

令和元年6月3日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08623

研究課題名(和文) 炎症を伴う腸管上皮修復過程におけるWnt5aシグナルの機能解明

研究課題名(英文) The role of Wnt5a signal in epithelial regeneration in colitis.

研究代表者

佐藤 朗 (SATO, AKIRA)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70464302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、薬剤誘導性Wnt5aコンディショナルノックアウトマウスを用いて実験を行い、炎症を伴う腸管上皮修復過程においてWnt5aを欠損させると回復度合いが減弱することから、Wnt5aシグナルがこの過程を促進することを明らかにした。さらに、発がん剤アゾキシメタン投与とその後のDSS投与によって誘発される大腸がん形成過程でも、Wnt5aシグナルは腫瘍形成を促進することが明らかになった。また、ヒトとマウスの腸管炎症病態では潰瘍部に集積した線維芽細胞でWnt5aが高発現するが、そのWnt5aの発現制御にはTGF-シグナルが関与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、腸管炎症病態におけるWnt5aの発現制御機構の一端が個体レベルで明らかになり、さらに高発現したWnt5aが炎症病態からの上皮修復過程を増強するばかりでなく、炎症を背景とした大腸がん形成を促進することが明らかになった。そのため、本研究は、Wnt5aシグナルが炎症応答やがんの浸潤・転移ばかりでなく、上皮細胞(がん細胞)の増殖にも関与することが示されたため、学術的に意義が深く、がんを標的とした医療の推進にも貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we observed that the depletion of Wnt5a suppresses epithelial regeneration process in colitis, suggesting that Wnt5a signal enhances epithelial regeneration in colitis. In addition, we also revealed that Wnt5a signal enhances the inflammation-associated tumor formation in vivo using the AOM/DSS-induced colorectal cancer model. Further we revealed that the expression of Wnt5a in intestinal fibroblasts in colitis is regulated by TGF-beta signaling pathway.

研究分野：分子生物学、生化学、腫瘍学

キーワード：Wnt5a 腸管炎症 上皮修復 大腸がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Wnt は線虫からヒトまで種間を越えて高度に保存された細胞外分泌因子であり、ヒト・マウスにおいては 19 種類存在する。Wnt によって活性化される細胞内シグナル伝達経路は、 β -カテニンを介して遺伝子発現を制御する β -カテニン経路と β -カテニンを介さない β -カテニン非依存性経路に大別される (Kikuchi, A., et al., *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 2011)。 β -カテニン経路は主として細胞の増殖や分化を制御し、成体では毛包や皮膚、腸管上皮等の幹細胞 niche の確立と維持に必須であり、そのシグナル伝達の異常と発癌との関連が明らかになっていた。一方、 β -カテニン非依存性経路は、Rho, Rac 等の small GTPase や Protein kinase C (PKC), Jun-N-terminal kinase (JNK) 等を活性化することで、細胞骨格や細胞極性、細胞運動を制御する。Wnt5a は β -カテニン非依存性経路を活性化する代表的な Wnt であり、胃癌、前立腺癌や肝癌において、その高発現とそのシグナルの異常が細胞浸潤・転移を促進することで癌の悪性化に関与することが示唆されていた。(Wang Y., *Mol. Cancer Ther.*, 2009; Kikuchi, A., *Cancer Sci.*, 2008; Gujral T., *Cell*, 2014) また、私共を含めた幾つかの報告から、肺癌、子宮頸癌、食道癌由来の癌細胞株が Wnt5a シグナル依存的 Src family の活性化によって細胞増殖が活性化することが判明した。研究開始当初、この Wnt5a シグナルが種々の炎症応答に関与するという報告が幾つかされていた (Bhatt PM, *Atherosclerosis*, 2014) 。しかし、実験動物を用いた個体レベルでの炎症病態での Wnt5a の役割は依然として未知のままだった。

私共は、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性腸管炎症マウスモデルを用いて、腸管炎症病態の進行に伴い Wnt5a の発現が大腸潰瘍部線維芽細胞で上昇すること、また同様の Wnt5a の発現がヒトの潰瘍性大腸炎や Crohn's 病患者由来の潰瘍部線維芽細胞においても上昇することを見出した。そこで私共は、種々の Wnt5a コンディショナルノックアウト (cKO) マウスと Wnt5a 受容体 Ror2 cKO マウスを DSS 誘導性腸管炎症モデルに導入し、腸管炎症病態における Wnt5a シグナルの機能解析を行い、Wnt5a シグナルが腸管炎症病態を促進することを見出した (Sato A., *Sci. Rep.*, 5:10536, 2016) 。その作用機構は、Wnt5a が樹状細胞に発現する受容体 Ror2 を介して樹状細胞での STAT1 の活性化を増強して IL-12 の分泌を促進すること、その結果、IL-12 依存性 Th1 細胞分化が増強されることで腸管炎症病態の増悪に関与するというものである。このように Wnt5a シグナルは、癌の転移や増殖に加えて炎症応答制御にも関与することが個体レベルで明らかになりつつある。しかし、炎症病態の進行に伴い潰瘍部線維芽細胞で高発現する Wnt5a の機能と発現制御機構に関しては不明である。また、腸管炎症病態の進行には Wnt5a シグナルは病態の増悪に関与するが、一方で腸管上皮の修復過程には適切に制御された炎症反応が重要な役割を担うことが明らかになっている (Forbes SJ, *Nat. Med.*, 2014) 。しかし、炎症を伴った上皮修復過程における Wnt5a シグナルの関与は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、上記の背景をふまえて、炎症病態からの回復モデルとして、炎症を伴った腸管上皮修復過程における Wnt5a シグナルの意義と発現制御機構を明らかにすることを目的として、主として下記の研究項目に焦点をあてた。

(1) 腸管線維芽細胞での時期特異的遺伝子欠損を行う CreER 発現マウスの作製

腸管において、Wnt5a やその受容体 Ror2 は線維芽細胞で最も高く発現している。そこで、既に入手している上皮特異的 (Villin-Cre) 血球系特異的 (Mx-Cre) Cre 発現マウスに加えて、線維芽細胞特異的 CreER 発現マウスを作製すれば、腸管に存在する主要な細胞種に対する特異的な遺伝子欠損が可能となる。

(2) 炎症を伴う上皮修復過程における Wnt5a シグナルの作用機構の解明

(1)で作製した線維芽細胞特異的 Wnt5a の cKO を行い、腸管炎症病態からの上皮修復過程における Wnt5a 産生の主たる細胞種を特定し、Wnt5a シグナルの意義を明らかにする。一般的に腸管上皮修復には血球系細胞から分泌されるサイトカインの他に、線維芽細胞から分泌される増殖因子や結合組織も必要である。Wnt5a 受容体 Ror2 の発現は Wnt5a と同様に線維芽細胞でも高いことが見出されている。そこで、上皮細胞、血球系細胞、線維芽細胞特異的 Ror2 cKO マウスを用いて上皮修復を制御する Wnt5a シグナルの受容細胞種を明らかにし、その作用機序を解明する。

(3) 腸管炎症病態における Wnt5a の発現制御機構の解明

腸管炎症病態では潰瘍部間質領域の線維芽細胞において Wnt5a の発現が高くなり、上皮が修復するにつれてその発現は減弱するため、この上皮修復過程における Wnt5a の発現制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞特異的 CreER 発現マウスの作製と解析

定常状態での腸管における Wnt5a の発現は、他の細胞群と比較して線維芽細胞で非常に高く、腸管炎症病態では潰瘍部間質領域に集積した線維芽細胞でその発現はさらに上昇する。また受容体 Ror2 の発現も線維芽細胞で最も高い。そのため、単純 KO では胎生致死となる Wnt5a や Ror2 遺伝子を、時期特異的に成体の線維芽細胞で欠失させる CreER 発現マウスの作製は必須である。そこで、線維芽細胞で高発現する遺伝子 (Twist2 や Vimentin など) に着目し、ゲノム編集技術を用いて CreER をノックイン (KI) したマウスを作製する。

(2) DSS 誘導性腸炎からの上皮修復過程における Wnt5a シグナルの機能解析

全身性時期特異的 Wnt5a cKO (CAG-CreER; Wnt5a^{fl/fl}) マウスはコントロールマウスと比較して腸管炎症病態の軽減が観察されるため、体重減少、出血度合い、便の性状といった病態観察を指標に、DSS 投与の期間を調整して Wnt5a cKO マウスにコントロールマウスと同程度に腸管炎症を惹起させた後 DSS 投与を終了し、その後の回復過程を観察・検討する。また、病態観察だけではなく実際の遺伝子発現レベルにおいてもコントロールマウスと同程度の腸管炎症病態からの回復過程を観察しているのか否かを判別するため、DSS 投与終了後の大腸から RNA を抽出し、種々の炎症性サイトカインや増殖因子の発現の解析を行う。さらに、回復過程において経時的に大腸組織を採取して、RT-PCR による遺伝子発現解析と大腸標本の組織学的な観察を行うことで、Wnt5a cKO マウスにおける DSS 誘導性腸炎からの回復の表現型を明らかにする。で述べた線維芽細胞特異的 CreER KI マウスを用いて同様に解析を行い、線維芽細胞分泌因子としての Wnt5a の欠失が全身性時期特異的 Wnt5a cKO マウスと同様の表現型を示すか否かを検討する。

(3) DSS 誘導性腸管炎症潰瘍部線維芽細胞における Wnt5a の発現制御機構の解析

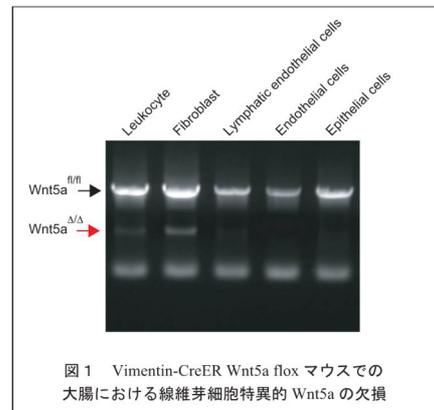
私共は、腸管から単離した線維芽細胞の初代培養系に対して、EGF、FGF、Wnt 等の増殖因子や炎症応答に關与する NF- κ B、TLR シグナルを活性化させる種々の ligand で処理を行うことによって、Wnt5a の発現に影響するか否かの検討を既に行い、少なくとも TGF- β 1 が Wnt5a の発現を亢進させることを見出している。DSS 投与によって大腸では TGF- β 1 の発現が亢進することも見出しているため、DSS 誘導性腸管炎症モデルに TGF- β 1 シグナルの阻害剤を導入することで、

個体レベルの線維芽細胞においても、Wnt5a の発現が TGF- β 1 シグナルに依存しているのか検討を行う。

4. 研究成果

(1) 線維芽細胞特異的 CreER 発現マウスの作製と解析

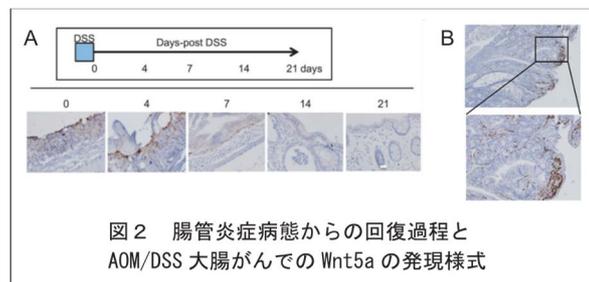
Wnt5a は腸管炎症病態において、線維芽細胞に高発現する。そこで線維芽細胞特異的転写因子 Twist2 遺伝子座に CreER をノックインした Twist2-CreER KI マウスの作製を行い、線維芽細胞特異的 Wnt5a cKO マウスの作製を試みた。ゲノム PCR によって、目的通り CreER がノックインされていることを確認した 3 系統のマウスにおいて、ROSA-YFP マウスとの掛け合わせを行い、タモキシフェン依存的 YFP の発現を検討した。しかし、残念なことに得られた 3 系統全てにおいて、CreER と共に YFP の明らかな発現を確認出来なかった。そこで、次に線維芽細胞に高発現している中間径フィラメント



Vimentin に着目し、Vimentin 遺伝子座に CreER を挿入した Vimentin-CreER KI マウスの作製を Crispr/Cas9 システムによるゲノム編集技術を用いて試みた。まず、Vimentin の 1st ATG に CreER を挿入した Targetting vector と Vimentin 1st ATG を含む Exon1 領域でデザインを行なった guide RNA (gRNA) の発現ベクター (pX459 ver2-Vimentin gRNA) を構築した。SSA assay により、Vimentin gRNA が確かに標的 Exon1 を効率よく切断することを確認後、これらの vector を ES 細胞に導入して薬剤選択により 96 個の ES クローンが得られた。Genotyping の結果、目的通りに CreER が挿入された ES 細胞クローンが 28 個得られた。この 28 個の ES クローンを用いて、定常状態での CreER の発現を定量的 RT-PCR によって確認したところ、6 クローンを選別できた。この 6 クローンの核型の正常率は全て 60% を超えていたため、これらのクローンを用いてキメラマウスの作製を行なった。作製されたキメラマウスのうち、生殖系組織に目的の ES クローン由来の細胞が伝達された系統を用いて、Vimentin-CreER マウスが得られた。そこで、Wnt5a flox マウスを掛け合わせて、Vimentin-CreER; Wnt5a^{fl/fl} マウスを作製した。タモキシフェン導入後の腸管から FACS によって単離した各細胞腫での Wnt5a 遺伝子の欠損を確認したところ、線維芽細胞で特異的に Wnt5a が欠失していることが確認できた (図 1)。今後は、この Vimentin-CreER; Wnt5a^{fl/fl} マウスを DSS 誘導性腸管炎症モデルに導入し、線維芽細胞由来の Wnt5a が炎症病態の増悪に関与するのかを検討する予定である。

(2) DSS 誘導性腸炎からの上皮修復過程における Wnt5a シグナルの機能解析

抗 Wnt5a 抗体を用いた組織免疫染色によって、腸管上皮修復過程における Wnt5a の発現様式の解析を行った。その結果、腸管炎症時の潰瘍部線維芽細胞での Wnt5a の発現は、上皮の修復過程が進むに連れて減弱し、潰瘍が一層の上皮組織に完全に覆われると、その発現は検出されなくなることが明らかになった (図 2 A)。



そこで、DSS 誘導性腸管炎症モデルに CAG-CreER; Wnt5a^{fl/fl} マウスを導入することで、炎症病態からの上皮修復過程での Wnt5a シグナルの役割を検討した。その結果、Wnt5a を欠損させると上皮修復が遅延することが明らかになっ

た。

発癌物質 AOM 投与と DSS 投与を組み合わせた炎症を背景とした大腸がんモデル (AOM/DSS 大腸がんモデル) がある。この AOM/DSS 大腸がんモデルにおいて、形成された腫瘍での Wnt5a の発現を検討したところ、腫瘍辺縁部の線維芽細胞に Wnt5a の高発現が観察された (図 2 B)。そこで、このモデルに CAG-CreER; Wnt5a^{fl/fl} マウスを導入し、Wnt5a シグナルの腫瘍形成過程における役割を検討した。炎症病態の程度はコントロールマウスと同程度にするために、DSS 投与後の炎症病態が回復した後にタモキシフェンを投与して Wnt5a を欠損させた。その結果、Wnt5a の欠損によって、腫瘍形成自体が抑制されることが明らかになった (図 3)。

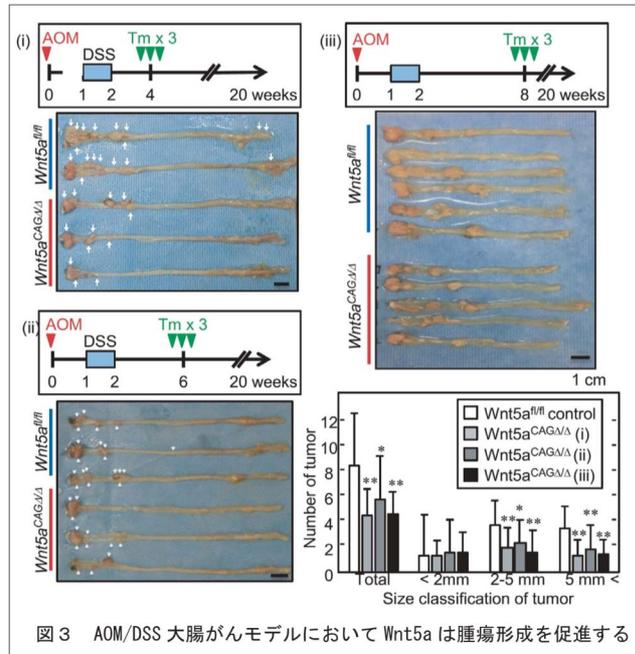


図3 AOM/DSS 大腸がんモデルにおいて Wnt5a は腫瘍形成を促進する

(3) DSS 誘導性腸管炎症潰瘍部線維芽細胞における Wnt5a の発現制御機構の解析

私共は、これまでに腸管線維芽細胞の初代培養系において Wnt5a の発現に関わるシグナル分子として TGFβ を見出している。そこで、DSS 投与群の野生型マウスに対して、TGFβ 受容体特異的阻害剤 SB525334 の経時的投与を行い、DSS 投与 9 日目の大腸における Wnt5a の発現を観察した。その結果、SB525334 投与群では Wnt5a の発現の顕著な減弱が観察されたため、個体レベルにおいても TGFβ シグナルが、Wnt5a の発現制御に関与することを明らかにした (図 4)。

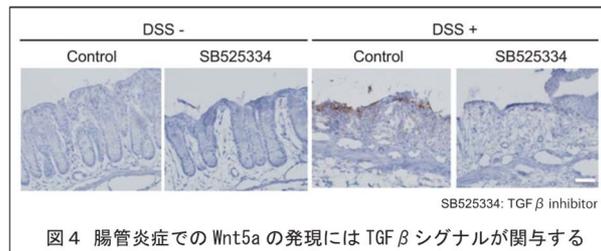


図4 腸管炎症での Wnt5a の発現には TGFβ シグナルが関与する

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Ahmat Amin MKB, Shimizu A, Zankov DP, Sato A, Kurita S, Ito M, Maeda T, Yoshida T, Sakaue T, Higashiyama S, Kawauchi A, Ogita H.

Epithelial membrane protein 1 promotes tumor metastasis by enhancing cell migration via copine-III and Rac1.

Oncogene. 2018; 37: 5416-5434. DOI: 10.1038/s41388-018-0286-0.

佐藤朗、扇田久和

Lp-PLA2 の新規アポトーシス制御機構 -動脈硬化との関連-

臨床化学 2018; 47: 140-147

Yamamoto H, Sato A, Kikuchi A.

Apical secretion of Wnt1 in polarized epithelial cells is regulated by exocyst-mediated trafficking.
J. Biochem., 2017; 162: 317-326. DOI: 10.1093/jb/mvx035.

Zankov DP, Sato A, Shimizu A, Ogita H.

Differential effects of myocardial afadin on pressure overload-induced compensated cardiac hypertrophy.

Circ J. 2017; 81: 1862-1870. DOI: 10.1253/circj.CJ-17-0394.

Sato A, Ogita, H.

Pathophysiological implications of dipeptidyl peptidases.

Curr Protein Pept Sci. 2017; 18: 843-849. DOI: 10.2174/1389203718666170329104936.

〔学会発表〕(計 1件)

佐藤朗、前原奈都美、扇田久和、菊池章

Wnt5a シグナルは炎症を背景とした大腸がん形成に促進的に作用する

第 39 回 日本分子生物学会年会、2016 年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者：該当なし

(2)研究協力者：該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。