

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21229010

研究課題名(和文) Wntシグナルによる心筋分化・心臓疾患発症機序の解明とそれに基づく治療法の開発

研究課題名(英文) Role of Wnt signaling in cardiomyocyte differentiation and its implication for the treatment of heart diseases

研究代表者

小室 一成 (Komuro, Issei)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30260483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 166,100,000円、(間接経費) 49,830,000円

研究成果の概要(和文)：我が国においても循環器疾患患者が急増しており、その病態生理の解明と新規治療法の開発が待望されている。Wntシグナルは、個体発生、幹細胞機能維持、発癌などに関与することが知られるシグナル伝達経路である。本研究において我々は、心臓発生を正に制御するタンパクであるIGFBP4がWntシグナルを抑制するメカニズムを明らかにした。また、Wntシグナルを時期特異的に制御することで再生医療や創薬に利用可能な心筋細胞をヒトiPS細胞やマウス間葉系幹細胞から効率良く分化誘導することに成功した。さらに老化および心不全発症に伴って血中で増加しWntシグナル活性化を介して病態形成に関与する分子としてC1qを同定した。

研究成果の概要(英文)：Patients with heart diseases are increasing in number, and elucidation of the pathophysiology and development of novel therapeutic strategies for heart diseases are mandatory. Wnt signaling pathway plays multiple roles in development and diseases, and recent studies have also implicated Wnt signaling both in heart development during embryogenesis and heart diseases in the adult. In the present study, we have clarified the molecular mechanism how IGFBP4 inhibits Wnt signaling and promotes heart development. We have also identified that activation of Wnt signaling followed by inhibition of Wnt signaling by using small molecules can efficiently induce cardiac differentiation of human iPS cells and mouse mesenchymal stem cells. Finally, we have identified that complement protein C1q is increased in the serum of heart failure model mice and may play detrimental role in the progression of heart failure.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：循環器・高血圧 発生・分化 Wntシグナル iPS細胞 間葉系幹細胞 心不全

1. 研究開始当初の背景

1. 心筋分化機構研究の意義と重要性

欧米型のライフスタイルが一般的になり虚血性心疾患が増加するにつれ心臓病は増加傾向にある。特に心機能が著明に低下した重症心不全患者の予後はきわめて不良であり、現時点では心臓移植が唯一の根治療法となっている。ドナー不足のために心臓移植の恩恵を受けられる患者数がきわめて少ない現状から、心臓移植にかわる治療法として心筋再生治療、とりわけ ES 細胞や iPS 細胞などの多分化能をもつ細胞から機能的な心筋細胞を作成し心臓に移植する細胞移植療法が非常に注目されている。しかしながら、これらの再生治療の実用化にあたっては ES 細胞 / iPS 細胞などから心筋細胞を選択的かつ大量に分化誘導する技術の開発が必須であり、そのためには心筋細胞分化の分子機構を明らかにすることが必要になる。すなわち、心臓発生・心筋細胞分化の分子機構を明らかにすることが、心筋再生治療法を確立するうえできわめて重要と考えられる。

2. 心筋細胞分化における Wnt シグナルの重要性

胎児発生過程における各臓器の発生分化は、胚葉間あるいは臓器・組織間の相互作用によって制御されており、心臓発生に関しては、発生初期に未分化中胚葉から心臓中胚葉が決定される段階において、隣接する内胚葉・外胚葉から分泌される Wnt / Wnt inhibitor などの液性因子によるシグナルが重要であることが明らかにされている。ES 細胞を用いた我々の検討でも、分化誘導初期では Wnt シグナルは心筋分化を促進し、分化誘導後期では逆に心筋分化を抑制すること、また、分化誘導初期に Wnt シグナルを活性化して分化誘導後期では Wnt シグナルを抑制すると、非常に高い効率で ES 細胞から心筋細胞を分化誘導できることが明らかになった。以上の結果は Wnt シグナルの心筋分化に対する作用が発生時期によって異なっており、発生時期に応じてシグナルを調節することが心筋分化に重要であることを示すものである。

さらに新たな心筋分化誘導因子を探索する試みから、insulin-like growth factor (IGF) に結合する蛋白として知られていた IGFBP-4 が Wnt シグナルを抑制することにより心筋分化を促進することが明らかになった。ツメガエル胚で IGFBP-4 の作用を阻害すると一旦形成された心臓が消失してしまうことから、IGFBP-4 による Wnt シグナルの阻害が、発生後期の心臓形成にきわめて重要であるものと考えられる。

3. 心筋障害における Wnt シグナルの重要性

心筋梗塞は、心筋を還流する冠状動脈の閉塞により閉塞部位より末梢の心筋組織が壊死に陥る疾患であり、心不全の原因疾患のなかで最も頻度が高く、近年さらに増加傾向に

ある。最近 Wnt inhibitor のひとつである secreted frizzled related protein 2 (SFRP2) を分泌する細胞を虚血部位に移植することにより、梗塞範囲が著明に減少することが報告された。この結果は Wnt シグナルが心筋障害を増悪させていることを示唆するものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では以下の3点について検討することにより、Wnt シグナルによる心臓発生制御の分子機構を解明するとともに Wnt シグナルを標的とした新たな循環器疾患治療法の開発を目指す。

(1) IGFBP-4 による Wnt シグナル抑制と心筋分化誘導の分子機構を明らかにする。

(2) Wnt, Wnt inhibitor を用いた未分化幹細胞からの高効率心筋分化誘導法を確立する。

(3) Wnt, Wnt inhibitor を利用した心筋再生治療法を開発する。

我々を含む複数のグループにより、心臓の発生段階の各ステップにおいて Wnt シグナルが極めて重要な役割を果たしていることが明らかにされ、さらに最近では Wnt シグナルが成人期の心不全発症に促進的に働く可能性が示唆されている。Wnt シグナルによる心臓発生・心筋細胞分化の分子機構や心臓疾患発症における役割の解明は、心臓の再生を含めた新しい治療法の開発につながると考えられる。また得られた研究成果は、循環器領域のみならず、Wnt シグナルが関与する他の様々な分野においても応用されることが期待される。

3. 研究の方法

(1) IGFBP-4 による Wnt シグナル抑制と心筋分化誘導の分子機構を明らかにする

(1)-1: IGFBP-4 による Wnt シグナル抑制の分子機構を明らかにする

我々のこれまでの検討により IGFBP-4 が Wnt シグナルを抑制することは明らかになったが、IGFBP-4 による Wnt シグナル抑制の分子機構については十分明らかにされていない。

Wnt シグナルは Fz と LRP5/6 の2つの受容体によって伝達されるが、Wnt による2つの受容体の活性化機構については、未だ不明な点が残されている。そこで Fz と LRP5/6 の会合様式について様々な変異体をもちいて、生化学的解析をするとともに、FRET/BRET のシステムを用いて real-time で解析することにより、未解明の Wnt シグナルの活性化および抑制のメカニズムを明らかにする。

(1)-2: Wnt シグナル抑制による心筋分化誘導の分子機構を明らかにする

発生後期に Wnt シグナルを抑制することにより心筋分化が促進されることはすでに明らかになったが、そのメカニズムについては不明である。そこでゼブラフィッシュ

胚、ES細胞を用いて、Wntシグナル抑制による心筋分化誘導の分子機構を明らかにすることを試みる。

(2) Wnt、Wnt inhibitorを用いた未分化幹細胞からの高効率心筋分化誘導法を確立する

これまで我々はWntシグナルを時期特異的に調節することにより、心筋分化誘導効率が上昇することを明らかにした。そこで、ES細胞およびすでに極く一部が心筋細胞に分化することが知られている脂肪由来の間葉系幹細胞を用いて、複数の液性因子の組み合わせによる高効率心筋分化誘導法の確立を目指す。

(3) Wntシグナルの心臓疾患発症における役割を解明する

虚血性心疾患などによって生じる心筋傷害にWntシグナルが関与している可能性が考えられており、Wntシグナル抑制が心疾患の治療標的となる可能性がある。そこでまず基礎的な検討として、マウスの心筋傷害モデルを用いて以下の解析を行う。

(3)-1: 傷害心筋で発現するWnt、Wnt-like ligandを明らかにする

傷害心筋において発現量が増加するWnt、Wnt-like ligand、逆に低下するWnt inhibitorがあるかについて、qRT-PCRなどを用いて検討する。また傷害心筋で発現している未知のWnt-like ligandを明らかにするために、Wnt-like ligandが結合すると考えられる可溶性Frz8受容体細胞外ドメイン(Frz8-CRD)に結合する分子の単離同定を試みる。

発現量の変化するWnt、Wnt-like ligandの病態における意義を明らかにするために、その阻害分子を投与することにより、心臓疾患が軽減するか否か、検討する。

4. 研究成果

(1) IGFBP-4によるWntシグナル抑制と心筋分化誘導の分子機構

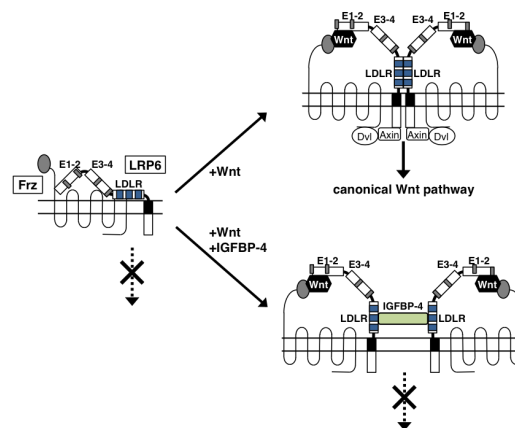
(1)-1: BRET法によるWnt受容体FrzとWnt共受容体LRP6の会合様式の解明

FrzとLRP6の会合様式を解明するため、FrzおよびLRP6の細胞内ドメインにそれぞれGFP、ルシフェラーゼを融合させたコンストラクトを作製した。これらコンストラクトを細胞に強制発現させたところBRET比の著しい上昇が認められ、野生型Frzを共強制発現させることでその上昇が抑制されたこと、さらにWntとの結合部位を欠くFrzとGFPの融合コンストラクトを用いてもBRET比の上昇が認められたことから、FrzとLRP6はWntタンパクの非存在下でも複合体を形成していることが明らかになった(図1)。

(1)-2: IGFBP-4のLRP6への結合と多量体形成阻害を介したWntシグナル抑制機構

同様に細胞内ドメインにGFP、ルシフェラーゼを融合させたLRP6コンストラクトをそれぞれ同時に強制発現させた後にWntタ

ンパクによる刺激を加えることでBRET比の上昇が認められたことから、Wnt刺激によりLRP6同士が会合し多量体を形成することが明らかとなった。また、IGFBP-4がLRP6と結合すること、IGFBP-4存在下でWnt刺激を行なうとLRP6の多量体形成が阻害されることから、IGFBP-4はLRP6に結合し、その多量体形成を阻害することでWntシグナルを抑制していることが明らかになった。

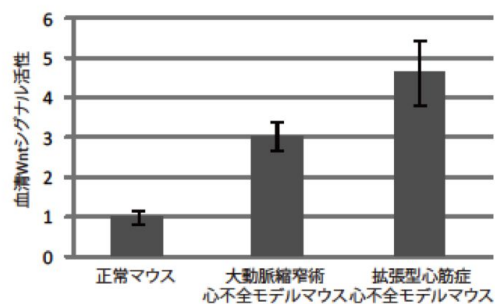


(図1) FrzとLRP6の会合様式
FrizzledタンパクとLRP6タンパクの会合様式についてBRET (bioluminescence resonance energy transfer) を用いて検討した。

(2) 心不全モデルマウスの心臓で発現が増加する新規Wntシグナル活性化物質の同定

(2)-1: C1qは心不全モデルマウス血中で増加する新規Wntシグナル活性化物質である。

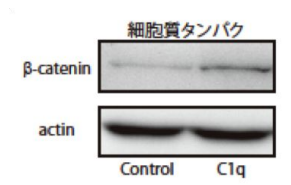
Wntシグナルを抑制することで心筋梗塞後の梗塞範囲が縮小することが報告されており、Wntシグナルが心筋梗塞後の細胞死もしくはリモデリングに影響を与えている可能性が考えられた。我々は高齢マウス、そして様々な心不全モデルマウスの血液に、通常のマウスと比べて高いWntシグナル活性化能が存在することを見出した(図2)。



(図2) 心不全モデルマウス血清のWntシグナル活性化能
大動脈縮窄術(TAC術)によって心不全を誘導するモデルマウスおよび遺伝子改変により心不全を呈するモデルマウスから血清を採取し、Wntシグナル活性化能を評価した。

血清によるWntシグナル活性化がWnt受容体Frzと結合することが報告されていることから、Frz-Fc融合タンパクを用いてFrz結合タンパクを沈降した後、SDS-PAGE

で展開し、質量分析法を用いて心不全モデルマウス血中で増加する Frz 結合タンパクとして古典的補体経路の第 1 因子である C1q を同定した。細胞質 β -catenin 量、Wnt シグナルを評価するルシフェラーゼアッセイ、Wnt シグナル標的遺伝子である Axin2 の発現といった従来の Wnt シグナル活性評価法を用いた結果、C1q は単独で Wnt シグナルを活性化することが明らかになった (図 3)。



(図3) C1qによるWntシグナル活性化
C1qを細胞に作用させることで細胞質の β -cateninが安定化し、Wntシグナルが活性化する。

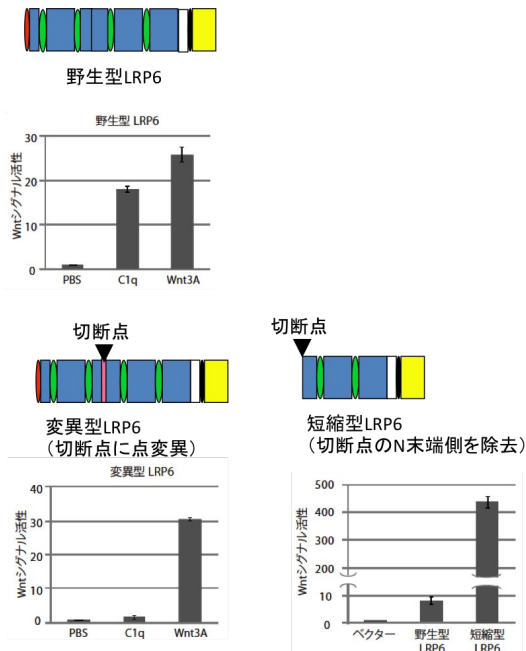
(2)-2: C1q による Wnt シグナル活性化機構
血清が有する Wnt シグナル活性化能は C1q 除去血清では消失している一方、古典的補体経路でより下流に位置する C3 や C5 除去血清では保たれていた。また、C1q 欠損マウスでは野生型マウスや C3 欠損マウスと比べ全身で Axin2 の発現が低いことから、C1q が古典的補体経路を介さずに Wnt シグナルを活性化することが示唆された。一方で C1q と複合体を形成する蛋白分解酵素 C1s に対する中和抗体により C1q 誘導性 Wnt シグナル活性化が消失したことから、C1s によるタンパク分解が Wnt シグナル活性化に重要であることが示唆された。

そこで Wnt の共受容体である LRP6 の細胞外ドメインと C1s とを反応させたところ C1s が LRP6 を 792R/793A の間で切断することを見出した。C1q による Wnt シグナル活性化は切断部位に変異を入れた LRP6 の強制発現によって失われること、792R より N 末端側のアミノ酸を欠く LRP6 を強制発現させることで Wnt シグナルが強く活性化されることから、C1q は C1s を介した LRP6 の切断を介して Wnt シグナルを活性化することが明らかになった (図 4)。

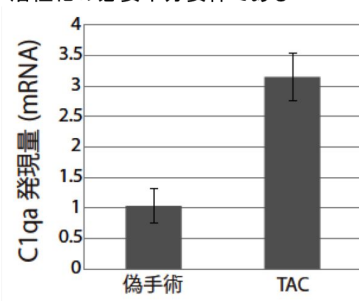
(2)-3: C1q は不全心で増加し Wnt シグナル活性化を通じ心臓線維化を引き起こす。

心不全モデルマウスにおいても血中 C1q 濃度は正常マウスと比べて約 3 倍に増加している。心不全モデルマウスの各種臓器を調べたところ、心臓で C1q, C1r, C1s の発現がいずれも 3 倍以上に増加しており、心不全モデルマウスの心臓における C1q の発現が血中 C1q 濃度の増加を引き起こしていることが示唆された (図 5)。

心不全モデルマウスの心臓組織全体で Axin2 の発現に大きな変化は認められなかったが、Tcf7 や Wisp (Wnt-inducible secretory protein) といった Wnt 標的遺伝子の発現が著明に増加していたこと、Wnt



(図4) C1sによるLRP6の切断はC1qによるWntシグナル活性化の必要十分要件である



(図5) 心不全モデルマウス心臓におけるC1qaの発現
大動脈縮窄術(TAC術)によって心不全を誘導するモデルマウスを作成し、心臓におけるC1qaの発現を解析した。

遺伝子に大きな発現の変化が認められないことから、不全心においても C1q が Wnt シグナルを活性化している可能性が示された。さらに GSK3 阻害剤 (GSK3 が阻害されると β -catenin の分解が抑制され、Wnt シグナル活性化が模倣される) を全身投与することで心臓に強い線維化が認められたことから、不全心で C1q が増加、Wnt シグナルを活性化させ線維化を増強させることで心不全の進行を促している可能性が示唆された。

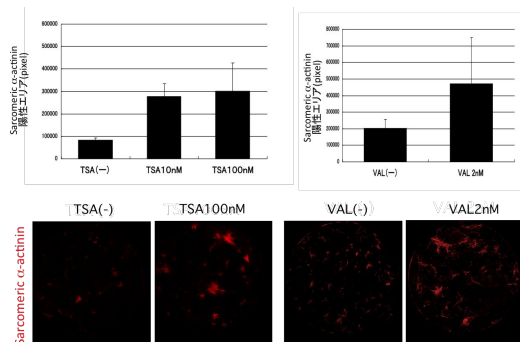
以上の結果は心不全の病態に Wnt シグナル活性化が関与しており、それが自然免疫で非常に重要な役割を果たす補体分子 C1q によって引き起こされるという独創性・新規性の高い発見である。この発見は、心不全と免疫・炎症の間に Wnt シグナルを介した新たな関連性が存在することを示唆するとともに、C1q や Wnt シグナルを標的とした心不全治療法の開発に発展する可能性など、様々な学術的インパクトを有していると考えられる。

(3) Wnt, Wnt inhibitor を用いた未分化幹細胞からの高効率心筋分化誘導法の確立

(3)-1: 脂肪間葉系幹細胞からの心筋細胞

分化誘導法の確立

脂肪間葉系幹細胞は体性幹細胞の中で、培養後比較的短時間に筋細胞に分化する幹細胞である。本培養系を用いて、脂肪組織幹細胞から筋細胞を選択的に分化誘導する条件の探索を行った。これまでの脂肪組織幹細胞に対する myogenic な因子のスクリーニングの結果から、トリコスタチン A およびバルプロ酸が最も筋細胞への分化を促進した (図 6)。



(図6) 脂肪間葉系幹細胞を用いた心筋分化誘導剤の探索
脂肪組織幹細胞を心筋細胞へと分化誘導する薬剤のスクリーニングを行ったところ、トリコスタチン A およびバルプロ酸が最も筋細胞への分化を促進した。

しかし、これらの試薬は、心筋細胞に加えて、骨格筋転写因子の遺伝子発現も増加させ、骨格筋への分化を促進した。我々は、同様のスクリーニングの結果から \square -secretase inhibitor は、骨格筋への分化を抑制するが、心筋細胞への分化には影響を与えない事を、アドレナリン作動薬およびコリン作動薬に対する反応や心筋細胞の遺伝子発現をもとに明らかにした。そこで、 \square -secretase inhibitor により骨格筋への分化を抑制した状態で、心筋細胞への分化を特異的に促進する因子のスクリーニングをした結果、leukemia inhibitory factor およびエンドセリンがそれぞれ筋収縮蛋白陽性の心筋細胞を増加させることが明らかになった。遺伝子発現解析の結果では、分化誘導の過程では、心筋細胞のイオンチャネルや転写因子の発現は維持されたままで MyoD や myogenin など骨格筋転写因子の発現が低下しており、心筋細胞への分化方向に選択性があると考えられた。

(3)-2: ヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化誘導法の確立

体細胞をリプログラミングして得られる人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は受精卵を破壊することなく作製することが可能な万能性幹細胞であり、再生医療の切り札として期待されている。循環器分野でも正常人から作製した iPS 細胞を心筋細胞へ効率的に分化させ大量に正常心筋を作製することで再生医療に用いようとする試みや、心疾患患者から作製した iPS 細胞を心筋細胞に分化させ、その表現型を解析することで心疾患の病態生理を解析しようとする試みがなされており、効率の良い心筋細胞

分化系を確立することは非常に意義深い。我々はフィーダー細胞上で培養しているヒト iPS 細胞をコロニー状に剥離した後、血清の存在下で浮遊培養を行なうことで心筋細胞を作製していたが、その分化効率は低く、血清のロットに依存するため再現性にも乏しかった。

浮遊培養中、もしくは平面培養を行っている iPS 細胞に Activin A、BMP、VEGF、FGF、Dkk-1 (内因性の Wnt 抑制タンパク)などのサイトカインを作用させることで血清を用いずに心筋細胞を分化誘導する方法が報告されたが (Nature 2008, Nat. Biotechnol 2007)、これらのサイトカインは高価であり、精製度や販売会社によってその生物活性が大きく異なることから、やはり最適な分化誘導法ということではできない。

そこで、ラージスケールへのスケールアップが可能な浮遊培養法を用いて、各種サイトカインを安価で安定的に大量生産可能な低分子化合物に置換することができないか検討したところ、我々が以前報告したように (PNAS 2006)、分化初期に Wnt シグナルを活性化する化合物、分化後期に Wnt シグナルを抑制する化合物を作用させることで再現性高く、高率に心筋細胞へと分化誘導することが可能になった。

以上の結果は Wnt シグナルが幹細胞の種類を問わず心筋細胞への分化に大きな影響を与えていることを示唆しており、今後ヒトから得られた幹細胞に対し Wnt シグナルを活性化する化合物、Wnt シグナルを抑制する化合物を利用した心筋細胞への分化系を確立することで、心筋再生医療や、遺伝性・特発性心疾患の病態解明へと発展していく可能性があり、大きな学術的インパクトを有すると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 369 件: 英文論文 226 件、和文論文 143 件、査読有 227 件)

- 1 Fukushima N, Matsuura K, Akazawa H, Honda A, Nagai T, Takahashi T, Seki A, Murasaki KM, Shimizu T, Okano T, Hagiwara N, Komuro I. A crucial role of activin A-mediated growth hormone suppression in mouse and human heart failure. *PLoS One* 6:e27901, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0027901 査読有
- 2 Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W,

- Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. **Cell** 149:1298-1313, 2012. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.047. 査読有
- 3 Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Nishida K, Akira S, Yamamoto A, Komuro I, Otsu K. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. **Nature** 485:251-255, 2012. doi: 10.1038/nature10992. 査読有
- 4 Naito AT, Okada S, Minamino T, Iwanaga K, Liu ML, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, Takashima A, Akazawa H, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. **Circ Res** 106:1692-1702, 2010. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.214346. 査読有
- 5 Matsuura K, Honda A, Nagai T, Fukushima N, Iwanaga K, Tokunaga M, Shimizu T, Okano T, Kasanuki H, Hagiwara N, Komuro I. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. **J Clin Invest** 119:2204-2217, 2009. doi: 10.1172/JCI37456. 査読有

他 3 6 4 件

〔学会発表〕(計 3 6 件)

- 1 Issei Komuro. Harmful Effects of

Excessive Insulin Signaling in a Setting of Pressure Overload. American Heart Association 2011 Nov 12-16, 2011. Orlando, USA.

- 2 Issei Komuro. A novel cardiomyocyte differentiation factor. XXth World Congress of the International Society for Heart Research 2010 Kyoto. May13-16, 2010. Kyoto, Japan.
- 3 Issei Komuro. Featured Lecture: Wnt Signaling and Age-Associated Diseases. Basic Cardiovascular Sciences 2010 Scientific Sessions. Jul 19-22, 2010. Rancho Mirage, USA.

他 3 3 件

〔図書〕(計 3 5 件)

- 1 Naito AT, Shiojima I, Komuro I. Novel therapeutic targets and strategies against myocardial diseases. In: Hill JA, Olson EN, eds. *Muscle: Fundamental biology and mechanisms of disease*. Elsevier Inc.; 2012:739-743.

他 3 4 件

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: インスリン様増殖因子結合タンパク質を含有する Wnt シグナル伝達阻害剤

発明者: 小室一成、塩島一朗、朱偉東

権利者: 国立大学法人千葉大学

種類: 特許

番号: JP2009/058045

出願年月日: 2009 年 4 月 23 日

国内外の別: 国際

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小室 一成 (KOMURO, Issei)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 3 0 2 6 0 4 8 3

(2)研究分担者

永井 敏雄 (NAGAI, Toshio)

千葉大学・大学院医学薬学府・准教授

研究者番号: 0 0 3 3 4 1 9 4