

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15025

研究課題名（和文）成体心筋細胞でのWNT/ カテニンシグナル活性化意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the significance of WNT/beta-Catenin signaling in adult zebrafish cardiomyocytes

研究代表者

千葉 彩乃 (Chiba, Ayano)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：10794159

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：心筋細胞でのWNT/ カテニンシグナルの活性化は心臓のルーピングや弁形成に必須であるが、成体での役割は明らかになっていない。ゼブラフィッシュ心筋細胞のWNT/ カテニンシグナルを可視化したところ、心房と心室の間に形成される房室管領域で成体まで持続的に活性化することを見出した。そこで、成体心筋細胞でのWNT/ カテニンシグナル活性化の意義の解明を目指した。心筋細胞でのWNT/ カテニンシグナルは、心拍依存性に房室管に発現するWNTによって制御されており、心臓に血液を供給する冠血管の形成に必要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓再生が可能であるゼブラフィッシュの冠血管形成メカニズムの解明は、発生学研究だけでなく、心臓再生研究でも重要な課題である。ゼブラフィッシュの冠血管は生後1ヶ月以降に房室管領域の心内膜内皮細胞から形成されるが、なぜ房室管から形成されるかは明らかになっていない。本研究によって、WNT/ カテニンシグナルを活性化心筋細胞による、新たな冠血管形成調節機構の存在が示唆された。房室管でのWNT/ カテニンシグナルの活性化は、冠血管が房室管から形成される理由の一つとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Although the canonical Wnt/beta-catenin signaling activation in cardiomyocytes (CMs) is required for cardiac development including heart tube looping and atrioventricular valve formation, the role of the Wnt/beta-catenin signaling in the adult heart is not known. We developed transgenic zebrafish lines that visualize beta-catenin dependent transcriptional activation in CMs. Wnt/beta-catenin signaling was activated in CMs at the atrioventricular canal region from embryo to adult fish. We focused on the significance of Wnt/beta-catenin signaling activation in adult CMs. We found that heartbeat-dependent Wnt expression activates Wnt/beta-catenin signaling in CMs at the AVC. We also identified that Wnt/beta-catenin signaling-activated CMs promote coronary vessel outgrowth.

研究分野：循環発生生物学

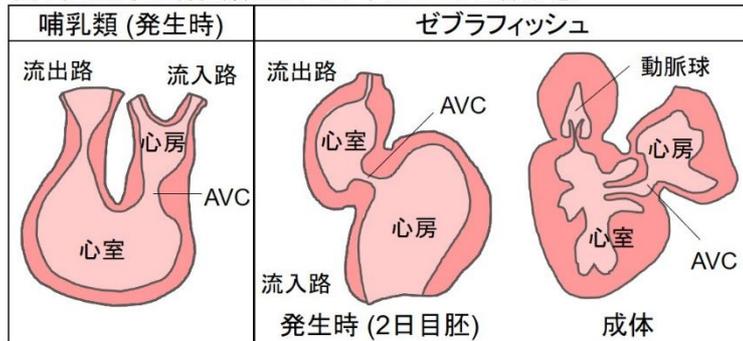
キーワード：WNT/ カテニンシグナル 心筋細胞 冠血管 ゼブラフィッシュ 房室管 心拍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞での WNT/ β カテニンシグナルの活性化は発生初期の心臓形成に必須であり、発生時の WNT/ β カテニンシグナル阻害は、心臓のルーピング異常と弁形成異常を引き起こすことが知られている。発生時の心臓での WNT/ β カテニンシグナルは、房室管領域 (Atrioventricular canal, AVC) に活性が観察される。AVC は原始心筒がルーピングする際に心房と心室の間に形成される領域であり、魚類から哺乳類まで保存されている (図1)。一方、成熟後の心臓では、WNT/ β カテニンシグナルは、ほとんど活性化していないと報告されていた。私たちは、細胞特異的に WNT/ β カテニンシグナルの活性を可視化するレポーターゼブラフィッシュ系統を樹立した。心筋細胞特異的なレポーターゼブラフィッシュの活性化部位を観察したところ、成体でも持続的に AVC 領域に活性が観察された。成体での WNT/ β カテニンシグナルの活性化は、病態時に活性化することは報告されていたが、生理的条件下の WNT/ β カテニンシグナルの機能はほとんど調べられていなかった。

図1 発生時の哺乳類とゼブラフィッシュの心臓形態



2. 研究の目的

上記の研究背景から、成体の心筋細胞で WNT/ β カテニンシグナルが活性化する意義を明らかにすることを目的に研究を行った。この目的を達成するために、WNT/ β カテニンシグナル活性化心筋細胞について、シグナルが活性化する時期と場所、心臓機能に対する役割、心臓機能を調節する際のメカニズムを順に検討した。

3. 研究の方法

以下の手順に従い研究を遂行した。

(1) 心筋細胞での WNT/ β カテニンシグナル活性化部位の特定

心筋細胞特異的に WNT/ β カテニンシグナル依存性の転写活性を検出するトランスジェニック (Tg) ゼブラフィッシュとして、*Tg(myf7:GAL4db-TCFΔC);(UAS:GFP)* を樹立した。心筋細胞特異的な *myosin, light chain 7, regulatory (myl7)* プロモーター制御下に酵母由来の転写因子 GAL4 の DNA 結合領域 (GAL4db) と転写因子 TCF の β カテニン結合領域 (TCFΔC) を融合したタンパク質を発現させる。この融合タンパク質 (GAL4db-TCFΔC) は核内に移行した β カテニンと結合し、*upstream activation sequence (UAS)* に結合して GFP を発現させる。この Tg フィッシュを利用することで、WNT/ β カテニンシグナルの活性化を GFP の蛍光によって検出することが可能となる。この Tg フィッシュの心臓を経時的に共焦点レーザー顕微鏡で観察し、WNT/ β カテニンシグナルの活性化部位を同定した。

(2) WNT/ β カテニンシグナル活性化心筋細胞の役割の解明

WNT/ β カテニンシグナル活性化心筋細胞特異的な細胞死を誘導するために *Tg(myf7:GAL4db-TCFΔC);(14xUAS:NTR-mCherry)* を利用した。この系統は WNT/ β カテニンシグナルが活性化した心筋細胞で、ニトロレダクターゼ (NTR) を発現する。NTR を発現した細胞はメトロニダゾール (MTZ) を投与すると細胞死が誘導される。細胞死誘導後の心拍、弁の形態、冠血管形成の変化を観察した。冠血管を観察するために、*Tg(myf7:GAL4db-TCFΔC);(14xUAS:NTR-mCherry)* と *Tg(fli1:GFP)* を交配し、*Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor (fli1)* プロモーター制御下で冠血管を含む血管内皮細胞に GFP を発現させた。冠血管が形成され始める 1 ヶ月齢から MTZ を投与開始して、2 週あるいは 4 週後の冠血管を観察した。また、心筋細胞特異的に WNT/ β カテニンシグナルを阻害するために、*Tg(myf7:GVEcR);(5xUAS:TCFΔN-GFP)* を樹立した。この系統は、心筋細胞特異的にテブフェノジド投与誘導性に核内移行する GAL4 (GVEcR) を発現する。そのため、薬剤誘導性に、心筋細胞で TCF のドミナントネガティブ体 (TCFΔN) を発現し、WNT/ β カテニンシグナルを抑制できる。

(3) WNT/ β カテニンシグナル下流で機能する因子の探索

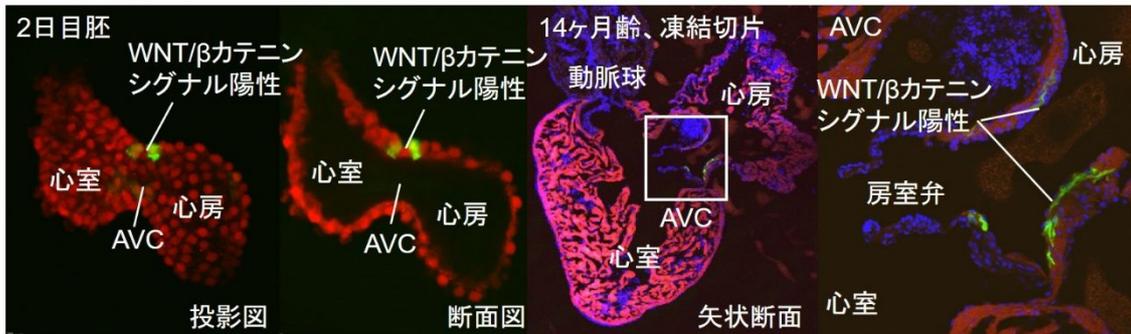
WNT/ β カテニンシグナル陽性心筋細胞と陰性心筋細胞を FACS ソーティングし、RNA-シーケンスで、遺伝子発現を網羅的に解析した。発現量が高く、変化量の大きい遺伝子の発現部位を *in situ* ハイブリダイゼーションで検討し、AVC に発現する遺伝子に着目した。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞での WNT/ β カテニンシグナル活性化部位の解明

心筋細胞での WNT/ β カテニンシグナル活性化部位を明らかにするために、*Tg(myf7:GAL4db-TCF Δ C);(UAS:GFP)*を経時的に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、生後2日目から成体に至るまで、AVC領域の房室弁よりも心房側の心筋細胞で、持続的に WNT/ β カテニンシグナルが活性化することを明らかにした(図2)。

図2 WNT/ β カテニンシグナルレポーター活性化部位



Tg(myf7:GAL4db-TCF Δ C-2A-mCherry);(UAS:GFP);(myf7:NLS-mCherry) 個体の2日目胚と14ヶ月齢の心臓。WNT/ β カテニンシグナルは2日目よりAVCに観察され、房室弁より心房側に観察された。

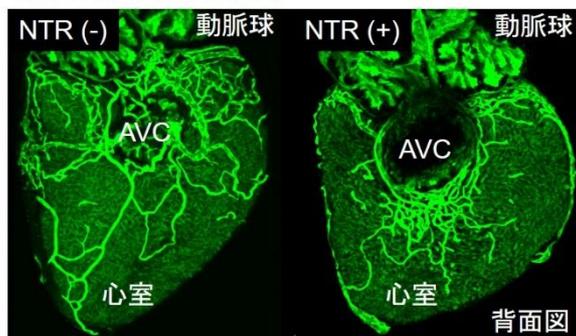
(2) 心筋細胞での WNT/ β カテニンシグナル活性化の上流因子の探索

AVCでの WNT/ β カテニンシグナル活性化の上流因子を探索するため、AVC領域特異的に発現する WNT リガンドを探索した。複数のリガンドの発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで観察した結果、*wnt2bb* と *wnt9b* が2日目胚および1ヶ月齢の心臓の AVC領域に発現することが明らかになった。AVCに発現する遺伝子の中には、心拍によって調節される遺伝子が多く報告されていたため、これらの WNT リガンドの発現が心拍に依存するかを検討した。*troponin T type 2a (tnnt2a)* をモルフォリノオリゴヌクレオチド (MO) でノックダウンして心拍を停止した個体の *in situ* ハイブリダイゼーションを行うと、*wnt2bb*・*9b* の AVC への発現は消失した。AVC の *wnt2bb*・*9b* の発現は、心拍に依存することが明らかになった。次に、*wnt2bb*・*9b* が心筋細胞での WNT/ β カテニンシグナル活性化に寄与するかを調べるために、*wnt2bb*・*9b* の発現を MO でノックダウンした。その結果、単独の MO では変化が見られなかったが、*wnt2bb*・*9b* を同時にノックダウンしたところ、レポーターの活性が低下した。さらに、ブタンジオンモノオキシム (BDM) 処理、あるいは *tnnt2a* MO によって心拍を停止しても、WNT/ β カテニンシグナルレポーターの活性は消失した。以上の結果より、心拍依存性に AVC 領域に発現する *wnt2bb*・*9b* が AVC 領域の WNT/ β カテニンシグナルの活性化に必要であることが示唆された。

(3) WNT/ β カテニンシグナル活性化心筋細胞の役割の解明

WNT/ β カテニンシグナルを活性化した心筋細胞の役割を明らかにするために、*Tg(myf7:GAL4db-TCF Δ C);(14xUAS:NTR-mCherry)*を用いて WNT/ β カテニンシグナル活性化心筋細胞特異的に NTR を発現させて、MTZ 投与誘導性に細胞死を誘導した。AVC 領域は心拍や弁の形成に重要な部位であるため、細胞死誘導後の心拍や電気伝導をライトシート顕微鏡で観察したり、弁の形態を切片で観察したりしたが、細胞死による影響は見いだせなかった。一方、ゼブラフィッシュの AVC は、冠血管が形成される部位としても報告されている。ゼブラフィッシュの冠血管は、生後1ヶ月以降に AVC 心内膜内皮細胞が、AVC 心筋細胞を通過し、心外膜側に出芽することで形成が開始され、成熟後も冠血管形成が持続すると報告されている。そこで、1ヶ月齢のゼブラフィッシュの WNT/ β カテニンシグナル活性化心筋細胞の細胞死を誘導したところ、冠血管形成が抑制された(図3)。WNT/ β カテニンシグナル活性化心筋細胞は、冠血管形成に必要であることが明らかになった。次に、WNT/ β カテニンシグナルの活性化が冠血管形成に必要であるか調べるために、WNT/ β カテニンシグナル阻害剤である、IWR-1 を1ヶ月齢の個体に処理したところ、冠血管の形成が阻害された。また、冠血管形成に心拍が影響するかを明らかにするために、低濃度の BDM 処理を行い、心拍を低下させたところ、冠血管形成が阻害された。これらの結果より、心拍誘導性の WNT/ β カテニンシグナルが、冠血管形成に寄与すると考えられた。さらに、心筋細胞で WNT/ β カテニンシグナルが活性化することが冠血管形成に必要であるかを明らかにするために、*Tg(myf7:GVEcR);(5xUAS:TCF Δ N-GFP)*を

図3 WNT/ β カテニンシグナルレポーター陽性心筋の細胞死誘導



Tg(myf7:GAL4db-TCF Δ C);(14xUAS:NTR-mCherry);(fli1:GFP) 個体にMTZを投与してTCFレポーター陽性心筋の細胞死を誘導した。NTR発現群では冠血管網の伸張が抑制された。

*Tg(myf7:GVEcR);(5xUAS:TCF Δ N-GFP)*を

用いた。心筋細胞特異的に TCF のドミナントネガティブ体を発現させ、WNT/ β カテニンシグナルを阻害した結果、冠血管形成が抑制された。以上の結果より、心筋細胞での WNT/ β カテニンシグナルの活性化がゼブラフィッシュの冠血管形成に必要であると考えられた。

(5) WNT/ β カテニンシグナル活性化心筋細胞による冠血管形成メカニズムの探索

WNT/ β カテニンシグナル活性化心筋細胞がどのようにして冠血管形成を調節するのかを明らかにするために、WNT/ β カテニンシグナル活性化心筋細胞に発現する遺伝子を RNA-シーケンスを用いて網羅的に解析した。房室管領域の WNT/ β カテニンシグナル活性化心筋細胞と、活性化していない心筋細胞での遺伝子発現を比較した。発現量に差のある遺伝子について、*in situ* ハイブリダイゼーションを行い、発現部位を検討した。続いて、AVC 領域に観察された遺伝子が冠血管形成を調節するか明らかにするために、心臓の組織培養を利用した。現在、冠血管を形成途中の 1 ヶ月齢の心臓を摘出して培養し、阻害剤や活性化剤の投与で冠血管形成が調節されるかを確認している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uribe Veronica, Ramadass Radhan, Dogra Deepika, Rasouli S. Javad, Gunawan Felix, Nakajima Hiroyuki, Chiba Ayano, Reischauer Sven, Mochizuki Naoki, Stainier Didier Y. R.	4. 巻 145
2. 論文標題 In vivo analysis of cardiomyocyte proliferation during trabeculation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.164194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ando Koji, Wang Weili, Peng Di, Chiba Ayano, Lagendijk Anne K., Barske Lindsey, Crump J. Gage, Stainier Didier Y. R., Lendahl Urban, Koltowska Katarzyna, Hogan Benjamin M., Fukuhara Shigetomo, Mochizuki Naoki, Betsholtz Christer	4. 巻 146
2. 論文標題 Peri-arterial specification of vascular mural cells from naïve mesenchyme requires Notch signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.165589	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ayano Chiba, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Wnt signaling-activated cardiomyocytes during cardiac development in zebrafish
3. 学会等名 Weinstein 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayano Chiba, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Myocardial canonical Wnt signaling during cardiac development in zebrafish
3. 学会等名 International Vascular Biology Meeting 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayano Chiba, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Endocardial and Myocardial canonical Wnt signaling in the developing zebrafish heart
3. 学会等名 The 16th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology (K-J meeting) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayano Chiba, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Myocardial canonical Wnt signaling in zebrafish heart development
3. 学会等名 The 2nd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉彩乃
2. 発表標題 Wnt/ β -cateninシグナル活性化心筋細胞がゼブラフィッシュ心臓発生に果たす役割
3. 学会等名 Wnt研究会2018-9/大阪大学蛋白研セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayano Chiba, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Myocardial canonical Wnt signaling in zebrafish coronary vessel development
3. 学会等名 The 3rd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayano Chiba, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Myocardial canonical Wnt signaling pathway regulates coronary vessel formation in zebrafish
3. 学会等名 Inaugural Joint Scientific Meeting of AVBS ANZMS AAVBM (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉彩乃、望月直樹
2. 発表標題 Wnt/ カテニンシグナル活性化心筋細胞はゼブラフィッシュの冠血管の伸展を促進する
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Max Herbert Cake, George Yeoh, Sonia Lobo, John Arnott, Gabor Halmos, Nikoletta Dobos, Eva Juhasz, Asuzsanna Szabo, Ayano Chiba, Naoki Mochizuki, Gerald Litwack 他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 738 (327-340)
3. 書名 Hormonal Signaling in Biology and Medicine	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考