

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590378

研究課題名(和文) Wnt5aシグナルによる腸管炎症の増悪機構の解明

研究課題名(英文) Involvement of the Wnt5a-Ror2 signaling in colitis

研究代表者

佐藤 朗 (SATO, AKIRA)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70464302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt5aシグナルと炎症病態との関連が示唆されているが、その作用機序は依然として不明である。そこで、薬剤誘発性腸管炎症モデルに、Wnt5aとその受容体Ror2の種々のコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを導入し、腸管炎症病態におけるWnt5aシグナルの機能を解析した。その結果、炎症時に繊維芽細胞から分泌されたWnt5aが樹状細胞に作用することでIFN- γ シグナルの応答性が増強し、樹状細胞のIL-12産生が促進することを見出した。IL-12はTh1細胞への分化を誘導することから、Wnt5a-Ror2シグナルがTh1応答を促進して腸管炎症病態の増悪化に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that post-natal abnormalities in Wnt5a signaling are involved in inflammatory diseases, however the mechanism is not well understood. I examined the role of Wnt5a signaling in intestinal immunity using conditional knockout mice for Wnt5a and its receptor Ror2. Removing Wnt5a or Ror2 suppressed dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. It also attenuated the DSS-dependent increase in inflammatory cytokine expression and suppressed IFN- γ -producing CD4+ Th1 cells in the colon. Wnt5a was expressed by stromal fibroblasts in ulcerative lesions in DSS-treated mice and inflammatory bowel disease patients. In vitro experiments demonstrated that the Wnt5a-Ror2 signaling axis augmented the dendritic cell (DC) priming effect of IFN- γ , leading to enhanced IL-12 expression. Taken together, these results suggest that the Wnt5a produced by stromal fibroblasts promotes IFN- γ signaling, leading to IL-12 expression in DCs, and thereby inducing Th1 polarization in colitis.

研究分野：分子生物学

キーワード：Wnt5a-Ror2シグナル 腸管炎症 樹状細胞 Th1細胞 IFN- γ -STAT1シグナル -カテニン非依存性経路 IL-12

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) (図1)。

β-カテニン経路では、Wnt が受容体 Fz と LRP5/6 に作用すると細胞質のβ-カテニンが安定化する。細胞質で蓄積したβ-

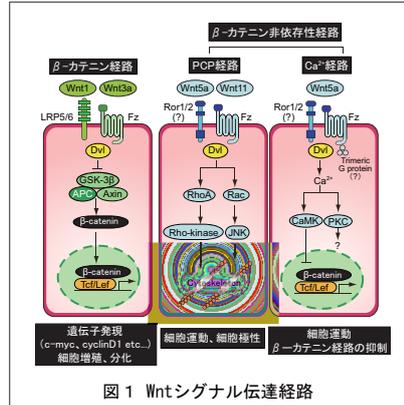


図1 Wntシグナル伝達経路

カテニンは核内に移行した後、転写因子 Tcf と複合体を形成し、遺伝子発現を介して細胞の増殖や分化を制御する。一方、β-カテニン非依存性経路の活性化は、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。また、私共を含めた幾つかの報告から、β-カテニン非依存性経路はβ-カテニン経路を抑制する作用を持つことが判明している (Sato, A., et al., 2010)。成体において、β-カテニン経路は毛包や皮膚、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る。一方、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、胃癌や前立腺癌において、その高発現とそのシグナルの異常活性化が癌の浸潤・転移を促進することで悪性化に関与することが示唆されている。(Wang Y., Mol. Cancer Ther., 2009; Kikuchi, A., Cancer Sci., 2008)。近年、この Wnt5a シグナルが炎症応答に関与するという報告が幾つかかなされている。その多くは、ヒトの炎症病態の病理組織標本における Wnt5a の発現上昇を示唆したものや、マクロファージ・単球の初代培養や培養細胞株に Wnt5a を作用させることで Wnt5a による炎症応答制御を解析した報告である。しかし、個体レベルにおいて Wnt5a シグナルと炎症応答との関連は明らかにされておらず、依然として Wnt5a が炎症応答制御に関与するのかわからないままであった。

2. 研究の目的

私共はデキストラン硫酸ナトリウム

(DSS) 投与によって誘発される腸管炎症において Wnt5a の発現が有意に上昇すること

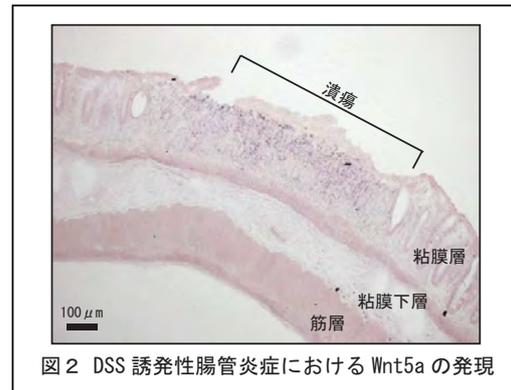


図2 DSS 誘発性腸管炎症における Wnt5a の発現

を in situ hybridization によって見出した (図2)。Wnt5a はβ-カテニン非依存性経路を活性化させる代表的な Wnt であり、主に細胞運動、細胞極性を制御すると考えられている。実際に Wnt5a 単純(-/-)KO マウスでは体軸、肢芽、腸管等の伸長抑制を伴い胎生致死となる。一方、Wnt5a ヘテロ(+/-)KO マウスは正常に発育する。そのため、私共は Wnt5a ヘテロ(+/-) KO マウスに、同様に DSS を投与し腸管炎症の進行を観察した。その結果、Wnt5a ヘテロ KO マウスでは、野生型マウスに比べて、

DSS 投与後の体重減少が緩和され、下痢や血便等の病態の活性指標

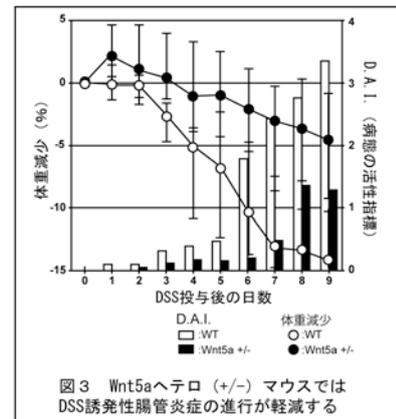


図3 Wnt5aヘテロ (+/-) マウスでは DSS誘発性腸管炎症の進行が軽減する

(D.A.I.) の減少を示した (図3)。以上の結果から、Wnt5a が腸管炎症病態を増悪させることが示唆された。本研究の目的は、Wnt5a の腸管炎症の増悪機構を個体レベル、組織・細胞レベル、分子レベルで明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 時期特異的・組織特異的 Wnt5a コンディショナルノックアウト (cKO) マウスの作製とその解析

Wnt5a 遺伝子の exon2 を loxP 配列で挟んだ Wnt5a flox マウスを既に作製しているので、これらマウスに組織特異的 Cre Tg マウスや薬剤誘導性時期特異的 Cre Tg マウスを掛け合わせることで、DSS 誘発性腸管炎症に耐性か否かを個体レベルで解析する。解析手段として、2.5% DSS 含有水投与後の体重変化、便の形状、血便・出血等の病理症状をスコア化し実験開始時の体重の80%以

下になる時点まで観察する。その後、消化管を中心に各臓器を採取し、潰瘍の程度や単球・マクロファージ等の浸潤の程度を免疫組織学的に観察し解析する。使用する Cre Tg マウスとしては、全身性にタモキシフェン (Tm) 誘導性 Cre が発現する CAG-CreER マウスとの掛け合わせを行い、成体において時期特異的に Wnt5a 遺伝子の完全欠失を引き起して、DSS 誘発性腸管炎症における表現型を解析する。また、DSS 誘発性腸管炎症の潰瘍部位で Wnt5a の発現が亢進しているため (図 2)、①腸管上皮組織 (Villin-Cre)、②血球系組織 (Mx-Cre)、③間質細胞 (Col1a2-CreER) のそれぞれにおいて特異的に Cre を発現する Tg マウスと Wnt5a cKO マウスとの掛け合わせを行い、組織特異的に Wnt5a 遺伝子の完全欠失を引き起して、DSS 誘発性腸管炎症に対する耐性を観察し解析する。その結果、Wnt5a の欠失が引き起す炎症耐性の主たる要因となる組織・細胞種が明らかになる。

(2) Wnt5a 受容体 Ror2 の時期特異的・組織特異的 cKO マウスの作製とその解析

Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor2 (Ror2) は、そのノックアウトマウスの表現型から Wnt5a 受容体の一つであると考えられている。実際に、マクロファージ (未分化破骨細胞) に発現した Ror2 が、Wnt5a 依存性に破骨細胞の成熟に関与していることが報告されている。既に、私共は Ror2 KO マウスや Ror2 flox マウスを入手しているので、組織特異的 Cre Tg マウスや薬剤誘導性時期特異的 Cre Tg マウスを掛け合わせることで、Ror2 の cKO を行い DSS 誘発性腸管炎症に耐性か否かを個体レベルで解析を行う。この解析から、Wnt5a に応答して DSS 誘発性腸管炎症への耐性を示す組織を明らかにする。

(3) 培養細胞における Wnt5a の炎症応答への作用機構の解析

(1)、(2) の解析から、DSS 誘発性腸管炎症への耐性の要因となる Wnt5a 分泌 (発現) 組織と Wnt5a 応答組織が明らかになる。そこで、Wnt5a や Ror2 の cKO マウスとそのコントロールマウスから Wnt5a 応答組織の初代培養細胞を単離し、Wnt5a-Ror2 シグナルの欠失が引き起こす表現型を解析する。加えて、これらの培養細胞に精製 Wnt5a を作用させることや Wnt5a の強制発現を行い、Wnt5a シグナルが増強した影響を解析する。これらの解析を通して、炎症応答における Wnt5a シグナルの作用機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) DSS 誘発性腸管炎症における Wnt5a cKO マウスの解析

全身性に CreER を発現し、タモキシフェン (Tm) 投与によって時期特異的に Wnt5a を欠

失する CAG-CreER Wnt5a cKO マウスと血球系細胞特異的 Wnt5a cKO マウス (Mx-Cre Wnt5a cKO マウス)、腸管上皮特異的 Wnt5a 欠損マウス (Villin-Cre Wnt5a cKO マウス) を作製し、Wnt5a の欠損の程度を各組織由来の RNA を用いた RT-PCR により解析した。その結果、CAG-CreER Wnt5a cKO マウスでは、Tm 投与後消化管を含む多くの組織で Wnt5a の欠失が観察された。また、Mx-Cre Wnt5a cKO マウスでは、骨髄と肝臓において Wnt5a の欠損が観察された。一方で、Villin-Cre Wnt5a cKO マウスでは腸管における Wnt5a mRNA の減少は全く観察されなかったが、腸管由来 genomic DNA を用いた PCR では、上皮組織由来と思われる

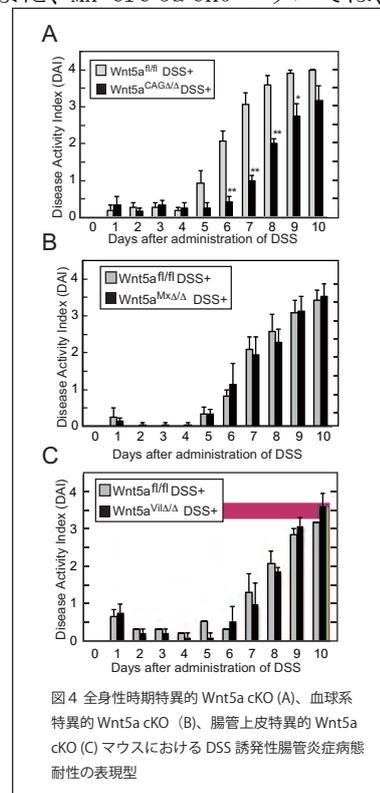


図4 全身性時期特異的 Wnt5a cKO (A)、血球系特異的 Wnt5a cKO (B)、腸管上皮特異的 Wnt5a cKO (C) マウスにおける DSS 誘発性腸管炎症耐性の表現型

Wnt5a 遺伝子の欠損を示す band が確認された。そこで、これら Wnt5a cKO マウスを DSS 誘発性腸管炎症モデルに導入し、その表現型の観察を行った。その結果、Wnt5a ヘテロ KO (+/-) マウスと同様に腸炎に耐性を示したものは、CAG-CreER Wnt5a cKO マウスのみであった (図 4)。DSS 誘発性腸管炎症では、Wnt5a の高発現が潰瘍部間質領域で観察されたことから、私共は、腸管間質細胞特異的 Wnt5a cKO マウス (Col1a2-CreER Wnt5a cKO) の作製を

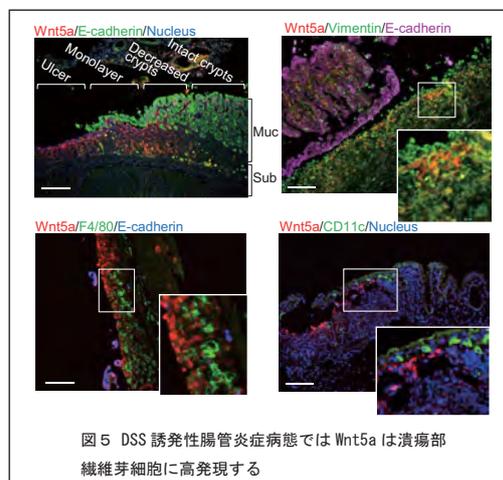
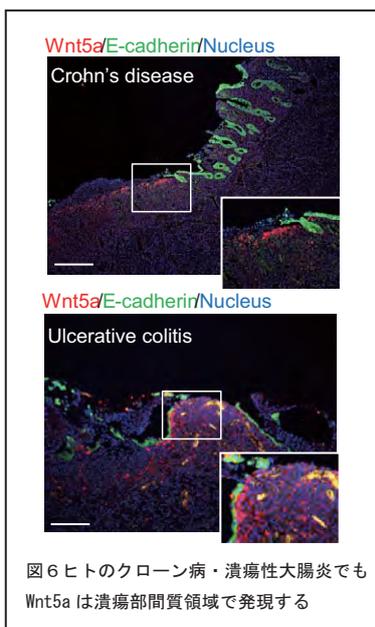


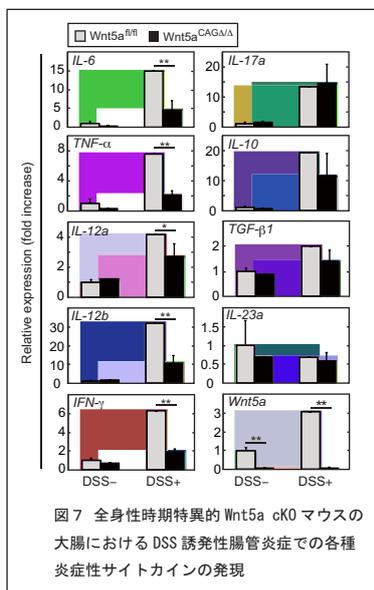
図5 DSS 誘発性腸管炎症病態では Wnt5a は潰瘍部繊維芽細胞に高発現する

試みたが、このマウスでは Tm 投与後の Wnt5a 遺伝子の欠損が、腸管由来 genomic DNA を用いた PCR でもほとんど生じないことが判明し、繊維芽細胞特異的 Wnt5a cKO マウスの作製はうまく行かなかった。以上の結果から、少なくとも血球系細胞と腸管上皮における Wnt5a は腸管炎症耐性に関与しないことが判明した。そのため、以降の実験を CAG-CreER Wnt5a cKO マウスを用いて行った。

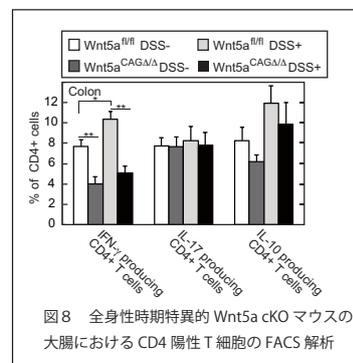


DSS 投与後の間質領域の細胞において、Wnt5a の発現が亢進しているが、実際にどのような細胞において Wnt5a が高発現しているのかを確かめるために、免疫染色を行った。その結果、Wnt5a 高発現細胞は、E-cadherin (上皮細胞マーカー)、F4/80 (マクロファージマーカー) や CD31 (血管内皮マーカー)、CD11c (樹状細胞マーカー) には陰性であったが、Vimentin では陽性となり繊維芽細胞であることを確認した (図5)。この Wnt5a の発現様式は、ヒトの潰瘍性大腸炎 (UC) や Crohn's 病患者由来の潰瘍部間質領域の繊維芽細胞においても観察された (図6)。さらに、DSS 投与有無の条件での大腸組織を FACS sorting によって上皮細胞、繊維芽細胞、T 細胞 (CD4 陽性)、B 細胞 (B220 陽性)、樹状細胞 (CD11c 陽性)、マクロファージ (CD11b 陽性) 細胞に単離し、RT-PCR を行ったところ、繊維芽細胞で Wnt5a の発現が非常に高く、DSS 投与によってその発現がさらに上昇することを確認した。CAG-CreER Wnt5a cKO

マウスの大腸における DSS 誘発性腸管炎症症での各種炎症性サイトカインの発現

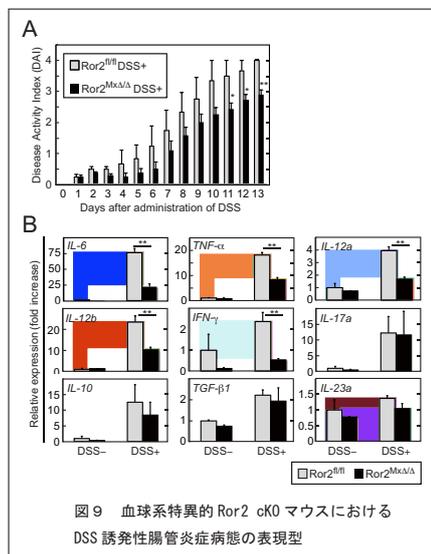


マウスの DSS 誘発性腸管炎症の耐性要因を探るために、DSS 処理後の大腸組織片を用いて、各種炎症性サイトカインの発現を RT-PCR と ELISA によって解析した。その結果、DSS 処理後の IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ 等の炎症性サイトカインの発現が CAG-CreER Wnt5a cKO マウスにおいて減弱していた (図7)。一方で、IL-10, IL-17 や TGF β 1 の発現には Wnt5a cKO による変化は認められなかった。そこで、腸管における T 細胞系譜の FACS 解析を行った。その結果、CAG-CreER Wnt5a cKO マウスでは、IFN- γ 産生 CD4 陽性 T 細胞 (Th1 細胞) の割合が特異的に減少しており、IL-10 産生 CD4 陽性 T 細胞 (Treg 細胞) や IL-17 産生 CD4 陽性 T 細胞 (Th17 細胞) には有意な変化は観察されなかった (図8)。このことは、CAG-CreER Wnt5a cKO マウスでは、DSS 誘発性腸管炎症症での IFN- γ の発現は減弱するが、IL-10 や IL-17 の発現には Wnt5a 欠損の影響が観察されなかったことにも一致する (図7)。以上の結果から、DSS 誘発性腸管炎症病態において、繊維芽細胞から分泌された Wnt5a が、Th1 細胞の誘導に関与していることが示唆された。



(2) DSS 誘発性腸管炎症における Ror2 cKO マウスの解析

Wnt5a 受容体 Ror2 flox マウスを用いて、全身性時期特異的 Ror2 cKO マウス (CAG-CreER Ror2 cKO マウス) と血球系特異的 Ror2 cKO (Mx-Cre Ror2 cKO マウス) を作製し、DSS 誘発性腸管炎症における表現型を観察した。その結果、CAG-CreER Wnt5a cKO マウスと同様に、CAG-CreER Ror2 cKO マウスも DSS 誘発性腸管炎症に耐性を示した。さらに、



Mx-Cre Ror2 cKO マウスにおいても、依然として DSS 誘発性腸管炎症に耐性が観察された (図 9)。また、DSS 処理後の大腸における各種炎症性サイトカインの発現を RT-PCR と ELISA によって解析したところ、Mx-Cre Ror2 cKO マウスでは IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ 等の炎症性サイトカインの発現が、CAG-CreER Wnt5a cKO マウスと同様に減弱していた。以上の結果から、腸管炎症病態において Wnt5a 応答細胞が血球系細胞であることが示唆された (図 9)。

(3) 樹状細胞における Wnt5a-Ror2 シグナルの作用機構の解析

CAG-CreER Wnt5a cKO マウスの大腸では Th1 細胞の有意な減少が観察される。naïve T 細胞から Th1 細胞への分化は、主として樹状細胞より分泌される

IL-12 によって誘導され、分化した Th1 細胞は IFN- γ を分泌することによって、樹状細胞を活性化する。そして、活性化した樹状細胞では、IL-12 をはじめとしたサイトカインの産生がさらに亢進するというポジティブフィードループの状況になる。実際に DSS 誘発性腸管炎症における大腸において、CAG-CreER Wnt5a cKO マウスでは IFN- γ に加えて IL-12 の発現も減弱していた (図 10)。そこで、樹状細胞を CAG-CreER Wnt5a cKO マウス、Mx-Cre Ror2 cKO マウスとそのコントロールマウスの大腸から単離して、LPS 刺激後の炎症性サイトカインの発現を解析した。その結果、コントロールマウスと比較して、IL-12、IL-6、IL-23 等の発現が CAG-CreER Wnt5a cKO マウスと Mx-Cre Ror2 cKO マウスでは減弱することが判明した。そこで、腸管樹状細胞による naïve T 細胞から Th1 細胞への分化促進作用を解析するために、マウス腸管から単離した樹状細胞と脾臓由来 naïve T 細胞との共培養を行い、分化した Th1 細胞から培地中に分泌される IFN- γ の量を ELISA で

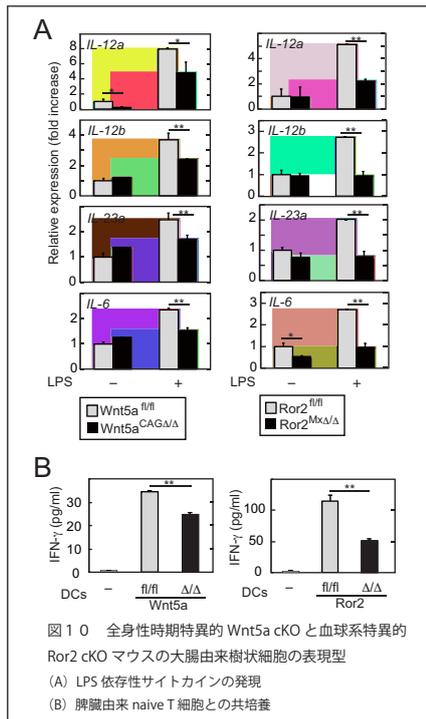


図 10 全身性時期特異的 Wnt5a cKO と血球系特異的 Ror2 cKO マウスの大腸由来樹状細胞の表現型 (A) LPS 依存性サイトカインの発現 (B) 脾臓由来 naïve T 細胞との共培養

解析した。その結果、コントロールマウス由来の樹状細胞と比較して、CAG-CreER Wnt5a cKO マウスと Mx-Cre Ror2 cKO マウス由来の樹状細胞との共培養では、培地中の IFN- γ の量が有意に減少した (図 10)。以上の結果から、Wnt5a シグナルの抑制によって Th1 細胞誘導が弱められることが *in vitro* の実験でも観察され、その要因が樹状細胞の分泌する IL-12 の発現量が減弱するためであることが示唆された。そこで、樹状細胞における LPS 刺激依存性 IL-12 の発現が減少することから、まずは LPS-TLR4 シグナルの応答性を CAG-CreER Wnt5a cKO マウスと Mx-Cre Ror2 cKO マウス由来の樹状細胞を用いて解析した。しかし、LPS 刺激依存性 NF κ B 経路の活性化や JNK、p38MAPK の活性化への影響は、Wnt5a や Ror2 の欠損によって観察されなかった。このことから、Wnt5a-Ror2 シグナルは直接的には TLR4 シグナルの制御には関与しないことが示された。そこで、樹状細胞の IL-12 (IL-12b) プロモーターを ChIP assay によって解析した。その結果、CAG-CreER Wnt5a cKO マウスと Mx-Cre Ror2 cKO マウス樹状細胞では、確かに LPS 刺激依存性の RNA ポリメラーゼや NF κ B の IL-12b プロモーターへのリクルート量が減少し、且つヒストンのアセチル化の程度も減弱していた。先ほどの結果から、Wnt5a シグナルは直接的には TLR4 シグナルに関与しないことが判明していることから、私共は Wnt5a シグナルの欠損が、IFN- γ -STAT1 シグナルによる priming 効果 (STAT1 がクロマチン上の遺伝子発現調節領域に結合することで、ヒストンのアセチル化を促し、TLR シグナル等の他のシグナル伝達経路下流で働く転写因子がクロマチン上にアクセスしやすくなる現象) を減弱させているのでは? と推測した。そこで、これら樹状細胞の IFN- γ シグナル応答性に着目した。IFN- γ が細胞膜受容体に結合すると JAK-STAT1 シグナルが活性化される。そこで、IFN- γ 刺激依存性 STAT1 や JAK1 の活性化 (リン酸化) を CAG-CreER Wnt5a cKO マウスと Mx-Cre Ror2 cKO マウス由来の樹状細胞を用いて解析した。その結果、Wnt5a シグナルの欠損により、IFN- γ -STAT1

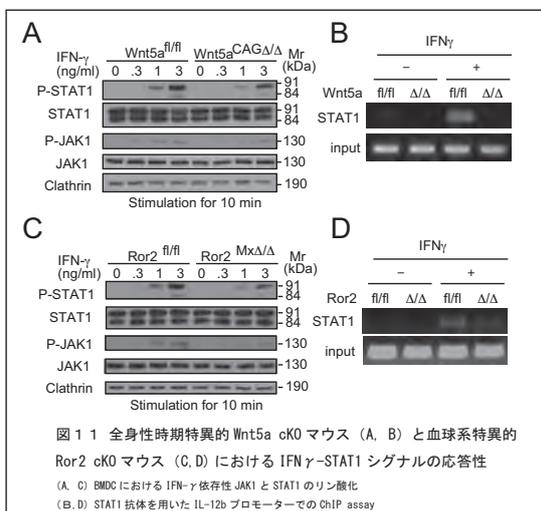
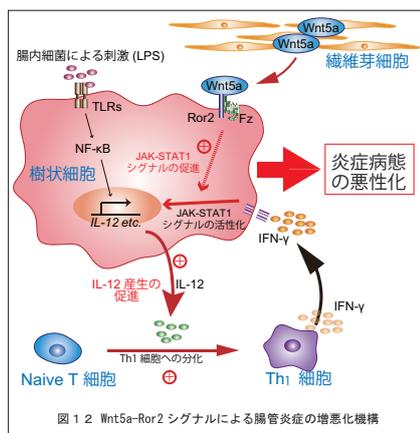


図 11 全身性時期特異的 Wnt5a cKO マウス (A, B) と血球系特異的 Ror2 cKO マウス (C, D) における IFN- γ -STAT1 シグナルの応答性 (A, C) BMDC における IFN- γ 依存性 JAK1 と STAT1 のリン酸化 (B, D) STAT1 抗体を用いた IL-12b プロモーターでの ChIP assay

シグナルの応答性が減弱することが明らかになり、実際にIL-12bプロモーターへのIFN- γ 刺激依存性STAT1のリクルート量の減少も観察された(図11)。

以上の結果から、樹状細胞におけるRor2を介したWnt5aシグナルが、IFN- γ -STAT1シグナル



を増強させることでTh1細胞分化を促進することが腸管炎症病態の増悪化に繋がることが明らかになった(図12)。本研究成果は、Wnt5aシグナルを介する腸管炎症増悪機構解明の一助になると考えられ、学術的に意義深い。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4件)

1. The Wnt5a-Ror2 axis promotes the signaling circuit between interleukin-12 and interferon- γ in colitis. Sato A., Kayama H., Shojima K., Matsumoto S., Koyama H., Minami Y., Nojima S., Morii E., Honda H., Takeda K., and Kikuchi A. **Sci Rep.** (査読有) *in press*, 2015
2. Wnt5a promotes cancer cell invasion and proliferation by receptor-mediated endocytosis-dependent and -independent mechanisms, respectively. Shojima K., Sato A., Hanaki H., Tsujimoto I., Nakamura M., Hattori K., Sato Y., Dohi K., Hirata M., Yamamoto H., and Kikuchi A. **Sci Rep.** (査読有) 5:8042. doi: 10.1038/srep08042., 2015
3. Custos controls β -catenin to regulate head development during vertebrate embryogenesis. Komiya Y., Mandrekar N., Sato A., Dawid I.B., and Habas R. **Proc Natl Acad Sci U S A.** (査読有) 111, 13099-13104, 2014

4. A combination of Wnt and growth factor signaling induces Arl4c expression to form epithelial tubular structures. Matsumoto S., Fujii S., Sato A., Ibuka S., Kagawa Y., Ishii M., and Kikuchi A. **EMBO J.** (査読有) 33, 702-718, 2014

[学会発表] (計 4件)

1. 第35回日本分子生物学会年会
2. 第36回日本分子生物学会年会
3. 平成25年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ
4. 第87回日本生化学会大会

[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:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
佐藤 朗 (SATO, Akira)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 70464302

(2) 研究分担者 ()
研究者番号:

(3) 連携研究者 ()
研究者番号: