

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659388

研究課題名(和文)小分子応答性人工受容体による増殖因子シグナル伝達制御を用いた心筋再生療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of Myocardial Regeneration Therapy Using Small Molecule-Responsive Artificial Receptors For Growth Factor Signal Transduction

研究代表者

川村 晃久 (Kawamura, Teruhisa)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：90393199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt分子や顆粒球コロニー刺激因子などの増殖因子は心筋細胞分化促進効果や心筋保護作用などを有しており、これらの因子によるシグナル伝達を制御することは、多能性幹細胞からの効率的な心筋細胞誘導だけでなく、移植後の生着効率の改善にも繋がると考えられる。しかし、増殖因子は、大量の分化培養に用いるには高額であり、細胞移植後に生体投与する場合も移植細胞以外に作用するため、その副作用が懸念される。これらの問題を解決する目的で、本研究では、生体において安定でかつ毒性のない小分子リガンドに応答する人工受容体を用いて増殖因子のシグナル伝達を制御する方法を開発した。心臓再生療法の基盤構築に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Signal transduction from Wnt ligands or Granulocyte Colony Stimulating factor (G-CSF) links to pathways involved in myocardial cell differentiation or cell survival from external stress stimuli. To control these signals in pluripotent stem cells is expected to improve the efficiency for cell survival after implantation as well as for myocardial cell induction. Then, we attempted to generate small molecule-responsive artificial receptors that can activate signal pathways, in the absence of Wnt3a or G-CSF. In the present research project, we constructed chimeric receptors in which single-chain Fv of anti-fluorescein (FL) antibody was tethered to transmembrane/cytoplasmic domains of the receptor for Wnt3a or G-CSF. Mouse ES cells or iPS cells transduced with these chimeric receptors are able to activate the signals in response to FL-conjugated BSA (BSA-FL) as a cognate ligand, and show increased efficiency for myocardial cell differentiation when they are stimulated with BSA-FL.

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：再生医学 幹細胞生物学 人工受容体

1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群の最大の合併症である心筋梗塞後の重症心不全に対する根本的治療として、喪失した心筋細胞を、胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)細胞から体外で作成移植する心筋再生療法が大きく期待されている。その実用化のためには、移植に必要な十分量の心筋細胞を誘導する方法や移植後の生着率を高める方法を開発することが重点課題と考えられる。

ES細胞やiPS細胞を心筋細胞へ効率的に分化させるには、分化過程におけるWnt分子や顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)などによる増殖因子シグナルの時期特異的な活性化が重要である[Naito A. et al., *PNAS* 2006; 103:19812-7, Shimoji K et al. *Cell Stem Cell* 2010;6:227-37]。さらに、WntやG-CSFによるシグナルの活性化はアポトーシスを抑制する報告[Almeida M. et al., *J Biol Chem.* 2005;280:41342-51, Harad M et al. *Nat Med.* 2005;11:305-11.]がなされている。故に、これらのシグナルを制御することで、iPS細胞から心筋細胞を効率的に誘導するとともに移植後の生着効率を高める方法が合理的と考えられる。しかし、増殖因子の生体投与は移植細胞以外にも作用し、例えばG-CSFの場合、白血球増多による組織の炎症などその副作用が懸念される。また、Wnt分子では、生体で安定して作用する組換え蛋白質が精製困難な状況である。

2. 研究の目的

背景で述べた問題を解決する目的で、本研究では、共同研究により開発した、増殖因子受容体のリガンド結合ドメインを、抗体の可変領域に置換した人工受容体(=キメラ受容体)を活用する。すなわち、生体において安定かつ毒性のない小分子リガンドに反応するキメラ受容体を用いてWntあるいはG-CSFのシグナル伝達を制御する方法を開発する。さらに、この受容体を発現するiPS細胞から誘導した心筋細胞を用いることで、移植細胞のみにこれらのシグナルを伝達できる新規心筋再生療法の確立を試みる。

3. 研究の方法

(1) 人工受容体発現ベクターの構築

Wnt3a に対しては、その受容体である Frizzled8 (Fz8) / LRP6 二量体における Wnt3a 分子結合領域を、フルオレセイン (FL) を認識する一本鎖抗体可変領域 (ScFv) に置換したキメラ受容体を作製する(図 1)。G-CSF に関しては、1 回膜貫通型受容体のホモ二量体として機能することが知られているので、リガンド結合領域あ

るいは細胞外ドメインすべてを、抗フルオレセイン (FL) 抗体の single chain Fv (ScFv) に置換した人工受容体 (=キメラ G-CSF 受容体、図 2) を作製する。

(2) 人工受容体発現 ES/iPS 細胞株の樹立と代替リガンドによる Wnt3a あるいは G-CSF のシグナル伝達の解析

複数個の FL と結合した BSA (BSA-FL) を代替リガンドとして用いる。Wnt3a シグナルに関しては、 β -catenin/TCF 依存性の転写活性をルシフェラーゼによる発光強度を指標に評価し、G-CSF シグナルに関しては、STAT3 や Akt のリン酸化を Western blot により解析を行う。

(3) 人工受容体発現 ES 細胞株における Wnt 経路活性化と心筋分化効率の評価

作製した人工受容体を、レンチウイルスベクターを用い遺伝子導入する。作製した細胞株を代替リガンド (BSA-FL) を用いて時期特異的に刺激する。心筋細胞特異的な遺伝子の発現や自己拍動率などを指標に心筋細胞分化効率を評価する。

4. 研究成果

(1) 古典的 Wnt 経路を活性化する人工受容体 (=キメラ受容体) の構築とシグナル伝達解析

はじめに、古典的 Wnt 経路を活性化させる目的で、Wnt3a 受容体のリガンド結合ドメインを、抗体の可変領域に置換したキメラ受容体を構築した。これにより、置換した抗体可変領域が認識する抗原分子を代替リガンドとしてシグナルを伝達させることが出来ると予想される。予想通り、代替分子 BSA-FL (fluorescein) により濃度依存性に Wnt3a による古典的 Wnt 経路を ES 細胞で活性化させることが示された (図 1)。

(2) G-CSF 経路を活性化する人工受容体 (=キメラ受容体) の構築とシグナル伝達解析

次に、G-CSF 受容体のリガンド結合ドメインの一部あるいはすべてを、抗体の可変領域に置換したキメラ受容体を構築した (図 2)。代替分子 BSA-FL (fluorescein) により STAT3 および Akt のリン酸化が刺激後 15~30min で亢進することを ES 細胞で確認した (図 3)。

(3) 人工受容体発現 ES 細胞株における代替リガンド刺激による心筋細胞分化効率

最後に、キメラ受容体発現 ES 細胞株 (ES/キメラ受容体) と mock 導入株 (ES/mock) で分化培養を行い、自律拍動率を指標に心筋細胞への分化効率を評価した。ES/mock では代替リガンド BSA-FL で刺激しても自律拍動率は変化しなかった

が、ES/キメラ受容体では BSA-FL 刺激によって、Wnt3a で刺激した場合と同等に自律拍動率が上昇することが確認された (図 4)。

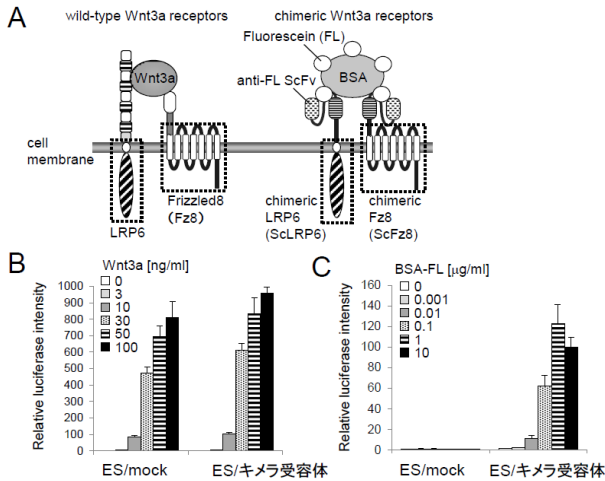


図 1. LRP6/Fz8 に対するキメラ受容体ペアーによる古典的 Wnt 経路の活性化
Wnt3a に結合する受容体ペアである LRP6 と Fz8 に対するキメラ受容体の模式図 (A)と、これを発現する ES 細胞株における Wnt3a 組み換えタンパク質 (B)および代替リガンド (BSA-FL;Fluorescein, C)による Wnt シグナルの活性化 (β-catenin/Tcf レポーターアッセイによる評価、)

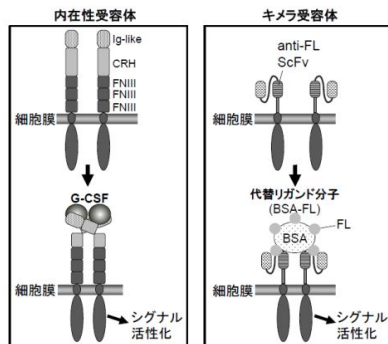


図 2. G-CSF に対するキメラ受容体の模式図

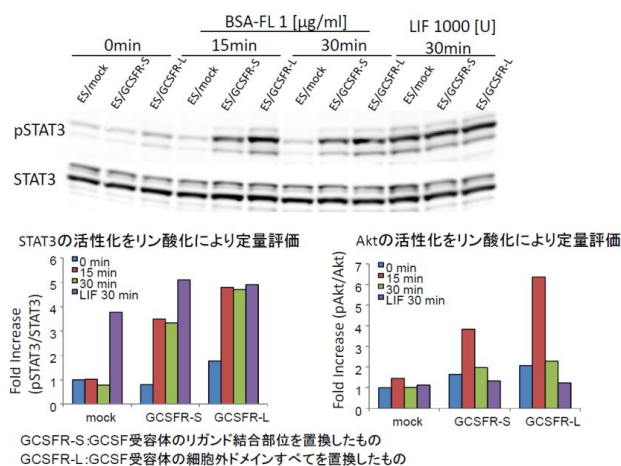


図 3. G-CSF に対するキメラ受容体によるシグナルの活性化
キメラ受容体を発現させた ES 細胞株は、代替リガンド刺激により STAT3 および Akt の

リン酸化の亢進を認めた。

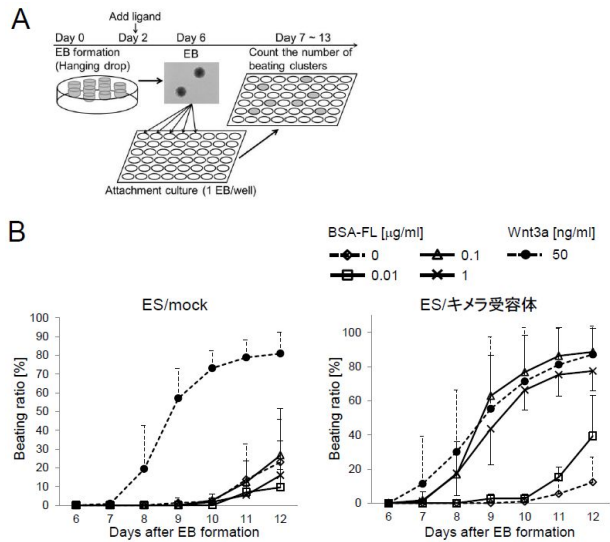


図 4. LRP6/Fz8 に対するキメラ受容体ペアーによるシグナルの活性はマウス ES 細胞において心筋細胞分化を亢進させた。 (A) マウス ES 細胞を用いた心筋細胞分化誘導方法 (B) キメラ受容体を発現させた ES 細胞株は、代替リガンドにより Wnt3a 組換タンパク質による刺激と同様、自己拍動する心筋細胞の誘導効率の亢進を認めた。

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 2 件)

Koga M, Matsuda M, Kawamura T, Sogo T, Shigeno A, Nishida E, Ebisuya M., Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process., *Nature Commun.* 2014;5:3197. doi: 10.1038/ncomms4197. (査読あり)

川村晃久、重野麻子、十河孝浩, iPS 細胞を用いた心血管創薬スクリーニング, J-ISCIP 会誌 2014 年 2 巻 1 号, pp71-74. URL <http://www.j-iscip.com/pdf/j-iscip02.pdf> (査読なし)

[学会発表] (計 4 件)

Sogo T, Shigeno A, Baba A, Hasegawa K, Kawahara M, Ueda H, Nagamune T, Kawamura T., Functional regulation of canonical Wnt signaling for self-renewal and differentiation of pluripotent stem cells using chimeric receptors for Wnt3a., 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 12 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

Sogo T, Shigeno A, Baba A, Hasegawa K, Kawahara M, Nagamune T, Kawamura T., Functional regulation of Wnt3a signaling for

an efficient and economical production of cardiac myocytes from mouse ES cells using chimeric receptors for Wnt3a., 第 18 回国際心血管薬物療法学会年次学術集会, 2013 年 6 月 28 日, ローマ (イタリア)

川村晃久, 初期化誘導技術を応用した次世代心筋再生治療薬の開発, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 03 月 29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

十河孝浩、重野麻子、丸野敬晃、河原正浩、上田 宏、長棟輝行、川村晃久, 古典的 Wnt シグナルを伝達する小分子応答性人工受容体の作製と、その多能性幹細胞への応用, 第 12 回日本再生医療学会, 2013 年 03 月 22 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

人工多能性幹細胞、心筋細胞又はその前駆細胞の製造方法

発明者：川村晃久

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：PCT/JP2013/085260

出願年月日：2013 年 12 月 28 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ～川村研究室へようこそ～ ; <http://kawamura-lab.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川村 晃久 (KAWAMURA, Teruhisa)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：90393199