

受賞者

岸田 想子

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医化学分野

研究テーマ

哺乳動物細胞におけるWnt/PCPシグナル伝達経路の働き

- Wnt-11蛋白質の精製とその生理機能の解析 -

1. はじめに

細胞外分泌蛋白質 Wnt の細胞内シグナル伝達経路は種を越えて保存されており、細胞の増殖や分化等の種々の細胞機能を制御している。Wnt は哺乳類ではそれぞれ

の Wnt が細胞膜上の受容体に結合した後、活性化される細胞内のシグナル伝達経路は、少なくとも3種類存在している (図1参照)。β-カテニン経路は、細胞質のβ-カテニンを安定化して蓄積させて、β-カテニン/Tcf 複合体による遺伝子発現を促進して、細胞の増殖や分化を制御している。次に、PCP 経路は、低分子量 G 蛋白質を介して Rho キナーゼや Jun キナーゼを活性化して細胞骨格を制御している。3つ目の、カルシウム経路は蛋白質リン酸化酵素 PKC やカルモジュリンキナーゼを活性化することや、β-カテニン経

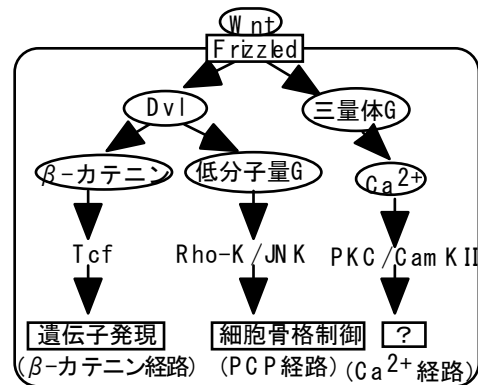


図1 Wnt シグナル伝達経路

路による遺伝子発現を抑制することが見出されている。ゼブラフィッシュにおいて、Wnt-11 をリガンドとした PCP 経路が原腸陥入の制御に関与していることが報告されている。また、哺乳動物細胞において、Wnt-11 は心臓形成に、Wnt-4 は腎臓形成に関与することが知られている。

これまで、Wnt の蛋白質の精製が困難なため、リガンドとして細胞に作用させる際は未精製品を使わざるを得ず、Wnt の純粋な作用を解析することが不可能であったが、近年、Wnt-3a や Wnt-5a 蛋白質の精製法が確立され、精製 Wnt のシグナル解析が行われるようになってきた。そこで私どもは、Wnt-11 および Wnt-4 CM (コンディションドメディウム) の作製に取り組んだ。

2. 方法 結果 研究成果

a. (Wnt-4, Wnt-11 の作用) まず、私どもは、マウス Wnt-11 及びマウス Wnt-4 の特異的抗体を作製した。次に、マウス L 細胞で Wnt-11 が恒常的に発現している細胞株、および、Wnt-4 が、L 細胞で恒常的に発現している細胞株を樹立し、培養上清を回収し、Wnt-11 蛋白質および Wnt-4 蛋白質を含む CM を得た。



図2 Wnt 刺激による Dvl のリン酸化

Wnt-3a や Wnt-5a のシグナルは、細胞質の Dvl をリン酸化することにより下流にシグナルを伝達していると考えられている。そこで、NIH3T3 細胞において、Wnt-11 CM や Wnt-4 CM による Dvl のリン酸化につ

いて解析した(図2参照)。Wnt-4CM処理ではWnt-3aCMと同様に、Dvlのリン酸化によるモービリティシフトが認められた。また、Wnt-4CMでは、時間依存性にDvlのリン酸化が認められた。Wnt-11CMでは、Wnt-3aやWnt-4ほどはっきりとした、モービリティシフトは認められなかった。

Wnt3a刺激により蓄積した β -カテニンが核内に移行して、転写因子Tcfと結合し、その転写活性化を引き起こす。そこで、Wnt-11CMやWnt-4CMの影響について解析した。今回、Tcf結合領域がプロモーターに組み込まれた、ルシフェラーゼレポーター遺伝子とレポーター遺伝子TOPFLASHを恒常的に組み込んだ293細胞を用いて解析した。各Wnt蛋白質を含むCMで12時間

処理した後、可溶化し、ルシフェラーゼの活性を測定した。Wnt-3aやWnt-4CMでは、用量依存性にTcfの転写活性の亢進が認められたが、Wnt-11CMでは、Tcfの転写活性化やWnt-3aCMによるTcfの転写活性の抑制効果は認められなかった。

b. (脳腫瘍におけるWntの作用) これまでに多くの腫瘍でWnt/ β -カテニン経路の異常による遺伝子発現で細胞増殖が亢進し、発癌に至ることが広く認められている。ところが、胃がんではWnt-5aが細胞運動を制御することや、予後と相関する事が見出されており、PCP経路を作動させるWntも腫瘍の病態に関わる可能性が高まっている。そこで、胃がん以外の腫瘍におけるWntの作用を見出したいと考えた。

gliomaは神経組織のグリア由来の腫瘍で、原発性脳腫瘍の4分の1を占め、本邦で毎年3000例前後発見されている。Gliomaは組織型により分類されており、もっとも悪性のglioblastomaでは発症後の一年生存率50%程度と、予後不良の疾患である。Glioblastomaでは病変が限局性ではあるものの、周囲の神経組織に浸潤する事が多く、根治的な切除等の治療を行う上での大きな課題となっている。

そこで、ヒトglioma症例より細胞を樹立し、ヒトWntファミリーの全遺伝子20種類について、定量PCRにより、その発現量を解析しました。その結果数種類のglioma由来細胞において、Wnt-5aやWnt-11が多量に発現していた。この2種類はtotalRNA1 μ gあたり100万コピーのオーダーで発現していた。

さらに、gliomaにおいてWnt-11が関わる細胞機能を検討するため、ヒトgliomaU251細胞における、wound healing assayを実施したところ、Wnt-11をRNAiでノックダウンした実験群では経時的にwound healingの遅延が認められた。

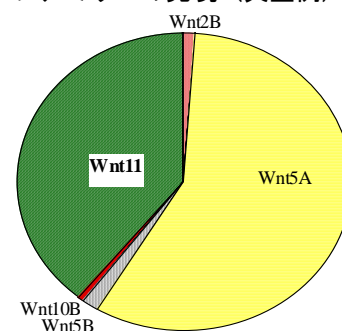
したがって、Wnt-11はこの細胞の運動に関わる事が示唆された。

3. 考察 まとめ

私共はこの1年で、Wnt-11やWnt-4特異的抗体を作製し、それぞれのWntが恒常的に発現している細胞株を樹立し、Wnt-11やWnt-4蛋白質を含むCMを得た。Wnt-4CMはDvlのリン酸化や、Tcfの転写活性化を促進することが明らかにした。現在、Wnt-11やWnt-4の部分精製を進めている。また、Wnt-11の脳腫瘍細胞における細胞運動に対する効果を一部解明したと考えており、今後さらに、Wnt-11のシグナルを受け取る受容体や下流のシグナルを明らかにすることにより、この疾患の病態の解明に貢献したいと考えている。

ヒト脳腫瘍細胞株 (glioma) におけるWnt

ファミリーの発現 (典型例)



total RNA 1 μ g当たりの各Wntファミリー (全20種類) mRNAの発現量を定量し、コピー数を基に全Wntを100%として表示