

Wnt 経路を制御するキメラ受容体による心筋再生療法

立命館大学 生命科学部 生命医科学科
幹細胞・再生医学研究室
川村 晃久

1. はじめに

ES細胞やiPS細胞を用いた重症心不全に対する心筋再生療法が強く期待されている。近年、我々を含む複数のグループによる報告から、ES/iPS細胞の分化過程の初期段階でWnt3aにより古典的Wnt経路を、後期ではWnt11により非古典的Wnt経路を活性化させるというWntシグナル伝達の時期特異的な切り替えを行うことで、心筋細胞へ効率的に分化誘導できることが見いだされた。しかし、Wnt分子に対する組換えタンパク質は作製困難あるいは高額であり、実用化できる程の大量の心筋細胞を調製することは医療経済的に現実的でない。そこで、本研究では、安価な小分子でWntシグナル伝達を制御する人工受容体を作製し、これをES/iPS細胞へ発現させることで心筋細胞を経済的かつ効率的に作製する。さらに、心筋梗塞によるマウス心不全モデルへ心筋細胞を移植した後に小分子リガンドを生体投与し、移植細胞にのみWntシグナルを*in vivo*で一過性に活性化させ生着効率の向上を試みる。このように、本研究の目的は、Wntシグナルを制御する小分子応答性の人工受容体を用いて、医療経済的に実現可能な心筋細胞の作製法と生着率の高い移植方法を開発し、効果的な心筋再生療法の基盤を築くことである。

2. 方法

人工受容体発現ベクターの構築とそのシグナル伝達解析

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中する。複数個の FL と結合した BSA (BSA-FL) を代替リガンドとして Wnt3a シグナルが制御されることを、 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確認する。一方、Wnt11 に関しては、Fz4 または Fz7 / ROR2 二量体で、同様の方法によりキメラ受容体を作製する。シグナルの活性化は、Wnt3a による古典的 Wnt 経路の活性化に対する抑制効果を指標に検証する。

人工受容体発現 ES 細胞株の樹立と Wnt 標的遺伝子の網羅的発現解析

代替リガンド刺激 24 時間後の遺伝子の網羅的発現変化をマイクロアレイを用いて評価した。各サンプルから RNA を回収して Affimetrix 社のプロトコールに従い、逆転写、増幅反応、cDNA の断片化、Biotin 標識を行い、DNA チップを用いた hybridization 反応を行った。遺伝子発現の類似性に関する解析は、Pearson correlation の計算式を使用して解析を行った。

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、ES 細胞で実績のある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。

3. 結果 研究成果

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

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が伝達されると予想される。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を確認した(図1)。

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Wnt標的遺伝子の網羅的発現解析

さらに、分化誘導初期段階でリガンド刺激を行い、マイクロアレイにより網羅的に遺伝子の発現を解析する。現在、Wnt3aシグナルを伝達するLRP6/Fz8人工受容体ペアにおいて。代替リガンド刺激による網羅的遺伝子発現変化が組換えWnt3a蛋白質刺激によるものと類似したパターンをとることを確認した(図2)。

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の上昇

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3)。

4. 考察 まとめ

これまでのWntシグナル伝達に関する研究は、主に、組み換えタンパク質やconditioned mediumによる刺激、受容体やその下流の制御因子である β -cateninの活性化型を強制発現させるモデルで行われてきた。Conditioned mediumはWnt以外の既知や未知の因子を多く含むためリガンド特異性に乏しく質の高い実験が困難である。また、組み換えタンパク質は、一部のWntリガンドで市販されるようになったが、種類が限られていること、その安定性などから、生体組織への投与実験は困難と考えられる。また、高額であるため、研究や実用化における費用の面でも経済的でない。本研究により開発された人工受容体は、上記の問題を解決する強力なツールとなりうる。幹細胞を用いた再生医療のみならず、複雑なWntシグナル伝達研究への応用にも期待出来る。

5. 発表論文、参考文献

- 1) 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.
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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3月
- 5) Sogo T and Kawamura T. Efficient Production of Cardiac Myocytes from ES cells and iPS cells Using Small Molecule-responsive Artificial Receptors for Wnt3a Signal Transduction, 第76回日本循環器学会学術集会、2012年3月

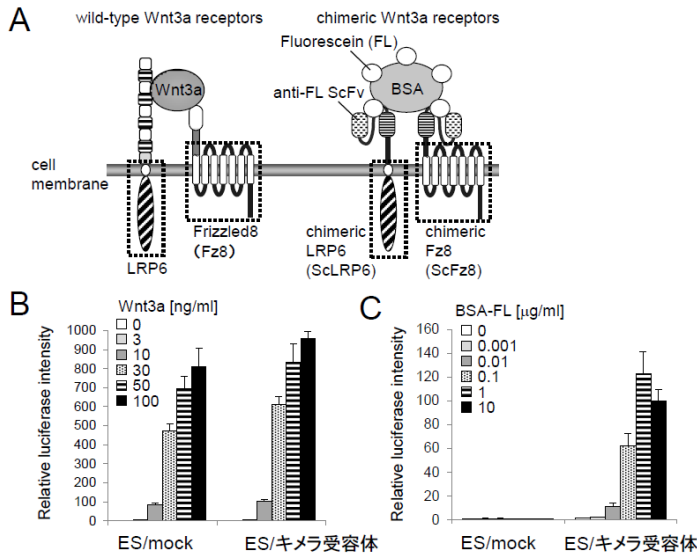


図1. LRP6/Fz8に対するキメラ受容体ペアによる古典的Wnt経路の活性化

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)。

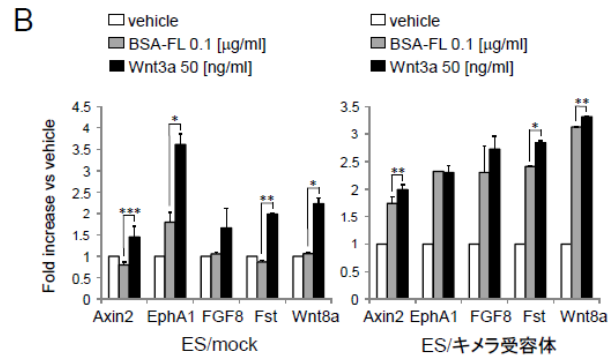
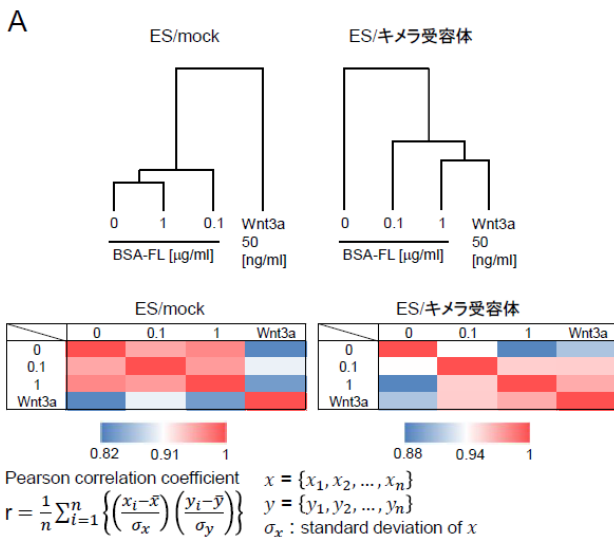


図2. LRP6/Fz8キメラ受容体ペアによる古典的Wntシグナルの標的遺伝子の網羅的解析

代替リガンド刺激24時間後の遺伝子の網羅的発現変化をマイクロアレイを用いて評価した。(A)

Mock発現ES細胞株では、代替リガンドによる遺伝子発現変化を認めず、キメラ受容体ペア発現株では、代替リガンド刺激による網羅的遺伝子発現変化が、組換Wnt3a蛋白質刺激によるパターンと類似性を示した。(B) 代替リガンドや組換Wnt3a蛋白質刺激により発現が誘導される代表的Wnt標的遺伝子の定量的解析(QPCR法)。

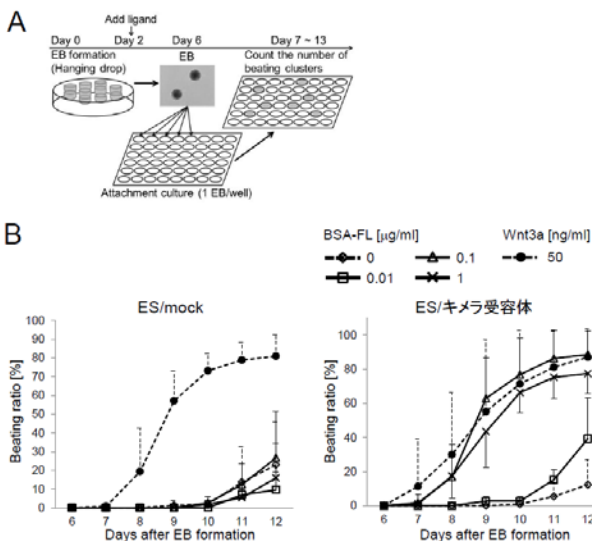


図3. LRP6/Fz8に対するキメラ受容体ペアによるシグナルの活性はマウスES細胞において心筋細胞分化を亢進させた。

(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。