

Wnt シグナルによる心筋分化・心臓疾患発症機序の解明と それに基づく治療法の開発

Role of Wnt signaling in cardiomyocyte differentiation
and its implication for the treatment of heart diseases

小室 一成 (KOMURO ISSEI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要

生活習慣の欧米化に伴い日本での心臓病患者数は増加し続けている。心機能が低下した心不全患者に対する新たな治療法として心筋再生療法が注目を浴びている。本研究では心筋再生療法の技術的基盤として Wnt シグナルによる心筋分化制御機構を解明するとともに同シグナルの心臓病への関与を明らかにすることで Wnt シグナル制御に基づく心臓病治療法開発を目指す。

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：循環器・高血圧、再生医学、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

欧米型のライフスタイルが一般的になり、日本における心臓病患者数は増加している。特に心機能が著明に低下した重症心不全患者の予後はきわめて不良であり、唯一の根治療法としての心臓移植にもドナー不足問題が付きまとっている。そこで重症心不全に対する新たな治療法として、多分化能をもつ幹細胞から心筋細胞を分化誘導し、心臓に移植する心筋再生療法が注目されている。

我々は Wnt シグナルが心筋細胞分化を時期特異的に制御すること、IGFBP-4 が Wnt シグナルを抑制することで心筋分化を促進することを見出している。さらに、Wnt シグナルを抑制することで心筋梗塞後の梗塞範囲を縮小することが可能であることも報告されており、Wnt シグナルが成人期に起こる心臓病にも関与している可能性も考えられる。

2. 研究の目的

本研究では心筋再生療法の技術的基盤として Wnt シグナルが時期特異的に心筋分化を制御するメカニズム、IGFBP-4 が Wnt シグナルを抑制するメカニズムを明らかにするとともに、Wnt、Wnt inhibitor を用いた幹細胞からの高効率心筋分化誘導法を開発することを目的としている。さらに Wnt シグナルが心臓病の発症・進展にどのように関与しているのかを明らかにすることで心臓病に対する新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

- ・Wnt シグナルによる時期特異的な心筋分化制御メカニズム、IGFBP-4 による Wnt シグナル抑制の分子メカニズムを明らかにするために BRET 法を用いて Wnt 受容体である Frz と LRP5/6 の会合様式を解析する。
- ・これまでの研究から Wnt シグナルは心筋分化初期には促進的に、後期には抑制的に心筋分化を制御することから Wnt、Wnt inhibitor 処置のタイミングを最適化することで未分化な幹細胞からの高効率心筋分化誘導法を確立する。
- ・様々な心疾患モデルマウスにおいて Wnt シグナル活性化の有無、Wnt シグナル活性化がどのようなリガンドで引き起こされているのかを網羅的手法を用いて解析する。

4. これまでの成果

IGFBP-4 による Wnt シグナル抑制機構を解明するため、まず Frz と LRP6 の会合様式を検討した。Frz および LRP6 の細胞内ドメインにそれぞれ GFP、ルシフェラーゼを融合させたコンストラクトを作製し細胞に強制発現させたところ BRET 比の著しい上昇が認められ、Wnt との結合部位を欠く Frz と GFP の融合コンストラクトを用いても同様に BRET 比の上昇が認められたことから、Frz と LRP6 は Wnt タンパクの非存在下でも複合体を形成していることが明らかになった。次に細胞内ドメインに GFP、ルシフェラーゼを融合させた LRP6 コンストラクトを同

時に強制発現させ、Wnt 刺激を行なうことで BRET 比の上昇が認められたことから、Wnt 刺激により LRP6 の多量体形成が誘導されることが明らかとなった。また、IGFBP-4 は LRP6 に結合し、その多量体形成を阻害することで Wnt シグナルを抑制していることが明らかになった。

心筋細胞のソースとして脂肪間葉系幹細胞、iPS 細胞を標的に高効率心筋細胞分化誘導法の開発を目指した。これまでマウス ES 細胞を用いて Wnt、Wnt inhibitor を用いた心筋細胞分化誘導法を行ってきたが、これら両因子だけでは効率的な心筋分化を誘導することはできなかった。脂肪間葉系幹細胞に関しては gamma-secretase inhibitor との併用を検討する予定である。ヒト iPS 細胞に関しては 2007 年に報告された Laflamme らの BMP4 と activin を用いた方法に Wnt、Wnt inhibitor を時期特異的に作用させることで再現性高く、高効率に心筋細胞を分化することができた。

心疾患モデルマウスの中で、心不全モデルマウスの血清が強い Wnt シグナル活性化能を有することを見出した。そこで心不全モデルマウスの血清中から Frz 結合タンパクを沈降させ、質量分析法で解析したところ、心不全モデルマウス血中で増加する Frz 結合タンパクとして補体分子 C1q を同定した。C1q は in vitro で Wnt シグナルを活性化し、C1q 欠損マウスでは全身の組織で Wnt シグナルの標的遺伝子である Axin2 の発現が低下していたことから、C1q が新規の Wnt 活性化物質であることが明らかになった。

C1q はタンパク分解酵素である C1r、C1s と複合体を形成し、古典的補体経路の第一分子として一連のタンパク分解反応を引き起こす。C1q による Wnt シグナル活性化が C1s 活性を抑制することで消失することから C1s の基質を検索したところ、Wnt タンパクの共受容体である LRP6 が C1s による切断を受け、Wnt シグナル活性化を引き起こしていることが明らかになった。

心不全モデルマウスでは血中 C1q 濃度が正常マウスと比べて約 3 倍に増加しているが、同マウスの心臓での C1q 発現量が著明に増加していることから、心不全マウスの心臓における C1q 発現増加が血中 C1q 濃度増加に寄与していることが考えられた。心不全モデルマウスの心臓では Tcf7 や Wisp(Wnt-inducible secretory protein)といった Wnt 標的遺伝子の発現が増加している一方で Wnt 遺伝子に発現変化が認められないことから、不全心で発現が増加した C1q が Wnt シグナルを活性化している可能性が示唆された。

5. 今後の計画

当初の計画が順調に進行しているため、当初の計画を更に発展させる予定である。具体的には以下の 3 点を中心に検討する。

1. Wnt シグナルによる心筋分化制御機構について次世代シーケンサーを用いた網羅的アプローチを適用して解析する。
2. ヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導をケミカルベースへと置換する手法を開発する。
3. Wnt シグナルが不全心におけるどの細胞種で活性化し、どのような変化をもたらしているのかを解析し、新規心不全治療法の開発へと発展させる。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

英文論文

1. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. Naito AT, Sumida T, Nomura S, Nagai T, Shiojima I, Komuro I et al. *Cell* (in press).
2. Wnt signaling and aging-related heart disorders. Naito AT, Shiojima I, Komuro I. *Circ Res* 107:1295-303, 2010.

和文論文

1. 話題の医療 7「拡張型心筋症の再生治療」小室一成 MEDICO 査読無 40:285-290, 2009
2. 細胞医療 Update「PuraMatrixの細胞移植床への応用-自己組織化ナノペプチドにより構成される三次元ゲルの細胞移植床としての可能性」永井敏雄、小室一成 医学のあゆみ 229 : 735-739, 2009
3. 循環器疾患「心不全の再生治療で画期的な進展が現実的に」小室一成 日本医事新報 4420:10-11, 2009

受賞

第 47 回(2010 年) ベルツ賞 小室一成、塩島 一郎、赤澤宏、岡 亨、内藤篤彦、永井敏雄、高野博之、南野徹