

## 審査の結果の要旨

氏名 讃岐 祥一

Wnt シグナルは、発生段階において様々な組織の形成に関与するばかりでなく、成体においても骨の恒常性維持など様々な生理機能を司っていることが知られている。また、シグナル経路の活性化を抑制する分子として知られる、sclerostin に対する中和抗体 romosozumab が、骨粗鬆症の治療薬として臨床でも使用が広がっており、Wnt シグナル経路の創薬標的としての可能性も注目されている。ヒトやマウスにおいては、リガンドである Wnt が 19 分子種、受容体である Fzd が 10 分子種知られており、さらに複数の共受容体分子およびシグナル阻害因子など、様々なシグナル調節因子の関与も報告されている。加えて、下流で活性化される主なシグナル伝達経路として、古典経路 (Wnt/ $\beta$ -catenin 経路) および非古典経路 (Wnt/PCP 経路および Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  経路) が存在し、その他に Wnt/cAMP 経路が活性化される例も報告されている。このようにシグナル起点部分の構成が複雑であり、下流経路のバリエーションも含めると、その組み合わせ数が膨大になることが、Wnt シグナル経路の全体像の理解を難しくしている。

### 第一章 Wnt シグナル経路活性化パターンの網羅的・定量的評価

申請者は自身の過去の研究において、ルシフェラーゼをレポーターとして用い、全ての Wnt、Fzd の組み合わせの下流で、シグナル経路の活性化パターンを網羅的に定量評価するアッセイ系を構築している。しかしながらその後の検討によって、細胞外から遺伝子を導入する際に使用していた、哺乳類の汎用プロモータである CMV プロモータに関して、Wnt-Fzd の組み合わせに依存して、CMV プロモータによる遺伝子発現効率に大幅な変動が生じることを、自身が見出した。そのため、自身が過去に評価した Wnt 下流シグナル経路の活性化パターン測定結果に関しても、CMV プロモータ活性の大幅な変動の影響が生じている可能性があると考えた。そこで申請者は、新たにアッセイ系を再構築して、網羅的なシグナル活性化パターンの測定と解析を、再実施する必要があると考えて検討を進めた。Wnt-Fzd の組み合わせによる影響が少なく、安定して高発現を達成可能な発現プロモータのスクリーニングを行った結果、UbC プロモータが最も発現量が安定することを見出した。この結果を踏まえ、マウス Wnt 19 分子種、Fzd 10 分子種、および共受容体あるいは阻害分子などの、修飾分子 5 種 (Lrp5/6、Ror1/2、阻害因子 Dkk1) に関して、それぞれ UbC プロモータを用いたアデノウィルス発現ベクターを再構築した。また、下流シグナル経路の活性化パターンの定量的な評価を行うため、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路、Wnt/PCP 経路、Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  経路、Wnt/cAMP 経路それぞれの下流で活性化する転写因子 TCF/LEF、AP-1、NFAT、CREB に対する応答配列を、それぞれルシフェラーゼ遺伝子上流に配置したレポーター・アデノウィルスを過去に構築しているが、今回の検討でもこれらのベクターを利用している。申請者は、これらのウィルスをマウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞に共導入することで、全ての Wnt-Fzd の組み合わせに関し、下流経路の活性化度合いを測定した。またこの際、UbC プロモータを用いた場合でも生じる発現量変動の影響に関して、UbC プロモータをルシフェラーゼ上流に配置した恒常発現型のレポーター・アデノウィルスを構築し、このレポーター活性との比率とすることで補正を行った。網羅的な測定の結果、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の活性化パターンは主として Wnt 分子種への依存性が観察され、Wnt3, 3a で強い、Wnt1, 2 で中程度、Wnt7a, 9b で弱い活性化が認められた。Wnt/PCP 経路の活性化に関しても Wnt 分子種への依存性が高く、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の活性化とは相互に排他的なパターンを示し、Wnt5a, 5b, 7b, 11, 16 で一定程度の活性化が認められた。また、これら以外の Wnt 分子種に関しては、AP-1 レポーター活性はむしろベースラインより抑制される傾向が認められた。両経路の活性化には共受容体が関与すると考えられており、共受容体と各 Wnt 分子種の相互作用の有無が、シグナル経路の活性化を決定する主要因になっていると考えることで、一連の結果を説明可能と考えられる。一方 Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  経路に関しては、広範な Wnt-Fzd の

組み合わせで活性化が認められているが、比較的 Fzd 分子種に依存的な傾向が観察され、特に Fzd8 において強い活性化が認められた。Wnt/cAMP 経路の活性化に関しては Fzd 分子種への依存性が高く、Fzd1, 8 などで一定レベルの活性化が認められたが、その他の広範な組み合わせにおいて、cAMP レポーター活性はベースラインよりもむしろ抑制される傾向が認められた。両経路の活性化には三量体 G タンパク質の共役が関与する可能性が提唱されており、Fzd 分子種への依存性が強い傾向を説明可能と考えられた。中でも、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化には G<sub>i/o</sub> 型の三量体 G タンパク質が関与する可能性が指摘されており、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化が認められる多くの組み合わせにおいて、逆に cAMP 応答の抑制が認められる点を説明可能であると考えられた。さらに、全ての組み合わせにおける下流シグナル経路の活性化パターンに対してクラスター解析を行ったところ、Wnt 下流シグナルの活性化パターンは、大きく 5 種類に分類されることが明らかとなった。特に Wnt に関しては、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路を活性化する古典 Wnt と Wnt/PCP 経路を活性化する非古典 Wnt に大別されたが、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路に関しては、両者に広くまたがって活性化する組み合わせが認められ、古典経路と非古典経路という単純な分類では Wnt シグナル経路の下流活性化パターンは説明できないと考えられた。

## 第二章 Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化に関与する分子機構の探索

申請者は、第一章の解析で、古典 Wnt および非古典 Wnt に広くまたがる組み合わせで Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化が認められた点に特に着目し、この特徴が Wnt シグナル経路に関する一般的な特徴か、検証を試みた。MC3T3-E1 細胞において、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化が認められた複数の Wnt-Fzd の組み合わせを、マウス筋芽細胞様 C2C12 細胞に導入して、同様に測定を行ったが、いずれの組み合わせにおいても、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化は認められなかった。同時に測定した Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の活性化に関しては、C2C12 細胞においても強い活性化が認められている。また、他の GPCR リガンドを用いた刺激では、NFAT レポーターの活性化は C2C12 細胞においても検出されている。これらの点を考慮すると、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化は細胞種に大きく依存する可能性が示唆された。この点を踏まえて申請者は、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化が細胞種依存的に生じる理由を解明すべく、活性化に関与する分子機構の詳細を明らかにしようとして試みた。この研究が行われる以前の段階では、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化メカニズムとして 2 つの分子機構が提唱されている。一つは前章でも触れたように、Fzd が G タンパク質共役型受容体として Wnt を認識し、G<sub>i/o</sub> 型の三量体 G タンパク質が共役することで、小胞体から Ca<sup>2+</sup>が動員される機構である。もう一つは、多発性嚢胞腎の原因遺伝子として知られる Pkd1 が、Fzd 非依存的に Wnt を認識する受容体として機能し、Pkd1 と共役してカチオンチャネルを形成する Trpp2 を介して、細胞外から Ca<sup>2+</sup>が動員される機構である。これらの機構が細胞ごとに使い分けられているのか、共存して機能しうるのか、あるいは未知の別の機構が存在するのか、などは明らかされていなかった。そこで申請者は、Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路を強く活性化する Fzd8 をモデル分子として採用し、まず MC3T3-E1 細胞において G<sub>i/o</sub> の関与を検証した。Wnt8a/Fzd8/Lrp5 の導入によって誘導される NFAT レポーター活性の上昇は、百日咳毒素によって大きく抑制され、MC3T3-E1 細胞においては Wnt/Ca<sup>2+</sup>経路の活性化に G<sub>i/o</sub> の関与が示唆された。そこで申請者は、MC3T3-E1 細胞には発現しているが C2C12 細胞には発現していない何らかの分子が、G<sub>i/o</sub> の共役から Ca<sup>2+</sup>動員が生じるまでのプロセスの何れかの段階に介在している可能性を想定して、分子の探索を試みている。MC3T3-E1 および C2C12 細胞に N 末端に His タグを付加した Fzd8 および Wnt8a/Lrp5 を導入し、細胞膜透過性のクロスリンカーでタンパク質間の架橋を行った後、Fzd8 分子を含むタンパク質複合体を回収した。得られたタンパク質複合体をプロテアーゼ消化した後、ショットガン・プロテオミクス解析を行って、含まれるタンパク質を網羅的に同定した。同定されたタンパク質群の機能・発現関連を GeneMANIA により解析し、Wnt シグナル経路と何らかの関連性が報告されており、かつ MC3T3-E1 細胞選択的に検出される分子として、Trpp2 および Ptk7 の 2 種類を見出している。そこで、shRNA を MC3T3-E1 細胞に導入することで、これらの分子の内因性遺伝子発現を抑制した。その上で、Wnt8a/Fzd8/Lrp5 の導入によって誘導される NFAT レポーターの活性を評価した結果、Trpp2 の遺伝子発現抑制に伴ってレポーター活性の減弱が認められた。Trpp2 は Pkd1 以外にも、Trpc1 あるいは Trpv4 と複合体を形成して細胞膜に局在し、Ca<sup>2+</sup>透過性のカチオンチャネルを形成することが知られている。

申請者は、Fzd8 が細胞膜上でこのようなチャネルと、機能的に相互作用して  $\text{Ca}^{2+}$  を細胞外から動員している可能性を想定した。MC3T3-E1 細胞において、EGTA をメディウム中に添加して  $\text{Ca}^{2+}$  をトラップした条件下では、Wnt8a/Fzd8/Lrp5 による NFAT レポーターの活性誘導は強く抑制された。また、Trpp2 と複合体を形成する Trpc1 に対する阻害剤で処理した場合にも、NFAT レポーターの活性誘導の強い抑制が観察された。一連の結果を踏まえて、申請者は、MC3T3-E1 細胞においては、Fzd8 に共役した  $G_{i/o}$  型三量体 G タンパク質によって、細胞膜上の Trpp2-Trpc1 複合体が活性化され、細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$  が動員される、という新たな機構によって Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  経路の活性化が生じる、という新たなシグナル伝達機構の可能性を提唱した。

本研究を通じて申請者は、Wnt シグナル経路に関する包括的なシグナル活性化プロファイルを明らかにし、特に Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  経路の活性化パターンの特徴、および強い細胞種依存性を見出した。加えて、Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  経路の活性化分子機構として、細胞種依存性を説明可能な新たな仮説の提唱に至っており、Wnt 非古典シグナル経路に対して発展性のある知見を与えた。これらを踏まえ、本論文は博士（薬学）の学位請求論文として合格と認められる。