

ヒト羊膜上皮細胞における運命決定機構の解明 ～非古典型 Wnt シグナル経路の探索～

高野智圭¹⁾, 加賀三鈴²⁾, 太向勇²⁾, 相澤(小峯)志保子¹⁾, 三木敏生²⁾

Elucidation of fate determination mechanisms in human amniotic epithelial cells ～ Exploring the non-canonical Wnt signaling pathway～

Chika TAKANO¹⁾, Millei KAGA²⁾, Isamu TAIKO²⁾, Shihoko KOMINE-AIZAWA¹⁾, Toshio MIKI²⁾

要旨

ヒト羊膜上皮細胞 (hAEC) は胎盤を覆う羊膜から分離できる多能性幹細胞である。我々はこれまでに hAEC の多能性および分化の制御機構について検討し、hAEC の自発的分化には TGF- β 経路に依存する上皮間葉転換が関与することを示した。さらに一連のプロセスには Wnt/ β -catenin 経路の介在がある可能性を見出し、hAEC における古典型 Wnt 経路のスイッチング機構について解析を進めてきた。しかし他の多能性幹細胞では古典型 Wnt 経路のみならず非古典型 Wnt 経路もこのスイッチング機構に影響を及ぼすことが示唆されており、我々も先行研究で非古典型 Wnt 経路の重要なリガンドである WNT5A の mRNA 発現上昇を捉えていたことから、本研究では β -catenin に依存しない非古典型 Wnt 経路について解析することを目的とした。相対定量プロテオーム解析を用いて hAEC における網羅的蛋白発現を解析し、非古典型 Wnt 経路および関連蛋白の翻訳後修飾を抽出することが出来た。hAEC の分化には Wnt/PCP 経路をはじめとする複数のシグナル伝達経路が関与することが示唆され、今後さらなる解析を重ねて hAEC の運命決定機構に関する新たな知見に繋げたい。

1. はじめに

ヒト羊膜上皮細胞 (human amnion epithelial cells: hAEC) は胎盤の羊膜を覆う一層の上皮細胞である。胎生初期の幹細胞と同じ表面マーカーを発現し、三胚葉に分化する能力を持つことから、「胎盤由来幹細胞」のひとつと考えられている¹⁾。遺伝子的に比較的安定で腫瘍原性がないこと、免疫原性が低いことから、臨床応用つまり細胞移植治療に適した細胞と考えられている^{2,3)}。また細胞自体は通常分娩後に破棄される胎盤から容易に、かつ大量に分離できるため、ドナーへの侵襲はなく、実用可能性も高い。成熟肝細胞への分化能を有することから、これまでに先天性代謝異常症、特にアミノ酸代謝異常症やライソゾーム病の疾患モデルマウスを用いて、その治療

効果が明らかにされてきた^{4,5)}。その作用機序は移植された hAEC が肝臓内で機能的肝細胞に分化し、先天的に欠失していた酵素を作り出すことによる病態改善と考えられる。これらの知見より hAEC は先天性肝代謝異常症に対する細胞移植の有力な細胞源になり得る。

hAEC を細胞移植のソースとして用いることを考える場合、「多能性の制御」は生着効率や治療効果に影響する最も重要な因子である。我々は hAEC が持つ多能性の維持や、分化の制御に関わる分子機序について研究を行ってきた。胎盤から分離した hAEC は *in vitro* で培養を始めると直ちに TGF- β 依存性の上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) を起こす。TGF- β の Type I レセプター

1) 日本大学医学部 病態病理学系微生物学分野,
2) 日本大学医学部 生体機能医学系生理学分野
責任者連絡先: 高野智圭, takano.chika@nihon-u.ac.jp

(ALK5) 選択的阻害剤であるSB-431542を用いてEMTを抑制すると、hAEC特有の上皮様形態を維持したまま細胞を培養することができる。我々は過去にRNA-seqを用いた網羅的トランスクリプトーム解析により、TGF- β 依存性EMTを起こしたhAECは三胚葉への分化を示唆する遺伝子が優位に発現する一方、TGF- β 依存性EMTを抑制したhAECは多能性を示唆する遺伝子発現が優位であることを見出した。さらに細胞免疫染色や細胞表面糖鎖の解析等から「TGF- β 依存性EMTを抑制することによりhAECの多能性が保持される」ことを2022年に報告した⁶。哺乳類における他の多能性幹細胞においても、EMTが起こるにつれて細胞の多能性が失われるという報告があり、上記はそれに一致する結果であった。しかしながら、TGF- β 経路がhAECの多能性/分化に与える影響は直接的作用か、間接的作用かについて、さらなる解析が必要と考えられた。我々はRNA-seq解析の結果から、Wnt/ β -catenin経路の標的遺伝子も二群間で大きく変化することを見出していた。Wnt経路は胚発生における機能が知られており、体軸パターンの決定や細胞運命の決定などに関与するため、hAECにおける運命決定のプロセスにも介在している可能性が示唆された。

多能性幹細胞におけるWnt/ β -catenin経路には単なるON/OFFだけではなく、特有のスイッチング機構があることが知られている。核内に移行した β -cateninがp300もしくはCBPどちらのコアクチベーターと複合体を形成するかにより、分化もしくは自己複製の細胞運命が決まるとされている(図1)。さらにここで重要な鍵を握るDNA結合蛋白としてT cell factor (TCF) familyが知られている

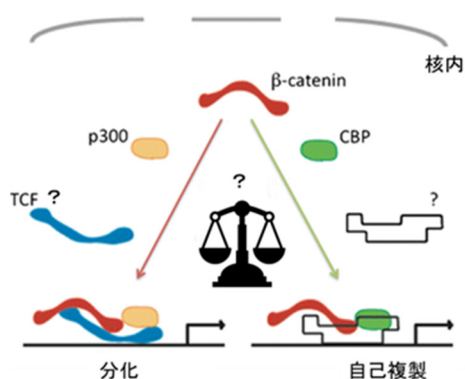


図1 Wnt/ β -catenin経路のスイッチング機構

が、自己複製に関わるCBPと複合体を形成するDNA結合蛋白は未だ不明であり⁷、特にhAECについてこの機序を検討した報告はない。前述のように我々は先行研究にて、TGF- β 依存性EMTを起こしたhAECと抑制したhAECでは、Wnt/ β -catenin経路の標的遺伝子発現が大きく異なることを見出した。DNA結合蛋白に関わる過去の報告を交えて遺伝子発現パターンを考察し、hAECにおいては「TCF7L2が β -catenin/p300と複合体を形成すると分化の運命決定がされ、TCF7L1が β -catenin/CBPと複合体を形成すると自己複製、つまり多能性維持の運命決定がされる」と仮説を立てた。本仮説については科学研究費助成事業の助成を受けて現在検証中である。

RNA-seq解析の結果では、培養したhAECにおいてWnt関連遺伝子であるWNT5AのmRNA発現上昇が見られていたことから、「古典型」Wnt経路のみならず β -cateninに依存しない「非古典型」Wnt経路も関与する可能性が示唆された。そこで本研究では、定量的プロテオーム解析を用いて、TGF- β 阻害剤を用いて培養した細胞と対照群における蛋白発現を比較し、hAECにおけるTGF- β 経路の部分的な不活化が非古典型Wnt経路に及ぼす影響を解析することを目的とした。さらには二群間における蛋白の翻訳後修飾を検出しPathway解析を行うことで、これまで着目してこなかった新たな制御機構を見出し、今後の研究の発展に繋がる知見を得ることを目的とした。

2. 対象及び方法

2-1. hAECの分離

日本大学医学部附属板橋病院 産婦人科で、研究対象者に研究内容を説明し、書面で同意書を取得した。患者選択基準は下記である。

- ① 本研究への参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、研究対象者本人または代諾者の自由意思による文書同意が得られた者
- ② 健常な妊産婦
- ③ 帝王切開術を予定されている者
- ④ HIVや肝炎ウイルスなどの感染症に罹患していない者（術前検査で確認）
- ⑤ 胎盤の病理検査を提出しない者

帝王切開手術の際に摘出された胎盤を収集した。

無菌操作にて羊膜を剥離し、十分な洗浄後、トリプシンによる酵素処理によりhAECを分離した。(倫理委員会承認番号: RK-220412-6)

2-2. hAECの培養

初代hAECは基本培地として、ダルベッコ改変イーグル高グルコース培地 (DMEM high glucose) に10%ウシ胎児血清, 1%非必須アミノ酸, 2mM L-グルタミン, 55 μ M 2-メルカプトエタノール, 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを加えた培地を用いて7日間培養した (Control群)。TGF- β 依存性EMTを阻害する目的で先行研究より使用しているTGF- β type Iレセプター (ALK5) の選択的阻害剤であるSB-431542を基本培地に10 μ M添加し, 同じく7日間培養した (SB-treated群)。いずれも37°C, 5% CO₂ 下で培養した。

2-3. 検討に用いるhAECの選出

異なる6名の妊婦から分離したhAECを培養し, 細胞接着率, 細胞生存数を記録し, 状態の良い3検体を検討に用いた。SB-431542を添加するとSMAD2/3のリン酸化が阻害され, そのフィードバックによりSMAD7のmRNA発現が上昇することが知られているため, 培養細胞からRNAを抽出し, Control群とSB-treated群におけるSMAD7発現解析を行い, 細胞の選出の指標とした。

2-4. プロテオーム解析

3検体のhAECを前述の2種類の培地で7日間培養し, それぞれControl群とSB-treated群の計6サンプルから, リン酸化阻害剤を含むタンパク質抽出試薬を用いて蛋白抽出を行った。その後の相対定量プロテオーム解析は, アプロサイエンスグループに委託した。ペプチドペアの同時同定と相対的定量化を行うため, 6サンプルはアイソバリック標識タンデム質量タグ (TMT pro TM 18plex Label Reagent Set) を用いて標識し, イオンクロマトグラフィーにはICAT[®] Cation Exchange Buffer Packを用いて, LC-MS/MS分析に供された。一部のサンプルはTitansphere[®] Phos-TiO Kitを用いてリン酸化ペプチドの精製・濃縮を行った後に, LC-MS/MS分析に供された。納品されたデータをもとに, Proteome Discoverer 3.0を用いて定量解析や二群間比較解析を実施した。

3. 結果

3-1. 蛋白定量解析

Control群とSB-treated群の計6サンプルの定量的プロテオーム解析により, 2332個のマスター蛋白が同定された。正規化された蛋白質量はサンプルによる個体差を認めなかった。PCA plotでSB-treated群にはやや個体間のばらつきが認められた。発現蛋白全体でエンリッチメント解析を行うと, 生物学的プロセスではCell organization and biogenesisおよびOther metabolic/ biological processesに関わる発現が高いことが示され, 一方でCell deathに関わる蛋白はほとんど検出されなかった。細胞の構成要素ではCytosol由来蛋白と同程度にNucleus由来蛋白も含有されていた。

個々の蛋白発現に着目するとControl群およびSB-treated群ともにWnt5aの発現が検出された。Wnt/ β -catenin経路に関わる蛋白を広くスクリーニングしたところ, 56の候補蛋白を抽出することが出来た。古典型Wnt経路であるTCF dependent signaling in response to WNTに関する蛋白発現のみならず, 非古典型Wnt経路である β -catenin independent WNT signalingのうち, PCP/CE pathway, Ca²⁺ pathway, WNT5A-dependent internalization of FZD4およびWNT5A-dependent internalization of FZD2, FZD5 and ROR2に関する蛋白が発現していた。

3-2. 発現変動蛋白の抽出

発現変動蛋白の統計解析処理により, 差次的発現する (P-value<0.05, Log2fold>0.5) 蛋白をControl群で42個, SB-treated群で55個抽出することが出来た。上位蛋白はcell organization and biogenesis, cell adhesion, protein metabolism, signal transductionに関わる蛋白であり, 予想通り上皮の増殖や接着に関わる蛋白発現が多かった。興味深いことに, Pathway解析では非古典型Wnt経路のWnt/PCP経路で重要な役割を果たすRho GTPaseファミリーに関する複数の蛋白が検出された。その他, 脱ユビキチン化酵素など翻訳後修飾に関わる蛋白も複数抽出することが出来た。

3-3. 蛋白質の翻訳後修飾

全マスター蛋白2332個のうち, 408個の蛋白のリン酸化が検出された。発現変動解析を行うとSB-

treated群の方が発現蛋白の翻訳後修飾が多いことがわかり、hAECにおけるTGF- β 経路のSMAD2/3のリン酸化阻害による他経路の活性化をスクリーニングすることが出来た。さらにSB-treated群で有意に発現する(P-value<0.05, Log2fold>0.5)蛋白を18個抽出することが出来た。上位蛋白はprotein metabolismに関わる蛋白であり、上記と同様に脱ユビキチン化酵素が含まれた。Pathway解析ではRho GTPaseファミリーや、同じくWnt/PCP経路で重要な役割を果たすRac1 GTPaseのリン酸化修飾が検出された。さらに β -catenin自体の翻訳後修飾を網羅的に解析することができ、Control群およびSB-treated群ともに特異的なセリンのリン酸化が検出された。

(図表や蛋白質名の詳細は別途学術誌に投稿予定のため掲載を控えた。)

4. 考察

本研究ではリン酸化蛋白質の相対定量プロテオーム解析により、培養した初代hAECの網羅的な蛋白発現を明らかにすることが出来た。さらに、EMTにより多能性と分化に影響を及ぼすTGF- β 経路の遮断による発現変動蛋白と翻訳後修飾が明らかとなった。hAECは胚盤胞を起源とする胎児由来の細胞であるが、胚発生に関わるWnt経路がhAECの分化にも関わることを示された。

前述のように我々が先行研究で行ったRNA-seq解析では、培養したhAECにWNT5AのmRNA発現の上昇を認めていたが、今回の解析でもControl群およびSB-treated群ともにWnt5a蛋白の発現が検出された。Wnt5aは非古典型Wnt経路を活性化する代表的なリガンドである。非古典的Wnt経路は β -cateninに依存しない経路であり、主に平面内細胞極性(Wnt/PCP: Planar Cell Polarity)経路とWnt/ Ca^{2+} 経路に二つが知られている⁸。前者のWnt/PCP経路では、WntリガンドがFrizzled (Fz) 受容体および共受容体に結合し、Disheveled (Dvl) タンパク質が活性化される。その後、RhoやRacなどのGTPaseが活性化され、これが細胞骨格の再構築や細胞の運動に関与する。最終的に、JNK (c-Jun N-terminal kinase) 経路が活性化される。後者のWnt/ Ca^{2+} 経路ではWntリガンドがFz受容体およびGタンパク

質共受容体に結合し、Gタンパク質を介してホスホリパーゼC (PLC) を活性化する。PLCは、 PIP_2 をイノシトール三リン酸(IP_3)とジアシルグリセロールに分解し、 IP_3 は Ca^{2+} 放出を刺激して細胞質 Ca^{2+} 濃度を上昇させる。カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ、カルシニューリン、およびその他のカルシウム依存性経路を活性化し、下流の遺伝子転写を引き起こす。本研究において発現変動蛋白を解析したところ、培養したhAECではWnt/PCP経路の活性化を示唆する蛋白が増加していた。翻訳後修飾の解析においてもRhoやRacなどのGTPaseのリン酸化修飾が検出されており、上記を裏付ける結果であった。我々はこれまで、SB-treated群における特徴的な細胞形態の変化や、多能性の維持について報告しており、この機構にWnt/PCP経路が関与している可能性が示唆されたが、個々の蛋白特異的な抗体を用いた発現解析や、関連するPathwayの活性化/遮断によるhAECの機能解析を含めたさらなる検討が必要である。さらに本研究では β -catenin自体のリン酸化部位も見出すことが出来たが、このリン酸化は細胞質および核の β -cateninレベルと転写調整を増加される機能が報告されており、今後の研究対象となる知見を得た。

多能性幹細胞のひとつであるヒトES細胞においても、その運命決定における古典型Wnt経路、非古典型Wnt経路の役割については複数の相対する議論がある⁹。つまり、Wnt経路の活性化は多能性の喪失につながるという報告もある一方で、Wnt経路が自己複製能の維持に不可欠とする報告もある。Wnt伝達が脊椎動物の初期発生中に体軸形成や、器官形成を制御するために重要であることは明らかであるが、多能性幹細胞の特徴の維持における役割は解明されていない。さらに非古典型Wnt経路においては、前述のWnt/ β -catenin経路のスイッチング機構を制御するとの報告もあるため、我々が科学研究費助成事業の助成を受けて検証中である古典型Wnt経路の解析に、本研究で得られた解析結果もあわせ、より広い視野で全体像を検討する必要がある。

本研究では非古典型Wnt経路に焦点を当てて解析を進めたが、hAECの網羅的な蛋白発現と定量解析は情報量が多く、Wnt経路の他にも分化や細胞遊

走に関わる様々な経路の関与や、翻訳後修飾が見出された。ここで得られた結果は運命決定に関わる研究のみならず、多岐に渡るシーズの抽出に使用することが出来る。我々は本研究の先に、hAECを用いた新規治療開発、再生医療としての臨床応用を目指している。hAEC製剤が実用化すれば、希少難治性疾患である多くの先天性代謝異常症の治療領域における画期的な第一歩となる可能性を秘めている。具体的にはアミノ酸代謝異常症、尿素サイクル異常症、ライソゾーム病、有機酸代謝異常症や脂肪酸代謝異常症など、単一遺伝子欠損による酵素活性の低下を主たる病因とする代謝疾患が広く適応となる。さらにはhAECの免疫寛容作用を生かし、代謝異常症以外の肝疾患、例えば肝線維症や劇症肝炎にも応用できる可能性がある。我々は本研究のような基礎研究を重ねるとともに、実装化に向けてhAEC製剤の作出にも取り組んでいる。

5. 結語

胎盤由来幹細胞であるhAECの網羅的蛋白解析を行い、主に非古典型Wnt経路における発現解析を行った。hAECの分化にはWnt/PCP経路をはじめとする複数のシグナル伝達経路が関わることが示唆された。さらなる検討を重ね、hAECの運命決定機構の解明に繋げたい。

謝辞

本研究についてお力添えを頂きました日本大学学術研究助成に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D.B. & Strom, S.C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* **23**, 1549-1559 (2005) .
- 2) Miki, T. A Rational Strategy for the Use of Amniotic Epithelial Stem Cell Therapy for Liver Diseases. *Stem Cells Transl Med* **5**, 405-409 (2016) .
- 3) Takano, C. *et al.* Clinical perspective on the use of human amniotic epithelial cells to treat congenital metabolic diseases with a focus on maple syrup urine disease. *Stem Cells Transl Med* **10**, 829-835 (2021) .
- 4) Skvorak, K.J. *et al.* Placental stem cell correction of murine intermediate maple syrup urine disease. *Hepatology* **57**, 1017-1023 (2013) .
- 5) Rodriguez, N.S. *et al.* Liver-Directed Human Amniotic Epithelial Cell Transplantation Improves Systemic Disease Phenotype in Hurler Syndrome Mouse Model. *Stem Cells Transl Med* **6**, 1583-1594 (2017) .
- 6) Takano, C. *et al.* Inhibition of Epithelial-Mesenchymal Transition Maintains Stemness in Human Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cell Rev Rep* **18**, 3083-3091 (2022) .
- 7) Miki, T., Yasuda, S.Y. & Kahn, M. Wnt/beta-catenin signaling in embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Stem Cell Rev* **7**, 836-846 (2011) .
- 8) Qin, K. *et al.* Canonical and noncanonical Wnt signaling: Multilayered mediators, signaling mechanisms and major signaling crosstalk. *Genes Dis* **11**, 103-134 (2024) .
- 9) Van Camp, J.K., Beckers, S., Zegers, D. & Van Hul, W. Wnt signaling and the control of human stem cell fate. *Stem Cell Rev Rep* **10**, 207-229 (2014) .