

論文の内容の要旨

論文題目：

A Role for Bone Morphogenetic Protein Signaling in Cardiomyocyte Differentiation

心筋細胞分化における BMP シグナルの役割

氏名： 門前 幸志郎

(背景および目的)

心筋細胞はそれ自体増殖能および再生能を持たないため、廃絶した心筋は二度と回復が望めないということが心臓病学における治療面での大きな問題であると考えられる。心筋細胞の分化、心臓の発生に関する基礎的研究の目標のひとつは、非心筋細胞から心筋細胞を分化誘導する手法を確立し、例えば分化誘導した心筋細胞を用いた不全心への細胞移植によって自己の細胞から心臓を再生させるといった、いわゆる再生医療の実現に寄与することである。

最近の分子生物学的アプローチの進歩によって、心臓の発生に関する研究についても分子レベルでの解明が進んできた。まず、心筋特異的ホメオボックス遺伝子であるショウジョウバエの *tinman* とその脊椎動物におけるホモログである *Csx/Nkx-2.5* が同定、解析された。*tinman*、*Csx/Nkx-2.5* はともに発生の非常に早期の段階から心臓に限局して発現している転写因子であり、遺伝子欠損モデル動物の解析などからその機能は正常な心臓の発生に必須のものであると考えられた。その後も他の心臓特異的転写因子である *MEF2C*、*GATA-4*、*HAND* などが相次いで同定、解析され、これらの因子が心筋細胞の分化から複雑な構造を持つ心臓の形態形成に至るまでの心臓発生の様々な段階で重要な機能を果たしていることが次第に明らかになってきている。

更に最近では、心臓予定中胚葉から心筋細胞への分化という心臓発生の最初の段階で、骨形成因子 *bone morphogenetic protein(BMP)* が重要な役割を果たしていることがわかってきた。*BMP* は *transforming growth factor-β(TGF-β)* や *activin* などとともに *TGF-β* スーパーファミリーに属する細胞増殖因子であるが、初期胚の発生において胚の腹側化を誘導する因子と考えられており、種々の組織、器官の形態形成に関与していることが明らかになりつつある。*BMP* の作用機序に関しては、*BMP* はリガンドとしてセリン・スレオニンキナーゼ型受

容体を介して細胞内にそのシグナルを伝達する。細胞内では Smad と呼ばれる転写活性化因子のリン酸化と複合体形成によってシグナルが核内へと伝えられ、特異的な遺伝子の転写が活性化されることが示されている。また最近では別のシグナル伝達因子として MAPKKK の一つである TAK1(TGF- β -activated kinase 1)が同定、解析されている。さらに最近では、転写因子 ATF-2 が BMP のシグナルを伝達する 2 つの経路である Smad 経路と TAK1 経路の共通の核内ターゲットとして働くことが示された。

近年、BMP が心臓の発生に関与しているという報告が続いた。ショウジョウバエ初期胚を用いた実験により、BMP の相同体である *dpp* は発生初期には背側外胚葉に局限して発現しているが、この領域に隣接する背側中胚葉（すなわち予定心臓領域）に *tinman* の発現を局限させる機能を有することがわかった。脊椎動物でも同様にニワトリ胚において、BMP-2 を予定心臓領域でない中胚葉に異所性に作用させると拍動する心筋細胞が誘導されることが示された。また、BMP-2 や BMP-4 のノックアウトマウスでは心臓の形成に種々の異常が認められたと報告されている。これらの結果から、BMP が心筋の分化を誘導する重要な因子の一つではないかと考えられた。しかしながら、BMP が分子レベルにおいて心臓の発生にどのように関与しているかについてはこれまで明らかにされていなかった。

これらのことから、心筋細胞分化における BMP の必要性を検討すること、また BMP により誘導される心筋細胞分化の分子メカニズムを解明することを目的として本研究を行った。

(方法)

本研究を行う上でのモデルとして、P19CL6 細胞を用いた。P19CL6 はマウスの奇形種由来の P19 細胞から限界希釈法にて分離された細胞株であり、ジメチルスルフォキシド(DMSO)存在下での接着培養で、ほとんどの細胞が自発的に拍動する心筋細胞に分化し、さらに心筋特異的遺伝子の発現を豊富に認めることから、心筋分化の研究に関して非常に有用なモデルであると考えられる。

この P19CL6 に様々な遺伝子やタンパクを作用させることによって、その心筋細胞への分化能がどのように変化するかを調べた。リポフェクション法による発現ベクターの導入とそれに引き続く neomycin による選択によって、BMP の阻害因子である *noggin* や抑制型 Smad である Smad6 を恒常的に過剰発現する P19CL6 の細胞株を得た。遺伝子の一過性の過剰発現はアデノウイルスを用いた遺伝子導入ないしリポフェクション法を用いて行い、BMP タンパクの作用については、天然型 BMP タンパクの培養液中への直接の添加により観察した。分化能の観察は DMSO 処理後の細胞形態の変化、自己拍動の有無と程度、抗 MHC 抗体による細胞免疫染色によって行った。また、心筋特異的遺伝子の発現は RT-PCR 法および Northern blot 法によって検出した。また遺伝子の過剰発現後の心筋特異的遺伝子の転写活性化はルシフェラーゼアッセイ法により測定した。

(結果および考察)

(Part I)

(1) BMP は P19CL6 の心筋細胞分化に必須の因子である

P19CL6 は、DMSO を含まない通常の培養液中で培養すると未分化の状態を保ったまま増殖を続けるのみであるが、1% の DMSO の存在下で培養すると抗 MHC 抗体 MF20 で染色され、単核で、規則的に自己拍動する心

筋細胞に高率に分化した。RT-PCR 法や Northern blot 法によって、心筋特異的転写因子である Csx/Nkx-2.5、GATA-4 および MEF2C、また心筋収縮タンパクである MHC や MLC2v の mRNA の発現が検出された。

noggin は BMP に直接結合して BMP のシグナル伝達を阻害する、すなわち BMP の antagonist として働くことが知られている。P19CL6 において BMP の機能を阻害するために、この noggin を恒常的に過剰発現させた P19CL6 の細胞株 P19CL6noggin を単離し、以下の解析を行った。

まず分化能を観察したところ、元来の P19CL6 と異なり、P19CL6noggin は DMSO の存在下においても拍動する筋細胞に分化しなかった。また抗 MHC 抗体にも染色陰性のままであった。ところがこの細胞に BMP-2 の発現ベクターを有するアデノウイルスを感染させ BMP-2 を一過性に過剰発現させるか、培養液中に BMP タンパクを添加して DMSO と共に培養したところ、再び MF20 陽性の拍動する筋細胞に分化した。ついで心筋特異的遺伝子の発現を調べたところ、上述の心筋特異的転写因子および心筋収縮タンパクについては元来の P19CL6 と異なり、P19CL6noggin では DMSO 処理によっても認められなかった。これらのことから、BMP が P19 細胞の筋細胞への分化に必須の因子であることが示唆された。

(2) BMP により誘導される筋細胞分化は MAPKKK である TAK1 を介している

次に P19CL6noggin に TAK1 ないし構成的活性型の TAK1 をトランスフェクションにより一過性に過剰発現させると、DMSO の存在下に再び抗 MHC 抗体陽性の拍動する筋細胞に分化した。逆に元来の P19CL6 に不活性型の TAK1 を過剰発現させたところ、抗 MHC 抗体染色陽性の拍動する筋細胞の割合が減少した。分化誘導後の遺伝子発現を観察すると、P19CL6noggin においても TAK1 ないし活性型の TAK1 を過剰発現させると本来検出されなかった心筋特異的遺伝子の発現が認められるようになった。これらのことから、BMP による筋細胞分化の誘導は少なくとも TAK1 の経路を介していることが示唆された。

(3) BMP による筋細胞分化の誘導は筋転写因子として Csx/Nkx-2.5 および GATA-4 を介している

さらに P19CL6noggin に 2 つの心筋特異的転写因子 CSX (マウス Csx/Nkx-2.5 のヒトホモログ) および GATA-4 を過剰発現させた。すると興味深いことにそれぞれ単独の過剰発現では P19CL6noggin は筋に分化しなかったが、両者の共発現により初めて筋細胞に分化した。mRNA 発現に関しても、両者を共発現した P19CL6noggin では元来の P19CL6 と同様の心筋特異的遺伝子の発現が認められた。また、筋に分化しなかった CSX の単独の過剰発現においても内因性の Csx/Nkx-2.5、MEF2C および MLC2v の発現は認められた。このことはこれらの遺伝子の発現が CSX 単独の作用で活性化される可能性を示唆している。以上により、BMP による筋細胞分化の誘導には転写因子として Csx/Nkx-2.5、GATA-4 の両者が関与していることが示された。

(Part II)

(4) BMP による筋細胞分化には Smad 経路が必須である

P19CL6noggin 細胞に BMP のシグナルを伝達する Smad である Smad1 と Smad4 の両者を一過性に過剰発現させたところ、筋細胞への分化能を回復し、心筋特異的遺伝子の mRNA の発現も誘導された。この筋細胞への分化の効率は、BMP タンパクの培養液中への添加によって上昇した。これらのことから、BMP により誘導される筋細胞分化は Smad を介していることが示された。

次に Smad によるシグナル伝達を阻害する抑制型の Smad である Smad6 に着目した。この Smad6 を恒常的に過剰発現する P19CL6 の細胞株 P19CL6Smad6 を単離し解析したところ、この細胞は元来の P19CL6 細胞と

は異なり全く心筋細胞へは分化せず、また心筋特異的遺伝子の発現も認められなかった。以上により、心筋細胞分化には Smad 経路の活性化が必須であることが示唆された。

(5) ATF-2 は心筋細胞分化において、Smad および TAK1 と協調的に作用して心筋特異的遺伝子の転写活性化を誘導する

近年、ATF/CREB ファミリー転写因子に属する ATF-2 が Smad および TAK1 の共通の核内ターゲットとして作用し、TGF- β 特異的遺伝子の転写活性化を制御することが示された。P19CL6 細胞の心筋細胞分化における ATF-2 の役割を調べるため、まずトランスフェクションによる遺伝子の過剰発現後の β MHC プロモーターの転写活性化をルシフェラーゼアッセイにより検出した。ATF-2 の過剰発現によって、 β MHC のプロモーター活性は上昇したが、Smad1/4 および活性型 TAK1 の過剰発現によって synergistic にさらに上昇することが示された。逆に ATF-2 による転写活性化の上昇は、抑制型の Smad6 あるいは不活性型の TAK1 の過剰発現によって抑制された。これらのことから、ATF-2 は BMP シグナルの下流の因子として Smad や TAK1 と協調的に作用して、心筋特異的遺伝子の発現を誘導することが示唆された。

(6) ATF-2 は P19CL6 の心筋細胞分化に重要な役割を果たしている

実際の心筋細胞分化に果たす ATF-2 の役割を調べるため、P19CL6 細胞に dominant negative 型の ATF-2 を過剰発現して ATF-2 の作用を抑制し、その分化能を観察した。すると dominant negative 型 ATF-2 を過剰発現した細胞は、元来の P19CL6 細胞よりも心筋細胞への分化の効率が有意に悪かった。この細胞における心筋特異的遺伝子の発現は減弱していた。また心筋特異的遺伝子のプロモーター活性も dominant negative ATF-2 の過剰発現によって抑制された。以上により、ATF-2 が P19CL6 細胞における心筋特異的遺伝子の発現誘導や心筋細胞分化に重要な役割を担っていることが示唆された。

(結論)

(1) BMP は P19 細胞の心筋細胞への分化に必須の因子である。

(2) BMP による心筋細胞分化は、MAPKKK である TAK1 と下流の心筋特異的転写因子として Csx/Nkx-2.5 および GATA-4 を介して誘導される。

(3) BMP により誘導される心筋細胞分化には、Smad 経路の活性化が必須である。

(4) ATF-2 は Smad および TAK1 と協調して、心筋特異的遺伝子の発現と心筋細胞分化に重要な役割を果たす。

(結語)

本研究の大きな意義は、BMP が心筋細胞分化に必須の液性因子であることを初めて見出し、その分子的メカニズムを一部解明できたことにあると考えられる。

P19CL6 の心筋細胞分化は DMSO の存在なしでは、たとえ BMP-2 を過剰発現させても誘導されないことから、BMP とは別の、DMSO によって誘導される未知の因子の作用も分化に必須であると考えられる。これらの未知の因子の同定が BMP と対をなすもう一方の心筋誘導因子の解明、ひいては心筋細胞分化、心臓形成の分子メカニズムの全貌の解明につながることを期待される。