

審査の結果の要旨

氏名 門前 幸志郎

本研究は、心筋細胞分化および心臓の発生において重要な役割を果たすと考えられる骨形成因子 BMP が関与する心筋細胞分化の分子的機序を明らかにするため、マウス胚性腫瘍細胞である P19 細胞から分離された心筋分化のモデル細胞である P19CL6 細胞を用いて、心筋細胞分化における BMP の必要性、BMP のシグナル伝達因子の重要性、BMP シグナルの下流で関与している転写因子などを解析しており、以下の結果を得ている。

1. BMP の特異的拮抗因子である noggin を恒常的に過剰発現する細胞株

P19CL6noggin を単離しその分化能を解析したところ、元来の P19CL6 細胞がジメチルスルフォキシド (DMSO) の添加によって高率に拍動する心筋細胞に分化するのに対して、P19CL6noggin 細胞は DMSO 処理によっても心筋細胞へは分化しなかった。心筋特異的転写因子や心筋特異的収縮関連タンパクの mRNA の発現も P19CL6 とは異なり、P19CL6noggin においては認められなかった。ところがこの P19CL6noggin に BMP-2 を過剰発現するアデノウイルスを感染させるか、もしくは培養液中に十分量の BMP タンパクを添加して培養したところ、DMSO 存在下において一部拍動する心筋細胞へ分化した。これらのことから、BMP が心筋細胞の分化に必須の液性因子であることが示唆された。

2. P19CL6noggin に BMP を始めとする TGF- β superfamily のシグナルを伝達する MAPKKK である TAK1 を lipofection 法を用いて一過性に過剰発現させ DMSO 存在下に培養したところ、一部拍動する心筋細胞への分化能を回復し、心筋特異的遺伝子の発現も認められた。逆に元来の P19CL6 に不活性型の TAK1 を過剰発現させたところ、心筋細胞への分化能が減少した。以上により、BMP により誘導される心筋細胞分化は少なくとも TAK1 を介していることが示唆された。

3. P19CL6noggin に 2 つの主要な心筋特異的転写因子である Csx/Nkx-2.5 と GATA-4 を作用させてその分化を観察した。Csx/Nkx-2.5 あるいは GATA-4 それぞれ単独の過剰発現によっては P19CL6noggin は心筋細胞への分化能を獲得しなかったが、両転写因子の同時の過剰発現によって DMSO 存在下に一部拍動する

心筋細胞へ分化し、心筋特異的遺伝子の発現も認められた。このことから、BMPにより誘導される心筋細胞分化には Csx/Nkx-2.5 と GATA-4 の両転写因子が関与していることが示唆された。

4. TGF- β superfamily の細胞内シグナル伝達因子である Smad のうち、BMP のシグナルを特異的に伝達する Smad1 とリガンド特異的 Smad に結合して核内へ移行する働きを持つ Smad4 を P19CL6noggin に過剰発現して、その分化能を調べた。Smad1 あるいは Smad4 それぞれ単独の発現では P19CL6noggin は心筋細胞へは分化しなかったが、両者同時の過剰発現により一部拍動する心筋細胞へと分化し、心筋特異的遺伝子の発現も認められた。また、Smad 経路を遮断する働きを持つ抑制型 Smad である 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、P19CL6Smad6 は心筋細胞への分化能を喪失していた。これらのことから、Smad 経路の活性化が BMP により誘導される心筋細胞分化に必須であることが示唆された。
5. Smad 経路と TAK1 経路の共通の核内ターゲットであることが最近示された転写因子 ATF-2 の心筋細胞分化における役割を調べるため、まず P19CL6 へのトランスフェクションによる β MHC プロモーターの活性化を解析した。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 および活性化型 TAK1 の過剰発現によって活性は synergistic に更に上昇した。逆に ATF-2 による活性の上昇は、抑制型の Smad6 あるいは不活性化型 TAK1 の過剰発現によって抑制された。以上により、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、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. 実際の心筋細胞分化に果たす ATF-2 の役割をみるため、P19CL6 に一過性に dominant negative 型の ATF-2 を過剰発現してその分化能を観察したところ、元来の P19CL6 よりも心筋細胞への分化の効率が有意に悪く、心筋特異的遺伝子の発現も減弱していた。また、心筋特異的遺伝子のプロモーター活性も dominant negative 型 ATF-2 の発現によって有意に抑制された。これらのことから、ATF-2 が P19CL6 における心筋特異的遺伝子の発現誘導や最終的な心筋細胞への分化に重要な役割を担うことが示唆された。

以上、本論文はマウス胚性腫瘍細胞株 P19CL6 を用いて、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、そのシグナル伝達因子として TAK1 経路や Smad 経路が介在していること、さらに下流の因子として転写因子 ATF-2 が重要な役割を担うことを明らかにした。本研究は、これまでほとんど不明であった BMP により誘導される心筋細胞分化の分子的メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものであると考えられる。