

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	胡 文字
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Smad4 regulates the nuclear translocation of Nkx2-5 in cardiac differentiation （Smad4 は心筋分化において Nkx2-5 の核移行を制御する）			
論文審査担当者			
主 査	教 授	東 幸仁	印
審査委員	教 授	高橋 信也	
審査委員	教 授	中野 由紀子	
〔論文審査の結果の要旨〕 <p>心臓は、他の臓器の発達に必要な血液循環システムを確立するための臓器で、最も初期に形成される。これまでに、Wnt、Bmp、Fgf 経路など含む多くのシグナル伝達ネットワークが、心臓の発生に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。このシグナル伝達ネットワークが心臓の発生を制御する分子機構の詳細を理解することは、先天性心疾患のメカニズムを解明すると共に再生医療の新しいアプローチを開発していく上で重要である。</p> <p>Bmpシグナルは、心臓特異的な転写因子の転写活性化を介して、心筋細胞を含む多くの細胞系譜の運命決定に関与すると考えられている。Bmp リガンドの結合により受容体が活性化されると、Smad1/5/8 などの Receptor regulated (R-)Smad がリン酸化され、Common (Co)-SmadであるSmad4と複合体を形成する。その後、複合体は核内に移動して、標的遺伝子の転写を制御する。これまでに、Bmpシグナルは心筋分化に必須な遺伝子群を制御することが示されているが、心筋細胞の運命決定における Bmp シグナルの役割は明らかになっていない。</p> <p>Smad4 は、Bmpシグナルの共通のエフェクターとして中心的役割を果たしているため多くの研究が報告がある。これまで、<i>Smad4</i> 遺伝子を欠損させたマウスの胚は、胎生7.5日の時点で原腸陥入が阻害されて胎生致死となることから、Smad4が中胚葉の形成に必須であることが示唆される。一方、心筋細胞特異的な <i>Smad4</i>-KOマウスを用いた解析では、Smad4が心筋細胞の増殖と分化に関与していることが明らかになっている。しかし、心筋細胞が分化する過程でのSmad4 の機能はまだ不明であった。今回、心筋前駆細胞で発現することを報告しているWntリガンドのデコイ受容体である <i>Sfrp5</i> の遺伝子座に Cre recominaseをコードする遺伝子を挿入したマウスと、<i>Smad4</i> 遺伝子を Cre が発現した細胞で欠損させることができる <i>Smad4^{floxex/floxex}</i> マウスを掛け合わせ、心臓前駆細胞特異的に <i>Smad4</i> 遺伝子を欠損させたマウスを作製し、心筋細胞が分化する過程における Smad4 の機能を解析した。</p> <p><i>Smad4</i>-cKO マウスは胎生9.5日までに胎生致死となり、心臓の低形成が認められた。心臓に於ける各遺伝子の発現を RT-PCR 法で検討したところ、<i>Nkx2-5</i> などの心筋特異的遺伝子の発現が低下していることを確認した。この結果から、Smad4を介して心筋特異的な転写活性化が起こらないために胎生致死となることが推察された。これまでに、心筋分化に必須な転写因子をコードする <i>Nkx2-5</i> 遺伝子のエンハンサー領域に Smad と結合する部位が存在し、Bmpシグナルが<i>Nkx2-5</i> 遺伝子の転写を直接制御することが報告されており、<i>Nkx2-5</i>-KO マウスの表</p>			

現型が *Smad4*-cKO マウスの表現型と類似していたため、*Nkx2-5* の発現消失が胎生致死に至る主な原因であると予測した。*in situ* hybridization 法で *Nkx2-5* の発現を確認したところ、その発現は減弱しているものの明確なシグナルが検出された。この観察から、*Nkx2-5* の発現契機には必須でないことが示された。一方、機能タンパク質が存在するか否かを免疫組織学的方法で確認したところ、*Nkx2-5* の核内局在が認められないことが明らかとなった。*Smad4* が、*Nkx2-5* の核内移行を制御している可能性が示唆された。

Smad4 による *Nkx2-5* の核内移行の制御機構を明らかにするため、まず、*Nkx2-5* の核内移行シグナル (NLS) のリン酸化状態を規定する因子の発現状態を確認した。*Nkx2-5* は、Casein kinase (CK)-2 や Protein phosphatase (PP)-1 によって NLS のリン酸化状態が規定され、核内移行が制御されることが知られているが、*Smad4*-cKO マウスにおいてもそれらの発現が影響を受けないことが示された。次に、*Smad4* が R-Smad と同様に *Nkx2-5* と直接結合して、核内移行が制御される可能性を考え、免疫沈降法を用いた実験を行った。その結果、*Smad4* が *Nkx2-5* と直接結合することを明らかになった。また、Importin や Exportin といった核内移行を制御する因子と結合する MH1 ドメインではなく、R-Smad と結合する MH2 ドメインを介して *Nkx2-5* と結合することも明らかにした。さらに、*Smad4*-cKO マウス胚由来の心筋細胞に *Smad4* を導入すると、*Nkx2-5* の核内局在が回復すること、*Smad4*^{Floxed/Floxed} マウス胚由来の線維芽細胞では、外因性の *Nkx2-5* の核内移行が確認されるが、Cre を導入することによって *Smad4* を欠損させると、核内移行が阻害されることが示された。これらの結果から、*Smad4* が *Nkx2-5* の転写だけでなく、これまで明らかとなっていなかった核内局在化も制御することが強く示唆され、*Smad4* が心筋細胞の分化に重要な役割を果たしていることを明らかとした。本研究によって得られた知見は、ES や iPS 細胞などからの心筋分化誘導技術の開発という再生医療の実現にむけての活用が期待される。

以上の結果から本研究は心臓形成の発生学的理解に資するところ大である。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。