

博士論文審査結果の要旨

学位申請者 足立 淳 郎

主論文 1 編

NFAT5 regulates the canonical Wnt pathway and is required for cardiogenic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 426:317-323, 2012

審査結果の要旨

NFAT5 (nuclear factor of activated T cells 5) は、NF- κ B とカルシニューリン依存性 NFATc を含む Rel family に属する転写因子である。NFAT5 は浸透圧刺激によって活性化される事が知られているが、浸透圧と無関係に細胞の遊走や増殖に関与する事も知られている。しかし NFAT5 の心筋細胞分化における働きに関しては明らかでない。本研究では、マウスの奇形腫細胞に由来し多能性幹細胞の性格を有する P19CL6 細胞を用い心筋細胞分化における NFAT5 の働きを調べた。

申請者は、はじめに NFAT5 蛋白は P19CL6 細胞の未分化状態において発現しているが、心筋細胞分化に伴い徐々に減少し、分化第 10 日には殆ど検出不可能なまでに減少する事を確認した。これに対し NFAT5 の mRNA は心筋分化の過程で減少傾向を示さない事も確認した。

さらに申請者は、心筋細胞分化過程にある P19CL6 細胞をシクロヘキシミド処理する事により、分化第 8 日において NFAT5 蛋白の安定性が低下している事を確認した。また分化第 12 日において MG132 を用いてプロテアソームの働きを阻害する事により NFAT5 が用量依存性に増加する事を確認した。更に免疫沈降を実施する事により NFAT5 のユビキチン化が無い事を確認した。

次に申請者は心筋細胞分化における NFAT5 の生理機能を解明するために、ドミナントネガティブ NFAT5(NFAT5DN)を恒常的に発現する P19CL6 細胞株(P19CL6-NFAT5DN 細胞)を樹立した。この P19CL6-NFAT5DN 細胞において未分化状態での未分化マーカーである Oct3/4 と Nanog の mRNA の発現や BrdU アッセイにて評価した細胞増殖能は、コントロールとして用いた GFP 発現株 (P19CL6-GFP 細胞)との間に差がない事を確認した。さらに、サルコメリックミオシン蛋白の発現と、心筋細胞特異的転写因子である Nkx2.5, GATA4 と心筋収縮蛋白の α MHC, cTnI の mRNA が P19CL6-GFP 細胞と比べ P19CL6-NFAT5DN 細胞において減少している事を確認した。そこで中胚葉分化への影響を調べるため心筋分化早期(0~84 時間)において Brachyury と Mesp1 の発現を評価したが、これらも同様に P19CL6-NFAT5DN 細胞において減少していた。

また、申請者は中胚葉形成の際、その活性化が必要とされる Wnt/ β カテニン経路の評価を TOPflash レポーターアッセイによって実施した。その結果 P19CL6 細胞において Wnt/ β カテニン経路の活性は NFAT5DN の過剰発現にて著明に抑制される事を確認した。NFAT5 を介した Brachyury 発現における古典的 Wnt 経路の関与を確かめるために選択的 GSK3 α/β の阻害剤である BIO ([20Z, 30E]-6-

bromindirubin-30-oxim) を用いたところ、P19CL6-NFAT5DN 細胞株において抑制されていた Brachyury の発現が増大する事が確認できた。また Wnt シグナルのメディエーターである Wnt3, Wnt3a の発現は P19CL6-NFAT5DN 細胞で抑制され、Wnt 拮抗物質である Cerberus1 と Dkk1 の遺伝子発現も P19CL6-NFAT5DN 細胞で抑制される事を確認した。

以上が本論文の要旨であるが、幹細胞の心筋細胞分化における NFAT5 の新たな役割が明らかとなり、これらの知見が心筋細胞への分化誘導技術の向上に寄与すると考えられる点で、医学上価値のある研究と認める。

平成 28 年 4 月 21 日

審査委員 教授 伊 東 恭 子 ㊞

審査委員 教授 的 場 聖 明 ㊞

審査委員 教授 太 田 凡 ㊞