

論文内容の要旨

論文提出者氏名 足立 淳郎

論文題目

NFAT5 regulates the canonical Wnt pathway and is required for cardiogenic differentiation

論文内容の要旨

NFAT5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細胞を用い心筋分化におけるNFAT5の働きを調べた。

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NFAT5蛋白発現は徐々に減少し、分化第10日には殆ど検出不能なまでに減少した。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かった。

心筋細胞分化過程にあるP19CL6細胞をシクロヘキシミドで処理したところ分化第8日においてNFAT5蛋白の安定性が低下していた。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したところNFAT5蛋白は用量依存性に増加した。ユビキチンとNFAT5の関連を調べるために免疫沈降を行ったが、NFAT5のユビキチン化を認めなかった。これらの結果から、心筋細胞分化過程におけるNFAT5蛋白の減少にはユビキチン非依存性のプロテアソーム分解の機序が存在する事が判った。

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)との間に差を認めなかった。

心筋細胞への分化誘導にて、サルコメリックミオシンタンパクの発現はP19CL6-GFP細胞と比較してP19CL6-NFAT5DN細胞にて減少していた。心筋細胞特異的転写因子であるNkx2.5、GATA4や心筋収縮蛋白の α MHC、cTnIのmRNA発現も、P19CL6-GFP細胞と比べP19CL6-NFAT5DN細胞において減少していた。

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時間~84時間)において中胚葉マーカーであるBrachyuryと心筋中胚葉マーカーであるMesp1の発現を評価したが、BrachyuryもMesp1もP19CL6-GFP細胞と比較してP19CL6-NFAT5DN細胞において減少していた。

中胚葉形成の際、Wnt/ β カテニン経路の活性化が必要である事が示されている。P19CL6細胞の心筋細胞分化誘導後のWnt/ β カテニン経路の活性化をTOPflashレポーターアッセイにて評価した。P19CL6細胞において、Wnt/ β カテニン経路の活性は心筋細胞分化誘導開始後24時間から上昇を始め48時間後にピークとなり72時間後には減衰した。そしてこの活性化はNFAT5DNの過剰発現にて抑制された。NFAT5を介したBrachyuryの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を用いた。BIOによる古典的Wnt経路活性化によって、P19CL6-NFAT5DN細胞株において抑制されていたBrachyuryの発現は増大した。更にWntシグナルのメディエーターの発現を調べたところ、P19CL6-GFP細胞におけるWnt3、Wnt3aの発現はそれぞれ心筋細胞分化誘導開始後48時間と72時間にそのピークがあり、P19CL6-NFAT5DN細胞ではこれらの発現が抑制されていた。またWnt拮抗物質として知られるCer1とDkk1の発現を調べたところ、Cer1はP19CL6-GFP細胞ではピークが二峰性であり分化0時間と48時間に存在するのに対しP19CL6-NFAT5DN細胞では発現が抑制されており、Dkk1はP19CL6-GFP細胞では48時間から60時間にその発現のピークがあるが、これもP19CL6-NFAT5DN細胞では抑制されていた。

これらの研究によって、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になった。内因性NFAT5は心筋細胞への分化初期における一時的なWntリガンドとその拮抗物質の発現する事により心筋細胞分化を制御すると考えられる。これらの知見は心筋細胞への分化誘導技術の向上に寄与するものと思われる。