

京都大学	博士（医学）	氏 名	中島 康弘
論文題目	The Search for Nkx2-5-regulated Genes Using Purified Embryonic Stem Cell-derived Cardiomyocytes with Nkx2-5 Gene Targeting (遺伝子改変 ES 細胞由来心筋細胞を用いた Nkx2-5 が制御する遺伝子の探索)		
(論文内容の要旨)			
心臓特異的転写因子は、心臓発生及び心筋分化において重要な役割を果たしている。これらの転写因子がどのようなターゲット遺伝子を制御しているかを明らかにする事は、同過程における分子メカニズムを理解する為に重要である。ノックアウトマウスを用いて多くの解析がなされたが、心臓特異的転写因子欠損マウスの多くは発生早期に胎生致死となる為、心形成異常に伴う循環動態の異常が遺伝子発現に影響する事や心臓の mRNA が微量しか得られない事により、これらの転写因子に起因する遺伝子発現変化を捉えるのが困難であった。中心的な心臓特異的転写因子の一つ Nkx2-5 に着目し、その心臓発生・心筋分化における制御遺伝子を明らかにする為に、ES 細胞の <i>in vitro</i> 分化系を用いた新たな解析法を確立した。 ネオマイシンにより心筋細胞のみを選別可能で、かつ、Nkx2-5 の発現量の異なる心筋細胞を分化する 3 ラインのマウス ES 細胞ラインを作成した。Nkx2-5 遺伝子座にネオマイシン耐性遺伝子を相同組換えする事により Nkx2-5 +/- ラインを作成した。両アレルの相同組換えにより Nkx2-5 -/- ラインを、また、Nkx2-5 +/- ラインの myosin light chain 2v 遺伝子座に Nkx2-5 cDNA をノックインする事により、Nkx2-5 過剰発現ラインを作成した。これらを hanging-drop 法により分化させた後、ネオマイシンにより心筋細胞を純化した。3 ラインともネオマイシン選別により拍動する心筋コロニーが得られた。各ラインの選別 ES 細胞由来心筋細胞の選別度及び心筋マーカーの発現をリアルタイム PCR により確認した。非心筋マーカーの発現はネオマイシン選別後約 2 % に減少を認め、非心筋細胞は十分に除去された。Nkx2-5 の発現は、Nkx2-5 -/- ラインでは認めず、過剰発現ラインでは、+/- ラインに比べ 1.4 倍の発現増加を認めた。Natriuretic peptide precursor type A 等の既知 Nkx2-5 下流遺伝子の発現は、Nkx2-5 -/- ラインで減少、過剰発現ラインで増加を認め、<i>in vivo</i> での以前の研究の結果と合致していた。次に、DNA マイクロアレイを用いて選別 ES 細胞由来心筋細胞の発現プロファイルをライン間で比較した。Nkx2-5 の発現量に伴ってライン間で発現が増加又は減少する遺伝子を、Nkx2-5 により促進的又は抑制的に制御される候補遺伝子として選出し、4 倍以上の変化を認めた遺伝子をそれぞれ 2 3 遺伝子、2 7 遺伝子同定した。一部の遺伝子について、ライン間で有意な発現変化がある事をリアルタイム PCR により確認した。これらには心筋分化促進に関わる可能性のある遺伝子 R-spondin 3 (Rspo3)、TGF β receptor 3(TBR3)が含まれていた。これらが遺伝子上流に Nkx2-5 結合配列を持つかを <i>in silico</i> で検討した。Rspo3 と TBR3 には、ヒト・マウス・ラット間で完全に保存された結合配列を認めた。TBR3 の上流プロモーター領域 7 0 6 bp をルシフェラーゼベクターにクローニングし、H9C2 細胞を用いてプロモータールシフェラーゼ解析を行った。Nkx2-5 結合配列の変異によりプロモーター活性はベースラインへ減少し、<i>in vitro</i> において Nkx2-5 が同部位を介して直接的に TBR3 の転写制御を行う事が示唆された。			

本研究により、ES 細胞由来心筋細胞における Nkx2-5 依存的変化を示す遺伝子群が明らかとなり、心臓発生及び心筋分化において Nkx2-5 が制御する遺伝子発現の可能性を明らかにした。 (論文審査の結果の要旨) Nkx2-5 は心臓発生において重要な心臓特異的転写因子の一つである。Nkx2-5 が心臓発生において制御する遺伝子群について、申請者は ES 細胞由来心筋細胞を用いた検討を行った。 Nkx2-5 発現量が異なり、かつ、ネオマイシンで選別可能な ES 細胞由来心筋細胞を得る為に、マウス ES 細胞に遺伝子改変を行った。Nkx2-5 遺伝子をネオマイシン耐性遺伝子で置き換えた ES 細胞ラインである Nkx2-5 neo/neo、Nkx2-5 +/-neo 及び、後者の Mlc2v 座に Nkx2-5 cDNA をノックインした ES 細胞ラインを新たに作成した。これらから得られた ES 細胞由来心筋細胞において、既知の Nkx2-5 下流遺伝子は各ラインの Nkx2-5 発現量に従った発現変化を示した。 DNA マイクロアレイにより各 ES 細胞由来心筋細胞ラインの遺伝子発現を比較し、Nkx2-5 依存的な変化を示す遺伝子群を新たに見出した。そのうち TGFβ receptor 3 について、Nkx2-5 が直接的に制御する可能性を <i>in vitro</i> において示した。 以上から、申請者は Nkx2-5 の機能を解析する為の新たな ES 細胞ラインを作成し、その遺伝子発現解析により Nkx2-5 が心臓発生過程で制御する可能性のある遺伝子群を示した。 以上の研究は心臓発生における分子機序の解明に貢献し、心臓特異的転写因子 Nkx2-5 の役割を明らかにする上で寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 2 2 年 1 月 4 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			