

機関番号：14401
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790985

研究課題名 (和文)

心筋細胞分化誘導システムを用いた肥大型心筋症発症機構の解明

研究課題名 (英文)

In vitro analyses of the pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy by using cardiomyocyte differentiation system

研究代表者

岡田 陽子 (OKADA YOKO)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：30457022

研究成果の概要 (和文)：

胎児期より発症するレオパルド症候群に伴う肥大型心筋症発症機構について、心筋細胞分化モデルである P19CL6 細胞を用いて解析を行った。レオパルド症候群型の変異 SHP2 タンパクを発現させると、コントロールや、ヌーナン症候群型の変異 SHP2 を発現させたのに比較して、心筋細胞の最終分化が抑制されており、心筋前駆細胞の増殖活性が上昇していた。また、成熟した心筋細胞のサイズも大きくなっていた。この異常には、Akt/GSK3 β / β -catenin のシグナル異常が関連していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

The mechanisms of cardiac hypertrophy associated with LEOPARD syndrome were analyzed by using P19CL6 cells, which is a convenient cardiomyocyte differentiation model in vitro. The LEOPARD-type mutant SHP2 attenuated the terminal differentiation of cardiomyocyte with increased proliferative activity, as compared to the controls and Noonan-type SHP2 mutant. It also induced cardiomyocyte hypertrophy. These alterations were associated with the dysregulation of Akt/Gsk3 β / β -catenin pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：心筋症，心筋細胞，分化誘導，肥大シグナル，レオパルド症候群

1. 研究開始当初の背景

レオパルド症候群は、特徴的な顔貌異常や発育遅延などを示す、常染色体優性遺伝の奇形症候群である。また、70-80%と非常に高率に肥大型心筋症を発症することが知られている。レオパルド症候群は、その臨床的特徴からヌーナン症候群関連疾患として位置づけられており、2003年、レオパルド症候群においても、ヌーナン症候群と同様 PTPN11 遺伝子が責任遺伝子として同定された。PTPN11 遺伝子がコードしている SHP2 (Src homology-2 protein tyrosin phosphatase) は、細胞内の多くの重要なシグナル伝達に関与しており、生体内でユビキタスに発現している。ヌーナン症候群においては、この SHP-2 変異体の酵素活性が正常に比べて著しく上昇しており、その下流の Ras/ERK 系の活性化が表現型に影響を及ぼすと考えられているが、逆に、レオパルド症候群における SHP-2 変異体は、酵素活性が著しく低下していることが発見された。

また、臨床疫学的データや自験例から、レオパルド症候群における肥大型心筋症は、ヌーナン症候群よりも発症頻度が高く、より重症度が高いと考えられている。しかしながら、現在までのところ、酵素活性の低い SHP-2 変異体をもつレオパルド症候群において、心筋肥大を誘導するメカニズムについてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

我々は、前述の臨床疫学データや自験例から、レオパルド症候群においては、胎児期より肥大型心筋症を発症する症例が少なからず存在することに注目し、肥大型心筋症発症には心筋細胞の分化発生異常が関与しており、遺伝子異常が心筋肥大を発生段階より促進し

ていると考えた。このことを検証するため、まず、多分化能幹細胞から心筋細胞への分化段階において SHP-2 変異が及ぼす影響について検討を行うことにした。具体的には、心筋細胞に分化する P19CL6 細胞に、変異型 SHP-2 を発現させたのち、心筋細胞に分化誘導することによって、in vitro における心筋細胞の形態変化や、心筋分化に関連する転写因子群の発現変化、心筋構造タンパク生成の変化などについて解析を行い、心筋分化における SHP-2 が果たす役割という観点から、レオパルド症候群の心筋肥大メカニズムの解明にせまることが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

P19CL6 細胞は、マウスの embryonal carcinoma 由来で、自己複製能と多分化能を有する細胞である。この細胞は 1%DMSO 添加培地で培養することによって約 10 日間で高率に心筋細胞に分化するため、心筋細胞分化研究において広く用いられている。我々はこの P19CL6 細胞を用いて、変異型 SHP2 が心筋細胞分化に及ぼす影響とそのメカニズムについて検討を行うこととした。

(1) レンチウイルスベクターを用いて、変異型 SHP2 を恒常的に発現する P19CL6 細胞を作成する。

レンチウイルスベクター cFUGW2 に、我々が新規に発見したレオパルド型 SHP2 変異である、Q510E 変異 (SHP2-Q510E) を組み込んだ。この変異体は、近年、他の研究者によっても、胎児期から重症肥大型心筋症を呈する変異として追加報告されている。対照として、ヌーナン型の SHP2 変異で一般的である D61N 変異 (SHP2-D61N) と、野生型 SHP2 (WT-SHP2)、GFP のみ発現する

レンチウイルスベクターを作成した。これらを、P19CL6 細胞に感染させ、恒常発現するクローンをそれぞれ 3 クローン採取した。ウェスタンブロット解析により、それぞれの変異体発現量が等しいことを確認した。

- (2) それぞれの変異体 SHP2 発現 P19CL6 細胞を心筋細胞に分化誘導する。

それぞれの P19CL6 細胞の培地に 1%DMSO を添加することによって、心筋細胞に分化誘導した。分化誘導後 0,3,6,9,12,15 日目に細胞を固定し、 α -actinin による免疫染色を行い成熟心筋細胞の area を計測した。また、タンパク、RNA を回収し、 α -actinin、 α -myosin heavy chain の発現量を測定し、心筋分化効率を比較した。また、増殖能の解析のため、0,2,6,9,12 日目に EdU を 30 分間取り込ませ、それを Alexa488 で発光させ、FACS で EdU 取り込み能を解析した。

- (3) それぞれの変異体 P19CL6 細胞から形成される心筋細胞の大きさを測定する。

1%DMSO 含有培地で P19CL6 細胞を培養し、成熟心筋細胞を得る。その後、trypsin 処理にて細胞を浮遊させ、1 つは、ラミネンでコートしたスライドガラスの上に播種し、翌日に α -actinin で免疫染色して陽性となった心筋細胞の面積をコンピュータソフトで計測した。もう 1 つは、浮遊細胞のまま α -actinin で免疫染色し陽性細胞の前方散乱光を FACS で解析した。

- (4) 変異体 P19CL6 細胞の細胞内シグナルを解析する。

それぞれの変異体 P19CL6 細胞に EGF を添加し、リン酸化 Akt、GSK3 β をウェスタンブロット解析で検討した。また、核タンパクを抽出し、核内 β -catenin を

ウェスタンブロットで測定した。

- (5) PI3K/Akt inhibitor LY294002 を添加することで、心筋細胞分化が回復するか検討した。

4. 研究成果

- (1) レオパルド型変異体 SHP2-Q510E は心筋細胞分化を抑制していた。

SHP2-Q510E 変異体 P19CL6 細胞は、他の変異体やコントロールと比較して、有意に心筋細胞への分化が抑制されていた。(図 1) これは、 α -MHC によるウェスタンブロットや定量的 Real-time PCR 解析でも明らかであった。(図 2)

図 1

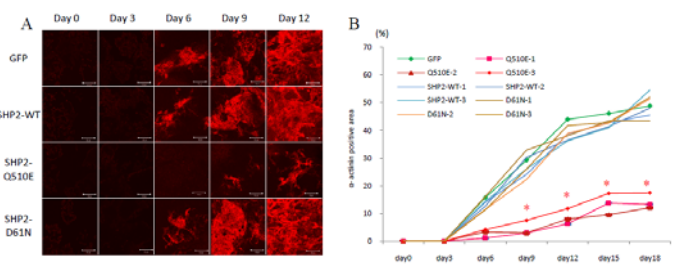
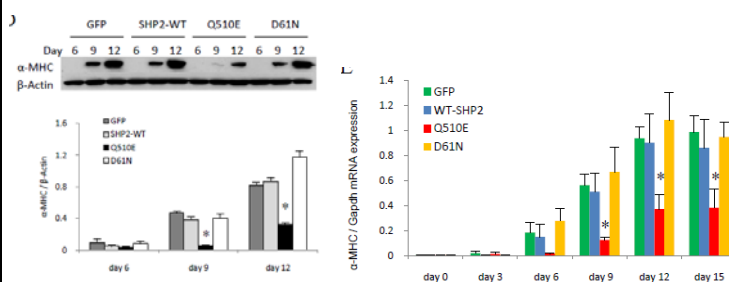


図 2



- (2) SHP2-Q510E 変異体 P19CL6 細胞では、心筋前駆細胞までの分化ではなく、最終分化が抑制されており、増殖活性の上昇した心筋前駆細胞が多く認められた。

EdU の取り込み能の解析から、SHP2-Q510E 変異体 P19CL6 細胞では、増殖活性の高い細胞がより多く残存している事が明らかになった。(図 3) また、Gata4, Nkx2.5, Tbx5 といった、心筋細胞分化段階で認められる転写因子の発現

は、それぞれの変異体間での差を認めず (図 4)、SHP2-Q510E 変異体では、心筋前駆細胞段階への分化は正常であるものの、心筋構造タンパク発現といった最終分化段階が抑制されていることが示唆された。

図 3

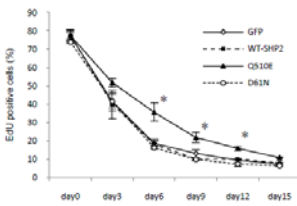
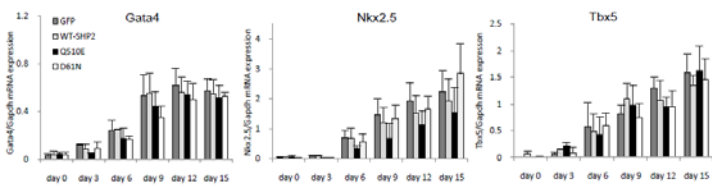
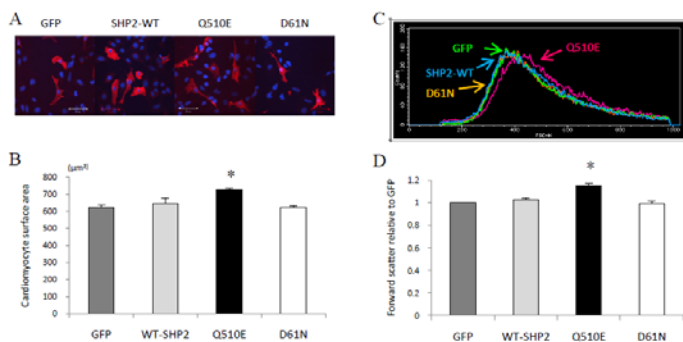


図 4



(3) 分化後の心筋細胞の大きさは、レオパルド型変異体では大きくなっていった。細胞表面積測定と FACS 解析の両者において、SHP2-Q510E 変異体では、分化してできた心筋細胞のサイズが有意に大きくなっている事が示された。(図 5)

図 5



(4) レオパルド型変異体では、Akt の活性化と GSK3β の活性低下が認められ、さら

に、分化後段階での核内 β-catenin の蓄積が上昇していた。

SHP2-Q510E 変異体では、EGF 刺激による Akt と GSK3β のリン酸化上昇が認められた。(図 6) さらに、分化後段階 (分化 12 日目) での核内 β-catenin の発現が上昇しており (図 7)、これまでの報告と総合すると、レオパルド型変異体では、PI3K/Akt 系の活性上昇に伴い、GSK3β の活性が低下し、これが β-catenin の上昇につながり、心筋最終分化を抑制している事が推察された。

図 6

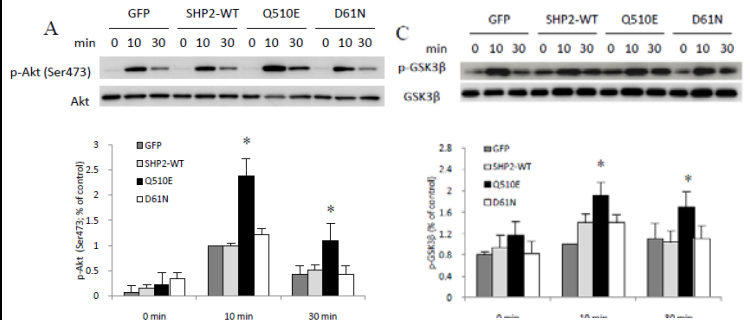
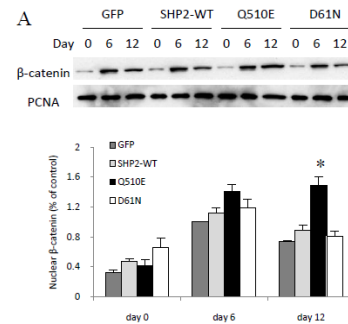


図 7



(5) PI3K/Akt inhibitor である、LY294002 添加により、レオパルド型変異体の心筋細胞分化抑制は改善し、心筋細胞肥大も改善した。

1%DMSO 含有培地による心筋細胞分化途中の day6 より、LY294002 を培地中に添加することによって、SHP2-Q510E 変異体の心筋細胞分化抑制は部分的に回復した (図 8)。また、核内 β-catenin の上

昇も改善していた (図 9)。さらに、分化後の心筋細胞のサイズも正常化していた (図 10)。これらの結果から、SH2-Q510E 変異体では、Akt/GSK3 β / β -catenin 経路の異常により、心筋細胞の最終分化が抑制され、それによって、増殖活性の高い細胞がより多く長く残存するとともに、個々の心筋細胞も Akt/GSK3 β 経路によって肥大することで、より重症の肥大型心筋症が胎児期より発症するということが示唆された。

図 8

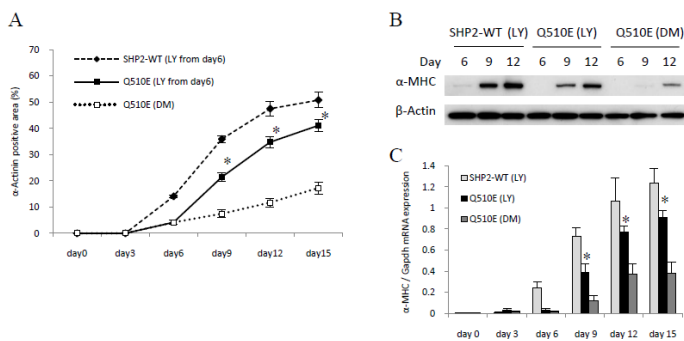


図 9

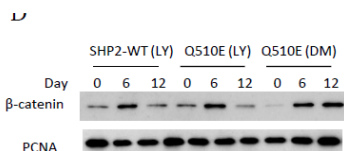
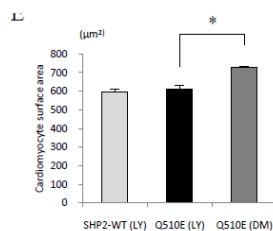


図 10



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

① Ishida H, Okada Y, Ichimori H, Narita J, Kogaki S, Ozono K
LEOPARD type SHP2 mutant Q510E attenuates cardiomyocyte differentiation via aberrant β -catenin signaling and promotes cardiomyocyte hypertrophy by PI3K/Akt pathway.

Keystone Symposia Mechanisms of Cardiac Growth, Death, and Regeneration 2011, 2011.02.03, Keystone Colorado USA

② 石田秀和, 岡田陽子, 市森裕章, 成田淳, 小垣滋豊, 大藪恵一

心筋細胞分化誘導システムを用いた LEOPARD 症候群における肥大型心筋症発症機構の解明

日本小児循環器学会 2010, 2010.07.06-9, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 陽子 (OKADA YOKO)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座 助教

研究者番号：30457022

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：