Osaka University Knowledge Archive

Title	LEOPARD-type SHP2 mutant Gln510Glu attenuates cardiomyocyte differentiation and promotes cardiac hypertrophy via dysregulation of Akt/GSK3β/β-catenin signaling
Author(s)	石田, 秀和
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58985
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【26】

氏　　名	石　田　秀　和（いし だ ひで かず）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学　位　記　番　号	第　２４９８７　号
学位授与年月日	平成24年１月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	LEOPARD-type SHP2 mutant Gln510Glu attenuates cardiomyocyte differentiation and promotes cardiac hypertrophy via dysregulation of Akt/GSK3β/β-catenin signaling （レオパルド症候群型のSHP2変異体Gln510GluはAkt/GSK3β/β-catenin シグナル異常を介して心筋細胞分化を抑制し、心筋肥大を誘導する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　大薗　恵一 （副査） 教　授　澤　　芳樹　　教　授　菊池　　章

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

LEOPARD症候群(LS)は、特異的な顔貌異常や骨格奇形などを来す、Noonan症候群（NS）類縁の先天奇形症候群である。LSの原因遺伝子の一つに*PTPN11*遺伝子の点変異があり、この遺伝子は、脱リン酸化酵素SHP2(Src homology 2-containing protein phosphatase)をコードしている。SHP2は、RAS/ERK系の活性化に重要な役割を担っているが、LSにおいては、NSとは逆に、このSHP2の酵素活性が低下している。また、LSの特徴として、胎児期や乳児期から高率に重度の肥大型心筋症（HCM）を来すことが知られているが、その発症メカニズムは解明されていない。近年、我々は新生児期より重度のHCMを合併したLS患者から新規のSHP2変異である

Gln510Glu (Q510E)変異を同定した。後の研究では、このQ510E変異は、胎児期など特に早期から重症HCMを来すことが報告されている。そこで今回、心筋細胞分化段階におけるLS型変異SHP2の働きに着目し、HCM発症機序の解明にせまることとした。

〔　方　　法　〕

マウスembryonal carcinoma cell由来のP19CL6細胞は、1%DMSO含有下で培養すると約10日間で自己収縮する心筋細胞へと分化誘導できる。このP19CL6細胞にlentivirusベクターを用いて、LS型SHP2変異体（Q510E）を恒常発現させたP19CL6細胞株を樹立した。コントロールとして、NS型SHP2変異体（D61N）、野生型SHP2（WT-SHP2）、GFP（native SHP2発現のみ）を発現するP19CL6細胞株を作成した。これらのP19CL6細胞における心筋細胞への分化過程を観察し、LS型SHP2変異体の影響を検討した。

〔　成　　績　〕

心筋構造タンパクである、α-actininやα-myosin heavy chain を用いた免疫染色やウエスタンブロット、定量的リアルタイムPCR解析の結果から、LS型Q510E変異体を発現させたP19CL6細胞は、コントロールに比較して心筋細胞分化が遅延していることが判明した。さらに、EdU取り込み能をフローサイトメトリーにて解析したところ、LS型Q510E変異体では、分化過程において増殖活性の高い細胞がより多く認められた。また、Nkx2.5、Gata4、Tbx5といった心筋細胞分化に関わる転写因子群の発現には差がなかったことから、LS型Q510E変異体では、心筋lineageへのcommitmentは正常であるが、myofibrillogenesisが遅延しているものと推察された。さらに、細胞内シグナル解析では、Q510E変異体においては、Akt、GSK3βのリン酸化上昇が見られた。また、分化後期段階において核内β-cateninの高い集積が認められた。PI3K/Akt inhibitorであるLY294002を分化後期段階に培地に添加すると、核内β-cateninの集積は抑制され、心筋細胞の分化遅延は部分的に回復した。一方、分化後の成熟心筋細胞について、そのサイズを免疫染色による細胞面積測定とフローサイトメトリーによる前方散乱光測定によって解析したところ、LS型SHP2変異体Q510Eにおいては、コントロールと比較して有意にそのサイズが大きくなっていた。また、LY294002の添加することによって、その効果はキャンセルされた。

〔　総　　括　〕

最近、LS患者の皮膚線維芽細胞を用いた研究において、LS型SHP2変異体が、Aktの活性を上昇させ、GSK3βの活性を低下させるという報告がなされているが、本研究では、心筋細胞のlineageにおいても同様のシグナル変化が起きている事が確認された。これまでの研究から、β-catenin シグナルは、心筋細胞分化初期段階においてはcardiac lineageへのcommitmentを誘導するとともにexpansionを促進するが、分化後期段階においては心筋細胞のmyofibrillogenesisを抑制すると考えられている。さらに最近、β-cateninシグナルが心筋細胞の数的増加を引き起こすという研究も報告されている。本研究では、LS型SHP2-Q510E変異体において、心筋分化段階での増殖能亢進を示唆する結果が得られたが、in vitro研究の限界があり、生体内での動態についてはさらなる研究が必要である。一方、本研究では、成熟心筋細胞の個々のサイズもLS型変異体では大きくなっていることが明らかになった。これは、最近報告された、LS患者iPS細胞を用いた研究やマウスモデルにおける研究と一致する結果であった。

これらの結果から、LS型変異体SHP2は、Akt/GSK3β/β-cateninシグナル経路に異常をきたし、その結果、心筋lineageでのmyofibrillogenesisを遅延させexpansionを促すとともに、一方で、myofibril形成を終えた個々の心筋細胞に対しては、従来より知られた肥大シグナルであるAkt系の活性上昇により細胞肥大を誘導するという可能性が示唆された。すなわち、心筋細胞の数的増大と形態的肥大が相加的に影響し、胎児期から重度のHCMを呈する可能性がある。

論文審査の結果の要旨

先天的な奇形症候群のひとつである、LEOPARD症候群の患者は、胎児期や乳児期から重度の肥大型心筋症をきたすことがあるが、その原因となるメカニズムは明らかではない。近年、この症候群はSHP2と呼ばれるタンパク質の変異によって引き起こされることが明らかになってきた。申請者らは、心筋細胞分化段階におけるLEOPARD型変異SHP2の役割に着目し、この変異型SHP2は、その下流のAktシグナルに異常をおこすことによって、心筋細胞自体が大きくなるということを明らかにした。それに加えて、さらに下流のβカテニンシグナルに異常をきたすことで、心筋細胞の分化を遅延させることを明らかにした。また、このことは幼若な心筋細胞系譜がより長く残存することにより、成熟心筋細胞の数が増大する可能性についても示唆していると考えられる。先天的に発症する肥大型心筋症が、個々の心筋細胞のサイズの増大だけでなく、数的増大も関連している可能性を示唆しているという点において、申請者の論文は独創的かつ画期的であり、本学における博士（医学）の学位授与にふさわしいと考える。