

博士論文

骨格筋発生分化における
転写因子 Lhx2 の機能解析

小高 悠作

目次

略語	3
要旨	4
総合序論	7
第一章	
序論	10
材料と方法	12
結果	18
考察	24
図表	26
第二章	
序論	37
材料と方法	39
結果	40
考察	42
図表	44
総合考察	50
参考文献	53
謝辞	60

略語一覽

ES cells, embryonic stem cells

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium

FBS, fetal bovine serum

PS, penicillin-streptomycin

FGF-2, fibroblast growth factor-2

RT-PCR, reverse transcription PCR

Gapdh, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

PBS, phosphate-buffered saline

MyHC, myosin heavy chain

siRNA, short interfering RNA

ChIP, chromatin immunoprecipitation

bps, base pairs

Bmp4, bone morphogenetic protein 4

Tgf β , transforming growth factor beta

要旨

LIM ホメオボックス型転写因子である *Lhx2* は、発生において必須なタンパク質である。*Lhx2* ノックアウトマウスは、肝臓における造血発生が起こらず胎生致死となる。また、発生期における *Lhx2* の発現部位は、前脳、眼、嗅上皮、神経管、そして肢芽において確認されている。*Lhx2* はこれら組織で細胞の増殖と分化を制御していると考えられている。転写因子である *Lhx2* の作用機序として、*Lhx2* のホメオドメインを介した転写活性機構が知られている。鰓弓中胚葉における *Myf5* 遺伝子、神経前駆細胞における *Pax6*、*Cer1* 遺伝子、脳下垂体における甲状腺刺激ホルモンと卵胞刺激ホルモンをコードする遺伝子のプロモーターに結合し、転写を活性化することが報告されている。*Lhx2* の標的となるタンパク質と下流エフェクター遺伝子は、組織細胞ごとに異なっているが、肢芽における作用標的は未だにわかっていない。肢芽は、後に骨格筋や骨などに分化する前駆細胞で構成されており、先行研究では *Lhx2* が筋発生に関与していることがわかっていたため、*Lhx2* は肢芽において骨格筋の発生に作用しているものであると考えられた。

そこで、*Lhx2* が骨格筋分化に作用するかを明らかにするために、*Lhx2* を筋芽細胞株 C2C12 細胞に過剰発現させ、効果を調べた。すると、*Lhx2* を過剰発現した C2C12 細胞では、筋管形成能が消失することを見出した。このとき、筋脱分化因子として知られている *Msx* ホメオボックス遺伝子や、*TGFβ* スーパーファミリー遺伝子群の発現増加が認められた。本研究では、この現象の分子機序解析を通して骨格筋の発生分化における *Lhx2* の役割を明らかにすることを目指した。

Lhx2、*Msx1*、*Msx2* は、いずれもマウス胎仔肢芽において高発現していることが先行

研究により明らかとなっている。そこで、Lhx2 が *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の転写に必須であるかどうかを明らかにするため、胎生 11.5 日齢マウス胎仔の肢芽を単離し、Lhx2-siRNA レトロウイルスベクターをスピニン感染法によって感染させた。この肢芽を、寒天上で 3 日間器官培養を行った後、*Lhx2*、*Msx1*、*Msx2* の mRNA 発現レベルをそれぞれ解析した。Lhx2 の発現が抑制された肢芽では、*Msx1*、*Msx2* 共に遺伝子発現量が減少していた。従って、Lhx2 は *Msx1*、*Msx2* 遺伝子上流で働いていることが示唆された。

次に、Lhx2 が、*Msx1*、*Msx2* 遺伝子を直接転写制御しているか、レポーターアッセイを用いて検討した。先行研究により、Lhx2 のコンセンサス結合配列が明らかとなっている。*Msx1* は、転写開始点上流-1795 から-1790 base pair(bp)と、-1309 から-1304 bp 領域に、*Msx2* は、-267 から-262 bp と、-186 から-181 bp 領域に、それぞれ 2 ヶ所ずつ Lhx2 コンセンサス結合配列を有していた。これらのゲノム DNA 領域を含む pGL3 ベクターを 293T 細胞にトランスフェクトしたところ、*Msx1* 遺伝子の-2097 から-1189 bp 領域を挿入した場合に、Lhx2 依存的なルシフェラーゼ活性が約 48 倍増大し、*Msx2* 遺伝子の-533 から+73 bp 領域を挿入した場合に約 4 倍増大した。さらにこの活性は、Lhx2 結合配列を欠失させると有意に低下した。これらの結果より、Lhx2 はコンセンサス結合配列を介して直接 *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の転写を制御していることが示唆された。

つづいて、Lhx2 が *Msx1*、*Msx2* のコンセンサス結合配列に結合しているか、ゲルシフトアッセイにより解析した。*Msx1*、*Msx2* 遺伝子上流域のコンセンサス結合配列を含んだ 20 mer のオリゴヌクレオチドを ^{32}P で末端標識し、Lhx2 を過剰発現させた 293T 細胞から単離した核抽出タンパク質と反応させたところ、電気泳動移動度が遅くなった ^{32}P 標識バンドが検出された。これらのバンドの位置は、抗 Lhx2 抗体存在下では上方に

スーパーシフトした。一方で、コンセンサス結合配列を改変したオリゴでは、これらの³²P 標識バンドは検出されなかった。

さらに、生体内で Lhx2 が *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の転写制御を行っている証拠を得るために、肢芽を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイを行った。マウス胎仔肢芽のクロマチン分画を、抗 Lhx2 抗体とコントロール抗体を用いて免疫沈降を行い、PCR によって比較した。その結果、抗 Lhx2 抗体の免疫沈降物中に、*Msx1*、*Msx2* 遺伝子のプロモーター領域がそれぞれ検出された。

最後に、この Lhx2 の転写制御様式は、他の遺伝子についても同様に行われるのかを確かめるために、鰓弓において Lhx2 が転写制御する *Myf5* 遺伝子を、肢芽を用いた ChIP アッセイにより確認した。すると、先行研究と同様に Lhx2 が *Myf5* 遺伝子上流で結合することがわかった。しかしながら、*Myf5* 遺伝子の発現レベルは増加しなかったことから、組織特異的に存在するコファクターと協調しながら転写制御することが示唆された。

以上の実験結果は、Lhx2 が *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の転写制御領域に結合していることを証明する。骨格筋発生の前組織である肢芽では、まず間葉系組織の増殖成長がおこる。Lhx2 は *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の転写を正に制御することによってそのプロセスをサポートする。そして、TGF β など他の下流エフェクター遺伝子の発現誘導を介して骨格筋系への早期分化を抑制しているものと推察される。また、Lhx2 の転写制御機構は組織特異的な転写因子と協調しながらそれぞれの発生分化に作用することが考えられる。

総合序論

多細胞生物の発生は、多様なシグナル伝達の積み重なりによって制御されている。シグナル伝達の様式として、シグナルのリガンドが受容体に結合し、修飾される。修飾された受容体は、二次シグナルを発し、情報はカスケードを伝わる。最後に転写因子を活性化(または抑制)し、転写因子は遺伝子を活性化する。そして、その細胞における必要なタンパク質が合成される。このとき、転写因子は複合体を形成し、その組み合わせによって活性化する遺伝子が異なる。転写因子複合体が厳密に時間、空間的な作用をすることにより、細胞の適切な分化が誘導される。すなわち、生命現象を理解する上で、分化する組織ごとのシグナル伝達機構や、転写に必要な分子を明らかにすることは非常に重要である。

近年、iPS 細胞を用いた再生医療への応用研究が進んでいる。iPS 細胞は分化多能性を持つことから、それぞれの臓器、組織に分化誘導する方法が再生医療に必要とされている。特定の組織へ分化誘導するひとつのアプローチとして、その組織の発生において必要な転写因子を強制発現する方法が用いられている。iPS 細胞から特定の組織に分化誘導するためには、発生段階における転写因子の機能と作用標的が明らかになっていることが、iPS 細胞の分化誘導に必要な転写因子を探索する上でおおいに役立つと考えられる。本博士論文においては、細胞の分化、増殖において重要な役割を担っている転写因子 *Lhx2* に着目し、その作用機序を明らかにすることにした。

Lhx2 は LIM ホメオボックス型転写制御因子のひとつであり、眼や脳の発生、そして成体型造血の成立に必須な役割を果たす [1]。先行研究によると、*Lhx2* には毛包幹細胞の機能を制御し、iPS 細胞から分化誘導した造血幹細胞を体外増幅する活性がある [2, 3]。マウスの胎生期において、*Lhx2* は眼、脳、神経、鰓弓、肢芽などで発現しており [4-8]、

これらの組織において、細胞の分化や増殖に作用していると考えられている。

Lhx2 の作用機序として、Lhx2 のホメオドメインが各種遺伝子のエンハンサー／プロモーター領域に散在する TAATTA という配列に結合することが知られている [5]。これまでのところ、Lhx2 は、鰓弓由来の咽頭筋の *Myf5* 遺伝子 [9]の他に、脳下垂体において糖タンパク質ホルモン α サブユニット遺伝子と甲状腺刺激ホルモン β サブユニット遺伝子を [10, 11]、そして神経前駆細胞において *Pax6* 遺伝子と *Cerberus 1* 遺伝子を転写制御することが報告されている [12]。これらの Lhx2 標的遺伝子は、いずれも組織特異的な発現様式を持つ遺伝子である。

筋組織に着目すると、Lhx2 は心筋と咽頭筋の発生に関与する転写因子群のひとつであり、下流で働く標的遺伝子群も同定されている [9]。骨格筋については研究が遅れているが、ショウジョウバエでは Lhx2 オルソログである *apterous* が骨格筋の発生に必須であることが示された [13, 14]。マウスにおいても、Lhx2 は胎仔肢芽に発現している [15]。肢芽に存在する沿軸中胚葉由来の筋芽細胞は、肢芽の発達に伴い活発に増殖し、骨や結合組織の発達と同調しながら分化して筋繊維を作り出す。Lhx2 ノックアウトマウスの四肢は正常に発生するが、そのホモログである *Lhx9* とのダブルノックアウトマウスは、四肢形成がほとんど起こらない [16]。この実験事実は、ニワトリ胚では *cLhx2* 遺伝子が肢芽の成長に必須であることと一致する [17]。以上の先行研究結果から、Lhx2 は哺乳類の骨格筋発生に必須の役割を果たしていることは確かであるが、標的遺伝子を含めてその作用機序はまだ明らかになっていない。

本博士論文においては、筋芽細胞に Lhx2 を過剰発現させる実験を皮切りに、骨格筋の発生分化過程における Lhx2 の生理的機能にアプローチした。第一章では、Lhx2 が

筋脱分化因子である *Msx1*, *Msx2* 遺伝子の転写を活性化することを明らかにした。第二章では、*Lhx2* が *Bmp4* と *Tgfβ* ファミリーメンバー遺伝子の発現を誘導することを証明した。これらの発見を通じて、骨格筋特異的な *Lhx2* の作用機序の一端を解明することに成功した。

第一章

序論

骨格筋を構成する筋原繊維は、筋芽細胞の分化・融合によってできる多核の筋管から作られている。他の臓器や組織と同様に、骨格筋の分化は、系統特異的な転写因子群によって調節されている。まず、*Myf5*、*MyoD* 遺伝子が筋芽細胞で強く発現し、次いで、*myogenin*、*Myf6* 遺伝子が発現することで、筋管形成が誘導される [18]。成体の骨格筋では、骨格筋系統の幹細胞である筋衛星細胞が筋管の周囲の基底膜に局在する。激しい運動などによって筋肉が損傷を受けると、通常は G₀ 期で分裂停止している筋衛星細胞が増殖を開始し、分化・融合によって壊れた筋管を修復する [19]。しかしながら、哺乳類や鳥類が手足の切断などの激しい損傷を受けた場合には、筋組織が再生することはない。対照的に、イモリなどの有尾両生類では手足を切断しても骨や筋肉を含む組織全体の再生が起こり、一定期間の後に完全に元の形へ戻る。これらの動物種では、成熟した骨格筋の筋細胞が間葉系幹細胞のステージまで脱分化し、再び増殖・分化を始めることが知られている [20]。

骨格筋を脱分化させる転写因子として、*muscle segment homeobox* の *Msx1* 遺伝子が最もよく知られている [21]。筋分化の誘導実験に用いられる筋芽細胞株 C2C12 に *Msx1* 遺伝子を強制発現させると、一度筋管形成した C2C12 細胞が筋芽細胞の状態まで脱分化する [22]。有尾両生類の四肢再生過程においても、*Msx1* 遺伝子の発現が確認されている。しかし、哺乳類モデルの代表であるマウスにおいては、*Msx1* 遺伝子は発生期の肢芽などでのみ発現しており、成獣の骨格筋では発現していない [23]。肢芽においては、*Msx1* と相同な *Msx2* 遺伝子も同時期・同部位に発現している。*Msx1* 遺伝子と *Msx2*

遺伝子は、四肢の発生において骨格筋の脱分化に関与していると推測されている [24]。興味深いことに、肢芽の発生時には、LIM ホメオボックス型転写因子をコードする *Lhx2* 遺伝子も同じ場所に発現しているが、その役割は解明されていない。*Msx1* と *Lhx2* はタンパク質複合体を形成するという報告があるため [25]、両者は骨格筋の脱分化に協調的に働いている可能性がある。

そこで本研究では、筋芽細胞への *Lhx2* 過剰発現実験を通じて、骨格筋における *Lhx2* の機能を明らかにすることを試みた。この章では、*Lhx2* が *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の上流転写因子として、それらの発現を正に制御することを証明した一連の実験的証拠を記述する。

材料と方法

細胞培養

マウス筋芽細胞株 C2C12 と、ヒト胎児腎臓由来細胞株 293T 細胞は、ATCC (Manassas, VA)より購入した。5 % CO₂、37 °C条件下において、10 %のウシ血清 (FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA)と、1 % ペニシリン-ストレプトマイシン (PS; Sigma, St. Louis, MO)を含んだダルベッコ改変イーグル培養液 (DMEM; Sigma)にて培養した。骨格筋の筋衛星細胞は、7-8 週齢のメスマウスの後肢より単離し [26]、20 % FBS、1 % PS、そして塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2; 10 ng/ml; Peprotech, Rocky Hill, NJ)を含んだ DMEM 培養液にて培養した。C2C12 と、マウス筋衛星細胞は、2 % ウマ血清 (HS; Invitrogen)と、1 % PS を含んだ DMEM 培養液にて培養し、筋分化を誘導した。

遺伝子導入実験

Lhx2 の過剰発現実験には、レトロウイルスベクター pMY-ires-EGFP を用いた。pMY-Lhx2 ires-EGFP、あるいは空ベクターを PLAT-E 細胞に Fugene HD (Promega, Madison, WI)を用いてトランスフェクトし、培養上清中のレトロウイルスを、細胞や組織に感染させた[7]。レトロウイルスに感染した細胞は、FACS(BD FACS ARIAIII; BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて、GFP 陽性細胞をセルソーティングすることにより選別した。

実験動物

C57BL/6 マウスと妊娠マウスは、日本 SLC (浜松)より購入し、筋衛星細胞と肢芽の単離実験に用いた。マウスは、特定病原体フリーの動物実験飼育室にて、12 時間の明

暗サイクルの条件下で飼育した。なお、すべての動物実験プロトコールは、東京都医学総合研究所の動物実験倫理委員会にて事前承認されている。

RT-PCR

Trizol reagent (Invitrogen)を用いて total RNA を抽出した。500 ng の RNA を PrimeScript RT master mix (Takara)を用いて逆転写し、cDNA 合成を行った。1/20 量の cDNA を、Taq ポリメラーゼ (Takara)による PCR 反応に供した。表 1 に、PCR に用いたプライマー配列を示した。基質量コントロールとして、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (*Gapdh*)を PCR 増幅した。リアルタイム RT-PCR は、SYBR premix ExTaq II (Takara)を用いて、LightCycler480 system (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)にて行った。mRNA の発現強度は、*Gapdh* を内在コントロールとして相対値で表した。

免疫蛍光染色

C2C12 細胞と筋衛星細胞は、Lab-Tek Chamber slide (Nunc, Roskilde, Denmark)上で培養し、4% パラホルムアミドを含んだ PBS に 10 分間浸して固定した。0.5% Triton X-100 を含む PBS 溶液に室温で 15 分間浸して透過処理を行った後、2% ウシ血清アルブミン (Sigma)を含む PBS 溶液で 1 時間ブロッキング反応を行った。一次抗体には、ヤギ抗 Lhx2 抗体 (1:100; Santa cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、マウス抗 myogenin 抗体 (1:1; Developmental Studies Hybridoma Bank)、マウス抗 sarcomeric myosin heavy chain (MyHC) (1:1, MF20; Developmental Studies Hybridoma Bank)を用いた。二次抗体として各種抗原に対する AlexaFluor 546 抗体 (1:500; Molecular Probes, OR)を用いた。核の染色には、Hoechst 33258 (1 : 1000; Sigma)を用いた。

肢芽パラフィン切片の免疫組織染色

10%ホルマリンで30分間E11.5マウス肢芽を固定し、パラフィン包埋した。ブロック標本より、5 μ mの薄切切片を作製した。切片をキシロールに10分間、3回浸して脱パラフィンし、5分間ごとに100%エタノール x 2、90%エタノール、80%エタノール、70%エタノールに浸して水和した。PBSで洗浄し、内因性ペルオキシダーゼの活性を阻害するため、0.3%過酸化水素水 / メタノール溶液に室温で30分間反応させ、PBSで洗浄後、ヤギ抗Lhx2抗体 (1:100; Santa cruz Biotechnology)を添加し、湿箱内で、4 $^{\circ}$ C、一晚反応させた。PBSで3回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識された二次抗体 (Histofine MAXPO, ニチレイ)を室温で30分間反応させた。DAB発色により、Lhx2発現を検出した。

Micro-mass culture 法

マウスE11.5の肢芽を単離し、30分間、37 $^{\circ}$ Cでトリプシン処理し、細胞を解離した。肢芽の細胞を 5×10^6 cells / mlに調整し、40 μ lの液滴としてシャーレに播いた。約1時間5%CO₂、37 $^{\circ}$ C条件下で静置し、細胞が接着しているのを確認した後、10%FBSと、1%PSを含んだDMEM培養液にて培養した。

siRNA 導入による *Lhx2* 遺伝子のノックダウン

所属研究室で開発された siRNA 安定導入用レトロウイルスベクターpRePS [27]にEGFPを組み込んで改変した pReGS siRNA レトロウイルスベクターを用いて、Lhx2 に対する siRNA (siLhx2)を細胞や組織に導入した。Micro-mass culture 法で培養した肢芽細胞のノックダウン実験には、siLhx2 レトロウイルスを含んだ培養液を1日おきに交換し

て2日間培養し、RNAを抽出した。肢芽のノックダウン実験には、胎生11.5日齢のマウス胎仔を使用した。肢芽を siLhx2 レトロウイルス液に浸し、ポリブレン(8 µg/ml; Sigma)を加え、2800 xg、25 °Cで90分間遠心した。ウイルス導入後の肢芽を、10 % FBS-DMEM に浸した1.5 %アガロース片(同仁堂、熊本)の上に静置し、37 °Cで3日間培養した。Lhx2 ノックダウンの標的配列は、表2に示した。

レポーターアッセイ

マウス *Msx1*、*Msx2* 遺伝子のゲノム DNA 配列は、Ensembl データベースから入手した (*Msx1*: ENSMUSG000000048450, *Msx2*: ENSMUSG000000021469)。*Msx1*、*Msx2* 遺伝子上流のエンハンサー、プロモーター領域の DNA 断片は、C57BL/6 系統マウス由来 ES 細胞のゲノム DNA をテンプレートとして PCR 増幅し、In-Fusion HD cloning kit (Takara)を用いて pGL3 basic vector (Promega)に組み込んだ。*Msx1* は、転写開始点上流の -2097bp から-1189bp、あるいは-1189bp から+202bp の領域を、*Msx2* は上流-536bp から+73bp、あるいは-133bp から+73bp の領域を用いた。White bottom 96-well plate (住友ベークライト、東京)に播いた 293T 細胞 (8×10^3 cells/well)に、各種レポーターコンストラクト 50 ng と、pRL-CMV ベクター10 ng (Promega)を、Effectene reagent (Qiagen)を用いて導入した。培養48時間後に、Dual-Glo Luciferase reporter assay kit (Promega)を用いて発光反応を行い、Luminometer Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)にてルシフェラーゼ活性を検出した。後半の実験では、各レポーターコンストラクトに対して、完全長 *Lhx2* cDNA、LIM ドメインを欠失した *Lhx2* cDNA (*Lhx2*- Δ LIM)、あるいはホメオドメインを欠失した *Lhx2* cDNA (*Lhx2*- Δ HHD)を組み込んだ pCS2P ベクター50

ng を同時にトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性を比較した [8]。

ゲルシフトアッセイ

Lhx2 を過剰発現させた 293T 細胞から、nuclear/cytosol fraction kit (BioVison, Mountain View, CA) を用いて核タンパク質を抽出した。合成オリゴ DNA を二本鎖にした後、T4 キナーゼ(Takara)を用いて、37 °C で 1 時間反応させ、末端を $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP で標識した [28]。ゲルシフトアッセイに用いたオリゴヌクレオチドプローブの配列を、表 3 に示した。抽出した核タンパク質を、3 x binding buffer [0.2M HEPES-KOH (pH 7.6), 2M KCl, 0.5M EDTA, 20 % Ficoll, 1M DTT]、Poly-IC (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、 ^{32}P -labeled oligo と、過剰量の非放射性同位体プローブ存在、あるいは非存在下で、室温、30 分間反応させた。このとき、抗 Lhx2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) との反応は、さらに室温で 30 分間行った。反応後のサンプルを、SuperSep 7.5 %ゲル (和光, 大阪) にアプライして、100 V、1 時間にて電気泳動した。その後、泳動したゲルを 80 °C、1.5 時間の条件で乾燥させた。乾燥ゲルの放射線を BAS 2040 カセットと BAS-2500 phosphor imager (富士フィルム, 東京) を用いて検出し、Image Gauge Version 3.2 (富士フィルム) にて解析した。

クロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイ

C2C12 細胞(1×10^6 個)を、室温で 30 分間 10 %ホルムアルデヒドを用いて架橋した。1.5 M のグリシンを加えて 5 分間反応させ架橋反応を停止した後、スクレーパーを用いて細胞を回収し、15,000 rpm、15 分間遠心して細胞を集めた。E11.5 マウス胎仔肢芽は、胎仔から肢芽を単離し、トリプシンを 37 °C、10 分間反応させ、懸濁し、遠心して細胞を回収した後に架橋反応を行った。それぞれの架橋反応後のサンプルは、lysis buffer (50

mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 % NP-40)を用いて溶解し、このクロマチン分画を超音波処理によって断片化した後、4 °Cで2時間 Protein G agarose beads (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)と反応させた。遠心後、上清を二等分し、抗 Lhx2 抗体(1 µg; Santa Cruz Biotech)、もしくは、コントロールとして抗 Scp1 抗体(1 µg; Santa Cruz Biotech)を加えた。4 °Cで一晩反応させた後、両サンプルに Protein G agarose beads を加え、さらに3時間4 °Cで反応させた。2000 x g で遠心してビーズを集め、RIPA buffer [1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 140 mM NaCl, 1 % TritonX-100, 0.1 % Na-deoxycholate, 0.1 % SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 x Protease inhibitor cocktail]で6回洗浄し、100 µl の digestion buffer (1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5 % SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0))を加え、37 °C、15 分間インキュベーションし、ビーズから DNA を溶出した。ProteinaseK (100 µg/ml)を加え、55 °Cで1時間、さらに65 °C、オーバーナイトで反応させ、フェノールクロロホルム抽出を行い、DNA 分画を15 µl の DW に溶出し、1 µl を用いて、PCR を行った。ChIP 実験に用いたプライマーリストを、表4に示した。

結果

Lhx2 は筋芽細胞の分化を阻害する

骨格筋の分化に Lhx2 が関係しているかどうか知るために、まず、レトロウイルスベクターを感染させ、C2C12 細胞に Lhx2 を過剰発現させた (図 1A)。ウマ低血清培地を用いて筋分化誘導を行ったところ、Lhx2 を過剰発現させた C2C12 細胞(C2C12^{Lhx2})では、細胞同士は融合せず、筋管は形成されなかった(図 1B)。空ベクターを導入した C2C12 細胞(C2C12^{Empty})では、筋管状の形態が確認された(図 1B)。そこで、筋分化マーカータンパク質の発現を免疫蛍光染色によって調べた。形態観察の結果と合致して、分化誘導後の C2C12^{Lhx2} 細胞では、myogenin、MyHC ともに発現が認められなかった (図 2A, B)。続いて、この現象が C2C12 細胞に限定された現象かどうか調べるため、マウス後肢骨格筋より筋衛星細胞を単離し、Lhx2 発現レトロウイルスベクターを感染させた。筋衛星細胞の初代培養系においても、Lhx2 を過剰発現すると筋管形成は阻害され、MyHC タンパク質の発現も検出されなかった (図 2C)。以上の実験結果は、Lhx2 には筋芽細胞の分化を阻害する活性があることを示す。

Lhx2 は、*Msx1*、*Msx2* 遺伝子の発現を亢進する

以前の研究において、筋脱分化因子である *Msx1* 遺伝子にも、C2C12 細胞の筋分化を抑制する活性が報告されている [22]。そこで、C2C12^{Empty} 細胞と C2C12^{Lhx2} 細胞を用いて、*Msx1*、*Msx2* 遺伝子の発現量を比較した。C2C12^{Lhx2} 細胞において、*Msx1* と *Msx2* の mRNA レベルは顕著に増大しており、これは分化条件においても保たれていた (図 3A)。次に、C2C12 細胞に、*Msx1*、あるいは *Msx2* cDNA を過剰発現させてみたところ、C2C12^{Lhx2} 細胞のケースと同様に、筋分化が抑制され、myogenin、MyHC タンパク質は

検出されなかった (図 3B, C)。これらの結果から、*Lhx2* の過剰発現による筋分化抑制は、*Msx1* と *Msx2* の発現亢進によって起こったものと推察される。

肢芽において *Lhx2* は、*Msx1*、*Msx2* 遺伝子の発現に必須である

マウス胎仔の肢芽では、*Lhx2*、*Msx1*、*Msx2* の mRNA が高レベルで発現していることが報告されている [12,13,29]。*Lhx2* が *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の上流で作用する可能性を考え、肢芽における *Lhx2* 遺伝子発現のノックダウン実験を行った。実際に *Lhx2* がタンパク質レベルで発現しているかどうかを、抗 *Lhx2* 抗体を用いてマウス E11.5 胎仔の肢芽を免疫染色することで確認した(図 4)。*Lhx2* タンパク質は、肢芽の外胚葉組織と、内部の間葉系組織の両方で発現していることが確認された。次に、*Lhx2*、*Msx1*、*Msx2* 遺伝子の胎仔肢芽のステージ、部位ごとの発現量を、RT-PCR により比較した(図 5)。E17.5 の肢芽の先端部以外(図 5A の 4,5)における *Lhx2*、*Msx1*、*Msx2* 遺伝子の発現レベルに対して、E11.5、E14.5 の肢芽、あるいは E17.5 の肢芽先端部(図 5A の 1,2,3)においては、それぞれの遺伝子が発現していることがわかった(図 5B)。*Lhx2* のノックダウン実験を行うにあたり、作成した si*Lhx2* レトロウイルスベクターが *Lhx2* 遺伝子の発現を抑制するか確かめるため、Micro-mass culture 法を用いて、培養した肢芽細胞の *Lhx2* 遺伝子発現レベルの比較を試みた。E11.5 から E14.5 の肢芽においては *Lhx2*、*Msx1*、*Msx2* それぞれの遺伝子の発現レベルが高いため(図 5B)、E11.5 のマウス肢芽を用いて Micro-mass culture を行った。肢芽の細胞は、培養 2 日目で筋管様の構造が確認された(図 6A)。si*Lhx2* ベクターを感染させたところ(コントロールとして空ベクター)、*Lhx2* 遺伝子の発現レベルの減少が確認された(図 6B)。肢芽における *Lhx2* 遺伝子をノックダウンするため、マウス E11.5 胎仔の肢芽を単離した後、si*Lhx2* レトロウイルスベクター(コントロールと

して空ベクター)をスピニンフェクション法によって感染させた。次に、siLhx2 ベクターを感染させた枝芽を、アガロース上で3日間培養した(図7A)。siLhx2 ベクターが確かに感染していることを、サロゲートマーカーであるEGFPの発現によって確認した(図7B)。器官培養した枝芽における*Lhx2* 遺伝子の発現レベルをqRT-PCRによって定量したところ、siLhx2 ベクターを導入した枝芽では、コントロールと比べて*Lhx2* mRNAレベルが約40%減弱していた(図7C)。このとき、Lhx2 ノックダウン枝芽では、*Msx1*、*Msx2* の mRNA レベルもコントロール枝芽の25~33%にまで低下していた(図7C)。この実験結果は、枝芽において、Lhx2 は *Msx1* と *Msx2* 遺伝子の発現を正に制御していることを示唆する。

Lhx2 は *Msx1* と *Msx2* の転写活性を亢進する

Lhx2 のホメオドメインはDNAに直接結合し、転写を活性化することが知られている。そこで、Lhx2 が *Msx1* と *Msx2* 遺伝子のエンハンサー/プロモーター領域に直接結合し、転写を制御しているかどうか解析した。これまでの先行研究において、Lhx2 はマウスゲノム上のTAATTAという配列に結合することが明らかになっている[5]。データベースサーチを行った結果、このコンセンサス結合配列は、*Msx1* 遺伝子においては転写開始点から数えて-2097から-1189塩基対の間に2カ所、*Msx2* 遺伝子では-536から+73塩基対の間に2カ所存在していた。そこで、それらの領域を含むレポーターコンストラクトを作成し、Lhx2 発現ベクター存在下・非存在下で293T細胞にトランスフェクトして、ルシフェラーゼ活性を測定した。

Msx1 遺伝子上流の-2097から-1189領域を用いた場合、Lhx2 依存的なルシフェラーゼ活性が48.1倍亢進した(図8A)。一方、Lhx2 コンセンサス結合配列を含まない *Msx1*

遺伝子上流-1189 から+202 領域で作成したコンストラクトにおいては、Lhx2 依存的なレポーター活性は検出されなかった (図 8A)。次に、Lhx2 結合コンセンサス配列を、TAATTA から TAAGGA へ、片方、あるいは両方とも置換したレポーターコンストラクトを用いたところ、Lhx2 依存的なレポーター活性は著しく減少した(48.1 倍から、~2.8 倍)。さらに、-2097 から-1189 領域を用いた場合、Lhx2- Δ LIM 発現ベクターではレポーター活性は高いまま維持されていたが (約 32.3 倍)、Lhx2- Δ HD 発現ベクターを導入したときには、活性が3分の1に低下した (約 15.9 倍)。これらの結果から、Lhx2 による *Msx1* 遺伝子の転写活性化は、ホメオドメインを介した直接的な作用 (3分の2) と、LIM ドメインに結合した他の核内タンパク質による間接的な作用 (3分の1) の、両者によることが示唆された。

一方、*Msx2* 遺伝子上流の-536 から+73 領域においては、Lhx2 依存的なレポーター活性は、*Msx1* のときと比較して弱かった (約 3.9 倍)(図 8B)。2ヶ所ある Lhx2 コンセンサス結合配列の片方、あるいは両方を改変したコンストラクトでは、わずかに Lhx2 依存的なレポーター活性が低下した (約 3.9 倍から 1.5 倍)。-536 から+73 領域を用いた場合、Lhx2- Δ LIM 発現ベクターの導入では活性が変わらなかったが (約 4 倍)、Lhx2- Δ HD 発現ベクターにおいては、活性が著しく低下した (約 0.5 倍)。これらの結果は、Lhx2 には、ホメオドメインを介した直接的な DNA 結合を介して *Msx2* 遺伝子の転写を高める働きがあることを示す。

Lhx2 は、*Msx1*、*Msx2* 遺伝子のエンハンサー領域に結合する転写制御因子複合体の構成要素である

Lhx2 が、*Msx1*、*Msx2* 遺伝子のエンハンサー領域に存在するコンセンサス配列に結

合することを確かめるために、ゲルシフトアッセイを行った (図 9A)。Lhx2 を過剰発現させた 293T 細胞の核抽出物を、³²P 標識したオリゴヌクレオチド(a, b)と反応させたところ、Lhx2 を発現させなかった 293T 細胞の核抽出物では観られないバンドが検出された (図 9B)。これらのバンドは、過剰量の非標識オリゴヌクレオチド存在下で消失し、抗 Lhx2 抗体添加によって上方へスーパーシフトした。Msx2 遺伝子についても同様に、Lhx2 を過剰発現させた 293T 細胞の核抽出物と ³²P 標識したオリゴヌクレオチド(c,d)との複合体形成を示すバンドが検出された (図 9B)。これらのバンドも、過剰量の非標識オリゴヌクレオチドで競合阻害され、抗 Lhx2 抗体添加によってスーパーシフトした (図 9B)。最後に、TAATTA を TAAGGA に置換した ³²P 標識オリゴヌクレオチドプローブを用いて実験すると、核抽出タンパク質をサンプルに用いているため、シフトしたバンドは検出されたものの、Lhx2 過剰発現サンプルを用いたときにこれまで観察されてきたシフトされたバンドはすべて検出されなくなった (図 9C)。これらの実験結果は、Lhx2 が Msx1 と Msx2 遺伝子のエンハンサー領域に結合する転写制御因子複合体に含まれていることを証明している。

細胞のクロマチン分画においても、Lhx2 が Msx1、Msx2 遺伝子上流のエンハンサー領域に結合していることを示すために、ChIP アッセイを行った。C2C12^{Lhx2} 細胞のクロマチン分画を抗 Lhx2 抗体と反応させたところ、免疫沈降物中に Msx1 遺伝子の a, b 領域、Msx2 遺伝子の c/d 領域がそれぞれ含まれていた (図 10A)。無関係な抗原を認識する抗 Scp1 抗体を用いた免疫沈降物中を用いた実験では、バンドは検出されないか、あるいは極めて薄くしか増幅されなかった。次に、マウス胎仔肢芽を用いて ChIP アッセイを行ったところ、C2C12^{Lhx2} 細胞での実験結果と同様に、Msx1、Msx2 遺伝子上流のエンハンサー領域が抗 Lhx2 抗体によって特異的に免疫沈降した (図 10B)。したがって、

Lhx2 は細胞や組織においても *Msx1* と *Msx2* 遺伝子のエンハンサー領域に確かに結合していることが示された。

考察

本研究では、筋芽細胞や肢芽において、*Msx1*、*Msx2* 遺伝子が *Lhx2* の標的遺伝子であることを見出した。レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、ChIP アッセイの結果から、*Lhx2* は、*Msx1*、*Msx2* 遺伝子のエンハンサー領域にそれぞれ 2ヶ所ずつ存在する TAATTA 配列に結合し、転写を正に調節することが明らかとなった。*Lhx2* が *Msx1*、*Msx2* 遺伝子上流に位置するという事実は、マウス胎仔肢芽の器官培養系を用いた *Lhx2* 遺伝子のノックダウン実験によっても裏付けられた。今回の実験結果は、*Lhx2* と *Msx1* 遺伝子がマウス胎仔の四肢先端部位に、それぞれのオルソログ遺伝子がショウジョウバエの羽原基に共発現している、という先行研究報告と一致している [12]。*Msx1/Msx2* ダブルノックアウトマウスでは、四肢の形成不全がおこるが [29]、同様の表現型は *Lhx2/Lhx9* ダブルノックアウトマウスにおいても観察される [13]。LIM ホメオボックス型の転写因子は全部で 11 種類存在し、ファミリーメンバーの中では、*Lhx2* は *Lhx9* と最も相同性が高い [30]。また、*Lhx9* の予測されるコンセンサス結合配列も *Lhx2* とほぼ同じであることがわかっている。したがって、*Lhx2* 遺伝子単独のノックアウトマウスで四肢の形成不全がおこらないのは、*Lhx9* が相補的に働いて *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の転写を誘導しているからではないかと推察される。

Lhx2 は、ホメオドメインを介して直接 DNA に結合すると同時に、LIM ドメインを介して他の転写制御因子と複合体を形成し、下流遺伝子の転写を活性化することが知られている。この特性を反映して、*Lhx2* による *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の転写調節機構も決して単純ではなかった。一連のレポーターアッセイの結果より、エンハンサー領域 DNA への直接結合は、*Msx1* 遺伝子においては 3分の2、*Msx2* 遺伝子においてはほぼすべての *Lhx2* による転写活性化をもたらすと考えられる。本研究では、*Lhx2* が *Msx2* 遺伝子

のエンハンサー領域に結合することを示したが、*Msx1* 遺伝子の場合と比べると *Msx2* 遺伝子の転写活性化は *Lhx2* にあまり依存していない。先行研究によると、肢芽において、*Msx2* 遺伝子のエンハンサー領域には少なくとも4ヶ所のシスエレメントが存在し、[31]、転写制御因子 *Dlx5* と *Sox11* がこれらの領域と相互作用することが判明している [32]。*Msx2* 遺伝子の転写は、上記のような異なるタイプの転写調節因子複合体によって支配されていると推測される。

興味深いことに、マウス胎仔において、*Lhx2* 遺伝子と *Msx1* 遺伝子の両方が肢芽で発現しているが、嗅上皮あるいは下垂体といった頭部においては、どちらか一方だけが発現している。それらの場所では、*Lhx2* の作用を抑制する組織特異的なレプレッサーが *Msx1* 遺伝子のエンハンサー領域に存在しているのではないかと予想される。あるいは、転写抑制に働く DNA やヒストンの化学修飾がおこっている可能性もある。一方、*Msx1* 遺伝子だけが発現している骨格筋以外の組織では、*Lhx2* 以外の転写活性化因子によってその発現がコントロールされていると推察される。研究が進んでいる中枢神経系や上皮組織においては、*Lhx2* が核内で標的遺伝子の転写を活性化するかどうかは細胞の系譜や場所に完全に依存する、すなわち **context-dependent** とされている。本研究の結果は、骨格筋においても同様の原理が当てはまることを示している。

表1 PCRに用いたプライマーリスト

Gene	Forward primer	Reverse primer	Product (bp)
<i>Msx1</i>	5'-GCTGGAGAAGCTGAAGATGG-3'	5'-GGTGACTCTGGACCCACCTA-3'	223
<i>Msx2</i>	5'-AACACAAGACCAACCGGAAG-3'	5'-GCAGCCATTTTCAGCTTTTC-3'	228
<i>Lhx2</i>	5'-CCAAAAGACAAAGCGCATGC-3'	5'-AGGCACAGAAGTTAAGACTG-3'	370
<i>Gapdh</i>	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'	5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'	223
<i>Tgfb1</i>	5'-TTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3'	5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3'	183
<i>Tgfb2</i>	5'-CCGGAGGTGATTTCCATCTA-3'	5'-GCGGACGATTCTGAAGTAGG-3'	201
<i>Tgfb3</i>	5'-GATGAGCACATAGCCAAGCA-3'	5'-ATTGGGCTGAAAGGTGTGAC-3'	177
<i>Bmp4</i>	5'-TGATACCTGAGACCGGAAG-3'	5'-AGCCGGTAAAGATCCCTCAT-3'	190
<i>tropoin C fast</i>	5'-GGGAAGAGCGAAGAGGAACT-3'	5'-TGGATGGACACGAACAAAGA-3'	244

表2 siRNAに用いた標的配列リスト

siLhx2	5'-GTAGACAAGCAATGGCACA-3'
siMsx1 #1	5'-TAGATTTACATGCGCAAGTTA-3'
siMsx1 #2	5'-CACCTGGTCCCTTCTCTTAAA-3'
siMsx2 #1	5'-AAGCGACAGGGCCACTTGATA-3'
siMsx2 #2	5'-AAGACCAGATGGACCAGACTC-3'

表3 ゲルシフトアッセイに用いたオリゴプローブ配列リスト

Msx1, a	5'-AACTGCCTAATTAGTTCTTA-3'
Msx1, b	5'-GCTCGGATAATTACCCCTAA-3'
Msx2, c	5'-TCGGCTTTAATTACGCCTTA-3'
Msx2, d	5'-GCTCCTGTAATTAACCTCCTA-3'

表4 ChIPアッセイに用いたプライマーリスト

Region	Forward primer	Reverse primer	Product (bp)
Msx1, a	5'-GTTTTAATCCGAGCGCAGAG-3'	5'-AGCCCTGCAAACGAAAGTTA-3'	157
Msx1, b	5'-GACGCCGTCTGGGTAATAAA-3'	5'-GACTGCCGGGCTCTAATCTC-3'	178
Msx2,c/d	5'-CTCGGCAAGCTTCCTCTTTA-3'	5'-AGACTCGGCTCAACCAACTG-3'	241
Cxcl14	5'-GTCCGATCTAACCTAGGTTG-3'	5'-AGACCTGTACGGCGGCGACTC-3'	210

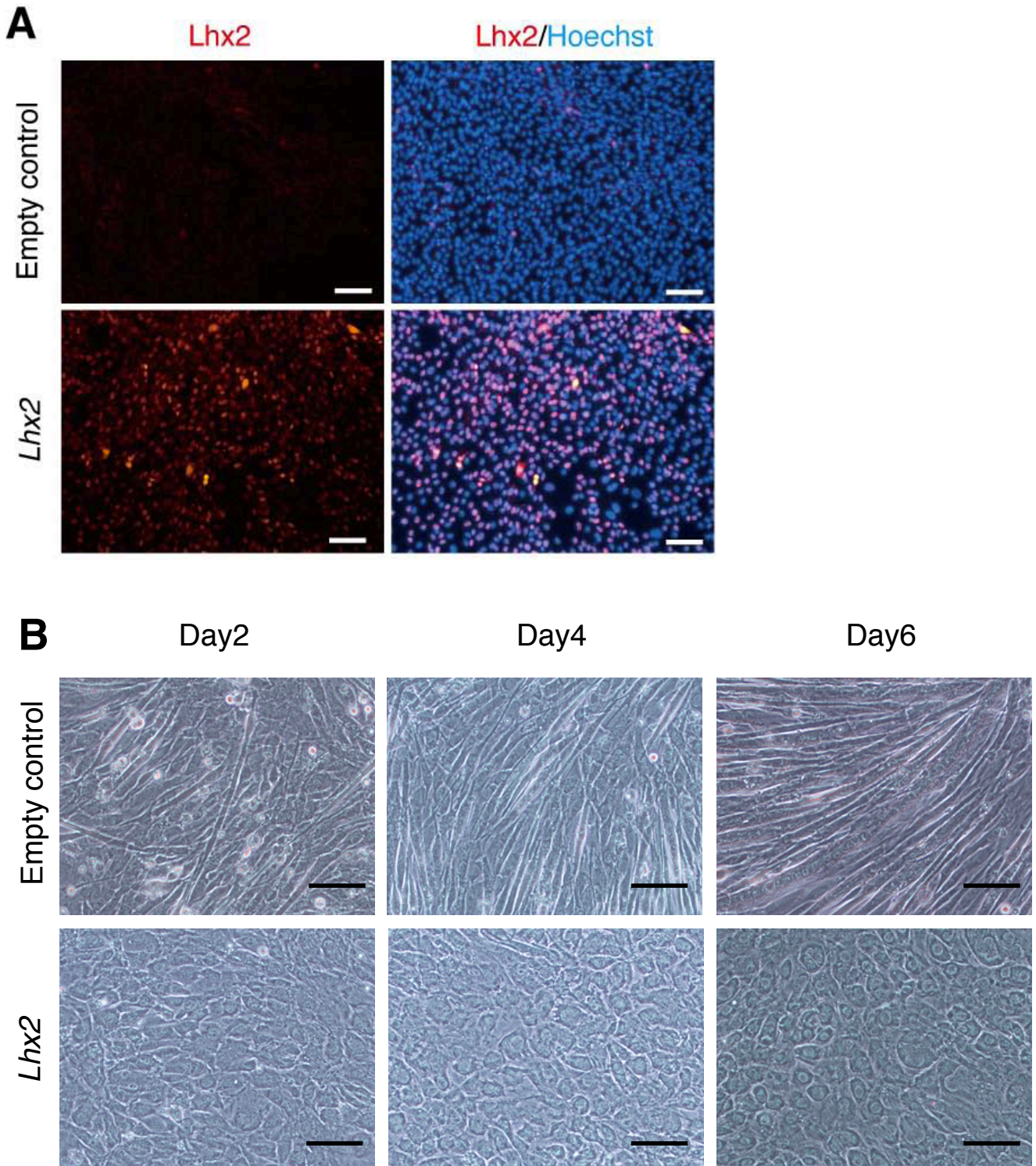


図1 Lhx2を過剰発現させたC2C12細胞における形態観察

(A) 通常培養におけるC2C12^{Empty}細胞(上段)と、C2C12^{Lhx2}細胞(下段)の抗Lhx2抗体を用いた免疫染色像。

(B) C2C12細胞においてLhx2を過剰発現させると、筋管様の構造の形成が阻害された。空ベクター(上段)を導入したC2C12細胞と、Lhx2ベクター(下段)を導入したC2C12細胞。左から分化誘導2,4,6日。

Scale bar = 100 μ m

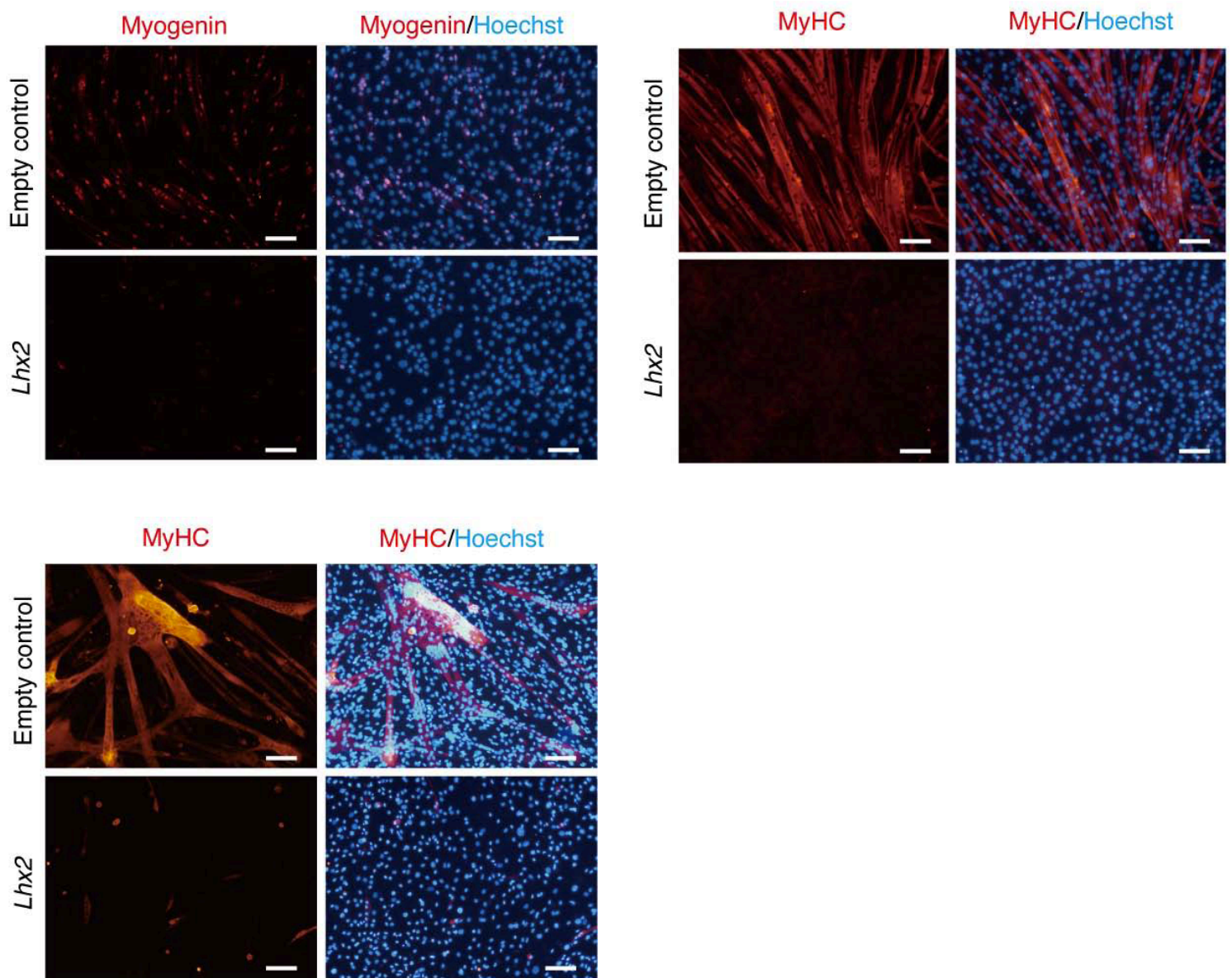


図2 Lhx2はC2C12細胞と初代培養した筋衛星細胞の筋分化を阻害する

(A,B) C2C12細胞においてLhx2を過剰発現させると、筋管形成が阻害された。C2C12^{Empty}細胞(上段)と、C2C12^{Lhx2}細胞(下段)をそれぞれ6日間筋分化誘導条件において培養した。(A)抗Myogenin抗体を、(B)抗MyHC抗体を用いた免疫染色像。

(C) 初代培養した筋衛星細胞においてLhx2を過剰発現させると、筋管形成が阻害された。マウスより単離した筋衛星細胞に空ベクター(Empty、上段)あるいはLhx2ベクター(Lhx2、下段)を導入したレトロウイルスを感染させ、6日間筋分化を誘導した。抗MyHC抗体を用いた免疫染色像。

(A-C) 核はHoechst-33258を用いて染色した。Scale bar = 100 μm

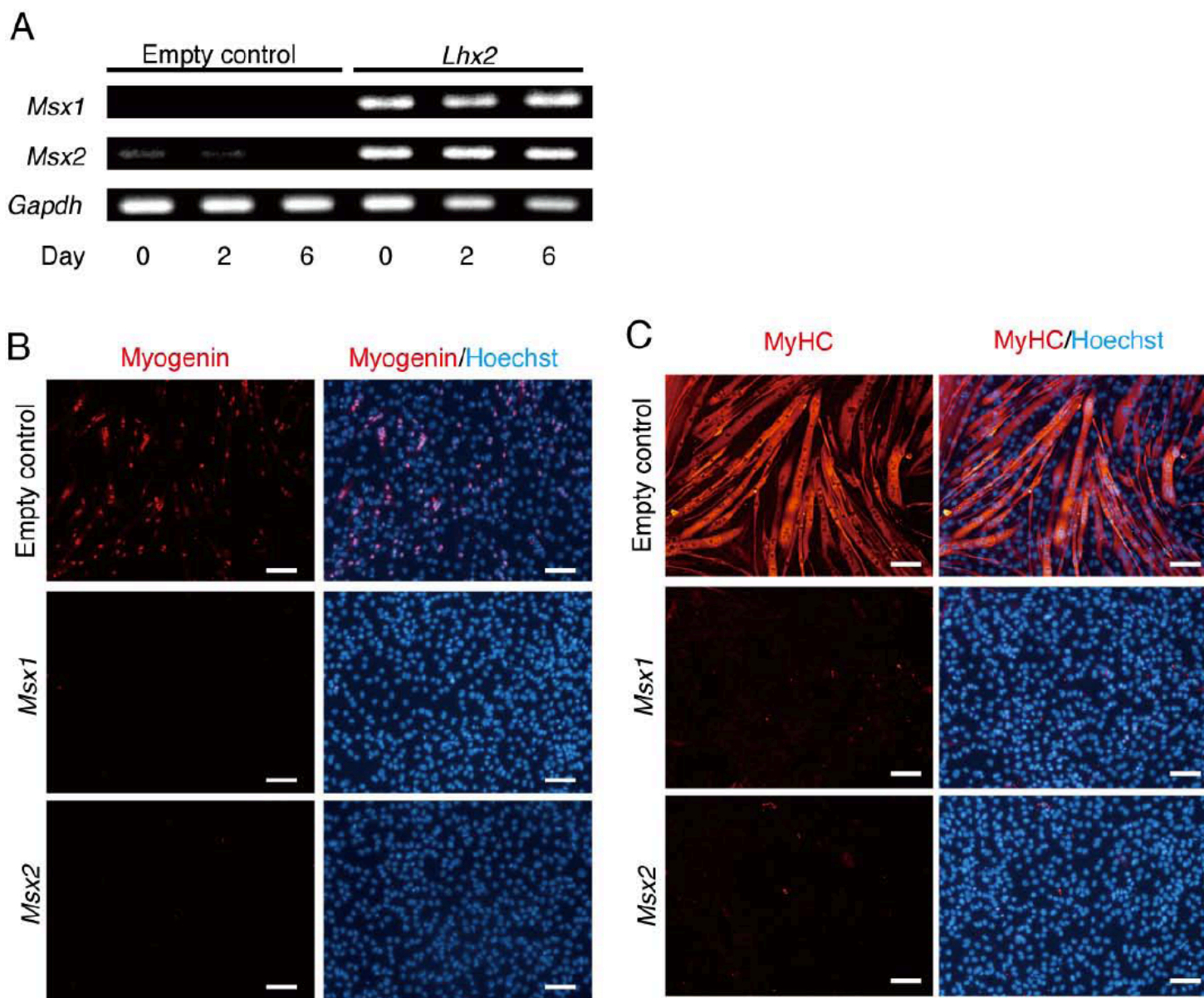


図3 *Lhx2*は*Msx1*、*Msx2*遺伝子の発現量を増加させ、*Msx1*、*Msx2*は共にC2C12の筋分化を阻害する

(A) *Lhx2*の過剰発現により、*Msx1*、*Msx2*遺伝子の発現量が顕著に増加した。C2C12^{Empty}細胞と、C2C12^{*Lhx2*}細胞をそれぞれ6日間筋分化誘導し、RT-PCRにより*Msx1*と*Msx2*のmRNA発現を検出した。*Gapdh*はテンプレートコントロールとして用いた。

(B,C) C2C12細胞において、*Msx1*、*Msx2*をそれぞれ過剰発現させると、筋分化が阻害された。C2C12細胞に、空ベクター(Empty、上段)、*Msx1*ベクター(*Msx1*、中段)、*Msx2*ベクター(*Msx2*、下段)をコードしたレトロウイルスベクターを感染させ、6日間筋分化誘導を行った。Myogeninの発現(B)と、MyHCの発現(C)を免疫染色によって検出した。核はHoechst-33258を用いて染色した。Scale bar = 100 μ m

Lhx2

Control

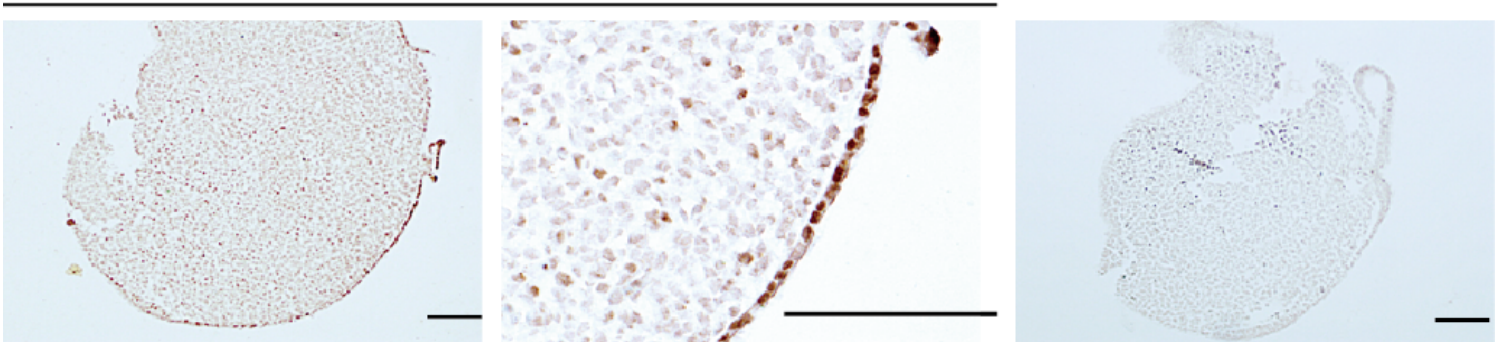


図4 肢芽におけるLhx2タンパク質の発現

抗Lhx2抗体を用いて(左、中)、Lhx2タンパク質の発現をE11.5マウス肢芽において確認した。また、二次抗体のコントロールを右に示した。

Scale bar = 100 μ m

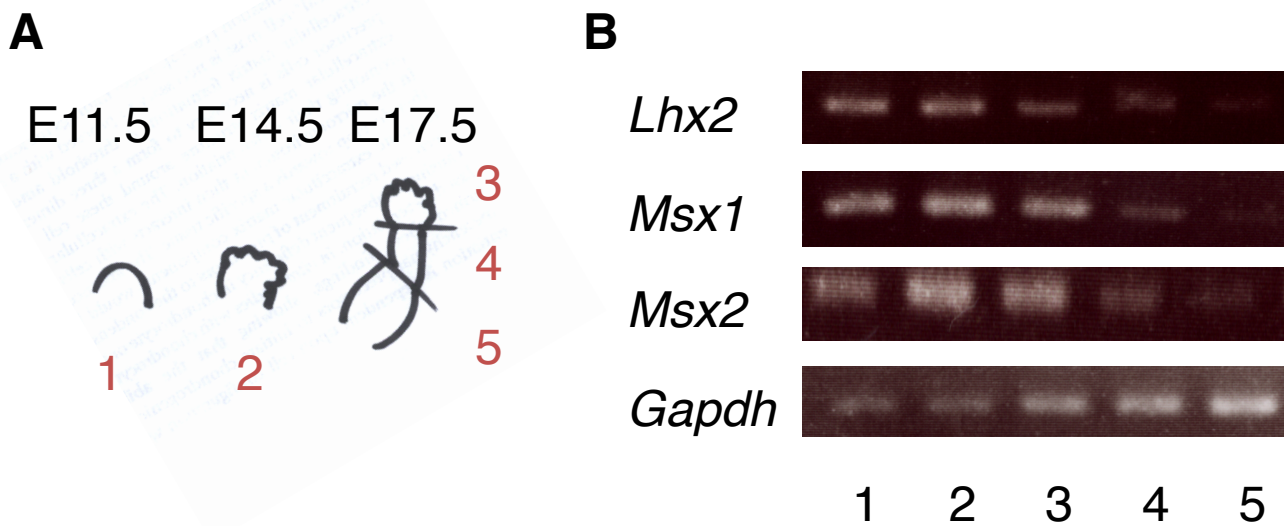
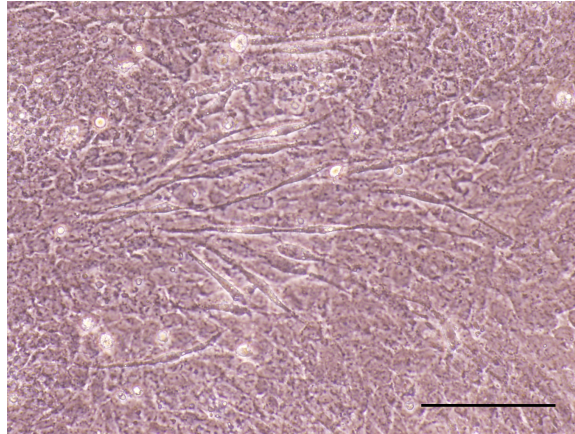


図5 異なった発生時期の肢芽における*Lhx2*、*Msx1*、*Msx2*遺伝子の発現

(A) 発生時期ごとの肢芽サンプルにおけるRNA抽出部位の模式図

(B) RT-PCRにより、発生時期ごとの肢芽サンプルにおける*Lhx2*、*Msx1*、*Msx2*遺伝子の発現量を比較した。*Gapdh*はテンプレートコントロールとして用いた。

A



B

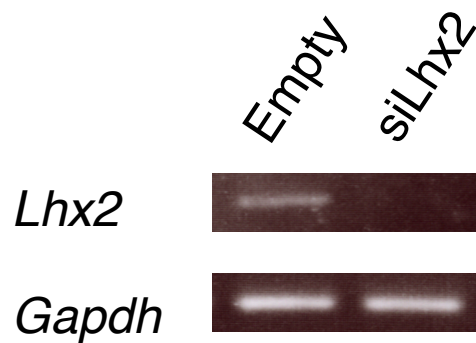


図6 Micro-mass cultureを用いたsiLhx2レトロウイルスによるLhx2ノックダウン効果の検討

(A) Micro-mass cultureを行って培養2日目の形態。Scale bar = 100 μ m

(B) RT-PCRにより、Lhx2遺伝子の発現量を比較した。左はコントロールベクターを感染させたサンプル (Empty)、右はsiLhx2ベクターを感染させたサンプル (siLhx2)。Gapdhはテンプレートコントロールとして用いた。

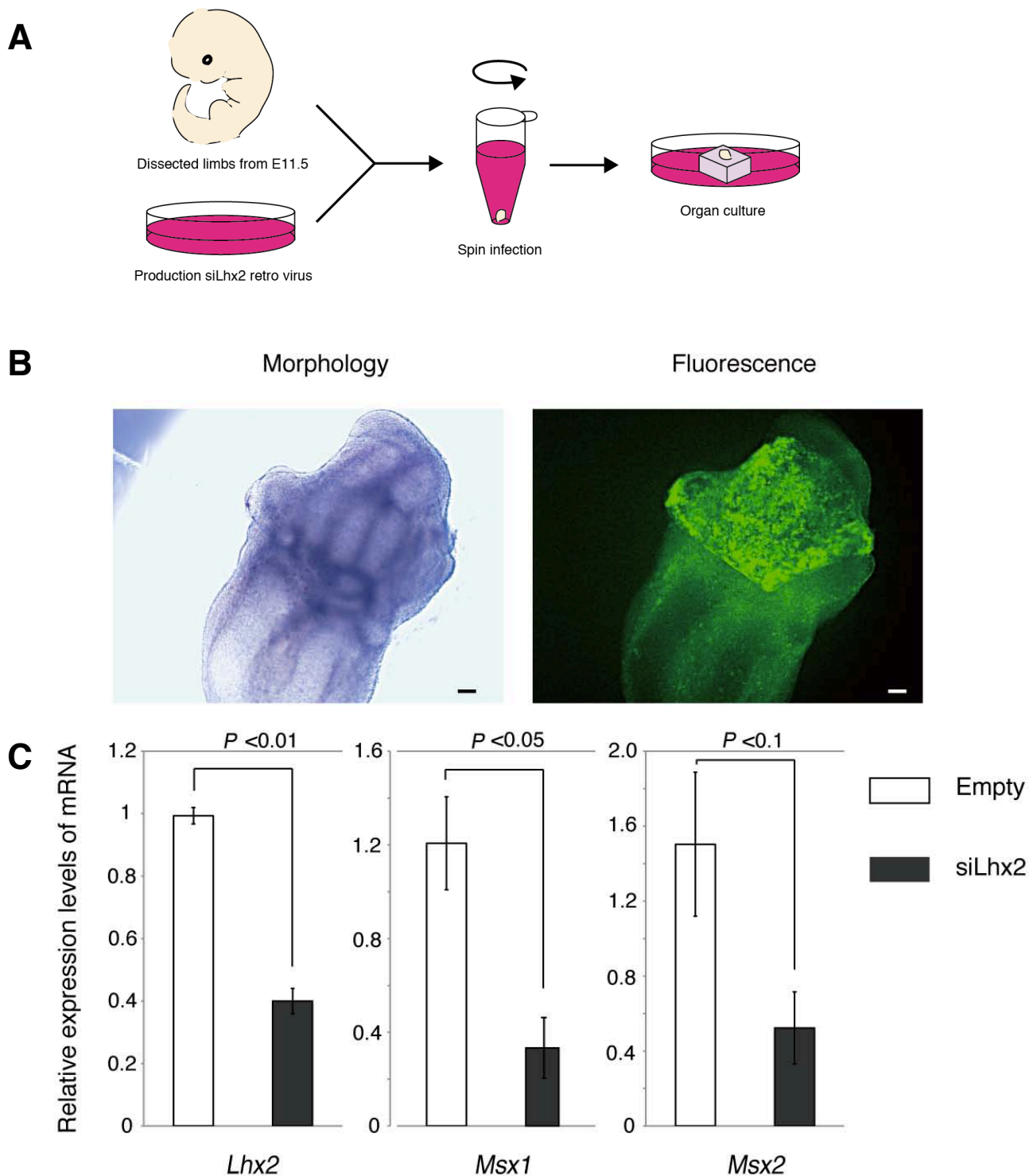


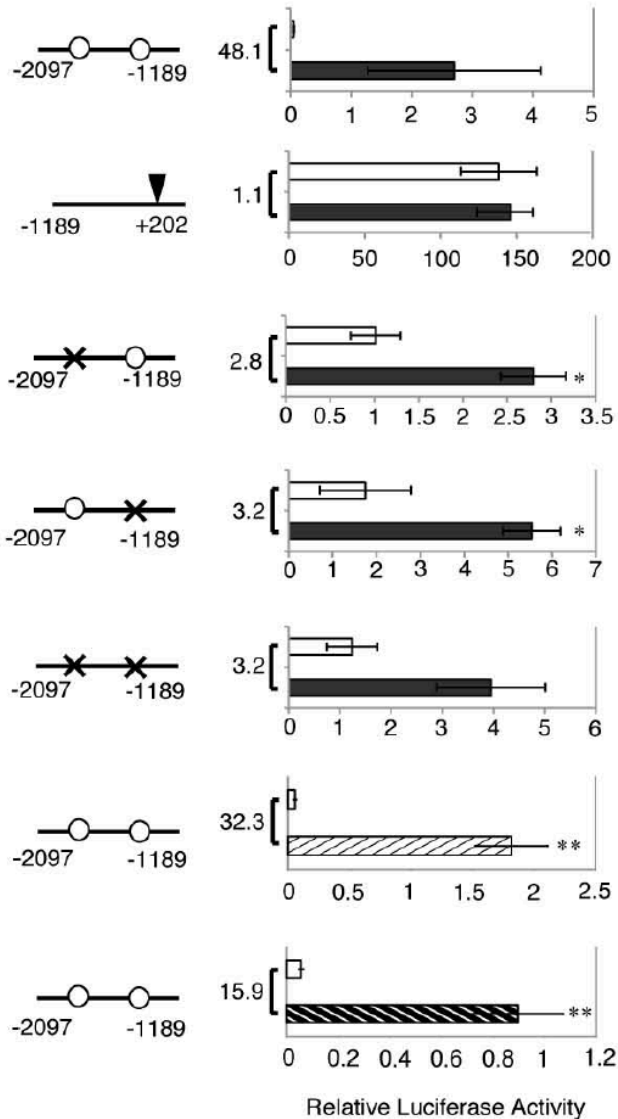
図7 Msx1とMsx2は、Lhx2の下流にある標的遺伝子である

(A) 肢芽におけるsiLhx2ベクターの導入方法を模式図で表した。E11.5マウスの四肢を単離し、siLhx2レトロウイルスベクターをスピン感染法により感染させた。その後、肢芽を寒天上で3日間培養し、解析した。

(B) マウス肢芽におけるsiLhx2レトロウイルスの感染した像を示した。siLhx2の感染は、EGFPの蛍光により、検出した。Scale bar = 100 μ m

(C) 肢芽においてLhx2をノックダウンすると、Msx1、Msx2 mRNAの発現レベルが減少した。空ベクター (Empty、白枠)あるいはsiLhx2ベクター (siLhx2、黒枠)のレトロウイルスベクターを感染させ、培養した肢芽におけるLhx2、Msx1、Msx2のmRNA量は、リアルタイムPCRによって検出した。それぞれの遺伝子の相対値は、Gapdhによって補正した(mean \pm S.E., n=3)。

A

Upstream region of *Msx1* gene

B

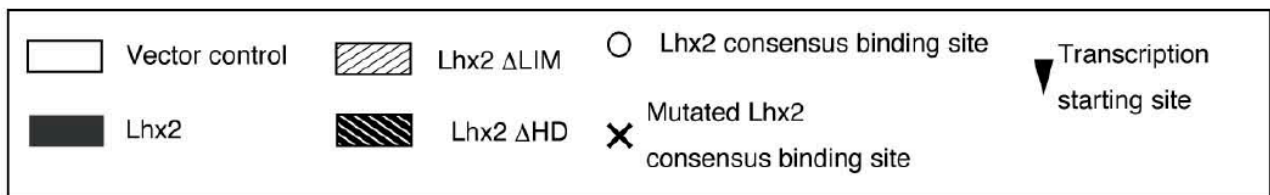
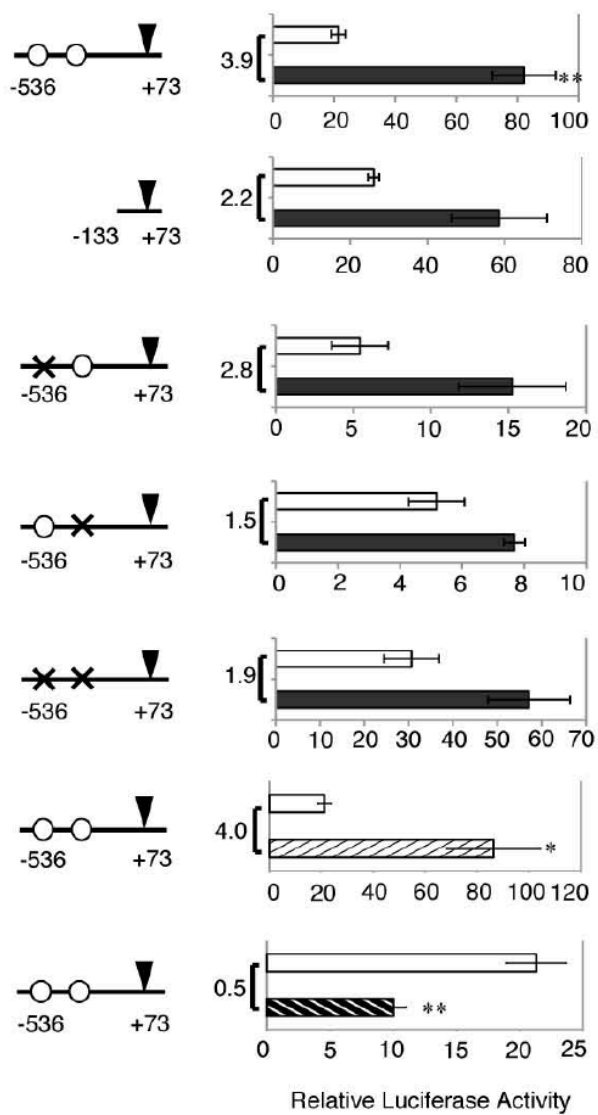
Upstream region of *Msx2* gene

図8 Lhx2は*Msx1*と*Msx2*の転写アクティベーターである

Msx1、*Msx2*上のLhx2コンセンサ結合配列は模式的に示した(丸印)。*Msx1*においては-2097から-1189塩基の間で、*Msx2*では-536から+73塩基の間で作成したコンストラクトをpGL3ベクターに組込んだ。点変異を導入した改変レポーターコンストラクトも同様に行った。これらのレポーターコンストラクトを293T細胞に導入し、同時に空ベクター、Lhx2発現ベクター、Lhx2ΔLIM発現ベクター、Lhx2ΔHD発現ベクターをそれぞれ導入した。ルシフェラーゼ活性は、ベクター導入48時間後に測定した。得られたルシフェラーゼ活性は、*Renilla*活性で割った値(F/R)を、それぞれのpGL3(F/R)の値で割り示した(mean ± SE, n=3)。T検定は、空ベクターを導入したコンストラクトと比較して行った。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

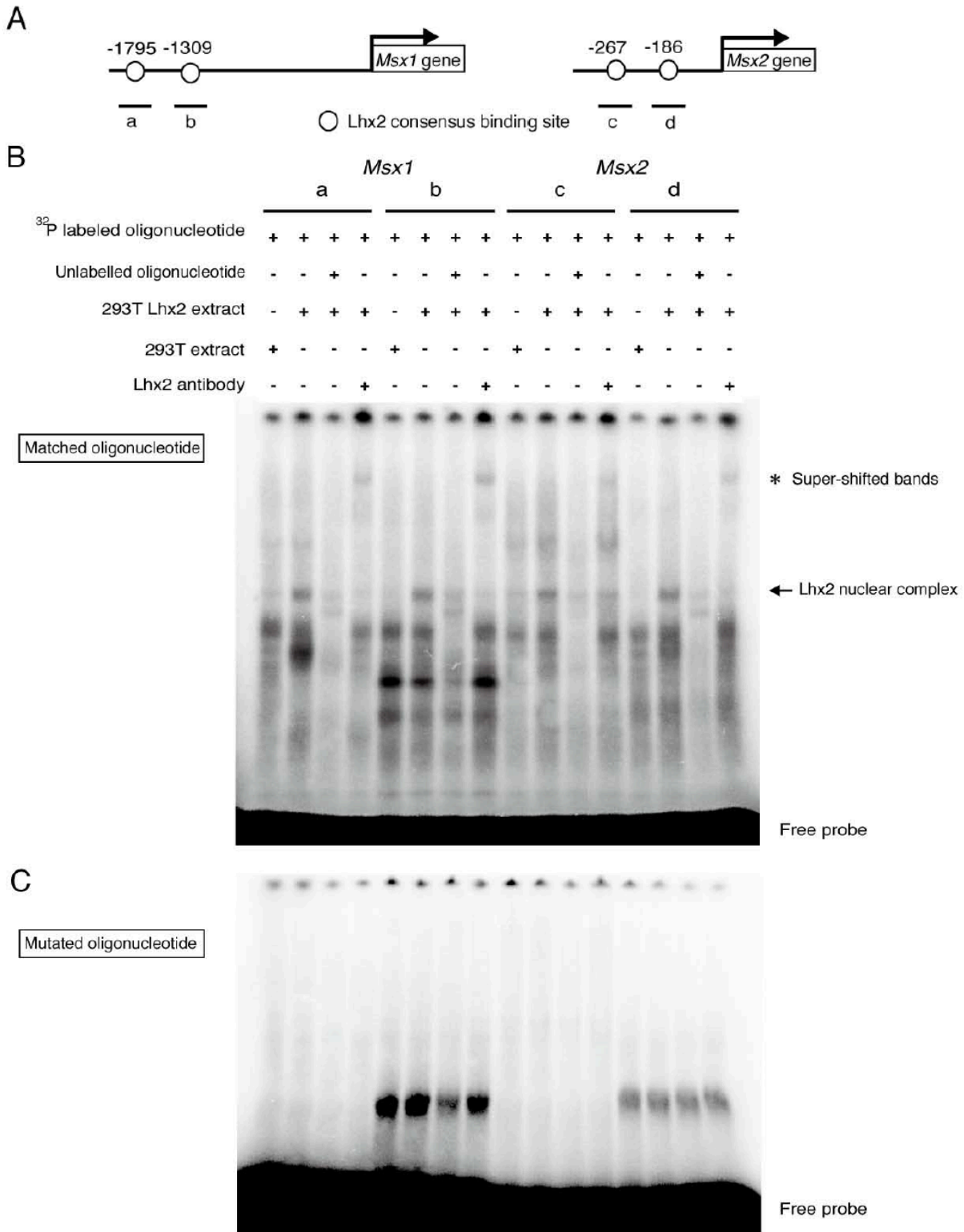


図9 核内のLhx2複合体は、*Msx1*、*Msx2*のエンハンサー領域に結合する

(A) ゲルシフトアッセイに用いたオリゴプローブの位置(a,b,c,d)を模式図に示した。

(B,C) 空ベクターもしくはLhx2発現ベクターを導入した293T細胞の核抽出物を、³²Pでラベルしたオリゴプローブと反応させ、一部にはラベルしていないオリゴプローブも加え、インキュベートした。各プローブセットの4番目は、抗Lhx2抗体を加えて、さらにインキュベートした。サンプルは、ポリアクリルアミドゲルで泳動し、オートラジオグラフィーを検出した。コンセンサス結合配列を含むプローブ(B)、あるいは改変したプローブ(C)で泳動した結果を示した。主なLhx2核複合体のバンドを矢印(←)、抗Lhx2抗体によりスーパーシフトしたバンドをアスタリスク(*)で示した。

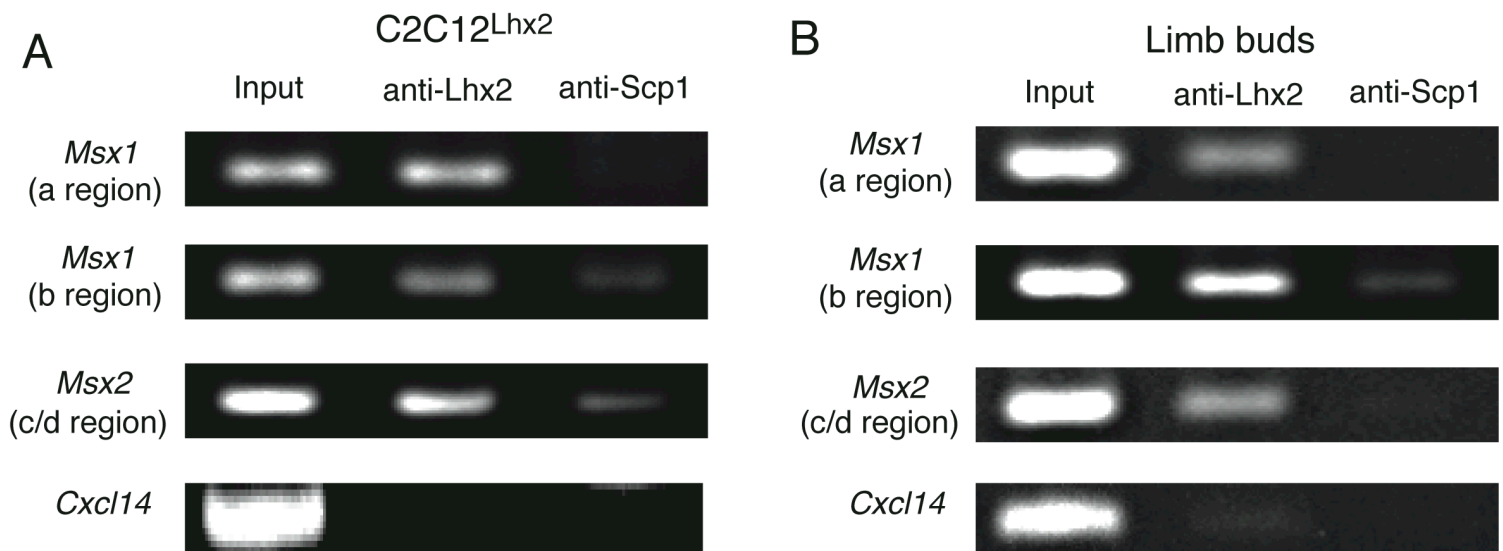


図10 Lhx2は、*Msx1*と*Msx2*遺伝子のエンハンサー領域のクロマチンDNAと相互作用する

C2C12^{Lhx2}細胞(A)もしくは肢芽(B)のクロマチンDNAを、抗Lhx2抗体もしくはコントロールとして抗Scp1抗体を用いて免疫沈降し、PCRによって*Msx1*のa,b領域、*Msx2*のc/d領域で設計したプライマーを用いて検出した。全クロマチン分画をPCRして、インプットコントロールとして示した。*Cxcl14*プライマーでPCRしたものは、抗体に非特異的に結合するクロマチンDNAに対するコントロールとして示した。

第二章

序論

脊椎動物の発生では、脊索の両側に位置する沿軸中胚葉から体節ができ、その背側から骨格筋の元である筋節が形成される。筋節の運命決定には、近傍の組織から分泌される様々なサイトカインが必須の役割を果たしている。体節が背側の神経管や外胚葉から分泌される Bone morphogenetic protein (Bmp)や Wnt などの因子の影響を受けると、筋節への発生が促され、さらに Sonic hedgehog (Shh)と Wnt の相乗的な作用により、筋節の分化がもたらされる [33]。

皮筋節に存在する筋前駆細胞では、Paired-homeodomain transcription factor 3 (*Pax3*) 遺伝子が高発現しており、*Pax3* が発現低下すると、*Myf5* や *MyoD* 遺伝子などの骨格筋特異的転写因子群の発現が始まり、筋芽細胞の分化と融合を経て筋管が形成される [34]。四肢の発生過程では、体節から筋前駆細胞が遊走して分化することで骨格筋部分がつくられる [34]。頭部の筋肉は、鰓弓中胚葉の筋前駆細胞が遊走して分化することによって形成される。興味深いことに、同じ筋組織であっても部位によって作用する転写因子や制御機構が異なる。例えば、鰓弓の中胚葉においては、T-box transcription factor 1 (*Tbx1*)、Transcription factor 21 (*Tcf21*)、Paired-like homeodomain transcription factor 2 (*Pitx2*)といった転写因子が相互作用し、*Lhx2* の発現誘導を介して、*Myf5* 遺伝子の転写レベルを増加させて、筋分化を促進する [9]。また、四肢では、筋前駆細胞の遊走に、Ladybird homeobox 1 (*Lbx1*)、C-X-C chemokine receptor type 4 (*CXCR4*)、c-met が関与しており、肢芽先端で発現している *Msx1* が、*Myf5* や *MyoD* 遺伝子の発現を抑制することで、未分化筋芽細胞のプールを維持していると考えられている [24, 34]。*Lhx2* 遺伝子も

Msx1 遺伝子と同様に肢芽において発現しているが、その意義はわかっていなかった。

第一章において、私は、マウス胎仔肢芽において、*Lhx2* が *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の転写を活性化する役割を果たすことを示した。本章では、*Lhx2* が示す強い筋分化抑制活性の背後にある、他の *Lhx2* 下流標的遺伝子を探索した。その結果、*Lhx2* が *Bmp4* と *Tgfβ* ファミリーメンバー遺伝子の発現を誘導することを見出した。

材料と方法

siRNA 導入による *Msx1*, *Msx2* 遺伝子のノックダウン

第一章で樹立した C2C12^{Lhx2} 細胞株を用いて、*Msx1*, *Msx2* 遺伝子の発現を抑制した。*Msx1* 遺伝子に対しては、市販の二本鎖 siRNA (Qiagen, Hilden, Germany) をトランスフェクトすることで、一過的に発現を抑制した。*Msx2* 遺伝子については、レトロウイルスベクター pRePS に 3'UTR から設計した 19 bp の siRNA 標的配列を組み込み、それを感染させることによって安定的に発現を抑制した。それぞれの遺伝子中の siRNA 標的配列を、表 2 に示した。

マイクロアレイ解析

C2C12^{Lhx2} 細胞と C2C12^{Empty} 細胞より total RNA を抽出し、Takara 社による SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いたマイクロアレイ受託解析に供した。発現プロファイルの Pathway 解析には、MetaCore (Thomson Reuter, New York, NY) を用いた。

アルカリフォスファターゼ染色

C2C12^{Empty} 細胞、および C2C12^{Lhx2} 細胞を 96 well プレーットの 3 ウェルに 10^3 個ずつ播き、10 % FBS-DMEM 培地で培養した。サンプルの一部は、1 日後にマウス BMP4 (100 ng/ml, R&D systems, Minneapolis, MN) を添加し、さらに 3 日間培養した。4 % PFA で 20 分間固定し、洗浄後、専用バッファー [0.1M NaCl, 0.05M MgCl₂, 0.1M Tris HCl (pH 9.5)] でインキュベートし、BM purple (50 μ l, Roche) を加えてアルカリフォスファターゼの発色反応を行った。

結果

Lhx2 は *Bmp4*, *TGFβ* ファミリー遺伝子の発現量を増加させる

Lhx2 の過剰発現による筋分化阻害の原因が、*Msx1*, *Msx2* 遺伝子の発現誘導だけかどうか決めるために、C2C12^{Lhx2} 細胞の *Msx1*, *Msx2* 遺伝子発現をノックダウンしてみた。遺伝子特異的な siRNA の導入によって、*Msx1* と *Msx2* の mRNA レベルは減少した (図 11A)。次に、筋分化の初期に発現する *troponin C fast* 遺伝子の発現量を qRT-PCR を用いて調べた [35]。*Msx1* と *Msx2* 遺伝子の発現が抑制されていても、筋分化はおこらず (図 11B)、*troponin C fast* 遺伝子の発現は検出されなかった (図 11C)。したがって、Lhx2 は *Msx1* と *Msx2* だけでなく、他の筋分化阻害因子の発現を誘導する可能性が示唆された。

そこで、C2C12^{Lhx2} 細胞と C2C12^{Empty} 細胞の RNA をマイクロアレイ解析にかけて、発現量に違いがある遺伝子をゲノムワイドで探索した。Lhx2 の過剰発現により、395 個の遺伝子の発現レベルが増加し、139 個の遺伝子が発現低下していた。代表的な遺伝子のリストを表 5 と表 6 に示す。興味深いことに、C2C12^{Lhx2} 細胞では *Bmp4* と transforming growth factor beta (*Tgfβ*) 関連遺伝子群の発現レベルが、C2C12^{Empty} 細胞と比べて顕著に増加していた (図 11D)。*Bmp4*, *Tgfβ1*, *Tgfβ2*, *Tgfβ3* mRNA の発現増加は、RT-PCR によっても確認された (図 11E)。*Bmp4* と *Tgfβ* ファミリータンパク質は、骨格筋分化を阻害することが報告されているため [36, 37]、これらも *Msx1*, *Msx2* と同様に、Lhx2 の下流エフェクターとして筋分化抑制に働いていると考えられる。

Bmp4 には、骨分化を促進する作用があるので [38]、Lhx2 の過剰発現によって筋芽細胞が骨細胞へ分化転換している可能性が存在する。この点をはっきりさせるために、骨分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) の活性を測定することにした。C2C12^{Empty} 細胞に *Bmp4* (100 ng/ml) を添加して培養したところ、予想通り ALP 陽性の細

筋集団が出現した (図 12)。しかし、C2C12^{Lhx2} 細胞では、同様の ALP 陽性細胞は分化誘導されなかった (図 12)。これは、内在性 Bmp4 の分泌量が少ないためかも知れない。しかし、少なくとも Lhx2 による筋分化阻害には、内在性 Bmp4 による骨分化転換は関与していないことが示された。

Lhx2 は C2C12 において *Myf5* 遺伝子の転写を活性化しない

先行研究によると、鰓弓の筋前駆細胞において、Lhx2 は *Myf5* 遺伝子の転写を活性化し、顔筋の形成に寄与することが報告されている [9]。そこで、Lhx2 が骨格筋以外の筋肉組織の発生に関わる転写因子群の発現に影響を与えるかどうかを知るために、C2C12^{Lhx2} 細胞と C2C12^{Empty} 細胞のマイクロアレイデータを再解析した。骨格筋の筋分化に関わる転写因子群では、*MyoD*、*myogenin* 遺伝子の発現量が C2C12^{Lhx2} 細胞では顕著に低下していた (表 7)。この事実は、RT-PCR によっても確認された (図 13A)。*Myf6* 遺伝子の発現量は逆に若干増加していた。

一方、鰓弓由来の筋組織と心筋の分化に関連する転写因子群は、C2C12^{Lhx2} 細胞と C2C12^{Empty} 細胞との間で発現量に差がほとんどないか、あるいはシグナルが検出されなかった (表 8, 9)。上述した鰓弓由来の筋組織に関する論文では、C2C12 細胞を用いた ChIP アッセイにより、Lhx2 が *Myf5* 遺伝子のエンハンサー領域に結合することを示している。マウス胎仔肢芽を用いて、先行研究と同じプライマーセットを用いて ChIP アッセイを行ってみたところ、Lhx2 は確かに *Myf5* 遺伝子のエンハンサー a 領域に結合していた (図 13B)。しかしながら、C2C12^{Lhx2} 細胞と C2C12^{Empty} 細胞との間で、*Myf5* mRNA の発現レベルに差はなかった (図 13A)。これらの実験結果は、*Myf5* 遺伝子の転写調節機構は骨格筋と鰓弓筋前駆細胞とで異なることを明瞭に示している。

考察

Lhx2 を筋芽細胞に過剰発現させると、筋分化が強く阻害される。第一章で示したように、Lhx2 は筋分化阻害活性を有する *Msx1*, *Msx2* 遺伝子の発現を顕著に増大させる。さらに、Lhx2 と *Msx1* タンパク質が複合体を形成することも報告されている [25]。したがって、*Msx1* と *Msx2* が、Lhx2 過剰発現による筋分化阻害の中心的なエフェクターである可能性があったが、事実はそう単純ではなかった。Lhx2 を過剰発現させたまま *Msx1*, *Msx2* 遺伝子をノックダウンしても、筋分化の抑制は解除されなかった。

より重要なことに、Lhx2 の過剰発現によって、*Bmp4* と *Tgf β* ファミリー遺伝子群が発現誘導されることが判明した。先行研究では、*Bmp4*, *Tgf β 1*, *Tgf β 2*, *Tgf β 3* は筋衛星細胞由来の筋芽細胞、もしくは C2C12 細胞の筋管分化を抑制することが知られている [36, 37]。筋芽細胞が *Tgf β* で刺激されると、*Smad3* がリン酸化され、*MyoD* と特異的に結合することでその働きをブロックする [39]。*Tgf β* の添加は、*MyoD* 自体の発現レベルも低下させる [40]。本章では、C2C12^{Lhx2} 細胞では *MyoD* 遺伝子の発現が消失していることを示したが、これは *Tgf β* の発現誘導を介した間接的な効果である可能性もある。いずれにせよ、Lhx2-*Tgf β* 軸の発見は骨格筋分化を抑制する新しい経路としてとても意義深い。

最後に本研究では、鰓弓の筋前駆細胞において報告された、Lhx2 による *Myf5* 遺伝子の転写活性化は、骨格筋には当てはまらないことを証明した。肢芽において、Lhx2 は *Myf5* 遺伝子エンハンサー領域に存在するコンセンサス配列に確かに結合していたが、転写活性化には働いていなかった。第一章でも考察したように、骨格筋では *Myf5* 遺伝子エンハンサー領域に Lhx2 の作用を抑制するレプレッサーが存在するか、あるいはエピジェネティックな修飾が施されていると推察される。筋組織においても、Lhx2 の作

用が context-dependent であることを明瞭に示した結果である。

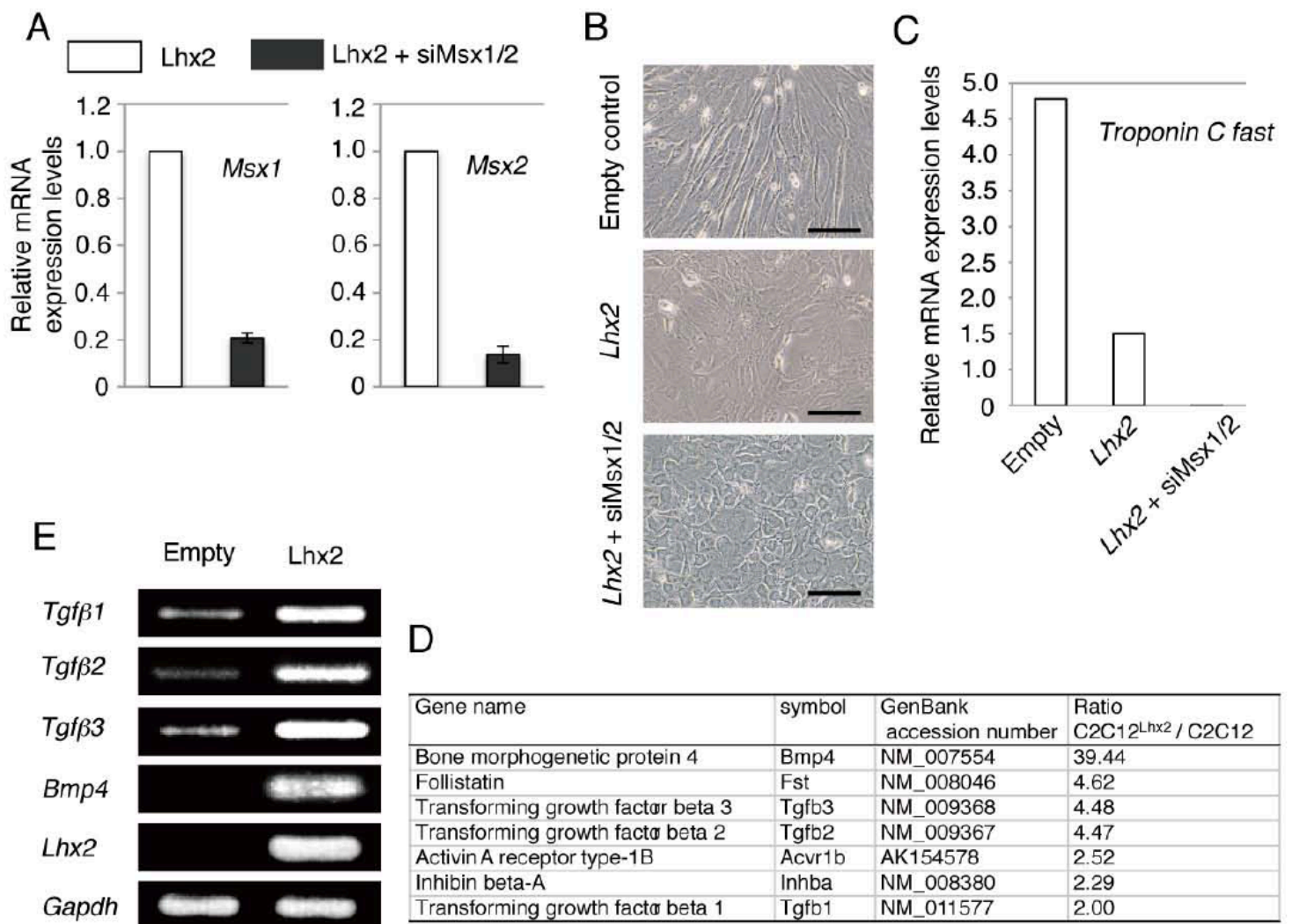


図11 C2C12細胞においてLhx2を過剰発現することにより、*Bmp4*、*Tgfβ*を含む多様な遺伝子発現が亢進した

- (A) C2C12^{Lhx2}細胞における、siRNAを介した*Msx1*と*Msx2*遺伝子のノックダウン。*Msx1*と*Msx2*のmRNA発現レベルは、リアルタイムPCRによって比較した(mean ± SE, n=6)。それぞれの相対値は、*Gapdh*を用いて表した。
- (B) C2C12^{Empty}細胞、C2C12^{Lhx2}細胞とsiMsx1/2処理したC2C12^{Lhx2}細胞を、3日間筋分化誘導条件で培養し、細胞の形態を示した。Scale bar = 100μm
- (C) C2C12^{Empty}細胞、C2C12^{Lhx2}細胞とsiMsx1/2処理したC2C12^{Lhx2}細胞を、2-3日間筋分化誘導条件で培養し、*Troponin C fast*遺伝子のmRNA発現レベルを、リアルタイムPCRによって比較した。それぞれの相対値は、*Gapdh*を用いて表した。
- (D) マイクロアレイ解析により、C2C12^{Lhx2}細胞とC2C12^{Empty}細胞を比較して、遺伝子発現量が増加した内の、*Tgfβ*関連遺伝子リスト。
- (E) C2C12細胞にLhx2を過剰発現させることで、*Bmp4*、*Tgfβ1*、*Tgfβ2*、*Tgfβ3*の遺伝子発現量が増加することを、RT-PCRにより確認した。コントロールには、*Gapdh*を用いた。

表5 C2C12^{Lhx2}細胞において発現量が増加した遺伝子

Gene name	Log2 ratio	Gene symbol	ID	Cytoband
fibronectin type III domain containing 1	7.47	Fndc1	NM_001081416	mm117qA1
PERP, TP53 apoptosis effector	6.21	Perp	NM_022032	mm110qA3
microfibrillar associated protein 5	5.86	Mfap5	NM_015776	mm16qF1
sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1	5.60	Svep1	NM_022814	mm4qB3
colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	5.59	Csf2rb	NM_007780	mm115qE1
bone morphogenetic protein 4	5.30	Bmp4	NM_007554	mm114qC1
neutrophil cytosolic factor 4	5.12	Ncf4	NM_008677	mm115qE1
beta-site APP-cleaving enzyme 2	5.05	Bace2	NM_019517	mm116qC4
myeloid leukemia factor 1, transcript variant 2	5.02	Mif1	NM_010801	mm13qE1
lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	4.98	Lgals3bp	NM_011150	mm111qE2
collagen, type XII, alpha 1	4.74	Col12a1	NM_007730	mm9qE1
solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 2	4.64	Slc16a2	NM_009197	mm1XqD
complement component 1, s subcomponent, transcript variant 1	4.58	C1s	NM_144938	mm6qF2
colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)	4.56	Csf2rb2	NM_007781	mm115qE1
predicted gene 5077	4.51	Gm5077	NM_173864	mm6qF2
phospholipase A2, group IIE	4.47	Pla2g2e	NM_012044	mm4qD3
lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	4.47	Lgals3bp	NM_011150	mm111qE2
colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)	4.31	Csf2rb2	NM_007781	mm115qE1
lincRNA:chr5:15033568-15033987 forward strand	4.14			mm15qA2
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3, transcript variant 1	4.14	Dhrs3	NM_011303	mm4qE1
UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6B	4.13	Ugt1a6b	NM_201410	mm11qD
coiled-coil domain containing 80	4.12	Ccdc80	NM_026439	mm116qB5
proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 1, transcript variant 1	4.02	Prrg1	NM_027322	mm1XqB
interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A	4.02	Ifi272a	NM_029803	mm112qE
transmembrane protein 45a	4.01	Tmem45a	NM_019631	mm116qC1.1
decorin (Dcn), transcript variant 2	3.88	Dcn	NM_007833	mm110qC3
plexin domain containing 2	3.85	Plexc2	NM_026162	mm2qA3
coiled-coil domain containing 80	3.82	Ccdc80	NM_026439	mm116qB5
neuropeptide Y receptor Y1	3.78	Npy1r	NM_010934	mm8qB3.3
expressed sequence A1646023	3.74	A1646023	NM_198860	mm110qC1
actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	3.73	Actg2	NM_009610	mm6qC3
prostaglandin E receptor 1 (subtype EP1)	3.71	Ptger1	NM_013641	mm8qC2
integrin alpha 11	3.71	Itpa11	NM_176922	mm9qB
spondin 2, extracellular matrix protein	3.70	Spon2	NM_133903	mm5qB1
family with sequence similarity 181, member B	3.68	Fam181b	NM_021427	mm7qE1
SH2 domain containing 4A	3.65	Sh2d4a	NM_028182	mm8qB3.3
receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	3.59	Ramp2	NM_019444	mm11qD
bone gamma-carboxyglutamate protein, related sequence 1	3.55	Bglap-rs1	NM_031368	mm13qF1
bone gamma-carboxyglutamate protein, related sequence 1	3.53	Bglap-rs1	NM_031368	mm13qF1
bone gamma-carboxyglutamate protein 2	3.52	Bglap2	NM_001032298	mm13qF1
FMS-like tyrosine kinase 1	3.51	Fli1	NM_010228	mm5qG3
guanine deaminase	3.50	Gda	NM_010266	mm119qB
phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1	3.47	Pik3ip1	NM_178149	mm111qA1
colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	3.47	Csf2rb	NM_007780	mm115qE1
ADP-ribosylation factor-like 4D	3.46	Arl4d	NM_025404	mm11qD
family with sequence similarity 198, member B	3.45	Fam198b	NM_133187	mm13qE3
src homology three (SH3) and cysteine rich domain	3.37	Stac	NM_016853	mm9qF3
chemokine (C-C motif) ligand 8	3.31	Ccl8	NM_021443	mm111qC
carbonyl reductase 2	3.30	Cbr2	NM_007621	mm11qE2
collagen, type I, alpha 1	3.29	Col1a1	NM_007742	mm11qD
family with sequence similarity 46, member A, transcript variant 1	3.29	Fam46a	NM_001160378	mm9qE3.1
BCL2-like 15, transcript variant 1	3.28	Bcl2l15	NM_001142959	mm13qF2.2
DNA segment, human D4S114, transcript variant 1	3.27	D0H4S114	NM_053078	mm118qB1
transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2	3.27	Tmeff2	NM_019790	mm11qC1.1
secretory leukocyte peptidase inhibitor	3.26	Slpi	NM_011414	mm2qH3
SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1 Gene	3.23	AK042881		mm110qD2
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 7	3.23	Slc7a7	NM_011405	mm114qC2
carbonyl reductase 2	3.20	Cbr2	NM_007621	mm11qE2
coagulation factor III	3.18	F3	NM_010171	mm13qG1
predicted gene 12824	3.16	Gm12824	NM_001085549	mm4qD1
kinesin family member 26B	3.16	Kif26b	NM_001161665	mm11qH4
histone cluster 2, H3c2, pseudogene	3.12	Hist2h3c2-ps	NM_054045	mm13qF2.1
ADP-ribosylation factor-like 4D	3.08	Arl4d	NM_025404	mm11qD
guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2, transcript variant 1	3.07	Gng2	NM_010315	mm114qA3
deiodinase, iodothyronine, type II	3.07	Dio2	NM_010050	mm112qD3
IgLO family member 5	3.07	Iglo5	NM_001164518	mm17qB4
coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10	3.05	Chchd10	NM_175329	mm110qC1
DNA segment, Chr 18, ERATO Doi 653, expressed	3.04	D18Ert653e	NM_172631	mm118qE2
EGF-like repeats and discoidin 1-like domains 3, transcript variant 2	3.03	Edil3	NM_010103	mm113qC3
keratin 14	3.02	Krt14	NM_016958	mm11qD
coagulation factor III	3.00	F3	NM_010171	mm13qG1
osteoglycin	2.99	Ogn	NM_008760	mm113qA5
platelet-derived growth factor receptor-like	2.95	Pdgfrl	NM_026840	mm8qA4
carbonic anhydrase 5b, mitochondrial, nuclear gene encoding mitochondrial protein	2.94	Car5b	NM_181315	mm1XqF5
histone cluster 2, H2aa1	2.94	Hist2h2aa1	NM_013549	mm13qF2.1
RIKEN cDNA 4632428N05 gene (4632428N05Rik), transcript variant 1	2.93	4632428N05Rik	NM_028732	mm110qB4
olfactomedin-like 3	2.92	Olfml3	NM_133859	mm13qF2.2
lincRNA:chr15:32708654-32725622 forward strand	2.91			mm115qB3.1
olfactomedin-like 3	2.89	Olfml3	NM_133859	mm13qF2.2
musculim	2.86	Msc	NM_010827	mm11qA3
glutathione peroxidase 3, transcript variant 2	2.85	Gpx3	NM_008161	mm11qB1.3
selenoprotein P, plasma, 1, transcript variant 3	2.82	Sepp1	NM_001042614	mm115qA1
myosin, light polypeptide 9, regulatory	2.81	My19	NM_172118	mm2qH1
leucine-rich repeat LGI family, member 4	2.80	Lgi4	NM_144556	mm7qB1
monoglyceride lipase, transcript variant 1	2.80	Mgll1	NM_001166251	mm6qD1
caspase 1	2.79	Casp1	NM_009807	mm9qA1
adult male urinary bladder cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:953005004 product:unclassifiable, full insert sequence	2.78	Gm3065	AK137227	mm115qB3.1
aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1	2.78	Aldh1l1	NM_027406	mm6qD1
monoglyceride lipase, transcript variant 1	2.77	Mgll1	NM_001166251	mm6qD1
parathyroid hormone-like peptide	2.77	Pthlh	NM_008970	mm6qG3
DIRAS family, GTP-binding RAS-like 2	2.77	Diras2	NM_001024474	mm113qA5
erythrocyte protein band 4.1-like 4b	2.74	Epb4.14b	NM_019427	mm4qB3
leukemia inhibitory factor receptor, transcript variant 2	2.74	Lifr	NM_001113386	mm115qA1
neuron specific gene family member 1	2.73	Nsg1	NM_010942	mm5qB3
connective tissue growth factor	2.73	Ctgf	NM_010217	mm110qA4
family with sequence similarity 20, member A	2.72	Fam20a	NM_153782	mm11qE1
ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast)	2.72	Elovl7	NM_029001	mm113qD2.1
phosphatidic acid phosphatase type 2B	2.72	Ppap2b	NM_080555	mm4qC6
lincRNA:chr15:32708654-32725622 forward strand	2.70			mm115qB3.1
nidogen 2	2.67	Nid2	NM_008695	mm114qA3
Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2	2.66	Rassf2	NM_175445	mm2qF2

表6 C2C12Lhx2細胞において発現量が減少した遺伝子

Gene name	Log2 ratio	Gene symbol	ID	Cytoband
G protein-coupled receptor 97	-5.96	Gpr97	NM_173036	mm 8qD1
RIKEN cDNA 1700012B09 gene	-5.35	1700012B09Rik	NM_029306	mm 9qA2
docking protein 7 Gene	-5.21		AK170454	mm 5qB2
tripartite motif-containing 54	-4.92	Trim54	NM_021447	mm 5qB1
adducin 2 (beta)	-4.50	Add2	NM_013458	mm 6qD1
selectin, platelet	-4.49	Sclp	NM_011347	mm 1qH2.2
nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	-4.31	Ngfr	NM_033217	mm 11qD
receptor (calcitonin) activity modifying protein 3	-4.02	Ramp3	NM_019511	mm 11qA1
keratin 13	-4.01	Krt13	NM_010662	mm 11qD
leucine rich repeat and Ig domain containing 2, transcript variant 1	-3.99	Lingo2	NM_001165999	mm 4qA5
TNF receptor-associated factor 1	-3.80	Traf1	NM_009421	mm 2qB
solute carrier organic anion transporter family, member 4a1	-3.75	Slc04a1	NM_148933	mm 2qH4
fibroblast growth factor 7	-3.74	Fgf7	NM_008008	mm 2qF1
GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	-3.56	Glipr1	NM_028608	mm 10qD2
hydrogen voltage-gated channel 1, transcript variant 1	-3.49	Hvcn1	NM_001042489	mm 5qF
Eph receptor A4	-3.39	Epha4	NM_007936	mm 1qC4
lincRNA:chr6:40693617-40720167 forward strand	-3.36			mm 6qB1
growth associated protein 43	-3.35	Gap43	NM_008083	mm 16qB4
cholinergic receptor, nicotinic, delta polypeptide	-3.35	Chrnd	NM_021600	mm 1qD
lincRNA:chr6:40693617-40720167 forward strand	-3.32			mm 6qB1
lincRNA:chr13:62580825-62596425 reverse strand	-3.32			mm 13qB3
lincRNA:chr6:40699474-40719122 forward strand	-3.30			mm 6qB1
transformation related protein 53 inducible protein 11	-3.30	Trp53i11	NM_001025246	mm 2qE1
leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6	-3.28	Lgr6	NM_001033409	mm 1qE4
PDZ and LIM domain 3	-3.24	Pdlim3	NM_016798	mm 8qB1.1
solute carrier family 14 (urea transporter), member 1, transcript variant 2	-3.22	Scl14a1	NM_028122	mm 18qE3
lincRNA:chr6:40699474-40719122 forward strand	-3.21			mm 6qB1
small proline-rich protein 1A	-3.20	Sprr1a	NM_009264	mm 3qF1
gap junction protein, beta 3, transcript variant 1	-3.14	Gjb3	NM_001160012	mm 4qD2.2
myosin, light polypeptide 1, transcript variant 1f	-3.11	My11	NM_021285	mm 1qC3
CD200 antigen	-3.10	Cd200	NM_010818	mm 16qB5
N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 3	-3.10	Ndst3	NM_031186	mm 3qG1
adult male aorta and vein cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A530047M13 product:unclassifiable, full insert sequence	-2.99		AK080018	mm 15qD3
lincRNA:chr6:40693617-40720167 forward strand	-2.97			mm 6qB1
germ cell-specific gene 1, transcript variant 3	-2.96	Gsg1	NM_010352	mm 6qG1
c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	-2.95	Mertk	NM_008587	mm 2qF1
protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform, transcript variant 2	-2.93	Ppp2r2b	NM_028392	mm 18qB3
cyclin O	-2.92	Ceno	NM_001081062	mm 13qD2.2
xin actin-binding repeat containing 1	-2.88	Xirp1	NM_011724	mm 9qF4
caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	-2.84	Casp4	NM_007609	mm 9qA1
RIKEN cDNA 1600029D21 gene	-2.75	1600029D21Rik	NM_029639	mm 9qA5.3
transmembrane protein 209	-2.74	Tmem209	NM_178625	mm 6qA3.3
dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 1	-2.73	Dyne1i1	NM_010063	mm 6qA1
sialic acid binding Ig-like lectin 15	-2.71	Siglec15	NM_001101038	mm 18qE3
SH3 and cysteine rich domain 3	-2.68	Stac3	NM_177707	mm 10qD3
microsomal glutathione S-transferase 2	-2.68	Mgst2	NM_174995	mm 3qC
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), and GPI membrane anchor, (semaphorin) 7A	-2.66	Sema7a	NM_011352	mm 9qB
dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 1, transcript variant 1	-2.66	Dyne1i1	NM_010063	mm 6qA1
transmembrane protein 171	-2.64	Tmem171	NM_001025606	mm 13qD1
maltase-glucosylase	-2.62	Mgam	NM_001171003	mm 6qB1
dual specificity phosphatase 9	-2.62	Dusp9	NM_029352	mm XqA7.3
cDNA sequence BC002189	-2.61	BC002189	BC002189	mm 3qA2
actinin alpha 3	-2.59	Actn3	NM_013456	mm 19qA
troponin T1, skeletal, slow	-2.58	Tnnt1	NM_011618	mm 7qA1
carbonic anhydrase 3	-2.57	Car3	NM_007606	mm 3qA1
CD164 sialomucin-like 2	-2.54	Cd164i2	NM_027152	mm 4qD2.3
actin, alpha, cardiac muscle 1	-2.54	Acte1	NM_009608	mm 2qE4
mitogen-activated protein kinase 8	-2.54	Mapk8	NM_016700	mm 14qB
chloride channel calcium activated 4	-2.53	Clea4	NM_139148	mm 3qH2
myogenin	-2.51	Myog	NM_031189	mm 1qE4
MONTH14_08_P15.x1 FH MONTH14 cDNA clone MONTH14_08_P15	-2.48	3010033K07Rik	DV059070	mm 8qD3
membrane-associated ring finger (C3HC4) 11	-2.46	March11	NM_177597	mm 15qB1
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like	-2.44	Hpd1	NM_146256	mm 4qD1
neurexophilin 3	-2.44	Nxph3	NM_130858	mm 11qD
dual specificity phosphatase 5	-2.40	Dusp5	NM_001085390	mm 19qD2
myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic	-2.38	Myh3	NM_001099635	mm 11qB3
LanC lantibiotic synthetase component C-like 3 (bacterial)	-2.33	Lanc13	NM_173414	mm XqA1.1
catenin (cadherin associated protein), alpha-like 1	-2.32	Ctnna1	NM_018761	mm 4qB3
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9c	-2.31	Serpib9c	NM_011456	mm 13qA3.3
tec protein tyrosine kinase, transcript variant 1	-2.29	Tec	NM_001113460	mm 5qC3.2
Rho GTPase activating protein 9	-2.28	Arhgap9	NM_146011	mm 10qD3
podocalyxin-like	-2.25	Podxl	NM_013723	mm 6qA3.3
myogenin	-2.25	Myog	NM_031189	mm 1qE4
lincRNA:chr6:125407739-125408857 forward strand	-2.23			mm 6qF3
amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 12 (human)	-2.23	Als2cr12	NM_175370	mm 1qC1.3
tec protein tyrosine kinase, transcript variant 1	-2.22	Tec	NM_001113460	mm 5qC3.2
titin transcript variant N2-A	-2.22	Tin	NM_011652	mm 2qC3
ATPase, class II, type 9A	-2.22	Atp9a	NM_015731	mm 2qH3
synuclein, gamma	-2.21	Sneg	NM_011430	mm 14qB
keratin 19	-2.20	Krt19	NM_008471	mm 11qD
myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic	-2.18	Myh3	NM_001099635	mm 11qB3
lincRNA:chr7:149761435-149764019 reverse strand	-2.18			mm 7qF5
integrin beta 7	-2.17	Irgb7	NM_013566	mm 15qF3
single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain	-2.16	Sigirr	NM_023059	mm 7qF5
lincRNA:chr7:149761435-149764019 reverse strand	-2.16			mm 7qF5
ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	-2.16	Ankrd1	NM_013468	mm 19qC2
lincRNA:chr7:149761435-149764019 reverse strand	-2.15			mm 7qF5
lincRNA:chr7:149761435-149764019 reverse strand	-2.15			mm 7qF5
ring finger protein 183	-2.14	Rnf183	NM_153504	mm 4qB3
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9f	-2.14	Serpib9f	NM_183197	mm 13qA3.3
lincRNA:chr18:70400082-70404236 reverse strand	-2.12			mm 18qE2
dystrophin related protein 2	-2.12	Drp2	NM_010078	mm XqE3
lincRNA:chr7:149761435-149764019 reverse strand	-2.12			mm 7qF5
membrane-associated ring finger (C3HC4) 11	-2.12	March11	NM_177597	mm 15qB1
RNA binding motif protein 47, transcript variant 1	-2.11	Rbm47	NM_178446	mm 5qC3.1
phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	-2.11	Pla2g7	NM_013737	mm 17qB3
lincRNA:chr4:88542373-88589148 reverse strand	-2.11			mm 4qC4
reproductive homeobox 5	-2.11	Rhox5	NM_008818	mm 4qB3
hemoglobin alpha, adult chain 1	-2.10	Hba-a1	NM_008218	mm 11qA4
lincRNA:chr18:70400082-70404236 reverse strand	-2.09			mm 18qE2
solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 13	-2.08	Slc16a13	NM_172371	mm 11qB3

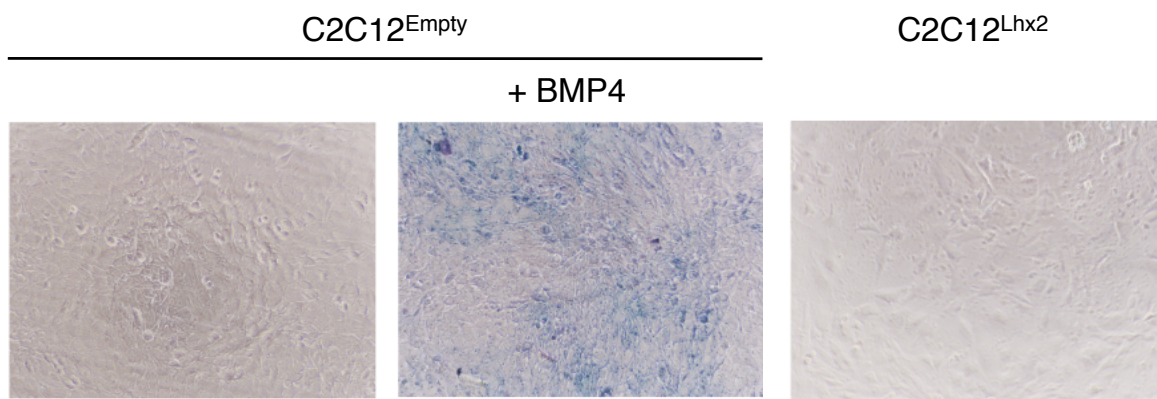


図12 C2C12におけるLhx2の過剰発現は骨分化を促進しない

C2C12Empty細胞もしくはC2C12Lhx2細胞を、一部サンプルにBMP4 (100 ng/ml)を添加して、3日間培養した。APバッファでインキュベートし、BMパープルを用いて発色した。

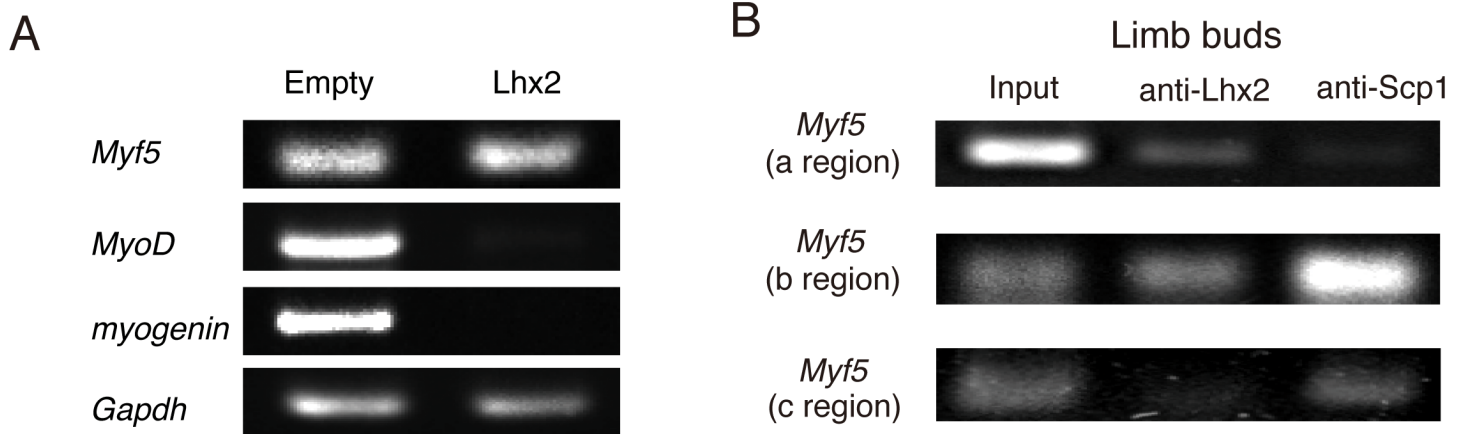


図13 Lhx2過剰発現による、骨格筋制御因子の発現に対する影響

- (A) C2C12^{Lhx2}細胞と、C2C12^{Empty}細胞における*Myf5*、*MyoD*、*myogenin*遺伝子の発現を、RT-PCRによって検出した。*Gapdh*をコントロールとして用いた。
- (B) 肢芽におけるクロマチン分画を、抗Lhx2抗体、もしくはコントロールとして抗Scp1抗体を用いて、免疫沈降を行い、*Myf5*遺伝子のエンハンサー領域においてプライマーを設計し(a,b,c領域)、PCRによって検出した。全クロマチン分画をPCRして、インプットコントロールとして示した。

表7 骨格筋特異的な転写因子の遺伝子発現(C2C12^{Lhx2} vs C2C12^{Empty})

Gene name	Log2 ratio	Gene symbol	ID	Cytoband
myogenic factor 6	1.74	Myf6	NM_008657	mm 10qD1
myogenic factor 5	0.25	Myf5	NM_008656	mm 10qD1
myogenic differentiation 1	-1.4	myod1	NM_010866	mm 7qB4
myogenin	-4.69	myog	NM_031189	mm 1qE4

表8 心筋特異的な転写因子の遺伝子発現(C2C12^{Lhx2} vs C2C12^{Empty})

Gene name	Log2 ratio	Gene symbol	ID	Cytoband
T-box 5	0.06	Tbx5	NM_011537	mm 5qF
serum response factor	-0.18	Srf	NM_020493	mm 17qC
GATA binding protein 4	-0.59	Gata4	NM_008092	mm 14qD1
NK2 transcription factor related, locus 5	-1	Nkx2-5	NM_008700	mm 17qA3.3
SRY-box containing gene 9	-1.27	Sox9	NM_011448	mm 11qE2

表9 鰓弓筋前駆細胞特異的な転写因子の遺伝子発現(C2C12^{Lhx2} vs C2C12^{Empty})

Gene name	Log2 ratio	Gene symbol	ID	Cytoband
musculin	2.86	Msc	NM_010827	mm 1qA3
transcription factor 21	0.93	Tcf21	NM_011545	mm 10qA3
T-box 1	0.29	Tbx1	NM_011532	mm 16qA3
paired-like homeodomain transcription factor 2	0.07	Pitx2	NM_001042502	mm 3qG3

総合考察

本研究では、*Lhx2* が筋芽細胞の分化を強力に阻害すること、そして骨格筋において *Lhx2* は、*Msx1*, *Msx2*, *Bmp4*, *Tgfβ* ファミリーメンバー遺伝子の発現を正に制御することを初めて明らかにした(図 14)。*Msx1* と *Msx2* は筋脱分化因子であることから、肢芽のような組織において、*Lhx2* は筋芽細胞のプールを維持するだけでなく、間葉系前駆細胞を増やすことで体重の30%を占める骨格筋の形成を助けているものと推察される。C2C12 細胞や筋衛星細胞の初代培養系では、*Lhx2* mRNA はほとんど発現していない。肢芽は *Lhx2* 陽性であることから、筋衛星細胞や筋芽細胞まで分化が進むと、筋分化を妨害しないよう *Lhx2* 遺伝子の転写をサイレンシングする何らかの機構が付与されるものと推察される。

Lhx2 には、成体骨髄や胎生期造血幹細胞を未分化の状態体外増幅する強力な活性があるため、*Lhx2* の過剰発現は骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞の自己複製も促進するのではないかと期待して研究を開始した。しかしながら、マウスから単離した筋衛星細胞にレトロウイルスベクターを用いて *Lhx2* 遺伝子を過剰発現させても、増殖や分化に顕著な違いは観察されなかった(小高悠作、修士論文 2011)。さらに、マウス ES 細胞を円軸中胚葉に *in vitro* 分化させた後で *Lhx2* を過剰発現させた場合でも、骨格筋前駆細胞のマーカである *Pax3*、*Pax7* の mRNA 発現レベルは上がったものの、*Pax7* タンパク質を発現している細胞の割合は増加しなかった(小高悠作、未発表データ)。幹細胞レベルでも、*Lhx2* の作用は context-dependent であった。しかし、骨格筋には特有の微小環境が存在するため、現存のマウス ES 細胞の *in vitro* 分化誘導系では筋衛星細胞を分化誘導できていない可能性も否定できない。

結論として、私は本博士論文において、骨格筋の発生分化における *Lhx2* の生理的

機能とその分子メカニズムの一端を解明した。鰓弓の筋前駆細胞で報告された *Lhx2* による *Myf5* 遺伝子の転写活性化が骨格筋では再現しないことから、*Lhx2* を介した遺伝子の組織特異的転写調節機構が当初の予想以上に複雑なものであることも実例をもって示した。私の研究はここで終了となるが、今後、*Lhx2* 遺伝子の骨格筋特異的トランスジェニックマウス、そして骨格筋特異的ノックアウトマウスを作出すれば、*Lhx2* 遺伝子の生理的役割に関してさらに多くの情報が得られるものと期待される。

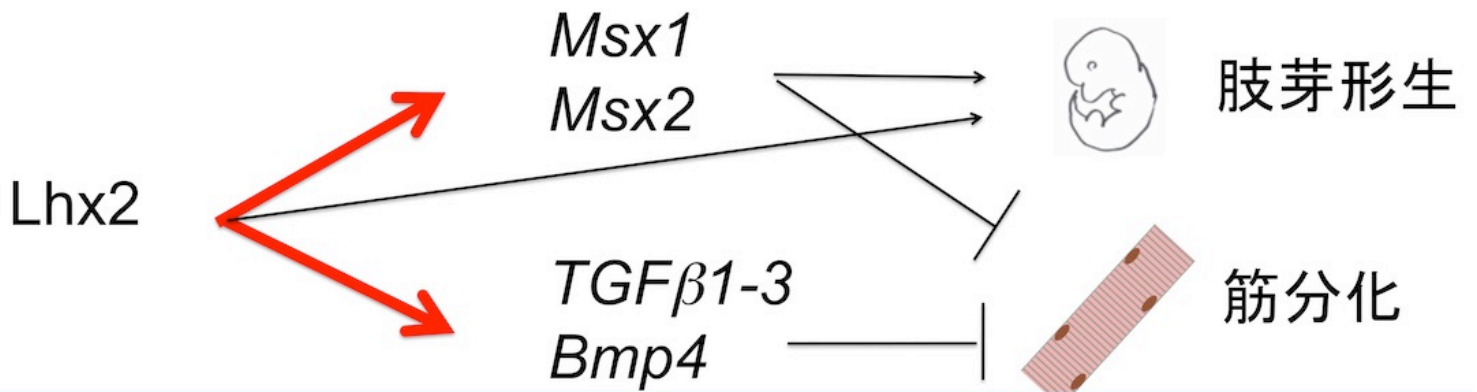


図14 Lhx2による、骨格筋発生分化の制御機構

本研究の知見を模式図に表した。Lhx2は、*Msx1*、*Msx2*遺伝子を転写制御する。また、*Tgfβ*ファミリー遺伝子の発現も増加させる(赤矢印)。これらの因子を介して、肢芽の発生と、筋分化を制御していると推察される。

参考文献

- [1] F.D. Porter, J. Drago, Y. Xu, S.S. Cheema, C. Wassif, S.P. Huang, E. Lee, A. Grinberg, J.S. Massalas, D. Bodine, F. Alt, H. Westphal, *Lhx2*, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development, *Development* 124 (1997) 2935-2944.
- [2] V.S. Mangale, K.E. Hirokawa, P.R. Satyaki, N. Gokulchandran, S. Chikbire, L. Subramanian, A.S. Shetty, B. Martynoga, J. Paul, M.V. Mai, Y. Li, L.A. Flanagan, S. Tole, E.S. Monuki, *Lhx2* selector activity specifies cortical identity and suppresses hippocampal organizer fate, *Science* 319 (2008) 304-309.
- [3] S.J. Chou, C.G. Perez-Garcia, T.T. Kroll, D.D. O'Leary, *Lhx2* specifies regional fate in *Emx1* lineage of telencephalic progenitors generating cerebral cortex, *Nat. Neurosci.* 12 (2009) 1381-1389.
- [4] H. Rhee, L. Polak, E. Fuchs, *Lhx2* maintains stem cell character in hair follicles, *Science* 312 (2006) 1946-1949.
- [5] A.R. Folgueras, X. Guo, H.A. Pasolli, N. Stokes, L. Polak, D. Zheng, E. Fuchs, Architectural niche organization by *LHX2* is linked to hair follicle stem cell function, *Cell Stem Cell* 13 (2013) 314-327.
- [6] O.P. Pinto do, K. Richter, L. Carlsson, Hematopoietic progenitor/stem cells immortalized by *Lhx2* generate functional hematopoietic cells in vivo, *Blood* 99 (2002) 3939-3946.

- [7] K. Kitajima, K. Minehata, K. Sakimura, T. Nakano, T. Hara, In vitro generation of HSC-like cells from murine ESCs/iPSCs by enforced expression of LIM-homeobox transcription factor Lhx2, *Blood* 117 (2011) 3748-3758.
- [8] K. Kitajima, M. Kawaguchi, M. Iacovino, M. Kyba, T. Hara, Molecular functions of the LIM-homeobox transcription factor Lhx2 in hematopoietic progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells, *Stem Cells* 31 (2013) 2680-2689.
- [9] I. Harel, Y. Maezawa, R. Avraham, A. Rinon, H.Y. Ma, J.W. Cross, N. Leviatan, J. Hegesh, A. Roy, J. Jacob-Hirsch, G. Rechavi, J. Carvajal, S. Tole, C. Kioussi, S. Quaggin, E. Tzahor, Pharyngeal mesoderm regulatory network controls cardiac and head muscle morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 18839-18844.
- [10] M.S. Roberson, W.E. Schoderbek, G. Tremml, R.A. Maurer, Activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 2985-2993.
- [11] K.K. Kim, S.B. Song, K.I. Kang, M. Rhee, K.E. Kim, Activation of the thyroid-stimulating hormone beta-subunit gene by LIM homeodomain transcription factor Lhx2, *Endocrinol.* 148 (2007) 3468-3476.
- [12] P.S. Hou, C.Y. Chuang, C.F. Kao, S.J. Chou, L. Stone, H.N. Ho, C.L. Chien, H.C. Kuo, LHX2 regulates the neural differentiation of human embryonic stem cells via transcriptional modulation of PAX6 and CER1, *Nucleic. Acids Res.* 41 (2013) 7753-7770.

- [13] D.E. Rincon-Limas, C.H. Lu, I. Canal, M. Calleja, C. Rodriguez-Esteban, J.C. Izpisua-Belmonte, J. Botas, Conservation of the expression and function of apterous orthologs in *Drosophila* and mammals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 2165-2170.
- [14] C. Bourgouin, S.E. Lundgren, J.B. Thomas, Apterous is a *Drosophila* LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles, *Neuron* 9 (1992) 549-561.
- [15] C.H. Lu, D.E. Rincon-Limas, J. Botas, Conserved overlapping and reciprocal expression of *msh/Msx1* and *apterous/Lhx2* in *Drosophila* and mice, *Mech. Dev.* 99 (2000) 177-181.
- [16] I. Tzchori, T.F. Day, P.J. Carolan, Y. Zhao, C.A. Wassif, L. Li, M. Lewandoski, M. Gorivodsky, P.E. Love, F.D. Porter, H. Westphal, Y. Yang, LIM homeobox transcription factors integrate signaling events that control three-dimensional limb patterning and growth, *Development* 136 (2009) 1375-1385.
- [17] T. Nohno, Y. Kawakami, N. Wada, T. Ishikawa, H. Ohuchi, S. Noji, Differential expression of the two closely related LIM-class homeobox genes *LH-2A* and *LH-2B* during limb development, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238 (1997) 506-511.
- [18] Barkes, C.A., Tapscott, S.J., MyoD and the transcriptional control of myogenesis, *Semin. Cell Dev. Biol.* 16 (2005) 585-595

- [19] Cerletti M, Shadrach JL, Jurga S, Sherwood R, Wagers AJ. Regulation and function of skeletal muscle stem cells, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 73 (2008) 317-22.
- [20] Brockes JP, Kumar A, Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 566–574.
- [21] Koshiba K, Kuroiwa A, Yamamoto H, Tamura K, Ide H. Expression of Msx genes in regenerating and developing limbs of axolotl, *J Exp Zool.* 282(6) (1998) 703-14.
- [22] S.J. Odelberg, A. Kollhoff, M.T. Keating, Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1, *Cell* 103 (2000) 1099-1109.
- [23] Bendall AJ, Ding J, Hu G, Shen MM, Abate-Shen C, Msx1 antagonizes the myogenic activity of Pax3 in migrating limb muscle precursors. *Development* 126 (1999) 4965–4976.
- [24] Buckingham M, Rigby PW., Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Dev Cell.* 10;28(2014)225-38.
- [25] A.J. Bendall, D.E. Rincon-Limas, J. Botas, C. Abate-Shen, Protein complex formation between Msx1 and Lhx2 homeoproteins is incompatible with DNA binding activity, *Differentiation* 63 (1998) 151-157.
- [26] Y. Tokura, Y. Nakayama, S. Fukada, N. Nara, H. Yamamoto, R. Matsuda, T. Hara, Muscle injury-induced thymosin beta4 acts as a chemoattractant for myoblasts, *J. Biochem.* 149 (2011) 43-48.

- [27] R.S. Fujino, K. Tanaka, M. Morimatsu, K. Tamura, H. Kogo, T. Hara, Spermatogonial cell-mediated activation of an IkappaBzeta-independent nuclear factor-kappaB pathway in Sertoli cells induces transcription of the lipocalin-2 gene, *Mol. Endocrinol.* 20 (2006) 904-915.
- [28] K. Ichiro Ohbayashi, K. Tanaka, K. Kitajima, K. Tamura, T. Hara, Novel role for the intraflagellar transport protein CMG-1 in regulating the transcription of cyclin-D2, E-cadherin and integrin-alpha family genes in mouse spermatocyte-derived cells, *Genes Cells* 15 (2010) 699-710.
- [29] Y. Lallemand, M.A. Nicola, C. Ramos, A. Bach, C.S. Cloment, B. Robert, Analysis of Msx1; Msx2 double mutants reveals multiple roles for Msx genes in limb development, *Development* 132 (2005) 3003-3014.
- [30] M. Srivastava, C. Larroux, D.R. Lu, K. Mohanty, J. Chapman, B.M. Degnan, D.S. Rokhsar, Early evolution of the LIM homeobox gene family, *BMC Biol.* 8 (2010) 4
- [31] L. Sumoy, C.K. Wang, A.C. Lichtler, L.J. Pierro, R.A. Kosher, W.B. Upholt, Identification of a spatially specific enhancer element in the chicken Msx-2 gene that regulates its expression in the apical ectodermal ridge of the developing limb buds of transgenic mice, *Dev. Biol.* 170 (1995) 230-242.
- [32] H.C. Cheng, C.K. Wang, W.B. Upholt, Transcriptional regulation of Msx2 in the AERs of developing limbs is dependent on multiple closely spaced regulatory elements, *Dev. Biol.* 270 (2004) 513-524.

- [33] Johnson RL, Tabin CJ., Molecular models for vertebrate limb development. *Cell*. 19;90 (1997) 979-90.
- [34] Yokoyama S, Asahara H., The myogenic transcriptional network. *Cell Mol Life Sci*. 68 (2011) 1843-9
- [35] Parmacek MS, Bengur AR, Vora AJ, Leiden JM. The structure and regulation of expression of the murine fast skeletal troponin C gene. Identification of a developmentally regulated, muscle-specific transcriptional enhancer. *J Biol Chem*. 265 (1990) 15970-6
- [36] Y. Ono, F. Calhabeu, J.E. Morgan, T. Katagiri, H. Amthor, P.S. Zammit, BMP signalling permits population expansion by preventing premature myogenic differentiation in muscle satellite cells, *Cell Death Differ*. 18 (2011) 222-234.
- [37] E.J. Schabort, M. van der Merwe, B. Loos, F.P. Moore, C.U. Niesler, TGF-beta's delay skeletal muscle progenitor cell differentiation in an isoform-independent manner, *Exp. Cell Res*. 315 (2009) 373-384.
- [38] Nojima J, Kanomata K, Takada Y, Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Takada T, Tsukui T, Yamamoto TS, Sasanuma H, Yoneyama K, Ueno N, Okazaki Y, Kamijo R, Yoda T, Katagiri T., Dual roles of smad proteins in the conversion from myoblasts to osteoblastic cells by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem*. 285(20) (2010) 15577-86

- [39] A.C. Mullen, D.A. Orlando, J.J. Newman, J. Loven, R.M. Kumar, S. Bilodeau, J. Reddy, M.G. Guenther, R.P. DeKoter, R.A. Young, Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF-beta signaling, *Cell* 147 (2011) 565-576.
- [40] T.B. Vaidya, S.J. Rhodes, E.J. Taparowsky, S.F. Konieczny, Fibroblast growth factor and transforming growth factor beta repress transcription of the myogenic regulatory gene MyoD1, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 3576-3579.

謝辞

本研究を行うにあたり、さまざまな方に大変お世話になりました。

松田先生にはいろいろと心配をかけましたが、最後まであたたかく声をかけてくださり、感謝しております。

原先生には、研究を進めていく上で、5年間ご指導いただきありがとうございました。

東京都医学総合研究所のみなさまにも、たくさんのご助言とご指導いただきありがとうございました。

みなさまのおかげで本研究を進めることができました。本当にありがとうございました。