

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 小高悠作

LIM ホメオドメイン型転写因子 **Lhx2** は、脳神経系の発生や毛包幹細胞の維持に必須の働きをする核内タンパク質である。**Lhx2** には、マウス ES/iPS 細胞から造血幹細胞を分化誘導し体外増幅させる活性があり、再生医療ツールとしても有望である。**Lhx2** は様々な種において発生中期の肢芽で強く発現しているが、骨格筋の発生分化における **Lhx2** の役割は解明されていない。

本研究では、肢芽発生に着目して、肢芽における **Lhx2** の発現が、骨格筋の分化に作用するものであると仮定し、筋分化への影響を検討した。その結果、**Lhx2** は筋芽細胞の筋分化を抑制するという。さらにこの筋分化の抑制作用は、**Lhx2** から **Msx** 遺伝子と **Tgfb** 関連遺伝子を介して行われていることを明らかにした。

第一章では、**Lhx2** の骨格筋に対する作用と、標的遺伝子の探索、制御機構について述べている。**Lhx2** を筋芽細胞で過剰発現した実験系においては、筋管形成の阻害が認められ、筋分化マーカーである **myogenin** とミオシン重鎖の発現も確認されなかった。この現象は、マウス筋衛星細胞の初代培養においても認められた。従って、**Lhx2** は骨格筋分化の抑制に作用していることがわかった。この筋分化抑制作用は、先行研究において報告されている **Msx1** 遺伝子の働きと一致していること、また発生期においても、肢芽で **Lhx2** と **Msx1** は共局在していることがわかってきたため、**Lhx2** と **Msx1** 遺伝子の相関について調べたところ、**Lhx2** を過剰発現した筋芽細胞では、**Msx1** 遺伝子と、そのファミリーである **Msx2** 遺伝子の発現レベルが亢進していることを明らかとなった。実際に肢芽を用いて **Lhx2** 遺伝子をノックダウンしたとき、**Msx1**、**Msx2** 共に発現レベルが減少したことから、**Lhx2** は肢芽において **Msx** 遺伝子の転写制御をしていると考えられる。さらにその作用機序を詳細にするため、レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、ChIP アッセイを行うことで、**Lhx2** タンパク質が、**Msx1**、**Msx2** 遺伝子のエンハンサー／プロモーター領域のそれぞれ 2ヶ所あるコンセンサス結合配列を認識し、転写制御をしていることが明らかになった。よってこれらの結果から、**Lhx2** は肢芽において骨格筋の分化を、**Msx** 遺伝子を介して抑制し、その未分化性を維持しているものであると考えられた。

第二章では、**Lhx2** の筋分化抑制の多岐に渡った作用機構を明らかにしている。第一章で **Msx** 遺伝子を介して **Lhx2** は筋分化を抑制しているものと考えられたが、**Lhx2** を過剰発現している筋芽細胞において、**Msx1**、**Msx2** 遺伝子をそれぞれノックダウンしても筋分化抑制作用はレスキューされなかった。そこで、**Msx** 遺伝子以外の経路を介した筋分化抑制

作用があると想定し、Lhx2 過剰発現時に変動している遺伝子をマイクロアレイ解析によって探索した。すると、パスウェイ解析の結果、Tgfb ファミリー遺伝子群の発現レベルが増加していることがわかった。先行研究において、Tgfb は筋分化を抑制していることが報告されているため、Msx 遺伝子の他に Tgfb ファミリー遺伝子を介した筋分化抑制作用があると考えられる。次に、Lhx2 が鰓弓や心筋の発生に必須であるという先行研究の結果から、筋芽細胞においても Lhx2 が鰓弓特異的及び心筋特異的な転写因子の転写を制御しているか、マイクロアレイ解析で得られた知見より比較した。すると、これら遺伝子の発現レベルは変動せず、鰓弓においては Lhx2 が結合して転写制御することが知られていた Myf5 遺伝子の発現レベルも変わらなかった。この結果は、Lhx2 は組織ごとに存在するコファクターと協調しながら、下流の遺伝子を転写制御することが想定される。

本論文は、1) 転写因子 Lhx2 が Msx1/2 遺伝子の発現誘導を介して骨格筋分化を抑制することの発見、そして2) その分子メカニズムの解明が主な内容である。Lhx2 は肢芽で強く発現しており、その生理的意味と下流制御遺伝子を同定したことは、骨格筋発生分野の進展に貢献する素晴らしい研究成果である。この研究を通じて、本論文提出者は転写制御因子の解析に必須な様々な分子生物学的実験手法（レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降、マイクロアレイデータのパスウェイ解析等）を習得している。前の実験結果から問題点を洗い出し、仮説を最終証明するための研究の道筋を自分で立てて研究できるようになった。

本論文は、発生に重要な転写因子である Lhx2 が骨格筋の分化に注目し、その働きと、標的とする遺伝子を明らかにした点で興味深く、高く評価される。成体における骨格筋幹細胞の増殖や分化を Lhx2 が直接制御しているかは不明であるが、発生において Lhx2 が筋分化抑制に作用することを詳細に調べたことは、単に Lhx2 の作用メカニズムを明らかにしただけではなく、発生を模した iPS 細胞からの分化誘導系の応用につながるものと期待され、高く評価できる。したがって、本研究は独自性があり、学術的意義も高いものと評価できる。本審査委員会では小高悠作は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。