

---

自己心筋細胞の増殖による心筋再生療法  
— 臨床応用に向けた研究 —

---

課題番号：15390243

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金  
( 基盤研究 (B) ) 研究成果報告書

平成18年4月

研究代表者： 伊 藤 宏

秋田大学 医学部 教授

<はしがき>

細胞周期は細胞の増殖に必須の機能であるが、増殖能を持たない心筋細胞における細胞周期に関してはほとんど研究がなされていなかった。われわれは以前から心不全の発症メカニズムと治療法に関する研究を続けてきたが、近年は心筋細胞における細胞周期が心不全の病態においてどのような役割を担っているかについて興味を持ち、研究のターゲットを「心筋細胞における細胞周期」に絞って研究を行ってきた。その過程で行った予備実験の結果、心筋細胞の細胞周期制御因子を操作することにより心筋を再生することが出来るのではないかとの結論にいたり、本研究を行った。本研究が成功すれば、予後不良な疾患である心不全に対する未来の治療法としての心筋再生療法につながると考えられる。

<研究組織>

研究代表者 : 伊藤 宏 (秋田大学医学部教授)

## <研究発表>

### 学会誌等

1. Morikawa K, Adachi S, Maejima Y, Adachi M, Suzuki J, Kitajima S, Ito H, M Isobe. HMG-CoA Reductase Inhibitor Fluvastatin Prevents Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy via Rho Kinase and Inhibition of Cyclin D1. *Life Sciences* (in press), 2006
2. Maejima Y, Adachi A, Morikawa K, Ito H, Isobe M. Nitric Oxide Inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J Mol Cell Cardiol.* 38; 163-174, 2005
3. Murakami, M., Ohba, T., Xu, F., Shida, S., Satoh, E., Ono, K., Miyoshi, I., Watanabe, H., Ito, H., and Iijima, T. Genomic organization and functional analysis of murine PKD2L1. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 5626 - 5635.
4. Suzuki J, Ito H, Gotoh R, Morishita R, Egashira K, Isobe M. Initial clinical cases using an NF- $\kappa$ B decoy at the site of the coronary stenting for prevention of restenosis. *Circ J* 68:270-271, 2004,
5. Maejima Y, Adachi A, Ito H, Nobori K, Tamamori-Adachi M, Isobe M. Nitric Oxide Inhibits Ischemia/Reperfusion-Induced Myocardial Apoptosis by Modulating Cyclin A-Associated Kinase Activity *Cardiovasc Res.* 59; 308-320, 2003
6. Tamamori-Adachi M, Ito H, S Piyamas, Adachi S, Hiroe M, Shimizu M, Kawauchi J, Sunamori M, Marumo F, Kitajima S, Ikeda M. Critical role of Cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res.* 92 12-19, 2003

### 口頭発表

1. 第78回 日本薬理学会年会 (平成17年3月23日、横浜)、シンポジウム20「心不全に関するトピックス 一分子薬理から臨床薬理まで」、S20-4 Heart failure and cell cycle
2. 第53回日本農村医学会学術総会 (平成16年10月7日・秋田)、ランチョンセミナー2「心不全の最新治療」
3. 第8回 日本心不全学会学術集会 (平成16年10月1日・岐阜)、プレナリーセッション2 “Molecular mechanisms in tissue regeneration” Cell cycle and regeneration of cardiac myocytes
4. 第138回 日本循環器学会東北地方会 (平成16年6月5日、盛岡) 特別講演「循環器領域における遺伝子治療と再生医療の現状と将来」

## 研究成果

### はじめに

細胞周期は細胞の増殖に必須の機能であるが、増殖能を持たない心筋細胞における細胞周期に関してはほとんど研究がなされていなかった。われわれは以前から心不全の発症メカニズムと治療法に関する研究を続けてきたが、近年は心筋細胞における細胞周期が心不全の病態においてどのような役割を担っているかについて興味を持ち、研究のターゲットを「心筋細胞における細胞周期」に絞って研究を行ってきた。その過程でいくつかの興味深い結果を得ることが出来たので報告する。その一つは心筋細胞肥大に細胞周期の制御因子が関わっていることを示唆するいくつかのデータであり、二番目は本来増殖をしない心筋細胞の細胞周期制御因子を操作することにより心筋を再生することが出来たことである。前者は心不全の危険因子として重要な心肥大のメカニズムを知る上で有用であるし、後者は心不全に対する未来の治療法としての心筋再生療法につながると考えられ、いずれも心不全という疾患の克服のために重要な知見であると考えている。本稿では上記2点についてわれわれの研究結果を中心に解説する。

### 細胞周期の基礎

細胞が染色体 DNA を複製し 2 つに分裂する一連の現象を細胞周期と呼ぶ。真核細胞の細胞周期は 4 つの時期に分けられる。DNA 複製が起きる時期を S 期、細胞の分裂が起きる時期を M 期と呼ぶ。さらに M 期と次の S 期まで、および S 期と M 期の間には間隙(Gap)があり、それぞれを G1, G2 期と呼ぶ。

細胞内にあって、これら一連の細胞周期反応を制御する鍵となる因子がサイクリン依存性キナーゼ(CDK)と呼ばれるリン酸化酵素群である。CDK はそれ単独では活性をもたずサイクリンと呼ばれるサブユニットが結合してはじめて活性化型となる。さらに CDK の活性は CDK インヒビターと呼ばれる一連の阻害因子群によっても調節されている。CDK インヒビターはINK4(Inhibitor of CDK4)ファミリー (p16 ファミリー) と CIP/KIP(CDK interacting protein /kinase inhibitory protein)ファミリー (p21 ファミリー) の 2 群に大別されている。細胞周期の進行を車の運転に例えれば CDK はアクセル、CDK インヒビターはブレーキの役割を果たす因子で、アクセルとブレーキが協調的に調節

しあうことで、細胞周期の進行、すなわち細胞の増殖がコントロールされている（総説<sup>1)</sup> 参照）。

### 細胞周期と蛋白合成

さらにサイクリン D/CDK の役割として細胞増殖（DNA 合成）の制御のほかに、蛋白合成の制御に関わることが最近知られてきた。細胞分裂を起こすときには細胞は多くの新しい蛋白を作る必要があり、そのためにも DNA 合成をスイッチオンする機構と、蛋白合成を亢進させるメカニズムが同様の蛋白群により制御されているのは目的にかなっている。実際にサイクリン D/CDK が、RNA ポリメラーゼのリン酸化を制御することにより、直接または間接的に蛋白合成を制御していることが、いくつかの研究において示されている。

### 心筋細胞は増殖できるか？

前述のごとく、心筋細胞は生後すぐに増殖能を持たなくなると考えられていたが、最近、Anversa らのグループにより成人の心筋がある程度増殖することが報告され注目をあびた<sup>2, 3)</sup>。彼らのデータでは傷害心筋において mitosis を起こしている心筋細胞は全体の 0.015% と低く、これが心機能の改善に役立つか否かは疑問がのこるが、いずれにしろ非常に割合は低いものの、心筋細胞にある程度の増殖能があることは間違いないと思われる。

### 心筋細胞における細胞周期

心筋細胞はほとんど増殖能をもたないため、最近まで心筋細胞において細胞周期は機能していないものと考えられていた。しかし、心筋細胞がわずかながら増殖能を持つことがわかった現在、細胞周期への再移行により心筋再生をめざすことは現実味をおびてきた。

実際、最近のいくつかの研究において、心筋細胞も細胞周期に入る可能性があることが、例えば c-myc の過剰発現マウスの心筋において cyclinE/cdk2 が活性化されていることなどにより<sup>4, 5)</sup> 示された。さらにいくつかの研究では、細胞周期制御因子の過剰発現マウスにおいて細胞周期の活性化と DNA 合成の更新が起こることも報告された<sup>6, 7)</sup>。これらのことは、心筋細胞においても細胞周期は機能しうること、さらにそのことにより心筋細胞の増殖が起こりうることを示している。しかしながら、細胞周期 G1 期の最終シグナルである E2F

を過剰発現すると DNA 合成は亢進するが、細胞自体は分裂せずにアポトーシスがおこってしまうことも証明されており<sup>8, 9)</sup>、心筋細胞の細胞周期への再移行は単純には達成できないことも事実である。

## 心肥大と CDK

心筋細胞は 1 つ 1 つの細胞が大きくなることによって成長する。これを生理的心肥大と呼び、心臓の成長に欠かせない機構である。また成長後も様々な刺激に対して病的な心肥大という形で反応する。病的な心肥大は心不全の予後を悪化させる最も重要な因子の一つだと言われている。

われわれは以前、培養心筋細胞を用いた研究で、血清刺激やエンドセリンなどにより心筋細胞肥大を起こすと、サイクリン D ファミリーの蛋白発現が時間依存性に増加することを示した。さらに CDK インヒビターの p16 蛋白を発現するアデノウィルスベクターを作成し、それを培養心筋細胞に作用させてみた。するとこのアデノウィルスを作用させた細胞で、血清刺激やエンドセリン、アンジオテンシン II などによる心筋細胞肥大が抑制されることがわかった<sup>10), 11)</sup>。

さらにアデノウィルスベクターを *in vivo* で心臓に感染させ、p16 蛋白過剰発現ラットを作成し、そのラットに大動脈縮窄による心肥大を起こさせたところ、p16 アデノウィルスを感染させないラットに比較して、p16 蛋白過剰発現ラットでは心肥大が抑制されることが示された<sup>11)</sup>。これらの結果は、p16 がサイクリン D/CDK4 の活性を抑制することにより、心筋細胞では肥大が抑制されることを示唆する。

Poolman ら<sup>12)</sup>は、CDK インヒビターである p27 のノックアウトマウスでは、心筋細胞のサイズが正常ラットより約 40%大きいことを報告している。このことも細胞周期制御因子が心肥大を抑制することを示す研究結果として注目される。

細胞周期制御因子が心肥大を抑制するメカニズムは不明であるが、その意義を考察すると、心筋細胞ではサイクリン D/CDK が活性化されても何らかの理由で DNA 合成は行われないが、それと平行する蛋白合成の機序は働くため、増殖刺激に対して細胞肥大が惹起されるものと理解することができる。しかし、詳しいメカニズムに関しては今後の研究結果を待たねばならない。

## 細胞周期制御因子による心筋再生

重症心不全は非常に予後不良の疾患（5年生存率が50%以下）で、現在のところ心臓移植以外に根治療法が無い。その重症心不全に対する究極の治療法として、心筋梗塞などにより脱落した心筋細胞を再生させる「心筋再生療法」が注目されている。心臓の収縮をつかさどる心筋細胞には再生能力をほとんど持たない高度に分化した細胞であるため、虚血などにより障害を受けた心筋組織が収縮能力のない間質組織に置き換わってしまい、それが心不全の大きな原因となる。そこで考えられているのが、心筋細胞を再生することにより心臓収縮力の改善を期待する「心筋再生療法」である。

「心筋再生療法」としては、ES細胞や骨髄幹細胞を心筋に分化させて細胞移植をする方法が現在のところ有望と考えられているが、これらの方法は外来細胞を移植するため、拒絶反応の問題や心筋細胞以外に細胞が分化してしまう危険性がある。またES細胞を臨床に用いるためには倫理的問題もクリアしなくてはならない。そこでわれわれは視点を変え、不全心の組織に残存した自己心筋細胞そのものを増殖させることにより「心筋再生治療」を行う技術の開発をめざして研究を進めてきた。われわれの方法の最大の長所は、心筋細胞そのものを増やすためES細胞や骨髄幹細胞を用いるよりも高い安全性が期待できる点にある。

細胞を増殖させるには、その細胞が細胞周期のG1期からS期に移行する必要がある。しかし心筋細胞は生後すぐに増殖能を失い、G1期からS期に移行出来なくなっていることが知られている。われわれは最近の研究で、サイクリンD1が分化した心筋細胞では核内に移行せず細胞質にとどまっていることを見いだした。増殖細胞ではサイクリンD1が核に移行すると細胞周期が回り始めることから、心筋細胞では何らかの理由でこの因子を核へ移動できないため増殖しないのではないかと考えた。そこでわれわれはサイクリンD1を核移行シグナル（Nuclear localizing signals = NLS）により強制的に核に移行させるアデノウィルスベクターを作成し、培養心筋細胞に作用させた。その結果、cyclin D1が心筋細胞の核に移行し、本来増殖能を持たない心筋細胞を増やすことに成功した<sup>13)</sup>。

今後我々の開発したサイクリンD1-NLSベクターによりin vivoでも心筋再生が起こるかを検討し、最終的には心筋細胞治療への臨床応用をめざ

す。

## まとめ

細胞周期と心肥大の関係について概説した。癌の研究において細胞周期は最も重要なテーマの一つであるが、増殖能を持たない心筋細胞細胞における細胞周期に関する研究はあまり行われていない。しかし心不全治療や心筋再生療法の進歩のためには、今後、細胞周期と心肥大の関係についての研究が発展することが望まれる。

## 文献

- 1) A.J. Obaya and J.M. Sedivy, Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells, *Cell. Mol. Life Sci.* **59** (2002), pp. 126–142.
- 2) J Kajstura, A Leri, N Finato, C Di Loreto, et al, Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans, *Proc Natl Acad Sci USA* **95** (1998), pp. 8801–8805.
- 3) AP Beltrami, K Urbanek and J Kajstura *et al.*, Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction, *N Engl J Med* **344** (2001), pp. 1750–1757.
- 4) I. Perez-Roger, S.H. Kim, B. Griffiths, A. Sewing and H. Land, Cyclins D1 and D2 mediate *myc*-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1), *EMBO J.* **18** (1999), pp. 5310–5320.
- 5) H.S. Liao, P.M. Kang, H. Nagashima, N. Yamasaki, A. Usheva and B. Ding *et al.*, Cardiac-specific overexpression of cyclin-dependent kinase 2 increases smaller mononuclear cardiomyocytes, *Circ. Res.* **88** (2001), pp. 443–450.
- 6) R. Agah, L.A. Kirshenbaum, M. Abdellatif, L.D. *et al.*, Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in postmitotic adult myocardium in vivo, *J. Clin. Invest.* **100** (1997), pp. 2722–2728.
- 7) M.H. Soonpaa, G.Y. Koh, L. Pajak, S. *et al.*, Cyclin D1 overexpression promotes cardiomyocyte DNA synthesis and multinucleation in transgenic mice, *J. Clin. Invest.* **99** (1997), pp. 2644–2654.
- 8) L.A. Kirshenbaum and M.D. Schneider, Adenovirus E1A represses cardiac gene transcription and reactivates DNA synthesis in ventricular myocytes, via alternative pocket protein- and p300-binding domains, *J. Biol. Chem.* **270** (1995), pp. 7791–7794.
- 9) R. Agah, L.A. Kirshenbaum, M. Abdellatif, L.D. Truong, S. Chakraborty and L.H. Michael *et al.*, Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in postmitotic adult myocardium in vivo, *J. Clin. Invest.* **100** (1997), pp. 2722–2728.
- 10) Tamamori M, Ito H, Hiroe M et al. Essential roles for G1 cyclin-dependent kinase activity in development of cardiomyocyte hypertrophy. *Am J Physiol* **275**: H2036-2040, 1998



- 11) Nozato T, Ito H, Watanabe M, et al. Overexpression of cdk inhibitor p16<sup>INK4a</sup> by adenovirus vector inhibits cardiac hypertrophy in vitro and in vivo: a novel strategy for the gene therapy of cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell Cardiol.* 33:1493-504, 2001.
- 12) Poolman RA. Expressions and activities of cell cycle regulatory molecules during the transition from myocyte hyperplasia to hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 30: 2121-2135, 1998
- 13) Tamamori-Adachi M, Ito H, S Piyamas, Adachi S, Hiroe M, Shimizu M, Kawauchi J, Sunamori M, Marumo F, Kitajima S, Ikeda M. Critical role of Cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res.* 92 12-19, 2003

本研究結果報告書は 2006 年に日本薬理学会誌に掲載予定の原稿を一部改変したものである。