

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590806

研究課題名（和文） 細胞周期制御因子による心筋再生療法の開発を目指した研究

研究課題名（英文）

研究代表者

安達 三美 (ADATI MIMI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：10323693

研究成果の概要：

哺乳類の心筋は生後終末分化すると増殖能を失う。哺乳類の心筋細胞がなぜ増えないのか解析する研究は、心筋細胞・神経細胞などの終末分化細胞の分化状態の維持機構の解明のみならず、未だ発展途上にある虚血性心疾患や特発性心筋症に対する心筋再生治療法の開発につながる可能性があり、重要性が高い。研究代表者はこれまでにラットを用いた実験で、細胞周期アクセラ分子であるサイクリン D1 が心筋の血清や Growth 刺激によって誘導されるものの核への局在が障害されており、実際には心筋の細胞周期は活性化されないことを見出し、サイクリン D1 に核移行シグナル(NLS)を付加し強制的に核内に移行させることによって *in vitro*, *in vivo* において心筋の細胞周期が廻ることを発見した。さらに、サイクリン D1 の核局在障害の原因を、①核内への移行、②核内分解、③核外移行の亢進、について解析したところ核内への移行が障害されていることが明らかになった。本研究ではサイクリン D1 の核内移行障害の責任領域（アミノ酸範囲）を明らかにするために、複数の欠失変異または点変異を有するサイクリン D1 の蛋白質とアデノウイルスベクターを作成し、*in vitro* および *in vivo* 核移行アッセイを行った。その結果 C-末のわずか 10 アミノ酸前後の配列がサイクリン D1 の核内移行を抑制的に制御している可能性があることを見出した。心筋細胞の再生能とサイクリン D1 の構造とを動物の進化段階に応じて比較すると、我々が同定した責任アミノ酸領域は、心筋再生能を有するフグや *Zebrafish* などの魚類や *Xenopus* などの両生類では見られず高等動物に進化するにつれて現れてくるということを見出している。また、サイクリン D2・D3 にはみられない。この構造の違いがサイクリン D1 の核移行阻害・心筋終末分化に伴う分裂停止に深く関わっていると考えられ、今後再生医療へ大きく発展する可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋再生、サイクリン D1、核移行

1. 研究開始当初の背景

心筋は終末分化すると増殖能を失う。このため、心不全に陥った心機能を再生することは困難である。これに対し、心筋の細胞周期制御因子の解析と心筋細胞の再分裂誘導を目指した研究が国内外で行われている。我々はこれまでに、心筋の細胞周期アクセラ分子サイクリン D1 の核局在が障害されていることを見出し、核移行シグナル(NLS)を付加したサイクリン D1 (D1NLS) の発現 (アクセラ分子の発現) により細胞分裂・増殖を惹起することに成功した。しかし、ブレーキ因子 p27^{kip1} の Skp2 による分解障害により p27 が蓄積するため、増殖が早期に抑制すること、D1NLS と Skp2 による p27 分解 (ブレーキ分子の分解) との組み合わせで、*in vitro* および *in vivo* で心筋細胞の著明で安定した分裂を誘導できること、さらにラット心筋梗塞心不全モデルの心機能・心不全を改善できることを見出した。

2. 研究の目的

より有効な心筋再生治療法の開発を目指し、終末分化心筋細胞における

- (I) サイクリン D1 の核移行障害のメカニズムを解明する。
- (II) 他の増殖バリアーを検索する。

3. 研究の方法

(I) サイクリン D1 の核移行阻害機構の解析

< *in vitro* 核移行アッセイ >

カバーガラス上に細胞を培養し、ジギトニ

ン処理によって細胞膜を透過させ、大腸菌によって発現させ精製した野生型および様々な変異型サイクリン D1 リコンビナント蛋白質を反応させ、核内への移行について解析した。

< *in vivo* 核移行アッセイ >

野生型および様々な変異型サイクリン D1 を発現するアデノウイルスベクターを作成し、培養心筋細胞に感染発現させ、核内発現について解析した。

以上により心筋細胞におけるサイクリン D1 の核移行障害の責任領域を同定し、野生型、責任領域欠損型サイクリン D1 を用いたタンパク結合実験を行い、責任領域を認識する特異的因子を質量分析 MS を用いて解析を試みた。

(II) 他の増殖バリアーの検索

< p21^{cip1} の解析 >

増殖バリアーとしてサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21^{cip1} に注目し、siRNA 発現アデノウイルスベクターを作成し、細胞周期の解析を行った。

4. 研究成果

(I) *in vitro* および *in vivo* 核移行アッセイの結果、C-末のわずか 10 アミノ酸前後の配列がサイクリン D1 の核内移行を抑制的に制御している可能性が示唆された。心筋細胞の再生能とサイクリン D1 の構造とを動物の進化段階に応じて比較すると、我々が同定した責任アミノ酸領域は、心筋再生能を有するフグや Zebrafish などの魚類や

Xenopus などの両生類では見られず高等動物に進化するにつれて現れてくるということを見出している。また、サイクリン D2・D3 にはみられない。

この構造の違いがサイクリン D1 の核移行阻害・心筋終末分化に伴う分裂停止に深く関わっている可能性がある。そこで野生型、責任領域欠損型サイクリン D1 を用いたタンパク結合実験を行い、責任領域を認識する特異的因子を質量分析 MS を用いて解析を試みた。その結果、CDK4 などの既知の結合因子をはじめ、核外トランスポーター因子として知られる CRM1 など複数の候補蛋白質が検出された。今後機能解析を行っていく予定である。

(II) siRNA 発現アデノウイルスベクターを用いて、p21cip1 が心筋細胞の増殖抑制因子として機能していることを見出した。心筋細胞では、細胞周期の活性化とともに発現が上がるサイクリン依存性キナーゼ 2 (CDK2) と結合することにより、ユビキチン化酵素 APC/CCdc20 によるユビキチン分解が抑制され、安定化することにより、心筋細胞の増殖が抑制されることが明らかになった。

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)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Miyazaki K, Inoue S, Yamada K, Watanabe M, Liu Q, Watanabe T, Tamamori-Adachi M, Tanaka Y, Kitajima S: Differential usage of alternate promoters of the human stress response gene ATF3 in stress response and cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 37: 1438-51, 2009
2. Okada M, Sakai T, Nakamura T, Tamamori-Adachi M, Kitajima S, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Sakaue H, Kasuga M: Skp2 promotes adipocyte differentiation via a p27Kip1-independent mechanism in primary mouse embryonic fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379: 249-254, 2009
3. Matsuda T, Zhai P, Maejima Y, Hong C, Gao S, Tian B, Goto K, Takagi H, Tamamori-Adachi M, Kitajima S, Sadoshima J: Distinct roles of GSK 3a and GSK 3b phosphorylation in the heart under pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 20900-20905, 2008
4. Tamamori-Adachi M, Goto I, Yamada K, Kitajima S: Differential regulation of cyclin D1 and D2 in protecting against cardiomyocyte proliferation. *Cell cycle* 7: 3768-3774, 2008
5. Tamamori-Adachi M, Takagi H, Hashimoto K, Goto K, Hidaka T, Koshimizu U, Yamada K, Goto I, Maejima Y, Isobe M, Nakayama K.I, Inomata N, Kitajima S: Cardiomyocyte proliferation and protection against post-myocardial infarction heart failure by cyclin D1 and Skp2 ubiquitin ligase. *Cardiovasc. Res.* 80: 181-191, 2008
6. Nakayama K, Sakaue H, Nishizawa A, Matsuki Y, Gomi H, Watanabe E, Hiramatsu R, Tamamori-adachi M, Kitajima S, Noda T, Ogawa W, Kasuga M: PDK1 regulates cell proliferation and cell cycle progression through control of cyclin D1 and p27Kip1 expression. *J. Biol. Chem.* 283: 17702-17711, 2008

7. Lee SA, Lee SY, Cho IH, Oh MA, Kang ES, Kim YB, Seo WD, Choi S, Nam JO, Tamamori-Adachi M, Kitajima S, Ye SK, Kim S, Hwang YJ, Kim IS, Park KH, Lee JW: Tetraspanin TM4SF5 mediates epithelial-mesenchymal transition leading to loss of contact inhibition. *J. Clin. Invest.* 18: 1354-1366, 2008
8. Miyata Y, Yasukawa T, Fukuda M, Takeuchi T, Yamazaki K, Sakumi K, Tamamori-Adachi M, Ohnishi Y, Ohtsuki Y, Nakabeppu Y, Kitajima S, and Aso T: Induction of apoptosis and cellular senescence in mice lacking transcription elongation factor, Elongin A. *Cell Death and differentiation* 14: 716-726, 2007

[学会発表] (計 7 件)

1. 安達 (玉盛) 三美他
終末分化心筋細胞における細胞周期メカニズムの解析。第 30 回日本分子生物学会、神戸、2008 年 12 月
2. 山田 一彦、安達 (玉盛) 三美他
心筋細胞では APC/CCdc20 ユビキチンリガーゼを介する p21Cip1 のユビキチン化が CDK2 によって抑制される。第 30 回日本分子生物学会、神戸、2008 年 12 月
3. 安達 (玉盛) 三美他
終末分化心筋細胞における増殖および再増殖停止メカニズムの解析。第 29 回日本分子生物学会、横浜、2007 年 12 月
4. 山田 一彦、安達 (玉盛) 三美他
p21 は CDK2 と結合することによってユビキチン化を抑制し、終末分化心筋細胞の再増殖を停止させる。第 29 回日本分子生物学会、横浜、2007 年 12 月
5. 宮崎 敬介、安達 (玉盛) 三美他
ストレス応答性転写因子 ATF3 の選択的プ

ロモーター制御とクロマチン構造。第 29 回日本分子生物学会、横浜、2007 年 12 月

6. 渡辺 雅司、安達 (玉盛) 三美他
CTD phosphatase FCP1 の機能解析。第 29 回日本分子生物学会、横浜、2007 年 12 月

7. 中村 恭子、安達 (玉盛) 三美他
PDK1 は cyclin D1 と p27Kip1 の発現制御により細胞周期進行と細胞増殖能を誘導する。第 29 回日本分子生物学会、横浜、2007 年 12 月

[図書] (計 1 件)

1. 安達 三美: Topics 心筋細胞の再分裂誘導は可能か「心筋症を識る・診る・治す」文光堂、2007 p390-391

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 三美 (東京医科歯科大学難治疾患研究所助教)

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。