

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2007 年度～2008 年度  
 課題番号：19390366  
 研究課題名（和文）細胞周期調節因子 p27 制御による心筋細胞増殖の試み：臨床応用に向けた基礎的研究  
 研究課題名（英文）Myocardocyte proliferation by inhibiting p27, a cell-cycle regulator

研究代表者  
 富永 隆治（TOMINAGA RYUJI）  
 九州大学・医学研究院・教授  
 研究者番号：70136464

## 研究成果の概要：

心臓移植に代わる重症心不全の治療法として、心筋細胞の増殖を起こすことを考えた。通常、成熟した心筋細胞はもはやそれ以上分裂しないことが知られている。今回我々は、細胞分裂の周期をコントロールしている p27 というタンパク質を制御することにより心筋細胞の再分裂、再増殖を促すことを試みた。また、心筋細胞の増殖以外に、心筋細胞内の収縮装置の修復による心機能改善の可能性も見いだした。

## 交付額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計         |
|---------|-----------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 4,100,000 | 1,230,000 | 5,330,000  |
| 2008 年度 | 3,900,000 | 1,170,000 | 5,070,000  |
| 年度      |           |           |            |
| 年度      |           |           |            |
| 年度      |           |           |            |
| 総計      | 8,000,000 | 2,400,000 | 10,400,000 |

研究分野：循環器外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心筋細胞増殖・再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

現在、重症心不全の治療としては最終的に心臓移植が確立した治療法として認識され

ている。しかし、我が国においてはドナー心臓の不足により、全ての移植適応患者に上記治療を施行することは極めて困難な状況で

あり、将来にわたってこの状況が大いに改善することは難しいと考えられる。多くの重症心不全患者が補助循環装置装着のもと、長期間の移植待機を余儀なくされ、塞栓症や感染症の合併により死亡する症例も多いのが現状である。

臓器移植治療に代わる治療として、近年注目されているのが再生医療である。しかし、心筋細胞は生後まもなく分化が停止し非増殖状態(細胞周期の停止)になるという特徴があり、これが治療法の開発を困難なものにしている。心不全に対する新たな治療法として自家骨髄移植療法が試みられており、以前我々も臨床応用に向け、家畜ブタを用いて、骨髄穿刺により得られた骨髄細胞(十分な量の造血幹細胞を含む)を虚血領域に直接注入する実験を行った(平成14~15年基盤研究B;慢性虚血心筋における骨髄細胞移植療法の展開と臨床への応用)。これにより虚血領域の血管形成促進は確認されたものの明らかな心筋細胞再生には至らなかった。虚血領域への血行の改善のみでは心筋細胞の増殖を起こすには不十分であり、心機能の回復には心筋細胞自体に働きかけて再生を促すことが不可欠と考えられた。

## 2. 研究の目的

上記の背景に基づき、我々は心筋細胞そのものの増殖を制御することによって心筋の再生を得ることを目指した。これは、未熟幹細胞から細胞を目的とする形質に分化させるといった手法とは異なり、成熟した心筋細胞を増殖させ心筋再生を行う(成熟に伴い一旦停止した細胞周期を再度進行させる)というアプローチである。この観点から、心筋細胞増殖制御の分子生物学的メカニズムに迫り、

人工的に心筋細胞増殖をコントロールすることを目的とした。

近年、心筋細胞周期調節のメカニズムが明らかになりつつあり、以下のことが示されている。

- (1) 増殖刺激により cyclin D が発現する。
- (2) 発現した cyclin D と CDK4 の複合体は核内に移行する。
- (3) cyclin D は転写活性因子である Myc を介して心筋細胞肥大(タンパク合成)を引き起こす。これは不全心において最終的には破綻してしまうことになる代償性心肥大への経路である。

一方、

- (4) cyclin D は心筋細胞増殖(DNA 合成)も誘導するが、これには CDK2 が必要であり、CDK2 は p27 により抑制されている。

我々は以前に、心筋細胞増殖を誘導すべく、cyclin D 遺伝子をコードしたレンチウイルスベクターを用いて心筋初代培養細胞に cyclin D 遺伝子導入を試みた。その結果、レンチウイルスベクターにより過剰発現した cyclin D の核内移行および細胞周期の進行を確認することができた。一方、このとき過剰発現した cyclin D は心筋細胞だけでなく線維芽細胞にも発現していた。心臓を構成している細胞のうち、心筋細胞は全体のおよそ1/3に過ぎず、残りの2/3は線維芽細胞を中心とした非筋細胞から成っている。よって、ウイルスベクターを *in vivo* で局所投与し cyclin D を過剰発現させた場合、それらの非筋細胞への影響、すなわち線維芽細胞の増殖、間質増加によって心筋リモデリングが誘導される可能性が否定できないことが示唆された(平成16~17年基盤研究B;心筋再生療法の臨床応用のための基礎的研究)。これらの結果から、臨床応用を考慮する場合、直接的に細胞周期に働きかける cyclin D を過剰発現

させるよりも、生理的な増殖刺激に応答して発現している内因性の cyclin D を利用して、心筋細胞再増殖(心筋細胞周期の再回転)への経路を誘導することが重要と考えた。この考えに基づいて、上記(4)において心筋細胞増殖への経路を阻害している p27 の発現を抑制するという着想を得た。すなわち、増殖刺激下の心筋細胞において p27 の発現を抑制し CDK2 活性を保つことにより、強いリモデリングを惹起することなく、より生理的な心筋細胞増殖を誘導することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 心筋細胞初代培養

Sprague-Dawley rat 1 生日の心臓より得られた心筋細胞を 48 時間無血清培地で培養することにより、最終分化した心筋細胞を得た。これらについて心筋 actin に対する抗体を用いて、90%以上が心筋細胞である事を確認した。

#### (2) 遺伝子導入効率の検討

Adenovirus-vector encoding LacZ を上述の培養心筋細胞に感染させて LacZ 染色を行った。効果的に LacZ が発現する条件を探る事により、ウイルスベクターによる遺伝子導入のための至適条件を検討した。

#### (3) p27 発現抑制

数種類の p27 shRNA を作成した。上述の培養心筋細胞に Adenovirus-vector encoding p27 shRNA を感染させ、RNAi を行った。対照群としては、心筋細胞に同量の Adenovirus-vector encoding LacZ を感染させた。感染させてから 72 時間後に心筋細胞を回収し、ウェスタンブロッティング法を行

い、p27 の発現が RNAi により抑制されているかを確認した。

#### (4) 細胞周期進行の確認

上記のごとく RNAi を行った心筋細胞にフェニレフリンによる増殖刺激を加え、細胞周期の進行が起こるかどうかを検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) p27 発現抑制に関して

p27 の発現を抑制する目的で数種類の shRNA を作成し、ウイルスベクターを用いて心筋細胞に感染させることはできたものの、ウェスタンブロッティング上 p27 の発現抑制を確認することが出来なかった。

さらに、上記の shRNA を遺伝子導入した心筋細胞にフェニレフリン(1~100  $\mu$ M)による増殖刺激を与えると細胞が死滅してしまうことが判明した。細胞が死滅しない条件を探るも至適な条件が得られず、これ以上、当初の計画通りに実験を遂行することが困難と考えられた。

#### (2) 細胞骨格破壊による心筋細胞増殖の試み

そこで、心筋細胞増殖(mitosis)を抑制する原因の一つとして強固な細胞骨格の存在が関与している可能性を示唆する報告(Ahuja P et.al. Experimental cell research, 1270-1283, 2007)があることに着目した。

以前の我々の研究(cyclin D 過剰発現による心筋細胞増殖の誘導)では、増殖マーカー Ki67 にて細胞周期の進行は確認できたものの、mitosis の確認には至っていなかった。よって、心筋細胞の mitosis/cytokinesis を得るといった元々の目的を達成するために、細

胞骨格を disrupt した心筋細胞に対して cyclin D を強制発現させることを試みた。

具体的には、心筋細胞骨格の本体である actin 繊維の重合阻害剤である cytochalasin B, D を用いて、細胞骨格を破綻させ、ウイルスベクターを用いて cyclin D を導入することを試みた。しかしながら、cyclin D 導入による細胞周期進行を起こすのに至適な cytochalasin 濃度を得ることができず、断念した。

### (3) サルコメア構造修復による心機能改善の試み

その後、不全心に対して、これまで目指してきた心筋細胞数の増加ではなく、残存心筋細胞のサルコメア構造修復による心機能改善を得ること目的として研究を行った。

心筋の収縮力は筋原繊維、すなわち心筋細胞内において actin や myosin により形成されるサルコメア構造に由来している。このため、心筋細胞においては通常の細胞では 5% 程度である actin タンパク質の含有率が 30% にも達している。心筋梗塞などの虚血障害によって惹起される急激な心筋タンパク質の崩壊や、拡張型心筋症などの慢性的な心筋変性によって心筋細胞内での筋原繊維の割合が減少する。これはサルコメア構造の破壊や萎縮によるものと考えられる。

actin 繊維は単量体の actin タンパク質の重合により形成されることが知られている。しかし、サルコメア構造の形成に際して actin タンパク質の重合がいかなる制御を受けているのかはこれまで明らかにされていなかった。actin 繊維は他の多くの非筋細胞においても重要な生理的役割を果たしており、細胞分裂や、細胞遊走、接着などに関わっている。そのため、actin 重合は厳密な制御を受けており、その制御に多くのタンパク

質が関与している。近年注目されている Formin family タンパク質は、直線状の actin 繊維形成を制御する因子であることが分かっている。われわれは Formin family タンパク質の一員であり、幼弱な心筋細胞に発現している Fhod3 に着目した。

まず、1 生日ラット心筋細胞に対して、ラビットポリクローナル抗 Fhod3 抗体を作成し、免疫組織染色を行った。その結果、Fhod3 がサルコメア構造に一致して局在していることを発見した。Formin family タンパク質が直線状の actin 重合制御因子であることを考えると、Fhod3 が心筋細胞においてサルコメア構造形成に直接的、あるいは間接的に関与している可能性が極めて高いと考えられた。

### (5) 今後の展望

本研究で得られた成果から、サルコメア構造の破壊や萎縮を来した不全心に対して、Fhod3 遺伝子を導入することによって残存心筋細胞のサルコメア構造を再構築し、心収縮力の改善を得る、といった治療法の可能性が示唆される。これは、これまで実験レベルや臨床試験レベルで試みられてきた、骨髄移植療法や細胞周期に着目した心筋細胞を増殖させる方法とは一線を画する、全く新しい心不全の治療法となりうるものである。

また、Fhod3 タンパク質の心筋細胞における機能を解析することは、学術的見地から見ても、これまであまり知られていなかったサルコメア構造の形成過程を明らかにする上で、非常に意義深いことである。

今後は、上記治療法の臨床応用に向けて基礎的研究をさらに発展させていく方針である。まず、今回の研究により培養細胞レベルで示唆された Fhod3 タンパク質によるサルコメア構造形成促進を、動物レベルで過剰発現

実験により検証したい。具体的には、下記の様  
様に実験を行っていく予定である。

#### ラット心不全モデルの作成

-刺激剤(イソプロテレノール)の持続皮下注射にてラットの遠心性心不全モデルを作成する。対照群には生理食塩水の持続皮下注射を行う。これらの心機能を経胸壁心エコーにより測定し、イソプロテレノール群で心機能が低下していることを確認する。

#### Fhod3 遺伝子導入、過剰発現

ラット心不全モデルを全身麻酔下に左側開胸心臓を露出する。Adenovirus-vector encoding Fhod3 を  $1 \times 10^9$  PFU ラット心臓前壁に筋肉内注入する。対照群には同量の生理食塩水を心臓筋肉内に注入する。

#### Fhod3 過剰発現による心機能評価

1 週間後に経胸壁心エコーにより Fhod3 導入群と対照群を比較し、Fhod3 導入による心機能改善効果について評価を行う。また、心筋組織の免疫組織染色による病理組織学的検査も行う。

本研究の遂行が、移植を待つしかない重症心不全患者に対する新たな治療戦略の開拓につながることを期待するものである。

#### 5 . 主な発表論文等

A Rho-kinase inhibitor improves cardiac function after 24-hour heart preservation. Kobayashi M, Tanoue Y, Eto M, Baba H, Kimura S, Oda S, Taniguchi K, Tominaga R. Journal of Thorac Cardiovasc Surg. 2008 Dec;136(6):1586-92. 査読有

Role of the cytokine profiles produced by invariant natural killer T cells in the initial phase of cyclophosphamide-induced

tolerance.

Onzuka T, Tomita Y, Shimizu I, Okano S, Yamada H, Yoshikai Y, Tominaga R. Transplantation. 2008 Nov15; 86(9):1301-10. 査読有

Local delivery of imatinib mesylate (STI571)-incorporated nanoparticle ex vivo suppresses vein graft neointima formation.

Kimura S, Egashira K, Nakano K, Iwata E, Miyagawa M, Tsujimoto H, Hara K, Kawashima Y, Tominaga R, Sunagawa K. Circulation. 2008 Sep 30;118(14 Suppl):S65-70. 査読有

Application of cyclophosphamide-induced tolerance in alpha1, 3-galactosyltransferase knockout mice presensitized with Gal alpha 1-3Gal beta-4-GlcNAc antigens.

Onzuka T, Shimizu I, Tomita Y, Iwai T, Okano S, Tominaga R. Surg Today. 2008;38(9):807-14. Epub 2008 Aug 28. 査読有

The immunoregulatory roles of natural killer T cells in cyclophosphamide-induced tolerance.

Iwai T, Tomita Y, Shimizu I, Kajiwara T, Onzuka T, Okano S, Yasunami Y, Yoshikai Y, Nomoto K, Tominaga R. Transplantation. 2007 Dec 27; 84(12):1686-95. 査読有

Blockade of monocyte chemoattractant protein-1 by adenoviral gene transfer inhibits experimental vein graft neointimal formation.

Tatewaki H, Egashira K, Kimura S, Nishida T, Morita S, Tominaga R. J Vasc Surg. 2007 Jun;45(6):1236-43.

査読有

Effects of cyclosporin A on the activation of natural killer T cells induced by alpha-galactosylceramide.

Kajiwara T, Tomita Y, Okano S, Iwai T, Yasunami Y, Yoshikai Y, Nomoto K, Yasui H, Tominaga R.

Transplantation. 2007 Jan 27;

83(2):184-92. 査読有

Efficacy and limitations of natural killer cell depletion in cyclophosphamide-induced tolerance.

Shimizu I, Tomita Y, Okano S, Iwai T, Kajiwara T, Onzuka T, Tominaga R.

SurgToday.2007;37(1):24-9.Epub2007Jan 1.

査読有

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

富永 隆治 (TOMINAGA RYUJI)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70136464

### (2)研究分担者

中島 淳博 (NAKASIMA ATSUHIRO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10260704

江藤 政尚 (ETOH MASATAKA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20419526

(2008年度より退職のため分担者を外す)

谷口 賢一郎 (TANUGUCHI KENICHIROU)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：60444840

(2008年度より退職のため分担者を外す)