心不全と細胞周期

伊藤 宏

要約：増殖能を持たない心筋細胞においては、細胞増殖のメカニズムである細胞周期は本来機能していないものと考えられていた。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、最近の一連の研究で、心筋細胞においても細胞周期制御因子が存在し、それが心不全に関連する心筋細胞特有の機能を担っていることを見いだした。その一つは、心不全の重要な増悪因子である心筋細胞肥大に、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る。われわれは CDK インヒビターの p16 タンパク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。このことは細胞周期制御因子が心筋細胞においては肥大の制御に関わることを示唆すると考えられた。二番目の知見は、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。その研究では、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結果、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。このことは自己心筋細胞自体を増やすことが可能であることを示唆しており、今後の展開によっては新しい心不全治療法としての心筋再生療法につながるものと考えられた。これらのことより、心筋細胞における細胞周期の研究の発展が、心不全の克服のために今後も重要であると思われる。

1. 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。

2. 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

キーワード：心不全、心筋細胞、細胞周期、心肥大、心筋再生療法
秋田大学医学部 内科学講座 循環器内科学分野、呼吸器内科学分野 (〒010-8543 秋田市本道 1-1-1)
e-mail: hito@doc.med.akita-u.ac.jp
原稿受領日：2005 年 8 月 31 日、会誌編集委員会依頼原稿
Title: Cell cycle and heart failure
Author: Hiroshi Ito

図1 細胞周期と、DNA合成、タンパク合成のメカニズム
略語は本文参照

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(1)。

3. 細胞周期とタンパク合成

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、タンパク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タンパクを作る必要があり、そのためにもDNA合成をスイッチオンする機構と、タンパク合成を亢進させるメカニズムが同様のタンパク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タンパク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（図1参照）。

4. 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(2,3)。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このころが、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。

5. 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(4,5)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(6,7)。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(8,9)、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。

6. 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ファミリーのタンパク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タンパクを発現するアデノウイ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イ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(10,11)。

図2 細胞周期抑制因子 p16 は大動脈縮窄ラットの心肥大を抑制した (文献 11 より改変)

A: 左室重量/体重比 (LVW/BW). * $P < 0.05$

AOB = 大動脈縮窄

LacZ = コントロールとして導入した β ラクタマーゼウイルス

B: 心筋組織の変化

さらにアデノウイルスベクターを *in vivo* で心臓に感染させ、p16 タンパク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 アデノウイルスを感染させないラットに比較して、p16 タンパク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(11) (図 2A, B)。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(12) 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、それと平行するタンパク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。

7. 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な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

図3 サイクリン D1 を心筋細胞に強制発現させるアデノウィルスベクターの構造

NLS : Nuclear localizing signals

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）（図3）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（図4）（13）。

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。

8. 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

図4 サイクリン D1-NLS アデノウィルスにより培養心筋細胞が増殖した
（文献13より改変）

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) Obaya AJ, et al. Cell Mol Life Sci. 2002;59:126-142.
- 2) Kajstura J, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:8801-8805.
- 3) Beltrami AP, et al. N Engl J Med. 2001;344:1750-1757.
- 4) Perez-Roger I, et al. EMBO J. 1999;18:5310-5320.
- 5) Liao HS, et al. Circ Res. 2001;88:443-450.
- 6) Agah R, et al. J Clin Invest. 1997;100:2722-2728.
- 7) Soonpaa MH, et al. J Clin Invest. 1997;99:2644-2654.
- 8) Kirshenbaum LA, et al. J Biol Chem. 1995;270:7791-7794.
- 9) Agah R, et al. J Clin Invest. 1997;100:2722-2728.
- 10) Tamamori M, et al. Am J Physiol. 1998;275:H2036-H2040.
- 11) Nozato T, et al. J Mol Cell Cardiol. 2001;33:1493-1504.
- 12) Poolman RA. J Mol Cell Cardiol. 1998;30:2121-2135.
- 13) Tamamori-Adachi M, et al. Circ Res. 2003;92:12-19.

著者プロフィール

伊藤 宏（いとう ひろし）

秋田大学医学部内科学講座 循環器内科学分野，呼吸器内科学分野，教授，医学博士。

◇1980年3月 東京医科歯科大学医学部卒業，'80年5月 東京医科歯科大学医学部・第二内科（武内重五郎教授），'86年6月～スタンフォード大学医学部・留学（M. Billingham教授），'89年7月 東京医科歯科大学医学部・第二内科（丸茂文昭教授），'01年8月 東京医科歯科大学医学部循環器内科（磯部光章教授）・講師，'02年2月 東京医科歯科大学大学院循環制御学・助教授，'03年9月 現職。

◇専門研究分野：循環器内科学（心不全・心筋症の臨床，遺伝子治療，再生医療）。◇趣味：テニス，ゴルフ，ジャズ鑑賞。

◇主な著書（すべて共著）

①心血管系疾患と遺伝子治療「心血管病学」，朝倉書店 2005。②心筋炎「循環器疾患 最新の治療 2002-2003」，南光堂；2001。③心不全とインスリン様増殖因子「循環器疾患—State of Art」，医歯薬出版；2000。④ Endothelin and cardiac hypertrophy. in Endothelial modulation of cardiac function. Harwood Academic Publishers; 1997.