

心筋細胞の再生を目指した 細胞周期機構の解明

siRNA発現アデノウイルスベクターを用いたp27^{kip1}のノックダウン

安達 三美、北嶋 繁孝

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ゲノム応用医学部門 遺伝生化学
東京医科歯科大学 大学院疾患生命科学研究所 ゲノム構造制御研究部門

はじめに

心筋は、ヒトで生後1カ月、ラットでは生後2日で最終分化に入り増殖を停止するとされる。その後の心臓の成長は、心筋細胞の大きさの増加(肥大)と非心筋細胞(主として繊維芽細胞)の増殖によるものであり、心筋自体は分裂能を喪失する。このため、心筋梗塞などにより心筋が傷害された場合には、心臓の一部は、収縮能を持たない間質細胞に置き換わってしまい心収縮力の低下をきたして心不全にいたる。これに対して、最近、心組織に増殖能を保持した多能性幹細胞がわずかながら存在することが知られてきた。この細胞は、虚血などにより心筋障害が起こった際には、心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などに分化するとされている。しかしながら、この再生はわずかであり心機能を改善するにはいたらず重症心不全に陥る例が多い。重症心不全は予後不良の疾患であり5年生存率が50%以下であるが、現在のところ、心移植以外に根治療法がない。しかしながら、もし心筋を高い確率で再生し低下した心機能を改善できるならば、重症心不全に対する究極の「心筋再生療法」となる。

これまで、「心筋再生療法」として、ES細胞や骨髄幹細胞を心筋に分化させ細胞移植をする方法が有望と考えられている。しかし、これらの方法は、Recipientと異なるdonor細胞を移植するため、拒絶反応の問題や、移植した細胞の心筋以外への分化などの問題など解決すべき高いハードルがある。さらには、ES細胞を用いるためには、倫理的な問題もクリアしなくてはならない。そこで、我々は、不全心筋に残存した心筋細胞自体を増殖させる真の「心筋分裂再生治療」を行う技術の開発を目指して研究を進めてきた。以下、最近の我々の研究結果を紹介する。

(1)心筋細胞における細胞周期機構の解析

多くの分裂可能な哺乳類動物の細胞周期は、G0期の停止状態からG1期、DNAが合成されるS期、それに続くG2期、分裂期であるM期を経てG1期へと戻り細胞分裂を完結する。近年、細胞周期に関する研究は急激に進歩した。その結果、細胞周期の進行には、サイクリンとサイクリンに結合して活性化されるリン酸化酵素(サイクリン依存性キナーゼ、CDK)が重要な働きをしていることが明らかになった。なかでもサイクリンDは、細胞周期のG1中期から後期に発現し、3つ

のファミリー(D1~D3)が同定されている。サイクリンDはCDK4およびCDK6キナーゼと結合し、主ながん抑制遺伝子産物として知られるRbタンパク質をリン酸化する。そのリン酸化によりRbにより抑制されている転写因子E2Fが活性化し、細胞周期をG1期からS期へと進行させる。さらに、細胞周期を負に制御するCDK阻害因子(INK4ファミリー、cip/kipファミリー)といわれる分子群も存在することが明らかになった。これに対して、終末分化した心筋細胞はG0期からG1期への移行あるいはG1期の進行ができず、そのため分裂できないとされてきた。そして多くの研究者たちが、非増殖細胞である心筋細胞の増殖抑制メカニズムの解明を目指して研究を行ってきた。そのほとんどは、心筋ではサイクリン・CDK・E2F等の細胞周期を正に制御する因子の発現・活性が低く抑えられているのではないかと考え、トランスジェニックマウスなどによる強制発現を行うことにより増殖を試みる研究である。あるいは負に制御するCDK阻害因子の活性が高いのではないかと考え、その因子のノックアウトまたはノックダウンにより増殖誘導が起こるかどうかが検討した研究である。たとえば、M. H. Soonpaaらは、サイクリンD1のトランスジェニックマウスの心筋細胞では多核になるが、細胞質分裂が起こらないと報告している。またM. D. Schneiderの研究グループはE2Fを活性化させるE1AとE2Fそのものをアデノウイルスベクターを用いてラットの心筋に強制発現させたところDNA合成が誘導されるが細胞分裂はおこらず、アポトーシスが誘導されることを報告している。このようにいまだ増殖を完全にコントロール可能にしたという報告はなかった。

(2)サイクリンD1の核移行による心筋細胞の増殖誘導

我々は培養細胞のレベルで細胞周期関連因子の発現・機能について心筋と一般増殖細胞との相違を解析した。その結果、分化した心筋細胞では、増殖刺激によって誘導されるサイクリンD1は増殖細胞と同レベルに発現されているものの、本来機能する核内に移行せず細胞質に局在することを見いだした¹⁾。そして細胞質に蓄積したサイクリンD1はタンパク合成を促進し細胞の肥大をもたらすことを明らかにした²⁾。さらに、もしサイクリンD1が核内に局在すれば分裂を誘導できるかも知れないと考え、サイクリンD1に核移行シグナ

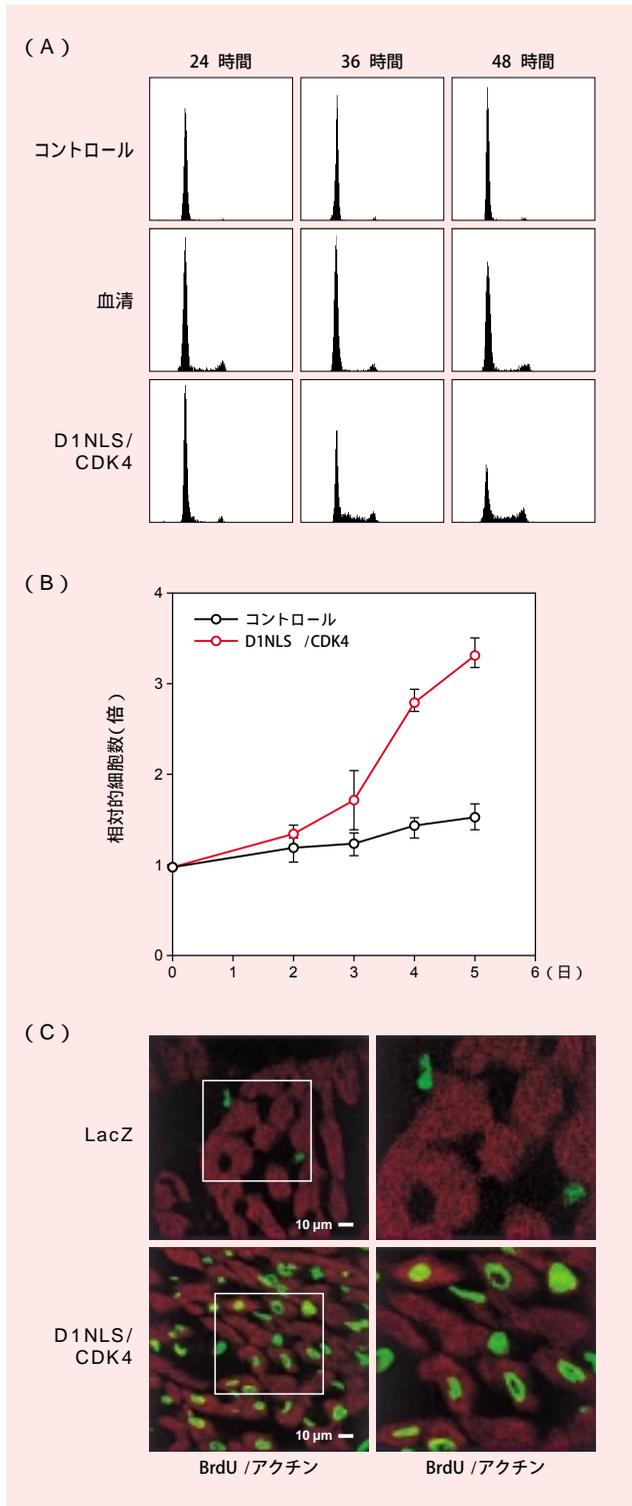


図1 サイクリンD1核移行による細胞増殖誘導

NLSを付加したサイクリンD1(D1NLS)とCDK4を発現するアデノウイルスを新生仔ラット培養心筋細胞に感染させ、経時的な心筋細胞の細胞周期の変化と細胞数の測定を行った。

(A)レーザーキャンサイトメーター(LSC)を用いた細胞周期解析
(縦軸：細胞数、横軸：DNA量)

(B)経時的な細胞数の増加。

(C)サイクリンD1核移行による成獣ラット心筋細胞におけるDNA合成の誘導。

D1NLSとCDK4またはLacZを発現するウイルスを成体ラット心臓に注入し、BrdU 10 mg/kgを12時間ごとに腹腔内注射し、4日後に固定して心筋特異的アクチン(赤)の発現とBrdUの取り込みを蛍光免疫染色により解析した。D1NLSとCDK4の発現によりBrdU陽性(緑)心筋細胞(赤)が多く観察される。左図の囲みを拡大した像を右に示す。(文献1より改変)

ル(Nuclear Localizing Signal = NLS)を付加した(D1NLS)アデノウイルスベクターとCDK4を発現するアデノウイルスベクターを作製し心筋細胞の核に強制発現させた(D1NLS/CDK4心筋)。その結果、図1AおよびBに示すように、D1NLS/CDK4心筋細胞の細胞周期は明らかにG1期からS期、G2/M期へと進行し、細胞数もおよそ3倍まで増加した。同時に、成獣ラット心筋細胞への影響も調べた。図1Cに示すように、ラット心臓 *in situ* の心筋細胞に対しても細胞周期を再賦活化することが明らかになった¹⁾。しかしながら、図1Bからわかるように、D1NLS/CDK4心筋の増殖速度は遅く doubling time はおよそ90時間であり細胞分裂は1~2回で停止することがわかる。従って、サイクリンD1の核内発現は増殖能力を失った心筋細胞の分裂を再賦活化できたが、早期に分裂の抑制にいたることが明らかとなった。そこで、心筋細胞の再増殖停止メカニズムを検討することにした。

(3) D1NLS心筋細胞でのp27^{kip1}蓄積と分裂停止

まず、D1NLS発現量とCDK4活性およびG1後期キナーゼであるCDK2活性を測定した。その結果、D1NLS発現、CDK4活性とともに維持されていたが、CDK2活性はD1NLS/CDK4感染24時間後に著明に活性化されるものの、その後著しく低下した。それと並行してCDK2阻害因子であるp27^{kip1}の集積が認められた。細胞増殖が持続するためには、細胞周期抑制因子であるCDK阻害因子p27^{kip1}が分解されないといけないが、サイクリンD1によって増殖誘導をさせた心筋細胞ではp27^{kip1}が核内に蓄積する(図2)。そこでp27^{kip1}が心筋細胞の再増殖停止機構に深く関与している可能性が考えられ、ロックダウンを試みるためp27siRNA発現アデノウイルスベクターを作製することにした。まずタカラバイオ社に構築を依頼したp27siRNA発現ベクター(3種類の配列)から、EcoRI/HindIIIによりhU6-p27siRNA

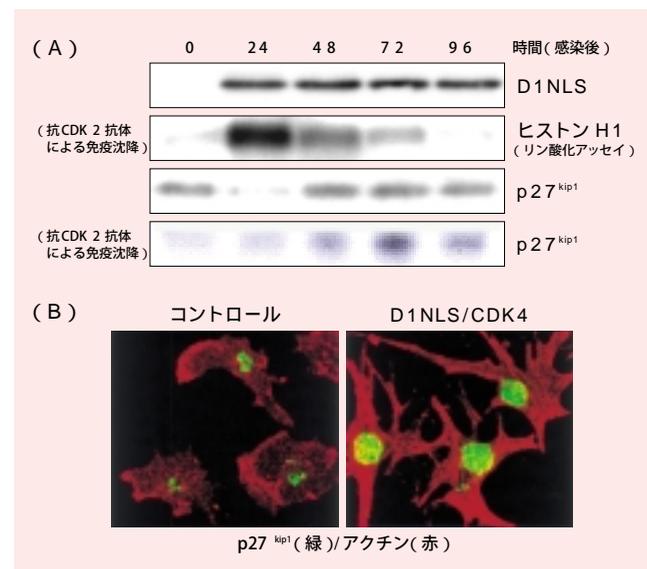


図2 サイクリンD1核移行によるp27^{kip1}の発現誘導

D1NLS/CDK4感染新生仔ラット培養心筋細胞におけるサイクリンD1NLSの発現、CDK2活性、p27^{kip1}の発現の変化(A:ウェスタンブロット)感染48時間後のp27^{kip1}の発現(B:蛍光免疫染色)(文献3より改変)

を切り出し、DNA Blunting Kit(製品コード6025)を用いて末端平滑化した。これをアデノウイルスゲノムが挿入されたコスミドベクター(pAxcw; Adenovirus Expression Vector Kit)のSwa I 部位に挿入し、Adenovirus Expression Vector Kitのプロトコルに従ってp27siRNA 発現アデノウイルスベクターを作製した(p27siRNA ウイルス)。これを培養心筋細胞に感染させると、#1、#4、#6のいずれのsiRNAもp27^{kip1}の発現を抑制したが、同じCIP/KIPファミリーであるp21の発現は抑制しなかった(図3A)。すなわち、p27^{kip1}を特異的に発現抑制することが確認できた。そしてもっとも強く抑制効果を示した#6を用いてCDK2活性および細胞周期・細胞増殖能について解析した。その結果、D1NLS/CDK4心筋では24時間をピークにCDK2活性は低下するが、p27siRNA ウイルスを共感染させると活性が持続した(図3B)。また、D1NLS/CDK4心筋では感染後144時間後から時間依存的

に増殖期(SG2/M期)の細胞が減少し(144時間後では29%、192時間後では15%)G1期の細胞数が増加し、多くの細胞がG1期に静止する傾向が認められた。p27siRNA ウイルスを共感染させることにより、144時間後の増殖期(SG2/M期)の細胞が29% 35.5%、192時間後では15% 30%と増殖期細胞数がD1NLS/CDK4心筋細胞と比較して多く認められ、再増殖停止が遅延する傾向が示された。さらに、細胞数を測定したところ、D1NLS/CDK4心筋は、コントロールに比べて約3倍程度の増加を認めたが、p27siRNAによりp27^{kip1}の発現を抑制することにより約5倍まで増加を示した(図3C、D)。すなわち、p27^{kip1}をノックダウンすることによりD1NLS/CDK4心筋細胞の増殖能がさらに賦活化されることが示され、p27^{kip1}が再増殖停止機構の少なくとも一つの主要な鍵であることが明らかになった³⁾。

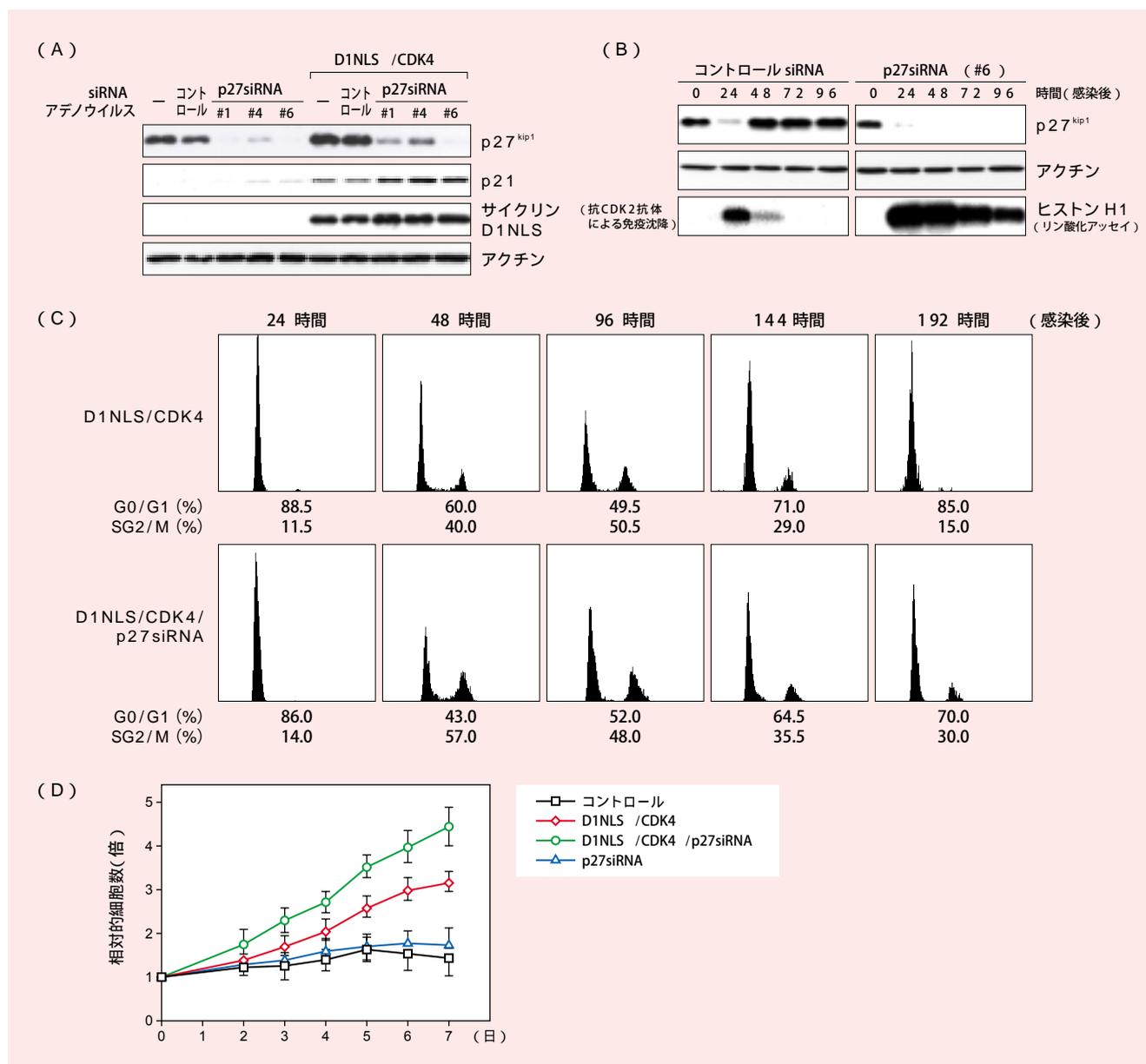


図3 siRNA 発現アデノウイルスベクターを用いた p27^{kip1} ノックダウンによる細胞周期、細胞増殖能の活性化 (A : ウェスタンブロット、B : ウェスタンブロット・CDK2リン酸化アッセイ、C : LSCによる細胞周期解析、D : 経時的細胞数測定) (文献3より改変)

(4) 心筋における p27^{kip1} ユビキチン化活性の低下
 一般の増殖細胞では、p27^{kip1} はSG2/M期においてF-boxタンパク質Skp2を含むSCF/Skp2複合体ユビキチンリガーゼによってポリユビキチン化されプロテアソームで分解される。そこで、D1NLS/CDK4心筋におけるp27^{kip1}蓄積の機構についてさらに検討した。
 まず、p27^{kip1}タンパク量の増加がmRNA量の変化によるものかを知る目的でノーザンブロット解析を行ったが、mRNA量には変化はなくp27^{kip1}の蓄積は転写レベルでもmRNA安定性によるものでもなかった(図4A)。次にD1NLS/CDK4心筋細胞の抽出タンパクを調製し、p27^{kip1}を基質としたユビキチン化活性を測定した。図4Bにその結果を示す。分裂能力をもつラット繊維芽細胞(REF52細胞)においては、反応後、ポリユビキチン化されたp27^{kip1}が高分子量領域に見られたが、心筋ではその活性が顕著に低下していた。この結果は、心筋細胞においてはp27^{kip1}のユビキチン化活性が著明に減弱していることを示唆する。

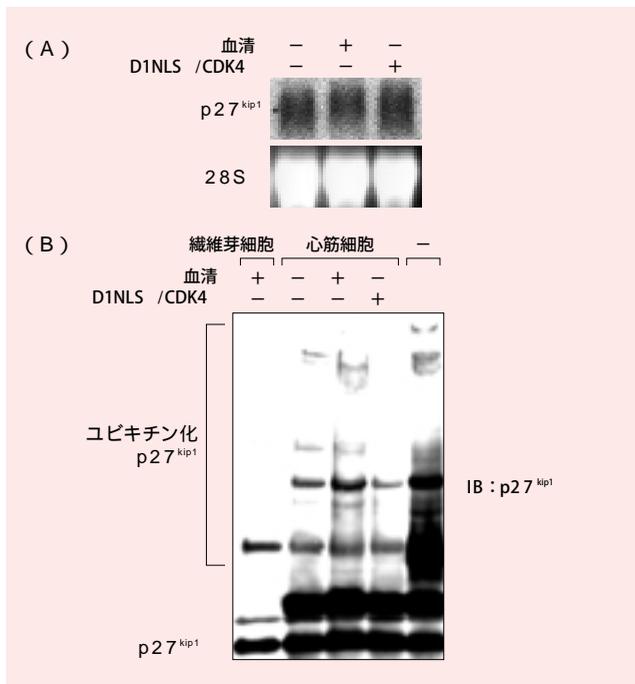


図4 心筋細胞におけるp27^{kip1} mRNA発現(A:ノーザンブロット) p27^{kip1}のユビキチン化アッセイ(B:ウェスタンブロット) (文献3より改変)

(5) 心筋細胞における p27^{kip1} の制御メカニズム
 次に、p27^{kip1}のユビキチンリガーゼであるSkp2について解析を行ったところ、心筋細胞においてタンパク発現レベルが非常に低いこと、さらにSkp2のユビキチン・プロテアソーム分解活性の亢進を認めた(図5A、B)。そこでSkp2をアデノウイルスベクターを用いて強制発現させてp27^{kip1}を特異的に分解させると、心筋細胞の増殖能はさらに増加した(図5C)。このことから終末分化した心筋細胞を強制的に増殖させるとp27^{kip1}が強く集積しブレーキとして働くこと、そのメカニズムにはSkp2の過剰なユビキチン分解活性の亢進が関与していることが示された³⁾。

さらに発生に伴う心筋細胞の終末分化における増殖停止メカニズムにもp27^{kip1}の安定化による発現誘導が関与している可能性が考えられる。事実、増殖能を残している胎生17日目の心筋細胞と終末分化した新生仔の心筋細胞のタンパク抽出液を用いてユビキチン化活性について比較したところ、胎仔心筋の方がp27^{kip1}に対するユビキチン化活性が高く、また、Skp2に関しては、分化した新生仔心筋でユビキチン化活性が高いという結果が得られた。すなわち、心筋の発生と分化過程でp27^{kip1}/Skp2の脱制御が心筋細胞の増殖停止に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。このことは、心筋細胞以外の例えば神経細胞などの終末分化細胞においても同様の細胞周期抑制メカニズムが存在する可能性を示している興味深い。心筋細胞分化におけるp27^{kip1}/Skp2の脱制御のメカニズムについてさらに詳しく解析することにより、一般的な終末分化機構の解明に迫れるかもしれない。

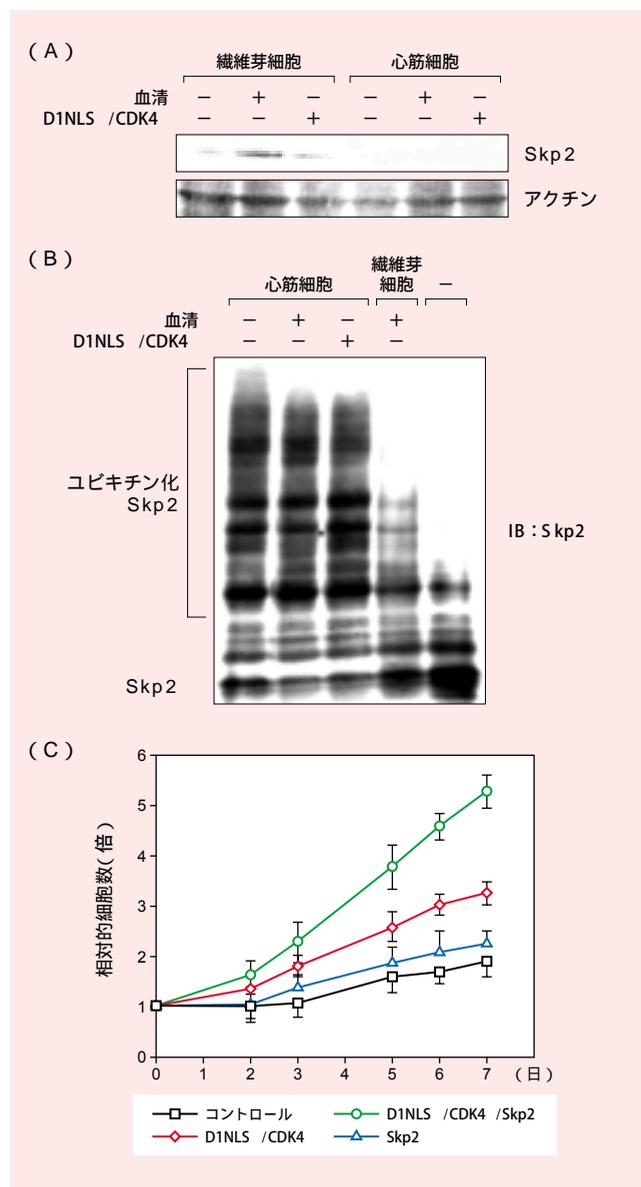


図5 心筋細胞におけるSkp2発現(A:ウェスタンブロット) Skp2のユビキチン化アッセイ(B:ウェスタンブロット) Skp2強制発現による増殖誘導(C:細胞数測定) (文献3より改変)

おわりに

我々は、サイクリンD1の核移行制御に加えて、p27^{kip1}の分解系の制御が心筋細胞の増殖に重要であることを見出した。しかし、細胞周期の進行が一連の協調された反応であることを考えると、この他にも心筋細胞の増殖を阻害する複数の段階があると思われる。我々は、それら一つずつ明らかにする過程で、何故心筋は終末分化とともに分裂能を失うのかという心筋特異的な機構を解明していきたいと考えている。そして心筋再生の実用化に向けた基礎的、応用的研究をさらに発展させ、真の心筋再生治療の確立に向けて積極的に挑戦していきたい。

【参考文献】

- 1) Tamamori-Adachi, M. et al.: Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. (2003) *Circ Res.*, 92, e12-19.
- 2) Tamamori-Adachi, M. et al.: Expression of cyclin D1 and CDK4 causes hypertrophic growth of cardiomyocytes in culture: a possible implication for cardiac hypertrophy. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 274-280.
- 3) Tamamori-Adachi, M. et al.: Down-regulation of p27Kip1 promotes cell proliferation of rat neonatal cardiomyocytes induced by nuclear expression of cyclin D1 and CDK4: Evidence for impaired Skp2-dependent degradation of p27 in terminal differentiation. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 50429-50436.

安達先生へのインタビュー

Q: 先生の今回の発表論文を簡単に教えてください。

A: 今回の論文では siRNA を発現するアデノウイルスベクターを作製し、p27^{kip1} のノックダウンを試みました。心筋細胞の増殖能が亢進し、心筋の再増殖を阻害している因子が p27^{kip1} であることが確認できました。Skp2 の強制発現実験と合わせて論文にまとめています(詳細は、本文参照)。

Q: siRNA 発現プラスミドをお届けしてから、4 カ月弱の期間で、論文をパブリッシュされておられます。いったい、どんなペースで実験しておられるのですか?

A: (笑)今回は、特別です。論文のリバイスに siRNA の実験を求められ、急いでいました。予備実験は行わず、アデノウイルス構築から実験まで、一気に行いました。御社が設計した 3 種の siRNA 配列が、すべてにおいてノックダウン効果が見られたことは、ラッキーでした。実を言いますと、保険として、他のデザインアルゴリズムでも設計し、並行してアデノウイルスを構築したのですが、そちらの方は、効果がありませんでした。助かりました。実験自体は、それほどバリバリやっている方ではないと、自分では思っています。

Q: ご研究に RNAi を取り入れられたのは、いつごろでしょうか。最初の頃の苦労話などあればお聞かせください。

A: RNAi は、今回が初めてです。やらなければと思ってはいたのですが、なかなか手が出ませんでした。今回、必要に迫られて行ったのですが、いきなり良い結果が得られたことはラッキーでした。

Q: 弊社の Adenovirus Expression Vector Kit をお使いいただいておりますが、使い勝手などをお聞かせください。

A: 大量に使ってます(笑)。実は、キットになる前から利用しています。心筋細胞など非増殖系の細胞には、現実的な手段がアデノしかないということに加え、CAG プロモーターに良い印象を持って使っています。使い勝手に多少の意見はありますが、強制発現の実験は、これでほとんどうまくいきましたので、このままで良

いと思います。ただ、siRNA 発現アデノウイルスの構築は、配列によって順調に行かない場合があり、注意が必要です。この点を解決していただければ助かりますが、このあたりをキットのせいにするのは酷だと考えています。このような経験から、siRNA 発現アデノウイルスは、なるべく複数の配列、複数の実験を並行して行い、リスクを分散するようにしています。

Q: 今後の研究の方向性は?

A: 一般増殖細胞において、安定して高発現している Skp2 が心筋においては分解されています。Skp2 分解のメカニズムには、ユビキチン化のステップが関与することもわかっており、次のテーマは、心筋細胞中で Skp2 をユビキチン化する因子はなにかです。その他にも、いくつか候補遺伝子を絞り込んでいて shRNA 発現プラスミドも大量にお願いしようと考えています。もう少し安くなりませんか?(笑)

本日は、貴重なお話をありがとうございました。



安達先生(中央)と研究室の皆さん

【インタビューを終えて】

人当たりが良く、優しい安達先生ですが、時折、研究者特有の厳しさが顔を覗かせます。バリバリやっている方ではないとのことですが、週 6 ~ 7 日は実験をされているそうです。「良い結果が得られたことはラッキー」とのことですが、リスクを分散する周到さと、急いでも綺麗なデータを出す技術があってこそです。お忙しい中、快くインタビューに応じていただいた安達先生、研究室の皆様、楽しい時間を過ごさせていただき、ありがとうございました。

関連製品のご紹介

効率のよいアデノウイルスベクター作製のために

Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)

製品コード 6170

Adenovirus Cre/loxP Kit (Dual Version)

製品コード 6173(近日発売)

Adenovirus genome DNA-TPC

製品コード 6171

6～10ページに掲載した東京医科歯科大学の安達三美先生の研究の中でも使われているように、アデノウイルスベクターは、その高い遺伝子導入効率と強力な遺伝子発現によって、遺伝子治療の基礎研究だけでなく、培養細胞および動物個体を用いた遺伝子機能の解明に広く使われています。さらに増殖細胞だけではなく神経系や筋肉などの静止期の細胞においても感染・発現できるという利点をもっています。タカラバイオでは、東京大学医科学研究所の斎藤泉博士らによって開発された高効率な組換えアデノウイルス作製法(完全長DNA導入法¹⁾およびCOS-TPC法²⁾)により組換えアデノウイルスを作製するためのキットを販売しています。

製品の特長

Adenovirus Expression Vector Kit(Dual Version)は、効率よく組換えアデノウイルスを作製するキットです。本キットを使用することにより目的遺伝子を搭載する組換えアデノウイルスを作製できます。一方、目的遺伝子が細胞毒性を有するような遺伝子で、通常の系では組換えアデノウイルス作製が困難な場合には、発現制御システムであるAdenovirus Cre/loxP Kit(Dual Version)を用いれば、組換えアデノウイルスを取得することができます。

これらのキットにはE1、E3遺伝子を除く完全長のアデノウイルスゲノムを搭載しているコスミドベクターが含まれています。これらのコスミドベクターに目的遺伝子をクローニングして組換えコスミドを作製します。作製した組換えコスミドから、制限酵素消化によりアデノウイルスゲノムを直鎖状にした後、293細胞にトランスフェクトすることにより、組換えアデノウイルスの作製を行います(完全長DNA導入法)。また、別売りのAdenovirus genome DNA-TPCと組み合わせ、より作製効率の高いCOS-TPC法により組換えアデノウイルスを作製することもできます。完全長DNA導入法でもCOS-TPC法でも、作製されたウイルスの構造はまったく同じですので、ウイルスの性質に差はありません。さらに詳細な情報につきましては、弊社ホームページオンラインカタログからご覧いただけます。

バージョンアップします!!

Adenovirus Expression Vector Kit(Dual Version)に続き、Adenovirus Cre/loxP Kitについても、ご要望の多かったDual Versionにバージョンアップします。これにより、Adenovirus Cre/loxP Kitでも、完全長DNA導入法で組換えアデノウイルス作製を行うことができるようになります。

siRNA 発現組換えアデノウイルスの作製には!!

Adenovirus Expression Vector Kit(Dual Version)とsiRNA発現基本ベクターpBAsiシリーズを組み合わせることにより、siRNA発現組換えアデノウイルスベクターを作製することができます。詳細につきましては、下記をご参照ください。

<https://www.takara-bio.co.jp/research/rnai/pdf/rnai7.pdf>

【参考文献】

- 1) 寺島美保、近藤小貴、鐘ヶ江裕美、斎藤泉(2003)実験医学 21(7)、931.
- 2) Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Takamori, K., Tokuda, C. and Saito, I.(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1320.

その他の関連製品

- ・ siRNA 発現用基本ベクター pBAsiシリーズ
製品コード 3220/3221/3222

【組換えアデノウイルス作製受託も承っております!!】

タカラバイオでは、希望される遺伝子を導入した組換えアデノウイルスをご多忙な研究者の方々に代わり作製いたします。熟練した技術者によるきめ細やかなサービスにより、お客さまにはすぐに遺伝子導入実験に着手していただくことができます。

- ・ 組換えアデノウイルスベクター作製
- ・ shRNA発現用組換えウイルスベクター作製

詳細につきましては、お気軽にお問い合わせください。

【お問い合わせ先】

タカラバイオ(株) 受託窓口
TEL : 077-565*--- FAX : 077-565*--)