

Title	Down-regulation of p27kip1 Promotes Cell Proliferation of Rat Neonatal Cardiomyocytes Induced by Nuclear Expression of Cyclin D1 and CDK4
Sub Title	p27kip1の発現低下によりサイクリンD1, CDK4による新生仔ラットの心筋細胞増殖は促進される
Author	林田, 健太郎(Hayashida, Kentaro)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.1 (2006. 3) ,p.8-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060302-0008

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Down-regulation of p27^{Kip1} Promotes Cell Proliferation of Rat Neonatal Cardiomyocytes Induced by Nuclear Expression of Cyclin D1 and CDK4

(p27^{Kip1}の発現低下によりサイクリンD1、CDK4による新生仔ラットの心筋細胞増殖は促進される)

林 田 健 太 郎

内容の要旨

心筋細胞は他の細胞とは異なり、出生後急速に細胞周期を停止し、増殖能を失う。その結果、心筋梗塞等により一度傷害された心筋組織は再生せず、不可逆的で重篤な心機能低下をきたすことが知られている。これまで心筋細胞における細胞周期のメカニズムについて多くの研究が報告されてきた。細胞増殖の開始段階では、多くの細胞では増殖刺激に対し、細胞周期調節因子であるサイクリンD1が増加し核内に移行することが知られている。近年Adachiらにより、新生仔ラットの培養心筋細胞では、増殖刺激によるサイクリンD1は発現が増加するものの、核内に移行しないことが明らかとなった。さらに核内移行シグナル(NLS: nuclear localizing signal)を連結したサイクリンD1(以後サイクリンD1NLS)を、共役して働くサイクリン依存性キナーゼ4(CDK4)とともにアデノウイルスベクターを用いて核内に強制発現させることにより、心筋細胞が再び細胞周期に入り、細胞分裂を開始することを明らかにした。

しかしサイクリンD1NLS/CDK4の強制発現による方法では、今回心筋細胞は一週間ほどで増殖を停止してしまうことが同時に示されたが、その機序は不明であった。今回我々は心筋細胞において、他の細胞周期調節因子について解析した結果、細胞周期に抑制的に働くサイクリン依存性キナーゼ抑制因子p27の発現が著明に亢進すること、これに伴いサイクリン依存性キナーゼ2(CDK2)の活性が抑制され、細胞周期の停止につながることを見いだした。p27はユビキチンリガーゼSkp2を介するユビキチン・プロテアソーム系によって分解されることが知られている。われわれはサイクリンD1NLS/CDK4の強制発現により増殖を開始した心筋細胞では、Skp2の発現が低下することにより、p27のSkp2依存性のユビキチン化が抑制され、p27の発現が亢進することを明らかにした。さらにSkp2のアデノウイルスベクターによる強制発現、またはp27のsmall interfering RNAによりp27の発現を特異的に低下させることにより、CDK2活性が増加し、サイクリンD1NLS/CDK4による心筋細胞増殖がさらに促進されることを見いだした。

以上により、心筋細胞ではユビキチンリガーゼSkp2の発現低下により、ユビキチン・プロテアソーム系による細胞周期抑制因子であるp27の分解が抑制され、発現量が増加するために細胞周期の停止に至り、増殖能を失うことが明らかになった。これらの所見は哺乳類の心筋細胞が終末分化に到る過程で増殖を停止する分子機序を解明する上で重要な現象であり、今後の研究に新たな影響を与えるものと考えられる。

論文審査の要旨

心筋細胞は出生後急速に細胞周期を停止し、増殖能を失うため、従来から心筋細胞増殖を目指してさまざまな試みがなされてきた。近年新生仔ラットの培養心筋細胞で、核内移行シグナル(NLS)を連結したサイクリンD1(以後サイクリンD1NLS)を、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)4とともにアデノウイルスベクターを用いて核内に強制発現させることにより、心筋細胞が再び細胞分裂を開始することが報告されたが、この方法では一週間ほどで増殖を停止してしまい、その機序は不明であった。今回我々はサイクリンD1NLS/CDK4の強制発現により増殖を開始した心筋細胞において、ユビキチンリガーゼを構成するSkp2の発現低下により、サイクリン依存性キナーゼ抑制因子であるp27のSkp2依存性のユビキチン化が抑制され、p27の発現が著明に亢進することによりCDK2の活性が抑制され細胞周期の停止につながることを、またSkp2のアデノウイルスベクターによる強制発現、またはp27のsiRNAによりp27の発現を特異的に低下させると、CDK2活性が増加しサイクリンD1NLS/CDK4による心筋細胞増殖がさらに促進されることを見いだした。

審査では、まず細胞周期解析においてG0期とG1期の区別についての質問があったが、現在分子生物学的な定義は確立されていないものの、Rb蛋白のリン酸化が一つの指標となり本研究でも確認されていることが示された。またSKp2のトランスジェニック、またノックアウトマウスの発現型と今回の結果との関係については、SKp2のノックアウトマウスでは躰は矮小であるものの心臓の発生については野生型とほとんど差がなく、心筋細胞においてSKp2の発現低下によるp27の増加をきたしているという今回の結果と合致することが示された。またSKp2の強制発現による他の細胞周期制御因子への影響、アポトーシスを起こしている可能性に関しては、既知の細胞周期制御因子に関しては余り変化がないこと、またTunel染色で陽性細胞の増加は見られず、否定的である旨回答された。さらに心筋細胞増殖時の増殖効率のコントロールと機能の維持についての質問に対しては、現在のところアデノウイルスベクターを用いているが完全に増殖の開始、停止をコントロールできる段階にはいたっておらず、癌化の危険性もあり再生医療への実用的な応用に向けては今後の更なる検討が必要であると回答された。また本論文はequal contributionとなっているが、実験の中でユビキチンアッセイとsiRNA作成は担当していない点を確認された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているが、心筋細胞の発生、分化機序の解明と心筋再生医療への応用の可能性を示した点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡

外科学 四津 良平 生理学 岡野 栄之

発生・分化生物学 須田 年生

学力確認担当者:

審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成17年11月28日