

学位論文題名

# 血管平滑筋細胞増殖への p57<sup>kip2</sup> 発現低下の関与

## 学位論文内容の要旨

### I. 背景

経皮的冠動脈拡張術後に認められる冠動脈再狭窄は、同手技成功後の最大の合併症として捉えられている。再狭窄病変における肥厚した新生内膜を構成する血管平滑筋細胞は、高い増殖能と幼若な表現形を持つことが知られている。すなわち、血管平滑筋細胞は種々の刺激に速やかに反応し、静止期を脱し増殖反応を開始しうる能力を有しており、その増殖促進的あるいは抑制的な分子機構の解明は、再狭窄の予防を考える上で極めて重要である。

細胞の分裂は、細胞周期の進行と密接に連動しており、G1 間期から DNA 合成が実際行われる S 期への細胞周期進行には、調節因子たるサイクリンと酵素活性を有するサイクリン依存性リン酸化酵素 (CDK) の複合体の活性化が必要であることが知られている。逆に、サイクリン/CDK 複合体に結合し、その活性を抑制している分子群 (CDK 抑制蛋白; CKI) の存在も明らかにされており、CKI はサイクリン/CDK 複合体を抑制することで、レチノブラストーマ蛋白 (pRb) のリン酸化を抑制し、結果として転写因子 E2F の活性化を抑制している。CKI には、D タイプのサイクリンをもつばら抑制する p16 family (p15<sup>ink4b</sup>, p16<sup>ink4a</sup>, p18<sup>ink4c</sup>, p19<sup>ink4d</sup>) と、より広い抑制能力を有する p21 family (p21<sup>cip1</sup>, p27<sup>kip1</sup>, p57<sup>kip2</sup>) からなる。

生体内において、p21 と p27 は比較的広範囲に発現しているが、p57<sup>kip2</sup> は終末分化を終えた組織 (脳、骨格筋、心筋、血管平滑筋など) にのみ発現が認められ、その平滑筋細胞増殖における動態や生理的役割は知られていない。

### II. 目的

本研究の目的は、血管平滑筋細胞における細胞周期進行中の p57<sup>kip2</sup> 蛋白の動態を明らかにし、さらに細胞周期に対する影響、特に G1 期から S 期にかけて検討することである。

### III. 方法

胎児ラットの大動脈由来の培養血管平滑筋細胞 A10 を 10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む培地 (DMEM) で培養し、60 時間の 0.5%FBS/DMEM で細胞周期を G0/G1 期に同調静止させ、10% FBS/DMEM を再添加し、血清による増殖刺激を加え 4 時間おきに細胞を調製、以下の実験に供した。すなわち、flow cytometry による細胞周期解析、RT-PCR による表現形の変化と p57<sup>kip2</sup> の mRNA 量の変化、Western blot による p57<sup>kip2</sup> 蛋白量の変化、in-vitro kinase assay による

サイクリン/CDK 複合体の活性量である。さらに、種々のサイクリン、CDK の一過性発現系において  $p57^{kip2}$  の追加発現の有無による影響を CD-20 陽性細胞のみを指標として flowcytometry により S 期+G2/M 期の分布量の変化を解析した。

#### IV. 結果

血清除去により 90%以上の A10 細胞が G0/G1 期に同調静止し、血清の再添加により G1 から S 期への移行が 10 時間前後で、また G2 から M 期の移行が 18 時間前後で見られた。成熟型の血管平滑筋特異的な分子マーカーの発現は、血清除去後あるいは血清刺激後にも認められず、逆に幼若な血管平滑筋に特異的な分子マーカーの発現は、血清除去あるいは刺激後を通して発現していた。 $p57^{kip2}$  の mRNA の量は観察期間中、ほぼ一定であった。一方、 $p57^{kip2}$  の蛋白量は G0/G1 の細胞静止期では多く発現し、血清刺激による細胞周期進行の過程においては、刺激直後から減少し、低い発現量が維持されていた。in-vitro kinase assay によるサイクリン/CDK 複合体のリン酸化活性定量化により、サイクリン D/CDK4 とそれに引き続いて、サイクリン E/CDK2 複合体が順次活性化されることが明らかとなった。さらに、A10 細胞に対する一過性発現系において、サイクリン D と CDK4、あるいはサイクリン E と CDK2 の共発現により S 期+G2/M 期の割合はベクターのみのコントロールに比して両者とも有意に増加したが、 $p57^{kip2}$  の各々への追加はその割合の増加を抑制した。

#### V. 考案

幼若な表現形に特異的な分子マーカーが恒常的に発現していること、逆に高分化型のマーカーが発現していないことから、A10 細胞は幼若な表現形を持ち続ける培養血管平滑筋細胞と考えられた。 $p57^{kip2}$  蛋白は細胞周期の静止期で多く発現し、逆に細胞周期の開始と進行の際には速やかに減少し抑制された発現量が維持されており、細胞周期進行に対する閾値を設定し抑制的に働いていると推測された。さらに、 $p57^{kip2}$  の mRNA レベルはほぼ一定であったことから、転写レベルでの調節よりむしろ蛋白分解系の亢進による発現量減少が示唆され、実際ユビキチンプロテアソーム系による分解を受けうることが既に報告されている。 $p57^{kip2}$  の蛋白量減少を強制発現により補うと、G1 期特異的なサイクリン/CDK 複合体の活性化を抑制することで細胞周期の停止が実行されていた。逆に  $p57^{kip2}$  遺伝子をノックアウトした細胞では細胞周期の適切な停止と逸脱が起きず、過剰な細胞増殖の継続とアポトーシスが起きることが知られ、併せて考えると  $p57^{kip2}$  の血清刺激後の減少は、増殖を惹起しうる細胞内情報伝達系のトリガーの一つと考えられた。 $p57^{kip2}$  の減少を阻害するような分子生物学的なアプローチは、血管閉塞性疾患の予防と治療に有用であることが示唆された。

#### VI. 結語

幼若な表現形を維持する血管平滑筋細胞の増殖において、 $p57^{kip2}$  の減少は G1 期特異的なサイクリン/CDK 複合体の活性化に関与し、細胞周期促進的に働く。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 島 顕  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎  
副 査 教 授 三 輪 聡 一  
副 査 教 授 島 山 昌 則

## 学位論文題名

### 血管平滑筋細胞増殖への p57<sup>kip2</sup> 発現低下の関与

経皮的冠動脈拡張術後に認められる冠動脈再狭窄は、手技成功後の最大の合併症として捉えられている。再狭窄病変における肥厚した新生内膜を構成する血管平滑筋細胞は、高い増殖能と幼若な表現形を持つことが知られ、その増殖を制御する分子機構の解明は、再狭窄の予防を考える上で重要である。細胞の分裂は、細胞周期の進行と密接に連動しており、G1 間期から DNA 合成が実際行われる S 期への細胞周期進行には、調節因子たるサイクリンと酵素活性を有するサイクリン依存性リン酸化酵素 (CDK) の複合体の活性化が必要であることが知られている。逆に、サイクリン/CDK 複合体に結合し、その活性を抑制している分子群である CDK 抑制蛋白; CKI は、サイクリン/CDK 複合体を抑制することで、レチノブラストーマ蛋白 (pRb) のリン酸化を抑制し、結果として転写因子 E2F の活性化を抑制している。CKI には、D タイプのサイクリンをもつばら抑制する p16 family と、より広い抑制能力を有する p21family (p21<sup>cip1</sup>, p27<sup>kip1</sup>, p57<sup>kip2</sup>) からなる。しかし、生体内において、p57 は終末分化を終えた組織 (脳、骨格筋、心筋、血管平滑筋など) にのみ発現が認められるものの、その平滑筋細胞の増殖における動態や生理的役割は知られていない。申請者は、血管平滑筋細胞における細胞周期進行中の p57 蛋白の動態を明らかにし、さらに細胞周期に対する影響、特に G1 期から S 期にかけて検討することを試みた。方法は、胎児ラットの大動脈由来の培養血管平滑筋細胞を 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む培地 (DMEM) で培養し、60 時間の 0.5% FBS/DMEM で細胞周期を G0/G1 期に同調静止させ、10% FBS/DMEM を再添加し、血清による増殖刺激を加え 4 時間おきに細胞を調製、以下の実験に供した。すなわち、flowcytometry による細胞周期解析、Western blot による p57 蛋白量の変化、in-vitro kinase assay によるサイクリン/CDK 複合体の活性量定量である。さらに、p57 発現アデノウイルスを用いて、サイクリン/CDK 複合体のリン酸化活性に対する影響の検討、また、種々のサイクリン、CDK の一過性発現系において p57 の追加発現

の有無による細胞周期への影響を解析した。血清除去により G0/ G1 期に同調静止した状態で、p57 は血管平滑筋細胞に多く発現しており、細胞周期進行に対する閾値を設定すると考えられた。逆に、血清刺激による細胞周期進行の過程においては、p57 は刺激直後から減少し、低い発現量が維持されており、その減少は細胞周期促進的に働いていることが予想された。一方、サイクリン D/ CDK4 とそれに引き続いて、サイクリン E/ CDK2 複合体が順次活性化されること、さらに p57 の減少を過剰発現により抑制すると、各々の活性化は有意に抑制されることが明かとなった。一過性発現系においても、サイクリン D と CDK4、あるいはサイクリン E と CDK2 の共発現による細胞周期促進作用は、p57 の追加発現により、著明に抑制されていた。以上から、増殖刺激後の血管平滑筋細胞において、p57 蛋白は減少し、その細胞周期抑制作用が減弱すること、また、その過剰発現による補充は、サイクリン / CDK 複合体の活性化を抑制することで細胞周期進行と細胞増殖を抑制し、将来的に経皮的冠動脈拡張術後の新生内膜肥厚による再狭窄予防に有用である可能性が示唆された。

学位発表に際し、主査からの経過説明と紹介の後、申請者はスライドを用いながら約 15 分にわたって学位論文内容の発表を行った。その後副査の長嶋教授から、他の細胞系での p57 の経時的变化について、癌細胞における p57 の変化について、p57 の分解系の機序と役割について、p57 の動脈硬化に対する一時予防の可能性について、また、副査の三輪教授から、p57 の内在性の結合と細胞周期抑制の可能性について、また、副査の畠山教授から、p57 以外の分子の関与について、また内在性の発現量による疾患予防の可能性について、主査の北島 顕教授から、分裂しうる細胞と分裂しない細胞の違い、また、そのテロメラーゼとの関連について質問がなされた。申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識を駆使して、誠実にかつ、概ね適切に回答し得た。

本論文は、先進的かつ精緻な分子生物学的手法を駆使して、血管平滑筋細胞における p57 蛋白の動態を明らかにした上で、今までに知られていなかった平滑筋細胞の増殖における役割を解析した点が高く評価される。

審査員一同は、これらの研究成果と申請者の豊富な知識と科学に対する見識などをあわせ、申請者が博士（学位）を受けるに十分な資格を有するものと判定した。