

学位論文題名

Adenovirus-mediated Overexpression of
A Cyclin-dependent Kinase Inhibitor, p57Kip2,
Suppressed Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation

(Cyclin Dependent Kinase 抑制蛋白 p57Kip2を用いた平滑筋増殖の抑制)

学位論文内容の要旨

【背景】動脈傷害の反応としての血管平滑筋増殖の分子生物学的メカニズムの理解は、動脈硬化症の治療に重大な意義を持っている。血管傷害は、中膜での平滑筋細胞(VSMC)の増殖とそれに引き続く中膜から内膜への遊走を導く。VSMC の増殖は、血管損傷の治癒にとって必須であるが、同時に動脈硬化や経皮的冠動脈形成術後の再狭窄の原因ともなっている。今までの研究により多くの増殖因子(GF)が VSMC の増殖に関与することが報告されている。GF による刺激は核内の細胞周期調節機構を介して VSMC 増殖をもたらす。細胞増殖には DNA 複製過程の厳密な制御が必要である。細胞の増殖、分化、apoptosis には G1-S 期における CDK(cyclin-dependent protein kinases) とサイクリンが重要な役割をになっている。一方 CDK は複数の阻害蛋白(cyclin -dependent kinases inhibitor :CKI)によって抑制制御を受けている。CKI はサイクリン/CDK 複合体、あるいはこの中のキナーゼ活性を担うサブユニットである CDK に結合し、サイクリン/CDK 複合体のキナーゼ活性を阻害する一連の細胞周期調節蛋白質である。哺乳動物細胞では現時点で、p21(Sdi1/Cip1/Waf1)と相同性のある p21 ファミリーと p16(Ink4a/MTS1/CDK4I/CDKN2)と相同性のある p16 ファミリーの 2 つに分類され、いずれも細胞周期を負に制御することができ、細胞の老化、細胞の分化、アポトーシス、X 線照射などによる DNA の損傷修復、TGF- β による刺激などに伴い細胞が増殖を停止する際に関与する因子として注目されている。p21 ファミリーに属する CKI としては現在、p21,p27 (Kip1) および p57(Kip2)の 3 種類が知られている。

【目的】CKI 蛋白を過剰発現させることで VSMC の増殖を抑制を試みた。遺伝子導入の手段としては、アデノウイルスベクターを用いた。さらに VSMC 増殖における p21, p27, p57 の役割とその違いについて検討した。再狭窄や、血管異常増殖に対する新しい遺伝子治療の可能性を示唆する。

【方法】p21,p27,p57 発現アデノウイルスベクターの作成(COS-TPC 法):p21, p27, p57 の cDNA をコスミドカセット(pAxCAwt)の Swa1 の切断部位に挿入する。作成したコスミドと末端蛋白を有する部分親アデノウイルス Ad5dlxDNA-TPC を 293 細胞に co-transfection し相同組換えにより目的の CKI 発現アデノウイルス(Ad5p21,Ad5p27,Ad5p57)を得る。培養細胞を用いた組換えアデノウイルスの CKI 蛋白発現とその機能の検討:各 cDNA の上流に α -Flag 蛋白をコードする配列が挿入されているため、培養平滑筋細胞(A10 細胞)に上記アデノウイルスを感染させた後、各 CKI 蛋白の発現を α Flag に対する抗体を用いた Westernblot 法にて確認する。

Thymidine の取込みによる機能評価:A10 細胞に各組換えアデノウイルスを感染させ 24 時間低血清培地培養し細胞周期を G0/1 期に同調させる。培地を DMEM/10%FBS に置換し 24 時間刺激する。血清の刺激による DNA 合成促進の程度の評価は、3H-thymidine の取込みにより測定した

Propidium 染色とフローサイトメトリー:アデノウイルスの感染した A10 細胞を 24 時間 0.5%FBS/DMEM で培養した後 10%FBS/DMEM に置換し 24 時間培養した細胞を 75%エタノールで 4℃ overnight で固定する。propidium iodid で染色したのちフローサイトメーターにて細胞周期の解析を行った。

ウサギ頸動脈内膜剥離モデルにおける CKI 遺伝子導入の効果:家兎(日本白色種)総頸動脈内膜剥離モデルにおいてアデノウイルスを用いて CKI 遺伝子を局所に導入し内膜増殖抑制効果を検討した。導入にあたってはバルーンとクリップにより密封した血管腔に 100mmHg の圧をかけたまま 20 分間ウイルスをインキュベートした後、血管内の溶液を回収しクリップをはずし、バルーンを収縮させ血流を回復させた。3 日後に総頸動脈を摘出し内膜増殖の程度を検討した。総頸動脈を含む各臓器組織より DNA を抽出しアデノウイルスベクターに対して作成したオリゴプライマーを用いて PCR を行い各臓器でのウイルス検出を試みた。

【結果および討論】細胞増殖を効率よく抑制するためには、多数の Growth factor をブロックするよりは、増殖の最終段階である細胞周期を停止させる方がより有効と思われる。CDK inhibitor は細胞周期を促進している CDK , cyclin を不活性化することで細胞周期を抑制的に制御している。この蛋白質を過剰発現させるためにそれぞれの遺伝子産物を発現する組換えアデノウイルスを製作した。Western blot 法により目的の蛋白が発現していることが確認された。フローサイトメトリーによる検討では、p57kip2 の過剰発現は平滑筋培養細胞に G1arrest を誘導できることが確認できた。H3-Thymidine の取込みによる DNA 合成の検討では、Adp27 , Adp57 ともに 10moi の少ない力価の感染で十分な抑制効果を示した。Adp57 では Adp27 に比べより著明な抑制効果を認めた。ウサギの頸動脈内膜剥離モデルを用いた検討でも組換えアデノウイルスベクターによる CKI 蛋白の過剰発現は新生内膜の形成を有意に抑制しており、遺伝子治療のターゲットとして CKI は有望なものと考えられた。しかし、今回の検討で局所投与でも肝臓、脾臓、心臓にてアデノウイルスが検出されたことや、インキュベーションに 20min 程度の時間を用すことなど臨床応用するまでには、検討すべき課題も多いと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕
副 査 教 授 三 輪 聡 一
副 査 教 授 川 口 秀 明

学 位 論 文 題 名

Adenovirus-mediated Overexpression of A Cyclin-dependent Kinase Inhibitor, p57Kip2, Suppressed Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation

(Cyclin Dependent Kinase 抑制蛋白 p57Kip2を用いた平滑筋増殖の抑制)

動脈傷害の反応としての血管平滑筋増殖の分子生物学的メカニズムの理解は、動脈硬化症の治療に重大な意義を持っている。多くの増殖因子が血管平滑筋の増殖に関与することが報告されているが、増殖因子の刺激は最終的に核内の細胞周期調節機構を介して血管平滑筋の増殖をもたらす。細胞の増殖には G1-S 期における CDK(cyclin-dependent-kinase)と cyclin が重要な役割をになっていることがわかっており、一方 CDK は複数の阻害蛋白(cyclin-dependent-kinases inhibitor:CKI)によって抑制制御を受けていることもわかってきている。CKI に関しては、p21(Sdi1/Cip1/Waf1)と相同性のある p21 family(p21,p27,p57)と p16(Ink4a/MTS1/CDK4I/CDKN2)と相同性のある p16 familyの 2つに分類されている。我々は CKI 蛋白である p21 familyを過剰発現させることで血管平滑筋の増殖抑制を試みた。遺伝子導入の手段としてはアデノウイルスベクターを用いた。p21,p27,p57 の発現アデノウイルスベクターを COS-TPC 法で作成し、培養血管平滑筋細胞に感染させて Westernblot 法で蛋白の発現を確認した。又、フロサイトメトリーと Thymidine の取り込みから抑制作用を確認した。CKI の過剰発現はフロサイトメトリーの検討では G1 arrest を誘導し、Thymidine の取り込みの検討では、control と比較し顕著な DNA 合成に対する抑制効果を示した。続いてウサギの頸動脈内膜剥離モデルを用いて、新生内膜の抑制効果について検討した。Balloon とクリップにより作成した閉鎖空間にアデノウイルスを 20 分間封じ感染させ、3 日間後に総頸動脈を摘出し内膜と中膜の比率を検討した。その結

果、control に比べそれぞれ 50%程度の抑制効果が認められ、なかでは p57 による抑制効果が最も顕著であった。これらの結果から冠動脈再狭窄に対する遺伝子治療のターゲットとして CKI 遺伝子導入は有望なものと考えられた。遺伝子治療に用いる際の副作用の検討として、各臓器へのウイルスの移行を PCR を用いて検討したところ、肝臓、脾臓、心臓でウイルスゲノムが検出され、ウイルス投与の方法には組織特異性の面で検討の余地があると考えられた。

口頭発表に際し、川口教授からアデノウイルスベクターの導入効率、CKI と他の cell cycle の制御因子 E2F との抑制効果の違い、三輪教授からフローサイトメトリーでのデータ解析の仕方、CDK,CKI の発現の臓器特異性について、また北畠教授より、この実験の遺伝子治療応用について、また今後の再狭窄予防の治療法について質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は過去のデータや関連論文を引用し、概ね妥当な回答を行った。

この論文は、動脈硬化のメカニズムと動脈硬化病変の治療へのアプローチとして意義のあるものとして評価され、審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。