

研究課題別研究評価

1. 研究課題: 組織修復と器官形成を制御する新しい細胞内分子機構

2. 研究者名: 高橋克仁

3. 研究のねらい

カルポニン¹は成体では平滑筋で特異的に発現しており、平滑筋分化の指標となっている。カルポニンはアクチンのC末端と結合し、アクチン・ミオシンの滑り運動を抑制する。また、カルポニン遺伝子を平滑筋肉腫細胞に導入すると、増殖が抑制され、腫瘍の悪性度が低下する。本研究では、遺伝子欠失マウスを用いてカルポニンの機能を解明することを目的とした。

4. 研究成果

(1) カルポニン遺伝子欠失マウスにおける骨形成の亢進

カルポニン遺伝子のホモ型欠失マウス(-/-)には致死性はなく、外観は野性型マウス(+/+)と変わらなかった。骨格組織を比較すると、-/-マウスでは、骨膜骨芽細胞の活性化を伴う骨形成の亢進が認められ、骨芽細胞のマーカーである血清アルカリホスファターゼ(ALP)活性が有意に高値を示したが、+/+型マウスでは、カルポニン遺伝子が未分化な骨芽細胞にも発現していることを見出した。

(2) カルポニン遺伝子欠失マウスにおける骨折治癒の促進

骨折治癒は、(1) 出血、血腫形成を伴う炎症反応、(2) 骨膜骨芽細胞による骨形成、(3) 軟骨細胞による仮骨形成など、種々の細胞における諸反応の連鎖から成る組織の修復過程を経て行われる。肋骨骨折モデルを用いて、-/-マウスと+/+マウスの比較検討により、カルポニン遺伝子の欠失によって骨折治癒が促進されることが明らかになった。

(3) カルポニン遺伝子欠失マウスにおける骨形成因子(BMP)応答性の亢進

ヒト組み換え体 BMP-2 (rhBMP-2)を凍結乾燥し、マウスの背部筋膜下に埋め込んだところ、-/-マウスにおいて、正常骨髄をもつより大きな異所骨が形成された。続いて、マウス胎仔の大腿筋から酵素処理により未分化な間葉系細胞を分離し、BMPによる骨芽細胞への分化を検討した。ALP活性はrhBMP-2によって用量依存性に誘導され、-/-マウスの細胞で有意に高値で、より多くの細胞が骨芽細胞に分化誘導された。また、大動脈を摘出し、BMPの存在下で器官培養を行ったところ、-/-マウスの大動脈では、中膜全層の平滑筋細胞がALP陽性の骨芽細胞様細胞へと分化誘導された。

(4) BMPのシグナル伝達におけるカルポニンの役割

BMPの細胞内シグナル伝達分子であるSmadがカルポニンと結合することによって、BMPの細胞内シグナル伝達を抑制することが示唆された。

(5) 間葉系細胞由来の腫瘍(肉腫)におけるカルポニン遺伝子の発現

後に骨や軟骨、腱、筋肉細胞に分化し得る胎生期の未分化間葉系細胞を発生母体とした腫瘍である肉腫でのカルポニンの発現をRT-PCR法および免疫染色法で検討し、骨肉腫や平滑筋肉腫など広範なヒト腫瘍でカルポニン蛋白が発現していることがわかった。

(6) 難治性肉腫に対する標的遺伝子治療法の開発

ヒトカルポニン遺伝子プロモーターを単純ヘルペスウイルス(HSV)ゲノムに挿入し、正常な平滑筋には影響を与えず、カルポニンを発現する肉腫細胞のみで複製しその細胞を選択的に破壊する新規HSVベクターを構築した。このベクターでヒト由来の培養肉腫細胞に対する抗腫瘍効果を培養細胞系とヌードマウス移植系で検討し、ヌードマウスに移植したヒト平滑筋肉腫に対して、腫瘍内へのウイルスの直接注入により、6例中5例で腫瘍が3-4週間以内に消失することを認めた(図1)。



図1 腫瘍内へのHSVベクター溶液を1回注入後11日目。

5. 自己評価と今後の展望

平滑筋アクチンへの結合蛋白として精製されたカルポニンが、未分化な間葉系細胞にも発現し、成熟骨芽細胞や骨細胞への分化を抑制することが示唆された。ホモ型欠失マウスの細胞でのBMPに対する応答性の亢進と骨折治癒が促進されたことは、カルポニン遺伝子の機能を抑制する薬物が骨形成促進薬になる可能性を示している。また、BMPシグナル伝達系におけるアクチン細胞骨格関

連蛋白の関与は新しい知見であり、そのメカニズムが明らかになれば、力学的負荷による骨形成促進機序の解明に寄与するものと思われる。今後、Smad4 の核内外での移行などの動態や転写活性化機構に対するカルポニンの作用をさらに明らかにする必要がある。

間葉系細胞由来の悪性、すなわち肉腫は化学療法や放射線療法に抵抗性で、外科的切除後も再発を繰り返す、最終的には肺、肝、腹膜などに転移し患者を死に至らしめる。我が国における症例数は、癌と較べて少ないものの、若年者にも多発し、有効な治療法がないことより、究極の治療法である遺伝子治療法が強く望まれている。しかし、国内外において、遺伝子レベルの研究はほとんど行われていないのが現状である。本研究で開発した新規 HSV-1 ベクターは、すべての腫瘍細胞に遺伝子導入できないという、現在のがん遺伝子治療での問題点を克服できると思われる。この研究の成果は *Cancer Research* 誌に投稿中である。今後、複製可能型 HSV-1 ベクターの安全性が確認され、さらに複製効率の良い高力価のベクターが開発されれば、難治性肉腫に対する世界で初の腫瘍選択的遺伝子治療法となるであろう。

6. 領域総括の見解

本研究によりニワトリ砂嚢平滑筋アクチン結合タンパク質として単離精製されたカルポニンについて、その発現部位と骨形成における機能の解明を徹底的に行っている。この過程で種々のヒト肉腫細胞でカルポニン遺伝子が異常に強く発現していることを見出した。この知見から肉腫細胞のみを選択的に破壊する新規 HSV-1 ベクターを構築し、腫瘍内へのウイルスの直接注入による平滑筋肉腫の遺伝子治療法への可能性を導いたことを高く評価したい。

7. 発表論文

- Yoshikawa, H., Taniguchi, S., Yamamura, H., Mori, S., Sugimoto, M., Miyado, K., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M., Shibata, N., Takahashi, K. (1998). Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. *Genes Cells* 3, 685-695.
- Parker, C. A., Takahashi, K., Tang, J. X., Tao, T., Morgan, K. G. (1998). Cytoskeletal targeting of calponin in differentiated, contractile smooth muscle cells of the ferret. *J. Physiol. (London)* 508, 187-198.
- Yamamura, H., Yoshikawa, H., Tatsuta, M., Akedo, H., Takahashi, K. (1998). Expression of the smooth muscle calponin gene in human osteosarcoma and its possible association with prognosis. *Intern. J. Cancer* 79, 245-250.
- Ono, H., Yoshikawa, H., Ueda, T., Yamamura, H., Kudawara, I., Manou, M., Ishiguro, S., Funai, H., Koyanagi, Y., Araki, N., Hashimoto, N., Sonobe, H., Tatsuta, M., Takahashi, K. (1999). Expression of smooth muscle calponin in synovial sarcoma. *Sarcoma* 3, 107-113.
- Matthew, J. D., Khromov, A. S., McDuffie, M. J., Somlyo, A. V., Somlyo, A. P., Taniguchi, S., Takahashi, K. (2000). Contractile properties and proteins of smooth muscles of a calponin knockout mouse. *J. Physiol. (London)* 529, 811-824.

8. その他

招待講演 10件 うち 国内6件、海外4件

受賞講演 海外1: Motohatsu Fujiwara Award, 4th US-Japan Workshop, May 1999

“Evidence for cross-bridge regulation by calponin in contracting smooth muscle cells”