

心筋細胞の生存にかかわるシグナル伝達機構 Akt/PKB (protein kinase B)による心不全治療の可能性

白石 公¹⁾, Mark A. Sussman²⁾, 浜岡 建城¹⁾

京都府立医科大学小児疾患研究施設内科部門¹⁾
Division of Molecular and Cardiovascular Biology,
Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA²⁾

Key words :

アポトーシス, Akt (protein kinase B),
生存シグナル, 心不全, 遺伝子治療,
再生医療

Cellular and Molecular Aspects of Cardiomyocyte Survival and Possible Therapeutic Application for Heart Failure

Isao Shiraishi,¹⁾ Mark A. Sussman,²⁾ and Kenji Hamaoka¹⁾

¹⁾Division of Pediatrics, Children's Research Hospital, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan,

²⁾Division of Molecular and Cardiovascular Biology, Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA

Apoptosis plays an important role in the onset and progression of cardiac failure induced by stresses such as ischemia-reperfusion, hypoxia, pressure and/or volume overload, and cardiotoxic drugs. Several novel therapeutic strategies of protecting against cardiac failure have been proposed, including the promotion of cell survival signaling cascades of cardiac myocytes. A serine-threonine kinase, Akt/PKB (protein kinase B), plays a central role in the survival and anti-apoptosis of cardiac myocytes. Transferring the Akt gene into the heart tissue could become a feasible therapeutic strategy to protect against heart failure. This article reviews the cellular and molecular aspects of survival signals that act against apoptosis in the heart tissue, and discusses the possibilities and problems of this novel treatment of cardiac failure by promoting survival signals.

要 旨

心不全の発症と進展には、虚血 - 再還流、低酸素、圧 - 容量負荷、心毒性のある薬剤などのストレスによる心筋細胞のアポトーシス(細胞自殺)が大きく関与している。そこで心筋細胞がアポトーシスに陥るメカニズムを明らかにし、そのシグナル伝達経路を抑制することによって心不全を治療しようとする試みが実験レベルでなされつつある。セリンスレオニンキナーゼであるAkt (protein kinase B)は、心筋細胞において“生存”のシグナル伝達の中心をなす。Aktを心筋細胞内で活性化すると、ストレスによるアポトーシスを抑制して心不全の進展を予防できる可能性がある。この総説においてAktを中心とした“生存”シグナル伝達のメカニズムを解説するとともに、今後発展してくであろう遺伝子導入や心筋細胞および心筋組織移植など、分子細胞生物学的見地に基づいた新しい心不全治療への可能性と問題点について論じる。

はじめに

小児循環器領域における診断および治療技術の飛躍的な進歩によって、多数の先天性心疾患患児が救命されるようになってきた。大部分の子供たちは治療後に良好なquality of lifeを送っているが、一部の複雑心奇形においては治療後も心機能障害が残存し、心不全から心移植を余儀なくされる症例も存在する¹⁾。このように重症先天性心疾患の長期生存例が増えるにつれ、小児においても拡張型心筋症のみならず、複雑先天性心疾

患の患児における心不全の進行予防、管理、治療が重要な問題となりつつある²⁾。

心不全の発症にはカテコラミンやレニン-アンジオテンシン系などの神経体液性因子が関与していることから、最近では内科的治療としてβブロッカー³⁾やACE阻害剤⁴⁾などの薬剤が用いられるようになってきた。しかしながら薬物療法だけでは残存する心筋細胞を一時的に賦活化して心機能を改善させることはできても、心不全の進行を長期にわたり阻止することは困難である。一方末期の心不全患者に対して心臓移植は有効な

平成14年 3月 5日 受付
平成14年 7月 15日 受理

別刷請求先：〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465
京都府立医科大学小児疾患研究施設内科部門 白石 公
isao@koto.kpu-m.ac.jp

治療法ではあるが、小児ではドナーが絶対的に不足しているために心移植が一般的な治療として普及するまでには解決しなければならない問題点が多い。これらの理由から、とりわけ小児においては既存の概念から離れた新しい発想に基づく心不全治療法の開発が強く望まれている。

ここ数年、遺伝子治療⁵⁾および自己組織を用いた細胞移植⁶⁾や組織移植⁷⁾などの再生治療が臓器移植にかわる実現可能な治療法として脚光を浴びてきた (Table)。出生後まもなく分裂増殖能を失う心筋細胞の分野においては、embryonic stem cell (ES細胞⁸⁾)や骨髄幹細胞⁹⁾を移植することが、近い将来に心不全に対する理想的な治療法として確立されるものと期待される。しかしながら心不全の病因や病態は単一ではなく、このような遺伝子治療や再生医療を安全かつ有効に行うためには、まず心不全の病態および進展のメカニズムを分子細胞生物学的に十分に理解する必要がある。

心不全におけるアポトーシスの関与

心不全の発症および進行にみられる共通したメカニズムとして、“アポトーシス(細胞自殺)”による心筋細胞の脱落が大きくかかわっている¹⁰⁾。すなわち心筋梗塞における虚血-再還流障害¹¹⁾、高血圧や弁膜症などの圧-容量負荷¹²⁾、肥大型および拡張型心筋症¹³⁾、ウイルス性心筋炎¹⁴⁾、抗癌剤による心筋障害¹⁵⁾、移植心の拒絶反応¹⁶⁾などで引き起こされる心不全では、個々の心筋細胞の収縮不全に対する代償機転の機能的な破綻のみならず、アポトーシスに基づく心筋細胞の脱落とその結果もたらされる心筋細胞数の絶対的な減少がかかわっている。末期の不全心においては、残存した心筋細胞は代償性に肥大するとともに、最終的にはそれらの心筋細胞もアポトーシスにより脱落する。

アポトーシスとは、内的小および外的なストレスにより細胞内のアポトーシスカスケードが賦活化されて核や細胞質の断片化が起こり、細胞が自発的に死んでゆく過程である。外的なストレスにより細胞内小器官および細胞全体が膨化し、細胞膜が破壊されて炎症性細胞浸潤を伴って細胞が死んでゆく“細胞壊死(necrosis)”とは異なる過程とされている¹⁰⁾。1990年代後半からアポトーシスのシグナル伝達が詳細に研究された結果、アポトーシスによって細胞が死に至る過程は、誘導、決定、実行の3段階に分けて考えられている^{10,17)}。すなわち心筋細胞においては、低酸素、虚血-再還流、圧負荷、機械的伸展、放射線、抗癌剤などの薬剤、カテコラミン、tumor necrosis factor(TNF)、Fas ligandなど、細胞外からの刺激によるアポトーシスの誘導、ミト

Table Gene and regeneration therapies for cardiac failure

Up-regulation of cardiac contractility
β-adrenergic receptor gene transfer
Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase(SERCA2) gene transfer
Phospholamban gene inhibition
Angiogenesis
Vascular endothelial growth factor(VEGF)gene transfer
Hepatocyte growth factor(HGF)gene transfer
Inhibition of apoptosis
Caspases, Fas, FADD, cytochrome C release, forkhead family gene inhibition
Up-regulation of survival signals
Insulin-like growth factor-1(IGF-1), PI3-kinase, Akt, NF-κB gene transfer
Cell and tissue transplantation
ES cells, bone marrow stem cells, bone marrow interstitial cells, cardiac stem cells, myoblasts
Induction of cell proliferation in cardiac myocytes
Elucidation of cell-cycle regulation of cardiac myocytes
E2F, RB protein, cyclin-dependent kinases
Induction of cell differentiation of cardiac myocytes
Isolation of master genes of cardiac myocytes

コンドリアからのcytochrome Cの放出やdeath receptorからのシグナルを経たcaspase活性化によるアポトーシスの決定、caspase-activated DNase(CAD)によるDNAの断片化によるアポトーシスの実行の過程を経て細胞は死に導かれる。

アポトーシスには以下に述べる大きな特徴がある。

アポトーシスは各種の病態において細胞内で比較的共通したシグナル伝達経路をたどる、アポトーシスは制御可能な細胞死である、という2点である。したがって心筋細胞においてもアポトーシスの誘因を除去することのみならず、アポトーシスの決定もしくはアポトーシスの実行のいずれかの過程を抑制することにより、さまざまな原因で発症する心不全の進展を予防できる可能性がある。

心筋細胞における“生存”シグナル

細胞内にはアポトーシスを誘導して細胞を“自殺”に導くシグナル伝達経路と同時に、細胞を“生存”に導くシグナル伝達機構が存在する。このシグナルは、アポトーシスを抑制する、生存に必要な蛋白合成を促進する、細胞周期を活性化させて細胞を増殖させるこ

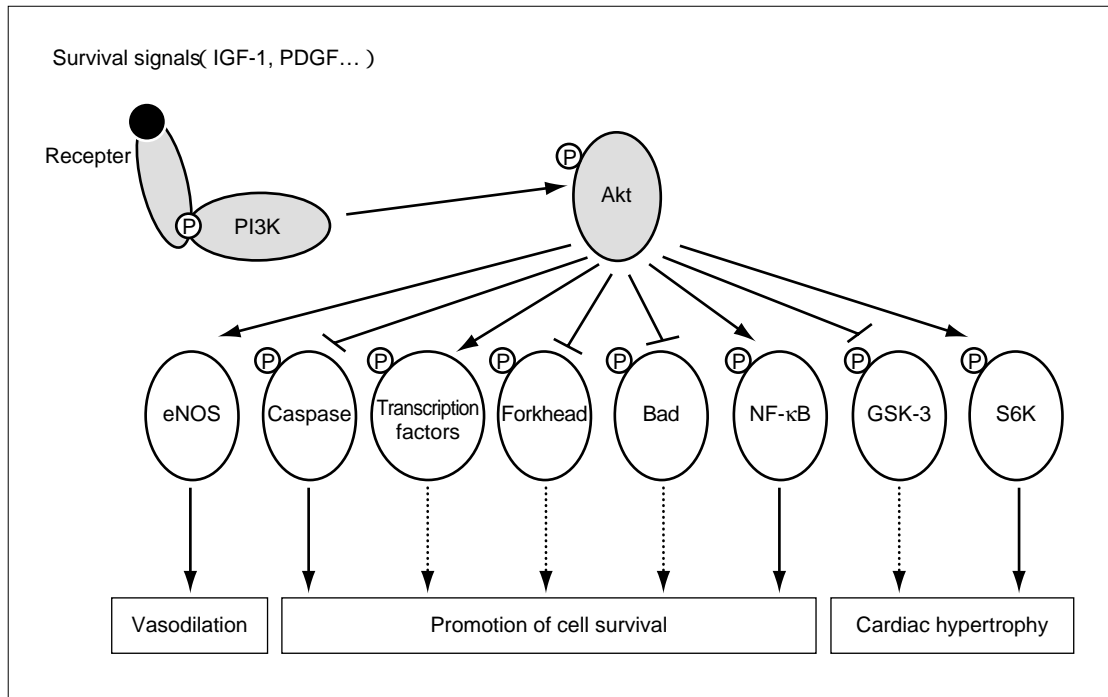


Fig. 1 Signaling cascade of Akt. Growth factors such as IGF-1 and PDGF activate Akt via receptor-type tyrosine kinase and PI3K. Activated Akt executes various kinds of cell survival signals.

とにより細胞を“生存”に向かわせる。これら“生存”と“死”の両者のシグナルのバランスが細胞の運命を決定していると考えられている。この“生存”のシグナル伝達をつかさどる蛋白質として、Akt (protein kinase B)^{8,19)}、その下流に位置するnuclear factor-κB (NF-κB)²⁰⁾、mitogen-activated protein kinase (MAPK) の1つであるextracellular signal-regulated kinase (ERK)²¹⁾などが存在する。心筋細胞において“生存”シグナルの中心をなすのはAkt (protein kinase B)である。

末期の拡張型心筋症の患者に成長ホルモン (GH) を投与して心機能を改善させようとする治療²²⁾が試みられているが、この治療の主なメカニズムはインスリンやGHのもつinsulin-like growth factor-1 (IGF-1) 様作用を利用したものである。IGF-1, platelet-derived growth factor (PDGF), hepatocyte growth factor (HGF) などの細胞の生存や増殖に必要な成長因子は、細胞膜に存在するレセプタ型tyrosine kinaseに結合するとtyrosine kinaseが自己リン酸化し、細胞内での多彩なシグナル伝達機構を惹起する。Aktはこのシグナルカスケードの下流に位置し、心筋細胞において抗アポトーシス作用の中心をなす物質である。成長因子はレセプタ型tyrosine kinaseおよびPI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) を介してAktを活性化する。活性化したAktは心筋細胞においてアポトーシ

スの抑制、蛋白合成促進、生存に重要なシグナル物質の転写促進、DNA合成促進などの作用により、さまざまなストレスに対する抵抗性を発揮する (Fig. 1)。

Aktによるシグナル伝達

Aktをコードする遺伝子*Akt*は、1970年代半ばにretrovirus (*Akt8*) の癌遺伝子*v-akt*として同定された²³⁾。その後1990年半ばにAktは正常の細胞にも普遍的に存在することが確認され (*c-akt*)、protein kinase Aおよびprotein kinase Cと多くの相同性をもつserine-threonine kinaseであることからprotein kinase Bとも呼ばれるようになった²⁴⁾。AktはN末端に細胞膜上に存在するリン脂質に強い親和性をもつpleckstrin homology (PH) domain、中央に基質蛋白質をリン酸化するkinase domain、C末端にはそれらを制御するregulatory domainをもつ構造をなしている (Fig. 2)。

Aktは元来細胞質内でPH domainを折りたたんだ不活性状態で存在する。インスリンやIGF-1, PDGF, HGFなどの成長因子が細胞膜上に存在するレセプタ型tyrosine kinaseに結合すると、レセプタ型tyrosine kinaseは、PI3Kをリン酸化する^{25,26)}。PI3Kは細胞膜の構成成分であるリン脂質phosphoinositides (PI) をリン酸化してphosphatidylinositol-3, 4-diphosphate [PI (3, 4)P₂]、phosphatidy-

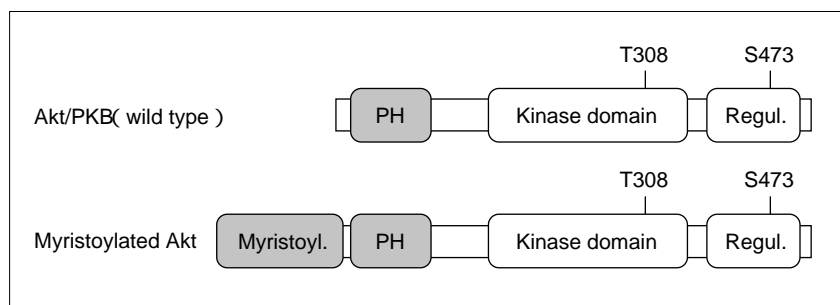


Fig. 2 Structure of Akt.

Akt consists of the plekstrin homology (PH) domain, which has strong affinity for cell membranes, the kinase domain, which plays an important role in substrate activation, and the regulatory domain. Myristoylated Akt is a constitutively activated form of Akt. This form of Akt has a myristoylation signal at the amino-terminus and shows a supraphysiological level of kinase activity at the cytoplasm.

inositol-3, 4, 5-triphosphate [$PK(3, 4, 5)P_3$] を産生する。もともと細胞質中に存在したAktとphosphatidylinositide-dependent kinase [PI-dependent kinase (PDK)] は、それぞれがもつPH domainが $PK(3, 4)P_2$ 、 $PK(3, 4, 5)P_3$ に親和性をもつことから細胞膜へと移動する。移動したPDK1とPDK2は活性化したPI3Kによりリン酸化される²⁷⁾。リン酸化したPDKはそのkinase activityによりAktをリン酸化する¹⁸⁾。具体的にはPDK1はthreonine-308を、PDK2はserine-473をリン酸化すると考えられている²⁸⁾。

細胞膜上でリン酸化を受けたAktは、蛋白内部で構造変化を来して最終的に核に移行する。Akt分子そのものはその分子構造に核移行シグナル(核へのシャトル蛋白が結合するアミノ酸配列)をもたないため、核移行の正確なメカニズムは現時点では明らかではない。最新の報告ではAktはリン酸化することにより3量体を形成し、蛋白質の構造変化を来して新しい核移行シグナルを形成するのか、T-cell leukemiaに認められるTCLなどの他のシャトル蛋白質がAktを核に運ぶのではないかと考えられている^{29, 30)}。

リン酸化したAktは細胞膜上から核に移行する間、細胞質において以下の基質をリン酸化することにより、細胞を“生存”に向かわせる(Fig. 3, 4)。

1. Badをリン酸化してミトコンドリア膜に存在するBcl-2から切り離すことにより、ミトコンドリアからのcytochrome Cの放出を阻止してアポトーシスを抑制する³¹⁾。
2. Caspase 9が合成される経路を抑制し、その結果アポトーシス実行をつかさどるcaspase 3の産生を阻止して、細胞がアポトーシスに陥るのを抑制する³²⁾。
3. グリコーゲン合成を抑制するGSK- α (glycogen synthase kinase-3) をリン酸化して不活性化することによりglycogen synthaseを活性化し、細胞のグリコー

ゲン合成を促進する³³⁾。

4. Glucose transporter (GLUT4) を活性化して細胞膜上へ移行させ、細胞内へのグルコースの取り込みを促進する³⁴⁾。
5. 細胞生存シグナルとして重要なNF- κ Bを制御するIKKをリン酸化し、不活性型のNF- κ Bダイマーに結合するIKBを切り離すことによりNF- κ Bダイマーが核に移行して、アポトーシスを抑制する種々の蛋白の転写活性を亢進させる³⁵⁾。
6. リボゾームに存在して蛋白合成を制御するp70S6-kinase活性を亢進させて、心筋細胞の蛋白合成を促進させ、心筋細胞を肥大に導く³⁶⁾。
7. 血管内皮細胞においてeNOSを活性化し、NO産生を亢進させる。その結果、血管は拡張する³⁷⁾。

リン酸化したAktは以上のような活性を細胞質内で示すとともに、最終的に核膜を通過して核内に移行し、アポトーシスを誘導する転写因子を核外に排除させたり、アポトーシスを抑制するさまざまな蛋白分子の転写活性を促進すると考えられている。

Aktの核内での基質として現在までに確認されているものとしては、以下の物質(主として転写因子)が存在する。

1. Forkhead transcription factorsは、アポトーシスを誘導するFas ligandの転写活性を促進するが、forkhead familyであるFKHRやAFXをリン酸化して、核から細胞質へ移行させることにより細胞のアポトーシス誘導を阻止する³⁸⁾。
2. リボゾームにおける蛋白合成を調節する転写因子SRK (S6 kinase-related kinase) をリン酸化して蛋白合成を促進させる³⁹⁾。
3. RB proteinとともに細胞周期を制御するE2Fを活性化して、細胞のDNA合成をS期に導く⁴⁰⁾。

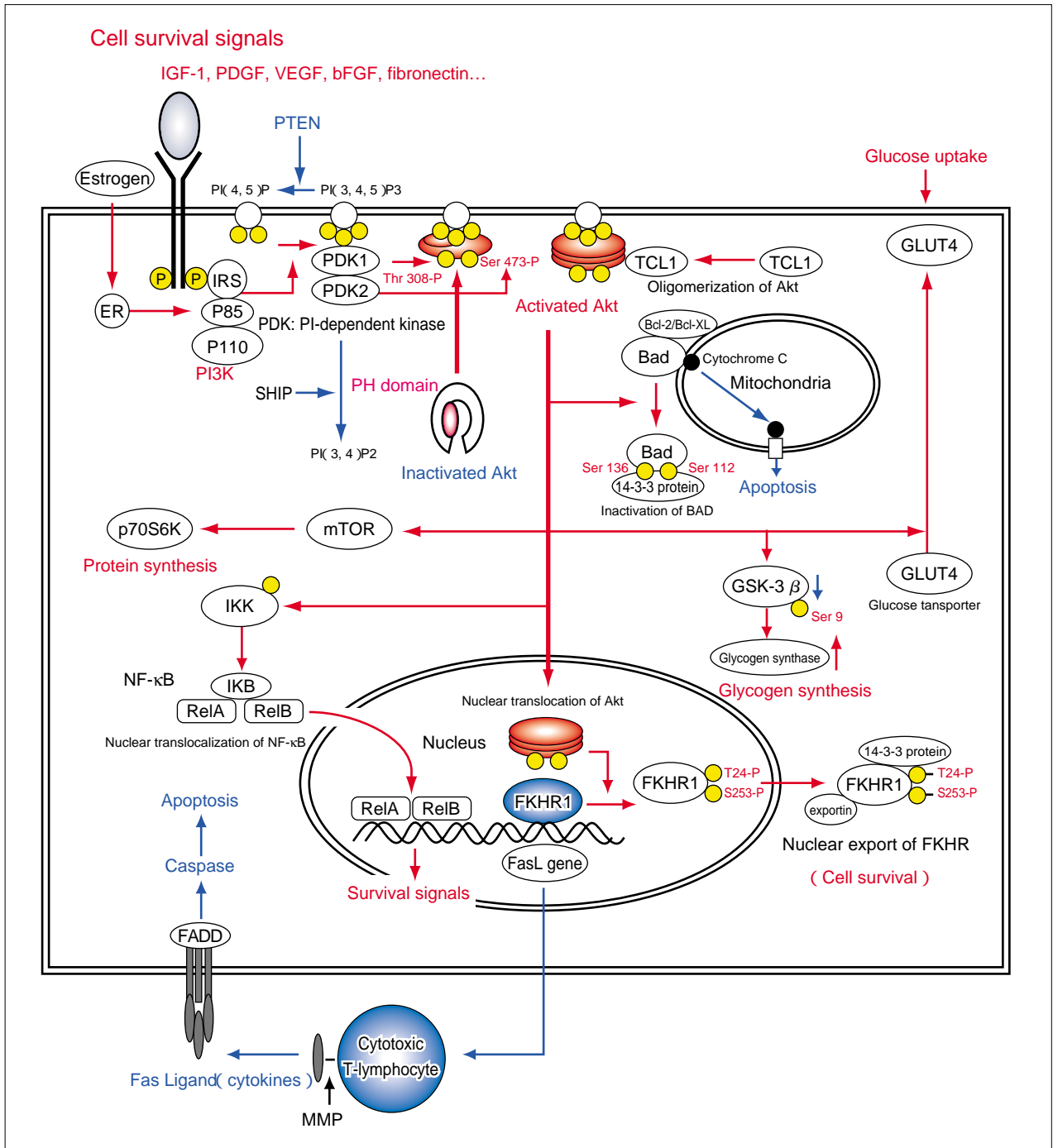


Fig. 3 Cell survival signaling cascades via Akt. Akt, which is initially activated by PI3K and PDK at the cell membrane, eventually translocates to the nucleus. In the nucleus, Akt regulates various kinds of transcription factors that are important for cell survival.

4. 細胞を生存へと導くさまざまな遺伝子の発現を調節する cyclic AMP response element binding protein (CREB) を活性化する⁴¹⁾。

このようにAktは細胞質および核内でさまざまな分子をリン酸化することによりアポトーシスを予防するとともに、リボゾームにおける蛋白質の合成、グルコースの細

胞質への取り込み、グリコーゲンの産生、核でのDNA合成促進などの細胞の「生存」シグナルを亢進させる。

Aktのリン酸化と細胞内での局在

ヒトの心筋細胞において、Aktが実際にどのような作用機序のもとで「生存」シグナルを実行するのは現時点

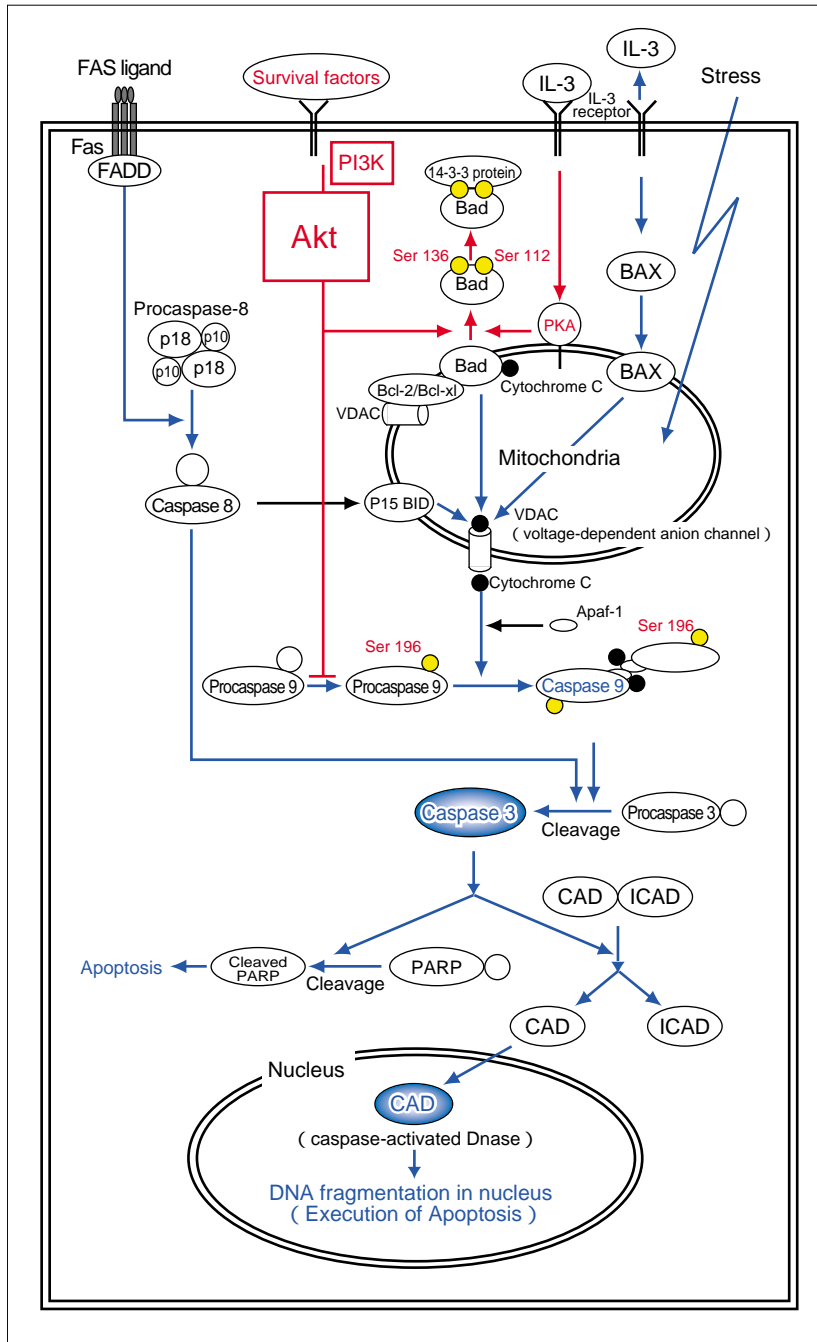


Fig. 4 Signaling cascades of apoptosis and anti-apoptotic effects of Akt. Apoptosis is executed by DNA fragmentation by CAD (caspase-activated DNase). Akt prevents apoptosis by inhibiting caspase 9 and Bad activity.

では十分には把握されていない．心筋組織でのAktの抗アポトーシス作用を考える上で，われわれはSussmanらとともに剖検心およびラット単離心筋細胞を用いて以下の報告を行った⁴²⁾．成人における心不全の発症と重症度には，年齢によって男女差が存在することが以前より知られている．すなわち男性においては各年齢における心不全の発症と死亡率の関係はおおまかな直線を描いて年

齢とともに増加するのに対し，閉経前の女性では心不全の発症率や死亡率が同じ年代の男性に比べて低く，閉経後にはそれらが高くなり同じ年代の男性とかわりなくなる⁴³⁾．この事実より，女性ホルモン，おそらくエストロゲンが心筋や血管に対して保護作用を有するのではないかと考えられてきた．事実エストロゲンは細胞膜を通過した後にエストロゲンレセプタに結合し，その複合体がAktの上流に位置するPI3Kの活性を亢進させることが判明している⁴⁴⁾．またエストロゲンと同様の作用を有する植物エストロゲン (phytoestrogen, その代表的なものは大豆に多く含まれるgenistein) にも心血管系に対する保護作用がある．大豆を多く摂取するわれわれ日本人が欧米人に比べて心血管病変の進行が軽度であるのは，genisteinに代表される植物エストロゲンの保護作用だとも考えられている⁴⁵⁾．そこでわれわれはAkt, 特にリン酸化したAkt (phospho-Akt 308, phospho-Akt 473) を剖検心筋組織において染色してみたところ，閉経前の女性ではphospho-Aktが同じ年代の男性や閉経後の女性に比べて高率に核内に存在し，閉経後の女性では同年代の男性と比べて核でのAktの存在に有意な差はなかった．すなわち活性化したAktによる抗アポトーシス作用の重要な作用部位は，核内に存在することが示唆された⁴²⁾．また雌マウスでは雄マウスに比べてphospho-Aktが核に高率に認められ，核分画から得た蛋白質をウエスタンブロットして定量したところ同様の所見が得られた．心筋特異的にIGF-1発現させたトランジェニックマウスは虚血・再還流に対して心筋保護作用を持つことが判明しているが⁴⁶⁾，このマウスの心臓組織を同様に染色，ウエスタンブロットしたところ，核に多量のphospho-Aktの存在を認められた．食餌にgenisteinを混ぜて飼育した雄マウスで

も, genisteinなしの食餌を摂取した雄マウスに比べて核に多くのphospho-Aktが認められた. さらに新生仔ラットの単離心筋細胞にエストロゲン, genisteinを作用させると明らかにphospho-Aktが核に集積し, Aktの核での抗アポトーシス作用の基質であるforkhead transcription factorの一つFKHRの活性化型が, 核から出て細胞質に集積しているのが観察された. すなわちエストロゲンやgenisteinの心筋細胞保護効果は, Aktの核内での抗アポトーシス作用による可能性が示唆された⁴³⁾. 核内におけるAktの基質としては, 現在までにforkhead transcription factor(FKHR, AFX)³⁸⁾やCREB⁴¹⁾, SRK³⁹⁾などが明らかとなっているが, Aktはアポトーシスに関するこれら以外の未知の多数の核内転写因子のリン酸化とその制御に参与しているものと考えられる. これら複数の基質や転写因子は近い将来に明らかになってくるものと考えられる.

Akt導入による心不全治療の可能性と その問題点

このようなAktの抗アポトーシス作用を利用して, Aktやその上流に位置するPI3Kを用いた心不全治療の試みが動物実験レベルで始まっている. アデノウイルスベクトルを用いてmyristoylated Akt(細胞膜に親和性があり強く活性化したAkt)遺伝子を新生仔ラットの単離心筋細胞内に導入したところ, 虚血-再還流⁴⁷⁾, 低酸素⁴⁸⁾に伴うアポトーシスを有意に抑制したという報告や, マウスの左冠動脈を結紮-解除して作成した虚血-再還流モデルにおいてAktをコードしたアデノウイルスを冠動脈より注入したところ, Akt治療群においてアポトーシスが有意に減少し心機能も改善したとする報告^{49, 50)}などがなされている. これらの実験事実よりAktを心筋細胞内で賦活化することにより, 心筋細胞がアポトーシスに陥ることを回避できると考えられる. アデノウイルスをベクトルとして用いた場合, 導入されたAkt遺伝子は心筋細胞に高率に取り込まれることも証明されている⁴⁹⁾.

Aktは細胞内に生理的に存在する物質であり, 心筋細胞においては, 種々のストレスから細胞を保護する役割を果たしているため, ヒトの心臓においても虚血, 低酸素, 圧負荷, 容量負荷, 薬剤などによるストレスから心筋細胞を保護するものと期待される. しかしながら現在までに行われているAktの遺伝子導入において, いくつかの問題点が存在する. 細胞内に生理的に存在するcAkt(cellular Akt, 細胞型Akt)を心筋細胞内で過剰発現させても, 上流のPI3Kによる活性化シグナルが活性化しない限り有意な抗アポトーシス作用を示さ

ない. そこで構造活性型のAkt(constitutively activated Akt, myristoylated Akt)を心筋細胞において強制発現する方法が用いられるようになった. myristoylated Aktとはアミノ末端に細胞膜に強い親和性をもつmyristoylation signalをもち, 細胞質, とくに細胞膜近辺において高度のリン酸化活性(約50~100倍のphospho-Akt)を示す⁵¹⁾. また線維芽細胞に導入すると形質転換して癌化を起こすこともある⁵²⁾. myristoylated Akt導入によって一部のphospho-Aktは核へも移行して抗アポトーシス作用を発揮するが, 大半のphospho-Aktは細胞質内に存在する基質へのリン酸化作用を現す. すなわちp70S6-kinaseを介した蛋白質の合成, GLUT4を介した細胞内へのグルコースの取り込み, GSK-3を介したグリコーゲン合成などを亢進させてしまう. その結果myristoylated Aktを心筋細胞内で長期間にわたって強制発現させると, アポトーシスを抑制する作用を発揮すると同時に心筋細胞を著しく肥大させてしまう^{53, 54)}. これまでにmyristoylated Aktを用いた実験は, *in vitro*における単離培養心筋細胞を用いた短期間の実験系や, 虚血-再還流などに伴って生じる急性心不全における心機能の改善についてなされてきたが⁴⁷⁻⁵⁰⁾, 長期投与の検討は十分なされていない. Aktを慢性心不全の治療法として確立するためには, 病的な肥大心を作らずに抗アポトーシス作用を発揮できるような方法を考え出さなければならない. この問題を解決する目的で, われわれはAktの抗アポトーシス作用の主体が核に存在することに着目し, 細胞内に生理的に存在する細胞型Akt(cAkt)に核移行シグナルをつけたDNA constructを作成して, アデノウイルスおよびトランスジェニックマウスの技術を用いて核内において発現させようとする試みを行っている. すでにアデノウイルスを用いた*in vitro*の実験系において, 核移行シグナルをもつcAktが心筋細胞を肥大させることなく有効な抗アポトーシス作用を発現することを確認している(Shiraishi et al. manuscript submitted).

今後の心不全治療

薬物療法や臓器移植にかわる心不全の新しい治療法として, 遺伝子治療や再生医療の発展が期待されている. 心筋梗塞後の虚血性心機能障害に対しVEGFやHGF遺伝子を導入する治療⁵⁾, 造血幹細胞やES細胞を梗塞巣に移植する細胞移植治療⁶⁾, 多層に培養した心筋組織を梗塞巣に移植するtissue engineering⁷⁾, などが進行した心不全に対する治療法として臨床応用されるものと考えられている. 先にも述べたように, 小児においてはドナーの絶対的不足や脳死判定の社会的制約により心臓移植が末期心不全の一般治療として定着するのが困難

であるために、現実的な医療として自己組織を用いた細胞移植療法や組織移植(tissue engineering)が発展してゆくものと考えられる。この際に移植した心筋細胞や心筋組織が、心筋障害を来す各種のストレスにさらされてアポトーシスに陥ってしまい短期間に脱落してしまっただけでは治療した意味がない。また自己の骨髄幹細胞より得られた心筋細胞や心筋組織といえども、移植した直後には移植操作に伴うさまざまなストレスによってかなりの細胞が脱落する可能性も考えられる。このような問題を解決する意味においても、あらかじめAktやNF- κ Bを代表とする“生存”シグナルを導入した心筋細胞や心筋組織を移植すれば、生着率が向上するとともに移植した部分がストレスに対して長期間にわたり強い防御効果を示すものと期待される。また移植した心筋細胞や組織がレシピエントの細胞や組織と正常なadherens junctionやgap junctionを形成し有効な同期収縮をするのか、移植片が心室性の不整脈の原因になったりしないかなどは、十分に検証されなければならない重要な課題である⁵⁵⁾。今後小児においても遺伝子再生医療が発展していくと考えられるが、これらを成功させて社会的にも受け入れられるようにするためにも、小児期の心不全を分子細胞生物学レベルにおいて十分に理解した上で治療戦略をたてていく必要があると考えられる。

まとめ

Aktを中心とする心筋細胞における“生存”シグナル伝達機構について解説するとともに、それを応用した新しい心不全治療の可能性について論じた。心移植のドナーの少ない小児においては、心筋細胞や心筋組織移植が末期心不全患者に対する有効な治療法として期待される。このような治療を実現し発展させるためには、小児の循環動態の特性を把握するとともに、心不全の病態や遺伝子再生医療の分子細胞生物学的なストラテジーを理解する必要がある。本総説が小児の心不全に対する遺伝子再生医療の実現と発展に寄与することを期待する。

謝辞

本研究に多くの助言をくださった京都府立医科大学第二病理学教室高松哲郎教授に深謝いたします。

【参考文献】

- Speziali G, Driscoll DJ, Danielson GK, et al: Cardiac transplantation for end-stage congenital heart defects: The Mayo Clinic experience. Mayo Cardiothoracic Transplant Team. Mayo Clin Proc 1998; 73: 923-928
- Brickner ME, Hillis LD, Lange RA: Congenital heart disease in adults: Second of two parts. N Engl J Med 2000; 342: 334-342
- Bruns LA, Chrisant MK, Lamour JM, et al: Carvedilol as therapy in pediatric heart failure: An initial multicenter experience. J Pediatr 2001; 138: 457-458
- Clark BJ 3rd: Treatment of heart failure in infants and children. Heart Dis 2000; 2: 354-361
- Simons M, Bonow RO, Chronos NA, et al: Clinical trials in coronary angiogenesis: Issues, problems, consensus: An expert panel summary. Circulation 2000; 102: E73-86
- Oakley RM, Ooi OC, Bongso A, et al: Myocyte transplantation for myocardial repair: A few good cells can mend broken heart. Ann Thorac Surg 2001; 71: 1724-1733
- Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, et al: Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? Circulation 2000; 102: III56-61
- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al: Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nat Med 2001; 7: 430-436
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 2001; 410: 701-705
- Haunzetter A, Izumo S: Apoptosis: Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. Circ Res 1998; 82: 1111-1129
- Itoh G, Tamura J, Suzuki M, et al: DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. Am J Pathol 1995; 146: 1325-1331
- Diez J, Fortuno MA, Ravassa S: Apoptosis in hypertensive heart disease. Curr Opin Cardiol 1998; 13: 317-325
- Narula J, Haider N, Virmani R, et al: Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. N Engl J Med 1996; 335: 1182-1189
- Bowles NE, Towbin JA: Molecular aspects of myocarditis. Curr Opin Cardiol 1998; 13: 179-184
- Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, et al: Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: *In vivo* study. Circulation 2000; 102: 572-578
- Narula J, Acio ER, Narula N, et al: Annexin-V imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection. Nat Med 2001; 7: 1347-1352
- Bromme HJ, Holtz J: Apoptosis in the heart: When and why? Mol Cell Biochem 1996; 163-164: 261-275
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME: Cellular survival: A play in three Acts. Genes Dev 1999; 13: 2905-2927
- Kandel ES, Hay N: The regulation and activities of the multi-functional serine/threonine kinase Akt/PKB. Exp Cell Res 1999; 253: 210-229
- Valen G, Yan ZQ, Hansson GK: Nuclear factor kappa-B and the heart. J Am Coll Cardiol 2001; 38: 307-314
- Molkentin JD, Dorn II GW 2nd: Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. Annu Rev Physiol 2001; 63: 391-426

- 22 Fazio S, Sabatini D, Capaldo B, et al: A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1996; 334: 809–814
- 23 Staal SP, Hartley JW, Rowe WP: Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 3065–3067
- 24 Hemmings BA: Akt signaling: Linking membrane events to life and death decisions. *Science* 1997; 275: 628–630
- 25 Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, et al: Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996; 15: 6541–6551
- 26 Kulik G, Klippel A, Weber MJ: Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 1595–1606
- 27 Franke TF, Yang SI, Chan TO, et al: The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target for the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 1995; 81: 727–736
- 28 Alessi DR, James SR, Downes CP, et al: Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol* 1997; 7: 261–269
- 29 Laine J, Kunstle G, Obata T, et al: The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. *Mol Cell* 2000; 6: 395–407
- 30 Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, et al: Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3028–3033
- 31 Wu W, Lee WL, Wu YY, et al: Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 40113–40119
- 32 Zhou H, Li XM, Meinkoth J, et al: Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol* 2000; 151: 483–494
- 32 Cross DA, Alessi DR, Cohen P, et al: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995; 378: 785–789
- 33 Ueki K, Yamamoto-Honda R, Kaburagi Y, et al: Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. *J Biol Chem* 1998; 273: 5315–5322
- 34 Valen G, Yan ZQ, Hansson GK: Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 307–314
- 36 Jonassen AK, Sack MN, Mjos OD, et al: Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res* 2001; 89: 1191–1198.
- 37 Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, et al: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399: 601–605
- 38 Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al: Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96: 857–868
- 39 Koh H, Jee K, Lee B, et al: Cloning and characterization of a nuclear S6 kinase, S6 kinase-related kinase (SRK), a novel nuclear target of Akt. *Oncogene* 1999; 18: 5115–5119
- 40 Brennan P, Babbage JW, Burgering BM, et al: Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. *Immunity* 1997; 7: 679–689
- 41 Du K, Montminy M: CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 1998; 273: 32377–32379
- 42 Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, et al: Myocardial Akt activation and gender: Increased nuclear activity in females and males. *Circ Res* 2001; 88: 1020–1027
- 43 Hayward CS, Kelly RP, Collins P: The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 28–49
- 44 Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, et al: Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 2000; 407: 538–541
- 45 Lissin LW, Cooke JP: Phytoestrogens and cardiovascular health. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1403–1410
- 46 Li Q, Li B, Wang X, et al: Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 1997; 100: 1991–1999
- 47 Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, et al: Akt promotes survival of cardiomyocytes *in vitro* and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 2000; 101: 660–667
- 48 Matsui T, Li L, del Monte F, et al: Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes *in vitro*. *Circulation* 1999; 100: 2373–2379
- 49 Miao W, Luo Z, Kitsis RN, et al: Intracoronary, adenovirus-mediated Akt gene transfer in heart limits infarct size following ischemia-reperfusion injury *in vivo*. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 2397–2402
- 50 Matsui T, Tao J, del Monte F, et al: Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia *in vivo*. *Circulation* 2001; 104: 330–335
- 51 Ahmed NN, Franke TF, Bellacosa A, et al: The proteins encoded by c-akt and v-akt differ in post-translational modification, subcellular localization and oncogenic potential. *Oncogene* 1993; 8: 1957–1963
- 52 Aoki M, Batista O, Bellacosa A, et al: The Akt kinase: Molecular determinants of oncogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14950–14955
- 53 Morisco C, Zebrowski D, Condorelli G, et al: The Akt-glycogen synthase kinase 3 β pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by β -adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2000; 275: 14466–14475
- 54 Shioi T, Kang PM, Douglas PS, et al: The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J* 2000; 19: 2537–2548
- 55 Matsushita T, Oyamada M, Kurata H, et al: Formation of cell junctions between grafted and host cardiomyocytes at the border zone of rat myocardial infarction. *Circulation* 1999; 100: 11262–268