

19980413

厚生科学研究費補助金
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

平成10年度研究報告書

AAVを利用した遺伝子導入法の基礎研究とその応用
(パーキンソン病の遺伝子治療法開発)

(H10-ゲノム-026)

平成11年4月

主任研究者 小澤敬也
(自治医科大学医学部)

別 添 2

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療 研究事業）

総括研究報告書

AAVを利用した遺伝子導入法の基礎研究とその応用
（パーキンソン病の遺伝子治療法開発）

主任 研究者 小澤 敬也 自治医科大学

研究要旨 AAVベクターに関する基礎研究としては、AAVベクター作製時、ベクタープラスミドのトランスフェクションの代わりに少量のAAVベクターをシードとして感染させ、AAVベクターを増幅させる方法を開発した。また、AAVベクターで導入した遺伝子の発現を増強させる方法については、放射線照射の効果を確認した。AAVの特性を利用した第19番染色体部位特異的遺伝子組込み法に関しては、この現象が造血系細胞でもみられることを明らかにすると共に、Rep蛋白質の機能ドメインの解析をさらに推進した。AAVベクターの応用研究としては、パーキンソン病の遺伝子治療法の開発を進めた。治療用候補遺伝子としては、ドーパミン合成に必要なチロシン水酸化酵素（TH）、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）、及びGTPシクロヒドロラーゼI（GCH）の各遺伝子に注目し、それぞれをAAVベクターに挿入して遺伝子導入実験を行った。その結果、これら三者の併用が最も有効であることが示唆された。また、核内オーファン受容体Nurr1がパーキンソン病の遺伝子治療の新たな候補遺伝子になりうると考え、ヒトNurr1遺伝子の単離と構造決定を行った。

分担研究者

中野 今治
自治医科大学医学部
教授
永津 俊治
藤田保健衛生大学総合医科学研究所
所長・教授

利な点は、野生型AAVがウイルスゲノムを第19番染色体長腕19q13.3-qter（AAVS1領域）に部位特異的に組み込む性質を有し、非病原性で安全性が高いと考えられること、また非分裂細胞への遺伝子導入が可能であることなどがあげられる。このようなユニークな性質を持つAAVに由来するベクターの実用化を図るには、作製法自体の開発が必須であり、パッケージング細胞株の樹立は重要課題である。また、AAVベクターの弱点の一つは、ウイルスゲノムが一本鎖DNAであるため、遺伝子発現効率が低い点である。遺伝子発現が起こるには二本鎖に変換される必要があるが、導入遺伝子のセカンド鎖合成の効率が悪いものと想定されている。そこで、AAVベクターで導入した遺伝子の発現レベルを高める工夫（具体的には放射線照射）を試みた。AAVの性質を利用した染色

A. 研究目的

遺伝子治療臨床研究が米国を中心に活発に実施されているが、臨床的有効性が確認されたものはまだほとんどなく、ベクター開発などの基礎研究の重要性が指摘されている。本研究では、最近脚光を浴びているアデノ随伴ウイルス（AAV: adeno-associated virus）を利用した遺伝子導入法に焦点を当て、その基礎研究から応用の可能性について検討した。AAVベクターの有

体部位特異的遺伝子組込み法 (TVI: targeted vector integration) に関しては、治療用遺伝子の第19番染色体AAVS1領域特異的組込みを狙った将来性のある技術であり、その開発を推進した。特に、造血系細胞でもこのような現象がみられるかどうか検討した。また、TVI活性を有するRep蛋白質の機能ドメインの解析をさらに推進した。

応用研究としては、神経細胞がAAVベクターに適した標的細胞であることに着目し、黒質線条体系ドーパミンニューロンの選択的変性を来す神経変性疾患であるパーキンソン病の遺伝子治療法開発に向けた基礎実験を行った。パーキンソン病に対する遺伝子治療の戦略としては、ドーパミン合成酵素遺伝子を用いる方法と、ドーパミン神経細胞の生存維持に関係する神経栄養因子遺伝子を用いる方法が代表的なものである。前者は対症療法の範疇に入るものであり、後者は疾患の進行を防ぐことを目的としたものである。ドーパミン合成には、チロシン水酸化酵素 (TH: tyrosine hydroxylase)、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC: aromatic L-amino acid decarboxylase) が必要である。昨年度までに、AAV-THにAAV-AADCを併用すると、THのみを発現させたときに比べてドーパミン生成量が増加すること、およびパーキンソン病のモデル動物であるドーパミンニューロン破壊ラットのアポモルフィン誘発回旋運動が減少することを報告してきた。本年度はこのアプローチをさらに発展させ、THとAADC遺伝子に加えGTPシクロヒドロラーゼI (GCH: GTP cyclohydrolase I) 遺伝子を導入する実験を行った。GCHはTHの補酵素であるテトラヒドロピオプテリン (BH₄) 合成系における律速酵素であり、GCHの遺伝子導入によりドーパミンの合成量のさらなる増加が期待できる。

パーキンソン病に対する新しい治療戦略の探索としては、主に中枢神経系、特にドーパミンニューロンに強く発現している核内オーファン受容体Nurr1に焦点を当てた研究を進めた。最近、Nurr1が中脳ドーパミンニューロンの発生分化に必須であることが示され、Nurr1がパー

キンソン病の遺伝子治療の新たな候補遺伝子になりうると思った。また、パーキンソン病や他の神経疾患の発症にNurr1が関与しているかどうかを調べる基礎として、ヒトNurr1遺伝子の単離と構造決定を行った。

B. 研究方法

1) AAVベクター作製技術の開発: ①パッケージング細胞株に関しては、ベクタープラスミドを予め組み込ませておくか、あるいはAAVベクター作製時に改めてベクタープラスミドをトランスフェクションする必要がある、この点が煩雑である。もし、パッケージング細胞株にシードとなるAAVベクターを感染させることにより大量のAAVベクターを作製することが可能となれば、実際面でのメリットは大きい。そこで、ベクタープラスミドのトランスフェクションの代わりに少量のAAVベクターを感染させてAAVベクターを増幅させる方法を試み、inputとoutputのAAVベクターの比較により増幅効率を検討した。②ヒト上顎がん由来の細胞株 (NKO-1) を用いてAAV-LacZを感染させ、24時間後にX-gal染色ならびにELISA法によるβガラクトシダーゼの定量を行った。この際、放射線照射がAAVベクターで導入した遺伝子の発現に及ぼす影響を調べるため、放射線の照射量とその照射のタイミングを検討した。また、導入遺伝子の存在様式 (一本鎖あるいは二本鎖) をSouthern分析により検討した。

2) 第19番染色体部位特異的遺伝子組込み法の開発: 野生型AAVはそのウイルスゲノムを第19番染色体長腕AAVS1領域に特異的に組み込む性質を有しているが、この現象はウイルスゲノム両端のITR (inverted terminal repeat) とRep蛋白質を介したものと考えられている。この現象を解析するために、ITRで挟んだneo^r遺伝子発現ユニットを持つプラスミド (pWNeo) とRep発現プラスミド [CMVプロモーターまたはp5プロモーターでドライブするRep78発現プラスミド (pCMVR78またはp5R78)] を標的細胞に同時にトランスフェクションした。

AAVS1領域への特異的遺伝子組込みの有無については、ITRとAAVS1領域にプライマーを設定したPCR-dot blot法、AAVS1領域の遺伝子再構成とそこへのneo^r遺伝子の組込みを調べるためのSouthern分析法（AAVS1フラグメントならびにneo^r遺伝子をプローブとしてハイブリダイゼーションを繰り返し、検出されたバンドの比較を行う）、第19番染色体長腕へのneo^r遺伝子の組込みを確認するためのFISH（fluorescence in situ hybridization）法などを行った。今回、Repプラスミドの至適量を検討するため、pWNeoの量を固定しておき、Rep78発現プラスミドの量を等量、0.2、0.1、0.02、0.01と変えて検討した（Repの細胞毒性を考慮し、等量以下での検討を行った）。また、造血系細胞でもこの部位特異的組込みがみられるかどうか、血球系の細胞株であるK562を用いた検討を行った。エレクトロポレーション法にてpCMVR78とpWNeoを導入し、G418抵抗性のクローンを分離して上記と同様の解析を行った。次に、Rep78のN末端約1/3の領域の極性アミノ酸をすべてアラニンに置換したRep変異体を約60種類作製した。極性アミノ酸が連続する場合は、2残基を同時にアラニンに換えた。それらの一部については、さらに各々を単独でアラニンに置換したものを作製した。導入した変異が、GAGCモチーフへの結合、部位特異的DNA切断、及び部位特異的組込みに影響を及ぼすかどうか、ゲルシフト法、in vitroアッセイ法、PCR法にてそれぞれ検討した。

3) パーキンソン病の遺伝子治療法開発：TH遺伝子、AADC遺伝子、GCH遺伝子、あるいはLacZ遺伝子の発現ユニットを含むAAVベクター（AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCH、及びAAV-LacZ）を作製した。AAVベクターは塩化セシウム密度勾配超遠心法により精製し、DNA dot blot法により力価を測定した。293細胞にin vitroでこれらのAAVベクターを感染させ、AAV-TH+AAV-AADC+AAV-LacZまたはAAV-TH+AAV-AADC+AAV-GCHの比較を行った。Western分析によりTH、AADC、GCHの発現を確認し、細胞内のL-ドーパ及び

ドーパミン含量は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法を用いて測定した。次に、黒質線条体路に6-OHDA（6-hydroxydopamin）を注入して作製したパーキンソン病モデルラットの線条体に、AAV-LacZ単独、AAV-TH+AAV-AADC+AAV-LacZ、AAV-TH+AAV-AADC+AAV-GCH（各 1×10^8 vector particles）をステレオ装置を用いて注入し、その前後でアポモルフィン誘発回旋運動の程度を比較検討した。

その他、報告されているマウスNurr1のcDNA配列を基にRT-PCR法によりマウスNurr1cDNAを増幅し、それをプローブとして用いてヒト線維芽細胞由来ゲノムライブラリーとヒト胎児脳由来cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。

C. 研究結果

1) AAVベクター作製技術の開発：①AAVベクター作製時に、ベクタープラスミドのトランスフェクションの代わりに少量のAAVベクターを感染させても、通常法とほぼ同レベルのAAVベクターが生成された（約 10^{10} particles/10 cm dish）。inputのAAVベクター量の条件により異なるが、この方法でほぼ数十倍の増幅効率を得られた。② 6×10^4 particles/cellのAAV-LacZベクターをNKO-1細胞に感染させ、その12時間前、6時間前、直前、直後、6時間後、12時間後に1～4 Gyの放射線を照射したところ、直後に3または4 Gy照射した時に、X-gal陽性細胞が約20%から50%へ増加した。その他の条件では陽性細数の有意の増加は認めなかった。また、 β ガラクトシダーゼを定量したところ、感染直後に3ないし4 Gy照射した時に、発現量はそれぞれ5ないし7倍に増加した。次に、Southern分析により導入遺伝子の状態を調べたところ、放射線量を上げるにしたがって、二本鎖への変換量が次第に増すことが確認できた。尚、一本鎖DNAに特異的に作用するmung bean nuclease処理を施すことにより、二本鎖部分を容易に検出することができた。

2) 第19番染色体部位特異的遺伝子組込み法（TVI）に関する基礎的検討：pWNeoとRep発現

プラスミドの比率を変えた検討では、後者の量が多くなるに従ってAAVS1の再構成を認めたクローンの頻度が高くなり、pCMVR78をpWNeoの等量もしくは1/5量使用したとき、解析したクローンの80%以上がAAVS1の再構成を示していた。Neo遺伝子がAAVS1に組み込まれていると考えられるクローンはpCMVR78、p5R78のどちらを用いても約25%前後で、1:1から1:0.02の間で比率を変えても変化はなかった。次に、造血系のK562細胞を用いた解析では、16/25クローンでAAVS1の再構成を認め、さらにそのうち8クローンでAAVS1にNeo遺伝子が組み込まれていることが判明した。FISH解析は8クローンについて行い、4クローンでNeo遺伝子のシグナルが実際に第19番染色体上に観察された。Rep変異体の解析では、R107A、K136A、R138Aが有意にGAGCモチーフへの結合活性を失っており、さらに部位特異的組込み活性も失われることを確認した。また、10K、66E、69R、84K、101K、113K、185R、239Eを変異させたものでは、結合活性が減弱していた。Mg²⁺と結合すると予想されているtwo His motifの90H、92Hをアラニンに置換したものでは、GAGCモチーフへの結合活性を保持していたが、nicking活性は失われており、かつ部位特異的組込み活性も消失していた。

3) パーキンソン病の遺伝子治療法開発: 293細胞にAAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCHベクターを感染させると、western分析でそれぞれTH、AADC、GCH蛋白質の発現が確認できた。AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCHの三者同時の遺伝子導入を行ったものと、AAV-THとAAV-AADCの二者のみのものを比較すると、三者の方がドーパミンの生成量が多かった。パーキンソン病モデルラットを用いた実験では、まだ少数例の検討の段階であるが、AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCHの三者同時の遺伝子導入を行った群の方が、AAV-THとAAV-AADCの二者のみの群に比べて、アポモルフィン誘発回旋運動の減少の程度が大きい傾向がみられた。

マウスNurr1cDNAをプローブとして、ヒト

ゲノムDNAライブラリーをスクリーニングした。さらに、Nurr1遺伝子を含む領域をサブクローンし、全遺伝子領域を含む約10 kbの塩基配列を決定した。その結果、Nurr1遺伝子は8個のエキソンからなり8.3 kbの長さを持つことが明らかとなった。ヒトNurr1遺伝子の5'上流プロモータ領域の塩基配列を約1,000 bp決定し、マウスの配列と比較した。第一エキシソンの近傍の配列は、ヒトとマウスの間で非常に相関性が高かった。また、ヒト胎児脳由来cDNAライブラリーからNurr1 cDNAのクローニングと全塩基配列の決定を行った。

D. 考察

1) AAVベクター作製技術の開発: AAVベクターは安全性の高い遺伝子導入法として注目されている。これまでAAVベクターの臨床応用を阻んできた大きな要因は、効率の良い作製法が確立されていないことと、遺伝子発現効率が低く、大量のベクターを用いる必要があったためである。パッケージング細胞株自体の開発に関しては、大きな進展が得られなかったが、全てのAAV蛋白質を制御する新しいストラテジーの準備を現在進めている。今年度は、ベクター作製時にベクタープラスミドのトランスフェクションの代わりに直接AAVベクターをシードとして感染させ、AAVベクターの増幅を図る新しい方法について検討した。このようなベクター作製法は、効率の良いパッケージング細胞株が利用できるようになった際には大きな利用価値があるものと考えている。AAVベクターで導入した遺伝子の発現増強法に関しては、放射線照射が有効であることが示された。この方法は、AAVベクターを癌の遺伝子治療に応用する際に有用であると思われる。

2) 第19番染色体部位特異的遺伝子組込み法の開発: TVI法を行うには、細胞毒性を持つRepの発現量をどの程度に設定したらよいか問題となる。今回、その基礎的な知見が得られ、今後の実験を進めていく上で有用な情報となっている。また、TVI法の応用面を考えた場合、分裂細胞に遺伝子導入する場合に大きな価値があ

ると考えられる。K562細胞にRep78を発現させた場合にITR-*neo*^r遺伝子の部位特異的組み込みが観察され、TVI法が造血系細胞でも有効であることが今回の研究で示された。Rep変異体の解析では、機能ドメインに関する知見がかなり蓄積されてきた。現在、TVI活性を保持し、細胞毒性が減弱したRep変異体のスクリーニングを進めており、既にその候補が幾つか挙がりつつある。もし、Rep蛋白質のTVI活性と細胞毒性を機能的に分離することができれば、TVI法の実用化に向けて大きな前進となる。

3) パーキンソン病の遺伝子治療法開発：パーキンソン病ではL-ドーパ療法が確立しているが、そのような内服療法では血中濃度の変動に伴う症状の日内変動があり、また急激な服薬中止により悪性症候群が生じるなどの問題点がある。本研究では、ドーパミン生合成酵素遺伝子を組み込んだベクターを線条体に注入し、直接線条体内でドーパミンを産生させる遺伝子治療の実験を行ってきた。これまでに、AAV-THとAAV-AADCの併用がTH単独の場合に比べて有効性が高いことを見出してきている。本年度は、さらにGCH遺伝子も導入することにより、ドーパミン生成量のさらなる増加とモデル動物の異常運動の改善傾向を認めた。パーキンソン病ではドーパミンニューロンの変性により線条体内のGCHの活性も低下していると考えられ、より効率よくドーパミンを生成するためにGCH遺伝子の補充が有効であることが今回の実験で示唆された。現在、その確認実験を進めると共に、将来のヒトへの応用の前段階として、サルMPTPによるパーキンソン病モデルを用いた遺伝子治療実験に着手している。

ヒトNurr1の遺伝子の染色体位置は、2q22-23にマップされている。これまでパーキンソン病関連疾患などでこの領域との連鎖が報告されているものはない。しかし、Nurr1の中脳ドーパミンニューロンの発生・維持に対する重要な働きを考えると、Nurr1はドーパミンニューロンと深い関わりを持つ疾患の病因を考えるうえで重要な鍵を握っていると予想される。

E. 結論

AAVベクターに関する基礎研究としては、AAVベクター作製時、ベクタープラスミドのトランスフェクションの代わりに少量のAAVベクターをシードとして感染させる方法を開発した。また、AAVベクターで導入した遺伝子の発現を増強させる方法については、放射線照射の効果を確認した。第19番染色体部位特異的遺伝子組込み法に関しては、この現象が造血系細胞でもみられることを明らかにすると共に、Rep蛋白質の機能ドメインの解析をさらに推進した。AAVベクターの応用研究としては、パーキンソン病の遺伝子治療法の開発を進めた。治療用候補遺伝子としては、ドーパミン合成に必要なTH、AADC、及びGCHの各遺伝子に注目し、それぞれをAAVベクターに挿入して遺伝子導入実験を行った。その結果、これら三者の併用が最も有効であることが示唆された。また、核内オーファン受容体Nurr1がパーキンソン病の遺伝子治療の新たな候補遺伝子になりうると考え、ヒトNurr1遺伝子の単離と構造決定を行った。ヒトNurr1の遺伝子構造は、Nurr1と神経精神疾患との関わりを調べるうえで重要な情報をもたらすものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogasawara, Y., Urabe, M., Kogure, K., Kume, A., Colosi, P., Kurtzman, G.J., and Ozawa, K.: Efficient production of adeno-associated virus vectors using split-type helper plasmids. *Jpn. J. Cancer Res.* (in press)
- 2) Urabe, M., Hasumi, Y., Kume, A., Surosky, R.T., Kurtzman, J., Tobita, K., and Ozawa, K.: Charged-to-alanine scanning mutagenesis of N-terminal half of adeno-associated virus type 2 Rep78 protein. *J. Virol.* (in press)
- 3) Ozawa, K., Fan, D., Ogawa, M., Urabe, M., Kume, A., Monahan, J., and Nakano, I.: Strategies for gene therapy of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors. *Biogenic Amines* (in press)
- 4) Fan, D., Ogawa, M., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Ogasawara, Y., Urabe, M., Nishizawa, M., Nakano, I., Yoshida, M., Nagatsu, I., Ichinose, H.,

Nagatsu, T., Kurtzman, G.J., and Ozawa, K.: Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase genes using two separate adeno-associated virus vectors. *Hum. Gene Ther.* 9: 2527-2535, 1998.

5) Fan, D., Ogawa, M., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Ogasawara, Y., Urabe, M., Kume, A., Nishizawa, M., Nakano, I., Yoshida, M., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kurtzman, G.J., and Ozawa, K.: Gene therapy of a rodent model of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors. In, *Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases* (ed. by Fisher, A., Hanin, I. and Yoshida, M.), Plenum Press, New York, p.647-652, 1998.

6) Kodaira, H., Kume, A., Ogasawara, Y., Urabe, M., Kitano, K., Kakizuka, A., and Ozawa, K.: Fas and mutant estrogen receptor chimeric gene: a novel suicide vector for tamoxifen-inducible apoptosis. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 741-747, 1998.

7) Kokubun, M., Kume, A., Urabe, M., Mano, H., Okubo, M., Kasukawa, R., Kakizuka, A., and Ozawa, K.: Apoptosis-mediated regulation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor production by genetically engineered fibroblasts. *Gene Ther.* 5: 923-929, 1998.

9) Fan, D., Ogawa, M., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Urabe, M., Kume, A., Nishizawa, M., Matsushita, N., Kiuchi, K., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kurtzman, G.J., Nakano, I., and Ozawa, K.: Prevention of dopaminergic neuron death by adeno-associated virus vector-mediated GDNF gene transfer in rat mesencephalic cells in vitro. *Neurosci. Lett.* 248: 61-64, 1998.

10) Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Ueno, S., Ogasawara, Y., Urabe, M., Kume, A., Takizawa, T., Saito, T., Colosi, P., Kurtzman, G., Shimada, K., and Ozawa, K.: Efficient gene transfer into cardiac myocytes using adeno-associated virus (AAV) vectors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30: 1341-1348, 1998.

11) Ogasawara, Y., Urabe, M., and Ozawa, K.: The use of heterologous promoters for adeno-associated virus (AAV) protein expression in AAV vector production. *Microbiol. Immunol.* 42:

177-185, 1998.

2. 学会発表

1) Ogasawara, Y., Kume, A., Kodaira, H., Urabe, M., Kakizuka, A., and Ozawa, K.: Ex vivo expansion of hematopoietic stem/progenitor cells using dominant negative retinoic acid receptor genes. Abstracts for 4th Annual Meeting of JSGT, p152, 1998.

2) Fan, D.S., Ogawa, M., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Muramatsu, S., Kawakami, T., Shizuma, N., Shen, Y., Ogasawara, Y., Urabe, M., Kume, A., Nishizuka, M., Matsushita, N., Kiuchi, K., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kurtzman, G.J., Nakano, I., and Ozawa, K.: AAV vector-mediated gene therapy for parkinson's disease: protection of dopaminergic neurons and dopamine supplementation. Abstracts for 4th Annual Meeting of JSGT, p134, 1998.

3) Kanazawa, T., Urabe, M., Kume, A., Nishino, H., Kurtzman, G.J., Kitamura, K., and Ozawa, K.: Enhancement AAV vector-mediated transgene expression by γ -ray irradiation for cancer gene therapy. Abstracts for 4th Annual Meeting of JSGT, p148, 1998.

4) Kogure, K., Urabe, M., Kume, A., Surosky, R.T., Kurtzman, G.K., and Ozawa, K.: Targeted integration of a foreign gene to AAVS1 locus on chromosome 19 using AAV-derived components: application to gene transfer into hematopoietic cells. Abstracts for 4th Annual Meeting of JSGT, p47, 1998.

5) Urabe, M., Hasumi, Y., Kogure, K., Kume, A., Surosky, R.T., Kurtzman, G.J., and Ozawa, K.: Critical residues of adeno-associated virus Rep78 Protein for targeted integration of transgenes: mutational analysis by charged-to-alanine scanning. Abstracts for 4th Annual Meeting of JSGT, p168, 1998.

6) Maeda, Y., Ikeda, U., Oya, K., Shimpo, M., Ueno, S., Urabe, M., Kume, A., Kurtzman, G.J., Shimada, K., and Ozawa, K.: Nitric oxide synthase gene transfer into cardiac myocytes inhibits the growth-promoting effects of α -adrenergic agonists. Abstracts for 4th Annual Meeting of JSGT, p124, 1998.

7) Kodaira, H., Kume, A., Ogasawara, Y., Urabe, M., Kakizuka, A., Kitano, K., and Ozawa,

K.: Fas and mutant estrogen receptor chimeric gene: a novel suicide vector for tamoxifen-inducible apoptosis. Abstracts for 4rd Annual Meeting of JSGT, p139, 1998.

8) Urabe, M., Hasumi, Y., Kogure, K., Kume, A., Surosky, R.T., Kurtzman, G.J., and Ozawa, K.: Mutational analysis of adeno-associated virus type 2 Rep78 protein by charged-to-alanine scanning mutagenesis: critical residues for targeted integration activity. Abstracts for 1st Annual Meeting of ASGT, p47a, 1998.

9) Fan, D.S., Ogawa, M., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Ogasawara, Y., Urabe, M., Kume, A., Nishizuka, M., Matsushita, N., Kiuchi, K., Nagatsu, I., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kurtzman, G.J., Nakano, I., and Ozawa, K.: Gene therapy for Parkinson's disease using adeno-associated virus vectors. Abstracts for 1st Annual Meeting of ASGT, p154a, 1998.

10) Kogure, K., Urabe, M., Kume, A., Sato, Y., and Ozawa, K.: Site-specific integration of a foreign gene to AAVS1 locus on chromosome 19 in hematopoietic cells using AAV-derived components. Blood 92 (Suppl.1): 378b, 1998.

別 添 3

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

別 添 3

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

分担研究報告書

パーキンソン病モデルラットを用いた遺伝子治療実験

分担研究者 中野 今治 自治医科大学

研究要旨 ドーパミン合成に関わる三種類の酵素の遺伝子をアデノ随伴ウイルスベクターを用いて神経細胞に導入することにより、ドーパミンの生成量の増加とラットの異常運動の改善傾向が得られた。

A. 研究目的

パーキンソン病では中脳黒質緻密部から線条体に投射するドーパミンニューロンの選択的な変性脱落が認められ、線条体でのドーパミンの欠乏により動作緩慢、固縮、振戦などの運動障害が生じる。パーキンソン病に対する遺伝子治療としては、神経細胞の保護作用のある神経成長因子を発現させることによりドーパミンニューロンの脱落を防ぐアプローチと、線条体内の細胞で直接ドーパミン合成を行う補充療法的アプローチが考えられる。前者について私たちは昨年度、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いてglial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF)遺伝子をラットの初代培養中脳細胞に導入するとドーパミンニューロンの突起形成が増加し、生存率も高まることを報告した。後者のドーパミン欠乏を補う方法としては、いくつかの研究グループによりドーパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH: tyrosine hydroxylase)の遺伝子をさまざまな方法で線条体の神経細胞に導入する試みが行われている。私たちは神経細胞への遺伝子導入ベクターとして優れているAAVベクターを使用した実験を行ってきた。昨年度までにTH遺伝子を組み込んだAAVベクターに加え、L-ドーパミンへ変換する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)の

遺伝子を組み込んだAAVベクターを併用するとTHのみを発現させたときに比べて、ヒト293細胞におけるドーパミン生成量が増加すること、およびパーキンソン病のモデル動物である6-OHドーパミンによるドーパミンニューロン破壊ラットのアポモルフィン誘発回旋運動が減少することを報告した。本年度はこのアプローチをさらに発展させ、THとAADC遺伝子に加えGTPシクロヒドロラーゼ I (GCH: GTP cyclohydrolase I) 遺伝子を導入する実験を行った。GCHはTHの補酵素であるテトラヒドロピオプテリン (BH₄) 合成系における律速酵素であり、GCHの遺伝子導入によりドーパミンの合成量のさらなる増加が期待できる。

B. 研究方法

(1) AAVベクターの作製:

霊長類のAAVのうち基礎研究の進んでいる2型AAV (AAV-2)を基にしたAAVベクターを作製した。ウイルスのゲノムのうち複製に重要な両端のITR (inverted terminal repeat) 部分を残し、非構造蛋白質であるRepと構造蛋白質であるVPをコードする領域 (rep, vp) を切り出し、その代わりにプロモーターとGCH遺伝子を組み込んだベクタープラスミドを作製した。このプラスミドと、rep, vpを組み込んだヘルパープラスミド、AAVの複製・増殖に必要なアデ

ノウイルスのヘルパー領域 (E1A, E1B, E2, E4ORF6, VAIRNA) を組み込んだプラスミドの三者を293細胞にトランスフェクションし、GCH遺伝子を発現する組換えAAVベクター (AAV-GCH) を作製した。同様な方法でTH、AADC、LacZ遺伝子をそれぞれ含むAAVベクター (AAV-TH、AAV-AADC、AAV-LacZ) を作製した。これらのAAVベクターは塩化セシウムの超遠心法により精製し、ドットプロット法により力価を測定した。

(2) 293細胞へのGCH遺伝子導入：

3.5cm²の培養皿に293細胞を 5×10^5 の密度でまき、24時間後にAAV-TH+AAV-AADC+AAV-LacZまたは AAV-TH+AAV-AADC+AAV-GCH (各 5×10^5 vector particles/cell) を添加した。AAV-GCHについては 0.5×10^5 、 2.5×10^5 vector particles/cellの低用量についても比較検討した。24時間後にcell extractを回収し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてL-ドーパ及びドーパミンを測定した。また、ウエスタンブロットによりTH、AADC、GCHの発現を確認した。

(3) ラット線条体へのGCH遺伝子導入：

6-OHドーパミンにより黒質線条体路を破壊したラットの線条体に、AAV-LacZ単独、AAV-TH+AAV-AADC+AAV-LacZ、AAV-TH+AAV-AADC+AAV-GCH (各 1×10^8 vector particles) を注入し、アポモルフィン誘発回旋運動の程度を比較検討した。

C. 研究結果

293細胞にAAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCHベクターを感染させると、ウエスタンブロットでそれぞれTH、AADC、GCH蛋白の発現が確認された。AAV-TH、AAV-AADC、AAV-GCHの三者同時の遺伝子導入を行ったものと、AAV-THとAAV-AADCの二者のみのものを比較すると、三者の方がドーパミンの生成量が多かった。また、ドーパミンの生成量はAAV-GCHベクターの濃度が高いほど多く用量依存的に増加した。ラットの6-OHドーパミンによるパーキンソン病モデルを用いた実験ではAAV-

TH、AAV-AADC、AAV-GCHの三者同時の遺伝子導入を行った群の方が、AAV-THとAAV-AADCの二者のみの群に比べて、アポモルフィン誘発回旋運動の減少の程度が著しい傾向がみられた。

D. 考察

パーキンソン病ではドーパミンの補充療法が運動症状の改善に有効であり、L-ドーパの内服治療が確立している。しかし、内服療法では血中濃度の変動に伴う症状の日内変動があり、また急激な服薬中止により悪性症候群が生じるなどの問題点がある。そこで、私たちはドーパミン生合成酵素遺伝子を組み込んだベクターを線条体に注入し、直接線条体内でドーパミンを補充する遺伝子治療の実験を行ってきた。遺伝子導入の方法としては、AAVベクターを選択した。AAVは野生型のウイルスの病原性がなく安全であることや非分裂細胞である神経細胞にも容易に感染することなど神経疾患に対する遺伝子治療を行う際の遺伝子導入ベクターとして優れた特徴を持っている。これまでに、AAV-THとAAV-AADCを併用すると、一つの神経細胞にこれらの二種類のベクターウイルスが感染しTHとAADCの遺伝子を同時に導入可能なこと、それによりTH単独の場合に比べ、ドーパミンの合成量が増加することを明らかにした。本年度はGCH遺伝子も導入することにより、ドーパミン生成量のさらなる増加とモデル動物の異常運動の改善傾向を認めた。パーキンソン病ではドーパミンニューロンの変性により線条体内のGCHの活性も低下していると考えられ、より効率よくドーパミンを生成するためにGCHの補充が有効であることが今回の実験で確認できた。本研究を進めている間に、米国のグループから同様にAAVベクターを用いてTH遺伝子とGCH遺伝子の二者の導入 (彼らの実験ではAADCは導入されていない) を行いドーパミンの合成量の増加を認めた報告がなされ、パーキンソン病の遺伝子治療におけるAAVベクターの有用性とGCH遺伝子導入の有効性が示されている。現在私たちはさらに将来のヒトへの応用

の前段階としてサルのMPTPによるパーキンソン病モデルを使用してこれらのAAVベクターの実験に着手している。

E. 結論

ドーパミン合成に重要なTH、AADC、GCHの遺伝子をそれぞれ組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを用いて、293細胞を使ったin vitroの系でドーパミン生合成量の増加と、パーキンソン病モデルラットを使用したin vivoの実験で異常運動の改善を認め、三種類の遺伝子導入の有効性を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

① Dong-sheng Fan, Matsuo Ogawa, Kunihiko Ikeguchi, Ken-ichi Fujimoto, Masashi Urabe, Akihiro Kume, Masatoyo Nishizawa, Natsuki Matsushita, Kazutoshi Kiuchi, Hiroshi Ichinose, Toshiharu Nagatsu, Gary J. Kurtzman, Imaharu Nakano, Keiya Ozawa: Prevention of dopaminergic neuron death by adeno-associated virus vector-mediated GDNF gene transfer in rat mesencephalic cells in vitro. *Neuroscience Letters* 248: 61-64, 1998.

② Makio Mogi, Akifumi Togari, Matsuo Ogawa, Kunihiko Ikeguchi, Nami Shizuma, Dong-shen Fan, Imaharu Nakano, Toshiharu Nagatsu: Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1 β and nerve growth factor in the striatum. *Neuroscience Letters* 250: 25-28, 1998.

③ Dong-Sheng Fan, Matsuo Ogawa, Ken-ichi Fujimoto, Kunihiko Ikeguchi, Yoji Ogasawara, Masashi Urabe, Masatoyo Nishizawa, Imaharu Nakano, Mitsuo Yoshida, Ikuko Nagatsu, Hiroshi Ichinose, Toshiharu Nagatsu, Gary J. Kurtzman, and Keiya Ozawa: Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid Decarboxylase genes using two separate adeno-associated virus vectors. *Human gene therapy* 9:

2527-2535. 1998.

④ Dong-Sheng Fan, Matsuo Ogawa, Ken-ichi Fujimoto, Kunihiko Ikeguchi, Yoji Ogasawara, Masashi Urabe, Akihiro Kume, Masatoyo Nishizawa, Imaharu Nakano, Mitsuo Yoshida, Hiroshi Ichinose, Toshiharu Nagatsu, Gary J. Kurtzman, and Keiya Ozawa: Gene therapy of a rodent model of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors. In "Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases" *Advances in behavioral biology* Vol. 49. ed by A Fisher, I Hanin and M Yoshida, New York, Plenum Press, 1998, pp.647-652.

2. 学会発表

① Dong-sheng Fan, Matsuo Ogawa, Kunihiko Ikeguchi, Ken-ichi Fujimoto, Yoji Ogasawara, Masashi Urabe, Akihiro Kume, Masatoyo Nishizawa, Natsuki Matsushita, Kazutoshi Kiuchi, Ikuko Nagatsu, Hiroshi Ichinose, Toshiharu Nagatsu, Gary J. Kurtzman, Imaharu Nakano, Keiya Ozawa: Gene therapy for Parkinson's disease using adeno-associated virus vectors. The American Society of Gene Therapy 1st Annual Meeting, Seattle, Washington, May 28-31, 1998.

② 村松慎一、中野今治、半田敦史、Young N.S. and Brown K.E.: 3型アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子導入ベクターの開発. 第39回日本神経学会総会、京都、1998年5月21日.

分担研究報告書

Nurr1 遺伝子の解析

分担 研究者 永津 俊治 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所

研究要旨 核内オーファン受容体 Nurr1 は主に中枢神経系、特にドーパミンニューロンに強く発現している。最近 Nurr1 が中脳ドーパミンニューロンの発生分化に必須であることが示された。我々は、Nurr1 がパーキンソン病の遺伝子治療の新たな候補遺伝子になりうるかと考え、また、パーキンソン病や他の神経疾患の発症に Nurr1 が関与しているかどうかを調べる基礎として、ヒト Nurr1 遺伝子を単離して構造を決定した。我々の解析の結果、ヒト Nurr1 遺伝子は単一遺伝子として存在し、約 8 kb にわたる 8 個のエキソンから構成されていることが明らかになった。我々は Nurr1 遺伝子全長を含む約 10 kb の遺伝子領域の全塩基配列を決定した。Nurr1 遺伝子の 5' 上流プロモーター領域には NF- κ B, CREB, Sp1 などの結合のためのコンセンサス配列が存在していた。さらに、ヒト Nurr1 cDNA をヒト胎児脳の cDNA ライブラリーからクローニングして、Nurr1 に選択的スプライシングから生じる多型があることを見出した。

A. 研究目的

パーキンソン病は、脳の黒質線条体系ドーパミンニューロンの選択的変性によるドーパミンの欠乏により発症する。パーキンソン病の遺伝子治療のための方法として、脳内でドーパミン量を増やすためにドーパミン合成酵素遺伝子を脳内に導入するか、残存ドーパミンニューロンの再生を促したり、機能を活性化したりする方法が考えられる。これまで我々は、カテコールアミン合成関連酵素のチロシン水酸化酵素・ドーパ脱炭酸酵素・GTPシクロヒドロラーゼ I・ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素の cDNA およびゲノム DNA の単離を行ってきた。こ

れらの遺伝子は、脳内のドーパミン量を増やす効果によりパーキンソン病の遺伝子治療のために有用であることが示されている。今回我々は、パーキンソン病患者の残存ドーパミンニューロンの活性を高める遺伝子として Nurr1 に注目した。

Nurr1 は、オーファン核内受容体の一つで RNR-1, HZF-3, NOT とも呼ばれている。Nurr1 は NGFI-B (Nurr7 とも呼ばれる) や NOR1 と相同性が高く、一群の遺伝子ファミリーを形成している。Nurr1 と NGFI-B は、モノマーでも DNA と結合するが、レチノイド X 受容体 (RXR) とヘテロダイマーを作って転写を調節することもある。これらの 3 つのタンパク

質の DNA 結合ドメインのアミノ酸は、90%以上保存されている。

Nurr1 は主に脳内のドーパミンニューロンに発現している。Nurr1 の胎児期での発現は、ドーパミン生合成律速段階の酵素であるチロシン水酸化酵素の発現の直前に起こる。Nurr1 の欠損マウスにおいて、Nurr1 が中脳のドーパミンニューロンの前駆細胞がドーパミンニューロンの形質を示す最終段階の分化に必須であることが示された。Nurr1 は成熟したドーパミンニューロンでも発現し続けており、ドーパミンニューロンの分化ばかりでなく成熟したドーパミンニューロンの機能維持においても重要な役割を演じていることが示唆される。また、パーキンソン病などの疾患において Nurr1 が病気の発症に関与していることも考えられる。

我々は、Nurr1 とパーキンソン病などの神経疾患との関連を調べる基礎として、また、本遺伝子のパーキンソン病患者の遺伝子治療に応用する基礎として、ヒト Nurr1 のゲノム構造を明らかにしヒト Nurr1cDNA をヒト胎児脳のライブラリーより単離した。

B. 研究方法

ライブラリーをスクリーニングするためのプローブは、報告されているマウス Nurr1 の cDNA 配列を基に設計した RT-PCR 法によりマウス Nurr1cDNA を増幅することにより行った。用いたプライマーの塩基配列は、5'-GCAATGGGGTGG-

TCTTGCACAG-3' と 5'-AGGTCTTAGAA-AGGTAAGGTGTCC-3' であった。増幅した領域はマウス Nurr1 の C-末側のリガンド結合ドメインの 1730 bp から 2138 bp までの 409 bp からなる領域であった。増幅された DNA 断片は、pT7Blue-T ベクターにサブクローンされ、塩基配列が報告されているものと同じであることを確かめた。その cDNA 断片がメガプライム DNA 標識システムにより [α - 32 P]dCTP で標識されプローブとして用いられた。

λ FixII ファージベクターに構築されたヒト線維芽細胞由来ゲノムライブラリーと λ ZAP II ベクターに構築されたヒト胎児脳由来 cDNA ライブラリーが、スクリーニングに用いられた。クローン化されたファージからの DNA の単離は常法に従って行われ、DNA は pBluescriptKS (+) ベクターにサブクローンされた後、さらに解析が行われた。クローンの塩基配列は、ダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングキットを用いて蛍光 DNA シーケンサーにより、遺伝子特異的プライマーを用いて行われた。

DNA プロットハイブリダイゼーション解析は、以下のようにして行われた。ヒトゲノム DNA (10 μ g) は、HindIII, BamHI, EcoRI で切断された後、0.8%アガロースゲルにより長さによって分離され、ナイロン膜上に転写された。このナイロン膜は、 32 P で標識されたヒト Nurr1 遺伝子でハイブリダイズされた。ハイブリダイゼーションは、6 x SSC (1 x SSC=0.15 M

NaCl と 0.015 M クエン酸ナトリウム)、5 x デンハルト溶液、0.5% SDS、および 0.1 mg/ml のサケ精子由来 DNA を含む溶液中で行われた。65°C で一晩ハイブリダイゼーション後、膜は 0.05% SDS を含む 2 x SSC 溶液で室温にて 2 回洗われた後、同溶液で 42°C にて 15 分 2 回洗われた。

C. 研究結果および考察

マウス *Nurr1* cDNA をプローブとして、我々は λ FixII ベクターに構築されたヒトゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングした。3 つの独立した陽性クローンが単離され、そのうちの 2 つのクローン *hgNurr1-3* と *hgNurr1-2* が同一クローンであること、また、もう一つのクローン *hgNurr1-1* も他の 2 つとオーバーラップしていることが判明した。*Nurr1* 遺伝子を含む領域をサブクローンし、全遺伝子領域をふくむ約 10 kb の塩基配列を決定した。その結果、*Nurr1* 遺伝子は 8 個のエキソンからなり 8.3 kb の長さをもつことが明らかとなった。すべてのエキソンイントロンの境界は GT-AG 則に従っていた。

ヒト *Nurr1* 遺伝子が単一遺伝子であるか否かを調べるために、ヒトゲノム DNA のプロットハイブリダイゼーション解析を、エキソン 3 特異プローブとエキソン 8 の非翻訳領域のプローブとで行った。それぞれのプローブにおいて、遺伝子クローンの解析から予測される長さのシグナルが検出された。この結果は、ヒト

Nurr1 遺伝子がヒトゲノム上に単一遺伝子として存在することを示した。

ヒト *Nurr1* 遺伝子の 5' 上流プロモータ領域の塩基配列を約 1,000 bp 決定し、報告されているマウスの配列と比較した。第一エキシソンの近傍の配列は、ヒトとマウスの間で非常に相同性が高かった。転写開始点の約 20 bp 上流に AT リッチな領域があった。また、CREB の結合のためのコンセンサス配列は、ヒトとマウスで完全に保存されていた。SP1 や NF- κ B の結合のためのコンセンサス配列がヒトとマウスの遺伝子上に存在していた。

これまでに Mages らにより活性化した末梢血 T 細胞由来の cDNA ライブラリーからのヒト *Nurr1* cDNA の単離が報告されているが、ヒト脳に存在する *Nurr1* mRNA が免疫系に存在する mRNA と同じであるかを調べるために、我々はヒト胎児脳由来 cDNA ライブラリーから *Nurr1* cDNA のクローニングを行った。

マウス cDNA をプローブとしてスクリーニングした結果、9 つの陽性クローンを単離した。一つのクローン (*hcNurr1-4*) はイントロンの配列を含み、*hcNurr1-6* は別の遺伝子と *Nurr1* とのハイブリッドクローンであった。このクローンは、元々存在したものではなく、おそらく cDNA ライブラリー作成時に人工的に作られたものであると考えられた。その他の 7 つのクローンについて全塩基配列を決定した。

7 つの cDNA の塩基配列の解析から、

我々は3つのクローンが他のクローンと異なる2種類のスプライシングパターンを示していることを見出した。それらはhcNurr1-2, hcNurr1-3 および hcNurr1-8 の3つで、hcNurr1-2 と-8 は、cDNA の開始点と終結点と同じであり、同一のクローンであると思われた。hcNurr1-2 も hcNurr1-3 もエクソン6 から7へのスプライシング部位が他のクローンと異なっていた。hcNurr1-2 はエクソン7の内部の配列にスプライスしており、結果としてフレームシフトからスプライシング部位の直後に終結コドンを生むことになった。このバリエーションタンパク質は455アミノ酸をコードすることになり、Nurr1 野生型の598アミノ酸よりC末端側の143アミノ酸を欠いている。また、もう一つのスプライシングバリエーションである hcNurr1-3 は、エクソン7内部の別の場所でスプライシングを起こしており、この場合には野生型と比べて18アミノ酸が欠落するがフレームシフトは起こさない。

hc Nurr1-2 のタイプのスプライシングバリエーションでは、C末端側のリガンド結合部位のほとんどを欠いている。このタンパク質では、リガンド非依存的に標的遺伝子の転写を活性化する可能性がある。

ヒト Nurr1 の遺伝子の染色体位置は、2q22-23 にマップされている。これまでにパーキンソン病関連疾患などでこの領域との連鎖が報告されているものはない。しかし、Nurr1 の中脳ドーパミンニ

ューロンの発生・維持に対する重要な働きを考えると、Nurr1 はドーパミンニューロンと深い関わりを持つ疾患の病因を考えるうえで重要であろう。

E. 結論

我々は、初めてヒト Nurr1 遺伝子の構造と塩基配列を明らかにした。また、ヒト胎児脳の cDNA ライブラリーのスクリーニングから、ヒト Nurr1 に選択的スプライシングから生じる2つのバリエーションが存在することを見出した。ヒト Nurr1 の遺伝子構造は、Nurr1 と神経精神疾患との関わりを調べるうえで重要な情報を我々に提供してくれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ichinose, H., Ohye, T., Suzuki, T., Sumi-Ichinose, C., Nomura, T., Hagino, Y. and Nagatsu, T. (1999) Molecular cloning of the human Nurr1 gene: characterization of the human gene and cDNAs. *Gene*, (In press).

資 料

19980413

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

研究成果の刊行に関する一覧表

Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase genes using two separate adeno-associated virus vectors.

Fan DS, Ogawa M, Fujimoto KI, Ikeguchi K, Ogasawara Y, Urabe M, Nishizawa M, Nakano I, Yoshida M, Nagatsu I, Ichinose H, Nagatsu T, Kurtzman GJ, Ozawa K.

Hum Gene Ther. 1998 Nov 20;9(17):2527-35.

Prevention of dopaminergic neuron death by adeno-associated virus vector-mediated GDNF gene transfer in rat mesencephalic cells in vitro.

Fan D, Ogawa M, Ikeguchi K, Fujimoto K, Urabe M, Kume A, Nishizawa M, Matsushita N, Kiuchi K, Ichinose H, Nagatsu T, Kurtzman GJ, Nakano I, Ozawa K.

Neurosci Lett. 1998 May 22;248(1):61-4

The use of heterologous promoters for adeno-associated virus (AAV) protein expression in AAV vector production.

Ogasawara Y, Urabe M, Ozawa K.

ol Immunol. 1998;42(3):177-85

Adeno-associated virus-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer into cardiac myocytes.

Maeda Y, Ikeda U, Shimpo M, Shibuya M, Monahan J, Urabe M, Ozawa K, Shimada K.

J Cardiovasc Pharmacol. 2000 Oct;36(4):438-43.