

心不全における遺伝子発現プロファイル作成 およびテラーメイド医療の確立

分担研究者 堀 正二 大阪大学医学系研究科 教授

研究要旨

心血管疾患は日本人の死因第 2 位を占め、その最終終末像である心不全の予後は極めて悪く、その克服は医学的にも社会的にも急務となっている。心不全の予後を著しく改善することは内科的には困難で、心臓移植に頼るほかないのが現状である。心臓移植に内科的立場より携わる我々は、移植待機患者が移植をうけることなく死亡していくことを経験するにつれ、新しい心不全治療の開発の必要性を痛感する。さらに高齢者増加による心不全患者増加が必至な将来、医療費抑制の観点からも、心不全の発症予防および進行予防の開発が最重要課題であることは疑う余地も無い。近年遺伝子解析技術の急速な進歩により、病態解明へのアプローチにおける大転換期にある。そこで、新しい遺伝子解析技術を駆使し、テラーメイド医療に向けての新しい心不全診断・治療の開発を目指す事を本研究の目的とし、3 段階に分けた研究計画を立てている。【第一段階】心不全関連遺伝子プロファイルの作成（DNA チップを用いた検討）【第二段階】心不全関連遺伝子の機能解明（①遺伝子改変動物、②蛋白機能解明、③遺伝子多型を用いた検討）【第三段階】心不全診断・治療の開発およびテラーメイド医療の確立

医療費抑制に重要なテラーメイド医療の確立に心不全関連遺伝子プロファイル作成は極めて重要である。特に心不全の病態は不均一性が強いことから、すべての遺伝子が解析可能な遺伝子プロファイルの作成は必要不可欠である。さらに本研究の成果によるわが国発の診断薬、治療薬開発が進むと、医療費抑制においてその重要性が増すことは容易に想像される。テラーメイド医療の実現に向けて、心不全の遺伝子発現パターンと重症度や予後の臨床データとの組み合わせから、心不全治療の薬剤を詳細に評価可能となる。本研究がなされれば、心不全の診断および治療に関する重要な知見が得られ、わが国の循環器病克服に多大な貢献をするものと考えられる。

A. 研究目的

日本人死因の第 2 位を占める心血管疾患の最終終末像の大半が心不全を呈する。しかし、現在の心不全治療において内科的治療では限界があり、心臓移植に頼るほかないのが現状である。心臓移植を内科的立場より携わる一員として、移植を受けられずに死亡する胃移植待機患者を経験する中で、新しい心不全治療開発の必要性を痛感する。さらに高齢者増加による心不全患者の増加は必至であり、厚生行政の最重要課題である医療費抑制の観点からもその適切な治療法の開発は急務である。しかし心不全は原因疾患が多岐にわたり病態が不均一であるという理由から心不全に関する研究は十分進んでいない。近年の遺伝子解析技術の急速な進歩により、病態解明へのアプローチに対する大転換期にある。そこで申請者は、遺伝子解析技術を駆使し新しい心不全治療の展開を目指す。

行い、各群 20 匹を目標に作成する。これらの動物モデルに共通に変化している遺伝子は、ヒトにおいても可能性が十分考えられるために心不全関連遺伝子として下記の研究へと展開する。

3. 心不全特異的遺伝子の機能解明

心不全特異的遺伝子の機能解析は、蛋白からのアプローチと遺伝子改変からのアプローチの 2 つで行う。

（倫理面への配慮）

厚生省の指針に基づいて、十分な注意を払い本研究を行う。特に得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。また、遺伝子発現レベルを検討する研究であることから、患者に対しての十分なインフォームドコンセントを得るように努力する。

B. 研究方法

1. ヒト不全心筋の遺伝子発現プロファイルの集積

心不全患者において、バチスタ手術、ドール手術、もしくは左心補助装置挿入時に摘出する心筋の一部（1cm 角）から mRNA を抽出する。正常心筋の RNA は現時点において入手困難なため、海外において市販されている mRNA を使用する。心不全より得られた mRNA を用いて affymetrix（現在予定）の DNA チップを用いてヒト不全心筋における遺伝子発現レベルの解析を施行する。

2. 心不全動物モデルの遺伝子発現プロファイルの集積

圧負荷モデルなどの心不全モデルにおける遺伝子発現プロファイルの作成を行う。方法は研究計画 1 と同様にして

C. 研究結果

バチスタ手術、ドール手術を施行された患者より、インフォームドコンセントにより同意を得られた症例の心筋サンプルが葉山ハートセンターより、RNA Later にて送付された。我々は、その RNA later に浸かった心筋サンプルから RNazol を用いて mRNA の抽出を施行した。本 mRNA を匿名化して、三共に送付し、Affymetrix 社製の DNA チップを用いて、未知遺伝子を含めた約 6 万遺伝子の解析を行った。得られた DNA チップ解析データをさらに臨床データとあわせて解析を行い、変化が認められた遺伝子は、1 万遺伝子中約 500 程度の遺伝子に変動が認められた。現在、これらの遺伝子に関して、臨床データをあわせてより詳細な解析を行っている。さらに、心不全動物モ

デルにおいても解析を進行している。現在、マウスの横行大動脈を縮窄することによる心不全モデルの確立に成功した。現在、1週間、2週間、4週間の大動脈縮窄によりBNPやHB-GEFの上昇が認められた。

D. 考察

我々の施設は、心臓移植認定施設であり、内科的立場より、心臓移植待機患者を非常に多く受け持つ。しかしながら、心臓移植の施行例数が極めて少ないことから、移植を受けることが出来ずに亡くなる症例を数多く経験し、現実の厳しさを認識せざるおえない。我々は、移植までのブリッジとしての心不全治療の開発が如何に重要であることを認識している。そこで、今回、不全心筋における新しい遺伝子ターゲットをみつけるべく本研究に参画した。現在、不全心筋における遺伝子発現レベルの解析を少数例ながら行い、非常に有望な研究であることがわかった。現在、症例を20症例に達するべく努力をしている。今回我々は、不全心筋の遺伝子発現レベルの解析を開始したわけであるが、コントロールとなる正常心筋のサンプル収集が困難であることが判明した。今回コントロールとして解析を開始したサンプルは、日本においてコントロールサンプルを得ることが難しいことから、アメリカにて市販されているサンプルを用いた。しかしながら、本サンプルを解析した結果、5症例中3例に心不全にて上昇するANPおよびBNPの上昇がみられた。本検討より、コントロールのサンプルの重要性が明らかとなった。また、心不全症例の不全心筋サンプルを12症例のDNAチップの解析を終了したが、6万遺伝子の解析を並列に解析することは非常に労力を伴い、解析方法の確立からスタートする必要が出てきた。また、臨床データとのすり合わせも重要であり、データマイニング法を駆使した解析方法を進めることが必要である。現在、いくつかの興味深い遺伝子が得られており、詳細な解析をすすめてつある。またマウス大動脈縮窄モデルでは心不全で上昇する遺伝子群の変化を観察できており、心不全も出るとしての妥当性を確認できた。

E. 結論

本研究により、不全心筋における遺伝子発現プロファイルの作成に着手した。パチスタ手術およびドール手術を施行した12症例の患者より得られた心筋からmRNAを抽出した。抽出したmRNAを用いてDNAチップ解析を行い、現在解析が進行中である。

F. 健康危機情報・・・・・・・・なし

G. 研究発表・・・・・・・・なし

I. 論文発表・・・・・・・・なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得・・・・・・・・なし
2. 実用新案登録・・・・・・・・なし
3. その他・・・・・・・・なし

心不全における遺伝子発現プロファイル作成 およびテーラーメイド医療の確立

分担研究者 村松正明 ヒュービットジェノミクス株式会社 研究所長

研究要旨

心血管疾患は日本人の死因第2位を占め、その最終終末像である心不全の予後は極めて悪く、その克服は医学的にも社会的にも急務となっている。高齢者増加による心不全患者増加が必至な将来、医療費抑制の観点からも、心不全の発症予防および進行予防の開発が最重要課題であることは疑う余地も無い。近年遺伝子解析技術の急速な進歩により、病態解明へのアプローチにおける大転換期にある。そこで、新しい遺伝子解析技術を駆使し、テーラーメイド医療に向けての新しい心不全診断・治療の開発を目指す事を本研究の目的とし、3段階に分けた研究計画を立てている。【第一段階】心不全関連遺伝子プロファイルの作成（DNAチップを用いた検討）【第二段階】心不全関連遺伝子の機能解明【第三段階】心不全診断・治療の開発およびテーラーメイド医療の確立

医療費抑制に重要なテーラーメイド医療の確立に心不全関連遺伝子プロファイル作成は極めて重要である。特に心不全の病態は不均一性が強いことから、すべての遺伝子が解析可能な遺伝子プロファイルの作成は必要不可欠である。さらに本研究の成果によるわが国発の診断薬、治療薬開発が進むと、医療費抑制においてその重要性が増すことは容易に想像される。さらに心不全関連の候補遺伝子が明らかになれば、その候補遺伝子の改変動物の作成に加えて、蛋白を実際に精製することにより機能解析を行う。また、テーラーメイド医療の実現に向けて、心不全の遺伝子発現パターンと重症度や予後の臨床データとの組み合わせから、心不全治療の薬剤を詳細に評価可能となる。本研究がなされれば、心不全の診断および治療に関する重要な知見が得られ、わが国の循環器病克服に多大な貢献をするものと考えられる。

A. 研究目的

日本人死因の第2位を占める心血管疾患の最終終末像の大半が心不全を呈する。しかし、現在の心不全治療において内科的治療では限界があり、心臓移植に頼るほかないのが現状である。心臓移植を内科的立場より携わる一員として、移植を受けられずに死亡する胃移植待機患者を経験する中で、新しい心不全治療開発の必要性を痛感する。さらに高齢者増加による心不全患者の増加は必至であり、厚生行政の最重要課題である医療費抑制の観点からもその適切な治療法の開発は急務である。しかし心不全は原因疾患が多岐にわたり病態が不均一であるという理由から心不全に関する研究は十分進んでいない。近年の遺伝子解析技術の急速な進歩により、病態解明へのアプローチに対する大転換期にある。そこで申請者は、遺伝子解析技術を駆使し新しい心不全治療の展開を目指す。

B. 研究方法

1. 心不全特異的遺伝子の遺伝子多型の検討

診断において有用になりうる遺伝子多型の検討を行う。心不全特異的遺伝子の報告されている遺伝子多型をサーチする。可能性の高い部位を中心に遺伝子多型の解析を行う。（倫理面への配慮）

厚生省の指針に基づいて、十分な注意を払い本研究を行う。特に得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。また、遺伝子発現レベルを検討する研究であることから、患者に対しての十分なインフォームドコンセントを得るように努力する。

C. 研究結果

ヒト遺伝子多型解析に関しても、倫理委員会の承認が得られたことから、インフォームドコンセントの取得のもと回収された約100例の心不全症例血液サンプルから得られたDNAを用いて解析を開始している。

D. 考察

現在、インフォームドコンセントを得て回収された血液を遺伝子多型解析を開始しており、アデノシン関連遺伝子を中心に解析中である。今後、DNAチップにより心不全に関連する遺伝子が明らかになった遺伝子も解析を順次進めている。

E. 結論

拡張型心筋症の血液を用いて順次解析中である。

F. 健康危機情報・・・・・・・・なし

G. 研究発表・・・・・・・・なし

I. 論文発表・・・・・・・・なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得・・・・・・・・なし

2. 実用新案登録・・・・・・・・なし

3. その他・・・・・・・・なし

心不全における遺伝子発現プロファイル作成 およびテーラーメイド医療の確立

分担研究者 寄兼良輔 三共研究所 主任研究員

研究要旨

心血管疾患は日本人の死因第2位を占め、その最終終末像である心不全の予後は極めて悪く、その克服は医学的にも社会的にも急務となっている。高齢者増加による心不全患者増加が必至な将来、医療費抑制の観点からも、心不全の発症予防および進行予防の開発が最重要課題であることは疑う余地も無い。近年遺伝子解析技術の急速な進歩により、病態解明へのアプローチにおける大転換期にある。そこで、新しい遺伝子解析技術を駆使し、テーラーメイド医療に向けての新しい心不全診断・治療の開発を目指す事を本研究の目的とし、3段階に分けた研究計画を立てている。【第一段階】心不全関連遺伝子プロファイルの作成（DNAチップを用いた検討）【第二段階】心不全関連遺伝子の機能解明【第三段階】心不全診断・治療の開発およびテーラーメイド医療の確立

医療費抑制に重要なテーラーメイド医療の確立に心不全関連遺伝子プロファイル作成は極めて重要である。特に心不全の病態は不均一性が強いことから、すべての遺伝子が解析可能な遺伝子プロファイルの作成は必要不可欠である。さらに本研究の成果によるわが国発の診断薬、治療薬開発が進むと、医療費抑制においてその重要性が増すことは容易に想像される。さらに心不全関連の候補遺伝子が明らかになれば、その候補遺伝子の改変動物の作成に加えて、蛋白を実際に精製することにより機能解析を行う。また、テーラーメイド医療の実現に向けて、心不全の遺伝子発現パターンと重症度や予後の臨床データとの組み合わせから、心不全治療の薬剤を詳細に評価可能となる。本研究がなされれば、心不全の診断および治療に関する重要な知見が得られ、わが国の循環器病克服に多大な貢献をするものと考えられる。

A. 研究目的

日本人死因の第2位を占める心血管疾患の最終終末像の大半が心不全を呈する。しかし、現在の心不全治療において内科的治療では限界があり、心臓移植に頼るほかないのが現状である。心臓移植を内科的立場より携わる一員として、移植を受けられずに死亡する移植待機患者を経験する中で、新しい心不全治療開発の必要性を痛感する。さらに高齢者増加による心不全患者の増加は必至であり、厚生行政の最重要課題である医療費抑制の観点からもその適切な治療法の開発は急務である。しかし心不全は原因疾患が多岐にわたり病態が不均一であるという理由から心不全に関する研究は十分進んでいない。近年の遺伝子解析技術の急速な進歩により、病態解明へのアプローチに対する大転換期にある。そこで申請者は、遺伝子解析技術を駆使し新しい心不全治療の展開を目指す。

B. 研究方法

心不全動物モデルの遺伝子発現プロファイルの集積

マウス大動脈縮窄圧負荷モデルにおける遺伝子発現プロファイルの検討を行った。マウスの横行大動脈を27ゲージ針を用いて縮窄を行い、圧負荷心不全モデルを作成した。左室心筋よりmRNAを抽出し、マウス用のAffymetrix社製のDNAチップを用いて解析を施行した。

（倫理面への配慮）

厚生省の指針に基づいて、十分な注意を払い本研究を行う。特に得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行っている。

C. 研究結果

マウス横行大動脈縮窄モデルを作成し、4週間後にsacrificeを行い、心臓を取り出した。心筋からmRNAを抽出し、Affymetrix社製のDNAチップを用いて、遺伝子

発現レベルの解析を行った。13年度は開胸のみを施行したマウス2匹をコントロール群として解析を行い、心不全群として2匹の解析を行ったが、今年度はさらに多くのマウスについて行い、ANPおよびBNPの遺伝子は、高発現を確認した。ANPおよびBNPと連動して変動する遺伝子群として、マウスの全遺伝子より約100種類の遺伝子を選出した。

D. 考察

ヒト心不全心筋における遺伝子発現プロファイルを本プロジェクトにおいて進行させている。ヒトにおいて介入試験は難しいことから、マウスにおける心不全発現プロファイルの作成を試みている。現在、圧負荷心不全モデルマウスを用いて検討を開始している。4週間の大動脈縮窄により、心不全が形成されることを、心臓超音波検査にて確認している。この不全心筋における遺伝子発現は、ヒトの遺伝子発現レベルと完全に一致しているわけではない。あくまで、ヒトの不全心筋の解析が重要であり、マウスの解析は補助的なものであることが認識された。しかしながら、介入試験はヒトにおいて不可能であることも事実であることから、今後、ノックアウトマウスを用いたDNAチップ解析などの応用を考えると、限界を認識したうえで重要なプロジェクトであると考えられる。

E. 結論

マウス圧負荷心不全モデルにおける不全心筋からmRNAを抽出し、マウス不全心筋における遺伝子発現レベルを検討した。現在、詳細は解析中であるが、ANPおよびBNPはヒトの不全心筋と同様に高値を示した。また、ANPおよびBNPと発現レベルが連動する遺伝子も約100遺伝子認めた。ヒト遺伝子プロファイルとの比較が望まれる。

F. 健康危機情報・・・・・・・・・・なし

G. 研究発表・・・・・・・・・・なし

I. 論文発表・・・・・・・・・・なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得・・・・・・・・・・なし

2. 実用新案登録・・・・・・・・・・なし

3. その他・・・・・・・・・・なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

主任研究者氏名 北風 政史

所属機関名 国立循環器病センター 職名 部長

研究項目 心不全における遺伝子発現プロファイル作成およびテーラーメイド医療の確立

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	頁	出版年
Asakura M, Kitakaze M et al	Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: Metalloproteinase inhibitors as a new therapy.	Nature Medicine	8 (1)	35-40	2002
Asakura M, Kitakaze M et al	Adenosine-induced cardiac gene expression Of ischemic murine hearts revealed by cDNA Array hybridization.	Circulation Journal	66(1)	93-96	2002
Takashma, S. Kitakaze M et al	Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis	Proceedings of the National Academy of Science	99(6)	3657-3662	2002
Minamino T, Kitakaze M et al	Cellular mechanisms for the treatment of chronic heart failure:the nitric oxide-and adenosine-dependnt pathways	ExpertOpinion Emerging Drugs	7(1)	99-110	2002
RyaoU, Kitakaze M et al	Echocardiographic assessment of LV Hypertrophy and function in aortic-bandedmice: Necropsy validation	American journal of Physiology.Heart and circulatory physiology	282	H1703-H1708	2002
Asakura M, Kitakaze M et al	Impact on Adenosine for a Novel Therapy of Chronic Heart Failure Innovated by Genome, Transcript and Protein Analyses				2003 投稿中

Asakura M, Kitakaze M et al	Canin DNA array as A Potential Tool to Combine the Physiology to Molecular Biology : An Application for Gene Expression Profile of Regional Ischemic Myocardium				2003 投稿中
Asanuma H, Kitakaze M et al	Amlodipine, a Long-acting Ca Channel Blocker, Increases Coronary Blood Flow via both Adenosine -and NO-dependent Mechanisms in Canine Ischemic Hearts -A Possibe Role of the Antioxidant Effect Of Amlodipine-				2003 投稿中

20020421

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.24-P.25の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。