

厚生労働科学研究研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

ヒト型重症心不全の作成と遺伝子・再生医療特許の実用化

(H14-トランス-013)

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15(2003)年 3月

主任研究者 豊岡 照彦

## 目 次

I.	統括研究報告書	
	ヒト型重症心不全の作成と遺伝子・再生医療の実用化 (H14-トランス-013) .....	2
	東京大学・医学部・器官病態内科 豊岡照彦	
II.	分担研究報告書	
	1. 治療用ベクターの大量生産 .....	8
	自治医科大学・遺伝子治療部 小澤敬也	
	2. 遺伝子エレメント ASE 及び AIE を用いた rAAV- $\delta$ -SG ベクターの構築.....	10
	産業技術総合研究所・年齢軸生命工学研究センター 倉地幸徳	
	3. 細胞内蛋白分解酵素による筋細胞膜蛋白傷害に関する研究 .....	12
	北海道大学大学院・医学研究科・病態医科学分野 川口秀明	
	4. プロテオーム解析による心不全の発症に関わるタンパク質の研究.....	16
	新潟大学・医学部・保健学科 仲澤幹雄	
	5. 心不全の進展に伴う筋細胞 dystrophin の変化 .....	23
	新潟大学・医学部附属病院・薬剤部 河田登美枝	
	6. 血管内膜肥厚に対する Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor type1 の関与について ....	29
	東京大学大学院・血管外科学分野 重松 宏	
	7. 大規模 SNP タイピング法の開発に関する研究 .....	33
	東京大学大学院医学系研究科・人類遺伝学分野 徳永勝士	
	8. 心筋症原因遺伝子の臨床的スクリーニングに関する研究 .....	37
	東京大学・保健センター 上原馨志夫	
	9. ヒト型重症心不全の作成と遺伝子・再生医療特許の実用化に関する研究.....	40
	東京大学・医学部・器官病態内科 豊岡照彦	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 .....	48
IV.	研究成果の刊行物・別刷 .....	50

ヒト型重症心不全の作成と遺伝子・再生医療の実用化 (H14-トランス-013)

主任研究者 豊岡照彦

東京大学医学部附属病院 器官病態内科 教授

研究要旨

特発性心筋症の一部、拡張型心筋症は循環器疾患の中でも最も難治性で心臓移植が最終治療と目されているが、心臓移植は未だ社会的にも医療面でも究極の治療からは程遠い。この問題の解決策として遺伝子と再生医療を併用した新たな治療開発戦略を平成14年から16年度までの3年計画を起案した。本稿では初年度の進捗状況を報告する。①筆者らが既に加齢させた数種の変異遺伝子の頻度を厚生省特発性心筋症研究班で調査する事を起案した。②正常配列の責任遺伝子を小型マウス動物に投与して rescue した成果を踏まえ、ヒトに近いカドで前臨床試験を始め、既に国立感染症研究所、霊長類共同利用施設に申請中である。③ serotype の異なる1~5型の rAAV を骨格筋および心筋に投与して発現効率を比較した。④臨床例では患者は心筋変性が進んだ後に治療を求める事を考慮して、*ex vivo* で遺伝子治療を加えた細胞の移植を行う計画を立てた。その予備検討として同系の正常動物から骨格筋芽細胞を単離して培養・増幅後に心筋に投与し、生着する事を確認した。⑤ヒト型拡張型心筋症モデルをカドで作成する為に、RNAi 法による遺伝子発現抑制実験を開始した。

研究代表者 豊岡 照彦

東京大学・器官病態内科学・教授

分担研究者

倉地 幸徳

産業総合技術研究所・

年齢軸生命工学研究センター・センター長

小澤 敬也

自治医大・遺伝子治療部・教授

仲澤 幹雄

新潟大学・医療工学科・教授

河田 登美枝

新潟大学病院・薬剤部・助教授

川口 秀明

北大病院・検査部・教授

徳永 勝士

東京大学・人類遺伝学・教授

重松 宏

東京大学・血管外科学・助教授

上原 誉志夫

東京大学・保健センター・助教授

分担研究者の小澤は rAAV ベクターによる治療効果を更に改善させるべく、serotype の異なる rAAV の開発作業を開始した。

生体に無害で安全な rAAV ベクターを効率

良く大量に作成する事は臨床実用化を進める上で極めて重要な課題である。現時点の作成法の主流は依然として transfection 法であるが、最近にはバクテリオファグ細胞株やバクテリオファグを用いる方法も検討されてきた。骨格筋に transfect する場合、従来の2型に比較して他の型は更に能率よく、かつ長期間バクテリオファグの発現させる事を見出した。今後 rAAV ベクターの精製に関しても改善法を開発する。

分担研究者の倉地は安定した遺伝子の発現可能な遺伝子治療用発現ベクターを構築し、臨床試験への技術基盤整備を目的として、治療に必要な遺伝子発現を長期間維持させる事を目指した。平成14年度目標のヒトδ-SG 遺伝子発現ベクター構築のため基盤技術の整備を行い、「遺伝子エレメント ASE 及び AIE を用いた rAAVδ-SG ベクターの構築」について検討して以下の成果を得た。

先にヒト血液凝固第 IX 因子及び $\delta$ -SG (抗凝固因子)の年齢軸に沿った遺伝子発現調節に遺伝子エレメント ASE と AIE が遺伝子の発現、増強している事を明らかにした。本研究では $\delta$ -SG 欠損による心不全を心臓病のモデルとして治療年齢軸で安定化した遺伝子発現が可能な至適遺伝子治療用ベクターの開発を目指す。具体的には $\delta$ -SG 遺伝子を持つ rAAV ベクター発現系を構築し、特に ASE エレメントの年齢軸に沿った遺伝子発現安定化効果を検証する。別途進行している基盤技術整備実験の支援も受けて、ヒト $\delta$ -SG 遺伝子のベクター構築を進めている。初期段階が終了次第、AAV1 及び AAV5 の生産を上記自治医大グループと共に、培養細胞とマウス胚による試験を開始する。また rAAV 以外の遺伝子導入ベクター系のテストを行う予定である。

分担研究者の川口は肢帯筋型筋ジストロフィー (LGMD) の発症機序を検討する端緒として、骨格筋内因性の calpain 3 との関係性を明らかにする為に細胞膜構成蛋白の $\alpha$ -SG に障害に注目し、「細胞内蛋白分解酵素による筋細胞膜蛋白傷害に関する研究」を行った。

本年度は calpain が骨格筋の構成蛋白に実際作用するか検討する目的で、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させ、calpain を活性化させた上で細胞膜構成蛋白、 $\alpha$ -SG に及ぼす影響について検討した。ヒト培養骨格筋細胞を組織培養し、培養液に 2 mM の  $Ca^{2+}$  存在下に次の 3 条件でインキュベートした。1) 対照実験、2)  $Ca^{2+}$  イノコペールの A23187 を用いて、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させ、3) calpain の阻害薬である leupeptin を添加した。各処置後の培養細胞を SDS で可溶化後、 $\alpha$ -SG の特異抗体を用いて Western blotting の後、発現量を測定し

た。結果、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させた培養細胞では、対照群と比較して $\alpha$ -SG が低下した。一方、leupeptin で前処置した細胞では、 $Ca^{2+}$  および A23187 の添加にも関わらず $\alpha$ -SG は減少しなかった。この結果細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇に伴って発生した $\alpha$ -SG の分解が calpain による可能性が強く示唆された。

分担研究者の仲澤は後天性の心不全について心筋梗塞や心筋炎などの心筋障害が引き金になり、心筋はリモデリングを起こして、さらに重症心不全へ進展する機構を解明するために「 $\delta$ -SG 欠損による心不全の発症に関わるタンパク質の研究」を実施した。

この解析は臓器に発現するタンパク質の網羅的な解析として注目される。心不全の新しい治療法を開発する目的で等電点電気泳動と SDS-PAGE を併用し、構成蛋白の泳動パターンと発現量を 2 次元画像解析した。今回は仲澤らが心不全の発症および治療の研究に既に使用している自己免疫性心筋炎後の心不全モデルマウスの可溶性画分では観察スポットのうち、43%に増減が認められ、一方膜画分では 40%に増減が認められた。膜画分では減少したスポット数が多く、これは可溶性画分へのタンパク質の移動を示唆している。

分担研究者、新潟大学・薬剤部の河田は DCM モデル動物の TO-2 マウスで $\delta$ -SG 遺伝子の欠損が DCM の原因である事は同定されたが、先天的な遺伝子の欠損状態でも心不全症状は初期に認められず、動物の成長に伴って症状が悪化する機構を解明する目的で「心不全の進展に伴う心筋細胞ジストロフィーの変化」を検討した。

両心臓病理検査により TO-2 では正常対照

の F1B に比べ収縮能が初期から低下し、後期に鬱血性心不全を呈した。両群の心筋組織をジストロフィン抗体および  $\delta$ -SG 抗体と細胞膜非透過性のエヴァンスブルー(EB)を用いた二重蛍光観察により蛋白発現と *in situ* の膜透過性を同時に検出した。その結果 DCM の重症化に伴い、ジストロフィンが崩壊して細胞膜から解離し、細胞質に移行して(translocate)、膜透過性が増加する事が示された。更に遺伝子治療により細胞膜に  $\delta$ -SG 遺伝子が発現した細胞と発現していない細胞を比較して  $\delta$ -SG の発現と細胞膜機能の増強作用が確認された。更に Western blotting の結果、週令に伴いジストロフィンの断片化が顕著になり、心不全の進展、ジストロフィンの崩壊と膜の脆弱化する時期が一致した。以上の結果から  $\delta$ -SG 遺伝子の欠損はジストロフィンの崩壊を介して DCM の重症化に関与する事が示された。

分担研究者、東京大学・血管外科学分野の重松は虚血性心疾患が重症化する現象に関連して、冠動脈再狭窄が心不全を増悪させる機構に注目して、「血管内膜肥厚に対する Inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) receptor type1 ( $IP_3$ - $R_1$ )の関与について」下記の研究を実施した。

虚血性心疾患や閉塞性動脈硬化症に対する血管内治療後の再狭窄は患者の予後を左右し、予防法の開発が急務である。本研究は血管内膜肥厚が再狭窄の主原因である事に着目し、 $IP_3$ - $R_1$  と内膜肥厚の関連を探る事を目的とした。 $IP_3$ - $R_1$  hetero knockout マウス及び対照マウスに新たに開発した頸動脈処理を加え、28 日後に組織学的に検討した。Neointima area / media area 比は knockout マウス群で有意に小さく、内膜肥厚が抑制された。

これは  $IP_3$ - $R_1$  の血管内膜肥厚への関与が示され、今後の治療戦略に寄与する可能性が示唆された。更に心筋細胞の肥大にも  $IP_3$ - $R_1$  が関与すると言われ、今後この研究は心肥大から心不全に移行する過程の解明と治療開発にも繋がると予想する。

分担研究者、東京大学・人類遺伝学分野の徳永はヒトゲノムスクリーニング計画の結果判明した膨大な数の遺伝子多型、診断の実現に多種の SNP(単一塩基多型)について多数検体を簡便、正確かつ低コストのタイルソグ法を確立する事を目標に「大規模 SNP タイルソグ法の開発に関する研究」を行った。

特に SNP の一部は多種疾患の発症や臨床的亜型に関わる。本研究の目的は大規模 SNP タイルソグに適した方法として SNP 特異的プライマー伸長反応と一分子蛍光検出法を組み合わせた 1 分子蛍光測定を確立した。本法により PCR 産物を測定して遺伝子型を決定した。更に whole genome amplification 処理後の試料を用いた大量 SNP タイルソグシステムの確立に成功した。本法はプローブの固相化を必要とせず、溶液中で測定可能な事に加えて、極微量の溶液でも短時間で測定し得る事は一分子蛍光検出法の大きな利点であり、今後の周辺技術開発を進める予定である。

分担研究者、東京大学・保健管理センターの上原は DCM に代表される重症心不全の遺伝的負荷要因を解析する為に「心筋症原因遺伝子の臨床的スクリーニングに関する研究」を進めた。

遺伝的素因の強い心筋症の原因遺伝子について、当研究室も含め、数種の候補遺伝子の異常を報告している。この基礎的成果を

臨床応用するには、効率的に対象者をスクリーニングして遺伝子異常を検出するとともに、前向きな予後追跡調査を行う必要がある。本研究ではこのシステムの確立を目標とした。集団健診時の心電図と超音波心エコー検査から心筋症は0.2%程度に検出されることをみだし、この中に豊岡らが示した心筋症責任遺伝子のミトコンドリア遺伝子異常を有する者が相当数含まれていた。今後スクリーニングされた心筋症疑いの対象者について原因遺伝子を効率的に同定する為に一分子蛍光観測診断法などを上記の徳永らと共同して、その臨床的所見と遺伝子異常の関連づけを進める。

研究代表者、東京大学・器官病態内科の豊岡は拡張型心筋症(DCM)に代表される重症心不全の心臓移植の代替医療の開発を目指して、「ヒト型重症心不全の作成と遺伝子・再生医療」に関する以下5種の実験を行った。

### 1) 心不全の重症化機構の解明。

$\delta$ -SG 遺伝子変異の結果、正常の $\delta$ -SG 蛋白が発現せず、細胞膜透過性を直接亢進させる事は考え難い。また先天性の遺伝子欠損に由来する疾患が何故幼若期から発症せず、心不全症状が成熟後に著明になるか説明ができない。本年の目標として、分担研究者と協力して心不全の進展過程を明らかにし、遺伝子治療と移植医療を結合させた新たな治療戦略を目指した。正常対照の F1B 系と DCM を発症する TO-2 系ハスターを用い、週齢を追って心機能を両心カテテル検査で比較した結果、全週齢で収縮能が悪化していた。更に生後 25-40 週目から鬱血状態が加わり、ヒト臨床例と共通した病態を示した。血行動態

測定後に心筋を摘出し、ジストロフィンの特異抗体と正常の細胞膜を透過しないエヴァンスブルー (EB) を用いて同一視野の二重蛍光観測法で観測した。心不全が顕在化する前はジストロフィンが細胞膜に局在したが、心機能が悪化するに従い、ジストロフィンは細胞膜から細胞質に translocate し、この細胞は EB を取り込み、細胞膜の透過性が亢進していた。更に Western blotting により幼若期には正常動物と同様の単一バンドのみ認められたが、週齢が進むに従いジストロフィンが分解し、断片化する事が示された。これは前記の心不全が増悪し、ジストロフィンが translocate する時期と一致した。この所見は非特異的な分解ではなく、蛋白分解酵素による限定分解を示唆し、先天的な心不全だけでなく後天的にイプロフェノールを過剰投与して作成した急性心不全に於いても同様のジストロフィンの translocation、断片化と EB の細胞内浸潤が認められる事から心不全一般に共通した病態である事が判明した (Xi et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2000)。

### 2) rAAV による遺伝子治療。

既に豊岡らが報告した生体に起炎性が無く、安全で長期遺伝子発現可能な rAAV による正常配列の $\delta$ -SG 遺伝子を強制発現した結果、このジストロフィンの変性と細胞膜の変性は防止可能な事を確認した (Kawada et al., *PNAS* 2002)。以上の結果は「DCM の重症化は $\delta$ -SG 遺伝子の欠損が一義的に起こすのではなく、ジストロフィンの二次的な崩壊による細胞変性の結果」と考える我々の仮説を支持する。

### 3) 細胞移植による心不全治療。

心筋病変が進行後の治療を考慮して、心筋

症動物の骨格筋芽細胞(myoblast)を単離、培養した後、*ex vivo* で正常配列の遺伝子を導入し、遺伝子変異を正常化した筋芽細胞を変性の進んだ心筋に移植して、「遺伝子治療と細胞移植の併用療法」を検討した。F1B と TO-2 は先祖を共有する事から移植後も拒絶反応を呈さない可能性が有る。これを皮膚と筋芽細胞を用いて同種間移植を検証した。

- ① 皮膚移植。本年度は予備実験として、先ず F1B の皮膚の一部を TO-2 に移植した。4 週目に肉眼的に生着し、これは病理学的にもマウスの浸潤や炎症反応などを認めず、完全に生着する事が確認された。
- ② 筋芽細胞移植。大腿四頭筋より既報により筋芽細胞を単離して組織培養・増幅後に TO-2 の骨格筋に移植して免疫組織学的に検討した結果、筋芽細胞は骨格筋に生着していた。この結果に基付き開胸手術下に左室心筋層に筋芽細胞を投与して 4 週目に  $\delta$ -SG の特異抗体で免疫染色した。その結果、本来  $\delta$ -SG 遺伝子を持たない TO-2 の心筋は  $\delta$ -SG 蛋白を発現せず、染色されない。しかし F1B 由来の筋芽細胞は大型の骨格筋に分化し、細胞膜に  $\delta$ -SG 蛋白を認めた。この同種間で心筋に生着する事実および今後の細胞移植治療に大きな期待を与える。

#### 4) RNAi による心不全増悪因子の発現抑制。

前記のように DCM の原因として 20~30% の責任因子が同定されつつあり、その治療目標も明確である。残りの 70~80% について今後ヒトゲノムプロジェクトの成果として徐々に解明されると予想するが、現段階では未だ不

明の部分が多い。敢えて新たな治療を開発するには直接原因遺伝子に迫らなくても増悪因子を改善する、いわば「対症的遺伝子治療」でも心機能が改善する事が我々と同じ心筋症ハスターを用いて同じ rAAV ベクターとプロモーターにより心筋に強制発現させて示された(Hoshijima *et al.*, *Nature Med.*, 2002)。

当研究室では心筋細胞内因性の  $Ca^{2+}$  活性化中性蛋白分解酵素(calpain)が関与する傍証を得ている。この酵素を選択的に抑制する薬物は未だ開発されておらず、またノックアウト動物の作成も成功していない。既に当教室では antisense DNA を用いて検討したが、不十分な抑制作用に終わった(Chen *et al.*, *J.Biol.Chem.*, 2000; Wang *et al.*, *Circulation* 2001)。今後更に強力な RNAi による遺伝子発現抑制して治療に供する予定であり、その予備実験を本年から開始した。現在進行中のデータは学会誌から発表を厳禁されており、詳細は明年以降に報告申し上げる。

#### 5) 卵を用いた心不全状態の作製。

従来から大型動物にヒトに類似した再現性の良い心不全病態モデルを作製する事は容易でないと考えられてきた。また前記ハスターのように心不全を自然発症する大型動物は稀に獣医学会で報告されても、飼育業者は販売できない動物を繁殖させないため実験に供される事は無かった。

筆者は今回の研究が認められた後に国立感染症研究所付属、霊長類共同利用施設に公募したが、締め切り後だったため平成 15 年度に再応募している。幸い同施設からは最優先で御協力頂ける承諾を頂いている。この間の文献調査により大型の犬に用いられていた人工ペースメーカーによる頻脈刺激は卵

に於いても再現性の良い心不全状態を作製できる事が報告されていた。平成 15 年度はこのモデルで心不全を作製して先ず、各種生理、生化学的診断を実施する予定である。この際に別を用いれば各種の診断に用いるの機材や試薬を流用可能な点で開発経費が大幅に削減できる。

次に臨床応用を考えると遺伝子治療用のベクターを冠動脈経由に投与する事が望ましい。既に rAAV ベクターを Langendorf 灌流法に

より心筋組織全体に遺伝子導入が可能な事は小型動物で立証されている。ヒトを含む大型動物では、この時に脳循環を確保する為に人工心肺装置が必要となるが、そのためにヒト小児-新生児用に開発された機器を用いる予定である。以上、最終的にヒトの重症心不全治療について遺伝子・細胞医療の研究を推進中である。



厚生科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分担研究報告書

治療用ベクターの大量生産

分担研究者 小澤敬也

自治医科大学遺伝子治療研究部・教授

研究要旨

心筋・骨格筋などへの効率良い遺伝子導入が可能な AAV ベクターにつき、各血清型由来のキャプシドを有するベクターの作製法を準備すると共により安全な精製法に関して検討を加え、大量生産に向けた準備を行った。

研究協力者  
水上浩明

自治医科大学

A. 研究目的

AAV ベクターは心筋を標的とした遺伝子導入に有用な性質を有しているが、従来検討されてきた 2 型以外の血清型についても有用性が示唆されている。この点を明らかにするため、AAV の各血清型由来のキャプシドを用いたベクター作製システムを準備し、大量調整に向けた検討を行った。また、精製法に関しても、従来用いられてきた塩化セシウムに代わる安全な媒体を用いて動物個体、ひいてはヒトへの投与に際して応用可能な方法を確認することを目的として検討を行った。

B. 研究方法

従来使用してきた 2 型に加えて他の血清型由来のベクター作製システムを準備した。具体的には、関係者が以前開発した 3 型に加え、米国 NIH の Chiorini 博士より 4 型・5 型の供与を受けた。1 型に関しては野生型のウイルスより関連する遺伝子領域を取

り出して 2 型の該当部位と入れ替えることで作製システムを準備した。また、精製法に関しては密度勾配に用いる媒体として毒性が危惧される塩化セシウムに代わって、生体に投与可能な造影剤でもある Iodixanol を用いて大量調整を行う方法を検討した。

（倫理面への配慮）本研究は、非病原性の AAV に由来するベクターの開発とその応用を目指したものであり、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的な問題が生ずることは基本的にないものと考えられる。

C. 研究結果

AAV の各血清型由来のキャプシドを有するベクターは従来用いてきた 2 型の場合と同様に作製することができた。作製効率については血清型により若干の違いがあるものの、概ね 2 型の場合と同じレベルであった。また、Iodixanol を用いた精製法に関しては条件の最適化を行った結果、塩化セシウムを用いた場合と同様の純度が得られた。尚、これらの方法を用いて LacZ 並びにエリスロポエチンを搭載するベクターを作製し、動物個体への投与を行ったところ、

いずれについても導入遺伝子の発現が認められ、遜色ない機能を発揮した。

#### D. 考察

AAV ベクターは心筋への効率良い遺伝子導入が可能であり、世界的にも様々な検討が行われてきている。各血清型に由来するベクターはこれまで検討されてきた2型に比べて一層有用性が高いものと期待され、特に1型は骨格筋に対する効果が証明されていることから、心筋においても治療効果が期待される。また、精製法に関しては生体に投与可能な素材を利用することで、一層安全なベクター調整法に結びつくものと考えられる。今回検討した作製法・精製法は従来法と同等の効率を有しており大動物を用いた検討に関しても対応可能と考えられ、今後様々な検討に用いることが期待される。

#### E. 結論

AAV ベクターの各血清型を用いたベクター作製法並びに従来法より安全と考えられる精製法を確立した。いずれも従来法と

遜色ない効率を有しており、有用と考えられる。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

Mochizuki S, Mizukami H, Kume A, Muramatsu S, Matsushita S, Okada T, Hanazono Y, Hoshika A, Kobayashi E, Ozawa K: Optimizing liver- and muscle-directed expression of adeno-associated virus vectors by promoters and serotypes. The 5<sup>th</sup> annual meeting of American Society for Gene Therapy, Boston, MA, USA, June 7, 2002. (Mol. Therapy 5: S190, 2002)

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

特になし

厚生労働科学研究費補助金(基礎研究成果の臨床応用成果の臨床応用推進研究事業)  
分担研究報告

遺伝子エレメント ASE 及び AIE を用いた rAAV- $\delta$ -SG ベクターの構築

分担研究者 倉地 幸徳

産業技術総合研究所 年齢軸生命工学研究センター

研究要旨

我々は先にヒト血液凝固第 IX 因子及びプロテイン C (抗凝固因子) 遺伝子発現の年齢軸調節機構研究から年齢軸に沿った遺伝子発現調節に遺伝子エレメント ASE と AIE が遺伝子の安定した発現、年齢で増強して行く発現に関与している事を明らかにした。基本的に ASE 及び AIE 機能は普遍性を持つことを証明している。現在の遺伝子治療の大きな問題の一つは、導入した治療用遺伝子の発現がヒト生体で不安定であり、これまで臨床応用されてきた遺伝子治療の実質全てが、半年から1年でその臨床的効果を維持するのに必要な遺伝子発現が維持できない事である。そこで、本研究では $\delta$ -サルコグライカン( $\delta$ -SG)欠損による心臓肥大症を心臓病をモデルに、治療年齢軸で安定した遺伝子発現が可能な至適化遺伝子治療用ベクターの開発を目指す。これは本疾患の治療に直接貢献できると共に、他の多くの疾患の遺伝子治療開発にも大きく寄与出来るものである。まず、最初の遺伝子導入ベクターモデルとして、 $\delta$ -SG 遺伝子を持つ組替えアデノ依存性ウイルス(rAAV)ベクター発現系を構築し、特に ASE エレメントの年齢軸に沿った遺伝子発現安定化効果を検証することにした。別途進行している基盤技術整備実験の支援も受けて、ヒト $\delta$ -SG 遺伝子のベクター構築に向けて実験を進めている。初期段階が終了次第、AAV1 及び AAV5 の生産を自治医大の助けを借りて行い、培養細胞、マウスモデルによる試験を開始する。また、rAAV 以外の遺伝子導入ベクター系のテストを行う。

研究協力者

安部 貴大 産業技術総合研究所  
年齢軸生命工学研究センター

A. 研究目的

長期目標:安定したヒト $\delta$ -SG 遺伝子の発現ができる遺伝子治療用発現ベクター構築及びマウスモデルによるテストを行い臨床試験への技術基盤整備。平成14年度目標は、ヒト $\delta$ -SG 遺伝子発現ベクター構築の基盤技術整備。

B. 研究方法

ヒト $\delta$ -SG 蛋白質は約35kDa の大きさの蛋白質である。遺伝子は9個のエクソンからなる43.3kbの大きな遺伝子である。そこでアクセスできる公的ゲノムデータベースからcDNA に関する

情報を得て、2つのベクター、rAAV-ASE- $\delta$ -SGcDNA 及びrAAV-ASE- $\delta$ -Sgminigene 作成そのデザインを行った。

cDNA クローンを市販ヒト cDNA ライブラリーから得て、構築をすすめる。

この一連の実験には倫理上の問題は含まれていない。

C. 研究結果

研究は初期段階にあり、報告すべき結果は未だ出ていない。平成15年度に大きく進展させる計画である。

E. 結論

実験は進行中であり、実験結果を基にした結論は未だ得られないが、AAV を用いた年齢軸

で安定した遺伝子発現のできるベクター構築とマウスでのテストは重要な極めて重要な意義を持っている。結果は、ヒト臨床試験を支持する重要な基盤データとなると共に、他の多くの遺伝子治療用ベクターシステムに応用できる可能性、更に ASE 機能の汎普遍性テストにも繋がる。

該当しない。

G. 研究論文

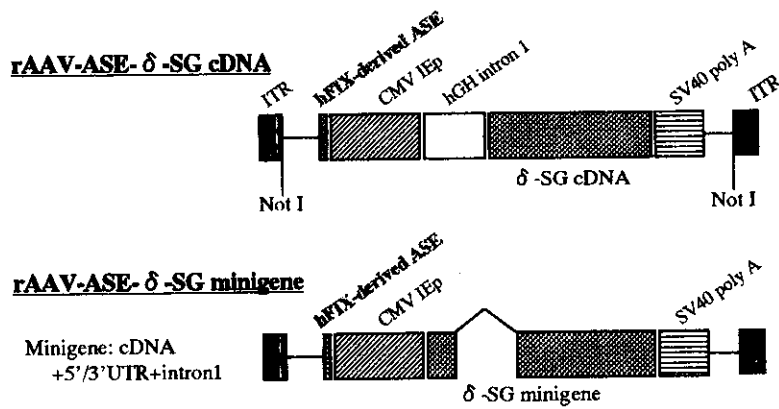
本年は該当なし。

H. 知的財産

本年は該当なし。

F. 健康機器情報

**δ-SG のrAAV発現ベクター構造**



厚生労働科学研究費補助金(基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)  
分担研究報告書

細胞内蛋白分解酵素による筋細胞膜蛋白傷害に関する研究

分担研究者 川口 秀明

北海道大学 大学院医学研究科病態医科学分野 教授

研究要旨

筋ジストロフィーの一群である肢帯筋型筋ジストロフィー(LGMD)は、四肢近位筋優位の進行性ミオパチーを発症する疾患群である。近年その遺伝的発症形式が明らかにされ、特にLGMD2Aでは発症の原因因子として細胞内蛋白分解酵素の一つである calpain3との関係が明らかにされた。本研究では、まず calpain が骨格筋の構成蛋白に対して作用しうるか否かを検討する目的で、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることで、calpain を活性化させた上で、細胞膜構成蛋白の一つである  $\alpha$ -sarcoglycan がどの様な影響を受けるかについて検討を行う。

研究協力者

飯塚 健治 北海道大学  
病態医科学分野

A. 研究目的

<背景>

筋ジストロフィーの一群である肢帯筋型筋ジストロフィー(LGMD)は、四肢近位筋優位の進行性ミオパチーを発症する神経筋疾患群である。近年その遺伝的発症形式が明らかにされ、特にLGMD2Aでは発症の原因因子の一つとして calpain のアイソフォームの一つである calpain3 との関係が明らかにされた。

Calpain (CANP; calcium activated neutral protease) は、ほ乳類を含め、多種多様な生物に広く分布する細胞内蛋白分解酵素の一種である。およそ80kDaと30kDaの分子量を持つ二つのサブユニットから成る構造を基本とし、分子内にカルシウム結合ユニット(EF hand構造)を持ち、分子周辺のカルシウムイオン濃度によってその活性が制御されており、現在ほ乳類では calpain3 を含めて他に12種類を越えるアイソフォームの存在が知られている。

細胞内における calpain の生理的機能につい

ては、未だ不明な点が多く、その機能解析が現在も進行中であるが、これまでの報告からは、細胞骨格、細胞膜蛋白や、細胞内情報伝達系に関わる分子をターゲットとして、その活性化や分解過程に関与していることが報告されている。さらに、calpainが細胞骨格、細胞膜蛋白や、細胞内情報伝達系に加えて、特に低酸素条件においては sarcoglycan をはじめ、細胞膜裏打ち蛋白など様々な細胞構成分子に対しても、蛋白分解酵素として作用し、細胞障害の発生に関与している可能性が示唆されている。

これらのことから、近年 calpain が2A以外の LGMD の発症や、虚血に伴う病態の発症、進展にも関与する可能性があるのではないかと予想されており、病態と発症メカニズムの関係が注目されている。

<目的>

本研究の目的は、LGMD の発症機序を検討する端緒として、蛋白分解酵素が細胞膜を構成する蛋白の一種である sarcoglycan に障害を及ぼす可能性があるか否かについて検討する

事である。

## B. 研究方法

### <細胞培養>

ヒト培養骨格筋細胞(HUSKMC)をDMEM培地およびハム F12 培地をベースに調製された CS-C 培地を用いて培養した。細胞は 37 °C、5% CO<sub>2</sub> + 95% air 条件下のインキュベーター内で培養した。培養ディッシュには 10 cm ディッシュを使用した。細胞は、いずれもコンフルエントに達する前に継代し F5-F12 までの細胞を用いた。

### <細胞内蛋白分解酵素の活性化と阻害薬>

Calpainの活性化には細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる手法を用いた。CS-C培養液に2 mMのCaCl<sub>2</sub>およびA23187 (0.5 μg/ml)を添加し、1時間インキュベートした。一方、セリンプロテアーゼの阻害薬であるleupeptin (2 μM)をあらかじめCS-C培養液に添加し、1時間インキュベートした後、上述のCaCl<sub>2</sub>およびA23187を加えてleupeptinの効果を検討した。

### <immunoblot>

Lowry 変法により各サンプルのタンパク含有量を測定し、35 μg を SDS-PAGE (10%) で展開した後、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体には anti α-sarcoglycan monoclonal antibody を用いて overnight で反応させた (4°C)。α-Sarcoglycan の検出は化学発光法 (ECL system) を用いて行い、X 線フィルムに感光させた後に スキャナ (EPSON, GT-6500ART2) を用いてデジタル処理し、NIH image でおのおの4検体ずつの結果を数値化し、post hoc テスト (Bonferroni/Dunn) により統

計解析 (分散分析) を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究では、特定の個人に由来する遺伝子を含むヒトの生体成分を使用しないため、倫理面での問題は発生しない。

## C. 研究結果

図に示す如く、CaCl<sub>2</sub> (2mM) および A23187 (0.5 μg/ml) を用いて HUSKMC 内のカルシウムイオン濃度を上昇させた細胞では、対照群と比較して α-sarcoglycan が低下を示した。

一方、あらかじめ leupeptin で前処置した HUSKMC では、CaCl<sub>2</sub> および A23187 の添加にもかかわらず α-sarcoglycan の減少はほとんど認められず、対照群と比較して有意な差は検出されなかった。

## D. 考察

従来より、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は、calpain の活性を制御する因子の一つであることが明らかにされている。本研究では、カルシウムイオンフォアを用いて HUSKMC 内のカルシウムイオン濃度を上昇させることにより calpain の活性化を試みた。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が、細胞内蛋白分解酵素の活性化以外にも様々な変化を細胞内に惹起することはこれまでの報告からも明らかであるが、本研究から α-sarcoglycan が蛋白レベルで減少することが明らかになった。

一方、calpain をはじめとして、酵素の活性中心部分に serine を持つ蛋白分解酵素群に対する活性阻害剤である leupeptin が α-sarcoglycan の分解を抑制したことから、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に伴って発生した α-sarcoglycan の分解が calpain を含む蛋

白分解酵素によってもたらされたものである可能性が強く示唆された。

今回用いた、leupeptin は calpain に対する特異的な阻害薬ではないことから、 $\alpha$ -sarcoglycan の分解との直接的な因果関係については今後さらなる検討が必要であるが、short interfering RNA を用いた HUSKMC 内の特定の calpain 活性の消去や、特異的な阻害薬を用いた研究から今後 LGMD2A を含む多くの疾患との関わり、並びにその発症阻止の方法が検討できるのではないかと考えられる。

#### E. 結論

細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が細胞膜を構成する蛋白の一種である  $\alpha$ -sarcoglycan を減少させる事が明らかになった。さらに、この過程に calpain を含む serine 蛋白分解酵素群が関与していること、またこれらの蛋白分解酵素の阻害薬である leupeptin が  $\alpha$ -sarcoglycan の減少を抑制することが明らかに

なり、骨格筋細胞の神経筋疾患の発症ならびにその阻止との関わりについて、今後さらなる検討を要すると考えられた。

F. 健康危険情報 なし

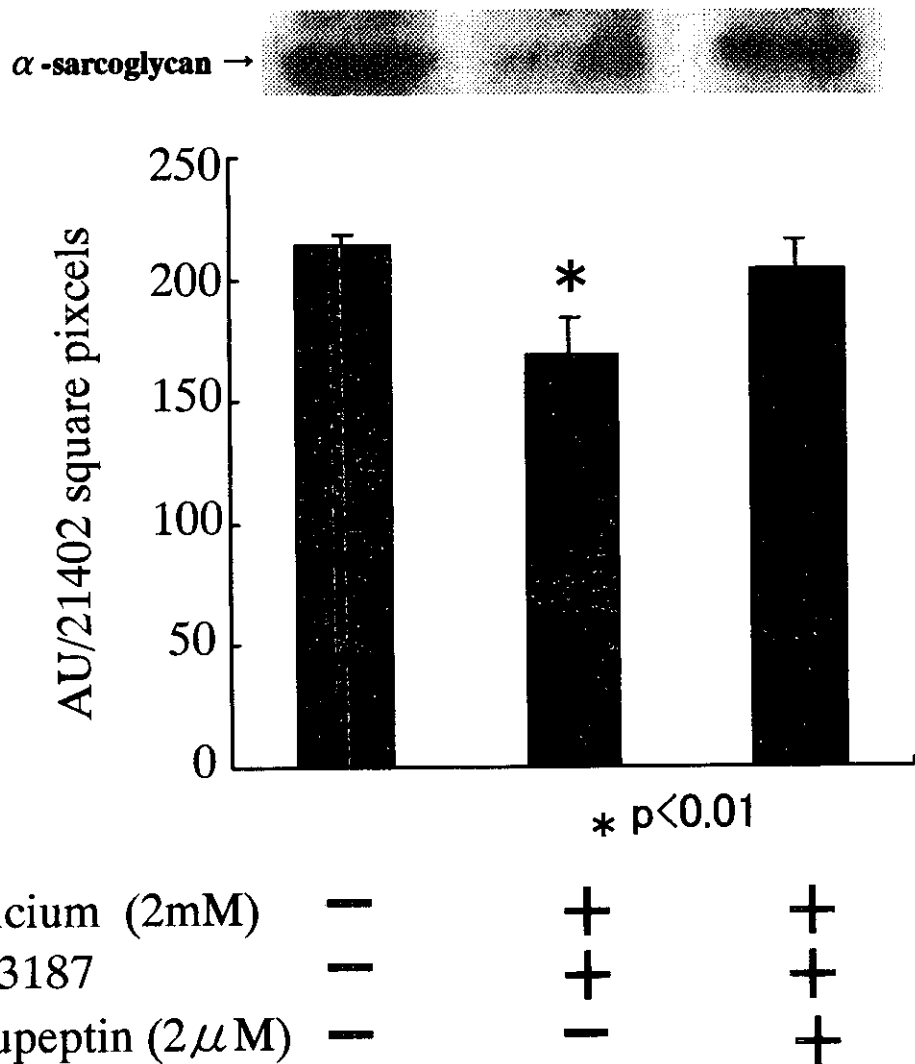
#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

<図>



ヒト培養骨格筋細胞における  $\alpha$ -sarcoglycan に対するカルシウムイオンの影響と、蛋白分解酵素阻害薬の作用

ヒト培養骨格筋細胞(HUSKMC)をDMEM培地およびハムF12培地ををベースに調製されたCS-C培地を用いて培養した。35  $\mu$ gをSDS-PAGE(10%)で展開した後、ニトロセルロース膜に転写し、anti  $\alpha$ -sarcoglycan monoclonal antibodyを用いてovernightで反応させた(4°C)。

CaCl<sub>2</sub>(2mM)およびA23187(0.5  $\mu$ g/ml)を用いてHUSKMC内のカルシウムイオン濃度を上昇させた細胞では、対照群と比較して $\alpha$ -sarcoglycanが低下を示した。一方、あらかじめleupeptinで前処置したHUSKMCでは、CaCl<sub>2</sub>およびA23187の添加にもかかわらず $\alpha$ -sarcoglycanの減少はほとんど認められず、対照群と比較して有意な差は検出されなかった。



プロテオーム解析による心不全の発症に関わるタンパク質の研究

分担研究者 仲澤 幹雄

新潟大学医学部教授

研究要旨

プロテオーム解析は、臓器に発現しているタンパク質の網羅的な解析を通して細胞の情報伝達系および構造タンパク質等の変化を探求する手段として注目されており、この手法を使用しタンパク質の発現と修飾による機能変化を明らかにすることで、疾病の新たな治療手段の開発が可能になると考えられている。

そこで、心不全の新しい治療方法の開発のため、心不全の病態進展に関連する情報伝達系を明らかにする目的で、心不全心臓のプロテオーム解析を行った。

今回の研究では、我々が心不全の発症および治療の研究に使用している自己免疫性心筋炎後心不全モデルラットの心筋を使用してプロテオーム解析を行い、心筋炎急性期の心筋では、検出できたタンパク質のうち約40%に濃度変化が起こっていることが明らかとなり、今後さらに病態の進展との関連についての検討を加えていく必要があると考えられた。

A. 研究目的

心不全は、心疾患の中で最後に残された重要な研究領域の一つとなっており、究極的な治療方法としての心移植が困難な状況では、それに替わる治療方法の確立が急務となっている。先天性心疾患については遺伝子欠損にその原因が求められており、原因遺伝子の導入により治療が可能であり、我々も  $\delta$  サルコグリカン遺伝子欠損による先天性心不全の遺伝子治療に道筋を開いた (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:901-906, 2002)。

一方後天性の心不全については心筋梗塞や心筋炎などを起点とした心筋障害が引き金になっており、その後心筋は対応性の変化(リモデリング)を起こしてさらに重篤な病態へと進展する。従ってリモデリングの発生およびその進展に関係する情報伝達系の解明は、心不全治療戦略の構築に重要な情報を提供することとなる。情報伝達系の研究は遺伝子発現の研究から情報伝達系に実際に関わっているタ

ンパク質の研究に重点が移ってきており、そのための方法としてプロテオーム解析が注目を集めている。

プロテオーム解析は、さまざまな疾患において各種臓器でのタンパク質発現の変化およびリン酸化等を介したタンパク質の機能変化の研究に応用されており、最近では機能的プロテオミクスと総称されている。この手法を使用することにより、心不全の発症や進展に関係しているタンパク質の網羅的な解析を行い、心不全の効果的な治療方法の確立を目的として今回の研究が計画された。

そのため我々が開発した心不全モデル (*Circ. Res.* 80:11-20, 1997) を使用して心臓のプロテオミクス解析を行った。

B. 研究方法

心不全モデルの作成

9週令 Lewis ラットをエーテル麻酔し、精製ブタミオシンと Freund のアジュバント混合液を

後肢掌に皮下投与して感作した。通常ミオシン感作後2から3週目に自己免疫性の心筋炎が発症し、ラットは心不全状態に陥る。心筋炎の活動期を過ぎた4週目に心臓を摘出し、心尖部心筋を切り出してタンパク質抽出の標本に供した。

#### タンパク質の抽出とプロテオーム解析

摘出した心筋は図1に示すように、タンパク抽出液中でホモジナイズし、遠心分離後、上清と沈差に分離する。上清は可溶性画分とし、沈差は膜画分としてさらに抽出操作を加え、二次元電気泳動用の標本とした。

#### 二次元電気泳動

1次元目の等電点電気泳動は、pH3-10の等電点電気泳動用ゲル (Immobline DryStrip, Amersham) を用いて行った。その後 10% SDS-Page による二次元電気泳動を行い、泳動ゲルを銀染色して泳動パターンを得た。銀染色されたゲルの泳動パターンはスキャナーにて電子化し、電子化された泳動パターンを二次元電気泳動画像解析ソフト (PDQuest、BioLad) にて解析を行った。心不全群と正常対照群とで泳動パターンの比較を行い、タンパク質濃度の増減について定量的な解析を行った。

(倫理面への配慮) 実験に用いたラットは新潟大学医学部動物実験施設で適切な環境で飼育され、動物愛護の観点からも十分な配慮をして実験に供されており、倫理面での問題は無いと考えられる。

#### C. 研究結果

図2に可溶性画分の二次元電気泳動像を示す。610のスポットが検出され、心不全により、実験した等電点および分子量範囲全体にわたってスポットに変化が認められる。図3に膜

画分の二次元電気泳動像を示す、可溶性画分より若干少ないスポットが観察された。心不全による変化では等電点7付近の領域で減少しているスポットが認められる。

さらに、心不全および正常ラットそれぞれ3例から得られた仮想ゲルイメージを用いて各スポットの増減を定量的に比較すると、表1に示すような結果が得られた。すなわち、可溶性画分では観察されたスポットのうち、260スポット (43%) に有意な増減が認められた。一方膜画分では339スポットが観察されそのうち136スポット (40%) に有意な増減が認められた。可溶性画分では増加が、また膜画分では減少したスポット数が多かった。

#### D. 考察

今回急性心筋炎による心不全ラットから得られた心筋を使用してプロテオーム解析の予備的な検討を行った。可溶性画分と膜画分に分画した標本での解析で、両画分ともに多くのスポットに濃度変化が認められた。可溶性画分では濃度が減少したスポット数 (104) より増加したスポット数 (156) が多く、膜画分では増加したスポット数 (55) より減少したスポット数 (81) が多かった。膜画分での減少は可溶性画分へのタンパク質の移動を、また減少は可溶性画分から膜画分への移動が起こっていることを示唆している。タンパク質の細胞内移動は各種の酵素および情報伝達系の活性変化が起こっていることを示唆しており、これらのタンパク質の同定がこれからの課題になると考えられる。タンパク質の同定により心筋炎・心不全の病態変化に関連している情報伝達経路を明らかにすることが可能になると思われ、さらに詳細な検討を加える予定にしている。

一方、今回の検討に用いた両画分のタンパ

ク質は心臓から抽出したものであり、炎症のピークは過ぎたとはいえ病理学的には未だ炎症性細胞の存在が明らかな時期であるので、心筋細胞そのものの変化なのか、あるいは炎症性細胞由来の変化なのかは明らかではない。この点については分離心筋細胞を用いた分析を行うことで、直接的に明らかにすることが出来ると考え、検討を予定している。

#### E. 結論

急性心不全モデルとして、自己免疫制心筋炎ラットを用い、心筋のプロテオーム解析を行い、約40%のタンパク質に濃度変化を認められた。

#### F. 健康危険情報

動物実験であるので、当該情報は無い。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Gene therapy prevents disruption of dystrophin-related proteins in a model of hereditary dilated cardiomyopathy in hamsters. Teruhiko Toyo-oka, Tomie Kawada, Hang Xi, Mikio Nakazawa, Fujiko Masui, Chieko Hemmi, Jumi Nakata Asaki Tezuka, Kuniaki Iwasawa, Masashi Urabe, John Monahan and Keiya Ozawa  
*Heart, Lung and Circulation* 11:174-181, 2002

2) Effects of sarpogrelate, a novel 5-HT<sub>2</sub> antagonist, on 5-HT-induced endothelium-dependent relaxations in porcine coronary artery. Mamunur Rashid, Mikio Nakazawa, Takafumi Nagatomo

*Japan. J. Pharmacol.* 89, 405-412, 2002

3) Effects of carvedilol on cardiac function and cardiac adrenergic neuronal damage in rats with dilated cardiomyopathy.

Kenichi Watanabe, Toshihiro Takahashi, Mikio Nakazawa, Mir II Wahed, Koichi Fuse, Naohito Tanabe, Makoto Kodama, Yoshifusa Aizawa, Hiroki Ashino, Susaku Tazawa  
*Journal of Nuclear Medicine* 43: 531-535, 2002

4) AT-1015, a newly synthesized 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist, dissociates slowly from the 5-HT<sub>2</sub> receptor sites in rabbit cerebral cortex membrane.

Manunur Rashid, Masatomo Watanabe, Mikio Nakazawa, Takafumi Nagatomo  
*Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54: 1123-1128, 2002

5) Effects of chronic administration of sarpogrelate on systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats: comparison with quinapril.

Yuki Setoguchi, Toshio Ohnuki, Manunur Rashid, Takahashi Nakamura, Kaoru Hattori, Takafumi Nagatomo, Kenichi Watanabe Akio Mitomi, Mikio Nakazawa  
*Pharmacology* 64:71-75, 2002

6) Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy: Amelioration of morphological findings, sarcolemmal permeability, cardiac performances, and the prognosis of TO-2 hamsters.

Tomie Kawada, Mikio Nakazawa, Sakura  
Nakauchi, Ken Yamazaki, Ryoichi Shimamoto,  
Masashi Urabe, Jumi Nakata, Chieko Hemmi,  
Fujiko Masui, Toshio Nakajima, Jun-ichi  
Suzuki, John Monahan, Hiroshi Sato, Tomoh  
Masaki, Keiya Ozawa and Teruhiko Toyo-oka  
*Proc Natl Acad Sci USA* 99(2):901-906, 2002

2. 学会発表

1) 第19回国際心臓研究学会日本部会年会  
・ Assessment of novel paradigm for the  
development of advanced heart failure.  
T. Kawada, M. Nakazawa, S. Takeo, T.  
Toyo-oka  
*J. Mol. Cell. Cardiol.* 34(10): A13

・ Progressive degradation of dystrophin in  
hamster hearts with dilated cardiomyopathy.  
J. Nakata, T. Kawada, M. Nakazawa, C.  
Hemmi, K. Iwasawa, H. Hikiji, T. Takato, T.  
Toyo-oka  
*J. Mol. Cell. Cardiol.* 34(10): A27

・ Assessment of dissociation ability of several  
5-HT<sub>2</sub> antagonists in muscarinic receptor of rat  
heart.  
M. Rashid, M. Nakazawa, T. Nagatomo  
*J. Mol. Cell. Cardiol.* 34(10): A34

・ The effect of secretory leukocyte protease  
inhibitor on experimental autoimmune  
myocarditis.

M. Hayashi, H. Hanawa, K. Kodama, Y.  
Aizawa, M. Nakazawa  
*J. Mol. Cell. Cardiol.* 34(10): A34

2) 第53回日本薬理学会北部会  
拡張型心筋症ハムスターモデルにおける心筋  
細胞 Dystrophin の経時的変化  
中田樹海、辺見智恵子、引地尚子、岩澤邦  
明、河田登美枝、仲澤幹雄、高戸毅、豊岡照  
彦  
日薬理誌 121:12P, 2003

Comparison of binding affinity and dissociation  
ability of several 5-HT antagonists in 5-HT<sub>2</sub>  
receptors and muscarinic receptors.  
M. Rashid, M. Nakazawa, T. Nagatomo  
日薬理誌 121:18P, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)無し。