

図1 心臓からのタンパク質抽出方法(可溶性画分と膜画分の調製)

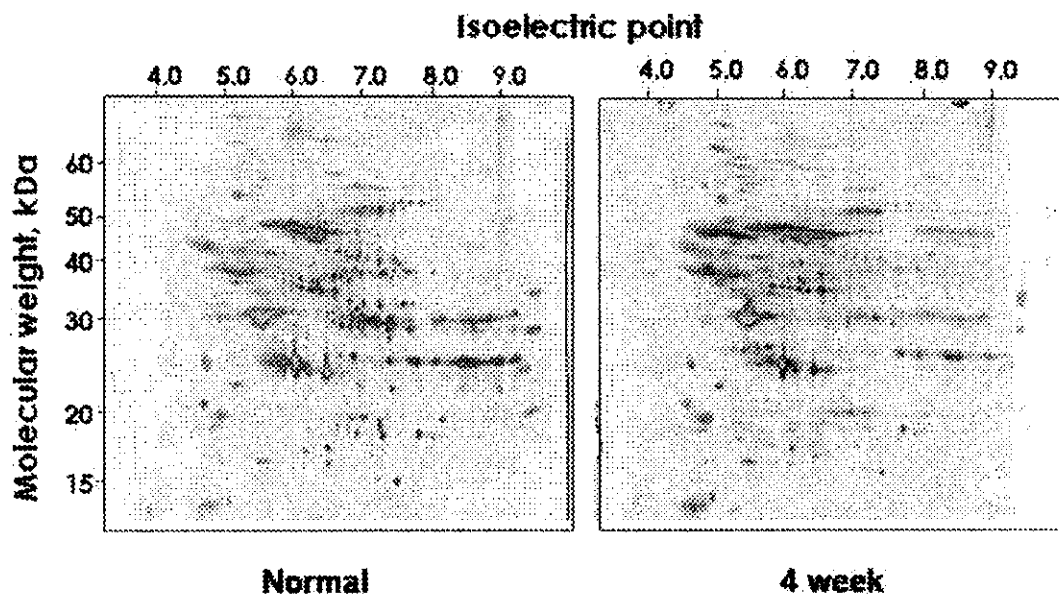


図2 可溶性画分の2次元電気泳動像。正常心臓(Normal)とミオシン投与後4週目の心臓(4 week)との比較。

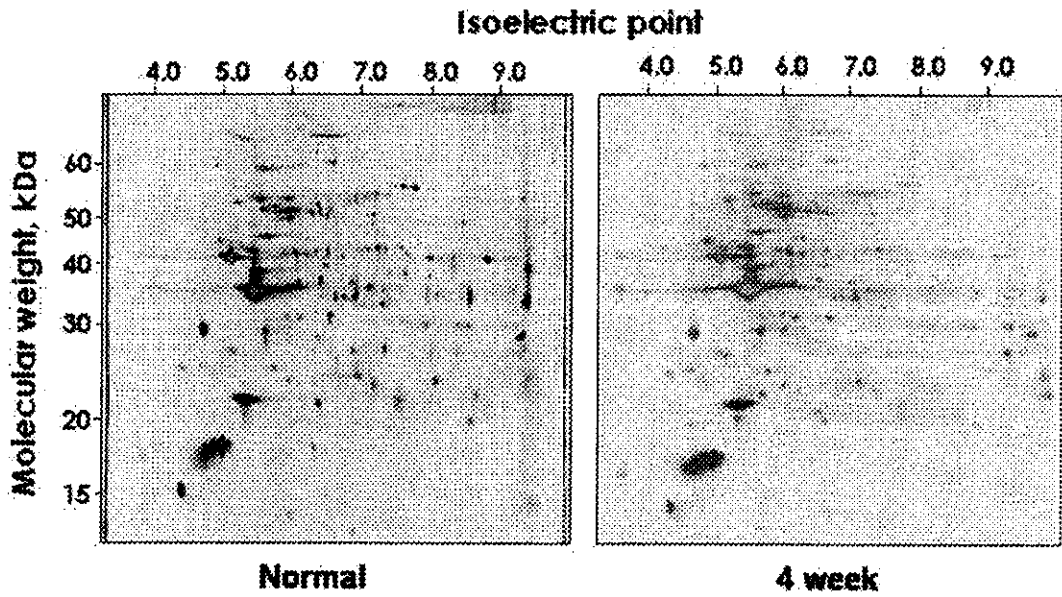


図3 膜画分の2次元電気泳動像。正常心臓 (Normal) とミオシン投与後4週目の心臓(4 week)との比較。

表1 急性心筋炎(心不全)でのプロテオームの変化

	可溶性タンパク質	膜結合性タンパク質
消失したスポット	13 (2.1%)	51 (15.0%)
1/2 以下になったスポット	91 (14.9%)	30 (8.8%)
出現したスポット	119 (19.5%)	25 (7.4%)
2倍以上になったスポット	37 (6.1%)	30 (8.8%)
全スポット数	610	339

正常心臓とミオシン投与後4週目の心臓との比較。

心不全の進展に伴う心筋細胞 dystrophin の変化

- 拡張型心筋症ハムスターを用いた検討 -

分担研究者 河田登美枝

新潟大学医学部附属病院・薬剤部 助教授

研究要旨

ジストロフィンとその 関連蛋白複合体は筋細胞膜の収縮時の過剰な膨隆を抑制し、その安定性を保つと考えられている。拡張型心筋症 (DCM) モデル動物の T0-2 ハムスターでは δ -sarcoglycan (δ -SG) 遺伝子の欠損が DCM の原因である事を我々は報告した。しかし、先天性な遺伝子の欠損にもかかわらず、初期には心不全症状は認められず、動物の成長に伴って症状が悪化していく理由は解明されていない。我々は筋ジストロフィー様の病変が心筋特異的に発生した結果、心不全が進展すると考えた。T0-2 におけるジストロフィンの組織学的及び生化学的な経時変化を観察した結果、DCM の重症化に伴い、ジストロフィンが崩壊し、細胞膜から解離して細胞質に移行し、膜透過性が増加した。Western blotting でも週令に伴いジストロフィンの断片化が顕著になった。この結果は我々の仮説を支持する。

A. 研究目的

ヒト DCM と類似の病態を示す T0-2 系ハムスター (T0-2) はモデル動物として有用であり、ジストロフィン関連タンパク複合体 (dystrophin-related proteins; DRP) の 1 つ、 δ -SG 遺伝子が欠損し (Sakamoto A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997)、その結果 δ -SG 蛋白も発現していない事を我々は既に同定した (Kawada *et al.*, *F.E.B.S. Lett.*, 1999)。更に同じ δ -SG 遺伝子変異によりヒトでも DCM を起こすことが 4 家系で報告され、この中の 1 例は心臓移植を受けている (Tsubata S. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2000)。従って、 δ -SG 遺伝子異常はハムスターに起きた特殊な疾患ではなく、ヒトにも共通した重症心不全である。

DRP は筋細胞膜の収縮時の過剰な膨隆を抑制し、その安定性を保つと考えられ

ている。T0-2 ハムスターでは δ -SG 遺伝子欠損が拡張型心筋症の原因であるにもかかわらず (Kawada T. *et al.*, *F.E.B.S. Lett.*, 1999; Kawada T. *et al.*, *B.B.R.C.*, 2001)、幼若期には心不全症状は認めず、成長に伴って症状が悪化する機序は解明されていない。我々は δ -SG 遺伝子欠損の結果、筋ジストロフィー様の病変が心筋特異的に発生し、心不全が進展すると考えた。この仮説を検証するために、T0-2 ハムスターを用いて経時的に心機能を測定し、同時にジストロフィンの組織学的及び生化学的な変化と遺伝子治療の効果を観察した。

B. 研究方法

正常対照動物の F1B ハムスター (F1B) と T0-2 の頸動静脈より両心室に心カテーテル

を挿入し心行動態を測定する。心筋細胞を FITC でラベルしたジストロフィン抗体およびローダミンでラベルした δ -SG 抗体を用いて蛍光免疫 2 重染色標本を作製する。また、ホモジナイズ心筋でジストロフィンの Western ブロッティングを行なう。

in situ にて細胞膜透過性を検討するために、ハムスターに正常の細胞膜を透過しないエバンスブルー (EB) を静注し、3 時間後に心臓を摘出する。細胞膜透過性が保たれていれば、EB は膜を通過しないが、細胞膜が脆弱になり膜透過性が増すと EB は細胞内に流入し、赤い蛍光を発する。ジストロフィン抗体と EB を二重蛍光観察することにより、蛋白発現と膜透過性を同時に検出する事が可能である。

また遺伝子治療のために、5 週令の T0-2 を開胸し、心筋細胞に正常 δ -SG 遺伝子を組み込んだ組換えアデノ随伴ウイルスベクターを *in vivo* にて導入した(Kawada T. *et al.*, *B.B.R.C.*, 2001)。

C. 研究結果

① 蛋白発現について

F1B の心筋ではジストロフィン抗体により細胞膜は緑に、 δ -SG 抗体で同じ部位に赤に染色され、両蛋白の発現が認められた。一方、T0-2 ハムスターでは細胞膜にジストロフィンの存在は認められるが、 δ -SG は全く発現していなかった。

② 細胞膜透過性の年齢依存性変化について(図 1)

生後 5 週 of T0-2 心筋細胞では、ジストロフィンが細胞膜にのみ発現し、細胞質には EB による赤の蛍光は認められず、細胞膜は正常だった。しかし、生後 25 週では、ジス

トロフィンが細胞膜のみならず、細胞質にも認められ、ジストロフィンが細胞膜から細胞質にトランスロケーションした。二つの像を重ねた結果、トランスロケーションした部位と膜透過性の亢進した部位は完全に一致していた。40 週令では、ジストロフィンがトランスロケーションした細胞が更に増加し、その細胞では EB が取り込まれ、膜透過性の亢進した細胞数は更に増加した。

③ ジストロフィンの断片化

F1B の心筋の Western blotting の結果、ジストロフィンは、おもに 430kD に単一のバンドとして認められた。5 週 of T0-2 では F1B と同様の blotting 像が得られ、ジストロフィンの分子量は保たれていた。しかし、25 週令では 90、70、60 kD 付近の新たなバンドが出現し、ジストロフィンの断片化が認められた。40 週令ではジストロフィンのバンドは著明に薄くなり、反対に断片化したバンドが濃染した。

④ 血行動態の変化(図 2)

15 週 of T0-2 では F1B に比べ、左室内圧が低下し、左室圧最大微分値および左室圧最小微分値が悪化し、左室拡張終期圧および中心静脈圧が著明に上昇してヒトの拡張型心筋症と同様の収縮能の低下と鬱血性心不全を呈した。T0-2 では週令に伴い心機能が更に悪化し、心不全が重症化する事が示された。F1B では週令に伴い心行動態に大きな変化は認められない。このように心不全の進展、ジストロフィンの崩壊、膜の脆弱化が一致して起きた。

⑤ 遺伝子治療による心機能と予後の改善

δ -SG 遺伝子治療を行った T0-2 は導入 35 週後(生後 40 週令)でも全例が生存したが、レポーター遺伝子のみを導入した群では

徐々に死亡例が増加し、生命予後は著明に向上した(図 3)。また、実験終了時に心行動態を測定した結果、 δ -SG 遺伝子導入群では、悪化していた心機能が改善し、遺伝子治療の効果が明確に認められた(Kawada T. *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 2002)。

遺伝子治療を行なった TO-2 の心筋では細胞膜に δ -SG 遺伝子が発現し、この細胞ではジストロフィンが細胞膜にのみ局在していたが、 δ -SG 遺伝子が発現していない細胞ではジストロフィンが細胞膜から細胞質内にトランスロケーションしており、上記の δ -SG 発現と細胞膜機能の増強作用が確認された。

D. 考察

従来 TO-2 ハムスターにおいて δ -SG 遺伝子の欠損が DCM の原因であり、ジストロフィンの異常は無いと考えられていたが、心筋症ハムスターにおいても DCM が重症化するに伴い、ジストロフィンが心筋細胞膜より解離し、細胞質の方へ遊離し、断片化する事が示された。

これらの結果は DCM の重症化に δ -SG 遺伝子の欠損が一義的に関与するのではなく、ジストロフィンの崩壊による筋ジストロフィー様の変性が心筋細胞特異的に起きる結果であるという我々の仮説を支持する。

E. 結論

心筋症ハムスターにおけるジストロフィンの組織学的及び生化学的な経時変化を観察した結果、DCM の重症化に伴い、ジストロフィンの移行、断片化と細胞膜透過性の亢進を示した。この一連の心筋細胞特異的に起きた筋ジストロフィー様の変性が心不

全の重症化の原因である事が示唆された。更にこの変性過程は原因遺伝子の補充療法により改善する事が示された。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

① Rescue of hereditary dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy: Amelioration of morphological alterations, *in situ* sarcolemmal permeability, cardiac performances and the prognosis of TO-2 hamsters.

T. Kawada, M. Nakazawa, S. Nakauchi, K. Yamazaki, R. Shimamoto, M. Urabe, J. Nakata, C. Hemmi, F. Masui, T. Nakajima, J. Suzuki, J. Monahan, H. Sato, T. Masaki, K. Ozawa and T. Toyo-oka. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 901-906 (2002)

② Gene therapy prevents disruption of dystrophin related proteins in a model of hereditary dilated cardiomyopathies in hamster.

T. Toyo-oka, T. Kawada, H. Xi, M. Nakazawa, F. Masui, C. Hemmi, J. Nakata, A. Tezuka, K. Iwasawa, M. Urabe, J. Monahan and K. Ozawa. *Heart Lung & Circ.*, 11:174-181 (2002)

③ 生体内心筋に対する遺伝子導入-拡張型心筋症の遺伝子治療-
河田登美枝、仲澤幹雄、豊岡照彦. 日本薬理学雑誌 119: 37-44 (2002)

2. 学会発表

① 遺伝子治療による心筋微細構造の改善-

拡張型心筋症ハムスターによる検討-

河田登美枝、仲澤幹雄、辺見智恵子、中田樹海、福田 覚、佐藤 博、豊岡照彦。

第75回薬理学会年会

② シンポジウム(基礎)1「循環器フィジオーム：遺伝子、分子から機能へ」

ジストロフィン関連蛋白の脱落による心不全の重症化とその遺伝子及び薬物療法。

河田登美枝、奚 航、仲澤幹雄、小清水美希、竹尾 聡、豊岡照彦。第66回日本循環器学会総会

③ Symposium “Genetic analysis of cardiomyopathies and heart failure”

A Novel Paradigm for the Development of Advanced Heart Failure-Disruption of dystrophin-related proteome and its gene/pharmaceutical treatments-

T. Toyo-oka, H. Xi, T. Kawada, M. Nakazawa, M. Koshimizu and S. Takeo

International Congress on Cardiomyopathies and Heart Failure

④ 拡張型心筋症ハムスターの心筋微細構造変化と遺伝子治療による改善

河田登美枝、仲澤幹雄、辺見智恵子、中田樹海、福田 覚、豊岡照彦。第25回心筋代謝研究会

⑤ Disruption of dystrophin (D) and dystrophin-related proteins (DRP) is a trigger

of advanced heart failure of both hereditary and acquired origins. T. Kawada, J. Nakata, M. Nakazawa, M. Koshimizu, C. Hemmi, S. Fukuda, S. Takeo and T. Toyo-oka. XXIV Annual Congress of the European Society of Cardiology

⑥ 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。第53回日本薬理学会北部会

⑦ Symposium “Cardiac hypertrophy and heart failure”

Assessment of novel paradigm for the development of advanced heart failure.

T. Kawada, M. Nakazawa, S. Takeo and T. Toyo-oka. 第19回国際心臓研究学会日本部会

⑧ Progressive degradation of dystrophin in hamster hearts with dilated cardiomyopathy.

J. Nakata, T. Kawada, M. Nakazawa, C. Hemmi, K. Iwasawa, H. Hikiji, T. Takato and T. Toyo-oka. 第19回国際心臓研究学会日本部会

⑨ Paradoxical Amelioration of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Failure by NOS Inhibitor, L-NAME.

T. Toyo-oka, N. Sago, C. Hemmi, A. Hirata, A. Tezuka, J. Nakata, T. Kawada and M. Nakazawa. AHA Scientific S

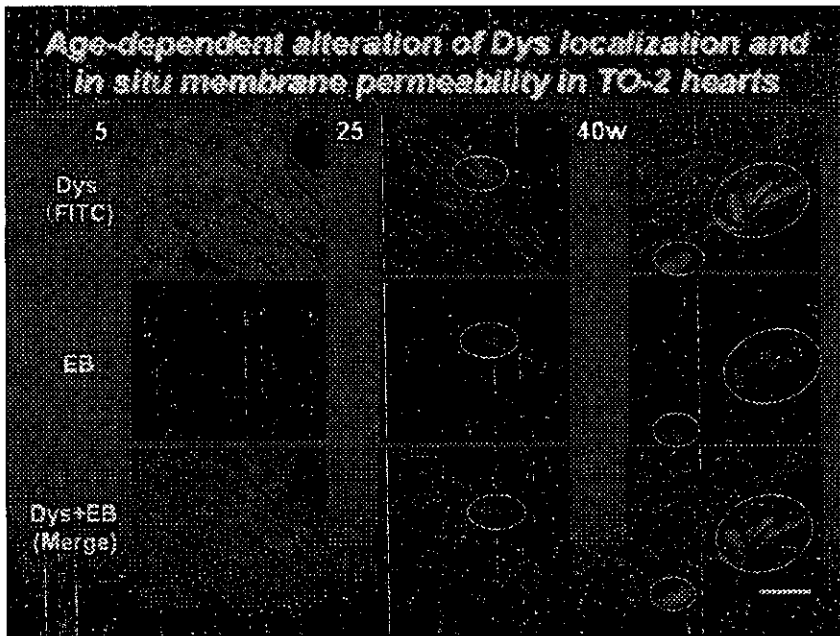


図1 TO-2 ハムスターの心筋細胞内ジストロフィンの局在と *in situ* での細胞膜透過性の年齢依存性変化

5、25、40週令(5w、25w、40w)のTO-2心筋細胞をFITCでラベルしたジストロフィン(Dys)抗体の蛍光免疫染色(上段)、エバンスブルー(EB)の蛍光染色(中段)および両者を重ね合わせた図(下段)。

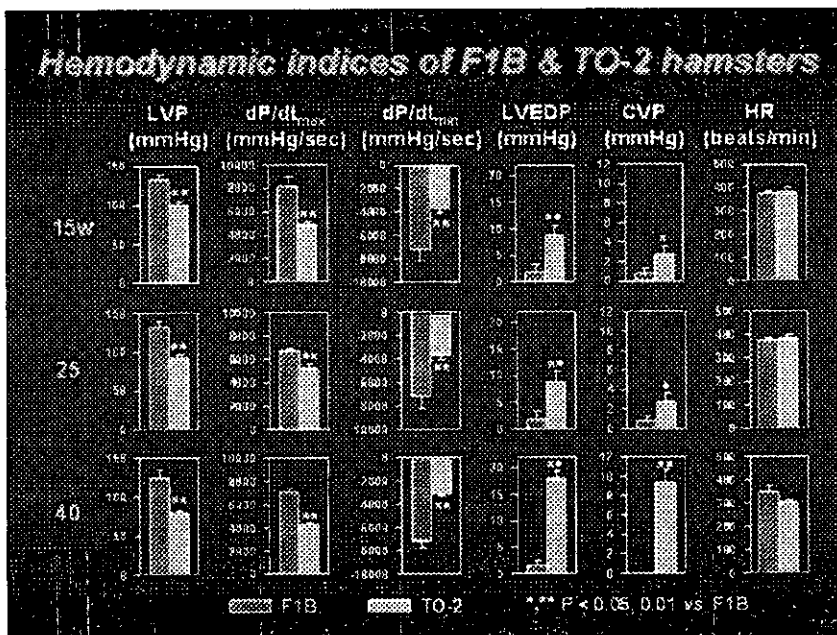


図2 F1BとTO-2ハムスターの心行動態の年齢依存性変化

F1BとTO-2ハムスターの15、25、40週令(15w;上段、25w;中段、40w;下段)における左室内圧(LVP)、左室圧最大微分値(dP/dt_{max})、左室圧最小微分値(dP/dt_{min})、左室拡張終期圧(LVEDP)、中心静脈圧(CVP)および心拍数(HR)。

Mortality of TO-2 after gene therapy

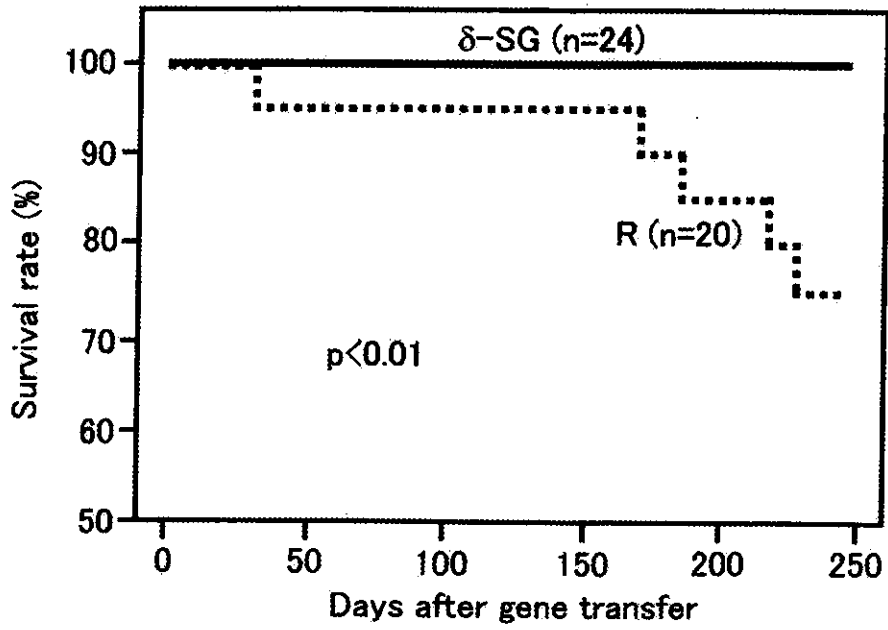


図3 遺伝子治療による生命予後の改善(Kaplan-Meier分析による)
R;レポーター遺伝子を投与した群、 δ -SG; δ -SG 遺伝子治療群。

血管内膜肥厚に対する Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor type1 の関与について

マウス頸動脈結紮モデルを用いて

分担研究者 重松 宏

東京大学大学院血管外科学分野

研究要旨

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、予後を左右する因子であり、予防方法の開発が切望されている。今回の研究は、血管内膜肥厚が再狭窄の主原因であることに着目し、Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor type1(IP3-R1)の観点から内膜肥厚抑制の可能性を探ることを目的とした。IP3-R1 hetero knock out mouse (10匹) および control mouse (10匹) に左頸動脈結紮処理を加え、28日後に検体を摘出、cross section の HE 染色標本を作成した。Neointima area / media area の値は knock out mouse 群で有意に小さく、内膜肥厚の抑制を認めた。さらなる研究が必要であるが、IP3-R1 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。

研究協力者

兼高武仁 東京大学大学院
血管外科学分野

報告され、再狭窄予防への糸口として期待されている。今回の研究は IP3-R1 hetero knock out mouse の左頸動脈結紮モデルを用いて内膜肥厚と IP3-R1 の in vivo での関係の解明を目的とした。

A. 研究目的

現在、動脈硬化などの血管疾患に対する血管形成術を受けた患者は日本でも10万人に達している。しかし冠動脈に血管内治療を施した場合、6ヶ月で30%が再狭窄するといわれ、施術後の再狭窄の発生は重要な問題となっている。予後を改善すると同時に医療資源の節約にもつながるであろう再狭窄予防方法の開発が切望されている。内膜肥厚は再狭窄の原因の一つであり、血管平滑筋細胞の遊走・増殖が内膜肥厚のプロセスであることが知られている。Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor type1(IP3-R1)は小胞体の膜上に存在し、細胞内カルシウム放出への一つの cascade の重要な factor である。近年この IP3-R1 の発現抑制が、in vitro で血管平滑筋細胞の増殖を抑制することが

(方法)

左頸動脈結紮モデルを用いた。麻酔下に頸部正中切開にて左内外頸動脈分枝部のみを露出し8-0絹糸で左総頸動脈末梢端を結紮した。28日後に総頸動脈を全長にわたって採取し両端1mmを除いた中央部について500 μ m毎の横断面切片を作成しHE染色を行った。顕微鏡画像をコンピューターに取り込み、面積計算をしたのち、Neointima Area / Medial Area (NA/MA)を計算した。各検体につきNA/MAの最大値を採用し、2群間の比較を行った。数値は(平均値) \pm (標準偏差)で表し、有意差の検定には Mann-Whitneyを使用した。

(倫理面への配慮)

東京大学医学部動物実験指針に従い、マウスの生命を尊重し愛護的に扱った。

C. 研究結果

KO 群 14 匹中 4 匹は結紮処理後死亡したため脱落した。Control 群 12 匹中 2 匹は検体摘出時に左総頸動脈に異常な分枝を認めたため脱落にした。最終的に 10 匹 : 10 匹について解析を行った。KO 群の 4 匹と Control 群の 1 匹には全長にわたって全く内膜肥厚が認められなかった。(図 1) NA/MA は control 群に比べ KO 群で有意に小さかった (KO 群 0.66 ± 0.68 , control 群 1.77 ± 1.01 ; $p=0.02$)。(図 2)

D. 考察

アゴニストが細胞膜上の受容体に結合すると、受容体と共役している三量体 G タンパク質に結合している GDP が GTP に置換され、GTP を結合した三量体 G タンパク質の α サブユニット ($G\alpha$) と $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$) サブユニットは解離して活性型となる。活性型となった $G\alpha$ -GTP はホスホリパーゼ C を活性化し、その結果、細胞膜構成微量リン脂質であるホスファチジルイノシトール 4, 5-ニリン酸を加水分解してジアシルグリセロールと IP3 の二種類の脂質性シグナル分子を産生する。この IP3 が小胞体上のレセプターと結合するとカルシウムイオンの放出が起こり、さらに下流へシグナルを伝達することが知られている。

哺乳動物ではほぼすべての細胞に IP3 レセプターが存在し、現在 3 つの subtype の存在がわかっている。predominant subtype は臓器によって異なり、中枢神経系では type 1, 心

筋細胞では type 2, 他の組織では type 3, 血管平滑筋細胞では type 1 が predominant であるといわれている。

IP3-R1 は生命現象の重要な部分に広く関わっており、homo knock out を施した mouse はほとんどが死産となり、かろうじて生まれた個体も 10 日ほどで死亡することがわかっている。今回用いた IP3-R1 hetero knock out mouse は外見上 control mouse との違いはなく正常に成長するが、今回のような頸動脈結紮処理などのストレス下では control mouse に比べ死亡率が高くなり、内膜肥厚も抑制されるなど、完全には正常ではないことがわかった。今回の研究で示した in vivo での内膜肥厚抑制効果の結果は、今後の血管内治療の予後改善に対する臨床応用の可能性を強く示唆するものである。現段階では、IP3-R1 hetero knock out mouse の頸動脈における IP3R1 発現は実際に少ないのか、カルシウムイオン放出に変化があるのか、等の background が不明であり、さらなる研究の積み重ねが必要であるが、虚血性心疾患による心不全や閉塞性動脈硬化症の治療戦略に寄与するものであると考える。

E. 結論

今回の研究によって IP3-R1 の血管内膜肥厚への関与が示され、今後の虚血性心疾患による心不全や閉塞性動脈硬化症に対する血管内治療の戦略に寄与する可能性が示唆された。

参考文献

Kumar A. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb*

Vasc Biol. 1997; 17: 2238-44

Wang Y. Crucial role of type 1, but not type 3, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP(3)) receptors in IP(3)-induced Ca(2+) entry, and proliferation of A7r5 vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2001; 88: 202-9

Furuichi T. Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 gene (Insp3r1) in the mouse central nervous system. *Receptors & Channels* 1993; 1(1) 11-24

Perez PJ. Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(38): 23961-9

Blondel O. Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract,

and other tissues. *J Biol Chem.* 1993; 268(15): 11356-63

Chen J. Autocrine action and its underlying mechanism of nitric oxide on intracellular Ca²⁺ homeostasis in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000; 275: 28739-49

Matsumoto, M. Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature.* 1996; 379: 168-71

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

<<図・表>>

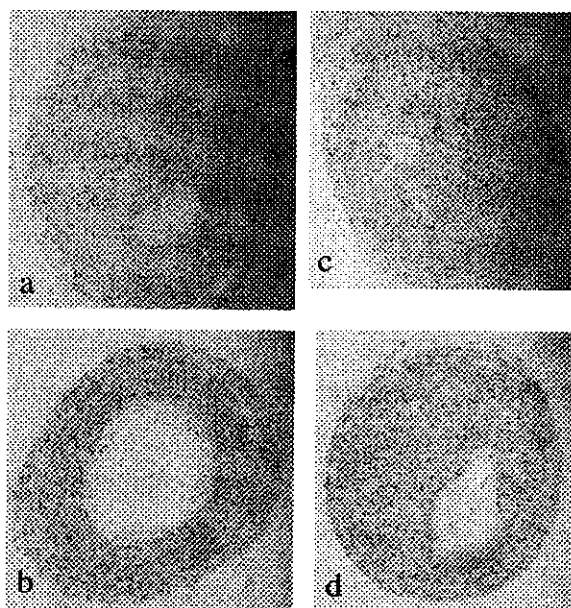


図1) HE染色標本
a,b; KO群, c, d; control群

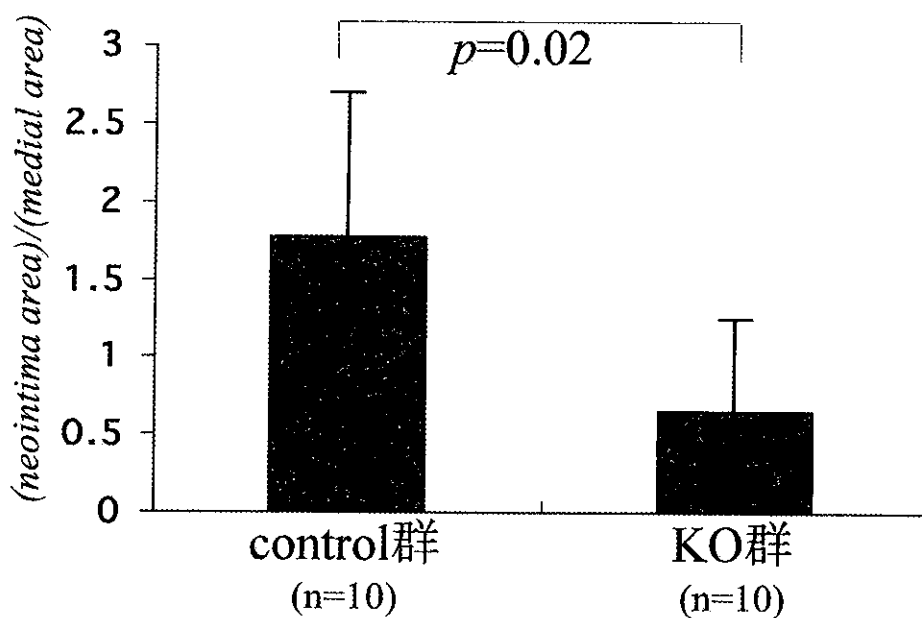


図2) (neointima area) / (medial area)
control群 1.77 ± 1.01 , KO群 0.66 ± 0.68 ; $p=0.02$

大規模 SNP タイピング法の開発に関する研究

分担研究者 徳永 勝士

東京大学大学院医学系研究科・人類遺伝学分野・教授

研究要旨

大規模 SNP タイピン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システムを確立した。この検出法は微小体積を焦点とし、この焦点に出入りする蛍光標識分子に由来する蛍光のゆらぎを測定することにより、蛍光標識された物質の大きさと数を推定することができる。伸長反応が起こらなかったプライマーと、伸長反応が起こった産物の割合を測定することによって、遺伝子型を決定できた。さらに、whole genome amplification 処理後の試料を用いた大量 SNP タイピングシステムの確立にも成功した。

A. 研究目的

ヒトゲノムシーケンス計画が順調に進み、2003年4月にはほぼ全容が明らかにされる予定である。これに伴って膨大な数の遺伝子多型、特に SNP（単一塩基多型）が発見されつつあり、その一部が心疾患をはじめ、さまざまな疾患の発症や臨床的亜型に関わっていることも明らかにされ始めている。これらの成果は、いわゆるテーラーメイド医療や Evidence based medicine の実現に必須であり、より一層の研究の進展が期待される。候補遺伝子の症例-対照関連分析をはじめ、ゲノムワイド連鎖分析によって検出された疾患感受性候補領域からの疾患遺伝子の特定、あるいはゲノムワイド関連分析の実現には、多数の SNP について多数の検体を簡便、正確かつ低コストでタイピングできる方法の確立が強く望まれている。本研究の目的は、大規模 SNP タイピングに適した新しい解析システムを構築することにある。

B. 研究方法

微量 DNA からの全ゲノム増幅

ng オーダーの微量ゲノム DNA から、Dietmaier W et al.(1999)による I-PEP (improved primer-extension-preamplification) 法を応用し、以後の PCR および測定操作に適した質を保持し、なおかつ多数の SNP 検査が可能である全ゲノム増幅法 (whole genome amplification) の条件を検討した。

第1段の PCR

全ゲノム増幅後の試料を用いるため、第1段の PCR で SNP 部位を含む断片の増幅を行うことが必要である。また多数の検体を効率良く処理するため、384 穴の PCR 用プレートを用いて条件を検討した。

SNP アリル特異的 PCR

1 個の SNP を構成する 2 個のアリルに特異的な sequence specific primers を異なる蛍光物質で標識し、同じ反応液中で PCR を実施することによって、増幅の特異性を高め、省力化とコストダウンを図った。

1分子蛍光測定

1分子蛍光測定法では、1 femtoliter という微小体積を共焦点とするレーザー顕微鏡を用いて、この焦点領域に出入りする蛍光標識分子に由来する蛍光のゆらぎを測定し、自己相関係数を計算させる。この結果から、伸長反応が起こらなかった標識プライマーと、アリル特異的伸長反応が起こった産物の割合を推定し、この値を基に各々のアリルの有無を判定し、遺伝子型を決定した。また、これら一連の数値解析のための新しいソフトウェアの開発も進めた。

(倫理面への配慮)

本研究の現段階の目的は多数の試料を対象とした SNP 解析そのものではなく、新規解析技術の開発研究にあるので、その主要部分はヒトゲノム・遺伝子解析研究の三省合同指針の対象とはならないと考えられる。技術の検定評価のために少数の健常者試料を用いるが、疾患関連研究の健常対照試料として倫理審査委員会の承認を得たものである。

C. 研究結果

微量 DNA からの全ゲノム増幅

Genomic DNA の濃度測定用色素には PicoGreen を用い、自動分注ロボットと蛍光プレートリーダーを接続して、96 穴プレート上の DNA を自動で定量し、濃度調整できるシステムを構築した。5ng の genomic DNA を用いて反応液量 100ul の全ゲノム増幅を行い、その 1ul のみを用いることで、以後の PCR で十分な増幅が得られることがわかった。

第1段の PCR

384 穴の PCR 用プレートを用い、自動分注

ロボットを用いて各穴に WGA 産物 1ul と PCR 反応液 9ul を分注し、4ヘッド型 PCR 装置を組み合わせることにより、効率良く第1段の PCR を実施できた。

SNP アリル特異的 PCR

2 個のアリルに対応する 2 種の蛍光標識 (Cy5 および TAMRA) プライマーを用意し、384 穴プレート上の第1段 PCR 産物 0.5ul ずつを、新しい 384 穴プレートに分注し、4ヘッド型 PCR 装置と組み合わせることにより、効率良くアリル特異的 PCR を実施できた。

1分子蛍光測定

1分子蛍光測定には、384 ヘッド分注器でアリル特異的 PCR の産物 4ul と 10mM Tris (pH8.0) 緩衝液 24ul を、384 穴蛍光測定専用ガラスボトムプレートに希積分注し、1分子蛍光測定装置 (DA2.0、オリンパス社) で測定した。続いて新たに開発した解析ソフトを用いて、伸長反応が起こらなかった標識プライマーと、アリル特異的伸長反応が起こった産物の割合を計算させ、その分布図を表示し、遺伝子型を決定するシステムを構築した。

D. 考察

大規模 SNP タイピングに適した方法のひとつとして、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システムを構築することができた。コスト面でも比較的安価なシステムといえる。すでに、免疫疾患について大量検体を対象とした大規模な SNP タイピングを実施しており、このシステムは実用段階にあることから、今後は本研究の対象である心疾患にも適用できるものと考えられる。一方、今後の技術

的課題としては、DOP 法など他の全ゲノム増幅法の適性評価、プライマーの作成・評価プロセスの効率化、SNP 特異的プライマー伸長反応に代わる反応系の試み、一分子蛍光検出法の測定領域の微少さを活かす測定システムの開発などが考えられる。

E. 結論

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、大規模 SNP タイピングに適したシステムを確立した。DNA チップ法などのようなプローブの固相化を必要とせず、溶液中で測定できることに加えて、極めて微量の溶液でも測定し得ることは一分子蛍光検出法の大きな潜在的利点であり、今後一層の周辺技術開発を進めたい。

G. 研究発表

2. 論文発表

- (1) Tsuchiya N, Ohashi J, and Tokunaga K: Variations in immune response genes and their associations with multifactorial immune disorders. *Immunological Reviews* 190: 169-181, 2002.
- (2) Kyogoku C, Dijstelboem M.H, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen D.M, Hashimoto H, Winkel G.J. J, Kallenberg G.M. C, and Tokunaga K: Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: Contribution of FEGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum.* 46(5): 1242-1254, 2002.
- (3) Ohashi J, and Tokunaga K: The expected

power of genome-wide linkage disequilibrium testing using single nucleotide polymorphism makers for detecting a low-frequency disease variant. *Ann. Hum. Genet.* 66: 297-306, 2002.

- (4) 徳永勝士: 疾患感受性遺伝子の探索法. *臨床免疫* 37: 601-604, 2002.
- (5) 徳永勝士: SNP タイピング法. *Medical Science Digest* 28: 30-31, 2002.

3. 学会発表

- (1) Akesaka T, Hori K, Sato K, Takeda C, and Tokunaga K: High-throughput and cost effective genotyping technology using homogenous assay by fluorescence correlation spectroscopy. XIII International Congress of Histocompatibility and Immunogenetics. May 18-22, 2002, Seattle, USA.
- (2) Bannai M, Akesaka T, Hori K, Sato K, Kawashima M, and Tokunaga K: High-throughput and cost-effective SNP typing method using single-molecule fluorescence detection system. 52nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. October 15-19, 2002, Baltimore, USA.
- (3) Tokunaga K, Ohashi J, and Tsuchiya N: Comparative association studies for searching susceptibility genes to complex diseases. 4th HUGO Pacific Meeting and 5th Asia-Pacific Conference on Human Genetics. October 27-30, 2002, Chonburi, Thailand.
- (4) 樋口香織、明坂珠生、古川雅子、山岡恵美、堀邦夫、佐藤和久、坂内誠、徳永勝士: 1分子蛍光分析を用いたハイ

スループット SNP タイピング法. 第 47
回日本人類遺伝学会大会. 2002 年 11
月 13-15 日, 名古屋.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

申請準備中

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

分担研究者 上原 馨志夫

東京大学保健管理センター助教授

研究要旨

遺伝的素因の強い心筋症の原因遺伝子については、これまで実験室レベルでの検討から、いくつかの候補遺伝子の異常が報告されている。このような基礎的成果を臨床的病態へ応用するには、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、前向きを追跡調査をおこない検証する必要がある。本研究では、このような基礎的成果を臨床応用する上で必要とされるシステムの確立を目標とした。心筋症疑いのスクリーニングには、これまで一般的な集団健康診断での心電図と超音波心臓エコー法を用いることで、0.2%程度の割合で検出されることをみいだしてきた。実際、これらのうちには実験室的に証明された心筋症遺伝子であるミトコンドリア遺伝子異常を有するものが含まれることを報告してきた。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の効率的なスクリーニングをおこなうとともに、本研究班で確認された遺伝子異常を含む心筋症遺伝子チップの開発を急ぎ、それを用いた臨床的所見と遺伝子異常の関連づけを進める。

A. 研究目的

心筋症の臨床的スクリーニング法の確立と心筋症原因遺伝子スクリーニング用の遺伝子チップの開発。そのための倫理的管理機構の確立をおこなう

B. 研究方法

東京大学保健管理センターで実施する健康診断データを用いて、心筋症疑いの発症前診断を目的としたスクリーニングの可能性につき検討する。さらに、現在報告のある心筋症原因遺伝子および本研究班がこれまで報告してきたミトコンドリア遺伝子異常を含んだ遺伝子チップを開発し、その検出力等について基礎的検討を行う。

（倫理面への配慮）

保健管理センター内でのスクリーニングを効率的におこなうために、検査実施機関と対象者との倫理面での調節をおこなう独立

した審査委員会を設置する。

C. 研究結果

これまでの基礎的検討から、心電図検査と心エコー法を用いた検討により健康受検者の0.2%で心筋症疑いを検出した。実際、このうち一名において、本研究班が明らかにしたミトコンドリア遺伝子異常が発見されており、本スクリーニング法が心筋症の検出に有効であることをみいだした。健康診断にて検出された心筋症疑いの対象者について、心筋症遺伝子異常を効率的に検出するための遺伝子チップの開発をおこなっている。さらに、研究を進めるうえでの倫理的側面の解決のために、審査委員会の設立を進めている。

D. 考察

保健管理センターでの健康診断成績を使用

し、心電図と超音波心臓検査法を組み合わせることにより臨床的未発症の段階での心筋症スクリーニングが可能であることが実証された。本スクリーニング法を広く健康診断に組み入れることにより、心筋症を疑われる多くの対象者を検出することが可能となる。遺伝子チップの成績と結びつけることでその成因に対して有力な情報が得られるのみならず、未発症段階での検出は発症前治療にも結びつくものであり、対象者への利益のみならず医療経済的な問題にも寄与することが考えられた。

E. 結論

心電図と超音波心臓検査法は心筋症の発症前診断が可能であり、遺伝子チップとの組み合わせによりその成因の解明と治療に道を開くことが期待された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Nagata T, Matsumoto A, **Uehara Y**, Tanaka G, Oonuma H, Hara K, Igarashi K, Hazama H, Hirata Y, Shiratori Y, Omata M: Oxygen abnormalities normoxemic patients with mild liver cirrhosis. *Intern Med* 41(6): 435-440, 2002.
- 2) Hirawa N, **Uehara Y**, Yamakado M, Toya Y, Gomi T, Ikeda T, Eguchi Y, Takagi M, Oda H, Seiki K, Urade Y, Umemura S: Lipocalin-type prostaglandin D synthase in essential hypertension. *Hypertension* 39(part 2):449-454, 2002.
- 3) Hamano K, Totsuka Y, Ajima M, Gomi T, Ikeda T, Hirawa N, Eguchi Y, Yamakado M, Takagi M, Nakajima H, Oda H, Seiki K, Eguchi N, Urade Y, **Uehara Y**: Blood sugar control reverses the increase in urinary excretion of prostaglandin D synthase in diabetic patients. *Nephron* 92(1): 77-85, 2002.
- 4) Negoro H, Shin WS; Hakamada-Taguchi R, Eguchi N, Urade Y, Goto A, Toyo-oka T, Fujita T, Omata M, **Uehara Y**: Endogenous prostaglandin D₂ synthesis is associated with an increase in plasminogen activator inhibitor-1 generation in bovine endothelial cells. *J Hypertens* 20(7): 1347-1354, 2002.
- 5) Hakamada-Taguchi R, **Uehara Y**, Haebara T, Negoro H, Toyo-oka T: The relationship between changes in normal-range systolic blood pressure and cognitive function in middle-aged healthy women. *Hypertens Res* 2002; 25(4): 565-569, 2002.
- 6) Yamamoto T, Yamashita N, Kuwabara M, Nakano J, Sugimoto H, Akiyama K, Hirai K, Ishii A, **Uehara Y**, Ohta K: Mutation screening of the muscarinic m2 and m3 receptor genes in asthmatics, outgrow subjects, and normal controls. *Annales de Genetique* 2002;45:109-113.
- 7) **Uehara Y**: The world of endothelin in the brain of the stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2003; 21(1): 23-25.
- 8) **Uehara Y**: X-linked quantitative trait locus for susceptibility to renal injury. *J Hypertens* 2003; 21(1):15-17.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 1) Hakamada-Taguchi R, Imamura A, Nagahara M, Hasegawa S, Toyo-oka T, Araie M, **Uehara Y**: Microcirculatory hemodynamic changes in normotensive offspring of essential hypertensive patients. 18 Scientific Meeting of International Society of Hypertension, Prague, June 24-27, 2002.
- 2) Hakamada-Taguchi R, **Uehara Y**, Negoro H, Toyo-oka T: Cognitive function in healthy middle-aged women is determined by systolic blood pressure within a normotensive range. 18 Scientific Meeting of International

Society of Hypertension, Prague, June 24-27, 2002.

- 3) Tsuchida T, Eguchi N, Eguchi Y, Nakajima H, Oda H, Seiki K, Taguchi R, Urade Y, **Uehara Y**: Lipocaline-type prostaglandin D synthase in development of adriamycin-induced nephropathy. 18 Scientific Meeting of International Society of Hypertension, Prague, June 24-27, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし