

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

β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

主任研究者 豊岡 照彦

東京大学・医学部・器官病態内科 教授

研究要旨

δ-SG 遺伝子変異の結果、正常のδ-SG 蛋白が発現せず、細胞膜透過性を直接亢進させるとは考えにくい。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。心筋症ハムスターにおける血行動態測定、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は細胞膜から解離して細胞質に移行し、断片化した。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。更にこのジストロフィンの変性は rAAV ベクターを用いた原因遺伝子の補充療法により改善される事が示された。また、現在進行中の細胞移植による心不全治療の途中経過も併せて報告する。

研究協力者

中田樹海	東京大学大学院 医学系研究科
手塚あさき	東京大学医学附属病院
左合典子	東京大学大学院 医学系研究科

筋細胞膜のジストロフィンの二次的な崩壊が誘発され、骨格筋の Duchenne 型筋ジストロフィー様の病変が心筋に特異的に起きた結果と考え、その作業仮説を検証する。筆者らは上記 DCM ハムスターを用いて心不全の進行を確認しながら同時にジストロフィンの変化と細胞膜の透過性を検討した。

A. 研究目的

拡張型心筋症に代表される重症心不全は難治性で心臓移植が最終治療と目されるが、心臓移植には未だ脳死問題等の社会的にも、術後の患者の QOL 医療面でも代替医療の開発は急務である。ex vivo における遺伝子治療と移植医療を結合させた新たな治療戦略を開発する。

特に今までの研究結果では先天性の遺伝子欠損に由来する疾患が成人後に著明になるか説明ができなかった。その機序を解明する事は心不全を増悪させる因子の解析にも繋がり、治療法を開発する上で重要なステップである。心不全の重症化する機構として筆者らはδ-SG 蛋白の欠損自体ではなく、心

B. 研究方法

1. 心不全の進行過程の確認

正常対照の F1B 系と拡張型心筋症を発症する TO-2 系ハムスター(1)を用い、5 から 40 週迄、心機能を血行動態に影響の少ないエンフルランによる全身麻酔下に両心カテーテル検査を既報 (Kawada et al., BBRC, 2001; Kawada et al., PNAS, 2002)に従って施行した。

2. ジストロフィンの免疫組織学的検討

血行動態の測定後に心筋を摘出、固定し、ジストロフィンの rod domain に対する特異抗体を用いて蛍光顕微鏡下に観測した(Kawada et

al., PNAS, 2002)。

3. 心筋細胞膜の *in vivo* 透過性の検討

一部の動物では生理的な細胞膜を透過しない Evans blue を静脈投与し、3 時間後に心筋を分離して、先と同様に固定後に蛍光観測した。この時ジストロフィンの局在との関連を正確に確認するために、同一の視野で二重蛍光観測法を用いた(Kawada *et al.*, PNAS, 2002)。

4. rAAV による遺伝子治療

既に我々は rAAV を用いて、生体に無害で長期間 transgene を発現可能な事を示した。遺伝子設計、全身麻酔と開胸手術下の遺伝子投与方法も既に記載した(Kawada *et al.*, PNAS, 2002)。

5. 細胞移植による心不全治療の予備検討

心筋病変が進行後の治療を考慮して、正常対照の F1B の皮膚を先祖を共有し、心不全を呈する T0-2 の皮膚に移植して拒絶反応の有無を病理組織学的に確認した。次に骨格筋由来の筋芽細胞を大腿四頭筋より既報により単離して、組織培養後に T0-2 の骨格筋または心筋に移植した。特に心筋の場合は人工呼吸下に心尖部に投与し、4 週後に免疫組織学的に検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子治療については文部科学省に届けた手技を遵守した。また動物実験にあたり苦痛を極力排除するために、可能な限り、全身麻酔下に行った。

C. 研究結果

1. 心臓カテーテルによる検査の結果。

全週齢を通して左室圧(LVP)、その最大上昇速度(dP/dt_{max})、最大下降速度(dP/dt_{min})が悪化していた。特に DCM 動物は正常対照と比較して生後 25-40 週目に心機能の中の最大下降速度(dP/dt_{min})、左室拡張末期圧(LVEDP)と中心静脈圧(CVP)を中心とした拡張機能が急速に悪化する事が示され、ヒト臨床例と共通した病態を示した(図 1)。

2. 病理組織学的検討。

上記の心不全が著明になる前の生後 5 週では特にジストロフィンの細胞膜に局在する像は正常対照と変わらない。しかし心機能が増悪した 25-40 週目にジストロフィンの一部が細胞膜から遊離して細胞質に translocate し、この細胞は前述したエヴァンスブルーを取り込み、細胞膜の透過性が亢進している事が示された(図 2)。一部の心筋細胞で膜に存在するジストロフィンが細胞膜から細胞質へ移行し、その細胞に完全に一致してエヴァンスブルー(EB)が取り込まれていた。

3. 心不全に伴うジストロフィンの限定分解。

更に Western blotting により生後 5 週までは正常動物と同様 430kD の単一バンドのみ認められたが、25-40 週目にジストロフィンが徐々に分解し、断片化する事が示された(図 3, Nakata *et al.*, in submission)。これは前記の心不全が増悪し、ジストロフィンが translocation する時期と良く一致する。心不全の進行に伴い主として 60kD 周辺に、一部 80-90kD に断片化したジストロフィンを認めた。なお同様のジストロフィンの断片化はイブ°ロレノール投与後の急性心筋障害時にも認められる(Xi *et al.*, J.Cardiovasc.Pharmacol., 2000)。従って、これ

らの所見は非特異的な蛋白分解ではなくて、蛋白分解酵素による限定分解を強く示唆する。

4. 遺伝子治療による心筋細胞膜の正常化。

特に注目すべき結果として既に発表した rAAV ベクターを用いて *in vivo* に正常配列の δ -SG 遺伝子を強制発現させた結果、図 4 の上半分に限局して transgene が発現した。この部分をジストロフィン抗体で免疫染色すると細胞膜のみに限局していた。しかし、たまたま transfect されず、transgene が認められなかった下半分の細胞群では図 4 に示すように同一視野で、ジストロフィンが先の TO-2 の結果と同様に translocation していた。これは δ -SG 蛋白はジストロフィンの translocation を防止している事を示す。

6. 皮膚および骨格筋芽細胞移植。

F1B と TO-2 は先祖を共通にする事から移植後も拒絶反応を呈さない可能性が有る。これを検証するために、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クアージや炎症反応などは全く認められず、移植の境界部分も認められなかった点に示された(図 5)。

次に F1B の大腿四頭筋から筋芽細胞 (myoblast) を分離し、*in vitro* で約 20 倍に増殖させた。これを骨格筋に投与して生着していた。こうした検討に基付き開胸手術下に左室心筋層に投与して 4 週目に δ -SG の特異抗体で免疫染色した。その結果、本来 δ -SG 遺伝子を持たない TO-2 の心筋は δ -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

胞膜に一致して δ -SG 蛋白を認めた。

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、細胞質へ遊離して断片化する事が示された。これらの結果は DCM の重症化は δ -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た結果とする我々の仮説を支持する。また骨格筋芽細胞の移植により同種間で心筋に生着する事が判明した。

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、ジストロフィンは崩壊し、細胞膜から解離して細胞質に移行し、断片化した。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。また、このジストロフィンの変性は原因遺伝子の補充療法により改善される事が示された。また骨格筋芽細胞は心筋に生着する事は今後の細胞移植治療に大きな希望を与える。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toyooka T, Kawada T, Nakazawa M, Yoshida H, Xi H, Masui F, Hemmi C,

- Urabe M and Ozawa K. Gene therapy of advanced heart failure secondary to disruption of dystrophin-related proteins (review), *Heart, Lung & Circulation* 11; 174-81, 2002.
2. Kawada T, Nakazawa M, Nakauchi S, Yamazaki K, Shimamoto R, Urabe M, Nakata J, Nakajima T, Suzuki J, Sato H, Ozawa K and Toyo-oka T. Rescue of hereditary dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 99; 901-6, 2002.
 3. Terasawa K, Nakajima T, Iida H, Iwasawa K, Oonuma H, Jo T, Morita T, Nakamura F, Fujimori Y, and Toyo-oka T. Nonselective cation currents regulate membrane potential of rabbit coronary arterial cell: modulation by lysophosphatidyl- choline. *Circulation* 106:3111-9, 2002.
 4. Negoro H, Shin WS, Hakamada-Taguchi R, Eguchi N, Urade Y, Goto A, Toyo-oka T, Fujita T, Omata M, and Uehara Y. Endogenous prostaglandin D2 synthesis reduces an increase in plasminogen activator inhibitor-1 following interleukin stimulation in bovine endothelial cells. *J.Hypertens.* 20:1347-54, 2002.
 5. Hakamada-Taguchi R, Uehara Y, Haebara T, Negoro H, and Toyo-oka T. The relationship between changes in normal-range systolic blood pressure and cognitive function in middle-aged healthy women. *Hypertens.Res.* 25:565-9, 2002.
 6. Shin WS, Hemmi C, and Toyo-oka T. Co-culture and crosstalk between endothelial cells and vascular smooth muscle cells mediated by intracellular calcium. *Methods Mol.Biol.* 188:347-57, 2002.
 7. 河田登美枝、仲澤幹雄、豊岡照彦. 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. *日本薬理学雑誌* 119 : 37-44, 2002.
2. 学会発表
1. T. Toyo-oka, H. Xi, T. Kawada, M. Nakazawa, M. Koshimizu & S. Takeo. 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- International Congress on Cardiomyopathies and Heart Failure.
 2. T. Kawada, J. Nakata, M. Nakazawa, M. Koshimizu, C. Hemmi, S. Fukuda, S. Takeo & T. Toyo-oka. Disruption of dystrophin and dystrophin-related proteins is a trigger of advanced heart failure of both hereditary and acquired origins. XXIV Annual Congress of the European Society of Cardiology.
 3. T. Toyo-oka, N. Sago, C. Hemmi, A. Hirata, A. Tezuka, J. Nakata, T. Kawada & M. Nakazawa. Paradoxical Amelioration of Monocrotaline-Induced pulmonary hypertension and right ventricular Failure by NOS Inhibitor, L-NAME. AHA Scientific Sessions 2002.
 4. T. Kawada, M. Nakazawa, S. Takeo & T. Toyo-oka. Symposium "Cardiac hypertrophy and heart failure" Assessment of novel paradigm for the development of

- advanced heart failure. 第 19 回国際心臓研究学会日本部会.
5. J. Nakata, T. Kawada, M. Nakazawa, C. Hemmi, K. Iwasawa, H. Hikiji, T. Takato & T. Toyo-oka. Progressive degradation of dystrophin in hamster hearts with dilated cardiomyopathy. 第 19 回国際心臓研究学会日本部会.
 6. 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-第 75 回薬理学会年会.
 7. 河田登美枝、奚 航、仲澤幹雄、小清水美希、竹尾 聡、豊岡 照彦. 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. 第 66 回日本循環器学会.
 8. 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. 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. 第 25 回心筋代謝研究会.
 9. 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. 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. 第 53 回日本薬理学会北部会秋田 2002 年 9 月 20, 21 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
現在、米国特許と国内特許を申請中である。
2. 実用新案登録
3. その他

図 1.

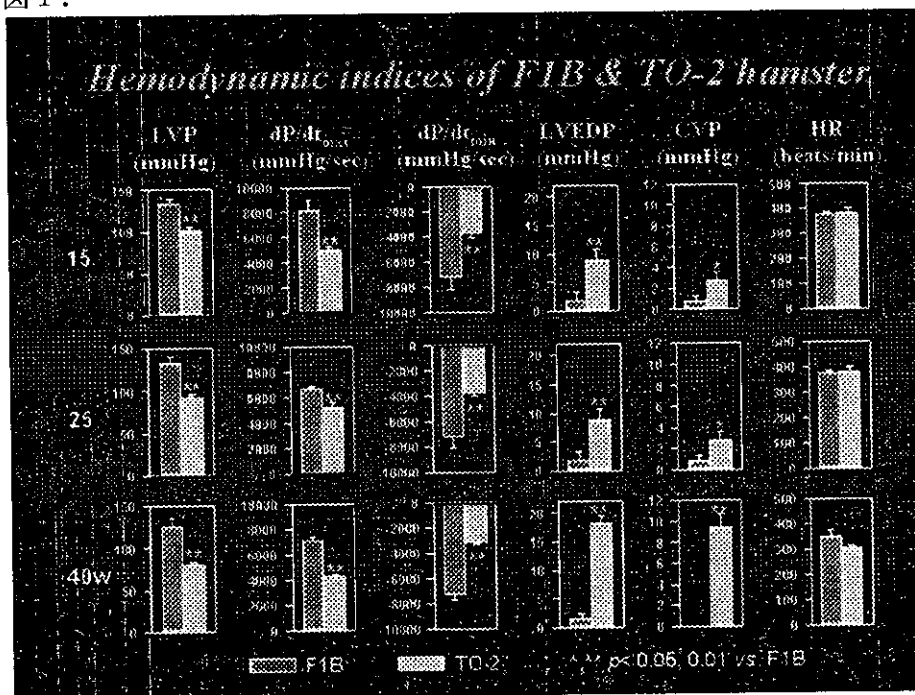


図 2.

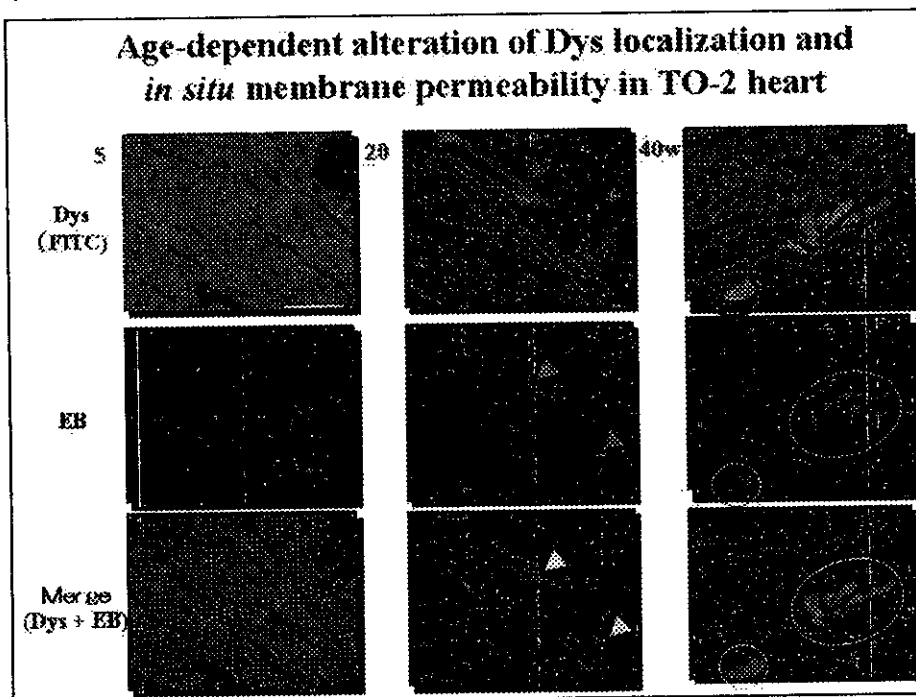


図3.

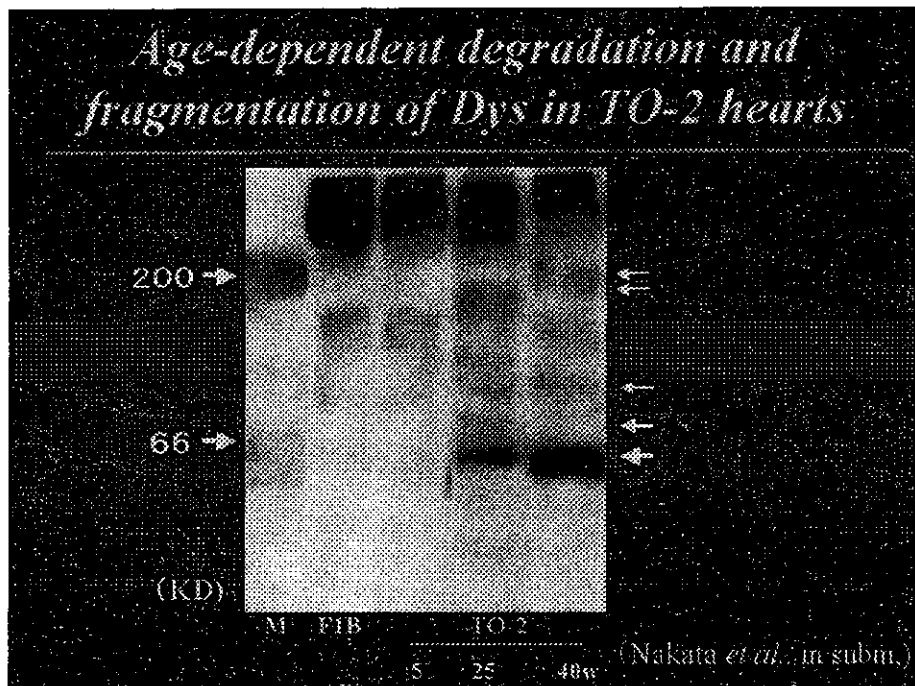


図4.

Amelioration of dystrophin translocation after local transduction of δ SG gene

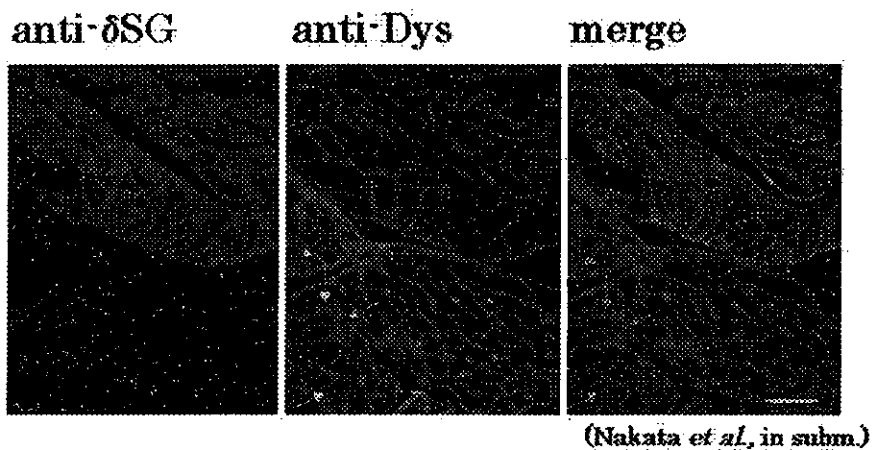


图 5.

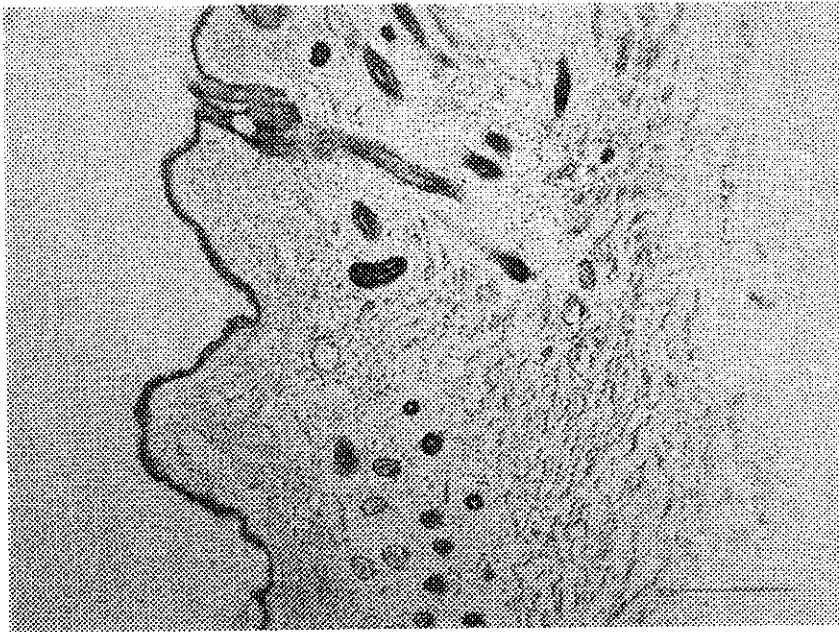
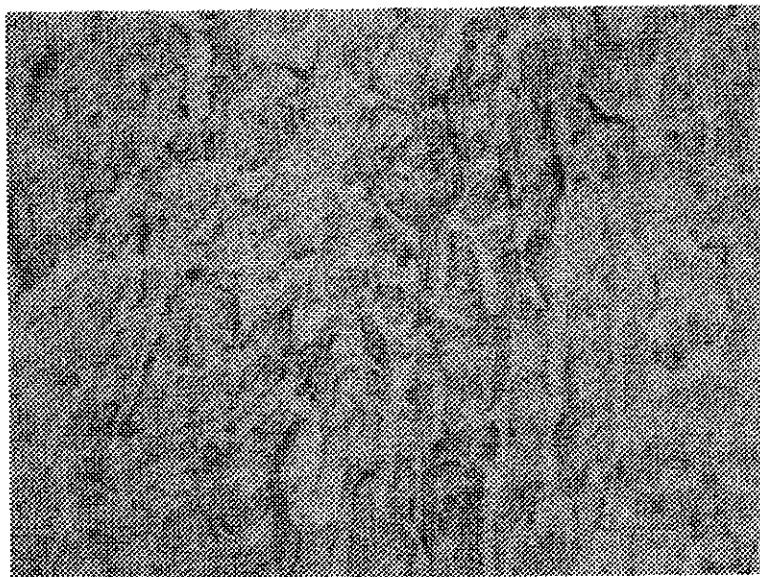


图 6.



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版者名	出版地	出版年	ページ
Shin WS, Hemmi C and Toyo-oka T.	Coculture and cross talk between endothelial cells and vascular smooth muscle cells mediated by intracellular Ca^{2+} .	C. Wise	<i>Methods in Molecular Biology</i> , Council Press	Medical Research Council Press	London	2001	347-357

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawada T, Nakazawa M, Sakamoto A, Urabe M, Wang Y, Shin WS, Sato H, Monahan J, Ozawa K, and Toyo-oka T.	Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV vector-mediated somatic gene therapy.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> ,	99	901-906	2002
Toyo-oka T, Kawada T, Hang Xi, Nakazawa M, Masui F, Hemmi C, Nakata J, Tezuka A, Iwasawa K, Urabe M, Monahan J and Ozawa K	Gene therapy prevents disruption of dystrophin-related proteins in a model of hereditary dilated cardiomyopathy in hamsters.	<i>Heart, Lung and Circulation</i>	11	174-181	2002
Terasawa K, Nakajima T, Iida H, Iwasawa K, Oonuma H, Jo T, Morita T, Nakamura F, Fujimori Y, and Toyo-oka T.	Nonselective cation currents regulate membrane potential of rabbit coronary arterial cell: modulation by lysophosphatidyl- choline.	<i>Circulation</i>	106	3111-9	2002
Negoro H, Shin WS, Hakamada-Taguchi R, Eguchi N, Urade Y, Goto A, Toyo-oka T, Fujita T, Omata M, and Uehara Y.	Endogenous prostaglandin D2 synthesis reduces an increase in plasminogen activator inhibitor-1 following interleukin stimulation in bovine endothelial cells.	<i>J.Hypertens.</i>	20	1347-54	2002
Rashid M, Nakazawa M, and Nagatomo T	Effects of sarpogrelate, a novel 5-HT2 antagonist, on 5-HT-induced endothelium-dependent relaxations in porcine coronary artery.	<i>Japan.J. Pharmacol.</i>	89	405-412	2002
Hakamada-Taguchi R, Uehara Y, Haebara T, Negoro H, and Toyo-oka T	The relationship between changes in normal-range systolic blood pressure and cognitive function in middle-aged healthy women.	<i>Hypertens. Res.</i>	25	565-9	2002
Watanabe K, Takahashi T, Nakazawa M, Wahed M, Fuse K, Tanabe N, Kodama M, Aizawa Y, Ashimo H, and Tazawa S	Effects of carvedilol on cardiac function and cardiac adrenergic neuronal damage in rats with dilated cardiomyopathy.	<i>J. Nucl. Med.</i>	43	531-535	2002
Rashid M, Watanabe M, Nakazawa M, and Nagatomo T	AT-1015, a newly synthesized 5-HT2 receptor antagonist, dissociates slowly from the 5-HT2 receptor sites in rabbit cerebral cortex membrane.	<i>J. Pharm. Pharmacol.</i>	54	1123-1128	2002
Tsuchiya N, Ohashi J, and Tokunaga K	Variations in immune response genes and their associations with multifactorial immune disorders.	<i>Immunological Reviews</i>	190	169-181	2002
Kyogoku C, Dijkstra M.H, Tsuchiya N, Hattai Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen D.M, Hashimoto H, Winkel G.J. J, Kallenberg G.M. C, and Tokunaga K	Fcy receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: Contribution of FcGR2B to genetic susceptibility.	<i>Arthritis Rheumatism</i>	46(5)	1242-1254	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohashi J, and Tokunaga K	The expected power of genome-wide linkage disequilibrium testing using single nucleotide polymorphism markers for detecting a low-frequency disease variant.	<i>Ann. Hum. Genet.</i>	66	297-306	2002
徳永勝士	疾患感受性遺伝子の探索法	臨床免疫	37	601-604	2002
Setoguchi Y, Ohnuki T, Rashid M, Nakamura T, Hattori K, Nagatomo T, Watanabe K, Mitomi A, and Nakazawa M	Effects of chronic administration of sarpegrelate on systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats: comparison with quinapril.	<i>Pharmacology</i>	64	71-75	2002
Yamamoto T, Yamashita N, Kuwabara M, Nakano J, Sugimoto H, Akiyama K, Hirai K, Ishii A, Uehara Y and Ohta K	Mutation screening of the muscarinic m2 and m3 receptor genes in asthmatics, outgrowth subjects, and normal controls.	<i>Annales de Genetique</i>	45	109-113	2002

20020835

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.48- P.49の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。