20030696

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

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１５年度　総括・分担研究報告書

平成１６年（２００４）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

1 昆虫細胞を利用した5型アデノ随伴ウイルスベクターの大量作製に関する研究・　・5

自治医科大学・遺伝子治療部　小澤敬也

2 重症性心筋機能障害症の予防治療法開発に向けて・・・・・・・・・・・・・・・・・・7

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・・・・・・・・・　・・・9

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に関する研究・・・・・17

新潟大学・医学部・保健学科　仲澤幹雄

5 心不全の重症化機構の新しい概念・・・・・・・・・　・・・・・・・・・・・・・・・21

新潟大学・医歯学総合病院・薬剤部　河田登美枝

6 血管内膜肥厚に対する IP_3 の関与について・・・・・・　・・・・・・・・・・・・・28

東京大学大学院・血管外科学分野　重松　宏

7 新規SNP解析技術の開発および筋疾患モデル動物作出に関する研究・・・・・・・32

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 重症心不全時における心筋ﾉ ｽﾄﾛﾌｨﾝ関連蛋白発現量低下の分子ﾒｶﾆｽﾞﾑ・・・・　・34

群馬大学大学院　臓器病態薬理学　熊谷　啓之

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・・・・・・・38

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・・・・・・・・・・　・・・・・・・・・・・・43

IV　研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　・・・・47

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)
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）

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(DCM)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移植が最終治療と目されているが、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2年度目の進捗状況を報告する。①筆者らが既にｸﾛｰﾆﾝｸﾞした数種の変異遺伝子の頻度を新たに開発した診断法により厚生労働省特発性心筋症研究班で調査するﾜｰｷﾝｸﾞｸﾞﾙｰﾌﾟを発足させた。②小型ﾓﾃﾞﾙ動物でrescueに成功した遺伝子治療の成果と、ﾋﾄのﾃﾞｰﾀから心不全が一般にﾃﾞｽﾄﾛﾌｨﾝの崩壊により重症化する機構を提唱した。これは循環器研究における大きな進展と考えられ、*Proc Natl Acad Sci USA* に投稿して受理された。③ﾊﾞｷｭﾛｳｲﾙｽにより rAAV の大量生産が可能となり、大型動物実験が可能となった。④臨床例では患者は心筋変性の進行後に治療を求める事を考慮して、細胞移植治療に関する予備検討を行った。同系の正常動物から骨格筋芽細胞を単離して培養・増幅後にﾓﾃﾞﾙ動物の心筋に投与して生着する事を確認した。その時に病理組織学的所見も改善し、apoptosis も軽減した⑤ﾋﾄ型 DCM をｻﾙで作成する為に、文部科学省大臣許可を頂いた平成 15 年 10 月より国立感染症研究所、霊長類ｾﾝﾀｰで行っている。先ず、ｱｶｹﾞｻﾞﾙを用いてﾍﾞｸﾀｰ自体の安全性確認実験を正常対照動物と心不全動物で開始した。

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
熊谷　啓之
群馬大学・薬理 助手

当該年度は当初の計画通り準備段階から遺伝子治療の実践を強力に推進した。特に vector の新規開発と心不全の重症化機構に関して、飛躍的な進展が得られた。以下、簡略に各々の結果を記載する。

分担研究者の小澤は昆虫細胞を利用した５型ｱﾃﾞﾉ随伴ｳｲﾙｽﾍﾞｸﾀｰの大量作製に関して、生体に無害かつ長期間発現可能筋組織で高効率で外来遺伝子の発現が期待される５型ｱﾃﾞﾉ随伴ｳｲﾙｽﾍﾞｸﾀｰ(AAV)を昆虫細胞、組換えﾊﾞｷｭﾛｳｲﾙｽを用いて作製する手法を開発した。この方法では大量の AAV ベクターを簡便かつ安価に作製可能であり、今後 AAV ベクターの臨床研究を強力に推進すると期待される。

分担研究者の倉地は重症心機能障害の予防治療法開発に向けて研究を進め、年齢軸

に沿った恒常性調節の最初の分子機構を解明し、それらの知識を基盤に年齢軸工学を開発しつつある。心筋において長期安定的に高い遺伝子発現を可能にするﾃｸﾉﾛｼﾞｰの開発も進んでおり、その応用の一環として本研究ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑにおいてδ-sarcoglycan(SG)欠損に由来する重症性心不全症の治療法開発に向けた研究の一端を展開してきた。一方、東大の豊岡らにより、この疾患発症の最終段階である筋ｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝ分解はｶﾙﾊﾟｲﾝによって引き起こされる可能性が示唆された。つまり、δ-SG欠損に起因してｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝの細胞質中蛋白分解酵素による限定分解が亢進し、細胞質への放出が引き起こされる事である。従って、治療法開発には、δ-SG補充又はｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝ分解の抑制の両面がある事になる。これまで、δ-SG過剰発現用のrAAVﾍﾞｸﾀｰの基本構造構築を行ってきた。しかし、研究ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑ全体の調整から、倉知らは改めてｶﾙﾊﾟｲﾝの活性を抑制する方法の開発に主力を移す事とし、まずｱﾝﾁｾﾝｽRNAｱﾌﾟﾛｰﾁの開発を行い、ｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝｱﾝﾁｾﾝｽRNAを生産するrAAVﾍﾞｸﾀｰの開発を進めている。年齢軸工学の技術を応用し、特に心筋に高い発現を見せるﾍﾞｸﾀｰ構造の構築が可能になった。

分担研究者の川口は細胞内蛋白分解酵素による筋細胞膜蛋白障害に関して、肢帯筋型筋ｼﾞｽﾄﾛﾌｨｰの発症原因として、細胞内蛋白分解酵素の一つであるｶﾙﾊﾟｲﾝ3との関係が明らかにされた。本研究ではSGに対するｶﾙﾊﾟｲﾝの作用を検討した。その結果、ﾋﾄ培養骨格筋細胞ではｶﾙﾊﾟｲﾝがα-およびβ-SGを分解することが明らかになり、一方ｶﾙﾊﾟｲﾝｻﾌﾞﾀｲﾌﾟのｶﾙﾊﾟｲﾝ3はSGの分解に関与しない事を見出した。

なお、この結果は平成15年度に豊岡らが発表した心筋梗塞後の心不全ﾗｯﾄ左室残存心筋組織内でα-とβ-SGが減少するが、δ-SGは不変である事とよく一致する(Yoshida *et al*, *Cardiovasc Res*, 2003)。

分担研究者の仲澤はﾌﾟﾛﾃｵｰﾑ解析による心不全の発症に関わるﾀﾝﾊﾟｸ質に関する研究を更に進め、心不全治療の新しい可能性を探るため、心筋に発現しているﾀﾝﾊﾟｸ質の網羅的な解析を用い心不全の発症と進展に関係する情報伝達系を同定することを目指し、自己免疫性心筋炎に伴う心不全時の心筋ﾀﾝﾊﾟｸ質の変動にﾌﾟﾛﾃｵｰﾑ解析を適用した。今回は急性期における心筋ﾀﾝﾊﾟｸ質の変動を自己免疫性心筋炎発症前後で経時的に測定した。心筋炎を誘発するためのﾌﾟﾀﾐｵｼﾝ投与前（0週）、投与後1,2,3,4週目で測定用の心筋ｻﾝﾌﾟﾙを採取し二次元電気泳動による量的な変化を測定、その結果にｸﾗｽﾀｰ解析を適用し、①可溶性画分のﾀﾝﾊﾟｸ質が濃度的に有意な変動を起こさない群、②1週後および2週後から増加する群、および③ﾐｵｼﾝ投与前より減少する群の3群に分けられることか示された。

分担研究者の河田は東大の豊岡らと共同研究を推進した結果、心不全の重症化機構の新しい概念を次のように提唱した。

拡張型心筋症（DCM）ﾊﾑｽﾀｰ（TO-2）ではｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝ関連ﾀﾝﾊﾟｸ複合体（dystrophin-associated proteins, DAP)の一つのδ-SG遺伝子が欠損していた(Sakamoto A *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997)。ｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝは細胞膜直下にあり、DAPと複合体を形成している。

今年度はｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝ量と心機能、あるいは生存率との関連を詳細に検討した結果、心不全の重症化に伴い、ｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝは減少し、逆に 60kD ﾀﾝﾊﾟｸは増加した。その変化は収縮機能と拡張機能の悪化及び生存率と密接に関係していた。また、ｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝの細胞質から細胞膜へのｼﾌﾄ及び細胞膜透過性亢進とも関連していた。これらの結果はｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝの断片化が心不全の重症化の原因であるとする筆者らの仮説を支持する。

分担研究者の重松は平滑筋増殖による血管内膜肥厚に対する Inositol 1,4,5-tris-phosphate (IP_3)の関与について、検討している。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、IP_3 Receptor (IP_3R)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。IP_3-R type 1 hetero knock out (KO) mouse, IP_3 type 2 homo KO mouse, IP_3 type 3 homo KO mouse および対照 mouse に対し，左頚動脈結紮処理を加え、28 日後に検体を摘出して組織学的に検討した。なお IP_3R type 1 homo KO mouse は幼弱期に死亡するため、今回の実験には適さなかった。Neointima area / media area 比は全ての KO mouse 群で有意に小さく、内膜肥厚の抑制を認めた。今後の検討が必要であるが、IP_3R の血管内膜肥厚への関与が示された。

この研究は心肥大に際してｱﾝｼﾞｵﾃﾝｼﾝ-II やｴﾝﾄﾞｾﾘﾝによる心肥大過程で、IP_3 の関与が強く示唆される状況にあり、心肥大から心不全に至る高血圧性心不全の重症化機構とも関連すると予想する。

分担研究者の徳永は簡便な遺伝子診断と RNAi による遺伝性筋疾患モデル動物作出に関する研究を行ない、(1)多因子疾患の感受性遺伝子探索にはﾊｲｽﾙｰﾌﾟｯﾄ SNP 解析法が必須である。ｷｬﾋﾟﾗﾘｰ型自動ｼｰｸｴﾝｻｰと SSCP 法を組み合わせることにより、1 回の泳動で同時に 4-8 SNPs を解析できる方法、および 100 検体以上をﾌﾟｰﾙした試料における SNP 対立遺伝子頻度を推定する方法を確立した。(2)遺伝性筋疾患をはじめとする様々な遺伝性疾患の病態解析及び治療法開発のために、ﾓﾃﾞﾙ動物の利用が不可欠である。簡便な遺伝子ﾉｯｸﾀﾞｳﾝ法として近年注目されている RNA interference (RNAi) 法を用いて、遺伝性筋疾患モデル動物作出のための基礎的研究を行った。

分担研究者の熊谷はサルコグリカン (SG) 複合体が、心筋の細胞内骨格と細胞外基質を橋渡すことにより細胞膜安定性に寄与している。近年、TO-2 ハムスターの遺伝性心筋症が δ-SG 欠損に起因することがわかり、さらに δ-以外の SG の発現低下がヒト慢性心不全一般に見出されるに至った。この蛋白量減少には転写後の機序が想定されている。その傍証を得るため、冠動脈結紮による心不全モデルラットと対照ラットの心筋 SG 転写量を現在厳密に検討している。

研究代表者の豊岡は 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以下の研究を推進した。

1)心不全の重症化機構の新たな概念。
2)細胞移植による心不全治療。
3) RNAi による心不全増悪因子の発現抑制。
4)ｻﾙを用いた心不全状態の作製。

その結果は豊岡の報告(p38)に詳述する。

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

昆虫細胞を利用した５型アデノ随伴ウイルスヘクターの大量作製に関する研究

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
心筋などの筋組織で高効率で外来遺伝子の発現が期待できる５型アデノ随伴ウイルス(AAV)ヘクターを昆虫細胞、組換えハキュロウイルスを用いて作製する手法を開発した。この方法ては大量の AAV ヘクターを簡便かつ安価に作製することができ、AAV ヘクターの臨床研究を強力に推進することが可能となると考えられる。

研究協力者
ト部匡司　　自治医科大学

A　研究目的

アデノ随伴ウイルス(AAV)ヘクターは心筋、骨格筋に効率良く外来遺伝子を導入することができ、かつ長期発現が期待できる。２型 AAV ヘクターを昆虫細胞とハキュロウイルスを用いて作製する方法は簡便に大量の AAV ベクターを調製することを可能とする。５型 AAV ヘクターは筋組織に２型よりも高効率で遺伝子を導入できることから、昆虫細胞で５型 AAV を作製する方法を確立することは５型 AAV ヘクターの臨床応用をめざすには重要と考えられる。

B　研究方法

２型作製の場合と同様、５型 Rep 蛋白質、VP 蛋白質を発現する組換えハキュロウイルスを作製した。またレポーター遺伝子として GFP を５型 AAV の inverted terminal repeat で挟んだ GFP ハキュロウイルスも作製した。３種の組換えハキュロウイルスを培養昆虫細胞である Sf9 細胞に同時感染させ、３日間培養し、産生された AAV 粒子を塩化セシウム密度勾配超遠心により精製し、その物理学的性状を検討した。AAV ヘクターの力価は AAV ベクター遺伝子コピー数をリアルタイム PCR 定量することにより決定した。従来法で作製した５型 GFP ヘクターと生物学的性状を比較するため同し dose で COS 細胞に感染させ GFP 陽性細胞数を比較した。

（倫理面への配慮）

当該研究は動物を実験に利用していないため、倫理面での配慮は必要ないと思われる。

C　研究結果

塩化セシウム密度勾配超遠心後、分画化しリアルタイム PCR にて GFP 遺伝子を定量したところ 1 4g/cm^3 画分にピークが存在した。一昆虫細胞あたり約 20,000 粒子の５型 AAV ヘクターが産生されたと推定できた。VP 蛋白質のウエスタン解析では VP2,3 の量は従来法で作製した AAV ヘクターとほぼ同一であったが VP1 の量が少なかった。VP1

の発現を高めるため、５型 VP1 蛋白質のアミノ末端を２型の対応する部分に置き換えたところ、VP1 量は従来法で作製した５型 AAV ヘクターと同程度となった。従来法で作製した GFP ヘクターと昆虫細胞で作製した VP 改変 GFP ヘクターを同力価で COS 細胞に感染させたところほぼ同程度の GFP 陽性率であった。

D　考察

Rep、VP、GFP ハキュロウイルス感染 Sf9 細胞溶解液の塩化セシウム密度勾配超遠心による解析から GFP 遺伝子含量のピークは 1 4g/cm³ 付近にあった。AAV 粒子の密度は 1 4g/cm³ であることから昆虫細胞でも５型 AAV ベクターを作製することか可能であることが分かった。当初予定していた５型 VP 蛋白質の発現方法では AAV 粒子中の VP1 含量か少なかったことから５型 VP1 の一部を２型の相同部分と置き換えたところ、VP1 含量が増加し、従来法て作製した AAV ヘクターの VP1 量と遜色ない状態となった。このキメラ VP を持つ GFP ヘクターは COS 細胞の感染性において、従来法で作製した GFP ヘクターとほぼ同程度であることか分かった。

バキュロウイルスを用いて AAV ベクターを作製する方法は容易にスケールアップか可能であり、AAV ヘクターの臨床応用の促進に直接結びつく成果であると考えられる。

E　結語

５型 AAV ヘクターを昆虫細胞で作製する方法を開発した。昆虫細胞で作製した GFP ヘクターは従来法て作製したものと物理学的性状、生物学的性状かほぼ同しであることか分かった。

F　健康危険情報

該当なし

G　研究発表

1　論文発表　Urabe, M, Kogure, K, Kume, A, Sato, Y, Tobita, K, and Ozawa, K Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration *J Gen Virol* 84 2127-2132, 2003

2　学会発表　卜部匡司、小倉剛、水上浩明、Kotin Robert、小澤敬也　1, 5 型組換えアデノ随伴ウイルスの昆虫細胞での作製の試み　第 51 回日本ウイルス学会学術集会総会　京都　2003 年 10 月 27-29 日（プログラム抄録集　p333)

H　知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。)

1　特許出願　Production of adeno-associated virus in insect cells Kotin, Urabe, and Ding US 2003/0148506 A1 Aug 7, 2003

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

重症性心筋機能障害症の予防治療法開発に向けて

分担研究者　倉地　幸徳
独立行政法人　産業技術総合研究所　年齢軸生命工学研究センター・センター長

研究要旨
先に我々は年齢軸に沿った恒常性調節の最初の分子機構を解明し、それらの知識を基盤に年齢軸工学を開発しつつある。心筋において長期安定的に高い遺伝子発現を可能にするテクノロジーの開発も進んでおり、その応用の一環として本研究プログラムにおいてδ-sarcoglycan(delta-SG)欠損に由来する重症性心不全症の治療法開発に向けた研究の一端を展開してきた。最近東京大学豊岡研究室において、この疾患発症の最終段である筋ジストロフィン分解はカルパインによって引き起こされる可能性が示唆された。つまり、δ-SG 欠損に起因してジストロフィンの細胞質中蛋白分解酵素による限定分解が亢進し、細胞質への放出が引き起こされる事である。従って、治療法開発には、δ-SG 補充又はジストロフィン分解の抑制の両面がある事になる。これまで、δ—SG 過剰発現用の r AAV ベクターの基本構造構築を行ってきた。しかし、研究プログラム全体の調整から、我々は改めてカルパインの活性を抑制する方法の開発に主力を移す事とし、まずアンチセンス RNA アプローチの開発を行い、ジストロフィンアンチセンス RNA を生産する rAAVベクターの構築を進めている。年齢軸工学の技術を応用し、特に心筋に高い発現を見せるベクター構造の構築が可能になった。

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：悪性筋疾患予防治療法の開発。筋ジストロフィンの安定化を目指してδ—SG の過剰発現を目指す rAAVの基本となるベクター構築を行ってきたが、分解を抑制する方向からのアプローチへの転換を図り、細胞内カルパインの抑制を安定、効果的に行う rAAVベクターの開発を行う。

B．研究方法

rAAVベクターの基本構造構築を行う。これは年齢軸で長期安定及び組織特異性が至適化されたものである。ヒトカルパインのアンチセンス RNA 生産用の rAAVの構築を行う。ヒトカルパインの mRNAの５領域、転写開始点を含むほぼ２５０ヌクレオチドの領域を CMV プロモーターに接続し、過剰発現が出来るベクターを構築する。次に骨格筋マイオブラストを用いて発現レベルの解析を行う。

（倫理面への配慮）
これらの実験にはヒト、動物実験に関与する倫理的問題は含まれていない。

C．研究結果

δ—SG の過剰発現から、カルパイン発現への方向転換で研究はこれから本格化する。rAAVベクターの基本構造は研究室に既に構築され、その活性、性質の解析は進んでいる。カルパインのアンチセンス RNA 過剰発現ベクターのデザインは出来ており、近い将来には本格的テストが可能になる予定である。

D．考察

重症性心不全の主原因がδ—SGの欠損、又は機能不全によるジストロフィンの不安定化、限定分解、細胞質内への放出、と言う機構である事を証明する豊岡研の新しい成果は重要で、その結果、この疾患の予防、治療法開発に二面性、つまり、δ—SGの補充による方法とジストロフィン分解を抑制する方法がある事がより明確となった。討議の結果、この研究班に参加している多彩な研究室のスキルを考慮し、当研究室は後者、特にカルパインをターゲットとする事に方針変更を行った。心筋細胞に非常にアフィにティーの高いｒAAV ベクターに我々が研究を進めてきている年齢軸恒常性機構の研究から、心筋における発現特異性を大きく高める事ができる仕掛けを加える事により、このアプローチの目的を達成していくことが可能であると考察する。

E．結論

心筋における遺伝子、アンチセンス RNA 過剰発現用ベクターとして、ｒＡＡＶベクターが適当であることの確認をし、心筋細胞のカルパイン活性の抑制を行うアプローチがより優れた新規治療法開発に適切である、との重要な結論を得た。この新規アプローチの実現に向かってのストラテジー作成を可能にした。

F．健康危険情報

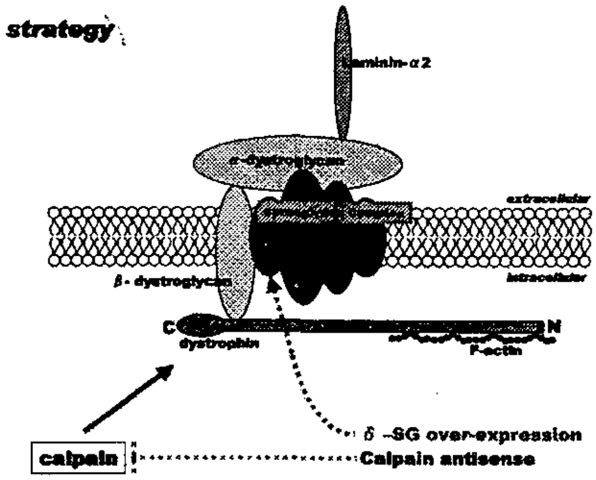
該当なし

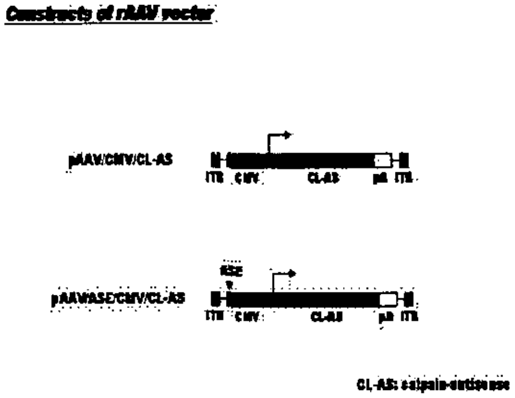
G．研究発表

本年度、直接関連したものはなし

H．知的財産権の出願・登録状況

該当なし





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
肢帯筋型筋シストロフィー の発症原因として、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 sarcoglycan に対する calpain の作用を検討した。その結果、ヒト培養骨格筋細胞では calpain がα-およびβ-sarcoglycan を分解することか明らかになり、一方 calpain サブタイプの calpain3 は sarcoglycan の分解に関与しないと考えられた。

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か明らかにされ、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上のmutationによる機能異常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、未た不明な点か多く、その機能解析が現在も進行中であか、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か報告されている。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か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、病態と発症メカニスムの関係が注目されている。

<目的>

本研究の目的は、LGMD を含む神経筋疾患群の発症機序を検討する端緒として、蛋白分解酵素の一種てある calpain か細胞膜を構成する蛋白の一種てある sarcoglycan に障害を及ぼす可能性かあるか否かを、ヒト培養骨格筋細胞を用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 培地ををヘースに調製された CS-C 培地を用いて培養した。細胞は 37 ℃、5% CO_2 + 95% air 条件下のインキュヘーター内で培養した。培養ティッシュには 10cm 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。

<Calpainの活性化、並びに酵素活性と発現の阻害>

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$CaCl_2$およびA23187 (0.5 μg/ml)を添加し、1時間インキュヘートした。一方、セリンプロテアーゼの阻害薬であるleupeptin (2 μM) 並びにcalpainの阻害薬であるMDL-28170 (1 μM) をあらかしめCS-C培養液に添加し、1時間インキュヘートした後、上述の$CaCl_2$およびA23187を加えてそれぞれの阻害薬の効果を検討した。

また、calpain3のmRNAから得られた塩基配列を元に、27merの塩基鎖を持つdouble strand RNA (iGene, B-Bridge international) を作成しLipofectamine-2000を用いてHUSKMCにトランスフェクションした。24—48時間後に上述の方法を用いてcalpainを活性し、sarcoglycanへの作用をimmunoblotを用いて検討した。

<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℃) 。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に後に スキャナ (EPSON, GT-6500ART2) を用いてデジタル処理し、NIH image ておのおの 4 検体す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。

<RT-PCR>

HUSKMC より RNeasy protect mini kit (QIAGEN) を用いて totalRNA を調製し、calpain3 に対する特異的プライマー (Forward 5'-GCCAACGTACAACAATCA, Reverse 5'-TATTCCTTACCATCCGTG) を用いて RT-PCR を行った (One-step RT-PCR kit, QIAGEN)。

(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 1 に示す如く、$CaCl_2$ (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 calpain か活性化する条件下においた HUSKMC では、カルシウムイオノフォアを使用しない対照群と比較して α-sarcoglycan か低下を示した。一方、あらかじめ蛋白分解酵素阻害薬である leupeptin で前処置した HUSKMC では、$CaCl_2$ および A23187 の添加にもかかわらず α-sarcoglycan の減少は抑制された。

Sarcoglycan の分解と calpain の関係を検討するため、カルシウムイオノフォアの存在下で sarcoglycan の各サブタイプの変化を immunoblot で検討したところ、図２に示すごとく α-およびβ-sarcoglycan か減少を示した。これに対し、calpain 阻害薬である MDL-28170 を用いて、同様に sarcoglycan の各サブタイプの変化を検討した所、α-およびβ-sarcoglycan の分解か抑制された。

Sarcoglycan の分解と calpain のサブタイプである calpain3 の関係を明らかにするため、siRNA を用いた mRNA の発現抑制を試みた。図３の如く３種類の siRNA を作製し、図４の如く capian3 の mRNA 発現への効果を確認したところ、C 末端に近い③の siRNA が最も強い発現抑制効果を示したため、以後の実験ではこの③を用いた。

β-sarcoglycan に対する calpain3 の作用の有無を確認するため、上記③の siRNA をトランスフェクションした HUSKMC と scramble siRNA をトランスフェクションした HUSKMC に対しそれぞれ $CaCl_2$ (2mM) および A23187 (0 5 μg/ml)を用いて calpain が活性化する条件下て検討を行ったところ、③の siRNA を用いた細胞でも β-sarcoglycan の分解を抑制することは出来なかった（図５）。

HUSKMC 内での calpain3 蛋白と mRNA の変化を $CaCl_2$(2mM)および A23187 (0 5 μg/ml)、並ひに calpain 阻害薬の MDL-28170 の存在下で検討したところ、94kDa の calpain3 に対して、カルシウム負荷を行った細胞ては自己分解産物である 60kDa の分子量を持つ蛋白か増加した。この自己分解は calpain 阻害薬てある MDL-28170 を用いても抑制出来ないことか明らかになった（図６、A）。さらに、calpain3 が自己分解する条件下では、蛋白の減少とは逆に mRNA の発現か増加を示すことか明らかになった（図６、B）。

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か明らかにされている。本研究では、カルシウムイオノフォアを用いて 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か、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か、本研究から α-ならひにβ-sarcoglycan が細胞内カルシウム濃度の上昇に伴って分解を受け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てある leupeptin か 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を含む細胞内の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ため、calpainに対する選択的な阻害薬であるMDL-28170を用いてさらに検討を行い、α-ならびにβ-sarcoglycanの分解にcalpainが関与していることが明らかにされた。

上述のごとくcalpainは多様なサブタイプを持っており、骨格筋に特異的に存在するcalpain3が、sarcoglycanの分解とどの様な関係を持つかについて、検討を行った。本研究ではcalpain3の発現を選択的に阻害する目的で、siRNAを用いた。SiRNAを用いてHUSKMC内のcalpainを阻害した上でβ-sarcoglycanの分解を検討した結果、ネガティブコントロールであるscramble siRNAをトランスフェクションした細胞と同程度の分解を受けることが明らかになり、calpain3の活性化とsarcoglycanの分解との関連は希薄であると考えられ、その理由として、細胞内のカルシウムが増加する条件下においては、calpain3は早期に自己分解を起こし、蛋白分解酵素としての機能を失うためであると考えられた。Calpain3の機能については、これまでの検討からhouse keeping proteaseとしてHUSKMC内のsarcoglycanの細胞内移動や高次構造組み立てなどの生理的機能の遂行にに重要な働きを示している事が予想されており、calpain3蛋白の減少を補完するかに見えるmRNAの増加はこれらの報告を支持すると考えられた。

E　結論

Calpainに対する特異的な阻害薬やsiRNAを用いた今回の研究から、LGMD2Aを含む多くの神経筋疾患の発症メカニズムの検討や、その阻止に向けた方策を検討する際の検討対象として、今後calpain3以外のcalpainサブユニットの活性化との関連を検討する必要があると考えられた。

F　健康危険情報

なし

G　研究発表

1　論文発表　なし

3　学会発表　なし

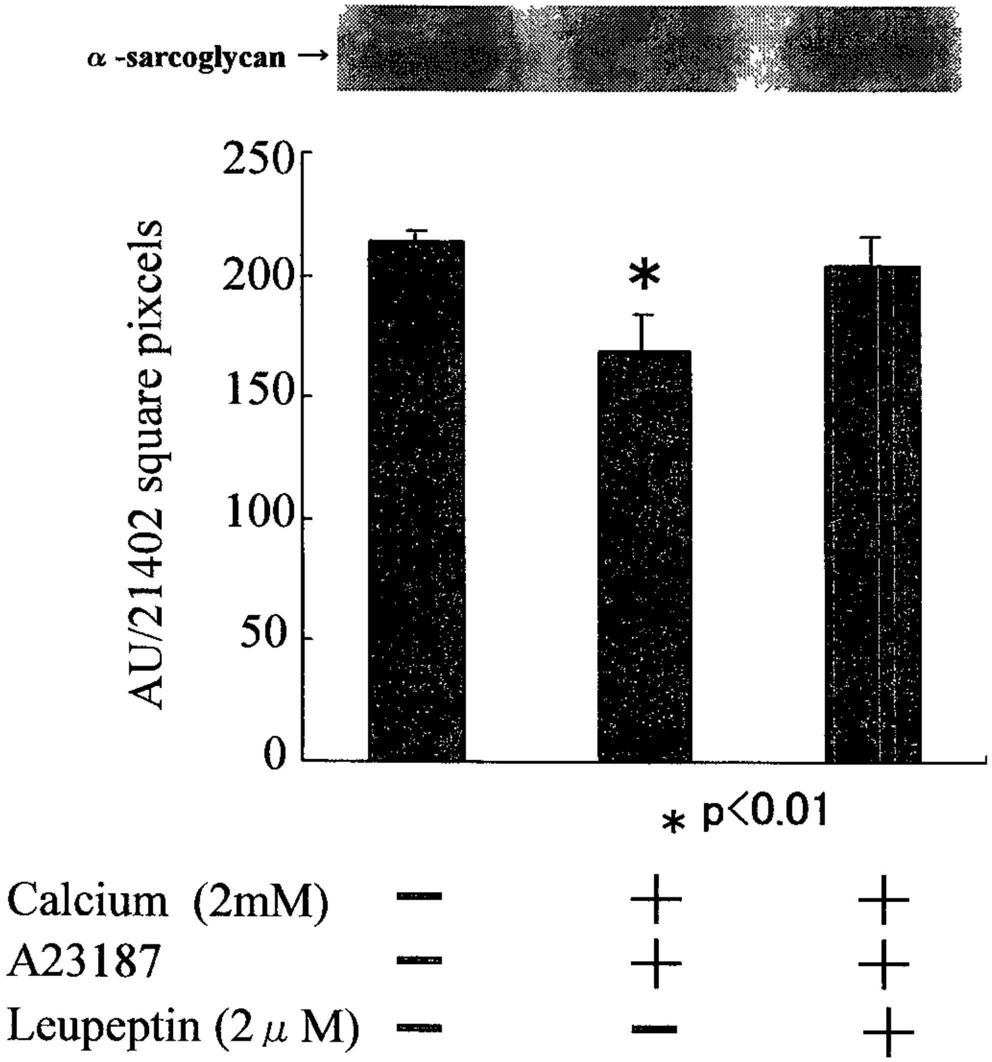
H　知的財産権の出願　登録状況

2　特許取得　なし

3　実用新案登録　なし

4　その他　なし

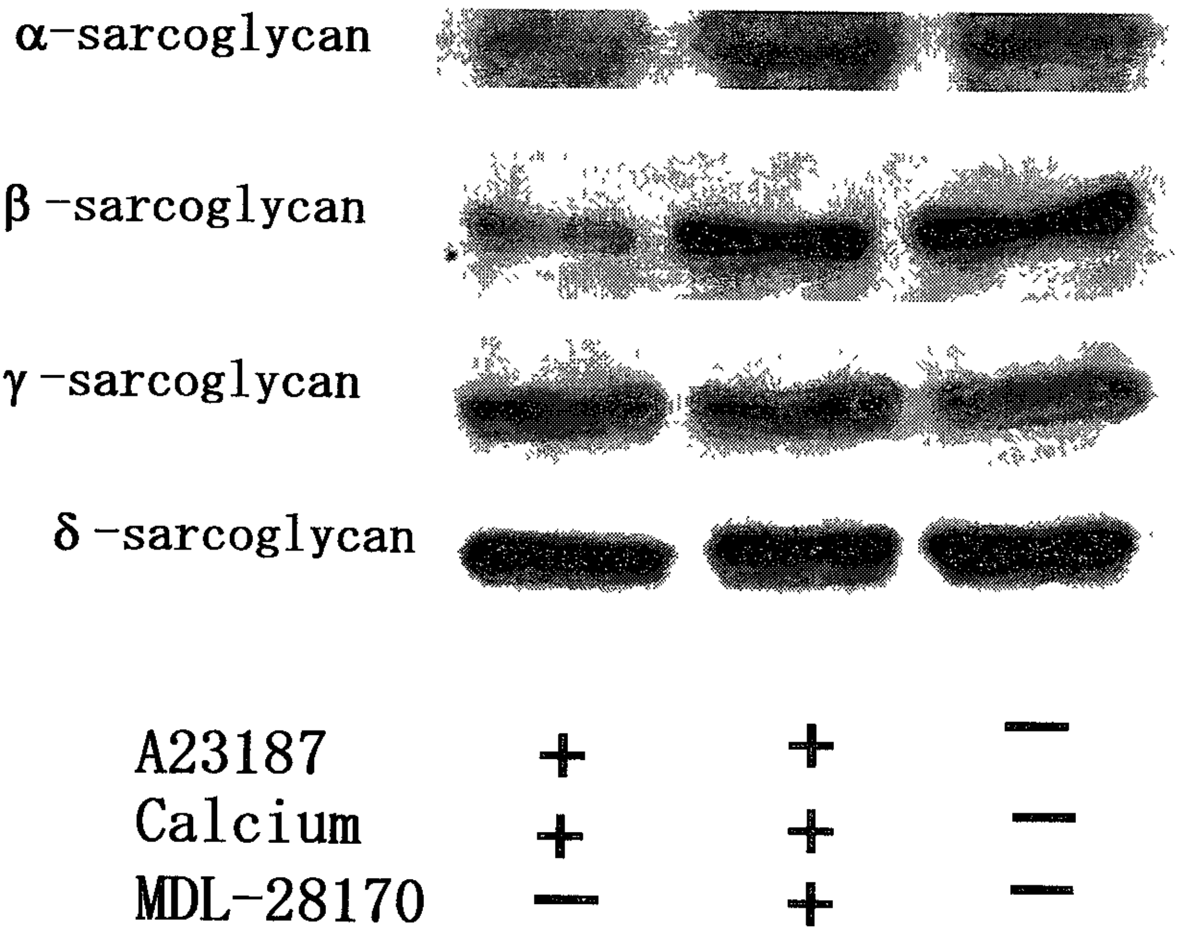
＜＜図・表＞＞



【図１】ヒト培養骨格筋細胞における α-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 培地ををヘースに調製された CS-C 培地を用いて培養した。35 μ g を SDS-PAGF（10%）で展開した後、ニトロセルロース膜に転写し、anti α-sarcoglycan monoclonal antibody を用いて overnight て反応させた（4℃）。

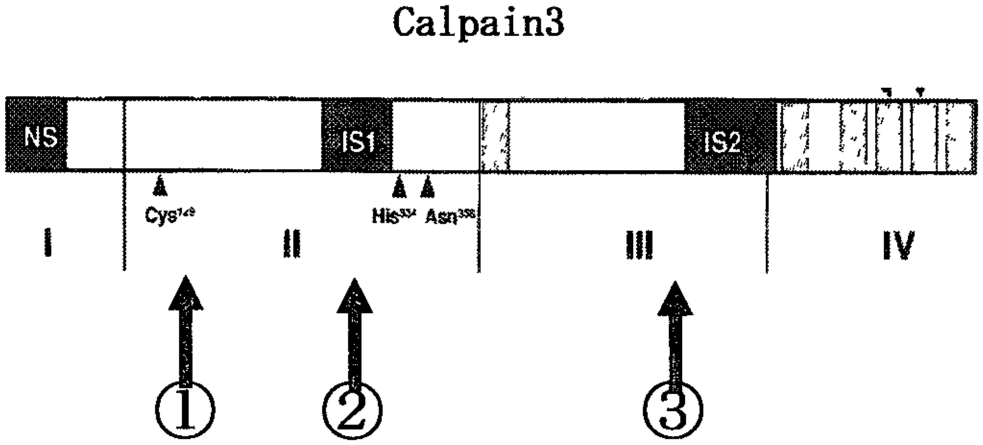
$CaCl_2$（2mM）および A23187（0 5 μ g/ml）を用いて HUSKMC 内のカルシウムイオン濃度を上昇させた細胞では、対照群と比較して α-sarcoglycan か低下を示した。一方、あらかじめ leupeptin で前処置した HUSKMC では、$CaCl_2$ および A23187 の添加にもかかわらず α-sarcoglycan の減少はほとんと認められず、対照群と比較して有意な差は検出されなかった。



【図 2】ヒト培養骨格筋細胞における sarcoglycan に対するカルシウムイオンの影響と calpain 阻害薬の作用

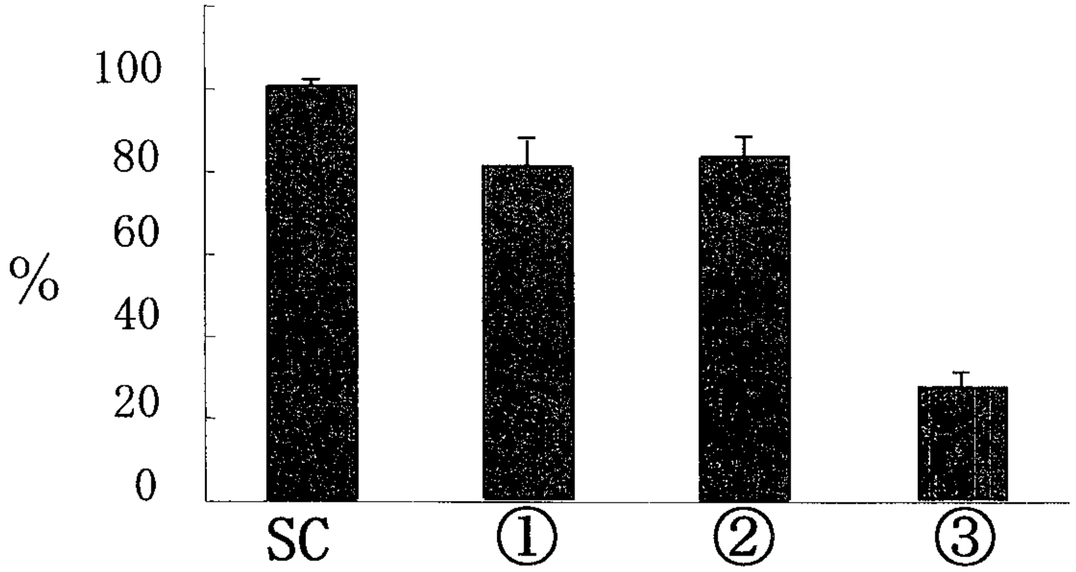
ヒト培養骨格筋細胞(HUSKMC)を DMEM 培地およびハム F12 培地をベースに調製された CS-C 培地を用いて培養した。35μg を SDS-PAGE (10%) で展開した後、ニトロセルロース膜に転写し、sarcoglycan の各サブユニットに対する monoclonal antibody を用いて overnight で反応させた (4℃) 。

$CaCl_2$ (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-およびβ-sarcoglycan が低下を示した。一方、あらかじめ MDL-28170 で前処置した HUSKMC では、$CaCl_2$および A23187 の添加にもかかわらずα-およびβ-sarcoglycan の減少抑制された。



【図 3】Calpain3 に対する siRNA の作製

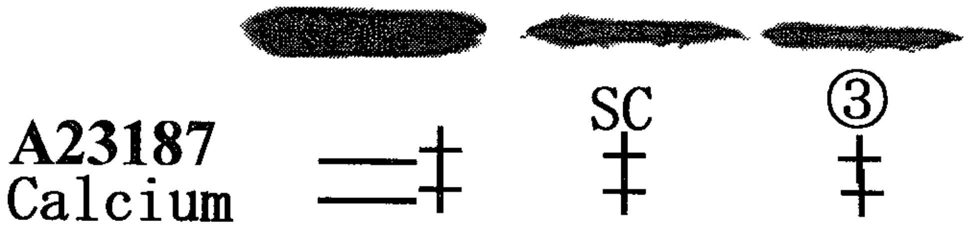
Calpain3 の細胞内での発現を抑制する目的で、3 種類の double strand RNA を設計した。



【図 4】Calpain3 に対する siRNA の発現抑制効果

3 種類の siRNA をそれぞれヒト培養骨格筋細胞(HUSKMC)にトランスフェクションし、RT-PCR を用いて HUSKMC 内での calpain の発現を検討した。

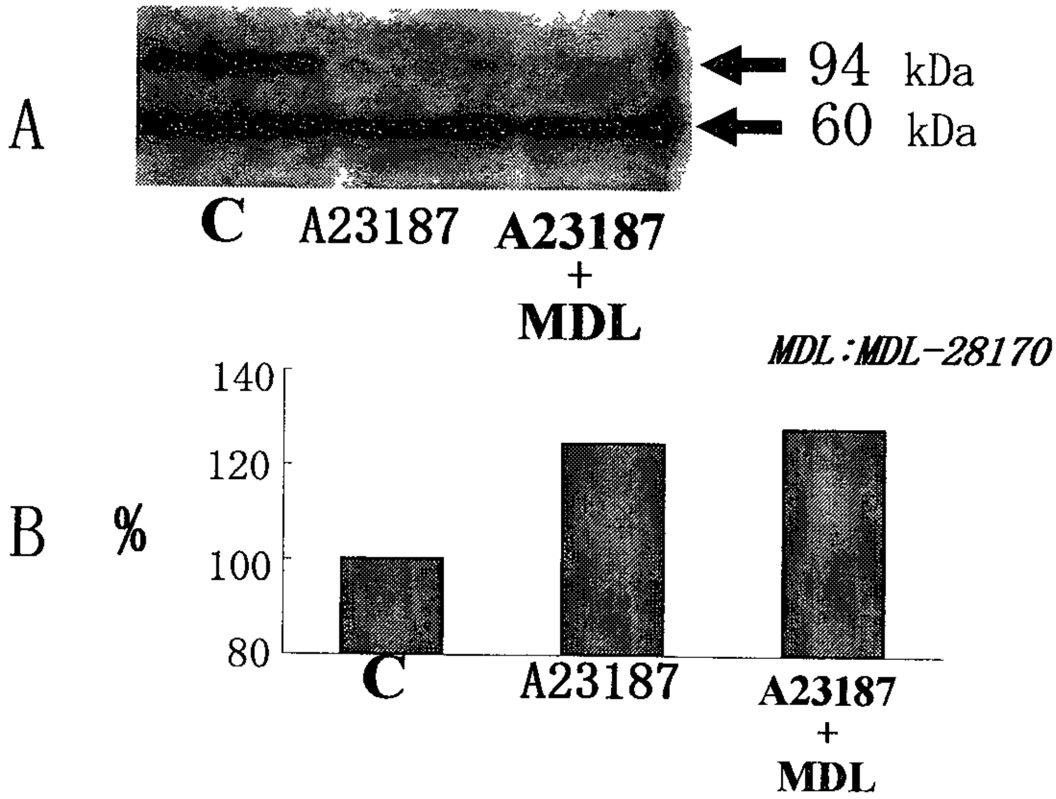
その結果 C 末端に近い siRNA (③) が scramble(SC)を 100%とした比較で、約 30%程度と最も強い calpain3 の発現抑制を示したため、以下の実験ではこの③を用いた。



【図 5】β-sarcoglycan に対する siRNA の効果

siRNA (③) をトランスフェクションしたヒト培養骨格筋細胞(HUSKMC)におけるβ-sarcoglycan の状態を immunoblot で検討した。

その結果siRNA(③)を導入したにも関わらず、β-sarcoglycanはscramble (SC)と同様に分解を受けた。



【図 6】Calpain-3 蛋白と mRNA 発現

ヒト培養骨格筋細胞(HUSKMC)における calpain-3 蛋白と mRNA の状態をそれぞれ immunoblot と RT-PCR で検討した。

A Calpain-3 は細胞内カルシウム濃度の上昇に伴って減少し、MDI-28170 はその分解を抑制しなかった。B calpain-3 の減少が発生した A23187 を使用した HUSKMC では、mRNA の発現が上昇を示し、MDL-28170 でも同様に mRNA か増加を示した。

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

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に関する研究

分担研究者　仲澤幹雄
新潟大学医学部保健学科基礎生体情報学講座教授

研究要旨
心不全治療の新しい可能性を探るため、心筋に発現しているタンパク質の網羅的な解析を用い心不全の発症と進展に関係する情報伝達系を同定することを目指し、自己免疫性心筋炎に伴う心不全時の心筋タンパク質の変動にプロテオーム解析を適用した。今回は急性期における心筋タンパク質の変動を自己免疫性心筋炎発症前後で経時的に測定した。心筋炎を誘発するためのブタミオシン投与前（０週）、投与後１，２，３，４週目で測定用の心筋サンプルを採取し二次元電気泳動による量的な変化を測定、その結果にクラスター解析を適用し、可溶性画分のタンパク質が、濃度的に有意な変動を起こさない群、１週後および２週後から増加する群およびミオシン投与前より減少する群の４群に分けられることが示された。

A　研究目的

心不全の治療には、薬物による対症療法、心移植による根治療法が行われており、最近では再生療法のターゲットとして注目を集めている。心不全は遺伝子異常により発症するものを除くと、心筋梗塞や心筋炎などを原因とした心筋障害が引き金になり、その後心筋に起こる対応性の変化（リモデリング）により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、心不全治療方法の構築に重要な情報を提供することとなる。

細胞内情報伝達系はタンパク質（酵素などの機能タンパク質）により制御されており、これらのタンパク質の量的および質的な変化を研究する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、より効果的な治療方法の確立を本研究の目的とした。

今年度は自己免疫性心筋炎による急性心不全時における心筋タンパク質の経時的変化を検討した。

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両後肢掌に皮下投与した。通常ミオシン投与後２から３週目に自己免疫性の心筋炎が発症し、ラットは急性心不全状態に陥る。今回はタンパク質発現の経時的変化を探るため、ミオシン投与前（０週）、ミオシン投与１週後、２週後、３週後および４週後にエーテル麻酔したラットから心臓を摘出し、心尖部心筋を切り出してタンパク質抽出に供した。

タンパク質の抽出とプロテオーム解析

摘出した心筋は昨年度と同様な方法でホモジナイズし、遠心分離後、上清と沈渣に分離する。上清は可溶性画分とし、沈渣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

一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（Immobiline DryStrip, Amersham）を用いて行った。その後 10% SDS-PAGE による二次元目の電気泳動を行い、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、BioRad）にて解析を行い、心不全群と正常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半定量した。さらにこの濃度変化に非階層的なクラスター分析を行い経時的変化の類別を行った。

（倫理面への配慮）

実験に使用したラットは動物愛護の精神に基ついて、痛みを伴う場合には麻酔を行って無痛状態で処置を行った。

C 研究結果

心筋の病理的な変化を図１に示す。ミオシン投与２週後から明らかな心筋炎か発症し、３週後には顕著な炎症像か認められる。４週後には心筋炎は消退していることか分かる。

図２にミオシン投与３週後の可溶性画分の二次元電気泳動パターンを示す。548 スポットが検出されミオシン投与前と比較して 200 スポットのタンパク質に濃度変化か認められる。濃度変化を０週からの対数変化で評価し、非階層的クラスター分析（κ-mean 法）を行った。

変動は４群に分けられた。有意な変化を認めない群（348 スポット）、１週目から持続的な増加を示す群(13 スポット)、２週目から持続的に増加する群(40 スポット)および１週目から減少する群（147 スポット）の４群である。

急激な心不全状態に陥るミオシン投与２週後に着目し変化か起こっているタンパク質について、スポットをゲルから切り出し、トリプシン分解後得られたペプチトについて MALDI-TOF-MS を用いた解析を行った。その結果一つのスポットか心臓タイプの脂肪酸結合タンパク質てあることか同定された。

D 考察

プロテオーム解析による網羅的なタンパク質変化測定を、自己免疫性心筋炎による心不全心臓に適用した。発症早期のタンパク質の経時的な変動を明らかにするため、ミオシン投与前および投与１，２，３，４週後、心臓を摘出してプロテオーム解析用の標本を得た。

可溶性画分では 548 スポットのタンパク質か検出された。これらのスポットの濃度変化をミオシン投与前からの対数比で表し、その増減について非階層的クラスター分析を適用して類別化した。４群に分けられたタンパク質は、有意な変化を認めない群（348 スポット）、ミオシン投与１週後から増加するスポット（13 スポット）、２週後から増加するスポット（40 スポット）および減少する 147 スポットに分けられた。

増減の変化を認めたスポットは、検出スポットの 36%であり、予想を超えた数のタンパク質に変化が認められた。

変化しているタンパク質を MALDI-TOF-MS により同定する手始めとして、ミオシン投与２週後に増加してくるタンパク質 40 スポットから同定を始めた。現時点で心臓タイプの脂肪酸結合タンパク質がこの群に属することを見いたした。

脂肪酸結合タンパク質は、正常心筋の主要なエネルギー源である脂肪酸を細胞内に輸送するのに働いていると考えられ、このタンパク質が顕著に増加していることは、心筋炎に伴う心不全状態ての心筋細胞のエネルギー代謝の変化に対応していると考えている。

さらにこの群のタンパク質の同定を行うとともに、変動しているその他の群のタンパク質についても同定を行う予定にしている。また、心不全急性期のみではなく、慢性心不全期におけるタンパク質の変動についての検討を行う予定にしている。

E 結論

自己免疫性心筋炎モデルラットにおいて心筋炎発症前からタンパク質の濃度変化か認められ、早期から細胞内での情報伝達に変化が起こっていることが示唆される。また、早期に変化してくるタンパク質の中で脂肪酸結合タンパク質か同定された。これは、心筋細胞に代謝的な変化が早期から起こっていることを示唆しているものと考えられる。

F 健康危険情報

本研究は該当しない。

G 研究発表

１　論文発表

投稿準備中である。

４　学会発表

１）第５４日本薬理学会北部会

自己免疫性心筋炎モデルラットにおける心筋プロテオーム解析。
仲澤幹雄、太田好美、加藤公則、吉田豊、小玉誠、山本格、相澤義房
日薬理誌　123 14P, 2004

2）第54日本薬理学会北部会
・rAAV の血清型による遺伝子発現の比較と交叉性の検討。
手塚あさき、河田登美枝、仲澤幹雄、中田樹海、水上浩明、卜部匡司、小澤敬也、豊岡照彦
日薬理誌　123 19P, 2004

3）第26回心筋代謝研究会
自己免疫性心筋炎モデルラットにおける心筋プロテオーム解析。
太田好美、加藤公則、吉田豊、小玉誠、山本学、相澤義房、仲澤幹雄

4）第20回国際心臓研究学会日本部会
Paradoxical improvement of monocrotalin (M)-induced pulmonary hypertension (PH) and right ventricular (RV) dysfunction by L-NAME
Noriko Sago, Tomie Kawada, Asaki Tezuka, Akiko Hirata, Yoko Miwa, Mikio Nakazawa, Teruhiko Toyo-oka
J Mol Cell Cardiol 35 A23, 2003

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

H　知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）
5　特許取得
6　実用新案登録
7　その他
該当無し。

<<図・表>>

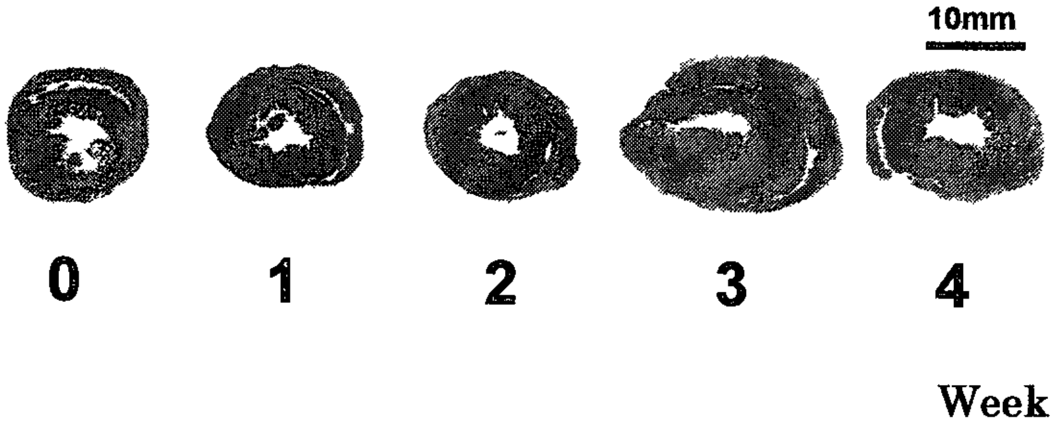


図1　ミオシン投与後の経時的な心筋の病理組織変化（HE染色像）