

心不全の重症化機構の新しい概念

- 心筋細胞 dystrophin のシフトと断片化がその原因である

分担研究者 河田登美枝

新潟大学医歯学総合病院 薬剤部 助教授

研究要旨

拡張型心筋症（DCM）ハムスター（T0-2）はシストロフィン関連タンパク複合体（dystrophin-associated proteins, DAP）の一つの δ -sarcoglycan (δ -SG) 遺伝子欠損している (Sakamoto A *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997)。昨年、心不全の重症化機構に、 δ -SG ではなくシストロフィンの崩壊かかわっている事を報告した。シストロフィンは細胞膜直下にあり、心筋の収縮力を細胞外マトリックスに伝える重要な役目を担っている。又、DAP とも密接に関連している。今年度はシ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。その結果、心不全の重症化に伴い、シストロフィンは減少し、逆に 60 kD タンパクは増加した。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いう我々の仮説を支持する。

A 研究目的

心不全の重症化機構を解明する事は、その予防と治療を開発する上で重要であるか、その機序は未だ解明されていない。T0-2 ハムスターは δ -SG 遺伝子欠損か拡張型心筋症の原因であるにもかかわらず (Kawada T *et al*, *FEBS 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、成長に伴って心不全が重症化する。しかし、その理由は明確でない。我々は δ -SG 遺伝子欠損の結果、最終的にシストロフィンが崩壊する、すなわち、筋シストロフィー様の病変か心筋特異的に発生し、心不全が進展すると思った。この仮説を検証するために、T0-2 ハムスター心筋細胞のシストロフィンの相対量および組織学的変化を経時的に測定し、心機能との詳細な関係を検討

した。

B 研究方法

正常対照動物の F1B ハムスター (F1B) と T0-2 の心エコー測定及び両心室カテーテル法にて心血行動態測定を実施する。ホモシナイス心筋でシストロフィンの Western ブロッキングを行ない、経時的にシストロフィンの変化を検討した。

in situ にて細胞膜透過性を検討するために、ハムスターにエハンスブルー (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 は膜を通過しないか、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。この方法ではシ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。

(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

①エコー測定(図1)

5、25、40週齢のF1BとT0-2系ハムスターの心エコー測定を実施した。F1Bは加齢による変化は認められなかった。T0-2の25及び40週令では5週令に比較し、又同週令のF1Bに比べ、左室駆出率(ejection fraction, EF)と左室内径短縮率(fractional shortening, FS)が顕著に減少した。

②血行動態の変化

5週令ではF1BとT0-2間では血行動態に差が見られなかったが、15週ではF1Bは左室内圧(LVP)の上昇と左室圧最大微分値(dP/dt_{max})および左室圧最小微分値(dP/dt_{min})の増加が顕著であった。T0-2ではF1Bに比べ、LVPが低下し、 dP/dt_{max} および dP/dt_{min} が悪化し、左室拡張終期圧(EDP)および中心静脈圧(CVP)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25から40週令の間で心機能が更に悪化し、心不全が重症化する事が示された。

③細胞膜透過性の年齢依存性変化について
生後5週令のT0-2心筋細胞では、シストロフィン(β-tropomyosin)は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週令では、シストロフィンは細胞膜のみならず、細胞質にも認められ、シ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(シフト)した。同じ細胞にEBの蛍光が認められ、膜透過性

が亢進していた。40週令では、シストロフィンがシフトした細胞が更に増加し、その細胞ではEBの蛍光を認め、膜透過性の亢進した細胞数は更に増加した。

④シストロフィン量と心行動態の関係(図2)

心筋のWestern blottingの結果、加齢に伴い、T0-2ではシストロフィンが断片化した。この傾向は40週令ではさらに明確になった。

更に心行動態との関係を調べた。シストロフィンの相対量と収縮機能を示すLVPには正の極めて強い相関が認められ($r=0.998$, $P<0.0004$)、拡張機能を示すEDPとCVPにも極めて強い負の相関(それぞれ $r=0.996$, $P<0.0005$ 及び 0.954 , $P<0.002$)が認められた。断片化した60kDの相対量と心行動態の相関も認められ、LVPと負の強い相関($r=0.961$, $P<0.002$)か、EDP及びCVPと強い正の相関(それぞれ $r=0.954$, $P<0.002$ 及び 0.996 , $P<0.0005$)が認められた。シストロフィンと60kDの相対量は dP/dt_{max} および dP/dt_{min} とは相関しなかった。

⑤シストロフィン量と生存率の関係(図3)

F1Bではシストロフィン量は週令にともなう変化はなく、生存率も40週令まで100%であった。T0-2では生存率の減少とシストロフィン量の減少が完全に一致していた。これらの両者の減少に反して60kDの相対量はあたかもミラーイメージのように増加した。160kDバンドは加齢に伴う変化はなかった。

D 考察

δ -SG遺伝子が欠損しているT0-2ハムス

ターでは同時に α 、 β 、 γ -SGの発現も減少する事を我々が既に報告した(Sakamoto A *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, Kawada *et al*, *F E B S Lett*, 1999)が、今回、ジストロフィンが加齢に伴い分断化されてその相対量が顕著に減少し、この減少は収縮機能及び拡張機能に密接に関係している事を示した。この現象はアクチンとミオシンのクロスブリッジによる心筋収縮力を細胞外マトリックスに伝えるジストロフィンの役割が阻害された事を示唆している。さらにジストロフィン及び分断化された60kDの相対量は生存率と一致している事も示した。心不全の重症化とジストロフィンのシフト及び細胞膜透過性亢進も関連していた。

我々は心筋梗塞後の心不全モデルでも残存心筋中のジストロフィンと α -SGが減少する事を報告した(Yoshida H *et al*, *Cardiovasc Res*, 2003)。さらにイソプロテレノールの過量投与したラットの心筋でもジストロフィンと α 、 β -SGが減少する事も報告した(Xi H *et al*, *Cardiovasc Pharmacol* 2000)。この時にはジストロフィンの細胞膜から細胞質へのシフト及び細胞膜透過性も亢進した(豊岡等、未発表)。したかつて、先天的なDCMの結果と同様に後天的(急性、慢性とも)な心不全もジストロフィンの分断化により細胞膜の透過性が高まり、膜が脆弱になった事が示唆される。その結果、心筋細胞が傷害され、筋ジストロフィー様の病態が心筋選択的に起こり、心不全が進展するという作業仮説を提唱する。

E 結論

心筋症ハムスターにおけるジストロフィンの心行動態、組織学的及び生化学的な経時変化を観察した結果、DCMの重症化とジストロフィン量に密接な相関が認められた。ジストロフィンのシフト、細胞膜透過性亢進も同様の傾向を示した。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。

F 健康危険情報

特に無し。

G 研究発表

1 論文発表

- ① T Toyo-oka and T Kawada Gene-based therapy of advanced heart failure secondary to the disruption of dystrophin-related proteom In "Signal transduction and cardiac hypertrophy", Eds N S Dhalla, L Hryshko, E Kardam, P K Signal, Kluwer Academic Publisher, Boston, 2003, p449-459
- ② T Kawada, C Hemmi, S Fukuda, A Tezuka, K Iwasawa, M Nakazawa, H Sato, T Toyo-oka Sarcolemmal fragility secondary to the degradation of dystrophin in dilated cardiomyopathy, as estimated by electron microscopy *Exp Clin Cardiol* 8 67-70, 2003
- ③ 豊岡昭彦, 河田登美枝, 阪本英二, 島本涼一, 山崎 憲, 鈴木順一, 仲澤幹雄, 卜部 匡, 小澤敬也 特集 循環器疾患と関連遺伝子, 拡張型心筋症の遺伝子治療-その現状と未来-*Cardiac Practice*,

14 171-180 (2003)

- ④河田登美枝, 山崎 憲, 島本涼一, 鈴木順一, 手塚あさき, 仲澤幹雄, 豊岡照彦。特集 心血管系における細胞療法・遺伝子療法の現状と展望, 責任遺伝子導入による心筋再生治療。循環器科, 53 429-437 (2003)

5 学会発表

- ①河田登美枝, 仲澤幹雄, 豊岡照彦。シンポジウム「心不全発症の分子的理解と治療について」心不全の発症メカニズムに関する新しい概念。

第76回日本薬理学会年会

- ②J Nakata, T Kawada, K Iwasawa, H Xi, M Nakazawa, H Hikiji, T Toyo-oka Final common pathway of dystrophin disruption in advanced heart failure of both hereditary and acquired origins 第67回日本循環器学会

- ③T Kawada, J Nakata, M Nakazawa, A Tezuka, C Hemmi, K Iwasawa, H Satoh, T Toyo-oka A novel paradigm of dystrophin disruption for the progression of heart failure-Evidence derived from gene therapy in the hereditary model-

Heart Failure 2003

- ④シンポジウム 拡張型心筋症の発症メカニズムとその遺伝子治療

河田登美枝, 中田樹海, 手塚あさき, 山崎 憲, 佐藤 博, 仲澤幹雄, 豊岡照彦
第26回心筋代謝研究会

- ⑤重症心不全の遺伝子治療-新しいヘクター及び導入法の開発

河田登美枝

心臓フォーラム

- ⑥rAAV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

第54回日本薬理学会北部会

- ⑦T Toyo-oka, T Kawada, J Nakata, M Nakazawa, K Ozawa Selective translocation and cleavage of dystrophin in cardiomyocytes and increased sarcolemmal fragility as a final common pathways to progress heart failure in both the hereditary and acquired origins Cardiomyopathy & Heart Failure 2003

- ⑧T Kawada, T Ebisawa, H Xie, F Masui, K Iwasawa, M Nakazawa, T Toyo-oka Symposium” Proteases and inhibitors in cardiovascular system” A new scheme of dystrophin (Dys) disruption for the progression of advanced heart failure (AdHF) The 3rd General Meeting of the International Proteolysis Society

- ⑨T Kawada, N Sago, A Tezuka, A Hirata, Y Niwa, M Nakazawa, T Toyo-oka Paradoxical improvement of monocrotalin (M)-induced pulmonary hypertension (PH) and rightventricular (RV) dysfunction by I-NAME
第20回国際心臓研究学会日本部会

H 知的財産権の出願・登録状況
なし

<<図・表>>

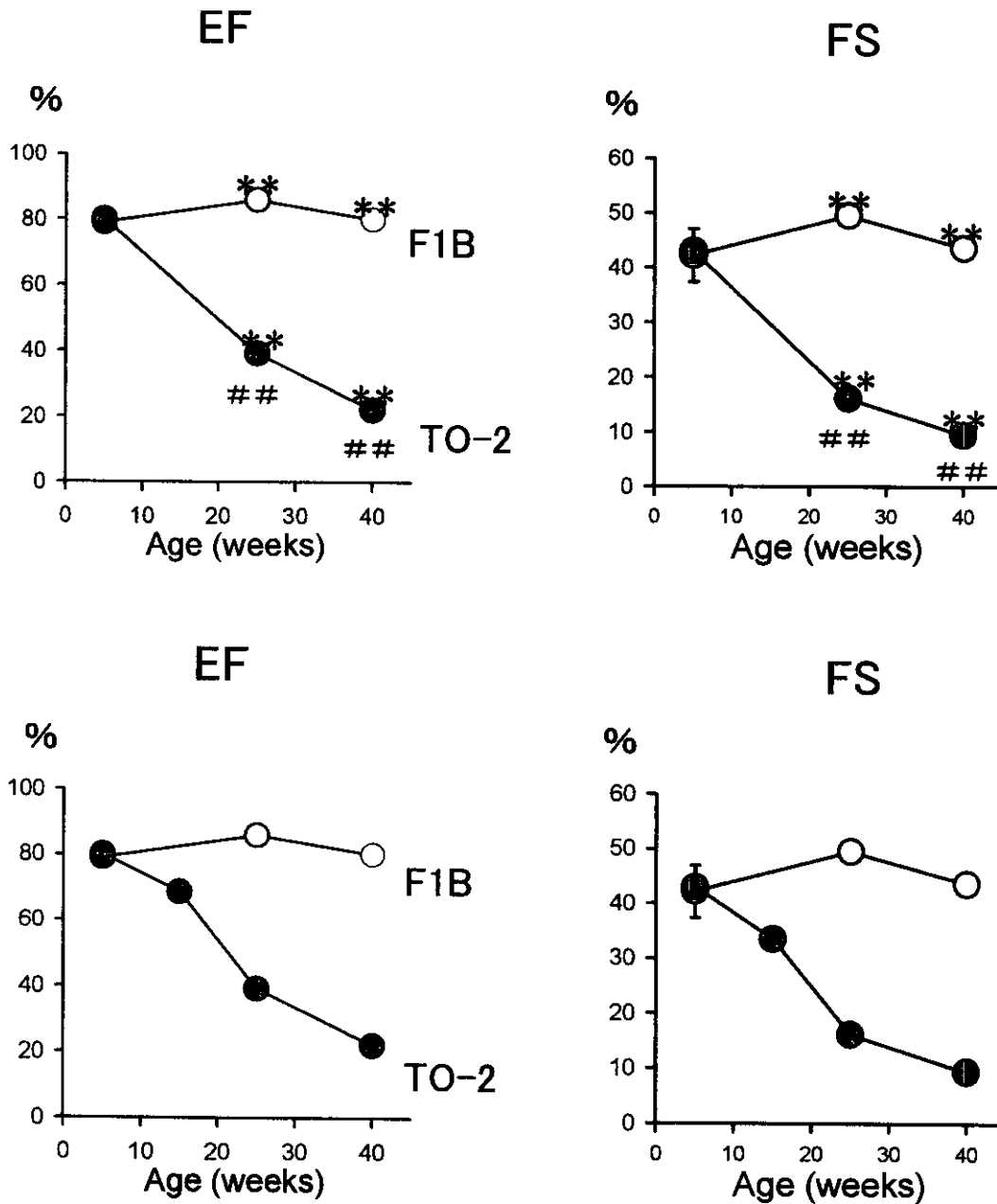


図1 TO-2ハムスターと正常F1Bハムスターの心エコー測定

の心筋細胞内シ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週令ではF1BとTO-2の左室駆出率 (ejection fraction, EF) と左室内径短縮率 (fractional shortening, FS) に差はなかった。TO-2の25、40週令では、5週令に比べ、又、同週令のF1Bに比べてEF、FSとも顕著に減少した。

*, **p<0.05, 0.01 vs 5週令, #, ## p<0.05, 0.01 vs F1B

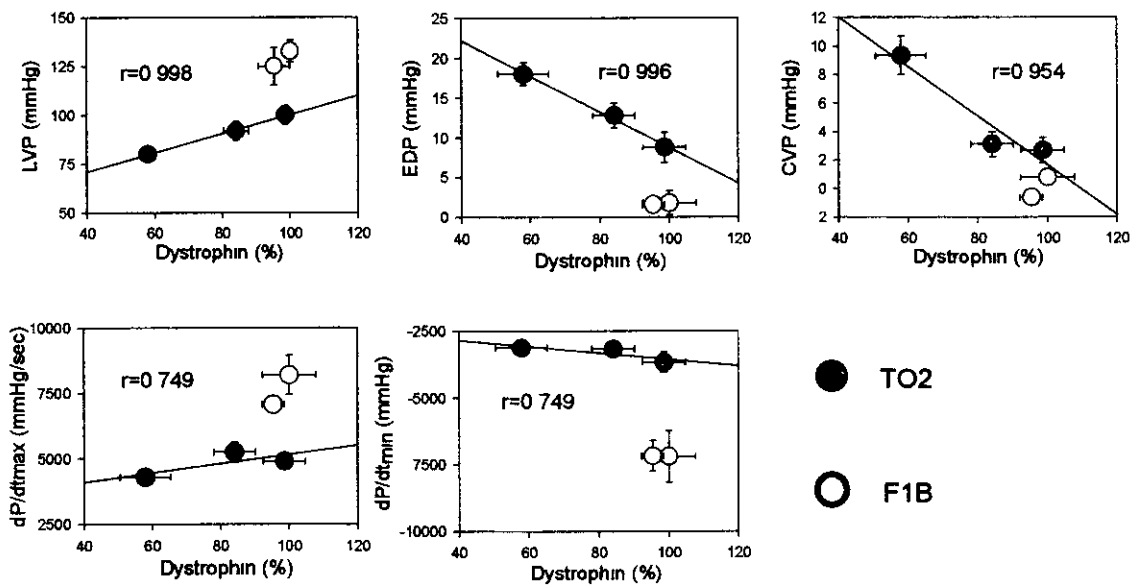


図2 シストロフィン量と心行動態の関係

シストロフィンの相対量と左室内圧(LVP)には負の相関、左室拡張終期圧(LVEDP)及び中心静脈圧(CVP)とは正の相関が認められた。シストロフィン量と左室圧最大微分値(dP/dt_{max})及び左室圧最小微分値(dP/dt_{min})とは相関が認められなかった。

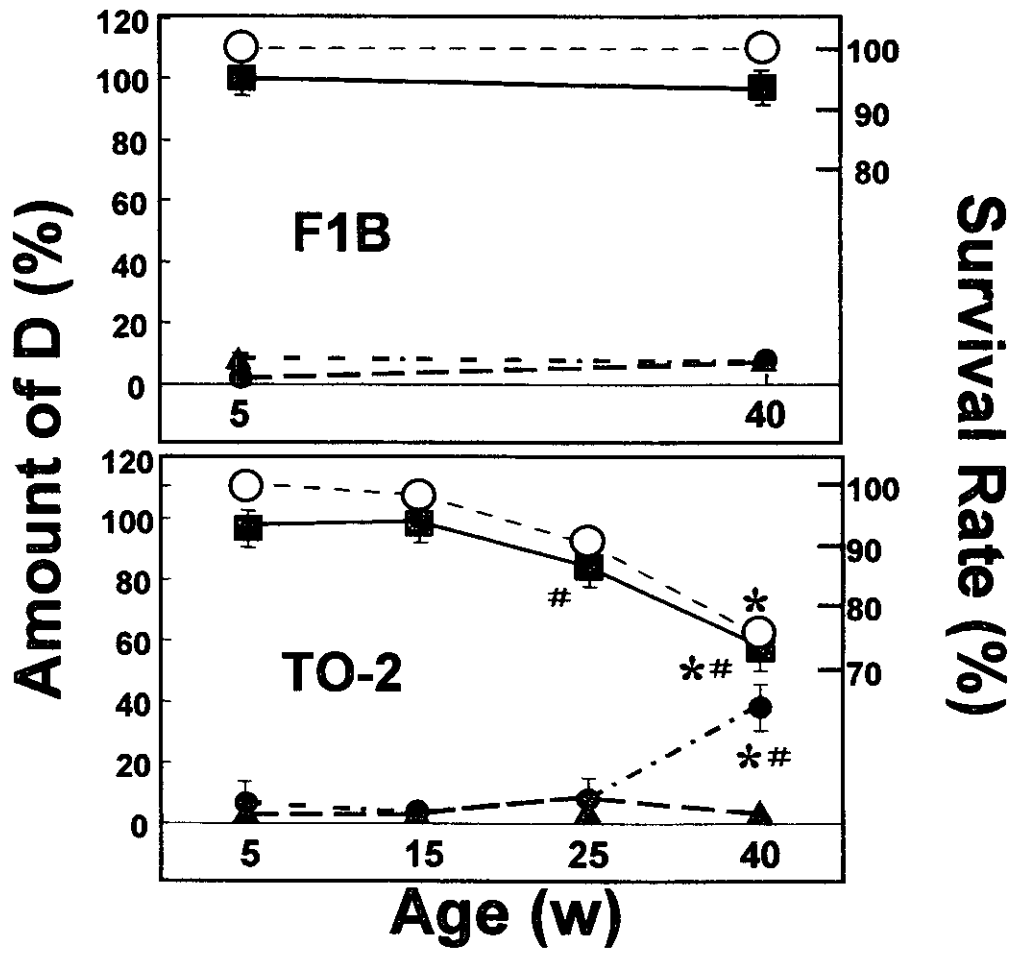


図3 シストロフィン量と生存率の関係

T0-2ではシストロフィン量 (Dys) の減少は生存率の低下と一致していた。この両者の変化は60 kD量の増加と一致していた。

血管内膜肥厚に対する Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor 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の血管病変に対する血管内治療後あるいはバイパス手術後の再狭窄は心不全における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要原因であることに着目し、Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate 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-3R typr1 hetero knock out mouse (n=10), IP-3 type2 homo knock out mouse (n=9), IP-3 type3 homo knock out mouse (n=11) および control mouse (10 匹) に対し、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、IP-3R 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
重松 邦広	東京大学大学院 血管外科学分野

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 IP-3R type1 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か報告され、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 IP-3R knock out mouse の左頸動脈結紮モデルを用いて内膜肥厚と IP-3R の *in vivo* での関係の解明を目的とした。

B 研究方法

IP-3R typr1 hetero knock out mouse (n=10), IP-3 type2 homo knock out mouse (n=9), IP-3 type3 homo knock out mouse (n=11) および control mouse (10 匹) を対象に左頸動脈結紮モデルを作製し、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

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おり、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

μm 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 の最大値を用いた比較および全切片を用いた比較を行った 数値は(平均値) \pm (標準偏差) で表し、有意差の検定には Dunnett の検定を使用した

(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

IP-3R type1 KO 群 14 匹中の 4 匹, IP-3R type2 KO 群 11 匹中の 2 匹および IP-3R type3 KO 群 13 匹中の 11 匹は結紮処理後死亡したため脱落した Control 群 12 匹中の 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とした 最終的に type1 10 匹, type2 9 匹, type3 11 匹, control 10 匹について解析を行った 最大値での検討では IP-3R type1 KO 群, IP-3R type2 KO 群は control 群に対し, NA/MA が有意に小さかった (図 1) 全切片での検討では, IP-3R type2 KO 群, IP-3R type3 KO 群は control 群に対し, NA/MA が有意に小さかった (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シ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 の存在が報告されている predominant subtype は臓器によって異なり、中枢神経系では type1, 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かわかっている 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か、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、完全には正常ではないことが推察される

Type2, 3 KO mouse については homo knock out を施しても外見上正常に成長する 今回の研究では、統計処理方法により若干の差異はあるものの、type1 のみならず type2, 3 KO mouse においても内膜肥厚が抑制されていた これは従来の *in vitro* における報告と矛盾する結果であり、今後の研究が待たれるか、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り、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-R 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治療戦略に寄与する可能性が示唆された

参考文献

Kumar A *et al*, Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997,17 2238-44
Wang Y *et al*, Crucial role of type 1, but not type 3, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptors in IP₃-induced Ca²⁺ entry, and proliferation of A7r5 vascular smooth muscle cells *Circ Res* 2001,88 202-9
Furuuchi T *et al*, Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 gene (Insp3r1) in the mouse central nervous system *Receptors & Channels* 1993,1 11-24
Perez PJ *et al*, Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes *J Biol Chem* 1997,272 23961-9
Blondel O *et al*, 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, 11356-63

Chen J *et al*, 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 *et al*, 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

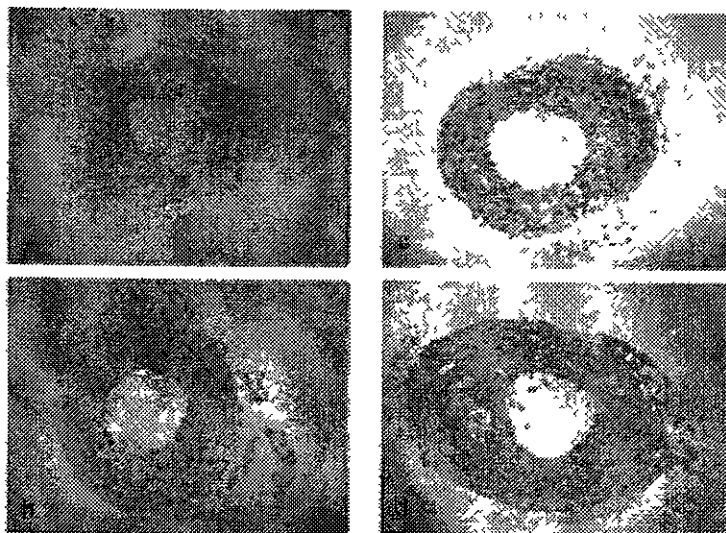
G 研究発表

特になし

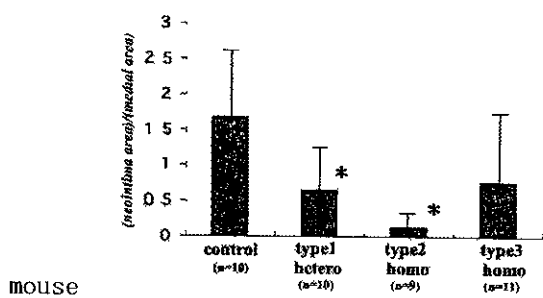
H 知的財産権の出願・登録状況

特になし

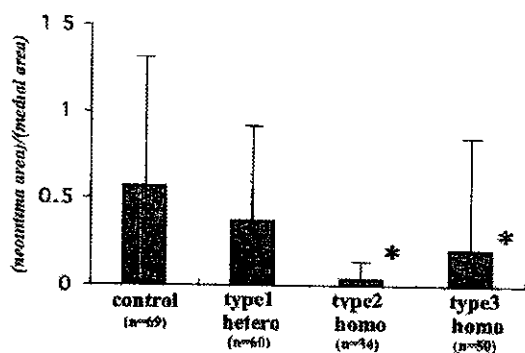
<<図・表>>



(図1) HE染色標本 a) type1 KO mouse, b) type2 KO mouse, c) type3 KO mouse, d) control



(図2) 最大値による neointima area/ medial area の検討
* p<0.05 vs control



(図3) 全切片による neointima area/ medial area の検討
* p<0.05 vs control

新規 SNP 解析技術の開発および

RNA₁ による遺伝性筋疾患モデル動物作出に関する研究

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

(1) 多因子疾患の感受性遺伝子探索にはハイスループット SNP 解析法が必須である。キャピラリー型自動シーケンサーと 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 検体以上をプ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、モデル動物の利用が不可欠である。簡便な遺伝子ノックダウン法として近年注目されている RNA interference (RNA₁) 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。

A 研究目的

本研究は大きく 2 つの目的をもつ。

第一は、新規 SNP 解析技術の開発である。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、多数の検体について多数の SNP 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。本年は、一度に数種類の SNPs を解析でき、またプール試料から SNP の対立遺伝子頻度を推定することができる新しい解析法の確立を目指した。

第二は、RNA₁ 法を用いた遺伝性筋疾患モデル動物作出のための基礎的研究である。従来法では、疾患モデル動物の作出に多大な作業が必要であった。本研究の目的は、簡便な遺伝子ノックダウン法として注目されている RNA interference (RNA₁) 法をモデル動物作出に応用することにある。本年

はその基礎的研究として、筋組織における RNA₁ の活性及び特徴について解析を行った。

B 研究方法

(1) 136 人の非血縁健常者の末梢血白血球よりゲノム DNA を得た。プール試料作製のために、各々の DNA 濃度を測定して等量ずつ混合した。VEGF、LDLR、eNOS および CD19 遺伝子上の SNPs を対象として、それらを含む断片を蛍光標識 (FAM、VIC、NED または PET) プライマーを用いて増幅した。この PCR 産物を加熱変成後、新しいポリマーを充填したキャピラリー型自動シーケンサーを用いた SSCP (single strand conformation

polymorphism) 解析を行った。プール試料からの SNP 対立遺伝子頻度推定では、ヘテロ接合体から得られた泳動ピークパターンを標準として、各々の対立遺伝子に対応するピークの相対値を求めた。ピークの高さから推定する場合と面積から推定する場合を比較した。

(2) マウスの各組織における Dicer 遺伝子

の発現量を調べるために、ICR マウスの各組織から RNA を抽出し、定量 RT-PCR を行った。また、筋組織における RNA₁ 誘導を調べるために、マウスの長指伸筋から単離した筋線維に、ホタルルシフェラーゼ遺伝子をコートするプラスミド DNA とそれに対する siRNA を導入し、ルシフェラーゼ活性測定によってホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果を解析した。次に、筋肉の分化過程における RNA₁ の活性を調べるために、筋管細胞への分化能を持つ C2C12 細胞を用いて、マウス組織と同様に Dicer 遺伝子の発現量及び RNA₁ 活性を調べた。さらに内在性 *delta-sarcoglycan* 遺伝子に対する 3 つの siRNA を設計し、未分化な C2C12 細胞に導入して、RNA₁ による内在性遺伝子の抑制効果を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究の目的は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

(1) PCR 増幅において 4 種の異なる蛍光標識を用いることに加え、増幅断片の易動度の差によって判別することによって、1 キャピラリーの 1 回の泳動によって、4～8 種の SNPs を同時に解析できた。さらに、136 検体をプールした試料を用いて、その SSCP パターンから対立遺伝子頻度の推定を試みたところ、ヘテロ接合型で十分にハントか分離されている SNP については、誤差が 5% 以内の精度で推定できた。またピークの高さに基づく推定

は、面積に基づく推定より正確であった。

(2) マウスの各組織間における Dicer 遺伝子の発現量の検討を行った結果、Dicer 遺伝子の発現量は心臓及び骨格筋において他組織よりも少ないことが観察された。しかしながら、筋線維における RNA₁ 誘導実験では非常に強い RNA₁ 活性が認められた。また、C2C12 細胞における Dicer 遺伝子の発現量は未分化な筋芽細胞から筋管細胞への分化に伴って減少し、分化誘導後 21 日目には骨格筋組織における発現量とほぼ同レベルになることか分かった。また、未分化な筋芽細胞も分化した筋管細胞も筋線維と同様に強い RNA₁ 活性を示した。さらに、C2C12 筋芽細胞における内在性 *delta-sarcoglycan* 遺伝子の抑制実験においては、約 50% 程度の抑制効果が観察された。

D 考察

(1) キャピラリー型自動シークエンサーと 4 色の蛍光色素を用いて SSCP 解析を行うことにより 4～8 SNPs の同時解析が可能となり、低コスト・省力化を実現できた。数百検体程度を対象とする疾患関連研究に有用であると考えられる。さらにプール試料を用いる SNP 対立遺伝子頻度推定が可能であったことより、原理的には疾患関連研究における一次スクリーニングを 100 倍以上低コスト化・省力化できることかわかった。疾患感受性候補領域における網羅的な SNP 関連分析に有用であると考えられる。

(2) マウスの各組織における Dicer の発現量の測定、および筋線維、筋芽細胞や筋管細胞における RNA₁ 誘導実験によって、Dicer 遺伝子の発現量が少ない筋組織においても RNA₁ が正確に誘導され、強い活性を示すことか実証された。この成果は、RNA₁ による様々な遺

伝性筋疾患モデル動物及びモデル細胞の作出への可能性を高めたと言える。

E 結論

新規 SNP 解析技術の開発については、SNP を用いる網羅的な関連分析研究における第一次スクリーニングに大変有利な技術を確立することかてきた。さらに、遺伝性筋疾患モデル動物およびモデル細胞の簡便な作出法の確立に向けて、RNA₁ 法を用いた基礎的検討によって有望な結果を得た。

F 健康危険情報

該当なし

G 研究発表

1 論文発表

- (1) Doi K, Doi H, Noiri E, Nakao A, Fujita T, and Tokunaga K High-throughput single nucleotide polymorphism typing by fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis with capillary electrophoresis Electrophoresis (in press)
- (2) Bannaï M, Higuchi K, Akasaka T, Furukawa M, Yamaoka M, Sato K, and Tokunaga K Single-nucleotide-polymorphism genotyping for whole-genome-amplified samples using automated fluorescence correlation spectroscopy Analytical Biochemistry (in press)
- (3) Omi K, Tokunaga K, and Hohjoh H Long-lasting RNA₁ activity in mammalian

neurons FEBS Letter 558 89-95, 2004

- (4) 徳永勝士 SNP タイピング法 Medical Science Digest 29 4-5, 2003

2 学会発表

- (1) 土井研人、野入英世、藤田敏郎、徳永勝士 進行性腎障害における NAD(P)H oxidase 多型解析 第 48 回日本人類遺伝学会大会、2003 年 10 月、長崎
- (2) 西田奈央、平安恒幸、高須美和、村上康文、陶山明、徳永勝士 DNA コンピューティングによる遺伝子情報解析 第 48 回日本人類遺伝学会大会、2003 年 10 月、長崎
- (3) 佐合典子、小見和也、田村美子、功刀浩、豊岡照彦、徳永勝士、北條浩彦 マウス筋芽細胞由来株 C2C12 細胞における RNA interference 第 26 回日本分子生物学会年会、2003 年 12 月、神戸
- (4) Omi K, Tokunaga K, and Hohjoh H Long-lasting RNA₁ activity in mammalian neurons 第 26 回日本分子生物学会年会、2003 年 12 月、神戸

重症心不全時における心筋ジストロフィン関連蛋白発現量低下の分子メカニズム

分担研究者 熊谷 啓之

群馬大学大学院医学系研究科・臓器病態薬理学・助手

研究要旨

ジストロフィン関連蛋白複合体(DRP)は、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、T0-2ハムスターの遺伝性拡張型心筋症がDRPの一つ、 δ -サルコグリカン(δ -SG)欠損に起因し、ジストロフィン蛋白の分解を伴うことがわかった。さらには後天性心不全モデルでもいくつかのDRP構成因子の発現量減少が見出されるに至った。この発現低下も同様に、蛋白分解によると我々は予測した。その傍証を得るため、私は冠動脈結紮による心不全モデルラットと対照ラット間で、心筋のDRP構成各因子の転写量を比較してみた。

A 研究目的

心不全は死亡あるいは入院に至る最大の原因であり、その患者数は人口の高齢化に伴い増加してきている。特に重症のものの子供は不良であり、拡張型心筋症(DCM)の場合は心移植の適応である。ところか心移植には社会医学的、臨床的な問題が山積しており、これに代わる治療手段の開発が急務となっている。そこで豊岡班は、心不全重症化の分子機序を解明し、これを踏まえた治療法を開発しようとするに至った。

重症心不全は様々な心筋疾患の末期状態で生じうるか、いずれの場合も心筋細胞内骨格と細胞外基質を橋渡すジストロフィン関連蛋白複合体(DRP)が脱落していることを以前、豊岡班は見出した。これによりサルコメアの発生張力が細胞外に伝達されないため、心収縮力が著減すると考えられている。この複合体脱落の機序のヒントとしては、DRP構成因子の一つ、 δ -サルコグリカン(δ -SG)の遺伝子を欠損したハムスター系統、T0-2のDCMが挙げられる。この系統は加齢に従いDCMを自然発症し、検査上、

ジストロフィンの蛋白分解と細胞膜の不安定化が見られる。心筋への δ -SG遺伝子導入によりこれらが防止できることから、T0-2では1つのDRP構成因子の欠損が、DRP全体の崩壊を招き、他のDRP構成因子の蛋白分解につながっていることが示唆される。さらには、イソプロテレノールによるoverdriveで生じさせたラットの心不全でもジストロフィン崩壊がみられ、また、心筋梗塞後の重症心不全モデルラットにおいても、DRP構成因子 α -SGとジストロフィンの蛋白量減少が見い出された。それでは、この発現低下もT0-2ハムスターにおけるジストロフィン崩壊と同様、蛋白分解によるものであろうか。それとも、心不全の進行に伴い転写量の低下などが起こるのであろうか。この疑問に答えるため、私は、冠動脈結紮による心不全モデルラットと対照ラット間で、心筋のDRP構成各因子のmessage量を比較してみた。これにより蛋白量減少の原因か、転写レベルか転写後の機序によるものかを鑑別できることか期待される。

B 研究方法

概略を述べると、心不全モデルラットと対照ラットの心臓を解剖学的部位別に分け、同一部位の心筋に発現している DRP 構成各因子（今年度は、実験手技上の理由により α -SG のみ調査し得た）の mRNA 量を Northern blotting (dot blot) により比較した。心不全モデルとしては、冠動脈結紮により左室梗塞を起こさせてから 8 日経過したラットを用いた。まず、心不全モデルと対照各 4 匹ずつから心摘出し、右心室、心室中隔、左室非梗塞部位、および梗塞巣に分別した。次に、それぞれから、Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform 法により total RNA を抽出した。最後にすべての RNA サンプルの濃度を $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に合わせ、核酸ハイブリダイゼーション用の膜上にスポットし、 α -SG cDNA より作成したプローブでプロッティングを行った。Loading control としてグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の message を用いた。

(倫理面への配慮)

ラットに対する冠動脈結紮や心摘出などの操作はエーテル麻酔下で行い、苦痛を最小限にとどめるよう心かけた。

C 研究結果

図 1 に示すように、心不全モデルにおいても α -SG の message 量はコントロールと

比較してほとんど差がないことがわかった。

D 考察

このことから、心筋梗塞後の重症心不全で見られる α -SG の蛋白量低下は、転写レベルで起こっているのではないことが示された。この結果は、 α -SG の蛋白分解亢進の可能性を強く示唆する。一体どのプロテアーゼによりどのように分解されるか、については今後の研究が待ち望まれる。

E 結論

私は心不全モデルラットを用いて、重症心不全時における DRP 構成因子の蛋白発現量低下機序解明の一端を担った。私は、心筋梗塞後の心不全における α -SG 発現量低下が転写後の機序によることを示し得た。

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 なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

<<図・表>>

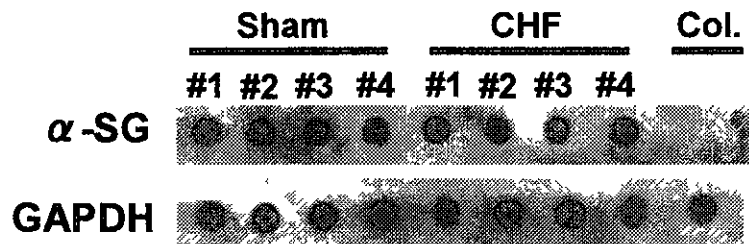


図1 dot blot (Northern) 法による、 α -SG mRNA量の比較

心不全モデルラットまたは対照ラットの左室(非梗塞部位)から抽出した total RNAを核酸ハイブリダイゼーション用の膜に10 μ gずつスポットした。プロットイングは、 α -SG またはGAPDHのcDNAを基に作成したプローブを用いて行った。 α -SG発現のnegative controlとして、ラット腸管由来の total RNAを用いた。

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

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、拡張型心筋症の治療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の中で、本稿では2年度目の進捗状況を報告する。①小型モデル動物でrescueに成功した遺伝子治療の成果と、このデータから心不全が一般にノストロインの崩壊により重症化する機構を提唱した。②臨床例で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・増幅後にモデ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③ト型DCMを効で作成する為に、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、霊長類センターで開始した。先ず、アゲザルを用いてvector自体の安全性確認実験を行っている。

研究協力者

小澤 敬也

自治医大・遺伝子治療部・教授

ト部 匡

自治医大・遺伝子治療部・助手

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

中田 樹海

溪 航

手塚 あさき

海老澤 崇

丹羽 陽子

東京大学・器官病態内科

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。

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、研究協力者の仲澤、河田、中田、手塚、海老澤と丹羽は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。なお、結果の一部は河田の報告に記載し、重複を避けた。

A 研究目的

本年度は当初の計画に従い、遺伝子・細胞移植治療の実践を強力に推進することを目指した。

B 研究方法および結果

研究協力者の小澤とト部は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型アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を昆虫細胞、組換えバキュロウイルスを用いて作製する手

1) 心不全の重症化機構の新たな概念。

8-SG 遺伝子変異の結果、DCMを来たす事はハムスター動物モデルとトて立証されているか、先天性の遺伝子欠損に由来する心不全症状が何故幼若期から発症せず、成熟後に著明になるか説明かできない。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FIB系とDCMを発症するTO-2

系ハスターを用い、心機能を両心カテテル検査でフォローした結果、5週令では両群間に差が認められなかったが、15,25,40週齢で(LVP, [dP/dt]_{max}, [dP/dt]_{min})に代表される収縮能が成長と共に増加せず、悪化した。更に生後25-40週目からLVEDPとCVPの上昇に代表される鬱血状態が加わり、ト臨床例と共通した病態を示した。血行動態測定後に正常細胞膜を透過しないエウァンソール(EB)を静注して16時間後に心筋を摘出し、ノストロフィンのFITCラベルした特異抗体と用いて同一視野でEBと二重蛍光観測法で観測した。心不全が顕在化する前はノストロフィンが細胞膜に局在したか、心機能が悪化するに従い②ノ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か、週齢が進むに従いノ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、ノストロフィンが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ている。特に興味有る事に、ノストロフィンの量と動物の予後は極めて良く相関した。

次に先天的な心不全だけでなく後天的にイブプロフェンを過剰投与して作成した急性心不全に於いても同様のノストロフィンのtranslocation、断片化とEBの細胞内浸潤が認められる事から先天性、後天性、急性および慢性を問わず、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) 細胞移植による心不全治療。

心筋病変が進行後には上記の遺伝子治療にも過大な期待は出来ない。この臨床的な隘路を考慮して、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。これを皮膚と筋芽細胞を用いて同種間移植で立証した。次に

①予備検討としてF1B由来の筋芽細胞を特殊培地で大量増幅する事が可能となった。

②筋芽細胞移植。上記のF1B由来筋芽細胞を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、特に炎症性細胞の浸潤等を認めず、拒絶反応を示さなかった。この結果に基づき開胸手術下に左室心筋層に筋芽細胞を投与して4-10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細胞に分化し、細胞膜にδ-SG蛋白を認めた。更に骨格筋myosin重鎖に対するWestern blottingの結果、投与量より遥かに多量の蛋白発現を認めた。

これは筋芽細胞の移植後に増殖・分化する証拠であり、今後の細胞移植治療の方針に大きな期待を与える。

3) RNAiによる心不全増悪因子の発現抑制。

現在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%について今後トクハプロエクトの成果として徐々に解明される