

と予想するか、現段階では未だ不明の部分が多い。豊岡らは心不全の増悪因子として心筋細胞内因性のカルシウムの活性化によりノストロフィンの崩壊が心不全を重症化させると考えた。既に antisense DNA で検討したか、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。RNAi の遺伝子発現抑制効果は非常に強力であるか、特異的な抑制部位の設計が難しい。現在、候補の遺伝子配列が数箇所挙げられ、その抑制効果を検討している。

4) サルを用いた心不全状態の作製。

大型動物にヒトに類似した再現性の良い心不全の病態を作製する事は容易でない。豊岡は本研究が認められた直後から国立感染症研究所付属、霊長類センターから御協力頂いている。この間、文部科学省にアケサルを用いる申請を提出して、平成15年10月に大臣承認を頂いた。

先ず、人工ペースメーカーによる頻脈刺激によりサルに於いても再現性の良い心不全状態を作製可能か検討した。最初の数頭は刺激用電極カソードを目的にして開発されたため、多くの工夫を要したが、最終的に心不全状態を作製する事ができた。今後、この病態で rAAV の生物学的、および遺伝学的な安全性を順次行う予定である。

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路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か、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。

D 考察

T0-2 ではノストロフィン関連タンパク複合体 (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)。ノストロフィンは細胞膜直下であり、DAP と複合体を形成している。今年度はノ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、ノ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、ノストロフィンの細胞質から細胞膜へのソフト及び細胞膜透過性亢進とも関連していた。

E 結論

以上の結果はノ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。

F 健康危険情報

該当なし

(倫理面への配慮)

当該研究は実験に霊長類を用いる事から、学内の倫理委員会と文部科学省の大臣許可を申請し、承認を受けて為された。

G 研究発表

1 論文発表

- ①Hori K, Shin WS, Hemmi C, Toyo-oka T, Makino T High fidelity SNP genotyping using sequence-specific primer elongation and fluorescence correlation spectroscopy *Curr Pharm Biotechnol* 4 477-84, 2003
- ②Hakamada-Taguchi R, Uehara Y, Kuribayashi K, Numabe A, Saito K, Negoro H, Fujita T Toyo-oka T, Kato T Inhibition of hydroxymethylglutaryl-coenzyme a reductase reduces Th1 development and promotes Th2 development *Circ Res* 93 948-56, 2003
- ③Yoshida H, Takahashi M, Koshimizu M, Tanonaka K, Oikawa R, Toyo-oka T, Takeo S Decrease in sarcoglycans and dystrophin in failing heart following acute myocardial infarction *Cardiovasc Res* 59 419-27, 2003
- ④Abe T, Hikiji H, Shin WS, Koshikiya N, Shima S, Nakata J, Susami T, Takato T, Toyo-oka T Targeting of iNOS with anti-sense DNA plasmid reduces cytokine-induced inhibition of osteoblastic activity *Am J Physiol (Endocrinol Metab)* 285 E614-21, 2003
- ⑤Numabe A, Ara N, Hakamada-Taguchi R, Suzuki N, Hirawa N, Kawabata Y, Negoro T, Nagata T, Goto A, Toyo-Oka T, Fujita T, Uehara Y Effects of the anti-platelet aggregation drug diltiazem on cognitive function in Dahl salt-sensitive rats *Hypertens Res* 26 185-91, 2003
- ⑥Koizumi T, Hikiji H, Shin WS, Takato T, Fukuda S, Abe T, Koshikiya N, Iwasawa K, Toyo-oka T Cell density and growth-dependent down-regulation of both intracellular cal-

cium responses to agonist stimuli and expression of smooth-surfaced endoplasmic reticulum in MC3T3-E1 osteoblast-like cells

J Biol Chem 278 6433-9, 2003

- ⑦Toyo-oka T, Kawada T, Nakata J, Xie H, Urabe M, Masui F, Ebisawa T, Tezuka T, Iwasawa K, Nakajima T, Uehara Y, Kostin S, Schaper J, Nakazawa M, and Ozawa K Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure -A novel scheme for the progression of cardiac dysfunction in humans and animal models and its amelioration with gene therapy- *Proc Natl Acad Sci USA*, (In press)

2 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」第76回日本薬理学会年会
- ②Nakata J, Kawada T, Iwasawa K, Xi H, Nakazawa M, Hikiji H, & Toyo-oka T 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
- ③Kawada T, Nakata J, Nakazawa M, Tezuka A, Hemmi C, Iwasawa K, Satoh H, & Toyo-oka T 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。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。第26回心筋代謝研究会。

⑤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. rAAV の血清型による遺伝子発現の比較と交叉性の検討. 第 54 回日本薬理学会北部会。

⑥Toyo-oka T, Kawada T, Nakata J, Nakazawa M, & Ozawa K 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

⑦T 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*

⑧T Kawada, N Sago, A Tezuka, A Hirata, Y Niwa, M Nakazawa, T Toyo-oka Paradoxical improvement of monocrotalin -induced pulmonary hypertension (PH) and right ventricular (RV) dysfunction by l-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
米国特許取得、拡張型心筋症の遺伝子治療剤, A Gene Therapy Agent of Dilated Cardiomyopathy US Patent No US 6,589,523 B2 issued on July 8, 2003

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 編者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Toyo-oka T and Kawada T	Gene-based therapy of advanced heart failure secondary to the disruption of dystrophin-related proteom	N S Dhalla, L Hryshko, E Kardami, P K Signal	<i>Signal transduction and cardiac hypertrophy</i>	Kluwer Academic Publisher	Boston	2003	p449-459

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hori K, Shin WS, Hemmi C, Toyo-oka T, Makino T	High fidelity SNP genotyping using sequence-specific primer elongation and fluorescence correlation spectroscopy	<i>Curr Pharm Biotechnol</i>	4	477-84	2003
Hakamada-Taguchi R, Uehara Y, Kuribayashi K, Numabe A, Saito K, Negoro H, Fujita T, Toyo-oka T, Kato T	Inhibition of hydroxymethylglutaryl-coenzyme a reductase reduces Th1 development and promotes Th2 development	<i>Circ Res</i>	93	948-56	2003
Yoshida H, Takahashi M, Koshimizu M, Tanonaka K, Okawa R, Toyo-oka T, Takeo S	Decrease in sarcoglycans and dystrophin in failing heart following acute myocardial infarction	<i>Cardiovasc Res</i>	59	419-27	2003
Abe T, Hikiji H, Shin WS, Koshikaya N, Shuma S, Nakata J, Susami T, Takato T, Toyo-oka T	Targeting of iNOS with antisense DNA plasmid reduces cytokine-induced inhibition of osteoblastic activity	<i>Am J Physiol (Endocrinol Metab)</i>	285	E614-21	2003

Numabe A, Ara N, Hakamada-Taguchi R, Suzuki N, Hirawa N, Kawabata Y, Negoro T, Nagata T, Goto A, Toyoo-Oka T, Fujita T, Uehara Y	Effects of the anti-platelet aggregation drug dilazep on cognitive function in Dahl salt-sensitive rats	<i>Hypertens Res</i>	26	185-91	2003
Koizumi T, Hikiji H, Shun WS, Takato T, Fukuda S, Abe T, Koshikiya N, Iwasawa K, Toyoo-oka T	Cell density and growth-dependent down-regulation of both intracellular calcium responses to agonist stimuli and expression of smooth-surfaced endoplasmic reticulum in MC3T3-E1 osteoblast-like cells	<i>J Biol Chem</i>	278	6433-9	2003
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	<i>J Gen Virol</i>	84	2127-2132	2003
Krebsbach PH, Zhang K, Malik AK, Kurachi K	Bone marrow stromal cells as a genetic platform for systemic delivery of therapeutic proteins in vivo human factor IX model	<i>J Gene Med</i>	5	11-7	2003
Muramatsu S, Wang L, Ikeguchi K, Fujimoto K, Nakano I, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Nakano I, Ozawa K	Adeno-associated viral vectors for Parkinson's disease	<i>Int Rev Neurobiol</i>	55	205-22	2003
Urabe M, Kogure K, Kume A, Sato Y, Tobita K, Ozawa K	Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration	<i>J Gen Virol</i>	84	2127-32	2003
Ideno J, Mizukami H, Honda K, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Saito T, Ishibashi S, Ozawa K	Persistent phenotypic correction of central diabetes insipidus using adeno-associated virus vector expressing arginine- vasopressin in Brattleboro rats	<i>Mol Ther</i>	8	895-902	2003
Itoh A, Okada T, Mizuguchi H, Hayakawa T, Mizukami H, Kume A, Takatoku M, Komatsu N, Hanazono Y, Ozawa K	A soluble CAR-SCF fusion protein improves adenoviral vector-mediated gene transfer to c-Kit-positive hematopoietic cells	<i>J Gene Med</i>	5	929-40	2003
Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Hasegawa M, Ookawara S, Haru K, Terao K, Ozawa K, Hanazono Y	Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells	<i>Transplantation</i>	76	1061-7	2003
Zhang K, Kurachi S, Kurachi K	Limitation in use of heterologous reporter genes for gene promoter analysis Silencer activity associated with the chloramphenicol acetyltransferase reporter gene	<i>J Biol Chem</i>	278	4826-30	2003

Allen DL, Teitelbaum DH, Kurachi K	Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion in vitro	<i>Am J Physiol (Cell Physiol)</i>	284	C805-15	2003
Ameri A, Kurachu S, Sueishi K, Kuwahara M, Kurachu K	Myocardial fibrosis in mice with overexpression of human blood coagulation factor IX	<i>Blood</i>	101	1871-3	2003
Miyashita R, Tsuchiya N, Hikami K, Kuroki K, Fukazawa T, Biji M, Kallenberg CG, Hashimoto H, Yabe T, Tokunaga K	Molecular genetic analyses of human NKG2C (KLRC2) gene deletion	<i>Int Immunol</i>	16	63-8	2004
Iizuka K, Morita N, Nagai T, Hanada A, Okita K, Yonezawa K, Murakami T, Kitabatake A, Kawaguchi H	A 44-kDa of protein identical to the N-terminal amino acid sequence of MCT1 in human circulation	<i>Mol Cell Biochem</i>	248	217-23	2003
Kamada K, Houkin K, Takeuchi F, Ishii N, Ikeda J, Sawamura Y, Kuriki S, Kawaguchi H, Iwasaki Y	Visualization of the eloquent motor system by integration of MEG, functional, and anisotropic diffusion-weighted MRI in functional neuron navigation	<i>Surg Neurol</i>	59	352-61	2003
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	<i>Electrophoresis (in press)</i>			
Bannai M, Higuchi K, Akesaka T, Furukawa M, Yamaoka M, Sato K, and Tokunaga K	Single-nucleotide-polymorphism genotyping for whole genome-amplified samples using automated fluorescence correlation spectroscopy	<i>Analy Biochem (in press)</i>			
Omi K, Tokunaga K, and Hohjoh H	Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons	<i>FEBS Letter</i>	558	89-95	2004
徳永勝士	SNP タイピング法	<i>Medical Science Digest</i>	29	4-5	2003
Iizuka K, Morita N, Nagai T, Hanada A, Okita K, Yonezawa K, Murakami T, Kitabatake A, Kawaguchi H	Effects of L-arginine on spontaneous contraction of the rat portal vein	<i>Pflügers Arch</i>	446	30-5	2003
Kamada K, Houkin K, Takeuchi F, Ishii N, Ikeda J, Sawamura Y, Kuriki S, Kawaguchi H, Iwasaki Y	Comparative effects of perindopril with enalapril in rats with dilated cardiomyopathy	<i>J Cardiovasc Pharmacol</i>	42	S105-9	2003
Shimamura K, Zhou M, Toba M, Kimura S, Higuchi T, Kawaguchi H, et al	Quinapril inhibits progression of heart failure and fibrosis in rats with dilated cardiomyopathy after myocarditis	<i>Mol Cell Biochem</i>	251	77-82	2003

Watanabe K, Saito Y, Ma M, Wahed M, Abe Y, Hirabayashi K, Narasimhan G, Wen J, Suresh P, Ali F, Shirai K, Soga M, Nagai Y, Nakazawa M, <i>et al</i>	Angiotensin II type I receptor blocker, valsartan, prevented cardiac fibrosis in rat cardiomyopathy after autoimmune myocarditis	<i>J Cardiovasc Pharmacol</i>	41	S105-10	2003
Juan W, Nakazawa M, <i>et al</i>	FR167653 suppresses the progression of experimental autoimmune myocarditis	<i>Mol Cell Biochem</i>	246	39-44	2003
Tachikawa H, Kodama M, Hui L, Yoshida T, Hayashi M, Abe S, Kashimura T, Kato K, Hanawa H, Watanabe K, Nakazawa M, <i>et al</i>	Insurmountable antagonism of AT-1015, a 5-HT ₂ antagonist, on serotonin-induced endothelium-dependent relaxation in porcine coronary artery	<i>J Pharm Pharmacol</i>	55	827-32	2003
Mariyama S, Kato K, Kodama M, Okura Y, Hirono S, Fuse K, Hanawa H, Nakagawa O, Nakazawa M, <i>et al</i>	Efficacy of fluticasone propionate compared with beclomethasone dipropionate in bronchial asthma improvement in compliance and symptoms by fluticasone	<i>Allergy Asthma Proc</i>	24	347-51	2003
Rashid M, Nakazawa M, Nagatomo T	Sarcolemmal fragility secondary to the degradation of dystrophin in dilated cardiomyopathy, as estimated by electron microscopy	<i>Exp Clin Cardiol</i>	8	67-70	2003
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	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
Suzuki T, Hasegawa T, Suzuki E, Sasahara K, Kawada T, <i>et al</i>	Efficacy of fluticasone propionate compared with beclomethasone dipropionate in bronchial asthma improvement in compliance and symptoms by fluticasone	<i>Allergy Asthma Proc</i>	24	347-51	2003
Suzuki T, Hasegawa T, Suzuki E, Sasahara K, Kawada T, Koya T, Akazawa K, Satoh H, Gejyo F	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。	日本薬理学会雑誌	123	14P	2004
Kawada T, Hemmu C, Fukuda S, Tezuka A, Iwasawa K, Nakazawa M, Sato H, Toyo-oka T	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-	<i>Cardiac Practice</i>	14	171-180	2003

20030696

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