

厚生労働科学研究研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

Ⅱ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  
(H14-トランスー013)

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17(2005)年10月

主任研究者 豊岡 照彦

## 目 次

I. 総括研究報告	
ヒ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-----	1
豊岡照彦	
(資料) 参考図表一覧	
II. 分担研究報告 高力価5型アデノ随伴ウイルスベクター作製法に関する研究	
1. 高力価5型アデノ随伴ウイルスベクター作製法に関する研究-----	11
小澤敬也	
(資料) 特になし	
2. 重症性信金機能障害症の予防治療法開発に向けて-----	14
倉地幸徳	
(資料) 参考図一覧	
3. 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-----	18
仲澤幹雄	
(資料) 参考図一覧	
4. 各種血清型rAAVベクターによる遺伝子発現の比較と免疫交叉性の検討---	21
河田登美枝	
(資料) 参考図一覧	
5. RNAiによるcalpain発現抑制に関する研究-----	26
土屋隆英	
(資料) 参考図一覧	
6. 新規SNP解析技術の開発およびRNAiによる遺伝性筋疾患モデル動物作出に 関する研究 -----	32
徳永勝士	
(資料) 特になし	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	40

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）

総括研究報告書

ヒト型重症心不全の作成と遺伝子・再生医療特許の実用化に関する研究

主任研究者 豊岡 照彦 前東京大学・医学部・器官病態内科・教授  
現東北大学・先進医工学研究機構・生命機能科学分野・教授

研究要旨;ヒト重症心不全の遺伝子治療開発の前臨床試験を行う為に、主任研究者は①カドによる心不全の作製とヒト病態との比較、②骨格筋芽細胞の心筋再生、③脂肪幹細胞から心筋細胞への再生、④Max-Planck研究所と共同で心移植例の心筋ジストロフィン関連蛋白の発現の検討をした。

更に研究協力者らは現在の遺伝子治療法を改善する為に、⑤恒久的な遺伝子発現を目指して投与遺伝子のプロモーター部分の改良、⑥新たな心不全モデルについてproteome解析を行い、⑦遺伝子治療用のrAAVベクターの改良と大量生産を目指し、⑧心不全の増悪因子と目されるcalpainの発現をRNAiで抑制する基礎実験を推進した。これらの分野を統合して遺伝子治療と再生医療の共同開発を目指した結果、心不全の重症化機構も含め、大きな進展が得られた。

分担研究者

小澤敬也、卜部匡司

自治医科大学・遺伝子治療研究部

倉地幸徳、安部貴洋

産業技術総合研究所・年齢軸生命工学研究センター

仲澤幹雄

新潟大学医学部保健学科・基礎生体情報学

河田登美枝

新潟大学・医歯学部附属病院・薬剤部

土屋隆英、神沢信行、本田みちよ

上智大学・理工学部・化学科

徳永勝士、佐合典子

東京大学医学系研究科・人類遺伝学

研究協力者

増井藤子、手塚あさき、海老澤崇史、黒澤京子

東京大学医学部・器官病態内科

行う。先ず、遺伝子治療と再生医療の有効性を確認するには再現性の良い心不全状態を作成して確認する必要がある。今回は、①心室頻脈電気刺激により心不全を作製して(図1-4)、ヒト重症心不全患者の管理と同様に胸部X線検査、心電図、各種生理学的検査、血液生化学検査、特に心不全の経過を観察する為に、血中BNPとトロポニン-Tのレベルを測定する。②動物を犠牲にする直前に正常の細胞膜を透過しない蛍光色素Evans blue(EB)を静注して*in situ*における細胞膜の透過性を検討する。③心不全の再生医療に関して骨格筋芽細胞(SkMb)、又は、④脂肪幹細胞から心筋再生を試みる。また⑤DCMモデル動物とヒトに認めたジストロフィン(Dys)と、その関連タンパク複合体(Dystrophin-associated proteins; DAP)の崩壊(Toyo-oka *et al.*, *PNAS*, 2004)を心不全末期の心移植時に摘出した心筋炎症例等の後天性心不全に拡大してヒト心臓で確認する。

分担研究者らは、上記の研究を支援する一方、⑥遺伝子治療に適した長期間安定した恒常的な

A. 研究目的

ヒト重症心不全の遺伝子治療と再生医療を実現する為の前臨床試験をヒトに近い種のカドを用いて

遺伝子発現ベクターの設計、⑦心不全心筋のプロテオーム解析、⑧治療用ベクターの大量生産、⑨RNAiによる増悪遺伝子の発現抑制を検討する。

以上、9項目に関する基礎、および臨床研究を総合的に研究者間の連携作業により推進する。

## B.研究方法

その概略を前記の番号順に記載する。

- ① 従来、頻脈刺激による心不全は可逆性でこのモデルとして、適切でないと考えられたが、これを多くの形態病理、免疫組織学、生理的な機能、生化学、代謝および分子生物学的に検証する。
- ② 正常ハムスターの骨格筋から既報により、SMblを得て(図5)、DCMハムスターの心臓に細胞移植し、その生着状態を一般病理学検査、及び免疫組織学的に解析した。更に、豊岡らは患者に浸襲の少ない脂肪幹細胞から心筋細胞の再生を検討した。
- ③ マウス褐色脂肪組織から幹細胞を得て、培養条件を種々工夫して心室筋型の心筋細胞の発現を探索した。
- ④ Max-Planck研究所のJ. Schaperらと協力してヒト重症心不全で心移植に至った心筋のDysとDAPの発現を検討する。即ち、23例の心移植者のDys,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -と $\delta$ -SGの発現を内部標準として正常ラット骨格筋をWestern blotting解析して各蛋白の発現量を定量した。この時、内部標準としてラット骨格筋を用いた。
- ⑤ 現在の遺伝子治療法を改善する為に、分担研究者の倉地らは恒久的な遺伝子発現を目指し、投与遺伝子のプロモーター部分に分子生物学的な設計を加えた。
- ⑥ 仲澤らは細胞移植実験を進める一方、新たな心不全モデルについてproteome解析を行った。即ち、心筋ミトコンドリアによる自己免疫性心筋症を複製後に、心筋をトリプシン処理して二次元電気泳

動によりペプチドを分画した。この結果、心不全状態に特異的に表れるスポットを質量分析器で解析した。

- ⑦ 小澤らは遺伝子治療用のrAAVベクターの改良と大量生産を目指し、組換えバキュロウイルスを用いて昆虫細胞で5型AAVベクターを大量作製し、高力価のAAVベクターを得ることを試みた。
- ⑧ 土屋と徳永らは心不全の増悪因子と目されるcalpainの発現を心筋細胞によりRNAiで抑制する基礎実験を推進した結果、マウス細胞株P<sub>19</sub>CL<sub>6</sub>を用いて2種の候補RNAiを選別した。この時にベクターの感染効率の差を避ける為に、microinjection法で直接投与した。対照にはeGFPを投与して遺伝子発現を確認した。

以上の学際的な諸分野を統合して遺伝子治療と再生医療の共同開発を目指す。

(倫理面への配慮)

動物愛護の観点から、*Ca*を用いた実験は文部科学省に申請し、約1.5年を要して大臣許可を頂いた。また遺伝子治療を成功させるには、正確な遺伝子診断が不可欠である。ヒトの遺伝子治療を推進するには受診者の無用な警戒心や疑問を払拭しなければ、全面的な御協力は頂けない。臨床心理や医療哲学領域との共同作業を通し、内外の状況を参考にしつつ、我国固有の事情も考慮した新たな理念が必要である。今後の遺伝子診断・発症前診断の社会システムの構築は新しい医療研究を推進する上で、最も肝要な課題と筆者は認識する。

これらの点を重視して筆者らはハルシキ宣言と遺伝子診療関連8学会等の勧告を遵守し、またホームページを開設して学外者にも検査結果のプライバシー保護の面で理解が得られるよう努力している。

実際、筆者らは試料と検査結果の連結性を遮断して、受診者のプライバシーを保つ為の具体的な提案を厚生労働省が組織する「特発性心筋症調

査・研究班」に向けて行った。

### C. 研究結果

① 当研究室の予備検討で、胸部X線検査は刺激中のみ軽度の心拡大を認めるが、刺激中止後には完全に刺激前の状態に戻った(図6)。心電図(図7)、心エコー検査(図8, 9)、カテーテルによる血行動態など生理的な指標も、また心不全の生化学的マーカーの血中BNPレベルも刺激を中断すると前値に戻った(図10)。このように、従来の臨床検査では一見、全て可逆性の変化に見えた。

しかし蛍光二重染色の結果、細胞膜透過性が亢進した細胞にEBが選択的に取り込まれ、その細胞ではDysの免疫組織学的な二重蛍光染色から、崩壊像が観察された。更に一般病理検査で心筋に高度の線維化が認められ、従来の解釈とは大きく異なる(図11-13)。

② 正常対照、goldenハムスターの大腿四頭筋からSkMbを採取、培養後にDAPIとDiIで核と細胞膜を蛍光ラベルした。~ $3 \times 10^6$ 個/ $30 \mu\text{l}$ を5-6週齢のTO-2の左室心筋層に注入した。5-15週後に心摘出し、マーカーと特異抗体により $\delta$ -SGを免疫染色してdonorのSkMbの生着を確認した(図15, 16)。生着した細胞の特徴、及びrecipient細胞との融合を免疫染色で検討した。

移植後の心筋細胞の一部に $\delta$ -SGが認められ、TO-2で欠損しているrecipient細胞中に $\delta$ -SG陽性細胞が共存していた。その中に介在板蛋白のconnexin43で染色される細胞を認めた(図4-5)。

③ 脂肪幹細胞から自律拍動する細胞を認め、電顕で明瞭なsarcomereが確認されて心筋細胞と同定した。

④ ヒ移植時に得たDCM症例の全例にDysの断片化を認め、分解産物の分子量と分解の程度から6型に分類された。各SGについても検体間で発現に差異が見られた。

なお、一部の図は共同研究者が論文発表まで公表を控えさせて頂いた。今回の結果は「Dysが崩壊することにより心不全が重症化する」筆者らの仮説を支持し、Dys及びDAPの発現様式と重症心不全をきたす様々な病態との相関が予想される。前記の先天性ハムスターに加え、ラットによるイブプロフェノールの過剰負荷による急性心不全、ラットの冠動脈結さつ後の残存心筋が慢性心筋梗塞、前記のサルの頻脈刺激による慢性の心不全、およびヒトDCM症例にも共通してジストロフィンとDAPの崩壊と心筋細胞膜の透過性の亢進を来す悪循環の結果、心不全に至る仮説を図19に纏めた。

このDAP崩壊に心筋細胞内因性のcalpainが関与する根拠として、

- ① 身の殆どの細胞に少量ながらubiquitousに発現しているが、心筋や骨格筋等の筋組織に多量に含まれること(Toyo-oka *et al.*, *BBRC*, 1978; Toyo-oka & Masaki, *JMCC*, 1979)、
- ② 心不全状態では、ヒトモデル動物でも心筋細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇してcalpainの活性化に必要な条件を満たすこと、
- ③ 心不全状態では特に心筋内calpainの活性と量が共に増加し(図20, Takahashi *et al.*, *Cardiovascular Res.*, 2005)、
- ④ 心筋から精製したcalpainは*in vitro*でDAPの一部を加水分解するが、その基質選択性が*in vivo*の特異的な崩壊と完全に一致すること(図21, Yoshida *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, 2003)、
- ⑤ 心不全状態の心筋細胞内のDys量と心機能を代表する左室拡張末期圧(LVEDP)がDCMでも(図22, Toyo-oka *et al.*, *PNAS* 2004)、広範囲慢性心筋梗塞の残存心筋でも(図23, Takahashi *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, 2005)、共通して非常に強く相関すること、
- ⑥ 臨床研究で心不全に一部有効なアンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACEI)やアンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)によりcalpainの活性化とDAPの崩

壊が軽減し、心機能の悪化を防止すること(図20、Takahashi *et al.*, *Cardiovasc.Res.*, 2005)。また

- ⑦ ヒトDCM心筋のmicroarray解析の結果、calpainのmRNA発現増加が2002年の米国生理学会から公表され、筆者らが報告した上記の各種動物モデルと共通している。

以上の種々の原因による心不全に際して、calpainが活性化する病態を図24に示す。現在、calpainに特異的な活性阻害薬が無く、またcalpainのノックアウトマウスに世界中が取り組んで、致死性のため、未だ開発されていない状況はcalpainが生命維持に本質的に重要な機能を有する事を示唆している。各種、先天性、後天性、急性および慢性の病態でジストロフィンとDAPの構成タンパクの代謝性変化を表に纏めた

なお分担研究者の研究結果は、以下に添付した各人の報告書に詳述する。

#### D. 考察

##### 1) 達成度について

ヒトを実験に供する際に文部科学省の大臣承認に約1年半を要した。更に各種生理、生化学検査を繰返し最終的にEBにより*in vivo*で心筋細胞膜の透過性を検討するには1頭当たり平均2年と200万円の飼育費と検査費用が必要となる。重症心不全をヒトに作製した前例も無い状態から出発して、現在、極限まで心機能を低下させる条件設定が確定した段階で、当初計画の中間点に位置する。この貴重な成果を治療開発に活かす為今後も積極的な御支援を賜りたい。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について。

各種生理学、生化学的な臨床検査にヒト用の機器を流用可能で新たな機器の開発の必要が無く、

時間と経費の大幅な削減に繋がった。特にヒトは直立歩行してヒトに生理機能も近似する事から交感神経系の関与など小型動物では得られない重要な所見が多数得られ、学術的・国際的意義が共に極めて大きい。

また、ヒトを用いた研究の是非について、本年3月16日の朝日新聞の「臨床研究のあり方に一石」にも触れられたように再生医療にはヒトの実験は不可欠である。最近の研究者と愛護団体の論争に重症心不全の患者さんか、その家族も受益者代表として加えて、議論を詰め、早急に結論を出して頂きたい。

##### 3) 今後の展望について

重症心筋障害は $\delta$ -sarcoglycan( $\delta$ -SG)の欠損にも起因するが、その予防、治療法開発には $\delta$ -SGの遺伝子治療的補填や最終段階におけるcalpainによる筋Dys分解の抑制を可能にする遺伝子治療法の開発が求められる。実験動物としてヒトを用い、現在11頭目を検討中であるが、倫理的にヒトでは得られない貴重なデータが得られつつある。幸い遺伝子治療に必要なrAAVの大量生産が可能になり、当初目標の遺伝子治療の有効性と安全性の確認に関して短期的な結果は早晩発表可能と予想する。

#### E. 結論

当初の計画は主に倫理問題と前例の無い領域で研究の進展は遅かったが、現段階で基本的な心不全作製の目標はほぼ達成されたと自認する。一方、ヒトを実験に用いる事の難しさと重要性を改めて痛感した。遺伝子治療や再生医療は近未来で実現可能な研究領域と考えられ、世界的にも競争が熾烈であるが、筆者らは現在、そのトップ集団に位置すると自負する。我国でも早急に法制面、人的および経済的な御支援を各方面から積極的に頂ければ幸いである。

## F. 健康危険情報

特に健康危険に関する問題は無かった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kawada T, Nakazawa M, Nakauchi S, *et al.*, Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 99; 901-906, 2002.
2. Yoshida 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: 419-427, 2003.
3. Toyo-oka T, Kawada T, Nakata J, *et al.*, Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 101:7381-7385, 2004.
4. Hori M, Sasayama S, Kitabatake A, *et al.* Low-dose carvedilol improves left ventricular function and reduces cardiovascular hospitalization in Japanese patients with chronic heart failure: the Multicenter Carvedilol Heart Failure Dose Assessment (MUCHA) trial. *Am.Heart J.* 147: 324-330, 2004.
5. Takahashi M, Tanonaka K, Yoshida H, *et al.*, Effects of ACE inhibitor and AT(1) blocker on dystrophin-related proteins and calpain in failing heart. *Cardiovasc.Res.*, 65:356-65, 2005.

6. Toyo-oka T. and Kawada T. Gene-based therapy of advanced heart failure secondary to the disruption of dystrophin-related proteom. *Signal transduction and cardiac hypertrophy*, Eds. Dhalla NS, Hryshiko L, Kardami E, Singal PK. Kluwer Acad Publ. (Boston), 449-459, 2003.
7. Kawada T, Masui F, Kumagai H, Koshimizu M, Nakazawa M, and Toyo-oka T. A novel paradigm for the development of advanced heart failure- Assessment by gene therapy. (A review) *Pharmacol. & Therap.* 2005 (In press).

### 2. 学会発表

1. 心筋細胞移植による重症心不全の治療、手塚あさき、河田登美枝、仲澤幹雄、豊岡 照彦。第77回薬理学会年会，横浜，2005年3月24日。
2. Preclinical study on the development of gene- and cell-based therapy of advanced heart failure. The 363<sup>rd</sup> Symposium of International Society of Heart Failure, Mar. 18, 2004.

## H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 米国特許取得、T. Toyo-oka. "A gene therapy agent of dilated cardiomyopathy", U.S. Patent No. US6,589,523 B2 issued on July 8, 2003.
2. 現在、国内特許の申請中。

## 参考図



図1. 肋による心不全作成手術の左肋間開胸後。

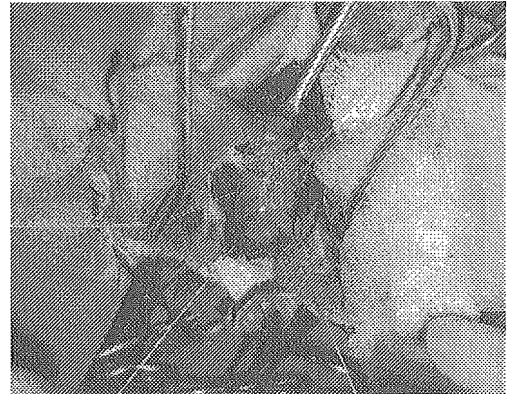


図2. 心外膜剥離後。

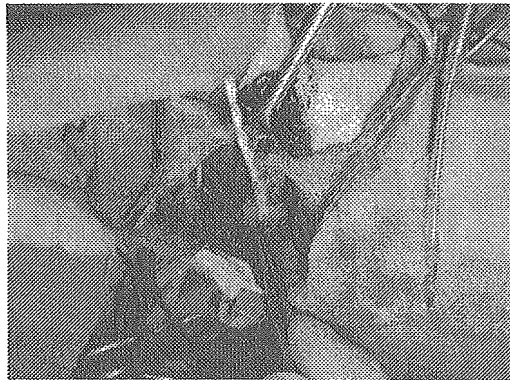


図3. 刺激用電極の逢着。



図4. 特注のペースメーカーを皮下に包埋。

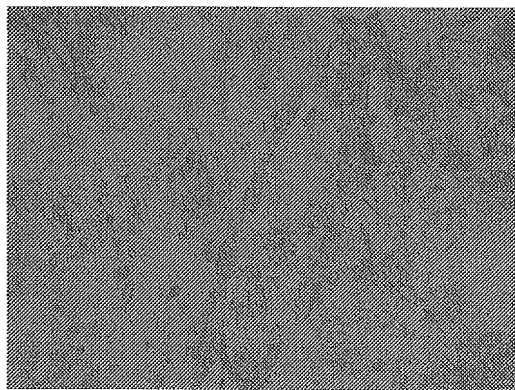


図5. 対照goldenハスターの骨格筋より得た myoblast.  $\delta$ -SG抗体の免疫染色により myotubeに分化した細胞は $\delta$ -SG蛋白を発現している。

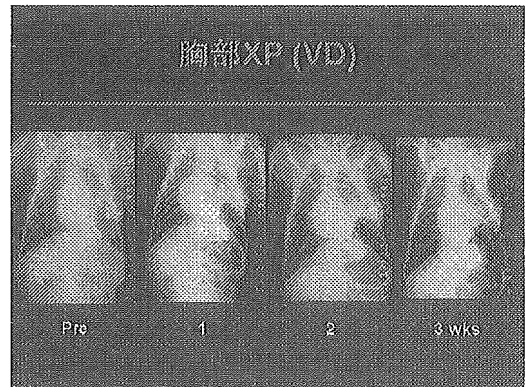


図6. 頻脈刺激前後の心拡大。1-2週の刺激中のみ心胸郭比が一過性に増大する。



# ECG

Pre-pacing

On

Off

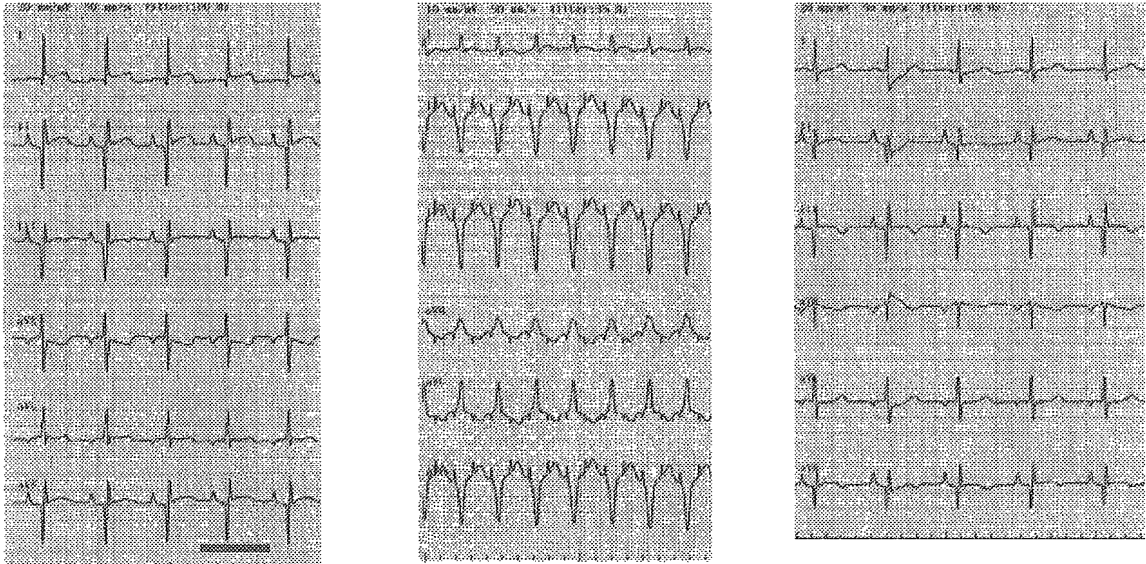


図7. ペースメーカー刺激前、後の心電図波形。

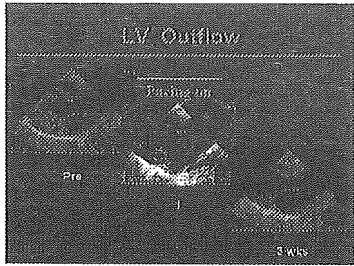


図8. ペースメーカー刺激前、後の左室流出路部分の超音波画像。

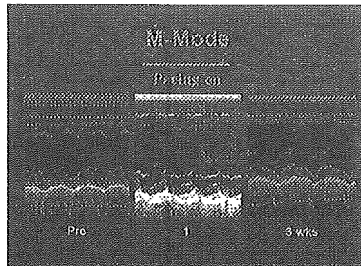


図9. ペースメーカー刺激前、後の左室短軸径のMモード超音波画像。

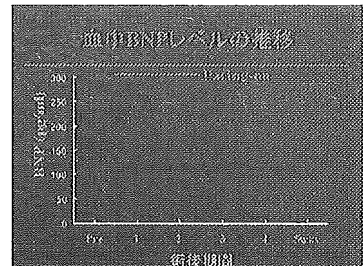


図10. ペースメーカー刺激前、後の血中BNPのレベル。

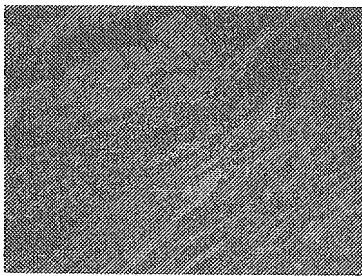


図11. 電気刺激後のAzan染色。(左室自由壁)。

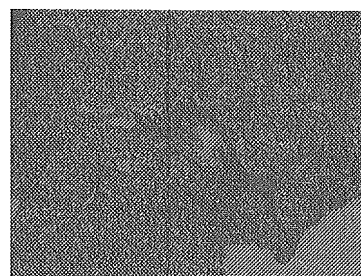


図12. 左室乳頭筋。

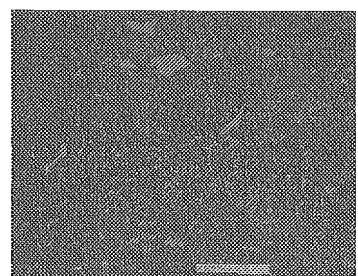


図13. 心室中隔。

いずれの部位でも結合組織の顕著な増勢と心筋細胞の崩壊が目立つ。

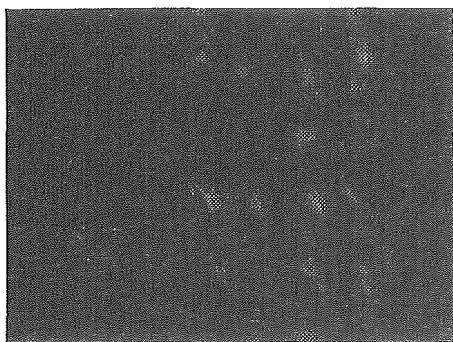


図14.正常動物の骨格筋芽細胞にdonorの細胞膜をDi-Iでラベル後に心筋に移植して5週後の組織像。



図15. donor細胞の膜をDi-I(赤)、核をDAPI(青)で蛍光色素ラベル後にDCM動物に細胞移植した。δ-SGをFITCラベル(緑)特異抗体、およびconnexin-43(茶)特異抗体による4重染蛍光。

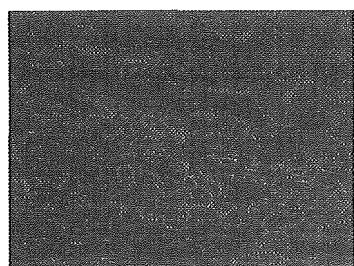


図16. δ-SG抗体によるrecipient心筋内のdonor細胞が緑色蛍光として集塊を形成する。

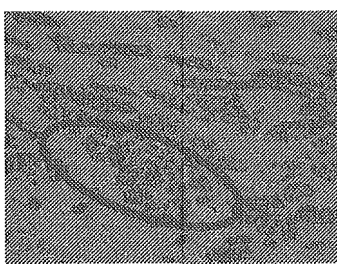


図17. fMHC抗体による骨格筋固有の速筋がrecipient心筋内に増殖している(赤円内)。



図18. smMHC抗体による遅筋の発現(緑円内)。一部の細胞はfMHCにもsmMHCにも染まる(黄円内)。

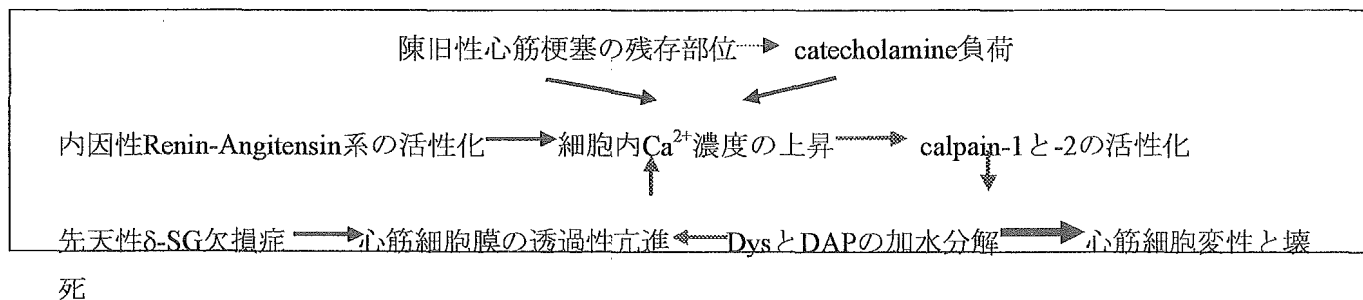


図19. 種々の原因による心不全の重症化仮説。

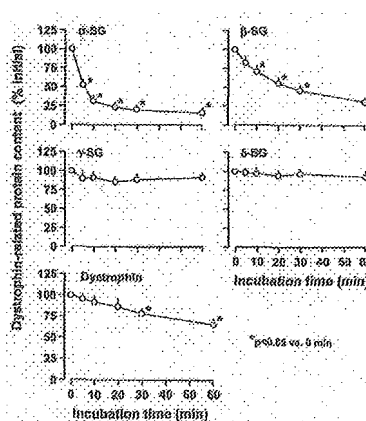
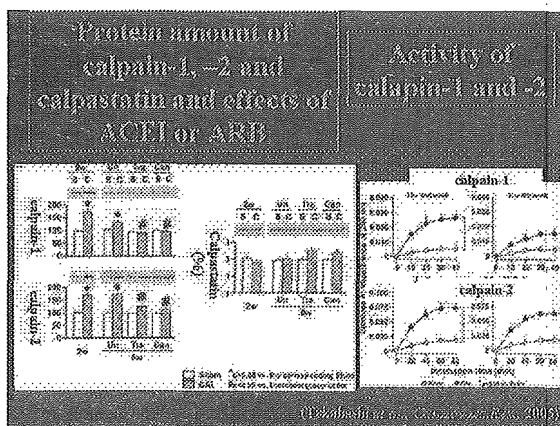


図20. 陳旧性心筋梗塞の残存心筋内calpain-1と-2、およびcalpastatinのタンパク量(左)と活性(右)。

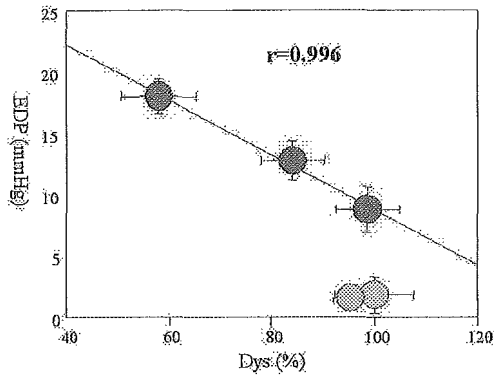


図21. 精製calpain-2によるジストロフィンとDAPの *in vitro*の加水分解。

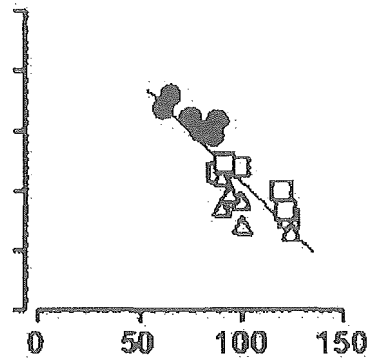


図22. 先天性DCMハムスターの心筋内Dys量と左室拡張末期圧 (EDP)の相関。

図23. 後天性に作成した広範囲陳旧性心筋梗塞の残存心筋内Dys量とEDPの相関。

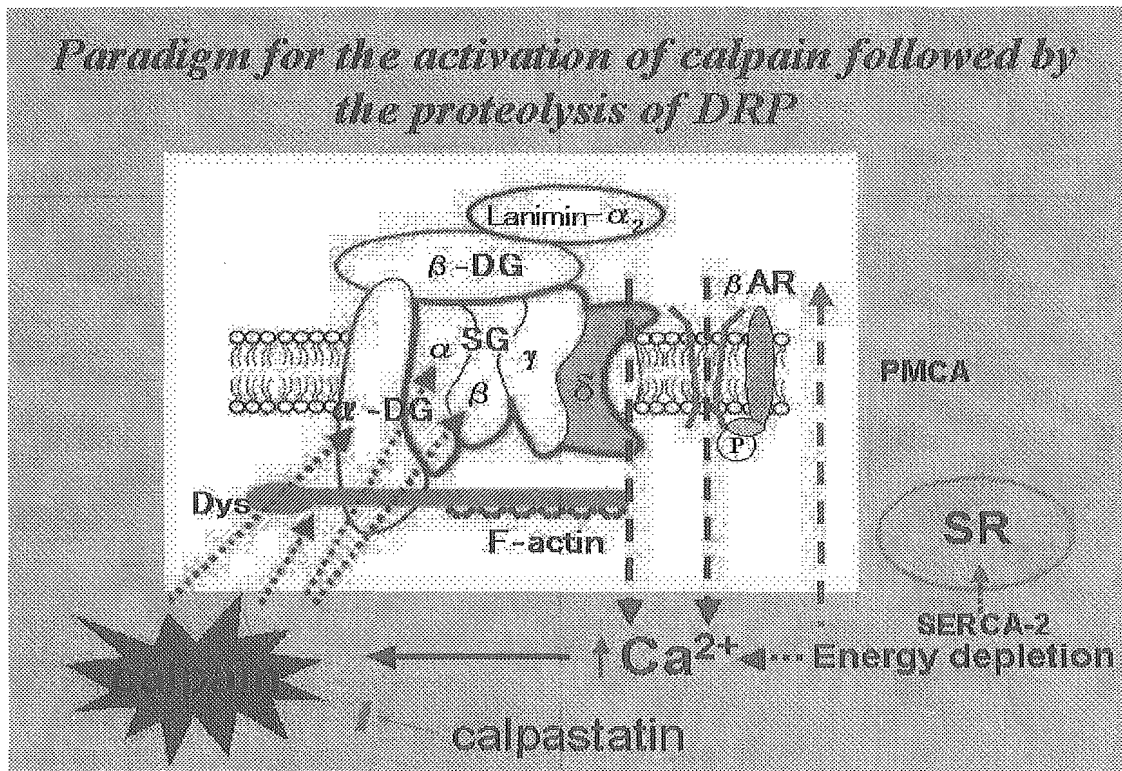


図24. 各種の心疾患でcalpainが活性化する共通機構。

参考表

Amount of Dys/DAP *in vivo* and Susceptibility to Calpain 2 *in vitro*

Model	TO-2	OMI	Isp	Human DCM	<i>In vivo</i> proteolysis by calpain 2
Etiology	hereditary	acquired		ni	
Progression	chronic	chronic	acute	chronic	
Dystrophin	↓	↓	↓	↓	+
DAP complex	α-SG	↓	↓↓	↓→	++
	β-SG	↓	→	↓	+/-
	γ-SG	↓	→	→	+/-
	δ-SG	null	→	→	-
[Ca <sup>2+</sup> ]	↑↑	↑	↑↑	↑↑	
EB entry	++	+	++	nd	

(ni, not identified)

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

高力価5型アデノ随伴ウイルスベクター作製法に関する研究

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  
研究協力者 卜部 匡司 自治医科大学遺伝子治療研究部・講師

研究要旨

組換え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、宿主細胞を浮遊状態で培養できること、プラスミドDNAのトランスフェクションの必要がないことから容易にスケールアップすることが可能である。本年度は、我々が確立した5型AAVベクター作製法を改良し、更に高力価のAAVベクターを得る系の確立を試みた。5型small Repを他の血清型のそれに置き換えてAAVベクターを作製したところ、特に1型small Repを用いた場合にベクター産生量が4倍以上増加した。この結果は、臨床応用のためには大量に必要とされる5型AAVベクター供給をより容易にすることにつながると期待される。

A. 研究目的

5型アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは従来の2型AAVベクターより効率良く心筋などの筋組織へ遺伝子導入が可能である。AAVベクターをバキュロウイルス・昆虫細胞を用いて作製する手法は容易にスケールアップできることから、ヒトや大型動物にAAVベクターを投与する場合に必要とされる大用量を比較的簡単に作製することが可能になると考えられる。我々が開発した5型AAVベクターの作製系では既存の方法と比べて遜色のない効率でAAVベクター（細胞あたり約15,000粒子）が得られる。

AAVは恒温動物に感染するウイルスであり、37度で効率良く増殖する。また既存の方法でAAVベクターを作製する際に使用する293細胞の培養は37度で行うが、昆虫細胞の培養至適温度は28度である。37度が至

適温度と考えられるAAVの蛋白質は28度では3次構造が変化しその機能が低下する可能性がある。AAVにはいくつかの血清型が存在するが、それらの中でより昆虫細胞培養系で機能が保持されているAAVの蛋白質があればそれを用いることによりAAVベクターの産生量を増加させることができるのではないかと考え検討した。

B. 研究方法

AAVの非構造蛋白質の一つであるsmall Repは、ウイルスゲノムをウイルスの殻（キャプシド）に組み込む機能を持つ。より昆虫細胞で機能を保持しているsmall Repを見極めるため、1, 2, 3または4型のsmall Repを発現するバキュロウイルスを構築し、AAV-GFPベクターの産生量を指標に5型small Repを発現する従来のバキュロ



ウイルスと比較した。2x10<sup>8</sup> 個のSf9細胞に組換えバキュロウイルスを感染し、3日後に感染細胞を破壊してベクターを回収した。AAVベクターは塩化セシウム密度勾配超遠心を2回行い精製し、リアルタイムPCR法にて定量した。

(倫理面への配慮) 本研究では培養細胞、大腸菌のみを使用しており、動物を実験に使用しておらず、特に動物倫理面の問題は生じない。また、AAVは非病原性であり、AAVに由来するベクターの開発では、周辺環境および実験従事者の安全性に関して、倫理的問題が生ずることは基本的にないと考えている。

#### C. 研究結果

5型small Repを用いると細胞あたり13,500±3,200のウイルス粒子が得られたが、1, 2, 3, 4型small Repに置き換えるとAAVベクター産生量はそれぞれ56,000±12,200、41,000±18,900、42,000±7,300、39,000±3,500と5型を用いた時よりベクターの産生量が増加した。特に1型を用いた場合は4倍以上に増えた。

各small Repで作製した5型 AAV-GFPベクターと293で作製したAAV-GFPベクターを同用量でCos細胞に感染させ、GFPの発現状態を観察したところ、すべてがほぼ同じGFP発現強度であった。

#### D. 考察

5型AAVベクターを組換えバキュロウイルスを用いて作製する系において効率を更

に上げるため、AAVベクターゲノムをキャプシドに組み込むsmall Repに着目し、1から5型のsmall Repを用いて5型AAVベクター作製を試みた。その結果、興味深いことに5型よりも他の血清型のsmall Repを用いた場合の方がAAVベクターの産生量が多いことが分かった。このことは昆虫細胞ではsmall Repの血清型による特異性は高くなく、他の型ものに置き換えてもAAVベクターを産生することができることを示している。また、5型small Repは他の血清型のsmall Repに比べて昆虫細胞では機能しにくくなっていることが、低いベクター作製効率の一因であると推察される。

今回の結果は、組換えバキュロウイルスを用いて5型AAVベクターを作製するシステムの作製効率を高めることができる知見と考えられ、ベクター大量作製システムの実用化に向けて有意義なものと思われる。

#### E. 結論

組換えバキュロウイルスを用いて5型AAVベクターの産生量を増加させるため、他の血清型のsmall Repを用いてAAVベクターを作製することを試みた。1型small Repの場合に5型small Repを用いた場合よりも4倍以上のAAVベクターが得られた。Cos細胞の感染実験から昆虫細胞で作製したAAV-GFPベクターの生物学的性状は通常の方法で作製したAAV-GFPベクターとほぼ同等であることが確認できた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Matsushita T, Okada T, Inaba T, Mizukami H, Ozawa K and Colosi P: The adenovirus E1A and E1B19K genes

provide a helper function for transfection-based adeno-associated virus vector production. J Gen Virol 85: 2209-2214, 2004.

- 2) Toyo-Oka T, Kawada T, Nakata J, Xie H, Urabe M, Masui F, Ebisawa T, Tezuka A, Iwasawa K, Nakajima T, Uehara Y, Kumagai H, Kostin S, Schaper J, Nakazawa M and Ozawa K: Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. Proc Natl Acad Sci USA 101: 7381-7385, 2004.

## 2. 学会発表

- 1) Urabe M, Nakakura T, Ozawa K, Kotin RM: Production of recombinant adeno-associated virus type 5 in insect

cells. 7<sup>th</sup> annual meeting of the American Society of Gene Therapy, Minneapolis MN, USA June 4 2004. (Mol Ther. 9: S160, 2004)

- 2) Urabe M, Nakakura T, Ozawa K, Kotin RM: Scalable production of type 5 adeno-associated virus vectors in invertebrate cells with recombinant baculoviruses. The 10<sup>th</sup> annual meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Tokyo August 5 2004. (Abstracts p 51)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

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

研究要旨

我々は別途進めている年齢軸恒常性分子機構研究に基盤を置いた応用技術、年齢軸工学、の開発に平行して、重要な技術応用開発の一つである遺伝子治療用に用いられる遺伝子導入、発現ベクター開発を行ってきた。一方、豊岡研究室では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が進んでおり、その応用の一環として本研究プログラムにおいて  $\delta$ -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として、この疾患発症の最終段である筋ジストロフィンの分解はカルパインによって引き起こされる可能性も示唆された。 $\delta$ -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、 $\delta$ -SG補充又はジストロフィン分解の抑制の複数のアプローチがある。これまで、 $\delta$ -SG過剰発現用の rAAVベクターの基本構造構築を行ってきたが、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を視野にアンチセンスRNAアプローチの開発に視野を移してきた（カルパインアンチセンスRNAを生産するrAAVベクターの構築）。しかし、これらの発現ベクター構築にとって心筋に高い発現を長期安定して行う遺伝子導入・発現ベクターの構築が重要であることに鑑み、別途開発している年齢軸工学技術を基盤に、心筋に高い発現特異性を持つと共に年齢軸安定な発現を保証できる遺伝子導入ベクターの構築を目指してきた。

研究協力者

安部貴大、本田徳穂、倉地須美

A. 研究目的

長期目標：悪性筋疾患予防治療法の開発。  
このため筋ジストロフィンの安定化を目指した効果的で安定した遺伝子治療に応用できる効果的遺伝子導入・発現ベクターの開発を行う必要があり、遺伝子の安定したin vivo発現を補償する基本となるベクターの構築を目指す。

B. 研究方法

年齢軸で長期安定及び心筋特異性が至適化された遺伝子導入及び導入遺伝子の年齢軸安定な発現を保証できる遺伝子発現ベクター技術開発を行ってきた。別途進めている年齢軸恒常性の分子機構に関する研究から同定された遺伝子エレメントASEは、遺伝子治療用遺伝子導入ベクターに必要な2つの条件、年齢軸安定な遺伝子発現と心筋での高い発現保証、を満足させる遺伝子発現ベクター構築の基盤になる可能性を持っている。そこで、本来ASEを持たず、遺伝治療用遺伝子発現ベクター構築に良く用いられるCMVプロモーターにヒト第IX因子（hFIX）遺伝子をリポーターにし



て連結したモデル系でASEが遺伝子発現に及ぼす影響の精査テストを行ってきた。血漿タンパク質第IX因子を生産するトFIX遺伝子をリポーターとして用いる事により遺伝子発現の定量が容易になり、技術の精査が可能であった。これらの実験にはト、動物実験に關与する倫理的問題は含まれていない。

### C. 研究結果

トランスジェニックマスの実験結果から、ASEの存在下、導入した第IX因子遺伝子の発現は年齢で安定である予備データがわかっていたが、更に発現の組織特異性を精査した。その結果を下図に示す。図1はCMV/FIX発現ベクターを持ったマスの諸器官組織からのRNA調製試料を示すが、非常に高い質のものであった。ASE/CMV/FIXを持ったマスのRNA質も同様な高質のものであった。リアルタイムPCRでFIX発現を定量した結果を図2に示す。ASEを持たないCMVプロモーターの場合は、腎臓、脳、心筋、骨格筋、肺、脾臓、等、多くの組織で発現が見られる一方、ASEを持ったCMVプロモーターでは骨格筋と心筋で高い発現が見られるが、腎臓、脳、肺、脾臓、肝臓の発現は低く抑えられる事が分かった。重症性心不全の遺伝子治療研究、 $\delta$ -SGの過剰発現、又はカルシウム発現の抑制研究に基盤を与える(図3)。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。カルシウムのアンチセンスRNA過剰発現ベクターのデザインも出来ている。

### D. 考察

豊岡研により証明されてきたジストロフィンの不安定化による重症性心不全発症に関する成

果からこの疾患の予防、治療法開発に関する方向性が示されてきたが、当研究室は別途進めている年齢軸恒常性機構の研究から得た知識を基盤に遺伝子導入・発現ベクター技術開発に努力を行ってきた。これまで得てきた結果から、心筋への遺伝子導入と安定した高い遺伝子発現を実現でき、重症性心不全の遺伝子治療開発に向け貢献出来る基盤が出来たと確信する。

### E. 結論

心筋をターゲットに理想的な遺伝子導入・発現ベクターの開発に取り組んできた。年齢軸恒常性分子機構研究から得られた知見を遺伝子導入ベクター技術開発に応用し、年齢軸に沿って安定で骨格筋・心筋に高い発現と組織特異性を持つ遺伝子発現を可能にする技術基盤を与える結果を得た。これからアンチセンスRNA過剰発現や $\delta$ -SG遺伝子発現に用いるより優れたベクターの構築が可能となった。この技術は現在のところ、ゲノムに遺伝子を安定に挿入するrAAVやレトロウイルス、等に用いる事で最も効果があると予測される。ゲノムに導入遺伝子が挿入されないアデノウイルスや非ウイルスベクターへの応用は更に精査する必要がある。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究論文

執筆準備中

### H. 知的財産権の出願・登録状況

現在該当なし

<<図・表>>

RNA quality

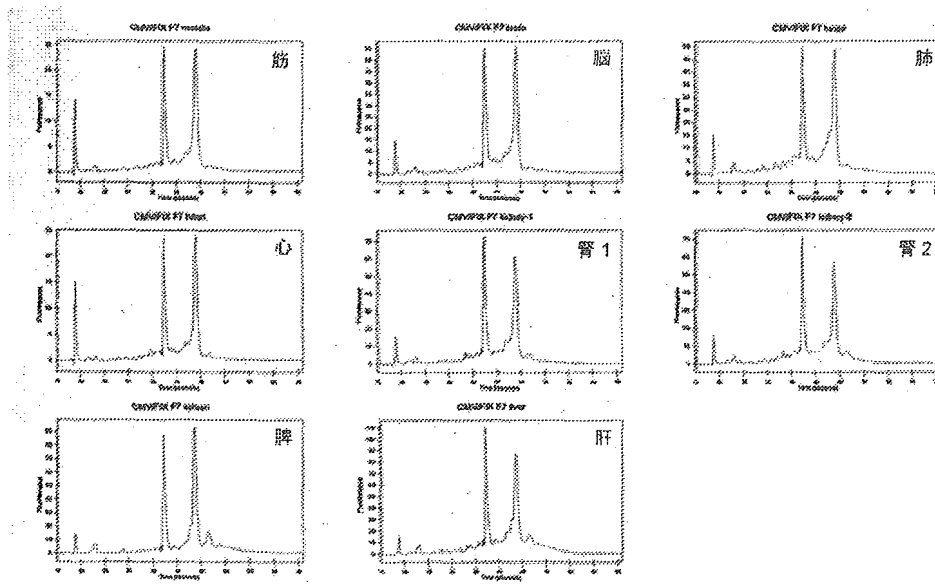


図1. トランスジェニックマウス器官組織から調製したRNA試料とそれらの質

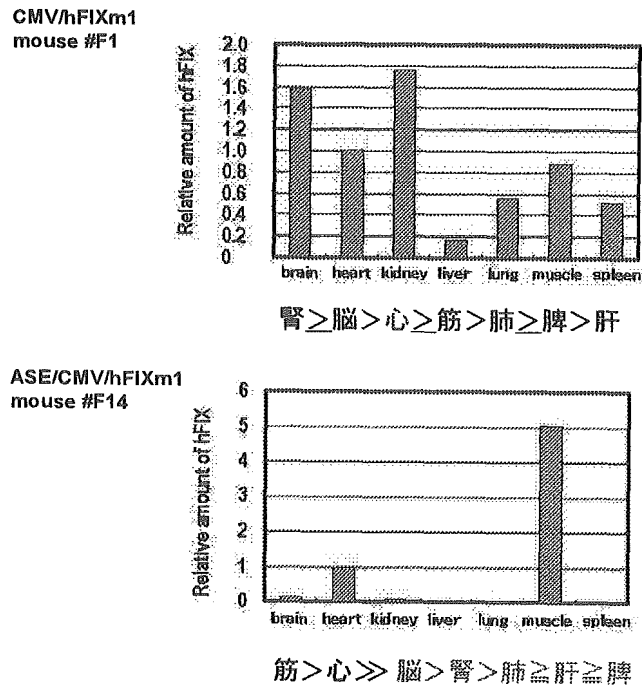


図2. ASEのトランスジェニックマウスに於ける遺伝子発現への影響

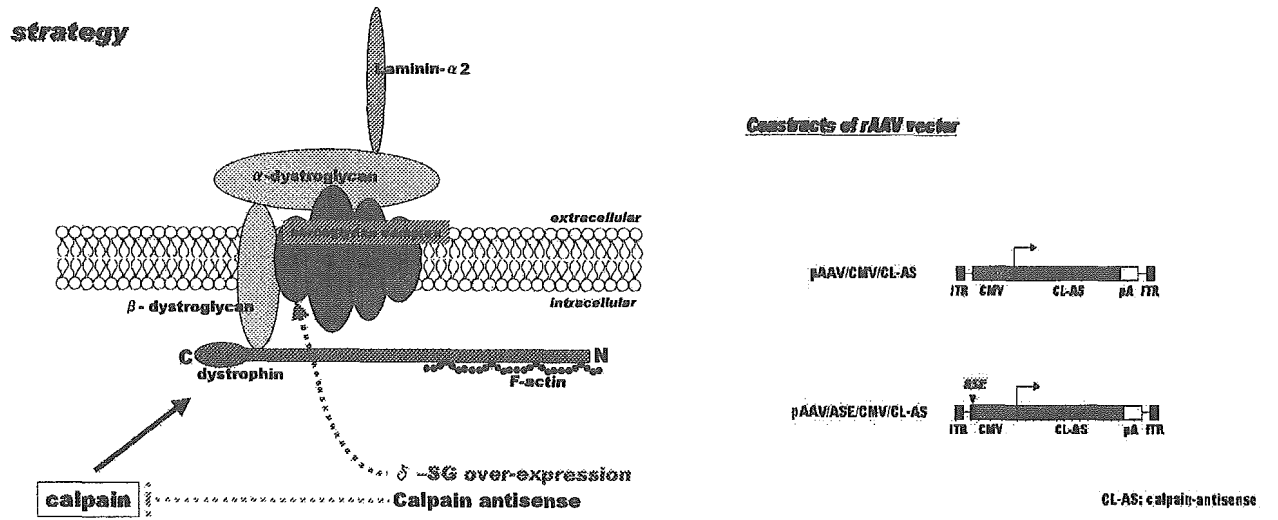


図3. 重症性心筋機能障害症の遺伝子治療に向けた戦略

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

心不全のより効果的な治療方法を探求するため、心不全心に発現しているタンパク質の網羅的な解析により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的として、心筋ミオシン投与で発症する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。急性心不全心に発現しているタンパク質の経時的な変動パターンをクラスター解析により類別化した。今回は心筋炎発症前（ミオシン投与1週後）から増加してくるタンパク質に着目し、その同定を試みた。現在までに15種類のタンパク質が同定され、病理的な炎症が発症する前に心筋細胞にタンパク質の発現変化の起こっていることが示唆された。

#### A. 研究目的

自己免疫性心筋炎急性期心不全心におけるタンパク質の発現の経時的な変化について昨年度報告した。今年度は変化しているタンパク質の同定を行うことを目的とし、心筋炎の発症前、ミオシン投与後1週間で発現の増加しているタンパク質に着目し、in Gel trypsin digestion を行い、MALDI-TOF型質量分析器によって同定を行った。

心不全発症に関連するタンパク質が同定されることで、心筋細胞における心不全応答の情報伝達機序が解明され、新しい心不全治療の方策の構築が可能となる。

#### 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。前回行った経時的な発現変化の測定からミオシン投与1週後に既に増加してくるタンパク質群が認められたので、今回はこのタンパク質群に着目してその同定を行うこととした。

##### タンパク質の抽出とプロテオーム解析

ミオシン投与1週後の心臓から摘切り出した心筋標本を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。

##### スポットの切り出しとトリプシン消化

ゲルを Milli-Q で十分に平衡化した後目的スポットを切り取り、トリプシン (Trypsin, sequence grade, Promega, V5111) 溶液を加え、37°C で16時間インキュベーションして消化した。消化されたスポットタンパク質溶液をMALDI-TOFターゲットプレートへ載せ分析を行った

MALDI-TOFによって得られたペプチドのマスマフラグメントから Mascot Search を用いてタンパク質の同定を行った。

##### (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づいて、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

図1に Mascot Search の結果の一例を示す。