

分析に供したスポットのトリプシン分解ペプチドのMascot Searchによりこのスポットのタンパク質はFatty Acid Binding Protein (FABP)と同定された。このような方法により、現在まで14種類のタンパク質が同定されている。それらをまとめて表1に示す。

#### D. 考察

ミオシン投与1週間後では心筋にはまだ病的な変化は認められていない。このような状況で心筋にタンパク質の発現変化が認められることは興味深いことである。今回同定されたタンパク質の中にはcarleticulinやcoat protein、ribosomal proteinあるいはnuclear receptor familyなど、細胞に何らかのストレスが加わった時に発現してくると考えられているタンパク質が認められた。この事実は、心筋炎の発症の極早期に心筋タンパク質発現が変化していることを示唆しており、以後のストレスに対応するために発現増加が起こっている能性があると思われる。

さらに心不全に対する応答に関連して変化するタンパク質の同定を行うことで、新しい心不全治療の戦略を構築することができると考えている。

#### E. 結論

自己免疫性心筋炎モデルラットにおいてミオシン投与1週間後、心筋炎が発症する以前に既に心筋細胞内のタンパク質が変化しており、現在までに同定されたタンパク質はストレス応答に関係すると思われるものが多く、病的に明らかな変化の起こる前に既に細胞応答が始まっている可能性が示唆された。

#### 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

Wahed MI, Watanabe K, Ma M, Nakazawa M, Takahashi T, Hasegawa G, Naito M, Yamamoto T, Kodama M, Aizawa Y: Effects of pranidipine, a novel calcium channel

antagonist, on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in rats with heart failure. *Pharmacology* 72:26-32, 2004

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, 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 U S A.* 101: 7381-7385, 2004

#### 3. 学会発表

##### 1) 第72回日本薬理学会年会

Ohta Y, Kato K, Yoshida Y, Kodama M, Yamamoto T, Aizawa Y, Nakazawa M: Proteome analysis of acute heart failure with autoimmune myocarditis in the rat.

##### 第27回心筋代謝研究会

河田登美枝、仲澤幹雄、手塚あさき、増井藤子、水上浩明、卜部匡司、佐藤博、小澤敬也、豊岡照彦: 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。

##### 第55回日本薬理学会北部会

太田好美、河田登美枝、佐藤博、仲澤幹雄:  
自己免疫性心筋炎後心不全モデルに対するタウリンの影響。

##### 第21回国際心臓研究学会日本部会

Nakazawa M, Ohta Y, Kawada T, Kato K, Kodama M, Sato H, Aizawa Y: Effects of taurine on heart failure in rat with dilated cardiomyopathy.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他  
該当無し。

<<図・表>>

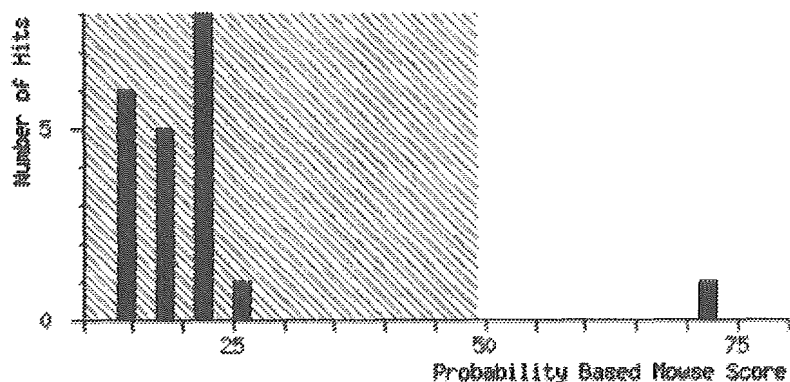


図1 Mascot SearchによるFatty Acid Binding Protein (FABP)の同定。Mowse Score 72にFABP由来のペプチド (P<0.05) が認められた。

表1 同定されたタンパク質のまとめ

Fraction	MW (kDa)	Protein
Mem	26.03	RIKEN cDNA 5730466C23
	27.8	coat protein $\gamma$ -cop
	31.58	hypothetical protein FLJ 20156
	34.72	nuclear receptor subfamily 1,group 1,member 2
	50.68	60S ribosomal protein L26
	53.67	putative calcium binding transporter
	61	alcohol dehydrogenase [NADP+]
	84.52	neurofilament triplet L protein
Sol	16.48	fatty acid-binding protein, heart (H-FABP)
	34.24	tropomyosin 1alpha chain
	36.69	creatine kinase, M chain (M-CK)
	43	alpha-actin cardiac
	54.63	calreticulin
	54.63	calreticulin precursor (CRP55)(Calregulin)
	93.62	Endoplasmic reticulum protein 99

Mem: Membrane fraction, Sol: Soluble fraction. MW: Molecular Weight.

## 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

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

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは生体に無害で発現期間が長いため、遺伝子導入に理想的といわれている。従来、AAVの研究はⅡ型を標準として進められてきたが、Ⅱ型以外にも数種の血清型が分離され、ベクターとして検討されている。ハムスターの心筋と骨格筋およびラットの心筋におけるrAAVの各種血清型（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ）による発現効率を比較検討した結果、ⅠとⅤ型はⅡ型より強かった。ラットで発現効率は悪かった。さらに免疫交叉性の検討を行った結果、Ⅱ型同士では発現効率は極端に減弱したが、ⅡとⅤ型では中和抗体による遺伝子発現の減弱は観察されず、免疫交叉性は認められなかった。これらの結果は臓器に適した血清型のrAAVベクターの選択、あるいは繰り返し投与が可能になり、rAAVによる遺伝子治療の有用性が広がった事を示す。

### A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは生体に無害で発現期間が長いため、遺伝子導入に理想的といわれている。従来、AAVの研究はⅡ型を標準として進められてきた。我々はⅡ型組み換えAAV (rAAV) ベクターを用いて拡張型心筋症の遺伝子治療に成功した (Kawada *et al.*, *BBRC* 2001; Kawada *et al.*, *PNAS* 2002)。しかし、自然界においてⅡ型以外の数種の血清型が分離され、ベクターとして検討されている。異なる血清型由来のベクターを用いた場合の有用性は(1) 標的組織の違いに応じた選択的な遺伝子導入が可能になる。(2) 異なる血清型を用いることで、従来のⅡ型より発現の増強が期待できる。(3) ある血清型に対して中和抗体が存在しても、異なる血清型由来ベクターを用いることで免疫交叉性を回避でき、繰り返し投与が可能になる。(4) ある遺伝子をノックイン、ノックアウトする

ような遺伝子導入の繰り返し、あるいは2重の遺伝子導入、遺伝子導入のスイッチのオン・オフが可能になる、という利点がある。今研究はハムスターの心筋と骨格筋およびラット心筋におけるrAAVの各種血清型（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ）による発現効率を比較検討する。さらにⅡ型とⅤ型による免疫交叉性の検討を行った。

### B. 研究方法

(1) ペントバルビタール麻酔下にてハムスターの左室心筋と骨格筋（前脛骨筋）、あるいはラットの心筋にLac Z遺伝子を組み込んだrAAVベクター ( $3 \times 10^{10}$  genome/ml、30 $\mu$ l) を投与した。免疫交叉性の検討実験では最初に右骨格筋に溶媒、Ⅱ型あるいはⅤ型を投与し、5週後に左骨格筋へⅡ型あるいはⅤ型ベクターを投与した。

(2) 最終投与5週後に各臓器を摘出、固定し、X-Gal活性による組織染色より特異性

が高いβ-Galの免疫染色を行い、発現効率を比較検討した (Kawada *et al.*, *BBRC* 1999)。

### C. 研究結果

(1) ハムスター心筋でのβ-Galの発現効率はI ≧ V ≫ II ≫ III型の順であった(図1、2A)。(2) ハムスター骨格筋でのβ-Galの発現効率はI ≫ V ≫ II型の順であった(図2B)。(3) ラット心筋ではV型において弱いβ-Gal発現が認められたのみで、IIおよびIII型ではほとんど発現しなかった。(4) II型の後に同じII型rAAVを導入した場合、2回目のII型によるβ-Gal発現は極端に弱くなった。(図3A)。しかし、両組織ともマクロファージの浸潤は認められなかった。V型の後にII型rAAVを導入した群 (V → II)、II型の後にV型を導入した群 (II → V) においては、それぞれの発現効率はII型およびV型単独投与群 (V → IIおよびV → V) とほぼ同程度であった (図3B)。

### D. 考察

rAAVのI及びV型rAAVはハムスターの心筋及び骨格筋の両臓器において、従来汎用されているII型よりも高い発現効率を示した。ラット心筋ではハムスターに比べ、すべての血清型において発現が弱かったことより、rAAVの発現効力には種差がある事が示唆された。同種の血清型の繰り返し投与では、中和抗体による遺伝子発現の顕著な減弱が認められ、免疫交叉性があったが、異なった血清型では中和抗体による遺伝子発現の減弱は観察されず、rAAVによる免疫交叉性は認められなかった。

### E. 結論

これらの結果は、効率のよい遺伝子治療が実施するためには、種差や臓器による発現の差を考慮してrAAVベクターの血清型を選ぶ必要がある事を示す。又、異なった血清型による繰り返し投与が可能になり、rAAVによる遺伝子治療の有用性が広がった。

### F. 健康危険情報

特に無し。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- ① Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: A scheme for the progression of cardiac dysfunction. T. Toyo-oka, T. Kawada, J. Nakata, H. Xie, M. Urabe, F. Masui, T. Ebisawa, A. Tezuka, K. Iwasawa, T. Nakajima, Y. Uehara, H. Kumagai, S. Kostin, J. Schaper, M. Nakazawa, and K. Ozawa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:7381-7385 (2004)
- ② A novel paradigm for the therapeutic basis of advanced heart failure-Assessment by gene therapy-. T. Kawada, F. Masui, H. Kumagai, M. Koshimizu, M. Nakazawa and T. Toyo-oka. *Pharmacol. & Therap.* 107:31-43 (2005)
- ③ A novel scheme of dystrophin disruption for the progression of advanced heart failure. T. Kawada, F. Masui, A. Tezuka, T. Ebisawa, H. Kumagai, M. Nakazawa and T. Toyo-oka. *Biochim Biophys Acta*. 1751:73-81 (2005)
- ④心不全の重症化機構 - その新しい概念-

河田登美枝、仲澤幹雄、豊岡照彦。日本薬理学雑誌、123:55-63 (2004)

## 2. 学会発表

① 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。

河田登美枝、仲澤幹雄、手塚あさき、増井藤子、水上浩明、卜部匡司、佐藤博、小澤敬也、豊岡照彦。第27回心筋代謝研究会

② Shift and cleavage of myocardial dystrophin (DYS) is a common pathway to advanced heart failure (HF). T. Toyo-oka, T. Kawada, M. Urabe, F. Masui, T. Ebisawa, A. Tezuka, K. Iwasawa, J. Schaper, M. Nakazawa and K. Ozawa. 2004 ISHR World Congress.

③ A novel scheme for the progression of cardiac dysfunction in humans and animal models and its amelioration with gene-based therapy. T. Toyo-oka, T. Kawada, M.

Urabe, F. Masui, T. Ebisawa, A. Tezuka, S. Kostin, J. Schaper, M. Nakazawa and K. Ozawa. 第8回心不全学会

④ 干渉RNA(RNAi)変法による心不全の遺伝子治療の開発。河田登美枝、本田みちよ、豊岡照彦。第35回病態代謝研究会研究報告会

⑤ Effects of taurine on heart failure in rats with dilated cardiomyopathy. M. Nakazawa, Y. Ohta, T. Kawada, K. Kato, M. Kodama, H. Sato and Y. Aizawa.

第21回国際心臓研究学会日本部会。

⑥ 拡張型心筋症への骨格筋芽細胞移植後の特性。手塚あさき、河田登美枝、仲澤幹雄、豊岡照彦。第78回日本薬理学会年会

⑦ アドリアマイシン誘発心不全に対するタウリンの作用。太田好美、柳瀬千保、山崎理沙、三膳良樹、河田登美枝、佐藤博、仲澤幹雄。第78回日本薬理学会年会

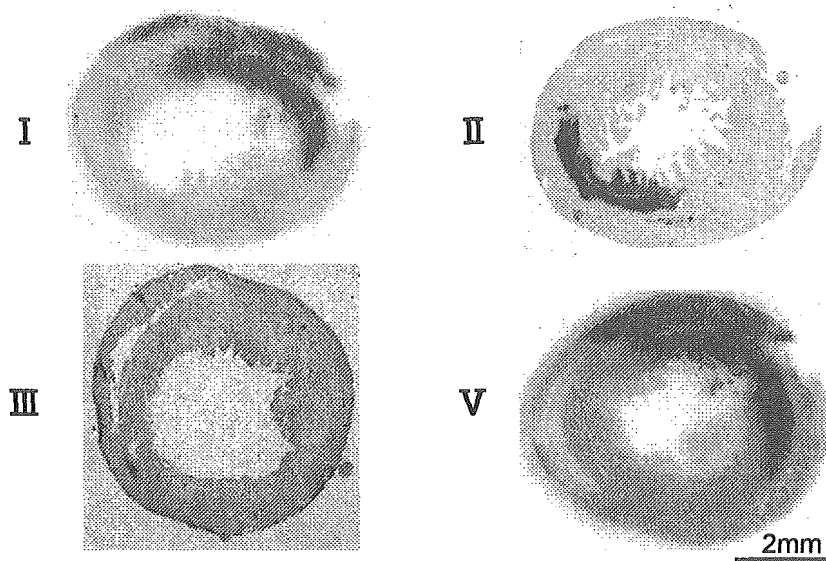


図1 ハムスター心筋での各血清型rAAVベクターによる $\beta$ -Gal免疫染色の比較  
II型に比べ、IとV型では広範囲に $\beta$ -Galが発現がしていたが、III型ではほとんど発現していなかった。

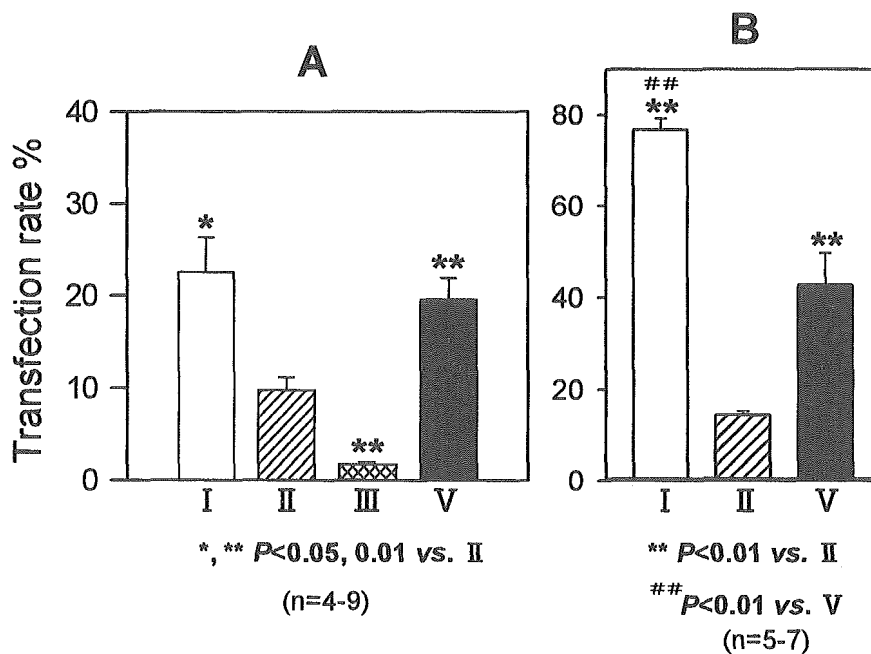


図2 ハムスター心筋 (A) および骨格筋 (B) における各血清型rAAVによる $\beta$ -Gal発現効率の比較。両組織においてII型より、IおよびV型の方が強い $\beta$ -Gal発現が認められた。

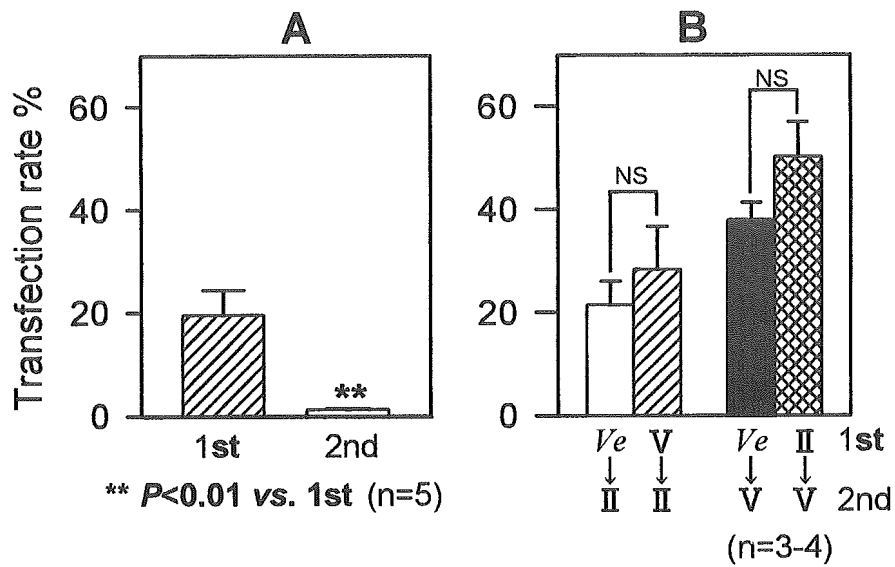


図3 ハムスター骨格筋における免疫交叉生の検討

(A) II型を繰り返し投与すると、2回目(2nd)はほとんど $\beta$ -Galの発現は認められなかった。

(B) 1回目に溶媒(Ve)、2回目にII型rAAVを投与した群(Ve  $\rightarrow$  II)とV型の後にII型を導入した群(V  $\rightarrow$  II)では差がなかった。また、1回目に溶媒、2回目にV型rAAVを投与した群(Ve  $\rightarrow$  V)とII型の後にV型を導入した群(II  $\rightarrow$  V)においても、その発現効率はほぼ同程度であり、免疫交叉性は認められなかった。

RNAiによるcalpain発現抑制に関する研究

～mouse EC細胞P19.CL6を用いて～

分担研究者 土屋 隆英

上智大学理工学部化学科

研究要旨

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されているが、社会的、医学的問題からも新たな治療法の開発が切望されている。その一つとして、遺伝子治療の開発が期待されている。本研究では、重症心不全の増悪因子の一つと考えられる細胞内タンパク質分解酵素calpainに着目し、RNAi法による遺伝子発現抑制を行い、遺伝子治療法の開発へむけたスクリーニングを実施することを目的とした。心筋細胞へ分化するmouse EC細胞P19.CL6においてcharacterizationを行った後に、calpainのsiRNAを導入、RNAiを誘導した上でreal-time PCRにより遺伝子の発現量を調べた。さらにzymographyにより活性を測定した。その結果、P19.CL6ではcalpainの発現が40%程度抑制され、その時の活性は大きく減少した。しかし現段階における抑制効率は治療に利用するためにはまだ十分ではないため、今後さらに強力に抑制する配列を検索する必要があると考えられた。

研究協力者

本田 みちよ 上智大学理工学部化学科

細田 真利 上智大学理工学部化学科

A. 研究目的

心不全の病態において細胞質内のカルシウム濃度は上昇し、またジストロフィン関連タンパク質複合体の崩壊は時間経過と共に進行する。これらのことから心不全の重症化機構における増悪因子は心筋内在性の細胞内タンパク質分解酵素calpainが有力候補としてあげられている。本研究ではこの増悪因子の遺伝子発現を抑制するためにRNAi法を利用し、心不全の進展を阻害することにより、遺伝子治療へ応用化するための基礎データを収集することを目的とした。RNAiに

よる遺伝子発現抑制は、siRNAのデリバリー方法、効果の持続性、安全性などの問題もあるが、配列の特異性と発現抑制効果の高さから難治性疾患に対しての遺伝子治療への期待が高まっている。

実用化へむけたスクリーニングを行うためには拡張型心筋症のモデル動物であるTO-2ハムスターの使用が適しているが、現時点における*in vivo*での検討は配列特異性を確認できていないことや前述の問題点を克服しなければいけないことなどから多大な時間を要することが予想される。そこで、我々は実用化へむけたより迅速なスクリーニングを行うために培養心筋細胞を用いて*in vitro*における検討を行った。



## B. 研究方法

従来の研究方法では、実験動物もしくは実験動物から摘出した心臓の初代培養細胞を実験材料として利用することが多いが、本研究では、心筋細胞へと分化させることのできるmouse EC細胞P19.CL6を用い、常時同条件の細胞を使用することにした。実験動物を使用しないため動物固有の個体差を無視できる。その他、安定的、持続的な細胞の供給が可能である上、実験期間を飛躍的に短縮することができるため、スクリーニングに最適な条件を整えることができるという利点を持つ。

### <mouse EC細胞P19.CL6の培養方法>

Petri dish上にP19.CL6を播種し、0.5% DMSO存在下で4日間培養した。4日後、塊となった細胞をculture dishへ播種しなおし、DMSO非存在下でさらに10日間培養した。1日おきに培地交換し、初期播種から14日目を分化した心筋細胞とみなした。初期播種9日目から自律拍動が観察された。

### <mouse EC細胞P19.CL6 characterization>

自律拍動するP19.CL6が心筋細胞へと分化しているか否かを確かめるために、培養14日目の細胞からRNAを抽出し、cDNAを合成した。心筋細胞に特異的に発現する遺伝子(GATA4,  $\alpha$ -MHC, MLC-2a)をマーカーとしてRT-PCRを行い、P19.CL6のcharacterizationを行った。

### <isoproterenolに対する反応性の確認>

培養14日目のP19.CL6に対し、最終濃度5  $\mu$ Mとなるようにisoproterenolを処理し、処理前後の拍動数を測定し、isoproterenolに対する反応性を調べた。またisoproterenol処理24時間後の細胞の状態に関して、dystrophinを免疫染色法で観察した。

### <RNAiによる遺伝子発現抑制>

自律拍動する培養14日目のP19.CL6に対し、Lipofectamine 2000を用いて、calpain siRNAをtransfectionし、48時間RNAiを誘導した細胞からRNAを抽出し、cDNAを合成した。このcDNAを鋳型として定量PCR(real-time PCR)を行い、遺伝子発現量を測定した。

### <calpain活性測定>

標準的なTris-glycine systemを用い、活性測定を行った。RNAiを誘導した細胞から抽出した可溶性画分200  $\mu$ gをcasein含有非変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。泳動後、proteolysis buffer(5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 10 mM 2-mercaptoethanol in 25 mM Tris-HCl)でincubateした後、Coomassie brilliant blueで染色した。

(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

mouse EC細胞P19.CL6はDMSOで分化誘導することにより心筋特異的な遺伝子を発現し、心筋細胞へと分化することを確認した(図1)。またisoproterenolの処理に対し十分な反応性(図2)を示した上に、高濃度のisoproterenolを処理することによりアポトーシスを起こす傾向があることも分かった。これは*in vivo*での結果とも相関していることから、P19.CL6は*in vitro*における心筋モデル細胞として活用可能であることが考えられた。しかし、*in vivo*で観察されるisoproterenol処理に伴うdystrophinのtranslocationに関しては現時点では確認できていない。一方、RNAiを用いたcalpainの発現

抑制に関しては、2種のsiRNAを候補としたが、抑制効率はコントロールに比べ各々40%程度（図3）に留まった。抑制効率が十分ではなかったのにも関わらず、**casein zymography**による活性測定において**calpain 2**の活性は減少する傾向が見られた（図4）。

#### D. 考察

拡張型心筋症のモデル動物(TO-2ハムスター)では、ジストロフィン関連タンパク質複合体(DRP)の一つである $\delta$ -サルコグリカンが発現せず、細胞膜を安定化するDRPが崩壊して筋ジストロフィー様の病変が心筋細胞特異的に生じ、重症心不全に至ることが報告されている。この心不全の重症化機構には細胞膜の不安定化に伴う細胞内へのカルシウムの過剰な流入、**calpain**の活性化が関与するものと推測される。**calpain**は様々な生物種・組織で機能するカルシウムによって活性化される細胞内システインプロテアーゼであり、哺乳類には14種類の分子種が存在する。その生理機能は未だに不明な点が多いが、筋ジストロフィーや神経疾患など様々な病態への関与が報告されている。これまでにも**calpain**が様々な病態に関与することが指摘されてきたことから、ノックアウト動物の作製が試みられてきたが、未だ完成に至っていない。これは、**calpain**が細胞内のカルシウム受容体として種々の細胞機能（転写やシグナル伝達の制御、細胞増殖・分化など）に関与することから生物にとって必要不可欠の分子であるためと考えられる。

今回我々は、この生命現象の重要な部分に関与する**calpain**をRNAi法を用い、遺伝子発現の抑制を試みたが、各々の配列特異性

が高くなかったことやsiRNAの導入方法に問題があったため、完全に抑制することはできなかった。そのため、細胞の分化、増殖には影響を与えておらず、形態的にも大きな変化は観察されなかった。しかし、遺伝子発現抑制の効率が40%程度に留まったのにも関わらず、**calpain**の活性は大きく減少するという結果が得られた。これは**zymography**の検出限界を反映した結果とも考えられるが、遺伝子発現が完全に抑制されなくとも活性が減少するという結論につながる。**calpain**の活性亢進が心不全重症化の引き金となることを考えると、今回得られた結果は今後の治療開発へむけた基礎データの一つとなる。但し、今回の研究では、RNAiの効果が不十分であった上にその効果が持続しないため、今後はより特異的な配列を探求し、安定的、長期的に遺伝子発現抑制を行うことのできる方法を利用することが重要となる。

#### E. 結論

本研究により、**mouse EC細胞P19.CL6**は*in vitro*における心筋モデル細胞として活用可能であることが確認された。また、RNAiによる**calpain**の発現抑制は不十分であったが、その活性には減少が確認された。**calpain**は重症心不全の治療戦略に大きく寄与することが考えられるため、特異性の高い配列検索が早急に必要である。

#### F. 健康危険情報

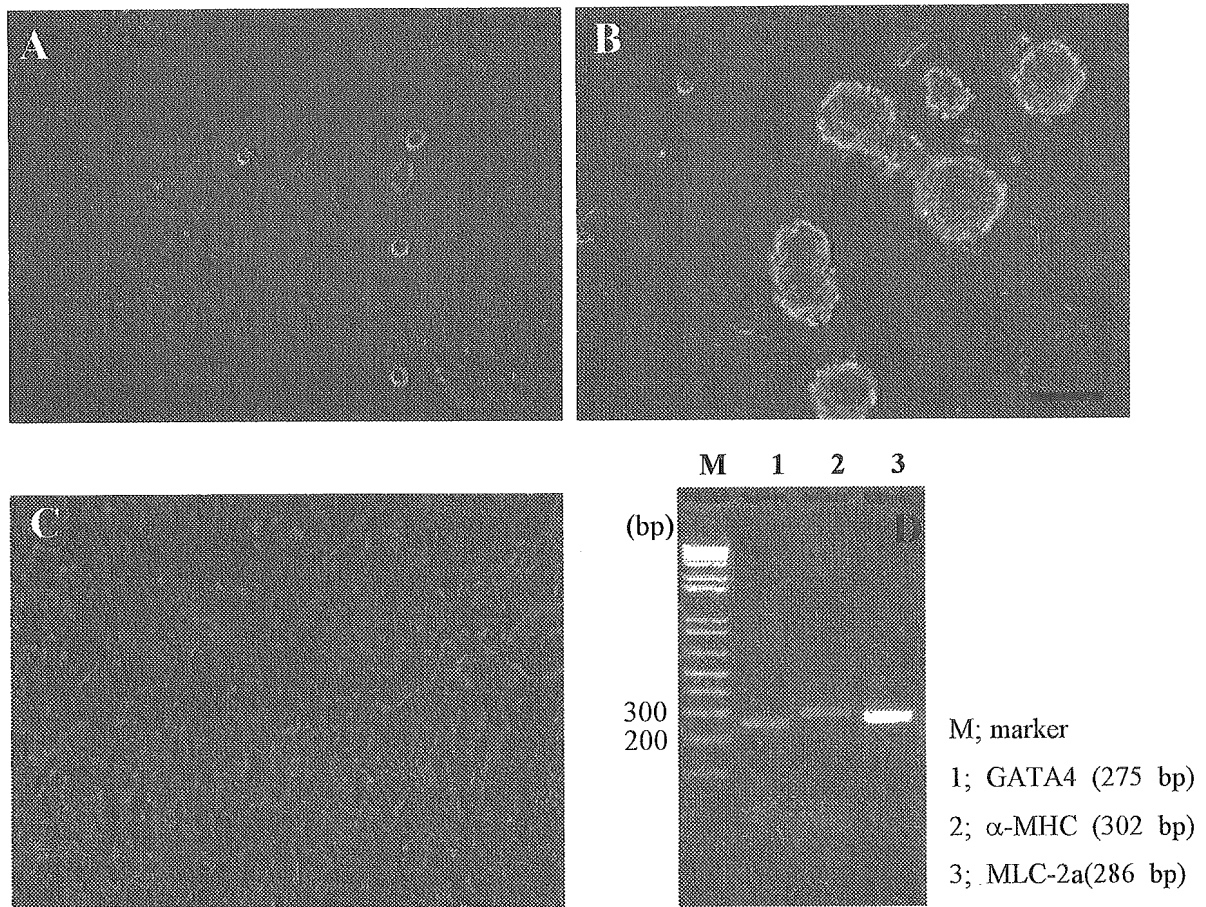
特になし

#### 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>>



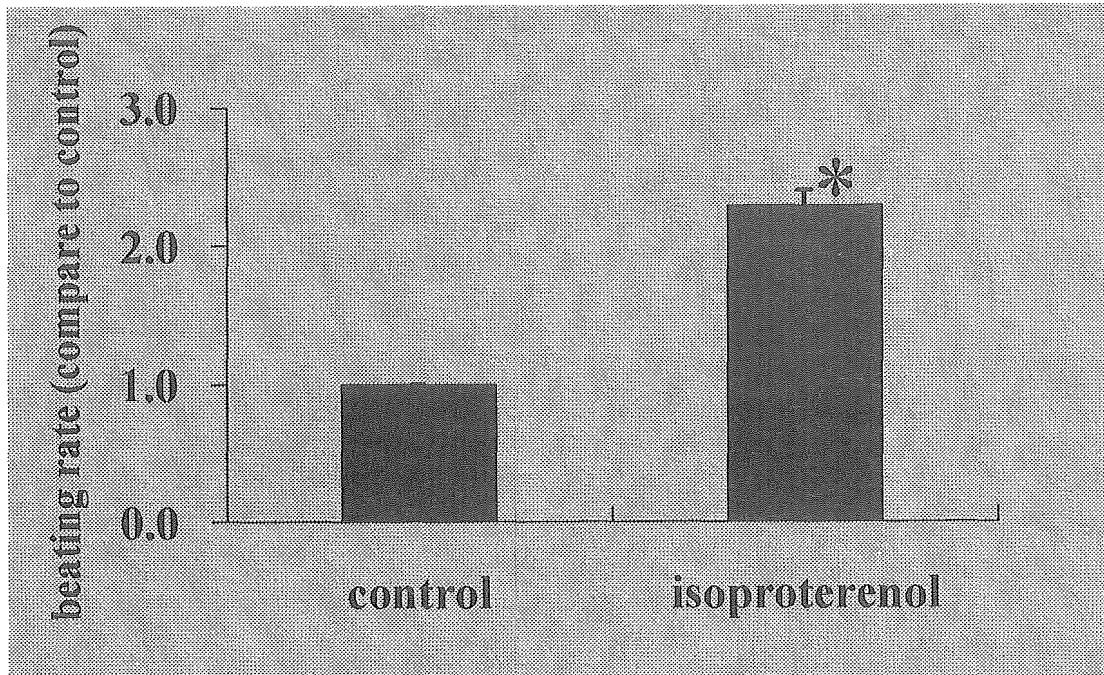
<図1> P19.CL6の形態及び心筋細胞特異的マーカーの発現確認

A; non differentiation B; DMSO-induced cell at day 2 C; cardiomyocyte at day 14 Bar, 100  $\mu\text{m}$

D; expression of specific marker in cardiomyocyte

A~Cは心筋細胞へ分化する過程の形態的観察。Dは培養14日目の細胞からcDNAを合成し、RT-PCRを行い、心筋細胞特異的マーカーの発現確認。

これよりP19.CL6が心筋細胞へ分化したことが確認できた。



\* p<0.01 vs control

<図2> P19.CL6のisoproterenolに対する反応性の確認

培養14日目 P19.CL6にisoproterenol（最終濃度5 μM）を処理し、処理前後の拍動数を測定し、controlと比較。isoproterenol処理に伴い、約2.5倍程度の拍動数の増加が見られた。

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

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を効率良く探索するにはハイスループットSNP解析法が求められる。我々はキャピ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を解析可能な方法、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) 遺伝性筋疾患を初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 (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。

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、RNAi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 (RNAi) 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RNAi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クエンサーを用いた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RNAi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ドするプラスミド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RNAi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RNAi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、RNAi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バンドが分離されている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RNAi誘導実験では非常に強いRNAi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が分かった。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RNAi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ケンサーと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・省力化できることがわかつ

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、および筋繊維、筋芽細胞や筋管細胞における RNAi 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 RNAi が正確に誘導され、強い活性を示すことが実証された。この成果は、RNAi 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スクリーニングに大変有利な技術を確立することができた。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、RNAi 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* 25: 833-8, 2004.
- (2) 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. *Analytical Biochemistry* 327:215-21, 2004.
- (3) Omi K, Tokunaga K, and Hohjoh H: Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett.* 558: 89-95, 2004

##### 2. 学会発表



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	出版社名	出版地	出版年	ページ
Toyo-oka T. and Kumagai H.	Cardiac troponin as a preferable biomarker of myocardial cell degradation	Tanokura, M, Ohtsuki I, and Maruyama K.	<i>Troponin Revisited: Biochemistry, Molecular Biology and Pathophysiology</i>	Oxford University Press	Oxford	2005 (In press).	

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
Toyo-oka T, Kawada T, Nakata J, <i>et al.</i>	Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction.	<i>Proc.Natl.Acad.Sci.USA.</i>	101	7381-7385	2004
Hori M, Sasayama S, Kitabatake A, <i>et al.</i>	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.	<i>Am.Heart J.</i>	147	324-330	2004
Sago N, Omi K, Tamura Y, <i>et al.</i>	RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed.	<i>Biochem. Biophys.Res. Commun.</i>	319	50-57	2004
Ma J, Iida H, Jo T, <i>et al.</i>	Ursodeoxycholic acid inhibits endothelin-1 production in human vascular endothelial cells.	<i>Eur.J.Pharmacol.</i>	505	67-74	2004
Takahashi M, Tanonaka K, Yoshida H, <i>et al.</i>	Effects of ACE inhibitor and AT(1) blocker on dystrophin-related proteins and calpain in failing heart.	<i>Cardiovasc.Res.</i>	65	356-365	2005

Kawada T, Tezuka A, Ebisawa T, <i>et al.</i>	A novel scheme of dystrophin disruption for the progression of advanced heart failure.	<i>Biochim. Biophys. Acta</i>	1751	73-81	2005
Kawada T, Masui F, Kumagai H, <i>et al.</i>	A novel paradigm for the development of advanced heart failure- Assessment by gene therapy. (A review).	<i>Pharmacol. &amp; Therap.</i>	107	31-43	2005
Iida H, Jo T, Iwasawa K, <i>et al.</i>	Molecular and pharmacological characteristics of transient voltage-dependent K <sup>+</sup> currents in cultured human pulmonary arterial smooth muscle cells.	<i>Br.J.Pharmacol</i>	146	49-59	2005.
Negoro H, Shin WS, Taguchi-Hakamada R, <i>et al.</i>	Endogenous prostaglandin D <sub>2</sub> synthesis decreases vascular cell adhesion molecule-1 expression in human umbilical vein endothelial cells.	<i>Life Sci.</i>			2005 (In press)
Mizukami H, Okada T, Ogasawara Y, <i>et al.</i>	Separate control of Rep and Cap expression using mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production.	<i>Mol.Biotechnol.</i>	27	7-14	2004
Takeda S, Takahashi M, Mizukami H, <i>et al.</i>	Successful gene transfer using adeno-associated virus vectors into the kidney: comparison among adeno-associated virus serotype 1-5 vectors <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .	<i>Nephron Exp. Nephrol.</i>	96	e119-26	2004
Hara T, Kume A, Hanazono Y, <i>et al.</i>	Expansion of genetically corrected neutrophils in chronic granulomatous disease mice by cotransferring a therapeutic gene and a selective amplifier gene.	<i>Gene Ther.</i>	11	1370-7	2004
Matsushita T, Okada T, Inaba T, <i>et al.</i>	The adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based adeno-associated virus vector production.	<i>J.Gen.Virol.</i>	85 (Pt 8)	2209-14	2004

Uchida M, Watanabe T, Kunitama M, <i>et al.</i>	Erythropoietin overcomes imatinib-induced apoptosis and induces erythroid differentiation in TF-1/bcr-abl cells.	<i>Stem Cells</i>	22	609-16	2004
Kanazawa T, Mizukami H, Nishino H, <i>et al.</i>	Topoisomerase inhibitors enhance the cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on head and neck cancer cells.	<i>Int.J.Oncol.</i>	25	729-35	2004
Ueda K, Hanazono Y, Shibata H, <i>et al.</i>	High-level <i>in vivo</i> gene marking after gene-modified autologous hematopoietic stem cell transplantation without marrow conditioning in non-human primates.	<i>Mol.Ther.</i>	10	469-77	2004
Takei Y, Mizukami H, Saga Y, <i>et al.</i>	Overexpression of a hybrid gene consisting of the amino-terminal fragment of urokinase and carboxyl-terminal domain of bikunin suppresses invasion and migration of human ovarian cancer cells <i>in vitro</i> .	<i>Int.J.Cancer.</i>	1;113	54-8	2005
Sasaki K, Inoue M, Shibata H, <i>et al.</i>	Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved.	<i>Gene Ther.</i>	12	203-10	2005
Yoshioka T, Okada T, Maeda Y, <i>et al.</i>	Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.	<i>Gene Ther.</i>	11	1772-9	2004
Takatoku M, Muroi K, Kawano-Yamamoto C, <i>et al.</i>	Involvement of the esophagus and stomach as a first manifestation of varicella zoster virus infection after allogeneic bone marrow transplantation.	<i>Intern Med.</i>	43	861-4	2004
Kurachi K, Kurachi S.	Molecular mechanisms of age-related regulation of genes.	<i>J.Thromb. Haemost.</i>	3	909-14	2005

Wahed MI, Watanabe K, Ma M, <i>et al.</i>	Effects of pranidipine, a novel calcium channel antagonist, on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in rats with heart failure.	<i>Pharmacology</i>	72	26-32	2004
Kanzawa N, Kondo M, Okushima T, <i>et al.</i>	Biochemical and molecular biological analysis of different responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in chick embryo heart and liver.	<i>Arch.Biochem. Biophys.</i>	427	58-67	2004
Hoshino D, Hayashi A, Temmei Y, <i>et al.</i>	Biochemical and immunohistochemical characterization of Mimosa antennae.	<i>Planta</i>	219	867-75	2004
Fujimi TJ, Yasuoka S, Ogura E, <i>et al.</i>	Comparative analysis of gene expression mechanisms between group IA and IB phospholipase A2 genes from sea snake <i>Laticauda semifasciata</i> .	<i>Gene</i>	332	179-90	2004
Kanzawa N, Yabuta H, Fujimi TJ, <i>et al.</i>	Solubility properties of a 65-kDa peptide prepared by restricted digestion of myosin with astacin-like squid metalloprotease.	<i>Zoolog.Sci.</i>	21	159-62	2004
Kanzawa N, Shintani S, Ohta K, <i>et al.</i>	Achacin induces cell death in HeLa cells through two different mechanisms.	<i>Arch Biochem Biophys.</i>	422	103-9	2004
Kanzawa N, Tatewaki S, Watanabe R, <i>et al.</i>	Expression and tissue distribution of astacin-like squid metalloprotease (ALSM).	<i>Comp.Biochem. Physiol.B.Biochem.Mol.Biol.</i>	142	153-63	2005
Temmei Y, Uchida S, Hoshino D, <i>et al.</i>	Water channel activities of Mimosa pudica plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation.	<i>FEBS Lett.</i>	579	4417-22	2005
Miyashita R, Tsuchiya N, Hikami K, <i>et al.</i>	Molecular genetic analyses of human NKG2C (KLRC2) gene deletion.	<i>Int Immunol.</i>	16	163-8	2004
Zheng YH, Irwin D, Kurosu T, <i>et al.</i>	Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication.	<i>J.Virol.</i>	78	6073-6	2004
Doi K, Noiri E, Tokunaga K.	The association of NAD(P)H oxidase p22 phox with diabetic nephropathy is still uncertain. Millward, and Demaine.	<i>Diabetes Care</i>	27	1518-9	2004