

厚生労働科学研究研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

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に関する研究

平成14年度～16年度 総合研究報告書

平成17(2005)年10月

主任研究者 豊岡 照彦

目 次

I. 総合研究報告		
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-----		1
豊岡照彦		
(資料) 参考図		
(資料) 参考表		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	1 8
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	2 3

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)

総合研究報告書

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

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・生命機能研究分野・教授

研究要旨:ヒ型重症心不全の遺伝子治療開発の前臨床試験を行う為に、主任研究者と研究分担者は平成 14-16 年度に、ヒ型重症心不全の克服を目指して、小型動物で既に筆者らが完成していた遺伝子治療をヒに近いカを用いて有効性と安全性の確認実験を展開した。先ず霊長類を実験に供する前に文部科学省大臣許可を得るために、約1年半の審査を頂いた。許可を頂いた上で、カで再現性の良い心不全の作製とヒ病態との厳密な比較を形態、各種生理学的、生化学的検査を経時的に行った。次に、動物を犠牲にする直前に細胞膜の透過性を検討する目的で正常の細胞膜を通過しない蛍光色素を静注し、*in situ*で細胞膜透過性を検証し、同時に各種病理学的検査を行った。

得られた結果はヒ臨床例で得難い貴重なデータとなった。このカによる慢性実験、ヒ DCM で心移植に至った臨床例、小型動物の先天性 DCM、心筋梗塞及び薬剤負荷による後天性の心不全でも共通して心筋細胞膜の透過性亢進、心筋細胞のジストロフィンの断裂と細胞膜から細胞質への移行(translocation)を認めた。即ち「心筋細胞に選択的に発生した筋ジストロフィー様の病変が心不全を重症化させる」普遍的なプロセスを示している。これは心不全の発生機序の解明と治療目標の設定に大きな意味を持つと考えられ、新たな心不全重症化機構に関する注目論文として欧州の循環器学会から高い評価を頂いた。このジストロフィンの断裂と移行は筋肉細胞内因性の calpain-2 の活性化による事を示唆する多くの傍証が得られた。次に臨床の現場では患者は心不全症状の進行後に治療を求める実情を考慮して、骨格筋芽細胞、および脂肪幹細胞から心筋細胞への改変に成功した。

更に分担研究者らは、現在の遺伝子治療法を改善する為に、①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の改良、②自己免疫性心不全モデルを用いて proteome 解析を行い、新たに 15 種類の蛋白発現を認めた。③遺伝子治療用の rAAV ベクターの異なる血清型(serotype)のベクターにより免疫的干渉の無い治療法の改良と、④バキュロウイルスにより rAAV ベクターの大量生産に成功した。⑤更に、心不全の増悪因子と目される calpain の発現を RNAi で抑制する基礎研究を推進した。今回の 3 年間の研究を通して病態の進展過程の解明と遺伝子・再生医療の実現に向けて大きく前進した。

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

倉地幸徳

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

寺尾恵治

国立感染症研究所・霊長類センター・センター長

仲澤幹雄

新潟大学・医学部保健学科・生体情報学・教授

河田登美枝

新潟大学・歯学部付属病院・薬剤部・助教授

土屋隆英

上智大学・理工学部・化学科・教授

徳永勝士

東京大学・医学系研究科・人類遺伝学・教授

A. 研究目的

ヒ型重症心不全の遺伝子治療と再生医療を実現する為の有効性と安全性の確認、遺伝子治療を更に確実にを行うための基礎検討を行う。

具体的には、主任研究者らが①カによる心不全を作製して、ヒ病態との比較を厳密に行う為に特注のペースマーカーを開発して、頻脈電気刺激を行う。次にヒ型重症心不全患者の管理と同様に、胸部 X 線検査による形態診断、心電図、エコーと心臓カテテル検査による各種生理学的

指標、血液生化学検査、特に心不全と心筋細胞障害を血中BNPとトロポニンTのレベルを用いて追跡する。④最後に *in situ* で心筋細胞膜の透過性を検討する目的で、ヒトでは倫理的に許されない研究として、動物を犠牲にする直前に正常の細胞膜を透過しない Evans blue(EB) を静注する。この後、心筋を摘出してEBの心筋細胞内貯留を確認する。

更に心筋細胞の再生医療に関して、⑤骨格筋芽細胞、又は⑥脂肪幹細胞からの心筋再生、⑦ヒト移植心のジストロフィンの解析、⑧安定した恒常的な遺伝子発現ベクターの設計、⑨心不全のプロテオーム解析、⑩治療用ベクターの大量生産、⑪RNAiによる増悪遺伝子の発現抑制を検討する。

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。

B. 研究方法

その概略を前記の番号順に記載する。

- ① 遺伝子治療と再生医療を実現するにはヒトに近いモデルを用いて再現性の良い心不全状態を作成する必要がある。従来、頻脈刺激による心不全は可逆性でヒトモデルとして、適切でないと考えられたが、カを用いて、多くの代謝性因子を生化学および分子生物学的に Western blotting, Northern blotting と免疫組織染色を用いて検証した。手術様式を図 1-4 に示す。
- ② 予備検討として異型同種間移植(allograft)による拒絶反応の有無を 5-6 週齢の DCM 発症雄性 TO-2 系ハムスターと 3 週齢の正常対

照 golden ハムスターとの間で皮膚移植を行った。ペントバルビタル麻酔下に golden、TO-2 それぞれの背部の皮膚を 1cm×1cm で切り出し、交換移植を行った。5-6 週後に移植片が recipient 動物の皮膚に生着する事を確認した後、移植部位を採取した。この組織を OCT に包埋し、液体窒素で凍結後に cryostat で厚さ 5 μm の連続切片を作成して、各種の組織学的検討を行った。

上記実験で拒絶反応が起きない事を確認した後、正常ハムスターの骨格筋から SMbl を得た。即ち、3 週齢の golden hamster をペントバルビタルで麻酔後に大腿 4 頭筋~400mg を無菌的に摘出し、氷冷下の燐酸加生理的食塩水(PBS)、10ml に保存した。細切後に collagenase type 1(Sigma、15mg/10ml)と soybean trypsin inhibitor (Sigma、3.75mg/10ml) を加え、37°C で機械的に振動させながら 60 分インキュベートした。反応後に同量の Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco BRL)、15% horse serum (Gibco BRL)、10%FBS (Cell culture technologies)、1% Antibiotic- Antimycotic を含む培地、10ml を加え、インキュベーターでろ過した。800 回転 10 分間、遠心分離し、細胞を $\sim 5 \times 10^6$ cells / dish になるように先の培地中に懸濁した。

fibroblast と myoblast を分離するために、coating していない 100mm Falcon dish に播き、5%CO₂ 存在下に 37°C でインキュベートした。約半数の細胞が接着する 40 分後に浮遊細胞を集め、gelatin coat した 100mm dish に移して培養を続けた。70%コンフルエント程度で継代し、2 代目で凍結保存した。上記操作で得られた細胞は、ほぼ均一の紡錘形の細胞で占められ、一部は多核で大

型の myotube に分化していた。他の結合組織や成筋の混入は認められなかった(図5)。

- ③ DCM ハムスターの骨格筋、または心臓に細胞移植して、その生着状態を一般病理組織学的、及び免疫組織学的に解析した。具体的には 5-6 週齢の TO-2 をペントバルビタール (5mg/100g) 麻酔下にメスにて左右両下肢の前脛骨筋を露出させた。移植された donor の細胞と recipient の細胞を区別する為に、細胞核を DAPI で、細胞膜を DiI 蛍光色素でラベルした骨格筋芽細胞を $\sim 1 \times 10^6$ 個/30 μ l を右前脛骨筋に 2-3 箇所に分注した。対側を対照として無血清の DMEM 30 μ l を筋注した。

心臓に対しては 5-6 週齢の TO-2 をアロピノン(0.1mg/100g, s.c.)、ペントバルビタール (5mg/100g, i.p.) 麻酔下に気管内挿管、人工呼吸下(Harvard 型)に左開胸手術を行った。下記の 2 種の蛍光色素でラベルした骨格筋芽細胞 $\sim 3 \times 10^6$ 個/30 μ l を左室自由壁の 2-3 箇所に分注した。対照群には同様に、無血清 DMEM (30 μ l) を注入した。

- ④ マウス褐色脂肪組織から既報により幹細胞を得て、培養条件を種々工夫して心筋細胞の発現を探索した。
- ⑤ 更に、Max-Planck 研究所の J. Schaper らと協力して増井らはヒト重症心不全で心移植に至った心筋のジストロフィン (Dys) 関連蛋白の発現を検討する。23 例の心移植者の Dys, α -, β -, γ -と δ -SG の発現を内部標準として正常ラット骨格筋を用いて Western blotting 解析して各蛋白の発現量を定量した。
- ⑥ 分担研究者の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 V 型 AAV ベクターを大量作製し、高力価のベクターを得ることを試みた。

- ⑦ 分担研究者の倉知は現在の遺伝子治療法を改善する為に、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。
- ⑧ 分担研究者の仲澤は心筋ミオシンによる自己免疫性心筋症を作製して、二次元電気泳動後に proteome 解析を行った。
- ⑨ 分担研究者の河田は小澤らの作製した数種の serotype の異なる rAAV ベクターを用いて同じ bGal 遺伝子が免疫的な干渉を受けずに発現するか、また反復投与が可能か検討した。
- ⑩ 分担研究者の土屋と徳永らは calpain 発現抑制について RNAi をマウス EC 細胞 P19CL6 を用いて 2 種の候補 RNAi を感染効率の影響を避ける為に、microinjection 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。

(倫理面への配慮)

動物愛護の観点から、サル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。こ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。

これらの点を重視して筆者らはヘ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

I. 当研究室の予備検討の結果、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)、カテテルによる血行動態など生理的な指標も、また心不全の鋭敏な生化学的マーカーの血中 BNP レベルも刺激中断により前値に戻った(図 10)。

しかし蛍光二重染色の結果、心筋細胞内に EB が取り込まれ、その細胞では Dys の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た(図 11-13)。これは不可逆性の高度の変性病変と考えた。

II. 次に正常対照の golden ハムスターの大腿四頭筋から SkMb を採取、培養後に DAPI と Dil で核と細胞膜を各々蛍光ラベルした。 $\sim 3 \times 10^6$ 個/30 μ 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、特異抗体により δ -SG を免疫染色して donor の SkMb の生着を確認した。生着細胞の特徴と recipient 細胞との融合を骨格筋固有の速筋型ミオシン重鎖 (fMHC)、遅筋型ミオシン重鎖 (sMHC)、および connexin43 の免疫染色で検討した。移植後に recipient 心筋の中に Dil 陽性細胞が播種増殖していた(図 14)。この一部に δ -SG が認められ、TO-2 で欠損している recipient 細胞中に δ -SG 陽性細胞が共

存していた(図 15)。

III. 特筆すべき点として、こうした細胞は移植 5 週後に、その細胞の約 80% が骨格筋に特異的な fMHC を発現し、残りの 20% が心筋と免疫学的に交差反応を示す sMHC で染色された(図 16-18)。donor の SkMb が分化した細胞と recipient の心筋細胞とは δ -SG の発現により明瞭に区別された(図 16)。これらの細胞は特異抗体により、骨格筋の中の速筋型ミオシン(図 17、赤線内)が 70-80%、遅筋型ミオシン(図 18、緑線内)が 15-25%、残りが両者を発現していた(図 18、黄線内)。興味有る事に、その発現頻度は移植後の経過中に変化し、2-4 週までは上記の割合だったが、8-15 週では大部分が遅筋型だった。これは移植後に速筋型が遅筋型に分化するか、または速筋型が淘汰される可能性を示す (Tezuka *et al.*, In subm.)。

従来、SkMb の移植治療は重症の不整脈を来し易いことが懸念されていたが、これは刺激伝導速度の大きい速筋型骨格筋が伝導速度の遅い心筋中に共存して心筋内伝導が非均質なためかも知れない。実際、移植した SkMb と recipient の心筋は介在板に特異的に発現する connexin 45 は遅筋型 SkMb との間にもみ形成され、融合していた。今回は遅筋骨格筋の SkMb を選択的に分取後に recipient の心臓に細胞移植して不整脈との関連を検討する予定である。

IV. 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。

V. 全症例で Dys の断片化を認め、分解産物の分子量と分解の程度から数群に分類された。各 SG についても検体間で発現に差異が見られた。これらの結果の一部は未だ

共同研究者の了解を得ていないため、公表を遠慮させて頂く。

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(図 19)を支持する。この Dys を崩壊させる候補因子として calpain を挙げた理由は、

- ① 全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 Ca²⁺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 の減少量と心機能を代表する左室拡張末期圧(LVEDP)の上昇が DCM でも(図 22)、広範囲慢性心筋梗塞の残存心筋でも(図 23)、共通して強い相関を示すこと、
- 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。今後、Dys 及び Dys 関連蛋白質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。

上記の研究に加えて、分担研究者の倉知は、

- ① 遺伝子治療の基盤となる心筋における導入遺伝子の安定した高い発現を実現し、維持可能な遺伝子導入/発現ベクターの開発を年齢軸恒常性分子機構研究と年齢軸工学開拓に関連させて行ってきた。
- ② 小澤と河田らは、従来用いてきた II 型に加え、serotype の異なる型の rAAV による感染効率と発現期間が *in vivo* の骨格筋と心筋において検討した(図 24)。その結果、I 型と V 型は従来用いた II 型以上の感染効率と発現期間を有し(図 25)、更に免疫学的に交差反応を示さなかった(図 26)。この結果は、将来同一の遺伝子の追加投与や特定のタンパクの down-regulation を行い、loss of function を検討した後に、serotype の異なるベクターを用いて同じタンパク、または代償機能を有すると考えられるタンパクを再発現させて gain of function を検討事が可能になる結果、従来以上に厳密な機能を遺伝子レベルで確認する新たな研究の道を築いた。
- ③ 仲澤は自己免疫性心筋炎による急性心不全心筋サンプルから抽出した蛋白質サンプルについて、二次元電気泳動を行い、心筋蛋白質の proteome 解析を行った(図 27)。明らかな心筋炎を発症する前から発現増加している蛋白質スポットについて、ペプチド消化サンプルを飛行時間型質量分析計にて分析し、現在まで 15 蛋白が同定した(表 1)。

- ④ 更の小澤らはv型 small Rep を他の血清型に置換して rAAV ベクターを作製した結果、特に I 型を用いた場合にベクター産生量が 4 倍以上増加した。これは臨床応用に大量に必要な AAV ベクター供給を容易にするものとして期待される。
- ⑤ 徳永らと土屋らは重症心不全の増悪因子の一つ、calpain、に着目し、RNAi 法による遺伝子発現抑制を行った。マウス細胞株、P19CL6 は心筋細胞に分化することが心筋固有の遺伝子発現により確認された(図 28)。これは β 受容体刺激薬の isoproterenol で自律拍動数が著明に増加することから薬理的に示された(図 29)。RNAi を誘導後、calpain 遺伝子の発現量と活性を測定した結果、発現量の抑制と活性の減少が確認された。しかし抑制効率は治療に利用するためには不十分なため、さらに強力に抑制する配列を検索する必要性がある。

D. 考察

1) 達成度について

重症心筋障害は δ -sarcoglycan(δ -SG)の欠損にも起因するが、その予防、治療法開発には δ -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。なお、先天性、後天性、急性または慢性を問わずジストロフィンと DAP の *in vivo* における発現量の変化と *in vitro* の calpain による分解を図 29 に纏めた。

カ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平均 2

年の時間と 1 頭当たり平均 200 万円の経費が必要となる。重症心不全をカ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。小型動物実験の結果が必ずしもヒを含めた大型動物に当てはまるとは限らない。新しい治療法の有効性と安全性をヒに近い種で確かめることは必須であるが実験に要する時間、経費は格段に難しくなる。

発表される論文数は少ないが、その内容は臨床的な意義も含めて極めて大きい。是非、質的な面も評価して頂きたい。現段階では当初計画の中間点に位置するが、この実績を活かす為にも今後も御理解と御支援を賜りたい。

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用の機器を流用可能で新たな機材の開発の必要が無く、この点で時間と経費の大幅な削減に繋がった。またカは直立歩行してヒ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。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の開発にはカを用いた研究は理想的である。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

現在 11 頭目を検討中であるが、倫理的にヒでは得られない貴重なデータが得られつつある。今後データが纏まり次第、順次発表する予

定である。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晚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世界的にも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。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, Yamazaki K, Shimamoto R, Urabe M, Nakata J, Hemmi C, Masui F, Nakajima T, Suzuki J, Monahan J, Sato H, Takeo S, Ozawa K and Toyo-oka T. Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 99; 901-906, 2002.
2. Tsuji T, Suzuki J-I, Shimamoto R, Yamazaki K, Nakajima T, Nagai R, Komatsu S, Ohtomo K, Toyo-oka T, and Omata M. Vector analysis of the wall shear rate at the human aortoiliac bifurcation using cine MR velocity mapping. *Am.J.*

Roentgenol. 178; 995-999, 2002.

3. Toyo-oka T, Kawada T, Nakazawa M, Yoshida H, Xi H, Masui F, Hemmi C, Urabe M and Ozawa K. Gene therapy prevents disruption of dystrophin-related proteins in a model of hereditary dilated cardio- myopathies in hamster. A review, *Heart, Lung & Circ.* 11; 174-181, 2002.
4. Terasawa K, Nakajima T, Iida H, Iwasawa K, Oonuma H, Jo T, Morita T, Nakamura F, Fujimori Y, Toyo-oka T, and Nagai R. Nonselective cation currents regulate membrane potential of rabbit coronary arterial cell: modulation by lysophosphatidylcholine. *Circulation* 106; 3111-3119, 2002.
5. Hakamada-Taguchi R, Uehara Y, Haebara T, Negoro H, and Toyo-oka T. The relationship between changes in normal-range systolic blood pressure and cognitive function in middle-aged healthy women. *Hypertens Res.* 25; 565-569, 2002.
6. Negoro H, Shin WS, Hakamada-Taguchi R, Eguchi N, Urade Y, Goto A, Toyo-oka T, Fujita T, Omata M, and Uehara Y. Endogenous prostaglandin D₂ synthesis reduces an increase in plasminogen activator inhibitor-1 following interleukin stimulation in bovine endothelial cells. *J.Hypertens.* 20; 1347-1354, 2002.
7. Koizumi T, Hikiji H, Takato T, Fukuda S, Abe T, Koshikiya N, Iwasawa K, and Toyo-oka T. Cell density and growth-dependent down-regula-

tion of both intracellular calcium responses to agonist stimuli and expression of smooth-surfaced endoplasmic reticulum in MC₃T₃-E₁ osteoblast-like cells. *J.Biol.Chem.* 278: 6433-6439, 2003.

8. Hakamada-Taguchi R, Uehara Y, Kuribayashi K, Numabe A, Saito K, Negoro H, Fujita T, Toyo-oka T, and Kato T. Inhibition of hydroxymethylglutaryl-coenzyme a reductase reduces Th1 development and promotes Th2 development. *Circ.Res.* 93: 948-956, 2003.

9. Numabe A, Ara N, Hakamada-Taguchi R, Suzuki N, Hirawa N, Kawabata Y, Negoro T, Nagata T, Goto A, Toyo-oka T, Fujita T, and Uehara Y. Effects of the anti-platelet aggregation drug dilazep on cognitive function in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens.Res.* 26: 185-191, 2003.

10. Abe T, Hikiji H, Takato T, Koshikiya N, Shima S, Nakata J, Shin WS, Susami T and Toyo-oka T. Targeting of iNOS with antisense DNA plasmid prevents cytokine-induced reduction of osteoblastic activity. *Am.J.Physiol. (Endocrinol.Metab.)* 285: E614-E621, 2003

11. 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.

12. Hori 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.* 4:477-484, 2003.

13. 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.

14. Sago N, Omi K, Tamura Y, Kunugi H, *et al.*, RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where Dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 319:50-57, 2004.

15. 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.

16. Ma J, Iida H, Jo T, Takano H, Oonuma H, Morita T, Toyo-oka T, Omata M, Nagai R, Okuda Y, Yamada N, and Nakajima T. Ursodeoxycholic acid inhibits endothelin-1 production in human vascular endothelial cells. *Eur.J.Pharmacol.* 505: 67-74, 2004.

17. Takahashi M, Tanonaka K, Yoshida H,

Oikawa R, Koshimizu M, Daicho T, Toyo-oka T, and Takeo S. Effects of ACE inhibitor and AT(1) blocker on dystrophin-related proteins and calpain in failing heart. *Cardiovasc.Res*, 65: 356-65, 2005.

18. 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).

19. Kawada T, Tezuka A, Ebisawa T, Masui F, Kumagai H, Nakazawa M, Toyo-oka T. A novel scheme of dystrophin disruption for the progression of advanced heart failure (A brief review). *Biochim.Biophys.Acta* 2005 (In press).

Books

1. 豊岡 照彦. 心不全の重症化と、その対策。日本医事新報 4171; 21-32, 2004.

2. 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, and Singal PK. Kluwer Acad Publ. (Boston), 449-459, 2003.

3. Toyo-oka T. and Kumagai H. Cardiac troponin as a preferable biomarker of myocardial cell degradation. *Troponin Revisited: Biochemistry, Molecular Biology and Pathophysiology*, Eds. Tanokura M, Ohtsuki I. and Maruyama K. Oxford University Press (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回日本薬理学会総会。

② Nakata 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回日本循環器学会総会

③ Kawada 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, 豊岡照彦. 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。

⑥ Toyo-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 pathway to progress heart failure in both the hereditary and acquired origins. *Cardiomyopathy*

& *Heart Failure* 2003.

⑦ Kawada T, Ebisawa T, Xie H, Masui F, Iwasawa K, Nakazawa M, & Toyo-oka T. “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.*

⑧ Kawada T, Sago N, Tezuka A, Hirata A, Niwa Y, Nakazawa M, & Toyo-oka T. Paradoxical improvement of monocrotalin- induced pulmonary hypertension and right ventricular 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
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.

2. 現在、国内特許の申請中。

参考図

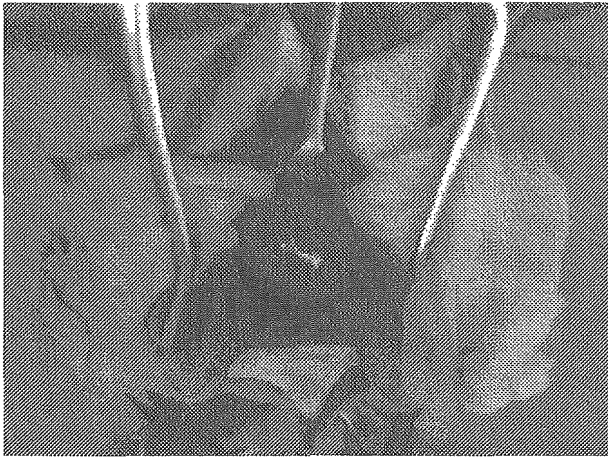


図 1. カルによる心不全作成手術の左肋間開胸後。



図 2. 心外膜剥離後。

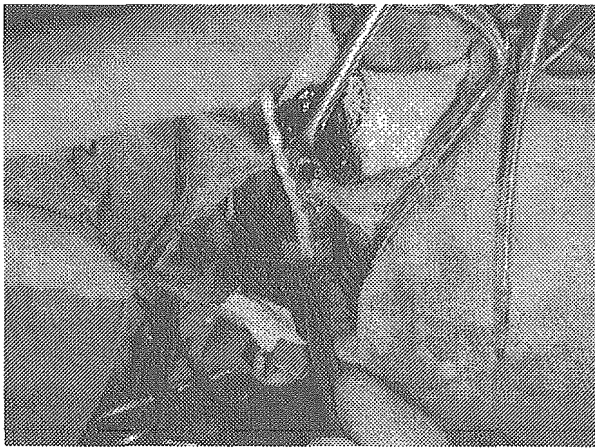


図 3. ペースメーカー電極の逢着。



図 4. 特注のペースメーカーを皮下に包埋。

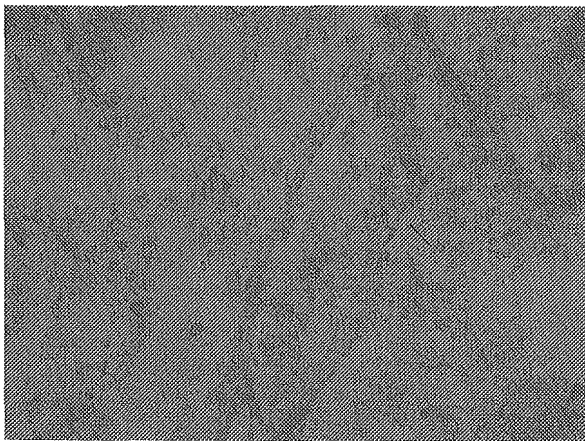


図 5. 対照 golden ハムスターの骨格筋より得た myoblast。8-SG 抗体の免疫染色により myotube に分化した細胞は8-SG 蛋白を発現している。

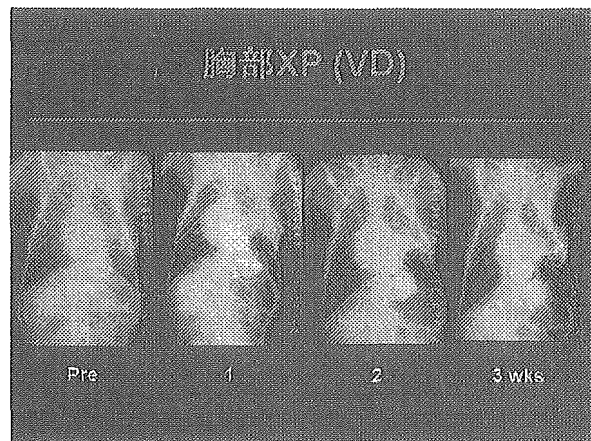


図 6. 頻脈刺激前後の心拡大。1-2 週の刺激中のみ心胸郭比が一過性に増大する。

ECCG

Pre-pacing

On

Off

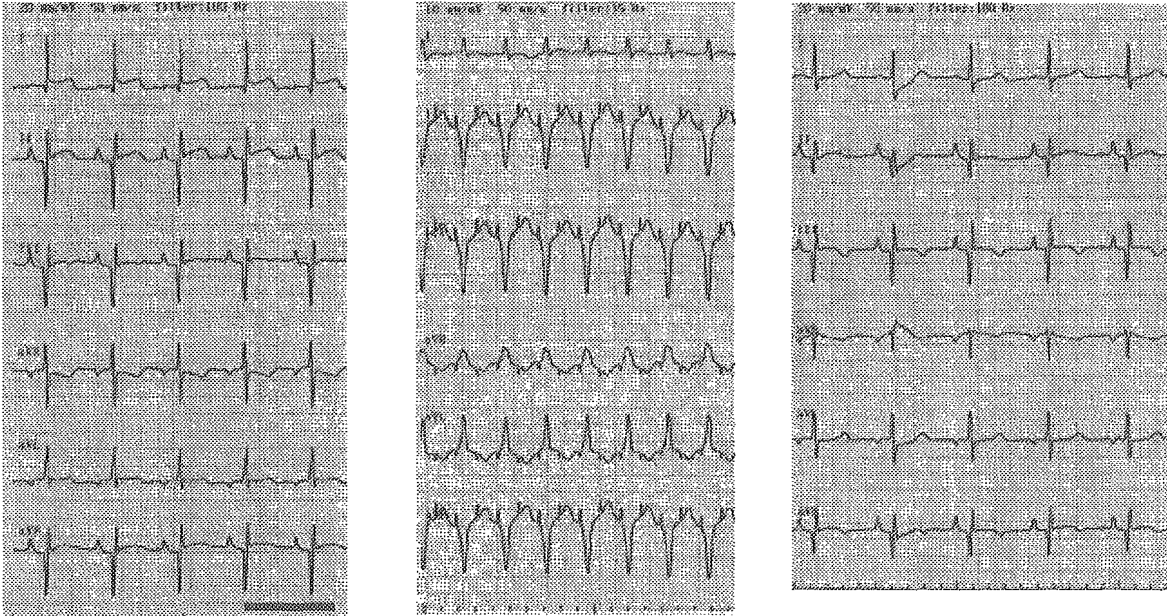


図 7. ペースメーカー刺激前、後の心電図波形。

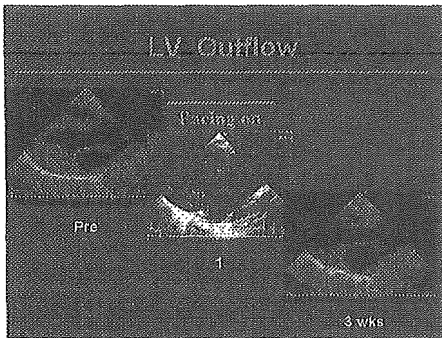


図 8. ペースメーカー刺激前、後の左室流出路部分の超音波画像。

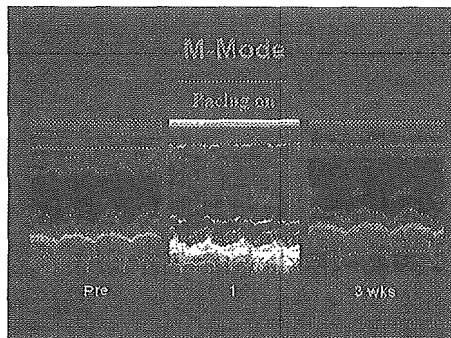


図 9. ペースメーカー刺激前、後の左室短軸径の M モード超音波画像。

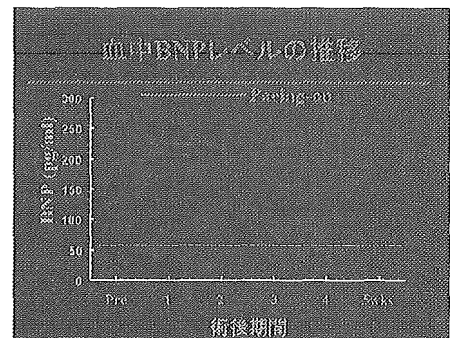


図 10. ペースメーカー刺激前、後の血中 BNP のレベル。

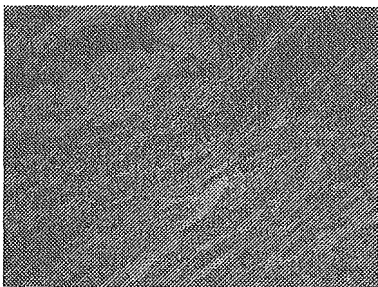


図 11. 電気刺激後の Azan 染色。

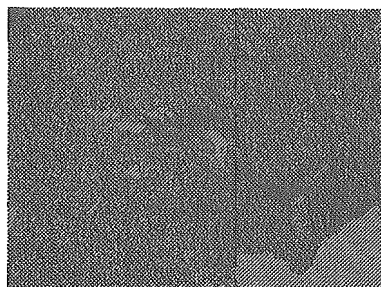


図 12. 左室乳頭筋。

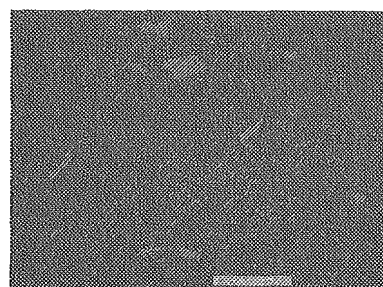


図 13. 心室中隔。

(左室自由壁)。 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。

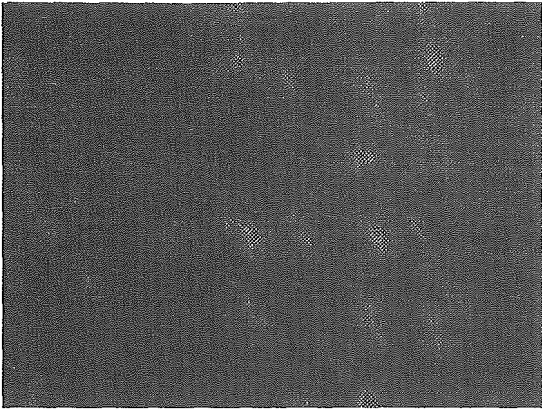


図 14. 正常動物の骨格筋芽細胞に donor の細胞膜を Di-I でラベル後に心筋に移植して 5 週後の組織像。



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。delta-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 重染色。

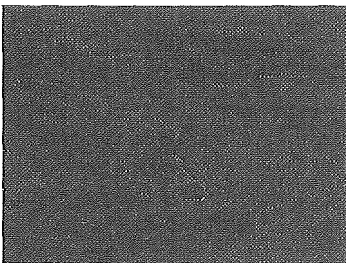


図 16. delta-SG 抗体による recipient 心筋内の donor 細胞が緑色蛍光として集塊を形成する。

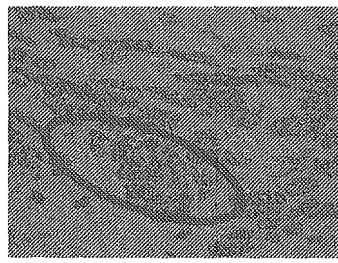


図 17. fMHC 抗体による骨格筋固有の速筋が recipient 心筋内に増殖している (赤円内)。

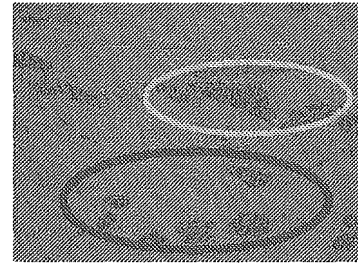


図 18. sMHC 抗体による遅筋の発現 (緑円内)。一部の細胞は fMHC にも sMHC にも染まる (黄円内)。

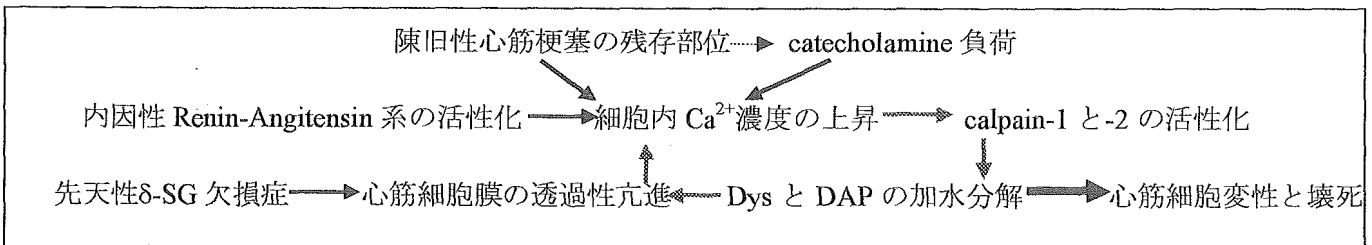


図 19. 種々の原因による心不全の重症化仮説。

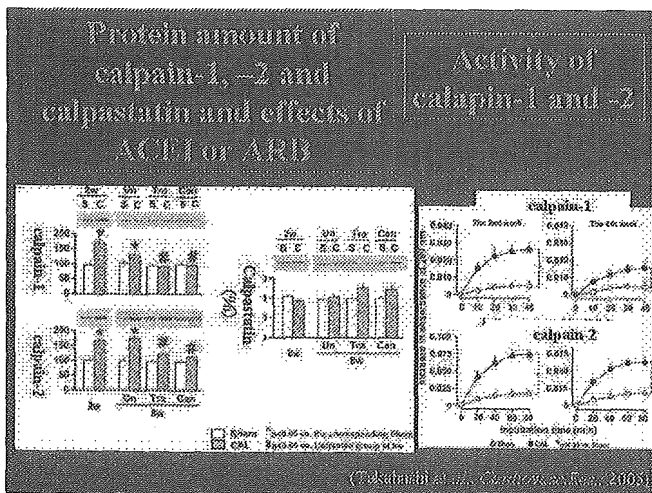


図 20. 陳旧性心筋梗塞の残存心筋内 calpain-1 と -2、および calpastatin のタンパク量 (左) と活性 (右)。

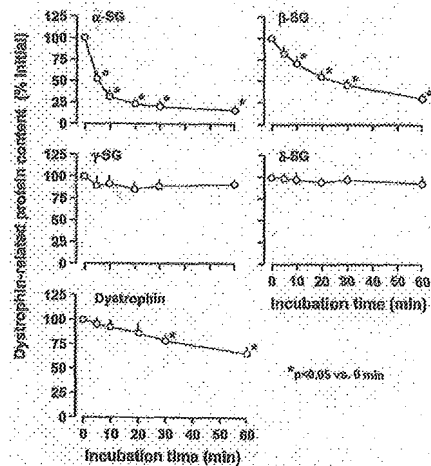


図 21. 精製 calpain-2 によるジストロフィンと DAP の in vitro の加水分解。

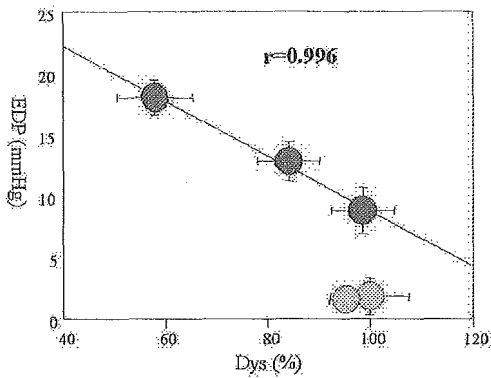


図 22. 先天性 DCM ハムスターの心筋内 Dys 量と左室拡張末期圧 (EDP) の相関。

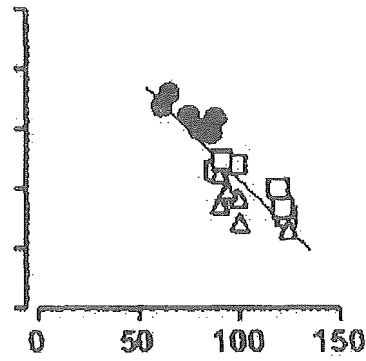


図 23. 後天性に作成した広範囲陳旧性心筋梗塞の残存心筋内 Dys 量と EDP の相関。

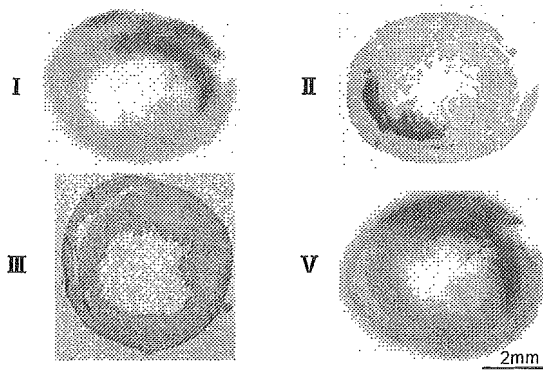


図 24. ハムスター心筋での各血清型 rAAV ベクターによる β -Gal 免疫染色の比較。II 型に比べ、I と V 型では広範囲に β -Gal が発現していたが、III 型では殆ど発現していなかった。

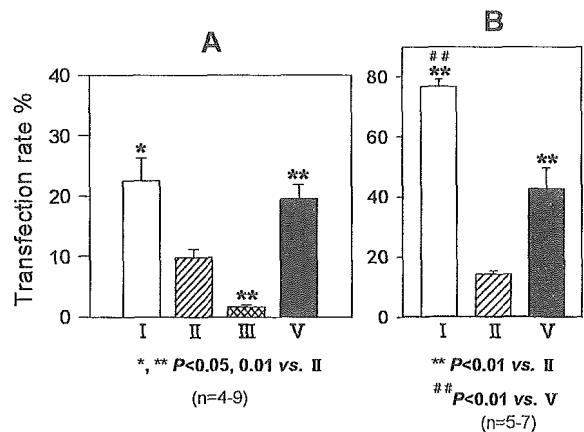


図 25. ハムスター心筋 (A) および骨格筋 (B) における各血清型 rAAV による β -Gal 発現効率の比較。両組織において II 型より、I および V 型の方が強い β -Gal 発現が認められた。

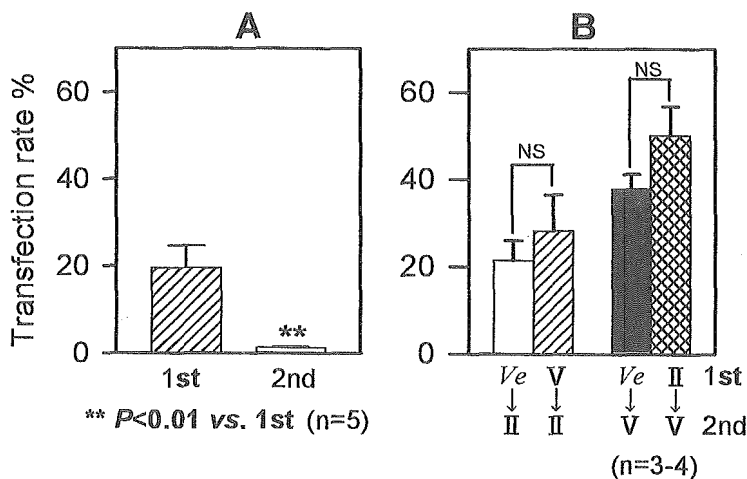


図 26. ハムスター骨格筋における免疫交叉生の検討。(A) II 型を繰り返し投与すると、2 回目(2nd)はほとんど β -Gal の発現は認められなかった。(B) 1 回目に溶媒 (Ve)、2 回目に II 型 rAAV を投与した群 (Ve \rightarrow II) と V 型の後に II 型を導入した群 (V \rightarrow II) では差がなかった。また、1 回目に溶媒、2 回目に V 型 rAAV を投与した群 (Ve \rightarrow V) と II 型の後に V 型を導入した群 (II \rightarrow V) においても、その発現効率はほぼ同程度であり、免疫交叉性は認められなかった。

図27. 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。

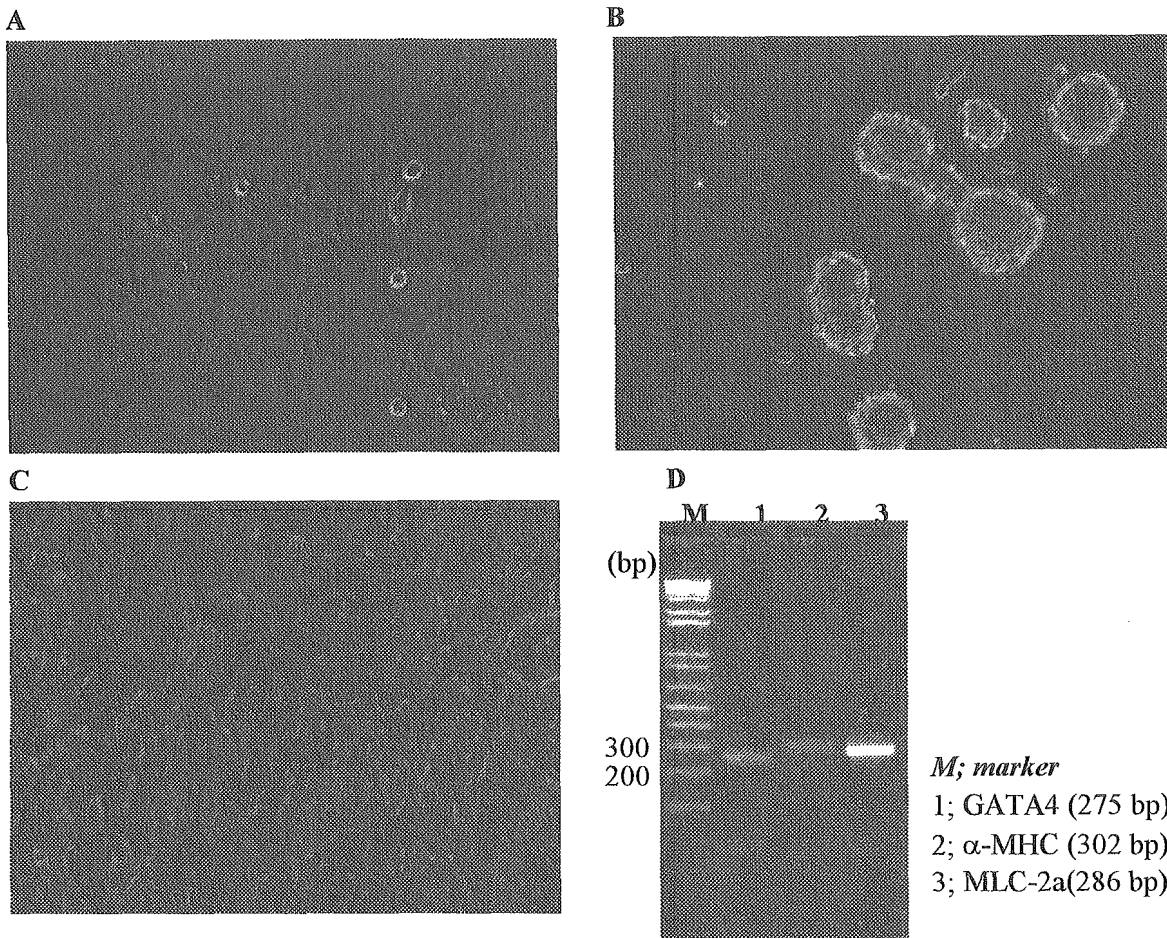
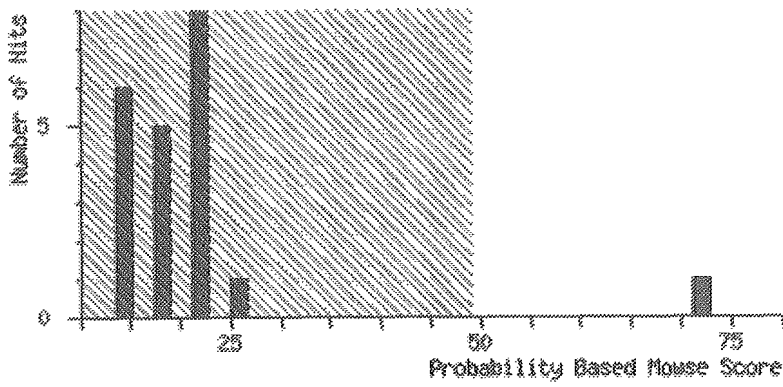


図 28.P19CL6 の形態及び心筋細胞特異的マーカーの発現確認。

A; non differentiation B; DMSO-induced cell at day 2 C; cardiomyocyte at day 14 Bar, 100 μ 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変化。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が発現し、P19CL6 が心筋細胞へ分化したことが確認された。

Paradigm for the activation of calpain followed by the proteolysis of DRP

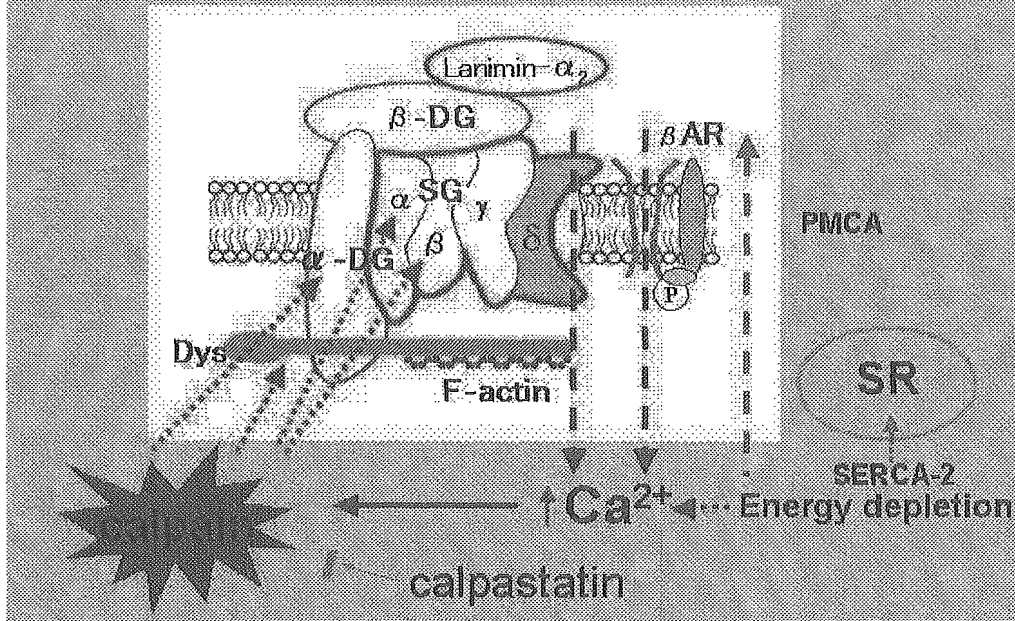


図 29. 各種の心疾患で calpain が活性化する共通機構。

参考表

表 1. 自己免疫性心筋炎の proteome 解析で質量分析により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 γ -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 1 alpha 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.

表 2. 各種遺伝性、後天性の急性、慢性の心不全の筋組織に発現している DAP の増減と *in vivo* における DAP の分解。

Amount of Dys/DAP <i>in vivo</i> and Susceptibility to Calpain 2 <i>in vitro</i>					
Model	TO-2	QMI	Ep	Human DCM	<i>In vivo</i> proteolysis by calpain 2
Etiology	hereditary	acquired		ni	
Progression	chronic	acute	chronic		
Dystrophin	↓	↓	↓	↓	+
Dysoplin	α -SG	↓	↓	↓	++
	β -SG	↓	→	→	+/-
	γ -SG	↓	→	→	+/-
	δ -SG	null	→	→	-
[Ca ²⁺]	↑↑	↑	↑↑	↑↑	
Entry	++	+	++	nd	

(ni, not identified)

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 Kawada T.	Gene-based therapy of advanced heart failure secondary to the disruption of dystrophin-related proteom.	Dhalla NS, Hryshiko L, Kardami E, Singal PK.	<i>Signal transduction and cardiac hypertrophy.</i>	Kluwer Acad Publ.	Boston	2003	449-459
Mizukami H, Okada T, Ogasawara Y, et al.	Separate control of Rep and Cap expression using mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production.	John M. Walker	<i>Mol. Biotechnol.</i>	Humana Press	Totowa	2004	7-14
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
Kawada T, Nakazawa M, Nakauchi S, et al.	Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA.</i>	99	901-906	2002
Tsuji T, Suzuki J-I, Shimamoto R, et al.	Vector analysis of the wall shear rate at the human aortoiliac bifurcation using cine MR velocity mapping.	<i>Am. J. Roentgenol.</i>	178	995-999	2002
Toyo-oka T, Kawada T, Nakazawa M, et al.	Gene therapy prevents disruption of dystrophin-related proteins in a model of hereditary dilated cardiomyopathies in hamster. A review.	<i>Heart, Lung & Circ.</i>	11	174-181	2002
Terasawa K, Nakajima T, Iida H, et al.	Nonselective cation currents regulate membrane potential of rabbit coronary arterial cell: modulation by lysophosphatidylcholine.	<i>Circulation</i>	106	3111-3119	2002
Hakamada-Taguchi R, Uehara Y, Haebara T, et al.	The relationship between changes in normal-range systolic blood pressure and cognitive function in middle-aged healthy women.	<i>Hypertens Res.</i>	25	565-569	2002