

200900836A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

HB-EGFにかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成と
その治療薬開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北風政史

(国立循環器病センター)

平成17(2005)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 1
北風 政史

II. 分担研究報告

- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 6
友池 仁暢

- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 8
宮武 邦夫

- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 10
駒村 和雄

- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 12
村松 正明

- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 14
高島 成二

- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 16
目加田 英輔

- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 18
東山 繁樹

- HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成とその治療薬開発に関する研究 … 20
小粥 章子

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 22

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear Export of PLZF.	24
J Cell Biol. 2003 Nov 10;163(3):489-502.	
The stress- and inflammatory cytokine-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is mediated by p38 MAPK, distinct from the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and lysophosphatidic acid-induced signaling cascades.	38
J Biol Chem. 2003 May 9;278(19):17255-62.	
Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. ..	46
J Cell Biol. 2003 Nov 10;163(3):469-75.	
Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice.	53
Nat Genet. 2004 Feb;36(2):123-30.	
Roles of charged amino acid residues in the cytoplasmic domain of proHB-EGF.	61
Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jul 23;320(2):376-82.	
Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis.	68
Circulation. 2004 Aug 10;110(6):705-12.	
HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis.	76
Cancer Res. 2004 Aug 1;64(15):5283-90.	
Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands.	84
J Cell Biol. 2004 Mar 1;164(5):769-79.	
Suppression of the biological activities of the epidermal growth factor (EGF)-like domain by the heparin-binding domain of heparin-binding EGF-like Growth Factor.	95
J Biol Chem. 2004 Nov 5;279(45):47335-43.	

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
総括研究報告書

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成と
その治療薬開発に関する研究

主任研究者 北風 政史 国立循環器病センター 部長

研究要旨

科学研究費補助金事業 3 年目の本年度は、増殖因子 HB-EGF の心筋における役割を生化学的にさらに検討するとともに、HB-EGF の心筋保護因子としての作用に注目し in vivo を含めた心筋障害モデルにてその作用を検討、さらに臨床例における HB-EGF の動態解析をおこなった。またヒト拡張型心筋症と極めて類似した HB-EGF 遺伝子改変マウスの表現型を統一させ、心不全治療薬としてのスクリーニングを開始した。

分担研究者

友池仁暢

国立循環器病センター
院長

宮武邦夫

国立循環器病センター
副院長

駒村和雄

国立循環器病センター研究所
室長

村松正明

東京医科歯科大学
教授

高島成二

大阪大学健康体育部
助手

目加田英輔

大阪大学微生物研究所
教授

東山 繁樹

愛媛大学医学部
教授

小粥 章子

国立循環器病センター研究所
室員

A. 研究目的

最終年度は、HB-EGF の心筋保護作用を明確にし、心不全治療薬としての可能性を検討すること。ヒト HB-EGF 高感度 ELISA を確立すること。HB-EGF 遺伝子を改変して作成したマウス拡張型心筋症モデルを確立し、心不全治療薬のスクリーニングを開始することを目的とした。

B. 研究方法

1、HB-EGF の心筋細胞保護作用の検討

カテコラミンやアンジオテンシン II などの生理活性物質により HB-EGF が細胞膜から遊離されることは心筋肥大に重要な役割をすること、およびその遊離を抑制した HB-EGF 遺伝子改変マウスの心臓において心筋細胞代謝不全が生じたことは、HB-EGF が心筋代謝に非常に重要な役割を担うことを示唆する。そこでラット培養心筋細胞および各種の HB-EGF 遺伝子改変マウスを使用して、HB-EGF の心筋細胞保護作用を検討した。ラット培養心筋細胞をドキシソルビシンおよび過酸化水素処理した際に、HB-EGF による心筋細胞保護作用を検討した。さらに HB-EGF 遺伝子過剰発現マウスおよび HB-EGF 遺伝子欠

損マウスにおいて腹腔内に投与したアドリアマイシンに対する心毒性の差を検討した。

2、ヒト HB-EGF 高感度 ELISA の作成

12 例のヒト心不全患者の gene CHIP による解析により、我々は HB-EGF が心不全で発現上昇することを明らかにした。HB-EGF の心保護機能とあわせてヒト心不全患者での血中濃度の測定は、心不全の重症度判定、予後予測に役立つと考えられた。そのためヒト HB-EGF 用の高感度 ELISA 作成を行った。HB-EGF は異なる種の間での保存がよくこれまで高感度 ELISA に使用可能な抗体が作成されていなかった。我々は HB-EGF 遺伝子欠損マウスを昆虫ウイルス由来の高純度ヒト HB-EGF で免疫することにより特異性およびアフィニティの強い monoclonal 抗体を 12 種作成することに成功した。これらを組み合わせることによりサンドイッチ ELISA の作成を行った。

3、心不全治療薬スクリーニング用心不全モデルマウスの作成。

現在我々が継代している HB-EGF 遺伝子改変拡張型心筋症モデルマウスは遺伝的背景を C57BL/6 他 5 系統に均一化したものを実験に使用している。これらのマウスは進行性の心不全をきたし約 20 週で死亡する。継代を重ねると生存曲線は均一になりつつあるが系統によるばらつきはおおきく、均一な表現型を得られる系統の選別を行った。また、このマウスを使用して心不全死をエンドポイントとした薬剤及び遺伝子導入、細胞移植などの心不全治療のスクリーニングをおこなった。現在、最も安定した予後をきたすマウスにおいて 120 日生存率は 50% であり、 β 遮断剤を生後 6 週から投与することにより予後の変化を検討した。

(倫理面への配慮)

心不全自然発症マウスを使用した実験は、マウスに対して新たな重大な苦痛を強いるものではないが、使用する薬剤によっては、投与によりマウスに不利益な状況となる可能性は否定できない。薬剤の投与そのものにより、マウスに身体

的異常が見られたときにはすぐに中止し、復元可能な障害の場合はたとえば運動制限の場合は単匹飼育や食餌の改善によりその苦痛の軽減を図る。もし復元不可能な重大な障害が生じ、その苦痛を和らげる手段がない場合は速やかに安楽死させることを考慮する。新たな治療薬の開発はその使用に常に危険を伴うがこの増殖因子治療法はこれまでの研究によりその有効性がかなりの確率で予想され、とくにこの心不全発症マウスでは有効性が期待される。またこういった生理活性物質による治療法はヒトでもインシュリンや成長因子などですでに開始されておりこの増殖因子も心不全治療薬として応用される可能性が高いとおもわれる。心不全発症マウスは遺伝的に不幸な転機をたどるマウスであるがこのマウスの積極的延命法のスクリーニングはあらたな心不全治療薬のすばやい検索に大変有用で臨床的意義がある。詳細な観察と対処をおこないこのマウスの更なる延命手段の検索をすすめる予定である。また本マウス以外に現在のところ新たな心不全治療薬の良否をより迅速にまた的確に判断する方法は存在しない。動物実験は各施設の実験ガイドラインにしたがって計画書を作成、承認を得て施行している。

C. 研究結果

1、HB-EGF の心筋細胞保護作用の検討

ラット心筋細胞では過酸化水素、ドキシソルピシンによる心筋障害を HB-EGF は抑制した。また HB-EGF 強制発現マウス、野生型マウス、HB-EGF 遺伝子欠損マウスにおいてドキシソルピシン腹腔内投与による心筋障害を作成すると、野生型に比し、HB-EGF 強制発現マウスでは軽度の、HB-EGF 欠損マウスではより重度の心筋障害をきたした。このことより HB-EGF は心筋細胞障害時に心筋保護的に働くことが示された。さらにこの保護メカニズムを検討するために、心筋細胞に UV, DNA 障害薬剤によりアポトーシスを生じさせ、HB-EGF の心筋保護作用を検討した。HB-EGF はこれらの障害時の p53 の蛋白量を有意に抑制した。これらの事実は非分裂細胞である心筋細胞においてもセルサイクルにか

かわるこれらの因子がアポトーシスにいたるシグナル経路を担っており、HB-EGF などの増殖因子はこのシグナルを調整していることが示された。今後はより普遍的な心筋障害モデルを使用して、*in vivo* での p53 を含めたシグナリング分子をモニターしながら、HB-EGF の心筋細胞保護作用のメカニズムを解明する予定である。

本研究により、心筋細胞におけるHB-EGFの心筋保護作用がより明確になったと思われる。HB-EGFのシグナル関連の阻害が心筋代謝の重大な障害につながるという事実は、我々の動物モデル、さらには臨床におけるEGF受容体阻害剤の作用から見て明らかであったが、HB-EGFそのものが心筋保護作用を持つかは不明であった。今後はHB-EGFの直接投与により、心筋障害が治療可能か、実際の心不全症例ではどの程度HB-EGFが病態に関与しているかを検討する予定である。

2、ヒトHB-EGF高感度ELISAの作成

HB-EGF 遺伝子欠損マウスを使用して Baculo virus にて作成、精製した大量の HB-EGF を抗原としてモノクローナル抗体を作成したところ約 12 種の良質のクローンが採取できた。これらの抗体価を測定した後、IgG 精製・ビオチン化後にエピトープとの競合 ELISA で抗体を選別。さらに sandwich-ELISA に最適な組み合わせの選択をおこない標本の標示値の検討をおこなった。作成された現在の ELISA はヒト血清中の 10pg/ml の HB-EGF を測定可能となった。現在ポリクローナル抗体の組み合わせでさらに高感度の ELISA スクリーニングを行う予定である。本 EILSA を利用してヒト血清中での HB-EGF を測定し、疾患との関連を検討していく予定である。また数種の中和活性を持った抗体も得られており、*vivo* への投与も検討中である。

3、心不全治療薬スクリーニング用心不全モデルマウスの作成。

マウスを心不全自然発症マウスとして薬剤や他の治療法のスクリーニングに利用するため遺伝的背景の均一化を行った。それぞれのマウス

を C57BL6J,129 の各系統に 10 代以上純化させた。実際 100 個サテライトマーカーを使用したタイピングによりほぼ 100% のマーカーが BL6 となっていることを確かめられた。しかし、生命予後に関しては BL6 は 129 に比べて早期に死亡するものの、予後のばらつきが大きく正確な予後判定に関しては適切でないと判断された。一方 129 は 50% 生存率がほぼ 120 日と安定していることが確かめられ、心不全治療薬のアッセイ系としてはより理想的と考えられた。

そこで現在低用量の β 遮断剤 (carvedilol) を 5mg/Kg を生後 6 週より経口投与し、非投与群と比較した。120 日経過現在で β 遮断剤投与下で有意な生命予後の改善が見られており、心不全治療薬のアッセイ系として、ヒト心不全症例を擬似できると判断している。今後他の薬剤のスクリーニングにも使用する予定である。

D. 考察

本年度の研究により、心筋細胞におけるHB-EGFの心筋保護作用がより明確になったと思われる。HB-EGFのシグナル関連の阻害が心筋代謝の重大な障害につながるという事実は、我々の動物モデル、さらには臨床におけるEGF受容体阻害剤の作用から見て明らかであったが、HB-EGFそのものが心筋保護作用を持つかは不明であった。今後はHB-EGFの直接投与により、心筋障害が治療可能か、実際の心不全症例ではどの程度HB-EGFが病態に関与しているかを検討する予定である。

E. 結論

EGFファミリーのリガンドの一つであるHB-EGFがほかの増殖因子にはない特異的生理作用を心筋細胞に対して及ぼすことが明らかになった。HB-EGFは今後新しいタイプの心不全治療薬となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Liao, Y., Asakura, M., Takashima, S., Kato, H., Asano, Y., Shintani, Y., Minamino, T., Tomoike, H., Hori, M. & Kitakaze, M. Amlodipine ameliorates myocardial hypertrophy by inhibiting EGFR phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 1083-7 (2005).
2. Sanada, S., Asanuma, H., Tsukamoto, O., Minamino, T., Node, K., Takashima, S., Fukushima, T., Ogai, A., Shinozaki, Y., Fujita, M., Hirata, A., Okuda, H., Shimokawa, H., Tomoike, H., Hori, M. & Kitakaze, M. Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C. *Circulation* 110, 51-7 (2004).
3. Sanada, S., Asanuma, H., Minamino, T., Node, K., Takashima, S., Okuda, H., Shinozaki, Y., Ogai, A., Fujita, M., Hirata, A., Kim, J., Asano, Y., Mori, H., Tomoike, H., Kitamura, S., Hori, M. & Kitakaze, M. Optimal windows of statin use for immediate infarct limitation: 5'-nucleotidase as another downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circulation* 110, 2143-9 (2004).
4. Okada, K., Minamino, T., Tsukamoto, Y., Liao, Y., Tsukamoto, O., Takashima, S., Hirata, A., Fujita, M., Nagamachi, Y., Nakatani, T., Yutani, C., Ozawa, K., Ogawa, S., Tomoike, H., Hori, M. & Kitakaze, M. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 110, 705-12 (2004).
5. Liao, Y., Asakura, M., Takashima, S., Ogai, A., Asano, Y., Shintani, Y., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Kim, J., Kitamura, S., Tomoike, H., Hori, M. & Kitakaze, M. Celiprolol, a vasodilatory beta-blocker, inhibits pressure overload-induced cardiac hypertrophy and prevents the transition to heart failure via

nitric oxide-dependent mechanisms in mice. *Circulation* 110, 692-9 (2004).

6. Fujita, M., Minamino, T., Sanada, S., Asanuma, H., Hirata, A., Ogita, H., Okada, K., Tsukamoto, O., Takashima, S., Tomoike, H., Node, K., Hori, M. & Kitakaze, M. Selective blockade of serotonin 5-HT_{2A} receptor increases coronary blood flow via augmented cardiac nitric oxide release through 5-HT_{1B} receptor in hypoperfused canine hearts. *J Mol Cell Cardiol* 37, 1219-23 (2004).
7. Asanuma, H., Minamino, T., Sanada, S., Takashima, S., Ogita, H., Ogai, A., Asakura, M., Liao, Y., Asano, Y., Shintani, Y., Kim, J., Shinozaki, Y., Mori, H., Node, K., Kitamura, S., Tomoike, H., Hori, M. & Kitakaze, M. Beta-adrenoceptor blocker carvedilol provides cardioprotection via an adenosine-dependent mechanism in ischemic canine hearts. *Circulation* 109, 2773-9 (2004).
8. Asano, Y., Takashima, S., Asakura, M., Shintani, Y., Liao, Y., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Kim, J., Ogai, A., Fukushima, T., Oikawa, Y., Okazaki, Y., Kaneda, Y., Sato, M., Miyazaki, J., Kitamura, S., Tomoike, H., Kitakaze, M. & Hori, M. Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. *Nat Genet* 36, 123-30 (2004).

2. 学会発表

1. 第 68 回日本循環器学会総会・学術集会
(平成 16 年 3 月 27-29 日、東京)
シンポジウム5「Genome Informatics of Cardiovascular System」
" Systematic Linkage between the Genomic and Clinical Database of Cardiovascular Disease to Find New Pathophysiology or Effective Treatment "
2. 第 68 回日本循環器学会総会・学術集会
(平成 16 年 3 月 27-29 日、東京)

ランチョンセミナー「心血管疾患の新しい治療法開発への挑戦—BNPなどの心機能指標の応用」
「心血管疾患の新しい治療法開発への挑戦—BNPなどの心機能指標の応用」

ランチョンセミナー「網羅的・包括的手法による慢性心不全治療法開発の戦略—ゲノム医学とインフォメーションサイエンスをいかに生かすか—」

3. 第47回日本糖尿病学会年次学術集会
(平成16年5月13-15日、東京)
ランチョンセミナー「IGTの病態を考える」
「糖尿病は心血管疾患である—IGTに対する介入の意義」
4. 第13回心血管インターベンション学会
(平成16年7月1-4日、名古屋)
ランチョンセミナー「心筋虚血・再灌流障害の分子メカニズム—臨床への展開」
5. 第52回日本心臓病学会(平成16年9月12-14日、京都)
ランチョンセミナー
「血管拡張性β遮断薬と心血管保護」
6. 第52回日本心臓病学会
(平成16年9月12-14日、京都)
ランチョンセミナー「循環器専門医が知っておきたいH2受容体拮抗薬の役割—専門家の意見を聞いてみよう」
「ゲノム・インフォメーションサイエンスを用いた新しい心不全治療法の解析—H2受容体拮抗薬と心血管保護—」
7. 第15回日本老年医学会近畿地方会
(平成16年11月6日、守口)
ランチョンセミナー「高齢者における急性・慢性心不全の病態とその治療」
8. 第85回日本循環器学会 中国・四国合同地方会
(平成16年11月26-27日、広島)
ランチョンセミナー
「慢性心不全治療の現状と新展開」
9. 第98回日本循環器学会 近畿地方会
(平成16年12月11日、京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む。)

1. 特許取得
現在のところなし
2. 実用新案登録
現在のところなし
3. その他
特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成と
その治療薬開発に関する研究

分担研究者 友池 仁暢 国立循環器病センター 院長

研究要旨

主任研究者らの研究により、HB-EGF や EGF 受容体遺伝子改変マウスがヒト拡張型心筋症に類似の表現型を示したこと及び、EGF 受容体の抗体が実際にヒトにおいて心筋障害をきたすことが明らかとなりつつある。そこで、HB-EGF およびそのプロセッシングに関する遺伝子群、あるいは HB-EGF の受容体およびそのシグナル伝達因子の異常がヒトにおいて同様の病態を引き起こすことが示唆された。われわれは心不全患者における心不全関連遺伝子の多型解析を進めており、この延長上で HB-EGF に関係するとおもわれる心不全関連遺伝子多型について検討をおこなった。本年度は昨年度に続いて EGF 受容体関連の遺伝子、HER1,2,4 の多型解析及び変異解析をおこなった。

A. 研究目的

心不全の病態背景にある遺伝子の同定が本研究の目的である。本研究では特に HB-EGF とその関連遺伝子に注目し心不全患者での遺伝子多型について検討する。

B. 研究方法

拡張型心筋症を発症した患者より血液を採取し、ゲノム DNA を採取する。心不全に関連するとおもわれる遺伝子群について、データベース上に存在する一塩基多型について、拡張型心筋症患者群と正常群においてその頻度を比較し、疾患との関連性を検討する。

(倫理面への配慮)

厚生労働省の指針に基づいて、十分な注意を払い本研究を行う。特に得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策をおこなう。また、遺伝子発現レベルを検討する研究であることから、患者に対しての十分なインフォームドコンセントを得る。

C. 研究結果

家族性の拡張型心筋症発症者 25 例、及び自然発症心不全症例 96 例を中心に HB-EGF 及び

ADAM12 の全エクソンにわたる遺伝子異常の検索を行った。HB-EGF はエクソンが6つと少数であったため、全エクソンを配列決定した。しかし SNP はみつかったものの心筋症の原因となる可能性のある変異は同定できなかった。ADAM12 に関してはエクソンが20以上存在するため WAVE 法による解析をおこなった。この方法は増幅した特定の遺伝子領域を熱変性し再構築する際の温度差を利用して変異あるいは SNP を同定する方法である。この方法により、ADAM12 の全エクソンの解析が現在までに終了できた。結果家族性発症の2家系の発症者にアミノ酸変異を伴う SNP のデータベースには記載のない変異がみつきり現在この家系及び健常人にてさらに同部位の検索を行なっている。興味深いことにこの変異を持つ ADAM12 は細胞内での局在が本来の ADAM12 と異なっており、機能性の変異であることが *in vitro* の実験で確かめられた。今後、ADMA12 の機能と心不全の関係を検討する予定である。さらに HER1,2,4 に関しては WAVE による解析をおこなったが心不全と連鎖する SNP 等は検出できなかった。

D. 考察

拡張型心筋症の原因遺伝子として現在までに報告されているのは、興奮収縮連関に関わる構造蛋

白のみであった。HB-EGF 及びその関連シグナル因子が拡張型心筋症の原因と同定されれば、新たな疾患メカニズムを提起するのみでなく、そのシグナルを補充することにより全く新しい治療法の確立につながると期待される

E. 結論

ヒト拡張型心筋症と HB-EGF との関連性を検討するため、インフォームドコンセントを得た患者より血液を採取した上でその遺伝子多型解析をおこなった。その結果家族性拡張型心筋症の 1 家系において、ADAM12 の変異が同定された。

F.健康危険情報

現在まで有害の事象の発生なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Itoda, M., Saito, Y., Maekawa, K., Hichiya, H., Komamura, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Tomoike, H., Ueno, K., Ozawa, S. & Sawada, J. Seven novel single nucleotide polymorphisms in the human SLC22A1 gene encoding organic cation transporter 1 (OCT1). *Drug Metab Pharmacokinet* 19, 308-12 (2004).
2. Komamura, K., Iwai, N., Kokame, K., Yasumura, Y., Kim, J., Yamagishi, M., Morisaki, T., Kimura, A., Tomoike, H., Kitakaze, M. & Miyatake, K. The role of a common TNNT2 polymorphism in cardiac hypertrophy. *J Hum Genet* 49, 129-33 (2004).
3. Liao, Y., Asakura, M., Takashima, S., Kato, H., Asano, Y., Shintani, Y., Minamino, T., Tomoike, H., Hori, M. & Kitakaze, M. Amlodipine ameliorates myocardial hypertrophy by inhibiting EGFR phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 1083-7 (2005).
4. Soyama, A., Kubo, T., Miyajima, A., Saito, Y., Shiseki, K., Komamura, K., Ueno, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Tomoike, H., Ozawa, S. & Sawada, J. Novel nonsynonymous single

nucleotide polymorphisms in the CYP2D6 gene. *Drug Metab Pharmacokinet* 19, 313-9 (2004).

2. 学会発表

現在のところなし

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

現在のところなし

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成と
その治療薬開発に関する研究

分担研究者 宮武 邦夫 国立循環器病センター 副院長

研究要旨

HB-EGF 遺伝子改変マウスがヒト拡張型心筋症に類似の表現型を示したことにより、HB-EGF およびそのプロセッシングに関する遺伝子群、あるいは HB-EGF の受容体およびそのシグナル伝達因子の異常がヒトにおいて同様の病態を引き起こすことが示唆された。われわれは心不全患者における心不全関連遺伝子の多型解析を進めており、この延長上でHB-EGFに関係するとおもわれる心不全関連遺伝子多型について検討をおこなった。

A. 研究目的

心不全の病態背景にある遺伝子の同定が本研究の目的である。本研究では特に HB-EGF とその関連遺伝子に注目し心不全患者での遺伝子多型について検討する。

B. 研究方法

拡張型心筋症を発症した患者より血液を採取し、ゲノム DNA を採取する。心不全に関連するとおもわれる遺伝子群について、データベース上に存在する一塩基多型について、拡張型心筋症患者群と正常群においてその頻度を比較し、疾患との関連性を検討する。

(倫理面への配慮)

厚生労働省の指針に基づいて、十分な注意を払い本研究を行う。特に得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策をおこなう。また、遺伝子発現レベルを検討する研究であることから、患者に対しての十分なインフォームドコンセントを得る。

C. 研究結果

ヒト遺伝子多型解析に関しては倫理委員会の申請がほぼ完了したことから、インフォームドコンセントの取得のもと、血液サンプルの収集を開始している。

D. 考察

現在、遺伝子多型解析を目的に、拡張型心筋症患者を中心にインフォームドコンセントを得るため倫理委員会の申請を行い、承認を得た。現在、実際に拡張型心筋症の患者から、十分な研究の説明を行った上で、研究の趣旨に同意の得られた症例においてのみ、同意書取得の上、遺伝子解析目的にて血液の採取を行っている。すでに、96例の症例において、遺伝子解析の血液を採取している。今後、HB-EGF に関連する遺伝子を中心に遺伝子多型解析を施行していく予定である。

E. 結論

ヒト拡張型心筋症と HB-EGF との関連性を検討するため、インフォームドコンセントを得た患者より血液を採取した。今後疾患との関連性を検討する。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象の発生なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Komamura, K., Iwai, N., Kokame, K., Yasumura, Y., Kim, J., Yamagishi, M., Morisaki, T., Kimura, A., Tomoike, H., Kitakaze, M. & Miyatake, K. The role of a common TNNT2 polymorphism

in cardiac hypertrophy. *J Hum Genet* 49, 129-33 (2004).

2. Nagaya, N., Moriya, J., Yasumura, Y., Uematsu, M., Ono, F., Shimizu, W., Ueno, K., Kitakaze, M., Miyatake, K. & Kangawa, K. Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation* 110, 3674-9 (2004).

2. 学会発表

現在のところなし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

現在のところなし

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成と
その治療薬開発に関する研究

分担研究者 駒村 和雄 国立循環器病センター 室長

研究要旨

主任研究者らの研究により、HB-EGF や EGF 受容体遺伝子改変マウスがヒト拡張型心筋症に類似の表現型を示したこと及び、EGF 受容体の抗体が実際にヒトにおいて心筋障害をきたすことが明らかとなりつつある。そこで、HB-EGF およびそのプロセッシングに関する遺伝子群、あるいは HB-EGF の受容体およびそのシグナル伝達因子の異常がヒトにおいて同様の病態を引き起こすことが示唆された。われわれは心不全患者における心不全関連遺伝子の多型解析を進めており、この延長上で HB-EGF に関係するとおもわれる心不全関連遺伝子多型について検討をおこなった。本年度は昨年度に続いて EGF 受容体関連の遺伝子、HER1,2,4 の多型解析及び変異解析をおこなった。

A. 研究目的

心不全の病態背景にある遺伝子の同定が本研究の目的である。本研究では特に HB-EGF とその関連遺伝子に注目し心不全患者での遺伝子多型について検討する。

B. 研究方法

拡張型心筋症を発症した患者より血液を採取し、ゲノム DNA を採取する。心不全に関連するとおもわれる遺伝子群について、データベース上に存在する一塩基多型について、拡張型心筋症患者群と正常群においてその頻度を比較し、疾患との関連性を検討する。

(倫理面への配慮)

厚生労働省の指針に基づいて、十分な注意を払い本研究を行う。特に得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策をおこなう。また、遺伝子発現レベルを検討する研究であることから、患者に対しての十分なインフォームドコンセントを得る。

C. 研究結果

家族性の拡張型心筋症発症者 25 例、及び自然発症心不全症例 96 例を中心に HB-EGF 及び

ADAM12 の全エクソンにわたる遺伝子異常の検索を行った。HB-EGF はエクソンが6つと少数であったため、全エクソンを配列決定した。しかし SNP はみつかったものの心筋症の原因となる可能性のある変異は同定できなかった。ADAM12 に関してはエクソンが20以上存在するため WAVE 法による解析をおこなった。この方法は増幅した特定の遺伝子領域を熱変性し再構築する際の温度差を利用して変異あるいは SNP を同定する方法である。この方法により、ADAM12 の全エクソンの解析が現在までに終了できた。結果家族性発症の2家系の発症者にアミノ酸変異を伴う SNP のデータベースには記載のない変異がみつき現在この家系及び健康人にてさらに同部位の検索を行なっている。興味深いことにこの変異を持つ ADAM12 は細胞内での局在が本来の ADAM12 と異なっており、機能性の変異であることが *in vitro* の実験で確かめられた。今後、ADMA12 の機能と心不全の関係を検討する予定である。さらに HER1,2,4 に関しては WAVE による解析をおこなったが心不全と連鎖する SNP 等は検出できなかった。

D. 考察

拡張型心筋症の原因遺伝子として現在までに報告されているのは、興奮収縮連関に関わる構造蛋

白のみであった。HB-EGF 及びその関連シグナル因子が拡張型心筋症の原因と同定されれば、新たな疾患メカニズムを提起するのみでなく、そのシグナルを補充することにより全く新しい治療法の確立につながるかと期待される

E. 結論

ヒト拡張型心筋症と HB-EGF との関連性を検討するため、インフォームドコンセントを得た患者より血液を採取した上でその遺伝子多型解析をおこなった。その結果家族性拡張型心筋症の 1 家系において、ADAM12 の変異が同定された。

F.健康危険情報

現在まで有害の事象の発生なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Fukushima-Uesaka, H., Saito, Y., Watanabe, H., Shiseki, K., Saeki, M., Nakamura, T., Kurose, K., Sai, K., Komamura, K., Ueno, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Hanai, S., Nakajima, T., Matsumoto, K., Saito, H., Goto, Y., Kimura, H., Katoh, M., Sugai, K., Minami, N., Shirao, K., Tamura, T., Yamamoto, N., Minami, H., Ohtsu, A., Yoshida, T., Saijo, N., Kitamura, Y., Kamatani, N., Ozawa, S. & Sawada, J. Haplotypes of CYP3A4 and their close linkage with CYP3A5 haplotypes in a Japanese population. *Hum Mutat* 23, 100 (2004).
2. Komamura, K., Iwai, N., Kokame, K., Yasumura, Y., Kim, J., Yamagishi, M., Morisaki, T., Kimura, A., Tomoike, H., Kitakaze, M. & Miyatake, K. The role of a common TNNT2 polymorphism in cardiac hypertrophy. *J Hum Genet* 49, 129-33 (2004).
3. Komamura, K., Tatsumi, R., Miyazaki, J., Matsumoto, K., Yamato, E., Nakamura, T., Shimizu, Y., Nakatani, T., Kitamura, S., Tomoike, H., Kitakaze, M., Kangawa, K. &

Miyatake, K. Treatment of dilated cardiomyopathy with electroporation of hepatocyte growth factor gene into skeletal muscle. *Hypertension* 44, 365-71 (2004).

2. 学会発表

現在のところなし

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

現在のところなし

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成と
その治療薬開発に関する研究

分担研究者 村松 正明 東京医科歯科大学 教授

研究要旨

主任研究者らの研究により、HB-EGF や EGF 受容体遺伝子改変マウスがヒト拡張型心筋症に類似の表現型を示したこと及び、EGF 受容体の抗体が実際にヒトにおいて心筋障害をきたすことが明らかとなりつつある。そこで、HB-EGF およびそのプロセッシングに関する遺伝子群、あるいは HB-EGF の受容体およびそのシグナル伝達因子の異常がヒトにおいて同様の病態を引き起こすことが示唆された。われわれは心不全患者における心不全関連遺伝子の多型解析を進めており、この延長上で HB-EGF に関係するとおもわれる心不全関連遺伝子多型について検討をおこなった。本年度は昨年度に続いて EGF 受容体関連の遺伝子、HER1,2,4 の多型解析及び変異解析をおこなった。

A. 研究目的

心不全の病態背景にある遺伝子の同定が本研究の目的である。本研究では特に HB-EGF とその関連遺伝子に注目し心不全患者での遺伝子多型について検討する。

B. 研究方法

拡張型心筋症を発症した患者より血液を採取し、ゲノム DNA を採取する。心不全に関連するとおもわれる遺伝子群について、データベース上に存在する一塩基多型について、拡張型心筋症患者群と正常群においてその頻度を比較し、疾患との関連性を検討する。

(倫理面への配慮)

厚生労働省の指針に基づいて、十分な注意を払い本研究を行う。特に得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策をおこなう。また、遺伝子発現レベルを検討する研究であることから、患者に対しての十分なインフォームドコンセントを得る。

C. 研究結果

家族性の拡張型心筋症発症者 25 例、及び自然発症心不全症例 96 例を中心に HB-EGF 及び

ADAM12 の全エクソンにわたる遺伝子異常の検索を行った。HB-EGF はエクソンが6つと少数であったため、全エクソンを配列決定した。しかし SNP はみつかったものの心筋症の原因となる可能性のある変異は同定できなかった。ADAM12 に関してはエクソンが20以上存在するため WAVE 法による解析をおこなった。この方法は増幅した特定の遺伝子領域を熱変性し再構築する際の温度差を利用して変異あるいは SNP を同定する方法である。この方法により、ADAM12 の全エクソンの解析が現在までに終了できた。結果家族性発症の2家系の発症者にアミノ酸変異を伴う SNP のデータベースには記載のない変異がみつきり現在この家系及び健康人にてさらに同部位の検索を行なっている。興味深いことにこの変異を持つ ADAM12 は細胞内での局在が本来の ADAM12 と異なっており、機能性の変異であることが *in vitro* の実験で確かめられた。今後、ADMA12 の機能と心不全の関係を検討する予定である。さらに HER1,2,4 に関しては WAVE による解析をおこなったが心不全と連鎖する SNP 等は検出できなかった。

D. 考察

拡張型心筋症の原因遺伝子として現在までに報告されているのは、興奮収縮連関に関わる構造蛋白のみであった。HB-EGF 及びその関連シグナル

因子が拡張型心筋症の原因と同定されれば、新たな疾患メカニズムを提起するのみでなく、そのシグナルを補充することにより全く新しい治療法の確立につながると期待される

E. 結論

ヒト拡張型心筋症と HB-EGF との関連性を検討するため、インフォームドコンセントを得た患者より血液を採取した上でその遺伝子多型解析をおこなった。その結果家族性拡張型心筋症の 1 家系において、ADAM12 の変異が同定された。

F.健康危険情報

現在まで有害の事象の発生なし

G.研究発表

1. 論文発表

現在のところなし

2. 学会発表

現在のところなし

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

現在のところなし

2. 実用新案登録

現在のところなし

3. その他

特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成と
その治療薬開発に関する研究

分担研究者 高島 成二 大阪大学 健康体育部 助手

研究要旨

生後まもなく分裂を停止する心筋細胞はその機能維持に分裂細胞とは異なる分子機構を必要とすることが予想される。HB-EGF は EGF ファミリーに属する増殖因子であるが心臓においては特異的に重要な機能維持に働くことが主任研究者らの報告により明らかになった。また心不全患者では特異的に HB-EGF の発現誘導がかかることがヒト心筋を使用した gene CHIP 解析により明らかとなった。心臓における各遺伝子の発現制御は転写因子制御だけではなく、ヘテロクロマチン構造の変化に伴うエピジェネティックな遺伝子制御が関与することを最近我々は明らかにした。そこで HB-EGF をはじめとする心筋細胞における発現誘導に、これらのヘテロクロマチン構造変化がいかに関与するかを検討した。

A. 研究目的

心不全患者にて HB-EGF が発現上昇することが知られている。HB-EGF の発現制御のメカニズムを解析した。

B. 研究方法

大動脈縮窄心不全モデルマウスの心筋において、HB-EGF 遺伝子上流の DNA メチル化状態およびヒストンの修飾の状態をクロマチン免疫沈降法により検討する。

(倫理面への配慮)

動物実験のプロトコール等は施設のガイドラインにのっとり適切に行う。マウスに苦痛を与える研究については必要最低限の範囲で行い、飼育環境等に十分配慮する。

C. 研究結果

マウス心不全モデルにおいては心筋における HB-EGF の発現が約 3 倍に上昇した。他の EGF ファミリーリガンドではニューレギュリンに軽度上昇が見られたものの、他のリガンドについてはほとんど発現上昇や見られず、不全心における HB-EGF の特異的発現上昇が証明された。マウス心不全における HB-EGF 遺伝子上流の DNA メチル化情報は、

コントロールのマウスと殆ど変化は見られなかった。一方転写活性を表す、ヒストンテイルの修飾には心不全とコントロール間で変化が見られた。特にヒストン K9 のメチル化情報には心不全モデルマウスで各個体間で均一な修飾変化が観察され、HB-EGF 遺伝子発現制御との関連が示唆された。

D. 考察

心臓における遺伝子発現制御は急激な変化を伴うもの以外に、ミオシンサブタイプ、ANP、BNP など長期にわたり発現誘導あるいは発現変化をきたすものが含まれる。これらの遺伝子発現制御には恒常的な転写因子活性化よりヒストンテイルの修飾など長期間維持される発現制御の関与が強く示唆される。今回の HB-EGF 遺伝子上流修飾はそういった発現制御がかなりの分子の上流で生じている可能性示唆し、興味深い。今後同様の検討がすすめば心不全の病態との関係、治療への応用も期待される。

E. 結論

心筋における HB-EGF の遺伝子発現制御にヘテロクロマチン構造変化を伴う epigenetic な遺伝子発現制御が関与することが示唆された。

F.健康危険情報

現在まで有害の事象の発生なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Liao, Y., Asakura, M., Takashima, S., Kato, H., Asano, Y., Shintani, Y., Minamino, T., Tomoike, H., Hori, M. & Kitakaze, M. Amlodipine ameliorates myocardial hypertrophy by inhibiting EGFR phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 1083-7 (2005).
2. Asano, Y., Takashima, S., Asakura, M., Shintani, Y., Liao, Y., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Kim, J., Ogai, A., Fukushima, T., Oikawa, Y., Okazaki, Y., Kaneda, Y., Sato, M., Miyazaki, J., Kitamura, S., Tomoike, H., Kitakaze, M. & Hori, M. Lmr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. *Nat Genet* 36, 123-30 (2004).
3. Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., Endoh, M., Kaneda, Y., Takagi, S., Itami, S., Takeda, N., Yamada, G. & Mekada, E. Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J Cell Biol* 163, 469-75 (2003).
4. Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., Nanba, D., Higashiyama, S., Hori, M., Klagsbrun, M. & Mekada, E. Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3221-6 (2003).

2. 学会発表

Epigenetic gene regulation and cardiomyopathy
AHA/JCS ジョイントシンポジウム "Recent Advances in Genomics and Treatment of Cardiovascular Diseases"

第 69 回日本循環器学会総会 2005/3/19 東京

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

現在のところなし

2. 実用新案登録

発明の名称:ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子遺伝子機能改変動物、スクリーニング方法、胚性幹細胞、ならびに心不全予防及び/または治療薬。国際出願番号:特願 2002-141791
国際出願日:2003年5月3日
出願者 北風政史、高島成二、目加田英輔

3. その他

特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

HB-EGF にかかわる新規拡張型心筋症モデルマウスの作成と
その治療薬開発に関する研究

分担研究者 目加田 英輔 大阪大学微生物研究所 教授

研究要旨

ヒト増殖因子 HB-EGF はその細胞膜結合型のタイプがジフテリア毒素の受容体として知られている。生体内では HB-EGF は膜結合型として主に存在し、必要時に刺激に応じて切断され、可溶性タイプとして EGF 受容体と結合する。このプロセッシングの最終段階は各臓器により厳密にコントロールされていることが明らかになりつつある。我々はこの HB-EGF の細胞膜からの遊離の重要性を検討するため、HB-EGF が細胞膜から遊離されないマウス及び遊離型の HB-EGF のみ発現するマウスを作成した。それに引き続き本年は可溶性の HB-EGF のみが発現する遺伝子改変を作成した、遊離型の HB-EGF しか発現しないマウスはヘテロマウスでさえ生まれてこず、キメラマウスをみの解析となったが、心臓においては著明な心肥大がみられた。他の HGB-EGF 遺伝子改変マウスの結果とあわせて、HB-EGF が他の EGF ファミリーでは代用されない心臓特異的作用を有することが示唆された。

A. 研究目的

増殖因子 HB-EGF の細胞膜からの遊離の生理学的意義を遺伝子改変マウスを用いることにより検討する。

B. 研究方法

遊離型の HB-EGF のみが発現するマウスの作成は HB-EGF の膜貫通部分以下を欠損させたマウス cDNA をノックインノックアウトすることにより作成した。

(倫理面への配慮)

心不全自然発症マウスを使用した実験は、マウスに対して新たな重大な苦痛を強いるものではないが、使用する薬剤によっては、投与によりマウスに不利益な状況となる可能性は否定できない。薬剤の投与そのものにより、マウスに身体的異常が見られたときにはすぐに中止し、復元可能な障害の場合はたとえば運動制限の場合は単匹飼育や食餌の改善によりその苦痛の軽減を図る。もし復元不可能な重大な障害が生じ、その苦痛を和らげる手段がない場合は速やかに安楽死させることを考慮する。新たな治療薬の開発はその使用に常に

危険を伴うがこの増殖因子治療法はこれまでの研究によりその有効性がかなりの確率で予想され、とくにこの心不全発症マウスでは有効性が期待される。またこういった生理活性物質による治療法はヒトでもインシュリンや成長因子などですでに開始されておりこの増殖因子も心不全治療薬として応用される可能性が高いとおもわれる。心不全発症マウスは遺伝的に不幸な転機をたどるマウスであるがこのマウスの積極的延命法のスクリーニングはあらたな心不全治療薬のすばやい検索に大変有用で臨床的意義がある。詳細な観察と対処をおこないこのマウスの更なる延命手段の検索をすすめる予定である。また本マウス以外に現在のところ新たな心不全治療薬の良否をより迅速にまた的確に判断する方法は存在しない。動物実験は各施設の実験ガイドラインにしたがって計画書を作成、承認を得て施行している。

C. 研究結果

HB-EGF が細胞膜から遊離されないホモマウスは興味深いことに、全身で HB-EGF が遊離されないにも関わらず、ほぼ心臓にだけ表現型が表れた、生後 8 週ぐらいより心筋細胞は徐々に変性・脱落し

生後 140 日でおおよそ半数のマウスが心不全にて死亡した。さらに HB-EGF の遊離型のみが発現するマウスはキメラマウスの段階で胎児期死亡し、著明な心肥大と皮膚の異常をきたした。

D. 考察

HB-EGF は全身で発現する増殖因子であるがその心筋における役割は特に重要であることが示唆された。生後心臓が形成されたあとであってもその機能維持には必須であることが明らかになった。またこのマウスが拡張型心筋症と類似の表現型を示したことにより、HB-EGF がヒトにおいても心不全の原因遺伝子となりうることが示唆された。またその遊離型的心筋肥大作用は著明で HB-EGF が心肥大またはそれにつながる心不全の発症に関与することが示唆された。

E. 結論

増殖因子 HB-EGF は心臓において特異的重要な代謝シグナルを担っており、その作用は細胞膜からの遊離によって調整されている。そのシグナルの異常は心臓にとって重大な機能不全の原因となる。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takazaki, R., Shishido, Y., Iwamoto, R. & Mekada, E. Suppression of the biological activities of the epidermal growth factor (EGF)-like domain by the heparin-binding domain of heparin-binding EGF-like Growth Factor. *J Biol Chem* 279, 47335-43 (2004).
2. Miyamoto, S., Hirata, M., Yamazaki, A., Kageyama, T., Hasuwa, H., Mizushima, H., Tanaka, Y., Yagi, H., Sonoda, K., Kai, M., Kanoh, H., Nakano, H. & Mekada, E. Heparin-binding EGF-like growth factor is a promising target for ovarian cancer therapy. *Cancer Res* 64, 5720-7 (2004).

3. Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., Endoh, M., Kaneda, Y., Takagi, S., Itami, S., Takeda, N., Yamada, G. & Mekada, E. Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J Cell Biol* 163, 469-75 (2003).
4. Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., Nanba, D., Higashiyama, S., Hori, M., Klagsbrun, M. & Mekada, E. Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3221-6 (2003).

2. 学会発表

第63回日本癌学会学術総会
(平成 16 年 9 月 29—10 月 1 日、福岡)
モーニングレクチャー14「HB-EGFのエクトドメインシェディングと癌の標的治療」

第34回日本免疫学会学術集会

(平成 16 年 12 月 1—3 日、札幌)

シンポジウム 13

「Perturbation of host responses by pathogens」
“The role of HB-EGF in tumor progression: The diphtheria toxin mutant could be effective therapeutics for cancer”

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む。)

1. 特許取得
現在のところなし
2. 実用新案登録
現在のところなし
3. その他
特記すべき事項なし