

Bioorg. Med. Chem. Lett., in press

- 8) S. Nakamura-Tsuruta, Y. Kishimoto, T. Nishimura and Y. Suda, "One-Step Purification of Lectins from Banana Pulp Using Sugar-immobilized Gold Nano-Particles (SGNPs)", *Journal of Biochemistry*, in press
2. 学会発表 (シンポジウムなど)
- 1) Y. Suda, T. Nishimura, Y. Kishimoto, S. Yamashita, M. Shigeta, S. Takahashi, M. Wakao, A. Saito, T. Kondo, R. Saruwatari, K. Ohishi, Y. Takahashi, S. Nakamura-Tsuruta, H. Ishida, H. Okuno, H. Tsutsui, "Advanced Analytical Systems for the Binding Interaction of Sugar Chains with Proteins, Cells or Viruses: Sugar Chips and Sugar Chain-Immobilized Gold Nano-Particles", XIX International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO-19), *Glycoconjugate Journal*, 24(6,7), 272, 2007年7月
- 2) M. Ando, T. Komori, T. Yoshikawa, A. Imamura, H. Ishida, M. Kiso, Y. Suda, "Systematic Synthesis of Functional Oligosaccharide Probes for Sugar Chips" XIX International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO-19), *Glycoconjugate Journal*, 24(6,7), 315, 2007年7月
- 3) S. Nakamura-Tsuruta, Y. Kishimoto, T. Nishimura, Y. Suda, "One-Step Purification of Lectins Using Sugar-Immobilized Gold Nano-Particles(SGNPs)", XIX International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO-19), *Glycoconjugate Journal*, 24(6,7), 368, 2007年7月
- 4) Y. Suda, M. Wakao, Y. Takahashi, A. Saito, T. Kondo, R. Saruwatari, K. Ohishi, S. Nakamura-Tsuruta, T. Nishimura, Y. Kishimoto, M. Shigeta, S. Takahashi, H. Ishida, H. Tsutsui, H. Okuno, "Sugar Chips and Sugar Chain-immobilized Gold Nano-Particles: Towards a Diagnosis for Influenza Virus Strains", XIX International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO-19), *Glycoconjugate Journal*, 24(6,7), 385, 2007年7月
- 5) M. Wakao, S. Watanabe, T. Ogawa, K. Suzuki, T. Yumino, T. Myogadani, A. Saito, K. Muta, M. Kimura, K. Kajikawa, Y. Suda, "Development of Optical Fiber-Type Sugar Chip for Localized Surface Plasmon Resonance Apparatus", XIX International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO-19), *Glycoconjugate Journal*, 24(6,7), 397, 2007年7月
- 6) 隅田 泰生, インフルエンザウイルス株の検査法を目指して—シュガーチップと糖鎖固定化金ナノ粒子, 第56回高分子討論会 予稿集, 56, 5415-5416, 2007年9月
- 7) 仮屋 博敬, 増田 真吾, 吉原 雄祐, 上野 勝, 橋本 雅仁, 隅田 泰生, カルボキシメチルキチンによる TGF-beta1 を介した軟骨形成の誘導, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 323, 2007年12月
- 8) 橋本 雅仁, 本田 大士, 梶山 健次, 隅田 泰生, 永田 真紀, 九町 健一, 阿部 美紀子, 内海 俊樹, 一酸化窒素誘導性 *Mesorhizobium loti* 由来リポ多糖の研, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 542, 2007年12月
- 9) 俵積田 一樹, 斎藤 敦, 隅田 泰生, 橋本 雅仁, *Bacteroides fragilis* 由来免疫調整リポプロテインの同定, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 846, 2007年12月
- 10) 隅田 泰生, 若尾 雅広, 高橋 優子, 齊藤 彰寛, 近藤 宇男, 大石 紘, 鶴田-中村 祥子, 西村 知晃, 岸本 裕子, 山下 早希子, 石田 秀治, 奥野 寿臣, ウイルスの糖鎖結合性を利用したウイルス株の識別, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 727, 2007年12月
- 11) 古屋 鋪舞子, 高重 克洋, 小出 裕之, 奥 直人, 守屋 陽一郎, 橋本 雅仁, 隅田 泰生, トリトン X-114 相分離法による OK-432 (ピシバニール) の抗腫瘍活性の向上, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 823, 2007年12月
- 12) 村岡 賢, 伊東 祐二, 橋口 周平, 馬場 昌範, 有馬 直道, 隅田 泰生, 中島 敏博, 杉村 和久, 抗体ファージライブラリによる HTLV 感染細胞に対するヒト抗体の単離とそのアポトーシス誘導能, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 830, 2007年12月
- 13) 鶴田 (中村) 祥子, 岸本 裕子, 西村 知晃, 奥野 寿臣, 隅田 泰生, 糖鎖固定化金ナノ粒子(SGNPs)を用いた糖結合タンパク質の1ステップ精製, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会), BMB2007 講演要旨集, 558, 2007年12月
- 14) 若尾 雅広, 倉橋 佳江, 渡辺 省伍, 小川 智央, 弓野 猛, 牟田 健一, 斎藤 敬, 梶川 浩太郎, 隅田 泰生, 多チャンネル光ファイバー型シュガーチップによる糖鎖相互作用解析, 日本化学会第88回春季年会, 2008年3月

◎知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 - 1) 若尾 雅広, 隅田 泰生, 小川 智央, 「支持体に対する金属微粒子膜の形成方法及び局在プラズモン共鳴センサ」, 特開 2007-240463, 公開日: 2007年9月2日
 - 2) 隅田 泰生, 西村 知晃, 岸本 裕子, 鶴田 祥子, 「病原微生物の濃縮方法」, 特願 2007-307044, 出願日: 2007年11月28日
2. 実用新案登録

なし
3. その他
なし

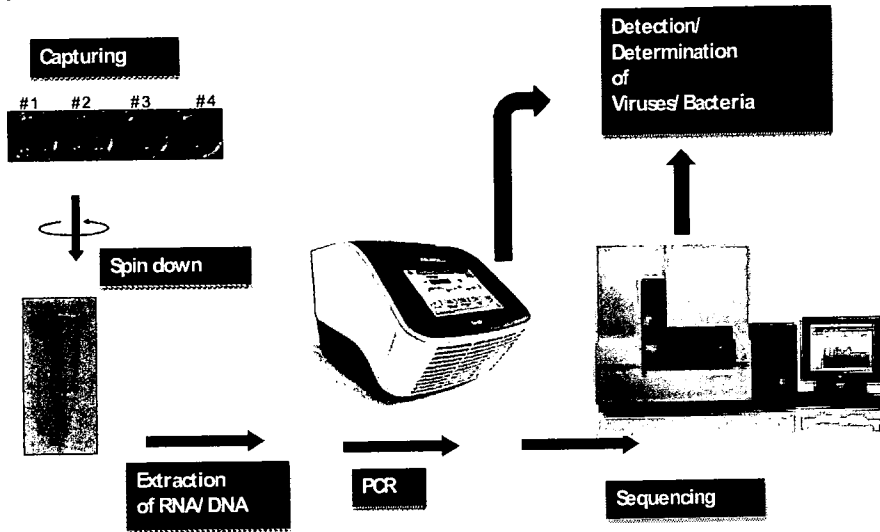


図1 選択的ウイルスの濃縮と超高度分析システム
の概念

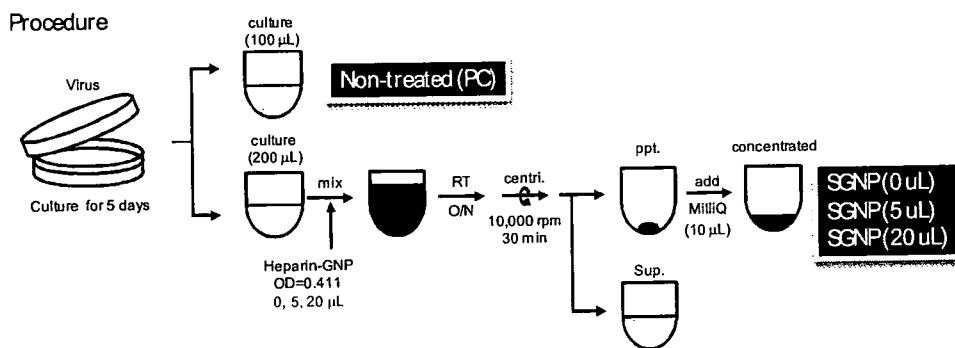


図2 ヘパリン固定化SGNPによるウイルス濃縮実験の流れ

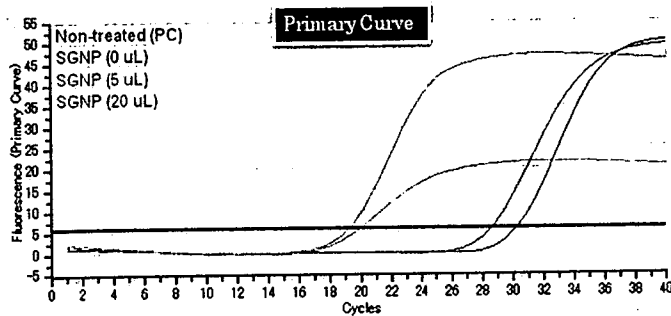
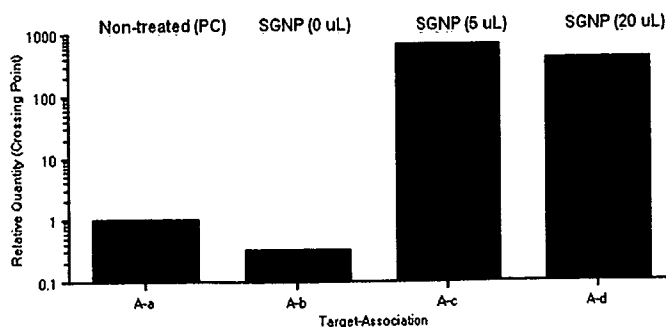


図3 ヘパリン固定化SGNPによるウイルス濃縮実験



幹細胞生物学での技術開発と解析

分担研究者 高橋 知之 久留米大学医学部・創薬再生医療学講座・准教授

《研究要旨》

本研究は、m-CRAに新規の癌特異化分子を組み合わせる事によって、新しい革新的な癌遺伝子治療法を開発する事を目的としている。これまでに、DNAマイクロアレイによる肝癌細胞に対するHGFのユニークな生理活性に着目した癌関連分子の解析や、癌細胞とマウス胚性幹（ES）細胞における遺伝子プロファイリングによる癌化に関わる分子を抽出し、m-CRAシステムに応用可能な癌特異化因子の探索を進めてきた。更に、既に癌細胞や幹細胞で機能する事が広く知られているヒトTERT (telomerase reverse transcriptase) 遺伝子のプロモーターをモデルとしてm-CRAにおける癌特異的遺伝子プロモーター評価システムの確立を進めてきた。

一方、近年、再生医学研究における幹細胞研究の進歩にともない、白血病を始めとした癌において癌幹細胞の存在が確認され、癌も極少数の自己複製能を持った癌幹細胞を中心とした幹細胞システムを構成することが示されている。この事から、癌遺伝子治療においてm-CRAシステムをより効率的に機能させるには、癌の増幅の根源となる癌幹細胞をターゲットとすることこそ、理にかなった癌ターゲティングシステムと考えられ、今後、癌幹細胞システムと正常幹細胞システムとの異同についても基礎的な検証が必要と考えられる。

そこで、本年度は、種々のヒト幹細胞におけるm-CRAシステムの安全性評価法を確立する一環として、独自に開発してきたマウスES細胞由来の目的細胞を効率良く同定・単離する方法（Adenoviral conditional targeting method: ACT法）をヒト正常幹細胞に応用するために、ヒトES細胞におけるアデノウイルスベクターの有用性を検証し、ヒトES細胞に対する遺伝子導入技術の開発を行った。また、近年、エピジェネティックな遺伝子発現の調節が、発癌にも関わる事が示されており、MeCP2遺伝子に関連したDNAマイクロアレイ実験の実施による新規エピジェネティック関連癌遺伝子の探索研究も進めた。

A. 研究目的

本研究は、m-CRAシステムに応用する新規癌関連分子の探索と新規m-CRAシステムのヒト癌細胞における有用性評価システムの整備を目的としている。近年、再生医学研究の発展とともに、白血病を始めとした癌において癌幹細胞の存在が確認され、癌も極少数の自己複製能を持つ癌幹細胞を中心とした幹細胞システムを構成することが示されている。この事から、m-CRAシステムをより効率的に癌遺伝子治療へ応用するためには、癌の増幅の根源となる癌幹細胞をターゲットとすることが重要と考えられ、今後、癌幹細胞システムと正常幹細胞システムとの比較検討による癌幹細胞の特徴付けや厳密な選別が必要と考えられる。そこで、今年度は、ヒト癌幹細胞との比較対照として、無限に増殖するヒト由来正常幹細胞を利用するために、正常幹細胞の1つとしてヒトES細胞に対するアデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率の検討、遺伝子導入方法の開発を試みた。

また、近年、エピジェネティックな遺伝子発現の調節が、発癌における遺伝子発現に関わる事が示されている。そこで、本研究では、増殖以外を指標とした新たな新規エピジェネティック関連癌遺伝子の探索し、新規癌関連遺伝子プロモーターによるm-CRAの開発研究を行なうために、Methylated-CpG binding proteins (MBDs) の1つであるMeCP2遺伝子

に関連した新規癌関連遺伝子の同定も目標としている。

B. 研究方法

1.ヒト幹細胞に対するアデノウイルスベクターによる遺伝子導入法の開発

これまでの研究から、アデノウイルスベクター (Ad) は、多くのヒト株化癌細胞に対して優れた遺伝子導入効率を示す事が示されている。しかし、ヒトES細胞をはじめとするヒト由来の幹細胞や、ヒトの癌幹細胞に対するアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率はこれまで示されていない。そこで本研究では、マーカー遺伝子としてLacZ遺伝子、または、EGFP (Enhanced green fluorescence protein) 遺伝子と、A、または、B、Cの三種類のプロモーターを連結した、Ad.A-LacZ、Ad.B-lacZ、Ad.C-LacZ、あるいは、Ad.C-EGFPを $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^8$ PFU/mlの濃度で利用し、代表的なヒト癌細胞株 (HepG2細胞、HeLa細胞) や正常ヒト幹細胞 (ヒトES細胞) に対する、それぞれのアデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率を検討した。更に、必要に応じて遺伝子導入効率を上昇させるため、ファイバー修飾アデノウイルス (Ad.C-EGFP/F-RGD) の利用を検討した。

2.MeCP2遺伝子によるエピジェネティックな遺伝子発現調節を受ける遺伝子の探索

MeCP2遺伝子産物（以下MeCP2）は、DNA上のメチル化したCpG配列に結合し、結合した領域より下流に存在する遺伝子の転写を抑制する転写抑制因子である。近年、エピジェネティックな遺伝子発現調節が発癌に関わることが示されており、本研究では、MeCP2の癌関連ターゲット遺伝子の探索を行うために、MeCP2遺伝子欠損マウス（KOマウス）と野生型正常マウス（WTマウス）のstemness geneや癌関連遺伝子の発現が予想される生殖組織におけるDNAマイクロアレイ解析を行なった。実際のDNAマイクロアレイ解析は、生後8週目のKOマウスとWTマウスそれぞれの精巣、精のうを単離後、RNAを抽出し、50gの総RNAを用いてAffymetrix mouse oligo microchipsに対して行なった。

C. 研究結果

1-1. アデノウイルスベクターによるヒトES細胞に対する遺伝子導入

これまでに開発してきたマウスES細胞由来の目的細胞を効率良く同定・単離する方法（ACT法）をヒトES細胞で応用し、m-CRAの正常幹細胞における安全性評価法確立のため、アデノウイルスベクターのヒトES細胞における有用性の検証を中心としたヒトES細胞における技術応用の可能性についての検討研究を進めた。

そこで、まず、3種類のプロモーター（A、B、C）によってLacZ遺伝子を発現するアデノウイルスベクター（Ad.A-LacZ、Ad.B-LacZ、Ad.C-LacZ）のヒトES細胞に対する遺伝子導入効率の検討を行なった。その結果、Ad.A-LacZならびにAd.B-LacZの感染では、フィーダー細胞はLacZ染色されるのに対して、ヒトES細胞では染色が観察されなかった。これに対して、Ad.C-LacZはフィーダー細胞のみならず、ヒトES細胞における強いLacZ染色が認められた

（論文準備中）。以上の結果から、ヒトES細胞に対するアデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率は高く、安定な導入遺伝子の発現が可能である事が明らかとなった。また、効率の良い導入遺伝子の発現を得るにはC等の強力なプロモーターの選択が重要である事が示された。

1-2. ファイバー修飾アデノウイルスベクターによるヒトES細胞に対する遺伝子導入

次に、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入を促進させるため、ファイバー変異型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率の評価を行った。アデノウイルスベクターは、そのファイバーがCAR（coxsackie/adenovirus receptor）に結合し、続いてペントンベースに存在するRGD（Arg-Gly-Asp）モチーフがインテグリンに結合するといった経路で標的細胞へ感染する。近年、アデノウイルスベクターのファイバーのHIループ領域にRGDモチーフを組み

込む事によって、標的細胞のCAR発現に関わらず修飾型アデノウイルスによる効率の良い遺伝子導入が可能となることが示されている。そこで、ヒトES細胞にファイバー修飾アデノウイルス（Ad.C-EGFP/F-RGD）を感染する事によって、コンベンショナルなアデノウイルスベクター（Ad.C-EGFP）との遺伝子導入効率の比較を行った。

Ad.C-EGFP/F-RGDあるいはAd.C-EGFPを感染したヒトES細胞はEGFPを強く発現する。また、2種類の培養方法が異なるマウスES細胞や、ヒト癌細胞株であるHeLa細胞、HepG2細胞においても、Ad.C-EGFPまたは、Ad.C-EGFP/F-RGDの感染により、強いEGFPの発現が認められた。その一方で、フィーダー細胞との共培養を必要とするヒトES細胞、ならびにR1-マウスES細胞に対してAd.C-EGFP/F-RGDを感染した結果、ヒト、マウスES細胞よりは、むしろ共培養しているフィーダー細胞においてEGFPの強い発現が認められた（論文準備中）。以上の結果から、ヒトES細胞に対するアデノウイルスを利用した遺伝子導入では、ヒトES細胞が内因性CRを強く発現する事から、ファイバー修飾したアデノウイルスベクターを必ずしも利用する必要はなく、むしろフィーダー細胞への不要な遺伝子導入の少ないコンベンショナルなアデノウイルスベクターが適している可能性が示された。

1-3. アデノウイルスベクターによるフィーダー除去後のヒトES細胞に対する遺伝子導入方法の確立

更に、我々の利用しているヒトES細胞はフィーダー細胞を必要とする事から、フィーダー細胞などの影響によって、同じ力価のウイルスベクターを用いても、マウスES細胞と比較してヒトES細胞では効率が低下する可能性が考えられた。そこで、フィーダー細胞によるウイルスの吸着を防ぐ目的で、フィーダー細胞の除去したヒトES細胞へのウイルス感染法や感染後のウイルスベクターの持ち込みを防ぐ為のアデノウイルス感染方法の開発に成功した。

1-4. アデノウイルスベクター感染ヒトES細胞における未分化マーカーの発現検討

最後に、過剰なアデノウイルスベクター感染は、宿主細胞において、細胞周期の崩壊、アポトーシスの誘導など細胞傷害性を示す事が報告されている。そこで、アデノウイルスベクター感染後のヒトES細胞における、未分化マーカーの発現を検討した。その結果、ヒトES細胞はアデノウイルス感染後も、Oct-4、TRA-1-60等のヒトES細胞の未分化維持に関わるマーカー分子を発現している事が明らかとなった。更に、Hoechst33342染色によって、細胞分裂期のEGFP陽性ヒトES細胞が観察される事から、アデノウイルスベクター感染後も、ヒトES細胞は分裂増殖している事が確認された（論文準備中）。以上の結果から、アデノウイルスベクターは、ヒトES細胞に対

する効率の良い、安全な遺伝子導入手段になると考えられる。

これらの結果は、アデノウイルスベクターが、ヒトES細胞に対して安全で、効率良い遺伝子導入を可能とする事を示しており、本研究におけるアデノウイルスベクターを利用した遺伝子導入法は、ヒトES細胞の遺伝子操作における遺伝子導入に幅広く応用しうるものである。

2-1. DNAマイクロアレイによる癌関連MeCP2制御遺伝子の探索

癌関連遺伝子や幹細胞の維持に関わる遺伝子の多くは、マウスの精巣や卵巣といった生殖系の組織で強い発現を示す場合が多い。そこで、まず、WTマウスとMeCP2 KOマウスの生殖系の組織（精巣、精のう）における遺伝子発現の比較解析を行うこととした。その結果、単離したWTマウスとMeCP2 KOマウスの精のうの重量に有為な差が認められ、組織学的な解析と平行して、抽出したRNAによるDNAマイクロアレイ解析を進めている。

D. 考察

アデノウイルスベクターは多くの株化癌細胞に対する効率の良い遺伝子導入ツールであり、これまでその性質に基づくm-CRAシステムの開発を進めてきた。一方、近年、種々の癌において癌幹細胞の存在が確認され、癌も極少数の自己複製能を持った癌幹細胞を中心とした幹細胞システムを構成することが示されている。この事から、癌組織でm-CRAシステムをより効率的に機能させるためには、癌の増幅の根源となる癌幹細胞をターゲットとすることこそ癌の根治につながると考えられ、ヒト癌幹細胞の特異的選別方法の開発が重要である。

そこで、本研究では、m-CRAのヒト株化癌細胞、ヒト癌幹細胞、ヒト正常幹細胞における機能評価を行うための第一段階として、ヒト株化癌細胞における癌幹細胞やヒト正常幹細胞に対するアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率を評価し、主にヒトES細胞に対する遺伝子導入効果の検討、遺伝子導入方法の開発を行なった。

その結果、コンベンショナルなアデノウイルスベクターによって、これまで効率良く遺伝子導入される事が知られるHepG2細胞やHeLa細胞と同様に、ヒトES細胞でも十分な遺伝子導入効果が得られ、更に効率良く遺伝子導入する方法の確立に成功した。以上の成果から、来年度以降、m-CRAのヒト株化癌細胞、ヒト癌幹細胞、ヒト正常幹細胞における機能比較が可能となり、m-CRAの癌遺伝子治療における体系的な安全性評価システムの確立が期待される。

また、癌関連遺伝子の多くは精巣や卵巣等の生殖系組織に強く発現していることが多く、本研究におけるMeCP2 KOマウスにおける生殖系組織の異常は興味深いもので、MeCP2遺伝子に関連した新規癌関

連遺伝子の同定を更に進めていく必要がある。

E. 結論

- 1) アデノウイルスベクターは、HepG2細胞やHeLa細胞のような株化癌細胞に対すると同様に、ヒトES細胞に対する良い遺伝子導入ツールとなることが示された。
- 2) ファイバー修飾型アデノウイルスベクターは、フィーダー細胞との共培養が必要なES細胞では、フィーダー細胞による吸着によって、かえって遺伝子導入効率が低下する。
- 3) 今後、ヒト正常幹細胞との比較によってm-CRAの癌遺伝子治療における体系的な安全性評価が可能となると期待される。
- 4) 癌関連のMeCP2のターゲット遺伝子の探索の過程で、MeCP2 KOマウスの生殖系組織の異常が認められ、DNAマイクロアレイ解析を進める事で、エピジェネティック関連のターゲット遺伝子の同定の可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Esaki M., Takemura G., Kosai K., Takahashi T., Miyata S., Li L., Goto K., Maruyama R., Okada H., Kanamori H., Ogino A., Ushikoshi H., Minatoguchi S., Fujiwara T., Fujiwara H. Treatment with an adenoviral vector encoding hepatocyte growth factor mitigates established cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol: Heart and Circulatory Physiology* 294(2):H1048-1057 (2008)
- ② Chen XH., Minatoguchi S., Kosai K., Yuge K., Takahashi T., Arai M., Wang N., Misao Y., Lu. C., Onogi H., Kobayashi H., Yasuda S., Ezaki M., Ushikoshi H., Takemura G., Fujiwara T., Fujiwara H. In vivo hepatocyte growth factor gene transfer reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through its multiple actions. *J Card Fail.* 13(10):874-83 (2007)

2. 学会発表

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 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
1 隅田泰生	糖鎖アレイ	伊藤嘉浩	マイクロアレ イ・バイオチ ップの最新技 術、第12章	(株) シ ーエムシ ー		2007	253-259

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
2 Esaki M, Takemura G, <u>Kosai KI</u> , <u>Takahashi T</u> , Miyata S, Li L, Goto K, Maruyama R, Okada H, Kanamori H, Ogino A, Ushikoshi H, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H.	Treatment with an adenoviral vector encoding hepatocyte growth factor mitigates established cardiac dysfunction in doxorubicin -induced cardiomyopathy.	<i>Am J Physiol Heart Circ Physiol.</i>	294(2)	H1048-1057	2008
3 Chen XH, Minatoguchi S, <u>Kosai K</u> , Yuge K, <u>Takahashi T</u> , Arai M, Wang N, Misao Y, Lu C, Onogi H, Kobayashi H, Yasuda S, Ezaki M, Ushikoshi H, Takemura G, Fujiwara T, Fujiwara H.	In vivo hepatocyte growth factor gene transfer reduces myocardial ischemiareperfusion injury through its multiple actions.	<i>J Card Fail.</i>	13(10):	874-883	2007
4 堀川良治、小宮 節郎、小賤健一 郎	増殖制御型アデノウイ ルスによる遺伝子治療	関節外科 基 礎と臨床。： メジカルビュ ー社。	27 (1)	132-133	2008
5 <u>小賤健一郎</u>	先端医学開発の研究と 医学教育。	鹿児島大学医 学雑誌。	59(2)	17-23	2007
6 Matsunaga S, Imakiire T, Koga H, Ishidou Y, Sasaki H, Taketomi E, Higo M, Tanaka H, <u>Komiya S</u> .	Occult spinal canal stenosis due to C-1 hypoplasia in children with Down syndrome.	<i>J Neurosurg.</i>	107(6 Supp l)	457-459	2007

7	Taniguchi N, Yoshida K, Ito T, Tsuda M, Mishima Y, Furumatsu T, Ronfani L, Abeyama K, Kawahara K, <u>Komiya S</u> , Maruyama I, Lotz M, Bianchi ME, Asahara H.	Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification.	<i>Mol Cell Biol.</i>	(16)	5650-5663	2007
8	Inatani M, Iwao K, Kawaji T, Hirano Y, Ogura Y, Hirooka K, Shiraga F, Nakanishi Y, Yamamoto H, Negi A, Shimonagano Y, <u>Sakamoto T</u> , Shima C, Matsumura M, Tanihara H.	Intraocular Pressure Elevation after Injection of Triamcinolone Acetonide: A Multicenter Retrospective Case- Control Study.	<i>Am J Ophthalmol.</i>	145(4)	676-681	2008
9	Sonoda S, Tachibana K, Uchino E, Yamashita T, Sakoda K, Sonoda KH, Hisatomi T, Izumi Y, <u>Sakamoto T</u> .	Inhibition of Melanoma by Ultrasound- Microbubble-Aided Drug Delivery Suggests Membrane Permeabilization.	<i>Cancer Biol Ther.</i>	6(8)	1276-83	2007
10	N. Sasaki, K. Okishio, K. Ui- Tei, K. Saigo, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, T. Nishimura, <u>Y.</u> <u>Suda</u> , M. Hayasaka, K. Hanaoka, S. Hitoshi, K. Ikenaka, and S. Nishihara	Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells	<i>J. Biol. Chem.</i>			<i>In press</i>
11	M. Wakao, A. Saito, K. Ohishi, Y. Kishimoto, T. Nishimura, M. Sobel, <u>Y. Suda</u>	Sugar Chips Immobilized with Synthetic Sulfated Disaccharides of Heparin/Heparan Sulfate Partial Structure	<i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>			<i>In press</i>
12	S. Nakamura- Tsuruta, Y. Kishimoto, T. Nishimura and <u>Y.</u> <u>Suda</u>	One-Step Purification of Lectins from Banana Pulp Using Sugar- immobilized Gold Nano- Particles (SGNPs)	<i>Journal of Biochemistry</i>			<i>In press</i>

IV. 研究成果の刊行物・別刷
(収載論文 12 冊)

マイクロアレイ・バイオチップの最新技術

Microarray Biochips

監修：伊藤嘉浩

Supervisor: Yoshihiro Ito

シーエムシー出版

第12章 糖鎖アレイ

隅田泰生*

1 はじめに

2~10個程度の糖分子から構成されるオリゴ糖鎖（以下、糖鎖）は様々な生理機能に関係しており、細胞の接着やシグナル伝達などには必須の役割を演じている¹⁾。糖鎖と蛋白質、細胞、ウイルスなどとの直接的な結合には、各々の糖鎖の特異的構造が重要であり、分子レベルでの解析には、構造明確な糖鎖を使用することが求められる。我々は、表面プラズモン共鳴（SPR）測定装置のセンサーチップとして、糖鎖を固定化した金チップ（シュガーチップと命名）を開発している²⁾。SPRは分子間相互作用を解析する技術として広く使用されている。簡単に原理を説明する。即ち、測定媒体である金属薄膜に光をある角度から入射させると、金属薄膜の表面の表面プラズモン波と金属薄膜に対して垂直方向のエバネッセント波が生じ、それらが共鳴する。この現象を表面プラズモン共鳴現象と称し、金属固有の誘電率や金属界面の屈折率の変化に影響されるので、反射光の強度あるいは表面プラズモン共鳴角（共鳴が起こるときの反射角の角度）の変化を測定することによって、界面で起こる変化を測定できる。従って、解析対象物を蛍光剤などのプローブ分子で化学修飾する必要がないため、相互作用解析が簡単に行え、化学修飾による解析対象物の変化（変性）を考える必要がない、さらにリアルタイムでの解析が可能となる。これらの利点から、生体分子のみならず、有機高分子や細胞の相互作用研究にも使用されている。このようなSPRと我々が開発したシュガーチップを組み合わせた分析法は、網羅的解析を可能とし、同時に新しい検査・診断法となる可能性を有している。

我々のシュガーチップに対する基本的コンセプトは、構造明確な糖鎖を金チップ上に固定化することであり、そのために我々はまず金チップと糖鎖とを結ぶリンカー化合物をデザインし、それと糖鎖とを複合体化した「糖鎖リガンド複合体」と称する化合物を合成した。このリガンド複合体の溶液を短時間金チップに接触させるだけで、Au-S結合を通して簡単に糖鎖を固定化したシュガーチップを調製できた。そこで、次に我々はこのリガンド複合体を多数（最大96個）固定化して、アレイタイプシュガーチップを調製し、それをSPRイメージング装置（東洋紡社製、

* Yasuo Suda 鹿児島大学 大学院理工学研究科 教授；(株)スティックスバイオテック
代表取締役

Multi SPRinter) のセンサーチップとして用いて、検体 (蛋白質, 血清, ウイルス溶液など) の糖鎖結合性を迅速に測定する系を構築した。以下にいくつかの例を示す。なお, 本章で紹介するアレイタイプのシュガーチップおよび SPR イメージング法を用いた解析については, 弊社ホームページ (<http://www.sudxbiotech.jp/>) も参照されたい。

2 リガンド複合体の調製

我々が開発したモノバレントリンカー化合物を用いて, マルトース (Glc α 1-4 Glc) をリガンド複合体化した例を, 図 1 に示した。この際, マルトースの還元末端はその糖構造を消失するが, その部分は親水性のスペーサーとして作用するため, 疎水性のあるリンカー分子と測定対象の蛋白質との疎水性相互作用に基づく非特異的吸着を軽減する。このリガンド複合体 (Glc α 1-4 Glc-mono) を用いた SPR 測定例を図 2 に示す。ここでは, モリテックス社製の 2 チャンネル型機器である SPR-670 M を使用した。まず, センサーチップは以下のように調製した。すなわち Glc α 1-4 Glc-mono の 1 μ M 溶液 (メタノール/水=1/1, v/v) を調製し, そこに金蒸着チップ (スティックスバイオテック社製) を 2 時間から一晩浸漬し, その後浸漬した溶媒, 界面活性剤 (0.05 % Tween-20) 入り溶媒, リン酸バッファー等で洗浄した。洗浄の際は超音波洗浄機を用

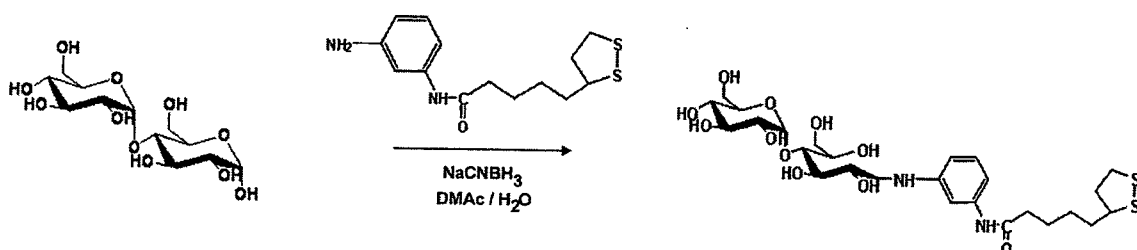


図 1 糖鎖リガンド複合体の調製例

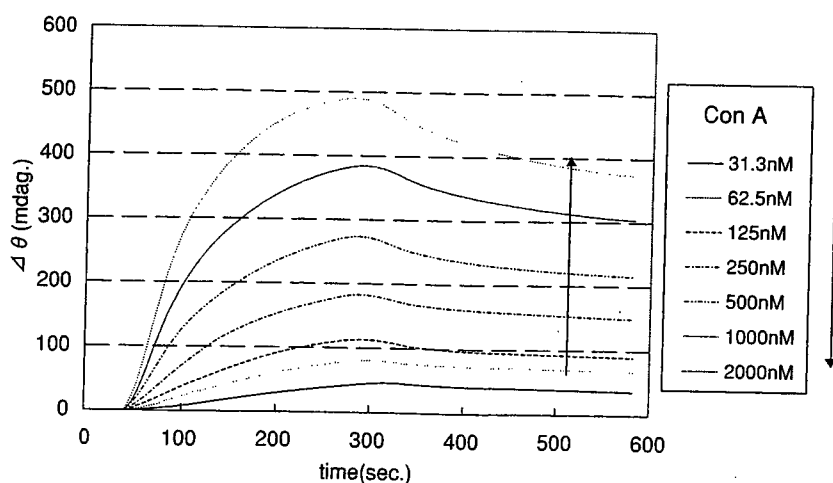


図 2 Glc α 1-4 Glc-mono チップへのコンカナバリン A の結合挙動 (SPR センサーグラム)

いて行い、固定化されていない糖鎖がチップ上に残存するのを防いだ。この方法によれば、同時に50枚以上のシュガーチップを調製することも可能であり、実験の再現性の確認時に問題となるチップロット間の差を無視することができる。このようにして調製したシュガーチップを用いて、 α グルコースに結合するレクチンとして知られるコンカナバリン A (Con A) の結合挙動を測定した。蛋白質濃度に依存してセンサーグラムが大きく観測されていることが分かる。なお、図2のデータは生データであり、対照を差し引いたものではない。一方、同じロットのチップを用いて、同じ条件でBSAの結合挙動を測定したところ、全く結合挙動は観測されなかった。以上から、我々の方法で固定化すると、非特異的相互作用を最小に抑え、かつ高選択的に糖鎖と蛋白質との相互作用が観測可能であることが明らかとなった。そこで、この系をアレイタイプのシュガーチップに適用することとし、70種類以上の糖鎖リガンド複合体を調製した。

3 アレイタイプのシュガーチップの調製と SPR イメージング

各々のリガンド複合体は $500\ \mu\text{M}$ (0.5%のグリセロールを含む水溶液) に溶解し、その溶液 $1\ \mu\text{l}$ を専用チップ (東洋紡社製) 上に、スポッター装置 (東洋紡社製) を用いてスポットした。スポットしたチップを室温で約1時間放置した後、水、リン酸緩衝液 (pH 7.4, PBS), 0.05% Tween-20 入り PBS で洗浄し、その後室温で乾燥させて保存した。このようにして、最大96種類の異なる糖鎖を固定化できるアレイタイプのチップを調製した。このチップを SPR イメージング装置 (MultiSPRinterTM, 東洋紡社製) のプリズムにマッチングオイルを介して装着し、機器付属のマニュアルにしたがって種々の蛋白質の結合挙動を観測した。結果の一例を図3に示した。この実験では、蛋白質の濃度は $2\ \mu\text{M}$ (PBS-T), 流速は $100\ \mu\text{l}/\text{min}$ に固定している。それぞれの糖鎖に特異的に結合する蛋白質を簡単に判別できたことがわかった。さらに、図3の輝度を定量化することによって、結合の強度 (親和性の強さ) を推定することもできた。

4 インフルエンザウイルスの糖鎖結合活性の解析

数年前に地球上に出現した強毒性のトリ型インフルエンザウイルス (H5N1) がヒト型に変異すると世界中に危機的流行が起こることは確実であり、簡便な検査法に基づく世界的な監視システムが必要である。インフルエンザウイルスは細胞表層のシアル酸含有糖鎖に結合し、そして細胞に侵入し感染することが知られている。また、ウイルスが結合するシアル酸含有糖鎖の構造は宿主の動物種によって異なり、さらに抗血清によって同じ亜型に分類されるウイルス株でも異なることが報告されている^{3~7)}。我々は、糖鎖を用いたウイルス株の検査・診断システムの構築

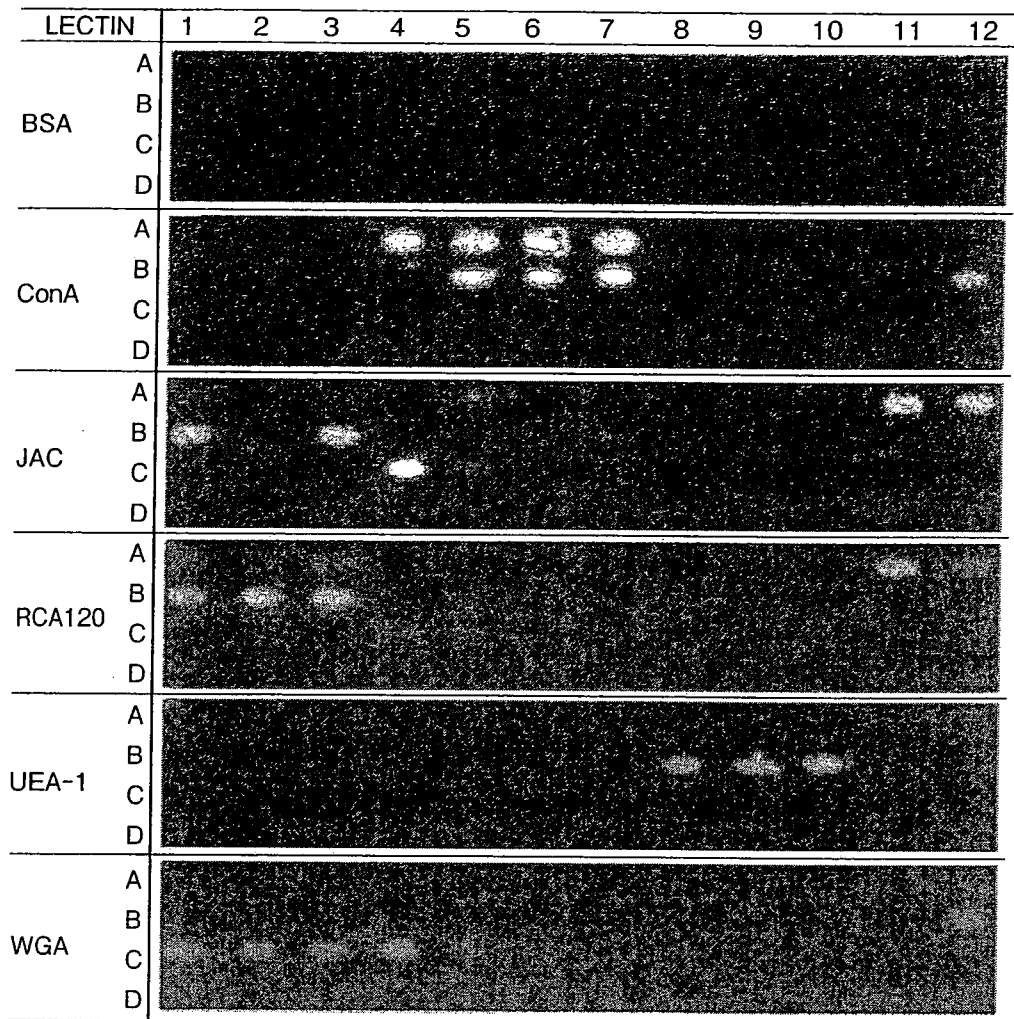
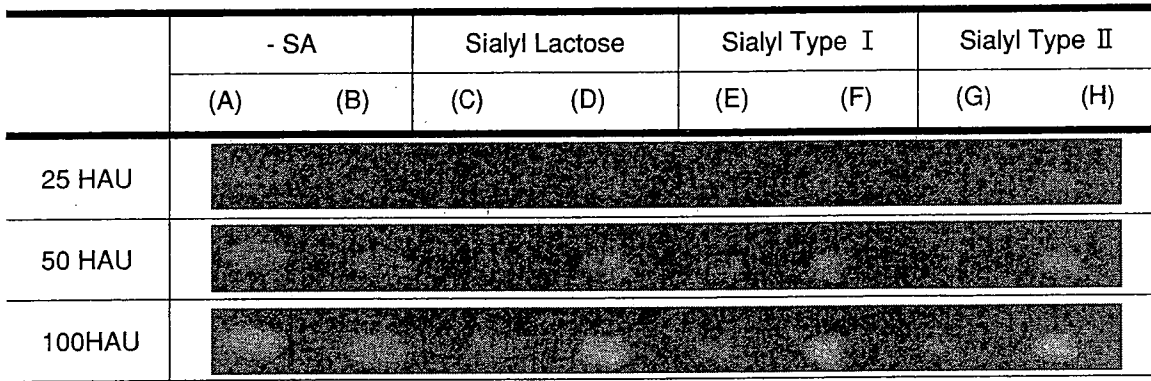


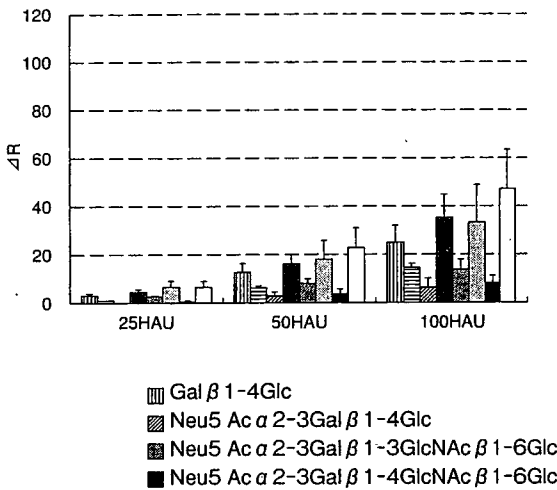
図3 アレイタイプのシュガーチップへの各種蛋白質の結合挙動 (SPR イメージング)
 蛋白質は牛血清アルブミン (BSA), コンカナバリン (ConA), *Jacalin lectin* (JAC), *Ricinus communis* アグルチニン (RCA 120), *Ulex europeas* アグルチニン (UEA-1), *Wheat germ* アグルチニン (WGA)。チップ上のアドレス (括弧内) にスポットした糖鎖リガンド複合体は以下の通り。Glc-mono (A 1); GlcNAc-mono (A 2); Gal-mono (A 3); Glc α 1-4 Glc-mono (A 4); Glc α 1-4 Glc α 1-4 Glc-mono (A 5); Glc α 1-6 Glc-mono (A 6); Glc α 1-6 Glc α 1-6 Glc-mono (A 7); Glc β 1-3 Glc β 1-3 Glc-mono (A 8); Glc β 1-4 Glc-mono (A 9); Glc β 1-6 Glc-mono (A 10); Gal α 1-6 Glc-mono (A 11); Gal α 1-4 Gal β 1-4 Glc-mono (A 12); Gal β 1-3 GalNAc α 1-6 Glc-mono (B 1); Gal β 1-4 GlcNAc β 1-6 Glc-mono (B 2); Gal β 1-4 Glc-mono (B 3); Gal β 1-4 [Fuc α 1-2] GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc-mono (B 4); Man α 1-2 Man-mono (B 5); Man α 1-3 Man α 1-4 Man-mono (B 6); Man α 1-6 Man-mono (B 7); Fuc α 1-2 Gal β 1-4 Glc-mono (B 8); Fuc α 1-6 Glc-mono (B 9); Fuc β 1-6 Glc-mono (B 10); Xyl β 1-6 Glc-mono (B 11); GlcNAc α 1-6 Glc-mono (B 12); GlcNAc β 1-4 GlcNAc-mono (C 1); GlcNAc β 1-6 Glc-mono (C 2); GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc-mono (C 3); GalNAc α 1-6 Glc-mono (C 4); GalNAc β 1-3 Gal-mono (C 5); NeuAc α 2-3 Gal β 1-4 GlcNAc-mono (C 7); NeuAc α 2-3 Gal β 1-3 GlcNAc β 1-6 Glc-mono (C 8); NeuAc α 2-3 Gal β 1-4 GlcNAc β 1-6 Glc-mono (C 9); NeuAc α 2-6 Gal β 1-4 Glc-mono (C 10); NeuAc α 2-6 Gal β 1-3 GlcNAc β 1-6 Glc-mono (C 11); NeuAc α 2-3 Gal β 1-4 GlcNAc β 1-6 Glc-mono (C 12); GlcNS 6 S α 1-4 IdoA 2 S β 1-6 Glc-mono (D 1); Heparin-mono (D 2)。

を目指し、異なるインフルエンザウイルス株の結合挙動を上記の糖アレイシステムを用いて検討した。すなわち、化学酵素法で合成、または市販の6種のシアル酸含有糖鎖とコントロールの2種類の糖鎖を固定化したアレイタイプのシュガーチップを調製し、実験に用いた。全部で8種類の糖鎖であるので、チップ上にはそれぞれの糖鎖は複数(4~8点)スポットした。インフルエンザウイルスは、MDCK細胞または鶏卵で培養し、シヨ糖密度勾配法で精製後、鶏赤血球を用いたヘマグルチニン(HA)価で濃度を決定し、HA価を合わせて実験に供した。図4に1例を示した。SPRイメージングで観測された輝度(a)を定量し、それぞれの糖鎖に対する絶対結合値

(a) SPRイメージング



(b) 結合の絶対値



(c) 相対結合率

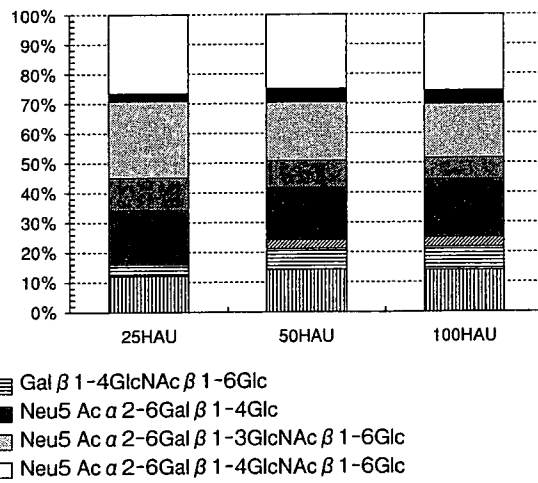


図4 A型インフルエンザウイルス福岡株 [A/Fukuoka/C 29/85 (H3N2)] のアレイタイプシュガーチップへの結合挙動

(a) SPR イメージング；(b) 結合の絶対値；(c) 相対結合率。チップ上のアドレス(括弧内)にスポットした糖鎖リガンド複合体は以下の通り。Gal β 1-4 Glc-mono(A)；Gal β 1-4 GlcNAc β 1-6 Glc-mono(B)；Neu 5 Ac α 2-3 Gal β 1-4 Glc-mono(C)；Neu 5 Ac α 2-6 Gal β 1-4 Glc-mono(D)；Neu 5 Ac α 2-3 Gal β 1-3 GlcNAc β 1-6 Glc-mono(E)；Neu 5 Ac α 2-6 Gal β 1-3 GlcNAc β 1-6 Glc-mono(F)；Neu 5 Ac α 2-3 Gal β 1-4 GlcNAc β 1-6 Glc-mono(G)；Neu 5 Ac α 2-6 Gal β 1-4 GlcNAc β 1-6 Glc-mono(H)。

を算出した (b)。当然のことながら、HA 価が大きいほど、結合値は大きくなっている。ここで、(b) の絶対結合値を相対結合率に直すと、HA 価によらずそれぞれの糖鎖への相対結合率はほぼ同じであることが分かった (c)。そこで、ウイルスの種類を増やし、同じ系でウイルスの 8 種の糖鎖への相対結合率を測定することとした。現在までに、約 20 種類のインフルエンザウイルス株を対象とした測定を終了し、データベースの作成とそれに基づくウイルス株の識別アルゴリズム作成を開始している。

5 おわりに

アレイタイプの糖チップ (シュガーチップ) は、本稿で述べたインフルエンザウイルス株の同定など、今までの抗体を用いた方法では識別できなかった対象物の新しい検査・診断法に応用できる可能性がある。我々はインフルエンザウイルス以外のウイルスや、各種細菌の識別、さらには細胞表層の変化をアレイタイプのシュガーチップで観測する系を構築している。現在の実験上の問題点は、比較的大量のサンプル量 (約 $300\mu\text{l}$) が必要であること、測定時のハンドリングが悪いこと、さらに測定方法が SPR イメージングであるため、定量化する際のダイナミックレンジが小さいことである。特に、後者は解離定数を求める時等に正確さを欠くときがあるので、我々はアレイタイプのシュガーチップは主としてスクリーニングに用いて、定性的情報を得るために使用し、正確な解離定数等は前述した 2 チャンネルの SPR 機器を使用して求めている。また、前者 2 つの問題をも一気に解決するために、我々は局所プラズモン共鳴法を原理とした光ファイバー型 SPR を別途開発しており、近い将来はそれに変えていきたいと考えている。

文 献

- 1) Varki, A. in *Essentials of Glycobiology*, (Eds.: Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, pp. 57-68, and references therein. (1999)
- 2) Suda, Y., Arano, A., Fukui, Y., Koshida, S., Wakao, M., Nishimura, T., Kusumoto, S., and Sobel, M., Immobilization and Clustering of Structurally Defined Oligosaccharides for Sugar Chips: An Improved Method for Surface Plasmon Resonance Analysis of Protein-Carbohydrate Interactions, *Bioconjug. Chem.*, **17**, 1125-1135 (2006)
- 3) Skehel, J. J., Wiley, D. C., Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 531-569 (2000)

- 4) Ito, T., Couceiro, J. N., Kelm, S., Baum, L. G., Krauss, S., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J. C., Webster, R. G., Kawaoka, Y., Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential, *J. Virol.*, **72**, 7367-7373 (1998)
- 5) Gamblin, S. J., Haire, L. F., Russell, R. J., Stevens, D. J., Xiao, B., Ha, Y., Vasisht, N., Steinhauer, D. A., Daniels, R. S., Elliot, A., Wiley, D. C., Skehel, J. J., The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin, *Science.*, **303**, 1838-1842 (2004)
- 6) Gagneux, P., Cheriyan, M., Hurtado-Ziola, N., van der Linden, E. C., Anderson, D., McClure, H., Varki, A., Varki, N. M., Human-specific regulation of alpha 2-6-linked sialic acids. *J. Biol. Chem.*, **278**, 48245-48250 (2003)
- 7) Ryan-Poirier, K., Suzuki, Y., Bean, W. J., Kobasa, D., Takada, A., Ito, T., Kawaoka, Y., Changes in H3 influenza A virus receptor specificity during replication in humans, *Virus Res.*, **56**, 169-176 (1998)

Treatment with an adenoviral vector encoding hepatocyte growth factor mitigates established cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy

Masayasu Esaki,¹ Genzou Takemura,¹ Ken-ichiro Kosai,² Tomoyuki Takahashi,² Shusaku Miyata,¹ Longhu Li,¹ Kazuko Goto,¹ Rumi Maruyama,¹ Hideshi Okada,¹ Hiromitsu Kanamori,¹ Atsushi Ogino,¹ Hiroaki Ushikoshi,¹ Shinya Minatoguchi,¹ Takako Fujiwara,³ and Hisayoshi Fujiwara¹

¹Division of Cardiology, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu; ²Division of Gene Therapy and Regenerative Medicine, Cognitive and Molecular Research Institute of Brain Diseases, Kurume University, Kurume; and ³Department of Food Science, Kyoto Women's University, Kyoto, Japan

Submitted 22 September 2007; accepted in final form 7 December 2007

Esaki M, Takemura G, Kosai K-i, Takahashi T, Miyata S, Li L, Goto K, Maruyama R, Okada H, Kanamori H, Ogino A, Ushikoshi H, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Treatment with an adenoviral vector encoding hepatocyte growth factor mitigates established cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1048–H1057, 2008. First published December 14, 2007; doi:10.1152/ajpheart.01102.2007.—Hepatocyte growth factor (HGF) reportedly exerts beneficial effects on the heart following myocardial infarction and during nonischemic cardiomyopathy, but the precise mechanisms underlying the latter have not been well elucidated. We generated nonischemic cardiomyopathy in mice by injecting them with doxorubicin (15 mg/kg ip). Two weeks later, when cardiac dysfunction was apparent, an adenoviral vector encoding human HGF gene (Ad.CAG-HGF, 1×10^{11} particles/mouse) was injected into the hindlimb muscles; LacZ gene served as the control. Left ventricular dilatation and dysfunction normally seen 4 wk after doxorubicin administration were significantly mitigated in HGF-treated mice, as were the associated cardiomyocyte atrophy/degeneration and myocardial fibrosis. Myocardial expression of GATA-4 and a sarcomeric protein, myosin heavy chain, was downregulated by doxorubicin, but the expression of both was restored by HGF treatment. The protective effect of HGF against doxorubicin-induced cardiomyocyte atrophy was confirmed in an *in vitro* experiment, which also showed that neither cardiomyocyte apoptosis nor proliferation plays significant roles in the present model. Upregulation of c-Met/HGF receptor was noted in HGF-treated hearts. Among the mediators downstream of c-Met, the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) was reduced by doxorubicin, but the activity was restored by HGF. Levels of transforming growth factor- β 1 and cyclooxygenase-2 did not differ between the groups. Our findings suggest the HGF gene delivery exerts therapeutic antiatrophic/degenerative and antifibrotic effects on myocardium in cases of established cardiac dysfunction caused by doxorubicin. These beneficial effects appear to be related to HGF-induced ERK activation and upregulation of c-Met, GATA-4, and sarcomeric proteins.

heart failure

THE ANTINEOPLASTIC DRUG doxorubicin is highly effective against a broad spectrum of hematogenous and solid human malignancies, but its clinical use is limited by its adverse side effects: irreversible degenerative cardiomyopathy and congestive heart failure (29, 32). Much effort has gone into the

search for treatments able to reduce or eliminate the risk of doxorubicin-induced cardiomyopathy and congestive heart failure (11, 31, 33), but so far the ability of these treatments to protect the heart from damage has been varied and limited.

Hepatocyte growth factor (HGF), which was originally identified and cloned as a potent mitogen for hepatocytes (25, 26), has been shown to exert mitogenic, angiogenic, antiapoptotic, and antifibrotic effects in various cell types, especially in epithelial and endothelial cells (5, 14). Moreover, HGF also reportedly exhibits cardioprotective effects. For instance, HGF protected cardiomyocytes from acute ischemic death during myocardial infarction (27, 36), and it enhanced survival among cardiomyocytes subjected to oxidative stress (13, 36). In addition to its beneficial effects on cardiomyocytes under acute stress, recent research has demonstrated that HGF also exerts beneficial effects on cardiac function in animal models of chronic heart diseases, including ischemic cardiomyopathy following old myocardial infarction and hereditary cardiomyopathy (18, 28, 34). In those cases, the main mechanisms appeared to be a hypertrophic effect on cardiomyocytes as well as angiogenic and antifibrotic actions. More recently, Iwasaki et al. (12) reported that HGF prevents cardiac dysfunction in an animal model of doxorubicin-induced cardiomyopathy. In that study, however, HGF was administered as the protein form, and the delivering method of HGF was very specific (intravenous injection of HGF delivered by ultrasound-mediated destruction of microbubbles). The effect of the HGF gene therapy has not been reported so far on established cardiac dysfunction due to doxorubicin cardiomyopathy.

Our hypothesis in the present study was that late treatment with HGF gene transfer can mitigate established heart failure brought on by doxorubicin-induced cardiomyopathy. To test that idea, we used an adenoviral vector to transfer the human (h)HGF gene into mouse hindlimbs (systemic transfection) 2 wk after doxorubicin injection, a time at which cardiac dysfunction was already apparent. We then examined the effects of the gene on the progression of heart failure during a more chronic stage and investigated the specific mechanisms involved.

Address for reprint requests and other correspondence: G. Takemura, Div. of Cardiology, Gifu Univ. Graduate School of Medicine, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1194, Japan (e-mail: gt@gifu-u.ac.jp).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

MATERIALS AND METHODS

Recombinant adenoviral vectors. The adenoviral vector plasmid pAd-HGF, which is comprised of the cytomegalovirus immediate early enhancer, a modified chicken β -actin promoter, rabbit β -globin polyA (CAG) and hHGF cDNA (Ad.CAG-HGF), was constructed using the *in vitro* ligation method described previously (18, 21). Control Ad-LacZ (Ad.CAG-LacZ) was prepared as described previously (7).

Measurement of hHGF levels. hHGF levels in plasma and tissues ($n = 3$ to 4/group) were measured using an ELISA kit (Institute of Immunology) as previously reported (18).

Experimental protocols. This study was approved by our Institutional Animal Research Committee and conformed to the animal care guidelines of the American Physiological Society. Cardiomyopathy was induced in 10-wk-old male C57BL/6J mice (Chubu Kagaku, Nagoya, Japan) by a single intraperitoneal injection of doxorubicin (doxorubicin hydrochloride, Kyowa Hakko, Tokyo, Japan) at a dose of 15 mg/kg. We previously confirmed both functionally and histologically that, at that dosage, doxorubicin induces cardiomyopathy in all mice not receiving a therapeutic intervention (16). In sham-operated mice, the same volume of saline was injected in a similar manner.

In the first set of experiments (*protocol 1*), treatment with adenoviral vectors was started 2 wk after saline or doxorubicin injection; Ad.CAG-HGF or Ad.CMV-LacZ at 1×10^{11} particles/mouse was injected into the hindlimb muscles of 10-wk-old male C57BL/6J mice. At that time, mice were assigned to receive saline alone ($n = 11$), doxorubicin plus LacZ gene ($n = 10$), or doxorubicin plus hHGF gene ($n = 9$). Before this assignment, echocardiography was done to reduce any bias among the groups. After an additional 2 wk (4 wk after doxorubicin administration), all mice received a physiological examination and were then euthanized with an overdose of pentobarbital sodium. Cardiac specimens were then collected and subjected to histological, immunohistochemical, and molecular biological analyses.

In a second set of experiments (*protocol 2*), we evaluated the role played by the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) signaling pathway in mediating the effects of the hHGF gene therapy. PD-98059 (Cell Signaling), a MEK1-p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-specific inhibitor (8), was administered intraperitoneally at a dose of $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ for 2 wk to mice given saline or doxorubicin plus hHGF ($n = 7$ each), after which the mice were examined as described in *protocol 1*.

***In vitro* study.** Cardiomyocytes were isolated from 1-day-old neonatal C57BL/6J mice as previously reported (3) and plated on laminin-coated dishes or in slide glass chambers and incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) supplemented with 10% FBS (Sigma) for 48 h at 37°C. Doxorubicin was then added to the medium to a final concentration of $0.1 \mu\text{mol/l}$. Simultaneously, recombinant hHGF (Wako) was added to a concentration of 0, 0.02, 0.2, 2, or 10 ng/ml. For the controls, doxorubicin and/or HGF was replaced with the same volume of saline. Twenty-four hours later, the cells were collected for morphometric and biochemical analyses.

The cardiomyocytes in slide glass chambers were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.05% Triton X, and stained with rhodamine phalloidin and Hoechst 33342 (both from Molecular Probes). Digital images captured using a laser-confocal microscope system (LSM510, Zeiss) were employed for morphometric analysis using Photoshop 7.0 (Adobe Systems). Proteins extracted from cardiomyocytes on dishes were used for Western blot analysis.

Physiological studies. Echocardiography and cardiac catheterization were carried out as described previously with modifications (16). Animals were anesthetized with halothane (induction, 2%; maintenance, 0.5%) in a mixture of N_2O and O_2 (0.5 l/min each) via a nasal mask. Echocardiograms were recorded using an echocardiographic system (Vevo770, Visualsonics) equipped with a 45-MHz imaging

transducer before treatment and at death. Following echocardiography, the right carotid artery was cannulated with a micromanometer-tipped catheter (SPR 671, Millar Instrument) that was advanced into the aorta and then into the left ventricle for recording pressure and maximal and minimal first derivative of pressure ($\pm \text{dP/dt}$).

Histological analysis. Following echocardiography, each heart was removed and cut into three transverse slices. Of those, the middle slice was fixed with 10% buffered formalin and embedded in paraffin, after which 4- μm -thick sections were stained with hematoxylin-eosin or Sirius red F3BA (0.1% solution in saturated aqueous picric acid) (Aldrich). Quantitative assessments, including cell size and cell number, were carried out in randomly chosen high-power fields (HPFs) in each section using a multipurpose color image processor (LUZEX F, Nireco). The fibrotic area was measured by searching the entire ventricle. Cardiomyocyte size (expressed as the transverse diameter of myocytes cut at the level of the nucleus) and cell populations were assessed in 20 randomly chosen HPFs in each section.

Immunohistochemistry. After deparaffinization, the 4- μm -thick sections were incubated with a primary antibody against c-Met/HGF receptor (Santa Cruz), endothelial cells (Flk-1, Santa Cruz), leuko-

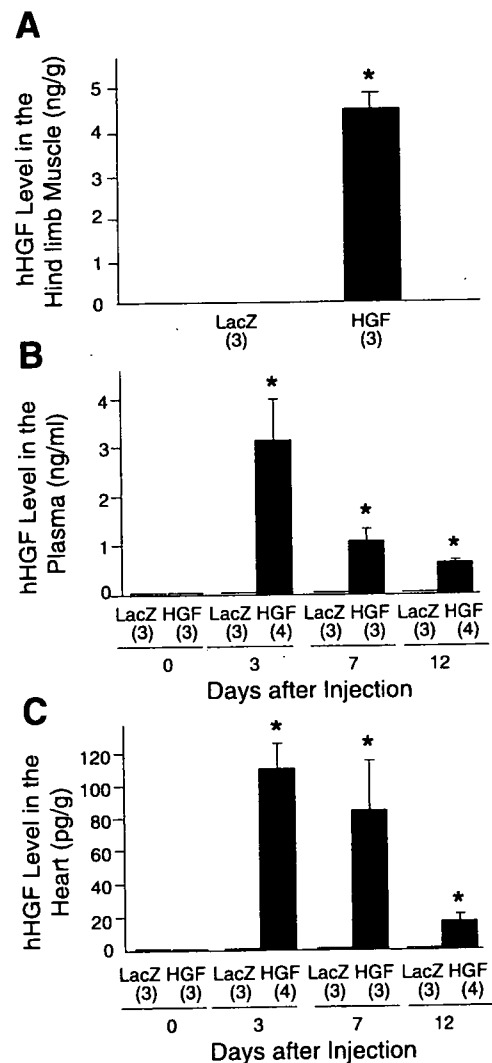


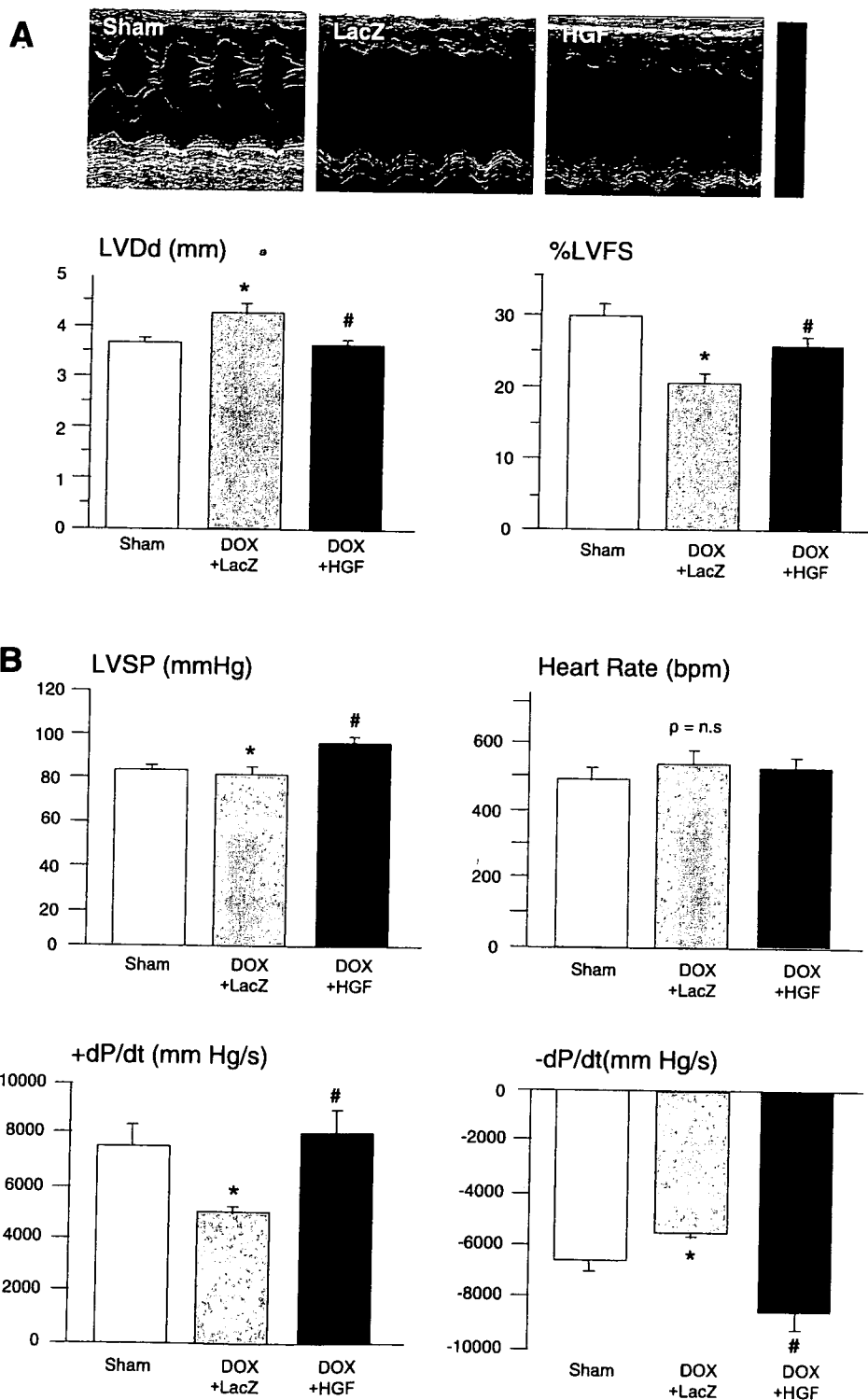
Fig. 1. A: human hepatocyte growth factor (hHGF) levels in the hindlimb muscles of mice injected with adenoviral vector 3 days earlier were detected by ELISA. B: time course of hHGF levels in the plasma of mice after adenovirus injection. C: time course of hHGF levels in the heart. Numbers in parentheses indicate those of animals used per group. * $P < 0.05$ vs. doxorubicin (Dox) + LacZ group.

cytes (CD45, Pharmingen), or Ki-67 (Santa Cruz). A Vectastain Elite ABC system (Vector) was then used to immunostain the sections; diaminobenzidine served as the chromogen, and the nuclei were counterstained with hematoxylin. Quantitative assessments, including the number or area of the immunopositive cells, were made in 20 randomly chosen HPFs using the multipurpose color image processor.

In situ terminal dUTP nick-end labeling (TUNEL) assays were carried out with sections using an ApopTag kit (Chemicon) according to the supplier's instructions. Mouse mammary tissue served as a positive control.

Electron microscopy. Cardiac specimens were immersion fixed overnight in phosphate-buffered 2.5% glutaraldehyde (pH 7.4), post-fixed for 1 h with 1% osmium tetroxide, dehydrated through a graded ethanol series, and embedded in Epon medium. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed in an electron microscope (H700, Hitachi, Tokyo, Japan).

Western blot analysis. Heart tissue lysates were used for Western blot analysis. Proteins were separated and transferred to membranes using standard protocols, after which they were probed using antibodies against GATA-4 and myosin heavy chain (MHC) (both from Santa



Cruz), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1, Promega), cyclooxygenase-2 (Santa Cruz), and Akt or ERK (both from Cell Signaling). Activation of Akt and ERK was assessed using antibodies against the phosphorylated form of Akt (p-Akt) and p-ERK (both from Cell Signaling), respectively. Procaspase-3 and the activated form of caspase-3 were evaluated using anti-caspase-3 antibody (Santa Cruz). Western blot analysis of hHGF was performed using anti-human IgG antibody (DAKO). Three to five hearts from each group were subjected to the blotting. The blots were visualized by means of enhanced chemiluminescence

(Amersham); and the signals were quantified by densitometry. α -Tubulin (analyzed using an antibody from Santa Cruz) served as the loading control.

Immunoprecipitation and Western blot analysis for c-Met. Heart tissue lysates were subjected to immunoprecipitation assays carried out with Ultra-Link Biosupport medium (Pierce) using anti-c-Met antibody (Santa Cruz). Thereafter, the immunoprecipitate was analyzed by Western blot analysis using the same antibody. Three to five hearts from each group and three normal livers were subjected to the assay.

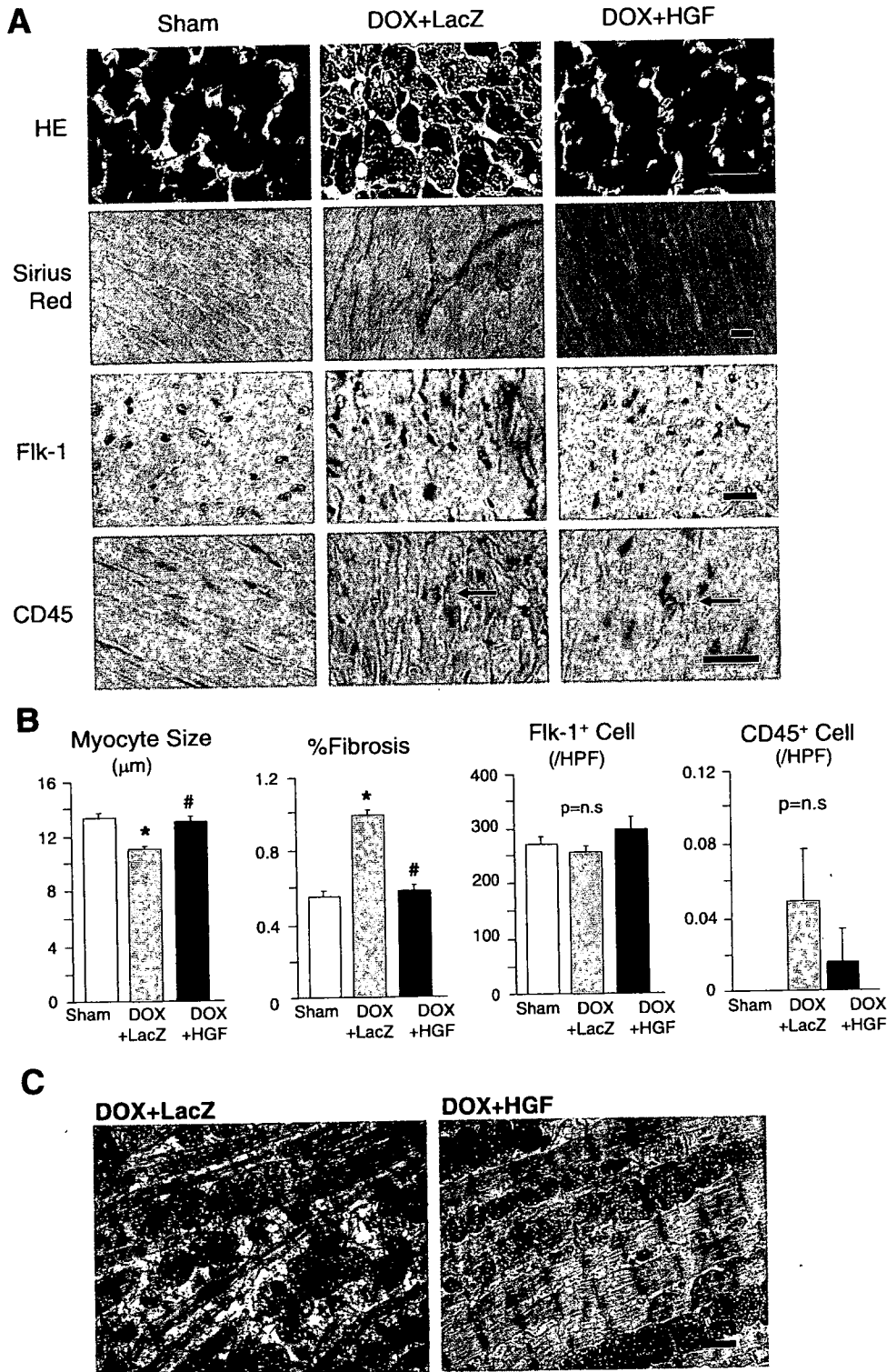


Fig. 3. Effects of hHGF gene delivery on cardiac histology in mice 4 wk after Dox administration (protocol 1). **A**: photomicrographs of histological [hematoxylin-eosin (HE) and Sirius red stained] and immunohistochemical (Flk-1 and CD45) preparations of heart specimens from the indicated groups. Arrows point to immunopositive cells; scale bars, 20 μ m. **B**: morphometric data. * P < 0.05 vs. sham group; # P < 0.05 vs. Dox + LacZ group. **C**: electron photomicrographs of doxorubicin-induced cardiomyopathy treated with LacZ or hHGF gene (bar, 1 μ m).