

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390241

研究課題名（和文）重症心不全・致死性不整脈に対する分子標的療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of Molecular Therapy for Severe Heart Failure and Intractable Fetal Arrhythmia

研究代表者

松崎 益徳 (MATSUZAKI MASUNORI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60116754

研究成果の概要（和文）：

心臓における Ca^{2+} 循環機能の低下は、重症心不全に対する新しい治療標的として注目されている。我々は、心不全時にのみ治療遺伝子が発現するシステムを用いて重症心不全治療が可能なシステムを考案した。ベクターを経静脈的に投与し、心筋への選択的な遺伝子導入に成功した。心筋症マウスでは心不全進行とともに病態特異的な遺伝子発現制御が可能であり、心筋収縮性は3ヶ月以上にわたって改善した。対照群に比べ心筋リモデリングに伴う心拡大が有意に抑制された。心不全誘導型遺伝子治療は今後重症心不全に対する新しい治療戦略として期待される方法である。

研究成果の概要（英文）：

The targeting of Ca^{2+} cycling has emerged as a potential therapy for the treatment of severe heart failure. Here, we developed a novel heart-failure-inducible gene transfer system that inhibits $PP1\beta$ by adeno-associated virus vector 9 (AAV9)-mediated shRNA. AAV9 mediated gene transfer mitigated progressive left ventricular remodeling and ameliorated heart failure progression in muscle LIM protein-deficient (MLPKO) mice cardiomyopathy. Heart failure inducible gene therapy system provides new potential as a strategy of treatment of severe heart failure and intractable fetal arrhythmia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：心臓病態学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：protein phosphatase 1β , adeno-associated virus vector, gene therapy, RNAi, B-type natriuretic peptide promoter

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト心不全に対する **SERCA2a** 遺伝子導入治療の臨床治験が米国で開始され、これまで大きな合併症なく良好な初期成績を収めており新たな心不全治療として期待されている。

ウイルスベクターを使用した遺伝子治療の臨床導入を考慮する上でいくつかの問題がある。それは免疫応答があること、臓器特異性に乏しいこと、そして治療遺伝子発現時期のコントロールができないこと、である。心不全に対してウイルスベクターを使用した遺伝子治療を行うにあたり、心臓特異的に治療遺伝子を発現させるシステム、また心不全増悪時に治療遺伝子が発現するシステムをもつウイルスベクターが必要であるが、現在までのところ開発されていない。そこで我々は **B** 型ナトリウム利尿蛋白(**B-type natriuretic peptide: BNP**)プロモーターに着目した。BNP は心不全の病態を反映するので、BNP プロモーターを使用すれば心不全増悪時(BNP 高値)に働く病態特異的なウイルスベクターを作成することができる。また、AAV9 は他の AAV セロタイプと比べ心臓に高率に導入されるウイルスベクターである。そこで我々は AAV9 と BNP プロモーターを組み合わせることで心不全特異的かつ心臓特異的に作用するウイルスベクターの作成を考案した。

2. 研究の目的

心臓特異的かつ心不全状態でのみ誘導される shRNA 発現アデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus-9: AAV9)による治療が(1)心不全治療システムとして利用可能かどうか、(2)遺伝的心筋症マウスの心不全進行を抑制するかどうかについて検討した。

3. 研究の方法

心筋細胞において Ca^{2+} 循環に最も強く関与することが以前の我々の研究で判明している蛋白ホスファターゼ 1 (PP1) のアイソフォーム、PP1 β 発現を抑制し得る short-hairpin RNA(shRNA) 構造を有した AAV9 と negative control(NC) shRNA を B 型ナトリウム利尿蛋白 (BNP)プロモーターの下流に作成し、emerald-green fluorescence protein(EmGFP)をはさんで遺伝子導入ベクターをデザインした (AAV9-BNP-EmGFP-PP1 β shRNA, AAV9-BNP-EmGFP-NCshRNA)。

AAV9 は尾静脈から一匹当たり 2×10^{11} vp を静脈注射で遺伝子導入を行った。1, 3 ヶ月後に心エコーで心機能評価、3 ヶ月後に左室圧測定後に犠牲死させ、蛋白リン酸化レベルの解析および組織学的解析を行った。

4. 研究成果

BNP プロモーターを使用したベクターシステムが心不全時に誘導されるか検討した(図 1A)。

図 1B に示すように pZAC2.1-BNP-EmGFP-PP1 β shRNA をプラスミドトランスフェクションした HL-1 細胞では PE 濃度依存性に BNP の上昇がみられ、BNP 上昇に伴い GFP 発現が上昇した。このことは BNP 上昇時、すなわち心不全増悪時に EmGFP-PP1 β shRNA が誘導されることを示している。500 μ M PE 刺激下では pZAC2.1-BNP-EmGFP-PP1 β shRNA で誘導された EmGFP は pZAC2.1-CMV-EmGFP-PP1 β shRNA で誘導された EmGFP の約 1/3 であり(図 1C)、BNP プロモーター活性は CMV の約 1/3 と考えら

れた。

AAV9-CMV-LacZ の遺伝子導入 (2×10^{11} vp) 1ヶ月後, MLPKO マウス心臓に 80% 以上の β -gal の発現が確認された。骨格筋, 腎臓, 膵臓でも発現はみられたが少量であった。(図 1D 左, 1F 左)。次に, AAV9-BNP-EmGFP-NCshRNA の MLPKO マウス, 正常マウスでの遺伝子導入効率をみたところ MLPKO マウスでは心筋に EmGFP の発現が確認された(図 1D 中)が, 一方で正常マウスでは EmGFP の発現はみられなかった(図 1D 右)。

AAV9-BNP-EmGFP-NCshRNA を遺伝子導入した MLPKO マウスでは心臓以外の臓器(骨格筋, 腎臓, 肝臓, 膵臓, 脾臓, 肺)では EmGFP の発現はみられず, AAV9-CMV-LacZ を遺伝子導入したマウスでは骨格筋, 腎臓, 膵臓で β -gal の発現が認められた(図 1F)。このことは BNP プロモーターの作用によって, より心臓特異的に遺伝子導入が可能であることが示唆された。AAV9-BNP-EmGFP-PP1 β shRNA 導入群において遺伝子導入 3ヶ月後に%FS が改善し, LVDD が縮小し, LVPWs に厚みがでた(図 5A, B)。さらに左室壁張率が有意に改善した。特に左室拡張末期圧が改善し, 拡張期 LV 圧一次導関数波形がコントロール群で凹型であるのに対して PP1 β 抑制群凸型になっていた。また AAV9-BNP-PP1 β shRNA 遺伝子導入により-dP/dt と Tau が有意に改善していた。また, PP1 β shRNA 治療群では, BNP の発現が有意に減少していた。心筋間質線維化は PP1 β 遺伝子抑制群で有意に減少がみられた。

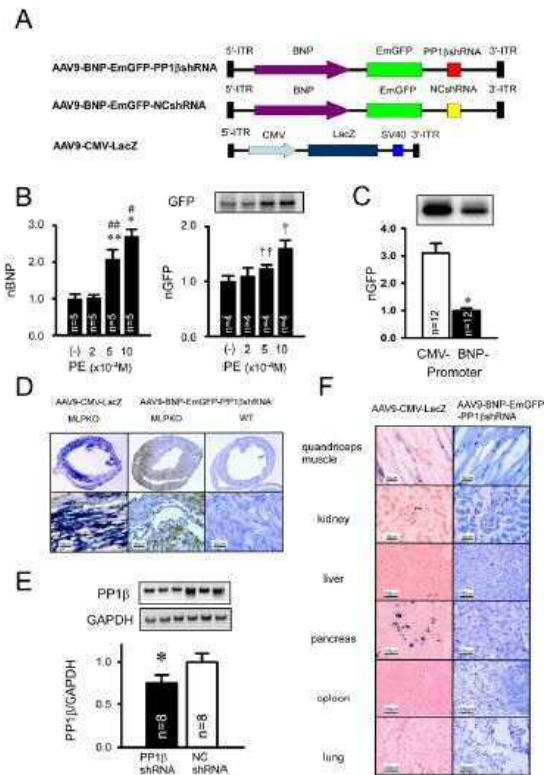


図 1. AAV9 ウイルスベクターによる心不全誘導 PP1 β 遺伝子抑制 :

- A. AAV9 ウイルスベクターの構造
 B. HL-1 細胞において BNP 上昇とともに EmGFP 発現上昇が認められた。* $p < 0.001$ vs. PE(-), ** $p < 0.05$ vs. PE 2×10^{-4} M, # $p < 0.001$ vs. PE 1×10^{-4} M, ## $p < 0.01$ vs. 2×10^{-4} M, † $p < 0.05$ vs. PE(-), †† $p < 0.05$ vs. PE 2×10^{-4} M
 C. HL-1 細胞で 500 μ M の PE 刺激下では BNP プロモーターによる EmGFP 発現は CMV プロモーターでの EmGFP 発現の約 1/3 であった* $p < 0.01$ vs. CMV プロモーター群
 D, F. AAV9-BNP ベクターは心臓特異的心不全特異的に EmGFP の発現がみられた
 E. AAV9 遺伝子導入により PP1 β は約 25%抑制された。* $p < 0.05$ vs. NCshRNA 群

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① Miyazaki Y, Ikeda Y, Shiraishi K, Fujimoto N.S., Aoyama H, Yoshimura K, Inui M, Hoshijima M, Kasahara H, Aoki H, and Matsuzaki. M Heart Failure-Inducible Gene Therapy Targeting Protein Phosphatase 1 Prevents Progressive Left Ventricular

- Remodeling PLoS ONE 7(4): e35875, 2012
doi:10.1371/journal.pone.0035875 (equal contribution, corresponding author) 査読有
- ② 松崎益徳, 斎藤能彦, 池田安宏. わが国の慢性心不全治療におけるメインテートの効能追加のインパクト 臨床のあゆみ, 田辺三菱製薬 89: 21-24, 2011. 査読無
- ③ Suetomi T, Yano M, Uchinoumi H, Fukuda M, Hino A, Ono M, Xu X, Tateishi H, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Mutation-linked defective interdomain interactions within ryanodine receptor cause aberrant Ca channel release leading to catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circulation. 2011 Aug 9;124(6):682-94. 査読有
- ④ Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H. TRPC3-mediated Ca²⁺ influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts Biochem Biophys Res Commun. 2011 May 27;409(1):108-13. Epub 2011 May 3. 査読有
- ⑤ Aoyama H, Ikeda Y, Miyazaki Y, Yoshimura K, Nishino S, Yamamoto T, Yano M, Inui M, Aoki H, Matsuzaki M. Isoform-Specific Roles of Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunits in Sarcoplasmic Reticulum-Mediated Ca²⁺ Cycling. Cardiovasc Res. 2011 Jan 1;89(1):79-88. Epub 2010 Jul 31. Ikeda Y corresponding author, (*equal contribution) 査読有
- ⑥ 松崎益徳, 池田安宏, 大草知子, 矢野雅文. 【ガイドラインに基づいた心不全の非薬物療法】トピックス 慢性心不全治療ガイドライン 2010 年改訂版における改訂ポイント CARDIAC PRACTICE, メディカルレビュー社 22(1): 15-20, 2011. 査読無
- ⑦ 池田安宏, 松崎益徳. 慢性心不全治療ガイドライン 2010 の改訂ポイント循環器内科, 科学評論社 70(1): 91-97, 2011. 査読無
- ⑧ 池田安宏, 宮崎要介, 松崎益徳. 特集II 第74回日本循環器学会学術集会 4. 拡張不全とリモデリングの分子機序 不全心の収縮・拡張性を規定する細胞内リン酸化調節異常と治療標的 循環器専門医, 日本循環器学会 19(1): 73-79, 2011. 査読無
- ⑨ Uchinoumi H, Yano M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor. Circ Res. 2010 Apr 30;106(8):1413-24. Epub 2010 Mar 11. 査読有
- ⑩ Xu X, Yano M, Uchinoumi H, Hino A, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ikemoto N, Matsuzaki M. Defective calmodulin binding to the cardiac ryanodine receptor plays a key role in CPVT-associated channel dysfunction. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Apr 9;394(3):660-6. Epub 2010 Mar 10. 査読有

- ⑪ Onoda M, Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Morikage N, Furutani A, Matsuzaki M, Hamano K. Lysyl oxidase resolves inflammation by reducing monocyte chemoattractant protein-1 in abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2010 Feb;208(2):366-9. Epub 2009 Jul 23. 査読有
- ⑫ 池田安宏, 宮崎要介, 松崎益徳. 【心不全研究と臨床の最前線】心不全の最先端研究トピックス 心不全に対する遺伝子治療研究—分子標的治療とそのターゲット 医学のあゆみ, 医歯薬出版 232(5): 626-632, 2010. 査読無
- ⑬ 池田安宏, 松崎益徳. 慢性心不全の治療の変遷と新しい分子標的治療法の開発 日本医事新報, 日本医事新報社 4449: 74-75, 2009. 査読無

[学会発表] (計 10 件)

- ① 池田安宏 心筋内 Ca 循環とリン酸化異常を標的とした心不全の遺伝子治療 2012 年度岡崎生理学研究所, 生理学研究会 2011/11/29 岡崎カンファレンスセンター 岡崎市
- ② Miyazaki Y, Ikeda Y, Shiraishi K, Aoki H, Matsuzaki M. In vivo Heart failure inducible suppression of protein phosphatase 1b mitigates heart failure progression in cardiomyopathic mice. Best poster award of subspeciality AHA annual scientific meeting, 2011/11/14-16, Orlando, U.S.A.
- ③ Ikeda Y, Ohkusa T, Yano M, Matsuzaki M. Revision points and remaining issues to be solved in the updated guidelines for treatment of chronic heart failure. The 15th Annual Scientific Meeting of the Japanese Heart Failure Society, 2011/10/14 Kagoshima, Kagoshima Prefectural Citizens Exchange Center
- ④ 池田安宏. 「心不全心筋細胞の Ca²⁺循環を標的とした分子治療」第 45 回河口湖心臓討論会, 2011/7/23-24 富士河口湖町, 富士ビューホテル
- ⑤ Miyazaki Y, Ikeda Y, Shiraishi K, Aoki H, Matsuzaki M. In vivo Heart failure inducible suppression of protein phosphatase 1b mitigates heart failure progression in cardiomyopathic mice. Basic Cardiovascular Sciences Annual Conference 2011/7/18-21, New Orleans, U.S.A.
- ⑥ Miyazaki Y, Ikeda Y, Aoyama H, Shiraishi K, Yoshimura K, Yano M, Aoki H, Matsuzaki M. In Vivo inducible suppression of phosphatase 1β ameliorates cardiac dysfunction in mouse cardiomyopathy. 19th International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society, 2010/9/23-26. Fukuoka, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine
- ⑦ Ikeda Y, Aoyama H, Miyazaki Y, Shiraishi K, Yoshimura K, Nishino S, Yamamoto T, Yano M, Inui M, Aoki H, Matsuzaki M. Isoform-specific role of protein phosphatase 1 catalytic subunits in sarcoplasmic reticulum-mediated ca²⁺ cycling. 19th International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society, 2010/9/23-26. Fukuoka, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine
- ⑧ 池田安宏. 「心筋収縮と細胞内脱リン酸化

制御」第2回研究推進体「ストレス」フォーラム, 2010/9/8. 宇部, 山口大学

- ⑨ Ikeda Y, Aoyama H, Miyazaki Y, Yoshimura K, Yamamoto T, Yano M, Matsuzaki M. Isoform-specific role of protein phosphatase 1 catalytic subunits in sarcoplasmic reticulum mediated Ca^{2+} cycling in cardiomyocytes. 20th World Congress of the International Society for Heart Research, 2010/5/13-15. Kyoto, Kyoto International Conference Center
- ⑩ Miyazaki Y, Ikeda Y, Aoyama H, Shiraiishi K, Yoshimura K, Yano M, Aoki H, Matsuzaki M. Protein phosphatase 1 β is critical to determine cardiac diastolic function in cardiomyopathic mice. 20th World Congress of the International Society for Heart Research, 2010/5/13-15. Kyoto, Kyoto International Conference Center

[図書] (計 3件)

- ① 池田安宏, 松崎益徳. 医学書院, 糖尿病と心臓病 基礎知識と実践患者管理 Q&A (第II章 糖尿病に合併する循環器疾患 3 心不全と糖尿病) 2010, 102-110.
- ② Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Springer, Advances in Understanding Aortic Diseases. (Regression of Abdominal Aortic Aneurysms through Pharmacologic Therapy.) 2009, 43-49.
- ③ 池田安宏, 松崎益徳. 最新医学社, 最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC 64 心臓突然死 (第2章 病理・病態 心不全と心臓突然死) 2009, 70-78.

[産業財産権]
○出願状況 (計 1件)

名称: ホスホランパン標的修飾 RNA アプタマー
発明者: 乾 誠, 池田安宏, 松崎益徳他
権利者: 山口大学
種類: 特許
番号: 特願 2012-028555
出願年月日: 2012/2/13
国内外の別: 国内

[その他]
ホームページ等
<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~ninai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 益徳 (MATSUZAKI MASUNORI)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60116754

(2) 研究分担者

池田 安宏 (IKEDA YASUHIRO)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 00260349
矢野 雅文 (YANO MASAFUMI)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 90294628
山本 健 (YAMAMOTO TAKESHI)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 50363122
上山 剛 (UEYAMA TSUYOSHI)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60380010

(3) 研究協力者

宮崎 要介 (山口大学大学院生)
青山 英和 (山口大学大学院生)
白石 宏造 (山口大学大学院生)
西野 静香 (山口大学技術補佐員)