

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08043

研究課題名(和文) 心筋疾患に対する新たな臨床応用可能な核酸医療薬の開発と評価

研究課題名(英文) Development and Evaluation of New Clinically Applicable Nucleic Acid Drugs for Myocardial Diseases

研究代表者

尾上 健児 (Onoue, Kenji)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：90510173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：特発性心筋症などの心筋疾患は、その病態が徐々に解明されてきた。一方で治療方法は対症療法しかなく、原因療法の開発が望まれている。本研究では、遺伝子異常により不足する正常蛋白質を核酸により補充する原因療法を開発し、臨床応用可能な核酸医療薬確立を目的とした。拡張型心筋症を呈するラミン(Lmna)遺伝子ノックアウトマウスに対し、生直後に野生型ラミンmRNAを投与し治療効果を検証した。しかしこの方法では心臓への効果的なデリバリーができず、AAVを用いたデリバリーに変更した。その結果、ラミン発現群でコントロールに対し生存期間の延長が認められ、心機能の改善も認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、遺伝性心筋症や蓄積病といった心筋疾患を呈するマウスモデルを対象に、遺伝子異常により不足している正常蛋白質を核酸により補充するという新たな原因療法を開発することを目的とした。すなわち特発性心筋症をはじめとした心筋疾患治療において新たな臨床応用可能な核酸医療薬を確立することである。現時点では有望な結果が得られ、さらに臨床応用可能なデリバリーや投与形態を模索中である。これらが完成すれば、本研究の成果は今後の心筋症診療のみならず、全ての遺伝性疾患の診療に応用でき、新たな原因療法となりうる。多くの患者治療に変革をもたらす非常に重要な研究になると考える。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of myocardial diseases such as idiopathic cardiomyopathy has been gradually elucidated. On the other hand, only symptomatic treatment is available, and the development of a causative therapy is desired. The aim of this study was to develop a causative therapy that replenishes normal proteins that are lacking due to genetic abnormalities using nucleic acids, and to establish a nucleic acid medicine that can be applied clinically. We tested the therapeutic effect of wild-type lamin mRNA by administering it immediately after birth to lamin (Lmna) gene knockout mice with dilated cardiomyopathy. However, effective delivery to the heart could not be achieved by this method, so we changed to AAV-based delivery. As a result, the Lamin-expressing group showed prolonged survival and improved cardiac function compared to the control.

研究分野：循環器内科

キーワード：特発性心筋症 核酸医療薬 原因療法 遺伝性疾患

### 1. 研究開始当初の背景

心臓病は日本人死因の第2位を占め、早世によって健康寿命を全うできずに失われた寿命の長さを表す標準早死損失年では、がん、不慮の事故、自殺に次いで4番目に損害の大きい死因である。その中で重要な位置を占める特発性心筋症は、心内腔の拡張と収縮不全を主兆候とする拡張型心筋症と、心筋の著明な肥大を主兆候とする肥大型心筋症に大別される。人口10万人当たりの有病率は前者で14人から100人以上、後方で17人から400人程度と統計により幅が認められるが、遺伝性の場合には若年から心不全・突然死の要因となる。また、これら特発性心筋症に代謝性疾患や全身炎症性疾患などを原因とした二次性心筋症を加えた心筋疾患は人口の高齢化に伴い近年増加傾向にあり、その診断および有効な治療法の確立は健康政策上も重要な課題である。そのため原因に即した根本的な治療方法の開発が望まれている。

1990年、ハーバード大学の Seidman らにより心筋構成蛋白の遺伝子異常が肥大型心筋症に認められることが報告されて以降、多くの遺伝子異常が心筋症の原因となることが明らかとなり、現在では拡張型心筋症の約3割が、肥大型心筋症では半数以上が遺伝子異常を原因とすることがわかってきた。同時にその発症機序の解明も進み、心筋症の病態は次第に明らかにされてきている。一方、その治療法は臨床的には薬物療法、機械的補助療法があり、これら医療技術の進歩により、次第に患者予後は向上している。しかし、いずれの治療法も発症機序に即した原因療法ではなくあくまで対症療法であり、一定の心イベント抑制効果、生命予後改善効果は認められるものの、次第に病勢が進行した場合、最終的には究極的対症療法ともいべき心臓移植しか治療法が残されていないのが現状である。さらに、2010年に改正臓器移植法が施行された後、本邦でも心臓移植の件数は増加したものの、未だ年間50例前後に過ぎず、心臓移植待機中に亡くなる例もまれではない。従って、根本的に病因を取り除くような原因治療を含め、新たな治療法が開発が待たれている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝性心筋症や蓄積病といった心筋疾患を呈するマウスモデルを対象に、遺伝子異常により不足する正常蛋白質を補充することによる原因療法を開発し、特発性心筋症をはじめとした心筋疾患治療において新たな臨床応用可能な核酸医療薬を開発することである。

### 3. 研究の方法

遺伝子異常に起因する蛋白異常および蛋白発現低下を mRNA 投与による正常蛋白質により補充し、心筋疾患を今までにない全く新たなアプローチで原因治療を行うことを目指した。まずは、研究協力者である Seidman 研究室所属の脇本博子博士から譲渡をうけた拡張型心筋症を発症するラミン異常マウスを対象に mRNA 投与による蛋白補充療法を行い表現形の改善を試みた。mRNA 投与による蛋白発現法は研究分担者である東京医科歯科大学の位高啓史教授らにより開発が行われてきた。RNA の標的臓器へのデリバリー法は、mRNA を高分子ポリマーによるミセルで内包し生体内に投与する。これにより mRNA は RNase による分解から守られ、また免疫系の賦活化を生じることなく標的細胞に到達し、目的蛋白を発現する。我々は位高教授らの考案したこの mRNA 投与法を心疾患に初めて適用し、これまでに核膜内側に存在しその異常が拡張型心筋症をきた

すことが知られているラミン遺伝子(*Lmna*)異常心筋症モデルマウスを治療対象として、正常なラミン蛋白を補充し原因療法を行なうことを試みた。

#### 4 . 研究成果

初年度は拡張型心筋症を発症するモデルマウスである核膜内側に存在するラミン蛋白をコードする *Lmna* 遺伝子ノックアウトマウスに対し、生直後に正常野生型ラミン mRNA 内包ミセルを投与し、野生型ラミン蛋白を発現させて治療効果を検証する方針とした。*Lmna* KO マウスは異常アレルを2本有すると、すなわち homozygous な遺伝子異常を有すると、拡張型心筋症を発症するのみならず、成長障害を呈し、5-6 週齢で死亡する。この homozygous *Lmna* KO マウスに対し、正常野生型ラミン mRNA を投与し表現形の改善を期待した。マウス心臓へ様に mRNA をデリバリーするために大動脈を一時的に結紮して心腔内に mRNA を投与し、経冠動脈的に mRNA を投与しようと試みたが、効果的なデリバリーは行うことができず、デリバリー法の再検討を要した。2 年目は、ラミン蛋白の補充による治療効果を検証するため、アデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus; AAV)を用いて正常ラミン蛋白を補充し、表現形の改善効果を検証した。AAV を用い、ラミン mRNA を効率よく心筋内で発現するシステムを開発し、実際に投与を行なったところ、ラミン発現群でコントロールマウスに対し生存期間の延長が認められ、心機能の改善も認められた。以上の結果をまとめ、学会発表を行い、論文作成を進めているとともに、現在さらに詳細なメカニズムを解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 尾上健児
2. 発表標題 ラミン異常と心筋症のフェノタイプ
3. 学会等名 第5回日本心筋症研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原邑、尾上健児
2. 発表標題 The treatment of Lmna-associated DCM with AAV improved the prognosis in our mouse model
3. 学会等名 The 4th JCS council forum on basic cardiovascular research（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 尾上健児、斎藤能彦（企画 小室一成）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 130
3. 書名 遺伝性心血管疾患の全て	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	位高 啓史  (Itaka Keiji)  (60292926)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授    (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
シンガポール	National University of Singapore			