

平成 23 年 3 月 3 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20790981
研究課題名（和文） 不全心機能改善を目的とした AAV9-D1NLS/CDK4 による心筋細胞増殖誘導
研究課題名（英文） Introduction of AAV9-D1NLS/CDK4 to failure heart to amplify matured myocardium

研究代表者
宮城 直人（MIYAGI NAOTO）
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40463913

研究成果の概要（和文）：

本研究は D1NLS/CDK4 遺伝子を、AAV9 をベクターとして正常ラット・ハムスター及びラット心筋梗塞モデル、拡張型心筋症ハムスター心筋へ導入、心筋細胞増殖を行うモデルであったが、D1NLS/CDK4 遺伝子を AAV9 の plasmid へ導入する段階及び D1NLS/CDK4 遺伝子を導入した AAV9 を増幅する過程で、D1NLS/CDK4 遺伝子を組み込んだ後 AAV9 plasmid 及び AAV9 自体の、D1NLS/CDK4 の発現が十分には確認できなかった。遺伝子サイズの問題が大きいと思われるが、その他の理由としては今回選択した promoter が心筋での発現には適していなかったことも可能性として考えられる。組み込んだ後の in vitro での発現実験において確認が取れなかったため、このままの状態では AAV9 への組み込むことは困難と判断した。

そのため D1NLS/CDK4 遺伝子を含んだ plasmid を直接正常ラットの尾静脈より注入（n=5）、ラット心筋での D1NLS/CDK4 遺伝子の発現を調べたが、発現は認められなかった。

現在、promoter を変えた(CMV promoter) D1NLS/CDK4 plasmid を作成中であり、発現が確認できた時点で AAV9 の増幅をおこなう予定である。他の promoter(CMV 等) および遺伝子(lacZ 等)では、AAV9 ベクターで in vitro、in vivo でも問題なく発現していることは確認済みであるため、CMV と D1NLS/CDK4 の相性の問題がクリアできれば、導入実験は可能であると考えている。

研究成果の概要（英文）：

This study was planned to introduce AAV9-D1NLS/CDK4 to healthy rat and hamster heart, rat infarcted heart and DCM hamster to amplify matured myocardium. At the step of introduce D1NLS/CDK4 gene to AAV9 plasmid and after amplifying plasmid, expression of D1NLS/CDK4 gene expression was not detected. This result was because of size of D1NLS/CDK4 gene and it seemed to be difficult to introduce D1NLS/CDK4 gene to AAV9.

After the difficulty was revealed, the plasmid including D1NLS/CDK4 gene was injected to rat through rat tail vein (n=5), and expression of D1NLS/CDK4 gene was

examined in rat heart, but the expression was not detected.
Now change of promoter has been tried to clear the mismatch between D1NLS/CDK4 gene and AAV9 vector.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心臓大血管外科

1. 研究開始当初の背景

重症虚血性心疾患や拡張型心筋症など、末期心不全に対する治療として、遺伝子治療は将来、臨床応用可能な治療として期待されている。心筋細胞に対する遺伝子導入を担う vector として、adenovirus が基礎研究及び臨床治療で広く用いられているが、その一方、adenovirus 自体の病原性による副作用の報告、またその免疫原性によって遺伝子の発現が2週間以内で消退してしまう欠点を認めている。その欠点を補い、発現期間の延長を期待できる vector として、adeno-associated virus(AAV)が発見され、更にその plasmid の改変により、心筋細胞に親和性の高い serotype の開発も進んでいる。

申請者が以前行った研究で、ラットの心移植モデルを用い、移植心への AAV1,2,5 の移植心への遺伝子導入効率を比較検討した。3種の serotype のうちでは AAV1 が最も心筋親和性が高く、また、少なくとも3ヶ月間は遺伝子発現を確認することができた。しかし導入効率は未だ不十分であるた

め、本研究では、心筋親和性の高い AAV9 を用いることを計画した。今回の共同実験者である University of Pittsburgh School of Medicine, Department of Molecular Genetics and Biochemistry の Dr.Nakai のグループは、マウスの尾静脈より CMV-AAV9-LacZ を静脈注射すると、ウイルス量の増加に伴って心筋への LacZ 導入効率が上がること、また 3×10^{11} vg/mouse 以上で、ほぼ 100%の心筋細胞に LacZ 遺伝子を導入できるという、今までに無い結果を示した。

Dr. Nakai との共同研究として行なった今回の予備実験では、ラットの心移植モデルを用い、移植心に AAV9 を用いて LacZ 遺伝子を導入した。ドナー心を摘出後、CMV-AAV-LacZ を混入した 4 の心筋保護液で、摘出心を 20 分灌流し、その後レシピエントの腹部に移植した。10日後と3ヶ月後に移植心を摘出し、LacZ の発現を観察すると、非生理的な(ポンプによる還流、4)条件にも関わらず、 10^{13} vg/ml のウイルス量で、最大 71.74%の導入効率を得

ることができた。更に導入効率、ELISA による β -galactosidase の定量測定でも、ウイルス量増加に伴ってそれぞれ増加することが示された。本研究では、AAV9 を用い導入効率を上げると共に治療遺伝子の導入を検討している。今回の共同研究者である東京医科歯科大学難治疾患研究所遺伝生化学分野の北嶋教授・安達らは、これまでに adenovirus を用い心筋に核移行シグナルを付加した細胞周期促進因子サイクリン D1 (D1NLS) とサイクリン依存性リン酸化キナーゼ 4(CDK4)を導入、心筋細胞の増殖誘導に成功、更に分化後の心筋も収縮能を持つことを示した。線維芽細胞をはじめとする増殖細胞では通常、Cyclin D1 と CDK4 はタンパク質翻訳後、核内へ移行し、網膜芽細胞腫遺伝子蛋白のリン酸化を介して細胞周期の G1~S 期を進行させ増殖するが、生後の終末分化心筋細胞では Cyclin D1 が核内に発現しないため細胞増殖は起こらない。そこで北嶋・安達らは Cyclin D1 の変異体を作成(D1NLS)、これと CDK4 を adenovirus を用いて培養心筋細胞へ感染させたところ、導入5日後に3倍に増えた。またラットの心筋梗塞モデルにおいて、梗塞巣周囲に adenovirus- D1NLS/CDK4 を筋肉注射することで、心筋組織内 (in vivo) 心筋細胞を分裂誘導させることができ、梗塞巣の心筋壁の壁厚を増大させ、収縮能を改善すること、心筋梗塞後心不全を予防するという画期的な結果を示し(論文投稿中)、細胞周期促進因子サイクリン D1 (D1NLS) と CDK4 の今後の心不全治療への応用の可能性が示唆された。しかしアデノウイルスを用いることに関して、(1) 感染効率が5%と低いこと、(2) 発現期間は2週間と短いこと、(3) gene delivery の方法も開胸して局所的に筋注する方法は、

拡張型心筋症など心筋梗塞以外の心疾患に対しては十分な治療効果が得られない可能性が考えられること、が課題として挙げられる。そこで本研究課題では、上記に記したように AAV9 の発現期間が長いこと、尾静脈からの投与で心筋細胞への導入効率が高いことに注目し、D1NLS/CDK4 発現 AAV9 を作成し、ラット心筋梗塞モデル・拡張型心筋症モデルを用いて、筋肉注射と尾静脈から導入することによる心筋細胞への導入効率、増殖促進能、心機能の改善効果をアデノウイルスベクターと比較解析することを目的とする。

2. 研究の目的

本実験の目的は、adenovirus の免疫原性を克服し、より長期に導入遺伝子が発現し続けられるように vector として AAV9 を用い、更に治療遺伝子として D1NLS/CDK4 を AAV9 を用いて導入し、心筋細胞の分化を促進、不全心の心機能を長期にわたって改善させることである。

本実験のゴールは、

1. AAV9-D1NLS/CDK4 を正常ラット、ハムスター心筋に導入した場合、どのような変化がおこるか(長期間 D1NLS/CDK4 が発現し続けた場合、心筋は増殖し続け、肥大心様に心機能を障害してしまう恐れがあるか。また、静脈注射、筋肉注射等の導入方法の違いも関係するか)。

2. 拡張型心筋症ハムスターモデルにおいて、により心機能を長期改善できるか。

3. ラット心筋梗塞モデルに AAV9-D1NLS/CDK4 を導入し、梗塞巣の縮小、心機能の改善を示すことができるか。以上3点を明らかにすることである。

3. 研究の方法

実験 1

正常ラット・ハムスターへ、 $10e12$ vg の AAV9-D1NLS/CDK4 を静脈注射、10 日後、1 カ月後、3 カ月後、6 カ月後の心機能を評価する。3 カ月後(n=6)、6 カ月後(n=6)に犠牲死せしめ、組織学的に心筋増殖の有無、壁肥厚の有無などを評価する。

同様に、正常ラット・ハムスターを手術的に開胸、心筋へ直接 $2 \times 10e11$ vg の AAV9-D1NLS/CDK4 を 5 箇所注射し上記タイムスケジュールで評価する。

実験 2

ハムスター拡張型心筋症モデルに、AAV9-D1NLS/CDK4 を静脈注射、10 日後、1 カ月後、3 カ月後、6 カ月後の心機能を評価する。3 カ月後(n=6)、6 カ月後(n=6)に犠牲死せしめ、組織学的に心筋増殖の有無、壁肥厚の有無などを評価する。

実験 3

手術的にラット心の左前下行枝を結紮、心筋梗塞領域を作成後、左前下行枝の灌流域へ $2 \times 10e11$ vg の AAV9-D1NLS/CDK4 を 5 箇所注射し上記タイムスケジュールで評価する。

4. 研究成果

本研究は D1NLS/CDK4 遺伝子を、AAV9 をベクターとして正常ラット・ハムスター及びラット心筋梗塞モデル、拡張型心筋症ハムスター心筋へ導入、心筋細胞増殖を行うモデルであったが、D1NLS/CDK4 遺伝子を AAV9 の plasmid へ導入する段階及び D1NLS/CDK4 遺伝子を導入した AAV9 を増幅する過程で、D1NLS/CDK4 遺伝子を組み込んだ後 AAV9 plasmid 及び AAV9 自体の、D1NLS/CDK4 の発現が十分には確認できなかった。遺伝子サイ

ズの問題が大きいと思われるが、その他の理由としては今回選択した promoter が心筋での発現には適していなかったことも可能性として考えられる。組み込んだ後の in vitro での発現実験において確認が取れなかったため、このままの状態では AAV9 への組み込むことは困難と判断した。

そのため D1NLS/CDK4 遺伝子を含んだ plasmid を直接正常ラットの尾静脈より注入 (n=5)、ラット心筋での D1NLS/CDK4 遺伝子の発現を調べたが、発現は認められなかった。

現在、promoter を変えた (CMV promoter) D1NLS/CDK4 plasmid を作成中であり、発現が確認できた時点で AAV9 の増幅をおこなう予定である。他の promoter (CMV 等) および遺伝子 (lacZ 等) では、AAV9 ベクターで in vitro、in vivo でも問題なく発現していることは確認済みであるため、CMV と D1NLS/CDK4 の相性の問題がクリアできれば、導入実験は可能であると考えている。

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮城 直人 (MIYAGI NAOTO)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40463913

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし