

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461135

研究課題名(和文)メッセンジャーRNA投与による新たな心筋症治療法の開発と評価

研究課題名(英文)Development of a new therapeutic strategy for cardiomyopathy by administration of mRNA

研究代表者

尾上 健児 (Onoue, Kenji)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90510173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：特発性心筋症は、その原因となる遺伝子異常や発症機序が明らかにされ、その病態が明らかになりつつある。一方で治療方法は薬物療法や機械的補助といった対症療法に限られていた。本研究では、遺伝性拡張型心筋症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タンパク質をメッセンジャーRNAを補充することにより補うという原因療法を試み、特発性心筋症治療法に新たな活路を見出すことを目的とした。投与するメッセンジャーRNAの生合成や有効な投与経路の開発に予想より長時間を要したが、約2年をかけてこれを確立し、現在も治療効果を判定するための投与実験を継続して行なっている。

研究成果の概要(英文)：The pathology of idiopathic dilated cardiomyopathy had been gradually elucidated in terms of genetic or molecular mechanisms. However, the treatment for that is still palliative in medication or mechanical support. In this study, we aimed for establish a new causal treatment by administrating a messenger RNA (mRNA) of mutationally deficient protein to a mouse model of dilated cardiomyopathy. It took much longer time than we expected for the biosynthesis of mRNA and the determination of a way of the most effective administration of that. We finally established those in 2 years and are currently working on experiments in which we can evaluate the effectiveness of this new causal treatment.

研究分野：循環器

キーワード：循環器 心筋症 遺伝学

1. 研究開始当初の背景

心疾患は日本人死因の第2位を占め、早世によって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番目に長い原因である。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、後者で17人から400人程度と統計により幅が認められるが、心不全、突然死の要因となるため、その診断および治療は健康政策上も重要な課題である。1990年、米国ハーバード大学の Seidman らにより心筋構成タンパク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¹⁾、多くの遺伝子異常が特発性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明らかになっている。同時にその発症機序の解明も徐々に進み、特発性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、機械的補助などが応用され、飛躍的に患者予後は向上した。しかし、いずれ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、対症療法のみでは次第に病勢は進行し最終的には究極的対症療法ともいべき心移植しか治療法が残されていないのが現状である。さらには、改正臓器移植法施行後、本邦でも心移植の件数は増加したものの、未だ年間40例前後に過ぎず、心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、新たな治療法の開発が待たれている。

2. 研究の目的

近年申請者らを含め多くの研究者により、特発性心筋症の発症機序が解明され²⁾、それとともにその発症経路を阻害するような治療戦略が考案されてきた³⁾。また最近申請者の所属していた研究施設から、Jiang らにより異常遺伝子から転写されるメッセンジャーRNA(mRNA)をアデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus; AAV)で導入した RNAi で選択的に阻害し、心筋症発症を抑えるという新規治療法が考案され発表された⁴⁾。この方法で使用されている AAV-9 はウイルス毒性自身少ないとされているが、低頻度ながら第19番染色体への部位特異的組み込みが報告されていること、成人の多数が抗体を有しており、繰り返しの投与によっても増加する抗体産生に伴う治療効果低下を考えると代替法の開発が望まれる状況である。申請者は前述の Seidman 研究室で2年あまり拡張型心筋

症の分子発症機序に関する研究を行ってきた。核膜の構成タンパクであるラミン遺伝子異常から拡張型心筋症発症に至る分子メカニズムの一つを解明し、また、心筋サルコメアの主要構成成分であるミオシン重鎖遺伝子異常に伴うエピゲノム変化についての研究を行ってきた。前述の Jiang らの研究にもディスカッションとして加わり、臨床応用のためにはいくつかの問題点を克服する必要があると考え新たな治療法を考案するに至った。すなわち、ウイルスベクターを用いずに RNA を心筋細胞にデリバリーすることができれば、遺伝子組み換えや治療効果低下の心配なく、原因治療が行えると考えに至った。RNA の標的臓器へのデリバリー法は、東京大学工学部の片岡らにより開発が行われてきた。片岡らは随腔内に高分子ミセルに内包した mRNA を投与することにより、脳での目的タンパク発現に成功している⁵⁾。mRNA 投与4時間後に投与した mRNA の約1-10%が脳細胞で発現していた。またこの手法では、ミセルを形成する高分子材料を調整することにより、標的細胞内に導入された mRNA を徐放させることも可能である。今回申請者は、片岡らの考案したこの mRNA 投与方法を心疾患に初めて適用し、その最適なデリバリー方法、ミセルとの混合条件等を最適化して、遺伝子異常を原因とする特発性心筋症に対し、その遺伝子異常のために不足したタンパク質を補充するという新たな原因療法を確立し、広く特発性心筋症の治療法として応用することを目的とした。

3. 研究の方法

申請者は遺伝子異常に起因する正常タンパク質の発現低下を mRNA の投与により補充し、特発性心筋症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ている。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受けた拡張型心筋症を発症する lamin 異常マウス、および明治薬科大学櫻庭教授から譲渡を受けた肥大型心筋症様の表現形を示すファブリー病を発症する ガラクトシダーゼ異常マウスを対象に mRNA 投与によるタンパク質投与療法を行い、表現形の改善を検討する予定とした。この方法が奏功した場合、同じメカニズム、すなわち遺伝子異常により正常タンパクの発現が低下することに起因する疾患、特発性心筋症のみならず、その他多くの疾患に本手法を応用できる可能性があり、遺伝性疾患に対する治療法が根本的に大きく前進する可能性を有していると考えた。健康政策上の問題点を解決できる糸口となるのみならず、遺伝性疾患に対する新たな治療法の出現は、いままで治療法がなかった疾患を有する患者およびその家族にとって光明となることは言うまでもなく、来るべきポストゲノム時代のテーラード医療において、

自己の保有する疾患発症素因となりうる遺伝子異常を克服できる手段を有する意義はこの上なく大きいと考え、研究を進めた。

具体的には、最初にミセル化した mRNA を作製し、野生型マウスに対して最も効果的な投与経路を検討することとした。mRNA 作製および投与経路を確立した後、まずは核膜内側に存在し、その異常により拡張型心筋症を発症する lamin KO マウスに正常型 lamin をコードする mRNA を投与し、その表現形を評価する予定とした。評価項目は、心エコーによる心機能の改善、平均寿命の改善、質量顕微鏡によるメタボローム解析および次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を予定した。

4. 研究成果

まずマウス心筋への有効な投与経路を検討するために、緑色蛍光タンパク質 GFP の mRNA を成獣および幼獣マウスに投与し、最適な投与方法を検討した。その後、目的とする lamin 蛋白を産生する mRNA の生合成に取りかかったが、当初取り組んだ in vitro transcription 法ではうまく生合成できず、codon optimization などを取り入れた有効な生成方法を確立するまでに当初計画より長時間を要した。約 2 年を費やし、目的とする蛋白の mRNA 生成方法および最適投与方法を確立し、in vivo での表現系評価に取り組んだ。平均寿命の観察に関しては、十分な改善効果が得られず、mRNA の投与量や投与回数を再検討している段階である。また、短期間での治療効果を判定するため、評価方法を変更し現在も投与と実験を継続して行なっている。当初予定した計画より大幅に遅れているが、新規治療法を目指し引き続き研究を継続する予定である。

<引用文献>

- 1) Solomon SD, Jarcho JA, McKenna W, Geisterfer-Lowrance A, Germain R, Salerni R, Seidman JG, Seidman CE. Familial hypertrophic cardiomyopathy is a genetically heterogeneous disease. *J Clin Invest.* 1990 Sep;86(3):993-9.
- 2) Arimura T, Onoue K, Takahashi-Tanaka Y, Ishikawa T, Kuwahara M, Setou M, Shigenobu S, Yamaguchi K, Bertrand AT, Machida N, Takayama K, Fukusato M, Tanaka R, Somekawa S, Nakano T, Yamane Y, Kuba K, Imai Y, Saito Y, Bonne G, Kimura A. Nuclear accumulation of androgen receptor in gender difference of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C mutations. *Cardiovasc Res.* 2013 Aug 1;99(3):382-94.
- 3) Wu W, Muchir A, Shan J, Bonne G, Worman HJ. Mitogen-activated protein kinase inhibitors improve heart function and prevent fibrosis in cardiomyopathy caused

by mutation in lamin A/C gene. *Circulation.* 2011 Jan 4;123(1):53-61.

4) Jiang J, Wakimoto H, Seidman JG, Seidman CE. Allele-specific silencing of mutant Myh6 transcripts in mice suppresses hypertrophic cardiomyopathy. *Science.* 2013 Oct 4;342(6154):111-4.

5) Uchida S, Itaka K, Uchida H, Hayakawa K, Ogata T, Ishii T, Fukushima S, Osada K, Kataoka K. In vivo messenger RNA introduction into the central nervous system using polyplex nanomicelle. *PLoS One.* 2013;8(2):e56220.

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

Kenji Onoue. The influence of androgenic hormone on congestive heart failure, through analyses of lamin associated dilated cardiomyopathy. 第 32 回国際心臓研究学会日本部会. 2015-12-10 - 2015-12-12 神戸.

Kenji Onoue, Hiroko Wakimoto, Jiangming Jiang, Michael Parfenov, Danos Christodoulou, Steve DePalma, David Conner, Joshua Gorham, David McKean, Yoshihiko Saito, Jonathan Seidman, Christine Seidman. Proliferative and hypertrophic defects contribute to LMNA associated dilated cardiomyopathy. International Society for Heart Research XXII World Congress. 2016-04-18 - 2016-04-21 ブエノスアイレス (アルゼンチン).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等 ;
<http://www.naramed-u.ac.jp/~1int/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾上健児 (Kenji Onoue)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：90510173

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

片岡一則 (Kazunori Kataoka)
東京大学・工学研究科・教授
研究者番号：00130245

位高啓史 (Keiji Itaka)
東京大学医学系研究科・准教授
研究者番号：60292926

(4) 研究協力者

脇本博子 (Hiroko Wakimoto)
ハーバード大学・遺伝学部門・講師