

遺伝子改変マウスの冠循環・肺循環の高精度画像評価法の開発

— 循環器病の分子機序解明と治療法開発を促進する新たな研究法 —

資料11

研究体制 国循：心臓生理機能部・生化学部、スプリング8：利用研究促進部門
(平成23年度循環器病研究開発費)

研究の概要

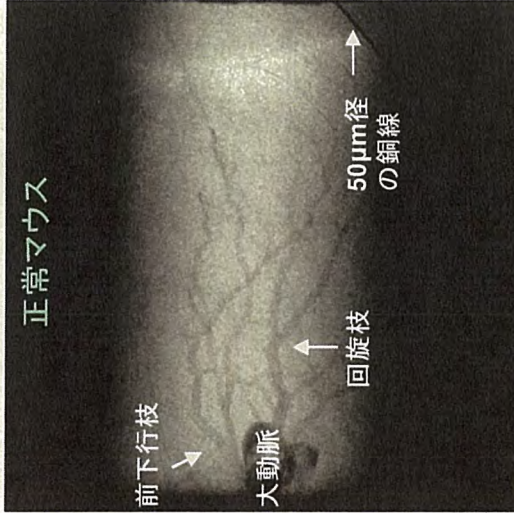
スプリング8の放射光を用いた高速・高解像度微小血管造影法を開発し、遺伝子改変マウスの冠循環・肺循環の機能を麻酔下で高精度に評価できる可視化技術を世界に先駆け確立した。

研究開発の背景

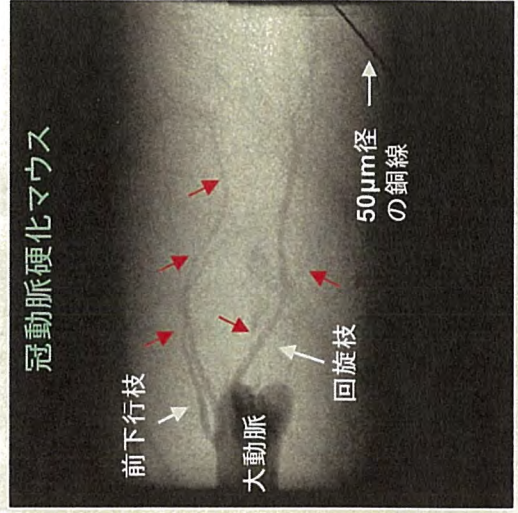
マウスでの遺伝子改変技術は、循環調節・病態に関連する遺伝子・蛋白質の機能を個体レベルで検証するための研究手法として不可欠である。しかし、体が小さく、高心拍数(約500拍/分)のマウスでは、動的臓器である心臓・肺の血管応答や狭窄・閉塞などが麻酔下で観察できなかったため、循環器病の生体分子機序の研究に遺伝子改変技術が充分活かせていなかった。

研究開発の成果

この度、スプリング8放射光を用いて、麻酔下マウスに応用できる高速・高解像度微小血管造影法を新たに開発した。この方法により、マウスの脳、腎臓、肝臓、下肢はもちろん、動的臓器である心臓・肺の微小血管が観察可能となった。冠および肺循環では、動脈本管から細動脈(径50μm)までの血管応答や病変が高精度に画像評価できた。将来、種々の遺伝子改変マウスに応用すれば、循環器病の生体分子機序解明および治療法開発が飛躍的に進むものと期待される。



微小血管造影法により左回旋枝の前下行枝と回旋枝が明瞭に可視化できた。(繰り返し造影することができるので、薬剤に対する血管応答も観察可能である)



遺伝子改変技術による冠動脈硬化マウスでは、赤矢印で示すように、冠動脈の狭小化と血管閉塞による血管数の減少が観察できた。(このマウスでは血管応答も異常であった)

生体内組織形成術を用いた自家移植用心臓弁の開発

研究体制

研究所: 医工学材料研究室・人工臓器部

資料12

研究の概要

再生医療の新しい実際的な概念として、患者自身の体内において、自己の移植用組織体を自己の組織を用いて作製できる「生体内組織形成技術」を提案し、循環系組織体を中心に開発を行っている。

皮下に一時的に高分子製の鑄型を埋入するだけで、自動的に自己組織のみからなる理想的な移植用心臓弁(バイオバルブ)が出来る。

免疫拒絶反応が無く、非毒性であり、体内での成長性が期待され、さらに大量に作製することができ、形が自在に設計でき、特に煩雑な生体外での細胞操作、培養施設を全く必要としないなど、安全性、経済性、生着性に優れた利点を有している。

研究開発の背景

現在臨床で用いられている機械弁(左)は、血栓性、牛心膜や豚弁から作製された生体弁(右)は耐用年数が十数年と短く、いずれも不完全。また、細胞培養を伴う従来型の再生医療弁の使用は実施施設が限局。高安全性、耐久性の心臓弁が切望される。



研究開発の成果

高分子製鑄型を皮下に1ヶ月埋入することで、培養することなく、完全に自己組織のみからなるバイオバルブ心臓弁が得られる(特許4815936)。

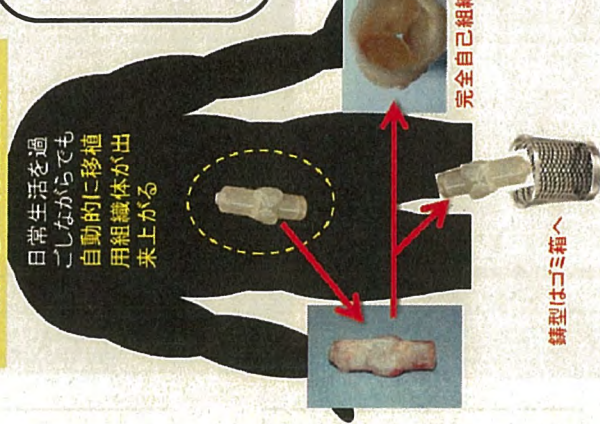
強度、耐圧性は生体動脈系組織と同程度以上を有する。

イヌ肺動脈弁、ヤギ大動脈弁として長期間機能を維持し、移植経過に伴って自己化(Circulation 2010;122:S100)。

ステントを組み合わせた鑄型によって、バイオバルブとステントを皮下作成時に一体化(ステントバイオバルブ)成形が可能(特許4735111)。カテーテルを用いて開胸手術することなしに、低侵襲で大動脈弁置換が可能。

生体内組織形成術による
新発想の再生医療

日常生活を過
ごしながらでも
自動的に移植
用組織体が出
来上がる



- 特徴**
- 安全性、経済性、生着性を兼ね備える
 - 完全に自己組織のみで、異物を含まない
(発ガン性、毒性、拒絶反応がない)
 - 特殊な設備を使う必要がない
(低コスト)
 - 成長性が期待できる
(~~小児科への応用~~)

移植後に自己
弁組織に再生

完全自己組織のみ

鑄型はゴミ箱へ

開発したバイオバルブ
心臓弁

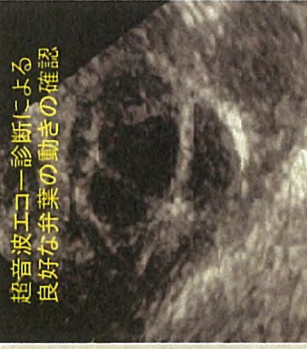
Aplic-Aorticバイオパス術



開発したステントバイオバルブ

ヤギでのバイオパス術を用いた大動脈環境での移植評価。好ましい維持と自己生着化を認める。

経カテーテル的な大動脈弁置換が可能。一体化も容易に作製できる。



超音波エコー診断による
良好な弁葉の動きの確認



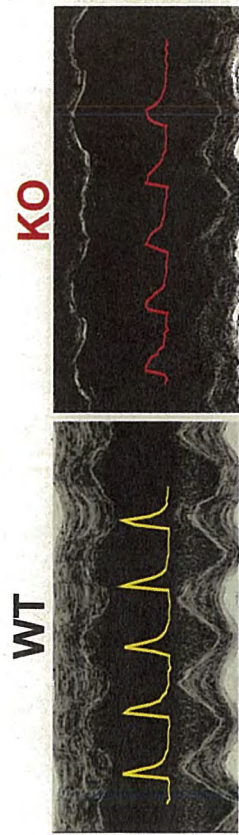
ヤギ大動脈弁へのステント
バイオバルブの留置

子どもの心臓拍動を調節する新しいタンパク質の発見

資料13

(1) NCS-1は幼少期の心臓収縮力を維持する必須因子！

- KOマウスでは、生後まもなく30%以上が死亡
- KOマウスでは、心筋の収縮力が低下



心エコー図と細胞内Ca²⁺動態

(2) NCS-1はホルモンによる心肥大形成を促進する！

- KOマウスでは、ホルモン刺激による心肥大形成が軽減



詳しい解析から、NCS-1はIP3リセプターとカルモデュリンキナーゼが関与する経路を介して、細胞内Ca²⁺シグナルを増強させ、幼少期の心筋収縮および心肥大の形成に寄与することを明らかにしました。

毎日 (新刊)

子供の心拍調節たんぱく質

心臓の拍動は、心筋細胞の収縮と弛緩を繰り返すことで生じる。この過程には、細胞内Ca²⁺濃度の調節が不可欠である。NCS-1は、このCa²⁺シグナルを増強させる重要なタンパク質であることが明らかになった。

国産理研チーム発見

京都府立医科大学の国産理研チームが、NCS-1の機能を明らかにした。この発見は、心臓疾患の治療に重要な手がかりを提供する。

幼い子の心臓を調節 たんぱく質発見

幼い子どもの心臓の働きを調節するたんぱく質を、国産理研チームが、マウスを用いた実験で発見した。このたんぱく質は、心臓が正常なリズムで動くのを保つために重要な役割を果たしている。

国産理研チームは、このたんぱく質の機能を明らかにし、心臓疾患の治療に重要な手がかりを提供した。この発見は、心臓の健康を維持するための新たなアプローチを開拓する。

乳幼児の心不全治療に光



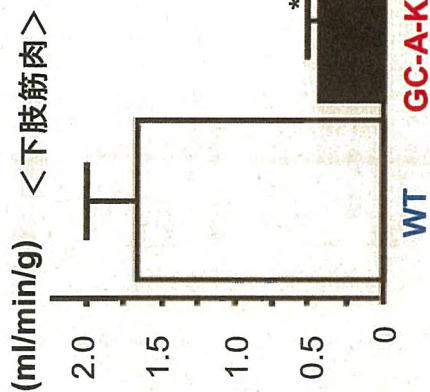
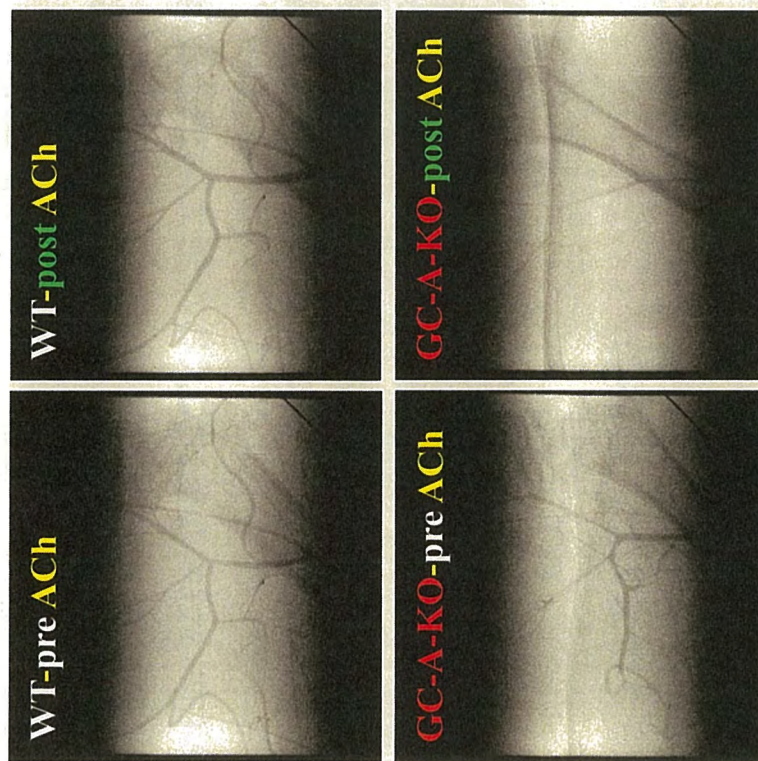
この発見は、乳幼児の心不全治療に重要な手がかりを提供する。NCS-1の機能を調節することで、心臓の収縮力を改善し、心不全の症状を軽減できる可能性がある。

これらの成果は新聞各紙でも取り上げられました！

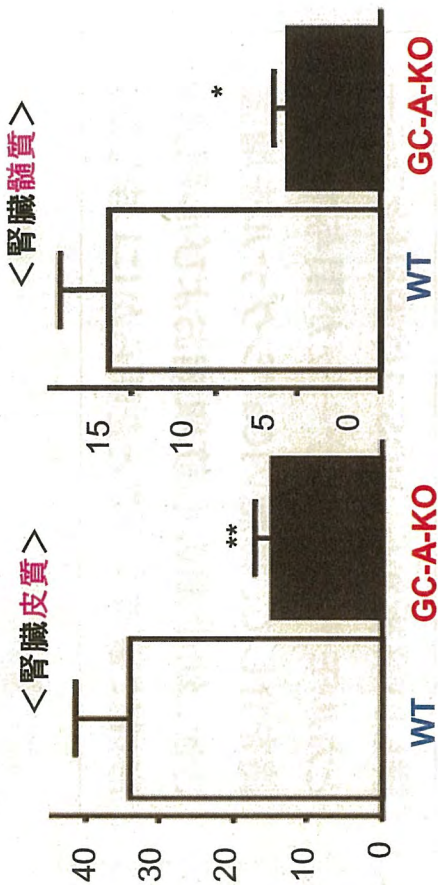
内因性Na利尿ペプチドの血管恒常性維持機構

ANP/BNPは、
血管トーンズの重要な制御因子である

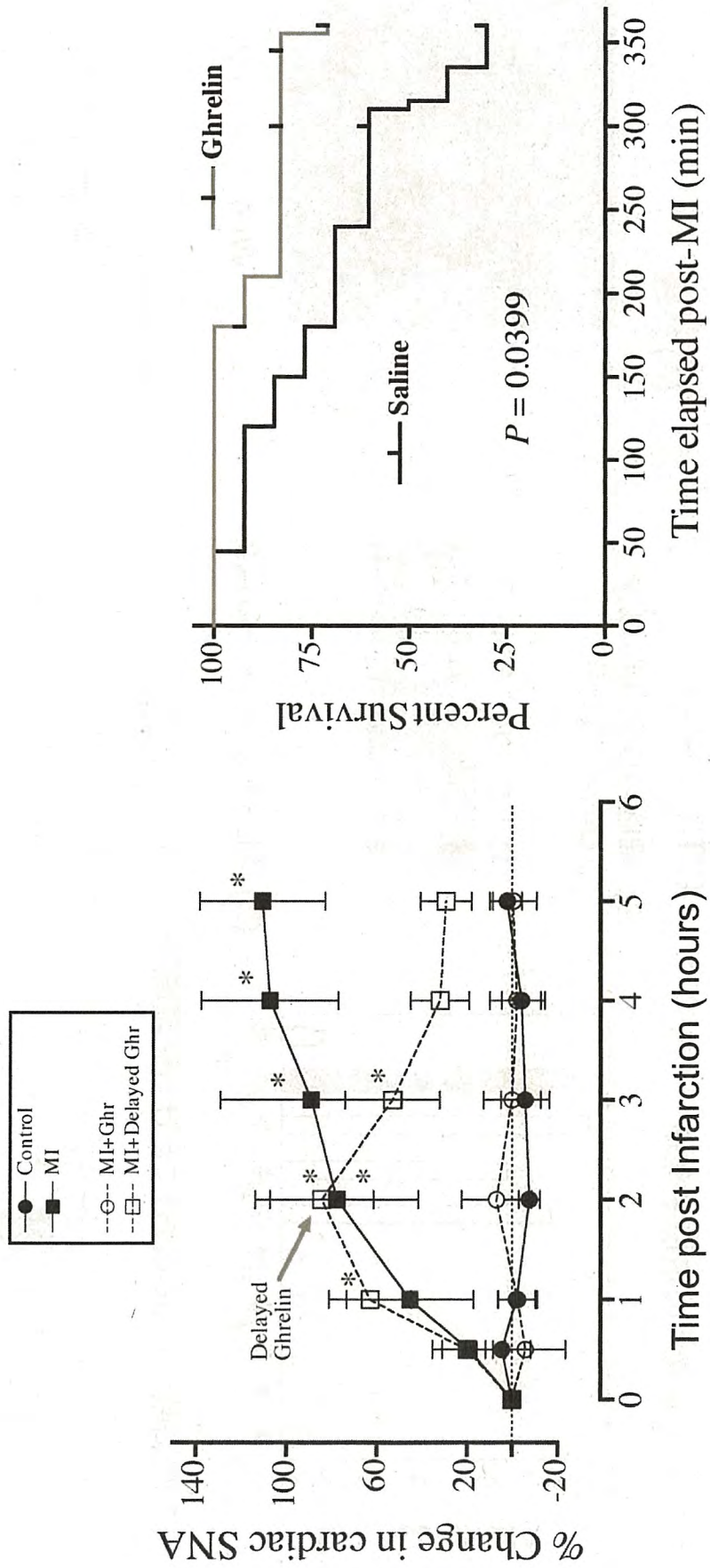
ANP/BNPは、
臓器血流の重要な制御因子である



* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ vs. WT



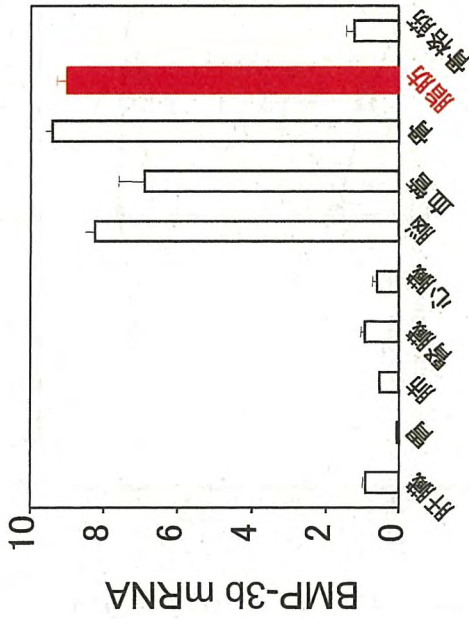
急性心筋梗塞モデルマウスへの急性期のグレリン投与は、交感神経活性化を抑制し、早期死亡率を減少させる



BMP-3bは脂肪細胞を分化抑制し、脂肪組織量減少作用を示す

1. 脂肪組織での発現(マウス)

(A) 主要組織での遺伝子発現



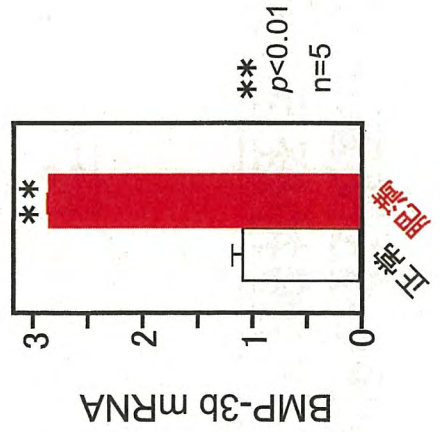
2. 脂肪細胞分化抑制作用 (3T3-L1細胞)

(A) 細胞内脂肪滴の減少 (Oil red O染色)



(B) 脂肪細胞マーカーの減少

(B) 肥満動物(内臓脂肪)における発現増加

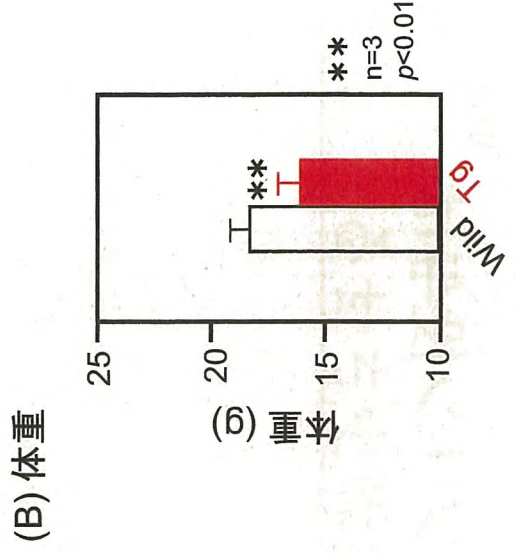


3. BMP-3b Tgの表現型(6週齢)

(A) 外観



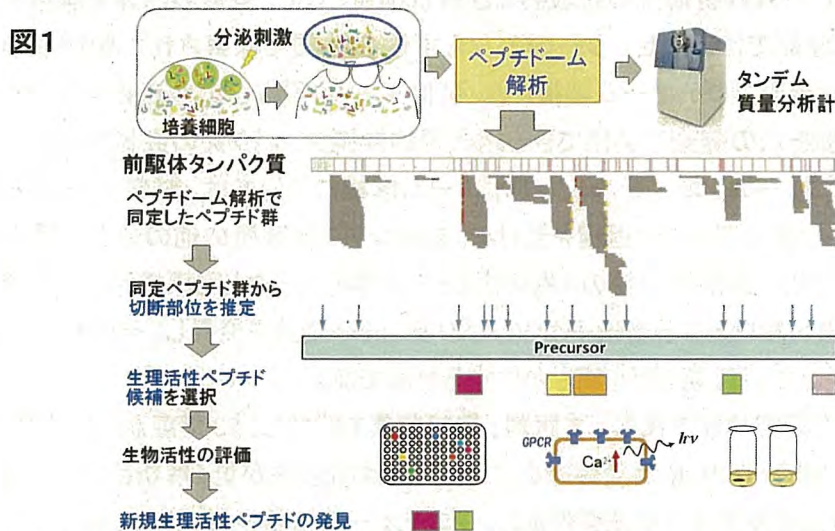
(B) 体重



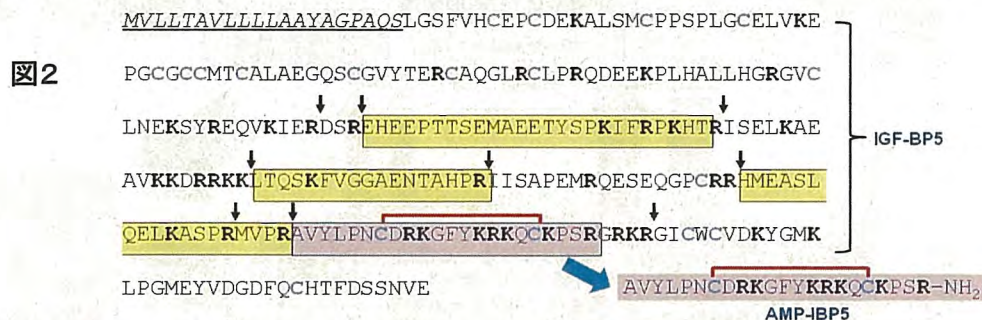
「ペプチドーム解析法を用いた新規生理活性ペプチドの探索・同定」 分子薬理部

恒常性維持のために生体は精巧な情報伝達・制御系を構築しており、その破綻は循環器疾患をはじめとした疾患発症に繋がる。情報伝達・制御系を構成する物質の中でも、生理活性ペプチドは循環器系や内分泌代謝系等で重要な働きをしている。生理活性ペプチドは当センター職員をはじめとする我が国の研究者により数多く発見され、医薬品や診断法に実用化されているため、新しいペプチドの発見は創薬や診断法開発の端緒となる可能性が高いが、その探索は非常に困難である。分子薬理部では、生理活性ペプチドを発見する新たな方法を22年度に開発した。(図1)

情報伝達に係わる細胞が分泌するペプチドを収集し、開発したペプチドーム解析法により網羅的に同定し、先ずペプチドカタログを作成する。前駆体タンパク質毎に同定されたペプチド(灰色横棒)と整列させると、前駆体タンパク質のプロセシング切断部位(↓)や生成するペプチドが予測できる。これらのペプチドより活性ペプチド候補を選択、合成し、種々の生物活性測定法により評価し、生理活性ペプチドを見出す。この手法により、2種のペプチド(NERP-3、NERP-4)を22年度に発見した。



平成 23 年度はこの手法を膵臓由来の神経内分泌細胞に適用し、インスリン様成長因子結合タンパク質5(IGF-BP5)が選択的な切断を受けてペプチドに変換され、その一つが強力な抗菌活性を有することを見出し、AMP-IBP5と命名した(図2)。本ペプチドは抗菌活性以外の機能を有する可能性



が高いため、さらなる機能解明に向けた研究を実施している。

分子薬理部では、体内物質であるこれらのペプチドを用いて、循環器疾患や生活習慣病に対する効果的で副作用のない創薬や治療法、診断法、予防法などの開発を目指している。

発表論文: T. Osaki, K. Sasaki, and N. Minamino: J. Proteome Res., 10: 1870-1880 (2011) Peptidomics-based discovery of an antimicrobial peptide derived from insulin-like growth factor-binding protein 5.

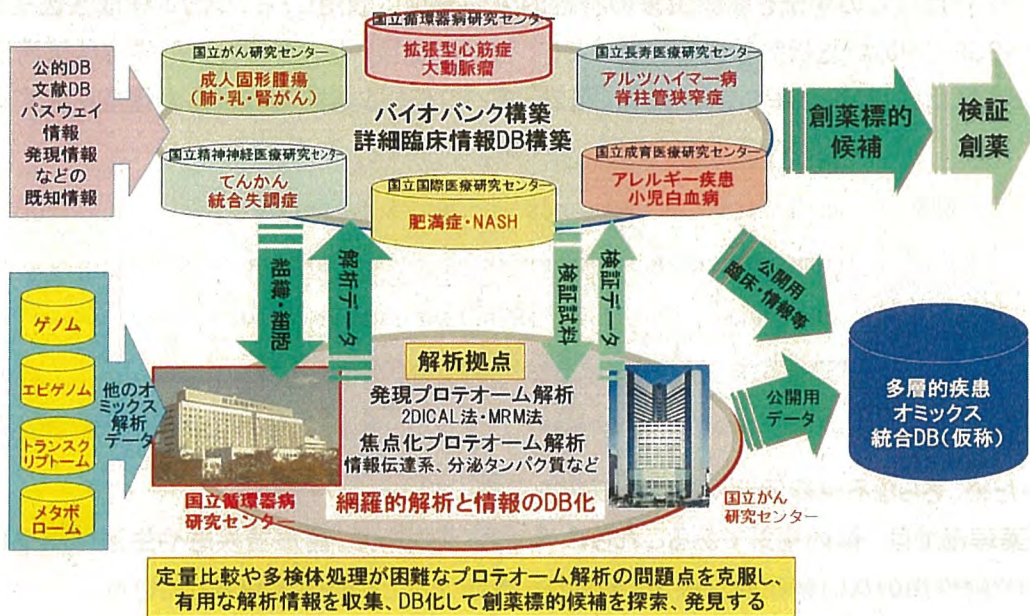
「多層的疾患オミックス解析に基づく創薬標的の網羅的探索を目指した研究」

当センターは、拡張型心筋症と大動脈瘤を対象疾患とし、プロテオーム解析拠点として参加。分子薬理部と研究所、病院、基盤センターの多部門が研究に参加。

健康長寿社会の実現は国民の最大の願いである。死亡率や罹患率が高く、その最大の障害となっている心血管疾患、がん、アレルギー疾患、認知症、肥満症、アルツハイマー病等の11疾患を対象に、ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・エピゲノム・メタボロームのオミックス解析技術を駆使して革新的な創薬標的候補分子の発見を目指す研究を、医薬基盤研究所の支援により平成22年度に開始した。「多層的疾患オミックス解析研究」では、6ヶ所の国立高度専門医療研究センターとオミックス解析研究者とが研究共同体を構築し、同じ病変組織試料を用いて5種類のオミックス解析を行い、疾患発症や病態形成の機序に基づく新しい創薬標的候補分子の発見を目指す。得られた情報や成果はデータベースに収録、公開し、創薬研究の推進に活用される予定である。

当センターでは拡張型心筋症と大動脈瘤を対象疾患に、組織試料、病情報や臨床情報を収集すると共に、プロテオーム解析研究の代表および解析拠点として、多数の検体を解析する計画である。研究所分子薬理部では、当センターのみならず他の機関で収集された組織試料について、2DICAL法を用いた発現プロテオーム解析、リン酸化タンパク質などの焦点化プロテオーム解析を実施し、治療法や診断法の開発に利用できる創薬標的候補タンパク質の発見を目指す(図参照)。ゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノム、メタボローム解析については、試料や情報を他の研究機関に提供して実施し、解析データの返還を受ける。当センター研究所の他の研究部門や病院、基盤センターでは、プロテオーム解析や他の4種のオミックス解析データと臨床情報、病情報との比較解析を行い、創薬標的候補となる遺伝子やタンパク質、分子経路を発見し、その機能や疾患発症との関係、創薬標的としての意義などを明らかにする計画である。

22年度に基本的な研究体制を構築して試料、情報収集を開始し、23年度からは本格的にオミックス解析に着手した。例えば、大動脈瘤組織のタンパク質は溶解性が低く解析困難であるが、可溶化して多数のタンパク質を解析する手法を作成し、プロテオーム解析を推進している。



「プロテオーム情報に基づく創薬標的の網羅的探索を目指した研究」の概要