

## 遺伝的心臓病の成因に対する分子生物学的アプローチ

所属機関 東京慈恵会医科大学小児科学講座  
研究者名 衛藤 義勝

## 《研究の概要》

心臓疾患については心筋梗塞など代表とする後天性の疾患群と遺伝的要因を病因とする疾患群がある。本研究は後者にフォーカスをしぼりその病因、病態並びに治療法の開発を目的とする。第一に心の発生異常に基づく病因の解明である。染色体 22 番長腕の q11 領域には多くの心臓の発生に関与する遺伝子が局在することが知られている。柳澤班員は白血病細胞から分離されたプローブを用いて先天性心疾患の発症の病因遺伝子を単離することを研究課題とした。いくつかの遺伝子が単離、同定されたが、臨床例の検討では今回同定された遺伝子に変異は認められなかった。今後、更に新しい病因遺伝子の同定が必要と考えられた。第二に心筋の細胞膜蛋白遺伝子欠損による遺伝的心筋症の治療法の開発である。細胞膜蛋白遺伝子欠損の動物モデルにおける HVJ リポソーム並びにアデノ随伴ウイルス (rAAV) をベクターとして用いた遺伝子治療の効果の検討を豊岡班員が行った。両者ベクターともに遺伝子発現が認められたが HVJ リポソームではその発現時間が短く臨床応用には困難と考えられた。rAAV においては遺伝子発現は投与後 30 週まで認められ、さらに生化学的、病理学的、臨床的にも効果が認められた。臨床的に心筋症の治療に結びつくものと考えられ、今後ヒトへの臨床応用を視野にいたした研究の推進が必要と考えられた。第三は遺伝的心筋症の病因、病態の解明である。心筋症ハムスターを用いて細胞膜蛋白の一つである  $\delta$ -sarcoglycan の遺伝子解析、c-myc、c-H-ras、BNP、endothelin-1、GATA-4 などの心肥大誘導遺伝子の発現の検討、心筋の病理学的検討を阪本班員が行った。 $\delta$ -sarcoglycan 遺伝子が独立した心筋症の原因遺伝子であること並びに dystrophin-associated glycoprotein complex (DAGC) (心筋形質膜) と desmin (Z 線) が心筋細胞骨格をなすことが明らかとなった。これらの知見は遺伝性心筋症の薬物治療を含めた治療法の開発に寄与するものと考えられるが、更に詳細な病態の解明が今後の課題と考えられた。第四は心筋障害を合併する先天代謝異常症の病態及び治療法の開発である。衛藤班員はゴーシェ病及びファブリー病の遺伝子解析を行いゴーシェ病では D409H/D409H という遺伝子型が心弁膜の石灰化という特有の心症状を呈することを明らかにした。また、ファブリー病ではミスセンス変異の症例では心肥大などの心合併症を伴いやすいことを明らかにした。これら二つの疾患では酵素補充療法が臨床的に用いられているがその他の臓器への有効性に比較し心には十分な効果は認められなかった。今後心症状を発症する病態並びに心合併症に有効な酵素製剤の開発が重要な課題と考えられた。

柳澤正義	東京大学医学部 小児科教授	先天性心疾患を起こす原因遺伝子の 単離
豊岡照彦	東京大学医学部 器官病態内科教授、保健管理セン ター所長	細胞膜蛋白遺伝子欠損による心筋症 の病態解明と治療法の開発
阪本英二	国立循環器病センター 研究所バイオサイエンス部バイ オテクノロジー実験室室長	遺伝性心筋症の病態及び成因に関す る研究

## 研究報告

### I 研究目的

1) 先天性心疾患を起こす原因遺伝子の単離：染色体 22 番長腕の q11 領域には心臓の発生に関与する遺伝子を含む複数の遺伝子が存在しこの領域の欠失は先天性心疾患を伴う先天奇形症候群を発症する事が知られている。その中で DiGeorge 症候群は心奇形、免疫不全、特徴的顔貌を呈する代表的疾患である。今回の研究の目的は本症候群の原因遺伝子を単離、同定しその病態を明らかにすることを第一とし、心疾患を発症するこの領域に存在する遺伝子について種々の先天性心疾患患者での変異について検討を行い、その役割を解明することである。

2) 細胞膜蛋白遺伝子欠損による心筋症の病態解明と治療法の開発：圧負荷や容量負荷などの要因がないにもかかわらず心筋細胞の肥大、変性、脱落を来す特発性心筋症は最終的に死にいたる予後不良の疾患である。その治療として種々の薬物療法が開発されており、患者の予後は徐々に改善はしているが根本的治療として心臓移植が行われている。しかし、移植にはドナーの絶対数の不足、脳死の判定など多くの社会的、倫理的な問題の他に、移植に伴う拒絶反応の予防など医学的な問題が存在し最善の治療とは言い難い。本研究では遺伝子異常の同定されている心筋症のモデル動物を用いてその遺伝子治療の可能性を検討する事を目的とする。

3) 遺伝性心筋症の病態及び成因に関する研究：遺伝性心筋症はその成因や治療が明らかにされていない予後不良の疾患である。これら心筋症の原因遺伝子として現在まで 10 前後が同定されており、その多くは心筋の収縮を担う蛋白質をコードしている。その動物モデルとして心筋症ハムスターが発見されており肥大型を呈する BI014.6 と拡張型を呈する T0-2 が有名である。既にこれら心筋症ハムスターでは筋形質膜の裏打ち蛋白である dystrophin に結合する蛋白である  $\delta$ -sarcoglycan 遺伝子の 5' 上流部分を含むゲノムが欠失している事が明らかにされている。そこで今回の研究では心筋症ハムスターで欠損する遺伝子は  $\delta$ -sarcoglycan 遺伝子のみであるか、また T0-2 の重症化に関わる遺伝子異常とその発症機構を明らかにする事を目的とする。

4) 心合併症をきたす先天代謝異常症の病態及び治療法に関する研究：先天代謝異常症は当該基質の分解に関与する酵素をコードする遺伝子の異常により発症する疾患である。肝脾腫や神経症状を主な症状とするが、心症状が前面に出現する亜型も存在する。すなわち、ゴーシェ病 3c 型やファブリー病の心臓型などである。これら亜型においてはその病態や

治療法は現在まで明らかにされていないのが現状である。そこで本研究ではこれらの特殊な病型を呈する遺伝子異常の解明及び治療法の開発を目的とする。

## II 研究計画および材料と方法

1) t (11;12) (q23;q11.2) より MLL 遺伝子の再構成を用いて単離した 22q11.2 に局在する CDCREL1 とその近傍の Glycoptotein (GP) 1b $\beta$  の種々の臓器での発現を調べ、染色体 22 番長腕欠失症候群との関連を検討する。CDCREL1 と GP1b $\beta$  をプローブとして用いてヒト BAC ライブラリーからこの周辺の領域の BAC をスクリーニングし、BAC コンテイングを作成し、染色体 22 番長腕欠失症候群の患者検体を用いて共通欠失領域の解析を試みる。共通欠失領域で発見された 16 個の遺伝子のうちノックアウトマウスで心奇形が発生した TBX1、CRKL、UFD1L 遺伝子につき先天性心疾患患者 100 例の末梢血より DNA を抽出し、各エクソンをはさむプライマーを作成し PCR-SSCP 法により移動度の異なるバンドを切り出し direct sequence 法により塩基配列を決定する。

2) 心筋症動物モデルの各病期の心筋から mRNA を抽出し DAGC の一つである  $\delta$ -sarcoglycan ( $\delta$ -SG) cDNA をプローブとして northern blot 法を施行した。人工呼吸器下で動物モデル左室心尖部に CMV プロモーターで駆動させたレポーター遺伝子の lacZ 及び  $\delta$ -SG 遺伝子を含む HVJ リポソームを注入した。7 日後の心臓を摘出し  $\beta$ -gal、 $\alpha$ -SG、 $\beta$ -SG、 $\gamma$ -SG 及び  $\delta$ -SG 抗体で免疫染色した。また、レポーター遺伝子として GFP 遺伝子を用いて遺伝子発現を確認した。同様の方法を用いて  $\delta$ -SG 遺伝子を組み込んだ rAAV ベクターを作成し動物モデルの心臓に投与した。30 週後に心臓を摘出し  $\alpha$ -SG、 $\beta$ -SG、 $\gamma$ -SG 及び  $\delta$ -SG の発現を northern blot 法並びに免疫抗体法で同定するとともに心カテーテル法や心超音波法を用いて左室拡張期圧、中心静脈圧、左室駆出率などの心機能を測定した。

3)  $\delta$ -SGcDNA をプローブに用いて正常ハムスターの  $\lambda$  phage genomic library をスクリーニングし  $\delta$ -SG 遺伝子の 5' 上流域をクローニングした。5' RACE 法で  $\delta$ -SG 遺伝子の複数のエクソン 1 をクローニングし、正常ハムスター心筋における各エクソンとスプライスされる  $\delta$ -SG 転写産物の相対的発現量を半定量 RT-PCR で検討した。心筋症ハムスターで欠失する全ゲノム領域をカバーする制限酵素断片をプローブとして正常ハムスター心筋の RNA ブロット解析を行った。正常ハムスター、動物モデルの左室における c-myc、c-H-ras、BNP、endothelin-1、GATA-4、 $\beta$ -myosin heavy chain、 $\alpha$ -skeletal muscle actin の遺伝子発現量を半定量 RT-PCR で検討した。正常ハムスター、動物モデルの左室の病理像及びアポトーシスの検討を行った。さらに正常ハムスター、動物モデルの左室から生化学的手法を用いて筋原繊維を精製し、myosin、actin を段階的に除去したサンプル、あるいは加齢したサンプルを用いて sarcomere 蛋白質を western blot 法で解析した。

4) ゴーシェ病においてはエクソン 2 から 11 までを増幅する PCR 条件にて各エクソンを得た後、日本人ゴーシェ病 100 例について 7 つの common mutation (84GG、IVS2+1、F213I、L444P、D409H、R463C、N370S) の有無を制限酵素切断法にて同定した。これら変異の同定されない症例については SSCP 法を用いて変異の局在を同定し、塩基配列法により変異を同定した。変異と臨床症状そして酵素補充療法の効果との相関を検討した。ファブリー病においては酵素補充療法中である 18 例の患者についてエクソン 1 から 7 までを PCR 法にて増幅し SSCP 法を用いて変異の局在を同定し、塩基配列法により変異を同定した。変異と

臨床症状そして酵素補充療法の効果との相関を検討した。

### III 研究成果

1) 白血病の t (11;22) (q23;q11.2) の患者より、11q23 に座位する MLL 遺伝子の再構成を用いて 22q11.2 の染色体切断点の遺伝子を単離、同定したところ、細胞分裂に關与する CDCREL1 遺伝子であった (文献 10)。この遺伝子の種々の臓器での発現を検討したところ、脳、心臓でのみ発現がみられ、白血病細胞株ではほとんど発現がみられなかった。この遺伝子の 3' 側に血小板 GPIb  $\beta$  があり、CDCREL1 と GPIb  $\beta$  の融合転写産物がみられることがある。この転写産物の発現頻度は正常細胞より白血病細胞で高い傾向がみられた。この 2 つの遺伝子をプローブにしてヒト BAC ライブラリーより、この周辺の領域の BAC をスクリーニングし、10 個の BAC によりコンティグを作成し、このうち 2 つを用いて fluorescence in situ hybridization (FISH) 法により、t (11;22) - 白血病細胞を検討したところ 2 つの BAC クローンいずれもスプリットがみられ、この BAC の中で切断点がみられることが判明した。この BAC と以前に我々が t (11;22) (q23;q13) - 白血病より単離、同定した p300 遺伝子、ユーイング肉腫の 22q13 に座位する EWS 遺伝子を手がかりに、ヒト BAC ライブラリーから BAC クローンをみだし、近傍の領域のコンティグを作成し、染色体 22 番長腕欠失症候群や DiGeorge 症候群の患者検体を用いて 22q11.2 の共通欠失領域の解析を試みた。共通欠失領域は 5 つの BAC の 2Mb の領域にあることが示唆された。

また 22q11.2 領域から、DiGeorge 症候群の候補遺伝子 UFD1L が単離された。この遺伝子は dHAND 遺伝子により制御され、遺伝子の 5' 側には CDC45 遺伝子が座位し、ユビキチン蛋白の degradation に關与する。我々は、先天性心疾患の患者へのこの遺伝子の関与と病型との関係を明らかにするため、30 例の患者の末梢血から DNA を抽出し、各 exon をはさむプライマーを作成して、PCR-SSCP 法を用いて検討を行ったが、変異は検出できなかった。

現在 TBX1 と CRKL 遺伝子の各 exon をはさむプライマーを作成し、同様の検討を行っているところである。

2) 初期に肥大型心筋症 (HCM) を呈し末期には拡張型心筋症 (DCM) に至る動物モデルである BI014.6 系では  $\delta$ -SG 以外の SG は一部残留していたの対し、初期から DCM を呈する T0-2 系では  $\delta$ -SG を含め全 SG が発現していなかった。この結果は全 SG 完備している場合には正常機能を有し  $\delta$ -SG のみの遺伝的欠損の場合には HCM を示し、代償不能の拡張相では全 SG が消失するという病態を示唆していた。一方、動物モデルの心筋においては mRNA は  $\alpha$ -SG、 $\beta$ -SG、 $\gamma$ -SG とともに正常ハムスターと同様に発現していた。従って、各 SG の蛋白発現は系と年齢により変化し重症度と一致していた。レポーター遺伝子の検討では  $\beta$ -gal の発現は特異性が高い抗体を用いれば従来の組織学的染色よりも免疫染色の方が感度の点で優れていた。また、GFP 遺伝子をレポーター遺伝子として用いる方法は心筋に存在する NAD/NADP が同一波長の蛍光を発するため適さないことが明らかとなった。HVJ リポソームを用いた遺伝子治療については T0-2 の心筋に  $\delta$ -SG と lacZ 遺伝子を共発現させた結果、 $\beta$ -gal の発現部位に一致して心筋細胞に全 SG 蛋白が明瞭に染色された。この結果は HVJ リポソームは心筋への遺伝子導入に有効なベクターを示唆していたが、発現時間が短く慢性疾患である心筋症の治療には適さないと考えられた。一方、rAAV ベクターを用いた遺伝子治療においては、投与 30 週後においても  $\delta$ -SG の mRNA と翻訳蛋白が細胞膜に発現して

おり、さらに $\alpha$ -SG、 $\beta$ -SG、 $\gamma$ -SGも再発現し萎縮していた心筋細胞の直径も改善した。更に左室拡張末期圧、左室最大拡張圧速度、中心静脈圧、左室収縮径、左室駆出率などの心機能が一部正常化した。そして生命予後も改善していた。

3) 正常ハムスター $\delta$ -SGには3つの第1エクソン(Exon 1A、Exon 1B、Exon 1C)が存在し、タンパク質の翻訳領域は第2エクソン(Exon 2)から始まっていた。Exon 1C、Exon 1BはExon 2の5'側それぞれ24.7kb、21.2kb上流に存在した。正常心筋における各第1エクソンとスプライスされる $\delta$ -SGのtranscriptの相対的発現量は、Exon 1B $\gg$ Exon 1A $>$ Exon 1Cであった。全ての心筋症ハムスターで、 $\delta$ -SGのExon 2の5'側6.1kb上流から29.8kbの範囲が欠失していた。このゲノムの欠失の結果、Exon 1BとExon 1Cが欠失し、これが $\delta$ -SGのmRNAとタンパク質の欠損の原因であることが分かった。心筋症ハムスターで欠失するゲノム領域には、 $\delta$ -SGのExon 1BとExon 1Cのみで心臓で発現する他の遺伝子はコードされていなかった。

c-myc、c-H-ras、BNP、endothelin-1、GATA-4などの心肥大誘導因子、あるいは $\beta$ -myosin heavy chainなどの心筋構成成分の遺伝子発現は、驚いたことに、いずれもT0-2でBI014.6よりさらに亢進していた。T0-2で心肥大関連遺伝子の強い活性化にもかかわらず肉眼的肥大を認めないことは、心筋変性がBI014.6より激しく起こっているためと考えられた。

T0-2では、BI014.6に比べて線維化と炎症細胞浸潤が強かった。またapoptosisに関しては、TUNEL法およびDNA ladderingのいずれにおいても、T0-2とBI014.6の間に有意差はなかった。以上のことから、T0-2では何らかの原因でnecrosisを主とした心筋変性が亢進していることが示唆された。

次に、心筋の電子顕微鏡解析を行ったところ、T0-2ではsarcomereのZ線が細いことを見出した。このことは、拡張型心筋症ではZ-lineに存在するタンパク質をコードしている遺伝子に異常が存在することを示唆した。

そこでまず、変性の少ない生後6週的心筋を用い、Z-line上の既知のタンパク質( $\alpha$ -actininとdesmin)の存在をWestern blotで解析したが、発現量は正常であった。次に、古典的な生化学的手法に従い心筋を、筋原線維(Z+A+I lines)、myosinの除去(Z+I lines)、actinの除去(Z line only)と段階的に精製し、再びWestern blotを行った。驚いたことに、拡張型でのみ、actinを除去したサンプルでは $\alpha$ -actininとdesminの双方が激減していた。このことは、拡張型ではZ-lineの構造がもろく物理的ストレスを加えると $\alpha$ -actininやdesminが脱落することを意味した。心臓は生まれてから死ぬまで常に収縮という物理的ストレスに曝されているので、この $\alpha$ -actininとdesminの脱落現象は、精製をしなくとも加齢した心筋標本でも見られるはずだと考えた。実際、拡張型的心筋では $\alpha$ -actininは加齢脱落しないがdesminは加齢脱落し、特に、自然死した拡張型的心筋ではdesminは完全に消失していた。一方T0-2では、 $\delta$ -sarcoglycan欠損に伴う $\alpha$ -sarcoglycanの二次的脱落がより早期に進行することも見出した。

加齢による脱落がdesminに特異的であることは、desminあるいはそれに近接するタンパク質が拡張型心筋症の原因遺伝子である可能性を示唆した。クローニングの結果、正常ハムスターのdesmin cDNAは、open reading frameが1,407塩基で、469残基からなる分子量53,445のポリペプチドをコードしていることが推定された。現在、拡張型心筋症ハムスターのdesmin cDNAの塩基配列の決定を急いでいる。

4) ゴーシェ病 3c 型は日本人 100 例中、一家系 2 例存在していた。3c 型においては心弁膜の石灰化が特徴的な心合併症でありその結果、大動脈弁閉鎖不全、僧帽弁閉鎖不全を呈していた。この家系の遺伝子型は D409H/D409H であった。この遺伝子型はアラブ、スペイン、トルコの 3c 型全例において同定されており本遺伝子型と臨床型との密接な関係を示していた。また、D409H/? の遺伝子型をもつ患者 5 例中 2 例において同様な心合併症を呈していた。これらの症例においては酵素補充療法を施行により肝脾腫、貧血、血小板減少は改善したのに対し、心合併症は改善せず心不全が進行した。従って、酵素補充療法はゴーシェ病の心合併症には有効でない事が明らかとなった。ファブリー病 18 例中、一例に左室肥大、心電図異常という心合併症が認められた。この患者の遺伝子型は L23H というミスセンス変異であった。古典的ファブリー病では欠失、スプライス異常、ナンセンス変異がほとんどであり臨床型と遺伝子型との相関が認められた。酵素療法の結果、腎、肝における CTH の減量は明らかであったが心における改善は症例により差異が認められた。

#### IV 考察

1) 我々の t (11;22) - 白血病の 22q11.2 により単離した CDCREL1 遺伝子は DiGeorge 症候群の候補遺伝子の推測される領域にあることがわかり、この遺伝子を用いて、近傍の BAC をスクリーニングして候補遺伝子の同定を検討した。この間に、少なくとも 27 個の遺伝子が存在することが判明し、この領域全体のノックアウトマウスでは心奇形が見られることが報告された。最近、別のノックアウトマウスの解析が報告され、これまで知られた DiGeorge 症候群の欠失領域の両端の合計 550kb (16 個の遺伝子を含む) の欠失では正常の心血管形成が起こり、DiGeorge 症候群の原因遺伝子は HIRA から COMT の間の 900kb の領域に存在すると考えられた。さらに最近、3 つのグループからほぼ同時にこの領域に座位する TBX1 遺伝子のノックアウトマウスに心奇形が発生したことが報告され、この遺伝子が DiGeorge 症候群の原因遺伝子の可能性が高いと考えられた。しかしその直後にさらに別のグループにより、CRKL 遺伝子という TBX1 とは全く異なる遺伝子のノックアウトマウスにやはり心奇形が発生することが報告され、心奇形の原因遺伝子は複数存在すると考えられた。

我々は 30 例の先天性心疾患症例で UFD1L の PCR-SSCP 法による変異の検討を行ったが、変異はみられなかった。UFD1L 遺伝子の先天性心疾患患者への関与は少ないものと思われる。さらにノックアウトマウスで心奇形のみられた TBX1 遺伝子の変異の検討は行っているが、現時点では nonsense mutation はみられない。現在 CRKL 遺伝子についても検討を開始している。さらに先天性心疾患症例を 100 例集めて検討をする予定である。

2) 今回の研究ではジストロフィン結合糖蛋白の障害により心筋症やこれと類似した病態が発生することが明らかとなった。さらに rAAV を用いた心筋症の遺伝子治療については生化学的、病理学的、臨床的に効果が認められ有望な治療法と考えられた。これらの研究成果は心筋症の病態を解明するとともに薬物療法の開発に多いに寄与するものと考えられる。遺伝子治療についても完全な治癒という状態には至っておらずプロモーター領域の改変を含むより発現効率の高いベクターの開発及び安全性の確認など今後の臨床応用についての研究を継続していく予定である。

3) 本研究の成果は大きく分けて 2 つある。まず、 $\delta$ -sarcoglycan 遺伝子を独立した心筋

症の原因遺伝子として証明したことである。δ-sarcoglycan は、α-, β-, γ-sarcoglycans と共に、dystrophin に結合する糖蛋白質複合体を構成し、いずれの遺伝子異常でも肢帯型筋ジストロフィー症を発症するが、その際心筋症が合併するのは10%前後であり、両者の相関関係は長く謎に包まれていた。他の sarcoglycan 遺伝子の異常と心筋症の関係ならびにその発症機構の解明が今後期待される。

もう一つの成果は、心筋収縮の基本装置である sarcomere に存在する Z 線の新しい機能を示唆する知見を得たことである。Z 線は、sarcomere の横紋に相当する構造であるが、従来これは myosin と actin を主とした筋収縮タンパク質の支持体と考えられていた。今回の研究で T0-2 においては、Z 線の構成タンパク質である desmin が加齢と共に特異的に脱落すること、心筋形質膜に存在する α-sarcoglycan が極めて早期に脱落すること、を見出した。このことは、dystrophin-associated glycoprotein complex (心筋形質膜) と desmin (Z 線) との物理的な結合を示唆するものである。この新しい細胞骨格の成り立ちは、T0-2 における第二の心筋症遺伝子の最終的な解明を通じ、近い将来明らかにされるはずである。

4) 今回の研究ではゴーシェ病においては D409H/D409H という遺伝子型が心合併症を発症することが明らかとなったが、その病態には不明な点が多い。今後はこの遺伝子型を持つ患者の培養皮膚繊維芽細胞を用いて変異グルコセレブロシダーゼの細胞内動態を明らかにする必要があると思われる。さらに mutagenesis の手法を用いて D409H の変異蛋白を作成し、活性などを含む酵素学的検討も必要と考えられる。現在治療に用いられている酵素製剤は肝臓、脾臓のマクロファージにターゲットするよう糖鎖を修飾してある。しかし、臨床的にはこの酵素製剤は心合併症には有効性が乏しく今後は心筋細胞に取り込みが良好な酵素製剤の開発が急務と思われる。ファブリー病においてはミスセンス変異が心合併症と高い相関を示した。この事実は残存酵素活性の高い患者においては心合併症の発症に留意すべき事示していると考えられた。ファブリー病においても酵素補充療法による心の蓄積物質のクリアランスは他の臓器に比較し十分ではなかった。ただし、今回は投与期間が6ヶ月と短期であったことも考慮すべきと考えられた。

## V 研究成果の発表

1. Taki T, Shibuya N, Taniwaki M, Hanada R, Morishita K, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y: ABI-1, a human homolog to mouse abl-interactor 1, fuses the MLL gene in acute myeloid leukemia with t(10;11). Blood 92: 1125-1130, 1998.
2. Kawamura M, Ohnishi H, Guo SX, Sheng XM, Minegishi M, Hanada R, Horibe K, Hongo T, Kaneko Y, Bessho F, Yanagisawa M, Matsuo Y, Sekiya T, Hayashi Y: Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia Res 23: 115-126, 1999
3. Yang HW, Piao HY, Taki T, Chen T, Hashizume K, Ohnishi H, Bessho F, Yanagisawa M, Matsuo Y, Hayashi Y: Pattern of FHIT gene expression in normal and leukaemic cells. Int J Cancer 81: 897-901, 1999.
4. Xu F, Taki T, Yang HW, Hanada R, Hongo T, Ohnishi H, Kobayashi M, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y: Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute

- lymphoblastic leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. *Brit J Haematol* 105: 155-62, 1999.
5. Narita M, Shimizu K, Hayashi Y, Taki T, Taniwaki M, Hosoda F, Kobayashi H, Nakamura H, Sadamori N, Ohnishi H, Bessho F, Yanagisawa M, Ohki M: Consistent Detection of CALM-AF10 chimeric transcripts in acute leukemia with t(10;11)(p13;q14) and Identification of novel, transcripts. *Brit J Haematol* 105: 928-37, 1999.
  6. Guo SX, Taki T, Ohnishi H, Piao HY, Tabuchi K, Bessho F, Hanada R, Yanagisawa M, Hayashi Y: Hypermethylation of p16 and p15 genes and RB protein expression in acute leukemia. *Leuk Res* 24: 39-46, 2000
  7. Miki Y, Taki T, Ohura T, Kato H, Yanagisawa M, Hayashi Y: Novel missense mutations in the glutamate dehydrogenase gene in the congenital hyperinsulinism hyperammonemia syndrome. *J Pediatr* 136: 69-72, 2000
  8. Hayashi Y, Honma Y, Niitsu N, Taki T, Bessho F, Sako M, Mori T, Yanagisawa M, Tsuji K, Nakahata T. SN-1, a novel leukemic cell line with t(11;16)(q23;p13): myeloid characteristics and resistance to Retinoids and Vitamin D<sub>3</sub>. *Cancer Res* 60: 1139-1145, 2000
  9. Yang HW, Piao HY, Chen YZ, Takita J, Kobayashi M, Taniwaki M, Hashizume K, Hanada R, Yamamoto K, Taki T, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y. The p73 gene is less involved in the development but involved in the progression of neuroblastoma. *Int J Mol Med* 5: 379-384, 2000
  10. Tatsumi K, Taki T, Taniwaki M, Nakamura H, Taguchi J, Chen YZ, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y. The CDCREL1 gene fused to MLL in de novo acute myeloid leukemia with t(11;22)(q23;q11.2) and its frequent expression in myeloid leukemia cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 230-235, 2001
  11. Murata T, Kurokawa R, Krones A, Tatsumi Ken, Ishii M, Taki T, Masuno M, Ohashi H, Yanagisawa M, Rosenfeld MG, Glass CK, Hayashi Y: Defect of histone acetyltransferase activity of the nuclear transcriptional coactivator CBP may cause Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum Mol Genet* 10: 1071-1076, 2001
  20. Kawaguchi, H., Shin, W.S., Yang, Y., Inukai, M., Kato, M., Matsuo-Okai, Y., Sakamoto, A., Kaneda, Y. and Toyo-oka, T. Apoptosis-like myocardial cell death with overexpression of human eNOS gene-Identification by Sendai virus-coated liposomes and in vivo gene transfection-. *Circulation* 95: 2441-7, 1997.
  21. Sakamoto, A., Ono, K., Abe, M., Jasmin, G., Eki, T., Murakami, Y., Masaki, T. Toyo-oka, T. and Hanaoka, F. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathy are caused by mutation of the same gene, d-sarcoglycan, in hamster: A model of dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc. Natl. Sci. Acad. USA.* 94: 13873-8, 1997.
  22. Iwasawa, K., T. Nakajima, H. Hazama, A. Goto, W. S. Shin, T. Toyo-oka and M. Omata. Effects of extracellular pH on receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> influx in A7r5

- rat smooth muscle cells: Involvement of two types of channel. *J. Physiol.* 503: 237-51, 1997.
23. Hikiji, H., W. S. Shin, S. Oida, T. Takato, T. Koizumi and T. Toyo-oka. Direct action of nitric oxide on osteoblastic differentiation. *F.E.B.S. Letters* 410: 238-42, 1997.
  24. Uehara Y, Hirawa N, Kawabata Y, Numabe A, Nagoshi H, Gomi T, Ikeda T, Goto A, Toyo-oka T and Omata M. Serum N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in a genetic rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Hypertens. Res.* 20: 193-9, 1997.
  25. Uehara U, Shin WS, Watanabe T, Osanai T, Miyazaki M, Kanase H, Sugano K and Toyo-oka T. Role of Y chromosome of hypertensive parent in determination of blood pressure in normotensive offspring. *Heart & Vessels. Suppl.* 12: 156-159, 1997.
  26. Nagoshi H, Uehara Y, Kanai F, Maeda S, Ogura T, Goto A, Toyo-oka T, Esumi H, Shimizu T and Omata M. Prostaglandin D2 inhibits inducible nitric oxide synthase expression in rat vascular smooth muscle. *Circ. Res.* 82: 204-209, 1998.
  27. Yamazaki T, Miyazaki M, Kanase H, Toyo-oka T and Sugano K. Transient hypertension in male adolescents when measured by women. *Heart* 79: 104-105, 1998.
  28. Shimamoto R, Suzuki J, Nishikawa J, Fujimori Y, Nakamura F, Shin WS, Tomaru T and Toyo-oka T. Measuring the diameter of coronary arteries on MR angiograms using spatial profile curves. *Am. J. Roent.* 170: 889-93, 1998.
  29. Uehara H, Shin WS, Watanabe T, Osanai T, Miyazaki M, Kanase H, Taguchi R, Sugano K and Toyo-oka T. A hypertensive father, but not hypertensive mother, determines blood pressure in normotensive male offspring through body mass index. *J Human Hyperten.* 12: 441-445, 1998
  30. Matsumori, A., Ohashi, N., Hasegawa, K., Sasayama, S., Eto, T., Imaizumi, T., Izumi, T., Kawamura, K., Kawana, M., Kimura, A., Kitabatake, A., Matsuzaki, M., Nagai, R., Tanaka, H. Hiroe, M., Hori, M, Inoko, H., Seko, Y., Sekiguchi, M. Shimotohno, K., Sugishita, Y., Takeda, N., Takihara, K., Tanaka, M. Tokuhisa, T., Toyo-oka, T., Yokoyama, M., and co-research workers. Hepatitis C virus infection and heart diseases: a multicenter study in Japan. *Jpn. Circ. J.* 62: 389-91, 1998.
  31. Suzuki J, Shimamoto R, Nishikawa J, Fujimori Y, Nakamura F, Shin WS, Tomaru T and Toyo-oka T. Vector analysis of the hemodynamics of atherogenesis in the human thoracic aorta with use of MR velocity mapping. *Am. J. Roent.* 171: 1285-90, 1998.
  32. Suzuki J, Shimamoto R, Nishikawa J, Yamazaki T, Tsuji T, Nakamura F, Shin WS, Nakajima F, Toyo-oka T, Ohotomo K. Morphological onset and early diagnosis in

- apical hypertrophic cardiomyopathy; a long-term analysis with nuclear magnetic resonance imaging *J. Am. Coll. Cardiol.* 33: 146-51, 1999.
33. Toyo-oka T, Kawaguchi H, Shin WS. Calcium-activated neutral proteases and myocardial protein catabolism. In: Sasayama S, ed. *New Horizon for Failing Heart Syndrome*. Tokyo: Springer-Verlag, 1996: pp27-43.
  34. Wang YP, Shin WS, Chen J, Inukai M, Kawaguchi H, Ando J, Toyo-oka T. Intracellular Ca<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>) dynamics for nitric oxide (NO) production in endothelial cells (EC) and secondary modification of Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> in vascular smooth muscle cells. 61th Annual Scientific Meeting of Japanese Circulation Society (International Session). Mar. 31-Apr. 2, 1997, Tokyo *J Circ J* 61(Suppl 1): 29, 1997
  35. Uehara Y, Shin WS, Gotoh A, Toyo-oka T, Omata M. Role of Y-chromosome of hypertensive parent in determination of blood pressure in their normotensive offspring. 61th Annual Scientific Meeting of Japanese Circulation Society (International Session). Mar. 31-Apr. 2, 1997, Tokyo *J Circ J* 61(Suppl I): 45, 1997
  36. T. Kawada, Y. Nakatsuru, A. Sakamoto, T. Koizumi, W.S. Shin, M. Nakazawa, J. Suzuki, T. Nakajima, Y. Uehara, T. Takato, H. Sato, T. Ishikawa, T. Toyo-oka. "In Vivo Gene Supplement for the Therapy of Cardiomyopathy", *Heart Failure Frontiers in Cardiology*, A. Kitakabe. S. Sasayama. G. S. Francis (Eds.), Springer-Verlag, 2000.
  37. K. Ono, A. Sakamoto, T. Masaki, M. Satake. "Desensitization of ET(A) endothelin receptor-mediated negative chronotropic response in right atria--species difference and intracellular mechanisms." *Br. J. Pharmacol.*, 125, 787-797, 1998.
  38. T. Masaki, H. Ninomiya, A. Sakamoto, Y. Okamoto. "Structural basis of the function of endothelin receptor." *Mol. Cell Biochem.*, 190, 153-156, 1999.
  39. J. Li, D. Dressman, Y.P. Tsao, A. Sakamoto, E.P. Hoffman, X. Xiao. "rAAV vector-mediated sarcoglycan gene transfer in a hamster model for limb girdle muscular dystrophy." *Gene Ther.*, 6, 74-82, 1999.
  40. T. Kawada, W.S. Shin, Y. Nakatsuru, T. Koizumi, A. Sakamoto, T. Nakajima, Y. Okai-Matsuo, M. Nakazawa, H. Sato, T. Ishikawa, and T. Toyo-Oka. "Precise identification of gene products in hearts after in vivo gene transfection, using Sendai virus-coated proteoliposomes." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 259, 408-413, 1999.
  41. A. Sakamoto, M. Abe, T. Masaki. "Delineation of genomic deletion in cardiomyopathic hamster." *FEBS Lett.*, 447, 124-128, 1999.
  42. T. Kawada, Y. Nakatsuru, A. Sakamoto, T. Koizumi, W.S. Shin, Y. Okai-Matsuo, J. Suzuki, Y. Uehara, M. Nakazawa, H. Sato, T. Ishikawa, T. Toyo-Oka. "Strain- and age-dependent loss of sarcoglycan complex in cardiomyopathic hamster

- hearts and its re-expression by delta-sarcoglycan gene transfer in vivo." FEBS Lett., 458, 405-408, 1999.
43. T. Shibasaki, K. Moroi, M. Nishiyama, J. Zhou, A. Sakamoto, T. Masaki, K. Ito, T. Haga, S. Kimura. "Characterization of the carboxyl terminal-truncated endothelin B receptor coexpressed with G protein-coupled receptor kinase 2." Biochem Mol Biol Int., 47, 569-577, 1999.
  44. T. Kawada, A. Sakamoto, M. Nakazawa, M. Urabe, F. Masuda, C. Hemmi, Y. Wang, W. Soo Shin, Y. Nakatsuru, H. Sato, K. Ozawa, T. Toyo-oka. "Morphological and physiological restorations of hereditary form of dilated cardiomyopathy by somatic gene therapy." Biochem Biophys Res Commun. 284, 431-5, 2001.
  45. K. Ono, H. Masumiya, A. Sakamoto, G. Christ, T. Shijuku, H. Tanaka, K. Shigenobu, Y. Ozaki. "Electrophysiological analysis of the negative chronotropic effect of endothelin-1 in rabbit SA node cells." (in submission).
  46. Mochizuki H, Joh K, Matsuyama N, Imadachi A, Usui N, Eto Y: Focal segmental glomerulosclerosis in a patient with Prader-Willi syndrome. Clin Nephrol 2000;53(3):212-5
  47. Tsukuno M, Suzuki H, Eto Y: Pfeiffer syndrome caused by haploinsufficient mutation of FGFR2. J Craniofac Genet Dev Biol 1999;19(4):183-8
  48. Urashima M, Suzuki H, Yuza Y, Akiyama M, Ohno N, Eto Y: An oral CD40 ligand gene therapy against lymphoma using attenuated Salmonella typhimurium. Blood 2000 15;95(4):1258-63
  49. Yokoo T, Ohashi T, Utsunomiya Y, Kojima H, Imasawa T, Kogure T, Hisada Y, Okabe M, Eto Y: Prophylaxis of antibody-induced acute glomerulonephritis with genetically modified bone marrow-derived vehicle cells. Hum Gene Ther 1999;10(16):2673-8
  50. Yamasaki K, Sasaki T, Nemoto M, Eto Y, Tajima N: Differentiation-induced insulin secretion from nonendocrine cells with engineered human proinsulin cDNA. Biochem Biophys Res Commun 1999;265(2):361-5
  51. Yoshimura K, Wakazono Y, Iizuka S, Morokawa N, Tada H, Eto Y: A Japanese patient homozygous for the H1085R mutation in the CFTR gene presents with a severe form of cystic fibrosis [letter] Clin Genet 1999;56(2):173-5
  52. Ichiba T, Hoshi Y, Eto Y, Tajima N, Kuraishi Y: Characterization of GFR, a novel guanine nucleotide exchange factor for Rap1. FEBS Lett 1999;457(1):85-9
  53. Ida H, Rennert OM, Iwasawa K, Kobayashi M, Eto Y: Clinical and genetic studies of Japanese homozygotes for the Gaucher disease L444P mutation. Hum Genet 1999;105(1-2):120-6
  54. Oishi K, Ida H, Kurosawa K, Eto Y: Clinical and molecular analysis of Japanese patients with neuronal ceroid lipofuscinosis. Mol Genet Metab 1999;66(4):344-8

55. Ida H, Rennert OM, Kato S, Ueda T, Oishi K, Maekawa K, Eto Y: Severe skeletal complications in Japanese patients with type 1 Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 1999;22(1):63-73
56. Eto Y, Ida H: Clinical and molecular characteristics of Japanese Gaucher disease. *Neurochem Res* 1999;24(2):207-11
57. Eto Y., Ohashi T. Gene therapy/cell therapy for lysosomal storage disease. *J Inherited Metabo Dis* (2000)23(3):293-8
58. Futagawa Y., Okamoto T., Ohashi T., Eto Y. Efficiency of adenovirus-mediated gene Transfer into hepatocytes by liver asanguineous perfusion method. *Res Exp Med(Berl)* (2000)199(5):263-74
59. Ohashi T., Yokoo T., Iizuka S., Kobayashi H., Sly W.S. and Eto Y., Eduction of Lysosomal storage in Murine Mucopolysaccharidosis Type VII by Transplantation of Normal and Genetically Modified Macrophages. *Blood* (2000)95(11):3631-3
60. Watabe K., Ohashi T., Sakamoto T., Kawazoe Y., Takeshima T., Oyanagi K., Inoue K., Eto Y., and Kim S.U. Rescue of lesioned adult rat spinal motoneurons by adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Journal of Neuroscience Research* (2000)60:511-9
61. Tsujino S., Kanazawa N., Ohashi T., Eto Y., Saito T., Kira J., Yamada T. Three novel mutations (G27E, insAAC, R179X) in the ORNT1 gene of Japanese patients with HHH syndrome. *Arch of Neuro* (2000)147(5):625-31
62. Sakamoto T., Watabe K., Ohashi T., Kawazoe Y., Oyanagi K., Inoue K., Eto Y. Adenoviral Vector mediated GDNF gene transfer prevents death of adult facial notoneurons. *Neuroreport* (2000)11(9):1857-60
63. Tsukuno M., Suzuki H., Eto Y. Reply to the critique: Pfeiffer syndrome is most likely caused by haploinsufficient mutation of FGFR2 in our cases. *J Craniofac Genet Dev Biol* (2000)20:112
64. Miyata I, Inagami T and Eto Y.: Physiological Function and Localization of a Short Isoform of the Corticotropin-Releasing Factor Receptor Subtype (CRF2  $\alpha$ -tr) in the Rat Brain. *Clinical Pediatric Endocrinology* (2000)9(2):55-62
65. Ida H, Rennert OM, Kobayashi M and Eto Y. Effects of enzyme replacement therapy in 13 Japanese pediatric patients with Gaucher disease. *Eur J Pediatr* (2000)accepted
66. Tsuda M, Kitasawa E, Ida H, Eto Y and Owada M. A newly recognized missense mutation in the GLUT2 gene in a patient with Fanconi-Bickel syndrome. *Eur J Pediatr* (2000)159:867