

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-507442

(P2014-507442A)

(43) 公表日 平成26年3月27日 (2014. 3. 27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02	4 B 0 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/76 (2006. 01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 4
A 6 1 K 33/00 (2006. 01)	A 6 1 K 33/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/616 (2006. 01)	A 6 1 K 31/616	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-555521 (P2013-555521)	(71) 出願人	508152917
(86) (22) 出願日	平成24年2月22日 (2012. 2. 22)		ザ ボード オブ リージェンツ オブ
(85) 翻訳文提出日	平成25年9月30日 (2013. 9. 30)		ザ ユニバーシティー オブ テキサス
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/026113		システム
(87) 国際公開番号	W02012/116064		アメリカ合衆国 テキサス州 オースティン
(87) 国際公開日	平成24年8月30日 (2012. 8. 30)		ン ウェスト 第七 ストリート 201
(31) 優先権主張番号	61/445, 390	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成23年2月22日 (2011. 2. 22)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 心臓線維芽細胞の心筋細胞への再プログラム化による心臓修復

(57) 【要約】

本発明は、インビトロおよびインビボの両方で心臓線維芽細胞を心筋細胞へ再プログラム化するための、Tbx5、Mef2C、Hand2、ミオカルディン、およびGata4を含む転写因子の使用を含む。そのような方法は、瘢痕を防止するかもしくは制限するためのおよび心筋修復を促進するための心筋梗塞後の患者の処置において特に用いられる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

心臓線維芽細胞を再プログラム化する方法であって、該心臓線維芽細胞をTbx5、Mef2C、およびHand2と接触させる工程を含む、方法。

【請求項 2】

接触させる工程が、Tbx5タンパク質、Mef2Cタンパク質、およびHand2タンパク質を前記心臓線維芽細胞へ送達することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

Tbx5、Mef2C、およびHand2が、異種細胞透過性ペプチド（CPP）を含む、請求項2記載の方法。

10

【請求項 4】

前記心臓線維芽細胞をGata4と接触させる工程をさらに含む、請求項2記載の方法。

【請求項 5】

前記心臓線維芽細胞をミオカルディンと接触させる工程をさらに含む、請求項2記載の方法。

【請求項 6】

前記心臓線維芽細胞をミオカルディンと接触させる工程をさらに含む、請求項4記載の方法。

【請求項 7】

接触させる工程が、Tbx5発現カセット、Mef2C発現カセット、およびHand2発現カセットを前記心臓線維芽細胞へ送達することを含む、請求項1記載の方法。

20

【請求項 8】

前記発現カセットが複製可能ベクターに含まれている、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

前記複製可能ベクターがウイルスベクターである、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターである、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

前記複製可能ベクターが非ウイルスベクターである、請求項8記載の方法。

30

【請求項 12】

前記非ウイルスベクターが脂質送達ビヒクル内に配置されている、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

前記心臓線維芽細胞をGata4発現カセットと接触させる工程をさらに含む、請求項7記載の方法。

【請求項 14】

前記心臓線維芽細胞をミオカルディン発現カセットと接触させる工程をさらに含む、請求項7記載の方法。

【請求項 15】

前記心臓線維芽細胞をミオカルディン発現カセットと接触させる工程をさらに含む、請求項13記載の方法。

40

【請求項 16】

心筋梗塞（MI）を経験した対象を処置する方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを、該対象へ送達する工程を含む、方法。

【請求項 17】

送達する工程が、Tbx5タンパク質およびMef2Cタンパク質の前記対象への投与を含む、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

Tbx5およびMef2Cが、異種細胞透過性ペプチド（CPP）を含む、請求項17記載の方法。

50

【請求項 19】

Hand2タンパク質、ミオカルディンタンパク質、および／またはGata4タンパク質のうちの1種、2種、または3種全てを前記対象へ送達する工程をさらに含む、請求項17記載の方法。

【請求項 20】

送達する工程が、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットの前記対象への投与を含む、請求項16記載の方法。

【請求項 21】

Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および／またはGata4発現カセットのうちの1種、2種、または3種全てを前記対象へ送達する工程をさらに含む、請求項20記載の方法。

10

【請求項 22】

前記発現カセットが複製可能ベクターに含まれている、請求項20記載の方法

【請求項 23】

前記複製可能ベクターがウイルスベクターである、請求項22記載の方法。

【請求項 24】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターである、請求項23記載の方法。

【請求項 25】

前記複製可能ベクターが非ウイルスベクターである、請求項22記載の方法。

20

【請求項 26】

前記非ウイルスベクターが脂質送達ビヒクル内に配置されている、請求項25記載の方法。

【請求項 27】

Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを前記MIの24時間後～1ヶ月後に送達する、請求項16記載の方法。

【請求項 28】

Hand2、ミオカルディン、および／もしくはGata4、または、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および／もしくはGata4発現カセットを24時間以内に送達する工程をさらに含む、請求項27記載の方法。

30

【請求項 29】

Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを複数回送達する、請求項16記載の方法。

【請求項 30】

Hand2、ミオカルディン、および／もしくはGata4、または、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および／もしくはGata4発現カセットを複数回送達する工程をさらに含む、請求項29記載の方法。

【請求項 31】

Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、13回、14回、15回、16回、17回、18回、19回、20回、21回、22回、23回、24回、25回、26回、27回、28回、29回、30回、または31回送達する、請求項16記載の方法。

40

【請求項 32】

Hand2、ミオカルディン、および／もしくはGata4、または、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および／もしくはGata4発現カセットを、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、13回、14回、15回、16回、17回、18回、19回、20回、21回、22回、23回、24回、25回、26回、27回、28回、29回、30回、または31回送達する工程をさらに含む、請求項31記載の方法。

【請求項 33】

Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを毎日送達する

50

、請求項16記載の方法。

【請求項 3 4】

Hand2、ミオカルディン、および / もしくはGata4、または、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および / もしくはGata4発現カセットを毎日送達する工程をさらに含む、請求項33記載の方法。

【請求項 3 5】

Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを、心臓内注射を介して送達する、請求項16記載の方法。

【請求項 3 6】

前記対象が、酸素、アスピリン、およびまたはニトログリセリンをさらに投与される、請求項16記載の方法。

10

【請求項 3 7】

前記対象が、経皮的冠動脈インターベンションをさらに実施される、請求項16記載の方法。

【請求項 3 8】

前記対象が、線維素溶解薬をさらに投与される、請求項16記載の方法。

【請求項 3 9】

前記MIが非ST上昇型MIである、請求項16記載の方法。

【請求項 4 0】

前記MIがST上昇型MIである、請求項16記載の方法。

20

【請求項 4 1】

心筋梗塞 (MI) を経験した対象における心肥大または心不全の発症を防止するかまたは遅延させる方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを該対象へ供給する工程を含む、方法。

【請求項 4 2】

二次的な抗肥大治療または抗心不全治療を前記対象へ実施する工程をさらに含む、請求項41記載の方法。

【請求項 4 3】

前記二次的な治療が、PKD阻害剤、ブロッカー、変力物質、利尿薬、ACE-I、AIIアンタゴニスト、BNP、Ca⁺⁺ブロッカー、またはHDAC阻害剤である、請求項41記載の方法。

30

【請求項 4 4】

防止または遅延が、心肥大を防止するかまたは遅延させることを含む、請求項41記載の方法。

【請求項 4 5】

防止または遅延が、運動能力の低下、心駆出量の減少、左室拡張末期圧の増加、肺毛細血管楔入圧の増加、心拍出量もしくは心係数の減少、肺動脈圧の増加、左室収縮末期径および左室拡張末期径の増加、左室壁応力および右室壁応力の増加、壁張力の増加、生活の質の低下、ならびに / または疾患に関連した罹患率もしくは死亡率の増加のうちの一つまたは複数を防止するかまたは遅延させることを含む、請求項41記載の方法。

【請求項 4 6】

Tbx5タンパク質およびMef2Cタンパク質が前記対象へ投与される、請求項41記載の方法。

40

【請求項 4 7】

Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットが前記対象へ投与される、請求項41記載の方法。

【請求項 4 8】

Hand2タンパク質、ミオカルディンタンパク質、および / またはGata4タンパク質を前記対象へ投与する工程をさらに含む、請求項46記載の方法。

【請求項 4 9】

Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および / またはGata4発現カセット

50

を前記対象へ投与する工程をさらに含む、請求項47記載の方法。

【請求項 5 0】

心筋梗塞を経験した対象の運動耐容能の減少を低下させる方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを該対象へ投与する工程を含む、方法。

【請求項 5 1】

Hand2、ミオカルディン、および/もしくはGata4、または、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および/もしくはGata4発現カセットを前記対象へ投与する工程をさらに含む、請求項50記載の方法。

【請求項 5 2】

心筋梗塞を経験した対象の入院を減少させる方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを該対象へ投与する工程を含む、方法。

【請求項 5 3】

Hand2、ミオカルディン、および/もしくはGata4、または、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および/もしくはGata4発現カセットを前記対象へ投与する工程をさらに含む、請求項52記載の方法。

【請求項 5 4】

心筋梗塞を経験した対象の生活の質を向上させる方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを該対象へ投与する工程を含む、方法。

【請求項 5 5】

Hand2、ミオカルディン、および/もしくはGata4、または、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および/もしくはGata4発現カセットを前記対象へ投与する工程をさらに含む、請求項54記載の方法。

【請求項 5 6】

心筋梗塞を経験した対象の罹患率を減少させる方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを該対象へ投与する工程を含む、方法。

【請求項 5 7】

Hand2、ミオカルディン、および/もしくはGata4、または、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および/もしくはGata4発現カセットを前記対象へ投与する工程をさらに含む、請求項56記載の方法。

【請求項 5 8】

心筋梗塞を経験した対象の死亡率を減少させる方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを該対象へ投与する工程を含む、方法。

【請求項 5 9】

Hand2、ミオカルディン、および/もしくはGata4、または、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および/もしくはGata4発現カセットを前記対象へ投与する工程をさらに含む、請求項58記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本願は、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる、2011年2月22日出願の米国仮出願第61/445,390号に基づく優先権の恩典を主張する。

【0 0 0 2】

本発明は、National Institutes of Health (NHLBI) により授与されたグラント番号1U01 HL100401-01の下で政府の援助を受けて作成された。政府は、本発明における一定の権利を所有する。

【0 0 0 3】

1. 発明の分野

本発明は、心臓病学、発生生物学、および分子生物学の領域に一般に関する。より具体

10

20

30

40

50

的には、心筋細胞における遺伝子調節および細胞生理学に関する。特に、本発明は、心臓線維芽細胞を心筋細胞へ再プログラム化するための様々な転写因子の使用、ならびに心筋梗塞後の瘢痕の防止および修復におけるそのような因子の使用に関する。

【背景技術】

【0004】

2. 関連技術の説明

心臓発作として一般的に公知の心筋梗塞(MI)または急性心筋梗塞(AMI)は、心臓細胞の死滅を引き起こす、心臓の一部への血液供給の中断である。これは、最も一般的には、動脈壁における脂質(脂肪酸)および白血球(特に、マクロファージ)の不安定な集合体である不安定動脈硬化プラークの破裂後の冠動脈の閉塞(遮断)による。その結果起こる虚血(血液供給の制限)および酸素不足は、十分な期間にわたり未処置のままにされた場合、心臓の筋肉組織(心筋)の傷害または死滅(梗塞)を引き起こし得る。心臓発作は、世界中の男女両方についての主要な死因である。

【0005】

MIは即時の医学的対応を要する医学的な緊急事態である。処置は、可能な限り多くの心筋を救済し、さらなる合併症を防止することを試みる。従って、「時は筋肉」という語句がある。酸素、アスピリン、およびニトログリセリンが投与され得る。古典的には、ニトログリセリンが有効でない場合、モルヒネが使用された。しかしながら、それは、NSTEMIの状況において死亡率を増加させる場合がある。冠動脈インターベンション(PCI)または線維素溶解は、STEMIを有するものにおいて推奨される。複数の遮断を有し、比較的安定している人々、または少数の緊急症例においては、バイパス手術がオプションであり得る。しかしながら、より有効な処置オプション、特に、心機能の損失をもたらすMI後瘢痕を防止するものが、必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

従って、心臓線維芽細胞を再プログラム化する方法であって、該心臓線維芽細胞をTbx5、Mef2C、およびHand2と接触させる工程を含む、方法が、本発明により提供される。接触させる工程は、Tbx5タンパク質、Mef2Cタンパク質、およびHand2タンパク質を心臓線維芽細胞へ送達することを含み得る。Tbx5、Mef2C、およびHand2のうちの1種または複数種は、異種細胞透過性ペプチド(CPP)を含んでいてもよい。方法は、心臓線維芽細胞をGata4と接触させる工程、ミオカルディンと接触させる工程、またはGata4およびミオカルディンの両方と接触させる工程をさらに含み得る。接触させる工程は、ウイルスベクター(例えば、アデノウイルスベクターもしくはレトロウイルスベクター)または(任意で、脂質送達ビヒクル内に配置された)非ウイルスベクターを含む複製可能ベクターに含まれる発現カセットなどの、Tbx5発現カセット、Mef2C発現カセット、およびHand2発現カセットを心臓線維芽細胞へ送達することを含み得る。方法は、心臓線維芽細胞をGata4発現カセットと接触させる工程、ミオカルディン発現カセットと接触させる工程、または、Gata4発現カセットおよびミオカルディン発現カセットの両方と接触させる工程をさらに含み得る。

【0007】

別の態様において、心筋梗塞(MI)を経験した対象を処置する方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを該対象へ送達する工程を含む、方法が提供される。方法は、例えば、異種細胞透過性ペプチド(CPP)を含むTbx5および/またはMef2Cを用いて、Tbx5タンパク質およびMef2Cタンパク質を対象へ投与する工程を含み得る。方法は、Hand2タンパク質、ミオカルディンタンパク質、および/またはGata4タンパク質のうちの1種、2種、または3種全てを対象へ送達する工程をさらに含み得る。あるいは、方法は、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを対象へ投与する工程を含んでいてもよく、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および/またはGata4発現カセットのうちの1種、2種、または3種全てを対象へ送達する工程をさらに含んでいてもよい。発現カセットは、ウイルスベクター(例えば、アデノウイルスベク

ターもしくはレトロウイルスベクター)または(任意で、脂質送達ビヒクル内に配置されたものを含む)非ウイルスベクターのような複製可能ベクターに含まれている。Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットは、MIの24時間後～1ヶ月後に送達され得、Hand2、ミオカルディン、および/もしくはGata4、または、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および/もしくはGata4発現カセットを、MI後24時間～1ヶ月以内に送達する工程をさらに含んでもよい。タンパク質または発現カセットは、複数回、例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、13回、14回、15回、16回、17回、18回、19回、20回、21回、22回、23回、24回、25回、26回、27回、28回、29回、30回、または31回送達され得る。タンパク質発現カセットは、毎日送達され得る。タンパク質または発現カセットは、心臓内注射を介して送達され得る。対象は、酸素、アスピリン、および/もしくはニトログリセリンをさらに投与されてもよい、または経皮的冠動脈インターベンションをさらに実施されてもよい、または線維素溶解薬をさらに投与されてもよい。MIは、非ST上昇型MIであってもよいまたはST上昇型MIであってもよい。

10

20

30

40

50

【0008】

さらに別の態様において、心筋梗塞(MI)を経験した対象における心肥大または心不全の発症を防止するかまたは遅延させる方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを該対象へ供給する工程を含む、方法が提供される。方法は、PKD阻害剤、ブロッカー、変力物質、利尿薬、ACE-I、AIIアンタゴニスト、BNP、Ca⁺⁺ブロッカー、またはHDAC阻害剤などの、二次的な抗肥大治療または抗心不全治療を、対象へ実施する工程をさらに含み得る。防止または遅延は、心肥大を防止するかまたは遅延させることを含み得る。防止または遅延は、運動能力の低下、心駆出量の減少、左室拡張末期圧の増加、肺毛細血管楔入圧の増加、心拍出量もしくは心係数の減少、肺動脈圧の増加、左室収縮末期径および左室拡張末期径の増加、左室壁応力および右室壁応力の増加、壁張力の増加、生活の質の低下、ならびに/または疾患に関連した罹患率もしくは死亡率の増加のうちの一つまたは複数防止するかまたは遅延させることも含み得る。方法は、Hand2タンパク質、ミオカルディンタンパク質、および/もしくはGata4タンパク質、または、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および/もしくはGata4発現カセットを対象へ投与する工程をさらに含み得る。

【0009】

付加的な態様には、心筋梗塞を経験した対象の運動耐容能の減少を低下させる方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを該対象へ投与する工程を含む、方法；心筋梗塞を経験した対象の入院を減少させる方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを該対象へ投与する工程を含む、方法；Hand2、ミオカルディン、および/もしくはGata4、または、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および/もしくはGata4発現カセットを該対象へ投与する工程をさらに含む、請求項52記載の方法；心筋梗塞を経験した対象の生活の質を向上させる方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを該対象へ投与する工程を含む、方法；心筋梗塞を経験した対象の罹患率を減少させる方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを該対象へ投与する工程を含む、方法；心筋梗塞を経験した対象の死亡率を減少させる方法であって、Tbx5およびMef2C、または、Tbx5発現カセットおよびMef2C発現カセットを該対象へ投与する工程を含む、方法が含まれる。上記方法の各々は、前出の態様のいずれかに頼り、前出の態様のいずれかを含んでもよく、例えば、具体的には、Hand2、ミオカルディン、および/もしくはGata4、または、Hand2発現カセット、ミオカルディン発現カセット、および/もしくはGata4発現カセットを対象へ投与する工程をさらに含んでもよい。

【0010】

本明細書に記載された任意の方法または組成物が、本明細書に記載された他の任意の方法または組成物に関して実施され得ることが企図される。

【0011】

「1つの(a)」または「1つの(an)」という単語の使用は、特許請求の範囲および/または明細書において「含む」という用語と共に使用された場合、「1」を意味し得るが、「1つまたはそれ以上」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは複数」の意味とも一致する。「約」という単語は、明示された数のプラスまたはマイナス5%を意味する。

【0012】

本発明のその他の目的、特色、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、本発明の本旨および範囲に含まれる様々な変化および修飾が、この詳細な説明から、当業者に明らかになるため、詳細な説明および具体例は、本発明の具体的な態様を示すが、例示として与えられているに過ぎないことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0013】

添付の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明のある種の局面をさらに証明するために含まれている。本発明は、本明細書に提示された具体的な態様の詳細な説明と組み合わせるこれらの図面のうちの一つまたは複数を参照することにより、よりよく理解され得る。

【図1】インビトロでのGHMTによる線維芽細胞の心臓表現型へ向けた再プログラム化。(図1A~B)心臓マーカーであるMHC-GFPおよびアクチニンについての免疫蛍光染色。MHC-GFPレポーターマウスから単離された成体のTTF(図1A)およびCF(図1B)を、GHMTを保持しているレトロウイルスまたはベクターにより形質導入した。免疫細胞化学を14日間の形質導入の後に実施した。筋節構造が観察された(下パネル)。白色ボックスは挿入図において拡大されている。スケールバー、40 μ m。(図1C)示された細胞型におけるカルシウムトランジェントの測定。示された細胞型におけるFura-2比(340/380nm)として示された代表的なカルシウムトランジェントトレース。iCLMは成体CFに由来し、新生児心室心筋細胞に最も類似したカルシウムトランジェントのパターンを示す。(図1D)GHMTまたはGMTによる再プログラム化効率の概要。

【図2】インビボでのGHMTによるCFの心臓運命へ向けた再プログラム化。(図2A)LADを結紮された心臓に、レトロウイルスGHMTおよびレトロウイルスTomatoマーカーを注射した。1ヶ月後、損傷心臓から心筋細胞を単離し、蛍光顕微鏡下で可視化した。上パネルは、tomato染色を示し、下パネルは位相差画像を示す。スケールバー、40 μ m。(図2B)MI後のFSP1-cre;Rosa26-LacZマウスにおけるGHMTにより再プログラム化された細胞の系統追跡。

-gal+心筋細胞(青色)は線維芽細胞に起因する。X-gal染色をMI後3週間目を実施した。未損傷心臓(左)においては、-gal+細胞がほとんど観察されなかった。GFP感染を受けた2つの異なる重症度のMIからの切片が示される;軽度(左から2番目)および重度(左から3番目)。GFP感染心筋は、-gal+非心筋細胞のみを示したが(中央4パネル)、GHMT感染心筋は広範な-gal+非心筋細胞および-gal+心筋細胞を示した(右)。上パネル内の黒色ボックスが、下パネルにおいて拡大されている。スケールバー、100 μ m。(図2B)GFP感染損傷心臓における-gal+細胞はcTnTを発現していなかったが(左から2番目)、GHMT感染損傷心臓における-gal+細胞の一部分はcTnTを発現しており(右4パネル)、組織化された筋節を示した(右)。上パネル内の示された数字によりマークされた-gal+細胞は、下パネル内の一致する数字によりマークされたcTnT+細胞を表す。右パネル内の白色ボックスは、挿入図において拡大されている。損傷心臓の切片は、境界領域のものであった。未損傷心臓の切片はLV由来である。スケールバー、40 μ m。(図2D)FSP1-cre;Rosa26-LacZマウスの未損傷心臓(1匹のマウスからの56切片)、GFP感染損傷心臓(3匹のマウスからのLAD結紮部位下の250 μ m間隔の4レベルにおける168切片)、およびGHMT感染損傷心臓(2匹のマウスからのLAD結紮部位下の250 μ m間隔の4レベルにおける20切片)における1切片当たりのLV内-gal+心筋細胞の定量化。データは平均値 \pm stdとして提示される。(図2E)タモキシフェンにより処理されたTcf21iCre;Rosa26RtdTマウスを、LAD結紮

に供した後、GFPレトロウイルスまたはGHMTレトロウイルスを注射した。1ヶ月後、心臓を切片化し、cTnTについて染色し、tomatoについて可視化した。1、2、および3は、境界領域におけるtomato陽性心筋細胞を示す。スケールバー、40 μ m。(図2F)示された処理の後のTcf21系統タグ付き心臓における1切片当たりのtomato陽性心筋細胞の定量化。1個の未損傷心臓からの20切片、2個の心臓からのLAD結紮部位下の250 μ m間隔の4レベルにおける12切片、および1個の心臓からのLAD結紮部位下の250 μ m間隔の4レベルにおける8切片を調査した。データは平均値 \pm stdとして提示される。(図2G)心臓毒による損傷後の後肢におけるiCLMの形成。切片を、cTnT(赤色)および細胞境界を可視化するための小麦胚芽凝集素(WGA)(緑色)について染色した。スケールバー、40 μ m。(図2H)示されるように、cTnT(赤色)、速筋型および遅筋型の骨格筋MHC(赤色)、ならびにWGA(緑色)について染色された損傷骨格筋の連続切片。スケールバー、40 μ m。(図2I)損傷マウス後肢におけるiCLMの定量化。損傷区域におけるcTnT+筋細胞の割合 = $100(\text{cTnT+筋細胞の数})/(\text{cTnT+筋細胞の数} + \text{中心核を有する筋細胞の数})$ 。前脛骨筋の損傷区域をcTnT発現について免疫染色した。GFPウイルスを注射された2匹のマウス、およびGHMTウイルスを注射された4匹のマウスから、cTnT+筋細胞および中心核を有する筋細胞の数を計数した。GFPを注射された筋肉において、cTnT陽性筋細胞は観察されなかった。データは平均値 \pm stdとして提示される。

【図3】インビボの誘導心筋細胞の機能性。(図3)境界領域における -gal+心筋細胞と -gal-心筋細胞との間のCx43染色。上パネル内の示された文字によりマークされた -gal+細胞は、下パネル内の一致する文字によりマークされたcTnT+細胞を表す。ギャップ結合(緑色)は、 -gal+心筋細胞と -gal-心筋細胞との間(AおよびB)、ならびに -gal+心筋細胞間(CおよびD)に観察された。スケールバー、40 μ m。(図3B)真の心室心筋細胞(-gal-心筋細胞)に類似した収縮性および Ca^{2+} トランジェントを示す、インビボの再プログラム化された心筋細胞(-gal+心筋細胞)。 -gal+心筋細胞を、蛍光顕微鏡下で緑色蛍光発生 -gal基質C12FDGにより標識した。筋節短縮の代表的なトレースを、電場刺激された -gal-心筋細胞(上)ならびに -gal+心筋細胞(中央および下)から記録した。15個の -gal-心筋細胞(損傷FSP1-Cre;Rosa26-LacZマウスから単離された6個の心筋細胞、および未損傷野生型マウスから単離された9個の心筋細胞)ならびに横紋形態学を有する7個の -gal+心筋細胞を調査した。全ての -gal-心筋細胞が、示されるような機能パターンを示す(上)。5/7(71.4%)のA型 -gal+細胞は、真の心室心筋細胞に類似した収縮性および Ca^{2+} トランジェントのパターンを示し、2/7(28.6%)のB型 -gal+細胞は、未熟な収縮性を示す(下)。

【図4】MI後の非心筋細胞へのGHMTの送達による心臓損傷の減弱。(図4A)MI後24時間目、2週間目、および3週間目の、心エコーを使用したEFおよびFSによる心機能の評価。8週齢のマウスを、LAD結紮に供した後、GFPレトロウイルスまたはGHMTレトロウイルスを心筋内注射した。データは平均値 \pm stdとして提示される。 * : $p < 0.05$ 、 ** : $p < 0.005$ 、ns: 統計的有意性なし。(図4B)心臓MRIによるMI後6週間目および12週間目の心機能の評価。EFおよび一回拍出量を査定した。8週齢のマウスを結紮し、GFPまたはGHMTのいずれかを保持しているレトロウイルスを注射した。MI後6週間目および12週間目のこれらのマウスの心機能を、MRIにより調査した。データは平均値 \pm stdとして提示される。 * : $p < 0.05$ 、 ** : $p < 0.005$ 。(図4C)MI後のGFP感染心筋とGHMT感染心筋との間の心臓線維症および瘢痕形成の程度の比較。LAD結紮の4週間後に、トリクローム染色により、LVの5つの異なるレベル(L1~L5)において、心臓線維症を評価した。結紮部位はXとしてマークされた。各群において、心臓線維症の重症度を、軽度(線維症面積 $< 20\%$)、中程度(線維症面積 $20 \sim 40\%$)、または重度(線維症面積 $> 40\%$)に分類した。数字は、各群における、MIに供された心臓の総数のうちの、示された重症度を示す心臓の数を示す。スケールバー、1mm。(図4D)図4Bに示された心臓切片における心臓線維症の定量化。線維症面積(%) = (レベル3および4における線維症面積の合計/レベル3および4におけるLV内心筋面積の合計) $\times 100$ 。 ** : $p < 0.005$ 。

【図5】心筋細胞特異的なレポーターマウス系統の生成。(図5A)心筋細胞において特異

的に発現される MHC-GFPトランスジーンを保有しているトランスジェニックマウスを生成した。尾先端部または心臓から単離された成体線維芽細胞を、候補心臓転写因子をコードするレトロウイルスに感染させた。フローサイトメトリーにより、GFPおよび/または心臓マーカーの発現について、細胞を分析した。(図5B) MHC-GFPトランスジーンの様式図。以前に記載されたとおり(Subramaniam et al.,1991)、マウス MHC遺伝子の上流にあり、エキソン1~3およびイントロン配列も包含している5.5kbのゲノム断片を、ネオマイシン耐性カセットの上流にクローニングした。ネオマイシン耐性カセットの後には、内部リボソーム進入配列(IRES)およびGFPレポーターが存在し、その後には、ヒト成長ホルモン(hGH)ポリアデニル化配列が存在した。(図5C)トランスジーンの心筋細胞特異的な発現を示す MHC-GFPトランスジェニックマウスから単離された細胞および組織の位相画像および蛍光画像。(図5D)成体 MHC-GFPトランスジェニックマウスから単離された典型的な心筋細胞(左パネル)および MHC-GFPトランスジェニックマウスから単離されたCFに由来するGHMT誘導心臓様筋細胞(iCLM)(右パネル)の位相差画像(上パネル)およびGFP蛍光画像(下パネル)。心筋細胞およびiCLMにおけるGFP蛍光の強度は類似している。

10

【図6】個々の心臓転写因子をコードするレトロウイルスの生成。マウス10T1/2線維芽細胞を、Mycエピトープタグ付き(MEF2C、Tbx5、Nkx2-5、HAND2、およびGATA4)またはFLAGエピトープ(Mesp1)タグ付きの、示された転写因子をコードするレトロウイルスに感染させ、各ウイルスに感染した細胞からの抽出物を用いて、抗Myc抗体または抗FLAG抗体を使用したウェスタンブロット分析により、タンパク質発現を検出した。GFP発現レトロウイルスを陰性対照として使用し、GAPDHは負荷対照であった。

20

【図7】成体TTFを心臓運命に向けて再プログラム化することができる転写因子のスクリーニング。(図7A)9日間の形質導入の後の MHC-GFP+細胞の分析についての代表的なフローサイトメトリープロット。心臓転写因子の示された組み合わせを、MHC-GFPレポーターマウスから単離された成体TTFへ形質導入した。6因子は、GATA4(G)、HAND2(H)、Tbx5(T)、MEF2C(M)、Mesp1(Ms)、Nkx2-5(N)を含む。5因子は、6因子からNkx2-5を除いたものである。各プロット内の数字は、MHC-GFP+細胞の割合を示す。死細胞は、ヨウ化プロピジウム(PI)染色により排除された。空ベクターレトロウイルスにより形質導入された細胞を、対照として使用した。(図7B)フローサイトメトリー分析の要約。6因子、5因子(GHMMsT)、または4因子(5因子-1因子)(左パネル);4因子(GHMT)または4因子-1(中央パネル);3因子(HMT)、3因子-1、または個々の因子(G、H、M、T)(右パネル)を発現するレトロウイルスによるTTFの感染の後の MHC-GFP+細胞の割合。2回の独立の実験のデータが、平均値 \pm stdとして提示される。

30

【図8】心臓転写因子により形質導入された心臓TTFにおける2種の心臓マーカーの分析。TTFを、転写因子の示された組み合わせを発現するレトロウイルスに感染させ、単一(MHC-GFP+またはcTnT+)および二重(MHC-GFP+かつcTnT+)の心臓マーカーについてフローサイトメトリーにより分析した。データは、心臓マーカーについて陽性の細胞の割合として示される。3~4回の独立の実験が、平均値 \pm stdとして提示される。

【図9】GHMTに应答して起こる心臓遺伝子活性化の時間経過。(図9A)GHMT(上パネル)またはGMT(下パネル)のレトロウイルス形質導入の後の示された時点における、成体TTFにおける2種の心臓マーカーcTnTおよび MHC-GFPについて陽性の細胞の分析についてのフローサイトメトリープロット。空ベクターレトロウイルスにより形質導入された細胞を、対照として使用した。(図9B)図9Aにおけるフローサイトメトリー分析の要約。二重陽性細胞の割合の経時的なわずかな減退は、非誘導線維芽細胞の増殖による可能性がある。

40

【図10】GHMTによる成体マウスCFの心臓表現型に向けた再プログラム化。(図10A)7日間の形質導入の後の成体CFにおける、GHMTまたはGMTにより誘導された、2種の心臓マーカーcTnTおよび MHC-GFPについて陽性の細胞の分析についてのフローサイトメトリープロット。空ベクターレトロウイルスにより形質導入された細胞を、対照として使用した。(図10B)GHMTにより誘導された2種の内在性心臓マーカーcTnTおよびcTnIについて陽性の細胞の分析についてのフローサイトメトリープロット。空レトロウイルスにより形質導入さ

50

れた細胞を、対照として使用した。

【図1 1】GHMTによる成体CFにおける心筋細胞マーカーの誘導。14日間の形質導入の後、MHC-GFPおよびcTnTについての免疫蛍光染色を実施した。MHC-GFPレポーターマウスから単離された成体CFを、GHMTを保持しているレトロウイルスまたは空ベクターにより形質導入した。筋節構造を観察した（下パネル）。下パネル内の白色ボックスは、挿入図において拡大されている。スケールバー、40 μ m。

【図1 2】GHMTによる成体線維芽細胞における筋節様構造の誘導。（図12A）2つの型のアクチニン陽性誘導心臓様筋細胞（iCLM）が、GHMTにより形質導入されたCFおよびTTFにおいて観察される。（A型細胞と呼ばれる）左側の細胞型は、高度に組織化された筋節を示し、（B型細胞と呼ばれる）右側の細胞型は、よりびまん性のアクチニン染色を示す。スケールバー、40 μ m。（図12B）成体CFに由来するiCLMの定量化。2回の独立の実験からの15の無作為に選ばれた領域における、A型細胞、B型細胞、およびDAPIの数を計数した。データは平均値 \pm stdとして提示される。（図12C）成体TTFに由来するiCLMの定量化。4回の独立の実験からの20の無作為に選ばれた領域において、A型細胞、B型細胞、およびDAPI染色細胞の数を計数した。データは平均値 \pm stdとして提示される。

【図1 3】GHMTにより形質導入された成体CFにおける遺伝子発現プロファイル。（図13A）実験設計。成体CFを空ベクターまたはGHMTレトロウイルスにより形質導入し、感染の2週間後または4週間後に採集した。（図13B）マイクロアレイ設計。感染CFおよび未感染CFおよび成体心臓から単離されたRNAを、45,281種のプローブから構成されるillumina Mouse-6 Beadchip（illumina）を使用したマイクロアレイにより、遺伝子発現プロファイルについて分析した。（図13C）CF、ベクターにより形質導入されたCF、GHMTにより形質導入されたCF、および成体心臓においてディファレンシャルに発現された遺伝子を図示するマイクロアレイデータのヒートマップ。赤色はアップレギュレートされた遺伝子を示し、緑色はダウンレギュレートされた遺伝子を示す。（図13D）PANTHER発現ツール（ワールドワイドウェブpantherdb.org）による遺伝子オントロジー分析は、GHMTにより形質導入されたCFにおいてアップレギュレートされた遺伝子をカテゴリー化する。（図13E）選択された遺伝子のヒートマップ。心臓収縮タンパク質、心臓ペプチド、Ca²⁺ハンドリングタンパク質、心臓転写因子、および心臓代謝をコードする遺伝子が、ベクターにより形質導入されたCFと比較して、成体心臓において見られるように、GHMTにより形質導入されたCFにおいてアップレギュレートされる。対照的に、非筋細胞マーカーをコードする遺伝子はダウンレギュレートされる。S100A4（FSP1）、COL16A1、およびCOL1A1は線維芽細胞マーカーである。TAGLN2は平滑筋マーカーである。PLP2は上皮濃縮遺伝子である。

【図1 4】リアルタイムPCRによる心臓遺伝子発現および線維芽細胞遺伝子発現のバリデーション。（図14A）心臓マーカーおよび（図14B）線維芽細胞マーカーの発現を、qPCRにより定量化した。UD、検出不能。

【図1 5】インビトロの心臓マーカーおよび線維芽細胞マーカーについての免疫染色。（図15A）それぞれ、アクチニン（赤色）およびプロリル4-ヒドロキシラーゼ ポリペプチド（P4HB）（緑色）について免疫染色された新生仔の心筋細胞および線維芽細胞。これらの2種のマーカーは共局在しない。枠で囲まれた区域は、挿入図において拡大されており、筋節を示す。核をDAPIにより染色した。スケールバー、40 μ m。（図15B）空ベクターまたはGHMTレトロウイルスにより形質導入された成体CFを、アクチニン（赤色）およびP4HB（緑色）について免疫染色した。核をDAPI（青色）により染色した。空ベクターにより形質導入されたCFは、P4HB染色陽性、およびアクチニン染色陰性であった（左パネル）。アクチニン染色陽性のGHMTレトロウイルスにより形質導入されたCFを、P4HBの染色パターンに基づき、3つのカテゴリー（A、B、およびC）に分類した。A、P4HB染色が陽性；B、P4HB染色が弱いが検出可能；およびC、P4HB染色が検出不能。スケールバー、40 μ m。（図15C）図15Bに記載された各カテゴリー（A、B、およびC）の細胞を、全アクチニン+細胞に対する割合として定量化した。データは平均値 \pm stdとして提示される。

【図1 6】GHMTは成体CFを機能性iCLMへ再プログラム化した。方法に記載されたように、電位感受性色素ジ-4-ANEPPSを使用して、自然拍動iCLMにおいて記録された代表的な活動

電位。

【図17】GHMTの誘導可能な発現によるCFからのiCLMの誘導。(図17A)実験設計およびレンチウイルスベクターの概略図。以前に記載されたGMT、およびMycエピトープタグ付きHAND2をコードする、テトラサイクリンにより誘導可能なウイルスにより、成体マウスから単離されたCFを形質導入した。示されるように、2日目に、因子の発現を誘導するためにドキシサイクリン(Dox)を添加し、12日目に除去した。30日目に、アクチニンおよびMycについての免疫染色により、心臓マーカーの発現を分析した。(図17B)レンチウイルスGHMTにより形質導入されたCFにおけるアクチニン(赤色)およびMyc(緑色)についての免疫染色。Doxは、29日間培養物中に存在したか(上パネル)、または12日目に削除された(下パネル)。枠で囲まれた領域は筋節様構造を示すために拡大されている。Doxの除去により、Myc染色は消失したが、アクチニン染色は維持されたことに注意すること(下パネル)。核はDAPI(青色)により染色された。

【図18】GHMTによるiCLMの誘導は、細胞自律的(cell-autonomous)である。(図18A)レトロウイルスGHMTにより形質導入されたCFにおけるアクチニン(赤色)およびMyc(緑色)についての免疫染色。枠で囲まれた領域は筋節様構造を示すために拡大されている。核はDAPI(青色)により染色された。(図18B)Myc陽性細胞の中のアクチニン陽性細胞の割合の定量化。アクチニン陽性細胞およびMyc陽性細胞を、2回の独立の実験からの37の無作為に選ばれた領域において計数した。データは平均値 \pm stdとして提示される。

【図19】レトロウイルスは損傷心臓内の虚血区域の非心筋細胞を感染させた。(図19A)梗塞心臓内の境界領域の5つの別々の区域における心筋内レトロウイルス注射の図示。(図19B)MIおよびその後のGFPレトロウイルス注射の4日後、心臓を採集し、切片化した。H&E染色および免疫組織化学を実施した。GFP発現(緑色)(右)は、白線で囲まれた虚血区域(左)においてのみ検出された。二次抗体のみによる染色を、陰性対照として使用した。スケールバー、100 μ m。(図19C)異なる拡大率でのcTnT(赤色)およびGFP(緑色)の発現を示す境界領域の免疫組織化学。GFPはcTnT発現と共局在しなかった。核はDAPI(青色)により染色された。スケールバー、40 μ m(上)、20 μ m(下)。(図19D)1心臓切片当たりのGFP+細胞の定量化。LAD結紮部位下の250 μ m間隔の8レベルにおける8切片から、GFP+細胞を計数した。

【図20】インビボのGHMMsTおよびGHMMsNTによるCFの心筋細胞への再プログラム化。(図20A)MIおよびその後のGHMMsNTレトロウイルスまたはGHMMsTレトロウイルスの注射の3週間後、FSP1-cre/Rosa26-LacZマウスの心臓を採集し、 β -gal基質により染色した。GHMMsT感染心臓は、GHMMsNT感染心臓より多くの β -gal+心筋細胞様細胞を示した。黒色ボックスにより示された領域(左)が、中央パネルおよび右パネルにおいて拡大されている。スケールバー、40 μ m。(図20B)FSP1-cre/Rosa26-LacZマウスの未損傷心臓(1匹のマウスからの56切片)、GFP感染損傷心臓(3匹のマウスからの168切片)、GHMMsNT感染損傷心臓(4匹のマウスからの189切片)、GHMMsT感染損傷心臓(2匹のマウスからの66切片)、およびGHMT感染損傷心臓(2匹のマウスからの20切片)における1切片当たりのLV内 β -gal+心筋細胞の定量化。全ての切片が、LAD結紮部位下の250 μ m間隔の4レベルで採取された。データは平均値 \pm stdとして提示される。

【図21】Tcf21iCre/+ノックインマウスの生成およびTcf21系統タグ付き細胞の特徴決定。(図21A)Tcf21遺伝子座の構造およびTcf21iCre/+ノックインマウスの生成のための戦略。Tcf21遺伝子の第1エキソンを置換するため、Tcf21遺伝子座へ誘導可能Cre(MerCreMer)をノックインするためのターゲティング戦略。Tcf21iCre/+マウスを生成するため、ターゲティングされた対立遺伝子を有するマウスを、ネオマイシン耐性カセットを除去するFLPeトランスジェニックマウスと交雑させた。赤色バーおよび青色バーは、それぞれ、サザンブロット分析のための5'プローブおよび3'プローブを表す。hFLP(フリップアーゼ認識標的)部位を示す。(図21B)サザンブロット分析によるターゲティングの確認。ScaIにより消化されたゲノムDNAを、aに示された5'プローブにハイブリダイズさせた。野生型(WT)バンドは7.7kbに移動したが、ターゲティングされたバンドは12.7kbに移動した。HindIIIにより消化され、aに示された3'プローブにハイブリダイズさせられたゲノム

DNA。WTバンドは9.1kbに移動し、ターゲティングされたバンドは5.4kbに移動した。遺伝子型を上を示した。(図21C)成体マウス心臓におけるTcf21系統タグ付き細胞を単離するための実験設計の模式図。Tcf21iCre/+;R26RtdT対立遺伝子を保持しているマウスを入手するため、Tcf21iCre/+(Tcf21-MerCreMer)マウスをR26RtdT(Rosa26-Tomato)マウスと交雑させた。連続3日間、タモキシフェンによるマウスの経管栄養により、Tcf21発現細胞におけるCreの活性化を誘導した。1週間後、心臓を消化し、Tcf21系統タグ付き細胞を、Tomato発現について選別した。解離した心臓細胞およびTomato+細胞からRNAを単離した。

(図21D)異なる細胞型をマークする遺伝子の発現を検出するため、qPCRを実施した。線維芽細胞特異的なマーカーは、Tomato+Tcf21系統タグ付き細胞において濃縮されている(上パネル)。対照的に、心筋細胞マーカー(CM)および血管平滑筋細胞マーカー(VSMC)は、検出不可能であるか、または無視し得る程度に発現されていた(下パネル)。これらの所見は、Tcf21が、マウス心臓における心臓線維芽細胞を確実にマークすることを示す。相対的な遺伝子発現は、選別されたTomato+細胞の発現を、解離した心臓細胞と比較することにより決定される。(図21E)Tcf21系統タグ付き細胞についての免疫組織化学。Tcf21iCre/+;R26RtdT対立遺伝子を保持しているタモキシフェン誘導マウスからの心臓切片を、P4HB(線維芽細胞)、SM22(平滑筋細胞)、イソレクチンB4(内皮細胞)、およびcTnT(心筋細胞)について染色した。Tcf21系統タグ付き細胞は、心臓線維芽細胞マーカー(P4HB)と同時に染色されたが、心筋細胞マーカーまたは他の非心筋細胞マーカーとは同時染色されなかった。スケールバー、40 μ m。

【図22】インビボのCFの誘導可能な標識のための実験設計。Tcf21iCre/+;R26RtdTを保持しているマウスを、CFを標識するため、連続3日間、タモキシフェンにより処理した。タモキシフェン処理の8日後(11日目)、LAD結紮を実施し、心臓にGFPまたはGHMTをコードするレトロウイルスを注射した。心臓を31日目に分析した。

【図23】GHMTがMI後の新たな心筋細胞の形成を促進することを示すための誘導可能 MHC-MerCreMer,Rosa26-LacZマウス系統の使用。(図23A)心筋細胞の遺伝学的運命マッピング研究の模式図。MHC-MerCreMerトランスジェニックマウスを、Rosa26-LacZレポーターマウスと交雑させた。連続7日間のタモキシフェンの投与の後、LacZレポーター遺伝子が大多数の心筋細胞においてオンに切り替わる。次いで、最終回のタモキシフェンの経管栄養の7日後にLAD結紮を実施し、GFPまたはGHMTをコードするレトロウイルスを心臓へ注射した。45日目に、マウスを屠殺し、LacZ発現を心臓の組織学的切片において決定した。GHMTを注射された心臓における、より高い割合のLacZ陰性心筋細胞の存在は、未標識細胞の心臓運命への再プログラム化を反映する。(図23B)MHC-MerCreMer;Rosa26-LacZの未損傷心臓(左)、または損傷GFPレトロウイルス感染心臓(中心)、または損傷GHMTレトロウイルス感染心臓(右)の横断面を、ガラクトシダーゼ活性を検出するために染色した(青色)。枠で囲まれた領域は、下パネルにおいて拡大されている。スケールバー、2mm(上)、40 μ m(中央および下)。(図23C)示されるように、GFPレトロウイルスまたはGHMTレトロウイルスを注射されたLAD結紮マウスの境界領域におけるガラクトシダーゼ陰性心筋細胞の定量化。各心臓からのLAD結紮部位下の250 μ m間隔の3つの異なるレベルにおける3切片を調査した。データは平均値 \pm stdとして提示される。p値は両側t検定により算出された。

【図24】マウス後肢へのGFPのレトロウイルス送達。筋線維損傷を誘導するため、マウス後肢に心臓毒(50 μ l、10 μ M)を注射した。24時間後および48時間後に、GFPまたはGHMTをコードするレトロウイルス50 μ lを後肢に注射した。3週間後に、前脛骨筋を解剖し、切片化し、H&E染色するか(左パネル)、またはGFPについて可視化した(右パネル)。スケールバー、0.1mm。

【図25】個々のマウスにおける心機能の分析。マウスをLAD結紮に供した後、GFPまたはGHMTをコードするレトロウイルスを心筋内注射した。6週間後および12週間後に、心臓MRIイメージングを使用して、(図25A)EF、(図25B)一回拍出量により、心機能を評価した。線でつながれたデータ点の各対は、同一マウスからのデータを表す。MI後のGHMT感染心筋。MIおよびGHMTレトロウイルス注射の4週間後、トリクローム染色により心臓線維

10

20

30

40

50

症を評価した。図4A～Dにおいて定義されたとおりに、心臓線維症の重症度を、軽度、中程度、または重度に分類した。数字は、MIに供された心臓の総数のうちの、示された重症度を示す心臓の数を示す。各心臓からの5切片が示される。結紮部位はXとしてマークされる。スケールバー、1mm。

【図26】MI後のGHMMsT感染心筋における心臓線維症および瘢痕形成の評価。MIおよびGHMMsTレトロウイルス注射の4週間後に、トリクローム染色により心臓線維症を評価した。図4A～Dにおいて定義されたとおりに、心臓線維症の重症度を、軽度、中程度、または重度に分類した。数字は、MIに供された心臓の総数のうちの、示された重症度を示す心臓の数を示す。各心臓からの5切片が示される。結紮部位はXとしてマークされる。スケールバー、1mm。

10

【図27】MI後3週間目の心機能に対する心臓転写因子の異なる組み合わせの効果の比較。8週齢のマウスを、LAD結紮、およびGFP、GHMMsNT、GHMMsT、GHMT、またはGMTを保持しているレトロウイルスの注射に供した。心エコーにより、MI後3週間目のFSにより、各マウスの心機能を査定した。心臓転写因子の組み合わせを注射された各マウスのFSを、GFP群の平均FSにより規準化した。データは平均値 \pm stdとして提示される。p値は両側t検定により算出されたものである。

【図28】イソレクチン染色による血管密度の分析。成体マウスにおいてLAD結紮を実施した後、GFPまたはGHMTを発現するレトロウイルスを注射した。3週間後、心臓を採集し、切片化した。境界領域のイソレクチン染色により血管密度を決定した。値は、1mm²当たりのイソレクチン陽性血管の数を表す。データは平均値 \pm stdとして提示される。p値は両側t検定により算出されたものである。^{*} : p<0.05。

20

【図29】ヒト新生児包皮線維芽細胞におけるGHMTによる心臓マーカー、心臓トロポニンT(cTnT)の発現を増強するための付加的な因子を検索するためのフローサイトメトリー分析。G : GATA4、H : HAND2、M : MEF2C、T : TBX5 (上)。フローサイトメトリー分析の要約(下)。

【図30】ヒト新生児包皮線維芽細胞におけるGHMTによる心臓マーカー、トロポミオシンの発現を増強するための付加的な因子を検索するためのフローサイトメトリー分析。G : GATA4、H : HAND2、M : MEF2C、T : TBX5 (上)。フローサイトメトリー分析の要約(下)。

【図31】ヒト新生児包皮線維芽細胞における最適な心臓遺伝子活性化を得るための5因子(GHMTおよびMYOCD)の使用を証明するためのフローサイトメトリー分析。MYOCD : ミオカルディン。

30

【図32】ヒト新生児包皮線維芽細胞における最適な心臓遺伝子活性化を得るための5因子(GHMTおよびMRTF-A)の使用を証明するためのフローサイトメトリー分析。MRTF-A : ミオカルディン関連転写因子A。

【図33】GHMTおよびMYOCDにより再プログラム化された細胞の免疫染色。心臓マーカー、アクチニンは、GHMTおよびMYOCDにより再プログラム化されたヒト包皮由来細胞における筋節様構造を証明する。

【図34】心臓遺伝子発現の活性化を示すフローサイトメトリー。GHMTおよびMYOCDによる、成体ヒト心臓線維芽細胞におけるトロポミオシン(上)およびcTnT(下)の活性化を示すための分析。

40

【図35】GHMTおよびMYOCDにより再プログラム化された細胞の免疫染色。心臓マーカー、アクチニンは、GHMTおよびMYOCDにより再プログラム化された成体ヒト心臓線維芽細胞由来細胞における筋節様構造を証明する。

【発明を実施するための形態】

【0014】

例示的な態様の詳細な説明

心不全は、世界中の罹患率および死亡率の主因の一つである。米国のみで、300万人の心筋症を有する人々が現在生存しており、毎年さらに400,000例が診断されていると推定されている。心疾患、および冠動脈疾患、心筋梗塞、うっ血性心不全、および心肥大を含むその徴候は、明白に、今日の米国における主要な健康リスクとなっている。これ

50

らの疾患に罹患した患者を診断し、処置し、支援するためのコストは、優に数十億ドルに達する。

【0015】

心疾患の一つの特に重度の徴候は、心筋梗塞(MI)である。典型的には、MIは、アテローム性動脈硬化症の結果として冠動脈において起こる急性血小板性冠動脈閉塞に起因し、心筋細胞死、即ち、梗塞を引き起こす。心臓の筋肉細胞である心筋細胞は、終末分化し、一般に細胞分裂能を有しないため、急性心筋梗塞において死滅する時には、一般に、瘢痕組織に置換される。瘢痕組織は、収縮性がなく、心機能に寄与することができず、心収縮中の拡大、または心室のサイズおよび有効半径の増加により、例えば、肥大により、心機能において有害な役割をしばしば果たす。心肥大は、心筋梗塞を含む心臓病の事実上全ての型に対する心臓の適応応答である。肥大応答は初期には心拍出量を強化する代償機序であるが、持続的な肥大は、DCM、心不全、および突然死をもたらす場合がある。米国においては、各年およそ50万人の個体が、心不全を有すると診断され、死亡率は50%近い。

10

【0016】

薬理学的剤による処置が、未だ、MIに起因するものを含む、心不全の徴候を低下させるかまたは排除するための主要な機序となっている。利尿薬は、軽度～中程度の心不全のための第一選択処置を構成する。残念ながら、一般的に使用されている利尿薬(例えば、チアジド)の多くが、多数の有害効果を有する。例えば、ある種の利尿薬は、血清中のコレステロールおよびトリグリセリドを増加させる場合がある。さらに、利尿薬は、重度心不全に罹患している患者には一般に無効である。利尿薬が無効である場合、血管拡張剤が使用され得る。アンジオテンシン変換(ACE)阻害剤(例えば、エナラプリルおよびリシノプリル)は、症候緩解を提供するのみならず、死亡率を減少させることも報告されている(Young et al., 1989)。しかしながら、やはり、ACE阻害剤も、有害効果に関連しており、ある種の疾患状態(例えば、腎動脈狭窄症)を有する患者においては禁忌となっている。同様に、変力剤治療(即ち、心筋の筋収縮の力を増加させることにより心拍出量を改善する薬物)は、胃腸障害および中枢神経系機能障害を含む多様な有害反応に関連している。

20

【0017】

従って、現在使用されている薬理学的剤は、特定の患者集団において重度の欠点を有する。より重要なことには、これらの剤は、いずれも、急性冠動脈イベントにより引き起こされた傷害を逆転させることができず、従って、ある程度にのみ、代償的であるに過ぎない。DCMを有する患者についての予後は、可変であり、心室機能障害の程度に依るが、死亡の大半は診断の5年以内に起こる。従って、本発明は、心機能の損失をもたらす傷害を防止するかまたは制限することにより、MIを解決するための革新的な方法を提供する。一連の心臓転写因子を提供することにより、虚血後の心筋における瘢痕を担う心臓線維芽細胞を、心筋を再生することができる心筋細胞へ変換し、それにより、梗塞のために失われた組織を置換することができ、さらに、機能を損なう瘢痕を低下させることができる。本発明のこれらおよびその他の局面を、以下に詳細に記載する。

30

【0018】

1. 転写因子

40

(時に、配列特異的DNA結合因子と呼ばれる)転写因子とは、特異的なDNA配列に結合し、それにより、DNAからmRNAへの遺伝情報の移動(または転写)を制御するタンパク質である。転写因子は、RNAポリメラーゼ(DNAからRNAへの遺伝情報の転写を実施する酵素)の特異的な遺伝子への動員を(活性化因子として)促進するか、または(抑制因子として)阻止することにより、単独で、または複合体内の他のタンパク質と共に、この機能を実施する。

【0019】

転写因子の明確な特色は、それらが調節する遺伝子に隣接するDNAの特異的な配列に付着する、1個または複数個のDNA結合ドメイン(DBD)を含有している点である。活性化補助因子、クロマチンリモデラー、ヒストンアセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、お

50

よびメチラーゼのような付加的なタンパク質も、遺伝子調節において重大な役割を果たしているが、それらは、DNA結合ドメインを欠き、従って、転写因子としては分類されない。

【0020】

本発明は、心臓線維芽細胞を心筋細胞へ再プログラム化するために、ある種の周知の転写因子を組み合わせることが可能であり、複雑なエキスピボの培養工程および再投与の必要なしにインサイチュでそれが可能であるという、本発明者らの観察を含む。特に、Tbx5およびMef2Cが、線維芽細胞-心筋細胞変換の達成のために重要であり、ミオカルディン、Hand2、およびGata4も、その効果を増強し得ることが示される。従って、Tbx5 + Mef2C、Tbx5 + Mef2C + Hand2、Tbx5 + Mef2C + Gata4、Tbx5 + Mef2C + Gata4 + Hand2、ミオカルディン + Tbx5 + Mef2C、ミオカルディン + Tbx5 + Mef2C + Hand2、ミオカルディン + Tbx5 + Mef2C + Gata4、およびミオカルディン + Tbx5 + Mef2C + Gata4 + Hand2を含む組み合わせが企図され、他の因子の追加も企図される。

10

【0021】

A. Tbx5

Tボックス転写因子TBX5は、ヒトにおいてはTBX5遺伝子によりコードされるタンパク質である。この遺伝子は、共通のDNA結合ドメインであるTボックスを共有する遺伝子の系統発生的に保存されたファミリーのメンバーである。Tボックス遺伝子は、発生過程の調節に関与している転写因子をコードする。この遺伝子は、ヒト12番染色体上の関連ファミリーメンバーTボックス3（尺骨乳房症候群）と密接に関連している。コードされたタンパク質は、心臓発生および四肢同一性の特定において役割を果たし得る。この遺伝子の変異は、心臓および上肢に影響を与える発達障害、ホルト・オーラム（Holt-Oram）症候群に関連付けられている。異なるアイソフォームをコードするいくつかの転写物バリエーションが、この遺伝子について記載されている。Basson et al. (1997)およびTerrett et al. (1994)を参照のこと。

20

【0022】

TBX5（Tボックス5）；mRNA = NM_000192（SEQ ID NO:1）；タンパク質 = NP_000183（SEQ ID NO:2）。

【0023】

B. Mef2C

MADSボックス転写エンハンサー因子2ポリペプチドCとしても公知の筋細胞特異的エンハンサー因子2Cは、ヒトにおいてはMEF2C遺伝子によりコードされるタンパク質である。MEF2CはMef2ファミリーの転写因子である。遺伝子はマイナス鎖上の5q14.3に位置し、200,723塩基長である。コードされたタンパク質は、473アミノ酸を有し、予測分子量は51.221kDである。3種のアイソフォームが同定されている。セリン59およびセリン396におけるリン酸化、リジン391におけるSUMO化、リジン4におけるアセチル化、ならびにタンパク質分解を含む、いくつかの翻訳後修飾が同定されている。成熟タンパク質は核に見出され、遺伝子の発現は出生後の時期に最大となる。

30

【0024】

MEF2Cは、MAPK7、EP300、Sp1転写因子、TEAD1、SOX18、HDAC4、HDAC7、およびHDAC9と相互作用することが示されている。この遺伝子は、心臓形態形成および筋形成および血管発生に関与している。また、神経形成および皮質構造の発生にも関与し得る。Mef2c遺伝子の機能性コピーを有しないマウスは、出生前に死亡し、心臓および血管系に異常を有する。ヒトにおいて、この遺伝子の変異は、重度の精神運動遅滞、周期性振戦、および乳児期に観察される上肢の鏡像運動を含む異常運動パターン、筋緊張低下、異常EEG、てんかん、発語の欠如、自閉的行動、歯ぎしり、および軽度の異形症特色、脳梁の軽度のひ薄化、ならびに後頭葉における白質ミエリン形成の遅延をもたらしている。McDermott et al. (1993)およびMolkentin et al. (1996)を参照のこと。

40

【0025】

MEF2C（筋細胞エンハンサー因子2C）；mRNA = NM_002397（SEQ ID NO:3）；タンパク質

50

= NP_002388 (SEQ ID NO:4)。

【0026】

C. GATA4

転写因子GATA-4は、ヒトにおいてはGATA4遺伝子によりコードされるタンパク質である。この遺伝子は、ジンクフィンガー転写因子のGATAファミリーのメンバーをコードする。このファミリーのメンバーは、多くの遺伝子のプロモーターに存在するGATAモチーフを認識する。このタンパク質は、胚形成ならびに心筋の分化および機能に関与している遺伝子を調節すると考えられている。この遺伝子の変異は、心中隔欠損にも生殖欠損にも関連付けられている。GATA4は、NKX2-5、TBX5、ZFPM2、血清応答因子、HAND2、およびHDAC2と相互作用することが示されている。White et al.(1995)を参照のこと。

10

【0027】

GATA4 (GATA結合タンパク質4) ; mRNA = NM_002052 (SEQ ID NO:5) ; タンパク質 = NP_02043 (SEQ ID NO:6)。

【0028】

D. Hand2

心臓神経堤派生物発現タンパク質 (Heart- and neural crest derivatives-expressed protein) 2は、ヒトにおいては、HAND2遺伝子によりコードされるタンパク質である。この遺伝子によりコードされたタンパク質は、転写因子の塩基性ヘリックスループヘリックスファミリーに属する。この遺伝子産物は、発生中の心室において非対称的に発現され、心臓形態形成において必須の役割を果たす、2種の密接に関連するファミリーメンバーHANDタンパク質のうちの1種である。それらは、相補的に作用して、右心室および大動脈弓の形成において機能し、従って、先天性心疾患のメディエーターとして関係付けられている。さらに、この転写因子は、四肢および鰓弓の発生において重要な役割を果たす。Russell et al.(1999)を参照のこと。

20

【0029】

HAND2 (心臓神経堤派生物発現タンパク質2) ; mRNA = NM_021973 (SEQ ID NO:7) ; タンパク質 = NP_068808 (SEQ ID NO:8)。

【0030】

E. ミオカルディン

ミオカルディンは、ヒトにおいてはMYOCD遺伝子によりコードされるタンパク質である。ミオカルディンは、血清応答因子の平滑筋および心筋に特異的な転写活性化補助因子である。非筋肉細胞において異所的に発現された場合に、ミオカルディンは、血清応答因子 (SRF) との会合により平滑筋分化を誘導することができる。

30

【0031】

MYOCD (ミオカルディン) ; mRNA = NM_001146312.1 (SEQ ID NO:9) ; タンパク質 = NP_01139784.1 (SEQ ID NO:10)。

【0032】

III. タンパク質送達

本発明は、一つの局面において、転写因子の作製および製剤化、ならびに細胞、組織、または対象へのそれらの送達に関する。一般に、タンパク質の組換え作製は周知であり、従って、本明細書には詳細に記載されない。しかしながら、以下に見出される核酸および発現ベクターの考察は、この考察に組み入れられる。

40

【0033】

A. タンパク質の精製

本発明に係るタンパク質を精製することは望ましいと考えられる。タンパク質精製技術は当業者に周知である。これらの技術は、あるレベルにおいて、ポリペプチド画分および非ポリペプチド画分への細胞環境の粗分画を含む。他のタンパク質からポリペプチドを分離した後、関心対象のポリペプチドを、部分精製または完全精製 (または均質になるまでの精製) を達成するため、クロマトグラフィ技術および電気泳動技術を使用してさらに精製することができる。純粋なペプチドの調製に特に適合した分析法は、イオン交換クロマ

50

トグラフィ、排除クロマトグラフィ；ポリアクリルアミドゲル電気泳動；等電点電気泳動である。ペプチドを精製する特に効率的な方法は、高速タンパク質液体クロマトグラフィまたはさらにはHPLCである。

【0034】

本発明のある種の局面は、コードされたタンパク質またはペプチドの精製に関し、特定の態様において、実質的な精製に関する。本明細書において使用されるように、「精製されたタンパク質」という用語は、タンパク質またはペプチドが、その天然に入手可能な状態に比べて任意の程度に精製されている、他の成分から単離可能な組成物をさすものとする。従って、精製されたタンパク質またはペプチドとは、それが天然に存在し得る環境を含まないタンパク質またはペプチドもさす。

10

【0035】

一般に、「精製された」とは、様々な他の成分を除去するための分画に供されており、かつその発現された生物学的活性を実質的に保持しているタンパク質組成物をさす。「実質的に精製された」という用語が使用される場合、この表記は、タンパク質が、組成物の主成分を形成し、例えば、組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、またはそれ以上を構成する組成物をさす。

【0036】

タンパク質の精製の程度を定量化する様々な方法が、本開示を考慮すれば、当業者に公知であろう。これらには、例えば、活性画分の比活性の決定、またはSDS/PAGE分析による画分内のポリペプチドの量の査定が含まれる。画分の純度を査定する好ましい方法は、画分の比活性を算出し、それを初期抽出物の比活性と比較し、それにより、「精製倍率」により本明細書において査定される、純度を算出することである。活性の量を表すために使用される実際の単位は、当然、精製を追跡するために選ばれた特定のアッセイ技術、および発現されたタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すか否かに依存すると考えられる。

20

【0037】

タンパク質精製において使用するために適当な様々な技術が、当業者に周知であろう。これらには、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体等による、または熱変性による沈殿、その後の遠心分離；イオン交換クロマトグラフィ、ゲルろ過クロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、およびアフィニティクロマトグラフィのようなクロマトグラフィ工程；等電点電気泳動；ゲル電気泳動；ならびにそのような技術およびその他の技術の組み合わせが含まれる。当技術分野において一般に公知であるように、様々な精製工程を実施する順序を変化させるか、またはある種の工程を省略しても、実質的に精製されたタンパク質またはペプチドの調製のための適当な方法をもたらすことが可能であると考えられる。

30

【0038】

タンパク質が必ず最も精製された状態で提供されなければならないという一般的な要件は存在しない。実際、比較的実質的に精製されていない産物が、ある種の態様において利用可能性を有すると考えられることが企図される。より少ない精製工程の組み合わせを使用することにより、または同一の一般的な精製スキームの異なる型を用いることにより、部分精製が達成されてもよい。例えば、HPLC装置を用いて実施された陽イオン交換カラムクロマトグラフィは、一般に、低圧クロマトグラフィシステムを用いた同一の技術より大きな精製「倍率」をもたらすことが認識される。より低い相対的精製度を示す方法は、タンパク質産物の全回収において、または発現されたタンパク質の活性の維持において利点を有し得る。

40

【0039】

ポリペプチドの移動が、SDS/PAGEの異なる条件によって、時には有意に、変動し得ることは公知である (Capaldi et al., 1977)。従って、精製または部分精製された発現産物の見かけの分子量は、異なる電気泳動条件の下で、変動し得ることが認識されることが考えられる。

50

【 0 0 4 0 】

高速液体クロマトグラフィ（HPLC）は、ピークの極めて高度の分解による極めて迅速な分離を特徴とする。これは、適度の流速を維持するための極めて微細な粒子および高圧の使用により達成される。分離は、わずか数分、または長くても1時間で達成され得る。さらに、粒子が極めて小さく、密に充填されており、空隙容量が総容量のうちの極一部であるため、極めて少量の試料のみが必要とされる。また、バンドが極めて狭く、試料の希釈がほとんど存在しないため、試料の濃度はさほど高くななくてもよい。

【 0 0 4 1 】

ゲルクロマトグラフィまたは分子ふるいクロマトグラフィは、分子サイズに基づく特殊な型の分配クロマトグラフィである。ゲルクロマトグラフィの理論は、分子が、サイズに依って、孔の中を通過するか、または孔の周囲を通過するため、小さな孔を含有している不活性物質の小さな粒子により調製されたカラムが、より小さな分子から、より大きな分子を分離するというものである。粒子が作成されている材料が分子を吸着しない限り、流速を決定する唯一の因子はサイズである。従って、形が比較的一定である限り、分子はサイズが大きい順にカラムから溶出する。ゲルクロマトグラフィは、分離が、pH、イオン強度、温度等のような全ての他の因子に依存しないため、異なるサイズの分子を分離するために卓越している。吸着も事実上存在せず、ゾーン拡散も比較的少なく、溶出容量は、単純に、分子量に関係している。

【 0 0 4 2 】

アフィニティクロマトグラフィは、単離される物質と、それが特異的に結合することができる分子との間の特異的親和性に頼るクロマトグラフィ手法である。これは、受容体-リガンド型相互作用である。カラム材料は、結合パートナーのうちの一方を不溶性マトリックスへ共有結合的にカップリングすることにより合成される。カラム材料は、次いで、溶液から物質を特異的に吸着することができる。溶出は、結合が起こらないと考えられる条件へと条件を変化させる（pH、イオン強度、温度等を改変する）ことにより起こる。

【 0 0 4 3 】

炭水化物含有化合物の精製において有用な特定の型のアフィニティクロマトグラフィは、レクチンアフィニティクロマトグラフィである。レクチンは、多様な多糖および糖タンパク質に結合する物質のクラスである。レクチンは、一般的に、臭化シアンによりアガロースにカップリングされる。セファロースにカップリングされたコンカナバリンAは、最初に使用されたこの種類の材料であり、多糖および糖タンパク質の単離において広く使用されている。他のレクチンには、レンチルレクチン、N-アセチルグルコサミニル残基の精製において有用である小麦胚芽凝集素、およびヘリックス・ポマチア（*Helix pomatia*）レクチンが含まれる。レクチンは、それ自体、炭水化物リガンドを用いたアフィニティクロマトグラフィを使用して精製される。乳糖は、トウゴマおよびピーナッツからレクチンを精製するために使用されており；マルトースは、レンチルおよびタチナタマメからのレクチンの抽出において有用であり；N-アセチル-D-ガラクトサミンは、大豆からレクチンを精製するために使用され；N-アセチルグルコサミニルは、小麦麦芽由来のレクチンに結合し；D-ガラクトサミンは、ハマグリからのレクチンの入手において使用され、L-フコースは、ハス由来のレクチンに結合すると考えられる。

【 0 0 4 4 】

マトリックスは、それ自体、有意な程度に分子を吸着せず、広範囲の化学的、物理的、および熱的な安定性を有する物質でなければならない。リガンドは、その結合特性に影響を与えないような方法でカップリングされなければならない。リガンドは、比較的強固な結合も提供しなければならない。そして、試料またはリガンドを破壊することなく、物質を溶出させることが可能でなければならない。アフィニティクロマトグラフィの最も一般的な型のうちの一つは、イムノアフィニティクロマトグラフィである。本発明による使用のために適すると考えられる抗体の生成は、後述される。

【 0 0 4 5 】

B. 細胞透過性ペプチド

10

20

30

40

50

本発明は、転写因子に連結された（細胞送達ペプチドまたは細胞形質導入ドメインとも呼ばれる）細胞透過性ペプチドの使用を企図する。そのようなドメインは、当技術分野において記載されており、複数のリジン残基およびアルギニン残基をしばしば含有している、短い両親媒性または陽イオン性のペプチドおよびペプチド誘導体であることを一般に特徴とする（Fischer, 2007）。その他の例は下記表1に示される。

【 0 0 4 6 】

（表 1）CDD/CTDペプチド

	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:	
GALFLGWLGAAGSTMGAKKKRK V	9	QAATATRGRSAASRPTERPRAPARS ASRPRRPVE	31	10
RQIKIWFQNRRMKWKK	10	MGLGLHLLVLAAALQGAKSKRKV	32	
RRMKWKK	11	AAVALLPAVLLALLAPAAANYKKP KL	33	
RRWRRWRRWRRWRR	12	MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCK KRPKP	34	
RGGRLSYSRRRFSTSTGR	13	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	35	
YGRKKRRQRRR	14	DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGPX PD	36	
RKKRRQRRR	15	PPPPPPPPPPPP	37	20
YARAAARQARA	16	VRLPPPVRLLPPPVRLLPPP	38	
RRRRRRRR	17	PRPLPPPRPG	39	
KKKKKKKK	18	SVRRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPR IPP	40	
GWTLNSAGYLLGKINLKALAALA KXIL	19	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	41	
LLILLRRRIRKQANAHSK	20	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	42	
SRRHHCRSKAKRSRHH	21	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIKAGPA VAVVGQATQIAK	43	30
NRARRNRRRVR	22	ALWMTLLKKVLKAAAKAALNAVL VGANA	44	
RQLRIAGRRLRGRSR	23	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQ Q	45	
KLIKGRTPIKFGK	24	INLKALAALAKKIL	46	
RRIPNRRPRR	25	GFFALIPKIISPLPKTLLSAVGSALG GSGGQE	47	
KLALKLALKALKALKLA	26	LAKWALKQGFALKS	48	
KLAKLAKKLAKLAK	27	SMAQDIISTIGDLVKWIIQTVNXFTK K	49	
GALFLGFLGAAGSTNGAWSQPKK KRKV	28	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKQ RIKDFLANLVPTES	50	40
KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	29	PAWRKAFRWAWRMLKKAA	51	
LKKLLKKLLKKLLKKLLKKL	30	KLKLLKLLKLLKLLKLLKLL	52	

【 0 0 4 7 】

C. タンパク質送達

一般に、タンパク質は、関心対象の細胞へのタンパク質の侵入を促進する製剤として、細胞へ送達される。最も基本的な形態は、リボソームなどの脂質ビヒクルである。例えば、脂質二重層から作成された人工的に調製された小胞であるリボソームが、多様な薬物を

送達するために使用されている。リボソームは、(卵ホスファチジルエタノールアミンのような)混合型の脂質鎖またはその他の界面活性剤と共に、天然に由来するリン脂質から構成され得る。特に、陽イオン性または中性の脂質を含有しているリボソームが、薬物の製剤化において使用されている。リボソームは、単層から構成されるミセルおよび逆ミセルと混同されるべきではないが、それらも送達のために使用され得る。

【0048】

PULSin(商標)、Lipodin-Pro、Carry-MaxR、Pro-DeliverIN、PromoFectin、Pro-Ject、Chariot(商標)Protein Delivery試薬、BioPORTER(商標)、およびその他を含む、タンパク質送達のための極めて多様な市販の製剤が周知である。

【0049】

ナノ粒子は、一般に、100nmまたはそれ未満の直径を有する微粒子状物質であると見なされる。中空であるリボソームとは対照的に、ナノ粒子は、固体である傾向がある。従って、薬物は、捕捉されるより、ナノ粒子に埋め込まれるかまたはナノ粒子上にコーティングされると考えられる。ナノ粒子は、酸化物、シリカ、ポリメチルメタクリレートのようなポリマー、およびセラミックスを含む金属から作成され得る。同様に、ナノシェルは、多少大きく、これらの同一の材料により送達される物質を包む。ナノ粒子もナノシェルも、ペプチドまたは模倣体の持続的放出または放出制御を可能にし、インビボ環境の効果に対してそれを安定化することができる。

【0050】

IV. 核酸送達

上述のとおり、ある種の態様において、その後の精製および細胞/対象への送達のため、または遺伝子に基づく送達アプローチにおいて直接使用するため、転写因子産物を発現させるため、発現カセットが用いられる。発現は、適切なシグナルがベクター内に提供され、細胞における関心対象の遺伝子の発現を駆動する、ウイルスおよび哺乳動物両方の起源からのエンハンサー/プロモーターのような様々な調節エレメントを含むことを必要とする。宿主細胞におけるメッセンジャーRNAの安定性および翻訳可能性を最適化するために設計されたエレメントも定義される。産物を発現する永久安定細胞クローンを確立するための多数のドミナント薬物選択マーカーの使用のための条件も提供され、薬物選択マーカーの発現をポリペプチドの発現と関連付けるエレメントも提供される。

【0051】

A. 調節エレメント

本願の全体にわたって、「発現カセット」という用語は、核酸コーディング配列の一部または全部が転写され翻訳され得る、即ち、プロモーターの制御下にある、遺伝子産物をコードする核酸を含有している任意の型の遺伝子構築物を含むものとする。「プロモーター」とは、遺伝子の特異的な転写を開始させるために必要とされる、細胞の合成機構により認識されるか、または合成機構へ導入されるDNA配列をさす。「転写制御下」という語句は、プロモーターが、RNAポリメラーゼ開始および遺伝子の発現を制御するため、核酸に対して正確な位置および方向にあることを意味する。「発現ベクター」とは、複製能を有する遺伝子構築物に含まれており、従って、複製起点、転写終結シグナル、ポリA領域、選択可能マーカー、および多目的クローニング部位のうちの一つまたは複数を含む発現カセットを含むものとする。

【0052】

プロモーターという用語は、RNAポリメラーゼIIのための開始部位の周辺に密集した転写制御モジュールの群をさすために本明細書において使用される。プロモーターの組織化に関する思考の大部分は、HSVチミジンキナーゼ(tk)およびSV40初期転写単位のためのものを含む、いくつかのウイルスプロモーターの分析に由来する。より最近の研究により強化されたこれらの研究は、各々、およそ7~20bpのDNAからなり、転写活性化タンパク質または抑制タンパク質のための1個または複数個の認識部位を含有している不連続の機能性モジュールから、プロモーターが構成されることを示している。

【0053】

10

20

30

40

50

各プロモーター内の少なくとも1個のモジュールは、RNA合成のための開始部位を位置決めするために機能する。これの最も周知の例は、TATAボックスであるが、哺乳動物末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子のためのプロモーターおよびSV40後期遺伝子のためのプロモーターのような、TATAボックスを欠くいくつかのプロモーターにおいては、開始部位自体に重なる不連続のエLEMENTが、開始の場所を固定するのを助ける。

【0054】

付加的なプロモーターELEMENTは、転写開始の頻度を調節する。典型的には、これらは開始部位の30~110bp上流の領域に位置するが、最近、多数のプロモーターが開始部位の下流にも機能性のELEMENTを含有していることが示された。ELEMENTが反転されるかまたは互い関して移動される場合に、プロモーター機能が保存されるように、プロモーターELEMENT間の間隔はフレキシブルであることが多い。tkプロモーターにおいて、プロモーターELEMENT間の間隔は、50bp間隔にまで増加し得、その後、活性が減退し始める。プロモーターに依って、個々のELEMENTは、転写を活性化するため、協同的にまたは独立に機能することができると考えられる。

10

【0055】

ある種の態様において、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)前初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス末端反復配列、ラットインスリンプロモーター、およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼのようなウイルスプロモーターが、関心対象のコーディング配列の高レベルの発現を入手するために使用され得る。発現のレベルが所定の目的のために十分であるならば、関心対象のコーディング配列の発現を達成するための、当技術分野において周知であるその他のウイルスまたは哺乳動物細胞または細菌ファージのプロモーターの使用も、同様に企図される。周知の特性を有するプロモーターを用いることにより、トランスフェクションまたは形質転換の後の関心対象のタンパク質の発現のレベルおよびパターンを最適化することができる。さらに、特定の生理学的シグナルに応答して調節されるプロモーターの選択は、遺伝子産物の誘導可能な発現を可能にすることができる。

20

【0056】

エンハンサーは、同一DNA分子上の遠位に位置するプロモーターからの転写を増加させる遺伝的ELEMENTである。エンハンサーの組織化は、プロモーターによく類似している。即ち、それらは、各々、1種または複数種の転写タンパク質と結合する、多くの個々のELEMENTから構成される。エンハンサーとプロモーターとの間の基本的な区別は、機能性である。エンハンサー領域は全体として離れて転写を刺激することができなければならない。このことは、プロモーター領域またはその成分ELEMENTには当てはまる必要がない。他方、プロモーターは、特定の部位における特定の方向でのRNA合成の開始を指図する1個または複数個のELEMENTを有しなければならないが、エンハンサーはこれらの特異性を欠く。プロモーターおよびエンハンサーは、しばしば、オーバーラップし、連続しており、しばしば、極めて類似したモジュール機構を有すると考えられる。

30

【0057】

以下は、発現構築物において関心対象の遺伝子をコードする核酸と組み合わせて使用され得るプロモーター/エンハンサーおよび誘導可能プロモーター/エンハンサーのリストである(表2および表3)。さらに、(Eukaryotic Promoter Data Base EPDBによる)任意のプロモーター/エンハンサー組み合わせも、遺伝子の発現を駆動するために使用され得る。送達複合体の一部として、または付加的な遺伝子発現構築物として、適切な細菌ポリメラーゼが提供される場合、真核細胞は、ある種の細菌プロモーターからの細胞質転写を支持することができる。

40

【0058】

(表2)

プロモーターおよび／またはエンハンサー	
プロモーター／エンハンサー	参考文献
免疫グロブリン重鎖	Banerji <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> , 1990
免疫グロブリン軽鎖	Queen <i>et al.</i> , 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
T細胞受容体	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> , 1990
HLA DQ aおよび／またはDQ β	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
β インターフェロン	Goodbourn <i>et al.</i> , 1986; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodbourn <i>et al.</i> , 1988
インターロイキン2	Greene <i>et al.</i> , 1989
インターロイキン2受容体	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHC クラス II 5	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHC クラス II HLA-DRa	Sherman <i>et al.</i> , 1989
β アクチン	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> , 1989
筋肉クレアチニンキナーゼ (MCK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> , 1989
プレアルブミン (トランスチレチン)	Costa <i>et al.</i> , 1988
エラスターゼI	Ornitz <i>et al.</i> , 1987
メタロチオネイン (MTII)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989
コラゲナーゼ	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987a
アルブミン	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Tronche <i>et al.</i> , 1989, 1990
α フェトプロテイン	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
t-グロビン	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990
β -グロビン	Trudel <i>et al.</i> , 1987
c-fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
インスリン	Edlund <i>et al.</i> , 1985

10

20

30

40

プロモーターおよび／またはエンハンサー	
プロモーター／エンハンサー	参考文献
神経細胞接着分子 (NCAM)	Hirsh <i>et al.</i> , 1990
α_1 -アンチトリパイン (Antitrypsin)	Latimer <i>et al.</i> , 1990
H2B (TH2B) ヒストン	Hwang <i>et al.</i> , 1990
マウスおよび／またはI型コラーゲン	Ripe <i>et al.</i> , 1989
グルコース調節タンパク質 (GRP94 および GRP78)	Chang <i>et al.</i> , 1989
ラット成長ホルモン	Larsen <i>et al.</i> , 1986
ヒト血清アミロイドA (SAA)	Edbrooke <i>et al.</i> , 1989
トロポニンI (TN I)	Yutzev <i>et al.</i> , 1989
血小板由来増殖因子 (PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989
デュシェンヌ型筋ジストロフィー	Klamut <i>et al.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleight <i>et al.</i> , 1985; Firak <i>et al.</i> , 1986; Herr <i>et al.</i> , 1986; Imbra <i>et al.</i> , 1986; Kadesch <i>et al.</i> , 1986; Wang <i>et al.</i> , 1986; Ondek <i>et al.</i> , 1987; Kuhl <i>et al.</i> , 1987; Schaffner <i>et al.</i> , 1988
ポリオーマ	Swartzendruber <i>et al.</i> , 1975; Vasseur <i>et al.</i> , 1980; Katinka <i>et al.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>et al.</i> , 1981; Dandolo <i>et al.</i> , 1983; de Villiers <i>et al.</i> , 1984; Hen <i>et al.</i> , 1986; Satake <i>et al.</i> , 1988; Campbell and/or Villarreal, 1988
レトロウイルス	Kriegler <i>et al.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>et al.</i> , 1982; Kriegler <i>et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>et al.</i> , 1986; Miksicek <i>et al.</i> , 1986; Celander <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celander <i>et al.</i> , 1988; Choi <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989
パピローマウイルス	Campo <i>et al.</i> , 1983; Lusky <i>et al.</i> , 1983; Spandidos and/or Wilkie, 1983; Spalholz <i>et al.</i> , 1985; Lusky <i>et al.</i> , 1986; Cripe <i>et al.</i> , 1987; Gloss <i>et al.</i> , 1987; Hirochika <i>et al.</i> , 1987; Stephens <i>et al.</i> , 1987
B型肝炎ウイルス	Bulla <i>et al.</i> , 1986; Jameel <i>et al.</i> , 1986; Shaul <i>et al.</i> , 1987; Spandau <i>et al.</i> , 1988; Vannice <i>et al.</i> , 1988

10

20

30

40

プロモーターおよび／またはエンハンサー	
プロモーター／エンハンサー	参照文献
ヒト免疫不全ウイルス	Muesing <i>et al.</i> , 1987; Hauber <i>et al.</i> , 1988; Jakobovits <i>et al.</i> , 1988; Feng <i>et al.</i> , 1988; Takebe <i>et al.</i> , 1988; Rosen <i>et al.</i> , 1988; Berkhout <i>et al.</i> , 1989; Laspias <i>et al.</i> , 1989; Sharp <i>et al.</i> , 1989; Braddock <i>et al.</i> , 1989
サイトメガロウイルス (CMV)	Weber <i>et al.</i> , 1984; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Foecking <i>et al.</i> , 1986
テナガザル白血病ウイルス	Holbrook <i>et al.</i> , 1987; Quinn <i>et al.</i> , 1989

10

【 0 0 5 9 】

(表 3)

誘導可能エレメント		
エレメント	誘導物質	参照文献
MT II	ホルボールエステル(TFA) 重金属	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Searle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987, Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeall <i>et al.</i> , 1989
MMTV (マウス乳癌 ウイルス)	グルココルチコイド	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
β インターフェロン	ポリ(rI)x ポリ(rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
アデノウイルス 5 <u>E2</u>	E1A	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
コラゲナーゼ	ホルボールエステル(TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987a
ストロメライシン	ホルボールエステル(TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
SV40	ホルボールエステル(TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
マウスMX遺伝子	インターフェロン、 ニューカッスル病ウイルス	Hug <i>et al.</i> , 1988
GRP78 遺伝子	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
α 2マクログロブリン	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
ビメンチン	血清	Rittling <i>et al.</i> , 1989
MHCクラスI遺伝子H-2 κ b	インターフェロン	Blanar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	E1A、SV40ラージT 抗原	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b
プロリフェリン	ホルボールエステル-TPA	Mordacq <i>et al.</i> , 1989
腫瘍壊死因子	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
甲状腺刺激ホルモン α 遺伝子	甲状腺ホルモン	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

10

20

30

40

50

【 0 0 6 0 】

特に興味深いのは、筋肉特異的プロモーター、より具体的には、心臓特異的プロモーターである。これらには、ミオシン軽鎖2プロモーター (Franz *et al.*, 1994; Kelly *et al.*, 1995)、アクチンプロモーター (Moss *et al.*, 1996)、トロポニン1プロモーター (Bhavsar *et al.*, 1996); $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体プロモーター (Barnes *et al.*, 1997)、ジストロフィンプロモーター (Kimura *et al.*, 1997)、7インテグリンプロモーター (Ziobe

r and Kramer,1996)、脳性ナトリウム利尿ペプチドプロモーター (LaPointe et al.,1996)、および Bクリスタリン / 低分子量熱ショックタンパク質プロモーター (Gopal-Srivastava,1995)、ミオシン重鎖プロモーター (Yamauchi-Takahara et al.,1989)、および ANFプロモーター (LaPointe et al.,1988) が含まれる。

【 0 0 6 1 】

cDNA挿入断片が用いられる場合には、遺伝子転写物の適切なポリアデニル化を達成するため、ポリアデニル化シグナルを含めることが、典型的には、望まれると考えられる。ポリアデニル化シグナルの性質は、本発明の実施の成功にとって重大ではないと考えられ、ヒト成長ホルモンおよびSV40のポリアデニル化シグナルのような、任意のそのような配列が用いられ得る。ターミネーターも発現カセットのエLEMENTとして企図される。これらのELEMENTは、メッセージレベルを増強し、カセットから他の配列へのリードスルーを最小限に抑えるために役立ち得る。

【 0 0 6 2 】

B. 多重遺伝子構築物およびIRES

本発明のある種の態様において、内部リボソーム結合部位 (IRES) ELEMENTの使用が、多重遺伝子または多シストロン性メッセージを作出するために使用される。IRES ELEMENTは、5'メチル化Cap依存性翻訳のリボソームスキヤニングモデルを回避し、内部部位において翻訳を開始することができる (Pelletier and Sonenberg,1988)。ピコルナウイルス科の2種のメンバー (ポリオおよび脳心筋炎) に由来するIRES ELEMENTが記載されており (Pelletier and Sonenberg,1988)、哺乳動物メッセージ由来のIRESも記載されている (Macejak and Sarnow,1991)。IRES ELEMENTは異種オープンリーディングフレームと連結され得る。複数のオープンリーディングフレームが、IRESにより各々分離されて、共に転写され、多シストロン性メッセージを作出することができる。IRES ELEMENTにより、各オープンリーディングフレームは、効率的な翻訳のためリボソームに対して接近可能となる。複数の遺伝子が、単一のメッセージを転写するため、単一のプロモーター / エンハンサーを使用して、効率的に発現され得る。

【 0 0 6 3 】

任意の異種オープンリーディングフレームがIRES ELEMENTと連結され得る。これには、分泌タンパク質、無関係の遺伝子によりコードされた多サブユニットタンパク質、細胞内タンパク質または膜結合型タンパク質、および選択可能マーカーについての遺伝子が含まれる。このようにして、単一の構築物および単一の選択可能マーカーを用いて、数種のタンパク質の発現を細胞において同時に実行することができる。

【 0 0 6 4 】

C. 発現ベクターの送達

発現ベクターを細胞へ導入することができる多数の方法が存在する。本発明のある種の態様において、発現構築物は、ウイルス、またはウイルスゲノムに由来する操作された構築物を含む。ある種のウイルスは、受容体により媒介されるエンドサイトーシスを介して細胞に侵入することができ、宿主細胞ゲノムへ組み込まれ、安定的かつ効率的にウイルス遺伝子を発現することができるため、哺乳動物細胞へ外来遺伝子を移入するための魅力的な候補である (Ridgeway,1988 ; Nicolas and Rubenstein,1988 ; Baichwal and Sugden,1986 ; Temin,1986)。遺伝子ベクターとして使用された最初のウイルスは、パポーウイルス (サルウイルス40、ウシパピローマウイルス、およびポリオーマ) (Ridgeway,1988 ; Baichwal and Sugden,1986) ならびにアデノウイルス (Ridgeway,1988 ; Baichwal and Sugden,1986) を含むDNAウイルスであった。これらは、比較的低い外来DNA配列の収容量を有し、限定された宿主スペクトルを有する。さらに、許容細胞における発癌の可能性および細胞変性効果のため、安全性に問題がある。それらは、8kBまでの外来遺伝材料しか収容し得ないが、多様な細胞株および実験動物へ容易に導入され得る (Nicolas and Rubenstein,1988 ; Temin,1986)。

【 0 0 6 5 】

インビボ送達のための好ましい方法のうちの一つは、アデノウイルス発現ベクターの使

用を含む。「アデノウイルス発現ベクター」とは、(a)構築物のパッケージングを支持し、(b)その中にクローニングされたアンチセンスポリヌクレオチドを発現するために十分なアデノウイルス配列を含有している構築物を含むものとする。これに関して、発現は、遺伝子産物が合成されることを必要としない。

【0066】

発現ベクターには、アデノウイルスの遺伝学的に操作された型が含まれる。36kBの直鎖状二本鎖DNAウイルスであるアデノウイルスの遺伝子組織化の知識は、アデノウイルスDNAの大断片の、7kBまでの外来配列への置換を可能にする (Grunhaus and Horwitz, 1992)。レトロウイルスとは対照的に、アデノウイルスDNAはエピソームとして複製し得るため、宿主細胞のアデノウイルス感染は、染色体組み込みをもたらさず、潜在的な遺伝毒性がない。また、アデノウイルスは構造的に安定しており、広範な増幅の後にもゲノム再編成は検出されていない。アデノウイルスは、細胞周期に関わらず、事実上全ての上皮細胞を感染させることができる。現在のところ、アデノウイルス感染は、ヒトにおける急性呼吸器疾患のような軽度の疾患にのみ関連付けられていると考えられる。

【0067】

アデノウイルスは、ゲノムのサイズが中程度であり、操作が容易であり、力価が高く、標的細胞範囲が広く、感染性が高いため、遺伝子移入ベクターとして使用するのに特に適当である。ウイルスゲノムの両端は、ウイルスDNAの複製およびパッケージングのために必要なシスエレメントである100~200塩基対逆方向反復 (ITR) を含有している。ゲノムの初期 (E) 領域および後期 (L) 領域は、ウイルスDNA複製の開始により分割される異なる転写単位を含有している。E1領域 (E1AおよびE1B) は、ウイルスゲノムおよび少数の細胞遺伝子の転写の調節を担うタンパク質をコードする。E2領域 (E2AおよびE2B) の発現は、ウイルスDNA複製のためのタンパク質の合成をもたらす。これらのタンパク質は、DNA複製、後期遺伝子発現、および宿主細胞シャットオフに関与している (Renan, 1990)。ウイルスカプシドタンパク質の大半を含む後期遺伝子の産物は、主要後期プロモーター (MLP) により生じた単一の一次転写物の有意なプロセッシングの後にのみ発現される。(16.8m.u.に位置する) MLPは、感染の後期に特に効率的であり、このプロモーターから生じたmRNAは、全て、5'トリパータイトリダー (TPL) 配列を保有しているため、翻訳のための好ましいmRNAである。

【0068】

あるシステムにおいて、組換えアデノウイルスは、シャトルベクターとプロウイルスベクターとの間の相同組換えから生成される。2種のプロウイルスベクターの間の可能性のある組換えのため、この過程から野生型アデノウイルスが生成される可能性がある。従って、個々のプラークからウイルスの単一クローンを単離し、そのゲノム構造を調査することが重要である。

【0069】

複製欠損である現在のアデノウイルスベクターの生成および繁殖は、Ad5 DNA断片によりヒト胎児腎細胞から形質転換され、E1タンパク質を構成的に発現している、293と名付けられた独特のヘルパー細胞株に依る (Graham et al., 1977)。E3領域は、アデノウイルスゲノムにとって不可欠でないため (Jones and Shenk, 1978)、現在のアデノウイルスベクターは、293細胞の補助により、E1領域、D3領域のいずれかまたは両方に外来DNAを保持する (Graham and Prevec, 1991)。本来、アデノウイルスは、野生型ゲノムのおよそ105%をパッケージングすることができ (Ghosh-Choudhury et al., 1987)、従って、約2kbのDNAを余分に収容し得る。E1領域およびE3領域において置換可能なおよそ5.5kbのDNAと組み合わせると、現在のアデノウイルスベクターの最大収容量は、7.5kb、またはベクターの全長の約15%未満である。アデノウイルスのウイルスゲノムの80%超が、ベクター骨格に残存し、ベクター由来の細胞傷害の起源となる。また、E1欠失ウイルスの複製欠損は不完全である。

【0070】

ヘルパー細胞株は、ヒト胎児腎細胞、筋肉細胞、造血細胞、またはその他の間葉系もし

10

20

30

40

50

くは上皮系のヒト胎児細胞のようなヒト細胞に由来し得る。あるいは、ヘルパー細胞は、ヒトアデノウイルスについて許容性の他の哺乳動物種の細胞に由来してもよい。そのような細胞には、例えば、Vero細胞またはその他の間葉系もしくは上皮系のサル胎仔細胞が含まれる。上述のとおり、好ましいヘルパー細胞株は293である。

【0071】

Racher et al.(1995)は、293細胞を培養し、アデノウイルスを繁殖させるための、改善された方法を開示した。あるフォーマットにおいて、100~200mlの培地を含有している1リットルシリコン処理スピナフラスコ(Techne,Cambridge,UK)へ個々の細胞を接種することにより、天然細胞凝集物を増殖させる。40rpmで撹拌した後、細胞生存能をトリパンブルーにより推定する。別のフォーマットにおいては、Fibra-Celマイクロキャリア(Bibby Sterlin,Stone,UK)(5g/l)を以下のとおり用いる。5mlの培地に再懸濁させられた細胞接種材料を、250ml三角フラスコ内の担体(50ml)へ添加し、1~4時間、時々撹拌しながら、静置する。次いで、培地を50mlの新鮮な培地に交換し、振とうを開始する。ウイルス産生のため、細胞を、約80%コンフルエンスにまで増殖させ、その時点の後、培地を(最終容量の25%に)交換し、アデノウイルスを0.05のMOIで添加する。培養物を一夜静置し、その後、容量を100%に増加させ、さらに72時間、振とうを開始する。

【0072】

アデノウイルスベクターが複製欠損であるかまたは少なくとも条件的複製欠損であるという要件以外、アデノウイルスベクターの性質は、本発明の実施の成功にとって重要ではないと考えられる。アデノウイルスは、42の異なる公知の血清型またはサブグループA~Fのうちの任意のものであり得る。サブグループCの5型アデノウイルスは、本発明において使用するための条件的複製欠損アデノウイルスベクターを入手するための好ましい出発材料である。これは、5型アデノウイルスが、多量の生化学的情報および遺伝学的情報が既知のヒトアデノウイルスであり、ベクターとしてアデノウイルスを用いる大部分の構築のために歴史的に使用されているためである。

【0073】

上述のとおり、本発明に係る典型的なベクターは、複製欠損であり、アデノウイルスE1領域を有しないと考えられる。従って、E1コーディング配列が除去された位置に、関心対象の遺伝子をコードするポリヌクレオチドを導入することが、最も便利であると考えられる。しかしながら、アデノウイルス配列内の構築物の挿入の位置は、本発明にとって重要ではない。Karlsson et al.(1986)により記載されたような、E3置換ベクターの欠失E3領域の代わりに、またはヘルパー細胞株もしくはヘルパーウイルスがE4欠損を補完するE4領域に、関心対象の遺伝子をコードするポリヌクレオチドを挿入することも可能である。

【0074】

アデノウイルスは、増殖させ操作するのが容易であり、インビトロおよびインビボで広い宿主範囲を示す。ウイルスのこの群は、高い力価、例えば、1ml当たり $10^9 \sim 10^{12}$ プラーク形成単位で入手され得、高度に感染性である。アデノウイルスの生活環は宿主細胞ゲノムへの組み込みを必要としない。アデノウイルスベクターにより送達された外来遺伝子は、エピソームであり、従って、宿主細胞に対する低い遺伝毒性を有する。野生型アデノウイルスを用いた予防接種の研究において、副作用は報告されておらず(Couch et al.,1963; Top et al.,1971)、このことは、インビボ遺伝子移入ベクターとしての安全性および治療的可能性を証明している。

【0075】

アデノウイルスベクターは、真核生物遺伝子発現(Levrero et al.,1991; Gomez-Foix et al.,1992)およびワクチン開発(Grunhaus and Horwitz,1992; Graham and Prevec,1991)において使用されている。最近、動物研究は、組換えアデノウイルスが遺伝子治療のために使用され得ることを示唆した(Stratford-Perricaudet and Perricaudet,1991; Stratford-Perricaudet et al.,1990; Rich et al.,1993)。種々の組織への組換えアデノウイルスの投与における研究には、気管滴注(Rosenfeld et al.,1991; Rosenfeld et al

.,1992)、筋肉注射(Ragot et al.,1993)、末梢静脈注射(Herz and Gerard,1993)、および脳への定位接種(Le Gal La Salle et al.,1993)が含まれる。

【0076】

レトロウイルスは、逆転写の過程により、感染細胞において、それらのRNAを二本鎖DNAへ変換する能力を特徴とする一本鎖RNAウイルスの群である(Coffin,1990)。次いで、得られたDNAは、プロウイルスとして細胞染色体へ安定的に組み込まれ、ウイルスタンパク質の合成を指図する。組み込みは、レシピエント細胞およびその子孫におけるウイルス遺伝子配列の保持をもたらす。レトロウイルスゲノムは、カプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素、およびエンベロープ成分をそれぞれコードする3種の遺伝子gag、pol、およびenvを含有している。gag遺伝子から上流に見出される配列は、ゲノムのビリオンへのパッケージングのためのシグナルを含有している。2個の末端反復配列(LTR)配列が、ウイルスゲノムの5'末および3'末に存在する。これらは強力なプロモーター配列およびエンハンサー配列を含有しており、宿主細胞ゲノムへの組み込みのためにも必要とされる(Coffin,1990)。

10

【0077】

レトロウイルスベクターを構築するためには、複製欠損であるウイルスを作製するため、ウイルスゲノム内のある種のウイルス配列の代わりに、関心対象の遺伝子をコードする核酸を挿入する。ビリオンを作製するため、gag遺伝子、pol遺伝子、およびenv遺伝子を含有しているが、LTRおよびパッケージング成分を有しないパッケージング細胞株を構築する(Mann et al.,1983)。レトロウイルスLTRおよびパッケージング配列と共に、cDNAを含有している組換えプラスミドを、(例えば、リン酸カルシウム沈殿により)この細胞株へ導入すると、パッケージング配列が、組換えプラスミドのRNA転写物がウイルス粒子へパッケージングされることを可能にし、次いで、それは培養培地へ分泌される(Nicolas and Rubenstein,1988; Temin,1986; Mann et al.,1983)。次いで、組換えレトロウイルスを含有している培地を、収集し、任意で濃縮し、遺伝子移入のために使用する。レトロウイルスベクターは、極めて多様な細胞型を感染させることができる。しかしながら、組み込みおよび安定的発現は、宿主細胞の分裂を必要とする(Paskind et al.,1975)。

20

【0078】

ウイルスエンベロープへの乳糖残基の化学的付加によるレトロウイルスの化学的修飾に基づく、レトロウイルスベクターの特異的なターゲティングを可能にするために設計された新規のアプローチが、最近開発された。この修飾は、シアロ糖タンパク質受容体を介した肝細胞の特異的感染を可能にすることができた。

30

【0079】

レトロウイルスエンベロープタンパク質および特異的細胞受容体に対するビオチン化抗体を使用する、組換えレトロウイルスのターゲティングのための異なるアプローチが設計された。抗体はストレプトアビジンを使用することによりビオチン成分を介してカップリングされた(Roux et al.,1989)。主要組織適合複合体クラスI抗原およびクラスII抗原に対する抗体を使用して、インビトロで、それらの表面抗原を保持している多様なヒト細胞のエコトロピックウイルスによる感染が証明された(Roux et al.,1989)。

40

【0080】

本発明の全ての局面において、レトロウイルスベクターの使用には、ある種の限界がある。例えば、レトロウイルスベクターは、一般的に、細胞ゲノム内のランダムな部位へ組み込まれる。これは、宿主遺伝子の中断を通して、またはウイルス調節配列の挿入を通して、隣接遺伝子の機能に干渉し得る挿入変異誘発をもたらす場合がある(Varmus et al.,1981)。欠損レトロウイルスベクターの使用に関する別の懸念は、パッケージング細胞における複製能を有する野生型ウイルスの可能性のある出現である。これは、宿主細胞ゲノム内に組み込まれたgag配列、pol配列、env配列の上流に、組換えウイルス由来の完全配列が挿入される組換えイベントに起因し得る。しかしながら、組換えの可能性を大幅に減少させるはずである新たなパッケージング細胞株が、現在では入手可能である(Markowitz et al.,1988; Hersdorffer et al.,1990)。

50

【 0 0 8 1 】

他のウイルスベクターが、本発明において発現構築物として用いられてもよい。ワクシニアウイルス (Ridgeway, 1988 ; Baichwal and Sugden, 1986 ; Coupar et al., 1988)、アデノ随伴ウイルス (AAV) (Ridgeway, 1988 ; Baichwal and Sugden, 1986 ; Hermonat and Muzycska, 1984)、およびヘルペスウイルスのようなウイルスに由来するベクターが用いられ得る。それらは、様々な哺乳動物細胞のため、いくつかの魅力的な特色を示す (Friedmann, 1989 ; Ridgeway, 1988 ; Baichwal and Sugden, 1986 ; Coupar et al., 1988 ; Horwich et al., 1990)。

【 0 0 8 2 】

センスまたはアンチセンスの遺伝子構築物の発現を達成するためには、発現構築物を細胞へ送達しなければならない。この送達は、細胞株を形質転換するための実験室手法などの場合、インビトロで達成されてもよいが、またはある種の疾患状態の処置のなどの場合、インビボもしくはエクスビボで達成されてもよい。発現構築物が感染性ウイルス粒子においてキャプシド形成する場合、送達のための一つの機序はウイルス感染を介したものである。

【 0 0 8 3 】

培養哺乳動物細胞への発現構築物の移入のためのいくつかの非ウイルス法も、本発明により企図される。これらには、リン酸カルシウム沈殿 (Graham and Van Der Eb, 1973 ; Chen and Okayama, 1987 ; Rippe et al., 1990)、DEAE-デキストラン (Gopal., 1985)、電気穿孔 (Tur-Kaspa et al., 1986 ; Potter et al., 1984)、直接微量注入 (Harland and Weintraub, 1985)、DNA負荷リボソーム (Nicolau and Sene, 1982 ; Fraley et al., 1979)、およびリポフェクタミン-DNA複合体、細胞超音波処理 (Fechheimer et al., 1987)、高速微粒銃を使用した遺伝子銃 (Yang et al., 1990)、および受容体により媒介されるトランスフェクション (Wu and Wu, 1987 ; Wu and Wu, 1988) が含まれる。これらの技術のうちのいくつかは、インビボまたはエクスビボの使用のために成功裡に適合し得る。

【 0 0 8 4 】

一度発現構築物が細胞へ送達されると、関心対象の遺伝子をコードする核酸は、異なる部位において位置付けられ発現され得る。ある種の態様において、遺伝子をコードする核酸は、細胞のゲノムへ安定的に組み込まれ得る。この組み込みは、相同組換え (遺伝子置換) を介して同族の位置および方向で起こる場合があるか、またはランダムな非特異的な位置において組み込まれる場合がある (遺伝子強化)。さらなる態様において、核酸は、DNAの別々のエピソームセグメントとして細胞内に安定的に維持される場合がある。そのような核酸セグメントまたは「エピソーム」は、宿主細胞周期と無関係に、または同期的に、維持および複製を可能にするのに十分な配列をコードする。発現構築物が如何にして細胞へ送達されるか、および細胞内の何処に核酸が残存するかは、用いられる発現構築物の型に依存する。

【 0 0 8 5 】

本発明のさらに別の態様において、発現構築物は、単純に裸の組換えDNAまたはプラスミドからなってもよい。構築物の移入は、物理的にまたは化学的に細胞膜を透過性化する前掲の方法のうちのいずれかにより実施され得る。これは、インビトロの移入のために特に適用可能であるが、インビボの使用にも同様に適用され得る。Dubensky et al. (1984) は、成体マウスおよび新生仔マウスの肝臓および脾臓へ、リン酸カルシウム沈殿物の形態で、ポリオーマウイルスDNAを成功裡に注射し、活発なウイルス複製および急性感染を証明した。Benvenisty and Neshif (1986) も、リン酸カルシウムにより沈殿させたプラスミドの直接腹腔内注射が、トランスフェクトされた遺伝子の発現をもたらすことを証明した。関心対象の遺伝子をコードするDNAは、インビボでも同様に移入され、遺伝子産物を発現し得ることが構想される。

【 0 0 8 6 】

本発明のさらに別の態様において、細胞への裸のDNA発現構築物の移入は、粒子銃を含み得る。この方法は、細胞膜を貫通し、細胞を死滅させることなく細胞に侵入することを

10

20

30

40

50

可能にする高速度にまで、DNAによりコーティングされた微粒子銃を加速する能力に依る (Klein et al., 1987)。小さな粒子を加速するためのいくつかのデバイスが開発されている。そのような一つのデバイスは、電流を発生させるために高電圧放出に頼り、次に、その電流が原動力を提供する (Yang et al., 1990)。使用される微粒子銃は、タングステンまたは金のビーズのような生物学的に不活性の物質からなる。

【0087】

ラットおよびマウスの肝臓、皮膚、および筋肉組織を含む、選択された器官が、インビボで砲撃された (Yang et al., 1990; Zelenin et al., 1991)。これは、銃と標的器官との間に介在する組織を排除するため、組織または細胞の外科的露出、即ち、エクスビボ処置を必要とする場合がある。特定の遺伝子をコードするDNAは、この方法を介して送達されてもよく、それでも、本発明に組み入れられる。

10

【0088】

本発明のさらなる態様において、発現構築物はリボソームに捕捉されてもよい。リボソームとは、リン脂質二重膜および内部水性媒体を特徴とする小胞構造である。多層リボソームは、水性媒体により分離された複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質を過剰の水性溶液に懸濁させた場合に自然に形成される。脂質成分が自己再配置を受けた後、閉構造を形成し、脂質二重層の間に水および溶解した溶質を捕捉する (Ghosh and Bachhawat, 1991)。リポフェクタミン-DNA複合体も企図される。

【0089】

インビトロの外来DNAのリボソームにより媒介される核酸送達および発現は、大いに成功している。Wong et al., (1980)は、培養されたニワトリ胚細胞、HeLa細胞、および肝臓癌細胞において、リボソームにより媒介される外来DNAの送達および発現の実現可能性を証明した。Nicolau et al., (1987)は、静脈注射後のラットにおけるリボソームにより媒介される遺伝子移入の成功を達成した。Lipofectamine 2000 (商標)として公知の試薬は、広く使用され市販されている。

20

【0090】

本発明のある種の態様において、リボソームは血球凝集性ウイルス (HVJ) と複合体化されてもよい。これは、細胞膜との融合を容易にし、かつリボソームに封入されたDNAの細胞侵入を促進することが示されている (Kaneda et al., 1989)。他の態様において、リボソームは、核非ヒストン染色体タンパク質 (HMG-1) と複合体化されるかまたは共に用いられてもよい (Kato et al., 1991)。さらなる態様において、リボソームは、HVJおよびHMG-1の両方と複合体化されるかまたは共に用いられてもよい。そのような発現構築物は、インビトロおよびインビボで、核酸の移入および発現において成功裡に用いられているため、本発明のために適用可能である。細菌プロモーターがDNA構築物において用いられる場合、リボソーム内に適切な細菌ポリメラーゼを含めることも望ましいと考えられる。

30

【0091】

特定の遺伝子をコードする核酸を細胞へ送達するために用いられ得るその他の発現構築物は、受容体により媒介される送達ビヒクルである。これらは、ほぼ全ての真核細胞における受容体により媒介されるエンドサイトーシスによる高分子の選択的取り込みを活用する。様々な受容体の細胞型特異的な分布のため、送達は高度に特異的であり得る (Wu and Wu, 1993)。

40

【0092】

受容体により媒介される遺伝子ターゲティングビヒクルは、一般に、2種の成分：細胞受容体特異的なリガンドおよびDNA結合剤からなる。いくつかのリガンドが、受容体により媒介される遺伝子移入のために使用されている。最も広範に特徴決定されているリガンドは、アシアロオロソムコイド (ASOR) (Wu and Wu, 1987) およびトランスフェリン (Wagner et al., 1990) である。最近、ASORと同一の受容体を認識する合成ネオ糖タンパク質が、遺伝子送達ビヒクルとして使用され (Ferkol et al., 1993; Perales et al., 1994)、上皮増殖因子 (EGF) も、扁平上皮癌細胞へ遺伝子を送達するために使用されている (M

50

yers,EPO 0273085)。

【0093】

V. 心筋梗塞を処置する方法

上述のとおり、本発明は、新たなMI後治療を提供する。本発明の一つの態様において、MI後の対象の処置の方法は、未処置の患者と比較して、以下の転帰のうちの一つまたは複数を提供する：運動能力の向上、血液駆出量の増加、左室拡張末期圧の減少、肺毛細血管楔入圧の減少、心拍出量の増加、心係数の改善、肺動脈圧の減少、左室拡張末期径および左室収縮末期径の減少、ならびに左室の壁応力の減少、壁張力の減少、および壁厚の減少、右心室についても同様。さらに、処置は、心肥大への進行を防止し、最終的には、心不全への進行を防止し得る。

10

【0094】

処置計画は、臨床状況に依って変動すると考えられる。しかしながら、一般には、患者が安定し、有意な心臓線維芽細胞動員および瘢痕が開始する前のMI後の時点で、処置が開始されると考えられる。患者は、MIの防止もしくは処置のいずれかのための1種もしくは複数種の他の治療、またはMI関連後遺症の防止もしくは処置を受けていてもよいかまたは受けていなくてもよい。これは、MIの約24時間以内、36時間以内、38時間以内、72時間以内、96時間以内、またはMIの約5日以内、6日以内、7日以内、8日以内、9日以内、もしくは10日以内に処置が開始されることを意味する。心臓線維芽細胞が、虚血領域において活性である間、例えば、7日まで、14日、21日、28日、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、またはそれ以上にわたり、治療は継続され得る。

20

【0095】

A. 組み合わせ治療

別の態様において、上述のものなどの他のMI治療モダリティおよびMI後治療モダリティと組み合わせ、本発明の転写治療阻害剤を使用することが構想される。組み合わせは、心臓細胞/患者を、両方の剤を含む単一の組成物もしくは薬理学的製剤と接触させることにより達成されてもよい、または細胞を、一方の組成物が発現構築物を含み他方が剤を含む2種の別個の組成物もしくは製剤と同時に接触させることにより達成されてもよい。あるいは、転写因子を使用した治療は、数分～数週間の範囲の間隔で、他の剤の投与に先行してもよいかまたは後続してもよい。他の剤および転写因子が心臓細胞/患者へ別々に適用される態様においては、剤および転写因子が、有利に組み合わせられた効果を細胞に対して発揮することができるよう、各送達の時点の間に有意な期間が空かないことが一般に確実にされとされる。そのような場合において、典型的には、相互に約12～24時間以内、より好ましくは、相互に約6～12時間以内に、両方のモダリティと細胞を接触させることが企図され、約12時間のみの遅延時間が最も好ましい。しかしながら、いくつかの状況においては、数日(2、3、4、5、6、または7日間)～数週間(1、2、3、4、5、6、7、または8週間)が、それぞれの投与の間に経過するよう、処置の期間を有意に延長することが望ましい場合がある。

30

【0096】

転写因子または他の剤のいずれかの複数回投与が望まれることも考えられる。この点に関して、様々な組み合わせが用いられ得る。例として、転写因子が「A」であり、かつ他の剤が「B」である場合、計3回および4回の投与に基づく以下の順列が例示的なものである。

40

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

その他の組み合わせも同様に企図される。

【0097】

50

B. 標準的なMI治療的介入

急性心筋梗塞のための治療は、梗塞心筋を救済するために可能な限り早く灌流を回復させるよう設計される。これは、典型的には、薬学的介入により、または経皮的冠動脈インターベンション（PCI）もしくは冠動脈バイパス移植のような機械的手段により、行われる。最近の研究は、以下のガイドラインに従った場合、これらの処置がより有効であることを示唆している：PCIについては<90分、溶解薬については<30分。これらのウィンドウから外れた処置は、死亡率の増加、および急性心筋梗塞または心不全のための再入院のリスクの有意な増加に関連していた。

【0098】

1. 薬物治療

患者の適切な群において適時に投与された場合、血栓溶解治療は、急性心筋梗塞を有する患者の生存率を向上させる。2回またはそれ以上の連続ECG誘導において0.1mVより大きいST部分上昇、新たな左脚ブロック（LBBB）、または後壁梗塞と一致する前部ST低下を有する患者において、PCIの可能性が90分以内に入手可能でない場合の選択は、症状の開始の12時間以内に、血栓溶解薬を投与することである。組織プラスミノゲン活性化因子（t-PA）は、より高い冠動脈開存率を達成するため、ストレプトキナーゼより好ましい。しかしながら、重要であるのは送達のスPEEDである。

【0099】

アスピリンは、心筋梗塞後の死亡率および再梗塞率を減少させることが示されている。やはり、送達は早急であるべきであり、可能であれば、咀嚼服用されるべきである。処置は、出血傾向またはアレルギーのような明白な禁忌がない限り、不確定に継続されるべきである。クロピドグレルは、アスピリン（300mgの用量）に対する抵抗性またはアレルギーの症例において別法として使用され得るが、クロピドグレルのより高い用量は付加的な利益を有する場合がある。

【0100】

血小板糖タンパク質（GP）IIb/IIIa受容体アンタゴニストは、継続的な虚血またはその他のハイリスク特色を有する患者、および経皮的冠動脈インターベンション（PCI）が予定されている患者に対する別の治療である。エプチフィバチドおよびチロフィバンはこの使用のために認可されており、アブシキシマブも、次の24時間以内にPCIが予定されている不安定狭心症またはNSTEMIを有する患者において12~24時間使用され得る。

【0101】

ヘパリンおよびその他の抗凝固剤は、t-PAを受容している患者における補助剤として確立された役割を有するが、ストレプトキナーゼを受容している患者においてはそうでない。ヘパリンは、初回血管形成を受ける患者においても必要が示される。低分子量ヘパリン（LMWH）は、不安定狭心症またはNSTEMIを有する患者において、UFHより優れていることが示されている。直接トロンビン阻害剤であるビパリルジンは、高用量クロピドグレルと組み合わせられた場合、STEMIにおいて見込みを示した。

【0102】

硝酸は、虚血症候群を有する患者の死亡率に対して明白な影響を及ぼさないが、症候緩解および前負荷低下において有用であり、禁忌（即ち、RV梗塞）でない限り、急性心筋梗塞を有する全ての患者が受診の最初の48時間以内に硝酸を与えられる程である。βブロッカーは、再梗塞および再発性虚血の率を低下させ得、従って、禁忌でない限り、MIを有する患者へ投与される。

【0103】

ACE阻害剤は、心筋梗塞後の死亡率を低下させ、従って、禁忌でなく、患者が安定し続けている限り、可能な限り早く投与される。ACE阻害剤は、心室機能障害を有する患者において最も大きな利益を有する。ACE阻害剤は、心筋梗塞後、不確定に継続される。アンジオテンシン受容体βブロッカーは、一次試験が確認される必要があるが、持続性の咳のような有害効果を発症する患者において、別法として使用され得る。

【0104】

10

20

30

40

50

2. PCIおよびその他の外科的介入

PCIは、病院到着からバルーン拡張までの時間 (door to balloon time) が90分未満であると想定して、STEMIを有する大部分の患者において選択される処置である。PCIは、より大きな冠動脈開存性 (>96%の血栓溶解)、より低い出血リスク、および基礎疾患の程度に関する即時の知識を提供する。研究は、初回PCIが、血栓溶解治療より死亡率に関して有益であることを示した。初回PCIの選択は、各患者の受診およびタイミングにより個別化されるべきである。初回PCIは、心原性ショックを有する患者、血栓溶解が失敗した患者、および高い出血リスクを有するかまたは血栓溶解治療が禁忌である者において選択される処置でもある。

【0105】

緊急のまたは急を要する冠動脈バイパス移植術は、血管形成が失敗した患者、およびVSD、LV、または乳頭筋断裂のような機械的合併症を発症した患者において必要が示される。

【0106】

C. 薬理学的治療剤

薬理学的治療剤および投与法、投薬量等は、当業者に周知であり (例えば、参照により関連部分が本明細書に組み入れられる、「Physicians Desk Reference」、Klaassenの「The Pharmacological Basis of Therapeutics」、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、および「The Merck Index, Eleventh Edition」を参照のこと)、本明細書中の開示を考慮して、本発明と組み合わせられ得る。投薬量のある程度の変動が、必ず、処置される対象の状態に依って存在すると考えられる。投与を担う者は、いかなる場合も、個々の対象のための適切な用量を決定すると考えられる。そのような個々の決定は、当業者の技術の範囲内にある。

【0107】

本発明の転写因子に加えて、転写因子と組み合わせた新たな治療計画を開発するため、以下のうちの任意のものが使用され得ることに注意すべきである。

【0108】

1. 抗高リポ蛋白血症薬

ある種の態様において、「抗高リポ蛋白血症薬」として本明細書において公知の、1種または複数種の血中の脂質および/またはリポタンパク質の濃度を低下させる剤の投与を、特に、アテローム性動脈硬化症および血管組織の肥厚または遮断の処置において、本発明に係る心血管治療と組み合わせることができる。ある種の局面において、抗高リポ蛋白血症剤には、アリアルオキシアルカン酸/フィブリン酸誘導体、樹脂/胆汁酸吸着薬、HMG CoAレダクターゼ阻害剤、ニコチン酸誘導体、甲状腺ホルモンもしくは甲状腺ホルモン類似体、種々の剤、またはそれらの組み合わせが含まれ得る。

【0109】

a. アリアルオキシアルカン酸/フィブリン酸誘導体

アリアルオキシアルカン酸/フィブリン酸誘導体の非限定的な例には、ベクロブラート (beclobrate)、エンザフィブラート (enzafibrate)、ビニフィブラート (binifibrate)、シプロフィブラート (ciprofibrate)、クリノフィブラート (clinofibrate)、クロフィブラート (atromide-S)、クロフィブリン酸、エトフィブラート (etofibrate)、フェノフィブラート (fenofibrate)、ゲムフィブロジル (gemfibrozil) (lobid)、ニコフィブラート (nicofibrate)、ピリフィブラート (pirifibrate)、ロニフィブラート (ronifibrate)、シムフィブラート (simfibrate)、およびテオフィブラート (theofibrate) が含まれる。

【0110】

b. 樹脂/胆汁酸吸着薬

樹脂/胆汁酸吸着薬の非限定的な例には、コレステラミン (cholybar、questran)、コレステポール (colestid)、およびポリデキシド (polidexide) が含まれる。

【0111】

10

20

30

40

50

c. HMG CoAレダクターゼ阻害剤

HMG CoAレダクターゼ阻害剤の非限定的な例には、ロバスタチン (mevacor)、プラバスタチン (pravochol)、またはシンバスタチン (zocor) が含まれる。

【0112】

d. ニコチン酸誘導体

ニコチン酸誘導体の非限定的な例には、ニコチン酸、アセピモックス (acepimox)、ニセリトロール、ニコクロナート (nicoclonate)、ニコモール、およびオキシニアシン (oxiniacic) 酸が含まれる。

【0113】

e. 甲状腺ホルモンおよび類似体

甲状腺ホルモンおよびその類似体の非限定的な例には、エトロキサート (etoroxate)、チロプロプ (thyropropic) 酸、およびチロキシシンが含まれる。

【0114】

f. 種々の抗高リポ蛋白血症薬

種々の抗高リポ蛋白血症薬の非限定的な例には、アシフラン (acifran)、アザコステロール、ベンフルオレックス、ベンザルブチルアミド、カルニチン、コンドロイチン硫酸、クロメストロン (clomestron)、デタキストラン (detaxtran)、デキストラン硫酸ナトリウム、5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸、エリタデニン、フラザボール、メグルトール、メリナミド、ミタトリエンジオール (mytatrienediol)、オルニチン、オリザノール、パンテチン、四酢酸ペンタエリスリトール、フェニルブチルアミド、ピロザジル (pirozadil)、プロブコール (lorelco)、シトステロール、スルトシル (sultosilic) 酸ピペラジン塩、チアデノール、トリパラノール、およびキセンブシン (xenbucin) が含まれる。

【0115】

2. 抗動脈硬化症薬

抗動脈硬化症薬の非限定的な例には、ピリジノールカルバメートが含まれる。

【0116】

3. 抗血栓 / 線維素溶解剤

ある種の態様において、血餅の除去または防止を補助する剤の投与を、特に、アテローム性動脈硬化症および血管系 (例えば、動脈) 遮断の処置において、モジュレーターの投与と組み合わせることができる。抗血栓かつ / または線維素溶解剤の非限定的な例には、抗凝固薬、抗凝固薬アンタゴニスト、抗血小板剤、血栓溶解剤、血栓溶解剤アンタゴニスト、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0117】

ある種の局面において、例えば、アスピリンおよびワルファリン (coumadin) のような、経口投与可能な抗血栓剤が好ましい。

【0118】

a. 抗凝固薬

抗凝固薬の非限定的な例には、アセノクマロール、アנקロッド、アニシンジオン、プロミンジオン、クロリンジオン、クメタロール (coumetarol)、シクロクマロール (cycloumarol)、デキストラン硫酸ナトリウム、ジクマロール、ジフェナジオン、エチルビスクムアセテート (ethyl biscoumacetate)、エチリデンジクマロール (ethylidene dicoumarol)、フルインジオン、ヘパリン、ヒルジン、リアボラート (lyapolate) ナトリウム、オキサジジオン (oxazidione)、ペントサンポリサルフェート、フェニンジオン、フェンブクロモン、ホスピチン、ピコタミド、チオクロマロール、およびワルファリンが含まれる。

【0119】

b. 抗血小板剤

抗血小板剤の非限定的な例には、アスピリン、デキストラン、ジピリダモール (persantin)、ヘパリン、スルフィンピラノン (sulfinpyranone) (anturane)、およびチクロ

10

20

30

40

50

ピジン (ticlid) が含まれる。

【 0 1 2 0 】

c. 血栓溶解剤

血栓溶解剤の非限定的な例には、組織プラスミノゲン活性化因子 (activase)、プラスミン、プロウロキナーゼ、ウロキナーゼ (abbokinase)、ストレプトキナーゼ (streptase)、アニストレプラーゼ / APSAC (eminase) が含まれる。

【 0 1 2 1 】

4. 血液凝固薬

患者が、大量出血、または大量出血の可能性の増加に罹患しているある種の態様においては、血液凝固を増強する剤を使用することができる。血液凝固促進剤の非限定的な例には、血栓溶解剤アンタゴニストおよび抗凝固薬アンタゴニストが含まれる。

【 0 1 2 2 】

a. 抗凝固薬アンタゴニスト

抗凝固薬アンタゴニストの非限定的な例には、プロタミンおよびビタミンK1が含まれる。

【 0 1 2 3 】

b. 血栓溶解剤アンタゴニストおよび抗血栓薬

血栓溶解剤アンタゴニストの非限定的な例には、アミノカプロン酸 (amicar) およびトラネキサム酸 (amstat) が含まれる。抗血栓薬の非限定的な例には、アナグレリド、アルガトロバン、シルスタゾール (cilstazol)、ダルトロバン (daltroban)、デフィプロチド、エノキサパリン、フラキシパリン (fraxiparine)、インドobufen、ラモパラン (lamoparan)、オザグレル、ピコタミド、ブラフィブリド (plafibride)、テデルパリン (tedelparin)、チクロピジン、およびトリフルサルが含まれる。

【 0 1 2 4 】

5. 抗不整脈剤

抗不整脈剤の非限定的な例には、クラスI抗不整脈剤 (ナトリウムチャンネルブロッカー)、クラスII抗不整脈剤 (アドレナリンブロッカー)、クラスIII抗不整脈剤 (再分極延長薬)、クラスIV抗不整脈剤 (カルシウムチャンネルブロッカー)、および種々の抗不整脈剤が含まれる。

【 0 1 2 5 】

a. ナトリウムチャンネルブロッカー

ナトリウムチャンネルブロッカーの非限定的な例には、クラスIA、クラスIB、およびクラスICの抗不整脈剤が含まれる。クラスIA抗不整脈剤の非限定的な例には、ジソピラミド (norpace)、プロカインアミド (pronestyl)、およびキニジン (quinidex) が含まれる。クラスIB抗不整脈剤の非限定的な例には、リドカイン (xylocaine)、トカイニド (tonocard)、およびメキシレチン (mexitil) が含まれる。クラスIC抗不整脈剤の非限定的な例には、エンカイニド (enkaid) およびフレカイニド (tambocor) が含まれる。

【 0 1 2 6 】

b. ブロッカー

アドレナリンブロッカー、アドレナリンアンタゴニスト、またはクラスII抗不整脈剤としても公知のブロッカーの非限定的な例には、アセプトロール (sectral)、アルプレノロール、アモスラロール、アロチノロール、アテノロール、ベフノロール、ベタキソロール、ベバントロール、ビスプロロール、ボピンドロール、ブクモロール、ブフェトロール、ブフラロール、ブニトロロール、ブプラノロール、ブチドリン (butidrine) 塩酸塩、ブトフィロロール (butofilolol)、カラゾロール (carazolol)、カルテオロール、カルベジロール、セリプロロール、セタモロール (cetamolol)、クロラノロール、ジレパロール、エパノロール、エスモロール (brevibloc)、インデノロール、ラベタロール、レボプロロール、メピンドロール、メチプラノロール、メトプロロール、モプロロール (moprolol)、ナドロロール、ナドキシロール (nadoxolol)、ニフェナロール (nifenalol)、ニブラジロール、オクスプレノロール、ペンブトロール、ピンドロール、プラクト

10

20

30

40

50

ロール、プロネタロール、プロパノロール (propanolol) (inderal)、ソタロール (betapace)、スルフィナロール (sulfinalol)、タリノロール、テルタトロール、チモロール、トリプロロール (toliprolol)、およびキシビノロール (xibinolol) が含まれる。ある種の局面において、ブロッカーには、アリアルオキシプロパノールアミン誘導体が含まれる。アリアルオキシプロパノールアミン誘導体の非限定的な例には、アセプトロール、アルプレノロール、アロチノロール、アテノロール、ベタキシソロール、ベバントロール、ビソプロロール、ボピンドロール、ブニトロロール、ブトフィロロール (butofilolol)、カラゾロール (carazolol)、カルテオロール、カルベジロール、セリプロロール、セタモロール (cetamolol)、エパノロール、インデノロール、メピンドロール、メチプラノロール、メトプロロール、モプロロール (moprolol)、ナドロール、ニブラジロール、オクスプレノロール、ペンブトロール、ピンドロール、プロパノロール (propanolol)、タリノロール、テルタトロール、チモロール、およびトリプロロール (toliprolol) が含まれる。

10

【0127】

c. 再分極延長剤

クラスIII抗不整脈剤としても公知の、再分極を延長する剤の非限定的な例には、アミオダロン (cordarone) およびソタロール (betapace) が含まれる。

【0128】

d. カルシウムチャンネルブロッカー / アンタゴニスト

クラスIV抗不整脈剤としても公知のカルシウムチャンネルブロッカーの非限定的な例には、アリアルアルキルアミン (例えば、ベプリジル (bepridile)、ジルチアゼム、フェンジリン、ガロパミル、プレニラミン、テロジリン、ベラパミル)、ジヒドロピリジン誘導体 (フェロジピン、イスラジピン、ニカルジピン、ニフェジピン、ニモジピン、ニソルジピン、ニトレンジピン)、ピペラジン誘導体 (例えば、シンナリジン、フルナリジン、リドフラジン)、またはベンシクラン、エタフェノン、マグネシウム、ミベフラジル、もしくはベルヘキリンのような種々のカルシウムチャンネルブロッカーが含まれる。ある種の態様において、カルシウムチャンネルブロッカーには、長時間作用型ジヒドロピリジン (ニフェジピン型) カルシウムアンタゴニストが含まれる。

20

【0129】

e. 種々の抗不整脈剤

種々の抗不整脈剤の非限定的な例には、アデノシン (adenocard)、ジゴキシン (lanoxin)、アセカイニド、アジュマリン、アモプロキサ (amoproxan)、アプリンジン、ブレチリウムトシレート、ブナフチン、ブトベンジン (butobendine)、カボベン (capoben) 酸、シフェンリン、ジソピラニド (disopyranide)、ヒドロキニジン (hydroquinidine)、インデカイニド、イパトロピウム (ipatropium) プロミド、リドカイン、ロラジミン、ロルカイニド、メオベンチン (meobentine)、モリシジン、ビルメノール、ブラジュマリン、プロパフェノン、ピリノリン (pyrinoline)、ポリガラクツロン酸キニジン、硫酸キニジン、およびビキジル (viquidil) が含まれる。

30

【0130】

6. 降圧剤

降圧剤の非限定的な例には、交感神経遮断薬、 α / β ブロッカー、 β ブロッカー、抗アンジオテンシンII剤、 α ブロッカー、カルシウムチャンネルブロッカー、血管拡張薬、および種々の降圧薬が含まれる。

40

【0131】

a. ブロッカー

アドレナリンブロッカーまたはアドレナリンアンタゴニストとしても公知の β ブロッカーの非限定的な例には、アモスラロール、アロチノロール、ダピブラゾール、ドキサゾシン、エルゴロイドメシル酸塩、フェンスピリド、インドラミン、ラベタロール、ニセルゴリン、プラゾシン、テラゾシン、トラゾリン、トリマゾシン、およびヨヒンビンが含まれる。ある種の態様において、 β ブロッカーには、キナゾリン誘導体が含まれ得る。キ

50

ナゾリン誘導体の非限定的な例には、アルフゾシン、ブナゾシン、ドキサゾシン、プラゾシン、テラゾシン、およびトリマゾシンが含まれる。

【 0 1 3 2 】

b. / ブロッカー

ある種の態様において、降圧剤は、 アドレナリン作用および アドレナリン作用の両方に対するアンタゴニストである。 / ブロッカーの非限定的な例には、ラベタロール (normodyne、trandate) が含まれる。

【 0 1 3 3 】

c. 抗アンジオテンシンII剤

抗アンジオテンシンII剤の非限定的な例には、アンジオテンシン変換酵素阻害剤およびアンジオテンシンII受容体アンタゴニストが含まれる。アンジオテンシン変換酵素阻害剤 (ACE阻害剤) の非限定的な例には、アラセプリル、エナラプリル (vasotec)、カプトプリル、シラザプリル、デラプリル、エナラプリラート、ホシノプリル、リシノプリル、モベルトプリル (moveltopril)、ペリンドプリル、キナプリル、およびラミプリルが含まれる。アンジオテンシンII受容体アンタゴニスト、ANG受容体ブロッカー、またはANG-II 1型受容体ブロッカー (ARBS) としても公知のアンジオテンシンII受容体ブロッカーの非限定的な例には、アンジオカンデサルタン (angiocandesartan)、エプロサルタン、イルベサルタン、ロサルタン、およびバルサルタンが含まれる。

【 0 1 3 4 】

d. 交感神経遮断薬

交感神経遮断薬の非限定的な例には、中枢作用性交感神経遮断薬または末梢作用性交感神経遮断薬が含まれる。中枢神経系 (CNS) 交感神経遮断薬としても公知の中枢作用性交感神経遮断薬の非限定的な例には、クロニジン (catapres)、グアナベンズ (wytensin)、グアンファシン (tenex)、およびメチルドーパ (aldomet) が含まれる。末梢作用性交感神経遮断薬の非限定的な例には、神経節遮断剤、アドレナリン作動性神経遮断剤、 アドレナリン遮断剤、または 1アドレナリン遮断剤が含まれる。神経節遮断剤の非限定的な例には、メカミルアミン (inversine) およびトリメタファン (arfonad) が含まれる。アドレナリン作動性神経遮断剤の非限定的な例には、グアナチジン (ismelin) およびレセルピン (serpasil) が含まれる。 アドレナリンブロッカーの非限定的な例には、アセニトロール (acenitrolol) (sectral)、アテノロール (tenormin)、ベタキソロール (kerlone)、カルテオロール (cartrol)、ラベタロール (normodyne、trandate)、メトプロロール (lopressor)、ナダノール (nadanol) (corgard)、ペンブトロール (levatol)、ピンドロール (visken)、プロプラノロール (inderal)、およびチモロール (blocadren) が含まれる。 1アドレナリンブロッカーの非限定的な例には、プラゾシン (minipress)、ドキサゾシン (doxazocin) (cardura)、およびテラゾシン (hytrin) が含まれる。

【 0 1 3 5 】

e. 血管拡張薬

ある種の態様において、心血管治療剤には、血管拡張薬 (例えば、脳血管拡張薬、冠血管拡張薬、または末梢血管拡張薬) が含まれ得る。ある種の好ましい態様において、血管拡張薬には冠血管拡張薬が含まれる。冠血管拡張薬の非限定的な例には、アモトリフェン (amotriphene)、ベンダゾール (bendazol)、ベンフロジルヘミスукシネート (benfurodil hemisuccinate)、ベンズヨーダロン、クロラシジン (chloracizine)、クロモナール、クロベンフロール (clobenfurol)、クロニトラート (clonitrate)、ジラゼブ、ジピリダモール、ドロブレニラミン (droprenilamine)、エフロキサート、四硝酸エリスリチル、エタフェノン、フェンジリン、フロレジル (floretil)、ガングレフェン (ganglefene)、ヘレストロール (herestrol) ビス(ジエチルアミノエチルエーテル)、ヘキソベンジン、イトラミントシレート、ケリン、リドフラニン (lidoflanine)、六硝酸マンニトール、メジバジン (medibazine)、ニコルグリセリン (nicorglycerin)、四硝酸ペンタエリスリトール、ペントリニトロール (pentrinitrol)、ペルヘキシリン、ピメフィ

10

20

30

40

50

リン (pimefylline)、トラピジル、トリクロミル (tricromyl)、トリメタジジン、リン酸トロールニトラート、およびビスナジンが含まれる。

【0136】

ある種の局面において、血管拡張薬には、慢性治療血管拡張薬または高血圧性緊急症血管拡張薬が含まれ得る。慢性治療血管拡張薬の非限定的な例には、ヒドララジン (apresoline) およびミノキシジル (loniten) が含まれる。高血圧性緊急症血管拡張薬の非限定的な例には、ニトロプルシド (nipride)、ジアゾキシド (hyperstat IV)、ヒドララジン (apresoline)、ミノキシジル (loniten)、およびベラパミルが含まれる。

【0137】

f. 種々の降圧薬

種々の降圧薬の非限定的な例には、アジュマリン、アミノ酪酸、ブフェニオド (bufenide)、シクレタイニン (cicletainine)、シクロシドミン (ciclosidomine)、タンニン酸クリプテナミン、フェノルドパム、フロセキナン、ケタンセリン、メブタメート、メカミルアミン、メチルドーパ、メチル4-ピリジルケトンチオセミカルバゾン、ムゾリミン、パルギリン、ペンピジン、ピナシジル、ピペロキサン、プリマペロン (primaperone)、プロトベラトリン、ラウバシン (raubasine)、レシメトール (rescimetol)、リルメニデン (rilmenidene)、サララシン、ニトロプルシドナトリウム、チクリナフェン、カンシル酸トリメタファン、チロシナーゼ、およびウラピジルが含まれる。

【0138】

ある種の局面において、降圧薬には、アリールエタノールアミン誘導体、ベンゾチアジジン誘導体、N-カルボキシアルキル(ペプチド/ラクタム)誘導体、ジヒドロピリジン誘導体、グアニジン誘導体、ヒドラジン/フタラジン、イミダゾール誘導体、四級アンモニウム化合物、レセルピン誘導体、またはスルホンアミド誘導体が含まれ得る。

【0139】

アリールエタノールアミン誘導体。アリールエタノールアミン誘導体の非限定的な例には、アモスラロール、ブフラロール、ジレバロール、ラベタロール、プロネタロール、ソタロール、およびスルフィナロールが含まれる。

【0140】

ベンゾチアジジン誘導体

ベンゾチアジジン誘導体の非限定的な例には、アルチジド (althizide)、ベンドロフルメチアジド、ベンズチアジド、ベンチルヒドロクロロチアジド、ブチアジド (buthiazide)、クロロチアジド、クロルサリドン、シクロペンチアジド、シクロチアジド、ジアゾキシド、エピチアジド (epithiazide)、エチアジド、フェンキゾン、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメチアジド、メチクロチアジド、メチ克蘭、メトラゾン、パラフルチジド (paraflutizide)、ポリチアジド、テトラクロルメチアジド、およびトリクロルメチアジドが含まれる。

【0141】

N-カルボキシアルキル(ペプチド/ラクタム)誘導体

N-カルボキシアルキル(ペプチド/ラクタム)誘導体の非限定的な例には、アラセプリル、カプトプリル、シラザプリル、デラプリル、エナラプリル、エナラプリラート、ホシノプリル、リシノプリル、モベルチプリル (moveltipril)、ペリンドプリル、キナプリル、およびラミプリルが含まれる。

【0142】

ジヒドロピリジン誘導体

ジヒドロピリジン誘導体の非限定的な例には、アムロジピン、フェロジピン、イスラジピン、ニカルジピン、ニフェジピン、ニルバジピン、ニソルジピン、およびニトレンジピンが含まれる。

【0143】

グアニジン誘導体

グアニジン誘導体の非限定的な例には、ベタニジン、デブリソキン、グアナベンズ、グ

10

20

30

40

50

アナクリン (guanaciline)、グアナドレル、グアナゾジン、グアナチジン、グアンファシン、グアノクロル、グアノキサベンズ、およびグアノキサンが含まれる。

【0144】

ヒドラジン系 / フタラジン系

ヒドラジン系 / フタラジン系の非限定的な例には、ブドララジン、カドララジン、ジヒドララジン、エンドララジン、ヒドラカルバジン (hydracarbazine)、ヒドララジン、フェニプラジン (pheniprazine)、ピルドララジン (pildralazine)、およびトドララジンが含まれる。

【0145】

イミダゾール誘導体

イミダゾール誘導体の非限定的な例には、クロニジン、ロフェキシジン、フェントラミン、チアメニジン (tiamenidine)、およびトロニジンが含まれる。

【0146】

四級アンモニウム化合物

四級アンモニウム化合物の非限定的な例には、アザメトニウム (azamethonium) プロミド、クロルイソングアミン (chlorisondamine) クロリド、ヘキサメトニウム、ペンタシニウム (pentacyinium) ビス(メチルスルフェート)、ペンタメトニウムプロミド、酒石酸ペントリニウム、フェナクトロピニウム (phenactropinium) クロリド、およびトリメチジニウムメトスルフェート (trimethidinium methosulfate) が含まれる。

【0147】

レセルピン誘導体

レセルピン誘導体の非限定的な例には、ピエタセルピン、デセルピジン、レシンナミン、レセルピン、およびシロシゴピンが含まれる。

【0148】

スルホンアミド誘導体

スルホンアミド誘導体の非限定的な例には、アムブシド (ambuside)、クロパミド、フロセミド、インダパミド、キネタゾン、トリパミド、およびキシパミドが含まれる。

【0149】

g. 血管収縮薬

血管収縮薬は、一般に、外科的手技の間に起こり得るショックの際に血圧を増加させるために使用される。昇圧薬としても公知の血管収縮薬の非限定的な例には、アメジニウムメチル硫酸塩、アンジオテンシンアミド、ジメトフリン、ドーパミン、エチフェルミン (etifelmin)、エチレフリン、ゲベフリン、メタラミノール、ミドドリン、ノルエピネフリン、フォレドリン (pholedrine)、およびシネフリンが含まれる。

【0150】

7. うっ血性心不全のための処置剤

うっ血性心不全の処置のための剤の非限定的な例には、抗アンジオテンシンII剤、後負荷-前負荷低下処置、利尿薬、および変力剤が含まれる。

【0151】

a. 後負荷-前負荷低下

ある種の態様において、アンジオテンシンアンタゴニストを耐容し得ない動物患者を、組み合わせ治療により処置することができる。そのような治療は、ヒドララジン (apresoline) およびイソソルビドジニトレート (isordil、sorbitrate) の投与を組み合わせることができる。

【0152】

b. 利尿薬

利尿薬の非限定的な例には、チアジド誘導体もしくはベンゾチアジジン誘導体 (例えば、アルチアジド、ベンドロフルメチアジド、ベンズチアジド、ベンジルヒドロクロロチアジド、ブチアジド、クロロチアジド、クロロチアジド、クロルサリドン、シクロペンチアジド、エピチアジド、エチアジド、エチアジド、フェンキゾン、ヒドロクロロチアジド

10

20

30

40

50

、ヒドロフルメチアジド、メチクロチアジド、メチ克蘭、メトラゾン、パラフルチジド、ポリチジド (polythizide)、テトラクロロメチアジド (tetrachloromethiazide)、トリクロルメチアジド)、有機水銀化合物 (例えば、クロルメロドリン、メラルリド (meralluride)、メルカンファミド (mercaphamide)、メルカプトメリンナトリウム、メルクマリル (mercumallylic) 酸、メルクマチリンナトリウム (mercumatilin sodium)、塩化第一水銀、マーサリル)、プテリジン (例えば、フルテレン (furterene)、トリウムテレン)、プリン系 (例えば、アセフィリン、7-モルホリノメチルテオフィリン、パモブロム (pamobrom)、プロテオブロミン (protheobromine)、テオブロミン)、アルドステロンアンタゴニストを含むステロイド (例えば、カンレノン、オレアンドリン (oleandrin)、スピロノラクトン)、スルホンアミド誘導体 (例えば、アセタゾラミド、アムブシド、アゾセミド、ブメタニド、ブタゾラミド (butazolamide)、クロルアミノフェナミド (chloraminophenamide)、クロフェナミド、クロバミド、クロレキソロン、ジフェニルメタン-4,4'-ジスルホンアミド、ジスルファミド (disulfamide)、エトキシゾラミド、フロセミド、インダパミド、メフルシド、メタゾラミド、ピレタニド、キネタゾン、トラセミド、トリパミド、キシパミド)、ウラシル (例えば、アミノメトラジン (aminometradine)、アミソメトラジン (amisometradine)、カリウム保持性アンタゴニスト (例えば、アミロライド、トリウムテレン)、またはアミノジン (aminozine)、アルブチン、クロラザニル (chlorazanol)、エタクリン酸、エトゾリン、ヒドラカルバジン、イソソルビド、マンニトール、メトカルコン (metochalcone)、ムゾリミン、ベルヘキシリン、チクルナフェン (ticrifen)、および尿素のような種々の利尿薬が含まれる。

10

20

【0153】

c. 変力剤

強心薬としても公知の陽性変力剤の非限定的な例には、アセフィリン、アセチルジゴキシン、2-アミノ-4-ピコリン、アムリノン、ベンフロジルヘミスクシネート、ブクラデシン、セルベロシン (cerberosine)、カンフォタミド (camphotamide)、コンバラトキシン (convallatoxin)、シマリン、デノパミン、デスラノシド、ジギタリン、ジギタリス、ジギトキシン、ジゴキシン、ドブタミン、ドーパミン、ドベキサミン、エノキシモン、エリスロフレイン (erythrophleine)、フェナルコミン (fenalcomine)、ギタリン (gitalin)、ギトキシン (gitoxin)、グリコシアミン、ヘプタミノール、ヒドラステニン (hydrastrinine)、イボパミン、ラナトシド、メタミバム (metamivam)、ミルリノン、ネリフォリン (nerifolin)、オレアンドリン、ウアバイン、オキシフェドリン、ブレナルテロール、プロシラリジン (proscillaridine)、レシブフォゲニン (resibufogenin)、シラレン (scillaren)、シラレニン (scillarenin)、ストルファンシン (strphanthin)、スルマゾール、テオブロミン、およびキサモテロールが含まれる。

30

40

【0154】

特定の局面において、変力剤は、強心配糖体、アドレナリンアゴニスト、またはホスホジエステラーゼ阻害剤である。強心配糖体の非限定的な例には、ジゴキシン (lanoxin) およびジギトキシン (crystodigin) が含まれる。アドレナリンアゴニストの非限定的な例には、アルブテロール、バンブテロール、ビトルテロール、カルブテロール、クレンブテロール、クロルブレナリン、デノパミン、ジオキセテドリン (dioxethedrine)、ドブタミン (dobutrex)、ドーパミン (intropin)、ドベキサミン、エフェドリン、エタフェドリン (etafedrine)、エチルノルエピネフリン、フェノテロール、ホルモテロール、ヘキソブレナリン、イボパミン、イソエタリン、イソプロテレノール、マブテロール、メタプロテレノール、メトキシフェナミン、オキシフェドリン、ピルブテロール、プロカテロール、プロトキロール (protokylol)、レブテロール、リミテロール、リトドリン、ソテレノール (soterenol)、テルブタリン、トレトキノール、ツロブテロール、およびキサモテロールが含まれる。ホスホジエステラーゼ阻害剤の非限定的な例には、アムリノン (inacor) が含まれる。

【0155】

d. 抗狭心症剤

50

抗狭心症剤には、有機硝酸化合物、カルシウムチャンネルブロッカー、ブロッカー、およびそれらの組み合わせが含まれ得る。

【0156】

ニトロ血管拡張薬としても公知の有機硝酸化合物の非限定的な例には、ニトログリセリン(nitro-bid、nitrostat)、二硝酸イソソルビド(isordil、sorbitrate)、および硝酸アミル(aspirol、vaporole)が含まれる。

【0157】

D. 外科的治療剤

ある種の局面において、二次的な治療剤には、PCIのような何らかの型の手術が含まれ得る。手術、特に、根治手術は、本発明、および1種または複数種の他の薬理学的剤のな
10
などの他の治療と共に使用され得る。血管および心血管の疾患および障害のためのそのような外科アプローチは、当業者に周知であり、この文書中に別途記載される。

【0158】

E. 薬物製剤化および患者への投与の経路

臨床適用が企図される場合、薬学的組成物は、意図された適用のために適切な型で調製されると考えられる。一般に、これは、発熱性物質およびヒトまたは動物にとって有害であり得るその他の不純物を本質的に含まない組成物を調製することを要すると考えられる。

【0159】

一般に、薬物、タンパク質、または送達ベクターを安定化し、標的細胞による取り込みを可能にするため、適切な塩および緩衝液を用いることが望まれると考えられる。本発明の水性組成物は、薬学的に許容される担体または水性媒体に溶解または分散した有効量の薬物、ベクター、またはタンパク質を含む。「薬学的にまたは薬理学的に許容される」という語句は、動物またはヒトへ投与された場合に有害反応、アレルギー反応、またはその他の不都合な反応を生じない分子実体および組成物をさす。本明細書において使用されるように、「薬学的に許容される担体」には、ヒトへの投与に適した医薬などの医薬の製剤化において使用するために許容される、溶媒、緩衝液、溶液、分散媒、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤、吸収遅延剤等が含まれる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および剤の使用は、当技術分野において周知である。本発明の活性成分と非適合性でない限り、任意の従来の媒体または剤が、治療用組成物において使用されることが
20
30
企図される。組成物のベクターまたは細胞を不活化しない限り、補足的な活性成分が、組成物に組み込まれてもよい。

【0160】

本発明の活性組成物には、古典的な薬学的調製物が含まれ得る。標的組織がその経路を介して利用可能である限り、本発明に係るこれらの組成物の投与は、任意の一般的な経路を介してなされ得る。これには、経口、経鼻、または経頬が含まれる。あるいは、投与は、皮内注射、皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射、もしくは静脈内注射によってもよいが、または心組織への直接注射によってもよい。前記のとおり、そのような組成物は、通常、薬学的に許容される組成物として投与されると考えられる。

【0161】

活性化化合物は、非経口投与されてもよいがまたは腹腔内投与されてもよい。例として、遊離塩基または薬理学的に許容される塩としての活性化化合物の溶液を、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と適切に混合された水で調製することができる。グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物、ならびに油で、分散液を調製してもよい。保管および使用の通常の下で、これらの調製物は、一般に、微生物の増殖を防止するための保存剤を含有している。

【0162】

注射可能な使用に適した薬学的形態には、例えば、無菌の水性の溶液または分散液、および無菌の注射可能な溶液または分散液の即時調製のための無菌の粉末が含まれる。一般に、これらの調製物は、無菌であり、かつ容易な注射可能性が存在する程度に液体である
40
50

。調製物は、製造および保管の条件の下で安定していなければならない、細菌および真菌のような微生物の汚染作用に対して保存されるべきである。適切な溶媒または分散媒は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、それらの適当な混合物、ならびに植物油を含有し得る。適度の流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用により、分散液の場合には必要とされる粒子サイズの維持により、そして界面活性剤の使用により維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン系、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によってもたらされ得る。多くの場合において、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましいと考えられる。注射可能組成物の吸収の長期化は、吸収を遅延させる剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に使用することによりもたらされ得る。

10

【0163】

無菌の注射可能溶液は、所望により他の成分（例えば、上に列挙されたもの）と共に、適切な量の活性化化合物を溶媒に組み込み、続いて、ろ過滅菌することにより調製され得る。一般に、分散液は、例えば、上に列挙されたとおりの基本的な分散媒および所望の他の成分を含有している無菌の媒体に、様々な滅菌された活性成分を組み込むことにより調製される。無菌の注射可能溶液の調製のための無菌の粉末の場合、好ましい調製の方法は、事前に滅菌ろ過された溶液から、活性成分 + 任意の付加的な所望の成分の粉末を与える、真空乾燥および凍結乾燥の技術を含む。

20

【0164】

本発明の組成物は、一般に、中性または塩の形態で製剤化され得る。薬学的に許容される塩には、例えば、無機酸（例えば、塩酸もしくはリン酸）、または有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等）に由来する（タンパク質の遊離アミノ基により形成された）酸付加塩が含まれる。タンパク質の遊離カルボキシル基により形成された塩を、無機塩基（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、もしくは水酸化鉄）または有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等）から得ることも可能である。

30

【0165】

製剤化の後、溶液は、好ましくは、投薬製剤と適合性の様式で、かつ治療的に有効であるような量で投与される。製剤は、注射可能溶液、薬物放出カプセル等のような多様な剤形で容易に投与され得る。例えば、水性溶液での非経口投与の場合、溶液は、一般に、適切に緩衝され、最初に、液体希釈剤が、例えば、十分な生理食塩水またはグルコースにより等張にされる。そのような水性溶液は、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内への投与のために使用され得る。特に、本開示を考慮すれば、当業者に公知であるように、好ましくは、無菌の水性媒体が用いられる。例として、単一用量を、1mlの等張NaCl溶液に溶解させ、1000mlの皮下注入液に添加するか、または提案された注入部位に注射する（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、1035～1038頁および1570～1580頁を参照のこと）。投薬量のある程度の変動が、処置される対象の状態に依って、必然的に起こると考えられる。投与を担う者が、いかなる場合にも、個々の対象のための適切な用量を決定すると考えられる。さらに、ヒトへの投与の場合、調製物は、FDA Office of Biologics standardsにより必要とされるような無菌性、発熱性、一般的安全性、および純度の基準を満たすべきである。

40

【実施例】

【0166】

VI. 実施例

以下の実施例は、本発明の様々な局面をさらに例示するために含まれる。実施例において開示される技術は、本発明の実施においてよく機能することが本発明者らにより発見された技術および/または組成物を表し、従って、その実施のための好ましいモードを構成すると見なされることが、当業者により認識されるべきである。しかしながら、当業者は、本開示を考慮すれば、開示された具体的な態様に多くの変化を施しても、本発明の本

50

旨および範囲から逸脱することなく、同様のまたは類似の結果を入手することが可能であることを認識するべきである。

【0167】

実施例1 - 方法

刻まれた組織から線維芽細胞を遊走させ、線維芽細胞増殖培地において増殖させる外植法により、成体のTTFおよびCFを単離した。線維芽細胞を、ポリブレン (Sigma; 6 μ g/ml) と、Platinum E細胞 (Cell Biolabs) から作成された転写因子を発現する新鮮なレトロウイルスとの混合物により形質導入した。ウイルス形質導入の24時間後、ウイルス培地を心臓誘導培地に交換した。2日毎に培地を交換した。心臓遺伝子の発現を、フローサイトメトリー、リアルタイムPCR、および免疫細胞化学により分析した。8~10週齢の成体マウスに、偽手術、または左心耳の1.5mm遠位におけるLADの結紮のいずれかを施した。濃縮レトロウイルス (およそ 10^8 pfuウイルス) を、気密1710注射器 (Hamilton) を使用して、境界領域に注射した。心エコーを使用して心機能を査定し、組織学的研究のため、安楽死させた動物から心臓を採集した。成体心筋細胞の単離、電気生理学的測定、組織学的分析、および免疫組織化学分析は、以前に記載されたとおりに実施された (19~22)。

10

【0168】

初代線維芽細胞の単離

尾先端部 (tail-tip) 線維芽細胞 (TTF) : 成体マウスの尾部を除膜し、小片へ切断し、それを組織培養ディッシュ上に播種し、15% FBSおよび抗生物質が補足されたDMEMで培養した。2~3日毎に培地を交換した。TTFは、2日後または3日後に外に遊走した。1週間後、TTFを凍結させるかまたはウイルス形質導入のために再播種した。心臓線維芽細胞 (CF) : 成体 (4週齢超) マウスの心臓を小片へ刻み、組織培養ディッシュ上に播種した。3分後、培養培地 (DMEM: 199 (4:1)、15% FBS、および抗生物質) を、ディッシュに穏和に添加した。CFは、2日後に、刻まれた心組織の外へ遊走し始めた。2日毎に培地を交換した。10日後、CFを凍結させるかまたはウイルス形質導入のために再播種した。

20

【0169】

レトロウイルスの生成

EGFP、Mycタグ付きのNkx2-5、GATA4、Tbx5、HAND2、MEF2C、およびFLAGタグ付きのMesP1のcDNAを、レトロウイルスベクターpBabe-X (Kitamura et al., 1995) へサブクローニングすることにより、レトロウイルスプラスミドDNAを生成した。トランスフェクションの24時間前に、1ディッシュ当たり 3×10^6 個の密度で10cm組織培養ディッシュ上に播種されたPlatinum E細胞 (Cell Biolabs) へ、Fugene 6 (Roche) を使用して、10 μ gのレトロウイルスプラスミドDNAをトランスフェクトした。トランスフェクションの12時間後、培地を12mlの新鮮な培地 (10% FBSおよび抗生物質が補足されたDMEM) に交換した。36時間のトランスフェクションの後、ウイルス培地を採集し、0.45 μ mセルロースフィルターでろ過した。ウイルス上清を、6 μ g/mlの最終濃度でポリブレン (Sigma) と混合した。

30

【0170】

ウイルス形質導入

TTFおよびCFを、 0.8×10^4 /cm²の密度で、SureCoat (Cellutron) により予めコーティングされた組織培養ディッシュ上に播種した。24時間後、線維芽細胞増殖培地を、新鮮に作成されたウイルスとポリブレンとの混合物に交換した。24時間後、ウイルス培地を、新生仔ラット/マウス心筋細胞から入手された10% 条件培地、DMEM/199 (4:1)、10% FBS、5% ウマ血清、抗生物質、非必須アミノ酸、必須アミノ酸、B-27、インスリン-セレン-トランスフェリン、ビタミン混合物、およびピルビン酸ナトリウムから構成された誘導培地 (Invitrogen) に交換した。条件培地を、0.22 μ m孔サイズセルロースフィルターでろ過した。細胞を採集するまで、2日毎に培地を交換した。qPCR、ウエスタンブロット分析、および免疫細胞化学。全RNAを培養細胞から抽出し、cDNAを逆転写により合成した。全てのqPCRプローブをApplied Biosystemsから入手した。ウエスタンブロットを、抗Myc抗体 (Santa Cruz、クローンA-14、1:1000) および抗FLAG抗体 (Sigma、1:2000) により実施した。免疫細胞化学のため、細胞を4% パラホルムアルデヒドで固定し、一次抗体: 抗GFP (

40

50

Torrey Pines Biolabs、1:400)、抗cTnT(Thermo Scientific、1:400)、抗Myc(Santa Cruz、クローンA-14、1:200)、抗P4HB(ProteinTech、1:200)、および抗アクチニン(Sigma、1:400)と共にインキュベートした。PBSにより洗浄した後、Alexa蛍光発生二次抗体(Invitrogen)を使用して、シグナルを検出した。

【0171】

DNAマイクロアレイ

未感染CF、空ベクターまたはGHMTレトロウイルスのいずれかにより形質導入されたCF、および成体心臓から、全RNAを単離した。マイクロアレイ分析は、University of Texas Southwestern Medical CenterのDNA Microarray Core Facilityによりillumina Mouse-6 Beadchipのプラットフォームで実施された。データはGeneSpring GXソフトウェア(Agilent)を使用して分析された。

【0172】

フローサイトメトリー分析

MHC-GFP発現を検出するための一次アッセイ法のため、付着細胞をPBSにより洗浄し、37℃で10時間のaccutase(Millipore)による処理により培養ディッシュから剥離した。次いで、細胞を2%FBSを含むPBSにより洗浄し、細胞ストレーナーでろ過した。細胞を、室温で15分間、ヨウ化プロピジウム(1%FBSを含むPBSによる1:1000希釈物)と共にインキュベートした。死細胞をヨウ化プロピジウム染色により排除し、生細胞をFACS Caliber(BD Sciences)およびFlowJoソフトウェアを使用してGFP発現について分析した。心臓特異的なマーカーについての細胞内染色のため、細胞を上記のとおりに採集した後、15分間、4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定された細胞を、PBSにより洗浄し、室温で10分間、サポニンにより透過性化した。PBSにより洗浄した後、細胞を、5%ヤギおよびロバ血清を含むPBSと共に室温で30分間インキュベートし、続いて、一次抗体(0.2%ヤギおよびロバ血清を含むPBSで1:100希釈されたウサギポリクローナル抗GFP抗体(Invitrogen)および1:400希釈されたマウスモノクローナル抗cTnT抗体(Thermo Scientific))と共に室温で30分間インキュベートした。PBSにより2回洗浄した後、細胞を二次抗体と共に室温で30分間インキュベートした。二次抗体は、0.2%ヤギおよびロバ血清を含有しているPBSで1:200希釈されたヤギ抗ウサギAlexa fluor 488(Invitrogen)および1:400希釈されたロバ抗マウスCy5(Jackson Laboratory)であった。細胞を、PBSにより3回洗浄し、次いで、FACS Caliber(BD sciences)およびFlowJoソフトウェアを使用して、GFPおよびcTnTの発現について分析した。

【0173】

TCF21発現細胞の選別および遺伝子発現

3ヶ月齢のTcf21iCre/+;R26RtdTマウスを、経管栄養により、連続3日間、0.2mg/gmタモキシフェンにより誘導し、1週間後に、心臓を単離し、以前に記載されたとおりに(Russell et al., 2011)、FACS選別のための単一細胞懸濁物を生成するために加工した(心房および大動脈肺動脈幹を除去した)。懸濁物を組織ストレーナーでろ過し、400gで5分間遠心分離し、10%CM培地(10% Hyclone FBS、3:1 DMEM/M-199、1% 1モル/L HEPES、1.2% 抗生物質/抗真菌薬)に再懸濁させた後、Summitソフトウェアを使用して、MoFloフローサイトメーター(Cytomation Inc)により選別した。転写物分析のため、選別された細胞を、RNA抽出用の溶解緩衝液(Ambion製のRNAqueous Microキット)へ収集した。各試料の一分を、選別後の純度の査定のため、PBSへも収集した。Superscript III逆転写酵素(Invitrogen)およびランダムヘキサマー(Roche)を使用して、相補DNAを合成した。CFX96装置(Bio-Rad)上でiTAQ SYBR Greenマスターミックス(Bio-Rad)を用いた標準的なqPCR法を使用して、遺伝子発現プロファイルを生成した。試料をトリプリケートで実行し、シクロフィリン発現に対して規準化した。未選別集団に対する濃縮倍率を決定した。

【0174】

MI手術およびレトロウイルスの心筋内注射

マウスにイソフルランで麻酔をかけ、ポリエチレン管(サイズ60)を挿管し、次いで、120サイクル/分の呼吸数で2~3ml/サイクルで従量式げっ歯動物人工呼吸器により換気し

た。第3肋間腔で開胸術を実施し、LADを可視化するため、第3肋骨と第4肋骨とを分離するために自己把持型マイクロリトラクターを置いた。次いで、左主冠動脈の分岐点直後の、左心耳の1.5mm遠位において、LAD下に7.0プロリン縫合糸 (Ethicon, Johnson & Johnson, Bussels, Belgium) を通した。LADを二重に結紮した。左心室の前壁の色の变化 (蒼白化) により、閉塞を確認した。偽手術マウスは、結紮なしの同一の手技を受けた。LADの結紮直後に、濃縮レトロウイルス50 μ l を、気密1710注射器 (Hamilton) を使用して、MIの境界領域の5つの異なる区域に注射した。次いで、胸壁を5.0 Dexon吸収性縫合糸 (Tyco Healthcare, United States Surgical, USA) により閉鎖し、皮膚をTopical Tissue Adhesive (Abbott Laboratory, IL, USA) により閉鎖した。マウスから抜管し、加熱ランプ下で手術から回復させた。マウス外科医に対しては盲検で行われた。MI後1日目にFS > 30%を有するマウスは、研究から除外された。

10

【0175】

経胸壁心エコー

VisualSonics Vevo2100画像システムを使用して、意識のあるマウスにおいて、二次元経胸壁心エコーにより心機能を評価した。短縮率 (FS) および駆出率 (EF) を心臓収縮機能の指数として使用した。拡張末期 (LVIDd) および収縮末期 (LVIDs) におけるLV内径を測定するため、Mモードトレーシングを使用した。FSを下記式により算出した。

$$FS (\%) = [(LVIDd - LVIDs) / LVIDd] \times 100$$

EFは、(LVEDV-LVESV)/LVEDV 100%から推定される。左室収縮末期容積、LVESV; 左室拡張末期容積、LVEDV。全ての測定が、経験を積んだ手術者により盲検で実施された。

20

【0176】

心臓MRI

MIの6週間後および12週間後、38mmバードケージ型RFコイルを有する7T小動物用MRスキャナ (Varian, Inc, Palo Alto, CA) を使用して、心臓MRIにより、マウスの心機能を再評価した。医療用空気と混合された1.5~2%イソフルランのノーゾコーンを介した吸入による麻酔の下で、心臓感知のための含気呼吸器センサーおよびECG電極が装備されたマウススレッド (Dazai Research Instruments) に、腹臥位で、RFコイルの中心に対して頭部を先頭に、心臓を中心にして、動物を置いた。マウス胸部を剪毛し、電極とマウスとの間のECG接触を最適化するために伝導ゲルを塗布した。全てのMRI取得が、心臓誘発および呼吸誘発の両方を使用してゲーティングされた。適度の一定の心拍数を確実にするため、口径温度は35℃に維持された。各マウスにおいて、心臓の長軸を決定するため、3つの直交面 (横断、冠状、および矢状) で二次元 (2D) 勾配エコー画像を取得した。心臓の長軸に対して垂直の軸画像をシネイメージングのために選んだ。1心周期当たり12相のシネ画像を、2.75msのエコー時間、反復時間 = EKG R-R間隔/12、45°のフリップ角、およびNEX = 4で入手した。各スキャンは、1mm厚、128×128のマトリックスサイズ、および30×30mmの視野を有する、尖部からLV流出部への7~10の連続スライスからなっていた。NIH ImageJソフトウェアを使用した左室収縮末期容積および左室拡張末期容積 (LVESV、LVEDV) の算出のため、心外膜および心内膜の境界を手動でトレーシングした。全LV容積を、全てのスライスの容積の総計として算出した。一回拍出量を式LVEDV-LVESVにより算出した。EFを、式 (LVEDV-LVESV)/LVEDV 100%により算出した。MRIの取得および分析を実施する研究者には、マウス群の割り当てが知らされなかった。

30

40

【0177】

タモキシフェン投与によるCreの誘導

タモキシフェン (Sigma) を50mg/mlの濃度でゴマ油 (90%) およびエタノール (10%) に溶解させた。Cre活性を誘導するため、タモキシフェン (0.2mg/g体重) を、それぞれ、連続3~5日間または7日間、Tcf21iCre/+;R26RtdTまたは MHC-MerCreMer (Sohal et al., 2001); Rosa26-LacZを保持しているマウスへ、22ゲージ給餌針による経管栄養により投与した。最後の投薬量の経口経管栄養後8日目に、マウスを分析するかまたはMI手術に供した。

【0178】

50

成体マウス心筋細胞の単離、心筋細胞筋節短縮および Ca^{2+} トランジェントの測定

以前に記載された酵素消化および機械的分散の方法21を使用して、マウス心筋細胞を単離した。簡単に説明すると、 Ca^{2+} 不含クレブスリンゲル緩衝液 (KR、35mM NaCl、4.75mM KCl、1.19mM KH_2PO_4 、16mM Na_2HPO_4 、134mM ショ糖、25mM NaCO_3 、10mM グルコース、10mM HEPES、NaOHによりpH7.4) およびその後のコラゲナーゼ溶液 (コラゲナーゼII、8mg/mL) による逆行性灌流の後、微細なメスおよびハサミを使用してLV筋細胞を分離した。温和な粉砕の後、細胞を、KB溶液 (10mM タウリン、70mM グルタミン酸、25mM KCl、10mM KH_2PO_4 、22mM グルコース、0.5mM EGTA、KOHによりpH7.2) 中に維持し、室温で6時間以内に研究した。筋細胞収縮能を調査するため、単離された心筋細胞を、33 μm C12FDGと共に30分間インキュベートした。緑色C12FDG+心筋細胞を蛍光顕微鏡により同定した。C12FDGと共にインキュベートされた野生型マウス由来の成体心筋細胞を、心筋細胞の自己蛍光を決定するために使用した。C12FDG+心筋細胞およびC12FDG-心筋細胞を、室温で細胞外緩衝液により灌流しながら1Hzで電場刺激した。可変フィールドレートCCDカメラ (IonOptix, Milton, MA) を使用して、60倍の顕微鏡接眼レンズを通して、240Hzで画像を取得した。細胞長を、IonOptixインターフェースシステムを使用して、ビデオエッジ検出システムにより測定した。心筋細胞の画像のリアルタイムフーリエ分析を、筋節長および収縮プロファイルを測定するために実施した。トレースを定常状態で記録した。これらは、通常、5分間の刺激の後に達成された。 Ca^{2+} 耐性であった、桿形で明白に横紋のある心筋細胞のみを、実験において使用した。以前に記載されたとおりに (Tandan et al., 2009; Laugwitz et al., 2005; Luo et al., 2005; Gryniewicz et al., 1985)、細胞内 Ca^{2+} トランジェントを測定した。遮光しながら室温で30分間、0.1% BSAおよび1% ビルビン酸を含有している細胞外緩衝液 (140mM NaCl、5mM KCl、1.8mM CaCl_2 、1mM MgCl_2 、10mM グルコース、および10mM Hepes) 中の5 μM fura-2-アセトキシメチルエステル (Fura-2 AM) を細胞に負荷し、次いで、細胞を細胞外緩衝液により2回洗浄し、0.1% BSAおよび1% ビルビン酸を含むこの緩衝液において使用時まで維持する。0.01% ポリリジン + 0.1% ゼラチンによりコーティングされたカバーガラス (Deckglaser, Germany) に、細胞を播種する。カバーガラスは灌流チャンパーの底に適合する。細胞を室温で細胞外緩衝液により灌流する。1~2秒毎に交互に340/380nmの光を細胞に照射することにより、Fura-2蛍光を測定する。細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]$) の変化を、340nmおよび380nmにおける蛍光強度の比率の変化から導出する。蛍光比 $R = (340\text{nm}$ 励起における蛍光強度 - 340nm励起におけるバックグラウンド強度) / (380nmにおける蛍光強度 - 380nmにおけるバックグラウンド強度) を、以下の式 (Gryniewicz et al., 1985) :

$$[\text{Ca}^{2+}] = \frac{K_d * \beta * (R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)}$$

を使用して、 $[\text{Ca}^{2+}]$ に換算した。

式中、 R_{\min} および R_{\max} は、それぞれ、 Ca^{2+} の非存在下 (Ca^{2+} を欠き、10mM EGTA、10 μM イオノマイシン、および40 μM BAPTA-AMを含有している溶液)、ならびに飽和 Ca^{2+} (2mM Ca^{2+} および10 μM イオノマイシンを含有している溶液) で入手された比率である。 $K_d = 224\text{nM}$ が、Fura-2の解離定数であり、 $\beta = (\text{Ca}^{2+}$ の非存在下での380nm励起における蛍光強度 / 飽和 Ca^{2+} における380nm励起における蛍光強度) である。分析は、特殊なデータ分析ソフトウェア (Ion Wizard, IonOptix Corp.) により実施された。

【0179】

自然拍動心筋細胞におけるカルシウムトランジェント測定

カルシウム画像化のため、遮光しながら37℃で30分間、0.1% BSAおよび1% ビルビン酸を含有している修飾タイロード液 (140mM NaCl、5mM KCl、1.8mM CaCl_2 、1mM MgCl_2 、10mM グルコース、および10mM Hepes、pH7.4) において、0.1% Pluronic F-127 (Invitrogen) と共に5 μM Fura-2 AM (Invitrogen) を、拍動iCLM、培養新生仔マウス心房筋細胞、新生仔マウス心室筋細胞、または単離された成体マウス心室筋細胞に負荷した。画像化の前に、細胞を洗浄し、以前に記載されたとおりに (Luo et al., 2005)、室温で30分間

、タイロート液においてFura-2 AMをエステル分解した。Ca²⁺画像化は、自動化された蛍光顕微鏡およびCCDカメラを用いてPTI (Photon Technology International) Ca²⁺ Imaging System (Birmingham, NJ) を使用して実施された。カバーガラスを灌流チャンバーの底に挿入した。細胞を修飾タイロート液により灌流し、340nmおよび380nmの両方でCa²⁺により誘導された蛍光を測定することにより、個々の自然拍動細胞におけるカルシウムトランジェントを算出した。

【0180】

実施例2 - 結果

進化的に保存された転写因子 (GATA4、HAND2、MEF2、MesP1、Nkx2-5、およびTbx5) のコアセットは、心臓遺伝子発現および心臓発生を制御する (Olson, 2006; Wu, 2008)。最近、GATA4、MEF2C、およびTbx5が、インビトロで線維芽細胞を心筋細胞様細胞へ変換し得ることが報告された7。本発明者らは、線維芽細胞を拍動心臓様筋細胞へ再プログラム化するために必要かつ十分なコア心臓転写因子の最適の組み合わせを定義し、これらの因子が、インビボで内在性心臓線維芽細胞の心筋細胞様細胞への再プログラム化を通して、損傷心臓の心機能を回復させ得るか否かを判定することに努めた。この目標に向けて、本発明者らは、心臓特異的なaMHC-GFPトランスジーンを保持しているマウスに由来する線維芽細胞において、6種のコア心臓転写因子 (GATA4 (G)、およびHAND2 (H)、MEF2C (M)、MesP1 (Ms)、Nkx2-5 (N)、およびTbx5 (T)) の各々を発現させるためのレトロウイルスを生成した (図5A~Dおよび6)。

【0181】

成体マウス尾先端部線維芽細胞 (TTF) における上記の6因子 (G、H、M、Ms、N、T) の可能性のある心臓形成活性を、9日間の形質導入の後、フローサイトメトリーによるGFP+細胞の分析により定量化した。ウイルス骨格により形質導入された線維芽細胞培養物、または未感染の線維芽細胞培養物においては、GFP+細胞は観察されなかった。しかしながら、6因子は、共同で、GFP陽性細胞の小さな集団 (およそ6%) を生成した (図7A~B)。1因子を削除することを数回繰り返した後、本発明者らは、MHC-GFP+細胞の高い割合を誘導することができる、GHMMsT、GHMT、HMMsT、GMT、HMT、およびMTを含む複数の組み合わせを同定した (図7A~B)。異なる因子の間の協調性は、心臓遺伝子発現を相乗的に活性化し、相互の発現を活性化する能力に一致している (Olson, 2006; Zang et al., 2004; Dai et al., 2002; Maitra et al., 2009; Ghosh et al., 2009)。

【0182】

上記の因子の組み合わせが、成体TTFにおける内在性の心臓特異的遺伝子を活性化し得る否かを判定するため、本発明者らは、フローサイトメトリーにより、心臓トロポニンT (cTnT) およびaMHC-GFPの発現を調査した (図8)。GHMTは、MHC-GFPおよびcTnTの両方について陽性となるよう、細胞のおよそ9.2%を誘導した。本発明者らは、少なくとも1種の内在性の心筋細胞マーカーcTnTまたはアクチニンを発現する細胞を、誘導心臓様筋細胞 (iCLM) と呼ぶ。それに対して、GMTは、cTnT+/ MHC-GFP+表現型をとるよう、細胞のおよそ2.9%を誘導した (図8)。GHMTにより成体TTFから生成されたcTnT+/ MHC-GFP+iCLMの割合 (9.2%) は、GMTにより新生仔TTFについて以前に報告されたもの (2.5%) よりおよそ4倍高い。cTnTおよびaMHC-GFPを発現する細胞の割合は、形質導入の7日目にピークに達し、再プログラム化されていない線維芽細胞の過増殖のため、時間と共に減退した (図9A~B)。

【0183】

心臓線維芽細胞 (CF) は、成体哺乳動物心臓における最も優勢な間質細胞型である。GHMTがCFにおける心臓遺伝子発現を活性化し得るか否かを調査するため、本発明者らは、GHMT、GMT、または空ウイルスにより成体CFを形質導入し、1週間後にフローサイトメトリーにより心臓マーカーの発現を分析した。GHMTは、CFの6.8%をcTnT+/ MHC-GFP+になるよう誘導し、それに対し、GMTでは1.4%が二重陽性細胞となった (図10A)。GHMTは細胞の7.5%においてcTnTおよびcTnI (心臓トロポニンI) を誘導した (図10B)。従って、GHMTは、成体線維芽細胞における心臓遺伝子発現の効率的な開始のための最適の因子の組み合わ

せを表した。GHMT形質導入により成体のTTFおよびCFから導出された MHC-GFP+細胞は、筋節タンパク質 α アクチニンおよびcTnTの強力な免疫染色を示した(図1A~Bおよび11)。GHMTの存在下で、およそCFの10%またはTTFの12%が、 α アクチニン+となり、これらのうちのそれぞれおよそ12%またはおよそ10%が、組織化された筋節様構造を示した(図12A~C)。

【0184】

遺伝子発現パターンのマイクロアレイ分析およびqPCR分析は、GHMTにより形質導入された線維芽細胞における、心室表現型を示す広範囲の心臓遺伝子の発現、およびFSP1(線維芽細胞特異タンパク質1/S100A4)を含む非筋細胞遺伝子の同時の抑制を示した(図13A~15C)。GHMTにより形質導入されたCFまたはTTFを培養物中に5週間維持した後、本発明者らは、筋節構造を示すiCLMの0.1%~1%において、自然収縮、カルシウムトランジェント、および活動電位を観察した(図1Cおよび16)。iCLMは、新生仔心室心筋細胞に最も類似したカルシウムトランジェントのパターンを示した(図1C)。誘導可能発現ベクターによる形質導入は、心筋細胞様の表現型が、外因性のGHMT発現の終了後に安定していることを示した(図17A~B)。

【0185】

心筋細胞マーカーおよびMycタグ付きGHMTについての同時染色は、GHMTによる心筋細胞様表現型の誘導が細胞自律的であること示唆している(図18A~B)。総合すると、これらの結果は、GHMTが、TTFおよびCFの亜集団において心臓遺伝子発現を活性化し得ることを示す。心臓様表現型をとる細胞の比較的小さな割合は、細胞の一画分においてのみ達成される、表現型変換のために必要とされる心臓因子の正確な化学量論をおそらく示している(図1D)。

【0186】

MIまたはその他の型の心臓損傷の後、心筋細胞が失われ、CFがコラーゲンおよびその他の細胞外マトリックス成分を産生するよう活性化され、それが、線維症および心機能障害を引き起こす(Porter and Turner, 2009)。CFを心筋細胞運命へ再プログラム化することにより、MI後の心機能の低下を弱めることができるか否かを判定するため、本発明者らは、複製細胞においてのみ発現を指図するレトロウイルス発現システム(Miller et al., 1990)を使用して、インビボで、CFおよびその他の分裂細胞において転写因子を発現させた(図19A)。成体哺乳動物心筋細胞は分裂せず、従って、レトロウイルス発現に対して抵抗性である。本発明者らは、MIを誘導する左前下行性冠動脈(LAD)の結紮の後、損傷心臓へ濃縮GFPレトロウイルスを注射することにより、複製非心筋細胞に対するレトロウイルス感染の特異性を確認した。GFP発現は、虚血区域において明白に検出された(図19B)。

【0187】

しかしながら、増殖非心筋細胞に対するレトロウイルス感染の特異性と一致して、GFP+細胞は、心臓マーカー-cTnTを発現していなかった(図19C)。1心臓切片当たり 745.6 ± 430.7 個のGFP+非心筋細胞が検出された(図19D)。Tomatoウイルスマーカーと共にGHMTウイルスを同時注射し、続いて、30日後に心臓から心筋細胞を単離したところ、真の心筋細胞においてTomatoが発現されていることが示され(図2A)、このことから、新たに形成された心筋細胞がGHMTにより誘導されたことが示された。

【0188】

FSP1は、線維芽細胞および移行上皮のような非心筋細胞において発現される(Bhowmick et al., 2004; Zeisberg et al., 2007; Schneider et al., 2007)。マウスおよびヒトの心臓において、FSP1の発現は、主としてCFのマーカーと共局在し、MI後に増加する(Schneider et al., 2007)。FSP1-CreおよびRosa26-LacZの対立遺伝子を保持しているマウスにおける非心筋細胞は、ガラクトシダーゼ(-gal)により特異的に標識され、線維芽細胞系統追跡のための信頼性のあるマーカーを提供する(Bhowmick et al., 2004)。インビボで心臓転写因子を発現する心臓線維芽細胞の運命を追跡するため、本発明者らはFSP1-Cre/Rosa26-LacZマウスにおいてLAD結紮を実施し、LAD結紮直後にGHMTまたはGFPをコード

する濃縮レトロウイルスを境界領域に注射した。本発明者らは、心臓の組織学的切片におけるガラクトシダーゼ活性を分析した。未損傷心臓においては、1切片当たり1個未満の-gal+心筋細胞が観察された。損傷後、-gal発現は、梗塞域全体のCFに容易に検出された(図2B~C)。

【0189】

GFPウイルスに感染した損傷心臓において、左心室(LV)の心筋に1切片当たり0~5個の疎らに分布した-gal+心筋細胞が観察されたが(0.4 ± 1.2 個の-gal+心筋細胞/切片)、それは低レベルの異所性活性化による可能性がある。対照的に、GHMTレトロウイルスカクテルに感染した損傷心臓の梗塞領域および境界領域の全体には、強く染色された-gal+心筋細胞の豊富なクラスター(64.8 ± 12.1 個の-gal+心筋細胞/切片)が観察された(図2B~C)。前述のとおり、レトロウイルスは、1切片当たりおよそ745個の非心筋細胞を感染させ(補足図15d)、このことから、GHMTがインビボで感染細胞のおよそ8.7%を-gal+心筋細胞へ再プログラム化したことが示唆された。一般に、梗塞領域に隣接している境界領域にはより多くの-gal+心筋細胞が観察されたが、それは、この領域における完全な血管構造またはより高いウイルス感染による可能性がある。類似の結果が、GHMTsTの注射により入手されたが、インビトロで見られたように、Nkx2-5を含めると(GHMTsNT)、他の5因子の効力が減弱した(図20A~B)。-gal+心筋細胞は、cTnTを発現し、明白な横紋を示した(図2C)。

【0190】

心臓線維芽細胞の独立のマーカーとして、本発明者らは、Tcf21(カプスリン(capsulin)/エピカルジン(epicardin))遺伝子座へ相同組換えにより挿入された誘導可能MerCreMer発現カセット(Tcf21iCre)を保有しているマウスの系統を生成した(図21A~B)。R26RtdTomatoを保持しているマウスとのこれらのマウスの交雑は、主に心臓線維芽細胞においてTomato蛍光の特異的な発現を示したが(図21C~E)、本発明者らは、正常心臓の心筋細胞にはTomato発現をほとんど観察しなかった(1切片当たり 0.4 ± 0.8 個のTomato+心筋細胞、図2F)。Tcf21iCreは、心臓線維芽細胞を時空間的に系統追跡するための有益な遺伝子ツールである(Acharya et al., 2011)。Tcf21iCre;R26RtdTマウスを、3日間、Tcf21発現細胞をマークするため、タモキシフェンにより処理した。最後のタモキシフェン処理の8日後に、LAD結紮を実施し、動物にGFPウイルスまたはGHMTウイルスを注射し、20日後に分析した(図22)。

【0191】

GHMTを注射された心臓(1切片当たり 10.1 ± 2.5 個のTomato+心筋細胞)においては、GFPを注射されたもの(1切片当たり 0.5 ± 0.7 個のTomato+心筋細胞)と比較して多数のTomato+心筋細胞が観察された(図2E~F)。これらの所見は、心臓の心臓線維芽細胞におけるGHMTの強制発現が、心臓マーカーの発現を誘導するのに十分であることを示唆する。GHMTがMI後の新たな心筋細胞の形成を実際に促進したか否かをさらに試験するため、本発明者らは、誘導可能MHC-MerCreMerトランスジェーンとloxPが導入されたRosa26-LacZレポーターとを有するマウスを用いた。連続7日間のタモキシフェンによるこれらのマウスの経管栄養は、LV心筋内の心筋細胞の $87.7 \pm 1.9\%$ の標識をもたらした。LAD結紮およびGFPレトロウイルスの注射の後、本発明者らは、梗塞部に隣接している境界領域における-gal標識心筋細胞の低下を観察した($83.2 \pm 4.6\%$)。これは、以前に記載されたような(Hsieh et al., 2007; Loffredo et al., 2011)、損傷後の心筋細胞の補充を示唆する。GHMTレトロウイルスの注射は、境界領域における-gal陽性心筋細胞の割合をさらに低下させた($76.0 \pm 5.2\%$)(図23)。

【0192】

これらの所見は、GHMTが、損傷後、インビボで、非MHC系統からの新たな心筋細胞の形成を促進することを示唆する。これらの所見は、再プログラム化結果の解釈における可能性のあるアーティファクトとしての細胞融合に対する反証ともなる。本発明者らは、他の非筋細胞集団がインビボでのGHMTによる再プログラム化に対して感受性であるか否かも試験した。骨格筋への心臓毒の注射は、筋線維変性および局所的な線維芽細胞、衛星細胞

10

20

30

40

50

の活性化、ならびに炎症細胞の動員をもたらす。心臓毒によって損傷を受けたマウスの後肢へのGHMTレトロウイルスの注射は、iCLMの効率的な形成をもたらした（図24および図3G～I）。

【0193】

心臓において、コネキシンから構成されるギャップ結合は、心筋細胞間の電気的および代謝的な共役を確実にし、収縮性を調和させる。再プログラム化された心筋細胞がギャップ結合を通して周辺の内在性筋細胞と共役し得るか否かを判定するため、本発明者らは、機能性心筋細胞における主要なコネキシンであるコネキシン43（Cx43）（Saffitz et al., 2000）についての免疫染色を実施した。ギャップ結合は、-gal+心筋細胞と -gal-心筋細胞との間、および -gal+心筋細胞間に観察され（図3A）、このことから、再プログラム化された心筋細胞の周囲の筋細胞との共役が示された。再プログラム化された -gal+心筋細胞をLV心筋から単離し、蛍光発生性の親油性 -gal基質（C12FDG）による標識により同定した。これらの細胞は、成熟心筋細胞に特徴的な棹様の外観を示し、再プログラム化された -gal+心筋細胞の71.4%（A型iCLM）が、1Hzでの電気的ペーシングにตอบสนองして正常な心室心筋細胞に類似した収縮性およびカルシウムトランジェントのパターンを表し（図3B）、このことから、それらの機能性が示された。しかしながら、再プログラム化された -gal+心筋細胞の28.6%（B型iCLM）は、1Hzでの電気的ペーシングにตอบสนองして未熟な機能性を示す（図3B）。

10

【0194】

盲検分析において、本発明者らは、非心筋細胞におけるGHMTの強制発現が、虚血心臓の機能の測定可能な改善をもたらすか否かを調べた。MI後の心機能を、心エコーおよび磁気共鳴画像法（MRI）を使用して、短縮率（FS）、駆出率（EF）、および一回拍出量により査定した。LAD結紮の24時間後、全てのマウスの心エコーにより査定されたFSおよびEFが、偽手術マウスに比べて40～50%減少した。その後、GFPを注射されたマウスの心機能は減退し続け、MI後2週間目に安定値に達した；FSおよそ13%およびEFおよそ30%。対照的に、GHMTレトロウイルスによる損傷心筋の感染は、MI後3週間目の心機能のさらなる悪化を弱めた；FSおよそ26%およびEFおよそ51%（図4A）。この効果が長期持続するか否かを判定するため、心臓MRIを使用して、EFおよび一回拍出量により、6週間目および12週間目の心機能を査定した。GFPを注射されたマウスのEFは減少し、MI後6週間目におよそ28%の安定値に達した（図4B）。対照的に、GHMTによる損傷心筋の感染は、MI後6週間目のEFの悪化を弱め（およそ49%）、MI後12週間目には、さらに有意に改善した（およそ57%）（図4B）。GHMTによるEFに対するこの長期の効果には、6週間目の値と比較した、12週間目の一回拍出量の有意な増加が伴った（図4B）。各群の個々のマウスは、心臓パラメーターの類似の機能的変化を示し、このことから、心機能を査定するための心臓MRIの信頼性が示された（図25A～B）。これらのデータは、損傷心臓における非心筋細胞におけるGHMTの発現が、心機能を持続させ得ることを示唆する。損傷心臓へのGHMTの注射は、6週間後も心機能を改善し続けるが、それは、経時的なiCLMの進行性の成熟による可能性がある。さらに、GHMTおよびGHMMsTに感染した心臓は、MI後のGFP感染心臓と比較して、線維症の著しい低下を示した（図4C～Dおよび26）。

20

30

【0195】

これらの結果は、GATA4、HAND2、MEF2C、およびTbx5（GHMT）が、インビトロおよびインビボで、CFを機能性心筋細胞へ再プログラム化し得ることを証明する。MI後の心臓における外因性のGHMT発現は、線維症を低下させ、心機能を改善する。異なる因子の組み合わせによるMI後の心機能の改善は、インビトロで線維芽細胞をiCLMへ変換する能力と相関し（図27）、このことは、心臓修復が、少なくとも一部分、非心筋細胞の心筋細胞運命へ向けた再プログラム化に起因することを示唆している。しかしながら、以前に記載されたように（Hsieh et al., 2007；Loffredo et al., 2011）、CFの活性化の阻止のようなその他の機序が、心筋細胞の生存を増強し、活性化された心臓前駆細胞の心筋細胞への分化を容易にしたか、または改善された血管形成（図28）が、MI後の心臓におけるこれらの因子の発現により観察された利益に寄与することも考えられる。本明細書に提示された再プログ

40

50

ラム化戦略は、インビボで心機能を改善し、細胞移植の限界のうちのいくつかを回避するための可能性のある手段を提供する。

【0196】

図31は、ヒト新生児包皮線維芽細胞における最適の心臓遺伝子活性化を入手するための5因子（GHMTおよびMYOCD）の使用を証明するフローサイトメトリー分析を示す。図32は、ヒト新生児包皮線維芽細胞における最適の心臓遺伝子活性化を入手するための5因子（GHMTおよびMRTF-A）の使用を証明するフローサイトメトリー分析を示す。図33は、GHMTおよびMYOCDにより再プログラム化された細胞の免疫染色を示す。心臓マーカーである アクチニンは、GHMTおよびMYOCDにより再プログラム化されたヒト包皮由来細胞における筋節構造を証明する。図34は、心臓遺伝子発現の活性化を示すフローサイトメトリーを示す。分析は、GHMTおよびMYOCDによる成体ヒト心臓線維芽細胞におけるトロポミオシン（上）およびcTnT（下）の活性化を示す。図35は、GHMTおよびMYOCDにより再プログラム化された細胞の免疫染色を示す。心臓マーカーである アクチニンは、GHMTおよびMYOCDにより再プログラム化された成体ヒト心臓線維芽細胞由来細胞における筋節様構造を証明する。

10

【0197】

本明細書に開示され特許請求の範囲に記載された組成物および方法は、全て、本開示を考慮すれば、過度の実験なしに作成され実施され得る。本発明の組成物および方法が好ましい態様に関して記載されたが、本発明の概念、本旨、および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載された組成物および方法ならびに方法の工程または工程の順序に変動が適用されてもよいことは、当業者には明白であろう。より具体的には、化学的にも生理学的にも関連しているある種の剤が本明細書に記載された剤の代わりに用いられても、同一のまたは類似の結果が達成されることが明白であろう。当業者に明白なそのような類似の代用物および修飾は、全て、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の本旨、範囲、および概念に含まれるものと見なされる。

20

【0198】

VII. 参考文献

以下の参考文献は、本明細書に示されたものを補足する例示的な手順またはその他の詳細を提供するという点で、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

- Acharya *et al.*, *Genesis*, 49:870-877, 2011
- Angel *et al.*, *Cell*, 49:729, 1987b
- Angel *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987a
- Atchison and Perry, *Cell*, 46:253, 1986
- Atchison and Perry, *Cell*, 48:121, 1987
- Baichwal and Sugden, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed), NY, Plenum Press, 117-148, 1986 10
- Banerji *et al.*, *Cell*, 27(2 Pt 1):299-308, 1981
- Banerji *et al.*, *Cell*, 33(3):729-740, 1983
- Barnes *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272(17):11510-7, 1997
- Basson *et al.*, *Nat. Genet.*, 15(1):30-35, 1997
- Benvenisty and Neshif, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:9551-9555, 1986
- Berkhout *et al.*, *Cell*, 59:273-282, 1989 20
- Bhavsar *et al.*, *Genomics*, 35(1):11-23, 1996
- Bhowmick *et al.*, *Science*, 303:848-851, 2004
- Blonar *et al.*, *EMBO J.*, 8:1139, 1989
- Bodine and Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987
- Boshart *et al.*, *Cell*, 41:521, 1985
- Bosher and Labouesse, *Nat. Cell. Biol.*, 2:E31-E36, 2000
- Bosze *et al.*, *EMBO J.*, 5(7):1615-1623, 1986 30
- Braddock *et al.*, *Cell*, 58:269, 1989
- Brinster *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(13):4438-4442, 1985
- Bristow, *Cardiology*, 92:3-6, 1999
- Bulla and Siddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986
- Campbell and Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988
- Campbell *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 180:1-19, 1984
- Campere and Tilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989 40

- Campo *et al.*, *Nature*, 303:77, 1983
- Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425-433, 1977
- Caplen *et al.*, *Gene*, 252(1-2):95-105, 2000
- Celander and Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987
- Celander *et al.*, *J. Virology*, 62:1314, 1988
- Chandler *et al.*, *Cell*, 33:489, 1983
- Chang *et al.*, *Hepatology*, 14:124A, 1991 10
- Chang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989
- Chatterjee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9114, 1989
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987
- Choi *et al.*, *Cell*, 53:519, 1988
- Coffey *et al.*, *Cancer Res.*, 61:3591-3594, 2001
- Coffin, In: *Virology*, Fields *et al.* (Eds.), Raven Press, NY, 1437-1500, 1990 20
- Cohen *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 5:75, 1987
- Cook *et al.*, *Cell*, 27:487-496, 1981
- Costa *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:81, 1988
- Couch *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:394-403, 1963
- Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988
- Cripe *et al.*, *EMBO J.*, 6:3745, 1987
- Culotta and Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376, 1989 30
- Dai *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277:24390-24398, 2002
- Dandolo *et al.*, *J. Virology*, 47:55-64, 1983
- De Villiers *et al.*, *Nature*, 312(5991):242-246, 1984
- Deschamps *et al.*, *Science*, 230:1174-1177, 1985
- Dubensky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984
- Durand *et al.*, *Ann. Med.*, 27:311-317, 1995
- Edbrooke *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908, 1989 40
- Edlund *et al.*, *Science*, 230:912-916, 1985
- EP 0273085
- Fechheimer *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987
- Feng and Holland, *Nature*, 334:6178, 1988

- Ferkol *et al.*, *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993
- Firak and Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986
- Fire *et al.*, *Nature*, 391:806-811, 1998
- Fischer, *Med. Res. Rev.*, 27(6):755-796, 2007
- Foecking and Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-105, 1986
- Forster and Symons, *Cell*, 49:211-220, 1987
- Fraley *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979 10
- Franz *et al.*, *Cardoscience*, 5(4):235-43, 1994
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989
- Fujita *et al.*, *Cell*, 49:357, 1987
- Furumai *et al.*, *Cancer Res.*, 62:4916-21, 2002
- Gefter, *et al.*, *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977
- Gerlach *et al.*, *Nature (London)*, 328:802-805, 1987 20
- Ghosh and Bachhawat, In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu *et al.* (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991
- Ghosh *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 29:2205-2218, 2009
- Ghosh-Choudhury *et al.*, *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987
- Gilles *et al.*, *Cell*, 33:717, 1983
- Gloss *et al.*, *EMBO J.*, 6:3735, 1987
- Godbout *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988 30
- Goding, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Orlando, Fla., Academic Press, 60-61, 65-66, 71-74, 1986
- Gomez-Foix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992
- Goodbourn and Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1447, 1988
- Goodbourn *et al.*, *Cell*, 45:601, 1986
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985
- Gopal-Srivastava *et al.*, *J. Mol. Cell. Biol.*, 15(12):7081-90, 1995 40
- Graham and Prevec, In: *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol*, Murray (Ed.), Humana Press, Clifton, NJ, 7:109-128, 1991
- Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973
- Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977

- Greene *et al.*, *Immunology Today*, 10:272, 1989
- Grishok *et al.*, *Science*, 287:2494-2497, 2000
- Grosschedl and Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985
- Grunhaus and Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992
- Gryniewicz *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 260:3440-3450, 1985
- Han *et al.*, *Cancer Research*, 60:6068-6074, 2000
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985 10
- Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988
- Haslinger and Karin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8572, 1985
- Hauber and Cullen, *J. Virology*, 62:673, 1988
- Hen *et al.*, *Nature*, 321:249, 1986
- Hensel *et al.*, *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989 20
- Hermionat and Muzycska, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984
- Herr and Clarke, *Cell*, 45:461, 1986
- Hersdorffer *et al.*, *DNA Cell Biol.*, 9:713-723, 1990
- Herz and Gerard, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:2812-2816, 1993
- Hirochika *et al.*, *J. Virol.*, 61:2599, 1987
- Hirsch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1959, 1990
- Hoffmann *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 12:51-55, 2001 30
- Holbrook *et al.*, *Virology*, 157:211, 1987
- Horlick and Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989
- Horwich *et al.*, *J. Virol.*, 64:642-650, 1990
- Hsieh *et al.*, *Nat. Med.*, 13:970-974, 2007
- Huang *et al.*, *Cell*, 27:245, 1981
- Hug *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:3065, 1988
- Hwang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990 40
- Imagawa *et al.*, *Cell*, 51:251, 1987
- Imbra and Karin, *Nature*, 323:555, 1986
- Imler *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987
- Imperiale and Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984

- Jakobovits *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2555, 1988
- Jameel and Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986
- Jaynes *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988
- Johnson *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3393, 1989
- Jones and Shenk, *Cell*, 13:181-188, 1978
- Joyce, *Nature*, 338:217-244, 1989
- Kadesch and Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986 10
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989
- Kao *et al.*, *Genes Dev.*, 14:55-66, 2000
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987
- Karlsson *et al.*, *EMBO J.*, 5:2377-2385, 1986
- Katinka *et al.*, *Cell*, 20:393, 1980 20
- Kato *et al.*, *J Biol Chem.*, 266(6):3361-3364, 1991
- Kawamoto *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:267, 1988
- Kelly *et al.*, *J. Cell Biol.*, 129(2):383-96, 1995
- Ketting *et al.*, *Cell*, 99:133-141, 1999
- Kiledjian *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988
- Kim and Cook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8788-8792, 1987
- Kim *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:2056, 1999 30
- Kimura *et al.*, *Dev. Growth Differ.*, 39(3):257-65, 1997
- Kitamura *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:9146-150, 1995
- Klaassen, In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman and Gilman, Eds.,
Pergamon Press, 8th Ed., 49-61, 1990
- Klamut *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990
- Klein *et al.*, *Nature*, 327:70-73, 1987
- Koch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989 40
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975
- Kriegler and Botchan, In: *Eukaryotic Viral Vectors*, Gluzman (Ed.), Cold Spring Harbor:
Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982

- Kriegler and Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983
- Kriegler *et al.*, *Cell*, 38:483, 1984
- Kriegler *et al.*, *Cell*, 53:45, 1988
- Kuhl *et al.*, *Cell*, 50:1057, 1987
- Kunz *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989
- LaPointe *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263(19):9075-8, 1988
- Larsen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:8283, 1986 10
- Laspia *et al.*, *Cell*, 59:283, 1989
- Latimer *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990
- Laugwitz *et al.*, *Nature*, 433:647-653, 2005
- Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990, 1993
- Lee *et al.*, *Nature*, 294:228, 1981
- Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:4191-206, 1984 20
- Levinson *et al.*, *Nature*, 295:79, 1982
- Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991
- Li *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:19402-8, 1996
- Lin and Avery, *Nature*, 402:128-129, 1999
- Lin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990
- Loffredo *et al.*, *Cell Stem Cell*, 8:389-98, 2011
- Lu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:4070-4075, 2000 30
- Luo *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280:12668-12675, 2005
- Luria *et al.*, *EMBO J.*, 6:3307, 1987
- Lusky and Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3609, 1986
- Lusky *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 3:1108, 1983
- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991
- Maitra *et al.*, *Dev. Biol.*, 326:368-377, 2009
- Majors and Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5866, 1983 40
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983
- Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988
- McDermott *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 13(4):2564-2577, 1993
- McNeall *et al.*, *Gene*, 76:81, 1989

- Michel and Westhof, *J. Mol. Biol.*, 216:585-610, 1990
- Miksicek *et al.*, *Cell*, 46:203, 1986
- Miller *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:4239-4242, 1990
- Molkentin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 16(6):2627-2636, 1996
- Montgomery *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:155-2-15507, 1998
- Mordacq and Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989
- Moreau *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981 10
- Moss *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 108(6):473-84, 1996
- Muesing *et al.*, *Cell*, 48:691, 1987
- Ng *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:601, 1989
- Nicolas and Rubinstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (Eds.), Stoneham: Butterworth, 494-513, 1988
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982 20
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987
- Olson, *Science*, 313:1922-1927, 2006
- Ondek *et al.*, *EMBO J.*, 6:1017, 1987
- Ornitz *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3466, 1987
- Palmiter *et al.*, *Cell*, 29:701, 1982
- Palmiter *et al.*, *Nature*, 300:611, 1982
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975 30
- Pech *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989
- Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334:320-325, 1988
- Perales *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9):4086-4090, 1994
- Perez-Stable and Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990
- Physicians Desk Reference
- Picard and Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984
- Pinkert *et al.*, *Genes and Dev.*, 1:268, 1987 40
- Ponta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1020, 1985
- Porter and Turner, *Pharmacol. Ther.*, 123:255-278, 2009
- Porton *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1076, 1990
- Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984

- Queen and Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983
- Quinn *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:4713, 1989
- Racher *et al.*, *Biotech. Techniques*, 9:169-174, 1995
- Ragot *et al.*, *Nature*, 361:647-650, 1993
- Redondo *et al.*, *Science*, 247:1225, 1990
- Reinhold-Hurek and Shub, *Nature*, 357:173-176, 1992
- Reisman and Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989 10
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, PA, 1980
- Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990
- Resendez Jr. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988
- Rich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993
- Ridgeway, *In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Stoneham: Butterworth, 467-492, 1988 20
- Ripe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2224, 1989
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990
- Rittling *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:1619, 1989
- Rosen *et al.*, *Cell*, 41:813, 1988
- Rosenfeld *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992
- Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991 30
- Roux *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989
- Russell *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1443(3):393-399, 1999
- Russell *et al.*, *Circ Res.*, 108:51-59, 2011
- Saffitz *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 278:H1662-H1670, 2000
- Sakai *et al.*, *Genes and Dev.*, 2:1144, 1988
- Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001 40
- Sarver *et al.*, *Science*, 247:1222-1225, 1990
- Satake *et al.*, *J. Virology*, 62:970, 1988
- Scanlon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10591-10595, 1991
- Schaffner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988

- Schneider *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, 75:40-50, 2007
- Searle *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985
- Sharp and Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989
- Sharp and Zamore, *Science*, 287:2431-2433, 2000
- Sharp, *Genes Dev.*, 13:139-141, 1999
- Shaul and Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987
- Sherman *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989 10
- Sleigh and Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985
- Sohal *et al.*, *Circ Res.*, 89:20-25, 2001
- Spalholz *et al.*, *Cell*, 42:183, 1985
- Spandau and Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988
- Spandidos and Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983
- Stephens and Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987 20
- Stratford-Perricaudet and Perricaudet, *In: Human Gene Transfer*, Cohen-Haguenauer and Boiron (Eds.), John Libbey Eurotext, France, 51-61, 1991
- Stratford-Perricaudet *et al.*, *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990
- Stuart *et al.*, *Nature*, 317:828, 1985
- Subramaniam *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:24613-24620, 1991
- Sullivan and Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987
- Swartzendruber and Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975 30
- Tabara *et al.*, *Cell*, 99:123-132, 1999
- Takahashi *et al.*, *Antibiotics*, 49:453, 1996
- Takebe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988
- Tandan *et al.*, *Cir. Res.*, 105:51-60, 2009
- Tavernier *et al.*, *Nature*, 301:634, 1983
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b 40
- Taylor *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989
- Temin, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986
- Terrett *et al.*, *Nat. Genet.*, 6(4):401-404, 1994
- The Merck Index, 11th Edition

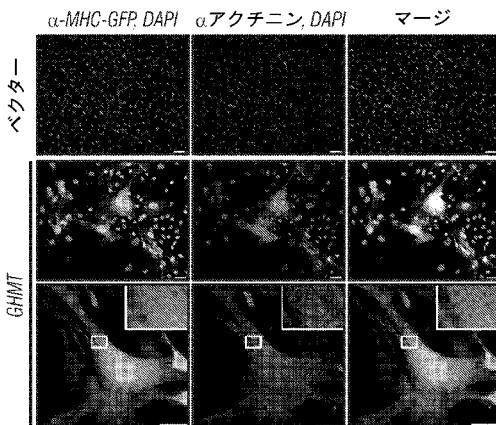
- Thiesen *et al.*, *J. Virology*, 62:614, 1988
- Top *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971
- Treisman, *Cell*, 42:889, 1985
- Tronche *et al.*, *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990
- Trudel and Constantini, *Genes and Dev.* 6:954, 1987
- Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986
- Tyndell *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 9:6231, 1981 10
- Vannice and Levinson, *J. Virology*, 62:1305, 1988
- Varmus *et al.*, *Cell*, 25:23-36, 1981
- Vasseur *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77:1068, 1980
- Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(9):3410-3414, 1990
- Wang and Calame, *Cell*, 47:241, 1986
- Weber *et al.*, *Cell*, 36:983, 1984 20
- Weinberger *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 8:988, 1984
- White *et al.*, *Genomics*, 27(1):20-26, 1995
- Wincott *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 23(14):2677-2684, 1995
- Winoto and Baltimore, *Cell*, 59:649, 1989
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980
- Workman and Kingston, *Annu. Rev. Biochem.*, 67:545-579, 1998
- Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993 30
- Wu and Wu, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987
- Wu, *Cell Stem Cell*, 3:1-2, 2008
- Yamano *et al.*, *Amer. Soc. Gene Ther.*, 2000
- Yamauchi-Takahara *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(10):3504-3508, 1989
- Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:9568-9572, 1990
- Young *et al.*, In: *Handbook of Applied Therapeutics*, 7.1-7.12 and 9.1-9.10, 1989 40
- Yutzey *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 9:1397, 1989
- Zang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279:54258-54263, 2004
- Zeisberg *et al.*, *Nat. Med.*, 13:952-961, 2007
- Zelenin *et al.*, *FEBS Lett.*, 280:94-96, 1991

Zhang *et al.*, *Cell*, 110:479-488, 2002

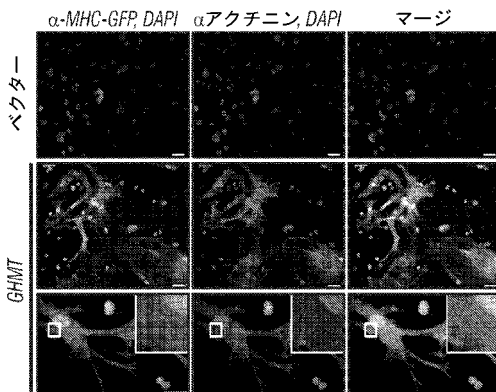
Zhou *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:10572-10577, 2001

Ziober and Kramer, *J. Bio. Chem.*, 271(37):22915-22922, 1996

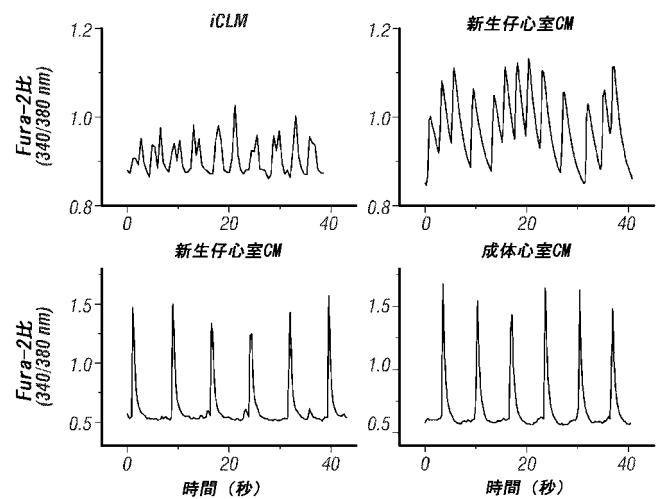
【図 1 A】



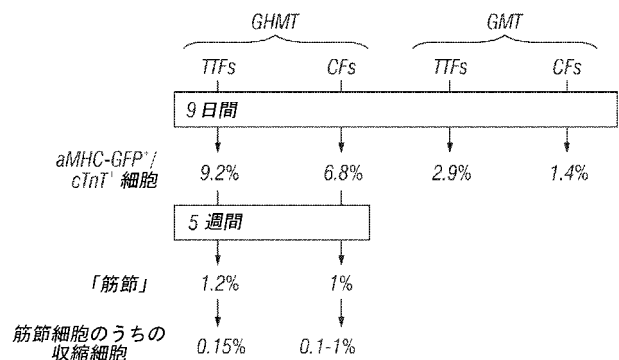
【図 1 B】



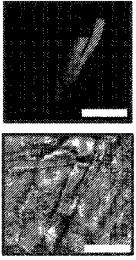
【図 1 C】



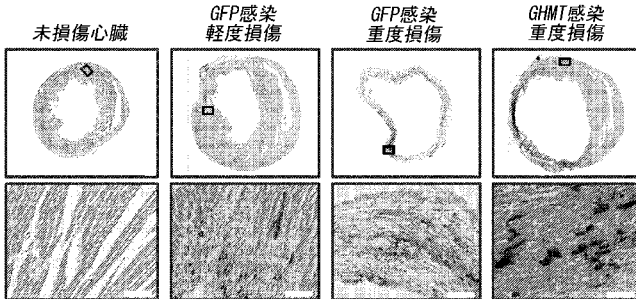
【図 1 D】



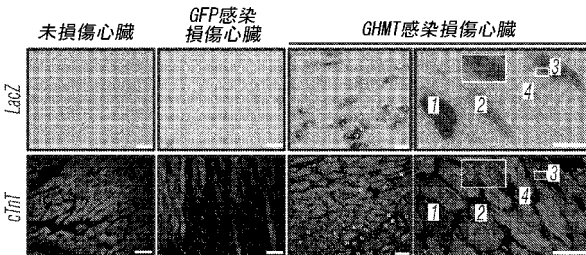
【図 2 A】



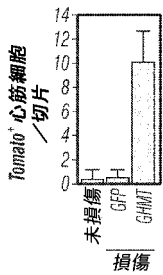
【図 2 B】



【図 2 C】



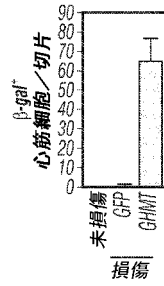
【図 2 F】



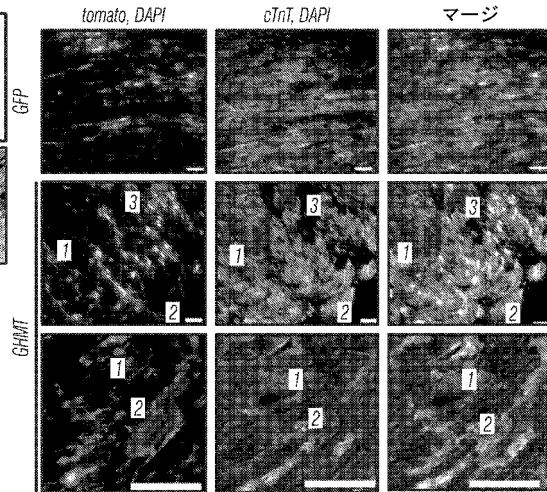
【図 2 G】



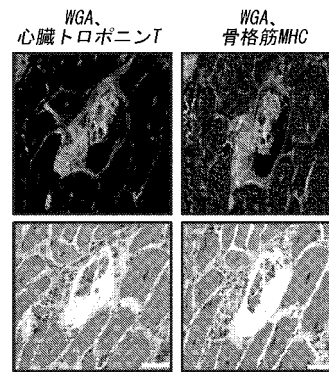
【図 2 D】



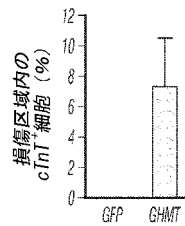
【図 2 E】



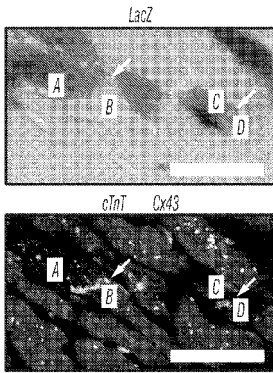
【図 2 H】



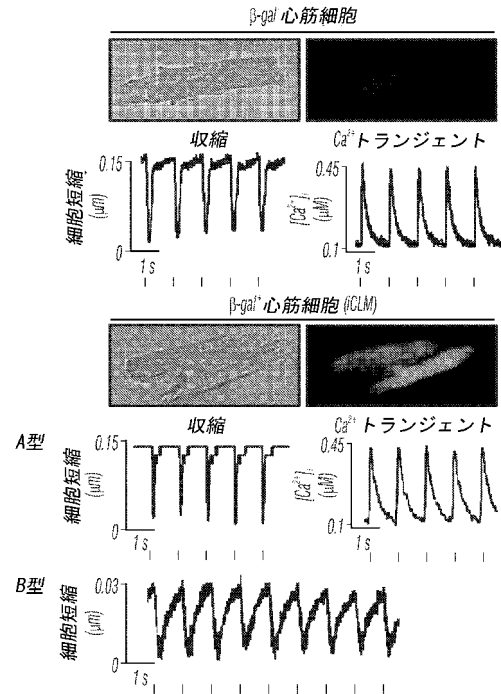
【図 2 I】



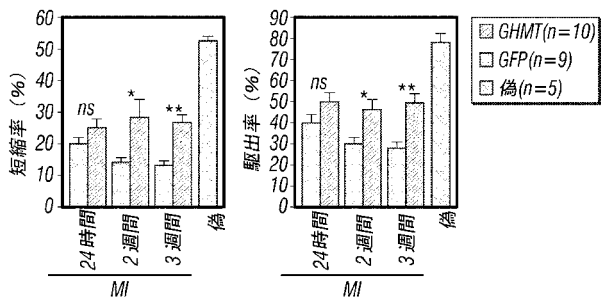
【図 3 A】



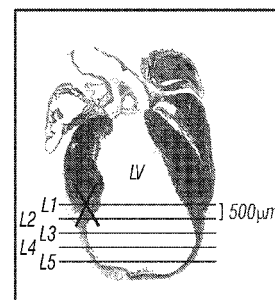
【図 3 B】



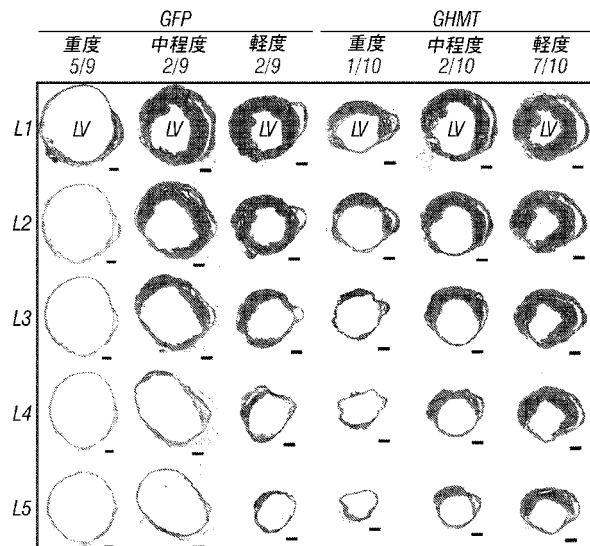
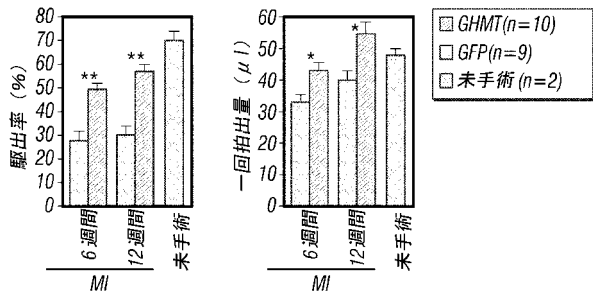
【図 4 A】



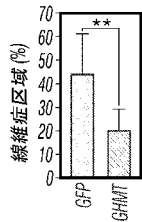
【図 4 C】



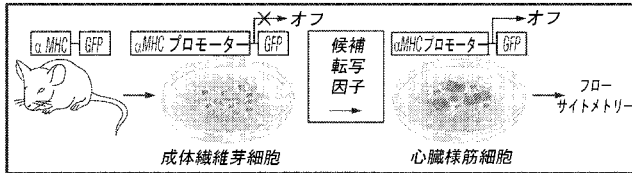
【図 4 B】



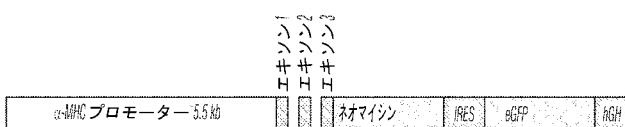
【図 4 D】



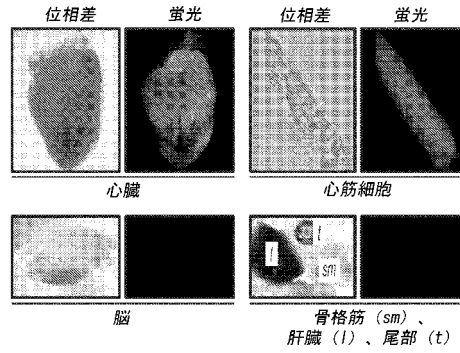
【図 5 A】



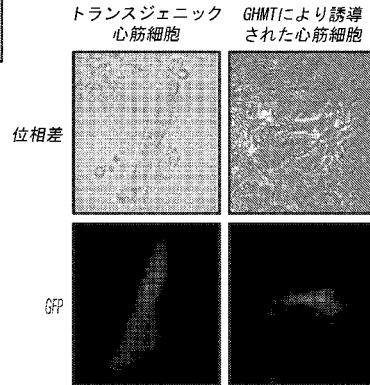
【図 5 B】



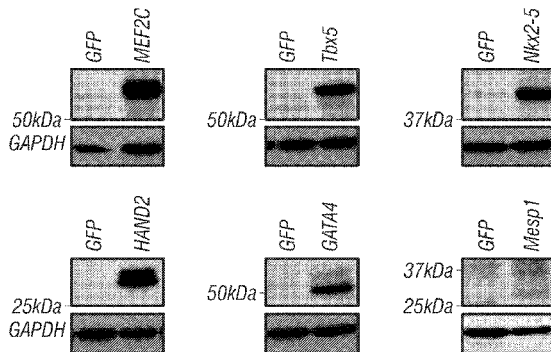
【図 5 C】



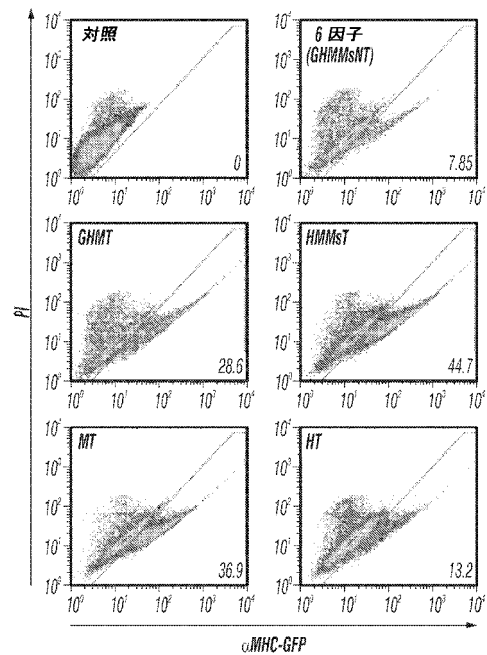
【図 5 D】



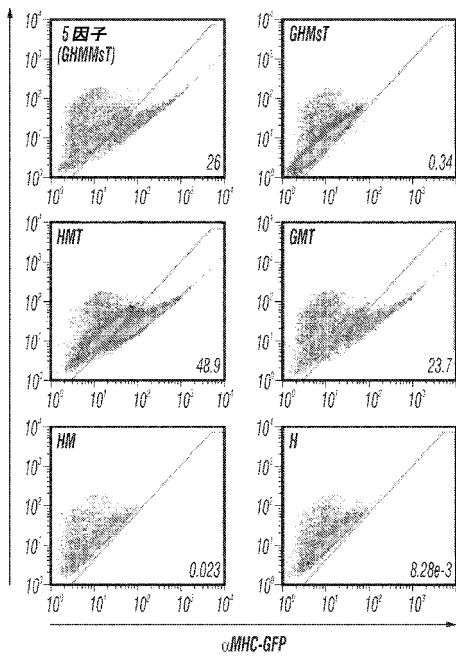
【図 6】



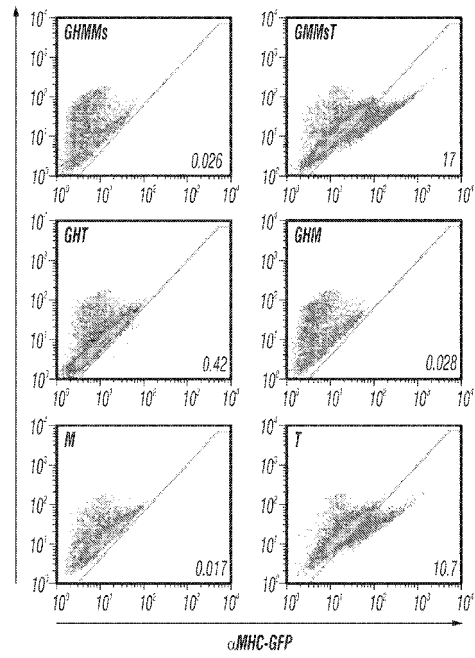
【図 7 A - 0 1】



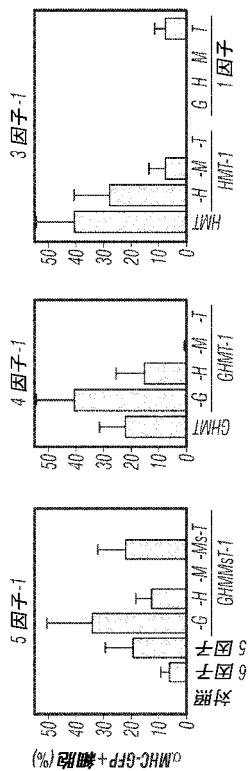
【図 7 A - 02】



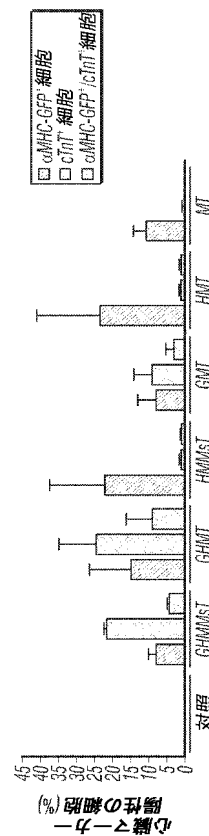
【図 7 A - 03】



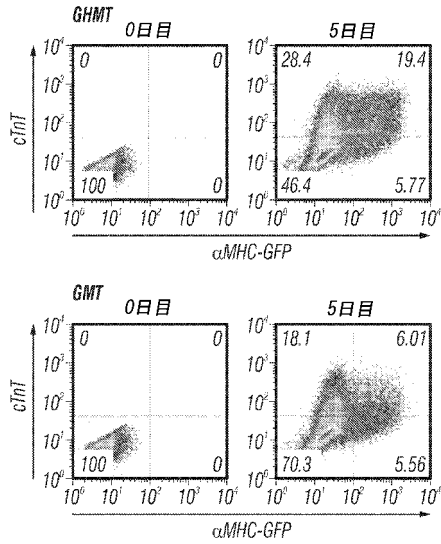
【図 7 B】



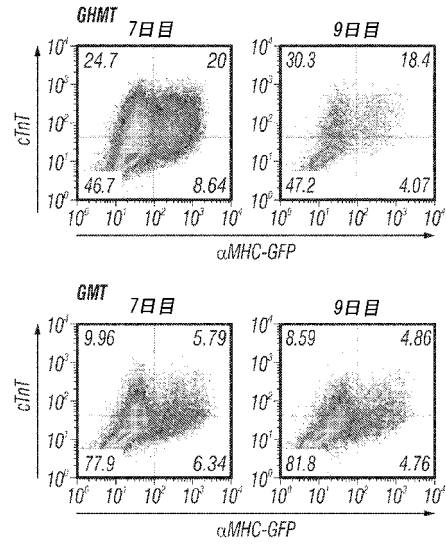
【図 8】



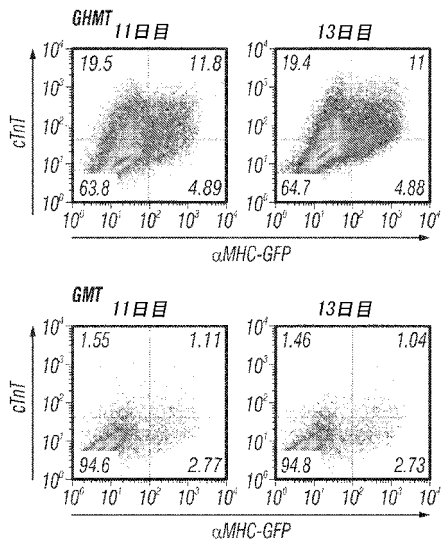
【図 9 A - 0 1】



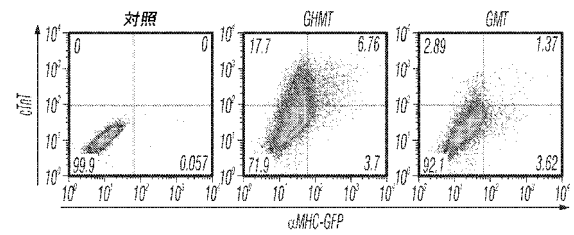
【図 9 A - 0 2】



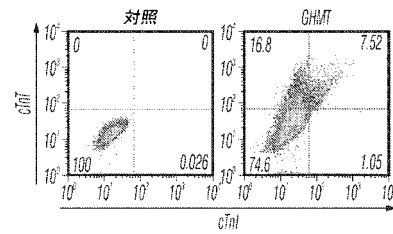
【図 9 A - 0 3】



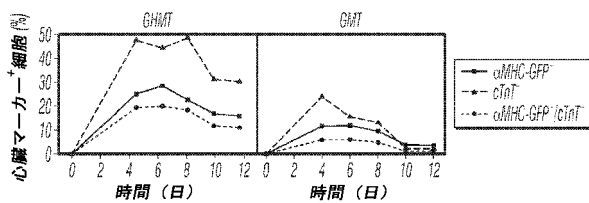
【図 10 A】



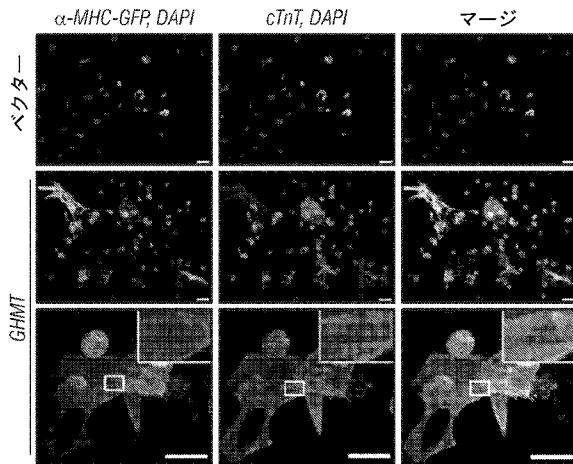
【図 10 B】



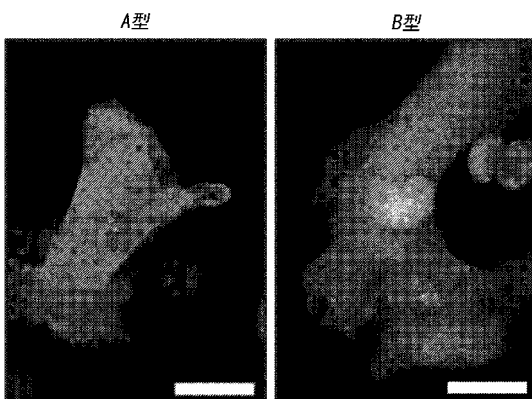
【図 9 B】



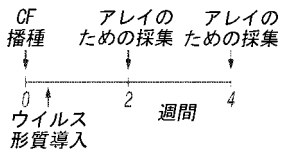
【図 1 1】



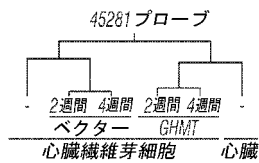
【図 1 2 A】



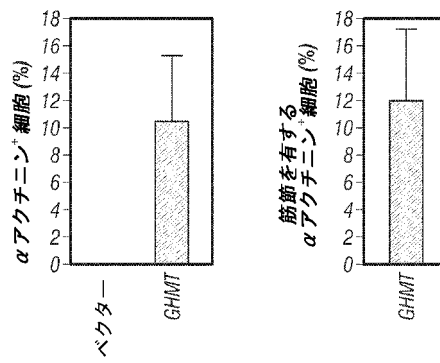
【図 1 3 A】



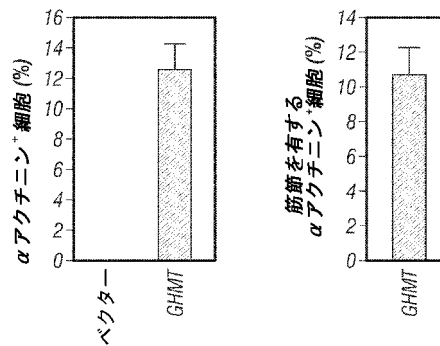
【図 1 3 B】



【図 1 2 B】



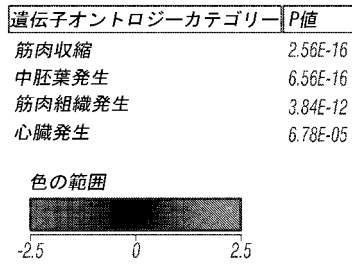
【図 1 2 C】



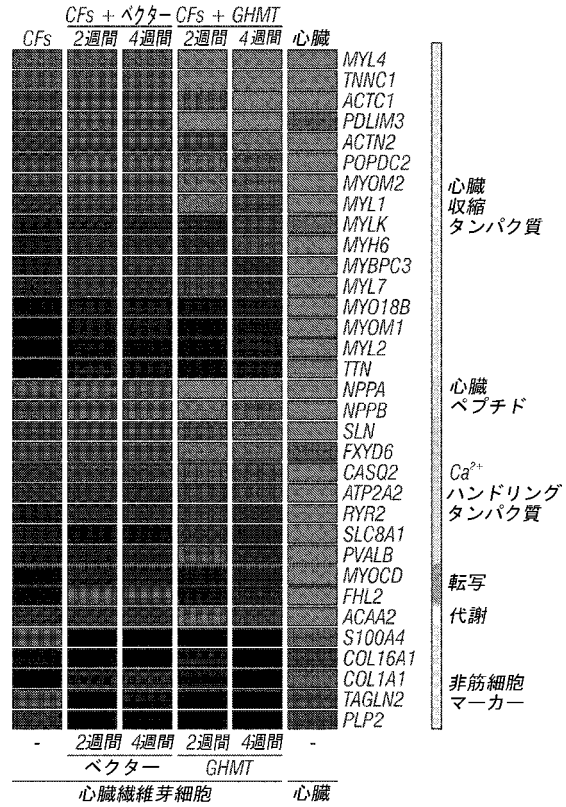
【図 1 3 C】



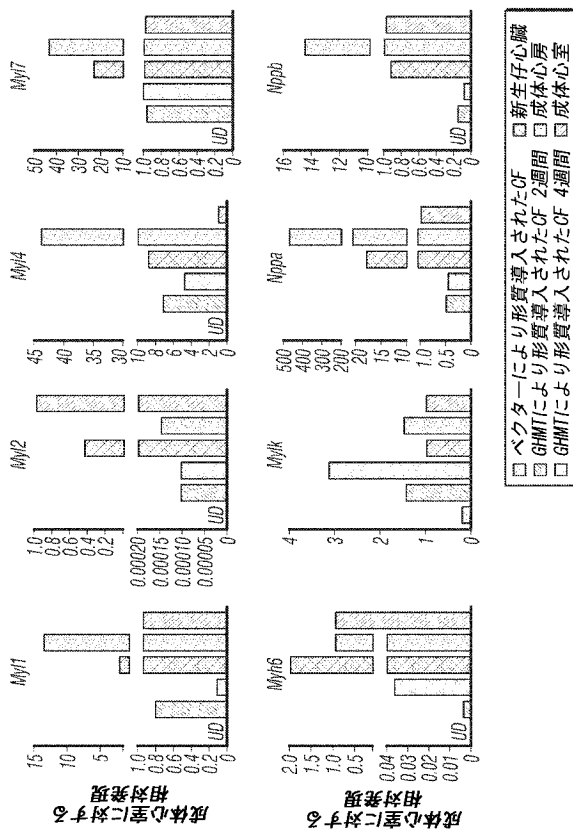
【図 1 3 D】



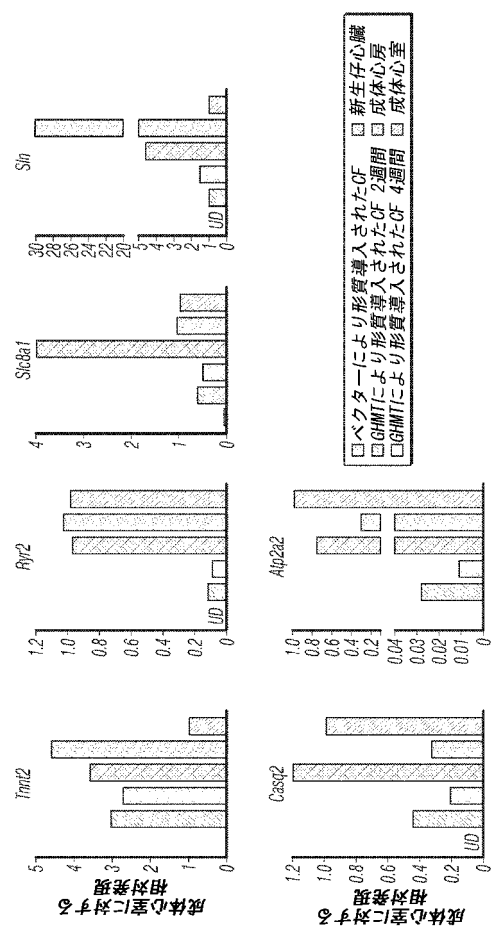
【図 1 3 E】



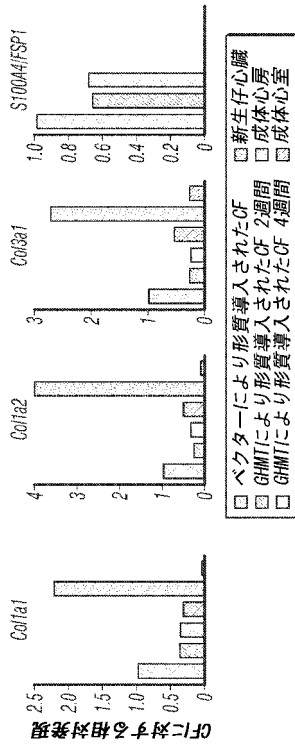
【図 1 4 A - 0 1】



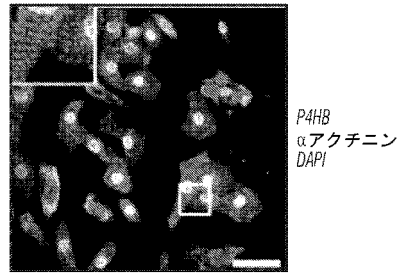
【図 1 4 A - 0 2】



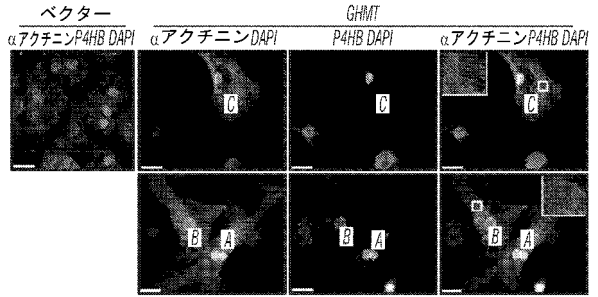
【図 1 4 B】



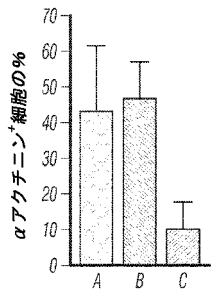
【図 1 5 A】



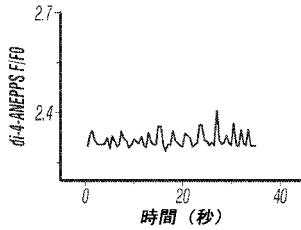
【図 1 5 B】



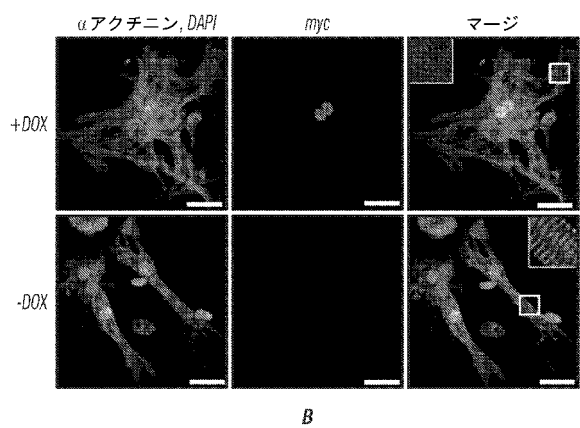
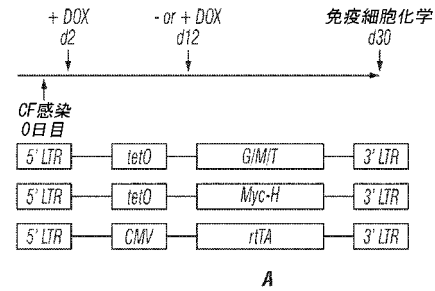
【図 1 5 C】



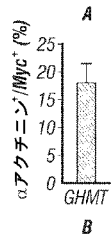
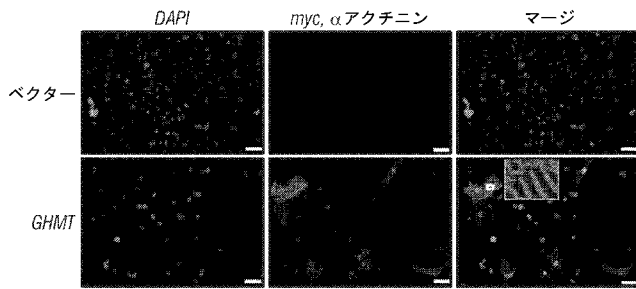
【図 1 6】



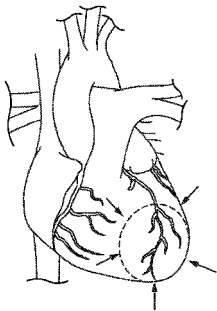
【図 1 7】



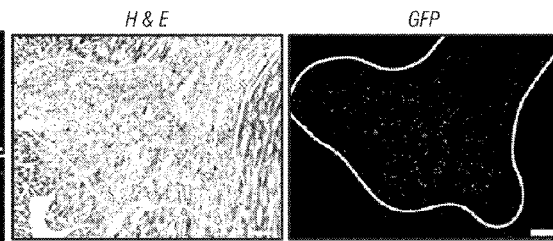
【図18】



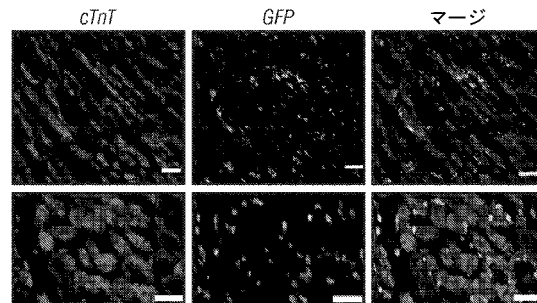
【図19A】



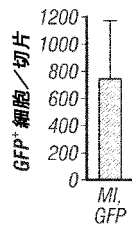
【図19B】



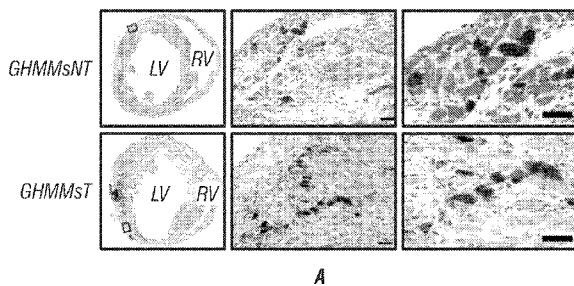
【図19C】



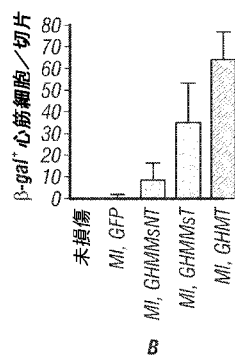
【図19D】



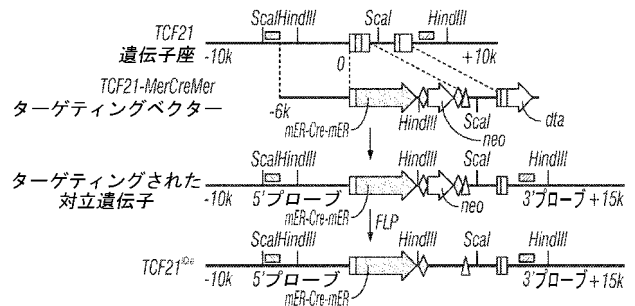
【図20】



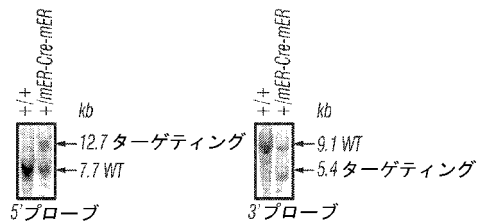
A



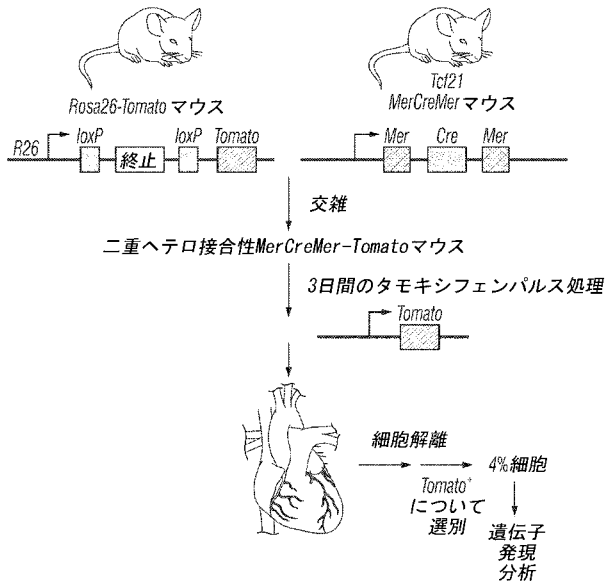
【図21A】



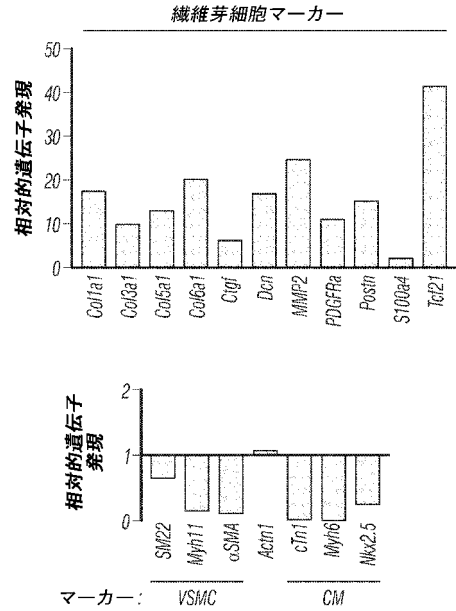
【図21B】



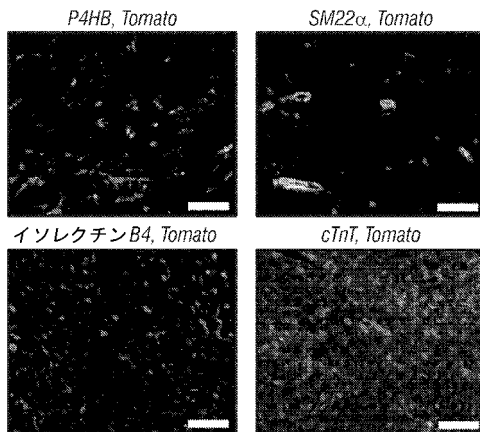
【図 2 1 C】



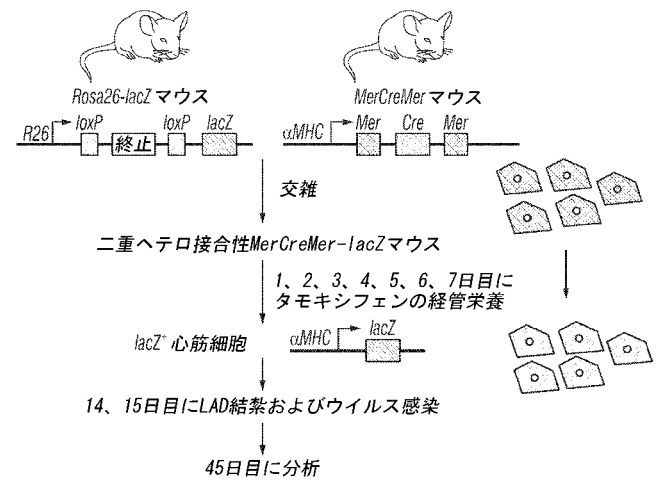
【図 2 1 D】



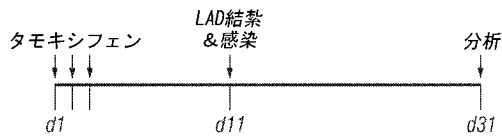
【図 2 1 E】



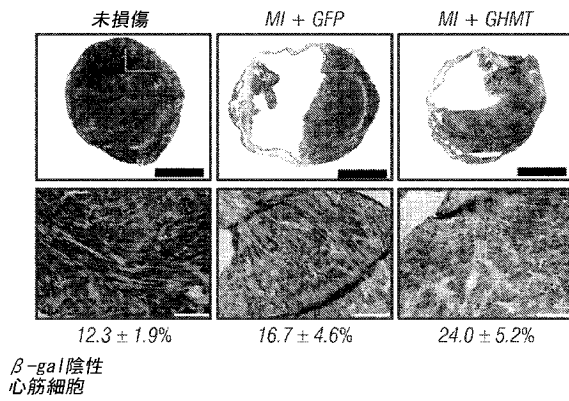
【図 2 3 A】



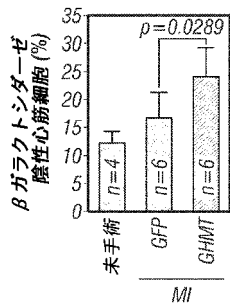
【図 2 2】



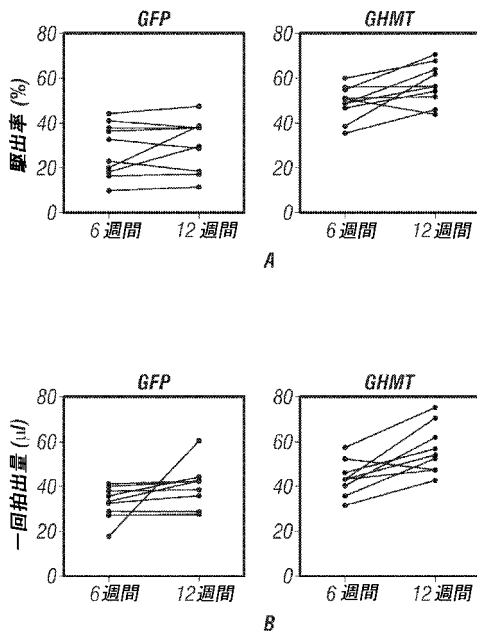
【図 2 3 B】



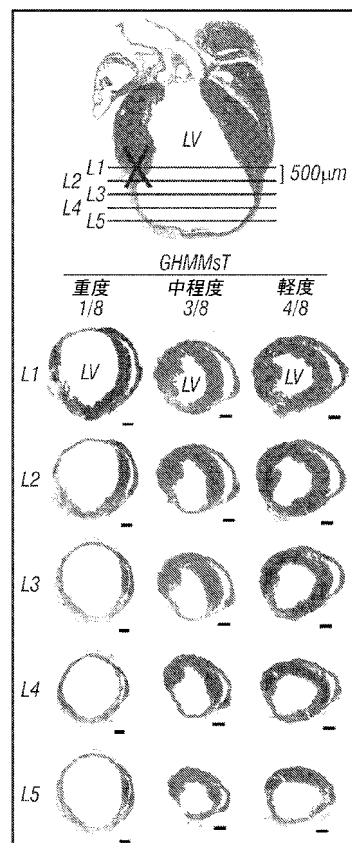
【図 2 3 C】



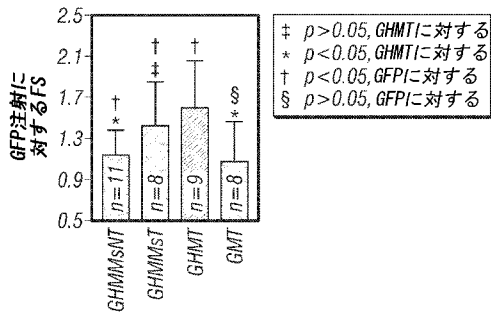
【図 2 5】



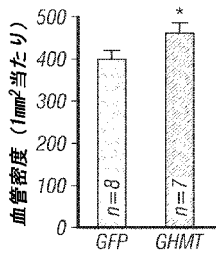
【図 2 6】



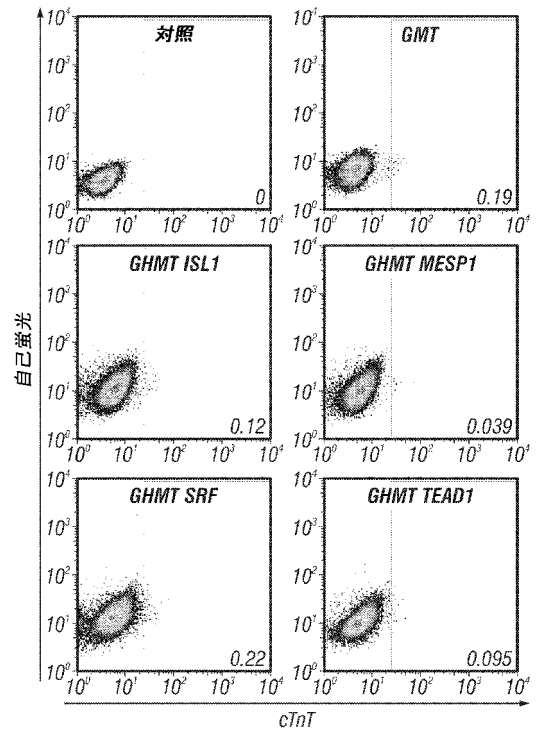
【図 27】



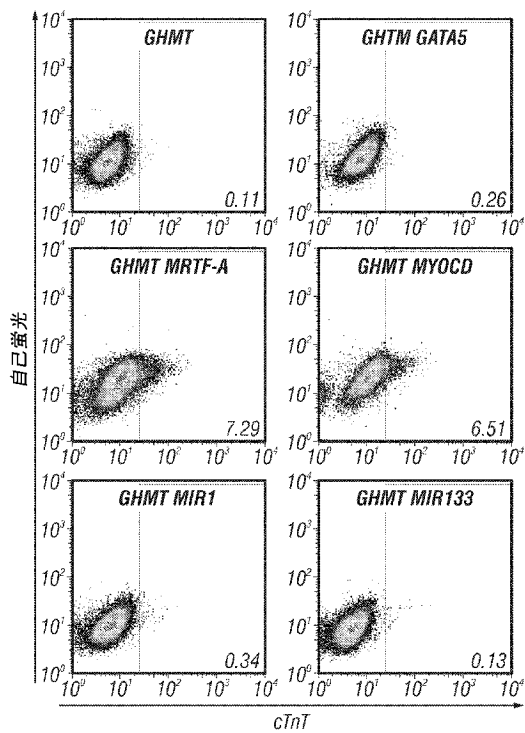
【図 28】



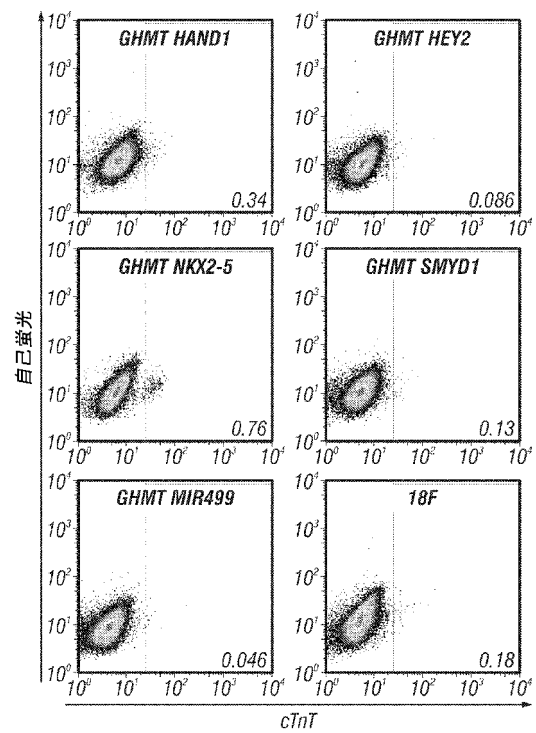
【図 29 - 01】



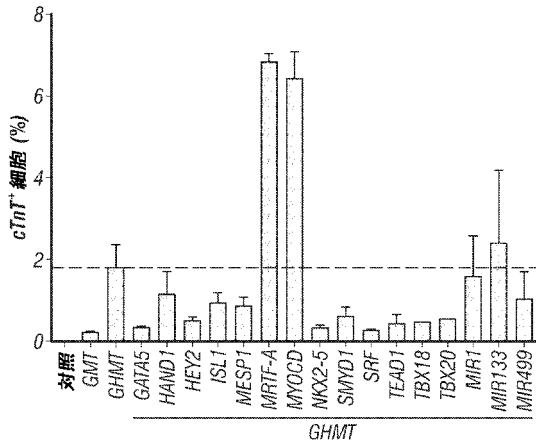
【図 29 - 02】



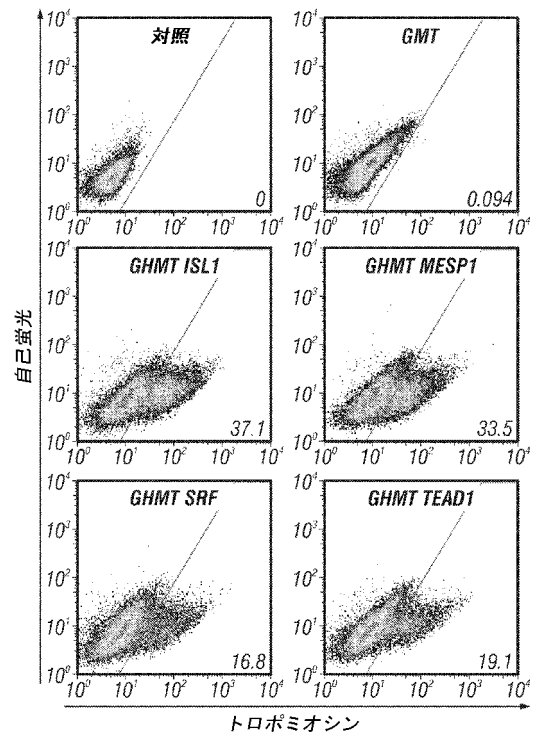
【図 29 - 03】



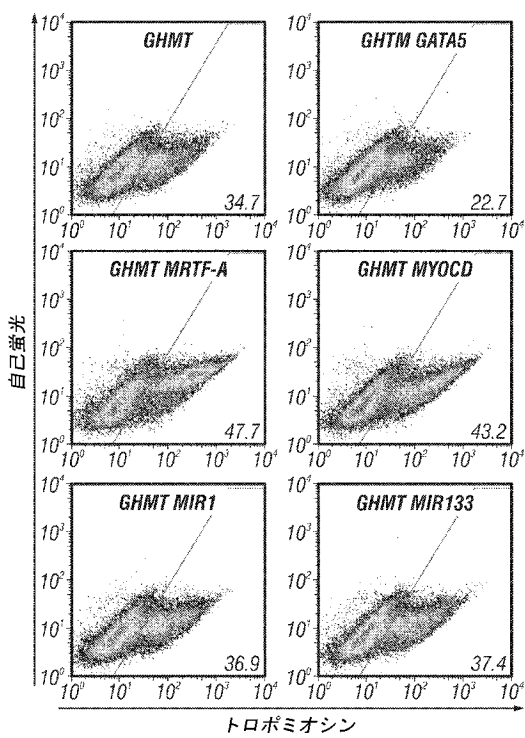
【図 29 - 04】



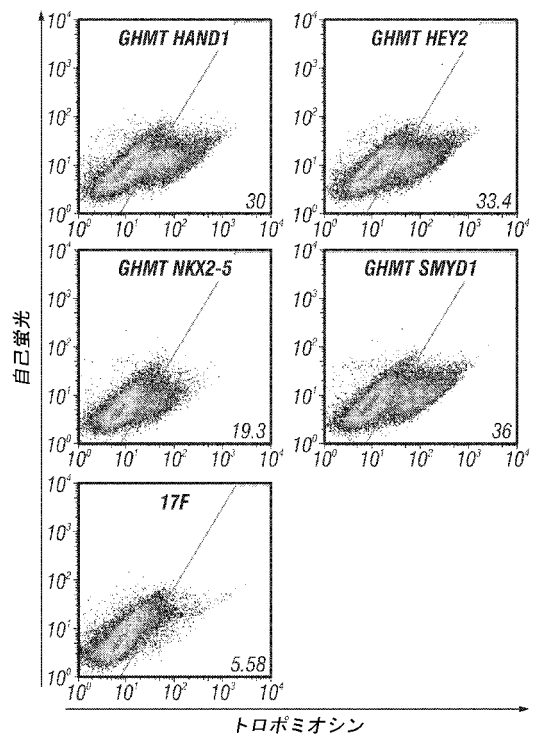
【図 30 - 01】



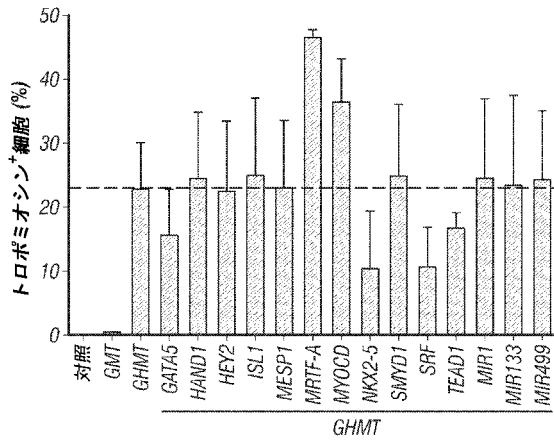
【図 30 - 02】



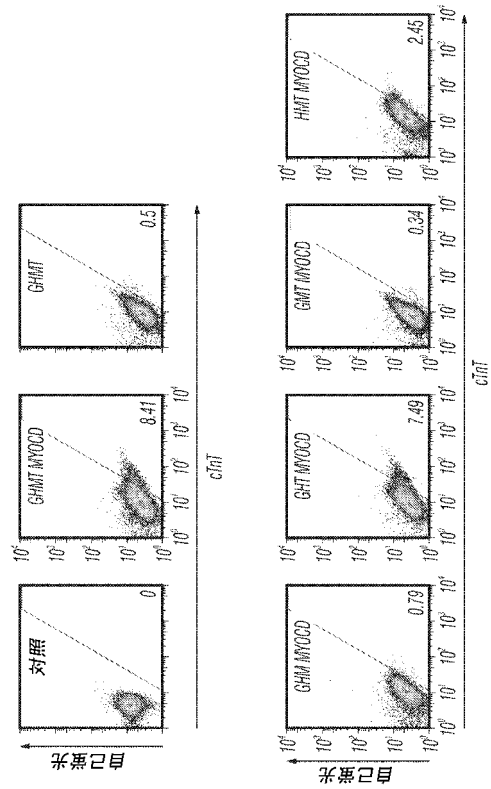
【図 30 - 03】



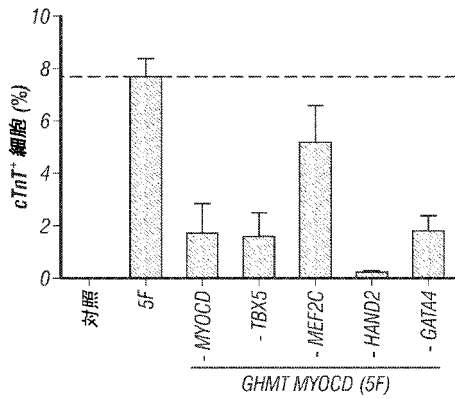
【図 30 - 04】



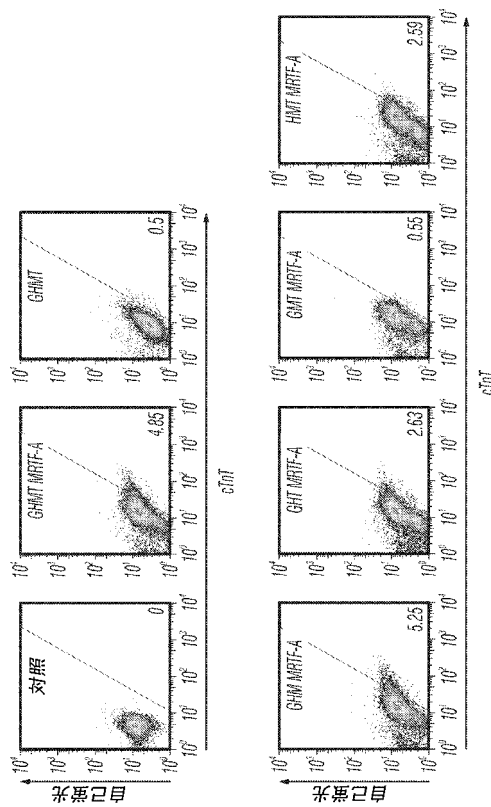
【図 31 - 01】



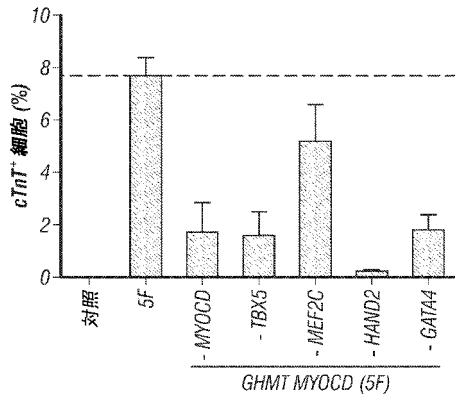
【図 31 - 02】



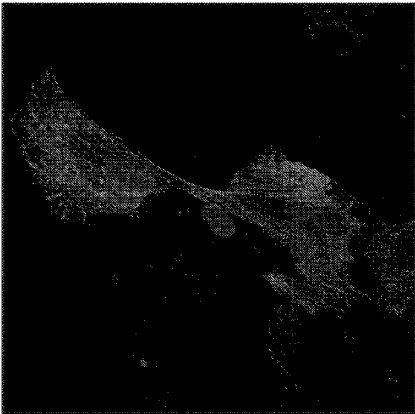
【図 32 - 01】



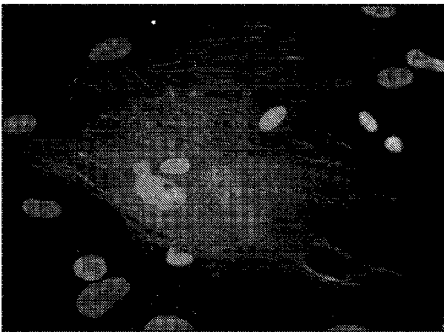
【図 3 2 - 0 2】



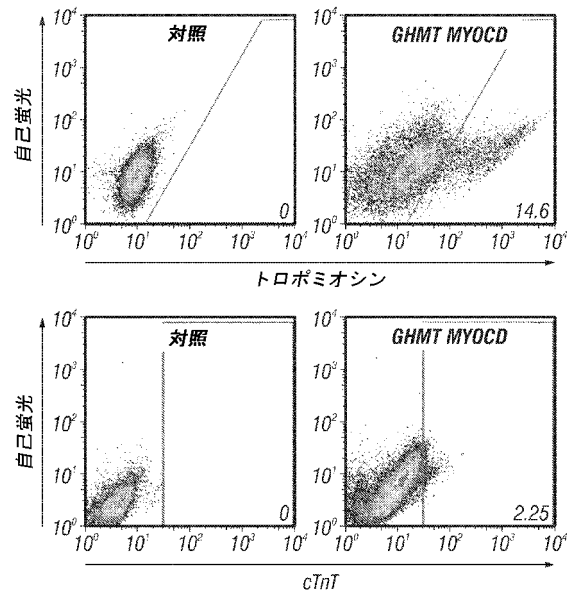
【図 3 3】



【図 3 5】



【図 3 4】



【配列表】

2014507442000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/026113

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/47 A61K38/17 A61K48/00 C12N5/077 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MASAKI IEDA ET AL: "Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors", CELL, vol. 142, no. 3, 1 August 2010 (2010-08-01), pages 375-386, XP55027656, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2010.07.002 page 377, left-hand column, paragraph second - paragraph third; figures 1-3, 5, 6 page 382, paragraph first - page 385; figure 7 ----- -/--	1-59
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 May 2012		04/06/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schulz, Regine

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/026113

Continuation. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GHOSH TUSHAR K ET AL: "Physical Interaction between TBX5 and MEF2C Is Required for Early Heart Development", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 29, no. 8, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 2205-2218, XP002592557, ISSN: 0270-7306, DOI: 10.1128/MCB.01923-08 [retrieved on 2009-02-09] page 2206, left-hand column, paragraph 1 -----	16-59
A	ALEXANDER J M ET AL: "Lessons for cardiac regeneration and repair through development", TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, ELSEVIER CURRENT TRENDS, GB, vol. 16, no. 9, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 426-434, XP027253352, ISSN: 1471-4914 [retrieved on 2010-08-31] page 429, right-hand column, paragraph 3 - page 432, right-hand column, paragraph first; figures 2, 3 -----	1-16
A	E. N. OLSON: "Gene Regulatory Networks in the Evolution and Development of the Heart", SCIENCE, vol. 313, no. 5795, 29 September 2006 (2006-09-29), pages 1922-1927, XP55027138, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1132292 page 1923 - page 1926; figures 3, 4 -----	1-16
A	WO 99/62940 A2 (COLLATERAL THERAPEUTICS [US]; ENGLER ROBERT L [US] COLLATERAL THERAPEU) 9 December 1999 (1999-12-09) page 61, line 3 - line 10; claims 1-4, 9, 14, 16, 17, 23-25.; examples 1, 2 -----	1-15
X,P	QIAN LI ET AL: "In vivo Reprogramming of Murine Cardiac Fibroblasts into Induced Cardiomyocytes", CIRCULATION, vol. 124, no. 21, Suppl. S, November 2011 (2011-11), XP008151995, & SCIENTIFIC SESSIONS OF THE AMERICAN-HEART-ASSOCIATION/RESUSCITATION SCIENCE SYMPOSIUM; ORLANDO, FL, USA; NOVEMBER 12 -15, 2011 the whole document ----- -/--	16-59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/026113

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	INAGAWA KOHEI ET AL: "Direct Conversion of Cardiac Fibroblasts into Cardiomyocyte-Like Cells in vivo", CIRCULATION, vol. 124, no. 21, Suppl. S, November 2011 (2011-11), XP008151969, & SCIENTIFIC SESSIONS OF THE AMERICAN-HEART-ASSOCIATION/RESUSCITATION SCIENCE SYMPOSIUM; ORLANDO, FL, USA; NOVEMBER 12 -16, 2011 the whole document -----	16-59
X,P	WO 2011/163531 A2 (VIVOSCRIPT INC [US]; ZHU YONG [US]; WU SHILI [US]; BAO JUN [US]) 29 December 2011 (2011-12-29) claims 34, 35; figure 18 -----	16-59
T	FRANCESCOS LOFFREDO ET AL: "Bone Marrow-Derived Cell Therapy Stimulates Endogenous Cardiomyocyte Progenitors and Promotes Cardiac Repair", CELL STEM CELL, CELL PRESS, US, vol. 8, no. 4, 28 January 2011 (2011-01-28), pages 389-398, XP028186794, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/J.JSTEM.2011.02.002 [retrieved on 2011-02-17] -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/026113

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9962940	A2	09-12-1999	AU 770384 B2 19-02-2004
			AU 4321299 A 20-12-1999
			AU 2004202064 A1 10-06-2004
			CA 2329934 A1 09-12-1999
			EP 1085910 A2 28-03-2001
			WO 9962940 A2 09-12-1999

WO 2011163531	A2	29-12-2011	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/04 (2006.01)	A 6 1 K 31/04	4 C 2 0 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 K 31/138 (2006.01)	A 6 1 K 31/138	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ナム ヨン ジェ
アメリカ合衆国 テキサス州 ダラス ハリー ハイน์ズ ブールバード 5 3 2 3 ユーティー
サウスウエスタン メディカル センター内

(72)発明者 ソン クンファ
アメリカ合衆国 テキサス州 ダラス ハリー ハイน์ズ ブールバード 5 3 2 3 ユーティー
サウスウエスタン メディカル センター内

(72)発明者 オルソン エリック
アメリカ合衆国 テキサス州 ダラス ハリー ハイน์ズ ブールバード 5 3 2 3 ユーティー
サウスウエスタン メディカル センター内

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 DA02 DA03 EA02 EA04 GA13 HA17
4B065 AA93X AA93Y AB01 AC20 BA02 BB19 BD35 BD39 CA44
4C084 AA01 AA02 AA13 AA23 BA44 NA05 NA14 ZA361 ZA362
4C086 AA01 AA02 DA17 HA08 MA01 MA02 MA03 MA04 NA05 NA14
ZA36
4C087 AA01 AA02 BC83 MA02 NA05 NA14 ZA36

4C206 AA01 AA02 EA01 FA22 MA01 MA02 MA03 MA04 NA05 NA14
ZA36