

厚生科学研究費補助金

特定疾患対策研究事業

進行性腎障害に対する進展の抑制に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 松彦

平成 13 年 (2001 年) 4 月

目次

I. 総括研究報告書	
進行性腎障害に対する進展の抑制に関する研究.....	1
林 松彦	
II. 分担研究報告書	
1. 骨髄由来間葉系未分化幹細胞の培養・分化誘導に関する研究.....	11
福田 恵一	
2. 骨髄幹細胞を用いた腎臓再生法の確立.....	19
川村 哲也	
3. 尿管細胞幹細胞の分化誘導に関する研究.....	24
佐々木 成	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	27
IV. 研究成果の刊行物・別冊.....	29

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総括研究報告書

進行性腎障害に対する進展の抑制に関する研究
－腎糸球体および尿細管細胞再生の腎疾患治療への応用

主任研究者 林 松彦 慶應義塾大学医学部助教授

研究要旨

本研究は、進行性腎障害ならびに末期腎不全患者の腎機能回復を目指して、腎臓を再生することを目的として立案された。本年度は、 β 間在細胞、尿中細胞、骨髄由来間葉系未分化幹細胞を出発点として、糸球体構成細胞、および尿細管幹細胞の分化誘導を試みた。また、in situ での腎細胞再生を目指して、アデノウィルスベクターによる遺伝子移入を試みた。その結果、間葉系未分化幹細胞からの腎構成細胞は未だ得られていないが、神経細胞様の細胞が得られ、神経疾患治療への応用の可能性が示された。また、アデノウィルスによる近位尿細管への遺伝子移入は、尿細管細胞局所での遺伝子発現を効率良く行うことが明らかとなり、疾患の治療、繊維化した間質の in situ での分化・誘導に有用な手段であることが示された。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設
における職名

猿田享男 慶應義塾大学医学部教授
福田恵一 慶應義塾大学医学部講師
佐々木成 東京医科歯科大学助教授
川村哲也 東京慈恵会医科大学助教授

不全治療、そして原疾患の治療の開発は急務である。現在、これらの疾患の治療法としては、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、あるいはステロイドホルモン等が用いられているが、根本治療とはいいがたく、進行の遅延がみられる程度か、あるいは治療可能であったとしても薬剤自体の副作用が大きな問題となっている。また、末期腎不全にいたった場合、血液透析、腹膜透析、腎移植が治療の選択肢となるが、患者の生活の質、代謝面等、腎移植が最も優れているものの、腎提供者は極めて限られており、また、移植後の免疫抑制薬による副作用などの問題も発生する。そこで、理想的には、原疾患の根絶と廃絶した腎機能の再生が最善の治療法となるが、今日まで実用化されていない。現実のものとなった高齢社会を

A.研究目的

本邦における透析患者数は20万人に達しようとしており、新規導入患者の30%が糖尿病、30%が慢性糸球体腎炎となっている。この2大原疾患は、発症後5年から20年にわたり進行性に腎機能が低下し、やがて機能廃絶にいたることを特色としている。今後の人口の高齢化を考慮すると、これらの疾患に加え、腎硬化症による末期腎不全も増加することが想定され、末期腎

迎え、増加し続ける腎不全の根治は厚生行政の面からも重要課題であり、また、保険財政の面からも急務となっている。本研究では、これらの問題を踏まえて、腎臓の再生の可能性を検討し、実用化をはかるために立案された。

B. 研究方法

本研究では、腎機能再生を目標として、*in vivo* および *in vitro* の検討を行った。

【単離 β 間在細胞、尿中細胞、骨髄由来間葉系未分化幹細胞を用いた尿細管幹細胞とメサンギウム細胞誘導】

腎機能の基本は糸球体濾過とその後の濾過液中のイオン、水をはじめとする種々の物質の再吸収、分泌である。この機能の最小単位はネフロンと呼ばれ、糸球体に始まり、近位曲尿細管から内髄質集合管にいたる尿細管から構成される。進行性腎障害では、糸球体硬化と、尿細管萎縮の進行により、次第に機能廃絶にいたる。そこで、本研究では、まず、単離 β 間在細胞、尿中細胞、骨髄由来間葉系幹細胞を原基として、糸球体の主要な構成成分である内皮細胞とメサンギウム細胞、および尿細管細胞の誘導を目標とした。

家兎 β 間在細胞は、当研究室既報の方法により、FITC 標識ピーナッツレクチン結合細胞を用いた。家兎、腎動脈から燐酸緩衝液により腎を灌流後、コラゲナーゼ処理した。この後、腎を細切して、さらに sieving により尿細管浮遊液とした。この尿細管浮遊液をパーコール液中で遠心分離し、遠位尿細管層を集めた。さらに酵素処理した後に、FITC 標識ピーナッツレクチンと反応させ、蛍光細胞単離装置により β 間在細胞

を得た。

尿中細胞は、ラットの尿を 100ml 収集し、遠心して得られた細胞を用いた。

上記の細胞と、Bio Whittaker より購入したヒト由来間葉系幹細胞を、MSCBM (human mesenchymal stem cell basal medium) 中で培養した。その後、培地を血清を含まない Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) に変更し、ネフロン構成細胞の誘導を行うために、hepatic growth factor (HGF)、dexamethasone、retinol、activin、bFGF、TGF- α を種々の組み合わせで培地に添加した。6 日間、誘導因子添加培地で培養後、細胞を位相差顕微鏡で観察するとともに、培養皿から回収し、total RNA を Trizol (GibcoBRL) により採取した。Total RNA は、その後、メサンギウム細胞、尿細管細胞のマーカーとなる遺伝子発現を検証するために、各遺伝子の特異的プライマーを用いて RT-PCR を行い、mRNA 発現を検討した。

また、免疫組織学的に検討するために、細胞をカバーガラス上で同様に培養後、4% paraformaldehyde で固定し、種々のマーカー蛋白に対する抗体で染色を行った。

【間質障害モデル動物における間質線維化修復の試み】

慢性糸球体腎炎、糖尿病腎症では原疾患自体の障害機序に加えて、結果として生じた蛋白尿が近位尿細管で再吸収される際に細胞障害を生じることが知られている。また、進行性腎障害の腎機能低下と間質障害、尿細管細胞障害はよく相関することが知られており、糸球体とともに、尿細管が重要な病変の場と想定されている。本研究では、

培養細胞を用いての腎機能再生を目指すとともに、in situ での腎機能再生を目指している。そこで、本研究では、in vitro の検討とともに、in vivo での検討を進めている。

間質障害動物モデル

間質障害動物モデルとしては、アルブミン負荷ラットを用いた。6週齢雌 Wistar ラットを Charles River Japan から購入し、代謝ケージで飼育した。飼料は高蛋白食 (CA-1、日本クレア) を与え、自由飲水とした。片腎摘出後1週間で後述の変異 I κ B 組み込みアデノウイルス (Adex I κ B Δ N)、LacZ 組み込みアデノウイルス (AdexLacZ)、生理食塩水を、腎動脈上下で大動脈をクリップにより遮断した後、大動脈内に投与した。投与後3分間血流を遮断した状態としてからクリップを解除した。Adex LacZ を投与したラットでは、その発現期間を検討する目的で、投与後、7、14、21、28日に各々屠殺して、腎臓を採取した。また、Adex I κ B Δ N による遺伝子発現を確認するために、アデノウイルス投与後、1、4、7日目で同様に腎臓を採取し、totalRNA を後述の方法で抽出した。

間質障害モデルとして、牛血清アルブミン (BSA) 投与モデルを用いた。アデノウイルス、または、生食水を投与した後1週間後から、2g の BSA を連日腹腔内に投与した。投与開始後7、14、21日後に各群のラットから腎臓を摘出し、後述の免疫組織学的検討と gel shift assay に用いた。

各群ラットの尿、血液サンプルを採取し尿中蛋白・クラアチニン排泄量、血中アルブミン、クレアチニン、総コレステロール

の定量を行った。また、血圧を tail-cuff plethysmography により測定した。

X-gal 染色

腎臓を摘出後、小切片とした後、OCT compound に凍結包埋した。包埋した組織を cryostat により 8 μ m の厚さの切片を作成し、固定液 (0.2% glutaraldehyde、0.1M 燐酸カリウム緩衝液 [pH7.4]、5mM EGTA、2 mM MgCl₂) 中に5分間浸漬した。緩衝液 B (0.1M 燐酸カリウム緩衝液 [pH7.4]、0.02% Nonidet P40、0.01% sodium-deoxycholate、5mM EGTA、2 mM MgCl₂) にて洗浄後、X-gal 溶液 (10mM K₃Fe(CN)₆、10mM K₄Fe(CN)₆、0.5mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside [Sigma Chemical Company、St. Louis、MO、USA]、緩衝液 B) で染色した。

RT-PCR

腎皮質から抽出した total RNA を用いて逆転写後、polymerase chain reaction によりアデノウイルス由来 I κ B の発現を RNA レベルで確認した。Primer は Adex I κ B Δ N を増幅するように設計された。PCR 産物は、1%アガロースで泳動した後 ethidium bromide により染色し期待される長さのバンドの有無を同定した。

腎組織学的検討

各群から摘出した腎臓を 10%フォルマリン固定後、パラフィン包埋し、PAS 染色、Masson trichrome 染色を行った。染色後、糸球体硬化は grade 1~4 までに定量化し、組織の炎症に関しては単球数を各標本 30 視野で数えて定量化を行った。

免疫組織化学

免疫組織化学により TGF- β と

fibronectin の腎内発現を同定した。腎組織を 4% paraformaldehyde で固定後、OCT compound 内に包埋した。Cryostat にて厚さ 8 μ m の切片を作成後、燐酸緩衝液で洗浄し、内因性ペルオキシダーゼの活性を 0.3% H_2O_2 含有メタノールにより阻害した。この後、抗 TGF- β 抗体、または抗フィブロネクチン抗体と 60 分間反応させた。次いで streptavidin-biotinylated 二次抗体を反応させ、tetramethylbenzidine により染色した。その定量化のためには、染色の濃度により grade1~4 に分類した。

核蛋白の抽出と electrophoretic mobility shift assay

抽出した腎臓約 200 μ g を酵素阻害薬 (protease inhibitor cocktail tablet, Roche Molecular Biochemicals) を加えた緩衝液 C (10mM HEPES [pH 7.9]、10 mM KCl、2 mM $MgCl_2$ 、and 0.1 mM EDTA) 中で homogenate した。その後、13,000g で 5 分間遠心し、上清を除去、沈殿物を緩衝液 D (50 mM HEPES、10% glycerol、300 mM NaCl、50 mM KCl、protease inhibitor cocktail tablet) に懸濁した。この懸濁液をさらに 13,000g で 10 分間遠心した。この上清を核蛋白画分として採取し、以後の electrophoretic mobility shift assay (EMSA) に供した。

二本鎖 NF- κ B 共通配列 (5 - AGTTGAGGGGACTTTCVCAGGC - 3) を [^{32}P]- γ -ATP で標識した。余剰の [^{32}P]- γ -ATP は QIAquick spin column により除去した。5 μ g の核蛋白抽出物、2 μ l の EMSA 緩衝液 (20% glycerol、5 mM $MgCl_2$ 、2.5 mM EDTA、2.5 mM DTT、250 mM NaCl、50 mM Tris-HCl [pH 7.5]、

0.25 mg/ml poly[dl-dC]-poly[dl-dC]) および前述の ^{32}P -標識プローベ 50,000 cpm を混合し、室温で 30 分間反応させた。Competition assay では、100 倍量の非標識プローベを上記反応液に加え同様の実験を行った。反応後、1 μ l の gel loading buffer (250 mM Tris-HCl、pH7.5、0.2% bromophenol blue、40% glycerol) を添加し、7% polyacrylamide gel により 150V、90 分間電気泳動を行い、乾燥後フィルムに 6 時間感光した。得られた autoradiography を densitometer により解析した。

(倫理面への配慮)

細胞・動物実験に関しては、倫理面の問題は生じないが、動物愛護上の問題はあり、Helsinki 宣言を遵守し、当学動物実験基準にのっとり研究を行った。

C. 研究結果

【 β 間在細胞、尿中細胞、骨髄由来間葉系未分化幹細胞を用いた尿細管幹細胞とメサンギウム細胞誘導】

β 間在細胞、尿中細胞、骨髄由来間葉系未分化幹細胞を原基として、種々の増殖因子を添加し、尿細管細胞、あるいはメサンギウム細胞の誘導を試みたが、位相差顕微鏡での観察上、上皮様の形態を示したものは現在まで誘導されていない。この分化誘導過程で、activin A と retinol で処理した場合、軸索様の突起をともなう細胞が観察された。神経細胞の可能性が考慮されたことから、その特性を検討した。まず、未分化なものから成熟したものまで、神経細胞特異的に発現している NeuroD の発現を

RT-PCRにより検討した。その結果、予想された367bpのバンドがゲル泳動で確認された。さらに、中枢神経の形態形成上重要であるOtx-2の発現を同様に検討したが、RT-PCR後、予想された211bpのバンドが確認された。これらのmRNA発現から、神経細胞の誘導が強く示唆され、さらに免疫組織学的検討によりその特性を検討した。その指標として、Hu蛋白、MAP-2、neurofilamentを選択したが、これらのいずれの蛋白も誘導因子を加えた細胞では陽性であり、反対に誘導因子を加えない細胞ではいずれも陰性であった。

この培養系で得られた神経細胞と思われる細胞の性格をさらに明らかにするために中脳ドーパミン産生細胞の指標であるNurr1の発現をRT-PCRで検討した。このNurr1は、tyrosine hydroxylase 遺伝子の転写活性化因子である。このNurr1のmRNA発現を認め、得られた細胞がドーパミン産生細胞の特性を持つことが証明された。

実際、機能的にドーパミン産生能を有するかを検証するためチロシン水酸化酵素の発現をRT-PCRにより検討したが、この酵素のmRNA発現は証明されなかった。さらに、機能的に神経伝達物質の産生がみられるか否かを、ヒスタミン、カテコールアミンなどを指標として検討中であるが、現時点ではヒスタミン産生細胞である可能性が高い。

【間質障害モデル動物における間質線維化修復の試み】

AdexLacZ投与後7日目に腎内での β -galactosidase発現が認められ、その発現は近位尿細管細胞に限局していた。また、

その発現は投与後3週目まで確認された。腎臓以外の臓器では、心臓、肝臓における発現を検討したが、いずれにおいても β -galactosidase活性は認められなかった。

AdexI κ B Δ Nの腎動脈投与後、1、4、7日目のI κ B Δ N発現を、RT-PCRにより確認した。特異的な、712bpのバンドはAdexI κ B Δ N投与ラットのみで確認され、AdexLacZ投与ラットおよび対照ラットでは認められなかった。さらに逆転写を行わない場合もこの712bpのバンドは検出されず、投与したAdexI κ B Δ N由来のmRNAから増幅されたものと考えられた。

EMSAの結果では、対照群に比べて、アルブミン負荷AdexLacZ群ではアルブミン投与開始1週間後からNF κ B活性化が認められた。このNF κ B活性化はアルブミン投与開始後2週間でピークとなり、3週間後でも活性を示した。一方、アルブミン負荷AdexI κ B Δ N群では、アルブミン投与開始後3週間まで、対照群と差を認めず、AdexI κ B Δ Nの投与がアルブミン負荷によるNF κ B活性化を抑制することが示された。

尿中蛋白量はアルブミン負荷AdexLacZ群とアルブミン負荷AdexI κ B Δ N群で有意差を認めず、近位尿細管における蛋白負荷量に差を認めないことが示された。また、血清アルブミン値は両アルブミン負荷群で対照群に比べ有意の高値を認めたが、血清クレアチニン、24時間内因性クレアチニンクリアランスには3群間で有意差を認めなかった。

光顕所見は、これまでの報告と一致して、アルブミン負荷AdexLacZ投与群では対照群に比べ、明らかな間質尿細管の変化、

すなわち、近位尿細管における刷子膜の脱落、細胞萎縮、基底膜の肥厚を認めた。間質領域では、その領域の拡大と、単球浸潤にともなうと考えられる間質浮腫、線維化を認めた。対照的に、アルブミン負荷 AdexI κ B Δ N 投与ラットでは、これらの間質尿細管変化は軽微にとどまった。顕微鏡所見の糸球体・間質変化をスコアリングした結果、糸球体の変化は両アルブミン投与群で軽度ではあるが有意の変化を示した。これに対し、間質変化は AdexI κ B Δ N 群では対照群と差異を認めず、AdexLacZ 投与群で明らかな間質線維化指数の増加を認めた。

免疫組織学的検討結果は、TGF- β 、fibronectin とともに、AdexLacZ 投与ラット腎では、有意の染色を間質に認めた。一方、AdexI κ B Δ N 群では、その染色性は間質では対照群と比べ有意差を認めなかった。また、糸球体においても、AdexLacZ 群は両者の有意の染色を認めたが、間質と異なり、その染色性に AdexI κ B Δ N 群との間で有意差を認めなかった。

D. 考察

単離 β 間在細胞、尿中細胞、間葉系幹細胞から、糸球体細胞および尿細管細胞の誘導を試みた。近年、骨髄より得られる間葉系幹細胞が多分化能を有し、骨髄造血細胞はもとより、骨細胞、平滑筋細胞、心筋細胞などの細胞に分化することが確認されている。これまで、同細胞から、腎臓固有の細胞が得られたとの報告はないが、腎障害治療の方法として、腎再生を実現すべく、種々の成長因子を用いることにより、糸球体構成細胞、尿細管構成細胞の分化誘導を試みた。方法の項に示したような成長因子

を用いた限りにおいては、これまで、尿細管原基となるような細胞は得られていない。

一方、この検討の過程で、神経細胞と思われる細胞が誘導された。これまで、胎児幹細胞から神経細胞が誘導されることは知られており、この神経細胞の中には、ニューロン、astrocyte、oligodendrocyte が含まれている。また、ドーパミン産生細胞も報告があり、パーキンソン病の治療などへの有用性が期待されている。しかし、胎児幹細胞からの誘導であるため、倫理的な問題を生じる可能性があり、また、宿主側に拒絶反応を生じることは確実である。こういった問題を考えるとき、自己の骨髄細胞からの誘導は、倫理的にも、免疫反応の点でも問題を生じず、臨床応用の可能性が極めて高い方法といえる。

本研究では、間葉系幹細胞にビタミン A と activin A を作用させることにより、ドーパミン産生細胞に類似した細胞を得ることに成功した。この細胞は、結果の項でも記載したように、神経細胞の指標である Hu、MAP-2、Neruofilament を発現しており、少なくとも神経細胞の特性を持ち合わせていることは明らかである。さらに、我々が誘導に成功した細胞は、Nurr 1 を発現していることが示された。この蛋白は、腹側 mesencephalon に発現しており、また、dopaminergic neuron に必須とされている。その役割としては、内因性チロシン水酸化酵素の転写活性化を行い、dopaminergic neuron のドーパミン産生に重要な役割を果たすことが知られている。したがって、間葉系幹細胞から誘導された細胞も同酵素の発現が期待されたが、少なくとも本研究で行った方法では証明されな

かった。この結果から、誘導された神経細胞様細胞は、少なくとも、完全に分化した細胞ではなく、分化の過程にあるか、あるいは一部の機能が脱落した細胞である可能性が考慮された。したがって、本細胞はそのままではパーキンソン病などの神経疾患の治療には使用し得ないが、骨髄由来の細胞が神経系細胞に分化し得る可能性を示したものであり、この細胞を利用して遺伝子治療などに応用する道を開いたものと言える。すなわち、この細胞は神経系に親和性を有する可能性は高く、何らかの方法により、遺伝子発現を行えば、ベクターとして細胞を用いることが可能であろう。現在、カテコールアミン産生酵素の発現を同細胞で試みており、その発現の後、パーキンソン病モデル動物への投与を行うべく準備中である。

一方、in situ での、腎機能再生を目指して、アデノウィルスを用いた遺伝子導入を試みた。アデノウィルスは、過去の報告から、腎動脈に投与した場合近位尿細管に選択的に遺伝子発現を行うことが知られており、この特性を利用して本研究に応用した。近位尿細管は、近年、進行性腎障害の病変の場として、糸球体と同様に重要視されており、間質の硬化は特に、IgA 腎症では、その予後を規定するものとして知られている。まず、予備実験として、LacZ を発現するアデノウィルスベクターを、ラットの腎動脈内に投与して、その発現部位を β -galactosidase 活性を指標として検討した。その結果、過去の報告と一致して、近位尿細管でのみ同酵素活性が確認された。さらに、今回の検討では、組織障害進展因子として種々の cytokine による NF κ B

が重要な役割を果たしているとの認識から、その抑制因子である I κ B の変異型の遺伝子導入を試みた。NF κ B は、一般には、p65、p50、I κ B の三種の蛋白質が形成する三量体を指すが、この三量体は、cytokine あるいは free radical などの刺激が加わると、先ず I κ B が磷酸化され、遊離する。この I κ B は引き続き ubiquitination を受け、代謝酵素により分解される。一方、p65、p50 は遊離して核内に移行し、転写領域にある NF κ B consensus sequence の部分に結合して転写促進を行う。この NF κ B により転写調節される蛋白としては代表的なものは interleukin 6、あるいは NF κ B 自身がある。本研究で導入を試みた変異 I κ B は、NF κ B 活性化の最初の段階である磷酸化を受ける部分のアミノ酸を欠失したものであり、したがって磷酸化を受けず、p65、p50 は遊離できない。この変異 I κ B の遺伝子を組み込んだアデノウィルスを、腎動脈内に投与した場合、その mRNA が腎内に発現することを確認した。変異 I κ B の移入が、in vitro での実験では NF κ B 活性化を完全に抑制することを、以前我々は示しているが、in vivo での効果を EMSA を用いて確認した。アデノウィルスによる遺伝子移入は、アルブミン負荷による NF κ B 活性化を抑制することが示され、その機能面での有用性が確認された。

本研究では、アデノウィルスによる治療効果を確認する目的で、アルブミン負荷蛋白尿モデルを用いた。これまで、アルブミンをラット腹腔内に大量投与すると、大量の蛋白尿を生じ、この蛋白尿自身が近位尿細管障害をきたすことが報告されており、臨床的に進行性腎障害でも間質が重要な病

変の場であることから、本研究では、このアルブミン負荷蛋白尿モデルを対象とした。これまで、この動物モデルでは、NF κ Bの活性化を通じて、MCP-1、RANTESや種々の cytokine が誘導され、これらの物質が尿細管障害に重要な役割を果たすことが示されていた。アデノウィルスを用いた変異 I κ B 発現による NF κ B 抑制は、先ず組織所見で観察した場合、アルブミン負荷による間質変化を明らかに抑制した。さらに、TGF- β の発現も低下した。TGF- β は、NF κ B により誘導される蛋白ではないことから、NF κ B 抑制による cytokine 産生の減少による単球浸潤の抑制を通して TGF- β 発現が減少した可能性が考慮された。また、これまでの報告で、アルブミン負荷蛋白尿モデルでは、アンジオテンシン II の局所での役割が示唆されているが、このアンジオテンシンの前駆物質であるアンジオテンシノーゲンは NF κ B による転写調節を受けることから、このアンジオテンシノーゲン産生抑制を介した TGF- β 減少、間質線維化抑制である可能性も考慮される。

NF κ B 抑制による、アルブミン負荷蛋白尿モデルの間質障害抑制は、pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) による実験でも報告がある。この PDTC は、抗酸化作用を示し、腎 NF κ B 活性を抑制することが報告されている物質であり、間質障害抑制に有効であることが示されている。しかし、この PDTC は必ずしも NF κ B に特異的に作用する薬品ではなく、他の機序を介して障害抑制に作用した可能性はある。

この PDTC 以外で NF κ B を抑制する薬剤として、代表的な薬剤としては糖質コルチコイドホルモンがある。このホルモンは、

I κ B の誘導を介して NF κ B 活性化を抑制するが、投与した場合、全身臓器での NF κ B を抑制することから、多くの副作用を生じるという問題点がある。その代表的なものは、免疫細胞における NF κ B 抑制による免疫抑制と易感染性であり、臨床で大きな問題となっている。したがって、本研究のように病変の場特異的な NF κ B 抑制が望まれている。アデノウィルスが直ちに臨床応用可能であるかは、ウィルス自体の副作用もあり、必ずしも容易ではないが、検討されるべき治療手段と考えられた。

E. 結論

単離 β 間在細胞、尿中細胞、間葉系幹細胞を原基として、糸球体構成細胞および、尿細管細胞の誘導を試みた。これらの細胞は現時点で得られていないが、神経細胞として矛盾しない細胞が分化誘導され、将来の神経系疾患細胞治療に有用な手段となる可能性がある。

一方、in situ での障害腎の回復を目的として、アデノウィルスによる変異 I κ B の近位尿細管での発現による間質障害改善の可能性を検討した。本年度は、アルブミン負荷蛋白尿モデルにおいて検討を行い、その障害を完全に予防することが明らかとなった。しかし、予防効果の段階であり、今後治療効果を異なる腎炎モデルで検討する必要がある。

F. 健康危険情報

本研究はヒトを対象とした検討を行っていないので、該当する情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Nakaya H, Sasamura H, Hayashi M, Saruta T. Temporary treatment of prepubescent rats with angiotensin inhibitors suppresses the development of hypertensive nephrosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2001, 12(4):659-66.
 2. Ichihara A, Hayashi M, Hirota N, Saruta T. Superoxide inhibits neuronal nitric oxide synthase influences on afferent arterioles in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2001, 37(2 Part 2):630-4.
 3. Ichihara A, Hayashi M, Hirota N, Saruta T. Superoxide inhibits neuronal nitric oxide synthase influences on afferent arterioles in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2001, 7(2):630-4.
 4. Kobori H, Hayashi M, Saruta T. Thyroid Hormone Stimulates Renin Gene Expression Through the Thyroid Hormone Response Element. *Hypertension.* 2001, 37(1):99-104.
 5. Tsuganezawa H, Kobayashi K, Iyori M, Araki T, Koizumi A, Watanabe SI, Kaneko A, Fukao T, Monkawa T, Yoshida T, Kim DK, Kanai Y, Endou H, Hayashi M, Saruta T. A new member of the HCO₃-transporter superfamily is an apical anion exchanger of beta-intercalated cells in the kidney. *J Biol Chem.* 2001, 276(11):8180-8189.
 6. Ichihara A, Hayashi M, Navar LG, Saruta T. Inducible nitric oxide synthase attenuates endothelium-dependent renal microvascular vasodilation. *J Am Soc Nephrol.* 2000, 11(10):1807-12.
 7. Monkawa T, Yoshida T, Hayashi M, Saruta T. Identification of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression in macrophages. *Kidney Int.* 2000, 58(2):559-68.
2. 学会発表
 1. 「ヒトメサンギウム細胞における vascular endothelial growth factor (VEGF) の細胞内情報伝達機構の検討」 雨宮哲朗、篠村裕之、三船瑞夫、中谷英章、広田良子、林 松彦、猿田享男、第 43 回日本腎臓学会総会、2000 年
 2. 「高血圧モデル動物における NHE3 調節蛋白質の機能解明」 小林一雄、林 松彦、猿田享男、第 43 回日本腎臓学会総会、2000 年
 3. 「ATP 枯渇による尿細管細胞死における apoptosis 実行遺伝子 caspase の活性化」 荒木崇志、林 松彦、三浦正幸、岡野栄之、猿田享男、第 43 回日本腎臓学会総会、2000 年
 4. 「アンジオテンシン II 型 (AT2) 受容体によるメサンギウム細胞のリモデルリング制御の検討」 三船瑞夫、篠村裕之、雨宮哲朗、中谷英章、広田良子、林 松彦、猿田享男、第 43 回日本腎臓学会総会、2000 年
 5. 「トラニラストによるメサンギウム細胞における単球遊走因子 MCP-1 発現抑制効果と機序の解明」 力石昭宏、平橋淳一、高瀬 敦、丸茂丈史、林 松彦、猿田享男、第 43 回日本腎臓学会総会、2000 年
 6. 「β 間在細胞特異的陰イオン交換体の分子クローニング」 津金澤浩彦、荒木崇志、小林一雄、吉田 理、伊従正博、林 松彦

彦、猿田享男、第 43 回日本腎臓学会総会、
2000 年

7. Apical anion exchanger of β -intercalated cells is a new member of the bicarbonate transporter superfamily. Tsuganezawa H, Kobayashi K, Iyori M, Araki T, Kim DK, Monkawa T, Kanai Y, Endou H, Hayashi M, & Saruta T, & Saruta T, The 33rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2000.

8. Adenovirus-mediated gene transfer of truncated I κ B α prevents tubulointerstitial injury in rats with protein-overload proteinuria. Takase O, Hirahashi J, Takayanagi A, Chikaraishi A, Marumo T, Hayashi M, Shimizu N, & Saruta T, & Saruta T,

The 33rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2000.

9. Tranilast inhibits interleukin-1 β -induced monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression in rat mesangial cells. Chikaraishi A, Hirahashi J, Takase O, Marumo T, Hayashi M, & Saruta T, & Saruta T, The 33rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2000.

H. 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

骨髄由来間葉系未分化幹細胞の培養・分化誘導に関する研究

分担研究者 福田 恵一

慶應義塾大学心臓病先進治療学 講師

研究要旨

本研究は骨髄間質細胞中に含まれる間葉系幹細胞を用いることにより再生心筋細胞を作製し、心筋細胞移植のドナー細胞を開発することを目的としている。本年度は心筋細胞に分化した CMG 細胞がカテコラミン受容体を発現し、シグナル伝達機能を有していることを明らかにした。また、間葉系幹細胞から心筋細胞に分化した CMG 細胞を単離する技術を開発し、再生心筋細胞の移植実験を行った。

A.目的

特発性拡張型心筋症や重症心筋梗塞等を原因とする難治性心不全に対してこれまで様々な治療法が考案されてきたが、心臓移植以外には有効な治療は見出されていない。臓器移植法の施行に伴い本邦においても心臓移植の道が開かれたが、脳死判定の問題や国民性から見て臓器提供者が多数出現し、現実的な治療法として普及するには多くの問題が山積している。これに対し、近年動物実験レベルではあるが心筋細胞移植により心不全を治療する方法が報告され注目をあびている。心筋細胞移植はこれまで胎仔あるいは新生仔の心筋細胞を用いて行われてきたが、ヒトへの応用を考えた場合ドナーとなる細胞の問題で行き詰まっていた。一方、分子生物学の発達により再生医学の研究が発達し、様々な臓器で組織再生が試みられている。心筋細胞の再生は神経と並んで最も難しいとされてきた。本研究では骨髄間質細胞を分化誘導することにより心筋細胞を作製し、心不全治療に応用しうるレベルに至るまでの基礎研究を目的としてい

る。心筋細胞にはカテコラミン受容体、アセチルコリン受容体が多数存在し、心拍数・心収縮力の調節、心肥大の促進等の重要な心機能の調節に関与している。本研究では骨髄由来の心筋細胞（CMG細胞）の性質を明らかにするため、CMG細胞のカテコラミン受容体の発現と機能解析を行った。さらに、さまざまに分化した細胞中より心筋細胞のみを単離する方法を開発した。

B.方法

①CMG細胞の作成

C3H/He マウス大腿骨より骨髄を摘出し、Dexter法により初代培養を行った。骨髄間質細胞は付着系の細胞であり浮遊系の骨髄芽細胞、血球系の細胞を除去致した後、3ヶ月以上の長期間培養を行った。長期培養後、不死化した細胞による多クローンの細胞株を作成し、この多クローンの細胞株に対し、limiting dilutionによる単一或いは数クローンによる細胞株を作成し、各々のクローンに対しDNA脱メチル化剤5-azacytidineによ

り分化誘導を行った。分化誘導後およそ4週間培養し、数百以上のクローンの中から自己拍動を行う細胞を含むクローンをスクリーニングした。自己拍動を開始した細胞の周辺をクローニングシリンジより採取し、さらにサブクローニングを反復した。得られたサブクローンの中から自己拍動する割合の高いクローンを最終的に CMG 細胞

(Cardiomyogenesis より命名) 株として樹立した。CMG 細胞は凍結融解を繰り返しても表現形は変わらず、分化誘導後自己拍動を開始する比率はおよそ 30%であった。この CMG 細胞に対し、免疫染色、Northern Blot、RT-PCR による心筋特異的遺伝子発現、電顕による微小構造解析、活動電位の記録等を行った。

②CMG細胞のカテコラミン受容体の発現：

(1)最終分化誘導前および5-Azacytidine による分化誘導後1-6週のCMG細胞よりRNAを抽出した。マウス心臓を陽性対照にカテコラミン α 1受容体(α 1A、 α 1B、 α 1D)および β 受容体(β 1、 β 2)のRT-PCRを行った。(2)分化誘導前および誘導後2週のCMG細胞をフェニレフリン(α 1 agonist)にて刺激し、ERK1/2の活性化を測定した。さらに α 1拮抗薬プラゾシン前処置による抑制効果を観察した。(3)同様にIBMX存在下に isoproterenol (ISP)により細胞を刺激し、cAMP生成量を測定した。さらに propranolol(PP)前処置によるcAMP生成量への影響を検討した。

③ミオシン軽鎖-2v 遺伝子プロモーターとEGFPの組み換え遺伝子を用いた心筋細胞の単離：

心筋細胞特異的に発現するミオシン軽鎖-2v 遺伝子のプロモーターに Enhanced Green

Fluorescent Protein (EGFP-cDNA 遺伝子を組み替えたプラスミドを作製した。この遺伝子組換えプラスミドと Neomycin 耐性遺伝子プラスミドを CMG 細胞に共遺伝子導入し、G418 存在下に細胞を選別した。

④再生心筋細胞の移植：再生心筋細胞をアデノウイルス lacZ 遺伝子で標識した。麻酔下のマウス心臓に注射した。経時的にマウスを屠殺し心筋を染色した。

(倫理面への配慮)

細胞・動物実験に関しては、倫理面の問題は生じないが、動物愛護上の問題はあり、Helsinki 宣言を遵守し、当学動物実験基準にのっとり研究を行った。

C.結果

①骨髄間質細胞より心筋細胞への分化誘導法の確立：

骨髄間質細胞は分化誘導前には線維芽細胞様の形態を呈した。分化誘導後には多くのクローンは骨芽細胞や脂肪細胞に分化したが、ごく少数の細胞が自己拍動を開始した。このクローンを単離し、CMG細胞とした。分化誘導後2週間より自己拍動を開始した。その後CMG細胞は形態的に他の細胞より肥大し、方向性を有し近接する細胞と縦列して接着し、筋管細胞を形成した。CMG筋管細胞は骨格筋の筋管細胞と異なり、分枝により他の筋管細胞と接合し、蜘蛛の巣状の外観を呈した。

②CMG細胞のカテコラミン受容体の発現：

心筋細胞にはカテコラミン受容体、アセチルコリン受容体が多数存在し、心拍数・心収縮力の調節、心肥大の促進等の重要な心機能の調節に関与している。CMG細胞におけるカテコラミン受容体の発現をRT-PCR法によ

り解析すると $\alpha 1$ 受容体の3種のサブタイプの内、 $\alpha 1A$ 、 $\alpha 1B$ 、 $\alpha 1D$ すべてが最終分化誘導前より発現していた。さらに、CMG細胞を $\alpha 1$ 刺激薬であるフェニレフリンで刺激するとMAPKの1種であるERK1/2の活性化が容量、時間依存性に観察され、この活性化は $\alpha 1$ 遮断薬であるプラゾシンにより抑制された。 β 受容体に関しては $\beta 1$ 受容体、 $\beta 2$ 受容体の両者が心筋細胞に分化誘導された後に発現された。CMG細胞を β 刺激薬であるイソプロテレノールで刺激すると細胞内cAMPの濃度が容量依存性に増加していた。以上よりCMG細胞はカテコラミン $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 受容体をmRNAレベルだけでなく蛋白レベルでも発現しかつ生理機能を有していることが観察された。

③ミオシン軽鎖-2v遺伝子プロモーターとEGFPの組み換え遺伝子を用いた心筋細胞の単離：

CMG細胞は5-azacytidineにより最終分化誘導を行うことにより、約30%の細胞が自己拍動する心筋細胞に分化する。移植を前提とした際には心筋細胞に分化しなかった細胞と心筋細胞に分化した細胞を選別しなければならない。このため、心筋細胞特異的に発現するミオシン軽鎖-2v遺伝子のプロモーターにEnhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)-cDNA遺伝子を組み替えたプラスミドを作製した。この遺伝子組換えプラスミドとNeomycin耐性遺伝子プラスミドをCMG細胞に共遺伝子導入し、G418存在下に細胞を選別した。この細胞に5-azacytidineにより最終分化誘導を行い、心筋細胞に分化した細胞のみをFACSによりsortingを行った。この手法によりCMG細胞は完全な心筋細胞の分画にすることが可能となった。

④再生心筋細胞の移植：移植された再生心筋細胞はレシピエントの心臓で生着し、同期して収縮していた。移植心筋細胞は少なくとも2カ月以上、レシピエント心で生着することが確認された。

D.考察

心筋梗塞症などにより局所的に心筋が壊死に陥った場合、壊死領域では線維芽細胞の増生により癒痕領域が形成され、心全体としていわゆるリモデリングがなされる。癒痕領域は収縮に寄与しないばかりか時に心室瘤を形成し心臓の収縮拡張機能を著しく損なう。これに対し壊死領域に細胞移植を行うことにより左室のリモデリングや収縮能の改善を行うのが心筋細胞移植の考え方である。

これまで動物実験レベルでは心臓に対する細胞移植は様々な形で行われてきた。研究の初期の段階ではラットあるいはウサギに心筋梗塞を作製し平滑筋細胞や骨格筋細胞を移植するというものであった。平滑筋、骨格筋細胞の場合にはもちろん心筋細胞と同期して収縮することはないが、心筋梗塞後の心室リモデリングの改善に有用であった。心筋細胞移植についてはこれまでに20を越える報告がなされているが、心筋細胞の場合初代培養を行ってある程度の生きた細胞が得られるのは胎仔あるいは新生仔の心筋細胞に限られる。これまでに行われた心筋細胞移植では胎仔細胞が用いられてきた。胎児心筋細胞の心臓への移植の結果、移植した心筋細胞は心臓の線維化された組織中に生着できること、移植したドナー細胞とホストの心筋細胞が介在板を介して電氣的に連結した結合を取りうるということが報告された。さらに胎児心筋細胞の移植により心収縮、拡張能が改善することが報告さ

れ、心筋細胞移植の将来的な臨床応用への期待が集まることとなった。

心筋細胞移植の最大の問題点はドナー細胞の確保である。ヒトを対象とした場合には胎児の細胞を用いることは倫理的に不可能である。心筋細胞の再生は現在 ES 細胞および骨髄間葉系幹細胞を材料として分化誘導する方法が試みられている。自己骨髄より骨髄間葉系幹細胞を単離し、*in vitro* で増幅した後心筋細胞に誘導出来れば移植の拒絶反応の問題も解決できる。現在我々は最終分化した骨髄細胞から心筋細胞に分化した細胞の単離法の開発や細胞移植に関する研究を行っている。今後のプラクティカルな問題として移植細胞がホストに長期間安定して生着するか否か、不整脈源とならないか、ヒト骨髄細胞より心筋細胞が作製できるか否かなどがあり、今後解決しなければならない課題と考えている。

E. 結論

本研究により骨髄間葉系幹細胞から胎児心室筋型の心筋細胞が分化誘導出来ること、骨髄細胞由来の心筋細胞は *in vivo* の心筋細胞と同様にカテコラミン受容体を発現し、かつ機能を有していることが明らかとなった。これは細胞移植後の CMG 細胞が生体内でもカテコラミンに充分反応し、機能を調節し得るという点で重要な意味を持つ。また、心筋細胞のみの単離法の確立は分化誘導した細胞を移植用に用いるには最も重要なステップの一つであると考えられる。

F. 健康危険情報

本年度はヒトの細胞を用いた実験やヒトに対する移植実験は行っておらず、健康上問題

となる点は存在しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahiro Kato, Motoaki Sano, Shunichiro Miyoshi, Toshihiko Sato, Daihiko Hakuno, Hideyuki Ishida, Hiroe Kinoshita-Nakazawa, Keiichi Fukuda, Satoshi Ogawa. Calmodulin kinase-II, -IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circ. Res.* 87:937-945, 2000
2. Hiroaki Kodama, Keiichi Fukuda, Jing Pan, Motoaki Sano, Toshiyuki Takahashi, Takahiro Kato, Shinji Makino, Tomohiro Manabe, Mitsushige Murata, Satoshi Ogawa. Significance of Raf-1/MEK/ERK cascade compared with JAK/STAT and PI3-K pathway in gp130-mediated Cardiac Hypertrophy. *Am. J. Physiol.* 2000; 279:H1635-H1644
3. Motoaki Sano, Keiichi Fukuda, Hiroaki Kodama, Jing Pan, Mikiyoshi Saito, Junichi Matsuzaki, Toshiyuki Takahashi, Shinji Makino, Takahiro Kato, Satoshi Ogawa. IL-6 Family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *J. Biol. Chem* 2000: 275:29717-29723.
4. Motoaki Sano, Keiichi Fukuda, Hiroaki Kodama, Toshiyuki Takahashi, Takahiro Kato, Daihiko Hakuno, Toshihiko Sato, Tomohiro Manabe, Satoko Tahara, Satoshi Ogawa. Autocrine/Paracrine Secretion of IL-6 Family Cytokines Causes Angiotensin II-Induced Delayed STAT3 Activation. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2000:269:798-802.

2. 学会発表

1. Keiichi Fukuda Development of regenerated cardiomyocytes from mesenchymal stem cell for the cardiovascular tissue engineering. COE international Symposium 2001. 2001.02.09. Osaka, Japan (招待講演)
2. Keiichi Fukuda. IL-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rat cardiomyocytes. Gordon Research Conferences on Angiotensin in 2001. Ventura, CA, USA. 2001. 03.11-16. (招待講演)
3. Keiichi Fukuda Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. German cardiology Society. 2000. 4. (招待講演)
4. 第 65 回 日本循環器学会 AHA/JCA ジョイントシンポジウム Development of Cardiomyocyte for Cardiovascular Tissue Engineering. 福田恵一：平成 13 年 3 月 27 日 京都
5. 第 78 回 日本生理学会 シンポジウム福田恵一：平成 13 年 3 月 29 日 京都
6. 第 28 回 日本集中治療医学会 フロンティアセッション 福田恵一：心血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発。平成 13 年 3 月 8 日 東京
7. 第 30 回 日本創傷治癒学会 記念シンポジウム 福田恵一：心血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発。平成 12 年 12 月 9 日東京
8. 第 23 回 日本造血細胞移植学会 福田恵一：教育講演 骨髄からの心筋再生とその臨床応用 平成 12 年 12 月 8 日京都国際会議場
9. 第 13 回 日本動物細胞工学会 福田恵一：シンポジウム 平成 12 年 11 月 20 日福岡
10. 第 53 回 日本細胞生物学会 シンポジウム『細胞移植と細胞コミュニケーション』福田恵一：『心血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発』平成 12 年 10 月 31 日福岡
11. 第 4 回 日本心不全学会 プレナリーセッション Cardiac Signaling and its Therapeutic Use 平成 12 年 10 月 9 日神戸
12. 第 48 回 日本心臓病学会 サテライトシンポジウム『心筋細胞移植』心血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発。平成 12 年 9 月 12 日大阪
13. 第 73 回 日本組織培養学会 シンポジウム『細胞治療の基礎と応用』心血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発。平成 12 年 9 月 31 日岡山
14. 第 4 回 Molecular Cardiovascular Conference：指定講演「心血管 Tissue engineering を目指した再生心筋細胞の開発」：福田恵一：平成 12 年 9 月 2 日：北海道
15. 第 24 回 阿蘇シンポジウム：テーマ“発生・再生と医学”「再生心筋細胞を用いた心血管 issue engineering：福田恵一：平成 12 年 7 月 29 日：宮崎
16. 再生医工学推進シンポジウム：「組織再生のための細胞分化制御」心筋細胞：福田恵一：平成 12 年 7 月 7 日：東京
17. 第 21 回 日本炎症学会 ワークショップ：『心血管の tissue engineering』心血管 issue engineering を目指した再生心筋細胞の開発：福田恵一、伯野大彦、小西総子、牧野伸治、富田雄一、小川聡：平成 12 年

- 7月4日：東京
18. Hiroaki Kodama, Keiichi Fukuda, Eiichi Takahashi, Takahiro Kato, Daihiko Hakuno, Toshihiko Sato, Satoko Tahara, Yusuke Suzuki, Jun Fujita and Satoshi Ogawa. Endothelin-1 activates JNK through cytoskeleton-dependent p130Cas/Crk1/c-Src-mediated pathway in cardiomyocytes. 第65回日本循環器学会：平成12年3月25日：京都
 19. Takahiro Kato, Motoaki Sano, Shunichiro Miyoshi, Toshihiko Sato, Satoko Tahara, Hiroaki Kodama, Daihiko Hakuno, Yuichi Tomita, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Calmodulin kinase-II, -IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats. 第65回日本循環器学会：平成12年3月25日：京都
 20. Toshihiko Sato, Keiichi Fukuda, Motoaki Sano, Satoko Tahara, Takahiro Kato, Hiroaki Kodama, Haruko Kawaguchi, Eiichi Takahashi, Satoshi Ogawa. Reactive oxygen species modulate ET-1-induced cardiac hypertrophy through activation of Akt and p70S6K pathway. 第65回日本循環器学会：平成12年3月25日：京都
 21. Satoko Tahara, Keiichi Fukuda, Takahiro Kato, Shunichiro Miyoshi, Hiroaki Kodama, Toshihiko Sato, Yuichi Tomita, Satoshi Ogawa. Potassium Channel Blocker Activates Extracellular Signal Regulated Kinases via Pyk2 and EGF Receptor in Rat Cardiomyocytes. 第65回日本循環器学会：平成12年3月25日：京都
 22. Motoaki Sano, Keiichi Fukuda, Toshihiko Sato, Haruko Kawaguchi, Takahiro Kato, Satoko Tahara, Makoto Suematsu, Satoshi Matsuda, Shigeo Koyasu, Hideo Matsui, Keiko Yamauchi-Takahara, Satoshi Ogawa. ERK and p38MAPK, but not NF- κ B, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. 第65回日本循環器学会：平成12年3月25日：京都
 23. Toshiyuki Takahashi, Keiichi Fukuda, Jing Pan, Hiroaki Kodama, Takahiro Kato, Eiichi Takahashi, Satoko Tahara, Haruko Kawaguchi, Satoshi Ogawa. Analysis of the role and the upstream signals of LIF-induced p38MAPK activation in cardiomyocytes 第65回日本循環器学会：平成12年3月25日：京都
 24. Kensuke Kimura, Keiichi Fukuda, Motoaki Sano, Masaki Ieda, Toshihiko Sato, Daihiko Hakuno, Yasuyo Hisaka, Satoshi Ogawa. Disorder of neurocrine cross talk in the failing heart: Analysis of the expression of norepinephrine, NGF, trkA and sympathetic nerve terminal in monocrotaline-induced right ventricular failure 第65回日本循環器学会：平成12年3月25日：京都
 25. Takahiro Kato, Keiichi Fukuda, Shunichiro Miyoshi, Motoaki Sano, Kensuke Kimura, Eiichi Takahashi, Hiroaki Kodama, Satoko Tahara, Satoshi Ogawa, Calmodulin kinase-II and -IV mediate Insulin-like growth factor-1-induced cardiac hypertrophy in rats 第65回日本循環器学会：平成12年3月25日：京都
 26. 伯野大彦、富田雄一、小西総子、真鍋知宏、鈴木雄介、小川聡、福田恵一。

- 骨髄間質細胞由来の心筋細胞におけるカテコラミン・アセチルコリン受容体の発現および機能解析。心筋代謝研究会。平成 12 年 9 月：大阪
27. 富田雄一、伯野大彦、真鍋知宏、小西総子、小川聡、福田恵一：マウス骨髄間細胞由来の心筋芽細胞（CMG 細胞）におけるサイトカインの発現：第 21 回日本炎症学会：平成 12 年 7 月 5 日：東京
28. 高橋暁行、牧野伸司、福田恵一、小玉博明、佐野元昭、加藤隆弘、高橋栄一、真鍋知宏、佐藤敏彦、伯野大彦、潘静、堀進悟、小川聡：心筋細胞における IGF-1 刺激による STAT リン酸化の機序：第 64 回日本循環器学会：平成 12 年 4 月 2 日：大阪
29. 加藤隆弘、福田恵一、小玉博明、潘静、高橋暁行、佐野元昭、佐藤敏彦、伯野大彦、佐藤敏彦、富田雄一、小西総子、真鍋知宏、高橋栄一、小川聡：心筋細胞における Endothelin-1 による CaMK II を介したシグナル伝達機構の解析：第 64 回日本循環器学会：平成 12 年 4 月 3 日：大阪
30. 伯野大彦、福田恵一、牧野伸司、小西総子、高橋栄一、小玉博明、佐野元昭、高橋暁行、加藤隆弘、佐藤敏彦、真鍋知宏、田原聡子、富田雄一、小川聡：骨髄間質細胞由来の心筋細胞におけるカテコラミン受容体の発現および機能解析：第 64 回日本循環器学会：平成 12 年 4 月 3 日：大阪
佐藤敏彦、福田恵一、小玉博明、高橋栄一、佐野元昭、高橋暁行、加藤隆弘、伯野大彦、田原聡子、富田雄一、真鍋知宏、小西総子、小川聡、末松誠：endothelin-1 による NADH/NADPH 酸化酵素を介した心筋細胞内での H₂O₂ の生成と心肥大への関与：第 64 回日本循環器学会：平成 12 年 4 月 1 日
31. 田原聡子、福田恵一、小玉博明、高橋栄一、高橋暁行、佐野元昭、加藤隆弘、佐藤敏彦、伯野大彦、富田雄一、真鍋知宏、小西総子、小川聡：K チャンネル遮断薬は心筋細胞内 Ca²⁺の上昇、ERK の活性化を介し心肥大マーカー遺伝子を発現する：第 64 回日本循環器学会：平成 12 年 4 月 2 日：大阪
32. 真鍋知宏、福田恵一、小玉博明、高橋栄一、佐野元昭、高橋暁行、加藤隆弘、佐藤敏彦、伯野大彦、小西総子、富田雄一、田原聡子、小川聡：心肥大刺激はラット心筋細胞において zinc finger 型転写調節因子 cMG1/ERF-1 の発現を誘導する：第 64 回日本循環器学会：平成 12 年 4 月 3 日：大阪
33. 小玉博明、福田恵一、高橋暁行、佐野元昭、加藤隆弘、佐藤敏彦、伯野大彦、田原聡子、富田雄一、真鍋知宏、小西総子、高橋栄一、小川聡：心筋細胞における Gq 結合型受容体(GqCR)を介した EGFR,Pyk2,c-Src の活性化と ERK 活性化に至る経路の解析：第 64 回日本循環器学会：平成 12 年 4 月 3 日：大阪
34. Keiichi Fukuda. Stem cells and Heart Formation. Perspectives to studies on Myogenesis and Therapeutics of Muscular Diseases. A Workshop on Muscular Distrophy. March 22, 2001. in Kyoto, Japan
35. Takahiro Kato, Hiroaki Kodama, Toshiyuki Takahashi, Motoaki Sano, Toshihiko Sato, Satoko Tahara, Tomohiro Manabe, Eiichi Takahashi, Mitsushige Murata, Keiichi Fukuda. Calmodulin Kinase-II, -IV and Calcineurin Are

- Activated by Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Via Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release, and Are Involved in GP130-Mediated Cardiac Hypertrophy. 73rd Scientific meeting New Orleans LU, USA 2000.11. 骨髓由来細胞
36. Satoshi Gojo, Hiroaki Tanabe, Noriko Gojo, Keiichi Fukuda, Jun-Ichi Hata, Shunei Kyo, Akihiro Umezawa, Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation into the Pulmonary Vasculature after Gene Modification. 73rd Scientific meeting New Orleans LU, USA 2000.11.
37. Prospective Identification of Cardiomyocyte Progenitors in Cardiomyogenic (CMG) Cell Line and Their Application to Cell-Transplantation. - Naoichiro Hattan, Kiyoshi Ando, Akihiro Umezawa, Hiroko Miyatake, Satoko Konishi, Hirofumi Kasahara, Etsuro Tanaka, Keiichi Fukuda 73rd Scientific meeting New Orleans LU, USA 2000.11.
38. Toshihiko Sato, Motoaki Sano, Takahiro Kato, Kensuke Kimura, Satoko Tahara, Makoto Suematsu, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda Reactive oxygen species modulates ET-1-induced cardiac hypertrophy through activation of Akt and p70s6k pathway. 10th Biennial Meeting of the International Society for Free radical research. 2000.10.16-20. Kyoto

H. 研究成果による特許権等の知的財産権の
取得状況

特許出願番号： 11-372826

特許出願日： 平成 11 年 12 月 28 日

特許出願タイトル：心筋形成能を有する生体