

200/0479

厚生科学研究研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業
血管新生と血管保護療法の開発に関する研究
(H12-再生-006)

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 永井 良三

平成 14 (2002) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	3
血管新生と血管保護療法の開発に関する研究 永井良三	
II. 分担研究報告	
1. 血管保護療法に関する研究 永井良三	11
2. 遺伝子を導入した細胞移植による血管新生の促進療法に関する研究 宮田哲郎	13
3. 血管保護療法に関する研究 山崎 力	16
4. 血管保護療法と血管新生の促進療法に関する研究 佐田政隆	18
5. 遺伝子導入による血管新生の促進療法に関する研究 森下竜一	21
6. 細胞移植による血管新生療法に関する研究 室原豊明	23
7. 遺伝子導入による血管新生の抑制療法に関する研究 上野 光	24
8. 細胞移植による血管新生療法に関する研究 松原弘明	27
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29

總 括 研 究 報 告 書

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

血管新生と血管保護療法の開発に関する研究

主任研究者 永井良三 東京大学大学院医学研究科（循環器内科）教授

研究要旨 虚血性疾患に対する新規治療法として、（１）自家骨髄移植による血管新生療法を開発し臨床治験を開始した。（２）遺伝子導入による血管新生の促進と抑制療法を開発した。肝細胞増殖因子を用いた血管新生療法は近日中に臨床応用開始予定である。（３）スタチン系の薬剤ならびにプロスタサイクリンが血管新生を促進することを明らかにその分子機構を解明した。（４）遺伝子を用いた各種の血管保護療法を開発した。E2F デコイを用いた血管形成術後の再狭窄予防に関する臨床治験を開始した。また老化関連遺伝子 klotho が血管内皮保護作用を持つことを明らかにした。

永井良三
東京大学大学院医学研究科・循環器内科、教授
宮田哲郎
東京大学大学院医学研究科・血管外科、講師
山崎 力
東京大学医学部薬剤疫学講座、助教授
佐田政隆
東京大学医学部附属病院・循環器内科、医員
森下竜一
大阪大学大学院医学系研究科・遺伝子治療部、助教授
室原豊明
久留米大学循環器病研究所、講師
上野 光
産業医科大学医学部病態医化学、教授
松原弘明
関西医科大学第二内科、助教授

A. 研究目的

血管新生は、虚血性心疾患、閉塞性動脈硬化症、癌、糖尿病性網膜症などの病態形成に密接に関与する。近年、この考えを基にして、血管再生や血管新生の面から難治性疾患に対する治療法が提唱されるようになった。血管新生・再生だけでなく、血管内皮保護も動脈硬化予防と循環障害改善に重要である。そこで本研究は、血管新生・再生・保護を制御する血管医学の展開をはかり、これを応用した虚血性心疾患、血行再建術後再狭窄、閉塞性動脈硬化症、心筋症、癌などに対する新しい治療法の開発を目的とする。本研究の成果は、虚血性疾患の患者の生命予後、QOL を改善すると考

えられる。また、従来から行われてきたバイパス手術や経皮的血管形成術といった高額医療の代替療法として普及し、医療費の削減に貢献すると期待される。

B. 研究方法

(1) 骨髄細胞移植による血管新生療法の臨床治験

外科的、内科的治療が無効な Fontaine Ⅱ-、度の重症下肢虚血疾患患者（45人）を対象にする。自己骨髄を 500ml 採取したのち、単核球成分を分離し濃縮したのち、約 10 億個の細胞を虚血肢 40 箇所筋肉内注射する。治療効果と副作用を検討する。

(2) 肝細胞増殖因子(HGF)遺伝子導入による血管新生両方の臨床治験

Fontaine Ⅱ-、度の重症下肢虚血疾患患者（6名）を対象にする。ヒト HGF 発現プラスミド(0.5 mg + 2mg + 2mg) を 3 回に分けて虚血肢に筋肉内注射する。治療効果と副作用を検討する。

(3) 血管リモデリングにおける BTEB2 の役割の検討

BTEB2 遺伝子欠損マウスを作製し、各種の血管リモデリングモデルを施す。血管傷害として大腿動脈のカフ留置、血管新生として下肢虚血、腫瘍移植モデルを用いる。更にアンギオテンシ

ン II 持続投与モデルにおける心肥大、心線維化を検討する。また、BTEB2 の機能を修飾する薬物療法を開発する。

(4) 薬物を用いた血管新生促進療法の開発

マウスの下肢虚血モデルにおいて、側副血流発達に対するスタチン系薬剤、インスリン抵抗性改善薬などの効果を検討する。

(5) Klotho を用いた血管保護療法の開発

Klotho を遺伝子もしくは組み換え型蛋白として投与し血管保護作用を検討する。

(倫理面への配慮)

ヒトへの臨床試験は各大学の倫理委員会で承認されたうえで試行する。遺伝子を用いた臨床試験では、厚生労働省と文部科学省で審議され承認されたのち施行する。また、患者から書面でのインフォームドコンセントを得る。基礎的検討においては、既に確立された細胞と実験動物疾患モデルを用いる。動物は換気、給餌等の完備した施設で飼育し、学内もしくは研究所内の規定に適合する条件で実験を行うため倫理的な問題はない。

C. 研究結果

(1) 骨髄細胞移植による血管新生療法

室原と松原は、久留米大学、関西医科大学、自治医科大学の多施設で自己骨髄細胞移植療法を施行した。約70%の患者で有効性を認めている。現在までに45人中31人で下肢の血圧が1月後に10mmHg以上上昇し、トレッドミル歩行距離は約2.9倍以上増加し、下肢の疼痛は45人中39人で消失した。虚血部潰瘍の治癒は18人中11人でみられた。腓腹筋注射部位の炎症・浮腫は認めず、血中のVEGF・FGF濃度、単核球細胞数は変化しなかった。

(2) HGF 遺伝子を用いた血管新生療法

森下は、HGF 遺伝子によるヒト遺伝子治療臨床研究を2001年6月より開始し、現在までに6人の閉塞性動脈硬化症およびビュルガー病患者にヒトHGF 遺伝子を投与した。血管の増強が確認され

る一方、全例で0.1以上のABI改善もしくは疼痛の改善においてもVASスケールで1cm以上の改善を認めている。一方で、VEGF 遺伝子治療で見られた投与部位の浮腫は認められなかった。HGF 遺伝子を用いた閉塞性動脈硬化症の治療は、現在までの成績ではVEGF 遺伝子治療より有効性が高く、安全性に優れる可能性が示された。

(3) 遺伝子変異マウスを用いたBTEB2機能解析
永井はBTEB2 遺伝子欠損マウスを解析した。BTEB2 が血管のリモデリングをはじめとして免疫系、消化器系などの生体反応で重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、BTEB2 の機能を修飾する薬物を同定した。

(4) 薬物を用いた血管新生療法

佐田と山崎は、スタチン系高脂血症治療薬が虚血後の血管新生を促進するものの、癌や動脈硬化に伴う病的血管新生は促進しないことを明らかにした。さらに、インスリン抵抗性改善薬が糖尿病マウスの血管内皮機能を改善させ側副血行路形成能を亢進させることを解明した。

(5) Klotho を用いた血管保護療法の開発

永井は、Klotho の遺伝子導入が血管内皮機能を改善することを明らかにした。

(6) 遺伝子導入した自己細胞移植による血管新生療法の開発

宮田は、アデノウイルスベクターを用いたex vivo法によるbFGF 遺伝子の遺伝子導入による血管新生療法を開発した。前臨床試験として、治療に最適な移植細胞数を同定した。また、ブタの狭心症モデルにおいて、有意な側副血行路の発達と虚血部位における心機能の改善がえられることを明らかにした。

(6) 腫瘍血管新生抑制療法の開発

上野は、血管新生因子に対する可溶性受容体を用いた抗腫瘍血管新生療法を開発した。可溶性VEGF受容体が無効であった腫瘍では可溶性FGF受容体の導入により腫瘍発育がほぼ完全に抑制されることを明らかにした。

D. 考察

今年度の研究計画はほぼ達成できた。世界に先駆けて、骨髄細胞移植もしくは、HGF 遺伝子を用いた血管新生療法の臨床試験を行った。いずれの治療法も安全で有効であることが明らかとなった。今後、長期成績を検討する。また、多施設での二重盲検試験を行い有効性を確認する。

平滑筋細胞の脱分化に関与する転写因子として単離された BTEB2 が様々な臓器リモデリングに関与していることが明らかとなった。今後 BTEB2 を標的とした治療法を開発していく。

E. 結論

虚血疾患の新規治療法として血管新生療法、血管保護療法を考案し、臨床試験を行った。有望な初期成績を得ており、今後の研究の進展が期待される。今後、心疾患治療への応用を計画する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

分担報告書参照

学会発表

分担報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

- ・ 永井：BTEB2/IKLF 欠損による病態に対する特定のレイチノイド系化合物の回復作用（申請予定）
- ・ 佐田：「カテーテルを兼用する医療用ガイドワイヤー」国際特許出願 PCT/JP01/04940
- ・ 佐田：「臓器移植後拒絶反応としての移植後動脈硬化症の予防および/または治療剤」特願 2001-337861

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分 担 研 究 報 告

研究要旨

血管平滑筋細胞活性化に関連する転写因子 BTEB2 の遺伝子変異マウスを樹立し、心血管病態モデルの検討から BTEB2 の転写制御機構を検討した。更に BTEB2 の機能を制御する薬物をスクリーニングし、転写因子を標的とした新たな血管保護療法を検討した。また、個体老化を抑制する新規遺伝子 Klotho の分子機能を明らかとし、Klotho 遺伝子あるいはタンパク質の効果的な生体内投与方法に関する研究を行った。

A. 研究目的

血管平滑筋細胞脱分化促進因子 BTEB2 の転写制御機構を解析し、BTEB2 の機能を修飾する薬剤をスクリーニングする。

老化関連遺伝子 Klotho の血管内皮細胞への保護作用を検討し、その分子機序を解明する。更に Klotho 発現ベクターならびに蛋白産生システムを確立する。

以上を血管新生と血管保護療法開発に応用する。

B. 研究方法

(1) 遺伝子変異マウスを用いた BTEB2 機能解析

BTEB2 遺伝子変異マウスにおいて、血管傷害モデルを作成し、血管リモデリング応答について検討する。血管新生能の検討として、大腿動脈結紮による下肢虚血モデル、腫瘍移植モデルなどにおける血管の形成を laser Doppler 法による血流計測、組織内毛細血管密度により評価する。更にアンジオテンシン II 持続投与モデルにおける心肥大、心線維化を検討する。

(2) Klotho 遺伝子を用いた血管保護療法の開発

膜型 Klotho アデノウイルスを作製する。これを Klotho 遺伝子変異マウスに導入後、大動脈の血管張力測定を行う。更にヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に遺伝子導入を行い、PI3K、リン酸化 Akt などの細胞内シグナルを検討する。次に Klotho をバキュロウイルストランスファーベクターに組み込み、バキュロウイルス DNA と共に Sf9 にトランスフェクションすることにより、組み換えバキュロウイルスを作製する。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱い、東京大学動物実験施設の実験動物取り扱い規定に基づき行い、また動物愛護に配慮して実験を行う。特に、動物への計測機器の装着は、苦痛を与えない様麻酔下で行う。覚醒動物実験では、使用動物数並びに刺激負荷時の動物への苦痛を最小限に留めるよう注意を払う。

C. 研究結果

(1) 遺伝子変異マウスを用いた BTEB2 機能解析

大腿動脈カフ傷害モデルでは、BTEB2^{+/-}において、炎症に伴う線維性組織の増殖、新生内膜形成、外膜における反応性微小血管の形成が低下していた。更に、下肢動脈結紮モデルでは、BTEB2^{+/-}にて血流回復の遅延が認められ、BTEB2 が虚血に伴う血管新生に関与している可能性が示された。

持続的アンジオテンシン II 負荷試験では、野生型で

は心筋細胞の肥大と間質線維化、冠動脈周囲線維化が認められたが、BTEB2^{+/-} マウスでは、いずれの反応も著明に低下していた。

(2) Klotho 遺伝子を用いた血管保護療法の開発

膜型 Klotho アデノウイルスでは、野生型と同程度まで、内皮弛緩反応が改善したが、5'側の配列のみを発現するアデノウイルスでは、改善が認められなかった。HUVEC への Klotho 発現アデノウイルス導入実験において Akt リン酸化の増強が認められた。組み換えバキュロウイルスを浮遊培養した Sf9 細胞に感染させ、上清中のウイルス分画から、Klotho 蛋白を精製に成功した。

D. 考察

(1) BTEB2 ノックアウトマウスの解析から BTEB2 が単に平滑筋細胞の活性化だけでなく、細胞免疫や血管新生を正に制御する事を明らかにした。

(2) Klotho 遺伝子変異マウスの検討に加え、Klotho 遺伝子導入実験から、Klotho が血管内皮の恒常性維持や、血管リモデリングに関与する可能性が示唆された。

E. 結論

BTEB2 が、臓器傷害後に誘導される線維芽細胞、平滑筋細胞、免疫系細胞の活性化と増殖、その結果としての肉芽形成、線維化、血管新生、ひいては臓器リモデリングを制御している重要な転写因子であることが

明らかとなった。今後 BTEB2 の機能を制御する薬物をスクリーニングし、BTEB2 遺伝子改変マウスを疾患モデルとして利用することで、転写因子を標的とした新たな治療法開発に貢献する事が期待される。また Klotho は血管内皮機能を保護する液性因子であることが明らかとなった。今後 Klotho 蛋白を活性化する分子をスクリーニングし、血管内皮機能の保護という立場から循環器疾患を予防・治療する薬剤の同定を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Mitani H, et al. Angiotensin II downregulates renal expression of anti-aging gene, klotho, and klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension in press.*
- ・ Fukino K, et al. Regulation of Angiogenesis by the Aging Suppressor Gene klotho. *Biochem Biophys Res Commun in press.*
- ・ Sata M, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular progenitor cells that contribute to atherosclerosis. *Nature Med in press*
- ・ Oyama Y, et al. PPAR γ ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells. *Circ Res.* 90:348-355, 2002.
- ・ Maeno T, et al. Stimulation of vascular endothelial growth factor gene through Sp1 and Sp3 sites in human bronchioloalveolar carcinoma cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26: 246-253, 2002
- ・ Aizawa T, et al. Angiotensin II and catecholamines increase plasma levels of 8-epi-prostaglandin F(2 α) with different pressor dependencies in rats. *Hypertension.* 39: 149-154, 2002
- ・ Ishizaka N, et al. Regulation and localization of HSP70 and HSP25 in the kidney of rats undergoing long-term administration of angiotensin II. *Hypertension.* 39: 122-128, 2002
- ・ Ishizaka N, et al. Abnormal iron deposition in renal cells in the rat with chronic angiotensin II administration. *Lab Invest.* 82: 87-96, 2002
- ・ Sato M, et al. Inducible expression of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia in human lung adenocarcinoma A549 cells. Role of Src family kinases-dependent pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26: 127-134, 2002
- ・ Iwasaki T, et al. Immunoscintigraphy of aortic dissection with 99mTc-labeled murine anti-smooth muscle myosin monoclonal antibody in rats. *J Nucl Med* 42: 130-137, 2001
- ・ Saiura A, et al. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nature Med* 7: 382-383, 2001
- ・ Ogata T, et al. Inducible expression of basic transcription factor binding protein 2 plays a potential role in the development of the allograft vascular disease. *J Heart Lung Transplant* 20: 228, 2001

- ・ Morita H, et al. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese: An approach entailing melting curve analysis with specific fluorescent hybridization probes. *Thromb Haemost* 85: 226-230, 2001
- ・ Nakajima A, et al. Endogenous PPAR γ mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology* 120: 460-469, 2001
- ・ Sekiguchi K, et al. Homeobox protein hex induces SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain-B gene expression through the cAMP-responsive element. *Circ Res* 88: 52-28, 2001
- ・ Kanai H, et al. Transforming growth factor- β /Smads signaling induces transcription of the cell type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 88: 30-36, 2001
- ・ Morita H, et al. Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates neointima formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Circulation* 103: 133-139, 2001
- ・ Nagai R, et al. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells: dissection of transcriptional regulatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 947: 56-66, 2001
- ・ Yamagishi T, et al. Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors. *Hypertens Res.* 2001 24:705-9.
- ・ Manabe N, et al. Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J Immunol.* 2001;167:2625-31.

2. 学会発表

- 2001. 10. 1 International Society for Heart Research 秋田シンポジウム: Pathophysiological assessment of transcriptional factor IKLF/BTEB2 by gene targeting. 新藤隆行
- 2001. 11. 5 第4回 日本血管細胞生物学会 福岡 転写因子 IKLF/BTEB2 の病態における意義: ノックアウトマウスによる検討 新藤隆行

G. 知的財産権の出願、登録状況 特になし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等）
分担研究報告書

遺伝子を導入した細胞移植による血管新生の促進療法に関する研究

分担研究者 宮田 哲郎 東京大学医学部血管外科講師

研究要旨 本研究では慢性虚血肢に対する新しい血管新生療法として、アデノウイルスベクターを用いた ex vivo 法による basic fibroblast growth factor (bFGF) 遺伝子の遺伝子導入療法の実用化に関して検討した。本法による虚血肢における血管新生効果については昨年度の研究で既に明らかにしたため、今年度は投与する細胞数による効果と安全性の評価を行った。ウサギ下肢慢性虚血モデルにおいて投与細胞数が 5×10^6 個未満の場合、対照と比べて有意な血管新生効果は得られなかった。また 5×10^6 個以上の投与では血管新生効果が認められたものの、過剰な細胞投与では投与直後の下肢血圧比の低下や、過剰分の細胞の肺への集積が認められるなど副作用の発生を危惧させる状態となることが明らかになった。一方、このプロトコルをブタの狭心症モデルに適応したところ、有意な側副血行路の発達と虚血部位における心機能の改善がえられ、本法の虚血性心疾患への応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

昨年度、我々は重症虚血肢に対する新しい血管新生療法としてアデノウイルスベクターを用いた bFGF 遺伝子の ex vivo 導入法を開発した。シグナル配列付の bFGF 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを宿主より採取培養した線維芽細胞に感染させ bFGF の分泌能を付与し、その細胞を虚血肢に分布する動脈内にカテーテルを用いて投与するというプロトコルである。ウサギ下肢慢性虚血肢モデルを用いて in vivo の効果を検討した結果、 5×10^6 個の bFGF 分泌線維芽細胞の虚血側内腸骨動脈への投与により、投与細胞の虚血肢における有意な蓄積と投与後 28 日目での有意な側副血行路の発達を確認することができた。そこで本年度は投与する細胞数を変化させることにより、(1)投与細胞の体内分布(2)側副血行路の発達(3)副作用の出現にそれぞれ影響を及ぼすか否かについてウサギ虚血肢モデルを用いて検討した。またこのプロトコルの虚血性心疾患治療への応用の可能性を検討するため、ブタの狭心症モデルを作成して遺伝子導入線維芽細胞を冠動脈内に注入しその効果を観察した。

B. 研究方法

投与細胞数に関する検討（ウサギ下肢慢性虚血モデル）

実験の 21 日前に予め雄性日本白色ウサギ(3-3.5kg)の左大腿動脈を全長にわたり切除して虚血状態を作成した。同時に同一個体より採取した皮膚片より線維芽細胞を分離培養した。実験前日にこの培養線維芽細胞に 20pfu/cell の濃度で bFGF 遺伝子組み込みアデノウイルス（第一世代）を感染させた。この bFGF 遺伝子には IL-2 の分泌シグナルが付加されており、遺伝子導入された細胞は bFGF 蛋白を細胞外に分泌する能力を付与される。この遺伝子導入された線維芽細胞を虚血側の内腸骨動脈より動脈注射するのだが、動注細胞数を 2×10^5 個、 1×10^6 個、 5×10^6 個、 2.5×10^7 個とした 4 群に加え、投与しない対照群を作成した。動注 28 日後、下肢血圧比測定、血管造影(angiographic score)、内腸骨動脈血流量測定の後、ウサギを殺処分としサンプルを採取し大腿筋における組織内毛細血管密度を測定した。また線維芽細胞を Indium-111 でラベルし動注して投与細胞の体内分布を検討した。ブタ狭心症モデルでの検討

実験の 28 日前に予め雄性 LWD ブタ(30kg)の左回旋枝根部を肋間開胸下に剥離露出しアメリロイドコンストラクターを装着した。これに

より回旋枝は徐々に閉塞していくため大きな心筋梗塞をおこすことなく 28 日後にはほぼ閉塞し重症の狭心症状態となる。また同一個体より採取した皮膚片より線維芽細胞を分離培養する。実験前日にこの培養線維芽細胞に対し前記と同様に bFGF 遺伝子組み込みアデノウイルスを感染させ、カテーテルによって右冠動脈及び左前下行枝に 2.5×10^6 個ずつ注入した (bFGF 群)。対照としては LacZ 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを用いて同様の操作を施行した (対照群)。注入後 28 日目に心エコー、冠動脈造影、NOGA システムによる心臓の electromechanical mapping、マイクロスフィアによる局所血流の評価を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験はすべて東京大学医学部附属動物実験施設において同施設の実験動物取り扱い規則に従って施行された。またウイルスによる遺伝子導入は東京大学旧第一外科 P2 レベル実験室で、また動物への投与は動物施設内の中大動物用 P2 レベル実験室で行った。Indium を用いた実験は東京大学 RI 総合センターで施行した。

C. 研究結果

投与細胞数に関する検討 (ウサギ下肢慢性虚血モデル)

- (1) 線維芽細胞動注によって 2.5×10^7 個の細胞を投与した群では動注直後に有意な下肢血圧比の低下を認めたが、他の群では有意な変化はなかった。
- (2) 細胞投与後 28 日目においては 2×10^5 個と 1×10^6 個投与された群では対照と比べて下肢血圧比の有意な変化はなかったが、 5×10^6 個、 2.5×10^7 個投与群は有意に改善していた。しかし、 5×10^6 個と 2.5×10^7 個投与群の間には有意差は認められなかった。
- (3) 血管造影による angiographic score、内腸骨動脈血流量測定、筋肉内毛細血管密度はいずれにおいても 2×10^5 個と 1×10^6 個

投与された群では対照と比べて有意な変化は認められなかったが、 5×10^6 個、 2.5×10^7 個投与群は有意に改善していた。そして同様に 5×10^6 個と 2.5×10^7 個投与群の間には有意差は認められなかった。

(4) Indium ラベルされた線維芽細胞は 5×10^6 個までの投与なら全身のうち左下肢にのみ有意に集積していたが、細胞投与数が 2.5×10^7 個となると肺に集積する細胞数が増加する事が明らかになった。

(5) 遺伝子導入線維芽細胞を 2.5×10^7 個投与された群においては他の群と比較して投与後における血中抗アデノウイルス抗体の有意な増加が認められた。

(6) 細胞投与後、定期的に採血したサンプルの血算、生化学検査では大きな以上を示すデータは得られなかった。

ブタ狭心症モデルでの検討

(1) 右冠動脈及び左前下行枝へのそれぞれ 2.5×10^6 個ずつの細胞投与により、投与直後における心電図変化や酵素値の変化は惹起されなかった。

(2) 心臓エコーによる EF 測定では bFGF 群は対照群と比べ有意な改善が認められた。

(3) 冠動脈造影はレントロースコアにより評価したが、左冠動脈造影では両群間に差異は認められなかったが、右冠動脈造影では bFGF 群が対照群と比べ有意に改善していた。

(4) NOGA システムでは心機能を反映する %LS と心筋細胞の viability を反映する UpV を測定した。%LS は左回旋枝の支配領域において bFGF 群が対照群と比べ有意に改善していた。しかし UpV では変化は認められなかった。

(5) マイクロスフィア検査でも左回旋枝の支配領域の虚血部位においてのみ有意な血流の増加が認められたが、その他の領域では変化はなかった。

D. 考察

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等）
分担研究報告書

我々の開発した *ex vivo* 法を用いた血管新生療法はウサギ下肢慢性虚血モデルを用いた検討では、その効果を得るためには一定以上の細胞の投与が必要なことが明らかになった。また過剰な細胞投与をするとその過剰分は静脈系に流れだし主に肺に集積してしまい、予期せぬ副作用の原因となる可能性があること考えられた。従って、副作用を回避し且つ有効な血管新生効果を期待した場合、細胞の投与量は割合制限されたものとなることが示唆された。

一方、ブタ虚血心を用いた検討では本プロトコルは側副血行路の発達を促し心機能の改善に有効に作用することが明らかになった。

D. 結論

本研究で検討された新しい血管新生療法は有効で安全な治療を実現するためには、投与する細胞数に注意すべき必要がある。また本法は虚血性心疾患の治療にも有効であった。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ohara N et al. Adenovirus-mediated *ex vivo* gene transfer of basic fibroblast growth factor for therapeutic angiogenesis. *Gene Therapy* 2001,8, 837-845.
- (2) Ishii S et al. Appropriate control of *ex vivo* gene therapy delivering basic fibroblast growth factor promotes successful and safe development of collateral vessels. *Human Gene Therapy*, in submission.
- (3) Ninomiya M et al. *Ex vivo* gene transfer of basic fibroblast growth factor promotes coronary collateral development and improvement of cardiac function in a swine model of chronic myocardial ischemia. *Gene Therapy*, in submission.
- (4) 宮田哲郎 他、血管の再生医療、呼吸と循環、2002,50,377-383.
- (5) 宮田哲郎 他、Adenovirus vector を用い

た bFGF 遺伝子の *ex vivo* 導入による血管新生治療、脈管学、印刷中

2. 学会発表

- (1)宮田哲郎 他、Adenovirus vector を用いた bFGF 遺伝子の *ex vivo* 導入による血管新生治療、2001 年日本脈管学会
- (2)二宮幹夫 他、新しい *ex vivo* bFGF 遺伝子導入法による血管新生療法の臨床応用、2001 年日本心臓血管外科学会

F. 知的所有権の取得状況

特許出願中

小山博之 他、血管新生を促進するための新規な方法、特願 2001-356765 号

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

血管保護療法に関する研究

分担研究者 山崎 力 東京大学医学部・薬剤疫学講座 助教授

研究要旨

平滑筋細胞の脱分化形質転換に転写因子 BTEB2 が中心的役割を担っていることを明らかにした。BTEB2 の機能調節機構を解明するため、BTEB2 の転写活性に対するアセチル化の影響を検討した。また、BTEB2 と相互作用する因子を同定した。BTEB2 に対するアンチセンスベクターならびに DNA 酵素を作製し、BTEB2 を標的とした血管保護療法の開発を試みている。また、スタチン系高脂血症治療薬が虚血後の血管新生を促進することを動物実験で明らかにした。さらに、骨髄由来の幹細胞が血管病変形成に寄与することを解明した。

A. 研究目的

虚血疾患の治療法として、血管新生療法が注目されている。その多くは内皮細胞に対する増殖因子を蛋白ないし遺伝子で過剰に投与する方法である。その有効性が報告されると同時に血管新生の増強による癌、糖尿病性網膜症、動脈硬化症の増悪が懸念されている。本研究では薬剤による血管新生促進効果を検討する。また、傷害血管の増殖平滑筋細胞で活性化が認められる転写因子 BTEB2 の作用機構を分子レベルで検討する。

B. 研究方法

(1) 薬物を用いた血管新生促進療法の開発

C3H/HeN マウスの大腿動脈を結さつ切離し、下肢虚血モデルを作製する。手術3日前から生食もしくはセリバスタチン(6mg/kg/日、皮下)を連日投与する。虚血下肢への血流回復をレーザードップラー血流計を用いてモニターする。5週目に大腿筋を採取し抗 CD31 染色を用いて毛細血管密度を計測する。また、薬効の機序を解明するため、セリバスタチン投与三日後のマウス大動脈を摘出し、Ach を用いて内皮依存性の血管弛緩反応を測定する。さらには、内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)欠損マウスを用いて、セリバスタチンの血流改善促進作用を評価する。

(2) BTEB2 の転写活性機序の解明

BTEB2 発現プラスミドを用いて、共トランスフェクションした胎児型ミオシン重鎖ならびに組織因子のプロモーター活性化能を測定する。この実験系においてアセチル化剤の効果の評価する。酵母 Two-Hybrid 法にて、BTEB2 の DNA 結合領域 DNA をエサ(bait)としてヒト白血球 cDNA ライブラリーをスクリーニングする。また、BTEB2 を大腸菌に発現させ、カラムを用いて精製する。この組換え型 BTEB2 に C2/2 細胞の核抽出液を結合させ、imidazole を用いて溶出する。二次元電気泳動ゲルの銀染色を施行し、特異的スポットを切り出す。TOF-MS/MS システムによりアミノ酸配列を決定する。

さらに、BTEB2 の発現を低下させる手段としてアンチセンスアデノウイルスベクター、DNA 酵素を作製する。細胞を用いてその有効性を確認したうえで、血管病に対する遺伝子治療法を確立する。また、BTEB2 の三次元構造を決定したうえで、その拮抗薬を開発する。

(倫理面への配慮)

本研究では既に確立された細胞と実験動物疾患モデルを用いて検討する。動物は換気、給餌等の完備した施設で飼育し、学内もしくは研究所内の規定に適合する条件で実験を行うため倫理的な問題はない。

C. 研究結果

(1)スタチン系薬物による血管新生促進作用

高脂血症治療薬である HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるセリバスタチンの投与により虚血肢の血流回復が有意に促進された。また、セリバスタチンの投与により大動脈の内皮依存性弛緩反応が著明に増強された。eNOS 欠損マウスでは、セリバスタチンによる血流改善効果が認められなかった。以上より、スタチン系薬剤は、内因性一酸化窒素合成酵素を活性化することで虚血後の血流回復を促進していることが解明された。

(2) BTEB2 の転写促進機序の解明

BTEB2 のアセチル化は胎児型ミオシン重鎖ならびに組織因子のプロモーター活性化能を増強した。また、その作用は co-activator p300 によって相乗的に亢進した。酵母 Two-Hybrid 法による検索により、BTEB2 相互作用因子として DNA トポイソメラーゼ II 結合蛋白、MAPKKK をはじめとして計 19 個のクローンを単離した。また、組み換え型 BTEB2 と試験管内で結合する蛋白を抽出した。TOF-MS/MS システムによりアミノ酸配列を決定したところ、数種類の因子を同定した。各因子の結合による BTEB2 の機能制御の意義を現在解析中である。

BTEB2 の発現を制御する手段として BTEB2 に対するアンチセンスアデノウイルスベクターならびに DNA 酵素を作製した。細胞を用いた in vitro の系でその有効性を確認した。現在血管病治療への応用を in vivo モデルで検討中である。また、BTEB2 の三次元構造を決定し、拮抗薬を開発中である。

D. 考察

大規模試験で、スタチン系の薬剤は正常コレステロール患者の心血管事故発症率、死亡率を低下させることが明らかになっている。本研究で明らかとなった、虚血後の血管新生促進作用はその臨床効果の一因であると思われる。

BTEB2 による転写制御にそのアセチル化が重要

であることを明らかにすると同時に、BTEB2 の相互作用因子を同定した。また、BTEB2 に対するアンチセンスアデノウイルスベクターや DNAzyme を開発した。平滑筋細胞形質転換因子である BTEB2 の機能制御機構を解明した。その機能への介入は今後有効な血管保護療法の開発に貢献すると期待される。

E. 結論

薬剤を用いた新規の血管新生療法を開発した。臨床研究への発展が期待される。平滑筋細胞の脱分化形質転換に重要な転写因子 BTEB2 の機能調節機構を解明した。BTEB2 を標的とした血管保護療法を開発中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(論文)

1. Zou Y, Nagai R, Yamazaki T. Urotensin II induces hypertrophic responses in cultured cardiomyocytes from neonatal rats. *FEBS Lett.* 2001 508:57-60.

(学会発表)

1. 山崎 力、林 同文多施設研究プロジェクトデータによる正常者脈波伝播速度の解析結果 第一回臨床動脈波研究会：平成 13 年 5 月 19 日東京（記録集作製中）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

血管保護療法と血管新生の促進療法に関する研究

分担研究者 佐田政隆 東京大学医学部附属病院（循環器内科）医員

研究要旨 血管病変で認められる平滑筋細胞に骨髄、しかもその一部は造血幹細胞を起源にしていることを明らかとした。スタチン系高脂血症治療薬が虚血後の血管新生を促進することを動物実験で明らかにした。さらに、インスリン抵抗性改善薬が糖尿病マウスの血管内皮機能を改善させ側副血行路形成能を亢進させることを解明した。

A. 研究目的

虚血性疾患の治療として冠動脈形成術やバイパス手術が広く行われるようになった。しかし、多くの症例で再狭窄や再閉塞が生じる。また、臓器移植が行われるようになったが移植後動脈硬化症によって予後が制限される。このような、増殖性血管病の病態で中心的役割を担う平滑筋細胞蓄積の機序を解明し、より有効な治療法の開発を目指す。

一方、血行再建術不能なび慢性虚血疾患患者に対して側副血行路の発達を促す「治療的血管新生療法」が注目されている。血管新生療法として内皮細胞に対する増殖因子を蛋白もしくは遺伝子として投与方法が行われているが、癌、糖尿病性網膜症、動脈硬化などに伴う血管新生を促進する危険性が指摘されている。また、米国で行われている臨床試験では、反応不良例が問題視されている。本研究では、虚血領域への側副血流量を増加するための薬物療法の可能性を検討した。

B. 研究方法

(1) 血管病変で認められる平滑筋細胞の起源に関する研究

！野生型マウスと LacZ マウスとの間で異所性心臓移植を行った。また、野生型マウスの骨髄を LacZ マウスもしくは GFP マウスの骨髄で置換したのち野生型マウスの心臓を移植した。” LacZ マウスから野生型マウスへ骨髄移植を行い、大腿動脈にワ

イヤーによる傷害を加えた。③GFP マウスもしくは LacZ マウスの骨髄を高脂血症マウスに移植した。

④ソーターを用いて骨髄の分画化をおこない、平滑筋細胞を生み出しうる細胞群の同定を試みた。

(2) 薬物を用いた血管新生促進療法の開発

C3H/HeN マウスの大腿動脈を結さつ切離し、下肢虚血モデルを作製した。手術3日前から生食もしくはセリバスタチン(6mg/kg/日、皮下)を連日投与し、虚血下肢への血流回復をレーザードップラー血流計を用いてモニターした。5週目に大腿筋を採取し抗 CD31 染色を用いて毛細血管密度を計測した。また、薬効の機序を解明するため、セリバスタチン投与三日後のマウス大動脈を摘出し、Ach を用いて内皮依存性の血管弛緩反応を測定した。さらには、内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)欠損マウスを用いて、セリバスタチンの血流改善促進作用を評価した。また、糖尿病や高脂血症のモデル動物を用いて血管新生能障害に対する薬物療法の効果を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究では既に確立された細胞と実験動物疾患モデルを用いて検討する。動物は換気、給餌等の完備した施設で飼育し、学内もしくは研究所内の規定に適合する条件で実験を行うため倫理的な問題はない。

C. 研究結果

(1) 平滑筋細胞の集積に関する研究

①移植後4週目にグラフト冠動脈には平滑筋細胞を中心とする新生内膜が認められた。LacZ マウスの心臓が野生型マウスに移植された場合は、中膜細胞はLacZを発現していたが、新生内膜細胞の大部分は陰性であった。逆に野生型マウスの心臓がLacZマウスに移植された場合は、中膜細胞はLacZ陰性であったが、新生内膜の大部分はLacZ陽性細胞より構成されていた。また、グラフト血管内皮細胞の一部もレシピエント由来細胞で置換されていた。同様の現象は性不一致個体間心臓移植後の動脈硬化においてもY染色体をマーカーとして確認された。更に、野生型マウスの骨髄をLacZマウスもしくはGFPマウスの骨髄で置換したのち野生型マウスの心臓を移植したところ、移植後動脈硬化病変は移植した骨髄由来細胞で構成されていた。②LacZマウスから野生型マウスへ骨髄移植を行い、大腿動脈にワイヤーによる傷害を加えた。4週後に形成された新生内膜の大部分と中膜の一部は骨髄由来のLacZ陽性細胞で構成されていた。同様の現象は、純化した造血幹細胞(Lin⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺分画)の移植によっても認められた。③ApoE欠損マウスにLacZマウスもしくはGFPマウスの骨髄を移植したところ、粥腫の平滑筋細胞の半数は骨髄由来細胞であった。④全骨髄もしくは造血幹細胞からαアクチン、カルポニン陽性細胞をin vitroで分化誘導できた。

(2) 薬物による血管新生促進作用

! レーザードップラー血流計で測定した虚血肢への血流の回復は、cerivastatin投与により著明に増強した。コントロール群では虚血肢の壊疽や自然切断がみられたが、cerivastatin投与群では認められなかった。5週目に採取した虚血側大腿筋の毛細血管密度はcerivastatin治療群で有意に増加していた(890±97 v.s. 1302±153/mm²)。"高脂血症(ApoE^{-/-})マウスモデルで、cerivastatinは虚血下肢の血流回復を促進したが、病変形成を抑制した。# cerivastatinは虚血肢の血流は改善するものの、同時に皮下に移植した大腸癌の成長は増強しなかった。\$ cerivastatin

を三日間投与したマウスより摘出した大動脈標本では、acetylcholineによる内皮依存性弛緩反応は有意に増強しており、内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の活性化が示された。Cerivastatinによる血流改善効果はeNOS欠損マウスでは認められなかった。% シンドロームXのモデルマウス(IRS-1^{-/-})では血管新生能が低下しており、インスリン抵抗性が血管新生能を障害すると考えられた。pioglitazoneは糖尿病マウスの血管新生能を改善した。

D. 考察

流血中には骨髄由来の血管前駆細胞が存在し血管病の病態生理に関与していると考えられる。その動員、定着、分化、増殖に関する研究は、血管病の新たな治療法開発に貢献すると期待される。また、スタチン系薬剤はeNOSの活性化を介して側副血行路の発達を促進すると考えられる。また、チアゾリジン系薬剤はインスリン抵抗性に伴う血管新生障害を改善すると思われる。

E. 結論

血管形成術後再狭窄、移植後動脈硬化、粥状動脈硬化の病変で認められる平滑筋細胞蓄積の原因を解明した。また、薬剤を用いた新規の血管新生療法を開発した。臨床研究への発展が期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(論文)

1. Saiura, A., Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R., Makuuchi, M. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nature Medicine*. 2001, 7: 382-383.
2. Sata, M., Luo, Z., Walsh, K. Fas ligand overexpression on allograft endothelium inhibits inflammatory cell infiltration and transplant-

- associated intimal hyperplasia. *J. Immunol.* 2001, 66: 6964-6971.
3. Nishimatsu, H., Suzuki, E., Nagata, D., Moriyama, N., Satonaka, H., Walsh, K., Sata, M., Kangawa, K., Matsuo, H., Goto, A., Kitamura, T., Hirata, Y. Adrenomedullin induces endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ. Res.* 2001; 89:63-70.
 4. Sata, M., Nishimatsu, H., Suzuki, E., Sugiura, S., Yoshizumi, M., Ouchi, Y., Hirata, Y., Nagai, R.. Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia. *FASEB J.* 2001. 15: 2530-2532.
 5. Sata, M., Sugiura, S., Yoshizumi, M., Ouchi, Y., Hirata, Y., Nagai, R.. Acute and chronic smooth muscle cell apoptosis after mechanical vascular injury can occur independently of the Fas-death pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001. 21: 1733-1737.
 6. Saiura, A., Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R., Makuuchi, M. Tranilast inhibits transplant-associated coronary arteriosclerosis in a murine model of cardiac transplantation. *Eur. J. Pharmacol.* 2001. 433: 163-168.
 7. Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y., Nagai, R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nature Medicine.* 2002. in press.
 8. Nishimatsu, H., Hirata, Y., Shindo, T., Kurihara, H., Kakoki, M., Nagata, D., Hayakawa, H., Satonaka, H., Sata, M., Tojo, A., Suzuki, E., Kangawa, K., Matsuo, H., Kitamura, T., Nagai, R. . Role of endogenous adrenomedullin in the regulation of vascular tone and ischemic renal injury. studies on transgenic/knockout mice of adrenomedullin gene. *Circ. Res.* 2002 in press.
 9. Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R. Role of Fas/FasL interaction in ischemia-induced collateral vessel growth. *Hypertension Research.* 2002 in press.
- (学会発表)
1. 佐田政隆、吹野恵子、斎浦明夫、幕内雅敏、平田恭信、永井良三「骨髓由来平滑筋前駆細胞の同定とその分化制御に関する検討」第33回日本動脈硬化学会総会モーニングセミナー「血管創生の可能性」2001年6月7日 東京（動脈硬化34巻、125ページ、2001）
 2. 佐田政隆「動脈硬化病巣の平滑筋細胞の起源をさぐる」第16回「大学と科学」公開シンポジウム「動脈硬化のしくみをさぐる」2001年10月31日・11月1日 東京（記録集製作中）
 3. 佐田政隆、永井良三「薬物による血管新生療法」第120回日本医学会シンポジウム「血管新生の基礎と臨床」2001年12月13日 東京（記録集製作中）
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - ・ 「カテーテルを兼用する医療用ガイドワイヤー」国際特許出願 PCT/JP01/04940（佐田）
 - ・ 「臓器移植後拒絶反応としての移植後動脈硬化症の予防および/または治療剤」特願 2001-337861（佐田）
 2. 実用新案登録
 - なし
 3. その他
 - なし

遺伝子導入による血管新生の促進療法に関する研究
（分担）研究者 森下 竜一 大阪大学医学部遺伝子治療学

ヒト閉塞性動脈硬化症患者に対するHGF遺伝子治療の臨床研究を開始する一方、血管再生を増強する治療戦略として、HGFに加えVEGF遺伝子とプロスタサイクリン合成酵素遺伝子との共導入による第二世代の血管再生療法の有用性を示した。

A、研究目的

動脈硬化性疾患である閉塞性動脈硬化症や心筋梗塞などの低侵襲な新規治療法として血管再生を促進する治療戦略が期待されている。肝細胞増殖因子（HGF）遺伝子を用いたヒト遺伝子治療臨床研究を開始する一方、血管再生を増強する治療戦略の開発を行う。

B、研究方法

HGF遺伝子によるヒト遺伝子治療臨床研究は、2001年6月より日本で初めての循環器疾患の遺伝子治療として開始された。プラスミドDNAのエコー下での筋肉内投与で閉塞性動脈硬化症及びビュルガー病患者（Fontaine III/IV）に対して実施された。また、血管再生を増強する治療戦略として、HGF遺伝子導入により再生された血管を拡張、もしくは、維持することが重要であるとの視点で、血管拡張物質であるプロスタサイクリンを合成するPGI₂合成酵素遺伝子との共導入をHGF及びVEGF遺伝子と行った。閉塞性動脈硬化症モデルはラット及びウサギ腸骨動脈の摘出により作成し、ヒトHGF遺伝子及びプロスタサイクリンを合成するPGI₂合成酵素遺伝子の筋肉内投与を行い、血管新生及び血流改善効果を調べた。

（倫理面への配慮）

遺伝子治療臨床研究審査委員会において倫理的な側面について検討され、承認されている。

C、研究結果

現在までに6人の閉塞性動脈硬化症およびビュルガー病患者にヒトHGF遺伝子を投与した。全例で、血管造影で有意な血管陰

影の増強が確認される一方、全例で0.1以上のABI改善もしくは疼痛の改善においてもVASスケールで1cm以上の改善を認めている（Efficacy rate = 100%）。一方で、VEGF遺伝子治療で見られた投与部位の浮腫は認められなかった。

一方、閉塞性動脈硬化症に対する血管新生療法の有効性は、閉塞性動脈硬化症の危険因子である糖尿病ラット及び高リポプロテイン(a)血症モデルマウスにおいてもHGF遺伝子導入による血管新生及び血流増加が見られる事より、危険因子を有した患者でも有効である可能性が示された。また、ヒトHGFプラスミドDNA及びプロスタサイクリンを合成するPGI₂合成酵素遺伝子のラット及びウサギ下肢筋肉内への導入により有意な血管新生・血流増加が確認された。HGF遺伝子による血管再生は、PGI₂合成酵素遺伝子との共導入により、血管数及び血流ともに単独投与に比べ有意な増加を示した。同様に、VEGF遺伝子とプロスタサイクリン合成酵素遺伝子の共導入でも血管新生増加が確認され、他の血管新生因子においても有用であることが示された。

D、考察

HGF遺伝子を用いた閉塞性動脈硬化症の治療は、現在までの成績ではVEGF遺伝子治療より有効性が高く、安全性に優れる可能性が示された。血管再生を増強する治療戦略として、HGFなど血管新生因子の遺伝子と血管拡張物質であるプロスタサイクリンを合成するPGI₂合成酵素遺伝子との共導入による第二世代の血管再生療法の有用性を示した。

E、結論

遺伝子導入による血管新生の促進療法に関する研究
(分担) 研究者 森下 竜一 大阪大学医学部遺伝子治療学

ヒト閉塞性動脈硬化症患者に対するHGF遺伝子治療の臨床研究を開始する一方、血管再生を増強する治療戦略として、HGFに加えVEGF遺伝子とプロスタサイクリン合成酵素遺伝子との共導入による第二世代の血管再生療法の有用性を示した。

閉塞性動脈硬化症及びビュルガー病の治療法としてHGF遺伝子を用いた血管再生は有用であると思われる。また、血管再生を増強する治療戦略として第二世代の血管再生療法の有用性を示した。

F、研究発表

1、論文発表

Morishita R, Sakaki M, Yamamoto K, Iguchi S, Aoki M, Yamasaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Lawn R, Ogihara T, Kaneda Y. Impairment of collateral formation in Lp(a) transgenic mice: therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene. *Circulation* (in press) (in press)

Taniyama Y, **Morishita R**, Hiraoka K, Aoki M, Nakagami H, Yamasaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model: molecular mechanisms of delayed angiogenesis in diabetes. *Circulation* 2001;104:2344-2350.

Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, Aoki M, Yamamoto S, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T, Kaneda Y, **Morishita R**. Development of safe and efficient novel non-viral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Therapy* (in press).

Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, Namba T, Yamasaki K, Hashiya N, Aoki M, Ogihara T, Kaneda Y, **Morishita R**. Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation* (in press).

G、知的所有権の取得情況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業） 分担研究報告書

細胞移植による血管新生療法に関する研究

分担研究者 室原豊明
久留米大学・循環器病研究所

研究要旨：内皮前駆細胞は、成人においては唯一の造血臓器である骨髄に由来する。本研究は、自己骨髄細胞あるいは末梢血中に動員された自己幹細胞を収集し、虚血組織に移植することにより内皮細胞の分化誘導・増殖を介して新しい血管や側副血管を再生すること、さらにこのことによって虚血組織の血行を機能的にも改善出来るかどうかを検討するものである。我々は自己骨髄単核球細胞を移植投与することによって、虚血下肢骨格筋内における血管再生が有意に促進されるか否かをウサギを用いてすでに検討した。この結果、血管新生・側副血管形成が、虚血下肢において実際に促進されることが確認された。この動物実験結果を元に、末梢性動脈閉塞性疾患 [閉塞性動脈硬化症 (ASO) およびピュルガー病] の患者に同様の治療法を適応するべく、当大学医学部倫理委員会に諮問した。この結果承認され、既に臨床治験を開始している。今後至適細胞数の決定、詳細な機序の検索、より低侵襲の手法等について検討して行きたい。

A. 研究目的

成人末梢血中の単核球分画中には、血管内皮細胞に分化しうる内皮前駆細胞が存在し、血管新生に関与する。内皮前駆細胞は成人においては骨髄に由来する。本研究の目的は、自己骨髄あるいは末梢血中に動員された自己幹細胞を収集し、虚血組織内に移植することにより内皮細胞の分化増殖を介して新しい血管や側副血管を再生すること、さらにこのことによって虚血組織の血行を機能的にも改善出来ないかどうかを基礎的臨床的に検討するものである。

B. 研究方法

成獣および成人の骨髄細胞から内皮前駆細胞を分離し、さらに成熟内皮細胞への分化誘導を試みる。また我々のこれまでの研究から、骨髄単核球細胞分画からもこのような内皮前駆細胞が分化誘導できると考えられる。比較的大きな動物（ウサギ）において、蛍光色素ラベルした自己骨髄単核球細胞または内皮前駆細胞を直接虚血骨格筋内に植え込む、または経動脈的に投与することによって、虚血部位における血管新生にこれらの骨髄細胞が組み込まれるか否かを検討する。さらに自己骨髄単核球細胞または内皮前駆細胞を移植投与することによって、虚血下肢骨格筋内における血管新生が有意に促進されるか否かを検討する。実際に他の治療法が無効であったヒト末梢動脈閉塞性疾患 [閉塞性動脈硬化症 (ASO) およびピュルガー病] の患者に同様の治療法が適応できるか否かも検討する。

C. 研究結果

自己骨髄単核球細胞を組織内移植投与することによって、ウサギ虚血下肢骨格筋内における血管再生が有意に促進された。この実験結果を元に、我々は末梢性動脈閉塞性疾患 [閉塞性動脈硬化症 (ASO) およびピュルガー病] の患者に同様の治療法を適応するべく、当大学医学部倫理委員会に諮問した。この結果承認され、既に臨床治験を開始している。第一例目は、73歳女性 ASO 患者であり、移植後有意な血管新生の増強とともに、患部の血流増加と QOL の著明な改善をみた。副作用は認められなかった。さらに9例10肢の病変についてこの治療法をこれまでに試みており、約70%の患者において有効性が臨床的に確認された。

D. 考案

自己骨髄単核球細胞の組織内移植は、虚血領域における血管再生と血流確保、さらに機能改善に有効であることが明らかにされた。今後この臨床治験を継続し、症例数を増やすとともに、詳細な分子メカニズム、より低侵襲の治療法を模索したい。併せて今後遺伝子治療との併用の可能性、さらには虚血性心疾患への応用を視野に入れた基礎的研究を続行したい。

E. 結論

自己骨髄単核球細胞の組織内移植は、臨床的にも有効な血管再生療法の一つであることが示唆された。

F. 健康危険情報

特に認めていない。

G. 研究発表

1. Shintani S, Murohara T. et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*. 2001; 103: 897-903.
2. Shintani S, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001; 103: 2776-2779.
3. Murohara T. Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors. *Trends Cardiovasc Med*. 2001; 11: 303-607

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし