

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

ヒト胚性幹細胞(ES細胞)を用いた「寝たきり」
高齢者に対する再生医療の開発に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15(2003)年4月

主任研究者 伊 藤 裕

目 次

I. 総括研究報告	
ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞 (human ES cell-derived vascular progenitor cells; VPC) の単離と体外大量培養及び hES-VPC の生体移植による心筋梗塞、脳卒中に対する心筋・脳保護再生治療効果の検証に関する研究	1
伊藤 裕	
II. 分担研究報告	
1. hES-VPC の生体移植治療のためのセルプロセッシング ーヒト血管細胞分化誘導因子の探索に関する研究	10
小川佳宏	
2. hES-VPC 含有ハイブリッド人工血管の開発とその血管再生効果の検証 基盤技術の開発：小口径ハイブリッド人工血管の易吻合化のための血管接合具の開発に関する研究	14
中山泰秀	
3. 霊長類 ES 細胞由来血管前駆細胞による血管発生分化系を用いた新規血管再生薬剤の開発ーサル ES 細胞由来血管前駆細胞の同定及びヒト ES 細胞培養に関する基礎的検討に関する研究	26
仁藤新治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	30
IV. 研究成果の刊行物・別冊	35

ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞(human ES cell-derived vascular progenitor cells; VPC)の単離と体外大量培養
及び hES-VPC の生体移植による心筋梗塞、脳卒中に対する心筋・脳保護再生治療効果の検証

主任研究者：伊藤 裕（京都大学大学院医学研究科 助教授）

無限の増殖性とほとんど全ての臓器に分化し得る ES 細胞は、再生医療において魅力的なマテリアルである。我々はこれまで、マウス ES 細胞より血管を構成する内皮細胞及び血管平滑筋細胞の双方に分化し、*in vitro* で血管を構築する能力を有する血管前駆細胞（vascular progenitor cells; VPC）を同定した。本研究は、ヒト ES 細胞細胞より VPC を同定し、体外で大量に分化培養を行い移植することで生体において有効な血管を再生させ、虚血脳や心筋を回復させる新しい脳卒中、心筋梗塞に対する治療法を開発し、「寝たきり」の解消を目指すものである。本年度は、マウス ES 細胞由来の VPC を成人生体に移植することで治療効果を生む移植方法を検討した。その結果、VPC を体外である程度内皮細胞と血管平滑筋細胞に分化させ移植することで、ES 細胞により血管が形成され血流量が増加することが明らかとなった。更に、我々がこれまで一貫して研究を続けてきた心血管ホルモンであるナトリウム利尿ペプチドやアドレノメジュリンが、損傷内皮の再生作用や血管再生作用を有することが示された。今後、以上の知見を踏まえ、ヒト ES 細胞からの VPC の同定と同細胞に対する心血管ホルモンによる *in vitro* 及び *in vivo* でのセルプロセッシング法を開発し、新規虚血臓器の機能回復療法の確立を目指したい。

A. 研究目的

現在、「寝たきり」の原因の第一位は脳血管障害である。動脈硬化性病変によりもたらされる脳卒中、あるいは心筋梗塞は、急性期を除いてほとんど有効な治療法のないまま文字通り保存的に患者を見守るしかない状況である。その結果、「寝たきり」患者の QOL は著しく障害され、医療経済に与える負担も極めて大きい。虚血壊死に陥った脳細胞や心筋細胞を再生させることは不可能であり、障害された血管を再生させることが虚血脳、心筋のレスキューにおいては重要である。

21 世紀の新しい医療として「再生医療」が注目されている。無限の増殖性とほとんど全ての臓器に分化し得る能力を有する ES 細胞（胚性幹細胞、embryonic stem cells）は再生医療において魅力的なマテリアルである。強力な内皮細胞遊走・増殖刺激因子である VEGF（vascular endothelial growth factor）

の受容体の一つである Flk1 は、ジーンターゲットングにより内皮細胞と血球細胞の発生に必須であることが明らかになっている。最近我々は、マウス ES 細胞から抗 Flk1 抗体を用いた FACS による cell sorting 技術により、Flk1 陽性細胞から血管を構成する内皮細胞及び血管平滑筋細胞の双方を *in vitro* 培養系で分化誘導できることを明らかにした。すなわち、Flk1 陽性細胞は VEGF 及び PDGF を添加すると、それぞれ内皮細胞と血管平滑筋細胞に分化した。更に、この細胞をコラーゲンゲル内で 3 次元的に培養することにより、内皮細胞による管腔形成と壁細胞による内皮細胞の支持を伴った完全な血管構造を *in vitro* において再現することに成功した。すなわち ES 細胞由来 Flk1 陽性細胞が“血管前駆細胞”（vascular progenitor cells; VPC）であることを報告した。

本研究は、我々が日本で初めて承認を得たヒト ES 細胞を使用した研究により、ヒト ES 細胞より VPC

を同定単離し、同細胞を用いて新しい血管再生医療を構築し、脳卒中、心筋梗塞の根治治療を実現し、「寝たきり」の解消を目指すことをその目的としている。

本年度は、マウス ES 細胞由来 VPC の生体移植による血流回復治療効果が得られるためのセルブロセシング法（細胞の分化誘導法、細胞の移植法）並びに、我々がこれまで研究を続けてきた心血管ホルモンであるナトリウム利尿ペプチド及びアドレノメジュリンについて、その損傷内皮細胞に対する再生作用、血管保護再生作用及びその分子メカニズムを検討した。

B. C. 研究方法及び結果

1. マウス ES 細胞由来血管前駆細胞の成人生体への移植による血管再生の検討

マウス ES 細胞由来 VPC の血管再生医療への応用を目指し、VPC の成体における血管新生への寄与、さらには移植による血流改善効果をもたらす至適細胞分化段階について検討した。

我々は恒常的に LacZ 遺伝子を発現するマウス ES 細胞を確立し、4つの分化段階の VPC を調整した。すなわち、未分化 ES 細胞を 10%FCS 存在下に 4 型コラーゲン上で 4 日間培養して誘導される Flk1 陽性細胞を“未分化 VPC”と名付け、“未分化 VPC”をさらに 10%FCS および 50 ng/ml VEGF 存在下で 3 日間培養した細胞を“分化 VPC”と名付けた。また、“分化 VPC”の内皮細胞分画である VE-cadherin 陽性細胞をソーティングした“VE-cadherin 陽性 VPC”、未分化 VPC を無血清条件で PDGF-BB 存在下に 3 日間培養した壁細胞分画を“PDGF-BB 添加後 VPC”と名付けた。これら 4 つの分化段階のマウス ES 細胞由来 VPC のマウス成体における血管新生への寄与について検討するため腫瘍血管新生モデルマウスを作製した。腫瘍の形成には VEGF を豊富に産生するラット神経膠芽種由来の C6 細胞種を使用した。6-8 週令のヌードマウス体幹部両側に C6 細胞種を移植し、7 日後に 4 つの異なる分化段階の VPC をマウスの左側腫瘍周囲に皮下注した。右側腫瘍周囲にはコントロールとして生理的食塩水を注入した。また我々は“未分化 VPC”と“分化 VPC”の静脈内への注入

もおこなった。5 日後にレーザードップラーを用いて各腫瘍の血流を測定した。血流測定後に各腫瘍を摘出し、ホルマウント LacZ 染色および凍結切片による免疫染色を施行し各移植 VPC の血管新生への寄与について検討した。

血管前駆細胞そのものである“未分化 VPC”は Flk1 陽性であり、その他の内皮細胞マーカー (VE-cadherin, PECAM1, CD34)、壁細胞マーカー (α -smooth muscle action(SMA)) は陰性であった。一方、“分化 VPC”は、Flk1 陽性および陰性の 2 種類の細胞分画に分化していた。Flk1 の発現を維持していた細胞分画は約 30% で、VE-cadherin, PECAM1, CD34 陽性の内皮細胞分画であると考えられた。約 70% は Flk1 の発現を喪失しており、 α SMA 陽性の壁細胞分画であると考えられた。また、“PDGF-BB 添加後 VPC”では 95% 以上が壁細胞であった。“未分化 VPC”移植群では生着した LacZ 陽性細胞のうち PECAM-1 と共陽性で内皮細胞と考えられる細胞を約 40% 認めたものの、LacZ 陽性細胞は塊状を呈し血管構造はほとんど構築されなかった。一方“分化 VPC”移植群では、生着した LacZ 陽性細胞のうち約 87% が PECAM-1 と共陽性であり、移植した VPC によって構築された管腔構造が認められた。また、管腔構造内部には LacZ 陰性血球細胞が確認され ES 細胞由来分化 VPC と宿主循環系との吻合が示唆された。更に、“分化 VPC”移植群においては、コントロール側と比較し約 50% の血流増加を認めたが、“未分化 VPC”および“PDGF-BB 添加後 VPC”移植群では有意な血流増加を認めなかった。また“未分化 VPC”と“分化 VPC”の静脈内への注入による移植実験ではマウス腫瘍内には LacZ 陽性細胞は認められなかった。

以上の成績より、マウス ES 細胞由来 VPC 移植がマウス成体における血管新生に寄与し、血管新生部位において血流を増加させることが示された。また、我々は本研究で移植 VPC の分化段階を詳細に検討することで最も効果的に血管新生に寄与する VPC を同定した。移植する VPC の分化段階と移植方法の選択は血管新生部位への寄与効率に質的にも量的にも関与しうることが証明された。本研究から ES 細胞由来血管前駆細胞の血管再生治療への応用の可能性が示唆された。

2. アデノウイルスを用いた遺伝子導入によるナト

リウム利尿ペプチドの内皮再生作用の検討

我々がクローニングしたラット CNPcDNA をアデノウィルスベクターに組み込み、ウサギ静脈グラフトモデルにおいて血管壁への遺伝子導入を行った。すなわち、ウサギ carotid artery に同側の jugular vein を端端吻合した。吻合の際、CNP アデノウィルス (5×10^8 PFU) を含有したリンゲル液 150 μ l をグラフト静脈内に 30 分間停留させ感染させた。グラフト後 2 週間、4 週間後の静脈血管を検討したところ、CNP アデノウィルス感染群では対照の LacZ 遺伝子アデノウィルス感染群に比べ、内膜肥厚が 40~50% に抑制されていた。更にエバンスブルーを用いた生体染色により、内皮の再生が著しく亢進することが明らかとなった。すなわち、4 週間後も対照群では内皮化面積は $46 \pm 8\%$ であったのに対し、CNP アデノウィルス感染群では $96 \pm 1\%$ であった。更に内皮化の促進に伴い、血栓形成も抑制された。

以上の結果より、ナトリウム利尿ペプチドは我々が以前に報告したように、血管平滑筋細胞の遊走・増殖抑制、分化誘導のみならず損傷内皮細胞に対し、その再生を促進し抗血栓性等内皮機能の回復を促す作用があることが明らかとなった。

3. ナトリウム利尿ペプチドの培養内皮細胞再生作用の分子機構の検討

ヒト冠動脈、臍帯静脈及びウシ大動脈由来培養内皮細胞を用いて、ナトリウム利尿ペプチドの内皮細胞再生促進作用を検討した。ナトリウム利尿ペプチドは、生理的あるいは病態生理的濃度の範囲内 ($10^{-11} \sim 10^{-9}$ M) において、内皮細胞の増殖及び遊走を有意に促進した。更に、損傷内皮再生の *in vitro* モデルである wound healing assay (10cm 培養皿にコンフルエントに培養した内皮細胞の 1/2 をスクレイパーにて剥離し、3 日間の細胞の遊走・増殖を計測する) においても同様に、内皮の修復を促進した。これらのナトリウム利尿ペプチドの作用は、cGMP プロテインキナーゼ (cGK) の阻害剤 (Rp-8-pCPT-cGMP) により抑制され、また MAP キナーゼの一つである Erk1/2 の阻害剤 (PD-98059) 及び Akt 阻害剤

(Wortmannin) で有意に抑制されたが、p38MAP キナーゼ阻害剤 (SB-203580) では抑制されなかった。更に、ナトリウム利尿ペプチド添加により、1.5 時間以内に Erk1/2 及び Akt のリン酸化の亢進を認めた。以上の結果より、ナトリウム利尿ペプチドは cGK の活性化に引き続く Erk1/2 及び Akt 活性の亢進により、培養内皮細胞の再生を促進すると考えられた。更に、*in vivo* においても BNP トランスジェニックマウス大腿動脈結紮モデルにおいて阻血部血管では、Erk1/2 のリン酸化が上昇していた。また、*in vitro* のコラーゲンゲル 3 次元培養系において、ナトリウム利尿ペプチド (10^{-8} M) は培養内皮細胞の毛細血管網の形成を促進し、この作用は Erk1/2 阻害剤により有意に抑制された。

4. ナトリウム利尿ペプチドの培養血管平滑筋細胞遊走増殖抑制作用の分子機構の検討

我々は、ナトリウム利尿ペプチド、NO/cGMP/cGK 経路が、血管トーン・リモデリング双方の抑制系であることを明らかにした。一方、我々は主要な血管収縮増強シグナルである RhoA/Rho-キナーゼ (ROCK) 経路が血管リモデリングに対しても促進的に機能することを報告した。さらに我々は、cGK が直接 RhoA を Ser188 でリン酸化し、抑制することを報告した。そこで、cGK による RhoA のリン酸化・抑制の意義を検討した。

- ① リン酸基のついた Ser188 を含む RhoA の C 末に対応するペプチド (182-188a.a.) を免疫源としてウサギを免疫した。得られた抗血清に対しリン酸化ペプチド・非リン酸化ペプチドを用いたポジティブ・ネガティブアフィニティー精製を行った。精製後の抗体は cGK により Ser188 でリン酸化された RhoA を特異的に認識した。
- ② リン酸化特異的抗 RhoA 抗体を用いたウェスタンブロット法により、8-br cGMP (200 μ M) で 2 時間処理後の培養ヒト VSMC において RhoA リン酸化の上昇が認められた。
- ③ BNP トランスジェニックマウスでは、対照に比し約 20mmHg の収縮期圧の下降が認められたが、ナト

リウム利尿ペプチド標的臓器(心・肺・腎)における RhoA のリン酸化が有意に上昇していた。

- ④ cGK $\Gamma^{+/+}$ マウスでは、cGK $\Gamma^{+/+}$ マウスに比べ収縮期圧が約 15mmHg 上昇していたが、cGK $\Gamma^{+/+}$ マウスの大動脈における RhoA のリン酸化は減少し(cGK $\Gamma^{+/+}$ マウスの 0.6 倍)、RhoA 活性(膜転移)は上昇していた。
- ⑤ cGK $\Gamma^{+/+}$ マウスに Rho キナーゼ阻害薬 Y-27632 を持続投与したところ、血圧はほぼ対照マウス(野生型マウス)と同等レベルにまで下がった。Rho キナーゼの特異的基質(ミオシンフォスファターゼ調節サブユニット; MYPT1)のリン酸化部位(Thr696)に対する特異抗体を用いたウェスタンブロット法により Rho キナーゼ活性を測定した。cGK $\Gamma^{+/+}$ マウスでは野生型マウスに比べ Rho キナーゼ活性が上昇していたが、これは Rho キナーゼ阻害薬である Y-27632(10-50mg/kg/day)の投与により野生型マウスと同レベルに下降した。

以上、ナトリウム利尿ペプチド/cGMP/cGK 経路の活性化・阻害のマウスモデルにおいて、RhoA のリン酸化は RhoA 活性・血圧と逆相関を示した。cGK による RhoA のリン酸化・抑制が、in vivo において血圧調節・血管リモデリング制御に重要な役割を果たしている可能性が示された。

5. アドレノメデュリンの血管再生作用の検討

アドレノメデュリン(AM)は内皮細胞から産生され、cAMP/ プロテインキナーゼ A (PKA)カスケードを活性化し、CNP 同様、内皮由来血管拡張ペプチドとして作用する。AM 過剰発現マウスでは血圧低下を認め、一方 AM ノックアウトマウスでは血管構築不全により胎生致死となる。これらの知見より AM が血管の機能構築制御において重要な意義を有することが示唆されたので、今回我々は AM の血管保護再生作用について in vitro, in vivo 双方において検討した。

- ① AM のヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に対する増殖遊走効果を検討した。増殖効果は一定数の細胞

を血清 0.5%で 48 時間培養した後の細胞数を測定することで評価した。遊走効果は Transwell apparatus を用いて評価した。その結果、AM は 10^{-9} M ないし 10^{-7} M 添加にて培養内皮細胞の増殖と遊走をともに有意に促進した。

- ② 損傷内皮再生過程の in vitro モデルである wound healing assay にて AM の内皮再生作用を検討した。HUVECをオーバーコンフルーエントまで培養し、スクレイパーで 2mm 幅の wound を作成して、40 時間での内皮再生面積を測定した。その結果、AM 10^{-11} M から 10^{-8} M の添加にて内皮再生面積は用量依存的かつ有意に増加した。
- ③ マトリゲルを用いた in vivo の系で AM の血管新生作用を検討した。AM 含有プラグの血流量をレーザー Doppler にて計測すると、プラグの血流量は 10^{-9} M から 10^{-5} M まで用量依存的かつ有意に増加した。また、プラグを PECAM-1 で染色し新生血管を観察すると、AM 含有プラグでは 10^{-9} M から 10^{-5} M まで用量依存的かつ有意に PECAM-1 陽性細胞数が増加した。
- ④ 以上 in vitro および in vivo で明らかにした AM の血管再生作用の細胞内分子メカニズムとして、HUVEC における AM による Akt 活性化を検討した。その結果、HUVEC に対する AM 10^{-8} M 刺激により Akt リン酸化は 30 分をピークに亢進した。さらには、コンフルーエントに達した HUVEC に短冊状の wound を 5mm 間隔で作成すると、その刺激のみで Akt リン酸化が亢進し、その状態で AM を添加するとリン酸化がより亢進した。
- ⑤ AM の血管再生作用に対する各種インヒビターの作用を検討した。AM/ PKA/ Akt カスケードのインヒビターとして、AM 受容体拮抗剤の AM(22-52)および CGRP(8-37)、PKA 阻害剤の Rp-cAMP および細胞膜透過型の PKA inhibitor peptide、PI3 キナーゼ阻害剤である LY294002 および Wortmannin の計 6 種を用いた。これら 6 種のインヒビターはいずれも

AMによるHUVECにおけるAkt活性化を抑制し、更にはwound healing assayでの内皮再生促進作用とゲルプラグでの血流量増加作用も抑制した。

Aktは内皮細胞の増殖遊走のみならず、in vivoでの血管新生でも重要な意義を有することが報告されている。今回、AMはHUVECにおいてPKAとPI3キナーゼの両者に依存してAktを活性化し、増殖と遊走を促進した。更には、AMがin vitro、in vivo双方でPKAとPI3キナーゼを介して血管再生を促進することも明らかとなった。これらの結果より、動脈硬化性疾患や虚血性疾患におけるAMによる血管再生治療の可能性が示唆された。

D. 考察

本年度の研究により、我々の同定したES細胞由来血管前駆細胞を、体外においてある程度内皮細胞及び血管平滑筋細胞に分化させ成人生体に移植することで、宿主側の循環系と吻合を有した血管を構築し、有効な血流量の改善が認められることが明らかとなった。この成績は我々のES細胞由来血管前駆細胞移植による虚血臓器の機能改善治療が可能であることを示している。

次年度は、分担研究者の仁藤らとともに、本年度得られたサルES細胞由来血管前駆細胞の知見をもとにヒトES細胞からの血管前駆細胞の同定と、同細胞移植治療を目指したい。

また、本年度は我々がこれまで一貫して続けてきた心血管ホルモンであるナトリウム利尿ペプチド及びアドレノメジュリンについて、分担研究者の小川らとともに損傷内皮の再生作用及び血管そのものの再生作用があることを明らかにし、その作用メカニズムも分子レベルで解明し得た。ES細胞由来血管前駆細胞移植による虚血臓器の再生においては、移植する細胞を体外で分化させ、更にはその細胞数を確保する必要がある。本年度得られた心血管ホルモンの血管再生作用をもとに、次年度はES細胞由来血管

前駆細胞移植時に血管ホルモンを同時に投与する方針を考えている。現在ナトリウム利尿ペプチドのなかでANP、BNPはそれぞれ既に日本及び米国で心不全治療薬として静注の形で臨床において使用されている。更に臨床使用された際のナトリウム利尿ペプチドの血中濃度は、今回見出された血管再生作用を発現する濃度に一致している。また、我々は分担研究者小川らとともにCNPプラスミドの虚血部への筋注により局所血流改善の治療効果が得られることを明らかにした。従って、このような形での心血管ホルモンの“ドラッグデリバリー”とES細胞移植のコンビネーション治療法を今後開発していきたい。

E. 結論

本年度の研究により、ES細胞由来血管前駆細胞の移植治療への有効性、並びに心血管ホルモンによる同細胞のセルプロセシングの可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Yamahara, H. Itoh, T-H. Chun, Y. Ogawa, J. Yamashita, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, T. Yurugi-Kobayashi, K. Miyashita, H. Tsujimoto, H. Kook, R. Feil, D.L. Garbers, F. Hofmann and K. Nakao. Significance and therapeutic potential of natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 100: 3404-3409, 2003.
2. Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Yamashita J, Ogawa M, Nishikawa S, Nishikawa S-I and Nakao K. Contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. *Blood* 101: 2675-2678, 2003.
3. M. Sone, H. Itoh, J. Yamashita, T. Yurugi-Kobayashi, Y. Suzuki, Y. Kondo, A. Nonoguchi, N.

- Sawada, K. Yamahara, K. Miyashita, K. Park, S. Nito, M. Shibuya, S-I. Nishikawa, K. Nakao. Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. **Circulation** 2003 in press.
4. N. Ohno, H. Itoh, T. Ikeda, K. Ueyama, K. Yamahara, K. Doi, J. Yamashita, M. Inoue, K. Masatsugu, N. Sawada, Y. Fukunaga, S. Sakaguchi, M. Sone, T. Yurugi, H. Kook, M. Komeda, K. Nakao. Accelerated re-endothelialization with suppressed thrombogenic property and neointimal hyperplasia of rabbit jugular vein grafts by adenovirus-mediated gene transfer of C-type natriuretic peptide. **Circulation** 105: 1623-1626, 2002.
 5. Kook H, Itoh H, Choi B-S, Sawada N, Doi K, Hwang T-J, Kim K-K, Arai H, Baik Y-H and Nakao K. Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro. **Am. J. Physiol.** 284: H1388-1397, 2003.
 6. K. Masatsugu, H. Itoh, T-H. Chun, T. Saito, J. Yamashita, K. Doi, M. Inoue, N. Sawada, Y. Fukunaga, S. Sakaguchi, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi, K. Nakao. Shear stress attenuates endothelin and endothelin converting enzyme expression through oxidative stress. **Regulatory Peptides** 111: 13-19, 2003.
 7. K. Miyashita, H. Itoh, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi, K. Nakao. Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells. **Hypertens. Res.** 26: S93-S98, 2003.
 8. K. Yamahara, H. Itoh, A. Yamamoto, H. Sasano, K. Masatsugu, N. Sawada, Y. Fukunaga, S. Sakaguchi, M. Sone, T. Yurugi and K. Nakao. New diagnostic procedure for primary aldosteronism: Adrenal venous sampling under adrenocorticotrophic hormone and angiotensin II receptor blocker – Application to a case of bilateral multiple adrenal microadenomas. **Hypertens. Res.** 25: 145-152, 2002.
1. 学会発表
国際学会
 1. H. Itoh, J. Yamashita, K. Doi, T. Ikeda, N. Ohno, K. Ueyama, H. Kook, N. Sawada, Y. Fukunaga, K. Yamahara, M. Sone, T. Yurugi and K. Nakao. Natriuretic peptides induce regeneration of endothelial cells both in vivo and in vitro. **19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension** 2002.6.23-27 Prague, Czech Republic
 2. N. Sawada, H. Itoh, K. Doi, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi, K. Miyashita and K. Nakao. Direct phosphorylation and protein kinase and its implication in hypertension and hypertensive vascular remodeling. **19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension** 2002.6.23-27 Prague, Czech Republic
 3. K. Yamahara, H. Itoh, Y. Ogawa, J. Yamashita, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, T. Yurugi, K. Miyashita and K. Nakao. Novel action of natriuretic peptides to accelerate ischemia-induced angiogenesis. **19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension** 2002.6.23-27 Prague, Czech Republic
 4. T. Yurugi, H. Itoh, J. Yamashita, K. Yamahara, Y. Fukunaga, N. Sawada, S. Sakaguchi, M. Sone, K. Miyashita, M. Ogawa, S-I. Nishikawa and K. Nakao. Embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells as promising cell sources for vascular regeneration therapy. **19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension** 2002.6.23-27 Prague, Czech Republic
 5. H. Itoh, T. Yurugi, J. Yamashita, K. Yamahara, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Miyashita, S. Nishikawa, K. Nakao. Potentials of embryonic stem (ES) cell-derived vascular progenitor cells (VPC) in vascular regeneration medicine. **12th International Vascular Biology Meeting** 2002.5.12-16 (Karuizawa)
 6. N. Sawada, H. itoh, K. Miyashita, K. Doi, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi, K.

Nakao. Direct phosphorylation and inactivation of small GTPase RhoA by cGMP-dependent protein kinase and its implication in hypertension and atherosclerosis. **12th International Vascular Biology Meeting** 2002.5.12-16 (Karuizawa)

7. J. Yamashita, H. Itoh, T. Yurugi, M. Ogawa, K. Nakao, S. Nishikawa. In vitro differentiation of cardiomyocytes from embryonic stem cell-derived FLK1-positive vascular progenitor cells. **12th International Vascular Biology Meeting** 2002.5.12-16 (Karuizawa)

8. T. Yurugi, H. Itoh, J. Yamashita, K. Yamahara, Y. Fukunaga, N. Sawada, M. Sone, K. Miyashita, S. Nishikawa, K. Nakao. Contribution of embryonic stem (ES) cell-derived vascular progenitor cells (VPC) to adult neoangiogenesis. **12th International Vascular Biology Meeting** 2002.5.12-16 (Karuizawa)

9. K. Yamahara, H. Itoh, Y. Ogawa, J. Yamashita, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, T. Yurugi, K. Miyashita, K. Nakao. Novel action of natriuretic peptides to accelerate ischemia-induced angiogenesis. **12th International Vascular Biology Meeting** 2002.5.12-16 (Karuizawa)

10. M. Mukoyama, T. Suganami, K. Mori, A. Sugawara, H. Makino, K. Yahata, T. Nagae, H. Itoh, I. Tanaka, K. Nakao. Amelioration of renal injury in rat model of malignant hypertension by selective blockade of prostaglandine receptor EP1 subtype. **12th International Vascular Biology Meeting** 2002.5.12-16 (Karuizawa)

国内学会

1. 山原研一、伊藤 裕、小川佳宏、澤田直樹、福永康智、坂口五月、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、中尾一和、山下 潤 ナトリウム利尿ペプチドの血管再生作用—マウス下肢虚血モデルを用いた検討 第5回フォーラム高血圧と臓器障害 2002.2.9 (東京)

2. 山下 潤、伊藤 裕、万木貴美、Martin L. Jakt、岡田光浩、中尾一和、西川伸一 ES細胞と血管形成 第39回日本臨床分子医学会学術総会

シンポジウム 2002.3.1-2 (大阪)

3. 万木貴美、伊藤 裕、山下 潤、山原研一、小川峰太郎、西川伸一、中尾一和 マウス ES細胞由来血管前駆細胞による血管再生の試み 第39回日本臨床分子医学会学術総会 2002.3.1-2 (大阪)

4. K. Nakao, H. Itoh, M. Mukoyama, Y. Ogawa, Y. Komatsu, I. Kishimoto. Translational medicine of natriuretic peptide family. **The 66th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society** 2002.4.24-26 (Sapporo)

5. J. Yamashita, H. Itoh, T. Yurugi, M. Okada, M. L. Jakt, K. Nakao, S. Nishikawa. Application of ES cells to cardiovascular regeneration. **The 66th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society** 2002.4.24-26 (Sapporo)

6. T. Yurugi, H. Itoh, Y. Fukunaga, N. Sawada, S. Sakaguchi, K. Yamahara, M. Sone, K. Miyashita, K. Nakao, J. Yamashita, S. Nishikawa. Contribution of embryonic stem (ES) cell-derived vascular progenitor cells (VPC) to blood vessel formation during adult neoangiogenesis. **The 66th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society** 2002.4.24-26 (Sapporo)

7. N. Sawada, H. Itoh, K. Doi, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi, K. Miyashita, K. Nakao. Direct phosphorylation and inactivation of small GTPase RhoA by cGMP-dependent protein kinase and its implication in vascular remodeling. **The 66th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society** 2002.4.24-26 (Sapporo)

8. 伊藤 裕、中尾一和 心臓血管ホルモンの再生医学へのリンク 第75回日本内分泌学会学術総会シンポジウム 2002.6.28-30 (大阪)

9. 澤田直樹、伊藤 裕、宮下和季、土居健太郎、福永康智、曾根正勝、山原研一、万木貴美、中尾一和 cGMP依存性蛋白キナーゼによる低分子量G蛋白RhoAの特異的リン酸化の検出法の開発とその血管病態における意義 第75回日本内分泌学会学術総会 2002.6.28-30 (大阪)

10. 山原研一、伊藤 裕、小川佳宏、山下 潤、澤田直樹、福永康智、坂口五月、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、中尾一和 ナトリウム利尿ペプチド(NP)/cGMP/cGMP 依存性プロテインキナーゼ(cGK)系の血管再生作用-遺伝子改変マウスを用いた検討 第75回日本内分泌学会学術総会 2002.6.28-30 (大阪)
11. 全 泰和、伊藤 裕、近藤一直、澤田直樹、福永康智、坂口五月、山原研一、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、梅村和夫、中尾一和 I型 cGMP 依存性プロテインキナーゼ(cGK)過剰発現トランスジェニックマウスの開発と血管リモデリングにおける cGK の意義の検討 第75回日本内分泌学会学術総会 2002.6.28-30 (大阪)
12. 伊藤 裕 ES細胞の血管再生医療へのトランスレーション 第7回南近畿循環器研究会 特別講演 2002.7.12 (大阪)
13. 山原研一、伊藤 裕、小川佳宏、山下 潤、澤田直樹、福永康智、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、中尾一和 遺伝子改変マウスを用いたナトリウム利尿ペプチド(NP)/cGMP/cGMP 依存性プロテインキナーゼ(cGK)系の血管再生作用の検討 第34回日本動脈硬化学会総会 シンポジウム 2002.7.18-19 (神戸)
14. 伊藤 裕 PPAR γ による内皮保護作用 第34回日本動脈硬化学会総会シンポジウム 2002.7.18-19 (神戸)
15. 伊藤 裕、中尾一和 心臓血管ホルモン：血管リモデリングから血管再生へ 第34回日本動脈硬化学会総会 ジョイントシンポジウム 2002.7.18-19 (神戸)
16. 澤田直樹、伊藤 裕、宮下和季、土居健太郎、福永康智、曾根正勝、山原研一、万木貴美、中尾一和 cGMP 依存性蛋白キナーゼによる低分子量 G 蛋白 Rho の直接的リン酸化および抑制とその動脈硬化症の病態生理における意義 第34回日本動脈硬化学会総会 2002.7.18-19 (神戸)
17. 伊藤 裕 動脈硬化症と血管生物学：血管ホルモンからのアプローチ 第6回 Molecular Cardiovascular Conference Keynote speech 2002.8.30-9.1 (北海道)
18. 伊藤 裕 生活習慣病におけるナトリウム利尿ペプチド系による血管保護・再生 第12回脳血管シンポジウム 2002.9.7 (大阪)
19. 伊藤 裕 生活習慣病と再生医療 第25回日本高血圧学会総会 教育講演 2002.10.11-13 (東京)
20. N. Sawada, H. Itoh, K. Nakao. In vitro and in vivo evidence for direct phosphorylation and inactivation of small GTPase RhoA by cGMP-dependent protein kinase. 第25回日本高血圧学会総会 YIA 2002.10.11-13 (東京)
21. N. Sawada, H. Itoh, K. Miyashita, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi, K. Nakao. In vivo evidence for direct phosphorylation and inactivation of small GTPase RhoA by cGMP-dependent protein kinase as a critical intracellular mechanism for blood pressure regulation. 第25回日本高血圧学会総会 国際セッション 2002.10.11-13 (東京)
22. 山下 潤、伊藤 裕、万木貴美、中尾一和、西川伸一 ES細胞(胚性幹細胞)を用いた血管分化系と血管再生 第25回日本高血圧学会総会 スポンサーセミナー 2002.10.11-13 (東京)
23. 山原研一、伊藤 裕、小川佳宏、山下 潤、澤田直樹、福永康智、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、中尾一和 ナトリウム利尿ペプチド/cGMP/cGMP 依存性プロテインキナーゼ(cGK)系の血管再生作用 遺伝子改変マウスを用いた検討 第25回日本高血圧学会総会 2002.10.11-13 (東京)
24. 伊藤 裕 心血管ホルモンと再生医学 第6回日本心血管内分泌代謝学会総会シンポジウム 2002.11.22-23 (大阪)
25. 澤田直樹、伊藤 裕、宮下和季、福永康智、曾根正勝、山原研一、万木貴美、中尾一和 ナトリウム利尿ペプチド/cGMP/cGMP 依存性蛋白キナーゼ系による RhoA のリン酸化・抑制と

その血圧制御における意義 第6回日本心血管内分泌代謝学会総会 YIA 候補口演
2002.11.22-23 (大阪)

26. 山原研一、伊藤 裕、小川佳宏、山下 潤、澤田直樹、福永康智、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、中尾一和 ナトリウム利尿ペプチド/cGMP/cGMP 依存性プロテインキナーゼ (cGK)系の血管再生作用 第6回日本心血管内分泌代謝学会総会 2002.11.22-23 (大阪)
27. 宮下和季、伊藤 裕、澤田直樹、福永康智、曾根正勝、山原研一、万木貴美、中尾一和 アドレノメデュリンの血管再生における新しい意義 第6回日本心血管内分泌代謝学会総会 2002.11.22-23 (大阪)
28. 宮下和季、伊藤 裕、澤田直樹、福永康智、曾根正勝、山原研一、万木貴美、朴 貴典、中尾一和 アドレノメデュリンの血管保護再生における新しい意義 The role of adrenomedullin on vascular protection and regeneration 第32回日本心脈管作動物質学会総会 2003.2.2 (大阪)
29. 曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、万木貴美、鈴木 豊、近藤 靖、澤田直樹、山原研一、宮下和季、朴 貴典、野々口あかね、仁藤新治、西川伸一、中尾一和 盞長類 ES 細胞由来「血管前駆細胞」の同定 第2回日本再生医療学会総会 2003.3.11-12 (神戸)
30. 神田圭一、中山泰秀、伊藤 裕、山下 潤、根本 泰、山田 進、北村信夫 ES 細胞を導入したハイブリッド型人工血管モデルの開発 第2回日本再生医療学会総会 2003.3.11-12 (神戸)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

hES-VPC 生体移植治療のためのセルプロセシング

ーヒト血管細胞分化誘導因子の探索

分担研究者：小川佳宏（京都大学大学院医学研究科 助手）

ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞（human ES cell-derived vascular progenitor cells; hES-VPC）の生体移植による血管再生においては、VPC の体外での大量分化培養技術（セルプロセシング）の開発が必要である。我々は、血管局所で産生され、血管トーンス並びにリモデリングに関与する血管ホルモンについて研究を続けてきた。これまで、ナトリウム利尿ペプチドの一つである C 型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）が内皮細胞で産生され NO と並ぶ EDRF として作用すること、並びに CNP が血管保護作用を有することを明らかにしてきた。本年度は、我々が開発した種々のナトリウム利尿ペプチドシステム遺伝子改変動物を用いて、ナトリウム利尿ペプチド/cGMP カスケードが血管再生に対して促進的に作用することを明らかにした。更に、虚血部への CNP 遺伝子導入により、虚血部の血流回復が認められ治療効果が確認された。今後、VPC の分化に対する血管ホルモンの作用とセルプロセシングへの応用を検討する予定である。

A. 研究目的

血管の再生は、“SOIL（土壌）”因子と“SEED（種子）”因子の双方が重要である。我々はこれまで SOIL 側の因子として血管局所で産生される血管ホルモンに着目し、その血管リモデリングにおける意義に関して一貫して研究を続けてきた。すなわち、血管収縮のペプチドであるアンジオテンシン II が、血管壁で産生される PDGF や TGF- β 、bFGF を介して血管平滑筋細胞の増殖、肥大に対して促進的に作用し（J. Clin. Invest. 1992）、一方ナトリウム利尿ペプチドなど血管弛緩因子が抑制的に作用すること（J. Clin. Invest. 1990）を報告した。更に、ナトリウム利尿ペプチドの一つである CNP が NO と並ぶ内皮由来血管拡張因子（EDRF）として作用することを明らかにした（J. Clin. Invest. 1992, Lancet 1992, Endocrinology 1993, Endocrinology 1998）。また、血流刺激を内皮細胞が感知し、内皮由来血管作動性物質が協調的な遺伝子発現制御を受け（ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメジュリン、NO、プロスタサイクリン等血管拡張因子の分泌増加とアンジオテンシン II やエンドセリン等血管収縮因子の産生低下）、血管弛緩、血管

増殖抑制の方向に働くことを報告した。動脈硬化病変の内皮細胞では、CNP の発現が低下しており、このことが動脈硬化症の発症進展に関与する可能性を示した（Hypertension 1998, Circulation 1998）。最近になり、アデノウィルスを用いた CNP の遺伝子導入により、CNP が血管平滑筋細胞の遊走や増殖を抑制するのみならず、その分化を誘導することを示し、CNP が血管保護的に作用することを明らかにした（BBRC 1998, Circ. Res. 1998）。主任研究者の伊藤らが同定した ES 細胞由来血管前駆細胞（ES cell-derived vascular progenitor cells; ES-VPC）を生体に移植することで虚血脳、心臓を保護再生させる本研究プロジェクトにおいては、ES 細胞より分化誘導、単離した ES-VPC を体外で大量に分化培養するセルプロセシング技術の開発が是非とも必要である。

そこで本年度は、血管ホルモンの ES-VPC の有効なセルプロセシングへの応用の可能性を想定し、これまで我々が研究を続けてきたナトリウム利尿ペプチドが血管再生作用を有するかにつき、我々が既に開発した種々の血管ホルモン関連遺伝子改変動物を用いて検討した。

B. C 研究方法及び結果

我々が開発した BNP を肝臓にて過剰発現するトランスジェニックマウス(BNP-Tg) (J. Clin. Invest. 1994)、ドイツミュンヘン大学 Hofmann 教授より供与されたナトリウム利尿ペプチドのシグナル伝達分子である cGMP 依存性プロテインキナーゼ(cGK)のアイソザイムの一つである cGK type1(cGKI)ノックアウトマウス、および我々が作成した CAG プロモーターを持つ cGKI トランスジェニックマウス(cGKI-Tg)を用い、大腿動脈を結紮切除した下肢虚血モデルを作成し、血管再生への影響を検討した。レーザードップラーでの解析では、術後 14 日間虚血部における血流の回復は BNP-Tg において有意に促進した。術後 10 日目における虚血筋の血管内皮および平滑筋マーカーである PECAM1/ α SMA による免疫染色では、BNP-Tg において有意に再生血管の増加を認めた。また、虚血筋の白血球マーカーである CD45 による免疫染色から、術後 3,5,7,10 日目いずれにおいても、BNP-Tg における浸潤白血球数は non-Tg と比較し同等あるいはむしろ減少していた。Dihydroethidium および 4-hydroxy-2-nonenal 染色の結果から、虚血側の血管壁におけるスーパーオキシドの産生は BNP-Tg において抑制された。NO 合成酵素阻害剤 L-NAME 投与における同様の解析では、non-Tg において有意に血管再生が抑制されたが、BNP-Tg では非投与群とほぼ同様の血流の回復が認められた。cGKI ノックアウトマウスにおける検討では、術後 28 日間にわたり虚血部における血管再生は有意に抑制された。一方、cGKI トランスジェニックマウスを用いた検討では、術後 28 日間にわたり虚血部における血管再生が有意に促進した。また、HUVEC を用いたマトリゲル法による検討では、ANP・BNP・CNP($10^{-10} \sim 10^{-8}$ M)によるネットワーク形成の促進が認められ、その作用は cGK 阻害剤である Rp-8-pCPT-cGMP により抑制された。以上の結果から、ナトリウム利尿ペプチド/cGMP/cGK 系を介した血管再生作用が明らかとなった。

この結果を踏まえ、ナトリウム利尿ペプチドの虚血性

疾患に対する血管再生療法への応用を目指し、下肢虚血モデルにおいて CNP の遺伝子導入を行った。ラット CNP cDNA を組み込んだ CMV プロモーターを持つプラスミド (500 μ g/匹)を虚血筋に術直後筋注にて導入したところ、術後 20 日目において虚血部における血管再生が有意に促進した。

D. 考察

VEGF による血管再生に関しては、内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)を介した作用があり、その下流の NO/cGMP/cGK 系の活性化も確認されている。我々は、NO と細胞内伝達系を共有するナトリウム利尿ペプチドにも同様な効果あると考え、上記実験を行った。マウス下肢虚血モデルによる解析から BNP-Tg における血管再生の促進を確認し、L-NAME による血管再生の抑制が BNP-Tg において代償されていることを示し、更には、その下流にある cGMP/cGK 系の活性化が血管再生に促進的に働くことを確認し、ナトリウム利尿ペプチド/cGMP/cGK 系による血管再生促進作用を示した。

NO donor としてすでに臨床的に広く用いられているニトログリセリンは、虚血性心疾患・閉塞性動脈硬化症などの疾患において、その血管再生作用が期待される。しかし、虚血障害血管においては NO の産生あるいは NO に対する反応性が低下することが報告されている。この原因として、血管内皮細胞におけるスーパーオキシドアニオンの増加が、NO の作用を抑制しているとする報告がある。BNP-Tg において、虚血側血管壁のスーパーオキシドの産生が抑制されたことは、ナトリウム利尿ペプチドにスーパーオキシド産生を抑制する作用がある可能性を示唆している。

一方、急性心不全の治療薬としてすでに臨床的に用いられている ANP であるが、BNP-Tg の血中 BNP 濃度は 1.8 ± 1.1 pmol/ml であり、その治療的濃度範囲内であった。従って、今回の我々の結果は、虚血性心疾患・閉塞性動脈硬化症に対するナトリウム利尿ペプチドの臨床応用の可能性を示唆している。

E. 結論

本年度の研究により、ナトリウム利尿ペプチドが血管保護作用のみならず、血管再生作用を有することが明らかとなった。血管ホルモンであるナトリウム利尿ペプチドは、血管平滑筋細胞の遊走増殖抑制、分化誘導のみならず、主任研究者伊藤らが明らかにした傷害内皮再生促進、血栓形成抑制作用、血管再生作用など血管構成細胞に対して多彩な作用を有することが示された。また、内因性の血管ホルモンであり副作用発現が少なく、血管再生療法において好適な因子であると考えられる。従って、次年度は血管ホルモンによる ES-VPC の体外大量分化培養について検討を行うことを予定している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Yamahara, H. Itoh, T-H. Chun, Y. Ogawa, J. Yamashita, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, T. Yurugi-Kobayashi, K. Miyashita, H. Tsujimoto, H. Kook, R. Feil, D.L. Garbers, F. Hofmann, K. Nakao. Significance and therapeutic potential of natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100: 3404-3409, 2003.
2. T. Miyazawa, Y. Ogawa, H. Chusho, A. Yasoda, N. Tamura, Y. Komatsu, A. Pfeifer, F. Hofmann, K. Nakao. CGMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. **Endocrinology** 143: 3604-3610, 2002.
3. M. Suda, K. Tanaka, A. Yasoda, Y. Komatsu, H. Chusho, M. Miura, N. Tamura, Y. Ogawa, K. Nakao. C-type natriuretic peptide/guanylate cyclase B system in ATDC5 cells, a chondrogenic cell line. **J. Bone Miner. Metab.** 20: 136-141, 2002.
4. H. Kobayashi, Y. Ogawa, M. Shintani, K. Ebihara, M. Shimodahira, T. Iwakura, M. Hino, T. Ishihara, K. Ikekubo, H. Kurahachi, and K. Nakao. A novel homozygous missense mutation of melanocortin-4 receptor (*MC4R*) in a Japanese woman with severe obesity. **Diabetes** 51: 243-246, 2002.
5. H. Kobayashi, M. Hino, M. Shimodahira, T. Iwakura, T. Ishihara, K. Ikekubo, Y. Ogawa, K. Nakao, and H. Kurahachi. Missense mutation of *TRPS1* in a family of tricho-rhino-phalangeal syndrome type III. **Am. J. Med. Genet.** 107: 26-29, 2002.
6. Y. Ogawa, H. Masuzaki, K. Ebihara, M. Shintani, M. Aizawa-Abe, F. Miyanaga, and K. Nakao. Pathophysiological role of leptin in lifestyle-related diseases: studies with transgenic skinny mice overexpressing leptin. **Diabetes Complications** 16: 119-122, 2002.
7. Y. Fujita, M. Murakami, Y. Ogawa, H. Masuzaki, M. Tanaka, S. Ozaki, K. Nakao, and T. Mimori. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. **Clin. Exp. Immunol.** 128: 21-26, 2002.
8. K. Shimizu, K. Chin, T. Nakamura, H. Masuzaki, Y. Ogawa, R. Hosokawa, A. Niimi, N. Hattori, R. Nohara, S. Sasayama, K. Nakao, M. Mishima, T. Nakamura, M. Ohi. Plasma leptin levels and cardiac sympathetic function in patients with obstructive sleep apnoea-hypopnoea syndrome. **Thorax** 57: 429-434, 2002.
9. H. Ariyasu, K. Takaya, H. Hosoda, H. Iwakura,

- K. Ebihara, K. Mori, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa, and K. Nakao. Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: Evidenced by a specific radioimmunoassay for active form of ghrelin. **Endocrinology** 143: 3341-3350, 2002.
10. N. Sagawa, S. Yura, H. Itoh, H. Mise, K. Kakui, D. Korita, M. Takemura, M.A. Nuamah, Y. Ogawa, H. Masuzaki, K. Nakao, and S. Fujii. Role of leptin in pregnancy-a review. **Placenta** 23: S80-86, 2002.
11. T. Miyawaki, H. Masuzaki, Y. Ogawa, K. Hosoda, H. Nishimura, N. Azuma, A. Sugawara, I. Masuda, M. Murata, T. Matsuo, T. Hayashi, G. Inoue, Y. Yoshimasa, and K. Nakao. Clinical implications of leptin and its potential humoral regulators in long-term low-calorie diet therapy for obese humans. **Eur. J. Clin. Nutr.** 56: 593-600, 2002.
- 2. 学会発表**
1. Y. Ogawa, K. Nakao. Physiologic and pathophysiologic implication of natriuretic peptide family. **Frontiers in molecular pharmacology and physiology** (Munich, Germany) 2002.5.30-6.1
2. K. Ebihara, Y. Ogawa, H. Yukioka, Y. Miyamoto, T. Tanaka, G. Inoue, C. Vision, M.L. Reitman, Y. Yoshimasa, K. Nakao. Effects of transgenic overexpression of leptin on hepatic gene expression in a mouse model of lipotrophic diabetes. **62nd Annual Meeting & Scientific Sessions** (San Francisco, USA) 2002.6.14-18
3. T. Nakagawa, Y. Ogawa, K. Ebihara, M. Yamanaka, A. Tsuchida, M. Taiji, H. Noguchi, K. Nakao. Antiobesity and antidiabetic effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent models of leptin resistance. **62nd Annual Meeting & Scientific Sessions** (San Francisco, USA) 2002.6.14-18
4. Y. Ogawa, K. Nakao. Pathophysiologic role of leptin in obesity-related hypertension: lessons from transgenic skinny mice. **Sympathetic neural mechanisms in cardiovascular control** (Goteborg, Sweden) 2002.6.19-20
5. Y. Ogawa, K. Nakao. Pathophysiologic and therapeutic implication of leptin: lessons from transgenic skinny mice. **9th International Congress on Obesity** (San Paulo, Brasil) 2002.8.24-29
6. Y. Ogawa, K. Nakao. Leptin, an antidiabetic hormone: lessons from transgenic skinny mice. **2th Yufuin International Workshop on Life-Style related Diseases** (Oita, Japan) 2002.9.11-14.
7. K. Ebihara, Y. Ogawa, K. Nakao. Clinical Implication of Leptin in Lipotrophic Diabetes. **Adiposcience and New Strategy for Obesity Treatment** (Kyoto, Japan) 2002.10.5
8. Y. Ogawa, K. Nakao. Leptin related peptide. **The Fifth Lilly International Symposium** (Kyoto, Japan) 2002.10.19
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
なし

hES-VPC 含有ハイブリッド人工血管の開発とその血管再生効果の検証

基盤技術の開発：小口径ハイブリッド人工血管の易吻合化のための血管接合具の開発

分担研究者：中山泰秀（国立循環器病センター研究所 室長）

マイクロ手術等で血管吻合を補助する器具としてカフが知られている。これを用いたカフ法は初心者にも習得が容易で、吻合時間の短縮が可能であるため、しばしば実験移植の分野で用いられている。本研究では、カフの概念を利用して、口径 1mm 程度の極小血管で端端ならびに端側吻合にも適用できる新しい血管接合具を開発した。接合具は、基材としてステンレス管（厚さ 100 μ m）を用い、これに YAG レーザーを用いたアブレーションにより微細多孔構造体化する、あるいはまた、別に溶接による分枝化加工を加えることにより直筒状と分枝筒状の 2 種類を作製した（径 1~4mm、長さ 2~15mm）。基材表面にはヘパリンを光化学固定した。端端接合は、まず宿主血管内に接合具を挿入し、外周を結紮固定し、これをさらにドナー血管の中に挿入し、再度外周を結紮固定することにより行った。端側接合は宿主血管に分枝型接合具の本管部を、移植血管に枝管部を挿入し、双方各々の外周の結紮固定により行った。口径の異なるステンレス管を用いることで宿主血管の口径に合うサイズの接合具を選択でき、容易にその内腔内に挿入することが可能であった。多孔化設計によって接合具にある程度の拡張性が付与でき、挿入後に血管径と最適化させることが可能であった。接合具の血管内への固定は外周を結紮するのみで行え、さらに移植血管で被覆し、外周を重ねて結紮することで端端吻合が達せられた。手縫い縫合に比べ確実かつ極めて短時間に終了した。端側吻合もほぼ同様の操作の繰り返しにより可能であった。壁に設けた微細孔からは血管細胞の浸潤が起り、内腔には新生血管壁構造の形成が観察された。ハイブリッド人工血管にも同様に適応でき、また宿主血管にほとんど傷害を与えないため、繰り返しの移植実験にも耐ええた。極小血管の吻合において虚血時間の大幅な短縮化、成功率の向上、また端側吻合への応用性が獲得された。虚血時間の短縮化は末梢臓器への負担の大幅な軽減をもたらせた。

A. 研究目的

本研究では、hES-VPC を用いて新しい血管壁のバイオニックデザインを行うことを目的とする。すなわち、人工血管の基材として用いることを考えているセグメント化ポリウレタン管状膜あるいはスポンジの内腔面に hES-VPC を播種する、あるいは hES-VPC を包埋したコラーゲンを内腔面にコーティングして生体とのコンプライアンスを一致させたスキャホールド上での hES-VPC の分化と血管壁の再構築を行う。その成果をもとに、微細口径ハイ

ブリッド血管あるいはハイブリッド毛細血管床の開発をめざしている。

本年度は、hES-VPC を用いたハイブリッド人工血管の開発と同時に、基盤技術として併行して進めている血管接合具の開発を行ったので報告する。血管の接合は通常、縫合による吻合によって行われている。その中でも 3mm 以下の小口径血管の場合には顕微鏡下でのマイクロ手術は必要となり、かなり熟練した縫合技術が要求される。そこで近年、マイクロ手術での血管吻合を補助する器具としてカフテ

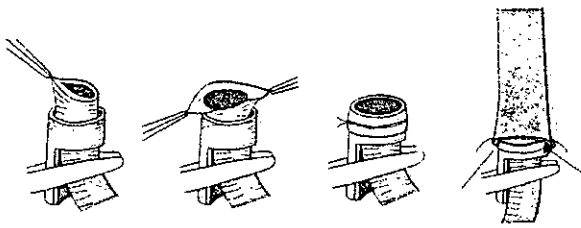


図1. カフテクニックを用いた血管の接合方法

クニックが開発された。これは、図1に示すように移植血管をカフ器具にめくりあげて固定させ、宿主血管を重ね合わせて外側を縛ることによって吻合が行われる。これによって極めて困難である血管の端端を合わせて縫合する必要が無く、吻合部からのほとんど出血させることなく吻合することができる。また、血管内腔面を移植片と宿主血管で密着させられるため内皮細胞層の断絶が無くスムーズな接合面が得られる。従って、このカフ法は初心者にも習得が容易で、吻合時間の短縮化が可能であるため、しばしば実験移植の分野において用いられている。

しかし、このカフ法では1端の血管をめくり返す必要があり、口径2mm以下の場合には極めて操作が困難となる。従って、小口径血管の場合においても簡便、確実に接合できる方法の開発が要求されている。

本研究では、我々が移植対象とするラットやマウスの腹部大動脈（口径1.5mm以下）などの超小口径血管を適用対象とする血管接合具の開発について検討した。これは、本研究で開発を予定しているハイブリッド人工血管に用いるスポンジ状チューブなどと宿主血管を吻合させる際に必須な基盤技術と考えられる。

B. 研究方法

B-1. 鈔付テフロン製接合具の作製

直径3mmのテフロン丸棒を3次元剪断加工機を用いて、内径1.3mm 外径1.6mm 長さ4mmの円柱状に切り出し、中央部に直径3mm 厚さ0.5のつばを設けた。

B-2. 多孔質ステンレス製接合具の作製

直径1mmまたは1.5mmのステンレスパイプをYAGレーザー加工機にて微細構造化させ、壁を格子状の網目構造化させた。次いで、長さ2mmまたは3mmに切り出した。

B-3. 接合具を用いた血管吻合

動物実験にはウイスター系の雄ラット（平均体重、250g）を用いた。エーテル麻酔下に開腹し、ラット尾静脈より200U/kgのヘパリンを投与した。顕微鏡下に腹部大動脈を露出させ、クランプにて血流を遮断させ血管を切断した。宿主血管の端端間に接合具を挿入し、外側を縛ることによって血管間を接合させた。また、一部では作製したポリウレタン製チューブ状のハイブリッド人工血管、あるいはスポンジ状のハイブリッド人工血管を切断した宿主血管の間に接合具を介して接合させた。所定期間後に接合具とその周囲の血管組織を取りだし、開存性を肉眼的に評価し、内腔面の微細構造を走査型電子顕微鏡にて観察した。

（倫理面への配慮）

研究上で倫理面に配慮すべき研究内容が生じた場合には、必要に応じて各所属施設内での倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ボランティアを必要とする研究ではインフォームドコンセントを行った上で協力をお願いする。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research)と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23)に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は各施設付属の動物管理施設にて一括管理される。

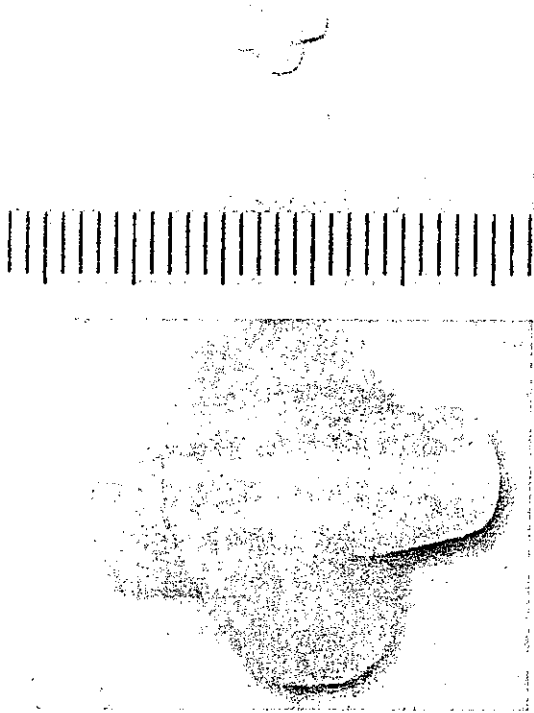


図 2. 第一世代接合具として作製した鈔付テフロン製接合具（上）とその拡大写真（下）

C, D. 研究結果と考察

CD-1. 鈔付テフロン製接合具を用いた血管の接合

第一世代として作製した鈔付テフロン製接合具の外観を図 2 に示す。内径 1.3mm 外径 1.6mm のテフロン管のほぼ中央部に取り扱い性を考慮して直径 3mm の鈔が設計されている。これを遮断したラット腹部大動脈の端端間に挿入させ、接合具の両端を覆った宿主血管の外側を結紮することで接合は完了した。クランプを除去すると血流は再開され、全く出血は無かった。血流の遮断時間は 10 分ほどですみ、極めて短時間で血管を接合させることができた（図 3）。

また、人工血管の接合への応用を検討した。まず、先と同様に遮断したラット腹部大動脈を切断し、血管の両断面に鈔付テフロン製接合具をそれぞれ挿入し、結紮固定した（図 4 上）。次いで、接続具の両端をスポンジ型人工血管の内腔内に挿入し、宿主血管と同様に結紮固定した（図 4 中）。両端のクラ

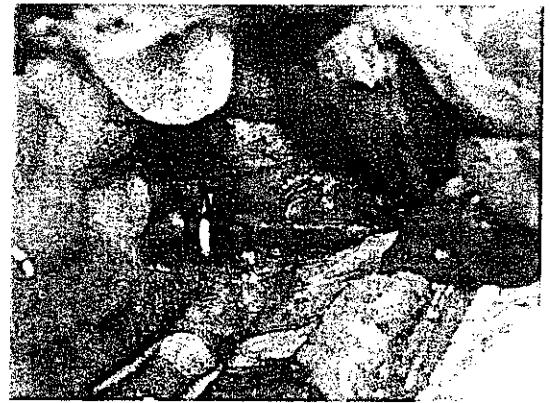


図 3. 鈔付テフロン製接合具を用いたラット腹部大動脈の接合例

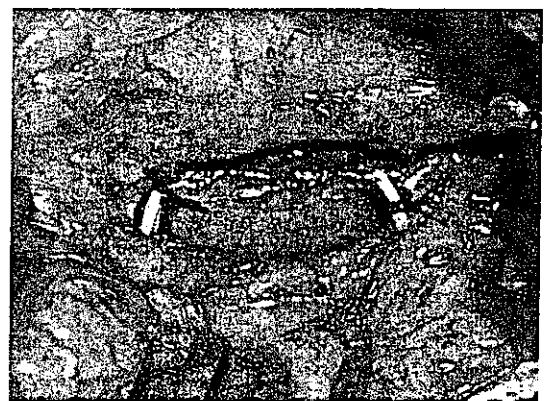
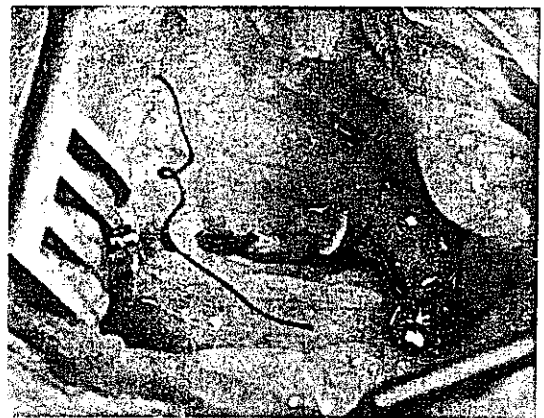


図 4. スポンジ型人工血管の接合例

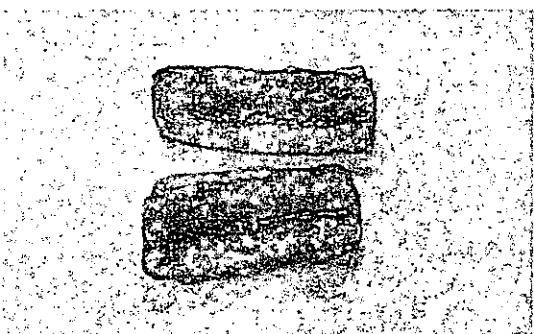
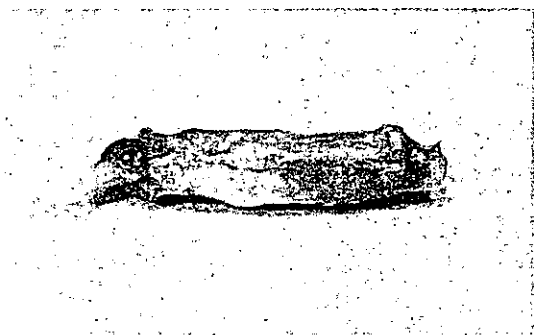


図5. ラット腹部大動脈に2週間移植したスポンジ型人工血管（上、中）、その内腔面（下）

ンプを除去すると血流は再開され、接合部を含めて出血はほとんど認めなかった。スポンジ状の人工血管は宿主血管と接合させる場合、内腔面の断端を揃えることが困難であるため、移植時の手技むらから結果を大きく変わることがしばしば経験される。しかし、この接合具を用いると簡便に接合でき、また内腔面をきれいに保つことができるため移植実験の結果の信頼性を大幅に高める事が期待できる。

スポンジ型人工血管を移植後、2週間目に開腹した。血流は保たれ、末梢側での拍動を認めた（図5上）。移植した人工血管を摘出すると、人工血管の周囲は結合組織で覆われ、宿主血管とほぼ一体化されていた（図5中）。人工血管を切断し、内腔面を

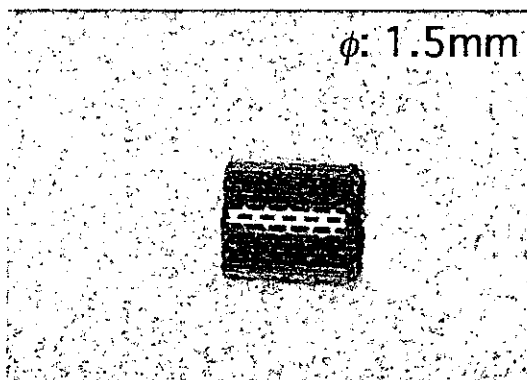
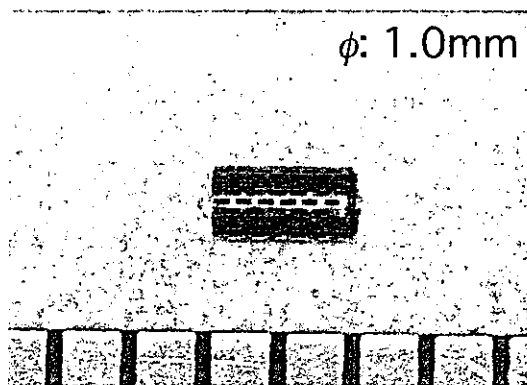


図6. 第二世代血管接合具として作製した多孔質ステンレス製接合具。上は直径1mm、下は直径1.5mm。いずれも秩序だった微細孔が均一に施され、格子状構造を形成している。

肉眼的に観察すると、血栓はほとんど認めず、薄ファイブリン層での皮膜化を認めた（図5下）。

以上より、テフロン製接合具を使うと、縫合することなく短時間で確実に血管を接合することができた。虚血時間を大幅に短縮化できることより末梢臓器への影響を最小限に止めることができ、一種の低侵襲治療法とも位置づけられた。血管の接合において宿主血管には大きな損傷を与えないことから、繰り返しの移植実験にも耐えうると考えられ、同一個体を用いた再現性の高い実験移植が可能である。

一方、用いた接合具は口径が既に規定されているため宿主血管との口径差が大きい場合には接合することができない。また、接合具は比較的柔らかい高分子材料であるテフロンを用いているため、ある程度の強度を得るには壁厚が厚くなる。その結果、内腔面を狭窄させることになり、小口径の血管では極めて深刻な問題となる。また、接合部の内腔面はテ

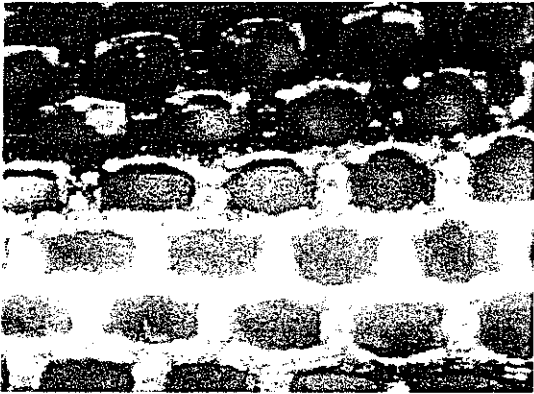


図7. 多孔質ステンレス製接合具の壁構造（上）。
その拡張後の壁構造（下）。

フロン面が露出しており、血管内腔面のように内皮化させることはほとんど期待できない。従って、慢性期にはテフロンと血管との端面において内膜肥厚が起こる可能性が高く、狭窄性閉塞になる危険性が高いと考えられる。そこで、上記の問題点を解決するため、第2世代となる多孔質接合具の開発について検討した。

基材は壁厚を薄くするため、強度の高い金属の中からステンレスを選択した。ステンレスはステントとして既に血管内治療器具として臨床応用されており、安全性が確立されている。ステンレスパイプを YAG レーザー加工機にてアブレーション加工すると金属の特定部位を除去することができた。CAD ソフトによって加工位置をミクロンレベルで厳密に設計すると、コンピューター制御によって厳密に多孔化することができた。四角い微細孔を繰り返し施すことによって格子状の壁構造を有する多孔質ステンレス製接合具が作製できた。用いるステンレスパイプの口径を変えることで、内径 1mm (図6上)

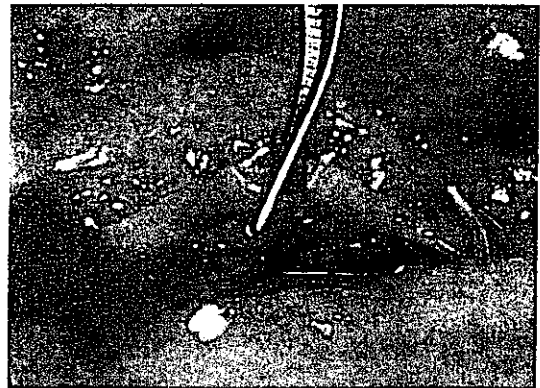
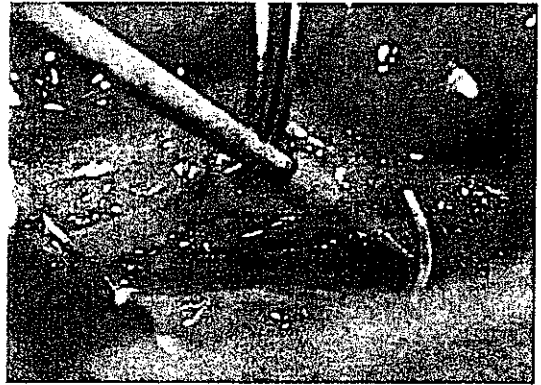


図8. 多孔質ステンレス接合具の宿主血管内への挿入方法。クランプにて血流を遮断し、血管壁の切開創（上）から挿入具を用いて接合具を血管内腔に挿入した（中）。切開面の両端にそれぞれ接合具を挿入した血管（下）。

と 1.5mm (図6下) の2種類の接合具が得られた。接合具は格子状構造であるため (図7上)、内腔より圧を付加するとステントと同様な原理で拡張させることができた (図7下)。

接合具は、特殊な挿入具を用いることで血管の内腔面にスムーズに留置することができた (図8)。