

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12-14年度 総括研究報告書

主任研究者 永井 良三

平成 15 (2003) 年 3 月

目 次

I. 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	3
永井 良三	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	17

総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総合研究報告書

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多施設による臨床治験にて有効性と安全性を確認した。（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第２ステージまで終了し良好な結果を得た。（３）スタチン系の薬剤が血管新生を促進することを明らかにし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。転写因子 KLF5 が心血管系のリモデリングに重要な役割を果たすことを示し、その抑制薬の開発に成功した。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。（５）骨髄由来細胞が動脈硬化病変を形成する平滑筋細胞の中に存在することを明らかにした。

永井良三
東京大学大学院医学系研究科・循環器内科、
教授
宮田哲郎
東京大学大学院医学系研究科・血管外科、講師
山崎 力
東京大学大学院医学系研究科・クリニカルバイ
オインフォーマティクス研究ユニット、教授
佐田政隆
東京大学大学院医学系研究科・循環器内科、
助手
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
名古屋大学大学院医学系研究科・器官制御内科、
教授
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) 動脈硬化病変を構成する細胞の由来

a)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。b)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。c)GFP 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。d)ソーターを用いて骨髄の分化化をおこない、平滑筋細胞を生み出しうる細胞群の同定を試みた。

2) 自家骨髄移植による血管再生と新生療法

a) 虚血肢に対する自己骨髄細胞移植による血管新生療法

成獣および成人の骨髄液、または末梢血から内皮前駆細胞を分離・培養し、さらに成熟内皮細胞への分化誘導を試みる。ヒト臍帯血単核球細胞か

ら内皮前駆細胞の培養・分化誘導を行う。これらの内皮前駆細胞を免疫抑制動物の虚血部位に移植し、血管新生の誘導が可能か否かを検討する。また我々のこれまでの研究から、骨髄単核球細胞の移植によっても、虚血部に血管新生を惹起し、虚血症状を改善できる可能性がある。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。

その後外科的・内科的治療によっても下肢虚血改善の認めない虚血下肢患者（Fontaine 3-4 度）に対して自己骨髄細胞移植を実施した。コントロール不良の糖尿病・網膜症、悪性腫瘍の合併症例は除外した。全身麻酔下で自家骨髄液約 500CC を採取したのち速やかに骨髄単核球を分離し、約 10 億個の細胞を虚血肢の筋肉内 40 箇所に分注した。第 1 相試験の結果（生食を対照利用、n=25）を受けて、第 2 相試験に必要な患者数を算定し、randomized, double-blind control (n=20)を開始した。トレッドミル負荷試験、組織酸素分圧、レーザードップラー、血管造影（DSA）、定量化疼痛スケールで評価した。

b) 虚血心筋に対する自家骨髄移植

外科的・内科的にも治療困難で他に代替え医療のない虚血性心臓病の症例を対象とした。骨髄採取は下肢移植と同様に実施する。約 1 億個の細胞を虚血冬眠心筋の 20 箇所に分注する。NOGA 解析システムより関西医大が独自に作製した細胞移植用カテーテルからの細胞移植を行う。移植細胞数を変えた dose-escalation test にて実施する。NOGA マッピング、心筋シンチ、コントラスト心エコー、冠動脈造影、運動負荷試験などで心機能改善、虚血部位血流増加、胸痛回数の軽減などを指標に実施する。

3) 遺伝子導入ならびに薬物による血管新生の促

進と抑制療法

a) HGF による下肢虚血患者への遺伝子治療

2 2 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 プラスミド DNA を超音波下で直接筋肉内投与（4 週及び 8 週）を行った。投与量は、ステージ 1（6 人）では 2mg（一回量）のみで、ステージ 2（16 人）では低容量（2mg）及び高容量（4mg）の設定で実施した。ヒト HGF 遺伝子は、サイトメガロウイルスのプロモーターによって発現され、環状プラスミド DNA の形で投与される。治療プロトコールとして、投与前 4 週間の観察期が設定され、既存の内科治療が無効であることを確認した後、第一ステージでは予備投与（0.5mg）でアレルギー反応などを確認し、本投与が実施される。

b) bFGF を発現する自己線維芽細胞による虚血下肢の治療

(1) 投与自家線維芽細胞数と治療効果及び副作用発生の可能性との関係

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、同時に採取した皮膚片より線維芽細胞を分離培養した。手術 20 日後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。翌日、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、血管造影スコア、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。

(2) デリバリーする血管新生因子による影響—bFGF と VEGF の比較

前記と同様にウサギ虚血肢を作成し、同時に自家線維芽細胞を培養した。手術 20 日後に、やはり同様の方法で培養線維芽細胞にシグナル配列付 bFGF

遺伝子又は VEGF 遺伝子、LacZ 遺伝子を導入した。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、細胞投与の組み合わせは以下の 4 群を作成した。bFGF 群 : bFGF 遺伝子を導入した細胞 5×10^6 個と LacZ 遺伝子を導入した細胞 5×10^6 個、VEGF 群 : VEGF 遺伝子を導入した細胞 5×10^6 個と LacZ 遺伝子を導入した細胞 5×10^6 個、併用群 : bFGF 遺伝子を導入した細胞 5×10^6 個と VEGF 遺伝子を導入した細胞 5×10^6 個、対照群 : LacZ 遺伝子を導入した細胞 1×10^7 個。

動注 28 日後、前記の評価法に加え、側副血行路における血液の流れ易さの指標である側副血行コンダクタンスを測定した。

c) HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (スタチン) の治療的血管新生への効果

C3H/HeN マウスの大腿動脈を結紮切離し、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にてモニターした。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。

d) 可溶性受容体による血管新生制御法の開発

血管新生因子群 (Vascular endothelial growth factor, Fibroblast growth factor, Angiopoietin-1, Platelet-derived growth factor, Transforming growth factor-beta, Hepatocyte growth factor) の特異的受容体のうち細胞外領域のみを取りだし (膜貫通部以下を削除) 免疫グロブリンの Fc 部分と融合させたキメラ体 cDNA を作成し、アデノウイルスベクターに組み込んだ (AdsTie2, AdPDGF-ExR, AdTb-ExR)。ヒト肺癌および膵臓癌由来の 15 種の癌細胞を準備した。コントロールとして β -galactosidase 発現ウイルス (AdLacZ) あるいは生食水注射群を用いた。癌細胞をヌードマウス皮下に移植し生着後、大腿筋肉内あるいは腹腔内にアデノウイルスを注入した。

腫瘍成育を経時的に観察した。腫瘍は組織学的に検討した。腫瘍内血管新生は第 VIII 因子発現細胞を免疫染色で、あるいは腫瘍内ヘモグロビン量を測定し評価した。

ECM の主要成分ヒアルロン酸と結合する CD44 および ECM の制御分子 TGF- β に対して可溶性 CD44, 可溶性 TGF- β 受容体を作成し、アデノウイルスに組み込んだ。ヒト由来がん細胞を尾静脈あるいは脾臓内に注入し、それぞれ肺転移および肝転移を観察した。マトリゲルを用いて癌細胞の浸潤能を評価した。ECM 分解酵素 (MMP) の活性をザイモグラフィで評価した。

4) 遺伝子およびアンチセンスを用いた血管保護療法

a) KLF5 遺伝子タノックアウトマウスを作成した。心血管系の病態モデルとして、大腿動脈カフ傷害、ワイヤー傷害、アンジオテンシン II 持続負荷、大動脈結紮などを行った。血圧などの生理学的検査を行うとともに、組織学的検討を行った。

b) Klotho 因子の血管への作用を検討するため、Klotho 遺伝子センダイウイルスを作成した。センダイウイルス、アデノウイルスを用いて、腎障害モデル、虚血モデルによって個体レベルで、また培養細胞によってさらに分子機構に関して検討した。

(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問題はない。ヒトへの臨床試験は各大学の倫理委員会で承認、さらには厚生労働省・文部科学省で承認を得て実施した。HGF 遺伝子治療では外部監査も NPO 法人 J-CRSU により実施された。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。

C. 研究結果

1) 動脈硬化病変を構成する細胞の由来

a) 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。

b) 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。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。

c) ApoE 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。

d) 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。

以上より骨髄細胞が血管前駆細胞として流血中に動員され、平滑筋細胞もしくは内皮細胞へ分化し、傷害後血管修復と血管病変形成へ寄与する機序が示唆された。

2) 自家骨髄移植による血管再生と新生療法

a) 虚血肢に対する自己骨髄細胞移植による血管新生療法

成人骨髄には血球系幹細胞のみならず、さまざまな成人幹細胞 (体性幹細胞) が含まれており、血管内皮細胞の前駆細胞も含まれることが最近明らかにされた。この細胞は生体内で骨髄より末梢血中に動員され、虚血領域に遊走し血管新生に加わることが判明した。我々は、ウサギ下肢虚血モデルを用い、虚血組織に自己骨髄細胞の幹細胞分画を移植すると血管新生が起きるか否かを検討した。ウサギの片側下肢虚血モデルを作成し、1 週間後に自己骨髄由来単核球を移植することにより、虚血下肢の血管新生が増強されるか否かを

検討した。血管造影、レーザードップラー、虚血組織切片における毛細血管密度のパラメーターにおいて、骨髄移植群がコントロール群 (生理食塩水注入群と線維芽細胞移植群) と比較して有意に側副血行や血管新生の改善がみられた。よって移植された自己骨髄単核球は虚血組織において、少なくともそれら細胞自身が血管形成に参加するか、もしくは血管新生促進因子を放出し、局所の血管新生を刺激するものと考えられた。次に、アメイロイドコンストラクターを用いた慢性ブタ心筋虚血モデルを作成し、自己骨髄単核球細胞移植により、虚血部血管新生と血流の改善が見られるか否かを検討した。マイクロスフェア注入による血流量、血管造影上の側副血行路、左心室壁運動いずれもが有意に改善された。なおこの実験では、先端に極小径の注射針がついた特殊なカテーテルを用いており、将来の内科的な細胞移植手段の糸口になるものと期待される。

また臨床応用については、重症末梢動脈閉塞症に対して、Vasculogenesis を利用した血管新生療法を 2000 年 1 月より開始した。(Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation) (TACT-1)。コントロール不良の糖尿病・網膜症、悪性腫瘍の合併症例は除外した。全身麻酔下で自家骨髄液約 500CC を採取したのち速やかに骨髄単核球を分離し、約 1×10^9 個の細胞を虚血肢の筋肉内 40 箇所に分注した。第 1 相試験の結果 (生食を対照利用、 $n=25$) を受けて、第 2 相試験に必要な患者数を算定し、randomized, double-blind control ($n=20$) を開始した。第 1 相試験で対照として対側の虚血肢に同時投与した末梢血単核球細胞 (PB-MNC) や生食では血流増加はみられなかった。第 2 相試験の対照としては末梢血単核球を用いた。この第 2 相試験では骨髄移植群では ABI (上肢・下肢血圧比) が 0.97 増加し、対照末梢血単核球群の ABI が 0.024 より統計学的有意な差を認めた。下肢疼痛完全緩和が 20 人中 18 人でみられた。トレッドミル歩行距離は約 2.6 倍以上増加した。注射部位の炎症・浮腫は認めず、血中の VEGF・FGF・HGF 濃度、単核球細胞数は変化しなかった。動物実験と同様に骨形成など内皮細胞以外の細胞への分化

は認めなかった。血管造影では著明な血流増加が観察された。下肢潰瘍は2月後には著明に改善した。現在まで90人の虚血下肢 (Fontaine 3-4 度) に対して自己骨髄細胞移植を実施し、二重盲検試験で効果を確認した。この治療成績は Lancet に世界初の循環器病での細胞移植による血管新生治療として掲載され、注目された。本邦でも24大学病院、2国立病院で同じプロトコールで91人の no option 虚血下肢症例を対象に実施され、有効性と安全性が確認されている。91人の実施例のうち死亡は3例 (心筋梗塞2例・脳梗塞1例) であった。

b) 虚血心筋に対する自家骨髄移植

これまで2例の症例に実施した。1例を紹介する。CCS class IV の重症狭心症であり、安静時狭心痛が頻発し、1日15回程度のニトログリセリンスプレーを使用している。NOGA mapping システムでカテーテルを介して虚血冬眠心筋に心内膜側より、自家骨髄単核球を20箇所に移植した。7日以内に狭心痛は全く消失した。冬眠心筋部位での運動低下部位は著明に改善した。4か月間、週一回24時間 Holter 心電図フォローした不整脈の出現は認めなかった。CPK、Troponin で評価される心筋傷害は最小限であり、4日以内に正常域に復帰した。左心室収縮率は43%から52%へと増加した。心筋シンチでは負荷後再分布現象は消失し、運動対応能は3倍も亢進した (TACT-2)。

3) 遺伝子導入ならびに薬物による血管新生の促進と抑制療法

a) HGF による下肢虚血患者への遺伝子治療

第一ステージの成績では、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。1年の時点でも、より改善を示した症例が認められるなど、有効性が持続していることが明らかになった。第一・第二ステージをあわせた全症例の解析では、22症例中19症例で改善を示し (86.4%)、22症例すべてで安全と認められた (100%)。各パラメータの改善では、0.1以上のABI改善は71% (12/17)、

25%以上の潰瘍サイズ縮小は72% (18/25)、VASで1cm以上の改善は95% (12/13)、2cm以上の改善は62% (8/13) で認められた。また、Fontaine IIbを対象にした試験では、25%以上のトレッドミル運動負荷試験の延長を86% (6/7) で認めた。一方で、HGF 遺伝子投与に関する重篤な有害事象は現在まで認めておらず、異常な血管増勢も確認されなかった。主な副作用として投与部位での痛みや皮下出血が一過性に確認されたが、時間経過とともに速やかに消失した。一方、遠隔臓器での血管新生が副作用として懸念されたが、血清及び血漿HGF濃度は、遺伝子治療の前後で増加していなかったことや実際にCTなどの確認により、否定的であった。

b) bFGF を発現する自己線維芽細胞による虚血下肢の治療

(1) 投与自家線維芽細胞数と治療効果及び副作用発生の可能性との関係

- 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。
- 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。
- 血管造影スコア、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。
- 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。
- 細胞投与後の血液検査では、炎症や臓器障

害を示すデータは得られなかったが、遺伝子細胞 2.5×10^7 個を投与された動物ではアデノウイルスに対する血中抗体価の有意な増加が認められた。

(2) デリバリーする血管新生因子による影響—bFGF と VEGF の比較

- 下腿血圧比、内腸骨動脈血流量では bFGF 群、VEGF 群ともに対照群と比べ有意な血圧の上昇を認めたが、両者の間には有意差はなかった。また併用群は bFGF、VEGF 両群よりさらに有意に上昇していたが、bFGF と VEGF の相乗効果は認められなかった。
- 血管造影スコア、側副血行コンダクタンスでは、対照群、VEGF 群、bFGF 群、併用群の順で改善しており、それぞれの間に有意差を認めた。

c) HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (スタチン) の治療的血管新生への効果

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、セリバスタチン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セリバスタチン治療群で有意に増加していた (890 ± 97 v. s. 1302 ± 153 /mm²)。

②高脂血症 (ApoE^{-/-}) マウスモデルで、セリバスタチン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。③セリバスタチン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。④セリバスタチン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。セリバスタチン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。

d) 可溶性受容体による血管新生制御法の開発

がん細胞のヌードマウス皮下移植モデルで腫瘍成長を観察すると、可溶性 VEGF 受容体遺伝子導入により腫瘍血管新生が阻害されがん細胞のアポトーシスが亢進し、腫瘍の退縮が惹起された。可溶性 VEGF 受容体は VEGF 産生能の高い癌ほど有

効で、検討した 6 種の癌細胞のうち 5 つで腫瘍退縮効果を認めた。可溶性 VEGF 受容体導入マウスは前例生存し成育や行動に明らかな異常は観察されなかった。

可溶性 VEGF 受容体が無効の 2 種の腫瘍の成長は可溶性 FGF 受容体導入によりほぼ完全に抑制された。

可溶性 VEGF 受容体と可溶性 FGF 受容体を併用すると、3 種の腫瘍で、それぞれの単独使用に比べて腫瘍成長は相加的に抑制された。

可溶性 VEGF および FGF 受容体を併用しても十分な抗癌効果を得られなかった腫瘍において、可溶性 Tie-2、PDGF 受容体が著効を示した。

可溶性 CD44 と可溶性 TGF β 受容体を導入すると癌転移 (肝および肺) をそれぞれ約 60% 抑制したが、両者を併用すると転移は 90% 以上抑制された。可溶性 CD44、可溶性 TGF β は癌細胞の皮下移植モデルにおいて腫瘍内血管新生も阻害し、腫瘍成長を抑制した。

4) 遺伝子およびアンチセンスを用いた血管保護療法

a) KLF5 ヘテロノックアウトマウスを用いて各種病態モデルにおける KLF5 の機能を検討した。ヘテロノックアウトマウスにおいて血管傷害に対する反応性の著明な低下、アンジオテンシン II 負荷による心肥大・心臓線維化の抑制が認められ、KLF5 が心血管系の外的ストレスに対する応答に重要であり、組織リモデリングを進める機能を持つことが明らかになった。さらに KLF5 の分子機能に関して検討を行い、KLF5 がアンジオテンシン II などの外的ストレスによって平滑筋細胞や線維芽細胞において誘導され、PDGF-A や TGF β などのパラクリン因子の発現を制御することを明らかとした。つまり、KLF5 は心血管系において外的ストレスに応じて、パラクリン因子等を発現制御を介して組織リモデリングを司る機能を持つと考えられた。

以上の結果より、KLF5 の機能を修飾することにより、動脈硬化、PCI 後再狭窄、心肥大・心臓線維化などの予防・治療が行える可能性があると考えた。そこで KLF5 の転写制御機能に作用する薬

剤をスクリーニングし、合成 RAR α リガンドである Am80 が KLF5 を抑制することを明らかとした。Am80 の機能をマウスの各種疾患モデルで検討し、*in vivo* においても KLF5 を抑制し、動脈硬化や心肥大・線維化を軽減させることを示した。

一方、KLF5 の分子機能の解析により、この転写因子が他の様々な転写因子・コレギュレーターと相互作用して機能する結果を得た。今後、KLF5 の蛋白構造が明らかになることにより特異的な蛋白相互作用に作用する薬剤の開発が可能になると考えられる。

薬理的な KLF5 抑制法だけではなく遺伝子導入による KLF5 発現抑制を試みるため、新規のテクノロジーである short interfering RNA (siRNA) の導入を試みた。開発した KLF5 に対する siRNA は培養細胞において明らかに KLF5 発現を抑制した。さらに下流遺伝子の発現も抑制され、この siRNA が KLF5 の機能を抑制することが示された。さらに *in vivo* の血管新生モデルにおいてこの siRNA が血管新生を抑制することを示した。

b) Klotho 遺伝子の機能解析と血管保護法への応用のため、Klotho を発現するセンダイウイルスを開発した。このウイルスによって培養細胞のみならず動物個体にも Klotho 発現を誘導できることが明らかとなった。またセンダイウイルスおよびアデノウイルスを用いて Klotho の血管保護作用の少なくとも一部が Akt リン酸化を介していることを見出した。

D. 考察

本研究により流血中に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た。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。

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も検

討する予定である。さらに、将来的には骨髄からより選択的に内皮前駆細胞を取り出す技術が必要になってくると思われる。このため、現在様々な幹細胞の細胞表面分子マーカーを用いて、細胞を選択することを試みている。

この骨髄細胞移植を用いた血管新生治療は世界で初めてのその有効性・安全性が確認された臨床試験である。閉塞性動脈硬化やバージャー病など虚血下肢に対する骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生治療の効果が 2 重盲検試験で確認されたことより、再建不可能な虚血下肢への細胞移植治療の安全性・有効性が示された。遺伝子治療と異なり疼痛の消失は 1 週間以内と非常に早く、これは血管新生による血流増加より早期に痛み抑制効果が発揮された。血球系細胞よりの VEGF 供給、それに続く血清成分の浸出などが知覚神経の興奮閾値を変化させたと考えられる。虚血下肢に対する骨髄細胞移植症例では、可能性は非常に少ないが、移植細胞のマクロファージへの分化、血管平滑筋細胞への分化による冠動脈、頸動脈の動脈硬化病変の修飾は、移植後の血管造影で注意深くフォローがなされている。

重症狭心症への骨髄単核球移植は 2 例ではあるが、有望な血行再建治療と期待される。内科的・外科的に胸痛の軽減手段のない患者さんにとっては新規の高度先進医療である。大動物実験で予想されたことではあるが、血管新生効果は下肢より勝るかもしれない。異種細胞への分化はなく、副作用としての不整脈も全く観察されていない。

HGF 遺伝子治療は、特記すべき副作用は見られず、第 2 ステージまで終了し、当初の目的を達成した。第一ステージの症例では、1 年のフォローが終了し、0.1 以上の ABI 増加は 3 人中 4 人、疼痛改善は 4 人中 4 人で認められており、長期間での効果持続と安全性が確認できた。第 2 ステージでも同様の成績が得られており、血管再生を利用した治療の有効性と安全性を示せた。血液中 HGF 濃度の変化が認められないことより、局所での HGF 産生の増加が症状改善をもたらしたものと考えられた。欧米で行われている VEGF 遺伝子による治療が、副作用として浮腫が 60% 以上に発生してい

るのに対して、HGF 遺伝子による治療では浮腫の発生を認めておらず、副作用の面で HGF 遺伝子が優れている可能性が示された。

ex vivo において遺伝子を導入した自己線維芽細胞を用いた血管新生療法は、ウサギ慢性虚血肢モデルにおいて有効であることが示された。導入する細胞数は 5×10^6 個以上必要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するため、予期せぬ副作用の原因となる可能性があると考えられた。

さらにデリバリーする血管新生因子についての検討では下腿血圧比、内腸骨動脈血流量、筋肉内毛細血管密度では、bFGF 群と VEGF 群は対照群と比較して有意に改善していたものの両者間に有意差は認められなかった。そのため、ほぼ同程度の血管新生効果を誘導する bFGF 及び VEGF がそれぞれ虚血肢にデリバリーされたと考えられる。その一方で、所謂血管新生のうち arteriogenesis を反映する側副血行コンダクタンス及び血管造影スコアでは、bFGF 群は VEGF 群と比較して有意な改善が認められた。従って、bFGF 群は VEGF 群より arteriogenesis の誘導において優位な傾向にあることが示唆された。当然、bFGF と VEGF は作用機序の異なる血管新生因子であり、活性を現すのに要する量も異なるため、単純に比較することは困難である。しかし、VEGF は血管内皮細胞に特異的は増殖因子であるのに対し、bFGF は内皮細胞に加えて平滑筋細胞や線維芽細胞に対する活性もあることから、前記の推測が成り立つ余地は十分あるのではないかと考えられる。もし、これが正しければ、血管新生療法に用いる血管新生因子としては VEGF より bFGF の方がより有利と言えるであろう。

高脂血症治療薬であるスタチン系薬剤が、eNOS の活性化を介して虚血肢への血流を増加する一方、生体にとって好ましくない血管新生は促進しないと思われる。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。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に関与しているかもしれない。

血管新生制御法の治療応用として抗腫瘍血管新生による抗癌療法の開発および臨床応用の可能性を探索してきた。初年度にまず可溶性 VEGF 受容体を用いた VEGF 抑制療法の有効性を実証した。この戦略は複数の癌で有効であった。しかし無効の癌も存在した。これらの癌では VEGF 以外の血管新生因子を使っているとの仮説を立て、次年度では FGF に焦点をあてた。可溶性 FGF 受容体は可溶性 VEGF 受容体無効癌の腫瘍成長を抑制した。また両者の併用で相加的抑制効果を示す癌も確認できた。抗血管新生分子群の併用療法の有効性・有用性が実証された。最終年度にはさらに別の抗血管新生分子の有効性を確認した（論文準備中）。3-4 種の抗血管新生分子群を併用すると、広範囲の癌種に有効で実用的な治療法となりうることが示された。最終年度はさらに新たな治療戦略として ECM-細胞機能連関の阻止の戦略の有用性を示した。抑制効果の分子基盤の解析が必要である。

今回の我々の研究によって転写因子 KLF5 が心血管系病態の形成に重要であることが明らかになった。特に KLF5 は中長期に進展する組織リモデリングの調節に重要であり、この転写因子の機能を制御することにより有効な血管保護法を開発できると考えられた。そこで KLF5 機能を抑制する薬剤を同定し、合成レチノイド Am80 が *in vitro*、*in vivo* で KLF5 機能を就職し、血管病変の進展を抑制することを明らかとした。さらに Am80 の薬剤溶出性ステントへの応用を進めているが、siRNA による KLF5 発現制御とともに有効な血管保護法への展開が期待される。

Klotho 遺伝子に関してその分子機構の解析とともにセンダイウイルスによる新しい遺伝子導入法を開発した。センダイウイルスによって *in vivo* においても効率的に遺伝子導入が得られており、今後の研究に有用であるだけでなく、治療法開発への応用も考えられる。

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。「骨髄由来血管前駆細胞」の定着や分化に関する研究は血管病の治療、血管再生に今後貢献すると期待される。

骨髄細胞移植を用いた血管新生治療は世界で初めてのその有効性・安全性が確認された臨床試験である。閉塞性動脈硬化やパージャーカー病など虚血下肢に対する骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生治療の効果が2重盲検試験で確認されたことより、再建不可能な虚血下肢への細胞移植治療の安全性・有効性が示された。さらに虚血心筋への骨髄細胞移植も2例で施行され、効果が認められた。今後の症例数の増加によりその有効性、安全性が明らかになることが望まれる。

世界で初めて実施されたヒト HGF 遺伝子を用いた血管再生の遺伝子治療は、安全に行うことができ、欧米で行われている VEGF 遺伝子による治療以上の有効性が明らかになった。潰瘍の改善や ABI の増加など、臨床症状の改善も期待される。現在、ヒト HGF 遺伝子を用いたマルチセンター試験を申請しており、本年には開始する予定である。米国においても、本研究成果を元にして臨床治験フェーズ II が FDA により認可されており、現在実施されており、世界的にもその効果が期待されている。

血管の慢性炎症と組織リモデリングに重要な転写因子 KLF5 を解析した。Am80 は KLF5 を抑制することによって血管保護療法に重要な薬剤となると考えられる。また、KLF5 を中心とした研究を展開することにより、心血管疾患の分子メカニズムの基礎的研究が進められるとともに、血管保護法の治療戦略に重要な知見や創薬の機会を与えるものと考えられる。Klotho の研究によって、血管保護に作用する液性因子のネットワークの解明が期待される。

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。

F. 研究発表

論文発表

論文リスト参照

学会発表

永井

12th International Vascular Biology Meeting
“Roles of KLF5/BTEB2 in phenotypic modulation of smooth muscle cell and cardiovascular remodeling” 2002. 5. 14 軽井沢

International Congress on cardiomyopathies and heart failure “KLF5/BTEB2, a Krüppel-like zinc-finger type transcription factor, is a target gene for angiotensin II signaling and involved in cardiovascular remodeling” 2002. 5. 3 京都

第 34 回日本動脈硬化学会 日本動脈硬化学会賞受賞講演「平滑筋形質変換の分子機構：心血管リモデリング因子 KLF5/BTEB2 の役割と意義」2002. 7. 19 神戸

分子血管リモデリング研究会 「転写因子 KLF5/BTEB2 による心血管リモデリング制御」2002. 8. 8 御殿場

第 6 回日本心不全学会 会長講演 “KLF5/BTEB2, a Krüppel-like zinc-finger type transcription factor, both smooth muscle activation and cardiac hypertrophy” 2002. 10. 3 東京

分子循環器研究会「転写因子 KLF5/BTEB2 による心血管リモデリング制御」2002. 10. 26 大阪

The 4th Fujihara Seminar Molecular and cellular aspects of muscle contraction “KLF5/BTEB2, a Krüppel-like zinc-finger type transcription factor, mediates both smooth muscle cell activation and cardiac hypertrophy” 2002. 10. 28 箱根

日本脈管学会 「クロマチン内の平滑筋サブタイプ特異的転写調節」2002. 11. 7 東京

American Heart Association Scientific Meeting “Krüppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling” 2002. 11. 19 シカゴ

Gordon Research Conference “Krüppel-like factor 5 (KLF5) controls cellular responses in vascular

diseases” 2003. 1. 26 ベンチュラ

日本心臓血管作動物質学会 「動脈硬化病変の形成、進展における KLF5 と PPAR γ の役割」 2003. 2. 2 大阪

宮田

小山博之、宮田哲郎ら、Ex vivo 遺伝子導入法による新しい治療的血管新生療法の有効性と特性、2002 年日本脈管学会

小山博之、重松宏、宮田哲郎ら、アデノウイルスベクターを用いた bFGF 遺伝子の ex vivo 導入法による血管新生遺伝子治療、2002 年日本外科学会

山崎

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）

今井 靖、林 同文、川浪 大治、都島 健介、西村 剛、山崎 憲、野尻 剛史、原田 智浩、門前 幸志郎、山崎 力、永井 良三 臨床・ゲノム研究の根幹となり症例データベースシステムの構築と疾患感受性遺伝子解析への応用 第 50 回日本心臓病学会学術集会：平成 14 年 9 月 9-11 日名古屋 Journal of Cardiology 2002. 40. Supple I 254.

佐田

佐田政隆、吹野恵子、斎浦明夫、幕内雅敏、平田恭信、永井良三「骨髄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 3 4 巻、125 ページ、2001）

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（公開シンポジウム講演収録集 代表 北徹）グバプロ 2002: 176-188.

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（日本医学会シンポジウム記録集 2002: 12 月. 68-73）

佐田政隆、永井良三「骨髄由来血管前駆細胞と血管リモデリング」第 23 回日本炎症・再生医学会ワークショップ 2002 年 7 月 2 日 東京（炎症・再生学会 22 巻、330 ページ、2002）

佐田政隆、平田恭信、永井良三「スタチンによる血管新生促進作用」第 34 回日本動脈硬化学会総会パネルディスカッション2 スタチンの pleiotropic effect を考える」2002 年 7 月 19 日 神戸（平成 14 年度動脈硬化学会抄録集、118 ページ、2002）Sata, M., Kato, H., Tanaka, K., Washida, M., Shoji, M., Hirata, Y. “Contribution of Bone Marrow Cells to Vascular Remodeling Varies in Different Types of Arterial Injuries.” American Heart Association 76th Scientific Sessions, Chicago, 2002 (Circulation 2002, 106: II-144.)

室原

Ueno T, Coussement PK, Murohara T, Cui J, Fallahi P, Ueno M, Frohwein S, Baldwin S, Palasis M, Imaizumi T, Chronos NAF, Robinson KA. Therapeutic angiogenesis by bone marrow-derived cell transplantation in pigs with coronary constrictor-induced chronic myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 37: 48A (abstract).

上野

上野 光 可溶性血管新生因子受容体を用いた抗腫瘍血管新生療法 第 5 回 がん分子標的治療研究会総会

小川 聡、北野 正剛、上野 光 可溶性血管新生因子受容体遺伝子導入による腫瘍退縮 第 60 回 日本癌学会総会

セ 連波、永井 拓、小川 聡、上野 光 細胞外マトリクス-がん細胞連関阻害によるがん転移抑制の試み 第 6 回がん分子標的治療研究会総会 2002. 6. 札幌

松原

Tateishi E, Shintani S, Murohara T, et al. Efficacy and safety of therapeutic angiogenesis using autologous

bone marrow cell implantation for critical limb ischemia.

2002 年 American Heart Association (シカゴ・米国)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

血管性疾患の治療のための医薬 (永井)

出願日 平成 14 年 4 月 22 日

血管新生を促進するための新規な方法 (宮田)、

特願 2001-356765 号

Novel method for promotion of angiogenesis (宮田)

US Patent 出願中 10-156135 号

「血管内狭窄部拡張機能付きガイドワイヤー」特願 2000-175983 (佐田)

「カテーテルを兼用する医療用ガイドワイヤー」

特願 2000-175993 (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

予防及び/又は治療剤 (特願 2001-337861) (佐田)

MED-PRV0205/US “Pharmaceutical Composition for angiogenesis” (森下)

「骨髄単核球細胞の分離、濃縮方法及び血管再生剤」 (松原) 平成 12 年 12 月 4 日 特許出願

「炭酸水による血管新生治療」 (松原) 特許出願
考案中

「磁場反応性細胞移植用カテーテルの作製及び心筋内注入」 (松原) 特許出願考案中

「細胞移植用カテーテルの作製及び心筋内注入」

(松原) 特許出願考案中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Morishita R, Aoki M, Kaneda Y.	Decoy oligodeoxynucleotides as novel cardiovascular diseases. Atherosclerosis VI.	Bertolottis R et al.	Annals of The New York Academy of Sciences	Numano F and MA Gimbrone.	米国	2001	294-302
Morishita R, Kaneda Y.	HVJ-liposome method.	MI Phillips	“Methods in Enzymology”	Academic Press.	米国	2002	619- 627
Morishita R	Cardiovascular disease: gene therapy.		The Encyclopedia of the Human Genome	Nature Publishing Group	米国	(in press)	(in press)
松原弘明, 正木浩哉, 岩坂壽二	骨髓細胞移植による心 血管再生医療	小室一成	循環器病フロ ンティア	メジカルビ ュー社	東京	2002	116- 120
松原弘明、 岩坂壽二	血管新生療法	藤田勝治	知っておきた い200Words— 現代医学理解 のために—	医歯薬出版	東京	2002	1143- 1144
松原弘明	閉塞性動脈硬化症 (ASO) の診断・治療	永井良三	循環器診療二 貢の秘訣	金原出版	東京	2002	192-193

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	頁	出版年
Aoki M, Morishita R, Taniyama Y, Kida I, Moriguchi A, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T.	Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis, etc.	Gene Ther	7	417-427	2000
Duan J, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shintani S, Akita T, Shimada T, Imaizumi T.	Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	20	2579-2585	2000
Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, Arai N, Sata M, Sugiura S, Takenaka K, Gualberto A, Hixon ML, Wagner MW, Aoyagi T.	Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training.	Circulation	101	2134-2137	2000
Honda M, Sakamoto T, Ishibashi T, Inomata H, Ueno H.	Experimental subretinal neovascularization is inhibited by adenovirus-mediated soluble VEGF/flt-1 receptor gene transfection: a role of VEGF and possible treatment for SRN in age-related macular degeneration.	Gene Ther	7	978-985	2000
Hoshino Y, Kurabayashi M, Kanda T, Hasegawa A, Sakamoto H, Okamoto E, Kowase K, Watanabe N, Manabe I, Suzuki T, Nakano A, Takase S, Wilcox JN, Nagai R.	Regulated expression of the BTEB2 transcription factor in vascular smooth muscle cells: analysis of developmental and pathological expression profiles shows implications as a predictive factor for restenosis.	Circulation	102	2528-2534	2000
Matsushita H, Morishita R, Aoki M, Tomita N, Taniyama Y, Nakagami H, Shimozato T, Higaki J, Kaneda Y, Ogihara T.	Transfection of antisense p53 tumor suppressor gene oligodeoxynucleotides into rat carotid artery results in abnormal growth of vascular smooth muscle cells.	Circulation	101	1447-1452	2000
Morishita R, Aoki M, Kaneda Y.	Oligonucleotide-based gene therapy for cardiovascular disease: are oligonucleotide therapeutics novel cardiovascular drugs?	Curr Drug Targets	1	15-23	2000
Murasawa S, Matsubara H, Mori Y, Masaki H, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Kitabayashi I, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Iba S, Iwasaka T.	Angiotensin II initiates tyrosine kinase Pyk2-dependent signalings leading to activation of Rac1-mediated c-Jun NH2-terminal kinase.	J Biol Chem	275	26856-26863	2000
Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T.	Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization.	J Clin Invest	105	1527-1536	2000
Nagai R, Kowase K, Kurabayashi M.	Transcriptional regulation of smooth muscle phenotypic modulation.	Ann N Y Acad Sci	902	214-222; discussion 222-213	2000
Nagata D, Suzuki E, Nishimatsu H, Yoshizumi M, Mano T, Walsh K, Sata M, Kakoki M, Goto A, Omata M, Hirata Y.	Cyclin A downregulation and p21(cip1) upregulation correlate with GATA-6-induced growth arrest in glomerular mesangial cells.	Circ Res	87	699-704	2000

Ogata T, Kurabayashi M, Hoshino YI, Sekiguchi KI, Kawai-Kowase K, Ishikawa S, Morishita Y, Nagai R.	Inducible expression of basic transcription factor-binding protein 2 (BTEB2), a member of zinc finger family of transcription factors, in cardiac allograft vascular disease.	Transplantation	70	1653-1656	2000
Ogata T, Kurabayashi M, Hoshino Y, Ishikawa S, Takeyoshi I, Morishita Y, Nagai R.	Inducible expression of BTEB2, a member of the zinc-finger family of transcription factors, in cardiac allograft arteriosclerosis.	Transplant Proc	32	2032-2033	2000
Ogata T, Kurabayashi M, Hoshino Y, Sekiguchi K, Ishikawa S, Morishita Y, Nagai R.	Inducible expression of basic transcription element-binding protein 2 in proliferating smooth muscle cells at the vascular anastomotic stricture.	J Thorac Cardiovasc Surg	119	983-989	2000
Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R.	In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome.	Biochem Biophys Res Commun	276	767-772	2000
Sata M, Maejima Y, Adachi F, Fukino K, Saiura A, Sugiura S, Aoyagi T, Imai Y, Kurihara H, Kimura K, Omata M, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R.	A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia.	J Mol Cell Cardiol	32	2097-2104	2000
Sata M, Kakoki M, Nagata D, Nishimatsu H, Suzuki E, Aoyagi T, Sugiura S, Kojima H, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Omata M, Nagai R, Hirata Y.	Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cyclic GMP-independent mechanism.	Hypertension	36	83-88	2000
Sato N, Mizumoto K, Nakamura M, Ueno H, Minamishima YA, Farber JL, Tanaka M.	A possible role for centrosome overduplication in radiation-induced cell death.	Oncogene	19	5281-5290	2000
Shindo T, Kurihara H, Kuno K, Yokoyama H, Wada T, Kurihara Y, Imai T, Wang Y, Ogata M, Nishimatsu H, Moriyama N, Oh-hashii Y, Morita H, Ishikawa T, Nagai R, Yazaki Y, Matsushima K.	ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function.	J Clin Invest	105	1345-1352	2000
Shiose S, Sakamoto T, Yoshikawa H, Hata Y, Kawano Y, Ishibashi T, Inomata H, Takayama K, Ueno H.	Gene transfer of a soluble receptor of VEGF inhibits the growth of experimental eyelid malignant melanoma.	Invest Ophthalmol Vis Sci	41	2395-2403	2000
Takayama K, Ueno H, Nakanishi Y, Sakamoto T, Inoue K, Shimizu K, Oohashi H, Hara N.	Suppression of tumor angiogenesis and growth by gene transfer of a soluble form of vascular endothelial growth factor receptor into a remote organ.	Cancer Res	60	2169-2177	2000
Taniyama Y, Morishita R, Nakagami H, Moriguchi A, Sakonjo H, Shokei K, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T.	Potential contribution of a novel antifibrotic factor, hepatocyte growth factor, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamsters.	Circulation	102	246-252	2000

Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, Shimamura K, Kimura J, Michishita I, Suzuki T, Nagai R.	Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	20	2243-2247	2000
Wada Y, Suzuki J, Tsukioka K, Zhang T, Takayama K, Endoh M, Watanabe N, Kurabayashi M, Kawauchi M, Nagai R, Takamoto S, Isobe M, Amano J.	Expression of the transcriptional factor egr-1/BTEB2 in cardiac xenograft vascular remodeling.	Transplant Proc	32	1089-1091	2000
Yamamoto K, Morishita R, Tomita N, Shimozato T, Nakagami H, Kikuchi A, Aoki M, Higaki J, Kaneda Y, Ogihara T.	Ribozyme oligonucleotides against transforming growth factor-beta inhibited neointimal formation after vascular injury in rat model: potential application of ribozyme strategy to treat cardiovascular disease.	Circulation	102	1308-1314	2000
Fujiyama S, Matsubara H, Nozawa Y, Maruyama K, Mori Y, Tsutsumi Y, Masaki H, Uchiyama Y, Koyama Y, Nose A, Iba O, Tateishi E, Ogata N, Jyo N, Higashiyama S, Iwasaka T.	Angiotensin AT(1) and AT(2) receptors differentially regulate angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding-epidermal growth factor (EGF)-mediated EGF receptor transactivation.	Circ Res	88	22-29	2001
Iwasaki T, Aihara Y, Kanda T, Oriuchi N, Endo K, Katoh H, Suzuki T, Nagai R.	Immunoscintigraphy of aortic dissection with 99mTc-labeled murine anti-smooth muscle myosin monoclonal antibody in rats.	J Nucl Med	42	130-137	2001
Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T.	Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines.	Circulation	104	1046-1052	2001
Kanai H, Tanaka T, Aihara Y, Takeda S, Kawabata M, Miyazono K, Nagai R, Kurabayashi M.	Transforming growth factor-beta/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
Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H, Miyaura C, Inada M, Nagai R, Nabeshima Y, Nakamura K, Sinclair AM, Scheuermann RH, Kuro-o M.	Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways.	J Immunol	167	2625-2631	2001
Morita H, Kurihara H, Imai Y, Sugiyama T, Hamada C, Sakai E, Mori M, Nagai R.	Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese.	Thromb Haemost	85	226-230	2001
Morita H, Kurihara H, Yoshida S, Saito Y, Shindo T, Oh-Hashi Y, Kurihara Y, Yazaki Y, Nagai R.	Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates neointima formation in rat carotid arteries after balloon injury.	Circulation	103	133-139	2001
Murohara T.	Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors.	Trends Cardiovasc Med	11	303-307	2001

Nagai R, Suzuki T, Aizawa K, Miyamoto S, Amaki T, Kawai-Kowase K, Sekiguchi KI, Kurabayashi M.	Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells: dissection of transcriptional regulatory mechanisms.	Ann N Y Acad Sci	947	56-66; discussion 66-57	2001
Nakajima A, Wada K, Miki H, Kubota N, Nakajima N, Terauchi Y, Ohnishi S, Saubermann LJ, Kadowaki T, Blumberg RS, Nagai R, Matsuhashi N.	Endogenous PPAR gamma mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury.	Gastroenterology	120	460-469	2001
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	89	63-70	2001
Ogata T, Nagai R, Kurabayashi M, Hoshino Y, Sekiguchi K, Kowase K, Akuzawa A, Ishikawa S, Takeyoshi I, Morishita Y.	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
Ohara N, Koyama H, Miyata T, Hamada H, Miyatake SI, Akimoto M, Shigematsu H.	Adenovirus-mediated ex vivo gene transfer of basic fibroblast growth factor promotes collateral development in a rabbit model of hind limb ischemia.	Gene Ther	8	837-845	2001
Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M.	Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis.	Nat Med	7	382-383	2001
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	433	163-168	2001
Sata M, Luo Z, Walsh K.	Fas ligand overexpression on allograft endothelium inhibits inflammatory cell infiltration and transplant-associated intimal hyperplasia.	J Immunol	166	6964-6971	2001
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	15	2530-2532	2001
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	21	1733-1737	2001
Sekiguchi K, Kurabayashi M, Oyama Y, Aihara Y, Tanaka T, Sakamoto H, Hoshino Y, Kanda T, Yokoyama T, Shimomura Y, Iijima H, Ohyama Y, Nagai R.	Homeobox protein Hex induces SMemb/nonmuscle myosin heavy chain-B gene expression through the cAMP-responsive element.	Circ Res	88	52-58	2001
Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T.	Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction.	Circulation	103	2776-2779	2001