

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15年度 総括・分担研究報告書

平成16(2004)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 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
微細口径ハイブリッド人工血管開発のための基盤技術の最適設計と動物実験による予備的検討に関する研究 15
- 中山泰秀
2. 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ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞の同定及び血管再生関連遺伝子の網羅的探索に関する研究 29
- 仁藤新治

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 33

IV. 研究成果の刊行物・別冊 37

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、ヒト ES 細胞から VPC と呼び得る細胞の分化誘導、同定とその単離、*in vitro* での ES 細胞由来ヒト血管の構築に成功した。更に、我々がこれまで一貫して研究を続けてきた血管ホルモンであるアドレノメジュリン (adrenomedullin; AM) が cAMP/プロテインキナーゼ A 系及び IP3 キナーゼ/Akt 系を活性化し、損傷内皮再生及び血管再生作用を発揮することを発生工学的手法を用いて証明した。AM は更に ES 細胞由来 VPC そのものの内皮細胞への分化を著明に促進した。今後、AM 等のペプチド及び遺伝子を用いた *in vitro* 及び *in vivo* でのセルプロセッシング法を確立し、ヒト ES 細胞由来 VPC 移植による新規虚血臓器の機能回復療法の開発を目指したい。

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、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、我々が日本で最初で承認を得たヒト 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。

昨年度の本研究課題により、マウス ES 細胞由来 VPC を体外である程度、血管構成細胞に分化させた後生体に移植することにより、生体において ES 細胞由来の血管が構築され、移植局所の血流が増加することを明らかにした。また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が cGMP/cGMP 依存プロテインキナーゼ (G キナーゼ) の活性化に引き続く IP3 キナーゼ/Akt 及び Erk1/2 の活性化により、損傷内皮再生促進及び虚血時血管再生を促進することを明らかにした。

本年度は、ES 細胞由来 VPC の臨床応用を目指し、ヒト ES 細胞からの VPC の同定単離に成功した。更に、ヒト ES 細胞由来 VPC 移植のための有効なセルプロセッシング法の確立を目指し、ナトリウム利尿ペプチド同様血管拡張ペプチドである“アドレノメジュリン (Adrenomedullin; AM)”に注目し、発生工学的手法を用い AM 過剰発現トランスジェニックマウスを開発し、その血管再生作用を証明し、更に脳卒中モデル動物を確立して、AM の虚血脳保護再生治療効果を見いだした。更に、AM は ES 細胞由来 VPC から移植用の内皮細胞を高効率に分化誘導させる作用があることも明らかにした。

B.C. 研究方法及び結果

1. ヒト ES 細胞 (human embryonic stem cell; hES) の血管再生への応用に関する基盤研究 (田辺製薬との共同研究)

① ヒト ES 細胞からの血管前駆細胞 (vascular progenitor cells; VPC) の同定単離とヒト血管構築

我々は、昨年度本研究課題により実施したサル ES 細胞での血管前駆細胞の同定の経験をもとに、昨年度よりヒト ES 細胞の維持培養を開始し、酵素法による独自の継代法を確立し、輸入元の従来の培養法に比べ約 16 倍となる大量培養に成功した。また、当培養法において、ヒト ES 細胞が多分化能を維持し、ALP 活性・TRA1 等の各種ヒト ES 未分化マーカーも維持されていることも確認した。

ヒト ES 細胞ではマウス ES 細胞と異なり、血球・血管系の前駆細胞マーカーである AC133, VEGFR2, c-kit が未分化な ES 細胞においてすでに発現していた (図 1)。ヒト ES 細胞 (HES-3) はマウス ES 細胞とは異なり、サル ES 細胞と同様に未分化な状態で約半数の細胞が VEGFR2 (Flk1) を発現していた。これらの VEGFR2 陽性細胞はすべてヒトの ES 細胞未分化マーカー TRA1 は強陽性であった。この未分化ヒト ES 細胞を線維芽細胞系ストローマ細胞株 OP9 細胞との共培養系にて分化誘導を行うと、VEGFR2 陽性かつ TRA1 陰性である細胞群が出現した (図 2)。これらの VEGFR2 陽性 TRA1 陰性細胞を FACS にて分離し、コラーゲン IV コートディッシュ上にて再培養したところ、VE カドヘリン陽性 CD34 陽性 PECAM1 陽性 eNOS 陽性の血管内皮細胞および α 平滑筋アクチン陽性 カルボニン陽性の血管平滑筋細胞の両方が出現した。これらの細胞はコラーゲン IA ゲル内 3 次元培養にて管状構造を形成し、ヌードマウス皮下への移植にてホストの血流と交通を持つ毛細血管網を構築した。

これらの結果から、ES 細胞由来 VEGFR2 陽性 TRA1 陰性細胞はヒトにおいて血管前駆細胞として働くことが示され、血管再生医療の有力な材料となりうることを示唆された。

図 1. 未分化 ES 細胞における血球・血管系幹細胞マーカーの発現

ヒト ES 細胞は、マウス ES 細胞とは異なり、未分化な状態で VEGFR2、AC133、cKIT の発現が認められる。

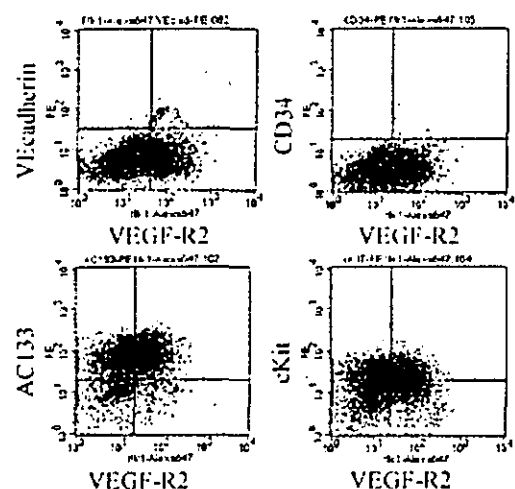
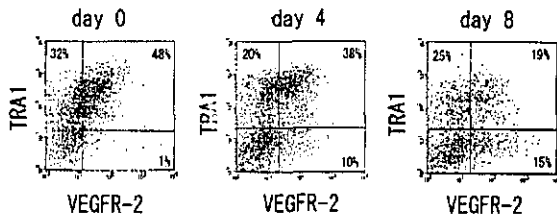


図2. ヒト ES 細胞からの血管内皮細胞の誘導

ヒト ES 細胞を OP9 上で8日間分化誘導を行うと、VEGF-R2+TRA1-の分画が約 15%出現し、これらは血管前駆細胞としての働きを有していた。



2. ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞(hES-VPC)の体外大量増幅技術の開発

①血管ホルモン、アドレノメジュリン(adrenomedullin; AM)トランスジェニックマウスの開発と AM の虚血時血管再生作用の証明

血管拡張ペプチドである AM は我々が昨年度本研究課題で見出した血管再生促進作用を有するナトリウム利尿ペプチドの一つである CNP と同様に、血管局所において産生分泌される。また昨年度本研究課題において AM が *in vitro* 及び *in vivo* の双方で損傷内皮再生、血管再生促進作用を有することを明らかにした。本年度は、この AM の血管再生作用を発生工学的手法を用いて解析した。

AM 前駆体遺伝子からは AM のみならず、生理活性作用を有するもうひとつのホルモンである PAMP(proadrenomedullin N-terminal 20 peptide)が産生される。AM 単独での効果を解析するために、PAMP が不活化されるよう塩基置換した変異型 AM 遺伝子を用いて AM が単独で過剰発現するトランスジェニックマウス (Tg) マウスを作成した。ヒト腎臓 cDNA ライブラリーより AM 前駆体 遺伝子 cDNA を増幅し、PAMP コード領域 3' 端のグアニンをシトシンに置換した。その結果、導入遺伝子から産生される PAMP のアミド化シグナル内のグリシンがアラニンに変異し、PAMP 活性発現に必須の過程である C 端アミド化が阻害され、活性型の PAMP は分泌されない。その変異型 AM 前駆体遺伝子 cDNA を肝細胞特異的な遺伝子過剰発現作用を有する Serum amyloid P (SAP)プロモーターと結合したコンストラクトを用いて、ヒト AM を単独で過剰発現する Tg マウスを作成した。

AMTg マウス F13 ラインでヒト AM 血中濃度の上昇を認めた。尾から抽出した DNA のサザンブロット解析で、トランスジーンコピー数はそれぞれ 8, 11, 30 コピーであった。血漿ヒト総 AM 濃度は 11 コピーの Tg マウスで 614 ± 137 fmol/ml、8 コピーの Tg マウスで 166 ± 98 fmol/ml、30 コピーの Tg マウスで 138 ± 40 fmol/ml であった。11 コピーの Tg マウスで成熟型 AM は 24 ± 4 fmol/ml まで上昇し、ヒトでの投与の際得られる血中濃度に匹敵していた。一方、ヒト成熟型 PAMP 血中濃度を測定したところ、その上昇を認めなかった。収縮期血圧は 16 週齢で野生型 123 ± 3 mmHg に対し Tg 114 ± 3 mmHg と有意な低下を認めた。脈拍数に有意差はなかった。

AMTg マウスおよび野生型マウスで、我々がこれまで報告した方法に準じて、大腿動脈結紮下肢虚血モデルを作成した。レーザードップラー血流計にて、阻血後の虚血肢の血流を経時的に測定して AM の血管再生作用を検討した。動物実験は京都大学動物実験指針を遵守して行われた。

その結果、AMTg マウスでは第 14 日から血流回復が有意に促進し、第 28 日まで野生型マウスよりも良好な血流が保たれた(第 28 日において、健常肢に対する虚血肢の血流は、野生型: $56 \pm 8\%$ 、AMTg: $73 \pm 5\%$; $P < 0.05$)。

②糖尿病性壊疽モデルでの AM の血管再生治療効果の検討

8 週齢 C57BL/6 に Streptozotocin (STZ) 70mg/kg を 5~10 日間腹腔内投与したところ、4 週後に高血糖(平均 308 mg/dl)を認めた。高血糖を認めた 26 週後、大腿動脈結紮を施行し、下肢阻血後の血管再生についてレーザードップラーによる術後 8 週間までの経時的血流変化および Lectin 染色による capillary density の評価にて検討した。高血糖マウスにおける結紮肢の血流改善は 39 日目まで対照に比し 70%に抑制され [$p < 0.05$, $n=10$ (STZ), 9 (対照)]、また capillary density は約 70% ($p < 0.05$, $n=4$) に減少していた。同様の検討を糖尿病発症から 16 週後のマウスを用いて検討したところ、22 日目に対照と比べて約 70% [$p < 0.05$, $n=9$ (STZ), 9 (対照)]に抑制されており、

糖尿病マウスにおいて下肢結紮後の血流回復が遅延していることが示された。

STZ により糖尿病化した AM Tg における検討では、AMTg における血流回復は下肢結紮後 17 日目において野生型に比べ約 50% [$p < 0.05$, $n = 6$ (Tg), 4 (野生型)] 促進されていた。

③ AM の ES-VPC の内皮細胞への分化誘導作用の発見

AM は生体内において副腎、心臓、腎臓などに幅広く分布しているが、発生段階においても胎生早期から心血管等に発現し、AM 遺伝子のホモノックアウトマウスは血管構築不全により胎生致死となることから心血管系分化制御因子としての意義が注目されている。我々はこれまでに、AM が *in vitro* での wound healing assay を用いた検討で損傷内皮の再生を促すことを証明し、また *in vivo* においても、ゲルプラグを用いた移植実験でプラグ内の毛細血管密度と血流を増加させることを報告した。また我々はマウス ES 細胞由来 VEGFR2 (Flk1) 陽性細胞が血管内皮細胞・血管平滑筋細胞両者への分化能を有する血管前駆細胞であることを報告した。そこで、AM によるマウス ES 細胞由来 VPC からの血管内皮細胞への分化誘導作用について検討した。

未分化 ES 細胞を分化抑制因子である LIF (leukemia Inhibitory factor) 非存在下に 4 型コラーゲン上で 4 日間培養すると VEGFR2 陽性細胞が全体の約 30-40% に誘導されてくる。これらの細胞を FACS を用いて 95% 以上の高い純度で sorting し、4 型コラーゲン上で再び培養をおこなった。培養液中には 10% FCS、VEGF (50ng/ml) および AM (10^{-8} M \sim 10^{-6} M) を添加した。3 日間の再培養後に PECAM-1 (内皮細胞マーカー) および VE-cadherin (内皮細胞マーカー) の発現について FACS による解析をおこなった。また、 α SMA (壁細胞マーカー) および PECAM-1 (内皮細胞マーカー) について免疫染色を施行し、各添加因子の VEGFR2 陽性細胞からの血管構成細胞分化に対する効果について検討した。

免疫染色の結果では、ウシ胎児血清 (FCS) のみで VEGFR2 陽性 VPC を培養した場合には α SMA 陽

性壁細胞が 95% 以上を占め PECAM-1 陽性の内皮細胞はほとんど出現しなかった。FCS に VEGF を投与すると PECAM-1 あるいは VE-cadherin が陽性の内皮細胞が全体の約 30% に誘導された。AM は VEGF との併用において 10^{-8} M \sim 10^{-6} M の範囲で濃度依存的な PECAM-1 陽性内皮細胞誘導作用を認めた (図 3)。また、FACS による解析によって FCS+VEGF+AM 10^{-6} M では内皮細胞が全体の約 50% に誘導されることが明らかとなった。また FCS+VEGF+AM 10^{-7} M によって認められた内皮細胞誘導作用は AM 受容体アンタゴニストである AM22-52 の添加によって、AM 非添加時である FCS+VEGF 添加時と同程度にまで阻害されることが示された (図 4)。以上より、AM によるマウス ES 細胞由来 VEGFR2 陽性 VPC からの血管内皮細胞への分化誘導作用が明らかになった。

図3. AMIによるES細胞由来VPCからの濃度依存的な内皮細胞誘導効果

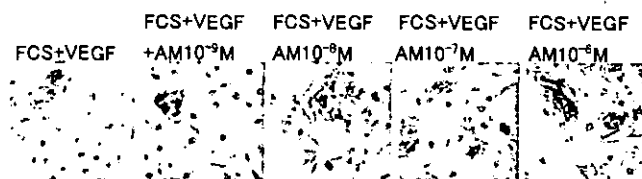
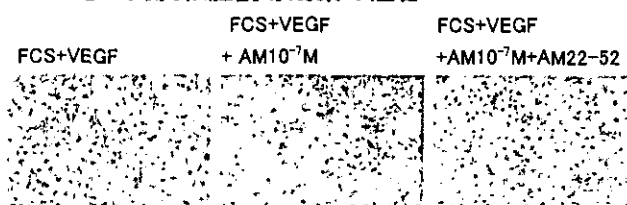


図4. AM22-52を用いたAM依存的ES細胞由来VPCからの内皮細胞誘導効果の阻害



ES 細胞の血管再生への応用を考えた場合、どのような分化段階の血管構成細胞をどのような経路で生体内に移植すべきであるのか、また移植する血管構成細胞をいかに量的に確保することができるのかということを検討する必要がある。すでに我々は腫瘍血管新生モデルマウスへの ES 細胞由来 VPC 移植において VPC をさらに分化させた状態で移植することによって腫瘍部分の血流を増加させることに成功

し、移植 VPC の分化段階が宿主生体の血流増加に重要であることを昨年度の本研究課題で明らかにしている。また、本実験結果の手法を用いることで、AM によって ES 細胞由来 VPC から血管構成細胞である内皮細胞を潤沢に確保することができる可能性が示された（現在投稿準備中）。我々はすでに霊長類であるカニクイザルの ES 細胞から VPC を同定しており、現在ヒトへの臨床応用を目指し、霊長類 ES 由来 VPC についても AM の血管内皮分化誘導作用について検討をおこなっている。

3. hES-VPC 移植の試みと治療効果の検証

①マウス中大脳動脈閉塞脳卒中モデルの確立とAMの虚血脳での血管保護再生、神経再生治療効果の検討

以下の方法にてマウス中大脳動脈閉塞脳卒中モデル確立に成功した。12 週齢マウスに対し、イソフルレンを用いて吸入麻酔を施行した。頸部正中切開にて左総頸動脈を露出して小孔を作成し、シリコンコートを施した塞栓子(8-0 ナイロンモノフィラメント)を挿入した。塞栓子を総頸動脈から内頸動脈に注意深く進め、中大脳動脈起始部を閉塞し、血流の途絶を側頭骨に設置したファイバー血流計にて確認した。20 分後に塞栓子を抜去し、血流の再開を血流計にて確認した。

AMTg マウスおよび野生型マウスで虚血作成後の脳血流を、レーザードップラーイメージャーを用いて第 56 日まで評価した。第 4~6 ないし第 7~9 日に BrdU を腹腔内投与し、第 56 日までに大脳を摘出して、虚血側基底核における梗塞域の大きさ、血管再生ならびに神経再生を組織学的に評価した。マウスを 4%PFA を用いて還流固定し、摘出した大脳を 30% スクロース/PBS にて置換した後、OCT コンパウンドにて凍結包埋した。頭頂 3mm から 4mm の部分で 30 μ m 厚の切片をミクロトームで作成し、室温で 2mol/l HCl に 30 分間浸漬した。ブロッキング処理後 4 $^{\circ}$ C で一次抗体に 24 時間浸漬し、その後二次抗体に 12 時間浸漬した。用いた一次抗体は、抗 BrdU 抗体、抗 neonatal nuclear antigen(NeuN) 抗体、抗 glial fibrillary acidic protein(GFAP) 抗体、抗 platelet-

endothelial cell-adhesion molecule 1 (PECAM-1)抗体である。PECAM-1 を用いた免疫染色で毛細血管密度を定量し、AMTg マウスと野生型マウスでの血管再生を評価した。NeuN を用いた免疫染色でニューロンの脱落を観察し、梗塞域の大きさを定量した。GFAP を用いた免疫染色でグリオシスを評価した。さらには、BrdU と NeuN が二重陽性となる細胞数を定量することで、神経再生を評価した。

20 分間の中大脳動脈閉塞にて、頭頂 3mm から 4mm に相当する部分の基底核を中心に、ニューロンの脱落とグリオシスを認めた。AMTg マウスの基底核虚血域において PECAM-1 染色で定量した毛細血管密度は野生型と比較して術後 7 日目から有意に増加し（第 28 日における毛細血管密度は、野生型: $484.9 \pm 23.6/\text{mm}^2$ 、AMTg: $541.1 \pm 23.1/\text{mm}^2$; $P < 0.05$ ）、これを反映して虚血域の脳血流も野生型と比較して有意に増加した（第 28 日において、健常側に対する虚血側の脳血流は、野生型: $88.9 \pm 3.3\%$ 、AMTg: $97.6 \pm 3.1\%$; $P < 0.05$ ）。

AMTg マウスでは第 28~56 日における虚血基底核での神経脱落が減少しており、梗塞域の大きさも AMTg マウスで有意に減少した（第 28 日における梗塞域は、野生型: $0.33 \pm 0.02\text{mm}^2$ 、AMTg: $0.25 \pm 0.02/\text{mm}^2$; $P < 0.05$ ）。またグリオシスも AMTg マウスで軽減していた。BrdU と NeuN が二重陽性となった細胞数を定量すると、AMTg マウスで増加しており（第 28 日での二重陽性細胞数は野生型マウス $32.0 \pm 2.5/\text{mm}^2$ に対して AMTg では $60.0 \pm 8.6/\text{mm}^2$; $P < 0.05$ ）、AMTg マウスにおいて梗塞後の神経再生の促進も認めた。

②ES-VPC のセルプロセッシングおよびティッシュエン지니어リングによる有効移植法の開発

ES-VPC を用いた虚血性疾患に対する血管再生療法の確立を目指し、マウス下肢虚血モデルにおいてマウス VPC の移植を行った。移植に用いた VPC の作成であるが、Elongation factor-1 の promoter をつないだ LacZ 遺伝子を導入し、恒常的に LacZ を核内で発現させた未分化 ES 細胞を Leukemia Inhibitory Factor(LIF)非存在下、IV 型コラーゲンコートディッ

シュ上にて4日間培養し、FACSにて95%以上の純度でFlk1陽性細胞を単離した。FACSによる解析結果から、この段階の細胞(undifferentiated VPCと名付けた)は、Flk1のみ陽性であり、VEcadherinやPECAM1といった他の内皮細胞マーカーは発現していなかった。更に、このFlk1陽性細胞をVEGF存在下にIV型コラーゲンコートディッシュ上で3日間再培養した。この段階の細胞(differentiated VPCと名付ける)は、約30%はFlk1の発現を維持し、加えてVEcadherinやPECAM1も陽性であった。残りの約70%の細胞は、免疫染色の結果から、 α SMA陽性の壁細胞に分化しており、differentiated VPCは内皮細胞および壁細胞からなる細胞集団であることがわかった。

マウス下肢虚血モデルは、6~10週令、雄のKSNヌードマウスを用い、右大腿動静脈を結紮切除し、作成した。このモデルを作成直後に1匹当たり $0.3 \sim 1.2 \times 10^6$ 個のVPCを計10カ所に分けて筋注した。結紮後6あるいは12日目に屠殺し、虚血側下肢筋のwhole mountでのLacZ染色を行った後、凍結切片を作成し、PECAM1および α SMAによる免疫染色を行った。VPC移植法としては、undifferentiated VPCに関しては、PBSに浮遊させ、筋注した。differentiated VPCの移植には、PBS以外にI型コラーゲンゲルに浮遊させ、筋注した。コラーゲンゲルには、増殖因子であるVEGFや塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を混ぜた群も作成した。コラーゲンゲルは、細胞外マトリックスであり、VPCの生着率の改善、あるいは、その増殖因子の徐放作用を期待し、用いた。

図5は、虚血下肢にundifferentiated VPCを移植した結果を示している。図左上は、移植後6日目におけるwhole mountでのLacZ染色であるが、undifferentiated VPCは移植部位にcell aggregateを形成し、周囲に拡散している様子はなかった。図左下は凍結切片のPECAM1による免疫染色の弱拡大であるが、LacZ陽性細胞が血管腫様構造を形成していた。図右の強拡大では、矢印で示すように、LacZ陽性細胞の中にはPECAM1陽性を示すものがあり、移植後undifferentiated VPCが内皮細胞に分化していることが確認された。更にこれら細胞が血管腫様構造

を形成しており、内部には血球成分も認めた。その他、血管腫様構造の周囲にはLacZ単独陽性細胞が散在し、内皮細胞以外へ分化している可能性が考えられた。

図6は、differentiated VPCをPBSに浮遊させ、虚血下肢に移植した結果を示している。図左上は、移植後6日目のwhole mountでのLacZ染色であるが、血管腫様構造はなく、筋膜に沿うような形で、cappillary loop様にLacZ陽性部位を認めた。図左下は、凍結切片のPECAM1染色であるが、LacZ/PECAM1両者陽性の細胞が血管構造をとっていた。図右の強拡大において、血管はundifferentiated VPC移植の場合と比較し、内径が小さく、周囲にLacZ単独陽性細胞は認めなかった。移植されたundifferentiated VPCは、血管腫様構造を取ったのに対し、differentiated VPCはより成熟した形の脈管構造となっていたことから、以後の実験はundifferentiated VPCではなく、differentiated VPCを用いた。

図7は、I型コラーゲンに浮遊させたdifferentiated VPCを移植した結果である。図左上は、移植後12日目のwhole mount LacZ染色であるが、筋注部にLacZ陽性部位を認めた。PBSに浮遊させて移植した場合と比較し、LacZ陽性部位はより大きくなっていた。図左下および右は、凍結切片のPECAM1と α SMAによる二重染色の結果を示している。LacZ/PECAM1両者陽性細胞が脈管構造を形成し、これらは矢印で示すように、 α SMA陽性細胞で囲まれる成熟した血管であった。

更に、移植したVPCの生着率を上げるために、VPCの移植における増殖因子の効果を検討した。図8は、2 μ gのVEGFをI型コラーゲンに混ぜてdifferentiated VPCと共に移植した結果を示している。図左上は、移植後12日目のwhole mount LacZ染色であるが、コラーゲンのみに浮遊させて移植した場合と比較し、LacZ陽性部位は更に大きくなっていた。図左下および右は、凍結切片のPECAM1と α SMAによる二重染色を示している。LacZ/PECAM1両者陽性の細胞が非常に増加しており、発達した脈管構造を認め、矢印で示すように、LacZ/PECAM1両者

陽性の脈管は、より多くの α SMA 陽性細胞で囲まれていた。

図5. Undifferentiated VPC (PBS、術後6日間)

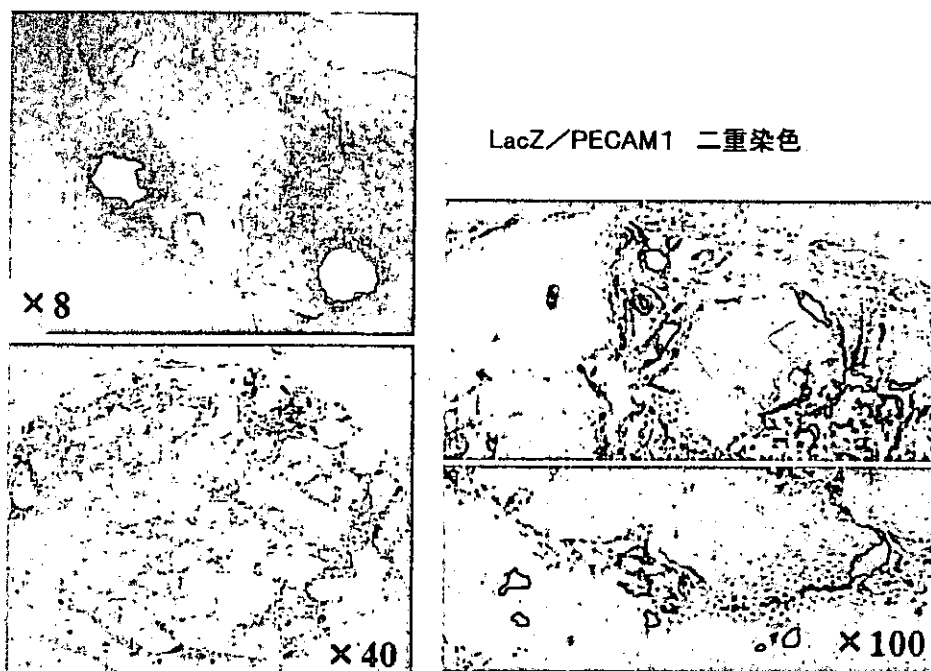


図6. Differentiated VPC (PBS、術後6日目)

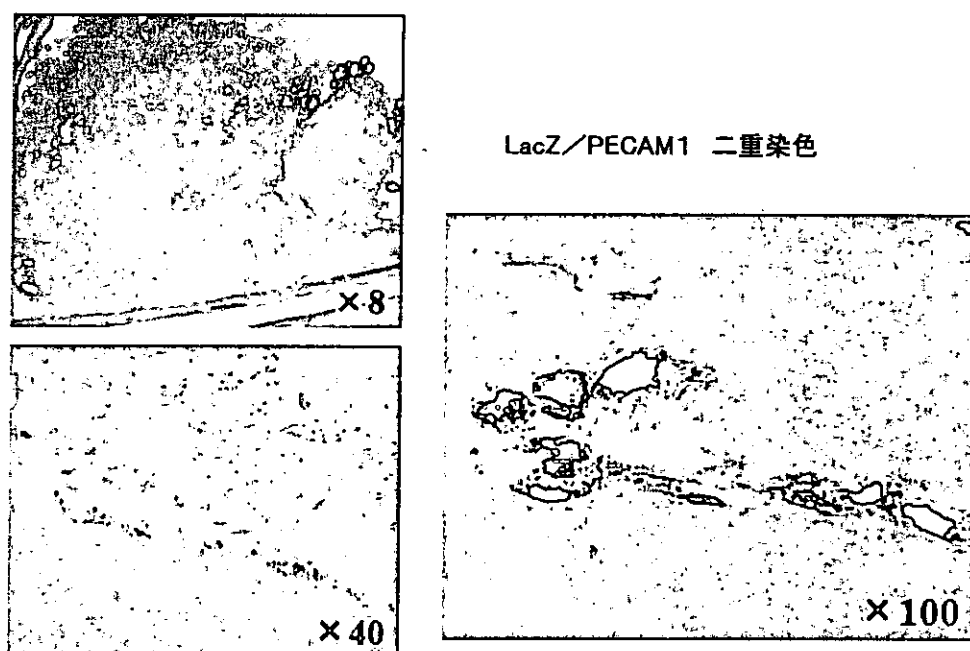


図7. Differentiated VPC (I型コラーゲン、術後12日目)

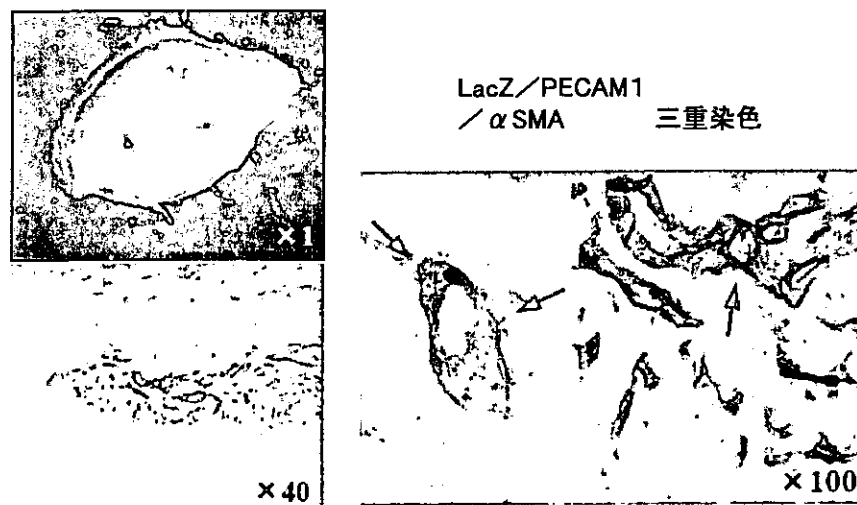


図8. Differentiated VPC (I型コラーゲン+VEGF、術後12日目)

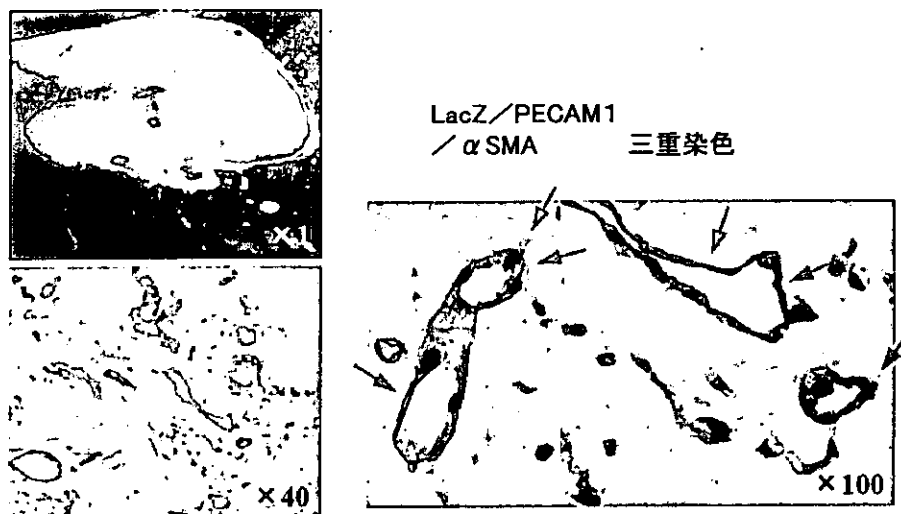


図9. Differentiated VPC (I型コラーゲン+bFGF、術後12日目)

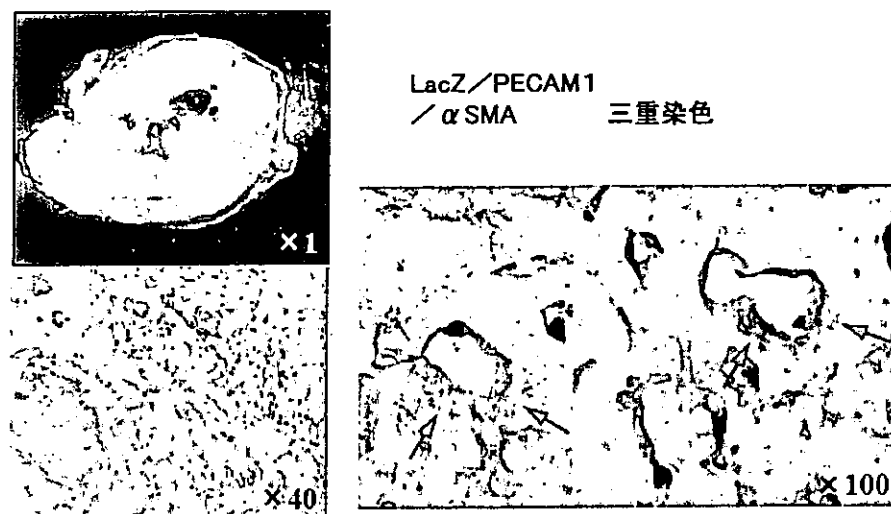


図9は、VPCの移植におけるbFGFの効果を示している。differentiated VPCを10 μ gのbFGF、I型コラーゲンと共に移植した。図左上は、移植後12日目のwhole mount LacZ染色であるが、VEGFの場合と同様、コラーゲンのみに浮遊させて移植した場合と比較し、より大きなLacZ陽性部位を認めた。図左下及び右は、凍結切片のPECAM1と α SMAによる二重染色であるが、コラーゲンのみの場合と比較し、より多くのLacZ/PECAM1両者陽性の細胞を認め、発達した脈管構造を認めた。また、矢印で示すように、LacZ/PECAM1両者陽性の脈管の周囲に、これまでの結果同様 α SMA陽性細胞を認めた。

即ち、下肢虚血モデルにおけるVPCの移植において、①differentiated VPCを選び
②VEGFやbFGFといった増殖因子、③I型コラーゲンといった細胞外マトリックス、と共に移植することで、より発達した毛細血管網の構築を認めた。このことから、VPCの生着には、それに相応しい分化段階、足場、増殖因子の存在が不可欠であることが明らかとなった。

D. 考察

本年度は、分担研究者の仁藤らとともに、彼らが中心になり昨年度成功したサルES細胞血管前駆細胞の同定の知見をもとに、我々が日本で最初に承認されたヒトES細胞を用いた研究により、ヒトES細胞由来血管前駆細胞の同定単離に成功した。更に同細胞からの有効な内皮細胞、血管平滑筋細胞の分化誘導を行い、in vitroでES細胞由来ヒト血管を構築した。

昨年度の研究により、我々の同定したマウス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。本年度はナトリウム利尿ペプチドと同様、血管拡張ペプチドであり血管において分泌されているAMに注目した。AMは発

生工学的解析より、血管発生分化において重要であることが既に報告されている。我々は昨年度の本研究より、AMはcAMP/PKAカスケード及びIP3キナーゼ/Aktカスケードを活性化し、血管再生作用を発現することをin vitro及びin vivoで発見した。

更に本年度は、今回開発したAMTgの検討より、現在ヒトに試験的に投与されている際認められるAM血中濃度においてこの作用が期待し得ることが示された。また、生活習慣病の一つである糖尿病による血管障害（下肢壊疽）に対して、AMが治療的意義を有することも明らかにした。更に、AMはES細胞由来血管前駆細胞の内皮細胞への分化を著明に促進した。従って、AMは、ヒトES細胞由来血管前駆細胞の移植治療への応用において、極めて有望なセルプロセシングのための薬剤になり得る可能性が示された。

更に本年度は、本研究のテーマの一つである「脳卒中による寝たきりの再生医療による解消」に迫るため、中大脳動脈閉塞脳梗塞モデルを確立した。このモデルにおいては、動脈閉塞の程度により、脳梗塞の程度、後遺症の発現をコントロールでき、またニューロン脱落、グリオシス、血管再生、神経再生を経時的にかつ定量的に評価することができる。このモデルを我々の開発したAMTgで検討することで、AMの脳卒中における血管保護再生及び神経保護再生治療効果を見いだすことができた。

次年度はこれらの成果をもとに、ナトリウム利尿ペプチドやAMなどの心血管ホルモンによるヒトES細胞由来血管前駆細胞の体外大量分化培養、あるいはこれら心血管ホルモン遺伝子導入ヒトES細胞由来血管前駆細胞の移植を、脳卒中モデル動物に対して施行し、新しいヒトES細胞を用いた血管再生医療を開発していきたい。

E. 結論

本年度の研究により、ヒトES細胞由来血管前駆細胞が同定され、アドレノメジュリン等心血管ホルモンによる分化誘導、大量増幅セルプロセシング及び脳卒中等の病態への移植再生治療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. T. Yurugi-Kobayashi, H. Itoh, J. Yamashita, M. Ogawa, S. Nishikawa, S-I. Nishikawa and K. Nakao.
Contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage.
Blood 101: 2675-2678, 2003.
2. H. Kook, H. Itoh, B-S. Choi, N. Sawada, K. Doi, T-J. Hwang, K-K. Kim, H. Arai, Y-H. Baik and K. Nakao.
Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro.
Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 284: H1388-1397, 2003.
3. 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 and K. Nakao.
Shear stress attenuates endothelin and endothelin converting enzyme expression through oxidative stress.
Regulatory Peptides 111: 13-19, 2003.
4. 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.
5. K. Miyashita, H. Itoh, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi and K. Nakao.
Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells.
Hypertens. Res. 26: S93-S98, 2003.
6. 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 and K. Nakao.
Different differentiation kinetics of vascular

progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells.

Circulation 107: 2085-2088, 2003.

7. TH. Chun, H. Itoh, L. Subramanian, J.A. Iniguez-Lluhi, K. Nakao.
Modification of GATA-2 transcriptional activity in endothelial cells by the SUMO E3 ligase PIASy.
Circ.Res. 92: 1201-1208, 2003.
8. K. Miyashita, H. Itoh, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi-Kobayashi, K. Park, K. Nakao.
Adrenomedullin provokes endothelial Akt activation and promotes vascular regeneration both in vitro and in vivo.
FEBS Lett. 544: 86-92, 2003.

2. 学会発表

国際学会

1. H. Itoh.
Embryonic stem (ES) cells and vascular regeneration medicine.
2003 年韓国動脈硬化学会秋季学術大会 シンポジウム
2003.9.26-27 Seoul, Korea
2. H. Itoh.
Significance of endothelium-derived vasorelaxing peptides, C-type natriuretic peptide (CNP) and adrenomedullin (AM) in vascular protection and regeneration for translational application.
XIII International Symposium on Atherosclerosis
2003.9.28-10.2 Kyoto, Japan
3. K. Miyashita, H. Itoh, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi-Kobayashi, K. Park, K. Nakao
Adrenomedullin provokes endothelial Akt activation and promotes vascular regeneration both in vitro and in vivo.
XIII International Symposium on Atherosclerosis
2003.9.28-10.2 Kyoto, Japan
4. K. Yamahara, H. Itoh, J. Yamashita, T. Yurugi-Kobayashi, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Miyashita, K. Park, S. Nishikawa, K. Nakao.
Contribution of embryonic stem (ES) cell-derived vascular progenitor cells (VPC) to neovascularization

in murine hindlimb ischemia model.

XIII International Symposium on Atherosclerosis

2003.9.28-10.2 Kyoto, Japan

5. K. Yamahara, H. Itoh, T-H. Chun, Y. Ogawa, J. Yamashita, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, T. Yurugi-Kobayashi, K. Miyashita, K. Park, K. Nakao. Significance and therapeutic potential of natriuretic peptides (NPs)/cGMP/ cGMP-dependent protein kinase (cGK) pathway in vascular regeneration.

XIII International Symposium on Atherosclerosis

2003.9.28-10.2 Kyoto, Japan

6. 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, S. Nishikawa, K. Nakao.

Identification of 'vascular progenitor cells' from primate embryonic stem cells.

XIII International Symposium on Atherosclerosis

2003.9.28-10.2 Kyoto, Japan

7. T. Yurugi-Kobayashi, H. Itoh, J. Yamashita, K. Yamahara, M. Sone, K. Kiyashita, T. Boku, S. Nishikawa, K. Nakao.

Proper differentiation stage of embryonic stem (ES) cell-derived vascular progenitor cells (VPCs) for vascular regeneration therapy.

XIII International Symposium on Atherosclerosis

2003.9.28-10.2 Kyoto, Japan

8. K. Yamahara

Contribution of embryonic stem (ES) cell-derived vascular progenitor cells (VPC) to neovascularization in murine hindlimb ischemia

American Heart Association Scientific Sessions 2003

2003.11.9-12 Orlando, USA

9. M. Sone

Identification of vascular progenitor cells from primate embryonic stem cells

American Heart Association Scientific Sessions 2003

2003.11.9-12 Orlando, USA

国内学会

1. 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)

2. K. Nakao, H. Itoh, Y. Ogawa

成人病における心臓血管ホルモンの血管保護・血管再生作用とその分子機構の解明

Molecular Elucidation of Significance of Cardiovascular Hormones in Vascular protection and Regeneration

平成 14 年度研究成果公開シンポジウム 成人病—遺伝素因と環境因子の解明

Genetic and Environmental Factors in Disease Prevalent in Adults and Elderly: Molecular and Cellular Mechanism of Vascular Complications

2003.2.15 (東京)

3. 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

霊長類 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)

4. 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)

5. 山田 豪、伊藤 裕、宮下和季、辰巳新水、万木 貴美、澤田直樹、福永康智、曾根正勝、山原研一、朴 貴典、中尾一和

MIBG シンチで胸部微小転移巣を検出した悪性褐色細胞腫の一例

第 13 回臨床内分泌代謝 Update

2003.3.15-16 (東京)

6. Masakatsu Sone

Identification of 'Vascular progenitor Cells' from Primate Embryonic Stem Cells

第 67 回日本循環器学会総会・学術集会

The 67th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society

2003.3.28-30 (福岡)

7. Kenichi Yamahara

Contribution of Embryonic Stem (ES) Cell-Derived Vascular Progenitor Cells (VPC) to

- Neovascularization in Murine Hindlimb Ischemia Model
第 67 回日本循環器学会総会・学術集会
The 67th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
2003.3.28-30 (福岡)
8. Naoki Sawada
cGMP-Dependent Protein Kinase Prevents Blood Pressure Elevation via Direct Phosphorylation and Inactivation of Small GTPase RhoA 第 67 回日本循環器学会総会・学術集会
The 67th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
2003.3.28-30 (福岡)
9. Kazutoshi Miyashita
Novel Roles of Adrenomedullin for Vascular Regeneration
第 67 回日本循環器学会総会・学術集会
The 67th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
2003.3.28-30 (福岡)
10. パネルディスカッション
パネリスト 伊藤 裕、梅澤明弘、田畑泰彦
基調講演 Rajvir Dahiya
司会 田畑泰彦
再生医療を支える再生医学と生体組織工学の現状と将来展望
基本 3 要素—細胞、細胞の足場、細胞増殖因子—
第 91 回日本泌尿器学会総会
2003.4.2-5 (徳島)
11. 血管ホルモンの動脈硬化症における意義
第 92 回日本病理学会総会 ワークショップ
2003.4.23-25 (福岡)
12. 伊藤 裕
内科の立場より
第 76 回日本内分泌学会学術総会 クリニカルアワー 褐色細胞腫—良性・悪性の鑑別はどうするか—
2003.5.9-11 (横浜)
13. 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作用
第 76 回日本内分泌学会学術総会
2003.5.9-11 (横浜)
14. 山原研一、伊藤 裕、山下 潤、万木貴美、澤田直樹、福永康智、曾根正勝、宮下和季、朴 貴典、西川伸一、中尾一和
ES 細胞由来血管前駆細胞のマウス下肢虚血モデルにおける血管再生への寄与—各種増殖因子の効果
第 76 回日本内分泌学会学術総会
2003.5.9-11 (横浜)
15. 朴 貴典、伊藤 裕、栗田 亮、宮下和季、澤田直樹、福永康智、坂口五月、曾根正勝、万木貴美、山原研一、向山政志、井上 元、中尾一和
女性ホルモン (メドロキシプロゲステロン) のグルココルチコイド作用とインスリン抵抗性および副腎機能不全
第 76 回日本内分泌学会学術総会
2003.5.9-11 (横浜)
16. 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、朴 貴典、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) 系の血管再生作用とその展開医療応用
第 76 回日本内分泌学会学術総会
2003.5.9-11 (横浜)
17. 澤田直樹、伊藤 裕、辻本浩一、山原研一、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、朴 貴典、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチド、NO/cGMP/cGMP 依存性蛋白キナーゼ経路による血圧下降作用における血管壁 RhoA のリン酸化・機能抑制の意義
第 76 回日本内分泌学会学術総会
2003.5.9-11 (横浜)
18. 岩倉 浩、細田公則、孫 徹、藤倉純二、富田努、野口倫生、高屋和彦、伊藤 裕、赤水尚史、小川佳宏、林 達也、井上 元、細田洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和
ラットグルカゴンプロモーターおよびラットインスリン 2 プロモーターを用いたグレリン過剰発現トランスジェニックマウスの解析
第 76 回日本内分泌学会学術総会
2003.5.9-11 (横浜)
19. 藤倉純二、細田公則、孫 徹、岩倉 浩、富田努、野口倫生、小川佳宏、林 達也、伊藤 裕、井上 元、中尾一和
脾における Notch 発現の検討

第 76 回日本内分泌学会学術総会

2003.5.9-11 (横浜)

20. 岩倉 浩、細田公則、孫 徹、藤倉純二、冨田努、野口倫生、高屋和彦、伊藤 裕、赤水尚史、小川佳宏、林 達也、井上 元、細田洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和

膵におけるグレリン過剰発現のおよぼす効果の検討

第 46 回日本糖尿病学会年次学術総会

2003.5.22-24 (富山)

21. 藤倉純二、細田公則、孫 徹、岩倉 浩、冨田努、野口倫生、小川佳宏、林 達也、伊藤 裕、井上 元、浜田義雄、中尾一和

膵における Notch 発現の検討

第 46 回日本糖尿病学会年次学術総会

2003.5.22-24 (富山)

22. 伊藤 裕

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) 経路の血管再生における意義とその医療応用

第 3 回日本 NO 学会学術総会 NOSJ 主催シンポジウム「血管新生の分子機構」

2003.5.29-30 (熊本)

23. 山原研一、伊藤 裕、山下 潤、曾根正勝、小林貴美、田畑泰彦、中尾一和

ナトリウム利尿ペプチドの血管再生利用とその再生医療への応用

第 11 回日本心臓財団・ファイザー「高血圧・高脂血症と血管代謝」研究助成研究発表会
Research Forum on Hypertension, Hyperlipidemia and Vascular Metabolism

2003.7.5 (東京)

24. 曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、万木貴美、野々口あかね、澤田直樹、山原研一、宮下和季、西川伸一、中尾一和

霊長類 ES 細胞由来血管前駆細胞の同定

第 40 回日本臨床分子医学会学術総会

2003.7.10-11 (東京)

25. 万木貴美

マウス ES 細胞由来血管前駆細胞の血管再生医療への応用

第 1 回 Metabolic Syndrome Conference

2003.7.12 (京都)

26. 伊藤 裕

生活習慣病と再生医療

第 1 回 Translational Medicine Seminar

2003.7.26-27 (静岡 御殿場)

27. 向山政志、伊藤 裕、中尾一和

心臓血管ホルモンの糖尿病性腎症治療への応用

第 18 回日本糖尿病合併症学会 シンポジウム

2003.10.10-11 (京都)

28. 朴 貴典、伊藤 裕、山原研一、澤田直樹、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、中尾一和

糖尿病における血管再生障害とナトリウム利尿ペプチドの治療的効果の検討

第 18 回日本糖尿病合併症学会

2003.10.10-11 (京都)

29. 小松研一、中島 蘭、伊藤 裕、朴 貴典、澤田直樹、曾根正勝、山原研一、万木貴美、宮下和季、向山政志、井上 元、中尾一和、堀井和子

片側切除により寛解をみた AIMAH の一例

第 4 回日本内分泌学会 近畿支部学術集会 (近畿内分泌代謝フォーラム)

2003.10.11 (京都)

30. 伊藤 裕

「ACTH 非依存性両側副腎皮質大結節性過形成 (AIMAH)」

第 4 回日本内分泌学会 近畿支部学術集会 (近畿内分泌代謝フォーラム)

ワークショップ 座長

2003.10.11 (京都)

31. 宮下和季、伊藤 裕、澤田直樹、福永康智、曾根正勝、山原研一、小林貴美、朴 貴典、中尾一和

アドレノメデュリンによる内皮 Akt 活性化と血管保護再生作用

第 26 回日本高血圧学会総会

2003.10.30-11.1 (宮崎)

32. 宮下和季、荒井宏司、伊藤 裕、向山政志、菅波孝祥、澤田直樹、福永康友、曾根正勝、山原研一、小林貴美、朴 貴典、中尾一和

アドレノメデュリン過剰発現マウスの開発

第 26 回日本高血圧学会総会 (ポスター)

2003.10.30-11.1 (宮崎)

33. 山原研一、伊藤 裕、山下 潤、万木貴美、澤田直樹、曾根正勝、宮下和季、朴 貴典、中尾一和

マウス下肢虚血モデルにおける ES 細胞由来血管前駆細胞の血管再生への寄与

- 第 26 回日本高血圧学会総会 (ポスター)
2003.10.30-11.1 (宮崎)
34. 山原研一、伊藤 裕、中尾一和
血管再生医療におけるホルモンとしてのナトリウム利尿ペプチドの意義
第 26 回日本高血圧学会総会 (シンポジウム)
2003.10.30-11.1 (宮崎)
35. Kenichi Yamahara, Hiroshi Itoh, Tae-Hwa Chun, Yoshihiro Ogawa, Jun Yamashita, Naoki Sawada, Yasutomo Fukunaga, Masakatsu Sone, Takami Yurugi-Kobayashi, Kazutoshi Miyashita, Hirokazu Tsujimoto, Hyun Kook, Robert Feil, David L. Garbers, Franz Hofmann, Kazuwa Nakao.
Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptide/cGMP/ cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration.
第 26 回日本高血圧学会総会 (The 26th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Hypertension) (YIA)
2003.10.30-11.1 (宮崎)
36. 伊藤 裕
ES 細胞の再生医療への応用
第 7 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 イブニングセミナー
2003.11.21-22 (札幌)
37. 曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、小林貴美、澤田直樹、山原研一、宮下和季、朴 貴典、西川伸一、中尾一和
霊長類 ES 細胞からの血管前駆細胞の分化誘導
第 7 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 YIA
2003.11.21-22 (札幌)
38. 山原研一、伊藤 裕、小川佳宏、山下 潤、澤田直樹、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、朴 貴典、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチドの血管再生作用とその展開医療応用
第 7 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2003.11.21-22 (札幌)
39. 朴 貴典、伊藤 裕、山原研一、澤田直樹、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、中尾一和
糖尿病における血管再生障害とナトリウム利尿ペプチド (NPs) の治療応用
第 7 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2003.11.21-22 (札幌)
40. 山原研一、伊藤 裕、山下 潤、万木貴美、澤田直樹、曾根正勝、宮下和季、朴 貴典、中尾一和
マウス下肢虚血モデルにおける ES 細胞由来血管前駆細胞の血管再生への寄与 - 各種増殖因子の効果
第 7 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2003.11.21-22 (札幌)
41. 宮下和季、荒井宏司、伊藤 裕、向山政志、澤田直樹、曾根正勝、山原研一、小林貴美、朴 貴典、中尾一和
アドレノメデュリン特異的過剰発現マウスの開発
第 7 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2003.11.21-22 (札幌)

H. 知的財産権の出願・登録状況

「霊長類動物胚性幹細胞から血管系細胞への分化方法」 米国特許出願 (平成 16 年 2 月 27 日)

「内皮細胞分化増殖方法」 特願 2004-25631 号

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
微細口径ハイブリッド人工血管開発のための基盤技術の最適設計と動物実験による予備的検討

分担研究者：中山泰秀（国立循環器病センター研究所 室長）

研究要旨：

hES-VPC を用いたハイブリッド人工血管の開発をめざしている。そのための基盤技術として、人工血管基材と血管接合具の開発を行った。人工血管基材としてセグメント化ポリウレタン製の連通孔を有するスポンジ状の管状構造物を作製した。鋳型を調整することによって内径と外径を任意に設定可能とし、また使用する溶媒の混合比を変化させることで、連通孔の開口径を調節でき、コンプライアンスをヒト大腿動脈と同程度に柔軟に設計できた。また、血管接合具として初年度開発した矩形孔を配したステント型に改良を加え、血管内での滑動性や細胞の侵入性を向上させた円形孔を配した血管接合具を開発した。作製したコンプライアント人工血管基材（内径約 2mm）の内腔内に、まずマウス血管内皮細胞を播種し、回転培養によって全周性に細胞を接着させ、ハイブリッド型人工血管を作製した。これをヌードラットの腹部大動脈（内径約 1.5mm）に血管接合具を用いて移植した。術後 3 週間、ほぼ全てが開存した。血管接合部を含めて、血管内腔面にはほとんど血栓形成を認めず、高い信頼性を有する移植システムが確立された。一方、予備的検討として、マウス ES 細胞を用いて同様にヌードラットに移植を行った。ES 細胞は、Flk1 陽性細胞に一部分化誘導（約 30%）させたが、分離することなく混合物の状態で用いた。多くの場合、強度の狭窄や閉塞を起こした。しかし、開存が得られた一部の場合において、血流下での PECAM1 陽性細胞への分化を認めた。生体内分化誘導の可能性が示唆された。分離精製した Flk1 陽性細胞を用いてハイブリッド型人工血管を作製すれば、開存性の向上が期待され、同時に生体内分化誘導による血管壁再構築の可能性をより追求できると考えられる。

研究協力者 西田真美
国立循環器病センター研究所
生体工学部

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セグメント化ポリウレタン製のスポンジ状の管状構造物を用い、その内腔内に hES-VPC を播種する、あるいは hES-VPC を包埋したコラーゲンをコーティングし

て、ハイブリッド人工血管を作製する。これを移植し、血液成分との接触や血流と拍動の付加を伴う生体内において、宿主血管とのコンプライアンスを一致させたスキヤホールド上での、hES-VPC の分化と血管壁の再構築を検討する。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す。

初年度は、hES-VPC を用いたハイブリッド人工血管の開発における基盤技術として血管接合具の開発について報告した。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

口径 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が必要となり、外科医においても、かなりの熟練した縫合技術が要求される。そこで我々は、カフテクニックを応用した血管接合具を開発した。これを用いると、内径 2mm の小口径ハイブリッド人工血管と宿主血管との接合を容易にし、工学研究者レベルでも特別な訓練を必要とせず可能とした。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ることが可能であった。虚血時間の大幅な短縮化と成功率の向上、さらに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。

本年度は、1) hES-VPC 化ハイブリッド人工血管の基材となる管状構造物を開発し、2) 血管接合具の最適構造設計を行い、さらに、3) マウス EC 細胞を播種したハイブリッド人工血管をヌードラットに移植することによって、移植システムの完成度の検証を行い、最後に、4) マウス ES 細胞を播種したハイブリッド人工血管を作製し、ヌードラットへの予備的な移植実験を行った。

B. 研究方法

1. 人工血管基材の作製

人工血管の基材として、セグメント化ポリウレタン製のスポンジ状管状構造体を設計した。作製は、水溶性セルロースとの層分離を利用して行った。また、良溶媒に N-メチル-2-ピロリドン、貧溶媒に加熱低級アルコールを使用し、両溶媒の比率を変化させることによって、孔径を数十 μm から数百 μm まで調整した連通孔を形成させた。

2. 多孔質ステンレス製接合具の作製

内径 1.5mm のステンレスパイプを YAG レーザーにて微細加工し、壁を円形の貫通孔を有する網目状に構造化させた。円の大きさは 200 μm と 400 μm の 2 種類に設定した。パターン設計は、CAD ソフトを用いてコンピューター上にて行った。

3. ハイブリッド人工血管の作製

スポンジ状の人工血管用管状組織体の内腔面に予めフィブロネクチンをコーティングした。マウス血管内皮細胞 (EC) またはマウス胚性幹細胞 (ES) 細胞を播種した。独自に設計した回転培養機にて 30 分間予備培養を行い、その後静置培養に移行し、ハイブリッド人工血管を作製した。

4. 移植実験

動物実験には雄ヌードラット (平均体重、250 g) を用いた。イソフルランの吸引麻酔下で開腹し、顕微鏡下に剥離操作によって腹部大動脈を露出させた。剥離部両端をクリップにて血流を遮断した。血流遮断部のほぼ中央に切開傷を作製した。切開口の両側に血管接合具を挿入した後、血管を切断した。接合具を覆うようにハイブリッド人工血管を接続した。移植時には、人工血管内にヘパリン (200U/kg) を満たしておいた。クリップを除去し、血流を再開させた。血流動態は超音波エコーによって調べた。所定期間後、人工血管を周囲組織とともに取り出し、内腔面の組織形態を走査型電子顕微鏡にて調べ、細胞の由来を LacZ 染色によって同定した。また、薄片を作製し、免疫染色等によって組織学的な評価を行った。

(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

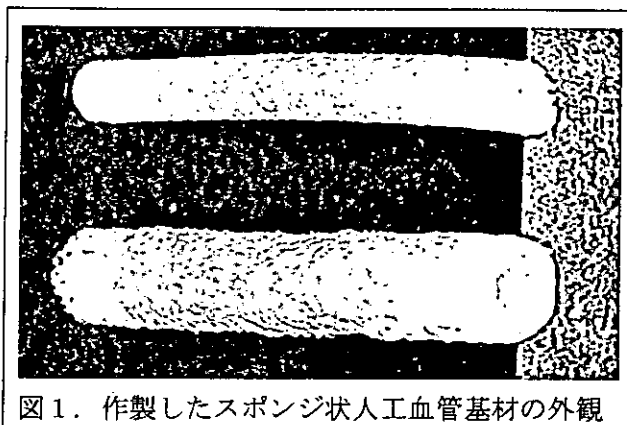


図1. 作製したスポンジ状人工血管基材の外観

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た。

C, D. 研究結果と考察

1. 人工血管基材の開発

水溶性セルロースとの層分離を利用することで、スポンジ状の多孔質構造を有する管状組織体を作製した。鋳型の大きさを調整することによって口径を任意に設定することができ(図1)、鋳型の内径を2mmに固定して外径を変化させることで、壁の厚い基材(図2)と薄い基材(図3)を作製した。基材の作製時に良質溶媒の混合比を調節すると、壁内に形成される連通孔の孔径を制御することができ、緻密(図2)と粗(図3)なスポンジ状が得られた。

作製した2種類のスポンジ状基材のコンプライアンスを調べた。評価は、内腔内への水圧の付加による管外径変化を測定することによって求まるスティッフネスパラメータ(β)を用いて行った。この値は、内圧100mmHg近傍での力学的強度を反映し、小さいことは、柔軟で伸縮性に富むことを示す。緻密で厚い壁を有する基材の場合(図1下、図2)、 β 値は、約50と大きく、一方、粗い孔の薄い壁を有する基材(図1上、図3)では約20と小さい値を示した。こ

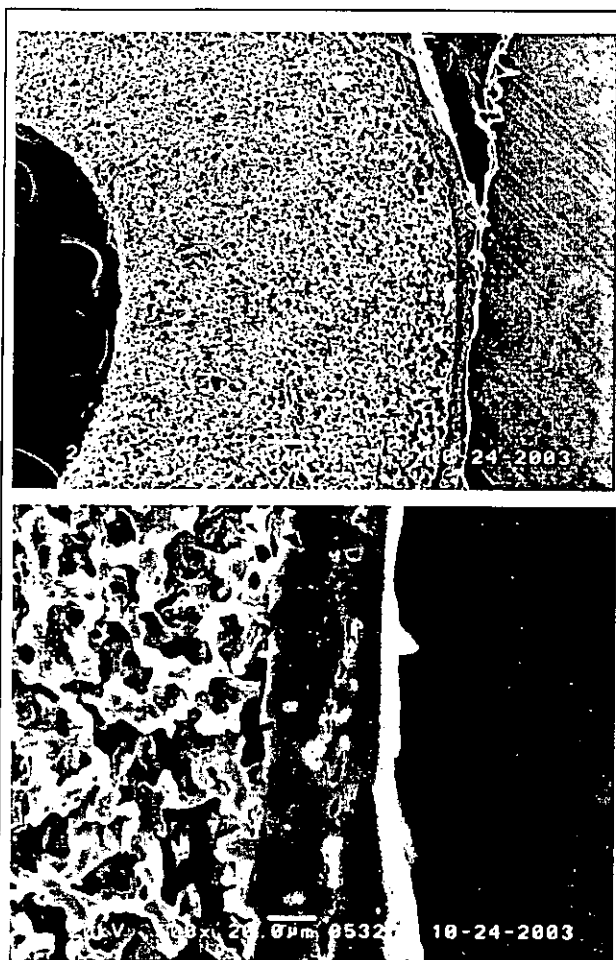


図2. ノンコンプライアント人工血管(図1下)の走査型電子顕微鏡写真。内径2mm、外径5mmの壁厚を有し、血液の漏出を防ぐため最外層をスキン化させている。断面形状(上)とその拡大(下)。

の値は、ヒト冠動脈($\beta=38$)の約半分、ヒト大腿動脈($\beta=20$)と同程度であり、生体血管に類似なコンプライアントな人工血管基材であった。さらに、この基材は、100mmHgの内圧負荷時に約5%の管外径の拡張を示し、生体動脈の変化量に相当した。従って、人工血管基材として理想的な力学的性質を有していると言える。さらに、スポンジ構造は、内腔では細胞接着の際のアンカリング効果が、また、壁内においては血管壁再構築のスキヤホールド効果が期待される。以上より、以降の動物実験は、図3に示す、粗な連通孔を有する壁の薄いスポンジ状の人工血管基材を用いて行った。

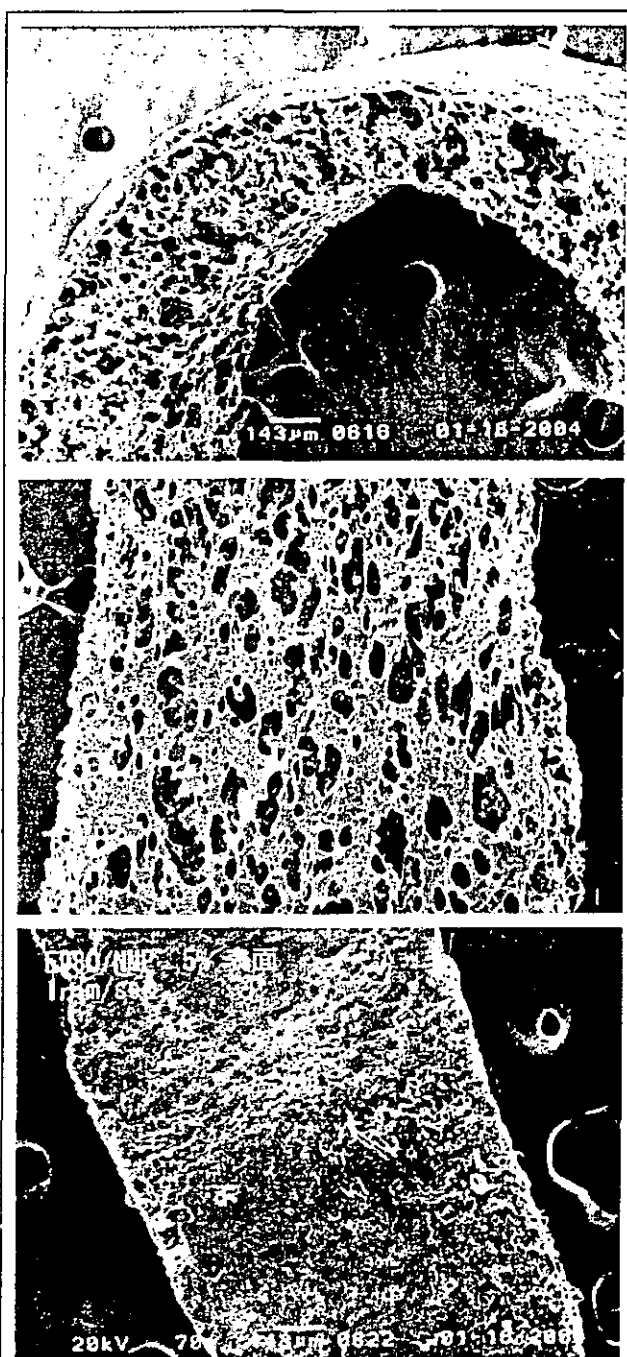


図3. コンプライアント人工血管（図1上）の走査型電子顕微鏡写真。内径2mm、外径3mmの壁厚を有し、最外層をスキン化させた。断面形状（上）と内腔面（中）と外側面（下）。

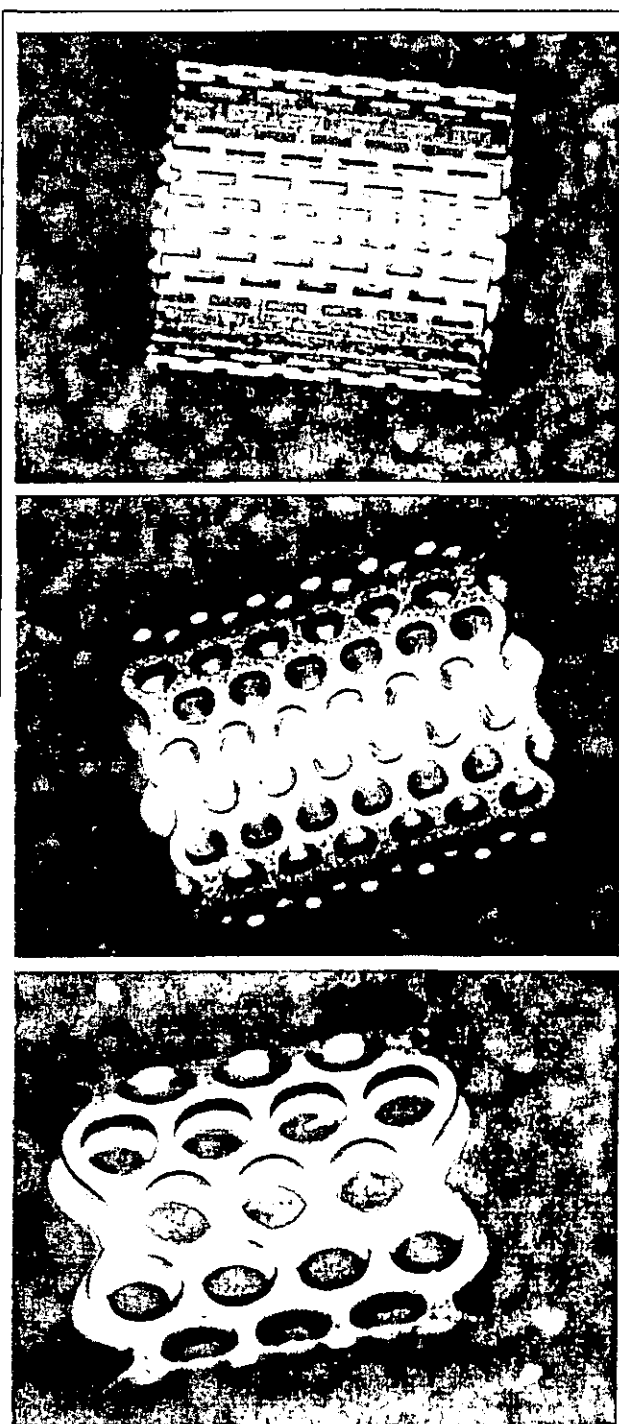


図4. 内径1.5mm、外径1.7mmの種々のステンレス製血管接合具の外観。従来使用していた矩形孔デザイン（上）。新しく設計した円形孔デザイン（中：孔径200μm、下：孔径400μm）。

2. 血管接合具の開発

初年度において、基盤技術の一つとして、血管接合具を開発した（図4上）。これによって、縫合することなく短時間で確実に人工血管を接合することが可能となった。さらに、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、また接合具が多孔化されていることより、接合部の内腔面の内皮化が促進され、抗血栓性の獲得と内膜肥厚