

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 (fig.2)。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。

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 を血管細胞にある程度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での有効な血管構築に重要であることを明らかにした (Blood 101:2675-2678, 2003)。

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 (Circulation 107:2085-2088, 2003)、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。

(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。

DE. 考察及び結論

以上、AM が in vitro および n vivo の双方で、cAM カスケードおよび IP3 キナーゼ/Akt カスケードを活性化し、障害内皮細胞の再生、血管新生を促進することが明らかになった。さらに、今回、ヒトへの投与の際得られる AM の血中濃度に達する AM-Tg の開発に成功し、マウスにおいて下肢虚血および脳虚血を行うことにより AM の血管保護再生、脳保護再生作用が認められることが明らかとなった。

一方マウス ES 細胞由来 VPC に AM を作用させることにより、cAMP カスケードの活性化により、VEGF の内皮分化誘導作用が著しく増強されることが明らかとなった。この成果より、VPC 移植による血管再生療法の確立において AM がその分化誘導および移植細胞数の確保において極めて有用であることが示唆された。

以上の成果に基づき、今後、AM 遺伝子の虚血肢や虚血脳への導入方法の確立、および ES 細胞への遺伝子導入方法を検討し、新しい虚血性疾患に対する再生遺伝子細胞治療法の開発を目指したい。

F. 健康危険情報

なし。

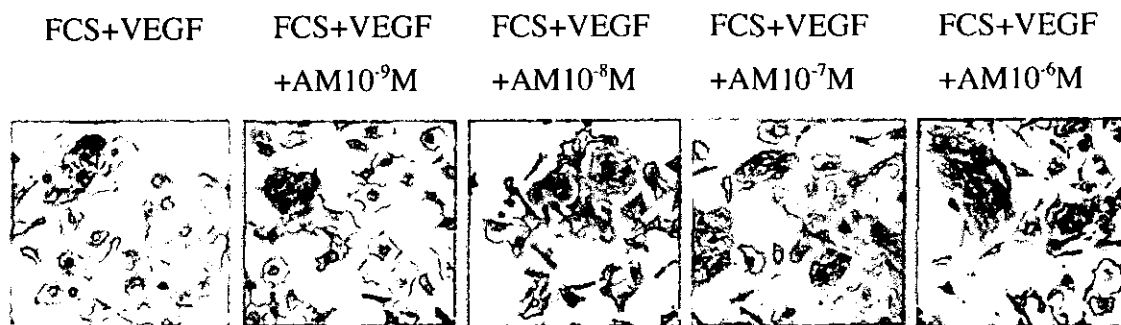


図1. AMによるES細胞由来VPCからの濃度依存的な内皮細胞誘導効果

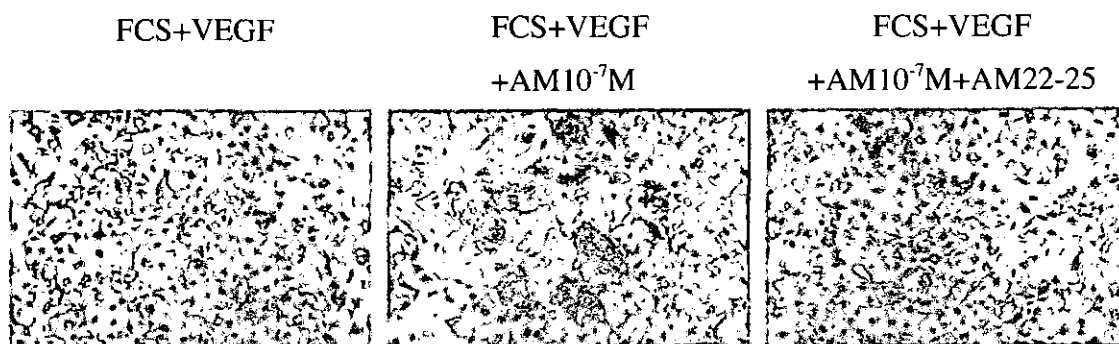


図2. AM22-25を用いたAM依存的ES細胞由来VPCからの内皮細胞誘導効果の阻害

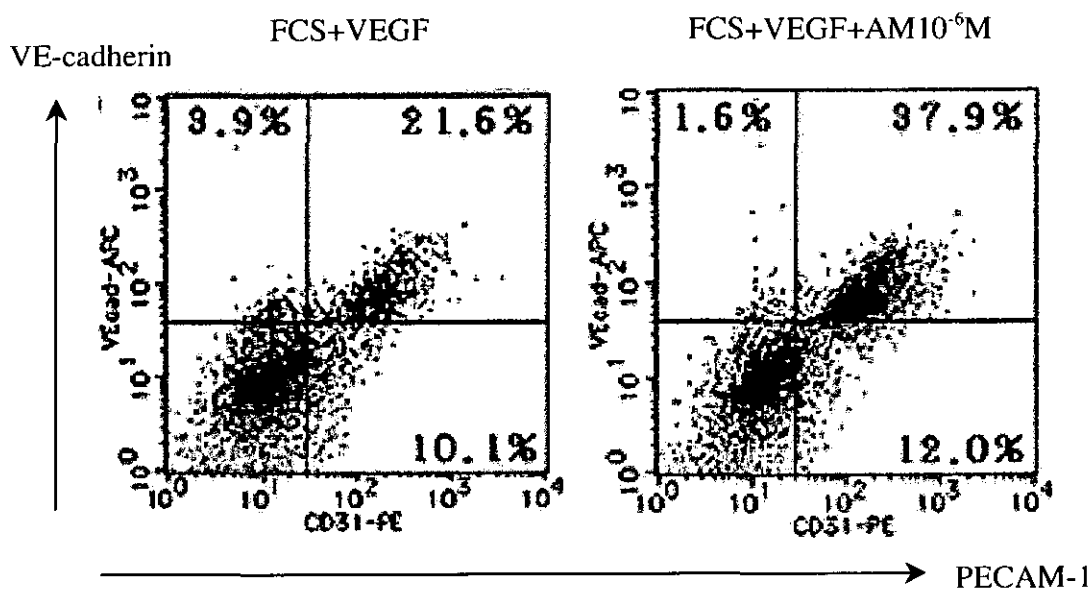


図3. FACS解析

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Yurugi-Kobayashi et al: 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 et al: Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 284: H1388-1397, 2003.
3. K. Masatsugu et al: Shear stress attenuates endothelin and endothelin converting enzyme expression through oxidative stress. **Regulatory Peptides** 111: 13-19, 2003.
4. K. Yamahara et al: 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 et al: Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells. **Hypertens. Res.** 26: S93-S98, 2003.
6. M. Sone et al: Different differentiation kinetics of vascular

progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells.

Circulation 107: 2085-2088, 2003.

7. T-H: Chun et al: Modification of GATA-2 transcriptional activity in endothelial cells by the SUMO E3 ligase PIASy. **Circ. Res.** 92: 1201-1208, 2003.
8. K. Miyashita et al: 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

(1) 学会・研究会発表

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 et al: 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 et al: 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 et al: Significance and therapeutic potential of natriuretic peptides (NPs)/cGMP/ cGMP-dependent protein kinase (cGK) pathway in vascular regeneratin. XIII International Symposium on Atherosclerosis, 2003.9.28-10.2 (Kyoto, Japan).
 6. M. Sone et al: 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 et al: 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 et al: 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 et al: Identification of vascular progenitor cells from primate embryonic stem cells. American Heart Association Scientific Sessions 2003, 2003.11.9-12 (Orlando, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 特許

1. 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).
2. 内皮細胞分化増殖方法、特願 2004-25631 号

(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レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeshi Masuda, Yasuhide Nakayama	Development of a water-soluble matrix metalloproteinase inhibitor as an intra-arterial infusion drug for prevention of restenosis after angioplasty	J Med Chem	46	3497-3501	2003
Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ueda-Ishibashi, Takehisa Matsuda	Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performances	J Biomed Mater Res	64A	52-61	2003
Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda,	Fabrication of drug-eluting covered stents with micropores and differential coating of heparin and FK506	Cardiovasc Rad Med	4	77-82	2003
Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Takehisa Matsuda	Embolization of experimental aneurysms using a heparin-loaded stent graft with micropores	Cardiovasc Rad Med	4	29-33	2003
Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ueda-Ishibashi, Takehisa Matsuda	Occlusion of experimental aneurysms with heparin-loaded, microporous stent grafts	Neurosurgery	53	213-224	2003
Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda	Photo-control of the interaction between endothelial cells and photo-cation generatable water-soluble polymers	Photochem Photobiol	77	480-486	2003
Hiromichi Sonoda, Keiichi Takamizawa, Yasuhide Nakayama, Hisataka Yasui, Takehisa Matsuda	Coaxial double-tubular compliant arterial graft prosthesis: time-dependent morphogenesis and compliance changes after implantation	J Biomed Mater Res	65A	170-181	2003
William G Brodbeck, Gabriela Voskerician, Nicholas P Ziats, Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda, James M Anderson	In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry	J Biomed Mater Res	64A	4517-4527	2003

Takehisa Matsuda, Junichi Nagase, Akane Ghoda, Yoshiaki Hirano, Satoru Kidoaki, Yasuhide Nakayama	Phosphorylcholine- endocapped oligomer and block co-oligomer and surface biological reactivity	Biomaterials	24	4517-4527	2003
Cailong Li, Toshinobu Sajiki, Yasuhide Nakayama, Masashi Fukui, Takehisa Matsuda	Novel visible-light-induced tissue adhesive composed of multiply strene-derivatized gelatin and poly(ethylene glycol) diacrylate	J Biomed Mater Res	66B	439-446	2003
Y Kuboki, M Kikuchi, H Takita, R Yoshimoto, Y Nakayama, T Matsuda, Y Ikada	Laser-perforated membranous biomaterials induced pore size-dependent bone induction when used as a new carrier	Connect Tissue Res	44	318-325	2003
Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi- Ueda, Keiichi Takamizawa	In vivo tissue-engineered small caliber arterial graft prosthesis consisting of autologous tissue (Biotube)	Cell Transplantation in press			2004
Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda	Geometical design of luminal surface for microporous covered stents	Int J Artif Organs in press			2004
西 正吾、中山泰秀、 植田初江、松田武久	高機能ステントグラフトによる 実験的動脈瘤の閉塞-その有用 性と展望	日本血管内治療学会誌	4	4-6	2003
中山泰秀	光反応によるバイオマテリアル 界面の精密創製	ナノバイオエンジニア リングマテリアル		19-29	2004
Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Harada-Shiba M, Kanda M, Ito T, Shimizu W, Tabata Y, Uematsu M, Nishigami K, Sano S, Kangawa K, Mori H	Adrenomedullin Gene Transfer Induces Therapeutic Angiogenesis in a Rabbit Model of Chronic Hind Limb Ischemia. Benefits of a Novel Nonviral Vector, Gelatin	Circulation in press			2004
Saito M, Tada Y, Harada-Shiba M, Yamamoto A, Kusakabe N, Yokogawa M, Kodama H, Asada H, Miyagawa S	Homozygous familial hypercholesterolaemia: development of xanthogranuloma in a boy at puberty. under long-term low-density lipoprotein apheresis and drug therapy	Br J Dermatol	149	1302-1303	2003
Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H	Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells	Circulation	108	889-895	2003

Makino H, Harada-Shiba M	Long-term effect of low-density lipoprotein apheresis in patients with homozygous familial hypercholesterolemia	Therap Apher Dial	7	397-401	2003
Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A	Clinical features and genetic analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia	J Clin Endocrinol Metab	88	2541-2547	2003
J. Yamashita, SI. Nishikawa	Embryonic stem cell-derived endothelial cells	Methods in Endothelial Cell Biology in press			2004
T. Watabe, A. Nishihara, K. Mishima, J. Yamashita, K. Shimizu, K. Miyazawa, SI. Nishikawa, K. Miyazono	TGF- β receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cell	J. Cell. Biol. in press			2004
M. Fujita, Y. Nakao, S. Matsunaga, M. Seiki, Y. Itoh, J. Yamashita, RWM. van Soest, N. Fusetani, Ageladine A	An anti-angiogenic matrixmetalloproteinase inhibitor from the marine sponge Agelas nakamurai	J. Am. Chem. Soc. in press			
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	107	2085-2088	2003
T. Yurugi-Kobayashi, H. Itoh, J. Yamashita, K. Yamahara, H. Hirai, T. Kobayashi, M. Ogawa, S. Nishikawa, S.I. Nishikawa, K. Nakao	Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage	Blood	101	2675-2678	2003
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 the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	100	3404-3409	2003

山下 潤	ヒトES細胞の樹立・分化研究と再生医療応用	病理と臨床	21	698-702	2003
山下 潤	幹細胞・ES細胞—血管	再生医療	2	111-119	2003
山下 潤	ヒトES細胞と再生医療	血液・免疫・腫瘍	8	19-26	2003
H. Kook et al	Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro	Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol	284	H1388-1397	2003
K. Masatsugu et al	Shear stress attenuates endothelin and endothelin converting enzyme expression through oxidative stress	Regulatory Peptides	111	13-19	2003
K. Miyashita et al	Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells	Hypertens. Res	26	S93-S98	2003
T-H. Chun et al	Modification of GATA-2 transcriptional activity in endothelial cells by the SUMO E3 ligase PIASy.	Circ. Res	92	1201-1208	2003
K. Miyashita et al	Adrenomedullin provokes endothelial Akt activation and promotes vascular regeneration both in vitro and in vivo	FEBS Lett.	544	86-92	2003

20030380

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。