

修正版

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

血管新生と血管保護療法の開発に関する研究  
(H15-再生-006)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 永井 良三  
平成17(2005)年3月

## 目 次

I. 総括研究報告	----- 1
血管新生と血管保護療法の開発に関する研究 永井良三	
II. 分担研究報告	----- 7
血管保護療法の開発に関する研究 永井良三	
血管保護療法と血管新生の促進療法 前村浩二	
血管新生と血管保護療法の開発に関する研究 佐田政隆	
遺伝子導入による血管新生の促進療法に関する研究 森下竜一	
内皮前駆細胞移植による血管新生療法 室原豊明	
傷害血管壁への抗血栓・抗炎症分子の遺伝子導入による局所血管保護療法の開発に関する研究 上野 光	
自家骨髄単核球移植による重症虚血下肢・虚血性心臓病への血管再生療法 松原弘明	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 31

# 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）  
総括研究報告書

血管新生と血管保護療法の開発に関する研究

主任研究者 永井良三 東京大学大学院医学研究科（循環器内科）教授

研究要旨 (1) 自家骨髄移植による下肢に対す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。さらに重症虚血心への治療も4例に実施した。(2) 虚血臓器へのONO-1301PLG A-MS局所投与による、血管新生促進と機能改善効果が確認された。治療的血管新生における補助的手段として今後の臨床応用が期待される。(3) 脳へのHGF遺伝子導入が脳梗塞後の記憶障害が改善することをモデル動物を用いた基礎的検討において明らかにした。さらに転写因子EPAS1の遺伝子導入はVEGFに比較して、より成熟した血管新生を促す可能性が示された。(4) PAF-AHは動脈硬化進展抑制に留まらず退縮も可能とする優れた治療分子となりうる事が示された。(5) 遺伝子を用いた各種の血管保護療法を開発した。KLF5機能を修飾する薬剤と、siRNA (short interfering RNA)を用いたKLF5ノックダウン法を開発し、これらの臨床応用を目指した基礎検討を行った。

永井良三  
東京大学大学院医学系研究科  
循環器内科、教授  
前村浩二  
東京大学大学院医学系研究科  
循環器内科、助手  
佐田政隆  
東京大学大学院医学系研究科  
先端臨床医学開発講座、助教授  
森下竜一  
大阪大学大学院医学系研究科  
臨床遺伝子治療学、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  
京都府立医科大学大学院医学研究科  
循環器病態制御学、教授

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。本研究の成果をもとに、虚血性疾患の患者の生命予後、QOLを改善し、さらに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、医療費の削減に貢献することをめざす。

B. 研究方法

1) 自家骨髄移植による血管再生療法

a) 虚血下肢への自家骨髄移植療法

平成12年から開始している末梢動脈疾患患者への自家骨髄移植療法の臨床治験を継続する。さらに多施設で施行し、有効性を検討する。PGI2 との併用効果、遺伝子 Angiopoietin-1 との併用効果についての基礎的検討を行う。

b) 虚血心への自家骨髄移植療法

動物実験を経て、内科的・外科的血行再建術が困難であり狭心症を頻発する重症虚血性心臓病患者に自家骨髄細胞を心筋に移植する。胸痛回数、心肺運動試験、心筋シンチ、心エコー、CAG、NOGAシステムにより心機能を評価した。

2) 遺伝子導入ならびに薬物による血管新生の促進療法

a) 脳梗塞の遺伝子治療

脳梗塞に対するHGF遺伝子治療の検討についてWistar ratを用いて右中大脳動脈閉塞モデルを作成し(n=60)、作成7日後に麻痺の状態を確認し、HVJ-env

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

elopeベクターにて、HGF遺伝子を投与する(コントロールベクター群n=23、HGF遺伝子投与群 n=23)。56日目以降、麻痺の状態、自発運動試験、モリス水迷路試験、受動回避試験を行い、96日目にMRIを施行し、翌日sacrificeし組織学的検討を行う。

b) 低酸素下での血管新生のメカニズムの解明と治療への応用

皮膚創傷治癒モデル、ラット心筋梗塞モデル、下肢虚血モデルにてEPAS1アデノウイルスを投与し心筋梗塞範囲の縮小効果、下肢の虚血の改善効果を検討する。特に、血管内皮細胞のみでなく、それを取り巻く周皮細胞、平滑筋にも注目し、VEGF投与に比較して、より成熟した血管新生が形成されるかを評価する。

c) 薬物による血管新生

ONO-1301は、プロスタグランジンI<sub>2</sub>受容体活性化とトロンボキサン合成酵素阻害作用を有する構造的に安定な合成化合物である。ONO-1301が虚血臓器におけるサイトカイン産生を増強し血管新生を促進する可能性を検討する。

3) 遺伝子をターゲットにした血管保護療法  
転写因子KLF5をターゲットにした血管保護療法

KLF5機能を解析するために、KLF5遺伝子発現を効率よく行えるsiRNAを開発した。内皮細胞および平滑筋細胞を用いてsiRNAの作用を検討した。また血管新生に対する作用を検討した。

KLF5を修飾する薬剤、特にKLF5阻害薬であるAm80の薬理作用をin vitro、in vivoで検討した。

b) 抗血栓・抗炎症分子の遺伝子導入による局所血管保護療法

動物(ウサギ、ラット、マウスなど)の動脈(頸動脈および大腿動脈)にバルーン傷害(マウスでは血管外周へのカフ装着による傷害)を加え、同時に組換えアデノウイルスを用いて治療分子群を遺伝子導入した。傷害後、血栓形成をFoltsの変法で、炎症を接着分子の発現レベルおよびマクロファージの浸潤数で、酸化脂質の蓄積を特異抗体を用いた免疫染色法で評価した。

(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な問題はない。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試行する。また、患者から書面でのインフォームドコンセントを得る。

C. 研究結果

1) 自家骨髄移植による血管再生療法

虚血下肢への自家骨髄移植療法

2005年1月1日までに本邦14施設からの臨床

成績を集積し多変量解析した。Fontaine分類3、4クラスASO 125人(男性92人、年齢66+/-9:SD)、Buerger病 65人(男性61人、年齢48+/-14)のABI、疼痛レベル:VAS、潰瘍直径、歩行距離を解析した。ASOとBuerger病は治療反応性に有意に異なるため別群として要因解析した。術後1年、2年後まで観察しえた患者数はASO:61人、37人、Buerger病:20人、14人であった。有害事象の例数と件数は、ASO:11(8.8%)、13(10.4%):AMI 4例、冠動脈再狭窄 2例、くも膜下出血 1例、小脳梗塞 1例、敗血症死亡 2例、自殺 1例、AMI死亡 2例) Buerger病:3(4.6%)、3(4.6%):AMI 1例、膝炎 1例、胃ガン 1例)であった。ASO合併症は糖尿病44.8%、透析20%、高血圧43.2%、高脂血症28.8%、バイパス経験症例21.6%であった。1月後ABI上昇>0.1を基準とした多変量解析では年齢(95%CI 0.9-0.992)、バイパス経験症例(95%CI 0.049-0.532)のみが治療成績を悪化させる要因であった。1ヵ月後ABI>0.1を基準とした有効性は閉塞動脈硬化症44.8%パージャー病49.2%であった。ASOとBuerger病ともABI、VAS、潰瘍直径、歩行距離は移植後有意に改善したが、時間経過とともに低下する傾向にあった。低下の程度はASOがBuerger病より有意に大であった。しかし、Buerger病ABIの2年後値を除いていずれの指標も2年後においても前値と比較し有意な上昇を示した。前値からの変化率のASOとBuerger病の群間反応性比較ではABI、VAS、歩行距離は2年後、潰瘍改善率は6月後にASO群での有意な低下が見られた。このようにASOも解析上では2年後まではBuerger病と同程度の移植後治癒経過を示した。2003年6月には厚生労働省より再生医療では初めて高度先進医療の保険給付が承認され、現在は国内7施設が承認された。

さらに、Ang-1 plasmidの単独療法では血管の増生を認めるものの、下肢の潰瘍所見や組織酸素分圧の改善を認めなかった。反面骨髄単核球細胞の併用により著明な治療効果を示し、その効果は骨髄細胞単独群より増強されていた。以上からAng-1 遺伝子と自己骨髄単核球細胞の併用療法は、採取骨髄液の必要量を減らしうる効果的な血管新生を促す有望な手段であると期待された。

b) 虚血心への自家骨髄移植療法

内科的・外科的に血行再建困難な虚血性心臓病患者への自家骨髄単核球移植を経皮的カテーテルを用いて4例に実施した。14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、運動耐容能は3倍も亢進した。他の症例では、左心室収縮率（EF）はいずれも移植前42%、49%、15%に比較して移植後53%、57%、26%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、運動耐容能は2.7-4.3倍亢進した。しかしながら3例ともCAGで同定される新生血管は観察されず、血管造影では検出感度以下の細小冠動脈レベルの新生血管の再生が考えられた。

## 2) 遺伝子導入ならびに薬物による血管新生の促進療法

a) 脳梗塞モデルラットにおいては、麻痺の状態自発運動試験では遺伝子投与群・コントロール両群間に差は認めなかったが、モリス水迷路試験では有意にHGF遺伝子投与群で記憶の改善が見られ、受動回避試験におけるretention trialでも有意にHGF遺伝子投与群で改善が見られた。記憶改善は頭部MRIで梗塞巣サイズに差がないことより、機能的なものであることが考えられる。

b) マウス皮膚創傷モデルに転写因子EPAS1のアデノウイルスを投与すると、mural cellに囲まれた新生血管が作られており、EPAS1がVEGFに比較してさらに成熟した血管新生をおこす遺伝子となる可能性が示された。その機序としてFlt-1の発現が関与していることが示された。

## c) 薬物による血管新生

ONO-1301は培養ヒト臍帯由来内皮細胞、線維芽細胞からの、VEGF、HGF、EGF、間質細胞由来因子（SDF-1）の産生を促進した。マウス心筋梗塞モデルでの投与により虚血心筋におけるHGF、VEGF発現が増強され毛細血管密度が増加し心機能ならびに心筋梗塞後の生存率は改善した。さらにブタの虚血冬眠心筋へのONO-1301PLGA-MSの経皮的注入によって、冠動脈造影で評価した側副血行路数は増加し、心拡大が抑制された。虚血領域の毛細血管密度が増加し、心筋線維化が抑制された。

## 3) 遺伝子をターゲットにした血管保護療法

### 転写因子KLF5をターゲットにした血管保護療法

KLF5-siRNAによってKLF5の発現を抑制することによって、平滑筋細胞においては形質変換が抑制された。また、内皮細胞においては遊走が抑制された。matrigelを用いたin vivo血管新生モデルによって、KLF5-siRNAが血管新生を抑制することが示された。

in vivoへのsiRNAの応用を進めるためには、遺伝子導入法が重要となる。従来の非ウイルス性遺伝子導入法では成体での遺伝子導入効率が非常に悪く、また肝臓や肺などの一部臓器にほとんどの遺伝子がトラップされることがわかっている。そこで、我々は新たな遺伝子導入法としてナノ粒子を用いることを検討した。このナノ粒子に封入したKLF5-siRNAによってmatrigel血管新生を抑制することが示され、

今後、ナノ粒子を最適化することにより、全身投与で作用するナノ粒子の開発が可能になると考えられる。

## b) 抗血栓・抗炎症分子の遺伝子導入による局所血管保護療法

血小板活性化因子（platelet activating factor ; PAF）の水解酵素であるPAF-acetylhydrolase (PAF-AH) をウサギ傷害血管壁に導入したところ、カテコラミン負荷でも消失しない強力な抗血栓作用と、抗炎症作用が観察された。これらの作用はNO産生を阻害しても有効性に何ら影響がなかった。またPAF-AH導入血管では酸化LDLの浸潤が見られないことが判明した。さらに酸化LDLが蓄積した血管壁にPAF-AHを導入すると酸化LDLが消失した。

Angiopoietin-1を傷害血管壁に導入すると、強力な抗血栓・抗炎症作用が観察された。同抑制効果は可溶性Tie2の導入で消失するので、受容体Tie2を介する作用である。

## D. 考察

虚血下肢での治療成績は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。この結果を受けて、本邦では24大学病院で同じプロトコールで175人の虚血下肢を対象に実施された。175人の統計ではABI、疼痛スケール、歩行距離は移植1月後には有意に改善した。しかし、年単位でABIは減少する傾向があり、新生血管の機能維持が今後の改善点と考えられた。虚血性心臓病への有効性は、自験4例ではいずれも、心機能・胸痛は著明に改善し、安全で有効な再生医療と考えられた。

平滑筋細胞の脱分化に関与する転写因子として単離されたKLF5が様々な臓器リモデリングに関与していることが明らかとなり、それを抑制するsiRNAや薬剤の開発にも成功した。今後KLF5を標的とした治療法を開発していく。

## E. 結論

流血中には骨髄由来の血管前駆細胞が存在し血管病の病態生理に関与していると考えられる。その動員、定着、分化、増殖に関する研究は、血管病の新たな治療法開発に貢献すると期待される。

「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。虚血疾患の新規治療法として血管新生療法、血管保護療法を考案し末梢血管疾患、虚血性心疾患に対して世界に先駆けて臨床治験を開始した。有望な結果を得ており、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. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

分担報告書参照

学会発表

分担報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

血管新生療法用医薬組成物：特願2000-192480

血管新生療法用医薬組成物：特願2000-388624

脳機能改善のための医薬および方法：特願2004-222

649

骨格筋由来の心筋幹細胞：特願2004-307797

心臓組織由来の多能性幹細胞：特願2005-60831

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 分担研究報告書



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）  
分担研究報告書  
血管保護療法に関する研究

分担研究者 永井良三 東京大学大学院医学系研究科・循環器内科

血管病態の鍵分子であるKrüppel型転写因子KLF5の機能解析を行い、この転写因子がin vivoにおいて、動脈硬化、心肥大・線維化、血管新生など慢性炎症を基盤として組織リモデリングが進展する病態の制御に重要なことを見いだした。さらに、KLF5機能を修飾する薬剤と、siRNA (short interfering RNA)を用いたKLF5ノックダウン法を開発し、これらの臨床応用を目指した基礎検討を行った。KLF5阻害薬Am80はin vitroで平滑筋細胞増殖や形質変換を抑制する。さらに、ウサギのステント留置モデルを用いてin vivoにおいても同様の作用を示し、ステント内再狭窄を抑制することを明らかにした。KLF5-siRNAについては内皮細胞機能を抑制し、血管新生を阻害することを示した。一方、血管保護に関わる液性因子に関しては老化関連因子Klothoを中心として研究を進めた。Klothoは血管新生促進作用および保護作用を示すが、内皮細胞においてはAktおよびeNOSを活性化することを明らかにした。

#### A. 研究目的

血管病変は代謝的ならびに物理的傷害に細胞が反応し、慢性に引き続くことによって血管壁組織の再構築が進み、形成されるということが出来る。従って、ストレスにตอบสนองする細胞の分子機構を解明し、特に、慢性期において細胞機能を制御し、組織リモデリングを調節するメカニズムを理解することは、新しい治療ターゲットの同定と治療・予防法開発に結びつく。本研究では、特に細胞の応答を最終的に決定付ける転写因子ネットワークと、細胞外からのシグナルに関しては血管保護作用を示す老化関連因子Klothoに着目して検討を進めると同時に、治療法へと結びつく遺伝子ノックダウン法の開発を行った。

血管病態の形成過程において形質変換・脱分化した平滑筋細胞が重要な機能を果たすことは広く知られている。これまでの研究においてアンジオテンシンIIをはじめとする増殖因子や物理的・化学的刺激が平滑筋細胞の形質変換を引き起こすことが明らかにされているが、最終的に細胞の運命を決定する遺伝子発現制御機構に関してはあまりよく分かっていなかった。我々は平滑筋細胞の形質変換に伴って発現誘導され、脱分化平滑筋細胞のマーカーである非筋型ミオシン重鎖SMEmbの転写を制御する転写因子KLF5を先に同定した。KLF5の動物個体における役

割を明らかにするために、ノックアウトマウスを作成しKLF5の機能をin vivoで検討したところ、KLF5が動脈硬化を含む血管病態のみならず、心肥大・線維化や血管新生に重要であり、慢性炎症を基盤として進展する心血管病態における細胞機能制御の鍵分子の一つであることが明らかとなった。

そこで、本研究計画では、心血管病態におけるKLF5を中心とした転写制御ネットワークの機能解明のために、RNAiを用いてKLF5遺伝子発現をノックダウンする手法の開発と、この方法を用いたKLF5機能解析、

さらに臨床応用を目指した基礎的検討を行った。また、KLF5機能を修飾する薬剤を同定し、臨床応用を目指した基礎的検討を行った。

Klothoに関してはセンダイウイルスを用いた新しいin vitro、in vivoの遺伝子導入法を開発し、Klothoの機能解析を進めた。

#### B. 研究方法

KLF5機能を解析するために、KLF5遺伝子発現を効率よく行えるsiRNAを開発した。内皮細胞および平滑筋細胞を用いてsiRNAの作用を検討した。また血管新生に対する作用を検討した。

KLF5を修飾する薬剤、特にKLF5阻害薬であるAm80の薬理作用をin vitro、in vivoで検討した。

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、内皮細胞におけるKlothoの作用と分子機構に関して検討した。

#### (倫理面への配慮)

上記研究は培養細胞および実験動物を用いて行われた。動物実験に関しては当施設のガイドラインに厳密に従い、動物愛護の観点に配慮して行われた。また、培養細胞で代替可能な実験に関しては培養細胞を積極的に用いた。

#### C. 研究結果

我々はこれまでの研究で、KLF5が外的ストレスに暴露された平滑筋細胞においてPDGF-AやTGF- $\beta$ といった組織リモデリングに重要なパラクライン因子の発現を制御することを明らかとした。KLF5ノックアウトマウスを用いたin vivoの機能解析の結果は、平滑筋細胞以外にも内皮細胞や心臓線維芽細胞など、間葉系細胞由来の細胞で広く重要な機能を持つことを示唆する。一方、KLF5の転写制御機構の解析から、KLF5が

RAR や PPAR $\gamma$ を含む、複数の転写因子、転写コファクターと相互作用することが示された。これらの結果から、KLF5 は各細胞において転写因子やコファクターからなるネットワークの中で鍵となる機能を持ち、このネットワークは各細胞において多様な遺伝子の機能制御に関わっている可能性が高い。KLF5 機能を解析するために、平成15年度に KLF5 遺伝子の発現を効率よくノックダウンする方法を開発した。

RNAi (RNA interference)は、二本鎖の RNA によって配列特異的な遺伝子発現抑制が生じる現象であり、最近になって哺乳類細胞でも作用することが明らかとなった。哺乳類細胞においては短い二本鎖 RNA (siRNA, short interfering RNA)が作用する。KLF5-siRNA によって KLF5 の発現を抑制することによって、平滑筋細胞においては形質変換が抑制された。また、内皮細胞においては遊走が抑制された。matrigel を用いた in vivo 血管新生モデルによって、KLF5-siRNA が血管新生を抑制することが示された。

in vivoへのsiRNAの応用を進めるためには、遺伝子導入法が重要となる。従来の非ウイルス性遺伝子導入法では成体での遺伝子導入効率が非常に悪く、また肝臓や肺などの一部臓器にほとんどの遺伝子がトラップされることがわかっている。そこで、我々は新たな遺伝子導入法としてナノ粒子を用いることを検討した。このナノ粒子に封入したKLF5-siRNAによってmatrigel血管新生を抑制することが示され、今後、ナノ粒子を最適化することにより、全身投与で作用するナノ粒子の開発が可能になると考えられる。

KLF5阻害薬Am80の薬理作用についてin vitro, in vivoで検討を行った。Am80はKLF5とレチノイン酸受容体RARの複合体形成を抑制することによって、KLF5機能を阻害することが示された。また、Am80はKLF5遺伝子の発現も抑制することが明らかとなった。このKLF5機能・発現抑制の結果、培養平滑筋細胞の形質変換を阻害するとともに、増殖や遊走を抑制した。

ウサギの腸骨動脈に冠動脈ステントを留置するモデルを作成しAm80を経口投与したところ、有意に新生内膜増生を抑制した。また、ステント留置部血管壁における遺伝子発現を検討したところ、Am80経口投与によって形質変換が抑制されるとともに、分化が促進されることが分かった。またKLF5の発現も抑制されており、in vivoにおいてもAm80がKLF5発現・機能の両面からKLF5を阻害し、血管病変形成を抑制することが示された。

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用いて、培養細胞および動物個体へのKlotho遺伝子導入を行った。その結果、培養内皮細胞および動物個体においてKlothoが血管保護作用を持つことを明らかとした。例えば、Klotho発現によって創傷治癒モデルにおいて、治癒が促進することを示した。さらに、内皮細胞においてはこの保護作用の少なくとも一部はAktの情報伝達系路を介していることを明らかとし、また、作用因子の一つとしてeNOSを同定した。

## D. 考察

従来の我々の研究によってKLF5が心血管系病態の鍵分子であることが明らかとなっている。今回の研究によって、siRNAを用いてKLF5発現を効率よくノックダウンすることが可能となり、このsiRNAを用いることによって血管新生を阻害出来ることが示された。siRNAを動物個体へと導入するためのナノ粒子の開発にも成功したことから、今後ナノ粒子の最適化を進めることによって、動脈硬化や血管新生の新しい治療法が開発できると考えられる。

KLF5阻害薬Am80については、KLF5の転写活性を阻害するだけでなく、KLF5遺伝子の発現も阻害して、KLF5機能を抑制することが明らかとなった。Am80がin vitro, in vivoの両方で平滑筋細胞の形質変換や増殖を抑制することが示された。さらに経口投与によって冠動脈ステント留置後再狭窄が抑制できることから、薬剤溶出性ステントを用いた局所投与が有効な治療法になる可能性がある。

Klotho 遺伝子に関してセンダイウイルスによる新しい遺伝子導入法を開発し、培養細胞および動物個体への効率よい遺伝子導入を得られた。さらに、健康な内皮機能に重要な Akt, eNOS の情報伝達系に作用することから、今後、Klotho の情報伝達系路を明らかにすることによって、内皮保護作用を持つ薬剤開発が可能となると期待される。

## E. 結論

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の機能解析と、KLF5をターゲットとする治療法開発のために、KLF5を効率よくノックダウンできるsiRNAを開発した。このsiRNAが血管新生抑制作用を持つことを示した。さらにナノ粒子と組み合わせることによってin vivoで遺伝子導入が可能であることを示した。このナノ粒子を最適化することによって、血管保護療法に重要な治療法へと展開が期待される。KLF5阻害薬Am80は平滑筋形質変換を抑制することによって、冠動脈形成術後の血管壁の安定化を進める血管保護作用を持つことが示された。今後、このような転写調節の分子機構の研究成果と、Klothoの研究成果を加えることによって、さらに新しい治療法開発のターゲットが同定されると期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Saito K, Ishizaka N, Aizawa T, Sata M, Iso ON, Noiri E, Mori I, Ohno M, Nagai R. Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensin II-induced upregulation of TGF- $\beta$ 1 in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1836-1843, 2005.
- Sato M, Kawai-Kowase K, Sato H, Oyama Y, Kanai H, Ohyama Y, Suga T, Maeno T, Aoki Y, Tamura J, Sakamoto H, Nagai R, Kurabayashi M. c-Src and hydrogen peroxide mediate transforming growth factor-beta1-induced smooth muscle cell-gene expression in 10T1/2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:341-347,

- 2005.
- Aizawa K, Suzuki T, Kada N, Ishihara A, Kawai-Kowase K, Matsumura T, Sasaki K, Munemasa Y, Manabe I, Kurabayashi M, Collins T, Nagai R. Regulation of platelet-derived growth factor-A chain by Kruppel-like factor 5: new pathway of cooperative activation with nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 279:70-76, 2004.
- Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 314:415-419, 2004.
- Niu P, Shindo T, Iwata H, Iimuro S, Takeda N, Zhang Y, Ebihara A, Suematsu Y, Kangawa K, Hirata Y, Nagai R. Protective effects of endogenous adrenomedullin on cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage. *Circulation* 109:1789-1794, 2004.
- Suzuki R, Tobe K, Aoyama M, Inoue A, Sakamoto K, Yamauchi T, Kamon J, Kubota N, Terauchi Y, Yoshimatsu H, Matsuhisa M, Nagasaka S, Ogata H, Tokuyama K, Nagai R, Kadowaki T. Both insulin signaling defects in the liver and obesity contribute to insulin resistance and cause diabetes in *Irs2(-/-)* mice. *J Biol Chem* 279:25039-25049, 2004.
- Sato M, Tanaka T, Maemura K, Uchiyama T, Sato H, Maeno T, Suga T, Iso T, Ohyama Y, Arai M, Tamura J, Sakamoto H, Nagai R, Kurabayashi M. The PAI-1 gene as a direct target of endothelial PAS domain protein-1 in adenocarcinoma A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:209-215, 2004.
- Muto S, Senda M, Adachi N, Suzuki T, Nagai R, Senda T, Horikoshi M. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human oncoprotein SET/TAF-1beta. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:712-714, 2004.
- Sata M, Nishimatsu H, Osuga JI, Tanaka K, Ishizaka N, Ishibashi S, Hirata Y, Nagai R. Statins Augment Collateral Growth in Response to Ischemia But They Do Not Promote Cancer and Atherosclerosis. *Hypertension*, 2004.
- Sata M, Nagai R. Inflammation, angiogenesis, and endothelial progenitor cells: how do endothelial progenitor cells find their place? *J Mol Cell Cardiol* 36:459-463, 2004.
- Sakamoto H, Sakamaki T, Kanda T, Tsuchiya Y, Sato M, Sato H, Oyama Y, Sawada Y, Tamura J, Nagai R, Kurabayashi M. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for cardiac myxoma cells. *Circ J* 68:488-493, 2004.
- Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takakawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 279:30817-30822, 2004.
- Sata M, Nishimatsu H, Osuga J, Tanaka K, Ishizaka N, Ishibashi S, Hirata Y, Nagai R. Statins augment collateral growth in response to ischemia but they do not promote cancer and atherosclerosis. *Hypertension* 43:1214-1220, 2004.
- Takeda N, Maemura K, Imai Y, Harada T, Kawanami D, Nojiri T, Manabe I, Nagai R. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res* 95:146-153, 2004.
- Sata M, Nagai R. Origin of neointimal cells in autologous vein graft. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1147-1149, 2004.
- Oyama Y, Kawai-Kowase K, Sekiguchi K, Sato M, Sato H, Yamazaki M, Ohyama Y, Aihara Y, Iso T, Okamoto E, Nagai R, Kurabayashi M. Homeobox protein Hex facilitates serum responsive factor-mediated activation of the SM22alpha gene transcription in embryonic fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1602-1607, 2004.
- Iimuro S, Shindo T, Moriyama N, Amaki T, Niu P, Takeda N, Iwata H, Zhang Y, Ebihara A, Nagai R. Angiogenic effects of adrenomedullin in ischemia and tumor growth. *Circ Res* 95:415-423, 2004.
- Ikeda Y, Imai Y, Kumagai H, Nosaka T, Morikawa Y, Hisaoka T, Manabe I, Maemura K, Nakaoka T, Imamura T, Miyazono K, Komuro I, Nagai R, Kitamura T. Vasin, a transforming growth factor beta-binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10732-10737, 2004.
- Ishizaka N, Saito K, Noiri E, Sata M, Ikeda H, Ohno A, Ando J, Mori I, Ohno M, Nagai R. Administration of angiotensin II induces iron deposition and upregulation of TGF-beta1 mRNA in the rat liver. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004.

## 2. シンポジウム・招待講演

2004.4.17

The 3rd international Nuclear Receptor Meeting in Japan "Significance of Kruppel-like transcription factor 5 (KLF5) in cardiovascular remodeling" 大阪

2004.10.9

山形大学医学部 21世紀 COE プログラム公開講演会 特別講演 「心血管系の病態形成における転写因子 KLF5 の意義」 山形

2004.11.23

第7回長崎循環器研究会 特別講演「心血管リモデリングの分子機構と創薬」長崎

2005.2.17

The University of Tokyo International Symposium Frontiers in Drug Development "Molecular mechanisms of cardiovascular remodeling" 東京

## 3. 学会発表

2004.6.1-5 The 13th International Vascular Biology Meeting "A zinc finger transcription factor  $\delta$ EF1 controls smooth muscle cell differentiation" トロント

2004.6.1-5 The 13th International Vascular Biology Meeting "Administration of Am80 inhibited intimal restenosis by modulating smooth muscle cell phenotype in vitro and vivo" トロント

2004.6.1-5 The 13th International Vascular Biology Meeting "Kruppel-like factor 5 is a key transcription factor of

adipocyte differentiation” トロント  
2004.5.13-15 第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会  
「KLF5 は脂肪細胞分化に必須である」東京  
2004.7.23-24 第 36 回日本動脈硬化学会総会「血管平滑筋細胞の分化誘導による新規薬剤溶出性ステント (DES)の開発」福岡  
2004.7.23-24 第 36 回日本動脈硬化学会総会「Krüppel-like factor 5(KLF5)は脂肪細胞分化に必須である」福岡  
2004.11.7-10 77th Scientific Sessions of American Heart Association “Bone marrow-derived SM1-positive smooth muscle cells contribute to physiological neovascularization, but not to neointimal formation” ニューオリンズ  
2004.11.7-10 77th Scientific Sessions of American Heart Association “The Klotho gene protects endothelial function and regulates homeostasis through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt/Nitric oxide pathway” ニューオリンズ  
2004.11.7-10 77th Scientific Sessions of American Heart Association “A novel transcriptional regulatory pathway of PDGF-A chain mediated by KLF5 through cooperative activation with NF-κB and phorbol ester” ニューオリンズ  
2004.11.7-10 77th Scientific Sessions of American Heart Association “Krüppel-like transcription factor 5 (KLF5) controls angiogenesis” ニューオリンズ  
2004.11.7-10 77th Scientific Sessions of American Heart Association “KLF5 is essential for adipocyte differentiation” ニューオリンズ  
2004.11.7-10 77th Scientific Sessions of American Heart Association “The cardiovascular remodeling transcription factor KLF5 is regulated by the histone deacetylase HDAC1 through direct interaction” ニューオリンズ  
2004.11.7-10 77th Scientific Sessions of American Heart Association “KLF5 inhibitor Am80 reduces atherosclerosis, adipose tissue growth, and fatty liver disease” ニューオリンズ  
2005.3.19-21 第 69 回日本循環器学会学術集会  
“Systemic Delivery of Retinoic Acid Receptor  $\beta$  Specific Agonist Inhibits In-Stent Restenosis by Inducing Differentiation of Smooth Muscle Cells” 横浜  
2005.3.19-21 第 69 回日本循環器学会学術集会 “SOX9 Controls Myofibroblast Differentiation in Response to TGF- $\beta$  in Tissue Remodeling” 横浜  
2005.3.19-21 第 69 回日本循環器学会学術集会  
“Adiponectin Inhibits the Transcriptional Circuitry Controlling Vascular Remodeling in Smooth Muscle Cells” 横浜  
2005.3.19-21 第 69 回日本循環器学会学術集会  
“Krüppel-like Transcription Factor KLF5 is a Key Regulator Governing Adipocyte Differentiation” 横浜  
2005.3.19-21 第 69 回日本循環器学会学術集会  
“Proteomic Identification of a Novel Regulatory Pathway of Pathologic Induction of PDGF-A as Mediated by KLF5 with Transcriptional Cofactors” 横浜  
2005.3.19-21 第 69 回日本循環器学会学術集会 “The Klotho Gene Protects and Regulates Endothelial Function Through the PI3K/Akt/NO Signaling Pathway” 横浜  
2005.3.19-21 第 69 回日本循環器学会学術集会 “The Cardiovascular Transcription Factor Krüppel-like Factor 5 is Negatively Regulated by the Deacetylase HDAC1 through

Direct Interaction” 横浜  
2005.3.19-21 第 69 回日本循環器学会学術集会  
“Acyclic Retinoid Prevents Cardiovascular Remodeling by Regulated KLF5” 横浜  
2005.3.19-21 第 69 回日本循環器学会学術集会 “Bone Marrow-derived SM1-positive Smooth Muscle Cells Contribute to Physiological Neovascularization, but Not to Neointimal Formation” 横浜

H. 知的財産権  
該当なし。

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）  
分担研究報告書

血管保護療法と血管新生の促進療法

分担研究者 前村浩二 東京大学大学院医学系研究科・循環器内科

転写因子EPAS1の過剰発現により、VEGFやそのreceptorであるFlt-1、Flk-1、さらにangiopoietin1のレセプターであるTie2の発現が誘導された。さらにマウス皮膚創傷モデルにEPAS1を発現するアデノウイルスを投与すると、mural cellに囲まれた新生血管が作られており、EPAS1がVEGFに比較して、より成熟した血管新生をおこす遺伝子となる可能性が示された。このEPAS1による成熟した血管新生はFlt-1に対する中和抗体を投与すると抑制され、少なくとも一部はFlt-1を介する作用であった。

### A. 研究目的

再生、血管新生療法は次世代の治療法として脚光を浴び、実際に VEGF や bFGF による血管新生療法の臨床治験が行われているものの、投与局所の浮腫の出現、高齢者や糖尿病患者では効果が低いなどの問題がある。我々は血管内皮細胞に多く発現し低酸素状態での血管新生に重要な役割を果たすと考えられる転写因子 Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) に注目し研究を行った。本研究により虚血による血管新生のメカニズムを明らかにするとともに、現在の血管新生療法に比べて、より効果があり副作用の少ない次世代の血管新生療法への応用をめざす。

### B. 研究方法

#### 1) EPAS1の標的遺伝子の同定

血管内皮細胞において、どのような遺伝子群がEPAS1の標的となり、血管新生において機能しているかをアデノウイルスによるoverexpressionやsiRNAを用いた抑制実験により解明する。アデノウイルスを培養細胞にinfectionし、血管新生に関連する遺伝子群の発現の変化をcDNAマイクロアレイ法にて検討する。これにより、血管新生を調節する新たな遺伝子が同定されることが期待できる。

#### 2) 低酸素下での血管新生のメカニズムの解明と治療への応用

皮膚創傷治癒モデル、ラット心筋梗塞モデル、下肢虚血モデルにてEPAS1アデノウイルスを投与し心筋梗塞範囲の縮小効果、下肢の虚血の改善効果を検討する。特に、血管内皮細胞のみでなく、それを取り巻く周皮細胞、平滑筋にも注目し、VEGF投与に比較して、より成熟した血管新生が形成されるかを評価する。

(倫理面への配慮)

上記研究は培養細胞および実験動物を用いて行われた。動物実験に関しては当施設のガイドラインに厳密に従い、動物愛護の観点に配慮して行われた。また、培養細胞で代替可能な実験に関しては培養細胞を積極的に用いた。

### C. 研究結果

#### 1) EPAS1の標的遺伝子の同定

我々は、前年度にEPAS1の下流遺伝子を検索する為

に、アデノウイルスを用いてヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) にEPAS1を過剰発現させ、その下流遺伝子をマイクロアレイを用いて解析した。その結果、VEGF、Adrenomedullin、prostacyclin synthaseを含む130個の標的遺伝子を同定した。その一つFlt-1、VEGFR-type 1の発現解析を行った。レポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイにて、Flt-1プロモーター上流に存在するHIF-1結合配列にEPAS1/ARNTの2量体が結合し、転写活性を亢進することを確認した。EPAS1に対するsiRNAをHUVECにトランスフェクションすると、低酸素にて誘導される内因性Flt-1 mRNA発現が減弱したが、HIF-1aに対するsiRNAではFlt-1の誘導は保たれていることから、EPAS1はFlt-1発現を生理的に調節していると考えられた。一方、HUVECにアデノウイルスを用いてEPAS1を過剰発現させると、VEGFに対する遊走能が亢進した。

#### 2) 低酸素下での血管新生のメカニズムの解明と治療への応用

マウス皮膚創傷治癒モデルを用いて、創部にEPAS1を過剰発現させるとSM  $\alpha$  actin陽性細胞に包まれた血管密度が増加し、治癒過程が有意に促進された。創部におけるVEGF、Flk-1、Flt-1、Tie2 mRNAも増加しており、EPAS1はVEGFおよびその受容体、Tie2発現を亢進することで成熟した血管形成を促進している可能性があると考えた。このEPAS1による成熟した血管新生はFlt-1に対する中和抗体を投与すると抑制され、少なくとも一部はFlt-1を介する作用であった。

#### 3) desferrioxamineによる創傷治癒促進作用

Desferrioxamine は薬剤的に低酸素状態と同様のシグナルを動かし、HIF-1a や EPAS1 を誘導する。そこでマウスの創傷部位に desferrioxamine を投与すると、コントロールに比較して創傷治癒が促進され、また血管新生も促進した。

### D. 考察

EPAS1はVEGFのみでなく、Tie2も誘導することが知られ、血管内皮とそれを取り巻く細胞との相互作用を促すことによりVEGFによる血管新生よりも、より成熟した血管新生をおこすことが期待されていた。実際に、VEGFを皮膚で過剰発現させたマウスでは、微小血管は増生するものの非常に漏れやすく、浮腫や炎症細胞の

浸潤が見られる不完全な血管であるのに対し、EPAS1と類似のHIF-1 $\alpha$ を過剰発現させたマウスでは、漏れのない、完全な血管が増生することが示された (Genes Dev. 2001;15:2520-32)。またVEGFを皮膚で過剰発現させたマウスでは出血性の潰瘍や、皮膚腫瘍を形成したのに対しHIF-1 $\alpha$ を過剰発現させたマウスではこれらの変化は見られなかった。EPAS1はVEGFのみでなく、さらにそのレセプターのFlt-1、Flk-1も誘導することにより、HIF-1 $\alpha$ よりもさらに成熟した血管新生が形成されることが期待されるとともに、高齢者や糖尿病患者などのVEGFのレセプターがdownregulationした患者でも有効であることが期待される。

本研究により虚血による血管新生のメカニズムを明らかにするとともに、現在の血管新生療法に比べて、より効果があり副作用の少ない次世代の血管新生療法の開発が期待される。

#### E. 結論

VEGFを用いた血管新生療法は臨床的にも行われてきているが、治療により生じた血管は脆弱で浮腫を生じやすいことが知られている。今回の結果から、EPAS1を用いた治療は、より成熟した血管を再構築する治療法として期待できると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Tsushima K, Shindo T, Fujiu K, Nishimura G, Maemura K, Yamauchi T, Kubota N, Suzuki R, Kitamura T, Akira S, Kadowaki T, Nagai R. Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metabolism* 1: 27-39, 2005
2. Ikeda Y, Imai Y, Kumagai H, Nosaka T, Morikawa Y, Hisaoka T, Manabe I, Maemura K, Nakaoka T, Imamura T, Miyazono K, Komuro I, Nagai R, Kitamura T. Vasin, a transforming growth factor beta-binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:10732-7.
3. Takeda N, Maemura K, Imai Y, Harada T, Kawanami D, Nojiri T, Manabe I, Nagai R. Endothelial PAS Domain Protein 1 Gene Promotes Angiogenesis Through the Transactivation of Both Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor, Flt-1. *Circ Res.* 2004;95:146-53.
4. Sato M, Tanaka T, Maemura K, Uchiyama T, Sato H, Maeno T, Suga T, Iso T, Ohyama Y, Arai M, Tamura J, Sakamoto H, Nagai R, Kurabayashi M. The PAI-1 Gene As a Direct Target of Endothelial PAS-domain Protein-1 in Adenocarcinoma A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31:209-15.
5. 前村浩二、武田憲彦、原田智浩、永井良三：転写因子 HIF の心血管リモデリングにおける役割と治療への応用. *診療と新薬* 2004; 41: 869-71

2. 学会発表 XIIIth International Vascular Biology Meeting, June 1-5, 2004, Toronto  
Delivery of endothelial PAS domain protein1 gene

promotes mature angiogenesis through the transactivation of both VEGF and its receptor, Flt-1  
Norihiro Takeda, Koji Maemura, Yasushi Imai, Daiji Kawanami, Tomohiro Harada, Takefumi Nojiri, and Ryozo Nagai

**American Heart Association Scientific Sessions 2004, Nov 7-10, 2004, New Orleans, Louisiana**

Endothelial PAS Domain Protein 1 Gene Promotes Mature Angiogenesis by Modulating the Coordinated Expressions of Flt-1, Flk-1, Tie2 as well as VEGF

Norihiro Takeda, Yasushi Imai, Daiji Kawanami, Tomohiro Harada, Takefumi Nojiri, Tetsuya Saito, Ichiro Manabe, and Koji Maemura,

**Gordon Research Conference on VASCULAR CELL BIOLOGY, Feb 6-11, 2005 VENTURA, CA.**

Endothelial PAS Domain Protein 1 Gene Promotes Mature Angiogenesis by Modulating the Coordinated Expressions of Flt-1, Flk-1, Tie2 as well as VEGF  
Norihiro Takeda, Yasushi Imai, Daiji Kawanami, Tomohiro Harada, Takefumi Nojiri, Tetsuya Saito, and Koji Maemura

H. 知的財産権  
該当なし

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）

（分担） 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

（分担） 研究者 佐田政隆 東京大学大学院医学系研究科先端臨床医学開発講座 助教授

研究要旨 合成化合物 ONO-1301 が線維芽細胞、内皮細胞を刺激して各種増殖因子の発現を誘導した。この化合物を徐放剤として、虚血下肢や心筋に投与すると局所における増殖因子発現を亢進させ、血管新生ならびに機能回復が促進された。今後の臨床応用が期待される。

## A. 研究目的

肝細胞増殖因子 (HGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF) などのサイトカインをタンパクもしくは遺伝子として投与すると血管新生が促進される。自家骨髄細胞移植による組織再生効果の一部も単核球から分泌されるサイトカインを介していることが示唆されている。ONO-1301 は、プロスタグランジン I<sub>2</sub> 受容体活性化とトロンボキサン合成酵素阻害作用を有する構造的に安定な合成化合物である。ONO-1301 が虚血臓器におけるサイトカイン産生を増強し血管新生を促進する可能性を検討した。

## B. 研究方法

### (a) in vitro における血管新生促進効果

培養したヒト臍帯由来内皮細胞、ヒト線維芽細胞に ONO-1301 を添加し、培養上清中のサイトカイン量を ELISA キットを用いて測定した。また、マトリゲル上内皮細胞に添加し、管腔形成への影響を検討した。

### (b) ラット下肢虚血モデル における効果

8 週齢 SD ラットの右大腿動脈を結紮切離し下肢虚血モデルを作製した。ONO-1301 を徐放化粒子 (ONO-1301 PLGA-MS) としてラット虚血下肢に筋肉注射した。虚血肢での血管新生は、レーザー血流計ならびに筋肉の抗 CD31 免疫染色で評価した。

### (c) マウス心筋梗塞モデル を用いての検討

C57BL/6 マウスの冠動脈前下行枝を結紮して心筋梗塞を作製すると同時に、梗塞心筋周囲に ONO-1301 PLGA-MS を注射した。

### (d) ブタの心筋虚血への経皮的投与

ブタ冠動脈回旋枝をアメロイドコンストラクターによって閉塞させた。NOGA システムを用いて、冬眠心筋に ONO-1301 PLGA-MS を経皮的に注入した。血管造影、心エコー、NOGA ナビゲーションシステムを用いて血管新生と心機能を評価した。

### (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な問題はない。

## C. 研究結果

### (a) in vitro における血管新生促進効果

ONO-1301 は培養ヒト臍帯由来内皮細胞、線維芽細胞からの、VEGF、HGF、EGF、間質細胞由来因子 (SDF-1) の産生を促進した。また、マトリゲル上における内皮細胞による管腔形成が促進された。

### (b) ラット下肢虚血モデル における効果

ONO-1301 PLGA-MS の局所投与によって、レーザー血流計で測定した血流回復ならびに組織学的血管密度は増加した。

### (c) マウス心筋梗塞モデル を用いての検討

虚血心筋における HGF、VEGF 発現が増強され毛細血管密度が増加した。心機能ならびに心筋梗塞後の生存率は改善した。心筋線維化と残存心筋の肥大化が抑制された。

### (d) ブタの心筋虚血への経皮的投与

虚血冬眠心筋への ONO-1301 PLGA-MS の経皮的注入によって、冠動脈造影で評価した側副血行路数は増加し、心拡大が抑制された。虚血領域の毛細血管密度が増加し、心筋線維化が抑制された。

## D. 考察

ONO-1301 徐放剤の局所投与により、周囲の組織から増殖因子発現が促進され、血管新生を増強し虚血臓器の機能を改善したと思われる。最近、心臓や脳、筋肉などに組織幹細胞が内在し、外来性増殖因子に応答することが報告されている。虚血心筋の機能改善には、心筋幹細胞の動員、分化促進効果が関与しているのかもしれない。効果の分子機序に関して、今後詳細な検討が期待される。

## E. 結論

虚血臓器への ONO-1301 PLGA-MS 局所投与による、血管新生促進と機能改善効果が確認された。治療的血管新生における補助的手段として今後の臨床応用が期待される。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sata, M., Nagai, R. Inflammation, angiogenesis, and endothelial progenitor cells: How do EPCs find their place? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004. 36: 459-463.
2. Sekiya, M., Osuga, J.I., Okazaki, H., Yahagi, N., Harada, K., Shen, W.J., Tamura, Y., Tomita, S., Izuka, Y., Ohashi, K., Okazaki, M., Sata, M., Nagai, R., Fujita, T., Shimano, H., Kraemer, F.B., Yamada, N., Ishibashi, S. Absence of hormone-sensitive lipase inhibits obesity and adipogenesis in Lepob/ob mice. *J Biol Chem.* 2004. 279: 15084-15090.
3. Sata, M., Nishimatsu, H., Osuga, J.I., Tanaka, K., Ishizaka, N., Ishibashi, S., Hirata, Y., Nagai, R. Statins augment collateral growth in response to ischemia but they do not promote cancer and atherosclerosis. *Hypertension.* 2004. 43: 1214-1220.
4. Sata, M., Nagai, R. Origin of neointimal cells in autologous vein graft. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004. 24: 1147 - 1149.
5. Saiura, A., Sata, M., Hiasa, K., Kitamoto, S., Washida, M., Egashira, K., Nagai, R., Makuuchi, M. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates graft vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004.24:1886-1890.
6. Saito, K., Ishizaka, N., Aizawa, T., Sata, M., Iso-O, N., Noiri, E., Ohno, M., Nagai, R. Role of aberrant iron homeostasis in the upregulation of transforming growth factor-beta1 in the kidney of angiotensin ii-induced hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2004. 8:599-607.
7. Sata, M., Nagai, R. Mouse models of vein graft. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004. 24: e185 - e187.
8. Fukuda, D., Sata, M., Tanaka, K., Nagai, R. Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells. *Circulation.* 2005. 111: 926-931.
9. Natori, T., Sata, M., Nagai, R., Makuuchi, M. Cimetidine inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Biomed Pharmacother.* 2005. 59: 56-60.
10. Higashikuni, Y., Sata, M., Nagai, R. Reversible left ventricular hypertrophy after Tako-Tsubo-like cardiomyopathy. *Acta Cardiol.* 2005. 60: 77-79.

### 2. 学会発表

1. 佐田政隆、永井良三 「骨髄由来血管壁細胞と炎症」第36回日本動脈硬化学会総会シンポジ

ウム「炎症・免疫機構と動脈硬化—現状と将来」2004年7月23日 福岡

2. 佐田政隆、永井良三 「平滑筋細胞アポトーシスとプラークの不安定化」第36回日本動脈硬化学会総会：コントロールバーシー1「アポトーシス/プラーク破綻」2004年7月24日 福岡
3. 佐田政隆 「血中前駆細胞による血管の新生、再生、病態形成」第51回日本臨床検査医学会総会：シンポジウム「幹細胞と再生医学」2004年9月4日 東京
4. Masakta Sata 「Molecular Mechanism of In-stent restenosis」(Complex Catheter Therapeutics 2004 Special Lecture、神戸、2004. 10. 23)
5. Masataka Sata “Circulating progenitors contribute to vascular repair and remodeling” 4<sup>th</sup> Taipei vascular molecular biology symposium, Taipei, September 11<sup>th</sup>, 2004.
6. Masataka Sata “Potential Roles of Circulating Vascular Progenitor Cells in Progression and Remodeling of Atherosclerotic Lesions” The 48<sup>th</sup> Annual Scientific Session of Korean Society of Circulation. Seoul, Korea, October 14<sup>th</sup>, 2004.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他



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研究事業）  
分担研究報告書

遺伝子導入による血管新生の促進療法に関する研究

分担研究者 森下 竜一 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学 教授

研究要旨

遺伝子治療による血管新生促進療法の開発を目的とする。すでに実施している肝細胞増殖因子（Hepatocyte growth factor: HGF）遺伝子を用いた閉塞性動脈硬化症・パーチャー病に対する遺伝子治療臨床研究において、長期における安全性及び所期効果の維持を確認した。また、他疾患に対する血管新生療法として脳梗塞に注目し、脳への HGF 遺伝子導入が脳梗塞後の記憶障害が改善することをモデル動物を用いた基礎的検討において明らかにした。

A. 研究目的

遺伝子治療による血管新生促進療法の開発を目的とする。血管新生を目的とした遺伝子治療臨床研究を継続し検討するとともに、今回脳梗塞に対する血管新生療法の可能性について基礎的検討を加える。

B. 研究方法

閉塞性動脈硬化症・パーチャー病に対する遺伝子治療臨床研究では Fontaine IIb, III, IV の重症虚血肢 22 症例を対象とし、安全性・有効性について 2 年間の追跡調査を行う。脳梗塞に対する HGF 遺伝子治療の検討については Wistar rat を用いて右中大脳動脈閉塞モデルを作成し (n=60)、作成 7 日後に麻痺の状態を確認し、HVJ-envelope ベクターにて、HGF 遺伝子を投与する (コントロールベクター群 n=23、HGF 遺伝子投与群 n=23)。56 日目以降、麻痺の状態、自発運動試験、モリス水迷路試験、受動回避試験

を行い、96 日目に MRI を施行し、翌日 sacrifice し組織学的検討を行う。

C. 研究結果

遺伝子治療臨床研究において遺伝子投与に起因する重篤な有害事象は確認できず、臨床許容範囲と考えられた。0.1 以上の ABI 改善症例は 10/17 例 (遺伝子投与後 2 ヶ月では 11/17 例)、最大潰瘍の 25% 以上の縮小は 8/11 症例 (遺伝子投与後 2 ヶ月では 7/11 例) に認めており、遺伝子投与後 2 年にわたり改善度が持続していた。脳梗塞モデルラットにおいては、麻痺の状態、自発運動試験では遺伝子投与群・コントロール両群間に差は認めなかったが、モリス水迷路試験では有意に HGF 遺伝子投与群で記憶の改善が見られ、受動回避試験における retention trial でも有意に HGF 遺伝子投与群で改善が見られた。記憶改善は頭部 MRI で梗塞巣サイズに差がないことより、機能

的なものであることが考えられる。組織学的には梗塞巣周囲の領域において、梗塞後14日目の時点で、HGF投与群でアストロサイトの活性化、神経樹状突起のマーカであるCdc42の発現が認められ、56日目の時点では、HGF投与群でグリオシスの抑制と血管数の増加が認められた。

#### D. 考察

遺伝子治療臨床研究に関しては、直接的に血管新生を検出する適当な検査方法が存在しないことから、血管新生の有無については言及困難である。しかしながら、初期判定時において血流の増加している像が血管造影で認められた症例もあり、臨床症状の一定の改善が見られることから、血流増加は示唆されるものと考えられる。また、本試験ではプラセボを設置していないため、厳密な有効性の関する言及は困難であり、現在有効性を明らかにすべく二重盲検法を用いたトライアルが実施されている。脳梗塞モデルラットにおいては血管数の増加が認められたものの、梗塞巣サイズに差はなかった。血管新生作用のみならず、HGFの神経細胞保護効果、神経樹状突起の伸長作用による機能的な改善である可能性が示唆された。

#### E. 結論

HGF遺伝子治療の安全性・有用性は臨床研究において示唆された。さらに脳梗塞に対するHGF遺伝子治療の応用についても、脳梗塞による記憶障害の改善が認められ、神経回路の再構築、血管新生がそのメカニズムとして考えられた。脳梗塞後亜急性期に

おけるHGF遺伝子を用いた遺伝子治療が脳血管性痴呆を改善させうる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

臨床研究において、遺伝子投与に起因すると考えられる重篤な有害事象は現在までに確認されていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Morishita R. Perspective in progress of cardiovascular gene therapy. *J Pharmacol Sci*, 95(1)1-8,2004
2. Morishita R, Gene Therapy vs Pharmacotherapy, *Contemporary Cardiology*, 137-56, 2004
3. Shimamura M, Sato N, Oshima K, Aoki M, Kurinami H, Waguri S, Uchiyama Y, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation*, 109(3), 424-31, 2004
4. Morishita R, Aoki M, Hashiya N, Yamasaki K, Kurinami H, Shimizu S, Makino H, Takeya Y, Azuma J and Ogihara T, Therapeutic Angiogenesis using Hepatocyte Growth Factor (HGF) *Current Gene Therapy*,4, 199-206,2004
5. Koibuchi N, Kaneda Y, Taniyama Y, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T,

- Morishita R. Essential role of HGF (hepatocyte growth factor) in blood formation in *Xenopus*. *Blood*, 103(9), 3320-25, 2004
6. Hashiya N, Jo N, Aoki M, Matsumoto K, Nakamura T, Sato Y, Ogata N, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R., In vivo evidence of angiogenesis induced by transcription factor Ets-1: Ets-1 is located upstream of angiogenesis cascade. *Circulation*, 109(24), 3035-41, 2004
7. Morishita R, Aoki M, Hashiya N, Makino H, Yamasaki K, Azuma J, Sawa Y, Matsuda H, Kaneda Y, Ogihara T. Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease, *Hypertension*, 44(2), 203-9, 2004
8. 牧野寛史、森下竜一、萩原俊男, 遺伝子を利用した血管新生療法, *心臓ナビゲーター*, 252-3, 2004
9. 橋弥尚孝、東純哉、萩原俊男、森下竜一, HGF 遺伝子治療, *医学のあゆみ*, 653-8, 2004
10. 牧野寛史、萩原俊男、森下竜一、金田安史, 肝細胞増殖因子 (HGF) の再生医療応用への展望, *バイオインダストリー*, 21(5), 12-19, 2004
11. 牧野寛史、森下竜一、萩原俊男, 遺伝子治療薬, *新世代の循環器薬物療法*, 170-177, 2004
12. 青木元邦、森下竜一、萩原俊男, 末梢性血管疾患に対する遺伝子治療臨床研究, *リウマチ病セミナーXV*, 15, 176-184, 2004
13. 梶原康夫、森下竜一、吉川秀樹、萩原俊男, 下肢血行障害に対する血管新生医療, *Monthly Book Orthopaedics*, vol.17 No.12, 31-36, 2004
14. 小池弘美、森下竜一, 糖尿病 macroangiopathy の遺伝子治療, *Diabetes Frontier*, .15(6), 867-72, 2004
2. 学会発表
1. Morishita R, Development of molecular therapy to treat ischemic arterial disease, XVIII World Congress International Society for Heart Research, 2004年8月8日(日), Brisbane Australia
2. 牧野寛史, Long Term Evaluation of Clinical Trial of Human Gene Therapy for Peripheral Arterial Disease Using Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer (Featured Research Session), 第68回日本循環器学会, 2004年3月27-29日(土,日,月), 東京
3. 橋弥尚孝, Therapeutic angiogenesis by a transcription factor; Ets-1 for peripheral arterial disease, 第68回日本循環器学会, 2004年3月27-29日(土,日,月), 東京
4. 小池弘美, Improvement of Diabetic Neuropathy by HGF Gene Transfer, 第68回日本循環器学会, 2004年3月27-29日(土,日,月), 東京
5. 梶原康夫, Acceleration of wound healing by combination gene transfer of Hepatocyte Growth Factor and Prostacyclin Synthase with Shima Jet, 第68回日本循環器学会, 2004年3月27-29日(土,日,月), 東京
6. 島村宗尚, A Therapeutic Strategy to Treat Brain Ischemia: Over-expression of Hepatocyte Growth Factor Gene Reduced Ischemic Injury in Rat Model, 第68回日本

循環器学会,

2004年3月27-29日(土,日,月),東京

7.森下竜一, 遺伝子治療の虚血性心疾患治療への応用, 第13回日本心血管インターベンション学会学術集会, 2004年6月30日(水),名古屋

8.島村宗尚、里直行、青木元邦、和栗聡、内山安男、林拓也、飯田秀博、金田安史、荻原俊男、森下竜一, HGF 遺伝子を用いた脳梗塞後における記憶障害に対する遺伝子治療の検討, 第8回 Molecular Cardiovascular Conference,

2004年9月3-5日(金,土,日),北海道

9.梶原康夫、富田奈留也、富田哲也、谷山義明、小池弘美、森下竜一, シマジエットを用いたHGF遺伝子及びPGIS遺伝子導入による難治性潰瘍の治療, 第8回 Molecular Cardiovascular Conference,

2004年9月3-5日(金,土,日),北海道

10.森下竜一, 閉塞性動脈硬化に対する遺伝子治療の現状(教育講演), 第52回日本心臓病学会学術集会, 2004年9月15日(水),京都

11.島村宗尚、里直行、青木元邦、和栗聡、内山安男、林拓也、飯田秀博、金田安史、荻原俊男、森下竜一, HGF 遺伝子を用いた脳梗塞後における記憶障害に対する遺伝子治療の検討, 第27回日本高血圧学会総会, 2004年10月7-9日(木,金,土),栃木

12.橋本尚孝、城信雄、青木元邦、金田安史、荻原俊男、森下竜一, ラット後肢虚血モデルに対する転写因子 Ets-1 を用いた遺伝子治療, 第27回日本高血圧学会総会,

2004年10月7-9日(木,金,土),栃木

13.梶原康夫、富田奈留也、富田哲也、谷山義明、小池弘美、大塚マリアナ今日美、森下竜一, シマジエットを用いた HGF 及び PGIS 遺伝子導入による難治性潰瘍の治療, 第8回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 2004年11月26日(金),宮崎

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1.血管新生療法用医薬組成物:

特願 2000-192480

2.血管新生療法用医薬組成物:

特願: 2000-388624

3.脳機能改善のための医薬および方法:

特願 2004-222649

1.実用新案登録

なし。

2.その他

なし。