

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

内皮前駆細胞移植による血管新生療法

分担研究者 室原豊明 名古屋大学大学院医学系研究科 病態内科学講座 器官制御内科

成人における血管新生現象は、隣接する既存の毛細血管内皮細胞の増殖と遊走によるもの(狭義Angiogenesis)のみであると考えられてきた。しかしながら我々は1997年に、成人末梢血中に血管内皮細胞に分化しうる未分化な内皮前駆細胞が存在することを明らかにしてきた。さらに血管内皮前駆細胞は、成人(成獣)では血球系幹細胞に起源が近く、骨髄に由来し生体内における血管新生や内皮修復に関与することが示されてきた。その後我々は、骨髄幹細胞を高率に含む自己骨髄単核球細胞を移植すると、虚血下肢において有意に血管新生が惹起され、側副血行路が発達し虚血症状が改善することを動物において確認し報告した(Shintani et al. *Circulation* 2001)。

内皮前駆細胞は成人においては骨髄に由来することが明らかにされている。本研究の目的は、自己骨髄あるいは末梢血中に動員された血管内皮前駆細胞を収集し、虚血組織内に移植することにより内皮細胞の分化増殖を介して新しい血管や側副血管を再生すること、さらにこのことによって虚血組織の血行を機能的にも改善出来ないかどうかを基礎的・臨床的に検討するものである。

1. 研究目的

これまでに我々は、成人末梢血中の単核球分画中に血管内皮細胞に分化しうる内皮前駆細胞が存在し血管新生に寄与することを示してきた。内皮前駆細胞は、成人においては骨髄に由来すると考えられている。本研究の目的は、自己骨髄あるいは末梢血中に動員された自己幹細胞を収集(培養)し、虚血組織に移植することにより内皮細胞の分化増殖を介して新しい血管や側副血管を再生すること、さらにこのことによって虚血組織の血行を機能的にも改善出来ないかどうか(新しい細胞治療による血管新生療法の開発)を検討するものである。

2. 研究方法

動物および成人の骨髄細胞から内皮前駆細胞を分離しさらに成熟内皮細胞への分化誘導を試みる。また我々のこれまでの研究から、骨髄全単核球細胞分画からもこのような内皮前駆細胞が分化誘導できると考えられる。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。実際に他の治療法が無効であったヒト末梢動脈閉塞性疾患[閉塞性動脈硬化症(ASO)およびピュルガー病]の患者に同様の治療法が適応できるか否かも検討する。

採取骨髄の量を減らすことは、患者の負担軽減につながる。さらに本年度は、細胞移植療法とangiopoietin-1プラスミド遺伝子治療を併用することにより、より少ない骨髄細胞数で同等の血管新生効果を得るべく研究を行う。

3. 研究結果及び考察

自己骨髄単核球細胞を組織内移植投与することによ

って、ウサギ虚血下肢骨格筋内における血管再生が有意に促進された。この実験結果を元に、2000年我々は末梢性動脈閉塞性疾患[閉塞性動脈硬化症(ASO)およびピュルガー病]の患者に同様の治療法を適応するべく、当大学医学部倫理委員会に諮問した。この結果承認され、臨床治験を開始した。第1例目は、73歳女性ASO患者であり、移植後有意な血管新生の増強とともに、患部の血流増加とQOLの著明な改善をみた。副作用は認められなかった。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。

TACT Trial

2000年6月より、上記自己骨髄細胞移植による重症虚血肢患者の血管新生療法が、国内3施設(関西医科大学・久留米大学・自治医科大学)において検討された。Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation (TACT) trialと呼ばれている。合計45人の患者の治療が行われ、ABIが平均で約1ポイント増加し、下肢疼痛完全緩解が約90%の患者でみられた。トレッドミルテストの歩行距離は約2.6倍へと増加した。細胞移植部位の炎症・浮腫は認められず、血中のVEGF、bFGF、HGF濃度、単核球数は変化を受けなかった。動物実験と同様に骨・軟骨形成などへの細胞分化はみられなかった。血管造影でも著明な改善例が認められ、虚血性皮膚潰瘍も約1-2ヶ月で著明に改善する例が多く(約80%)みられた。

細胞移植による血管新生療法の改良型開発のための基礎研究

また、移植前の骨髄細胞や内皮前駆細胞を刺激することにより、さらに血管新生を増強できることを示した。内皮前駆細胞を移植前に虚血に暴露することにより、その細胞移植による血管新生が増強された(Akita et al. *Lab Invest.* 2003)。

さらに、骨髄単核球細胞移植とAngiopoietin-1 (Ang-1) 遺伝子治療を組み合わせるにより血管新生

を増強できるか否かを検討している。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。反面骨髓単核球細胞の併用により著明な治療効果を示し、その効果は骨髓細胞単独群より増強されていた。マウス耳での微小血管の観察から、Ang-1 蛋白による異常血管の形成がウサギ下肢での微小循環悪化の原因である可能性が示唆され、その走行異常はマウス耳において骨髓細胞移植の併用により著明に改善された。以上から Ang-1 遺伝子と自己骨髓単核球細胞の併用療法は、採取骨髓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。

4. 結論

自己骨髓単核球細胞移植により、有意な虚血部血管新生が観察された。重症虚血肢の患者に対する検討でも良好な成績が治められ、海外でも高く評価された。今後もこの治療法の効果を検討し、長期にわたって経過をフォローする必要性がある。

さらに細胞治療と遺伝子・薬剤などとの併用によるいわゆるハイブリッド治療が有効である可能性が示唆された。

5. 研究発表

海外

口頭発表	20 件
原著論文による発表	35 件

そのうち主なもの

論文発表

Numaguchi Y, Murohara T, et al. Catheter-based prostacyclin synthase gene transfer prevents in-stent restenosis in rabbit at heromatous arteries. *Cardiovasc. Res.* 2004; 61: 177-185.

Higashi Y, Murohara T, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation.* 2004; 109: 1215-1218.

Kondo T, Murohara T, et al. Smoking cessation rapidly increases endothelial progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 1442-1447.

Murohara T, et al. Inhibition of platelet adherence to mononuclear cells by α -tocopherol: Role of P-selectin. *Circulation.* 2004; 110: 141-148.

Shimada T, Murohara T, et al. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in precocious aging *Klotho* mouse. *Circulation.* 2004; 110: 1148-1155.

Choi JH, Murohara T, et al. Augmentation of therapeutic angiogenesis using genetically-modified human endothelial progenitor cells with altered glycogen synthase kinase-3 β activity. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 49430-49438.

Niiyama H, Murohara T, et al. Roles of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 in ischemia-induced neovascularization. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 44: 661-666.

Yamamoto K, Murohara T, et al. Molecular evaluation of endo-

thelial progenitor cells in patients with ischemic limbs: therapeutic effect by stem cell transplantation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: e192-e196.

Aoki M, Yasutake M, Murohara T. Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device. *Stem Cells.* 2004; 22: 994-1002.

Kondo T, Kobayashi K, Murohara T. Nitric oxide signaling during myocardial angiogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* 2004; 264: 25-34.

Yokoyama S, Murohara T, et al. Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005 (in press).

Naruse K, Murohara T, et al. Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2005 (in press).

6. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）
なし

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
H16 年度分担研究報告書

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

分担研究者 上野 光 産業医科大学教授

研究要旨: 心筋梗塞の主因は冠動脈の血栓塞であり、動脈硬化血管や傷害血管壁における抗血栓療法の開発は重要である。本研究では治療分子群を遺伝子として導入し血管壁局所で発現させることで、病態の解析に資すると共に、全身の副作用を伴わない局所抗血栓・抗炎症療法の開発をめざした。血管に傷害が加わると低コレステロール動物であるウサギであっても短期間に酸化脂質が沈着した。血小板活性化因子水解酵素(PAF-AH)を導入すると、この酸化脂質が選択的に分解されカタコラミン負荷にもNO産生阻害にも影響を受けない強力な抗血栓・抗炎症効果が生じた。ヒト冠動脈ではすでに内膜肥厚と酸化脂質の蓄積が起こっているが、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ことを示された。血管新生因子Angiopoietin-1の遺伝子導入でも抗血栓・抗血栓作用を生じたがその分子機構が不明でありさらに検討を要する。

A. 研究目的

心筋梗塞はすでに死因の上位を占めその予防法・治療法の開発は最重要課題の1つである。心筋梗塞は冠動脈壁に形成された粥腫の破綻に伴う血栓塞が原因である。従って粥腫の形成阻止・安定化とともに傷害血管壁の抗血栓性の維持が重要となる。本研究では傷害血管壁に治療分子群を遺伝子導入することで、分子病態の解析を進めるとともに、将来の局所抗血栓・抗炎症療法の開発に繋がる基礎研究を動物モデルで実施することを目的とした。

B. 研究方法

動物(ウサギ、ラット、マウスなど)の動脈(頸動脈あるいは大腿動脈)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。炎症の最終像としての内膜肥厚も検討した。

(倫理面への配慮)臨床研究は含まず、ヒトの遺伝子解析も行わない。実験動物はガイドラインに従って取り扱った。

C. 研究結果

① 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遺伝子導入したところ、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産生を阻害しても何ら影響受けなかった。酸化LDLを特異抗体で免疫染色すると、i) 低脂質動物であるウサギであっても血管傷害が加わって極めて短い時間内に(48時間以内)酸化脂質が生成され動脈壁全層に広く蓄積すること、ii) PAF-AH導入血管では酸化LDLの蓄積が見られないことが判明した。さらに、一度酸化脂質を蓄積させた血管壁に後日PAF-AHを導入すると、酸化脂質が消失することも確認した。PAF-AH導入血管では傷害3週間後の内膜肥厚が対照群に比べ有意に減少した。

- ② Angiotensin-1 (Ang-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。Ang-1の抑制効果はカテコラミン負荷でもNO産生阻害でも影響を受けなかった。抗血栓・抗炎症の両作用とも可溶性Tie-2(Ang-1の受容体)の過剰発現で消失したが、中膜平滑筋細胞にはTie-2の発現は少なくとも通常の方法では検出できなかった。外膜に存在する微小血管内皮細胞でのみTie-2の発現を認めた。どのような機構でAng-1が治療効果を示したのか現時点では不明である。

D. 考察

- ① PAF-AHおよびAng-1の傷害血管壁局所への遺伝子導入により、強力な抗炎症・抗血栓効果が発揮された。これまでもTFPI(Tissue factor pathway inhibitor)およびCNP(C-type natriuretic peptide)で抗血栓作用を確認したが、それぞれの分子で作用発揮にいたる分子機構が異なる。治療分子群個々の作用機構の解明は、動脈壁における血栓形成のメカニズムの理解に資すると期待される。
- ② たとえウサギのような低コレステロール動物であっても、傷害後きわめて短期間で酸化脂質が血管壁に広範に蓄積することが判明した。酸化脂質は動脈硬化の発症ならびに促進因子と考えられているが、本研究結果からも酸化脂質の催炎症・催血栓分子としての重要性が再認識できた。同時に酸化ストレスが傷害血管壁の炎症反応に重要な役割を果たしていることも確認された。
- ③ PAF-AH導入血管では酸化脂質のみが除去されていた。すでに蓄積された酸化脂質の不活性化も可能であり、単に動脈硬化の進展阻止にとどまらない積極的な動脈硬化退縮療法へ発展する可能性がある。
- ④ Ang-1の導入で優れた抗血栓・抗炎症作用を観察し、Ang-1の新たな作用を認めた。作用機構の解明に興味を持たれる。

- ① 傷害血管壁で抗炎症・抗血栓作用を發揮できる治療分子群を新たに2種同定した。酸化ストレスおよび酸化脂質の催炎症性を再確認するとともに、その制御分子となりうるPAF-AHを同定した。PAF-AHの粥腫への作用や血管内皮細胞への効果をさらに検討して、動脈疾患の予後の改善に繋がる血管保護療法に発展させたい。
- ② Ang-1という血管新生因子に強力な抗炎症作用があることを発見した。既存の分子でもその作用は多岐でありいろいろな可能性を想定することの重要性を再認識した。Ang-1の作用機構の解明過程で血管生物学の新局面を開く可能性もある。

F. 研究発表:

1. 論文発表

Arakawa H, Qian J-Y, Baatar D, Karasawa K, Asada Y, Sasaguri Y, Miller ER, Witztum JL, Ueno H. Local expression of platelet-activating factor-acetylhydrolase reduces accumulation of oxidized lipoproteins, and inhibits inflammation, shear stress-induced thrombosis, and neointima formation in balloon-injured carotid arteries in non-hyperlipidemic rabbits. *Circulation* (2005 in press)

2. 学会発表

Baatar D, et al. Local expression of Angiotensin-1 Suppresses

E. 結論

Inflammation and Thrombosis in Balloon-injured Rabbit Carotid Arteries. American Heart Association Meeting. Nov. 2003, Orlando, USA

G. 知的財産権の出願・登録はなし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）
分担研究報告書

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

（分担研究者） 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

研究要旨 骨髄単核球は内皮前駆細胞 (EPC) に分化可能な血管芽細胞と強力な血管内皮増殖因子 (VEGF, bFGF) を含む。大動物実験より骨髄単核球の虚血組織（下肢・心筋）への自家移植は高率に側副血管形成、機能改善を誘導した。これら前臨床データをもとに“自家骨髄単核球移植による末梢動脈閉塞性疾患（2000年1月より）・虚血性心臓病（2000年12月より）への血管新生治療”を多施設で開始した。世界で初めての細胞治療による血管新生療法として世界に普及した。本邦では21施設で200人以上の末梢動脈閉塞性症患者さんが治療を受けられ、2003年には再生医療で初めて高度先進医療の適用を受けた。2000年1月より2004年末までの治療症例を多変量解析した。有害事象は8.8%であり、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%であり、生活習慣病・透析の有無は有効性に影響しなかった。本邦で開発された自家骨髄単核球移植による重症虚血下肢への血管再生療法は安全で有効な治療法と考えられた。

A. 研究目的

骨髄単核球は内皮前駆細胞 (EPC) に分化可能な血管芽細胞と強力な血管内皮増殖因子 (VEGF, bFGF) を含む。大動物実験より骨髄単核球の虚血組織（下肢・心筋）への自家移植は高率に側副血管形成、機能改善を誘導した。これら前臨床データをもとに“自家骨髄単核球移植による末梢性血管疾患（2000年1月より）・虚血性心疾患（2000年12月より）への血管新生治療”を開始した。研究目的は骨髄細胞移植の血管再生医療としての有効性・安全性を確認することである。

B. 研究方法

対象症例：1) 末梢閉塞性動脈疾患（閉塞性動脈硬化症・パージャー病）。Fontaine分類 III度およびIV度、Rutherford慢性虚血肢臨床分類II度4群、III度5群および6群に属し、安静時痛または虚血性潰瘍・壊死を有する患者で、内科的・外科的に血行再建術の適応が無く、将来切断が予想される患者。2) 重症虚血性

心臓病患者への適用は内科的・外科的血行再建術が困難であり狭心症を頻発するCCS分類IVの症例である。

適応除外事項：悪性新生物を有する患者及び3年以内にその既往のある患者、規定の諸検査により悪性腫瘍の可能性があると判断された患者、未治療の糖尿病性網膜症を有する患者、治療されていない虚血性心臓病を有する患者、インフォームドコンセントを得られない患者、その他、主治医が不適當と判断した患者

移植方法：全身麻酔下に患者腸骨より骨髓液（下肢：500ml、心臓：200ml）を採取し、骨髄単核球細胞を血液分離機 (SPECTRA) を用いて高率に回収した。分離・濃縮された骨髄単核球細胞（下肢：10億個、40箇所、心臓：2億個、20箇所）を筋肉内移植した。心臓は開胸あるいはカテーテル (NOGAシステム) を用いて虚血冬眠心筋部位に移植した。

評価：虚血下肢での血管新生効果は、疼痛スケール（10段階評価）、虚血性潰瘍の縮小、ABPI（ankle-brachial index必要時はTBPI）、最大歩行距離（トレッドミル、平地2.4km/h）、経皮的組織酸素分圧で評価した。虚血性心臓病での血管新生効果は、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。

倫理面への配慮

大学倫理委員会で当該臨床試験は承認される。説明文書にて発生する合併症・効能・不利益・利益を説明し、患者意志にて細胞移植医療を希望する場合のみ施行する。

C. 研究結果

虚血下肢での有効性・安全性：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、肺炎 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% バージャー病

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療経過を示した。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。

虚血性心臓病に対する有効性・安全性：

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（2-4x10⁸個/20部位）。肋間小切開にて虚血冬眠心筋に心外膜側より、自家骨髄単核球を30箇所に移植した。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、運動対応能は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、運動対応能は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。

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（3）。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200人以上の虚血下肢患者を対象に実施された。190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。生活習慣病・透析の有無は有効性に影響しなかった。年齢・バイパス術の有無が影響因子であった。本邦で開発された自家骨髄単核球移植による重症虚血下肢への血管再生療法は安全で有効な治療法と考えられた。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・胸痛は著明改善し、安全で有効な再生医療と考えられた。

E. 結論

自家骨髄単核球移植による血管新生治療は難治性の末梢動脈閉塞症、虚血性心臓病に有効で安全な再生医療である。世界的にも普及し、当該研究の達成度は臨床的、科学的に実証された。我々の臨床成績をもとに欧州6カ国で当該治療が実施された。米国FDAも本年3月より承認し、欧米も含めて難治性心臓血管病の症例が骨髄単核球による血管新生治療で救済されている。世界に普及させた血管再生治療としての、国際的・社会的意義は非常に大きい。

F. 研究発表

論文発表:

- 1) Irie H, Okigaki M, Zen K, Takamiya M, Takahashi T, Azuma A, Tatsumi T, Matsubara H. Carbon Dioxide-Rich Water Bathing Enhances Collateral Blood Flow In Ischemic Hindlimb via Mobilization of Endothelial Progenitor Cells and Activation of NO-cGMP System *Circulation*, 2005;111 in press
- 2) Mano A, Tatsumi T, Shiraishi J, Keira N, Nomura T, Takeda M, Nishikawa S, Yamanaka S, Matoba S, Kobara M, Tanaka H, Shirayama T, Takamatsu T, Nozawa Y, Matsubara H. Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways. *Circulation*. 2004;110(3):317-23.
- 3) Tatsumi T, Akashi K, Keira N, Matoba S, Mano A, Shiraishi J, Yamanaka S, Kobara M, Hibino N, Hosokawa S, Asayama J, Fushiki S, Fliss H, Nakagawa M, Matsubara H. Cytokine-induced nitric oxide inhibits mitochondrial energy production and induces myocardial dysfunction in endotoxin-treated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37(3):775-84.
- 4) Mano A, Tatsumi T, Shiraishi J, Keira N, Nomura T, Takeda M, Nishikawa S, Yamanaka S, Matoba S, Kobara M, Tanaka H, Shirayama T, Takamatsu T, Nozawa Y, Matsubara H. Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways. *Circulation*. 2004;110(3):317-23
- 5) Amano K, Okigaki M, Adachi Y, Fujiyama S, Mori Y, Kosaki A, Iwasaka T, Matsubara H. Mechanism for IL-1 beta-mediated neovascularization unmasked by IL-1 beta knock-out mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36(4):469-80.
- 6) Matsubara H. Risk to the coronary arteries of intracoronary stem cell infusion and G-CSF cytokine therapy. *Lancet*. 2004;363:746-7.
- 7) Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Sueda T, Goto C, Matsubara H, Murohara T, Yoshizumi M. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation*. 2004;109(10):1215-8.
- 8) Bove CM, Yang Z, Gilson WD, Epstein FH, French BA, Berr SS, Bishop SP, Matsubara H, Carey RM, Kramer CM. Nitric oxide mediates benefits of angiotensin II type 2 receptor overexpression during post-infarct remodeling. *Hypertension*. 2004;43(3):680-5.
- 9) Hashimoto N, Maeshima Y, Satoh M, Odawara M, Sugiyama H, Kashihara N, Matsubara H, Yamasaki Y, Makino H. Overexpression of angiotensin type 2 receptor ameliorates glomerular injury in a mouse remnant kidney model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(3):F516-25

学会発表:

1. Mano A, Tatsumi T, Shiraishi J, Nishikawa S, Takeda M, Yamanaka S, Keira N, Kobara M, Shirayama T, Matsubara H Identification of Plasma Membrane Receptor for Aldosterone and Evaluation of Aldosterone-Induced Apoptosis Via Calcineurin-Dependent Nongenomic Signaling in Cardiac Myocytes American Heart Association (米国心臓病学会) 2004 Nov7-10, New Orleans, USA
2. Yamada H, Urao N, Doue T, Takamiya M, Zen K, Irie H, Sawada T, Azuma A, Okigaki M, Matsubara H Targeted overexpression of Angiotensin II Type2 Receptor in Vascular Smooth Muscle Cells Reduces Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice American Heart Association (米国心臓病学会) 2004 Nov7-10, New Orleans, USA
3. Yamada H, Kamide T, Urao N, Doue T, Takamiya M, Zen K, Irie H, Sawada T, Azuma A, Okigaki M, Matsubara H Administration of Mesenchymal Stem Cell-Derived Endothelial Cells 'Aggravated' Luminal Narrowing after Arterial Injury in Mice American Heart Association (米国心臓病学会) 2004 Nov7-10, New Orleans, USA
4. Imada T, Matsubara H Nishiue T, Yoshida M,

Fujiyama S, Iba O, Amano K, Masaki H, Mori Y, Okigaki M, Nishiwaki Y, Nitta N, Iwasaka T, Development of Novel Cell Delivery System for Therapeutic Angiogenesis-Targeted Delivery of Bone Marrow Cells by Ultrasound Destruction of Microbubbles American Heart Association (米国心臓病学会) 2004 Nov7-10, New Orleans, USA

5. Zen K, Takamiya M, Irie H, Doue T, Azuma A, Matsubara H, Okigaki M Novel Cell Delivery System for Angiogenic Cell Therapy to Failing Heart: Targeted Delivery of Bone Marrow Cells by Ultrasound Destruction of Microbubbles American Heart Association (米国心臓病学会) 2004 Nov7-10, New Orleans, USA
6. Simizu A, Lu Z, Sago M, Niwa R, Honjo H, Matsubara H Kamiya K Developmental Changes in APDs and Ionic Currents of Mouse Myoblasts American Heart Association (米国心臓病学会) 2004 Nov7-10, New Orleans, USA

G. 知的所有権の出願・取得状況

骨格筋由来の心筋幹細胞
出願日；2004年10月22日
出願番号；2004-307797

心臓組織由来の多能性幹細胞
出願日；平成17年3月4日
出願番号；2005-60831
平成12年12月4日 特許出願

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	ページ	出版年
田中君枝 佐田政隆	血管不全、総論	野出孝一	血管不全フロンティア	メディカルレビュー社	東京	27-34	2004
佐田政隆	ES細胞・心血管幹細胞	浅田祐士郎、江頭健輔、甲斐久史、古森公浩、佐田政隆、室原豊明	心臓ナビゲーター	メディカルレビュー社	東京	56-57	2004
Sata, M, Nagai, R	Vascular regeneration and remodeling by circulating progenitor cells	Mori, H., Matsuda, H. eds.	Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches.	Springer-Verlag	Tokyo	117-127	2005
田中君枝 佐田政隆	血管内皮前駆細胞の機能的意義	矢崎義雄、山口徹、高本眞一、中澤誠	Annual Review 循環器 2005	中外医学社	東京	55-61	2005
Morishita Ryuichi	Perspective in progress of cardiovascular gene therapy		J. Pharmacol Science			1-8	2004
牧野寛史、荻原俊男、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	三島和展	バイオインダストリー	シーエムシー出版	東京	2-19	2004
青木元邦、森下竜一、荻原俊男	抹消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	永井出版	大阪	176-184	2004
松原弘明	NOGAシステム	浅田祐士郎、江頭健輔 他4名	心臓ナビゲーター	メディカルレビュー社	東京	190-191	2004
松原弘明	血管再生医療の実施と展望ー骨髄系体細胞移植を用いた末梢性血管疾患・狭心症への血管新生医療ー	日本老年医学会雑誌編集委員会	老年医学update 2004-2005	メジカルビュー社	東京	56-164	2004
辰巳哲也、高橋知三郎、王英正、松原弘明	細胞移植と血管新生治療ー末梢血管病から心臓病へー	野出孝一	血管不全フロンティア	メディカルレビュー社	東京	349-356	2004

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
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
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
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
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, Takekawa 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
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.	Vasorin, 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 USA	101	10732-10737	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	146-53	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	209-15	2004
Sata, M., Nagai, R.	Inflammation, angiogenesis, and endothelial progenitor cells: How do EPCs find their place?	J Mol Cell Cardiol	36	459-463	2004

Sekiya, M., Osuga, J.I., Okazaki, H., Yahagi, N., Harada, K., Shen, W.J., Tamura, Y., Tomita, S., Iizuka, 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	279	15084-15090	2004
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	43	1214-1220	2004
Sata, M., Nagai, R.	Origin of neointimal cells in autologous vein graft.	Arterioscler Thromb Vasc Biol.	24	1147-1149	2004
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	24	1886-1890	2004
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.	8	599-607	2004
Sata, M., Nagai, R.	Mouse models of vein graft.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	24	e185-e187	2004
Fukuda, D., Sata, M., Tanaka, K., Nagai, R.	Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells.	Circulation	111	926-931	2005
Natori, T., Sata, M., Nagai, R., Makuuchi, M.	Cimetidine inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth.	Biomed Pharmacother	59	56-60	2005
Higashikuni, Y., Sata, M., Nagai, R.	Reversible left ventricular hypertrophy after Tako-Tsubo-like cardiomyopathy.	Acta Cardiol	60	77-79	2005
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	424-31	2004
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	3320-25	2004
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	203-9	2004
小池弘美、森下竜一	糖尿病macroangiopathyの遺伝子治療	Diabetes Frontier	15	867-72	2004
Shimokata K, Yamada Y, Kondo T, Izawa H, Nagata K, Murohara T, Ohno M, Yokota M.	Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in individuals with or without nonfamilial hypercholesterolemia.	Atherosclerosis	172	167-173	2004

Numaguchi Y, Okumura K, Harada M, Naruse K, Yamada M, Osanai H, Matsui H, Ito M, Murohara T.	Catheter-based prostacyclin synthase gene transfer prevents in-stent restenosis in rabbit atheromatous arteries.	Cardiovasc Res	61	177-185	2004
Takeshita K, Hayashi M, Iino S, Kondo T, Inden Y, Iwase M, Kojima T, Ito M, Loskutoff DJ, Saito H, Murohara T, Yamamoto K.	Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cardiomyocytes contributes to cardiac fibrosis after myocardial infarction.	Am J Pathol	164	449-456	2004
Murohara T.	Therapeutic angiogenesis: Cellular approach from bone marrow, cord blood and peripheral blood.	Int Congress Series	1262	332-338	2004
Suzuki N, Shibata Y, Urano T, Murohara T, Muramatsu T, Kadomatsu K.	Proteasomal degradation of the nuclear targeting growth factor midkine.	J Biol Chem	279	17785-17791	2004
Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jituike D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Goto C, Matsubara H, Murohara T, Yoshizumi M.	Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia.	Circulation	109	1215-1218	2004
Kato T, Chan MC, Gao SZ, Schroeder JS, Yokota M, Murohara T, Iwase M, Noda A, Hunt SA, Valantine HA.	Glucose intolerance, as reflected by hemoglobin Alc level, is associated with the incidence and severity of transplant coronary artery disease.	J Am Coll Cardiol	43	1034-1041	2004
Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K, Lee JH, Kamiya K, Kitaichi K, Ito M, Kondo T, Iino S, Yamamoto K, Inden Y, Hirai M, Murohara T, Kodama I, Nabeshima Y.	Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression.	Circulation	109	1776-1782	2004
Kondo T, Hayashi M, Kinoshita K, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T.	Smoking cessation rapidly increases endothelial progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	24	1442-1447	2004
Murohara T, Ikeda H, Otsuka Y, Aoki M, Haramaki N, Katoh A, Takajo Y, Imaizumi T.	Inhibition of platelet adherence to mononuclear cells by a-tocopherol: Role of P-selectin.	Circulation	110	141-148	2004
Shimada T, Takeshita Y, Murohara T, Sasaki K, Egami K, Shintani S, Katsuda Y, Ikeda H, Nabeshima Y, Imaizumi T.	Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in precocious aging Klotho mouse.	Circulation	110	1148-1155	2004
Choi JH, Hur J, Yoon CH, Kim JH, Lee CS, Youn SW, Oh IY, Skurk C, Murohara T, Park YB, Walsh K, Kim HS.	Augmentation of therapeutic angiogenesis using genetically-modified human endothelial progenitor cells with altered glycogen synthase kinase-3b activity.	J Biol Chem	279	49430-49438	2004
Niiyama H, Kai H, Yamamoto T, Shimada T, Sasaki K, Murohara T, Egashira K, Imaizumi T.	Roles of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 in ischemia-induced neovascularization.	J Am Coll Cardiol.	44	661-666	2004
Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, Izawa H, Kobayashi M, Emi N, Komori K, Naoe T, Takamatsu J, Murohara T.	Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs: therapeutic effect by stem cell transplantation.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	24	e192-e196	2004

Kondo T, Kobayashi K, Murohara T.	Nitric oxide signaling during myocardial angiogenesis.	Mol Cell Biochem	264	25-34	2004
Yokoyama S, Ikeda H, Haramaki N, Yasukawa H, Murohara T, Imaizumi T.	Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates.	J Am Coll Cardiol	in press		2005
Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H.	Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats.	Gastroenterology	128	138-146	2005
Sako A, Kitayama J, Kojima H, Ueno H, Uchida H, Hamada H, Nagawa H.	Transduction of soluble Flt-1 gene to peritoneal mesothelial cells can effectively suppress peritoneal metastasis of gastric cancer.	Cancer Research	64	3624-3628	2004
Nagashio Y, Ueno H, Imamura M, Asami H, Watanabe S, Yamaguchi T, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M.	Inhibition of transforming growth factor β decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice.	Lab Invest	84	1610-1618	2004
Nie L, Imamura M, Itho H, Ueno H.	Pitavastatin enhances the anti-fibrogenesis effects of candesartan, an angiotensin II receptor blocker, on CC14-induced liver fibrosis in rats.	J UOEH	26	165-177	2004
Nishioka A, Ogawa Y, Mima T, Jin Y-J, Sonobe H, Kariya S, Kubota K, Yoshida S, Ueno H.	Histopathological amelioration of fibroproliferative change in rat irradiated lung using soluble transforming growth factor-beta (TGF- β) receptor mediated by adenoviral vector.	Int J Radiat Oncol Biol Phys	58	1235-1241	2004
Sakata R, Uno T, Nakamura T, Ueno H, Sata M.	Mechanical stretch induces TGF-beta synthesis in hepatic stellate cells.	Eur J Clin Invest	34	129-136	2004
Shirakata Y, Ueno H, Hanakawa Y, Kameda K, Yamasaki K, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.	TGF-beta is not involved in early phase growth inhibition of keratinocytes by 1 alpha, 25(OH)(2)vitamin D(3)	J Dermatol Sci	36	41-50	2004
松原弘明	血管病－動脈硬化の成因と治療－	細胞 (The Cell)	3	2(80)	2004
山田浩之、浦尾紀文、高宮充孝、松原弘明	細胞移植による内皮再生・再狭窄予防	細胞 (The Cell)	3	30(108)-32(110)	2004
松原弘明	骨髄幹細胞移植による虚血性心臓病の治療	日本医事新報	4175	26-27	2004
山田浩之、松原弘明	心肥大における新たなアンジオテンシンIIタイプ2受容体シグナル伝達機序	Angiotensin Research	4(1)	70-79	2004
松原弘明	虚血性心臓病への骨髄幹細胞移植による血管再生医療	Organ Biology	11(1)	61-68	2004

松原弘明、王 英正、辰巳哲也、他3名	細胞移植による血管再生医療 —末梢性血管病から心臓病まで—	実験医学	22(8)	160-165	2004
辰巳哲也、松原弘明、高橋知三郎、他3名	血管再生医療の現状と将来— 末梢性血管病から心臓病へ—	循環器科	56(1)	77-83	2004
松原弘明、王 英正、辰巳哲也、神島 宏、岩坂壽二	心血管前駆細胞と再生医療— 末梢性血管病から心臓病まで—	呼吸と循環	52(8)	819-825	2004
辰巳哲也、松原弘明、王 英正、他3名	細胞移植再生医療による心臓病治療	Cardiovascular Med-Surg	6(3)	19-25	2004
松原弘明、王 英正	難治性虚血性心臓病を細胞移植で再生治療する	医学のあゆみ	210(6)	642-647	2004
松原弘明、辰巳哲也、高橋知三郎、他3名	骨髄細胞移植による虚血性心臓病の再生治療	治療学	38(8)	84-87	2004
松原弘明、辰巳哲也、王 英正、他3名	難治性心臓病への心筋再生・血管新生療法	分子心血管病	5(5)	60-66	2004
辰巳哲也、高橋知三郎、王 英正、松原弘明	難治性心臓病への血管新生療法	Medical Science Digest	30(14)	19-24	2004
松原弘明	骨髄幹細胞移植による虚血性心臓病の治療	日本醫事新報	4157	26-27	2004
松原弘明	虚血性心臓病へのカテーテルを用いた細胞移植治療	医工学治療	16(2)	96-102	2004
芦原英司、王 英正、松原弘明	心筋再生—骨髄由来幹細胞による心筋細胞への可塑性について—	移植	39(5)	499-508	2004
松原弘明	細胞移植と再生医療—血管新生から心筋再生へ—	循環器科	56(4)	347-348	2004
伊藤一貴、杉原洋樹、東 秋弘、松原弘明	急性心筋梗塞治療における血栓吸引装置Rescue tm の有用性— ^{99m} Tc-tetrofosmin/ ^{99m} Tc-PYP心筋SPECTを用いた検討—	循環器科	55(6)	579-586	2004

山口真一郎、伊藤一貴、木下法之、加藤周司、東 秋弘、松原弘明	Anchor Balloon technique を用いた経皮的冠動脈形成術において遅発性の冠動脈穿孔を生じ、コイル塞栓術により止血し得た急性心筋梗塞の1例	循環器	56(2)	203-212	2004
--------------------------------	--	-----	-------	---------	------