

200400083B

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15-16年度 総合研究報告書

主任研究者 永井 良三

平成17(2005)年3月

目 次

I. 総合研究報告	————— 3
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	————— 15

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総合研究報告書

血管新生と血管保護療法の開発に関する研究

主任研究者 永井良三 東京大学大学院医学研究科（循環器内科）教授

研究要旨 (1) 骨髄由来細胞が動脈硬化病変を形成する平滑筋細胞の中に存在することを明らかにした。(2) 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開始した。(3) 遺伝子導入による血管新生の促進療法を開発した。肝細胞増殖因子を用いた血管新生療法は第2ステージまで終了し良好な結果を得た。肝細胞増殖因子遺伝子導入は動物モデルで、糖尿病性神経障害、皮膚潰瘍、脳梗塞後の記憶障害を改善することを明らかにした。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) 可溶性 VEGF, FGF 受容体に加え可溶性 Tie2 や可溶性 PDGF 受容体が顕著な抗腫瘍効果を示した。(5) 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。(6) 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

年、この考えを基にして、血管再生や血管新生の面から難治性疾患に対する治療法が提唱されるようになった。血管新生・再生だけでなく、血管内皮保護も動脈硬化予防と循環障害改善に重要である。そこで本研究は、血管新生・再生・保護を制御する血管医学の展開をはかり、これを応用した虚血性心疾患、血行再建術後再狭窄、閉塞性動脈硬化症、心筋症、癌などに対する新しい治療法を開発を目的とする。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) 動脈硬化病変を構成する細胞の由来 異なる血管傷害モデルを用いての検討

野生型マウスに致死量の X 線(9Gy)を照射し、GFP マウスもしくは LacZ マウスの骨髄を移植した。一匹の骨髄移植マウスの三つの異なる血管に、同時に別々の異なる傷害を加えた。ワイヤー傷害 (Wire Injury)、頸動脈の結紮 (Ligation)、ポリエチレンチューブの大腿動脈周囲への留置 (Cuff)の三種類の異なるモデルで手術を行い、4 週後に骨髄由来の病変への取りこまれ方を検討した。

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

一個の造血幹細胞を用いた骨髄置換マウスの解析

骨髄細胞のうち、血管の修復と病変形成に関与する分画を検討した。野生型マウスの骨髄を、①全骨髄 1×10^6 個(TBM群)、②造血幹細胞が大部分を占めるc-Kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻分画 1×10^3 個(KSL群)③高度に純化した造血幹細胞1個(HSC群)によって置換した。その後、血管にワイヤーを用いた傷害を加え、病変への骨髄細胞の取り込まれ方を比較した。

Parabiosisモデルを用いての検討

従来の骨髄置換法においては、致死量放射線照射を用いたレシピエント骨髄の破壊が必須である。しかし、放射線照射は骨髄以外のさまざまなレシピエント臓器に影響をもたらす、生理的な骨髄細胞の標識方法ではない。また、移植した骨髄細胞が造血系を完全に置換することは認められているが、他の間葉系システムも生理的に再構築するかどうかは不明である。そこで、照射を伴わないで骨髄と血液細胞を標識する方法として、二つのマウスを皮下で結合させるという parabiosis のモデルを樹立した。このモデルを用いて、血管傷害と高脂血症性血管傷害モデルを施し、パートナー由来細胞の血管病変への関与を検討した。

2) 自家骨髄移植による血管再生療法

a) 虚血下肢、心筋への自家骨髄移植療法

対象症例：1) 末梢閉塞性動脈疾患(閉塞性動脈硬化症・バージャー病)。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、主治医が不適当と判断した患者

移植方法：全身麻酔下に患者腸骨より骨髄液(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。

b) 細胞移植療法と angiopoietin-1 プラスミド遺伝子治療を併用(遺伝子剤棒ハイブリッド治療)

移植前骨髄細胞の虚血暴露刺激・機械的刺激などにより、細胞の血管新生機能を強化する手法について検討をする。また、細胞移植療法と angiopoietin-1 プラスミド遺伝子治療を併用(遺伝子剤棒ハイブリッド治療)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) 遺伝子導入ならびに薬物による血管新生の促進と抑制療法

a) 肝細胞増殖因子(HGF)遺伝子導入による治療 糖尿病性神経障害に対する遺伝子治療

12週齢の雌性SDラットにSTZ(40 mg/kg ip)により糖尿病を誘発、その13週間後にヒトHGF遺伝子を両大腿部筋肉内に直接注射し、その2週間後に神経伝達速度、4週間後に血流量の増加をLaser Doppler Image(LDI)にて、さらに8週間後に神経伝達速度、LDIを再度測定し効果判定を行った。また体重測定、血糖測定も随時行った。

皮膚潰瘍に対する遺伝子治療

7週齢の雄性Wistarラットにステロイドホルモンの皮下注射にて潰瘍を誘発、創傷遅延モデルを作成。潰瘍誘発直後にヒトHGF遺伝子とヒトPGIS遺伝子を潰瘍周囲にシマジェットを用いて導入した。その後経時的に潰瘍の修復を創面積にて、潰瘍面における血流の増加をLDIにて、さらに創内におけるコラーゲン量を測定し、遺伝子導入の効果を評価した。

脳梗塞に対するHGF遺伝子治療

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。

閉塞性動脈硬化症・バージ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、4mg 遺伝子投与群・8mg 遺伝子投与群にわけ安全性・有効性について2年間の追跡調査を行う。

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) 血管新生に関係する受容体の可溶型による腫瘍血管新生抑制療法

血管新生因子(Angiopoietin-1, PDGF, TGF- β)の受容体の細胞外領域のみに免疫グロブリンのFc部分を融合させたキメラ体の可溶型受容体を作成しアデノウイルスベクターに組み込んだ(AdsTie2, AdPDGF-ExR, AdT β -ExR)。可溶型 VEGF, FGF 受容体が無効であった5つのがん細胞をヌードマウス皮下に移植し生着後、大腿筋肉内あるいは腹腔内にアデノウイルスを注入して可溶型受容体を発現させ、腫瘍成育を経時的に観察した。Jiang らの方法(Nature. 418, 41-49, 2002)に従いマウス骨髄よりEPCの起源と思われる増殖能の高い細胞(MAPC; multipotent adult progenitor cell と命名)を単離した。このMAPCをVEGFとともに培養すると血管内皮細胞様の細胞(EPC; Endothelial progenitor cell)に分化した。同じ手法を用いてLacZ トランスジェニック・マウス由来のEPCを調製した。ヌードマウス皮下にヒト肺がん由来のH460細胞を移植し、がん細胞が生着した後、LacZ トランスジェニック・マウス由来のEPCを注入した(尾静脈内、心臓腔内、腫瘍近傍)。癌生育後、腫瘍内のLacZ 陽性細胞の有無をX-Gal 染色および組織切片作成後の抗 β -galactosidase 抗体による免疫染色にて検討した。LacZ トランスジェニック・マウス由来のEPCに可溶型FGF受容体を発現させて、マウス尾静脈内、心臓腔内あるいは腫瘍移植近傍に注入し、腫瘍生育を経時的に観察した。

4) 遺伝子をターゲットにした血管保護療法

a) 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)の頸動脈また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血管壁内側に遺伝子導入した。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定量した。

(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) 動脈硬化病変を構成する細胞の由来 異なる血管傷害モデルを用いての検討

ワイヤー傷害(Wire Injury)、頸動脈の結紮(Ligation)、ポリエチレンチューブの大腿動脈周囲への留置(Cuff)何れのモデルによってもアクチン陽性細胞からなる新生内膜が形成された。Wire Injury では多くの骨髄細胞が取り込まれていたが、Ligation では非常に少なかった。また、Cuff では周囲の炎症細胞としては骨髄由来細胞が存在したが、新生内膜には殆ど取り込まれていなかった。骨髄由来細胞の取り込まれる程度は、組織損傷の程度とその後のケモカイン、サイトカインの発現量と相関していた。特にwire injury 後の大腿動脈では、内皮はほぼ完全に剥離され中膜の細胞はアポトーシスにより消失していた。このような強い傷害後は、修復に必要な細胞が局所に残存せず遠隔の幹細胞が動員されざるをえなくなると考えられた。

一個の造血幹細胞を用いた骨髄置換マウスの解析

TBM, KSL, HSC どの群においても末梢の血液細胞は移植細胞由来のものに再構築されていた。TBM もしくはKSLで骨髄を置換したマウスでは、傷害後の血管病変に骨髄由来細胞が数多く認められた。骨髄由来細胞の多くの細胞は、血管平滑筋細胞もしくは内皮細胞のマーカーを発現していた。一方、一個の造血幹細胞

を移植した HSC 群では、病変には骨髄由来細胞が関与することは殆ど認められなかった。以上より、造血幹細胞より未分化な骨髄細胞もしくは間葉系細胞から、血管前駆細胞が分化している可能性が高いと考えられた。

Parabiosis モデルを用いての検討

皮下の結合によって、従来から知られているように液性因子が交流するばかりでなく、末梢血、骨髄細胞も二マウス間を交流していた。すなわち、GFP マウスと野生型マウスを結合すると、7-10 日には野生型マウスの末梢血の約 50% が GFP 陽性になっていた。3-4 ヶ月後には、骨髄においてもほぼ 50% のキメリズムが確認された。片方のマウスの血管にワイヤー傷害を加えると、パートナー由来の細胞が新生内膜形成に関与していた。

2) 自家骨髄移植による血管再生療法

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 ヶ月後 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。

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（ $2-4 \times 10^8$ 個/20 部位）。肋間小切開にて虚血冬眠筋に心外膜側より、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。冬眠筋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。

b) 細胞移植療法と angiopoietin-1 プラスミド遺伝子治療を併用（遺伝子剤棒ハイブリッド治療）

Angiopoietin-1 (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。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髄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。

3) 遺伝子導入ならびに薬物による血管新生の促進と抑制療法

a) 肝細胞増殖因子(HGF)遺伝子導入による治療 糖尿病性神経障害に対する遺伝子治療

経時的に測定した体重や血糖値においてはコントロ

ールベクター導入群と HGF 遺伝子導入群においては有意な差は認めなかった。神経伝達速度は糖尿病誘発後 13 週の時点ですでに健常コントロール群に比し有意な低下が認められた。その後ヒト HGF 遺伝子導入群では 2 週間でコントロールベクター導入群に比し、有意な改善を認め、さらに遺伝子導入後 8 週間で HGF 遺伝子導入群では健常コントロール群と同等のレベルにまで回復していた。LDI による両大腿部(遺伝子導入部位周辺)での血流量は予想どおり HGF 遺伝子導入群においてコントロール群に比し、有意に上昇していた。さらに坐骨神経における血流量も同様の結果であり HGF 遺伝子導入群において有意な上昇がコントロール群に比し認められた。

皮膚潰瘍に対する遺伝子治療

まず皮膚への遺伝子導入方法が確立されていなかったため、インスリン注射用に開発された無針のシマジェット的应用を試みた。予備実験においては皮膚から遺伝子導入を行うと表皮から真皮にかけて遺伝子が効率良く導入されることを確認し、本研究の目的に使用可能であると考えた。その後ヒト HGF 遺伝子単独導入群、およびヒト HGF 遺伝子およびヒト PGIS 遺伝子共導入群、コントロール群間で効果を比較検討した。創面積においては HGF 群においてもコントロール群と比較すると有意な縮小が認められ、その効果 HGF + PGIS 群においてさらに増強されていた。また LDI による血流量測定でもやはり HGF + PGIS 群において最も有意な増加を認め、ついで HGF 群となっていた。コラーゲン量の測定においては HGF + PGIS 群と HGF 群においては有意な差は認められなかったが、ともにコントロール群よりは有意に増加していた。

脳梗塞に対する HGF 遺伝子治療

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。

閉塞性動脈硬化症・バージャー病に対する遺伝子治療

遺伝子投与に起因する重篤な有害事象は確認できず、

臨床上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。

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

従来 VEGF により血管新生治療が試みられているが、新生血管は漏れやすく、また永続しないことが問題となっている。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 の発現が亢進していることが示された。

c) 血管新生に関係する受容体の可溶性による腫瘍血管新生抑制療法

可溶性 VEGF, FGF 受容体が無効であったガンのうち、QG56 では可溶性 PDGF 受容体が無効であった。N417 細胞では可溶性 Tie2 (sTie-2) が顕著な抗腫瘍効果を示した。N417 腫瘍内部には通常の血管内皮細胞が観察されず、PAS 染色陽性の偽血管形成 (Vasculogenic mimicry: VM) が認められた。N417 細胞自身は Tie-2 のリガンドである Angiopoietin-1 (Ang-1) を産生しないが、受容体である Tie2 を発現していた。マウス骨髄から増殖能の高い細胞を分離しクローン化に成功した。内皮細胞のマーカである Tie-2, Flk を発現しており、VEGF の添加では内皮様細胞に分化したため、内皮前駆細胞 (EPC) と考えた。同方法で LacZ マウスより EPC を分離し、腫瘍近傍に注入したところ、腫瘍内に EPC が浸潤していることを確認することができた。しかし尾静脈から注入すると腫瘍内部に LacZ 陽性の細胞を検出することはできなかった。可溶性 FGF 受容体をアデノウイルスを用いて EPC に導入し、この EPC を H460 腫瘍近傍に注入すると、腫瘍の生育が抑制された。腫瘍内に取り込まれた EPC から産生される可溶性 FGF 受容体により血管新生が阻害され腫瘍成長が抑制されたと考えた。

4) 遺伝子をターゲットにした血管保護療法

a) 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。

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、血管病変形性を抑制することが示された。

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

血小板活性化因子の加水分解酵素である 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 NO 産生を阻害しても影響を受けない強力な抗血栓・抗炎症作用が観察された。酸化脂質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 導入血管では酸化脂質の蓄積が見られないことが判明した。さらに酸化脂質が蓄積した血管壁に後日 PAF-AH を導入すると酸化脂質が除去された。傷害 3 週間後の内膜肥厚も対照群に比べ有意に減少した。

Angiopoietin-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

本研究により流血中に骨髄由来の血管前駆細胞が存在し血管病の病態生理に関与していると考えられた。血管に、免疫学的、機械的、液性 (サイトカインや酸化脂質) 傷害が血管に加わると骨髄などから未分化細胞が動員され、平滑筋ないし内皮細胞に分化しうると考えられる。そして、その修復反応が過剰になると病変形成にも関与すると考えられる。この骨髄から動員される細胞を制御することは新たな治療法にむすびつくと考えられる。

虚血下肢への自己骨髄単核球細胞の組織内移植の治療成績は 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 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。

動物実験において HGF 遺伝子導入による血管新生・及び標的部位での血流増加により、糖尿病性神経障害における神経伝達速度の改善・創傷遅延モデルにおける創傷治癒促進効果が認められた。神経障害は糖尿病の重要な合併症のひとつであり、患者数も多くまた現在著効する治療法が開発されていないことから、同治療法はユニークである。海外では VEGF 遺伝子の同様の効果が報告されており、これらの血管新生因子の治療への応用が期待される。また皮膚潰瘍に対する応用については、大血管の虚血の改善のみならず、局所での微小循環改善を目指したもので、末梢性血管疾患のトータルケアとして有意義であると考えられる。現在 FGF 蛋白を用いた潰瘍製剤が市販されているが、虚血性潰

瘍への効果は未だ明らかでなく、本治療法は新たな治療法になりうる。PGIS 遺伝子の共導入、血管新生のみならず、血管拡張因子の作用を加えることによる血流増加を狙った。長期効果についてはモデル動物の限界もあり、十分な検討ができていないが、今後さらにいろいろなモデルでの検討を行い、長期にわたる効果について検討したい。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る。今後血管性痴呆や、神経細胞保護効果があることからパーキンソン病などへの応用も可能かもしれない。

HGF 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。

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。

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。

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。

HGF 遺伝子による血管新生療法を基礎レベル・臨床研究での両面で検討してきた。糖尿病性の神経障害や皮膚潰瘍といった日常臨床でよく遭遇する疾患に動物実験では有効であった。さらに HGF 遺伝子治療の安全性・有用性は下肢虚血に対する臨床研究において示唆された。製剤化を狙った Phase III が既に実施されており、本研究により遺伝子治療の臨床応用がより近くなったと考える。

血管の慢性炎症と組織リモデリングに重要な転写因子 KLF5 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。

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. 研究発表

論文発表

論文リスト参照

学会発表

永井

2003.7.17 日本薬学会 薬学研究ビジョン部会 第2回創薬ビジョンシンポジウム 特別講演「循環器研究における創薬」 東京

2003.8.22. 高遠・分子細胞額シンポジウム 第15回ゲノム、発生、生体調節 「心血管系のストレス応答に

おける転写因子：KLF5の役割」高遠
2003.10.15 第76回日本生化学学会 シンポジウム 生活習慣病と転写調節因子 —モデル動物から創薬への模索— 「Role of Krüppel-like factor 5 (KLF5) in the cardiovascular system: From pathophysiological mechanisms to therapeutic target」横浜
2003.12.6 第1回循環系フィジオーム 「KLF5/BTEB2, a Krüppel-like zinc-finger type transcription factor, mediates both smooth muscle cell activation and cardiac hypertrophy」岡山
2003.9.30 第13回国際動脈硬化学会 「Potential role of Krüppel-like transcription factor5 (KLF5) in adipocyte differentiation」京都
2003.10.1 第13回国際動脈硬化学会 シンポジウム Proliferation and differentiation of smooth muscle cells 「Role of KLF5/BTEB2, a Krüppel-like zinc-finger type transcription factor, in vascular remodeling」京都
2003.10.3 第13回国際動脈硬化学会 Satellite Symposia Vascular smooth muscle cells and remodeling 「Role of Krüppel-like factor 5 (KLF5) in the cardiovascular system」神戸
2003.11.9 776th Scientific Sessions of American Heart Association Cardiovascular Seminars 「Krüppel-like zinc-fingers in cardiovascular development and remodeling」オランダ
2003.11.9 76th Scientific Sessions of American Heart Association 「Oral Retinoic Acid Receptor Alpha Agonist Inhibits In-Tent Restenosis」オランダ
2004.4.17 The 3rd international Nuclear Receptor Meeting in Japan “Significance of Krüppel-like transcription factor 5 (KLF5) in cardiovascular remodeling” 大阪
2004.6.1-5 The 13th International Vascular Biology Meeting “Administration of Am80 inhibited instent 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 “Krüppel-like factor 5 is a key transcription factor of adipocyte differentiation” トロント
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 “A novel transcriptional regulatory pathway of PDGF-A chain mediated by KLF5 through cooperative activation with NF-κB and phorbol ester” ニューオーリンズ
2004.11.7-10 77th Scientific Sessions of American Heart Association “Krüppel-like transcription factor 5 (KLF5)

controls angiogenesis” ニューオーリンズ
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” ニューオーリンズ
2004.11.7-10 77th Scientific Sessions of American Heart Association “KLF5 inhibitor Am80 reduces atherosclerosis, adipose tissue growth, and fatty liver disease” ニューオーリンズ
2005.2.17 The University of Tokyo International Symposium Frontiers in Drug Development “Molecular mechanisms of cardiovascular remodeling” 東京
2005.3.19-21 第69回日本循環器学会学術集会 “Systemic Delivery of Retinoic Acid Receptor α 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 “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 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

前村

Gordon Research Conference: Angiogenesis and microcirculation (Newport, RI: 2003/8/11-15)

Norihiko Takeda, Koji Maemura, Yasushi Imai, Tomohiro Harada, Daiji Kawanami, Takefumi Nojiri, Ichiro Manabe, Ryoza Nagai. DELIVERY OF ENDOTHELIAL PAS DOMAIN PROTEIN 1 GENE PROMOTES MATURE ANGIOGENESIS THROUGH THE TRANSACTIVATION OF BOTH VEGF AND ITS RECEPTOR, FLT-1

American Heart Association Scientific Sessions 2003 (Orlando: 2003/11/9-12)

Norihiko Takeda, Koji Maemura, Yasushi Imai, Tomohiro Harada, Daiji Kawanami, Takefumi Nojiri, Ichiro Manabe, Ryoza Nagai. DELIVERY OF ENDOTHELIAL PAS DOMAIN PROTEIN 1 GENE PROMOTES MATURE ANGIOGENESIS THROUGH THE TRANSACTIVATION OF BOTH VEGF AND ITS RECEPTOR, FLT-1

第 67 回日本循環器学会総会 (福岡: 2003 年 3 月 28 日-30 日)

Norihiko Takeda, Koji Maemura, Yasushi Imai, Tomohiro Harada, Daiji Kawanami, Takefumi Nojiri, Ichiro Manabe, Ryoza Nagai. DELIVERY OF ENDOTHELIAL PAS DOMAIN PROTEIN 1 GENE PROMOTES MATURE ANGIOGENESIS THROUGH THE TRANSACTIVATION OF BOTH VEGF AND ITS RECEPTOR, FLT-1

第 40 回日本臨床分子医学会学術集会 (東京: 2003 年 7 月 10, 11 日)

武田憲彦、前村浩二、今井靖、原田智浩、川浪大治、野尻剛史、永井良三 Endothelial PAS Domain Protein 1 により成熟した血管形成が誘導される

第 26 回日本高血圧学会 (宮崎: 2003 年 10 月 29 日-11 月 1 日)

武田憲彦、前村浩二、川浪大治、永井良三 Endothelial PAS Domain Protein 1 により VEGF およびその受容体 Flt-1 発現が誘導され、成熟した血管形成が促進される

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

Norihiko Takeda, Koji Maemura, Yasushi Imai, Daiji Kawanami, Tomohiro Harada, Takefumi Nojiri, and Ryoza 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

Norihiko 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

Norihiko Takeda, Yasushi Imai, Daiji Kawanami, Tomohiro Harada, Takefumi Nojiri, Tetsuya Saito, and Koji Maemura

佐田

佐田政隆、平田恭信、永井良三 「骨髄由来血管前駆細胞による血管修復と再生」第 76 回日本薬理学会年会シンポジウム「血管新生制御機構と治療戦略」 2003 年 3 月 25 日 福岡

Sata, M., Tanaka, K., Nagai, R. Hematopoietic Stem Cells Differentiate into Vascular Cells that Participate in the Pathogenesis of Atherosclerosis 日本循環器学会学術集会 Plenary Session 5 "Frontier of Atherosclerosis Research" 2003 年 3 月 30 日 福岡

佐田政隆、永井良三 「骨髄由来細胞による再生および病態形成」第 100 回日本内科学会講演会パネルディスカッション「再生医療の展望」 2003 年 4 月 2 日 福岡

佐田政隆 「Statin の pleiotropic action」第 51 回日本心臓病学会学術集会「モーニングセミナー」 2003 年 9 月 9 日 東京

Sata, M. "Bone marrow-derived progenitor cells contribute to vascular repair and atherosclerosis" XIIIth International Symposium on Atherosclerosis Master's Lecture (4ML14) October 2, 2003. Kyoto

Sata, M. "Roles of circulating vascular progenitors in plaque progression and destabilization" XIIIth International Symposium on Atherosclerosis Satellite Symposium October 3, 2003. Fukuoka

佐田政隆、永井良三 「プラーク破綻の機序」第 44 回日本脈管学会総会シンポジウム: コンセンサス/コントロール-3 「冠動脈疾患-病態、診断、治療をめぐって」 2003 年 11 月 7 日 福岡

佐田政隆、永井良三 「動脈硬化形成への骨髄細胞の関与」第 26 回日本血栓止血学会: 座長指定演題シンポジウム 2003 年 11 月 28 日 東京

Masataka Sata "Bone marrow-derived progenitor cells contribute to vascular repair and atherosclerosis." Annual Spring Conference of the Korean Society of Circulation. Cheju, Korea, April 17th, 2003.

Masataka Sata "Bone marrow-derived progenitor cells participate in the pathogenesis of atherosclerosis." 1st Euregio-Symposium Workshop on Atherosclerosis-Molecular Basis of an Inflammatory Disease. Vaals, Netherlands, September 27th, 2003.

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

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

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
Masakta Sata 「Molecular Mechanism of In-stent restenosis」 (Complex Catheter Therapeutics 2004 Special Lecture, 神戸, 2004.10.23)

Masataka Sata "Circulating progenitors contribute to vascular repair and remodeling" 4th Taipei vascular molecular biology symposium, Taipei, September 11th, 2004.

Masataka Sata "Potential Roles of Circulating Vascular Progenitor Cells in Progression and Remodeling of Atherosclerotic Lesions" The 48th Annual Scientific Session of Korean Society of Circulation. Seoul, Korea, October 14th, 2004.

森下

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. 梶座康夫, 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. 梶座康夫, 富田奈留也, 富田哲也, 谷山義明, 小池弘美, 森下竜一, シマジェットを用いた 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. 橋弥尚孝, 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. 梶座康夫, 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, シマジェットを用いた 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

14. Kunugiza Y, Tomita N, Morishita R, Simultaneous transfer of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and Prostacyclin Synthase (PGIS) genes using ShimaJet accelerates wound healing. ESGT, Tampere, 2004
上野

Baatar D, et al. Local expression of Angiopoietin-1 Suppresses Inflammation and Thrombosis in Balloon-injured Rabbit Carotid Arteries. American Heart Association Meeting. Nov. 2003, Orlando, USA

松原

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

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

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

Fujiyama S, Matsubara H, Kamihata H, Nishiue T, Iba O, Amano K, Imada T, Kurimoto K, Iwasaka T, Iso Y, Suzuki H. Novel Cell Therapy that Prevents in Stent Restenosis by Re-Endothelialization after Transplantation of MCP-1-Activated Bone Marrow Mononuclear Cells. American Heart Association (米国心臓病学会) 2003 Nov 9-12, Orland, USA

Masaki H, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Amano K, Imada T, Iwasaka T, Shimada K, Imaizumi T. Therapeutic Angiogenesis Therapy by Autologous Bone Marrow Cell Transplantation for Critical Limb Ischemia (TACT) Study-A Randomised, Multicentre, Controlled Trial. American Heart Association (米国心臓病学会) 2003 Nov 9-12, Orland, USA

Iba O, Matsubara H, Imada T, Fujiyama S, Masaki H, Okigaki M, Iwasaka T. Implantation of Platelets Induces Collateral Vessel Formation In a VEGF-Dependent Manner -New Cell Source For Therapeutic Angiogenesis- American Heart Association (米国心臓病学会) 2003 Nov 9-12, Orland, USA.

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

血管新生療法用医薬組成物:

特願 2000-192480 (森下)

血管新生療法用医薬組成物:

特願 2000-388624 (森下)

脳機能改善のための医薬および方法:

特願 2004-222649 (森下)

複数のノズル孔を有する針無注射器:

特願 2003-131127 (森下)

薬液が収容された針無注射器:

特願 2003-131126 (森下)

針無注射器を用いた皮膚疾患の遺伝子治療: 特願 2003-307713 (森下)

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 (松原)

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 (松原)

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

研究成果の刊行に関する一覧表

【15年度】 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
佐田政隆	細胞から見た再狭窄のメカニズム	山口 徹、田村 勤	Drug-Eluting Stent	医学書院	東京	5-11	2003
佐田政隆	循環器の生物学.細胞の起源を知る	矢崎義雄、山口 徹、高本真一、中澤誠	Annual Review 循環器 2004	中外医学社	東京	7-11	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
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 T, Muto S, Miyamoto S, Aizawa K, Horikoshi M, Nagai R.	Functional interaction of the DNA-binding transcription factor Sp1 through its DNA-binding domain with the histone chaperone TAF-I.	J Biol Chem	278	28758-28764	2003
Sakamoto H, Sakamaki T, Kanda T, Hoshino Y, Sawada Y, Sato M, Sato H, Oyama Y, Nakano A, Takase S, Hasegawa A, Nagai R, Kurabayashi M.	Smooth muscle cell outgrowth from coronary atherectomy specimens in vitro is associated with less time to restenosis and expression of a key Transcription factor KLF5/BTEB2	Cardiology	100	80-85	2003
Saito K, Ishizaka N, Mitani H, Ohno M, Nagai R.	Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensin II-induced downregulation of klotho, an anti-aging gene, in rat.	FEBS Lett	551	58-62	2003
Niu P, Shindo T, Iwata H, Ebihara A, Suematsu Y, Zhang Y, Takeda N, Iimuro S, Hirata Y, Nagai R.	Accelerated cardiac hypertrophy and renal damage induced by angiotensin II in adrenomedullin knockout mice.	Hypertens Res	26	731-736	2003
Nishimatsu H, Hirata Y, Shindo T, Kurihara H, Suzuki E, Sata M, Satonaka H, Takeda R, Nagata D, Kakoki M, Hayakawa H, Kangawa K, Matsuo H, Kitamura T, Nagai R.	Endothelial responses of the aorta from adrenomedullin transgenic mice and knockout mice.	Hypertens Res	26	Suppl:S79-84	2003

Miyamoto S, Suzuki T, Muto S, Aizawa K, Kimura A, Mizuno Y, Nagino T, Imai Y, Adachi N, Horikoshi M, Nagai R.	Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic regulator SET through interaction and acetylation on the DNA-binding domain.	Mol Cell Biol	23	8528-8541	2003
Manabe I, Nagai R.	Regulation of smooth muscle phenotype.	Curr Atheroscler Rep	5	214-222	2003
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
Nitobe J, Yamaguchi S, Okuyama M, Nozaki N, Sata M, Miyamoto T, Takeishi Y, Kubota I, Tomoike H.	Reactive oxygen species regulate FLICE inhibitory protein (FLIP) and susceptibility to Fas-mediated apoptosis in cardiac myocytes.	Cardiovasc Res	57:	119-128	2003
Lee, P., Sata, M., Lefer, D.J., Factor, S.M., Walsh, K., Kitsis, R.N.	Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and myocardial infarction during ischemia/reperfusion in vivo.	Am J Physiol Heart Circ Physiol	284	H456-H463.	2003
Nishimatsu H, Hirata Y, Shindo T, Kurihara H, Suzuki E, Sata M, Satonaka H, Takeda R, Nagata D, Kakoki M, Hayakawa H, Kangawa K, Matsuo H, Kitamura T, Nagai R..	Endothelial responses of the aorta from adrenomedullin transgenic mice and knockout mice	Hypertens Res.	Suppl	:S79-84.	2003
Sata, M., Tanaka, K, Nagai, R.	Origin of smooth muscle progenitor cells: Different conclusions from different models	Circulation	107	e106-e107	2003
Kumano K, Chiba S, Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Masuda S, Shimizu K, Takahashi T, Ogawa S, Hamada Y, Hirai H.	Notch1 but not notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells.	Immunity	18	699-711	2003
Abe, M., Sata, M., Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, Terauchi Y, Kadowaki T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Hirata Y, Nagai R	Adrenomedullin augments collateral development in response to acute ischemia.	Biochem Biophys Res Commun	306	10-15	2003
Yamazaki S, Miki K, Hasegawa K, Sata M, Takayama T, Makuuchi M	Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells.	J Hepatol.	39	17-23	2003
Sata M.	Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling and lesion formation.	Trends Cardiovasc Med	13	249-253	2003

Saiura A, Sata M, Washida M, Sugawara Y, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M.	Little evidence for cell fusion between recipient and donor-derived cells.	J Surg Res	113	222-227	2003
Sata, M., Tanaka, K., Ishizaka N., Hirata, Y., Nagai R.	Absence of p53 leads to accelerated neointimal hyperplasia after vascular injury.	Arterioscler Thromb Vasc. Biol	23	1548-1552	2003
Fukino, K., Sata, M., Seko, Y., Hirata, Y., Nagai, R.	Genetic background influences therapeutic effectiveness of VEGF.	Biochem Biophys Res Commun	310	143-147	2003
Tanaka K., Sata M., Hirata Y., Nagai R.	Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries.	Circ Res	93	783-790	2003
Matsui Y, Saiura A, Sugawara Y, Sata M, Naruse K, Yagita H, Kohro T, Mataka C, Izumi A, Yamaguchi T, Minami T, Sakihama T, Ihara S, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T, Makuuchi M.	Identificaton of gene expression profile in tolerizing murine cardiac allograft by co-stimulatory blockade.	Physiol Genomics	15	199-208	2003
Natori T, Sata M, Washida M., Hirata, Y, Nagai R., Makuuchi, M.	Nicotine enhances neovascularization and promotes tumor growth.	Mol Cells	16	143-146	2003.
Sata, M	Molecular strategies to treat vascular diseases; Circulating vascular progenitor cell as a potential target for prophylactic treatment of atherosclerosis.	Circ J	67	983-991	2003
Sata, M., Nagai, R.	Inflammation, angiogenesis, and endothelial progenitor cells: How do EPCs find their place?	J Mol Cell Cardiol		in press	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		in press	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		in press	2004
Akita T, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shimada T, Egami K, Imaizumi T.	Hypoxic Preconditioning Augments Efficacy of Human Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic Neovascularization	Lab Invest	83	65-73	2003

Murohara T	Angiogenesis and vasculogenesis for therapeutic neovascularization..	Nagoya J Med Sci	66	1-7	2003
Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki K, Shintani S, Sugaya T, Ishii M, Akagi T, Ikeda H, Matsuishi T, Imaizumi T.	Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth.	J Clin Invest	112	67-75	2003
Sasaki K, Duan J, Murohara T, Ikeda H, Shintani S, Shimada T, Akita T, Egami K, Imaizumi T.	Rescue of hypercholesterolemia-related impairment of angiogenesis by oral folate supplementation.	J Am Coll Cardiol	42	364-372	2003
Uetani T, Matsubara T, Nomura H, Murohara T, Nakayama S..	Ca ²⁺ -dependent modulation of intracellular Mg ²⁺ concentration with amiloride and KB-R7943 in pig carotid artery.	J Biol Chem	278	47491-47497	2003
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
Fujiyama S, Amano K, Matsubara H.	Bone Marrow Monocyte-Lineage Cells Adhere on Injured Endothelium by MCP-1-Dependent Manner and Accelerate Reendothelialization as Endothelial Progenitor Cells.	Circ Res	93	980 - 989	2003
Matsubara H.	Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation.	Lancet	361	47-49	2003
Amano K, Matsubara H, Iba O, Fujiyama S, Amano K, Mori Y, Kojima H, Iwasaka T.	Enhancement of Ischemia-Induced Angiogenesis by eNOS overexpression.	Hypertension	41	156-62	2003

【16年度】 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－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－	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－末梢血管病から心臓病へ－	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, Ohshima 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