

- Curr Drug Delivery 2: 53-57, 2005.
6. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Atsushi Ohtaka, Yoshihiro Okamoto, Yasushi Nemoto. Development of Microporous Covered Stents: Geometrical Design of the Luminal Surface. Int J Artif Organs, in press, 2005.
  7. Mariko Umeda, Mariko Harada-Shiba, Kingo Uchida, Yasuhide Nakayama, Photo-control of the Polyplexes Formation between DNA and Photo-cation Generatable Water-soluble Polymers. Curr Drug Deliver in press, 2005.
  8. Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda, Photocycloaddition-induced Preparation of Cyclic Macromolecules Using Biscinnamated or Biscoumarinated Oligo(ethylene glycol)s. J Polym Sci Part A: Polym Chem in press, 2005.
  9. Haiying Huang, Yasuhide Nakayama, Kairong Qin, Kimiko Yamamoto, Joji Ando, Jun K Yamashita, Itoh Hiroshi, Keiichi Kanda, Hitoshi Yaku, Yoshihiro Okamoto, Yasushi Nemoto, In Vitro Pulsatile Flow Loading Can Induce the Differentiation from Embryonic Stem (ES) Cells to Vascular Wall Cells. J Artif Organs, in press, 2005.
  10. Osamu Sakai, Yasuhide Nakayama, Yasushi Nemoto, Yoshihiro Okamoto, Taiji Watanabe, Keiichi Kanda, Hitoshi Yaku, Development of Sutureless Vascular Connecting System for Easy Implantation of Small Caliber Artificial Grafts. J Artif Organs, in press, 2005.
  11. Ohtaka Atsushi, Takahiro Kameo, Yoshiaki Hirano, Yasuhide Nakayama, Enhancement of Visible Light-Induced Gelation of Photocurable Gelatin by Addition of Polymeric Amine. Photochem Photobiol, in press, 2005.
  12. 中山泰秀, 光反応によるバイオマテリアル界面の精密創製、ナノバイオエンジニアリング、第2章、p19-29、フロンティア出版(東京) 2004年。
  13. Hatsue Ishibashi-Ueda, Yasuhide Nakayama, Biotube technology for a novel tissue-engineered blood vessels. In Cardiovascular Regeneration Therapies using Tissue Engineering Approach, pp95-104, Springer-Verlag, (Tokyo) 2005.
- G-2. 学会発表
1. 中山泰秀, 笥千聡、舛田健、斯波真理子、大平望都、スター型カチオン性高分子ベクターのブロック鎖化による遺伝子導入の高効率化、第53回高分子学会年次大会、神戸 2004年5月25-27日
  2. 中山泰秀, 長石誠、舛田健、斯波真理子、大平望都、6分岐スター型カチオン性高分子ベクターの高効率遺伝子導入能、第53回高分子学会年次大会、神戸 2004年5月25-27日
  3. 中山泰秀, 鎌田なぎさ、大高敦、川田徹、神経活動のスイッチング材：エステル結合を有する高分子による神経信号の可逆的 on-off 制御、第53回高分子学会年次大会、神戸 2004年5月25-27日
  4. 中山泰秀, 林美智子、光カチオン性高分子の光反応性基導入量とポリプレックス形成能との相関、第53回高分子学会年次大会、神戸 2004年5月25-27日

5. 神田圭一、中山泰秀、伊藤裕、山下潤、西田真美、根本泰、夜久均、ES細胞を導入したハイブリッド型人工血管モデルの作成、第32回日本血管外科学会総会、東京京王プラザホテル2004年5月12-14日
6. 中山泰秀、舛田健、笥千聡、林美智子、斯波真理子、大平望都、合成高分子ベクターのナノ分子骨格の最適設計：スター型高分子ベクターの分子設計と持続的遺伝子発現、遺伝子デリバリー研究会、第4回シンポジウム、2004年5月10日
7. 中山泰秀、舛田健、笥千聡、林美智子、斯波真理子、大平望都、遺伝子導入ベクターの幾何学的設計：スター型カチオン性高分子ベクターの非イオン性親水性ブロック鎖化による遺伝子発現の向上、第20回日本DDS学会、東京京王プラザホテル、2004年7月14-15日
8. Yasuhide Nakayama, Makoto Nagaishi, Chiaki Kakei, Michiko Hayashi, Takeshi Masuda, Mariko Shiba, Moto Ohira, High performance gene delivery molecular conjugate: Molecular design of nano-structured branched cationic polymers as a non-virus vector, The 10<sup>th</sup> Annual Meeting 2004, The Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 2004, Aug. 6<sup>th</sup>.
9. Yasuhide Nakayama, Chiaki Kakei, Takeshi Masuda, Mariko Shiba, Moto Ohira, High performance gene delivery polymeric vector: blocking of branch chain in star-shaped polymers, ESAO 2004, Warsaw 2004, Sept. 9<sup>th</sup>.
10. Yasuhide Nakayama, Mami Nishida, Keiichi Kanada, Yasushi Nemoto, Yoshihiro Okamoto, Development of sutureless connecting system for implantation of small caliber vascular prostheses, ESAO 2004, Warsaw 2004, Sept. 9<sup>th</sup>.
11. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Atsushi Ohtaka, Yasushi Nemoto, Micropored drug eluting stent grafts for canine carotid aneurysms, Cardiovascular and Interventional Radiological society of Europe 2004, Barcelona 2004, Sept. 25-29.
12. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Atsushi Ohtaka, Masanori Shiomi, Yasushi Nemoto, Development of novel microporous covered stents with differential drug coating, Cardiovascular and Interventional Radiological society of Europe 2004, Barcelona 2004, Sept. 25-29.
13. 中山泰秀、鎌田なぎさ、大高敦、川田徹、麻酔作用の時空間制御能を有するゼリー状高分子麻酔材の開発、第42回日本人工臓器学会、東京京王プラザホテル、2004年10月
14. 坂井修、中山泰秀、服部裕美、岡本吉弘、根本泰、渡辺太治、神田圭一、夜久均、小口径人工血管移植における無縫合血管接合デバイスの開発、第42回日本人工臓器学会、東京京王プラザホテル、2004年10月
15. 渡辺太治、中山泰秀、岡本吉弘、根本泰、坂井修、神田圭一、夜久均、バイオチューブ人工血管の開発—実験動物移植の予備的検討—、第42回日本人工臓器学会、東京京王プラザホテル、2004年10月
16. 黄海瑛、西田真美、中山泰亮、山本希美子、安藤譲二、山下潤、伊藤裕、神田圭一、岡本吉弘、根本泰、中山泰秀、ハイブリッド型人工血管の開発をめざす In vitro 拍動流負荷による ES 細胞の血管壁構成細胞への

力学的分化誘導、第 42 回日本人工臓器学会、東京京王プラザホテル、2004 年 1 0 月

17. 神田圭一、中山泰秀、山下潤、伊藤裕、根本泰、坂井修、夜久均、ハイブリッド型人工血管モデルにおける ES 細胞の動態観察—生体内 Hemodynamic Stress による影響について、第 42 回日本人工臓器学会、東京京王プラザホテル、2004 年 1 0 月
18. 矢澤真樹、緒方寿夫、中島龍夫、森泰昌、槌谷宏平、中山泰秀、成長因子を用いた血管誘導性移植母床作成の試み、日本形成外科学会基礎学術集会：浦安、2004 年 1 0 月 2 2 日
19. 坂井修、中山泰秀、神田圭一、小口径人工血管無縫合吻合デバイスの開発とシステム化、第 35 回日本心臓血管外科学術総会：アクトシティー浜松、2005 年 2 月 24 日
20. 神田圭一、中山泰秀、ハイブリッド型人工血管モデルにおける ES 細胞の生体内分化誘導、第 35 回日本心臓血管外科学術総会：アクトシティー浜松、2005 年 2 月 24 日
21. 林田恭子、神田圭一、土井潔、福本淳、井上知也、夜久均、中山泰秀、Raspig 法による大動脈弁形成の有用性について破断強度解析による力学的検討、第 35 回日本心臓血管外科学術総会：アクトシティー浜松、2005 年 2 月 24 日
22. 黄海瑛、中山泰秀、山本希美子、安藤譲二、山下潤、伊藤裕、神田圭一、夜久均、岡本吉弘、根本泰、ES 細胞由来ハイブリッド人工血管の開発：ES 細胞の血管壁構成細胞への力学的分化誘導、第 4 回再生心臓血管外科治療研究会、アクトシティー浜松、2005 年 2 月 24 日
23. 黄海瑛、中山泰亮、山本希美子、安藤譲二、山下潤、伊藤裕、神田圭一、岡本吉弘、根

本泰、中山泰秀、ES 細胞から血管壁構成細胞への力学的分化誘導、第 4 回日本再生医療学会：大阪国際会議場、2005 年 3 月 2 日

24. 矢澤真樹、森泰昌、槌谷宏平、緒方寿夫、中嶋龍夫、中山泰秀、血管誘導性移植母床が脂肪組織に与える効果、第 4 回日本再生医療学会：大阪国際会議場、2005 年 3 月 2 日
25. 渡辺太治、中山泰秀、黄海瑛、坂井修、岡本吉弘、根本泰、神田圭一、夜久均、小口径バイオチューブ人工血管の易吻合法の開発と移植実験評価、第 4 回日本再生医療学会：大阪国際会議場、2005 年 3 月 2 日
26. 坂井修、中山泰秀、黄海瑛、岡本吉弘、根本泰、山下潤、伊藤裕、安藤譲二、神田圭一、夜久均、小口径バイオチューブ人工血管での ES 細胞の分化誘導、第 4 回日本再生医療学会：大阪国際会議場、2005 年 3 月 2 日
27. 坂井修、中山泰秀、岡本吉弘、根本泰、神田圭一、渡辺太治、夜久均、小口径人工血管開発のための簡易吻合システムの開発、第 4 回日本再生医療学会：大阪国際会議場、2005 年 3 月 2 日

### G-3. 新聞報道

1. 遺伝子治療、効果長く：ゼラチンで固め徐々に放出、日経産業新聞、2004 年 4 月 7 日
2. 合成ベクター導入効率を改善：遺伝子治療を安全に、日本経済新聞、2004 年 4 月 19 日
3. 麻酔ゼリー薬：効果時間を自在に調節、注射針などへ応用も、毎日新聞、2004 年 5 月 24 日
4. 国立循環器病センター：麻酔の性質を持つ

- ゼリー状の薬開発、毎日新聞東京版、2004年5月25日
5. 塗る麻酔使いやすく：ゼリー状の薬剤持続時間を制御、日経産業新聞、2004年5月26日
  6. 当てるだけで痛みなくす：新しい麻酔薬開発、福井新聞、2004年6月16日
  7. 新しい麻酔薬：当てるだけで痛み消える、秋田さきがけ新聞、2004年6月21日
  8. 張るだけで麻酔効果：ジェル状の薬開発、河北新聞、2004年6月28日
  9. 部位に当て痛み抑える：ジェル状の新麻酔薬開発、南日本新聞、2004年6月16日
  10. 当てるだけで効く麻酔薬、信濃毎日新聞、2004年6月7日
  11. 手軽な麻酔薬完成、新潟日報、2004年6月7日
  12. 当てるだけで痛みなくす、福島民報、2004年6月28日
  13. 当てるだけで・・・痛いの飛んでいく、神戸新聞、2004年6月16日
  14. 新たな麻酔薬開発、効果ピンポイント、熊本日日新聞、2004年6月11日
  15. 局所に当てるだけ、ジェル状の麻酔薬開発、東奥日報、2004年6月28日
  16. スイッチ高分子材、神経信号伝達を制御、化学工業日報、2004年5月31日
- H. 知的所有権の取得状況
1. ステンント及びその製造方法並びに該ステンントによるドラックデリバリー方法、中山泰秀、大高 敦、亀尾崇宏、特願 2004-132623
  2. 神経活動スイッチ及び麻酔材、中山泰秀、川田 徹、特願 2004-129787
  3. ステンント及び動脈瘤閉鎖方法、中山泰秀、西 正吾、特願 2004-163354
  4. ステンントデリバリーシステム、中山泰秀、西 正吾、特願 2004-163353
  5. 創傷治癒促進剤、中山泰秀、根本 泰、特願 2004-229562
  6. 速やかな止血が可能なカテーテルシース、中山泰秀、根本 泰、特願 2004-239698
  7. ステンントデリバリーシステム、中山泰秀、西正吾、根本 泰、特願 2004-322505
  8. 可視光硬化性材料及び創傷治癒促進材、中山泰秀、大高 敦、亀尾崇宏、特願 2004-145051
  9. 可視光硬化性材料及び創傷治癒促進材、中山泰秀、大高 敦、亀尾崇宏、特願 2004-273609
  10. 医薬品組成及び該組成物による遺伝子治療方法、中山泰秀、舩田 健、周関みん、特願 2004-325236
  11. ステンント及びその製造方法、中山泰秀、西正吾、根本 泰、特願 2004-333441
  12. 人工血管、中山泰秀、神田圭一、特願 2004-335754
  13. ステンントデリバリーシステム、中山泰秀、西 正吾、根本 泰、特願 2004-329332
  14. 人工赤血球及びその製造方法、根本 泰、中山泰秀、特願 2004-379634
  15. ゲル粒子及びその製造方法、中山泰秀、根

本 泰、特願 2005-035822

16. 細胞分化誘導法、中山泰秀、黄海瑛、安藤讓二、山下潤、伊藤裕、神田圭一、岡本吉弘、根本泰、特願 2005-066683
17. ステント、中山泰秀、岡本吉弘、根本 泰、特願 2005-079669
18. ステント、中山泰秀、西 正吾、根本 泰、特願 2005-081282
19. 結合組織シート（バイオシート）の形成基材およびバイオシートの製造方法、中山泰秀、特願 2005-055562

霊長類 ES 細胞由来血管前駆細胞による血管発生分化系を用いた新規血管再生薬剤の開発

—ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞を用いた血管再生薬剤探索の基盤研究および細胞移植治療の安全性の検討

分担研究者: 仁藤新治(田辺製薬株式会社 先端医学研究所長)

ES 細胞由来血管前駆細胞の血管再生医療への臨床応用のための基盤研究として、昨年度までの研究により我々が樹立したサル ES 細胞を用い、血管を構成する内皮細胞と血管平滑筋細胞の双方に分化可能な血管前駆細胞 (vascular progenitor cells; VPC) の分化誘導を行い、霊長類 ES 細胞由来 VPC と我々が既に同定したマウス ES 細胞の VPC との性状の差異を明らかにした。また、ヒト ES 細胞について未分化性を維持した簡便な継代培養法及び大量の細胞ストックを得るための適切な凍結保存法を確立した。更に、本主任研究者伊藤らとともに、海外樹立ヒト ES 細胞を用いて、ヒト ES 細胞において VPC の同定とその性状についての解析を行った。また、マウス ES 細胞由来 VPC を用いた血管発生分化関連遺伝子に関する機能的データ解析システムを開発し、新規血管構成細胞分化誘導因子の絞り込みとその解析を行った。本年度は、同定したヒト ES 細胞由来 VPC を用いた *in vitro* ヒト血管発生分化系においても、同様のシステムを用いて、ヒト血管発生分化関連遺伝子群のデータベースの構築を試みた。すなわち、ヒト ES 細胞から分化誘導した各種血管系譜細胞を用いて遺伝子発現プロファイリングデータの取得と血管細胞分化誘導分子群の絞り込みを行った。一方、主任研究者伊藤らが本研究課題で、血管再生作用を有する血管ホルモン、アドレノメジュリン (adrenomedullin; AM) について、ヒト ES 細胞由来 VPC 移植において AM がその血管再生治療効果を増強することを見出し、AM のヒト ES 細胞移植治療における補助薬剤としての有用性を見出した。また、ヒト ES 細胞移植の安全性の担保のため、ES 細胞移植による腫瘍形成を検討したところ、ヒト VPC 由来細胞の移植では、腫瘍形成は認められなかった。

#### A. 研究目的

本研究課題においては、主任研究者伊藤らの有する ES 細胞由来 VPC に関する知見の集積並びに FACS セルソーターを用いた VPC の純化のノウハウと、我々が樹立保有する霊長類 ES 細胞とその維持培養系を融合させ、ES 細胞の血管再生医療への実用化に向け、霊長類 ES 細胞由来 VPC を用いた血管再生医療の基礎的基盤を検討することを目的としている。

昨年度までの研究により、1) サル ES 細胞において VPC を同定し、その分化特性について明らかにするとともに、2) ヒト ES 細胞研究においては研究に供する十分な量の細胞調製が可能な培養法の改良として酵素処理法による安定な継代培養法と凍結保存

方法を確立することに成功した。更に、主任研究者伊藤らとともに、ヒト ES 細胞においても血管を構成する内皮細胞と血管平滑筋細胞の双方に分化し、*in vitro/in vivo* で血管を構築できる VPC と呼び得る細胞の同定に成功し、その VPC の分化特性を明らかにした。

また、網羅的遺伝子発現プロファイリングデータベースと機能遺伝子探索技術開発を行い、フィーダー細胞 (ES 細胞由来 VPC を機能細胞へ分化誘導できる細胞) の遺伝子発現プロファイルを行い、遺伝子発現データから血管細胞分化誘導分子群の検討を行った。

本年度は、ヒト ES 細胞由来 VPC の特性検討とそれらの遺伝子発現情報の取得によるヒト血管発生分

化に関する分子機構の解明を目指した。ヒト ES 細胞由来 VPC を用いた網羅的遺伝子発現プロファイリングを行い得られたデータベースと遺伝子解析ツールを用いてヒト ES 細胞における血管細胞遺伝子発現データの取得と血管細胞分化誘導分子群の検討を行った。更に、ヒト ES 細胞移植治療における血管ホルモン AM の薬剤としての有用性、およびヒト ES 細胞の生体移植の安全性を検討した。

## B.C. 研究方法及び結果

### 1. 新規血管再生薬剤創薬を目指したヒト ES 細胞由来血管前駆細胞を用いたヒト血管発生分化関連遺伝子のデータベース構築と遺伝子探索:

我々の構築したマウス ES 細胞由来血管前駆細胞を用いた *in vitro* 血管発生分化システムによるマウス血管発生分化に関連する遺伝子の発現プロファイリングのノウハウに基づき、ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞についても同様の検討を行い、ヒト血管発生分化関連遺伝子群のデータベースを構築し、血管細胞の分化各ステージでの遺伝子発現を解析した。

ヒト ES 細胞は、移植治療のみならず、ES 細胞から成熟細胞への分化誘導課程を詳細に解析することにより、発生・分化のメカニズムを明らかにする目的にも有効なツールである。特にヒトにおいては、倫理上、遺伝子改変による特定遺伝子の発生・分化における役割の解析を行うことは不可能であり、その点からもヒト ES 細胞の有効性は高い。そこで、血管発生分化各段階の細胞を用いて、マイクロアレイ法にてヒト血管発生分化誘導に関与する遺伝子群を網羅的に解析し、データベースを構築することを試みた。今後、構築した遺伝子データベースとヒトゲノムデータベースとのリンクにより、血管再生に関与する各種因子を検索し、血管再生治療への応用を目指す予定である。

今回の検討ではヒト ES 細胞セルライン HES-3 および KhES-1 を使用した。

1. KhES-1 未分化 ES 細胞
2. HES-3 未分化 ES 細胞
3. HES-3 TRA-1 陽性細胞
4. HES-3 由来 TRA1 陰性 VEGF-R2 陽性細胞  
分離直後

5. HES-3 由来 TRA1 陰性 VEGF-R2 陽性細胞  
collagenIV コートディッシュへの接着細胞
6. HES-3 由来  $\alpha$  平滑筋アクチン陽性壁細胞  
(10%血清により分化誘導)
7. HES-3 由来  $\alpha$  平滑筋アクチン陽性壁細胞  
(PDGF-BB により分化誘導)
8. HES-3 由来 VE カドヘリン陽性血管内皮細胞  
(VEGF により分化誘導後、VE カドヘリンにて再分離)

の 8 群の細胞群のトータル RNA をそれぞれ 15  $\mu$ g ずつ回収し、マイクロチップにて遺伝子発現を網羅的に解析した。

すなわち、分離した各分画由来の RNA を分離精製し、DNA Chip 実験に供した。DNA Chip は、Human Genome U133A&B GeneChip (Affymetrix 社) を用いた。実験に用いたサンプルは、GeneChip Target Preparation 法に従って調整した。DNA Chip 用に精製した Total RNA を用いて、逆転写酵素による First strand cDNA、second strand cDNA 合成反応を行った。さらに 2 本鎖 cDNA を鋳型に試験管内 cRNA 合成反応後、cRNA Fragmentation による GeneChip 用サンプル調整を行った。各調整済み核酸 Target サンプルは、ハイブリカクテルとして上記 DNA Chip カートリッジ内に注入し、プレハイブリダイゼーションに続き、ハイブリダイゼーション (45°C 60 回転/分 16 時間) を行った。ハイブリダイゼーション反応終了後、各カートリッジを Fluidics station にセットし、指定のプロトコール (染色、洗浄) による処理を行い、最後にスキャナーでハイブリダイゼーションパターンを蛍光イメージとして読み取り、各プローブ・セルに対する蛍光強度情報を生データファイルとして取得した。

(<http://www.affymetrix.com/products/index.affx> 参照)

各生データファイルを The eXintegrator system (<http://www.cdb.riken.go.jp/scb/>参照) に登録、データベース化し、血管分化過程のアレイデータを利用した遺伝子発現パターンを対比解析し、血管構成細胞での遺伝子発現解析を行った。

未分化ヒト ES 細胞から血管前駆細胞、さらに血管内皮細胞への分化誘導細胞で特異的発現パターンを示す遺伝子の検索 (*in silico* primary screening) を行

った。未分化ヒト ES 細胞特異的発現遺伝子 Top 50 中には、Nanog 遺伝子（未分化維持機能を持つ）や developmental pluripotency associated 4 などの ES 細胞の多分化能に関連する遺伝子が認められた(表 1)。血管前駆細胞特異的遺伝子の検索結果では、Ephrin type A receptor7, G protein coupled receptor RDC1 homolog など細胞膜結合タンパク質をコードする遺伝子発現が優位であった(表 2)。また、HAND1, Sox6, EST downstream of HoxC4 などの造血系幹細胞や心血管系発生・分化に関連する転写因子群の遺伝子発現も優位であった。血管内皮細胞特異的遺伝子検索の結果は、VE-cadherin, Endoglin (CD105), CD34, PECAM1 などの血管内皮細胞特異的分子マーカーの発現の他に、MEF2C, PDGF-D, Angiopoietin-2 の遺伝子発現も高かった(表 3)。血管前駆細胞を、10% 胎仔牛血清 (FCS) を含む培養液中で 24 時間培養後、特異的遺伝子発現検索を行った。Collagen 8 alpha (血管内皮細胞特異的マーカー) の発現も優位であるが、Skeletal muscle LIM protein 1, Myopodin 遺伝子の発現も高かった(表 4)。

その他、FGF 5, IL-7 receptor, IGFBP5, BDNF などサイトカイン関連遺伝子の特異的発現が認められた。また、各対象のデータ解析結果には、EST (未知遺伝子) 情報も含まれていた。遺伝子発現プロファイルに基づく細胞間距離を 2 次元マップとして描写した。データマイニング手法として、188 種類 (Anova Sort 法により) のプローブ情報を利用したマッピングを行った。データ解析結果は、未分化 ES 細胞から分化誘導開始後、血管前駆細胞を経て血管内皮細胞へ細胞分化が進むに従い、各細胞が遺伝子発現レベルにおいても生物学的な細胞分化プロセスと類似した距離にマッピングした。また、血管前駆細胞から時系列および培養 (分化条件) が異なると遺伝子発現レベルでは異なる細胞に分化した。

## 2. 血管ホルモンのヒト ES 細胞由来血管前駆細胞移植治療の補助製剤としての応用の基礎検討:

我々の見出した AM の血管再生促進作用をもとに、AM トランスジェニックマウスにおいて、ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞移植による血管再生治療効果がより顕著に認められることを明らかにし、AM 投

与がヒト ES 細胞移植治療において有効な補助薬剤となる可能性を見出した。

昨年度我々が構築したマウス ES 細胞由来 VPC を用いた血管発生分化に関連する遺伝子群のデータベースを用い、AM およびその受容体である RAMP-2 の発現を解析したところ、それら遺伝子の発現上昇が明らかとなり血管発生における AM の意義が示唆された (図 1)。このことは昨年主任研究者の伊藤らが報告した AM のマウス ES 細胞由来 VPC から内皮細胞への分化誘導作用と合致するものである。

一方、昨年度報告したように、我々は血管拡張ペプチドである AM 単独過剰発現トランスジェニックマウス (AM-Tg) を開発した。この AM-Tg の血中 AM 濃度は、現在ヒトでの投与の際、治療効果の認められる血中濃度に匹敵するものであった。AM-Tg マウスおよび野生型マウスで、我々がこれまで報告した方法に準じて、大腿動脈結紮下肢虚血モデルを作成したところ、AM-Tg マウスでは第 14 日から血流回復が有意に促進し、第 28 日まで野生型マウスよりも良好な血流が保たれた (第 28 日において、健康肢に対する虚血肢の血流は、野生型:  $56 \pm 8\%$ 、AM-Tg:  $73 \pm 5\%$ ;  $P < 0.05$ ) (図 2)。以上より、生体において AM の血管再生促進作用が証明された。

そこで、ヒト ES 細胞由来 VPC 移植による再生治療における AM の薬剤としての有用性を更に検討した。AM-Tg および対照マウスを用い、主任研究者伊藤らが本年度行ったように、下肢虚血モデルを作成し、ヒト ES 細胞由来 VPC から分化させた発生初期の内皮細胞および血管平滑筋細胞を移植したところ、VPC 由来血管細胞移植による血流改善効果は、AM-Tg においてより顕著に認められた。

## 3. ヒト ES 細胞生体移植の安全性の検討: 腫瘍形成毒性試験

ヒト ES 細胞移植の安全性の担保のため、未分化ヒト ES 細胞およびヒト ES 細胞由来血管前駆細胞を移植し、長期フォローアップすることで、ES 細胞由来の腫瘍形成を検討したところ、未分化な ES 細胞とは異なり、血管前駆細胞由来血管細胞の移植では腫瘍形成は認められなかった。



分化させた VE カドヘリン陽性細胞の腫瘍形成の有無を検討するため、ヒト ES 細胞または ES 細胞由来 VE カドヘリン陽性血管内皮細胞を免疫不全マウスの皮下に移植して 5 ヶ月間観察したところ、ヒト ES 細胞群では 3 例中 2 例で腫瘍を形成したが、ES 細胞由来 VE カドヘリン陽性血管内皮細胞群では腫瘍形成は認められなかった。

ES 細胞を用いた移植治療の実現には腫瘍化の問題や免疫的な拒絶反応の問題など、いくつかの乗り越えなければならないハードルがある。我々の検討では適切な分化段階の細胞を移植した場合は、奇形種などの腫瘍形成は認められなかった。従って ES 細胞を体外で移植可能なまで分化させ移植することにより、安全性はある程度担保されると考えられる。

#### D. 考察

1. DNA Chip を利用したヒト ES 細胞由来血管細胞に発現する遺伝子の網羅的発現解析を行った。未分化 ES 細胞や分化した血管内皮細胞の特異的遺伝子発現データは、既存の分子マーカーをはじめ、マウス ES 細胞を用いた実験結果と一致するプローブ情報が多く得られた。(我々のデータベース内に登録されているマウス ES 細胞を用いた DNA マイクロアレイデータを利用)。また、MEF2C, PDGF-D, Angiopoietin-2 などの血管発生リモデリングに関与する遺伝子の発現も高いことから、特異的遺伝子発現情報による評価では、この分化誘導条件で出現した血管内皮細胞は、個体における血管発生過程に当てはめると、一次血管形成後期の内皮細胞に相当すると推察できた。血管前駆細胞では、HAND1, Sox6, EST downstream of HoxC4 などの造血系幹細胞や心血管系発生・分化に関連する転写因子群の特異的遺伝子発現により、内皮細胞に比べ、細胞分化度が低く、外部刺激(外的因子)により、細胞分化過程において運命調節可能状態であることが推察できた。さらに、血管前駆細胞を 10%FCS 存在下、24 時間培養下で、壁細胞への分化誘導を行った結果、筋肉系細胞関連遺伝子の発現が誘導されていた。また、サイトカイン、免疫系遺伝子の発現が誘導されていることも興味深い。血清という未知因子(物質)の混合物質では、細胞内にマルチシグナルが入るため、

特定の分化細胞へのコミットが行われず、特定細胞分化系譜の特異的遺伝子発現誘導が相対的に低下している可能性がある。遺伝子発現情報に基づく細胞類似性評価では、血管細胞分化誘導により、分化した細胞間の距離が異なった。これは、ES 細胞由来血管細胞の生物学的分化プロセスとフィットしていた。この遺伝子発現情報を用いた手法でデータベース化を行うことで、細胞同士の類似性、分化度、運命決定方向を評価できる可能性がある。また、遺伝子発現情報を利用し、新たな分子マーカーの発見とそれらを用いた詳細な細胞分画解析による細胞分化経路を明らかにすることができるかもしれない。

2. 我々は、本研究課題において、主任研究者の伊藤らとともに血管ホルモンであるナトリウム利尿ペプチドや AM が血管再生を促進することを明らかにした。またこれら血管ホルモンは炎症細胞浸潤抑制作用も有しており、移植細胞に対する免疫的拒絶に対してもある程度抑制的に作用する可能性が考えられる。以上の知見及び今回の成果より、血管ホルモンは、ヒト ES 細胞由来 VPC を用いた細胞治療において有効な補助製剤となり得る可能性が示された。

3. ES 細胞を用いた移植治療の実現には、腫瘍化の問題や免疫的な拒絶反応の問題など、いくつかの乗り越えなければならないハードルがある。我々の検討では適切な分化段階の細胞を移植した場合は、奇形種などの腫瘍形成は認められなかった。従って、ES 細胞を体外で移植可能なまで分化させ移植することにより、安全性はある程度担保されると考えられる。

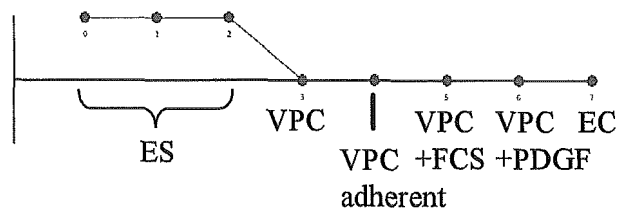
#### E. 結論

本年度の研究により、初期に目標としたヒト ES 細胞由来 VPC を用いた *in vitro* ヒト血管発生分化系における DNA マイクロアレイ解析及びヒト血管細胞発生分化関連遺伝子群のデータベース構築をある程度達成することができた。更に、構築したデータベースをもとに、血管ホルモンである AM が血管再生促進薬剤として、ヒト ES 細胞由来 VPC の移植治療に併用することにおいても有効である可能性を示すことができた。

表 1. ES specific genes

rank	Affymetrix id	Description	Note
10	203453_at	Amiloride-sensitive sodium channel alpha-subunit	
6	212599_at	Autism susceptibility gene 2 protein.	
13	205268_s_at	Beta adducin (Erythrocyte adducin beta subunit)	
27	220147_s_at	C12orf14 or TERA protein	uncertain match
18	223075_s_at	Calcium-binding EF-hand	
50	201130_s_at	CDH1, Epithelial-cadherin precursor (E-cadherin)	
45	207828_s_at	CENPF, CENP-F kinetochore protein (Centromere protein F)	
33	237810_at	Claudin-6	
23	232985_s_at	developmental pluripotency associated 4	
19	201487_at	Dipeptidyl-peptidase I precursor	
31	203764_at	Discs, large homolog 7, DLG7, Guanylate-kinase-associated protein, Bipartite nuclear localization signal	
42	231310_at	ESTs	multi-match
39	228658_at	ESTs, downstream of CRYBA4 (Beta crystallin A4)	
36	229724_at	GABRB3, Gamma-aminobutyric-acid receptor beta-3 subunit precursor (GABA(A) receptor)	
46	227830_at	GABRB3, Gamma-aminobutyric-acid receptor beta-3 subunit precursor (GABA(A) receptor)	
3	231061_at	HDCMA18P protein	uncertain match, multi-match
22	231381_at	HT017 protein	uncertain match
41	220239_at	KLHL7, Kelch-like 7	
12	210715_s_at	Kunitz-type protease inhibitor 2 precursor	
44	200706_s_at	LITAF, Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor	
11	212693_at	Midasin (MIDAS-containing protein)	
38	220184_at	NANOG	multicopy, multi-match
40	203413_at	NELL2, Protein kinase C-binding protein NELL2 precursor	
24	202761_s_at	Nesprin 2 (Nuclear envelope spectrin repeat protein 2)	
35	225846_at	NP_060167, RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif)	
28	209445_x_at	NP_060694, Tmhmm	
43	219978_s_at	nucleolar and spindle associated protein 1	
48	218039_at	NUSAP1, nucleolar and spindle associated protein 1	
17	227492_at	Occludin. [	multicopy multi-match
25	209337_at	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	
30	205961_s_at	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	
2	208286_x_at	POU domain, class 5, transcription factor 1 (Octamer-binding transcription factor 3) (Oct-3) (Oct-4).	multicopy
8	214532_x_at	POU domain, class 5, transcription factor 1-like protein 1	multicopy
1	210265_x_at	POU domain, class 5, transcription factor 1-like protein 1 (Octamer binding protein 3-like)	multicopy
4	210905_x_at	POU domain, class 5, transcription factor 1-like protein 3. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q9BZW0]	multicopy
16	204469_at	Receptor-type protein-tyrosine phosphatase zeta precursor	
26	213467_at	Rho-related GTP-binding protein RhoN (Rho7) (Rnd2)	
15	219121_s_at	RNA-binding region RNP-1	
37	213263_s_at	Sal-like protein 2 (Zinc finger protein SALL2) (HSal2)	
7	220454_s_at	Semaphorin 6A precursor	
21	225660_at	Semaphorin 6A precursor	
29	213849_s_at	Serine/threonine protein phosphatase 2A	
34	230597_at	SLC7A3, Cationic amino acid transporter 3 (CAT-3) (Solute carrier family 7 member 3)	
9	206042_x_at	Small nuclear ribonucleoprotein associated protein N	
20	201522_x_at	Small nuclear ribonucleoprotein associated protein N	
49	213721_at	SOX2, Transcription factor SOX-2	
32	203449_s_at	Telomeric repeat binding factor 1	
14	206286_s_at	Teratocarcinoma-derived growth factor 1 precursor	multi-match
5	201839_s_at	Tumor-associated calcium signal transducer 1 precursor	
47	226587_at	Upstream of ENSG00000192514 and cluster of very short transcribed sequences	

### Search Pattern

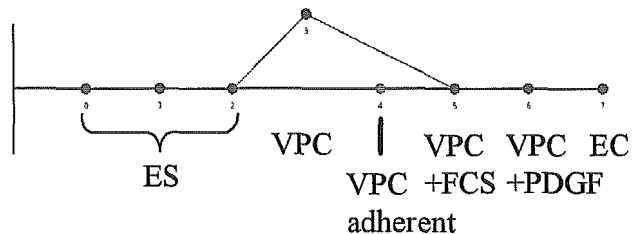


- ES Embryonic Stem Cells
- VPC Vascular Progenitor Cells
- VPC adherent VPC adhered to ColIV for 24 hours
- VPC + FCS VPC grown in the presence of 10% FCS
- VPC +PDGF VPC grown in the presence of PDGF
- EC VeCdh+ subset of cells grown in the presence of VEGF

表 2. VPC specific genes

Rank	Affymetrix Id	Description
26	226311_at	ADAMTS2
50	204694_at	AFP Alpha-fetoprotein precursor
30	202672_s_at	ATF3 Cyclic-AMP-dependent transcription factor ATF-3
16	213182_x_at	CDKN1C Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
25	216894_x_at	CDKN1C Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
32	219534_x_at	CDKN1C Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
45	212624_s_at	CHN1 N-chimaerin (NC) (N-chimerin) (Alpha chimerin) (A-chimaerin) (Rho- GTPase-activating protein 2)
10	212977_at	CMKOR1 G protein-coupled receptor RDC1 homolog
44	221900_at	COL8A2 Collagen alpha 2(VIII) chain precursor (Endothelial collagen)
5	221019_s_at	COLEC12 collectin sub-family member 12 isoform 1
3	242496_at	DO Ecto-ADP-ribosyltransferase 4 precursor
31	207220_at	DO Ecto-ADP-ribosyltransferase 4 precursor
47	209691_s_at	DOK4 downstream of tyrosine kinase 4
39	225078_at	EMP2 Epithelial membrane protein-2
33	209392_at	ENPP2 Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (E-NPP 2)
49	210839_s_at	ENPP2 Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (E-NPP 2)
13	205923_at	ENSG00000189056, Glycosyl hydrolase, BNR repeat, EGF-like domain, Laminin-type EGF-like domain, Reeler region
18	225855_at	EPB41L5 Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5
27	238533_at	EPHA7 Ephrin type-A receptor 7 precursor
29	214053_at	ERBB4 Receptor protein-tyrosine kinase erbB-4 precursor
9	228582_at	EST downstream of HoxC4
7	205666_at	FMO1 Dimethylaniline monooxygenase
28	203698_s_at	FRZB Frizzled-related protein precursor (Frzb-1)
22	230498_at	GPR24 Melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCH receptor 1)
6	220138_at	HAND1 Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1
35	205524_s_at	HAPLN1 Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 precursor
46	230204_at	HAPLN1 Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 precursor
48	203153_at	IFIT1 Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
8	221558_s_at	LEF1 Lymphoid enhancer binding factor 1
37	210302_s_at	MAB21L2 mab-21-like protein 2
41	226225_at	MCC Colorectal mutant cancer protein (MCC protein)
21	227386_s_at	NP_001003682 cDNA DKFZp434C184 gene, Tmhm
34	220496_at	NP_057593 C-type lectin-like receptor-2, Type II antifreeze protein, Tmhm
42	224743_at	NP_060283 Tumour necrosis factor c/lymphotoxin-beta, Inositol monophosphatase, Tmhm
11	225626_at	NP_060910 phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains
36	227354_at	NP_060910 phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains
23	226833_at	NP_653208 Endoplasmic reticulum targeting sequence, Cytochrome b5
15	226492_at	NP_705871 semaphorin 6D isoform 1 precursor
17	226769_at	NP_976249 Sigs
2	229452_at	NP_981956 Tmhm Seg
12	204624_at	Q15453 Protein-serine/threonine kinase
43	210258_at	RGS13 Regulator of G-protein signaling 13
1	205374_at	Sarcophilin
38	235334_at	SIAT7C sialyltransferase 7
4	223044_at	SLC40A1 Solute carrier family 40, member 1 (Ferroportin 1)
14	201349_at	SLC9A3R1 Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 1
24	227498_at	SOX6
40	209890_at	TM4SF9 transmembrane 4 superfamily member 9
19	202643_s_at	TNFAIP3 Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
20	202644_s_at	TNFAIP3 Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3

### Search Pattern

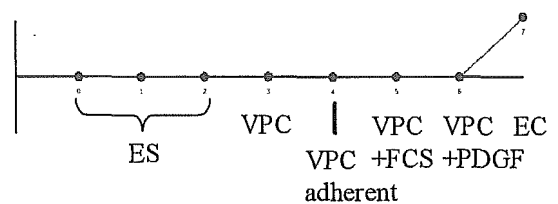


- ES Embryonic Stem Cells
- VPC Vascular Progenitor Cells
- VPC adherent VPC adhered to ColIV for 24 hours
- VPC + FCS VPC grown in the presence of 10% FCS
- VPC +PDGF VPC grown in the presence of PDGF
- EC VeCdh+ subset of cells grown in the presence of VEGF

表 3. Endothelial Specific Genes

Rank	Affymetrix Id	Description
8	205572_at	ANGPT2 Angiotensin-2 precursor (ANG-2)
5	236034_at	ANGPT2 Angiotensin-2 precursor (ANG-2)
26	237261_at	ANGPT2 Angiotensin-2 precursor (ANG-2)
6	228489_at	Beta and gamma crystallin
2	230061_at	Beta and gamma crystallin
21	202877_s_at	C1QR1 Complement component C1q receptor precursor
4	202878_s_at	C1QR1, Complement component C1q receptor precursor
13	204677_at	CDH5 Vascular endothelial-cadherin precursor (VE-cadherin)
22	209732_at	CLECSF2 C-type lectin superfamily member 2
38	201843_s_at	EFEMP1 EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 precursor (Fibulin-3)
35	201324_at	EMP1 Epithelial membrane protein-1
41	201325_s_at	EMP1 Epithelial membrane protein-1
36	201808_s_at	ENG Endoglin precursor (CD105 antigen)
19	201809_s_at	ENG Endoglin precursor (CD105 antigen)
10	225369_at	ESAM endothelial cell adhesion molecule
24	228339_at	ESTs
46	227780_s_at	ESTs
42	226985_at	FGD5 FYVE, RhoGEF and PH domain containing 5
33	239942_at	GNG11 Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) gamma-11 subunit
45	212951_at	GPR116 Probable G-protein coupled receptor 116 precursor.
9	212950_at	GPR116 Probable G-protein coupled receptor 116 precursor.
16	209543_s_at	Hematopoietic progenitor cell antigen CD34 precursor
48	44783_s_at	HEY1 Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
50	223775_at	HHIP hedgehog-interacting protein
44	213620_s_at	ICAM2 Intercellular adhesion molecule-2 precursor
27	204683_at	ICAM2 Intercellular adhesion molecule-2 precursor
23	219243_at	IMP4 HUMAN Immunity-associated protein 4
12	202202_s_at	LAMA4 Laminin alpha-4 chain precursor
43	204249_s_at	LMO2 Rhombotin-2 (Cysteine-rich protein TTG-2) (T-cell translocation protein 2) (LIM-only protein 2)
30	203549_s_at	LPL Lipoprotein lipase precursor
40	210869_s_at	MCAM Cell surface glycoprotein MUC18 precursor
28	209199_s_at	MEF2C Myocyte-specific enhancer factor 2C
47	226992_at	NOSTRIN nitric oxide synthase trafficking
37	227874_at	NP_057326 endomucin; likely ortholog of mouse Emcn; endomucin-2
49	219872_at	NP_057697 Bipartite nuclear localization signal
29	227856_at	NP_689613 Tnhmm, Seg
17	235306_at	NP_783161 immune associated nucleotide 6
39	219304_s_at	PDGFD platelet derived growth factor D isoform 1 precursor
14	208981_at	PECAM1
3	208982_at	PECAM1
11	208983_s_at	PECAM1
1	221529_s_at	Plasmalemma vesicle associated protein
31	230250_at	PTPRB Protein-tyrosine phosphatase beta precursor
34	221840_at	PTPRE Protein-tyrosine phosphatase epsilon precursor (EC 3.1.3.48) (R-PTP- epsilon)
25	226955_at	Q8IW82 Proline-rich region, Pleckstrin-like
18	232080_at	Q9P2P5 WWW/Rsp5/WWP domain, HECT domain (Ubiquitin-protein ligase), C2 domain
32	235489_at	RHOJ Rho-related GTP-binding protein RhoJ (Tc10-like GTP-binding protein TCL)
7	226028_at	ROBO4 Roundabout homolog 4 precursor (Magic roundabout)
20	228698_at	SOX7 Transcription factor SOX-7
15	204468_s_at	TIE Tyrosine-protein kinase receptor Tie-1 precursor

Search Pattern

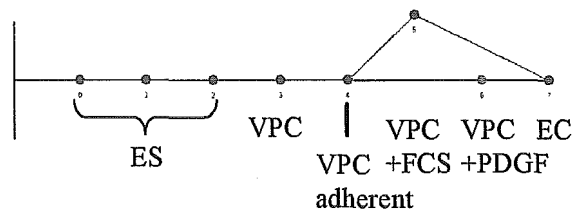


- ES Embryonic Stem Cells
- VPC Vascular Progenitor Cells
- VPC adherent VPC adhered to ColIV for 24 hours
- VPC + FCS VPC grown in the presence of 10% FCS
- VPC +PDGF VPC grown in the presence of PDGF
- EC VeCdh+ subset of cells grown in the presence of VEGF

表 4 Genes induced in VPC grown in the presence of 10% FCS

Rank	Affymetrix Id	Description
39	224810_s_at	ANKRD13 ankyrin repeat domain 13
20	213238_at	ATP10D Potential phospholipid-transporting ATPase VD
26	239367_at	BDNF Brain-derived neurotrophic factor precursor
50	221211_s_at	C21orf7 TAK1-like protein
6	236313_at	CDKN2B Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B (p14-INK4b) (p15-INK4b)
3	226237_at	COL8A1 Collagen alpha 1(VIII) chain precursor (Endothelial collagen)
33	214587_at	COL8A1 Collagen alpha 1(VIII) chain precursor (Endothelial collagen)
29	226609_at	DCBLD1 Discoidin, CUB and LCCL domain containing protein 1 precursor
10	237435_at	DKK1 Dickkopf related protein-1 precursor
49	225381_at	Downstream of ENSG00000190054 non-coding transcript
11	210896_s_at	Downstream of ENSG00000191964 non-coding transcript
45	230487_at	ESTs
44	202765_s_at	FBN1 Fibrillin 1 precursor
31	210310_s_at	FGF5 Fibroblast growth factor-5 precursor
22	214505_s_at	FHL1 Skeletal muscle LIM-protein 1
30	201539_s_at	FHL1 Skeletal muscle LIM-protein 1
21	1598_g_at	GAS6 Growth-arrest-specific protein 6 precursor (GAS-6)
4	203159_at	GLS Glutaminase, kidney isoform, mitochondrial precursor
28	203157_s_at	GLS Glutaminase, kidney isoform, mitochondrial precursor
1	203425_s_at	IGFBP5 Insulin-like growth factor binding protein 5 precursor
25	211958_at	IGFBP5 Insulin-like growth factor binding protein 5 precursor
43	203424_s_at	IGFBP5 Insulin-like growth factor binding protein 5 precursor
7	211959_at	IGFBP5 Insulin-like growth factor binding protein 5 precursor
17	205798_at	IL7R Interleukin-7 receptor alpha chain precursor
13	226218_at	IL7R Interleukin-7 receptor alpha chain precursor
12	209016_s_at	KRT7 Keratin, type II cytoskeletal 7
37	242722_at	LMO7 LIM domain only protein 7
24	213640_s_at	LOX Protein-lysine 6-oxidase precursor
42	202729_s_at	LTBP1 Latent transforming growth factor beta binding protein, isoform 1L precursor
47	203151_at	MAP1A Microtubule-associated protein 1A
38	213765_at	MFAP5 Microfibrillar-associated protein 5 precursor
15	236565_s_at	NP_060827 acheron isoform 2; death-associated LA motif protein
41	227638_at	NP_066015 Bipartite nuclear localization signal, Rhodopsin-like GPCR superfamily
5	223519_at	NP_598407 mixed lineage kinase-related kinase MRK-beta
2	225665_at	NP_598407 mixed lineage kinase-related kinase MRK-beta
18	225662_at	NP_598407 mixed lineage kinase-related kinase MRK-beta
8	229649_at	NRXN3 Neurexin 3-alpha precursor (Neurexin III-alpha).
23	219032_x_at	OPN3 Opsin 3 (Encephalopsin) (Panopsin)
36	202619_s_at	PLOD2 Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 precursor
32	201482_at	QSCN6 quiescin Q6 isoform a
9	203108_at	RAI3 Retinoic acid induced 3 protein (G protein-coupled receptor family C group 5 member A)
34	226021_at	RDH10 retinol dehydrogenase 10
19	227467_at	RDH10 retinol dehydrogenase 10
16	226989_at	RGMB RGM domain family, member B
27	219874_at	SLC12A8 solute carrier family 12, member 8
40	227408_s_at	SNX25 Sorting nexin 25 (MSTP043)
35	203001_s_at	STMN2 Stathmin 2 (SCG10 protein)
46	225720_at	SYNPO2 Synaptopodin 2 (Myopodin) (Genethonin 2)
48	225721_at	SYNPO2 Synaptopodin 2 (Myopodin) (Genethonin 2)
14	213725_x_at	XYLT1 xylosyltransferase I

Search Pattern



- ES Embryonic Stem Cells
- VPC Vascular Progenitor Cells
- VPC adherent VPC adhered to ColIV for 24 hours
- VPC + FCS VPC grown in the presence of 10% FCS
- VPC +PDGF VPC grown in the presence of PDGF
- EC VeCdh+ subset of cells grown in the presence of VEGF

図1. 遺伝子解析システムを使ったアドレノメジュリンおよびアドレノメジュリン受容体(RAMP2)の血管発生分化過程における発現

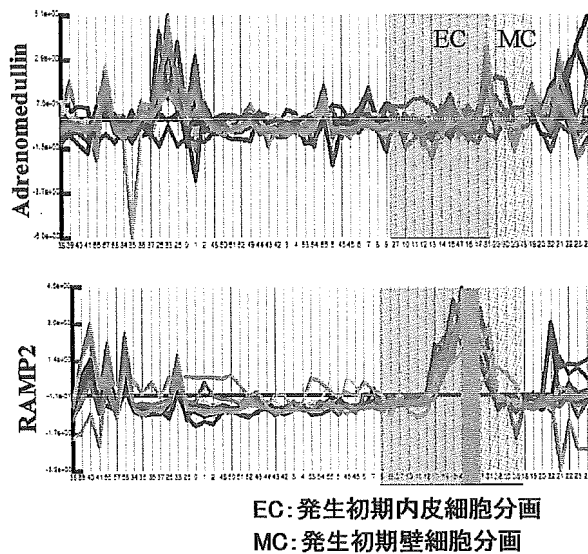
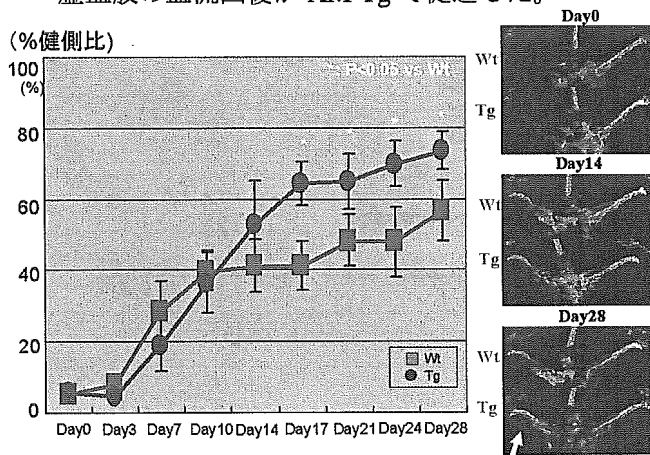


図2. AM-Tg での大腿動脈結紮 下肢虚血モデルにおける虚血肢血流の改善

虚血肢の血流回復が AM-Tg で促進した。



## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 近藤靖、鈴木豊、仁藤新治. ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞). バイオインダストリー. 2:10-16, 2005
2. N. Suzuki, R. Ikeda, M. S Kurokawa, S. Chiba, H. Yoshikawa, M. Ide, M. Tadokoro, S. Nito, N.

Nakatsuji, Y. Kondo, K. Nagata, T. Hashimoto, Y. Ueda, E. Takada, C. Masuda. Transplantation of Neural Cells derived from Retinoic Acid-treated Cynomolgus Monkey Embryonic Stem Cells successfully improved Motor Function of Hemiplegic Mice with Experimental Brain injury. *Neurobiology of Disease*. in press.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

「霊長類動物胚性幹細胞からの血管内皮細胞の製造方法」

特願 2004-184138 (平成 16 年 6 月 22 日)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 (伊藤 裕)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Tanaka, Y. Fukunaga, H. Itoh, K. Doi, J. Yamashita, T-H. Chun, M. Inoue, K. Masatsugu, T. Saito, N. Sawada, S. Sakaguchi, H. Arai, K. Nakao.	Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferators-activated receptor $\gamma$ for monocyte recruitment and endothelial regeneration.	Eur. J. Pharmacol.	508	255-265	2005
T. Saito, H. Itoh, J. Yamashita, K. Doi, T-H. Chun, T. Tanaka, M. Inoue, K. Masatsugu, Y. Fukunaga, N. Sawada, S. Sakaguchi, H. Arai, K. Tojo, N. Tajima, T. Hosoya, K. Nakao.	Angiotensin II suppresses growth-arrest specific homeobox (Gax) expression via redox-sensitive mitogen-activated protein kinase (MAPK).	Regul. Pept.	127	159-167	2005
H. Iwakura, K. Hosoda, C. Son, J. Fujikura, T. Tomita, M. Noguchi, H. Ariyasu, K. Takaya, H. Masuzaki, Y. Ogawa, T. Hayashi, G. Inoue, T. Akamizu, H. Hosoda, M. Kojima, H. Itoh, S. Toyokuni, K. Kangawa, K. Nakao.	Analysis of rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagons promoter-ghrelin transgenic mice.	J. Biol. Chem.		in press	2005
K. Nishizawa, E. Nakamura, T. Kobayashi, T.	Successful treatment of primary aldosteronism due to computed tomography-negative	Int. J. Urol.	10	544-546	2003

Kamoto, A. Terai, T. Terachi, O. Ogawa, H. Itoh, K. Nakao.	microadenoma.				
---	---------------	--	--	--	--

雑誌 (中山泰秀)

Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Keiichi Takamizawa	In vivo Tissue-engineered Small Caliber Arterial Graft Prosthesis Consisting of Autologous Tissue (Biotube)	Cell Trans	13	439-449	2004
Hiroshi Naito, Yoshiaki Takewa, Toshihide Mizuno, Shoji Ohya, Yasuhide Nakayama, Eisuke Tatsumi, Soichiro Kitamura, Hisateru Takano, Shigeki Taniguchi, Yoshiyuki Taenaka.	Three-dimensional Cardiac Tissue Engineering Using a Thermoresponsive Artificial Extracellular Materix.	ASAIO J	50	344-348	2004
Shoji Ohya, Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda	In vivo evaluation of poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin as an in situ-formable scaffold	J Artif Organs	7	181-186	2004
Shoji Ohya, Hiromichi Sonoda, Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda.	The Potential of Poly(N-isopropylacrylamide)(PN IPAM)-grafted Hyaluroran and PNIPAM-grafted Gelatin in the Control of Post-surgical Tissue Adhesions	Biomaterials	26	655-659	2005
Yasuhide Nakayama, Takeshi Masuda, Makoto Nagaishi, Michiko Hayashi, Moto Ohira, Mariko Shiba	High Performance Gene Delivery Polymeric Vector: Nano-structured Cationic Star Polymers.	Curr Drug Delivery	2	53-57	2005
Yasuhide	Development of Microporous	Int J Artif		in press	2005



Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Atsushi Ohtaka, Yoshihiro Okamoto, Yasushi Nemoto.	Covered Stents: Geometrical Design of the Luminal Surface.	Organs			
Mariko Umeda, Mariko Harada-Shiba, Kingo Uchida, Yasuhide Nakayama	Photo-control of the Polyplexes Formation between DNA and Photo-cation Generatable Water-soluble Polymers.	Curr Drug Deliver		in press	2005
Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda	Photocycloaddition-induced Preparation of Cyclic Macromolecules Using Biscinnamated or Biscoumarinated Oligo(ethylene glycol)s.	J Polym Sci Part A: Polym Chem		in press	2005
Haiying Huang, Yasuhide Nakayama, Kairong Qin, Kimiko Yamamoto, Joji Ando, Jun K Yamashita, Itoh Hiroshi, Keiichi Kanda, Hitoshi Yaku, Yoshihiro Okamoto, Yasushi Nemoto	In Vitro Pulsatile Flow Loading Can Induce the Differentiation from Embryonic Stem (ES) Cells to Vascular Wall Cells.	J Artif Organs		in press	2005
Osamu Sakai, Yasuhide Nakayama, Yasushi Nemoto, Yoshihiro Okamoto, Taiji Watanabe, Keiichi Kanda, Hitoshi Yaku	Development of Sutureless Vascular Connecting System for Easy Implantation of Small Caliber Artificial Grafts.	J Artif Organs		in press	2005
Ohtaka Atsushi,	Enhancement of Visible	Photochem		in press	2005

Takahiro Kameo, Yoshiaki Hirano, Yasuhide Nakayama	Light-Induced Gelation of Photocurable Gelatin by Addition of Polymeric Amine.	Photobiol			
中山泰秀	光反応によるバイオマテリア ル界面の精密創製	ナノバイオ エンジニア リング	2	19-29	2004
Hatsue Ishibashi-Ueda, Yasuhide Nakayama	Biotube technology for a novel tissue-engineered blood vessels.	Cardiovascular Regeneration Therapies using Tissue Engineering Approach		95-104	2005

雑誌 (仁藤新治)

近藤靖、鈴木豊、 仁藤新治	ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞)	バイオインダ ストリー	2	10-16	2005
N. Suzuki, R. Ikeda, M. S Kurokawa, S. Chiba, H. Yoshikawa, M. Ide, M. Tadokoro, S. Nito, N. Nakatsuji, Y. Kondo, K. Nagata, T. Hashimoto, Y. Ueda, E. Takada, C. Masuda.	Transplantation of Neural Cells derived from Retinoic Acid-treated Cynomolgus Monkey Embryonic Stem Cells successfully improved Motor Function of Hemiplegic Mice with Experimental Brain injury.	Neurobiology of Disease		in press	2005



## Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ for monocyte recruitment and endothelial regeneration

Tokuji Tanaka<sup>1</sup>, Yasutomo Fukunaga<sup>1</sup>, Hiroshi Itoh\*, Kentaro Doi, Jun Yamashita, Tae-Hwa Chun, Mayumi Inoue, Ken Masatsugu, Takatoshi Saito, Naoki Sawada, Satsuki Sakaguchi, Hiroshi Arai, Kazuwa Nakao

Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

Received 8 July 2004; received in revised form 18 October 2004; accepted 28 October 2004  
Available online 30 December 2004

### Abstract

Thiazolidinediones, a new class of antidiabetic drugs that increase insulin sensitivity, have been shown to be ligands for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). Recent studies demonstrating that PPAR $\gamma$  occurs in macrophages have focused attention on its role in macrophage functions. In this study, we investigated the effect of thiazolidinediones on monocyte proliferation and migration *in vitro* and the mechanisms involved. In addition, we examined the therapeutic potentials of thiazolidinediones for injured atherosclerotic lesions. Troglitazone and pioglitazone, the two thiazolidinediones, as well as 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 inhibited in a dose-dependent manner the serum-induced proliferation of THP-1 (human monocytic leukemia cells) and of U937 (human monoblastic leukemia cells), which permanently express PPAR $\gamma$ . These ligands for PPAR $\gamma$  also significantly inhibited migration of THP-1 induced by monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Troglitazone and 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 significantly suppressed the mRNA expression of the MCP family-specific receptor CCR2 (chemokine CCR2 receptor) in THP-1 at the transcriptional level. Furthermore, troglitazone significantly inhibited MCP-1 binding to THP-1. Oral administration of troglitazone to Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits after balloon injury suppressed acute recruitment of monocytes/macrophages and accelerated re-endothelialization. These results suggest that thiazolidinediones have therapeutic potential for the treatment of diabetic vascular complications.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Thiazolidinedione; PPAR $\gamma$ ; MCP-1; CCR2; Macrophage; Insulin resistance

### 1. Introduction

Recruitment of circulating monocytes and their proliferation and differentiation into macrophages are not only the central events for initiation and progression of atherosclerosis, but have also been recently recognized as crucial pathogenic events in both diabetic micro- and macroangiopathy. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 is a member of the C-C branch (or  $\beta$ ) of the chemokine family

and a potent monocyte and lymphocyte chemoattractant, which is expressed abundantly in atherosclerotic lesions (Nelken et al., 1991). MCP-1 initiates signal transduction through binding to the chemokine CCR2 receptor (CCR2) (Charo et al., 1994). In a study of CCR2 knockout mice, markedly fewer macrophages were present in the aorta of CCR2 $^{-/-}$ , apoE $^{-/-}$  double knockout mice than in that of apoE $^{-/-}$  mice (Boring et al., 1998). Moreover, an independent study demonstrated that MCP-1 $^{-/-}$  mice, when crossed with LDL receptor $^{-/-}$  mice, had smaller lesions and a significant reduction of macrophages in the lesions (Gu et al., 1998). These findings indicate the direct role of MCP-1 and CCR2 in monocyte recruitment and atherosclerosis.

\* Corresponding author. Tel.: +81 75 751 3170; fax: +81 75 771 9452.

E-mail address: [hiito@kuhp.kyoto-u.ac.jp](mailto:hiito@kuhp.kyoto-u.ac.jp) (H. Itoh).

<sup>1</sup> These two authors contributed equally to this work.

Thiazolidinediones are a new class of antidiabetic agents that increase sensitivity to insulin (Nolan et al., 1994). Insulin resistance has been attracting attention as the common casual factor not only for diabetes mellitus but also for hypertension, hyperlipidemia and obesity, all of which are risk factors for atherosclerosis (DeFronzo and Ferrannini, 1991). Recently, thiazolidinediones have been shown to be the ligands for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), which is a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors and has been identified as the functional receptor in antidiabetic action of thiazolidinediones (Lehmann et al., 1995).

PPAR $\gamma$  and the retinoid X receptor contain a heterodimer to bind regulatory elements in the promoter region of a number of adipocyte-specific genes and stimulate transcription (Tontonoz et al., 1994). In a previous study, we cloned rat PPAR $\gamma$  and detected down-regulation of PPAR $\gamma$  mRNA by several cytokines (Tanaka et al., 1999). Recent studies have demonstrated that PPAR $\gamma$  is expressed in cells of monocyte/macrophage lineage (Ricote et al., 1998; Tontonoz et al., 1998), and that oxidized low density lipoprotein (oxLDL), which plays a central role in atherogenesis, can regulate PPAR $\gamma$ -dependent gene transcription (Nagy et al., 1998). We recently reported that oxLDL potentiates, through the activation of PPAR $\gamma$ , the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human endothelial cells and in monocytes/macrophages (Inoue et al., 2001). Another study demonstrated that the administration of troglitazone, one of the thiazolidinediones, to Watanabe heritable hyperlipidemia (WHHL) rabbits and high fat-fed low density lipoprotein receptor or apo E knockout mice inhibits progression of atherosclerosis (Shiomi et al., 1999; Chen et al., 2001; Collins et al., 2001). All of these studies indicate the significance of PPAR $\gamma$  in monocyte and macrophage functions and atherogenesis.

The objective of the study presented here was to determine the effect of thiazolidinediones on the migration and proliferation of monocytes/macrophages and to investigate the molecular mechanism of the effect of thiazolidinediones on MCP-1-induced monocyte migration, with the focus on the expression of CCR2. Furthermore, we used WHHL atherosclerotic rabbits for an *in vivo* investigation of the therapeutic potentials of thiazolidinediones for acute monocyte recruitment and infiltration as well as for endothelial regeneration after acute vascular injury.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture

THP-1 (human monocytic leukemia cells) and U937 (human monoblastic leukemia cells) were obtained from ATCC and cultured as previously reported (Inoue et al., 2001), with or without the following agents: troglitazone

(Sankyo, Tokyo, Japan), pioglitazone (Takeda Chemical Industries, Osaka, Japan), 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 (Sigma, St. Louis, MO), which is one of the natural ligands of PPAR $\gamma$ , or 9-*cis*-retinoic acid (Sigma), which is the ligand of the retinoid X receptor.

### 2.2. Northern blot analysis

Total cellular RNA was isolated from cultured cells using TRIzol reagents (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Northern blot analysis was performed as described elsewhere (Tanaka et al., 1999). The human PPAR $\gamma$  probe consisted of an 858-base pair fragment of the cDNA corresponding to nucleotides 329–1186 of the human PPAR $\gamma$ 1 cDNA. The human CCR2 probe consisted of a 939-base pair fragment of the CCR2 cDNA corresponding to nucleotides 1–939. A human  $\beta$ -actin probe (Wako, Japan) was used to monitor the amount of total RNA in each sample.

### 2.3. Establishment of U937 cells permanently expressing PPAR $\gamma$

U937 cells permanently expressing PPAR $\gamma$  were established by using the PPAR $\gamma$  expression vector (pCMX-mPPAR $\gamma$ ), which contains a cytomegalovirus enhancer and mouse full-length PPAR $\gamma$  cDNA, as we previously reported and explained in detail (Inoue et al., 2001).

### 2.4. Chemotaxis assay

The cell migration was evaluated with the modified Boyden chamber technique using a 96-well chemotaxis chamber (Neuroprobe, Cabin John, MD) with 50  $\mu$ l of cell suspension ( $2 \times 10^7$  cells/ml cells in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)), as previously reported by us (Sawada et al., 2000).

### 2.5. Equilibrium binding analysis

The cells were suspended at a density of  $2 \times 10^7$  cells/ml in 200  $\mu$ l of binding buffer containing 0.1% bovine serum albumin. The cells were incubated with 0.02 nM  $^{125}$ I-MCP-1 and various amounts of unlabelled ligand for 90 min at 25 °C. All assays were done in triplicate, and binding data were examined with the Ligand Assistance Program (Ligand Pharmaceuticals, Charlotte, NC) or Scatchard analysis.

### 2.6. Balloon angioplasty and troglitazone administration

Homozygous male WHHL rabbits (10 months old,  $3.6 \pm 0.1$  kg) were used for this study. The rabbits were supplied by Sankyo Pharmaceutical. All animals used in the present study were treated with humane care in compliance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH