

200500188 A

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

組織幹細胞賦活化による心血管再生療法の開発
(H17-再生-008)

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 佐田 政隆

平成 18 (2006) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
組織幹細胞賦活化による心血管再生療法の開発-----	5
佐田政隆	
II. 分担研究報告	
1. 組織幹細胞賦活化による心血管再生療法の開発-----	13
佐田政隆	
2. 組織幹の動態とその制御因子に関する研究 -----	21
平田恭信	
3. 徐放化ナノ粒子の開発および心機能評価 -----	25
杉浦清了	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	31

総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

組織幹細胞賦活化による心血管再生療法の開発

主任研究者 佐田政隆 東京大学大学院医学系研究科（先端臨床医学開発講座）
寄附講座教員（客員助教授）

研究要旨 プロスタサイクリン受容体活性化物質として開発された化学合成物 ONO-1301 が、cAMP 依存性に線維芽細胞、内皮細胞などから VEGF や HGF といった増殖因子分泌を促した。ONO-1301 をポリグリコール酸で徐放化することに成功した。マウス心筋梗塞モデルにおいて、徐放化 ONO-1301 製剤は内因性 VEGF、HGF の発現を亢進させ毛細血管密度も増加させた。徐放化 ONO-1301 製剤投与により心筋拡大が抑制され死亡率、心臓破裂が有意に減少した。ラット心筋梗塞モデルにおいて、高容量より低容量の方が効果的であった。ブタ慢性虚血モデルにおいて、徐放化 ONO-1301 の外科的投与により、側副血行路と心拍出量、駆出率が増加し、心拡大が抑制された。臨床応用するために、今後、剤型、投与経路、投与量、投与頻度などを検討する必要があると考えられる。

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
寄附講座教員（客員助教授）

平田 恭信
東京大学大学院医学系研究科・循環器内科
助教授

杉浦 清了
東京大学大学院新領域創成科学研究科・
環境学専攻
教授

を徐放化したのち生体に投与し、自然治癒力を増強する戦略の実用化を図る。

③医用工学的電磁気ナビゲーションシステムを用いて経皮的に心筋にアプローチする手法を開発する。徐放粒子の大きさや性状を調整して化合物を心筋へ経皮的に伝達させようとする新しい試みである。

④小、中動物で有効性は確認している。また、ブタ心筋梗塞モデルにおいても、ONO-1301MS 剤の心筋投与にて有効性が確認されている。今回は、血管新生・心筋再生能の再確認、用量相関性、作用機作、および臨床試験を考慮した投与方法の検討等を主に行う。

⑤また、徐放性基剤の性状を工夫し、放出速度の異なる粒子を調整する。各種の投与方法、剤型、投与量を試みて有効性と安全性を比較検討する。

A. 研究目的

冠動脈硬化などを原因とする重症心不全患者数は増加している。薬物療法無効な症例では、心臓移植しか治療手段がない。しかし、日本ではドナーが絶対的に不足している。遺伝子治療や細胞移植療法が考案されているが、有効性と安全性および経済性、汎用性などに未解決な問題点が多い。

本研究では、

- ①合成化合物を用いて生体の自然治癒力を増強するという新しい概念で心機能回復を図る。安全で有効な心筋再生療法の開発を目指す。
- ②材料工学的手法を駆使して合成化合物; ON-1301

B. 研究方法

(1) ON-1301による増殖因子分泌促進の分子機序の解明

- ・培養心筋細胞、線維芽細胞、内皮細胞、平滑筋細胞にON-1301を添加する。上清中の内皮細胞増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)の濃度

を測定する。

- 各種キナーゼ阻害剤やブチル化cAMP, cGMPを添加して、増殖因子発現への効果を検討することでON-1301による増殖因子発現促進作用を仲介する細胞内伝達系を考察する。

(2) ON-1301徐放化粒子の開発

- 生体内局所で持続的効果を得るためON-1301の徐放化粒子を開発する。Poly lactic glycolic acid (PLGA：乳酸・グリコール酸の共重合体) やPoly lactic acid (PLA)と配合して粒子化する。走査電子顕微鏡で粒子の大きさ、形状を検討する。
- 試験管内培養液中で、ON-1301徐放化剤(ON-1301-PLGA)の分解速度を測定する。PLGA中の乳酸：グリコール酸の配合比や重合反応温度を調整して、4週間程度の持続的放出が維持できるように、粒子化の至適条件を決定する。
- 試作した徐放化ナノ粒子をマウス、ラットの大腿筋、心筋内に注射して、生体内での分解速度を評価する。また、筋肉注射部位の組織傷害、炎症反応を検討する。

(3) マウス心筋梗塞モデルにおけるON-1301徐放化剤の効果検討

- 人工呼吸器管理下に開胸し、マウス前下行枝を結紮し心筋梗塞を作製する。虚血領域周囲4-5ヶ所にPBS/Tween-80 50 μ l に懸濁したON-1301-PLGA 0.5mgを27G針とハミルトンシリンジを用いて注射する。心機能を毎週の経胸壁的心エコー図と4週目のミラーカテーテルを用いた心内腔圧測定にて評価する。毛細血管数、線維化を組織学的に検討する。
- 骨髄をGFPもしくはLacZマウスのもので置換したのち心筋梗塞を作成、骨髄細胞の血管、心筋分化への関与を検討する。局所に注入したON-1301-PLGAの骨髄細胞動員効果を評価する。

(4) マウス心筋梗塞モデルにおけるON-1301徐放化剤の効果検討

(4-a) 試験方法；心筋梗塞モデルの作製

ラットをペントバルビタールナトリウム (35~40 mg/kg, i. p.) で麻酔後、背位に固定し、気道に気管チューブを経口的に挿入し、小動物用人工呼吸器 (Model 683, HARVARD) により人工呼吸 (呼吸容量：1.5~2.0 mL/body、呼吸回数：70回/min) を施し、胸部側壁を開胸して心臓を露出する。糸付縫合針を用いて左冠動脈前下行枝 (LAD) を完全閉塞する。この時、心電図用アンプを介して心電図 (第II誘導) を測定し、閉塞の有無をST電位の変化及び心筋色で確認する。なお、ST電位に変化の見られない個体は試験より除外する。その後、閉胸して切開部を縫合し、動物用イソジン液を用いて消毒する。なお、Sham群は開胸手術のみ行い縫合する。

(4-b) 心機能検査

投与開始後4週 (採血翌日) にラットをペントバルビタールナトリウム (25~35 mg/kg, i. p.) 麻酔下で背位に固定し、心機能を測定する。右頸動脈内にミラーカテーテル (SPR-249<2.0Fr> 又はSPR-524<2.5Fr>、Millar Instruments Inc.) を挿入し、ひずみ圧力用アンプ (AP-621G、日本光電工業株) 又は血圧測定用アンプ (AP-641G、日本光電工業株) を介して血圧〔収縮期血圧 (SBP)、拡張期血圧 (DBP) 及び平均血圧 (MBP)〕を測定する。その後、左心室内に誘導留置し左心室内圧 (LVP) を測定する。さらに左心室内圧波形を微分ユニット (ED-600G、日本光電工業株) 又は微分演算ユニット (EQ-601G、日本光電工業株) に導いてLVdP/dt及び-LVdP/dtを測定する。また、左心室内圧波形を生体電気アンプ (AB-621G、日本光電工業株) に導いて拡大し、左心室拡張末期圧 (LVEDP) を測定する。心電図は心電図用アンプ (AC-601G、日本光電工業株) を介して第II誘導を記録する (解析なし)。心拍数 (HR) は血圧波形よ

り瞬時心拍計ユニット (AT-601G、日本光電工業(株)) を介して測定する。それぞれのパラメーターはインク書き記録器 (WI-642G又はWI-622G、日本光電工業(株)) 上に記録する。

(4-c) 解剖

心機能検査後、動物を頸椎脱臼により安楽死させて心臓及び肺を摘出し、心臓は、右心房重量、左心房重量、右心室重量、左心室重量、心臓全重量 (両心房重量+両心室重量) 及び肺重量を測定する。評価のため右心房重量/体重比、左心房重量/体重比、右心室重量/体重比、左心室重量/体重比及び肺重量/体重比を算出する。その後、半数例 (奇数番号) は左心室の乳頭筋を横断する位置で短軸方向に二等分し、横断面の起始部側を10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬させて固定する。ホルマリン固定した心筋は、パラフィンブロックを作製後、薄切し、Hematoxylin-Eosin染色を行い、病理組織学的検査を行う。また、Azan-Mallory染色を行い、左心室における線維化面積について画像解析装置 (汎用画像処理 "Win ROOF Version 3.1"、三谷商事(株)) を介して計測する。残りの半数例 (偶数番号) については左心室を短軸方向に垂直にスライスし、輪切り標本 (4切片) を作製する。輪切り標本の重量を測定後、心筋梗塞領域 (Infarct area) の特定のため、1% TTC液 (pH 7.4 リン酸緩衝液に溶解) で染色 (液温: 37°C、時間: 5分間) する。染色後、標本の両面について写真撮影を行い、写真を画像解析装置 (汎用画像処理 "Win ROOF Version 3.1"、三谷商事(株)) に取り込み心筋梗塞面積及び左心室面積を測定する。算出は心筋梗塞面積/左心室面積×切片重量 (g) より心筋梗塞領域を重量で求め、左心室重量に占める割合を心筋梗塞サイズ (%) とする。

(5) ブタ心筋虚血モデルにおける経皮的投与法の確立と効果判定

体重 30-35 kg 家畜用ブタ冠動脈のうち回旋枝根部に、アメロイドコンストラクター (径 2.25-2.4mm: 3-4 週にて完全閉塞) を左側胸部開胸手術により植え込むことによって作成した。生体電気磁場探査装置付きカテーテル (バイオセンス社 NOGA) を用いて、電気活動はあるものの壁運動が低下している冬眠心筋を同定した。徐放製剤を心腔内もしくは外膜側から心筋へ直接注入した。放出された化合物が周辺細胞に作用して増殖因子の発現を誘導するかどうかを確認した。0 週でアメロイドコンストラクター植え込み、4 週・6 週において、①冠動脈造影・②左心室造影・③右心カテーテル検査・④NOGA システムによる電位・壁運動モニタリングを組み合わせて行った。ONO1301 投与は経冠動脈投与では 4・6 週、心外膜側投与では 4 週、心内膜投与では 4・6 週に行った。その後第 8 週に上記検査施行後、解剖、病理学的評価を行った。心機能をエコー図、左室造影、左室内圧で評価する。血管新生を冠動脈造影、組織学的に評価した。

(倫理面への配慮)

既に確立された細胞と実験動物疾患モデルを用いる。動物は換気、給餌等の完備した施設で飼育し、学内もしくは研究所内の規定に適合する条件で実験を行うため倫理的な問題はない。

C. 研究結果

(1) ONO-1301 による増殖因子分泌促進の分子機序の解明 (in vitro)

- ① 正常人皮膚線維芽細胞に ONO-1301 を添加すると、培養上清中の HGF および VEGF の濃度は、時間依存性、容量依存性に有意に上昇した。
- ② cAMP 類似化合物である Dibutyryl cAMP ならびに adenylate cyclase 活性化薬 Forskolin を添加すると、ONO-1301 と同様に培養上清中の HGF および VEGF 濃度はともに上昇した。このことから、ONO-1301 の内因性 HGF および VEGF 分泌作用の細胞内伝達には cAMP の関与

が考えられた。

- ③ 正常人線維芽細胞と正常人血管内皮細胞の共培養条件下に ONO-1301 を添加すると、内皮細胞の管腔様構造の形成は、陽性コントロールの VEGF および HGF と同程度まで促進した。また、ONO-1301 に加え、抗 VEGF 中和抗体および抗 HGF 中和抗体をそれぞれ添加すると、ONO-1301 による管腔形成は抑制された。このことから ONO-1301 の管腔形成促進効果は、内因性 VEGF および HGF の分泌促進に依存していると考えられた。

(2) マウス心筋梗塞モデルにおける ONO-1301 徐放化剤の効果検討 (in vivo)

C57BL/6J マウスの前下行枝冠動脈を結紮し心筋梗塞モデルを作製した。虚血作製と同時に ONO-1301 の徐放剤 (ONO-1301MS) を、ハミルトンシリンジと 25G テルモ針を用いての虚血心筋周辺二ヵ所に直接筋肉内注射した。心筋梗塞後 7 日目において、虚血部位の毛細血管密度は ONO-1301 によって増加した。このような血管新生促進効果は抗 VEGF 中和抗体の同時投与により、打ち消された。ONO-1301 による血管新生促進効果は、内因性 VEGF の発現亢進を介すると推測された。

心エコー図検査において、左室の拡大、収縮能の低下は ONO-1301MS により抑制された。組織学的検査では、残存心筋細胞の肥大、間質の線維化は抑制され、ONO-1301MS の局所投与により梗塞後心筋リモデリングは有意に抑制されたと考えられた。抗 VEGF 中和抗体の投与で、ONO-1301 の予後改善効果は打ち消された。また、ONO-1301 の投与によって心臓破裂が抑制される傾向があった。心筋梗塞後 28 日の生存率はコントロールに比較し、改善傾向にあった。

(3) ラット心筋梗塞モデル (完全閉塞および虚血再灌流モデル) における ONO-1301 および ONO-1301 徐放剤の効果の検討 (in vivo)

ラット心筋梗塞モデルを用い、ONO-1301MS の 4

週間反復経口投与及び ONO-1301MS の心外膜心筋投与による一般症状観察、体重、血中 cAMP、血漿中 BNP 濃度、心エコー図検査、血行動態、臓器重量比、線維化面積比及び形態学的変化に対する作用を検討した。

Control 群及び PLGA・MS 群では、臓器重量比 (心・肺重量比) の増加、心エコー図検査、血行動態検査上の左心室機能の低下 (左心室拡大、左室駆出率の低下、 $\pm LVdP/dt$ の低下、左心室拡張末期圧の上昇) が認められた。また、血中の cAMP 及び脳性利尿ペプチド (BNP) レベルの上昇が認められた。組織学的検査では心臓において、心筋変性壊死、線維化、間質浮腫、炎症性細胞浸潤、出血及び骨様化生の所見が観察された。

ONO-YS-1301 の 1 mg/kg 経口投与群では Control 群に比べ、血中 cAMP ($P < 0.05$) 及び BNP の低下が認められた。臓器重量比の増加抑制 (右心房重量比: $P < 0.05$) が認められた。また、左心室機能の低下の抑制 (左心室拡大の抑制、左室駆出率低下の抑制、 $\pm LVdP/dt$ の上昇及び左心室拡張末期圧の低下) が認められた。さらに線維化面積比の縮小効果 ($P < 0.05$) が観察された。組織学的検査では Control 群で認められた心筋変性壊死、線維化及び骨様化生の所見が軽減される傾向にあった。

ONO-1301MS 心筋内投与群では PLGA・MS 群に比べ、血中 BNP の低下が認められた。左心室機能の低下の抑制 (左心室拡大の抑制、左室内圧 ($P < 0.10$)、 $\pm LVdP/dt$ の上昇及び左心室拡張末期圧の低下) が認められた。また、臓器重量比の増加抑制 (右心房重量比: $P < 0.05$) が認められた。組織学的検査では PLGA・MS 群で認められた心筋変性壊死及び線維化の程度が軽減される傾向にあった。

以上より、ラット心筋梗塞モデルにおいて、ONO-1301 及び ONO-1301 MS は、左心室機能 (左室径、左室駆出率、 $\pm LVdP/dt$) の改善、cAMP、BNP レベルの低下、心・肺重量比の増加抑制、線維化面積比の縮小効果及び病理所見の軽減傾向を示し、心筋梗塞後左室リモデリングの抑制効果を有する

可能性が示唆された。

4) ブタ心筋梗塞モデルにおける ONO-1301MS の効果の検討 (in vivo) – 各種投与方法の検討 –

1、開胸手術による心外膜側からの直接投与

ONO1301-MS (4 週間リリース製剤) 投与により、心機能は有意に改善し、NOGA システムにより測定された虚血部位の壁運動・電位ともに改善していた。

2、カテーテルを用いての経皮的な心筋内への投与

2 週間リリース製剤 ONO1301-MS の 2 回投与は側副血行形成を促進すること、左心室リモデリングを抑制することが示唆された。また、心筋の線維化が抑制される傾向があった。

3、経冠動脈投与

右冠動脈から左回旋枝への側副血行路形成を目的として右冠動脈内に ONO1301-MS を投与したが、投与後 1 時間以内に ONO1301-MS 投与した動物 4 頭のうち 2 頭が死亡。生存した動物でも、両群とも左心室拡張末期容積が 74.1ml (コントロール群) vs. 65.05ml (ONO1301-MS 群) (有意差なし) とかなり拡張しており、冠動脈投与自体が、心機能低下に寄与している可能性が考えられた。冠動脈投与を行うには、ONO1301-MS の剤型・溶媒などに関して、詳細な検討が必要であると考えられた。

D. 考察

今年度の研究計画はほぼ達成できた。冠動脈投与では有効性を証明することはできなかったが、ONO1301-MS の外膜・内膜両側とも心筋内直接投与により、側副血行路形成が促進されその結果、左心室全体の拡大すなわちリモデリングが明らかに抑制された。

冠動脈内への投与は最も汎用性があると考えられるが、徐放性剤の粘度が高い場合は、逆に塞栓症や心筋梗塞を誘発することになるので慎重に検討する必要がある。

ONO-1301 の血管新生促進作用は確認できたが、

心筋に存在する心筋幹細胞や骨髄由来細胞の動態に関しては不明点が残る。骨髄移植マウスを用いて骨髄由来細胞の動態を確認する。また、心筋幹細胞のマーカーとして用いられる、c-kit, sca-1 などを用いた免疫染色、ソーティングを用いて心筋内での組織幹細胞の動態を評価する。ONO-1301 による組織幹細胞の分化、増殖への影響を評価する予定である。

また、ONO-1301 投与による副作用を評価する必要がある。血圧低下作用や炎症惹起作用を詳細に検討する。ブタやマウスで投与後長期観察を行い、癌や血管腫の発生を検討する。

今後、臨床応用へ向けて①剤型②投与経路③投与量④投与頻度などをさらに検討する必要があると同時に、その有効性のメカニズムについてのさらに詳細な検討を予定している。

E. 結論

ONO-1301 が内因性増殖因子の発現を促進し、血管新生を促進することが確認され、その分子機序も検討できた。臨床応用するため、今後、徐放性剤の性状 (遊離速度、粒子径など)、至適投与量、投与経路を詳細に検討する必要があると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

分担報告書参照

学会発表

分担報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

- ・ 佐田：「カテーテルを兼用する医療用ガイドワイヤー」国際特許出願 PCT/JP01/04940
- ・ 佐田：「臓器移植後拒絶反応としての移

植後動脈硬化症の予防及び/又は治療剤」

国際特許出願 PCT/JP02/11441

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分 担 研 究 報 告 書

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織幹細胞賦活化による心血管再生療法の開発

分担研究者 佐田政隆 東京大学大学院医学系研究科（先端臨床医学開発講座）
寄附講座教員（客員助教授）

研究要旨 プロスタサイクリン受容体活性化物質として開発された化学合成物 ONO-1301 が、cAMP 依存性に線維芽細胞、内皮細胞などから VEGF や HGF といった増殖因子分泌を促し、in vitro での管腔形成を濃度依存性に促進させた。マウス、ブタの虚血モデルにおいて、徐放化 ONO-1301 製剤の局所投与は、側副血行路の発達を促し、心機能悪化を抑制した。一方、冠動脈内への投与では no flow 現象が認められた。ONO-1301 の虚血心筋でも血管新生促進作用の効果とその分子機序が明らかとなった。徐放化低分子化合物による、血管新生促進作用が確認できた。臨床応用するために、今後、剤型、投与経路、投与量、投与頻度などを最適化していく予定である。

A. 研究目的

冠動脈硬化などを原因とする重症心不全患者数は増加している。薬物療法無効な症例では、心臓移植しか治療手段がない。しかし、日本ではドナーが絶対的に不足している。遺伝子治療や細胞移植療法が考案されているが、有効性と安全性および経済性、汎用性などに未解決な問題点が多い。

①合成化合物を用いて生体の自然治癒力を増強するという新しい概念で心機能回復を図る。安全で有効な心筋再生療法の開発を目指す。

②材料工学的手法を駆使して合成化合物; ON-1301 を徐放化したのち生体に投与し、自然治癒力を増強する戦略の実用化を図る。

③医用工学的電磁気ナビゲーションシステムを用いて経皮的に心筋にアプローチする手法を開発する。徐放粒子の大きさや性状を調整して化合物を心筋へ経皮的に伝達させようとする新しい試みである。

④小、中動物で有効性は確認している。また、ブタ心筋梗塞モデルにおいても、ONO-1301MS 剤の心筋投与にて有効性が確認されている。今回は、血管新生・心筋再生能の再確認、用量相関性、作用機作、および臨床試験を考慮した投与方法の検討等を主に行う。

⑤また、徐放性基剤の性状を工夫し、放出速度の異なる粒子を調整する。各種の投与方法、剤型、投与

量を試みて有効性と安全性を比較検討する。

B. 研究方法

(1) ONO-1301による増殖因子分泌促進の分子機序の解明

- ・培養心筋細胞、線維芽細胞、内皮細胞、平滑筋細胞にON-1301を添加し、上清中の内皮細胞増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の濃度を測定する。
- ・各種キナーゼ阻害剤やブチル化cAMP, cGMPを添加して、増殖因子発現への効果を検討することでON-1301による増殖因子発現促進作用を仲介する細胞内伝達系を考察する。

(2) マウス心筋梗塞モデルにおけるON-1301徐放化剤の効果検討

- ・生体内局所で持続的効果を得るためON-1301の徐放化粒子を開発する。Poly lactic glycolic acid (PLGA: 乳酸・グリコール酸の共重合体) やPoly lactic acid (PLA) と配合して粒子化する。走査電子顕微鏡で粒子の大きさ、形状を検討する。
- ・試験管内培養液中で、ON-1301徐放化剤(ON-1301-PLGA)の分解速度を測定する。PLGA中の乳酸: グリコール酸の配合比や重合反応温度を

調整して、4週間程度の持続的放出が維持できるように、粒子化の至適条件を決定する。

- ・試作した徐放化ナノ粒子をマウス、ラットの大腿筋、心筋内に注射して、生体内での分解速度を評価する。また、筋肉注射部位の組織傷害、炎症反応を検討する。
- ・人工呼吸器管理下に開胸し、マウス前下行枝を結紮し心筋梗塞を作製する。虚血領域周囲4-5ヶ所にPBS/Tween-80 50 μ l に懸濁したON-1301-PLGA 0.5mgを27G針とハミルトンシリンジを用いて注射する。心機能を毎週の経胸壁の心エコー図と4週目のミラーカテーテルを用いた心内腔圧測定にて評価する。毛細血管数、線維化を組織学的に検討する。
- ・骨髄をGFPもしくはLacZマウスのもので置換したのち心筋梗塞を作成、骨髄細胞の血管、心筋分化への関与を検討する。局所に注入したON-1301-PLGAの骨髄細胞動員効果を評価する。

(3) ブタ心筋虚血モデルにおける経皮的投与法の確立と効果判定

・ブタの冠動脈左回旋枝をアメロイドコンストリクターで閉塞させ、心筋虚血を作製する。生体電気磁場探査装置付きカテーテル（バイオセンス社NOGA）を用いて、電気活動はあるものの壁運動が低下している冬眠心筋を同定する。徐放製剤を心腔内から心筋へ経皮的に直接注入する。放出された化合物が周辺細胞に作用して増殖因子の発現を誘導するかどうかを確認する。また、心機能をエコー図、左室造影、左室内圧で評価する。血管新生を冠動脈造影、組織学的に評価する。（1）動物モデル

体重 30-35 kg 家畜用ブタ冠動脈のうち回旋枝根部に、アメロイドコンストリクター（径 2.25-2.4mm：3-4週にて完全閉塞）を左側胸部開胸手術により植え込むことによって作成した。0週：アメロイドコンストリクター植え込み（図14）、4週・6週：必要に応じて①冠動脈造影・②左心室

造影・③右心カテーテル検査・④NOGAシステムによる電位・壁運動モニタリングを組み合わせて行った。ON01301投与は経冠動脈投与では4・6週、心外膜側投与では4週、心内膜投与では4・6週に行った。その後第8週に上記検査施行後、解剖、病理学的評価を行った。

（倫理面への配慮）

既に確立された細胞と実験動物疾患モデルを用いる。動物は換気、給餌等の完備した施設で飼育し、学内もしくは研究所内の規定に適合する条件で実験を行うため倫理的な問題はない。

C. 研究結果

(1) ONO-1301による増殖因子分泌促進の分子機序の解明 (in vitro)

- ① 正常人皮膚線維芽細胞に ONO-1301 を添加すると、培養上清中の HGF および VEGF の濃度は、時間依存性、容量依存性に有意に上昇した。
- ② cAMP 類似化合物である Dibutyryl cAMP ならびに adenylate cyclase 活性化薬 Forskolin を添加すると、ONO-1301 と同様に培養上清中の HGF および VEGF 濃度はともに上昇した。このことから、ONO-1301 の内因性 HGF および VEGF 分泌作用の細胞内伝達には cAMP の関与が考えられた。
- ③ 正常人線維芽細胞と正常人血管内皮細胞の共培養条件下に ONO-1301 を添加すると、内皮細胞の管腔様構造の形成は、陽性コントロールの VEGF および HGF と同程度まで促進した。また、ONO-1301 に加え、抗 VEGF 中和抗体および抗 HGF 中和抗体をそれぞれ添加すると、ONO-1301 による管腔形成は抑制された。このことから ONO-1301 の管腔形成促進効果は、内因性 VEGF および HGF の分泌促進に依存していると考えられた。

(2) マウス心筋梗塞モデルにおける ONO-1301 徐放化剤の効果検討 (in vivo)

C57BL/6J マウスの前下行枝冠動脈を結紮し心筋梗塞モデルを作製した。虚血作製と同時に ONO-1301 の徐放剤 (ONO-1301MS) を、ハミルトン シリンジと 25G テルモ針を用いての虚血心筋周辺 2ヵ所に直接筋肉内注射した。

心筋梗塞後 7 日目において、虚血部位の毛細血管密度は ONO-1301 によって増加した。このような血管新生促進効果は抗 VEGF 中和抗体の同時投与により、打ち消された。ONO-1301 による血管新生促進効果は、内因性 VEGF の発現亢進を介すると推測された。

心エコー図検査において、左室の拡大、収縮能の低下は ONO-1301MS により抑制された。組織学的検査では、残存心筋細胞の肥大、間質の線維化は抑制され、ONO-1301MS の局所投与により梗塞後心筋リモデリングは有意に抑制されたと考えられた。抗 VEGF 中和抗体の投与で、ONO-1301 の予後改善効果は打ち消された。また、ONO-1301 の投与によって心臓破裂が抑制される傾向があった。心筋梗塞後 28 日の生存率はコントロールに比較し、改善傾向にあった。

(3) ブタ心筋梗塞モデルにおける ONO-1301MS の効果の検討 (in vivo)

ー各種投与方法の比較検討ー

1、開胸手術による心外膜側からの直接投与

ONO1301-MS (4 週間リリース製剤) 投与により、心機能は有意に改善し、NOGA システムにより測定された虚血部位の壁運動・電位ともに改善していた。

2、カテーテルを用いての経皮的な心筋内への投与

2 週間リリース製剤 ONO1301-MS の 2 回投与は側副血行形成を促進すること、左心室リモデリングを抑制することが示唆された。また、心筋の線維化が抑制される傾向があった。

3、経冠動脈投与

右冠動脈から左回旋枝への側副血行路形成を目的として右冠動脈内に ONO1301-MS を投与したが、投与後 1 時間以内に ONO1301-MS 投与した動物 4 頭

のうち 2 頭が死亡。生存した動物でも、両群とも左心室拡張末期容積が 74.1ml (コントロール群) vs. 65.05ml (ONO1301-MS 群) (有意差なし) とかなり拡張しており、冠動脈投与自体が、心機能低下に寄与している可能性が考えられた。冠動脈投与を行うには、ONO1301-MS の剤型・溶媒などに関して、詳細な検討が必要であると考えられた。

D. 考察

今年度の研究計画はほぼ達成できた。冠動脈投与では有効性を証明することはできなかったが、ONO1301-MS の外膜・内膜両側とも心筋内直接投与により、側副血行路形成が促進されその結果、左心室全体の拡大すなわちリモデリングが明らかに抑制された。

冠動脈内への投与は最も汎用性があると考えられるが、徐放性剤の粘度が高い場合は、逆に塞栓症や心筋梗塞を誘発することになるので慎重に検討する必要がある。

ONO-1301 の血管新生促進作用は確認できたが、心筋に存在する心筋幹細胞や骨髄由来細胞の動態に関しては不明点が残る。骨髄移植マウスを用いて骨髄由来細胞の動態を確認する。また、心筋幹細胞のマーカーとして用いられる、c-kit, sca-1 などを用いた免疫染色、ソーティングを用いて心筋内での組織幹細胞の動態を評価する。ONO-1301 による組織幹細胞の分化、増殖への影響を評価する予定である。

また、ONO-1301 投与による副作用を評価する必要がある。血圧低下作用や炎症惹起作用を詳細に検討する。ブタやマウスで投与後長期観察を行い、癌や血管腫の発生を検討する。

今後、臨床応用へ向けて①剤型②投与経路③投与量④投与頻度などをさらに検討する必要がある。また、その有効性をさらに詳細に検討する必要がある。

E. 結論

ONO-1301 が内因性増殖因子の発現を促進し、血

管新生を促進することが確認され、その分子機序も検討できた。臨床応用するため、今後、徐放性剤の性状（遊離速度、粒子径など）、至適投与量、投与経路を詳細に検討する必要があると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto, T., Sata, M., Fukuda, D., Takamoto, S. The angiotensin II type 1 receptor blocker valsartan attenuates graft vasculopathy. *Basic Res Cardiol.* 2005. 100: 84-91.
2. Hirata, Y., Sata, M., Motomura, N., Takanashi, M., Suematsu, Y., Ono, M., Takamoto, S. Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005. 327: 609-614.
3. Fukuda, D., Sata, M., Tanaka, K., Nagai, R. Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells. *Circulation.* 2005. 111: 926-931.
4. Natori, T., Sata, M., Nagai, R., Makuuchi, M. Cimetidine inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Biomed Pharmacother.* 2005. 59: 56-60.
5. Higashikuni, Y., Sata, M., Nagai, R. Reversible left ventricular hypertrophy after Tako-Tsubo-like cardiomyopathy. *Acta Cardiol.* 2005. 60: 77-79.
6. Kim-Kaneyama JR, Suzuki W, Ichikawa K, Ohki T, Kohno Y, Sata M., Nose K, Shibamura M. Uni-axial stretching regulates intracellular localization of Hic-5 expressed in smooth-muscle cells in vivo. *J Cell Sci.* 2005. 118: 937-949.
7. Iwata, H., Sata, M., and Nagai, R. Complete aspiration of thrombi from an occluded coronary artery. *Heart.* 2005. 91: 530.
8. Ishizaka, N., Saito, K., Noiri E, Sata, M., Ikeda, H., Ohno, A., Ando, J., Mori, I., Ohno, M., Nagai, R. Administration of angiotensin II induces iron deposition and upregulation of TGF- β 1 mRNA in the rat liver. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005. 288: R1063 - R1070.
9. Saito, K., Ishizaka, N., Aizawa, T., Sata, M., Iso-o, N., Noiri, E., Mori, I., Ohno, M., Nagai, R. Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensin II-induced upregulation of TGF-1 in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005. 288: H1836 - H1843.
10. Kitamura, T., Sata, M., Motomura, N., Takamoto, S. Seeding of recipient bone marrow cells reduces neointimal hyperplasia of deendothelialized rat aortic allograft. *Int Heart J.* 2005. 46: 303-312.
11. Tanaka, K., Sata, M., Fukuda, D., Suematsu, Y., Motomura, N., Takamoto, S., Hirata, Y., Nagai, R. Age-associated Aortic Stenosis in ApoE-deficient Mice. *J Am Coll Cardiol.* 2005. 46. 134-141.
12. Guleng, B., Tateishi, K., Ohta, M., Kanai, F., Jazag, A., Ichijo, H., Tanaka, Y., Washida, M., Morikane, K., Fukushima, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Kawabe, T., Miyagishi, M., Taira, K., Sata, M., Omata, M. Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. *Cancer Res* 2005. 65, 5864-5871.
13. Ohta, M., Tateishi, K., Kanai, F., Ueha, S., Guleng, B., Washida, M., Tanaka, Y., Ijichi, H., Ikenoue, T., Sata, M., Sudo, T., Shiina, S., Kawabe, T., Matsushima, K., Omata, M. Reduced p38 mitogen-activated protein kinase in donor grafts accelerates acute intestinal graft-versus-host disease in mice. *Eur J Immunol.* 2005. 35: 2210-2221.

14. Sahara, M., Sata, M., Matsuzaki, Y., Tanaka, K., Morita, T., Hirata, Y., Okano, H., Nagai, R. Comparison of various bone marrow fractions in the ability to participate in vascular remodeling after mechanical injury. *Stem Cells* 2005. 23: 874-878.
15. Sata, M., Fukuda, F., Tanaka, K., Kaneda, Y., Yashiro, H., Shirakawa, I. The role of circulating precursors in vascular repair and lesion formation. *J. Cell. Mol. Med.* 2005. 9: 557-568.
16. Sata, M., Tanaka, K., Nagai, R. Circulating Osteoblast-Lineage Cells. *N. Engl. J. Med.* 2005 353: 737-738.
17. Saito K, Ishizaka N, Hara M, Matsuzaki G, Sata M, Mori I, Ohno M, Nagai R. Lipid accumulation and transforming growth factor- β upregulation in the kidneys of rats administered angiotensin II. *Hypertension*, 2005. 46:1180-1185.
18. Ohta, M., Tateishi, K., Kanai, F., Watanabe, H., Kondo, S., Guleng, B., Tanaka, Y., Asaoka, Y., Jazag, A., Imamura, J., Ijichi, H., Ikenoue, T., Sata, M., Miyagishi, M., Taira, K., Tada, M., Kawabe, T., Omata, M. p53-Independent Negative Regulation of p21/Cyclin-Dependent Kinase-Interacting Protein 1 by the Sonic Hedgehog-Glioma-Associated Oncogene 1 Pathway in Gastric Carcinoma Cells. *Cancer Res* 2005 65: 10822-10829.
19. Yamamoto, T., Sata, M., Fukuda, D., Takamoto, S. The angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan attenuates graft vasculopathy. *J Surg Res* 2006. 132:62-68.
20. Takeda R, Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, Nagata D, Oba S, Sata M., Takahashi M, Yamamoto Y, Terauchi Y, Kadowaki T, Kangawa K, Kitamura T, Nagai R, Hirata Y. Ghrelin improves renal function in mice with ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17:113-121.
21. Yamazaki S, Miki K, Takayama T, Hasegawa K, Sata M., Midorikawa Y, Aburatani H, Makuuchi M. Hepatic gene induction in murine bone marrow after hepatectomy. *J Hepatol.* 2006. 44:325-333.
22. Tateishi K, Ohta M, Guleng B, Kanai F, Tanaka Y, Asaoka Y, Jazag A, Imamura J, Imamura T, Ijichi H, Ikenoue T, Kawakami T, Fukushima Y, Washida M, Sata M., Miyagishi M, Taira K, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. TRAIL-induced cell death cooperates with IFN-gamma activation in the graft-versus-tumor effect against colon tumors. *Int J Cancer.* 2006. 118:2237-2246.
23. Sainz, J., Sata, M. Targeting bone marrow to treat vascular diseases: Accelerated vascular healing by colony stimulating factor. *Cardiovasc Res.* 2006. 70:3-5.
24. Sata, M. The role of circulating vascular progenitors in angiogenesis, vascular healing and pulmonary hypertension: Lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* in press.
25. Nishimura S, Nagai S, Sata M., Katoh M, Yamashita H, Saeki Y, Nagai R, Sugiura S. Expression of green fluorescent protein impairs the force-generating ability of isolated rat ventricular cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem.* in press

2. 学会発表

1. Masataka Sata “Do blood cells turn into vessels?” International Cardiovascular Symposium-Clinical Implications of Stem Cells in Cardiovascular Disease, Chang Gung Memorial Hospital, Keelung, Taiwan, April 9, 2005.
2. Masataka Sata “Use of animal models to elucidate the role of stem cells in the cardiovascular

- system" (Plenary Lecture 1 Atherosclerosis at the forefront) European Atherosclerosis Society 75th EAS Congress, Prague, Czech Republic, April 24, 2005.
3. Masataka Sata "Bone Marrow-Derived Stem Cells in Vascular Disease" (Cardiovascular Seminar.06 Stem Cell and Vascular Diseases) American Heart Association Scientific Sessions 2005, Dallas, November 13, 2005.
 4. Sahara, M., Nakamura, K., Sata, M. "Bone marrow-derived cells do not appreciably to the pulmonary arterial remodeling associated with monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." American Heart Association Scientific Sessions 2005, Dallas, November 13-16, 2005.
 5. Sahara, M., Tanaka, K., Sata, M. "Comparison of various bone marrow fractions in the ability to participate in vascular remodeling after mechanical injury." American Heart Association Scientific Sessions 2005, Dallas, November 13-16, 2005.
 6. Iwata, H., Nakamura, K., Sakai, Y., Takamoto, S., Sata, M. "Local delivery of slow-releasing synthetic prostaglandin I₂ agonist augments collateral growth in swine chronic cardiac ischemia model." American Heart Association Scientific Sessions 2005, Dallas, November 13-16, 2005.
 7. Fukuda, D., Sata, M. "Angiotensin II type 1 receptor in bone marrow plays a pivotal role in the pathogenesis of atherosclerosis." American Heart Association Scientific Sessions 2005, Dallas, November 13-16, 2005.
 8. Fukuda, D., Sata, M. "Potential contribution of bone marrow derived vascular progenitor cells in the pathogenesis of angiotensin II-induced aortic aneurysm formation." American Heart Association Scientific Sessions 2005, Dallas, November 13-16, 2005.
 9. Tanaka, K. Sata, M. "Circulating progenitors contribute to neointimal formation in nonirradiated bone marrow chimeric mice." American Heart Association Scientific Sessions 2005, Dallas, November 13-16, 2005.
 10. 岩田洋、佐田政隆、中村和人、墨誠、酒井芳紀、永井良三 「徐放性低分子化合物局所投与によるサイトカイン発現誘導と血管新生」第46回日本脈管学会総会 2005年12月1日 大阪 "血管新生" (シンポジウム)
 11. Sata, M. "Therapeutic angiogenesis for heart failure" The 22nd annual meeting of the Japanese Section of International Society for Heart Research. Problem-solving Panel Discussion 3 "What is the most appropriate method to perform regeneration therapy in cardiovascular medicine" December 17, 2005. Osaka
 12. Sata, M. "The 14th CDB Meeting "EPC Biology Conference" "Potential contribution of circulating progenitors to vascular healing and remodeling" Center for Developmental Biology, RIKEN Kobe, 2006 Kobe
 13. Sahara M., Sata M., Tanaka K., Morita T., Hirata Y., Nagai R. "The Potential Therapeutic Efficacy of Cyclic GMP-specific Phosphodiesterase-5 Inhibition for Angiogenesis in a Mouse Hindlimb Ischemia Model" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋
 14. Fukuda D., Sata M., Nagai R. "Angiotensin II Type 1 Receptor in Bone Marrow Plays a Pivotal Role in the Pathogenesis of Atherosclerosis" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋

15. Iwata H., Sata M., Nakamura, K., Ninomiya, M., Sakai, Y., Takamoto, S., Nagai R. "Local Delivery of Slow-releasing Synthetic Prostaglandin I2 Agonist Augments Collateral Growth in Swine Chronic Cardiac Ischemia Model" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋
16. Nakamura K., Sata M., Hirata, Y., Nagai R. "Targeted Disruption of Angiotensin-converting Enzyme 2 Deteriorates Cardiac Performance" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋
17. Sumi M., Sata M., Hirata, Y., Nagai R. "A Silk-based Biodegradable Artificial Blood Vessel for Small Artery" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋
18. Inoue T., Katoh, T., Hikichi, Y., Hirase, T., Komoda, H., Sohma, R., Uchida, T., Shimizu, M., Sata M., Node K. "Recruitment of bone-marrow-derived stem cells after coronary stent implantation and its clinical significance" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋
19. Tanaka K., Sata M., Hirata Y., Nagai R. "Circulating Progenitors Contribute to Neointimal Formation in Non-irradiated Bone Marrow Chimeric Mice" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋
20. Matsumoto M., Sata M., Soma, M., Nagai R. "Oral Administration of Eicosapentanoic Acid up-regulates Adiponectin Expression by Periadventitial Fat and potently suppresses Atherosclerotic Lesion Formation in ApoE-deficient Mice" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋
21. Sahara M., Sata M., Morita T., Hirata Y., Nagai R. "Diverse Contribution of Bone Marrow-derived Cells to Vascular Remodeling between Carotid Arteries Injured Mechanically and Pulmonary Vasculature Injured by Monocrotaline" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋
22. Iwata H., Sata M., Manabe, I., Shindo, T., Kuro-o, M., Nagai R. "Variation in the origins of mature smooth muscle cells with SM1/2 expression in vascular remodeling" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋
23. Iwata H., Sata M., Morita, T., Ando, J., Sawaki D., Nagai R. "Early accumulation of primitive cells into intracoronary thrombi in patients with acute coronary syndrome" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋
24. Tanaka K., Sata M., Hirata Y., Nagai R. "Perivascular Fats Anatomically Communicate with Atherosclerotic Lesions via Vasa Vasorum; Possible Link of Adipo-vascular Axis" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋
25. Fukuda D., Sata M., Hirata, Y., Nagai R. "Blockade of Angiotensin II Type1 Receptor Inhibits Atherosclerotic Lesion Formation and Stabilizes Plaque Contents" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋
26. Shimamura, M., Sato, N., Sata M., Kawakami, K., Hayashi, T., Iida H., Nagai R., Ogihara, T., Morishita, R. "Post-ischemic administration of fluvastatin improves cognitive dysfunction in the chronic stage of cerebral infarction in rat model" 第70回日本循環器学会総会 2006年3月23-25日 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

- ・ 発明者 佐田政隆：「カテーテルを兼用する医療用ガイドワイヤー」国際特許出願 PCT/JP01/04940
- ・ 発明者 佐田政隆：「臓器移植後拒絶反応としての移植後動脈硬化症の予防及び/又は治療剤」国際特許出願 PCT/JP02/11441

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）
分担研究報告書

組織幹の動態とその制御因子に関する研究

分担研究者 平田恭信 東京大学大学院医学系研究科（循環器内科）助教授

研究要旨 血中前駆細胞は強い傷害後の血管修復と病態形成に関与することが再確認された。骨髄中の間葉系もしくはより未分化幹細胞から前駆細胞は派生しており、造血幹細胞からの形質転換分化の可能性は少ないと思われる。「骨髄由来血管前駆細胞」が血管病予防のための新たな標的になることが明らかになった。

A. 研究目的

閉塞性血管病は局所の細胞の分化、増殖によって生じると考えられている。私たちは、移植後動脈硬化、血管形成術後再狭窄、高脂血症による動脈硬化のモデルを用いて、血液中に動員された骨髄由来前駆細胞が傷害後の血管に定着し、内皮細胞もしくは平滑筋細胞に分化して病態形成に関与することを報告した。この説は世界で広く受け入れられるようになったが、一方では骨髄由来細胞の可塑性に疑問を投げかける報告も多くみられている。特に骨髄中の造血幹細胞の可塑性に関しては非常に激しい論争がなされている。血液中の骨髄由来前駆細胞が血管病変形成に関与するかどうか、いくつかの方法を用いて再検証してみた。

B. 研究方法

(1) 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。

(2) 一つ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 $c\text{-Kit}^+$, $Sca\text{-1}^+$, 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。

(3) 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し、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しう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。

(倫理面への配慮)

本研究では既に確立された細胞と実験動物疾患モデルを用いて検討する。動物は換気、給餌等の完備した施設で飼育し、学内もしくは研究所

内の規定に適合する条件で実験を行うため倫理的な問題はない。

C. 研究結果

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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。

D. 考察

血液中の前駆細胞が強度傷害後の血管の修復と病変形成に関わる現象が再確認された。前駆細胞としてはいろいろな細胞分画が混在している可能性が高いが、造血幹細胞からの形質転換分化現象は少ないようである。各種病態における前駆細胞の動態とその制御機構を現在研究している。

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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeda R, Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, Nagata D, Oba S, Sata M, Takahashi M, Yamamoto Y, Terauchi Y, Kadowaki T, Kangawa K, Kitamura T, Nagai R, Hirata Y. Ghrelin improves renal function in mice with ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2006 17:113-121.
2. Satonaka H, Suzuki E, Hayakawa H, Nishimatsu H, Nagata D, Oba S, Kamijo A, Takeda R, Takahashi M, Yamamoto Y, Kimura K, Hirata Y.