

200500260A

厚生労働科学研究費補助金  
基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

アドレノメデュリンを用いた循環器疾患の  
画期的治療法の開発

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 宮武 邦夫

平成18 (2006) 年 3 月

## 目 次

I.	総括研究報告書	
	アドレノメデュリンを用いた循環器疾患の画期的治療法の開発	
	大阪南医療センター 宮武 邦夫	1
II.	分担研究報告書	
	アドレノメデュリン投与による心筋炎治療に関する基礎的研究	
	国立循環器病センター 寒川 賢治	4
	急性心筋梗塞患者における ProGEAR 研究登録患者に関する研究	
	国立循環器病センター 宮崎 俊一	7
	脳硬塞既往患者に対するアドレノメデュリン長時間投与による循環動態と各種液性因子の変化	
	宮崎大学医学部 北村 和雄	9
	アドレノメデュリンの虚血脳保護再生作用と脳血管疾患への応用に関する研究	
	京都大学大学院医学研究科 中尾 一和	10
	脂肪由来前駆細胞による肺高血圧治療	
	国立循環器病センター 永谷 憲歳	18
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	21
V.	研究成果の刊行物・別刷	28

厚生労働科学研究費補助金 (基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)  
総括研究報告書

アドレノメデュリンを用いた循環器疾患の画期的治療法の開発

主任研究者 独立行政法人 国立病院機構 大阪南医療センター 宮武邦夫

アドレノメデュリン (AM) は、抗炎症作用・抗アポトーシス作用、血管新生作用などから心筋保護的薬剤として臨床への応用が期待されている。本年度は、前年度の基礎的研究をもとに、急性心筋梗塞患者に対する AM 投与の臨床試験を行った。AM 投与量を変えて検討した結果、低容量では血圧の著明な低下をきたすことなく 12 時間投与できることが分った。また、過去の蓄積データとの比較により AM の心筋保護効果が示唆された。一方、脳梗塞の新たな治療薬としての可能性を検討するために、陳旧性脳梗塞患者を対象に AM を 27 時間持続投与を行った。脳血流・代謝への悪影響はなく、脳血管障害患者への投与は安全と判断した。また、探索的検討では、AM はヒト ES 細胞由来血管前駆細胞から血管内皮細胞への分化を促進し、また脂肪由来幹細胞を内皮系へ誘導することを明らかにし、AM の血管再生医療への応用が期待される。これらのことから、AM は難治性循環器疾患に対する我が国独自の画期的治療薬となる可能性が示唆された。

分担研究者

寒川 賢治 国立循環器病センター研究所 副所長

宮崎 俊一 国立循環器病センター  
心臓血管内科 医長

北村 和雄 宮崎大学医学部 講師

中尾 一和 京都大学大学院医学研究科 教授

永谷 憲歳 国立循環器病センター 再生医療部長

A. 研究目的

医療技術が進歩した現在においても虚血性心疾患、脳虚血疾患は常に死因の上位を占め、また高額な医療費の原因にもなっている。アドレノメデュリン (AM) は 1993 年、研究分担者の寒川らが発見した内因性循環調節ペプチドである。近年、AM にはさまざまな心血管保護効果があることが報告された。我々は前年度 (平成 16 年度) に、心筋および脳の保護効果を動物実験で明らかにした。本年度は、また急性心筋梗塞や脳梗塞

に対する AM の治療薬としての可能性を検討するために、実際に急性心筋梗塞患者や脳梗塞患者に AM を投与して安全性を検討することを主な目的とする。また、探索的研究として、AM の血管再生医療における有用性について、基礎的検討を行った。

B. 研究方法

アドレノメデュリンによる虚血心筋保護作用の検討

(宮武、宮崎、永谷、寒川)：前年度の動物実験の結果をふまえ、パイロット臨床試験を行った。初回急性心筋梗塞症例 11 人を対象に高濃度 (n=6) と低濃度の AM (n=5) を虚血再灌流時に投与し、虚血心筋保護効果と投与の安全性を検討した。

アドレノメデュリンによる心不全治療効果の検討 (北村、寒川、永谷)：

AM の心不全治療効果のメカニズムを調べるために、AM の血管線維化抑制作用をラット高血圧性心肥大モデルで検討した。また、急性心筋炎モデルにおける AM 投与の効果を検討した。

### アドレノメデュリンによる脳虚血保護作用の検討（北村、中尾）：

軽症の脳梗塞既往者を対象に、化学合成 AM (15 ng/kg/min) の 27 時間持続投与を行い、脳血流、代謝を含む血行動態、各種液性因子の変化を検討した。

### アドレノメデュリンによる血管再生効果の検討（中尾、永谷）：

ヒト E S 細胞由来血管前駆細胞や脂肪由来幹細胞に対する AM の内皮系への分化誘導作用に関して検討した。

#### （倫理面への配慮）

1. 動物操作にあたっては、各施設の動物実験指針に従って行う。
2. 基礎的研究において遺伝子改変動物、プラスミド DNA を用いる場合は使用に際しては遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づき研究を実施する。
3. 臨床研究に関しては、国立循環器病センターを含め各施設の倫理委員会承認のもとで進める。

### C. 研究結果

#### アドレノメデュリンによる虚血心筋保護作用の検討：

国立循環器病センター倫理委員会承認のもと臨床試験により症例を蓄積した。現在までのところ 11 例の患者に施行し、静脈内投与の安全性を確認した。先行の急性心筋梗塞 6 例に対しては再灌流療法に先行してアドレノメデュリン (0.025  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) の静脈内投与を開始以後 12 時間継続した。血圧が低下する症例があったため、次の 5 例は 0.025  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  で 3 時間投与した後に半量の 0.0125  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  で 9 時間投与した。これにより過度の低血圧を生じることはなくなった。ただし、11 例目の症例が急性心筋梗塞に伴う左室自由壁破裂のために死亡したので、アドレノメデュリンとの因果関係を安全評価委員会において審議中である。今後は多施設共同試験を実施する予定である。

#### アドレノメデュリンによる心不全治療効果の検討：

アンジオテンシン II による高血圧に伴い、左心室内の冠動脈周囲の線維芽細胞数は増加したが、14 日間の AM

の同時皮下投与により、収縮期血圧に非依存的にそれらは有意に減少した。左室内 TGF- $\beta$ 1 と type 1 collagen 遺伝子発現は減少した。ラット急性心筋炎モデルにおいて心筋炎急性期に AM を持続投与すると心筋組織の炎症細胞浸潤・浮腫等が抑制され、心機能が改善した。以上より AM の高血圧性心血管リモデリング効果、心筋炎抑制効果が明らかとなった。

#### アドレノメデュリンによる脳虚血保護作用の検討：

AM 投与により収縮期血圧は約 30 mmHg へ低下し、心拍数は有意に上昇した。副作用はみられず、投与中止 15 時間後には基礎値に復帰した。また、血圧低下にもかかわらず、脳血流への影響は軽微であり、脳血管障害患者への臨床応用の安全性が示された。

#### アドレノメデュリンによる血管再生効果の検討：

In vitro においてヒト E S 細胞由来血管前駆細胞や脂肪由来幹細胞に AM+VEGF を添加すると、これらの細胞は内皮系への分化した。こうして得た血管前駆細胞は強力な血管再生能を in vitro のみでなく、in vivo で示した。

### D. 考察

医療技術が進歩した現在においても虚血性心疾患、脳虚血疾患は常に死因の上位を占め、また高額な医療費の原因にもなっている。分担研究者の中尾と寒川は ANP や BNP などのナトリウム利尿ペプチドの発見と病態生理的意義の研究によって、血中 BNP による診断法や心不全治療薬であるハンブ (HAMP) を開発し、多くの患者を救命してきた。これまでの研究結果から、内因性ペプチドの一つであるアドレノメデュリンも循環器疾患の病態に深く関与していることが明らかとなり、その特異的な作用から循環器疾患の新たな治療薬として期待される。すなわち、現状の心臓、脳血管疾患などの循環器疾患の新しい治療法の開発が望まれている中で急性心筋梗塞の梗塞サイズの縮小効果は生命予後に直結し、また、脳梗塞の傷害部位の縮小や脳機能の改善は患者の生命予後のみならず、QOL の改善をもたらす治療法は大きな期待がかけられている。

前年度に行った動物実験の結果をふまえて、本年度は急性心筋梗塞や脳梗塞を対象に臨床試験を行った。

急性心筋梗塞患者への急性期に低濃度と高濃度のAMを静脈内投与し、低濃度AM群では血圧の著明な低下をきたすことなく12時間の投与が行えることが分った。また、過去の蓄積データとの比較によりAMの心筋保護効果が示唆された。再灌流療法が普及した現在においても急性心筋梗塞後の心筋保護・再灌流障害抑制は不十分である。AMはこれらの心筋障害を著明に抑制する可能性があり、今後はパイロット研究の結果を無作為化二重盲検試験で検証していく。また、前年度の動物実験をふまえ、AMの脳梗塞治療に関する探索的臨床研究を開始した。基礎および臨床研究の結果より、AMが虚血脳において血管再生作用ならびに神経保護再生作用を発揮すること、また脳梗塞患者へのAM投与の安全性が示され、AM投与が新たな脳梗塞治療法となる可能性が示唆された。最後に、探索的研究としてAMの血管再生効果、内皮分化誘導能について検討した。AMはヒトES細胞由来血管前駆細胞から血管内皮細胞への分化を促進し、また脂肪由来幹細胞を内皮系へ誘導することを明らかにし、AMの血管再生医療における有用性が示された。これらの結果よりAMの細胞移植治療への応用が期待される。

我々は本年度のパイロット臨床研究結果をもとに、来年度は比較臨床試験にて急性心筋梗塞や脳血管疾患に対するAM投与の安全性と有効性を検討する予定である。前述のごとくAMは我が国で発見され国立循環器病センター、京都大学、宮崎医科大学が中心となり世界に先駆けて基礎的、臨床的研究成果を蓄積してきた循環調節ペプチドである。難治性循環器疾患に対する我が国独自の画期的治療薬として実用化に向けたトランスレーショナルリサーチをさらに推進したい。

#### E. 結論

本年度は、急性心筋梗塞患者に対するパイロット臨床研究を行い急性心筋梗塞に対する画期的治療法となる可能性を示した。またAMの脳梗塞治療に関する探索的臨床研究を行い、安全性を証明した。さらにES細胞や脂肪由来幹細胞とAMを用いることで、新たな血管再生医療が行える可能性が示された。最終年度は、急性心筋梗塞と脳梗塞に対象を絞り、比較臨床試験にてAM投与の安全性と有効性のさらなる検討を行っていく。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. H. Ariyasu, K. Takaya, H. Iwakura, H. Hosoda, T. Akamizu, Y. Arai, K. Kangawa, and K. Nakao. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology*. 146: 355-364, 2005
2. T. Suganami, M. Mukoyama, K. Mori, H. Yokoi, M. Koshikawa, K. Sawai, S. Hidaka, K. Ebihara, T. Tanaka, A. Sugawara, H. Kawachi, C. Vinson, Y. Ogawa, and K. Nakao. Prevention and reversal of renal injury by leptin in a new mouse model of diabetic nephropathy. *FASEB J.* 19: 127-129, 2005
3. N. Takahashi, Y. Saito, K. Kuwahara, M. Harada, K. Tanimoto, Y. Nakagawa, R. Kawakami, M. Nakanishi, S. Yasuno, S. Usami, A. Yoshimura, and K. Nakao. Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38: 185-192, 2005
4. AOzasa, Y. Komatsu, A. Yasoda, M. Miura, Y. Nakatsuru, Y. Sakuma, H. Arai, N. Itoh, and K. Nakao. Complementary antagonistic actions between C-type natriuretic peptide and MAPK pathway through FGFR-3 in ATDC5 cells. *Bone*. 36: 1056-1064, 2005
5. 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, and K. Nakao. Analysis of rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagon promoter-ghrelin transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 280: 15247-15256, 2005

##### 2. 学会発表

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特願 2005-036419

特願 2005-062951

特願 2005-117588

##### 2. 実用新案登録 なし

##### 3. その他 なし

## アドレノメデュリン投与による心筋炎治療に関する基礎的研究

分担研究者 寒川 賢治 国立循環器病センター研究所 副所長

急性心筋炎は急速に進行する重症心不全を来し、時に致死性的となるが、有効な特異的治療がないのが現状である。ラット急性心筋炎モデルにおいて心筋炎急性期にアドレノメデュリン(AM)を持続投与すると心筋組織の炎症細胞浸潤・浮腫等が抑制され、心機能が改善した。急性心筋炎治療に AM が有用である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

急性心筋炎は心不全の急速な進行により致死性的となり得るが、現在、対症療法以外に特異的治療法がない。アドレノメデュリン (AM) は血管拡張性の降圧ペプチドであり、抗炎症作用、心筋細胞に対する抗アポトーシス作用、酸化ストレス抑制作用等を有し、新たな心筋保護薬として有望である。我々はこれまでにラット急性心筋梗塞の再灌流障害モデルにおいて AM 投与が梗塞サイズを縮小し、心機能を改善することを報告した (Okumura H, Nagaya N et al. *Circulation* 2004;109:242-248)。心筋炎に対する AM 投与の有効性の報告はないが、これまでの実験事実より① AM が炎症性サイトカインの分泌を抑制すること (Isumi Y et al. *FEBS Lett.* 1999;463:110-4)、② AM が抗アポトーシス作用を有すること、③ AM が心線維芽細胞の増殖、コラーゲン合成を著明に抑制すること (Horio T et al. *Eur J Pharmacol* 1999;382:1-9) が証明されており、AM 投与が心筋炎においても心筋保護的に作用する可能性が示唆される。今回、我々はラット急性心筋炎モデルにおいて AM を持続投与し、AM の心筋炎に対する治療効果、その作用機序について検討した。

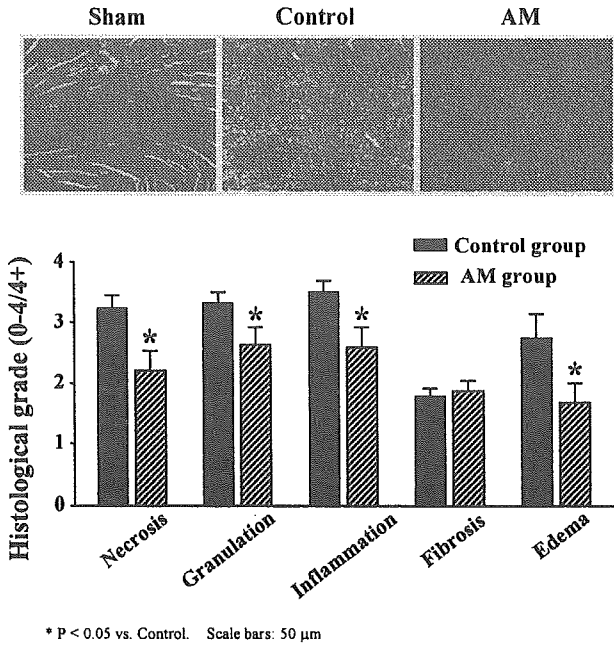
### B. 研究方法

10 週齢雄 Lewis ラットの足底部にブタミオシンを注射し、自己免疫性急性心筋炎モデルを作製した。ミオシン注射 1 週後より浸透圧ポンプを用い、AM の持続投与を 2 週間行った後、心内圧測定・心エコー検査による心機能評価、組織学的解析、血中・心筋組織中の macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) レベルの測定を行い、心筋炎に対する AM の治療効果について検討を行った。

### C. 研究結果

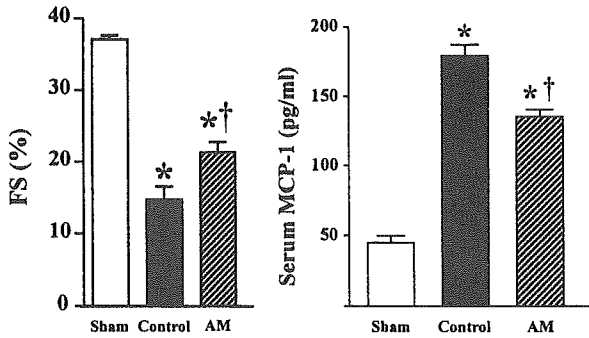
ブタミオシン注射により誘導されたラット急性心筋炎モデルの心筋組織においては、炎症細胞浸潤・浮腫等を認め、心筋収縮性の低下、血中および心筋組織中の MCP-1 の上昇を認めた。AM 投与は心筋組織への炎症細胞浸潤・浮腫等を著明に抑制し (図1)、また LV systolic pressure、maximum dP/dt、fractional shortening 等で示される心筋収縮性の指標を有意に改善した (図2)。血中および心筋組織中の MCP-1 レベルは AM 投与により有意に低下した (図3)。心筋組織中の毛細血管密度は AM 投与により有意に増加した (図4)。

(図1)



(図2)

(図3)



(図4)

\* P < 0.05 vs. Sham † P < 0.05 vs. Control.

#### D. 考察

以上の結果より、AM 投与が急性心筋炎モデルにおいても心筋保護的に作用し、心筋炎の進展を抑制し、心機能を改善することが明らかとなった。AM による心筋組織における抗炎症作用の少なくとも一部は MCP-1 の発現抑制作用を介するものと考えられた。また AM による血管新生促進作用も心筋炎における AM の心筋保護作用の機序の一部に関与していると考えられた。前述のごとく我々は虚血心における AM の心筋保護作用について既に報告した。AM によるこれらの心筋保護作用の機序に関しては、今回の研究で明らかにした①抗炎症作用、②血管新生促進作用の他に、③心筋細胞に対する抗アポトーシス作用、④酸化ストレス抑制作用、⑤心肥大・線維化抑制作用、⑥アルドステロン産生抑制作用等が証明されており、心筋保護の機序に関与しているものと考えられる。我々は、このような基礎的研究で得た研究成果を踏まえ、今後臨床応用を目指し、臨床試験を行う予定である。これまでに我々は NYHA III または IV 度のうっ血性心不全患者を対象にした臨床試験において AM 投与が心不全患者の心機能を改善することを証明した(Nagaya N, et al. Circulation 2000;101:498-503)。今後は急性心筋炎をベースにした心不全患者についても前臨床試験、臨床試験の実施を予定している。

#### E. 結論

ラット急性心筋炎モデルにおいて心筋炎急性期に AM を投与すると、心筋組織への炎症細胞浸潤・浮腫等が抑制され、心機能が改善することが明らかとなった。AM が、心不全治療薬としてのみならず、心筋炎における心筋保護薬としての可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hanabusa K, Nagaya N, Iwase T, Itoh T, Murakami S, Shimizu Z, Taki W, Miyatake K, Kangawa K. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats. *Stroke* 2005;36:853-858.
- 2) Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura S. Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288:R1432-R1437.
- 3) Fujii T, Nagaya N, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Nishigami K, Ishibashi-Ueda H, Shirai M, Itoh T, Ishino K, Sano S, Kangawa K, Mori H. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H1444-H1450.
- 4) Murakami S, Nagaya N, Itoh T, Iwase T, Fujisato T, Nishioka K, Hamada K, Kangawa K, Kimura H. Adrenomedullin regenerates alveoli and vasculature in elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:581-589.
- 5) Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K. Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation* 2005;11:356-362.

### 2. 学会発表

- 1) Ishimura K, Nishikimi T, Ishikawa Y, Mori Y, Tadokoro K, Koshikawa S, Kangawa K, Matsuoka H. Chronic administration of combined vasopeptidase inhibition and adrenomedullin has renoprotective effects in Dahl salt-sensitive rat via inhibition of oxidative stress. 第69回日本循環器学会学術総会、2005、横浜
- 2) Iwashima Y, Horio T, Suzuki Y, Kihara S, Rakugi

H, Kangawa K, Funahashi T, Ogihara T, Kawano Y. Plasma adiponectin and adrenomedullin levels in peripheral arterial occlusive disease. 第69回日本循環器学会学術総会、2005、横浜

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

### 1. 特許取得

特願 2005-036419

特願 2005-062951

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他



## 分担研究報告書

### 急性心筋梗塞患者における ProGEAR 研究登録対象者に関する研究

分担研究者 宮崎俊一 国立循環器病センター心臓内科 医長  
研究協力者 川村 淳 国立循環器病センター心臓内科 医員

#### 研究要旨

アドレノメデュリンは、抗炎症作用・抗アポトーシス作用、血管新生作用などから心筋保護的薬剤として臨床への応用が期待されている。これらの作用は急性心筋梗塞症に対する急性期治療として好都合であることから、再灌流療法適応例において有用性が十分に期待できる。昨年度に引き続いて、アドレノメデュリンの経静脈的投与の安全性について検討した。

#### A. 研究目的

生体内生理活性物質であるアドレノメデュリンの経静脈的投与の安全性について検討すること。

#### B. 研究方法

急性心筋梗塞 7 例に対して再灌流療法に先行してアドレノメデュリン(0.025  $\mu$ g/kg/min)の静脈内投与を開始以後 12 時間継続した。昨年はこの投与量で右室梗塞の 1 例で血圧低下が生じ、最低 70mmHg 程度の最低値まで達したことから本年度の 4 例は 0.025  $\mu$ g/kg/min で 3 時間投与した後に半量の 0.0125  $\mu$ g/kg/min とするよう工夫した。これにより過度の低血圧を生じる症例は亡くなっている。昨年報告したように梗塞部壁運動(短縮率)は約 2%程度の改善が認められている。

(倫理面での配慮) 本研究は外部の安全評価委員会によって研究実施の妥当性が適宜

検討されている。昨年来 2 回の検討会が開かれている。

#### C. 研究結果

現在のところ、11 例の症例登録があるが慢性期の追跡データが欠損しており最終データは得られていない。7 例での集計では再灌流までの時間は平均 3.0 時間、CPK 最高値は 4090 U/L で、梗塞部壁運動(短縮率)は前: 0.82 $\pm$ 0.64%から後: 2.13 $\pm$ 0.98%へ改善している。脳性ナトリウム利尿ペプチドは慢性期に低下を示している(発症 3 日:187, 1 ヶ月:134, 3 ヶ月:103pg/mL)。

#### D. 考察

現時点ではアドレノメデュリンの再灌流療法施行前投与は右室梗塞例に置いて過度の低血圧が見られた点を除けば、めだつた副作用はないように思われた。ただし、11 例目の症例が急性心筋梗塞に伴う左室自由壁

破裂のために死亡したので、アドレノメデュリンとの因果関係を安全評価委員会において審議中である。

#### E. 結論

アドレノメデュリンの心筋保護効果については今後の多数例での検討を待たねばならないが、安全性の面では血管拡張作用による血圧低下に注意が必要である。11例目の症例が左室自由壁破裂のために死亡したが、血管拡張作用を有するアドレノメデュリンは心破裂に対しても防御的に作用すると考えられるので、本例は血管拡張を上回る左室壁の急速な菲薄が原因と思われるが、現在、安全評価委員会においてさらなる詳細な検討が行われている。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Y. Asami, S. Yasuda, I. Morii, H Kakuchi, Y. Otsuka, A. Kawamura, Y. Sasako, T. Nakatani, H. Nonogi, and S. Miyazaki. Favourable clinical outcome in patients with cardiogenic shock due to fulminant myocarditis supported by percutaneous extracorporeal membrane oxygenation. *Eur Heart J* 26:2185-2192, 2005.

##### 2. 学会発表

Y. Kataoka, S. Yasuda, M Takeno, S. Miyamoto, I. Morii, A. Kawamura, and S. Miyazaki. An association between

proteinuria and coronary atherosclerosis in patients with abnormal glucose tolerance. *J Am Coll Cardiol* 45:434A, 2005. (Abstract)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金 (H16-トランス-008 研究事業)  
分担研究報告書

脳梗塞既往患者に対するアドレノメデュリン長時間投与による循環動態と各種液性因子の変化  
分担研究者 北村和雄 宮崎大学医学部第一内科教授

研究要旨: アドレノメデュリン(AM)を循環器疾患治療薬として臨床応用する前段階として、陳旧性脳梗塞患者を対象に AM を 27 時間持続投与し、安定した血圧低下と動脈コンプライアンス改善を得た。血中アルドステロンは低下したが、ANP、BNP は上昇した。脳血流・代謝への悪影響はなく、脳血管障害患者への投与は安全と判断した。

A. 研究目的

アドレノメデュリン(AM)は種々の虚血性疾患において臓器保護的に作用すると考えられている。ヒトにおける AM 長時間投与の報告はほとんどなく、臨床応用に際し、AM 長時間投与の影響を検討することは必須である。本研究では軽症の脳梗塞既往者に対し、AM 長時間投与を行い、脳血流、代謝を含む血行動態、各種液性因子の変化を検討した。

B. 研究方法

微小梗塞ないしラクナ梗塞を有する男性 9 名 (65.2±2.5 歳)を対象とした。当科入院管理下に、頭部 MRI、頸部エコー、脳血流シンチ、FDG による脳代謝 PET および各種スクリーニング検査を実施した。入院 3 日目の午後 2 時より化学合成 AM (15 ng/kg/min)を 27 時間持続投与し、3、18、27 時間後と投与中止 15 時間後に血行動態、各種液性因子の検討を行った。また、AM 投与 20 時間以降に脳血流シンチ、FDG による脳代謝 PET を再検した。

(倫理面への配慮)

事前に当大学の倫理委員会の承諾を得ており、患者には文書による十分な説明を行い、承諾書を得た。

C. 研究結果

AM 投与により血圧は低下し、心拍数は上昇したが、試験期間を通じて血行動態は安定しており、副作用はみられなかった。脈波伝播速度(PWV)、Augmentation Index (AI)、頸動脈弾性特性といった動脈コンプライアンスの指標が低下(改善)した。

脳血流、脳代謝に対する影響は軽微であり、神経症状などはみられなかった。液性因子では、血漿レニン活性は有意に上昇したが、アルドステロン濃度は全例で低下した。ANP、BNP 濃度は上昇した。

D. 考察

ヒトに対して AM 長時間投与は、安定した血圧低下と動脈コンプライアンスの改善をもたらすことが確認された。血圧低下にもかかわらず、脳血流への影響は軽微であり、脳血管障害患者への臨床応用の安全性は高いと考えられた。

E. 結論

AM 長時間投与試験において、AM の脳血流・代謝への悪影響はなく、脳血管障害患者への AM 投与は安全と判断した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

北俊弘、長町茂樹、西井龍一、江藤胤尚、北村和雄：脳梗塞既往者に対する長時間投与で明らかとなったアドレノメデュリンの多彩な作用. 第 28 回日本高血圧学会総会、2005 年 9 月 (旭川)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 (別紙 4 へ記載)
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働科学研究費補助金(基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)

平成 17 年度分担研究報告書

アドレノメデュリンの虚血脳保護再生作用と脳血管疾患への応用に関する研究

分担研究者： 中尾 一和 (京都大学大学院医学研究科 教授)

我々はこれまで、アドレノメデュリン (AM) が血管トーンス及びリモデリング制御に加え、傷害内皮再生、更に血管再生作用を発揮することを報告した。昨年度の本研究課題において我々は、発生工学的手法を用い、ヒトへの AM 投与で得られる血中濃度に匹敵する血中濃度の上昇を認める 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。更に、AM-Tg に脳梗塞モデルを作成し、AM の血管再生促進に加え、ニューロンのアポトーシス抑制と再生促進作用による血管神経保護再生作用を明らかにした。一方我々は、全能性と無限の増殖能を有するマウス、サル更にヒト ES 細胞より、内皮細胞と血管平滑筋細胞の双方に分化する血管前駆細胞 (Vascular progenitor cells; VPC) を同定した。そこで本年度は、AM-Tg を用いて下肢虚血モデルにおいて、ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞および同細胞より分化させた血管構成細胞移植による血管再生における AM の治療促進効果を検討した。その結果、AM はヒト ES 細胞由来 VPC から血管内皮細胞への分化を促進し、VPC 移植による血管再生を有意に増強することが明らかとなり、血管前駆細胞移植による血管再生医療における VPC の有用性が示された。

A. 研究目的

我々はこれまで、アドレノメデュリン (AM) が血管トーンス及びリモデリング制御に加え、cAMP カスケード及び  $PI_3$  キナーゼ/Akt カスケードを活性化し、傷害内皮再生、更に血管再生作用を発揮することを *in vitro* 及び *in vivo* で報告した。昨年度の本研究課題において我々は、発生工学的手法を用いヒトへの AM の投与により得られる血中濃度と同等の血中濃度の上昇を認める AM トランスジェニックマウス (AM-Tg) を開発し、同モデル動物に中大脳動脈 20 分閉塞脳梗塞を作成し、AM の虚血脳の保護再生作用を検討した。その結果、対照マウスと比較し有意の梗塞域およびグリオーシスの

抑制と、神経機能の回復が認められた。AM の血管再生促進に加え、内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells; EPC) 動員促進、炎症細胞浸潤抑制、ニューロンのアポトーシス抑制と再生促進作用による血管神経保護再生作用を生体において明らかにした。一方我々は、全能性と無限の増殖能を有するマウス、サル更にヒト ES 細胞より、内皮細胞と血管平滑筋細胞の双方に分化する血管前駆細胞 (Vascular progenitor cells; VPC) を同定した。ヒト ES 細胞由来 VPC は、TRA-1 (未分化マーカー) 陰性 VEGFR-2 陽性 VE カドヘリン陰性 PDGF 受容体陽性細胞分画であった。そこで本年度は、AM-Tg を用いて下肢虚血血管再生モデルにおいて、ヒト ES 細胞

由来血管前駆細胞および同細胞より分化させた血管構成細胞（内皮細胞および血管平滑筋細胞）移植における AM の治療促進効果を検討した。

## B. 研究方法

### ①細胞移植とその評価

AM 遺伝子の PAMP コード領域 3' 端アミド化シグナルのグアニンをシトシンに塩基置換することで、PAMP 生理活性発現に必須であるアミド化を阻害した変異型 AM 遺伝子を作成し、SAP プロモーターと結合してトランスジーンを作成し、肝臓から AM のみを単独で過剰産生する AM-Tg マウスを用いた。12 週齢の AM-Tg および野生型マウス (WT) を用い、我々が既に報告した大腿動脈結紮下肢虚血モデルを作成した。大腿動脈結紮直前に生食 (PBS) 100  $\mu$ l に溶解したヒト ES 細胞由来細胞を  $5 \times 10^5$  個動脈内投与した。免疫的拒絶反応を抑制する目的で、術前 2 日前より術後連日サイクロスポリン A 10mg/kg を投与した。レーザードップラーを用い、局所血流量を測定し、健常な反対側血流量との比を計算した。また、ヒトおよびマウス PECAM-1 染色にてヒトおよびマウス内皮細胞数を計測し、毛細血管密度を評価した。

### ②ヒト ES 細胞由来血管細胞の調整

オーストラリア Monash 大学にて樹立されたヒト ES 細胞株 (hES-3) を OP9 ストローマ細胞上で 9 日間培養した。その細胞 TRA-1 陰性 VEGFR2 陽性細胞が全体の 19.4% 出現した。我々は、この細胞分画が内皮細胞および血管平滑筋細胞の双方に分化可能な VPC であることを明らかにした。

この VPC 分画を FACS にてソートし、4 型コーゲンコートディッシュ上に播種し、VEGF50ng/ml、10%血清下に 3 継代培養を続けた。

このようにして得られた細胞は、PECAM-1 陽性内皮細胞および  $\alpha$  平滑筋アクチン陽性血管平滑筋細胞の 2 種類の細胞より構成されていた。この 2 種類の血管細胞の混合物を VPC 由来血管細胞 (VPC-derived vascular cells; VPC-VC) とした。

細胞移植群は以下の 6 群とした。

- ①野生型マウス；生食投与群：WT+PBS
- ②AM-Tg；生食投与群：Tg+PBS
- ③野生型マウス；VPC-VC 移植群：WT+VPC-VC
- ④AM-Tg；VPC-VC 移植群：Tg+VPC-VC
- ⑤野生型マウス；VPC 移植群：WT+VPC
- ⑥AM-Tg；VPC 移植群：Tg+VPC

## C. 研究結果

細胞移植後 28 日間の下肢血流量を経時的に計測した結果、AM-Tg (Tg+PBS) は野生型マウス (WT+PBS) に比べ術後 10 日目より有意の血流増加を認めた。VPC-VC 移植群は、野生型マウスおよび AM-Tg はほぼ同程度 WT+PBS に比べ有意血流の増加を認め、Tg+PBS と比べ高値の傾向を示した。一方、VPC を野生型マウスに移植しても、有意の血流増加は認められなかった。しかしながら、VPC を AM-Tg に移植した群では、6 群中最も高い血流量を示した。

術後 22 日目の反対側に対する血流量の比 (%) の平均値は以下の通りであった。①WT+PBS；53 ②Tg+PBS；77 ③WT+VPC-VC；98 ④Tg+VPC-VC；99 ⑤WT+VPC；60 ⑥Tg+VPC；110

マウス内皮細胞数は、AM-Tg (Tg+PBS、Tg+VPC-VC、Tg+VPC) において野生型マウスに比べ有意に高値を示した。一方、VPC-VC 移植群において、ヒト内皮細胞は新生血管に認められた。VPC 移植群では野生型マウスに比べ AM-Tg において、より多くのヒト内皮細胞の生着を認めた。

一方、in vitro においても、ヒト ES 細胞由

来 VPC に VEGF100ng/ml 存在下に AM を添加したところ用量依存性に AM は VPC より内皮細胞への分化を促進した。

#### D. 考察

本年度の研究において、AM がヒト ES 細胞由来 VPC から内皮細胞への分化を促進することが明らかとなった。一方、ヒト ES 細胞由来 VPC より適切な分化段階まで分化誘導した血管構成細胞（内皮細胞および血管平滑筋細胞）は、生体移植により血管再生に寄与することも示された。AM は、生体においてもヒト ES 細胞由来 VPC より内皮細胞への分化を促進し、VPC 移植による血管再生を促進することが明らかとなり、AM 投与とヒト ES 細胞由来 VPC 移植の両者の併用がより有効な治療効果を生む可能性が示唆された。

#### E. 結論

血管の前駆細胞移植による血管再生療法において、AM 投与がその治療効率を増強する可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. H. Ariyasu, K. Takaya, H. Iwakura, H. Hosoda, T. Akamizu, Y. Arai, K. Kangawa, and K. Nakao. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology* 146: 355-364, 2005.

2. T. Suganami, M. Mukoyama, K. Mori, H. Yokoi, M. Koshikawa, K. Sawai, S. Hidaka, K. Ebihara,

T Tanaka, A. Sugawara, H. Kawachi, C. Vinson, Y. Ogawa, and K. Nakao.

Prevention and reversal of renal injury by leptin in a new mouse model of diabetic nephropathy.

*FASEB J.* 19: 127-129, 2005.

3. N. Takahashi, Y. Saito, K. Kuwahara, M. Harada, K. Tanimoto, Y. Nakagawa, R. Kawakami, M. Nakanishi, S. Yasuno, S. Usami, A. Yoshimura, and K. Nakao.

Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes.

*J.Mol.Cell.Cardiol.* 38: 185-192, 2005.

4. A. Ozasa, Y. Komatsu, A. Yasoda, M. Miura, Y. Nakatsuru, Y. Sakuma, H. Arai, N. Itoh, and K. Nakao.

Complementary antagonistic actions between C-type natriuretic peptide and MAPK pathway through FGFR-3 in ATDC5 cells.

*Bone* 36: 1056-1064, 2005.

5. 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, and K. Nakao.

Analysis of rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagon promoter-ghrelin transgenic mice.

*J.Biol.Chem.* 280: 15247-15256, 2005.

6. M. Nakanishi, Y. Saito, I. Kishimoto, M. Harada, K. Kuwahara, N. Takahashi, R. Kawakami,

- Y. Nakagawa, K. Tanimoto, S. Yasuno, S. Usami, Y. Li, Y. Adachi, A. Fukamizu, D. L. Garbers, and K. Nakao.  
Role of natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A in myocardial infarction evaluated using genetically engineered mice.  
*Hypertension* 46: 441-447, 2005.
7. T. Tanaka, S. Hidaka, H. Masuzaki, S. Yasue, Y. Minokoshi, K. Ebihara, H. Chusho, Y. Ogawa, T. Toyoda, K. Sato, F. Miyanaga, M. Fujimoto, T. Tomita, T. Kusakabe, N. Kobayashi, H. Tanioka, T. Hayashi, K. Hosoda, H. Yoshimatsu, T. Sakata, and K. Nakao.  
Skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation parallels metabolic phenotype in leptin transgenic mice under dietary modification.  
*Diabetes* 54: 2365-2374, 2005.
8. 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, and K. Nakao.  
Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxysome proliferators-activated receptor  $\gamma$  for monocyte recruitment and endothelial regeneration.  
*Eur. J. Pharmacol.* 508: 255-265, 2005.
9. 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, and 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.
10. K. Hamada, T. Sasaki, P-A. Koni, M. Natsui, H. Kishimoto, J. Sasaki, N. Yajima, Y. Horie, G. Hasegawa, M. Naito, J. Miyazaki, T. Suda, H. Itoh, K. Nakao, T-W. Mak, T. Nakano, and A. Suzuki.  
The PTEN/PI3K pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis.  
*Genes Dev.* 19: 2054-2065, 2005.
11. M. Koshikawa, M. Mukoyama, K. Mori, T. Suganami, K. Sawai, T. Yoshioka, T. Nagae, H. Yokoi, H. Kawachi, F. Shimizu, A. Sugawara, and K. Nakao.  
Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental nephritic syndrome.  
*J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 2690-2701, 2005.
12. T. Tanaka, H. Masuzaki, K. Ebihara, Y. Ogawa, S. Yasue, H. Yukioka, H. Chusho, F. Miyanaga, T. Miyazawa, M. Fujimoto, T. Kusakabe, N. Kobayashi, T. Hayashi, K. Hosoda, and K. Nakao.  
Transgenic expression of mutant peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in liver precipitates fasting-induced steatosis but protects against high-fat diet-induced steatosis in mice.  
*Metabolism* 54: 1490-1498, 2005.

13. T. Tomita, H. Masuzaki, M. Noguchi, H. Iwakura, J. Fujikura, T. Tanaka, K. Ebihara, J. Kawamura, I. Komoto, Y. Kawaguchi, K. Fujimoto, R. Doi, Y. Shimada, K. Hosoda, M. Imamura, and K. Nakao.  
GPR40 gene expression in human pancreas and insulinoma.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 338: 1788-1790, 2005.
14. T. Nambu, H. Arai, Y. Komatsu, A. Yasoda, K. Moriyama, N. Kanamoto, H. Itoh, and K. Nakao.  
Expression of the adrenomedullin gene in adipose tissue.  
Regul. Pept. 132: 17-22, 2005.
15. K. Miyashita, H. Itoh, H. Arai, T. Suganami, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi-Kobayashi, K. Park, N. Oyamada, N. Sawada, D. Taura, H. Tsujimoto, T-H. Chao, N. Tamura, M. Mukoyama, and K. Nakao.  
The neuro-protective and vasculo-neuro-regenerative roles of adrenomedullin in ischemic brain and its therapeutic potential.  
Endocrinology in press 2005.
16. J. Fujikura, K. Hosoda, H. Iwakura, T. Tomita, M. Noguchi, H. Masuzaki, K. Tanigaki, D. Yabe, T. Honjo, and K. Nakao.  
Notch/Rbp-j signaling prevents premature endocrine and ductal cell differentiation in the pancreas.  
Cell Metab. 3:59-65, 2006.
17. T. Tomita, H. Masuzaki, M. Noguchi, H. Iwakura, J. Fujikura, T. Tanaka, K. Ebihara, J. Kawamura, I. Komoto, Y. Kawaguchi, K. Fujimoto, R. Doi, Y. Shimada, K. Hosoda, M. Imamura, and K. Nakao.  
Gene expression of a membrane-bound fatty acid receptor, GPR40, in Pancreas and Islet Cell Tumors in humans - Evidence for GPR40 expression in pancreatic beta cells and its implication in insulin secretion in humans -.  
Diabetologia in press.
1. 学会発表  
国内学会
1. 伊藤 裕  
シンポジウム「心脈管の再生・遺伝子治療」オーガナイザー  
第34回日本心脈管作動物質学会  
2005. 2. 4 (京都市)
2. 伊藤 裕  
メタボリックドミノと心血管内分泌代謝学  
千里ライフサイエンスセミナー ～動脈硬化最前線 in メタボリックシンドローム～  
—異なった側面よりの病態解明と治療法の開発—  
2005. 2. 18 (豊中市)
3. 伊藤 裕  
血管再生療法  
第39回糖尿病学の進歩 シンポジウム  
「心血管疾患の進展阻止を目指して：適切な治療法選択のポイント」  
2005. 2. 18-19 (仙台)
4. 宮下和季、伊藤 裕、荒井宏司、向山政



- 志、菅波孝祥、曾根正勝、山原研一、朴貴典、中尾一和  
 アドレノメデュリンの虚血脳における血管神経再生作用の検討  
 第4回日本再生医療学会総会  
 2005. 3. 1-2 (大阪)
5. Masakatsu Sone, Hiroshi Itoh, Jun Yamashita, Kenichi Yamahara, Takami Yurugi-Kobayashi, Yutaka Suzuki, Naoki Sawada, Yasutomo Fukunaga, Kazutoshi Miyashita, Kwijun Park, Naofumi Oyamada, Naoya Sawada, Yasushi Kondo, Shinji Nito, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Shin-Ichi Nishikawa, Kazuwa Nakao.  
 Identification of vascular progenitor cells from human embryonic stem cells and their application to vascular regeneration therapy.  
 The 69<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society / YIA  
 2005. 3. 19-21, 2005 (Yokohama)
6. Kenichi Yamahara, Masakatsu Sone, Hiroshi Itoh, Jun Yamashita, Takami Yurugi-Kobayashi, Kazutoshi Miyashita, Kwijun Park, Naofumi Oyamada, Naoya Sawada, Kazuwa Nakao.  
 Synergistic augmentation of neovascularization by transplantation of human ES cells-derived endothelial cells and mural cells—approach towards hybrid stem cell therapy.  
 The 69<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society / YIA  
 2005. 3. 19-21, 2005 (Yokohama)
7. 朴 貴典、伊藤 裕、山原研一、曾根正勝、宮下和季、小山田尚史、澤田直哉、田村尚久、中尾一和  
 末梢動脈閉塞性疾患に対するナトリウム利尿ペプチドの治療応用  
 第78回日本内分泌学会学術総会  
 2005. 7. 1-3 (東京都)
8. Ting-Hsing Chao、伊藤 裕、曾根正勝、山原研一、宮下和季、朴 貴典、澤田直哉、小山田尚史、辻本浩一、中尾一和  
 Potentiation of endothelial differentiation of embryonic stem cells-derived vascular progenitor cells by adipocytes  
 第78回日本内分泌学会学術総会  
 2005. 7. 1-3 (東京都)
9. 澤田直哉、伊藤 裕、曾根正勝、山原研一、宮下和季、朴 貴典、小山田尚史、中尾一和  
 マウス ES 細胞の2次元培養による脂肪細胞発生分化系の開発  
 第78回日本内分泌学会学術総会  
 2005. 7. 1-3 (東京都)
10. 宮下和季、伊藤 裕、山原研一、曾根正勝、朴 貴典、小山田尚史、澤田直哉、田浦大輔、田村尚久、中尾一和  
 1mg デキサメサゾン抑制下迅速 ACTH 負荷試験によるアルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症の鑑別

- 第78回日本内分泌学会学術総会  
2005.7.1-3 (東京都)
11. 宮下和季、伊藤 裕、荒井宏司、向山政志、菅波孝祥、曾根正勝、山原研一、小林貴美、朴 貴典、小山田尚史、澤田直哉、田浦大輔、田村尚久、中尾一和  
虚血脳におけるアドレノメデュリンによる血管、神経再生機序の検討  
第78回日本内分泌学会学術総会  
2005.7.1-3 (東京都)
12. 小山田尚史、伊藤 裕、曾根正勝、山原研一、宮下和季、朴 貴典、澤田直哉、中尾一和  
脳梗塞モデルにおけるヒトES細胞由来血管前駆細胞移植効果の検討  
第37回日本動脈硬化学会総会  
2005.7.14-15 (東京都)
13. 伊藤 裕  
再生医療におけるヒトES細胞を用いたトランスレーショナルリサーチ  
第42回日本臨床分子医学会学術集会  
2005.7.22-23 (京都)
14. 宮下和季、伊藤 裕、荒井宏司、菅波孝祥、曾根正勝、山原研一、小林(万木)貴美、朴 貴典、向山政志、中尾一和  
アドレノメデュリンの血管-神経再生作用と虚血脳再生医療への応用  
第42回日本臨床分子医学会学術集会  
2005.7.22-23 (京都)
15. 朴 貴典、伊藤 裕、山原研一、曾根正勝、小山田尚史、田浦大輔、田村尚久、中尾一和  
ナトリウム利尿ペプチドの末梢動脈閉塞性疾患に対する治療効果の検討  
第42回日本臨床分子医学会学術集会  
2005.7.22-23 (京都)
16. 小山田尚史、伊藤 裕、曾根正勝、山原研一、宮下和季、朴 貴典、澤田直哉、田浦大輔、中尾一和  
ヒトES細胞由来血管前駆細胞の虚血脳保護、再生医療への応用  
第42回日本臨床分子医学会学術集会  
2005.7.22-23 (京都)
17. 小山田尚史、伊藤 裕、曾根正勝、山原研一、宮下和季、朴 貴典、澤田直哉、田浦大輔、辻本浩一、野々口あかね、中尾一和  
ヒトES細胞由来血管前駆細胞の虚血脳保護、再生療法への応用  
第28回日本高血圧学会総会  
2005.9.15-17 (旭川市)
18. Ting-Hsing Chao, Hiroshi Itoh, Kenichi Yamahara, Masakatsu Sone, Kazutoshi Miyashita, Kwijun Park, Naofumi Oyamada, Naoya Sawada, Daisuke Taura, Hirokazu Tsujimoto, Akane Nonoguchi, Kazuwa Nakao.  
Augmented vascular regeneration by transplanted human stem cell-derived vascular progenitor cells with adrenomedullin.  
The 7<sup>th</sup> Japan-China Joint Hypertension Symposium / International Session of the 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese

Society of Hypertension

2005. 9. 16 (旭川市)

19. 朴 貴典、伊藤 裕、山原研一、曾根正勝、宮下和季、小山田尚史、澤田直哉、田浦大輔、田村尚久、中尾一和  
末梢動脈閉塞性疾患に対するナトリウム利尿ペプチドの治療効果  
第 20 回日本糖尿病合併症学会 (ワークショップ 末梢血管障害)  
2005. 10. 7-8 (東京都)

20. Chao Ting-Hsing、伊藤 裕、山原研一、曾根正勝、宮下和季、朴 貴典、小山田尚史、澤田直哉、田浦大輔、中尾一和  
Augmented vascular regeneration by transplanted human stem cell-derived vascular progenitor cells with adrenomedullin  
第 9 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会  
2005. 11. 18-19 (東京)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 脂肪由来前駆細胞による肺高血圧治療

分担研究者 永谷 憲歳 国立循環器病センター研究所先進医工学センター再生医療部 部長

研究要旨 アドレノメデュリン（AM）や血管内皮増殖因子（VEGF）を添加培養することによって脂肪由来前駆細胞の血管内皮への分化誘導法を開発し、その作用がPI3Kの活性化を介していることを示した。また、ラット肺高血圧モデルへの経静脈的細胞移植治療は血行動態、肺動脈肥厚や生存率を改善させた。この作用は移植細胞の血管再生能のみでなく、血管新生因子のパラクライン効果によるものと考えられた。AMとVEGFで分化誘導した脂肪間質由来前駆細胞の移植は新たな肺高血圧治療として有用である。

### A. 研究目的

近年、脂肪組織由来の幹細胞（脂肪由来前駆細胞）が新たな再生医療材料として注目されつつある。また、AMやVEGFは血管新生を誘導することが報告されている。そこで、AMとVEGFを用いた脂肪由来前駆細胞の血管内皮への分化誘導法を検討し、さらにこれをラット肺高血圧モデルへ移植し血管再生による治療効果を検討した。

### B. 研究方法

ラットの腹部皮下脂肪組織から脂肪由来前駆細胞を単離し、通常の培養液にAM ( $10^{-7}$  M) とVEGF (20ng/ml) を添加、FACSにて血管内皮特異的マーカー (CD31、VE-cadherin) や前駆細胞マーカー (CD34、CD45) の発現を検討した。さらに、マトリゲル上での培養にて血管形成能を、脂肪分化誘導を行い成熟脂肪細胞への分化能を評価した。また培養細胞からの血管新生因子 (VEGF、AM、Hepatocyte growth factor ; HGF) の分泌をELISA法で検討した。

雄性 Wistar ラットにモノクロタリン (MCT、60mg/kg) を皮下投与 3 日後に、AM と VEGF を 3

週間作用させた脂肪由来前駆細胞を経静脈的に移植 ( $1.5 \times 10^6$ /body) した。その3週間後に血行動態、右心重量比を評価し、6週間の生存率も評価した。また、肺組織中の肺動脈肥厚や毛細管密度の測定、PKH染色移植細胞の局在を解析し効果発現機序について考察した。

### C. 研究結果

脂肪由来前駆細胞はAMとVEGF添加培養にて血管内皮細胞様の数石状形態を呈し、また血管内皮特異的マーカーを発現する細胞の割合が経時的に増加した (図1)。このマーカーの発現はAMとVEGFの作用経路であるPI3K阻害により抑えられた。さらにマトリゲル内での血管形成能もAMとVEGF添加によって有意に増強され、通常の培養液にて培養された脂肪由来前駆細胞は脂肪分化誘導条件下で多くの細胞が脂肪細胞へ分化したが、AMとVEGF添加培養された細胞は脂肪細胞への分化が有意に減少した。また、AMとVEGFを添加培養した細胞はVEGF、AMやHGFなどの血管新生因子を多く分泌していた。