

厚生労働科学研究研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

ヒト心筋・骨格筋からの心筋幹細胞株の樹立と末期的心不全への幹細胞移植医療実現化へ向けての研究基盤形成に関する研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 松原 弘明

平成18（2006）年4月8日

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告

ヒト心筋・骨格筋からの心筋幹細胞株の樹立と末期的心不全への幹細胞移植医療
実現化へ向けての研究基盤形成に関する研究 -

松原 弘明----- 3

II. 分担研究報告

1. ヒト心筋・骨格筋からの心筋幹細胞株の分離に関する研究

王 英正----- 8

2. 細胞移植と遺伝子治療による機能的血管新生療法の開発に関する研究

室原 豊明 ----- 11

3. 心筋幹細胞移植実現化へ向けての最適な血管新生療法探索研究に関する研究

尾池 雄----- 16

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 19

IV. 研究成果の刊行物・別刷----- 23

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

ヒト心筋・骨格筋からの心筋幹細胞株の樹立と末期的心不全への幹細胞移植医療実現化へ向けての研究基盤形成に関する研究

（主任）研究者 松原 弘明 京都府立医科大学医学研究科教授

研究要旨

国民死亡の 30%以上は心不全である。重症心不全への心臓移植事業はドナー不足のため十分に機能せず、これを打開するのが心筋再生医療である。ヒト心筋やヒト骨格筋から心筋幹細胞を分離し、細胞移植によって末期的心不全の患者さんを救済する革命的医療の確立を事業目的とする。

A. 研究目的

ヒト心臓組織やヒト骨格筋より心筋幹細胞を単離・増殖させ、アロ移植用細胞株の樹立し、心臓移植が必要な末期的心不全患者さん心筋に移植する。世界で初めての心筋細胞移植医療の実現化に向け、大動物を使用した前臨床試験及び心筋再生臨床試験を実施する。

B. 研究方法

1) ヒト心筋・骨格筋から心筋幹細胞クローン化とアロ移植細胞株の樹立、大動物移植実験の実施：研究代表者らはヒト心筋および骨格筋から心臓幹細胞の単クローン化増殖・増幅に成功している。小動物移植実験は終了しているので、大動物（ブタ）を用いた前臨床試験を実施する。ヒト心臓

組織は開心術中の心房、ヒト骨格筋は下肢切断肢より約5-10g採取する。コラゲナーゼ処理による分離後、我々が独自に開発した、単一細胞無血清浮遊系システムでスフェアを形成した幹細胞群を再度酵素処理にて分離し、我々が発見した心筋特異的分化誘導培養液にて大量に増幅させる。ブタ冠動脈を遮断・再開通させ虚血心筋モデルを作成し、1月後に心筋幹細胞を生体吸収hydrogelとともに心筋内に移植する。血管造影・エコーにて移植後の心機能を評価する。

（京都府立医大、京都大学）

2) 血管新生能力の最も高い血管系幹細胞ソースの探索：最も患者負担が少なく有効な血管新生療法を現在実施されている血管再生医療（骨髄細胞、末梢血単核球、FGFビーズ、G-CSF）から比較検討し心筋幹細胞

と同時投与する。(京都府立医大、名古屋大学、慶應大学) 3) 臨床試験プロトコール作成と第1相臨床試験：大動物前臨床試験の成績をもとに第1相臨床試験プロトコールは京大探索医療センター検証部で作成する。心臓移植ドナー待ち、あるいは他に治療法のない末期的心不全(虚血性心臓病または拡張型心筋症)を対象に、心筋幹細胞を移植する心筋再生医療の第1相臨床試験を開始する。

(倫理面への配慮)

1) 前臨床試験の有効性・安全性評価、臨床試験プロトコールはTR実施に当たっての共通倫理審査指針に沿って京都大学探索医療センター検証部で作成する。患者さんに対する治療前の説明と理解を得て、またプライバシーの保護を第一とし治療経過はすべて情報公開にする。移植細胞および臨床試験は厚生労働省よりの「幹細胞の臨床応用についての治療指針」、医薬品GCP、臨床研究倫理指針(厚生労働省告示第255号)を遵守する。

2) 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。基礎的研究においては、遺伝子改変マウス、プラスミドDNAを用いる場合は仕様に際しては、遺伝子組み換え生物などの使用等の規則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。

C. 研究結果

末期の重症心不全症例に対する心臓移植療法は、国内外を問わず深刻なドナー不

足によってその遂行が極めて困難で、現在の再生医学技術では心移植待機中の重症拡張型心筋症に対して有効な治療法はなく、迅速に新たな救命法の実現に向けた革新的な研究が極めて重要である。

骨髄由来の造血幹細胞では治療的有効に心筋細胞に分化し得ないことが科学的に証明された今、新たな幹細胞ソースの探求が当プロジェクトの使命である。我々は、近年世界に先駆けてヒトを含めた哺乳類の心臓及び骨格筋組織内より高率に心筋細胞に分化する能力を持った心筋幹細胞の同定に成功した。

プロジェクト開始1年目となる平成17年の研究達成内容はマウス骨格筋及び心臓組織を用いて、単一細胞からクローン化増殖する心筋幹細胞の純化に取り組み、それぞれの体組織から心筋細胞のみならず、血管内皮平滑筋、脂肪細胞などにも分化しうる多能性幹細胞であることを明らかにした。さらに、ヒトの骨格筋及び心臓切除組織を用いた解析でも、これらのヒトの体組織内にヒト心筋細胞に分化する心筋幹細胞の存在を明らかにした。この画期的な発見に基づいて、当プロジェクトは今後、中、大型動物での移植実験を重ね、その有効性及び安全性を検証し、臨床応用ができるよう、その大量培養法を開発中である。

当プロジェクト研究のもう一つの柱として胚性幹細胞(ES細胞)を用いた心筋細胞分化機構や誘導因子の同定を行っている。ES細胞から胚様体を介しての三次元構造の中で、約5-10%の割合で自律的に拍動する心

筋細胞に分化させることは、方法論的に既に確立されているが、その分化効率は未だ低く、臨床応用上の障害の一つである。当プロジェクトはマウス及びサルES細胞を用いて、通常の胚様体法より5倍以上高率に心筋細胞に分化する心筋分化誘導因子を同定した。

また、未分化ES細胞から心筋細胞に分化する前駆細胞群の認識法の開発にも取り組んでおり、細胞表面抗原に着目した心筋前駆細胞の同定、精製により、これまでにない画期的なES細胞を用いた移植細胞の応用展開が期待できる。さらに、これらのマウス及びサルES細胞の基礎実験を踏まえて、将来に向けたヒトES細胞の使用計画を京都大学及び文部科学省に現在申請中である。

上記以外に、ES細胞の研究は心筋細胞分化機構の解析を通じて、新たな心筋特異的分化制御遺伝子の単離から発展させた遺伝子治療または創薬の可能性を秘めており、当プロジェクトで既に細胞株化に成功している骨格筋及び心臓由来の心筋幹細胞をはじめ、ES細胞を用いての心筋幹細胞特異的分泌蛋白や分化誘導因子の単離にも精力的に行っている。

以上より、現在平成17年度に確立した2種類の体組織由来心筋幹細胞を用いて、より有効にかつ安全に心筋細胞を再生できる臨床応用のための前臨床試験の完成を目指している。

D. 考察

末期的心不全の患者さんにとって心臓移

植ドナー数は全く不足する。我々が開発した心筋幹細胞は世界で初めての臨床応用可能な細胞ツールである。移植幹細胞の増殖方法、生体吸収ゲルを使った足場を確保した移植方法や大動物での安全性が新年度の解決目標である。これらの問題点をクリアーして、世界で初めての心筋再生医療の実施に向けて研究を進める。

E. 結論

ヒト心筋あるいはヒト骨格筋から分離に成功した心筋幹細胞は、心筋分化効率、心機能改善効果から考えて、末期的心不全に対して最高の移植細胞ツールである。今後は安全性を目的とした大動物実験にて、前臨床試験を実施して、心筋再生臨床試験へと進む予定である。

F. 健康危険情報

臨床応用は未だ実施しておらず、臨床試験に向けた基礎研究の段階であるが、基礎研究の段階では、臨床応用時に予想される健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamanishi K, Miyazaki M, Matsubara H, Yabe-Nishimura C. Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2677-85.

- 2 Tsunoda S, Mazda O, Oda Y, Iida Y, Akabame S, Kishida T, Shin-Ya M, Asada H, Gojo S, Imanishi J, Matsubara H, Yoshikawa T. Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Oct 14;336(1):118-27.
- 3 Takamiya M, Okigaki M, Jin D, Takai S, Nozawa Y, Adachi Y, Urao N, Tateishi K, Nomura T, Zen K, Ashihara E, Miyazaki M, Tatsumi T, Takahashi T, Matsubara H Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Circulating c-Kit+/Flk-1+ Progenitor Cells Regenerate Endothelium and Inhibit Neointimal Hyperplasia After Vascular Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(4):751-7.
- 4 Imada T, Tatsumi T, Mori Y, Nishiue T, Yoshida M, Masaki H, Okigaki M, Kojima H, Nozawa Y, Nishiwaki Y, Nitta N, Iwasaka T, Matsubara H. Targeted delivery of bone marrow mononuclear cells by ultrasound destruction of microbubbles induces both angiogenesis and arteriogenesis response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 25(10):2128-34.
- 5 Irie H, Okigaki M, Zen K, Takamiya M, Takahashi T, Azuma A, Tatsumi T, Matsubara H. Carbon Dioxide-Rich Water Bathing Enhances Collateral Blood Flow In Ischemic Hindlimb via Mobilization of Endothelial Progenitor Cells and Activation of NO-cGMP System *Circulation*,2005;111(12):1523-1529
- 6 Tatsumi T, Akashi K, Keira N, Matoba S, Mano A, Shiraishi J, Yamanaka S, Kobara M, Hibino N, Hosokawa S, Asayama J, Fushiki S, Fliss H, Nakagawa M, Matsubara H. Cytokine-induced nitric oxide inhibits mitochondrial energy production and induces myocardial dysfunction in endotoxin-treated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(3):775-84
- 7 Mano A, Tatsumi T, Shiraishi J, Keira N, Nomura T, Takeda M, Nishikawa S, Yamanaka S, Matoba S, Kobara M, Tanaka H, Shirayama T, Takamatsu T, Nozawa Y, Matsubara H. Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways. *Circulation.* 2004;110(3):317-23.
- 8 Amano K , Okigaki M, Adachi Y, Fujiyama S, Mori Y, Kosaki A, Iwasaka T and Matsubara H Mechanism for IL-1 β -mediated neovascularization unmasked by IL-1 β knock-out mice, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology J Mol Cell Cardiol* 2004 36(4):459-640
- 9 Matsubara H. Risk to the coronary arteries of intracoronary stem cell infusion and G-CSF cytokine therapy. *Lancet.* 2004 Mar 6;363(9411):746-7.
- 10 Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Sueda T, Goto C, Matsubara

H, Murohara T, Yoshizumi M. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. Circulation. 2004 Mar 16;109(10):1215-8.

2. 学会発表

1. Michitaka Takamiya, Mitsuhiko Okigaki, Hidekazu Irie, Kan Zen, Tomoki Dohue, Takahisa Sawada, Akihiro Azuma, Denan Jin, Shinji Takai, Mizuo Miyazaki, Hiroaki Matsubara G-CSF Treatment Inhibits Neointimal Hyperplasia Associated with Endothelial Progenitor Cell Mobilization and Acceleration of Reendothelialization in Catorid Artery Injuty Model 第69回日本循環器学会 2005年3月 横浜
2. Michitaka Takamiya, Mitsuhiko Okigaki, Hidekazu Irie, Kan Zen, Tomoki Dohue, Takahisa Sawada, Akihiro Azuma, Hiroaki Matsubara G-CSF Treatment Dose-dependently Induces Collateral Blood Flow Associated with Endothelial Progenitor Cell Mobilization and Neocapillary Formation in Hindlimb Ischemia 第69回日本循環器学会 2005年3月 横浜
3. Norifumi Urao, Mitsuhiko Okigaki, Hiroyuki Yamada, Eishi Ashihara, Yasushi Adachi, Akihiro Azuma,

Hiroaki Matsubara Erythropoietin Accelerates Regeneration of Endothelium and Prevents Neointimal Hyperplasia after Vascular Injury by Mobilizing Endothelial Progenitor Cells 第69回日本循環器学会 2005年3月 横浜

4. Kento Tateishi, Tomosaburo Takahashi, Tetsuya Nomura, Hidemasa Oh, Hiroaki Matsubara Clonal isolation and characterization of multipotent adult progenitor cels from mammalian heart: Therapeutic potential for severe heart failure 第9回日本心不全学会 2005年10月 下関
5. Hidemasa OH, Hiroaki Matsubara. Clonal identification of multipotent adult progenitor cells from mammalian heart and skeletal muscle 第9回日本心不全学会 2005年10月 下関

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
心臓内心筋幹細胞特許国際出願中
骨格筋組織内幹細胞特許国内出願中
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

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）
（分担）研究報告書

ヒト心筋・骨格筋からの心筋幹細胞の分離に関する研究

（分担）研究者 王 英正 京都大学医学部 助教授

研究要旨

心臓移植でしか救命できない重度の心不全症例に対する新たな治療法として心筋細胞による細胞移植医療法を開発し、標準治療として確立する。

A. 研究目的

- (1) ヒト心臓組織やヒト骨格筋より心筋幹細胞の単離とアロ移植用細胞株の樹立。
- (2) 心筋細胞移植医療の実現化に向けて、前臨床試験及び臨床試験の実施。

B. 研究方法

ヒト体組織から単一細胞より増幅させた心筋幹細胞をクローン化し、心筋梗塞を作成したヌードマウスに移植する。移植後4週間に心機能の改善度を確認する。

（倫理面への配慮）

- 1) 臨床試験プロトコールはTR実施に当たっての共通倫理審査指針に沿って京都大学探索医療センター検証部で作成する。患者さんに対する治療前の説明と理解を得て、またプライバシーの保護を第一とし治療経過はすべて情報公開にする。移植細胞および臨床試験は厚生労働省よりの「幹細胞の臨

床応用についての治療指針」、医薬品GCP、臨床研究倫理指針（厚生労働省告示第255号）を遵守する。

- 2) 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。基礎的研究においては、遺伝子改変マウス、プラスミドDNAを用いる場合は仕様に際しては、遺伝子組み換え生物などの使用等の規則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。

C. 研究結果

ヒト心筋細胞に分化しうるヒト心筋幹細胞のクローン化に成功し、培養細胞系及び移植検討にて、心筋細胞に分化することを確認した。間葉系幹細胞であることも明らかとなり、自己血清培養によって、大量培養可能であることも確認した。

プロジェクト開始1年目となる平成17年の研究達成内容はマウス骨格筋及び心臓組織を用いて、単一細胞からクローン化増殖

する心筋幹細胞の純化に取り組み、それぞれの体組織から心筋細胞のみならず、血管内皮平滑筋、脂肪細胞などにも分化しうる多能性幹細胞であることを明らかにした。さらに、ヒトの骨格筋及び心臓切除組織を用いた解析でも、これらのヒトの体組織内にヒト心筋細胞に分化する心筋幹細胞の存在を明らかにした。この画期的な発見に基づいて、当プロジェクトは今後、中、大型動物での移植実験を重ね、その有効性及び安全性を検証し、臨床応用ができるよう、その大量培養法を開発中である。

D. 考察

小型動物での検討を終了し、株化にも成功したことから、今後、大型動物への細胞移植へと進めて行きたい。間葉系幹細胞という表現型は拒絶反応が少なく、株化したヒト心筋幹細胞は他家移植という形で、スムーズに臨床応用される可能性があり、骨髄由来間葉系幹細胞移植の既報から、安全性は期待できる。

E. 結論

ヒト心臓及び骨格筋組織内には臨床応用可能な心筋幹細胞が存在し、その表現型は間葉系幹細胞であり、今後大型動物を用いて、安全性と有効性を検証する。

F. 健康危険情報

臨床試験に向けた基礎研究の段階である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 11 [Oh H](#), Chi X, Bradfute SB, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Schwartz RJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells **Annu. NY. Acad. Sci.** **2004** ;**1015**:182-9
- 12 [Oh H](#), Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **2003** ;**100**:12313-8.
- 13 [Oh H](#), Wang SC, Prahash A, Sano M, Moravec CS, Taffet GE, Michael LH, Youker KA, Entman ML, Schneider MD. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **2003** ;**100**:5378-83
- 14 Sano M, Abdellatif M, [Oh H](#), Xie M, Bagella L, Giordano A, Michael LH, DeMayo FJ, Schneider MD. Activation and function of cyclin T-Cdk9 (positive transcription elongation factor-b) in cardiac muscle-cell hypertrophy. **Nat Med.** **2002** ;**8**:1310-7.
- 15 [Oh H](#), Taffet GE, Youker KA, Entman ML, Overbeek PA, Michael LH, Schneider MD. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **2001**;98:10308-13.

2. 学会発表

6. アメリカ心臓病学会 *Circulation*

112-51, 2005

7. アメリカ心臓病学会 Circulation

112-37, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

4. 特許取得

心臓内心筋幹細胞特許国際出願中

骨格筋組織内幹細胞特許国内出願中

5. 実用新案登録

特になし

6. その他

特になし

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)
(分担)研究報告書

細胞移植と遺伝子治療による機能的血管新生療法の開発に関する研究

(分担)研究者 室原 豊明

名古屋大学大学院医学系研究科 病態内科学講座 循環器内科学教授

研究要旨

虚血性心疾患や特発性心筋症に伴う重症心不全への心臓移植医療が、我が国ではドナーの圧倒的不足のために機能していない。現状を打開することを目的とする末期的心不全への幹細胞移植医療実現化へ向けての基盤形成研究の中で、本分担研究者とそのグループは、細胞移植による血管再生医療の確立に関する基礎ならびに臨床的研究を行う。

室原豊明・名古屋大学 教授

それ以外にも、既存の心筋を出来るだけ温存するためには、血管再生療法は依然として重要な研究分野である。

A. 研究目的

虚血性心疾患や特発性心筋症に伴う重症心不全への心臓移植医療が、我が国ではドナーの圧倒的不足のために全く機能していない。現状を打開することを目的とする末期的心不全への幹細胞移植医療実現化へ向けての基盤形成研究の中で、本分担研究者とそのグループは、細胞移植による血管再生医療の確立に関する基礎ならびに臨床的研究を行う。

心筋が広範囲にダメージを受けた場合、心筋の再生が必須となるが、その医療の実現は容易ではない。心筋再生の部分に血管新生を誘導することはもちろん重要であるが、

B. 研究方法

自己骨髄細胞単核球細胞や血管内皮前駆細胞移植による血管新生効果の強化については、以前我々は虚血前刺激(hypoxic preconditioning)で細胞機能が強化されることを報告している(Akita et al. *Lab Invest* 2004)。この方法では簡便に細胞を刺激することができたが、その機能促進効果に長期の持続性が認められなかった。

最近我々は自己骨髄単核球細胞と遺伝子治療を組み合わせることで、より効果的な血管再生療法が可能なることを、基礎レベルで

確認している(Kobayashi et al. ATVB 2006 in press)。この方法でいくと、より少ない骨髄採取(従来の約5分の1量の骨髄細胞)でも、これまでの細胞移植療法単独の場合と同等またはそれ以上の治療効果が期待出来ることが確認されている。

本研究では、ヒト型Angiopoietin-1発現プラスミド遺伝子、さらにVEGF-E/PIGF キメラ・プラスミド遺伝子を治療候補遺伝子として考慮し、これらと自己骨髄細胞単核球細胞移植による血管新生療法の増強方法について、in vivo, in vitroの系で探求していくものである。VEGF-E/PIGF キメラ・プラスミド遺伝子については、すでに単独遺伝子単独治療でも血管再生療法が可能であることが、確認されている(Inoue et al. JCS 2005, ACC 2006, 論文投稿中)。遺伝子治療と細胞治療の併用療法に関しては、循環器領域で未だ全世界的に研究が遅れている分野であり、今後も精力的な研究が待たれる分野である。

C. 研究結果

Angiopoietin-1プラスミド遺伝子と自己骨髄単核球細胞移植の併用効果:

骨髄細胞単核球細胞または内皮前駆細胞移植による血管新生効果の強化については、我々はすでに体外での低酸素刺激(hypoxic preconditioning)が、内皮前駆細胞の血管新生機能を強化出来ることを報告している(Lab Invest 2003)。さらに我々は最近、ヒト型Angiopoietin-1プラスミド遺伝子と自己骨髄単核球細胞移植の時系列的な併用が、ウサギの虚血下肢モデルにおいて血管新生

効果を増強させることを確認している(Kobayashi et al. ACC 2005, ATVB 2006 in press)。以下にその概略を示す。

少量(これまで治療実験に使われてきたものの1/5量)の自己骨髄単核球細胞と(Ang-1) 遺伝子を併用することによる血管新生増強効果をウサギの下肢虚血モデルを用いて評価した。またマウスの耳においてAng-1、骨髄細胞併用により促される毛細血管構築を観察した。40匹のNZW ウサギに下肢虚血を作成し、以下の4群に分け治療効果を評価した。control群:control vector (500 mg) + PBS、angiopoietin-1 (Ang-1) 群:Ang-1 plasmid (500 mg) + PBS、骨髄単核球細胞 (BMC) 群:control vector + 少量の自己骨髄単核球細胞(1×10^6)、併用(combination) 群:Ang-1 plasmid + 少量の自己骨髄単核球細胞(1×10^6)の4群に分けて評価した。day 35に血管造影、flow wireを使った側副血行への血流量算出、組織酸素分圧(TcO₂)の測定を行い、安楽死後には組織を採取し、微小血管の評価も進めた。さらに、骨髄単核球細胞を培養し得られた内皮前駆細胞のmigration機能、HUVECが形成する管腔構造に取り込まれる機能がangiopoietin-1により増強されるか否か検討した。

また、マウスの耳にrecombinant Ang-1 蛋白(150 ng)を連日3日間、骨髄細胞(1.5×10^5)を投与するものでは初日に皮下注射し、4日後にFITC-lectinにより微小血管を染色し共焦点顕微鏡にてその血管構築を観察した。

Ang-1 plasmidの単独療法では血管の増生を認めるものの、下肢の潰瘍所見や組織酸素分圧の改善を認めなかった。しかしAng-1 plasmidに少量の骨髄単核球細胞を併用することにより、血管造影で確認できる比較的太い血管や組織染色で評価できる微小血管がともに有意に増加し、下肢の潰瘍所見や組織酸素分圧の著明な改善も認められた。この効果は少量の骨髄単核球細胞を投与した群と比べ増強されており、Ang-1 plasmidと骨髄単核球細胞を併用することによって得られた相乗効果と考えられる。また、骨髄単核球細胞を培養することで得られた内皮前駆細胞はAng-1存在下でmigrationが高められ、内皮の管腔形成への寄与も増強されることが確認された。これらの機序により骨髄単核球細胞による血管新生がAng-1 plasmidの併用で増強されたと考えられる。さらに、マウスの耳においてはAng-1蛋白の単独投与により蛇行の強い異常血管が観察された。ウサギ下肢にAng-1を単独投与したときも同様に異常血管が形成され、そのために新生血管の量的促進にも関わらず、潰瘍所見や組織酸素分圧の改善がみられなかったと推察された。Ang-1に骨髄細胞を併用することで異常血管は殆ど認められなくなり、この現象によりウサギ下肢においても微小循環が改善され、新生血管の増加に比例した酸素運搬が可能となったと考えられた。

D. 考察

海外では、adenovirus やretrovirusを用い

て、VEGF遺伝子を前駆細胞や間葉系幹細胞にあらかじめ遺伝し導入し、それらを細胞移植して血管再生を図るという研究が先行して発表されている。しかし、この方法だと導入遺伝子の発現調節が(遺伝子が既に)細胞に入り込んでしまっているために困難なこと、遺伝子でエンコードされている蛋白が過剰に産生された場合に、局所で血管腫や動脈瘤を作るなどの合併症が出ることが報告された。このため、未だ臨床応用には至っていない。我々の方法は、従来から効果があると報告されていて、かつ安全な発現プラスミドを使用した遺伝子治療と、すでに臨床応用されている自己骨髄細胞移植の併用による血管再生療法であり、より安全で、臨床への応用も十分視野内にある。

E. 結論

Ang-1 plasmidと自己骨髄単核球細胞との併用療法は、強力な血管新生増強効果をもつと同時に、生理的な血管により近い機能的血管新生をもたらす治療法であると考えられた。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shintani S, Kusano K, Ii M, Iwakura A, Heyd L, Curry C, Wecker A, Gavin M, Ma H, Kearney M, Silver M, Thorne T, Murohara T, Losordo DW. Synergistic effect of combined intramyocardial CD34

cells and VEGF-2 gene therapy post-myocardial infarction. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2006; 3(Suppl.): S123-S128.

Taniguchi E, Kin M, Torimura T, Nakamura T, Kunemura M, Hanada S, Hisamoto T, Yoshida T, Kawaguchi T, Baba S, Maeyama M, Koga H, Harada M, Kumashiro R, Ueno T, Ikeda H, Imaizumi T, Murohara T, Sata M. Endothelial progenitor cell transplantation improves the outcome following liver injury in mice. *Gastroenterology.* 2006; 130: 521-531.

Kobayashi K, Kondo T, Inoue N, Aoki M, Mizuno M, Komori K, Yoshida J, Murohara T. Combination therapy using angiopoietin-1 plasmid gene and autologous bone marrow cell implantation promotes functional angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006 (in press).

Murakami H, Murakami R, Kambe F, Cao X, Takahashi R, Asai T, Hirai T, Numaguchi Y, Okumura K, Seo H, Murohara T. Fenofibrate activates AMPK and increases eNOS phosphorylation in HUVEC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 341: 973-978.

Yokoyama S, Fukuda N, Li Y, Hagikura K, Takayama T, Kunimoto S, Honye J, Saito S, Wada M, Satomi A, Kato M, Mugishima H, Kusumi Y, Mitsumata M, Murohara T. A strategy of retrograde injection of bone marrow mononuclear cells into the myocardium for the treatment of ischemic heart dis-

ease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2006; 40: 24-34.

Lee M, Aoki M, Kondo T, Okumura K, Komori K, Murohara T. Therapeutic angiogenesis with intramuscular injection of low dose recombinant granulocyte-colony stimulating factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 2535-2541.

Rookmaaker MB, Verhaar MC, Loomans CJM, Peters E, Murohara T, Staal FJT, van Zonneveld AJ, Koolwijk P, Rabelink TJ, van Hinsbergh VWM. CD34+ cells home, proliferate and participate in capillary formation and in combination with CD34- cells enhance tube formation in a 3D matrix. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 1843-1850.

Izumi Y, Kim-Mitsuyama S, Yoshiyama M, Omura T, Shiota M, Matsuzawa A, Yukimura T, Murohara T, Takeya M, Ichijo H, Yoshikawa J, Iwao H. Important role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 1877-1883.

Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H, Yuzawa Y, Matsuo S, Murohara T, Matsubara T, Oiso Y, Nakamura J. Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2005; 54: 1823-1828.

2.学会発表

Inoue N, Kondo T, Numaguchi Y, Murohara T, Shibuya M. Therapeutic angiogenesis using novel va-

scular endothelial growth factor E / human placental growth factor chimera genes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 47: 303A (abstract).

Numaguchi Y, Ishii M, Kubota R, Yokouchi K, Ogawa Y, Okumura K, Murohara T. Local delivery of bone marrow derived stromal cells engineered to overexpress prostacyclin synthase enhanced collateral perfusion in hindlimb ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 47: 341A (abstract).

Aoki M, Lee M, Kondo T, Kobayashi K, Inoue N, Yamada T, Okumura K, Murohara T. Local injection of low dose recombinant granulocyte-colony stimulating factor ischemia-induced angiogenesis. *Circ. J.* 2005;69:452 (abstract).

Kajiguchi M, Kondo T, Yamamoto K, Izawa H, Kobayashi M, Komori K, Murohara T. Therapeutic angiogenesis by autologous bone marrow cell transplantation: limited efficacy in patients with long-term hemodialysis. *Circ. J.* 2005;69:394 (abstract).

Inoue N, Kondo T, Kobayashi K, Numaguchi Y, Murohara T, Shibuya M. Therapeutic angiogenesis

using novel VEGF-E/human PIGF chimera genes. *Circ. J.* 2005;69:150 (abstract)

Kobayashi K, Kondo T, Aoki M, Inoue N, Yoshida O, Lee M, Li P, Komori K, Murohara T. Combinatorial therapy using angiopoietin-1 plasmid gene and autologous bone marrow mononuclear cell implantation promotes functional angiogenesis in a rabbit model of hindlimb ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005; 45: 377A (abstract).

H. 知的財産権の出願・登録状況

7. 特許取得

特になし

8. 実用新案登録

特になし

9. その他

特になし

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）
（分担）研究報告書

心筋幹細胞移植実現化へ向けての最適な血管新生療法探索研究に関する研究

（分担）研究者 尾池 雄一 慶應義塾大学医学部講師

研究要旨

重症心不全への心臓移植事業がドナー不足のため充分には機能していない現状を打開することを目的とする末期的心不全への幹細胞移植医療実現化へ向けての研究基盤形成研究の中で、私は細胞移植による心筋・血管再生医療が実現化されるために最も適した血管を誘導できる新生方法の確立、血管新生因子の探索と同定に関する研究を行う。

尾池雄一・慶應義塾大学 講師

B. 研究目的

重症心不全への心臓移植事業がドナー不足のため充分には機能していない現状を打開することを目的とする末期的心不全への幹細胞移植医療実現化へ向けての研究基盤形成研究の中で、私は細胞移植による心筋・血管再生医療が実現化されるために最も適した血管を誘導できる新生方法の確立、血管新生因子の探索と同定に関する研究を行う。

B. 研究方法

造血幹細胞の血管網構築における役割解析に関しては、造血幹細胞に異常のあるEvil1遺伝子の欠損マウスを用いて解析した。

また、アンジオポエチン様血管新生因子ファミリー(Angpt1)の血管新生因子としての機能解析は、各々の遺伝子改変マウスを作製し機能解析を行った。さらに臨床応用に向けて各々の組み替えタンパクの作成や発現調節機構の解析を進めている。

（倫理面への配慮）

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。基礎的研究においては、遺伝子改変マウス、プラスミドDNAを用いる場合は仕様に際しては、遺伝子組み換え生物などの使用等の規則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。今後の臨床研究に関しては、慶應義塾大学医学部の倫理委員会承認のもとで進め、患者、ボランティアに対するインフォームド・コンセントは書面で行う。

C. 研究結果

造血幹細胞は組織形成にあたり、アンジオポエチン1の分泌を介して血管網構築に重要な役割を果たしていることを明らかにした (EMBO J 2005)。また、AGF/Angpt16は血管新生作用のみならず、上皮細胞への増殖作用も有し、注入される細胞にとっての足場形成には適した分子であることを明らかにした。さらに、重症新心不全の原因となる重篤な虚血性心疾患の基盤病態と言えらるメタボリックシンドロームに対しても治療効果を有していることを明らかにし、単に心筋幹細胞移植時に最適な血管新生療法を行える分子としてのみならず、その基盤となる病態改善にも寄与できる可能性を明らかにした (Nat Med 2005)。また、数多くの血管新生因子が生理的血管とは異なる質の血管を増やすことが明らかになりつつあるが、本研究で対象としているAngpt12は、アポトーシスに拮抗的に作用し血管内皮細胞の生存維持に重要な役割を果たしていること (PNAS 2005)、さらに血管透過性においてより生理的な血管新生を誘導できることを明らかにした(論文準備中)。

D. 考察

欠損した組織で注入された細胞が増殖し組織を再生誘導するためには、適切な細胞増殖因子と細胞周囲の環境が重要であるが、AGFは血管新生作用のみならず上皮細胞への増殖作用も有し注入される細胞にとっての足場形成には適した分子であることを明

らかにしたことは、心筋幹細胞移植による心不全への細胞移植事業実現化へ向けて最も適した血管を誘導できる方法を探索し検証するという点において多大に貢献したものと考えられる。また、AGFが同時に重症新心不全の原因となる重篤な虚血性心疾患の基盤病態と言えらるメタボリックシンドロームに対しても治療効果を有していることを明らかにしたことは、細胞移植治療後の再発の危険度を下げる意味でも治療標的分子として重要な意味をもつと考える。

E. 結論

心筋幹細胞移植による心不全への細胞移植事業実現化へ向けて最も適した血管新生療法の開発にアンジオポエチン及びアンジオポエチン様因子が貢献できる可能性を見出した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Yuasa, H[#], Oike, Y.[#], Iwama, A., Nishikata, I., Sugiyama, D., Perkins, A., Mucenski, ML., Suda, T. & Morishita, K.
([#] equally contributed)

Oncogenic transcription factor Evi-1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through *GATA-2* expression. EMBO J 24:1976-1987 2005

Oike, Y., Akao, M., Yasunaga, K. Yamachi, T., Morisada, T., Ito, Y., Urano,

T., Kimura, Y., Kubota, Y., Maekawa, H., Miyamoto, T., Miyata, K., Matsumoto, S., Sakai, J., Nakagata, N., Takeya, M., Koseki, H., Kadowaki, T. & Suda, T.

Angiopoietin-related growth factor (AGF) antagonizes obesity and related insulin resistance. *Nat Med* 11:400-408 2005

Kubota, Y., Oike, Y., Satoh, S. Tabata, Y., Niikura, Y., Morisada, T., Akao, M., Urano, T., Ito, Y., Miyamoto, T., Nagai, N., Koh, G.Y., Watanabe, S. & Suda, T.

Cooperative interaction of Angiopoietin-like proteins 1 and 2 in zebrafish vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:13502-13507 2005

Morisada, T., Kubota, Y., Urano, T., Suda, T. & Oike, Y.

Angiopoietins and Angiopoietin-like proteins in angiogenesis
Endothelium 2006 in press

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

10. 特許取得

特になし

11. 実用新案登録

特になし

12. その他

特になし

研究成果の刊行に関する一覧

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
辰巳哲也、 <u>松原弘明</u>	虚血性心疾患に対する再生医療	山口 徹、堀 正二	循環器疾患最新の治療	南江堂	東京	2006年	p 15-20
辰巳哲也、 <u>松原弘明</u>	血管新生療法	松尾 汎	血管疾患を知る	メジカルビュー社	東京	2005	pp184-187
<u>松原弘明</u>	末梢性動脈疾患(閉塞性動脈硬化症、バージャー病)	山口 徹、北原光夫	今日の治療指針	医学書院	東京	2005	299-300
辰巳哲也、高橋知三郎、王英正、 <u>松原弘明</u>	細胞移植と血管新生治療ー末梢血管病から心臓病へー	野出孝一	血管不全フロントニア	メディカルレビュー社	東京	2004	pp349-356
<u>松原弘明</u>	血管再生医療の実施と展望ー骨髄系体細胞移植を用いた末梢性血管疾患・狭心症への血管新生医療ー	日本老年医学会雑誌編集委員会	老年医学update 2004-2005	メジカルビュー社	東京	2004	pp156-164
辰巳哲也、 <u>松原弘明</u>	虚血性心臓病への骨髄細胞移植による再生医療	矢崎義雄、山口 徹、高本眞一、中澤 誠	Annual Review 循環器	中外医学社	東京	2004	pp147-151

雑誌 (松原 弘明)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamanishi K, Miyazaki M, <u>Matsubara H</u> , Yabe-Nishimura C.	Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice.	Circulation.	25	2677-85	2005
Tsunoda S, Mazda O, Oda Y, Iida Y, Akabame S, Kishida T, Shin-Ya M, Asada H, Gojo S, Imanishi J, <u>Matsubara H</u> , Yoshikawa T.	Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart.	Biochem Biophys Res Commun.	14	118-27	2005

Takamiya M, Okigaki M, Jin D, Takai S, Nozawa Y, Adachi Y, Urao N, Tateishi K, Nomura T, Zen K, Ashihara E, Miyazaki M, Tatsumi T, Takahashi T, <u>Matsubara H</u>	Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Circulating c-Kit+/Flk-1+ Progenitor Cells Regenerate Endothelium and Inhibit Neointimal Hyperplasia After Vascular Injury.	Arterioscler Thromb Vasc Biol.	26	751-7	2006
Imada T, Tatsumi T, Mori Y, Nishiue T, Yoshida M, Masaki H, Okigaki M, Kojima H, Nozawa Y, Nishiwaki Y, Nitta N, Iwasaka T, <u>Matsubara H</u> .	Targeted delivery of bone marrow mononuclear cells by ultrasound destruction of microbubbles induces both angiogenesis and arteriogenesis response.	Arterioscler Thromb Vasc Biol.	25	2128-34	2005
Irie H, Okigaki M, Zen K, Takamiya M, Takahashi T, Azuma A, Tatsumi T, <u>Matsubara H</u> .	Carbon Dioxide-Rich Water Bathing Enhances Collateral Blood Flow In Ischemic Hindlimb via Mobilization of Endothelial Progenitor Cells and Activation of NO-cGMP System	Circulation	111	1523-29	2005
Tatsumi T, Akashi K, Keira N, Matoba S, Mano A, Shiraishi J, Yamanaka S, Kobara M, Hibino N, Hosokawa S, Asayama J, Fushiki S, Fliss H, Nakagawa M, <u>Matsubara H</u> .	Cytokine-induced nitric oxide inhibits mitochondrial energy production and induces myocardial dysfunction in endotoxin-treated rat hearts	J Mol Cell Cardiol.	37	775-84	2004
Mano A, Tatsumi T, Shiraishi J, Keira N, Nomura T, Takeda M, Nishikawa S, Yamanaka S, Matoba S, Kobara M, Tanaka H, Shirayama T, Takamatsu T, Nozawa Y, <u>Matsubara H</u> .	Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways.	Circulation	110	317-23	2004
Amano K, Okigaki M, Adachi Y, Fujiyama S, Mori Y, Kosaki A, Iwasaka T and <u>Matsubara H</u>	Mechanism for IL-1 β -mediated neovascularization unmasked by IL-1 β knock-out mice,	J Mol Cell Cardiol	36	459-640	2004
<u>Matsubara H</u> .	Risk to the coronary arteries of intracoronary stem cell infusion and G-CSF cytokine therapy.	Lancet.	363	746-7	2004
Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Sueda T, Goto C, <u>Matsubara H</u> , Murohara T, Yoshizumi M.	Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia.	Circulation.	109	1215-8	2004