

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第 1 分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第 2 分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析; 癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法の作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
 第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭 金正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭 金正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ポツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

## 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンス  
に関する研究



## 細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発

所属 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部  
研究者 山口 照英

**研究要旨** 初期血管内皮前駆細胞はトロンボポエチンにより強く誘導されること、及び IL-8 の産生能が極めて高いことを明らかにした。末梢血及び臍帯血から OEC 誘導できる条件を明らかにした。血管内皮細胞を用いて *in vitro* で毛細血管を作り出す方法を開発し、ヌードマウスへの移植実験より、作成した血管が *in vivo* でも機能することを明らかにした。

### 分担研究者

- (1) 東京医科歯科大学 森田 育男
- (2) 大日本印刷株式会社 服部 秀志

### A. 研究目的

近年、幹細胞学や発生学の急速な進歩やバイオテクノロジー応用技術の発展により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に用いる細胞組織利用医薬品の開発が急速に進んでいる。このように細胞や組織を医療に用いることができれば、ガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、重篤な肝疾患、神経疾患、熱傷、創傷等に対してきわめて有効な治療法（いわゆる細胞治療・再生医療）になる可能性が高い。本邦においても、様々な形での細胞組織利用医薬品の開発が進められているところであるが、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題は多い。本研究では、細胞組織利用医薬品の品質や安全性の確保、また有効性等を適切に評価できる試験法の開発を行うとともに、開発した評価技術を用いて、より安全性が高く高品質の製品の実用化に向けた基盤技術の開発につなげていくことを目的としている。

本年度は、細胞組織利用医薬品の品質・安全性等の確保の一環として、ヒト臍帯血や末梢血造血幹細胞から血管内皮前駆細胞の誘導系の解析を行った。我々はこれまで、血管内前駆細胞として初期血管内皮前駆細胞 (early EPC) を中心に検討を行ってきたが、その増幅方法の最適化を目指した検討を行った。また、early EPC よりも増幅能が高く、量的にも得やすい後期血管内皮前駆細胞 (out-growth EPC: OEC) の血管再生治療への応用に関する基礎研究が行われている。しかし、未だ十分に OEC を誘導できる条件は確立されていないことから、安定して OEC を誘導する条件を解析した。

一方、血管内皮前駆細胞や血管内皮細胞等を用いた臨床研究が多くの施設で実施され、またいくつかの有望な効果も報告されつつある。しかし、このような血管再生を目指した臨床研究において、各施設で用いられている

細胞の調製方法、培養方法、純度等については施設毎に異なっている。血管内皮前駆細胞・血管内皮細胞の血管再生能を適切に評価するための試験法が確立されていないために、このような同時多発的に開発されている施設間の有用性を相互に比較することが困難となっている。求められる臨床効果を得るには、どの様な純度、品質、生物活性を持った血管内皮（前駆）細胞等を投与することが必要なかについては十分に解明されていない。そこで、これらを検査するための手段として、体外で毛細血管を作成する方法の確立し、有効性を評価できる試験法となり得るかについて検討を行った。このために、光リソグラフィーを利用して体外で管腔形成した毛細血管様構造が、毛細血管としての機能を果たすことができるか、*in vitro* 及び *in vivo* での解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 臍帯血と末梢血の CD31 強陽性細胞の分画

ヒト末梢血より単核球分画を単離し、洗浄後、分離バッファーに再浮遊させた。AC133 陽性細胞を、AC133 マイクロビーズ分離キット (Milteny Biotec) を用いて分離した。分離した AC133 陽性細胞は 20% 牛胎児血清 (FBS)、50 ng/ml 血管内皮増殖因子 (VEGF)、50 ng/ml トロンボポエチン (TPO)、50 ng/ml 幹細胞増殖因子 (SCF) を含む EBM-2 培地に浮遊し、タイプ IV コラーゲンをコートしたプレートに播種し、1 週間培養した。培養後、CD31 強陽性および CD31 陽性画分をソーティングした。

#### 2. 臍帯血及び末梢血の CD31 強陽性・陽性細胞の各種サイトカインの産生能

セルソーターにより分画した CD31 強陽性と CD31 陽性細胞を 20% FBS-EBM2 培地に浮遊し、96 穴マイクロプレートに培養した。培養 4 日後に培養上清を回収した。サイトカインの測定は Bio-Plex サイトカインアッセイ法の記載に従った。

#### 3. OEC の培養と免疫染色による解析

末梢血・臍帯血の単核球を分離後、FBS を含む EGM2 培

地(三光純薬)に浮遊し、ファイブロネクチン(FN)コートしたプレートに播種した。一週間、毎日培地交換を行い、その後、3日ごとに培地交換を行った。

OECの細胞特性を解析するために、細胞を回収した後、FNコートに再播種した。2日後、細胞を洗い、固定及びエタノール処理をした。1% BSA-PBS(-)でブロッキング後、各種抗体を用いて、4°Cで抗原抗体反応させた。用いた抗体は抗 lectin-like oxidized-LDL receptor (Lox-1) 抗体、抗 endothelial NO 合成酵素 (eNOS, Cayman Chemical)、抗 kinase insert domain protein receptor (KDR) 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 CD11b 抗体、抗 CD14 抗体、VE-cadherin 抗体 (以上は BD PharMingen) を用いた。細胞を PBS(-) で洗浄し、FITC あるいはローダミン標識した 2 次抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### 4. OEC の管腔形成

マトリゲル(BD Biosciences)を無血清 EBM2 培地(1:1, vol:vol)と水中で混合し、24 穴のマルチウェルに 0.4 ml/well 分注し、37°C でゲル化した。2%FBS EBM2 培地に浮遊した OEC をゲル上に播種し、24 時間培養後、光顕像を撮影した。

#### 5. *in vitro* での毛細血管形成

*in vitro* での毛細血管形成は、光リソグラフィーを利用して疎水加工されたガラス等の基盤上に光反応を利用して親水性のパターンを描き、その部分に血管内皮細胞を配列させるという技術を用いた。さらに、配列させた血管内皮細胞を付着させた基盤とマトリックスをコートしたプレートあるいはヒト羊膜と接着させることにより血管内皮細胞を転写させ、この転写過程で配列させた血管内皮細胞が管腔を形成することを利用している。

#### 6. 毛細血管の機能解析

上記のようにして形成した管腔様構造物の一端より蛍光色素のカルセインをマイクロインジェクションし、管腔内から漏出することなく腔内をどの程度流れるかどうかを、マイクロマニピュレーター、位相差蛍光顕微鏡を用いて調べた。

*in vitro* で羊膜に転写した管腔様構造物を NOD/SCID マウスに移植し、*in vivo* での血流の流れを確認した。すなわち、羊膜上に管腔形成させた血管内皮細胞の機能を解析するために、免疫不全マウスの下肢の血管を結紮する occlusion モデルを作成し、毛細血管網をもつ羊膜を移植した。血流は、レーザードップラーで測定するとともに、行動パターンを経日的に観察し、スコア化した。また、移植した血管内皮細胞と移植を受けたマウスの血管内皮細胞とを区別するため、生体に不活性な蛍光色素を取り込ませた血管内皮細胞を用いて羊膜に転写し移植を行った。蛍光染色された羊膜上の血管に血液が流れて

いるかを組織化学的に解析し、毛細血管として機能を明らかにした。

#### 7. 倫理面への配慮

ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会による審査・承認を得た上で行った。

#### C. 研究結果

##### 1. TPO による CD31 強陽性細胞数の増加

我々は既に、ヒト末梢血及び臍帯血 AC133 陽性から分化誘導される CD31 強陽性細胞が VEcadherin 陰性の early EPC であることを明らかにするとともに、その特性指標について明らかにしてきた。本年度は、さらに効率よく early EPC を誘導する諸条件の解析を行った。AC133 陽性細胞に、VEGF 単独、あるいは TPO や SCF を添加して培養し、細胞数の増加と CD31 強陽性細胞の比率の変化を解析し、CD31 強陽性細胞の増加率を定量した。VEGF に SCF を添加しただけでは CD31 強陽性細胞数の比率は観察できなかった。一方、VEGF に TPO を添加すると、末梢血では対照の 0.46% から 2.3% に臍帯血では 0.35% から 2.6% にと CD31 強陽性細胞の比率が増加した。細胞数の増加とフローサイトメーターの結果から、CD31 強陽性の絶対数を算出した結果、表 1 に示すように、TPO 添加した条件において顕著な増加が観察された。

##### 2. 初期 EPC が産生するサイトカインの解析

EPC を細胞組織利用医薬品として用いる場合、産生するサイトカインの解析は非常に重要である。サスペンション・アレイ・テクノロジーは少量のサンプルで、種々のサイトカインを、同時に定量できる有用な方法とされている。本法は、ビーズ上で各種サイトカインの免疫反応を行わせてフローサイトメトリーの技術を利用してビーズに結合したサイトカイン量から培養液中のサイトカイン量を測定するものである。

表 2 に示す様に、末梢血も臍帯血も GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、bFGF、G-CSF の産生能はそれほど高くないと考えられた。一方、VEGF 産生能は比較的高いが、末梢血及び臍帯血由来 CD31 強陽性細胞と CD31 陽性細胞の間で産生能に大きな差は認められなかった。一方、IL-8 の産生能は early EPC である CD31 強陽性細胞が顕著に高く、抹消血由来及び臍帯血由来 CD31 強陽性細胞で、それぞれ 200 ng/ml 以上、100 ng/ml 以上の IL-8 産生が認められた。

##### 3. 臍帯血からの OEC の採取

臍帯血の単核球を FN コート上で培養すると、14 日目ぐ

らいから、円形コロニーが確認される様になった。このコロニーの細胞は敷石様を呈しており、増殖能が極めて高い(図1)。辺縁増殖を示すコロニーも確認され、播種した7cm<sup>2</sup>ウエルあたり1箇所以上のコロニーが観察された。さらに、培養15日目に各ウエルよりコロニーを回収したところ、約1.5×10<sup>6</sup>個の細胞が得られた。プレリミナリーな結果ではあるが、early EPCに比べ、150倍の細胞を得ることができることになる。

回収した細胞を再播種し、血管内皮細胞の特性指標の発現について解析した。その結果、このOECはCD31陽性、eNOS陽性、VEcadherin陽性、KDR陽性、CD11b陰性、CD14陰性(図2)であった。また、early EPCと比較してCD31の発現の細胞内局在はOECで大きく異なっていた。eNOSとCD31、VEcadherin、KDRを2重染色すると、すべての細胞が2重に染色され、均一細胞から構成されていると考えられた(図3)。

得られたOECの機能を解析するため、マトリゲル上の3次元培養を行った。その結果、このOECはマトリゲル上で、管腔を形成する(図4)ことから、血管内皮細胞と同等の機能的をもつことが確認できた。臍帯血からのOEC誘導率は約50%であった。同様の培養条件を用いることにより、ヒト末梢血由来単核球細胞からもOEC誘導することが可能であった。

#### 4. 管腔構造物の毛細血管としての同定

基板に描いたパターンに接着するように培養した血管内皮細胞をマトリクスに転写し、24時間後に基板を取り除いて、パターンニングされた管腔様構造物をマトリクス上に作成した。その管腔様構造物をマイクロピペットで固定した後、マイクロマニピュレーターを用いてキャピラリーを管腔様構造物のルーメン内に導入した。その後、このキャピラリーから色素を注入し、管腔様構造物から色素が漏出しないか、さらには管腔内を流れることができるかを蛍光顕微鏡にビデオカメラを接続し連続観察を行った。その結果、注入した色素は漏出することなく注入部から1mmまで到達し、この管腔様構造物が毛細血管としての機能を持つことが確認された(図5)。

以上の様に*in vitro*で形成した管腔様構造物が毛細血管としての機能を持つ可能性が示唆されたことより、次に動物へ移植し*in vivo*における機能解析を行いその有用性を評価した。*in vivo*での機能解析を行うために、マトリクスへの転写に替えてヒト羊膜への転写を行った。羊膜上にパターンニングされた毛細血管を形成させることにした。まず、上記と同様に基板上に血管内皮細胞を播種・培養した後、ヒト羊膜と接着させ24時間培養することにより羊膜へ血管内皮細胞をパターン化したまま転写した。この転写過程で、マトリクスと同様に管腔様構造物が形成された(図6)。その後、この血管つき羊膜を免疫不全マウスに移植し、血流の変化、動物行動の改

善、組織染色などを行った。その結果、図6に示すように、組織染色においては、蛍光色素で生体染色したドナー血管内皮細胞由来毛細血管においても、その内腔に血球が流れていることが確認された。さらに、既存の血管を結紮した下肢の血流が羊膜のみを移植(control)した動物と比較し、速やかに回復が認められた。また、この血流の回復とともに、マウスの行動の改善が認められ、血管付き羊膜を移植した群では、下肢を引きずる動作も見られなくなり、踏ん張りがきくようになった。これらの結果は、体外で作成した毛細血管に血流が流れた世界最初の結果であり、この系を用いることにより、血管内皮前駆細胞や血管内皮細胞の有効性を*in vitro*、*in vivo*で評価することが可能になったと考えられる。

#### 5. 管腔形成に關与する転写因子の探索

基板上にパターンニング培養された血管内皮細胞をマトリクスに転写し管腔形成をさせる過程にどの様な因子が関与しているのかを解析するために種々のキナーゼ阻害薬を用いて解析した。その結果、管腔過程のみを阻害するキナーゼ阻害剤は、KDRK (VEGFR-2 kinase)の阻害剤とP38キナーゼの阻害剤であることが明らかとなった。

#### D. 考察

early EPCは増殖能は低いが、血管新生する患部に遊走し、血管新生に關与するサイトカインを産生するのではないかと推定されている。この観点から、今回我々が*in vitro*で誘導したCD31強陽性のearly EPCが血管新生に寄与すると考えられているIL-8の高い産生能を持つことを明らかにできたことは、early EPCの血管新生における分子機構の解明に大きく寄与すると考えられる。また、early EPCの有効性指標として大きな意味を持つと考えられる。このearly EPCの高いIL-8産生能が血管再生という機能面にどの程度寄与しているのか、今後*in vivo*でのモデル動物を用いた解析を含め、詳細な検討が必要である。また、今回サイトカインの網羅的測定にビーズを利用したフローサイトメトリーを用いたが、本法は細胞組織利用医薬品のサイトカイン産生を評価するのに有用であることが示された。

EPCには2種類あると考えられており、OECはearly EPCとは対比的に高い増殖能をもつため、細胞数を確保でき、患者から採取された単核球から確実にOECが培養できる技術を確認することができれば、細胞治療の適用において非常に重要である。これまで、OECの誘導についていくつかの報告があるものの、確実にOECを誘導できる条件は確立されていない。また、その特性についても不明の点が多い。今回、ヒト臍帯血及び末梢血を用いてOECの培養に成功し、early EPCに比べ150倍の細胞が得られる可能性が示された。しかし、臍帯血では50%、末梢血では30%と、未だ十分な誘導条件ではない。今後、early EPC

との共培養等の検討を行い、より確実な誘導条件を確立し、その特性解析を行う予定である。

体外で血管内皮細胞を用いて作成した毛細血管は、①蛍光溶液をマイクロインジェクションしても漏出することなく管腔内を流れることを明らかにできたこと、②*in vitro*で羊膜上に転写し血管網を形成させ、下肢動脈狭窄を行った自己免疫マウスに移植し、血流の確認、症状の改善等が認められたことなどより、毛細血管として十分な機能をもつことが確認された。本結果は、体外で形成した毛細血管に血流が流れることを世界で初めて示した結果である。これまで、血管内皮細胞の血管新生の機能解析は、マトリゲル内での管腔形成や *in vivo* へ直接投与することにより評価されていた。マトリゲル内での管腔形成では血流等の機能面の解析を行うことは不可能であった。また、*in vivo* へ直接投与する系では、形成された血管がドナー由来であるかについて否定的な見解も出されていた。今回の確立した方法では、作成した血管を構成するヒト血管内皮（前駆）細胞を予め標識しておくことも可能であり、機能評価系として非常に有用であると考えられる。

## E. 結論

初期血管内皮前駆細胞は TPO により強く誘導されること、及び IL-8 の産生能が極めて高いことを明らかにした。末梢血及び臍帯血から OEC 誘導できる条件を明らかにした。血管内皮細胞を用いて *in vitro* で毛細血管を作り出す方法を開発し、ヌードマウスへの移植実験より、作成した血管が *in vivo* でも機能することを明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hosono, T., Mizuguchi H., Katayama K., Koizumi, N., Kawabata, K., Yamaguchi T., Nakagawa S., Watanabe Y., Mayumi T., Hayakawa T.; RNA interference of PPARgamma using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. **Gene**. 348, 157-165. (2005)
- 2) Kawabata K., Sakurai F., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. **Mol. Therapy**. 12, 547-554 (2005)
- 3) Yoji Sato, Ryo Nakamura, Mitsutoshi Satoh, Kayoko Fujishita, Satoko Mori, Helen Kiriazis Seiichi Ishida, Teruhide Yamaguchi, Kazuhide Inoue, Taku Nagao and Yasuo Ohno: Thyroid Hormone Targets Matrix Gla Protein Gene Associated with Vascular Smooth Muscle Calcification. **Circulation Res**. 97, 550-557 (2005)
- 4) Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa

T., Mizuguchi H. Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors: comparison of promoter activities. **Gene Ther.**, 12, 1424-1433 (2005)

- 5) Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Naoya Koizumi, Naokazu Inoue, Masaru Okabe, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa, and Hiroyuki Mizuguchi: Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice. **Gene Therapy**. in press (2006)
- 6) Yoshida T, Ohno-Matsui K, Ichinose S, Sato T, Iwata N, Saudo T, Hisatomi T, Mochizuki M and Morita I. The Potential role of amyloid- $\beta$  in the pathogenesis of age-related macular degeneration. **J. Clin Invest.**, 115:2793-2800, 2005
- 7) Hosomichi J, Yasui N, Koide T, Soma K, Morita I. Involvement of the collagen I-binding motif in the anti-angiogenic activity of pigment epithelium-derived factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 335:756-761, 2005
- 8) Ohno-Matusi K, Ichinose S, Nakahama K, Yoshida T, Kojima A, Mochizuki M, Morita I. The effects of amniotic membrane on retinal pigment epithelial cell differentiation. **Mol Vis.**, 11:1-10, 2005
- 9) Nakamura M, Kobayashi A, Takagi F, Watanabe A, Hiruma Y, Ohuchi K, Iwasaki Y, Horie M, Morita I, Takatani S. Biocompatible Inkjet Printing Technique For Designed Seeding Of Individual Living Cells. **Tissue Engineering** 11(11/12); 1658-1666, 2005
- 10) 森田育男. 印刷技術を応用して毛細血管網を作ること成功/わだい. **Medical Technology** 33 (5) : 443-444, 2005
- 11) 森田育男: 製版と光触媒技術を活用した毛細血管の再生. **Review/バイオサイエンス. 未来材料** 6(5):15-19, 2005
- 12) 森田育男. エヌティーエス. 光触媒技術情報 (財) 神奈川県科学技術アカデミー) 37:309-313, 2005
- 13) 森田育男 次世代の再生医療を実現するパターン培養技術 **表面技術** 56: 887-891, 2005

### 2. 学会発表

- 1) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英: 造血支持能を持つフィーダー細胞の解析について. 第5回日本再生医療学会総会. (2006. 3. 8. 岡山)
- 2) 佐藤孝浩、藤田 浩、森田育男. 慢性特発性血小板減少性紫斑病患者血清の巨核球分化に対する抑制機構. 第33回血管研究会. 第一製薬(株)共催. 東京. 2005年5月25日
- 3) 小林暁子、桑名るみ子、黒田正敏、服部秀志、中浜

健一、竹田 省、森田育男. パターニングされた毛細血管の作成と生体応用. 第26回日本炎症・再生医学会. 東京. 2005年7月12～13日

- 4) 桑名るみ子、小林暁子、服部秀志、中浜健一、森田育男. 管腔形成過程における血管内皮細胞の血管新生関連遺伝子の変動. 第26回日本炎症・再生医学会. 東京. 2005年7月12～13日
- 5) 小林暁子、桑名るみ子、服部秀志、太田正人、市野瀬志津子、森田育男. パターニングされた毛細血管の作成と生体応用. 第16回再生医療・細胞治療研究会. 東京. 2005年9月16日

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表1. AC133 陽性細胞からの CD31 強陽性細胞の誘導に及ぼす SCF や TPO の影響

	Control	SCF	TPO	SCF+TPO
Peripheral cells	2139 ± 376.7*	4456 ± 496.3	17319 ± 2026.3	25149 ± 3585.5
Cord blood cells	3108 ± 172.2	3960 ± 598.5	33930 ± 6037.2	31407 ± 3473.2

\*: CD31<sup>bright</sup> cell number (means ± S.D.)

表2. CD31 強陽性・陽性細胞が産生するサイトカインの定量

	Peripheral blood		Cord blood	
	CD31 <sup>bright</sup>	CD31 <sup>+</sup>	CD31 <sup>bright</sup>	CD31 <sup>+</sup>
G-CSF	0.6	0.8	0.3	0.2
TNF- $\alpha$	0.4	0.2	0	0.4
bFGF	6.6	3.6	3.7	2.8
VEGF	109.7	99.7	77.9	61
IL-8	21369	3843	11292	304
GM-CSF	6.8	1.7	1.4	1.8

図1. 臍帯血より誘導したOEC

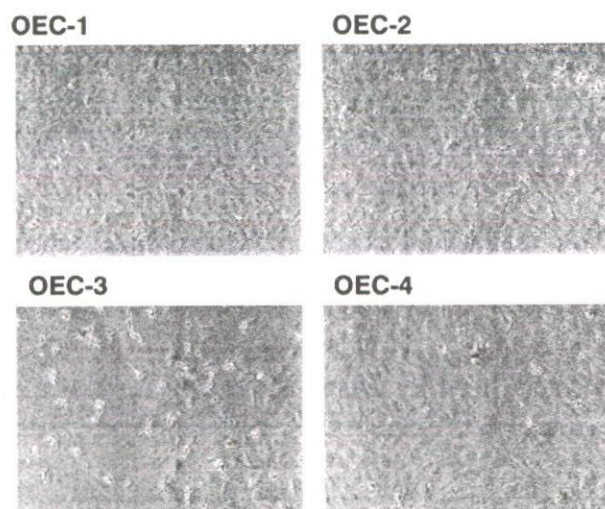


図2. 臍帯血由来OECがもつ血管内皮細胞としての特性

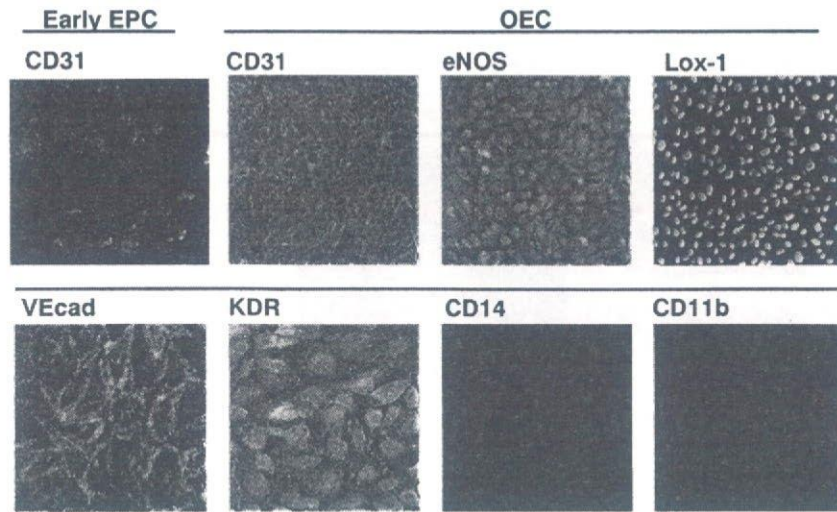


図3. 臍帯血由来OECが持つ血管内皮細胞としての特性



図4. 臍帯血由来OECの管腔形成能

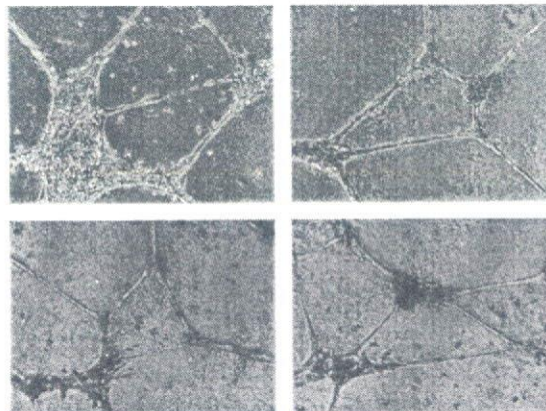


図5. 管腔構造物への色素のマイクロインジェクション

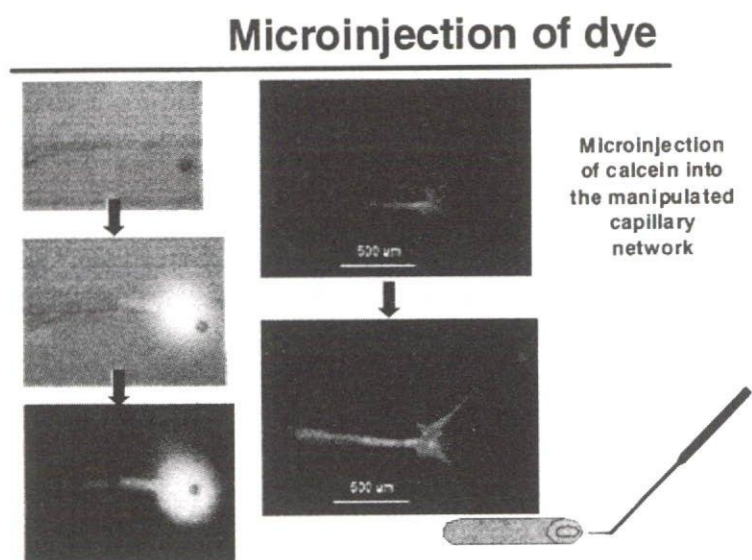
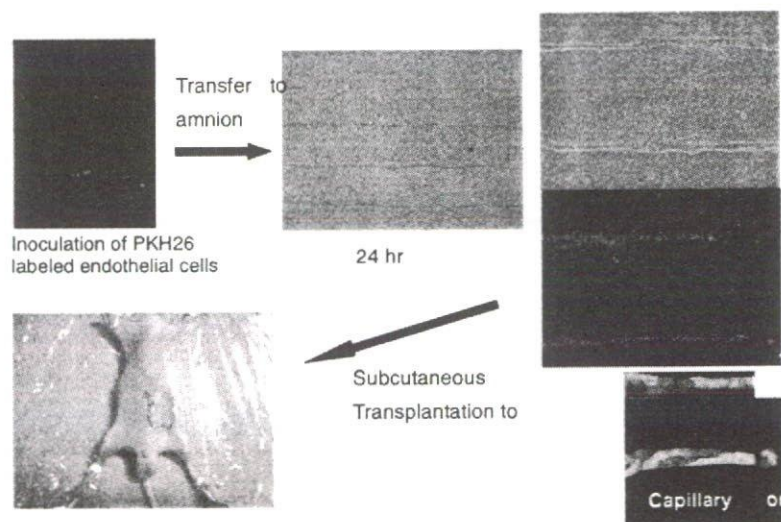


図6. 羊膜上への血管内皮細胞の転写と毛細血管網の構築





---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社