

Endothelial Progenitor Cells and Augments Ischemia-induced Angiogenesis” 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸

34. Shimamura M., Sato N., Sata M., Wakayama K., Hayashi T., Iida H., Ogihara T., Morishita R. “Delayed Post-ischemic Treatment with Fluvastatin Improved Learning and Memory Deficit After Stroke in Rats without affecting Infarction Volume” 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸

#### 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
- ・ 佐田：「フィブロイン糸を使用した小動物用人工血管」国際特許出願 PCT/JP2007/55818

##### 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) 一個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  $1 \times 10^6$  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  $1 \times 10^3$  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す、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) 一つ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、一つ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. Abe, M., Sata, M., Suzuki, E., Takeda, R., Takahashi, M., Nishimatsu, H., Nagata, D., Kangawa, K., Matsuo, H., Nagai, R., Hirata Y.

- Effects of adrenomedullin on acute ischemia-induced collateral development and mobilization of bone marrow-derived cells. *Clin Sci (Lond)*. 2006. 111:381-387.
3. Sahara M, Takahashi T, Imai Y, Nakajima T, Yao A, Morita T, Hirata Y, Nagai R. New insights in the treatment strategy for pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2006 Oct;20(5):377-86.
  4. Shimizu T, Takeda N, Takahashi M, Imai Y, Ishizaka N, Hirata Y, Nagai R. Subarachnoid hemorrhage from mycotic aneurysms. *Intern Med*. 2006;45(20):1189-90.
  5. Sahara M, Takahashi T, Morita T, Yao A, Nagashima Y, Hirata Y, Nagai R. Three-vessel coronary artery disease complicated with congestive heart failure in a highly aged patient with tetralogy of Fallot having undergone palliative surgeries. *Intern Med*. 2006;45(20):1147-51.
  6. Sakamoto A, Okamoto K, Ishizaka N, Tejima K, Hirata Y, Nagai R. (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in a case of retroperitoneal fibrosis. *Int Heart J*. 2006 Jul;47(4):645-50.
  7. Matsumura T, Matsumoto A, Ohno M, Suzuki S, Ohta M, Suzuki E, Takenaka K, Hirata Y, Fujita T, Nagai R. A case of cholesterol embolism confirmed by skin biopsy and successfully treated with statins and steroids. *Am J Med Sci*. 2006 May;331(5):280-3.
  8. Sahara, M., Sata, M., Morita, T., Nakamura, K., Hirata, Y., Nagai, R. Diverse contribution of bone marrow-derived cells to vascular remodeling associated with pulmonary arterial hypertension and arterial neointimal formation. *Circulation* 2007. 115: 509-517
  9. Nakamura, K., Sata, M., Iwata, H., Sakai, Y., Hirata, Y., Kugiyama, K., Nagai, R. A synthetic small molecule, ONO-1301, enhances endogenous growth factor expression and augments angiogenesis in ischemic heart *Clin Sci (Lond)*. in press
  10. Shirakawa, I., Sata, M., Saiura, A., Kaneda, Y., Yashiro, H., Hirata, Y., Makuuchi, M., Nagai, R. Atorvastatin attenuates transplant-associated coronary arteriosclerosis in a murine model of cardiac transplantation. *Biomed Pharmacother*. in press.
2. 学会発表
    1. Nakamura K., Sata M., Iwata H., Hirata Y., Kugiyama K., Nagai R. "A Synthetic Prostaglandin I2 Agonist Up-regulates Endogenous Growth Factors Via c-AMP Mediated Pathway and Promotes Therapeutic Angiogenesis" 第71回日本循環器学会総会 2007年3月15-17日 神戸
    2. Nakamura K., Sata M., Hirata Y., Kugiyama K., Nagai R., "Blockade of Angiotensin II Type1 Receptor Attenuates the Post-Infarcted Cardiac Dysfunction in Angiotensin-converting Enzyme 2 Deficient Mice" 第71回日本循環器学会総会 2007年3月15-17日 神戸
    3. Sahara M., Sata M., Morita T., Hirata Y., Nagai R. "cGMP-specific Phosphodiesterase-5 Inhibition Enhances Angiogenesis via the Synthesis of Vascular Endothelial Growth Factor and the Recruitment of Endothelial Progenitor Cells" 第71回日本循環器学会総会 2007年3月15-17日 神戸
    4. Sahara M., Sata M., Morita T., Hirata Y., Nagai R. "A Combination of a Cyclic GMP-specific Phosphodiesterase-5 Inhibitor, Vardenafil, and Nicorandil Ameliorates Synergistically

- Monocrotaline-induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats” 第71回日本循環器学会総会 2007年3月15-17日 神戸
5. Sahara M., Sata M., Morita T., Nakamura K., Hirata Y., Nagai R. “Diverse Contribution of Bone Marrow-derived Cells to Vascular Remodeling Associated with Pulmonary Arterial Hypertension and Arterial Neointimal Formation” 第71回日本循環器学会総会 2007年3月15-17日 神戸
  6. Sumi M., Sata M., Miura S., Saku K., Hirata Y., Nagai R. “Reconstituted High-Density Lipoprotein Promotes Differentiation of Endothelial Progenitor Cells and Augments Ischemia-induced Angiogenesis” 第71回日本循環器学会総会 2007年3月15-17日 神戸
  7. Shimamura M., Sato N., Sata M., Wakayama K., Hayashi T., Iida H., Ogihara T., Morishita R. “Delayed Post-ischemic Treatment with Fluvastatin Improved Learning and Memory Deficit After Stroke in Rats without affecting Infarction Volume” 第71回日本循環器学会総会 2007年3月15-17
  8. Tanaka K., Sata M., Hirata Y., Nagai R. “Perivascular Adipose Tissue Anatomically Communicate with Atherosclerotic Lesions via Vasa Vasorum; Possible Link of Adipo-Vascular Axis” 第71回日本循環器学会総会 2007年3月15-17日 神戸
  9. Sahara M., Sata M., Morita T., Hirata Y., Nagai R. “Nicorandil Attenuates Monocrotaline-induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats: The Promising Therapeutic Potential of a Novel Combination Therapy” 第71回日本循環器学会総会 2007年3月15-17日 神戸 Symposium 4 Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension
  10. Tanaka K, Sata M, Hirata Y, Nagai R. Perivascular

Adipose Tissues Anatomically Communicate with Atherosclerotic Lesions via Vasa Vasorum; Possible Link of Adipo-vascular Axis. American Heart Association Scientific Sessions 2006, Chicago, November 12-15, 2006

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

## 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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	ページ	出版年
佐田政隆	骨髄由来細胞の役割	小川久雄編集	慢性冠動脈疾患の臨床	中山書店	東京	48-53	2006

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto, T., Sata, M., Fukuda, D., Takamoto, S.	The angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan attenuates graft vasculopathy.	<b>J Surg Res</b>	132	62-68	2006
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.	<b>J Am Soc Nephrol,</b>	17	113-121	2006
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	<b>J Hepatol.</b>	44	325-333	2006
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.	<b>Int J Cancer.</b>	118	2237-2246	2006
Sainz, J., Sata, M.	Targeting bone marrow to treat vascular diseases: Accelerated vascular healing by colony stimulating factor.	<b>Cardiovasc Res</b>	70	3-5	2006
Sata, M.	The role of circulating vascular progenitors in angiogenesis, vascular healing and pulmonary hypertension: Lessons from animal models.	<b>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</b>	26	1008-1014	2006
Sainz, J., Sata, M	Maintenance of Vascular Homeostasis by Bone Marrow-derived Cells.	<b>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</b>	26	1196-1197	2006

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	<b>Mol Cell Biochem.</b>	286	59-65	2006
Ohtani, K., Egashira, K., Ihara, Y., Nakano, K., Funakoshi, K., Zhao, G., Sata, M., Sunagawa, K...:	Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade Attenuates In-Stent Restenosis by Inhibiting Inflammation and Progenitor Cells.	<b>Hypertension.</b>	48	664-670	2006
Abe, M., Sata, M., Suzuki, E., Takeda, R., Takahashi, M., Nishimatsu, H., Nagata, D., Kangawa, K., Matsuo, H., Nagai, R., Hirata Y.	Effects of adrenomedullin on acute ischemia-induced collateral development and mobilization of bone marrow-derived cells.	<b>Clin Sci (Lond).</b>	111	381-387	2006
Yoshioka M, Yuasa S, Matsumura K, Kimura K, Shiomi T, Kimura N, Shukunami C, Okada Y, Mukai M, Shin H, Yozu R, Sata M, Ogawa S, Hiraki Y, Fukuda K.	Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis.	<b>Nat Med.</b>	12	1151-1159	2006
Hanajiri K, Maruyama T, Kaneko Y, Mitsui H, Watanabe S, Sata M, Nagai R, Kashima T, Shibahara J, Omata M, Matsumoto Y.	Microbubble-induced increase in ablation of liver tumors by high-intensity focused ultrasound.	<b>Hepatol Res.</b>	36	308-314	2006
Sahara M, Takahashi T, Imai Y, Nakajima T, Yao A, Morita T, Hirata Y, Nagai R.	New insights in the treatment strategy for pulmonary arterial hypertension.	<b>Cardiovasc Drugs Ther</b>	20	377-386	2006
Shimizu T, Takeda N, Takahashi M, Imai Y, Ishizaka N, Hirata Y, Nagai R.	Subarachnoid hemorrhage from mycotic aneurysms.	<b>Intern Med.</b>	45	1189-1190.	2006
Sahara M, Takahashi T, Morita T, Yao A, Nagashima Y, Hirata Y, Nagai R.	Three-vessel coronary artery disease complicated with congestive heart failure in a highly aged patient with tetralogy of Fallot having undergone palliative surgeries.	<b>Intern Med.</b>	45	1147-1151	2006
Sakamoto A, Okamoto K, Ishizaka N, Tejima K, Hirata Y, Nagai R.	(18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in a case of retroperitoneal fibrosis.	<b>Int Heart J.</b>	47	645-650	2006
Matsumura T, Matsumoto A, Ohno M, Suzuki S, Ohta M, Suzuki E, Takenaka K, Hirata Y, Fujita T, Nagai R.	A case of cholesterol embolism confirmed by skin biopsy and successfully treated with statins and steroids.	<b>Am J Med Sci.</b>	331	280-283	2006

Sumi, M., Sata, M., Toya, N., Yanaga, K., Ohki, T., Nagai, R.	Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis.	<b>Life Sci.</b>	80	559-565	2007
Wakayama, K., Shimamura, M., Sata, M., Sato, N., Kawakami, K., Fukuda, H., Tomimatsu, T., Ogihara, T., Morishita, R.	Quantitative measurement of neurological deficit after mild (30 min) transient middle cerebral artery occlusion in rats.	<b>Brain Res.</b>	1130	181-187	2007
Sainz, J., Sata, M.	CXCR4, a key modulator of vascular progenitor cells.	<b>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</b>	27	263-265	2007
Sahara, M., Sata, M., Morita, T., Nakamura, K., Hirata, Y., Nagai, R.	Diverse contribution of bone marrow-derived cells to vascular remodeling associated with pulmonary arterial hypertension and arterial neointimal formation.	<b>Circulation</b>	115	509-517	2007
Inoue, T., Sata, M., Hikichi, Y., Sohma, R., Fukuda, D., Uchida, T., Shimizu, M., Komoda, H., Node, K.	Mobilization of CD34-Positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis.	<b>Circulation</b>	115	553-561	2007
Sumi, M., Sata, M., Miura, S.I., Rye, K.A., Toya, N., Kanaoka, Y., Yanaga, K., Ohki, T., Saku, K., Nagai, R.	Reconstituted high-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and enhances ischemia-induced angiogenesis.	<b>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</b>	27	813-818.	2007
Kojima, I., Tanaka, T., Inagi, R., Kato, H., Yamashita, T., Sakiyama, A., Ohneda, O., Takeda, N., Sata, M., Miyata, T., Fujita, T., Nangaku, M	Protective role of HIF-2 $\alpha$ against ischemic damage and oxidative stress in the kidney.	<b>J Am Soc Nephrol.</b>	18	1218 -1226	2007
Suzuki, T., Nishi, T., Nagino, T., Sasaki, K., Aizawa, K., Kada, N., Sawaki, D., Munemasa, Y., Matsumura, T., Muto, S., Sata, M., Miyagawa, K., Horikoshi, M., Nagai, R.	Functional interaction between the transcription factor Kruppel-like factor 5 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in cardiovascular apoptosis.	<b>J Biol Chem.</b>	282	9895 -9901	2007

Sumi, A., Sata, M., Hashimoto, A., Imaizumi, T., Yanaga, K., Ohki, T., Mori, T., Nagai, R.	OPC-28326, a selective femoral arterial vasodilator, augments ischemia induced angiogenesis.	<b>Biomed Pharmacother.</b>			in press.
Shirakawa, I., Sata, M., Saiura, A., Kaneda, Y., Yashiro, H., Hirata, Y., Makuuchi, M., Nagai, R.	Atorvastatin attenuates transplant-associated coronary arteriosclerosis in a murine model of cardiac transplantation.	<b>Biomed Pharmacother.</b>			in press.
Nakamura, K., Sata, M., Iwata, H., Sakai, Y., Hirata, Y., Kugiyama, K., Nagai, R.	A synthetic small molecule, ONO-1301, enhances endogenous growth factor expression and augments angiogenesis in ischemic heart	<b>Clin Sci (Lond).</b>			in press
Aihara, K, Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Sata, M., Takamori, N., Yagi, S., Iwase, T., Sumitomo, Y., Kawano, H., Yamada, T., Fukuda, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Sato, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Yoshimura, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Oomizu, A., Tsukada, M., Hayashi, H., Sudo, T., Kato, S., Matsumoto, T.	Strain-dependent embryonic lethality and exaggerated vascular remodeling in heparin cofactor II-deficient mice.	<b>J. Clin. Invest. in press</b>			
Tanaka, K., Sata, M.	Therapeutic application of bone marrow-derived progenitor cells for vascular diseases: Magic bullets having the good without the bad.	<b>Int. J. Gerontol.</b>			in press
Shimamura, M., Sato, N., Sata, M., Wakayama, K, Ogihara, T., Morishita, R.	Expression of hepatocyte growth factor and c-Met after spinal cord injury in rats.	<b>Brain Res.</b>			in press
Iwata, H., Sta, M.	Potential contribution of bone marrow-derived precursors to vascular repair and lesion formation: lessons from animal models of vascular diseases.	<b>Frontiers in Bioscience</b>			in press