

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

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 ……	589
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 ……	636
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 ……	656
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 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
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 ……	691
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 ……	707
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 ……	720
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 ……	728
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 ……	740
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 ……	761
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 ……	772
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 ……	783
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 ……	795
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 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
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 ……	836
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 ……	839
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 ……	919
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 ……	939
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の確立に関する研究	乾 賢一 ……	951
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 ……	966

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 …… 979
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 …… 1000
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 …… 1021
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 …… 1042
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 …… 1054
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 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 …… 1115

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

所属 (独) 国立病院機構京都医療センター 展開医療研究部
研究者 長谷川 浩二

研究要旨 内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法を確立するため、低用量 G-CSF による細胞動員への追加として、増殖因子徐放化を介した幹細胞の生着を促す再生療法の確立を目指し、さらに幹細胞分化効率を上げるため心筋細胞分化制御機構の解明を行った。

分担研究者

- (1) 麒麟麦酒(株)医薬カンパニー開発本部医薬開発研究所
桑木 知朗
- (2) 京都大学大学院医学研究科心臓血管外科
米田 正始
- (3) (財)生産開発科学研究所心臓分子細胞生物学研究室
森本 達也

A. 研究目的

生活習慣の欧米化に伴い増加した重症びまん性冠動脈病変は血行再建困難で、現存の薬物量に対して抵抗性の重症末期心不全を合併する。心不全の予後は薬物療法の進歩により改善傾向にあるものの、薬物療法に抵抗性の重症末期心不全は悪性腫瘍の予後より不良といわれる。成人の心筋細胞は増殖能を喪失しているため、心臓は創傷治癒過程における組織再生能力が非常に乏しい臓器であり、ドナー不足の我国において臓器移植が困難な状況では、重症末期心不全に対する再生医療の確立は、国家的、社会的急務と考えられている。

このような状況のなか、心筋再生療法の確立へ向けて、これまで内因性幹細胞を採取して、これらを *ex vivo* 培養系で増殖、心筋に分化させて移植するアプローチが試みられようとしている。しかし、骨髄、骨格筋心臓あるいは脂肪組織内の幹細胞が心筋細胞へ分化する可能性が報告されているものの、その増殖能・分化効率は極めて低く、臨床応用できる段階ではない。胚性幹 (ES) 細胞は無限増殖能をもちつつ多分化能を有するため、倫理的問題をクリアすれば大いに期待されるアプローチである。しかし、ES 細胞から心筋細胞への分化効率は依然低く、また、分化した細胞を移植しても組織に生着する

細胞数が少ないという欠点がある。内因性幹細胞を顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)により心臓内へ動員させるアプローチは、患者に対する侵襲も少なく簡便な治療である。しかし急性心筋梗塞後のリモデリング抑制や、代償期から心不全発症の予防に奏功するという報告は多いが、病変が完成した心不全末期における治療効果に関しては不明である。

そこで本研究の目的は、重症末期心不全に対する心筋再生療法を確立することであり、この目的を達成するためには

- (1) 慢性期における重症心不全に対して G-CSF、増殖因子を介した内因性幹細胞の動員、生着を促す再生療法の確立
 - (2) 幹細胞の分化効率を上げるための心筋細胞への分化制御機構の解明
- の2つが極めて重要である

B. 研究方法

分担研究者の桑木らは G-CSF に加えてエリスロポイエチンを用いた動員療法に関して検討し、米田らは増殖因子徐放化投与による幹細胞生着療法の確立を目指し、森本らは転写因子 GATA-4 による心筋細胞分化機構の解明を行った。

C. 研究結果

桑木らは主任研究者と共に Biol4.6 心筋症ハムスターの心不全末期において $4\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下の低用量 G-CSF の隔日投与が、心機能と生存率を改善することを見出した。しかし臨床応用するためにはさらにその効果を増強する必要がある。そこで本年度においては造血ホルモンであるエリスロポイエチンによる細胞動員に関して検討し、G-CSF とエリスロポイエチンの併用により造血細胞の動員量に相乗的な増加が認められる

ことを見いだした。

米田らは生体吸収性ゼラチン水和ゲルを用いた蛋白徐放システムを利用して半減期の短い bFGF, HGF, IGF-1 などの細胞増殖因子を徐放化することにより、虚血性心筋症モデルや拡張型心筋症モデルにおいて心機能が改善することを見出した。そしてその機序として血管新生の誘導と心筋アポトーシス減少、組織線維化の抑制が関与していることを示した。さらにこれらの増殖因子徐放化シートを心外膜に貼付し、有茎大網組織を被覆することで血管吻合術不要のバイパス作成が可能であり、虚血心筋の心機能を改善し得ることをウサギ心筋梗塞モデルで示した。そしてその心機能改善メカニズムとして被覆大網からの増殖因子 (VEGF 及び HGF) の分泌が関与していることを見出した。またエリスロポイエチンは抗アポトーシス作用、血管新生作用も有するが、その局所徐放化投与により心筋梗塞モデルにおいて、その心機能を改善することを見出した。

本研究グループは転写コアクチベーター p300 が心筋特異的転写の統制において中心的役割を担う GATA-4 をアセチル化し、その DNA 結合能を増加させること、胚性幹 (ES) 細胞においてヒストン脱アセチル化酵素活性阻害剤 Tricostatin A により GATA-4 がアセチル化し心筋細胞分化亢進が誘導されることを報告した。森本らは心筋細胞分化における GATA-4 因子の活性化機構に関して検討するため、プロテオミクスにより GATA-4 複合体の精製を行った。そして GATA-4 の結合蛋白として Cdk9/Cyclin T1 が存在することを見出し、Cdk9 阻害薬である 5,6-dichloro-1-h-ribofuranosyl-benzimidazole (DRB) が p300 による GATA-4 依存性転写活性の亢進を抑制すること、また ES 細胞において Tricostatin A による心筋細胞分化亢進を DRB が抑制することを示した。

D. 考察

血管再生療法は既にヒトにおいて臨床試験が行われているが、重症末期心不全に対する心筋再生療法は未だ確立していない。今回、我々は平成 17 年度に見出した心不全末期から低容量 G-CSF による細胞動員の追加療法として、増殖因子徐放化投与の有効性を動物レベルで証明すると同時にそのメカニズムに関して検討した。心筋分化効率の上昇に向けた新たな知見も集積しつつある。本治療法を確立するためには幹細胞の動員、生着、分化を組み合わせた治療法の確立が必要であると考えられる。

E. 結論

本研究グループは幹細胞の動員、生着、分化のそのそれぞれのステップにおいて新たなる知見を見出し、動物レベルにおいてこれらを組み合わせ合わせた治療法を検討し、重症末期心不全に対する心筋再生療法の臨床応用を目指している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kanemitsu N, Tambara K, Goditha Upul Premaratne, Kimura Y, Tomita S, Kawamura T, Hasegawa K, Tabata Y, Komeda M. Insulin-like Growth Factor-1 Enhances the Efficacy of Myoblast Transplantation With Its Multiple Functions in the Chronic Myocardial Infarction Rat Model. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:1253-62

2) Xue Lin, Fujita M, Kanemitsu N, Kimura Y, Tambara K, Goditha U, Premaratne, Nagasawa A, Ikeda T, Tabata Y, Komeda M. Sustained-Release Erythropoietin Ameliorates Cardiac Function in Infarcted Rat Heart Without Inducing Polycythemia. *Circ J* 2007; 71:132-137

3) Takaba K, Chunli Jiang, Nemoto S, Saji Y, Ikeda T, Urayama S, Azuma T, Hokugo A, Tsutsumi S, Tabata Y, Komeda M. A combination of omental flap and growth factor therapy induces arteriogenesis and increases myocardial perfusion in chronic myocardial ischemia: Evolving concept of biologic coronary artery bypass grafting. *J Thoracic Cardiovascular Surg.* 2006;132 (4) :891-899

2. 学会発表

1) 杉本亮大, 丹原圭一, 金光尚樹, 長澤 淳, 長谷川浩二, ゴディタ・ウップール・プレマラットネ, 林 雪, 木村 祐, 田畑泰彦, 米田正始. 肝細胞増殖因子徐放投与によるラット拡張型心筋症モデルの治療効果の検討-HGF の抗アポトーシス、抗線維化作用-第 36 回日本心臓血管外科学会学術集会 (2006. 4. 14 盛岡)

2) Yoichi Sunagawa, Tatsuya Morimoto, Teruhisa Kawamura, Tomohide Takaya, Hiromichi Wada, Akira Shimatsu, Masatoshi Fujita, Toru Kita, Koji Hasegawa. Cyclin-dependent kinase-9 is a novel component of p300/GATA-4 complex required for hypertrophic responses in cardiac myocytes. 第 71 回日本循環器学会, 3. 15~17, 神戸

3) Shinji Kaichi, Tomohide Takaya, Tatsuya Morimoto, Yoichi Sunagawa, Teruhisa Kawamura, Kou Ono, Toru Kita, Kyoko Hidaka, Tatsutoshi Nakahata, Koji Hasegawa. Cyclin-dependent kinases-9, as a novel component of p300/GATA-4 complex, is involved in the differentiation of mouse ES cells into cardiac myocytes. 第71回日本循環器学会、3.15~17、神戸

G. 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

なし

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19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