

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18年度 統括・分担研究報告書

主任研究者 宮武 邦夫

平成19 (2007) 年3月

目 次

I. 総括研究報告		
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	-----	1
宮武 邦夫		
II. 分担研究報告		
1. アドレノメデュリン遺伝子導入による間葉系細胞の細胞移植治療効果の増強	-----	4
永谷 憲歳		
2. アドレノメデュリン投与による急性心筋梗塞治療の開発	-----	7
寒川 賢治		
3. 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	-----	10
中尾 一和		
4. アドレノメデュリン投与の循環体液因子・炎症関連因子に与える影響	-----	18
北村 和雄		
5. 急性心筋梗塞症におけるアドレノメデュリンの心筋保護治療の臨床評価	-----	20
川村 淳		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	24

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 宮武邦夫 大阪南医療センター 病院長

研究要旨

アドレノメデュリン(AM)による心筋および脳の保護効果を病態モデルや遺伝子改変動物を用いて明らかにした。また、急性心筋梗塞患者 12 人に対する臨床研究を行い、安全性と有効性を確認した。以上の結果より、AM は虚血性心疾患を含む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
副所長

永谷 憲歳 国立循環器病センター
再生医療部長

中尾 一和 京都大学医学研究科
教授

北村 和雄 宮崎大学医学部内科学
教授

川村 淳 国立循環器病センター
心臓血管内科 医長

B. 研究方法

AM による虚血心筋保護作用とメカニズムを動物実験で検討し、その後、初回急性心筋梗塞症患者を対象に AM を虚血再灌流時に投与し、AM による虚血心筋保護効果と投与の安全性を検討した。心不全治療効果の検討に関しては

ラット心筋梗塞、高血圧性心肥大、急性心筋炎の各モデルを作製し、AM 投与の効果を検討した。脳虚血治療効果を検証する動物モデルとして AM 単独過剰発現トランスジェニックマウスを開発し、脳虚血に対する AM の効果を検討した。その後、軽症の脳梗塞既往者を対象に、AM 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。また、原発性肺高血圧症患者を対象とし、ネブライザーを用いた AM 吸入投与の安全性と有効性(肺高血圧軽減効果)を検討した。

A. 研究目的

アドレノメデュリン(AM)による心筋および脳の保護効果を病態モデルや遺伝子改変動物を用いて明らかにし、また急性心筋梗塞、心不全、脳梗塞、肺高血圧に対して AM を治療薬として臨床応用し、AM 投与による新たな循環器治療法の開発を行なうことである。

(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。臨床応用は国立循環器病センターの倫理委員会承認のもとで行う。

C. 研究結果

AMの虚血心筋保護作用とメカニズムを動物実験で明らかにし、急性心筋梗塞患者12人に対する臨床研究を行い、安全性と有効性を確認した。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。原発性肺高血圧症患者に対するAMの吸入投与により、強力な肺血管拡張作用を確認した。また、AMの急性心筋炎に対する治療効果について、基礎的検討を行い成果をあげた。

D. 考察

当初、計画していた動物実験はすべてが完了し、AMの心血管脳保護作用とそのメカニズムが明らかとなった。臨床試験は急性心筋梗塞症に対してパイロット臨床試験を完了するにとどまったが、低容量と高容量の比較試験を行い、低容量の投与がより安全であることが示された。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。AMはこれらの疾患の治療に有効である可能性が

示された。本ペプチドは日本で発見されたこともあり、虚血性心疾患、脳虚血疾患に対する創薬が行える可能性がある。

E. 結論

AMは虚血性心疾患を含む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。

F. 健康危険情報

急性心筋梗塞を対象とした臨床試験「急性心筋梗塞におけるアドレノメデュリン心筋保護治療の臨床評価」の対象症例12例中の1例においては心破裂による死亡例があった。本例は安全評価委員会で検討され、AMの直接的影響を積極的に示唆するデータはないので研究継続は可能の評価であった。

G. 研究発表

(1) 国内学会発表

口頭発表23件

そのうち主なもの

- 1) 大西俊介、Bobby Yanagawa、片岡雅晴、小玉誠、寒川賢治、永谷憲歳、急性心筋炎に対するアドレノメデュリンの効果 第10回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2006年11月、福井
- 2) 永谷憲歳：骨髄間葉系細胞移植による心不全治療。第6回日本再生医療学会。パシフィコ横浜(横浜市)、3月14日、2007年
- 3) 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)

(2) 海外

原著論文による発表28件

そのうち主なもの

- 1) Jo Ji, Nagaya N, Miyahara Y, Kataoka M, Harada-Shiba M, Kangawa K, Tabata Y. Transplantation of Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Rats With Myocardial Infarction: Benefit of a Novel Nonviral Vector, Cationized Dextran. *Tissue Eng.* 2006 Dec 1; (Epub ahead of print)
- 2) Murakami S, Kimura H, Kangawa K, Nagaya N. Physiological significance and therapeutic potential of adrenomedullin in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2006 6:125-132
- 3) 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* 147: 1642-1653, 2006.
- 4) 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.
- 5) 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* 49: 962-968, 2006.

特許取得

発明の名称:「アドレノメデュリン前駆体 C 端末ペプチドの濃度の上昇を指標として循環器疾患又は炎症性疾患を診断する方法」

発明者:北村和雄

出願人(権利者):国立大学法人宮崎大学

番号:出願番号 特願 2006-148348(出

願日:2006年5月29日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

アドレノメデュリン遺伝子導入による間葉系幹細胞の細胞移植治療効果の増強

分担研究者 永谷 憲歳 国立循環器病センター研究所 再生医療部 部長

研究要旨 我々は、自己複製能・多分化能を有する自己骨髄間葉系幹細胞 (MSC) を用い、不全心に対する新たな細胞移植療法として臨床応用を行ってきた。しかし、心臓に対する細胞移植療法において、MSC を含めたほとんどの移植細胞は生着することなくアポトーシスに陥ることが報告されている。そこで、カチオン化多糖誘導体を用い抗アポトーシス作用をもつアドレノメデュリン遺伝子を効率的に MSC に導入し、ラット心筋梗塞モデルにおいて、その細胞移植治療効果を検討した。

A. 研究目的

骨髄間葉系幹細胞 (MSC) は、自己複製能および多分化能を有し、容易に患者から採取可能な細胞移植ソースであり、近年、その再生医療応用が進みつつある。我々の施設においても、不全心に対する新たな細胞移植療法として、MSC を臨床応用し、その有用性を確認している。

しかし、心臓に対する細胞移植療法において、MSC を含めたほとんどの移植細胞は生着することなくアポトーシスに陥ることが報告されている。特に、虚血心筋においては、移植部位が低酸素状態であることから、その原因は容易に推測される。

これまでに我々はカチオン化多糖誘導体を用いた MSC への効率的な遺伝子導入法について報告してきた。そこで、本研究においては、カチオン化多糖誘導体を用い、抗アポトーシス作用を持つアドレノメデュリン (AM) 遺伝子を MSC に導入し、ラット急性心筋梗塞モデルに

おいて、その細胞移植による治療効果増強の有無を検討した。

B. 研究方法

遺伝子導入キャリアとして、水溶性多糖のデキストランに生体ポリアミンの一つスペルミンを導入したカチオン化デキストラン (SD) 誘導体を作製した。この SD 誘導体を用い、抗アポトーシス作用を持つアドレノメデュリン (AM) 遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を MSC に遺伝子導入し、AM 過剰発現 MSC (AM-MSC) を作製した。ラット心筋梗塞モデル作製 30 分後に、AM-MSC およびコントロール MSC を心筋梗塞境界部位に移植した。治療効果に関し、4 週目において、血行動態、心エコーを用い、心機能改善に関し、比較検討を行った。

C. 研究結果

SD 誘導体を用いることにより、AM 遺伝子を効率よく MSC に導入することに

成功し、AMを過剰分泌するMSCを作製した。この細胞（AM-MSC）はMSC単独と比較して、*in vitro* 無血清低酸素化条件下でアポトーシスを回避できた。ラット急性心筋梗塞モデル作製直後に、AM-MSCを移植したところ、MSC単独群と比較し、血行動態、心エコー上有意な心機能の改善を認めた（図1）。

図1

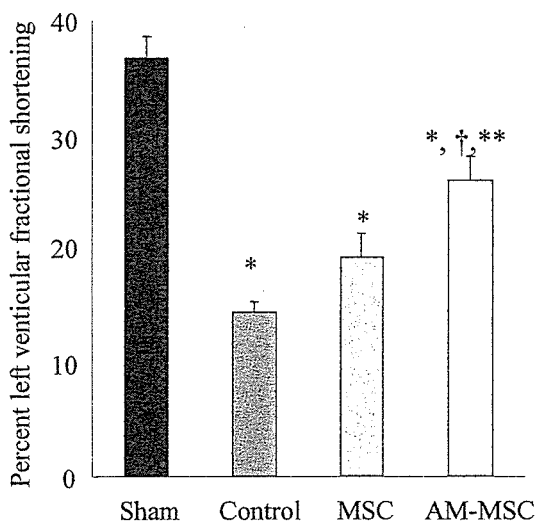


Figure 2. Cardiac function of normal rats (sham), MI rats (control), and those intramuscular transplantation of original MSC (MSC) and AM-MSC, 4 weeks after transplantation. *, $P < 0.05$; significant against the value of sham group. †, $P < 0.05$; significant against the value of control group. **, $P < 0.05$; significant against the value of MSC group.

D. 考察

以上の結果から、急性心筋梗塞モデルにおいて、AM遺伝子を過剰発現させたMSCを移植することで、MSC単独移植と比較し、心機能は更に改善することが明らかとなった。心臓に対する細胞移植療法において、MSCを含めたほとんどの移植細胞は生着することなくアポトーシスに陥ることが報告されている。特に、虚血心に対する細胞移植では、低酸素部

位に対する移植となるため、その生着があまり期待できない。今回、我々は、抗アポトーシス作用を有するAMを移植MSCに遺伝子導入することで、低酸素部位における移植MSCの生着率の向上を目指した。血行動態および心エコーによる評価から、AM-MSC群ではMSC単独群と比較し有意な心機能改善を認めたことから、AM-MSC群においてより多くのMSCが生着しているものと思われる。更に、AMは抗アポトーシス作用のみならず血管拡張、血管新生作用などさまざまな生理活性作用を持つことから、このモデルにおける心機能改善のメカニズムに関し、今後、病理学的検討により解析を行っていく予定である。

E. 結論

急性心筋梗塞モデルにおいて、AM遺伝子導入によるAM過剰発現MSC移植を行い、MSC単独と比較し、心機能が更に改善することが明らかとなった。MSC細胞移植とAM遺伝子導入を組み合わせた新しい細胞移植療法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

Jo JI, Nagaya N, Miyahara Y, Kataoka M, Harada-Shiba M, Kangawa K, Tabata Y. Transplantation of Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Rats With Myocardial

Infarction: Benefit of a Novel Nonviral Vector, Cationized Dextran. Tissue Eng. (in press)

2. 学会発表

①永谷憲歳：骨髄間葉系細胞移植による心不全治療. 第6回日本再生医療学会. パシフィコ横浜（横浜市）、3月14日、2007年

②永谷憲歳：脂肪組織・胎児付属物由来間葉系細胞を用いた心血管保護再生治療. 第6回日本再生医療学会. パシフィコ横浜（横浜市）、3月14日、2007年

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

アドレノメデュリン投与による急性心筋梗塞治療の開発

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

研究要旨 急性心筋炎は急速に進行する重症心不全を来し、時に致命的となるが、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、線維化などが抑制され、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

アドレノメデュリン(AM)は強力な血管拡張性ペプチドであり、血管新生作用や抗アポトーシス作用により臓器保護に働くことが明らかとなっている。したがって AM は種々の臓器障害に対する新たな治療薬となり得る可能性がある。

B. 研究方法

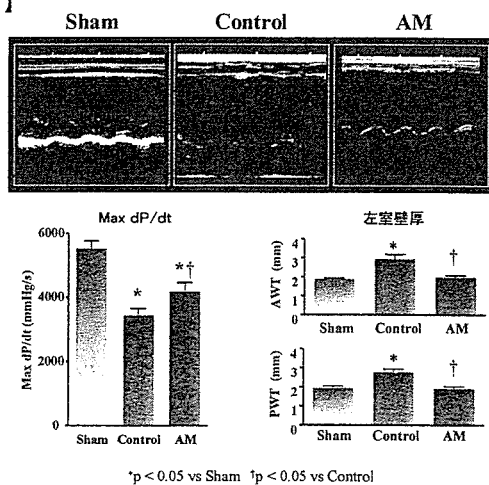
動物モデルは精製ブタ心筋ミオシンを雄性 Lewis ラットの足底に注射し、自己免疫性急性心筋炎モデルを作成した。AM の投与は浸透圧ポンプを皮下に埋め込み、炎症の強い免疫応答期間に合わせて、ミオシン投与 1 週間後から 2 週間、0.05 μ g/kg/min 持続投与した。

病態の評価は、AM投与2週間後に心エコー、カテーテル検査による心機能評価と、病理組織のスコアリングにより行なった。作用機序の検討として、心筋組織中のCD68陽性炎症細胞浸潤の定量、心筋組織・血漿中のmacrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1)濃度の対照との比較、心筋組織中のmatrix metalloproteinase (MMP)-2、-9および、TGF- β 発現の定量を行なった。さらに心筋組織の毛細血管密度の定量を行なった。

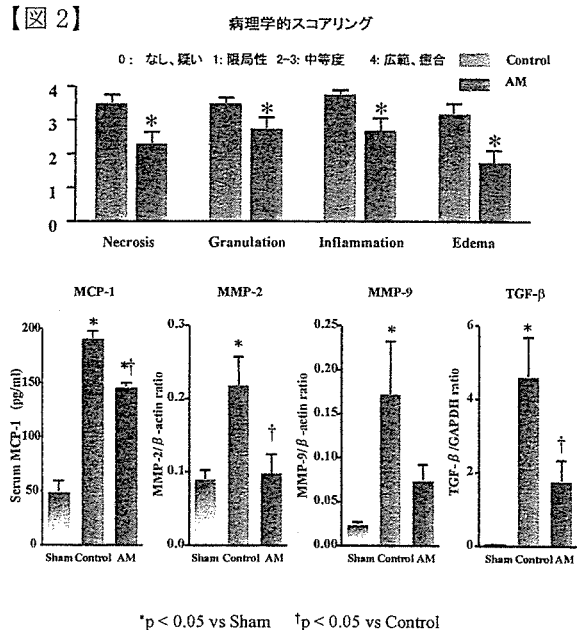
C. 研究結果

急性心筋炎によって、非治療群では左室の拡大、壁肥厚や心筋収縮能の低下を認め、心筋病理組織像においては著明な炎症細胞浸潤・浮腫等を認めた。しかし、AM持続投与群では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(図1)、心筋組織への炎症細胞浸潤・浮腫等を著明に抑制した(図2)。また、心筋炎によって心筋組織へのCD68陽性細胞浸潤、心筋組織・血漿中のMCP-1濃度、心筋組織のMMP-2、MMP-9、TGF- β 発現はそれぞれ増加していたが、AM投与によっていずれも有意に減少した(図2)。さらに、心筋組織内の毛細血管密度は炎症によって上昇しており、AM投与群はそれを上回る上昇を認めた。

【図 1】



【図 2】



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することによって、心機能を改善することが明らかとなった。AMの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であり、著明な浮腫の改善はAMによる血管透過性亢進の抑制によるものであると考えられた。また、MMP-2、MMP-9、TGF-βは心筋リモデリング促進に関わっており、今回の研究では、これらの病理組織における線維化抑制とともにMMP-2、MMP-9、TGF-βの発現抑制

が示された。また、炎症単独による効果を上回る血管新生促進作用も明らかとなり、これらがAMの心筋炎における心筋保護作用の機序の一部関与していると考えられた。

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ていく。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、またそれをベースにした心不全患者についても前臨床試験さらには臨床試験へと展開していくことを目標とする。

E. 結論

ラット急性心筋炎モデルにおいて炎症急性期に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は心不全治療薬としてのみならず、急性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) Jo JI, Nagaya N, Miyahara Y, Kataoka M, Harada-Shiba M, Kangawa K, Tabata Y. Transplantation of Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Rats With Myocardial Infarction: Benefit of a Novel Nonviral Vector, Cationized Dextran. Tissue Eng. 2006 Dec 1; (Epub ahead of print)

2) Murakami S, Kimura H, Kangawa K, Nagaya N.
Physiological significance and therapeutic
potential of adrenomedullin in pulmonary
hypertension. Cardiovasc Hematol Disord Drug
Targets. 2006 6:125-132

2. 学会発表

1) 大西俊介、Bobby Yanagawa、片岡雅晴、小玉誠、
寒川賢治、永谷憲歳、急性心筋炎に対するアド
レノメデュリンの効果 第10回日本心血管内
分泌代謝学会学術総会、2006年11月、福井

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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）

研究要旨：我々は血管拡張作用を有するホルモンであるアドレノメデュリン（AM）が傷害内皮再生、更には血管再生作用を発揮することを明らかにした。これまでの本研究課題において我々は、ヒトへの AM 投与での有効域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、AM-Tg マウスに脳梗塞モデルを作成すると、AM が血管再生を促進するのに加え、ニューロンのアポトーシスを抑制し、神経再生を促進することを明らかにした。

一方我々はこれまでに、全能性と無限の増殖能を有する 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）の同定に成功し、野生型マウス下肢虚血モデルにおいて VPC が血管再生を促進することを明らかにした。

これらの研究成果を踏まえ我々は、AM-Tg マウス下肢虚血モデルに VPC 移植を施行し、AM の増強が血管前駆細胞による血管再生に与える効果を検討した。また、慢性脳虚血に伴う認知障害を有する患者への AM 投与を計画し、臨床投与に向けた取り組みを開始した。

A 研究目的

我々はこれまで、アドレノメジュリン（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。また、ヒトへの AM での有効域と同等の血中濃度上昇を認める AM トランスジェニックマウス（AM-Tg）を開発し、中大脳動脈 20 分閉塞脳梗塞モデルを作成することで、AM の虚血脳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シスの抑制と、神経機能の回復が認められることを明らかにした。

一方我々は、全能性と無限の増殖能を有する

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(-) VEGFR-2(+) VE カドヘリン(-) PDGF 受容体(+) 細胞分画であった。このような性質を持つヒト VPC を、野生型マウス大腿動脈結紮下肢虚血モデルに移植すると、虚血肢の血管再生を有意に促進することを明らかにした。

そこで我々は、AM-Tg マウスを用いた下肢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）を移植し、細胞治療に AM を併用した際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

肝臓から AM を単独で過剰産生する AM-Tg マウスに、大腿動脈結紮下肢虚血モデルを作成し、生食 (PBS) 100 μ l に溶解したヒト ES 細胞由来細胞を 5×10^5 個動脈内投与した。免疫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血流計を用いて、虚血下肢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 型コラ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 α 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。

以下の 6 群において虚血肢の血管再生を比較した。

- 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

動物実験は京都大学実験動物施設規定に準拠し、倫理面に配慮して行った。

C. 研究成果

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

AM がヒト ES 細胞由来 VPC から内皮細胞への分化を促進して VPC 移植による血管再生を促進することが明らかとなり、虚血性疾患に対する血管前駆細胞移植による血管再生療法におい

て、AM 投与がその治療効果を増強する可能性が示唆された。

E. 結論

これまでの研究成果を踏まえ我々は、小血管性認知障害を有する患者への AM 持続静注による血管-神経再生療法を着想し、臨床応用に向けた計画書の作成を開始した。

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. Miyana, 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 proliferator-activated receptor γ 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 γ 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 147: 1642-1653, 2006.

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 49: 962-968, 2006.

2. 学会発表

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 69th 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 69th 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 7th Japan-China Joint Hypertension Symposium / International Session of the 28th 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

アドレノメデュリン投与の循環体液因子・炎症関連因子に与える影響
分担研究者 北村和雄 宮崎大学医学部内科学講座循環体液制御学分野教授

研究要旨: アドレノメデュリン(AM)を人体に長時間投与すると、強力かつ直接的なアルドステロン分泌抑制効果が観察され、これは原発性アルドステロン症患者でも確認された。アルドステロン抑制は心血管疾患の治療には有利と考えられる。一方、interleukin-6を介するCRP上昇作用も確認され、AMは場合によっては炎症促進的な作用があると考えられた。

A. 研究目的

虚血性心血管障害では血行動態の変化に加えて、循環体液因子や炎症関連因子が疾患形成や病態修飾に重要であり、アドレノメデュリン(AM)を治療薬として利用する場合は、人体へのAM投与時の各種因子に及ぼす影響を十分評価しておく必要がある。

B. 研究方法

短時間投与は化学合成 AM (30 ng/kg/min)を90分間投与し、投与前と60分後に血行動態、各種液性因子の検討を行い、長時間投与では化学合成 AM (15 ng/kg/min)を27時間持続投与し、前、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、原発性アルドステロン症患者4名についても同様の長時間投与を行った。

(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

ヒトに対する AM の1時間投与では、血圧低下に対抗する反射性の血漿レニン活性(PRA)が認められたが、血漿アルドステロン濃度(PAC)

には変化がみられなかった。PRAは長時間投与でも同程度の上昇が維持されたが、PACは投与開始後3時間以降に低下がみられ、18時間以降は有意差をもって低下した。さらに、原発性アルドステロン症患者においても、PACの著明な低下がみられ、血圧も大きく低下した。一方、炎症関連因子では、AM長時間投与により全症例で血中CRP、interleukin-6が有意に上昇したが、Interleukin-1やTNF- α に変化はみられなかった。経時的にみると、Interleukin-6の上昇が先行して出現し、遅れてCRPの持続的な上昇が認められた。

D. 考察

基礎実験において AM には副腎皮質細胞からのアルドステロン分泌を直接抑制する効果が報告されている。今回、PRA上昇にもかかわらずアルドステロンの抑制が認められたことから、ヒトにおいても AM による非常に強力かつ直接的なアルドステロン分泌抑制効果があることが確認できた。これは、心不全などの治療において、AMが血行動態以外に体液制御因子に関しても有益である可能性を示すものと考えられる。一方、AMにはInterleukin-6増加を介する炎症促進因子としての作用もあることが示唆された。