

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18年度 総括研究報告書

主任研究者 松原 弘明

平成19（2007）年4月8日

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18年度 総括研究報告書

主任研究者 松原 弘明

平成19（2007）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調整と前臨床研究

王 英正----- 1 1

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 ----- 1 5

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 雄一----- 2 0

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 2 4

IV. 研究成果の刊行物・別刷----- 2 8

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

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。ヒト心筋生検サンプルから心筋幹細胞を単離・増殖させ、移植細胞の生存・増殖を目的とした局所 bFGF 徐放シートとの併用による新規の心筋再生細胞移植療法を開発し、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の極少量サンプルより心筋幹細胞を単離・増殖させ、自己の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結果をもとに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の単離・増幅とオート移植自己幹細胞株の樹立、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。より効率に幹細胞を精製するため、特定の

表面抗原を用いず、幹細胞の特徴である高い増殖能によって生成される幹細胞コロニーを形成させることで、ヒト心筋幹細胞の純化に成功した。このヒトCSC及びMDPCはCD105⁺/Nkx2.5⁺の間葉系幹細胞の特徴を示し、移植実験にて心筋及び血管細胞への直接分化とparacrine効果によって虚血心機能を改善させることを確認した。初年度におけるこれらの研究成果は、特異的な体組織幹細胞とその増幅因子との併用療法へとさらに発展させる形で応用した。平成18年度は大型動物を用いた研究に重きを置き、ランダム割り振りによる2つの前臨床治験を行った。(治験1) bFGF単独の効果を検討するため2群間の割り振り治験として、ブタに心筋梗塞作成後1ヶ月の慢性期に(a) 200μg bFGF単独徐放群と(b) 血清投与群の2群比

較(母集団=20)を行い、MRI、心エコー、心筋血流測定などによる効果判定を行った。

(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、GCSF）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）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

より効率に幹細胞を精製するため、特定の表面抗原を用いず、幹細胞の特徴である高い増殖能によって生成される幹細胞コロニーを形成させることで、ヒト心筋幹細胞の純化に成功した。このヒトCSC及びMDPCはCD105⁺/Nkx2.5⁺の間葉系幹細胞の特徴を示し、移植実験にて心筋及び血管細胞への直接分化とparacrine効果によって虚血心機能を改善させることを確認した。初年度におけるこれらの研究成果は、特異的な体組織幹細胞とその増幅因子との併用療法へとさらに発展させる形で応用した。平成18年度は大型動物を用いた研究に重きを置き、ランダム割り振りによる2つの前臨床治験を行った。(治験1)bFGF単独の効果を検討するため2群間の割り振り治験として、ブタに心筋梗塞作成後1ヶ月の慢性期に(a)200 μ g bFGF単独徐放群と(b)血清投与群の2群比較(母集団=20)を行い、MRI、心エコー、心筋血流測定などによる効果判定を行った。各処置後一ヶ月、(a)群は(b)群に比し5%の有意な機能改善を認めた。この結果は病理組織学的検討により、幹細胞移植を行わない状況下でもbFGF単独徐放で虚血心における血管新生効果として観察された。この試験結果に基づき、次に(治験2)としてbFGF徐放下で、移植する幹細胞の必要最小細胞数と幹細胞

の機能的特異性を検証した。比較細胞としてヒト骨髄間葉系幹細胞(MSC)を用いた。母集団=40のランダム割り振り治験で、(a)bFGF単独徐放群、(b)bFGF+10⁷MSC、(c)bFGF+10⁷CSC、(d)bFGF+10⁸ CSCの4群比較治験を遂行中。現在までの中間評価として、治験1で観察されたbFGF単独徐放の有効性は高い再現性で認められたが (b)群のMSCとの併用では更なる改善効果を認めず、CSCは(c)群で(a)群よりさらに5%前後の心機能改善効果があった。興味深いことに(d)群では有効性が認められず、逆に不整脈の発生頻度が有意に増加した。本研究により、CSCの特異性と品質基準が確立され、最小有効細胞数が決定された。今後、上記の治験結果を詳細に検証して、平成19年度は臨床応用に展開させる予定である。

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している。我々が開発した自己心臓由来の心筋幹細胞とFGF徐放シートは世界で初めての臨床応用可能な心筋再生治療技術である。この移植法は世界で最も有効な心筋再生医療と考えられる。大動物実験の成果を踏まえて、京大探索医療センター検証部で作成されるプロトコールで平成19年度は臨床応用に展開させる予定である。

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・有効性を目的とした大動物実験の成果を踏まえて、京大探索医療センター検証部で作成されるプロトコールをもとに、慢性虚血性心臓病を対象に平成19年度は臨床応用に展開させる。

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 Tateishi K, Ashihara E, Takehara N, Nomura T, Honsho S, Nakagami T, Morikawa S, Takahashi T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by stem cell antigen-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration. **J Cell Science, in press**
- 2 Tateishi K, Ashihara E, Honsho S, Takehara N, Nomura T, Takahashi T, Ueyama T, Yamagishi M, Yaku H, Matsubara H, Oh H. Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3 β signaling **Biochem Biophys Res**

- Commun. 2007; 352(3):635-641.**
- 3 Nomura T, Ashihara E, Tateishi K, Asada S, Ueyama T, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. Skeletal myosphere-derived progenitor cell transplantation promotes neovascularization in α -sarcoglycan knockdown cardiomyopathy. **Biochem Biophys Res Commun. 2007; 352(3):668-674.**
 - 4 Nakajima N, Takahashi T, Kitamura R, Isodono K, Asada S, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. MicroRNA-1 facilitates skeletal myogenic differentiation without affecting osteoblastic and adipogenic differentiation. **Biochem Biophys Res Commun. 2006 ;350:1006-1012.**
 - 5 Zen K, Okigaki M, Hosokawa Y, Adachi Y, Nozawa Y, Takamiya M, Tatsumi T, Urao N, Tateishi K, Takahashi T, Matsubara H. Myocardium-targeted delivery of endothelial progenitor cells by ultrasound-mediated microbubble destruction improves cardiac function via an angiogenic response. **J Mol Cell Cardiol. 2006;40:799-809.**
 - 6 Urao N, Okigaki M, Yamada H, Adachi Y, Matsuno K, Matsui A, Matsunaga S, Tateishi K, Nomura T, Takahashi T, Tatsumi T, Matsubara H. Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia. **Circ Res. 2006;98:1405-1413.**
 - 7 Nishikawa S, Tatsumi T, Shiraishi J, Matsunaga S, Takeda M, Mano A, Kobara M, Keira N, Okigaki M, Takahashi T, Matsubara H. Nicorandil regulates Bcl-2 family proteins and protects cardiac myocytes against hypoxia-induced apoptosis. **J Mol Cell Cardiol. 2006 40:510-519**
 - 8 Iida Y, Oda Y, Nakamori S, Tsunoda S, Kishida T, Gojo S, Shin-Ya M, Asada H, Imanishi J, Yoshikawa T, Matsubara H, Mazda O. Transthoracic direct current shock facilitates intramyocardial transfection of naked plasmid DNA infused via coronary vessels in canines. **Gene Ther. 2006 13 :906-16.**
 - 9 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 ;112:2677-85.**
 - 10 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 ;336:118-27.
- 11 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.
- 12 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.
- 13 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;111:1523-1529
- 14 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;37:775-84
- 15 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.
- 16 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**
- 17 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.

18 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. M. Takeda, T. Tatsumi, M. Okigaki, S. Matsunaga, S. Nishikawa, M. Kobara, H. Matsubara Overexpression of Tie2-Promoted Activated Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Endothelial Cells Enhances Mature Neovascularization via Akt Signaling Pathway in Mice Hindlimb Ischemia. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA

2. S. Matsunaga T. Tatsumi, M. Okigaki, M. Takeda, S. Nishikawa, M. Kobara, H. Matsubara Overexpression of Tie2-Promoted Activated Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Endothelial Cells Enhances Angiogenesis and Induces Cardioprotective Effect via Akt Signaling Pathway in Mice Myocardial Infarction. **American Heart Association** (米国心臓

病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA

3. A. Katsume, M. Okigaki, A. Matsui, N. Urao, H. Yamada, H. Matsubara Ca²⁺-dependent Tyrosine Kinase PYK2 Promotes Atherogenesis by Inducing Monocyte/Macrophage-Derived IL-1 β and MCP-1 Unmasked by Analysis of PYK2/ApoE Double Deficient Mice. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA

4. A. Matsui, M. Okigaki, A. Katsume, N. Urao, H. Yamada, H. Matsubara, Calcium-Dependent Tyrosine Kinase PYK2 Plays Crucial Role in Angiotensin II- But Not Norepineprine-Mediated Activation of Rac/Superoxide Pathway That Differentially Regulates Blood Pressure and Vasoconstriction Unmasked by Analysis of PYK2-Knock-out Mice. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA

5. A. Matsui, M. Okigaki, A. Katsume, S. Matsunaga, S. Nishikawa, N. Urao, H. Yamada, H. Matsubara Central Role of Calcium-Dependent Tyrosine Kinase PYK2 in eNOS-Mediated Angiogenesis

- Unmasked by PYK2 Knockout Mice
American Heart Association (米国心臓病学術会議) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
6. M. Kobara, J. Hamada, M. Matsumura, T. Tanaka, H. Toba, H. Hayashi, None; T. Tatsumi, H. Matsubara, T. Nakata
Antagonism of Interleukin-6 Receptor Attenuates Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction **American Heart Association** (米国心臓病学術会議) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
7. N. Nakajima, T. Takahashi, R. Kitamura, K. Isodono, S. Asada, T. Ueyama, H. Matsubara, H. Oh, MicroRNA-1 Facilitates Myogenic Differentiation and Maturation into Skeletal Myotubes without Affecting Osteoblastic and Adipogenic Differentiation **American Heart Association** (米国心臓病学術会議) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
8. K. Tateishi, T. Takahashi, S. Honsho, N. Takehara, T. Nomura, H. Matsubara, H. Oh
Single Cardiac Stem Cells in Adult Mammals Exhibit Mesenchymal Features and Proliferate through Akt/GSK3 Pathway **American Heart Association** (米国心臓病学術会議) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
9. K. Zen, M. Okigaki, H. Matsubara
Myocardium-Targeted Delivery of Endothelial Progenitor Cells By Ultrasound-Mediated Microbubble Destruction Improves Cardiac Function via an Angiogenic Response **American Heart Association** (米国心臓病学術会議) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
10. H. Yamada, H. Yokoi, Y. Tsubakimoto, H. Takada, T. Takahashi, M. Okigaki, E. Ashihara, T. Maekawa, M. Iwai, M. Horiuchi, H. Matsubara, Bone Marrow Cells that Abundantly Express Angiotensin AT1 and AT2 Receptors Modulate Vascular Repair by Regulating Mobilization and Differentiation of Smooth Muscle Cell Progenitors and Macrophage Activation **American Heart Association** (米国心臓病学術会議) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
11. H. Yamada, Y. Tsubakimoto, H. Yokoi, H. Takada, T. Takahashi, M. Okigaki, E. Ashihara, T. Maekawa, H. Matsubara
Bone Marrow Angiotensin II Type 1 Receptor Accelerated the Development of Atherosclerosis by Regulating Differentiation of Macrophage Progenitors and Macrophage Functions **American Heart Association** (米国心臓

病学会議) 2006 Nov12-15, Chicago,
USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

心臓内心筋幹細胞の単離法 (PCT出願中)

骨格筋組織内幹細胞の精製法 (PCT出願中)

骨格筋由来多能性幹細胞 (国内出願公開)

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

上記の3つの特許に関して、米国の2社より、特許の買収及び米国内での産業展開または京都大学との共同研究を折衝中

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単離・増幅に関する研究

（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) ヒト心臓内及び骨格筋組織から心筋幹細胞の単離精製法とその増殖因子の同定
- (2) 心筋細胞移植医療の実現化に向けたヒト心筋幹細胞と特異的増殖因子を組み合わせたハイブリッド的細胞療法の開発。

B. 研究方法

ヒト体組織内から心筋幹細胞を純化し遺伝子の網羅的検索により、細胞特異的増幅因子を同定する。組織工学的手法を用いて増幅因子の組織局所的徐放下で、心筋幹細胞を低心機能の心臓内に直接移植する。

（倫理面への配慮）

- 1) 臨床試験プロトコールはIR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。

B. 研究結果

ヒト心臓内及び骨格筋組織から心筋幹細胞の単離とbFGFとFSTがそれぞれ特異的な増幅因子であると同定した。前臨床治験にて、bFGF徐放下での心筋幹細胞移植は同じ表現型である骨髄間葉系幹細胞よりも有効に心

機能を改善させる結果となった。

C. 考察

本前臨床治験は、比較細胞を用いた細胞機能の特異性や必要有効細胞数の検討を初めて行った研究であり、単離したヒト幹細胞の高い有用性を証明した。bFGFの徐放を併用した細胞療法の開発は画期的であり、臨床応用は期待できる。

E. 結論

ヒト心筋幹細胞とbFGFとの併用移植療法は前臨床治験でその有効性と安全性が確認され、平成19年度には各体制との連携を進め、第I/II相臨床治験を実施する。

F. 健康危険情報 該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Tateishi K, Ashihara E, Takehara N, Nomura T, Honsho S, Nakagami T, Morikawa S, Takahashi T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by stem cell antigen-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration. **J Cell Science, in press**
- 2 Tateishi K, Ashihara E, Honsho S, Takehara N, Nomura T, Takahashi T, Ueyama T, Yamagishi M, Yaku

H, Matsubara H, Oh H. Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3 β signaling **Biochem Biophys Res Commun. 2007; 352(3):635-641.**

- 3 Nomura T, Ashihara E, Tateishi K, Asada S, Ueyama T, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. Skeletal myosphere-derived progenitor cell transplantation promotes neovascularization in α -sarcoglycan knockdown cardiomyopathy **Biochem Biophys Res Commun. 2007; 352(3):668-674.**
- 4 Nakajima N, Takahashi T, Kitamura R, Isodono K, Asada S, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. MicroRNA-1 facilitates skeletal myogenic differentiation without affecting osteoblastic and adipogenic differentiation. **Biochem Biophys Res Commun. 2006 ;350:1006-1012.**
- 5 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**
- 6 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.
- 7 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
- 8 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.
- 9 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
- 1 N. Nakajima, T. Takahashi, R. Kitamura, K. Isodono, S. Asada, T. Ueyama, H. Matsubara, H. Oh, MicroRNA-1 Facilitates Myogenic Differentiation and Maturation into Skeletal Myotubes without Affecting Osteoblastic and Adipogenic Differentiation **American Heart Association** (米国心臓病学術会議) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
- 2 K. Tateishi, T. Takahashi, S. Honsho, N. Takehara, T. Nomura, H. Matsubara, H. Oh Single Cardiac Stem Cells in Adult Mammals Exhibit Mesenchymal Features and Proliferate through Akt/GSK3 Pathway **American Heart Association** (米国心臓病学術会議) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
- 3 K. Zen, M. Okigaki, H. Matsubara Myocardium-Targeted Delivery of Endothelial Progenitor Cells By Ultrasound-Mediated Microbubble Destruction Improves Cardiac Function via an Angiogenic Response **American Heart Association** (米国心臓病学術会議) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
- 4 H. Yamada, H. Yokoi, Y. Tsubakimoto, H. Takada, T. Takahashi, M. Okigaki, E. Ashihara, T. Maekawa, M. Iwai, M. Horiuchi, H. Matsubara, Bone Marrow Cells that Abundantly Express Angiotensin AT1 and AT2 Receptors Modulate Vascular Repair by Regulating Mobilization and Differentiation of Smooth Muscle Cell Progenitors and

Macrophage Activation **American Heart
Association** (米国心臓病学会)

2006 Nov12-15, Chicago, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

心臓内心筋幹細胞の単離法 (PCT出願中)

骨格筋組織内幹細胞の精製法 (PCT出願中)

2 実用新案登録

特になし

1. その他

上記の3つの特許に関して、米国の2社より、特許の買収及び米国内での産業展開または京都大学との共同研究を折衝中

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ということが報告された。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, Kumemura 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 angiotensin-I 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 HUVECs. *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, Oogawa 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 PlGF 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

2. 特許取得

特になし

3. 実用新案登録

特になし

4. その他

特になし