

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

ヒト ES 細胞を用いた *in vitro* 血管神経
細胞分化システムによる「虚血脳再生ホ
ルモン」の探索とホルモン補償による新
規認知症治療法の開発に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 伊藤 裕

平成19年（2007年）4月

目次

I. 総括研究報告

アドレノメジュリンの血管神経再生作用に関する研究 -----1

伊藤 裕

II. 分担研究報告

1. サル ES 細胞を用いた神経細胞への分化誘導法の開発---7

仁藤 新治

2. 血管性認知症の成因に関する基礎的および臨床的検討---11

高橋 良輔

3. アドレノメジュリンの内因性幹細胞活性化による組織障害

作用の検討 -----12

永谷 憲歳

4. メタボリックシンドローム患者における末梢血中内皮前駆

細胞の動態の解析 -----14

吉政 康直

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----16

IV. 研究成果の刊行物・別冊 -----21

ヒト ES 細胞を用いた in vitro 血管神経細胞分化システムによる
「虚血脳再生ホルモン」の探索とホルモン補償による新規痴呆治療法の開発
——アドレノメジュリンの血管神経再生作用

主任研究者：伊藤 裕 (慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝学講座 教授)

メタボリックシンドロームの結果生じる血管性痴呆は極めて深刻な医学的問題であるが、これまで根治的治療法は開発されておらず、虚血脳再生医療に大きな期待が寄せられている。本年度の検討で、心不全症患者等へ応用されていた血管拡張ホルモンであるアドレノメジュリン(AM)が、マウス脳梗塞モデルにおいて血管再生と神経再生を促進して梗塞域を縮小し、また梗塞後の運動機能の回復を促進することが明らかとなった。さらには、AM が培養細胞の神経分化を促進することを見出した。これらの結果より、虚血脳再生ホルモンを用いた新規痴呆治療法の開発に向けた取り組みが前進し、我々は血管性痴呆患者に対する AM の臨床応用に向けた準備を開始した。

A 研究目的

高血圧症、糖尿病など生活習慣病の重積はメタボリックシンドローム(Metabolic Syndrome; MS)として脚光を浴びている。MS 患者は全人口の 1/4 にも達し、その結果生ずる脳血管障害による認知障害の患者数は 100 万人に及び、2020 年には倍増する。認知障害は患者の QOL 障害、家族の介護負荷を考えると極めて深刻な問題であるが、これまで認知障害に対する根治的治療法はなく、保存的に患者を見守るしかない状況である。そこで虚血脳における“再生医療”に期待が寄せられているが、神経幹/前駆細胞の完全な同定が未だなされず、移植細胞による高次脳機能の回復も、期待された効果を得られていない。

これまで我々はわが国で発見された心臓血管ホルモンの臨床的意義について研究を続け、

血管拡張作用を有するナトリウム利尿ペプチド(ANP, BNP, CNP)及びアドレノメジュリン(AM)が、血管再生を促進することを明らかにした。一方我々は、無限の増殖性とすべての臓器細胞に分化し得る ES 細胞の再生医療への応用を検討し、ES 細胞より血管を構成する内皮細胞及び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)”の同定に成功した。また、最近になり、VPC から神経細胞の分化の可能性も見出した。

これらの成果を踏まえ我々は、ヒト ES 細胞由来“血管神経前駆細胞(Vasculo-Neural Progenitor Cells; VNPC)”を同定するとともに、ヒト血管、神経細胞への分化誘導システムを構築し、そのシステムを駆使して新たな虚血脳再生ホルモンを探索し、認知障害治療におけるホルモン補償の臨床的有用性を検討するこ

とを計画した。

本年度はヒトでの有効域に匹敵する AM 血中濃度の上昇を認める AM トランスジェニックマウスを開発し、中大脳動脈 20 分閉塞脳梗塞モデルにおいて、AM の虚血脳再生ホルモンとしての有用性を検討した。

B. 研究方法

肝臓において AM を過剰産生し、血中 AM 濃度がヒトでの投与の有効域に達する SAP プロモーター AM トランスジェニックマウス (AM-Tg) を開発した。AM-Tg に中大脳動脈 20 分閉塞脳梗塞モデル (20m-MCAO) を作成し、第 56 病日までマウスを観察して、脳梗塞亜急性期から慢性期における AM の血管-神経再生作用を検討した。また、20m-MCAO を施行した野生型マウスにおいて浸透圧ポンプを用いた外因性の AM 投与を行い、投与開始に好適のタイミングを検討した。

第 56 病日までに回収した大脳基底核組織において、ニューロンマーカー NeuN, アストログリアマーカー GFAP, 断片化 DNA マーカー ssDNA, 白血球マーカー CD45, 内皮マーカー PECAM-1 による免疫染色を施行し、梗塞域、グリオーシス、アポトーシス、白血球浸潤、血管再生を評価した。さらには BrdU を第 4~6 病日に腹腔内投与した後に BrdU/NeuN 二重陽性細胞の免疫染色を施行し、神経再生を評価した。

20m-MCAO を作成したのち末梢血中の CD34 陽性細胞数を定量して、脳梗塞後内因性に生じる内皮前駆細胞の動員を評価した。また、レーザードップラー血流計を用いて、梗塞域の局所血流を評価した。梗塞後の運動機能の回復はロータロッド法により評価した。

また AM が神経分化に与える効果を検討する目的で、ラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞を血

清 0.5% 下で 7 日間培養し、AM 添加に伴う神経突起の伸長を評価した。

C. 研究成果

20m-MCAO における梗塞域とグリオーシスは AM-Tg において有意に減少した、第 28 病日において、梗塞域は野生型と比較して $20.7 \pm 10.0\%$ 減少、グリオーシスは $29.4 \pm 6.6\%$ 減少した (図 1)。梗塞域の縮小が認められるよりも早期の段階から、虚血基底核におけるアポトーシスと白血球浸潤が有意に低下していた。第 4 病日においてアポトーシスは $28.8 \pm 7.4\%$ 減少、白血球浸潤は $42.6 \pm 5.2\%$ 減少した。

脳梗塞後の血管再生と神経再生は AM-Tg において有意に増加した。MCAO 施行前に野生型と AM-Tg でそれぞれ 1118 ± 69 , 1244 ± 89 (/ml) であった末梢血中 CD34 陽性細胞数は 20m-MCAO 施行後、有意に上昇して day4 にはそれぞれ 1774 ± 272 , 3199 ± 562 (/ml) となり AM-Tg で有意に高値であった。第 28 病日において、レーザードップラー法で測定した梗塞域の血流は野生型比 $10.9 \pm 3.9\%$ 増加、BrdU/NeuN 二重陽性細胞として定量した再生ニューロンは $20.2 \pm 7.2\%$ 増加した (図 2)。ロータロッド法で評価した脳梗塞後の運動機能は、血管-神経再生促進に伴い、AM-Tg において有意な改善を認めた。浸透圧ポンプによる AM の外因性投与においても、第 7 病日までに有意な血管再生の促進と梗塞域の縮小を認め、脳梗塞発症直前ないしは 24 時間以内の AM 投与開始で十分な効果が認められた。一方、脳梗塞発症 72 時間以降での投与開始では第 7 病日までに梗塞域の有意な縮小を得られなかった。

PC12 細胞 7 日間培養後の神経突起長は AM 10^{-8} mol/l 添加でコントロールに対して $210.1 \pm$

48.3%増加した。PC12 細胞と臍帯血静脈内皮細胞 (HUVEC) の共培養でも神経突起長は有意に増加したが (124.2±25.1%増)、AM の添加で更に増加した (内皮共培養 AM 非添加群と比較して 82.6 ±30.7%増)。

図1: AM-Tg マウスにおける梗塞域とグリオシスの縮小

中大脳動脈20分閉塞脳梗塞モデル第7病日 虚血基底核
青,ニューロンマーカー-NeuN 緑,アストログリアマーカー-GFAP

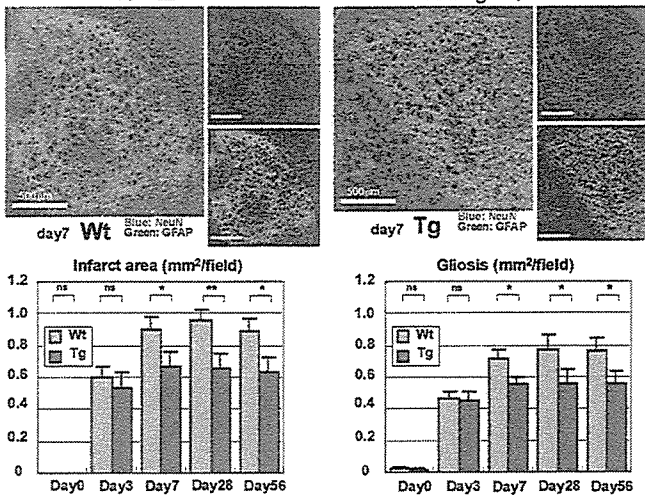
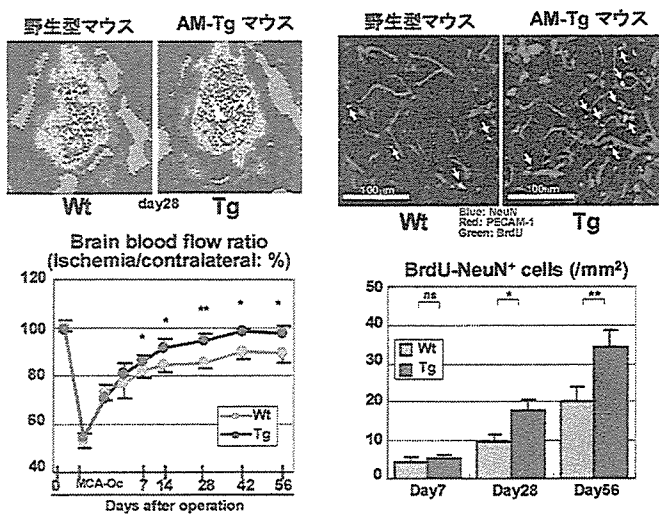


図2: AM-Tg マウスにおける血管再生と神経再生の促進

中大脳動脈20分閉塞脳梗塞モデル第28病日 中大脳動脈20分閉塞脳梗塞モデル第28病日
虚血側: 左脳 健側: 右脳 矢印: 再生ニューロン



D. 考察

以上の検討より、マウス脳梗塞モデル発症直後急性期から慢性期において、AM が血管-神経再生作用を発揮することが明らかとなり、これまで心不全症患者等への臨床応用が期待されて

いた AM が、虚血脳再生ホルモンとしても有用である可能性が示唆された。

E. 結論

AM の虚血脳再生ホルモンとしての有用性が明らかとなり、ホルモン補償による新規痴呆治療法の開発が前進した。これまでの研究成果を踏まえ我々は、脳虚血患者に AM を投与することで、血管再生と神経再生を誘導する新しい治療法「血管-神経再生療法」を構築できる可能性を着想し、血管性痴呆患者に対する AM の投与を計画している。現在倫理委員会への申請を準備中である。

ミニメンタルステート検査 (MMSE)、臨床痴呆評価尺度 (CDR) 等の神経学的テストで客観的に証明される認知障害を有し、核磁気共鳴画像法 (MRI) による画像検査で認知障害の発症を説明する小血管病変が示される患者に対して、AM を 0.0025 γ から投与開始し、0.02 γ までの増量を試みる (心不全治療量の 40% の投与量)。2 週間の持続的静脈投与の後、評価スケールによる認知能の評価、画像検査による脳血流と脳代謝の評価、採血検査による末梢血 CD34 陽性血管前駆細胞動員の評価等を行い、血管性痴呆における、AM 投与による虚血脳再生を介した治療効果を判定する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yurugi-Kobayashi T, Itoh T, Schroeder T,

Nakano A, Narazaki G, Kita F, Yanagi K, Hiraoka-Kanie M, Inoue E, Ara T, Nagasawa T, Just U, Nakao K, Nishikawa S, Yamashita JK.

Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors.

Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 26: 1977-1984, 2006.

2. Miyashita K, Itoh H, Arai H, Suganami T, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Yurugi-Kobayashi T, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tsujimoto H, Chao TH, Tamura N, Mukoyama M, Nakao K.

The neuroprotective and vasculo-neuro-regenerative roles of adrenomedullin in ischemic brain and its therapeutic potential.

Endocrinology 147: 1642-1653, 2006.

3. Yokota K, Shibata H, Kurihara I, Kobayashi S, Suda N, Murai-Takeda A, Saito I, Kitagawa H, Kato S, Saruta T, Itoh H.

Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9.

J. Biol. Chem. 282: 1998-2010, 2007.

4. Iigaya K, Kumagai H, Onimaru H, Kawai A, Oshima N, Onami T, Takimoto C, Kamayachi T, Hayashi K, Saruta T, Itoh H.

Novel axonal projection from the caudal end of the ventrolateral medulla to the intermediolateral cell column.

Am.J.Physiol.Regul.Intergr.Comp.

Physiol. 292: R927-R936, 2007.

2. 学会発表

1. 曾根正勝、山原研一、伊藤 裕、中尾一和
血管再生における内皮／平滑筋細胞連関
—ヒトES細胞からのアプローチ

第38回日本動脈硬化学会総会・学術集会 シンポジウム「動脈硬化と幹細胞」

2006.7.13-14(東京)

2. 金城 雪、市原淳弘、武光智子、迫田万里代、西山 成、鈴木文昭、稲上 正、伊藤 裕

ヒトプロレニン受容体のアンジオテンシン II 非依存性作用

第43回日本臨床分子医学会学術集会～トランスレーショナルリサーチの推進と臨床展開～

2006.7.20-21(札幌)

3. Kwijun Park, Hiroshi Itoh, Kenichi Yamahara, Masakatsu Sone, Kazutoshi Miyashita, Naofumi Oyamada, Naoya Sawada, Daisuke Taura, Megumi Inuzuka, Naohisa Tamura, Yasutomo Fukunaga, Kazuwa Nakao.

Therapeutic potentials of natriuretic peptides for peripheral arterial disease.

The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension

2006.10.15-19(福岡)

4. Kazutoshi Miyashita, Hiroshi Itoh, Hirokazu Tsujimoto, Masakatsu Sone, Kwijun Park, Naofumi Oyamada, Naoya

- Sawada, Daisuke Taura, Megumi Inuzuka, Naohisa Tamura, Kazuwa Nakao.
Activation of natriuretic peptides and cyclic-GMP dependent protein kinase cascades attenuate diet-induced obesity and insulin resistance.
The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension
2006.10.15-19(福岡)
5. 宮下和季、伊藤 裕、曾根正勝、朴 貴典、小山田尚史、澤田直哉、田浦大輔、犬塚 恵、田村尚久、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチド/cGMP/cGMP依存性プロテインキナーゼ系の抗肥満作用と糖脂質代謝に及ぼす効果の検討
第 27 回日本肥満学会
2006.10.27-28(神戸)
 6. 伊藤 裕、篠村裕之、石黒喜美子、猿田享男
高血圧発症における reno-vascular amplifier 仮説とアンジオテンシンブロッカーモリー
第 10 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 シンポジウム
2006.11.17-18(福井)
 7. 迫田万里代、市原淳弘、金城 雪、鈴木文昭、伊藤 裕
ヒト培養血管平滑筋細胞におけるプロレニン受容体を介したアンジオテンシン II 非依存性 ERK リン酸化
第 10 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2006.11.17-18(福井)
 8. 石黒喜美子、篠村裕之、坂巻裕介、猿田享男、伊藤 裕
高血圧発症における Reno-vascular Amplifier の関与の検討
第 10 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2006.11.17-18(福井)
 9. 宮下和季、伊藤 裕、曾根正勝、朴 貴典、小山田尚史、澤田直哉、田浦大輔、犬塚 恵、田村尚久、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチド/cGMP 依存性プロテインキナーゼカスケードの抗肥満作用と代謝制御における意義
第 10 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2006.11.17-18(福井)
 10. 金城 雪、市原淳弘、武光智子、迫田万里代、西山 成、伊藤 裕
アンジオテンシン変換酵素阻害薬はヒトプロレニン受容体を介して糖尿病性腎症を重症化する
第 10 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2006.11.17-18(福井)
 11. 菅野 直希、林 晃一、脇野 修、立松 寛、本間康一郎、吉岡恭子、長谷川一宏、徳留悟朗、細谷龍男、猿田享男、伊藤 裕
T型 Ca チャネル(TCC)は腎不全で血圧非依存的に発現が亢進する
第 10 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2006.11.17-18(福井)

12. 小宮直子、広瀬 寛、税所芳史、伊藤 裕
2型糖尿病におけるバルサルタン(AT-II受容体拮抗薬)の抗酸化作用
第10回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2006.11.17-18(福井)

13. 伊藤 裕
新たなる高血圧治療戦略—メタボリックドミノからのアプローチ—
第7回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会 教育講演
2007.2.23-24(東京)

14. Hiroshi Itoh
Human ES cell/Vascular Hormone ‘Cocktail therapy’ for Vascular Regeneration.
The 71st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Keynote Lecuture)
2007.3.15-17(神戸)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ヒト ES 細胞を用いた in vitro 血管神経細胞分化システムによる「虚血脳再生ホルモン」の探索とホルモン補償による新規痴呆治療法の開発

—サル ES 細胞を用いた神経細胞への分化誘導法の開発—

分担研究者 仁藤 新治 田辺製薬株式会社 先端医学研究所長

本年度はサル ES 細胞からの神経細胞への分化誘導法の確立を目指して研究を行った。その結果、サル ES 細胞から神経細胞へ分化誘導する途上で得られる「神経幹細胞」と呼称できる分化段階の細胞を in vitro で継代増幅できる技術を開発し、その細胞を用いた神経細胞への分化誘導法を確立することに成功した。

A. 研究目的

本研究課題において、主任研究者伊藤らが血管神経再生作用を有し、既に心血管疾患患者への試験的投与を開始している心血管ホルモンに関する知見と我々が樹立保有する霊長類 ES 細胞とその維持培養技術を融合させることによって、霊長類 ES 細胞を用いた血管神経細胞分化系を構築しそのシステムを駆使することにより新たな虚血脳再生ホルモンの探索を行い、痴呆治療における臨床的有用性を検討することを目的としている。

これまでに、伊藤らは ES 細胞より血管を構成する内皮細胞及び血管平滑筋細胞の双方に分化する「血管前駆細胞（VPC）」の同定に成功し、我が国で発見された心臓血管ホルモンの臨床的意義について研究を続け、血管拡張作用を有するナトリウム利尿ペプチド（ANP, BNP, CNP）及びアドレノメジュリン（AM）が、血管再生及び神経再生促進することを明らかにしている。またヒト ES 細胞由来の VPC を用いて DNA マイクロアレイ法を行うことによりヒト血管細胞分化遺伝子発現データベースの構築にも成功している。臨床においては、メタボリックシンドローム（MS）に

伴う ASO 患者に対して ANP の低用量持続投与を試行し、著明な治療効果を得ている。また永谷らは、心不全、肺高血圧症患者に対する AM 投与により良好な臨床成績を得ている。

本年度は、主任研究者伊藤らとともに、新たな虚血脳再生ホルモンの探索に必須と思われる in vitro 血管神経細胞分化誘導系の構築に伴い、手始めとしてサル ES 細胞を用いた神経幹細胞の継代増幅手法の開発と神経細胞への分化誘導法の確立を行った。

B. 研究方法

1. サル ES 細胞を用いた神経幹細胞の継代増幅手法の開発と神経細胞への分化誘導法の確立

[サル ES 細胞から神経幹細胞への分化と継代培養法]

サル ES 細胞は 20% KSR 含 DMEM/F-12 の培地を用いてマウス胎仔線維芽細胞上で培養した。継代後 4 日目のサル ES 細胞のコロニーを、ガラスキャピラリーを用いてピックアップし、神経培養培地（住友ベークライト）に 20 ng/ml の Human Recombinant FGF basic (bFGF) (R&D Systems) を加えた培地中で浮遊培

養した。bFGF を毎日添加し、10 日間培養して Neurosphere 状の凝集塊を作製した。この凝集塊を Poly-L-Lysine (PLL) コーティングディッシュ (住友ベークライト) にさらに 5 µg/ml Laminin (LA) でコートしたディッシュにプレーティングし、接着培養を行った。この際、B27 (Invitrogen), 20 ng/ml bFGF, Human Recombinant EGF (hrEGF) (R&D Systems) を含む Neurobasal medium を培地として用い、bFGF と hrEGF は毎日添加した。この条件で、7-10 日培養を続けることで、神経幹細胞が増幅する。神経幹細胞は Neurosphere 状の凝集塊をプレーティングした際に出来る凝集塊をガラスピペットで剥離して PLL+LA コートしたディッシュにプレーティングすることによって継代培養を行った。

[神経幹細胞から神経細胞への分化誘導法]

増殖した神経幹細胞は Dissociation Buffer (Invitrogen) を用いて剥離回収し、神経培養培地 (bFGF および hrEGF の添加なし) に懸濁して、PLL+LA コートしたディッシュにプレーティングし、2 週間培養することによって神経分化を誘導した。

[免疫染色法]

細胞を PBS にて 1 回洗浄した後に、4% パラホルムアルデヒド溶液により室温で 20 分間処理することにより固定し、0.1% triton-X100 溶液にて室温で 5 分間処理した。次に 10% BSA 含 PBS にて室温で 30 分間処理することによりブロッキングを行った。一次抗体を 1% BSA 含 PBS に最適濃度で希釈した溶液を調製して 4°C でオーバーナイト反応させた。翌日、細胞を PBS にて 3 回洗浄した後に、二次抗体を 1% BSA 含 PBS に最適濃度で希釈した溶液を調製して室温で 30 分間反応させた後に蛍光顕微鏡を用いて観察した。使用した一次抗体は anti-Tuj1 抗体、anti-MAP2 抗体、anti-TH 抗体及び anti-GFAP 抗体である (何れも Chemicon 社製)。

C. 結果

神経幹細胞はニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトへと分化及びその特性を維持したまま自己増殖が可能な細胞であることが知られている。今回、サル ES 細胞由来の Neurosphere 状凝集塊から増殖させた神経幹細胞は Nestin を発現しており (図 1 A)、また我々の研究室で開発した神経分化誘導法を用いて分化誘導させた結果、Tuj1 (図 1 B) 及び MAP2 (図 1 C) といった神経細胞マーカーの発現を確認することができ、TH 陽性の神経終末分化した細胞も存在することが確認できた (図 1 D)。また、分化した細胞の中にはアストロサイト特異的マーカーである GFAP を発現する細胞も確認出来た (図 1 E)。更に、誘導した神経幹細胞は十数回の継代培養でもその特性を維持することに成功した。

D. 考察

今回の実験結果から、我々が開発した神経細胞への分化誘導法はサル ES 細胞から神経細胞への分化誘導を可能にする方法であることを証明した。またこの神経分化誘導法はマウス ES 細胞においても応用可能であり、種差に関係なく幅広い細胞種に対応可能であると思われた。

E. 結論

ES 細胞を用いた研究は様々な研究施設で行われているが、新規薬剤の開発に使用されている例は殆どない。新規薬剤の開発における毒性試験、安全性試験は試験期間が長期に渡る場合が多く、コストもそれに伴い多額になる。

ES 細胞から分化誘導した細胞を用いて候補薬剤を網羅的に薬効及び副作用を簡便に短時間でスクリーニングすることが出来れば上記の問題点も大きく改善できるものと考えられる。また、動物等を用いた試験の代替法として用いられたならば動物福祉の観点からも大いに喜ばしいことである。

本年度で得られた結果は、ES 細胞を用いた新しい

タイプの高効率な薬剤スクリーニング構築の足がかりとなりえると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 古寺美加, 村松慎一, 奈良優子, 滝野直美, 西田紘子, 奥野剛, 小西奈依, 道端英男, 鈴木豊, 近藤靖, 仁藤新治, 中野今治 : 自殺遺伝子を導入したより安全な移植用ES細胞の開発. 第4回幹細胞シンポジウム, 東京, 2006年5月19日.
- 2) Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Tamura Y, Okuno T, Konishi N, Michihata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Nakano I, Muramatsu S. Embryonic stem cells expressing suicide gene reduced risk of teratoma formation. The 29th Annual meeting of the Japan Neuroscience Society. Kyoto, July 20, 2006.
- 3) 古寺美加, 山本茂一, 近藤靖, 仁藤新治, 村松慎一 : 自殺遺伝子導入による安全な移植用ES細胞の開発. 第46回日本臨床化学会年次学術集会, 東京, 2006年9月8日.
- 4) Muramatsu S, Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Sato K, Kakiuchi T, Okuno T, Konishi N, Michibata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Tsukada H and Nakano I. Suicide gene transduction of embryonic stem cells for safer cell therapy. Tenth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. Kyoto, October 30,

Movement Disorders 21(15) s399, 2006.

- 5) 間 淑郎黒川真奈絵, 池田律子, 仁藤新治, 中辻憲夫, 橋本卓雄, 鈴木 登 : カニクイザルES細胞からの運動神経分化誘導と脳損傷マウスへの移植応用. 第6回日本再生医療学会総会, 横浜, 2007年3月13日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

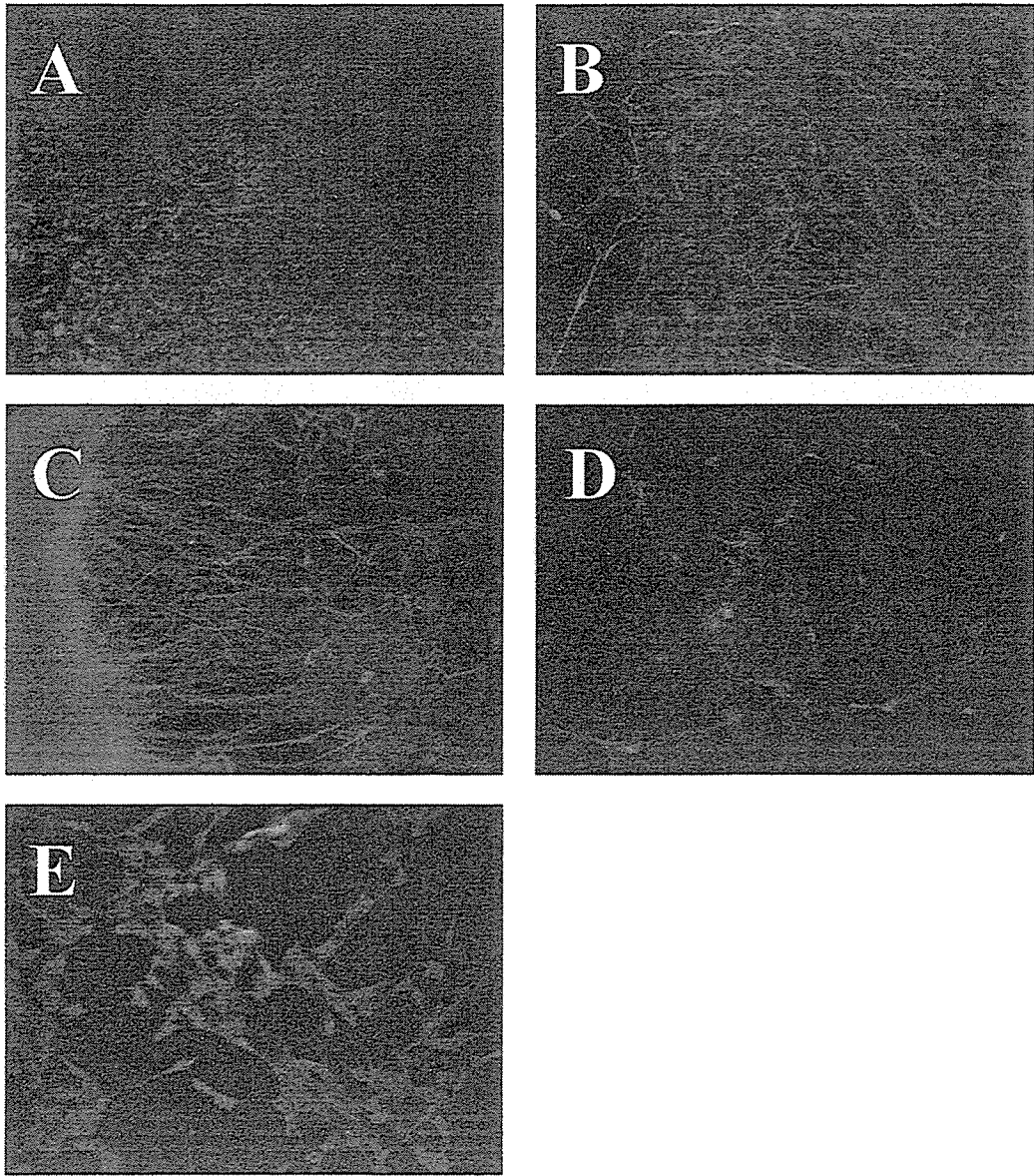


图 1. 免疫組織学的解析

A. 抗 Nestin 抗体, B. 抗 TuJ1 抗体, C. 抗 MAP2 抗体, D. 抗 TH 抗体, E. 抗 GFAP 抗体

血管性認知症の成因に関する研究

分担研究者 高橋 良輔 京都大学大学院医学研究科 臨床神経学教授

研究要旨

認知症の脳血管構築と血液脳関門（BBB）を検索した。血管性認知症ではアルツハイマー病に比べ白質血管に異常があり、そのBBB障害が病態に関与することが示された。

A. 研究目的

虚血脳再生ホルモンを用いた血管性認知症の新規治療法の開発を目指して、認知症における脳微小血管の変化を検討する。認知症の脳血管では血管網の構築や機能のさまざまな異常が指摘されている。本研究では認知症の2大原因であるアルツハイマー病（AD）と脳血管性認知症に焦点を絞り、それらの脳血管構築と病態機序の相違を解明する。

B. 研究方法

非神経疾患、AD、皮質下血管性認知症（subcortical vascular dementia; SVD）の前頭葉、頭頂葉より凍結切片を作成し、鍍銀法、βアミロイド免疫組織化学法を行った。皮質微小血管について鍍銀切片の大脳皮質2-4層を定量解析し、その血管密度とβアミロイドの沈着との関連を調べた。さらに、SVDでは脳血流の低下と血液脳関門（BBB）の機能異常が指摘されることから、新規に開発したマウス慢性脳低灌流モデルを用いBBB障害に作用するマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の遺伝子k/oが病変形成に及ぼす影響を調べた。

（倫理面への配慮）

京都大学医の倫理委員会規定によった。

C. 研究結果

AD患者脳ではSVDに比較して皮質微小血管構築の異常と血管密度の低下が認められ、βアミロイドの沈着部位と関連していた。SVDでは白質血管では構築異常が高度であったが、皮質の微小血管は非神経疾患脳と差を認めなかった。MMPの遺伝子ノックアウトでは、野生型マウスに慢性脳低灌流負荷を行った場合にみられるBBB障害と慢性期脳病変が認められなくなることを確認した。

D. 考察

ADでは、βアミロイドの沈着と関連する皮質血管構築の障害が認められたが、SVDでは白質血管の異常が高度であった。脳血流低下や白質病変などの慢性虚血病態はADよりSVDで高度で、SVDの実験モデルとされる慢性脳低灌流モデルでもBBBや白質の障害が報告されている。本研究では、MMP遺伝子k/oによって大脳白質の保護効果が認められており、慢性脳虚血病変治療におけるBBB保護の重要性が示された。

E. 結論

SVDでは白質血管に異常があり、BBB障害が病態に関与する。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakaji K et al. MMP-2 play a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents. Stroke 2006, 37: 2816-2823

Kitaguchi H et al. Capillary beds are decreased in Alzheimer's disease, but not in Binswanger's disease. Neurosci Lett, in press

2. 学会発表

北口浩史、富本秀和、高橋良輔：アルツハイマー病におけるcapillary networkの障害；Silver impregnation techniqueによる剖検脳の検討。臨床

神経学、46: 123, 2006

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；特記事項なし。

アドレノメデュリンの内因性幹細胞活性化による組織傷害修復作用

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 アドレノメデュリン(AM)を投与することでマウス末梢血中の単核細胞およびSca-1陽性細胞数が有意に増加した。AMを肺気腫症モデル動物に投与すると、病態が改善し、その機序として骨髄細胞の動員とその結果もたらされた血管内皮細胞および肺上皮細胞の再生が関与した。これらの結果より、AMは内因性幹細胞活性化により組織傷害に対する修復効果をもたらす可能性が示唆された。

A. 研究目的

脳血管障害に伴う認知機能低下に対しては根治的治療法がなく、細胞治療や増殖因子の補充などによる組織再生療法が試みられているが、未だ治療法としては確立していない。一方アドレノメデュリン(AM)は強力な血管拡張性の心臓血管ホルモンであり、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きた。したがってAMは脳血管障害をはじめ様々な難治性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。今回我々は、AMの組織再生と修復機序を検討するために、AMの内因性幹細胞への働き(骨髄細胞の動員効果)を検討した。また、高齢者に多い難治性肺疾患の一つである肺気腫症の動物モデルを用いて、AMの治療効果および内因性幹細胞活性化作用を含めた作用機序について検討を行なった。

B. 研究方法

正常C57BL/6マウスに対してAMまたは生理食塩水を無作為に5日間投与し、血中の単核細胞および内皮前駆細胞マーカーの一つであるSca-1陽性細胞の数を算定した。疾患モデルとしては、ブタ腭エラスターゼまたは生理食塩水の気管内注

射後に、GFP陽性骨髄キメラマウスを無作為化してAM(0.05 μ g/kg/min)または生理食塩水の持続注入を14日間行い、投与から28日後に機能分析および組織学的分析を行った。AMの投与は浸透圧ポンプを皮下に埋め込み、持続投与した。

C. 研究結果

正常マウスに対してAMを投与したところ、末梢血中の単核細胞およびSca-1陽性細胞数が有意に増加した(図1)。

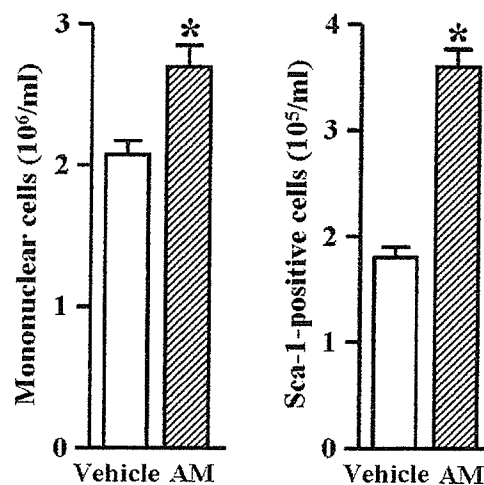
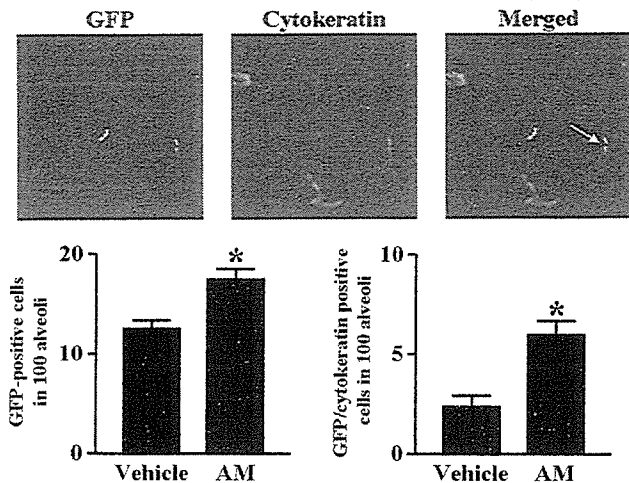


図1 : AM投与後の末梢血単核球およびSca-1陽性細胞数

エラスターゼ注射から28日後の時点で、肺胞壁の破壊を伴う気腔拡大が観察された。しかし、AM

注入により、エラストラーゼ処置マウスにおける肺容積、静肺コンプライアンスおよび平均肺胞径の増加は有意に抑制された。また、AM はエラストラーゼを投与した肺における骨髄由来細胞の数を有意に増加させ、これらの細胞の一部は、上皮細胞



胞マーカーであるサイトケラチン (図 2) や血管内皮細胞マーカーであるフォンビルブランド因子が陽性であった。

図 2 : GFP 陽性骨髄キメラ肺気腫マウスに対する AM 治療後の骨髄細胞の動員および上皮細胞への分化

D. 考察

以上の結果より、AM を投与することにより障害組織に遊走・定着する骨髄細胞の量が増加し、また、動員された骨髄細胞は病変局所において血管、肺胞に分化することを見出した。さらに、その結果として、小動物を用いた肺気腫モデルにおいて肺胞径拡大の抑制および機能の改善が認められた。したがって、AM が虚血性心疾患のみならず肺胞および肺血管再生にも適用できると考えられ、致命的な障害を受ける脳血管障害を含めた多くの臓器疾患に対する優れた治療方法となりうると考えられた。これらの疾患に対する自然治癒力の促進、新たな治療法の開発、不足機能の再建は患者の生活の質の向上に繋がるのみならず、入

院患者を社会復帰させることで高齢者医療費の削減効果も期待される。

E. 結論

AM は内因性幹細胞の活性化作用により肺組織傷害の修復に寄与した。AM が心血管保護のみならず他の多くの組織修復に関与すると考えられ、高齢者に多い脳血管障害を含めた臓器障害の新たな治療法となる可能性がある。

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.* (in press)
- 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

なし

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

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

ヒト ES 細胞を用いた *in vitro* 血管神経細胞分化システムによる「虚血脳再生ホルモン」の
探索とホルモン補償による新規認知症治療法の開発
——メタボリックシンドローム患者における末梢血中内皮前駆細胞の動態

分担研究者 吉政 康直 国立循環器病センター 動脈硬化代謝内科 部長

研究要旨：近年、末梢血中の血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cell; EPC）が動脈硬化性疾患の進展に対し保護的な役割をしていることが明らかになりつつある。しかしメタボリックシンドロームにおける心血管病との関連は不明である。本研究ではメタボリックシンドロームの構成因子と EPC の関連を検討し、内臓脂肪面積と負の相関する傾向にあることを示したが、この結果をふまえ今後アディポサイトカインの EPC との関連を検討していく必要があると考えられる。

A.研究目的：

近年、末梢血中の血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cell; EPC）が血管内皮機能の維持や血管新生に作用し、動脈硬化性疾患の進展に対し保護的な役割をしていることが明らかになりつつある。実際いくつかの臨床研究によって末梢血 EPC の低下が心血管病の発症の危険因子であることも示されている。一方メタボリックシンドロームは腹部肥満を中心に一個人に耐糖能障害、高血圧、脂質代謝異常などが複数合併し、動脈硬化疾患の新しい危険因子として注目されている。メタボリックシンドロームの心血管病発症・進展における末梢血 EPC の意義を明らかにする。

B.研究方法：

国立循環器病センター通院中の 70 歳以下の糖尿病患者 95 名に対して末梢血 EPC 陽性細胞数（CD34 陽性細胞数）を測定し、メ

タボリックシンドロームの各パラメーターとの相関について検討した。

（倫理面への配慮）臨床研究については、当センター内の高度先駆的治療委員会、倫理委員会の審議を受ける。患者本人の意志を尊重し、臨床成績発表の際にも最大限にプライバシー保護に努める。

C.研究結果：

CD34 陽性細胞数は年齢と有意な負の相関を認めたが（ $r^2 = 0.068$, $p = 0.008$ ）、メタボリックシンドロームの各コンポーネントである収縮期血圧（ $r^2 = 0.000036$, $p = 0.95$ ）、HbA1c（ $r^2 = 0.0055$, $p = 0.462$ ）、中性脂肪（ $r^2 = 0.00916$, $p = 0.34$ ）、HDL-C（ $r^2 = 0.017$, $p = 0.194$ ）とは有意な相関を認めなかった。内臓脂肪面積（ $r^2 = 0.036$, $p = 0.185$ ）に関しては負の相関を示す傾向はあったが、有意ではなかった。

D. 考察 :

今回の検討では CD34 陽性細胞数が内臓脂肪面積と相関する傾向にあり、今後アディポサイトカインの CD34 陽性細胞数との関連を検討していく必要があると考えられる。またメタボリックシンドロームにおいて末梢血 CD34 陽性細胞数とそのアウトカムである心血管病の発症、進展に寄与しているかを検証していく必要がある。

E. 結論

末梢血 CD34 陽性細胞数が内臓脂肪蓄積と関連する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takaoka M, Uemura S, Kawata H, Imagawa K, Takeda Y, Nakatani K, Naya N, Horii M, Yamano S, Miyamoto Y, **Yoshimasa Y**, Saito Y. Inflammatory Response to acute myocardial infarction augments neointimal hyperplasia after vascular injury in a remote artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:2083-2089.
2. Nakano M, Hamada T, Hayashi T, Yonemitsu S, Miyamoto L, Toyoda T, Tanaka S, asuzaki H, Ebihara K, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, **Yoshimasa Y**, Otaka A, Fushiki T, a Nakao K. $\alpha 2$ isoform-specific activation of 5' denoseine monophosphate-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribo nucleoside at a physiological level activates

glucose transport and increases glucose transporter 4 in mouse skeletal muscle. *Metabolism.* 2006; 55:300-308.

3. Makino H, Miyamoto Y, Sawai K, Mori K, Mukoyama M, Nakao K, **Yoshimasa Y**, Suga S. Altered gene expression related to glomerulogenesis and podocyte structure in early diabetic nephropathy of db/db mice and its restoration by pioglitazone. *Diabetes* 2006; 55:2747-2756.
4. Makino H, Mukoyama M, Mori K, Suganami T, Kasahara M, Yahata K, Nagae T, Yokoi H, Sawai K, Ogawa Y, Suga S, **Yoshimasa Y**, Sugawara A, Tanaka I, Nakao K: Transgenic overexpression of brain natriuretic peptide prevents the progression of diabetic nephropathy in mice. *Diabetologia* 2006; 49: 2514-2524.

2. 学会発表

1. Yasunao Yoshimasa. Metabolic syndrome and the risk of stroke and myocardial infarction in a Japanese general population from epidemiology and genetics. 50th anniversary symposium on health management and health screening. in National Taiwan University Hospital Taipei city 2006.7.21

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

(伊藤 裕)

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 |
|---|---|--|-----|-----------|------|
| Yurugi-Kobayashi T, Itoh T, Schroeder T, Nakano A, Narazaki G, Kita F, Yanagi K, Hiraoka-Kanie M, Inoue E, Ara T, Nagasawa T, Just U, Nakao K, Nishikawa S, Yamashita JK. | Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. | Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. | 26 | 1977-1984 | 2006 |
| Miyashita K, Itoh H, Arai H, Suganami T, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Yurugi-Kobayashi T, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tsujimoto H, Chao TH, Tamura N, Mukoyama M, Nakao K. | The neuroprotective and vasculo-neuro-regenerative roles of adrenomedullin in ischemic brain and its therapeutic potential. | Endocrinology | 147 | 1642-1653 | 2006 |
| Yokota K, Shibata H, Kurihara I, Kobayashi S, Suda N, Murai-Takeda A, Saito I, Kitagawa H, Kato S, Saruta T, Itoh H. | Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. | J. Biol. Chem. | 282 | 1998-2010 | 2007 |
| Iigaya K, Kumagai H, Onimaru H, Kawai A, Oshima N, Onami T, Takimoto C, Kamayachi T, Hayashi K, Saruta T, Itoh H. | Novel axonal projection from the caudal end of the ventrolateral medulla to the intermediolateral cell column. | Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. | 292 | R927-R936 | 2007 |

(高橋 良輔)

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 | 出版年 | ページ |
|------|---------------------------|-----------|-----------------|------|-----|------|---------|
| 富本秀和 | Binswanger型脳梗塞の概念、病理、成立機序 | 篠原幸人 | インターベンション時代の脳卒中 | 日本臨床 | 大阪 | 2006 | 238-242 |

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 |
|--|---|----------------------|---------|-----------|----------|
| Tomimoto H. | Are cerebrovascular white matter lesions an early sign of vascular cognitive impairment and vascular dementia? | Vasc Dis Prevension | 3 (3) | 159-164 | 2006 |
| Nakaji K, Ihara M, Takahashi C, Itoharu S, Noda N, Takahashi R, Tomimoto H | MMP-2 play a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents. | Stroke | 37 (11) | 2816-2823 | 2006 |
| 富本秀和 | 血管性認知症とイメージング | Cognition & Dementia | 5 (3) | 39-45 | 2006 |
| Ohtani R, Tomimoto H, Wakita H, Kitaguchi H, Nakaji K, Takahashi R. | Expression of S100 protein and protective effect of arundic acid on the rat brain in chronic cerebral hypoperfusion. | Brain Research | 1135 | 195-200 | 2007 |
| Kitaguchi H, Ihara M, Saiki H, Takahashi R, Tomimoto H. | Capillary beds are decreased in Alzheimer's disease, but not in Binswanger's disease, | Neurosci Lett | | | in press |

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 |
|--|--|--|----|---------|----------|
| Obata H, Yanagawa B, Tanaka K, Ohnishi S, Kataoka M, Miyahara Y, Ishibashi-Ueda H, Kodama M, Aizawa Y, Kangawa K, <u>Nagaya N.</u> | CNP infusion attenuates cardiac dysfunction and inflammation in myocarditis. | Biochem Biophys Res Commun. | | | in press |
| Jo JI, <u>Nagaya N.</u> , 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 |
| Murakami S, Kimura H, Kangawa K, <u>Nagaya N.</u> | Physiological significance and therapeutic potential of adrenomedullin in pulmonary hypertension. | Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets | 6 | 125-132 | 2006 |