

200706006B

厚生労働科学研究費補助金

再生医療等研究事業

心筋組織再生のための集約的研究

(H17-再生-007)

平成17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 小室 一成

平成20年(2008)年3月

目 次

I. 総合研究報告書	
心筋組織再生のための集約的研究-----	1
小室 一成	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	14
III. 研究成果の刊行物・別刷-----	23

心筋組織再生のための集約的研究

主任研究者 小室一成 千葉大学大学院医学研究院循環病病態医科学 教授

研究要旨 骨髄間葉系細胞、心筋幹細胞を心筋細胞に分化誘導する因子と、血管新生を促進する因子の解明を目的とした本研究において、我々は、骨髄間葉系細胞を効率よく心筋細胞に分化させる因子を網羅的に分析し、高い心筋分化効率を有するヒト幹細胞株にのみ強発現している遺伝子をMicroArray法により同定し、その結果より類推できた心筋誘導因子の心筋分化誘導活性を明らかにした。OP9細胞の培養上精中に存在する心筋分化誘導因子(X因子)を単離同定し、この因子がP19CL6細胞およびES細胞において心筋分化に必須の蛋白であることを明らかにした。心臓SP細胞のin vitro、in vivoにおける遊走、分化能を明らかにした。心筋細胞と毛細血管の内皮細胞間の相互調節機構として内皮細胞からNeuregulinが心筋へ、心筋細胞からangiopoietinが内皮細胞へ作用することが重要であることを明らかにした。

(主任研究者)

小室 一成 千葉大学大学院医学研究院
循環病病態医科学教授

(分担研究者)

永井 敏雄 千葉大学大学院医学研究院
循環病病態医科学 講師

南野 徹 千葉大学医学部附属病院
循環器内科 助教

梅澤 明弘 国立成育医療センター研究所
部長

望月 直樹 国立循環器病センター研究所
部長

A. 研究目的

心不全・心筋梗塞の新しい治療法として再生治療が注目されている。現在、骨格筋芽細胞、骨髄細胞、内皮前駆細胞による細胞移植が臨床試験中であるが、臨床的に十分な数の心筋細胞と血管の両者を再生する方法は確立されていない。本研究では骨髄間葉系細胞、心筋幹細胞を心筋細胞に分化誘導する因子と、血管新生を促進する因子を単離精製し、非侵襲的な心血管分化誘導療法の確立を目的とする。

B. 研究方法

間葉系幹細胞

1) 心筋易誘導細胞の抽出

心筋易誘導細胞に発現している抗原に対する抗体を用いて、心筋易誘導細胞の免疫染色を行った。また、雑多な幹細胞の集団である骨髄および胎盤間葉系幹細胞初代培養を酵素反応により単離し、FACSにより抗原陽性細胞が抽出できるか否かを検討した。

2) 心筋誘導率の算定と機能評価

心筋誘導率は、誘導率が低い場合は目視によって確認可能であるが、誘導率が20%以上となると目視で正確に評価する事が困難となる。そのため、共培養1週間後に単離し、心筋特異的なCardiac Troponin-Iを用いて免疫染色を行い、GFP陽性のヒト細胞中のTroponin-I陽性細胞率を心筋誘導率として評価を行った。

3) 無血清培養システムの導入

心筋誘導因子の同定を行う際に、培養液中に含まれる血清が結果の評価を曖昧なものとする可能性を排除するため、無血清培地を用いたin vivo誘導率アッセイを試みた。

4) 心筋分化誘導因子の同定と分化誘導能の検討

マイクロアレイ解析の結果より類推できた心筋誘導因子を、P19CL6細胞に処理することにより、心筋分化誘導能を検討する。心筋誘導率は、誘導率が低い場合は目視によって確認可能であるが、誘導率が20%以上となると目視で正確に評価する事が困難となる。そのため、共培養1週間後に単離し、心筋特異的なCardiac Troponin-Iを用いて免疫染色を行い、GFP陽性のヒト細胞中のTroponin-I陽性細胞率を心筋誘導率として評価を行った。

さらに、GeneSpringソフトウェアを用いて、当研究室で樹立した細胞とNCBIのGeneChipデータベースであるGEO datasets

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gds&cmd=search&term=>)から取得した69種類のヒト GeneChipの結果を解析した。さらに発現の

近い細胞同士をグループ化し、統計解析ソフトウェア NIA array解析 (<http://lgsun.Grc.nia.nih.gov/ANOVA/>) で処理することで、心筋分化が可能な細胞群特異的な遺伝子を選出した。

5) 心筋分化誘導因子Grem1の誘導能の評価

Grem1の心筋分化能の評価には、P19CL6細胞を用いた。この細胞は、マウスC3H胚性ガン細胞であり、培養培地(10%ウシ血清MEM- α)にDMSOを添加することで心筋細胞に分化誘導できる。この細胞にGrem1を添加したときの動画撮影による拍動面積の測定、RT-PCR法による遺伝子発現の有無、免疫組織化学染色法によるタンパク質発現を、評価した。またGrem1の添加期間を振って、最も高い心筋誘導能を示す時期を免疫組織化学染色法で評価した。

6) BMP2タンパク質による心筋分化阻害

分化誘導初期にリコンビナントヒトBMP2タンパク質をP19CL6細胞に添加し、RT-PCR法による遺伝子発現、免疫組織化学染色法による心筋特異的なタンパク質の有無を、それぞれ評価した。

7) BMP2タンパク質によるBmp2/4遺伝子発現抑制とBMP活性の経時的な変化

リアルタイムRT-PCR法を用いて、各条件で分化誘導したP19CL6細胞のBmp2/4遺伝子発現量の変化を経時的に測定した。同様にBMP活性値を測定できるId1 promoter-Luxプラスミドを用いたりポーターアッセイ法で、同活性値の変化を経時的に測定した。

8) BMP2タンパク質によるWnt3a遺伝子発現抑制とWnt活性の経時的な変化

リアルタイムRT-PCR法を用いて、各条件で分化誘導したP19CL6細胞のWnt3a遺伝子発現量の変化を経時的に測定した。同様にWnt活性値を測定できるTOPflashプラスミドを用いたりポーターアッセイ法で、同活性値の変化を経時的に測定した。

OP9培養上清中に存在する心筋細胞分化誘導因子の機能の解明

平成17年度には、OP9細胞の培養上清中に存在する心筋分化誘導因子(X因子)を単離同定するために、signal sequence trap法によりOP9細胞由来の分泌蛋白cDNAのクローニングをおこない、P19CL6細胞を用いて各cDNAの心筋分化誘導活性を評価した。平成18年度にはP19CL6細胞においてsiRNAによりX因子をノックダウンし、その機能を解析した。平成19年度にはES細胞において同様に

X因子をノックダウンし、機能解析を行った。また、候補遺伝子アプローチによりX因子の受容体候補分子を選定し、実際にX因子がこの受容体に結合するかについて検討した。

血管新生

1) Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)プロモーター活性によりGFPを発現するマウスの作成

新生血管の構築にかかわる細胞として骨髄由来もしくは虚血部以外から動員される細胞として血管内皮細胞前駆細胞(EPC)がこれまで盛んに提唱されてきたが、生体内での実体は不明のままであった。また、どれだけこの前駆細胞が血管を本当に形作る細胞として新生血管に取り込まれるかも未解決であった。EPCは血管内皮細胞としての機能するため、血管内皮細胞のマーカーとして繁用されているVE-cadherinとTie2のプロモーター活性依存的にGFPを発現するマウスを作成して、これらの細胞が虚血によりどのような部位で発現してくるかを検討した。VE-cadherinプロモーターにCreを発現するマウス、Tie2プロモーターの下流でCreを発現するマウスと、Enhanced GFPをCreが働くと発現するマウスを交配し、それぞれVE-cadherin/EGFP, Tie2/EGFPとして解析を行った。

2) 虚血(心筋梗塞モデル)でのEGFP発現細胞の同定

VE-cadherin/EGFPマウスの左冠状動脈を結紮して、数日後から骨髄でのGFP陽性細胞の出現の確認と、虚血部位でのGFP陽性細胞の確認をおこなった。

3) VE-cadherin依存性GFP発現マウスの骨髄ならびに末梢血液のGFP陽性細胞のFACS解析

VE-cadherin/EGFPマウスのGFP陽性細胞をflow cytometryで採取して、以下の表面抗原を認識する抗体を用いてGFP陽性細胞の表面抗原特性を検討した。(VE-cadherin, CD34, Lin, CD45, CD45, CD31)。

4) 心筋の発生に重要なErbB受容体の下流で機能する分子Gabファミリー分子のノックアウトマウスの作製による心筋-内皮細胞間シグナルの理解

心筋細胞の機能維持にはErbBファミリーチロシンキナーゼ受容体のシグナルが重要であることが示されている。心筋再生にもErbBファミリー受容体のシグナルは不可欠であると予想した。こ

れまでに心臓の保護作用に必須であるErbBと、gp130の両者の下流で機能するアダプター分子Gabファミリー分子を心臓で特異的に欠損させたマウスを作成した。

- ① alpha-Myosin Heavy Chain Promoter-Cre (αMHC-Cre) マウスの入手
- ② conventional Gab2 KOマウス
- ③ conditional Gab1 KO マウスの作製 (floxed Gab1)のマウスをCre/loxPシステムを用いて心臓でGab1を欠損させるように計画し、さらにGab2 KOマウスとの交配をおこなった。以上により、4群のマウスを作成した。
 - (i) control マウス-control
 - (ii) 心臓特異的Gab1 KOマウス-Gab1CKO
 - (iii) 全身Gab2欠損マウス-Gab2KO
 - (iv) 心臓でGab1 Gab2欠損マウス-DoubleKO (②と③の交配による。)

5) 骨髄間葉系細胞に発現する機能未知分子PTKの心臓分化における機能の解析

これまでにPTK7が骨髄間葉系細胞に発現することをsignal sequence trapでとらえていた。心臓に分化することがよく知られているP19CL9細胞でのPTK7の発現を検討した。

心臓SP細胞

1) 心臓SP細胞の単離とin vitro分化誘導

10-12週齢のマウスおよび新生子仔ラット心臓より酵素消化法により細胞を単離し、ヘキスト33342により染色した後にfluorescent cell sortingを行い色素染色性の低いSP細胞と非SP細胞を分取した。単離した心臓SP細胞を、オキシトシンまたはトリコスタチンAで72時間処理した後に、心筋細胞への分化について自律拍動の有無、および心筋転写因子、収縮蛋白の発現をPCR法と免疫染色法で確認した。

2) 心臓SP細胞のホーミングと分化

GFP陽性新生仔ラットの心臓より単離した心臓SPおよび非SP細胞をそれぞれ、心筋凍結障害モデルおよび正常ラットの尾静脈から移植した。移植後1、4、12週後に心臓、肝臓、脾臓、骨格筋、肺臓、骨髄組織についてGFP陽性細胞の有無、GFP陽性細胞の組織特異的マーカー蛋白の発現について免疫組織学的手法により評価した。また、凍結障害および健全心についても同様の検討を行った。

3) 心筋梗塞における心臓SP細胞の増殖活性に関与する因子の検討

単離した心臓SP細胞をcytospin3 (Thermo社)により圧着して固定後、β-カテニンの発現と核内移行について免疫蛍光染色法により定量的に評価した。心臓SP細胞よりRNAを抽出後、LightCycler TaqMan Master Kit (Roche Applied Science社)を用いて行なった。解析はLightCycler Software ver. 3.5 (Roche社)を用いてSecond Derivative Maximum法にて定量分析した。

(倫理面への配慮)

ヒト細胞の培養に関しては、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている(国立成育医療センター研究所、受付番号25、26及び27、平成15年1月承認、受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認、受付番号88、89、90、91平成16年7月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認)。また、倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針(未定稿)」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮し研究を行った。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行っている。

実験動物を用いる研究については、千葉大学、国立循環器病センターおよび国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号2003-002, 2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

C. 研究結果

間葉系幹細胞

1) 心筋易誘導細胞の抽出

心筋易誘導細胞に発現している抗原が、確かにこれらの細胞に発現している事が明らかになった。

2) 心筋誘導率の算定と機能評価

誘導された心筋細胞の機能評価は、ガラス微小電極を用いた活動電位記録と、我々が独自に開発したVideo image解析装置で細胞収縮速度、収縮持続時間、収縮長を測定する事によって定量的に評価した。その結果、ヒト細胞コロニーについて、それらの細胞収縮速度、収縮持続時間、収縮長を数値化することで、より具体的な機能解析が可能

となった。

3) 無血清培養システムの導入

我々は心筋代謝を考慮した独自の無血清培地の開発に成功しており、本培地により無血清でありながら、血清が存在しているときと同程度か、さらに強い心筋誘導を確認した。

4) 心筋誘導因子の同定と分化誘導能の検討

マイクロアレイ解析の結果より類推できた心筋誘導因子を、P19CL6細胞に処理することにより、心筋分化誘導能を検討した。これらの細胞をRT-PCRで各遺伝子の発現量を確認した。その結果心筋特異的な転写因子 (Mef2c, Csx/ Nkx2.5, GATA4, Hand2) やタンパク質 (MyLC-2a, MyLC-2v, b - MyHC, ANP, BNP) の発現量が有意に増加した。同定した心筋誘導因子はBMPアンタゴニストであり、発生時の四肢形成にSonic hedgehogやBMP、FGFらと相互作用している事が報告されており、骨格筋の分化にも関与している事も報告されている。

5) 心筋分化誘導因子の同定

GeneSpringソフトウェアを用いて、69種類のヒトGeneChipを解析し、遺伝子発現の似た細胞をグループ化していったところ、30グループに分けることができた。この30グループのうち、21グループは、心筋分化が可能な細胞群であり、このグループに特異的な遺伝子を統計解析ソフトであるNIA array解析 (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/>) で2つの遺伝子を選択できた。このうちの一つが今回選択したGremlin (Grem1) 遺伝子だった。

6) 心筋分化誘導因子Grem1の誘導能の評価

CL6細胞にGrem1 (125ng/ml) をDMSOとともに培地中に添加したところ、DMSOのみ添加した場合に比べて誘導開始14日目の拍動面積の顕著に増加できることを明らかにした。またRT-PCR法による遺伝子発現を調べたところ、先程同様にDMSOにGrem1を添加することで心筋細胞特異的な転写因子、構造タンパク質、ホルモンの発現が上昇することを明らかにした。さらに免疫組織化学染色法でも心筋特異的なタンパク質であるトロポニンTタンパク質やミオシン重鎖の発現がGrem1の添加によって発現量が上昇することを明らかにした。その一方で、Grem1単独では、P19CL6細胞に心筋特異的な遺伝子やタンパク質が一切発現しなかった。

次に、Grem1が最もCL6細胞の心筋分化に寄与す

る期間を調べたところ、誘導開始1日目から3日目の添加が一番高い誘導能を示した。

7) BMP2タンパク質による心筋分化阻害

BMP2タンパク質は、心筋分化を誘導するサイトカインとして知られており、心筋分化誘導実験でよく用いられている。今回、GeneChipの解析結果より選出したGrem1は、BMP2/4/7のアンタゴニストであり、BMPシグナルを阻害する。P19CL6細胞にBMP2タンパク質を誘導開始1日目から3日目に添加したところ、心筋特異的な転写因子やタンパク質の発現が極端に減少しており、心筋分化を阻害することが明らかとなった。また同細胞にBMP2タンパク質を誘導開始4日目から14日目に添加したところ、心筋特異的なタンパク質を発現した。

8) BMP2タンパク質によるBmp2/4遺伝子発現抑制とBMP活性の経時的な変化

誘導開始1日目から3日目にBMP2タンパク質を添加したP19CL6細胞は、Bmp2/4遺伝子の発現が抑制されていた。またBMPシグナルも検出できなかった (ただしBMP2タンパク質を添加した3日目だけはBMPシグナルを検出できた)。一方で、同時期にBMP2タンパク質を添加しなかったP19CL6細胞は、Bmp2/4遺伝子は誘導開始3日目から14日まで発現しており、同期間のBMPシグナルも検出できた。

9) BMP2タンパク質によるWnt3a遺伝子発現抑制とWnt活性の経時的な変化

胚性細胞の心筋分化には、誘導開始直後にWntシグナルが必要となる。誘導開始1日目から3日目にBMP2タンパク質を添加したP19CL6細胞は、Wnt3a遺伝子の発現が抑制されていた。またWntシグナルも検出できなかった。一方で、同時期にBMP2タンパク質を添加しなかったP19CL6細胞は、Wnt3a遺伝子を1日目から3日まで発現しており、Wntシグナルも3日目から5日まで検出できた。

OP9培養上清中に存在する心筋細胞分化誘導因子の機能の解明

平成17年度の研究で、OP9細胞由来の心筋分化誘導因子 (X因子) を単離同定し、P19CL6およびES細胞の心筋分化を促進することを見いだした。平成18年度の研究において、P19CL6ではX因子をノックダウンすると心筋分化が起こらなくなることを明らかにした。平成19年度の研究では、X因子をノックダウンしたES細胞では心筋細胞への分化が著明に抑制されていることを明らかにした。また、候補遺伝子アプローチによりX因子

の受容体候補分子を選定し、ヨードラベルしたX因子との結合を検討したところ、X因子との特異的結合が観察され、この蛋白がX因子の受容体である可能性が示唆された。

血管新生

1) VE-cadherin/EGFPマウスとTie2/EGFPマウスの相違

Tie2/EGFPマウスは成体までEGFPを血管で発現するのに対して、VE-cad/EGFPマウスは生後直ちにEGFPの発現が減弱し、5週目までに血管のEGFP陽性細胞が消失していた。どちらのマウスも発生時期の血管ではEGFPを強く発現することから、血管構築にかかわる細胞でVE-cadherin, Tie2ともにプロモーターが活性化することがわかった。しかし、特徴的なのはVE-cadherin/EGFPマウスは虚血に伴い、再度骨髄にEGFP陽性細胞が出現したことである。さらに詳細に心臓組織を検討した。

2) 心筋梗塞部位の炎症細胞と毛細血管でのVE-cadherin/EGFP細胞の出現

心筋梗塞では梗塞部位に著名な炎症細胞が浸潤するが、殆どがCD45陽性であり、このなかの30%近くがEGFPを発現していた。すなわち血球系細胞でありながらVE-cadherinプロモーターが活性化されるという血球・内皮細胞の両方の性格をもつ成人のヘマンジオブラストである可能性も考えられた。

3) 骨髄・末梢血液にVE-cadherin/EGFP細胞の虚血による再出現

VE-cadherin/EGFPマウスは生後GFP発現細胞が消失するが、心筋梗塞で再出現してきた。この細胞はFACS解析によると95%以上がCD45陽性細胞であり、また血管内皮に出現するCD31も半数で陽性であった。したがって、流血中もしくは骨髄でGFP陽性細胞となったものが、血球かつ内皮細胞の二つの系統の性格をもつ細胞である可能性が示唆された。

また、骨髄のCD45陽性細胞が本当にVE-cadherinを発現しているかを定量的RT-PCRでVE-cadherin mRNAを用いて確認したところ虚血によりVE-cadherin mRNAが顕著に増加していることを確認した。

4) Gabファミリー分子の欠損により心筋症様の病態を呈する

(1) 計画にそって作成した4群のマウスがメンデルの法則に従って誕生することから胎生致死ではないことがまず確認された。

(2) 心臓のGab1ファミリー分子の磷酸化を誘導するのが、EGFファミリー分子のなかでもこれまで重要と考えられてきたHB-EGFではなく、Neuregulin-ErbB2/4系であることをマウス、培養心筋細胞で明らかにした。

このNeuregulin刺激で心臓のERKならびにAKTの活性化を検討したとこと、DKOマウスでのみERK, AKTの活性化が抑制されていた。DKOマウスのみ、生後から著明な心拡大と心臓内膜の線維化を始めた。これに矛盾しない結果として心臓の超音波検査と心臓のカテーテル検査で心機能低下を確認した。心臓内膜の線維化はエラスチンとコラーゲンの顕著な蓄積の結果であった。心臓内の血管数を定量化したところ、最小血管数の現象を認め、異常に拡張した内皮細胞だけで血管平滑筋層を伴わない異常な血管も多数認めた。

以上の結果から心筋内のシグナルだけでなく心臓からの内皮細胞のなんらかの栄養因子の欠落により内皮細胞系の異常をきたしていると思われ、microarrayを行った。その結果DKOではangiopoietinの遺伝子発現が著明に低下していることがわかった。

5) PTK7は心臓への分化刺激で発現が増加する
(1) まずanti-PTK抗体を作製した。この抗体の特異性を確認した。
(2) P19CL9細胞をDMSOで分化誘導後数日でのPTKの発現を調べたところ、誘導2-3日目で数倍の発現を認めた。

心臓SP細胞

心臓SP細胞の単離とin vitro分化誘導

心臓SP細胞はオキシトシンまたはトリコスタチンAで72時間分化誘導した後に3週間培養したところ、自律拍動する心筋細胞を認めた。分化誘導した心臓SP細胞は心筋転写因子や心筋収縮蛋白の発現を認めた。

心臓SP細胞のホーミングと分化

移植されたGFP陽性心臓SP細胞は、心臓、肝臓、脾臓、骨格筋、肺臓、骨髄組織に分布し、肝臓および骨格筋では、albuminおよびdesminを発現した単核のGFP陽性心臓SP細胞が認められ、それぞれ肝細胞および骨格筋細胞に分化したと考えられた。傷害心筋では健常心筋に比較して多くのGFP陽性心臓SP細胞が認められ、移植された心臓SP細胞の多くは凍結傷害部と健常部の境界領域に選択的に遊走し、移植4週間後には心筋troponin T, von Willebrand factor, calponinまたはvimentin陽性かつGFP陽性細胞が認められ

た。

3) 心筋梗塞における心臓SP細胞の増殖活性に関与する因子の検討

心臓SP細胞はsham \sim 0.4%、心筋梗塞1日 \sim 0.2%、3日後 \sim 1.6%、7日後 \sim 1.0%であり、梗塞3日後はshamに比較して有意に増加した。免疫染色法による β -カテニンの発現解析をshamおよび心筋梗塞3日目の心臓SP細胞について検討した結果、 β -カテニン陽性細胞はsham 45%、梗塞マウス73%であった。また、shamおよび心筋梗塞3日目の心臓SP細胞の、それぞれ3%、6%に β -カテニンの核内移行が認められた。また、GSK-3 β 抑制薬BIOを心筋梗塞作成直後と3日目に腹腔内投与した場合、心臓SP細胞の72%に β -カテニンの発現が、また、25%に β -カテニンの核内移行が認められた。定量的PCR法による遺伝子発現解析の結果、sham心臓SP細胞ではCyclinD1、Axin2、c-Mycの遺伝子発現は認められなかったが、梗塞3日目の心臓SP細胞では発現が認められた。また、BIOを投与した梗塞マウスの心臓SP細胞では、CyclinD1、c-Mycの発現が非投与梗塞マウスに比較して \sim 1.6倍増加した。以上の結果から、心筋梗塞時に心臓SP細胞にはcanonical Wnt signalを介した細胞増殖シグナルが作用し、GSK-3 β を抑制してcanonical Wnt signalを促進することにより増殖活性を亢進させることが示唆された。

D. 考察

Polyclonalな間葉系幹細胞の集団よりも(25-30%)、限界希釈法でmonoclonal化した幹細胞の心筋誘導率が高い(60-90%)。初代培養細胞の雑多な幹細胞中に、心筋易誘導性を示す細胞が一定比率混入している事を推測させる。

我々はすでに確立した30近くのヒト間葉系幹細胞のMicroArrayのデータから、心筋易誘導性を示す細胞に特徴的な膜貫通蛋白に着目し、これらに対する抗体作成に成功している。これらは細胞単離時に使用するトリプシン処理にて簡単に消滅する可能性が高く、そのため既知のCDマーカーではない可能性が高い。この細胞外ドメインの抗原性を失う事無く細胞単離する方法を考案すれば、この抗体を用いて心筋易誘導細胞のみを抽出濃縮し、心筋誘導率を改善する事が出来る。

さらに、我々の開発したヒト幹細胞in vitro心筋誘導率アッセイシステム(特許PCT/JP2006/301043)を用いて、間葉系細胞培養時の条件やex vivoでの薬剤投与による心筋誘導率の変化を観察することにより、幹細胞の心筋誘導率改善因子の同定が可能となった。また、心筋分化

に必要な液性因子のみならず、物理刺激、至適培養条件、培地の無血清化がその細胞分化・発現遺伝子にどのような影響を与え、また、マーカーとなる細胞表面タンパクについても数種類同定できた。これらの基盤的研究より、得られた成果について臨床応用を検討していくことが可能となった。

今回のバイオインフォマティクスを応用した心筋分化可能な細胞群特異的な遺伝子の選択方法は、有用であることが明らかとなった。この方法は様々な応用が利くために、心筋分化因子以外の因子の選択も可能である。また誘導開始初期のBMPタンパク質はWntシグナルを阻害することも明らかになったことからこの両者には何らかの相互作用があることも予測される。

新規心筋分化誘導因子であるX因子を単離同定し、X因子が心筋分化に必須の蛋白であることを明らかにした。今後は、これらの結果をもとにして、X因子が心筋分化誘導をおこす分子機構についての解析をさらに進めるとともに、X因子、およびX因子と他の増殖因子の組み合わせによる高効率心筋分化誘導法の確立を目的とした研究も進めていく予定である。

虚血によって炎症細胞として虚血部位に浸潤する細胞がVE-cadherinのプロモーターが活性化された細胞であり、かつCD45陽性であった。新生血管の内皮細胞として働くというよりも、炎症細胞として様々なサイトカインを分泌する可能性をもったangiogenesis-stimulating cytokine-producing細胞としての機能が予想された。今後、虚血によって末梢血液もしくは骨髄に出現するGFP陽性細胞を集め、サイトカインの分泌を起こしているのかを確認する必要がある。また、虚血部位でなければ分泌しない可能性もあるので虚血部位に浸潤しているGFP陽性細胞がサイトカイン陽性であることを、in situで調べる必要がある。

浸潤細胞でのVE-cadherin依存性のGFP発現とともに、心筋梗塞部位の毛細血管ならびに梗塞巣周囲の健常部の小動脈内皮細胞でも、GFPの発現を認めた。生後一度、VE-cadherinのプロモーター活性は低下するが、虚血によって再度、血管でのVE-cadherinプロモーターの活性化が起きていることを示す結果である。実際、虚血部位で抗VE-cadherin抗体を用いた免疫組織学的研究でもVE-cadherinの再出現を確認しており、VE-cadherin promoterの活性化とVE-cadherinの発現が一致しているという結果である。

虚血によりどのように、骨髄からのGFP陽性細胞の動員が起きるのかは未解決であるが、おそら

く局所での虚血シグナルが血中のサイトカインの上昇が骨髄に伝達され、流血中のCD45陽性細胞かつVE-cadherin陽性細胞が、局所で発現されるVE-cadherinとの接着により積極的に虚血部位である心臓へと集積するのではないかと予想した。

心臓の収縮機能、生存機能維持にはErbBファミリー分子が重要でありその下流のアダプター分子Gabがの心機能維持における重要性をまず示した。血管内皮細胞から分泌されるNeuregulinがErbBの活性化因子として特に心筋では重要であることも突き止めた。また、Gab欠損により心筋細胞からのangiopoietinの発現が著明に低下しているためにangiopoietinの受容体を発現する心内膜内皮細胞、血管内皮細胞の変化をきたしている可能性が予想された。その予想に一致して内膜の線維化ならびに、血管数の現象・異常血管の出現を認めた。以上の結果から心筋細胞と毛細血管の内皮細胞間の相互調節（内皮細胞からNeuregulinが心臓へ、心筋細胞からangiopoietinが内皮細胞へ作用）が心臓の機能調節に重要であることを突き止めた。

心筋細胞への分化が示されている骨髄間葉系細胞に発現するPTK7分子を同定していたが、機能未知であった。このため、まず心臓への分化にしたがって発現が変化するか否かを検討したところ、心臓の分化前、誘導とともに発現が明らかに増加することから、心臓への分化に重要な分子である可能性が考えられた。

再生医療のための細胞移植治療は、分化した細胞を移植する方法とsomatic stem細胞を増やして移植する方法が考えられる。本研究結果から分化した心筋の機能維持には、内皮細胞との相互調節作用が重要であることから、分化した細胞を用いる場合も、未分化細胞を用いる場合も心筋・内皮細胞への分化を考慮した上での治療を考えなければいけないことがわかった。分化した心筋を移植するか、未分化細胞を移植するかを決定することが今後の課題であると考えられた。

心臓SP細胞は心筋細胞、骨、脂肪へ分化可能な多能性を有した心臓幹細胞分画であることが明らかになった。オキシトシンやトリコスタチンAの作用の詳細な分子機序はまだ不明であるが、SP細胞はヒトを含めた種々の臓器に存在する幹細胞分画であり、心臓においても成熟した心筋細胞に分化可能な幹細胞分画としてSP細胞が存在することが明らかになった。また、心臓SP細胞はin vivo、in vitroにおいて心筋細胞や他の心筋構成細胞に分化することが可能な組織幹細胞であることが明らかになった。経静脈的に移植された心臓SP細胞が長期にわたり、各臓器、特に心臓に生

着する点は心臓SP細胞の高いホーミングおよび遊走能力を示唆する。また、障害心筋においてホーミングおよび遊走が促進される点は、障害心筋から発せられるシグナルが存在することを示唆する。内在性の心臓Sca-1および心臓SP細胞はともにオキシトシンを作用させることにより心筋細胞に分化した。現在のところ、in vivoにおいては不明であるが、今後、遊走因子とともにこのような分化誘導因子が解明されることにより、内在性心筋幹細胞の能力を活用した心筋再生が可能となると考える

一般に、臓器幹細胞は静止期にあり、増殖活性は制御されている。我々の検討でも心臓SP細胞は骨髄SP細胞と同様にG0期の細胞が高率に存在した。また、内在性の心臓幹細胞の病態時におけるin vivoでの増殖・分化の挙動に関しては明らかにされていない。本研究において、心筋梗塞時にはcanonical Wnt signalを介して心臓SP細胞は細胞周期に入り、増殖することが示唆された。今後、梗塞急性期において、内在性の心臓SP細胞、および、心臓SP細胞にWnt signalを供与する細胞の局在と動態を解析することが重要である。

E. 結論

我々はGene chipの解析を行う事で心筋分化にBMPアンタゴニストとして知られている心筋誘導因子が関与している可能性を示唆する事ができた。同定した心筋誘導因子を用いた心筋分化誘導実験を胎児性癌細胞(mEC)細胞であるP19CL6を用いてその検討を行った。DMSOと一緒にグレムリンを添加することでDMSO単独の添加よりも高い心筋分化誘導に成功した。同定した分子が、心筋形成（促進）因子であることを明らかにした。

Grem1は、P19CL6細胞に誘導開始初期に添加すると心筋分化を促進できた。また、心筋分化因子として知られているBMP2タンパク質は誘導開始初期には心筋分化を抑制した。これらのことは、再生医療としての心筋分化細胞の臨床応用化にも役立つ。心筋分化を行なう際、分化させたい細胞の分化ステージを確認し、そのステージに適した分化誘導を行なうことで誘導率の上昇が見込めるからである。例えば、ヒトES細胞やヒトiPS細胞といった胚性細胞の場合は、誘導開始直後にBMPタンパク質を添加すると心筋分化を抑制する可能性がある。その一方で、間葉系幹細胞といった細胞の場合、Grem1を添加しても心筋分化抑制作用しか示さないことも予想される。

OP9細胞から分泌される心筋分化誘導因子(X因子)を単離同定した。X因子はP19CL6細胞およ

びES細胞の心筋分化に必須の蛋白であることが示された。また、X因子の受容体の同定にも成功し、X因子が心筋分化誘導をおこす分子機構についてその一端を明らかにした。

心筋虚血により浸潤するCD45陽性細胞は一部VE-cadherinを発現し、血管内皮細胞と血球系の両方の性格を持つ細胞系であった。実際一つの細胞が両方の性格を有することから、成人のヘマンジオプラスト様の細胞が血管新生にかかわる可能性が考えられた。内皮細胞からNeuregulinの心臓への、心筋細胞からangiopoietinの内皮細胞への作用が心臓の再生のためのシグナルとして重要であることがわかった。

心臓SP細胞はin vitroにおいて成熟した心筋細胞へ、また、in vivoにおいて心筋細胞、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞といった心筋組織構成細胞に分化可能な心筋組織幹細胞であり、心筋障害に呼応してホーミング、遊走、分化した。また、静止期にある心臓SP細胞は心筋梗塞時にcanonical Wnt signalを介して細胞周期に入ることが示唆され、これまで不明であった病態時の心臓幹前駆細胞の動態の一端が解明された。

平成17年度から平成19年度の本研究期間に体性間葉系幹細胞および心臓幹前駆細胞からの心筋分化、血管形成、心筋分化誘導因子の解明という心筋再生に必須な3項目について有用な結果が得られた。本研究の成果をさらに関連させることにより、今後の心筋組織再生治療の発展に寄与すると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

・Harada, M., Qin, Y., Takano, H., Minamino, T., Zou, Y., Toko, H., Ohtsuka, M., Matsuura, K., Sano, M., Nishi, J., Akazawa, H., Kunieda, T., Zhu, W., Hasegawa, H., Kunisada, K., Nagai, T., Nakaya, H., Yamauchi-Takahara, K., Komuro, I. G-CSF prevents cardiac Remodeling after myocardial infarction by activating Jak/Stat in cardiomyocytes. Nat Med11:305-311, 2005.

・Naito, A.T., Akazawa, H., Takano, H., Minamino, T., Nagai, T., Aburatani, H., Komuro, I. Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Plays a Critical Role in Early Cardiomyogenesis by Regulating Canonical Wnt Signaling. Circ Res 97:144-151, 2005.

・Ohtsu, Y., Johkura, K., Ito, K., Akashima, T., Asanuma, K., Ogiwara, N., Oka, T., Komuro, I., Sasaki, K., Amano, J. Stimulation of P19CL6 with multiple reagents induces pulsating particles in vivo. Curr Med Res Opin 21:795-803, 2005.

・Somekawa S, Fukuhara S, Fujita H, Masuda M, Saito Y, Mochizuki N. Enhanced functional Gap junction neofunction by PKA-dependent and Epac-Rapl-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. Circ. Res. 92:655-662, 2005.

・Cho CH, Kim KE, Byun J, Jang HS, Kim DK, Baluk P, Baffert F, Lee GM, Mochizuki N, Kim J, Jeon BH, McDonald DM, Koh GY. Long-term and sustained COMP-Ang1 induces long-lasting vascular enlargement and enhanced blood flow. Circ Res. 97 : 86-94, 2005.

・Fujita H, Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Kmioka Y, Nakaoka Y, Masuda M, Mochizuki N. Local activation of Rap1 contributes to directional vascular endothelial cell migration accompanied by extension of microtubules on which RAPL, a Rap1-associating molecule, localizes. J.Biol Chem. 280: 5022-5031, 2005.

・Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N. Cyclic AMP potentiates VE-cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through Epac-Rapl signaling pathway. Mol. Cell Biol. 25: 136-146, 2005.

・Lu FZ, Fujino M, Kitazawa Y, Uyama T, Hara Y, Funeshima N, Jiang JY, Umezawa A, Li XK. Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human umbilical-cord blood. J Lab Clin Med.;146(5):271-8, 2005.

・Matsushita K, Iwanaga S, Oda T, Kimura K, Shimada M, Sano M, Umezawa A, Hata J, Ogawa S. Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. Lab Invest. 85(10):1210-23; 2005.

・Matsumoto S, Shibuya I, Kusakari S, Segawa K, Uyama T, Shimada A, Umezawa A. Membranous osteogenesis system modeled with KUSA-A1 mature osteoblasts. Biochim Biophys Acta. 1725(1):57-63, 2005.

- Mori T, Kiyono T, Imabayashi H, Takeda Y, Tsuchiya K, Miyoshi S, Makino H, Matsumoto K, Saito H, Ogawa S, Sakamoto M, Hata J, Umezawa A. Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol Cell Biol*. 25(12):5183-95, 2005.
- Katagiri YU, Kiyokawa N, Nakamura K, Takenouchi H, Taguchi T, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J. Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by monoclonal antibody Raft.2. *Biochem Biophys Res Commun* ;332(4):1004-11, 2005.
- Higuchi A, Shindo Y, Gomei Y, Mori T, Uyama T, Umezawa A. Cell separation between mesenchymal progenitor cells through porous polymeric membranes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* ;74(1):511-9, 2005.
- Kuroda M, Oikawa K, Yoshida K, Takeuchi A, Takeuchi M, Usui M, Umezawa A, Mukai K. Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. *Cancer Lett*. 221(1):21-8, 2005.
- Kawashima N, Shindo K, Sakamoto K, Kondo H, Umezawa A, Kasugai S, Perbal B, Suda H, Takagi M, Katsube K. Molecular and cell biological properties of mouse osteogenic mesenchymal progenitor cells, Kusa. *J Bone Miner Metab*. ;23(2):123-33, 2005.
- Terai M, Uyama T, Sugiki T, Li XK, Umezawa A, Kiyono T. Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol Biol Cell*. ;16(3):1491-9, 2005.
- Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, Komuro I. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19812-19817, 2006.
- Hasegawa, H., Takano, H., Iwanaga, K., Ohtsuka, M., Qin, Y., Niitsuma, Y., Ueda, K., Toyoda, T., Tadokoro, H., Komuro I. Cardioprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor in swine with chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 47:842-849, 2006.
- Hasegawa H, Takano H, Ohtsuka M, Ueda K, Niitsuma Y, Qin Y, Tadokoro H, Shiomi M, Komuro I. G-CSF prevents the progression of atherosclerosis and neointimal formation in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 344:370-376, 2006.
- Tateno K, Minamino T, Toko H, Akazawa H, Shimizu N, Takeda S, Kunieda T, Miyauchi H, Oyama T, Matsuura K, Nishi JI, Kobayashi Y, Nagai T, Kuwabara Y, Iwakura Y, Nomura F, Saito Y, Komuro I. Critical Roles of Muscle-Secreted Angiogenic Factors in Therapeutic Neovascularization. *Circ Res* 98:1194-1202, 2006.
- Ueda K, Takano H, Hasegawa H, Niitsuma Y, Qin Y, Ohtsuka M, Komuro I. Granulocyte Colony Stimulating Factor Directly Inhibits Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Through Akt-Endothelial NO Synthase Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:e108-e113, 2006.
- Hasegawa H, Takano H, Shiraishi H, Ueda K, Niitsuma Y, Tadokoro H, Komuro I. Intracoronary injection of granulocyte colony-stimulating factor ameliorates the progression of left ventricular remodeling after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits. *Circ J* 70:942-944, 2006.
- Kunieda, T., Minamino, T., Nishi, J. I., Tateno, K., Oyama, T., Katsuno, T., Miyauchi, H., Orimo, M., Okada, S., Takamura, M., Nagai, T., Kaneko, S., Komuro, I. Angiotensin II Induces Premature Senescence of Vascular Smooth Muscle Cells and Accelerates the Development of Atherosclerosis via a p21-Dependent Pathway. *Circulation* 114:953-960, 2006.
- Hasegawa H, Takano H, Kohro T, Ueda K, Niitsuma Y, Aburatani H, Komuro I. Amelioration of hypertensive heart failure by amlodipine may occur via antioxidative effects. *Hypertens Res* 29:719-729, 2006.
- Sakamoto M, Minamino T, Toko H, Kayama Y, Zou Y, Sano M, Takaki E, Aoyagi T, Tojo K, Tajima N, Nakai A, Aburatani H, Komuro I. Upregulation of heat shock transcription factor 1 plays a critical role in adaptive cardiac hypertrophy. *Circ Res* 99:1411-1418, 2006.

- Cao Y, Kamioka Y, Yokoi N, Kobayashi T, Hino O, Onodera M, Mochizuki N, Nakae J. Interaction of FoxO1 and TSC2 induces insulin resistance through activation of mTOR/p70S6K pathway. *J Biol Chem* 281: 40242-40251, 2006.
- Masuda M, Takeda S, Sone M, Ohki T, Mori H, Kamioka Y, Mochizuki N. Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *EMBO J* 25: 2889-2897, 2006.
- Maeng YS, Min JK, Kim JH, Yamagishi A, Mochizuki N, Kwon JY, Park YW, Kim YM, Kwon YG. ERK is an anti-inflammatory signal that suppresses expression of NF- κ B-dependent inflammatory genes by inhibiting IKK activity in endothelial cells. *Cell Signal* 18:994-1005, 2006.
- Sakurai A, Fukuhara S, Yamagishi A, Sako K, Kamioka Y, Masuda M, Nakaoka Y, Mochizuki N. MAGI-1 is required for Rap1 activation upon cell-cell contact and for enhancement of VE-cadherin-mediated cell adhesion. *Mol. Biol. Cell* 17:966-976, 2006.
- Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells* 24(10):2270-8. 2006.
- Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and Umezawa A. Increased mobilization of c-kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ (KSL) cells and colony-forming units in spleen (CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. *J Cellular Physiology* 208:188-194. 2006.
- Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. *Endocrinology* 147(9):4104-11. 2006.
- Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito A. T., Matsuura K, Iwanaga K, Takahashi T, Goto M, Mikami Y, Yasuda N, Akazawa H, Uezumi A, Takeda S, and Komuro I. Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 176:329-341, 2007.
- Min JK, Cho YL, Choi JH, Kim Y, Kim JH, Yu YS, Rho J, Mochizuki N, Kim YM, Oh GT, Kwon YG. Receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL) increases vascular permeability; Impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Blood* 109:1495-1502, 2007.
- Yoshizaki H, Mochizuki N, Gotoh Y, Matsuda M. Akt-PDK1 Complex Mediates EGF-induced Membrane Protrusion through Ral Activation. *Mol Biol Cell* 18,119-128, 2007.
- Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res* 313:698-706, 2007.
- Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs : Marrow Stromal cells and mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration* 27(1):28-36. 2007.
- Sano, M., Minamino, T., Toko, H., Miyauchi, H., Orimo, M., Qin, Y., Akazawa, H., Tateno, K., Kayama, Y., Harada, M., Shimizu, I., Asahara, T., Hamada, H., Tomita, S., Molkenkin, J.D., Zou, Y., Komuro, I. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 446:444-448, 2007.
- van den Boom, V., Kooistra, S.M., Boesjes, M., Geverts, B., Houtsmuller, A.B., Monzen, K., Komuro, I., Essers, J., Drenth-Diephuis, L.J., Eggen, B.J. UTF1 is a chromatin-associated protein involved in ES cell differentiation. *J Cell Biol* 178:913-924, 2007.
- Miyagawa Y, Okita H, Nakaijima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata JI, Umezawa A, Kiyokawa N. Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol.* in press.
- Yazawa T, Uesaka M, Inaoka Y, Mizutani T, Sekiguchi T, Kajitani T, Kitano T, Umezawa A, Miyamoto K. Cyp11b1 is induced in the murine gonad by luteinizing hormone/ human chorionic gonadotropin and involved in the production of 11-ketotestosterone, a major fish androgen; conservation and evolution of androgen

- metabolic pathway. *Endocrinology*. in press.
- Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, Satoh M, Shioda S, Ozawa Y, Ohtani A, Morita K, Hirano T, Terai M, Umezawa A, Mizusawa H. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 43(3-4):129-38. 2007.
 - Yoshida Y, Shimomura T, Sakabe T, Ishii K, Gonda K, Matsuoka S, Watanabe Y, Takubo K, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Hisatome I, Uyama T, Terai M, Umezawa A, Shiota G. A role of Wnt/beta-catenin signals in hepatic fate specification of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 293(5):G1089-98. 2007.
 - Sato B, Katagiri Y, Miyado K, Akutsu H, Miyashita Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun*. 364:838-43. 2007.
 - Kato S, Mohri Y, Matsuo T, Ogawa E, Umezawa A, Okuyama R, Nishimori K. Eye-open at birth phenotype with reduced keratinocyte motility in LGR4 null mice. *FEBS Lett*. 581(24):4685-90. 2007.
 - Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Katagiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T. Study on the quality control of cell therapy products. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1160(1-2):263-9. 2007.
 - Toyoda M, Takahashi H, Umezawa A. Ways for a mesenchymal stem cell to live on its own: maintaining an undifferentiated state ex vivo. *Int J Hematol*. 86(1):1-4. 2007.
 - Shimomura T, Yoshida Y, Sakabe T, Ishii K, Gonda K, Murai R, Takubo K, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Hisatome I, Uyama T, Umezawa A, Shiota G. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived UE7T-13 cells: Effects of cytokines and CCN family gene expression. *Hepatol Res*. 37(12):1068-79. 2007.
 - Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A. Working cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Exp Cell Res*. 313(12): 2550-62. 2007.
 - Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Miss, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The Significant Cardiomyogenic Potential of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Stem cells*. 25(8):2017-24. 2007.
 - Cui CH, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A. Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells. *Mol Biol Cell*. 18(5):1586-94. 2007.
 - Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem*. 100(5):1240-54. 2007.
 - Nakaoka Y, Nishida K, Narimatsu K, Kamiya A, Minami T, Sawa H, Okawa K, Fujio Y, Koyama T,¹ Maeda M, Sone M, Yamasaki S, Arai Y, Koh GY, Kodama T, Hirota H, Otsu K, Hirano T, Mochizuki N. Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function through transmitting neuregulin-1/ErbB signaling. *J Clin. Invest* 117:1771-1181, 2007.
 - Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, Asakura M, Asano Y, Shintani Y, Wakeno M, Minamino T, Kondo H, Furukawa H, Nakamaru K, Naito A, Takahashi T, Ohtsuka T, Kawakami K, Isomura T, Kitamura S, Tomoike H, Mochizuki N, Kitakaze M. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. *J Clin. Invest* 117: 2812-2824, 2007.
 - Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K,

Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, Kitakaze M. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 116, 1226-1233, 2007.

・Takaya A, Kamio T, Masuda M, Mochizuki N, Sawa H, Sato M, Nagashima K, Mizutani A, Matsuno A, Kiyokawa E, Matsuda M. R-Ras regulates exocytosis by Rgl2/Rlf-mediated activation of RalA on endosomes. *Mol Biol Cell*. 18:1850-60, 2007.

学会発表

- ・小室一成：サイトカインと心筋梗塞. 第9回日本適応医学会学術集会. 宮崎. 2005年6月10日.
- ・小室一成：遺伝子治療から再生医療へ. 第37回日本動脈硬化学会総会. 東京. 2005年7月14日.
- ・Komuro I: Cardioprotective Effects of G-CSF. The 16th Great Wall International Congress of Cardiology, Beijing, China, Nov 3-7, 2005.
- ・Komuro I: Cytokine therapy for myocardial infarction. Chinese Cardiovascular Regeneration Conference 2006, Beijing, China, Nov 3-7, 2005.
- ・小室一成：循環器疾患の再生治療. 第70回日本循環器学会総会・学術集会ランチョンセミナー. 名古屋. 2006年3月24日
- ・小室一成：末梢血単核球を用いた血管再生. 第79回内分泌学会学術集会. 東京. 2006年5月20日～21日.
- ・小室一成：再生医学の最前線. 東京歯科大学大学院セミナー. 千葉. 2006年6月22日.
- ・小室一成：心臓血管の再生治療. 第8回みなど循環器病診連携セミナー. 東京. 2006年7月6日.
- ・Komuro I: G-CSF and Cardioprotection. 3rd Annual Symposium of the American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences, Keystone, USA, July 31-Aug 5, 2008.
- ・小室一成：心臓血管の再生治療. 第60回国立病院総合医学学会ランチョンセミナー. 京都. 2006年9月22日.
- ・Komuro I: Cytokine therapy for myocardial infarction. Chinese Cardiovascular Regeneration Conference 2006, Beijing, China, Oct 20-22, 2006.
- ・小室一成：心筋再生. 第34回日本救急医学会総会サイエンスシリーズ. 福岡. 2006年10月30日.
- ・Komuro I: Regeneration Therapy for Cardiovascular Diseases. Zhongshan Hospital, Fudan University, Zhongshan, China, Nov 3-6,

2006.

- ・小室一成：心臓血管疾患の再生治療. 学術講演会. 千葉. 2007年2月9日.
- ・小室一成：心臓血管疾患に対する再生治療一期待される閉塞性動脈硬化症への有効性一. 日本赤十字医療センター院内講演会. 東京. 2007年4月7日.
- ・Komuro I: Cardiovascular Regeneration Therapy. Philippine Heart Association INC. Philippine College of Cardiology 38th Annual Convention & Scientific Meeting, Manila, Philippines, May 16-18, 2007.
- ・Komuro I: Cardiac side population cells. Cardiac Stems Cells: What we Need For Clinical Translation, Rome, Italy, June 37-28, 2007.
- ・Komuro I: Stem Cell Response to Growth Factors. 4th Annual Symposium of the American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Science, Keystone, USA, July 30-Aug 2, 2007.
- ・小室一成：Cardiac regeneration by Somatic Stem Cell. 第55回日本心臓病学会学術集会・日本心臓核医学会. 千葉. 2007年9月11日.
- ・小室一成：心臓は再生するのか? 阪大医療組織工学フォーラム. 大阪. 2007年12月11日.
- ・小室一成：心臓は再生するのか? 平成19年度再生医療等研究成果発表会. 東京. 2008年3月11日.
- ・上大介、渡邊昌俊、梅澤明弘：心筋形成因子としてのグレムリン-胎児性癌細胞を拍動心筋に-. 第96回日本病理学会総会、大阪、2007年3月
- ・岡本一真、三好俊一郎、西山伸弘、池上憲幸、上大介、宇山太郎、宮戸健二、梅澤明弘：Human Mesenchymal Stem Cell from Human Chorionic Villi is a New Cell Source for Autologous Cardiac Stem Cell Therapy. 第71回日本循環器学会学術集会、神戸、2007年3月
- ・上大介、渡邊昌俊、梅澤明弘：GeneChipとNIA array analysisを用いた心筋形成因子の探索-胎児性癌細胞を拍動心筋に-. 第28回日本炎症・再生医学会、東京、2007年8月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許取得

- ・「心筋細胞分化誘導促進剤及びその使用方法—テルミサルタン、バルサルタンを用いる」
発明者：梅澤明弘、三好俊一郎、小川聡
出願日：特願2007-315920、平成19年12月6日
出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

・「心筋細胞分化誘導促進剤及びその使用方法—
ピオグリタゾンを用いる」

発明者：梅澤明弘、三好俊一郎、小川聡

出願日：特願2007-315921 平成19年12月6日

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Harada M, Minamino T, Nagai T, Komuro I, et al.	G-CSF prevents cardiac Remodeling after myocardial infarction by activating Jak/Stat in cardiomyocytes	Nat Med	11	305-311	2005
Naito AT, Minamino T, Nagai T, Komuro I, et al.	Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Plays a Critical Role in Early Cardiomyogenesis by Regulating Canonical Wnt Signaling.	Circ Res	97	144-151	2005
Lu FZ, Fujino M, Kitazawa Y, Uyama T, Hara Y, Funeshima N, Jiang JY, Umezawa A, Li XK.	Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human umbilical-cord blood.	J Lab Clin Med.	146(5)	271-8	2005
Matsushita K, Iwanaga S, Oda T, Kimura K, Shimada M, Sano M, Umezawa A, Hata J, Ogawa S.	Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis.	Lab Invest.	85(10)	1210-23	2005
Matsumoto S, Shibuya I, Kusakari S, Segawa K, Uyama T, Shimada A, Umezawa A.	Membranous osteogenesis system modeled with KUSA-A1 mature osteoblasts.	Biochim Biophys Acta.	1725(1)	57-63	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Mori T, Kiyono T, Imabayashi H, Takeda Y, Tsuchiya K, Miyoshi S, Makino H, Matsumoto K, Saito H, Ogawa S, Sakamoto M, Hata J, Umezawa A.	Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential.	Mol Cell Biol.	25(12)	5183-95	2005
Katagiri YU, Kiyokawa N, Nakamura K, Takenouchi H, Taguchi T, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J.	Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by monoclonal antibody Raft.2.	Biochem Biophys Res Commun	332(4)	1004-11	2005
Higuchi A, Shindo Y, Gomei Y, Mori T, Uyama T, Umezawa A.	Cell separation between mesenchymal progenitor cells through porous polymeric membranes.	J Biomed Mater Res B Appl Biomater	74(1)	511-9	2005
Kuroda M, Oikawa K, Yoshida K, Takeuchi A, Takeuchi M, Usui M, Umezawa A, Mukai K.	Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL.	Cancer Lett.	221(1)	21-8	2005
Kawashima N, Shindo K, Sakamoto K, Kondo H, Umezawa A, Kasugai S, Perbal B, Suda H, Takagi M, Katsube K.	Molecular and cell biological properties of mouse osteogenic mesenchymal progenitor cells, Kusa.	J Bone Miner Metab	23(2)	123-33	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Terai M, Uyama T, Sugiki T, Li XK, Umezawa A, Kiyono T.	Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway.	Mol Biol Cell.	16(3)	1491-9	2005
Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N.	Cyclic AMP potentiates VE-cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through Epac-Rap1 signaling pathway.	Mol. Cell Biol.	25	136-146	2005
Fujita H, Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Kmioka Y, Nakaoka Y, Masuda M, Mochizuki N.	Local activation of Rap1 contributes to directional vascular endothelial cell migration accompanied by extension of microtubules on which RAPL, a Rap1-associating molecule, localizes.	J. Biol. Chem	280	5022-5031	2005
Cho CH, Kim KE, Byun J, Jang HS, Kim DK, Baluk P, Baffert F, Lee GM, Mochizuki N, Kim J, Jeon BH, McDonald DM, Koh GY.	Long-term and sustained COMP-Ang1 induces long-lasting vascular enlargement and enhanced blood flow.	Circ. Res.	97	86-94	2005
Somekawa S, Fukuhara S, Fujita H, Masuda M, Saito Y, Mochizuki N.	Enhanced functional Gap junction neofunction by PKA-dependent and Epac-Rap1-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes.	Circ. Res	92	655-662	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, Komuro I.	Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis.	Proc Natl Acad Sci USA	103	19812-19817	2006
Hasegawa H, Komuro I, et al.	Cardioprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor in swine with chronic myocardial ischemia	J AM Coll Cardiol	47	842-849	2006
Hasegawa H, Komuro I, et al.	G-CSF prevents the progression of atherosclerosis and neointimal formation in rabbits	Biochem Biophys Res Commun	344	370-376	2006
Teteno K, Minamino T, Komuro I, et al.	Critical Roles of Muscle-Secreted Angiogenic Factors in Therapeutic Neovascularization	Circ Res	98	1194-1202	2006
Ueda K, Komuro I, et al.	Granulocyte Colony Stimulating Factor Directly Inhibits Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Through Akt-Endothelial NO Synthase Pathway	Arterioscler Thromb Vasc Biol	26	e108-e113	2006
Hasegawa H, Komuro I, et al.	Intracoronary injection of granulocyte colony-stimulating factor ameliorates the progression of left ventricular remodeling after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits	Circ J	70	942-944	2006
Kunieda T, Minamino T, Komuro I, et al.	Angiotensin II Induces Premature Senescence of Vascular Smooth Muscle Cells and Accelerates the Development of Atherosclerosis via a p21-Dependent Pathway	Circulation	114	953-960	2006
Hasegawa H, Komuro I, et al.	Amelioration of hypertensive heart failure by amlodipine may occur via antioxidative effects	Hypertens Res	29	719-729	2006

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ.	A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells.	Stem Cells.	24(10)	2270-8.	2006
Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and Umezawa A	Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin-(KSL)cells and colony-forming units in spleen(CFU-S)following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossificaion.	J. Cell Physiol.	208.	188-194	2006
Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K.	Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells.	Endocrinology	147(9)	4104-11	2006
Fukuhara Y, Li XK, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuoka K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, Umezawa A, Okano H, Takahashi T, Okuyama T.	Histopathological and behavioral improvement of murine mucopolysaccharidosis type VII by intracerebral transplantation of neural stem cells.	Mol Ther.	13(3)	548-55	2006