

200706007A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療等研究事業

組織幹細胞賦活化による心血管再生療法の開発

(H17-再生-008)

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 佐田 政隆

平成 20 (2008) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

組織幹細胞賦活化による心血管再生療法の開発----- 5

佐田政隆

II. 分担研究報告

1. 組織幹細胞賦活化による心血管再生療法の開発----- 13

佐田政隆

2. 組織幹細胞の動態とその制御因子に関する研究 ----- 23

平田恭信

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 29

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----35

総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

組織幹細胞賦活化による心血管再生療法の開発

主任研究者 佐田政隆 東京大学大学院医学系研究科（先端臨床医学開発講座）
寄附講座教員（客員助教授）

研究要旨 プロスタサイクリン受容体活性化物質として開発された化学合成物 ONO-1301 が線維芽細胞から VEGF や HGF といった血管新生促進増殖因子の分泌を促した。この作用は cAMP の類似物質で模倣され、cAMP の阻害物質で打ち消された。ONO-1301 をポリグリコール酸で徐放化することに成功した。ラット下肢虚血モデルで、ONO-1301 徐放製剤の筋肉内投与により虚血下肢の血流は増加した。マウス心筋梗塞モデルにおいて、徐放化 ONO-1301 製剤は内因性 VEGF、HGF の発現を亢進させ毛細血管密度も増加させた。徐放化 ONO-1301 製剤投与により心筋拡大が抑制され死亡率、心臓破裂が有意に減少した。ラット心筋梗塞モデルにおいて、高容量より低容量の方が効果的であった。ブタ慢性虚血モデルにおいて、徐放化 ONO-1301 のカテーテルを用いた経皮的な心筋内投与により、側副血行路と心拍出量、駆出率が増加し、心拡大が抑制された。2 週間徐放製剤と 4 週間徐放製剤を比較検討したが、どちらも同等に有効であった。4 週間徐放製剤を用いて、外科的に投与する追試実験を行った。統計学的に有意な有効性を確認できた。副作用は認められなかった。臨床応用するために、プロトコール作りと GMP グレードの製剤作製を行っている。

佐田 政隆

東京大学大学院医学系研究科・
先端臨床医学開発講座
寄附講座教員（客員助教授）

平田 恭信

東京大学大学院医学系研究科・循環器内科
助教授

- ①合成化合物を用いて生体の自然治癒力を増強するという新しい概念で心機能回復を図る。安全で有効な心筋再生療法の開発を目指す。
- ②材料工学的手法を駆使して合成化合物; ON-1301 を徐放化したのち生体に投与し、自然治癒力を増強する戦略の実用化を図る。
- ③医用工学的電磁気ナビゲーションシステムを用いて経皮的に心筋にアプローチする手法を開発する。徐放粒子の大きさや性状を調整して化合物を心筋へ経皮的に伝達させようとする新しい試みである。
- ④小、中動物で有効性は確認している。また、ブタ心筋梗塞モデルにおいても、ONO-1301MS剤の心筋投与にて有効性が確認されている。今回は、血管新生・心筋再生能の再確認、用量相関性、作用機作、および臨床試験を考慮した投与方法の検討等を主に行う。
- ⑤また、徐放性基剤の性状を工夫し、放出速度の異

A. 研究目的

冠動脈硬化などを原因とする重症心不全患者数は増加している。薬物療法無効な症例では、心臓移植しか治療手段がない。しかし、日本ではドナーが絶対的に不足している。遺伝子治療や細胞移植療法が考案されているが、有効性と安全性および経済性、汎用性などに未解決な問題点が多い。

本研究では、

なる粒子を調整する。各種の投与方法、剤型、投与量を試みて有効性と安全性を比較検討する。

B. 研究方法

(1) ON-1301による増殖因子分泌促進の分子機序の解明

- ・培養心筋細胞、線維芽細胞、内皮細胞、平滑筋細胞にON-1301を添加する。上清中の内皮細胞増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)の濃度を測定する。
- ・各種キナーゼ阻害剤やブチル化cAMP, cGMPを添加して、増殖因子発現への効果を検討することでON-1301による増殖因子発現促進作用を仲介する細胞内伝達系を考察する。

(2) ON-1301徐放化粒子の開発

- ・生体内局所で持続的効果を得るためON-1301の徐放化粒子を開発する。Poly lactic glycolic acid (PLGA: 乳酸・グリコール酸の共重合体)やPoly lactic acid (PLA)と配合して粒子化する。走査電子顕微鏡で粒子の大きさ、形状を検討する。
- ・試験管内培養液中で、ON-1301徐放化剤(ON-1301-PLGA)の分解速度を測定する。PLGA中の乳酸:グリコール酸の配合比や重合反応温度を調整して、4週間程度の持続的放出が維持できるように、粒子化の至適条件を決定する。
- ・試作した徐放化ナノ粒子をマウス、ラットの大腿筋、心筋内に注射して、生体内での分解速度を評価する。また、筋肉注射部位の組織傷害、炎症反応を検討する。

(3) ラット下肢虚血モデルにおけるON-1301徐放化剤の効果検討

- ・ペントバルビタールナトリウム(25~35 mg/kg, i.p.)麻酔下にSDラットの右大腿動脈を結紮、切離する。Moor社のレーザー血流計を用いて、虚血下肢への血流回復を毎週測定す

る。

- ・5週目の計測のち、犠牲死させたのち患側下肢をメタノールで一昼夜固定する。虚血下肢の筋肉を切り出しパラフィン包埋したのち、切片を抗CD31抗体を用いて染色する。単位面積あたりの毛細血管密度を算出する。

(4) マウス心筋梗塞モデルにおけるON-1301徐放化剤の効果検討

- ・人工呼吸器管理下に開胸し、マウス前下行枝を結紮し心筋梗塞を作製する。虚血領域周囲4-5ヶ所にPBS/Tween-80 50 μ lに懸濁したON-1301-PLGA 0.5mgを27G針とハミルトンシリンジを用いて注射する。心機能を毎週の経胸壁的心エコー図と4週目のミラーカテーテルを用いた心内腔圧測定にて評価する。毛細血管数、線維化を組織学的に検討する。
- ・骨髄をGFPもしくはLacZマウスのもので置換したのち心筋梗塞を作成、骨髄細胞の血管、心筋分化への関与を検討する。局所に注入したON-1301-PLGAの骨髄細胞動員効果を評価する。

(5) ラット心筋梗塞モデルにおけるON-1301徐放化剤の効果検討

(5-a) 試験方法; 心筋梗塞モデルの作製

ラットをペントバルビタールナトリウム(35~40 mg/kg, i.p.)で麻酔後、背位に固定し、気道に気管チューブを経口的に挿入し、小動物用人工呼吸器(Model 683, HARVARD)により人工呼吸(呼吸容量:1.5~2.0 mL/body、呼吸回数:70回/min)を施し、胸部側壁を開胸して心臓を露出する。糸付縫合針を用いて左冠動脈前下行枝(LAD)を完全閉塞する。この時、心電図用アンプを介して心電図(第II誘導)を測定し、閉塞の有無をST電位の変化及び心筋色で確認する。なお、ST電位に変化の見られない個体は試験より除外する。その後、閉胸して切開部を縫合し、動物用イソジン液を用いて消毒する。

なお、Sham群は開胸手術のみ行い縫合する。

(5-b) 心機能検査

投与開始後4週（採血翌日）にラットをペン
トバルビタールナトリウム（25～35 mg/kg、i.
p.）麻酔下で背位に固定し、心機能を測定す
る。右頸動脈内にミラーカテーテル（SPR-249
<2.0Fr>又はSPR-524<2.5Fr>、Millar Instrum
ents Inc.）を挿入し、ひずみ圧力用アンプ
（AP-621G、日本光電工業㈱）又は血圧測定用
アンプ（AP-641G、日本光電工業㈱）を介して
血圧〔収縮期血圧（SBP）、拡張期血圧（DB
P）及び平均血圧（MBP）〕を測定する。その
後、左心室内に誘導留置し左心室内圧（LVP）
を測定する。さらに左心室内圧波形を微分ユ
ニット（ED-600G、日本光電工業㈱）又は微分
演算ユニット（EQ-601G、日本光電工業㈱）に
導いてLVdP/dt及び -LVdP/dtを測定する。ま
た、左心室内圧波形を生体電気アンプ（AB-62
1G、日本光電工業㈱）に導いて拡大し、左心
室拡張末期圧（LVEDP）を測定する。心電図は
心電図用アンプ（AC-601G、日本光電工業㈱）
を介して第Ⅱ誘導を記録する（解析なし）。
心拍数（HR）は血圧波形より瞬時心拍計ユ
ニット（AT-601G、日本光電工業㈱）を介して測
定する。それぞれのパラメーターはインク書
き記録器（WI-642G又はWI-622G、日本光電工
業㈱）上に記録する。

(5-c) 解剖

心機能検査後、動物を頸椎脱臼により安楽死
させて心臓及び肺を摘出し、心臓は、右心房
重量、左心房重量、右心室重量、左心室重量、
心臓全重量（両心房重量＋両心室重量）及び
肺重量を測定する。評価のため右心房重量/体
重比、左心房重量/体重比、右心室重量/体重
比、左心室重量/体重比及び肺重量/体重比を
算出する。その後、半数例（奇数番号）は左
心室の乳頭筋を横断する位置で短軸方向に二
等分し、横断面の起始部側を10%中性緩衝ホル

マリン溶液に浸漬させて固定する。ホルマリ
ン固定した心筋は、パラフィンブロックを作
製後、薄切し、Hematoxylin-Eosin染色を行い、
病理組織学的検査を行う。また、Azan-Mallor
y染色を行い、左心室における線維化面積につ
いて画像解析装置（汎用画像処理” Win ROOF
Version 3.1”、三谷商事㈱）を介して計測
する。残りの半数例（偶数番号）については
左心室を短軸方向に垂直にスライスし、輪切
り標本（4切片）を作製する。輪切り標本の重
量を測定後、心筋梗塞領域（Infarct area）
の特定のため、1% TTC液（pH 7.4 リン酸緩衝
液に溶解）で染色（液温：37℃、時間：5分
間）する。染色後、標本の両面について写真
撮影を行い、写真を画像解析装置（汎用画像
処理” Win ROOF Version 3.1”、三谷商事
㈱）に取り込み心筋梗塞面積及び左心室面積
を測定する。算出は心筋梗塞面積/左心室面積
×切片重量（g）より心筋梗塞領域を重量で
求め、左心室重量に占める割合を心筋梗塞サ
イズ（%）とする。

(6) ブタ心筋虚血モデルにおける経皮的投与法の 確立と効果判定

体重 30-35 k g 家畜用ブタ冠動脈のうち回旋枝
根部に、アメロイドコンストラクター（径 2.25-
2.4mm：3-4 週にて完全閉塞）を左側胸部開胸手
術により植え込むことによって作成した。
Ameroid constrictor 装着後4週目に再度開胸し、
心臓を露出させ心筋虚血周辺部に外側から数箇所
直接薬剤を筋肉内投与し6週目および8週目に心
機能検査をした。8週目の心機能検査終了後剖検
し、病理検査等を実施した。代表的な術中動画撮
影および心臓手術部、投与時、検査時、解剖時等
の写真撮影（スライド用）を行った。

また、経皮的投与方法においては、生体電気磁場
探査装置付きカテーテル（バイオセンス社
NOGA）を用いて、電気活動はあるものの壁運動が

低下している冬眠心筋を同定した。徐放製剤を心腔内もしくは外膜側から心筋へ直接注入した。放出された化合物が周辺細胞に作用して増殖因子の発現を誘導するかどうかを確認した。

0週でアメロイドコンストラクター植え込み、4週・6週において、①冠動脈造影・②左心室造影・③右心カテーテル検査・④NOGAシステムによる電位・壁運動モニタリングを組み合わせて行った。ONO1301投与は経冠動脈投与では4・6週、心外膜側投与では4週、心内膜投与では4・6週に行った。その後第8週に上記検査施行後、解剖、病理学的評価を行った。心機能をエコー図、左室造影、左室内圧で評価する。血管新生を冠動脈造影、組織学的に評価した。

(倫理面への配慮)

既に確立された細胞と実験動物疾患モデルを用いる。動物は換気、給餌等の完備した施設で飼育し、学内もしくは研究所内の規定に適合する条件で実験を行うため倫理的な問題はない。

C. 研究結果

(1) ONO-1301による増殖因子分泌促進の分子機序の解明 (in vitro)

- ① 正常人皮膚線維芽細胞に ONO-1301 を添加すると、培養上清中の HGF および VEGF の濃度は、時間依存性、容量依存性に有意に上昇した。
- ② cAMP 類似化合物である Dibutyryl cAMP ならびに adenylate cyclase 活性化薬 Forskolin を添加すると、ONO-1301 と同様に培養上清中の HGF および VEGF 濃度はともに上昇した。このことから、ONO-1301 の内因性 HGF および VEGF 分泌作用の細胞内伝達には cAMP の関与が考えられた。
- ③ 正常人線維芽細胞と正常人血管内皮細胞の共培養条件下に ONO-1301 を添加すると、内皮細胞の管腔様構造の形成は、陽性コントロールの VEGF および HGF と同程度まで促進した。

また、ONO-1301 に加え、抗 VEGF 中和抗体および抗 HGF 中和抗体をそれぞれ添加すると、ONO-1301 による管腔形成は抑制された。このことから ONO-1301 の管腔形成促進効果は、内因性 VEGF および HGF の分泌促進に依存していると考えられた。

(2) マウス心筋梗塞モデルにおける ONO-1301 徐放化剤の効果検討 (in vivo)

C57BL/6J マウスの前下行枝冠動脈を結紮し心筋梗塞モデルを作製した。虚血作製と同時に ONO-1301 の徐放剤 (ONO-1301MS) を、ハミルトンシリンジと 25G テルモ針を用いての虚血心筋周辺ニカ所に直接筋肉内注射した。心筋梗塞後 7 日目において、虚血部位の毛細血管密度は ONO-1301 によって増加した。このような血管新生促進効果は抗 VEGF 中和抗体の同時投与により、打ち消された。ONO-1301 による血管新生促進効果は、内因性 VEGF の発現亢進を介すると推測された。

心エコー図検査において、左室の拡大、収縮能の低下は ONO-1301MS により抑制された。組織学的検査では、残存心筋細胞の肥大、間質の線維化は抑制され、ONO-1301MS の局所投与により梗塞後心筋リモデリングは有意に抑制されたと考えられた。

抗 VEGF 中和抗体の投与で、ONO-1301 の予後改善効果は打ち消された。また、ONO-1301 の投与によって心臓破裂が抑制される傾向があった。心筋梗塞後 28 日の生存率はコントロールに比較し、改善傾向にあった。

(3) ラット下肢虚血モデルにおける ONO-1301 徐放化剤の効果検討

ONO1301 徐放製剤の筋肉内投与は、虚血下肢の血流回復を有意に促進した。また、虚血下肢筋肉内の毛細血管数が増加していた。この効果は、ONO1301 の単回全身投与では得られなかった。また、全身投与では血圧低下などの副作用が出現した。

(4) ラット心筋梗塞モデル（完全閉塞および虚血再灌流モデル）における ONO-1301 および ONO-1301 徐放剤の効果の検討 (in vivo)

ラット心筋梗塞モデルを用い、ONO-1301MS の 4 週間反復経口投与及び ONO-1301MS の心外膜心筋投与による一般症状観察、体重、血中 cAMP、血漿中 BNP 濃度、心エコー図検査、血行動態、臓器重量比、線維化面積比及び形態学的変化に対する作用を検討した。

Control 群及び PLGA・MS 群では、臓器重量比（心・肺重量比）の増加、心エコー図検査、血行動態検査上の左心室機能の低下（左心室拡大、左室駆出率の低下、 \pm LVdP/dt の低下、左心室拡張末期圧の上昇）が認められた。また、血中の cAMP 及び脳性利尿ペプチド (BNP) レベルの上昇が認められた。組織学的検査では心臓において、心筋変性壊死、線維化、間質浮腫、炎症性細胞浸潤、出血及び骨様化生の所見が観察された。

ONO-YS-1301 の 1 mg/kg 経口投与群では Control 群に比べ、血中 cAMP ($P < 0.05$) 及び BNP の低下が認められた。臓器重量比の増加抑制（右心房重量比： $P < 0.05$ ）が認められた。また、左心室機能の低下の抑制（左心室拡大の抑制、左室駆出率低下の抑制、 \pm LVdP/dt の上昇及び左心室拡張末期圧の低下）認められた。さらに線維化面積比の縮小効果 ($P < 0.05$) が観察された。組織学的検査では Control 群で認められた心筋変性壊死、線維化及び骨様化生の所見が軽減される傾向にあった。

ONO-1301MS 心筋内投与群では PLGA・MS 群に比べ、血中 BNP の低下が認められた。左心室機能の低下の抑制（左心室拡大の抑制、左心室内圧 ($P < 0.10$)、 \pm LVdP/dt の上昇及び左心室拡張末期圧の低下）が認められた。また、臓器重量比の増加抑制（右心房重量比： $P < 0.05$ ）が認められた。組織学的検査では PLGA・MS 群で認められた心筋変性壊死及び線維化の程度が軽減される傾向にあった。

以上より、ラット心筋梗塞モデルにおいて、

ONO-1301 及び ONO-1301 MS は、左心室機能（左室径、左室駆出率、 \pm LVdP/dt）の改善、cAMP、BNP レベルの低下、心・肺重量比の増加抑制、線維化面積比の縮小効果及び病理所見の軽減傾向を示し、心筋梗塞後左室リモデリングの抑制効果を有する可能性が示唆された。

(5) プタ心筋梗塞モデルにおける ONO-1301MS の効果の検討 (in vivo) —各種投与方法の検討—

1、開胸手術による心外膜側からの直接投与

ONO1301-MS(4 週間リリース製剤)投与により、心機能は有意に改善し、NOGA システムにより測定された虚血部位の壁運動・電位ともに改善していた。

4 週間リリース製剤 ONO1301-MS の一回投与も試みたところ、2 週間製剤 2 回投与と同等の効果が得られたことから、一回投与でより患者に少ない侵襲で、十分な効果が得られることが明らかとなった。

4 週間徐放製剤を用いて、外科的に投与する追試実験を行った。統計学的に有意な有効性を確認できた。副作用は認められなかった。臨床応用するために、プロトコール作りと GMP グレードの製剤作製を行っている。

2、カテーテルを用いての経皮的な心筋内への投与

2 週間リリース製剤 ONO1301-MS の 2 回投与は側副血行形成を促進すること、左心室リモデリングを抑制することが示唆された。また、心筋の線維化が抑制される傾向があった。

3、経冠動脈投与

右冠動脈から左回旋枝への側副血行路形成を目的として右冠動脈内に ONO1301-MS を投与したが、投与後 1 時間以内に ONO1301-MS 投与した動物 4 頭のうち 2 頭が死亡。生存した動物でも、両群とも左心室拡張末期容積が 74.1ml(コントロール群) vs. 65.05ml (ONO1301-MS 群) (有意差なし) とかなり拡張しており、冠動脈投与自体が、心機

能低下に寄与している可能性が考えられた。冠動脈投与を行うには、ON01301-MS の剤型・溶媒などに関して、詳細な検討が必要であると考えられた。

D. 考察

今年度の研究計画はほぼ達成できた。ON0-1301 の有効性の作用機序を明らかにすることができるのと同時に、虚血骨格筋ならびに心筋における *in vivo* の有効性と安全性を確認することができた。

冠動脈投与では有効性を証明することはできなかったが、ON01301-MS の外膜・内膜両側とも心筋内直接投与により、側副血行路形成が促進されその結果、左心室全体の拡大すなわちリモデリングが明らかに抑制された。冠動脈内への投与は最も汎用性があると考えられるが、徐放性剤の粘度が高い場合は、逆に塞栓症や心筋梗塞を誘発することになるので慎重に検討する必要がある。

ON-1301 の血管新生促進作用は確認できたが、心筋に存在する心筋幹細胞や骨髄由来細胞の動態に関しては不明点が残る。骨髄移植マウスを用いて骨髄由来細胞の動態を確認する。また、心筋幹細胞のマーカーとして用いられる、c-kit, sca-1 などを用いた免疫染色、ソーティングを用いて心筋内での組織幹細胞の動態を評価する。ON-1301 による組織幹細胞の分化、増殖への影響を評価する予定である。

また、ON-1301 投与による副作用を評価する必要がある。血圧低下作用や炎症惹起作用を詳細に検討する。ブタやマウスで投与後長期観察を行い、癌や血管腫の発生を検討する。

今後、臨床応用へ向けて①剤型②投与経路③投与量④投与頻度などをさらに検討する必要があると同時に、その有効性のメカニズムについてのさらに詳細な検討を予定している。

E. 結論

ON-1301 が内因性増殖因子の発現を促進し、血管新生を促進することが確認され、その分子機序も検討できた。臨床応用するため、今後、徐放性剤の性状（遊離速度、粒子径など）、至適投与量、投与経路を詳細に検討する必要があると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

分担報告書参照

学会発表

分担報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

- ・ 佐田：「カテーテルを兼用する医療用ガイドワイヤー」国際特許出願 PCT/JP01/04940
- ・ 佐田：「臓器移植後拒絶反応としての移植後動脈硬化症の予防及び/又は治療剤」国際特許出願 PCT/JP02/11441
- ・ 佐田：「フィブロイン糸を使用した小動物用人工血管」国際特許出願 PCT/JP2007/55818

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分 担 研 究 報 告 書

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織幹細胞賦活化による心血管再生療法の開発

分担研究者 佐田政隆 東京大学大学院医学系研究科（先端臨床医学開発講座）
寄付講座教員（客員助教授）

研究要旨 プロスタサイクリン受容体活性化物質として開発された化学合成物 ONO-1301 が線維芽細胞から VEGF や HGF といった血管新生促進増殖因子の分泌を促した。この作用は cAMP の類似物質で模倣され、cAMP の阻害物質で打ち消された。ONO-1301 をポリグリコール酸で徐放化することに成功した。ラット下肢虚血モデルで、ONO-1301 徐放製剤の筋肉内投与により虚血下肢の血流は増加した。マウス心筋梗塞モデルにおいて、徐放化 ONO-1301 製剤は内因性 VEGF、HGF の発現を亢進させ毛細血管密度も増加させた。徐放化 ONO-1301 製剤投与により心筋拡大が抑制され死亡率、心臓破裂が有意に減少した。ラット心筋梗塞モデルにおいて、高容量より低容量の方が効果的であった。ブタ慢性虚血モデルにおいて、徐放化 ONO-1301 のカテーテルを用いた経皮的筋肉内投与により、側副血行路と心拍出量、駆出率が増加し、心拡大が抑えられた。4 週間徐放製剤と 4 週間徐放製剤を比較検討したが、どちらも同等に有効であった。4 週間徐放製剤を用いて、外科的に投与する追試実験を行った。統計学的に有意な有効性を確認できた。臨床応用するために、プロトコール作りと GMP グレードの製剤作製を行っている。

A. 研究目的

冠動脈硬化などを原因とする重症心不全患者数は増加している。薬物療法無効な症例では、心臓移植しか治療手段がない。しかし、日本ではドナーが不足している。遺伝子治療や細胞移植療法も提案されているが、有効性と安全性および経済性、操作性などに未解決な問題点が多い。

①合成化合物を用いて生体の自然治癒力を増強するという新しい概念で心機能回復を図る。安全で有効な心筋再生療法の開発を目指す。

②材料工学的手法を駆使して合成化合物 ONO-1301 を徐放化したのち生体に投与し、自然治癒力を増強する戦略の実用化を図る。

③医用工学的電磁気ナビゲーションシステムを用いて経皮的に心筋にアプローチする手法を開発する。

④放出粒子の大きさや性状を調整して化合物を心筋へ効果的に伝達させようとする新しい試みである。

⑤中動物で有効性は確認している。また、ブタ心筋梗塞モデルにおいても、ONO-1301MS 剤の心筋投与にて有効性が確認されている。今回は、血管新生・心筋再生能の再確認、用量相関性、作用機作、および臨床試験を考慮した投与方法の検討等を主に行う。

⑥また、徐放性基剤の性状を工夫し、放出速度の異なる粒子を調整する。各種の投与方法、剤型、投与量を試みて有効性と安全性を比較検討する。

⑦臨床応用のため、投与プロトコール、投与経路、投

与量、形体に関する前臨床試験を行う。

B. 研究方法

(1) ON-1301による増殖因子分泌促進の分子機序の解明

- ・培養心筋細胞、線維芽細胞、内皮細胞、平滑筋細胞にON-1301を添加する。上清中の内皮細胞増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)の濃度を測定する。
- ・各種キナーゼ阻害剤やブチル化cAMP, cGMPを添加して、増殖因子発現への効果を検討することでON-1301による増殖因子発現促進作用を仲介する細胞内伝達系を考察する。

(2) ON-1301徐放化粒子の開発

- ・生体内局所で持続的効果を得るためON-1301の徐放化粒子を開発する。Poly lactic glycolic acid (PLGA: 乳酸・グリコール酸の共重合体)やPoly lactic acid (PLA)と配合して粒子化する。走査電子顕微鏡で粒子の大きさ、形状を検討する。
- ・試験管内培養液中で、ON-1301徐放化剤(ON-1301-PLGA)の分解速度を測定する。PLGA中の乳酸:グリコール酸の配合比や重合反応温度を調整して、4週間程度の持続的放出が維持できるように、粒子化の至適条件を決定する。
- ・試作した徐放化ナノ粒子をマウス、ラットの大腿筋、心筋内に注射して、生体内での分解速度を評価する。また、筋肉注射部位の組織傷害、炎症反応を検討する。

(3) ラット下肢虚血モデルにおけるON-1301徐放化剤の効果検討

- ・ペントバルビタールナトリウム(25~35 mg/kg, i.p.)麻酔下にSDラットの右大腿動脈を結紮、切離する。Moor社のレーザー血流計を用いて、虚血下肢への血流回復を毎週測定す

る。

- ・5週目の計測のち、犠牲死させたのち患側下肢をメタノールで一昼夜固定する。虚血下肢の筋肉を切り出しパラフィン包埋したのち、切片を抗CD31抗体を用いて染色する。単位面積あたりの毛細血管密度を算出する。

(4) マウス心筋梗塞モデルにおけるON-1301徐放化剤の効果検討

- ・人工呼吸器管理下に開胸し、マウス前下行枝を結紮し心筋梗塞を作製する。虚血領域周囲4-5ヶ所にPBS/Tween-80 50 μ lに懸濁したON-1301-PLGA 0.5mgを27G針とハミルトンシリンジを用いて注射する。心機能を毎週の経胸壁的心エコー図と4週目のミラーカテーテルを用いた心内腔圧測定にて評価する。毛細血管数、線維化を組織学的に検討する。
- ・骨髄をGFPもしくはLacZマウスのもので置換したのち心筋梗塞を作成、骨髄細胞の血管、心筋分化への関与を検討する。局所に注入したON-1301-PLGAの骨髄細胞動員効果を評価する。

(5) ラット心筋梗塞モデルにおけるON-1301徐放化剤の効果検討

(5-a) 試験方法; 心筋梗塞モデルの作製

ラットをペントバルビタールナトリウム(35~40 mg/kg, i.p.)で麻酔後、背位に固定し、気道に気管チューブを経口的に挿入し、小動物用人工呼吸器(Model 683, HARVARD)により人工呼吸(呼吸容量:1.5~2.0 mL/body、呼吸回数:70回/min)を施し、胸部側壁を開胸して心臓を露出する。糸付縫合針を用いて左冠動脈前下行枝(LAD)を完全閉塞する。この時、心電図用アンプを介して心電図(第II誘導)を測定し、閉塞の有無をST電位の変化及び心筋色で確認する。なお、ST電位に変化の見られない個体は試験より除外する。その後、閉胸して切開部を縫合し、動物用イソジン液を用いて消毒する。

なお、Sham群は開胸手術のみ行い縫合する。

(5-b) 心機能検査

投与開始後4週（採血翌日）にラットをペントバルビタールナトリウム（25～35 mg/kg、i. p.）麻酔下で背位に固定し、心機能を測定する。右頸動脈内にミラーカテーテル（SPR-249<2.0Fr>又はSPR-524<2.5Fr>、Millar Instruments Inc.）を挿入し、ひずみ圧力用アンプ（AP-621G、日本光電工業㈱）又は血圧測定用アンプ（AP-641G、日本光電工業㈱）を介して血圧〔収縮期血圧（SBP）、拡張期血圧（DBP）及び平均血圧（MBP）〕を測定する。その後、左心室内に誘導留置し左心室内圧（LVP）を測定する。さらに左心室内圧波形を微分ユニット（ED-600G、日本光電工業㈱）又は微分演算ユニット（EQ-601G、日本光電工業㈱）に導いてLVdP/dt及び-LVdP/dtを測定する。また、左心室内圧波形を生体電気アンプ（AB-621G、日本光電工業㈱）に導いて拡大し、左心室拡張末期圧（LVEDP）を測定する。心電図は心電図用アンプ（AC-601G、日本光電工業㈱）を介して第Ⅱ誘導を記録する（解析なし）。心拍数（HR）は血圧波形より瞬時心拍計ユニット（AT-601G、日本光電工業㈱）を介して測定する。それぞれのパラメーターはインク書き記録器（WI-642G又はWI-622G、日本光電工業㈱）上に記録する。

(5-c) 解剖

心機能検査後、動物を頸椎脱臼により安楽死させて心臓及び肺を摘出し、心臓は、右心房重量、左心房重量、右心室重量、左心室重量、心臓全重量（両心房重量+両心室重量）及び肺重量を測定する。評価のため右心房重量/体重比、左心房重量/体重比、右心室重量/体重比、左心室重量/体重比及び肺重量/体重比を算出する。その後、半数例（奇数番号）は左心室の乳頭筋を横断する位置で短軸方向に二等分し、横断面の起始部側を10%中性緩衝ホル

マリン溶液に浸漬させて固定する。ホルマリン固定した心筋は、パラフィンブロックを作製後、薄切し、Hematoxylin-Eosin染色を行い、病理組織学的検査を行う。また、Azan-Mallory染色を行い、左心室における線維化面積について画像解析装置（汎用画像処理”Win R00F Version 3.1”、三谷商事㈱）を介して計測する。残りの半数例（偶数番号）については左心室を短軸方向に垂直にスライスし、輪切り標本（4切片）を作製する。輪切り標本の重量を測定後、心筋梗塞領域（Infarct area）の特定のため、1% TTC液（pH 7.4 リン酸緩衝液に溶解）で染色（液温：37℃、時間：5分間）する。染色後、標本の両面について写真撮影を行い、写真を画像解析装置（汎用画像処理”Win R00F Version 3.1”、三谷商事㈱）に取り込み心筋梗塞面積及び左心室面積を測定する。算出は心筋梗塞面積/左心室面積×切片重量（g）より心筋梗塞領域を重量で求め、左心室重量に占める割合を心筋梗塞サイズ（%）とする。

(6) ブタ心筋虚血モデルにおける経皮的投与法の確立と効果判定

体重 30-35 kg 家畜用ブタ冠動脈のうち回旋枝根部に、アメロイドコンストラクター（径 2.25-2.4mm：3-4 週にて完全閉塞）を左側胸部開胸手術により植え込むことによって作成した。Ameroid constrictor 装着後4週目に再度開胸し、心臓を露出させ心筋虚血周辺部に外側から数箇所直接薬剤を筋肉内投与し6週目および8週目に心機能検査をした。8週目の心機能検査終了後剖検し、病理検査等を実施した。代表的な術中動画撮影および心臓手術部、投与時、検査時、解剖時等の写真撮影（スライド用）を行った。

また、経皮的投与法においては、生体電気磁場探査装置付きカテーテル（バイオセンス社 NOGA）を用いて、電気活動はあるものの壁運動が

低下している冬眠心筋を同定した。徐放製剤を心腔内もしくは外膜側から心筋へ直接注入した。放出された化合物が周辺細胞に作用して増殖因子の発現を誘導するかどうかを確認した。

0週でアメロイドコンストラクター植え込み、4週・6週において、①冠動脈造影・②左心室造影・③右心カテーテル検査・④NOGA システムによる電位・壁運動モニタリングを組み合わせて行った。ONO1301 投与は経冠動脈投与では4・6週、心外膜側投与では4週、心内膜投与では4・6週に行った。その後第8週に上記検査施行後、解剖、病理学的評価を行った。心機能をエコー図、左室造影、左室内圧で評価する。血管新生を冠動脈造影、組織学的に評価した。

(倫理面への配慮)

既に確立された細胞と実験動物疾患モデルを用いる。動物は換気、給餌等の完備した施設で飼育し、学内もしくは研究所内の規定に適合する条件で実験を行うため倫理的な問題はない。

C. 研究結果

(1) ONO-1301 による増殖因子分泌促進の分子機序の解明 (in vitro)

- ① 正常人皮膚線維芽細胞に ONO-1301 を添加すると、培養上清中の HGF および VEGF の濃度は、時間依存性、容量依存性に有意に上昇した。
- ② cAMP 類似化合物である Dibutyryl cAMP ならびに adenylate cyclase 活性化薬 Forskolin を添加すると、ONO-1301 と同様に培養上清中の HGF および VEGF 濃度はともに上昇した。このことから、ONO-1301 の内因性 HGF および VEGF 分泌作用の細胞内伝達には cAMP の関与が考えられた。
- ③ 正常人線維芽細胞と正常人血管内皮細胞の共培養条件下に ONO-1301 を添加すると、内皮細胞の管腔様構造の形成は、陽性コントロールの VEGF および HGF と同程度まで促進した。

また、ONO-1301 に加え、抗 VEGF 中和抗体および抗 HGF 中和抗体をそれぞれ添加すると、ONO-1301 による管腔形成は抑制された。このことから ONO-1301 の管腔形成促進効果は、内因性 VEGF および HGF の分泌促進に依存していると考えられた。

(2) マウス心筋梗塞モデルにおける ONO-1301 徐放化剤の効果検討 (in vivo)

C57BL/6J マウスの前下行枝冠動脈を結紮し心筋梗塞モデルを作製した。虚血作製と同時に ONO-1301 の徐放剤 (ONO-1301MS) を、ハミルトンシリンジと 25G テルモ針を用いての虚血心筋周辺ニカ所に直接筋肉内注射した。心筋梗塞後7日目において、虚血部位の毛細血管密度は ONO-1301 によって増加した。このような血管新生促進効果は抗 VEGF 中和抗体の同時投与により、打ち消された。ONO-1301 による血管新生促進効果は、内因性 VEGF の発現亢進を介すると推測された。

心エコー図検査において、左室の拡大、収縮能の低下は ONO-1301MS により抑制された。組織学的検査では、残存心筋細胞の肥大、間質の線維化は抑制され、ONO-1301MS の局所投与により梗塞後心筋リモデリングは有意に抑制されたと考えられた。

抗 VEGF 中和抗体の投与で、ONO-1301 の予後改善効果は打ち消された。また、ONO-1301 の投与によって心臓破裂が抑制される傾向があった。心筋梗塞後28日の生存率はコントロールに比較し、改善傾向にあった。

(3) ラット下肢虚血モデルにおける ONO-1301 徐放化剤の効果検討

ONO1301 徐放製剤の筋肉内投与は、虚血下肢の血流回復を有意に促進した。また、虚血下肢筋肉内の毛細血管数が増加していた。この効果は、ONO1301 の単回全身投与では得られなかった。また、全身投与では血圧低下などの副作用が出現した。

(4) ラット心筋梗塞モデル (完全閉塞および虚血再灌流モデル) における ONO-1301 および ONO-1301 徐放剤の効果の検討 (in vivo)

ラット心筋梗塞モデルを用い、ONO-1301MS の 4 週間反復経口投与及び ONO-1301MS の心外膜心筋投与による一般症状観察、体重、血中 cAMP、血漿中 BNP 濃度、心エコー図検査、血行動態、臓器重量比、線維化面積比及び形態学的変化に対する作用を検討した。

Control 群及び PLGA・MS 群では、臓器重量比 (心・肺重量比) の増加、心エコー図検査、血行動態検査上の左心室機能の低下 (左心室拡大、左室駆出率の低下、 \pm LVdP/dt の低下、左心室拡張末期圧の上昇) が認められた。また、血中の cAMP 及び脳性利尿ペプチド (BNP) レベルの上昇が認められた。組織学的検査では心臓において、心筋変性壊死、線維化、間質浮腫、炎症性細胞浸潤、出血及び骨様化生の所見が観察された。

ONO-YS-1301 の 1 mg/kg 経口投与群では Control 群に比べ、血中 cAMP (P<0.05) 及び BNP の低下が認められた。臓器重量比の増加抑制 (右心房重量比 : P<0.05) が認められた。また、左心室機能の低下の抑制 (左心室拡大の抑制、左室駆出率低下の抑制、 \pm LVdP/dt の上昇及び左心室拡張末期圧の低下) が認められた。さらに線維化面積比の縮小効果 (P<0.05) が観察された。組織学的検査では Control 群で認められた心筋変性壊死、線維化及び骨様化生の所見が軽減される傾向にあった。

ONO-1301MS 心筋内投与群では PLGA・MS 群に比べ、血中 BNP の低下が認められた。左心室機能の低下の抑制 (左心室拡大の抑制、左心室内圧 (P<0.10)、 \pm LVdP/dt の上昇及び左心室拡張末期圧の低下) が認められた。また、臓器重量比の増加抑制 (右心房重量比 : P<0.05) が認められた。組織学的検査では PLGA・MS 群で認められた心筋変性壊死及び線維化の程度が軽減される傾向にあった。

以上より、ラット心筋梗塞モデルにおいて、

ONO-1301 及び ONO-1301 MS は、左心室機能 (左室径、左室駆出率、 \pm LVdP/dt) の改善、cAMP、BNP レベルの低下、心・肺重量比の増加抑制、線維化面積比の縮小効果及び病理所見の軽減傾向を示し、心筋梗塞後左室リモデリングの抑制効果を有する可能性が示唆された。

(5) ブタ心筋梗塞モデルにおける ONO-1301MS の効果の検討 (in vivo) - 各種投与方法の検討 -

1、開胸手術による心外膜側からの直接投与

ONO1301-MS (4 週間リリース製剤) 投与により、心機能は有意に改善し、NOGA システムにより測定された虚血部位の壁運動・電位ともに改善していた。

4 週間リリース製剤 ONO1301-MS の一回投与も試みたところ、2 週間製剤 2 回投与と同等の効果が得られたことから、一回投与でより患者に少ない侵襲で、十分な効果が得られることが明らかとなった。

4 週間徐放製剤を用いて、外科的に投与する追試実験を行った。統計学的に有意な有効性を確認できた。副作用は認められなかった。臨床応用するために、プロトコール作りと GMP グレードの製剤作製を行っている。

2、カテーテルを用いての経皮的心筋内への投与

2 週間リリース製剤 ONO1301-MS の 2 回投与は側副血行形成を促進すること、左心室リモデリングを抑制することが示唆された。また、心筋の線維化が抑制される傾向があった。

3、経冠動脈投与

右冠動脈から左回旋枝への側副血行路形成を目的として右冠動脈内に ONO1301-MS を投与したが、投与後 1 時間以内に ONO1301-MS 投与した動物 4 頭のうち 2 頭が死亡。生存した動物でも、両群とも左心室拡張末期容積が 74.1ml (コントロール群) vs. 65.05ml (ONO1301-MS 群) (有意差なし) とかなり拡張しており、冠動脈投与自体が、心機能低下に寄与している可能性が考えられた。冠動

脈投与を行うには、ON01301-MS の剤型・溶媒などに関して、詳細な検討が必要であると考えられた。

D. 考察

今年度の研究計画はほぼ達成できた。ON0-1301 の有効性の作用機序を明らかにすることができると同時に、虚血骨格筋ならびに心筋における *in vivo* の有効性と安全氏を確認することができた。

冠動脈投与では有効性を証明することはできなかったが、ON01301-MS の外膜・内膜両側とも心筋内直接投与により、側副血行路形成が促進されその結果、左心室全体の拡大すなわちリモデリングが明らかに抑制された。冠動脈内への投与は最も汎用性があると考えられるが、徐放性剤の粘度が高い場合は、逆に塞栓症や心筋梗塞を誘発することになるので慎重に検討する必要がある。

ON-1301 の血管新生促進作用は確認できたが、心筋に存在する心筋幹細胞や骨髄由来細胞の動態に関しては不明点が残る。骨髄移植マウスを用いて骨髄由来細胞の動態を確認する。また、心筋幹細胞のマーカーとして用いられる、c-kit, sca-1 などを用いた免疫染色、ソーティングを用いて心筋内での組織幹細胞の動態を評価する。ON-1301 による組織幹細胞の分化、増殖への影響を評価する予定である。

また、ON-1301 投与による副作用を評価する必要がある。血圧低下作用や炎症惹起作用を詳細に検討する。ブタやマウスで投与後長期観察を行い、癌や血管腫の発生を検討する。

今後、臨床応用へ向けて①剤型②投与経路③投与量④投与頻度などをさらに検討する必要があると同時に、その有効性のメカニズムについてのさらに詳細な検討を予定している。

E. 結論

ON-1301 が内因性増殖因子の発現を促進し、血管新生を促進することが確認され、その分子機序も検討できた。臨床応用するため、今後、徐放性

剤の性状（遊離速度、粒子径など）、至適投与量、投与経路を詳細に検討する必要があると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sumi, M., Sata, M., Toya, N., Yanaga, K., Ohki, T., Nagai, R. Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis. *Life Sci* 2007. 80:559-565.
2. Wakayama, K., Shimamura, M., Sata, M., Sato, N., Kawakami, K., Fukuda, H., Tomimatsu, T., Ogihara, T., Morishita, R. Quantitative measurement of neurological deficit after mild (30 min) transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 2007. 1130:181-187.
3. Sainz, J., Sata, M. CXCR4, a key modulator of vascular progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007. 27: 263-265.
4. Sahara, M., Sata, M., Morita, T., Nakamura, K., Hirata, Y., Nagai, R. Diverse contribution of bone marrow-derived cells to vascular remodeling associated with pulmonary arterial hypertension and arterial neointimal formation. *Circulation* 2007. 115: 509-517.
5. Inoue, T., Sata, M., Hikichi, Y., Sohma, R., Fukuda, D., Uchida, T., Shimizu, M., Komoda, H., Node, K. Mobilization of CD34-Positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis. *Circulation* 2007.

- 115: 553-561.
6. Sumi, M., Sata, M., Miura, S.I., Rye, K.A., Toya, N., Kanaoka, Y., Yanaga, K., Ohki, T., Saku, K., Nagai, R. Reconstituted high-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007. 27: 813-818.
 7. Kojima, I., Tanaka, T., Inagi, R., Kato, H., Yamashita, T., Sakiyama, A., Ohneda, O., Takeda, N., Sata, M., Miyata, T., Fujita, T., Nangaku, M Protective role of HIF-2 α against ischemic damage and oxidative stress in the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2007. 18: 1218-1226
 8. Suzuki, T., Nishi, T., Nagino, T., Sasaki, K., Aizawa, K., Kada, N., Sawaki, D., Munemasa, Y., Matsumura, T., Muto, S., Sata, M., Miyagawa, K., Horikoshi, M., Nagai, R. Functional interaction between the transcription factor Kruppel-like factor 5 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in cardiovascular apoptosis. *J Biol Chem.* 2007. 282: 9895-9901
 9. Iwata, H., Sta, M. Potential contribution of bone marrow-derived precursors to vascular repair and lesion formation: lessons from animal models of vascular diseases. *Frontiers in Bioscience* 2007. 12: 4157-4167
 10. Shirakawa, I., Sata, M., Saiura, A., Kaneda, Y., Yashiro, H., Hirata, Y., Makuuchi, M., Nagai, R. Atorvastatin attenuates transplant-associated coronary arteriosclerosis in a murine model of cardiac transplantation. *Biomed Pharmacother.* 2007. 61. 154-159
 11. Tanaka, K., Sata, M. Therapeutic application of bone marrow-derived progenitor cells for vascular diseases: Magic bullets having the good without the bad. *Int. J. Gerontol.* 2007. 1. 10-21
 12. Nakamura, K., Sata, M., Iwata, H., Sakai, Y., Hirata, Y., Kugiyama, K., Nagai, R. A synthetic small molecule, ONO-1301, enhances endogenous growth factor expression and augments angiogenesis in ischemic heart *Clin Sci (Lond).* 2007. 112. 607-616
 13. Sumi, A., Sata, M., Hashimoto, A., Imaizumi, T., Yanaga, K., Ohki, T., Mori, T., Nagai, R. OPC-28326, a selective femoral arterial vasodilator, augments ischemia induced angiogenesis. *Biomed Pharmacother.* 2007. 61. 209-215
 14. Aihara, K, Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Sata, M., Takamori, N., Yagi, S., Iwase, T., Sumitomo, Y., Kawano, H., Yamada, T., Fukuda, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Sato, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Yoshimura, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Oomizu, A., Tsukada, M., Hayashi, H., Sudo, T., Kato, S., Matsumoto, T. Strain-dependent embryonic lethality and exaggerated vascular remodeling in heparin cofactor II-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 2007. 117. 1514-1526
 15. Shimamura, M., Sato, N., Sata, M., Wakayama, K, Ogihara, T., Morishita, R.

- Expression of hepatocyte growth factor and c-Met after spinal cord injury in rats. *Brain Res.* 2007. 1151. 188-194.
16. Yamada, T., Kondo, T., Numaguchi, Y., Tsuzuki, M., Matsubara, T., Manabe, I., Sata, M., Nagai, R., Murohara, T. Angiotensin II receptor blocker inhibits neointimal hyperplasia through regulation of smooth muscle-like progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007. 11. 2363-2369.
 17. Fukuda, D., Sata, M. Renin-angiotensin system: a potential modulator of endothelial progenitor cells. *Hypertens Res.* 2007. 30. 1017-1018.
 18. Shimamura, M., Sato, N., Sata, M., Kurinami, H., Takeuchi, D., Wakayama, K., Hayashi, T., Iida, H., Morishita, R. Delayed post-ischemic treatment with fluvastatin improved cognitive impairment after stroke in rats. *Stroke.* 2007. 38. 3251-3258.
 19. Fukuda, D., Sata, M., Ishizaka, N., Nagai, R. A critical role of bone marrow angiotensin II type 1 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008. 28. 90-96.
 20. Sainz, J., Sata, M. Open sesame! CXCR4 blockade recruits neutrophils into the plaque. *Circ Res.* 2008. 102. 154-156.
 21. Tanaka, K., Sata, M., Natoti, T., Kim-Kaneyama, J-R., Nose, K., Shibamura, M., Hirata, H., Nagai, R. Circulating progenitor cells contribute to neointimal formation in non-irradiated chimeric mice. *FASEB J* 2008. 22. 428-436.
 22. Huang, P-H., Sata, M., Nishimatsu, H., Sumi, M., Hirata, Y., Nagai, R. Pioglitazone ameliorates endothelial dysfunction and restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice. *Biomed Pharmacother.* 2008. 62. 46-52.
 23. Matsumoto, M., Sata, M., Fukuda, D., Tanaka, K., Soma, M., Hirata, Y., Nagai, R. Orally administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2008. 197. 524-533.
 24. Shimazaki, M., Nakamura, K., Kii, I., Kashima, T., Amizuka, N., Li, M., Fukuda, K., Nishiyama, T., Kitajima, S., Saga, Y., Fukayama, M., Sata, M., Kudo, A. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *J Exp. Med.* 2008. 205. 295-303.
 25. Imaizumi, S., Miura, S., Nakamura, K., Kiya, Y., Uehara, Y., Zhang, B., Matsuo, Y., Urata, H., Ideishi, M., Rye, K.A., Sata, M., Saku, K. Anti-arrhythmogenic effect of reconstituted high-density lipoprotein against ischemia/reperfusion in rats. *J Am Coll Cardiol.* in press
 26. Kumano, K., Masuda, S., Sata, M., Saito, T., Lee, S.Y., Sakata-Yanagimoto, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Natsugari, H., Kurokawa, M., Ogawa, S., Chiba, S. Both Notch1 and Notch2 contribute to the regulation of melanocyte homeostasis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008. 21: 70-78.

27. Enomoto, S., Sata, M., Fukuda, D., Nakamura, K., Nagai, R. Rosuvastatin prevents endothelial cell death and reduces atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient mice. *Biomed Pharmacother.* in press
28. Fukuda, D., Sata, M. Role of bone marrow renin angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Pharmacol Ther.* in press
29. Tanaka, K., Sata, M. Potential role of statins in re-endothelialization. *Immun., Endoc. & Metab. Agents in Med. Chem.* in press

2. 学会発表

1. Enomoto S., Sata M., Fukuda D., Nagai R. "The Additional Effects of Rosuvastatin on Atherosclerosis Independent of Cholesterol-lowering Actions" 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
2. Tanaka K., Sata M., Hirata Y., Nagai R. "Perivascular Adipose Tissue Anatomically Communicate with Atherosclerotic Lesions via Vasa Vasorum; Possible Link of Adipo-Vasculer Axis" 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
3. Fukuda D., Sata M., Nagai R., "Fluvastatin Accelerates Re-endothelialization Impaired by Local Sirolimus Treatment" 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
4. Fukuda D., Sata M., Nagai R. "Deletion of Angiotensin II Type 1 Receptor in Bone Marrow Reduced Atherosclerotic Region Fomation in ApoE Deficient Mice" 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
5. Fukuda D., Sata M., Nagai R. "Angiotensin II Type 1 Receptor in Bone Marrow Plays a Crucial Role in Plaque Progression and Destabilization" 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
6. Iwata H., Sata M., Nakamura K., Sumi M., Sakai Y., Takamoto S., Nagai R. "Local Delivery of Slow-releasing Synthetic Prostaglandin I2 Agonist Augments Collateral Growth in Swine Chronic Cardiac Ischemia Model" 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
7. Matsumoto M., Sata M., Soma M., Nagai R. "Eicosapentaenoic Acid Up-regulates Adiponectin Expression in Peri-Adventitial Adipose Tissue and Suppresses Atherosclerotic Lesion Formation in ApoE-Deficient Mice" 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
8. Matsumoto M., Sata M., Soma M., Nagai R. "Oral Administration of Eicosapentaenoic Acid Reduces and Stabilizes Atherosclerotic Lesions through Lipid-Lowering-Independent Mechanism in ApoE-Deficient Mice" 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
9. Nakamura K., Sata M., Iwata H., Hirata Y., Kugiyama K., Nagai R. "A Synthetic Prostaglandin I2 Agonist Up-regulates Endogenous Growth Factors Via c-AMP Mediated Pathway and Promotes Therapeutic Angiogenesis" 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
10. Nakamura K., Sata M., Hirata Y., Kugiyama K., Nagai R., "Blockade of

- Angiotensin II Type1 Receptor Attenuates the Post-Infarcted Cardiac Dysfunction in Angiotensin-converting Enzyme 2 Deficient Mice” 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
11. Sahara M., Sata M., Morita T., Hirata Y., Nagai R. “cGMP-specific Phosphodiesterase-5 Inhibition Enhances Angiogenesis via the Synthesis of Vascular Endothelial Growth Factor and the Recruitment of Endothelial Progenitor Cells” 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
12. Sahara M., Sata M., Morita T., Hirata Y., Nagai R. “A Combination of a Cyclic GMP-specific Phosphodiesterase-5 Inhibitor, Vardenafil, and Nicorandil Ameliorates Synergistically Monocrotaline-induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats” 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
13. Sahara M., Sata M., Morita T., Nakamura K., Hirata Y., Nagai R. “Diverse Contribution of Bone Marrow-derived Cells to Vascular Remodeling Associated with Pulmonary Arterial Hypertension and Arterial Neointimal Formation” 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
14. Sumi M., Sata M., Miura S., Saku K., Hirata Y., Nagai R. “Reconstituted High-Density Lipoprotein Promotes Differentiation of Endothelial Progenitor Cells and Augments Ischemia-induced Angiogenesis” 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
15. Shimamura M., Sato N., Sata M., Wakayama K., Hayashi T., Iida H., Ogihara T., Morishita R. “Delayed Post-ischemic Treatment with Fluvastatin Improved Learning and Memory Deficit After Stroke in Rats without affecting Infarction Volume” 第 71 回日本循環器学会総会 2007 年 3 月 15-17 日 神戸
16. 墨誠、佐田政隆、小野佳子、立石法史、大木隆生、永井 良三「ケルセチン配糖体による下肢虚血モデルに対する血管新生の検討」第 7 回日本抗加齢医学会総会 2007 年 7 月 20-21 日 京都
17. 墨誠、佐田政隆、大木隆生、永井良三 「合成 HDL は血管内皮前駆細胞の分化を促進させて虚血に伴う血管新生を増強する」 第 28 回日本炎症再生医学会 2007 年 8 月 2-3 日 東京 “血管内皮細胞・血管新生・微小循環 (2)” (一般演題 39)
18. 中村和人、佐田政隆、岩田洋、酒井芳紀、永井良三 「合成低分子化合物による内因性増殖因子発現誘導と血管新生促進効果」 第 28 回日本炎症再生医学会 2007 年 8 月 2-3 日 東京 “血管内皮細胞・血管新生・微小循環 (2)” (一般演題 39)
19. 岩田洋、佐田政隆、真鍋一郎、藤生克人、武田憲文、永井良三 「平滑筋ミオシン、平滑筋アクチンレポーターマウスを用いた血管リモデリングにおける平滑筋細胞起源の検討」 第 48 回日本脈管学会総会 2007 年 10 月 25 日 松本 “動脈硬化 2 “
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得
- ・ 佐田：「カテーテルを兼用する医療用ガイドワイヤー」 国際特許出願 PCT/JP01/04940
 - ・ 佐田：「臓器移植後拒絶反応としての移植後動脈硬化症の予防及び/又は治療剤」 国際特許出願 PCT/JP02/11441
 - ・ 佐田：「フィブロン系を使用した小動物用人工血管」 国際特許出願 PCT/JP2007/55818
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし