

200706008B

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療等研究事業

間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法の  
基礎及び臨床研究

平成17年度～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 北村 惣一郎

平成20(2008)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療等研究事業

間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法の  
基礎及び臨床研究

## 目 次

- I. 総括研究報告
  - 間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法の基礎及び臨床研究…………… 1  
北村 惣一郎
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表
- III. 研究成果の刊行物・別刷

## 間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法の基礎及び臨床研究

主任研究者 北村 惣一郎 国立循環器病センター 総長

研究要旨 拡張型心筋症や虚血性心筋症に対して自己骨髄間葉系細胞の移植による心筋血管再生療法の基礎および臨床研究を行った。慢性心不全に対する骨髄間葉系細胞移植に関しては、パイロット臨床試験により長期安全性と有効性を確認した。また、基礎研究として、次世代の細胞移植治療として間葉系幹細胞+細胞シートまたは成長因子によるハイブリット再生治療による心筋再生療法を開発した。特に脂肪由来間葉系細胞シートを用いた心不全研究では、小動物実験が終わり、大動物（ブタ）を用いた前臨床試験を行い成果を挙げた。基礎的研究では骨髄由来と皮下脂肪由来の間葉系細胞の差異について検討を行った。

分担研究者	清水 渉	国立循環器病センター
永谷憲歳	国立循環器病センター研究所 再生医療部 部長	心臓血管内科 医長
大串 始	産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 グループ長	西川雄大 国立循環器病センター研究所 先進治療機器開発室 室長
竹下 聡	国立循環器病センター 心臓血管内科 医長	A. 研究目的
清水達也	東京女子医科大学先端生命医科学 研究所 講師	虚血性心疾患および拡張型心筋症などによる 難治性心不全は心臓移植の適応であるが、ドナー の不足により十分な移植医療ができないのが現 状である。近年、骨髄間葉系細胞の中には多分化 能を有する幹細胞が存在し、心筋、血管、神経、 脂肪及び骨に分化することが明らかとなってき た。我々は心不全動物の心筋内へ間葉系幹細胞を 移植すると心筋と血管が同時に再生され、心機能 が改善されることを証明してきた。これらの基礎 的検討をもとに、骨髄間葉系細胞を用いた難治性 心不全治療・狭心症治療を開発し臨床応用を行っ た。また次世代の細胞移植治療として間葉系幹細 胞+細胞シートまたは成長因子によるハイブリ ット再生治療による心筋再生療法の開発を行っ た。また、近年皮下脂肪が細胞ソースとして注目
盛 英三	国立循環器病センター研究所 心臓生理部 部長	
宮武邦夫	独立行政法人国立病院機構 大阪南医療センター 院長	
中谷武嗣	国立循環器病センター 臓器移植部 部長	
八木原俊克	国立循環器病センター 副院長	
山岸正和	金沢大学大学院医学系研究科 教授	
小林順二郎	国立循環器病センター 心臓血管外科 医長	

されているが、骨髄由来と皮下脂肪由来の間葉系細胞の差異について詳細な検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 自己間葉系細胞を用いた難治性循環器疾患に対する心筋血管再生療法の臨床応用

患者自身の骨髄液 15-20mL と自己末梢血 400-600mL を採取し、末梢血から分離した血清を用いて約3週間培養した。以下の2つのプロトコールを行った。

1) 拡張型心筋症、虚血性心筋症による慢性心不全に対する経皮的細胞移植治療（北村、永谷、山岸、清水、宮武、中谷、竹下担当）虚血性心疾患や拡張型心筋症等が原因で心不全を有し、既存の治療に抵抗性を示す重症慢性心不全患者を対象に、NOGA システムを用いて間葉系細胞を経カテーテル的に心内膜側から心筋へ注入した。

2) 虚血性心筋症に対する細胞移植および冠動脈バイパス手術併用療法（北村、小林、八木原担当）従来の治療法で改善困難な領域を有する重症虚血性心疾患患者を対象として、冠動脈バイパス術による外科的血行再建と同時に、自己骨髄より採取培養された間葉系細胞の移植を行った。

### 2. 間葉系細胞+細胞シート、成長因子によるハイブリット再生治療の開発

間葉系細胞+細胞シートによる心筋様組織再生療法の開発を行った（清水、西川、永谷、中谷、八木原、盛、北村）。まず、種々の細胞ソースから間葉系細胞を採取し、間葉系細胞シートを作製した。これらの細胞シートから分泌される血管新生関連サイトカイン蛋白質・遺伝子の発現量を調べた。また、皮下脂肪由来間葉系細胞を温度応答性培養皿上で培養し、単層の細胞シートグラフトを作製し、心筋梗塞後4週間経過した慢性心不全

ラットの心外膜表面に移植し、治療効果を検討した。ブタを用いた前臨床研究では冠動脈結紮1カ月後、すなわち心筋梗塞が完成し心不全となった時期に、脂肪由来間葉系細胞シートを1層として移植した。

間葉系幹細胞+成長因子によるハイブリット再生治療として、強力な抗アポトーシス作用と心筋保護作用を持つインスリン様増殖因子 (IGF-1) を細胞移植に併用し、両者の相加・相乗効果を検討した（宮武、永谷、北村）。MSCs を梗塞周囲心筋に直接注入し、引き続き IGF-1 を 2mg/kg/day で14日間投与し、術後4週間目に心エコー、心カテーテル及び組織学的検討を行った。また、MSCs に対する IGF-1 の作用機序を調べた。

### 3. 脂肪組織および骨髄由来間葉系細胞における遺伝子・分泌タンパク発現の比較検討

心血管再生領域における細胞移植療法において、新たな細胞ソースとして脂肪組織由来間葉系幹細胞が注目されている。我々は、脂肪組織由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞における差異を、遺伝子や分泌タンパク発現に関して網羅的な比較検討を行った（北村、永谷）。

## C. 研究結果

### 1. 自己間葉系細胞を用いた難治性循環器疾患に対する心筋血管再生療法の臨床応用

難治性心不全患者11人、重症狭心症患者2人を臨床試験にエントリーし、難治性慢性心不全患者8人、重症狭心症患者2人に対して間葉系幹細胞移植を行った。細胞移植が施行できなかった3例の内訳は、細胞増殖不良による中止1例、細胞移植待機時に急性腸炎発症1例、術前カテーテル検査や骨髄穿刺後の心不全増悪による中止1例であった。心不全患者に対してはカテーテルを用

いて心内膜より約 40 ヲ所に細胞移植を行った（北村、永谷、清水、山岸、宮武）。細胞移植 2 ヲ月後の評価では左室駆出率の有意な改善が得られた。また、細胞移植後の安全性に関しては、細胞移植 2・6・12 ヲ月後に心臓 CT や 24 時間心電図らを行ったが、致死的不整脈の増悪や心内骨形成らは認められなかった。1 例の心不全患者において細胞移植 1 ヲ月後に肺炎を起こしたが、細胞移植との因果関係はないと安全委員会で判断された。また狭心症患者に対しては冠動脈バイパス術時に心外膜より間葉系幹細胞移植を行った。有効性の確立には更なる症例の蓄積と経過観察が必要である（北村、小林、中谷）。

## 2. 間葉系細胞+細胞シート、成長因子によるハイブリット再生治療の開発

温度応答性培養皿から脱着した子宮内膜由来間葉系細胞シートは、脱着前の細胞シートに比べて 4 倍近い VEGF の産生が認められた。また骨髄由来間葉系細胞シートは、子宮内膜由来間葉系細胞シートに比べて VEGF の分泌量は若干低いものの、HGF と bFGF の分泌量は高かった。今回の結果は、同じ間葉系細胞シートでも由来する組織によりサイトカイン分泌量が異なり、また同じ細胞シートでも培養方法を変えることによりサイトカイン産生を増強できる事を示している。これらはより効果的な細胞シートの作製・移植法につながるものと思われる。

単層の皮下脂肪由来間葉系細胞をラット慢性心筋梗塞モデルの心外膜表面に移植すると、血管再生及び心筋分化を伴いながら増殖し、厚みのある組織を構築した。更に、心不全ラットの心機能及び予後を劇的に改善させた。また、大動物（ブタ心筋梗塞モデル）を使用した脂肪組織由来の単層性間葉系細胞シート移植治療の前臨床試験を

施行したが、虚血部位の血管新生を促進し、心機能を改善させる可能性が示され、さらに懸念されていた不整脈の発症もなく、同治療の安全性も示された。

細胞移植+IGF-1 による心筋再生療法の開発に関しては、IGF-1 は移植 MSCs の増殖を促進、アポトーシスを抑制することで生着率を増大させ、その結果 MSCs 移植の心機能改善効果を増強することが確認された。また、これらの効果は PI3k-Akt 及び MEK-ERK1/2 シグナル経路を介したものであることも明らかになった。

## 3. 脂肪組織および骨髄由来間葉系細胞における遺伝子・分泌タンパク発現の比較検討

骨髄由来間葉系細胞は発生や形態形成に関与する遺伝子を多く発現していたのに対し、脂肪組織由来間葉系細胞は細胞増殖や免疫応答に関与する遺伝子を多く発現していた。分泌タンパクでは、脂肪組織由来間葉系細胞は骨髄由来間葉系細胞と比較し HGF、VEGF などの細胞保護、血管新生に関する因子をより多く分泌しており、脂肪組織由来間葉系細胞は骨髄由来間葉系細胞以上の組織修復効果が期待出来る新たな移植細胞ソースと考えられた（北村、永谷）。

## D. 考察

骨髄間葉系細胞による心筋血管再生治療の安全性と有効性に関して、基礎および臨床研究を行った。臨床試験において拡張型心筋症などの難治性心不全に対する安全性と有効性を確認した。また、新たな治療法として温度感応性細胞シートによるハイブリット再生治療による心筋再生療法を開発し（Miyahara, et al Nat Med 2006;12:456-65）、大動物を用いた前臨床試験で安全性と有効性を確認した。一層の脂肪由来間葉系細胞を心筋梗塞

部位に移植することで血管を豊富に含んだ厚みのある組織をつくることに成功し、また心機能の改善や心筋リモデリングの抑制効果を確認した。細胞移植のみでは効果が不十分な症例に対する治療として期待される。脂肪組織由来間葉系細胞も再生医療ソースとして使用できることを、遺伝子・分泌タンパク発現を骨髄細胞と比較することで確認し、脂肪組織由来間葉系細胞は骨髄由来間葉系細胞以上の組織修復効果が期待出来る新たな移植細胞ソースとなる可能性が示唆された。

#### E. 結論

拡張型心筋症や虚血性心筋症に対して自己骨髄間葉系細胞の移植による心筋血管再生療法の基礎および臨床研究を行い、慢性心不全患者を対象とした臨床試験では、骨髄間葉系細胞移植の安全性と有効性を確認した。また、基礎研究として、次世代の細胞移植治療として間葉系幹細胞+細胞シートまたは成長因子によるハイブリット再生治療による心筋再生療法を開発し、成果を挙げた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in a Rat Model of Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*. 2005; 112: 1128-35.

2. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006; 12: 459-465.
3. Miyahara Y, Ohnishi S, Obata H, Ishino K, Sano S, Mori H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Beraprost sodium enhances neovascularization in ischemic myocardium by mobilizing bone marrow cells in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 349: 1242-1249.
4. Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; 42: 88-97.
5. Ohnishi S, Nagaya N. Prepare Cells to Repair the Heart: Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Heart Failure. *Am J Nephrol*. 2007; 27: 301-307.
6. Yamahara K, Nagaya N. Mesenchymal stem cells for the treatment of heart disease. *Regen Med*. 2007; 2: 107-9.
7. Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Lett*. 2007; 581: 3961-3966.

8. Ohnishi S, Ohgushi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. Int J Hematol. 2007; 86: 17-21.

2. 学会発表

- ①永谷憲歳：骨髄間葉系細胞移植による心不全治療. 第6回日本再生医療学会. パシフィコ横浜(横浜市)、3月14日、2007年
- ②永谷憲歳：脂肪組織・胎児付属物由来間葉系細胞を用いた心血管保護再生治療. 第6回日本再生医療学会. パシフィコ横浜(横浜市)、3月14日、2007年

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特許取得

特願 2005-19802

特願 2005-197489

2. 実用新案登録

なし



研究成果の刊行に関する一覧表

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
永谷憲歳 小幡裕明	将来の治療（細胞移植、遺伝子治療）		Heart View	メディカルレビュー社		2006	107-112
永谷憲歳	骨髄細胞移植による心不全治療		循環器科			2006	73-78
永谷憲歳 清水 渉 野田 貴 野口輝夫 土井 香 石田良雄 鎌倉史郎 北風政史 中谷武嗣 寒川賢治 盛 英三 友池仁暢 北村総一郎	骨髄細胞移植による心不全治療		循環器病研究の進歩			2006	34-40
竹下 聡	VEGF/VEGF-E (末梢動脈疾患)		細胞増殖因子と再生医療（松本邦夫・田畑泰彦編，メディカルレビュー社，大阪）			2006	304-308
竹下 聡 知久正明	微小血管造影－新生血管描出への応用－		Cardiac Practice			2006	387-390
清水達也	心筋に対する再生医療		臨床看護			2006	1136-1143
中谷武嗣	臨床心臓病学、松崎益徳・吉川純一編集、		心移植	文光堂	東京	2006	101-103

中谷武嗣	日本における心臓移植の現状		今日の移植			2005	287-293
------	---------------	--	-------	--	--	------	---------

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
Fujii T, Nagaya N, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Nishigami K, Ishibashi-Ueda H, Shirai M, Itoh T, Ishino K, Sano S, Kangawa K, Mori H.	Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats.	Am J Physiol Heart Circ Physiol.	288	H1444-1450	2005
Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K.	Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia.	Circulation.	11	356-362	2005
Hanabusa K, Nagaya N, Iwase T, Itoh T, Murakami S, Shimizu Y, Taki W, Miyatake K, Kangawa K.	Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats.	Stroke	36	853-858	2005
Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura S.	Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy.	Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.	288	R1432-1437	2005
Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, Kangawa K, Kitamura S.	Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia.	Cardiovasc Res	66	543-551	2005

Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S.	Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in a Rat Model of Dilated Cardiomyopathy.	Circulation.	112	1128-1135	2005
Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H.	Monolayered Mesenchymal Stem Cells Repair Scarred Myocardium After Myocardium Infarction.	Nature Medicine	12	459-465	2006
Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Kobayashi E, Okano T,	Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues	The FASEB Journal	20	708-710	2006
中谷武嗣、永谷 憲歳、富田伸司	心筋再生	総合臨牀	54	91-97	2005
中谷武嗣、 花谷彰久	補助人工心臓	ICU と CCU	29	265-273	2005
Saito S, Kobayashi J, Tagusari O, Bando K, Niwaya K, Nakajima H, Yamagishi M, Yagihara T, Kitamura S.	Successful excision of a cystic tumor of the atrioventricular nodal region.	Circ J.	69(10)	1293-4	2005

Shimizu W, Aiba T, Antzelevitch C	Specific therapy based on the genotype and cellular mechanism in inherited cardiac arrhythmias. - Long QT syndrome and Brugada syndrome -.	Curr Pharm Design	11	1561-1572	2005
Noda T, Shimizu W, Taguchi A, Aiba T, Satomi K, Suyama K, Kurita T, Aihara N, Kamakura S	Malignant entity of idiopathic ventricular fibrillation and polymorphic ventricular tachycardia initiated by premature extrasystoles originating from right ventricular outflow tract.	J Am Coll Cardiol	46	1288-1294	2005
Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N.	Effect of Hypoxia on Gene Expression of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells and Mononuclear Cells.	Stem Cells.	25	1166-1177	2007
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.	13	313-322	2007
Miyamoto K, Nishigami K, Nagaya N, Akutsu K, Chiku M, Kamei M, Soma T, Miyata S, Higashi M, Tanaka R, Nakatani T, Nonogi H, Takeshita S.	Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans.	Circulation.	114	2679-84	2006

Miyahara Y, Ohnishi S, Obata H, Ishino K, Sano S, Mori H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N.	Beraprost sodium enhances neovascularization in ischemic myocardium by mobilizing bone marrow cells in rats. Biochem Biophys	Res Commun.	349	1242-1249	2006
中谷武嗣	補助人工心臓の現況	循環器専門医	13	27-31	2006
Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari S, Niwaya K, Funatsu T, Kawamura A, Yagihara T, Kitamura S	Angiographic flow grading and graft arrangement of arterial conduits	The Journal of Thracic and Cardiovascular Surgery	132(5)	1023-1029	2006
Ohnishi S, Ohgushi H, Kitamura S, Nagaya N.	Mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure.	Int J Hematol.	86	17-21	2007
Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N.	Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis.	J Mol Cell Cardiol.	42	88-97	2007

Shimizu W, Matsuo K, Kokubo Y, Satomi K, Kurita T, Noda T, Nagaya N, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Inamoto N, Akahoshi M, Tomoike H	Sex hormone and gender difference. - Role of testosterone on male predominance in Brugada syndrome.	J Cardiovasc Electrophysiol	18	415-421	2007
Nakajima H, Kobayashi J, Tagusari S, Niwaya K, Funatsu T, Brik A, Yagihara T, Kitamura S	Graft design strategies with optimum antegrade bypass flow in total arterial off-pump coronary artery bypass	European Association for Cardio-Thoracic Surgery	31	276-282	2007
Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N.	Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions.	FEBS Lett.	581	3961-3966.	2007
Yanagawa B, Kataoka M, Ohnishi S, Kodama M, Tanaka K, Miyahara Y, Ishibashi-Ueda H, Aizawa Y, Kangawa K, Nagaya N.	Infusion of adrenomedullin improves acute myocarditis via attenuation of myocardial inflammation and edema.	Cardiovasc Res.	76	110-118	2007
Itoh T, Obata H, Murakami S, Hamada K, Kangawa K, Kimura H, Nagaya N.	Adrenomedullin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats.	Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.	293	L446-L452	2007

Yamahara K, Nagaya N.	Mesenchymal stem cells for the treatment of heart disease.	Regen Med.	2	107-109	2007
Ohnishi S, Nagaya N.	Prepare Cells to Repair the Heart: Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Heart Failure.	Am J Nephrol.	27	301-307	2007
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.	27	60-66	2007

特集

肺高血圧症を診る

治す

Expertise

## 将来の治療 (細胞移植, 遺伝子治療)

▶ *Novel therapeutic strategy for pulmonary hypertension—Cell and gene therapy—*

永谷憲歳, 小幡裕明 (国立循環器病センター研究所再生医療部)

キーワード

肺高血圧, 遺伝子治療, 再生医療, 血管内皮前駆細胞, アドレノメデュリン

特発性肺動脈高血圧症 (idiopathic pulmonary arterial hypertension ; IPAH) などの肺動脈高血圧症 (pulmonary arterial hypertension ; PAH) に対する治療としてプロスタサイクリン療法やエンドセリン (endothelin ; ET) 受容体拮抗薬などが開発され, その有効性が報告されている。しかしなお治療抵抗性の症例が存在し, 肺移植の適応とされながらもドナー不足により十分な治療が行われていないのが現状である。正常の肺血管内皮細胞はさまざまな血管拡張因子を分泌して肺血管の低圧系を維持しているが, 肺高血圧症では肺血管内皮機能障害により血管作動物質のバランスが破綻 (収縮因子 > 拡張因子) している。すなわち ET-1, トロンボキサン<sub>A2</sub> らの収縮因子が増加し, 内因性血管拡張因子であるプロスタサイクリン (PGI<sub>2</sub>) や一酸化窒素 (NO) の産生が相対的に低下している (図1)。このような病態に着目した治療として, ①肺血管内皮細胞で産生される拡張因子の補充, ②肺血管収縮因子の抑制, ③正常な肺血管内皮細胞の再生という治療法が考えられる。また, ④IPAHの成因とされる内皮細胞のモノクローナルな増殖や平滑筋細胞増殖を抑制するなどの治療戦略が考えられる。肺血管内皮由来の拡張因子の補充という観点から, プロスタサイクリン合成酵素 (prostacyclin synthase ; PGIS) や一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric-oxide synthase ; eNOS) 遺伝子治療の効果が動物実験で証明され, また血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell ; EPC) を用いた肺血管内皮の再生治療が数多く報告されている。本稿では肺高血圧症に対する遺伝子治療, 再生医療の可能性に関して最近の基礎的研究を中心に概説する。





## 肺高血圧症の遺伝子治療

これまで肺高血圧に対するさまざまな遺伝子治療戦略が実験動物において報告されている(表1)。標的遺伝子は、血管拡張や内皮機能改善を目的としたものが多い。前述したようにIPAH患者では肺血管内皮細胞から産生させる血管作動物質のバランスが破綻しており、PGI<sub>2</sub>やNOなどの血管拡張因子の遺伝子導入が肺高血圧軽減につながる可能性がある。これまでに報告された肺循環への遺伝子導入法にはカテーテルによる肺動脈内直接投与、経気道の投与、遺伝子導入した細胞の移植な

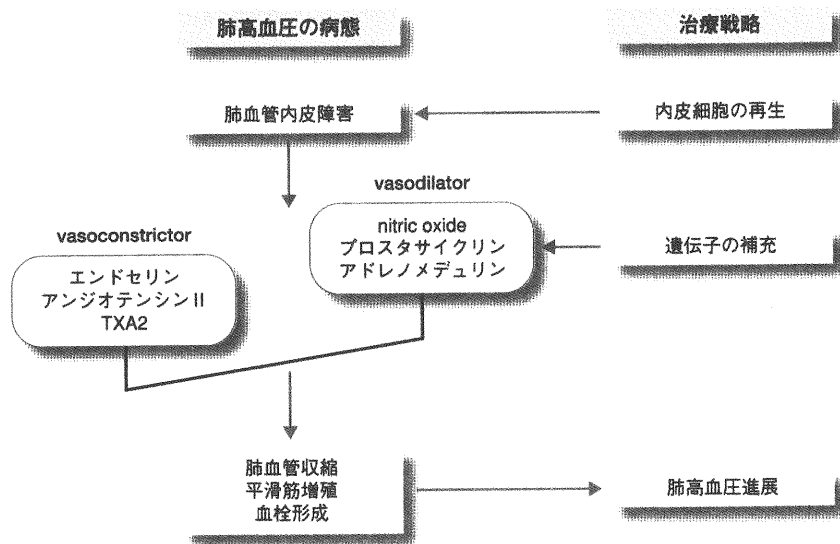


図1 肺高血圧症における血管作動物質のバランス破綻と病態に基づいた治療戦略

表1 肺高血圧に対するさまざまな遺伝子治療戦略

導入遺伝子	導入経路	ベクター	モデル	著者
eNOS, VEGF	経静脈	Fibroblast	MCT, rat	Zhao, et al
eNOS	経静脈	Endothelial progenitor cell	MCT, rat	Zhao, et al
eNOS	経気道	Adenovirus	Hypoxia (BLM), mouse	Champion, et al
eNOS	経静脈	Smooth muscle cell	MCT, rat	Campbell, et al
iNOS	経気道	Adenovirus	Hypoxia, rat	Budts, et al
VEGF	経気道	liposome	Hypoxia (BLM), rabbit	Gong, et al
VEGF	経静脈	Smooth muscle cell	MCT, rat	Campbell, et al
VEGF	経気道	Adenovirus	Hypoxia, rat	Partovian, et al
PGIS	大腿筋	Plasmid	MCT, rat	Tahara, et al
PGIS	経皮的肝臓	HVJ-liposome	MCT, rat	Suhara, et al
PGIS	経気道	HVJ-liposome	MCT, rat	Nagaya, et al
HGF, PGIS	経静脈	HVJ-envelope plasmid	MCT, rat	Ono, et al
DN-survivin	経気道	Adenovirus	MCT, rat	McMurtry, et al
AM	経静脈	Endothelial progenitor cell	MCT, rat	Nagaya, et al
Kv1.5	経気道	Adenovirus	Hypoxia, rat	Pozeg, et al
Ang-1	経静脈	Smooth muscle cell	MCT, rat	Zhao, et al
DN-MCP-1	大腿筋	Plasmid	MCT, rat	Ikeda, et al
CGRP	経気道	Adenovirus	Hypoxia, mouse	Champion, et al

eNOS : endothelial nitric-oxide synthase, iNOS : inducible nitric oxide synthase, VEGF : vascular endothelial growth factor, PGIS : prostacyclin synthase, HGF : hepatocyte growth factor, DN-survivin : dominant negative survivin, AM : adrenomedullin, Kv1.5 : O<sub>2</sub>-sensitive voltage-gated potassium channel, Ang-1 : angiotensin-1, DN-MCP-1 : dominant negative monocyte chemoattractant protein-1, CGRP : calcitonin gene-related peptide, MCT : monocrotaline, BLM : bleomycin.

どがある。経気道的遺伝子導入法は肺血管への直接の導入効率は低い、細気管支への遺伝子導入が可能であり、並走する肺抵抗血管に作用することができる。また*ex vivo*で遺伝子導入された細胞を静脈内投与すると、細胞を介して肺血管床に遺伝子導入が可能である。

われわれは、IPAH患者の肺組織ではプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)の産生が低下している<sup>1)</sup>ことに注目し、経気道的PGIS遺伝子治療を開発した<sup>2)</sup>。PGISはプロスタグランジンH2からプロスタサイクリンを生成するのに必要な酵素である。PGIS遺伝子導入により肺でのプロスタサイクリンの合成を促しその濃度を保つことができれば、点滴による持続投与の必要もなくなり、患者負担の少ない新しい治療法となる可能性がある。HVJリボソームをベクターとしてPGIS遺伝子を経気道的にモノクロタリン肺高血圧ラットに導入すると、肺組織でのプロスタサイクリンの産生が増大し、肺高血圧の軽減、生存率の改善が得られた(図2)。

その他、eNOSの経気道的遺伝子導入<sup>3)</sup>や強力な肺血管拡張因子であるCGRP(calcitonin gene-related peptide)遺伝子導入による肺高血圧軽減効果<sup>4)</sup>が報告されている。また、VEGF(vascular endothelial growth factor)<sup>5)</sup>、HGF(hepatocyte growth factor)<sup>6)</sup>、Ang-1(angiotensin-1)<sup>7)</sup>などの血管新生因子の遺伝子導入によって血管内皮細胞の再生を促すことにより、肺高血圧が軽減されるという報告がある。

一方、IPAHの成因とされる内皮細胞のモノクローナルな増殖や平滑筋細胞増殖を抑制する治療戦略も考えられる。また、IPAHの成因とされる内皮細胞のモノクローナルな増殖や平滑筋細胞増殖を抑制する治療戦略も考えられる。survivinはアポトーシス抑制蛋

白の1つで、増殖の激しい癌細胞に多く存在すると考えられていたが、PAH患者の肺動脈にも存在することがわかった<sup>8)</sup>。モノクロタリン肺高血圧ラットに、リン酸化能をもたないsurvivin mutant遺伝子を導入することによってsurvivinの活性を低下させアポトー

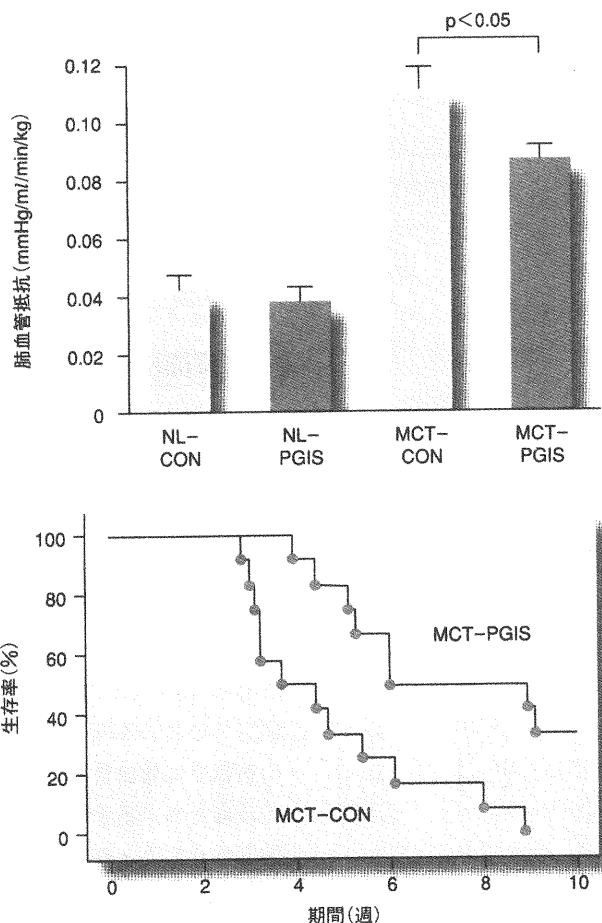


図2 プロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子導入による肺高血圧軽減効果(文献1より改変引用)

- a: PGIS遺伝子導入後のモノクロタリン(MCT)肺高血圧ラットでは、肺血管抵抗が有意に低下していた。  
b: 2週間ごとに繰り返しPGIS遺伝子を導入するとモノクロタリン肺高血圧ラットの生命予後が改善された。

シスを誘導することで肺高血圧が改善された。どの遺伝子の導入が最も効果的なのか、どのベクターを用いるべきか、また動物実験と同様に実際のPAH患者にも有効か否か、さらなる検討が必要である。

### 肺高血圧症に対する再生医療

再生医療に用いる細胞種には、大きく分けて胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES細胞) と成体内に存在する体性幹細胞がある。虚血性心疾患などを対象とした血管新生療法では、骨髓単核球<sup>9)</sup>、血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell; EPC)<sup>10)</sup>、間葉系幹細胞<sup>11)</sup>などの体性幹細胞である。PAHの病態では肺血管内皮機能が障害されているため、正常な肺血管内皮細胞を再生させることができれば、血管床の増加により直接的に、また血管拡張作動物質の分泌により間接的に肺高血圧を軽減できる可能性がある。

従来、成人個体における血管新生は既存の血管内皮細胞の発芽的増殖と遊走によるものと理解されていたが、成人の骨髓や末梢血中には内皮細胞に分化しうるEPCが存在することが報告された<sup>10)</sup>。EPCは血管障害部位への遊走能、血管再生能をもち、生体内で虚血や血管内皮障害が起こったときに骨髓から強制動員され、血中を流れてその障害部位へ付着して血管内皮細胞に分化して血管を形成する。この細胞の能力を利用して、急性心筋梗塞ラットに

静脈からEPCを投与すると、血管新生さらには梗塞サイズが縮小され、心機能が改善することが報告された<sup>12)</sup>。臨床の場合においてもEPCを含む骨髓単核球移植は虚血性心疾患、閉塞性動脈硬化症の治療に有効であることが報告されている<sup>13)</sup>。EPCの治療効果は、①血管内皮前駆細胞自身が血管内皮細胞に分化して血管形成に参加するため、②血管内皮前駆細胞がVEGFなどの血管新生因子を放出して局所の血管新生を促すためと考えられる。

われわれは、経静脈的EPC投与による肺高血圧軽減効果を検討した<sup>14)</sup>。ヒト臍帯血由来EPCを、モノクローリンで肺血管や間質に障害を与えた後に投与すると、EPCは肺組織に付着し成熟した血管内皮細胞となった(図3)。またEPCの移植は肺組織の血管数を増加させた。平均肺動脈圧に有意な変化は認められなかったが、肺血管抵抗のわずかな改善が認められた。その後、自家の血管内皮前駆細胞を移植すれば、モノクローリン誘発肺高血圧を有意に抑制することが他施設から報告された<sup>15)</sup>。しかし、EPCの移植のみでは肺高血圧治療効果に限界があると思われた。

そこで、肺血管拡張因子の遺伝子を導入した細胞を移植する遺伝子-細胞移植ハイブリッド治療を開発した。EPCの移植治療効果を高めるために、生体内で最も強力な血管拡張ペプチドと考えられているアドレノメデュリン (adrenomedullin; AM) の遺伝子をEPCに導入した。AMは血管平滑筋細

胞の受容体に直接作用してcAMPを増加させ、また血管内皮に働き一酸化窒素を介して血管拡張をきたす<sup>16)</sup>。AM遺伝子はEPCをベクターとして肺組織まで運ばれることで(cell-based gene therapy)、AMの発現による肺血管拡張作用が期待できる。AM遺伝子導入EPCの移植は、未治療群やEPCの単独投与群に比べて平均肺動脈圧を有意に低下させ、生存率を改善させた(図3)。また、Zhaoらは、eNOS遺伝子を導入したEPCの肺高血圧軽減効果を

報告した<sup>17)</sup>。その他、平滑筋細胞や線維芽細胞に遺伝子を導入して移植するという方法も試みられている(表1)。これらの遺伝子-細胞移植ハイブリット治療法は重症肺高血圧症に対する新たな治療法となる可能性がある。

近年、造血系幹細胞と同様に骨髄内に存在する間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)による再生医療が注目されている。われわれはMSCの移植によってモノクローリン肺高血圧ラットと血行動態と生命予後が改善す

ることを報告した<sup>18)</sup>。MSCは自己複製能と多分化能を有する細胞であり、体性幹細胞の1つとして分類される<sup>11)</sup>。組織の修復や恒常性の維持、造血幹細胞の増殖や分化の制御に機能するだけでなく、骨・軟骨・骨格筋・脂肪などに分化しうるが、血管内皮や心筋にも分化する能力をもっている<sup>11,19,20)</sup>。興味深いことに培養したMSCはMNC(mononuclear cell)と比較して大量のVEGF, HGF, AMを分泌する<sup>19)</sup>。これらの因子は血管新生、血管拡張に働

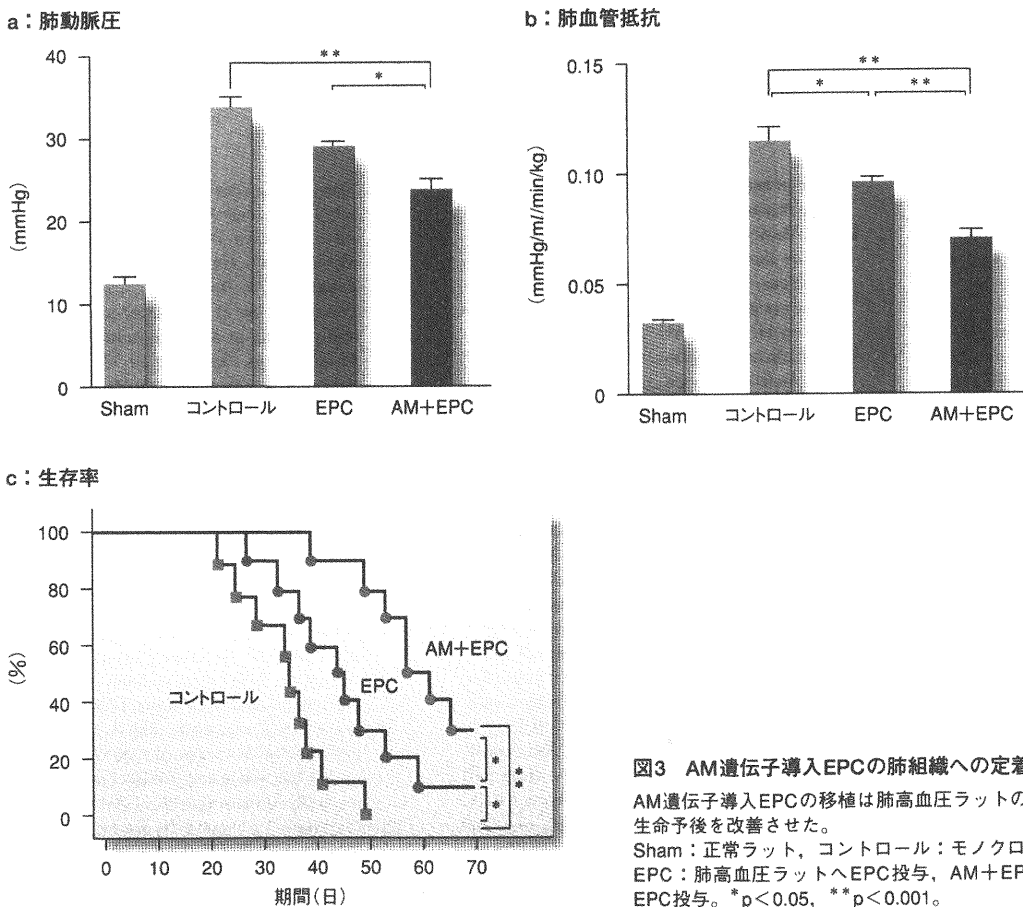


図3 AM遺伝子導入EPCの肺組織への定着と肺高血圧軽減効果

AM遺伝子導入EPCの移植は肺高血圧ラットの平均肺動脈圧と肺血管抵抗を軽減し、生命予後を改善させた。Sham: 正常ラット, コントロール: モノクローリン肺高血圧ラットへvehicle投与, EPC: 肺高血圧ラットへEPC投与, AM+EPC: 肺高血圧ラットへAM遺伝子導入EPC投与。\*p<0.05, \*\*p<0.001。