

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

ヒト心筋・骨格筋からの心筋幹細胞株の樹立と末期的心不全への幹細胞移植医療実現化へ向けての研究基盤形成に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 松原 弘明

平成20（2008）年4月10日

# 研究報告書目次

## 目 次

### I. 総括研究報告

ヒト心筋・骨格筋からの心筋幹細胞株の樹立と末期的心不全への幹細胞移植医療  
実現化へ向けての研究基盤形成に関する研究 -

松原 弘明-----3

### II. 分担研究報告

1. ヒト心筋幹細胞の調整、前臨床研究、臨床試験プロトコル作成

王 英正-----14

2. 細胞移植と遺伝子治療による機能的血管新生療法の開発に関する研究

室原 豊明 -----18

3. 心筋幹細胞移植実現化へ向けての最適な血管新生療法探索研究に関する研究

尾池 雄-----23

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----26

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----32

厚生労働科学研究費補助金

(医療技術実用化総合研究事業：基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)

(総括) 研究報告書

ヒト心筋・骨格筋からの心筋幹細胞株の樹立と末期的心不全への幹細胞移植医療実現化へ向けての研究基盤形成に関する研究

(主任) 研究者 松原 弘明 京都府立医科大学医学研究科教授

研究要旨

重症心不全への心臓移植事業はドナー不足のため十分に機能せず、これを打開するのが心筋再生医療である。ヒト心筋生検サンプルから心筋幹細胞を単離・増殖させ、移植細胞の生存・増殖を目的とした局所 bFGF 徐放シートとの併用による新規の心筋再生細胞移植療法を開発し、末期的心不全の患者さんを救済する世界で初めての心筋再生医療の確立を事業目的とする。

A. 研究目的

末期心不全への心臓移植事業はドナー組織不足のため十分に機能せず、実用性の高い心筋再生医療は世界中でまだ実施されていない。我々は、少量のヒト心筋材料よりヒト心筋幹細胞の単離精製・増幅法を世界に先駆けて確立した(国際特許申請済)。臨床実用化にむけて、大動物を使用した前臨床試験を実施し、安全性・有効性を検証し、臨床試験phase I/IIaのプロトコールを作製して、世界で初めての心筋再生医療の実現化を目的とする。

B. 研究方法

1)ヒト心筋から心筋幹細胞の単離・増殖法の確立と大動物移植実験の実施: 研究代表者らはヒト心筋から心臓幹細胞の単クローン化増殖・

増幅に成功している。小動物移植実験は終了しているため、大動物(ブタ)を用いた前臨床試験を実施する。ヒト心臓組織は開心術中の心房、ヒト骨格筋は下肢切断肢より約2-4g採取する。コラゲナーゼ処理による分離後、我々が独自に開発した、単一細胞無血清浮遊系システムでスフェアを形成した幹細胞群を再度酵素処理にて分離し、我々が発見した心筋幹細胞特異的増殖因子bFGF存在下にて大量に増幅させる。ブタ冠動脈を遮断・再開通させ虚血心筋モデルを作成し、1月後に心筋幹細胞を心筋内に移植し、生体吸収性bFGF徐放ゲラチンシートをその上から覆う。血管造影・エコー・MRIにて移植後の心機能・不整脈を評価する。移植後の心筋組織を免疫組織学的検索により、移植細胞の心筋分化・血管数・奇形種形成を検証する(京都府立医

大、京都大学)

2) 血管新生能力の最も高い血管系幹細胞ソースの探索: 最も患者負担が少なく有効な血管新生療法を現在実施されている血管再生医療(骨髄細胞、末梢血単核球、FGFビーズ、G-CSF)から比較検討し心筋幹細胞と同時投与する。(京都府立医大、名古屋大学、熊本大学)

3) 臨床試験プロトコル作成と第1相臨床試験: 大動物前臨床試験の成績をもとに第1相臨床試験(phase I/IIa)プロトコルは京大探索医療センター検証部で作成する。低心機能(EF<35%以下)で心筋壊死領域の多い、冠動脈バイパス形成術を受ける末期的心不全(虚血性心臓病)を対象に、bFGF徐放ゲラチンシート+心筋幹細胞移植(107個)を組み合わせたハイブリッド療法にて心筋再生医療の第1相臨床試験を開始する。

(倫理面への配慮)

1) 前臨床試験の有効性・安全性評価、臨床試験プロトコルはTR実施に当たっての共通倫理審査指針に沿って京都大学探索医療センター検証部で作成する。患者さんに対する治療前の説明と理解を得て、またプライバシーの保護を第一とし治療経過はすべて情報公開にする。移植細胞および臨床試験は厚生労働省よりの「幹細胞の臨床応用についての治療指針」、医薬品GCP、臨床研究倫理指針(厚生労働省告示第255号)を遵守する。

2) 動物操作にあたっては各施設の動物実験指針に従って行う。基礎的研究においては、遺伝子改変マウス、プラスミドDNAを用いる場合は仕様に際しては、遺伝子組み換え生物などの使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律

に基づき研究を実施する。

### C. 研究結果

本研究者は平成18年8月～平成19年11月の期間において、大型動物(ブタ)を用いたヒト心臓幹細胞とbFGF徐放シートの併用療法の有効性・安全性評価を目的とする前臨床試験を施行した。試験デザインは、ヒト臨床試験の対象となる重症虚血性心疾患患者のモデルとして陳旧性心筋梗塞による慢性虚血機能不全心を作成し、前向きランダム化試験1:bFGF徐放シート移植の有効性・安全性の評価、前向きランダム化試験2:bFGFシート単独移植に対する心臓幹細胞移植併用の有効性評価、追試1:心臓幹細胞単独移植に対するbFGFシート移植併用の有効性評価、追試2:bFGFシート+心臓幹細胞移植術後4ヶ月の長期観察による奇形種形成の危険性評価、を行った。有効性については、試験2において用量依存性効果評価目的で低用量群( $5 \times 10^5$  個/kg)、高用量群( $5 \times 10^6$  個/kg)を設定、また心臓幹細胞の対照細胞としてヒト組織由来幹細胞の骨髄間葉系幹細胞を用い、比較検討を行った。異種間細胞移植治療に該当するため、全頭に免疫抑制剤を移植前日から治療終了まで継続して投与し、血中濃度のモニタリングを行った。

安全性に関しては、試験1及び試験2の合計、全治療ブタ70例において、全死亡は術関連死1例のみで、術後～試験終了時までの期間における死亡例の発生は認めなかった。24時間心電図による不整脈監視においても、心室性不整脈を含む有害事象としての不整脈の発生はいずれの群においても発生は認められなかった。

試験1及び試験2において、bFGFシートの心筋表面への移植に際し、術後4週後に再開胸の上確認したが、シートの脱落は1例も認めなかった。また、bFGFシート移植による術後心膜炎、心タンポナーデの発症は全70例中1例も認めず、創感染に起因する軽度の心膜外膿瘍形成を2例認めたが、全身状態及び心機能には何ら悪影響を認めなかった。その他、免疫抑制に伴う感染症、骨髄機能の低下、及び心機能低下は認めなかった。

心臓幹細胞、及び骨髄間葉系幹細胞の移植後の奇形腫形成、癌腫形成の危険性について術後4週の短期観察及び、追試2の術後4ヶ月の長期観察を行い、最終的に36頭の免疫不全ブタの細胞移植後心臓の病理学的検索を行ったが、内胚葉、中胚葉、外胚葉組織を含めいかなる奇形種、異形細胞腫の形成も確認されなかった。

有効性に関しては、試験1の無治療対象(開胸及び培養液単独投与)群とbFGFシート移植(及び培養液単独投与)群の2群比較では、bFGFシート群で明かな虚血心筋内微少循環の改善を機序とした心機能の有意な改善と梗塞部重量の減少を認めた。

心臓幹細胞単独移植に対するbFGFシート移植併用による有効性を評価した追試1では、移植したヒト心臓幹細胞のbFGFシート併用による明らかな宿主心筋内での生着率の改善が認められ、術後4週において心臓幹細胞単独移植群に対し、bFGFシート併用心臓幹細胞移植群の有意な左心機能の改善を認めた。

以上結果を踏まえ、心臓幹細胞移植の有効性評価目的の試験2を行った。心臓幹細胞移

植の有効性に関して、細胞用量依存性効果の有無を評価した低用量移植及び高用量移植群の比較では、高用量群において高濃度の細胞移植による組織障害の結果、宿主心筋への心臓幹細胞の生着能、心筋細胞への分化能は低く、移植治療の有効性は認めなかった。これに比し、低用量群では移植細胞による組織障害は認められず、ゲラチンハイドロゲルを介したbFGFの虚血心筋組織徐放による微小心筋血流の改善と、移植したドナー幹細胞の生着性の向上により、骨髄間葉系幹細胞に比し8倍以上の実質的な心筋細胞再生を確認した。

この結果、低用量心臓幹細胞移植とbFGFシート併用移植による相乗的な心機能改善効果は治療4週後において約12%もの不全梗塞心筋の左室駆出率の改善と3%もの梗塞重量の減少を認めた。この細胞移植とbFGFシート併用移植による相乗的な心機能改善効果は骨髄由来幹細胞移植では認めず、本研究における心臓幹細胞移植の心筋再生における特異的有用性を証明した。さらに、並行して行われた追試2の長期観察試験にて、標識された心臓幹細胞は、4ヶ月後の移植後慢性期においても心臓幹細胞とbFGFシートの併用移植群では高い生着率を保ち、心機能改善効果も保持されていた。

#### D. 考察

##### 1) 達成度について

当初の研究目的は十分に達成されたと考えられる。大動物を用いた前臨床試験で有効性・安全性は確認された。phase I/IIa臨床試験プロトコルを作製中である。

## 2) 学術的・国際的・社会的意義

これまで難治性重症不全心患者に対して、心臓幹細胞を用いた細胞治療を施行した報告は世界的に一例の報告もない。また急性虚血心に対する骨髄細胞移植(冠動脈注入及びカテーテルによる心筋移植)、米国で行われた小動物への心臓幹細胞単独移植と比較して下記の利点があると考えられる。

- 1) 体外細胞培養工程により移植細胞数を均一化することで、細胞移植の効果を正確に判定できる
- 2) 直視下に障害心筋に細胞移植操作を行うことで、治療有効領域への確実な移植が可能にできる
- 3) bFGF シート移植を併用することで、心臓幹細胞の生着率を向上させ、心筋再生を飛躍的に改善できる
- 4) 必要最小限の有効細胞数の移植により、移植後組織障害の軽減を図ることが可能であり、かつ体外細胞増幅にかかる期間の短縮は必要とされるヒト血清量の節減(患者侵襲の低減)および手術待機期間の短縮を図ることができる

### 3) 今後の展望について

本研究はヒト幹細胞を用いた世界で初めての臨床研究として新規性が認められるものと考え、重症虚血性心疾患患者へのbFGFシート併用心臓幹細胞移植をphase I/IIa 臨床試験プロトコルを京大探索医療センター検証部と作成中である。

## E. 結論

我々が世界に先駆けて開発したFGFシート併

用心臓幹細胞移植治療は、心機能改善効果、心筋分化効率、移植後細胞生存率などから考えて世界で最も優れた心筋再生医療であると結論される。国際特許も申請しており、今後の臨床試験への展開が期待される。

## F. 健康危険情報

特記すべきものはない

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1 Matsui A, Matsubara H (他 10 人、最終著者) Central role of calcium-dependent tyrosine kinase PYK2 in endothelial nitric oxide synthase-mediated angiogenic response and vascular function.  
**Circulation 116:1041-1051, 2007**
- 2 Takahashi T, Matsubara H. New targeted angiogenic strategy: bursting bubbles.  
**Circ Res 101:232-233, 2007**
- 3 Kitamura R, Matsubara H (他 8 人、最終著者) Stage-specific role of endogenous Smad2 activation in cardiomyogenesis of embryonic stem cells.  
**Circ Res 101:78-87, 2007**
- 4 Ogata T, Matsubara H, (他 6 人、8 番目著者) Osteopontin is a myosphere-derived secretory molecule that promotes angiogenic progenitor cell proliferation through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway.  
**BBRC 359:341-347, 2007**
- 5 Tateishi K, Matsubara H, Oh H (他 8 人、10 番目著者) Clonally amplified cardiac

- stem cells are regulated by Sca-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration  
**J Cell Sci. 120:1791-1800, 2007**
- 6 Yamamoto T, Matsubara H (他 6 人、最終著者) Enhanced activity of ventricular Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub>-cotransport in pressure overload hypertrophy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol 293:H1254-1264, 2007**
- 7 Tateishi K, Matsubara H, Oh H (他 8 人、10 番目著者) Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3β signaling.  
**BBRC 352:635-641, 2007**
- 8 Nomura T, Matsubara H, Oh H (他 5 人、7 番目著者) Skeletal myosphere-derived progenitor cell transplantation promotes neovascularization in deltasarcoglycan knockdown cardiomyopathy.  
**BBRC 352:668-674, 2007**
- 9 Nakajima N, Matsubara H, Oh H (他 5 人、7 番目著者) MicroRNA-1 facilitates skeletal myogenic differentiation without affecting osteoblastic and adipogenic differentiation. **BBRC 350:1006-1012, 2007**
- 10 Takeda M, Matsubara H (他 8 人、最終著者) Spironolacton modulates expressions of cardiac mineralocorticoid receptor and 11β-hydroxysteroid dehydrogenase 2 and prevents ventricular remodeling.  
**Hypertens Res 30:427-37 2007**
- 11 Ikeda K, Matsubara H (他 6 人、最終著者) Glia maturation factor-γ is preferentially expressed in microvascular endothelial and inflammatory cells and modulates actin cytoskeleton reorganization.  
**Circ Res 99:424-433, 2007**
- 12 Voros S, Matsubara H (他 6 人、9 番目著者) Interaction between AT1 and AT2 receptors during postinfarction left ventricular remodeling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol. 290:H1004-10, 2006**
- 13 Shirayama T, Matsubara H (他 4 人、最終著者) Usefulness of Paroxetine in Depressed Men With Paroxysmal Atrial Fibrillation **Am J Cardiol 97:1749-51, 2006**
- 14 Zen K, Matsubara H (他 9 人、最終著者) Myocardium-targeted delivery of endothelial progenitor cells by ultrasound-mediated microbubble destruction improves cardiac function via an angiogenic response  
**J Mol Cell Cardiol. 40:799-809, 2006**
- 15 Urao N, Matsubara H (他 9 人、最終著者) Erythropoietin-Mobilized Endothelial Progenitors Enhance Reendothelialization via Akt-Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation and Prevent Neointimal Hyperplasia **Circ Res 98: 1405-1413, 2006**
- 16 Nishikawa S, Matsubara H (他 9 人、最終著者) Nicorandil regulates Bcl-2 family proteins and protects cardiac myocytes against hypoxia-induced apoptosis.  
**J Mol Cell Cardiol. 40:510-519, 2006**
- 17 Matsuno K, Matsubara H (他 9 人、最終著者) Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-

- deficient mice. **Circulation**. 2005;112:2677-85.
- 18 Tsunoda S, Matsubara H (他7人、6番目著者) Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart. **BBRC** 2005;336:118-27
- 19 Takamiya M, Matsubara H (他8人、最終著者) Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Circulating c-Kit+/Flk-1+ Progenitor Cells Regenerate Endothelium and Inhibit Neointimal Hyperplasia After Vascular Injury. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2006;26:751-7.
- 20 Imada T, Matsubara H (他6人、最終著者) Targeted delivery of bone marrow mononuclear cells by ultrasound destruction of microbubbles induces both angiogenesis and arteriogenesis response. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2005 25:2128-34.
- 21 Irie H, Matsubara H (他7人、最終著者) Carbon Dioxide-Rich Water Bathing Enhances Collateral Blood Flow In Ischemic Hindlimb via Mobilization of Endothelial Progenitor Cells and Activation of NO-cGMP System **Circulation** 2005;111:1523-1529
- 22 Tatsumi T, Matsubara H (他8人、最終著者) Cytokine-induced nitric oxide inhibits mitochondrial energy production and induces myocardial dysfunction in endotoxin-treated rat hearts **J Mol Cell Cardiol**. 2004;37:775-84
- 23 Mano A, Matsubara H (他6人、最終著者) Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways. **Circulation**. 2004;110:317-23.
- 24 Amano K, Matsubara H (他5人、最終著者) Mechanism for IL-1 $\beta$ -mediated neovascularization unmasked by IL-1 $\beta$  knock-out mice **J Mol Cell Cardiol** 2004 36:459-640
- 25 Matsubara H. Risk to the coronary arteries of intracoronary stem cell infusion and G-CSF cytokine therapy. **Lancet** 2004 ;363:746-7.

## 2. 学会発表

- Honsho S, Nisikawa S, Kishita E, Katsume A, Matsunaga S, Matsui A, Okigaki M, Matsubara H. Cardioprotective Action of Interleukin-1 $\beta$  in Adaptation to Cardiac Pressure Overload Stress by Activation of IGF-1/Akt Pathway. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
- Kimata M, Matoba S, Nakamura H, Tatsumi T, Matsubara H. p53 Shifts the Balance of Energy Source in Cardiac Myocytes. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
- Katsume A, Okigaki M, Matsui A, Yamada H, Matsubara H. Ca<sup>2+</sup>-dependent Tyrosine Kinase PYK2 Promotes Atherogenesis by



- Inducing Monocyte and endothelial cell-Derived TNF-alpha and MCP-1 Synthesis Unmasked by Analysis of PYK2/ApoE Double Deficient Mice. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
4. Takehara N, Tsutsumi Y, Ota H, Tateishi K, Takahashi T, Ueyama T, Yamagishi M, Yaku H, Tabata Y, Matsubara H, Oh H. Controlled Intramyocardial-delivery of Basic Fibroblast Growth Factor Combined With Human Cardiac Stem Cell Transplantation In Chronic Myocardial Infarction: A Randomized Controlled Preclinical-trial. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
  5. Kobayashi S, Ueyama T, Roh R, Masano T, Sakoda T, Matsubara H, Oh H, Hirata K. Myocardium is Required to Prevent Mitochondrial Damage and Cardiac Dysfunction in Response to Beta-Adrenergic Receptor Stimulation. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
  6. Yokoi H, Yamada H, Tsubakimoto Y, Takata H, Kawahito H, Takahashi T, Okigaki M, Hirai H, Aihara E, Maekawa T, Iwai M, Horiuchi M, Matsubara H. Bone Marrow Angiotensin AT1 and AT2 Receptors Differentially Modulate Vascular Repair by Regulating Mobilization and Activation of Bone Marrow-Derived Vascular Progenitors. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
  7. Okigaki M, Kusaba T, Honsyo S, Matsui A, Matsunaga S, Katsume A, Kishita E, Matsubara H. Klotho-protein Regulates Transient Receptor Potential Canonical-1-mediated Ca(2+)-influx In Endothelial Cells And Prevents Cell Death And Disruption Of Endothelial Integrity Induced By Ca(2+)-overload **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
  8. Matsui A, Okigaki M, Katsume A, Yamada H, Matsubara H. Calcium-Dependent Tyrosine Kinase PYK2 Plays Crucial Role in Angiotensin II - But Not Norepinephrine-Mediated Activation of Rac/Superoxide Pathway That Differentially Regulates Blood Pressure and Vasoconstriction **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
  9. Kawahito H, Yamada H, Tsubakimoto Y, Yokoi H, Takata H, Hirai H, Imanishi J, Takahashi T, Okigaki M, Mori Y,

- Matsubara H. Mild Renal Dysfunction Caused by Uninephrectomy Accelerated the Development of Atherosclerosis by Augmented Monocyte Mobilization from Bone Marrow via CCR2-Mediated Signals. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
10. Matsunaga S, Tatsumi T, Okigaki M, Kishita E, Kimata M, Honsyo S, Takeda M, Nishikawa S, Matoba S, Kobara M, Matsubara H. Overexpression of Tie2-promoted Activated Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Endothelial Cells enhances Angiogenesis and Induces Cardioprotective Effect via Src-Akt-Hif1 $\alpha$  Signaling Pathway in Mice Myocardial Infarction **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
11. Tsubakimoto Y, Yamada H, Yokoi H, Takata H, Kawahito H, Hirai H, Imanishi J, Ashihara E, Maekawa T, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H. Bone Marrow Angiotensin II Type1 Receptor Augments Atherosclerosis by Promoting Monocyte/Macrophage Lineage Differentiation from Hematopoietic Stem Cells **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
12. Matsui A, Okigaki M, Katsume A, Matsunaga S, Yamada H, Matsubara H. Central Role of Calcium-Dependent Tyrosine Kinase PYK2 in eNOS-Mediated Vascular Function and Angiogenic Response- Unmasked by PYK2 Knockout Mice- **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
13. Ikeda K, Nakano R, Thomas Quertermous, Matsubara H. BLADE Is A Novel Membrane Protein Regulates Endothelial Apoptosis and Consequently Angiogenesis Both In Vitro and Vivo. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
14. Takeda M, Tatsumi T, Okigaki M, Matsunaga S, Nishikawa S, Kobara M, Matsubara H. Overexpression of Tie2-Promoted Activated Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Endothelial Cells Enhances Mature Neovascularization via Akt Signaling Pathway in Mice Hindlimb Ischemia. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
15. Matsunaga S, Tatsumi T, Okigaki M, Takeda M, Nishikawa S, Kobara M,

- Matsubara H. Overexpression of Tie2-Promoted Activated Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Endothelial Cells Enhances Angiogenesis and Induces Cardioprotective Effect via Akt Signaling Pathway in Mice Myocardial Infarction. **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2006 Nov12-15, Chicago, USA
16. Katsume A, Okigaki M, Matsui A, Urao N, Yamada H, Matsubara H. Ca<sup>2+</sup>-dependent Tyrosine Kinase PYK2 Promotes Atherogenesis by Inducing Monocyte/Macrophage-Derived IL-1 $\beta$  and MCP-1 Unmasked by Analysis of PYK2/ApoE Double Deficient Mice. **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2006 Nov12-15, Chicago, USA
17. Matsui A, Okigaki M, Katsume A, Urao N, Yamada H, Matsubara H. Calcium-Dependent Tyrosine Kinase PYK2 Plays Crucial Role in Angiotensin II- But Not Norepineprine-Mediated Activation of Rac/Superoxide Pathway That Differentially Regulates Blood Pressure and Vasoconstriction Unmasked by Analysis of PYK2-Knock-out Mice. **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2006 Nov12-15, Chicago, USA
18. Matsui A, Okigaki M, Katsume A, Matsunaga S, Nishikawa S, Urao N, Yamada H, Matsubara H. Central Role of Calcium-Dependent Tyrosine Kinase PYK2 in eNOS-Mediated Angiogenesis Unmasked by PYK2 Knockout Mice **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2006 Nov12-15, Chicago, USA
19. Kobara M, Hamada J, Matsumura M, Tanaka T, Toba H, Hayashi H, None; Tatsumi T, Matsubara H, Nakata T. Antagonism of Interleukin-6 Receptor Attenuates Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2006 Nov12-15, Chicago, USA
20. Nakajima N, Takahashi T, Kitamura R, Isodono K, Asada S, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. MicroRNA-1 Facilitates Myogenic Differentiation and Maturation into Skeletal Myotubes without Affecting Osteoblastic and Adipogenic Differentiation **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2006 Nov12-15, Chicago, USA
21. Tateishi K, Takahshi T, Honsho

- S, Takehara N, Nomura T, Matsubara, H. Oh Single Cardiac Stem Cells in Adult Mammals Exhibit Mesenchymal Features and Proliferate through Akt/GSK3 Pathway **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
22. Zen K, Okigaki M, Matsubara H. Myocardium-Targeted Delivery of Endothelial Progenitor Cells By Ultrasound-Mediated Microbubble Destruction Improves Cardiac Function via an Angiogenic Response **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
23. Yamada H, Yokoi H, Tsubakimoto Y, Takada H, Takahashi T, Okigaki M, Ashihara E, Maekawa T, Iwai M, Horiuchi M, Matsubara H. Bone Marrow Cells that Abundantly Express Angiotensin AT1 and AT2 Receptors Modulate Vascular Repair by Regulating Mobilization and Differentiation of Smooth Muscle Cell Progenitors and Macrophage Activation **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
24. Yamada H, Tsubakimoto Y, Yokoi H, Takada H, Takahashi T, Okigaki M, Ashihara E, Maekawa T, Matsubara H. Bone Marrow Angiotensin II Type 1 Receptor Accelerated the Development of Atherosclerosis by Regulating Differentiation of Macrophage Progenitors and Macrophage Functions **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
25. Tateishi K, Takahashi T, Nomura T, Matsubara H, Oh H. Single cardiac stem cells from adult mammalian heart are multipotent and can regenerate ischemic myocardium. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2005 Nov13-16, Dallas, USA
26. Urao N, Takahashi T, Nomura T, Matsubara H. Erythropoietin-mediated mobilization of endothelial progenitors enhances reendothelialization via Akt-eNOS activation and prevents neointimal hyperplasia of injured arteries **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2005 Nov13-16, Dallas, USA
27. Takamiya M, Okigaki M, Irie H, Zen K, Dohue T, Sawada T, Azuma A, Denan J, Takai S, Miyazaki M, Matsubara H. G-CSF Treatment Inhibits Neointimal Hyperplasia Associated with Endothelial Progenitor Cell Mobilization and

Acceleration of Reendothelialization in  
Catorid Artery Injury Model **American  
Heart Association** (米国心臓病学会  
議) 2005 Nov13-16, Dallas, USA

28. Nomura T, Takahashi T, Matsubara H, Oh  
H. Adult mammalian skeletal muscle-  
derived stem cells that are distinct from  
satellite popuration and can regenerate  
functional cardiac muscle cells. **American  
Heart Association** (米国心臓病学会  
議) 2005 Nov13-16, Dallas, USA

29.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

ヒト心臓内幹細胞と bFGF 徐放ゲラチンハイドロ  
ゲルシートの同時移植による心筋再生医療法の  
開発 特許出願番号 2007-265008

心臓組織由来の多能性幹細胞 特許出願番  
号 2005-60831

PCT出願番号 PCT/JP2006/304111

骨格筋組織由来の多能性幹細胞 特許出願  
番号 2005-207670

PCT出願番号 PCT/JP2006/314070

骨格筋由来の心筋幹細胞 特許出願番号  
2004-307797

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

3. その他

上記の3つの特許に関して、米国の1社  
より、特許の買収及び米国内での産業展開  
または京都大学との共同研究を折衝中

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
（分担）研究報告書

ヒト心筋・骨格筋からの心筋幹細胞の単離・増幅に関する研究

（分担）研究者 王 英正 京都大学医学部 助教授

研究要旨

心臓移植でしか救命できない重度の心不全症例に対する新たな治療法として心筋細胞による細胞移植医療法を開発し、標準治療として確立する。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

（倫理面への配慮）

- 1) 臨床試験プロトコールはIR実施に当たっての共通倫理審査指針に沿って京都大学探索医療センター検証部で作成する。患者さ

んに対する治療前の説明と理解を得て、またプライバシーの保護を第一とし治療経過はすべて情報公開にする。移植細胞および臨床試験は厚生労働省よりの「幹細胞の臨床応用についての治療指針」、医薬品GCP、臨床研究倫理指針（厚生労働省告示第255号）を遵守する。

2) 動物操作にあたっては各施設の動物実験指針に従って行う。基礎的研究においては、遺伝子改変マウス、プラスミドDNAを用いる場合は仕様に際しては、遺伝子組み換え生物などの使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律に基づき研究を実施する。

A. 研究結果

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

機能を改善させる結果となった。

## B. 考察

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

## E. 結論

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

## F. 健康危険情報 該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1 Tateishi K, Ashihara E, Takehara N, Nomura T, Honsho S, Nakagami T, Morikawa S, Takahashi T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by stem cell antigen-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration. **J Cell Science, in press**
- 2 Tateishi K, Ashihara E, Honsho S, Takehara N, Nomura T, Takahashi T, Ueyama T, Yamagishi M, Yaku H, Matsubara H, Oh H. Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3 $\beta$  signaling **Biochem Biophys Res Commun. 2007; 352(3):635-641.**
- 3 Nomura T, Ashihara E, Tateishi K, Asada S, Ueyama T, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. Skeletal myosphere-derived progenitor cell transplantation promotes neovascularization in  $\alpha$ -sarcoglycan knockdown cardiomyopathy **Biochem Biophys Res Commun. 2007; 352(3):668-674.**
- 4 Nakajima N, Takahashi T, Kitamura R, Isodono K, Asada S, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. **Biochem Biophys Res Commun. 2006 ;350:1006-1012.**
- 5 Oh H, Chi X, Bradfute SB, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Schwartz RJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells **Annu. NY. Acad. Sci. 2004 ;1015:182-9**
- 6 Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. **Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 ;100:12313-8.**
- 7 Oh H, Wang SC, Prahash A, Sano M, Moravec CS,

Taffet GE, Michael LH, Youker KA, Entman ML, Schneider MD. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 ;100:5378-83

- 8 Sano M, Abdellatif M, Oh H, Xie M, Bagella L, Giordano A, Michael LH, DeMayo FJ, Schneider MD. Activation and function of cyclin T-Cdk9 (positive transcription elongation factor-b) in cardiac muscle-cell hypertrophy. **Nat Med.** 2002 ;8:1310-7.
- 9 Oh H, Taffet GE, Youker KA, Entman ML, Overbeek PA, Michael LH, Schneider MD. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001;98:10308-13.

## 2. 学会発表

- 1 N. Nakajima, T. Takahashi, R. Kitamura, K. Isodono, S. Asada, T. Ueyama, H. Matsubara, H. Oh, MicroRNA-1 Facilitates Myogenic Differentiation and Maturation into Skeletal Myotubes without Affecting Osteoblastic and Adipogenic Differentiation **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
- 2 K. Tateishi, T. Takahashi, S. Honsho, N. Takehara, T. Nomura, H. Matsubara, H. Oh Single Cardiac Stem Cells in Adult Mammals Exhibit Mesenchymal Features

and Proliferate through Akt/GSK3 Pathway **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA

- 3 K. Zen, M. Okigaki, H. Matsubara Myocardium-Targeted Delivery of Endothelial Progenitor Cells By Ultrasound-Mediated Microbubble Destruction Improves Cardiac Function via an Angiogenic Response **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
- 4 H. Yamada, H. Yokoi, Y. Tsubakimoto, H. Takada, T. Takahashi, M. Okigaki, E. Ashihara, T. Maekawa, M. Iwai, M. Horiuchi, H. Matsubara, Bone Marrow Cells that Abundantly Express Angiotensin AT1 and AT2 Receptors Modulate Vascular Repair by Regulating Mobilization and Differentiation of Smooth Muscle Cell Progenitors and Macrophage Activation **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
心臓内心筋幹細胞の単離法 (PCT出願中)  
骨格筋組織内幹細胞の精製法 (PCT出願中)
- 2 実用新案登録



特になし

#### 4. その他

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

厚生労働科学研究費補助金(基礎研究成果の臨床応用推進研究事業)

(分担)研究報告書

細胞移植と遺伝子治療による機能的血管新生療法の開発に関する研究

(分担)研究者 室原 豊明

名古屋大学大学院医学系研究科 病態内科学講座 循環器内科学教授

### 研究要旨

虚血性心疾患や特発性心筋症に伴う重症心不全への心臓移植医療が、我が国ではドナーの圧倒的不足のために機能していない。現状を打開することを目的とする末期的心不全への幹細胞移植医療実現化へ向けての基盤形成研究の中で、本分担研究者とそのグループは、細胞移植による血管再生医療の確立に関する基礎ならびに臨床的研究を行う。

室原豊明・名古屋大学 教授

存するためには、血管再生療法は依然として重要な研究分野である。

#### A. 研究目的

虚血性心疾患や特発性心筋症に伴う重症心不全への心臓移植医療が、我が国ではドナーの圧倒的不足のために全く機能していない。現状を打開することを目的とする末期的心不全への幹細胞移植医療実現化へ向けての基盤形成研究の中で、本分担研究者とそのグループは、細胞移植による血管再生医療の確立に関する基礎ならびに臨床的研究を行う。

心筋が広範囲にダメージを受けた場合、心筋の再生が必須となるが、その医療の実現は容易ではない。心筋再生の部分に血管新生を誘導することはもちろん重要であるが、それ以外にも、既存の心筋を出来るだけ温

#### B. 研究方法

自己骨髄細胞単核球細胞や血管内皮前駆細胞移植による血管新生効果の強化については、以前我々は虚血前刺激(hypoxic preconditioning)で細胞機能が強化されることを報告している(Akita et al. *Lab Invest* 2004)。この方法では簡便に細胞を刺激することができたが、その機能促進効果に長期の持続性が認められなかった。

最近我々は自己骨髄単核球細胞と遺伝子治療を組み合わせることで、より効果的な血管再生療法が可能なることを、基礎レベルで確認している(Kobayashi et al. *ATVB* 2006 in press)。この方法でいくと、より少ない骨

髓採取(従来の約5分の1量の骨髓細胞)でも、これまでの細胞移植療法単独の場合と同等またはそれ以上の治療効果が期待出来ることが確認されている。

本研究では、ヒト型Angiopoietin-1発現プラスミド遺伝子、さらにVEGF-E/PIGF キメラ・プラスミド遺伝子を治療候補遺伝子として考慮し、これらと自己骨髓細胞単核球細胞移植による血管新生療法の増強方法について、in vivo, in vitroの系で探求していくものである。VEGF-E/PIGF キメラ・プラスミド遺伝子については、すでに単独遺伝子単独治療でも血管再生療法が可能であることが、確認されている(Inoue et al. JCS 2005, ACC 2006, 論文投稿中)。遺伝子治療と細胞治療の併用療法に関しては、循環器領域で未だ全世界的に研究が遅れている分野であり、今後も精力的な研究が待たれる分野である。

### C. 研究結果

#### Angiopoietin-1プラスミド遺伝子と自己骨髓細胞移植の併用効果:

骨髓細胞単核球細胞または内皮前駆細胞移植による血管新生効果の強化については、我々はすでに体外での低酸素刺激(hypoxic preconditioning)が、内皮前駆細胞の血管新生機能を強化出来ることを報告している(Lab Invest 2003)。さらに我々は最近、ヒト型Angiopoietin-1プラスミド遺伝子と自己骨髓細胞移植の時系列的な併用が、ウサギの虚血下肢モデルにおいて血管新生効果を増強させることを確認している(Kobayashi et al. ACC 2005, ATVB 2006 in pr

ess)。以下にその概略を示す。

少量(これまで治療実験に使われてきたものの1/5量)の自己骨髓細胞単核球細胞と(Ang-1) 遺伝子を併用することによる血管新生増強効果をウサギの下肢虚血モデルを用いて評価した。またマウスの耳においてAng-1、骨髓細胞併用により促される毛細血管構築を観察した。40匹のNZW ウサギに下肢虚血を作成し、以下の4群に分け治療効果を評価した。control群:control vector (500 mg) + PBS、angiopoietin-1 (Ang-1) 群:Ang-1 plasmid (500 mg) + PBS、骨髓細胞単核球細胞 (BMC) 群:control vector + 少量の自己骨髓細胞(1×10<sup>6</sup>)、併用(combination) 群:Ang-1 plasmid + 少量の自己骨髓細胞(1×10<sup>6</sup>)の4群に分けて評価した。day 35に血管造影、flow wireを使った側副血行への血流量算出、組織酸素分圧(TcO<sub>2</sub>)の測定を行い、安楽死後には組織を採取し、微小血管の評価も進めた。さらに、骨髓細胞単核球細胞を培養し得られた内皮前駆細胞のmigration機能、HUVECが形成する管腔構造に取り込まれる機能がangiopoietin-1により増強されるか否か検討した。また、マウスの耳にrecombinant Ang-1 蛋白(150 ng)を連日3日間、骨髓細胞(1.5 × 10<sup>5</sup>)を投与するものでは初日に皮下注射し、4日後にFITC-lectinにより微小血管を染色し共焦点顕微鏡にてその血管構築を観察した。

Ang-1 plasmidの単独療法では血管の増生を認めるものの、下肢の潰瘍所見や組織

酸素分圧の改善を認めなかった。しかしAng-1 plasmidに少量の骨髄単核球細胞を併用することにより、血管造影で確認できる比較的太い血管や組織染色で評価できる微小血管がともに有意に増加し、下肢の潰瘍所見や組織酸素分圧の著明な改善も認められた。この効果は少量の骨髄単核球細胞を投与した群と比べ増強されており、Ang-1 plasmidと骨髄単核球細胞を併用することによって得られた相乗効果と考えられる。

また、骨髄単核球細胞を培養することで得られた内皮前駆細胞はAng-1存在下でmigrationが高められ、内皮の管腔形成への寄与も増強されることが確認された。これらの機序により骨髄単核球細胞による血管新生がAng-1 plasmidの併用で増強されたと考えられる。

さらに、マウスの耳においてはAng-1蛋白の単独投与により蛇行の強い異常血管が観察された。ウサギ下肢にAng-1を単独投与したときも同様に異常血管が形成され、そのために新生血管の量的促進にも関わらず、潰瘍所見や組織酸素分圧の改善がみられなかったと推察された。Ang-1に骨髄細胞を併用することで異常血管は殆ど認められなくなり、この現象によりウサギ下肢においても微小循環が改善され、新生血管の増加に比した酸素運搬が可能となったと考えられた。

#### D. 考察

海外では、adenovirus やretrovirusを用いて、VEGF遺伝子を前駆細胞や間葉系幹細胞にあらかじめ遺伝し導入し、それらを細胞

移植して血管再生を図るという研究が先行して発表されている。しかし、この方法だと導入遺伝子の発現調節が(遺伝子が既に)細胞に入り込んでしまっているために困難なこと、遺伝子でエンコードされている蛋白が過剰に産生された場合に、局所で血管腫や動脈瘤を作るなどの合併症が出るということが報告された。このため、未だ臨床応用には至っていない。我々の方法は、従来から効果があると報告されていて、かつ安全な発現プラスミドを使用した遺伝子治療と、すでに臨床応用されている自己骨髄細胞移植の併用による血管再生療法であり、より安全で、臨床への応用も十分視野内にある。

#### E. 結論

Ang-1 plasmidと自己骨髄単核球細胞との併用療法は、強力な血管新生増強効果をもつと同時に、生理的な血管により近い機能的血管新生をもたらす治療法であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

該当無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shintani S, Kusano K, Ii M, Iwakura A, Heyd L, Curry C, Wecker A, Gavin M, Ma H, Kearney M, Silver M, Thome T, Murohara T, Losordo DW. Synergistic effect of combined intramyocardial CD34 cells and VEGF-2 gene therapy post-myocardial infarction. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2006;