

200718036A

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

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

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 伊藤 裕

平成20年(2008年)4月

目次

I. 総括研究報告

虚血脳再生ホルモン アドレノメデュリンの作用機序の検討とホルモン補償とヒト ES 細胞移植による虚血脳再生療法の開発 ……1

伊藤 裕

II. 分担研究報告

1. 虚血脳再生ホルモン アドレノメデュリンを用いた皮質下血管性認知症の治療法の開発 ……4

高橋 良輔

2. 糖尿病患者における末梢血中内皮前駆細胞動態の解析 ……8

吉政 康直

3. アドレノメデュリンによる組織再生作用およびその作用機序…10

永谷 憲歳

4. サル ES 細胞由来神経幹細胞のサルへの移植に関する研究 ……12

近藤 靖

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……15

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……17

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

- 虚血脳再生ホルモン アドレノメデュリンの作用機序の検討と

ホルモン補償とヒト ES 細胞移植による虚血脳再生療法の開発 -

主任研究者： 伊藤 裕 (慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝学講座 教授)

メタボリックシンドロームの結果生じる血管性認知症は、極めて深刻な医学的問題であるが、これまで根治的治療法は開発されておらず、虚血脳再生治療に大きな期待が寄せられている。昨年度我々は、マウス脳梗塞モデルにおいてアドレノメデュリン(AM)が血管-神経再生作用を発揮することを明らかにした。本年度は、AM により抑制される心血管障害因子として注目されているアルドステロンの作用を、脳梗塞モデルマウスにおいて抑制すると、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)等の発現が増加し、虚血脳再生を促進することを明らかにした。また、AM が血管前駆細胞の動脈内皮への分化を促進することを明らかにした。さらに、ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞を内皮細胞、壁細胞へそれぞれ分化させ、両者の混合移植で良好な血管再生効果を得ることを見出した。これらの結果は、虚血脳再生ホルモンとヒト ES 細胞を用いた認知症新規治療法の有用性を示唆している。

A 研究目的

認知症は患者の QOL 障害、家族の介護負荷を考えると極めて深刻な問題であるが、これまで根治的治療法は開発されておらず、保存的に患者を見守るしかない状況であった。そこで虚血脳における“再生医療”に期待が寄せられているが、神経幹/前駆細胞の完全な同定が未だなされず、移植細胞による高次脳機能の回復も、期待された効果を得られていない。

我々はこれまでわが国で発見された心臓血管ホルモンの臨床的意義について研究を続け、血管拡張作用を有するナトリウム利尿ペプチド (ANP, BNP, CNP) 及びアドレノメジュリン

(AM) が、血管再生を促進することを明らかにした。一方我々は、無限の増殖性とすべての臓器細胞に分化し得る ES 細胞の再生医療への応用を目指し、ES 細胞より血管を構成する内皮細胞及び血管平滑筋細胞の双方に分化する“血管前駆細胞 (Vascular Progenitor Cells; VPC)” の同定に成功した。また、昨年度までの研究で、脳梗塞後に発現が著増するホルモンである AM が血管-神経再生を促進し、虚血脳再生作用を発揮する可能性を明らかにした。

これらの成果を踏まえ本年度は、AM の虚血脳再生機序を詳細に検討するとともに、虚血モデルにおけるヒト ES 細胞移植での示適分化段階

を検討し、虚血脳再生ホルモンと ES 由来細胞を用いた認知症再生治療の実現に向けた研究を推進した。

B. 研究方法

1. AM は心血管障害因子として現在注目されているアルドステロン (Aldo) の分泌を抑制する事が知られている。そこで中大脳動脈 20 分閉塞 (20m-MCAO) 脳梗塞モデルマウスにアルドステロン (Aldo) ブロッカーであるスピロノラクトンを投与することで AM による Aldo 産生抑制を模倣し bFGF など虚血脳再生因子の発現や梗塞域の大きさを評価した。
2. マウス ES 細胞由来血管前駆細胞(VPC)から内皮細胞への誘導過程で AM を添加し、分化挙動の変化を解析した。
3. 大腿動脈結紮下肢虚血モデルマウスにヒト ES 細胞由来血管内皮細胞(VPC-EC)ならびに、壁細胞(VPC-MC)を移植し治療効果を検討した。

C. 研究成果

1. 20m-MCAO により、Aldo 受容体であるミネラルコルチコイドレセプターの発現が、主に虚血局所のグリア細胞で増加した。20m-MCAO 脳梗塞モデルマウスへのスピロノラクトン投与により、虚血脳再生促進因子である bFGF や VEGF の発現が増加し梗塞域が縮小した (図 1)。
2. ES 細胞由来 VPC は VEGF 添加にて内皮細胞に分化し、さらに AM を添加することで、動脈マーカーである ephrineB2, CXCR4 等の発現が増加した (図 2)。
3. 大腿動脈結紮下肢虚血モデルマウスへの ES 由来細胞移植後の虚血下腿筋における血管密度と血流は、VPC-EC, VPC-MC 単独移植よりも両者の混合移植において顕著に増加した (図 3)。

図 1: アドレノメデュリンによる神経再生機序の検討

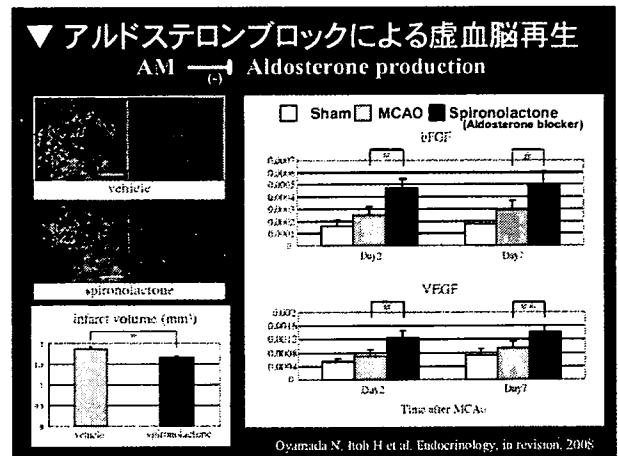


図 2: アドレノメデュリンによる血管再生機序の検討

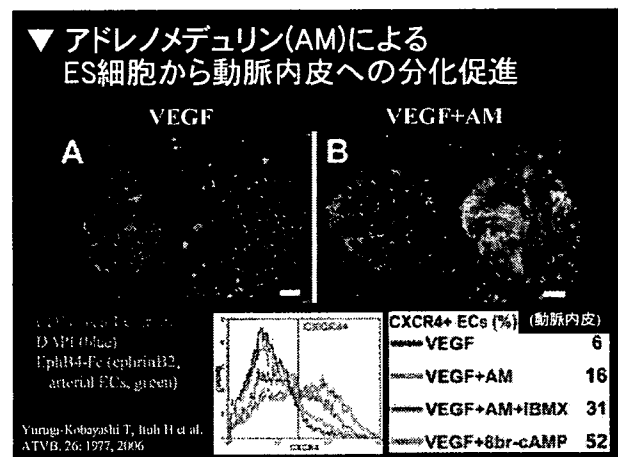
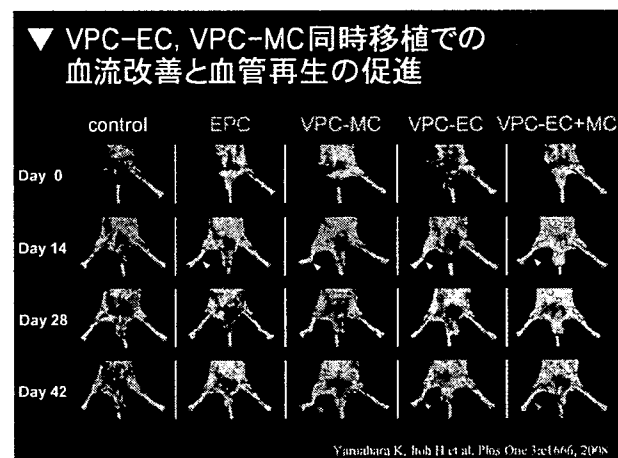


図 3: ヒト ES 細胞を用いた血管再生療法における 示適分化段階の検討



D. 考察

以上の検討より、AM は Aldo 作用を抑制し、bFGF や VEGF の発現を増加させることや、血管前駆細胞の動脈内皮への分化を促進すること

で虚血脳再生を促進する可能性が示された。また、ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞を示適分化段階にまで分化させ、内皮細胞と壁細胞の両者を移植することにより効果的な血管再生が認められることが明らかとなった。

E. 結論

これらの結果は、虚血脳再生ホルモンとヒト ES 細胞を用いた認知症新規治療法の有用性を示唆する重要な成果である。

これまでの研究成果を踏まえ我々は、虚血脳への AM 投与で血管再生と神経再生を誘導する「血管-神経再生療法」を着想し、血管性認知症患者への AM 投与を計画している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Sone M, Itoh H, Yamahara K, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Nonoguchi A, Suzuki Y, Chao TH, Sawada N, Fukunaga Y, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Kondo Y, Nito S, Suemori H, Nakatsuji N, Nishikawa S, Nakao K. Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration.

Arterio Thromb Vasc Biol. 27:2127-34 (2007)

2. Park K, Itoh H, Yamahara K, Sone M, Miyashita K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Tsujimoto H, Fukunaga Y, Tamura N, Nakao K. Therapeutic Potential of Atrial Natriuretic Peptide Administration on Peripheral Arterial Diseases.

Endocrinology 149:483-491 (2008)

3. Yamahara K, Sone M, Itoh H, Yamashita J, Yurugi-Kobayashi T, Chao TH, Homma K, Taura D, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Tamura N, Nakao K. Augmentation of Neovascularization in Hindlimb Ischemia by Combined Transplantation of Human Embryonic Stem Cells-derived Endothelial and Mural Cells.

PLoS ONE 3:e1666 (2008)

4. Oyamada Y, Itoh H, Sone M, Miyashita K, Park K, Sawada N, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Tsujimoto H, Fukunaga Y, Tamura N, Nakao K. The role of mineralcorticoid receptor expression on brain remodeling after cerebral ischemia.

Endocrinology in revision (2008)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ヒト ES 細胞を用いた in vitro 血管神経細胞分化システムによる
「虚血脳再生ホルモン」の探索とホルモン補償による新規認知症治療法の開発
-虚血脳再生ホルモン アドレノメデュリンを用いた皮質下血管性認知症の治療法の開発-

分担研究者 高橋 良輔 京都大学大学院医学研究科 臨床神経学教授

研究要旨; 本年度の研究では、1)皮質下血管性認知症のモデルマウスであるマウス脳低灌流モデルで月齢が進むとワーキングメモリのみならず参照記憶も障害されること、2)薬剤による白質保護は、遺伝子操作動物を用いる方法に限らず腹腔内慢性投与でも有効であることが示された。

A. 研究目的

皮質下血管性認知症(subcortical vascular dementia: SVD)はわが国の血管性認知症患者の半数以上を占めている。パーキンソニズムなどの運動機能障害を伴いやすく、寝たきりの原因として重要であるが、その治療法は危険因子の管理と抗血小板療法に限られ、寝たきり予防への有効性が不十分である。病態の進展増悪を防ぐ有効な対策の開発は急務であり、われわれは虚血脳再生ホルモン、アドレノメデュリン(AM)を用いた治療法の開発を目指している。

SVDは病理学的にはラクナ梗塞と白質病変によって特徴づけられ、脳循環動態の解析から慢性脳低灌流がその原因と考えられている。AM は血管拡張作用と血管新生作用を有し、SVD患者に対する有効性が期待される。研究の最終目標はヒトにおける臨床試験で有効性を証明することであるが、平行してAM の遺伝

子過剰発現あるいは腹腔内投与が慢性脳虚血に及ぼす効果を検証し基礎データとすることを検討している。マウス慢性脳低灌流モデルは、近年われわれが開発したSVDのモデル動物であり、虚血性白質病変と認知機能障害を呈する。AM 過剰発現が慢性脳虚血に及ぼす効果を検証するため、次年度に向けてマウス慢性脳低灌流モデルの加齢変化を解明し、種々の薬剤による白質病変の治療反応性を調べた。

B. 研究方法

1. マウス慢性脳低灌流モデルにおける加齢変化

筆者らは若齢マウスの両側頸動脈狭窄術(bilateral carotid artery stenosis: BCAS)によって、術後一ヶ月で大脳白質の白質病変とグリア細胞の活性化が生じ、ワーキングメモリの選択的障害が認められることを報告している

[文献1]。しかし、SVD患者治療の理論的裏づけとして薬剤の効果を検証することはヒトと同様に高齢マウスで行うのが望ましい。この目的で、BCASが高齢マウスに対して与える影響を、レーザードップラー血流測定、組織学的・行動学的評価を行って若齢マウスの結果と比較した。

2. 慢性脳虚血モデルにおける薬剤の白質保護効果

SVD剖検脳では血液脳関門(BBB)障害とグリア細胞の異常活性化が指摘されており、BBBの障害とグリア細胞から産生される炎症性サイトカインやフリーラジカルが白質病変の病理学的機序として推定されている。BBB障害を惹起するマトリックスメタロプロテアーゼ阻害薬、およびアストロサイトのS100蛋白を発現抑制するarundic acid について、腹腔内慢性投与を行って、白質病変への効果を比較検討した。

C. 研究結果

1. マウス慢性脳低灌流モデルにおける加齢変化について

従来の若齢マウスの慢性脳低灌流負荷では認知機能障害はワーキングメモリの選択的障害に限定され、リファレンスメモリの障害や脳萎縮は認められなかった。これに対し、老齢マウスに慢性脳低灌流負荷を行った場合、脳萎縮が進行してリファレンスメモリも傷害され記憶障害が全般的となることを明らかにした。

2. 慢性脳虚血モデルにおける薬剤の白質保護効果

マトリックスメタロプロテアーゼ阻害薬 ilomastat の慢性投与は微小血管からの Evans blueの漏出を抑制し、白質病変を抑制した。Arundic acid については薬剤の投与を慢性脳低灌流負荷の開始後7日遅れて薬剤投与を開始しても、白質病変の保護効果があることを明らかにした(図2)。慢性脳低灌流導入3日目からの投与ではグリア細胞活性化と白質病変の両者が抑制されたが、7日目以降の投与ではグリア細胞活性化のみが抑制された [文献2]。

図1: Barnes Test – reference memory

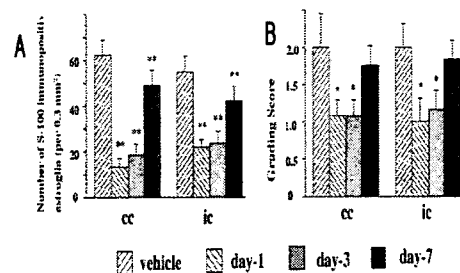
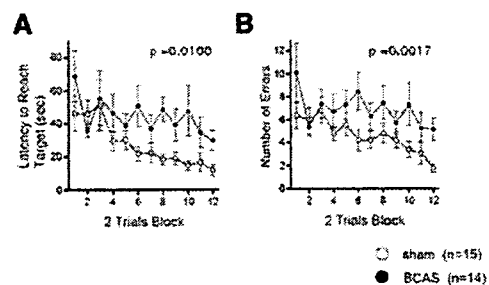


図2: Arundic acidのグリア活性化と白質病変に対する効果。術後7日目からの投与開始ではS-100陽性グリアは抑制されるが(A)、白質病変は抑制されない(B)。

D. 考察

慢性脳低灌流マウスがワーキングメモリの選択的低下を示すことは、SVD患者の白質障

害が前頭葉に顕著でワーキングメモリや実行機能の低下を認めることと符合している。しかし、老齢マウスに慢性脳低灌流負荷を行うと記名力の全般的低下や脳萎縮が起こる事実は、慢性脳虚血の効果は年齢依存的であることを示している。また、SVD患者へのAM 投与効果の判定においても年齢による層別化が必要と思われる。

いっぽう、BBBの障害とそれに続発するグリア細胞の異常活性化は白質病変形成機転の初期変化とされている。実際、arundic acidの7日後投与ではグリアは活性化は抑制されるが白質病変形成に至らず、グリア活性化が白質病変形成機転の上流に位置することが示唆された。

E. 結論

本年度で得られた結果から、AMの慢性脳低灌流モデルにおける効果について1)加齢の影響を考慮する必要があること、2)薬剤による白質保護は遺伝子操作動物を用いる方法に限らず、腹腔内慢性投与でも有効であることが明らかになった。次年度の研究準備としてAM 遺伝子の過剰発現マウスを入手し、病理学的、生理学的に検索し表現形に大きな異常を認めないことをすでに確認している。また、AMはヒト剖検脳でも主として神経細胞に発現することを確認し、現在臨床試験を実施するため倫理委員会への申請作業中である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shibata M, Yamasaki N, Miyakawa T, Ohtani R, Ihara M, Takahashi R and Tomimoto H Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. Stroke 38; 2826-2832, 2007
2. Ohtani R, Tomimoto H, Wakita H, Kitaguchi H, Nakaji K and Takahashi R Expression of S100 protein and protective effect of arundic acid on the rat brain in chronic cerebral hypoperfusion Brain Res 1135; 195-200, 2007
3. Ihara M, Tomimoto H, Ishizu K, Yoshida H, Sawamoto N, Hashikawa K and Fukuyama H. Association of vascular parkinsonism with impaired neuronal integrity in the striatum.. J Neural Transm 114; 577-584
4. Tomimoto H, Lin Jin-Xi, Ihara M, Ohtani R, Matsuo A and Miki Y. Subinsular vascular lesions; an analysis of 119 consecutive autopsied brains. Eur J Neurol 14 ; 95-101 2007

2. 学会発表

1. 富本秀和、柴田益成、中治佳代子、猪原匡史、高橋良輔;皮質下血管性認知症(SVD)モデルマウスの開発。第 回日本脳卒中学会総会、2007. 5. 16 -18(博多)
2. 田祐之、富本秀和、Jin-Xi Lin、高橋良輔シロスタゾールは自然発症ラット脳に

における高血圧平滑筋形質変換と白質病変を抑制する。第 回日本脳卒中学会総会、2007. 5. 16-18(博多)

3. 富本秀和、柴田益成、猪原匡史、宮川剛、高橋良輔;皮質下血管性認知症の動物モデルの開発。第 回日本神経学会総会、2007. 3. 22-23(名古屋)
4. 西尾桂子、猪原匡史、富本秀和、高橋良輔;慢性脳低灌流マウスにおける病理学および行動学的検討。第 回日本脳卒中学会総会、2008. 3. 20-22(京都)
5. 岡本洋子、藤田祐之、高橋良輔、富本秀和;ラット慢性脳低灌流モデルにおける抗血小板薬の効果:シロスタゾールとアスピリンの比較。第 回日本脳卒中学会総会、2008. 3. 20-22(京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

ヒト ES 細胞を用いた *in vitro* 血管神経細胞分化システムによる
「虚血脳再生ホルモン」の探索とホルモン補償による新規認知症治療法の開発
・ 糖尿病患者における末梢血中内皮前駆細胞動態の解析 ・

分担研究者 吉政 康直 国立循環器病センター 動脈硬化代謝内科 部長

研究要旨：近年、末梢血中の血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cell; EPC）が動脈硬化性疾患の進展に対し保護的な役割をしていることが明らかになりつつある。しかしメタボリックシンドロームにおける心血管病との関連は不明である。今回の横断解析において糖尿病患者において血中 BNP と EPC に負の相関があることが明らかになった。今後 MS 患者において EPC 数と心血管イベントの発症について前向きに検討する必要がある。

A.研究目的：

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

メタボリックシンドローム、特に耐糖能障害における心血管病発症・進展に対する末梢血 EPC の意義を明らかにする。

B.研究方法：

国立循環器病センター通院中の 70 歳以上の明らかな心疾患の既往のない糖尿病患者 34 名に対して末梢血 EPC 陽性細胞数 (CD34 陽性細胞数) を測定し、血中 BNP 濃度、心エコーパラメーターとの相関を検討した。

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

C.研究結果：

CD34 陽性細胞数は BNP と有意な負の相関を認めた ($r = -0.40, p < 0.05$)。また左室肥大の指標である LVMI とも有意な負の相関を認めたが ($r = -0.46, p < 0.05$)、収縮障害の指標である LVFS や拡張障害の指標である E/A とは有意な相関を認めなかった。また CD34 陽性細胞数と BNP, LVMI との相関は年齢、性、HbA1c、血圧、medication を入れた多変量解析でも有意であった。

D.考察：

今回の検討では CD34 陽性細胞数が糖尿病患者における左室肥大と相関することが明らかになった。この結果は耐糖能障害における

心筋障害に EPC の低下が関与していることで EPC 数と心血管イベントの発症について前向きに検討する必要がある。

E. 結論

末梢血 CD34 陽性細胞数が糖尿病患者の左室肥大に関連していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki M, Takamisawa I, Yoshimasa Y, Harano Y. Association between insulin resistance and endothelial dysfunction in type 2 diabetes and the effects of pioglitazone. *Diabetes Res Clin Pract.* 76: 12-17, 2007.
2. Kawamura M, Itoh H, Yura S, Mogami H, Suga S, Makino H, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Sagawa N, Fujii S. Undernutrition in utero augments systolic blood pressure and cardiac remodeling in adult mouse offspring: possible involvement of local cardiac angiotensin system in developmental

を示唆する所見であり、今後MS患者において origins of cardiovascular disease.

Endocrinology. 148(3): 1218-1225, 2007.

3. Ito A, Suganami T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Takeya M, Kamei Y, Ogawa Y: Role of MAPK phosphatase-1 in the induction of monocyte chemoattractant protein-1 during the course of adipocyte hypertrophy. *J Biol Chem,* 35: 25445-25452, 2007.
4. Okada S, Makino H, Nagumo A, Sugisawa T, Fujimoto M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Kikuchi-Taura Akie, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y: Circulating CD34-Positive Cell Number Is Associated With Brain Natriuretic Peptide level in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care,* 31:157-158,2008.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし

アドレノメデュリンによる組織再生作用およびその作用機序

分担研究者 永谷 憲歳 国立循環器病センター研究所再生医療部 部長

研究要旨 局所の循環障害を基盤とするリンパ浮腫モデルマウスを用いてアドレノメデュリン（AM）の組織再生作用およびその作用機序について検討を行った。AMをリンパ浮腫モデルマウスに持続投与すると、病態が改善し、その機序としてリンパ管新生、血管新生およびその結果もたらされた組織再生が関与した。さらに、AMは培養リンパ管内皮細胞の増殖、遊走を有意に増加した。また、この作用はAM受容体拮抗薬、cAMP阻害剤およびMEK阻害剤により抑制された。これらの結果より、AMはリンパ浮腫治療効果を有する可能性が示唆された。

A. 研究目的

リンパ浮腫は、根治療法がなく患者数は全国で4～5万人と推定されている。一方、アドレノメデュリン（AM）は強力な血管拡張性の心臓血管ホルモンであり、血管新生作用や抗アポトーシス作用により組織保護、修復に働くことが明らかとなっている。今回我々は、リンパ浮腫モデルマウスを用いて、AMの浮腫治療効果およびリンパ管再生作用を含めた作用機序について検討を行なった。

B. 研究方法

培養ヒトリンパ管内皮細胞に対するAMの作用を細胞増殖、遊走及び管腔形成評価により検討した。また、Western blotting法でAMによるERK及びAktの活性化を検討した。8-10週齢の雄性BALB/Cの尾の付け根から1cmの部位を1.5-2.0mm幅に円周状に尾の皮膚を取り除き、これをリンパ浮腫モデルとした。その後、浸透圧ポンプを皮下に埋め込み、AM（0.05 μ g/kg/min）または生理食塩水を14日間持続投与した。尾直径を経日的に測り、浮腫に対するAMの治療効果を評価した。さらに、浮腫モデル作製16日後に組

織採取し、LYVE-1、Podoplanin及びvWF抗体を用いて、組織学的評価を行った。

C. 研究結果

AM群では、コントロール群と比較して、有意な尾直径の縮小を認めた（図1）。

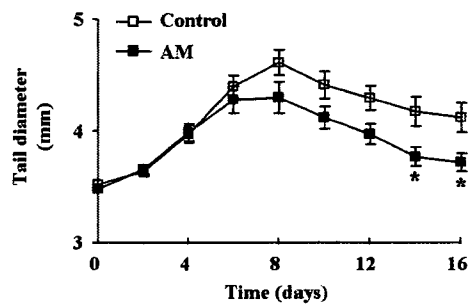


図1：マウス尾リンパ浮腫に対するAMの作用

マウス尾組織において、コントロール群と比較してAM群では、LYVE-1陽性、Podoplanin陽性細胞及びvWF陽性細胞の有意な増加を認めた（図2）。AMはリンパ管内皮細胞の増殖および遊走を有意に増加した（図3）。AMによるリンパ管内皮細胞

の増殖は、cAMP の阻害剤 Rp-cAMP (Rp) 及び MEK の阻害剤 PD98059 (PD) または U0126 により阻害された。また、AM 群は、コントロール群と比較して、ERK を有意にリン酸化した。

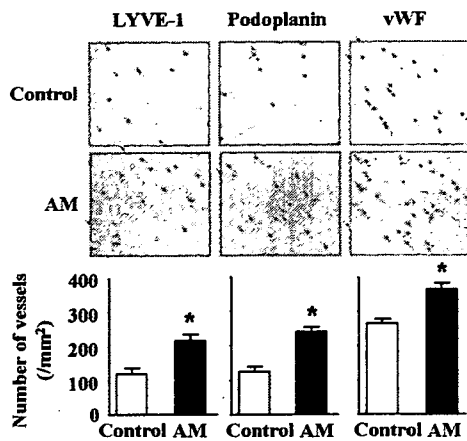


図2：AM のリンパ管再生及び血管再生促進作用

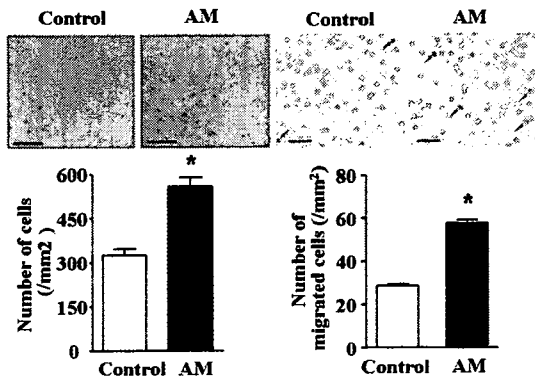


図3：ヒトリンパ管内皮細胞の増殖及び遊走に対するAMの作用

D. 考察

以上の結果より、AM の持続投与がリンパ浮腫モデルにおいても治療効果を示すことが明らかとなった。AM によるリンパ浮腫治療効果は、①リンパ管内皮細胞の増殖・遊走作用を伴うリンパ管新生作用、②血管新生作用、さらには、③尾組織修復促進作用によると考えられる。

①リンパ管内皮細胞の増殖・遊走作用を伴うリン

パ管新生作用に関しては、リンパ管の発生過程でAMが必要であることが既に報告されており (Fritz-Six KL et al. J Clin Invest. 2008;118:40-50)、我々の結果からもAMによる直接的なリンパ管新生作用があることが考えられる。さらに、②血管新生作用による局所血流改善効果が考えられ、①および②の結果、尾組織の修復が促されているものと考えられる。

E. 結論

AM はリンパ管再生促進作用及び血管再生促進作用によりマウス尾組織傷害の修復に寄与した。AM がリンパ浮腫の新たな治療薬となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

1)リンパ浮腫に対するアドレノメデュリンの治療効果とそのメカニズム(第7回日本再生医療学会、2008/03/13-14)

2)褥瘡に対するアドレノメデュリンの効果(第7回日本再生医療学会、2008/03/13-14)

3)褥瘡に対するアドレノメデュリンの効果(第11回 心血管内分泌代謝学会、2007/11/16-17)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

—サル ES 細胞由来神経幹細胞のサルへの移植に関する研究—

分担研究者 近藤 靖 田辺三菱製薬株式会社 先端医療研究所

本年度はサル ES 細胞からの分化誘導した神経幹細胞をサルの線条体に移植し、神経幹細胞の in vivo での分可能を検討した。その結果、移植細胞の生着と神経細胞への分化を確認した。また、PSA-NCAM 抗体で移植細胞をセレクションすることにより、腫瘍形成を回避できることが明らかとなった。

A. 研究目的

においては、メタボリックシンドローム (MS) に伴う ASO

本研究課題において、主任研究者伊藤らが血管神経 患者に対して ANP の低用量持続投与を試行し、著明な再生作用を有し、既に心血管疾患患者への試験的投与 治療効果を得ている。また永谷らは、心不全、肺高血を開始している心血管ホルモンに関する知見と我々 圧症患者に対する AM 投与により良好な臨床成績を得が樹立保有する霊長類 ES 細胞とその維持培養技術を ている。

融合させることによって、霊長類 ES 細胞を用いた血 本年度は、前年度に報告したサル ES 細胞から分化管神経細胞分化系を構築しそのシステムを駆使する 誘導して神経幹細胞を大量調製する技術を用いて得ることにより新たな虚血脳再生ホルモンの探索を行い、たサル ES 細胞由来神経幹細胞をカニクイザルの線条痴呆治療における臨床的有用性を検討することを目 体に移植することによって in vivo においても神経細胞的としている。 胞へ分化可能な細胞であるかを検討することを目的

これまでに、伊藤らは ES 細胞より血管を構成する としている。これにより血管神経細胞分化系システム内皮細胞及び血管平滑筋細胞の双方に分化する「血管 構築に使用可能か否かについて検討を行う。

前駆細胞 (VPC)」の同定に成功し、我が国で発見され

た心臓血管ホルモンの臨床的意義について研究を続 B. 研究方法

け、血管拡張作用を有するナトリウム利尿ペプチド [サル ES 細胞から神経幹細胞への分化法]

(ANP, BNP, CNP) 及びアドレノメジュリン (AM) が、血 サル ES 細胞から神経幹細胞への分化誘導法は前年管再生及び神経再生促進することを明らかにしてい 度に報告した方法に準じて行った。分化させた神経幹る。またヒト ES 細胞由来の VPC を用いて DNA マイク 細胞は Trypsin/Dissociation buffer で剥離した後に、ロアレイ法を行うことによりヒト血管細胞分化遺伝 細胞を回収し、 1.5×10^7 cells/100 ml になるように子発現データベースの構築にも成功している。臨床に 再懸濁した。

[カニクイザルへの移植]

麻酔下カニクイザルの左側被殻に上記で調製した細胞懸濁液を各ポイントに5 mlで、3トラック9ポイント総量45 ml注入した。Hamilton syringeは50 ml、針は26Gで注入速度は1 ml/minで行った。移植後は2～7ヶ月の期間、飼育した。

[免疫組織染色]

4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した組織切片を過酸化水素水で処理し、血清等でブロッキングした後、一次抗体を反応させた。次に対応する二次抗体で染色を行った。またヘマトキシリン・エオジンを用いて染色も行った。

C. 結果

サルES細胞由来神経幹細胞は移植したカニクイザルの線条体においてTH陽性神経細胞などの神経細胞へ分化することが確認できた。また、神経幹細胞から分化することが確認されているアストロサイトへの分化についても確認出来た。しかしながら、移植細胞中に混入している未分化ES細胞に由来する腫瘍が確認された(図1)。この問題を回避する目的で、我々は分化誘導した神経幹細胞について神経前駆細胞の膜表面に発現しているPSA-NCAMを指標とした細胞分離法を用いて未分化ES細胞を除くことに成功した。この方法を用いて得た細胞をカニクイザルの線条体に移植すると腫瘍を形成することなくTH陽性神経細胞をはじめ様々な神経細胞へ分化することを確認した。

D. 考察

前年度に開発した方法を用いて作製された細胞はin vitro, in vivoにおいて様々な神経細胞へと分化可能な細胞であり、血管神経細胞分化系システムを構築する際に使用可能な細胞であることが明らかとなった。今回の方法を用いて作製されたES由来の神経

細胞は、神経細胞死を指標にin vitroアッセイ系の開発、作用機序解明、毒性評価への利用につながるものと思われる。また、神経突起伸張、シナプス形成を指標にした評価系を構築し、神経突起伸張やシナプス形成を誘導する物質をスクリーニングすることにより、神経再生治療薬等の開発、また、神経変性物質、例えばアルツハイマー病アミロイドなどを低濃度添加することによって誘導サレルシナプス消失や神経突起退縮を抑制する天然物や低分子化合物のスクリーニングに用いることにより、神経変性疾患治療薬の開発につなげるのが期待できる。

E. 結論

ES細胞を用いた研究は様々な研究施設で行われているが、新規薬剤の開発に使用されている例は殆どない。新規薬剤の開発における毒性試験、安全性試験は試験期間が長期に渡る場合が多く、コストもそれに伴い多額になる。ES細胞から分化誘導した細胞を用いて候補薬剤を網羅的に薬効及び副作用を簡便に短時間でスクリーニングすることが出来れば上記の問題点も大きく改善できるものと考えられる。また、動物等を用いた試験の代替法として用いられたならば動物福祉の観点からも大いに喜ばしいことである。

本年度で得られた結果は、ES細胞を用いた新しいタイプの高効率な薬剤スクリーニング構築の足がかりとなりえると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M. Yamamoto, N. Tase, T. Okuno, Y. Kondo, S. Akiba, N. Shimozawa, K. Terao Monitoring of gene expression in differentiation of embryoid bodies from

cynomolgus monkey embryonic stem cells in the presence of bisphenola, *Journal of Toxicological Sciences*, 32, 301-310, 2007.

- 2) M. Sone, H. Itoh, K. Yamahara, J.-K. Yamashita, T.-Y. Kobayashi, A. Nonoguchi, Y. Suzuki, T.-H. Chao, N. Sawada, Y. Fukunaga, K. Miyashita, K. Park, N. Oyamada, N. Sawada, D. Taura, N. Tamura, Y. Kondo, S. Nito, H. Suemori, N. Nakatsuji, S.-I. Nishikawa, K. Nakao. A pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 27, 2127-2134, 2007.
- 3) M. Nakahara, K. Saeki, Y. Yogiashi, A. Kimura, A. Horiuchi, N. Nakamura, A. Yoneda, K. Saeki, S. Matsuyama, M. Nakamura, T. Toda, Y. Kondo, Y. Kaburagi, A. Yuo. The protein expression profile of cynomolgus embryonic stem cells in two-dimensional gel electrophoresis: a successful identification of multiple proteins using human databases. *Journal of Electrophoresis*, 51, 1-8, 2007.

2. 学会発表

- 1) H. Michibata, T. Okuno, N. Konishi, K. Wakimoto, S. Nito, Y. Kondo. The effect of an altered expression level of GPM6A on neural differentiation derived from mouse embryonic stem cells. 5th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Cairns, Australia, Jun. 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

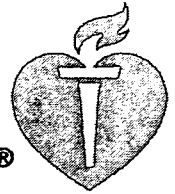
発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sone M, Itoh H, Yamahara K, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Nonoguchi A, Suzuki Y, Chao TH, Sawada N, Fukunaga Y, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Kondo Y, Nito S, Suemori H, Nakatsuji N, Nishikawa S, Nakao K.	Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration.	Arterio Thromb Vasc Biol.	27	2127-34	2007
Park K, Itoh H, Yamahara K, Sone M, Miyashita K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Tsujimoto H, Fukunaga Y, Tamura N, Nakao K.	Therapeutic Potential of Atrial Natriuretic Peptide Administration on Peripheral Arterial Diseases.	Endocrinology	149	483-491	2008
Yamahara K, Sone M, Itoh H, Yamashita J, Yurugi-Kobayashi T, Chao TH, Homma K, Taura D, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Tamura N, Nakao K.	Augmentarion of Neovascularization in Hindlimb Ischemia by Combined Transplantation of Human Embryonic Stem Cells-derived Endothelial and Mural Cells.	PLoS ONE	3	e1666	2008
Shibata M, Yamasaki N, Miyakawa T, Ohtani R, Ihara M, Takahashi R, Tomimoto H	Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion.	Stroke	38 (10)	2826-2832	2007
Ohtani R, Tomimoto H, Wakita H, Kitaguchi H, Nakaji K, Takahashi R	Expression of S100 protein and protective effect of arundic acid on the rat brain in chronic cerebral hypoperfusion	Brain Research	1135 (1)	195-200	2007
Ihara M, Tomimoto H, Ishizu K, Yoshida H, Sawamoto N, Hashikawa K, Fukuyama H	Association of vascular parkinsonism with impaired neuronal integrity in the striatum	J Neural Transm	114 (5)	577-584	2007
Tomimoto H, Lin Jin-Xi, Ihara M, Ohtani R, Matsuo A, Miki Y	Subinsular vascular lesions; an analysis of 119 consecutive autopsied brains.	Eur J Neurol	14 (1)	95-101	2007
Suzuki M, Takamisawa I, Yoshimasa Y, Harano Y.	Association between insulin resistance and endothelial dysfunction in type 2 diabetes and the effects of pioglitazone.	Diabetes Res Clin Pract.	76	12-17	2007

Kawamura M, Itoh H, Yura S, Mogami H, Suga S, Makino H, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Sagawa N, Fujii S.	Undernutrition in utero augments systolic blood pressure and cardiac remodeling in adult mouse offspring: possible involvement of local cardiac angiotensin system in developmental origins of cardiovascular disease.	Endocrinology	148(3)	1218-1225	2007
Ito A, Suganami T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Takeya M, Kamei Y, Ogawa Y	Role of MAPK phosphatase-1 in the induction of monocyte chemoattractant protein-1 during the course of adipocyte hypertrophy.	J Biol Chem	35	25445-25452	2007
Okada S, Makino H, Nagumo A, Sugisawa T, Fujimoto M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Kikuchi-Taura Akie, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y	Circulating CD34-Positive Cell Number Is Associated With Brain Natriuretic Peptide level in Type 2 Diabetic Patients.	Diabetetes Care,	31	157-158	2008
Yanagawa B, Nagaya N.	Adrenomedullin: molecular mechanisms and its role in cardiac disease.	Amino Acids.	32	157-164	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
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
M. Yamamoto, N. Tase, T. Okuno, Y. Kondo, S. Akiba, N. Shimozawa, K. Terao	Monitoring of gene expression in differentiation of embryoid bodies from cynomolgus monkey embryonic stem cells in the presence of bisphenol A	Journal of Toxicological Sciences	32	301-310	2007
M. Nakahara, K. Saeki, Y. Yogiashi, A. Kimura, A. Horiuchi, N. Nakamura, A. Yoneda, K. Saeki, S. Matsuyama, M. Nakamura, T. Toda, Y. Kondo, Y. Kaburagi, A. You.	The protein expression profile of cynomolgus embryonic stem cells in two-dimensional gel electrophoresis: a successful identification of multiple proteins using human databases.	Journal of Electrophoresis	51	1-8	2007

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

American Heart
Association®



Learn and Live SM

Pathway for Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Vascular Cell Components and Their Potential for Vascular Regeneration

Masakatsu Sone, Hiroshi Itoh, Kenichi Yamahara, Jun K. Yamashita, Takami Yurugi-Kobayashi, Akane Nonoguchi, Yutaka Suzuki, Ting-Hsing Chao, Naoki Sawada, Yasutomo Fukunaga, Kazutoshi Miyashita, Kwijun Park, Naofumi Oyamada, Naoya Sawada, Daisuke Taura, Naohisa Tamura, Yasushi Kondo, Shinji Nito, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Shin-Ichi Nishikawa and Kazuwa Nakao
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2007;27;2127-2134; originally published online Sep 13, 2007;

DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.143149

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association,
7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2007 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 1079-5642. Online
ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/full/27/10/2127>

Subscriptions: Information about subscribing to Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular
Biology is online at
<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters
Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax:
410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Pathway for Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Vascular Cell Components and Their Potential for Vascular Regeneration

Masakatsu Sone, Hiroshi Itoh, Kenichi Yamahara, Jun K. Yamashita, Takami Yurugi-Kobayashi, Akane Nonoguchi, Yutaka Suzuki, Ting-Hsing Chao, Naoki Sawada, Yasutomo Fukunaga, Kazutoshi Miyashita, Kwijun Park, Naofumi Oyamada, Naoya Sawada, Daisuke Taura, Naohisa Tamura, Yasushi Kondo, Shinji Nito, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Shin-Ichi Nishikawa, Kazuwa Nakao

Objective—We demonstrated previously that mouse embryonic stem (ES) cell–derived vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGF-*R2*)–positive cells can differentiate into both vascular endothelial cells and mural cells. This time, we investigated kinetics of differentiation of human ES cells to vascular cells and examined their potential as a source for vascular regeneration.

Methods and Results—Unlike mouse ES cells, undifferentiated human ES cells already expressed VEGF-*R2*, but after differentiation, a VEGF-*R2*-positive but tumor rejection antigen 1-60 (TRA1-60)–negative population emerged. These VEGF-*R2*-positive but tumor rejection antigen 1-60–negative cells were also positive for platelet-derived growth factor receptor α and β chains and could be effectively differentiated into both VE-cadherin⁺ endothelial cell and α -smooth muscle actin⁺ mural cell. VE-cadherin⁺ cells, which were also CD34⁺ and VEGF-*R2*⁺ and thought to be endothelial cells in the early differentiation stage, could be expanded while maintaining their maturity. Their transplantation to the hindlimb ischemia model of immunodeficient mice contributed to the construction of new blood vessels and improved blood flow.

Conclusions—We could identify the differentiation process from human ES cells to vascular cell components and demonstrate that expansion and transplantation of vascular cells at the appropriate differentiation stage may constitute a novel strategy for vascular regenerative medicine. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2127-2134.)

Key Words: angiogenesis ■ developmental biology ■ embryonic stem cells ■ vascular biology ■ endothelium

Pluripotent embryonic stem (ES) cells are gaining attention as promising cell sources for regenerative medicine, especially after the establishment of human ES cells.¹ Because the knockout animal research approach is not applicable to humans, investigating human cell development/differentiation using human ES cells is more helpful. These cells possess a number of characteristics distinct from those of mouse ES cells, such as surface antigens, leukemia inhibitory factor independency, and long doubling time.¹ We demonstrated previously that mouse ES cell–derived vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (VEGF-*R2*)–positive cells can differentiate into both vascular endothelial cells (ECs) and mural cells (MCs), the latter composed of pericytes and vascular smooth muscle cells. We termed these mouse VEGF-*R2*⁺

cells “vascular progenitor cells” (VPCs).² We also showed that VEGF and the vasodilating peptide adrenomedullin, which, as we reported previously, enhances angiogenesis,³ play important roles in EC differentiation from these mouse VEGF-*R2*⁺ cells.⁴ However, recent studies have shown that, in undifferentiated human ES cells, unlike in mouse ES cells, VEGF-*R2* is expressed and continues to be expressed during differentiation associated with embryoid body formation.^{5,6} To further clarify the vascular differentiation process in human beings and to determine the possible clinical application of ES cells to vascular regeneration, investigation of human ES cells is essential. It was also found that CD31⁺ cells could be isolated from human embryoid bodies, indicating that they can act as ECs.⁶ However, a precise analysis of the differentiation process

Original received February 27, 2007; final version accepted June 9, 2007.

From the Department of Medicine and Clinical Science (M.S., H.I., K.Y., T.Y.-K., A.N., T.-H.C., Naok.S., Y.F., K.M., K.P., N.O., Naoy.S., D.T., N.T., K.N.), Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan; Department of Internal Medicine (H.I.), Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan; Laboratory of Stem Cell Differentiation (J.K.Y.) and Laboratory of Embryonic Stem Cell Research (H.S.), Stem Cell Research Center, and Department of Development and Differentiation (N.N.), Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan; Discovery Research Laboratory (Y.S., Y.K., S.N.), Tanabe Seiyaku Co, Ltd, Osaka, Japan; Center for Developmental Biology (S.-I.N.), RIKEN, Kobe, Japan.

Correspondence to Hiroshi Itoh, Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. E-mail hiito@kuhp.kyoto-u.ac.jp

© 2007 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.143149

Downloaded from atvb.ahajournals.org at KITAO PUBLICATIONS KEIO IGAKU on March 27, 2008