

立体構造からの適正評価においては、ターゲットHLAのアミノ酸配列の親水性、疎水性、抗原性、アクセスビリティなどを調査し、抗原としての適正を有していることを確認した。また、既存の立体構造データベースや論文情報をもとに立体構造を予測し、前述の絞り込んだ領域が、生体内で抗原提示されやすい場所に位置しているかどうか確認したところ、比較的抗体がアクセスし易い場所であることが予測できた。一方、昆虫細胞の発現系にて、タンパク質の生産・精製のため、遺伝子組換えウィルス感染カイコ蛹を、磨砕・可溶化処理後に超遠心分離を行い、可溶性画分と不溶性画分を分離し、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットで、目的のタンパク質の量や質の確認を行った。精製後、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットでタンパク質の量と質を確認したところ、いずれのタンパク質も、回収率は悪いながらも比較的高純度で精製されていることが確認できた。

②マイクロチップにおける光硬化性樹脂濃度の検討においては、スライドガラス上に滴下した各濃度の光硬化性樹脂に対して光照射を行ない、光硬化状態について検討を行った。その結果、6%以上の濃度の光硬化性樹脂については、光照射による硬化が認められた。さらに、30%以上の濃度の光硬化性樹脂については、硬化した樹脂がスライドガラスから脱落することが明らかとなった。一方、抗体固相化に用いる微小ポリスチレンビーズ径、抗体濃度、抗体吸着時間の検討では、各直径のマイクロビーズに対し、各濃度の抗ヒトIgE抗体を経時的に反応させた。そして反応終了後のマイクロビーズを用いてイムノアッセイ系を行ない、最適な抗体固相化条件について検討を行った。その結果、対し、50  $\mu\text{g/ml}$  の抗ヒトIgE抗体を終夜反応させた1  $\mu\text{m}$  のマイクロビーズを用いたイムノアッセイが最も高感度であることが明らかとなった

③レーザーを用いた拒絶反応制御ナノ免疫抑制薬剤の開発においては、三種類の難水溶性免疫抑制剤について、レーザー照射によるナノ粒子水分散化を試みた。FK506においては、貧溶媒として水を使用し、試料は免疫抑制剤FK506を使用した。攪拌により水中にFK506微結晶を浮遊分散させ、パルスレーザー照射を行った。レーザー照射によってFK506が分解していることが分かった。FK-778においては、レーザ

ー照射後のFK-778 / エタノール溶液の吸収スペクトルは未照射のものと一致していることから、レーザー照射によってFK-778は分解せずにナノ粒子化できていることが確認できた。薬剤Aにおいては、レーザー照射後のセルの底には、沈殿物がほとんど見られないことまた、分散液の色が濃くなった点からも、水中に分散している粒子の濃度は高くなったことが確認できた。

④心臓移植モデルでのDe nova抗体による急性、慢性拒絶反応の検討では、GFP/F344-Tg、HLAB27/F344-Tg、HLAB27・GFP/F344-Tg ラットをドナー、F344 ラットに移植後、HLAB27/F344-Tg 群では、移植心の生存期間が平均49.5  $\pm$  25 日で、慢性拒絶反応によって、心臓が拒絶された。GFP/F344-Tg 群では、移植心の生存が全例100日を超え、拒絶反応が全く起きてない。一方、HLAB27・GFP/F344-Tg ラットをドナーした群では、5~24日の間(平均14.9  $\pm$  7.0)で、すべて移植心が急性或は亜慢性拒絶反応によって、拒絶された。また、移植後ラット血中には抗HLA-B27抗原のIgG抗体が移植後7日から産生され、21日にはピクに達したことを明らかにした。

⑤ラットの腎移植モデルを用いたCD28スーパーアゴニスト抗体の拒絶反応に対して抑制効果の検討においては、無治療群では10日前後で急性拒絶反応により全例死亡したが、CD28スーパーアゴニスト抗体群では、10例中1例が術後30日で死亡したが、残りは100日以上生存した。移植腎に浸潤した細胞において、抗体投与群では、間質内に多くのFoxp3陽性の制御性T細胞の浸潤が認められ、ED1陽性のマクロファージ浸潤が抑制されていた。さらに、腎臓移植後120日目のレシピエントに、移植腎と同じWistarおよびthird partyであるBNラットをドナーとした2つの心臓移植を施行し、抗体投与により移植腎が生着したLewisラットは拒絶反応を起こさず、移植した心臓は生着する。Third partyであるBNラットから移植した心臓は、移植後速やかに拒絶されることが確認された。

⑥慢性的肥満や高血圧を発症する慢性腎症のモデルにおいては、腎内TGF- $\beta$ の発現とともに糸球体硬化、足細胞障害、間質の線維化などの慢性腎症に特徴的な病理変化と尿蛋白増加などの

症状が出現していることが示唆された。以上から、これらは、慢性移植腎症における病態の診断や治療への応用のためにも基礎的な理解を提供するものと思われる。

⑦慢性移植腎症に深く関わっている glyocalyx 傷害の移植腎障害へ及ぼす影響の検討においては、正常ヒト腎生検組織を用い、鉄コロイド染色を行う際のPH条件を検討し、pH1.5で最適の染色性が得られることが確認され、糸球体および傍尿細管血管内皮細胞の glyocalyx は酸性糖鎖であることが確認された。次に、慢性移植腎症・C4d陽性移植腎患者の生検における染色性を正常腎と比較検討した。正常では糸球体内皮細胞、傍尿細管血管内皮細胞および尿細管細胞のbrush borderに染色性が認められるのに対し、C4d陽性移植腎患者の生検では、糸球体内皮細胞の glyocalyx の染色性は保たれているにも関わらず、傍尿細管血管内皮細胞ではほとんど染色性は失われていた。一方、慢性移植腎症の腎生検組織では、傍尿細管血管内皮細胞のみならず、糸球体内皮細胞においても染色性が失われていることが確認された。

#### D. 考察

本研究では、最新の遺伝子・タンパク質情報、バイオインフォマティクス技術、検出技術を高度に統合することにより、画期的な抗HLA抗体検出用プロテインチップの開発を行うことを目的としている。また、二年目から、従来の免疫抑制剤では成し得なかった「薬効の増大」と「副作用の減少」を達成できるナノ製剤の開発を含めた新規治療法の確立を目的とする研究を行った。

①慢性移植腎症の発症に関わる抗HLA抗体診断用プロテインチップの開発のために、主に、パブリックに公開されているHLAに関する多様性の情報を収集し、日本人の多様性、抗原特異性、抗原性、安定性などを考慮し、検出に最適なHLAの抗原領域の決定を行い、代表的なHLAとして、HLA-DR4およびHLA-A2を選択し、これらを中心に研究を行った。

②HLA抗体が結合するHLA分子あるいはそのミミックを基板上に固相化および抗体認識部位構造の保持等の検討においては、血漿分離デバイスを有する免疫分析マイクロチップにおいて、

全血を滴下するのみで、血漿分離及び免疫測定を行えた。本デバイスによって遠心分離操作が不要になることから、サンプルをセットしてから測定までを全自動で行う測定機器の開発には非常に有利となる。一方、今回抗HLA抗体に反応する各種ミミックペプチドを見つけることができなかった。

③レーザーを用いた拒絶反応制御ナノ免疫抑制剤の開発においては、LiNTECを用いることにより、難水溶性免疫作用を有する三種類（FK506、FK778、薬剤A）のナノ粒子水分散液作製を試みた結果、二種類（FK778、薬剤A）免疫抑制作用を有する薬剤のナノ粒子水分散化に成功した。

④心臓移植モデルでのDe nova抗体による急性、慢性拒絶反応の検討においては、近交系F344ラットへ各種類のTgF344ラット（GFP/F344-Tg、HLAB27/F344-Tg、HLAB27・GFP/F344-Tg）をドナーとする同種同系移植実験の結果、GFP/F344-Tgの異所性心臓移植では、全例生着し、HLAB27/F344-Tgでは、全例慢性拒絶反応により40日以内に移植心を拒絶するものがある事を見いだした。また、その拒絶反応は血中のDe nova抗HLAクラスI抗体と密接な関係を明らかにした。

⑤ラットの腎移植モデルを用いたCD28スーパーアゴニスト抗体の拒絶反応に対して抑制効果の検討においては、抗体を直接投与しない方法として、レシピエントから制御性T細胞を分離し、in vitroで抗体を添加して培養した後、レシピエントに移植する方法も考えられる。制御性T細胞が、抗原特異的な免疫寛容を獲得する可能性を考慮すると、培養時にドナー細胞と共培養すれば、ドナー抗原特異的な制御性T細胞を得ることができる可能と考えられる。

⑥慢性の肥満や高血圧を発症する慢性腎症のモデルにおいては、腎内TGF- $\beta$ の発現とともに糸球体硬化、足細胞障害、間質の線維化などの慢性腎症に特徴的な病理変化と尿蛋白増加などの症状が出現していることが示唆された。

⑦慢性移植腎症に深く関わっている glyocalyx 傷害の移植腎障害へ及ぼす影響の検討においては、正常ヒト腎生検組織、慢性

移植腎症移植腎組織およびラットシクロスボリン腎症モデルを用いて、慢性移植腎症傷害の進展に glycocaryx 障害が関与する可能性が示唆された。特に、慢性移植腎症における尿細管間質障害にシクロスボリンの腎毒性が関与していることが示唆された。

#### E. 結論

①本研究で精製した5つのリコンビナントタンパク質を用いて、実際に抗原としての適正評価を行うこととした；②免疫マイクロチップ法にてマイクロチップイムノアッセイによりヒトIgE抗体の測定を行なうことができた；③従来の免疫抑制剤では成し得なかった「薬効の増大」と「副作用の減少」を達成するため、LiNTECにて検討を行い、二種類免疫抑制薬剤のナノ粒子水分散化に成功した；④トランスジェニックラットを用いて、De nova抗体による急性、慢性拒絶反応を示す事が明らかになった；⑤CD28スーパーアゴニスト抗体によるラットの腎移植後特異的な免疫寛容が誘導され、拒絶反応の抑制効果が示唆された；⑥慢性腎症を自然発症するモデルラットを用いて、移植片や慢性の腎症をきたす病態においてはその局所における微小循環系の再生や細胞動態を観察することができた；⑦移植腎における glycocaryx 障害は、移植腎傷害のマーカーとなる可能性を示唆した。

二年間、主に上記七つのテーマにおいて、研究を進めてきた。プロテインチップによる抗HLA抗体の検出およびその発生機序の解明ができれば、慢性移植腎症の発症に関わる抗体関連型慢性拒絶反応の病態が解明され、移植腎障害機序の最大の危険要因である拒絶反応の予防と治療対策において非常に有用である。本研究の成果は移植腎永久生着の可能性を広げる画期的な診断法・治療法であると考えられる。また、従来の免疫抑制剤では成し得なかった「薬効の増大」と「副作用の減少」を達成できるナノ製剤の開発を含めたテーラーメイドの移植医療の確立および腎移植の発展に寄与することを期待したい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Funeshima-Fuji N, Fujino M, Xie L, Kimura H, Takahara S, Ezaki T, Zhu BT, Li X-K. Prolongation of rat major histocompatibility complex-compatible cardiac allograft

survival during pregnancy. **J Heart Lung Transplant** 28(2): 17682; 2009.

2) Azuma H, Isaka Y, Li X-K, Hunig T, Skamoto T, Takabatake Y, Mizui M, Kitazawa Y, Ichimaru N, Ibuki N, Inamoto T, Katsuoka Y, Takahara S. Superagonistic CD28 antibody induces donor-specific tolerance in rat renal allografts. **Am J Transplant** 8(10): 2004-14; 2008.

3) Kitazawa Y, Fujino M, Sakai T, Azumu H, Kimura H, Isaka Y, Takahara S, Hünig T, Abe R, Li X-K. Foxp3-expressing regulatory T-cells expanded with CD28 superagonist antibody prevent rat cardiac allograft rejection. **J Heart Lung Transplant** 27(4): 362-71; 2008.

4) Funeshima-Fuji N, Fujino M, Kimura H, Takahara S, Nakayama T, Ezaki T, Li X-K. Survival of skin allografts is prolonged in mice with a dominant-negative H-Ras. **Transpl Immunol** 18(4): 302-6; 2008.

5) Ichimaru N, Takahara S. Japan's experience with living-donor kidney transplantation across ABO barriers. **Nature clinical practice** 4:682-92, 2008.

6) Suzuki, C., Y. Isaka, S. Shimizu, Y. Tsujimoto, Y. Takabatake, T. Ito, S. Takahara, and E. Imai. Bel-2 protects tubular epithelial cells from ischemia reperfusion injury by inhibiting apoptosis. **Cell Transplant** 17: 223-9, 2008.

7) Zhang, D., Y. Isaka, R. Imamura, Ichimaru, Y. Shi, E. Imai, Y. Tian, A. Otsuka, and S. Takahara. Glycocalyx damage as estimated by colloidal iron method. **Cell Transplant** 17: 159-63, 2008.

8) Kitamura, H., Y. Isaka, Y. Takabatake, R. Imamura, C. Suzuki, S. Takahara, E. Imai, Nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects against tubulointerstitial injury in unilateral ureteral obstruction model. **Nephrol Dial Transplant** 23: 1521-8, 2008.

9) Tsukamoto, T, Tanaka, M, Komiya, T, Unda, S, Takasu, K, Takahara, S, Koizumi, A, Muso, E, Nephronophthisis complicated with hepatic fibrosis: an autopsy case with rupture of the splenic artery after renal transplantation:

**Clin Exp Nephrol** 12:82-88, 2008.

10) Nishimura, K, Arichi, N, Tokugawa, S, Yoshioka, I, Namba, Y, Kishikawa, H, Takahara, S, and Ichikawa, Y, Hepatocyte growth factor and interleukin-6 in combination with prostate volume are possible prostate cancer tumor markers in patients with gray-zone PSA levels: **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**

11:258-263, 2008.

11) Isaka Y, Takahara S, Imai E. Chronic deteriorating renal function and renal fibrosis. **Contributions to Nephrology** 159: 109-121, 2008.

12) Isaka, Y, Imai, E, Takahara, S and Rakugi, H Oligonucleotidic therapeutics: **Expert Opin. Drug Discov** 3(9), 991-996, 2008.

13) Ayako Nakamura-Ishizu, Shunichi Morikawa, Kazuhiko Shimizu, Taichi Ezaki; Characterization of sinusoidal endothelial cells of the liver and bone marrow using an intravital lectin injection method. **J Mol Hist** 39, 471-479, 2008.

14) Morita M, Fujino M, Li X-K\*, Kimura H, Nakayama T, Taniguchi M, Sugioka A. Spontaneous tolerance involving natural killer T cells after hepatic grafting in mice. **Transpl Immunol** 18(2): 142-5; 2007.

15) Hara Y, Funeshima-Fuji N, Fujino M, Tokunaka K, Abe F, Sato Y, Hatakeyama K, Takahara S, Ezaki T, Kimura H, Li X-K. A novel chemical compound, NK026680, targets dendritic cells to prolong recipient survival after rat liver grafting. **Transplantation** 84(3):407-414; 2007.

16) Kitazawa Y, Fujino M, Wang QX, Kimura H, Azuma M, Kubo M, Abe R, Li X-K. Involvement of the PD-1/PD-L1 pathway in CD4+CD25+ regulatory T cells activity to suppress alloimmune responses. **Transplantation** 83(6):774-782; 2007.

17) Imamura, R., Y. Isaka, N. Ichimaru, S. Takahara, and A. Okuyama. Carbamylated erythropoietin protects the kidneys from ischemia-reperfusion injury without stimulating erythropoiesis. **Biochem Biophys Res Commun** 353:786-792; 2007.

18) Imamura, R., T. Moriyama, Y. Isaka, Y. Namba, N. Ichimaru, S. Takahara, and A. Okuyama. Erythropoietin protects the kidneys against ischemia reperfusion injury by activating hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ . **Transplantation** 83:1371-1379; 2007.

## 2. 学会発表

1) 李 小康、北沢祐介、東 治人、猪阪義隆、高原史郎 CD28superagonist を用いた免疫寛容誘導 第44回日本移植学会総会 大阪 平成20年9月19日~21日.

2) 李 小康 移植免疫寛容の誘導・維持機序の解明および免疫制御細胞療法の確立 第36回日本臨床免疫学会総会 東京 平成20年10月17日~18日.

3) 高原 史郎 最新の話—腎臓移植の保険適応について— 日本移植学会 Renal Transplantation Forum 2008/1/18

4) 高原 史郎 大阪大学腎移植グループでの腎移植研修カリキュラム 第41回日本透析医学会総会 2008/6/20

5) 高原 史郎 既存抗体陽性症例に対するIVIG療法 第44回日本移植学会総会 2008/9/21

6) 江崎太一: 局所変化に伴う内皮と中皮の相関性は?, 第113回日本解剖学会総会・シンポジウム13, 大分, 2008年3月27日

7) 江崎太一、出崎順三、遠藤千穂、中田和子、山崎康子、笠原弘美: リンパ管腫の誘導による脂肪の吸収・排導の局所変化, 第114回日本解剖学会総会、岡山、2008年3月29日

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1) WO 2007/074756 免疫分析マイクロチップ、免疫分析用キット及び免疫分析方法

2) 血漿分離デバイスを有する免疫分析マイクロチップ (出願準備中)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 慢性移植腎症の発症に関わる抗HLA抗体検出のための 診断用プロテインチップの開発および抗体産生機序の 解明に関する研究

所属 国立成育医療センター研究所  
移植・外科研究部  
研究者 梨井 康

研究要旨：従来の免疫抑制剤では成し得なかった「薬効の増大」と「副作用の減少」を達成するため、LiNTECにて検討を行い、二種類免疫抑制薬剤のナノ粒子水分散化に成功した。また、不溶化した各種ミミックペプチドを可溶化し天然型HLAと同様の三次構造の形成を検討した。さらに、トランスジェニックラットを用いて、De nova抗体による急性、慢性拒絶反応を示す事が明らかにし、CD28スーパーアゴニスト抗体によるラットの腎移植後特異的な免疫寛容が誘導され、拒絶反応の抑制効果を示唆した。一方、慢性腎症を自然発症するモデルラットを用いて、移植片や慢性の腎症をきたす病態においてはその局所における微小循環系の再生や細胞動態を観察することができた。

### 分担研究者

- |                                |      |
|--------------------------------|------|
| (1) 国立成育医療センター研究所<br>共同研究管理室   | 木村廣光 |
| (2) 大阪大学大学院医学系研究科<br>先端移植基盤医療学 | 高原史郎 |
| (3) ABsize 株式会社<br>大阪大学工学部     | 王 勇  |
| (4) マイクロ化学技研(株)                | 江端智彦 |
| (5) 東京女子医科大学医学部<br>解剖学・発生生物学講座 | 江崎太一 |
| (6) (株)メディビック                  | 中江裕樹 |
| (7) アステラス製薬(株)                 | 浅野雅之 |
| (8) 中外製薬(株)                    | 内田智昭 |
| (9) 田辺三菱製薬(株)                  | 大和俊介 |
| (10) 旭化成ファーマ(株)                | 伊東裕通 |

常に少ないうえ、移植腎長期生着率が低いことが、移植医療の、慢性腎不全の決定的な治療方法としての確立を妨げている。慢性移植腎症の発症には、抗体関連型慢性拒絶反応、とりわけ抗ドナー特異的抗体が深く関わっていると報告されている。近年、古典的血清学的交差試験に加え、抗HLA抗体を検出する方法が開発され、抗ドナー抗体関連拒絶反応の病態と病理解析が進んでいるが、特異性、簡便性、精度などの問題点があった。本研究は、慢性移植腎症の発症に関わる抗HLA抗体を検出するための、日本人のHLA多様性に対応した高精度で簡便なプロテインチップの開発および抗体産生機序の解明による新規治療法の確立を目的とする。昨年度の研究成果を踏まえて、本年度は、研究班全体が主に ①レーザーを用いた拒絶反応制御ナノ免疫抑制薬剤の開発； ②抗HLA抗体が結合するHLA分子あるいはそのミミックを基板上に固相化および抗体認識部位構造の保持等の検討； ③トランスジェニックラットを用いた心臓移植モデルでのDe nova抗体による急性、慢性拒絶反応の検討； ④ラットの腎移植モデルを用いたCD28スーパーアゴニスト抗体の拒絶反応に対して抑制効果の検討；⑤メタボリック症候群

### A. 研究目的

現在わが国では、慢性透析患者数は25万人を超えてきており、その医療費は1兆円を超え、国民総医療費の3%を占めるとも言われ、大きな問題となっている。その主な原因となっている慢性腎不全の透析医療における、現在唯一の解決策は腎移植である。しかし、年々増大する慢性腎不全患者数に対し、ドナー腎の提供は非

にともなう慢性腎症を自然発症するモデルラットにおける慢性的腎症障害の解析など、5つのテーマを分けて検討を行った。

## B. 研究方法

①レーザーを用いた拒絶反応制御ナノ免疫抑制薬剤の開発について、LiNTECという技術を用いた。LiNTECとは、貧溶媒中（対象物質がほとんど溶解しない溶媒）に、対象微結晶を加え、攪拌浮遊させる（図1）。その結晶に高強度のレーザーを照射するとレーザーアブレーション（レーザー粉砕）が誘起され、結晶表面からナノ粒子が噴出する。このナノ粒子を貧溶媒中で効率よく回収することにより、ナノ粒子を液中で分散した形態として得ることができる技術である。



図1、LiNTEC技術概念図

LiNTEC技術の特徴は、1) 顔料・炭素材料・薬剤等の幅広い物質への適用が可能；2) 非接触であり、他の技術（DDS技術）への併用が可能；3) 作製時に熱が発生しない等が挙げられる。また、LiNTECにより作製したナノ粒子及びナノ粒子水分散液の特徴は、1) レーザーの可変パラメータを調節することにより20～150 nmのナノ粒子作製が可能；2) 狭いサイズ分布；3) レーザー照射による高い分散安定性等が挙げられる。

②慢性移植腎症の発症に関わる抗HLA抗体診断用のプロテインチップ作製のためには、抗HLA抗体が結合するHLA分子あるいはそのミミックを基板上に固相化する技術が必要である。慢性移植腎症の発症に関わる抗HLA抗体診断用のプロテインチップとしては、親水性光硬化性樹脂マイクロチップ免疫アッセイを用いることとした（WO2007/074756）。本技術は、任意の形状で抗体を液相と同様の状態で容易に固相化することができること、マイクロチップを用いるこ

とにより分子の移動距離が短縮され迅速に結果が得られる、またキャピラリー力のみで送液が可能であることから操作が容易であるといった特長を有する（図2）。

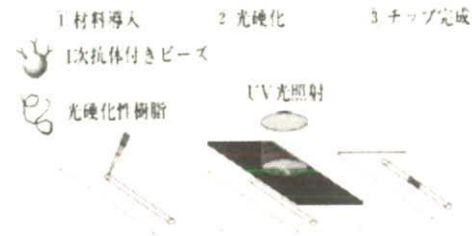


図2. 親水性光硬化性樹脂を利用したマイクロチップ免疫アッセイ用のマイクロチップの作製法

同チップにて抗HLA抗体診断を行うにあたっては、レシピエントの血液を採取した後遠心分離機等にて血漿または血清を分離してサンプルとして用いる。本研究では、より操作を簡略化することを目的とし、全血にて診断を行うことが可能となるデバイスについて検討を行った。具体的には、図3に示すように、サンプル導入口に血漿分離フィルターと血液添加用のチャンバーを付加したマイクロチップを作製した。チャンバー内に全血を添加すると、血球はフィルターにてトラップされ、血漿はキャピラリー力で抗体固定部を含むチャンネル内に導入されることが期待される。実際の免疫分析に関しては、C反応性蛋白（C-reactive protein; CRP）測定系にて検討を行った。

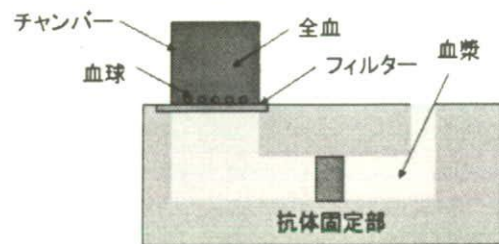


図3. 血漿分離デバイスを有する免疫分析マイクロチップ

また昨年度中江らによって作製されたHLA-DR4およびHLA-A2の各種ミミックペプチド（図4）について、マイクロプレートを用いたサンドイッチELISA法により評価を行った（図5）。

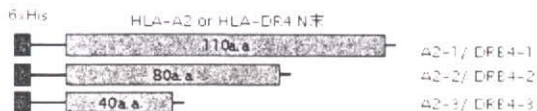


図4. HLA-DR4 およびHLA-A2 の各種ミミックペプチド

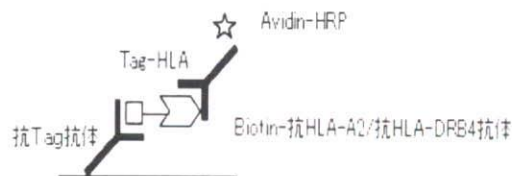


図5. 各種ミミックペプチドの評価系

③心臓移植モデルでのDe nova抗体による急性、慢性拒絶反応の検討においては、まず、F344 ラット、EGFP-transgenicF344 ラット（以下 GFP/F344-Tg ラット）、ならびにHLA-B27 抗原発現近交系HLAB27-transgenicf344 ラット（以下HLAB27/F344-Tg ラット）を用い、雌HLAB27/F344-Tgと雄GFP/F344-Tgラット交配し、GFP/F344-Tg、HLAB27/F344-Tg、HLAB27、GFP ダブル陽性F344（以下HLAB27・GFP/F344-Tgラット）、F344 四種類のラットを作成した。HLAB27、GFP 遺伝子特異的に検出するプライマーを用いて、PCR 法にて、スクリーニングを実施し、実験に供与した。つぎ、GFP/F344-Tg、HLAB27/F344-Tg、HLAB27・GFP/F344-Tg ラットをドナー、F344 ラットをレシピエントとした頸部異所性心臓移植拒絶反応モデルを作製した。移植後、頸部の移植心の拍動を毎日観察し、その生着期間を検討した。また、各グループの移植心臓を停止した時点で、サンプリングした後、HE 染色を行い、病理組織の変化を検討した。さらに、HLAB27/F344-Tg 胸腺細胞をターゲット、移植後ラット血清（De nova 抗体を含む）を評価サンプルとして反応させ、逐次、間接的に抗体を反応させた後、FACS を行い、蛍光強度の強さにて抗体の有無と半定量的な抗体量の測定を行った。

④ラットの腎移植モデルを用いたCD28 スーパーアゴニスト抗体の拒絶反応に対して抑制効果の検討においては、Wistar をドナー、Lewis をレシピエントとした移植腎急性拒絶反応モデルを作製し、腎臓移植の3日前、当日および3日後にCD28 スーパーアゴニスト抗体を投与した。その移植腎生着延長効果を検討した。また、腎移植後、フローサイトメトリーにて、末梢血・

脾臓・腎臓におけるCD4+Foxp3+制御性T細胞の割合を検討した。さらに、Lewis ラットにCD28 スーパーアゴニスト抗体を投与し、3日後CD4+CD25+制御性T細胞とCD4+CD25-細胞を分離した。CD4+CD25+細胞もしくはCD4+CD25-細胞を投与したLewisラットに、Wistarラットから腎臓移植を行い、移植腎生着期間への効果を検討した。一方、CD28 スーパーアゴニスト抗体を投与により移植腎が生着し免疫寛容が成立したと考えられる、腎臓移植後120日目のレシピエントに、移植腎と同じWistarおよびthird partyであるBNラットをドナーとした2つの心臓移植を施行した。

⑤メタボリック症候群にともなう慢性腎症を自然発症するモデルラットにおける慢性の腎症障害の解析においては、慢性腎症を自然発症するモデルラット(SHR/NDmcr-cp; CP)は加齢に伴う肥満や高血圧に伴う慢性腎症をきたすため、その組織変化の特徴を形態学的(電顕、PAS 染色、Azan 染色、PCNA 染色、IV型 collagen免疫染色、他)、機能的(血圧、尿蛋白、クレアチンクレアランスなど)に解析し、慢性腎症の発症および病態変化に対する基礎的理解を得ることとした。

#### (倫理面への配慮)

本実験を遂行するにあたり、動物実験では各施設の実験動物指針マニュアルに則り、また、遺伝子操作に関しては、各施設の遺伝子組み換え実験等の規約・マニュアルを遵守し、実験を遂行した。動物愛護の観点にも配慮し、実験に用いる動物は最低限とすると共に、出来る限りin vitroの系で代用するように心がけた。

#### C. 研究結果

①レーザーを用いた拒絶反応制御ナノ免疫抑制剤の開発においては、3種類の難水溶性免疫抑制剤について、レーザー照射によるナノ粒子水分散化を試みた。貧溶媒として水を使用し、薬剤は、免疫抑制作用を有するFK-506、FK-778及び薬剤Aを用いた。

1) FK-506においては、貧溶媒として水を使用し、試料は免疫抑制剤FK-506を使用した。攪拌により水中にFK-506微結晶を浮遊分散させ、パルスレーザー照射を行った。レーザー光強度が高くなるにつれ、吸光度の増加が見られた。しかし、レーザー光強度が高くなるにつれ、レーザー照射後の分散液の吸収スペク

トルは未照射のものとは明らかに形状が異なってくることで、また分散液に色が着いてくる点などから、レーザー照射によってFK-506が分解していることが分かった。

2) FK-778においては、貧溶媒として水を使用し、試料は免疫抑制剤FK-778を使用した。攪拌により水中にFK-778微結晶を浮遊分散させ、パルスレーザー照射を行った。レーザー照射後のFK-778分散液の吸収スペクトル形状は、未照射のものと同様のことから、レーザー照射によって水中に分散しているFK-778が分解せずにナノ粒子化できていることが考えられる。レーザー照射によってFK-778が分解していないかどうか確認するために、次のような操作を行った。レーザー照射後のナノ粒子水分散液の上澄み液を取り、水を除去した後、エタノールを加え溶解させた。また、レーザー未照射の懸濁液は、攪拌子を用いてセルの底に沈んでいた粒子を浮遊分散させ、液を取り、水を除去した後、エタノールを加え溶解させた。レーザー照射後のFK-778 / エタノール溶液の吸収スペクトルは未照射のものと一致していることから、レーザー照射によってFK-778は分解せずにナノ粒子化できていることが確認できた。

3) 薬剤Aにおいては、貧溶媒として水を使用し、試料は免疫抑制剤を使用した。攪拌により水中に薬剤A微結晶を浮遊分散させ、パルスレーザー照射を行った。波長：355 nm、照射時間：10分間照射による薬剤A懸濁液( $8.8 \times 10^5$  M)に対するレーザー光強度依存性の実験を行った。レーザー光強度が高くなるにつれ、300 nm付近のピーク吸光度が増加していくことから、レーザー光強度が高くなるにつれ、水中に分散している粒子の濃度は高くなることが確認できた。また、レーザー照射後のセルの底には、沈殿物がほとんど見られないことまた、分散液の色が濃くなった点からも、水中に分散している粒子の濃度は高くなったことが確認できた。

②血漿分離デバイスを有する免疫分析マイクロチップの検討においては、血漿分離デバイスを有する免疫分析マイクロチップに対し、穿刺採血により採取した全血(20 $\mu$ l)を添加し、チャンネル内への血漿導入について検討を行った。その結果、チャンネル内に分離された血漿が導入された。また、CRP測定系にて、実際の免疫分析

について検討を行ったところ、従来の血清サンプルを用いた検討と同様の測定結果が得られた。一方、各種ミミックペプチドの可溶性画分と可溶化した不溶性画分について、抗HLA抗体に対する反応性の検討を行ったが、抗HLA抗体にして反応する画分は得られなかった。

③心臓移植モデルでのDe nova抗体による急性、慢性拒絶反応の検討では、まず雌HLAB27/F344-Tgと雄GFP/F344-Tgラット交配し、出産後GFP/F344-Tg、HLAB27/F344-Tg、HLAB27、HLAB27・GFP/F344-Tgラット、F344四種類のラットを25%の割合で確定し、実験に供与した。次、GFP/F344-Tg、HLAB27/F344-Tg、HLAB27・GFP/F344-Tgラットをドナー、F344ラットをレシピエントとした頸部異所性心臓移植拒絶反応モデルを作製した。移植後、頸部の移植心の拍動を毎日観察し、その生着期間を検討したところ、図6で示したように、HLAB27/F344-Tg群では、移植心の生存期間が平均49.5 $\pm$ 25日で、慢性拒絶反応によって、心臓が拒絶された。その内の一匹は100日を超えた。GFP/F344-Tg群では、移植心の生存が全例100日を超え、拒絶反応が全く起きてない。一方、HLAB27・GFP/F344-Tgラットをドナーとした群では、5~24日の間(平均14.9 $\pm$ 7.0)で、すべて移植心が急性或は亜慢性拒絶反応によって、拒絶された。さらに、HLAB27/F344-Tg胸腺細胞をターゲットとし、移植後ラットから経時的に(Day7, 14, 21, 28)採集された血清(De nova抗体を含む)を非動化し(56 $^{\circ}$ C, 30 min)、評価サンプルとして反応させ、その後、FITC標識2次抗体を反応させ、FACSにて蛍光強度の強さによる抗体の有無と半定量的な抗体量の測定を行った。図7で示したように、移植後ラット血中には抗HLA-B27抗原のIgG抗体が移植後7日から産生され、21日にはピクに達し、その後下がって行くことを明らかになった。一方、抗HLA-B27抗体のIgMタイプでは、移植後早い時期に上昇し、7日がピクに達し、その後下がり、正常に戻った。また、HLAB27/F344-TgとHLAB27・GFP/F344-Tgラットの比較においては、IgG、IgMとも有意な差が認められた。

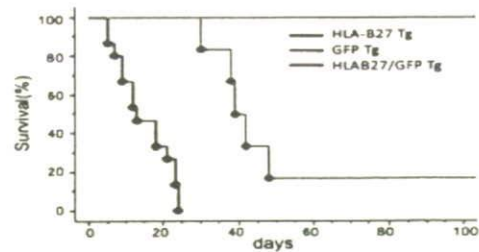




図6. 移植心の生着期間

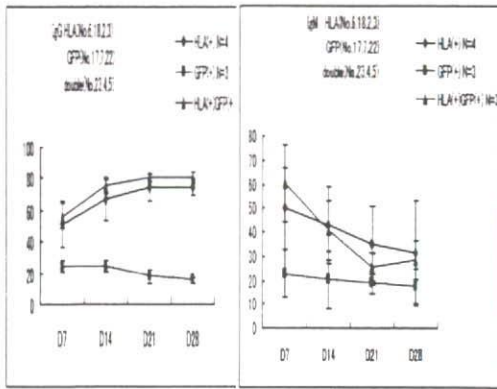


図7. 心移植ラット血中抗体測定値

④ラットの腎移植モデルを用いたCD28 スーパーアゴニスト抗体の拒絶反応に対して抑制効果の検討においては、Wistar をドナー、Lewis をレシピエントとした移植腎急性拒絶反応モデルを作製し、腎臓移植の3日前、当日および3日後にCD28 スーパーアゴニスト抗体を投与した。mouse IgG (mIgG) 投与群および無治療群では10日前後で急性拒絶反応により全例死亡したが、CD28 スーパーアゴニスト抗体群では、10例中1例が術後30日で死亡したが、残りは100日以上生存した。腎移植後6日目に、フローサイトメトリーにて、末梢血・脾臓・腎臓におけるCD4+Foxp3+制御性T細胞の割合を検討したところ、CD28 スーパーアゴニスト抗体投与群では、mIgG 投与群や腎臓移植を受けていないLewis ラットと比べてCD4+Foxp3+制御性T細胞が著増していることが確認できた。移植腎に浸潤した細胞を免疫染色にて検討すると、mIgG 投与群では、マクロファージのマーカーであるED1 陽性細胞が著明に移植腎に浸潤していたが、Foxp3 陽性の制御性T細胞の浸潤はほとんど認めなかった。一方、CD28 スーパーアゴニスト抗体投与群では、間質内に多くのFoxp3 陽性の制御性T細胞の浸潤が認められたのに対し、ED1 陽性のマクロファージ浸潤が抑制されていた。

上述した移植腎の生着期間の延長が、CD28 スーパーアゴニスト抗体による直接作用なのか、あるいはCD28 スーパーアゴニスト抗体による制御性T細胞の増加を介した間接作用によるものかを検討するために、制御性T細胞の移植実

験を行った。Lewis ラットにCD28 スーパーアゴニスト抗体を投与し、3日後CD4+CD25+制御性T細胞とCD4+CD25-細胞を分離した。CD4+CD25+細胞もしくはCD4+CD25-細胞を投与したLewis ラットに、Wistar ラットから腎臓移植を行い、移植腎生着期間への効果を検討した。CD4+CD25-細胞を投与したラットでは、移植腎はほぼ移植後10日目に廃絶したが、CD4+CD25+細胞の投与を受けたラットでは、移植腎の生着期間が延長したことから、移植腎の生着期間の延長はCD28 スーパーアゴニスト抗体による制御性T細胞の増加を介したものであることが確認された。さらに、CD28 スーパーアゴニスト抗体を投与により移植腎が生着し免疫寛容が成立したと考えられる、腎臓移植後120日目のレシピエントに、移植腎と同じWistar およびthird partyであるBN ラットをドナーとした2つの心臓移植を施行した。図8で示したように、Wistar をドナーとした移植心は、ナイーブのLewis ラットに移植した場合はすぐに拒絶されてしまうが、CD28 スーパーアゴニスト抗体投与により移植腎が生着したLewis ラットは拒絶反応を起こさず、移植した心臓は生着する。しかしながら、third partyであるBN ラットから移植した心臓は、移植後速やかに拒絶されることが確認された。

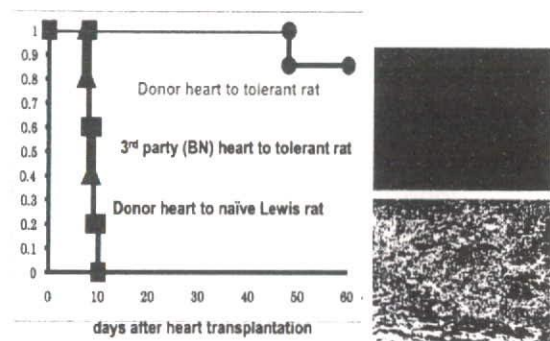


図8. 腎移植後120日目に、心臓移植を行い、Wistar ラットの心臓は拒絶反応をきたさないが、BN ラットからの心臓は、急性拒絶反応を示した。

⑤メタボリック症候群にともなう慢性腎症を自然発症するモデルラットにおける慢性的腎症障害の解析においては、CP ラットが有意の体重増加が見られる10週齢以前から、血圧上昇、尿蛋白増加、クレアチニンクリアランス低下が確認されたが、腎内TGF-βの発現上昇とともに、

光顕的に糸球体硬化、尿細管間質の線維化、PCNA陽性細胞増加(図9)、電顕的には糸球体基底膜の肥厚や足細胞の突起の融合や扁平化、血管内皮やメザンギウム細胞の障害像、などが観察された(図10)。

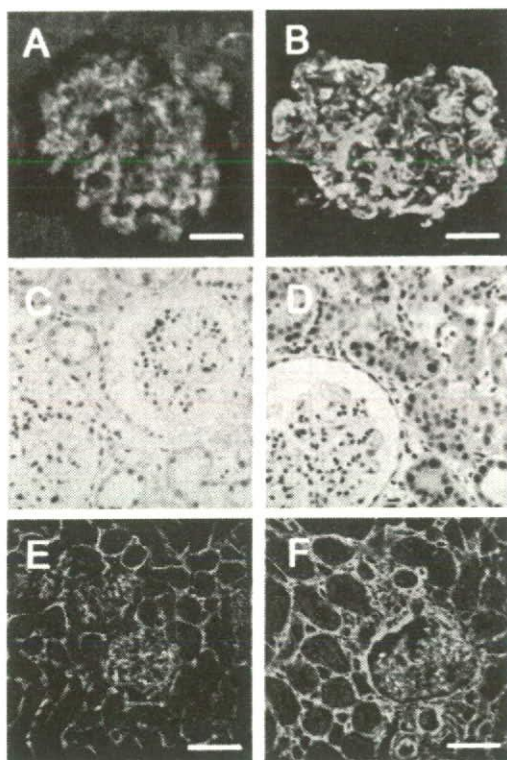


図9. 生後21週齢におけるCPラット腎臓の免疫染色像。

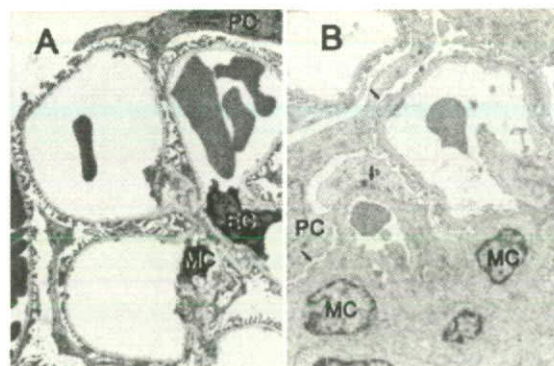


図10. 生後21週齢におけるCPラット腎臓の電子顕微鏡像。

正常コントロールWKY/129ラット(A)に比べ、CPラット(B)では、糸球体基底膜の肥厚や足細胞の突起の融合や扁平化(矢印)、血管内皮やメザンギウム細胞の障害像。EC:糸球体血管内皮細胞、MC:メザンギウム細胞、PC:足細胞。

#### D. 考察

本研究では、最新の遺伝子・タンパク質情報、バイオインフォマティクス技術、検出技術を高度に統合することにより、慢性移植腎症の発症に関わる抗HLA抗体を検出するための日本人のHLA多様性に対応した高精度で簡便なHLA抗体診断用プロテインチップの開発および拒絶反応に関わる抗体の産生機序の解明による新規治療法の確立を目的とする。また、本年度から、従来の免疫抑制剤では成し得なかった「薬効の増大」と「副作用の減少」を達成できるナノ製剤の開発を含めた新規治療法の確立を目的とする研究を行った。

①レーザーを用いた拒絶反応制御ナノ免疫抑制剤の開発においては、LiNTECを用いることにより、難水溶性免疫作用を有する3種類(FK-506、FK-778、薬剤A)のナノ粒子水分散液作製を試みた結果、2種類(FK-778、薬剤A)免疫抑制作用を有する薬剤のナノ粒子水分散化に成功した。

②抗HLA抗体が結合するHLA分子あるいはそのミミックを基板上に固相化および抗体認識部位構造の保持等の検討においては、血漿分離デバイスを有する免疫分析マイクロチップにおいて、全血を滴下するのみで、血漿分離及び免疫測定を行えた。本デバイスによって遠心分離操作が不要になることから、サンプルをセットしてから測定までを全自動で行う測定機器の開発には非常に有利となる。一方、今回抗HLA抗体に反応する各種ミミックペプチドを見つけることができなかった。主要な要因としては、各種ミミックペプチドが大部分不溶化したことに示されるように、天然型HLAと異なった三次構造を形成している可能性が強く示唆された。今後、各種ミミックペプチドが天然型HLAと同様の三次構造を形成するために、ペプチド発現系やrefolding条件についてさらに検討を進めていく必要がある。また、ペプチド設計についても再検討を要すると考えられた。

③心臓移植モデルでのDe nova抗体による急性、慢性拒絶反応の検討においては、抗ドナー抗体関連とTリンパ球関連型、両者の混在型があることは周知のことであった。しかし、抗ドナー抗体関連型拒絶反応に関しては、移植直後の超急性拒絶反応と数日以内に発症する促進型拒

絶反応を除いて臨床病理学的解析は行われていなかった。慢性移植腎症の発症には、抗体関連型慢性拒絶反応、とりわけ抗ドナー特異的抗体が深く関わっていると報告されている。抗 HLA 抗体産生機序の解明のために、ヒト HLA 発現する動物モデルを用いる検討が必要となる。

遺伝子改変ラットの移植医療への応用研究においては、抗体産生機序の解明のため、近交系 F344 ラットへ各種のトランスジェニック F344 ラット (GFP/F344-Tg, HLAB27/F344-Tg, HLAB27・GFP/F344-Tg) をドナーとする同種同系移植実験の結果、GFP/F344-Tg の異所性心臓移植では、全例生着し、HLAB27/F344-Tg では、全例慢性拒絶反応により 40 日以内に移植心を拒絶するものがある事を見いだした。しかしながら、HLAB27・GFP/F344-Tg ラットをドナーとした場合、全例 20 日以内に移植心を急性拒絶されることが観察できました。また、その拒絶反応は血中の De nova 抗 HLA クラス I 抗体と密接な関係を示し、特に、移植後ラット血中には抗 HLA-B27 抗原の IgG 抗体が移植後 7 日から産生され、21 日にはピクに達し、その後下がって行くことを明らかになった。遺伝子改変型緑色蛍光タンパク質 (EGFP)、ヒト HLA-B27 分子発現動物、特に本研究の主要な研究テーマである、移植臓器の慢性拒絶反応に於ける、抗主要組織適合抗原抗体の免疫学的意義を解明する為に、EGFP 発現トランスジェニックラット、ならびにヒト HLA-A2 発現トランスジェニックラットの果たす役割は大変大きいものと考えられる。なお、本研究の最終目標である、プロテインチップの移植医療への診断評価、応用研究には極めて重要である。

④ラットの腎移植モデルを用いた CD28 スーパーアゴニスト抗体の拒絶反応に対して抑制効果の検討においては、制御性 T 細胞は、試験管内で抗原刺激に対して増殖活性を示さず (アナジー状態)、他の T 細胞と混合すると、その活性化反応を強力に抑制する。例えば、CD4+CD25+ T 細胞あるいは CD4+CD25- T 細胞を APC とともに抗 CD3 抗体や ConA で刺激すると、CD4+CD25- T 細胞は増殖反応を示すが、CD4+CD25+ T 細胞は増殖しない。また、両者を混合した場合は、CD4+CD25+ T 細胞は、細胞数依存的に CD4+CD25- T 細胞の増殖を抑制する。CD4+CD25+ T 細胞が増殖抑制活性を有するためには、T 細胞受容体 (TCR) を介した刺激が必要であるが、活性化した CD4+CD25+ T

細胞による抑制効果は抗原非特異的である。このように抗原刺激をうけても増殖しない CD4+CD25+ T 細胞も、過剰の IL-2 あるいは抗 CD28 抗体の存在下で抗原刺激を与えると増殖反応を示し、免疫抑制効果も失うことが報告されている。しかし、IL-2 や抗 CD28 抗体を除去すれば再度アナジー状態に戻り、免疫活性も発揮する。

本実験で使っている抗体のヒト用 CD28 スーパーアゴニスト抗体である TGN1412 の初回臨床試験は 0.1 mg/kg の静脈投与で実施されたが、被験者 6 名全員に重度のサイトカイン放出症候群が生じ、多臓器不全に陥った。症状は極めて重篤であったものの救命処置により幸い死亡には至らなかった。事故の原因分析は、英国および欧州規制当局によって詳細に実施されている。TGN1412 の作用の *in vitro* 検出系を用いた解析結果によると、カニクイザルのリンパ球に比べて、ヒトリンパ球では、低濃度でアゴニスト作用が起こることが報告された。このように、アゴニスト抗体は天然の生理活性物質では予測困難な薬理作用を示すことがあり、作用機構の解析、濃度作用相関あるいは用量作用相関の解析を行うために、適切な *in vitro* 系、適切な種の動物を用いた *in vivo* 解析系の構築が必要である。我々の研究からでも示唆したように、アゴニスト抗体を直接投与しない方法として、レシピエントから制御性 T 細胞を分離し、*in vitro* で CD28 スーパーアゴニスト抗体を添加して培養した後、レシピエントに移植する方法も考えられる。制御性 T 細胞が、抗原特異的な免疫寛容を獲得する可能性を考慮すると、培養時にドナー細胞と共培養すれば、ドナー抗原特異的な制御性 T 細胞を得ることができる可能性があり、日和見感染症などの副作用のない強力な免疫抑制療法となる可能性があり、今後の検討が必要と考えられる。

⑤慢性の肥満や高血圧を発症する慢性腎症のモデルにおいては、腎内 TGF- $\beta$  の発現とともに糸球体硬化、足細胞障害、間質の線維化などの慢性腎症に特徴的な病理変化と尿蛋白増加などの症状が出現していることが示唆された。以上から、これらは、慢性移植腎症における病態の診断や治療への応用のためにも基礎的な理解を提供するものと思われる。

## E. 結論

①有機物のナノ粒子化・水分散化技術 (LiNTEC)

を用いて、難水溶性免疫抑制剤のナノ粒子水分散液作製を行い、従来の免疫抑制剤では成し得なかった「薬効の増大」と「副作用の減少」を達成するための検討を行い、2種類(FK-778、薬剤A)免疫抑制作用を有する薬剤のナノ粒子水分散化に成功した。

②不溶化した各種ミックペプチドを可溶化し天然型HLAと同様の三次構造を形成するために、ペプチド発現系やrefolding条件についてさらに検討を行う予定である。それと同時にペプチド設計についても再検討を行う予定である。さらに、免疫分析マイクロチップにおいて検出装置及び全自動測定装置などの検討を行っていく予定である。

③EGFP及びヒトHLA-B27発現する二種類のトランスジェニックラットを用いることで、心臓移植モデルにおいては、De nova抗体による急性、慢性拒絶反応を示す事が明らかとなった。今後、EGFPおよびヒトHLA-B27を標的とした慢性腎臓移植モデルを確立し、慢性臓器拒絶反応に於ける抗HLA抗体の診断意義を更に詳細に解析する。

④ラットの腎移植モデルを用いて、CD28スーパーアゴニスト抗体による特異的な免疫寛容が誘導され、その機序は*in vivo*で優位的に増殖したFoxP3陽性Treg細胞が拒絶反応に対して抑制効果によることを示唆した。

⑤移植片や慢性の腎症をきたす病態においてはその局所における微小循環系の再生や細胞動態を観察することによって、その診断や治療効果の判定への応用が期待される。

本年度は、主に上記5つのテーマにおいて、研究を進めてきた。プロテインチップによる抗HLA抗体の検出およびその発生机序の解明ができれば、慢性移植腎症の発症に関わる抗体関連型慢性拒絶反応の病態が解明され、移植腎障害機序の最大の危険要因である拒絶反応の予防と治療対策において非常に有用である。本研究の成果は移植腎永久生着の可能性を広げる画期的な診断法・治療法であると考えられる。また、従来の免疫抑制剤では成し得なかった「薬効の増大」と「副作用の減少」を達成できるナノ製剤の開発を含めたテーラーメイドの移植医療の確立および腎移植の発展に寄与す

ることが期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kitazawa Y, Fujino M, Li X-K, Xie L, Ichimaru N, Okumi M, Nonomura N, Tsujimura A, Isaka Y, Kimura H, Hunig T, Takahara S. Superagonist CD28 antibody preferentially expanded Foxp3-expressing nTreg cells and prevented graft-versus-host diseases. **Cell Transplant** (In press).

2) Tsuji A.B, Morita M, Li X-K, Sogawa C, Sudo H, Sugyo A, Fujino M, Sugioka A, Koizumi M, Saga T. 18F-FDG PET for the Semiquantitative Evaluation of Acute Allograft Rejection and the Immunosuppression Therapy Efficacy in Liver Transplantation Rat Models. **J Nucl Med** (In press).

3) Funeshima-Fuji N, Fujino M, Xie L, Kimura H, Takahara S, Ezaki T, Zhu BT, Li X-K. Prolongation of rat major histocompatibility complex-compatible cardiac allograft survival during pregnancy. **J Heart Lung Transplant** 28(2): 17682; 2009.

4) Azuma H, Isaka Y, Li X-K, Hunig T, Skamoto T, Takabatake Y, Mizui M, Kitazawa Y, Ichimaru N, Ibuki N, Inamoto T, Katsuoka Y, Takahara S. Superagonistic CD28 antibody induces donor-specific tolerance in rat renal allografts. **Am J Transplant** 8(10): 2004-14; 2008.

5) Kitazawa Y, Fujino M, Sakai T, Azumu H, Kimura H, Isaka Y, Takahara S, Hünig T, Abe R, Li X-K. Foxp3-expressing regulatory T-cells expanded with CD28 superagonist antibody prevent rat cardiac allograft rejection. **J Heart Lung Transplant** 27(4): 362-71; 2008.

6) Funeshima-Fuji N, Fujino M, Kimura H, Takahara S, Nakayama T, Ezaki T, Li X-K. Survival of skin allografts is prolonged in mice with a dominant-negative H-Ras. **Transpl Immunol** 18(4): 3026; 2008.

7) Ichimaru N, Takahara S. Japan's experience with living-donor kidney transplantation across ABO barriers. **Nature clinical practice** 4:682-92, 2008.

8) Suzuki, C., Y. Isaka, S. Shimizu, Y.

- Tsujimoto, Y. Takabatake, T. Ito, S. Takahara, and E. Imai. Bcl-2 protects tubular epithelial cells from ischemia reperfusion injury by inhibiting apoptosis. **Cell Transplant** 17: 223-9, 2008.
- 9) Zhang, D., Y. Isaka, R. Imamura, Ichimaru, Y. Shi, E. Imai, Y. Tian, A. Otsuka, and S. Takahara. Glycocalyx damage as estimated by colloidal iron method. **Cell Transplant** 17: 159-63, 2008.
- 10) Kitamura, H., Y. Isaka, Y. Takabatake, R. Imamura, C. Suzuki, S. Takahara, E. Imai, Nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects against tubulointerstitial injury in unilateral ureteral obstruction model. **Nephrol Dial Transplant** 23: 1521-8, 2008.
- 11) Tsukamoto, T, Tanaka, M, Komiya, T, Unda, S, Takasu, K, Takahara, S, Koizumi, A, Muso, E, Nephronophthisis complicated with hepatic fibrosis: an autopsy case with rupture of the splenic artery after renal transplantation: **Clin Exp Nephrol** 12:82-88, 2008.
- 12) Nishimura, K, Arichi, N, Tokugawa, S, Yoshioka, I, Namba, Y, Kishikawa, H, Takahara, S, and Ichikawa, Y, Hepatocyte growth factor and interleukin-6 in combination with prostate volume are possible prostate cancer tumor markers in patients with gray-zone PSA levels : **Prostate Cancer and Prostatic Diseases** 11:258-263, 2008.
- 13) Xue, F, Takahara, T, Yata, y, Xia, q, Nonome, K, Shinno, E, Kanayama, M, Takahara, S, and Sugiyama, T Blockade of Rho/Rho-associated coil-forming kinase signaling can prevent progression of hepatocellular carcinoma in matrix metalloproteinase-dependent manner : **Hepatology Research** 38 810-817, 2008.
- 14) Ichimaru, N, Kakuta, Y, Abe, T Okumi, M, Imamura, R, Isaka, Y, Nonomura, N, Koojima, Y, Okuyama, A and Takahara, S Treatment Adherence in Renal Transplant Recipients: A Questionnaire Survey on Immunosuppressants, **Transplantation Proceedings** 40(5) 1362-1365, 2008.
- 15) Isaka Y, Takahara S, Imai E. Chronic deteriorating renal function and renal fibrosis. **Contributions to Nephrology** 159: 109-121, 2008.
- 16) Isaka. Y. imai, E, Takahara, S and Rakugi, H Oligonucleotidic therapeutics: **Expert Opin. Drug Discov** 3(9), 991-996, 2008.
- 17) 江崎太一, 北原秀治, 清水一彦, 森川俊一: 血管の三次元イメージング法, **サージカルフロンティア**, 15(3), 94-99, 2008.
- 18) Ayako Nakamura-Ishizu, Shunichi Morikawa, Kazuhiko Shimizu, Taichi Ezaki; Characterization of sinusoidal endothelial cells of the liver and bone marrow using an intravital lectin injection method. **J Mol Hist** 39, 471-479, 2008.
2. 学会発表
- 1) 李 小康, 北沢祐介, 東 治人, 猪阪義隆, 高原史郎 CD28superagonist を用いた免疫寛容誘導 第44回日本移植学会総会 大阪 平成20年9月19日~21日.
- 2) 李 小康 移植免疫寛容の誘導・維持機序の解明および免疫制御細胞療法の確立 第36回日本臨床免疫学会総会 東京 平成20年10月17日~18日.
- 3) Miwa Morita, Masayuki Fujino, Lin Xie, Yusuke Kitazawa, Hiromitsu Kimura, Miyuki Azuma, Xiao-Kang Li, Atsushi Sugioka. The requirement of the B7-H1 for spontaneous acceptance after mouse liver allografting. 22<sup>th</sup> International Congress of the Transplantation Society; Sydney, Aug. 10-14, 2008.
- 4) Yusuke Kitazawa, Lin Xie, Hiromitsu Kimura, Thomas Hünig, and Shiro Takahara, Xiao-Kang Li. Superagonist CD28 antibody preferentially expand Foxp3-expressing nTreg cells to prevent graft-versus-host disease. 22<sup>th</sup> International Congress of the Transplantation Society; Sydney, Aug. 10-14, 2008.
- 5) Lin Xie, Naoko Funeshima-Fuji, Hiromitsu Kimura, Shiro Takahara, Xiao Kang Li. Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Curcumin Treatment through Inhibition of IL-17 Production. International Conference on Regulatory T

cells and Clinical Application in Human Disease; Beijing, Oct. 25-27, 2008.

6) 森田美和、藤野真之、Lin Xie、北沢祐介、木村廣光、東みゆき、李 小康、杉岡篤 マウス肝移植モデルを用いた免疫寛容誘導におけるB7-H1の必要性の検討 第44回日本移植学会総会 大阪 平成20年9月19日~21日.

7) 北沢祐介、李 小康、木村廣光、猪阪義隆、高原史郎 ラット骨髄由来間葉系幹細胞によるGvHD抑制効果についての検討 第44回日本移植学会総会 大阪 平成20年9月19日~21日.

8) 北沢祐介、猪阪義隆、高原史郎、李 小康 Superagonist CD28抗体で増殖されたFoxP3陽性Treg細胞の抗原特異性について 第35回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 東京 平成20年11月22~23日.

9) Yusuke Kitazawa, Hiromitsu Kimura, Shiro Takahara, Xiao-Kang Li. Superagonist CD28 antibody wcpand antigen-specific Foxp3-expressing nTreg cell to prevent graft-versus-host disease. 第38回日本移植学会総会 京都 平成20年12月1日~3日.

10) Lin Xie, Naoko Funeshima-Fuji, Hiromitsu Kimura, Yoh Matsumoto, Shiro Takahara, Xiao-Kang Li. Curcumin Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing the Production of IL-17. 第38回日本移植学会総会 京都 平成20年12月1日~3日.

11) 高原 史郎 最新の話題—腎臓移植の保険適応について— 日本移植学会 Renal Transplantation Forum 2008/1/18

12) 高原 史郎 腎移植の実際 第3回阪神透析研究会、2008/2/23

13) 高原 史郎 病腎移植「何が問題なのか？」 第70回大阪透析研究会、2008/3/23

14) 高原 史郎 大阪大学腎移植グループでの腎移植研修カリキュラム 第41回日本透析医学会総会 2008/6/20

15) 高原 史郎 既存抗体陽性症例に対するIVIg療法 第44回日本移植学会総会 2008/9/21

16) 高原 史郎 腎移植最新情報2008 全国調査からわかったこと 第44回日本移植学会総会、2008/9/21

17) 江崎太一: 局所変化に伴う内皮と中皮の相関性は?, 第113回日本解剖学会総会・シンポジウム13, 大分, 2008年3月27日

18) 江崎太一、出崎順三、遠藤千穂、中田和子、山崎康子、笠原弘美: リンパ管腫の誘導による脂肪の吸収・排導の局所変化, 第114回日本解剖学会総会、岡山、2008年3月29日

19) 森川俊一、関谷佐智子、清水達也、岡野光夫、江崎太一: 移植した積層化心筋シートにおける血管網構築機構の形態学的解析, 第114回日本解剖学会総会、岡山、2008年3月28日

20) 渡邊大輔、田辺晶代、成瀬光荣、高野加寿恵、江崎太一: メタボリックシンドロームモデルラットに対するアンジオテンシン2受容体拮抗剤の腎保護作用, 第114回日本解剖学会総会、岡山、2008年3月28日

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1) WO 2007/074756 免疫分析マイクロチップ、免疫分析用キット及び免疫分析方法

2) 血漿分離デバイスを有する免疫分析マイクロチップ (出願準備中)

2. 実用新案登録  
なし

### 3. その他

## 带状疱疹ワクチン開発のための疫学研究

所属 独立行政法人医薬基盤研究所

研究者 山西 弘一

研究要旨 本疫学研究の立ち上げに当たって、香川県小豆郡の対象者への説明や登録者の募集を行うとともに、パイロットスタディとしてのモデル地区での電話調査、抗体検査等を行った結果、今後当該疫学研究を小豆郡全域に拡大して推進できるものと判断された。

### 分担研究者

- |                  |       |
|------------------|-------|
| (1)大阪大学大学院医学系研究科 | 磯 博康  |
| (2)独立行政法人医薬基盤研究所 | 森 康子  |
| (3)奈良県立医科大学      | 浅田 秀夫 |
| (4)財団法人阪大微生物病研究会 | 奥野 良信 |

### A. 研究目的

带状疱疹について、米国では水痘ワクチンの力価を高めたワクチンを用いて、大規模臨床試験(M. N. Oxman, et al.)が行なわれ、その結果を基に同ワクチンが带状疱疹ワクチンとして承認されている。また、ACIP(米国予防接種勧告委員会)も60歳以上の成人への带状疱疹ワクチン接種を推奨している。

一方国内では、带状疱疹発症の詳細な疫学研究は無く、水痘ワクチンを高齢者に接種すると水痘带状疱疹ウイルス(VZV)に対する細胞性免疫の増強効果が解明された(平成12年厚生科学研究費補助金「带状疱疹神経痛の予防を目的とする成人高齢者への水痘ワクチン接種による免疫増強に関する研究」)。しかし、細胞性免疫の程度と带状疱疹発症の相関や免疫持続期間については検証されていない。

本研究では、将来の带状疱疹ワクチン開発のための基礎的な検討を行うため、香川県小豆郡における50歳以上の住民約19,000人のうち本研究に登録した方を対象に、带状疱疹の発生頻度と発症者における痛みの程度と持続期間、VZVに対する免疫の程度と带状疱疹発症の相関、細胞性免疫と液性免疫の各種抗体価の相関、及び免疫持続期間について、3年間のプロスペクティブな疫学調査を行う。

推進体制は「带状疱疹疫学研究の体制図」参照。

### B. 研究方法

本疫学研究の規模および研究テーマは、以下の通

りである。

1. 本疫学研究の対象者と目標登録者数  
本疫学研究対象者は、香川県小豆郡在住の50歳以上の男女19,138人(平成19年6月時点)であり、対象者の63%に当たる12,000人を目標登録者数とした。
2. 本疫学研究内容の周知方法  
調査対象者への周知は、小豆郡小豆島町・土庄町、小豆郡医師会および自治会の協力のもと、ポスターやリーフレット等で全島的に行なった。
3. 研究テーマの内容について
  - 1) テーマA(目標登録者数7,000人以上)
    - (1) 電話による聞き取り調査。
  - 2) テーマB(目標登録者数4,800人～7,300人)
    - (1) 電話による聞き取り調査
    - (2) 水痘皮内反応による細胞性免疫の測定
  - 3) テーマC(目標登録者数200人～300人)
    - (1) 電話による聞き取り調査
    - (2) 水痘皮内反応及びELISPOT法による細胞性免疫の測定(登録時、1年後、2年後に測定)
    - (3) gp-ELISA価測定法、中和抗体価測定法、IAHA価測定法によるVZVに対する液性免疫の測定(登録時、1年後、2年後に測定)
4. パイロットスタディ  
今回、小豆郡馬木自治会(対象者数680人)を対象に以下の内容でパイロットスタディを実施した。
  - 1) 登録者の募集
  - 2) 带状疱疹発症確認調査
    - ① アンケート調査
    - ② 電話調査
  - 3) 各種抗体調査

- ①水痘皮内反応
- ②液性免疫測定
- 4) 带状疱疹発症歴調査
- 5) 带状疱疹発症疑いの者の調査

#### 【研究倫理面への配慮】

「带状疱疹ワクチン開発のための疫学研究」は、(独) 医薬基盤研究所の倫理委員会 (山西、森) (H20 年 11 月 11 日)、(財) 阪大微生物病研究会 (奥野) の倫理委員会 (H20 年 8 月 23 日) 及び奈良県立医科大学の倫理委員会 (浅田) (H20 年 月 日) で承認を得た。今後、大阪大学医学部附属病院の倫理委員会 (磯) への申請を行う予定である。

#### C. 研究結果

1. 行政、自治会の協力の下、対象者に本研究の趣旨、意義および内容を説明するためのパンフレットやDVDを作製し、研究協力医療機関へ配布した。また、带状疱疹の病態、診断、治療法について理解を深めていただくための講演会を開催した。
2. 疫学研究登録者の募集に関して、パイロットスタディでの先行募集は、対象者 680 人に対して 536 人 (79%) の希望者が登録し、目標 (63%) 以上の登録者を得た。
3. 带状疱疹発症確認調査のアンケート調査においては、536 人の登録者のうち 532 人から回答を得て、発症有は 4 人、痛み有は 7 人、水痘患者との接触有はなしであった。発症と痛み共に有は 2 人いたが共に医療機関で带状疱疹と診断され治療中であり、本アンケート調査による新たな発症疑いの者の発生はなかった。
4. 水痘皮内反応は 204 名に対して実施した。紅斑の長径の平均値(mm)は  $12.0 \pm 8.5$  であり、年齢に伴い減少傾向を示した。また、水痘抗原接種部位において、小水痘 1 例、そう痒感 14 例、その他 5 例の異常が認められた。
4. 液性免疫測定は 10 名に対して gpELISA、中和抗体値及び IAHA の測定を実施し、陰性は IAHA 抗体値において 1 名のみであった。
5. 带状疱疹発症歴調査は登録者 536 名に対して行い (回答 532 人)、77 人 (14.5%) 発症歴有と回答

した。

6. 带状疱疹発症疑いの者の調査においては、発症疑い者及び带状疱疹確定者の発生がないため、実施に至らなかった。
7. 本疫学調査のデータ解析については以下の 3 つのデータを検討することとし、それぞれについてのサンプルサイズ、データ管理、解析等の方針を決定した。
  - ①带状疱疹の発生頻度と発症者における痛みの程度と持続期間との関連
  - ②生活習慣病・社会心理的要因と带状疱疹の発症および細胞性免疫の程度との関連
  - ③带状疱疹の発生による細胞性免疫、液性免疫と免疫持続期間との関連

#### D. 考察

パイロットスタディでは目標より高い登録が得られたが、これは事務局スタッフと小豆郡自治会関係者等との人間関係の構築に基づく緊密な連携作業の成果により、当該疫学研究的趣旨、意義などの情報が住民によく浸透し理解されたためと考えられる。

また、パイロットスタディにおける带状疱疹発症確認調査 (アンケート、電話)、各種抗体調査 (水痘皮内反応、液性免疫測定) 等も無事終えることができた。

#### E. 結論

小豆郡馬木自治会におけるパイロットスタディの結果、当該疫学研究的を小豆郡全域に拡大して推進できるものと判断された。

#### F. 研究発表

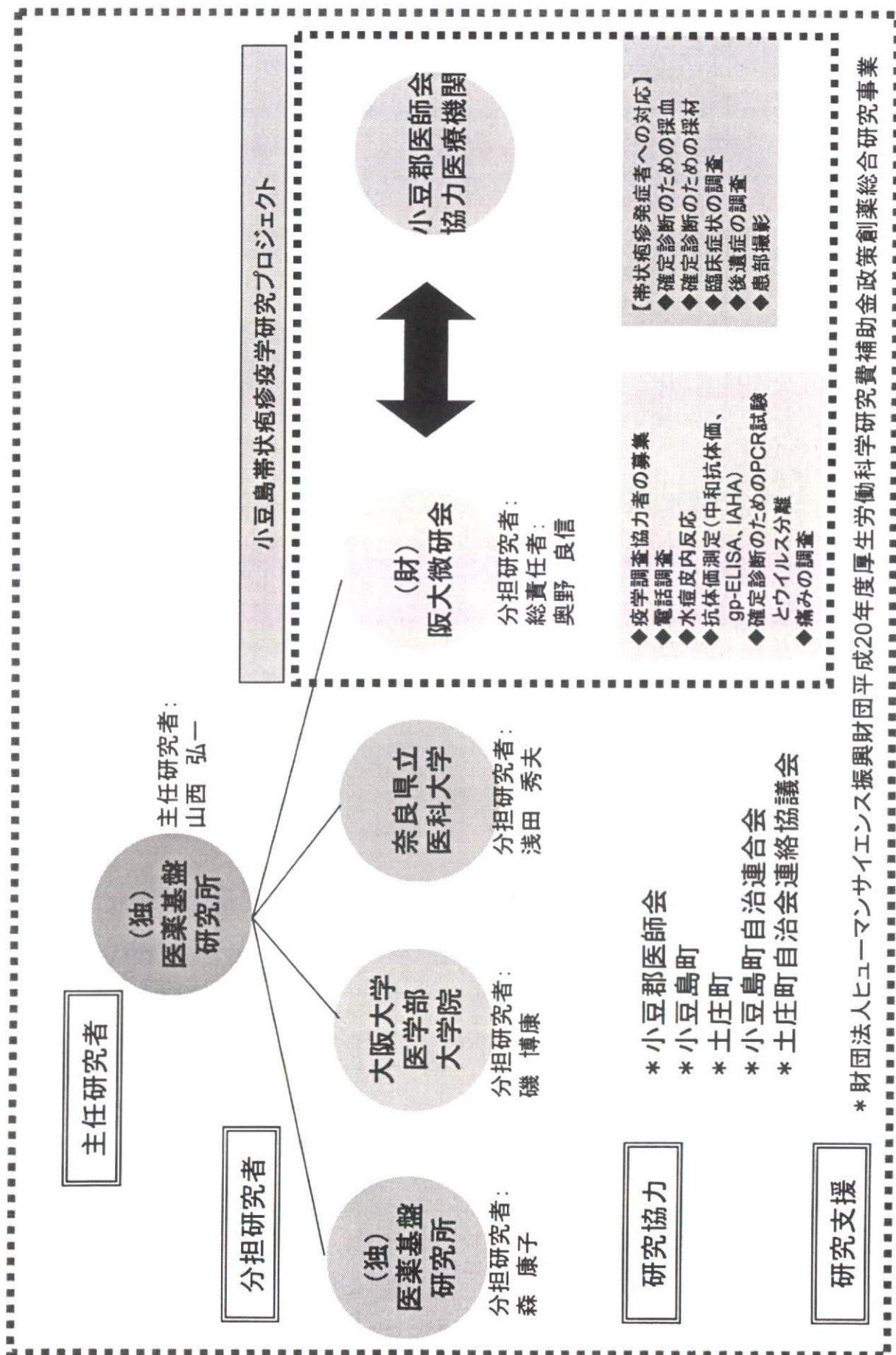
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



# 带状疱疹疫学研究の体制図



## 内因性幹細胞の動員・生着・分化と心筋細胞肥大の情報伝達を標的とした新規心不全治療法

所属 (独) 国立病院機構京都医療センター 展開医療研究部  
研究者 長谷川 浩二

**研究要旨** 内因性幹細胞の動員、生着、分化と心筋細胞肥大の情報伝達を標的とした新規心不全治療法の確立のため、p300 特異的アセチル化阻害作用を持つクルクミンのヒト臨床試験に向けて、経口クルクミン DDS の開発、新規クルクミン誘導体の合成、動物レベルでの前臨床研究を行った。また、遺伝子導入により内因性幹細胞を活性化し、心血管構築細胞を再生する心不全再生療法確立に向けて、iPS 細胞の分化解析を行い、複数の iPS 細胞株において心筋細胞分化システムを確立すると同時に、増殖因子徐放化投与の有効性を種々の動物モデルで証明した。

### 分担研究者

- (1) セラバリュース(株)プロテオミクス解析センター  
センター長 福田 宏之
- (2) 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻  
教授 藤田 正俊
- (3) 京都大学大学院医学研究科心臓血管外科  
准教授 池田 義
- (4) 京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学専攻  
教授 掛谷 秀昭

### A. 研究目的

我が国においても生活習慣病の最も重篤な合併症である冠動脈硬化症ならびに心筋梗塞後心不全の発症頻度が急増している。21世紀の高齢化社会の到来と共にこれからますます増加する心不全に対して、その発症・増悪を抑制すると同時に、末期心不全に対する新たな治療法を確立することは社会的、医療経済的急務である。

心筋細胞の脱落が激しい心臓移植が必要な末期心不全に対する根本的治療としては、心筋再生療法が必須である。骨髄、骨格筋心臓あるいは脂肪組織内の内因性幹細胞を採取して、これらを ex vivo 培養系で増殖、心筋に分化させて移植するアプローチが試みられようとしてきたが、これら幹細胞の増殖能・分化効率は極めて低く、臨床応用できる段階ではない。胚性幹(ES)細胞は無限増殖能をもちつつ多分化能を有するため、倫理的問題をクリアすれば大いに期

待されるアプローチである。しかし、ES 細胞から心筋細胞への分化効率は依然低く、また、分化した細胞を移植しても組織に生着する細胞数が少ないという欠点がある。

主任研究者らは内因性幹細胞の動員、生着、分化のそれぞれにおいて多くの新事実を見出してきた。即ち(1) G-CSF の少量持続投与による末期心不全の心機能改善、(2) G-CSF 少量とエリスロポイエチンの組み合わせ投与による相乗的な心筋梗塞後の心機能改善、(3) 心筋特異的転写因子のアセチル化を介した心筋分化効率の著明な亢進 (*J Biol Chem* 2005; 280: 19682-19688, *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 386-391) などの重要な知見を見出した。さらに最近、ES 細胞と同様の多分化能と無限増殖能を持つ人工多能性幹(induced pluripotent stem, iPS)細胞が体細胞への遺伝子導入により作出された。iPS 細胞は ES 細胞の免疫拒絶の可能性や倫理的問題をクリアし、再生医療における移植細胞の新たなソースとして期待されている。

**心不全発症の心筋細胞核内情報伝達機構を標的とした治療**に関しては、主任研究者らは心不全発症の心筋細胞核内情報伝達に転写コアクチベーターである p300 のヒストンアセチル化酵素活性による核の過剰なアセチル化が重要であるという事実を見出した (*Mol Cell Biol*

2003;23:3593-606、*Circulation* 2006; 113: 679-690、国際特許出願中)。さらに、健康食品として使用され天然物ウコンの成分で p300 の特異的アセチル化阻害作用を持つクルクミンが、高血圧性心疾患ならびに心筋梗塞後の心不全発症・増悪を抑制することも動物モデルで確認した (*J Clin Invest* 2008; 118: 868-878)。

そこで本研究の目的は、内因性幹細胞の動員、生着、分化と心筋細胞肥大の情報伝達を標的とした新規心不全治療法を確立することであり、そのため、

### 1) 心不全発症の情報伝達を標的とした新規薬物療法

経口クルクミン Drug delivery system を用いてクルクミンの腸管からの吸収効率を改善する、あるいは新規クルクミン誘導体・類縁化合物の合成を行い、効率よい心不全治療法を開発し、ヒト臨床試験に向けた前臨床研究を行う。

### 2) 末期心不全に対する内因性幹細胞の活性化による心筋再生療法

遺伝子を体細胞に導入し、内因性幹細胞を活性化、あるいは体細胞を心血管細胞前駆細胞に変換することにより治療する心不全再生療法の確立に向けた基盤研究を行う。また細胞が組織に生着するための増殖因子徐放化に関する研究を行う。

## B. 研究方法

分担研究者の福田らは3種の経口クルクミン DDS 製剤を開発し、クルクミン血中濃度測定システムを確立した。掛谷らはクルクミン誘導体・類縁化合物の合成を行った。池田らは増殖因子徐放化投与による幹細胞生着療法の確立を目指し、藤田らはクルクミンの心不全臨床試験のための前臨床研究を行うと同時に iPS 細胞における心筋細胞分化機構の解明を行った。

## C. 研究結果

藤田、森本らは心不全発症の心筋細胞内情報伝達に中心的な役割を果たす p300 のアセチル化作用を標的とし、クルクミンを用いた心不全治療の前臨床研究を行った。心筋梗塞ラットにおいてクルクミンは用量依存的に心機能を改善し、論文 (*J Clin Invest* 2008) で発表した

50mg/kg/日の10分の1である5mg/kg/日経口投与でも有意に改善すること、心不全の標準的治療薬である ACE 阻害薬 (Enalapril) と相加的に心機能を改善することを見出した。さらにヒトで安全性の確かめられているクルクミン 2g/日経口投与により、心不全治療効果のあるラット 50mg/kg/日経口投与よりも高い血中濃度が得られることを示した。

福田らは血漿中クルクミン濃度測定法を LC/MS/MS を用いて確立し、3種類の経口クルクミン DDS を開発した。そのうちのひとつ、コロイダルディスパージョン型クルクミン、及びその粉末物は、そのままのクルクミン粉末試薬に比べて、ラット経口投与時に約30倍以上の血中濃度を示すことが判明した。

掛谷らは効率よい心不全治療法を開発するため、クルクミンをリード化合物として、その誘導体及び類縁化合物を短工程で合成するための経路を確立した。

本研究グループはこれまで胚性幹 (ES) 細胞において心筋特異的転写因子のアセチル化を介した心筋分化効率の著明な亢進などの重要な知見を見出してきた。最近、遺伝子を皮膚線維芽細胞などに導入することによりリプログラミングを誘導し、体細胞から幹細胞が作成されることが報告された (iPS 細胞)。藤田、鶏内らは複数のマウス iPS 細胞株において心筋分化システムを確立し、iPS 細胞の株間には大きな分化効率の差異が存在すること、心筋分化効率が極めて低い iPS 細胞株でも脱アセチル化酵素阻害薬である Tricostatin A により、著明に心筋分化が亢進することを見出した。

池田、丸井らは生体吸収性ゼラチン水和ゲルを用いた蛋白徐放システムを利用して半減期の短い塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) を徐放化し、その効果を左室補助人工心臓 (LVAD) 治療モデル、肺高血圧症モデル、下肢虚血モデルで検討した。LVAD モデルでは心筋萎縮を抑制し、肺高血圧症モデル、下肢虚血モデルでは血管新生により病状を改善することを示した。

## D. 考察

本研究グループは、心不全発症の心筋細胞内情報伝達を標的とした治療法に向けた基盤研究を行い、p300 のアセチル化作用を有するクルクミンが心筋 GATA4 のアセチル化を抑制することにより心不全の増悪を抑制することを高血圧心疾患及び梗塞後心不全の2つの動物モデルで確認した (*J Clin Invest* 2008; 118: 868-878)。平成 20 年度においては、梗塞後心不全において、

クルクミンと心不全の標準治療薬である ACE 阻害薬は相加的に心機能を改善すること、ヒトで安全性の確かめられているクルクミン 2g/日経口投与により、心不全治療効果のあるラット 50mg/kg/日経口投与よりも 高い血中濃度が得られることを見出した。これらの事実は心筋細胞核内情報伝達を標的とした薬物療法が臨床現場において有用であることを示唆する。さらにより高い血中濃度の得られる経口クルクミン DDS を開発し、創薬に向けた新規誘導体作成のための合成経路も確立し、実用化に向けて着実に進みつつある。

遺伝子導入により体細胞がリプログラミングし、幹細胞化することが報告された (iPS 細胞)。この方法は ES 細胞の倫理的問題をクリアすると同時に、分化効率の高い幹細胞が得られる可能性がある。そこで末期心不全に対する心筋再生療法に関しては、本年度は遺伝子導入により内因性幹細胞を活性化し、心血管構築細胞を再生する治療法の確立に向けて iPS 細胞の分化解析を行い、複数の iPS 細胞株において心筋細胞分化システムを確立した。また増殖因子徐放化投与の有効性を種々の動物レベルで証明した。

## E. 結論

本研究グループは心筋細胞分化と肥大の情報伝達において多くの新たな知見を見出してきた。p300 特異的アセチル化阻害作用を持つクルクミンによる心不全治療においてはヒトで臨床試験を行う一歩手前まで到達した。末期心不全に対する心筋再生療法に関しては、体細胞への遺伝子導入による心血管構築細胞再生に向けて前進した。心不全の新規治療法の確立、臨床現場における実用化に向けて今後も突き進む予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Nagasawa A, Komeda M, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K: The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. *J Clin Invest.* 2008;118:868-78

2) Takaya T, Kawamura T, Morimoto T, Ono K, Kita T, Shimatsu A, Hasegawa K. Identification of p300-targeted acetylated residues in GATA4 during hypertrophic responses in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2008; 283: 9828-9835.

3) Shyamal Chandra Bir, MBBS; Masatoshi Fujita, MD; Akira Marui, MD; Keiichi Hirose, MD; Yoshio Arai, MD; Hisashi Sakaguchi, MD; Yuhong Huang, MD; Jiro Esaki, MD; Tadashi Ikeda, MD; Yasuhiko Tabata, PhD\*\*; Masashi Komeda, MD New Therapeutic Approach for Impaired Arteriogenesis in Diabetic Mouse Hindlimb Ischemia *Circ. J.* 2008;72:633-640

4) Morimoto T, Fujita M, Kawamura T, Sunagawa Y, Takaya T, Wada H, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K. Myocardial regulation of p300 and p53 by doxorubicin involves ubiquitin pathways. *Circ J.* 2008 72 (9):1506-11

5) Wada H, Abe M, Ono K, Morimoto T, Kawamura T, Takaya T, Satoh N, Fujita M, Kita T, Shimatsu A, Hasegawa K. Statins activate GATA-6 and induce differentiated vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 374 (4):731-6.

## 2. 学会発表

1) Kaichi S, Takaya T, Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Ono K, Hasegawa K. Cardiac-specific transcription in ES cells by Cdk9. The 25th Annual Meeting of the International Society of Heart Research Japanese Section (Yokohama), Dec 5, 2008.

2) Hasegawa K, Takaya T, Kaichi S. Signaling pathways that mediate differentiation of ES and iPS cells into cardiomyocytes. The 1st World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell (Foshan, CHINA), Dec 3, 2008.

3) 高谷智英, 川村晃久, 尾野亘, 高鍋利依子, 鶏内伸二, 馬場志郎, 平家俊男, 中畑龍俊, 森本達也, 北徹, 島津章, 長谷川浩二. MicroRNA-1 の過剰発現はマウス ES 細胞の心筋分化を抑制する. 第 45 回日本臨床分子医学会学術集会 (神戸), 2008/07/25.

## 3. 出版物

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし