

201006002B

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

「ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の
分化誘導と移植医療応用に関する研究」

平成20年度~平成22年度 総合研究報告書

研究代表者 山下 潤

平成23 (2011) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告	1
ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究		
山下 潤		
II. 分担研究報告	9
1. ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究		
池田 義		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	19

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)

総合研究報告書

ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究

研究代表者 山下 潤

研究要旨

2007年京都大学山中伸弥教授らにより樹立されたヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、再生医療への応用が期待されている。本研究は、ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療の早期実現を目的とし、ヒト iPS 細胞の心臓細胞分化誘導法・純化法、純化細胞の移植法の開発と移植細胞に関する安全性の検討を行うものである。

研究期間内においては、マウス及びヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導法の開発及び高効率分化誘導法の開発と、心臓への細胞移植法の開発、特に温度感受性培養皿を用いた細胞シート技術を用いた心筋シートのラット心筋梗塞モデルへの移植を行った。

分担研究者

池田 義 (京都大学医学部心臓血管外科学 准教授)

研究協力者

山中伸弥 (京都大学 iPS 細胞研究所 所長)

A. 研究目的

2007年京都大学再生医科学研究所山中伸弥教授らにより樹立された成人皮膚細胞由来の幹細胞であるヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)(Takahashi, Cell, 2007)は、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同等の分化能を有

する万能の幹細胞と考えられ、再生医療を中心とする臨床応用が大いに期待されている。iPS 細胞は ES 細胞とほぼ同様の性質を有する細胞であり、再生医療応用にはヒト ES 細胞と同様に、1) 目的細胞の分化誘導・純化・移植法、2) 奇形腫形成を防ぐ方法、に加えて、3) がん形成性をはじめとする iPS 細胞そのものの安全性の検討が必要である。

研究代表者はこれまで ES 細胞を用いた心血管分化再生研究を行い、ES 細胞から心血管細胞の新しい分化誘導法を開発した (**Nature**, 2000; **FASEB J**, 2005)。サルおよびヒト ES

細胞の心血管分化研究も行っている (Circulation, 2003; Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007)。

本研究は、ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療の早期実現を目的とし、1) ヒト iPS 細胞の心臓細胞 (心筋および心筋前駆細胞) 分化誘導法、2) 誘導細胞純化法、3) 純化細胞の移植法の開発、及び移植細胞の4) 奇形腫形成、5) がん形成等に関する安全性の検討、の5項目の研究を行う。ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療の早期実現を目的とし、ヒト iPS 細胞の心臓細胞 (心筋および心筋前駆細胞) 分化誘導法、誘導細胞純化法、純化細胞の移植法の開発、及び移植細胞の奇形腫形成、がん形成等に関する安全性の検討に関する研究を行う。

B. 研究方法

①マウス iPS 細胞からの心血管細胞分化誘導法の開発

研究代表者らは、未分化マウス ES 細胞から中胚葉マーカー Flk1 を発現する細胞を分化誘導・純化し、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として種々の心血管系細胞を分化誘導するシステムを構築している (Nature, 2000; FASEB J, 2005 ほか)。同システムをマウス iPS 細胞に適用し、マウス iPS 細胞からの系統的心血管細胞誘導システムの構築を行った。

②マウス ES 細胞からの効率的な心血管細胞分化誘導法の開発

研究代表者らの開発したマウス ES 細胞心血管分化系を用いて効率的な心筋分化を誘導する物質・増殖因子等の探索をおこなった。

③マウス iPS 細胞からの効率的な心血管細胞分化誘導法の開発

②において免疫抑制剤サイクロスポリン A が強力に心筋細胞及び FCV 心筋前駆細胞分化を促進することを見出したが、同システムをマウス iPS 細胞に適用した。

④ヒト iPS 細胞からの心筋分化とサイクロスポリン A による誘導効率化

2003 年 Mummery C. らが報告したマウス内胚葉様支持細胞 END2 細胞によるヒト ES 細胞の心筋分化誘導法 (Circulation, 2003) を用いてヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導を行った。さらにサイクロスポリン A 法によるヒト心筋細胞分化の効率化を試みた。

⑤心筋前駆細胞及び心筋細胞のラット心筋梗塞モデルへの移植実験

マウス ES 細胞由来心筋細胞及び心筋前駆細胞のラット心筋梗塞モデルへの細胞移植を行った。

⑥細胞シート技術を用いた心筋細胞シート移植

研究代表者は、東京女子医科大学岡野光夫教授・清水達也准教授らとの共同研究により温度応答性培養皿を用

いた細胞シート技術の ES 細胞への導入を進めてきた。マウス ES 細胞から誘導した心筋細胞シートをラット心筋梗塞モデルの梗塞巣上に貼付し、心機能や梗塞巣の変化を解析した (分担研究者・池田ら)。

C. 研究結果

①マウス iPS 細胞からの心血管細胞分化誘導法の開発

マウス ES 細胞において用いた方法をマウス iPS 細胞に適用した。誘導効率・時間などほぼすべての分化特性はマウス ES 細胞と同等と考えられた。マウス iPS 細胞からの種々の心血管細胞分化誘導法を開発した (Narazaki, *Circulation*, 2008)。

②マウス ES 細胞からの効率的な心血管細胞分化誘導法の開発

純化 Flk1 陽性細胞を OP9 上で培養する際に、免疫抑制剤サイクロスポリン A を添加すると心筋細胞の著しい増加を認めた (約 10-20 倍)。サイクロスポリン A は、Flk1 陽性中胚葉細胞に特異的に作用し、FCV 心筋前駆細胞を特異的に増加させた (約 20 倍)。

③マウス iPS 細胞からの効率的な心血管細胞分化誘導法の開発

マウス iPS 細胞由来 Flk1 陽性細胞へのサイクロスポリン A 添加により、誘導心筋細胞量が約 10 倍増加した。また心筋前駆細胞 (FCV 細胞) も数

倍増加した。

④ヒト iPS 細胞からの心筋分化とサイクロスポリン A による誘導効率化

ヒト iPS 細胞をマウス内胚葉系ストローマ細胞 END2 上で培養することにより、拍動心筋細胞を誘導することに成功した。心筋細胞出現の時間及び効率はヒト ES 細胞とほぼ同様であった。未分化ヒト iPS 細胞を END2 細胞上で培養し、中胚葉段階と考えられる分化 8 日目にサイクロスポリン A を投与したところ、拍動細胞コロニー総数及び拍動コロニー出現率が約 4 倍あまりに増加した。誘導された細胞は、形態的機能的にヒト心筋のモデル細胞としての特質を備えていた (Fujiwara, *PLoS One*, 2011)。

⑤心筋前駆細胞及び心筋細胞のラット心筋梗塞モデルへの移植実験

心筋梗塞モデルラットに needle injection により細胞移植を行った。移植細胞による再生心筋の量は、分化心筋細胞の移植に比べ、心筋前駆細胞移植では約 20 倍多いと考えられた。

⑥細胞シート技術を用いた心筋細胞シート移植

積層化マウス ES 細胞由来心筋細胞シートをラット心筋梗塞モデルに移植した。心筋シート移植群では、左室収縮率の有意な改善や梗塞部の線維化領域の有意な縮小が認められた。

D. 考察

マウス iPS 細胞からの心血管分化誘導は、2008 年に研究代表者らが世界に先駆けて成功し、同業績は 2008 年に *Circulation* 誌に掲載されたすべての論文の中から、Basic Science 部門第 1 位の **Best Paper Award** を受賞するなど非常に高い評価を得ている。サイクロスポリン A による心筋前駆細胞特異的分化促進効果は、心筋前駆細胞を大量に調製し、心筋前駆細胞移植治療という新しい可能性を開く重要な成果である。実際、本方法の開発により、心筋細胞シート移植実験が飛躍的進展を示した。これらの成果を有機的に組み合わせ、マウス iPS 細胞からの心筋細胞及び心筋前駆細胞の効率的分化誘導を初めて可能にした。また、END2 細胞を用いたヒト ES 細胞心筋分化誘導法をヒト iPS 細胞に導入し、ヒト心筋細胞の誘導に成功するとともに、サイクロスポリン A 法を導入し、ヒト iPS 細胞においてもサイクロスポリン A 法が有効であることを示し、ヒト心筋モデル細胞樹立のための基本的技術基盤の確立に成功した。細胞移植に関しても、細胞シート技術を導入して心ラット心筋梗塞モデルへの移植を行い、明らかな心機能の改善に成功している。さらに分子・細胞機構の解析とヒト iPS 細胞を用いた移植への研究の展開を目指している。

E. 結論

iPS 細胞からの心筋分化誘導法、その促進方法、細胞移植法等、本研究課題推進において必要とされるヒト iPS 細胞心筋分化技術に関して基盤となる成果を着実にあげることができたと考えられる。さらに心筋シート移植法の進展により当初の予想以上の成果が認められており、今後これらの成果を複合的にヒト iPS 細胞へ応用することにより、同細胞の臨床応用に向けた展開が開けることが大いに期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK*. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A. **PLoS One**, 6: e16734, 2011
2. Yamamizu K, Yamashita JK*. Roles of cyclic adenosine monophosphate signaling in endothelial cell differentiation and arterial-venous specification during vascular

- development. **Circ J**, 75: 253-260, 2011 (*Review*)
3. Yamashita JK. ES and iPS cell research for cardiovascular regeneration. **Exp Cell Res**, 316: 2555-2559, 2010 (*Review*)
 4. Yamamizu K, Matsunaga T, Uosaki H, Fukushima H, Katayama S, Hiraoka-Kanie M, Mitani K, Yamashita JK*. Convergence of Notch and β -catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors. **J Cell Biol**, 189: 325-338, 2010
 5. Suzuki H, Shibata R, Kito T, Ishii M, Li P, Yoshikai T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, Yamashita JK, Murohara T, Isobe K. Therapeutic angiogenesis by transplantation of induced pluripotent stem cell-derived Flk-1 positive cells. **BMC Cell Biol**, 11: 72, 2010
 6. Matsuda M, Yamashita JK, Tsukita S, Furuse M. abLIM3 is a novel component of adherens junctions with actin-binding activity. **Eur J Cell Biol**, 89: 807-816, 2010
 7. Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, Yamashita JK*. Enhancement of vascular progenitor potential by protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1. **Blood**, 114: 3707-3716, 2009
 8. Narazaki G, Yamashita JK*. Creations of biological Pacemaker. **Inflammation and Regeneration**, 29: 123-127, 2009 (*Review*).
 9. Kuratomi S, Ohmori Y, Ito M, Shimazaki K, Muramatsu SI, Mizukami H, Uosaki H, Yamashita JK, Arai Y, Kuwahara K, Takano M. The cardiac pacemaker-specific channel Hcn4 is a direct transcriptional target of MEF2. **Cardiovasc Res**, 83: 682-687, 2009
 10. Sasaki D, Shimizu T, Masuda S, Kobayashi J, Itoga K, Tsuda Y, Yamashita JK, Yamato M, Okano T. Mass preparation of size-controlled mouse embryonic stem cell aggregates and induction of cardiac differentiation by cell patterning method. **Biomaterials**, 30: 4384-4389, 2009.
 11. Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, Sugimoto A, Yamamizu K, Teranishi M, Matsuda H, Matsuoka S, Ikeda T, Komeda M, Sakata R, Yamashita JK*. Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 379: 115-120, 2009
 12. Narazaki G, Uosaki M, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, Yamashita JK*. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. **Circulation**, 118: 498-506, 2008 <Circulation 2008, *Best Paper Award* in Basic Science>
 13. Yamashita JK. A linkage in the developmental pathway of vascular and hematopoietic cells. In Tanaka K, Davie EW. **Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008**. Part 5, p363-p373. Springer, Tokyo, 2008 (*Review*)
 14. Nakao Y*, Narazaki G, Hoshino T, Maeda S, Yoshida M, Maejima H, Yamashita JK*. Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. **Bioorg Med Chem Lett**, 18: 2982-2984, 2008
 15. Yamahara K, Sone M, Itoh H, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T,

- Homma K, Chao TH, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, 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.
16. Matsuda M, Kobayashi Y, Masuda S, Adachi M, Watanabe T, Yamashita JK, Nishi E, Tsukita S, Furuse M. Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization-based expression cloning. **Exp Cell Res**, 314:939-49, 2008.
17. Shimizu N, Yamamoto K, Obi S, Kumagaya S, Masumura T, Shimano Y, Naruse K, Yamashita JK, Igarashi T, Ando J. Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor {beta}. **J Appl Physiol**, 104: 766-772, 2008
- 土社
5. 山下 潤. 「iPS 細胞の展望」 Cardiovascular Frontier 別冊「特集再生医療」1: 111-117, 2010
6. 山下 潤. 「心不全に対する iPS 細胞の臨床応用」医学の歩み「心不全 —研究と臨床の最前線—」 232: 559-605, 2010. 医歯薬出版
7. 山下 潤. 「iPS 細胞による血管再生治療の展望」細胞「特集血管の発生と再生」41: 18-21, 2009. ニューサイエンス社
8. 山下 潤. 「iPS 細胞研究の現状と展望」循環器科・特集「循環器疾患の再生医療 update」66: 472-480, 2009. 科学評論社
9. 山下 潤. 「iPS 細胞からの心血管細胞の分化誘導とその応用」臨床検査 53: 1097-1103, 2009. 医学書院
10. 山下 潤. 「iPS 細胞研究の現状と展望」分子血管病・特集「幹細胞研究の新展開」10: 18-26, 2009. 先端医学社
11. 山下 潤. 「ES 細胞および iPS 細胞からの血管細胞分化」再生医療 8: 28-33, 2009. 日本再生医療学会雑誌
12. 山下 潤. 「ES 細胞、iPS 細胞を用いた血管再生医療技術」幹細胞の分化誘導と応用 - ES 細胞・iPS 細胞・体性幹細胞研究最前線-. 第 3 章 p253-261, 2009. NTS.
13. 山下 潤. 「iPS 細胞と心血管再生」Annual Review 循環器 2009. p1-p9, 2009. 中外医学社
14. 山下 潤. 「ES 細胞・iPS 細胞からの血管・リンパ管内皮細胞分化」分子細胞治療 7: 22-28, 2008
- < 和文総説 >
1. 山下 潤. 「iPS 細胞を用いた心筋再生」心臓「iPS 細胞の循環器疾患への応用」企画：山下 潤. 43: 3-9, 2011
2. 山水康平、山下 潤. 「血管発生のメカニズム：内皮細胞の分化と動静脈形成」細胞工学「血管新生を制御する」29: 1075-1081, 2010
3. 山下 潤. 「iPS 細胞の発見が心血管再生医学研究に与えるインパクト」Cardiac Practice 特集「心血管系の再生医学」21: 17-22, 2010
4. 山下 潤. 「血管内皮細胞の発生・分化—血管多様性研究のプロローグ」実験医学増刊「血管研究と血管治療」28: 28-35, 2010. 羊

15. 山下 潤. 「iPS 細胞を用いた血管再生」
CLINICIAN「再生医療を考える」56: 61-74,
2008. エーザイ株式会社
16. 山下 潤. 「血管再生」総合臨床 58: 72-78,
2008. 永井書店
17. 山下 潤. 「ES 細胞による血管の分化再生」
遺伝子医学MOOK 別冊「進み続ける細胞移植
治療の実際」田畑泰彦編, p107-p111, 2008.
メディカルドゥ社

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 名称：新規環状デシペプチドおよびそ
の用途
国際出願番号： 61/334, 961

発明者： 中尾洋一、勝俣良祐、山
下 潤
出願人： 早稲田大学、京都大学
出願日： 2010年5月14日

2. 名称： Efficient and specific
expansion of highly cardiogenic
progenitors and cardiomyocytes from
embryonic and induced pluripotent
stem cells
PCT 国際出願
出願番号： PCT/JP2008/066033
発明者： 顔培実、山下 潤
権利者： 国立大学法人京都大学
出願日： 2008年8月29日
出願公開
公開番号： W02009/118928
公開日： 2009年10月1日

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)

総合研究報告書

ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究

研究分担者 池田 義

研究要旨 ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生療法の確立を目的とし、幹細胞から分化誘導した心筋細胞、心筋前駆細胞を用いて、in vivo における細胞移植法の開発と移植後のがんや奇形腫形成性など安全性の検討を行う。

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療の早期実現を目的とし、ヒト iPS 細胞の心臓細胞 (心筋および心筋前駆細胞) 分化誘導法、誘導細胞純化法、純化細胞の移植法の開発、及び移植細胞の奇形腫形成、がん形成等に関する安全性の検討に関する研究を行う。

平成 20 年度は needle injection による移植法での細胞生着効率を高めるための化合物処理を中心に研究した。平成 21 年度は、さらなる生着効率上昇を目指した移植法開発を、細胞シート移植法を中心に研究した。平成 22 年度は、昨年度までに認めた細胞シート移植による心機能回復のメカニズムの解析を重点的に研究した。

B. 研究方法

iPS 細胞由来心筋細胞移植の前段階として、より心筋分化効率が高いマウ

ス EMG7 細胞 (α MHC-EGFP transgenic EB5) を用いて研究を行った。既に発表した方法により、マウス ES 細胞から心筋細胞等への分化誘導を行い (Yamashita J et al. Nature 408: 92-6, 2000, Yamashita JK et al. FASEB J. 19: 1534-6, 2005)、これを needle injection にて 0.4×10^6 および 1.0×10^6 細胞の移植を、左前下行枝結紮により心筋梗塞を誘導した無胸腺ラット (F344/N Jcl-rnu/rnu) モデルに対して行った。生着効率を高めるため、Y-27632 (ROCK inhibitor) を併用して同様に行った。さらに、誘導した心筋細胞を温度感受性培養皿上で培養して心筋細胞シートを作製した。作製した心筋細胞シートを in vitro で積層化し、梗塞部に貼付することで細胞移植を行った。移植後 2 週および 4 週目に心臓超音波および心臓カテテル検査による生理学的心機能評価、

病理組織学的評価を行った。さらに心機能回復に関与する因子について検討するため、定量性 RT-PCR 法により細胞シートの遺伝子発現パターン解析を行った。

C. 研究結果

Needle injection では、Y-27632 の有無にかかわらず、明らかな心機能の改善は認めなかった。組織学的評価においても少量の生着細胞を認めるのみで、Y-27632 処理群と未処理群では生着率に差は認めなかった。一方、心筋細胞シートを貼付した群では、2 週後、4 週後のいずれにおいても心臓超音波検査によって左室収縮率の有意な改善が認められた。同様に心臓カテーター検査によっても、左心室の収縮能の指標である E_{max} が有意に上昇することが明らかとなった。

細胞シート移植群に対する組織学的検討として、シリウスレッド染色による線維化部位の計測を行い、細胞シート貼付群で、梗塞部の繊維化領域の有意な縮小が認められた。また、生着した心筋細胞の周囲を中心に、新生血管の著明な増加を認めた。

また、移植後 1 週目の段階で梗塞巣に移植されたマウス心筋細胞の生着が確認されたが、4 週目では生着細胞は認められるもののごく少数であり、移植による心機能回復はサイトカイン

を介したパラクライン効果によるものが主であると考えられた。

定量性 RT-PCR 法による細胞シートの遺伝子発現パターン解析により、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)などの発現亢進が認められ、これらの因子による血管新生促進効果が、結果的に心機能回復につながっているものと考えられた。

D. 考察

マウス ES 細胞から分化誘導させた心筋細胞の移植による心機能回復効果を検討したが、needle injection では十分な効果が得られず、新たな細胞移植法を開発する必要があった。我々は分化誘導した心筋細胞からなる細胞シートを作製した。このシートを用いてラット心筋梗塞モデルに対して、細胞移植を行い、in vivo で心機能改善効果が認められることを明らかにした。さらにそのメカニズム解析の結果、各種サイトカインを介した血管新生効果が心機能改善に大きく寄与しているものと考えられた。

E. 結論

幹細胞から分化誘導させた心筋細胞を用いて、ラット心筋梗塞モデルに対して細胞シート移植を行い、虚血部位の血管新生に伴う心機能の改善、左

室リモデリングの抑制を得ることができた。

F. 研究発表

1. Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, Sugimoto A, Yamamizu K, Teranishi M, Matsuda H, Matsuoka S, Ikeda T, Komeda M, Sakata R, Yamashita JK. Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jan 30;379(1):115-20.
2. Yoshikawa E, Marui A, Tsukashita M, Nishina T, Wang J, Muranaka H, Ikeda T, Komeda M. Carvedilol may alleviate late cardiac remodelling following surgical ventricular restoration. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010; 37(2):362-367.
3. Shimamoto T, Marui A, Nagata Y, Sato M, Saito N, Takeda T, Ueda M, Ikeda T, Sakata R, Inoue K. A novel approach to prevent spinal cord ischemia: Inoue stent graft with a side branch of small caliber for the reconstruction of the artery of Adamkiewicz. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;139(3):655-659.
4. Yamazaki K, Miwa S, Toyokuni S, Nemoto S, Oriyanhan W, Takaba K, Saji Y, Marui A, Nishina T, Ikeda T, Komeda M. Effect of edaravone, a novel free radical scavenger, supplemented to cardioplegia on myocardial function after cardioplegic arrest: in vitro study of isolated rat heart. *Heart Vessels.* 2009; 24(3):228-235.
5. Wang J, Tsukashita M, Nishina T, Marui A, Yoshikawa E, Muranaka H, Matsuoka S, Ikeda T. Chronic partial unloading restores beta-adrenergic responsiveness and reverses receptor downregulation in failing rat hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009; 137(2): 465-470.
6. Lin X, Tammbara K, Fu M, Yamamoto M, Premaratne GU, Sakakibara Y, Marui A, Ikeda T, Komeda M, Tabata Y. Controlled release of matrix metalloproteinase 1 with or without skeletal myoblasts transplantation improves cardiac function of rat hearts with chronic myocardial infarction. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15(9): 2699-2706.
7. Esaki J, Sakaguchi H, Marui A, Bir SC, Arai Y, Huang Y, Tsubota H, Kanaji T, Ikeda T, Sakata R. Local sustained release of prostaglandin E1 induces neovascularization in murine hindlimb ischemia. *Circ J.* 2009;73(7):1330-1336.

8. Bir SC, Esaki J, Marui A, Yamahara K, Tsubota H, Ikeda T, Sakata R. Angiogenic properties of sustained release platelet-rich plasma: characterization in-vitro and in the ischemic hind limb of the mouse. *J Vasc Surg.* 2009;50(4):870-879.
9. Takeda T, Shimamoto T, Marui A, Saito N, Uehara K, Minakata K, Miwa S, Nakajima N, Ikeda T, Hyon SH, Sakata R. Topical application of a biodegradable disc with amiodarone for atrial fibrillation. *Ann Thorac Surg.* 2011;91(3):734-9.
10. Bir SC, Esaki J, Marui A, Sakaguchi H, Kevil CG, Ikeda T, Komeda M, Tabata Y, Sakata R. Therapeutic Treatment with Sustained-Release Platelet-Rich Plasma Restores Blood Perfusion by Augmenting Ischemia-Induced Angiogenesis and Arteriogenesis in Diabetic Mice. *J Vasc Res.* 2010;48(3):195-205.
11. Yanagi S, Matsumura K, Marui A, Morishima M, Hyon SH, Ikeda T, Sakata R. Oral pretreatment with a green tea polyphenol for cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in an isolated rat heart model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;141(2):511-7.
12. Muranaka H, Marui A, Tsukashita M, Wang J, Nakano J, Ikeda T, Sakata R. Prolonged mechanical unloading preserves myocardial contractility but impairs relaxation in rat heart of dilated cardiomyopathy accompanied by myocardial stiffness and apoptosis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;140(4):916-22.
13. Morishima M, Marui A, Yanagi S, Nomura T, Nakajima N, Hyon SH, Ikeda T, Sakata R. Sustained release of vancomycin from a new biodegradable glue to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* graft infection. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010;11(1):52-5.

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Yamashita JK</u>	A linkage in the developmental pathway of vascular and hematopoietic cells.	Tanaka K, Davie EW	Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008	Springer	Tokyo	2008	363-373
山下 潤	ES細胞、iPS細胞を用いた血管再生医療技術	中辻憲夫	幹細胞の分化誘導と応用 — ES細胞・iPS細胞・体性幹細胞研究最前線—	NTS	東京	2009	253-261
山下 潤	iPS細胞と心血管再生	山口徹、高本眞一、中澤誠、小室一成	Annual Review 循環器2009	中外医学社	東京	2009	1-9
山下 潤	ES細胞による血管の分化再生	田畑泰彦	遺伝子医学MOOK別冊「進み続ける細胞移植治療の実際」	メディカルドゥ社	東京	2008	107-111

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
Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, <u>Yamashita JK</u>	Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A.	PLoS One	6	E16734	2011
<u>Yamamizu K, Yamashita JK</u>	Roles of cyclic adenosine monophosphate signaling in endothelial cell differentiation and arterial-venous specification during vascular development.	Circ J	75	253-260	2011

<u>Yamashita JK</u>	ES and iPS cell research for cardiovascular regeneration.	Exp Cell Res	316	2555-2559	2010
Yamamizu K, Matsunaga T, Uosaki H, Fukushima H, Katayama S, Hiraoka-Kanie M, Mitani K, <u>Yamashita JK</u>	Convergence of Notch and β -catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors.	J Cell Biol	189	325-338	2010
Suzuki H, Shibata R, Kito T, Ishii M, Li P, Yoshikai T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, <u>Yamashita JK</u> , Murohara T, Isobe K.	Therapeutic angiogenesis by transplantation of induced pluripotent stem cell-derived Flk-1 positive cells.	BMC Cell Biol	11	72	2010
Matsuda M, <u>Yamashita JK</u> , Tsukita S, Furuse M.	abLIM3 is a novel component of adherens junctions with actin-binding activity.	Eur J Cell Biol	89	807-816	2010
Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, <u>Yamashita JK</u>	Enhancement of vascular progenitor potential by protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1.	Blood	114	3707-3716	2009
Narazaki G, <u>Yamashita JK</u>	Creations of biological Pacemaker.	Inflammation and Regeneration,	29	123-127	2009
Kuratomi S, Ohmori Y, Ito M, Shimazaki K, Muramatsu SI, Mizukami H, Uosaki H, <u>Yamashita JK</u> , Arai Y, Kuwahara K, Takano M.	The cardiac pacemaker-specific channel Hcn4 is a direct transcriptional target of MEF2.	Cardiovasc Res	83	682-687	2009

Sasaki D, Shimizu T, Masuda S, Kobayashi J, Itoga K, Tsuda Y, <u>Yamashita JK</u> , Yamato M, Okano T.	Mass preparation of size-controlled mouse embryonic stem cell aggregates and induction of cardiac differentiation by cell patterning method.	Biomaterials	30	4384-4389	2009
Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, Sugimoto A, Yamamizu K, Teranishi M, Matsuda H, Matsuoka S, <u>Ikeda T</u> , Komeda M, Sakata R, <u>Yamashita JK</u>	Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells.	Biochem Biophys Res Commun	379	115-120	2009
Narazaki G, Uosaki M, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, <u>Yamashita JK</u>	Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells.	Circulation	118	498-506	2008
Nakao Y, Narazaki G, Hoshino T, Maeda S, Yoshida M, Maejima H, <u>Yamashita JK</u>	Evaluation of anti-angiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse iPS cells.	Bioorg Med Chem Lett	18	2982-2984	2008
Yamahara K, Sone M, Itoh H, <u>Yamashita JK</u> , Yurugi-Kobayashi T, Homma K, Chao TH, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, 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
Matsuda M, Kobayashi Y, Masuda S, Adachi M, Watanabe T, <u>Yamashita JK</u> , Nishi E, Tsukita S, Furuse M	Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization-based expression cloning.	Exp Cell Res	314	939-949	2008
Shimizu N, Yamamoto K, Obi S, Kumagaya S, Masumura T, Shimano Y, Naruse K, <u>Yamashita JK</u> , Igarashi T, Ando J	Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor {beta}.	J Appl Physiol	104	766-772	2008
<u>山下 潤</u>	iPS細胞を用いた心筋再生	心臓	43	3-9	2011

山水康平、 <u>山下 潤</u>	血管発生のメカニズム： 内皮細胞の分化と動脈 形成	細胞工学	29	1075-1081	2010
<u>山下 潤</u>	iPS細胞の発見が心血管 再生医学研究に与えるイ ンパクト	Cardiac Practice	21	17-22	2010
<u>山下 潤</u>	血管内皮細胞の発生・分 化ー血管多様性研究のプ ロローグ	実験医学増 刊「血管研究 と血管治療」	28	28-35	2010
<u>山下 潤</u>	iPS細胞の展望	Cardiovascular Frontier別冊 「特集再生医 療」	1	111-117	2010
<u>山下 潤</u>	心不全に対するiPS細胞 の臨床応用	医学の歩み 「心不全ー 研究と臨床の 最前線ー」	232	559-605	2010
<u>山下 潤</u>	iPS細胞による血管再生 治療の展望	細胞「特集血 管の発生と再 生」	41	18-21	2009
<u>山下 潤</u>	iPS細胞研究の現状と展 望	循環器科・特 集「循環器疾 患の再生医療 update」	66	472-480	2009
<u>山下 潤</u>	iPS細胞からの心血管細 胞の分化誘導とその応用	臨床検査	53	1097-1103	2009
<u>山下 潤</u>	iPS細胞研究の現状と展 望	分子血管病・ 特集「幹細胞 研究の新展 開」	10	18-26	2009
<u>山下 潤</u>	ES細胞およびiPS細胞か らの血管細胞分化	再生医療	8	28-33	2009
<u>山下 潤</u>	ES細胞・iPS細胞からの血 管・リンパ管内皮細胞分 化	分子細胞治療	7	22-28	2008