

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化 研究事業

ヒト心臓内多能性幹細胞と幹細胞増幅因子
bFGF徐放シートのハイブリット移植療法に
よる心筋再生医療の多施設共同型臨床開発

平成22年度 総括研究報告書

主任研究者 松原 弘明

平成23(2011)年5月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化 研究事業

ヒト心臓内多能性幹細胞と幹細胞増幅因子
bFGF徐放シートのハイブリッド移植療法に
よる心筋再生医療の多施設共同型臨床開発

平成22年度 総括研究報告書

主任研究者 松原 弘明

平成23（2011）年5月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告

ヒト心臓内多能性幹細胞と幹細胞増幅因子bFGF徐放シートのハイブリッド移植療法による心筋再生医療の多施設共同型臨床開発

松原 弘明----- 3

II. 分担研究報告

患者選別・登録と臨床試験の実施にむけての準備

夜久 均----- 9

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 1 2

IV. 研究成果の刊行物・別刷----- 1 3

厚生労働科学研究費補助金

(再生医療実用化 研究事業)

(総括)研究報告書

ヒト心臓内多能性幹細胞と幹細胞増幅因子bFGF徐放シートのハイブリッド移植療法による心筋再生医療の多施設共同型臨床開発

(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安全性・有効性確認臨床試験の実施を事業目的とする

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:WO2006/093276)。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・有効性を検証する。その結果をもとに、臨床試験phase I/IIaのプロトコルを作製して、世界で初めての重症心不全へ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ので、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、心筋より約20mg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幅因子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か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。

2) 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相安全性確認のための第1相臨床試験プロトコルを、先端医療振興財団臨床研究情報センター (TRI)

で作成する。低心機能(BF<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(約1千万個)を組み合わせたハイブリッド療法の第1相安全性確認臨床試験を厚生労働省科学技術部会「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」に申請する。

(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府立医大、TRI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

「前臨床試験」

本研究者は大型動物(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腫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(5×10^5 個/kg)、高用量群(5×10^6 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、術後一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、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腫、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

評価解析を行った。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、ホスト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、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。

「第1相安全性確認pilot臨床試験」

重症慢性虚血性心不全に対して、厚生労働省のヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書“重症慢性虚血性心不全に対するヒト心臓幹細胞と幹細胞増幅因子bFGFのハイブリッド自家移植療法の検討”のプロトコールを作成し、申請した。平成21年9月に承認され、現在は第I相安全性確認臨床試験中である(6症例)。上記臨床試験の安全性を確認し、高度医療に申請する。第I相試験の結果を受けて、第II相比較対照有効性確認試験(40症例)を実施する。今後、2年以内に6例の患者に実施する。3例終了の段階で中間評価を外部評価委員より受ける。現在、1例目の臨床試験登録を終え、患者心筋より組織採取し、心筋幹細胞の培養を実施している。

プロトコールの概略をのべる

適格規準

1) 年齢：症例登録時において年齢20歳以上80

歳以下

- 2) 左心機能：術前の検査でLVEFにて15%以上、35%以下
- 3) 臨床病期(心不全分類)：stage D
- 4) 臨床症状(心不全重症度)：NYHA III～IV度
- 5) 冠動脈バイパス術適応病変：前項5-2-2の冠動脈造影法において主要冠動脈に有意狭窄を有し、冠動脈バイパス術の適応がある
- 6) viabilityのある領域：上記冠動脈病変に起因する障害心筋領域で、造影心MRIによる評価において以下の規準が満たされていること
 - ① 梗塞領域が18分割心区域分類法で2領域以上存在する
 - ② すべての梗塞領域の遅延造影濃染部が、短軸像において心筋壁に対し50%以下の場合、または遅延造影濃染部が51%以上の領域を含む場合でも、同部位が1領域以下に限定される場合
 - 注1) 同部位に対するバイパス術の既往は問わない
 - 注2) 冠動脈の罹患枝数は問わない
 - 注3) 該当のviabilityのある領域が複数存在する場合は、梗塞領域の大きい方を細胞移植領域とする
- 7) 試験参加について文書による説明がなされ、文書同意の得られた者

除外規準

- 1) 28日以内の新規の心筋梗塞、不安定狭心症発症
- 2) 左室切除術もしくは弁形成術(置換術を含む)を必要とする症例 *1
- 3) 心筋生検禁忌の症例*2
- 4) 悪性新生物を有する患者及び3年以内にその既往のある患者
- 5) 血液透析患者
- 6) 肝硬変患者(ICG15分停滞率 30%以上)
- 7) コントロール不良の糖尿病患者(HbA1c>8.0)
- 8) 5cm以上の大動脈瘤(解離性含む)
- 9) 心原性ショック
- 10) 活動性感染症(サイトメガロ感染症を含む)
- 11) 薬物依存症(アルコール心筋疾患を含む)
- 12) HIV抗体陽性

13) 活動性出血性疾患(消化管出血、外傷その他)

14) ゼラチンアレルギーの既往*3

*1 左室切除術の必要な症例とは、造影心MRIにおいて梗塞部心筋の濃染部が心筋壁に対して51%以上の領域が2領域以上にわたる症例とする。

*2 心筋生検禁忌の症例とは以下の症例とする

- ① 心原性ショック状態の患者
- ② カテコラミン等を治療に必要とする鬱血性心不全状態の患者
- ③ II度以上の房室ブロックの患者

*3 ゼラチンアレルギーについては詳細な既往歴の聴取及び、登録前にパッチテスト、ゼラチンIgEの検査において陰性であることを確認する

採取、調製、移植又は投与の方法

被験者患者右心室から、心筋生検法を用いて15～20mgの心筋組織を採取し、平成19年8月通達「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従いGMP準拠の細胞調整施設である京都府立医科大学再生医療・細胞治療研究センター(以下CPCと略す)において、無菌的に自家心臓幹細胞を単離、体外増幅培養を行う。被験者の400mL末梢血から採取分離した血清を用いて5-6週間の細胞培養の後、CPCにおいて生理食塩水に 5×10^5 個/kgに調整、懸濁する。プロトコール治療はまず冠動脈バイパス術を行い、その後に、培養自家心臓幹細胞を障害心筋領域に均等に20箇所、筋肉注射する。その後、bFGF徐放シートを同部位に貼付する。

安全性についての評価

細菌試験、真菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドキシン試験を、培養工程における無菌性の検証を細胞調整の各工程において、細胞製剤標準書SOPに従い行う。

幹細胞としての安全に関しては長期継代株における核型異形発生の有無の確認、免疫不全マウス皮下へのヒト自家心臓幹細胞の移植実験における造腫瘍性の確認を全症例において行う。有害事象発現時・中間評価の際は、本臨床研究から独立した専門家で構成される効果安全性評価委員会が研究責任者の依頼を受けて情報を評価する。

第I相臨床試験

phase I/IIa臨床試験プロトコールを作製し、厚生労働省科学技術部会「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」に申請し、平成21年9月の承認を受け、平成22年4月より京都府立医科大学において第I相臨床試験(目標症例6例)を先行開始した。平成23年3月までに3例のプロトコール治療が終了している。3例のいずれの症例においても有害事象なく経過、臨床症状、心機能に有意な改善を認めており現在中間評価を実施している段階である。

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。平成20～22年度の研究実績として、世界初のヒト心筋幹細胞移植治療の前臨床開発から臨床試験の実施までが達成されており、現在標準治療化に向けた高度医療申請、第二相試験の開始に向けて多施設共同試験の体制整備(プラットフォーム化)を進めている。

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大幅に向上させ、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

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。GMP準拠CPC活用、細胞培養技術・細胞品質・移植技術の検証、臨床試験プロトコルの妥当性、は厚生労働省科学技術部会「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」にて、承認された。今後の第1相安全性確認臨床試験の結果、第2相有効性安全性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 Shigematsu A, Matsubara H, Ikehara S. (他 7 人) Signaling from fibroblast growth factor receptor 2 in immature hematopoietic cells facilitates donor hematopoiesis after intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Stem Cells Dev.* 19:1679-86, 2010.
- 2 Isodono K, Matsubara H. (他 8 人) PARM-1 is an endoplasmic reticulum molecule involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. *PLoS ONE.* 5:e9746, 2010.
- 3 Kusaba T, Matsubara H. (他 8 人) Klotho is associated with VEGF receptor-2 and transient receptor potential canonical-1 Ca^{2+} channel to maintain endothelial integrity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:19308-13, 2010.
- 4 Yokoi H, Matsubara H. (他 1 2 人) Bone marrow AT1 augments neointima formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitors via platelet-derived SDF-1 α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30:60-7, 2010.
- 5 Kimata M, Matsubara H (他 1 3 人) p53 and TIGAR regulate cardiac myocyte energy homeostasis under hypoxic stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299:H1908-16,

2010.

- 6 Nakagawa Y, Matsubara H. (他 1 1 人) Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2 accelerate the atherosclerotic intimal calcification in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30:1908-15, 2010.
- ### 2. 学会発表
1. Koide M, Ikeda K, Kitamura Y, Akakabe Y, Nakagawa Y, Matsubara H. ARIA regulates ischemia-induced angiogenesis and vasculogenesis through modulating the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway. *American Heart Association (米国心臓病学会)* 2010 Nov 13-17, Chicago, USA
 2. Nakagawa Y, Ikeda K, Kurimoto-Nakano R, Uraoka M, Koide M, Akakabe Y, Kitamura Y, Matsubara H. Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2 accelerate atherosclerotic intimal calcification. *American Heart Association (米国心臓病学会)* 2010 Nov 13-17, Chicago, USA
 3. Nakamura H, Matoba S, Iwai-Kanai E, Kimata M, Hoshino A, Nakaoka M, Katamura M, Okawa Y, Mita Y, Tatsumi T, Matsubara H. p53-mediated acceleration of mitochondrial oxygen consumption promotes lipotoxicity via SCO2 in diabetic mice. *American Heart Association (米国心臓病学会)* 2010 Nov 13-17, Chicago, USA
 4. Hoshino A, Matoba S, Iwai-Kanai E, Kimata M, Nakamura H, Nakaoka M, Katamura M, Okawa Y, Mita Y, Tatsumi T, Matsubara H. p53-mediated decrease in ROS signal reduces mitophagy via inactivation of Bnip3 to aggravate cardiac damage after ischemic injury. *American Heart Association (米国心臓病学会)* Nov. 13-17, 2010. Chicago, USA
 5. Doue T, Iwai-Kanai E, Matoba S, Ogawa K, Matsubara H. Imaging oxidative stress in unstable atherosclerotic plaque with iodine-125-labeled 4-hydroxy-2-nonenal in vivo. *American*

- Heart Association (米国心臓病学会) Nov. 13-17, 2010. Chicago, USA
6. Taniguchi T, Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Miyagawa K, Amano K, Isodono K, Imoto H, Tagawa M, Takehara N, Asada S, Adachi A, Morimoto T, Takahashi T, Oh H, Ueyama T, Matsubara H. MURC, muscle-restricted coiled-coil protein, regulates caveolae morphology and induces hypertrophy in cardiomyocytes. American Heart Association (米国心臓病学会) Nov. 13-17, 2010. Chicago, USA
 7. Nakamura H, Matoba S, Iwai-Kanai E, Kimata M, Hoshino A, Nakaoka M, Katamura M, Tatsumi T, Matsubara H. p53 promotes heart failure in diabetic cardiomyopathy. 日本循環器学会総会 2010年3月5-7 京都、日本
 8. Kimata M, Matoba S, Iwai-Kanai E, Nakamura H, Hoshino A, Nakaoka M, Katamura M, Tatsumi T, Matsubara H. p53/TIGAR System Inhibits Glucose Metabolism and Augments Myocyte Apoptosis in Ischemic heart. 日本循環器学会総会 2010年3月5-7 京都、日本
 9. Hoshino A, Matoba S, Iwai-Kanai E, Kimata M, Nakamura H, Nakaoka M, Katamura M, Tatsumi T, Matsubara H. p53 inhibits autophagy and accelerates apoptotic cell death through mitochondrial redox signal in ischemic myocardium. 日本循環器学会総会 2010年3月5-7 京都、日本
- 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

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化 研究事業)

(分担)研究報告書

患者選別・登録と臨床試験の実施にむけての準備

(分担)研究者 夜久 均 京都府立医科大学 心臓血管外科

研究要旨

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の適用となる患者選別・登録、臨床試験の実施にむけた準備を実施した。厚生労働省のヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書“重症慢性虚血性心不全に対するヒト心臓幹細胞と幹細胞増幅因子bFGFのハイブリッド自家移植療法の検討”のプロトコールを作成し申請した。

A. 研究目的

臨床試験phase I/IIaのプロトコールを主任研究者らと協力して作製して、適用となる患者選別・登録を実施し、世界で初めての重症心不全への心筋再生医療の臨床試験の実施を目的とする。

B. 研究方法

「第1相安全性確認pilot臨床試験」

重症慢性虚血性心不全に対して、厚生労働省のヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書“重症慢性虚血性心不全に対するヒト心臓幹細胞と幹細胞増幅因子bFGFのハイブリッド自家移植療法の検討”のプロトコールを作成し、平成21年9月に認可された。

プロトコールの概略をのべる

適格規準

- 1) 年齢：症例登録時において年齢20歳以上80歳以下
- 2) 左心機能：術前の検査でLVEFにて15%以上、35%以下
- 3) 臨床病期(心不全分類)：stage D
- 4) 臨床症状(心不全重症度)：NYHA III～IV度
- 5) 冠動脈バイパス術適応病変：前項5-2-2の冠動脈造影法において主要冠動脈に有意狭窄を有し、冠動脈バイパス術の適応がある
- 6) viabilityのある領域：上記冠動脈病変に起因する障害心筋領域で、造影心MRIによる評価において以下の規準が満たされていること

- ① 梗塞領域が18分割心区域分類法で2領域以上存在する
- ② すべての梗塞領域の遅延造影濃染部が、短軸像において心筋壁に対し50%以下の場合、または遅延造影濃染部が51%以上の領域を含む場合でも、同部位が1領域以下に限定される場合

注1) 同部位に対するバイパス術の既往は問わない

注2) 冠動脈の罹患枝数は問わない

注3) 該当のviabilityのある領域が複数存在する場合は、梗塞領域の大きい方を細胞移植領域とする

- 7) 試験参加について文書による説明がなされ、文書同意の得られた者

除外規準

- 1) 28日以内の新規の心筋梗塞、不安定狭心症発症
- 2) 左室切除術もしくは弁形成術(置換術を含む)を必要とする症例 *1
- 3) 心筋生検禁忌の症例*2
- 4) 悪性新生物を有する患者及び3年以内にその既往のある患者
- 5) 血液透析患者
- 6) 肝硬変患者(ICG15分停滞率 30%以上)
- 7) コントロール不良の糖尿病患者(HbA1c>8.0)

- 8) 5cm以上の大動脈瘤(解離性含む)
- 9) 心原性ショック
- 10) 活動性感染症(サイトメガロ感染症を含む)
- 11) 薬物依存症(アルコール心筋疾患を含む)
- 12) HIV抗体陽性
- 13) 活動性出血性疾患(消化管出血、外傷その他)
- 14) ゼラチンアレルギーの既往*3

- *1 左室切除術の必要な症例とは、造影心MRIにおいて梗塞部心筋の濃染部が心筋壁に対して51%以上の領域が2領域以上にわたる症例とする。
- *2 心筋生検禁忌の症例とは以下の症例とする
 - ① 心原性ショック状態の患者
 - ② カテコラミン等を治療に必要とする鬱血性心不全状態の患者
 - ③ II度以上の房室ブロックの患者
- *3 ゼラチンアレルギーについては詳細な既往歴の聴取及び、登録前にパッチテスト、ゼラチンIgEの検査において陰性であることを確認する

採取、調製、移植又は投与の方法

被験者患者右心室から、心筋生検法を用いて15～20mgの心筋組織を採取し、平成19年8月通達「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従いGMP準拠の細胞調整施設である京都府立医科大学再生医療・細胞治療研究センター(以下CPCと略す)において、無菌的に自家心臓幹細胞を単離、体外増幅培養を行う。被験者の400mL末梢血から採取分離した血清を用いて5-6週間の細胞培養の後、CPCにおいて生理食塩水に 5×10^5 個/kgに調整、懸濁する。プロトコール治療はまず冠動脈バイパス術を行い、その後、培養自家心臓幹細胞を障害心筋領域に均等に20箇所、筋肉注射する。その後、bFGF徐放シートを同部位に貼付する。

安全性についての評価

細菌試験、真菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドキシン試験を、培養工程における無菌性の検証を細胞調整の各工程において、細胞製剤標準書SOPに従い行う。

幹細胞としての安全に関しては長期継代株における核型異形発生の有無の確認、免疫不全マウス皮下へのヒト自家心臓幹細胞の移植実験における

造腫瘍性の確認を全症例において行う。有害事象発現時・中間評価の際は、本臨床研究から独立した専門家で構成される効果安全性評価委員会が研究責任者の依頼を受けて情報を評価する。

第I相臨床試験

phase I/IIa臨床試験プロトコールを作製し、厚生労働省科学技術部会「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」に申請し、平成21年9月の承認を受け、平成22年4月より京都府立医科大学において第I相臨床試験(目標症例6例)を先行開始した。平成23年3月までに3例のプロトコール治療が終了している。3例のいずれの症例においても有害事象なく経過、臨床症状、心機能に有意な改善を認めており現在中間評価を実施している段階である。

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。平成20～22年度の研究実績として、世界初のヒト心筋幹細胞移植治療の前臨床開発から臨床試験の実施までが達成されており、現在標準治療化に向けた高度医療申請、第二相試験の開始に向けて多施設共同試験の体制整備(プラットフォーム化)を進めている。

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大幅に向上させ、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

E. 結論

今後の第1相安全性確認臨床試験、第2相有効性安全性臨床試験への展開が期待される。

研究成果の刊行に関する一覧

書籍 (松原 弘明)

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
内藤大督、 松原弘明	心筋再生医療	小室一成	循環器疾患のサイエンス	南山堂	東京	2010	201-208
谷口琢也 松原弘明	心筋虚血に対する細胞移植療法の現況	山口 徹	ANNUAL REVIEW2010 循環器	中外医学社	東京	2010	145-153

雑誌 (松原 弘明)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shigematsu A, <u>Matsubara H</u> , Ikehara S. (他7人)	Signaling from fibroblast growth factor receptor 2 in immature hematopoietic cells facilitates donor hematopoiesis after intra-bone marrow-bone marrow transplantation.	Stem Cells Dev	19	1679-86	2010
Isodono K, <u>Matsubara H</u> . (他8人)	PARM-1 is an endoplasmic reticulum molecule involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rat cardiac myocytes.	PLoS ONE	5	e9746	2010
Kusaba T, <u>Matsubara H</u> . (他8人)	Klotho is associated with VEGF receptor-2 and transient receptor potential canonical-1 Ca ²⁺ channel to maintain endothelial integrity.	Proc Natl Acad Sci USA	107	19308-13	2010
Yokoi H, <u>Matsubara H</u> . (他12人)	Bone marrow AT1 augments neointima formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitors via platelet-derived SDF-1 α .	Arterioscler Thromb Vasc Biol	30	60-7	2010
Kimata M, <u>Matsubara H</u> . (他13人)	p53 and TIGAR regulate cardiac myocyte energy homeostasis under hypoxic stress.	Am J Physiol Heart Circ Physiol	299	H1908-16	2010
Nakagawa Y, <u>Matsubara H</u> . (他11人)	Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2 accelerate the atherosclerotic intimal calcification in vivo.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	30	1908-15	2010

PARM-1 Is an Endoplasmic Reticulum Molecule Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in Rat Cardiac Myocytes

Koji Isodono^{1,2}, Tomosaburo Takahashi^{1,2*}, Hiroko Imoto^{1,2}, Naohiko Nakanishi¹, Takehiro Ogata^{1,2}, Satoshi Asada^{1,2}, Atsuo Adachi^{1,2}, Tomomi Ueyama^{1,2}, Hidemasa Oh^{1,2}, Hiroaki Matsubara^{1,2}

¹ Department of Cardiovascular Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan, ² Department of Experimental Therapeutics, Translational Research Center, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan

Abstract

To identify novel transmembrane and secretory molecules expressed in cardiac myocytes, signal sequence trap screening was performed in rat neonatal cardiac myocytes. One of the molecules identified was a transmembrane protein, prostatic androgen repressed message-1 (PARM-1). While PARM-1 has been identified as a gene induced in prostate in response to castration, its function is largely unknown. Our expression analysis revealed that PARM-1 was specifically expressed in hearts and skeletal muscles, and in the heart, cardiac myocytes, but not non-myocytes expressed PARM-1. Immunofluorescent staining showed that PARM-1 was predominantly localized in endoplasmic reticulum (ER). In Dahl salt-sensitive rats, high-salt diet resulted in hypertension, cardiac hypertrophy and subsequent heart failure, and significantly stimulated PARM-1 expression in the hearts, with a concomitant increase in ER stress markers such as GRP78 and CHOP. In cultured cardiac myocytes, PARM-1 expression was stimulated by proinflammatory cytokines, but not by hypertrophic stimuli. A marked increase in PARM-1 expression was observed in response to ER stress inducers such as thapsigargin and tunicamycin, which also induced apoptotic cell death. Silencing PARM-1 expression by siRNAs enhanced apoptotic response in cardiac myocytes to ER stresses. PARM-1 silencing also repressed expression of PERK and ATF6, and augmented expression of CHOP without affecting IRE-1 expression and JNK and Caspase-12 activation. Thus, PARM-1 expression is induced by ER stress, which plays a protective role in cardiac myocytes through regulating PERK, ATF6 and CHOP expression. These results suggested that PARM-1 is a novel ER transmembrane molecule involved in cardiac remodeling in hypertensive heart disease.

Citation: Isodono K, Takahashi T, Imoto H, Nakanishi N, Ogata T, et al. (2010) PARM-1 Is an Endoplasmic Reticulum Molecule Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in Rat Cardiac Myocytes. PLoS ONE 5(3): e9746. doi:10.1371/journal.pone.0009746

Editor: Arnold Schwartz, University of Cincinnati, United States of America

Received: December 10, 2009; **Accepted:** February 28, 2010; **Published:** March 18, 2010

Copyright: © 2010 Isodono et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, a grant from the Mitsubishi Pharma Research Foundation and Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ttaka@koto.kpu-m.ac.jp

Introduction

Chronic heart failure is a major and increasing public health problem, especially in industrialized societies with aging populations. The rate of hospital admission has increased progressively over the past years, making heart failure one of the most common indications for hospital admission in elderly people [1]. Considerable therapeutic advances including pharmacotherapy such as blockade of renin-angiotensin system and β adrenergic receptor, and nonpharmacologic therapies such as heart transplantation and resynchronization therapy have been made in recent years. However, mortality among patients with heart failure remains still substantial, and the well-beings deteriorate dramatically, underscoring the need for additional therapeutic options [2]. Since there may be significant potential in therapies targeting the novel pathological pathways, it is crucial to understand the molecular mechanisms involved in cardiac pathophysiology, especially ones specifically operated in the hearts.

Apoptosis is a process of innate cellular death, controlled by complex and diverse molecular mechanisms with considerable cell

type specificity. Apoptosis plays important roles in various aspects of biology from development to a wide range of diseases such as cancers and cardiovascular diseases. In the heart, apoptosis is essential for cardiac development such as formation of cardiac valves and outflow tract [3]. Although apoptosis is rare in normal human hearts, the rate of cardiac myocyte apoptosis can increase several hundred fold in dilated and ischemic cardiomyopathies, hypertensive heart disease and arrhythmogenic right ventricular dysplasia, and an association between apoptosis, cardiac myocyte loss, ventricular remodeling and deterioration of systolic performance has been demonstrated in multiple experimental models [4,5]. Although apoptotic processes are tightly regulated by extracellular factors and intracellular signalings, the precise molecular mechanisms governing cardiac myocyte apoptosis have not been fully elucidated, and understanding the regulation of apoptosis is of great importance for the advancement of cardiac biology and for developing novel therapeutic strategies.

In this study, we sought to identify a novel molecule involved in cardiac pathophysiology using efficient signal sequence trap method. Signal sequence trap is a strategy to specifically clone

cDNA fragments with signal sequence, a short hydrophobic stretch of amino acids which mediates targeting of secreted and cell-surface proteins to the cell membrane [6,7]. As secreted and membrane molecules play critical roles in cellular functions and interactions, and are potential therapeutic targets for antagonistic or agonistic strategies, this strategy could be useful to identify novel molecules involved in cardiac pathophysiology. Among the molecules identified, in this study, we analyzed the role of prostatic androgen repressed message-1 (PARM-1) [8] in cardiac myocytes.

Results

Identification of PARM-1 as an endoplasmic reticulum protein expressed in cardiac myocytes

In this study, we applied the efficient signal sequence trap cloning using retrovirus-mediated gene transfer to identify novel transmembrane and secreted molecules expressed in cardiac myocytes [6,9]. Among the molecules identified (Table 1), a transmembrane protein, PARM-1, was selected for further

analysis, because its expression and functions in cardiac myocytes were largely unknown. Our expression analysis revealed that PARM-1 was most abundantly expressed in hearts (Fig. 1A). PARM-1 was also expressed in skeletal muscles and stomachs. These results suggested that PARM-1 could be expressed in striated and smooth muscles. To identify a cell type expressing PARM-1 in the hearts, we separated cardiac myocytes and non-myocytes from neonatal hearts, and expression of PARM-1 in cardiac myocytes and non-myocytes was analyzed. As shown in Fig. 1B, PARM-1 transcript was specifically expressed in cardiac myocytes, but not in non-myocytes, indicating that the major source of PARM-1 in the hearts is cardiac myocytes. To evaluate how PARM-1 expression is regulated during heart development, we analyzed mRNA expression in hearts of embryos, neonates and adult mice (Fig. 1C). PARM-1 mRNA expression in the heart was detected at embryonic day 10.5 (E10.5), increased until neonatal stages and, thereafter remained unchanged through adult stages. To assess subcellular localization of PARM-1 in cardiac myocytes, flag-tagged PARM-1 was expressed in cultured neonatal cardiac myocytes, and the cells were stained with anti-flag antibody.

Table 1. Signal sequence trap screening of cultured neonatal cardiac myocytes.

Symbol	protein name	clone number
Spark	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	33
Nppa	natriuretic peptide precursor type A	13
Tmem9	transmembrane protein 9 (predicted)	10
Coll8a1	procollagen, type XVIII, alpha 1	10
Podd	podocalyxin-like	8
Gpc1	glypican 1	6
Fxyd5	FXID domain-containing ion transport regulator 5	5
Parm1	prostatic androgen repressed message 1	5
Col4a1	procollagen, type IV, alpha 2 (predicted)	4
Col1a1	procollagen, type 1, alpha 1	4
Srl	sarcalumenin	4
Sdc3	syndecan 3	4
Jun	Jun oncogene	3
Dlk1	delta-like 1 homolog (Drosophila)	3
Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3	3
Col4a2	procollagen, type IV, alpha 1	2
Pi16	protease inhibitor 16 (predicted)	2
Notch3	Notch gene homolog 3	2
Tmem9 3f4	transmembrane 9 superfamily protein member 4	1
RGD1562476	similar to Eso3 protein (predicted)	1
Pecam	platelet/endothelial cell adhesion molecule	1
Gnai2	guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 2	1
Spard1	SPARC-like 1	1
Atp6ap2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2	1
Myadm	myeloid-associated differentiation marker	1
Apoe	apolipoprotein E	1
Fstl1	folistatin-like 1	1
Hspa5	heat shock 70 kDa protein 5 (glucose-regulated protein)	1
Sfrp1	secreted frizzled-related protein 1	1
Cd320	CD320 antigen	1
Canx	Calnexin	1

doi:10.1371/journal.pone.0009746.t001

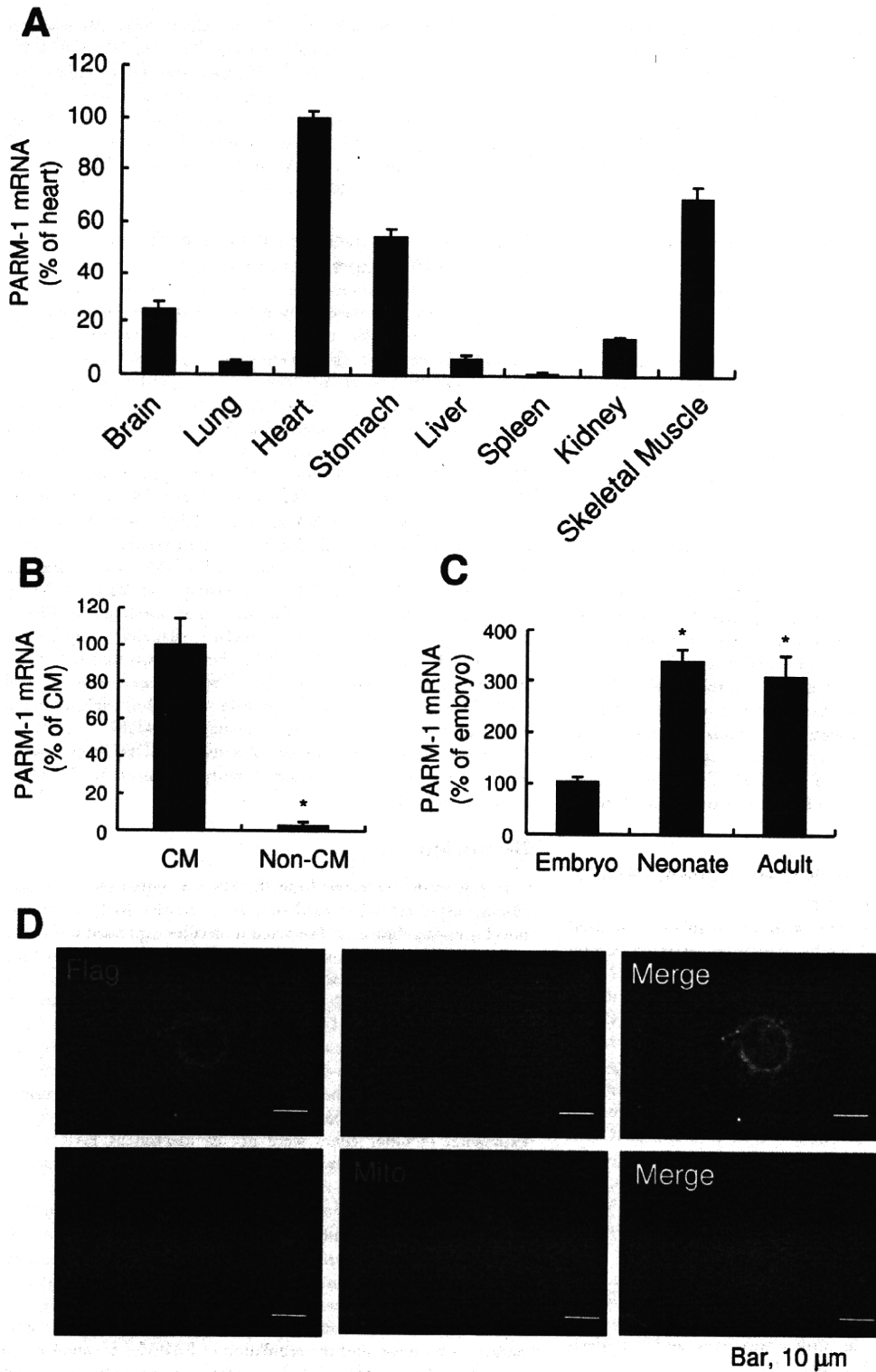


Figure 1. PARM-1 is an ER protein expressed in cardiac myocytes. A, B, C: PARM-1 expression was assessed by kinetic real-time RT-PCR in various tissues of adult mice (A), cultured rat neonatal cardiac myocytes and non-myocytes (B), and developmental mouse hearts (C), respectively. * $P < 0.05$ versus cardiac myocytes (B) or embryonic hearts (C). D: Cellular localization of PARM-1 was analyzed by immunostaining of cultured neonatal rat cardiac myocytes expressing flag-tagged PARM-1 with anti-Flag antibody (left), and anti-GRP78 antibody or MitoTacker (center). Nuclei were stained by DAPI. doi:10.1371/journal.pone.0009746.g001

PARM-1 staining showed cytoplasmic vesicular network pattern with intense perinuclear localization (Fig. 1D). When the cells were co-stained with anti-78 kDa glucose regulated protein/BiP (GRP78) antibody or MitoTracker, PARM-1 was co-localized with GRP78, an endoplasmic reticulum (ER)-resident chaperone, but not with MitoTracker, a mitochondrion-selective dye (Fig. 1D). Thus, PARM-1 is a transmembrane protein predominantly localized in ER in cardiac myocytes.

PARM-1 expression is increased in hearts of hypertensive heart disease

To investigate whether PARM-1 expression was regulated under pathological conditions in the postnatal hearts, we analyzed PARM-1 expression in the hearts of Dahl salt-sensitive rats. Dahl salt-sensitive rats were randomly assigned to receive either a 0.3% NaCl (low-salt) diet or an 8% NaCl (high-salt) diet at the age of 6 weeks. Consistent with the previous reports [10,11], upon a high-salt diet, Dahl salt-sensitive rats developed systemic hypertension, and a subsequent increase in left ventricular weight (LVW) to body weight (BW) ratio until 4 weeks after starting diet (Fig. 2A), indicating the development of left ventricular hypertrophy. Thereafter, a significant increase in lung weight (LW) to BW ratio and atrial weight (AW) to BW ratio was observed at 8 weeks (Fig. 2A), which was concomitant with a marked increase in atrial natriuretic factor (ANF) expression (Fig. 2B), suggesting the transition from hypertrophy to heart failure. In this model, PARM-1 expression was significantly increased at 8 weeks after starting diet, and reached more than 5 fold increase at 12 weeks (Fig. 2B). As ER stress is recently implicated in the pathogenesis of heart diseases such as ischemic heart disease and heart failure [12,13], we analyzed the expression of ER stress markers such as GRP78 and C/EBP homologous protein transcription factor (CHOP) in this model, and found that these ER stress markers were induced at the phase of transition from hypertrophy to heart failure (Fig. 2C).

Inflammatory cytokines and ER stress augment PARM-1 expression in cardiac myocytes

To explore how PARM-1 expression was regulated, cultured cardiac myocytes were stimulated by various hypertrophic stimuli or cytokines, and PARM-1 expression was analyzed by real time PCR. As shown in Fig. 3A, PARM-1 expression was stimulated by proinflammatory cytokines such as TGF- β , TNF- α and IL-1 β , but not by hypertrophic stimuli such as phenylephrine, leukemia inhibitory factor and isoproterenol. Since ER stress developed in hypertensive heart failure (Fig. 2C), we also analyzed PARM-1 expression in ER stress conditions (Fig. 3B). Both thapsigargin and tunicamycin treatments led to induction of GRP78 and CHOP in cardiac myocytes. PARM-1 expression was markedly increased 24 hours after treatment with these ER stress inducers, and continued to be increased up to 48 hours (Fig. 3B). While thapsigargin and tunicamycin increased PARM-1 expression in a dose-dependent manner in cardiac myocytes, neither of them induced PARM-1 expression in cardiac fibroblasts (Fig. 3B), indicating PARM-1 induction by ER stress is also specific for cardiac myocytes. Treatment with thapsigargin and tunicamycin resulted in reduced viability in cardiac myocytes, and the effects were time- and dose-dependent (Fig. 3C).

Silencing PARM-1 augments apoptotic cell death induced by ER stress

To assess functional significance of PARM-1 induction in response to ER stress, PARM-1 expression was silenced by siRNA.

We identified three different siRNAs, which efficiently silenced PARM-1 expression in cardiac myocytes (Fig. 4A). When PARM-1 expression was silenced by siRNA, ER stress-induced apoptotic response was significantly increased compared to control siRNA (Fig. 4B). Silencing PARM-1 expression further reduced cell viability in response to ER stress inducers. These results indicated that increased expression of PARM-1 in response to ER stress has a protective role in cardiac myocytes.

PARM-1 silencing decreases PERK and ATF6, and increases CHOP expression in ER stress condition

In the last set of experiments, we analyzed the effects of PARM-1 silencing on the signal transduction pathways mediating ER stress responses. In ER stress/unfolded protein response (UPR), misfolded proteins are first recognized by ER-resident chaperons such as GRP78. The status of protein folding in ER lumen is then sensed and transduced by three ER membrane proteins, PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6) and endoribonuclease inositol-requiring enzyme-1 (IRE-1), each of which defines a distinct arm of ER stress responses [12,13,14]. Expression of GRP78, ATF6 and IRE-1, phosphorylation of PERK and mRNA splicing of XBP-1 were induced by ER stress inducers, thapsigargin or tunicamycin, in cardiac myocytes (Fig. 5A). Although silencing PARM-1 expression did not change GRP78 and IRE-1 expression, and XBP-1 splicing, expression of PERK and ATF6, and phosphorylation of PERK were markedly attenuated by PARM-1 silencing, only in the settings of ER stress (Fig. 5A). It has been shown that ER stress-induced apoptosis signal is mediated by increased expression of CHOP, and activation of Caspase-12 and c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) [12,13,14]. While silencing of PARM-1 expression did not alter JNK and Caspase-12 activation, CHOP expression by ER stress inducers was significantly enhanced by PARM-1 silencing (Fig. 5B).

Discussion

In this study, we carried out the efficient signal sequence trap cloning using retrovirus-mediated gene transfer [6,9] to identify novel transmembrane and secreted molecules expressed in cardiac myocytes. Through this screening, several genes, which have not been widely recognized to be expressed in cardiac myocytes, were identified. These include PARM-1, glypican-1, podocalyxin-like and CD320 antigen, and our expression analysis verified that these genes were indeed expressed in cardiac myocytes (data not shown). As PARM-1 expression was most significantly modulated in the hearts of hypertensive heart disease model of Dahl salt-sensitive rats, we focused PARM-1 in this study. While changes in expression of other genes were not as marked as PARM-1 in this model (data not shown), changes in expression level could not designate the biological significance, and the roles of these other gene products in cardiac myocytes will be an important issue to be studied in the future studies.

PARM-1, also referred to as castration induced prostatic apoptosis-related protein 1 (Cipar1), is originally identified as a gene overexpressed in the prostate of castrated rats [8]. PARM-1 is expressed in the epithelial cells of involuting rat prostates after androgen removal, and the regulation of PARM-1 by androgen is limited to the prostates [8]. In contrast, in prostate cancer cell lines, and in human prostate cancer xenograft, CWR22, PARM-1 is constitutively expressed, and PARM-1 expression is positively regulated by androgen in CWR22 xenograft [15]. While the kinetics of PARM-1 expression is highly correlated with the development of apoptosis after castration, transient expression of

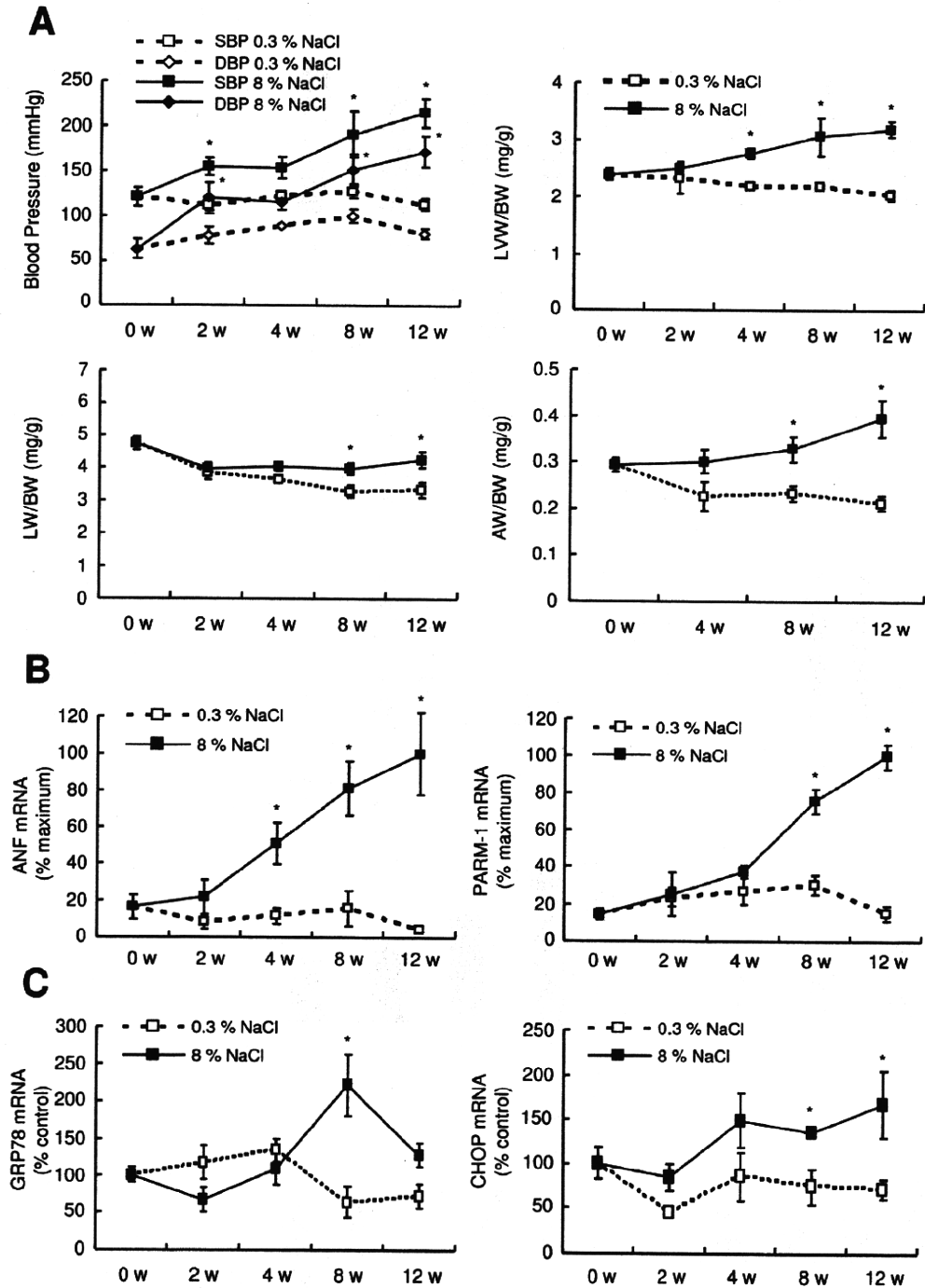


Figure 2. PARM-1 expression and ER stress response was activated in hypertensive heart disease model of Dahl salt-sensitive rats. A: The animals were subjected to a high- (8% NaCl, n = 12 for each time point) or low-salt diet (0.3% NaCl, n = 8 for each time point). Blood pressure and left ventricular weight (LVW), Body weight (BW), lung weight (LW) and atrial weight (AW) were measured at the indicated periods of time after starting the designated diet. B, C: ANF and PARM-1 expression (B), and ER stress markers such as GRP78 and CHOP (C) were analyzed by kinetic real-time PCR on cDNAs from the hearts of Dahl salt-sensitive rats. *P<0.05 versus a low-salt diet group at the respective time point. doi:10.1371/journal.pone.0009746.g002

PARM-1 does not induce programmed cell death [8]. Although ectopic expression of human PARM-1 in a prostate cancer cell line results in increased colony formation [15], suggesting a probable

role of PARM-1 in cell proliferation, the others reported that transient expression of rat PARM-1 does not alter the proliferative property of another prostate cancer cell line [16]. Thus, the

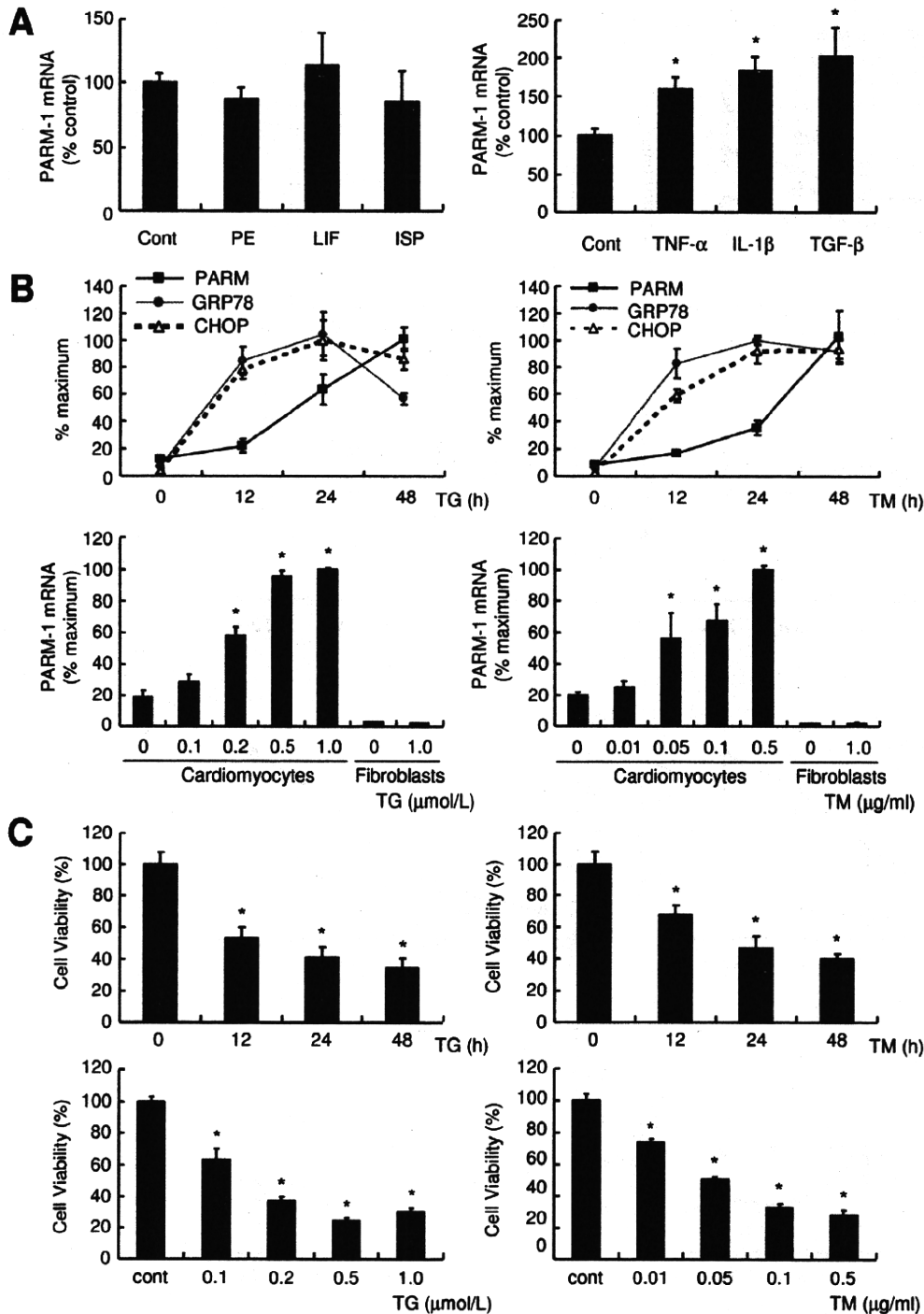


Figure 3. PARM-1 expression was induced by inflammatory cytokines and ER stress inducers specifically in cardiac myocytes. *A:* Cultured rat neonatal cardiac myocytes were stimulated by hypertrophic stimuli such as 100 μ mol/l phenylephrine (PE), 1000 U/ml leukemia inhibitory factor (LIF) and 10 μ mol/l isoproterenol (ISP), or inflammatory cytokines such as 100 ng/ml TNF- α , 5 ng/ml IL-1 β and 4 ng/ml TGF- β . PARM-1 expression was analyzed 48 hours after stimulation. *B:* Cardiac myocytes were treated with 0.5 μ mol/l thapsigargin (TG) or 0.1 μ g/ml tunicamycin (TM) for the indicated periods of time, and GRP78, CHOP and PARM-1 expression was analyzed by kinetic real time PCR. *C:* Cardiac myocytes and fibroblasts were treated with TG or TM for 48 hours at the indicated concentration, and PARM-1 expression was analyzed. *D:* Cardiac myocytes were treated with TG or TM as indicated, and cell viability was assessed by WST-8 assay. **P*<0.05 versus non-treated control cells. doi:10.1371/journal.pone.0009746.g003

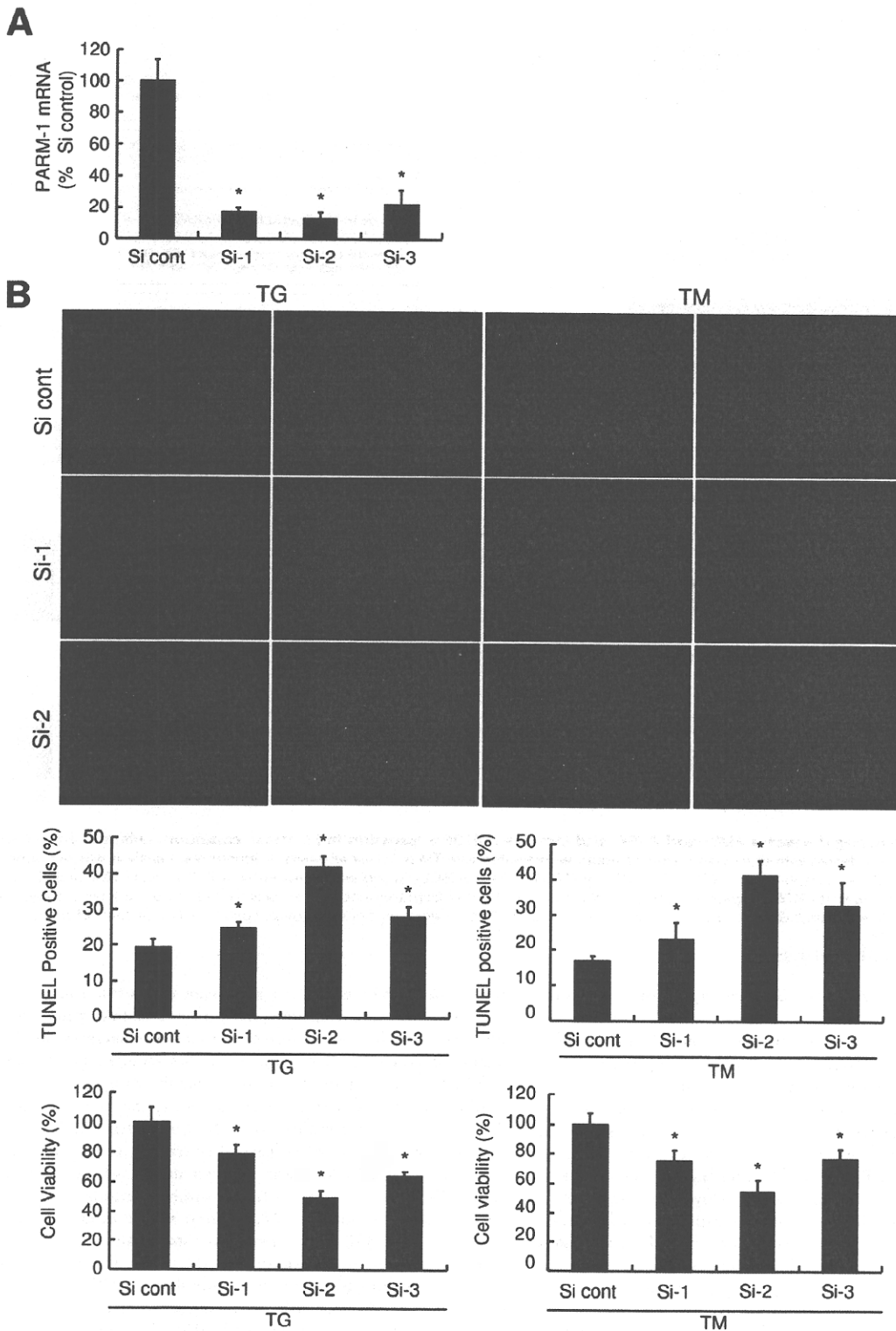


Figure 4. Silencing of PARM-1 augmented apoptotic response to ER stress. A: Cultured neonatal rat cardiac myocytes were transfected with 30 nmol/l of three different siRNA duplexes, and assessed for PARM-1 expression 24 hours after transfection. B: Cells were treated with TG or TM 72 hours after transfection with siRNAs for 24 hours. Apoptotic cell death was assessed by TUNEL assay, and cell viability was analyzed by WST-8 assay. * $P < 0.05$ versus control siRNA (Si cont). doi:10.1371/journal.pone.0009746.g004