

2010-24043A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

プロスタグランジン- I_2 合成酵素遺伝子を用いた
肺動脈性肺高血圧症に対する
新規治療法の開発に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 福田 恵 一

平成23(2011)年5月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

プロスタグランジン-I₂合成酵素遺伝子を用いた
肺動脈性肺高血圧症に対する
新規治療法の開発に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 福田 恵一

平成23(2011)年5月

目次

I. 総括研究報告書	
プロスタグランジン-12 合成酵素遺伝子を用いた 肺動脈性肺高血圧症に対する 新規治療法の開発に関する研究	1
福田 恵一	
II. 分担研究報告書	
プロスタサイクリン合成酵素による 遺伝子治療の臨床的背景に関する研究 肺動脈性肺高血圧症の予後と予後規定因子	8
佐藤 徹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	9
IV. 研究成果の刊行物・別刷	19

プロスタグランジン- I_2 合成酵素遺伝子を用いた
肺動脈性肺高血圧症に対する新規治療法の開発に関する研究

研究代表者	福田 恵一	慶應義塾大学	医学部	循環器内科	教授
研究分担者	佐藤 徹	杏林大学	医学部	循環器内科	教授
研究協力者	川上 崇史	慶應義塾大学	医学部	循環器内科	助教
	片岡 雅晴	慶應義塾大学	医学部	循環器内科	助教
	田邊 忠	慶應義塾大学	医学部	再生医学教室	講師

研究要旨

昨年度までに GMP レベルで大量生産したアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いたプロスタグランジン I_2 合成酵素(PGIS)の遺伝子治療ベクター(AAV-PGIS)を用いて小動物と犬で安全性試験を行った。AAV ベクターは 1 型と 2 型を用意し、マウスを用いてベクターの作成効率、安全性・有効性を比較検討した。その結果、最終的に 2 型ベクターを用いて GMP レベルの AAV-PGIS の生産を開始した。また、ベクターの安全性試験を行った。前臨床試験として使用するコモンマーモセットサルの肺動脈性肺高血圧症モデルを作出した。また、AAV-PGIS ベクターの安全性試験および品質検査試験を施行し、臨床応用へ向けてのベクターの安全性を確認した。さらに、マーモセットサルにおいて AAV-PGIS 投与後の血中 PGIS 代謝産物の濃度を経時的に測定することにより、臨床応用へ向けてヒトでの AAV-PGIS 必要量の検討を行うことを目標とした。

A. 研究目的

肺動脈性肺高血圧症（以下、肺高血圧症）は若年女性を中心に発症する予後不良の疾患である。近年、プロスタグランジン I_2 (PGI $_2$)、エンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステ

ラーゼV阻害薬等の薬剤が開発され、病気の進行を遷延させ予後が改善されつつあるが、後二剤の効果はさほど強いものではない。一方、肺高血圧症に対して予後改善が実証されており現在最も強力な治療薬とされているのが PGI $_2$ (エポプロステノール) であるが、投与が鎖骨下静脈からの持続静注療法によるた

め、患者の QOL は著しく制限されている。PGI2 合成酵素 (PGIS) は本申請者の一人田邊忠がクローニングした遺伝子であり、PGI2 を合成できる唯一の酵素である。本研究の目的は申請者らが特許を有する PGIS を既にヒトに臨床応用され安全性が確立されているアデノ随伴ウイルスベクターに組み込み、これを用いて肺高血圧症を治療しようというものである。すでに申請者らは低酸素 (10%酸素) 負荷による肺高血圧を惹起したマウスに対して PGIS を搭載した本ウイルスベクター (AAV-PGIS) を用いた遺伝子治療を行った。この方法は AAV-PGIS をマウス大腿部骨格筋に投与し、骨格筋細胞から産生される PGI2 により肺高血圧症を治療しようというもので、AAV-PGIS は投与部の骨格筋に限局して強力に発現し、その発現は長期間維持されることが示された。さらに肺微小血管の肥厚を抑制することが可能であり、肺動脈圧上昇の抑制、右室肥大の抑制が可能であること、長期予後を改善することが可能であることが示された。

本研究では、第一に前臨床試験に用いるための GMP レベルの AAV-PGIS ベクターを工業レベルで生産する仕組みを確立することを目的とした。そして、この AAV ベクターとしては、我々が使用してきた生産効率がよいタイプ 1 型と、生産効率は落ちるが既に臨床使用されているタイプ 2 型を使用し、ベクターの作成効率、安全性・有効性を検討することを目的とした。

また、前臨床試験として使用するコモンマーモセットサルの原因性肺高血圧モデルを作出する方法を確立することを目的とした。

さらに、中国の Joinn との共同研究により、臨床応用を目指して AAV-PGIS ベクターの安全性を確立することを目的とした。

さらに、マーモセットサルにおいて AAV-PGIS 投与後の血中 PGIS 代謝産物の濃度を経時的に測定することにより、臨床応用へ向けてヒトでの AAV-PGIS 必要量の検討を行うことを目標とした。

B. 研究方法

(1) タイプ 1 型と 2 型のウイルスベクターの肺高血圧症に対する治療効果の検討

低酸素条件にて作成する肺高血圧症モデルマウスに対して、前述の本元にて作製した GMP レベルのタイプ 1 型 AAV-PGIS とタイプ 2 型 AAV-PGIS の治療効果の検討を行った。肺高血圧症が完成する期間後に、右心カテーター検査や組織学的解析等により、治療効果を検討した。

(2) コモンマーモセットサルを用いた肺動脈性肺高血圧症モデルの作成

エステル型モノクロタリン (MCT-E) を用いて肺高血圧モデルを作成する。モノクロタリンは肺高血圧症を惹起することが知られている植物アルカロイドであるが、これ自身は前駆物質であり、体内にはいるとエステル型に変化し、活性型になることが知られている。マーモセットでは予備実験によりモノクロタリンによる肺高血圧の出来方に大きな個体差があり、より安定した作成を目指すためエステル型を使用することとした。

マーモセットを開胸して右室に MCT-E を静注した後に、テレメトリーシステムの圧測定カテーターを右室内に挿入して閉胸し、その後数週間にわたり飼育することにより、肺高血圧症の出現による右室圧の上昇を認

めるか否かを検討した。テレメトリーシステムは圧を常時モニタリングすることの可能な機器である。

(3) AAV ウイルスベクターの安全性試験

中国北京市昭衍 (JOINN Laboratories) に依頼し、第三者機関において AAV-PGIS の安全性試験を開始した。マウス・ラット・犬等を用いて AAV-PGIS を投与し、採血検査・病理組織学的検査等を施行して、急性毒性試験、長期毒性試験を施行した。また、AAV-PGIS の品質検査試験を施行した。

(4) コモンマーモセットサルを用いた AAV-PGIS 投与後の血中 PGIS 代謝産物の経時変化の検討

臨床応用を目指すにあたり、ヒトにおいて必要となる AAV-PGIS 量を検討することは重要である。また、AAV-PGIS 投与をどれだけの期間毎に繰り返すかを検討することも重要となってくる。そこで、我々は、AAV-PGIS をヒトと同じ霊長類であるマーモセットに投与した際の PGIS 代謝産物である 6-keto-PGF_{1α} の血中濃度を ELISA 法または RIA 法にて測定することを検討した。この結果から、ヒトへの臨床応用の際の AAV-PGIS 必要量の検討や投与間隔の検討を行っていく。

(倫理面の考慮)

遺伝子組み換え実験・遺伝子導入実験はすべて大学の遺伝子組み換え実験に関する監査委員会に申請書を提出し、認可を得ている。動物実験は大学の動物実験委員会に申請し、認可を得ている。AAV-PGIS は P2 レベルの実験室で研究が出来るため、研究上の支障となることはない。本研究 (治療実験) はヒト臨

床試験の前段階までであるため、大学の倫理委員会に審査請求する必要はない。健常例、肺動脈性肺高血圧症症例における採血は通常の臨床検査の余剰血液を使用するため、新たな負担を加えることはなく、特に問題となることはない。

C. 研究結果

(1) タイプ 1 型と 2 型のウイルスベクターの肺高血圧症に対する治療効果の検討

右室収縮期圧・右室重量体重量比・免疫染色による肺動脈中膜肥厚率等の解析で、タイプ 1 型 AAV-PGIS またはタイプ 2 型 AAV-PGIS による治療により、有意に肺高血圧症の改善を認めた。なお、その治療効果にはタイプ 1 型 AAV-PGIS とタイプ 2 型 AAV-PGIS の両群間では有意差は認めなかった。以上の結果より、タイプ 1 型 AAV-PGIS とタイプ 2 型 AAV-PGIS の両ベクターの肺高血圧症に対する治療効果は同等であると考えられた。タイプ 2 型 AAV は既に他疾患に対して臨床応用されており、ヒトに対する安全性が確立している。そのため、今後はタイプ 2 型 AAV-PGIS を用いて臨床応用の実現を目指していくことを検討している。

(2) サルを用いた肺動脈性肺高血圧症モデルの作成

2.5mg/kg の MCT-E を投与した際には長期間観察しても有意な肺高血圧症が作成できなかった。5.0mg/kg の MCT-E を投与した際には、投与翌日に急性肺水腫によりマーモセットは死亡した。4.0mg/kg の MCT-E を投与した際には、投与 1 週間後に肺水腫により死亡した。3.0mg/kg の MCT-E を投与した際には、当初は 25-30mmHg であった右室収縮期圧が、その後

徐々に増加し、8週間後には75-80mmHgまで増加した。肺高血圧症の作成に成功したといえる。

ただし、3.0mg/kgのMCT-Eを投与してさらに追加実験を行ったところ、2匹で軽度の肺高血圧（右室収縮期圧）40mmHgが観察されたのみであり、他の数匹ではMCT-E投与後数日後に急性肺水腫により死亡した個体もあり、また、MCT-E投与して2カ月以上観察しても肺高血圧を認めない個体もいて、個体差があり肺高血圧症作成の効果にばらつきがある。

今後は、MCT-E投与濃度のより詳細な検討と作成効率の検討を行っていく。

（3）AAV ウイルスベクターの安全性試験および品質検査試験

タイプ2型AAV-PGISを用いた安全性試験を施行した。その結果、マウスを用いた筋注及び静注（ 5×10^{10} vg/mouse）による急性毒性試験において、全ての動物で特記すべき異常は無かった。また、筋注（ 1×10^9 vg/mouse, 3×10^9 vg/mouse）による中枢神経系への作用を検査する試験において（投与後72時間までの検査）、薬剤に起因する異常は見られなかった。さらに、犬を用いた筋注（ 1×10^{10} vg/dog, 3×10^{10} vg/dog）による一般薬理試験／循環呼吸器への作用を検査する試験において、薬剤に起因する異常は見られなかった。

さらには、AAV-PGISの品質検査試験を施行した。無菌試験にて製剤の無菌性を確認した。エンドトキシン試験において基準に適合することを確認した。BSA含有量を測定し、問題が無いことを確認した。

（4）コモンマーモセットサルを用いたAAV-PGIS投与後の血中PGIS代謝産物の経時

変化の検討

正常マーモセット個体に対して、 1×10^9 vg/body, 1×10^{10} vg/body, 1×10^{11} vg/bodyのAAV-PGISを大腿筋へ筋注し、1週間後・2週間後・以後2週間ごとに採血検査を施行し、血中6-keto-PGF 1α の濃度を測定していく。今研究は現在進行中であり、今年度中の結果報告を予定している。

D. 考察

GMPレベルのAAVベクターを中国北京の本元正阻基因技術有限公司において作出した。タイプ1型のAAVとタイプ2型のAAVの生産効率、治療効果を比較し、最終的にタイプ2型のベクターを作成することとし、安全性試験に充分量のベクターをGMPレベルで作成した。

エステル型モノクロタリンによるコモンマーモセットを用いた肺高血圧モデルでは、投与濃度の調整により肺高血圧が作成できることが明らかとなった。霊長類における肺高血圧症モデル作成は従来において報告がなく、世界初のモデル作成の実現として本研究のみでなく、今後の世界中の肺高血圧研究領域においても非常に意義のある結果が得られたと思われる。今後は投与量のより詳細な検討とモデル作成効率の向上を図る。また、PGIS-AAV治療の臨床応用へ向けた前臨床試験としてマーモセット肺高血圧症モデルを用いた検討を行っていく。

また、臨床応用に向けて、安全性試験および品質検査試験を実施して、AAV-PGISに安全性上および品質上臨床応用へ向けて問題がないことを確認することができ、臨床応用へ向けて大きく前進することができたと思われる。

今年度は、臨床応用へ向けて、ヒトに対する AAV-PGIS 必要量の検討などを詳細に行っていく予定である。

E. 結論

プロスタグランジン I2 合成酵素のアデノ随伴ウイルスの GMP 生産拠点を確保した。タイプ 1 型と 2 型の両者のベクターでの治療効果を検討し、肺高血圧症モデルマウスを用いた検討において、両群間では治療効果に有意差が無いことを確認した。GMP レベルの AAV ベクターをタイプ 2 型 AAV にて作出した。

前臨床試験として使用するコモンマーモセットサルの肺高血圧モデルを作出する方法を確立することに成功した。

タイプ 2 型 AAV ウイルスベクターの安全性試験および品質検査試験を実施し、安全性と品質性を確認することができた。

F. 研究発表

- 論文発表
- Shinsuke Yuasa, Takeshi Onizuka, Kenichiro Shimoji, Yohei Ohno, Toshimi Kageyama, Sung Han Yoon, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Hisayuki Hashimoto, Takahiko Nishiyama, Ruri Kaneda, Mitsushige Murata, Fumiyuki Hattori, Shinji Makino, Motoaki Sano, Satoshi Ogawa, Richard P Harvey, Keiichi Fukuda. *Zac1* is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. *Circ Res*. 106:1083-91, 2010. (Corresponding author, IF = 9.989)
- Mitsushige Murata, Shugo Tohyama, Keiichi Fukuda. The impact of recent advances in cardiovascular regenerative medicine on clinical therapeutics and drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics*. 2010; 126:109-18. (Corresponding author, IF = 9.443)
- Gregory G. Neely, Keiji Kuba, Anthony Cammarato, Kazuya Isobe, Sabine Amann, Liyong Zhang, Mitsushige Murata, Lisa Elmén, Rinku Sarangi, Keiichi Fukuda, Andrew A Hicks, Peter P. Pramstaller, Sai Subramaniam, Karen Ocorr, Rolf Bodmer, and Josef M, et al. Penninger. A global *in vivo Drosophila* RNAi screen identifies NO T3 as a conserved regulator of heart function. *Cell*. 2010; 141:142-53. (IF = 31.253)
- Yusuke Takada, Sayaka Konno, Shinji Makino, Keiichi Fukuda, Yoshiyuki Imai, Akira Kudo, Atsushi Kawakami. Epigenetic control of cardiomyocyte production in response to a stress during the medaka heart development. *Develop Biology*. 2010;340:30-40 (IF=4.416)
- Fumiyuki Hattori, Keiichi Fukuda. Strategies for making regenerative cardiomyocytes work properly and cooperatively with host myocardium. *Experimental and Molecular Medicine*. 2010;42:155-65. (IF=2.376)
- Masayoshi Kinoshita, Takashi Ariizumi, Shinsuke Yuasa, Shunichiro Miyoshi, Shinji Komazaki, Keiichi Fukuda, Makoto Asahima. Creating frog heart as an organ: *in vitro*-induced heart functions as circulatory organ *in vivo*. *Int. J. Dev. Biol*. 2010;54(5):851-6.. (IF=2.830)
- Kensuke Kimura, Miho Sakai-Kimura, Ryuichi Takahashi, Atsushi Watanabe, Shigeta Noma, Keiichi Fukuda. Too friable to treat? *Lancet* 2010;375: 1578. (IF=28.409)
- Kensuke Kimura, Hideaki Kanazawa, Masaki Ieda, Haruko Kawaguchi-Manabe, Yoshiko Miyake, Takashi Yagi, Takahide Arai, Motoaki Sano, Keiichi Fukuda. Norepinephrine-induced nerve growth factor depletion causes cardiac sympathetic denervation in severe heart failure. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2010 (in press) (IF=2.130)
- Hisayo Fujita, Mariko Hida, Katsuyoshi Kanamoto, Michio Nakada, Keiichi Fukuda. Cyclic stretch induces proliferation and TGF- β 1-mediated apoptosis via p38 and ERK in ureteric bud cells. *Am J Physiol (Renal Physiology)*. 2010 299:F648-55.
- Kenichiro Kinouchi, Atsuhiko Ichihara, Motoaki Sano, Ge-Hong Sun-Wada, Yoh Wada, Yoichi Oshima, Mariyo Sakoda, Asako Kurauchi-Mito, Kanako Bokuda, Tatsuya Narita, Yoshitaka Tamai, Hiromu Sato, Minoru Takemoto, Susan E. Quaggin, Keiichi Fukuda, and Hiroshi Itoh. The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H⁺-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circ Res* 2010; 107: 30-4. (IF = 9.989)
- Tomohisa Seki, Shinsuke Yuasa, Mayumi Oda, Toru Egashira, Kojiro Yae, Dai Kusumoto, Hikari Nakata, Shugo Tohyama, Hisayuki Hashimoto, Masaki Kodaira, Yohei Okada, Hiroyuki Seimiya, Noemi Fusaki,

- Mamoru Hasegawa, Keiichi Fukuda. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. **Cell Stem Cell**. 2010; 7:11-4. (Corresponding author, IF = 23.563)
12. Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, Muki M, Kimura T, Okada Y, Yozu R, Shukunami C, Hiraki Y, Kudo A, Ogawa S, Fukuda K. Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. **J Clin Invest**. 2010;120: 2292-306. (Corresponding author, IF = 17.089)
 13. Uchida K, Aramaki M, Nakazawa M, Yamagishi C, Makino S, Fukuda K, Nakamura T, Takahashi T, Mikoshiba K, Yamagishi H. Gene knock-outs of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors types 1 and 2 result in perturbation of cardiogenesis. **PLoS One**. 2010;5. e12500. (IF = 4.351)
 14. Zhang Y, Sano M, Shinmura K, Tamaki K, Katsumata Y, Matsuhashi T, Morizane S, Ito H, Hishiki T, Endo J, Zhou H, Yuasa S, Kaneda R, Suematsu M, Fukuda K. 4-hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. **J Mol Cell Cardiol**. 2010 ;49:576-86. (IF = 5.054)
 15. Takahashi T, Anzai T, Kaneko H, Mano Y, Anzai A, Nagai T, Kohno T, Maekawa Y, Yoshikawa T, Fukuda K, Ogawa S. Increased C-reactive Protein Expression Exacerbates Left Ventricular Dysfunction and Remodeling after Myocardial Infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2010; 299: H1795-804. (IF = 3.712)
 16. Shinmura K, Tamaki K, Sano M, Murata M, Yamakawa H, Ishida H, Fukuda K. Impact of long-term caloric restriction on cardiac senescence: Caloric restriction ameliorates cardiac diastolic dysfunction associated with aging. **J Mol Cell Cardiol**. 2011;50: 117-27. (IF = 5.054)
 17. Tamura Y, Matsumura K, Sano M, Tabata H, Kimura K, Ieda M, Arai T, Ohno Y, Kanazawa H, Yuasa S, Kaneda R, Makino S, Nakajima K, Okano H, Fukuda K. Neural Crest-Derived Stem Cells Migrate and Differentiate Into Cardiomyocytes After Myocardial Infarction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2011;31:582-9. (IF = 7.235)
 18. Kimura T, Miyoshi S, Takatsuki S, Tanimoto K, Fukumoto K, Soejima K, Fukuda K. Safety and efficacy of pericardial endoscopy by percutaneous subxyphoid approach in swine heart in vivo. **J Thorac Cardiovasc Surg**. 2010 Nov 10. (IF = 3.063)
 19. Li W, Yamashita H, Hattori F, Chen H, Tohyama S, Satoh Y, Sasaki E, Yuasa S, Makino S, Sano M, Fukuda K. Simple autogenic feeder cell preparation for pluripotent stem cells. **Stem Cell Res**. 2011;6:83-9. (IF = 3.368)
 20. Nagai T, Anzai T, Kaneko H, Mano Y, Anzai A, Maekawa Y, Takahashi T, Meguro T, Yoshikawa T, Fukuda K. C-reactive protein overexpression exacerbates pressure overload-induced cardiac remodeling through enhanced inflammatory response. **Hypertension**. 2011;57:208-15. (IF = 6.614)
 21. Morikawa T, Murata M, Okuda S, Tsuruta H, Iwanaga S, Murata M, Satoh T, Ogawa S, Fukuda K. Quantitative analysis of right ventricular function in patients with pulmonary hypertension using three-dimensional echocardiography and a two-dimensional summation method compared to magnetic resonance imaging. **Am J Cardiol**. 2011;107:484-9. (IF = 3.575)
 22. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. **Cell Metab**. 2011; 13: 170-82. (IF = 17.350)
 23. Kaneko H, Anzai T, Nagai T, Anzai A, Takahashi T, Mano Y, Morimoto K, Maekawa Y, Itoh H, Yoshikawa T, Ogawa S, Fukuda K. Human C-reactive protein exacerbates metabolic disorders in association with adipose tissue remodeling. **Cardiovasc Res**. 2011 Mar 29. [Epub ahead of print] (IF = 5.947) e-pub online
 24. Kaneko H, Anzai T, Takahashi T, Kohno T, Shimoda M, Sasaki A, Shimizu H, Nagai T, Maekawa Y, Yoshimura K, Aoki H, Yoshikawa T, Okada Y, Yozu R, Ogawa S, Fukuda K. Role of vascular endothelial growth factor-A in development of abdominal aortic aneurysm. **Cardiovasc Res**. 2011 Mar 24. (IF = 5.947) e-pub online
 25. Hara M, Yuasa S, Shimoji K, Onizuka T, Hayashiji N, Ohno Y, Arai T, Hattori F, Kaneda R, Kimura K, Makino S, Sano M, Fukuda K. G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. **J Exp Med**. 2011 208:715-27. (Corresponding author, IF = 15.219)
 26. 金澤英明、福田恵一。医学のあゆみ特集『心不全：研究と臨床の最前線』 『心不全に

- おける交感神経異常:交感神経の可塑性と新しい病態生理』2010年;232巻5号:370-377. 医歯薬出版
27. 福田恵一。『ヒト心臓再生医療に向けた治療戦略とその展望』 診療と新薬 2010年47巻3号52-54 医事出版
 28. 金澤英明、福田恵一。『心不全における交感神経の分化転換』 Heart View 2010年8月14巻8号60-65
 29. 村田光繁、福田恵一。『循環器系の遺伝学一』 最新医学 2010年9月増刊号 65巻1981-1993
 30. 関倫久、湯浅慎介、福田恵一。『末梢血0.1mlからのiPS細胞樹立技術』 Medical Bio 2010年第7巻6号 22-27
 31. 楠本大、福田恵一。『iPS細胞と心筋再生』 細胞 2010年42巻12号15-19
 32. 湯浅慎介、福田恵一。『心血管領域再生医療の進歩—成体幹細胞、ES細胞からiPS細胞へ』 Angiology Frontier 2010年9月9巻3号58-63
 33. 福田恵一。『iPS細胞由来心筋細胞の医薬品開発への応用』 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 42巻4月号2011年
 34. 福田恵一。『iPS細胞は心血管領域に何をもたらすか』 心臓 2011年43巻1号107-108
 35. 湯浅慎介、福田恵一。『循環器疾患iPS細胞研究の展開』 心臓2011年43巻1号10-13
1. 学会発表
 1. Keiichi Fukuda, Generation of iPS cell from a single droplet of peripheral blood and its application to human heart failure. The fourth international conference on cell therapy. November 11th, 2010. Seoul, Korea. (招待講演)
 2. Keiichi Fukuda, “Generating human induced pluripotent stem cell from a droplet of peripheral blood without genome destruction” Congress. The second Annual Stem Cell Asia Regenerative Medicine 27, October 2010, The Ritz Carlton Hotel, Seoul, Korea (招請講演)
 3. Keiichi Fukuda, The 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologist Jointly sponsored by Asia-Pacific Developmental Biology Network. June 23rd, 2010. (招請講演)
 4. Keiichi Fukuda, “Remodeling of Cardiac Sympathetic Nerves by Heart Failure” Symposium. International Meeting of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism.: April 1st. 2010. Nara, Japan (招請講演)
 5. 福田恵一『iPS細胞を用いた循環器疾患の病態解明と心不全治療法の開発』 第10回再生心臓血管外科治療研究会 平成23年2月23日 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート
 6. 福田恵一 『iPS細胞を用いた遺伝性不整脈の病態解明と心不全治療法の開発』 第219日本循環器学会関東甲信越地方会 教育講演 平成23年2月5日 新横浜プリンスホテル
 7. 『心不全治療の現状と未来』 福田恵一 第18回日本血管生物学会ランチョンセミナー 平成22年12月3日 大阪
 8. 『Generation of iPS cells from a single droplet of peripheral blood and its application to human heart failure』 福田恵一 第18回日本血管生物学会シンポジウム 平成22年12月3日 大阪
 9. 福田恵一 『臨床医にも出来るiPS細胞樹立法:血液一滴からiPS細胞を創る』 日本心電学会総会 モーニングセミナー 平成22年10月9日 大分全日空ホテル
 10. 福田恵一 iPS細胞の電気生理学:心電学への応用とその将来展望『ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた心臓病学へのアプローチ』 第45回理論心電図研究会 平成22年10月8日 大分全日空ホテル
 11. 福田恵一 『iPS細胞を用いた心筋再生の治療戦略とその展望』 第14回日本適応医学会 イブニングセミナー 平成22年7月2日 千代田区一ツ橋学術総合センター
 12. 福田恵一 iPS細胞等多能性幹細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの新展開『ヒトiPS細胞からの心筋細胞分化誘導技術の開発—機能発現の確認と疾患患者iPS細胞からの創薬支援技術への展開の可能性—』 第37回日本トキシコロジー学会 ワークショップ 平成22年6月17日 沖縄コンベンションセンター
 13. 福田恵一 『iPS細胞研究最前線:臨床応用と疾患研究』第47回日本臨床分子医学会 学術集会 シンポジウム2 平成22年4月11日 東京国際フォーラム
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
特になし

プロスタサイクリン合成酵素による遺伝子治療の臨床的背景に関する研究
—肺動脈性肺高血圧症の予後と予後規定因子

研究分担者 佐藤 徹 杏林大学医学部循環器内科 教授

研究要旨

肺動脈性肺高血圧症の予後は極めて不良であったが、プロスタグランジン製剤、エンドセリン受容体拮抗薬、PDE5 阻害剤の開発により改善が認められるようになった。2004 年より 2009 年までに慶應義塾大学医学部、杏林大学医学部に入院した 113 人の肺動脈肺高血圧症について 1 年予後、3 年予後が 98%、86% であり約 15% の患者の予後は依然極めて不良であった。また予後規定因子を検索したところ 20 の諸所見の中でアルカリフォスファターゼが最も予後と関係し、特発性肺動脈性肺高血圧症（65 例）だけを見ると血小板が予後との関連が強く、遺伝子治療の適応を決めるうえで有用であった。

A. 研究目的

日本では 1999 年以降、プロスタグランジン製剤、エンドセリン受容体拮抗薬、PDE5 阻害剤が相次いで使用されるようになり、自覚症状、臨床所見の改善が得られるようになった。予後の改善の度合いに関する報告は少なく、またこのような新しい治療薬が開発された時代における予後規定因子に関する検討は皆無であり、今回はこの点に関する解析を試みた。

B. 研究方法

2004 年より 2009 年までに慶應義塾大学医学部、杏林大学医学部に入院した 113 人の肺動脈肺高血圧症について 20 の所見（血行動態指標 9、生化学指標 6）に関して解析を行った。予後については Kaplan-Meier 曲線を描出した。予後規定因子に関しては Cox proportional hazard model を使用して解析した。

C. 研究結果

(ア) 予後 平均観察期間が 35 ± 18 ヶ月で、1 年予後 98%、3 年予後 86% と、1991 年報告の特発性肺動脈性肺高血圧症の予後と比し、著明な改善が認められた。
(イ) 予後規定因子 Cox proportional hazard model に多変量解析を使用して解析すると血清アルカリフォスファターゼが肺動脈性肺高血圧症の予後と最も密接な関連を示した。中間値の 234 IU/L で 2 群に分類すると高値群の 3 年予後が 76% であったのに対し、低値群は 93% と有意な差があった。特発性のみ（65 例）に限定して予後規定因子をみると血小板が最も予後と関係し

ていた。中間値 $200,000/\text{mm}^3$ で 2 群に分類すると低値群の 3 年予後 76% であったのに対し高値群は 95% であった。

D. 考察

肺動脈性肺高血圧症に対する新しい血管拡張剤の使用により著明な予後の改善が認められた。逆にこれらの治療によっても 3 年以内に約 15% の死亡率があり、当研究事業が目的としているプロスタグランジンを使用した遺伝子治療の必要性が認識されると考えられる。また遺伝子治療も早期に開始したほうが有用と思われる。そのためには予後不良症例の早期選別と、遺伝子治療の適応決定が必要となるが、血清アルカリフォスファターゼや血小板値に注意することにより遺伝子治療が早期に開始され更に予後が改善するものと思われる。

E. 結論

新しい治療によっても約 15% の肺動脈性肺高血圧症患者は 3 年以内に死亡し、血清アルカリフォスファターゼや血小板値が予後決定に重要であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

投稿中

H. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
Shinji Makino, Keiichi Fukuda.	Methods for Differentiation of Bone Marrow Derived Stem Cells into Myocytes		Regenerating the Heart: Stem Cells and the Cardiovascular System			2010	Chapter 6
金澤英明、 福田恵一	『心不全における自律神経の適応機構』	山口徹、 高本眞一、 小室一成、 佐地勉	Annual Review 2011 循環器	中外医学社	東京	2011	87-93
金田るり、 福田恵一	『心不全は遺伝しますか？』	野出孝一	かかりつけ医・非専門医の心不全治療Q&A	南山堂	東京	2011	46-47
湯浅慎介、 福田恵一	『心筋再生療法はどこまで進んでいますか？』	野出孝一	かかりつけ医・非専門医の心不全治療Q&A	南山堂	東京	2011	289-291
金澤英明、 福田恵一	『心不全における交感神経異常：交感神経の可塑性と新しい病態生理』	小室一成	医学のあゆみ特集『心不全：研究と臨床の最前線』	医歯薬出版	東京	2010年	370-377
福田恵一	『ヒト心臓再生医療に向けた治療戦略とその展望』	福田恵一	診療と新薬	医事出版	東京	2010	52-54
佐藤徹	浮腫を主訴に来院した慢性肺疾患をもつ70歳男性	松尾 汎	むくみの診かた「例で読み解く浮腫診療」	文光堂	東京	2010	32-38
佐藤徹	急性肺血栓塞栓症 肺高血圧症	吉川純一 渡辺弘之 大門雅夫	循環器専門医研修テキスト	文光堂	東京	2010	359-364

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shinsuke Yuasa, Takeshi Onizuka, Kenichiro Shimoji, Yohei Ohno, Toshimi Kageyama, Sung Han Yoon, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Hisayuki Hashimoto Takahiko Nishiyama, Ruri Kaneda, Mitsushige Murata, Fumiyuki Hattori, Shinji Makino, Motoaki Sano, Satoshi Ogawa, Richard P Harvey, Keiichi Fukuda	Zac1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis.	Circ Res	106	1083-91	2010
Mitsushige Murata, Shugo Tohyama, Keiichi Fukuda.	Impacts of recent advances in cardiovascular regenerative medicine on clinical therapeutics and drug discovery.	Pharmacology & Therapeutics.	126	109-118	2010
Gregory G. Neely, Keiji Kuba, Anthony Cammarato, Kazuya Isobe, Sabine Amann, Liyong Zhang, Mitsushige Murata, Lisa Elmén, Rinku Sarangi, Keiichi Fukuda, Andrew A Hicks, Peter P. Pramstaller, Sai Subramaniam, Karen Ocorr, Rolf Bodmer, Josef M, et al.	A global <i>in vivo</i> <i>Drosophila</i> RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function.	Cell	141	142-153	2010
Yusuke Takada, Sayaka Konno, Shinji Makino, Keiichi Fukuda, Yoshiyuki Imai, Akira Kudo, Atsushi Kawakami.	Epigenetic control of cardiomyocyte production in response to a stress during the medaka heart development.	Develop Biology	340	30-40	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fumiyuki Hattori, Keiichi Fukuda.	Strategies for ensuring that regenerative cardiomyocytes function properly and in cooperation with the host myocardium.	Experimental and Molecular Medicine.	42	155-165	2010
Masayoshi Kinoshita, Takashi Ariizumi, Shinsuke Yuasa, Shunichirou Miyoshi, Shinji Komazaki, Keiichi Fukuda, Makoto Asashima.	Creating frog heart as an organ: <i>in vitro</i> -induced heart functions as circulatory organ <i>in vivo</i> .	Int. J. Dev. Biol.	54(5)	851-856	2010
Kensuke Kimura, Miho Sakai-Kimura, Ryuichi Takahashi, Atsushi Watanabe, Shigetaka Noma, Keiichi Fukuda.	Too friable to treat?	Lancet	375	1578	2010
Kensuke Kimura, Hideaki Kanazawa, Masaki Ieda, Haruko Kawaguchi-Manabe, Yoshiko Miyake, Takashi Yagi, Takahide Arai, Motoaki Sano, Keiichi Fukuda.	Norepinephrine-induced nerve growth factor depletion causes cardiac sympathetic denervation in severe heart failure.	Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.			2010
Hisayo Fujita, Mariko Hida, Katsuyoshi Kanemoto, Keiichi Fukuda, Michio Nakada.	Cyclic stretch induces proliferation and TGF- β 1-mediated apoptosis via p38 and ERK in ureteric bud cells.	Am J Physiol (Renal Physiology).	299	F648-655	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kenichiro Kinouchi, Atsuhiko Ichihara, Motoaki Sano, Ge-Hong Sun-Wada, Yoh Wada, Yoichi Oshima, Mariyo Sakoda, Asako Kurauchi-Mito, Kanao Bokuda, Tatsuya Narita, Yoshitaka Tamai, Hiromu Sato, Minoru Takemoto, Susan E. Quaggin, Keiichi Fukuda, Hiroschi Itoh.	The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H ⁺ -ATPase assembly in murine cardiomyocytes.	Circ Res	107	30-34	2010
Tomohisa Seki, Shinsuke Yuasa, Mayumi Oda, Toru Egashira, Kojiro Yae, Dai Kusumoto, Hikari Nakata, Shugo Tohyama, Hisayuki Hashimoto, Masaki Kodaira, Yohei Okada, Hiroyuki Seimiya, Noemi Fusaki, Mamoru Hasegawa, Keiichi Fukuda.	Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells.	Cell Stem Cell.	7	11-14	2010
Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, Mukai M, Kimura T, Okada Y, Yozu R, Shukunami C, Hiraki Y, Kudo A, Ogawa S, Fukuda K.	Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents.	J Clin Invest.	120	2292-2306	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Uchida K, Aramaki M, Nakazawa M, Yamagishi C, Makino S, Fukuda K, Nakamura T, Takahashi T, Mikoshiha K, Yamagishi H.	Gene knock-outs of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors types 1 and 2 result in perturbation of cardiogenesis.	PLoS One.	5	e12500	2010
Zhang Y, Sano M, Shinmura K, Tamaki K, Katsumata Y, Matsuhashi T, Morizane S, Ito H, Hishiki T, Endo J, Zhou H, Yuasa S, Kaneda R, Suematsu M, Fukuda K.	4-hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway.	J Mol Cell Cardiol.	49	576-686	2010
Takahashi T, Anzai T, Kaneko H, Mano Y, Anzai A, Nagai T, Kohno T, Maekawa Y, Yoshikawa T, Fukuda K, Ogawa S.	Increased C-reactive Protein Expression Exacerbates Left Ventricular Dysfunction and Remodeling after Myocardial Infarction.	Am J Physiol Heart Circ Physiol.	299	H1795-1804	2010
Shinmura K, Tamaki K, Sano M, Murata M, Yamakawa H, Ishida H, Fukuda K.	Impact of long-term caloric restriction on cardiac senescence: Caloric restriction ameliorates cardiac diastolic dysfunction associated with aging.	J Mol Cell Cardiol.	50	117-127	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tamura Y, Matsumura K, Sano M, Tabata H, Kimura K, Ieda M, Arai T, Ohno Y, Kanazawa H, Yuasa S, Kaneda R, Makino S, Nakajima K, Okano H, Fukuda K.	Neural Crest-Derived Stem Cells Migrate and Differentiate Into Cardiomyocytes After Myocardial Infarction.	Arterioscler Thromb Vasc Biol.	Jan 6		2011
Kimura T, Miyoshi S, Takatsuki S, Tanimoto K, Fukumoto K, Soejima K, Fukuda K.	Safety and efficacy of pericardial endoscopy by percutaneous subxyphoid approach in swine heart in vivo.	J Thorac Cardiovasc Surg.	Nov 10		2010
Li W, Yamashita H, Hattori F, Chen H, Tohyama S, Satoh Y, Sasaki E, Yuasa S, Makino S, Sano M, Fukuda K.	Simple autogeneic feeder cell preparation for pluripotent stem cells.	Stem Cell Res.	6	83-89	2011
Nagai T, Anzai T, Kaneko H, Mano Y, Anzai A, Maekawa Y, Takahashi T, Meguro T, Yoshikawa T, Fukuda K.	C-reactive protein overexpression exacerbates pressure overload-induced cardiac remodeling through enhanced inflammatory response.	Hypertension	57	208-215	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morikawa T, Murata M, Okuda S, Tsuruta H, Iwanaga S, Murata M, Sato T, Ogawa S, Fukuda K.	Quantitative analysis of right ventricular function in patients with pulmonary hypertension using three-dimensional echocardiography and a two-dimensional summation method compared to magnetic resonance imaging.	Am J Cardiol.	107	484-489	2011
Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H.	Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle.	Cell Metab.	13	170-182	2011
Kaneko H, Anzai T, Nagai T, Anzai A, Takahashi T, Mano Y, Morimoto K, Maekawa Y, Itoh H, Yoshikawa T, Ogawa S, Fukuda K.	Human C-reactive protein exacerbates metabolic disorders in association with adipose tissue remodeling.	Cardiovasc Res.			2011 Mar Epub online

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kaneko H, Anzai T, Takahashi T, Kohno T, Shimoda M, Sasaki A, Shimizu H, Nagai T, Maekawa Y, Yoshimura K, Aoki H, Yoshikawa T, Okada Y, Yozu R, Ogawa S, Fukuda K.	Role of vascular endothelial growth factor-A in development of abdominal aortic aneurysm.	Cardiovasc Res.			2011 Mar Epub online
Hara M, Yuasa S, Shimoji K, Onizuka T, Hayashiji N, Ohno Y, Arai T, Hattori F, Kaneda R, Kimura K, Makino S, Sano M, Fukuda K.	G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation.	J Exp Med.	208	715-727	2011
金澤英明、 福田恵一	『心不全における交感神経の分化転換』	Heart View	14 巻 8 号	60-65	2010
村田光繁、 福田恵一	『循環器系の遺伝学一』	最新医学	9 月増刊 号 65 巻	1981- 1993	2010
関倫久、 湯浅慎介、 福田恵一	『末梢血 0.1ml からの iPS 細胞樹立技術』	Medical Bio	第 7 巻 6 号	22-27	2010
楠本大、 福田恵一	『iPS 細胞と心筋再生』	細胞	42 巻 12 号	15-19	2010
湯浅慎介、 福田恵一	『心血管領域再生医療の進歩—成体幹細胞、ES 細胞から iPS 細胞へ』	Angiology Frontier	9 巻 3 号	58-63	2010
福田恵一	『iPS 細胞由来心筋細胞の医薬品開発への応用』	医薬品医療機器 レギュラトリー サイエンス	42 巻 4 月 号		2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
福田恵一	『iPS細胞は心血管領域に何をもたらすか』	心臓	43 巻 1 号	107-108	2011
湯浅慎介、 福田恵一	『循環器疾患 iPS細胞研究の展開』	心臓	43 巻 1 号	10-13	2011
佐藤徹	最良のcombination治療とは	医学のあゆみ	233-7	545-549	2010
佐藤徹	肺動脈性肺高血圧症の診断方法	循環器内科	67-5:	475-481	2010
佐藤徹	肺塞栓症	Medicina	47-8:	1409-1414	2010
佐藤徹	序説：肺高血圧症の概念、分類、治療戦略、予後 治療戦略、予後	治療学	44-8	5-10	2010
佐藤徹、京谷晋吾、松原広巳、国枝武義	肺高血圧症治療の進歩	治療学	44-8	85-93	2010
片岡雅晴、佐藤 徹	Churg-Strauss 症候群に肺高血圧を合併した症例	治療学	44-8	99-100	2010
佐藤徹	肺高血圧症の最新診療早わかり 序論	最新医学	65-8	5	2010
佐藤徹	肺高血圧症の最新診療早わかり	最新医学	65-8	6-11	2010
片岡雅晴、佐藤 徹	エボプロステノールの使用法、効果、副作用	最新医学	65-8	48-53	2010
佐藤徹	プロスタサイクリン誘導体	Heart View別冊	15-1	52-58	2010
伊波巧、池田隆徳、谷合誠一、坂田好美、佐藤徹、藤岡保範、吉野秀朗	Brugada 症候群に類似する臨床所見を示した小児の不整脈原性右室心筋症の 1 例	心臓	42-4	169-175	2010
佐藤徹	軽症肺動脈性肺高血圧症の臨床経過	Therapeutic Research	R31-10	1421-1422	2010