

平成21年04月30日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007年度～2008年度

課題番号：19590811

研究課題名（和文）急性心筋梗塞における血管内皮前駆細胞の動態解析と予後相関の解明

研究課題名（英文）Analysis for the association between mobilization of endothelial progenitor cells and prognosis in patients with acute myocardial infarction

研究代表者

沼口 靖 (NUMAGUCHI YASUSHI)

名古屋大学・医学部・寄附講座准教授

研究者番号：90378224

研究成果の概要：

本研究では、急性心筋梗塞発症時に血管内皮前駆細胞（EPC）が骨髄より動員される現象に着目し、急性期のEPCの動態と慢性期での心筋回復の機序や予後との相関について解析した。分化型EPCを有する患者や血中アディポネクチン濃度の高い患者は、そうでない患者より心血管病を発症したものが有意に少なかった（ $P < 0.05$ ）。これにより急性期のEPCの分化度とアディポネクチン濃度が遠隔期の心筋機能の生体マーカーとして機能しうることが推察された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋梗塞、内皮前駆細胞、再生医学、脂肪酸代謝、アディポカイン

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞は心臓を栄養する冠動脈の血流低下に伴う心筋障害に続く一連の症候群である。急性期に血流低下部位に一致してダメージを受けた心筋には炎症反応が生じるが、同時に修復機転として血管内皮前駆細胞（EPC）が骨髄より動員されることが共同研究者の室原、新谷によって明らかにされた。（Circulation, 2000）急性期に動員される

EPCについては、血管や心筋の再生に関与す

ると推察されているが、量的もしくは質的変化がどのように、またどれだけ臨床的に意義があるのかは未解明であった。そこで本研究においては急性期に骨髄より動員されるEPCが慢性期の病状にどの程度影響を及ぼすかを核医学的手法と血液学的手法を組合せて定量的に解析した。またEPCの機能や動員数に影響を与える因子としてどういった液性因子があるのかを併せて検討した。

2. 研究の目的

本研究では、1) 急性期に動員される EPC の動態と慢性期に至るまでの心筋回復の機序や予後との相関を解明する。2) 急性期・慢性期・遠隔期の各時相における分化型 EPC 量を追跡調査し、それらが心筋機能回復におけるバイオマーカーとして機能しうるかどうかを解析する。3) 急性期に得られた脂肪酸代謝シンチ (BMIPP) の結果や脂肪細胞由来サイトカインの経時的变化を解析し、それらの虚血性心筋症における病態への関与を解明する。の3点を主な研究目的とした。

3. 研究の方法

1) 臨床研究

心筋梗塞発症後ステント留置術によって再還流療法に成功した患者のうち文書で同意書の得られた症例について登録した。発症後7日目に採血により EPC を末梢血より採取し、一部は細胞培養して分化度を測定した。同時期に脂肪酸代謝シンチ (BMIPP) を撮像し、虚血エリアを算定した。無事退院後患者は外来にて管理され、3-6ヶ月後に心筋血流シンチ (Tc シンチ: Myoview) を撮像して血流梗塞エリアを算定し、その回復の度合いと分化度や数量など EPC の各パラメータとを比較した。

またバイオマーカーとしての EPC について動脈硬化の初期段階の検出や、血管内皮機能との相関についても解析した。

2) 基礎研究

EPC の分化や動員数に影響を与える因子として、アディポネクチンに注目し、各種虚血モデルを用いて EPC とアディポネクチンの動態について相関関係を解析した。

臨床研究で得られた結果を、再生医療分野に応用するため、EPC ならびに間葉系幹細胞と遺伝子強制発現を組み合わせた「ハイブリッド細胞療法」の可能性について動物実験で確認した。

4. 研究成果

1) 臨床研究

名古屋大学医学部循環器内科関連病院より同意を得た症例について検体を収集し、観察期間中に症例は86症例を得た。遠隔期症例 (発症後2年以上経過したもの) については80症例最長5.5年の経過を追って管理した。このうち分化型 EPC を有する患者と未分化型 EPC を有する患者を比較した場合、既報のとおり分化型 EPC を有する患者では心筋サルベージが良好であることが症例数が増えても確認された。再発ないしは他の血管性疾患、腎疾患、糖尿病を発症したものは有意に少ない傾向がみられた。(P<0.05)

脂肪由来サイトカインに関して分担研究者柴田らと共にアディポネクチンと心筋サ

ルベージについて解析した。EPC 同様、血中アディポネクチン濃度も心筋梗塞発症後7日目に上昇し、その濃度は慢性期の心筋梗塞サイズと逆相関し、心機能とは正の相関を認めることを発見した。これにより急性期のアディポネクチン濃度が EPC の機能と同様に遠隔期の心機能や心筋梗塞サイズを予知する生体マーカーとして機能しうることが推察された。(Am J Cardiol. 2008にて報告)

心筋梗塞など重篤な動脈硬化疾患の発症を予防するには、動脈硬化病変の初期段階での検出が重要であると考え、分化型 EPC 量とアディポネクチンと血管内皮機能について若年男性ボランティアを対象に解析を行った。分化型 EPC 量・アディポネクチンの両方が血管内皮機能と相関を認めたことから、動脈硬化の初期段階の検出するためのバイオマーカーとして有用であることが示唆された。(Circ J. 2009, FEBS Lett. 2008 および Eur J Endocrinol. 2008にて報告)

2) 基礎研究

①アディポネクチンと EPC について

上記臨床試験において、EPC の分化度とアディポネクチンがそれぞれ独立して急性心筋梗塞後の心筋サルベージを規定する因子であることが示唆されたが、両者の相関については不明であった。

共同研究者の柴田らはマウス下肢虚血モデルを用いて、アディポネクチン欠損マウスでは、虚血後の EPC の循環量が少ないことと、血流回復が遅延していることが判明した。さらに合成されたアディポネクチンの投与やアデノウイルスを用いたアディポネクチンの強制発現によって、アディポネクチン欠損マウスにおいて、もともと少なかった EPC 量が増え、これに伴ってかき血流量も対照である野生型マウスと同等のレベルに回復した。

以上のことからアディポネクチンは EPC の分化度や動員数に直接関与することが示唆された。このことは臨床研究で得られた結果を強く指示する理論的根拠となると考えられた。(FEBS Letter 2008にて報告)

②ハイブリッド細胞療法について

虚血や組織傷害時に動員・活性化される EPC や骨髄由来間葉系幹細胞は、通常の組織を構成する細胞の数倍の成長因子を産生してそれにより、定着した局所の傷害組織をアポトーシスから保護し、再生を促すと考えられている。

この現象を理論的根拠に閉塞性動脈硬化症やバージャー病などの患者を対象に細胞治療が志向され一定の効果を上げているが、問題点として、注入される幹細胞の傷害組織への定着が不十分であること (Graft failure) も指摘されている。このため EPC および骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) に多機能を有する血管保護因子であるプロスタサ

イクリンを過剰発現するためにプロスタサイクリン合成酵素 (PGIS) を EPC や MSC に強制発現させて (ハイブリッド細胞療法)、マウス下肢虚血モデルでその効果を確認した。EPC より MSC の方が、細胞としては有効であり、また MSC 単独で細胞治療を行った場合より、遺伝子導入を組み合わせた方が、有意に虚血からの回復を改善した。特に 1) 足趾の血流回復はハイブリッド細胞療法で従来法より優れていた。2) 遺伝子導入だけでは局所の浮腫を来すなど副作用が見られたため、安全かつ有効な細胞治療には細胞注入と遺伝子の強制発現を組み合わせたハイブリッド細胞療法が次世代の新規再生療法として有用である可能性が示唆された。(Atherosclerosis 2009 にて報告)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

①Ishii M, Numaguchi Y, Okumura K, Kubota R, Ma X, Murakami R, Naruse K, Murohara T. Mesenchymal Stem Cell-Based Gene Therapy with Prostacyclin Synthase Enhanced Neovascularization in Hindlimb Ischemia. Atherosclerosis. 2009 (in press) 査読有

②Miura M, Numaguchi Y, Ishii M, Kubota R, Takeuchi T, Imamura A, Murakami R, Kondo T, Okumura K, Murohara T.

Differentiation capacity of endothelial progenitor cells correlates with endothelial function in healthy young men. Circ J. 2009 (in press) 査読有

③Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Murakami R, Imaizumi M, Kitagawa Y, Murohara T.

Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(1):61-66

査読有.

④Shibata R, Skurk C, Ouchi N, Galasso G, Kondo K, Ohashi T, Shimano M, Kihara S, Murohara T, Walsh K.

Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function. FEBS Lett. 2008;582(11):1607-1612. 査読有

⑤Sugiura T, Kondo T, Kureishi-Bando Y, Numaguchi Y, Yoshida O, Dohi Y, Kimura G, Ueda R, Rabelink TJ, Murohara T.

Nifedipine improves endothelial function: role of endothelial progenitor cells.

Hypertension. 2008;52(3):491-498. 査読有

⑥Shibata R, Numaguchi Y, Matsushita K, Sone T, Kubota R, Ohashi T, Ishii M, Kihara S, Walsh K, Ouchi N, Murohara T.

Usefulness of adiponectin to predict myocardial salvage following successful reperfusion in patients with acute myocardial infarction.

Am J Cardiol. 2008; 101(12):1712-1715 査読有.

⑦Imamura A, Takahashi R, Murakami R, Kataoka H, Cheng XW, Numaguchi Y, Murohara T, Okumura K.

The effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on endothelial function and metabolic risk factors in healthy subjects: the significance of plasma adiponectin levels.

Eur J Endocrinol. 2008;158(2):189-195 査読有.

⑧Li P, Kondo T, Numaguchi Y, Kobayashi K, Aoki M, Inoue N, Okumura K, Murohara T.

Role of bradykinin, nitric oxide, and angiotensin II type 2 receptor in imidapril-induced angiogenesis.

Hypertension. 2008 Feb;51(2):252-258. 査読有

⑨ Yamada T, Kondo T, Numaguchi Y, Tsuzuki M, Matsubara T, Manabe I, Sata M, Nagai R, Murohara T.

Angiotensin II receptor blocker inhibits neointimal hyperplasia through regulation of smooth muscle-like progenitor cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27(11):2363-2369. 査読有

[学会発表] (計5件)

① 沼口靖

虚血時血管新生におけるアンギオテンシンIIの役割

第16回日本血管生物医学会

(2008年12月3日 石川県立音楽堂)

② 沼口靖

Ablation of Insulin-Regulated Aminopeptidase (IRAP/AT4R) Attenuates Lipid Accumulation and Plaque Rupture in ApoE Deficient Mice

アメリカ心臓協会年次学会2008

(2008年11月8日 アメリカカリフォルニア州ニューオリンズ市コンベンションセンター)

③ 沼口靖

磁性ナノ微粒子を用いた間葉系幹細胞シートの下肢虚血治療への応用

第32回日本鉄バイオサイエンス学会

(2008年9月14日 ウェディングプラザアラスカ 青森県)

④ 沼口靖

Ablation of AngiotensinIV Receptor Attenuates Hypofibrinolysis via PAI-1 Down regulation and Reduces Thromboembolism in Injured Arteries.

ATVB Conference2008

(2008年4月17日 CNN センター (アトランタ))

⑤ 沼口靖

1, 再生医療治療時におけるカルシウム拮抗薬シルニジピンの腎機能保護効果について

2, 新規アンギオテンシン受容体 (AT4R) の

動脈傷害後における血栓閉鎖に関する役割について

3, 医工連携研究の成果である細胞シートの虚血下肢血流改善効果について

日本循環器学会総会

(2008年3月28日~30日 福岡マリンメッセ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沼口 靖 (NUMAGUCHI YASUSHI)

名古屋大学・医学部・寄附講座准教授

研究者番号: 90378224

(2) 研究分担者

室原 豊明 (MUROHARA TOYOAKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90299503

新谷 理 (SHINTANI SATOSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 20309777

柴田 玲 (SHIBATA REI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号: 70343689