

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 5 月 1 日現在

機関番号 : 13601

研究種目 : 基盤研究 (B)

課題番号 : 20390222

研究課題名 (和文)

新規糖鎖結合分子による標的心血管組織への細胞・遺伝子・薬物輸送システムの開発

研究課題名 (英文)

Development of cell, gene and drug delivery system to the cardiovascular tissue using a novel cell-surface lectin.

研究代表者 池田 宇一 (IKEDA UICHI)

信州大学・医学系研究科・教授

研究番号 : 30221063

研究成果の概要 (和文) :

糖鎖結合分子 (レクチン) を利用した標的心血管組織への細胞輸送システムを確立し、心血管病の再生医療へ応用することを目指した。心筋細胞や血管平滑筋細胞に存在する新規 GlcNAc 結合型レクチン分子の同定を行ったところ、中間型フィラメントファミリーのビメンチンとデスミンである可能性が明らかになった。さらにこの分子を利用し、GlcNAc で修飾した骨髄細胞を心筋細胞と共培養したところ、両細胞の接着および骨髄細胞の心筋細胞への分化が亢進した。

研究成果の概要 (英文) :

We found a novel function of vimentin and desmin of cardiovascular tissues by which these proteins interact with physiological GlcNAc-bearing ligands on the cell surface through their GlcNAc-binding lectin-like properties. Cell surface coating of bone marrow cells with GlcNAc promoted adhesion of these cells to cardiac myocytes and their regeneration to cardiac myocytes, and this would be useful for the treatment of cardiovascular disease with bone marrow implantation.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間節経費	合計
2008 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：再生医療、糖鎖、遺伝子、心筋梗塞、動脈硬化

## 1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子や細胞を利用した遺伝子治療や再生医療が注目されている。申請者は、これまでサイトカイン遺伝子を用いた動脈硬化の遺伝子治療 (Ito et al. *Circ Res*, 2007; Ito et al. *Hypertension*, 2007) や骨髄幹細胞を用いた心血管疾患の再生治療 (Yoshioka et al. *Stem Cells*, 2005; Shiba et al. *ATVB*, 2006) の研究に従事してきた。特に、再生治療については、自己骨髄細胞移植による重症下肢虚血に対する血管再生療法の多施設臨床試験 Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) の中心メンバーとしてその有効性と安全性を報告している (Tateishi-Yuyama et al. *Lancet*, 2002)。さらに、2004年度から6年間、厚生労働省の「難治性血管炎に対する血管再生療法研究班」(H16-難治-08)の主任研究者として、強皮症などの膠原病患者の末梢血管障害に対する骨髄細胞移植療法の有効性・安全性について多施設で検証している。

しかし、このような骨髄細胞移植療法を行っても、その効果が十分とはいえない症例も多く存在するを経験してきた。そこで、現在行われている治療法の有効性をより高めながら、かつ副作用を軽減する一つの戦略として、標的心血管組織への細胞・遺伝子・薬物輸送システムの開発に取り組み始めた。

生体に存在する糖鎖および糖鎖結合分子であるレクチンは、炎症や感染、組織再生における細胞間同士の認識や情報伝達に関わっている。すでに申請者らは、肝臓ではアジアロ糖タンパク質レセプターと呼ばれるガラクト

ース結合型のレクチンが発現しており、ガラクトースを表面に露出させた骨髄細胞を全身投与すると、肝臓へ効率よく集積し、肝細胞への分化が増強することを明らかにしている (Misawa et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006)。これを契機に、心血管系組織に特異的な糖鎖結合分子 (レクチン) の存在を探索したところ、心筋細胞および血管平滑筋細胞において N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に結合する新規の糖鎖結合分子が存在することを見いだした (Aso et al. *J Control Release*, 2007)。この GlcNAc 結合型レクチンを利用することにより、骨髄細胞・遺伝子・薬物を全身投与で効率よく標的心筋や血管に集積させることが可能になる。これにより、効果の増大と副作用および患者負担を軽減した新たな心臓血管病の治療法の開発が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖鎖工学を利用して、標的心血管組織への細胞・遺伝子・薬物輸送システムを確立し、心臓血管病への臨床応用を目指し、(1) 心筋細胞や血管平滑筋細胞に存在する新規 GlcNAc 結合型レクチン分子の同定と機能解析、(2) この分子を利用した心血管系組織への細胞・遺伝子・薬物輸送システムの開発を行う。

心筋細胞や血管平滑筋細胞の機能を修飾する細胞や遺伝子、薬物を傷害心血管組織に特異的に輸送できるシステムを開発できれば、従来の心血管インターベンション治療に比し

患者の身体的苦痛が大幅に軽減できる簡便な治療法を確立できる。すでに臨床で使用されている薬物についても、より少ない投与量で病巣心血管への集積が可能となり、効果の増大と副作用および患者負担の軽減が期待できる。さらに、細胞や遺伝子、薬物に対する糖鎖修飾は、糖鎖が低分子であるために容易に可能であり、生体に対しても毒性がない。この糖鎖結合分子（レクチン）を利用した細胞・遺伝子・薬物輸送システムは、これまでにない画期的アプローチである。本申請課題は、心血管分野においてこれまで検討されてこなかった新しい位置付けにあり、病態生理の解明や治療法の開発が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 心筋梗塞部位への骨髄細胞輸送システム開発

申請者らは、すでに GlcNAc で修飾した蛍光リポソーム（直径 200nm）を虚血再灌流モデルマウスに全身投与すると、虚血傷害部位にのみ本リポソームが特異的に集積することを確認している。

そこで、GlcNAc結合型レクチンを利用して、骨髄細胞を虚血心筋へ集中的に集積させ、心筋の再生医療に応用する基礎実験を行った。ラットから骨髄液を採取し、GlcNAc-lipophilic polymerを用いて骨髄細胞表面にGlcNAcを修飾した。修飾した骨髄細胞をラット培養心筋細胞と共培養し、骨髄細胞の接着や心筋細胞への分化について検討した。

#### (2) GlcNAc 結合型レクチンの機能解析

GlcNAc に結合する新規分子を培養心筋細胞および血管平滑筋細胞から抽出し、SDS-PAGEにより分子量を確認した。さらに、二次元電気泳動、アミノ酸シーケンスおよび質量分析（TOF-MAS）によりこの分子の同定を行った。

さらに、GlcNAc で修飾したリポソームが

心筋細胞／平滑筋細胞上の GlcNAc 結合分子に接着し、細胞内に取り込まれることを電子顕微鏡下で観察した。新たに作製する抗血清を用い、組織学的に GlcNAc 接着におけるこの分子の役割について解明した。

### 4. 研究成果

N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を修飾したリポソームが、心筋細胞や血管平滑筋細胞に特異的に取り込まれることを見出し、通常は細胞に取り込まれない親水性の物質をこのリポソームによって細胞内に特異的に取り込ませることに成功した。そこでラットより骨髄細胞を採取し GlcNAc-lipophilic polymerを用いて骨髄細胞表面に GlcNAc を修飾した。この方法により細胞傷害性無く、骨髄細胞を修飾できることを trypan blue 染色にて確認した。次に、GlcNAc 修飾骨髄細胞をラット培養心筋細胞と in vitro で反応させたこと、有意に心筋細胞への接着が亢進した。さらに、心筋細胞に接着した骨髄単核球は高率に心筋細胞へ分化した (Kobayashi et al. Biomaterial, 2009)。

引き続き、この GlcNAc に結合する新規分子を培養心筋細胞および血管平滑筋細胞から抽出し、SDS-PAGEにより約 50-KD の分子であることを確認し、二次元電気泳動によりこの分子が筋原線維蛋白質の機能があることを明らかにした。さらに本分子の同定を行い、中間径フィラメントと呼ばれるファミリーに属するビメンチンとデスミンである可能性が高いことを明らかにした。そこで、ビメンチン・デスミンにおける GlcNAc 結合部位の同定を試みた。ビメンチン・デスミンはそれぞれ相同性が高く、rod Ib ドメインと rod II ドメインの組み替えタンパク質を作成し、人工糖鎖高分子である PV-GlcNAc への結合活性を表面プラズモン共鳴解析および共焦点レーザー顕微鏡による解析によって検討した。その結果、ビメンチン・デスミンの rod II ドメイン

が PV-GlcNAc に対して非常に高い相互作用を示すことが明らかになった。さらに rod II ドメインの組み替え蛋白質を利用して rod II ドメインを特異的に認識する抗血清を作製し、細胞表面におけるビメンチン・デスミンの局在を免疫染色によって調べたところ、rod II ドメインが細胞表面に局在していることが明らかになった (Ise et al. Glycobiology, 2010)。

## 5. 主な発表論文

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Inflammation activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 123:594-604, 2011 査読有
2. Ise H, Kobayashi S, Goto M, Sato T, Kawakubo M, Takahashi M, Ikeda U, Akaike T. Vimentin and desmin possess GlcNAc-binding lectin-like properties on cell surfaces. *Glycobiology* 20:843-64, 2010 査読有
3. Takahashi M, Izawa A, Ishigatsubo Y, Fujimoto K, Miyamoto M, Horie T, Aizawa Y, Amano J, Minota S, Murohara T, Matsubara H, Ikeda U. Therapeutic neovascularization by the implantation of autologous mononuclear cells in patients with connective tissue diseases. *Curr Pharm Design*, 15: 2778-2783, 2009 査読有
4. Doi H, Iso T, Shiba Y, Sato H, Yamazaki M, Oyama Y, Akiyama H, Tanaka T, Tomita T, Arai M, Takahashi M, Ikeda U, Kurabayashi M. Notch signaling regulates the differentiation of bone marrow-derived cells into smooth muscle-like cells during arterial

lesion formation. *Biochem Biophys Res Commun* 381:654-659, 2009 査読有

5. Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takeuchi K, Katsura KI, Mizukami H, Kume A, Ookawara S, Ikeda U, Katayama Y, Ozawa K. Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther* 16:383-391, 2009 査読有
6. Kobayashi S, Ise H, Takahashi M, Goto M, Akaike T, Ikeda U. Surface coating of bone marrow cells with N-acetylglucosamine for bone marrow implantation therapy. *Biomaterials* 30: 574-582, 2009 査読有
7. Shiba Y, Takahashi M, Hata T, Murayama H, Morimoto H, Ise H, Nagasawa T, Ikeda U. Bone marrow CXCR4 induction by cultivation enhances therapeutic angiogenesis. *Cardiovasc Res* 81: 169-177, 2009 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. Kashima Y, Takahashi M, Hata T, Kawaguchi K, Izawa A, Ikeda U. Critical role of hyaluronan derived from vascular smooth muscle cells in neointimal formation after vascular injury. AHA scientific sessions 2010, 2010.11.14-16 in Chicago.
2. 池田宇一. 末梢動脈疾患の未来治療：細胞療法. 第 34 回金澤医師会学術セミナー招待講演 2010.8.2 金沢市
3. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Izawa A, Takahashi Y, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Inflammation activation in cardiac fibroblasts triggers initiation of myocardial ischemia-reperfusion injury. 第 74 回日本循環器学会総会、2010.3.5-7, 国立京都国際会館
4. Hata T, Takahashi M, Kawaguchi M, Kashima Y, Hida S, Izawa A, Taki S, Iwakura Y, Ikeda

- U. Contribution of CD4<sup>+</sup>-Th17 cells to angiogenesis following hindlimb ischemia in mice. 第 74 回日本循環器学会総会、2010.3.5-7, 国立京都国際会館
5. Kashima Y, Takahashi M, Hata T, Kawaguchi M, Izawa A, Itano N, Taniguchi S, Ikeda U. Critical role of hyaluronan derived from vascular smooth muscle cells in neointimal formation after vascular injury. 第 74 回日本循環器学会総会、2010.3.5-7, 国立京都国際会館
6. 池田宇一. Vascular regeneration therapy for peripheral occlusive disease and collagen disorders. 第 10 回 CCT シンポジウム 招待講演 2010.1.29, 神戸市
7. Kobayashi S, Ise H, Takahashi M, Goto M, Aso S, Ikeda U. Development of the Targeting for Myocardium by Artificial Glycoside-coated Bone Marrow Cells. (人工的な糖鎖修飾を行った骨髄細胞の心筋組織へのターゲティング法の開発) 第 31 回日本分子生物学会・第 18 回日本生化学学会合同大会、2008.12.9-12 ; 神戸ポートアイランド
8. 小林 聡、伊勢裕彦、高橋将文、麻生真一、後藤光昭、赤池敏宏、池田宇一 : 人工的な糖鎖修飾を行った骨髄細胞の心筋組織へのターゲティング法の開発. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008、2008.11.17-18 ; 東京大学本郷キャンパス
9. 小林 聡、伊勢裕彦、高橋将文、後藤光昭、麻生真一、池田宇一 : 糖鎖工学を利用した骨髄幹細胞の心臓ターゲティング法の開発. Cardiovascular Medicine 21/ 第 8 回フォーラム、2008.8.2 ; 東京国際フォーラム
10. 伊勢裕彦、小林 聡、高橋将文、伊勢真美子、池田宇一 : 細胞骨格分子デスミン・ビメンチンの細胞膜上の発現と N-アセチルグルコサミン結合活性. 第 29 回日本炎症・再生医学会、2008.7.8-7.9 ; 都市センターホテル
11. Ise H, Kobayashi S, Takahashi M, Aso S, Akaike T, Ikeda U : Desmin and vimentin have N-acetylglucosamine-binding lectinic properties and are expressed on the cell surface. 第 60 回日本細胞生物学会、2008.6.29-7.1 ; パシフィコ横浜
- [図書] (計 3 件)
1. 伊澤 淳、池田宇一. 心筋梗塞の再発予防 (循環器疾患最新の治療) p126-128 南江堂、東京、2010
2. 池田宇一 動脈疾患 内科確定診断完全マスター p124-130 メジカルビュー社、東京、2009
3. 伊澤 淳、池田宇一. コレステロールと末梢動脈 (コレステロール—基礎から臨床へ—) p 81-87 ライフサイエンス出版、東京、2009
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
池田 宇一 (IKEDA UICHI)  
信州大学・医学系研究科・教授  
研究者番号 : 30221063
- (2) 研究分担者  
小山 潤 (KOYAMA JUN)  
信州大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 10303463
- 伊澤 淳 (IZAWA ATSUSHI)  
信州大学・医学系研究科・助教  
研究者番号 : 50464095