

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590887

研究課題名（和文） アシアロエリスロポエチンを用いた心血管系再生医療の前臨床基盤研究

研究課題名（英文） Preclinical study of cardiovascular regenerative medicine using asialoerythropoietin

研究代表者

鳥羽 健（TOBA KEN）

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：60313540

研究成果の概要（和文）：

細胞治療には技術的・倫理的問題が存在し、薬剤のみで同等の効果が得られれば一般臨床への導入が容易になる。生体内に於ける血管の新生および心筋の生存に重要な役割を果たすアシアロ EPO (AEPO) を用いた心血管再生医療の前臨床的研究を行った。AEPO には強力な心血管保護作用および血管新生作用が認められた。EPO 誘導体の作用には IL-6 の共同作用が必須であった。EPO とは異なり AEPO には組織親和性が見られた。AEPO の臨床治験を目指し、海外のパートナー企業との協議を開始した。

研究成果の概要（英文）：

There have been technical and ethical problems for the application of cell therapy. Alternative medical resources such as cytokines other than cultured cells may help resolving these problems. Asialoerythropoietin (AEPO), a natural derivative of EPO, plays important role in angiogenesis and tissue protection of cardiovascular and central nervous systems. We started the preclinical studies on the in vitro and in vivo effects of AEPO. AEPO exerted strong cardiovascularprotective and angiogenic activity in vivo. EPO derivatives expressed in vitro angiogenic activity in an intrinsic IL-6 dependent manner. AEPO showed tissue affinity in vitro and in vivo. We have entered into negotiations with a partner company for clinical applications of AEPO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯学系

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：臨床心血管病態学，心血管系再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 今世紀に入り幹細胞の可塑性を利用した再生医療の研究が隆盛を極めている。しかしその臨床応用には高度な設備と技術をもった限定された施設が必要であり、また細胞治療にはホスト内での腫瘍形成の可能性や種々の倫理的障壁が存在し、一般病院で行う医療に結びつけるには多くの困難が想定される。これに対しサイトカイン等の薬剤投与で同等の効果が得られれば一般臨床への導入が迅速に行える。
- (2) 糖蛋白サイトカインの1つエリスロポエチン (EPO) は生理的な赤血球造血ホルモンとして腎性貧血の治療に利用されてきたが、その糖鎖成熟中間体であり、かつ分泌型成熟 EPO の脱シアル化代謝産物であるアシアロエリスロポエチン (AEPO) は EPO とは異なり遠隔臓器への内分泌活性を欠くが、分泌局所に留まるためパラクリン物質としての性質をもち、心血管系および中枢神経での組織保護・血管新生に対する生理的役割を担っていることが推測される。
- (3) 造血系前駆細胞には EPO 受容体 (EPOR) のホモ 2 量体 (EPOR/EPOR) が発現しているが、造血系以外の組織では EPOR とサイトカイン受容体共通  $\beta$  鎖のヘテロ 2 量体 (EPOR/ $\beta c$ ) が発現している。EPO の人工的誘導体であるカルバミルエリスロポエチン (CEPO) は EPOR/ $\beta c$  とのみ相互作用するため造血作用を欠く。

## 2. 研究の目的

- (1) AEPO の *in vivo* での心血管保護作用・血管新生作用の特性を EPO および CEPO と比較しつつ解析し、その機構を考察する。
- (2) AEPO の *in vitro* での作用を EPO および CEPO と比較しつつ解析し、その差異および機構を解析する。
- (3) AEPO の物性を EPO および他のサイトカインと比較し、その生物作用の特性の原因を説明する。

## 3. 研究の方法

- (1) ラット肺細動脈血管内皮傷害/肺高血圧モデル：モノクローリン誘発による実験的肺高血圧モデルを作成し、500 IU/kg/day の EPO・AEPO・CEPO または Medium の 21 日間持続静注による治療をおこない、心臓カテーテルによる生理学的解析・肺細動脈の組織学的解析および肺に於ける mRNA の誘導を定量した。
- (2) マウス下肢虚血モデル：虚血に弱い白マウスおよび虚血から自然回復する黒マウスを用いて大腿動脈結紮による下肢虚血を作成し、400 IU/kg の EPO・AEPO・CEPO または Medium の 6 日間筋注により

治療し、骨髄細胞移植による血管新生作用と比較した。

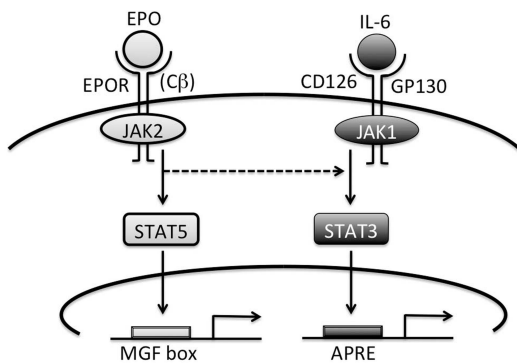
- (3) ラット冠動脈虚血/再環流モデル：ラット冠動脈左前下降枝を 30 分間結紮することで再環流モデルを作成した。500 IU/kg/day の EPO・AEPO または Medium を 28 日間持続静注することで治療した。心エコーによる心機能解析、組織学的な心筋梗塞サイズの定量および心臓における mRNA の誘導を比較した。
- (4) *In vitro* 血管新生モデル：単層の線維芽細胞上に内皮を播種することで毛細血管チューブ様構造を *in vitro* で再現し、この系に対する EPO・AEPO・CEPO の血管新生作用を IL-6 および VEGF と比較した。
- (5) EPO 誘導体の生物作用の違いを説明するため、heparin-agarose gel chromatography およびマウス下肢筋内投与後の筋中濃度の変化を観察した。
- (6) 新規キメラサイトカインの作成：AEPO 投与では血中濃度が上昇せず血管内皮を傷害から保護しないため、致死性血管内皮傷害の治療を目的として内皮・組織親和性 EPO を遺伝子操作により作成し、その作用を確認した。

## 4. 研究成果

- (1) 肺細動脈の内皮傷害に伴う中膜肥厚・肺高血圧は EPO 投与によって著明に改善され、肺組織における抗アポトーシス因子 Bcl-xL の誘導が観察されたが、AEPO・CEPO にはそのような効果がなかった。AEPO は血中濃度が上昇しなかった。内皮傷害の治療には血中濃度の上昇が必要であることがわかる。また、CEPO が無効であることから、内皮には赤血球系細胞と同様に EPOR/EPOR ホモ受容体が発現していると推測される。
- (2) マウス下肢虚血モデルにおける *in vivo* 血管新生作用では、AEPO に骨髄細胞移植治療に匹敵する強い血管新生作用が認められたが、EPO・CEPO の血管新生作用は微弱であった。組織中では EPO より AEPO の方がはるかに強い活性を示す。CEPO の作用は EPOR/ $\beta c$  を発現していると推測される線維芽細胞を介した作用かもしれない。AEPO 投与に伴った筋組織内の IL-6 の強い誘導が観察された。
- (3) ラット冠動脈再環流モデルでも EPO より AEPO ではるかに強い心筋梗塞縮小効果が見られた。また EPO 投与では多血症による心臓内 BNP の強い誘導がみられたが、AEPO 投与では造血作用も心不全誘発作用も見られなかった。
- (4) *In vitro* の血管新生では EPO と AEPO で同等の血管新生誘導作用が認められた。線維芽細胞によって分泌される内因性

IL-6 を抗体で中和すると、EPO 誘導体の血管新生作用は消失した。この系では CEPO には血管新生作用が認められなかった。再度、内皮には EPOR/EPOR ホモ受容体が発現していることが推測された。EPO と AEPO の生物作用の違いが in vitro と in vivo で一致しないことを、両者の物性の違い等で説明する必要が生じた。

- (5) Gel chromatography によるヘパリン親和性の強さは：VEGF > AEPO >> EPO = 0 であった。EPO とは異なり、AEPO にはグリコサミノグリカンに対する結合能（組織親和性）があることが推測された。また筋肉内投与後の組織中濃度は、EPO では持続的な濃度低下の進行が見られたが、AEPO では最初の6時間での急激な濃度低下に引き続き一定の濃度が1日間持続した。
- (6) AEPO には EPO より強い組織保護・血管新生効果が期待されるが、一方では血栓性血小板減少性紫斑病等の致死の血管内皮傷害に対する治療効果は期待できない。そこで血管内皮に選択的に結合するような EPO 誘導体を設計した。ヒト EPO の 165 アミノ酸全長の C 末端にヒト PLGF-2 のアルギニンリピートに富む領域である C 末端側 30 アミノ酸残基を繋げたキメラ蛋白：HEPO をバキュロウイルスベクター・昆虫細胞の発現系で作成し、部分生成ののちにその性状・活性を調べた。強力なヘパリン親和性を呈し、in vivo 投与によって long-acting EPO として作用した。驚いたことに血管新生抑制作用を示した。PLGF-2 由来のモチーフがグリコサミノグリカンに強く結合することで徐放効果を示すとともに、VEGF 等の血管新生増殖因子群の組織中の濃度勾配を消去し、血管新生阻害作用を示したと推測された。EPO には腫瘍血管新生作用が危惧されているが、HEPO は血管内皮傷害治療薬としてのみならず、腫瘍性貧血の治療薬としても期待される。



- (7) 考案：EPO 受容体の細胞内ドメインには

Jak1/stat3 の活性化モチーフが存在するが、これが赤血球造血 (Jak2/stat5) に有用であるとは考えにくい。EPO の血管新生作用には内因性 IL-6 の存在が必須であったが、これは IL-6 受容体と EPO 受容体の両者を同時に発現する内皮や中枢神経等で IL-6 分泌亢進による炎症反応活性化を誘発することなく、恒常的に分泌されている微量の IL-6 による弱い細胞内シグナルを利用して血管新生作用および神経保護作用を誘導するために進化した仕組みかもしれない。また生理的 EPO 誘導体でありながら造血作用を欠く AEPO が EPO より遙かに強い造血外作用をもつのも、脱シアル体の組織親和性によって説明されそうである。実際、内分泌系から隔離され、パラクリンによる制御を受けている中枢神経内では脱シアル糖タンパクが重要な働きをしていることが知られているが、これは中枢神経に限ったことではないようである。

- (8) 展望：AEPO は特許された。HEPO は出願中である。近年、本邦の製薬業者はリスクを回避する傾向が強くなっている。我々は TLO との協力で、海外の製薬業者と AEPO の臨床開発に関する協議を開始した。海外で臨床治験を進めたのちに本邦へ逆導入したい。

#### 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 15 件)

1. Ikarashi N, Toba K, Kato K, Ozawa T, Oda M, Takayama T, Kobayashi H, Yanagawa T, Hanawa H, Suzuki T, Nakazawa M, Nomoto N, Asami F, Higuchi M, Saito H, Aizawa Y. Erythropoietin, but not asialo-erythropoietin or carbamyl-erythropoietin, attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Clinical and Experimental Hypertension*, in press, 2012, 査読有
2. Minamino T, Toba K, Higo S, Nakatani D, Ozawa T. Erythropoietin, progenitor cells and restenosis. *Thrombosis and Haemostasis*, in press, 2012, 査読有
3. Oda M, Toba K, Kato K, Ozawa T, Yanagawa T, Ikarashi N, Takayama T, Suzuki T, Hanawa H, Masuko M, Kobayashi H, Aizawa Y. Hypocellularity and insufficient expression of angiogenic factors in implanted autologous bone marrow in patients with chronic critical limb ischemia.

- Heart and Vessels 27: 38-45, 2012, 査読有
4. Oda M, Watanabe H, Oda E, Tomita M, Obata H, **Ozawa T**, Oda Y, Iizuka T, **Toba K**, Aizawa Y. Rise in international normalized ratio after a catastrophic earthquake in patients treated with warfarin. International Journal of Cardiology 52: 109-110, 2011, 査読有
  5. **鳥羽健**, 加藤公則, **小澤拓也**, 相澤義房. シリーズ「日本発臨床研究の紹介と反省点を語る」:EPO/AMI-1 研究. 日本内科学会雑誌 100, 2008-2014, 2011, 査読無
  6. Hao K, **Hanawa H**, Ding L, Ota Y, Yoshida K, **Toba K**, Ogura M, Ito H, Kodama M, Aizawa Y. Free heme is a danger signal inducing expression of proinflammatory proteins in cultured cells derived from normal rat hearts. Molecular Immunology 48: 1191-1202, 2011, 査読有
  7. Yoshimura N, **Toba K**, **Ozawa T**, Aizawa Y, Hosoya T. A novel program to accurately quantify infarction volume by (99m)Tc MIBI SPECT, and its application for re-analyzing the effect of erythropoietin administration in patients with acute myocardial infarction. Circulation Journal 74: 2741-2743, 2010, 査読有
  8. **小澤拓也**, **鳥羽健**, 相澤義房. エリスロポエチンの急性心筋梗塞に対する臨床試験. 循環器内科 67: 232-236, 2010, 査読無
  9. Oda M, **Toba K**, **Ozawa T**, Kato K, Yanagawa T, Ikarashi N, Takayama T, Suzuki T, **Hanawa H**, Fuse I, Nakata K, Narita M, Takahashi M, Aizawa Y. Establishment of culturing system for ex-vivo expansion of angiogenic immature erythroid cells, and its application for treatment of patients with chronic severe lower limb ischemia. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 49: 347-353, 2010, 査読有
  10. Isoda M, **Hanawa H**, Watanabe R, Yoshida T, **Toba K**, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Hao K, Ding L, Tanaka K, Takayama T, Kato K, Okura Y, Kodama M, Ota Y, Hayashi J, Aizawa Y. Expression of the peptide hormone hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction. The Journal of Nutritional Biochemistry 21: 749-756, 2010, 査読有
  11. **Ozawa T**, **Toba K**, Suzuki H, Kato K, Iso Y, Akutsu Y, Kobayashi Y, Takeyama Y, Kobayashi N, Yoshimura N, Akazawa K, Aizawa Y. Single-dose intravenous administration of recombinant human erythropoietin is a promising treatment for patients with acute myocardial infarction - randomized controlled pilot trial of EPO/AMI-1 study -. Circulation Journal 74: 1415-1423, 2010, 査読有
  12. Ding L, **Hanawa H**, Ota Y, Hasegawa G, Hao K, Asami F, Watanabe R, Yoshida T, **Toba K**, Yoshida K, Ogura M, Kodama M, Aizawa Y. Lipocalin-2/neutrophil gelatinase-B associated lipocalin is strongly induced in hearts of rats with autoimmune myocarditis and in human myocarditis. Circulation Journal 74: 523-530, 2010, 査読有
  13. Suzuki H, **Toba K**, Kato K, **Ozawa T**, Tomosugi N, Higuchi M, Kusuyama T, Iso Y, Kobayashi N, Yokoyama S, Fukuda N, Saitoh H, Akazawa K, Aizawa Y. Serum hepcidin-20 is elevated during the acute phase of myocardial infarction. Tohoku Journal of Experimental Medicine 218: 93-98, 2009, 査読有
  14. **鳥羽健**, **小澤拓也**, 相澤義房. エリスロポエチン誘導体の血管新生作用. Angiology Frontier 8: 61-69, 2009, 査読無
  15. **鳥羽健**, 加藤公則. エリスロポエチンの心・血管系疾患への応用. 循環器科 66: 424-432, 2009, 査読無
- [学会発表] (計 11 件)
1. Oda M, **Ozawa T**, **Toba K**, Kato K, Takayama T, Yanagawa T, Ikarashi N, Suzuki T, **Hanawa H**, Aizawa Y. Long-term effects of EVEETA therapy in patients with severe peripheral artery disease. 第 75 回日本循環器学会総会学術集会. 平成 23 年 8 月 3 日, パシフィコ横浜.
  2. 森山雅人, **鳥羽健**, 埴晴雄, 樋口正人, 齊藤英樹, 相澤義房. ヘパリン結合性エリスロポエチンの作成とその生物学的特徴の検討. 第 72 回日本血液学会学術集会. 平成 22 年 9 月 24 日, パシフィコ横浜
  3. **鳥羽健**, **小澤拓也**, 相澤義房. 特別企画「循環器 Translational Research の課題」-3. 心筋梗塞に対するエリスロポエチン治療 (指定演題). 第 58 回日本心臓病学会学術集会. 平成 22 年 9 月 17 日,

- 東京国際フォーラム
4. Moriyama M, **Toba K**, **Hanawa H**, Higuchi M, Saitoh H, Aizawa Y. Establishment of a novel synthetic derivative of human erythropoietin designed to bind to glycosaminoglycans. JSH International Symposium 2010. 平成22年7月16日, 秋田大学
  5. Hao K, **Hanawa H**, Ding L, **Toba K**, Watanabe R, Yoshida T, Kodama M, Aizawa Y. Free heme strongly induces pro-inflammatory proteins in cultured cells derived from normal rat hearts. 第74回日本循環器学会総会学術集会. 平成22年3月6日, 国立京都国際会館
  6. Yanagawa T, **Toba K**, Takayama T, Oda M, Otaki K, Ikarashi N, Minagawa S, **Ozawa T**, **Hanawa H**, Aizawa Y. The angiogenic effects of erythropoietin-derivatives. 第74回日本循環器学会総会学術集会. 平成22年3月6日, 国立京都国際会館
  7. **Ozawa T**, **Toba K**, Suzuki H, Kato K, Minamino T, Iso Y, Akutsu Y, Kobayashi Y, Takayama Y, Konayashi N, Yoshimura N, Komuro I, Aizawa Y. Single-dose intravenous-administration of erythropoietin improved cardiac function in patients with acute myocardial infarction. 第74回日本循環器学会総会学術集会. 平成22年3月6日, 国立京都国際会館
  8. **Ozawa T**, **Toba K**, Suzuki H, Kato K, Iso Y, Akutsu Y, Kobayashi Y, Takayama Y, Kobayashi N, Yoshimura N, Akazawa K, Aizawa Y. Single-dose intravenous-administration of recombinant human erythropoietin considerably improved cardiac function in patients with acute myocardial infarction: A randomized controlled pilot trial of EPO/AMI-I study. AHA Scientific Sessions 2009. 平成21年11月14日, Orlando World Center Marriott Orlando
  9. **小澤拓也**, **鳥羽健**, 加藤公則, 小田雅人, 柳川貴央, 五十嵐登, 高山亜美, **埴晴雄**, 相澤義房. 重症下肢虚血患者に対する体外増幅自己赤芽球移植を用いた血管再生治療の第I/II相臨床試験. 第57回日本心臓病学会学術集会. 平成21年9月19日, ロイトン札幌
  10. **小澤拓也**, **鳥羽健**, 加藤公則, 柳川貴央, 高山亜美, 相澤義房, 鈴木洋, 磯良崇, 小林直彦, 横山慎一郎, 福田昇. 急性心筋梗塞に対するエリスロポエチン投与による心機能改善効果. 第57回日本心臓病学会学術集会. 平成21年9月19

- 日, ロイトン札幌
11. **小澤拓也**, **鳥羽健**, 加藤公則, 小田雅人, 柳川貴央, 五十嵐登, 高山亜美, **埴晴雄**, 相澤義房. 重症下肢虚血患者に対する体外増幅自己赤芽球移植を用いた血管再生治療の第I/II相臨床試験. 第106回日本内科学会総会. 平成21年4月9日, 東京国際フォーラム

〔図書〕(計2件)

1. **鳥羽健**, **小澤拓也**, 加藤公則. 日本臨床社, 冠動脈疾患(上)-診断と治療の進歩-, 2. 心筋再生療法, 3) エリスロポエチンを用いた心血管疾患の治療. 2011年, p533-536.
2. **鳥羽健**. メディカルレビュー社, 循環器再生医学の現状と展望, Chapter 2 血管新生療法の基礎研究, 4. EPO. 2011年, p45-54.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/inl/godo/project/saisei.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鳥羽 健 (TOBA KEN)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号: 60313540

##### (2) 研究分担者

埴 晴雄 (HANAWA HARUO)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号: 40282983

小澤 拓也 (OZAWA TAKUYA)

新潟大学・医歯総合病院・特任助教

研究者番号: 70467075

##### (3) 連携研究者

該当者なし

