

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591035

研究課題名(和文)次世代血管再生療法開発のための基礎および臨床研究

研究課題名(英文)Basic and clinical research for therapeutic angiogenesis of the next generation

研究代表者

池田 宇一 (IKEDA, Uichi)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：30221063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖を心血管病の再生医療へ応用することを目的とし、血管傷害モデルマウスに糖鎖GlcNAcで修飾したリポソームを経静脈的に投与したところ、傷害血管部位にGlcNAcリポソームが特異的に集積することが明らかになった。GlcNAc修飾は傷害血管への細胞輸送へ応用が期待できる。また、従来の骨髄幹細胞移植に比し侵襲性が低い治療法として、脂肪組織由来幹細胞(ADRC)を用いた血管再生治療に着手した。

研究成果の概要(英文)：To apply the sugar chain for regenerative medicine of cardiovascular diseases, we administered N-acetyl glucosamine (GlcNAc)-modified liposome intravenously to the vascular injury model of mice, and found that GlcNAc-liposome was accumulated specifically in the vascular injury site. In addition, we started a new therapeutic angiogenesis using adipose tissue-derived stem cells (ADRC), which is less invasive compared to revascularization therapy using bone marrow cells.

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：糖鎖 血管再生 循環器内科学

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、閉塞性動脈硬化症 (ASO) やバージャー病による重症虚血肢に対する骨髄細胞移植療法の多施設臨床試験 (TACT study) 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。本治療法は 2003 年には厚生労働省から再生医療分野では初めて高度先進医療の保険適用を承認されている。さらに申請者は 2004 年より、難治性血管炎に対する血管再生療法の多施設共同研究を開始し、強皮症をはじめとする膠原病患者の指趾虚血に対しても自己骨髄細胞移植が有効であることを明らかにしている。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言い難い症例も多く存在することを経験してきた。

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、副作用や侵襲性を軽減した、より患者さんに優しい血管再生療法の実践を目指し、(1) 糖鎖工学を利用した標的血管組織への骨髄細胞輸送システムの開発、および (2) 骨髄細胞に替わる治療細胞源として脂肪組織由来幹細胞を用いた血管再生療法の開発に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

### (1) 骨髄細胞輸送システムの開発

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、肝臓ではアシアロ糖蛋白質レセプターと呼ばれるガラクトース結合型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。これを契機に、心血管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、心筋細胞において N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に結合する糖鎖結合分子が

存在し、それが desmin および vimentin である可能性を見いだしている。この GlcNAc 結合型レクチンを利用することにより、骨髄細胞を全身投与で効率よく標的傷害血管組織に集積させることが可能となり、効果の増大と副作用および患者負担を軽減した新たな血管再生治療法の開発が期待できる。

### (2) 脂肪組織由来幹細胞を用いた血管再生療法

2001 年にヒト脂肪組織中に脂肪組織由来幹細胞 (ADRC: Adipose tissue-Derived Regenerating Cell) の存在が報告され、この細胞を用いた再生医療の可能性が注目されている。既にわが国でも 2007 年より ADRC を用いた乳癌術後の乳房再建治療が開始され、その有効性と安全性が明らかにされている。ADRC の採取は局所麻酔下で可能であることから低侵襲であり、治療に要する細胞も皮下脂肪組織から十分量を採取でき、さらに自己細胞であることから免疫拒絶もない。

ADRC は間葉系幹細胞として血管内皮細胞への分化能を有すると共に、種々のサイトカインを産生・分泌し、血管新生に促進的に作用する。しかし、ASO やバージャー病などの末梢閉塞性動脈疾患に対する ADRC 移植療法は未だ行われておらず、世界初となる血管再生療法の臨床研究を開始する。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨髄細胞輸送システムの開発

既に GlcNAc で修飾したリポソームが心筋細胞上の 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ている。そこで、GlcNAc 修飾リポソームを作成し、培養血管平滑筋および内皮細胞への接着、取り込みについて検討する。

さらに、骨髄細胞を虚血下肢へ集中的に集積させ、血管再生に応用することを目的に、マウスの大腿動脈を結紮した下肢虚血モデルを作製し、GlcNAc 修飾リポソームを経静脈

的に全身に投与し、傷害血管部位への集積を検討する。

## (2) 脂肪組織由来幹細胞を用いた血管再生療法

信州大学医学部附属病院において脂肪組織由来幹細胞 (ADRC) 移植による血管再生治療を行い、その安全性・有効性について検証する。対象患者は、従来の治療法では改善の認められない重症の末梢閉塞性動脈疾患 (ASO・バージャー病:Fontaine III~IV 度、年齢 25~80 歳)。方法は、局所麻酔下で腹壁皮下脂肪 (100~300g) を吸引・採取し、Celution システム (サイトリ社) により ADRC を 1~2 時間で分離する。分離された ADRC を直接四肢の虚血部位へ筋注・移植し、低用量群 ( $1 \times 10^7$  個) と高用量群 ( $1 \times 10^8$  個) の 2 群に分けて治療効果を比較検討する。評価項目として、臨床症状 (疼痛スケール・潰瘍径)、ABI (上下肢血圧比)、レーザードップラー血流、歩行可能距離、QOL を術前および術後 1 年間継続して観察する。

## 4. 研究成果

### (1) 骨髄細胞輸送システムの開発

GlcNAc で修飾したリポソームおよびコントロールとして D-グルコンアミド (MA) で修飾したリポソームを作成した。平均リポソーム径は、前者が 140nm、後者が 115nm であった。ラット培養平滑筋細胞に両リポソームを添加すると、GlcNAc リポソームは高率に平滑筋細胞に接着し、取り込まれたのに対して、MA リポソームはほとんど平滑筋細胞に取り込まれなかった。一方、ヒト培養血管内皮細胞への両リポソームの接着、取り込みは平滑筋細胞に比し極めて少量であった。すなわち、血管においては GlcNAc が糖鎖結合分子を介して特異的に平滑筋細胞に取り込まれることが明らかになった。

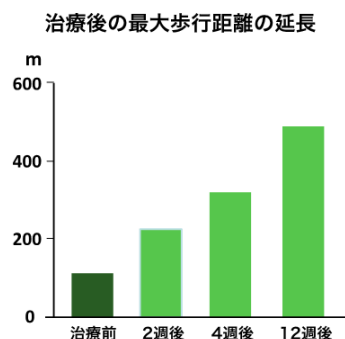
そこで、内皮細胞が消失し平滑筋細胞が露出した傷害血管には GlcNAc が特異的に集積

するか、in vivo の系で検討を行った。マウスの大腿動脈にワイヤーを挿入し、血管傷害モデルを作成した。血管傷害作成 3 時間後に、GlcNAc および MA で修飾したリポソームを経静脈的に全身に投与した。24 時間後にマウスを屠殺し、病理学的観察を行ったところ、非傷害血管にはリポソームの集積を認めなかったが、傷害血管には GlcNAc 修飾リポソームの特異的集積を認めた。

今後は、GlcNAc で修飾した骨髄細胞を血管傷害モデルに経静脈的に投与することにより、傷害血管に骨髄細胞が集積し、血管新生を促進するかについて検討を行う予定である。

### (2) 脂肪組織由来幹細胞を用いた血管再生療法

安静時疼痛のある 60 代の閉塞性動脈硬化症患者 (Fontaine III 度) に対して、第 1 例目となる ADRC 移植による血管再生治療を実施した。腹壁皮下より脂肪組織を 360g 採取し、 $1.1 \times 10^7$  の ADRC を分離・精製した。この ADRC を虚血下肢 80 ヶ所に筋注・移植したところ、安静時疼痛は著明に改善した。移植前には 100m であった最大歩行距離も、移植 12 週後には 500m まで延長した (下図)。副作用の出現は認めず、有効かつ安全な治療法であることを確認できた。今後、さらに症例を重ねて検討していく。



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 13 件)

Kashima Y, Takahashi M, Shiba Y, Itano N, Izawa A, Koyama J, Nakayama J, Taniguchi S, Kimata K, Ikeda U. Crucial role of hyaluronan in neointimal formation after vascular injury. PLoS One. 8(3):e58760, 2013 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0058760

Yamasaki S, Izawa A, Shiba Y, Tomita T, Miyashita Y, Koyama J, Ikeda U. Presence of diastolic dysfunction in patients with peripheral artery disease. Angiology. 64(7): 540-543, 2013 査読有 doi:10.1177/0003319713476135.

Shiba Y, Ikeda U. Prostacyclin -a potential new target for endothelial progenitor cell-mediated angiogenesis -. Circ J. 77(4):906-907, 2013 査読有 PMID: 23412756

Matsuura K, Wada M, Shimizu T, Haraguchi Y, Sato F, Sugiyama K, Konishi K, Shiba Y, Ichikawa H, Tachibana A, Ikeda U, Yamato M, Hagiwara N, Okano T. Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 25(2):321-327, 2012 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.089

Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, Filice D, Muskheli V, Kim J, Palpant NJ, Gantz J, Moyes KW, Reinecke H, Van Biber B, Dardas T, Mignone JL, Izawa A, Hanna R, Viswanathan M, Gold JD, Kotlikoff MI, Sarvazyan N, Kay MW, Murry CE, Laflamme MA. hESC-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. Nature. 489(7415):322-325, 2012 査読有 doi: 10.1038/nature11317.

Kasai H, Kashima Y, Izawa A, Tomita T, Miyashita Y, Koyama J, Takahashi M, Yoshio T, Yazaki Y, Higuchi M, Ikeda U. Immunoabsorption therapy reduces

oxidative stress in patients with dilated cardiomyopathy. World Journal of Cardiovascular Diseases. 2:305-312, 2012 査読有 doi:10.4236/wjcd.2012.24048

Otagiri K, Tsutsui H, Kumazaki S, Miyashita Y, Aizawa K, Koshikawa M, Kasai H, Izawa A, Tomita T, Koyama J, Ikeda U. Early Intervention with Rosuvastatin Decreases the Lipid Components of the Plaque in Acute Coronary Syndrome. Circulation Journal 75(3): 633-641, 2011 査読有 PMID:21266787

Motoki H, Koyama J, Tomita T, Aizawa K, Kasai H, Koshikawa M, Izawa A, Kumazaki S, Takahashi M, Ikeda U. Transient pseudorestrictive pattern of transmitral flow velocity curve in patients with paroxysmal atrial fibrillation. Echocardiography. 28(3): 289-297, 2011 査読有 doi: 10.1111/j.1540-8175.2010.01312.x.

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. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. Circulation. 123(6):594-604, 2011 査読有 doi:

10.1161/CIRCULATIONAHA.110.982777.  
Hata T, Takahashi M, Hida S, Kawaguchi M, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Nishiyama A, Izawa A, Koyama J, Iwakura Y, Taki S, Ikeda U. Critical role of Th17 cells in inflammation and neovascularization after ischaemia. Cardiovasc Res. 90(2):364-72, 2011 査読有 doi: 10.1093/cvr/cvq397.

Tomita T, Aizawa K, Shimada K, Motoki H, Otagiri K, Koshikawa M, Kasai H, Izawa A, Kumazaki S, Tsutsui H, Koyama J, Ikeda U. Influence of circumferential pulmonary vein isolation for atrial fibrillation on ST elevation in patient with Brugada syndrome.

Int J Cardiol. 149: e82-e84, 2011 査読有  
doi: 10.1016/j.ijcard.2009.04.010.

Miyashita Y, Saigusa T, Ikeda U. Novel  
microsnare successfully used to remove  
small debris from the right coronary artery.  
J Invasive Cardiol Jul. 23(7): E161-163,  
2011 査読有 PMID:21725131

Ise M, Ise H, Shiba Y, Kobayashi S, Goto M,  
Takahashi M, Akaike T, Ikeda U. Targeting  
N-acetylglucosamine-bearing  
polymer-coated liposomes to vascular  
smooth muscle cells. J Artif Organs.

(4): 301-309, 2011 査読有

doi: 10.1007/s10047-011-0595-3.

[学会発表](計 8 件)

Kashima Y, Takahashi M, Itano N,  
Taniguchi S, Kimata K, Ikeda U. Crucial  
role of hyaluronan derived from  
macrophages in neointimal formation after  
vascular injury. ESC2013 欧州心臓学会議.  
2013.8.31-9.4 ; アムステルダム (オランダ)

Izawa A, Hirota S, Yamaka K, Takeuchi T,  
Okada A, Shiba Y, Tomita T, Miyashita Y,  
Koyama J, Ikeda U. Predictors of long-term  
outcomes in patients with medical treatment  
for acute aortic dissection. ESC2013 欧州心  
臓学会議. 2013.8.31-9.4 ; アムステルダム  
(オランダ)

Ebisawa S, Miyashita Y, Hioki H, Karube K,  
Yaguchi T, Abe N, Saigusa T, Miura T,  
Ikeda U. The successful case of angioplasty  
on popliteal artery occlusion by using  
excimer laser atherectomy after balloon  
angioplasty failure. 第 22 回日本心血管イ  
ンターベンション治療学会学術集会.  
2013.7.11-13 ; 横浜

Hioki H, Miyashita Y, Yaguchi T, Abe N,  
Ebisawa S, Miura T, Tomita T, Koyama J,  
Ikeda U. Assessment of prognostic  
improvement by multidisciplinary therapy  
on patients with critical limb ischemia. 第  
22 回日本心血管インターベンション治  
療学会学術集会. 2013.7.11-13 ; 横浜

Gautam M, Izawa A, Shiba Y, Kashima Y,

Koyama J, Hongo M, Sano K, Hayashi T,  
Ichikawa M, Ikeda U. Development of  
spontaneous myocarditis in Nuclear Factor  
kappa B(NFκB)p50-deficient mice:the  
emerging role of NFκB p65 in its  
pathogenesis. AHA2012 アメリカ心臓協  
会. 2012.11.3-7; ロサンゼルス(アメリカ)  
Kashima Y, Takahashi M, Shiba Y, Itano N,  
Kimata K, Izawa A, Ikeda U. Critical role of  
hyaluronan in neointimal formation after  
vascular injury in mice. AHA2012 アメリ  
カ心臓協会. 2012.11.3-7 ; ロサンゼルス  
(アメリカ)

Gotam M, Izawa A, Shiba Y, Kashima Y,  
Koyama J, Hongo M, Sano K, Hayashi T,  
Agematsu K, Ichikawa M, Ikeda U.  
Targeted Disruption of p50 Subunit of  
Nuclear Factor kappa B (NFκB) Leads to  
Spontaneous Myocarditis in Mice.  
AHA2011 アメリカ心臓協会 .  
2011.11.12-16 ; オーランド (アメリカ)  
Kashima Y, Takahashi M, Hata T,  
Kawaguchi M, Izawa A, Itano N, Kimata K,  
Ikeda U. Specific Overexpression of  
Hyaluronan in Vascular Smooth Muscle  
Cells Augments Neointimal Formation after  
Vascular Injury in Mice. 第75回日本循環  
器学会. 2011.8.3-8.4 ; 横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

池田 宇一 ( IKEDA, Uichi )

信州大学・医学部・教授

研究者番号 : 30221063

(2)研究分担者

小山 潤 ( KOYAMA, Jun )

信州大学・医学部・准教授

研究者番号 : 10303463

伊澤 淳 ( IZAWA, Atsushi )

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 50464095

嘉嶋 勇一郎 ( KASHIMA, Yuichiro )

信州大学・医学部附属病院・助教 (診療)

研究者番号 : 70545722