

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591048

研究課題名(和文)再生医療を用いた拡張型心筋症・虚血性心筋症に対する新たな治療戦略の開発

研究課題名(英文)Development of new therapeutic strategies for dilated cardiomyopathy, ischemic cardiomyopathy with regenerative medicine

研究代表者

西尾 亮介(Nishio, Ryosuke)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00335275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は拡張型心筋症および心筋梗塞モデルマウスにおいて、リンパ管新生インデューサーであるVEGF-C156S及びリンパ管新生ブロッカーであるVEGFR3-Fcの治療効果につき検討し、臨床応用可能な心臓リンパ管新生調整因子による治療法をマウスモデルにおいて確立し、臨床応用に向け、これらの治療法をより発展させた。さらに、治療用マイクロデバイス開発を視野に入れた動物実験も行うことを検討した。我々は心筋細胞の配列を制御する方法を開発しており、この技術を用い、リンパ管新生インデューサー、VEGF-C156S及びリンパ管新生ブロッカー、VEGFR3-Fcの治療戦略への応用も検討した。

研究成果の概要(英文)：We examined the therapeutic effects of VEGF-C156S, a lymphangiogenesis inducer, and VEGFR3-Fc, a lymphangiogenesis blocker in murine models of dilated cardiomyopathy and myocardial infarction. And we also established lymphangiogenesis factor treatments in the heart, and developed these treatments for clinical application in these murine models. In addition, we developed micro devices for clinical treatments in animal models. We have developed a method for controlling an array of cardiomyocytes. By using this technique, we examined the therapeutic effects of VEGF-C156S, a lymphangiogenesis inducer, and VEGFR3-Fc, a lymphangiogenesis blocker for application to clinical treatment strategies.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全 心筋症 心筋梗塞 リンパ管 心機能 免疫 マイクロマシン

1. 研究開始当初の背景

我々はマウスにおける左室圧容積関係測定法を確立し、世界で初めてウイルス性心筋炎のモデルマウスの心機能解析を行い、拡張型心筋症・心筋梗塞等のモデルマウスを用いた心機能解析も行ってきている。(*Nature Medicine* 9: 1477-83, 2003.; *Circulation* 113:679-90, 2006.; *J. Am. Coll. Cardiol.* 40:1506-1514, 2002.). これらの技術により、左室圧容積関係から病態生理における様々な因子の役割の解明が可能となった。

我々は、実現可能な臨床応用を視野に入れ、新規治療用マイクロデバイスのための動物実験および細胞実験も行ってきた。経冠動脈的にアデノウイルスベクターを心臓へ導入するためのマイクロバルーン開発 (<知的所有権> : 特願 2003-129241、発明者: 京都大学助手 西尾亮介、他 出願人: 株式会社ヴァーユ) および、心筋細胞の配列を制御する方法を開発してきた (<知的所有権> 「進展方向が制御された細胞の培養方法」 出願番号: 特願 2005-003926、発明者: 西尾亮介、他 出願人: 西尾亮介、他)。

20世紀初頭にリンパ管は、はじめて解剖学的に詳しく記載され、近年のリンパ管新生因子 VEGF-C (*Vascular endothelial growth factor-C*) やその受容体 VEGFR-3 といったリンパ管特異的な新生因子や受容体の発見により、リンパ管の分子生物学的解析が可能となった。

心臓においてリンパ管は、1) 心筋浮腫、2) 免疫反応に大きく関与している。心筋の浮腫は心不全、心筋炎などの様々な病態と関連して認められ、また、心臓浮腫は収縮能、拡張能へ影響を与え、心機能障害との関連が指摘され、慢性的な浮腫は心臓の繊維化とも関連があると指摘されてきた。一方、近年、心臓疾患における免疫の関与の重要性が明らかとなっている。心臓リンパ管は心筋浮腫と免疫の双方にとり重要な役割を担っていることから、心疾患の病態にとって重要な関与が大いに予想された。ところが、我々の研究まで、心臓リンパ管の誘導や存在および心疾患の病態に関する役割について、分子生物学的または免疫学的観点から行われた研究は皆無に等しかった。

我々はウイルス性心筋炎、拡張型心筋症、心筋梗塞、高血圧性心不全モデルマウスにおいてリンパ管を特異的に同定する抗 VEGF-R3抗体および抗Podoplanin抗体を用い、心臓におけるリンパ管の存在を検討した。そして、世界で初めて心筋炎及び心筋梗塞モデルにおいて分子生物学的または免疫学的に心臓リンパ管の存在を明らかにした (*Circulation*. 2006;114 suppl I: 185)。

また、我々の研究により、拡張型心筋症・心筋梗塞などの病態に心臓リンパ管が強く関与していることが明らかとなった (*Nishio R, Kubo H, Matsumori A. Role of Lymphangiogenic*

Factors in a Murine Model of Viral Myocarditis. Circulation. 2006;114 suppl I: Scientific Sessions Abstracts Suppl, 185., *Nishio R, Kubo H, Matsumori A. Role of Lymphangiogenic Factors in Myocardial Infarction. Circulation*. 2007 suppl I: Scientific Sessions Abstracts Suppl B117.)。

さらに、我々は拡張型心筋症、心筋梗塞、ウイルス性心筋炎、高血圧性心不全モデルマウスに対する**心臓リンパ管新生調整因子**を用いた治療法の有効性を明らかとし、動物実験レベルでの治療法を確立した。(*Ryosuke Nishio, Hajime Kubo, Akira Matsumori, Role of Lymphangiogenesis Factors in Heart Diseases. World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2010, June 19th, 2010, Beijing, China. Nishio R, Kubo H, Matsumori A. Role of Lymphangiogenic Factors in Hypertensive Heart Failure. Circulation*. 2008 suppl I: Scientific Sessions Abstracts Suppl 12961.)。

VEGF-C の 156 番システインをセリンに置き換えた VEGF-C^{156S} は、リンパ管新生を特異的に作用する、リンパ管新生インデューサーである。また、VEGFR-3 の VEGF-C 結合領域を含む第 1 ~ 第 3Ig ドメインにヒト IgG1 の Fc 部位を結合させたタンパク (VEGFR3-Fc) は VEGFR-3 の拮抗作用を持つタンパク、リンパ管新生ブロッカーとして用いられている (*Cao R, Eriksson A, Kubo H, et. al. Circ Res*. 2004;94:664-70.)。そこで、我々は、これらリンパ管作用物質を用い、拡張型心筋症、心筋梗塞、ウイルス性心筋炎、高血圧性心不全モデルマウスにおける心臓リンパ管新生療法及び抗心臓リンパ管療法の効果を検討し、これらの治療法を動物モデルにおいて確立した (特許申請準備中)。我々はヒト心内膜心筋生検および剖検心病理組織標本を用い、拡張型心筋症、心筋梗塞、心筋炎、心不全患者における心臓リンパ管の病態との関連を解析中である。また、リアルタイム PCR 法等を用い、VEGF-C や VEGFR-3 等のリンパ管関連因子の発現を定量化し、病態との関連も解析中である。リンパ管関連因子はこれら疾患の新たな**バイオマーカー**として発展する可能性が示唆されている (特許申請準備中)。

2. 研究の目的

拡張型心筋症・虚血性心筋症は難治性疾患であり、新たな治療法が待望されている。心臓移植・人工心臓においては高侵襲性・ドナー・感染症等の問題があり、低侵襲性の治療法も不可欠と考えられる。

我々の研究により、拡張型心筋症、心筋梗塞などに対する**心臓リンパ管新生調整因子**を用いた治療法の有効性が明らかとなった (*World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2010, June 19th, 2010, Beijing, China. ; Circulation*. 2008 suppl I: Scientific Sessions Abstracts Suppl 12961.)。しかしながら、臨床

応用には課題も多い。そこで、再生医療の応用も考慮に入れた、拡張型心筋症、虚血性心筋症に対する臨床応用可能な新たな治療戦略の構築を目標とする。

我々がこれまで行ってきた経冠動脈的にアデノウイルスベクターを心臓へ導入するためのマイクロバルーン開発（**<知的所有権>**：特願 2003-129241、発明者：京都大学助手 西尾亮介、他 出願人：株式会社ヴァーユ）などと ES 細胞や iPS 細胞といった再生医療を応用・発展させ、臨床応用を検討する。

治療への応用の観点から、患者の生活の質を十分に考慮した実現可能な治療法の開発が不可欠と考えられる。臨床応用の段階では、アデノウイルスベクターの治療目的での使用の制限が予想され、さらに、用いるタンパク、遺伝子、成長因子等の性質を考慮すると、少なくともモニタリングとデリバリーの機能を備えた**治療用マイクロデバイス**による心内膜または心外膜直下からのアプローチが不可欠と考えられる。同時に、経血管的・経リンパ管のアプローチが不可欠なため、**微小血管用マイクロデバイス**の開発も視野に入れる。

リンパ管関連因子は新たな**バイオマーカー**として発展する可能性が極めて高く、心筋細胞の配列を制御する方法の開発（**<知的所有権>**「進展方向が制御された細胞の培養方法」出願番号：特願 2005-003926、発明者：西尾亮介、他 出願人：西尾亮介、他）などを応用・発展させ、臨床応用を検討する。

心疾患における分子生物学的な心臓リンパ管の研究は我々の研究以外では皆無に等しい。本研究は極めて独創的であると思われる。あらゆる心疾患で、心臓リンパ管の関与が予想され、リンパ管と血行動態との関連は極めて臨床的に重要であると思われる。これまでの研究は冠動脈をはじめとした動脈系の研究が中心であった。しかし、免疫との関連を考えると心臓リンパ管の病態への関与も極めて重要であると考えられる。そして、再生医療を考慮した場合、心臓リンパ管は不可欠なものであると予想される。

心臓リンパ管新生療法及び抗心臓リンパ管療法による新たな治療法へつながる可能性が極めて高いと思われる。また、これらの治療法はモニタリングとデリバリーの機能を備えた治療用デバイスによる心内膜または心外膜直下からのアプローチが不可欠と思われる。一方、診断の立場からも、リンパ管新生調整因子はウイルス性心筋炎・心筋症の新たなバイオマーカーとして発展する可能性が極めて高い。しかし、分子医学的また免疫学的な心臓リンパ管の研究は皆無に等しく、循環器内科学の分野で、全く新たな領域として発展する可能性を秘めた研究であると思われる。

3. 研究の方法

難治性疾患である拡張型心筋症・虚血性心筋症の臨床応用可能な新規治療戦略を構築するため、

マウスモデルにおける心臓リンパ管新生調整因子の新規治療戦略の開発（新規デリバリー法を念頭とした治療用植込み型マイクロデバイスの開発を含む）

大型動物（イヌまたはブタ）における心臓リンパ管新生調整因子の新規治療戦略の開発（前臨床試験を視野に入れる）

リンパ管新生調整因子の新規バイオマーカーとしての応用の確立

を中心に開発を行う。

我々は拡張型心筋症および心筋梗塞モデルマウスにおいて、リンパ管を特異的に同定する抗 VEGF-R3 抗体および抗 Podoplanin 抗体により、心臓リンパ管の存在を明らかとした (Nishio R, Kubo H, Matsumori A. Role of Lymphangiogenic Factors in a Murine Model of Viral Myocarditis. *Circulation*. 2006;114 suppl I: Scientific Sessions Abstracts Suppl, 185.)。そして、これらのモデルマウスを用い、これらの病態における心臓リンパ管新生調整因子の関与をさらに詳細に解析した。我々は独自の方法により（**<知的所有権>**特願 2001-200975、発明者：西尾亮介、他 出願人：関西 TLO；*Nature Medicine* 9: 1477-83, 2003.; *J. Am. Coll. Cardiol.* 40:1506-1514, 2002.）心機能との関連をさらに詳細に検討した。我々は経冠動脈的にアデノウイルスベクターを心臓へ導入するためのマイクロバルーンを開発した（**<知的所有権>**：特願 2003-129241、発明者：京都大学助手 西尾亮介、他 出願人：株式会社ヴァーユ）。これらを用い、リンパ管新生インデューサーである VEGF-C^{156S} 及びリンパ管新生ブロッカーである VEGFR3-Fc の治療効果につきさらに検討し、臨床応用可能な心臓リンパ管新生調整因子による治療法をマウスモデルにおいて確立してきた (Ryosuke Nishio, Hajime Kubo, Akira Matsumori, Role of Lymphangiogenesis Factors in Heart Diseases. *World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2010, June 19th, 2010, China National Convention Center, Beijing, China. Nishio R, Kubo H, Matsumori A. Role of Lymphangiogenic Factors in Hypertensive Heart Failure. *Circulation*. 2008 suppl I: Scientific Sessions Abstracts Suppl 12961.*)。臨床応用にはこれらの治療法をより発展させる必要がある。

VEGFR-3 ノックアウトマウスは心外膜液貯留等のため胎生 9.5 日で致死となることから、心臓リンパ管は心疾患の治療ターゲットとなることが示唆されてきた。治療への応用の観点から、用いるタンパク、

遺伝子、成長因子等の性質を考慮すると、少なくともモニタリングとデリバリーの機能を備えた**治療用マイクロデバイス**による心内膜または心外膜直下からのアプローチが不可欠と考えられる。同時に、経血管的・経リンパ管的アプローチが不可欠なため、**微小腔用マイクロデバイス**の開発も視野に入れる。そこで、治療用マイクロデバイス開発を視野に入れた動物実験も行うことも検討する。我々は心筋細胞の配列を制御する方法を開発しており、この技術を用い、**リンパ管新生インデューサー、VEGF-C^{156S}及びリンパ管新生ブロッカー、VEGFR3-Fc**の治療戦略への応用も検討する(＜**知的所有権**＞「進展方向が制御された細胞の培養方法」出願番号：特願2005-003926、発明者：西尾亮介、他 出願人：西尾亮介、他)。

治療用マイクロデバイスの開発にあたっては、用いるタンパク、遺伝子、成長因子等の性質を考慮し、モニタリングとデリバリーの機能を備えたものを心内膜または心外膜直下から使用することが予想される。開発のプロセスは、(1)治療用マイクロデバイスの設計：マウス心臓カテーテルの技術を応用し、設計を行う；(2)外部製造メーカーでの試作品の作成；医療用機器製造メーカー等にて試作品を作成する；(3)マウスを使った生体内実験：マウスの心臓を用い、生体にて試作品の実用化へ向けての実験を行う；(4)特許申請：マウスを使った実験で特許化が可能な部分につき特許申請を行う、といったものとなる。

マイクロデバイス開発に当たっては実用化を考慮し、可能な限り早期に開始することが望まれる。医療用マイクロデバイスの実用化には、ノウハウの蓄積が不可欠であり、総合的にマイクロテクノロジーを開発することが必要条件となる。我々はマイクロテクノロジーを用い、マウスの心臓移植、心筋梗塞のモデルを作成し、経血管的に体重17gの心不全モデルマウスの心機能の評価を行うことに成功している。マウスにおける安定した血行動態解析技術を持っている機関は当研究機関のみである。(特許出願済み 出願番号：特願2001-200975、発明者：京都大学助手 西尾亮介、同助教授 松森昭 出願人：関西TLO)。

治療用マイクロデバイスには以下に述べるマイクロデバイスを統合したものとなることが予想される。すなわち、マイクロ圧センサー、マイクロサーミスターを応用した微小流量計、血管内マイクロスコープ、マイクロスコープ付マイクロバイオトーム、エレクトロポレーション法による遺伝子導入用マイクロデバイス、および超音波法による遺伝子導入用マイクロデバイス、リアルタイムマイクロプロテインアナライザー等である。心疾患における微小循環の病態は不明な点が多い。リンパ管・微小血管を

対象としたマイクロデバイスによりリンパ管を含めた微小循環の測定および解析と微小領域における蛋白や遺伝子発現の測定が可能となる。

また、以下に述べる、マイクロテクノロジーをサポートする周辺医療器材の開発も重要と思われる。すなわち、微小血管用切開、縫合器具、マイクロクリップ、微小人工血管、マイクロインフュージョンポンプ、超微細チューブ等である。

治療用マイクロデバイスの開発は診断・治療の両面において低侵襲的であり、医療コストおよび患者本位の医療という両面から今後の医療に不可欠であり、日本の医療の向かうべき方向に合致しているとも考えられる。医療の発展には不可欠であり、研究のための研究ではなく、臨床での治療・診断で用いられることを前提としたものである。また、新たな医療用ハードの開発には莫大な投資が必要となり、かつ実用化不可能となるリスクも存在する。当研究においては可能な限り現在使用されている測定・治療機器を応用、マイクロ化し、低コストで短期間に臨床実用化する事を目標と考えている。

また、(1)製品化：外部メーカーにより製品化を行う；(2)医療法器具認可申請：医療法器具として認可されるための業務を行う、といったプロセスも視野に入れる。

可能な限り低侵襲的であり、医療コストおよび患者本位の医療という両面から治療法を考慮していく。

我々は心内膜心筋生検および剖検心病理組織標本、リアルタイムPCR法等を用いたVEGF-CやVEGFR-3等のリンパ管関連因子の発現の定量化、臨床上のパラメータを用い、拡張型心筋症・虚血性心筋症患者における心臓リンパ管の病態との関連の解明を詳細に検討した。疾患における病期と心臓リンパ管形成との関連について詳細な検討を加え、動物モデルおよびヒト心臓組織から得られたデータより病態における心臓リンパ管の役割をより詳細に解明した。これらより、拡張型心筋症・虚血性心筋症におけるリンパ管新生調整因子の新規バイオマーカーとしての確立を目指す。

4. 研究成果

我々は拡張型心筋症および心筋梗塞モデルマウスにおいて、リンパ管を特異的に同定する抗VEGF-R3抗体および抗Podoplanin抗体により、心臓リンパ管の存在を明らかとしてきた。そして、これらのモデルマウスを用い、これらの病態における心臓リンパ管新生調整因子の関与をさらに詳細に解析してきた。今回、我々は独自の方法により心機能との関連をさらに詳細に検討した。我々は経冠動脈的にアデノウイルスベ

クターを心臓へ導入するためのマイクロバルーンを開発し、リンパ管新生インデューサーである VEGF-C156S 及びリンパ管新生ブロッカーである VEGFR3-Fc の治療効果につきさらに検討し、臨床応用可能な心臓リンパ管新生調整因子による治療法をマウモデルにおいて確立し、今回、臨床応用に向け、これらの治療法をより発展させてきた。VEGFR-3 ノックアウトマウスは心外膜液貯留等のため胎生 9.5 日で致死となることから、心臓リンパ管は心疾患の治療ターゲットとなることが示唆されてきた。治療への応用の観点から、用いるタンパク、遺伝子、成長因子等の性質を考慮すると、少なくともモニタリングとデリバリーの機能を備えた治療用マイクロデバイスによる心内膜または心外膜直下からのアプローチが不可欠と考えられる。同時に、経血管的・経リンパ管的アプローチが不可欠なため、微小管腔用マイクロデバイスの開発も視野に入れる。そこで、今回、治療用マイクロデバイス開発を視野に入れた動物実験も行うことを検討した。我々は心筋細胞の配列を制御する方法を開発しており、この技術を用い、リンパ管新生インデューサー、VEGF-C156S 及びリンパ管新生ブロッカー、VEGFR3-Fc の治療戦略への応用も検討した。

拡張型心筋症および心筋梗塞モデルマウスの病態における心臓リンパ管の役割が明らかとなってきたが、治療への応用へはその詳細な検討が不可欠である。これらの病態における心臓リンパ管新生調整因子の関与をさらに詳細に解析すると同時に、臨床応用に向け、治療法をより発展させた。治療への応用の観点から、モニタリングとデリバリーの機能を備えた治療用マイクロデバイスによる心内膜または心外膜直下からのアプローチが不可欠であり、微小管腔用マイクロデバイスの開発も視野に入れ、治療用マイクロデバイス開発を視野に入れた動物実験をより詳細に行った。治療用マイクロデバイスの開発のプロセスは、(1)治療用マイクロデバイスの設計；(2)外部製造メーカーでの試作品の作成；(3)マウスを使った生体内実験(4)特許申請、といったものとなった。マイクロデバイス開発に当たっては実用化を考慮し、可能な限り早期に開始することが望まれる。医療用マイクロデバイスの実用化には、ノウハウの蓄積が不可欠であり、総合的にマイクロテクノロジーを開発することが必要条件となる。治療用マイクロデバイスの開発は診断・治療の両面において低侵襲的であり、医療コストおよび患者本位の医療という両面から今後の医療に不可欠であり、日本の医療の向かうべき方向に合致しているとも考えられた。医療の発

展には不可欠であり、研究のための研究ではなく、臨床での治療・診断で用いられることを前提とした。また、新たな医療用ハードの開発には莫大な投資が必要となり、かつ実用化不可能となるリスクも存在した。当研究においては可能な限り現在使用されている測定・治療機器を応用、マイクロ化し、低コストで短期間に臨床実用化する事を目標とした。

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 2 件)

西尾亮介, 原論文に対する Editorial Comment, 心臓, 査読有, 44 巻, 2012, 1208, DOI なし
Kinashi H, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Terabayashi T, Nagura F, Hattori R, Matsukawa Y, Mizuno T, Noda Y, Nishimura H, Nishio R, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Takei Y. TGF- β 1 promotes lymphangiogenesis during peritoneal fibrosis. J Am Soc Nephrol. 査読有, 24 巻, 2013, 1627-1642

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 2 件)

井村裕夫監修, 文光堂, わかりやすい内科学 第4版, 2013
佐藤幸人編, メディカ出版, 臨床心不全のいちばん大事なところ 60, 2014

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 心筋炎の予防または治療剤
発明者: 西尾亮介
権利者: 西尾亮介
種類: 特許
番号: 505013686
出願年月日: 2014 年 06 月 11 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 亮介 (NISHIO, Ryosuke)
京都大学医学部附属病院・助教
研究者番号：00335275

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：