

**GATA-4 導入した骨髄幹細胞の心筋内移植による  
心筋症治療法の開発  
(課題番号 16209043)**

**平成 16、17 年度科学研究費補助金(基盤研究 A)  
研究成果報告書**



**平成 18 年度 12 月**



**研究代表者 黒澤 博身**

**(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 教授)**



**GATA-4 導入した骨髄幹細胞の心筋内移植による**

**心筋症治療法の開発**

**(課題番号 16209043)**

**平成 16、17 年度科学研究費補助金(基盤研究 A)**

**研究成果報告書**

**平成 18 年度 12 月**

**研究代表者 黒澤 博身**

**(東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 教授)**

# 目次

はしがき	2
1. 研究課題名・研究組織・研究経費	4
2. 研究発表	5
3. 研究成果	
1. 研究計画と成果の概要	19
2. 肺動脈弁の Tissue Engineering (羊)	28
3. 肺動脈の Tissue Engineering (羊)	32
4. 心臓血管領域における Tissue Engineering の現状	43
5. 下大静脈の Tissue Engineering Vascular Autografts (TEVAs)(犬)	48
6. 血管の Tissue Engineering	59
7. TEVAs に対する骨髄細胞播種の有効性	65
8. 播種される骨髄細胞の培養の必要性	71
9. TEVAs の臨床応用	78
10. TEVAs のフォンタン手術への応用	80
11. TEVAs の臨床応用(中間報告)	82
12. TEVAs の中期遠隔成績(臨床)	88
13. TEVAs の組織学的小および生化学的評価	101
4. 参考文献	
1. 心臓血管外科の再生治療の基礎	110
2. 心血管系のティッシュエンジニアリング	116
3. 培養人工血管	120
4. 骨髄細胞を用いた再生血管移植の臨床例	127
5. バイオ人工血管	132
6. バイオ人工血管の臨床応用	139
7. 再生人工血管の臨床応用	146
8. 骨髄細胞を用いた再生血管と臨床応用	153
9. 先天性心疾患領域における再生医療	157
10. 組織工学による心臓弁、再生血管	163

はしがき

東京女子医科大学心臓血管外科 黒澤博身

現在、虚血性心筋症や拡張型心筋症が原因となる末期重症心不全患者に対しての治療法として人工心臓、心臓移植が挙げられる。しかし、人工心臓は半永久的ではなく、また、心臓移植は確実な治療効果が期待できる治療法だが、免疫応答の問題、わが国においては深刻なドナー不足からそれらの適応が制限されているのが現状である。

近年、「再生医療」という言葉が紙面で多く取り上げられている。実際の医療現場においても各科で盛んに応用され、この分野の研究は今まさに日進月歩である。また、急性心筋梗塞、閉塞性動脈硬化症に対して骨髄幹細胞を用いた再生医療の有効性が報告されている。しかし、その多くの主たる要因は血管新生であり、心筋細胞自身に障害を有する心筋症が原因となる重症心不全に対しては現在、未知数である。自己の持つ修復機能を利用したこれらの新しい医療は、患者本人に対する侵襲、安全性だけでなく、この行き詰った医療経済へのブレイクスルーとしても注目されている。

2003年に米国の Srivastava 博士らのグループと研究分担者の松岡らのグループによって GATA4 遺伝子に変異があると心中隔欠損をはじめとする様々な心疾患が引き起こされるが報告された (Nature 424:443-447,2003)。このことはヒトにおいても GATA4 の機能低下が心筋細胞の分化および遊走に異常をきたす事を示唆している。

GATA4 は zinc finger を介して標的遺伝子のプロモーター領域に

ある結合配列(A/TGATAA/G)に結合し転写活性を示す。CSX/NKX2.5 との protein-protein interaction を介して心筋特異的遺伝子である心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)やミオシン、アクチン、イオンチャネル、コネキシンなど心筋特異的蛋白群の遺伝子の転写を強力に活性化するが、CSX/NKX2.5 遺伝子のプロモーター領域にも GATA 結合配列が存在し、CSX/NKX2.5 の転写にも関与していると考えられる。また、NF-AT3 と GATA4 との結合によりミオシン重鎖などの心筋収縮タンパクの発現が活性化する事も知られている。

心臓系譜に関与する転写因子の一つとして zinc finger motif を持つ GATA ファミリーが知られている。脊椎動物において GATA4、GATA5、GATA6 が心臓で発現している。その中の一つ、Gata4 は Csx/Nkx2.5 と同様にマウス胎生 7.5 日から心臓予定領域に発現し、成体期までその発現は続く。培養細胞での GATA4 の発現を阻止すると心筋形成が阻害される。また、Gata4 欠損マウスは、心筋分化は正常であるが、左右の心臓原基が正中線で融合できず、linear heart tube が形成されずに胎生致死となる。これらの結果から GATA4 は心筋細胞分化誘導だけでなく心筋細胞の遊走にも関与していることが示唆される。

そこで、我々は遺伝子導入という新たな治療法を用いて末期重症心不全治療法である心臓移植治療が現在ドナー不足で停滞している状況を打破できる新しい治療体系を確立できることを目標とする。

末期重症心不全治療においてさらなる発展の一役を担えるよう今後も努力していきたい。

1. 研究課題名・研究組織・研究経費

【研究課題名】

GATA-4 導入した骨髄幹細胞の心筋内移植による心筋症治療法の開発

(課題番号 16209043)

【研究組織】

研究代表者：

黒澤博身（東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 教授）

研究分担者：

新岡俊治（東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助教授）

松岡瑠美子（東京女子医科大学医学部小児循環器 講師）

松村剛毅（東京女子医科大学医学部心臓血管外科学講座 助手）

今村真一郎（東京女子医科大学医学部分子細胞生物学 助手）

【研究経費】

平成 16 年度 18,500 千円

平成 17 年度 22,500 千円

計 41,000 千円

## 2. 研究発表

### 【学会誌など】

1. Goki Matsumura, Yoko Ishihara, Sachiko-Miyagawa Tomita, Yoshito Ikada, Shojiro Matsuda, Hiromi Kurosawa, Toshiharu Shin'oka. Evaluation of Tissue-Engineered Vascular Autografts: Tissue Engineering. 12, 11, 2006
2. Shin'oka, T.、Matsumura, G.、Hibino, N.、Naito, Y.、Watanabe, M.、Konuma, T.、Sakamoto, T.、Nagatsu, M.、Kurosawa, H. Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells : J Thorac Cardiovasc Surg、129, 6, 1330, 2005
3. Hibino, N.、Shin'oka, T.、Matsumura, G.、Ikada, Y.、Kurosawa, H. The tissue-engineered vascular graft using bone marrow without culture : J Thorac Cardiovasc Surg、129, 5, 1064, 2005
4. Shin'oka T、 [Clinical results of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells] Nippon Geka Gakkai Zasshi. 2004 Aug;105(8):459-63. Japanese.
5. Isomatsu Y, Shin'oka T, Aoki M, Terada M, Takeuchi T, Hoshino S, Takanashi Y, Imai Y, Kurosawa H Establishing Right Ventricle - Pulmonary Artery Continuity by Autologous Tissue: An Alternative Approach for Prosthetic Conduit Repair Ann Thorac Surg 2004; 78: 178-180
6. Shin'oka T Clinical results of tissue engineered vascular autografts Yonsei Medical Journal 2004; 45: 73-74

7. Sakamoto T, Kurosawa H, Shin`oka T, Aoki M, Isomatsu Y The influence of pH strategy on cerebral and collateral circulation during hypothermic cardiopulmonary bypass in cyanotic patients with heart disease: Results of a randomized trial and real-time monitoring J Thorac Cardiovasc Surgery 2004; 127:12-19
8. 新岡俊治、黒澤博身 「ラット肺に対する経肺動脈 HGF 遺伝子導入による新生血管の検討」 小野論文に対する comment 心臓 2004
9. 松村剛毅、新岡俊治 骨髄細胞を用いた再生血管移植の臨床例 炎症と免疫 12:154-158, 2004
10. Hibino N, Shin'oka T, Kurosawa H Long-Term Histologic Findings in Pulmonary Arteries Reconstructed with Autologous Pericardium The New England Journal of Medicine 348:865-867, 2003
11. Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience Biomaterials24: 2303-2308, 2003
12. Matsumura G, Sachiko Miyagawa-Tomita, Shin'oka T, Ikada Y, Kurosawa H First Evidence That Bone Marrow Cells Contribute to the Construction of Tissue-Engineered Vascular Autografts In Vivo Circulation108: 1729-1734, 2003
13. Isomatsu, Y, Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N, Konuma T, Nagatsu M, Kurosawa H, Extracardiac total cavopulmonary connection using a tissue-engineered graft J Thorac Cardiovasc Surg 126:1958-1962, 2003



14. Matsumura G, Shin'oka Successful Application of Tissue Engineered Vascular Autografts; Clinical Experience. *Biomaterials* 2003 ; 24:2303-2308
15. Shin'oka T Tissue Engineered Heart Valves: Autologous Cell Seeding on Biodegradable Polymer Scaffold Artificial Organ2002; 26:522-6
16. Naito Y, Imai Y, Shin'oka T, Aoki M, Kashiwagi, Konuma T, Murata A, Miyake T, Kurosawa H. A Successful Clinical Application of Tissue Engineered Graft for Extracardiac Fontan Operation *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery.* 2002; 125, 419-420
17. T. Hiramatsu, Y. Imai, H. Kurosawa, Y. Takanashi, M. Aoki, T. Shin'oka, M. Nakazawa Effects of dilutional and modified ultrafiltration in plasma endothelin-1 and pulmonary vascular resistance after the fontan procedure *Ann Thorac Surg*2002; 73:862-5
18. T. Hiramatsu, Y. Imai, H. Kurosawa, Y. Takanashi, M. Aoki, T. Shin'oka, T. Sakamoto Midterm results of surgical treatment of systemic ventricular outflow obstruction in Fontan patients *Ann Thorac Surg*2002; 73: 855-861
19. Hiramatsu T, Okamura T, Imai Y, Kurosawa H, Aoki M, Shin'oka T, Takanashi Y Effects of Autologous Platelet Concentrate Reinfusion After Open Heart Surgery in Patients With Congenital Heart Disease *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1282-5

20. Kashiwagi J, Imai Y, Aoki M, Shin'oka T, Hagino I, Nakazawa M An arterial switch operation for a concordant crisscross heart with the complete transposition of the great arteries *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 2002; 124:176-8
21. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *New England Journal of Medicine*. 2001;344:532-533.
22. Ishida T, Imai Y, Hoshino S, Hiramatsu T, Seo K, Aoki M, Shin'oka S. [Case report of CABG for progressive coronary artery stenosis after 22-year history of Kawasaki disease]. *Kyobu Geka - Japanese Journal of Thoracic Surgery*. 2001;54:859-862.
23. Nemoto S, Aoki M, Dehua C, Imai Y. Effects of carnitine on cardiac function after cardioplegic ischemia in neonatal rabbit hearts. *Annals of Thoracic Surgery*. 2001;71:254-259.
24. Sakamoto T, Aoki M, Imai Y, Nemoto S. Carnitine affects fatty acid metabolism after cardioplegic arrest in neonatal rabbit hearts. *Annals of Thoracic Surgery*. 2001;71:648-653.
25. Isomatsu Y, Imai Y, Shin'oka T, Aoki M, Sato K. Coarctation of the aorta and ventricular septal defect: should we perform a single-stage repair? [see comments.]. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 2001;122:524-528.
26. Watanabe M, Shin'oka T, Tohyama S, Hibino N, Konuma T, Matsumura G, Kosaka Y, Ishida T, Imai Y, Yamakawa M, Ikada Y,

- Morita S. Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. *Tissue Engineering*. 2001;7:429-439.
27. Isomatsu Y, Imai Y, Shin'oka T, Aoki M, Iwata Y. Surgical intervention for anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary artery: the Tokyo experience. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 2001;121:792-797.
28. Momma K, Takao A, Matsuoka R, Imai Y, Muto A, Osawa M, Takayama M. Tetralogy of Fallot associated with chromosome 22q11.2 deletion in adolescents and young adults. *Genetics in Medicine*. 2001;3:56-60.
29. Fujimaki W, Iwashima M, Yagi J, Zhang H, Yagi H, Seo K, Imai Y, Imanishi K, Uchiyama T. Functional uncoupling of T-cell receptor engagement and Lck activation in anergic human thymic CD4<sup>+</sup> T cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:17455-17460.
30. Hibino N, Shin'oka T, Matsumura G, Watanabe M, Toyama S, Imai Y. [Cryopreservation of vascular mixed cell for tissue engineering in cardiovascular surgery]. *Kyobu Geka - Japanese Journal of Thoracic Surgery*. 2001;54:479-484.
31. Shinoka T, Imai Y, Matsumura G. [Current status of tissue engineering for therapeutic use]. *Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine*. 2001;59:1389-1399.
32. Hibino N, Imai Y, Aoki M, Shin'oka T, Hiramatsu T. Double

switch operation for superior-inferior ventricles. *Annals of Thoracic Surgery*. 2001;72:2119-2121.

33. Imai Y, Seo K, Aoki M, Shin'oka T, Hiramatsu K, Ohta A. Double-Switch operation for congenitally corrected transposition. *Seminars in Thoracic & Cardiovascular Surgery. Pediatric Cardiac Surgery Annual*. 2001;4:16-33.

【学会・研究会発表等】

1. 日比野成俊、今井康晴、新岡俊治、瀬尾和宏、青木 満、渡辺 学、小坂由道、松村剛毅、山川光徳、森田真一郎 ティッシュエンジニアリング技術を用いた末梢肺動脈再建術 第31回日本心臓血管外科学会(平成 13 年 2 月)
2. 新岡俊治 培養自己細胞を使用したティッシュエンジニアリングによる再生血管移植 第6回関東甲信越セロトニン研究会学術集会(招請講演)(平成 13 年 2 月)
3. Naito Y, Shin'oka, Imai Y The Expansion of Human Bone Marrow Derived Cells with Combinations of Growth Factor ISACB 8th(International Society for Applied Cardiovascular Biology) Biennial meeting, St. Gallen, Switzerland 2002
4. Watanabe M, Shin'oka, Imai Y Tissue Engineered Vascular Autograft - Inferior Vena Cava Replacement Study in a Dog Model ISACB 8<sup>th</sup> (International Society for Applied Cardiovascular Biology) St. Gallen, Switzerland 2002
5. 日比野成俊、黒澤博身、青木 満、新岡俊治、磯松幸尚、森島重弘、坂本貴彦、石山雅邦、岩田祐輔、山本 昇、松村剛毅 大血管転位症に対する Jatene 術後遠隔期に生じた AR に対して free style valve による弁置換を行った2例 日本循環器学会関東甲信越地方会 第184回学術集会, 2002
6. Hibino N. Shin'oka T, Watanabe M, Matsumura G, Konuma T, Kurosawa H Tissue Engineered vascular graft: Effects of the Cell Source on the Creation of the Tissue Engineered vessel



5th Annual Meeting of the Tissue Engineering Society international , 2002

7. 新岡俊治、黒澤博身、齋藤聡、松村剛毅、小坂由道、筏 義人、保々恭子、市原有起、宮本真嘉、自己細胞を用いた中～大口径再生血管の再生治療。第43回日本人工臓器学会、2005年、東京
8. 松村剛毅、新岡俊治、齋藤聡、坂本貴彦、小坂由道、市原有起、宮本真嘉、保々恭子、黒澤博身、筏 義人。骨髓細胞と生分解性ポリマーを用いた再生血管の経時的变化・遠隔評価。第36回日本心臓血管外科学会総会、2006年4月、盛岡
9. Goki Matsumura, Toshiharu Shin' oka, Narutoshi Hibino, Yoshimichi Kosaka, Hiromi Kurosawa. Tissue Engineering Vascular Autograft Utilizing Bone Marrow Cells in a Dog Model. 4th World Congress of Pediatric Cardiology and Pediatric Cardiovascular Surgery. 2005.9. Argentina
10. 松村剛毅、新岡俊治、齋藤 聡、小坂由道、小沼武司、保々恭子、市原有起、宮本真嘉、黒澤博身、筏 義人。自己細胞を用いた中～大口径再生血管の作成：心筋・血管新生療法研究会、2005年7月、東京
11. 松村剛毅、新岡俊治、小坂由道、日比野成俊、黒澤博身。再生血管の内皮細胞の評価：日本胸部外科学会総会、2004年10月、札幌
12. 松村剛毅、新岡俊治、齋藤聡、小坂由道、小沼武司、保々恭子、市原有起、宮本真嘉、黒澤博身、筏義人。自己細胞を用いた

- 再生血管治療と臨床経過：第4回再生心臓血管外科治療研究会、  
2005年、浜松
13. 松村剛毅.” 再生医療技術を用いた循環器疾患に対する組織移植および血管新生に関する研究” ハイブリッド心臓弁、血管サブグループ。再生血管の臨床応用：循環器病研究委託費 13公-1、2004年2月、大阪
14. 松村剛毅. 生分解性ポリマーによる血管の再生：循環器病研究委託費「医工学的再生治療技術に関する分野横断的研究」、第1回 班会議、2006年12月、大阪
15. 保々恭子、清水達也、関根秀一、黒澤博身、齋藤聡、小坂由道、松村剛毅、市原有起、宮本真嘉、岡野光夫、新岡俊治 *虚血肢に対する細胞移植と細胞シート移植による血管再生療法の比較検討* 第5回再生医療学会（平成17年3月）
16. 保々恭子、清水達也、関根秀一、黒澤博身、齋藤聡、小坂由道、松村剛毅、市原有起、宮本真嘉、岡野光夫、新岡俊治 *虚血肢に対する細胞シート移植による血管再生療法の検討* 第5回再生心臓血管外科治療研究会（平成18年4月）
17. Kyoko Hobo, Tatsuya Shimizu, Hidekazu Sekine, Hiromi Kurosawa, Satoshi Saito, Yoshimichi Kosaka, Goki Matsumura, Shinka Miyamoto, Yuki Ichihara, Teruo Okano, Toshiharu Shin'oka *Smooth muscle cell sheet transplantation enhances angiogenesis and improves of hindlimb ischemia* The1st World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine (2006.4.)

18. 保々恭子、清水達也、関根秀一、黒澤博身、齋藤聡、小坂由道、松村剛毅、市原有起、宮本真嘉、岡野光夫、新岡俊治 ラット虚血肢モデルにおける細胞シート移植による血管再生 第9回日本組織工学会（平成18年9月）
19. Kyoko Hobo, Tatsuya Shimizu, Hidekazu Sekine, Hiromi Kurosawa, Satoshi Saito, Yoshimichi Kosaka, Goki Matsumura, Shinka Miyamoto, Yuki Ichihara, Teruo Okano, Toshiharu Shin'oka *Smooth muscle cell sheet transplantation induced revascularization and preserve blood perfusion in ischemic hind limb* The5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine-EU meeting (2006.11.)

## 【著書】

1. 新岡俊治 先天性心臓病 最新版 家庭医学大全科 1008-1012, 2004
2. 新岡俊治 1. Tissue Engineering 第11章 医療材料、治療機器の進歩 先端医療シリーズ12:心臓病「心臓病-その最新医療と21世紀への展望」 357-363 先端医療技術研究所 2001
3. 新岡俊治 心臓弁、血管の再生「化学フロンティア③」再生医療工学 筏 義人編、化学同人、2001
4. 新岡俊治 第II部再生組織 第5章 胸・腹部5. 血管「再生医療工学の最先端」 153-158 シーエムシー出版、2002
5. 新岡俊治 心臓血管外科における再生医療 「Annual Review 循環器」271-277 2002 中外医学社 2002
6. 新岡俊治 バイオ医人工血管 現代化学増刊「再生医学・再生医療」201-206 東京化学同人 2002
7. 新岡俊治 ティッシュエンジニアリング 目で見ると循環器病フロンティア ベーシック&クリニカルサイエンス 128-137 メジカルレビュー社 2002
8. 新岡俊治 再生弁 「生活習慣と遺伝子疾患」 267-273 メディカルレビュー刊 2002
9. Goki Matsumura, Toshiharu Shin'oka. Clinical Application of Tissue-Engineered Blood Vessels : Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches、105,2005, Springer-Verlag Tokyo, H. Mori, H. Matsuda edition
10. 松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身. 心臓血管外科の再生治療の基礎:

Cardiovascular Med-Surg、6, 3, p64, 2004

11. 松村剛毅、新岡俊治. 弁の再生医療：現代医療、36, 1, p23, 2004
12. 松村剛毅、新岡俊治、日比野成俊、黒澤博身、松田晶二郎、高橋文丈、筏義人. 骨髄細胞を用いた再生血管治療と臨床応用：第3回再生心臓血管外科治療研究会、2004年2月、福岡
13. 松村剛毅、新岡俊治、日比野成俊、内藤祐次、村田明、東隆、黒澤博身. 骨髄細胞による Tissue Engineered Vascular Autograft：第2回再生心臓血管外科治療研究会、2003年5月、札幌



## 【総説】

1. 小坂由道、松村剛毅、新岡俊治 血管再生医学の臨床応用  
Medical View Point 25:4, 2004
2. 小坂由道、新岡俊治 自己骨髄細胞を用いた再生血管移植 医学  
のあゆみ 210: 215-216
3. 松村剛毅、新岡俊治 弁の再生医療 現代医療 36:23-27, 2004
4. 日比野成俊、新岡俊治 バイオ人工血管 バイオマテリアル  
2004
5. 市原有起、松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身 生体弁の tissue  
engineering Cardiovascular Med-Surg 7: 317-320, 2004
6. 新岡俊治 骨髄細胞を使用する再生血管移植の臨床 外科学会  
雑誌 105: 459-463, 2004
7. 内藤祐次、新岡俊治、松村剛毅 生体吸収性ポリマーを使用する再  
生血管の臨床応用 高分子 53:153-155, 2004
8. 松村剛毅、新岡俊治 骨髄細胞を用いた再生血管移植の臨床例  
炎症と免疫 12:154-158, 2004
9. 新岡俊治、今井康晴、渡辺 学、松村剛毅、小坂由道、日比野成  
俊 再生血管移植の基礎 整形・災害外科 44:161-167, 2001
10. 新岡俊治、今井康晴、渡辺 学、松村剛毅、小坂由道、日比野  
成俊、村田 明 再生血管の臨床応用 外科 63: 304-310, 2001
11. 新岡俊治、今井康晴 心臓血管外科の再生医工学 分子心血管病  
2:17-24, 2001
12. 保々恭子、松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身. バイオ人工血管の  
臨床応用 : Vascular Biology & Medicine、5, 6, p59, 2004

13. 保々恭子、松村剛毅、新岡俊治. バイオ人工血管：医療用マテリアルと機能膜、119、2005
  14. 松村剛毅、新岡俊治、黒澤博身. 心臓血管外科の再生治療の基礎：Cardiovascular Med-Surg、6, 3, p64, 2004
  15. 新岡俊治、黒澤博身、長津正芳、松村剛毅、小坂由道、小沼武司、日比野成俊. 心臓血管外科の再生治療の臨床：Cardiovascular Med-Surg、6, 3, p70, 2004
16. 保々恭子、新岡俊治 培養人工血管(*Tissue Engineering Graft*)  
分子新血管病学 2006; 7:5:761-68

### 3. 研究成果

#### 1. 研究計画と成果の概要

##### はじめに

ここでは本研究全体の理解を深めるため、まず研究計画および成果の概要を解説する。研究背景およびその歴史的推移、社会的な意義や位置づけについて説明し、この分野の現状と研究目的を明確にする。

##### 研究の背景

心臓系譜に關与する転写因子の一つとして **zinc finger motif** を持つ **GATA** ファミリーが知られている。脊椎動物において **GATA4**、**GATA5**、**GATA6** が心臓で発現している。その中の一つ、**Gata4** は **Csx/Nkx2.5** と同様にマウス胎生 7.5 日から心臓予定領域に発現し、成体期までその発現は続く。培養細胞での **GATA4** の発現を阻止すると心筋形成が阻害される。また、**Gata4** 欠損マウスは、心筋分化は正常であるが、左右の心臓原基が正中線で融合できず、**linear heart tube** が形成されずに胎生致死となる。これらの結果から **GATA4** は心筋細胞分化誘導だけでなく心筋細胞の遊走にも關与していることが示唆される。

**GATA4** は **zinc finger** を介して標的遺伝子のプロモーター領域にある結合配列 (**A/TGATAA/G**) に結合し転写活性を示す。**CSX/NKX2.5** との **protein-protein interaction** を介して心筋特異的遺伝子である心房性ナトリウム利尿ペプチド(**ANP**)やミオシン、アク

チン、イオンチャネル、コネキシンなど心筋特異的蛋白群の遺伝子の転写を強力に活性化するが、CSX/NKX2.5 遺伝子のプロモーター領域にも GATA 結合配列が存在し、CSX/NKX2.5 の転写にも関与していると考えられる。また、NF-AT3 と GATA4 との結合によりミオシン重鎖などの心筋収縮タンパクの発現が活性化する事も知られている。

最近米国の Srivastava 博士らのグループと研究分担者の松岡らのグループによって GATA4 遺伝子に変異があると心中隔欠損をはじめとする様々な心疾患が引き起こされることを報告した (Nature 424:443-447,2003)。このことはヒトにおいても GATA4 の機能低下が心筋細胞の分化および遊走に異常をきたす事を示唆している。

また、2003 年、米国において同様の方法 (Akt - gene を培養骨髄間葉細胞に導入) でラットにおいて心筋再生が可能であったとの報告が出された (Nature Medicine 9:1195-1201,2003)。

我々は既に、組織工学的手法を用いて自己の静脈壁細胞からなる Tissue Engineered Vascular Autograft の in vivo での作成に成功しており、2000 年 5 月以降、東京女子医科大学倫理委員会の承認下に患者家族の十分なインフォームドコンセントを得た後、25 名の患者にこの方法による血行再建を行っており、自己骨髄細胞を使用した細胞治療の有効性を確認している (N Engl J Med 344: 532-3, 2001)。

## 研究の目的

心筋細胞分化誘導および心筋細胞の遊走に関与している GATA4

遺伝子を導入した骨髄幹細胞を心筋内移植し、心筋症の治療法の確立を試みる。本年、米国において同様の方法（Akt-gene を培養骨髄間質細胞に導入）でラットにおいて心筋再生が可能であったとの報告が出された（Nature Medicine 9:1195-1201, 2003）。本研究の目的は、本再生医療法のヒトでの応用を考慮し、遺伝子導入の安全性、操作性、効果等を大動物にて証明することである。この証明は、分子生物学者と臨床医学者との共同研究によって初めて実現すると考える。

#### この研究の学術的特色，独創的な点及び予想される結果と意義

再生医療では体内で徐々に分解吸収される素材を細胞の足場として用い、細胞が細胞間質蛋白質を産生した段階で吸収消失するため、組織が完成した段階においては組織内に異物は残存しない。生分解性ポリマーのシートに幹細胞を播種する事により同細胞の生分解性ポリマーへの浸潤を誘導する。骨髄幹細胞は種々の細胞への分化能を有するために、血流を担う部位に移植された同細胞は心筋組織への誘導が可能と考える。

我々が細胞の起源として自己骨髄細胞を選択した理由は、1) 心筋組織は主として心筋細胞、内皮細胞・平滑筋細胞・線維芽細胞で構成されていること、2) 骨髄はこれらの前駆細胞すべてを含むこと、3) 採取する際に患者の負担を少なくできること、である。

本研究の意義としては、末期心不全治療法である心臓移植治療が現在ドナー不足で停滞している状況を打破できる新しい治療体系を確立できることである。



## 過去の関連研究費

種別 科学研究費 基盤研究（B）（2）  
研究代表者 今井康晴  
題名 自己細胞と吸収性ポリマーを用いた組織工学による  
心血管用補填材料の開発、応用  
期間 平成10年～11年  
研究経費 平成10年度分として7,700千円  
平成11年度分として1,900千円  
研究成果 新岡俊治、今井康晴、高梨吉則：組織工学による自  
己肺動脈作成：第51回日本胸部外科学会 優秀演題  
受賞、東京、平成10年10月3日

種別 科学研究費 基盤研究（C）  
研究代表者 渡辺 学  
題名 組織工学的手法を応用した、自己組織の再生と凍結  
保存同種組織の開発  
期間 平成12年～13年  
研究経費 平成12年度分として1,100千円  
平成13年度分として1,200千円  
研究成果 渡辺 学、新岡俊治、遠山悟史、日比野成俊  
今井康晴、山川光徳、筏 義人、森田真一郎：Tissue  
engineered vascular autograft の経時的遠隔期価：  
第53回日本胸部外科学会 優秀演題受賞、大分、  
平成12年10月27日

## その他の研究成果

2000年5月以降、東京女子医科大学倫理委員会の承認下に患者家族の十分なインフォームドコンセントを得た後、47名の患者に自己静脈細胞を使用したティッシュエンジニアリングによる肺および静脈血行再建を行っている。本方法による血管移植の第一例目は世界でも初の臨床応用例であった。2001年の *New England Journal of Medicine* の論文が掲載された。

また、骨髄細胞が再生血管の形成に関与することの証明にて *Circulation* に、そしてこれらの臨床応用に関して *Biomaterials* に論文が掲載された。

厚生労働省：循環器病研究委託費 14 公-5 平成 14 年度

肺高血圧の成因に関する罹患同胞対研究（中西班） 松岡瑠美子  
1,000,000 円

平成 14 年度は、肺高血圧症患者について、家族性肺高血圧症の疾患遺伝子 *BMPR2* および *BMPR1β* を含む疾患候補遺伝子の検索を行い、散発例 4 例、家族例 1 例に *BMPR2* 遺伝子異常を認め、欧米で報告された成人例だけでなく、小児例でも同様に *BMPR2* 遺伝子異常により肺高血圧症が引き起こされていることを明らかにした。

## 準備状況

最近米国の *Srivastava* 博士らのグループと研究分担者の松岡らのグループによって *GATA4* 遺伝子に変異があると心中隔欠損をはじめとする様々な心疾患が引き起こされることを報告し (*Nature*

424:443-447,2003)、ヒトにおいても GATA4 の機能低下が心筋細胞の分化および遊走に異常をきたす事を示した。カスケードの下流にある心筋特異的遺伝子である心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)や心筋型アクチン、ミオシン重鎖などの心筋収縮タンパクの転写を活性化する事も知られており、GATA-4 遺伝子を導入した骨髄幹細胞の心筋内移植による心筋症治療の可能性の検討を行っている。

## 研究計画

### <in vitro 実験>

1) GATA4 遺伝子導入の準備として、ヒトおよびブタの GATA4 を PCR 法、5'-RACE 法、3'-RACE 法 (pfuUltra High-Fidelity DNA polymerase, 5'/3' RACE Kit 等)を用いて TA ベクターにクローニングする。GATA4 の組み込まれた TA ベクターと哺乳動物細胞発現ベクター (pcDNA3.1) を制限酵素処理し、GATA4 発現ベクター (pcDNA3.1-GATA4) を作製する。この際、無標識 GATA4 を発現するベクターだけでなく、アッセイ用に GFP, Myc-tag, His-tag, FLAG-tag (pcDNA/His Vector, pcDNA/myc-His Vector 等) などの標識を付けたベクターも作製する。野生型発現ベクターを用いて site-direct mutagenesis で GATA4 に変異 (Nature にて報告された変異) を導入したベクターを作製し、pcDNA3.1 と共にネガティブコントロールとする。

2) 以下に骨髄細胞の採取方法を記載する。ブタ骨髄細胞を新鮮かつ清潔に採取し、二種類の幹細胞系列を作成する。第一は全骨髄細胞を培養の後、間葉系細胞より、CD117+, CD90+, CD34- の細胞を

単離培養する。二週間の培養後、血球系の幹細胞はセルソーティングにより除去し、さらに培養して被導入細胞とする。第二番目は骨髓より単核球成分を選択的に集約し遺伝子導入細胞として用いる。具体的には、滅菌濾過フィルターにて骨片や脂肪組織を除去した後に静かに密度勾配液上に重層する。遠心後、骨髓単核球を分離しさらに生理食塩水と混合し、2回遠心を繰り返し洗浄を行う。

3) 作製したベクターを大量抽出(QIAfilter Plasmid Mega Kit 等)し、上記抽出骨髓幹細胞にリポフェクトアミン 2000 等を用いてトランスフェクションし数日間培養する。GATA4 を遺伝子導入した培養細胞における細胞内局在を、GATA4 および tag (前述の Myc-tag 等) の抗体を用いて、免疫染色法により検討する。また、心筋型ミオシン重鎖や心筋型アクチン等心筋特異的なタンパクとの共染を行うことにより、心筋への分化を確認する。これらの実験を行う際、ネガティブコントロールとして pcDNA3.1 および上記作製 pcDNA3.1-GATA4 mutant を導入した骨髓幹細胞を用いる。

#### <in vivo 実験>

大動物モデルとして体重約 10kg のヨークシャーピッグ (ブタ) を使用する。基本的には骨髓細胞を採取した同一の個体に細胞移植実験を行う (自家移植)。生後、約 3 カ月でケタミン麻酔科に気管内挿管し、前上腸骨稜より骨髓穿刺にて骨髓液を採取し細胞の準備を行う。動物は生存させ一旦農場に返し心筋梗塞モデル作成実験まで待機とする。

まず、前段階実験として、健常心筋に遺伝子導入した骨髓細胞を

単体でまたは吸収性素材（スポンジ粒子）に播種した状態で移植し、術後 12 週間目に移植部位の組織評価をする。また、導入遺伝子の動物へ及ぼす影響を長期的に調査するため、初期の動物は約 2 年間生存させる（生物学的安全性テスト）（N=3）。細胞のキャリアー（担体）として吸収素材を使用するのは、細胞移植の効率を増すことが目的で、粒子の大きい担体内に細胞が留まり、流血中に流れ去る細胞数を減少させる。担体は、スポンジ粒子状のポリカプロラクトンとポリ乳酸からなる共重合体ポリマーを補強材である、これらに骨髄細胞を播種し、インキュベータ内にて保存液中に浸した状態で 1〜2 時間留置した後に使用する。

実験モデルとしては、左冠動脈前下行枝を閉塞した心筋梗塞モデル（アメロイドモデル）を予め作成し使用する。全身麻酔下にモデル動物の心機能評価を行った後、左第 6 肋間で開胸し、心筋梗塞巣およびその境界領域 10 ヶ所に各 108 個の細胞を移植する。動物を生存させ、移植後、6 週、12 週、24 週間目にそれぞれ心機能評価施行後に動物を犠牲死させ、移植部位の組織学的検討を行う。心機能検査としては、心超音波検査、心臓カテーテル検査、心室造影検査、tagging を利用した MRI 検査等を施行する。組織学的検査として、GATA4 導入骨髄幹細胞を心筋移植したブタの心臓における導入細胞の局在を GATA4 および tag（前述の Myc-tag 等）の抗体を用いて、免疫染色法により検討する。また、心筋型ミオシン重鎖や心筋型アクチン等心筋特異的なタンパクとの共染を行うことにより、心筋への分化を確認する。これらの実験を行う際、ネガティブコントロールとして pcDNA3.1 および上記作製 pcDNA3.1-GATA4 mutant を導

入した骨髄幹細胞を用いる。移植細胞の追跡は上述したように導入遺伝子の追跡が可能であり、生存率、分化率等の検討も可能である。上記実験により、心筋再生療法における至適幹細胞種、細胞移植の際の至適細胞数、至適投与方法（単独投与か担体を用いるか？）等を明らかにする所存である。