

り有意に増加していることを明らかにした。さらに、免疫寛容動物から得られたリンパ球の養子移植実験を行い、control群に対して、免疫寛容ラットから分離したリンパ球を養子移植した群の心移植片の生着期間が顕著な延長が見られた。

表1 ラット心移植における抗 ICOS 抗体と CTLA4Ig アデノウイルスベクターとの併用による拒絶反応阻止効果

実験群	治療	n	生存日数	中央値	有意差
1	無 (同系対照)	4	>300x4	>300	
2	無 (同種対照)	10	5x3,6x7	6	NS
3	AdLacZ	7	6x4,7x3	6	NS
4	AdCTLA4Ig	11	40,42,58,62,64,68,65,>100x2, >140x2	64	p<0.001
5	Anti-ICOSAb	7	5x2, 6x5	6	NS
6	Anti-ICOSAb +AdCTLA4Ig	8	>300x8	>300	p<0.001

D. 考案

近年の免疫抑制技術の進歩は著しく、移植初期の成績は格段に改良された。しかし薬剤の副作用は依然として問題となり、長期の予後となるとまだ完全に満足できるものではない。新しい免疫抑制手技、とりわけカルシニューリンフリーの免疫抑制を如何に行なっていくかが、現在の大きな課題となっている。

この目的のために本研究では、遺伝子導入療法と共刺激分子の抑制に着目した検討を進めている。とりわけ、B7-CD28あるいはCD40-CD40Lを介するシグナル伝達は、リンパ球の反応性の調節に重要なものであり、その抑制は拒絶反応を阻止することが明らかにされている。最近新たな共刺激分子として活性化したリンパ球が発現する ICOS が注目されている。これは CD28/CTLA4 ファミリーの第3のメンバ

とされ、細胞内へ活性化のシグナルを伝える。

われわれはこれまでに、T細胞の活性化がB7/CD28の伝達経路に依存していることを明らかにしている。すなわち、アデノウイルスベクターを用いてCTLA4Ig遺伝子をラットレシピエントの肝臓内に導入すると、その蛋白が血中に遊離されることにより、移植心が生着することを認めている。

本研究では昨年度の成果を踏まえ、ICOSに対する抗体およびCTLA4Igアデノウイルスベクターを用い、ICOS/B7h経路、CD28-CTLA4/B7経路を選択的に阻害することにより、補助シグナル経路の臓器特性を解析し、移植臓器に対する効果的な寛容導入法を確立することを目的とする。

したがって、この抗体に他の共刺激分子を抑制する蛋白CTLA4Igを併用することにより永久生着を目指しことができると予

想とおりの成果が得られた。

E. 結論

これらの研究結果により抗 ICOS 抗体による T 細胞の活性化を ICOS/B7h 経路を阻害するだけでは、免疫反応を抑制効果があったもので、寛容誘導することができなかった。しかし、CTLA4Ig アデノウイルスベクターの併用で CD28-CTLA4/B7 経路を通して抗原提示細胞の活性を抑制することで、安定な免疫寛容状態の誘導および維持ができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) X-K. Li, M. Kosuga, K. Tokieda, A. Kanaji, Y. Fukuhara, M. Hashimoto, K. Okabe, H. Yaginuma, M. Yamada, S. Suzuki, T. Okuyama. Prolongation of transgene by co-expression of cytokine response modifier A in rodent liver after adenoviral gene transfer. *Molecular Therapy* 5: 262-268, 2002.
- (2) L Guo, X-K. Li, N. Funeshima, M. Fujino, Y. Nagata, H. Kimura, H. Amemiya, S. Enosawa, T. Tsuji, Y. Harihara, M. Makuuchi, S. Suzuki. Prolonged survival in rat liver transplantation with mouse monoclonal antibody against an inducible co-stimulator (ICOS). *Transplantation* 73(7): 1027-1032, 2002.
- (3) X-K. Li, M. Fujino, L. Guo, H. Amemiya, T. Amano, S. Suzuki. Activation of Caspases and Mitochondria in FTY720-Mediated Apoptosis in Human T Cell Line Jurkat. *International Immunopharmacology* 1(2001): 2011-2021, 2001.
- (4) X-K. Li, M. Fujino, A. Sugioka, M. Morita, T. Okuyama, L. Guo, N. Funeshima, H. Kimura, S. Enosawa, H. Amemiya, and S. Suzuki. Fulminant Hepatitis by Fas-Ligand Expression in MRL-lpr/lpr Mice Grafted with Fas-Positive Livers and Wild-Type Mice with Fas-Mutant Livers. *Transplantation* 71(4): 503-508, 2001.
- (5) X-K. Li, A. Tamura, M. Fujino, L. Guo, T. Kakefuda, N. Funeshima, S. Enosawa, M. Amari, S. Naoe, H. Amemiya, and S. Suzuki. Induction of lymphocyte apoptosis in rat liver allograft with ongoing rejection by FTY720. *Clinical and Experimental Immunology* 123(2): 331-339, 2001.
- (6) Y. Yano, M. Hara, T. Miyahara, K. Shibata, T. Onitsuka, Y. Nawa, X-K. Li, S. Suzuki, H. Amemiya, H. Kimura. Microchimeric cells from the peripheral blood associated with cardiac grafts are bone marrow derived, long-lived and maintain acquired tolerance to minor histocompatibility antigen H-Y. *Transplantation* 71(10): 1456-1462, 2001.
- (7) M. Fujino, X-K. Li, T. Suda, M. Hashimoto, K. Okabe, H. Yaginuma, K. Mikoshiba, L. Guo, T. Okuyama, S. Enosawa, H. Amemiya, T. Amano and S. Suzuki. In vitro prevention of cell-mediated xenograft rejection via the Fas/FasL-pathway in

- CrmA-transduced porcine kidney cells. *Xenotransplantation*. 8(2): 115-124, 2001
- (8)M. Ohba, X-K. Li, Y. Kita, S. Enosawa, N. Funeshima, H. Nagai, HQ. Zhang, T. Okuyama, S. Ogoshi, S. Sasaguri, H. Amemiya, S. Suzuki. The combined therapy of CTLA4Ig-gene transfection with FTY720: FTY720 may enhance the effect of gene therapy. *World J Surg* 25(4):391-398, 2001
- (9)M. Kosuga, K. Sasaki, X-K. Li, H. Ohkawa, I. Ogino, O. Okuda, H. Arai, N. Sakuragawa, Y. Kamata, N. Azuma, S. Suzuki, M. Yamada & T. Okuyama. Engraftment of genetically-engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol. Therapy* 3(2):139-148, 2001.
- (10)K. Adachi, X.-K. Li, H. Kimura, H. Amemiya, S. Suzuki. HIV-1 Nef protein Prolonged Recipient Survival in rat liver Allografting. *Transplant Proc* 33: 284, 2001
2. 学会発表
- (1)Seiichi Suzuki. (Invited Speaker) FTY720: Action mechanisms and immunosuppressive activity in organ transplantation. The 9th Keio University Interbational Symposium for Life Science and Medicine. March 23-24, 2001 (Keio University, Tokyo)
- (2)XK. Li, M. Fujino, N. Funeshima, C. Shimizu, T. Nakayama, S. Suzuki. Prolonged survival of skin allografts in T cell specific H-ras-dominant-negative transgenic mice. The 11th International Congress of Immunology 22-27 July 2001 (Stockholm)
- (3)Zhang HQ, Lu H, Enosawa S, Amemiya H, Takahara S, Sakamoto K, Suzuki S. Identification of Novel Genes Associated with Immune Suppression in Renal Transplant Patients. The 6th Congress of the International Society for Organ Sharing, 25-27 July, 2001 (Nagoya)
- (4)H Lu,, HQ Zhang, S Enosawa, S Suzuki. Identification of the alterations in gene expression in rat recipients with long-term surviving cardiac grafts The 6th Congress of the International Society for Organ Sharing, 25-27 July, 2001 (Nagoya)
- (5)Huiqi Zhang, Hua Lu, Shin Enosawa, Shiro Takahara, Kaoru Sakamoto, Toshiharu Nakajima, Hirohisa Saito, Seiichi Suzuki.
- (6)Microarray Analysis of Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Long-Sueviving Renal Recipients. The 2nd International Congress on Immunosuppression, 6-8 December, 2001(San Diego)
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他

『心筋虚血再灌流障害における HGF の心筋保護効果に関する研究』

分担研究者 澤 芳樹 大阪大学医学系研究科 臓器制御外科学

研究要旨：ラット心に対し左冠動脈前下行枝短時間結紮による虚血再灌流モデルを作成した。虚血再灌流後の血中 HGF 値、心筋中 c-Met レセプター数は急激に増加した。HGF 抗体投与により心筋アポトーシスは亢進し、梗塞巣は増大し、死亡率は増加した。リコンビナント HGF 投与により心筋アポトーシスは抑制され、梗塞巣は縮小し、心機能は改善した。HGF 投与により虚血再灌流後 Bcl-xL の発現は増強した。これにより、心筋細胞のアポトーシスは虚血再灌流における心筋障害の主要因と考えられ、これを抑制する HGF の投与は、臨床の場における心筋保護効果の増強、心保存時間の延長等に対する有用な方法になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

心筋症などの重症心不全に対する治療としての心臓移植は、欧米における外科的治療として確立されているのに加え、本邦においても 1999 年より再開された。しかしドナー不足は深刻な問題であり、補助人工心臓をブリッジとして利用してもその多くは移植を待たずして死亡している。現状の心筋保護法では心臓阻血時間の安全限界は 4 時間前後であり、虚血耐性獲得による保存心の移植後心機能向上は、その不足するドナープールを拡大するために是非とも達成されるべき課題である。

我々はこれまでに、肝細胞増殖因子 (HGF) のもつ心筋保護作用に注目し、HGF 遺伝子を HVJ-リボソーム法によりラット心筋内に導入し、虚血再灌流後の心機能改善、心筋逸脱酵素減少など虚血再灌流障害の抑制効果を報告してきた。

本研究では、この HGF の心筋虚血・再灌流障害における内因性 HGF の役割とその外的補充による心筋保護効果につき検討することを目的とした。

B. 研究方法

ラット心に対し 20 分の左冠動脈前下行枝短時

間結紮による虚血再灌流モデルを作成した。再灌流後の心機能を測定し、血中・心筋内 HGF 値の測定、心筋細胞中の c-Met レセプター数の測定、梗塞巣の大きさの測定、生存率、虚血領域の TUNEL 染色によるアポトーシスの評価を行なった。更に、リコンビナント HGF 投与および HGF 抗体投与による各指標の変化と心筋中 Bcl-xL の発現を検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物は本学附属動物実験施設にてガイドラインにのっとり飼育・管理し、実験にあたっては麻酔処置により苦痛を最小限にとどめるよう配慮した。また、犠牲死は麻酔薬の大量投与により得た。

C. 研究成果

冠動脈短時間結紮による虚血ラット心筋において血中・心筋内 HGF レベルおよび心筋内 c-Met は約 10 倍に上昇した。HGF 中和抗体投与により心筋 apoptosis は著しく増加し、梗塞領域は拡大し ($13.3 \pm 6.4\%$ から $37.5 \pm 2.0\%$, $p < 0.05$)、生存率は 50% まで低下した。Recombinant HGF 投与にて心筋 apoptosis は抑制され、梗塞領域は著明に縮小し ($16.0 \pm 2.5\%$ から $5.7 \pm 2.3\%$, $p < 0.05$)、

心機能の改善を認めた。また、HGF 投与により障害心筋中における Bcl - xL の発現亢進を認めた。

D. 考察

HGF は心筋に対して直接作用し、虚血再灌流後の心筋保護作用を有することが明らかとなった。その主要因として Bcl - xL を介するアポトーシスの抑制が示唆された。今後はこの機序を心保存へ応用し、心保存時間の延長、移植後心機能の改善が可能となるかを検討する。

E. 結論

HGF は、虚血再灌流時の保護因子の一つとして作用し、外因性 HGF 投与は心筋保護において有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ A potential cardioprotective role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction in rats. H Ueda, Y Sawa, H Matsuda et al. Cardiovascular Research; 51:41-50.2001.
- ・ A novel strategy of Decoy Transfection against nuclear factor-kB in myocardial preservation. T Sakaguchi, Y Sawa, H Matsuda, et al. Annals of Thoracic Surgery; 71: 624-630. 2001.
- ・ Ecto-5'-nucleotidase plays a role in the cardioprotective effects of heat shock protein 72 in ischemia-reperfusion injury in rat hearts. Cardiovascular Research; 47:74-80.2000.
- ・ Development of new techniques using genetic and tissue engineering for the treatment of severe heart failure. Y Sawa, H Matsuda, et al. Transplantation Proceedings; 32: 242-244. 2000.
- ・ Myocardial protection from ischemia /

reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. T Nakamura, Y Sawa, H Matsuda, et al. The Journal of Clinical Investigation; 106: 1511-1519.2000.

2. 学会発表

- ・ 虚血再灌流障害に対する NF κ B decoy の有用性 - 虚血心および保存心への応用 - . 船津俊宏、澤 芳樹、松田 暉他. 第 101 回日本外科学会総会 2001.4.11 - 13
- ・ 虚血再灌流障害における HGF の心筋保護因子としての有用性. 船津俊宏、澤 芳樹、松田 暉他. 第 102 回日本外科学会総会 2002.4.11 - 13

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

申請中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

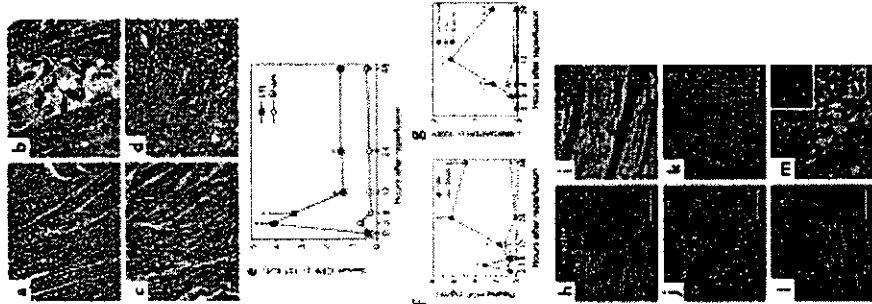


Figure 1. Changes in pathophysiology and HGF/c-Met expression in rats with ischemia/reperfusion injury. (a?d) Histopathology of the heart. At 6 hours after treatment, infiltration with inflammatory cells was seen in the LVFW (a, b). At 24 hours after ischemia/reperfusion, a more diffuse infiltration of inflammatory cells was evident (c), and the infarct lesion had expanded widely at 48 hours (d) Bars: a, c, and d, 200 μ m; b, 50 μ m. (e) Change in CPK activity in sera. I/R, ischemia/reperfusion injury. AP < 0.001, BP < 0.01, CP < 0.05. (f) Plasma HGF levels determined by ELISA. AP < 0.001, BP < 0.01, CP < 0.05 compared with IVS; DP < 0.001, EP < 0.01 compared with sham LV. (h?m) Immunohistochemical findings for c-Met. (h?k) Double immunohistochemistry for α -sarcomeric actin and c-Met in the heart resected 48 hours after reperfusion. Photographs of the LVFW (h, i) and IVS (j, k) of a section are shown. Red (h, j) and green (i, k) fluorescence, respectively, indicate α -sarcomeric actin and c-Met labeling. (l and m) Immunostaining for c-Met in the sham-operated myocardium (l) and the border region between infarcted and noninfarcted area (m). To detect background staining, anti-c-Met antibody was preabsorbed with antigenic synthetic peptide in a serial section (inset in m). Bars: 100 μ m.

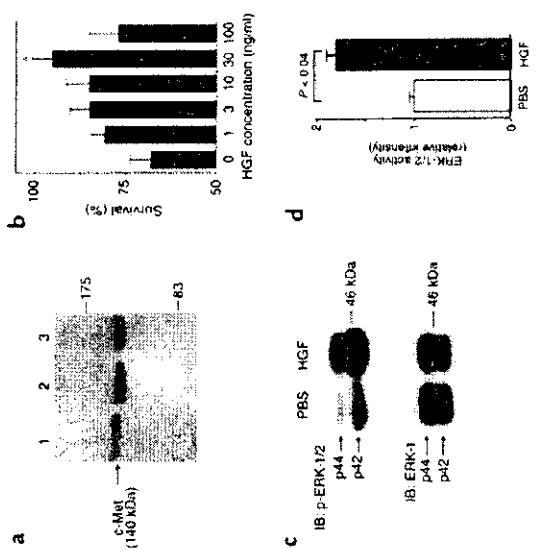


Figure 2. c-Met expression and cardioprotection by HGF in vitro. (a) c-Met protein expression determined by Western blot. Cardiomyocytes from neonatal rats were cultured for 3 days (lane 1), and further cultured in serum-free condition for 24 hours without (lane 2) or with (lane 3) hydrogen peroxide (H₂O₂). (b) Survival of cardiomyocytes in culture. The cells were pretreated with HGF for 1 hour, then treated with 50 μ M H₂O₂ for 1 hour and further cultured for 6 hours. AP < 0.05 vs. 0 ng/ml of HGF. (c) Activation of ERK-1/2 (p44/p42 mitogen-activated protein kinases) in cultured cardiomyocytes by HGF, as determined by immunoblotting with anti-phospho-ERK-1/2 antibody (top). Immunoblotting with anti-ERK-1 antibody (bottom) indicates that the total amount of ERK-1/2 protein is similar in two lanes (bottom). (d) Quantification of ERK-1/2 activity. Intensity of the bands was analyzed by densitometry. Each value represents the mean \pm SEM of quadruplicate experiments.

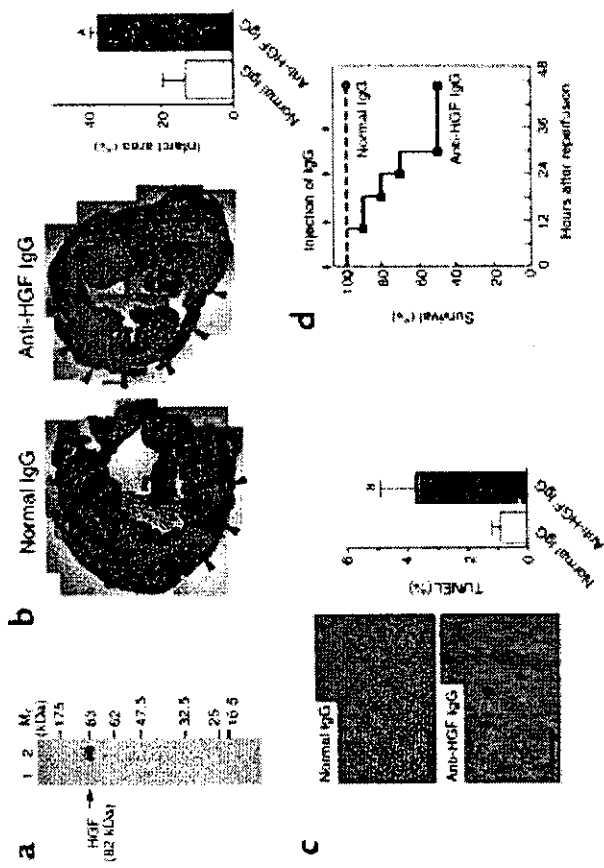


Figure 3. Adverse effects of neutralization of endogenous HGF on the ischemia/reperfusion injury model. (a) Specificity of the neutralizing antibody to HGF. Plasma from a rat with ischemia/reperfusion injury was immunoprecipitated with normal IgG (lane 1) or anti?rat HGF IgG (lane 2), and immunoreactive proteins were detected by Western blot, using biotinylated anti?rat HGF IgG. (b) Immunohistochemical staining of infarcted hearts with -sarcomeric actin to depict the infarct area and its quantification. Anti?rat HGF IgG (n = 10) or normal IgG (n = 10) was injected 20 minutes before coronary occlusion, and every 12 hours after reperfusion. Forty-eight hours after operation, rats were killed and histological and biochemical analyses were made. Arrowheads indicate the -sarcomeric actin?negative infarct area (original magnification, x40). AP < 0.05. (c) Change in TUNEL-positive cardiomyocytes by neutralization of endogenous HGF 48 hours after reperfusion. Bars: 100 μ m. BP < 0.01. (d) Survival of rats injected with anti-HGF IgG (n = 10) or normal IgG (n = 10) after reperfusion. There was a significant difference in survival between the two groups (P < 0.01).

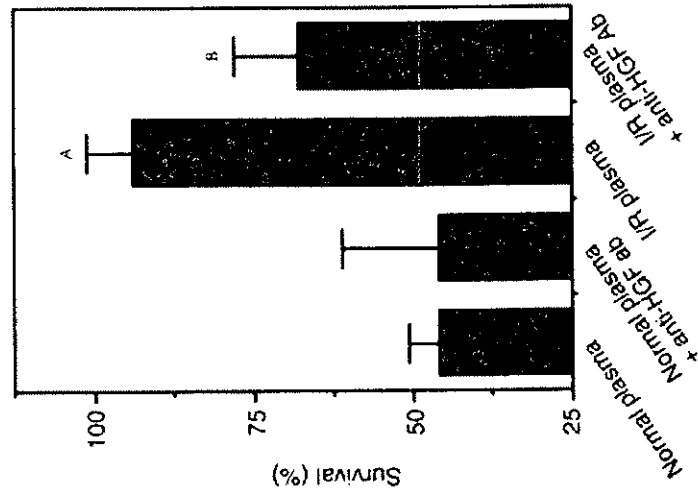


Figure 4. Survival of cultured cardiomyocytes in the presence of plasma from a normal rat (Normal plasma) or plasma from a rat with ischemia/reperfusion injury (I/R plasma). Plasma was nontreated or treated with anti?rat HGF antibody for 2 hours, and the cells were cultured in the absence or presence of the plasma for 2 hours. Cells were treated with H2O2 for 1 hour and further cultured for 6 hours. AP < 0.01 vs. normal plasma; BP < 0.05 vs. I/R plasma.

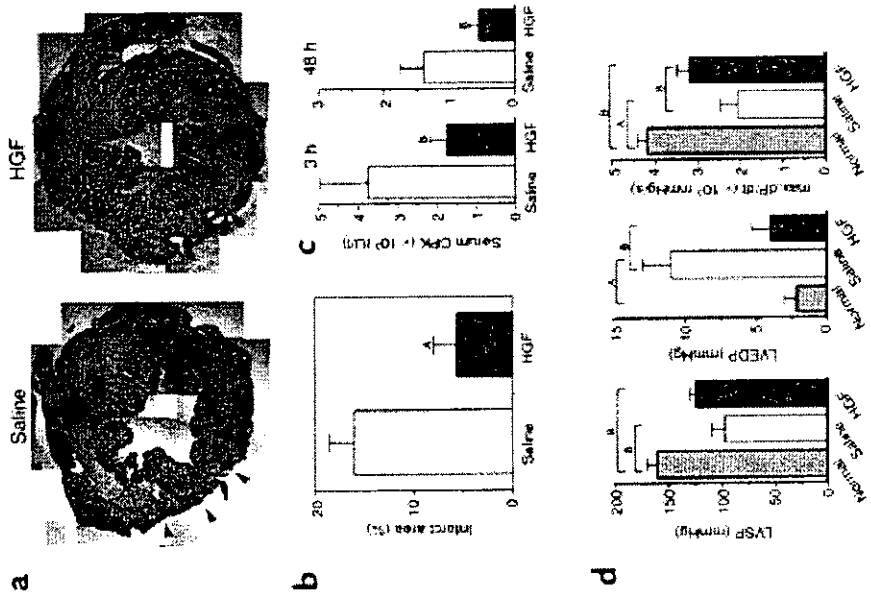


Figure 5. Amelioration of ischemia / reperfusion injury by HGF. Recombinant human HGF (n = 8) or saline (n = 8) was injected immediately after and every 12 hours after reperfusion. After 48 hours, rats were killed. (a) - Sarcomeric actin staining done to depict the infarct area (original magnification, x40). Arrowheads indicate the - actin?negative infarct area. (b and c) Changes in infarct area (b) and serum CPK activity (c). AP < 0.01, BP < 0.05. (d) Change in cardiac functions after ischemia/reperfusion injury. AP < 0.01, BP < 0.05. LVSP, left ventricular systolic pressure; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; max dP/dt, maximal rate of left ventricular pressure rise.

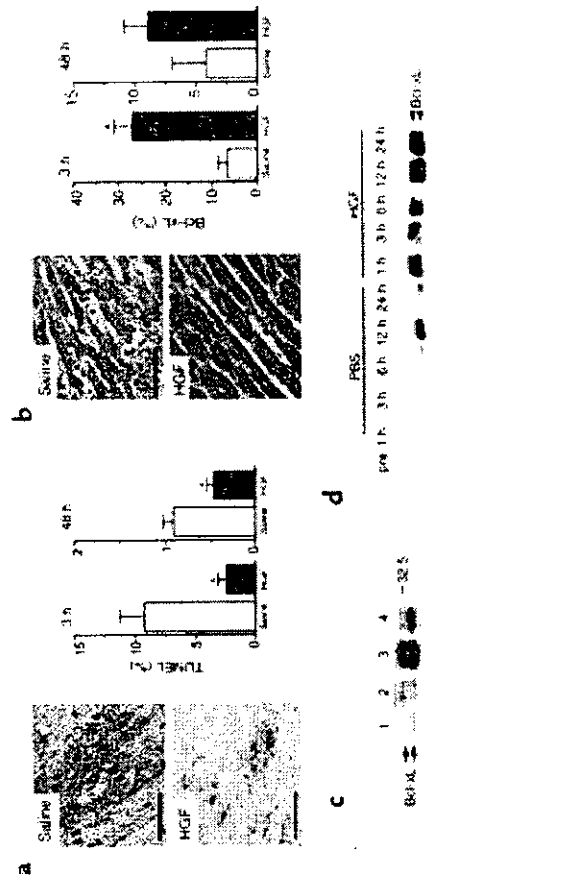


Figure 6. Antiapoptotic effect of HGF on the ischemia/reperfusion injury model. Hearts were excised 3 hours and 48 hours after reperfusion. (a) Distribution of TUNEL-positive cardiomyocytes 3 hours after reperfusion (bars: 100 μ m) and changes in TUNEL-positive cells by HGF-treatment. AP < 0.05. (b) Immunohistochemical staining for Bcl-xL in the rat heart and semiquantitative analysis (bars: 100 μ m). Bar graphs represent percent of Bcl-xL?positive myocytes observed at least in ten fields per section. AP < 0.05. (c) Change in Bcl-xL expression in myocardial extracts detected by Western blot. Lane 1, sham-operated LV; lane 2, ischemia/reperfused LV with saline treatment; lane 3, ischemia/reperfused LV with HGF-treatment; lane 4, normal rat spleen for positive control. (d) Bcl-xL expression in cardiomyocytes in culture. Cardiomyocytes were cultured in serum-free medium in the presence or absence of HGF for the indicated period. Expression of Bcl-xL was detected by Western blot.

分担研究報告書

可溶性補助シグナル分子による免疫寛容の導入法の確立に関する研究

分担研究者 上出 利光 北海道大学遺伝子病制御研究所 教授

研究要旨 免疫学的寛容を導入する為に、5種類の可溶性補助シグナル分子を作成した。すなわちCTLA4Ig, CD40Ig, ICOSIg, HVEMIg, 及び4I-BBIgである。遺伝子治療用に上記遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作成した。1)ラット腎移植モデルでは、CD40Ig蛋白と樹状細胞移入併用により免疫抑制剤を使用することなく移植臓器の長期生着が可能となった。2)ラット肝移植モデルでは、CD40Igアデノウイルスベクターの単回投与により全列に100日以上長期生着をもたらし、免疫学的寛容状態の導入に成功した。3)慢性拒絶モデルとしてマウス気管支移植を行い、CTLA4Ig蛋白とFTY720併用により、気管支内腔閉塞の阻害と、これまで難しいとされてきた呼吸上皮の保存に成功した。

A. 研究目的

臓器移植における最大の問題は拒絶反応をいかにして制御するかである。これまで非特異的免疫抑制剤が主体であり、易感染性や腫瘍発生の副作用があり、新たな治療戦略の開発が期待されている。我々は可溶性補助シグナル分子を用いて、異なるT細胞活性化補助シグナル経路を選択的に阻害することにより、免疫学的寛容を誘導する方法を確立することを研究の目的とする。

B. 研究方法

- 1)ラット及びマウスをもちいて、肝臓移植、腎臓移植、肢移植及び気管支移植モデル系を確立する。
- 2)CTLA4IgG, CD40IgG, ICOSIgG, HVEMIgG及び4I-BBIgG遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作成する。
- 3)上記アデノウイルスベクターを用いてCOS細胞に遺伝子導入し、その培養上清よりCTLA4IgG, CD40IgG, ICOSIgG, HVEMIgG, 及び4I-BBIgGを精製する。
- 4)脾臓より樹状細胞 (DC)を分離、培養する。
- 5)上記移植モデルを用いて、各種アデノウイルスベクター、精製した可溶性補助シグナル分子、及びDCを単独あるいは併用し、移植臓器の生着を検討する。

(倫理面への配慮)

動物を用いた研究は、遺伝子病制御研究所の動物実験委員会に実験計画書を提出し、実験動物に対する倫理や福祉に、十分配慮しているか否か審議を受け許可された。

C. 研究結果

- 1)脾臓から精製したラットDC細胞はアロT細胞を活性する際、CD28/B7経路よりもCD40/CD40L経路を用いていることを明らかにした。次いで、精製したDC細胞とCD40Igをレシピエントラットに併用投与することにより移植腎の長期生着が可能なプロトコルを確立した。
- 2)肺移植時の慢性拒絶に認められる病理形態像を呈するマウス気管支移植モデルでは、CTLA4IgG蛋白投与により腺維筋肉細胞増殖による内腔閉塞は抑制することができた。しかし、内腔の呼吸上皮は失われており、大きな問題であった。作用点の異なるFTY720を併用することにより、呼吸上皮の脱落を予防することが可能となった。
- 3)CD40IgG, を含有するアデノウイルスベクターを単回投与することにより、ラット肝臓移植モデルにおいて免疫寛容の導入に成功した。

D. 考察

移植臓器によって拒絶反応に係わる補助シグナル分子が異なる可能性が示唆された。急性拒絶反応に比べてコントロールが不可能であった慢性拒絶反応も可溶性補助シグナル分子と新規免疫抑制剤を併用することで、抑制可能であることが示唆された。

E. 結論

1.可溶性補助シグナル分子を用いることにより、急性拒絶のみならず、慢性拒絶反応をコントロールできる可能性を示した。精製蛋白として複数回投与する方法、あるいは組み換えウイルスベクターとして単回投与する遺伝子治療としての方法が可能である。小動物での有効性が確認されたことより、今後大動物を用いた検討が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Feasibility of Immunosuppression in Composite Tissue Allografts by Systemic Administration of CTLA4Ig. Transplantation. In press. (Iwasaki N, Gohda T, Yoshioka C, Murakami M, Inobe M, Minami A, Uede T)
- 2) Induction of donor-specific tolerance by adenovirus mediated CD40Ig gene therapy in rat liver transplantation. Transplantation. In press. (Nomura M, Yamashita K, Murakami M, Takehara M, Echizenya H, Sunahara M, Kitagawa N, Fujita M, Furukawa H, Uede T, Todo S)
- 3) Combination treatment with FTY720 and CTLA4IgG preserves the respiratory epithelium and prevents obliterative disease in a murine airway model. J Heart Lung Transplantation. In press. (Konishi K, Inobe M, Yamada A, Murakami M, Todo S, Uede T)

2. 学会発表

- 1) Splenic dendritic cells with soluble forms of CD40 induce a long-term acceptance of rat renal allograft. Experimental Biology 2001, Orlando, March 31-April 4, 2001. (Usuki T, Inobe M, Uede T)
- 2) Feasibility of immunosuppression in limb allografts by blocking the CD28/B7 T cell costimulatory pathway. American Orthopaedic Research Society 47th Annual Meeting. San Francisco, Feb 25-28, 2001. (Iwasaki N, Gohda T, Yoshioka C, Minami A, Uede T)
- 3) The feasibility of gene therapy by local administration for immunosuppression in allogeneic nerve graft. American Orthopaedic Research Society. 47th Annual Meeting. San Francisco, Feb 25-28, 2001. (Yoshioka C, Iwasaki N, Gohda T, A Minami, T Uede)
- 4) 移植におけるCD40Ig遺伝子治療によるdonor特異的免疫寛容誘導のメカニズム 第37回日本移植学会、東京、12月15日～16日2001。(増永太郎、山下健一郎、崎浜秀康、橋本卓、華南、藤堂省、上出利光)

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

分担研究報告書

遺伝子導入による移植臓器の機能保持に関する研究

分担研究者 金田安史 大阪大学医学系研究科 分子治療学教授

研究要旨

低侵襲で高効率の遺伝子導入法として HVJ エンベロープベクターを開発した。これは各種培養細胞、生体組織、移植臓器に遺伝子や合成核酸の効率のよい導入法であることが明らかになった。また連続投与も可能であった。Bcl-2 遺伝子、HGF 遺伝子はそれぞれ移植腎の機能保持、骨髄移植時の GVHD の抑制を促進した。また心停止下での脳虚血に NFκB decoy 核酸の有効性等が明らかになった。

A. 研究目的

移植臓器への遺伝子導入により、移植前後の移植臓器の機能保持、機能改善を行う。そのための遺伝子導入法を開発し、さらに移植臓器の機能保持が可能な導入遺伝子を探索する。

B. 研究方法

1) 非侵襲で高効率の遺伝子導入ベクターとしてHVJ-liposomeを開発・改良してきたが、最近リポソームを用いず不活性化HVJに遺伝子を封入し細胞内導入可能なHVJエンベロープベクターを開発した。これを用いてラットやマウスの移植臓器にどのような方法で注入するのが最も高い遺伝子導入が可能かどうかを検討する。

2) HVJエンベロープベクターによる連続投与の可能性、複数の遺伝子の共導入の可能性について検討する。

3) 慢性拒絶の抑制を合成核酸で治療する場合には、連続投与可能なHVJ-

liposomeやHVJエンベロープベクターをベースにして移植後の臓器に対してターゲティングできるように、細胞表面抗原に対する抗体ヤリガンドのキメラ蛋白を表面に有する標的融合ベクターを開発する。

4) 慢性拒絶の抑制を遺伝子で行う場合、長期に発現させ、さらに必要に応じて遺伝子発現を誘発できる発現系が必要である。Ebstein-Barr virusのoriPとEBNA-1を用いて、エピソームに遺伝子を維持し必要に応じて発現を誘発する系を開発する。

5) 遺伝子としてはHSP70, HGF, Mn-SOD, Bcl-2を、合成核酸としてはE2F及びNFκBのおとり型核酸用い、どのような組み合わせが移植臓器の機能保持、拒絶反応の抑制などそれぞれの目的にかなうかを検討し、最適な処方箋を決定する。

(倫理面への配慮)

実験については大阪大学医学系研究科で定める動物実験のガイドラインを遵守する。基本的には極力苦痛の除去、軽減をはかり、臓器摘出時は深麻酔下で行い、実験終了後には深麻酔により安楽死させる。臓器移植をうけた動物については自力で飲水・摂食が可能になるまで保温、体液の補充等を行う。

C. 研究結果

1) HVJエンベロープベクターによる遺伝子導入効率を様々な細胞において検討し、硫酸プロタミン濃度、HVJエンベロープ量、インキュベーション時間などの最適化を行った。特に従来導入効率の低かった初代培養細胞や浮遊系のヒトリンパ球系細胞への効率のよい導入も可能になった。さらに細胞に遠心かけることにより導入効率を3-10倍増強できた。またこのベクターの特徴である生体組織への導入の可能性についても検討し、マウス、ラット、ウサギなどの脳、肝臓、眼、子宮、気管、癌組織等への導入が可能になったが、この場合は直接注入によった。ラットの肺を取り出し、肺動脈より蛍光オリゴを封入したHVJエンベロープベクターを注入し、2時間後に観察したが、肺動脈の血管壁ばかりでなく、ほぼすべての気管・気管支の上皮に蛍光オリゴの導入が認められた。In vivoにおいても肺動脈からHVJエンベロープを用いてLacZ遺伝子導入を行うと気管・気管支上皮に遺伝子発現が認められた。ラットの移植心に

GFP遺伝子を封入したHVJエンベロープを冠動脈から注入すると、冠動脈の内壁ばかりでなく心筋細胞にも遺伝子発現が認められた。

2) 連続投与の可能性を検討するためpcDNA3封入のHVJエンベロープベクター或いは生理食塩水のみを2週間隔でマウス骨格筋に2回投与し、その2週後にルシフェラーゼ遺伝子を封入したHVJエンベロープベクターを注入した。ルシフェラーゼ活性を測定したところ、HVJエンベロープベクターの連続投与による遺伝子発現の阻害は認められなかった。HVJに対する抗体は産生されていた。またGFP遺伝子とLacZ遺伝子を同時封入したHVJエンベロープベクターを培養細胞(BHK-21)にかけたところ、全く同じ細胞にGFPの発現とLacZの発現が認められた。

3) HVJエンベロープベクターはマウスの尾静脈より注入すると脾臓に遺伝子導入できることがわかった。他の臓器にも標的化できるため、一部の融合蛋白にHGFのアルファ鎖の断片(受容体結合部位)を結合させたキメラ蛋白を作成中である。これによりHGF受容体のc-metを介して遺伝子導入が可能になると予想される。

4) EBV(Epstein-Barr virus)のoriPをもつ導入遺伝子を作成し、これをEBNA-1強発現ベクターとを改良型HVJ-liposomeで共導入する系を開発した。導入遺伝子発現はoriPの存在とEBNA-1の量に依存して約30倍増強された。マウス肝臓での導入遺伝子の再

活性化にも成功した。

5) NFκB decoy 核酸を HVJ-liposome で心停止したマウスの頸動脈に導入すると、マウス脳内に取り込まれ、虚血による脳障害が抑制された。ラット移植腎に HVJ-liposome で HSP70 遺伝子もしくは bcl-2 遺伝子を導入し 48 時間後に移植すると、移植後の腎組織に於いて尿細管傷害、腎梗塞巣を評価したところ、bcl-2 遺伝子導入によって優位に低下した。HGF 遺伝子を HVJ-liposome によってマウス骨格筋に連続投与しておくこと、骨髄移植の際の GVHD の抑制に成功した。さらに肝臓や腸における TNF-α や血中の IL-12 レベルは結い医に低下した。さらにドナー細胞による髄外造血がおり、生存率の改善をみた (70 日以内に全例死亡するモデルに於いて 75% の生存率を示した)。

D. 考察

1) HVJ エンベロープベクターの低侵襲性はウイルスゲノムが完全に破壊されており、ウイルス蛋白が新生されないことによると考えられ、移植臓器への遺伝子導入には適している。標的導入、遺伝子発現の長期化が今後の課題であるが、現在の研究の結果から判断すれば、両者とも可能であると考えられ、移植後の臓器の機能保持に大きな貢献をするであろう。

2) bcl-2, NF-κB decoy 核酸はそれぞれアポトーシスの抑制及び抗炎症作用により虚血耐性機能を移植臓器、移植された個体に与えると思われる。HGF

については GVHD の抑制は抗アポトーシス作用と IL-12 の抑制によるものと判断されるが、初めての報告である。今後移植後の拒絶制御にも利用されると考えられる。

E. 結論

HVJ エンベロープベクターは遺伝子導入効率、簡便性において HVJ-liposome をはじめとする従来の非ウイルスベクター系を凌駕するものであり、移植医療にも大きな貢献をするであろう。臨床応用が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuboniwa, N., Morishita, R., Hirano, T., Fujimoto, J., Furukawa, S., Kikumori, M., Okuyama, A., and Kaneda, Y.: Safety evaluation of HVJ-AVE liposomes in nonhuman primates. *Hum. Gene Therapy*, 12, 469-487, 2001.
2. Nakamura, N., Hart, D.A., Frank, C.B., Marchuk, L.L., Shrive, N. G., Ota, N., Taira, T., Yoshikawa, H., and Kaneda, Y.: Efficient transfer of intact oligonucleotides into the nucleus of ligament scar fibroblasts by HVJ-cationic liposomes is correlated With effective antisense gene inhibition. *J. Biochem.* 129, 755-759, 2001.
3. Otomo, T., Yamamoto, S., Morishita, R. and Kaneda, Y.: EBV replicon vector system enhances transgene expression in vivo : applications to gene therapy for cancer. *J. Gene Med.* 3, 345-352, 2001.

4. Yamamoto, K., Morishita, R., Hayashi, S., Matsushita, H., Nakagami, H., Moriguchi, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y., and Ogihara, T.: Contribution of bcl-2, but not bcl-xL and bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. *Hypertension* 37, 1341-1348, 2001.
 5. Nakagami, K., Morishita, R., Yamamoto, K., Yoshimura, S., Taniyama, Y., Aoki, M., Matsubara, H., Lim, S., Kaneda, Y., and Ogihara, T.: Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase downstream of bax-caspase-3 pathway leads to cell death induced by high d-glucose in human endothelial cells. *Diabetes* 50, 1472-1481, 2001.
 6. Kuroiwa, T., Kakishita, E., Hamano, T., Kataoka, Y., Seto, Y., Iwata, N., Kaneda, Y., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ueki, T., Fujimoto, J., and Iwasaki, T.: Hepatocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease and promotes hematopoietic function. *J. Clin. Invest.* 107, 11, 1365-1373, 2001.
 7. Kita, J., Kobayashi, E., Hishinuma, A., Kaneda, Y. and Kubota, K.: Genetic modification of cold-preserved renal grafts using HSP70 or bcl-2 HVJ-Liposome method. *Transplant Immunology* in press.
 8. Hayashi, K., Morishita, R., Nakagami, H., Yoshimura, S., hara, A., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ogihara, T., Kaneda, Y. and Sakai, N.: Gene therapy for preventing neuronal death using hepatocyte growth factor; in vivo gene transfer of HGF to subarachnoid space prevents delayed neuronal death in gerbil hippocampal CA1 neurons. *Gene Therapy* 8, 1167-1173, 2001.
 9. Ueno, T., Sawa, Y., Kitagawa-Sakakida, S., Nishimura, M., Morishita, R., Kaneda, Y., Kohmura, E., Yoshimine, T., and Matsuda, H.: Nuclear factor-kB decoy attenuates neuronal damage after global brain ischemia; a future strategy for brain protection during circulatory arrest. *Cardiopulmonary Support and Physiology*, 720-727, 122, 2001
 10. Kobayashi, Y., Fukushima, N., Sawa, Y., Ohtake, S., Matsumiya, G., Horiguchi, K., Kawaguchi, N., Matsuura, N., Kaneda, Y., and Matsuda, H.: Effects of gene transfection of human bcl-2 on concordant cardiac xenografts In hamster to rat model. *Jp. J. Thoracic and Cardiovascular Surgery* 49, 570-575, 2001.
 11. Yokoseki, O., Suzuki, J., Kitabayashi, H., Watanabe, N., Wada, Y., Aoki, M., Morishita, R., Kaneda, Y., Ogihara, T., Funamatsu, H., Kobayashi, Y., and Isobe, M.: cis Element decoy against nuclear factor-kB attenuates development of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation Research* 89, 899-906, 2001.
2. 学会発表
1. Yasufumi Kaneda: The device for the

enhancement of transgene expression and
Its use for cancer gene therapy 第4回ア
メリカ遺伝子治療学会ワークショップ
2001年6月1日 シアトル

2. 金田安史：“新規非ウイルスベク
ターの開発” 第24回日本分子生物学
学会年会 2001年12月12日 横浜

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

“遺伝子導入のためのウイルスエン
ベロープベクター” 金田安史（発明
者） 金田安史（出願人） 番号
90102208 2001年4月19日 出願中

3. その他

分担研究報告書

膵島移植における拒絶反応機構の解析とその回避に関する研究

分担研究者 井上 一知 京都大学再生医科学研究所

研究要旨 糖尿病に対する膵島細胞移植の確立を目指した研究で、塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた血管新生誘導前処置や免疫隔離膜(デバイス)の有効性などを既に報告している。本年度はさらに新しい免疫隔離デバイスの作製やブタ膵内分泌細胞の調製とその異種移植応用性を検討し、ブタ膵内分泌細胞をロッド型免疫隔離デバイスに封入し糖尿病モデルマウスの腹腔内あるいは皮下に移植した場合での血糖値の正常化を観察した。すなわち、この膵島細胞皮下移植治療システムが安全で普遍的な治療法であることを確認した。

A. 研究目的

糖尿病に対する根本的な治療法として膵臓器移植や膵島細胞移植は有効な方法と考えられてきている。しかしながら、深刻なドナー不足や免疫抑制剤の長期使用による副作用など種々の課題も残ったままで、普遍的な治療法として確立されるまでには至っていない。

我々は、元来血管の乏しい皮下部位に塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)徐放デバイスを移植に先立ち処置することで、同種同系・同種異系膵島の皮下移植における生着期間の延長を確認し、普遍的な膵島細胞移植治療法の開発への一歩を踏み出している。また、これら膵島細胞移植において、移植後に免疫抑制剤を使用しない移植法として、免疫隔離機能を持つ膜に膵島細胞を封入したカプセル化膵島細胞を応用し、拒絶反応を回避し得る移植法の開発に関しても成果を報告している。さらには、ドナー不足を克服する新規移植ドナー細胞の調製に関する検討を試み、糖尿病に対する根本的かつ普遍的で、安全な移植治療法を確立しつつある。

昨年度の本研究で、免疫隔離膜を利用した膵島移植治療において、移植後の異物反応や拒絶反応の詳細な機構の明瞭化や、更なる免疫隔離デバイスの改良のために、同種・異種移植時に動員される免疫系細胞群の動態や炎症関連分子の発現様態の検討を報告したが、特に本年度の研究では、新規移植ドナー細胞として有用

なブタ膵島細胞の調製とその異種移植における有効性・安全性の確認を行った。

B. 研究方法

免疫隔離膜として、抗補体活性を有する合成高分子、polystyrene sulfonic acid (PSSa) を主成分に用いカプセル化膵島細胞を調製した。移植部位への血管新生誘導は bFGF の除法化デバイスを用いて実施した。ドナーソース細胞は 6 ヶ月齢ブタ膵臓を材料とし、コラゲナーゼと膵内在性酵素(群)を用いた 2 段階消化後にセルプロセッサを用いて密度勾配遠心法で分画し得た膵内分泌細胞を用いた。糖尿病モデル C57BL/6 マウス(8・10 週齢)はストレプトゾトシン(STZ)の腹腔内投与により作製した。カプセル化膵島細胞の移植は、腹腔内および皮下に行い、移植後の糖尿病状態の改善は血糖値の変化や耐糖能に関する検討などで評価した。

(倫理面への配慮)

本研究に関しては、科学的かつ倫理的な実施を図るため、「ヘルシンキ宣言」および「動物の保護および管理に関する法律」に基づき、また、「京都大学動物実験に関する指針」に準拠し実施した。

C. 研究結果

従来のバック型カプセル化膵島細胞に加え、

本年度新たに調製したロッド型免疫隔離カプセル化膵島細胞を開発した。SD ラット膵島をカプセル化したロッド型デバイスを血管新生誘導前処置後の糖尿病モデルマウス皮下に移植した結果、血糖値は正常化(150mg/dl 前後)した。また、移植後 90 日を越えても血糖値の正常化を維持する個体も観察され、ロッド型免疫隔離デバイスの有効性が認められた。

ブタ膵内分泌細胞は、摘出した6ヵ月齢ブタの膵臓に経膵管でコラゲナーゼ溶液を注入し冷消化および温消化、さらに引き続いて膵内在性酵素による氷上での自己消化で得た細胞懸濁液を Histopaque(Sigma-Aldrich)を利用し COBE 2991 セルプロセッサーを用いた密度勾配遠心法で分画した。得られた画分を浮遊性に培養することでブタ膵内分泌細胞を精製し、これを移植実験に用いた。この方法で調製した膵内分泌細胞は、培養 1・7 日後においても 100・200mg/ml/4h/5x10⁵cells 前後の安定したインスリン放出能を有し、theophylline 応答性のインスリン分泌能も確認できるなど、カプセル化膵島細胞に用いるバイオリクターとして十分な機能を示すことが確認できた。

ブタ膵内分泌細胞 2.5・5.0x10⁶cells をロッド型デバイスに封入したカプセル化膵島細胞を糖尿病モデルマウス腹腔内に移植した結果、少なくとも 45 日以上血糖値は正常化した。また、移植 30 日後に IPGTT を実施した結果でも正常マウスに類似した耐糖能を示し、カプセル化したブタ膵内分泌細胞の機能性が確認できたと共に、ブタ膵島細胞を異種移植に応用した場合の有効性が示唆された。また、膵 β細胞に相当すると考えられる dithizone に染色されたブタ膵内分泌細胞 3・4x10⁶cells を同様にロッド型デバイスに封入したカプセル化膵島細胞を血管新生誘導善処置した糖尿病モデルマウス皮下に移植した結果でも、少なくとも移植後 30 日血糖値が 150・200mg/dl と正常化することが認められた。さらに、血糖値の正常化期間など継続して検討中ではあるものの、糖尿病モデルラットにおいても移植したカプセル化ブタ膵内分泌細胞が機能していることも認められており、これら実験動物レベルではブタ膵内分泌細胞がカプセル化膵島細胞の

バイオリクターとして充分機能し、異種移植においてもモデル動物の糖尿病状態を改善することが証明できたものと考えられる。

D. 考察

移植部位としての皮下は術式が簡便で低侵襲性であるなどの利点を備えているが、血管が乏しくそのままでは移植片が生着しにくいという難点もあった。この点に関して我々は血管新生誘導前処置が、移植部位への栄養供給や移植膵島産生成分の分泌・排泄の改善を促し、移植膵島生着期間の延長や機能維持を向上させることを見出している。さらに、この移植部位へ適応する免疫隔離デバイスの選択肢を拡大するために新しい形状のデバイスの有効性を証明することは重要であると考えられ、ロッド型のデバイスもバッグ型など従来タイプと共に普遍的な移植治療に応用できることが示唆された。

一方、ヒト臓器・組織との生理的および生化学的類似性などから注目されているブタ臓器・組織に関して、本研究で検討したブタ膵内分泌細胞を糖尿病治療に応用する方法はドナー不足の解消やドナー細胞の選択肢の拡大という点からも重要性は高い。移植免疫に関する検討が充分とは言えないが、異種移植においても移植ブタ膵内分泌細胞の機能は十分に確認できた者と考えられ、ヒト幹細胞やヒト ES 細胞から分化誘導されたヒト膵島細胞が利用できるまでの膵島細胞を用いた糖尿病治療における重要なバイオリクターソースとして普遍的な糖尿病治療に貢献するものと考えられる。

E. 結論

糖尿病治療に関して、免疫隔離膜技術や血管新生誘導技術による安全で低侵襲な皮下移植治療法の開発を模索する過程で、免疫隔離デバイス選択肢の多様化がはかれた。また、ドナー不足の解消にブタ膵内分泌細胞を用いた異種移植が有効で安全であることを明らかとした。これら、ブタ膵内分泌細胞、各種免疫隔離デバイス、および、新生血管誘導前処置法を組み合わせたカプセル化膵島細胞皮下移植システムは、再生ヒト膵島細胞が利用できるまでの糖尿病治

療法として大きな効果をもたらすことが示唆される。

さらにこのシステムのより普遍的な臨床応用実現のために、大動物での有効性と安全性の確認、さらには、開発したカプセル化膵島細胞皮下移植システムにおける拒絶反応回避機構、移植膵島細胞の詳細な機能廃絶機構やこのような人工物に対する異物反応を明らかにすることも必要であろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Wang W.J., Gu Y.J., Tabata T., Miyamoto M., Hori H., Nagata N., Touma M., Balamurugan A.N., Kawakami Y., Nozawa M., and Inoue K.: Reversal of diabetes in mice by xenotransplantation of a bioartificial pancreas in a prevascularized subcutaneous site. *Transplantation* 15:122-129,2002
2. Kawakami Y., Iwata H., Gu Y.J., Miyamoto M., Murakami Y., Yamasaki T., Cui W.X., Ikada Y., Imamura M., and Inoue K.: Modified subcutaneous tissue with neovascularization as the site for pancreatic islet transplantation. *Cell Transplant* 9:729-732, 2001
3. Kinoshita N., Echigo Y., Shinohara S., Gu Y.J., Miyazaki J., Inoue K., and Imamura M.: Regulation of cell proliferation using tissue engineering in MIN6 cells. *Cell Transplant* 10:473-477, 2001
4. Wang W.J., Gu Y.J., Miyamoto M., Hori H., Nagata N., Balamurugan A.N., and Inoue K.: Effect of basic fibroblast growth factor on insulin secretion from micro-encapsulated pancreatic islets; An in vitro study. *Cell Transplant* 10:465-471, 2001
5. Hori H., Gu Y.J., Nagata N., Balamurugan A.N., Satake A., Morimoto Y., Wang W.J., Misawa Y., Nozawa Y., Nembai T., Miyamoto M., Nozawa M., and Inoue K.: Isolation, culture and characterization of endocrine cells from six-months-old porcine pancreas. *Cell Transplant* 10:459-464, 2001

6. Gu Y.J., Tabata Y., Kawakami Y., Balamurugan A.N., Hori H., Nagata N., Satake A., Cui W.X., Qi R.M.G, Misawa Y., Toma M., Miyamoto M., Nozawa M., and Inoue K. : Development of a new method to induce angiogenesis at subcutaneous site of streptozotocin-induced diabetic rats for islet transplantation. *Cell Transplant* 10:453-457, 2001
7. Nagata N., Gu Y.J., Hori H., Balamurugan A.N., Toma M., Kawakami Y., Wang W.J., Satake A., Misawa Y., Baba T., Miyamoto M., Nozawa M., Tabata Y., and Inoue K: Evaluation of insulin secretion of isolated rat islets cultured in extracellular matrix. *Cell Transplant* 10:447-451, 2001

2. 学会発表

国内学会

1. 顧元駿, 堀洋, 田畑泰彦, 長田奈津紀, 櫻井智徳, 金度勳, 奇梅日更, 王文敬, 三澤裕子, 佐竹晃, 井上一知: バイオ人工膵におけるコラーゲンコーティングによる血管新生誘導能に関する検討. 第28回膵膵島移植研究会(2001.3.3.奈良)
2. 三澤裕子, 堀洋, 顧元駿, 長田奈津紀, 藤間真紀, 王文敬, 森反俊幸, 野澤真澄, 井上一知: プタ膵臓由来内分泌細胞単離法の改良と移植応用性の検討. 第28回膵膵島移植研究会(2001.3.3.奈良)
3. 櫻井智徳, 顧元駿, 川上義行, 堀洋, 長田奈津紀, 藤間真紀, Balamurugan AN., 金度勳, 佐竹晃, 田畑泰彦, 野澤真澄, 井上一知: 血管新生誘導能を有するバイオ人工膵の開発. 第101回日本外科学会総会(2001.4.11.仙台)
4. 森元良彦, 顧元駿, 堀洋, 長田奈津紀, 藤間真紀, 三澤裕子, 野澤真澄, 井上一知: 培養プタ膵内分泌細胞の移植応用. 第101回日本外科学会総会(2001.4.11.仙台)
5. 櫻井智徳, 顧元駿, 堀洋, 長田奈津紀, 藤間真紀, 金度勳, 佐竹晃, 宮本正章, 田畑泰彦, 野澤真澄, 井上一知: バイオ人工膵皮下移植における血管新生誘導法の検討. 第9回細胞療法研究会(2001.4.21.松本)

6. 王 文敬, 顧元駿, 田畑泰彦, 宮本正章, 堀 洋, 長田奈津紀, 藤間真紀, Balamurugan AN., 川上義行, 岩田博夫, 野澤真澄, 井上一知: Xenotransplantation of agarose hydrogel-based bioartificial pancreas into neovascularized subcutaneous site of mouse. 第9回細胞療法研究会(2001.4.21.松本)

7. 三澤裕子, 堀 洋, 顧 元駿, 長田奈津紀, 藤間真紀, 森反俊幸, 野澤真澄, 井上一知: ブタ膵内分泌細胞分離・培養法の改良に関する検討. 第9回細胞療法研究会(2001.4.21.松本)

8. 佐竹 晃, 顧 元駿, 井上一知: バイオ人工膵臓による皮下・筋肉間同種移植の検討; 血管誘導処置の効果. 日本膵臓学会第32回大会ワークショップ(2001.7.13 北九州)

9. 佐竹 晃, 顧 元駿, 王 文敬, 宮本正章, 佐竹克介, 野澤真澄, 井上一知: 再生医学的手法によるバイオ人工膵移植の検討. 第56回日本消化器外科学会総会シンポジウム消化器外科領域の再生医学(2001.7.26 秋田)

10. 日裏彰人, 佐竹 晃, 宮本正章, 佐竹克介, 井上一知: バイオ人工膵の皮下移植 臨床応用に向けて. 第63回日本臨床外科学会総会 特別シンポジウム3 21世紀の移植医療 わが国における展望 (2001.10.11 横浜)

11. 堀 洋, 顧 元駿, 王 文敬, 櫻井智徳, 金 度勳, 佐竹 晃, 日裏彰人, 長田奈津紀, 野澤真澄, 井上一知: ブタ膵内分泌細胞分離・培養法の改良に関する検討. 第74回日本生化学会大会(2001.10.27.京都)

12. 日裏彰人, 井上一知: 膵島再生医療の開発. 第4回移植遺伝子工学研究会 シンポジウム(2) 膵の再生医学(2001.12.15 東京)

13. 顧 元駿, 堀 洋, 王 文敬, 奇 梅日更, 金 度勳, 櫻井智徳, 佐竹 晃, 日裏彰人, 井上一知: ブタ膵内分泌細胞を用いたバイオ人工膵移植に関する検討. 第37回日本移植学会総会(2001.12.16.東京)

国際学会

1. Satake A., Gu Y.J., Balamurugan AN, Hori H, Nagata N, Touma M, Sakurai T, Misawa Y, Kim DH, Cui WX, Wang W.J, Miyamoto M,

Satake K, Nozawa M, and Inoue K.: Surgical and function of the transplants islet-allograft at prevascularized subcutaneous and intermuscular site; effectiveness of angiogenesis induction. International Surgical Week 2001 (2001.8.28, Brussels)

2. Satake A., Wang W.J, Gu Y.J., Hiura A, Satake K, and Inoue K: Xenotransplantation of encapsulated islets into prevascularized subcutaneous site. American Pancreatic Association (2001.11.2, Chicago)

3. Gu Y.J., Hiura A, Hori H., and Inoue K.: Regenerative islet therapy for diabetes mellitus. 6th International Conference on Tissue Engineering for Therapeutic Use (2001.11.25, Osaka)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

発明者: 岩田博夫、井上一知、筏 義人; 生体内に毛細血管が豊富な組織を作成するのに用いる新生血管床形成用器具

特許第 3080299; 特許権者: 京都府京都市左京区吉田本町36の1 京都大学長

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

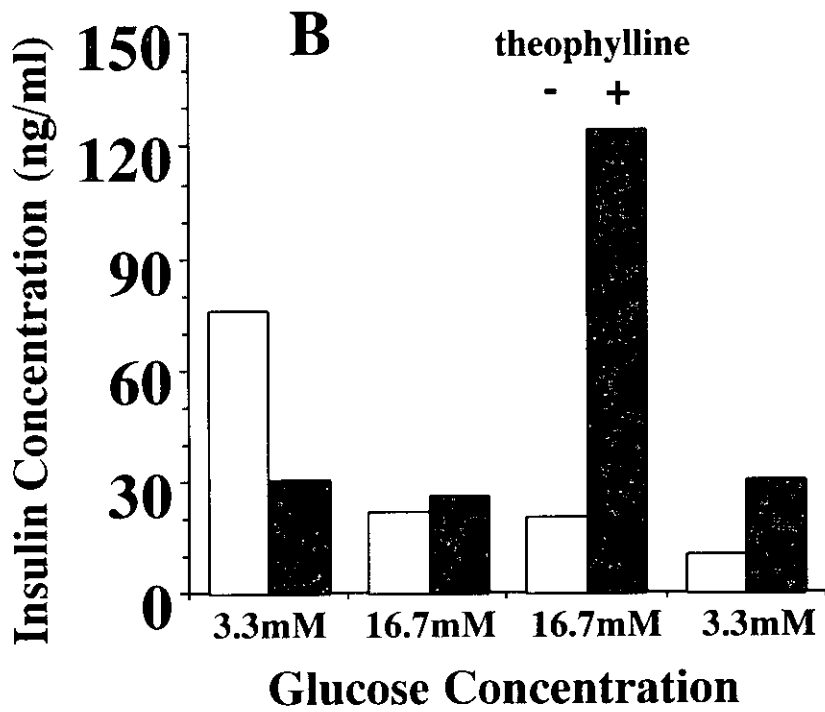
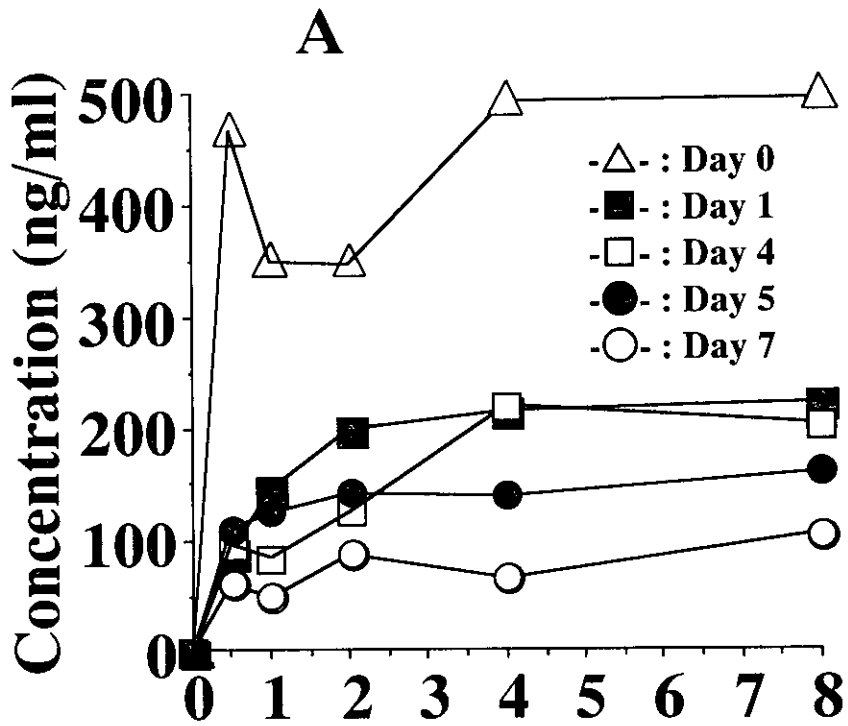


Fig. 1. 分離ブタ膵内分泌細胞の機能

A ; 培養上清へのインスリンの放出

B ; グルコース応答性