



図9. 多孔質ステンレス製接合具を用いて吻合したラット腹部大動脈

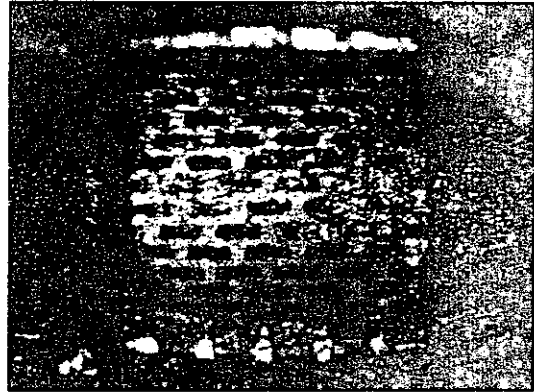
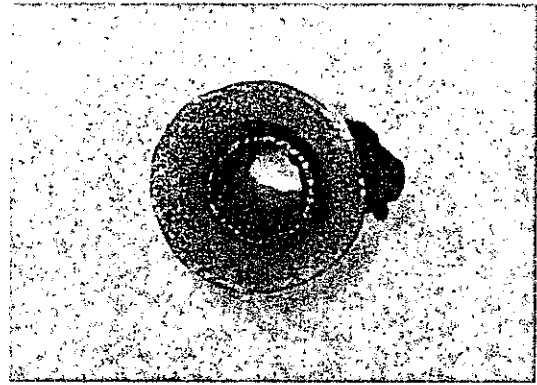


図11. 多孔質ステンレス製接合具を用いてラット腹部大動脈に2週間移植したスポンジ型人工血管。接合部の断面(上)と内腔面(下)



図10. スポンジ型人工血管の接合例

また、切断したラット腹部大動脈の方端の内腔内に多孔質ステンレス製接合具を挿入し、その外側を他端の動脈断端で覆い、外側を結紮した。クランプを除去すると、拍動をともなって血流が再開された(図9)。接合具を挿入して、切断血管断端を重ね合わせて結紮するのみで血管の接合が完了した。先の鈔付テフロン製接合具と同様に短い血流遮断時間内に确实、簡便に切断血管を接合させることができた。

一方、切断血管の両断端に挿入した血管接合具(図10上)の外側にスポンジ型人工血管の一端を挿入させた(図10中)、人工血管の両端の内腔内に各接合具を挿入し、外側を結紮した。これも先の鈔付テフロン製接合具と同様に操作することができた。

スポンジ型人工血管を接合し、2週間経過を観察した。開腹すると血流は保たれており、人工血管は

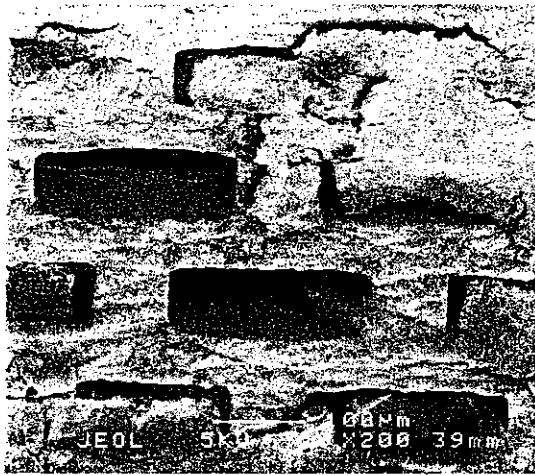


図 1 2. ラット腹部大動脈への人工血管の移植に用いた接合具の内腔面。上：走査型電子顕微鏡写真。下：蛍光顕微鏡写真。

開存していた。人工血管を摘出し、断端を観察すると、特に肥厚は認めなかった（図 1 1 上）。また、断面で内腔面を観察すると、薄く透明なフィブリン様の層が認められたが、特に大きな血栓は観察されなかった（図 1 1 下）。

接合具の内腔面を走査型電子顕微鏡で観察すると宿主血管内腔面から浸潤したと考えられる血管壁細胞でほぼ完全に皮膜化されていた（図 1 2 上）。内皮細胞を選択的に染め分ける蛍光試薬を作用させると、ほぼ全ての細胞に蛍光が観察された（図 1 2 下）ことより、血管接合具を挿入すると、宿主血管の内腔面から内皮細胞の浸潤が起こり、接合具の内腔面がほぼ完全に内皮化されたと言える。

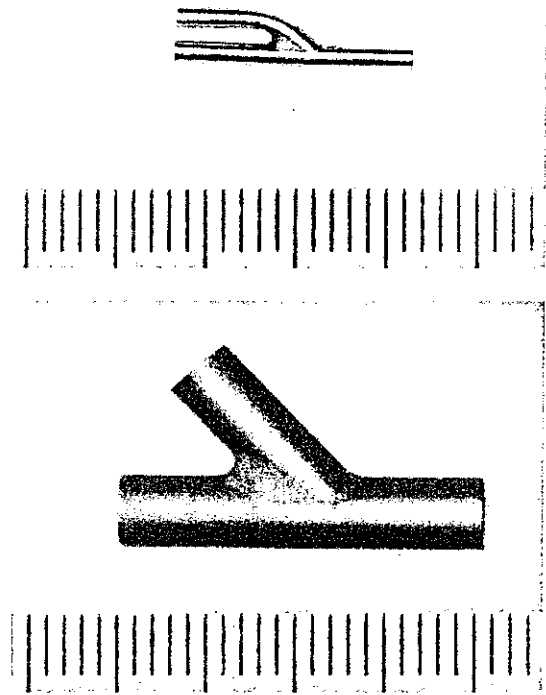


図 1 3. 分岐型血管接合具に試作品

以上より、多孔質ステンレス製接合具は、ある程度の拡張性を有していたため、接合させる宿主血管との口径をある程度適合化させることができ、宿主血管内に挿入される管状部分の壁厚が薄くでき、さらに、組織侵入によって生着性が高まったと言える。

また、現在、分岐構造を持つより複雑な形状を有する接合具の開発を行っている（図 1 3）。

E. 結論

極小血管の吻合において虚血時間の大幅な短縮化、成功率の向上、また端側吻合への応用性が獲得される血管接合具が開発できた。本研究でめざしている、hES-VPC とのハイブリッド人工血管の研究を推進する上で基盤技術の一つが確立されたと言える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Nakayama, S. Nishi, H. Ueda-Ishibashi, T. Matsuda, Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performances, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 64A, 52-61.
2. W.G. Brodbeck, G. Voskerician, N.P. Ziats, Y. Nakayama, T. Matsuda, J.M. Anderson, In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 64A, 320-329.
3. Y. Nakayama, M. Sudo, K. Uchida, T. Matsuda, Spatio-resolved hyperbranched graft polymerized surfaces by iniferter-based photograft copolymerization, *Langmuir*, 2002, 18, 2601-2606.
4. H. Sonoda, S. Urayama, K. Takamizawa, Y. Nakayama, C. Uyama, H. Yasui, T. Matsuda, Compliant design of artificial graft compliance determination by new digital X-ray imaging system-based method, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, 60, 191-195.
5. H. Okino, Y. Nakayama, M. Tanaka, T. Matsuda, *In situ* hydrogelation of photocurable gelatin and drug release, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, 59, 233-245.
6. S. Yasuda, T. Noguchi, M. Gohda, T. Arai, N. Tsutsui, Y. Nakayama, T. Matsuda, H. Nonogi, Local delivery of low dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model, *Cardiovas. Res.*, 2002, 53, 481-486.
7. T. Kawada, Y. Nakayama, C. Zheng, S. Ohya, K. Okuda, K. Sunagawa, A novel photocurable insulator material for autonomic nerve activity recording, *Biomaterials*, 2002, 23, 3169-3174.
8. W.G. Brodbeck, J. Patel, G. Voskerician, E. Christenson, M.S. Shive, Y. Nakayama, T. Matsuda, N.P. Ziats, J.M. Anderson, Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 10287-10292.
9. T. Magoshi, H. Ziani-Cherif, S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive heparin coating: heparin conjugated with poly(N-isopropylacrylamide) at one terminus, *Langmuir*, 2002, 18, 4862-4872.
10. S. Yasuda, M. Kanna, S. Sakuragi, S. Kojima, Y. Nakayama, S. Miyazaki, T. Matsuda, K. Kangawa, H. Nonogi, Local Delivery of single low-dose of C-type natriuretic peptide, an endogenous vascular modulator, inhibits neointimal hyperplasia in balloon-injured rabbit iliac artery model, *J. Cardiovas. Phram.*, 2002, 39, 784-788.
11. W.G. Brodbeck, Y. Nakayama, T. Matsuda, E. Colton, N.P. Ziats, J.M. Anderson, Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro, *Cytokine*, 2002, 18, 311-319.
12. T. Masuda, Y. Nakayama, Development of a water-soluble matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors as an intra-arterial infusion drug for prevention of restenosis after angioplasty, *J. Med. Chem.*, 2003, in press.
13. Y. Kuboki, M. Kikuchi, H. Takita, R. Yoshimoto, Y. Nakayama, T. Matsuda, Y. Ikada, Laser-perforated membranous biomaterials

- induced pore size-dependent bone-induction when used as a new BPM-carrier, *Connective Tissue Res.*, 2003, in press.
14. Y. Nakayama, T. Matsuda, Photo-control of cell adhesivity and proliferativity on photo-induced cation-generatable polymer film surface, *Photochem. Photobiol.*, 2003, in press.
 15. H. Sonoda, K. Takamizawa, Y. Nakayama, H. Sasui, T. Matsuda, Coaxial double-tubular compliant arterial graft prosthesis: time-dependent morphogenesis and compliance changes after implantation, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, in press.
 16. Y. Nakayama, T. Matsuda, Photo-control of interaction between endothelial cells and photo-cation generatable water-soluble polymers, *J. Control Release*, 2003, in press.
 17. S. Nishi, Y. Nakayama, H. Ueda-Ishibashi, T. Matsuda, Occlusion of experimental aneurysms with heparin-loaded micropored stent graft, *Neurosurgery.*, 2003, in press.
- ## 2. 学会発表
1. 亀尾崇宏、平野義明、松田武久、中山泰秀、多水酸基化親水性高分子の可視光ゲル化、第51回高分子学会年次大会(パシフィコ横浜)、2002年5月30日
 2. 梅田真理子、庄田香織、斯波真理子、内田欣吾、中山泰秀、光カチオン生成型親水性高分子を用いたDNAとのコンプレックス形成の光制御、第51回高分子学会年次大会(パシフィコ横浜)、2002年5月30日
 3. 奥田かんな、中山泰秀、松田武久、機能性ゼラチンの分子設計:オリゴスチレン化ゼラチンの合成と光ゲル形成の促進、第51回高分子学会年次大会(パシフィコ横浜)、2002年5月30日
 4. 中村孝志、大屋章二、内田欣吾、中山泰秀、松田武久、主鎖にエステル結合を有するビニル系ポリマーの合成と加水分解性、第51回高分子学会年次大会(パシフィコ横浜)、2002年5月30日
 5. 舛田健、中山泰秀、MMP阻害薬の水溶性高分子化設計による血管傷害治療の促進化、第51回高分子学会年次大会(パシフィコ横浜)、2002年5月30日
 6. Nakayama Y, Umeda M, Harada-Shiba M, Shoda K, Development of high-performance gene delivery vector: Photocontrol of DNA complex formation. *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug. 30th.
 7. Nakayama Y, Kanda K, Development of simple cuff technique for microvascular anastomosis. *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug. 29th.
 8. Nakayama Y, Ishibashi-Ueda H, Takamizawa K, Biotubes prepared in recipient mouse body as a vascular prosthesis. *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug. 30th.
 9. Masuda T, Nakayama Y, Drug material design for balloon angioplasty and stenting: Development of water-soluble matrix metalloproteinase inhibitor. *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug. 30th.
 10. Nishi S, Nakayama Y, Ueda-Ishibashi H, Matsuda T, A novel high-performance stent graft with micropores and heparin

- immobilization: Embolization of canine cervical carotid aneurysm. *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug. 30th.
11. Kanda K, Nakayama Y, Ito H, Yamashita J, Kitamura N, Development of the hybrid vascular prosthesis: Incorporation of differentiated embryonic stem cells in vitro and in vivo (preliminary study). *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug. 29th.
 12. Ohya S, Nakayama Y, Matsuda T, Matrix design in tissue engineering: In vitro and in vivo evaluation of thermoresponsive gelatin for cell scaffold. *European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference* (Winner), 2002, Aug. 28th.
 13. 中山泰秀、奥田かんな、庄田香織、組織工学用マトリックス材料の設計: 光硬化性ゼラチンの高ゲル化能の獲得、*光化学討論会*、2002年9月13日
 14. 亀尾崇宏、鈴木貞信、長石誠、西村学、平野義明、中山泰秀、医療デバイスの光表面設計: プロトドナー型親水性高分子の合成と表面光ゲル形成、*光化学討論会*、2002年9月11日
 15. 中山泰秀、斯波真理子、梅田真理子、内田欣吾、庄田香織、林美智子、マラカイトグリーン化高分子の遺伝子ベクターとしての可能性、*光化学討論会*、2002年9月11日
 16. 大屋章二、中山泰秀、木戸秋悟、松田武久、AFMによるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)化ゼラチンゲルの超微細構造・物性測定とマトリックス機能との相関、第24回日本バイオマテリアル学会(早稲田大学国際会議場)、2002年11月29日
 17. 舩田健、庄田香織、中山泰秀、MMPI ポリマーの細胞遊走・増殖抑制効果と血管形成促進剤としての可能性、第24回日本バイオマテリアル学会(早稲田大学国際会議場)、2002年11月29日
 18. 大屋章二、中山泰秀、松田武久、機能性人工細胞外マトリックス設計: 感温性ゼラチンの *in situ*ゲル硬化性 Scaffold 材料への応用、第31回医用高分子シンポジウム(上智大学)、2002年8月1日
 19. 西正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、再狭窄への予防-ヘパリン固定化多孔質カバースtentの開発、第8回日本血管内治療学会(奈良三井ガーデンホテル)、2002年7月5日
 20. 西正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、高機能カバースtentによる実験的動脈瘤の閉塞-その有用性-、第8回日本血管内治療学会(奈良三井ガーデンホテル)、2002年7月5日
 21. 中山泰秀、神田圭一、西正吾、山田進、血管接合具の開発、第40回日本血管内治療学会(札幌京王プラザホテル)、2002年10月3日
 22. 中山泰秀、林美智子、高見沢計一、植田初江、人工血管への応用をめざすバイオチューブ組織体の作製、第40回日本血管内治療学会(札幌京王プラザホテル)、2002年10月4日
 23. 西正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、高機能カバースtentの実験的動脈瘤への応用-薄膜カバーへの微細孔とヘパリンの付与、第40回日本血管内治療学会(札幌京王プラザホテル)、2002年10月3日
 24. 西正吾、中山泰秀、植田初江、マツダ武久、FK506を付与した covered stent の開発-内膜肥厚に対する抑制効果、第40回日本血管内治療学会(札幌京王プラザホテル)、2002年10月3日
 25. 大屋章二、中山泰秀、松田武久、再生医療を目指す *in situ* 感温ゲル化性 Scaffold 材の開発、

- 第40回日本血管内治療学会(札幌京王プラザホテル)、2002年10月3日
26. 神田圭一、中山泰秀、伊藤裕、山下潤、根本泰、山田進、北村信夫、ES細胞を用いたハイブリッド型人工血管の開発、第40回日本血管内治療学会(札幌京王プラザホテル)、2002年10月3日
27. 植田初江、中山泰秀、西正吾、薬物塗布 polymer covered stent の動物実験での組織像について、第50回日本心臓病学会学術集会(名古屋国際会議場)、2002年8月9日
28. 西正吾、香月教寿、中山泰秀、植田初江、松田武久、頸部内頸動脈血管形成術(ステント留置術)より安全な手技、長期効果を目指して、第18回日本脳神経血管内治療学会(沖縄コンベンションセンター)、2002年12月5日
29. 西正吾、香月教寿、中山泰秀、植田初江、松田武久、高機能カバーステントの実験的動脈瘤への応用、薄膜カバーへの微細孔とヘパリンの付与、第18回日本脳神経血管内治療学会(沖縄コンベンションセンター)、2002年12月5日
30. Y. Nakayama, S. Nishi, H. Ishibashi-Ueda, Development of novel drug-eluting covered stents with combination of micropores and differential coating of heparin and FK506, *Cardiovascular Radiation Therapy (CRT) 2003* (Washington DC, Hilton Hotel), 2003年1月27日
31. S. Nishi, Y. Nakayama, H. Ishibashi-Ueda, T. Matsuda, A heparin loaded stent graft with micropores: Embolization of experimental carotid aneurysms, *Cardiovascular Radiation Therapy (CRT) 2003* (Washington DC, Hilton Hotel), 2003年1月27日
32. 中山泰秀、林美智子、植田初江、バイオチューブ人工血管の開発: ナノ表面化学設計による組織形成制御、第2回再生医療学会(神戸国際会議場)2003年3月11日
33. 大塚章二、中山泰秀、松田武久、再生医療における3次元人工細胞外マトリックス設計: 感温性ゼラチンの分子設計とマトリックス材料としての機能評価、第2回再生医療学会(神戸国際会議場)2003年3月11日
34. 内藤洋、武輪能明、水野敏秀、大塚章二、中山泰秀、巽英介、北村惣一郎、高野久輝、妙中義之、感温硬化性ゼラチンを用いた心筋細胞三次元培養の試み、第2回再生医療学会(神戸国際会議場)2003年3月11日
35. 神田圭一、中山泰秀、伊藤裕、山下潤、根本泰、山田進、北村信夫、ES細胞を導入したハイブリッド型人工血管モデルの開発、第2回再生医療学会(神戸国際会議場)2003年3月11日
36. H. Ishibashi-Ueda, Y. Nakayama, S. Nishi, Histological evaluation of FK506 eluting and polymer covered stents in rabbits, 第67回日本循環器病学会学術集会(福岡国際会議場)2003年3月30日
37. Satoshi. Yasuda, Shunichi Miyazaki, Yoritaka Ohtsuka, Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda, Hiroshi Nonogi, Local drug delivery for prevention of post-angioplasty restenosis, 第67回日本循環器病学会学術集会(福岡国際会議場)2003年3月28日(Circulation Journal, 67 Suppl. 1, 32, 2003)
38. Yoritaka Otsuka, Satoshi Yasuda, Norihiko Kotooka, Yasuhide Asami, Hiriyuki Okumura, Yasuhide Nakayama, Hitoshi Nonogi, 第67回日本循環器病学会学術集会(福岡国際会議場)2003年3月30日(Circulation Journal, 67 Suppl. 1, 353, 2003)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 中山泰秀、西 正吾、山田 進、動脈瘤閉鎖具、特願 2002-195851
2. 中山泰秀、山田 進、荒木修一、生体管接合材、特願 2002-088131
3. 中山泰秀、山田 進、荒木修一、イオン結合性生体組織接着剤、特願 2002-088214
4. 中山泰秀、山田 進、荒木修一、血管内拡張用具、特願 2002-088130
5. 中山泰秀、上垣昭彦、小野静香、ヒドロキサム酸化合物、特願 2002-123795
6. 中山泰秀、根本 泰、組織工学用スキャホールド材及び、該材からなる人工血管、特願 2002-091793
7. 中山泰秀、根本 泰、ベクター、核酸含有複合体及びその形成方法、特願 2002-243872
8. 中山泰秀、西 正吾、根本 泰、ステント、特願 2002-243871
9. 中山泰秀、根本 泰、核酸複合体及びその製造方法、特願 2002-268698
10. 中山泰秀、根本 泰、ベクター、核酸含有複合体及びその形成方法、特願 2002-299226
11. 中山泰秀、梅田真理子、ベクター、ベクター用高分子、その製造方法、核酸含有複合体及びその製造方法、特願 2002-299225
12. 中山泰秀、根本 泰、動脈瘤閉塞剤及び動脈瘤閉塞方法、特願 2002-352736
13. 中山泰秀、根本 泰、動脈瘤閉塞材及び動脈瘤閉塞方法、特願 2002-359528
14. 中山泰秀、林美智子、高見沢計一、植田初江、人工血管、特願 2003-052512

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

霊長類 ES 細胞由来血管前駆細胞による血管発生分化系を用いた新規血管再生薬剤の開発

—サル ES 細胞由来血管前駆細胞の同定及びヒト ES 細胞培養に関する基礎的検討

分担研究者：仁藤新治（田辺製薬株式会社創薬研究所 主任研究員）

ES 細胞由来血管前駆細胞の血管再生医療への臨床応用のための基盤研究として、本年度は我々が樹立したサル ES 細胞を用い、血管を構成する内皮細胞と血管平滑筋細胞の双方に分化可能な血管前駆細胞（vascular progenitor cells; VPC）の分化誘導を行った。更に、霊長類 ES 細胞由来 VPC と我々が既に同定したマウス ES 細胞の VPC との性状の差異を明らかにした。また、ヒト ES 細胞について未分化性を維持した簡便な継代培養法及び大量の細胞ストックを得るための適切な凍結保存法を検討した。これらの知見をもとに次年度は、ヒト ES 細胞 VPC の同定と同細胞を用いたヒト血管の *in vitro*、*in vivo* での構築及びそのために有効な新しい血管再生誘導因子（薬剤）の探索を行う予定でいる。

A. 研究目的

全能性と self-renewal を有する ES 細胞は、再生医学において有力な細胞ソースとして注目されている。主任研究者の伊藤らは、マウス ES 細胞より血管を構成する内皮細胞と血管平滑筋細胞の双方に分化し、*in vitro* 及び *in vivo* で血管を構築できる“血管前駆細胞（vascular progenitor cells; VPC）”の単離に成功した。しかしながら、この知見はマウス ES 細胞における成績であり、実際の臨床応用を考えた場合、是非とも霊長類での血管前駆細胞の存在の実証とその移植治療への応用の検討並びに、新たな複数の分化誘導因子の同定を要すると考えられる。海外においてヒト胚細胞より ES 細胞が樹立されたが、霊長類由来 ES 細胞はマウスと比べその細胞増殖パターン、LIF 要求性等いくつかの異なった性質を有することが見いだされている。一方本邦においては、我々が京都大学再生医科学研究所中辻憲夫教授らのチームと共同し、カニクイザルより ES 細胞株の樹立に成功した。そこで本研究課題においては、主任研究者伊藤らの有する ES 細胞由来血管前駆細胞に関する知見の集積並びに FACS セルソーターを用いた血管前駆細胞の純化のノウハウと、我々が樹立保有する霊長類 ES 細胞とその維持培養系を融合させ、ES 細胞の血管再生医療への実用化に向け、霊長類 ES 細胞由来血管前駆細胞を用いた血管再生医療の基礎的

基盤を検討することを目的としている。

本年度は、サル ES 細胞より VPC と呼び得る細胞の同定に成功し、マウス ES 細胞由来の VPC との異同を明らかにした。更に、昨年 4 月認可された海外樹立ヒト ES 細胞の培養に関し、主任研究者伊藤らとともにその基礎的検討を行った。

B. C. 研究方法及び結果

1. サル ES 細胞からの血管前駆細胞の同定

マウス ES 細胞では、未分化な ES 細胞は Fik1 を発現していないが、コラーゲン IV コートディッシュ上で 4 日間分化誘導を行うと 30~40% が Fik1 陽性となる。一方、サル ES 細胞はマウス ES 細胞と異なり、未分化な状態で既に大部分の細胞が Fik1 を発現していた。しかし、これらの未分化 ES 細胞に含まれる Fik1 陽性細胞は、フィーダー細胞上で血清及び VEGF 存在下で 5 日間培養を続けても、内皮細胞あるいは血管平滑筋細胞は分化せず、血管前駆細胞としての働きを持たなかった。サル ES 細胞をコラーゲン IV コートディッシュ上で分化誘導を試みたが、マウス ES 細胞と同等の細胞密度・条件ではコラーゲン IV 上に生着しなかった。次に、マウス頭

蓋冠由来のフィーダー細胞との共培養にて分化誘導を試みたところ、一度 Flk1 陽性分画がほぼ消失したのち、8 日後に再び約 8% が Flk1 陽性でかつ内皮マーカー VE カドヘリン陰性となった。これらの細胞は未分化 ES 細胞が持つアルカリフォスファターゼ活性を持たず、Flk1 陽性の未分化 ES 細胞とは異なるものであった。この Flk1 陽性 VE カドヘリン陰性細胞を FACS にて分離し、再培養したところ、VE カドヘリン陽性 PECAM1 陽性 eNOS 陽性の内皮細胞及び α 平滑筋アクチン陽性カルポニン陽性の壁細胞が出現し、それらはコラーゲンゲルによる 3 次元培養にて血管様構造を構築した。これらの結果により、分化誘導後出現した Flk1 陽性 VE カドヘリン陰性細胞は霊長類においても血管前駆細胞として働くことが示され、血管前駆細胞は霊長類において血管再生医療の有力な材料となりうることが示唆された。

2. ヒト ES 細胞の継代維持及び凍結保存に関する基礎的検討

標準プロトコールにおいてヒト ES 細胞の継代維持培養法は、Cutting pipette と称すガラスキャピラリーのエッジ部分で個々のコロニーを実体顕微鏡下で数個の塊に細分し、その塊を新しい MEF 上に手作業で植え継ぐ手法 (Cut 継代) が採用されている。この Cut 継代は確かにヒト ES 細胞の未分化性を維持できる安定な継代法であるが、その操作には熟練したスキルが要求されるうえ、コロニーのひとつひとつをハンドリングするため細胞の大量調製法としては時間的・労力的に限界がある。本研究課題においては、一度に大量の未分化 ES 細胞が必要とされるため、サル ES 細胞で用いられているようなコラゲナーゼ等を用いる酵素法が適用できることが望まれる。

そこで、細胞の量産が可能な継代法として、酵素法によるヒト ES 細胞の継代法の確立を目指した検討を行った。マウス胎児由来線維芽細胞 (MEF) 上で、ヒト ES 細胞のコロニーが十分生育した段階で

コラゲナーゼで一定時間処理した。その後、タッピングにてヒト ES 細胞コロニーを MEF より遊離させ、軽くピペティングの後小片にし、一定の比率で新しい MEF 上に散布した。

本酵素法で数回継代培養したヒト ES 細胞のコロニーのアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定し、その未分化性を確認した。ほとんどのコロニーの全体で強い ALP 活性が検出され、酵素法によっても未分化状態を維持したままでの継代・維持が十分行い得ることが確認できた。また、サル ES 細胞と同様に、ALP 活性は分化状態の判断指標としてある程度、利用できる指標であることが確認できた (図 1)。また、未分化ヒト ES 細胞の一つの指標である表面抗原マーカー SSEA-4 の発現を免疫細胞組織化学的に解析した。その結果、SSEA-4 の発現は、酵素法によって継代・維持されたコロニー (細胞) についても発現しており、未分化性を維持できていることが示唆された (図 2)。

更に、胚様体形成能についても検討したが、約 1 週間~2 週間の浮遊培養で Cystic Embryoid Body と思われる形態への変化が確認できた。

研究開始当初、培養増幅したヒト ES 細胞を安定に凍結保存する際、通常細胞保存に頻用されている市販の凍結保存液 (セルバンカー等) は生存率の著しい低下をきたすので使用できない状況にあった。また、通常サル ES 細胞に用いられる簡便な凍結保存条件も、ヒト ES 細胞へは適用困難であることが確認されていた。研究を効率的に進めるうえにおいて、細胞ストックの大量確保が不可欠である。そこで、簡便な操作で、一度に、且つ大量の未分化ヒト ES 細胞を凍結保存できる条件を確立すべく検討を行った。

通常の培養細胞で頻用される方法に準じた形で行えることを基本とし、まず凍結保存液の組成の改良のみで生存率を高める条件を見出す方針で検討を行った。酵素法で継代を続けたヒト ES 細胞をコラゲ

ナーゼ処理で分散させ、遠心分離操作（1000rpm×5分）で細胞を5等分し、組成が異なる5種類の凍結保存液のそれぞれに懸濁し、クリオチューブに入れた。プログラムフリーズ容器（ナルゲン社ミスターフロスティ）に入れて一晩で-80℃まで冷却した。その後、液体窒素タンクに保存した。液体窒素保存2日以上経過後、クリオチューブを液体窒素タンクから取り出し、37℃温浴で急速解凍したものを HES 培地とともに MEF プレートに播種し、約1週間かけてコロニーの生育程度やアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定観察し、比較した。

今回検討した中では、いずれの条件でもヒト ES 細胞の生存は確認できたが、特に条件3と条件5が良好な生存率を示した。また、未分化状態を解析すべく行った ALP 活性測定の結果においても、条件3と条件5で強 ALP 活性を示すコロニーが多数確認でき、これら保存条件が使用可能なレベルにあることが示された（図3）。

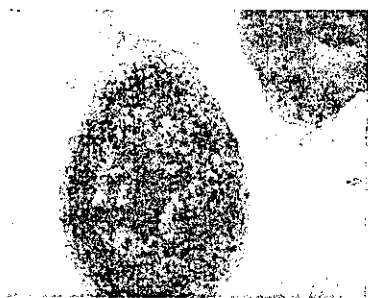


図1：アルカリフォスファターゼ活性

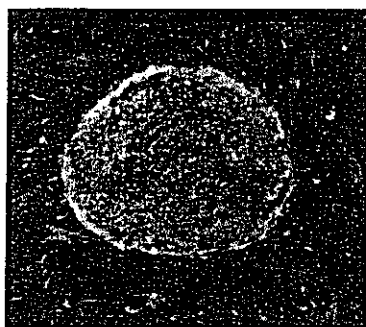


図2：SSEA-4の発現

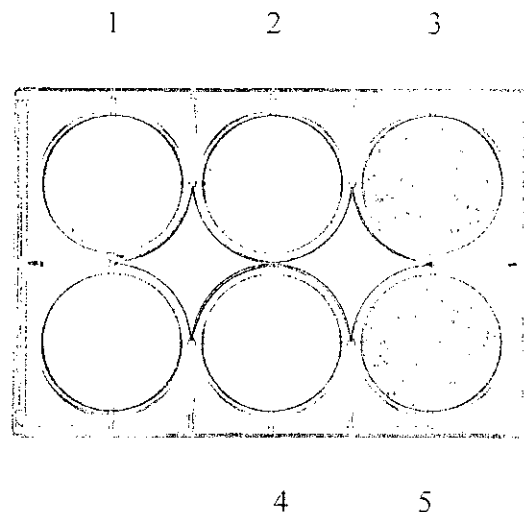


図3：凍結保存条件検討結果（ALP 活性）

D. 考察

本研究において、サル ES 細胞の未分化維持培養系を確立し、更に Fik1 陽性細胞より、内皮細胞と血管平滑筋細胞の双方を分化誘導する技術を開発した。この研究により、サル ES 細胞における“血管前駆細胞”の分化動態は、我々がこれまで明らかにしてきたマウス ES 細胞のそれと明らかに異なることが判明した。すなわち、サル ES 細胞ではフィーダー線維芽細胞上で培養された未分化の状態ですでに Fik1 を発現しており、この未分化 Fik1 陽性細胞からは血管細胞は分化誘導されなかった。この未分化 Fik1 陽性細胞をコラーゲン IV の上で8日間培養することで初めて、血管前駆細胞と呼び得る細胞（Fik1+VEカドヘリン-）が分化することを明らかにすることが出来た。ともすれば、マウスやラット等を用いた研究成果をヒトへ外推して考えてしまうが、今回の研究においてマウス ES 細胞とサル ES 細胞の差異が明らかになったことは、ES 細胞の臨床応用研究においては霊長類 ES 細胞を用いた検討が不可欠であることが示され、貴重な成果であると考えられる。また、本年度の研究でヒト ES 細胞においても維持・継代方法として酵素法が適用可能となった。また、新たに十分な生存率を確保した大量凍結保存条件を見出すこと

ができた。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

E. 結論

本研究により、サル ES 細胞において我々がマウス ES 細胞で得られた知見を基に、血管を構成する内皮細胞及び血管平滑筋細胞に分化し得る血管前駆細胞を分化誘導することに成功した。サル ES 細胞由来血管前駆細胞の分化動態は、マウス ES 細胞と異なる点が多く、その性状を明らかにできた点は今後本研究においてヒト ES 細胞からの血管前駆細胞の同定並びに同細胞を用いたヒト血管の構築を行う上で、極めて有用な情報を得ることができたと考えられる。本年度同時に、ヒト ES 細胞に関し、簡便でかつ確実な継代維持培養法及び凍結保存法を開発し得た。次年度は、これらの知見を統合し、ヒト ES 細胞を用いた血管再生への次段階の研究を展開していきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Sone, H. Itoh, J. Yamashita, T. Yurugi-Kobayashi, Y. Suzuki, Y. Kondo, A. Nonoguchi, N. Sawada, K. Yamahara, K. Miyashita, K. Park, S. Nito, M. Shibuya, S-I. Nishikawa, K. Nakao. Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. *Circulation* 2003 in press.
2. T. Takada, Y. Suzuki, Y. Kondo, N. Kadota, K. Kobayashi, S. Nito, H. Kimura, R. Torii. Monkey embryonic stem cell lines expressing green fluorescent protein. *Cell Transplantation* 11: 631-635, 2002.

2. 学会発表

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 (伊藤 裕)

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|----------------------------|-----|-------------|------|
| K. Yamahara, H. Itoh, T-H. Chun, Y. Ogawa, J. Yamashita, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, T. Yurugi-Kobayashi, K. Miyashita, H. Tsujimoto, H. Kook, R. Feil, D.L. Garbers, F. Hofmann, K. Nakao. | Significance and therapeutic potential of natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. | Proc. Natl. Acad. Sci. USA | 100 | 3404-3409 | 2003 |
| Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Yamashita J, Ogawa M, Nishikawa S, Nishikawa S-I and Nakao K. | Contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. | Blood | 101 | 2675-2678 | 2003 |
| M. Sone, H. Itoh, J. Yamashita, T. Yurugi-Kobayashi, Y. Suzuki, Y. Kondo, A. Nonoguchi, N. Sawada, K. Yamahara, K. Miyashita, K. Park, S. Nito, M. Shibuya, S-I. Nishikawa, K. Nakao. | Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. | Circulation | | in press | 2003 |
| N. Ohno, H. Itoh, T. Ikeda, K. Ueyama, K. Yamahara, K. Doi, J. Yamashita, M. Inoue, K. Masatsugu, N. Sawada, Y. Fukunaga, S. Sakaguchi, M. Sone, T. Yurugi, H. Kook, M. Komeda, K. Nakao. | Accelerated re-endothelialization with suppressed thrombogenic property and neointimal hyperplasia of rabbit jugular vein grafts by adenovirus-mediated gene transfer of C-type natriuretic peptide. | Circulation | 105 | 1623-1626 | 2002 |
| Kook H, Itoh H, Choi B-S, Sawada N, Doi K, Hwang T-J, Kim K-K, | Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro. | Am. J. Physiol. | 284 | H1388-H1397 | 2003 |

| | | | | | |
|--|---|---------------------|-----|---------|------|
| Arai H, Baik Y-H and Nakao K. | | | | | |
| K. Masatsugu, H. Itoh, T-H. Chun, T. Saito, J. Yamashita, K. Doi, M. Inoue, N. Sawada, Y. Fukunaga, S. Sakaguchi, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi, K. Nakao. | Shear stress attenuates endothelin and endothelin converting enzyme expression through oxidative stress. | Regulatory Peptides | 111 | 13-19 | 2003 |
| K. Miyashita, H. Itoh, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi, K. Nakao. | Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells. | Hypertens. Res. | 26 | S93-S98 | 2003 |
| K. Yamahara, H. Itoh, A. Yamamoto, H. Sasano, K. Masatsugu, N. Sawada, Y. Fukunaga, S. Sakaguchi, M. Sone, T. Yurugi and K. Nakao. | New diagnostic procedure for primary aldosteronism: Adrenal venous sampling under adrenocorticotrophic hormone and angiotensin II receptor blocker – Application to a case of bilateral multiple adrenal microadenomas. | Hypertens. Res. | 25 | 145-152 | 2002 |

雑誌 (小川佳宏)

| | | | | | |
|--|---|----------------------------|-----|-----------|------|
| K. Yamahara, H. Itoh, T-H. Chun, Y. Ogawa, J. Yamashita, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, T. Yurugi-Kobayashi, K. Miyashita, H. Tsujimoto, H. Kook, R. Feil, D.L. Garbers, F. Hofmann, K. Nakao. | Significance and therapeutic potential of natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. | Proc. Natl. Acad. Sci. USA | 100 | 3404-3409 | 2003 |
| T. Miyazawa, Y. Ogawa, H. Chusho, A. Yasoda, N. Tamura, Y. Komatsu, A. Pfeifer, F. Hofmann, K. Nakao. and K. Nakao. | cGMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. | Endocrinology | 143 | 3604-3610 | 2002 |
| M. Suda, K. Tanaka, A. | C-type natriuretic peptide/guanylate cyclase B | J. Bone Miner. Metab. | 20 | 136-141 | 2002 |

| | | | | | |
|---|---|------------------------|-----|-----------|------|
| Yasoda, Y. Komatsu, H. Chusho, M. Miura, N. Tamura. Y. Ogawa, K. Nakao. | system in ATDC5 cells. a chondrogenic cell line. | | | | |
| H. Kobayashi, Y. Ogawa, M. Shintani, K. Ebihara, M. Shimodahira, T. Iwakura, M. Hino, T. Ishihara, K. Ikekubo, H. Kurahachi, and K. Nakao. | A novel homozygous missense mutation of melanocortin-4 receptor (<i>MCR4R</i>) in a Japanese woman with severe obesity. | Diabetes | 51 | 243-246 | 2002 |
| H. Kobayashi, M. Hino, M. Shimodahira, T. Iwakura, T. Ishihara, K. Ikekubo, Y. Ogawa, K. Nakao, and H. Kurahachi. | Missense mutation of <i>TRPS1</i> in a family of tricho-rhino-phalangeal syndrome type III. | Am. J. Med. Genet. | 107 | 26-29 | 2002 |
| Y. Ogawa, H. Masuzaki, K. Ebihara, M. Shintani, M. Aizawa-Abe, F. Miyayaga, and K. Nakao. | Pathophysiological role of leptin in lifestyle-related diseases: studies with transgenic skinny mice overexpressing leptin. | Diabetes Complications | 16 | 119-122 | 2002 |
| Y. Fujita, M. Murakami, Y. Ogawa, H. Masuzaki, M. Tanaka, S. Ozaki, K. Nakao, and T. Mimori. | Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. | Clin. Exp. Immunol. | 128 | 21-26 | 2002 |
| K. Shimizu, K. Chin, T. Nakamura, H. Masuzaki, Y. Ogawa, R. Hosokawa, A. Niimi, N. Hattori, R Nohara, S. Sasayama, K. Nakao, M. Mishima, T. Nakamura, M. Ohi. | Plasma leptin levels and cardiac sympathetic function in patients with obstructive sleep apnoea-hypopnoea syndrome. | Thorax | 57 | 429-434 | 2002 |
| H. Ariyasu, K. Takaya, H. Hosoda, H. Iwakura, K. Ebihara, K. Mori, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. | Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: Evidenced by a specific radioimmunoassay for active form of ghrelin. | Endocrinology | 143 | 3341-3350 | 2002 |

| | | | | | |
|--|--|------------------------|----|---------|------|
| Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa, and K. Nakao. | | | | | |
| N. Sagawa, S. Yura, H. Itoh, H. Mise, K. Kakui, D. Korita, M. Takemura, M.A. Nuamah, Y. Ogawa, H. Masuzaki, K. Nakao, and S. Fujii. | Role of leptin in pregnancy-a review. | Placenta | 23 | S80-S86 | 2002 |
| T. Miyawaki, H. Masuzaki, Y. Ogawa, K. Hosoda, H. Nishimura, N. Azuma, A. Sugawara, I. Masuda, M. Murata, T. Matsuo, T. Hayashi, G. Inoue, Y. Yoshimasa, and K. Nakao. | Clinical implications of leptin and its potential humoral regulators in long-term low-calorie diet therapy for obese humans. . | Eur. J. Clin. Nutr. | 56 | 593-600 | 2002 |

雑誌 (中山泰秀)

| | | | | | |
|--|--|---------------------------|-----|-----------|------|
| Y. Nakayama, S. Nishi, H. Ueda- Ishibashi, T. Matsuda. | Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performances. | J. Biomed. Mater. Res. | 64A | 52-61 | 2003 |
| W.G. Brodbeck, G. Voskerician, N.P. Ziats, Y. Nakayama, T. Matsuda, J. M. Anderson. | In vivo leukocyte cytokine mRNA response to biomaterials are dependent on surface chemistry. | J. Biomed. Mater. Res. | 64A | 320-329 | 2003 |
| Y. Nakayama, M. Sudo, K. Uchida, T. Matsuda. | Spatio-resolved hyperbranched graft polymerized surfaces by iniferter-based photograft copolymerization. | Langmuir | 18 | 2601-2606 | 2002 |
| H. Sonoda, S. Urayama, K. Takamizawa, Y. Nakayama, C. Uyama, H. Yasui, T. Matsuda. | Compliant design of artificial graft compliance determination by new digital x-ray imaging system-based method. | J. Biomed. Mater. Res. | 60 | 191-195 | 2002 |
| H. Okino, Y. Nakayama, M. Tanaka, T. Matsuda. | In situ hydrogelation of photocurable gelatin and drug release. | J. Biomed. Mater. Res. | 59 | 233-245 | 2002 |
| S. Yasuda, T. Noguchi, M. Gohda, T. Arai, N. Tsutsui, Y. | Local delivery of low dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a | Cardiovas. Res. | 53 | 481-486 | 2002 |

| | | | | | |
|--|--|----------------------------|----|-------------|------|
| Nakayama, T. Matsuda, H. Nonogi | ballon-injured rabbit iliac artery model. | | | | |
| T. Kawada, Y. Nakayama, C. Zheng, S. Ohya. K. Okuda, K. Sunagawa. | A novel photocurable insulator material for autonomic nerve activity recording. | Biomaterials | 23 | 3169-3174 | 2002 |
| W.G. Brodbeck, J. Patel, G. Voskerician, E. Christenson, M.S. Shive, Y. Nakayama, T. Matsuda, N.P. Ziats, J.M. Anderson. | Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo. | Proc. Natl. Acad. Sci. USA | 99 | 10287-10292 | 2002 |
| T. Magoshi, H. Ziani-Cherif, S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda | Thermoresponsive heparin coating: heparin conjugated with poly(N-isopropylamide) at one terminus | Langmuir | 18 | 4862-4872 | 2002 |
| S. Yasuda, M. Kanna, S. Sakuragi, S. Kojima, Y. Nakayama, S. Miyazaki, T. Matsuda, K. Kangawa, H. Nonogi. | Local delivery of single low-dose of C-type natriuretic peptide, an endogenous vascular modulator, inhibits neointimal hyperplasia in balloon-injured rabbit iliac artery model. | J. Cardiovas. Phram. | 39 | 784-788 | 2002 |
| W.G. Brodbeck, Y. Nakayama, T. Matsuda, E. Colton, N.P. Ziats, J.M. Anderson. | Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro. | Cytokine | 18 | 311-319 | 2002 |

雑誌 (仁藤新治)

| | | | | | |
|--|--|----------------------|----|----------|------|
| M. Sone, H. Itoh, J. Yamashita, T. Yurugi -Kobayashi, Y. Suzuki, Y. Kondo, A. Nonoguchi, N. Sawada, K. Yamahara, K. Miyashita, K. Park, S. Nito, M. Shibuya, S-I. Nishikawa, K. Nakao. | Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. | Circulation | | in press | 2003 |
| T. Takada, Y. Suzuki, Y. Kondo, N. Kadota, K. Kobayashi, S. Nito, H. Kimura, R. Torii. | Monkey embryonic stem cell lines expressing green fluorescent protein. | Cell Transplantation | 11 | 631-635 | 2002 |

20020197

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.30-P34の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。