

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

遺伝子導入の時間・空間・量を厳密に制御できる次世代型  
ベクターの分子設計と遺伝子導入デバイスの総合開発

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中山 泰秀

平成15（2003）年3月

# 目 次

## I 総括研究報告書

遺伝子導入の時間・空間量を厳密に制御できる次世代型ヘクターの分子設計と遺伝子導入テハイスの総合開発に関する研究	中山泰秀	1
---	------	---

## II 分担研究報告

1 ヘクターの骨格設計に関する研究 スター型カチオン性高分子の合成と遺伝子発現	中山泰秀	21
2 ヘクターの機能化設計に関する研究 光応答性修飾金ナノクラスターのベクターへの応用	大屋章二	39
3 ヘクターのノステム化に関する研究1 生体内吸収性合成高分子の開発	中山敦好	51
4 ベクターのシステム化に関する研究2 光硬化性ゼラチンの高機能化に関する研究	植田初江	59
5 遺伝子開発に関する研究 ES細胞 in vitro 分化系を用いた血管分化関連遺伝子の同定	山下 潤	67
6 遺伝子導入テハイスの開発に関する研究 血管内遺伝子導入テハイスの開発に関する研究	西 正吾	75
7 循環器系疾患動物モデルの作製と遺伝子治療に関する研究1 内膜肥厚 虚血疾患モデルと血管ホルモン遺伝子導入効果	伊藤 裕	85
8 循環器系疾患動物モデルの作製と遺伝子治療に関する研究2 原発性肺高血圧症 原発性高コレステロール血症に対する遺伝子治療	斯波真理子	91

III 研究成果の刊行に関する一覧表		95
--------------------	--	----

IV 研究成果の刊行物・別刷		97
----------------	--	----

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム 再生医療等研究事業）

総括研究報告書

遺伝子導入の時間・空間・量を厳密に制御できる次世代型ベクターの分子設計と  
遺伝子導入デハイスの総合開発に関する研究

主任研究者 中山泰秀 国立循環器病センター研究所 生体工学部 室長

研究要旨

合成高分子系ベクターの分子工学的設計として、1) 骨格設計 2) 機能化設計、3) システム設計に細分要素化して進めている。遺伝子発現の高効率化を目的とする骨格設計としてスター型カチオン性高分子を開発し、ベクターのナノ幾何学的構造と遺伝子発現との関係から分岐構造の有効性を明らかとした。遺伝子導入機構の制御化を目的として開発した光カチオン誘起型水溶性高分子は 光照射によって分子内にカチオンを生成でき、室温下で徐々に非イオン化できるため、遺伝子との複合体形成過程ならびに細胞内に取り込まれた後の遺伝子の放出過程の操作を可能とした。また、遺伝子の能動輸送化をめざして前段階として金ナノ粒子化ベクターを開発した。金ナノ粒子表面には先の光カチオン誘起型化合物が固定化されており、次段階とする磁性ナノ粒子化によって体内能動輸送化が獲得される。また、遺伝子を包埋 徐放化させるマトリックス材料として 光硬化性ゼラチンを合成した。遺伝子の局所送達化のために遺伝子治療に特化した血管内治療デハイス（カバーステント）の表面への遺伝子の固定化マトリックス材として有用であった。また、デハイス基材の生分解性の付与のために、生分解性ポリエステルを分子設計した。共重合組成を変化させることで柔軟性や強度など機械的性質を調節することが可能であった。また 遺伝子導入デハイスとして気管内投与デハイスを開発し 肺内への選択的導入の有効性を確かめた。遺伝子治療に有効な新しい遺伝子の開発を併行して行っており、ES 細胞からの内皮細胞分化に関与する遺伝子群を探索しつつある。さらに 臨床研究に向けた準備として、循環器系疾患（再狭窄、末梢阻血、肺高血圧症、原発性高コレステロール血症など）の動物実験モデルを作製し 既存のベクターを用いた遺伝子治療を行い、最終年度に予定している前臨床研究における動物モデルとその評価系が確立できた。

分担研究者 斯波真理子  
国立循環器病センター研究所  
ハイオサイエンス部  
室長

植田初江  
国立循環器病センター  
臨床検査部 医長

大屋章二  
国立循環器病センター研究所  
生体工学部 室員

中山敦好  
産業技術総合研究所関西センター  
人間系特別研究体グリーンハイ  
研究グループ主任研究員

伊藤 裕  
京都大学大学院医学研究科  
助教授

山下 潤  
京都大学大学院医学研究科  
分子遺伝学 助教授

西 正吾  
高槻赤十字病院脳神経外科  
部長

## A 研究目的

本研究での研究体制と研究課題との相関関係を図1に示した。研究目的は、新しい合成高分子系のヘクターの開発(図2)、ならびにそれらを有効に病変部に誘導、徐放できるデハイスを開発することである。初年度は基盤技術の開発を主目的として、合

成高分子系ベクターの分子工学的設計を中心として行い、支援技術として、遺伝子開発と材料開発を行った。また、遺伝子導入デハイスと導入技術の開発を同時併行で進めた。次年度にあたる今年度では、引き続きベクター開発など初年度の課題を克服し最適化するためのフィードバック研究を推進すると同時に、臨床応用をターゲットとして循環器系疾患を対象とする動物実験モデルとその評価系を確立した。最終年度は、既に共同出願申請等によって権利化を獲得したベクターならびにデハイス関連の技術の商品化に向けて、企業への技術移転を図りつつ、臨床応用研究として、構築した動物実験モデル 評価系を用いて、ベクターの有効性を確かめる。

本年度は、合成高分子ヘクターの基本骨格として、ナノレヘルの厳密な幾何学的設計を行い、次いで機能化設計として光反応性を有する光機能性分子を組み込み、遺伝子とのコンプレックス形成過程、ならびに解離過程を任意に制御する光操作型材料の基盤分子設計を行い、遺伝子導入の時間・空間・量を厳密に制御できる高い安全性と発現効率を併せ持つ次世代型の高機能性ヘクターを開発した。

さらにヘクターと遺伝子との複合体を体内で誘導できる金や磁性ナノ粒子を遺伝子の支持担体として開発し、また、局所送達のために血管内治療デバイスや気管内投与デバイスを応用して遺伝子導入に特化した新しいデハイスを開発する。その際デハイスの材料や遺伝子の包埋担体材料として生分解性高分子材料を支援材料として開発した。

また、導入する遺伝子の探索研究を併せて行う。難治性の原発性肺高血圧症や原発

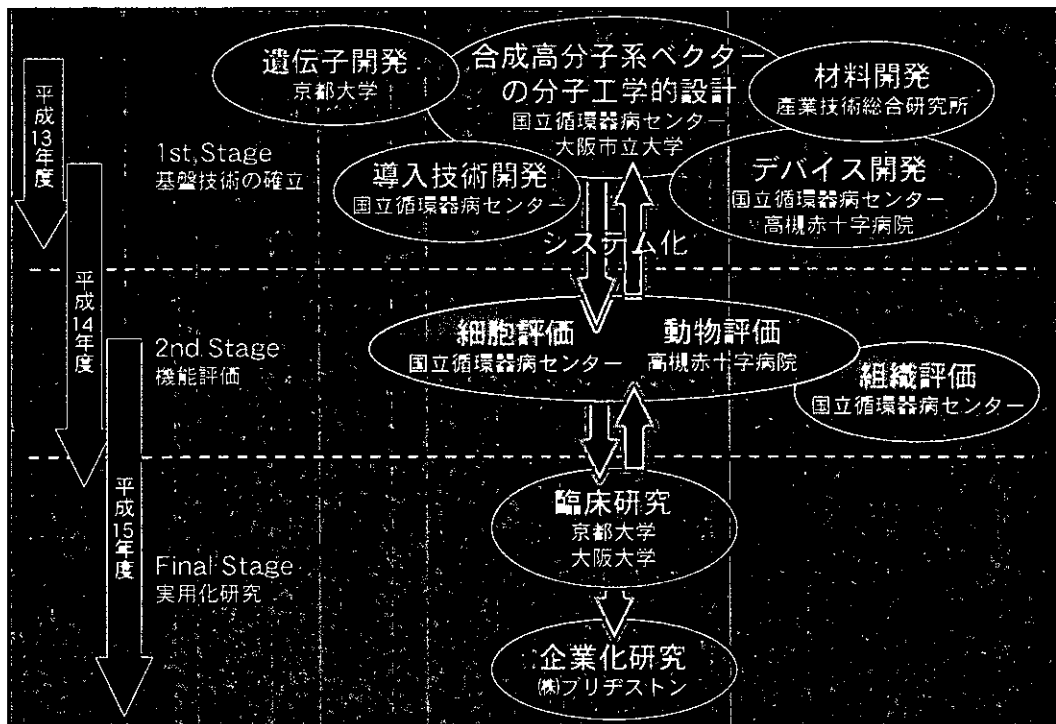


図1 本研究の研究体制ならびに研究課題の相関関係

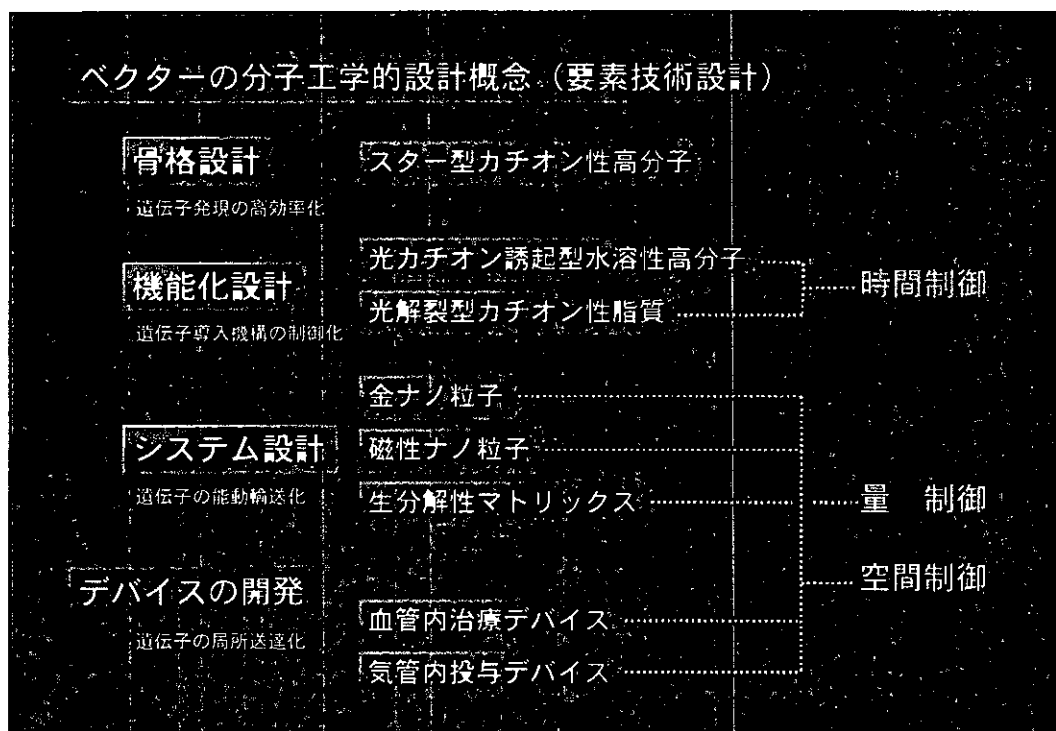


図2 合成高分子系ベクターの分子工学的設計における要素技術設計項目ならびに開発目標とする遺伝子治療デバイス

性高コレステロール血症、または内膜肥厚や阻血病変への遺伝子治療をめさして疾患動物モデルを作製し、臨床化研究を進め、商品化をめさす。

## B 研究方法

**ベクターの骨格設計** 多イニファタとしてイニファタ基を1, 3, 4, 6個有するヘンセン誘導体を合成し、シメチルアミノプロピルアクリルアミドのリヒングラシカル重合により、分岐数ならびに鎖長を厳密に制御したカチオン性高分子を合成した。DNAとの複合体形成能を調べ、遺伝子発現をCOS-1細胞を用いたルシフェラーゼ活性の測定により評価した。

**機能設計** 昨年度開発した光カチオン発生型高分子を金ナノ粒子の表面にチオール結合形成によって複合化させる。DNAとの複合体形成能を動的光散乱測定によって調べる。

**遺伝子開発** 古典的サブトラクション法による探索に加え、DANチップを用いたコランスクリプトーム解析とRNAiを用いた遺伝子機能阻害実験を組み合わせる。

**遺伝子導入デハイスの作成** ストラット周囲に薄膜でカハ化させ、エキシマレーザーにて多孔化することで多孔質カバーステントを作製し、同時併行して開発している生分解性マトリックス材料をもちいて、カハ材の内外面に遺伝子を包埋させたゲル層を固定化させる。また、気管内投与器を用いてマウス気管内への噴霧法により肺への局所送達を行い、発現量をルシフェラーゼ法にて評価する。

**臨床研究** 循環器疾患のモデルとして、モノクロタリン投与ラットおよびアポEノックアウトマウスを作成し、遺伝子治療を

行う。静脈片の動脈へのグラフト化による吻合部狭窄モデルを作成し、CNP遺伝子導入の効果、内皮再生の程度を調べる。また、下肢阻血モデルによるCNPプラスミドによる遺伝子導入効果を調べる。

### (倫理面への配慮)

研究上で倫理面に配慮すべき研究内容が生じた場合には、必要に応じて各所属施設内での倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ボランティアを必要とする研究ではインフォームドコンセントを行った上で協力をお願いする。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は各施設付属の動物管理施設にて一括管理される。

## CD 結果と考察

遺伝子導入の高効率化をめさして、分岐数ならびに鎖長を厳密に制御したスター型高分子を分子設計した(図3)。合成はイニファタリヒングラジカル重合法を用いた。イニファタ基数を1, 3, 4, 6個有するヘンセン誘導体をそれぞれ相当するハロゲン化メチル基導入体のジチオカルハミン酸塩との脱塩反応から得られ、これらをメタノール溶液中での紫外光照射により、3-(N,N-dimethylamino)propyl acrylamide を光重合させると、直鎖ならびに分岐数3, 4, 6の分岐型高分子(スター型高分子)が得られた。分岐数はイニファタの存在量によってまた鎖長は溶液条件(モノマー濃度と仕込

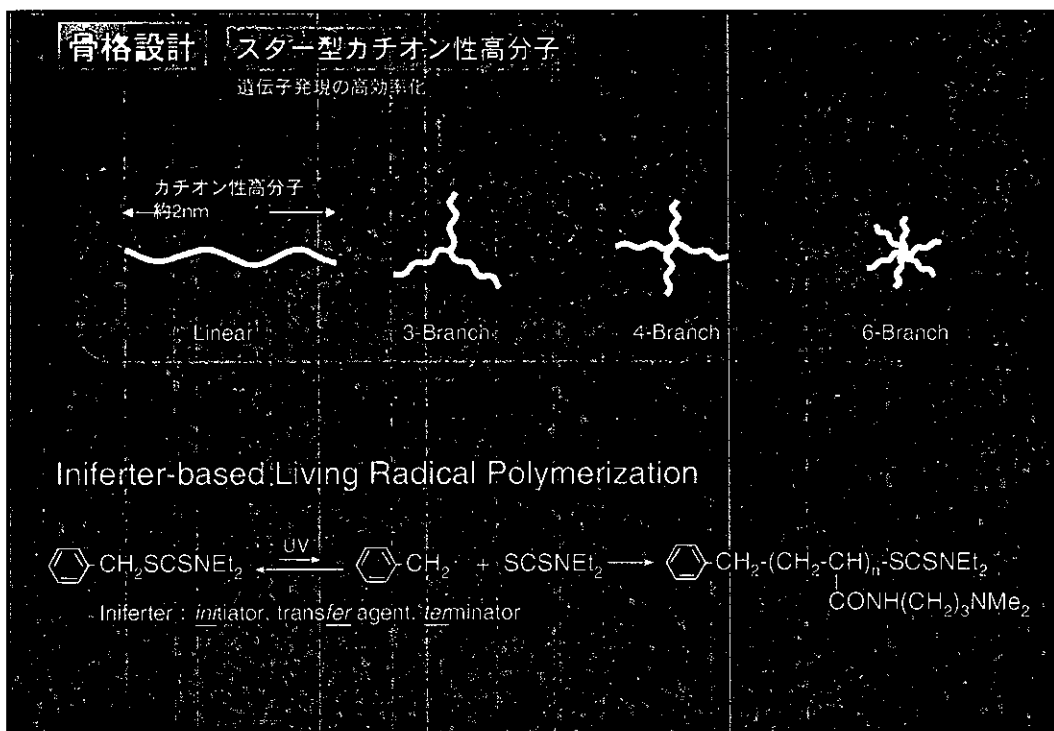


図3 合成高分子ベクターの分子工学的設計における骨格設計  
スター型カチオン性高分子の設計概念。遺伝子発現の高効率化をめさす。

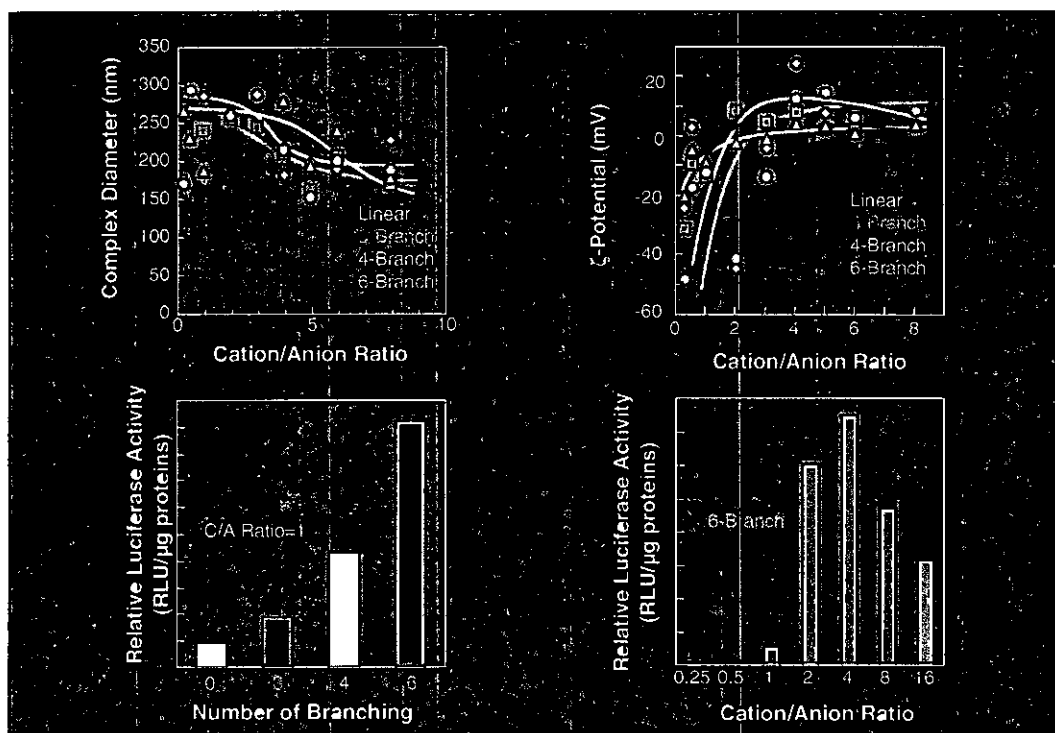


図4 スター型カチオン性高分子の DNA とのポリイオンコンプレックス形成能と  
遺伝子発現効率

み比)ならびに照射条件(強度と時間)によって調節可能であった。

分子量を約2万に調整した各スター型高分子を合成すると、これらはいずれもDNA(pGL3-control)と混合すると、ポリイオンコンプレックスを形成した(図4)。コンプレックスの粒径はカチオン(ベクター)とアニオン(DNA)との比(C/A比)が5以下では約250nmであり、C/Aが5以上で約150nmとなった。また、 $\zeta$ 電位はC/A比が4以下ではやや負電荷を有していたが、C/A比4以上で約+5mVにほぼ収束した。分岐数か変化しても、生成するコンプレックスの粒径や表面電位に大きな差はなかった。

一方、コンプレックスを培養COS-1細胞に作用させ、遺伝子発現量をLuciferase活性で評価すると、発現量のおおよその相対比は直鎖 3分岐 4分岐 6分岐=1 2 4 10となり、分岐数の増加に伴う大幅な発現量の増加を認めた。分子構造のナノ幾何学的設計は遺伝子発現の高効率化を獲得する有力な設計手段に成り得ると考えられる。

可視光照射によってカチオンを生成し、遮光条件下で元に戻る性質を持つホトクロミック分子として知られているマラカイトグリーンのアルカンチオール化誘導体MG-SHを新規に合成した(図5)。次にMG-SHの紫外光照射に対するカチオン体への異性化挙動を紫外可視吸光スペクトルを測定すると、水-DMSO系溶媒中ではまずカチオン体への光異性化はおおよそ45秒で飽和し、40℃におけるロイコ体への熱異性化は75%ほどにまで戻ることがわかった。MG-SH修飾金コロイドでも水-DMSO系溶媒中ではカチオン体への光異性化が起きることから、MG-SH修飾金コロイドはDNA存在下ではDNAとポリイオンコンプレックスを形成し

ポリイオンコンプレックスを形成した後遺伝子キャリアーとして細胞内へDNAを輸送し、熱異性化によりポリイオンコンプレックスが崩壊することによってDNAを効率的に放出することか期待される。

ベクターの分子工学的設計においてシステム設計として上記でも扱った金ナノ粒子や磁性ナノ粒子、ならびに生分解性マトリックス材料を開発した(図6)。これらによって遺伝子の能動輸送化か獲得される。

遺伝子治療に特化した遺伝子導入デハイスとして血管内治療デハイスならびに気管内投与デハイスを開発中である(図7)。ステントストラットをステンレス棒にマウントし、ポリウレタン溶液への浸漬、乾燥を繰り返すと、ポリウレタンエラストマーの薄膜か形成された。フォトマスクで照射領域を制限してエキシマレーザーを照射すると、直径100 $\mu$ mの微細孔が厳密に配置された多孔質カハーステントが作製できた。カバー材の表面に、本研究で開発した光硬化性のゼラチンと遺伝子を混合して光照射すると、カハーステント表面に生成したゼラチンゲル内に遺伝子を包埋できた。カハーステントは遺伝子を含む薬物の担持徐放担体として有用と考える。

臨床研究に向けた準備として、循環器系疾患(再狭窄、末梢阻血、肺高血圧症、原発性高コレステロール血症など)の動物実験モデルを作製し、既存のベクターを用いた遺伝子治療を行い、最終年度に予定している前臨床研究における動物モデルとその評価系か確立できた。

アデノウイルスベクターを用いた血管壁へのCNP遺伝子導入により、血管平滑筋細胞の過剰増殖を抑制することができた(図8)。さらに障害内皮の再生か促進され、抗



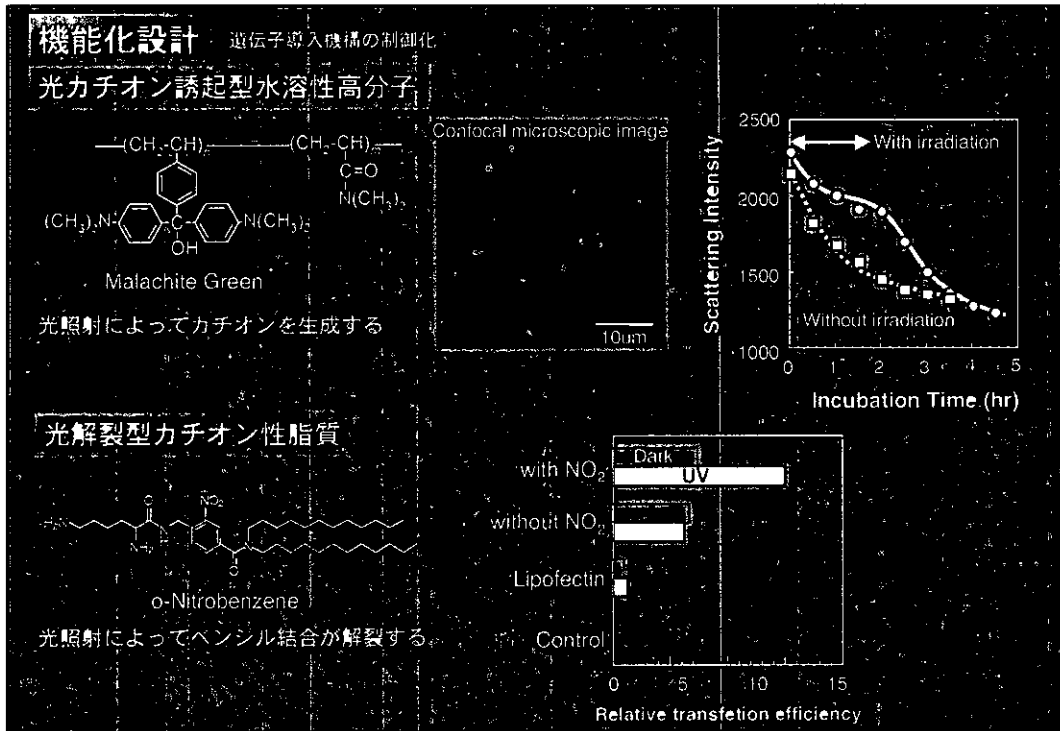


図5 合成高分子系ベクターの分子工学的設計における機能化設計。  
遺伝子導入機構の制御化をめさす。

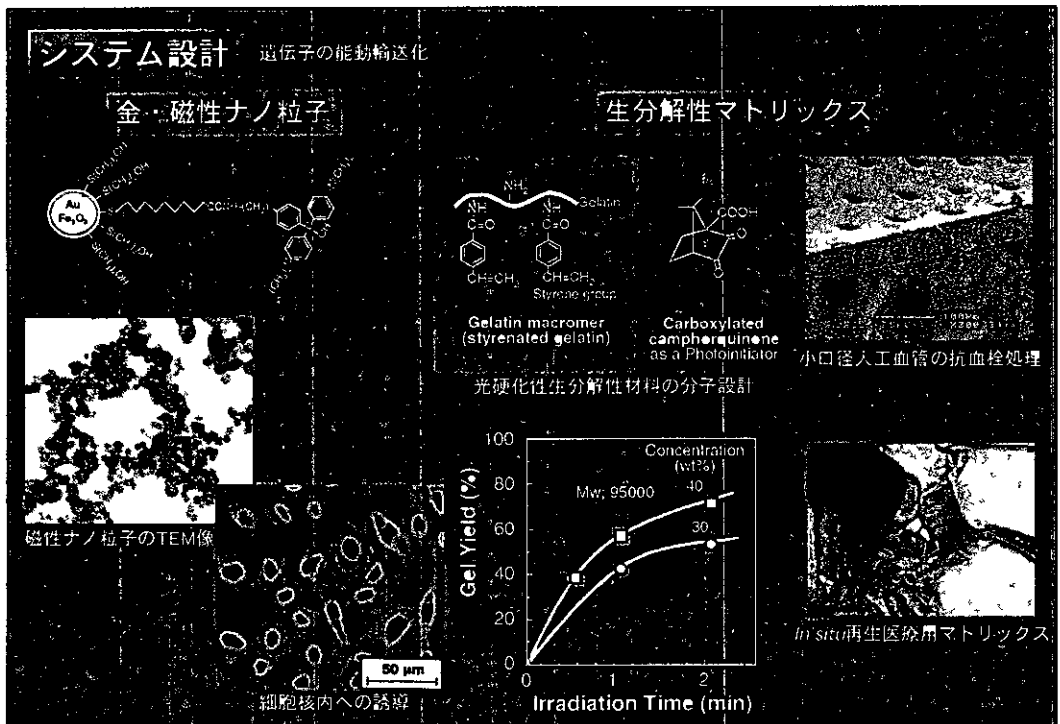


図6 合成高分子系ベクターの分子工学的設計におけるシステム設計。  
遺伝子の能動輸送化をめさす。

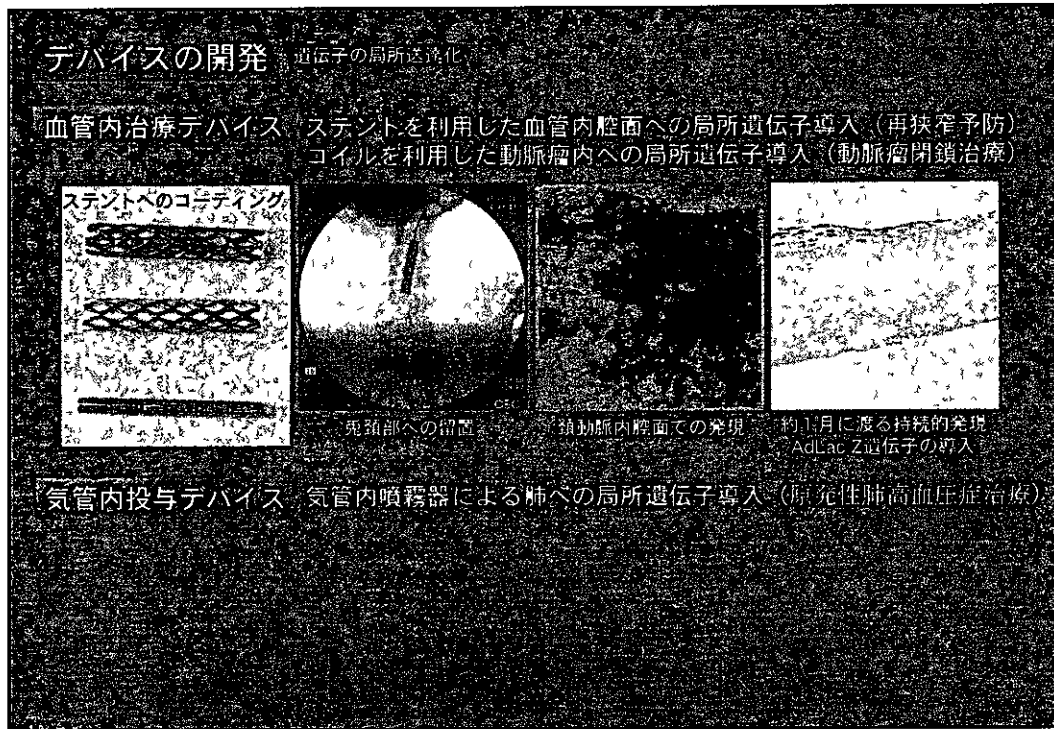


図7 遺伝子導入デハイスの開発例

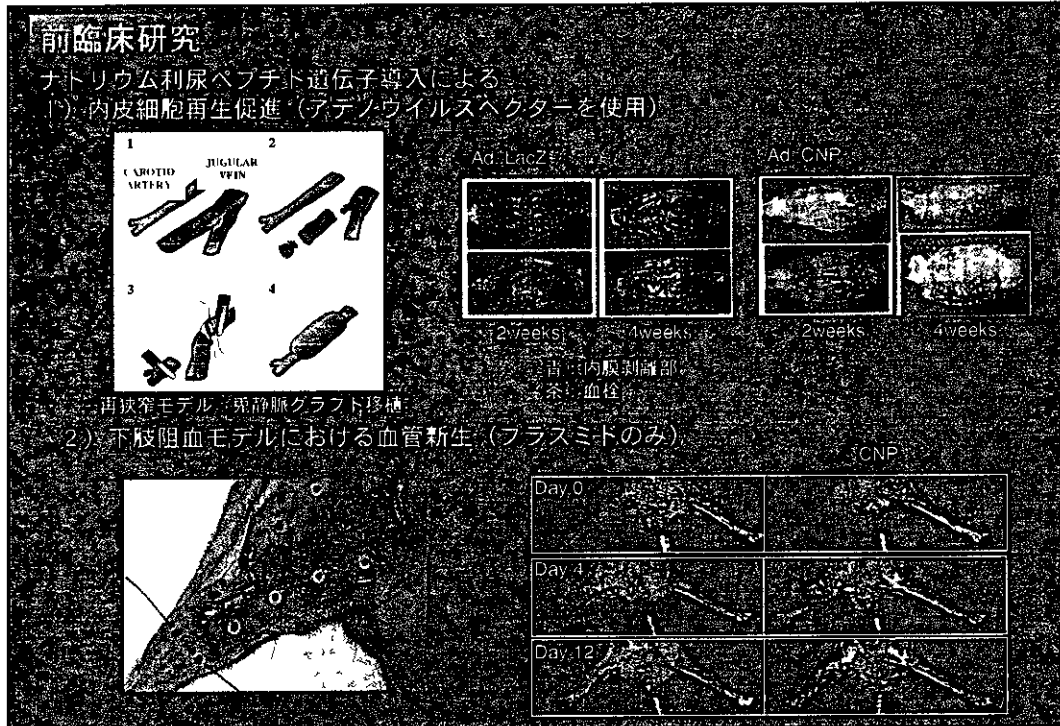


図8 前臨床研究として行った再狭窄ならびに末梢阻血症の動物実験モデルと  
 遺伝子治療評価系の確立

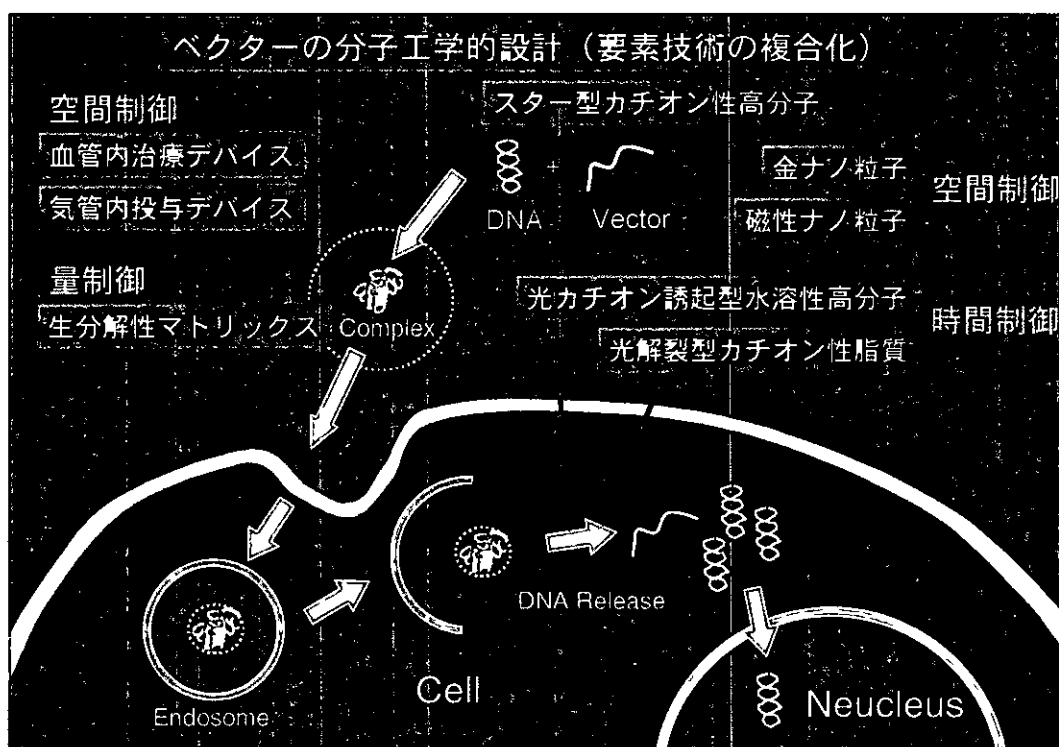


図9 ベクターの分子工学的設計における要素技術のアッセムプリング

血栓機能等内皮機能を回復でき、血管保護作用が発揮されることか示された。更に CNP プラスミトを虚血疾患モデル兎に筋注すると、血管再生が促進されることを明らかとした。

また、他の循環器疾患のモデル動物としてモノクローリン投与ラットならひにアポ E ノックアウトマウスを作製し、ポリエチレンイミンや Surfactant を組み合わせて原発性肺高血圧症や原発性高コレステロール血症の治療の有用性を示した。

前臨床研究のモデル系が作製され 本ベクターとの比較系が確立されたといえる。

## E 結論

ベクターの分子工学的設計において細分化して研究を進めている、1) 骨格設計 (スター型カチオン性高分子)、2) 機能化設計 (光カチオン誘起型水溶性高分子、光解劣

型カチオン性脂質)、3) システム設計 (金ナノ粒子、磁性ナノ粒子、生分解マトリックス) の集合化相関関係を図9にまとめた。高効率化を獲得したスター型カチオン性高分子を基本骨格として 金ナノ粒子や磁性ナノ粒子によって体内能動輸送化か獲得され、空間制御か得られた。また、別に遺伝子の局所送達を目的に開発した血管内治療デバイスや気管内投与デバイスを用いることによっても空間制御か得られた。量制御は、血管内治療デバイスの表面にゲル層として遺伝子包埋として機能できる光硬化性材料などの生分解性マトリックスの利用によって達成される。遺伝子とのポリイオンコンプレックス形成過程ならひに細胞内での遺伝子の放出過程は光カチオン誘起型水溶性高分子や光解裂型カチオン性脂質の光機能性を利用することで制御化能となり 時間制御が獲得される。以上、要素設計技

術をアッセンブリングすることで、時間・空間・量を厳密に制御できる次世代型ベクターが現実のものとなる。

分岐型カチオン性高分子は、分岐数の増加に伴って飛躍的に遺伝子発現効率を増大させることかてきた。ベクターの基本骨格には6分岐型のカチオン性高分子鎖が最適といえる。

また、マラカイトグリーンは光照射によってカチオンを可逆的に発生させることができたため、金ナノ粒子表面に修飾することで、DNA と金ナノ粒子との複合体形成が可能であった。

同時併行で進めている磁性ナノ粒子との複合化により、体外からの体内動態の磁気誘導能か獲得される。

遺伝子開発においては、ES 細胞 in vitro 分化系、DNA チップによる網羅的遺伝子解析、siRNA による in vitro 遺伝子機能解析の3つを組み合わせることて、細胞分化の分子機構に新たな可能性を与える有力な新手法を提供てきた。

また、遺伝子導入デバイスとしてカハーステントを提案し、開発した生分解性マトリックス材料を用いてモデルとした薬物の包埋放出能か獲得され、動脈瘤治療への適用を可能とした。遺伝子の局所送達か可能な新規デバイスといえる。

さらに、アデノウイルスを用いた系てはあるか、血管壁へのCNP 遺伝子導入により血管平滑筋細胞の過剰増殖が抑制されるのみならず 障害内皮の再生を促し、血管保護作用か発揮させることか示された。さらに、CNP プラスミトの虚血部への筋注によって血管再生の促進を明らかとした。本研究て開発したベクターを用いることて更なる有効性の向上か期待される。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### 1 論文発表

- 1 Y Nakayama, M Sudo, K Uchida, T Matsuda, Spatio-resolved hyper-branched graft polymerized surfaces by iniferter-based photograft copolymerization, *Langmuir*, 2002, 18, 2601-2606
- 2 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
- 3 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
- 4 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
- 5 T Kawada, Y Nakayama, C Zheng, S Ohya, K Okuda, K Sunagawa, A novel photocurable insulator materi-

- al for autonomic nerve activity recording, *Biomaterials*, 2002, 23, 3169-3174
- 6 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
  - 7 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
  - 8 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
  - 9 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
  - 10 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
  - 11 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
  - 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, Photocrosslinking 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 com-

- pliance 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
  - 18 H Sashiwa, N Kawasaki, A Nakayama, E Muraki, N Yamamoto, I Arvanitoyannis, H Zhu, S Aiba, "Chemical modification of chitosan 12 Synthesis of organo-soluble chitosan derivatives toward palladium adsorbent for chemical plating", *Chem Lett*, 598-599 (2002)
  - 19 H Sashiwa, N Kawasaki, A Nakayama, E Muraki, N Yamamoto, H Zhu, H Nagano, Y Omura, H Saimoto, Y Shigemasa, S Aiba, "Chemical modification of chitosan 13 Synthesis of organo-soluble, palladium adsorbable, and biodegradable chitosan derivatives toward the chemical plating on plastics", *Biomacromolecules*, 3, 1120-1125 (2002)
  - 20 H Sashiwa, N Kawasaki, A Nakayama, E Muraki, N Yamamoto, S Aiba, "Chemical modification of chitosan 14 Synthesis of water-soluble chitosan derivatives by simple acetylation", *Biomacromolecules*, 3, 1126-1128 (2002)
  - 21 H Sashiwa, N Kawasaki, A Nakayama, E Muraki, S Aiba, "Dissolution of chitosan in hexafluoro-2-propanol", *Chitin and Chitosan Research*, 8, 249-251 (2002)
  - 22 H Sashiwa, S Fujishima, N Yamano, N Kawasaki, A Nakayama, E Muraki, K Hiraga, K Oda, S Aiba, "Production of N-acetyl-D-glucosamine from  $\alpha$ -chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330", *Carbohydr Res*, 337, 761-763 (2002)
  - 23 S Privsa-Art, A Nakayama, N Kawasaki, N Yamamoto, S Aiba, "Biodegradability study of copolyesteramides based on diacid chlorides, diamine, and diols", *J Appl Polym Sci*, 85, 774-784 (2002)
  - 24 T Yurugi-Kobayashi, H Itoh, J Yamashita, K Yamahara, H Hirai, T Kobayashi, M Ogawa, S Nishikawa, S I Nishikawa and K Nakao Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage *Blood In press*
  - 25 N Ohono, 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 reendothelialization 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
- 26 K Doi, T Ikeda, H Itoh, K Ueyama, K Hosoda, Y Ogawa, J Yamashita, T H Chun, M Inoue, K Masatsugu, N Sawada, Y Fukunaga, T Saito, M Sone, K Yamahara, H Kook, M Komeda, M Ueda, K Nakao C-type natriuretic peptide induces redifferentiation of vascular smooth muscle cells with accelerated reendothelialization **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 21 930-936, 2001
- 27 N Sawada, H Itoh, J Yamashita, K Doi, M Inoue, K Masatsugu, Y Fukunaga, S Sakaguchi, M Sone, K Yamahara, T Yurugi, K Nakao cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA **Biochem Biophys Res Commun** 280 798-805, 2001
- 28 T Saito, H Itoh, T H Chun, Y Fukunaga, J Yamashita, K Doi, T Tanaka, M Inoue, K Masatsugu, N Sawada, S Sakaguchi, H Arai, M Mukoyama, K Tojo, T Hosoya, K Nakao Coordinate regulation of endothelin and adrenomedullin secretion by oxidative stress in endothelial cells **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 281 H1364-71, 2001
- 29 Y Fukunaga, H Itoh, K Doi, T Tanaka, J Yamashita, T H Chun, M Inoue, K Masatsugu, N Sawada, T Saito, K Hosoda, H Kook, M Ueda, K Nakao Thiazolidinediones, peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists, regulate endothelial cell growth and secretion of vasoactive peptides **Atherosclerosis** 158 113-9, 2001
- 30 J Yamashita, H Itoh, M Hirashima, M Ogawa, S Nishikawa, T Yurugi, M Naito, K Nakao and S I Nishikawa Flk1 positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors **Nature** 408 92-96, 2000
- 31 N Ohno et al 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
- 32 K Masatsugu et al Shear stress attenuates endothelin and endothelin converting enzyme expression through oxidative stress **Regulatory Peptides** 111, 13-19, 2003
- 33 K Miyashita et al Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells **Hypertens Res** 26 S93-S98 2003
- 34 K Yamahara et al Significance and therapeutic potential of natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular

- regeneration *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 in press
- 35 H Kook et al Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro *Am J Physiol* 2003 in press
- 36 Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A Clinical features and genetic analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia *J Clin Endocrinol Met* in press
- 37 Harada-Shiba M, Yamauchi K, Harada A, Takamisawa I, Shimokado K, Kataoka K Polyion complex micelles as vectors in gene therapy Pharmacokinetics and *in vivo* gene transfer *Gene Therapy* 9 407-414, 2002
- 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、機能性セラチンの分子設計 オリゴスチレン化セ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ヒ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 舩田健、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, Takamisawa K, Biotubes prepared in recipient's 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 光硬化性セ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 医療デハイスの光表面設計 プロトント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) 化セ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 舛田健、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 感温性セラチンの *in situ* ケル硬化性 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ハーステントの開発、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、高機能カハーステント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さすハ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、高機能カハーステントの実験的動脈瘤への応用-薄膜カハーステント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、マツタ武久、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 感温ケル化性 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、高機能カハーステントの実験的動脈瘤への応用、薄膜カハーステント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、ハ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 大屋章二、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 感温性セ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、大屋章二、中山泰秀、巽英介、北村物一郎、

- 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 I, 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 I, 353, 2003）
- 39 中山敦好、川崎典起、山野尚子、山本 襄、相羽誠一 ウレタン結合の生分解性、高分子学会年次大会（H14 5）
- 40 中山敦好 生分解性プラスチックの適正使用のための分解菌データベース作成 産技連物質工学部会高分子分科会（H14 11）
- 41 中山敦好、川崎典起、山本 襄 耐熱性生分解性高分子ナイロン4の開発、AIST講演会（H14 11）
- 42 A Nakayama, N Kawasaki, N Yamano, N Yamamoto, S Murakami\* and S Aiba, Biodegradability of Urethane bonds, IUPAC symposium（H14 12）
- 43 N Yamano, A Nakayama, N Kawasaki, N Yamamoto, and S Aiba Nylon-4 Degradation by Bacteria Isolated from Activated Sludge, IUPAC symposium（H14 12）
- 44 中山敦好、生分解性プラスチックのデータベース構築、関西バイオポリマー研究会(H15 1)
- 45 Keystone Symposia 2002 Angiogenesis in Cancer and Other Diseases Feb 9, 2002 Banf CANADA (Invited lecture)
- 46 第39回臨床分子医学会 3月1日 大阪
- 47 第67回日本循環器学会 4月26日 札幌
- 48 国際 vascular biology 学会 2002 5月13日、軽井沢
- 49 第25回日本高血圧学会モーニングセッション 10月13日、東京
- 50 第43回日本脈管学会 11月7日 東京
- 51 American Heart Association Scientific Meeting 2002 Nov 17, 2002 Chicago, USA
- 52 H Itoh et al Natriuretic peptides induce regeneration of endothelial cells both in vivo and in vitro 19th

- Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2002 6 23-27 (Prague, Czech Republic)
- 53 N Sawada Direct phosphorylation and protein kinase and its implication in hypertension and hypertensive vascular remodeling 19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension 2002 6 23-27 (Prague, Czech Republic)
- 54 K Yamahara Novel action of natriuretic peptides to accelerate ischemia-induced angiogenesis 19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension 2002 6 23-27 (Prague, Czech Republic)
- 55 T Yurugi Embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells as promising cell sources for vascular regeneration therapy 19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension 2002 6 23-27 (Prague, Czech Republic)
- 56 H Itoh Potentials of embryonic stem (ES) cell-derived vascular progenitor cells (VPC) in vascular regeneration medicine 12th International Vascular Biology Meeting 2002 5 12-16 (Karuzawa)
- 57 N Sawada Direct phosphorylation and inactivation of small GTPase RhoA by cGMP-dependent protein kinase and its implication in hypertension and atherosclerosis 12th International Vascular Biology Meeting 2002 5 12-16 (Karuzawa)
- 58 J Yamashita In vitro differentiation of cardiomyocytes from embryonic stem cell-derived FLK1-positive vascular progenitor cells 12th International Vascular Biology Meeting 2002 5 12-16 (Karuzawa)
- 59 T Yurugi Contribution of embryonic stem (ES) cell-derived vascular progenitor cells (VPC) to adult neoangiogenesis 12th International Vascular Biology Meeting 2002 5 12-16 (Karuzawa)
- 60 K Yamahara Novel action of natriuretic peptides to accelerate ischemia-induced angiogenesis 12th International Vascular Biology Meeting 2002 5 12-16 (Karuzawa)
- 61 N Sawada Direct phosphorylation and inactivation of small GTPase RhoA by cGMP-dependent protein kinase and its implication in hypertension and atherosclerosis American Heart Association 75th Scientific Sessions 2002 11 17-20 (Chicago, USA)
- 62 T Yurugi Contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage American Heart Association 75th Scientific Sessions 2002 11 17-20 (Chicago USA)
- 63 T Yamahara Therapeutic potentials of natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular re-