

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

細胞機能・組織修復・再生のナノ・マニピュレーション：

生体機能材料のナノ設計・ナノ加工技術および医療応用

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松田 武久

平成15（2003）年 4月

## 目次

### I. 総括研究報告

- 細胞機能・組織修復・再生のナノ・マニピュレーション：  
生体機能材料のナノ設計・ナノ加工技術および医療応用 . . . . . 1  
松田武久

### II. 分担研究報告

1. ナノカプセル技術を用いた血管形成術後の再狭窄 . . . . . 15  
予防法の開発  
下川宏明
2. 機能的ナノ生体材料 . . . . . 20  
片山佳樹
3. Photocurable Liquid Biodegradable Copolymer: Synthesis of . . . . . 27  
Acrylate-*end*capped Trimethylene Carbonate-based Copolymers,  
Photocuring and Hydrolytic Behaviors  
新名主輝男
4. 電界紡糸 (electrospinning) 法による機能的人工細胞外 . . . . . 30  
マトリックス・骨格基材のナノ設計・ナノ加工とそのマイ  
クロデバイス化技術の開発  
木戸秋悟
5. 新しい設計概念による遺伝子キャリア . . . . . 36  
新海征治
6. ナノ表面加工技術とナノ構造表面 . . . . . 40  
高原淳
7. 感温性人工細胞外マトリックスの応用：温度感応性 . . . . . 44  
高分子を用いたターゲット細胞の培養下 *in situ* 選別回収  
藤井康雄

8. 人工細胞外マトリックスによる再生軟骨組織工学 . . . . .	47
岩本幸英	
9. 人工細胞外マトリックスのナノ超分子構造体による . . . . .	51
ドラッグ・デリバリーシステム	
田中雅夫	
10. ナノ加工技術による血管壁組織工学 . . . . .	56
安井久喬	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	60
IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . .	64

## 厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

### 総括研究報告書

#### 細胞機能・組織修復・再生のナノ・マニピュレーション： 生体機能材料のナノ設計・ナノ加工技術および医療応用

主任研究者 松田 武久（九州大学大学院医学研究院医用工学教授）

**研究要旨：**本研究では、(1)組織修復・再構築を迅速に可能にする機能材料の創製とナノスケール加工技術の開発とデバイス化、および(2)細胞内異常シグナルに应答して細胞機能の制御を行うナノカプセルおよび DNA/多糖の精緻なナノ複合体の開発を行い、(1)・(2)を組み合わせて、循環器疾患、癌疾患および再生医療（血管・軟骨）に新しい治療デバイス・バイオアクティブ材料と医療技術の基盤を確立しつつある。

#### (1) 再生医療に必須の人工骨格基材および人工細胞外マトリックスの設計とナノ加工技術

- 精密合成技術を駆使した温度応答性および光反応性人工細胞外マトリックスによる生体外マトリックス類似のナノ構造体および液状生体適合化材料の設計と、その生分解性および細胞接着性の制御を行った。コラーゲンによる剛直性、ヒアルロン酸による保水性・耐圧縮反発性に加えて、エラスチンによる弾性性質の付与ができ、再生組織工学のマトリックスおよび骨格（Scaffold）の多様なニーズに対応できる材料とその加工技術を開発した。
- 超微細加工技術の開発：1) 独自に開発したマイクロ光造形技術（ミリレベル）に加えて、二光子光造形技術（阪大・河田研より一部技術指導）の開発による超微細立体マイクロ形状（マイクロ・レベル）の開発と組織工学の基盤技術、2) 高電圧紡糸（Electro-spinning）技術の開発によるナノレベルの超分子構造体形成（Nano-fiber, Nano-mesh, Nano-spring）のプロトタイプ技術を開発した。この技術をもとにそのマイクロデバイス化（小口径人工血管）を行った。
- 再生医療への応用に関して 1) 血管内皮前駆細胞を組み込んだ微細人工血管（上記の Nano-mesh のマイクロデバイス化）と病変血管壁の内張技術を開発した。2) ナノ加工した生体高分子由来のメッシュ型マトリックスと Nano-spring を組み込んだ耐圧縮および反発力を有する mechano-active 材料の設計とそれを組み込んだ軟骨組織工学を行った。

#### (2) ナノカプセル・ナノ超分子構造体を用いた薬剤・遺伝子送達：疾患細胞に選択的な細胞機能制御と遺伝子発現

- 細胞内シグナル伝達系の異常細胞に対して標的シグナル基質ペプチドを含有する高分子複合体（ナノカプセル）の開発：各種の細胞内プロテインキナーゼ応答型、Rho キナーゼ応答型、カスパーゼ応答型等の開発を行った。
- 機能性造影剤の開発を行った。
- 動脈硬化巣へ新しく考案する送達デバイスの開発と上記のナノカプセルおよび DNA/多糖の共らせん構造体の組織内移行及び細胞機能の manipulation を行った。

#### (3) (1)および(2)の技術・材料の組み合わせによる高効率・高精度の医療システムの確立

分担研究者	下川宏明 九州大学医学研究院 助教授
分担研究者	片山佳樹 九州大学工学研究院 助教授
分担研究者	新名主輝男 九州大学有機化学基礎研究 センター 助教授
分担研究者	木戸秋悟 九州大学医学研究院 助教授
分担研究者	新海征治 九州大学工学研究院 教授
分担研究者	高原淳 九州大学有機化学基礎研究 センター 教授
分担研究者	藤井康雄 九州大学医学研究院 助手
分担研究者	岩本幸英 九州大学医学研究院 教授
分担研究者	田中雅夫 九州大学医学研究院 教授
分担研究者	安井久喬 九州大学医学研究院 教授

#### A. 研究目的

革新的な設計概念・精密制御による分子設計、革新的加工技術によって作製した人工材料による生体組織の反応性の制御、および細胞内シグナルに応答して細胞機能を制御する

生体機能材料のナノカプセル・ナノ超分子構造体による組織修復・再構築技術は、新しい高品位の医療を近未来に提供するものと大いに期待される。このためには、ナノレベルでの材料の組成・構造およびこれらが集合した超分子構造体であるメソスコピックからナノレベルでの形状を制御できる超微細加工技術および機能付与技術の開発、これらを統合したデバイス化および医療システム化が重要と考える。

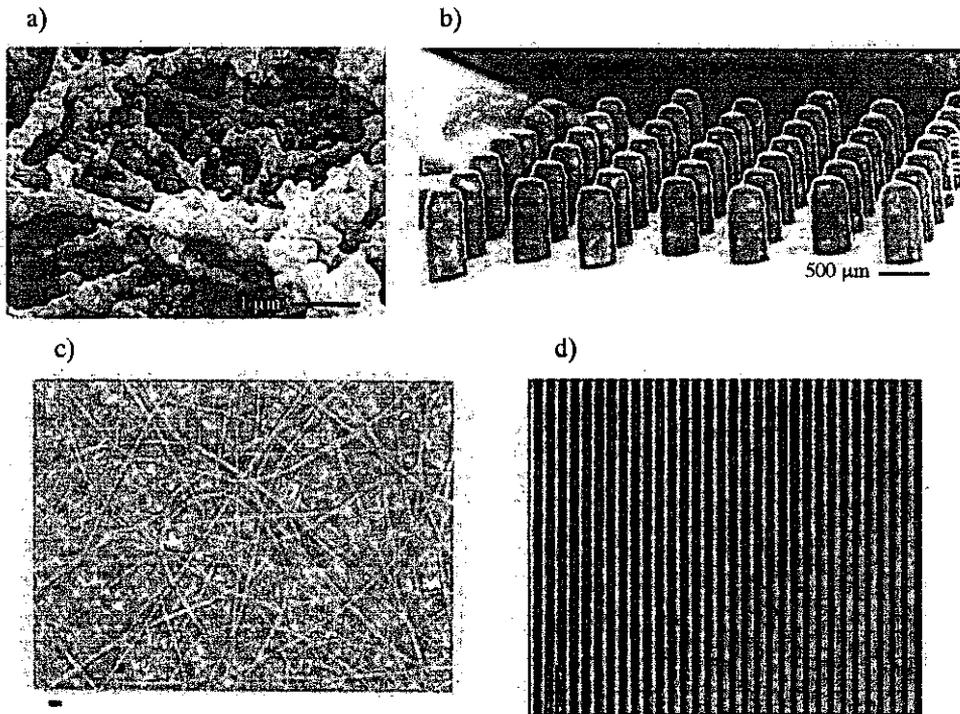
本研究の目的は、具体的には 1) 従来から独自に開発してきた精密合成技術によって、ナノ組成・ナノ構造を制御し、細胞の接着・非接着および生分解性を高精度で制御した機能的生体材料（人工骨格、人工細胞外マトリックス、液状生分解性材料）の開発、2) 新しく開発しているナノ加工技術（二光子光造形技術、高電圧紡糸技術）による超分子構造化と形状制御、3) 全く新しい概念による細胞機能を制御するナノカプセル（特定の細胞内シグナルに応答して活性を制御あるいは増大あるいは遺伝子発現させる）、および精密立体構造化した多糖・核酸の共らせん複合体による遺伝子導入、4) これらをシステム化した新しい医療技術の開発である。本研究によって、病的細胞のみに作用して、多様な細胞機能を多面的に制御することによって組織修復（動脈硬化・癌）、および新しい加工技術と材料による三次元組織体形成による再生医療が可能になる。これによって国内外に例をみない、全く新規で高効率・高精度・高品位の医療を提供できる。また、本技術の産業への応用および製品化による産業化活性化を促進できると大いに期待できる。産業界からは産学連携機構九州、新産業技術研究所（福岡）、東海メディカル（株）（名古屋）、鍾ヶ淵化学（大阪）、三洋化成工業（株）（京都）、新田ゼラチン（大阪）が参加している。

## B. 研究方法、研究結果および考察

(1) ナノレベルでの細胞外マトリックス・人工骨格：本研究では、生体エラスチンの低分子量体の光重合性付与およびエラスチン構造の繰り返しアミノ酸配列の合成オリゴペプチドの両末端に光重合（反応）性基を導入したものを作製した（松田・新名主・高原）。国内外に先駆けて多様な光反応性バイオマテリアル技術の開発と表面生体適合化技術および感温性および感光性人工細胞外マトリックスの分子設計とナノスケールの超分子構造化（松田・木戸秋）（図 a）を行った。既に開発している液状生分解性プレポリマーの surface erosion 機構による生分解性制御と高速光硬化を可能にする分子パラメータを設定した（新名主・松田）。新しい液状生分解性高分子の開発と光造形技術による三次元微細立体マイクロ構造化（松田・新名主・木戸秋）（図 b）を行った。

(2) 超微細ナノ加工技術：自作した高電圧紡糸装置により、生体高分子、合成高分子の超微細紡糸（数十～数百ナノメートル径）およびそのマクロ構造（メッシュ・チューブ）を形成する技術を完成させた（木戸秋・高原：例：図 c）。また、二光子光造形技術を改良して三次元立体構造体を上記の液状光反応性材料によって作製した（例：図 d）。以上の機能材料を組み合わせることで組織再生を行った。再生軟骨の人工骨格基材として上記で作製した nano-spring（岩本）、微小血管は筒状ナノメッシュ（安井）を作製した。一部、動物実験にて検証しつつある。

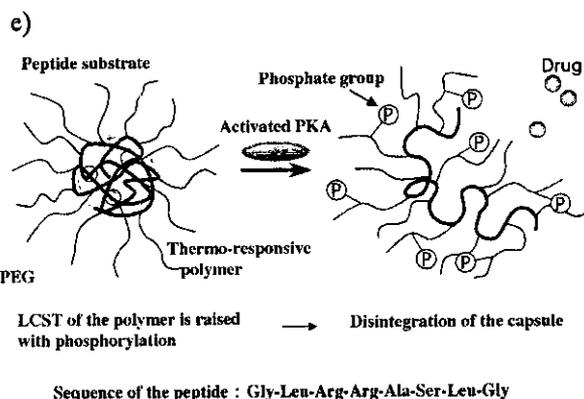
(3) ナノカプセルの創製と医療への応用：細胞内伝達系の異常シグナルを発生している細胞を感知して、これらの病的細胞にのみ選択的に薬剤・遺伝子を送達するナノカプセルを作製した。具体的には、プロテインキナーゼ・Rho-kinase の活性が亢進している細胞



高電圧紡糸法によるエラスチン重合体の繊維加工（試作）：径50 nm、スケールは1 μm.



多光子重合法による光反応性ゲルの微細格子加工



### リン酸化反応性薬物ナノカプセルの設計概念

を感知するナノカプセルのプロトタイプが既に得られた (図 e)。内皮細胞剥離部位を感知する機能化造影剤の開発 (片山・下川)、抗癌剤含有ナノカプセルによる動脈硬化病変形成の予防・治療 (下川・片山)、差分接着能マトリックスの概念提出と実用化 (血管前駆細胞の選別・純化技術の開発とハイブリッド内膜の内張技術) (松田・藤井・下川) を行った。

#### 倫理面への配慮：

動物実験に関しては動物愛護に十分に配慮し、綿密なる実験計画により実験量を必要最小限にし、大学の動物実験委員会の審査を受け、ヒトへの応用に関しては、学内での倫理委員会の審査を受ける予定であるが、本年度は該当しない。

#### C. 結論

可視光照射による硬化と生分解性の表面制御 (Surface Erosion) のできる液状光反応性生体適合材料、マイクロ・レベルの光造形技術およびより超微細な二光子光造形技術は国内外に例がない。また、高電圧紡糸 (Electro-spinning) 自作装置を用いる人工細胞外マトリックスのナノ fiber、およびそれらの積層したナノ mesh および三次元化によるマイクロ筒状構造体形成の技術の開発は全く新しい加工技術を提供し、再生医療の

platform 又は scaffold を提供できる独創的技術であり、材料の機能性およびマイクロ・ナノ加工技術では国際的にも大幅にリードしている。組織特性 (透過性の充進、内皮剥離、プロテインキナーゼ活性化、等) を感知するナノカプセルに、任意の薬剤や遺伝子を組み込んで動脈硬化組織にのみ送達する研究を実際に行っているのは、国内外で我々の研究グループ (下川・片山) のみであり、抗増殖薬を選択的に送達することにより、バルーン傷害後の再狭窄病変が著明に抑制される実験結果を得た。

#### D. 健康危険情報

現在のところ、該当なし。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 主任研究者：松田 武久

1. H. Ziani-Cherif, Y. Abe, K. Imachi, T. Matsuda. Visible-light-induced surface graft polymerization via camphorquinone impregnation technique. J Biomed Mater Res 2002, 59: 386-389.

2. T. Matsuda. Device-directic drug delivery systems. Journal of Controlled release 2002, 78, 125-131.

3. T. Matsuda, H. He. Newly Designed Compliant Hierarchic Hybrid Vascular Grafts Wrapped

- with a Microprocessed Elastomeric Film (I): Fabrication Procedure and Compliance Matching. *Cell Transplantation* 2002, Vol. 11, 67-74.
4. H. He and T. Matsuda. Newly designed compliant hierarchic hybrid vascular graft wrapped with microprocessed elastomeric film (II) Morphogenesis and compliance change upon implantation. *Cell Transplantation* 2002, Vol. 11, 75-87.
  5. H. He and T. Matsuda. Arterial Replacement with Compliant Hierarchic Hybrid Vascular Graft: Biomechanical Adaptation & Failure. *Tissue Engineering* 2002, Vol. 8 (2): 213-224.
  6. M. Mizutani and T. Matsuda. Photocurable Liquid Biodegradable Copolymers: In vitro Hydrolytic Degradation Behaviors of Photocured Films of Coumarin-Endcapped Poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-trimethylene carbonate). *Biomacromolecules* 2002, 3(2): 249-255.
  7. Y. Nakayama, M. Sudo, K. Uchida, and T. Matsuda. Spatio-Resolved Hyperbranched Graft Polymerized Surfaces by Iniferter-Based Photograft Copolymerization. *Langmuir* 2002, 18: 2601-2606.
  8. N. Morikawa and T. Matsuda. Thermoresponsive Artificial Extracellular Matrix: N-Isopropylacrylamide-Graft-Copolymerized-Gelatin. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* 2002, 13 (2), 167-183.
  9. M. Mizutani and T. Matsuda. Liquid Photocurable Biodegradable Copolymers: In Vivo Degradation of Photo cured Poly( $\epsilon$ -Caprolactone-co-Trimethylene Carbonate). *J Biomed Mater Res* 2002, 61: 53-60.
  10. K. Takamizawa, K. Shoda and T. Matsuda. Pull-out mechanical measurement of tissue-substrate adhesive strength: Endothelial cell monolayer sheet formed on a thermoresponsive gelatin layer. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* 2002, 13(1): 81-94.
  11. T. Matsuda, T. Magoshi, H. Ziani-Cherif, S. Ohya, Y. Nakayama. Thermoresponsive heparin coating: heparin conjugated with poly(*N*-isopropylacrylamide) at one terminus. *Langmuir* 2002, 18 (12): 4862-4872.
  12. M. Mizutani, Steven C. Arnold, T. Matsuda. Liquid, Phenylazide-Endcapped Copolymers of  $\epsilon$ -Caprolactone and Trimethylene Carbonate: Preparation, Photocuring Characteristics and Surface Layering. *Biomacromolecules* 2002, 3(4): 668-675.
  13. W. G. Brodbeck, J. P. G. Voskerician, E. Christenson, M. S. Shive, Y. Nakayama, T. Matsuda, N. P. Ziats, and J. M. Anderson. Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo. *PNAS* 2002, 99 (16): 10287-10292.
  14. T. Matsuda and T. Magoshi. Preparation of Vinylated Polysaccharides and Photofabrication of Tubular scaffolds as Potential Use in Tissue Engineering. *Biomacromolecules* 2002, 3 (5): 942-950.
  15. T. Magoshi and T. Matsuda. Formation of Polymerized Mixed Heparin/Albumin Surface Layer and Cellular Adhesion Responses. *Biomacromolecules* 2002, 3 (5): 976-983.
  16. 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 (6): 311-319.
  17. M. Mizutani and T. Matsuda. Liquid Acrylate-Endcapped Biodegradable Poly( $\epsilon$ -Caprolactone-co-Trimethylene Carbonate) (I): Preparation and Visible-Light-Induced Photocuring Characteristics. *J Biomed Mater Res* 2002, 62: 387-394.
  18. T. Matsuda and M. Mizutani. Liquid-Acrylate-Endcapped Biodegradable Poly( $\epsilon$ -Caprolactone-co-Trimethylene Carbonate) (II):

- Computers-aided Stereolithographic Microarchitectural Surface-Photoconstructs. *J Biomed Mater Res* 2002, 62:395-403.
19. S. Yasuda, T. Noguchi, M. Gohda, T. Arai, N. Tsusui, 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. *Cardiovascular Research* 2002, 53: 481-486.
20. S. Yasuda, M. Kanna, S. Sakuragi, S. Kogima, Y. Nakayama, S. Miyazaki, T. Matsuda, K. Kanagawa, and H. Nonogi. Local Delivery of Single Low-Dose of C-Type Natriuretic Peptide, an Endogenous Vascular Modulator, Inhibits Neointimal Hyperplasia in a Balloon-Injured Rabbit Iliac Artery Model. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002, 39 (6): 784-788.
- 2) 分担研究者 : 下川 宏明
21. Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biophys Biochem Res Comm.* 2002, 290:909-913.
22. Matsumoto Y, Shimokawa H, Morishige K, Eto Y, Takeshita A. Reduction in neointimal formation with a stent coated with multiple layers of releasable heparin in porcine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002, 39:513-522.
23. Kandabashi T, Shimokawa H, Mukai Y, Matoba T, Kunihiro I, Morikawa K, Ito M, Takahashi S, Kaibuchi K, Takeshita A. Involvement of Rho-kinase in agonists-induced contractions of arteriosclerotic human arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002, 22:243-248.
24. Masumoto A, Mohri M, Shimokawa H, Urakami L, Usui M, Takeshita A. Suppression of coronary artery spasm by a Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina. *Circulation.* 2002, 105:1545-1547.
25. Sun H, Mohri M, Shimokawa H, Usui M, Urakami L, Takeshita A. Coronary microvascular spasm causes myocardial ischemia in patients with vasospastic angina. *J Am Coll Cardiol.* 2002, 39:847-851.
26. Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Hiroki J, Higashi M, Kunihiro I, Talukder HMA, Takeshita A. Inhibition of renin-angiotensin system ameliorates endothelial dysfunction with aging in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002, 22:1445-1450.
27. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002, 106:57-62.
28. Satoh S, Yamaguchi T, Hitomi A, Sato N, Shiraiwa K, Ikegaki I, Asano T, Shimokawa H. Fasudil attenuates interstitial fibrosis in rat kidneys with unilateral obstruction. *Eur J Pharmacol.* 2002, 455:169-174.
29. Satoh S, Ikegaki I, Toshima Y, Watanabe A, Asano T, Shimokawa H. A new model of chronic angina in rats and anti-anginal and anti-fibrotic properties of Rho-kinase inhibitor. *Life Sci.* 2002, 72:103-112.
- 3) 分担研究者 : 片山 佳樹
30. Y. Ueki, H. Nakamura, K. Matsumoto, T. Tominaga, S. Miyake, Y. K. Kita, Y. Katayama, S. Fukuyama, Y. Hirasawa, K. Yoshida, K. Eguchi. NOR-1: a nitric oxide releasing agent for calibrating low levels of nitric oxide by the chemiluminescence method. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2002, Vol.13, No.2, 75-80.
31. Y. Katayama, N. Soh, M. Maeda. Strategies and Development of Molecular Probes for Nitric Oxide Monitoring. *Bull Chem Soc. Jpn* 2002,

- Vol.75, 1681-1691.
32. Y. Katayama, K. Fujii, E. Ito, S. Sakakihara, T. Sonoda, M. Murata, M. Maeda. Intracellular signal-responsive artificial gene regulation for novel gene delivery. *Biomacromolecules* 2002, Vol.3, No.5, 905-909.
33. N. Soh, T. Imato, K. Kawamura, M. Maeda, Y. Katayama Ratiometric direct detection of nitric oxide using novel signal-switching mechanism. *Chem. Commun.* 2002, No.22, 2650-2651.
34. T. Anada, T. Kano, W. Kaku, Y. Katayama, M. Maeda, M. Murata. Functional regulation of biomolecule using DNA-conjugation. *Nucleic Acids Res. Suppl.* 2002, No.2, 269-270.
35. Y. Katayama, Y. Ohuchi, M. Maeda, H. Higashi, Y. Kudo. Sensing of Second Messengers Using Oligopeptides. *Biomedical Diagnostic Science and technology (Marcel Dekker)* 2002, Chapter 13, 243-258.
36. 片山佳樹. 導入した遺伝子が患部細胞内だけで機能する新しい遺伝子治療法. *遺伝子医学* 2002, Vol.6, No1.
- 4) 分担研究者：新名主 輝男
37. M. Yasutake, T. Koga, C. Lim, Z. Ming, T. Shinmyozu. Solid State Structural Properties of Multibridged [3<sub>3</sub>]Cyclophanes and Their Charge Transfer Complexes. *Cyclophane Chemistry for the 21<sup>st</sup> Century*, Research Signpost, Kerala, India 2002, 265-300.
38. Y. Nakamura, M. Kaneko, K. Tani, T. Shinmyozu, J. Nishimura, Synthesis and Properties of Triply-Bridged *syn*-Carbazolophanes *J. Org. Chem.* 2002, 67, 8706-8709.
39. T. Shimo, T. Uezono, T. Obata, M. Yasutake, T. Shinmyozu, K. Somekawa. X-Ray and MO Analysis of Highly Stereoselective Solid-state Photocycloaddition of 2-Pyrones with Maleimide, *Tetrahedron* 2002, 58, 6111-6116.
40. T. Satou, T. Shinmyozu. Synthesis and Structural Study of 2,11-Diaza[3.3](3,5)pyridinophane, *J. Chem. Soc., Perkin Trans* 2002, 2, 393-397.
41. S. Jogo, H. Nishino, M. Yasutake, T. Shinmyozu. Manganese(III)-based Intramolecular Macrocyclization of 3,3-Diphenyl-2-propenyloxyoligomethylene-oxobutanoates, *Tetrahedron Lett.* 2002, 43, 9031-9034.
42. 野北里花、新名主輝男、光化学反応によるヘキサプリズマン誘導体の合成研究, *光化学* 2002, 33: 106-113.
- 5) 分担研究者：木戸秋 悟
43. S. Kidoaki and T. Matsuda, Mechanistic aspects of protein/material interaction probed by AFM, *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 23, 153-163.
- 6) 分担研究者：新海 征治
44. Jong Hwa JUNG, Seiji SHINKAI, Toshimi SHIMIZU. Preparation of Mesoscale and Macroscale Silica Nanotubes Using a Sugar-appended Aznaphthol Gelator Assembly. *Nano Lett.* 2002, Vol. 2, No. 1, pp. 17-20.
45. Shun-ichi TAMARU, Masayuki TAKEUCHI, Masahito SANO, Seiji SHINKAI. Sol-Gel Transcription of Sugar-Appended Porphyrin Assemblies into Fibrous Silica: Unimolecular Stacks versus Helical Bundles as Templates. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, Vol. 41, No. 5, pp.853-856.
46. Yohei KUBO, Atsushi SUGASAKI, Masato IKEDA, Kazunori SUGIYASU, Kenshi SONODA, Atsushi IKEDA, Masayuki TAKEUCHI, Seiji SHINKAI. Cooperative C<sub>60</sub> Binding to a Porphyrin Tetramer Arranged around a *p*-Terphenyl Axis in 1:2 Host-Guest Stoichiometry. *Org. Lett.* 2002, Vol. 4, No. 6, pp. 925-928.
47. Maik LIEBAU, Henk M. JANSSEN,

- Kazuhiko INOUE, Seiji SHINKAI, Jurriaan HUSKENS, Rint P. SIJBESMA, E. W. MEIJER, David N. REINHOUDT. Preparation of Dendric Multisulfides and Their Assembly on Air/Water Interfaces and Gold Surfaces. *Langmuir* 2002, Vol. 18, No. 3, pp. 674-682.
48. Jong Hwa JUNG, Hideki KOBAYASHI, Kjeld J. C. van BOMMEL, Seiji SHINKAI, Toshimi SHIMIZU. Creation of Novel Helical Ribbon and Double-Layered Nanotube TiO<sub>2</sub> Structures Using an Organogel Template. *Chem. Mater.* 2002, Vol. 14, No. 4, pp. 1445-1447.
49. Shun-ichi TAMARU, Seiji SHINKAI. Circular Dichroism Readout of Sugar Recognition in the Cleft of a Fused-pyridine Receptor *Proceedings Nat. Acad. Sci.* 2002, Vol. 99, No. 8, pp. 4972-4976.
50. Masatsugu AYABE, Atsushi IKEDA, Seiji SHINKAI, Shigeru SAKAMOTO, Kentaro YAMAGUCHI. A Novel [60]Fullerene Receptor with a Pd(II)-switched Bisporphyrin Cleft. *Chem. Commun.* 2002, No. 10, pp. 1032-1033.
51. Kazunori SUGIYASU, Shun-ichi TAMARU, Masayuki TAKEUCHI, Damien BERTHIER, Ivan HUC, Reiko ODA, Seiji SHINKAI. Double Helical Silica Fibrils by Sol-gel Transcription of Chiral Aggregates of Gemini Surfactants. *Chem. Commun.* 2002, No. 11, pp. 1212-1213.
52. Shun-ichi TAMARU, Shin-ya UCHINO, Masayuki TAKEUCHI, Masato IKEDA, Tsukasa HATANO, Seiji SHINKAI. A Porphyrin-based Gelator Assembly Which Is Reinforced by Peripheral Urea Groups and Chirally Twisted by Chiral Urea Additives. *Tetrahedron Lett.* 2002, Vol. 43, No. 20, pp. 3751-3755.
53. Hideki KOBAYASHI, Arianna FRIGGERI, Kazuya KOUMOTO, Masato AMAIKE, Seiji SHINKAI, David N. REINHOUDT. Molecular Design of "Super" Hydrogelators: Understanding the Gelation Process of Azobenzene-Based Sugar Derivatives in Water. *Org. Lett.* 2002, Vol. 4, No. 9, pp. 1423-1426.
54. Masahito SANO, Ayumi KAMINO, Junko OKAMURA, Seiji SHINKAI. Noncovalent Self-Assembly of Carbon Nanotubes for Construction of "Cages". *Nano Lett.* 2002, Vol. 2, No. 5, pp. 531-533.
55. Masato AMAIKE, Hideki KOBAYASHI, Kazuo SAKURAI, Seiji SHINKAI. Novel Attempts to Change the Colour of Dye Molecules Utilizing the Aggregation Mode of Saccharides. *Supramol. Chem.* 2002, Vol. 14, No. 3, pp. 245-253.
56. Tsutomu ISHI-I, Mercedes CREGO-CALAMA, Peter TIMMERMAN, David N. REINHOUDT, Seiji SHINKAI. Self-Assembled Receptors for Enantioselective Recognition of Chiral Carboxylic Acids in a Highly Cooperative Manner. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, Vol. 41, No. 11, pp. 1924-1929.
57. Kjeld J. C. van BOMMEL, Seiji SHINKAI. Silica Transcription in the Absence of a Solution Catalyst: The Surface Mechanism. *Langmuir* 2002, Vol. 18, No. 12, pp. 4544-4548.
58. Jong Hwa JUNG, Seiji SHINKAI, Toshimi SHIMIZU. Spectral Characterization of Self-assemblies of Aldopyranoside Amphiphilic Gelators: What Is the Essential Structural Difference between Simple Amphiphiles and Bolaamphiphiles? *Chem. Eur. J.* 2002, Vol. 8, No. 12, pp. 2684-2690.
59. Masatsugu AYABE, Atsushi IKEDA, Yohei KUBO, Masayuki TAKEUCHI, Seiji SHINKAI. A Dendritic Porphyrin Receptor for C<sub>60</sub> Which Features a Profound Positive Allosteric Effect. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, Vol. 41, No. 15, pp. 2790-2792.
60. Arianna FRIGGERI, Oliver GRONWALD,

- Kjeld J. C. van BOMMEL, Seiji SHINKAI, David N. REINHOUDT Charge-Transfer Phenomena in Novel, Dual-Component, Sugar-Based Organogels. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, Vol. 124, No. 36, pp. 10754-10758.
61. Shigeki KIYONAKA, Kazunori SUGIYASU, Seiji SHINKAI, Itaru HAMACHI. First Thermally Responsive Supramolecular Polymer Based on Glycosylated Amino Acid. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, Vol. 124, No. 37, pp. 10954-10955.
62. Masashi YAMAMOTO, Masayuki TAKEUCHI, Seiji SHINKAI. Oligosaccharide Binding to a Boronic-acid-appended Phenanthroline-Cu(I) Complex Which Creates Superstructural Helicates and Catenates. *Tetrahedron* 2002, Vol. 58, No. 36, pp. 7251-7258.
63. Kazuo SAKURAI, Ritsuko IGUCHI, Kazuya KOUMOTO, Taro KIMURA, Masami MIZU, Yoshio HISAEDA, Seiji SHINKAI. Polysaccharide-Polynucleotide Complexes VIII. Cation-Induced Complex Formation between Polyuridylic Acid and Schizophyllan. *Biopolymers* 2002, Vol. 65, No. 1, pp. 1-9.
64. Hideki KOBAYASHI, Kazuya KOUMOTO, Jong Hwa JUNG, Seiji SHINKAI. Sol-Gel Phase Transition Induced by Fiber-Vesicle Structural Changes in Sugar-based Bolaamphiphiles. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 2002, 2, No. 10, pp. 1930-1936.
65. Erwin SNIP, Kazuya KOUMOTO, Seiji SHINKAI. Gel Formation Properties of a Uracil-appended Cholesterol Gelator and Cooperative Effects of the Complementary Nucleobases. *Tetrahedron* 2002, Vol. 58, No. 43, pp. 8863-8873.
66. Toshifumi KONISHI, Atsushi IKEDA, Takanori KISHIDA, Brian Schou RASMUSSEN, Mamoru FUJITSUKA, Osamu ITO, Seiji SHINKAI. Photoinduced Electron Transfer between C<sub>60</sub>-Pendent Calixarene and Captured Electron Donor: Improvement of Electron-Transfer Efficiency by Applying Host-Guest Chemistry. *J. Phys. Chem. A* 2002, Vol. 106, No. 43, pp. 10254-10260.
67. Kazuya KOUMOTO, Taro KIMURA, Masami MIZU, Toyoki KUNITAKE, Kazuo SAKURAI, Seiji SHINKAI. Polysaccharide-Polynucleotide Complexes. Part 12. Enhanced Affinity for Various Polynucleotide Chains by Site-specific Chemical Modification of Schizophyllan. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 2002, 1, No. 11, pp. 2477-2484.
68. Taro KIMURA, Kazuya KOUMOTO, Masami MIZU, Kazuo SAKURAI, Seiji SHINKAI. Polysaccharide-Polynucleotide Interaction (XI): Novel Separation System of RNAs by Using Schizophyllan-Appended Column. *Chem. Lett.* 2002, No. 12, pp. 1240-1241.
69. Masato IKEDA, Masayuki TAKEUCHI, Seiji SHINKAI, Fumito TANI, Yoshinori NARUTA, Shigeru SAKAMOTO, Kentaro YAMAGUCHI. Allosteric Binding of an Ag<sup>+</sup> Ion to Cerium(IV) Bis-porphyrinates Enhances the Rotational Activity of Porphyrin Ligands. *Chem. Eur. J.* 2002, Vol. 8, No. 24, pp. 5541-5550.
70. Tsutomu ISHI-I, Mercedes CREGO-CALAMA, Peter TIMMERMAN, David N. REINHOUDT, Seiji SHINKAI. Enantioselective Formation of a Dynamic Hydrogen-Bonded Assembly Based on the Chiral Memory Concept. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, Vol. 124, No. 49, pp. 14631-14641.
71. Oliver GRONWALD, Erwin SNIP, Seiji SHINKAI. Gelators for Organic Liquids Based on Self-assembly: A New Facet of Supramolecular and Combinatorial Chemistry. *Curr. Opin. Coll. Int. Sci.*, Vol. 7, No. 2, pp. 148-156, March, 2002
72. 中野幸二, 田中幸子, 高木 誠, 新海征治.

- カリックス[6]アレーン単分子膜修飾電極におけるカテコールアミン類の電極反応とドーパミンセンサーへの応用. 分析化学, 2002年, 第51巻, 第6号, pp. 409-413.
73. 櫻井和朗, 新海征治. 多糖・核酸からなる3重らせんの発見とその応用. 高分子, 2002, 第51巻, 第8号, pp. 603-606.
74. 新海征治, David N. REINHOUDT. 分子認識から分子転写へ: 「相補性」の分子世界を探索する. JST ニュース 2002, No. 68, pp. 1-3.
75. 田丸俊一, 新海征治. ゴルーゲル転写反応を用いたナノサイズのシリカ超構造体の創製. セラミックス 2002, 第37巻, 第8号, pp. 586-589.
76. 池田 将, 竹内正之, 新海征治. 分子機械を利用した非線形応答システムの構築. 有機合成化学協会誌 2002, 第60巻, 第12号, pp. 1201-1209.
- 7) 分担研究者: 高原 淳
77. T. Koga, M. Morita, H. Sakata, H. Otsuka, A. Takahara, "Surface Structure and properties of Multi-component Micropatterned Organosilane Monolayers Prepared by Stepwise Photodecomposition and Chemisorption Process", Int. J. Nanoscience in press.
78. A. Takahara, H. Sakata, M. Morita, T. Koga, H. Otsuka, "Fabrication and Characterization of Multi-component Organosilane Nanofilms", Composite Interfaces in press.
79. 高原 淳、梶山千里、有機シラン単分子膜の表面ナノ構造とナノ力学物性、真空、印刷中
80. 高原 淳、有機超薄膜の凝集構造と表面物性、薄膜作製プロセスにおける問題点・対応策と製膜条件の最適化、技術情報協会、印刷中
81. A. Takahara, Y. Hara, K. Kojio, T. Kajiyama, "Plasma Protein Adsorption Behavior onto the Surface of Phase-separated Organosilane Monolayers on the basis of Scanning Force Microscopy", Coll. Surf. B. 2002, 23,141-152.
82. A. Takahara, K. Kojio, T. Kajiyama, "Effect of Aggregation State on Nanotribological Behaviors of Organosilane Monolayers", Ultramicroscopy, 2002, 91, 203-113.
83. T. Koga, H. Otsuka, A. Takahara, "Area-selective Fabrication of Polyaniline/Poly(styrenesulfonic acid) Composite Ultrathin Films on Micropatterned Aminosilane Grafted Surfaces", Trans. Mater. Res. Soc., Japan 2002, 27, 497-500.
84. T. Koga, H. Otsuka, A. Takahara, "Fabrication of Three-component Micropatterned Organosilane Monolayer by a Stepwise Photolithography Process", Chem. Lett. 2002, 1196-1197.
- 8) 分担研究者: 岩本 幸英
85. S. Ibusuki, Y. Fujii, Y. Iwamoto, T. Matsuda, An Injectable and *in Situ* Moldable Hybrid Cartilage for Cartilage Repair Using Thermoresponsive Gelatin and Chondrocytes: Chondrocyte-entrapped Gelation, Phenotypic Reversion, and Functional Expression *in Vitro*, Tissue Engineering 2002, in press.
- 9) 分担研究者: 田中 雅夫
86. 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.
- 10) 分担研究者: 安井 久喬
87. T. Shirota, H. He, H. Yasui, and T. Matsuda. Human Endothelial Progenitor Cell (EPC)-Seeded Hybrid Graft: Proliferative and Antithrombogenic Potentials of EPC in vitro and Fabrication. Tissue Engineering, in press.
88. H. He, T. Shirota, H. Yasui, and T. Matsuda. Canine endothelial progenitor cell-lined hybrid

vascular graft with nonthrombogenic potential. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, in press.

89. T. Shirota, H. Yasui, and T. Matsuda. Intraluminal Tissue-Engineered Therapeutic Stent Using Endothelial Progenitor Cell-Inoculated Hybrid-Tissue and *In vitro* Performance. Tissue Engineering in press.

90. T. Shirota, H. Yasui, H. Shimokawa, T. Matsuda. Fabrication of Endothelial Progenitor Cell (EPC)-seeded Intravascular Stent Devices and *In vitro* Endothelialization on Hybrid Vascular Tissue. Biomaterials in press.

91. 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.

## 2. 学会発表

1) Annual Scientific Meeting of the American Heart Association (November 17-20, 2002, Chicago, USA)

Uwatoku T, Shimokawa H, Abe K, Matsumoto Y, Hattori T, Takeshita A. Application of nanotechnology for the prevention of neointimal formation after balloon injury in rats. *Circulation*. 106 (Suppl II):II-150,2002.

2) 第49回応用物理学関連連合講演会シンポジウム、リン酸化シグナル応答型分子、片山 佳樹

3) 平成14年度遺伝子・デリバリー研究会夏季セミナー、細胞内シグナル応答型材料の開発と遺伝子発現制御への応用、片山 佳樹

4) 第6回化学とマイクロシステム研究会細胞シグナル応答型材料の開発と医薬・創薬への応用

片山 佳樹

5) 日本化学会第81春季年会

細胞内キナーゼシグナル応答型遺伝子転写制御システム

伊藤悦子・園田達彦・安藤友一・片山佳樹・前田瑞夫

6) 日本化学会第81春季年会

細胞内プロテアーゼシグナル応答型遺伝子発現制御システムの構築

藤井 健司・榊原 茂基・片山 佳樹・前田 瑞夫

7) 第51回高分子学会年次大会

細胞内リン酸化シグナル応答型遺伝子発現制御システム

伊藤悦子・園田達彦・安藤友一・片山佳樹・前田瑞夫

8) 第51回高分子学会年次大会

細胞内プロテアーゼシグナル応答型遺伝子発現制御システム

藤井 健司・榊原 茂基・片山 佳樹・前田 瑞夫

9) 第51回高分子学会年次大会

細胞内プロテアーゼシグナルに応答する遺伝子発現制御システムの構築

榊原茂基、河村健司、藤井健司、片山佳樹、前田瑞夫

10) 第39回化学関連支部合同九州大会

細胞内プロテアーゼシグナル応答型遺伝子転写/発現制御系の開発

河村 健司・藤井 健司・榊原 茂基・片山 佳樹・前田 瑞夫

11) 第39回化学関連支部合同九州大会

細胞内リン酸化シグナル応答型遺伝子転写/発現制御システムの開発

伊藤 悦子・園田 達彦・片山 佳樹・前田 瑞夫

12) 第39回化学関連支部合同九州大会

細胞内プロテアーゼシグナル応答型遺伝

- 子転写/発現制御系の開発(1)  
藤井 健司・河村 健司・榊原 茂基・  
片山 佳樹・前田 瑞夫
- 13) 第 51 回高分子討論会  
細胞内プロテアーゼ応答型遺伝子送達  
システム  
河村 健司・藤井 健司・榊原 茂基・村  
田 正治・前田 瑞夫・片山佳樹
- 14) 第 51 回高分子討論会  
細胞内リン酸化シグナル応答型材料の創製  
伊藤悦子・園田達彦・安藤友一・前田瑞夫・  
片山佳樹
- 15) 第 51 回高分子討論会  
細胞内プロテアーゼ応答型分子システム  
藤井 健司・河村 健司・榊原 茂基・  
村田 正治・前田 瑞夫・片山 佳樹
- 16) 第 51 回高分子討論会  
細胞内プロテインキナーゼ応答型分子シ  
ステム  
園田達彦・伊藤悦子・村田正治・前田  
瑞夫・片山佳樹
- 17) 九州地区高分子若手研究会  
細胞内カスパーゼシグナル応答型遺伝  
子発現制御系の開発  
藤井 健司・河村 健司・榊原 茂基・  
村田 正治・前田 瑞夫・片山 佳樹
- 18) 第 12 回バイオ・高分子シンポジウム  
細胞内シグナル応答性材料の開発  
片山佳樹・榊原茂基・園田達彦・藤井健司・  
伊藤悦子・河村健司・村田正治木戸秋悟、  
松田武久  
Electrospinning による機能性ナノファイ  
バーと組織工学  
第 24 回バイオマテリアル学会、東京、2002  
年 11 月
- 20)  $\beta$ -1, 3-グルカンの核酸との相互作用にお  
ける分子量の影響  
甲元一也, 小林秀輝, 国武豊喜, 水 雅美,  
櫻井和朗, 新海征治  
第 17 回生体機能関連化学シンポジウム,  
2002 年 9 月
- 21) シゾフィランを利用したアンチセンス DNA  
の新規な遺伝子キャリアー  
水 雅美, 甲元一也, 櫻井和朗, 新海征治  
第 17 回生体機能関連化学シンポジウム,  
2002 年 9 月
- 22) カードラン硫酸と核酸との超構造複合体  
の形成  
梅田真理子, 松本貴博, 沼田宗典, 甲元一  
也, 水 雅美, 櫻井和朗, 新海征治  
第 17 回生体機能関連化学シンポジウム,  
2002 年 9 月
- 23) 蛍光共鳴エネルギー移動を利用したカー  
ドラン-核酸複合体の構造評価  
沼田宗典, 松本貴博, 梅田真理子, 新海征  
治, 甲元一也, 水 雅美, 櫻井和朗  
第 51 回高分子討論会, 2002 年 10 月
- 24) 化学修飾による $\beta$ -1, 3-グルカン系多糖の  
新機能の開発  
松本貴博, 沼田宗典, 梅田真理子, 新海征  
治, 甲元一也, 水 雅美, 櫻井和朗  
第 51 回高分子討論会, 2002 年 10 月
- 25) 多糖シゾフィランを利用した核酸の選択  
的分離  
木村太郎, 甲元一也, 水 雅美, 櫻井和朗,  
新海征治  
第 51 回高分子討論会, 2002 年 10 月
- 26) 3 重らせん構造を有するシゾフィランお  
よびその核酸複合体の電子顕微鏡による観  
察  
ベ アヒョン, 李 丞祐, 櫻井和朗, 新海  
征治  
第 51 回高分子討論会, 2002 年 10 月
- 27) A.Takahara, T. Koga H. Otsuka  
Area-selective Molecular Assembly of  
Organosilanes on Silicon Wafer

- 224<sup>th</sup> ACS National Symposium, Boston, U.S.A. (August, 2002).
- 28) A. Takahara, T. Koga, H. Otsuka  
Surface Structure and Surface Properties of Organosilane Monolayers Selectively Assembled on the Si-wafer Substrate  
49<sup>th</sup> AVS International Symposium, Denver, U.S.A. (November 2002).
- 29) T. Koga, M. Morita, H. Sakata, H. Otsuka, A. Takahara  
Surface Structure and Properties of Multi-component Micropatterned Organosilane Monolayers Prepared by Stepwise Photodecomposition and Chemisorption Process  
ASIA Nano, Tokyo, Japan (November 2002).
- 30) 高原 淳  
走査プローブ顕微鏡による材料の表面構造と材料表面-生体成分の相互作用の解析  
第 24 回日本バイオマテリアル学会大会 (2002).
- 31) 高原 淳  
有機シラン単分子膜を用いた材料表面のマイクロパターンニング  
高分子学会 2002 年度印刷・情報記録・表示研究会講座(2003).
- 32) A. Takahara, T. Koga, H. Sakata, M. Morita, H. Otsuka  
Fabrication of Three-dimensional Structure from Organosilane Monolayer as a Template.  
Second International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (2003).
- 33) A. Takahara, T. Koga, H. Sakata, M. Morita, H. Otsuka  
Preparation and Characterization of Area-selectively Assembled Multi-component Organosilane Monolayers  
225<sup>th</sup> ACS National Meeting, New Orleans (2003).
- 34) **Tissue engineering for cartilage repair using a thermoresponsive gelatin as a scaffold**  
指宿真一、藤井康雄、岩本幸英、松田武久  
第 15 回日本軟骨代謝学会、群馬、(2002 年 3 月 9-10 日)
- 35) **感温性ゼラチンを用いた軟骨の組織工学: An injectable and *in situ* gellable cartilage using a thermoresponsive gelatin and chondrocytes**  
指宿真一、藤井康雄、岩本幸英、松田武久  
第 1 回再生医療学会総会、京都、(2002 年 4 月 18-19 日)
- 36) **System engineered cartilage using thermoresponsive gelatin**  
指宿真一、藤井康雄、岩本幸英、松田武久  
第 40 回日本人工臓器学会大会、札幌、(2002 年 10 月 2-4 日)
- 37) 沖野秀宣、水元一博、永井英司、真鍋達也、松本邦夫、中村敏一、鳴海晃、貫和敏博、田中雅夫、松田武久  
膀胱切除術後の局所再発・遠隔転移防止のための新しい治療戦略: 光硬化性ゼラチンを Matrix とした癌摘出部位への Ad-NK 4 の輸送と徐放システムの開発  
第 102 回日本外科学会、京都、平成 14 年 4 月 11-13 日
- 38) 沖野秀宣、真鍋達也、水元一博、永井英司、松本邦夫、中村敏一、鳴海晃、貫和敏博、田中雅夫、松田武久  
膀胱の集学的治療: 光硬化性ゼラチンを Matrix とした Ad-NK 4 の輸送と徐放システム  
第 33 回日本膀胱学会、仙台、平成 14 年 9 月 4、5 日
- 39) **血管内皮前駆細胞を用いた血管壁組織工学の開発**  
城田利彦、安井久番、松田武久

第1回日本再生医療学会総会  
(平成14年4月18-19日 国立京都国際会館)

#### F.知的財産の出願・登録状況

- 1) 名称：細胞移植用担体及びこれを用いた細胞移植用材料  
発明者および出願人：満洲邦彦、松田武久、中村耕三、中山泰秀、星川淳人  
特願 2001-342173
- 2) 名称：細胞が播種されたステント  
発明者：松田武久、城田利彦、安井久喬  
出願人：鐘淵化学工業  
特願 2002-112075
- 3) 名称：細胞が播種されたステントグラフト  
発明者：松田武久、城田利彦、安井久喬  
出願人：鐘淵化学工業  
特願 2002-112076
- 4) 名称：留置チューブとそのチューブのコーティング方法

発明者：松田武久、前山良、宮野保男、井上義光

出願人：オリンパス光学工業株式会社

- 5) 名称：新規な血管狭窄治療剤又は予防剤

発明者：下川宏明

出願人：日本化薬株式会社

- 6) 名称：軟骨組織再生用補助材、軟骨組織再生用キット及び軟骨組織再生方法

発明者：松田武久、岩本幸英、指宿真一

出願人：松田武久、岩本幸英、指宿真一、山本順一

- 7) 名称：局所内分散注射方法および注射針装置

発明者および特許出願人：松田武久、園田拓道、沖野秀宣

特願 2001-333255

- 8) 名称：医療用高分子ゲル化剤および局所に治療用物質を徐放する方法

発明者および特許出願人：松田武久、沖野秀宣、田中雅夫

特願 2001-374868

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

ナノカプセル技術を用いた血管形成術後の再狭窄予防法の開発

分担研究者 下川 宏明 九州大学大学院医学研究院循環器内科助教授

研究要旨：循環器分野において、経皮的冠動脈形成術などの血管傷害後の再狭窄は今なお重要な合併症の一つである。再狭窄予防のため、以前より様々な薬剤、デバイスが試みられてきた。しかし薬剤自体の組織選択性、生体内での代謝などの諸問題により、臨床応用の観点からはいまだ有効な治療法は得られていないのが現状である(図①)。

最近のナノテクノロジーの進歩に伴い、特に抗腫瘍治療の分野において、特定の抗癌剤を搭載したナノカプセル製剤の使用が可能となった。その背景として、腫瘍組織に認められる EPR 効果（血管新生の亢進・血管透過性の亢進・局所での薬物の長期停滞）がミセル集積の機序の一つとして考えられている。一方で、冠動脈を含めた血管形成術後の血管局所においては、その後一定期間ではあるが、腫瘍組織におけるような血管透過性の亢進が認められることが報告されている。今回我々はドキソルビシン含有ナノカプセル(NK911)に着目した。NK911 は、ポリエチレングリコールの疎水性側鎖にドキソルビシンが結合した構造を持ち、水中でミセル化するとともに、周囲のドキソルビシンを内殻に取り込み安定化し、直径約 40nm のミセルを形成する(図②)。かつ NK911 は過去の検討により、特に腫瘍組織においては血管透過性亢進部位に特異的に集積し、ドキソルビシン単独投与と比較し非常に高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなっている。本研究において我々はラット頸動脈バルーン傷害モデルを作成し、傷害後の血管病変形成に対する NK911 の抑制効果について検討を行った。

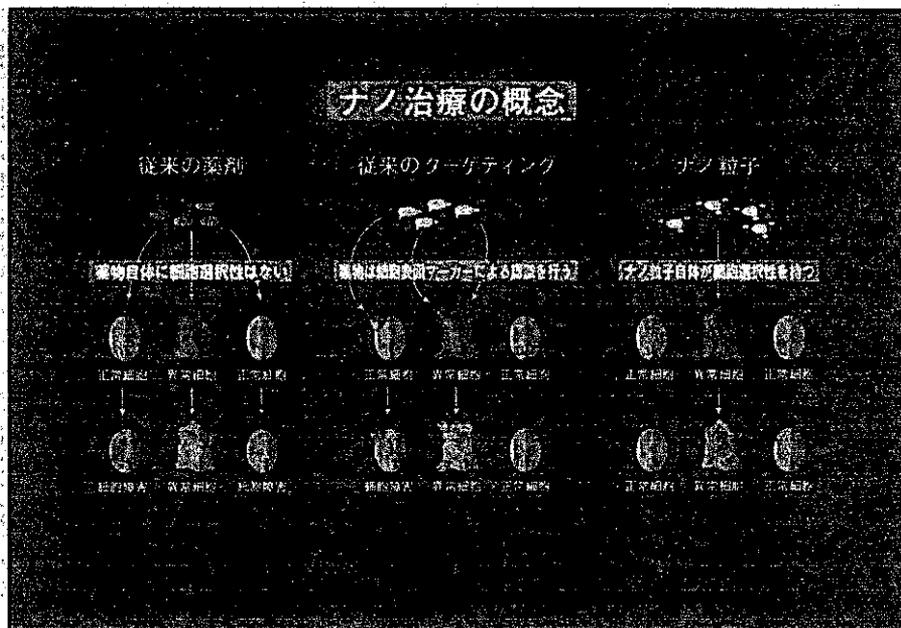


図 1

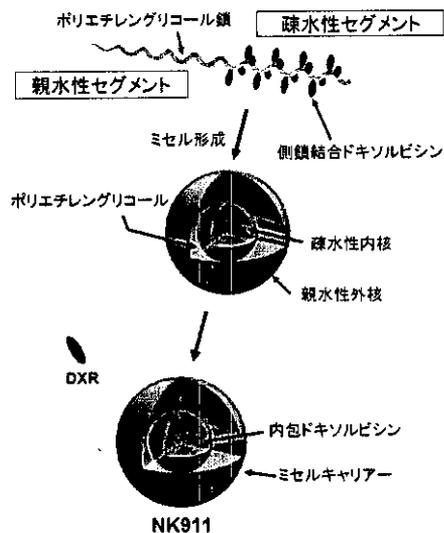


図 2

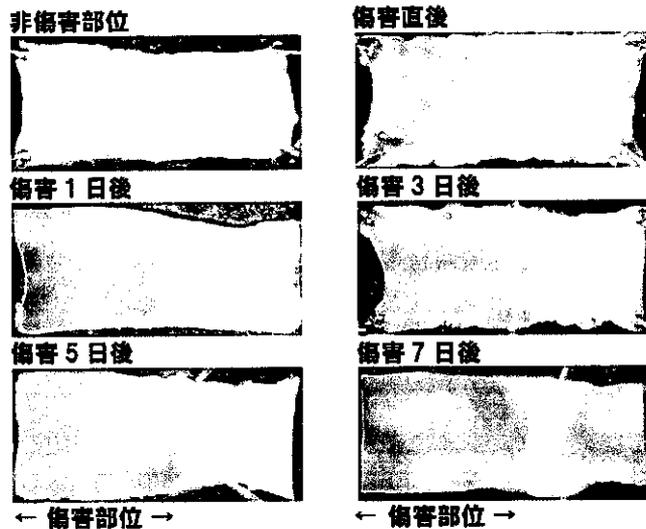


図 3

### A. 研究目的

ラット頸動脈バルーン傷害モデルにおいて、NK911 の血管病変形成に対する抑制効果を検討する。

### B. 研究方法

実験動物は WKY ラット (体重 240~280 g) を使用した。まず予備実験としてわれわれはラットの総頸動脈に 2F のフォガティーカーテールを用いてバルーン傷害を加え、傷害後の血管透過性亢進の評価を Evans-Blue と呼ばれる色素を用いて行った。その結果傷害部位は傷害後 7 日目の時点に到るまで青染が認められ、本モデルにおいては、バルーン傷害後少なくとも 1 週間にわたり、局所での血管透過性が亢進していることを確認した (図③)。これにより、血管透過性亢進部位に対する選択性を持つ NK911 は、バルーン傷害部位に選択的に集積し、抗増殖作用を発揮することが期待された。バルーン傷害後の薬剤の投与方法・投与量は通常の臨床における投与方法に準じ、傷害直後、傷害後 3 日目、6 日

目の 3 回、それぞれ NK911 (0.1, 1, 10 mg/kg の 3 群) およびドキシソルビシン単独 (0.016, 0.16, 1.6 mg/kg の 3 群) を経静脈的に投与した。なお、ドキシソルビシン単独群の投与量は、おのおの NK911 に含有される実際のドキシソルビシン量に調製した。バルーン傷害後 4 週間後に頸動脈を摘出し NK911 及びドキシソルビシン単独投与の動脈硬化病変に対する抑制効果を検討した。また単独傷害モデルと並行し、より臨床に近い状況を再現するため、先行するバルーン傷害により形成された既存の動脈硬化病変に対して再びバルーン傷害を与え、より重度な病変に対する NK911 およびドキシソルビシン単独投与の効果も検討した。また同時に傷害後いくつかの時点で頸動脈を摘出、組織中のドキシソルビシンを測定することで、NK911 によるドキシソルビシンの送達効率を評価した。そして NK911 による増殖抑制機序の解明のため、総細胞数及び PCNA 染色 (細胞増殖の評価)、TUNEL 染色 (アポトーシスの評価) および ED-1 染色 (炎症細胞浸潤の評価) といった免疫染色や、サイトカインおよびア

ポトーシス関連 mRNA をターゲットとした RNA protection assay (RPA)を行った。これらと平行し、血行動態、体重増加率、臓器機能、血液像といった観点から、NK911 による全身性の副作用についても検討を行った。

### C. 研究成果

NK911 は、4 週間後の動脈硬化病変の形成を用量依存性に抑制することが明らかとなった (図④)。またその抑制効果はドキシソルビシン単独群に比較し NK911 群において顕著に強く認められた。また並行して検討した再傷害モデルにおいては、単独傷害に比較しより重度な病変が形成され、ドキシソルビシン単独投与では病変抑制効果は認められなかったものの、NK911 は再傷害モデルにおいても有意に動脈硬化病変の形成を抑制し、単回傷害のレベルまでに病変の形成を抑えることができた (図⑤)。また動脈硬化病変抑制の詳細については、主にその抑制箇所は傷害後の新生内膜の抑制であり、収縮性リモデリングなどの因子に対する抑制効果は認められなかった。また頸動脈中のドキシソルビシン組織濃度測定

の結果、傷害頸動脈において、ドキシソルビシン単独投与群に比較して、NK911 群では有意に高値のドキシソルビシン濃度が検出され、NK911 が血管透過性の亢進したバルーン傷害後の頸動脈に対して、有効にドキシソルビシンを送達していることが明らかとなった (図⑥)。引き続き我々は NK911 の新生内膜形成抑制効果の機序を免疫染色により検討したところ、NK911・ドキシソルビシン単独投与群ともにアポトーシスや炎症細胞の浸潤には影響を与えなかったものの、NK911 は傷害後 1 週間の時点においてドキシソルビシン単独群と比較し有意に PCNA 陽性の増殖細胞数および、一切片あたりの細胞数を強力に抑制していた。また RPA においては、アポトーシス関連因子には NK911 およびドキシソルビシンは影響を与えなかったが、NK911 はドキシソルビシン単独群と比較し有意にサイトカイン関連 mRNA の発現を抑制していた。

また 4 週間後の時点において、血行動態、体重増加率、肝・腎機能、血算には有意な影響は認められなかった。

#### 結果 (単回傷害モデル)

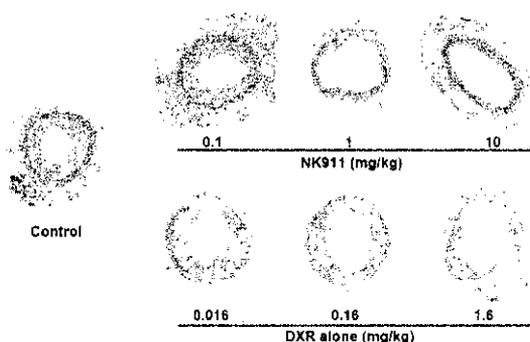


図 4

#### 結果 (2重傷害モデル)

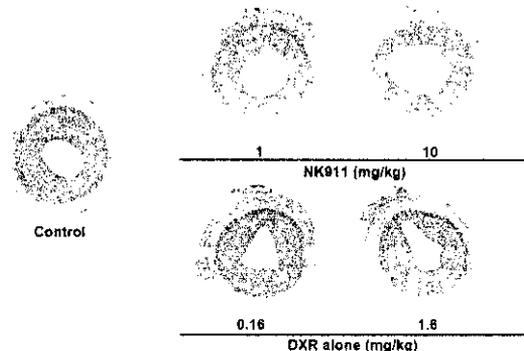


図 5