

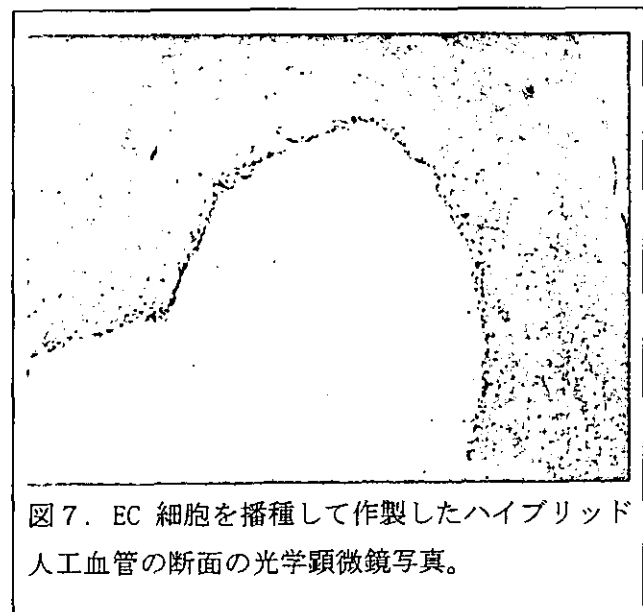
の抑制によって開存率の向上が期待された。しかし、矩形の孔を有する接合具は滑動性が悪いため、血管内に挿入したり、血管内を誘導させる際に血管壁を傷つける危険性が高かった。一方、孔の周辺部は血流の滞留を伴うため、血栓形成の足場となる可能性が高い。そのため孔をできるだけ大きくして、孔側壁と血液との接触面積を少なくする必要がある。しかし、矩形の孔では孔を大きくすると、ストラットの強度が大幅に減少し、人工血管接合時の結紮操作によって接合具を変形させる。そのため、最大寸法は、200 $\mu$ m $\times$ 100 $\mu$ m に制限しなければならなかった。

そこで、血管内での滑動性の向上と孔径の拡大を目的として、孔の形状を円に、また、段短部を波型に仕様変更した。孔の大きさは直径 200 $\mu$ m と 400 $\mu$ m の 2 種類に設定した。作製した円形孔を有する新しい血管接合具の外観を図 4 に示す。いずれも、CAD データをもとに YAG レーザーによって微細加工した。

血管接合具の力学的強度を調べるため、圧縮



強度試験を行った。結果を図 5 に示す。いずれの血管接合具も圧縮によって変形を加えると、耐圧縮荷重が増加し、約 0.1-0.2mm 変形時に破断した。破断時の荷重は、従来型で約 400gf であった。孔の形状を円形とすると、両孔径とも矩形孔に比べて耐圧縮荷重が増した。孔径 200 $\mu$ m では約 0.1mm 変形させるのに約 600gf の荷重を



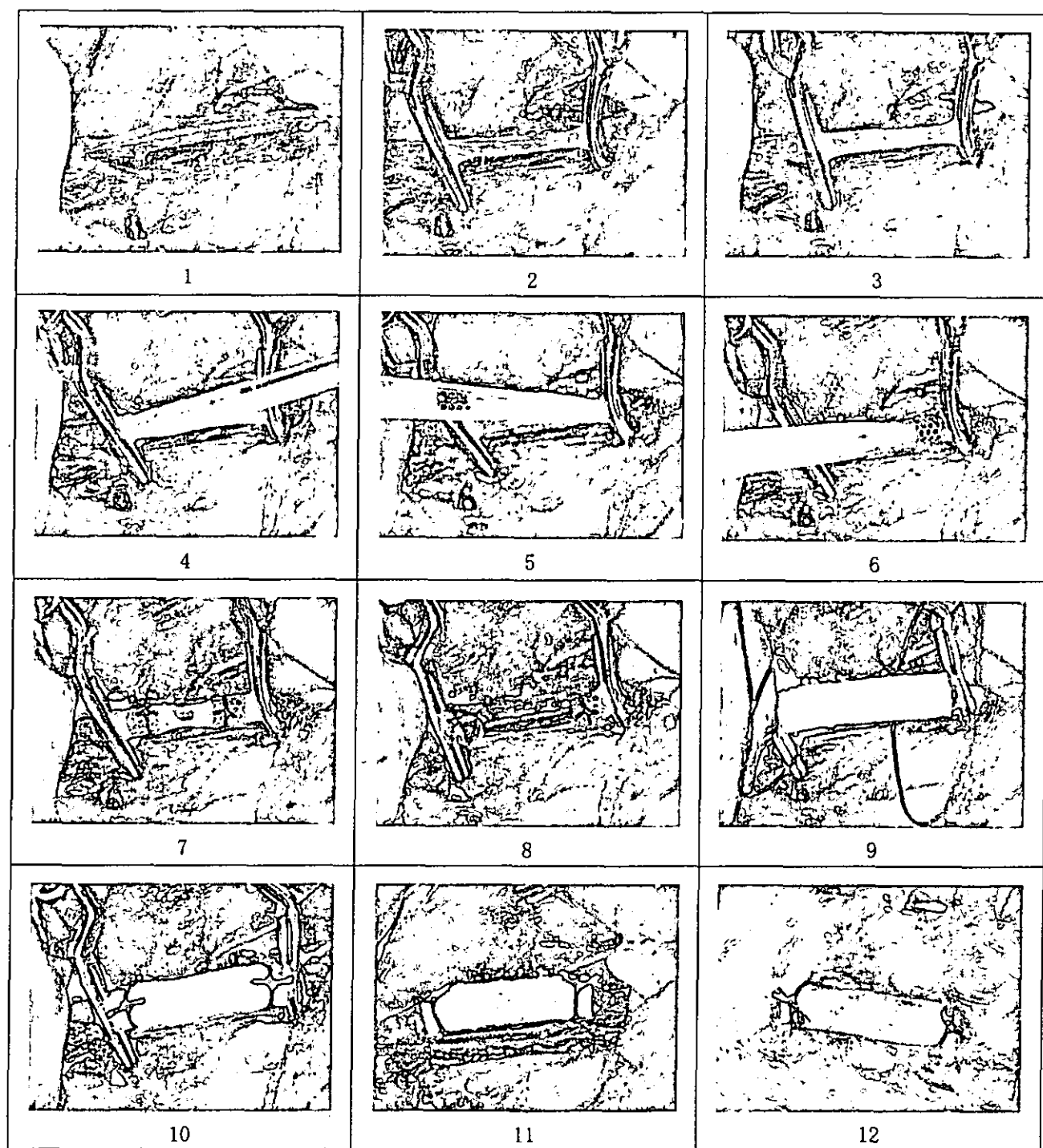


図8. EC細胞をコンプライアント基材に播種して作製したハイブリッド人工血管の移植手順。

1 : 剥離操作によって露出させたヌードラットの腹部大動脈、2 : 人工血管移植部の両端をクランプ処理によって、血流を遮断、3 : 人工血管接合位置を切開、4 ~ 6 : 独自に設計した挿入具を用いた血管内への血管接合具の留置 (左右)、7 : 血管接合具の生体血管との結紮固定、8 : 血管切断による段端処理、9 : 血管接合具の内装によるハイブリッド人工血管の装着、10 : 人工血管の生体血管への結紮固定、11 : クランプ除去後の血流の再開、12 : 7日移植後。

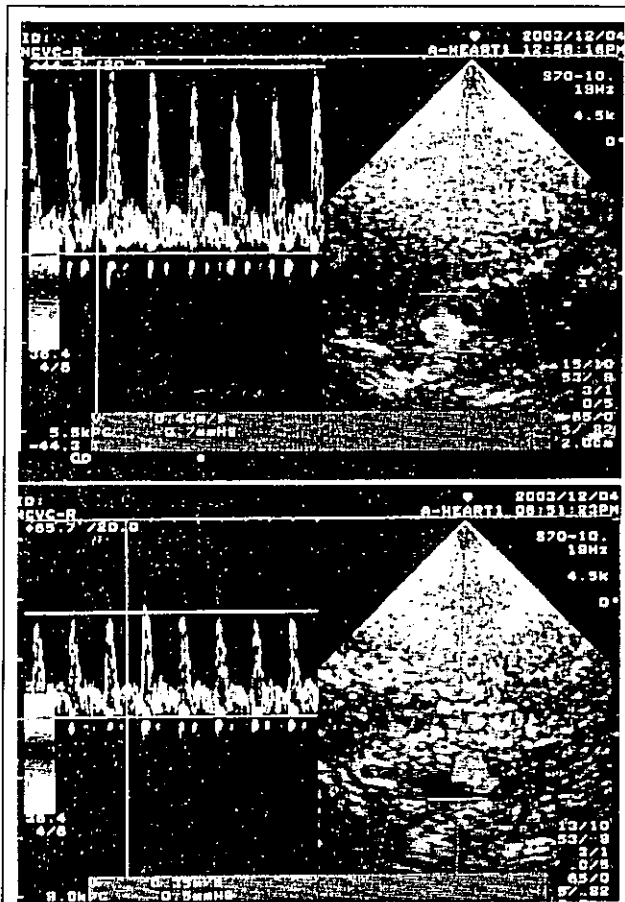


図9. 超音波エコーを用いたヌードラットの腹部大動脈の移植前後での血流量の測定。(上) 移植直前、0.43m/s、(下) 移植5時間後、0.35m/s。

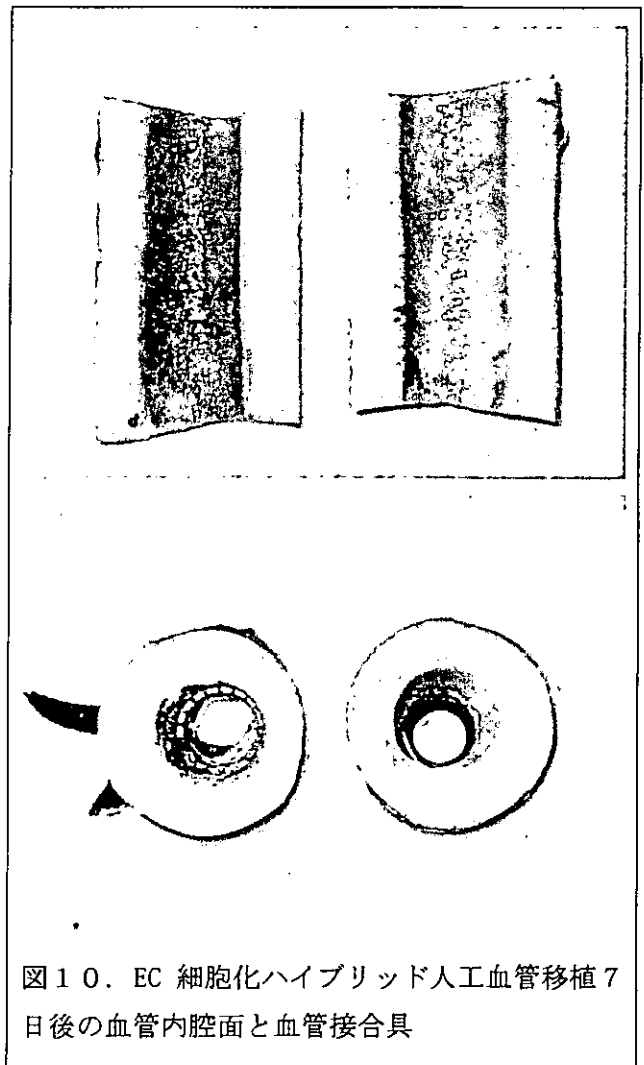


図10. EC細胞化ハイブリッド人工血管移植7日後の血管内腔面と血管接合具

要した。また、孔径400 $\mu$ mにおいても400gfが必要であり、矩形孔の約2倍の強度を有していた。従って、孔の形状を円形とすることで、血管接合具の耐圧縮強度を高め、孔の面積を大きくすることが可能であった。また、孔が円形でかつ段短部を波形としていることより、血管内での移動はスムーズとなり、滑動性に優れていた。

### 3. 移植実験

移植実験に際し、血管接合を用いる移植システムの信頼性を調べる目的で、マウス血管内皮細胞を用いてハイブリッド人工血管を作製し、ヌードラットへの移植を行った。人工血管の基材として、粗孔を有する壁の薄い、コンプライアント基材(内径2mm、外径3mm、長さ2cm)を

用いた。

人工血管基材内部への細胞の接着は、独自に設計した回転培養器を用いて行った(図6)。人工血管基材をローター部に固定し、基材内部を細胞懸濁液で満たした。1分間に1回転させながら30分間予備培養を行うと、内腔面をほぼ均一に内皮細胞で覆うことができた(図7)。

図8に移植手順を示した。移植は、ヌードラットの腹部大動脈(血管径約1.5mm)を用いた。麻酔下に開腹し、剥離によって腹部大動脈を約3cm剥離した。剥離部の動脈枝は出来るだけ残すよう注意した。剥離部の両端をクリップで固定することによって血流を遮断し、動脈の中央部に短軸方向に約2mmの切開傷を作成した。切開口を通して、独自に開発した血管接合具の挿入具を用いて、血管接合具を、切開創の両側に留

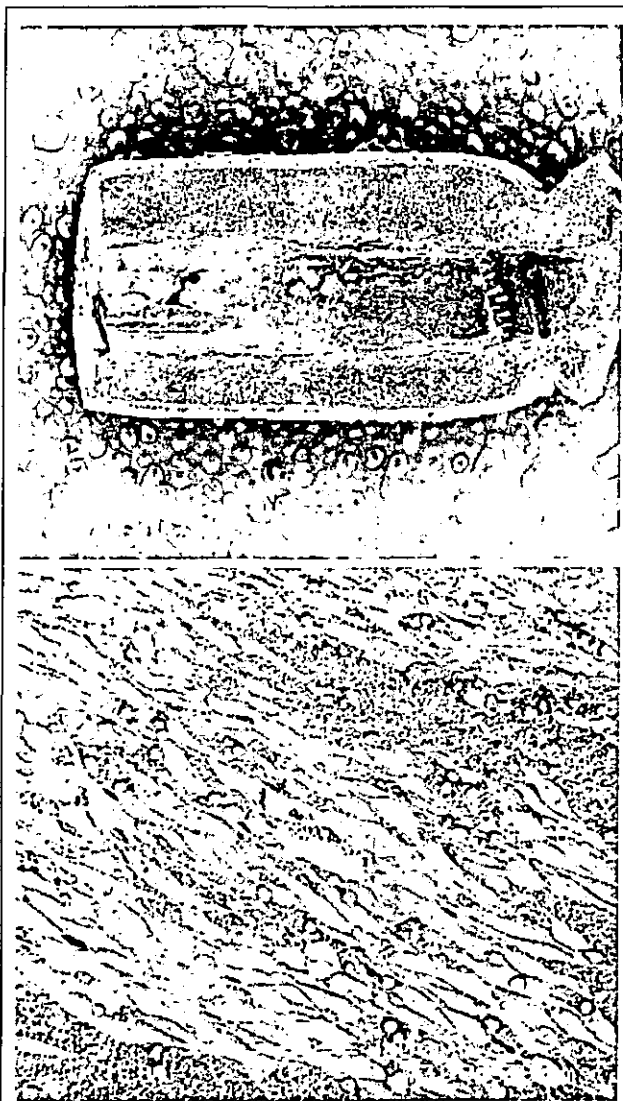


図11. EC細胞化ハイブリッド人工血管移植7日後の血管内腔面の走査型電子顕微鏡写真。(上) 全景像、(下) 内腔面の拡大像。

置した。血管接合具は直径400 $\mu$ mの円形孔を配したものをを用いた。留置した接合具は生体血管で移動しないように、6.0糸にて結紮固定した。血管接合具の段端の余分な血管組織を取り除き、接合具と血管壁との断面をそろえた。次いで、接合具が挿入された血管片を内装するように、ハイブリッド血管を外側に装着した。最後に、ハイブリッド血管が外れないように、接合具周囲のハイブリッド血管基材を4.0糸にて結紮固定した。血流遮断から血管の接合までは10分ほどで完了した。クリップを除去して血流を再開させると、ハ

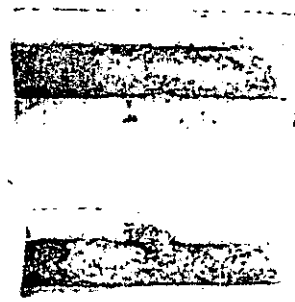


図12. ES細胞から分化誘導したFlk1陽性細胞を内腔面に播種して作製したハイブリッド人工血管。LacZ染色によってES細胞を染色することによって内腔のほぼ全面がES細胞で覆われていることが分かる。

イブリッド血管は拍動を始め、吻合部を含めて出血は全く認めなかった。超音波エコーによって血流量を測定すると、移植前は0.43m/sであったのが、移植5時間後において0.35m/sと少し減少したが大きな変動ではないと考える(図9)。特別な技能を必要とせず、約1.5mmの血管に内径約2mmのスポンジ状のハイブリッド血管を、短時間で接合することを可能とした。動物実験における術者の個人差などの影響をほとんど排除できる移植実験系が構築されたといえる。

移植1週間後にハイブリッドを摘出した。内面にはほとんど血栓を認めず、平滑であった(図10)。また、エバンスブルーを作用させても内面にはほとんど変化がなかったことより、内腔面は内皮細胞で皮膜化されていると考えられる。実際、内腔面を走査型電子顕微鏡にて観察すると血流方向に並んだ紡錘形の内皮細胞で覆われていた(図11)。移植期間は最大3週間まで行っているが、ほとんど血栓形成を認めず、開存した。

内径2mmの小口径人工血管においても、マウスEC細胞を内腔面に播種しておくことで、人工血管の開存性を大幅に向上できることが分かつ

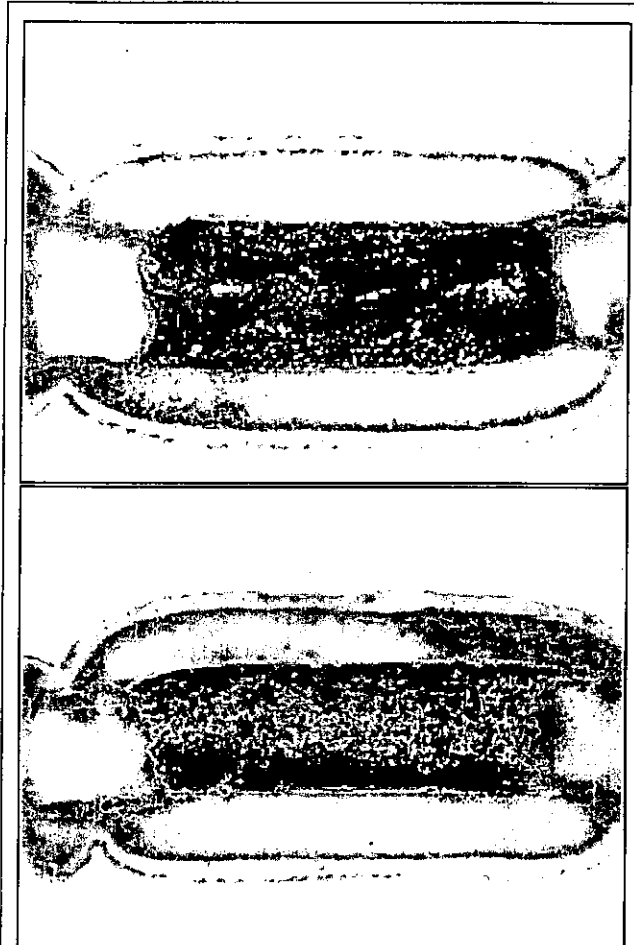


図13. ES細胞を播種したハイブリッド人工血管の移植7日後の内腔面(上)と形成された血栓層を除去した後にLacZ染色を行った(下)。

た。また、カフ部においてもほとんど血栓形成を認めず、カフ金属の表面は1週間で完全に内皮化されていた。従って、短期間の移植実験においては全く問題ないと判断される。ES細胞においても、出来るだけ内皮細胞に近く分化誘導させることによって人工血管の開存を高めることができると期待される。

予備的な検討として、ES細胞を用いたハイブリッド人工血管の移植を行った。ES細胞をFlk1陽性細胞に一部分化誘導させた(分化率:約10-30%)。これを、分離せず先で使用したスポンジ状の人工血管基材の内腔内に播種してES細胞化ハイブリッド人工血管を作成した。

作製したハイブリッド人工血管をヌードラットに移植した。1週間後、摘出すると多くの

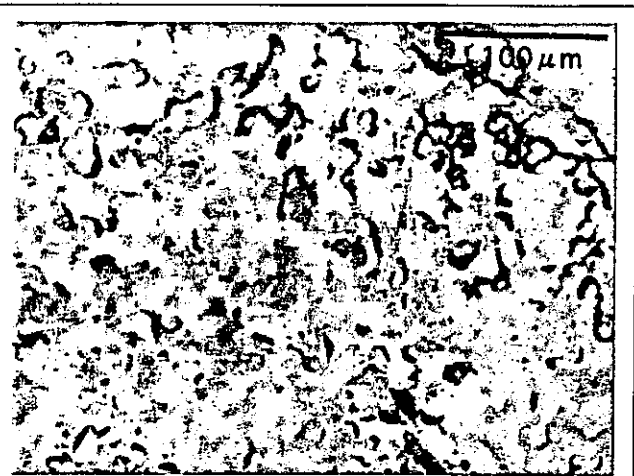


図14. 血栓内のES細胞をLacZとPECAM1の2重染色した後の光学顕微鏡写真。

場合、内腔内には厚い血栓層が形成された。血栓層を除去すると、ES細胞の存在を認め、血流下においても接着を維持できていることが分かった(図13)。また、血栓内のES細胞をLacZとPECAM1で2重染色を行うと、両方に陽性反応を示す細胞群を認めた(図14)。生体血管内での分化誘導の可能性が示唆された。

今後、Flk1陽性細胞を分離精製により、できるだけ純化してハイブリッド人工血管を作製し、移植を行うことで、血栓形成の抑制による開存性の向上が期待される。

#### E. 結論

基盤技術として人工血管基材ならびに血管接合具の開発を行い、簡便で確実な実験的移植システムが構築できた。また、EC細胞を用いたハイブリッド人工血管の予備的移植実験を終え、最終年度においてhES-VPCを用いたハイブリッド人工血管を開発する準備体制が整った。

#### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### G-1. 論文

1. Takeshi Masuda, Yasuhide Nakayama, Development of a water-soluble matrix metalloproteinase inhibitor as an intra-arterial infusion drug for prevention of restenosis after angioplasty. *J Med Chem* 46: 3497-3501, 2003
2. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ueda-Ishibashi, Takehisa Matsuda, Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performances. *J Biomed Mater Res* 64A: 52-61, 2003
3. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Fabrication of drug-eluting covered stents with micropores and differential coating of heparin and FK506. *Cardiovasc Rad Med* 4: 77-82, 2003
4. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Takehisa Matsuda, Embolization of experimental aneurysms using a heparin-loaded stent graft with micropores. *Cardiovasc Rad Med* 4: 29-33, 2003
5. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ueda-Ishibashi, Takehisa Matsuda, Occlusion of experimental aneurysms with heparin-loaded, microporous stent grafts. *Neurosurgery* 53: 1397-1405, 2003
6. Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda, Photo-control of the interaction between endothelial cells and photo-cation generatable water-soluble polymers. *J Control Release* 89: 213-224, 2003
7. Yasuhide Nakayama, Akiko Furumoto, Satoru Kidoaki, Takehisa Matsuda, Photocontrol of cell adhesion and proliferation by a photoinduced cationic polymer surface. *Photochem Photobiol* 77: 480-486, 2003
8. Hiromichi Sonoda, Keiichi Takamizawa, Yasuhide Nakayama, Hisataka Yasui, Takehisa Matsuda, Coaxial double-tubular compliant arterial graft prosthesis: time-dependent morphogenesis and compliance changes after implantation. *J Biomed Mater Res* 65A: 170-1781, 2003
9. William G Brodbeck, Gabriela Voskerician, Nicholas P Ziats, Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda, James M Anderson, In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. *J Biomed Mater Res* 64A: 320-329, 2003
10. Takehisa Matsuda, Junichi Nagase, Akane Ghoda, Yoshiaki Hirano, Satoru Kidoaki, Yasuhide Nakayama, Phosphorylcholine-endocapped oligomer and block co-oligomer and surface biological reactivity. *Biomaterials* 24: 4517-4527, 2003
11. Cailong Li, Toshinobu Sajiki, Yasuhide Nakayama, Masashi Fukui, Takehisa Matsuda, Novel visible-light-induced tissue adhesive composed of multiply strene-derivatized gelatin and poly(ethylene glycol) diacrylate. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 66B: 439-446, 2003
12. 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 carrier. *Connect Tissue Res* 44: 318-325, 2003
13. Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Keiichi Takamizawa, In vivo

tissue-engineered small caliber arterial graft prosthesis consisting of autologous tissue (Biotube). Cell Transplantation, in press.

14. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Geometrical design of luminal surface for microporous covered stents, Int J Artif Organs, in press.
15. 西 正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、高機能ステントグラフトによる実験的動脈瘤の閉塞-その有用性と展望-。日本血管内治療学会誌 4: 6-9, 2003

#### G-2. 学会発表

1. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Development of novel drug-eluting covered stents with combination of micropores and differential coating of heparin and FK506, Cardiovascular Radiation Therapy 2003 (Washington DC, Hilton Hotel), 2003年1月27日
2. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Takehisa Matsuda, A heparin loaded stent graft with micropores: Embolization of experimental carotid aneurysms, Cardiovascular Radiation Therapy 2003 (Washington DC, Hilton Hotel), 2003年1月27日
3. 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
4. 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
5. 内藤 洋、武輪能明、水野敏秀、大屋章二、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
6. 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
7. Hatsue Ishibashi-Ueda, Yasuhide Nakayama, Shogo 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 (Circulation Journal, 67 Suppl. I, 353, 2003)
8. 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)
9. Yoritaka Otsuka, Satoshi Yasuda, Norihiko Kotooka, Yasuhide Asami, Hiriyuki Okumura, Yasuhide Nakayama, Hitoshi Nonogi, Local delivery of low-doseONO-4817, a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, reduces neointimal hyperplasia coupled with decreased collagen deposition, 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)
10. 大屋章二、木戸秋悟、松田武久、中山泰秀、人工細胞外マトリックス材料の表面ナノ構造・物性解析、第52回高分子学会年次大会(名古屋国際会議場) 2003年5月28日-30日

- 日
11. 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：ナノ表面化学設計は3次元組織構造構築を決定するか、第52回高分子学会年次大会（名古屋国際会議場）2003年5月28日-30日
  12. 根本泰、巽 英介、中山泰秀、水野敏秀、妙中義之、再生医療用スキャホールド材、器質化材料の開発：ハイブリッド型人工臓器、皮下刺入管カフ材への応用、第52回高分子学会年次大会（名古屋国際会議場）2003年5月28日-30日
  13. 林 美智子、高木由美、内田欣吾、斯波真理子、大平望都、中山泰秀、可逆的カチオン発生型水溶性高分子による遺伝子ベクターの機能化：ポリオンコンプレックス形成に及ぼす分子鎖長と置換基の影響、第52回高分子学会年次大会（名古屋国際会議場）2003年5月28日-30日
  14. 亀尾崇宏、長石 誠、西村 学、平野義明、中山泰秀、エレクトロドナー型親水性高分子の合成と再結合による光ゲル形成、第52回高分子学会年次大会（名古屋国際会議場）2003年5月28日-30日
  15. 長石 誠、斯波真理子、大平望都、平野義明、中山泰秀、多分岐型カチオン性高分子の構造設計と遺伝子ベクターへの応用、第52回高分子学会年次大会（名古屋国際会議場）2003年5月28日-30日
  16. 西村 学、川田 徹、森内隆代、中山敦好、中山泰秀、光硬化性生体絶縁材の開発、第52回高分子学会年次大会（名古屋国際会議場）2003年5月28日-30日
  17. 内藤 洋、武輪能明、水野敏秀、大屋章二、中山泰秀、巽 英介、北村惣一郎、高野久輝、妙中義之、組織工学を利用した三次元心筋作成の試み、第19回日本医工学治療学会学術大会（札幌）2003年5月16日-18日
  18. 水野敏秀、巽 英介、根本 泰、中山泰秀、北村惣一郎、高野久輝、妙中義之、埋め込み型人工心臓システム使用時における感染防御に有用な新規被覆材の検討、ME学会（札幌コンベンションセンター）2003年6月3日-5日
  19. 内藤 洋、武輪能明、水野敏秀、大屋章二、中山泰秀、巽 英介、北村惣一郎、高野久輝、妙中義之、感温硬化性細胞外マトリックスを用いた三次元心筋組織作製、ME学会（札幌コンベンションセンター）2003年6月3日-5日
  20. Naito H, Takewa Y, Mizuno T, Ohya S, Nakayama Y, Tatsumi E, Kitamura S, Takano Y, Taenaka Y, Three-dimensional cardiac tissue engineering using a thermoresponsive artificial extracellular matrix, ASAIO (Washington DC) 2003年6月19日-23日
  21. 中山泰秀、長石 誠、平野義明、大平望都、斯波真理子、遺伝子導入ベクターの幾何学設計：スター型カチオン性高分子の精密分子設計と遺伝子発現、第19回日本DDS学会大会（京都国際会議場）2003年6月19、20日
  22. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Development of drug-eluting stent graft with micropores (Heparin and FK506), ESAO2003 XXXth Annual Congress (Aachen, Germany) 2003年9月3日-6日
  23. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, geometrical design of luminal surface for microporous covered stents, ESAO2003 XXXth Annual Congress (Aachen, Germany) 2003年9月3日-6日
  24. Michiko Hayashi, Yasuhide Nakayama, Yumi Takagi, Mariko Umeda, Kingo Uchida, Mariko Shiba, Moto Ohira, High performance gene delivery polymeric vector: molecular design of photo-cation generatable water-soluble polymers,



- ESAC2003 XXXth Annual Congress (Aachen, Germany)2003年9月3日-6日
25. Makoto Nagaishi, Yasuhide Nakayama, Mariko Shiba, Moto Ohira, Yoshiakin Hirano, High performance gene delivery polymeric vector: Nano-structured hyperbranched cationic polymers, ESAO2003 XXXth Annual Congress (Aachen, Germany)2003年9月3日-6日
  26. Naito H, Takewa Y, Mizuno T, Ohya S, Nakayama Y, Tasumi E, Kitamura S, Takano H, Taenaka Y, A thermoresponsive gelatin with hyaluronic acid: in vitro engineering of three-dimensional cardiac tissue, ESAO 2003 XXXth Annual Congress (Aachen, Germany)2003年9月3日-6日
  27. 安田 聡、宮崎俊一、中山泰秀、野口輝夫、大塚頼隆、松田武久、野々木宏、循環器系領域における治療機器の臨床、現在と将来：進歩する冠動脈インターベション：より多機能なデバイスの開発、第17回日本エム・イー学会秋季大会、京都2003年10月20-22日
  28. 西 正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、実験的動脈瘤に対する Stent Graft の応用-微細孔とヘパリン付与の工夫、第32回日本神経放射線学会、筑波2003年2月26-28日
  29. 西 正吾、中山泰秀、植田初江、森 久恵、湯川弘之、FK506、ヘパリンを付与した Stent graft (DESG)の開発-急性期血栓症と中長期再狭窄予防を目指して、第19回日本脳神経血管内治療学会、2003年11月17-19日
  30. 神田圭一、中山泰秀、伊藤 裕、山下潤、斉藤裕子、万木貴美、根本泰、北村信夫、実験ツールとしてのES細胞組み込み型小口径人工血管モデル-生体内 Hemodynamic Stress 下でのES細胞の動態観察-、第41回日本人工臓器学会大会、仙台2003年10月30-31日
  31. 神田圭一、斉藤祐子、万木貴美、中山泰秀、伊藤 裕、山下 潤、根本 泰、北村信夫、未分化ES細胞を導入した新しいハイブリッド型超小口径人工血管モデルの開発、第56回日本胸部外科学会総会、東京2004年11月19-21日
  32. 舩田 健、中山泰秀、再狭窄防止を目的としたMMPIポリマーのステントコーティング剤としての有用性、第25回バイオマテリアル学会、大阪2003年12月16、17日
  33. 亀尾崇宏、大高 敦、西田真美、平野義明、中山泰秀、組織工学用マトリックス材料の設計：再結合を利用した光感受性低侵襲性光ゲル形成、第25回バイオマテリアル学会、大阪2003年12月16、17日
  34. 鎌田なぎさ、大高 敦、川田 徹、砂川賢二、中山敦好、中山泰秀、神経電極固定剤の開発、光硬化性ポリエステルマクロマーの物性と *in vivo* 評価、第25回バイオマテリアル学会、大阪2003年12月16、17日
  35. 神田圭一、中山泰秀、伊藤 裕、山下 潤、西田真美、根本 泰、夜久 均、北村信夫、ES細胞を組み込んだハイブリッド型人工血管モデル、Hemodynamic Stress による分化誘導-第34回日本心臓血管外科学会学術総会、福岡2004年2月18-20日
  36. 神田圭一、中山泰秀、伊藤 裕、山下 潤、根本 泰、西田真美、夜久 均、ES細胞の生体内 Hemodynamic Stress における動態を観察するためのハイブリッド型人工血管モデルの開発、第3回再生医療学会、幕張メッセ2004年3月23-25日
  37. 内田欣吾、並川 敬、斉藤全亮、林 美智子、中山泰秀、長い共役鎖を持つジアリールエテンの金表面上でのフォトクロミック反応、第84回日本化学会春期年会、関西学院大学2004年3月26-28日
- G-3. 新聞報道  
なし

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 人工血管、発明者：中山泰秀、林 美智子、高見沢計一、植田初江、出願日：平成 15 年 2 月 28 日、出願番号：特願 2003-052512、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
2. ステンント、発明者：中山泰秀、西 正吾、根本泰、出願日：平成 15 年 4 月 14 日、出願番号：特願 2003-109168、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
3. ステンントの製造方法、発明者：中山泰秀、西 正吾、根本泰、出願日：平成 15 年 4 月 14 日、出願番号：特願 2003-109169、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
4. ステンントの製造方法、発明者：中山泰秀、西 正吾、根本 泰、出願日：平成 15 年 4 月 14 日、出願番号：特願 2003-109167、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
5. ベクター、中山泰秀、長石 誠、斯波真理子、出願日：平成 15 年 4 月 18 日、出願番号：特願 2003-114541、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
6. ステンントの製造方法及びステント、岡本吉弘、中山泰秀、西 正吾、出願日：平成 15 年 6 月 16 日、出願番号：特願 2003-169510、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
7. 核酸複合体及びその製造方法、中山泰秀、大高 敦、根本 泰、出願日：平成 15 年 7 月 4 日、出願番号：2003-192140、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
8. ステンント、中山泰秀、西 正吾、根本 泰、出願日：平成 15 年 7 月 24 日、出願番号：特願 2003-201201、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
9. ステンント、中山泰秀、西 正吾、出願日：平成 15 年 7 月 25 日、出願番号：特願 2003-201836、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
10. ステンント、中山泰秀、西 正吾、根本 泰、出願日：平成 15 年 8 月 15 日、特願番号：2003-286901、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
11. 光硬化性生体吸収材料、中山敦好、中山泰秀、西村 学、鎌田なぎさ、大高 敦、川田 徹、砂川賢二、出願日：平成 15 年 11 月 7 日、特願 2003-379012、国立循環器病センター、(独)産業技術総合研究所

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  
—ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞の同定及び血管再生関連遺伝子の網羅的探索

分担研究者:仁藤新治(田辺製薬株式会社 先端医学研究所長)

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、昨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) の分化誘導を行い、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確立した。これらの知見をもとに、本年度は主任研究者伊藤らとともに、海外樹立ヒト ES 細胞を用いて、ヒト ES 細胞において VPC の同定とその性状についての解析を行った。更に、マウス ES 細胞由来 VPC を用いた血管発生分化関連遺伝子に関する機能的データ解析システムを開発し、新規血管構成細胞分化誘導因子の絞り込みとその解析を行った。

#### A. 研究目的

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。

昨年度は、1) サル ES 細胞において血管前駆細胞 (VPC) を同定し、その分化特性について明らかにするとともに、2) ヒト ES 細胞研究においては研究に供する十分な量の細胞調製が可能な培養法の改良として酵素処理法による安定な継代培養法と凍結保存方法を確立することに成功している。

本年度は、主任研究者伊藤らとともに、ヒト ES 細胞においても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* *in vivo* で血管を構築できる“血管前駆細胞 (vascular progenitor cells; VPC)”と呼び得る細胞の同定に成功し、その VPC

の分化特性を明らかにした。

また、網羅的遺伝子発現プロファイリングデータベースと機能遺伝子探索技術開発を行い、フィーダー細胞 (ES 細胞由来 VPC を機能細胞へ分化誘導できる) の遺伝子発現プロファイルを行い、遺伝子発現データから血管細胞分化誘導分子群の検討を行った。

#### B.C. 研究方法及び結果

##### § 1.ヒト ES 細胞からの血管前駆細胞の同定

##### ①未分化ヒト ES 細胞における各種血管系マーカー分子の発現

サル ES 細胞では、マウス ES 細胞とは異なる点として、その未分化状態において既に VEGFR-2 を発現しており、マウス頭蓋冠由来ストローマ細胞株 (OP9 細胞) と共培養することで分化誘導を行うと、一旦消失後、再び発現してくるという発現様式をとることを昨年度までに明らかにしている。

ヒト ES 細胞 (HES3 株: オーストラリア産 (ES Cell International ; ESI 社) のヒト ES 細胞を輸入使用) に関して、こうした基本的性状に関する情報を取得す

る目的で、先ず未分化維持状態下での各種中胚葉(造血・血管)系幹細胞マーカーの発現をフローサイトメトリー解析した。

その結果、ヒト ES 細胞でも既に未分化状態で Flk1 を発現しており、更にこの他にも AC133 陽性、c-Kit 弱陽性、CD34 陰性であるとの性状が明らかとなった。

上記各種マーカーの未分化維持段階での発現の意味については不明であるが、血管系前駆細胞では、少なくとも未分化 ES 細胞の指標とされる SSEA-4 (Stage-specific embryonic antigen-4) 発現や TRA1 (Tumor Rejection Antigen 1; TRA1-60) の発現、及び高いアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性は通常検出されないはずである。これら未分化維持条件下で存在する VEGFR-2 発現細胞や AC133 発現細胞では、その細胞表面で SSEA-4 や TRA1 が発現しており、また、高 ALP 活性を示したことから判断して、“未分化 ES 細胞”と呼ぶことのできる(あるいは、それに匹敵する)状態にあると考えられた。

## ②ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞の同定と分化特性

ヒト ES 細胞をマウス頭蓋冠から分離したストローマ細胞株 (OP9 細胞) と共培養することで分化誘導を試み、未分化状態および分化誘導下での TRA1 マーカーと Flk1 マーカーの発現の経時変化をフローサイトメトリー解析した。その結果、OP9 細胞との共培養の時間経過に伴って Flk1<sup>+</sup>/TRA1<sup>+</sup>細胞 (未分化 ES 細胞と考えられる) が次第に減少する一方で、4 日目あたりから Flk1<sup>+</sup>/TRA1<sup>-</sup>細胞 (分化細胞と考えられる) が出現し始め、共培養 (分化誘導) 後 8 日目には全細胞の 15%程度にまで増加することがわかった。

この分化誘導 8 日目の Flk1<sup>+</sup>/TRA1<sup>-</sup>細胞集団にはヒト ES 細胞由来 VPC が含まれるものと考えられるが、この細胞分画における VEcadherin の発現を解析すると若干 (約 2%程度) の陽性細胞の混在 (内皮細胞

段階まで分化が進んでいる細胞) が認められた。そこでこの分化誘導後 8 日目の細胞集団から Flk1<sup>+</sup>/TRA1<sup>-</sup>/VEcadherin<sup>-</sup>細胞分画のみを改めて分取し、この細胞分画の内皮細胞と壁細胞への双方向分化能 (VPC 能) を検討した。その結果、IV 型コラーゲン基質上で 10% 血清と VEGF (50ng/ml) 存在下に更に 8 日間再培養により、CD34<sup>+</sup>細胞、PECAM1<sup>+</sup>細胞、VEcadherin<sup>+</sup>細胞、および eNOS<sup>+</sup>細胞が出現し、内皮細胞への分化が示唆された (図 1A-D)。また、ここで生じた分化細胞集団の中に観察される PECAM1<sup>-</sup>細胞は  $\alpha$ SMA を発現しており、細胞形態からも判断して血管平滑筋に分化したものと考えられた。(図 1E)。

一方、同 Flk1<sup>+</sup>/TRA1<sup>-</sup>/VEcadherin<sup>-</sup>細胞は、IV 型コラーゲン基質上で 10%血清存在・VEGF 非存在下で再培養する条件下では、逆に内皮細胞にはあまり分化せず、その殆どが壁細胞と考えられる  $\alpha$ SMA<sup>+</sup>/calponin<sup>+</sup>細胞に分化した (図 1F, G)。

成体組織に存在する VPC は、VEGF 受容体と PDGF 受容体の双方を同時に発現しており、VEGF や PDGF の刺激によってそれぞれ血管内皮細胞と壁細胞への分化の方向付けがなされるといわれている。ヒト ES 細胞由来 VPC のマーカーを詳細に定義する目的で、上記 Flk1<sup>+</sup>/TRA1<sup>-</sup>/VEcadherin<sup>-</sup>細胞について PDGF 受容体の発現の有無も検討した。その結果、殆どの Flk1<sup>+</sup>/TRA1<sup>-</sup>/VEcadherin<sup>-</sup>細胞は PDGFR $\beta$  を発現しており、一方 VEcadherin<sup>+</sup>細胞 (既に内皮細胞にコミットしている) となった段階では PDGFR $\beta$  発現を消失していることがわかった。

この Flk1<sup>+</sup>/TRA1<sup>-</sup>/VEcadherin<sup>-</sup>/PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>細胞を純化して行った分化誘導実験では、この細胞細胞分画を IV 型コラーゲン上に播種し、再培養を行い、PDGF-BB 刺激 (10ng/ml) あるいは VEGF 刺激 (50ng/ml) を加えることによって、それぞれ PECAM1<sup>+</sup>細胞 (内皮細胞) と  $\alpha$ SMA<sup>+</sup>細胞 (壁細胞) を高効率に選択誘導、増殖促進することを確認した

(図 1H, I)。

以上の結果から、Flk1<sup>+</sup>/TRA1<sup>-</sup>/VEcadherin<sup>-</sup>/PDGFRβ<sup>+</sup>細胞はヒト ES 細胞由来 VPC といえる細胞群であると判断された。

### 図1 ヒトES細胞由来VPCの血管系細胞への分化(免疫組織化学的解析結果)

A-D: Flk1<sup>+</sup>/TRA1<sup>-</sup>/VEcadherin<sup>-</sup>細胞の血管内皮細胞への分化

CD34 (A), VEcadherin (B), PECAM1 (C), eNOS (D)

E: Flk1<sup>+</sup>/TRA1<sup>-</sup>/VEcadherin<sup>-</sup>細胞の再培養後のPECAM1とαSMAの発現

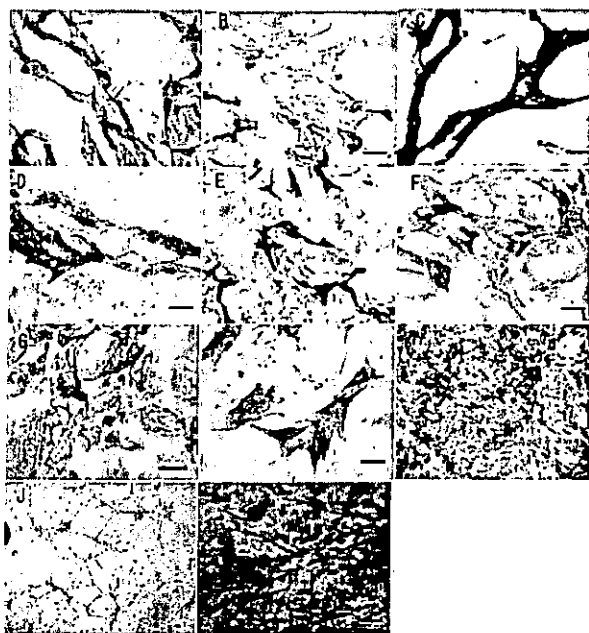
F, G: Flk1<sup>+</sup>/TRA1<sup>-</sup>/VEcadherin<sup>-</sup>細胞の壁細胞への分化 αSMA (F), calponin (G)。

H: PDGF-BB 刺激によるヒト ES 細胞由来 VPC の壁細胞への分化(αSMA 発現)

I: VEGF 刺激によるヒト ES 細胞由来 VPC の内皮細胞分化(PECAM1 と αSMA)

J, K: ヒト ES 細胞由来 VPC の *in vitro* 3次元培養における血管構築の再構成

※ スケールは、すべて 50 μm を示す



### ②血管細胞分化に関連する遺伝子の網羅的探索

血管再生の臨床応用に利用可能な血管分化誘導因子(遺伝子)を探索する目的で、マイクロアレイを利用しての霊長類(サル・ヒト)ES細胞の血管発生分化に関する遺伝子発現解析を計画している。

これまでの検討から、フィーダー細胞には、血管細胞の分化を誘導する、従来から知られている

VEGF など以外の因子が発現している可能性が示唆されたので、今回開発した機能的データ解析システム(特願 S508-03-15)を用いて、マウス ES 細胞の血管分化のアレイデータと各種フィーダー細胞での遺伝子発現パターンを対比解析し、新規血管構成細胞分化誘導因子の絞込みとその解析を行った。

### E. 結論

フィーダー細胞うち、OP9細胞株の遺伝子発現プロファイリングデータ解析から、機能未知遺伝子を含む、25種類の遺伝子が発生過程のマウスを使った *in vivo* 実験から、血管形成部位での発現が確認された。

また、そのうち9種類の遺伝子は、心・血管部位に発現していることが判明した。

上述したように、独自に開発したデータ解析システムには、オリジナルデータ解析用ソフトウェアを含んでいる。

このプログラムには、一般的なデータ解析機能の他に、マウス ES 細胞の *in vitro* 血管細胞分化誘導系の全遺伝子発現量変化を測定したデータベースとそのデータベース情報から細胞分化モデルの全遺伝子発現パターンの自動抽出を行うアルゴリズム(遺伝子発現パターン認識機能)を備えている。このデータ解析機能を用いて、約36,000種類の遺伝子情報から血管細胞分化誘導遺伝子群を選び出した。

実際にマウス胎仔発生時において各候補遺伝子が血管細胞に発現するか、またはどのような発現パターンを示すのかについて検証している。

これまでに血管細胞特異的発現パターンを示すもの、神経細胞にも発現するものなど、少なくとも神経冠細胞(血管細胞と神経細胞の起源)由来の細胞群に発現が認められるものが確認されている。これは、当方システムの解析精度の高さを示すものである。またその一方で、これら以外の幾つかなの特徴的な発現パターンを示すデータが得られている。発現部位は、必ずしも血管特異的ではないものもあり、

同一分子が時空間的にその機能を変化させて成体機能を司っていることが示唆された。

<血管前駆細胞から血管内皮細胞または平滑筋細胞への分化決定に関与する機能分子の解析：岩田先生との共同研究として「ES細胞を用いた in vitro 血管分化誘導系」をモデル利用>

我々は、すでに多くの血管細胞分化関連遺伝子群を情報として選び出している。

当方解析システムを利用して、その中から血管細胞の各細胞系列への分化過程における遺伝子発現情報から候補遺伝子（転写因子）と各候補分子同士の組合せを選抜した。（in silico）

現在 各候補遺伝子の発現ベクター構築を進めている。

#### 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 and K. Nakao.

Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells.

*Circulation* 107: 2085-2088, 2003.

##### 2. 学会発表

###### 国際学会

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, S. Nishikawa, K. Nakao.

Identification of 'vascular progenitor cells' from primate embryonic stem cells.

XIII International Symposium on Atherosclerosis

2003.9.28-10.2 Kyoto, Japan

##### 2. M. Sone

Identification of vascular progenitor cells from primate embryonic stem cells

American Heart Association Scientific Sessions 2003

2003.11.9-12 Orlando, USA

#### 国内学会

1. 曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、万木貴美、鈴木豊、近藤 靖、澤田直樹、山原研一、宮下和季、朴 貴典、野々口あかね、仁藤新治、西川伸一、中尾一和

霊長類 ES 細胞由来「血管前駆細胞」の同定

第 2 回日本再生医療学会総会

2003.3.11-12 (神戸)

2. Masakatsu Sone

Identification of 'Vascular progenitor Cells' from Primate Embryonic Stem Cells

第 67 回日本循環器学会総会・学術集会

The 67<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society

2003.3.28-30 (福岡)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

「霊長類動物胚性幹細胞から血管系細胞への分化方法」 米国特許出願（平成 16 年 2 月 27 日）

「内皮細胞分化増殖方法」 特願 2004-25631 号

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
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
Kook H, Itoh H, Choi B-S, Sawada N, Doi K, Hwang T-J, Kim K-K, Arai H, Baik Y-H and Nakao K.	Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro.	Am. J. Physiol.	284	H1388-H1397	2003
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 and K. Nakao.	Shear stress attenuates endothelin and endothelin converting enzyme expression through oxidative stress.	Regulatory Peptides	111	13-19	2003
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 and 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

K. Miyashita, H. Itoh, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi and K. Nakao.	Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells.	Hypertens. Res.	26	S93-S98	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 and K. Nakao.	Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells.	Circulation	107	2085-2088	2003
TH. Chun, H. Itoh, L. Subramanian, J.A. Iniguez-Lluhi and K. Nakao.	Modification of GATA-2 transcriptional activity in endothelial cells by the SUMO E3 ligase PIASy.	Circ.Res.	92	1201-1208	2003
K. Miyashita, H. Itoh, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi-Kobayashi, K. Park and sK. Nakao.	Adrenomedullin provokes endothelial Akt activation and promotes vascular regeneration both in vitro and in vivo.	FEBS Lett.	544	86-92	2003

雑誌 (中山泰秀)

T. Masuda, Y. Nakayama	Development of a water-soluble matrix metalloproteinase inhibitor as an intra-arterial infusion drug for prevention of restenosis after angioplasty.	J Med Chem	46	3497-3501	2003
Y. Nakayama, S. Nishi, H.	Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents	J Biomed Mater Res	64A	52-61	2003



Ueda-Ishibashi, T. Matsuda	and acute-phase performances.				
Y. Nakayama, S. Nishi, H. Ishibashi-Ueda	Fabrication of drug-eluting covered stents with micropores and differential coating of heparin and FK506.	Cardiovasc Rad Med	4	77-82	2003
S. Nishi, Y. Nakayama, H. Ishibashi-Ueda, T. Matsuda	Embolization of experimental aneurysms using a heparin-loaded stent graft with micropores.	Cardiovasc Rad Med	4	29-33	2003
S. Nishi, Y. Nakayama, H. Ueda-Ishibashi, T. Matsuda	Occlusion of experimental aneurysms with heparin-loaded, microporous stent grafts.	Neurosurgery	53	1397-1405	2003
Y. Nakayama, T. Matsuda	Photo-control of the interaction between endothelial cells and photo-cation generatable water-soluble polymers.	J Control Release	89	213-224	2003
Y. Nakayama, A. Furumoto, S. Kidoaki, T. Matsuda	Photocontrol of cell adhesion and proliferation by a photoinduced cationic polymer surface.	Photochem Photobiol	77	480-486	2003
H. Sonoda, K. Takamizawa, Y. Nakayama, H. Yasui, T. Matsuda	Coaxial double-tubular compliant arterial graft prosthesis: time-dependent morphogenesis and compliance changes after implantation.	J Biomed Mater Res	65A	170-181	2003
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	64A	320-329	2003
T. Matsuda, J. Nagase, A. Ghoda, Y. Hirano, S. Kidoaki, Y. Nakayama	Phosphorylcholine- endocapped oligomer and block co-oligomer and surface biological reactivity.	Biomaterials	24	4517-4527	2003
C. Li, T. Sajiki, Y.	Novel visible-light-induced	J Biomed	66B	439-446	2003

Nakayama, M. Fukui, T. Matsuda	tissue adhesive composed of multiply strene-derivatized gelatin and poly (ethylene glycol) diacrylate.	Mater Res Part B: Appl Biomater			
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 carrier.	Connect Tissue Res	44	318-325	2003
Yasuhide Nakayama, Hatsu Ishibashi-Ueda, Keiichi Takamizawa	In vivo tissue-engineered small caliber arterial graft prosthesis consisting of autologous tissue (Biotube).	Cell Transplantation		in press	
Y. Nakayama, S. Nishi, H. Ishibashi-Ueda	Geometical design of luminal surface for microporous covered stents	Int J Artif Organs		in press	
西 正吾、中山泰 秀、植田初江、松 田武久	高機能ステントグラフトによる実験的動脈瘤の閉塞-その有用性と展望-	日本血管内治療学会誌	4	6-9	2003

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	107	2085-2088	2003
--	--	-------------	-----	-----------	------

20030209

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