

水性ポリアクリルアミド超薄膜とUV  
エキシマレーザーを利用したセルア  
レイの開発”, 講演要旨集, 75-76,  
(2004)

- 2) 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 岡  
野光夫, “超薄膜化した温度応答性  
グラフトゲルの機能制御”, 講演要  
旨集, 109-110, (2004)
- 3) 菊池明彦, 津田行子, 中尾愛子, 大  
和雅之, 櫻井泰久, 梅津光生, 岡野  
光夫, “ナノメートル厚の超薄膜ゲ  
ルからなるパターン化温度応答性表  
面を用いた共培養組織の再生”, 講  
演要旨集, 111-112, (2004)

#### 招待講演・依頼講演

1. ワークショップ「21世紀の細胞利用テク  
ノロジー」 2003. 2. 10 東京,  
・岡野光夫, 基調講演 “再生医療応用テク  
ノロジー”, 資料集, (2002)
2. nano tech 2003 +Future ナノテクノロジー  
に関する国際会議および国際展示会 2003.  
2. 26-28 東京  
・岡野光夫, “Fusion of intelligent  
polymers and cell by nanotechnology”,  
Abstracts, 158-159
3. 第26回日本医学会総会 2003. 3. 4-6 福  
岡  
・岡野光夫, 大和雅之, 清水達也, “4. 人  
工臓器, 再生医療と人工臓器”, 要旨, 243  
(2003)

4. 国際再生医療Expo 2003. 3. 10-12 神  
戸  
・長谷川昌輝, 大和雅之, 菊池明彦, 石川  
烈, 岡野光夫, “細胞シート工学に基づく  
歯周組織再生療法” (2003)
5. 日本再生医療学会 2003. 3. 11-12 神  
戸  
・清水達也, 大和雅之, 磯井由紀, 菊池明  
彦, 岡野光夫, “細胞シート工学による心  
筋組織再構築”, 要旨集, 60 (2003)
6. The 1st International Symposium on  
Developmental Biology and Tissue  
Engineering 2003. 3. 24 横浜  
・Teruo Okano, Masayuki Yamato, “Cell  
sheet engineering for tissue and organ  
regeneration”, Abstracts, S80 (2003)
7. 第123年会日本薬学会 2003. 3. 27-29 長  
崎  
・岡野光夫, “創薬・医療を目指したナノ  
テクノロジー”, 要旨集, 98 (2003)
8. 第11回関東脳SPECT研究会 2003. 3. 29 東  
京  
・岡野光夫, “再生医療の現状と展望”  
(2003)
9. 19回医学生物学電子顕微鏡技術学会 2003.  
4, 埼玉  
・阿部一彦, 菅原基晃, 迫村泰成, 笠貫宏,  
菊池明彦, 岡野光夫, “Jarvik-7型完全人  
工心臓の血液ポンプ素材表面における粘着  
リンパ球の早期壊死誘発” (会長賞受賞)
10. The international congress on bio -

- nanointerface 2003. 5. 19-24 Tokyo  
 ・ T. Okano, “Cell Manipulation” (2003)
11. IADR 81st general session 2nd meeting of the pan European federation 2003, 6, 25-28  
 ・ M. Hasegawa, M. Yamato, T. Okano, I. Iseki, “Transplantable human periodontal ligament cell sheets: A novel approach for periodontal tissue regeneration” (2003)
12. 第6回日本組織工学会 2003. 06. 12-13 早稲田  
 1) 清水達也, 大和雅之, 磯井由紀, 菊池明彦, 岡野光夫, “細胞シート工学による心筋組織の再構築”, 抄録集, 49 (2003)  
 2) 宮川繁, 澤芳樹, 竹谷哲, 清水達也, 岡野光夫, 松田暉, “重症心不全に対する最良シートを用いた新しい心筋再生法の開発”, 抄録集, 50 (2003)
13. 第10回皮膚創傷治癒フォーラム 2003. 06. 28 東京  
 ・ 岡野光夫, “細胞シート工学-再生医療の新しいアプローチ”, 抄録集, 12-13 (2003)
14. 第40回日本臨床分子医学会学術総会 2003. 7. 10-11 東京  
 ・ 岡野光夫, “細胞シート工学による組織/臓器の構造と機能再生” (2003)
15. 第14回東京ベイ心臓カンファレンス 2003. 7. 19 東京  
 ・ 清水達也, “Myocardial Tissue Engineering-細胞シート工学による心筋組織再構築-”, 予稿集, 6 (2003)
16. Advanced Polymeric Materials and Technology (APMT-2003) 2003. 08. 4-7 Korea  
 ・ Teruo Okano, “Intelligent Surfaces for Cell Sheet Engineering”, Abstract, 56(2003)
17. Advanced Technology Applications for Combat Casualty Care 2003. 08. 18-22 Florida  
 ・ Teruo Okano, “Cell Sheet Engineering for Tissue and Organ Regeneration”, (2003)
18. 1st COE 21 International Symposium on Human-Friendly Materials Based on Chemistry 2003. 08. 27-28 Tokyo  
 ・ Teruo Okano, “Intelligent Biointerface for Tissue and Organ Regeneration”, Abstract, 3-4(2003)
19. Fifth International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers 2003. 09. 10-13 Italy  
 ・ Teruo Okano, “Intelligent Surfaces for Cell Sheet Engineering”, Abstract, IL11(2003)
20. The Korean Society for Biomaterials 2003. 09. 19-20 Korea  
 ・ Teruo Okano, “Recent Progress of Tissue Engineering”, Abstract, 2(2003)
21. US-Japan Symposium on Nanotechnology in Advanced Therapy and Diagnosis

2003. 10. 09-11 横浜
- ・ Teruo Okano, "Bio-Nano-Designed Surfaces for Regenerative Medicine", Abstract, 24(2003)
22. 医療機器フォーラム設立記念シンポジウム「21世紀の医療機器 Tissue Engineering — 開発と評価」 2003. 10. 25 東京
- ・ 岡野光夫, "細胞シートによる組織・臓器の再生", プログラム, 16-17, (2003)
23. 第41回日本人工臓器学会大会2003. 10. 30-11. 01 仙台
- 1) 岡野光夫, "細胞シートを利用したティッシュエンジニアリング", 人工臓器, 32(2), S-19(2003)
  - 2) 白柳慶之, 大和雅之, 東間紘, 岡野光夫, "膀胱の再生医療", 人工臓器, 32(2), S-22(2003)
  - 3) 宮川繁, 澤芳樹, 宮本裕治, 福嶋教偉, 榊田悟, 松宮護郎, 榊雅之, 竹谷哲, 近藤晴彦, イムラン・メモン, 泰広樹, 清水達也, 岡野光夫, 松田暉, "重症心不全に対する細胞シートを用いた新しい心筋再生法の開発", 人工臓器, 32(2), S-36(2003)
  - 4) 菊池明彦, 津田行子, 櫻井靖久, 梅津光生, 大和雅之, 岡野光夫, "パターン化温度応答性表面からの高機能パターン化共培養組織の回収", 人工臓器, 32(2), S-65(2003)
24. 2nd Swiss-Japanese Workshop on Biomaterials 2003. 11. 05-07 Tukuba
- ・ Teruo Okano, "Cell Sheet Engineering for Tissue and Organ Regeneration", Program, 72(2003)
25. Sweden-Japan Workshop on Bionanotechnology 2003. 11. 09-11 Kyoto
- ・ Teruo Okano, "Interlligent Biointerface for Tissue and Organ Regeneration", Abstracts, 22-23, (2003)
26. 第三回山梨再生・移植研究会 2003. 11. 11 山梨
- ・ 岡野光夫, "細胞シート工学による組織・臓器の再生", (2003)
27. 第19回マイクロ化学懇話会 2003. 11. 14 埼玉
- ・ 岡野光夫, "再生医療を切り開くインテリジェント表面", 資料集, (2003)
28. 社団法人化学工学会関東支部 第7回イブニングセミナー 2003. 11. 14 東京
- ・ 岡野光夫, "細胞シート工学による再生医療", (2003)
29. 第8回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 2003. 11. 18-19 東京
- ・ 岡野光夫, "インテリジェント表面による組織・臓器の再生", 講演要旨集, 6-7, (2003)
30. ISSP International Workshop 5th Gel Symposium Polymer Gels; Fundamentals and Nano-Fabrications (GelSympo 2003) 2003. 11. 17-21 Kashiwa
- ・ Teruo Okano, "Intelligent Surfaces for Switching Attachment and Detachment of

Cells” , Program, 58-59, (2003)

31. 第5回国際新技術フェア2003 \_シーズと  
ニーズの出会い・融合\_ 2003. 11. 19-21 東

京

・岡野光夫, “マルチターゲティング癌治療システムの開発”, 独創的革新技術開発研究提案公募制度 \_平成12年度採択制度の成果\_ (文部科学省), 76, (2003)

32. 第8回産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門研究フォーラム \_医療に生きるナノテクフォーラム\_ 2003. 11. 28 東京

・岡野光夫, “パターン化細胞表面の作製とその医療への応用”, (2003)

33. 第4回心血管再生医学研究会 (CVR)  
2003. 11. 29 大阪

・岡野光夫, “組織工学を切り開く細胞シート操作テクノロジー”, (2003)

34. 21COE「実践的ナノ化学」国際シンポジウム 早稲田大学2003 2003. 12. 10-11 東京

・岡野光夫, “組織・臓器再生のためのナノバイオテクノロジー”, プログラム, 22, (2003)

35. 東京理科大学DDS研究部門発足記念シンポジウム DDS研究の展望 2003. 12. 24 東京

・岡野光夫, “細胞シートによる組織・臓器の再生”, プログラム, 6-7, (2003)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

組織工学による血管増生心筋組織の構築ならびにその移植による冠血管床の再生

分担研究者 福田 恵一 慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学 講師

**研究要旨** 本研究ではマウス胚性幹細胞に対し、効率的に心筋細胞に分化誘導させることが出来る因子を発見すべく、既知の物質、未知の物質の探索に取り組んだ。その結果、Factor X なる物質が胚性幹細胞において効率的に心筋細胞に分化誘導できることを明らかにした。Factor X をある特定の濃度、時期に作用させることにより心筋分化は促進されたが、それ以外の方法では心筋分化は促進されなかった。

**A. 研究目的**

胚性幹細胞から心筋細胞を効率的かつ大量に分化誘導する方法を確認し、再生心筋細胞を用いた細胞シートの作成を行う。

**B. 方法**

マウス胚性幹細胞に発生過程で重要とされるさまざまな液性因子 (IGF-1、FGF2、レチノイン酸、アスコルビン酸、BMP、Wnt、Shh、TGF $\beta$ 等) を反応させることにより、胚性幹細胞から心筋細胞への分化誘導を試みた。心筋細胞への分化は心筋特異的転写因子(Nkx2.5、GATA4、MEF2C)、心筋特異的蛋白質 ( $\alpha$ -skeletal actin, ANP, actinin, beta-myosin heavy chain, actinin, Cav1.2) 等の遺伝子発現や免疫染色により判定する。

**C. 結果**

液性因子をスクリーニングすることによりある種の物質(Factor X)が心筋細胞の分化誘導に重要な働きを示すことが明らかとなった。このFactor Xを投与することにより、胚性幹細胞から心筋細胞に分化誘導される確率は約70-80%と著しく上昇した。Factor Xの濃度、投与時間は分化誘導効率に大きな影響を持ち、至適濃度、投与時間を変化させると心筋分化誘導効率は著しく低下した。非投与群に比してFactor X投与群では心筋転写因子の発現時期は早くなり、また発現量も著しく上昇した。Factor Xの投与はマウス胚性幹細胞の株を替えても、ほぼ同様な効果が得られた。

**D. 考察**

マウス胚性幹細胞から心筋細胞への分化誘

導はマウス胚の正常発生過程をたどることが推測されている。Factor Xはこの発生過程における生理的なリガンドであることにより、効率的に心筋分化を促進したものと推測される。

## E. 結論

マウス胚性幹細胞を効率的に分化誘導する因子を発見した。

## F. 健康危険情報

本年度はヒトの細胞を用いた実験やヒトに対する移植実験は行っておらず、健康上問題となる点は存在しない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Keiichi Fukuda. Use of adult mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocyte and its application to cell transplantation therapy. *Bone Marrow Transplant.* 32:S25-S27, 2003.
2. Keiichi Fukuda. Stem cell transplantation as a mode of regenerative medicine. *Jpn Med Association J.* 46:333-338, 2003
3. Hiroaki Kodama, Keiichi Fukuda, Eiichi Takahashi, Satoko tahara, Yuichi Tomita, Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Koji M Owada, Kristiina Vuori, Satoshi Ogawa, Selective involvement of p130Cas/Crk/Pyk2/c-Src in endothelin-1-induced JNK activation. *Hypertention* 41:1372-1379, 2003
4. Ariizumi T, Kinoshita M, Yokota C, Takano K, Fukuda K, Moriyama N, Malacinski GM, Asashima M. *Amphibian in vitro heart induction: a simple and reliable model for the study of vertebrate cardiac development.* *Int J Dev Biol.* 2003;47:405-410.
5. Keiichi Fukuda. Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow: Use of mesenchymal stem cell for cardiovascular tissue engineering. *Cytotechnology.* 41:165-175, 2003.
6. Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda, Yuichi Tomita, Jun Fujita, Masaki Ieda, Satoko Tahara, Yuji Itabashi, Takashi Yagi, Haruko Kawaguchi, Yasuyo Hisaka, Satoshi Ogawa. Cardiomyocytes undergo cells division following myocardial infarction is a spatially and temporally restricted event in rats. *Mol Cell Biochem.* (in press)2004
7. Yasuyo Hisaka, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Isao Shibuya, Haruko Kawaguchi, Toshikazu Nakamura, Hidezo Mori, Koji Kimura, Naoto Fukuyama, Kenichiro Kosai, Satoshi Ogawa. Powerful and controllable angiogenesis by using gene-modified cells expressing human hepatocyte growth factor and thymidine kinase. *J Am Coll Cardiol* (in press) 2004
8. Masaki Ieda, Keiichi Fukuda, Kensuke Kimura, Yasuyo Hisaka, Haruko Kawaguchi, Kouji Shimoda, Eiko Takeshita, Hideyuki Okano, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara, Junji Ishida, Akiyoshi Fukamizu, Linda Salamone, Howard J. Federoff, Satoshi Ogawa. Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic nerve innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest* 113: 1-10, 2004
9. Eiichi Takahashi, Keiichi Fukuda, Shunichiro Miyoshi, Mitsushige Murata, Takahiro Kato, Makoto Ita, Tsutomu Tanabe, Satoshi Ogawa. LIF activates cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels via phosphorylation of serine 1829 of rabbit Cav1.2 *Circ Res.* (in press)2004.

10. Keiichi Fukuda. Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy. *Human Cell*. 13: 83-94, 2003
11. Keiichi Fukuda. Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow stem cells and its application to cell transplantation therapy. *Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potential Clinical Use*. pp121-145. Santiagi Grisolia, M. Dolores Minana, Elena Bendala-Tufanisco, Edit. 2003. Ministerio De Sanidad Y Consumo (Madrid, Spain)
12. Fukuda K, Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow stem cells and application to cell transplantation therapy. *Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease*, pp39-49, 2004, edited by Richard K. Burt and Alberto Marmont. (Landes Bioscience, USA)
13. Keiichi Fukuda. Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow stem cells and its application to cell transplantation therapy. *Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potential Clinical Use*. pp121-145. Santiagi Grisolia, M. Dolores Minana, Elena Bendala-Tufanisco, Edit. 2003. Ministerio De Sanidad Y Consumo (Madrid, Spain)
14. Fukuda K, Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow stem cells and application to cell transplantation therapy. *Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease*, pp39-49, 2004, edited by Richard K. Burt and Alberto Marmont. (Landes Bioscience, USA)
15. 板橋裕史、福田恵一。『心筋再生療法』『日本臨床：増刊号：冠動脈の臨床』2003年日本臨床社
16. 福田恵一。『幹細胞による心筋再生療法』。Annual Review循環器2003。2003年：25-28。中外医学社。
17. 福田恵一、板橋祐史。『体性幹細胞による心筋再生療法』現代医療の最前線 最新医学増刊号644-647。最新医学社刊2003年3月。
18. 福田恵一。「心筋の再生」 39-46。再生医療。ティッシュエンジニアリング&生体材料最前線 田中順三・四宮謙一編 日刊工業新聞社刊
19. 八木崇、福田恵一。内科増刊号91巻。内科キーワード2003。『心血管病の遺伝子治療』1229-1230。南江堂刊
20. 八木崇、福田恵一。内科増刊号91巻。内科キーワード2003。『心筋再生療法』1231-1232。南江堂刊
21. 福田恵一。『Rebuilding myocardium- Stem cell therapy』AHAハイライト2002 2003年2月146-151。
22. 福田恵一、伯野大彦。『骨髄幹細胞由来の再生心筋細胞における交感神経・副交感神経受容体の発現と機能解析』循環器専門医2003年11巻3月号21-28
23. 真鍋知宏、福田恵一。心筋形成と再生医療。細胞工学。22巻5号、525-528,2003年
24. 真鍋知宏、福田恵一。『フローサイトメトリー』Heart View. 11巻66-67、2003年
25. 真鍋知宏、福田恵一。『心筋再生の現状』Angiology fronteer.2巻3号。50-55、2003年
26. 湯浅慎介、福田恵一。『心筋の再生戦略』Surgery Fronteer. 10巻3号31-35、2003年

27. 福田恵一。『骨髄間葉系幹細胞を用いた心筋再生の現状と展望』医学のあゆみ 207巻11号905-908、2003年

28. 福田恵一。『Regulation of Angiogenesis in Models of Ischemia and Arteriosclerosis I』AHA ハイライト2003 : 152-159 2004年2月。

29. 福田恵一。『G-CSFを用いた循環器再生医療』 Medical View Points2004年3月 (in press)。

30. 福田恵一。『骨髄間葉系幹細胞を用いた心筋細胞の再生』東海循環器核医学研究会記録集38 : 1-4 , 2003

## 2. 学会発表

1. Korean Circulaion Society Scientific meeting. Development of regenerated cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. 4.17.2003韓国、済州島(招聘講演)

2. Yuji Itabashi, Shunichirou Miyoshi, Tatsuya Shimizu, Shinsuke Yuasa, Jun Fujita, Fumiyuki Hattori, Teruo Okano, Keiichi Fukuda; Direct Demonstration of Electrical Disconnection of the Cell Sheets between Cardiomyocytes and Skeletal Muscle Cells by Optical Mapping. 75th Scientific meeting 2003.11.17-20, Orlando, USA

3. Yasuyo Hisaka, Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Haruko Kawaguchi, Keiichi Fukuda Powerful and Controllable Angiogenesis by Gene-modified Cell Transplantation Expressing hHGF and TK Genes in Murine Hind Limb Ischemia. American Heart Association. 75th Scientific meeting 2003.11.17-20, Orlando, USA

4. Yasuyo Hisaka, Jun Fujita, Hiroshi Kawada, Masaki Ieda, Haruko Kawaguchi, Kiyoshi Ando, Keiichi Fukuda. G-CSF and HGF: Combination of Vasculogenesis and Angiogenesis. Synergistically Improves Murine Hind Limb Ischemia American Heart Association. 75th Scientific meeting 2003.11.17-20, Orlando, USA

5. 第26回日本造血幹細胞移植学会シンポジウム。福田恵一、川田浩志。「G-CSF and GM-CSF differentially affect the regeneration of infarcted myocardium by bone marrow-derived cells。」平成15年12月20日 パシフィコ横浜。

6. Complex Catheter Therapeutics 2003. ファイアサイドセッションAngiogenesis/ myogenesis 「G-CSF and GM-CSF differentially affect the regeneration of infarcted myocardium by bone marrow-derived cells」平成15年10月21日神戸ポートピアホテル

7. 第43回日本核医学会 シンポジウム：心不全最新治療における心臓核医学の意義と展望 「成体幹細胞を用いた心筋細胞の再生と細胞移植による心不全治療法の開発」福田恵一 平成15年10月28日

8. 第7回日本心不全学会 プレナリーセッション「G-CSF and GM-CSF differentially affect the regeneration of infarcted myocardium by bone marrow-derived cells。」福田恵一 平成15年10月25日 大阪国際会議場

9. 第51回日本心臓病学会シンポジウム 東京国際フォーラム 「心血管再生医学の現状と将来」福田恵一 平成15年9月8日

10. 第21回ヒト細胞学会 ミニシンポジウム

「心血管tissue engineeringを目指した再生心筋の開発」 福田恵一「成体幹細胞を用いた心筋細胞の再生と心血管tissue engineering」 平成15年8月29日 ラフレさいたま 大宮

11. 第45回日本老年医学会 シンポジウム

「高齢社会と再生医療」 福田恵一 心筋再生による高齢者医療 平成15年6月18日

12. 宮武諭、川口治子、家田真樹、渡部紀久子、近江谷克裕、堀進悟、福田恵一。Prostaglandin E2の心肥大作用とmembrane associated prostaglandin E synthase2の誘導。第26回心筋代謝研究会 平成15年7月20日 全社協灘尾ホール

**H. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況**

1. 「細胞シートを作製するための支持体をコーティングするための組成物、細胞シート作製用支持体及び細胞シートの製造方法」 国内出願中（特願2003-328340、平成15年9月19日）
2. 「幹細胞から心筋細胞を分化誘導する方法」 国内 出願中（特願2003-032116、平成15年10月3日）

分担研究報告書

組織工学による血管増生心筋組織の構築ならびにその移植による冠血管床の再生

分担研究者 浅原 孝之 東海大学医学部再生医療科学 教授

**研究要旨** 心筋シートをより重層化するために機能強化型血管内皮前駆細胞や血管新生因子の遺伝子を心筋シートに導入し、心筋シートへ血管新生を誘導する。

**A. 研究目的**

分担研究者岡野らは組織的工学法を用い拡張型心筋症などの心機能の低下した心臓に対して移植することのもできる重層型心筋シートを開発した。しかしながら、重層の心筋シートを移植しても移植後心筋シートは虚血に陥り、薄くなってしまふ。本研究で、分担研究者は心筋シートに機能強化した血管内皮前駆細胞や各種血管新生因子の遺伝子を導入することにより心筋シートに血管新生を誘導し心筋シートの重層化を目指す。

**B. 研究方法**

本年度は来年度への基礎実験として血管内皮前駆細胞への機能強化及び遺伝子導入ベクターの開発を主として行った。遺伝子導入ベクターの開発は従来報告されているウイルスベクターの他に臨床応用を目指しゼラチンハイドロゲルを用い、その作成から遺伝子導入まで至適条件の検討を行った。

(倫理面への配慮)

東海大学医学部動物実験に関する指針に従い、ヘルシンキ宣言の精神を尊重して実験動物に対する十分な倫理的配慮のもとに動物実験を行った。

**C. 研究結果**

臨床応用するためには効率よく遺伝子導入ゼラチンハイドロゲルを作成する必要がある。従来ゼラチンハイドロゲルは豚皮膚より1%程の収率でしか遺伝子導入するためのカチオン化ゼラチンが作成できなかったが、カチオン化ゼラチン作成時にグルタルアルデヒド濃度及びイマルジョン作成時の遠心回転数を変化させることにより収率を6%まで向上することが出来た。このように新たに作成したゼラチンハイドロゲルを用いて腹腔マクロファージへの遺伝子導入を試みその遺伝子導入効率が従来に比較し変化しないことを確認した。

#### D. 考察

本年度の研究により次年度実験で用いるゼラチンハイドロゲルの作成及び至適条件の検討は終了し、次年度実際に心筋シートへの遺伝子導入を試みる。

#### E. 結論

本年度は、ほぼ予定していた行程を終了する事が出来、次年度に向けての礎が築けたと考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 ;126(6):1813-21
- 2) Trakia J Science 1: 15-21, 2003
- 3) Pathophysiology. 2003. 9 (2) : 89-95
- 4) Free Radic Res. 2003. 37 (5) : 481-9
- 5) Circulation. 2003 19;108(7):889-95.
- 6) Brain Res. 2003. 980 (1) : 156-160.
- 7) Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. 2003. 12(4) : 196-200
- 8) Plast Reconstr Surg 2003 15;111(5):1638-45
- 9) JACC. 2003 : 41(6) : 1056-1062
- 10) J Clin Biochem Nutr. 2003. 33 : 61-67.

##### 2. 学会発表

第67回日本循環器病学会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

分担研究報告書

組織工学による血管増生心筋組織の構築ならびにその移植による冠血管床の再生：

重層化心筋細胞シート多段階移植による血管増生

分担研究者 清水 達也 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 講師

**研究要旨** 重症心不全に対する新たな治療法として細胞から組織を再構築し移植する研究が始まっている。我々はシート状の心筋細胞を積層化することで3次元の心筋組織を再構築する独自の研究を展開してきた。本年度の研究では初期の酸素・栄養の透過性に起因する作製組織の厚さの限界を克服するため多段階移植の技術を用いることでより厚い心筋組織を作ることを試み、実際に厚さ約 1mm の心筋組織の再構築に成功した。さらに血管吻合可能な既存血管上に多段階移植を行うことで血管付きの心筋グラフトを作製し異所性に再移植可能なことを示した。

#### A. 研究目的

当研究室では低温処理のみで培養した細胞をシート状に回収できる温度応答性培養皿を用い細胞シートを積層化することで3次元組織を再構築する独自の手法「細胞シート工学」による心筋組織の再構築を追究してきた。これまでに心筋細胞シートを重層化することで同期して拍動する心筋組織の構築には成功しているが、虚血による厚みの限界が組織工学共通の新たな課題となっている。そこで本研究では虚血の限界を克服するひとつの手段として重層化心筋細胞シートを十分な血管新生を待って繰り返し移植することにより、毛細

血管網を伴ったより厚い心筋組織の構築が可能かどうかを検討することを目的とした。さらに既存血管上に移植を反復することにより血管付きの心筋グラフトを作製することも試みた。

#### B. 研究方法

シート状の細胞の回収には温度応答性培養皿を用いた。この培養器材は通常の培養皿上に温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を電子線照射により表面修飾したもので、通常の培養温度である37℃では疎水性表面となり細胞接着性であるが、

32°C以下の低温処理で親水性表面に変化し細胞非接着性となる。この培養皿に細胞を密に培養し細胞が互いに接着した状態にすると、低温処理により細胞がその下面の接着因子とともに培養皿から脱着するものの、細胞間の結合は全く解離せず維持されるため細胞をシート状に回収できる。この培養皿上に新生仔ラット心筋細胞を培養し細胞シートを作製した。低温処理により脱着した細胞シート3枚を重層化しヌードラット皮下組織に移植した。この3層の心筋グラフトを移植後、1、2、3日のインターバルをおいて次の3層の心筋グラフトを移植、それらの同期の有無や組織切片像を解析した。さらに最大10回まで移植を繰り返す、拍動の観察・組織像の解析を行った。次に大腿部浅後腹壁大動静脈上に重層化心筋細胞シートを反復移植し1週間後に血管付きグラフトとして頸動静脈部に再移植する実験を行った。実験動物に関しては苦痛を伴わないよう正しく取り扱い、適切な麻酔を行って研究を行った。

### C. 研究結果

1,2日のインターバルの場合は1週間後2つの移植組織は完全に同期して自律拍動し、一方への移植グラフトへの電気刺激が他方の移植片に伝達されることが確認された。また組織切片上、全層にわたって虚血による壊死は認めずより厚い心筋組織の構築が可能となった。Factor VIII染色では組織内には多数の毛細血管網が確認された。一方3日インターバル

をおいた場合は同期せずそれぞれ異なる拍動を示した。これらの結果をふまえ重層化細胞シート移植を1あるいは2日のインターバルで10回まで反復したところ同期して拍動する厚さ約1mmの心筋組織の再構築が可能となった。

次に大腿部に重層化心筋細胞シートを反復移植して再構築した心筋グラフトを血管付きで単離し頸部に移植したところ直ちに拍動の再開を認めた。

### D. 考察

今回の研究結果より重層化心筋細胞シートの複数回移植により、同期して拍動するより厚い心筋組織の構築が可能であることが示された。すなわちin vivoにおいては多段階移植により酸素・栄養の透過性の限界を超えることが可能であることが明らかとなった。また、3日インターバルをおいた場合は同期しなかったがこれは組織の上層に結合組織層が形成され2つの移植片の電気的結合を妨げるためと考えられた。吻合可能な径の血管上に異所性に作製した心筋グラフトをその血管とともに虚血を生じることなく再移植することが可能であったことは、心筋グラフトがその血管から血流を受けていることを証明するものであった。

### E. 結論

細胞シート工学と多段階移植技術との組み合わせによる治療法は虚血に伴う作製組織厚

の限界を克服するものであり心筋組織のみならず他臓器も含めた今後の再生医療に大きく貢献するものと考える。

研究協力者

関根秀一（東京女子医科大学）

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

論文発表

1. Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. Biomaterials. 2003; 24(13): 2309-2316
2. Shimizu T, Okano T. Tissue engineering for ischemic heart disease. Nippon Rinsho. 2003;61(4):710-715
3. 清水達也, 岡野光夫. Tissue engineering による心筋組織の再生 再生医療, 2003;2(1):45-50
4. 清水達也. 心筋組織再生とバイオマテリアル. バイオマテリアル, 2003;21(3):194-195
5. 清水達也. 心不全に対する心筋再生療法 CARDIAC PRACTICE, 2003 ; 14(3) : 277-281
6. 清水達也. 心筋組織に対する再生医療 医学の歩み, 2003;205(9):693-698
7. 清水達也 細胞シートを用いた心筋の組織工学 医学の歩み, 2003;20(11):915-919
8. 清水達也 組織工学の心血管病への応用

分子心血管病, 2004;5(1):58-64

学会発表

1. 第6回組織工学会 シンポジウム「循環器の再生医療」 細胞シート工学による心筋組織の再構築 清水達也 他
2. Cardiomyopathy and Heart Failure 2003 Plenary Session Myocardial tissue reconstruction by cell sheet engineering Shimizu t et al.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
知久正明、西上和宏、佐藤英一、盛英三	放射光および普及型 X線源を用いた微小血管造影による再生血管の評価	西村恒彦	機能代謝画像診断法と分子画像	南山堂	東京	2003	177-186
藤井隆文、永谷憲歳、盛英三	ゼラチンによる遺伝子の徐放化と細胞-遺伝子ハイブリッド治療への応用	田畑泰彦	遺伝子医学別冊・ドラッグデリバリーシステムDDS技術の新たな展開とその活用方法	メディカルドゥ	大阪	2003	194-199
白柳慶之、岡野光夫	尿路の再生医療	吉田修、東間紘、村井勝 編集主幹	先端医療シリーズ 24・泌尿器科泌尿器疾患の最新医療	株式会社寺田国際事務所 先端医療技術研究所		2003	311-316
松方美樹、菊池明彦、岡野光夫	生命医療材料	山岡亜夫	応用化学シリーズ 高分子工業化学	朝倉書店		2003	108-128
Fukuda K	Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow stem cells and its application to cell transplantation therapy.	Santiagi Grisolia, M. Dolores Minana, Elena Bendala-Tufanisco	Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potential Clinical Use	Ministerio de Sanidad Y Consumo	Madrid, Spain	2003	121-145

Fukuda K	Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow stem cells and application to cell transplantation therapy.	Richard K. Burt and Alberto Marmont	Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease	Landes Bioscience	USA	2003	39-49
板橋裕史、福田恵一	心筋再生療	日本臨床：増刊号：	冠動脈の臨床	日本臨床社	東京	2003	
福田恵一、板橋祐史	体性幹細胞による心筋再生療	最新医学増刊号	現代医療の最前線	最新医学社刊	東京	2003	644-647
福田恵一	心筋の再生	田中純三・四宮健一編	再生医療。ティッシュエンジニアリング&生体材料最前線	日刊工業新聞社刊	東京	2003	39-46
八木崇、福田恵一	心血管病の遺伝子治療	内科増刊号 91巻	内科キーワード 2003	南江堂	東京	2003	1229-1230
八木崇、福田恵一	心筋再生療法	内科増刊号 91巻	内科キーワード 2003	南江堂	東京	2003	1231-1332
田畑泰彦、福山直人、知久正明、國本聡、浅原孝之、田中越郎、盛英三他	遺伝子による血管新生	田畑泰彦	再生医療の実際	羊土社		2003	116-123

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
H.Kitagawa, T.Yamazaki, T.Akiyama, H.Mori, K.Sunagawa	Effects of ketamine on exocytotic and non-exocytotic noradrenaline release	Neurochemistry International	42	261-267	2003

H.Kasahara, E.Tanaka, N.Fukuyama, E.Sato, <u>H.Mori</u>	Biodegradable Gelatin Hydrogel Potentiates the Angiogenic Effect of FGF4 Plasmid in Rabbit Hindlimb Ischemia	JACC	41	1056- 1062	2003
N.Nagaya, M.Kanda, M.Uematsu, N.Fukuyama, T.Horio, H.Mori	Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells	Circulation	108	889-895	2003
T.Akiyama, T.Yamazaki, <u>H.Mori</u> , K.Sunagawa	Inhibition of cholinesterase elicits muscarinic receptor-mediated synaptic transmission in the rat adrenal medulla	Auton Neurosci	107(2)	65-73	2003
E.Sato, Y.Hayasi, R.Gemer, E.Tanaka, <u>H.Mori</u> , et al.	Intense characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma and applications	Jpn J Med Imag Inform Sci	20	154-161	2003
E.Sato, Y.Hayasi, R.Gemer, E.Tanaka, <u>H.Mori</u> ,	Irradiation of intense characteristic x-rays from weakly ionized linear molybdenum plasma	Jpn J Med Phys	23(2)	123-131	2003
N.Tokunaga, T.Yamazaki, T.Akiyama, S.Sano, <u>H.Mori</u>	In vivo monitoring of norepinephrine and its metabolites in skeletal muscle	Neurochem istry Internation al	43	573-580	2003
M.Shirai, J.T.Pearson, A. Shimouchi, N.Nagaya, H.Tsuchimochi, I.Ninomiya, H.Mori	Changes in functional and histological distributions of nitric oxide synthase caused by chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries	Brit J Pharmacol	139	899-910	2003
N.Nagaya, H.Okumura, M.Uematsu, W.Shimizu, F.Ono, M.Shirai, <u>H.Mori</u> , et al.	Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats	Am J Physiol Heart circ Physiol	54(5)	2125- 2131	2003
N.Tokunaga, T.Yamazaki, T.Akiyama, H.Mori	Detection of 3-methoxy-4-hydro- xyphenylglycol in rabbit skeletal muscle microdialysate	J Chromatog r	798	163-166	2003
E.Sato, Y.Hayasi, R.Gemer, E.Tanaka, <u>H.Mori</u> , et al.	Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing weakly ionized linear copper plasma	Rev.Sci.Ins trum	74	5236- 5240	2003
Kwon O. H., Kikuchi A., Yamato M. and Okano T.	Accelerated cell sheet recovery by co-grafting of PEG with PIPAAm onto porous cell culture membranes	Biomaterial s	24	1223- 1232	2003
Feng Z., Yamato M., Akutsu T., Nakamura T., Okano T.	Investigation on the mechanical properties of contracted collagen gels as a scaffold for tissue engineering	Artificial Organs	27(1)	84-91	2003
Yoshida T., Aoyagi T., Kokufuta E., Okano T.	Newly designed hydrogel with both sensitive thermoresponse and biodegradability	J. Polym. Sci. Part A : Polym. Chem.	41	779-787	2003

Ebara M., Yamato M., Hirose M., Aoyagi T., Kikuchi A., Sakai K., Okano T.	Copolymerization of 2-carboxyisopropylacrylamide with N-Isopropylacrylamide accelerates cell detachment from grafted surfaces by reducing temperature	Biomacromolecules	4	334-349	2003
Annaka M., Matsuura T., Kasai M., Nakahira T., Hara Y., Okano T.	Preparation of comb-type N-isopropylacrylamide hydrogel beads and their application for size-selective separation media	Biomacromolecules	4(2)	395-403	2003
Otsuka H., Uchimura E., Koshino H., Okano T., Kataoka K.	Anomalous binding profile of phenylboronic acid with N-acetylneuraminic acid (Neu5AC) in aqueous solution with varying pH	J. Am. Chem. Soc.	125	3493-3502	2003
Yamanaka H., Yoshizako K., Akiyama Y., Sota H., Hasegawa Y., Kikuchi A., Okano T.	Affinity chromatography with collapsibly tethered ligands	Anal. Chem.	75	1658-1663	2003
Kobayashi J., Kikuchi A., Sakai K., Okano T.	Cross-linked thermoresponsive anionic polymer-grafted surfaces to separate bioactive basic peptides	Anal. Chem.	75	3244-3249	2003
Shiroyanagi Y., Yamato M., Yamazaki Y., Toma H., Okano T.	Transplantable urothelial cell sheets harvested noninvasively from temperature-responsive culture surfaces by reducing temperature	Tissue Engineering	9(5)	1005-1012	2003
Yamato M., Konno C., Koike S., Isoi Y., Shimizu T., Kikuchi A., Makino K., Okano T.	Nanofabrication for micropatterned cell arrays by combining electron beam irradiated polymer-grafting and localized laser ablations	J. Biomed. Mater. Res.	67A	1065-1071	2003
Shimizu T., Yamato M., Kikuchi A., Okano T.	Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction	Biomaterials	24	2309-2316	2003
Harimoto M., Yamato M., Kikuchi A., Okano T.	Cell Sheet Engineering: Intelligent Polymer Patterned Surfaces for Tissue Engineered Liver	Macromol. Symposia	195	231-235	2003
Keiichi Fukuda	Stem cell transplantation as a mode of regenerative medicine.	Jap Med Ass J.	46	333-338	2003
Keiichi Fukuda	Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy.	Human Cell	13	83-94	2003
Masaki Ieda, Keiichi Fukuda, et al.	Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic nerve innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression.	J Clin Invest	113	1-10	2004
Yasuyo Hisaka, Keiichi Fukuda, et al.	Powerful and controllable angiogenesis by using gene-modified cells expressing human hepatocyte growth factor and thymidine kinase.	J Am Coll Cardiol	In press		2004

Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda, et al.	Cardiomyocytes undergo cells division following myocardial infarction is a spatially and temporally restricted event in rats	Mol Cell Biochem	In press		2004
Keiichi Fukuda	Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow: Use of mesenchymal stem cell for cardiovascular tissue engineering.	Cytotechnology.	41	165-175	2003
Ariizumi T, Kinoshita M, Fukuda K, et al.	Amphibian in vitro heart induction: a simple and reliable model for the study of vertebrate cardiac development.	Int J Dev Biol.	47	405-410	2003
Hiroaki Kodama, Keiichi Fukuda, et al	Selective involvement of p130Cas/Crk/Pyk2/c-Src in endothelin-1-induced JNK activation.	Hypertension	41	1372-1379	2003
Eiichi Takahashi, Keiichi Fukuda, et al.	LIF activates cardiac L-type Ca <sup>2+</sup> channels via phosphorylation of serine 1829 of rabbit Cav1.2	Circ Res	In press		2004
Keiichi Fukuda.	Use of adult mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocyte and its application to cell transplantation therapy.	Bone Marrow Transplant.	32	S25-S27	2003
藤田尚代、福田恵一ほか	培養尿細管細胞周期的伸展刺激による p38MAPキナーゼの活性化	日本小児腎臓病学会雑誌	16	29-33	2003
吉岡正豊、福田恵一	心筋細胞の新生・再生療法と細胞移植療法	再生医療	2	57-63	2003
福田恵一	Regulation of Angiogenesis in Models of Ischemia and Arteriosclerosis I	AHA ハイライト	2003	152-159	2002
福田恵一、伯野大彦	骨髄幹細胞由来の再生心筋細胞における交感神経・副交感神経受容体の発現と機能解析	循環器専門医	11	21-28	2003
真鍋知宏、福田恵一	心筋形成と再生医療	細胞工学	22	525-528	2003

真鍋知宏、福田恵一	フローサイトメトリー	Heart View	11	66-67	2003
真鍋知宏、福田恵一	心筋再生の現状	Angiology fronteer	2	50-55	2003
湯浅慎介、福田恵一	心筋の再生戦略	Surgery Fronteer	10	31-35	2003
福田恵一	骨髄間葉系幹細胞を用いた心筋再生の現状と展望	医学のあゆみ	11	905-908	2003
福田恵一	G-CSFを用いた循環器再生医療	Medical View Points	In press		2004
福田恵一	骨髄間葉系幹細胞を用いた心筋細胞の再生	東海循環器核医学研究会記録集	38	1-4	2004
Hayashi Y, Sawa Y, Fukuyama N, Miyamoto Y, Takahashi T, Nakazawa H, Matsuda H.	Leukocyte-depleted terminal blood cardioplegia provides superior myocardial protective effects in association with myocardium-derived nitric oxide and peroxynitrite production for patients undergoing prolonged aortic crossclamping for more than 120 minutes.	J Thorac Cardiovasc Surg.	126(6)	1813-21	2003
Hoshiai K, Fukuyama N, Yoshida T, Kimura K, Meng H, Ishiwata K, Obama R, Ichimori K, Nakazawa H.	Inhibition of nitrotyrosine formation reduces endotoxin-induced liver injury irrespective of TNF- $\alpha$	J Clin Biochem Nutr	33	61-67	2003
Masuda T, Fukuyama N, Nakazawa H	High extracellular inorganic phosphate causes reduction of intracellular free magnesium in perfused rat heart. <i>Trakia</i>	J Science	1	15-21	2003
Shoyama, Y. Tsuji, C. Shioya, S. Fukuyama, N. Nakazawa, H.	Anti-inflammatory effect of <i>Pelteobagrus nudiceps</i> extract on rat model of CFA-induced pulmonary tuberculous granuloma.	Pathophysiology.	9 (2)	89-95	2003
Ichimori, K. Fukuyama, N. Nakazawa, H. Aratani, Y. Koyama, H. Takizawa, S. Kameoka, Y. Ishida-Okawara, A. Kohi, F. Suzuki, K.	Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction--study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice.	Free Radic Res.	37 (5)	481-9	2003
N. Nagaya, M. Kanda, M. Uematsu, N. Fukuyama, T. Horio, K. Nishioka, J. Hino, H. Okumura, M. Shiba, Y. Tabata, N. Mochizuki, T. Asahara, Y. Chiba, K. Miyatake, H. Hara, K. Kangawa, H. Mori	Hybird cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells.	Circulation	108(7)	889-95	2003