

200400049B

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

循環器系疾患治療のための
次世代遺伝子導入ベクターの創製に関する研究

平成 14 年度～16 年度 総合研究報告書

主任研究者 田畑 泰彦

平成 17(2005)年 3 月

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

循環器系疾患治療のための
次世代遺伝子導入ベクターの創製に関する研究

平成 14 年度～16 年度 総合研究報告書

主任研究者 田畑 泰彦

平成 17(2005)年 3 月

目次

I. 総合研究報告	
循環器系疾患治療のための次世代遺伝子導入ベクターの創製に関する研究 ……	1
田畑 泰彦	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	19
III. 研究成果の刊行物・別刷 ……	26

循環器系疾患治療のための次世代遺伝子導入ベクターの創製

主任研究者 田畑泰彦 京都大学再生医科学研究所 生体組織工学研究部門 生体材料学分野 教授

研究要旨

プラスミド DNA を徐放するための生体吸収性のカチオン化ゼラチンからなる次世代の遺伝子キャリアシステムを作製し、それらのキャリアシステムのキャラクタリゼーションとそれらとプラスミド DNA とのコンプレックス形成、ならびに遺伝子発現特性を評価した。ゼラチンのカルボキシル基にエチレンジアミンを導入することによりカチオン化ゼラチンを得た。カチオン化ゼラチンからなる徐放化キャリアをデザイン、作製し、この徐放化キャリアから遺伝子を徐放化させることによって、遺伝子の導入・発現効率を高めること、また、その発現期間がコントロールできることを見出した。次に、得られたカチオン化ゼラチンにポリエチレングリコール（PEG）を結合させ、PEG 導入カチオン化ゼラチンを作製した。これらの試料は水溶液中で臨界ミセル濃度を示し、分子サイズ数百ナノメートルの高分子ミセルを形成した。PEG 修飾カチオン化ゼラチンとプラスミド DNA とを水溶液中で混合したところ、両者のポリイオンコンプレックスからなる微細化粒子が得られた。得られたプラスミド DNA 微細化粒子をマウス皮下に投与したところ、遊離のプラスミド DNA に比較して、高い遺伝子発現レベルが認められた。また、超高压処理による遺伝子-高分子複合体の調製と機能評価およびそれらの担体としての無機ナノ粒子の調製と複合化についての検討を行った。一方、血管内皮前駆細胞（EPC）への遺伝子導入によるハイブリッド細胞-遺伝子治療について以下の検討を行った。まず、従来の遺伝子導入方法により、血管新生作用をもつ Hif1- α の遺伝子を導入した EPC 移植療法の虚血性疾患に対する治療有効性を示した。次に、カチオン化ゼラチンからなる次世代遺伝子キャリアシステムを利用して、*in vitro* で EPC、末梢血単球、マクロファージ、骨髄単核球に高い効率で遺伝子を導入できることを示した。また、カチオン化ゼラチンからなる次世代遺伝子キャリアシステムから強力な血管拡張ペプチドであるアドレノメデュリンの遺伝子を徐放化することによって、血管再生治療が行える可能性を示した。さらに、このアドレノメデュリン遺伝子をカチオン化ゼラチンシステムから徐放化することにより機能強化した EPC を利用した肺高血圧治療の有効性を示した。次世代遺伝子ベクターを用いて、EPC へ血管内皮増殖因子（VEGF）の遺伝子を導入した。遺伝子導入された EPC は VEGF を分泌し、自己増殖能が促進された。また、兔下肢虚血モデルでアドレノメデュリン遺伝子と次世代遺伝子ベクターとの複合体の血管再生治療効果を確認した。さらに、血管再生の評価法として、病院設置型微小血管造影装置を完成させるとともに、国立循環器病センターに設置した病院設置型微小血管造影装置の臨床応用を開始した。本装置の安全性と有用性に関して、下肢循環障害患者において血管再生治療前後の 2 度にわたる造影を実施し、検討を行った。最後に、細胞移植方法として、単離細胞移植と細胞シート移植とを比較したところ、細胞シートの移植では単離細胞の移植に見られる細胞塊の形成による内部壊死を回避でき、細胞の損失なく効率よく移植できることがわかった。基本的な細胞シートの作製ならびに積層化法を確立し皮下組織において細胞シート移植が単離細胞移植より効率的に細胞をデリバリー可能であることを示した。実際、次世代遺伝子ベクターを用いて遺伝子導入可能な細胞である EPC を細胞シートとともに心筋梗塞モデルに移植しその有効性を解析したところ、EPC が細胞シートとともに効率的に生着するとともに梗塞部の血管網の再生に寄与し心機能を改善することが示された。

分担研究者

岸田晶夫 東京医科歯科大学
生体材料工学研究所 教授
浅原孝之 東海大学医学部生理科学 教授
盛 英三 国立循環器病センター研究所
心臓生理部 部長
永谷憲歳 国立循環器病センター研究所
再生医療部 部長
清水達也 東京女子医科大学
先端生命医科学研究所 講師

A. 研究目的

本研究の目的は、虚血性心筋症（心筋梗塞、心筋症）や慢性閉塞性動脈硬化症などの血管狭窄病変に対する遺伝子細胞療法のための両親媒性遺伝子ベクターを開発し、これを用いて①血管内投与による高効率な Gene Therapy さらに②血管成長因子等の遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞などによるハイブリッド細胞・遺伝子治療法を開発することである。また機能強化した細胞をシート化して移植組織の機能向上を実現する。これまでに遺伝子の発現効率が高まる徐放化キャリアの作製に成功しているが、これをさらに高機能化するために、遺伝子の徐放が可能でかつ凝集のない微細化遺伝子キャリアを生体吸収性ゼラチン、ヒト遺伝子組み換え型ゼラチンあるいは合成高分子であるポリビニルアルコールから作製する。これらを用いることで遺伝子導入効率を飛躍的に高めることができ、遺伝子導入血管内皮前駆細胞などによるハイブリッド細胞・遺伝子治療法を実現できる。本研究が実現されることで、安全性が高く、かつ、導入効率が高い理想的な遺伝子導入ベクターが得られ、遺伝子治療の普及を加速する。また、治療機能を有する細胞内に遺伝子を導入することで細胞治療と遺伝子治療の要素を併せもった新しいハイブリッド治療法が提唱できる。また、この遺伝子導入システムは温度応答性基材を用いて作製した細胞シートの機能強化にも利用でき、その組織移植医療への応用を拡大する。

B. 研究方法

各分担研究者の研究方法の概略について以下にまとめる。

次世代遺伝子キャリアの作製と性質の評価

ブタ皮膚のコラーゲンを酸処理することによって得られたゼラチンのカルボキシル基へエチレンジアミンの片末端アミノ基を水溶性カルボジイミドを用いて縮合反応を行った。反応時におけるエチレンジアミン、水溶性カルボジイミドの濃度を変化させて、アミノ基導入率の異なるカチオン化ゼラチンを作製した。アミノ基導入率はトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 法により測定した。また、得られたカチオン化ゼラチンの electrophoretic light scattering (ELS) 測定によりゼラチンのカチオン化度を調べた。

得られたカチオン化ゼラチンの 10wt%水溶液に異なる濃度のグルタルアルデヒドを加え、攪拌下、4℃で 12 時間の架橋反応を行った。残存アルデヒド基を化学的にブロックするために、カチオン化ゼラチンハイドロゲルを 100mM のグリシン水溶液で処理した。蒸留水で洗浄、凍結乾燥することによって架橋程度の異なる架橋カチオン化ゼラチンを得た。

CMV プロモータをもつ LacZ coding プラスミド DNA を Bolton-Hunter 試薬にて放射ヨードラベル化した。このラベル化プラスミド DNA 水溶液にて乾燥カチオン化ゼラチンハイドロゲルを室温、12 時間の条件下で膨潤、¹²⁵I ラベル化プラスミド DNA 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルを作製した。一方、カチオン化ゼラチンを同様の方法で ¹²⁵I ラベル化を行った。¹²⁵I ラベル化プラスミド DNA 含浸ハイドロゲルおよび ¹²⁵I ラベル化ハイドロゲルを ddY マウスの背部皮下へ埋入後、経時的に埋入部位での残存放射活性を測定することによって、体内におけるプラスミド DNA およびカチオン化ゼラチンハイドロゲルの残存の時間変化を評価した。次に、プラスミド DNA 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルをマウス大腿筋肉内に埋入、経時的に筋肉を採取、そ

のプラスミド DNA 発現を評価した。加えて、ハイドロゲル埋入部位における遺伝子発現を組織学的に観察した。それぞれの動物実験はサンプル数 5~6 で行い、ANOVA 法による有意差検定を行った。

得られたカチオン化ゼラチンのリン酸緩衝溶液 (pH8.5) 中に、片末端メトキシ、片末端活性化エステルをもつポリエチレングリコール (PEG、重量平均分子量：3,000、5,000、および 12,000 日本油脂 (株) から供与) を加え、所定時間、反応させた。PEG 仕込み量を変化させることにより、異なる PEG 導入率をもつカチオン化ゼラチンを得た。PEG 導入率は TNBS 法によるアミノ基の減少から算出した。得られた PEG 導入カチオン化ゼラチン (PEG-ゼラチン) の水溶液中における臨界ミセル濃度 (CMC) は、定法である蛍光試薬の強度変化から定量した。また、ELS 測定と dynamic light scattering (DLS) 測定により PEG-ゼラチンの電荷と分子サイズを評価した。PEG の分子量およびその導入率の異なる様々な PEG-ゼラチンと CMV プロモータをもつ LacZ coding プラスミド DNA とを水溶液中で混合した。両者のポリイオンコンプレックス形成については、DLS 測定による混合前後のプラスミド DNA の分子サイズ変化、および混合前後のプラスミド DNA の陰イオン交換樹脂への吸着挙動を調べることで評価した。さらに、遺伝子発現レベルを *in vivo* において評価した。すなわち、PEG-ゼラチンとプラスミド DNA とのコンプレックス、コントロールとして遊離プラスミド DNA をそれぞれマウス大腿筋肉内に投与した。経時的に筋肉を採取、そのプラスミド DNA 発現を評価した。加えて、ハイドロゲル埋入部位における遺伝子発現を組織学的に観察した。それぞれの動物実験はサンプル数 5~6 で行い、ANOVA 法による有意差検定を行った。

高分子-遺伝子複合体の新プロセス開発に関する研究

重合度、けん化度の違う数種類の PVA を用い

た。PVA に所定量の超純水を加え、オートクレーブにより完全に融解させた。DNA+PVA 複合体形成の観察のためには、DNA+PVA 溶液の最終の濃度が 1%, 0.1%, 0.02%, 0.01%, 0.005%, 0.002%, 0.001%, 0.0005%, 0.0002%, 0.0001%, 0.00002w/v% になるように 12 種類の PVA 水溶液を調整した。DNA は pEGFP-C1 プラスミドベクター (4.7kbp) を用いた。PVA 水溶液に DNA 水溶液を添加後、密封し、40°C において 10000atm で 10 分間処理した。

得られた DNA/PVA 複合体の特性解析として、CD 測定、AFM 測定、UV を用いた融点測定、DNA 分解酵素に対する耐性試験、および無細胞タンパク質合成系を用いた発現評価測定を行った。

次に、分子量の異なる 3 種の PVA と緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードしたプラスミドを FITC でラベル化後、種々の比で混合し、超高压処理 (10,000 気圧) を行った。得られた溶液をそのまま所定の細胞培養系に添加し、FITC の発光により複合体の取り込みを、1 日後の GFP の発現により遺伝子発現をそれぞれ評価した。さらに、焼結リン酸カルシウムの結晶のサイズを制御することによって、ナノ粒子化ならびにプラスミド DNA と複合化し、より高い遺伝子導入剤としての応用を試みた。

ヒト組み換え DNA 生分解性物質の開発

成人末梢血より血管内皮前駆細胞 (EPC) を単離した。すなわち、末梢血より密度勾配遠心法を用いて単核球を分離し、EPC 用培地を用いて単核球中 EPC を *ex vivo* にて 7 日間、分化・増幅培養した。次に、Hif1- α 遺伝子導入 EPC 移植療法の有効性を検討するために、*ex vivo* にて培養した EPC を重傷下肢虚血マウスモデルに静脈内投与し、Laser Doppler Analysis により 4 週後に血流量を評価した。

一方、培養 EPC にカチオン化ゼラチンを用いて GFP 及び VEGF plasmid 遺伝子を導入し

た。遺伝子導入された EPC の増殖能は MTS assay kit により、また、遊走能を modified Boyden chamber により検討した。

上記 ex vivo にて培養した VEGF 遺伝子導入 EPC を重傷下肢虚血マウスモデルに静脈内投与し、Laser Doppler Analysis により 4 週後に評価、また重傷下肢虚血ラットモデルを用いてアセチルコリンに対する血管反応性を放射光血管造影 (Spring8) にて検討した。

細胞への遺伝子導入法の開発と循環傷害への応用

EPC にカチオン化ゼラチン遺伝子キャリアシステム (GFP およびアドレノメデュリン遺伝子を含む) を貪食させ、細胞内での遺伝子発現を GFP 遺伝子で検討し、肺高血圧モデル等で細胞-遺伝子ハイブリッド治療の効果を検討した。

次に、兎の下肢動脈を結紮して作製した下肢虚血モデルに対して、モデル作製 10 日後に以下の治療を行い、それらの血管再生効果を比較した。

- ①カチオン化ゼラチン-アドレノメデュリン 遺伝子複合体治療群
- ②カチオン化ゼラチン単独投与群。
- ③カチオン化ゼラチン-LacZ 遺伝子複合体投与群。

また、血管再生の評価方法では、放射光を線源とする微小血管造影法の代替として、病院に設置可能な普及型微小血管造影装置の試作機を作製した。吸収線量および散乱線の測定に基づいて安全性を確認した後、3 例の臨床例への応用を実施した。

遺伝子導入細胞を用いた肺高血圧治療法の開発

ゼラチン-IGF-1 複合体による心筋細胞への抗アポトーシス作用及び心機能改善効果をラット急性心筋梗塞モデルで検討した。

遺伝子導入細胞の組織移植用シートへの応用

シート状の細胞の回収には当研究所で開発された温度応答性培養皿を用いた。この培養基材は

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℃以下の低温処理で親水性表面に変化するため細胞非接着性となる。細胞を密に培養した細胞が互いに接着した状態では、温度効果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。この培養皿上でラットの腹部皮下組織より採取した線維芽細胞と GFP 遺伝子を発現したラットの末梢血より採取した EPC とを用いて共培養シートを作製した。温度降下処理 (20℃) により脱着した細胞シート 3 枚を積層化、心筋梗塞作製 1 週後のヌードラットの梗塞部位上に移植した。比較対照として同数の EPC を心筋内へ局所注入した群及び移植を行わなかった群を作製した。移植後 1 週間毎に心エコーで経時的に心機能を評価、移植 4 週間後に組織像を観察した。

C. 研究成果

各分担研究者の研究成果の概略について以下にまとめる。

次世代遺伝子キャリアの作製と性質の評価

エチレンジアミンならびに水溶性カルボジイミドのそれぞれの濃度の増加にともないアミノ基導入率の高いカチオン化ゼラチンを作製することができた。ELS 測定により、カチオン化ゼラチンが正電荷をもっていること、また、カチオン化ゼラチンとの混合によりプラスミド DNA の負電荷が減少、弱い正電荷を示すことがわかった。DLS 測定によって見かけの分子サイズを評価したところ、カチオン化ゼラチンとの混合によってプラスミド DNA の分子サイズが小さくなることがわかった。電気泳動測定の結果も考慮して、プラスミド DNA がカチオン化ゼラチンとポリイオンコンプレックス形成していることを確認した。

生体内におけるカチオン化ゼラチンハイドロ

ゲルの分解性を調べたところ、ハイドロゲルは時間とともに分解し、さらに、その分解がハイドロゲル作製時におけるグルタルアルデヒド濃度の減少とともに速くなることがわかった。これは、グルタルアルデヒドの濃度の減少にともなって、ハイドロゲルの架橋程度が低下し、酵素攻撃によるゼラチン分子の水可溶化の速度の上昇したことが原因であると考えられる。このように、ハイドロゲルの生体内分解性は、その架橋程度をコントロールすることでコントロールすることができた。

¹²⁵I ラベル化プラスミド DNA を含浸したカチオン化ゼラチンハイドロゲルを埋入したところ、その残存放射活性は時間とともに減少した。また、その減少はハイドロゲルの分解性によってコントロールが可能であり、その時間変化は、前述のカチオン化ゼラチンハイドロゲルの生体内残存の時間変化とよく相関していた。これは、体内でプラスミド DNA が、その徐放キャリアであるハイドロゲルの分解性によってコントロールされていることを示している。

プラスミド DNA 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルをマウス筋肉内に埋入時の埋入部位における遺伝子発現が見られた。埋入 2 日目から水溶液プラスミド DNA 投与に比較して、有意に高いレベルの遺伝子発現が認められ、その発現期間も延長した。また、この遺伝子発現期間は、プラスミド DNA の徐放期間の延長とともに延長した。

カチオン化ゼラチンへの PEG 導入反応においては、用いる PEG の分子量にかかわらず、いずれの PEG においても、ゼラチンに対する PEG の添加量の増加とともに PEG 導入率は増加した。PEG-ゼラチンは、それ自身が水溶液中で CMC をもっていた。その CMC の値は、PEG の分子量とその導入率とに依存していた。PEG 分子量および導入率の増加とともに CMC 値は低下し、より安定な高分子ミセルを形成していることがわかった。そのミセルの分子サイズは数百ナノメートルであり、表面電荷は数 mV であった。次に、得られた PEG-ゼラチンと混合することによりプラ

スミド DNA の負電荷が減少、弱い正電荷を示すことがわかった。また、DLS 測定によって見かけの分子サイズを評価したところ、カチオン化ゼラチンとの混合によってプラスミド DNA の分子サイズが小さくなることがわかった。PEG-ゼラチンとの混合の前後におけるプラスミド DNA の電気泳動測定の結果も考慮して、プラスミド DNA が PEG-ゼラチンとポリイオンコンプレックスを形成、微細化粒子ができていることを確認した。コンプレックス形成は、PEG-ゼラチンの PEG の分子量および PEG の導入率に大きく影響された。PEG の分子量とその導入率の増加とともにコンプレックス形成は抑制された。この結果は、ゼラチンに導入された PEG 分子の立体障害により、PEG-ゼラチンとプラスミド DNA との相互作用が抑制されたことを示している。PEG の導入されていないカチオン化ゼラチンおよび PEG-ゼラチンとプラスミド DNA とのコンプレックスを陰イオン交換樹脂カラムにアプライしたところ、前者はカラム内に吸着、溶出されなかったのに対して、後者は吸着されず、溶出された。このことは、後者のコンプレックス表面に PEG 鎖が存在し、陰イオン交換樹脂との相互作用を弱めた結果であると考えられた。以上の結果より、PEG-ゼラチンをプラスミド DNA と混合することによって、内部コアにプラスミド DNA が包含され、表面に PEG 鎖をもつ微細粒子の形成されていることがわかった。また、この微細粒子の形成には、PEG 分子量とその導入率のコントロールとが重要であった。

プラスミド DNA 単独あるいは PEG-ゼラチンとのコンプレックスをマウス筋肉内に注射した後の注射部位における遺伝子発現を調べた。その結果、注射 2 日目から水溶液プラスミド DNA 投与に比較して、PEG-ゼラチン-プラスミド DNA コンプレックスの場合には、有意に高いレベルの遺伝子発現が認められ、その発現期間においても、数日、延長した。

高分子-遺伝子複合体の新プロセス開発に関する研究

PVA-プラスミドDNA混合溶液を超高压処理した後に電気泳動を行い、複合体形成を検討したところ、DNA マーカーの場合と比較すると、より高分子量の PVA を用いなければ複合体は生成しなかった。重合度 1500 以上の PVA で、再現性の良い複合体の形成バンドが観察された。この結果より、PVA と DNA との複合体形成には双方の分子量が影響することがわかった。DNA の構造を評価するために CD 測定を行ったところ、DNA 単独では超高压処理されると変性するが、PVA を混合して超高压処理することによって、DNA の構造が安定化されることがわかった。このことは、PVA が DNA/PVA 複合体を形成し、DNA の構造安定性に寄与していることを示している。さらに、DNA/PVA 複合体の AFM 観察を行ったところ、DNA は PVA が絡み合った繊維状の構造をもち、その直径は DNA 単独と比較して約 1.5 倍であった。

DNA が安定化されているかどうかを調べるために、複合体の熱力学的特性評価として UV を用いた DNA の融点測定を行った。DNA 単独では 56℃ 付近に融点が存在するがこれに PVA を混合しただけでは融点は変化しなかった。しかしながら、超高压処理による DNA/PVA 複合体では、40℃ 付近から徐々に融解曲線が変化し、53℃ に融点を示した。このことは、DNA/PVA 複合体が DNA 単体よりも低い融点を示すことから、低温側で徐々に PVA が DNA から解離し、ほどけた PVA が DNA の融解を促進したことを示唆している。一方、DNA/PVA 複合体の DNA 分解酵素に対する抵抗性を調べたところ、超高压処理によって得られた複合体は優れた耐性を示し、この方法が遺伝子デリバリー法として優れていることが示された。

次に、PVA-プラスミド DNA 複合体の細胞内への取り込みについて検討を行った。種々の細胞を

用いて検討を行った結果、特に貪食能の高い細胞において、多量に取り込まれていることが明らかとなった。マクロファージ系の樹立細胞である RAW 細胞に PVA-プラスミド DNA 複合体を投与した場合、ほぼすべての細胞が FITC に由来する蛍光を発しており、高い取り込みが実現されていることがわかった。さらに、GFP 遺伝子を用いて遺伝子発現を観察したところ、ほとんどすべての細胞は弱くではあるが、発現していることがわかった。しかしながら、細胞内取込は高いものの、発現効率は低い結果が得られている。この原因を推察するために、無細胞蛋白質合成系による検討を行った。その結果、DNA/PVA 複合体は DNA 単体と比較して蛋白質合成量が低下していた。このことは、細胞内での遺伝子発現が低い原因として、DNA/PVA 複合体が安定すぎて解離ができないためであることを示唆している。一方、血清存在下では 20 時間後では蛋白質合成量は低下しているが、DNA/PVA 複合体ではほとんど低下が認められなかった。以上より、超高压処理によって得られる DNA/PVA 複合体は血清中でも安定であり、発現量は低いものの長時間の発現が期待できることが明らかとなった。

一方、焼結リン酸カルシウムのナノ粒子の作製を行った。水中への分散性に問題があるため、このままでは遺伝子デリバリー用担体として応用することは困難であったため、表面改質を行って水分散性の向上を試みた。その後、プラスミド DNA を複合化させ、遺伝子取り込みについて検討を行った。細胞を用いた実験によって、無機微小粒子の細胞内への取り込み、および遺伝子導入が確認できた。

ヒト組み換え DNA 生分解性物質の開発

Hif1- α 遺伝子導入 EPC の増殖能・遊走能はコントロール遺伝子導入 EPC に比し有意に上昇していた。また虚血組織内の新生血管数は、有

意に増加しており、Laser Doppler Analysis では Hif1-alpha 遺伝子導入 EPC 移植群において有意に血流の改善が認められた。

GFP 遺伝子導入 EPC の導入効率、他のウイルス性ベクターと比し、同等以上導入効率であった。また、VEGF 遺伝子導入 EPC の増殖能・遊走能は非遺伝子導入及び GFP 遺伝子導入 EPC に比し有意に上昇していた。in vivo 実験にて Laser Doppler Analysis では VEGF 遺伝子導入 EPC 移植群において有意に血流の改善が認められた。また、放射光血管造影において、アセチルコリン反応性の血管新生が認められた。

細胞への遺伝子導入法の開発と循環傷害への応用

アドレノメデュリン遺伝子を含むカチオン化ゼラチン遺伝子キャリアシステムを食食させた EPC は、ラットの肺高血圧モデルで、EPC 単独治療群よりも有意に肺血圧と肺血管抵抗を低下させた。さらに、動物の生存期間も延長させた。また、遺伝子導入による副作用は認められなかった。次世代遺伝子ベクターによる安全で高率の高い遺伝子導入法が確立されたと考えられる。

カチオン化ゼラチン-アドレノメデュリン遺伝子複合体を食食させた下肢虚血兎では、同遺伝子単独治療群、カチオン化ゼラチン単独治療群よりも有意に下肢血管密度と下肢血流を増加させ、虚血性組織変化を軽減させた。一方、解像度の検討では、チャートにおいて、一般の血管造影では 250 μm が限界であったが、病院設置型微小血管造影装置では、50 μm まで観察できた。臨床応用では、3 例の重症末梢動脈閉塞症に施行し、同日に実施された既存の血管造影法との比較を行った。いずれの例でも既存の血管造影法よりも微細な血管床の観察ができることが確認された。そのうちの 1 例では血管再生治療後に再生したと推測される、新たな血管床の観察が確認された。

遺伝子導入細胞を用いた肺高血圧治療法の開発

ウサギ下肢虚血モデルへのアドレノメデュリン

遺伝子導入によって、レーザードップラーより求めた虚血下肢/健側下肢血流比が有意に改善し、また毛細血管数の有意な増加が認められた。アドレノメデュリンは骨格筋内の Akt をリン酸化し血管新生に働くことが明らかとなった。アドレノメデュリンプラスミド DNA とカチオン化ゼラチン遺伝子キャリアとの複合体の投与はプラスミド DNA 単独に比べて、骨格筋内のアドレノメデュリンの発現およびその発現期間を持続させ（2 週間以上）、強力な血管再生作用を示した。

またアドレノメデュリン投与と骨髄単核細胞移植の併用群では、アドレノメデュリン単独投与群、細胞移植単独群と比較してレーザードップラーによる下肢血流量の増加と毛細血管数の増加を認めた。In vitro ではアドレノメデュリンは骨髄単核細胞のアポトーシスを抑制し、血管内皮細胞への接着、分化を促した。

ラットの心筋梗塞作製直後にゼラチン-IGF-1 複合体を心筋内に直接注入した。術後 4 週間目に心エコー、心臓カテーテル及び組織学的解析を施行したところ、ゼラチン-IGF-1 複合体投与群は対照群に比較して有意に心拡大及び左室拡張末期圧の増大を抑制し、左室駆出率及び LVdP/dt を増大させた。また、梗塞率を著明に減少させ、ラットの生存率を改善した。また、虚血により誘導される心筋細胞のアポトーシスを抑制した。

遺伝子導入細胞の組織移植用シートへの応用

細胞浮遊液の移植と重層化細胞シートの移植との比較において前者では移植後早期に TUNEL 陽性細胞を認め、7 日目では球状の細胞塊の中央部に壊死組織を認めたのに対し、後者では TUNEL 陽性細胞は認めず経時的にも層状の組織内に壊死組織は認めなかった。また前者では数日してから connexin43 の発現を認めたのに対し、後者では組織内に最初から connexin43 の発現を認めた。また蛍光ラベルした EPC を心筋細胞シート間に挿入し培養後、皮下組織に移植したところ前駆細胞が拍動する心筋組織内に生着して残存していることが確認された。また一部の細胞は

管状構造を形成し血管網の再構築に貢献していることが示唆された。

心エコー上 EPC—線維芽細胞共培養シート移植群では心機能（左室短縮率）の有意な改善が認められた。EPC 単独注入群に関しても心機能の改善傾向は認められたが、改善度は共培養シート移植群の方が大きかった。組織像では共培養シート移植群および EPC 単独注入群では移植を行わなかった群と比較し、梗塞部位における血管数が有意に増加していた。また血管増生部位に関しては EPC 単独注入群で部分的に局在しているのに対し、共培養シート移植群では一様であった。さらに GFP 抗体および血管内皮特異的 isolectin B4 の同時蛍光染色を行ったところ共培養シート移植群において再生した組織内血管網に共染色される血管内皮細胞が多数認められた。

D. 考察

薬物の徐放化研究の歴史は古く、これまでに多くの報告がされている。しかしながら、その中でもプラスミド DNA の徐放化の試みは少ない。これらの報告では、生体吸収性高分子キャリア内にプラスミド DNA を包含させ、プラスミド DNA のキャリア内での単純拡散によりその徐放をコントロールしている。本研究では、これとは異なった徐放メカニズムを提唱している。すなわち、プラスミド DNA を徐放キャリアを構成するカチオン化ゼラチンとポリイオンコンプレックスを形成させ、徐放キャリア内に固定化、保持している。この状態ではプラスミド DNA は徐放されず、ハイドロゲルが分解され、カチオン化ゼラチン分子が水可溶化して初めて、固定化プラスミド DNA はハイドロゲルから放出される。このシステムでは、徐放化キャリア自身の分解により DNA の徐放パターンをコントロールすることができる。この徐放メカニズムでは、拡散により徐放を制御している従来法とは違い、キャリアのサイズ、体積あたりのキャリアの表面積などが変化しても、プラスミド DNA の徐放パターンを自由に変えることができる。また、プラスミド DNA

は水可溶化されたカチオン化ゼラチン断片とポリイオンコンプレックスを形成した状態で徐放される。そのため、プラスミド DNA の負電荷の中和とその分子サイズの減少などが期待され、従来より報告されてきたプラスミド DNA のみの徐放と比較して、プラスミド DNA の遺伝子発現に有利であると考えられる。また、コンプレックスを形成しているため、プラスミド DNA の DNase による酵素分解に対する抵抗性も向上する。プラスミド DNA の徐放パターンが、その徐放ハイドロゲルキャリアの分解パターンによく対応している実験結果は、本研究の徐放キャリアの設計思想を証明するものであり、期待通り、徐放キャリアの分解にともなうプラスミド DNA の徐放化が実現している。また、徐放期間の延長が遺伝子発現期間の延長をもたらし、本徐放化システムが *in vivo* における遺伝子発現の有力なツールであることがわかった。本研究では、すでに、注射可能なサイズ（10～150 μ m 直径）カチオン化ゼラチンハイドロゲル粒子の作製とそれらによるプラスミド DNA の遺伝子発現の増強も確認している。これらのハイドロゲル粒子においても、期待通りプラスミド DNA の発現増強のための徐放化システムの作製が可能であることを実験的に確認している。加えて、プラスミド DNA とポリイオンコンプレックスを形成させるためのカチオン化ゼラチンからなる高分子ミセルをデザイン、作製した。つまり、カチオン化ゼラチンに PEG を化学的に導入し、高分子界面活性剤を調製した。PEG 導入カチオン化ゼラチン（PEG—ゼラチン）は、それ自身が CMC を示し、界面活性であった。プラスミド DNA との混合によって、プラスミド DNA を内部に包含、外部に PEG 分子をもつ数百ナノメートルサイズの微細化粒子の形成が確認された。この微細化粒子をマウスに投与したところ、遊離プラスミド DNA 水溶液に比べて、より高い遺伝子発現レベルと発現期間の若干の延長が認められた。今後、カチオン化ゼラチンとプラスミド DNA とからなる微細化次世代遺伝子発現システムについて、より詳しく調べ、ゼラチンの分解

にともなうプラスミド DNA の徐放化のコントロールをより確実にすることが必要である。

超高压状態では、物質間の相互作用の内、水素結合成分が強調されることが報告されている。PVA 自身は水素結合性を側鎖に有しており、その濃厚溶液は短時間の処理でハイドロゲルを形成する。これまでの検討により、PVA ハイドロゲルの生成メカニズムは、まず分子内での水素結合形成による分子の局所的凝縮と粒子形成、それに引き続く粒子間の架橋からなると考えられている。ここに水素結合性を有する分子 (DNA 等) を添加し、分子集合体の形成が可能である。溶液の濃度を下げ、粒子間架橋を抑制することによって、ナノメートルサイズの遺伝子デリバリー用微粒子が得られた。超高压処理によって得られる DNA/PVA 複合体は血清中でも安定であり、DNA 分解酵素に対する耐性を有していることがわかった。一方、長時間の発現が期待できるものの、遺伝子発現量は低いことがわかった。

PVA・プラスミド複合体の取り込みについては、PVA の高い補体活性化能によるものと考えている。すなわち、PVA+DNA 複合体を投与することによって、補体第 3 成分以降のタンパク質による修飾を受け、これによって食細胞に取り込まれていると思われる。そのため、取り込みに引き続く遺伝子発現では、食食による食胞内部での遺伝子の分解が優勢になり、細胞質に逃れ出て遺伝子発現するプラスミドが少ないために、低い発現量となったと考えられる。

この食細胞の食食による食胞への取り込みは、水酸基によることが補体の活性化の研究により明らかになっている。すなわち、水酸基を用いた水素結合を駆動力として遺伝子と複合化させる方法論の場合には、避けて通ることができない。しかし、一般に補体活性化によって活性化された免疫細胞は肺に集積することが知られており、原発性肺高血圧症など、肺特有の疾病の治療においては特別のターゲティング機構を組み込まなくても自発的に肺に集積するため有用である。そ

のためには、食胞からの早期の脱出を可能にする方法論を考案する必要がある。食胞からの遺伝子の放出に有効な手段としては、食胞内部の浸透圧を上昇させることによって食胞を破裂させることが考えられる。この目的のために、無機微粒子の応用を考案した。無機粒子を同時に取り込ませることによって、低 pH で一気に溶解させてイオン濃度を上昇させ、浸透圧変化を促す。これに用いる無機ナノ粒子の合成と水分散性を向上させるための表面改質を行った。また、それ自体の遺伝子デリバリー効果について検討したところ、かなりの可能性を有していることが明らかとなった。浸透圧変化を誘発する能力が発揮されれば、細胞膜の透過性を向上させることも考えられ、これを裏付ける結果と考えている。

Hif1-alpha 遺伝子導入 EPC 移植により、マウス重症下肢虚血部位において機能的な新生血管、血流の改善が認められた。Hif1-alpha は血管再生候補遺伝子として有用であると考えられた。

カチオン化ゼラチンを用いた VEGF 遺伝子導入 EPC 移植により、マウス重症下肢虚血部位において機能的な新生血管、血流の改善が認められ、カチオン化ゼラチンは臨床応用を考える上で重要と考えられた。

カチオン化ゼラチン遺伝子キャリアシステムによる遺伝子導入法は安全でかつ導入効率が高い。アドレノメデュリン遺伝子を EPC へ導入すると肺高血圧の低減に有効であった。これは EPC の血管発生 (新生) 作用を同細胞内で発現するアドレノメデュリンが補完するためと考えられた。確認されたメカニズムのうち、アドレノメデュリンの強い血管拡張作用にもとづく arteriogenesis の促進、血管内皮の apoptosis 抑制作用、固有の angiogenesis 作用などが重要と考えられた。

本研究ではアドレノメデュリンが独自の血管再生作用を有することを明らかにした。さらに非ウイルスベクターであるカチオン化ゼラチン遺伝子キャリアシステムとアドレノメデュリン遺伝子複合体を投与すると強力な血管再生効果が得られることをウサギ下肢虚血モデルで証明し

た。虚血性心疾患や閉塞性動脈硬化症に対して血管再生療法が行われているが、効果が不十分な症例が少なからず存在する。また従来から遺伝子治療に使われてきたウイルスベクターは抗原性・毒性など安全性に問題がある。本研究では、カチオン化ゼラチン遺伝子キャリアシステムを遺伝子の非ウイルスベクターとして用いることで安全で強力な血管再生治療を可能にした。また、アドレノメデュリン投与と骨髄幹細胞移植の併用は、両者の相加効果のみでなく、アドレノメデュリンによる移植細胞のアポトーシス抑制、血管内皮細胞への接着促進、分化促進が関与しており、両者は血管再生に相乗的に働く可能性が示された。この併用療法は重症下肢虚血に対する新たな治療となる可能性がある。さらに、微小血管造影装置は臨床例の再生血管の評価に資することが確認された。

心筋内へのゼラチン-IGF-1複合体直接投与は安全で、心筋梗塞後の左室リモデリングの抑制及び収縮力の改善に有効であった。これは半減期の短いIGF-1がゼラチンの格子構造の中に封入・保護され、組織内でゼラチンが徐々に分解されるのに従って局所にIGF-1が放出された為、組織内濃度が長期間にわたって維持されたためと考えられた。

シート状の細胞の移植が単離した浮遊細胞の移植に比べ、壊死や流出なく効率的であることが確認された。また、EPCをシート内に挿入した形で移植し生着させることが可能になった。共培養シート移植群のほうがEPC単独注入群より心機能改善効果が大きいという結果はEPCをシート状の組織として移植することの有用性を示す。これは細胞シートとして移植することにより細胞の損失を減じたことによる効果と考えられる。実際GFP抗体および血管内皮特異的isolectin B4の同時蛍光染色で示されたように細胞シートとして移植されたEPCは梗塞部上で一様な血管網の再生に寄与することで心機能の改善を促進したと推察される。本研究の結果は細胞を最初から互いに接着した状態で組織として移植するとい

う新たな細胞デリバリーシステムの有用性を裏付けるものである。今後、遺伝子導入したEPCを用いた細胞シート移植により、より有効な治療法の開発も可能になると考えられる。

E. 結論

生体吸収性のカチオン化ゼラチンからなる徐放キャリアとしてハイドロゲルを作製した。この徐放システムは、ハイドロゲルの分解にともなってプラスミドDNAが徐放化し、その発現レベルの増強、徐放化による遺伝子発現期間の延長が可能となった。アドレノメデュリン遺伝子をゼラチンハイドロゲルから徐放することによって、遺伝子の水溶液投与と比較して、虚血動物モデルでの有効な血管新生効果が見られた。カチオン化ゼラチンにPEGを結合することにより、プラスミドDNAと相互作用する粒子サイズの小さなハイドロゲルの作製ができた。このPEG結合ゼラチン(PEG-ゼラチン)とコンプレックスしたプラスミドDNAは、マウス筋肉内で遊離のプラスミドに比較して、より高く、より長い期間の遺伝子発現が認められた。また、超高压を用いて超微細粒子を作製する新しいプロセスを開発し、微粒子状の加工に成功した。新しい遺伝子デリバリー用材料として、超高压処理によるDNA/PVA複合体の調製を行い、その安定性について検討を行った。昨年までの検討によって、DNA/PVA複合体は血中投与によって炎症細胞を活性化し、肺などへの集積化が可能であったが、その発現効率の低さが問題であった。ところが、研究を続けた結果、従来の遺伝子ベクターと異なり、長時間細胞内にとどまって、発現を持続するという、新しい機能の存在が示唆された。発現量自体が少ないため、これまで観察出来なかったものと考えられる。よって、評価系を最適化し、少量で効果の高い蛋白質合成を長時間必要とする局面に置いてこのDNA/PVA複合体の効果は最大限に発揮されるものと考えられる。

EPCなどの貪食能を有する細胞がプラスミドDNAとカチオン化ゼラチン複合体を貪食し、細

胞質内でその貪食した遺伝子の発現が見られるとともに、その発現レベルがウイルスベクターを用いた場合と同じレベルまで高まることを見いだした。この複合体を利用した遺伝子治療と細胞治療を評価できる動物モデルを用いて、ゼラチン遺伝子複合体による治療実験を進めた。さらに、普及型微小血管造影装置により下肢虚血疾患に対する血管再生医療の視覚的効果判定が実現できることを確認した。虚血性疾患に対し、血管新生促進遺伝子導入による EPC 移植療法を開発する上で、非ウイルス性ベクターは、ウイルス性のそれに比し、倫理面での弊害が少なくより実地的な遺伝子導入法として期待される。本研究により、カチオン化ゼラチンの有用性及び本ベクターを用いた VEGF 遺伝子導入 EPC 移植による機能性血管再生療法の有用性が示された。

また、温度応答基材を利用した心筋細胞シートの重層化技術を完成し、得られた心筋細胞シートが期待通り、機能していることを *in vitro* で確認した。単離細胞のインジェクションによる移植法は既に骨髄由来細胞や筋芽細胞を用いた臨床応用もされておりある程度の効果は期待されるが、血管への流出、移植片の内部壊死など細胞の損失も多くより効率的なデリバリー法の開発が必要となっている。そこでシート状に組織化された細胞を用いれば、最初から隣接している細胞が互いに接着していることで血管への流出を防ぐことができ、その結果、細胞の損失なく効率よくデリバリーできることが期待される。本年度、EPC と線維芽細胞とを共培養することで重層化細胞シートを作製し、虚血心筋モデルへの移植したところ、EPC を加えることによって細胞への血管新生と細胞移植効果がより高まることがわかった。

これらの一連の研究成果によって、微細化したプラスミド DNA を徐放する次世代の遺伝子キャリアシステムに対する分子デザインが完成した。しかしながら、システムにより完成度の高いプラスミド DNA の徐放性の付与が必要である。徐放化システムに血管新生作用をもつ細胞増殖因子のプラスミド DNA を含浸させ、動物の血管投与

で目的組織内に徐放システムを導入したところ、それらのシステムの優れた血管新生作用が認められた。超高压プロセスを用いた新しい遺伝子複合体粒子作製法については、粒子の安定性および遺伝子発現効果に及ぼすプロセス操作の最適化も進んだ。EPC にプラスミド DNA 含浸ハイドロゲル粒子を取り込ませ、細胞内でプラスミド DNA を徐放したところ、EPC はその生物活性を増強 (genetic engineered) されることがわかった。今後は、貪食能をもたない他の幹細胞に対しても、genetic engineering 技術を適用し、ハイブリッド細胞—遺伝子治療の概念と有効性をより広め、高めていきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hosseinkhani, H., Tabata, Y.: PEGylation enhances tumor targeting of plasmid DNA by an artificial cationized protein with repeated RGD sequences, *Pronectin. J. Control. Release.* 97(1): 157-71 (2004).
2. Hosseinkhani, H., Azzam, T., Tabata, Y., Domb, AJ.: Dextran-spermine polycation: an efficient nonviral vector for *in vitro* and *in vivo* gene transfection. *Gene Ther.* 11(2): 194-203 (2004).
3. Kushibiki, T., Matsuoka, H., Tabata, Y.: Synthesis and physical characterization of poly(ethylene glycol)-gelatin conjugates. *Biomacromolecules.* 5(1): 202-8 (2004).
4. Kimura T, Okuno A, Miyazaki K, Furuzono T, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshizawa H, Kitamura Y, Fujisato T, and Kishida A. Novel PVA-DNA nanoparticles prepared by ultra high pressure technology for gene delivery. *Mater. Sci. Eng. C*, 24: 797-801 (2004).
5. Iwami Y, Masuda H, and Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future.

- J Cell Mol Med. 8(4): 488-497 (2004).
6. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K. Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation*. 11: 356-362 (2005).
 7. Fujii T, Nagaya N, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Nishigami K, Ishibashi-Ueda H, Shirai M, Itoh T, Ishino K, Sano S, Kangawa K, Mori H. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 288: H1444-1450 (2005).
 8. Nagaya N, Kangawa K. Adrenomedullin in the treatment of pulmonary hypertension. *Peptides*. 2511: 2013-2018 (2004).
 9. Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Harada-Shiba M, Kanda M, Ito T, Shimizu W, Tabata Y, Uematsu M, Nishigami K, Sano S, Kangawa K, Mori H. Adrenomedullin Gene Transfer Induces Therapeutic Angiogenesis in a Rabbit Model of Chronic Hind Limb Ischemia. Benefits of a Novel Nonviral Vector, Gelatin. *Circulation*. 109:526-31 (2004).
 10. Nagaya N, Kyotani S, Uematsu M, Ueno K, Oya H, Nakanishi N, Shirai M, Mori H, Miyatake K, Kangawa K. Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 109:351-6 (2004).
 11. Okumura H, Nagaya N, Itoh T, Okano I, Hino J, Mori K, Tsukamoto Y, Ishibashi-Ueda H, Miwa S, Tambara K, Toyokuni S, Yutani C, Kangawa K. Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Circulation*. 109:242-8 (2004).
 12. Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura S. Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. *Am J Physiol*. (in press).
 13. 清水達也,岡野光夫. 細胞シート工学を利用した組織再構築 *Bio Clinica* 19;74-78(2004)
 14. 清水達也. 組織工学の心血管病への応用 分子血管病 58;58-64(2004)
 15. 清水達也,岡野光夫. 組織工学における血管新生. *血管医学* 5;41-48(2004)
 16. Hosseinkhani, H., Tabata, Y.: In vitro gene expression by cationized derivatives of an artificial protein with repeated RGD sequences, Pronectin®. *J. Control. Release*., 86(1): 169-182 (2003).
 17. Kushibiki, T., Tomoshige, R., Fukunaka, Y., Kakemi, M., and Tabata, Y.: In vivo release and gene expression of plasmid DNA by hydrogels of gelatin with different cationization extents. *J. Control. Release*, 90(2): 207-216 (2003).
 18. Aoyama, T., Yamamoto, S., Kanematsu, A., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Local delivery of matrix metalloproteinase gene prevents the onset of renal sclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Tissue Eng.*, 9(6): 1289-1299 (2003).
 19. Matsuda A., Furuzono T., Walsh D, Kishida A., Tanaka J.: Surface modification of a porous hydroxyapatite to promote bonded polymer coatings. *J. Mater. Sci., Mater. Med.*,14: 973-978 (2003).
 20. Masuda H., Asahara T.: Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res.*, 58(2): 390-398 (2003).
 21. Yamaguchi J., Kusano K.F., Masuo O., Kawamoto A., Silver M., Murasawa S., Bosch-Marce M., Masuda H., Losordo D.W., Isner J.M., Asahara T.: Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic

- neovascularization. *Circulation.*, 107(9): 1322-1328 (2003).
22. Kasahara, H., Tanaka, E., Fukuyama, N., Sato, E., Sakamoto, H., Tabata, Y., Ando, K., Iseki, H., Shinozaki, Y., Kimura, K., Kuwabara, E., Koide, S., Nakazawa, H., and Mori H.: Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 41(6): 1056-1062 (2003).
 23. 河合敏昭, 盛英三, 他, 微小血管撮影装置開発と再生血管の可視化, *Radiosotopes* 2003, 52:55-58.
 24. Nagaya, N., Kangawa, K., Kanda, M., Uematsu, M., Horio, T., Fukuyama, N., Hino, J., Harada-Shiba, M., Okumura, H., Tabata, Y., Mochizuki, N., Chiba, Y., Nishioka, K., Miyatake, K., Asahara, T., Hara, H., and Hori H.: Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation.* 108(7): 889-895 (2003)
 25. Nagaya N., Okumura H., Uematsu M., Shimizu W., Ono F., Shirai M., Mori H., Miyatake K., Kangawa K.: Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 285(5): H2125-2131 (2003).
 26. 永谷憲歳, 再生医療, *Thrombosis Circ.*, 11(4): 352-357 (2003).
 27. Shimizu T., Yamato M., Kikuchi A., Okano T.: Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*, 24(13): 2309-2316 (2003).
 28. 清水達也: 細胞シートを用いた心筋の組織工学, *医学のあゆみ*, 207(11): 915-919 (2003).
 29. 清水達也: 心筋, *バイオマテリアル-生体材料-*, 21(3): 194-195 (2003).
 30. Fukunaka Y, Iwanaga K, Morimoto K, Kakemi M, Tabata Y, Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. *J. Controlled Release*, 2002, 80:333-343.
 31. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation.* 2002, 105:732-738.
 32. Kawamoto A, Iwaguro H, Asahara T et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2002, 107:461-468.
 33. 西上和宏, 盛英三, 他, 血管再生療法の未来と画像評価法, *BME* 2002, 16:45-50.
 34. 土持 裕胤, 盛英三, 他, 生分解性ゼラチンを用いた遺伝子治療法, *遺伝子医学* 2002, 6:382-385.
2. 学会発表
1. Hosseinkhani, H. and Tabata, Y.: PEGylation enhances tumor targeting of plasmid DNA by an artificial protein with repeated RGD sequences, Pronectin, cationized. 7th world biomaterials congress (2004.5.17-21 Sydney)
 2. Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Tumor targeting of plasmid DNA by dextran conjugation based on metal coordination. The 6th Asian Symposium on Biomedical Materials (2004.7.19-22 Emei)
 3. Hosseinkhani, H. and Tabata, Y.: Tumor targeting of plasmid DNA by spermine derivative of dextran combined with ultrasound. 第53回高分子討論会 (2004.9.15-17 札幌)
 4. Hosseinkhani, H. and Tabata, Y.: Perfusion culture combined with plasmid DNA impregnated scaffold enhances gene expression of mesenchymal stem cells. The joint meeting of

- the Tissue Engineering Society International and European Tissue Engineering Society (2004.10.10-13 Lausanne)
5. 櫛引俊宏, 中島奈津紀, 菅井 学, 清水 章, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンを利用した siRNA 発現ベクターによる腎線維化進展抑制. 第 20 回日本 DDS 学会学術集会 (2004.7.15-16 京都)
 6. Kushibiki, T., Tabata, Y.: Delivery of small interference RNA of transforming growth factor beta I receptor by cationized gelatin to prevent interstitial renal fibrosis. Joint Meeting of the Tissue Engineering Society International and the European Tissue Engineering Society. (2004. 10.11-13 Lausanne)
 7. 櫛引俊宏, 中島奈津紀, 菅井 学, 清水 章, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンを用いた siRNA の腎間質へのデリバリー. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004.11.15-16 つくば)
 8. Kushibiki, T., Nagata-Nakajima, N., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y.: Delivery of small interference RNA of transforming growth factor beta 1 receptor by cationized gelatin. 4th Asian International Symposium on Biomaterials (AISB4) and 2nd International Symposium on Fusion of Nano and Bio Technologies (FNB) (2004.11.16-18 Tsukuba)
 9. 稲田 聡, 藤原 斉, 窪田 健, 高嶋一博, 阿辻清人, 吉村 衛, 友重龍治, 田畑泰彦, 上田祐二, 山岸久一: 生分解性カチオン化ゼラチンを用いたヒト樹状細胞への遺伝子導入. 第 25 回癌免疫外科研究会. 第 26 回日本癌局所療法研究会ジョイントミーティング (2004.5.20-21 京都)
 10. 稲田 聡, 藤原 斉, 窪田 健, 高嶋一博, 阿辻清人, 吉村 衛, 友重龍治, 田畑泰彦, 山岸久一: 樹状細胞を用いた癌免疫療法の効果増強の試み—カチオン化ゼラチンを用いた遺伝子導入—. 第 59 回日本消化器外科学会総会 (2004.7.21-23 鹿児島)
 11. 稲田 聡, 藤原 斉, 窪田 健, 高嶋一博, 阿辻清人, 城潤一郎, 田畑泰彦, 山岸久一: カチオン化多糖類—遺伝子複合体を用いた癌に対する遺伝子治療. 第 42 回日本癌治療学会総会 (2004.10.27-29 京都)
 12. 田中基幹, 高田 聡, 富岡厚志, 穴井 智, 松村善昭, 櫛引俊宏, 田畑泰彦, 植村天受, 平尾佳彦: 徐放性 PTEN 遺伝子薬を用いた前立腺癌における放射線感受性増強効果. 第 63 回日本癌学会 (2004.9.29-10.1 福岡)
 13. 高分子学会第 53 回討論会予稿集, p. 4304 (2003)
 14. 第 7 回世界バイオマテリアル会議予稿集, p.35 (2004)
 15. 第 7 回世界バイオマテリアル会議予稿集, p.713 (2004)
 16. 第 20 回日本 DDS 学会予稿集 p.288(2004)
 17. 第 13 回ポリマー材料フォーラム予稿集, p.9(2004)
 18. Regeneration of Heart Muscle by Stem Cell and Gene Therapy “Gene Manipulation for the Enhancement of Stem Cell Therapy”
 19. Franqui Symposium Brussels “Link between angiogenesis and neurogenesis: implication for development, disease and treatment.”
 20. 30th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Barcelona, Spain “Regenerative therapy with stem cells”
 21. 第 3 回日本再生医療学会総会 “成体多能性幹細胞の展開”
 22. 第 68 回日本循環器学会総会・学術集会 “Angiogenesis and Regeneration Medicine in Cardiovascular Medicine”
 23. 第 104 回日本外科学会定期学術集会 “幹細胞生物学の血管医学への応用”
 24. Cardiovascular Cell an Gene Therapy Conference II, MA “Endothelial progenitor cells for vascular medicine”
 25. Angioplasty Summit 2004, Korea “The

- Therapeutic Potential of Stimulated Endothelial Progenitor”
26. Vascular Biology Meeting, Germany “Stem cells growth factors and angiogenesis future treatment strategies”
 27. XIIIth International Vascular Biology Meeting, Toronto “Vascular stem cell/cell transdifferentiation”
 28. 日本炎症・再生医学会 “血管再生治療の現状”
 29. XVIII World Congress International Society for Heart Research, Brisbane “Stem cell biology for vascular regeneration”
 30. Twelfth pulmonary circulation conference, Colorado “Circulating Endothelial Cells in Vascular Repair”
 31. Basic Concepts and Innovative Strategies in Heart Disease, Capri “Endothelial progenitor cell biology and therapeutic regeneration”
 32. Ernst Shering Foundation +Riken Symposium, Kobe “Stem cell biology for vascular regeneration”
 33. Fujii T, Nagaya N, Nishigami K, Ishibashi-Ueda H, Iwase T, Ito T, Yutani C, Sano S, Mori H, Adrenomedullin Enhances Therapeutic Potency of Bone Marrow Transplantation for Acute Myocardial Infarction in Rats, The Annual Scientific Section 2004, American College of Cardiology (New Orleans, USA), 2004.3
 34. Chiku M, Nishigami K, Mori H, Development of In-house Micro-angiographic System for Visualizing Collateral Micro-vessels Induced by Regeneration Therapy, The Annual Scientific Section 2004, American College of Cardiology (New Orleans, USA), 2004.3
 35. Mori H, Chiku M, Nishigami K, Tanaka E, Kimura K, Kawai T, Suzuki K, Mochizuki R, Okawa Y, Micro-angiographic system using synchrotron radiation and conventional x-ray source for visualizing angiogenic vessels induced by cardiovascular regeneration therapy, 7th International School and Symposium on Synchrotron Radiation in Natural Science 2004 (Zakopane, Poland), 2004.6
 36. Mori H, Nagaya N, Kangawa K, Tabata Y, Special Program: Plenary Session; Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells, 第 68 回日本循環器学会総会・学術集会 (東京), 2004.3
 37. Kobayashi H, Shimizu T et al. Fibroblast cell sheets co-cultured with endothelial progenitor cells improve cardiac function of infarcted heart.. The 69th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2004.3 Yokohama
 38. Shimizu T, Okano T. Pulsatile tissue grafts: getting rid of old scaffolds? European Society of Cardiology 2004 2004.8 Munich
 39. Hosseinkhani, H., Tabata, Y. In vitro gene expression by cationized derivatives of an artificial protein with repeated RGD sequences, Pronectin®. International symposium on fusion of nano and bio technologies (2003.3.9-10 Tsukuba)
 40. Hosseinkhani, H., Tabata, Y.: In vitro gene expression by cationized derivatives of an artificial protein with repeated RGD sequences, Pronectin®. 第 19 回日本 DDS 学会 (2003.6.19-20 京都)
 41. Hosseinkhani, H., Azzam, T., Tabata, T., Domb, AJ.: Dextran-Spermine Polycation: An Efficient Non-Viral Vector for In Vivo Gene Transfection, 31st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2003.7.19-23 Glasgow)
 42. Hosseinkhani, H., Azzam, T., Tabata, T., Domb, AJ.: Polymer complexes with DNA for gene therapy. 4th International Symposium on Pharmaceutical Chemistry (2003.9.5-10

- Istanbul)
43. Kushibiki, T., Yamamoto, M., and Tabata, Y.: Body distribution of PEGylated gelatin micelles after intravenous administration. International symposium on fusion of nano and bio technologies (2003.3.9-10 Tsukuba)
 44. 榑引俊宏, 松本邦夫, 中村敏一, 田畑泰彦: NK4 plasmid DNA の徐放化による腫瘍転移抑制効果の増強. 日本薬剤学会第 18 年会 (2003.4.4-6 京都)
 45. 榑引俊宏, 松本邦夫, 中村敏一, 田畑泰彦: 徐放化 HGF/NK4 plasmid DNA による膵癌腹膜転移の抑制効果. 第 19 回日本 DDS 学会 (2003.6.19-20 京都)
 46. Kushibiki, T., Fukunaka, Y., Tomoshige, R., and Tabata, Y.: Controlled release from biodegradable hydrogels enhances *in vivo* expression of plasmid DNA. 31st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2003. 7.19-23 Glasgow)
 47. 榑引俊宏, 松岡秀樹, 田畑泰彦: ゼラチンとポリエチレングリコールとからなる分子集合体の作製. 第 52 回高分子討論会 (2003.9.24-26 山口)
 48. 榑引俊宏, 友重龍治, 田畑泰彦: 生体吸収性ハイドロゲルを用いた plasmid DNA の徐放化とその活性増強. 第 24 回日本炎症・再生医学学会 (2003.11.26-27 京都)
 49. 榑引俊宏, 藤川智行, 友重龍治, 田畑泰彦: PEG グラフト-カチオン化ゼラチンの構造と遺伝子導入機能. 第 25 回日本バイオマテリアル学会大会 (2003.12.16-17 大阪)
 50. 友重龍治, 榑引俊宏, 宮崎 誠, 岩永一範, 森本一洋, 掛見正郎, 田畑泰彦: 異なるカチオン化ゼラチンハイドロゲルからの plasmid DNA の徐放. 日本薬剤学会第 18 年会 (2003.4.4-6 京都)
 51. 友重龍治, 榑引俊宏, 宮崎 誠, 岩永一範, 掛見正郎, 田畑泰彦: Plasmid DNA の徐放化に及ぼすゼラチンハイドロゲルのカチオン化の影響. 第 19 回日本 DDS 学会 (2003.6.19-20 京都)
 52. 友重龍治, 榑引俊宏, 掛見正郎, 田畑泰彦: 異なるカチオン化ゼラチンハイドロゲルによる Plasmid DNA の徐放. 第 25 回日本バイオマテリアル学会大会 (2003.12.16-17 大阪)
 53. 藤川智行, 榑引俊宏, 平野義明, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンマイクロスフェアからのプラスミド DNA の *in vivo* 徐放. 第 49 回高分子研究発表会 (2003.7.10 神戸)
 54. 藤川智行, 榑引俊宏, 平野義明, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンマイクロスフェアからのプラスミド DNA の *in vivo* 徐放. 第 25 回日本バイオマテリアル学会大会 (2003.12.16-17 大阪)
 55. 高分子学会第 52 回年次大会(2003) 予稿集, p.1036
 56. 高分子学会第 52 回討論会(2003) 予稿集, p.3736
 57. 30th CRS, Preprints p.166(2003)
 58. 第 13 回バイオ高分子シンポジウム 予稿集, p43(2003)
 59. Iwaguro H, Iwami Y, Masuda H, Akita GY, Kunimoto S, Nakazawa I, Ishikawa T, Gregory R, Asahara T. Hypoxia inducible factor-1a gene transduction of endothelial progenitor cells for vascular regeneration (第 67 回日本循環器病学会)
 60. American Heart Association 76th, 2003, Ohland, Okumura H, Nagaya N, et al. Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway.
 61. 日本循環器病学会 第 67 回 2003, Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, et al. Adrenomedullin Gene Transfer Induces Therapeutic Angiogenesis in a Rabbit Model of Chronic Hind Limb Ischemia. Benefits of a Novel Nonviral Vector, Gelatin.

62. 日本心血管内分泌代謝学会 第 7 回 2003, 岩瀬 俊、永谷憲歳、藤井隆文、他, アドレノメデュリン投与と骨髄単核球細胞移植による下肢虚血血管再生療法
63. 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
64. Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Tumor targeting of plasmid DNA by dextran conjugation based on metal coordination. 第 18 回日本 DDS 学会 (2002.6.21-22 札幌)
65. Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Liver targeting of plasmid DNA through metal-coordinated conjugation of pullulan. IUPAC Polymer Conference on the Mission and challenges of Polymer Science and Technology (2002.12.2-5 Kyoto)
66. 福中泰紀, 岩永一範, 森本一洋, 掛見正郎, 田畑泰彦: 異なるカチオン化率を持つハイドロゲルからの Plasmid DNA の Controlled release. 日本薬剤学会 2002 (2002.3.29-31 静岡)
67. Aoyama, T., Hosseinkhani, H., Yamamoto, S., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Ultrasound enhancement of gene expression of plasmid DNA complexed with cationized gelatin derivatives. 3rd Asian Symposium on Biomaterials and DDS (2002.4.14-16 Taipei)
68. 高分子学会第 51 回年次大会(2002)予稿集、p.2602
69. 高分子学会第 51 回討論会(2002)予稿集、p.1527
70. IUPAC-PC2002, Preprints p.591(2002)
71. 第 66 回日本循環器学会学術集会 2002.4.25., 岩畔英樹、増田治史、浅原孝之 et al. Incorporation of ex vivo expanded VEGF-expressing EPCs into foci of ischemic neovascularization.
72. 第 79 回日本生理学会 2002.3.29., 岩畔英樹、増田治史、浅原孝之 et al. 浅原孝之遺伝子導入後血管内皮前駆細胞の虚血部位への関与について、
73. American Heart Association 75th, 2002, Chicago
74. Nagaya N, Horio T, Horio T, et al. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells.
75. The 75th Scientific Sessions of American Heart Association, 2002.11.17-20, Chicago, Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Kikuchi A, Okano T. Tissue-Engineered Cardiac Grafts Survive and Preserve Their Beating up to 6 Months in Rat Subcutaneous Tissues. Supplement to Circulation Vol.106, No.19, II-464 (2002)
76. 5th Annual Meeting of the Tissue Engineering Society international, 2002.12.8-10, Kobe. Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Fabrication of multi-layered and neovascularized myocardial tissues by cell sheet engineering. Tissue Engineering Vol. 8, No.6, P1246 PP-197

3. 著書

1. 清水達也、細胞シート用材料、筏 義人編 再生医療工学の最先端、pp.29-35 (2002)
2. 増田治史、浅原孝之、血管内皮前駆細胞による血管再生、須田年男、岡野栄之編 再生医学、pp.162-168 (2003)
3. 國本 聡、笠原啓史、福山直人、田中越郎、知久正明、永谷憲歳、西上和宏、岩畔英樹、増田治史、浅原孝之、盛 英三. 遺伝子による血管新生. 田畑泰彦編 ここまで進んだ再生医療、pp.116-123、羊土社 (2003) .
4. 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. 西村恒彦編 機能・画像代謝診断法と分子画像 pp.177-186、南山堂 (2003).
5. 藤井隆文、永谷憲歳、徳永宜之、神田宗武、福山直人、田中越郎、田畑泰彦、浅原孝之、盛 英三. ゼラチンによる遺伝子の徐放化と