

Figure 6. SDF-1 improved tissue perfusion. Hindlimb perfusion was measured by LDPI. A, Representative LDPI 28 days after induction of limb ischemia. Boxes indicate areas of interest. B, Quantitative analysis of perfusion recovery measured by LDPI. Ratios of ischemic/nonischemic limbs at day 28 were as follows: for PBS, 0.26 ± 0.04 ; for SDF-1, 0.50 ± 0.08 ; * $P < 0.05$.

a chemoattractant effect in excess of the native locally expressed factors. The magnitude of EPC incorporation in the SDF-1 treatment group at day 3 was 1.8-fold higher than in the control group. The magnitude of EPC incorporation was similar between days 3 and 7, suggesting that the homing of exogenously administered EPCs occurs early after transplantation. Subsequent physiological and histological evaluations were performed to determine whether this increase in EPC local accumulation culminated in an increase in neovascularization. Serial LDPI measurements indicated significant differences in limb perfusion 28 days after induction of ischemia, whereas histological analysis revealed that capillary density, a direct anatomic reflection of neovascularization, was significantly greater in the SDF-1 treatment group than in the control group. These data provide evidence that the ultimate degree of physiological improvement is critically dependent on sufficient EPC recruitment at an early time point.^{18,19}

It seems likely that in addition to transplanted EPCs, SDF-1 might stimulate host endothelial cells from preexisting blood vessels and host EPCs derived from bone marrow. Indeed, Salcedo et al⁹ reported that subcutaneous serial SDF-1 injections into mouse skin induced formation of local small blood vessels and that SDF-1 treatment enhanced VEGF release from human umbilical vein endothelial cells in vitro. We have also observed enhanced VEGF release from

EPCs treated with SDF-1 in vitro (data not shown).²⁰ Taken together with these observations, SDF-1 appears to have effects on endogenous angiogenesis (direct or via certain secondary cytokines) as well as vasculogenesis.

However, SDF-1 administered locally as the sole therapy for hindlimb ischemia in the same animal model resulted in autoamputation within 7 days in all animals ($n=5$, data not shown). Accordingly, at least under the experimental conditions used in this study, the effect of SDF-1 on neovascularization appears to result primarily from its ability to enhance the recruitment and incorporation of transplanted EPCs.

To the best of our knowledge, this study represents the first experimental proof of principle for the feasibility and therapeutic effectiveness of augmenting local accumulation of EPCs. EPCs widely express CXCR4, and local administration of SDF-1 enhanced vasculogenesis and subsequently contributed to neovascularization in vivo inducing in situ recruitment of transplanted EPCs in ischemic tissues. To apply SDF-1 treatment in clinical ischemic patients, certain issues will need to be considered, such as the effect of SDF-1 on atherosclerosis. Additional experiments using atherosclerotic animal models may shed light on this concern. Nevertheless, we believe that the concept of augmenting local accumulation of transplanted EPCs opens perspectives for the clinical strategy of EPC therapies.

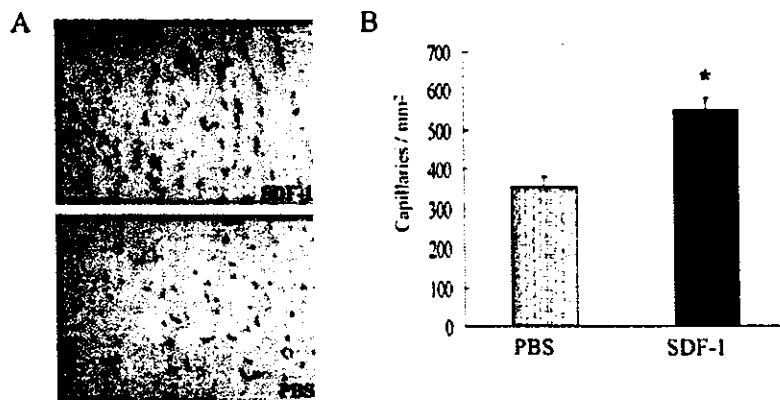


Figure 7. SDF-1 increased capillary density in ischemic tissue at day 28. Histological skeletal muscle section retrieved from ischemic hindlimbs at day 28 was examined for capillary density, an index of neovascularization, using endothelial-specific chemical staining of isolectin B4. A, Representative microscopic photographs of isolectin B4 histochemical staining in ischemic muscles at day 28. Brown indicates isolectin B4-positive vasculatures. Scale bars = 100 μ m. B, Quantitative analysis of capillary density. PBS vs SDF-1, 355 ± 26 vs 551 ± 30 cells/mm² (* $P < 0.0001$).

Acknowledgments

This research is supported in part by National Institutes of Health Grants HL57516, HL60911, and HL53354; a Grant-in-Aid from the American Heart Association (to Takayuki Asahara); and a Grant-in-Aid from the Uehara Memorial Foundation (to Jun-ichi Yamaguchi).

This article is dedicated to Dr Jeffrey M. Isner, who died on October 31, 2001. We gratefully acknowledge him for his inspirational leadership, friendship, and encouraging support.

References

- Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:2305-2309.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*. 1996;382:829-833.
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382:635-638.
- Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*. 1998;393:591-594.
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, et al. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998;393:595-599.
- Mohle R, Bautz F, Rafii S, et al. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34⁺ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 1998;91:4523-4530.
- Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, et al. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood*. 2000;95:756-768.
- Hattori K, Heissig B, Tashiro K, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. 2001;97:3354-3360.
- Salcedo R, Wasserman K, Young HA, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: in vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 α . *Am J Pathol*. 1999;154:1125-1135.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.
- Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998;92:362-367.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-705.
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5:434-438.
- Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*. 2001;7:1194-1201.
- Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103:634-637.
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:3422-3427.
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 1999;18:3964-3972.
- McDonald DM, Munn L, Jain RK. Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? *Am J Pathol*. 2000;156:383-388.
- Moldovan NI, Goldschmidt-Clermont PJ, Parker-Thornburg J, et al. Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium. *Circ Res*. 2000;87:378-384.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-228.



組織工学における血管新生

Tatsuya Shimizu © 清水達也

東京女子医科大学先端生命医科学研究所



Summary

これまでに生体吸収性の支持体に細胞を播種して組織を再構築する組織工学的手法により、骨・軟骨など細胞密度の低い組織の再構築は可能となっているが、心臓・肝臓など細胞密度が高い組織に関しては組織内に豊富な血管網を新生する必要があり、新たな技術革新が期待されている。増殖因子により作製組織移植後のホストからの血管新生を促進する方法や微細加工技術を用いて、あらかじめ血管網を構築する方法などが追究されている。また、重層化細胞シートの多段階移植により、虚血の限界を超えた、より厚い組織の再生も可能となっており、今後の発展が期待されている。

Key words

- ◎組織工学
- ◎血管新生
- ◎心筋
- ◎細胞シート

はじめに

近年、傷害あるいは欠損した組織・臓器に対する再生医療のひとつとして、組織工学的手法により組織・臓器を再構築し移植する新たな治療法の研究が盛んに行われ、一部臨床応用されるに至っている。しかしながら、心臓・肝臓・腎臓など細胞密度の高い組織の再生に関しては、十分な栄養・酸素の供給および老廃物の除去を可能とする血管のネットワークを再生組織内にいかに新生するかが大きな課題となっている。ここでは、組織工学における血管網再構築に関する研究の現状と展望を、われわれの研究成果もふまえて概説する。

組織工学と新たな課題

1. 組織工学(tissue engineering)

組織工学は医学と工学が融合した学際的な学問である。1980年代より皮膚組織の再生の研究が行われていたが、1993年、工学者である Langer および外科医である Vacanti が、マウスの背部皮下組織内に耳の形状をしたヒトの軟骨を再生し tissue engineering

を提唱したのをきっかけに、組織工学の研究が世界的に行われるようになった³⁾。彼らは、組織の再生には細胞、細胞の足場となる細胞外マトリックス(ECM)、細胞の分化・増殖のためのサイトカインが必要であるとし、その足場として3次元の生体吸収性材料を用いた。細胞を3次元の支持体に播種・培養後、生体内に移植すると、生体吸収性の支持体が徐々に分解、細胞が産生するECMと置換され、生体に類似した組織が再構築されるという手法である。組織工学において、組織再生の足場として用いられる生体材料の多くは、生体吸収性の高分子である。これには天然高分子と合成高分子がある。いずれも酵素分解あるいは加水分解によって高分子主鎖が切断され吸収される。天然高分子の中で最も多く利用されているのは、生体のECMの主成分であるコラーゲンである。一方、合成高分子としては、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)、およびそれらの共重合体が最も盛んに使用されている。また、生体由来組織を脱細胞化して支持体として用いる場合もある。これら生体吸収性の3次元生体材料を細胞の足場として用いた組織工学の研究は、ほとんどすべての組織を対象に行われている。すでに軟骨、皮膚、太い血管に関しては臨床応用可能な組織が作製され、一部商品化されているものもある^{2,4)}。

2. 細胞密度の高い組織の再構築と虚血による限界

組織・臓器は細胞およびECMより成り立っているが、骨・軟骨のように細胞密度の低い組織もあれば、心臓、肝臓、腎臓などのように細胞密度の高い組織もある。生体吸収性の高分子を細胞の足場として用いる手法で作製した組織に関しては、最終的には支持体がECMに置換されるため、ECM成分の多いすなわち細胞密度の低い疎な組織ができる。したがって、支持体を用いた手法では細胞密度の高い組織・臓器を再構築することは困難であり、新たな技術開発が必要となっている。細胞密度の向上を目的に、できるだけ多孔質の高分子材料の開発も進められているが、細胞播種

法などに課題があり、十分な成果は挙げられていない。

一方、組織・臓器は毛細血管網により酸素・栄養の供給を受け、老廃物が除去されている。細胞密度が低い場合は、この血管網が少なくてもECM内での拡散によりまかなわれるが、細胞密度が高い場合は組織内に十分な血管網が必要となる。実際、軟骨・靭帯組織などではミリオーダーで無血管の部分も存在するが、心筋組織では血管が約10%の体積を占有しており、毛細血管相互の距離も約15 μm ときわめて高密度な血管網が形成されている⁵⁾⁶⁾。したがって細胞密度の高い組織の再構築にとっては、それに応じた十分量の毛細血管網をいかに再生組織内に新生するかがきわめて重要な課題になっている。

毛細血管網を伴わず培地や間質液の拡散のみで生存できる組織のサイズは、細胞種、細胞密度および周囲の環境に応じて異なる。細胞密度の高い組織に関するこれまでの報告として、単離臓組織を*in vitro*で培養した場合、組織内の酸素濃度は中心部に近づくほど低下し、およそ表層より250 μm 以上では虚血に陥り壊死が生じるとことが示されている⁷⁾。また、心筋組織の再生を目的に、PGAやコラーゲンを支持体として心筋細胞を播種・培養した場合は、結果的に表層の50~100 μm の部分にのみ細胞が密な心筋組織を再構築することが可能であるが、中心部には細胞がほとんど生着しないことが明らかとなっている⁸⁾⁹⁾。組織の酸素・栄養の拡散を増進する目的で培養液を還流したり、組織を回転培養装置内で培養することにより、2倍程度の厚みの組織を作製することは可能になっている¹⁰⁾。しかしながら、これらの効果には限度があり、毛細血管網が無い状態で再生可能な高細胞密度の組織のサイズの限界は、およそ数百 μm と考えられている。

再生組織における毛細血管網の新生

1. *in vivo*での血管新生促進

前述したように、細胞密度の高い組織のスケールア

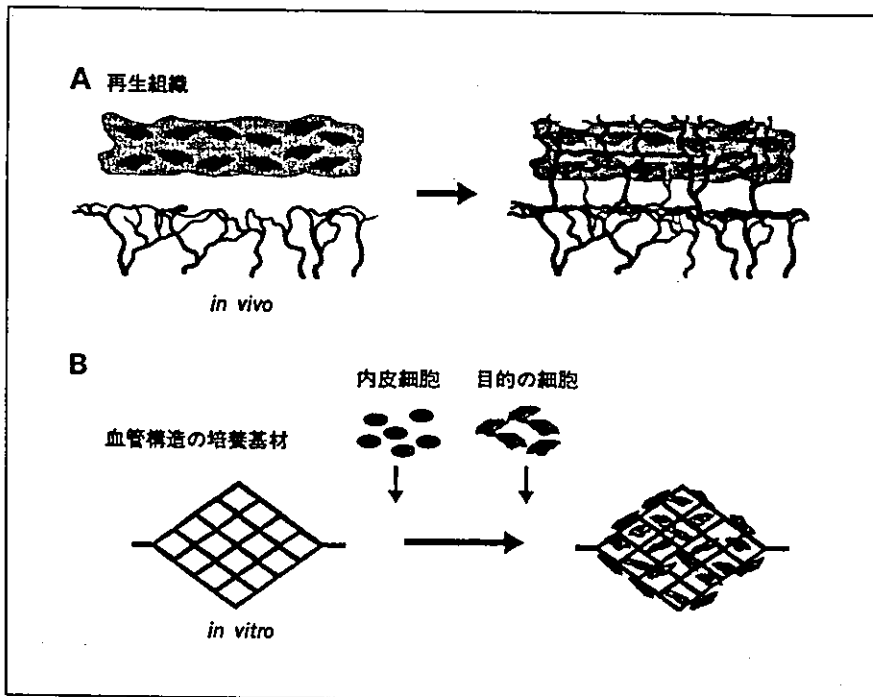


図1. 組織工学における血管網新生のアプローチ

ップには、酸素・栄養の供給、老廃物の排除のために、再生組織内にいかに毛細血管網を誘導するかが最大の課題となっている。これまで再生組織への血管網に関しては、移植後のホストからの血管新生を待つのが一般的な手法である(図1A)。この場合、移植後血管網が新生してくるまでの初期段階において、拡散のみで生存できるか否かが最終的な組織のサイズを規定することになる。そこで、より厚い組織を作るひとつのアプローチとして、移植後の血管新生を促進する方法がある。血管新生を促進する因子としてVEGF(vascular endothelial growth factor), bFGF(basic fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth factor)などが挙げられるが、これらの因子を再生組織の移植とともに導入することにより血管新生を促進する方法が考えられる。蛋白単独の投与であると作用時間が短いため、ゼラチンハイドロゲルなどのデリバリーシステムを用い徐放する必要がある(前項参照)。また、これらの因子の遺伝子を移植する組織に導入し

ておくことも有効と考えられる。一方、血管網の構成成分である内皮細胞、平滑筋細胞、あるいはそれらの幹・前駆細胞を組織再構築時に共培養することで、これらの細胞が*in vivo*での血管網構築の構成成分として寄与し、毛細血管網の新生を促進する可能性もある。骨髄細胞や血管内皮前駆細胞は単独での注入療法による血管新生効果が確認されていることから、これらの細胞との共培養が有効かもしれない。さらに、液性因子と細胞あるいは遺伝子導入した内皮細胞の使用といったコンビネーションも、よりいっそう再生組織への血管新生を促進する可能性がある。

2. *in vitro*での毛細血管網の再構築

*In vivo*での血管新生に対し、*in vitro*であらかじめ毛細血管網を新生し、組織を再構築したうえで移植するアプローチが追求されている(図1B)。すでに種々の微細加工技術を用い、培養基材や高分子材料をマイクロオーダーで加工することが可能となっており、



網目状に内皮細胞をパターン化して培養することも可能となっている¹¹⁾。3次元的な網目構造の材料開発も可能と考えられ、これらに内皮細胞を播種し周囲に目的の細胞を培養することで、毛細血管網を伴った組織を *in vitro* で再生するという試みがなされている。また、血管構造を維持した脱細胞化組織を利用する研究グループもある。

これら *in vitro* で血管網を構築したうえで目的の細胞をその周囲に培養するアプローチにおいては、いかに網目構造に内皮細胞を播種し、またその間隙に目的の細胞を密に播種するか、また、最終的に生体に移植するためにはホストの血管と吻合可能な太い血管が必要であるが、そのような血管を毛細血管網とともにいかに再構築するかに関し、さらなる技術開発が追求されている。また、作製した血管網が管状を維持して再生組織内において機能的な血管となり得るのかどう

かという重要な点に関し、今後の研究により明らかにしていく必要がある。

組織工学における新たな展開

1. 細胞シート工学

生体吸収性の支持体を用いる組織工学的手法においては、支持体内へ十分な細胞を播種することが困難なことや、また移植後支持体が ECM に置換されることから、細胞が疎な組織の作製には適しているが、細胞の密な組織を作製するには不向きであることは前述した。そこでわれわれは、この支持体を用いる手法に対し、温度変化のみで細胞の接着・脱着を制御できる培養基材を用い、細胞をシート状に回収、細胞シートの積層化により3次元組織を再構築する独自のコンセプトを提唱し、細胞密度の高い組織の再生を目指してい

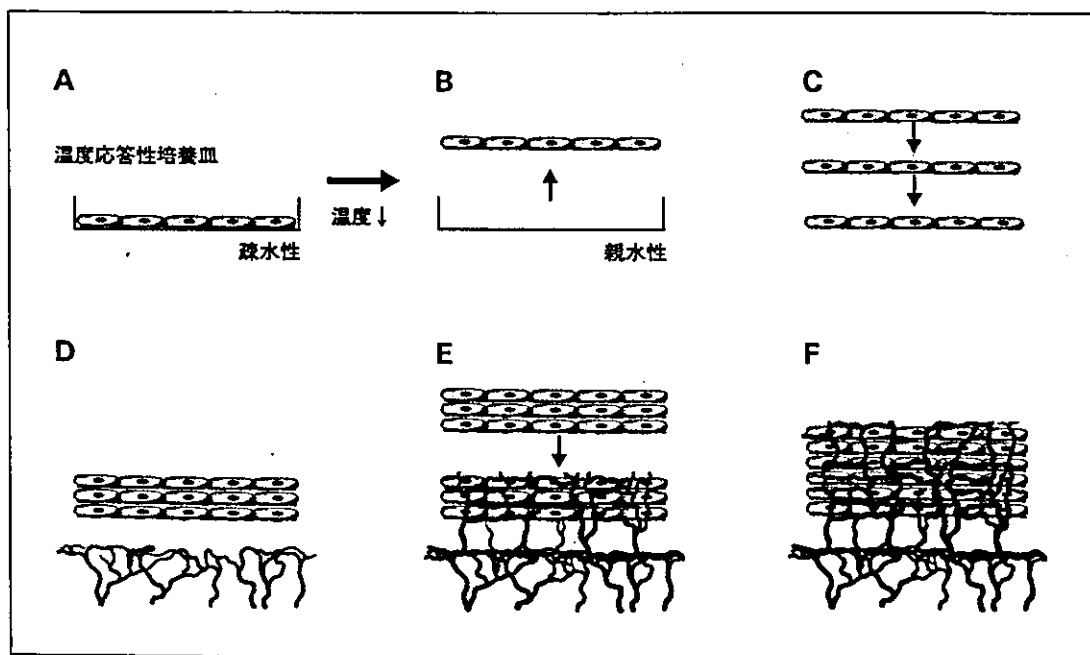


図2. 細胞シートの回収・重層化と心筋グラフトの多段階移植による血管網新生

A, B: 温度応答性培養皿にコンフルエントに培養した細胞は、温度を下げるだけでシート状に回収できる。C: 重層化により細胞密度の高い3次元組織を構築できる。D~F: 重層化心筋細胞シートを移植後血管網が新生するのを待って多段階に移植することにより、虚血の限界を超えることが可能である。

る。

この培養基材は、通常のポリスチレン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)を電子線を用いてグラフトしたもので、通常の培養温度である37°Cでは疎水性表面となり細胞接着性であるが、32°C以下に温度を降下させることにより親水性表面に変化し細胞非接着性となる。この培養皿の使用により、接着した細胞をトリプシンなどの蛋白分解酵素を用いることなく脱着させることが可能である¹²⁾。さらに、細胞を密に培養し、細胞が互いに接着した状態では、温度を降下させることにより細胞がその下面の接着因子・ECM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、トリプシンを用いた時のように細胞をばらばらにすることなく、シート状に回収できる(図2 A, 2 B)。また、細胞シート下面の接着因子が新たな培養基材や別の細胞シート上への移動時に糊の役目を果たすため、速やかな接着・積層化が可能である(図2 C)。すでに種々の細胞シートの移動・積層化を可能としているほか、角膜に関しては臨床にも応用されている¹³⁾¹⁴⁾。

2. 細胞シート工学による心筋組織再構築

われわれはこの細胞シート工学により、新生仔ラット心筋細胞シートを重層化することで、細胞密度の高い心筋組織の再構築を目指している。2枚の心筋細胞シートは重層化後1時間以内に同期して拍動し、一方の心筋細胞シートへの電気刺激が他方のシートへ伝達することが確認された¹⁵⁾。さらに、形態的にも2枚の心筋細胞シートは密に接着し、gap junctionが形成されることが示された。心筋細胞シートを4層まで積層化したところ、肉眼レベルで全体が同期して拍動することが確認された。さらに、重層化心筋細胞シートをヌードラットの背部皮下組織に移植したところ、移植後1年まで心筋グラフトが拍動を維持したまま生着し得ることが明らかとなった。移植片には十分な毛細血管網が発達しており、円柱状に伸びた心筋細胞が

gap junctionを介して密に接着している組織像が観察された¹⁶⁾。

3. 多段階移植による血管新生

このように、細胞シートの重層化により細胞密度の高い組織の再構築は可能となっているが、より多くの細胞シートを重層化するには虚血による厚みの限界を克服する必要がある。皮下組織における重層化心筋細胞シートに関しては、枚数にして3~4枚、組織厚にしておよそ80 μmがその限界であり、それ以上重層化して一度に移植した場合は、初期の毛細血管網の新生が不十分なため一部が壊死を起こす。この限界を克服する方法として、前述したような血管新生因子などを用いる手法も有用であると考えられるが、われわれは*in vivo*における新たなアプローチとして、最初に移植した重層化心筋細胞シートに十分な血管が新生されるのを待って新たな重層化心筋細胞シートを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を構築することを試みた(図2 D~2 F)。温度応答性培養皿上から低温処理により脱着した細胞シート3枚を重層化し、ヌードラット背部皮下組織に移

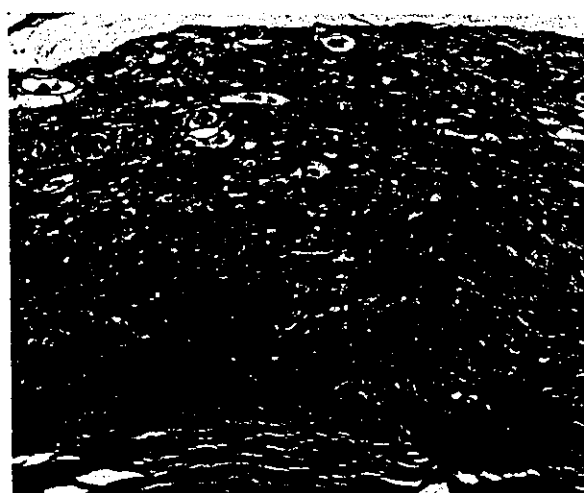


図3. 重層化心筋グラフトの組織切片像(Azan染色)
再生組織内には赤血球(橙色)を含む血管網が多数認められる(矢印)。



植した。その翌日、この心筋グラフトの上に次の3層の心筋グラフトを移植した。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、毛細血管網を伴ったより厚い心筋組織の構築が可能となった(図3)。さらにこの多段階移植を反復したところ、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。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し、異所性に移植することにも成功している。このように、細胞シートと細胞シート、そして移植グラフトと移植グラフトの直接的な接着を可能とする独自の組織工学的手法により、細胞が密で電気的にも同期し、虚血の限界を超えた、より厚い心筋組織の再生が可能となっている。

おわりに

以上のように、組織工学においては細胞密度の高い組織の再構築、それに伴う毛細血管網の新生が大きな課題となっており、種々のアプローチで研究開発が進んでいる。その中で細胞シート工学を基盤とした *in vivo* における既存血管上への多段階移植による異所性再生組織の作製は、再生医療における新たな可能性を示すものと考えられる。一方、*in vivo* において血管が周囲の細胞と相互作用しながら組織中にネットワークを形成することを鑑みると、*in vitro* での毛細血管網の新生に関しては、前述したような血管網を再構築したうえで、その後目的の細胞を播種する方法よりも、それぞれの細胞が共存した状態で組織の再構築を試みる方が機能的な血管網が新生するのではないかと考えられる。実際、皮膚の線維芽細胞と血管内皮細胞を3次元的に共培養することにより、毛細血管網が新生し得ることが示されている¹⁷⁾。最近、われわれも *in vitro* 心筋細胞シート内で内皮細胞が網目構造を形成し得るという新知見を得ており、今後、組織工学にお

いて *in vitro* 共培養系での毛細血管網新生のメカニズムの解明ならびにその制御に関する研究が重要になってくると考えられる。

◎文 献

- 1) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 260: 920-926, 1993
- 2) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889-895, 1994
- 3) Kirsner RS, Falanga V, Eaglstein WH: The development of bioengineered skin. *Trends Biotechnol* 16: 246-249, 1998
- 4) Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y: Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 344: 532-533, 2001
- 5) Petersen W, Tillmann B: Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anat Embryol (Berl)* 200: 325-334, 1999
- 6) Hossler FE, Douglas JE: Vascular Corrosion Casting: Review of Advantages and Limitations in the Application of Some Simple Quantitative Methods. *Microsc Microanal* 7: 253-264, 2001
- 7) Schrezenmeier J, Kirchgessner J, Gero L, et al: Effect of microencapsulation on oxygen distribution in islets organs. *Transplantation* 57: 1308-1314, 1994
- 8) Papadaki M, Bursac N, Langer R, et al: Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H168-H178, 2001
- 9) Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, et al: Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J* 11: 683-694, 1997
- 10) Radisic M, Euloth M, Yang L, et al: High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 82: 403-414, 2003
- 11) Kaihara S, Borenstein J, Koka R, et al: Silicon micromachining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue Eng* 6: 105-117, 2000
- 12) Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y: A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(*N*-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* 27: 1243-1251, 1993

- 13) Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T : Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* 24 : 2309-2316, 2003
- 14) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al : Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351 : 1187-1196, 2004
- 15) Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, et al : Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res* 60 : 110-117, 2002
- 16) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al : Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90 : e40-e48, 2002
- 17) Hudon V, Berthod F, Black AF, et al : A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro. *Br J Dermatol* 148 : 1094-1104, 2003

厚生労働省科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業

組織工学による血管増生心筋組織の構築並びにその移植による血管床の再生

平成16年度 総括・分担報告書

発行者：国立循環器病センター研究所心臓生理部 部長 盛英三

〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1

TEL:06-6833-5012 (内線 2530)、FAX:06-6835-5416

発行日：平成17年3月31日

印刷所：株式会社ジップ

© 国立循環器病センター研究所心臓生理部

無断複写・転載を禁ず