

200400080B (vol.1)

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
ならびにその移植による冠血管床の再生

総合研究報告書 VOL.1

主任研究者 盛 英三

平成17年3月

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
ならびにその移植による冠血管床の再生

総合研究報告書 VOL.1

主任研究者 盛 英三

平成17年3月

目次

VOL.1

I. 総合研究報告

- 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・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
盛 英三

II. 研究成果の刊行に関する一覧・・・・・・・・ 7

III. 学会発表一覧・・・・・・・・ 18

IV. 研究成果の刊行物・別刷（1）・・・・・・・・ 32

VOL.2

IV. 研究成果の刊行物・別刷（2）・・・・・・・・ 433

総合研究報告書

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

主任研究者 盛 英三 国立循環器病センター研究所心臓生理部長

研究要旨 虚血性心疾患に伴う重症心不全に対する次世代の再生医療として組織工学的手法を用い 3 次元的な組織を再構築したうえでそれを心筋パッチとして虚血部位に移植する治療法の開発が始まっている。本研究では世界的に行われているスキュフォールドを用いた手法は用いず細胞シートを重層化して不全心筋部に移植するという独自の技術を要素技術とし細胞ソースの開発ならびに血管増生によるスケールアップといった課題を克服するための新たな技術開発を追究した。具体的には①生理的因子 (Factor X) を用いた胚性幹(ES)細胞からの効率的な心筋細胞の分化誘導法の確立およびそのメカニズムの解明②血管の細胞ソースとして血管内皮前駆細胞 (EPC) を導入した細胞シート移植の有効性の確認およびヒト EPC シート作製条件の検討③間葉系幹細胞を用いた細胞シート移植による心機能の改善効果の確認④非ウイルス性ゼラチンハイドロゲルを用いた遺伝子導入条件の最適化とアドレノメジュリン遺伝子-ゼラチン複合体の血管新生効果の確認⑤重層化細胞シートの多段階移植による 1mm 厚の心筋組織の再構築⑥血管内皮-心筋共培養細胞シート重層化による *in vitro* での再生組織内血管増生⑦パターン化共培養細胞シートの作製⑧*in vitro* において再生組織厚の向上を可能とする環流培養装置の開発を行った。以上の研究開発により血管床を伴ったより厚く機能的な心筋組織の再構築を可能とする基盤技術を確立した。

分担研究者

浅原孝之 東海大学医学部再生医療科学 教授

清水達也 東京女子医科大学

岡野光夫 東京女子医科大学

先端生命医科学研究所 講師

先端生命医科学研究所 所長・教授

福田恵一 慶應義塾大学医学部

A.研究目的

心臓病先進治療学 講師

食生活の欧米化ならびに高齢化に伴い虚血

性心疾患の患者は増加し続けている。近年、虚血性心疾患に伴う重症心不全に対する新たな治療法として単離細胞を直接心筋組織内に注入する細胞移植療法が世界的に研究され、筋芽細胞や骨髄細胞の移植が既に臨床応用されるに至っている。一方、これら単離した細胞の直接注入に関しては移植位置の制御や広範な心筋壊死に対する治療が困難であること、流出・壊死により細胞が損失することなど新たな課題が生じている。これに対し虚血性心疾患による重症心不全に対する次世代の再生医療として組織工学（ティッシュエンジニアリング）的な手法により三次元的な組織を体外で再構築し心筋パッチとして移植する研究が始まっている。世界的にはポリ乳酸、コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸といった生体吸収性の高分子支持体に細胞を播種する方法が主流であるのに対し、分担研究者である岡野らはこれら余分な支持体を用いずに温度応答性培養皿を用い温度降下処理のみでシート状に心筋細胞を回収さらに心筋細胞シートを積層化することで*in vitro*および*in vivo*で拍動する3次元心筋組織を作製することに可能とした。心筋組織の再構築においては臨床応用に向けて血管および心筋の細胞ソースをどうするかまたいかに組織内に豊富な血管床を再生し十分な酸素・栄養を供給してスケールアップを図るかが次なる課題となっている。そこで本研究では細胞シートを用いた独自の技術を開発させ新たな技術導入を行うことで豊富な血管床を有するより高機能な心筋パッチを

再構築する手法を開発し臨床応用にむけた基盤技術を確立することを目的とした。

B. 研究方法

本研究では細胞シートの回収・積層化法、心筋や血管の幹細胞の単離培養法、遺伝子導入法など各研究者が独自に持つ要素技術を融合し発展させることで高機能な心筋パッチ再構築のための新たな技術開発を試みた。具体的には以下の研究を行った。

①心筋の細胞ソースとしてマウスES細胞を用い、心筋細胞へ効率的に分化誘導させる生理的因子の同定を試みた。②血管増生のための細胞ソースとして血管内皮前駆細胞(EPC)を重層化細胞シート間に挿入ラット心筋梗塞モデルに移植、その有効性を評価した。またヒトEPC単独でのシート化も試みた。③心筋および血管の細胞ソースとしてラット間葉系幹細胞を用いた細胞シートを作製しラット心筋梗塞モデルへ移植、心筋や血管への分化の有無を解析するとともにその移植効果を評価した。④血管新生効果増強を目的にウィルスを用いないゼラチンハイドロゲルを用いた遺伝子導入法の最適化を行うとともに新たな血管新生因子としてアドレノメジュリン遺伝子を用いたゼラチン複合体を作成しその血管新生効果を検討した。⑤*in vivo*におけるスケールアップを目的に重層化心筋細胞シートを移植後十分な血管網が新生するのを待つて繰り返し移植した（多段階移植）。またホストの血管吻合可能な既存の動静脈上に多段階移植を行い血

管付き心筋パッチの作製を試みた。⑥*in vitro*においてラット内皮細胞とラット心筋細胞の共培養シートを作製し重層化することであらかじめ*in vitro*で血管網の構築が可能かどうかを解析した。⑦新生血管の数や位置の制御を目的として血管内皮細胞-心筋細胞のパターン化共培養細胞シートを作製するためマイクロオーダーでパターン化した培養基材の開発を試みた。⑧組織還流培養装置(バイオリアクター)を開発し重層化細胞シートへの酸素・栄養の供給を増大することで*in vitro*でのスケールアップを試みた。これら①から⑧の多面的な手法により血管床再生能力の高い心筋組織を作製・移植し、重症心不全に対するより効果的な治療法の確立を目指した。

(倫理面への配慮)

なお実験動物を使用した実験に関しては研究者の所属するそれぞれの施設の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実験を行った。またヒトEPCの採取に関しては所属施設の倫理委員会に承認を得るとともに十分なインフォームドコンセントのうえで実施した。

C. 研究結果

①～⑧の研究を行い以下の結果を得た。

①マウスES細胞を心筋細胞へ効率的に分化誘導させる因子の探索の結果、ある種の生理活性物質(Factor X)を同定した。このFactor Xは、ES細胞を効率的に(70-80%)心筋細胞へ分化誘

導した。Factor Xは胎児期の心臓形成予定領域の内胚葉および近傍の中胚葉から分泌されていることが明らかとなり心筋細胞の分化誘導において重要な生理的な因子であることが確認された。またFactor Xで刺激したGFP陽性ES細胞と無刺激のGFP陰性ES細胞を共培養したところGFP陽性細胞のみが心筋細胞に分化することが確認され、そのcell autonomousな効果が明らかとなった。②EPCを導入した細胞シート移植群ではEPC単独注入群および細胞シート単独移植群に比べ心機能の改善効果が高く、EPCが心筋パッチ内の血管新生に寄与していることが明らかとなった。またEPCのシート化に関しては臨床応用も視野にいれてヒト末梢血からEPCを単離培養した。細胞シートの作製に関しては温度応答性培養皿への細胞播種時のコーティング条件が重要であるがヒトEPCに関しては血漿コーティングを行うことで安定した細胞シートの回収が可能となった。③ラットから得た間葉系幹細胞を用いた細胞シートをラット心筋梗塞モデルに移植したところ心機能の改善を認めた。さらに移植組織が自身の分化増殖能力により心筋細胞や血管を含んだ組織に再生するとともに種々のサイトカインを分泌することが明らかとなった。④ゼラチンハイドロゲルを用いた遺伝子導入法はElectroporation法やLipofection法より効率良く遺伝子導入することが可能であった。EPCを対象とした遺伝子導入に至適なゼラチンハイドロゲルの条件を確認し、アドレノメジュリン遺伝子を導入したEPCを作製した。またアドレノ

メジュリン遺伝子-ゼラチン複合体を下肢虚血兔に投与したところ遺伝子単独群あるいはゼラチンハイドロゲル単独群よりも有意に血管密度ならびに血流量が増加し、虚血性の組織変化が軽減することが明らかとなった。⑤重層化ラット心筋細胞シート(3層)の多段階移植を行ったところ血管網を伴った厚さ1mmにおよぶ心筋組織の再生が可能となった。重層化した組織間には電氣的結合が形成され全体が同期して拍動することも示された。さらにホストの動静脈上に多段階移植することで血管付きの厚い心筋組織を作製し異所性に移植する手法も確立した。⑥*in vitro*においてラット内皮細胞とラット心筋細胞を混和して共培養細胞シートを作製し積層化したところ、内皮細胞が円柱状に伸展・増殖するとともに網目構造を呈し、内皮細胞単独の単層培養時に認められるような敷石状の形態とは全く異なる形態を示した。さらに重層化したGFP陽性共培養細胞シートをヌードラットに移植して組織像を観察したところ再生心筋組織内にはグラフト由来(GFP陽性)の毛細血管網が再構築されるとともに一部はホスト組織内に伸びてホストの血管と結合していることが明かとなった。⑦温度応答性培養皿作製時に微細加工したマスクを用いることで50~100 μ mの円形やストライプ状にパターン化した培養皿が作製可能となった。その上で異なる細胞を培養しパターン化共培養細胞シートとして回収することにも成功した。⑧還流培養装置を作製し培養液中の酸素分圧やpHを向上させた状態

で心筋組織に圧較差を負荷して培養を行ったところ静置培養に比べより厚い組織の作製が可能となった。また静置培養では細胞間の隙間や結合組織が多いのに対し還流した場合は細胞同士が密着し細胞質成分の多い組織像を示した。

D. 考察

本プロジェクトにおいては細胞シートを重層化するという独自の手法を要素技術として用いたがこれまでのばらばらの細胞浮遊液の移植と比較し壊死・流出といった損失がなく組織として定位置に移植できることで虚血性心疾患に伴う重症心不全に対する極めて有効な治療になると考えられる。さらに細胞シート下面の細胞外マトリックスが糊の役目として働き移植時の心臓表面への接着や重層化細胞シートの多段階移植時の組織間の電氣的結合を加速するものと考えられる。また細胞シートは心臓に対する物理的サポートに加え、種々のサイトカインのデリバリーシステムとしてまた細胞の供給源として機能し心機能を改善するものと推察される。

これまで再生心筋組織の心筋細胞ソースとしては胎児あるいは新生仔ラットから単離した心筋細胞を用いた基礎研究が行われてきたがその有効性が示されるに至った現在では臨床応用を目指した細胞ソースの追究が必須となっている。代替として自己筋芽細胞も候補としてあげられるが本研究においては近年注目を集めている間葉系幹細胞を用いてシート

作製・移植を試みその有効性を示した。間葉系幹細胞シートの場合、心筋のみならず血管への分化増殖能も有するため今後早期の臨床応用に向けて有望な細胞ソースのひとつと考えられる。またマウスES細胞から心筋細胞へ効率良く分化させる手法を開発したがヒトES細胞利用には倫理的問題、拒絶反応、奇形腫といった障壁も多くあり、今後そのrisk and benefitを科学的に議論しつつES細胞利用の可能性を追究していく必要がある。

血管新生に関してはEPCなど血管になる幹細胞の導入、安全かつ効率的なゼラチンハイドロゲルを用いた血管新生因子の遺伝子導入さらに多段階移植といった手法により*in vivo*においては機能的な血管網増生が可能であることが示されたがさらにこれらの技術を組み合わせることにより、より血管床に富んだ高機能的組織の再構築が可能になると考えられる。一方、*in vitro*においても心筋—内皮共培養細胞シートを用いることにより培養組織中に既に血管内皮細胞の網目構造が再構築され移植後の血管新生に寄与するという知見を得たが今後細胞の混合率を最適化したり本研究で開発したような生体環境を模倣したバイオリアクターを用いたり、パターン化した培養基材を用いて細胞の配置を制御することで機能的な血管網に成長させ*in vitro*において血管床に富んだ心筋組織を再構築することも可能であると推察される。

今後の展望としてEPCや間葉系細胞はヒトにおいて自己からの採取が可能でありそれらを用いた細胞シート移植は早期に臨床応用可能と考えられる。本研究において確認されたEPCや間葉系細胞を用いた細胞シート移植の有効性を今後大動物を用いて検証していく。これが臨床応用可能となれば多くの人命が救われるものと推察される。また将来的にES細胞から心筋細胞を大量に分化誘導することが可能となれば拍動する心筋パッチの作製も可能であろう。ヒトESに関しては倫理、免疫拒絶、奇形腫形成の問題があり臨床応用の実現にはさらなる研究と議論を要すると考えるが、*in vitro*において血管床を伴った心筋組織モデルをヒトES細胞から作製すれば、より生体に近い薬効試験や研究などが実現し動物実験の削減にもつながるものと推察する。さらに本研究で開発された技術は虚血性心疾患に対する治療のみならず血管の豊富な他の組織の再生医療にも応用可能であろう。

E. 結論

心筋組織再生には細胞ソース、組織再構築・培養法、血管増生法、移植法と多岐にまたがる技術開発が必要である。本研究においては細胞シートを用いた独自の組織工学的手法を基本とし細胞ソース、遺伝子導入法、組織培養法に関する技術導入あるいは新たな技術開発を行い血管床を伴ったより厚く機能的な心筋組織の再構築を可能とした。またその研究過程において新たな知見や技術革新も得られ

た。細胞シートを用いた心筋パッチ移植により虚血性心疾患に伴う心不全を改善できるという研究成果は循環器領域において細胞浮遊液の注入に次ぐ新たな再生医療を提案するもので極めて意義深いと考えられる。今後引き続きこの共同体制を維持し、開発した技術を基盤としてさらに発展・統合することにより臨床応用可能な心筋パッチの開発が実現するであろう。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

研究成果刊行参照

学会発表

学会発表一覧参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

知的財産権の出願・登録状況一覧参照。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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, 東間統, 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
Keiichi Fukuda	Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow stem cells and application to cell transplantation therapy.	edited by Richard K. Burt and Alberto Marmont	Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease	Landes Bioscience	USA	2004	39-48
福田恵一	再生医学による心臓病治療	永井良三 他	先端医療シリーズ28 心臓病心臓病の最新医療	先端医療技術研究所	東京	2004	5-9
N.Nagaya, N.Fukuyama, Y.Tabata, H.Mori	Potentiation of Regenerative Therapy by Non-Viral Vector, Gelatin Hydrogel, 他 19編	H Mori, H Matsuda	Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches	Springer	東京	2005	1-238
福田恵一	心筋幹細胞	松島綱治、酒井敏行、石川昌、稲寺秀邦	予防医学事典	朝倉書店	東京	2005	in press

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, H.Mori	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	Hybird 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	Neurochemistry International	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-hydroxyphenylglycol in rabbit skeletal muscle microdialysate	J Chromatogr	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.Instrum	74	5236-5240	2003
E.Sato, Y.Hayasi, R.Gemer, K.Murakami, Y.Kooriyama, E.Tanaka, <u>H.Mori</u> , et al.	Weakly ionized plasma flash x-ray generator and its distinctive characteristics	SPIE	5196	383-392	2004
E.Sato, Y.Hayasi, <u>H.Mori</u> , T.Kawai, T.Ichimaru, et al.	Quasi-monochromatic polycapillary imaging utilizing a computed radiography system	SPIE	5196	412-420	2004
N.Nagaya, S.Kyotani, M.Uematsu, K.Ueno, H.Oya, ---, <u>H.Mori</u> , et al	Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension	Circulation	109	351-356	2004
N.Tokunaga, N.Nagaya, M.Shirai, E.Tanaka, H.Ishibashi-Ueda, M.Harada-Shiba, ----, <u>H.Mori</u>	Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia - Benefits of nonviral vector, gelatin	Circulation	109	526-531	2004
T.Akiyama, T.Yamazaki, <u>H.Mori</u> , K.Sunagawa	Simultaneous monitoring of acetylcholine and catecholamine release in the in vivo rat adrenal medulla	Neurochemistry International	44	497-503	2004

T.Pang, T.Hisamitsu, H.Mori, M.Shigekawa, S.Wakabayashi	Role of calcineurin B homologous protein in pH regulation by the Na ⁺ /H ⁺ exchanger 1: Tightly bound Ca ²⁺ ions as important structural elements	Biochemistry	43	3628-3636	2004
T.Fujii, T.Yamazaki, T.Akiyama, S.Sano, <u>Mori H.</u>	In vivo assessment of catechol O-methyltransferase activity in rabbit skeletal muscle	Auton Neurosci	30;111(2)	140-143	2004
T.Akiyama, T.Yamazaki, <u>Mori H.</u> , Sunagawa K.	Effects of Ca ²⁺ channel antagonists on acetylcholine and catecholamine releases in the in vivo rat adrenal medulla	Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.	287(1)	R161-166	2004
E.Sato, Y.Hayasi, R.Gemer, E.Tanaka, <u>H.Mori</u> , et al.	Portable x-ray generator utilizing a cerium-target radiation tube for Angiography	J.Electron Spectroscopy and Related Phenomena	137-140	699-704	2004
E.Sato, Y.Hayasi, R.Gemer, E.Tanaka, <u>H.Mori</u> , et al.	Quasi-monochromatic parallel radiography utilizing a computed radiography system	J.Electron Spectroscopy and Related Phenomena	137-140	705-711	2004
E.Sato, Y.Hayasi, R.Gemer, E.Tanaka, <u>H.Mori</u> , et al.	Sharp characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma	J.Electron Spectroscopy and Related Phenomena	137-140	713-720	2004
J.T.Pearson, M.Shirai, H.Ito, N.Tokunaga, H.Tsuchimochi, N.Nishiura, D.O.Schwenke, --- <u>H.Mori</u> , et al.	In Situ Measurements of Crossbridge Dynamics and Lattice Spacing in Rat Hearts by X-Ray Diffraction. Sensitivity to Regional Ischemia	Circulation	109	2983-2986	2004
T.Fujii, T.Yamazaki, T.Akiyama, S.Sano, <u>H.Mori</u> .	Extraneuronal enzymatic degradation of myocardial interstitial norepinephrine in the ischemic region	Cardiovasc.Rec.	64	125-131	2004
H.Asanuma, T.Minamino, S.Sanada, S.Takashima, H.Ogita, --- <u>H.Mori</u> , et al.	Beta-adrenoceptor blocker carvedilol provides cardioprotection via an adenosine-dependent mechanism in ischemic canine hearts	Circulation	8;109(22)	2773-2779	2004
H.Asanuma, S.Sanada, A.Ogai, T.Minamino, S.Takashima, --- <u>H.Mori</u> , et al.	Methotrexate and MX-68, a new derivative of methotrexate, limit infarct size via adenosine-dependent mechanisms in canine hearts	J Cardiovasc Pharmacol.	Apr;43(4)	574-579	2004
E.Sato, M.Sagae, E.Tanaka, Y.Hayashi, R.Gemer, <u>H.Mori</u> , et al.	Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing disk-cathode molybdenum tube	Jpn J Appl Phys	43	7324-7328	2004
M.Sagae, E.Sato, Y.Hayasi, E.Tanaka, <u>H.Mori</u> , et al.	Monochromatic polycapillary imaging utilizing a computed radiography system	Jpn J Med Phys	24	78-85	2004
S.Sanada, H.Asanuma, T.Minamino, K.Node, S.Takashima, --- <u>H.Mori</u> , et al.	Optimal windows of statin use for immediate infarct limitation 5'-nucleotidase as another downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase	Circulation	110	2143-2149	2004

N.Nagaya, T.Fujii, T.Iwase, H.Ohgushi, T.Itoh, M.Uematsu, M.Yamagishi, H.Mori, et al.	Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis	Am J Physiol Heart Circ Physiol	287	H2670-H2676	2004
E.Sato, et al.	Demonstration of enhanced K-edge angiography using a cerium target x-ray generator	Med. Phys.	Vol31-11	3017-3021	2004
E.Sato, et al.	Compact monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode molybdenum tube	Med. Phys.	Vol.32-1	49-54	2005
M.Sagae, E.Sato, E.Tanaka, Y.Hayashi, H.Mori, T.Kawai, T.Ichimarui, S.Sato, K.Takayama, H.Ido	Quasi-Monochromatic X-Ray Generator Utilizing Graphite Cathode Diode with Transmission-Type Molybdenum Target	Japan Journal of Applied Physics	Vol.44-1	446-449	2005
H.Kitagawa, T.Yamazaki, T.Akiyama, M.Sugimachi, H.Mori	Myoglobin release in early stage of cardiac ischemia and its enhancement by reperfusion				2004 (in press)
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	Biomaterials	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
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
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
K.Nishida, M.Yamato, Y.Hayashida, K.Watanabe, N.Maeda, H.Watanabe, S.Nagai, A.Kikuchi, Y.Tano and T.Okano	Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface.	Transplantation	77(3)	379-385	2004

K.Itoga, M.Yamato J.Kobayashi,A.Kikuchi And T.Okano	Cell micropatterning using photopolymerization with a liquid crystal device commercial projector.	Biomaterials	25	2047-2053	2004
Y.Tsuda, A.Kikuchi M.Yamato, Ysakurai M.Umezu and T.Okano	Control of cell adhesion and detachment using temperature and thermo-responsive copolymer grafted culture surfaces.	L.Biomed.Mater. Res.	69A(1)	70-78	2004
M.Ebara, M.Yamato T.Aoyagi, A.Kikuchi K. Sakurai and T.Okano	Temperature Responsive cell culture surfaces enable "On-Off" affinity control between cell integrins and RGDS ligands.	Biomacromolecul es	5(2)	505-510	2004
Y.Shiyoyanagi, M.Yamato Y.Yamazaki, H.Toma and T.Okano	Urothelium regeneration using viable cultured cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps.	BJU Int	93	1069-1075	2004
K.Itoga, M.Yamato, J.Kobayashi, A.Kikuchi and T.Okano	Micropatterned surfaces prepared using a liquid crystal projector-modified photopolymerization device and microfluidics.	J.Biomed Mater. Res.	69A(3)	391-397	2004
Y.Akiyama,A.Kikuchi M.Yamato and T.Okano	Ultrathin poly(<i>N</i> - isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control.	Langmuir	20	5506-5511	2004
K.Watanabe, K.Nishida M.Yamato,T.Umemoto, T.Sumida, K.Yamamoto N.Maeda,H.Watanabe, T.Okano and Y.Tano	Human limbal epithelium contains side population cell expressing the ATP- binding cassette transporter ABCG2.	FEBS Letters	565	6-10	2004
M.Ebara, M.Yamato, T. Aoyagi, A.Kikuchi K.Sakai and T.Okano	Immobilization of cell-adhesive peptides to temperature- responsive surfaces facilitates both serum-free cell adhesion and non- invasive cell harvest.	Tissue Engineering	10(7)	1125-35	2004
K.Nishida, M.Yamato, Y.Hayashida,K.Watanabe K.Yamamoto, E.Adachi, S.Nagai, A.Kikuchi, N.Maeda, H.Watanabe, T.Okano and Y.Tano	Corneal reconstruction with tissue engineered cell sheets composed of autologous oral epithelium.	N.Engl.J.Med.	351(12)	1187-1196	2004
M.Ebara, M.Yamato, S.Nagai, T.Aoyagi, A. Kikuchi, K.Sakai,, T.Okano	Incorporation of new carboxylate functionalized co-monomers to temperature-responsive polymer- grafted cell surfaces.	Surface Science	570	134-141	2004
清水達也, 岡野光夫	細胞シート工学を応用した組織再構築	Bio Clinica	19(10)	74-78	2004
A.Kikuchi and T.Okano	Regeneration of tissues and organs- New technique opens up new possibilities for regenerative medicine through control of interaction of polymers with water.	Nitto Denko Technical Report85	42	44-48	2004
A.Kikuchi and T.Okano	Nanostructured designs biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissue and organs.	J.Control Rel.	101(1-3)	69-84	2004

岡野光夫	細胞シート工学を基盤とする再生医療	核医学技術	24(4)	324-325	2004
大和雅之, 岡野光夫	再生医学研究の現状と将来展望: 消化器組織構築のバイオマテリアル	Frontiers in Gastroenterology	9(1)	62-68	2004
岡野光夫	巻頭言: バイオマテリアル-新しい生命科学の基盤テクノロジー	バイオマテリアル-生体材料	22(1)	3-4	2004
岡野光夫, 大和雅之	Newsフラッシュ-生理活性因子で移植用組織を培養 定着しやすい細胞シート作製へ 成功率高い再生医療技術を実現	ナノテク専門ニュースレター日経・先端技術	227	1-2	2004
菊池明彦, 岡野光夫	生命・特別寄稿: 生体組織を再生する-高分子と水の相互作用制御が拓く再生医療の新手法	日東電工技報	42(1)	44-48	2004
岡野光夫	再生医療の現状と展望	関東脳SPEC研究会記録集	11	26-35	2004
大和雅之, 岡野光夫	細胞シート工学	Medical Science Digest	30(12)	2-3	2004
清水達也, 岡野光夫	血管再生医工学	血管医学	5(6)	7-8	2004
Y.Tsuda, A.Kikuchi, M.Yamato, A.Nakao, Y.Sakurai, M.Umezu, and T.Okano	The use of patterned dual thermoresponsive surfaces for the collective recovery as co-cultured cell sheets.	Biomaterials	26(14)	1885-93	2005
清水達也, 大和雅之, 岡野光夫	細胞シートから心筋をつくる	日経サイエンス	35(2)	50	2005
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
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.	Hypertention	41	1372-1379	2003
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	培養尿管細胞周期的伸展刺激による p 38MAP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	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
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	259	177-181	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	43(10)	1915-1922	2004

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(6)	876-884	2004
Eiichi Takahashi, Keiichi Fukuda, et al.	LIF activates cardiac L-type Ca ²⁺ channels via phosphorylation of serine 1829 in the rabbit Cav1.2 subunit.	Circ Res	94(9)	1242-1248	2004
Naoichiro Hattan, Haruko Kawaguchi, Keiichi Fukuda, et al.	Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice.	Cardiovasc Res	65	334-344	2005
Keiichi Fukuda	Regenerative medicine for cardiomyocytes.	Jap Med Ass J.	47(7)	328-332	2004
Hiroshi Kawada, Jun Fujita, Keiichi Fukuda, et al.	Non-hematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction.	Blood	104(12)	3581-3587	2004
Mimi Tamamori-Adachi, Kentaro Hayashida, Keiichi Fukuda, et al.	Down-regulation of p27 ^{Kip1} promotes cell proliferation of rat neonatal cardiomyocytes induced by nuclear expression of cyclin D1 and CDK4.	J Biol Chem	279(48)	50429-50436	2004
Yuji Itabashi, Keiichi Fukuda, et al.	A new method for manufacturing cardiac cell-sheets using fibrin-coated dishes and its electrophysiological studies by optical mapping.	Artifi organs	29(2)	95-103	2005
Kentaro Hayashida, Keiichi Fukuda, et al.	Bone marrow derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension.	CHEST	in press		2005
Keiichi Fukuda	Current status of myocardial regeneration and cell transplantation.	Future Cardiology	in press		2005
林田健太郎、福田恵一	循環器疾患における再生療法：心筋細胞の再生	The Circulation Frontier	8 (1)	18-25	2004
真鍋知宏、福田恵一	外科領域における再生医療の現況と展望：6.心筋細胞の新生、再生療法の現況と展望	日本外科学会雑誌	105(8)	454-458	2004
藤田淳、福田恵一	動き出す心筋創生：骨髄細胞からの心筋再生	分子心血管病	5(3)	233-238	2004
川口治子、福田恵一	再生医療による心臓病治療の最前線—基礎と臨床—：心筋の細胞治療	Cardiovascular Med-Surg	6(3)	327-334	2004
福田恵一	骨髄幹細胞を用いた筋組織再生：心筋細胞の再生	Molecular Medicine	41(3)	344-349	2004

Mimi Tamamori-Adachi, Kentaro Hayashida, Keiichi Fukuda, et al.	Down-regulation of p27 ^{KIP1} promotes cell proliferation of rat neonatal cardiomyocytes induced by nuclear expression of cyclin D1 and CDK4.	J Biol Chem	279(48)	50429-50436	2004
Yuji Itabashi, Keiichi Fukuda, et al.	A new method for manufacturing cardiac cell-sheets using fibrin-coated dishes and its electrophysiological studies by optical mappig.	Artifi organs	29(2)	95-103	2005
福田恵一	骨髄幹細胞由来の再生心筋細胞の特徴と機能解析	Jap J Electrocardiology	supplement3 24	S3-3-14	2004
福田恵一	心筋再生と細胞移植の現状	循環器科	56(4)	385-392	2005
福田恵一	Melvin L. Marcus Young Investigator Awards in Cardiovascular Disease	AHAハイライト	2004	in press	2005
福田恵一	G-CSFによる骨髄筋前駆細胞の動員	Medical Science Digest.	31(2)	38-40	2005
下地顕一郎、福田恵一	心筋の再生	分子リウマチ	1(4)	313-317	2004
板橋裕史、福田恵一	間葉系幹細胞を用いた心筋再生	血液フロンティア	15(2)	237-242	2005
Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM And Asahara T	Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia.	Circ.	107	461-468	2003
Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Boschmarce M, Masuda H, Losordo DW, Inner JM, And Asahara T	Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization.	Circulation	107	1322-1328	2003
Mssuda H and Asahara T	Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration.	Cardiovasc.Res.	58	390-398	2003
Goukassian AD, Kishore R, Krasinski K, Dolan C, Luedemann C, Yoon Youngsup, Kearney M, Hanley A, Ma H, Asahara T, Isner JM and Losordo DW	Engineering the Response to Vascular Injury Effects of Deregulated E2F1 Expression on Bascular Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells Results in Endothelial Recovery and Inhibition of Neointimal Growth.	Circ.Res.	93	162-169	2003

Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Asahara T, Et al.	Hybrid Cell-Gene Therapy for Pulmonary Hypertension Based on Phagocytosing Action of Endothelial Progenitor Cells.	Circulation	108	889-895	2003
Asahara T, Isner JM	Endothelial Progenitor Cells.	Human Press	19	221-227	2003
Kawamoto A, Losordo DW, and Asahara T	Transplantation of Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic neovascularization.	Cardiovascular Radiation Medicine	3	221-225	2003
Moldovan NI and Asahara T	Role of blood mononuclear cells In recanalization and vascularization of thrombi. Rest, present, and future.	Cardiovasc Med	7	265-269	2003
Oren M, Tepper, Brett A, Sealove, Murayama T, and Asahara T	Newly Emerging Concepts in Blood Vessel Growth: Recent discovery of Endothelial Progenitor Cells and Their Function in Tissue Regeneration.	Journal of Investigative Medicine	51	353-359	2003
Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, Ando J	Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress.	J A Appl Physiol	95	2081-2088	2003
Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, Isner JM, Asahara T and Losordo DW	Estrogen-Mediated, Endothelial Nitric Oxide Synthase dependent Mobilization of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells Contributes to Reendothelialization After Arterial Injury.	Circ	108	144-150	2003
Masuda H, T Asahara	Endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration.	Cardiovasc Res.	58 (2)	390-398	2003
Yamaguchi J, T Asahara	Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization.	Circulation	107 (9)	1322-1328	2003
Kusano KF, T Asahara	Sonic Hedgehog Induces Arteriogenesis in Diabetic Vasa Nervorum and Restores Function in Diabetic Neuropathy.	Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.	24 (11)	2102-2107	2004
Iwami Y, Asahara T.	Endothelial progenitor cells: Past, state of the art, and Future.	J Cell Mol. Med.	8 (4)	488-97	2004
M Ii, T Asahara.	Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity.	Circulation			2004 (in press)
Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A and Okano T	Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction.	Biomaterials	24(13)	2309-13	2003

Shimizu T and Okano T	Tissue engineering for inchemic heart disease.	Nippon Rinshou	61(4)	710-15	2003
清水達也、岡野光夫	Tissue engineering による心筋組織の再生	再生医療	2(1)	45-50	2003
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	21(3)	194-195	2003
清水達也	心不全に対する心筋再生医療法	CARDIAC PRACTICE	14(3)	277-278	2003
清水達也	心筋組織に対する再生医療	医学の歩み	205(9)	693-98	2003
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	20(11)	915-19	2003
清水達也	組織工学の心血管病への応用	分子心血管病	5(1)	58-64	2004
Iwami Y, Asahara T.	Endothelial progenitor cells: Past, state of the art, and Future.	J Cell Mol. Med.	8 (4)	488-97	2004
清水達也	特集・新しい医工連携：組織工学の心血管病への応用	分子心血管病	5(1)	58-64	2004