

もあり、その代替治療が検討されている。虚血性心筋疾患においては、冠動脈バイパス術の適応拡大が検討され、血行再建可能な領域に回復可能な心筋がある場合、特に回復し得ると考えられる心筋量がある程度以上ある場合には冠動脈バイパス術により心機能の改善が期待される。今後、回復可能な心筋の評価をより詳細に行う検査法や、侵襲が少ない手術法の開発が望まれる。

我が国においても心臓移植が行われるようになり、まだ少数例ではあるが、その成績は良好

である。しかし、これまでに行われた症例は拡張型心筋症あるいは拡張相肥大型心筋症で、虚血性心筋疾患には行われていない。また、移植待機例においても1割程度である。これは、移植対象が我が国では60歳未満が望ましいとされていることも関係していると考えられる。しかし、今後我が国においても若年者の虚血性心筋疾患による心不全例は増加し、心臓移植が必要な症例も増加することが予想される。このような症例に対する受け皿として、我が国における心臓移植の定着が望まれる。

■ 文 献

- 1) 慢性心不全治療ガイドライン. Jpn Circ J 64(Suppl 4): 1023-1079, 2000.
- 2) 中谷武嗣ほか: 人工心臓と心臓移植. 循環器病専門医 9: 51-56, 2001.
- 3) 日本臓器移植ネットワーク HP. <http://www.jotnw.or.jp/>
- 4) Matsuda H, et al: First brain dead donor heart transplantation under new legislation in Japan. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg 47: 499-505, 1999.
- 5) Kitamura S, et al: Cardiac transplantation under new legislation for organ transplantation in Japan. Jpn Circ J 64: 333-339, 2000.
- 6) Hertz MI, et al: The registry of the International Society for heart and Lung Transplantation: Nineteenth Official Report-2002. J Heart Lung Transplant 21: 950-970, 2002.
- 7) Kron IL, et al: Coronary revascularization rather than cardiac transplantation for chronic ischemic cardiomyopathy. Ann Surg 210: 348-354, 1989.
- 8) Louie HW, et al: Ischemic cardiomyopathy. Criteria for coronary revascularization and cardiac transplantation. Circulation 84(Suppl III): III-290-III-295, 1991.
- 9) Di Carli MF, et al: Long-term survival of patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction: Implications for the role of myocardial viability assessment in management decisions. J Thorac Cardiovasc Surg 116: 997-1004, 1998.
- 10) Samady H, et al: Failure to improve left ventricular function after coronary revascularization for ischemic cardiomyopathy is not associated with worse outcome. Circulation 100: 1298-1304, 1999.

心筋細胞との共培養による骨髄細胞の心筋分化

Direct Cell-Cell Interaction of Cardiomyocyte is a Key for Bone Marrow stromal Cells to Go into Cardiac Lineage in Vitro

Keywords

GFP 遺伝子組み換えマウス由来骨髄細胞

→用語解説 92 頁

心筋分化→用語解説 93 頁

心筋細胞 環境因子 共培養

富田 伸司¹⁾ 中谷 武嗣²⁾

1) 国立循環器病センター 再生医療部

2) 同 臓器移植部

Summary

幹細胞による心筋再生の分野において、環境因子の重要性が指摘されている。しかし、体内現象であるためにその解明は困難であり詳細は不明である。我々は、GFP 遺伝子組み換えマウス由来骨髄細胞 (GFP-BMC) と新生児ラット心筋細胞 (CM) との共培養システムを考案し、環境因子による骨髄細胞の心筋分化を検討した。一部の GFP-BMC は、共培養開始 2 日後には同期収縮を開始した。免疫組織学的検討では、1 日後には Myosin Heavy Chain (MHC) が、2 日後には Connexin43 と atrial natriuretic peptide (ANP) が、4 日後には心筋特異的 Troponin I (Tn I) が発現した。これらの結果から、心筋細胞との直接接着が、骨髄細胞の心筋分化には重要であることが判明した。今回考案した系を応用することで、さらにさまざまな *in vivo* 現象を *in vitro* で模擬化することが可能となる。

はじめに

骨髄細胞は、諸臓器を再生するツールとして有力な候補である。我々は、これまで、骨髄間葉系細胞移植により筋原性分化、血管新生を報告した¹⁾²⁾。また諸家の報告で、体内では、環境因子により人為的操作を加えることなく、骨髄細胞が心筋細胞に分化することが明らかになりつつある³⁾⁴⁾⁵⁾。異種細胞でさえも、体内において site-specific に分化することが報告された⁶⁾⁷⁾。さらに、最近では、心臓が障害時に自己再生することが明らかになってきた。これらの現象は、環境因子が分化誘導因子であることを示唆している。しかし、これらはすべて体内で起こる現象であるため、さまざまな因子が関与していることが想像され、その解明は困難である。そこで我々は、GFP 遺伝子組み換えマウス由来骨髄

細胞 (GFP-BMC) とラット心筋細胞 (CM) を用いて心臓内環境を模擬化し、骨髄細胞と心筋細胞との直接接着が骨髄細胞の心筋分化に重要な役割を果たしているという仮説を立て、その検証を行った。

方 法

1. GFP 遺伝子組み換えマウス由来骨髄細胞 (GFP-BMC)

GFP 遺伝子組み換えマウス⁸⁾を diethylethanol で麻酔をかけた後、下肢の骨を摘出した⁹⁾¹⁰⁾。周囲組織を除去した後、骨の両端を切断した。IMDM (Iscove's modified Dulbecco medium) + 10% FBS (fetal bovine serum) で骨の内部の骨髄を注射器でフラッシュし収集した。十分 suspend したのち培養皿に播種し、培養を開始した。3 日後の培養液交換時に浮遊系細胞を除去した。その後 3 日おきに培

養液を交換した。実験では, passage2 または3を使用した。

2. ラット新生児心筋細胞(CM)

生後1日目のSDラット新生児を使用した¹¹⁾。Diethylethanolにて麻酔後に断頭し, 迅速に心臓を摘出し冷やした培養皿の上で心室筋以外の組織を除去したのち, 眼科尖刀で細切した。そして, phosphate-buffered saline solution (PBS) (in millimoles per liter: NaCl 136.9; KCl 2.7; Na₂HPO₄ 8.1; KH₂PO₄ 1.5; pH 7.3) で洗浄し, 残存血液を除去した。細切した組織を, PBS(0.5% trypsin, 0.1% collagenase, and 0.02% glucose入り)で酵素分解した。Mediumで中和した後, 一度洗浄し, 培養皿に播種した(1.25×10^4 /cm²)。

3. 共培養システム実験系

GFP-BMCとCMを上述のごとく準備し, 各々 1×10^5 cellsを35mm dishに播種した。グループ1ではGFP-BMCのみを播種した(N=5)。グループ2では, CMをインサートにまず播種した。その後, 外側の培養皿にGFP-BMCを播種した(N=5)。グループ3では, 培養皿にまずCMを播種し, 2日後同じ場所にGFP-BMCを播種した(N=5)。蛍光顕微鏡(Nikon TE300, Tokyo, Japan)と共焦点顕微鏡(OLYMPUS FLUOVIEW, Tokyo, Japan)を用いて, 1週間, 観察および撮影を行った。

4. 免疫組織学的検討

まず, 4% paraformaldehydeで5分間(室温)固定した(ただし, Connexin 43の場合は, 10分・4℃)。抗Myosin Heavy Chain-slow(MHC)は, 筋肉細胞を評価するために, 抗atrial natriuretic peptide (ANP)は, 心筋特異性を評価するために, 抗Connexin 43はgap junctionを評価するために, 抗cardiac-specific Troponin I (Tn I)は心筋細胞を評価するために使用した。まず, 一次抗体を一昼夜反応させたのち, 二次抗体と反応させ, 共焦点顕微鏡にて観察, 撮影した。

5. 定量的解析

まず, 1視野中全細胞数を算定した。そして, GFP-BMCを515~540 nmのfilterで陽性細胞を算定した。さらに, 免疫組織染色陽性細胞数を算定した。陽性細胞率は, 無作為に4視野を選択し, 5サンプルで測定した。評価は, 共培養開始当日から7日後まで施行した。

結 果

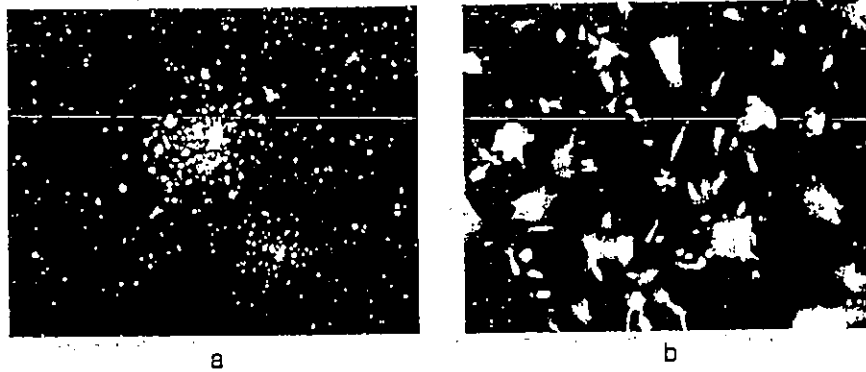
1. 形態学的変化

培養過程でGFP-BMCの中の浮遊系細胞は自然除去された。星状または, 紡錘形の付着系細胞がコロニーを形成し, 急速に増殖した。赤血球以外の細胞はすべて, GFPを発現していた(図1)。CMは1日後では, 自己拍動(約60回・分)を行っていた。2日後では, 一部のCMは結合し, 同期収縮(約70

回・分)していた。これらのCMは蛍光顕微鏡下では, 可視化されなかった。このことで, GFP-BMCとCMの区別をすることができるようになった。グループ1では, GFP-BMCがさまざまな形に変化していたが, 拍動は観察されなかった。グループ2でも, GFP-BMCの拍動はなかった。グループ3では, 1日後から拍動するCMのコロニーの細胞走行に沿って, ある一部のGFP-BMCが接着しているのが観察された($12.5 \pm 1.8\%$)。2日後にはその一部の細胞がCMとともに同期収縮するのが観察されるようになった($5.6 \pm 2.3\%$) (図2)。5日後には, GFP-BMCはコロニーを形成し, 同期収縮を認めた($15.6 \pm 4.2\%$)。6日目以降は, 過剰増殖のため, 細胞が培養皿から剥脱したため, 評価不能であった。

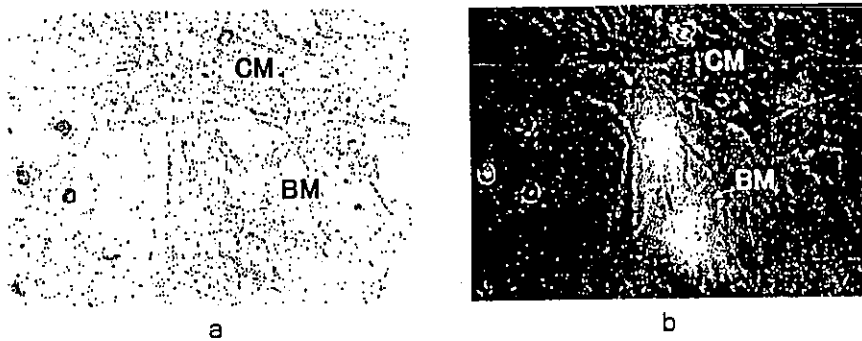
2. 各蛋白の発現様式

グループ1, 2では, 今回調べた蛋白陽性像は, GFP-BMCにはみられなかった。グループ3では, 1日後で, $0.14 \pm 0.09\%$ のGFP-BMCがMHC陽性であった。その後漸増し, 5日後には, $2.49 \pm 0.87\%$ となった。GFP-BMC由来ANP陽性細胞は, 2日後と3日後で発現した($0.78 \pm 0.56\%$)。Connexin 43は2日目以降発現した。cardiac-specific Tn Iは, 他の蛋白と比べると最も遅く, 4日後から発現し漸増した($1.86 \pm 0.53\%$ on day 5)。



GFP-mouse-derived bone marrow stromal cells maintain green fluorescence from (a) initial plating (40 ×, magnification) through (b) 8 weeks (200 ×, magnification).

図1 GFP-mouse-derived bone marrow cell (200 ×, magnification) (→巻頭Color Gravure参照)



GFP-mouse-derived BM stromal cells contract synchronously with rat CMs (200 ×, magnification), (a) Bright field, (b) Bright field with filter (Nikon G-2A).

図2 GFP-mouse-derived bone marrow cells contract with cardiomyocytes (day 2, 200 ×, magnification) (→巻頭Color Gravure参照)

考 察

体内での骨髄細胞の心筋分化の現象は、環境因子の存在を示唆するものである^{11,12-14}。しかし、体内現象である

ために詳細は不明である。可能性としては、細胞接着、電気的あるいは機械的刺激、その他未知の chemokine などが考えられる。

本研究はいくつの特徴を有する。まず、GFP-BMCが生きたままの状態

で緑色の細胞として観察することができた。そのため心筋細胞の特徴である拍動を観察することが可能となり、周囲のCMとの関係を検討することができた。第二に、GFP-BMCは常にGFPを発色しているため、GFP(+)細胞

と区別することができた。そのため、他細胞との混合培養でも GFP-BMC の定量化が可能となった。また、今回の細胞の組み合わせは、ラットとマウスであるため異種移植の模擬化である。異種細胞の再生医療への応用は確かに課題も存在するが、将来のためにも研究は必要である。

骨髄細胞が薬品を用いて心筋分化することを示した報告はあるが^{11,12)}、単に共培養を行うのみで骨髄細胞の心筋分化を示したのは、本研究が初めてである。GFP-BMC は CM と同期収縮し、Isoproterenol (25nM) 付加で収縮回数が 100 回・分に増加した。このような骨髄細胞の心筋分化や心筋細胞との同期収縮は *in vivo* においても起こることが十分考えられる³⁾。

グループ 1, 2 に対比して、グループ 3 のみに心筋分化現象がみられたことから、細胞接着が心筋分化に重要な役割をもっていることが強く示唆された。また、GFP-BMC の心筋分化には経時的変化があることが明らかになった。その中で、ほぼすべての蛋白発現細胞の比率が漸増するのに対して、ANP は一時的に陽性となったが 5 日以降消失した。ANP は胎生期の心臓形成において重要な役割を担っているといわれており¹³⁾、この ANP の消失は、GFP-BMC が心室筋へ分化した可能性を示唆している。

グループ 1, 2 でなんら筋原性分化が起きなかった理由はいくつか考えられる。骨髄細胞に心筋分化する能力のあることはさまざまな報告が明らかに

しているが、少なくとも何らかのトリガーが必要なのかもしれない^{11,12)}。グループ 2 で GFP-BMC の心筋分化が観察されれば、心筋分化誘導液性因子が存在するということになるが、今回の実験系では分化現象はみられなかった。これは本当に存在しないのか、または今回の系ではその濃度が低かったのか、詳細については不明である。

今回我々は、GFP-BMC の心筋分化を観察し得たが、その発現率は低い。我々は、特に細胞選択をすることなく heterogenous な細胞群を使用したため、いわゆる幹細胞の占める割合がもともと低かったことが考えられる。また、今回 5 日間のみの観察であったため、さらに長期間の観察でその発現率が上昇することも考えられる。そして、今回は、骨髄細胞を正常心筋内に移植した場合を模擬化している。元来、幹細胞は正常ではおとなしく、臓器障害が起きたときに修復能力が賦活化されると考えられている。たとえば、虚血などの障害で幹細胞が活発化する可能性などが考えられる。

また、最近、成体幹細胞の研究にブレーキをかける問題が話題となっている^{14,15)}。細胞融合が ES 細胞と骨髄細胞との間で起こり、このような現象が成体幹細胞の研究全体に警鐘を鳴らしている。他の研究者は、共培養を行うことなく体外で、成体幹細胞が各細胞に高率に分化したことで反論している^{16,17)}。本研究ではこの細胞融合の可能性は否定できないが、我々の分化効率が約 2.5 % であるのに対して、

Terada らの報告¹⁴⁾では 2~11 clones / 10^5 bone marrow cells (0.0002~0.0011%) と頻度に隔たりがあり、すべてが細胞融合から生じているとは考えにくい。

今回我々はマウス・ラット間の異種移植の模擬化を行い、細胞接着という環境因子による骨髄細胞の心筋分化現象を検討した。今後、この系を応用して、自家細胞移植やヒト他家細胞移植などさまざまな体内動向を *in vitro* で模擬化することが可能と考えられる。

●文 献

- 1) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al : Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100 (19 Suppl) : II 247-II 256, 1999
- 2) Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al : Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123 (6) : 1132-1140, 2002
- 3) Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, et al : Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty ; feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120 (5) : 999-1006, 2000
- 4) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 (6829) : 701-705, 2001
- 5) Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al : Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107 (11) : 1395-1402, 2001
- 6) Saito T, Kuang JQ, Bittira B, et al :

- Xenotransplant cardiac chimera ; immune tolerance of adult stem cells. *Ann Thorac Surg* 74 (1) : 19-24, 2002
- 7) Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al : Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6 (11) : 1282-1286, 2000
- 8) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, et al : 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407 (3) : 313-319, 1997
- 9) Wakitani S, Saito T, Caplan AI : Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18 (12) : 1417-1426, 1995
- 10) Tomita S, Nakatani T, Fukuhara S, et al : Bone marrow stromal cells contract synchronously with cardiomyocytes in a coculture system. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 50 : 321-324, 2002
- 11) Sakai T, Li RK, Weisel RD, et al : Fetal cell transplantation ; a comparison of three cell types. *J Thorac Cardiovasc Surg* 118 (4) : 715-724, 1999
- 12) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103 (5) : 697-705, 1999
- 13) Koide M, Akins RE, Harayama H, et al : Atrial natriuretic peptide accelerates proliferation of chick embryonic cardiomyocytes *in vitro*. *Differentiation* 61 (1) : 1-11, 1996
- 14) Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al : Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416 (6880) : 542-545, 2002
- 15) Ying QL, Nichols J, Evans EP, et al : Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416 (6880) : 545-548, 2002
- 16) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 (6893) : 41-49, 2002
- 17) Lagasse E, Connors H, Al Dhalimy M, et al : Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 6 (11) : 1229-1234, 2000

● 本 論

骨髄由来外因性および内因性幹細胞
による心筋分化

*1 国立循環器病センター 再生医療部 室長 *2 同 臓器移植部 部長
富 田 伸 司*1 中 谷 武 嗣*2

|| 要 旨 ||

重症心不全に対する新たな治療戦略として細胞療法が注目を集めている。外部から細胞を心筋内に移植する外因性幹細胞移植と、内在する幹細胞により心筋再生を目指す内因性幹細胞のコントロールの2法が考えられている。その中で、心臓内環境因子は重要な役割を果たしていることが予想されるが詳細は不明である。本稿では自験例を交えてこれら3点について述べる。

こ れ に つ い て

薬剤抵抗性の重症末期的心不全患者に対して、心臓移植は有効な治療法であるが、ドナー不足のために手術例数は著しく制限されている。これまでドナー不足解消のためさまざまな研究がなされてきたが、完全なものはない。

骨格筋を細胞レベルに細分し心筋内へ移植した場合、移植細胞が心筋化し、心機能が改善するのではないかという仮説のもとに、重症心不全に対する細胞移植の研究がスタートした¹⁾。成人心筋細胞の大量培養は不可能であることから、それに代わる細胞種の探索が盛んである。

キーワード：心筋再生、骨髄細胞、外因性幹細胞移植、内因性幹細胞、
環境因子

骨髄細胞移植の現状と将来展望 (Current Status and Future Prospects of Bone Marrow Cell Transplantation)

細胞移植のソースとして骨髄細胞を考えた場合、他細胞に比べ多くの利点を有する。骨髄穿刺は臨床上通常手技としてすでに確立され、自己細胞であるため免疫拒絶反応を回避しえ、倫理的に問題なく利用が可能である。

骨髄の中には造血幹細胞とともに間葉系幹細胞が存在するとされ、適切な条件により骨・軟骨・脂肪細胞へ分化誘導が可能となった²。骨髄細胞は経代培養していくと、通常接着能の弱い造血幹細胞は自然に除去され、線維芽細胞に似た、いわゆる“間葉系幹細胞”を含む集団となるが、経時的に表面抗原が変化することや、間葉系幹細胞に対する抗体が存在しないことなどから、この分野の進歩が遅れている。

1999年に、骨髄細胞から心筋細胞へ分化誘導されるという報告がなされ³⁾、心筋再生の源を骨髄へ求める動きが活発となった。さらに筆者らは、ブタモデルで左心室全体と局所の心筋収縮能の改善や、血流改善などを MIBI (^{99m}Tc sestamibi SPECT imaging) にて確認した⁵。他報告では末梢血管から骨髄細胞を移植した場合、心筋組織へ移植細胞が取り込まれ、心筋細胞へ分化することが示された⁶。全骨髄細胞から移植細胞分画を特に選別しない場合、骨や軟骨などの不要な表現型 (phenotype) へ分化することが危惧される。細胞側の条件 (分画、濃度、数) やホスト側の条件により状況は変わりうるものと考えられ、詳細な検討が待たれる。

最近ではさらに特定の細胞群である Lin⁻C-kit⁺細胞⁷⁾や SP (side population) 細胞⁸⁾による心筋分化が報告され、骨髄全体から狭い範囲に絞られてきた。しかし現段階では、ヒト骨髄細胞から効率良く心筋芽細胞、あるいは幹細胞を選択し培養する技術は確立されていない。

ホストとドナーの電氣的結合によりポンプ機能を改善することは細胞移植の最終目標であるが、不完全に接合したことをきっかけにして不整脈の誘因になるという問題点も指摘されている。フランスの Menasche らは、自己骨格筋芽細胞を用いた虚血心筋への細胞移植に関する第 I 相臨床試験を終了したが、10 例中 4 例に対して心室頻拍

(VT) 出現のため植込み型除細動器 (AICD) 埋め込み術を施行した⁹。この結果を判断するには、さらなる詳細な研究結果を待たなければならない。

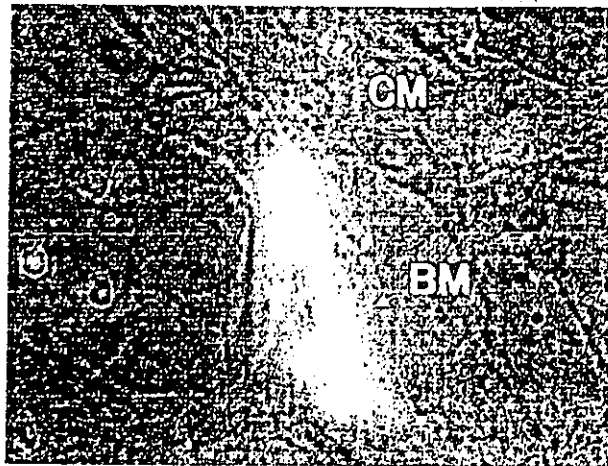
内因性幹細胞 (endogenous stem cell) による心筋再生

成人の心筋細胞は一度障害を受け死滅した場合、増殖再生をしないと長い間信じられてきた。1998 年頃から Anversa らが、成人心筋細胞もまた分裂増殖するという有力な証拠を報告した¹⁰。この報告は、体内に存在する幹細胞 (内因性幹細胞) による自己心筋再生能を示すものとして注目されている。外因性細胞と異なり、外科的手術、体外増殖させるための施設は不要であるために、汎用性が高いと考えられる。この内因性幹細胞の働きを人為的に賦活化することができれば、もはや外部からの細胞移植という方法論が不要になる可能性を秘めている。

Orlic らが、この幹細胞を賦活化するために、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) と幹細胞因子 (SCF) をマウス急性心筋梗塞モデルに投与したところ、心機能の改善、生存率の改善を報告した¹¹。しかし、再生された心筋がホストの心筋由来か骨髄由来かについての詳細は不明である。そこで我々は、この内因性幹細胞は骨髄由来であるという仮説を証明するため、GFP 遺伝子組み替えマウス由来骨髄細胞 (GFP-BMC) を放射線照射後の C57b6 マウスに移植し、キメラマウスを作成した¹²。心筋梗塞 1 ヶ月後には、G-CSF 投与群において、生存率の改善傾向が認められた。G-CSF 投与群において、心筋梗塞境界部には、GFP-BMC 数がコントロール群に比し有意に増加した。その GFP-BMC のうち、約 20% がトロポニン I 陽性細胞であった。また、ネスチン陽性細胞も多数認めた。この研究結果から、再生心筋の細胞起源の一つは骨髄であり、G-CSF によりその効果が増強されることが示唆された。

しかし、解決されるべき課題も存在する。骨髄細胞による心筋再生現象は事象としてとらえられたが、これらの再生心筋群が心筋全体に生理学的に心機能を回復させるだけの意味を持つものなのか不明である。また、これらの実験系は急性心筋梗塞モデルであり、慢性の虚血

図1 骨髄細胞と心筋細胞の同期収縮



骨髄細胞（BM，緑色）が心筋細胞（CM）と共培養開始2日後同期収縮を開始した。（×200）

性心不全に対する有効性に関しては不明である。

また，Sata らは，造血幹細胞が動脈硬化に寄与すると報告した¹³⁾。本来心筋梗塞を起すような患者は，全身性に動脈硬化を伴っていることが考えられるが，仮に，内因性幹細胞が心筋を再生する反面，動脈硬化巣に遊走しプラーク破綻を来す危険性をはらんでいるのであれば，大きな問題である。

内因性幹細胞の応用は，このような体内での生命現象の解明を行ったうえで，それをうまくコントロールしていくことが大切である。

心臓で環境因子

諸家の報告^{7,14)}で，幹細胞の心筋分化における環境因子の重要性が指摘されている。しかし，詳細は不明である。

筆者らは，ラット新生児心筋細胞をホストの心筋（CM）とし，GFP-BMC を移植細胞と見立てて，環境因子の一つが細胞同士の直接接着であるという仮説を立て，共培養実験系を考案した。GFP-BMC 単独培養や GFP-BMC と CM との間に隔壁を置いた double chamber 培養では，GFP-BMC に特に変化は見られなかった。それに対し，GFP-BMC と CM を混合した共培養系では，ある GFP-BMC は，2日後から CM と同期収縮を開始するものが現れた¹⁵⁾（図1）。また，免疫組織染色では，myosin heavy chain-slow（1日後から），コネキシン 43 と心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）（2日後から），トロポニン I（4日後から）が経時的に発現し漸増した。

5日後には myosin heavy chain-slow 陽性細胞はおよそ 2.5% になった。この結果、幹細胞の心筋分化には、ホストの心筋細胞との直接接着が重要な役割を果たしていることが判明した。

2002年に、細胞融合 (cell fusion) の問題が2研究施設から同時に報告された¹⁶⁾。ES細胞と GFP マウス由来骨髓細胞との共培養により、一見 GFP を発現した細胞が分化増殖するよう見えるが、その細胞の核内には ES 細胞由来の DNA も含んでいるというものである。この報告により、体性幹細胞は従来期待されたよりも、分化能、増殖能の両面において、劣るのではないかという風潮も見られるようになった。しかし、現在の情報のみで、体性幹細胞の可能性を完全否定するには時期尚早である。今後、内因性であれ外因性であれ、それらの細胞が心筋内でホスト細胞とどのようなかわりを持って行動するのか興味のあるところである。

文 献

- 1) Marelli D. et al: Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1 (6): 383-390. 1992.
- 2) Pittenger M.F. et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (5411): 143-147. 1999.
- 3) Makino S. et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103 (5): 697-705. 1999.
- 4) Tomita S. et al: Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100 (19 Suppl): II247-II256. 1999.
- 5) Tomita S. et al: Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123 (6): 1132-1140. 2002.
- 6) Bittner R.E. et al: Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 199 (5): 391-396. 1999.
- 7) Orlic D. et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 401 (6829): 701-705. 2001.
- 8) Jackson K.A. et al: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107 (11): 1395-1402. 2001.
- 9) Menasche P. et al: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357 (9252): 279-280. 2001.
- 10) Beltrami A.P. et al: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344 (23): 1750-1757. 2001.

- 11) Orlic D. et al: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (18): 10344-10349. 2001.
- 12) Fukuhara S. et al: G-CSF Promoted Bone Marrow Cells to Migrate into Infarcted Heart and Differentiate into Cardiomyocytes. *Circulation* 103 [suppl I]: A. 2002.
- 13) Sata M. et al: Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 8 (4): 403-409. 2002.
- 14) Wang J S. et al: Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120 (5): 999-1006. 2000.
- 15) Tomita S. et al: Bone marrow stromal cells contract synchronously with cardiomyocytes in a coculture system. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 50: 321-324. 2002.
- 16) Terada N. et al: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416 (6880): 542-545. 2002.

Regeneration of Myocardium by Using Exogenous-Stem-Cells and Endogenous-Stem-Cells Derived from Bone Marrow

Shinji Tomita¹, Takeshi Nakatani²

¹ Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,
National Cardiovascular Center

² Department of Organ Transplantation National Cardiovascular Center

富田伸司(国立循環器病センター) 中谷武嗣 福原慎也 大津義徳 石田理子
濱本正樹 久 容輔 藤里俊哉 由谷親夫 山田和彦 北村惣一郎

Shinji TOMITA, National Cardiovascular Center, Takeshi NAKATANI, Shinya FUKUHARA,
Yoshinori OHTSU, Michiko ISHIDA, Masaki HAMAMOTO, Yosuke HISASHI,
Toshiya FUJISATO, Chikao YUTANI, Kazuhiko YAMADA, Soichiro KITAMURA

Key Word : regeneration, heart, bone marrow cell

1. はじめに

薬剤抵抗性の重症末期の心不全患者に対して、心臓移植は有効な治療法であるが、ドナー不足のために手術例数は著しく制限されている。これまでドナー不足解消のためさまざまな研究がなされてきたが、完全なものはない。

骨格筋を細胞レベルに細分し心筋内へ移植した場合、移植細胞が心筋化し、心機能が改善するのではないかという仮説のもとに、重症不全心に対する細胞移植の研究がスタートした⁽¹⁾。成人心筋細胞の大量培養は不可能であることから、それに代わる細胞種の探索が盛んである。

2. 外因性幹細胞移植

細胞移植のソースとして骨髄細胞を考えた場合、他細胞に比べ多くの利点を有する。骨髄穿刺は臨床で通常手技としてすでに確立され、自己細胞であるため免疫拒絶反応を回避し、倫理的に問題なく利用が可能である。

骨髄の中には造血幹細胞とともに間葉系幹細胞が存在するとされ、適切な条件により骨・軟骨・脂肪細胞へ分化誘導が可能となった⁽²⁾。骨髄細胞は経代培養していくと通常接着能の弱い造血幹細胞は自然に除去され、繊維芽細胞に似た、いわゆる“間葉系幹細胞”を含む集団となるが、経時的に表面抗原が変化することや、間葉系幹細胞に対する抗体が存在しないことなどから、この分野の進歩が遅れている。

1999年に、骨髄から心筋細胞分化誘導されるという報告がなされ^(3,4)、心筋再生の源を骨髄へ求める動きが活発となった。さらに筆者らは、ブタモデルで左心室全体と局所の心筋収縮能の改善や、血流改善などを MIBI(^{99m}Tc sestamibi SPECT imaging)にて確認した⁽⁵⁾。他報告では抹消血管から骨髄細胞を移植した場合、心筋組織へ移植細胞が取り込まれ、心筋細胞へ分化することが示された⁽⁶⁾。全骨髄細胞から移植細胞分

面を特に選別しない場合、骨や軟骨などの不要な phenotype へ分化することが危惧される。細胞側の条件(分画、濃度、数)やホスト側の条件により状況は変わりうるものと考えられ、詳細な検討が待たれる。

最近ではさらに特定の細胞群である Lin-C-kit+細胞⁽⁷⁾、SP(side population)細胞⁽⁸⁾による心筋分化が報告され、骨全体から狭い範囲に絞られてきた。しかし現段階では、ヒ骨髄細胞から効率よく心筋芽細胞、あるいは幹細胞を選択培養する技術は確立されていない。

ホストとドナーの電気的結合によりポンプ機能を改善することは細胞移植の最終目標であるが、不完全に接合したことをきっかけにして不整脈の誘因になるという問題点も指摘されている。フランスの Menasche らは、自己骨格筋芽細胞を用いた虚血心筋への細胞移植に関する臨床研究 Phase I を終したが、10例中4例に対してVT出現のためAICD埋め込みを施行した⁽⁹⁾。この結果を判断するには、さらなる詳細研究結果を待たなければならない。

3. 内因性幹細胞による心筋再生

成人の心筋細胞は一度障害を受け死滅した場合、増殖再をしないと長い間信じられてきた。1998年頃から Anversa が、成人心筋細胞もまた分裂増殖するという有力な証拠を告した⁽¹⁰⁾。この報告は、体内に存在する幹細胞(内因性幹細胞)による自己心筋再生能を示すものとして注目されている。外因性細胞と異なり、外科的手術、体外増殖させるための設は不要であるために、汎用性が高いと考えられる。この内因性幹細胞の働きを人為的に賦活化することができれば、はや外部からの細胞移植という方法論が不要になる可能性秘めている。

Orlic らが、この幹細胞を賦活化するために、G-CSF(Granulocyte-colony stimulating factor)と SCF(Stem cell factor)をマウス急性心筋梗塞モデルに投与したところ、心機能の改善、生存率の改善を報告した⁽¹¹⁾。しかし、再生された心筋がホストの心筋由来か骨髄由来かについての詳細は不明である。そこで、われわれは、この内因性幹細胞は骨髄由来であるという仮説を証明するため、GFP 遺伝子組み替えマウス由来骨髄細胞(GFP-BMC)を放射線照射後の C57b6 マウスに移植し、キメラマウスを作成した⁽¹²⁾。心筋梗塞1ヵ月後には、G-CSF 投与群において、生存率の改善傾向が認められた。G-CSF 投与群において、心筋梗塞境界部には、GFP-BMC 数がコントロール群に比し有意に増加した。その GFP-BMC のうち、約 20%が Troponin I 陽性細胞であった。また、Nestin 陽性細胞も多数認めた。この研究結果から、再生心筋の細胞源のひとつは骨髄であり、G-CSF によりその効果が增强されることが示唆された。

しかし、解決されるべき課題も存在する。骨髄細胞による心筋再生現象は事象として捉えられたが、これらの再生心筋が心筋全体に生理学的に心機能を回復させるだけの意味をものなのか不明である。また、これらの実験系は急性心筋梗塞モデルであり、慢性の虚血性心不全に対する有効性については不明である。

また、Sata らは、造血幹細胞が動脈硬化に寄与すると報告した⁽¹³⁾。本来心筋梗塞を起こすような患者は、全身性に動脈化を伴っていることが考えられるが、仮に、内因性幹細胞が心筋を再生する反面、動脈硬化巣に遊走しプラーク破壊をたす危険性をはらんでいるのであれば、大きな問題である。内因性幹細胞の応用は、このような体内での生命現象の解明を行なったうえで、それをうまくコントロールしていくことが大切である。

reference

- 1) Marelli D, Desrosiers C, el Ajfy M, et al. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1992; 1(6):383-390.
- (2) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143-147.
- (3) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103(5):697-705.
- (4) Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100(19 Suppl):II247-II256.
- (5) Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123(6):1132-1140.
- (6) Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 1999; 199(5):391-396.
- (7) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410(6829):701-705.
- (8) Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107(11):1395-1402.
- (9) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357(9252):279-280.
- (10) Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344(23):1750-1757.
- (11) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(18):10344-10349.
- (12) Fukuhashi S, Tomita S, Ohtsu Y, et al. G-CSF Promoted Bone Marrow Cells to Migrate into Infarcted Heart and Differentiate into Cardiomyocytes. *Circulation* 103[suppl I]:A, 2002
- (13) Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002; 8(4):403-409.

Technical Note

Alternating gene expression in fibroblasts adhering to multilayers of chitosan and dextran sulfate

Takeshi Serizawa,¹ Miyuki Yamaguchi,¹ Akio Kishida,² Mitsuru Akashi¹

¹Department of Nanostructured and Advanced Materials, Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, 1-21-40 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

²Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

Received 17 March 2003; revised 20 May 2003; accepted 20 May 2003

Published online 29 October 2003 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.a.10150

Abstract: The alternating compatibility of fibroblast cells adhering to multilayers of chitosan and dextran sulfate (Dex) on a substrate was analyzed at the gene expression level. A greater number of round-shaped cells adhered to the films with an outermost surface composed of Dex, although the total number of adherent cells was independent of the film surface. Greater expression of heat-shock protein 70B mRNA was demonstrated in cells adhering to films with

the Dex surface. It was found that analysis of gene expression was a powerful tool for evaluating the bioactivity of multilayers. © 2003 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res* 67A: 1060–1063, 2003

Key words: multilayer; layer-by-layer assembly; cell adhesion; gene expression; heat-shock protein

INTRODUCTION

Fabrication of ultrathin polymer films on material surfaces improves surface characteristics without any change in the mechanical properties of the materials. Conventional spin coating and solution casting methods for fabrication of the films are simply performed; however, it is difficult to delicately regulate assembling structures of the films. Layer-by-layer (LbL) assembly readily fabricates polyelectrolyte multilayers based on alternate immersion of solid substrates into aqueous solutions of oppositely charged polyelectrolytes.¹ Various shaped materials can be applied to LbL assemblies because multilayers can be prepared by simple immersion of the materials into polymer solutions.

Because polyelectrolytes are occasionally bioactive, the multilayers prepared on material surfaces have potential biomedical applications, which are dependent on the outermost polyelectrolyte species as well as the bulk physicochemical properties. Interactions of living cells with the multilayers have been recently

investigated.^{2–9} For instance, human fibroblast cells did not adhere to cell-adhesive material surfaces after coating with multilayers composed of polylysine and alginate, resulting in a bioinert surface.² Pro versus anticoagulation of human whole blood has been observed for multilayers composed of alternating layers of chitosan and dextran sulfate (Dex).^{3–5} Specific responses of murine melanoma cells against a small peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes in/on multilayers composed of polylysine and poly-(glutamic acid) have been analyzed.⁶ Influences of the outermost layer, the presence of proteins, the number of layers,⁷ the polymer species,⁸ and the swelling or charge compensation of films⁹ on cell interactions with the multilayers has also been evaluated in detail. Furthermore, time-controlled desorption of the multilayers have been demonstrated by spontaneous¹⁰ and alternating enzymatic^{11,12} degradation of biodegradable constituents.

Although these previous studies^{2–12} demonstrated the potential of multilayers in biomedical applications, fundamental investigations to evaluate the bioactivity of multilayers remain to be performed. Furthermore, it is sometimes difficult to understand cytophilic/cytophobic properties exclusively on the basis of the number and shape of adherent cells. Analysis of gene

Correspondence to: M. Akashi; e-mail: akashi@apc.kagoshima-u.ac.jp

expression¹³⁻¹⁵ in relation to the properties of multilayer assemblies is another method of evaluating the potential applications of multilayers. In the present article, the fibroblast cell compatibility of chitosan-Dex multilayers³⁻⁵ prepared by LbL assembly on a poly(ethylene terephthalate) (PET) film was demonstrated by evaluating heat-shock protein 70B (HSP 70B) mRNA as a model cytokine gene. The fibroblasts recognized minor differences in surface components of the multilayer at the gene expression level, although the number of adherent cells did not change with changes in the surface components. Greater amounts of HSP 70B mRNA were expressed in the cells adhering to multilayers with an outermost surface composed of Dex.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of multilayers

Chitosan (MW 1,200,000) (Wako, Japan) with 20% chitin units and Dex (MW 500,000) (Wako, Japan) were used without further purification. A disk of 13.5-mm diameter, which was normally utilized as a cell-culture plate prepared from poly(ethylene terephthalate), was used as a solid substrate and as a positive control for cell adhesion. The assembly process was essentially as described in previous studies.³⁻⁵ In brief, the substrate was alternately immersed into aqueous chitosan (1 mg mL⁻¹) and Dex solutions (1 mg mL⁻¹) of 25%-HCOOH (pH of solution = 1) and water (pH of solution = 6), respectively, at ambient temperature. The assembly was initiated with chitosan as the odd assembly step. The mean thicknesses at the chitosan and Dex steps were estimated to be 1.1 ± 0.3 and 0.6 ± 0.3 nm, respectively. The multilayers obtained remained stable on the substrate under cell culture conditions.

Cell culture

The substrates coated with the chitosan-Dex multilayers were placed in 24-well tissue culture plates. A suspension of mouse fibroblasts (L929, donated by Japanese Cancer Research Resources Bank, Foundation for Promotion of Cancer Research, Tokyo, Japan) at a concentration of 3×10^4 cells mL⁻¹ was added to each well, and then incubated for 24 h at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere in Eagle's minimum essential medium (Eagle's MEM) containing 10% fetal calf serum (GIBCO Laboratories). Adherent cells were counted using a colorimetric assay (Cell Counting Kit: Dojindo Lab., Kumamoto, Japan). The cells were treated with formalin and with hematoxylin-eosin staining, and then photographed.

mRNA isolation and RT-PCR

Isolation of mRNA and the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed by meth-

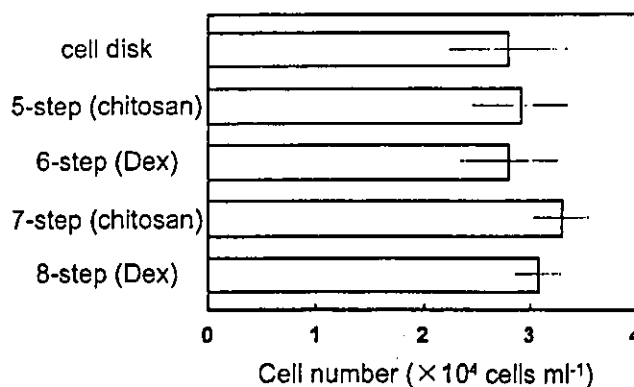


Figure 1. Number of fibroblasts adhering to a cell disk and to chitosan-Dex films with different outermost surfaces.

ods described in previous studies.¹³⁻¹⁵ RNA was isolated from fibroblasts by an acid guanidine method and reverse transcribed to cDNA. The cDNA was then amplified using PCR, and separated by electrophoresis in agarose hydrogels. The 162 base-pair band corresponding to HSP cDNA, relative to a 566 base-pair band for β -actin cDNA as an internal standard were visualized by staining with ethidium bromide, and then detected by an image analyzer.

RESULTS AND DISCUSSION

Before analysis of gene expression, the number and shape of adherent cells were evaluated. Figure 1 shows the number of cells adhering to the cell disk surfaces and to the chitosan-Dex multilayers prepared in five to eight steps. This number of steps was selected because it resulted in regular assembly based on previous analysis.^{3,4} In all cases, approximately 3×10^4 cells mL⁻¹ were counted and this number was almost the same as that added initially, indicating that the cells were readily cultured on the multilayers. The cell number was independent of the surface component of the multilayers. Figure 2 shows photographs of cells adhering to the multilayers. The cells adhered with either extended or rounded shapes. The percentage of round-shaped cells against extended ones for the cell disk and the five- to eight-step multilayers were 12, 47, 59, 43, and 54%, respectively. Accordingly, a slightly greater number of cells with a round shape adhered to the multilayers with a Dex surface, indicating difficult extension. These observations indicate that the number of adherent cells was independent of the outermost layer of the chitosan and Dex multilayers, but that more cells with a round shape adhered to the films with an outermost surface composed of Dex.

It is further significant to analyze the slight differences in the responses of the cells, because these short-term cell responses would affect long-term use in a biological environment. HSP 70B is a sensitive maker

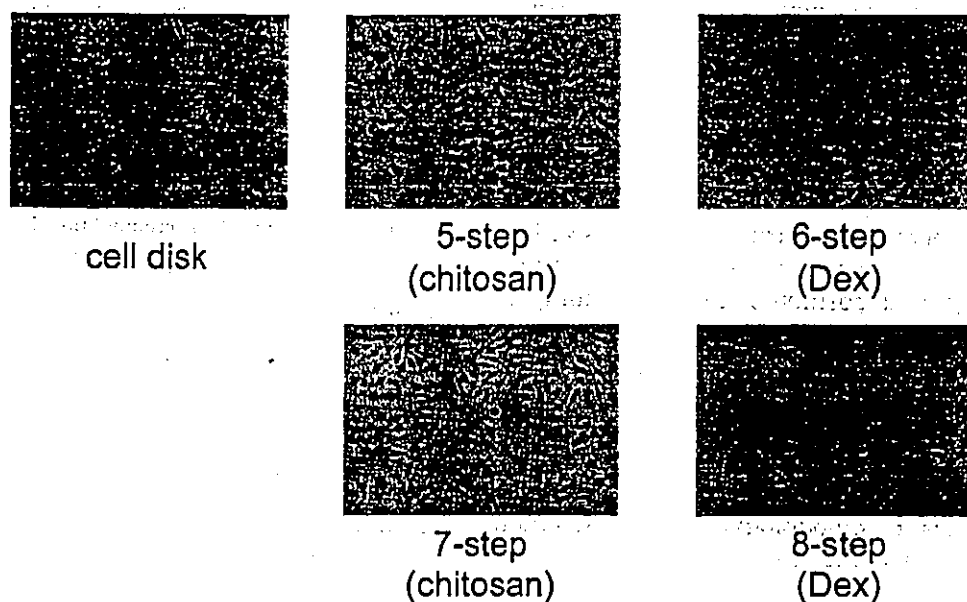


Figure 2. Photographs of fibroblasts adhering to a cell disk and to chitosan-Dex films with different outermost surfaces.

for analyzing cell-material interactions caused by physicochemical stimulation of the cells. In other words, expression of mRNA corresponding to HSP 70B suggests cell stress due to contact with the materials. We previously demonstrated that HSP 70B mRNA was expressed when fibroblasts adhered to the surfaces of lipid films artificially constructed on solid substrates, dependent on minor differences in the chemical structure of the lipids.¹³⁻¹⁵ Accordingly, evaluation of HSP 70B mRNA expression of fibroblasts adhering to the chitosan-Dex multilayers provides significant insights into alternating bioactivity. Figure 3 shows the amounts of HSP 70B mRNA expressed in cells adhering to the multilayers with an outermost surface composed of either chitosan (seven-step) or Dex (eight-step), relative to those adhering to the cell disks. The relative amount of HSP 70B mRNA expressed in the cells adhering to the outermost chitosan surface was the same as that in cells on the cell

disk. However, that in cells adhering to the outermost Dex surface was approximately two times greater than that of cells on the cell disk or the chitosan surface, indicating greater stress in cells cultured on the Dex surface.

It is hard to explain why the cells adhering to the films with an outermost surface composed of Dex expressed greater amounts of HSP 70B mRNA. Greater numbers of cells with a round shape were also evident on the films with the Dex surface, as previously shown. Because serum was added to the present culture medium, proteins related to cell adhesion should adsorb onto the film surfaces. Picart et al. demonstrated that anionically charged serum proteins adsorbed electrostatically onto the cationic outermost layer, resulting in the cell-adhesive multilayer surface.⁷ In other words, the anionic surface resisted adsorption of serum proteins. The observations in the present study suggest that interactions of the extra cellular matrix with the Dex surface are a possible trigger for greater expression of HSP 70B mRNA. However, serum proteins were similarly adsorbed onto the chitosan-Dex multilayers, independent of the outermost layer. In addition, there was a slight difference in the physicochemical properties of the chitosan-Dex assembly. The zeta potentials were +55 and +23 mV, respectively, for the chitosan and Dex surfaces, thus indicating the overall surface charges to be cationic. Although both polymers could be assembled on solid substrates, the amount of Dex assembled was half that of chitosan (see Experimental section), resulting in the overall charges. In fact, anticoagulation of human blood was not observed on the Dex surface of multilayers prepared on the present condi-

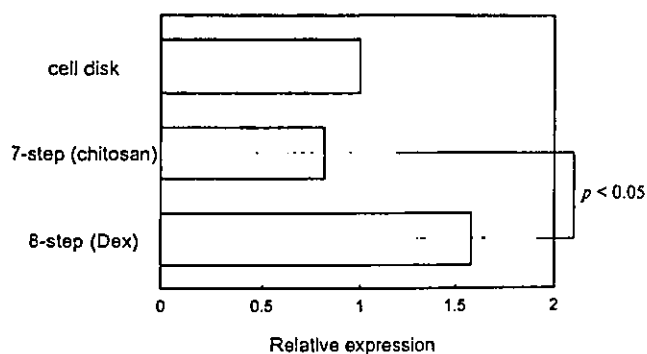


Figure 3. HSP 70B mRNA expression in fibroblasts adhering to a cell disk and to chitosan-Dex films with different outermost surfaces.

tions.³⁻⁵ On the other hand, greater amounts of HSP 70B mRNA have similarly been expressed in fibroblasts cultured on lipid films, when the cells had difficulty adhering to the films.¹³⁻¹⁵ Because greater numbers of round-shaped cells adhered to the Dex surface, more HSP 70B mRNA might be expressed. However, all of these parameters cannot reasonably explain the present results at a molecular level. Regardless of surface charge, some unique proteins may be adsorbed onto the Dex on the surface, leading to the present observations. Furthermore, the swelling properties of the real surface of the multilayers⁹ might also be changed by deposition of Dex, accounting for the present differences. To understand in detail, other model polymer systems are necessary. The present study indicated that cells recognize minor differences in the assembly structures of ultrathin multilayer films, and that cell compatibility can be evaluated by gene expression. Accordingly, analysis of gene expression is an important methodology in the investigation of the biomedical activities of multilayers.

References

1. Decher G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* 1997;27:1232-1237.
2. Elbert DL, Herbert CB, Hubbell JA. Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces. *Langmuir* 1999;15:5355-5362.
3. Serizawa T, Yamaguchi M, Matsuyama T, Akashi M. Alternating bioactivity of polymeric layer-by-layer assemblies: Anti-versus pro-coagulation of human blood on chitosan and dextran sulfate layers. *Biomacromolecules* 2000;1:306-309.
4. Serizawa T, Yamaguchi M, Akashi M. Alternating bioactivity of polymeric layer-by-layer assemblies: Anti- versus pro-coagulation of human blood. *Biomacromolecules* 2002;3:724-731.
5. Sakaguchi H, Serizawa T, Akashi M. Layer-by-layer assembly on hydrogel surfaces and control of human whole blood coagulation. *Chem Lett* 2003;32:174-175.
6. Chluba J, Voegel J-C, Decher G, Erbacher P, Schaaf P, Ogier J. Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. *Biomacromolecules* 2001;2:800-805.
7. Richert L, Lavalle P, Vautier D, Senger B, Stoltz J-F, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C. Cell interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules* 2002;3:1170-1178.
8. Tryoen-Tóth P, Vautier D, Haikel Y, Voegel J-C, Schaaf P, Chluba J, Ogier J. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *J Biomed Mater Res* 2002;60:657-667.
9. Mendelsohn JD, Yang SY, Hiller JA, Hochbaum AI, Rubner MF. Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films. *Biomacromolecules* 2003;4:96-106.
10. Vázquez E, Dewitt DM, Hammond PT, Lynn DM. Construction of hydrolytically-degradable thin films via layer-by-layer deposition of degradable polyelectrolytes. *J Am Chem Soc* 2002;124:13992-13993.
11. Serizawa T, Yamaguchi M, Akashi M. Enzymatic hydrolysis of a layer-by-layer assembly prepared from chitosan and dextran sulfate. *Macromolecules* 2002;35:8656-8658.
12. Serizawa T, Yamaguchi M, Akashi M. Time-controlled desorption of ultrathin polymer films triggered by enzymatic degradation. *Angew Chem Int Ed* 2003;42:1115-1118.
13. Kishida A, Matsuyama T, Nakashima M, Serizawa T, Sugimura K, Akashi M. Heat shock protein 70B mRNA expressions in L929 cells attached on lipid films. *Chem Lett* 1999; 1267-1268.
14. Kishida A, Matsuyama T, Nakashima M, Serizawa T, Akashi M. Study of cell-lipid interaction by measuring heat shock protein mRNA expressions. *J Bioactive Compatible Polym* 2000;15:478-488.
15. Kato S, Matsuyama T, Serizawa T, Kishida A, Akashi M. HSP 47 and collagen mRNA expression in L929 cells adhered to lipid films. *J Biomater Sci Polym Ed* 2001;12:149-156.



Human Calcitonin Delivered Orally by Means of Nanoparticles Composed of Novel Graft Copolymers

Shinji Sakuma,^{1,*} Rika Sudo,¹ Norio Suzuki,¹ Hiroshi Kikuchi,¹
Hideo Takamori,² Toshiyuki Sato,² Yoshiharu Minamitake,³
Yujiro Hayashi,³ Osamu Sugita,³ Ken-ichiro Hiwatari,⁴
Akio Kishida,^{4,*} and Mitsuru Akashi⁴

¹Drug Metabolism and Physicochemical Property Research Laboratory, Daiichi
Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan

²New Product Research Laboratory III, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan

³Bio-Pharma. Tech. Center, Suntory Ltd., Gunma, Japan

⁴Department of Applied Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Engineering,
Kagoshima University, Kagoshima, Japan

ABSTRACT

The ability of nanoparticles having surface hydrophilic polymeric chains to enhance the oral absorption of human calcitonin was examined in rats. The oral relative bioavailability of calcitonin against its subcutaneous administration was 0.01% without nanoparticles, but increased significantly when it was administered with nanoparticles. Nanoparticles having cationic poly(vinylamine) (PVAm) chains on their surfaces had a relatively stronger enhancing effect than did other nanoparticles. When divinylbenzene was added to the nanoparticle preparation, PVAm nanoparticles with a crosslinked hydrophobic polystyrene core were synthesized. The addition of divinylbenzene resulted in nanoparticles with larger zeta potential through the efficient accumulation of hydrophilic PVAm chains on their surfaces; however, inadequate amounts decreased the zeta potential. Changes in the bioavailability proportional to the zeta potential indicated that the cationic moiety is indispensable for inducing the significant enhancement of calcitonin absorption. The chemical structure of nanoparticles could be optimized by introducing nonionic poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) or anionic poly(methacrylic acid) chains onto the PVAm nanoparticle surface to effectively further improve the absorption-enhancing function of PVAm nanoparticles. Finally, the maximum bioavailability of 1.1% was achieved after oral administration of calcitonin with PVAm-PNIPAAm nanoparticles.

*Correspondence: Shinji Sakuma, Drug Metabolism and Physicochemical Property Research Laboratory, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, 134-8630, Japan. Fax: 81-3-5696-8332; E-mail: sakumv8j@daiichipharm.co.jp.

*Current address: Department of Biological Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka 565-8565, Japan.

whose components, VAm macromonomer, *N*-isopropylacrylamine (NIPAAm) macromonomer, and styrene were copolymerized in the molar ratio of 1.5:0.5:10.

Key Words: Nanoparticle; Graft copolymer; Oral delivery; Human calcitonin; Peptide.

INTRODUCTION

It is well known that the bioavailability of peptide and protein drugs after oral administration is very low because of their instability in the gastrointestinal (GI) tract and low permeability through the intestinal membrane.^[1,2] Consequently, injectable dosage forms are currently used to obtain their therapeutic effects. Since injections, however, are poorly accepted by patients, it is indispensable to develop alternative means such as oral, nasal, buccal, rectal, vaginal, pulmonary, and transdermal routes.^[3] A number of nasal formulations, for instance, showed therapeutical plasma levels of derivatives of oligopeptide hormones, and the bioavailability after their nasal administration in man was in the range of 2 to 10%.^[4] Nevertheless, the most convenient route for patients would be oral administration of a suitable dosage form. Several approaches including chemical modification,^[5] the use of an absorption enhancer,^[6] the use of a protease inhibitor,^[6] colon delivery systems,^[7,8] mucoadhesive drug delivery systems^[9,10] and particulate drug delivery systems^[10-12] have been investigated in order to achieve oral peptide delivery.

We also demonstrated previously that nanoparticles composed of novel graft copolymers having a hydrophobic polystyrene backbone and hydrophilic polyvinyl branches are useful as carriers for peptide drugs.^[13-19] These nanoparticles were prepared by the free radical copolymerization between hydrophilic macromonomers terminating in vinylbenzyl groups and styrene.^[20-22] Their surfaces were covered with hydrophilic polymeric chains^[23] and their diversity was controlled by designing and synthesizing different functional macromonomers.^[24]

These nanoparticles enhanced the absorption of salmon calcitonin (sCT) in rats via the GI tract.^[13] The absorption enhancement was affected by the chemical structure of the hydrophilic polymeric chains. Nonionic thermosensitive poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) groups on the nanoparticle surface were essential for significantly enhancing sCT absorption. Nanoparticles having cationic poly(vinylamine) (PVAm) or anionic poly(methacrylic acid) (PMAA) on their surfaces also somewhat improved sCT absorption, although to a degree less than that by PNIPAAm nanoparticles.

We further developed nanoparticles having two kinds of hydrophilic polymeric chains on their surfaces by copolymerizing styrene with two different macromonomers.^[19] The introduction of PVAm chains

synergistically enhanced sCT absorption by PNIPAAm nanoparticles, and this effect was improved further by increasing the ratio of the respective macromonomers to styrene in the copolymerization. The ability of nanoparticles to enhance sCT absorption depended greatly on their chemical structure, which was relevant to their surface characteristics. That optimization yielded excellent enhancement of sCT absorption.

The optimal chemical structure of nanoparticle probably varies according to the characteristics of the peptide drugs being delivered. In this paper, we examine the effect of the chemical structure of nanoparticles on the absorption of human calcitonin (hCT), which is partially homologous to sCT.

EXPERIMENTAL

Materials

Human calcitonin and rabbit antiserum against hCT were prepared and identified in Suntory Ltd. (Osaka, Japan).^[25,26] Rabbit IgG and anti-rabbit IgG goat serum were purchased from UCB Bioproducts (Cambridge, MA) and JIMRO (Gunma, Japan), respectively. *N*-vinylacetamide (NVA) monomer was supplied by Showa Denko Co. (Tokyo, Japan). *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) and *t*-butyl methacrylate (BMA) monomers were obtained from Kohjin Co. (Tokyo, Japan). *p*-Chloromethyl styrene (*p*-CMSt) was furnished by Nippon Oil and Fats Co. (Tokyo, Japan). Divinylbenzene was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All other chemicals were commercial products of reagent grade. These materials were purified in the usual manner when necessary.^[27-30]

Preparation of Nanoparticles

Macromonomer

Nonionic NIPAAm, NVA, and BMA macromonomers were prepared according to the procedures reported in our earlier articles.^[27-30] Oligomers were prepared by the free radical polymerization of monomers (NIPAAm, NVA, and BMA) by using 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) as initiator in the presence of 2-mercaptoethanol as a chain transfer agent. The resulting hydroxyl group-terminated oligomers were reacted with *p*-CMSt to