

200400199A

厚生労働科学研究費補助金  
萌芽的先端医療技術推進研究事業

細胞機能・組織修復・再生のナノ・マニピュレーション：  
生体機能材料のナノ設計・ナノ加工技術および医療応用

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松田 武久

平成17(2005)年4月

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

細胞機能・組織修復・再生のナノ・マニピュレーション：

生体機能材料のナノ設計・ナノ加工技術および医療応用

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松田 武久

平成17（2005）年 4月

## 目次

### I. 総括研究報告

- 細胞機能・組織修復・再生のナノ・マニピュレーション：  
生体機能材料のナノ設計・ナノ加工技術および医療応用 . . . . . 4  
松田武久

### II. 分担研究報告

1. 次世代低侵襲性医療の開発 . . . . . 30  
下川宏明
2. 機能的ナノ生体材料 . . . . . 43  
片山佳樹
3. 光リビングラジカル重合反応による温度感応性高分子の合成研究 . . . 53  
新名主輝男
4. 電界紡糸法による組織工学骨格基材の機能的設計：生分解性ポリマーナ  
ノ・マイクロファイバーメッシュの作製 . . . . . 59  
木戸秋悟
5. 熱応答性シゾフィランを利用した核酸分離剤の開発 . . . . . 66  
新海征治
6. 生分解性セグメント化ポリウレタンの特性解析とマイクロファイバーの調  
製 . . . . . 74  
高原淳
7. 感温性人工細胞外マトリックスの応用：温度応答性高分子化合物を用い  
たターゲット細胞の培養下 *in situ* 選別回収 . . . . . 82  
高松洋
8. 軟骨組織工学に関する研究 . . . . . 91  
岩本幸英

9. 膀胱切除後の局所再発を防止するための新しい治療戦略：組織工学的手法による局所薬剤持続投与システムの開発	96
田中雅夫	
10. 医用弾性接着剤	104
森田茂樹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	116
IV. 研究成果の刊行物・別刷	122

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
総括研究報告書

細胞機能・組織修復・再生のナノ・マニピュレーション：  
生体機能材料のナノ設計・ナノ加工技術および医療応用

主任研究者 松田 武久（九州大学大学院医学研究院医用工学教授）

研究要旨： 本研究は（A）組織修復・再構築を迅速に可能にする機能材料の創製とナノスケール加工技術の開発とデバイス化、および（B）細胞内異常シグナルにตอบสนองして細胞機能の制御を行うナノカプセルおよび DNA/多糖の精緻なナノ複合体の開発を行い、（A）および（B）を組み合わせ、循環器疾患、癌疾患および再生医療（血管・軟骨）に新しい治療デバイス・バイオアクティブ材料と医療技術を提供する。今年度は、下記 4 項目の主要課題について検討し、成果を得た。

(1) ナノ・マイクロレベルでの細胞外マトリックス・人工骨格設計：

- 光リビングラジカル重合による、下限臨界温度の異なる三種類のモノマーからなる感温性3ブロック共重合体の合成。
- 生分解性セグメント化ポリウレタンのマイクロファイバーメッシュ化
- 生体分解性エラストマー-poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL) のナノファイバーメッシュ化

(2) 超微細ナノ加工技術：

- PLCL ナノファイバーメッシュチューブのコンプライアンス設計および生体力学場負荷条件下での血管内皮細胞の接着・機能発現応答の解析
- 生体力学場にตอบสนองする mechano-active 骨格基材設計

(3) ナノカプセルの創製および多糖・核酸の共らせん複合体の創製：

- プロテイナーゼ C および HIV プロテアーゼ応答型キャリアナノカプセルの開発
- 熱応答性シゾフィランによる核酸分離剤の開発

(4) 医療への応用：

A. 研究目的

革新的な設計概念・精密制御による分子設計と加工技術によって作製したデバイスによる生体組織の反応性の制御、および細胞内シグナルにตอบสนองして細胞機能を制御する生体機能材料、ナノカプセル・ナノ超分子構造体による組織修復・再構築技術は、新しい高品位の医療を近未来に提供するものと大いに期待

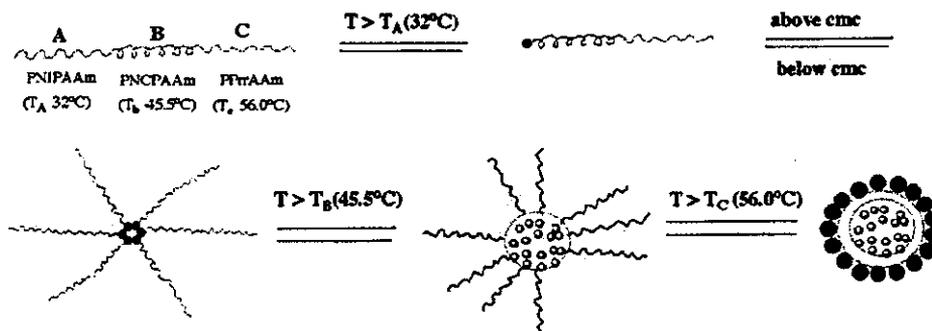
される。このためには、ナノレベルでの材料の組成・構造およびこれらが集合した超分子構造体であるメソスコピックからナノレベルでの形状を制御できる超微細加工技術および機能付与技術の開発、これらを統合したデバイス化および医療システム化が重要と考える。

研究組織	
分担研究者	下川宏明 九州大学医学研究院 助教授
分担研究者	片山佳樹 九州大学工学研究院 教授
分担研究者	新名主輝男 九州大学 先導物質化学研究所 教授
分担研究者	木戸秋悟 九州大学医学研究院 助教授
分担研究者	新海征治 九州大学工学研究院 教授
分担研究者	高原淳 九州大学 先導物質化学研究所 教授
分担研究者	高松洋 九州大学工学研究院 教授
分担研究者	岩本幸英 九州大学医学研究院 教授
分担研究者	田中雅夫 九州大学医学研究院 教授
分担研究者	森田茂樹 九州大学医学研究院 助教授

本研究の目的は、具体的には 1) 従来から独自に開発してきた精密合成技術によって、ナノ組成・ナノ構造を制御し、細胞の接着・非接着および生分解性を高精度で制御した機能的生体材料（人工骨格、人工細胞外マトリックス、液状生分解性材料）の開発、2) 新しく開発しているナノ加工技術（二光子光造形技術、高電圧紡糸技術）による超分子構造化と形状制御、3) 全く新しい概念による細胞機能を制御するナノカプセル（特定の細胞内シグナルに応答して活性を制御あるいは増大あるいは遺伝子発現させる）、および精密立体構造化した多糖・核酸の共らせん複合体による遺伝子導入、4) これらをシステム化した新しい医療技術の開発である。本研究によって、病的細胞のみに作用して、多様な細胞機能を多面的に制御することによって組織修復（動脈硬化・癌）、および新しい加工技術と材料による三次元組織体形成による再生医療が可能になる。これによって国内外に例をみない、全く新規で高効率・高精度・高品位の医療を提供できる。また、本技術の産業への応用および製品化による産業化活性化を促進できると大いに期待できる。

## B. 研究方法、研究結果および考察

(1) ナノ・マイクロレベルでの細胞外マトリックス・人工骨格設計：本課題ではこれまでに、光反応バイオマテリアル技術の開発と生体適合化技術および、感温性・感光性人工細胞外マトリックスの分子設計とナノ・ミクロスケールの超分子構造化技術の開発を進めてきた。今年度は(1) 光リビングラジカル重合反応を利用し、下限臨界温度の異なる三種類のモノマーからなる3ブロック共重合体を合成し、新規の感温性人工細胞外マトリックス用材料の作製を行った（松田・新名主：図1）。

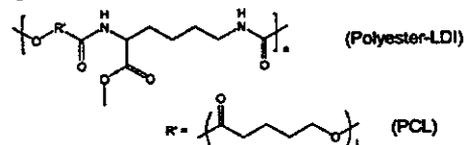


$T_A, T_B, T_C$ : LCSTs for polymer A, B, and C. cmc: critical micelle concentration.

図 1. 下限臨界温度の異なる三種類のモノマーからなる感温性3ブロック共重合体の模式図

(2) アミノ酸由来のジイソシアナートと生分解性ポリエステルおよび生体由来のジアミンあるいはジオールよりなるセグメント化ポリウレタンおよびセグメント化ポリウレタンウレアのマイクロファイバー化（高原・木戸秋：図 2）。(3) 生分解性エラストマーである poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL) のナノファイバーメッシュ化を行い、細胞との相互作用特性を調べた（松田・木戸秋：図 3）。

#### Soft Segment



#### Hard Segment

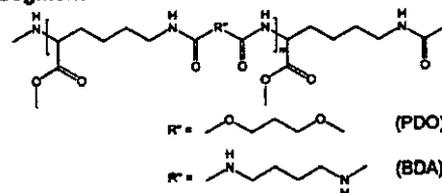


図 2. SPU と SPUU のハードセグメントとソフトセグメントの化学構造

(2) 超微細ナノ加工技術：昨年度までに確立した、電界紡糸法による生体高分子、合成高分子のナノ・マイクロファイバーメッシュ化技術およびそのマイクロデバイス構造化（メッシュ・チューブ）の超微細加工技術を応用し、今年度は PLCL ナノファイバーメッシュチューブを作製し、そのコンプライアンス特性を調べるとともに、生体環境を模倣した生体力学場を負荷した場合の血管内皮細胞の接着・機能発現等の応答の解析を進めた（松田・森田）。また、対象となる臓器が常時さらされている生体力学場でのストレスに感応する mechano-active 人工骨格の開発を進めた（松田・岩本）。

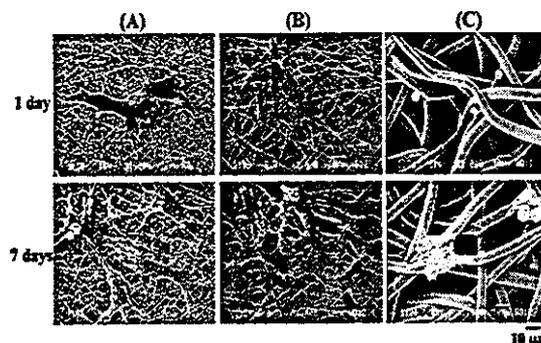


図 3. 異なるファイバー径の PLCL (50/50) 電界紡糸メッシュ上で 1 および 7 日間培養した HUVEC の SEM 写真。ファイバーの平均直径：(A) 0.3  $\mu\text{m}$ 、(B) 1.2  $\mu\text{m}$ 、(C) 7  $\mu\text{m}$ 。

(3) ナノカプセルの創製および多糖・核酸の共らせん複合体の創製：細胞内伝達系の異常シグナルを発生している病的細胞にのみ選択的に薬剤・遺伝子を送達するナノカプセルとして、今年度新たに、プロテインキナーゼC(PKC)および HIV プロテアーゼ応答型キャリアの開発に成功した(片山：図4) PKC $\alpha$ 特異的な基質設計を行い、マウスを用いて癌組織では特異的にリン酸化される基質を見出した(片山)。天然多糖シゾフィランに熱応答性を

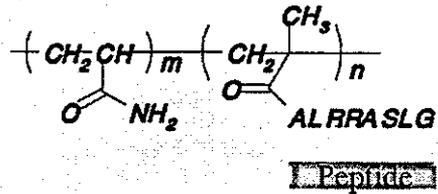


図4 PKC 応答型遺伝子送達材料

導入し、mRNA の選択的分離・回収を可能とする新しい核酸分離剤を開発した(新海：図5)

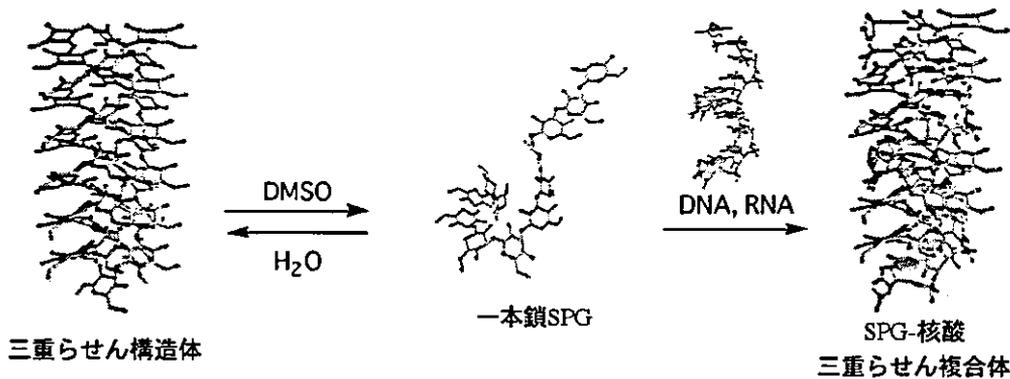


図5. シゾフィランの構造と核酸の複合体形成過程

(4) 医療への応用：抗癌剤含有ナノカプセルの動脈硬化病変形成の予防・治療への適用(下川・片山)、再生軟骨用人工細胞外マトリックスの開発および in vivo での機能評価(岩本)、細胞を担体としたタンパク質輸送システムの開発と膀胱増殖抑制への適用(田中)、新しく開発したフッ素化アルキルジイソシアネートを基本骨格成分とする液状ウレタンポリマーによる組織接着剤(図6)の、心血管外科領域での止血剤への応用(森田)等の各医療応用について検討を進めた。特に組織接着剤の医療応用については、製品化に向け、三洋化成と協力し、前臨床試験の各段階を進行させつつある。

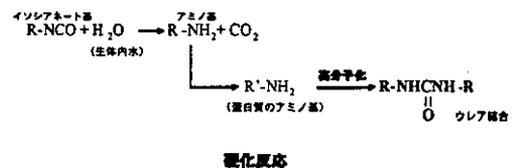
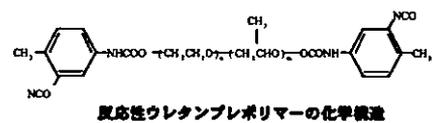


図6.

#### 倫理面への配慮：

動物実験に関しては動物愛護に十分に配慮し、綿密なる実験計画により実験量を必要最小限にし、大学の動物実験委員会の審査を受け、ヒトへの応用に関しては、学内での倫理委員会の審査を受ける予定であるが、本年度は該当しない。

#### C. 結論

今年度は、新規の感温性人工細胞外マトリックス用材料の開発を行うとともに、昨年度までに確立した、電界紡糸法による生体高分子、合成高分子のナノ・マイクロファイバメッシュ化技術およびそのマイクロデバイス構造化（メッシュ・チューブ）の超微細加工技術を応用し、生分解性セグメント化ポリウレタンおよび生分解性エラストマーPLCL のナノ・マイクロファイバメッシュ組織工学

骨格基材を作製した。また、組織特性（透過性の亢進、内皮剥離、プロテインキナーゼ活性化、等）を感知するナノカプセル式新型キャリアの開発、天然多糖シゾフィランを用いた新しい核酸分離剤・RNA 検出試薬の開発、新しい組織接着剤の前臨床試験の開始等、の成果が得られた。以上の各技術は新しい再生医療の platform 又は scaffold を提供する独創的技術であり、材料の機能性およびマイクロ・ナノ加工技術では国際的にも大幅にリードしている。これらの細胞機能・組織再構築の nano-manipulation の要素材料と要素加工技術を組み合わせることによるシステムとしてのナノ医療の基盤の構築と医療応用への展開が期待できる。

#### D. 健康危険情報

現在のところ、該当なし。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 主任研究者：松田 武久

1. T. Masuda, M. Furue, T. Matsuda. Novel strategy for soft tissue augmentation based on transplantation of fragmented omentum and preadipocytes. *Tissue Engineering* (2004), 10(11/12), 1672-1683.
2. T. Matsuda. Mechanics and remodeling of bio artificial blood vessels. *Kekkan Igaku* (2004), 5(6), 577-586.
3. I. K. Kwon, S. Kidoaki, T. Matsuda. Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials* (2005), 26(18), 3929-3939.
4. S. Ohya, S. Kidoaki, T. Matsuda. Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin hydrogel surfaces: interrelationship between microscopic structure and mechanical property of surface regions and cell adhesiveness. *Biomaterials* (2005), 26(16), 3105-3111.
5. T. Yamaguchi, H. Otsuka, S. Kidoaki, T. Matsuda, A. Takahara. Physicochemical properties and bio-degradation of segmented polyurethane and poly(urethane-urea) derived from lysine-based diisocyanate. *Transactions of the Materials Research Society of Japan* (2004), 29(6), 2873-2876.
6. I. K. Kwon, T. Matsuda. Photopolymerized microarchitectural constructs prepared by microstereolithography ( $\mu$ SL) using liquid acrylate-end-capped trimethylene carbonate-based prepolymers. *Biomaterials* (2004), Volume Date 2005, 26(14), 1675-1684.
7. T. Matsuda. Poly(N-isopropylacrylamide)-grafted gelatin as a thermoresponsive cell-adhesive, mold-releasable material for shape-engineered tissues. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* (2004), 15(7), 947-955.
8. S. Ohya, H. Sonoda, Y. Nakayama, T. Matsuda. The potential of poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted hyaluronan and PNIPAM-grafted gelatin in the control of post-surgical tissue adhesions. *Biomaterials* (2004), Volume Date 2005, 26(6), 655-659.
9. R. Maeyama, Y. Mizunoe, J. M. Anderson, M. Tanaka, T. Matsuda. Confocal imaging of biofilm formation process using fluoroprobed *Escherichia coli* and fluoro-stained exopolysaccharide. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* (2004), 70A(2), 274-282.
10. S. Kidoaki, I. K. Kwon, T. Matsuda. Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials* (2004), Volume Date 2005, 26(1), 37-46.
11. T. Manabe, H. Okino, M. Tanaka, T. Matsuda. In situ-formed, tissue-

- adhesive co-gel composed of styrenated gelatin and styrenated antibody: potential use for local anti-cytokine antibody therapy on surgically resected tissues. *Biomaterials* (2004), 25(27), 5867-5873.
12. T. Masuda, M. Furue, T. Matsuda. Photocured, Styrenated Gelatin-Based Microspheres for de Novo Adipogenesis through Corelease of Basic Fibroblast Growth Factor, Insulin, and Insulin-Like Growth Factor I. *Tissue Engineering* (2004), 10(3/4), 523-535.
  13. S. Kato, S. Kidoaki, T. Matsuda. Substrate-dependent cellular behavior of Swiss 3T3 fibroblasts and activation of Rho family during adhesion and spreading processes. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* (2004), 68A(2), 314-324.
  14. H. Sonoda, H. Yasui, T. Matsuda. A device for the spatio-regional delivery of a photocurable drug formulation. *Biomaterials* (2004), 25(14), 2859-2866.
  15. Y. Matsumoto, T. Uwatoku, K. Oi, K. Abe, T. Hattori, K. Morishige, Y. Eto, Y. Fukumoto, K. Nakamura, Y. Shibata, T. Matsuda, A. Takeshita, H. Shimokawa. Long-Term Inhibition of Rho-Kinase Suppresses Neointimal Formation After Stent Implantation in Porcine Coronary Arteries: Involvement of Multiple Mechanisms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (2004), 24(1), 181-186.
  16. T. Matsuda, I. K. Kwon, S. Kidoaki. Photocurable Biodegradable Liquid Copolymers: Synthesis of Acrylate-End-Capped Trimethylene Carbonate-Based Prepolymers, Photocuring, and Hydrolysis. *Biomacromolecules* (2004), 5(2), 295-305.
  17. T. Manabe, H. Okino, R. Maeyama, K. Mizumoto, E. Nagai, M. Tanaka, T. Matsuda. Novel strategic therapeutic approaches for prevention of local recurrence of pancreatic cancer after resection: trans-tissue, sustained local drug-delivery systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* (2004 Dec 10), 100(3), 317-30.
  18. I. K. Keun, S. Kidoaki, T. Matsud. Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials* (2005 Jun), 26(18), 3929-39.
  19. E. Gamez, Y. Goto, K. Nagata, T. Iwaki, T. Sasaki, T. Matsuda. Photofabricated gelatin-based nerve conduits: nerve tissue regeneration potentials. *Cell transplantation* (2004), 13(5), 549-64.
  20. T. Nishida, H. Shimokawa, K. Oi, H. Tatewaki, T. Uwatoku, K. Abe, Y. Matsumoto, N. Kajihara, M. Eto, T. Matsuda, H. Yasui, A. Takeshita, K. Sunagawa. Extracorporeal cardiac shock wave therapy markedly ameliorates ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo. *Circulation* (2004 Nov 9), 110(19),

- 3055-61.
21. T. Yambe, Y. Abe, K. Imachi, Y. Shiraishi, M. Shibata, T. Yamaguchi, Q. Wang, X. Duan, H. Liu, M. Yoshizawa, A. Tanaka, H. Matsuki, F. Sato, Y. Haga, M. Esashi, K. Tabayashi, Y. Mitamura, H. Sasada, M. Umezu, T. Matsuda, S. Nitta. Development of an implantable undulation type ventricular assist device for control of organ circulation. *Artificial organs* (2004 Oct), 28(10), 940-4.
  22. T. Matsuda. Recent progress of vascular graft engineering in Japan. *Artificial organs* (2004 Jan), 28(1), 64-71.
- 2) 分担研究者：下川 宏明
23. Y. Matsumoto, T. Uwatoku, K. Abe, K. Oi, T. Hattori, K. Morishige, Y. Eto, Y. Fukumoto, K. Nakamura, Y. Shibata, T. Matsuda, A. Takeshita, H. Shimokawa. H. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses neointimal formation after stent implantation in porcine coronary arteries -Involvement of multiple mechanisms-Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004, 24:181-186.
  24. T. Hattori, H. Shimokawa, M. Higashi, J. Hiroki, Y. Mukai, K. Kaibuchi, A. Takeshita. Long-term treatment with a specific Rho-kinase inhibitor suppresses cardiac allograft vasculopathy in mice. *Circ Res.* 2004, 94:46-52.
  25. K. Ito, Y. Hirooka, T. Kishi, Y. Kimura, K. Kaibuchi, H. Shimokawa, A. Takeshita. Rho/Rho-kinase pathway in the brainstem contributes to hypertension caused by chronic nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension.* 2004, 43:156-162.
  26. K. Abe, H. Shimokawa, K. Morikawa, T. Uwatoku, K. Oi, Y. Matsumoto, T. Hattori, Y. Nakashima, K. Kaibuchi, K. Sueishi, A. Takeshita. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ Res.* 2004, 94:385-393.
  27. T. Yamamoto, K. Ikuta, K. Oi, K. Abe, T. Uwatoku, M. Murata, N. Shigetani, K. Yonemitsu, H. Shimokawa, Y. Katayama. First functionalized MRI contrast agent recognizing vascular lesions. *Analytical Sciences.* 2004, 20:5-7.
  28. T. Hattori, H. Shimokawa, M. Higashi, J. Hiroki, Y. Mukai, H. Tsutsui, K. Kaibuchi, A. Takeshita. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2004, 109:2234-2239.
  29. T. Kishi, Y. Hirooka, Y. Kimura, K. Ito, H. Shimokawa, A. Takeshita. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 2004, 109:2357-2362.
  30. A. Ito, H. Shimokawa, H. Meno, T. Inou. Possible involvement of macrophage-colony stimulating factor in the pathogenesis of cardiac dysfunction in hemodialysis patients. *Jpn Heart J.*

- 2004, 45:497-503.
31. S. Sanada, H. Asanuma, O. Tsukamoto, T. Minamino, K. Node, S. Takashima, T. Fukushima, A. Ogai, Y. Shinozaki, M. Fujita, A. Hirata, H. Okuda, H. Shimokawa, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C. *Circulation*. 2004, 110:51-57.
  32. K. Oi, H. Shimokawa, Y. Hirakawa, H. Tashiro, R. Nakaike, T. Kozai, K. Ohzono, K. Yamamoto, S. Koyanagi, S. Okamatsu, T. Tajimi, Y. Kikuchi, A. Takeshita. Postprandial increase in plasma concentrations of remnant-like particles: An independent risk factor for restenosis after percutaneous coronary intervention. *J Cardiovasc Pharmacol*. 44:66-73, 2004.
  33. S. Shiotani, M. Shimada, T. Suehiro, Y. Soejima, H. Shimokawa, Y. Maehara. Involvement of Rho-kinase in cold ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in rats. *Transplantation*. 2004, 78:375-382.
  34. K. Oi, H. Shimokawa, J. Hiroki, T. Uwatoku, K. Abe, Y. Matsumoto, Y. Nakajima, K. Nakajima, S. Takeichi, A. Takeshita. Remnant lipoproteins from patients with sudden cardiac death enhance coronary vasospastic activity through upregulation of Rho-kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004, 24:918-922.
  35. K. Ito, Y. Hirooka, Y. Kimura, H. Shimokawa, A. Takeshita. Effects of hydroxyfasudil administered in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.*, in press.
  36. J. Hiroki, H. Shimokawa, M. Higashi, K. Morikawa, T. Kandabashi, N. Kawamura, T. Kubota, T. Ichiki, M. Amano, K. Kaibuchi, A. Takeshita. Inflammatory stimuli upregulate Rho-kinase in human vascular smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 2004, 37:537-546.
  37. T. Nishida, H. Shimokawa, K. Oi, H. Tatewaki, T. Uwatoku, K. Abe, Y. Matsumoto, Y. Kajihara, M. Eto, T. Matsuda, H. Yasui, A. Takeshita, Sunagawa K. Extracorporeal cardiac shock wave therapy markedly ameliorates ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo. *Circulation*. 2004, 110:3055-3061.
  38. T. Yamamoto, K. Ikuta, K. Oi, K. Abe, T. Uwatoku, F. Hyodo, M. Murata, N. Shigetani, K. Yoshimitsu, H. Shimokawa, Y. Katayama. In vivo MR detection of vascular endothelial injury using a new class of MRI contrast agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2004, 14:2787-2790.
  39. Y. Fukumoto, T. Matoba, A. Ito, H. Tanaka, T. Kishi, S. Hayashidani, K. Abe, A. Takeshita, H. Shimokawa. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart.*, in press.
  40. K. Inokuchi, A. Ito, Y. Fukumoto, T. Matoba, A. Shiose, T. Nishida, M. Masuda,

- S. Morita, H. Shimokawa. Usefulness of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, to treat intractable severe coronary spasm after coronary artery bypass surgery. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004, 44:275-277.
41. MAH. Talukder, T. Fijiki, K. Morikawa, M. Motoishi, H. Kubota, T. Morishita, M. Tsutsu, A. Takeshita, H. Shimokawa. Upregulated neuronal nitric oxide synthase compensates coronary flow response to bradykinin in endothelial nitric oxide-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004, 44:437-445.
42. K. Hirayama, Y. Hata, Y. Noda, M. Miura, I. Yamanaka, H. Shimokawa, T. Ishibashi. The involvement of Rho-kinase pathway and its regulation in cytokine-induced collagen gel contraction by hyalocytes. *Invest Ophthalmol Visual Sci.*, in press.
43. A. Ito, Y. Fukumoto, H. Shimokawa. Changing characteristics of patients with vasospastic angina in the era of new calcium channel blockers. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004, 44:480-485.
44. MAH. Talukder, T. Fujiki, K. Morikawa, M. Motoishi, Y. Matsuo, M. Hatanaka, M. Tsutsui, A. Takeshita, H. Shimokawa. Endothelial nitric oxide synthase-independent effect of an ACE inhibitor on coronary flow response to bradykinin in mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004, 44:557-563.
45. K. Morikawa, T. Matoba, H. Kubota, M. Hatanaka, T. Fujiki, S. Takahashi, H. Shimokawa. Important role of superoxide dismutase in EDHF-mediated responses of human mesenteric arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004, 44:552-556.
46. Y. Zhao, Y. Fukumoto, M. Mohri, H. Shimokawa, A. Takeshita. Impact of gender and age on coronary basal tone. *Int Med.*, in press.
47. T. Nishikimi, K. Akimoto, X. Wang, Y. Mori, K. Tadokoro, Y. Ishikawa, H. Shimokawa, H. Ono, H. Matsuoka. Fasudil, a new Rho-kinase inhibitor, attenuates glomerulosclerosis in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypert.* 2004, 22:1787-1796.
48. PV. Rao, P. Deng, R. Maddala, DL. Epstein, CY. Li, H. Shimokawa. Expression of dominant-negative Rho-binding domain of Rho-kinase in organ cultured human eye anterior segments increases aqueous humor outflow. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.*, in press.
49. K. Ito, Y. Hirooka, Y. Sagara, Y. Kimura, K. Kaibuchi, H. Shimokawa, A. Takeshita, K. Sunagawa. Inhibition of Rho-kinase in the brainstem augments baroreflex control of heart rate in rats. *Hypertension.* 2004, 44:478-483.
50. T. Yada, H. Shimokawa, O. Hiramatsu, T. Kajiya, F. Shigeto, M. Goto, Y. Ogasawara, F. Kajiya. Beneficial effects of hydroxyfasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo. *J Am Coll Cardiol.*, in press.
51. K. Abe, K. Morikawa, T. Hizume, T. Uwatoku, K. Oi, M. Seto, I. Ikegaki, T. Asano, K. Kaibuchi, H. Shimokawa.

- Prostacyclin does not inhibit Rho-kinase: An implication for the treatment of pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.*, in press.
52. J. Hiroki, H. Shimokawa, Y. Mukai, T. Ichiki, A. Takeshita. Divergent effects of estrogen and nicotine on Rho-kinase expression in human coronary vascular smooth muscle cells. *Biophys Biochem Res Commun.* 2004, 326:154-159.
53. R. Chapados, K. Abe, J. Elliot, AT. Gates, K. Ihida-Stunbery, M. Kern, D. McKean, S. Merklinger, A. Plant, L. Sisbarro, H. Shimokawa, PL. Jones. Adhesion-dependent induction of vascular smooth muscle cell tenascin-C expression relies upon RhoA-mediated changes in actin dynamics and cell shape. *Circ Res.*, in press.
54. H. Shimokawa, T. Matoba, K. Morikawa, T. Yada, H. Kubota, Y. Hirakawa, A. Takeshita. Important role of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. In: Vanhoutte PM (ed.), *EDHF 2002*, pp. 63-69, Taylors & Francois Co., London, 2003.
- 3) 分担研究者：片山 芳樹
55. K. Kawamura, J. Oishi, J-H. Kang, K. Kodama, T. Sonoda, M. Murata, T. Niidome, Y. Katayama. Intracellular Signal-Responsive Gene Carrier for Cell-Specific Gene Expression. *Biomacromolecules* 2004, ASAP
56. T. Yamamoto, K. Ikuta, K. Oi, K. Abe, T. Uwatoku, F. Hyodo, M. Murata, N. Shigetani, K. Yoshimitsu, H. Shimokawa, H. Utsumi, Y. Katayama. In vivo MR Detection of Vascular Endothelial Injury Using A New Class of MRI Agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14: 2787-2790.
57. T. Yamamoto, K. Ikuta, K. Oi, K. Abe, T. Uwatoku, M. Murata, N. Shigetani, K. Yoshimitsu, H. Shimokawa, Y. Katayama. First Functionalized MRI Contrast Agent Recognizing Vascular Lesions. *Anal. Sci.* 2004, 20: 5-7.
58. T. Sonoda, S. Shigaki, T. Nagashima, O. Okitsu, Y. Kita, M. Muarata, Y. Katayama. Mass-Tag Technology for Monitoring of Protein Kinase Activity Using Mass Spectrometry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14: 847-850.
59. 片山佳樹、山本竜広、下川宏明. 内皮傷害部位を特異的に診断できる造影剤. *Bio Medicinal Quick Review Net.* 2004. 4009: 1-5.
60. 片山佳樹. ケミストからみたポストゲノム10~プロテオミクスにおける質量分析～. *Dojin News.* 2004, 110: 10-16.
- 4) 分担研究者：新名主 輝男
61. R. Nogita, K. Matohara, T. Oda, Y. Sakamoto, C. Lim, M. Yasutake, T. Kumagai, T. Shimo, C. W. Jefford, T. Shinmyozu. Photochemical Study of [33] (1, 3, 5)Cyclophane and Emission Spectral Properties of [3n]Cyclophanes (n = 2-6). *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126: 13732-13741.
62. H. Takemura, M. Kotoku, M. Yasutake, T. Shinmyozu. 9-Fluoro-18-hydroxy[3.3]metacyclophane: Synthesis and Estimation of a C-F...H-O Hydrogen

Bond. Eur. J. Org. Chem. 2004, 2019-2024.

5) 分担研究者：木戸秋 悟

63. S. Kidoaki, I.K. Kwon, T. Matsuda, Mesoscopic spatial designs of nano- and micron-fiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques, *Biomaterials* 2005, 26: 37-46.

64. I.K. Kwon, S. Kidoaki, T. Matsuda, Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential, *Biomaterials* 2005, 26: 3929-3939.

65. S. Kidoaki, I.K. Kwon, T. Matsuda. Structural Feature and Mechanical Property of *In Situ*-Bonded Meshes of Segmented Polyurethane Electrospun from Mixed Solvents. *J. Biomed. Mater. Res. B.* 2005 in press.

6) 分担研究者：新海 征治

66. M. Mizu, K. Koumoto, T. Anada, K. Sakurai, S. Shinkai, Antisense oligonucleotides bound in the polysaccharide complex and the enhanced antisense effect due to the low hydrolysis. *Biomaterials* 2004, 25: 3117-3123.

67. T. Satoh, T. Nagasaki, N. Sakurai, S. Shinkai, 6-Amino-6-deoxychitosan. Preparation and application as plasmid vector in COS-1 cells. *Chem. Lett.* 2004, 33: 340-341.

68. T. Nagasaki, M. Hojo, A. Uno, T. Satoh,

K. Koumoto, M. Mizu, K. Sakurai, S. Shinkai, Long-term expression with a cationic polymer derived from a natural polysaccharide: schizophyllan. *Bioconjugate Chem.* 2004, 15: 249-259.

69. K. Koumoto, M. Mizu, K. Sakurai, T. Kunitake, S. Shinkai, Complementary-strand-induced release of single-strand DNA bound in the schizophyllan complex. *Chemistry & Biodiversity*, 2004, 1: 520-529.

70. R. Karinaga, M. Mizu, K. Koumoto, T. Anada, S. Shinkai, K. Sakurai, First observation by fluorescence polarization of complexation between mRNA and the natural polysaccharide schizophyllan. *Chemistry & Biodiversity* 2004, 1: 634-639.

71. M. Mizu, K. Koumoto, T. Anada, R. Karinaga, T. Kimura, T. Nagasaki, S. Shinkai, K. Sakurai, Enhancement of the antisense effect of polysaccharide-polynucleotide complexes by preventing the antisense oligonucleotide from binding to proteins in the culture medium. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2004, 77: 1101-1110.

72. M. Mizu, K. Koumoto, T. Anada, T. Matsumoto, M. Numata, S. Shinkai, T. Nagasaki, K. Sakurai, A polysaccharide carrier for immunostimulatory CpG DNAs to enhance cytokine secretion. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126: 8372-8373.

73. K. Miyoshi, K. Uezu, K. Sakurai, S. Shinkai, Proposal of a new hydrogen-bonding form to maintain curdlan triple helix. *Chemistry & Biodiversity* 2004, 1: 916-924.

74. K. Koumoto, R. Karinaga, M. Mizu, T. Anada, K. Sakurai, T. Kunitake, S. Shinkai, Removal of the side-chain glucose groups from schizophyllan improves the thermal stability of the polycytidylic acid complexes under the physiological conditions. *Biopolymers* 2004, 75: 403-411.
75. T. Hasegawa, T. Fujisawa, M. Numata, M. Umeda, T. Matsumoto, T. Kimura, S. Okumura, K. Sakurai, S. Shinkai, Single-walled carbon nanotubes acquire a specific lectin-affinity through supramolecular wrapping with lactose-appended schizophyllan. *Chem. Commun.* 2004, 2150-2151.
76. T. Anada, H. Matsunaga, R. Karinaga, K. Koumoto, M. Mizu, K. Nakano, S. Shinkai, S. Sakurai, Proposal of new modification technique for linear double-stranded DNAs using the polysaccharide schizophyllan. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2004, 14: 5655-5659
77. T. Hasegawa, T. Fujisawa, M. Numata, T. Matsumoto, M. Umeda, R. Karinaga, M. Mizu, K. Koumoto, T. Kimura, S. Okumura, K. Sakurai, S. Shinkai, Schizophyllans carrying oligosaccharide appendages as potential candidates for cell-targeted antisense carrier. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2004, 2: 3091-3098.
78. M. Numata, T. Hasegawa, T. Fujisawa, K. Sakurai, S. Shinkai,  $\beta$ -1,3-Glucan (schizophyllan) can act as a one-dimensional host for creation of novel poly (aniline) nanofiber structure. *Org. Lett.* 2004, 6: 4447-4450.
79. T. Hasegawa, S. Haraguchi, M. Numata, T. Fujisawa, C. Li, K. Kaneko, K. Sakurai, S. Shinkai, Schizophyllan can act as a one-dimensional host to construct poly(diacetylene) nanofibers. *Chem. Lett.* 2005, 34: 40-41.
80. T. Hasegawa, T. Fujisawa, S. Haraguchi, M. Numata, R. Karinaga, T. Kimura, S. Okumura, K. Sakurai, S. Shinkai, Schizophyllan-folate conjugate as a new non-cytotoxic and cancer-targeted antisense carrier. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15: 327-330.
81. T. Kimura, A. Beppu, K. Sakurai, S. Shinkai, Separation technique for messenger RNAs by use of schizophyllan/poly (A) tail complexation. *Biomacromolecules* 2005, 6: 174-179.
82. D. H. Yang, A. H. Bae, K. Koumoto, S. W. Lee, K. Sakurai, S. Shinkai, In situ monitoring of polysaccharide-polynucleotide interaction using a schizophyllan-immobilized QCM device. *Sensors and Actuators B: Chemical*, in press.
83. R. Karinaga, K. Koumoto, M. Mizu, T. Anada, S. Shinkai, K. Sakurai, PEG-appended  $\beta$ -1,3-glucan schizophyllan for antisense-oligonucleotides delivery to induce endosomal escape. *Biomaterials*, in press.
84. T. Nagasaki, T. Kawazu, T. Tachibana, S. Tamagaki, S. Shinkai, Enhanced nuclear import and transfection efficiency of plasmid DNA using streptavidin-fused importin- $\beta$ . *J. Controlled Release*, in press.

85. T. Matsumoto, M. Umeda, T. Hasegawa, M. Numata, K. Sakurai, K. Koumoto, S. Shinkai, Poly (N-substituted-acrylamide)-branched schizophyllans are useful for selective recovery of polynucleotide through convenient and quick precipitation procedures. *Polymer J.*, in press.
86. T. Anada, K. Sakurai, S. Shinkai, A new polynucleotide-polysaccharide complex and its application to functional oligonucleotide delivery. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, in press.
87. A. H. Bae, M. Numata, T. Hasegawa, C. Li, K. Kaneko, K. Sakurai, S. Shinkai, One-dimensional arrangement of Au nanoparticles utilizing a helical structure constructed by schizophyllan: a unique encounter of a natural product with inorganic compounds. *Angew. Chem., Int. Ed.*, in press.
88. 狩長亮二、甲元一也、櫻井和朗、新海征治、多糖・核酸複合体を用いた機能性高分子コンジュゲート-核酸医薬デリバリーへの挑戦-。高分子加工 2004, 53(12): 561-568.
- 7) 分担研究者：高原 淳
89. 高原 淳、山本 和弥、和田信一郎。天然無機ナノファイバー「イモゴライト」、 「ナノファイバーテクノロジーを用いた高度産業発掘戦略」(梶原、谷岡、片岡、小池、高原編) CMC, 443-452 (2004).
90. K. Yamamoto, H. Otsuka, A. Takahara, Preparation of Polymer Nanohybrid via in situ Synthesis of Inorganic Nanofiber in Polymer Solution, *Trans. Mater. Res. Jpn.* 2004, 29: 149-152.
91. N. Hosaka, K. Tanaka, H. Otsuka and A. Takahara, Influence of the Addition of Silsesquioxane on the Dewetting Behavior of Polystyrene Thin Film, *Composite Interfaces*, 2004, 11: 297-306.
92. T. Yamaguchi, H. Otsuka, S. Kidoaki, T. Matsuda, A. Takahara, Physicochemical Properties and Bio-degradation of Segmented Polyurethane and Poly(urethane-urea) Derived from Lysine-Based Diisocyanate, *Trans. Mater. Res. Jpn.*, 2004, 29: 2873-2876.
93. A. Takahara, M. Hadano, T. Yamaguchi, H. Otsuka, S. Kidoaki, T. Matsuda, Characterization of Novel Bio-degradable Segmented Polyurethanes Prepared from Amino-acid Based Diisocyanate, *Macromol. Symp.* in press.
- 8) 分担研究者：岩本 幸英
94. 松田秀一、岩本幸英：軟骨欠損修復の現況。骨・関節・靭帯 2001, 14:797-800.
95. 松田秀一、岩本幸英：間葉系幹細胞を用いた軟骨再生。最新医学 2002, 57: 75-79.
96. 田仲和宏、岩本幸英。軟骨コラーゲン遺伝子の発現制御機構。 *Connective Tissue*, 2002, 34: 147-155.
97. S. Matsuda, H. Miura, R. Nagamine, K. Urabe, T. Mawatari, Y. Iwamoto. A Comparison of Rotational Landmarks in the Distal Femur and the Tibial Shaft. *Clin Orthop* 2003, 414: 183-188.
98. R. Nagamine, K. Miyaniishi, H. Miura, K. Urabe, S. Matsuda, Y. Iwamoto. Medial torsion of the tibia in Japanese patients with osteoarthritis of the knee.

- Clin. Orthop. Related Res. 2003, 408: 218-224.
99. T. Kawano, H. Miura, T. Mawatari, T. Moro-oka, Y. Nakanishi, H. Higaki, Y. Iwamoto. Mechanical effects of the Intraarticular administration of high molecular weight hyaluronic acid plus phospholipids on synovial joint lubrication and prevention of articular cartilage degeneration in experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 2003, 48(7): 1923-1929.
100. A. Matsuo, T. Shuto, G. Hirata, H. Satoh, Y. Matsumoto, Z. Hongpu, Y. Iwamoto. Antiinflammatory and chondroprotective effects of the Aminobisphosphonete incadronate (YM175) in Adjuvant induced arthritis. *J. Rheumatology*, 2003, 30(6): 1280-1290.
101. K. Okazaki, S. Jingushi, T. Ikenoue, K. Urabe, K. Sakai, Y. Iwamoto. Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor I during rat fracture healing. *J. Orthop. Res.* 2003, 21: 511-520.
102. 田仲和宏, 岩本幸英. 境界領域 知っておきたい 軟骨コラーゲン遺伝子の転写調節因子に関する研究. *臨床整形外科* 2003, 38巻7号, 916-918.
103. 首藤敏秀, 岩本幸英. RAにおける骨軟骨破壊のメカニズム. *九州リウマチ* 2003, 22: 6-10.
104. 田仲和宏, 岩本幸英 (その1). CRYBP 1 とNT 2/FPM 315. *整形外科* 2003, 54(1), 68.
105. 田仲和宏, 岩本幸英. CRYBP1 とNT2/FPM315 (その2), *整形外科*, 2003, 54(2): 202.
106. S. Matsuda, H. Miura, R. Nagamine, T. Mawatari, M. Tokunaga, R. Nabeyama, Y. Iwamoto. Anatomical Analysis of the Femoral Condyle in Normal and Osteoarthritic Knees. *J Orthop Res* 2004, 22:104-109.
- 9) 分担研究者: 田中 雅夫
107. T. Manabe, H. Okino, R. Maeyama, K. Mizumoto, M. Tanaka, T. Matsuda. New infusion device for trans-tissue, sustained local delivery of anticancer agent to surgically resected tissue: Potential use for suppression of local recurrence of pancreatic cancer, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004. in press.
108. T. Manabe, H. Okino, R. Maeyama, K. Mizumoto, E. Nagai, M. Tanaka, T. Matsuda. Novel strategic therapeutic approaches for prevention of local recurrence of pancreatic cancer after resection: trans-tissue, sustained local drug-delivery systems. *J Control Release* 2004, 100(3): 317-330.
2. 学会発表
- 1) K. Hirayama, Y. Hata, Y. Noda, M. Miura, I. Yamanaka, H. Shimokawa, T. Ishibashi. The involvement of Rho-kinase and its regulation in cytokine-induced collagen gel contraction by hyalocytes. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology* 2004 (April 29, 2004, Fort Lauderdale, FL, USA)
- 2) H. Shimokawa, Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing

- factor in animals and humans. The 3<sup>rd</sup> International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (May 24-28, 2004, Nara, Japan) \*Symposium: NO and EDHF: Pivotal Roles of Reactive Oxygen Species in Vascular Homeostasis
- 3) K. Morikawa, H. Kubota, T. Matoba, M. Hatanaka, T. Fujiki, MAH. Talukder, T. Akaike, H. Maeda, H. Shimokawa, Endothelial Cu, Zn-SOD plays a pivotal role in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. The 3<sup>rd</sup> International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (May 24-28, 2004, Nara, Japan)
  - 4) M. Higashi, T. Hattori, K. Morikawa, H. Shimokawa, Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo. The 3<sup>rd</sup> International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (May 24-28, 2004, Nara, Japan)
  - 5) K. Morikawa, H. Kubota, T. Matoba, M. Hatanaka, T. Fujiki, MAH. Talukder, H. Shimokawa, Important role of superoxide dismutase in EDHF-mediated relaxations of human mesenteric arteries. The 3<sup>rd</sup> International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (May 24-28, 2004, Nara, Japan)
  - 6) K. Abe, T. Uwatoku, K. Oi, K. Morikawa, T. Hizume, H. Shimokawa. Long-term inhibition of Rho-kinase markedly ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction in rats -Effects on endothelial NO synthase. The 3<sup>rd</sup> International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (May 24-28, 2004, Nara, Japan)
  - 7) T. Yada, H. Shimokawa, O. Hiramatsu, Y. Ogasawara, F. Kajiya. Beneficial role of hydroxyfasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation. The 3<sup>rd</sup> International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (May 24-28, 2004, Nara, Japan)
  - 8) T. Fujiki, H. Kubota, M. Hatanaka, K. Morikawa, MAH. Talukder, T. Matoba, H. Shimokawa. Endothelium-derived hydrogen peroxide accounts for the enhanced EDHF-mediated relaxations by long-term treatment with an angiotensin converting enzyme inhibitor in mice. The 3<sup>rd</sup> International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (May 24-28, 2004, Nara, Japan)
  - 9) Y. Kimura, Y. Hirooka, K. Ito, Y. Sagara, H. Shimokawa, A. Takeshita. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increased oxidative stress. The 3<sup>rd</sup> International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (May 24-28, 2004, Nara, Japan)