

200400199B

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14～16年度 総合研究報告書

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14～16年度 総合研究報告書

主任研究者 松田 武久

平成17（2005）年 4月

## 目次

### I. 総合研究報告

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・・・・・・・・・・3  
松田武久

II. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・51

III. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・62

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）  
総合研究報告書

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）を組み合わせて、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。三年の研究期間を通じて下記 4 項目の主要課題にわたって検討し、成果を得た。

**(1) 人工細胞外マトリックス・骨格基材のナノ・マイクロ構造設計のための機能材料の創製**

迅速な組織修復・再構築には、人工細胞外マトリックス・組織工学骨格基材のナノ・マイクロレベルでの構造化とその設計が重要となる。本課題では精密合成技術を駆使し、光反応性、液状光硬化性、温度応答性、生分解性等の特性を付加した新規機能性材料の開発を行うとともに、それらを用いたマトリックス・骨格基材のナノ・マイクロ構造の作製を行った。

- 生分解性液状光重合性プレポリマーの新規合成。
- アミノ酸由来のジイソシアネ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などの生分解物質より構成されるセグメント化ポリウレタン（SPU）およびセグメント化ポリウレタンウレア（SPUU）の新規合成。
- 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トリブロック共重合体の新規合成。
- 生分解性SPUのマイクロファイバーメッシュ化
- 生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の開発とデバイス化**

独自に開発した上記材料をナノ・マイクロ構造化し、さらに医用デバイスとして活用するためのミリスケール以上の構造体化・形状化を行うには、ナノ・マイクロスケールの要素構造の作製に加え、それらを機能的にアッセンブル化する技術の開発が必要である。本課題では、新しく光造形法と電界紡糸法の応用を検討し、作製されたデバイスのプロトタイプについて生体力学場応答性、細胞接着性、生分解性の設計を行った。

- 細胞接着性足場構造体の微細形状設計のための、生分解性液状光重合性プレポリマーを用いたマイクロ光造形技術の開発と組織工学の基盤技術としての可能性の検討。
- 電界紡糸（Electro-spinning）技術による超分子構造体形成（ナノ・マイクロファイバー

メッシュ)を応用した、小口径人工血管等の医用デバイスのサブミリ構造の機能的設計を可能とする新しい紡糸法(積層・混合・配向制御電界紡糸等)の開発。

- SPU および PLCL のナノ・マイクロファイバ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。
- PLCL をナノ・マイクロ加工して作製した耐圧縮および反発力を有し生体力学場に応答する mechano-active 骨格基材の設計とそれを組み込んだ軟骨組織工学の開発。

### (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

病的細胞や病変組織部位を検出しそれらに選択的に作用して治療効果を発揮するターゲティング薬剤の開発には、ナノスケールの分子複合体の設計・構築が必要となる。本課題では、細胞機能調節能を付与したナノカプセルおよび遺伝子導入の新しい効果的ベクターシステムの開発を行った。

- 細胞内シグナル伝達系の異常細胞や腫瘍組織等を標的として特異的に作用し得るシグナル基質ペプチドあるいは抗癌剤を含有させた機能的な高分子複合体(ナノカプセル)の開発: 各種の細胞内プロテインキナーゼ応答型、Rho キナーゼ応答型、カスパーゼ応答、HIV プロテアーゼ応答型キャリアナノカプセルの開発と細胞内導入と発現制御の確立。
- 天然多糖シゾフィランの3本鎖にアンチセンス DNA を取り込ませた共らせん構造体の作製とこれを用いた新しい遺伝子導入システムの確立、および熱応答性シゾフィランによる核酸分離剤の開発。
- 血管傷害後病変に選択的に送達可能なドキシソルビジン含有ナノカプセル薬剤の機能評価。
- 内皮細胞剥離部位・動脈硬化病変を感知する機能性造影剤として、Evans Blue 誘導体分子内に有するガドリニウム錯体の開発と in vivo での機能評価。

### (4) (1) ~ (3) を組み合わせた医療への応用

- 感温性ゼラチン人工細胞外マトリックスを用いた軟骨組織再生。
- 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。
- 血管内皮前駆細胞を組み込んだ小口径人工血管と病変血管壁の内張技術の開発。
- 新しい医用弾性接着剤の開発。

## 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反応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ゾ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。

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反応し

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

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

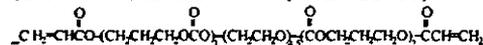
酸の共らせん複合体による遺伝子導入、4) これらをシステム化した新しい医療技術の開発である。本研究によって、病的細胞のみに作用して、多様な細胞機能を多面的に制御することによって組織修復（動脈硬化・癌）、および新しい加工技術と材料による三次元組織体形成による再生医療が可能になる。これによって国内外に例をみない、全く新規で高効率・高精度・高品位の医療を提供できることが期待される。また、本技術の産業への応用および製品化による産業化活性化を促進できると大いに期待できる。

## B. 各研究の成果概要

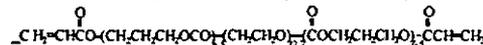
### 1) 人工細胞外マトリックス・骨格基材のナノ・マイクロ構造設計のための機能材料の創製

- 生分解性液状光重合性プレポリマーの新規合成（松田）：低分子量ポリエチレングリコール（PEG；分子量 200 または 1000、各々 PEG200, PEG1000 と表記）もしくは トリメチロールプロパン（TMP）を開始剤としてトリメチレンカーボネート（TMC）の重合を行うことにより、三種類の光重合性液状プレポリマーを合成した（図 1）。これらの液状プレポリマーは、マイクロ光造形法によって生分解性を有する彫密な光硬化型構造体を作製することが可能である。

(A) アクリレート化前駆ポリマー (TMC/PEG200)



(B) アクリレート化前駆ポリマー (TMC/PEG1K)



(C) アクリレート化前駆ポリマー (TMC/TMP)

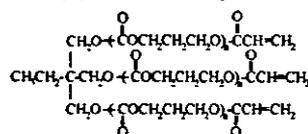


図 1. 生分解性液状光重合性プレポリマーの化学構造



ファイバーメッシュは、彫密なフィルムに比べ、顕著に柔軟であり、生体力学場への適合性を高めることができることが確かめられた。メッシュと細胞の相互作用について調べ、ナノファイバー構造が細胞の接着・増殖に有利であることを確認した(図4)。

## 2) 超微細ナノ加工技術の開発とデバイス化

- 細胞接着性足場構造体の微細形状設計のための、生分解性液状光重合性プレポリマーを用いたマイクロ光造形技術の開発と組織工学の基盤技術としての可能性の検討(松田): コンピュータ制御された可動型 UV ペンを用い、逐次積層的にプレポリマーへ光照射し、三次元微小円柱アレイ (micropillar array)、微小塀アレイ (microbank array)、微小采針アレイ (microcone array)、およびマルチ微小格子 (microwell) を、基材上で精密に成型加工した(図5)。PEG を開始剤としたプレポリマーから成型した表面は非常に低い細胞接着性を示す一方、疎水性の TMP を開始剤としたプレポリマーから成型した表面は高い細胞接着性と増殖性を示した。ラット皮下への微小采針アレイの埋込みでは、低膨潤性 PEG200 ベースポリマー製の光重合構造体は、表面層からの分解特性と、低い薬物包含能および放出能を示

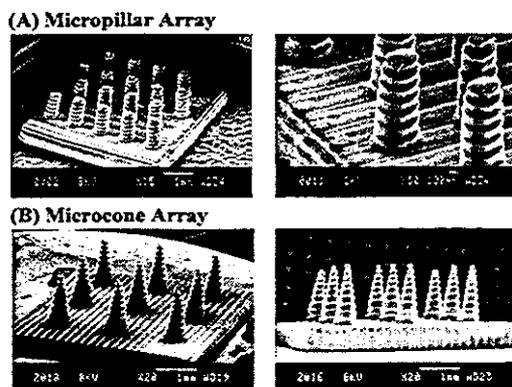


図5. 光造形法による三次元微細立体マイクロ構造体

した。

- 電界紡糸 (Electro-spinning) 技術による超分子構造体形成 (ナノ・マイクロファイバーメッシュ) を応用した、小口径人工血管等の医用デバイスのサブミリ構造の機能的設計を可能とする新しい紡糸法 (積層・混合・配向制御電界紡糸等) の開発 (木戸秋・松田): 電界紡糸装置を自作し、ナノ・マイクロファイバーメッシュを医用デバイスとして成型加工する技術を確立した。この技術により、細胞接着性に優れたコラーゲンのナノファイバーメッシュを内腔面に、機械的特性に優れたセグメント化ポリウレタンを外層に有する多層型小口径人工血管のプロトタイプを作製した(図6)。
- SPU および PLCL のナノ・マイクロ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 (松田・木戸秋): SPU の電界紡糸メッシュの引張り試験から、THF と DMF の混合溶媒系を用いて電界紡糸を行った場合、THF/DMF の混合比を変えることでマイクロファイバー間の接合度を制御でき、メッシュの柔軟性を設計できることを見出した。このようなファイバー間接合制御式電界紡糸技術を用いて、

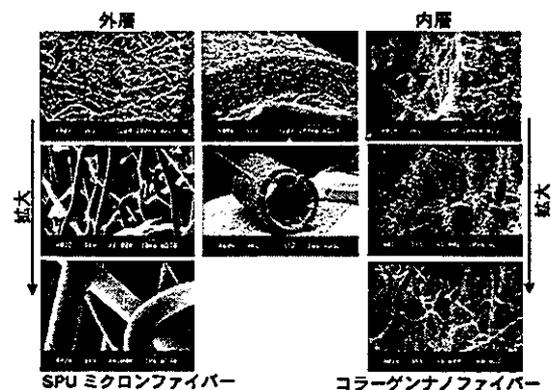


図6. 電界紡糸法により作製した SPU マイクロファイバーとコラーゲンナノファイバーの積層型チューブ

SPU のマイクロファイバーメッシュからなる小口径人工血管プロトタイプのコンプライアンス設計を行った (図 7)。この方法により、チューブのコンプライアンスを生体血管に相当する範囲で設計できることがわかった。PLCL 人工血管チューブについても同様のコンプライアンス設計を可能とし、生体力学場を模倣した循環血流回路下で血管内皮細胞の接着性と機能発現応答の解析を検討した。

- PLCL をナノ・マイクロ加工して作製した耐圧縮および反発力を有し生体力学場に応答する mechano-active 骨格基材の設計とそれを組み込んだ軟骨組織工学の開発 (松田・岩本) : PLCL の多孔性構造体に軟骨細胞を播種した人工軟骨を作製し、生体力学場を模

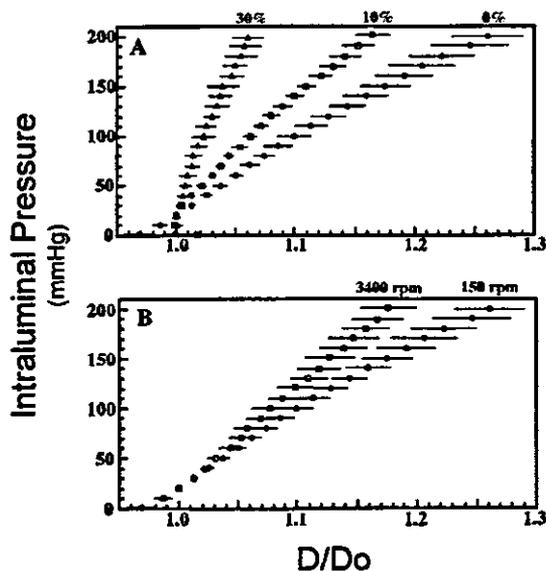


図 7 : ELSP-SPU ファイバーメッシュ筒状構造体の内圧-管外径曲線。 a) DMF 濃度 (0, 10, 30%) を変えてファイバー接合度を制御して作製した 3 本のチューブについての結果、 b) マンドレル回転数を変えてファイバー配向性を制御した 2 本のチューブについての結果。  $D_0$  : 20 mmHg における管径。

倣した静的荷重および周期的荷重負荷条件下で培養した際の、軟骨細胞の増殖・分化特性を解析した。再生組織における細胞の機能発現を調節し得る mechano-active 骨格基材の開発を行った。

### 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

- 細胞内シグナル伝達系の異常細胞や腫瘍組織等を標的として特異的に作用し得るシグナル基質ペプチドあるいは抗癌剤を含有させた機能的高分子複合体 (ナノカプセル、図 8) の開発 (片山・下川) : 各種の細胞内プロテインキナーゼ応答型、Rho キナーゼ応答型、カスパーゼ応答、HIV プロテアーゼ応答型等キャリアナノカプセルの開発と細胞内導入と発現制御の確立を行った。PKA 応答型ナノカプセルは 37℃ で平均粒径 100~200nm のナノ粒子を形成し、PKA 活性に応答して崩壊した。その際、粒子の疎水性コアに内包した分子を徐放する事に成功した。また、材料に組み込むペプチド配列を種々変化させることで、応答性を自由にコントロールできる事を明らかにした。PKA に応答して導入遺伝子の発現を活性化できる人工遺伝子導入剤のための基礎材料の開発にも成功した。これを細胞に導入し、細胞内での PKA シグナルによる発現制御ができた。プロテインキナーゼ C (PKC)、HIV プロテアーゼに応答するキャリアの開発に成功した。また、PKC 応答型キャリアの開発に伴い、PKC  $\alpha$  特異的な基質設計を行い、マウスを用いて、がん組織で特異的にリン酸化される基質を見出した。プロテインキナーゼ A (PKA) に応答するキャリアでは、種々の薬物刺激に伴う細胞内の PKA 活性化と遺伝子発現制御能の相関を検討し、本キャリアを用いたときの遺伝子発現応答が、確かに細胞内 PKA の活性化に基づくものであることを証明した。

- 天然多糖シゾフィランの 3 本鎖にアンチセンス DNA を取り込ませた共らせん構造体の作製とこれを用いた新しい遺伝子導入システムの確立、および熱応答性シゾフィランによる核酸分離剤の開発（新海）：天然に存在する  $\beta$ -1,3-グルカン類の 3 重螺旋に注目した。この螺旋構造は、加熱や極性有機溶媒に溶解することによって崩壊し、3 本のランダムなコンフォメーションを有する糖鎖に変化する。しかし、ランダムな糖鎖を室温で水溶液中に戻すと 3 重螺旋へと可逆的に回復する。このプロセスは DNA の 2 螺旋形成に極似している上に、 $\beta$ -1,3-グルカン類の 3 重螺旋構造が DNA の 2 重螺旋構造に極めて類似している。この事より、核酸が系内に存在する状況で糖の螺旋構造の再生を行うと、核酸と多糖があらたな複合体を形成すると予想した（図 9）。この予想は正しく、カードラン、シゾフィラン、レンチナン等のすべての  $\beta$ -1,3-グルカン類で、核酸と多糖の複合体の形成が起こることを世界で初めて発見した。DNA や RNA と相互作用する化合物は遺伝子工学上重要であり、ポストゲノムやプロテオミクスの技術開発の中で、極めて広範な応用範囲がある。
- 血管傷害後病変に選択的に送達可能なドキソルビジン含有ナノカプセル薬剤の機能評価（下川・片山）：悪性腫瘍の治療目的で開発されたドキソルビジン含有したナノカ

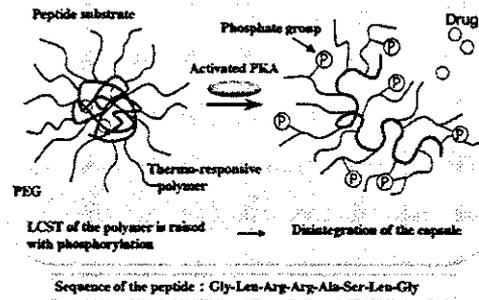


図 8. リン酸化反応性薬物ナノカプセルの設計

プセルである NK911 に着目した。NK911 は、ポリエチレングリコールの疎水性側鎖にドキソルビシンを結合させたもので、溶解後、水中で直径約 40 nm のミセルを形成する。このミセルは血管透過性亢進部位に対する選択性を有しており、特に固形腫瘍に対して高い腫瘍集積性・抗腫瘍効果を有している。一方、血管形成術後の血管局所は一定期間血管透過性が亢進しており、NK911 が高い集積性を示すことが考えられ、結果として新生内膜形成を抑制することが期待された。実際に、ラットの頸動脈バルーン傷害モデルを作成し、経静脈的に NK911 を投与したところ、4 週間後の血管病変形成が強力に抑制され（図 10）、さらに傷害部血管でのドキソルビシンの選択的な集積も確認された。一方、全身性の副作用は全く認められなかった（ドキソルビシン換算常用投与量の 10 倍まで）。

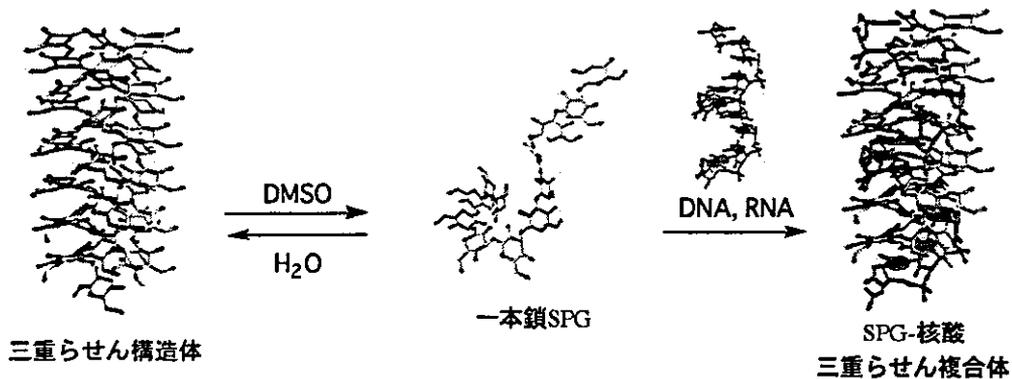


図 9. シゾフィランの構造と核酸の複合体形成過程

- 内皮細胞剥離部位・動脈硬化病変を感知する機能性造影剤として、Evans Blue 誘導体を分子内に有するガドリニウム錯体の開発と *in vivo* での機能評価 (片山・下川) : Evans Blue 誘導体を分子内に有するガドリニウム錯体 (図 11) の開発に成功し、これが実際にブタ大動脈切片において内皮剥離部位に特異的に吸着し、MRI イメージングによって、該当部位を掲出できる事を見出した。生きたラットにおいても体内動態を調べ、この造影剤が種々の臓器への滞留が少なく、実際に該当部位のみを検出できる事を確認した。ApoE ノックアウトマウスでの動脈硬化病変を造影可能であることを見出した。さらに、エバンスブルー誘導体を用いる血管病変ターゲティング概念を応用した DDS 用高分子ミセル形成材料の開発にも成功した。

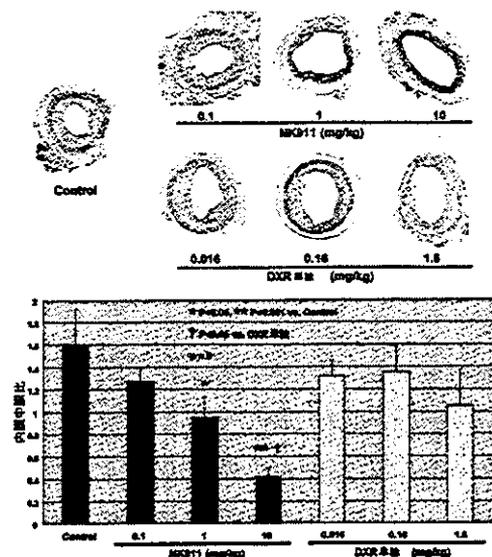


図 10. ナノカプセルを用いた血管傷害後の再狭窄予防  
ドキシソルピシン含有ナノカプセルである NK911 は、ラット頸動脈のバルーン傷害後の再狭窄病変の形成を著明に抑制した

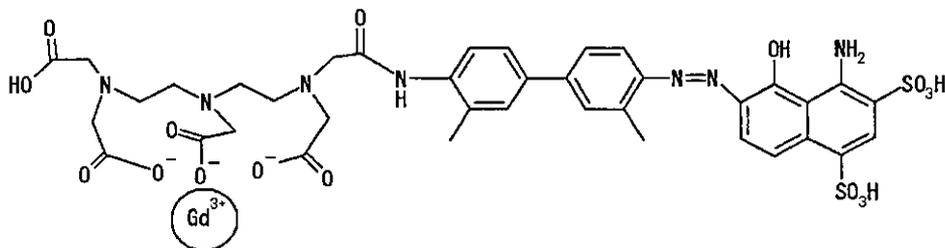


図 11. 機能化造影剤の構造

#### 4) 医療への応用

- 感温性ゼラチン人工細胞外マトリックスを用いた軟骨組織再生 (松田・岩本) : 関節軟骨再生の際、*in situ* でゲル化する液状の骨格基材 (scaffold) は複雑な形状を呈する軟骨欠損部を完全に補填することができる。この概念を基に、室温では液体であり、34℃以上でゲル化するという特徴をもつ感温性ゼラチンである poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted gelatin (PNIPAAm-gelatin) を用い、軟骨欠損部の複雑な形状に適合することができる新しい軟骨再生技術の開発を試みた。

PNIPAAm-gelatin ゲル内で軟骨細胞を 3 次元培養することで *in vitro* において軟骨様組織を再構築することができ、動物実験にて軟骨欠損部位を硝子軟骨様組織で修復することができた。

- 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 (田中) : 組織工学的手法によって腫瘍切除部位に薬剤を運搬するための幾つかのデバイスを開発した。この全てのデバイスは手術時に、腫瘍切除部位に使用して薬剤を散布するものであり、主に 4 つのシステムから成り立っている。(1) 生物活性物質リザーバー : 薬

剤、蛋白質、遺伝子改変ウイルスなどを持続放出可能な組織固着性の薬剤含有光硬化性ゼラチン。(2) サイトカインバリアー：外科切除部位の組織にサイトカインが浸透することを阻止する抗サイトカイン抗体を固着させた組織固着性の光硬化性ゼラチン。(3) 遺伝子導入細胞シート：非常に高価な治療用蛋白質を持続的に放出するように遺伝子導入した細胞シート。(4) 経皮的持続薬剤注入用デバイス：薬剤を持続投与可能で、不要時に術創から容易に抜去可能な経皮的薬剤投与デバイス。これらの4つのシステムによって、腫瘍の局所再発を防止することが可能になると期待される。

- 血管内皮前駆細胞を組み込んだ微細人工血管と病変血管壁の内張技術の開発（松田・安井・森田）：血管壁 Tissue engineering への血管内皮前駆細胞の応用の可能性を、その採取法、増殖性、及び抗血栓性機能の面から検討し、ヒト末梢血由来の前駆細胞を用いたハイブリッド小口径人工血管のモデルを作成した。さらにイヌの総頸動脈置換実験にて前駆細胞ハイブリッド小口径人工血管の開存性について検討をおこなった。末梢血より増殖性の高い血管内皮前駆細胞を単離、

大量培養することができた。この細胞は比較的良好な抗血栓性機能を有しており、前駆細胞を用いて作成されたハイブリッド型人工血管は植え込み時より抗血栓性機能を発現することが可能であると考えられた。ヒトにおいてこの前駆細胞を用いたハイブリッド型小口径人工血管の作成が可能であり、灌流培養装置にて流体力学的剪断応力を負荷することで生体動脈内膜類似の細胞内面を持たせることができた。さらにイヌでの植込み実験では、血栓の付着のない抗血栓性の高い人工血管内面が得られ、前駆細胞を用いたハイブリッド人工血管が実際に高い開存性を持つことが示された。以上のより、前駆細胞を用いて植え込み前より抗血栓性機能を発現し、高い開存性を持つハイブリッド小口径人工血管を作成することが可能であり、臨床応用への可能性が示された。

- 新しい医用弾性接着剤の開発（森田）：ヘパリン投与下で数分以内に硬化し、硬化物が拍動圧に感応して伸縮して止血部の応力集中を緩和できる柔軟性のある止血剤が存在すれば、心臓血管外科の領域で臨床的に大きな意義がある。生体組織表面の水で反応し、発泡を伴いながら硬化し、硬化物が柔軟性のあるゴム弾性を持ち、かつ高い組織接着力を有する外科用接着剤を開発した。基本骨格はフッ素化アルキルジイソシアネートを成分とする液状ウレタンポリマーである（図 12）。これまでの接着剤と異なり、親水性があり水分の多い生体内での使用に適している。また、硬化物が弾力性を持ち常時拍動の力学場にさらされている動脈血管の特性に特化させてある。動物実験によりその止血効果を評価した。比較的速い硬

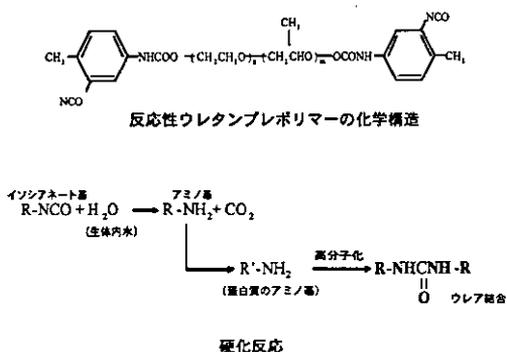


図 12.

化速度と高い接着力、再現性のある強力な止血効果が確認され、その有効性は極めて高いといえる。

### C. 結論

本研究では、精密合成技術を駆使して種々の新規機能性生体材料（光反応性、液状光重合性、温度応答性、生分解性等）の開発を行うとともに、それら材料を用いた人工細胞外マトリックス・組織工学骨格基材の機能的設計のための新しい加工技術として、マイクロ光造形法、および積層・混合・配向・接合制御式電界紡糸法を導入・開発し、ナノ・マイクロスケールの要素構造を機能的にアッセンブル化した医用デバイスの成型加工を行った。一方、病的細胞や病変組織部位を検出しそれらに選択的に作用して治療効果を発揮するターゲティング薬剤をナノスケールの分子複合体の設計・構築技術に基づいて作製し、細胞機能調節能を付与したナノカプセルおよび遺伝子導入の新しい効果的ベクターシステムの開発を行った。

代表的な成果としては、可視光照射による硬化と生分解性の表面制御の可能な液状光反応性生体適合材料、新規の感温性人工細胞外マトリックス用材料の開発、生分解性セグメント化ポリウレタンの開発、マイクロ光造形技術およびより超微細な二光子光造形技術、

電界紡糸法を用いた生体高分子、合成高分子のナノ・マイクロファイバーメッシュ式組織工学骨格基材の作製、それらを積層・混合・配向制御した三次元化による小口径人工血管チューブプロトタイプの開発、再生軟骨用人工細胞外マトリックスの開発、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、任意の薬剤や遺伝子を組み込んで動脈硬化組織のみへの送達、抗増殖薬を選択的に送達することによるバルーン傷害後の再狭窄病変の著明な抑制、天然多糖シロフィランを用いた新しい遺伝子導入剤・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、が挙げられる。

以上の各成果は全く新しい機能的生体材料とそのナノ・マイクロ加工技術を提供し、再生医療の platform 又は scaffold を提供できる独創的技術であり、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. H. Ziani-Cherif, Y. Abe, K. Imachi, T. Matsuda. Visible-light-induced surface graft polymerization via camphorquinone impregnation technique. *J Biomed Mater Res*, 59: 386-389, 2002.
2. T. Matsuda. Device-directic drug delivery systems. *Journal of Controlled release*, 78: 125-131, 2002.
3. T. Matsuda, H. He. Newly Designed Compliant Hierarchic Hybrid Vascular Grafts Wrapped with a Microprocessed Elastomeric Film (I): Fabrication Procedure and Compliance Matching. *Cell Transplantation*, 11: 67-74, 2002.
4. H. He and T. Matsuda. Newly designed compliant hierarchic hybrid vascular graft wrapped with microprocessed elastomeric film (II) Morphogenesis and compliance change upon implantation. *Cell Transplantation*, 11: 75-87, 2002.
5. H. He and T. Matsuda. Arterial Replacement with Compliant Hierarchic Hybrid Vascular Graft: Biomechanical Adaptation & Failure. *Tissue Engineering*, 8 (2): 213-224, 2002.
6. M. Mizutani and T. Matsuda. Photocurable Liquid Biodegradable Copolymers: In vitro Hydrolytic Degradation Behaviors of Photocured Films of Coumarin-Endcapped Poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-trimethylene carbonate). *Biomacromolecules*, 3(2): 249-255, 2002.
7. Y. Nakayama, M. Sudo, K. Uchida, and T. Matsuda. Spatio-Resolved Hyperbranched Graft Polymerized Surfaces by Iniferter-Based Photograft Copolymerization. *Langmuir*, 18: 2601-2606, 2002.
8. N. Morikawa and T. Matsuda. Thermo-responsive Artificial Extracellular Matrix: N-Isopropylacrylamide-Graft-Copolymerized-Gelatin. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 13 (2): 167-183, 2002.
9. M. Mizutani and T. Matsuda. Liquid Photocurable Biodegradable Copolymers: In Vivo Degradation of Photo cured Poly( $\epsilon$ -Caprolactone-co-Trimethylene Carbonate). *J Biomed Mater Res*, 61: 53-60, 2002.
10. K. Takamizawa, K. Shoda and T. Matsuda. Pull-out mechanical measurement of tissue-substrate adhesive strength: Endothelial cell monolayer sheet formed on a thermo-responsive gelatin layer. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 13(1): 81-94, 2002.
11. T. Matsuda, T. Magoshi, H. Ziani-Cherif, S. Ohya, Y. Nakayama. Thermo-responsive heparin coating: heparin conjugated with poly(N-isopropylacrylamide) at one terminus. *Langmuir*, 18 (12): 4862-4872, 2002.
12. M. Mizutani, Steven C. Arnold, T. Matsuda. Liquid, Phenylazide-Endcapped Copolymers of  $\epsilon$ -Caprolactone and Trimethylene Carbonate: Preparation, Photocuring Characteristics and Surface Layering. *Biomacromolecules*, 3(4): 668-675, 2002.
13. W. G. Brodbeck, J. P. G. Voskerician, E. Christenson, M. S. Shive, Y. Nakayama,

- T. Matsuda, N. P. Ziats, and J. M. Anderson. Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo. *PNAS*, 99 (16): 10287-10292, 2002.
14. T. Matsuda and T. Magoshi. Preparation of Vinylated Polysaccharides and Photofabrication of Tubular scaffolds as Potential Use in Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 3 (5): 942-950, 2002.
15. T. Magoshi and T. Matsuda. Formation of Polymerized Mixed Heparin/Albumin Surface Layer and Cellular Adhesion Responses. *Biomacromolecules*, 3 (5): 976-983, 2002.
16. W. G. Brodbeck, Y. Nakayama, T. Matsuda, E. Colton, N. P. Ziats, J. M. Anderson. Biomaterial Surface Chemistry Dictates Adherent Monocyte/Macrophage Cytokine Expression in Vitro. *CYTOKINE*, 18 (6): 311-319, 2002.
17. M. Mizutani and T. Matsuda. Liquid Acrylate-Endcapped Biodegradable Poly( $\epsilon$ -Caprolactone-co-Trimethylene Carbonate) (I): Preparation and Visible-Light-Induced Photocuring Characteristics. *J Biomed Mater Res*, 62: 387-394, 2002.
18. T. Matsuda and M. Mizutani. Liquid-Acrylate-Endcapped Biodegradable Poly( $\epsilon$ -Caprolactone-co-Trimethylene Carbonate) (II): Computers-aided Stereolithographic Microarchitectural Surface-Photoconstructs. *J Biomed Mater Res*, 62:395-403, 2002.
19. S. Yasuda, T. Noguchi, M. Gohda, T. Arai, N. Tsusui, Y. Nakayama, T. Matsuda, H. Nonogi. Local delivery of low-dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model. *Cardiovascular Research*, 53: 481-486, 2002.
20. S. Yasuda, M. Kanna, S. Sakuragi, S. Kogima, Y. Nakayama, S. Miyazaki, T. Matsuda, K. Kanagawa, and H. Nonogi. Local Delivery of Single Low-Dose of C-Type Natriuretic Peptide, an Endogenous Vascular Modulator, Inhibits Neointimal Hyperplasia in a Balloon-Injured Rabbit Iliac Artery Model. *J Cardiovasc Pharmacol*, 39 (6): 784-788, 2002.
21. Y. Nakayama, S. Nishi, H. Ueda-Ishibashi, T. Matsuda. Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performances. *J. Biomed. Mater. Res.* 64 A: 52-61, 2003.
22. W.G. Brodbeck, G. Voskerician, N.P. Ziats, Y. Nakayama, T. Matsuda, J.M. Anderson. In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. *J. Biomed. Mater. Res.* 64A: 320-329, 2003.
23. T. Shirota, H. He, H. Yasui, T. Matsuda. Human endothelial progenitor cell (EPC)-seeded hybrid graft: proliferative and antithrombogenic potentials of EPC. *Tissue Eng.* 9: 127-136, 2003.
24. S. Ibusuki, Y. Fujii, Y. Iwamoto, T. Matsuda. Tissue-engineered cartilage using an injectable and in situ gelable thermoresponsive gelatin: fabrication and in vitro performances. *Tissue Eng.* 9: 371-84, 2003.
25. H. Sonoda, K. Takamizawa, Y. Nakayama,

- H. Yasui, T. Matsuda. Coaxial double-tubular compliant arterial graft prosthesis: time-dependent morphogenesis and compliance changes after implantation. *J. Biomed. Mater. Res.* 65A: 170-81, 2003.
26. T. Shirota, H. Yasui, H. Shimokawa, T. Matsuda. Fabrication of endothelial progenitor cell (EPC)-seeded intravascular stent devices and *in vitro* endothelialization on hybrid vascular tissue. *Biomaterials* 24: 2295-2302, 2003.
27. T. Uwatoku, H. Shimokawa, K. Abe, Y. Matsumoto, T. Hattori, K. Oi, T. Matsuda, K. Kataoka, K. Takeshita. Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats. *Circ Res.* 92: e62-e69, 2003.
28. 松田武久 血管 エラスチック精密マシン バイオマテリアル-生体材料- 21: 188-189, 2003.
29. T. Shirota, H. Yasui, T. Matsuda. Intraluminal tissue-engineered therapeutic stent using endothelial progenitor cell-inoculated hybrid tissue and *in vitro* performance. *Tissue Eng.* 9: 473-485, 2003.
30. C. Li, T. Sajiki, Y. Nakayama, M. Fukui, T. Matsuda. Novel visible-light-induced photocurable tissue adhesive composed of multiply styrene derivatized gelatin and poly (ethylene glycol) diacrylate. *J. Biomed. Mater. Res.* 66B: 439-446, 2003.
31. 松田武久 Clemson Award for Applied Biomaterials 受賞に寄せて A quarter century's biomaterial odyssey バイオマテリアル-生体材料- 21: 329-330, 2003.
32. H. He, T. Shirota, H. Yasui, T. Matsuda. Canine endothelial progenitor cell-lined hybrid vascular graft with nonthrombogenic potential. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 126:455-464, 2003.
33. Y. Nakayama, T. Matsuda. Photo-control of the interaction between endothelial cells and photo-cation generatable water-soluble polymers. *J. Control Release* 89, 213-224, 2003.
34. Y. Nakayama, A. Furumoto, S. Kidoaki, T. Matsuda. Photocontrol of cell adhesion and proliferation by a photoinduced cationic polymer surface. *Photochem. Photobiol.* 77: 480-486, 2003.
35. Y. Kuboki, M. Kikuchi, H. Takita, R. Yoshimoto, Y. Nakayama, T. Matsuda. Laser-perforated membranes biomaterials induced pore-size-dependent bone induction when used as a new BMP carrier. *Connective Tissue Res.* 44: 318-325, 2003.
36. S. Nishi, Y. Nakayama, H. Ueda-Ishibashi, T. Matsuda. Embolization of experimental aneurysms using a heparin-loaded stent graft with micropores. *Cardiovasc. Radiat. Med.* 4: 29-33, 2003.
37. T. Manabe, K. Mizumoto, E. Nagai, K. Matsumoto, T. Nakamura, T. Nukiwa, M. Tanaka, T. Matsuda. Cell-based protein delivery system for the inhibition of the growth of pancreatic cancer: NK4 gene-transduced oral mucosal epithelial cell sheet. *Clin. Cancer Res.* 9: 3158-66, 2003.
38. H. Okino, T. Manabe, M. Tanaka, T. Matsuda. Novel therapeutic strategy for

- prevention of malignant tumor recurrence after surgery: Local delivery and prolonged release of adenovirus immobilized in photocured, tissue-adhesive gelatinous matrix. *J. Biomed. Mater. Res.* 66A: 643-51, 2003.
39. T. Matsuda, M. Kaneko, S. Ge. Quasi-living surface graft polymerization with phosphorylcholine group(s) at the terminal end. *Biomaterials.* 24: 4507-15, 2003.
40. T. Matsuda, J. Nagase, A. Ghoda, Y. Hirano, S. Kidoaki, Y. Nakayama. Phosphorylcholine-encapped oligomer and block co-oligomer and surface biological reactivity. *Biomaterials.* 24: 4517-27, 2003.
41. H. Okino, R. Maeyama, T. Manabe, T. Matsuda, M. Tanaka. Trans-tissue, sustained-release of gemcitabine from photocured gelatin gel inhibits the growth of heterotopic human pancreatic tumor in nude mice. *Clin. Cancer Res.* 9: 5786-5792, 2003.
42. S. Ibusuki, Y. Iwamoto, T. Matsuda. System engineered cartilage using PNIPAAm-gelatin as *in situ* formable scaffold: *in vivo* performances. *Tissue Eng.* 9, 1133-1142, 2003.
43. T. Matsuda, M. Kaneko, S. Ge. Quasi-living surface graft polymerization with phosphorylcholine group(s) at the terminal end. *Biomaterials* 24: 4507-4515, 2003.
44. E. Gamez, K. Ikezaki, M. Fukui, T. Matsuda. Photoconstructs of nerve guidance prosthesis using photoreactive gelatin as a scaffold. *Cell Transplantation* 12: 481-490, 2003.
45. S. Nishi, Y. Nakayama, H. Ishibashi-Ueda, T. Matsuda. Occlusion of Experimental Aneurysms with Heparin-Loaded, Microporous Stent Grafts. Reprinted from *Neurosurgery* 53: 1397-1405, 2003.
46. T. Matsuda. A Bioengineer's Challenge and Dream. *ISACB Fall/Winter*: 10-13 2003.
47. S. Kato, S. Kidoaki, T. Matsuda. Substrate-dependent cellular behavior of Swiss 3T3 Fibroblasts and activation of Rho family during adhesion and spreading processes. *J. Biomed. Mater. Res.* 68: 315-324, 2004.
48. 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. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 24: 181-186. 2004.
49. H. Sonoda, H. Yasui, T. Matsuda. A device for the spatio-regional delivery of a photocurable drug formulation. *Biomaterials* 25: 2859-2866, 2004.
50. T. Matsuda. Recent progress of vascular graft engineering in Japan. *Artificial Organs.* 28: 64-71, 2004.
51. T. Matsuda, I.K. Kwon, S. Kidoaki. Photocurable biodegradable liquid copolymer: synthesis of acrylate-encapped trimethylene carbonate-based prepolymers, photocuring and hydrolysis. *Biomacromolecules.* 5: 295-305, 2004.

52. T. Masuda, M. Furue, T. Matsuda. Novel strategy for soft tissue augmentation based on transplantation of fragmented omentum and preadipocytes. *Tissue Engineering*, 10(11/12): 1672-1683, 2004.
53. T. Matsuda. Mechanics and remodeling of bio artificial blood vessels. *Kekkan Igaku* 5(6): 577-586, 2004.
54. 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* 26(18): 3929-3939, 2005.
55. 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* 26(16): 3105-3111, 2005.
56. 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* 29(6): 2873-2876, 2004.
57. I. K. Kwon, T. Matsuda. Photo-polymerized microarchitectural constructs prepared by microstereolithography ( $\mu$ SL) using liquid acrylate-end-capped trimethylene carbonate-based prepolymers. *Biomaterials* 26(14): 1675-1684, 2005.
58. T. Matsuda. Poly(N-isopropyl-acrylamide)-grafted gelatin as a thermoresponsive cell-adhesive, mold-releasable material for shape-engineered tissues. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 15(7): 947-955, 2004.
59. 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* 26(6): 655-659, 2005.
60. 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* 70A(2): 274-282, 2004.
61. 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* 26(1): 37-46, 2005.
62. 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* 25(27): 5867-5873, 2004.
63. T. Masuda, M. Furue, T. Matsuda. Photocured, Styrenated Gelatin-Based Microspheres for de Novo Adipogenesis through Corelease of Basic Fibroblast

- specific Rho-kinase inhibitor suppresses cardiac allograft vasculopathy in mice. *Circ Res.* 94: 46-52, 2004.
86. 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.* 43: 156-162, 2004.
87. 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.* 94: 385-393, 2004.
88. 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.* 20: 5-7, 2004.
89. 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.* 109: 2234-2239, 2004.
90. 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.* 109: 2357-2362, 2004.
91. 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.* 45: 497-503, 2004.
92. 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.* 110: 51-57, 2004.
93. 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.
94. 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.* 78: 375-382, 2004.
95. 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. 24: 918-922, 2004.
96. 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.
97. 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. 37: 537-546, 2004.
98. 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. 110: 3055-3061, 2004.
99. 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. 14: 2787-2790, 2004.
100. 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.
101. 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. 44: 275-277, 2004.
102. 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. 44: 437-445, 2004.
103. 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.
104. A. Ito, Y. Fukumoto, H. Shimokawa. Changing characteristics of patients with vasospastic angina in the era of new calcium channel blockers. J Cardiovasc Pharmacol. 44: 480-485, 2004.
105. 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. 44: 557-563, 2004.