

P-168

ポリメリック遺伝子キャリアーの分子特性と  
ポリプレックス被転写効率

○小林由美子<sup>1</sup>、橋本朋子<sup>1</sup>、小堀哲生<sup>1</sup>、村上 章<sup>1</sup>、山岡哲二<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>京都工繊大繊維、<sup>2</sup>国立循環器病セ研

1. 緒言 ポリメリックキャリアー分子構造や側鎖のpKaなどが、ポリプレックスの取り込みやエンドソームからのリリースなどの各挙動に影響を与えることが報告されている、すなわち、キャリアー分子の諸特性に焦点を絞った分子設計が各ステップの効率向上につながることを示唆される。我々は、ポリプレックス形成に直接は関与しない疎水性基、または親水性基をポリメリックキャリアーに付与し、ポリプレックスの高い被転写効率を引き出すことで発現効率の向上に成功している。本研究では、キャリアーのカチオン性セグメントと疎水性セグメントの量比を変えた両親媒性のキャリアーを合成し、得られたキャリアーの特性評価、また遺伝子発現効率の評価を行った。また被転写効率を向上させる分子設計の諸条件についても検討した。

2. 実験 Fmoc 固相合成法により、オリゴアルギニン(以下 Rn)を合成した。続いてペプチドのN末端側にステアリン酸を導入し、その後脱保護・脱樹脂反応を行った。得られた両親媒性のオリゴアルギニン(以下 RnS)の組成は <sup>1</sup>H-NMR 測定、また元素分析により確認した。RnS の物性評価として、ピレン法による臨界ミセル濃度(CMC)の測定、AFM 測定を行った。Rn や RnS、また高分子量のポリアルギニンをを用い、プラスミドDNAとのポリプレックス形成、および、そのポリプレックスからのプラスミドDNAのリリース挙動を、アガロースゲル電気泳動により評価した。各ポリプレックスの遺伝子導入効率は、クロロキン処理法によりCOS-1 および HepG2 細胞に pCMV-Luc プラスミドを導入することで評価した。

3. 結果・考察 AFM 観察の結果より、両親媒性の RnS は水溶液中で疎水性基をコアとしたミセル構造をとることが明らかとなった。また CMC は R4S では 0.023g/L となり、アルギニンの残基数が増すに従ってその値は徐々に減少し、R20S では 0.009g/L であった。図1および図2には、それぞれ Rn、および RnS を用いた COS-1 細胞への遺伝子導入実験結果を示した。

ステアリン酸を含まない Rn に対し、両親媒性の RnS を用いた場合、顕著な発現効率の向上が見られ、その発現効率は、直鎖状ポリエチレンイミンに匹敵する値となった。いずれの RnS キャリアーも、CMC 以上の濃度で発現効率の極大を示し、両親媒性分子がミセル構造をとることが必須であることが示唆された。キャリアーの分子特性という意味では、このミセル構造化は2つの特性を変化させていることになる。第一は、みかけの分子量の増大であり、第二は分子トポロジーの変化、すなわち、球状であることの重要性である。そこで、形成されたミセルの会合数を光散乱法により定量し、これと類似の分子量を有する直鎖状ポリアルギニンと比較検討することにより、図2に示された発現効率の向上メカニズムについて考察した。

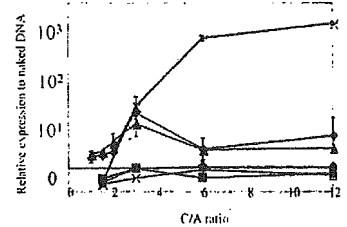


Figure 1. Transfection efficiency of R4 (X), R8 (■), R12 (●), R16 (◆), R20 (▲), and 1-PEI (△). The COS-1 cell line was transfected with carrier/DNA complex. Reporter gene expression is given as CPS (count per second) per milligram of protein.

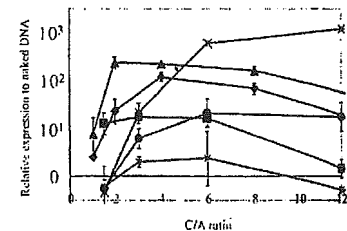


Figure 2. Transfection efficiency of R4s (X), R8s (■), R12s (●), R16s (◆), R20s (▲), and 1-PEI (△). The COS-1 cell line was transfected with carrier/DNA complex. Reporter gene expression is given as CPS (count per second) per milligram of protein.

A key factor of self-organizing polymeric carriers affecting on the transcription efficiency of the transgene

Yumiko KOBAYASHI<sup>1</sup>, Tomoko HASHIMOTO<sup>1</sup>, Akio KOBORI<sup>1</sup>, Akira MURAKAMI<sup>1</sup>, and Tetsuji YAMAOKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology and

<sup>2</sup>Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute

## JSAO 2005 オリジナル賞候補者発表

## JSAO 2005 オリジナル賞候補者発表1

## 01 完全生体吸収性ゲル化材料による細胞注入システムの開発

国立循環器病センター研究所生体工学部<sup>1)</sup>, 京都工業繊維大学  
繊維学部高分子学科<sup>2)</sup>, Boise State University<sup>3)</sup>

山岡 哲二<sup>1)</sup>, 中野 順子<sup>2)</sup>, 藤原 知子<sup>3)</sup>, 藤原 俊哉<sup>1)</sup>, 木村 良  
晴<sup>2)</sup>

【目的】アルツハイマーや心筋梗塞の治療法として注目されている細胞移植術において、細胞懸濁液を直接組織などに注入した場合には、足場と空間確保の問題から細胞の十分な機能を果たすことはできない。そこで、細胞注入を支援する材料として、温度変化に应答して水溶液から含水ゲルへ変化する生体吸収性材料の開発を進めている。従来から開発されているインジェクタブルスキャホールドには、光反応性基や、化学反応性基、あるいは、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)などの温度応答性ポリマーが利用されているが、その安全性は必ずしも確保されていない。我々は、ポリ乳酸とポリエチレングリコールという、生体内での利用実績に優れる2つの高分子材料のみを利用することで、全く新たなメカニズムに基づいた温度応答ゲル化性インジェクタブルスキャホールドを開発した。

【実験と結果】様々なブロック長を有するポリ-L-乳酸あるいはポリ-D-乳酸とポリエチレングリコールとのトリブロック共重合体を合成し、そのミセル分散液を調製した(それぞれ、PLLA-PEG-PLLA分散液およびPDLA-PEG-PDLA分散液)。得られた分散液を種々の混合液を、所定温度で所定時間処理した時のゲル化挙動を熱測定、nmr、および、IRにより追跡するとともに、同種細胞移植の媒体としての機能性をin vitro および in vivo にて評価した。

【結論】PLLA-PEG-PLLA分散液とPDLA-PEG-PDLA分散液との等量混合分散液を25度から、37℃に昇温することにより、透明なゲルが形成された。X線散乱測定により、温度上昇とともにPLLAとPDLAの間にステレオコンプレックス結晶が成長することが確認され、このステレオコンプレックス結晶の生成とともにこのゲル形成現象が進行することが確認された。得られたゲルの含水率は90%以上であり、その物質透過性に優れること、さらに、細胞毒性を誘発する一切の化学物質を利用していないことから、細胞生存率を下げることなく、対象部位に細胞を注入できるインテリジェントゲル化材料であることが明らかとなった。



## SY1-7 幹細胞分離基材による組織再生材料の構築

国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部<sup>1)</sup>, 東京女子医科大学日本心臓血管研究所心臓血管外科学講座<sup>2)</sup>

馬原 淳<sup>1)</sup>, 樋上 智一<sup>1)</sup>, 松村 剛毅<sup>2)</sup>, 新岡 俊治<sup>2)</sup>, 山岡 哲二<sup>1)</sup>

【目的】自己幹細胞を用いて組織再生材料を構築する場合、目的とする幹細胞を単離し、多孔質スキャホールド上に効率よく播種する必要がある。現在、目的の幹細胞のみを単離するためには、表面レセプターの有無に基づいたFACS法や磁気ビーズ法が検討されているが、操作が煩雑で採取から移植までに長時間かかることが臨床への展開の障害となっている。本研究では、幹細胞の表面マーカーに対する特異抗体を基材表面へ固定化し、特定の幹細胞のみを連続的に単離するシステムの開発を目指した。この手法により、骨髄から目的の細胞へ分化が可能な幹細胞を接着させた再生組織を迅速に構築できる。本発表では、造血幹細胞の表面マーカーであるCD34に対する特異抗体を固定化したpolyethylene tubeおよびpoly(L-lactide-co-caprolactone) p(LA/CL) 表面の修飾法ならびに、これらの基材を用いたCD34陽性細胞の選択的な分離について検討した結果を報告する。

【実験と結果】p(LA/CA) 多孔質体を1NのNaOHで30分間加水分解することでカルボキシル基を導入し、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) によりカルボキシル基を活性化後anti-human CD34 mouse IgG 抗体 (CD34抗体) を固定化した。ペルオキシダーゼ標識抗体により固定化抗体密度は $7.6 \mu\text{g}/\text{m}^2$ であることを算出した。次に、CD34陽性細胞であるKG-1aと、CD34陰性細胞であるHL60が等量存在する細胞混合液をスキャホールドに通液後、溶出液をフローサイトメーターで解析した。その結果、KG-1a細胞に由来する蛍光シグナルが大きく減少し、HL60に由来するシグナルの割合が増加した。

【結論】細胞混合液中に存在するCD34陽性細胞は抗CD34抗体を固定化したスキャホールドへ選択的に接着した。この原理を骨髄液へ適応することで数%程度しか存在しない目的の幹細胞を選択的に単離できると考えられる。



## ES-7 灌流システム下での多孔質スキャホールドへの特異的細胞播種

国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部<sup>1)</sup>、鈴鹿医療科学大学<sup>2)</sup>馬原 淳<sup>1)</sup>、北川 達哉<sup>1)</sup>、筏 義人<sup>2)</sup>、山岡 哲二<sup>1)</sup>

【目的】In vitroでの血管組織の三次元再構築化が多く検討されているが、幹細胞や体細胞の単離の問題に加えて、多孔質スキャホールド内全体への均一な細胞播種が容易ではなく、さらにスキャホールド深部でのネクロシスが問題となっている。本研究では、新規バイオリアクターを利用した灌流条件下での、細胞の播種/培養システムの構築を検討し、スキャホールドの表面特性や灌流速度をはじめとする培養条件が組織再生に与える影響を検討した。

【実験と結果】ポリ-L-乳酸(PLLA)、あるいは、ポリ(L-乳酸-co-カプロラクトン)共重合体 p(LA/CL) からなる、細孔径の異なる多孔質スキャホールドを作製した。得られたスキャホールドを新たに設計した灌流型バイオリアクターにセットし、骨髄細胞、平滑筋細胞、あるいは、血管内皮細胞などを種々の条件下で灌流することによる特異的細胞播種効率および細胞増殖効率について検討した。また、灌流システム下でのシェアストレスが細胞の播種/増殖効率を低下させることが予想されるため、上記スキャホールド表面の細胞親和性を修飾することで、さらなる効率向上を図った。

【結論】静置または灌流状態で平滑筋細胞をスキャホールドに播種した時の細胞分布を3次元的に解析したところ、 $1.1\text{mL}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$  という最適条件下においてスキャホールド全体に細胞を播種することが可能となり、また、従来の静置播種法に比較して遙かに優れた細胞播種効率が得られた。その後の、細胞増殖速度に対しては、さらに高い灌流速度が最適である事が明らかになったが、反面、シェアストレスによる細胞の流出も継続的に認められた。この細胞流出は、スキャホールド表面修飾による細胞親和性の向上により大きく改善され、3次元的に均一な細胞増殖が達成された。同様の、システムを利用して、中空スキャホールド内壁への内皮細胞特異的播種システム、および、骨髄細胞からの造血幹細胞特異的播種システムについても併せて報告する。

Program Number: 195 Day / Time: Sunday, Dec. 18, 4:00 PM - 6:00 PM

### Molecular design of non - viral gene carriers aiming at facilitated transcription efficiency

T.Hashimoto<sup>1,3</sup>; O.Mazda<sup>2</sup>; A.Murakami<sup>1</sup>; T.Yamaoka<sup>3</sup>

1. Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Kyoto, Japan;

2. Department of Microbiology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Kyoto, Japan; 3.

Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan

Viral gene carriers, which have mostly been used in clinical trials because of their excellent transfection efficiency, possess some drawbacks such as limited DNA size, toxicity and immunogenicity. Non-viral gene transfection systems, in contrast, are biologically safe, cost-effective and easy to manufacture compared with viral systems and show useful potentials. However, its application is also limited, because not only the optimum molecular design of effective non-viral gene carriers such as molecular weight, charge density and shape, but also intracellular trafficking of polyplexes has not been clarified yet. We have been focusing on the last step of the gene transfer, that is, the recognition of polyplexes by transcription factors in the nuclei. We have previously reported that the uncompact state of the polyplexes enhances the transcription efficiency.

In this work, we proposed an intracellular signal-responsive non-viral gene delivery system based on the enzymatic activity of the intracellular proprotein convertase(PC), furin. Cationic polypeptides containing furin recognizing sequences, Arg-Xaa-Arg/Lys-Arg, were cleaved by furin and fragmented. The fragmentation resulted in the intracellular destabilization of polyplexes and showed high reporter gene expression. These results indicated that this PC-induced gene delivery system is an effective strategy to enhance transcription efficiency.

**Citation:** T.Hashimoto, O.Mazda, A.Murakami, T.Yamaoka. Molecular design of non - viral gene carriers aiming at facilitated transcription efficiency. Program No. 195. 2005 Abstract Viewer. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

**Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.**

Abstract Viewer

Program Number: 962 Day / Time: Sunday, Dec. 18, 8:00 PM - 10:00 PM

## Soft tissue regeneration using novel biodegradable hydrogel/HAp composite materials

Y.Nakamura<sup>1,2</sup>; A.Mahara<sup>2</sup>; A.Murakami<sup>1</sup>; T.Yamaoka<sup>2</sup>

1. Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Kyoto, Japan;

2. Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan

Recently, tissue regeneration using living cells and the artificial extracellular matrix called scaffolds has been attracting great attention as alternative strategies to the artificial organs or organ transplantation. In this treatment, collagen or its derivatives has been tested clinically as scaffolds for the regeneration of soft tissue such as skin tissue. However the antigenecity and biological contaminants of these bio-derived materials has been pointed out. The other promising biodegradable scaffold materials, poly-L-lactic acid (PLLA) derivatives, do not have enough flexibility and tissue compatibility.

In the present study, we have developed novel synthetic scaffold materials with high flexibility, rapid biodegradability, and excellent tissue compatibility. Multiblock copolymers composed of biodegradable hydrophobic segment, PLLA, and hydrophilic segment, polyethylene glycol (PEG), were newly synthesized. The copolymers with high PEG cotents were found to form bioinert soft hydrogels. Composite material of the hydrogel and hydroxyapatite (HAp) has been prepared by the alternate soaking process, because HAp was previously reported to have high tissue compatibility. Their *in vivo* evaluation indicated that the composite material induces tissue/cell ingrowth and was rapidly replaced with surrounding tissue. These results show the synthesized composite hydrogel are promising scaffold for soft tissue regeneration.

**Citation:** Y.Nakamura, A.Mahara, A.Murakami, T.Yamaoka. Soft tissue regeneration using novel biodegradable hydrogel/HAp composite materials. Program No. 962. 2005 Abstract Viewer. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

**Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.**

Abstract Viewer

Program Number: 482 Day / Time: Saturday, Dec. 17, 4:00 PM - 6:00 PM

## Immobilization of bioactive molecules onto PLLA porous matrices for tissue regeneration

T.Yamaoka <sup>2</sup>; S.Uchida <sup>1,2</sup>; T.Higami <sup>1</sup>; A.Murakami <sup>1</sup>

1. Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Kyoto, Japan;  
2. Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan

Tissue regeneration using biodegradable scaffolds such as poly(L-lactic acid) (PLLA) has been attracting great attention as a new alternating strategy to the artificial organs and organ transplantation. Although PLLA is an expectant biodegradable safe material, this is not necessarily an ideal substance for the scaffold from the viewpoint of the cell-compatibility and selectivity. Moreover, it is quite difficult to modify the surface characterization of PLLA because of the lack of side functional groups. In the present study, we developed some novel immobilization methods of bioactive molecules onto PLLA porous scaffolds.

Oligo peptide including Arg-Gly-Asp sequence (RGD oligo peptide) was selected to improve the non-specific cell adhesion properties of PLLAs. We newly synthesized Oligo(lactic acid)-(RGD)s block oligomers (OLA-RGD) and a small amount of the synthesized OLA-RGD was added to PLLA solution before fabricating the PLLA scaffold. The amphiphilic peptides migrated to the surface of the scaffolds and were stably immobilized due to the hydrophobic interaction and their cell adhesion property was greatly enhanced. In addition, immobilization of cell specific immunoglobulin onto the scaffolds and their improved selectivity of cell adhesion will be presented.

**Citation:** T.Yamaoka, S.Uchida, T.Higami, A.Murakami. Immobilization of bioactive molecules onto PLLA porous matrices for tissue regeneration. Program No. 482. 2005 Abstract Viewer. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

**Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.**

Abstract Viewer

Program Number: 1120 Day / Time: Monday, Dec. 19, 4:00 PM - 6:00 PM

*In vitro* vascular regeneration using biodegradable scaffold in the perfusion bioreactor

T.Kitagawa<sup>1,2</sup>; A.Murakami<sup>1</sup>; T.Yamaoka<sup>2</sup>

1. Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto, Japan; 2. Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka, Japan

In *in vitro* tissue regeneration using various bioreactors, cells should be seeded beforehand onto the scaffolds under the static culture condition, but it is quite difficult to seed them evenly throughout the entire scaffolds. Moreover, the cellular necrosis due to the severe anoxia and the lack of nutrients at the central part of the three-dimensional (3-D) scaffolds is the other big problem.

In the present study, we have designed a novel perfusion-type bioreactor and examined the effect of perfusion conditions on the smooth muscle cell (SMC) seeding and growth in tubular poly-L-lactic acid (PLLA) porous scaffolds. The cell suspension was flown from the luminal side to the lateral side of the scaffold for SMCs seeding. It is found that cell seeding at the perfusion rate of  $1.1\text{ml}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$  was the most effective, and the seeded cells were distributed evenly overall the scaffolds. In the following cultivation, the perfusion rate affected not only on the growth rate but also on the collagen producing ability of SMCs. In addition, a gene transfection system to the cells under the perfusion condition with novel hydrophobized polycations-type gene carriers which enable the controlled release of plasmid DNA from PLLA scaffolds has been established.

**Citation:** T.Kitagawa, A.Murakami, T.Yamaoka. *In vitro* vascular regeneration using biodegradable scaffold in the perfusion bioreactor. Program No. 1120. 2005 Abstract Viewer. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

**Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.**

Abstract Viewer



Program Number: 219 Day / Time: Friday, Dec. 16, 4:00 PM - 6:00 PM

### Long - lifetime Ru ( II ) complex - labeled probes for the evaluation of the dynamic feature of biomolecule and its interaction

T.Sakamoto<sup>1</sup>; A.Mahara<sup>2</sup>; T.Munaka<sup>1</sup>; A.Kobori<sup>1</sup>; T.Yamaoka<sup>2</sup>; A.Murakami<sup>1</sup>

1. *Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan*; 2. *Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan*

To evaluate the dynamic feature of biomolecules and their interactions with other biomolecules, more sophisticated methodology that can analyze the feature in homogeneous physiological media is required. To fulfill this requirement, we adopted the time-resolved luminescence anisotropy (TR-LA)-based method using a long-lifetime Ru(II) complex as the luminescent molecule. In this report, we present two novel approaches: (1) for the evaluation of the structural dynamics of biomolecules and (2) for the development of the highly-sensitive detection system of the biomolecules in the presence of auto-fluorescence.

(1) 5'-Ru(II) complex-labeled oligoDNAs (Ru-probes) which were complementary to *Escherichia coli* 16S rRNA were synthesized and used to evaluate the rotational motion of the RNA strand by the TR-LA analysis. It was found that the rotational motion was significantly dependent on the site Ru-probe bound and the results suggest that the Ru-probe was applicable to evaluate the structural dynamics of folded RNAs. (2) *Staphylococcus aureus* protein A was labeled with Ru(II) complex (Ru-SpA) and used for detection of immunoglobulin G (IgG). It was found that the TR-LA analysis 50nsec after the pulse excitation enabled us to avoid the auto-fluorescence from the serum. These results suggested that the method was applicable to detect IgG with high-sensitivity in cell culture medium or serum.

**Citation:** T.Sakamoto, A.Mahara, T.Munaka, A.Kobori, T.Yamaoka, A.Murakami. Long - lifetime Ru ( II ) complex - labeled probes for the evaluation of the dynamic feature of biomolecule and its interaction. Program No. 219. 2005 Abstract Viewer. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

**Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.**

Program Number: 205      Day / Time: Sunday, Dec. 18, 4:00 PM - 6:00 PM

## Development of novel photo - sensitive antisense oligonucleotides

M.Higuchi<sup>1</sup>; A.Yamayoshi<sup>2</sup>; A.Kobori<sup>1</sup>; T.Yamaoka<sup>3</sup>; A.Murakami<sup>1</sup>

1. *Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan*; 2. *Institute of Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, Fukuoka, Japan*; 3. *Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan*

Through the development of molecular biology, it was found that various serious diseases result from a consequence of single base point mutations in coding regions of genes. It is desired to inhibit selectively the expression of the disease-causing mutant gene without affecting its normal genes which are essential for cell survival. We developed novel antisense oligonucleotides to inhibit the expression of mRNA which has a point mutation. 4,5',8-Trimethylpsoralen (Ps), photo-crosslinking reagent, was conjugated with oligonucleotides at 2'-position (2'-Ps-oligo). Two kinds of 2'-psoralen-conjugated nucleosides were synthesized. Type I nucleoside has Ps via methylene linkage and type II nucleoside has Ps via amidomethylene linkage. 2'-Ps-oligo (type I) effectively crosslinked with the complementary oligoribonucleotide (oligo-RNA) at the designated base by UVA (365nm)-irradiation, whereas it scarcely crosslinked with the oligo-RNA having a mismatch base. These results suggest that 2'-Ps-oligo could discriminate a point mutation of RNA. It was also found that the effectiveness of the photo-crosslinking reaction was dependent on the length and structure of the linkage.

**Citation:** M.Higuchi, A.Yamayoshi, A.Kobori, T.Yamaoka, A.Murakami. Development of novel photo - sensitive antisense oligonucleotides. Program No. 205. 2005 Abstract Viewer. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

**Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.**

Abstract Viewer

Program Number: 203      Day / Time: Sunday, Dec. 18, 4:00 PM - 6:00 PM

Bispyrene - conjugated 2' - O - methyloligoribonucleotide as a highly specific RNA - recognition probe and its application to RNA - bio - imaging

A.Murakami<sup>1</sup>; A.Mahara<sup>2</sup>; T.Sakamoto<sup>1</sup>; N.Shimada<sup>3</sup>; T.Yamaoka<sup>2</sup>

*1. Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan; 2. Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan; 3. Faculty of Environmental Engineering, The University of Kitakyushu, Kitakyushu, Fukuoka, Japan*

In designing antisense molecules, it is crucial to specify the regions on the target RNA where

Abstract Viewer

Program Number: 207 Day / Time: Sunday, Dec. 18, 4:00 PM - 6:00 PM

Synthesis and properties of fluorescent - labeled oligonucleotides containing an amide internucleoside linkage at the 3' - site of 2' - pyrene - modified uridine

R.Iwase<sup>2,1</sup>; Y.Namie<sup>1</sup>; T.Yamaoka<sup>3</sup>; A.Murakami<sup>1</sup>

1. Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Kyoto, Japan;  
2. Department of Biosciences, Teikyo University of Science and Technology, Uenohara, Yamanashi, Japan;  
3. Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan

The duplex formation of oligonucleotide containing 2'-pyrene modified uridine (U<sub>py</sub>) with the complementary RNA causes the increase of the pyrene monomer emission. The increase of the fluorescence intensity is attributed to the location of the pyrene group outside of the A-form duplex. To examine the effect of restricted C3'-endo conformation of the U<sub>py</sub> residue for the enhancement of the fluorescence intensity on the duplex formation, a phosphodiester internucleoside linkage at the 3'-position of U<sub>py</sub> residue on the pyrene-labeled oligonucleotide was replaced by an amide internucleoside linkage. We synthesized 3'-carboxymethyl-5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-(1-pyrenylmethyl)-3'-deoxyuridine(U<sub>apy</sub>) as a building block. By means of H-NMR analysis of U<sub>apy</sub>, the furanose ring was found to be fixed in the C3'-endo conformation. Incorporation of the U<sub>apy</sub> during the synthesis of oligodeoxyribonucleotide was accomplished by the use of PyAOP as the coupling reagent to obtain the pyrene-labeled oligonucleotide with the amide internucleoside linkage at 3'-position of U<sub>py</sub> (U<sub>apy</sub>ODN : 5'-dCATGU<sub>apy</sub>CTAC-3'). The UV-melting temperature ( $T_m$ ) for the duplex of U<sub>apy</sub>ODN with the complementary RNA was slightly higher than that of the unmodified DNA/RNA duplex. On excitation at 342nm, the duplex of U<sub>apy</sub>ODN with the complementary RNA exhibited the increase of the pyrene monomer emission at 375nm by 7-fold compared to the single-stranded U<sub>apy</sub>ODN. These results suggest that U<sub>apy</sub>ODN has the potential as a fluorescent probe to detect the complementary RNA.

**Citation:** R.Iwase, Y.Namie, T.Yamaoka, A.Murakami. Synthesis and properties of fluorescent - labeled oligonucleotides containing an amide internucleoside linkage at the 3' - site of 2' - pyrene - modified uridine. Program No. 207. 2005 Abstract Viewer. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

**Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.**

Abstract Viewer

**O-29-7 造血幹細胞特異的スキャホールドの評価**

山岡哲二<sup>1</sup>, 松村剛毅<sup>2</sup>, 馬原 淳<sup>1</sup>, 村上 章<sup>1</sup>, 新岡俊治<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部, <sup>2</sup>東京女子医科大学, <sup>3</sup>京都工芸繊維大学

【目的】本研究では、造血幹細胞を選択的に吸着する生体吸収性スキャホールドを開発することで、FACS法や磁気ビーズ法による単離をせずに、採取した骨髄細胞を直接播種して、移植できる治療システムの構築を目指した。【方法】すでに血管再生用スキャホールドとして用いられているポリ(L乳酸-co-ε-カプロラクトン)の多孔質体の表面を、NaOHで加水分解することで、その表面にカルボキシル基を導入し、カルボジイミド法により抗ヒトCD34マウスIgG抗体を固定化した。スキャホールド表面に残存した活性化カルボキシル基は、2-アミノエタノールでキャッピングした。固定化された抗体量を、HRP標識された抗マウスIgGゴートIgG抗体を用いて間接的に定量化した結果、30ng/スキャホールドであった。【結果】抗体修飾スキャホールド上に、CD34抗原マーカーをもつヒト白血球由来のKG-1a細胞、および、CD34陰性のHL60細胞の混合懸濁液(2×10<sup>6</sup>個/50ml)を、流速0.05ml/minで播種し、選択的細胞接着の効率を、FACS法により評価した。比較のために、未処理スキャホールド、および、アルカリ加水分解の後、カルボジイミド法により2-アミノメタノールのみを固定化したコントロールスキャホールドも同様に評価したところ、抗CD34抗体固定化スキャホールドでは約80%の標的細胞接着率が得られた。

**O-29-1 抗体固定化カラムを用いた幹細胞分離システムの開発**

馬原 淳, 山岡哲二

国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部

【目的】組織再生治療で用いる幹細胞は、再生効率と安全性の観点から分化に関与する均一な細胞群である事が望まれる。しかし、磁気ビーズ法などの細胞表面マーカーの有無による選別法では細胞の純度を必ずしも確保できない。そこで本研究では、白血球ローリングを模倣した新規細胞分離カラムを開発し、細胞表面マーカー密度の違いをも分離できるカラムシステムを開発した。【方法】内径1mmのポリエチレンチューブに対して、オゾン処理後、表面にポリアクリル酸のグラフト鎖を重合した。得られたポリアクリル酸に対してカルボジイミドにより抗ヒトCD34抗体を固定化し、ペルオキシダーゼにより固定化抗体量を定量した。その後、このカラムに対してCD34陽性細胞であるKG-1aおよび、陰性細胞であるHL60を通液し、FACSにより回収したフラクション内に含まれる細胞量を定量した。【結果】カラム内腔に固定化されている抗CD34抗体量は200 μg/m<sup>2</sup>であった。このカラムに対してKG-1a細胞を通液後各フラクションの細胞数を測定した結果、2つの溶出ピークが確認できた。これは、HL60細胞を通液した場合、ならびに抗ヒトCD34抗体を固定化していないチューブの場合には見られなかった。さらにこの2つのピークではCD34抗体密度が異なることから、表面マーカー密度の違いにより細胞が分離されていることが示唆された。

**O-31-2 両親媒性遺伝子キャリアーのナノ構造と遺伝子導入効率**

橋本朋子<sup>1</sup>, 小堀哲生<sup>1</sup>, 村上 章<sup>1</sup>, 山岡哲二<sup>2</sup>

<sup>1</sup>京都工芸繊維大学 繊維学部 高分子学科, <sup>2</sup>国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部

組織再生や移植用血管床の構築を目指した増殖因子の利用が積極的に検討されているが、生体内安定性に劣る増殖因子の徐放化では長期的効果は期待できない。近年、非ウイルスキャリアーを用いた増殖因子遺伝子の導入による改善が期待されるものの、その遺伝子発現には未だ問題が残る。我々は、非ウイルスキャリアーの諸特性を最適化することで、導入遺伝子発現効率の向上を図ってきた。今回は、疎水性基を含むキャリアーとしてステアрил基などの疎水性基を付与したPEIや細胞内酵素分解性オリゴペプチドを設計した。前者はPEIの側鎖反応によって、また、後者は従来の固相ペプチド合成法により調製した。これら両親媒性のキャリアーを用いて培養細胞への遺伝子導入を行った結果、カチオン性のみのキャリアーに比較して高い発現効率が得られた。これらのキャリアー分子は、水環境下で明確な臨界ミセル濃度を示し、ステアрил基をコアとしたミセル様の形状を取ることが示された。また、この形状変化が、DNA分子とのポリプレックス形成挙動に影響を与え、さらに、ポリプレックスとポリアニオンとのポリイオン交換反応を促進するなど、特徴的な動的特性を示すことが明らかとなった。これらの動的現象の結果、遺伝子発現効率が向上したと考えられる。さらに、このミセル形状を取るキャリアーを用いた諸環境での遺伝子導入結果も併せて報告する。

**P-070 軟組織再生を目的としたHAp複合化ハイドロゲルのin vivo生体吸収性・組織適合性の評価**

中村友亮<sup>1</sup>, 小堀哲生<sup>1</sup>, 村上 章<sup>1</sup>, 山岡哲二<sup>2</sup>

<sup>1</sup>京都工芸繊維大学 繊維学部 高分子学科, <sup>2</sup>国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部

【目的】組織親和性に優れたコラーゲンやその複合体の軟組織再生用スキャホールド材料としての有用性が高く評価されているが、生体由来であるために、抗原性や異物混入等の問題点が指摘されている。そこで我々は、コラーゲンに代わり、軟組織親和性を有するハイドロキシアパタイト(HAp)を複合化したポリ乳酸誘導体ハイドロゲルの軟組織再生への応用を検討してきた。今回は、ラット皮下への長期間埋入におけるHAp複合化ハイドロゲルの分解挙動、浸潤組織の評価を中心に発表する。【方法】直接脱水重合法により合成したポリ乳酸とポリエーテルのマルチブロック共重合体を合成後、交互浸漬法によりHAp複合化ハイドロゲルとした。その後、ラット皮下に埋入し、2、および4ヶ月後のHAp複合化ハイドロゲルの生体吸収性、浸潤組織中のコラーゲン組織量の定量を行った。【結果】ラット皮下埋入実験の結果、浸潤組織、カプセル化層より良好な軟組織親和性が確認された。中でも、ポリエーテル組成の高いHAp複合化ハイドロゲルは、4ヶ月ではほぼすべてが生体吸収され、HAp複合化することで浸潤組織中のコラーゲン組織量の割合が上昇した。また、コラーゲンコートハイドロゲルとの軟組織親和性の比較についても合わせて報告する。

Transaction: 170

Citation: Society For Biomaterials 30th Annual Meeting Transactions, page 167

### Fabrication And Cell Adhesion Of 3d Scaffold Made Of Composite Material With A Silk Fibroin Substrate To Develop A Percutaneous Device

T. Furuzono<sup>1</sup>, M. Okada<sup>1</sup>, A. Kishida<sup>1</sup>, J. Tanaka<sup>2</sup>, S. Yasuda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan, <sup>2</sup> National Institute for Materials Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan

#### Introduction

To prevent germ infection, various materials such as tantalum, silicone, polyester, carbon, polypropylene, alumina, polyurethane, titanium, collagen and hydroxyapatite (HAp), have been applied to percutaneous devices since 1950 but sufficient results have not been clinically obtained. A novel inorganic-organic composite has been under development aiming at producing a percutaneous device which displays adhesiveness between soft tissue and a material surface.<sup>1</sup> Attention in the development of the composite has been placed on excellent bioactivity of HAp for hard or soft tissues as the inorganic content in this process. In this article, a prototype of a percutaneous device made of an inorganic-organic composite consisting of nano-scaled sintered HAp particles and silk fibroin (SF) via covalent bonding between the interface is presented.

#### Materials and Methods

Nano-scaled HAp particles were prepared by an alternating emulsion system, sintered at 800°C for 1h.<sup>2</sup> The size of the sintered HAp particles showed an a-axis length of 87±23 nm, a c-axis length of 236±81 nm and an aspect ratio (c/a) of 2.72 by transmission electron micrograph observation (n=100). Degummed fibers with 27-denier or *habutae* fabric made of silk from *Bomboxy mori* were used as polymer substrate. Graft-polymerization with  $\gamma$ -methacryloxypropyl trimethoxysilane (MPTS) on the SF was conducted by free radical initiation. After the HAp particles were suspended in a toluene/methanol (9/1) mixture solvent, a poly(MPTS)-grafted SF fibers were soaked in the suspended solution. The fibers adsorbed with HAp were heated at 120°C for 2h in vacuum at 1mmHg for a reaction between the HAp surface and the alkoxy-silyl groups of the graft polymers to donate covalent bonding. A polymer substrate for a button form was molded using a silicone compound. HAp/SF fibers of about 100  $\mu$ m in length thoroughly coated the buttons. To detect initial cell adhesiveness on the samples, fibroblast morphologies were observed by SEM.

#### Results and Discussion

The weight gain of poly(MPTS) on SF increased with increasing the reaction time, eventually reaching a plateau value of about 15 wt%. Fig. 1 shows an SEM photograph of the sintered HAp-coated SF fiber with 13.1±1.2 wt% (n=4) in the composite determined by TGA. The weight gain of HAp particles on the SF fiber increased about 5 times compared to that on the SF fabric, 2.8 ± 0.5 wt% by the same preparation conditions. This means that it is hard for nano-HAp particles to penetrate into and coat on gaps between fibers in the SF fabric. The HAp particles separated or aggregated into several crystals under SEM observation. Aggregation was easy because the HAp mono-particle has an a-plane with a cationic charge and a c-plane with an anionic charge in a mono-crystal. To fabricate a prototype for a percutaneous device, the HAp-coated SF fibers were transplanted onto a button-shaped substrate made of silicone via an adhesive agent. The HAp-coated SF fibers of 100  $\mu$ m in length were uniformly transplanted individually in random directions on the button. To evaluate the cell adhesiveness on the HAp-coated SF, the morphologies of L929 fibroblast cells incubated on sample fabrics or devices were observed by SEM. It is clear that cells favorably adhere only on the HAp surface of the composite but not on the dehydrated

grafted-surface without HAp particles on the SF substrate. It is estimated that cell-adhesion proteins in serum, such as fibronectin, vitronectin, bFGF, etc., prior to cell adhesion, adsorb on a HAp surface much better than on an area of dehydrated graft-polymer.

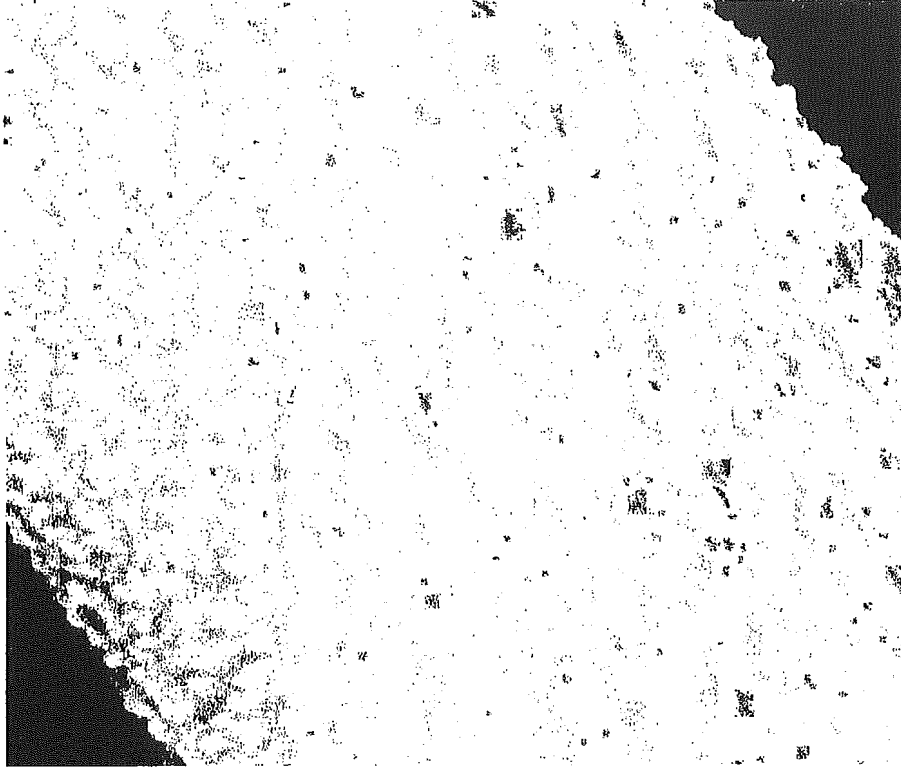


Fig. 1. SEM photograph of HAp particles covalently coated on an SF fiber.

#### Conclusions

HAp single-crystals showing high crystalline HAp were covalently coated on an SF substrate via poly(MPTS)-grafted SF. The HAp coating was thoroughly effective for improving the adhesiveness of the fibroblast cells. In our research, a model of a percutaneous device made of a composite coated on a silicone substrate was designed. HAp-coated SF fibers of about 100  $\mu\text{m}$  in length were transplanted onto the surface of buttons made of a silicone compound via an adhesive. The device was a white and had good flexibility. Cells were able to penetrate into the gaps between the inorganic/organic composite fibers with in three-dimensional tangle. Soft tissue is expected to behave in a manner similar to the penetration of the cells into the three-dimensional scaffold. Animal experiments with a percutaneous implantation using the button for short to long periods are now progressing in order to see infection-protection results brought about by adhesiveness to skin tissue.

#### References

1. Furuzono T., *et al.*, *J Mater Sci Mater Med* 2004;**15**: 19-23
2. Furuzono T., *et al.*, *J. Mater Sci Lett* 2001;**20**: 1205-1212.
3. Furuzono T., *et al.*, *J Artif Organs*, in press.

#### Acknowledgements

This study was financially supported in part by PRESTO, JST.

(15) リン脂質ポリマーハイブリッドコラーゲングルの作製と  
*in vitro* での評価

(東京医歯大生材研<sup>1</sup>、ヒューマンサイエンス振興財団<sup>2</sup>) Kwangwoo Nam<sup>1, 2</sup>、  
木村 剛<sup>1</sup>、岸田 晶夫<sup>1</sup>  
E-mail: bloodnam.fm@tmd.ac.jp  
電話：03-5280-8029 FAX：03-5280-8005

【緒論】

コラーゲンは哺乳動物中の全たんぱく質の3分の1を占め、細胞の支持物質の構成成分として生物の保護及び支持など物理的機能を有する。これまでコラーゲンをバイオマテリアルとして生体に利用するため、コラーゲンの架橋による物性や生物的特性の改善に関する研究が多く行われている。しかしながら、架橋剤を使うことによる様々な問題が生じる可能性があるため、慎重な架橋方法を選択が必要とされる。

本研究では優秀な血液適合性を示す2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーをコラーゲングルに固定化したリン脂質ポリマーハイブリッドコラーゲングルを作製した。種々の条件にてハイブリッドゲルを作製し、その物性と細胞接着性等を分析し、組織再生用ポリマーマトリックスとしての可能性を検討した。

【実験】

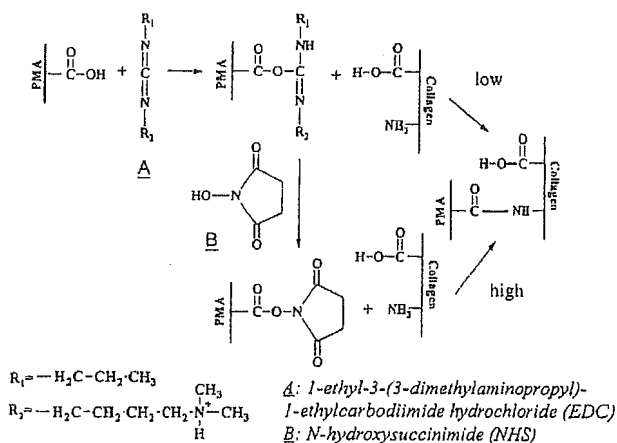
まず、コラーゲン0.5wt%水溶液からコラーゲンフィルムを調製した。コラーゲンフィルムを1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC) と *N*-hydroxysuccinimide (NHS) を含有する2-morpholinoethane sulfonic acid (MES) 水溶液中に浸漬し、4時間架橋させ、コラーゲングルを得た(E/Nゲル)<sup>1)</sup>。MPCポリマーをE/Nゲルと架橋させるため、カルボキシル基を有するpoly(MPC-co-methacrylic acid) (PMA) 選択し、MES水溶液中でEDCとNHSと反応させPMAのカルボキシル基を活性化させた。その後、E/Nゲルを加え4℃で4時間反応させMPCと架橋されたコラーゲングル(MPC-immobilized collagen gel: MiCゲル)を得た。架橋メカニズムをScheme 1に示す。さらにMPCの固定化過程を再度行いPMAの含有率の高いコラーゲングルを得た(MPC-doubled collagen gel: MdCゲル)。

架橋されていないコラーゲングル(Uゲル)、E/Nゲル、MiCゲルの化学的特性と力学物性と表面分析、膨潤実験、生体分解性を等により検討し、架橋及びPMAの固定化によるコラーゲングルの特性を評価した。さらに、細胞実験によりコラーゲングルの細胞適合性を検討した。

【結果と考察】

架橋されていないコラーゲンフィルムは酸性条件(pH=2.1)のMES水溶液で解け、中性とアルカリ性条件では膨潤した。EDCとNHSを溶かした

MES水溶液中にコラーゲンフィルムを浸漬した場合、pHと関係なく全て膨潤し、ゲル化した。しかし、pHによってゲル化傾向が大きく異なり、酸性条件での膨潤度はアルカリ性条件での膨潤度に比べ約4.5倍大きくなった。これはEDCとカルボキシル基との反応によるものの、



Scheme 1. Schematic picture of cross-linking of PMA with collagen.



カルボキシル基はEDCと反応するためにはカルボキシオン化する必要があるからである<sup>1,2)</sup>。

X線光電子分光解析法を使ってPMAの固定化を確認した。リンピーク(134eV)はMICゲルとMdCゲルに認められたが、架橋されていないコラーゲンゲルとE/Nゲルでは認められなかった。走査電子顕微鏡でゲルの表面観察した結果、未架橋ゲル(U-ゲル)では凸凹があり架橋ゲル(E/N-ゲル、MICゲル、MdCゲル)は平らであった。(Figure 1)。MICゲルの断面は多孔性構造の内部と緻密な構造の外部の層分離されていることが分かった。MdCゲルの場合、外部の緻密な層が厚くなったことからPMAはコラーゲンゲルの表面に固定化されていることが明らかとなった。

PMA導入による物性の変化は示差走査熱量計(DSC)と引張り実験で行った。EDCとNHSのみ使用した場合、コラーゲン繊維はネットワークを形成し、ゲルの物性を増加させる。しかしながら、コラーゲンを構成している $\alpha$ 'ヘリックス間の架橋でしかないため、力学的物性の増加には限界があると考えられる。PMAを固定化した場合にはPMA鎖によってコラーゲン繊維間の架橋が形成されるためさらなる強度のゲルが出来上がる。DSCによるコラーゲンゲルの収縮温度 $T_c$ を測定した結果、PMAが固定化されたゲルの収縮温度が最も高かった。これはPMAの導入により緻密なネットワークが形成されたことを示している。また、引張強度はMICの場合、U-ゲルに比べ約1.2、8倍であった。(Figure 2)。

膨潤実験の結果、全てのゲルにおいて酸性条件での膨潤度が高く、中性条件での膨潤度が低く、また、ゲルが架橋されると酸性条件と中性条件とも膨潤度が低かった。これは、未反応のアミン基の存在を示しており、PMAの架橋密度が向上し膨潤度が低くなったと考えられる。

コラーゲナーゼによる生分解性を調べた結果、架橋度が上がると共に分解が遅くなった。コラーゲナーゼはヘリックスを切断する。PMAの固定化は水の吸収を抑制し、コラーゲナーゼの浸透を防ぐ効果があると考えられ、コラーゲナーゼが吸収されてヘリックスが分解された場合でもPMAとコラーゲンの間の結合が維持され、分解速度は遅くなると考えられる。これは低い膨潤度と緻密なネットワーク形成により、コラーゲナーゼがゲル中に浸透し難いからであること意味する。さらに、各コラーゲンゲルの細胞との接着関係についても報告する。

【謝辞】

本研究は、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業費(KH6106)、厚生労働省科学研究費の補助を受けて行われた。

【参考文献】

1. L. H. H. Olde Damink et al., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **6** (1995) 460-472.
2. N. Nakajima et al., *Bioconjugate Chem.* **6** (1995) 123-130.

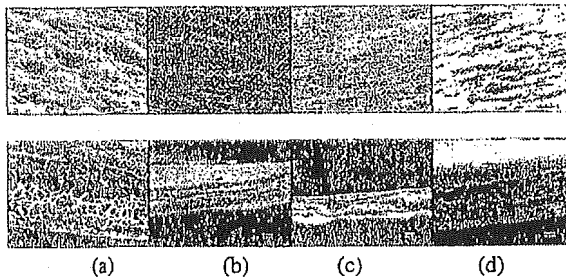


Figure 1. Morphological picture of (a) Uncross-linked collagen gel, (b) E/N gel, (c) MIC gel, and (d) MdC gel. Upper picture shows the outer surfaces and below picture shows the fractured surfaces.

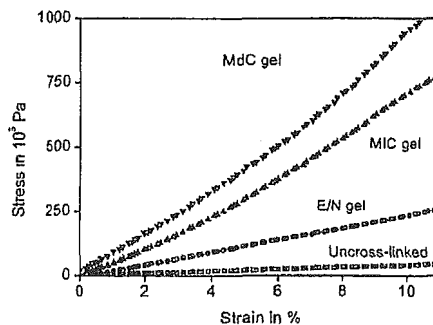


Figure 2. Stress-strain curve of each collagen gels.

X SO                    精密バイオインターフェイスポリマー  
—Introductory Remarks—

(東京大学大学院工学系研究科) 石原 一彦  
(東京医科歯科大学生体材料工学研究所) 岸田 晶夫

健康で楽しい生活を続けたいと願う気持ちは万人が持つものであり、これを支える医療が果たす役割はますます重要となってきた。ゲノム解析に伴い個々に合ったテーラーメイド医療、ターゲット医療、バイオ分子・細胞を対象としたナノ医療、再生医療あるいは医療デバイス技術の向上による低侵襲医療が強く求められている。さらに在宅での日々の健康管理に役立つデバイスの開発が、医療費の爆発的な高騰を抑制するための予防医学を発展させるであろう。

このように新しい医療を展開するためには、これに対応できる技術を駆使してデバイスを創製しなくてはならない。今回、“精密バイオインターフェイスポリマー”を特定テーマとして取り上げた。対象が生体、あるいはそれに関連したバイオ分子である限りデバイスの創製にあたり、ポリマーマテリアルとのインターフェイスにおける生体反応の抑制が極めて重要な課題である。医療デバイスが生体反応のために使えなくなることは稀ではない。一方では生体反応を巧妙に利用して、多成分から標的分子・細胞の選択認識を行うことも可能である。これらはバイオインターフェイスの制御いかに関わることである。生体の機能に近づき、さらにこれを越える性能を引き出すためのポリマーデザイン、インターフェイスの処理手法、新しい高機能医療デバイスの創製など様々な観点からバイオインターフェイスポリマーの先端研究を議論したいと考える。

工学と医学・薬学の連携は、“バイオ”というカテゴリーを共有することで融合し、刺激しあいながら発展する。さらにバイオ工学という観点に立った場合、バイオインターフェイスの構築は高分子科学の領域を超えて、機械、電気、電子、化学工学、あるいは環境、エネルギーなど全ての工学を統合するキーワードであることは間違いない。健康で楽しい暮らしが永く続けられる社会に必要な高度技術を支えるバイオインターフェイスの構築に将来にわたり大きな可能性を見つけれられる。

本特定テーマでは、バイオインターフェイスのポリマーサイエンスに携わる研究者間で、特に精密分子設計・制御・合成を意識した観点から未来型医療の基盤となる新規な高機能バイオインターフェイスの構築を目指して、討論する。

**Precise Design of Biointerface Polymers**

**Kazuhiro ISHIHARA** (Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8656 Japan)

Tel 03-5841-7124, Fax 03-5841-8647, e-mail [ishihara@bmw.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:ishihara@bmw.t.u-tokyo.ac.jp)

**Akio KISHIDA** (Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, 101-0062 Japan)

Tel 03-5280-8028, Fax 03-5280-8007, e-mail [kishida.fm@tmd.ac.jp](mailto:kishida.fm@tmd.ac.jp)

## 論文賞

MA-1 Nano-scaled hydroxyapatite/polymer composite IV. Fabrication and cell adhesion properties of a three-dimensional scaffold made of composite material with a silk fibroin substrate to develop a percutaneous device

国立循環器病センター研究所生体工学部<sup>1)</sup>, 国立循環器病センター心臓血管内科<sup>2)</sup>, 物質・材料研究機構生体材料研究センター<sup>3)</sup>

古菌 勉<sup>1)</sup>, 安田 昌司<sup>1)</sup>\*, 木村 剛<sup>1)</sup>\*\* , 京谷 晋吾<sup>2)</sup>, 田中 順三<sup>3)</sup>, 岸田 晶夫<sup>1)</sup>\*\*

「体に医療機器を装着しながら健常者と同じように生活できる」

これが我々の夢である。しかしながら「細菌感染」がこの実現を妨げている。米国の報告によると静脈留置カテーテル関連の感染は院内感染の原因として最多とされている。これまで経皮部からの感染防止デバイスや抗菌剤を担持したデバイスが数多く開発されたが、満足いく効能が得られていないのが現状である。現在では材料工学的に何ら手を加えていないカテーテルが一般的であり、医療従事者による消毒の励行やカテーテル取り扱い方法の徹底教育など人手を介した管理による感染対策が強いられている。

当該論文では、我々は以上のことを踏まえ、カテーテル感染を低減できる新規ナノ無機・有機複合材料の設計・製造およびデバイス製造法について報告した。新材料設計のコンセプトは、「硬い・脆いといったハイドロキシアパタイト (HAp) セラミックス固有の欠点を補い、HApの生体親和性を損なうことなく柔軟性を付与したソフトセラミックスを創出すること」にある。それは「HAp単結晶体のナノスケールでの粒径・形態制御技術」および「共有結合による無機・有機複合化技術」の二つの基盤技術より成り立っている。

本受賞講演では、無機・有機複合材料およびデバイス製造技術について説明するとともに、動物実験等を含めた現在の進捗状況を紹介する。

## 【現所属】

\* 科学技術振興機構研究成果活用プラザ大阪

\*\* 東京医科歯科大学生体材料工学研究所



## 細胞デリバリー

(東京医科歯科大学生体材料工学研究所) 岸田 晶夫  
電話&FAX 03-5280-8028 E-mail kishida.fm@tmd.ac.jp

### 1. はじめに

細胞は、輸血、骨髄移植および免疫細胞療法などにおいて、疾病治療に用いられてきた。近年、再生医療および遺伝子治療の概念の導入とともに、細胞を“デリバリー”することが重要となり、特に再生医療においては、必要不可欠の技術となりつつある。本稿では、「細胞デリバリー」の考え方を整理し、これに用いられている技術、および今後開発が望まれているデバイスなどについて概観する。

### 2. 細胞デリバリーの分類

#### a) 細胞を生体内に直接送達する

最も単純な細胞デリバリー法で、すでに臨床で用いられている。虚血性疾患治療のための骨髄細胞注入では、分離した骨髄幹細胞をマーキングされた患部に直接、注射する手法がとられている。また、他項で紹介される血管内カテーテルを用いて心臓に骨髄細胞を注入する方法もある。本法は簡便であるため広く用いられるが、心筋や筋肉あるいは血管壁などに注入する場合には、組織の密度が高いため、注入した細胞浮遊液が溢れ出し、細胞を患部にとどめることが困難な場合がある。ゼラチンなどで粘性を高めた浮遊液を調製する試みも提案されているが、注射針から射出する際の圧力が高くなるため、手持ちでは定量的に吐出することが困難であり、また細胞の Viability や変性等が懸念される。

#### b) 細胞を担体に担持させて生体内に送達する

上記と同様に細胞を生体内に移植する際に、担体を使用する方法が提案されている。糖尿病治療のための膵島細胞の移植については、拒絶反応を回避するためのマイクロカプセルへの内包の研究がよく知られている。これに加えて、セラミクス多孔質体、ハイドロゲル、生分解性スポンジやメッシュなど多くの担体が研究されている。これらの担体に細胞を担持させることにより、生体内で一定の細胞密度を保ち、また細胞機能発現を促進することが期待される。また、生体内に移植する際には担体からはずして使用するが、感温性培養皿を用いた細胞シートも、この分類の変法と考えられる。

#### c) 細胞を2次元 Scaffold に送達する

再生医療だけでなく、細胞機能探索のためには、細胞の集団形成、あるいは2種類以上の細胞を共培養する技術が必要である。これを実現するために、培養基盤表面をマイクロ加工したり、インクジェットプリンター (micro droplet 法) や細胞吐出装置を備えた細胞ディスペンサーを用いた2次元配置法が研究されている。細胞の接着面積や接着斑の分布が細胞の機能発現に影響するとの報告がある。

#### d) 細胞を3次元 Scaffold に送達する

再生医療のコンセプトを確立した方法が、生分解性3次元スキャフォールドに細胞を播種したものであった。現在では、単純な播種だけでなく、スキャフォールド内部への送達を目指した細胞インジェクションなども研究されている。また、バイオリアクタータイプ