

主任研究者が一括して報告。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamagami S, Yokoo S, Mimura T, Takato T, Araie M, Amano S. Distribution of precursors in human corneal stromal cells and endothelial cells. *Ophthalmology*. 2007 Mar;114(3):433-9.
 2. Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Lichtler AC, Nakamura K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Identification of a potent combination of osteogenic genes for bone regeneration using embryonic stem (ES) cell-based sensor. *FASEB J*. in press, 2007
 3. Igawa K, Mochizuki M, Sugimori O, Shimizu K, Yamazawa K, Kawaguchi H, Nakamura K, Takato T, Nishimura R, Suzuki S, Anzai M, Chung UI, Sasaki N. Tailor-made tricalcium phosphate bone implant directly fabricated by a three-dimensional ink-jet printer. *J Artif Organs*. 2006;9(4):234-40.
 4. Yokoo S, Yamagami S, Mimura T, Amano S, Saijo H, Mori Y, Takato T. UV absorption in human oral mucosal epithelial sheets for ocular surface reconstruction. *Ophthalmic Res*. 2006;38(6):350-4.
 5. Yamagami S, Mimura T, Yokoo S, Takato T, Amano S. Isolation of Human Corneal Endothelial Cell Precursors and Construction of Cell Sheets by Precursors. *Cornea*. 2006 Dec;25 Suppl 1:S90-S92.
 6. Susami T, Matsuzaki M, Ogihara Y, Sakiyama M, Takato T, Sugawara Y, Matsumoto S. Segmental alveolar distraction for the correction of unilateral open-bite caused by multiple ankylosed teeth: A case report. *J Orthod*. 2006 Sep;33(3):153-9.
 7. Suzuki T, Yokoyama Y, Kumano K, Takanashi M, Kozuma S, Takato T, Nakahata T, Nishikawa M, Sakano S, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Highly efficient ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells using Delta1-Fc chimeric protein. *Stem Cells*. 2006 Nov;24(11):2456-65.
 8. Abe M, Westermann F, Nakagawara A, Takato T, Schwab M, Ushijima T. Marked and independent prognostic significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas. *Cancer Lett*. 2007 Mar 18;247(2):253-258.
 9. Mori Y, Eguchi T, Matsuzaki M, Ogihara Y, Susami T, Chikazu D, Saijo H, Yonehara Y, Takato T. A 2-stage procedure combining maxillary advancement by distraction technique with mandibular setback surgery in patients with cleft lip and palate. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Jul;35(7):594-7.
 10. Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jul;78(1):1-11.
 11. Miyahara T, Koyama H, Miyata T, Shigematsu H, Inoue J, Takato T, Nagawa H. Inflammatory responses involving tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 contribute to in-stent lesion formation in a stent implantation model of rabbit carotid artery. *J Vasc Surg*. 2006 Mar;43(3):592-600.
2. 学会発表
1. 小笠原徹、川口浩、中村耕三、鄭雄一、高戸毅 星和人：骨再生医療におけるサイクリン依存性キナーゼ 6(Cdk6)応用の試み：第3回日本再生医療学会総会：千葉県千葉市：2004・3日本再生医療学会雑誌 3suppl: 94, 2004
 2. 星和人、小笠原徹、劉光耀、高橋嗣明、山岡尚世、川口浩、鄭雄一、朝戸裕貴、中村耕三、高戸毅：ヒト耳介軟骨由来細胞による再生軟骨作製の試み：第3回日本再生医療学会総会：千葉県千葉市：

- 2004.3 日本再生医療学会雑誌 3suppl: 96, 2004
3. 劉光耀、小笠原徹、岸本淳司、高橋嗣明、鄭雄一、川口浩、朝戸裕貴、高戸毅、中村耕三、星和人：軟骨細胞の再分化を誘導する液性因子の最適化：第7回日本組織工学会：東京都千代田区：2004.7 プログラム抄録集 105
 4. 高橋嗣明、小笠原徹、鄭雄一、川口浩、朝戸裕貴、内沼栄樹、高戸毅、星和人 軟骨細胞の増殖・分化を誘導する液性因子の組み合わせの最適化 第13回日本形成外科学会基礎学術集会 千葉県浦安市 日本
 5. 星和人、劉光耀、小笠原徹、浅輪幸世、鄭雄一、川口浩、中村耕三、高戸毅、軟骨細胞の再分化を誘導する液性因子の検索と作用機序の解明 第3回日本再生医療学会総会：大阪市大阪府：2005・3・1-2 日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、P104
 6. 矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、小笠原徹、星和人、中村耕三、川口浩、高戸毅、鄭雄一 新規軟骨誘導物質チエノインダゾール誘導体は Sox9 と独立して作用して軟骨分化を促進し肥大分化を抑制する 第3回日本再生医療学会総会：大阪市大阪府：2005・3・1-2 日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、P104
 7. 山岡尚世、小笠原徹、朝戸裕貴、鄭雄一、高戸毅、星和人 各種足場素材を用いたインプラント型再生軟骨作製の試み 第3回日本再生医療学会総会：大阪市大阪府：2005・3・1-2 日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、P131
 8. 大庭伸介、池田敏之、緒方直史、リヒトラアレックス、小笠原徹、星和人、中村耕三、川口浩、高戸毅、鄭雄一 骨形成のための最小十分シグナルの同定と幹細胞を用いない新規骨再生法の開発 第3回日本再生医療学会総会：大阪市大阪府：2005・3・1-2 日本再生医療学会雑誌 4 (Suppl) 2005、P127
 9. 星和人、劉光耀、小笠原徹、高橋嗣明、浅輪幸世、鄭雄一、高戸毅、中村耕三、川口 浩、軟骨細胞の再分化を誘導する液性因子の組み合わせの最適化と相互作用機序の検討：第18回 日本軟骨代謝学会：大阪市大阪府：2005・3・18-19 第18回 日本軟骨代謝学会 プログラム抄録集 P85
 10. 大庭伸介、池田敏之、緒方直史、Lichtler Alex, 小笠原徹、星和人、中村耕三、川口浩、高戸毅、鄭雄一：骨形成のための最小十分シグナルの同定と幹細胞を用いない新規骨再生法の開発。第4回日本再生医療学会総会、2004.3.2, 大阪。
 11. 小笠原徹、高橋嗣明、浅輪幸世、山岡尚世、田中庸子、西澤悟、劉光耀、須佐美隆史、依田哲也、高戸毅、星和人：ヒト耳介由来軟骨細胞培養における TGF- β 添加の影響について。第8回日本組織工学会、2005年9月1日-2日、東京。
 12. 山岡尚世、小笠原徹、朝戸裕貴、西澤悟、鄭雄一、高戸毅、川口浩、中村耕三、中塚貴志、星和人：軟骨再生医療に用いる足場素材ハイドロゲルの検討。第8回日本組織工学会、2005年9月1日-2日、東京。
 13. 小笠原徹、大庭伸介、近津大地、末永英之、矢野文子、中村耕三、鄭雄一、川口浩、星和人、高戸毅：細胞周期調節因子による Runx2 機能制御機構の解明と骨再生医療への応用可能性。第8回日本組織工学会、2005年9月1日-2日、東京。
 14. 星和人、劉光耀、小笠原徹、高橋嗣明、浅輪幸世、鄭雄一、中村耕三、川口浩、高戸毅：軟骨再生医療に用いる軟骨細胞再分化誘導法の検討と作用機序の解明。第8回日本組織工学会、2005年9月1日-2日、東京。
 15. 浅輪幸世、小笠原徹、中塚貴志、鄭雄一、高戸毅、星和人：ヒト鼻中隔および耳介由来軟骨細胞の細胞特性の比較検討。第8回日本組織工学会、2005年9月1日-2日、東京。
 16. 高橋嗣明、小笠原徹、西澤悟、中塚貴志、鄭雄一、川口浩、中村耕三、内沼栄樹、高戸毅、星和人：ヒト軟骨細胞の増殖培養法の検討と液性因子の最適化。第8

- 回日本組織工学会、2005年9月1日-2日、東京。
17. 末永英之、古川克子、星和人、小笠原徹、牛田多加志、立石哲也、高戸毅：旋回培養を利用した分化促進と組織工学への応用。第8回日本組織工学会 2005年9月1日、東京。
 18. 小笠原徹、筑田博隆、大庭伸介、高戸毅、星和人：細胞周期調節因子 Cdk6 と Cdk4 の Runx2 機能制御による骨芽細胞分化調節機構(会議録)。第28回日本分子生物学会年会、2005年12月7日-10日、福岡。
 19. Ohba S., Ikeda T., Kamekura S., Kugimiya F., Yano F., Lichtler AC., Komori T., Ogasawara T., Hoshi K., Nakamura K., Takato T., Kawaguchi H., Chung UI.: Combination of BMP and Runx2 Signalings Constitute the Minimum and Sufficient Unit for Osteogenic Differentiation through Regulation of Cbfb. 26th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, October 1-5, 2004. Seattle, USA. J Bone Miner Res. 19(suppl 1), s149, 2004.
 20. Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Fujita T, Komori T, Ogasawara T, Nakamura K, Takato T., Kawaguchi H, Chung U: Involvement of Cbfb in the Cooperative Action of BMP and Runx2 Signalings on Osteogenic Differentiation. 27th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2005.9.24, Nashville, Tennessee, USA. (J Bone Miner Res. 20(Suppl 1), S5, 2005.)
 21. Yano F, Ohba S, Kugimiya F, Ikeda T, Ogata N, Ogasawara T, Takato T., Nakamura K, Kawaguchi H, Chung U: A New Thienopyridone Derivative Promotes Chondrogenic Differentiation in a Sox-9-Independent Manner without Inducing Hypertrophy. 27th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2005.9.25, Nashville, Tennessee, USA. (J Bone Miner Res. 20(Suppl 1), S197, 2005.)
 22. Ogasawara T, Chikuda H, Ohba S, Chikazu D, Katagiri M, Yano F, Nakamura K, Chung U, Hoshi K, Takato T., Okayama H, Kawaguchi H: Functional Switching of Runx2 by Cdk6 and Cdk4 in Regulation of Osteoblast Differentiation. 27th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2005.9.24, Nashville, Tennessee, USA. (J Bone Miner Res. 20(Suppl 1), S5, 2005.)
 23. Hoshi K., Liu G., Ogasawara T., Asawa Y., Chung U, Takato T., Nakamura K., and Kawaguchi H.: Thyroid Hormone (T3) Realizes Ideal Redifferentiation of Dedifferentiated Chondrocytes in Cooperation with BMP-2 and Insulin. Twenty-Seventh Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 23-27, 2005, Nashville, Tennessee, USA.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）
分担研究報告書

皮膚由来の再生用細胞取得のための多能性幹細胞の単離法と性状解析

分担研究者 大河内 仁志 国立国際医療センター研究所・細胞組織再生医学研究部 部長

研究要旨

皮膚由来の再生用細胞取得のために多能性幹細胞の単離法と開発し、それらの細胞の性状を明らかにすることを試みた。ヒト皮膚とマウス皮膚から浮遊培養によりsphereを形成させることにより多能性幹細胞を単離・培養することができた。また色素排出能に注目して幹細胞の候補であるSP細胞を皮膚から採取する方法を試みた。いずれの方法によっても幹細胞の採取に成功したが、マウスに比べてヒトでは細胞数が少なかった。皮膚においてCD133が毛乳頭細胞に特異的に発現していることが明らかになり、CD133陽性細胞がin vitroにおいて多能性を示す結果が得られた。ヒトおよびマウスの脂肪組織にも間葉系幹細胞の存在が示唆され、骨芽細胞への分化も見られた。

A. 研究目的

皮膚由来の再生用細胞取得のために多能性幹細胞の単離法と性状解析を行い、骨芽細胞への分化誘導を検討する。

B. 研究方法

(1) 皮膚から多能性幹細胞の分離・培養

術前に承諾の得られた摘出皮膚（n=3, 50-75歳）およびマウス(CD57BL/6J)の皮膚を用いた。2% B27 supplementを含むDMEM/F12培地を使用し、表皮細胞増殖因子20ng/ml、塩基性繊維芽細胞増殖因子10ng/ml添加し、2週間浮遊培養した。Sphereを適宜継代した。

(2) 脂肪組織から多能性幹細胞の分離・培養

術前に承諾の得られた摘出皮膚の脂肪組織はコラゲナーゼ処理を行い、遠心して沈殿分画の間葉系幹細胞を分離した。まず10%FBS添加DMEM培地で1-3回継代後、前述の無血清培地でsphereを形成させた。

(3) 分化条件下における分化マーカーの検討

形成したsphereを、1%ウシ血清を含むDMEM/F12培地で1-2週間培養して分化を誘導した、必要に応じて市販の骨芽細胞誘導培地、脂肪細胞誘導培地などを使用した。ALP染色、von Kossa染色等を行った。

(4) 皮膚からSP細胞の分離・培養

術前に承諾の得られたヒト摘出皮膚およびマウス(CD57BL/6J)の皮膚を用いた。0.1%トリプシン溶液にて個細胞化し、hoechst33342を5ug/mlとなるように加え、UVレーザーを照射しFACS解析を行った。SP細胞群と非SP細胞群に分けて細胞を分取し、遺伝子発現並びに表面マーカーの解析を行った。

(5) 皮膚に存在するCD133陽性細胞の性状解析

E16.5あるいは成体マウスの皮膚からCD133陽性細胞をMACS（磁気ビーズ）を用いて集め、RT-PCRを行った。またFACSにより表面マーカーおよび細胞内蛋白の解析を行った。

分取したCD133陽性細胞を培養皿に播種し、in vitro の分化条件（1%FBS添加DMEM）にて2-3週間培養した。次に浮遊培養条件（DMEM/F-12+B27+EGF+bFGF）でCD133陽性細胞を培養してsphere形成能を検討した。

「倫理面への配慮」

研究に用いたヒト皮膚は術前に患者の同意が得られた手術標本の一部を使用した。実験にはマウスを用いたが、当研究所の実験動物委員会の規則に従い、動物愛護上の配慮をもって実験を行った。

C. 研究結果

(1) 皮膚から多能性幹細胞の分離・培養

マウス皮膚より浮遊培養系を用いて、sphereを形成させ、半年以上の長期継代に成功した。In vitroでの多分化能を確認した。ヒト真皮由来の細胞はマウスに比べると増殖が遅く、sphereの形成率も低かった。

(2) 脂肪組織から多能性幹細胞の分離・培養

ヒトおよびマウスの脂肪組織由来の細胞は長期継代が可能で、骨芽細胞誘導培地にかえるとアルカリフォスファターゼ陽性細胞が多数出現し、4週間後にはカルシウム沈着もみられた。また脂肪細胞誘導培地にてOil Red Oに染まる脂肪滴を含んだ脂肪細胞の分化がみられた。真皮の細胞と同様にsphereを形成させて、神経分化条件にすると β Tubulin、MAP2陽性細胞が出現した。

(3) 皮膚からSP細胞の分離・培養

まずマウス皮膚を用いてSP細胞の存在を確認した。新生児マウス表皮では5-40%SP細胞が見られたのに対して、生後1ヶ月から0.1%程度に激減していた。6ヶ月や24ヶ月のマウスでも検討したが、0.1%以下の割合であった。真皮の細胞において検討したところSP細胞の割合は0.1%以下であった。Versican-GFP-Tgマウスから毛乳頭細胞のみを選択的に集めて検討したところ、SP細胞の割合は3%と上昇した。

ヒトの皮膚においてもSP細胞の検討を行ったが、SP細胞の割合は0.01-0.1%程度と非常に少なかった。

(4) CD133陽性細胞の培養と多能性の検討

CD133陽性細胞が毛乳頭に選択的に存在することが免疫染色により明らかになったので、CD133陽性細胞ソーティングして集め、RT-PCRを行うとneural crest originを示唆するSlug、Twist、Snailの発現が認められた。CD133陽性細胞を浮遊培養したところ、sphereを形成したが、SKP（真皮の多能性幹細胞）は1-2週間で形成するのに対し、6週間かかった。CD133のsphereは3回継代すると増殖が止まった。CD133陽性細胞は分化条件にすると、それぞれ5-10%の細胞がTuj、GFAP、 α SMAの抗体によって染色され、脂肪細胞も検出された。骨芽細胞への分化は現在確認中である。

D. 考察

ヒト皮膚とマウス皮膚から浮遊培養によりsphereを形成させることによって多能性幹細胞を単離・培養することができた。また色素排出能に注目して幹細胞の候補であるSP細胞を皮膚から採取する方法を試みた。いずれの方法によっても幹細胞の採取に成功したが、マウスに比べてヒトでは細胞数が少なかった。またSP細胞の培養法については条件の検討の余地が大きいと思われた。真皮ではSP細胞のデータから毛乳頭部に多能性幹細胞の存在が示唆された。最近他のグループの報告でも毛乳頭部における多能性幹細胞の存在が示唆されているが、これまで毛乳頭細胞に特異的な表面マーカーが見つからないために、explant culture以外に毛乳頭細胞を採取することは困難であった。今回我々の検討で皮膚においてCD133が毛乳頭細胞に特異的に発現していることが明らかになり、CD133陽性細胞がin vitroにおいて多能性を示す結果が得られた。CD133陽性細胞は浮遊培養では増殖が遅く、接着培養では多分化能が低下する傾向が見られたので、やはりさらなる培養条件の検討が必要と思われる。

一方ヒトおよびマウスの脂肪組織にも間葉系幹細胞の存在が示唆され、骨芽細胞への分化も見られた。接着培養で比較的増殖能力は保たれていたが、分化能には年齢による差がみられたので、症例数を増やしてさらなる検討が必要と思われる。

E. 結論

皮膚の真皮や脂肪組織から多能性幹細胞の取得に成功したが、ヒトの細胞では採取のしやすさや増殖能力の点で、脂肪組織由来の細胞が優れていると考えられた。

F. 健康危険情報

主任研究者が一括して報告。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Osada A, Iwabuchi T, Kishimoto J, Hamazaki TS, Okochi H. Long-Term

Culture of Mouse Vibrissal Dermal Papilla Cells and De Novo Hair Follicle Induction. Tissue Eng. in press, 2007

2. Nakashima H, Fujimoto M, Asashima N, Watanabe R, Kuwano Y, Yazawa N, Maruyama N, Okochi H, Kumanogoh A, Tamaki K. Serum chemokine profile in patients with bullous pemphigoid. Br J Dermatol. in press, 2007
3. Watanabe R, Fujimoto M, Yazawa N, Nakashima H, Asashima N, Kuwano Y, Tada Y, Maruyama N, Okochi H, Tamaki K. Increased serum levels of a proliferation-inducing ligand in patients with bullous pemphigoid. J Dermatol Sci. in press, 2007
4. Nakanishi M, Hamazaki TS, Komazaki S, Okochi H, Asashima M. Pancreatic tissue formation from murine embryonic stem cells in vitro. Differentiation. in press, 2007
5. Ito Y, Hamazaki TS, Ohnuma K, Tamaki K, Asashima M, Okochi H. Isolation of Murine Hair-Inducing Cells Using the Cell Surface Marker Prominin-1/CD133. J Invest Dermatol. in press, 2006
6. Kuwano Y, Fujimoto M, Watanabe R, Asashima N, Nakashima H, Ohno H, Yano S, Yazawa N, Okochi H, Tamaki K. Serum anti-Fcγ receptor autoantibodies in patients with alopecia areata. Arch Dermatol Res. in press, 2006
7. Asashima N, Fujimoto M, Watanabe R, Nakashima H, Yazawa N, Okochi H, Tamaki K. Serum levels of BAFF are increased in bullous pemphigoid but not in pemphigus vulgaris. Br J Dermatol. in press, 2006
8. Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K. Activation of Akt by mechanical stretching in human epidermal keratinocytes. Exp Dermatol. in press, 2006

2. 学会発表

Ito Y, Hamazaki TS, Tamaki K, Asashima M, Okochi H. A new surface marker for dermal papilla cells. 67th Annual meeting of the So-

ciety of Investigative Dermatology, Philadelphia, Pennsylvania, USA, May, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

高分子ナノミセルを用いた遺伝子導入方法の開発

分担研究者 片岡 一則 東京大学工学系研究科 教授

研究要旨

組織より分離された成体細胞に有効な高分子ナノミセルを用いる遺伝子導入方法の開発を目指した。新規合成、最適化したブロック共重合体を用いたナノミセル型遺伝子キャリアにより、皮膚線維芽細胞を含めた初代培養株細胞への低毒性かつ効率よい遺伝子導入が確認された。

A. 研究目的

本研究は、複合組織の欠損による患者のQOL低下を回避するため、組織欠損を補うための新規手法を開発するものである。従来は組織欠損を補う手法として、自家組織移植や人工組織を用いられてきたが、いずれもその機能・形態の両面において課題を残している。また他家組織移植においても、ドナーの慢性的不足や免疫学的問題など多くの問題を抱えている。このような問題を解決するため、本研究では、再生医学と生体材料工学の最先端の技術を融合させて、骨軟骨欠損を再建す

LL)ブロック共重合体に対し、PLL側鎖アミノ基の一部をスルフヒドリル基(SH基)で置き換えジスルフィド架橋を施すことにより、細胞内環境変化(グルタチオン濃度の上昇)に反応して内包pDNAを制御放出するインテリジェントナノミセル型遺伝子キャリアを構築した。

2) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子キャリアの機能検証

インテリジェントナノミセル型遺伝子キャリアの細胞内機能は、ルシフェラーズをコードしたpDNAの発現効率から評価した。主としてin vitroにおいては培養293T細胞、in vivoにおいてはマウスの尾静注によりレポーター遺伝子を投与し、肝臓での遺伝子発現により評価した。また架橋型ナノミセル型遺伝子キャリアの静脈内投与におけるpDNAの血中安定性をサザンブロット法により評価した。さらにin vivoとin vitroでの機能相関を定量的に評価する目的で、アレイ状に構築した初代肝実質細胞スフェロイドへの遺伝子導入を試みた。

3) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子キャリアの凍結乾燥製剤化の検討

遺伝子キャリアの臨床応用への展開を考慮した場合には、保存安定性や投与量の幅広い選択性などの製剤学的要件の満足が必要であり、凍結乾燥製剤化が望まれるため、凍結乾燥前後における遺伝子発現効率を株化細胞実験により、また粒径測定を動的光散乱によって評価した。

4) 細胞内移行促進機能を有するナノミセル型遺

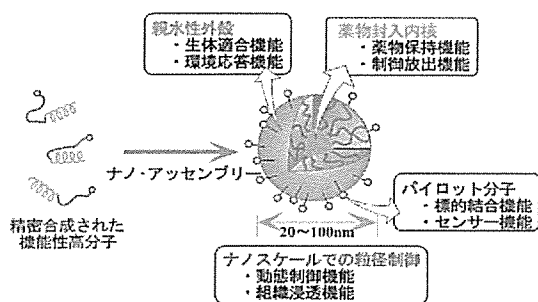


図1 ブロック共重合体のナノアセンブリーに基づく超機能化高分子ミセルベクターの構築る治療技術を開発することを目的としている。本分担研究においては、組織より分離された成体幹細胞に有効な高分子ナノミセル(図1)を用いる遺伝子導入方法の開発を目指した。

B. 研究方法

1) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子キャリアの構造最適化

ポリエチレングリコール-ポリ(L-リジン)(PEG-P

伝子キャリアの構築

本システム構築のため、ブロック共重合体へ細胞内移行促進セグメントを導入した。具体的にはPEG-ポリ(β -ベンジルアスパルテート)(PEG-PBLA)ブロック共重合体の側鎖のベンジル基に対する定量的アミノリシスによって、pKaや疎水性などの異なる各種アミノ基を導入する方法を確立し、この手法で合成した種々のブロック共重合体からDNA内包ナノミセル型遺伝子キャリアを調製した。

5) A-B-C型トリブロック共重合体の合成

全身投与が可能なベクター系の構築を目指して、生体適合性のポリエチレングリコール、バッファー効果により細胞内移行能を賦与するpKaの低いポリカチオン、DNAを効率的に凝縮させるポリカチオンの3つの異なる機能性セグメントを有するA-B-C型トリブロック共重合体を新規に合成した。

6) A-B-C型トリブロック共重合体によって構築された遺伝子キャリアの担ガンマウスによるin vivo評価

固形ガン(マウス大腸ガンC-26細胞)を皮下移植したマウスに対し、3層構造ナノミセル型遺伝子ベクターを尾静脈内投与し、腫瘍部位での遺伝子発現を評価した。

7) 表層にリガンド分子を結合した高分子ナノミセル型遺伝子キャリアの構築

リガンドを導入するための反応性基として従来のアセタール基に加え、脱保護に伴う二量化反応が惹起されないベンジルアセタール基を片末端に導入したPEGを合成し、アセタール基およびベンジルアセタール基とポリアミノ酸側鎖の選択的脱保護を実現するために、温和なアルカリ条件で脱離可能な保護基を有するアミノ酸誘導体(例: ϵ -トリフルオロアセチル-L-リシン酸無水物)をPEG末端から重合させた。これにより、従来法では困難であったブロック共重合体の末端に、ラクトース、ペプチドを導入することを試みた。

8) ポリカチオンの合成とポリプレックスの調製

アミノリシス法によるブロック共重合体合成を行った。ポリアスパラギン酸(P[Asp])側鎖にジエチレントリアミン(DET)を導入したP[Asp(DET)]ポリマーとポリエチレングリ

コール(PEG)とのブロック共重合体(PEG-DET)を合成した(PEG分子量12000,ポリアミノ酸重合度98)。ナノミセル型キャリアはトリスバッファー中でDNAとポリマー溶液を混合することによって調製した。

9) 初代培養株細胞への遺伝子導入

マウス皮膚組織より皮膚線維芽細胞を採取し、6穴プレートに播種、培養し、ナノミセル型キャリアによる遺伝子導入を行った。同様に新生マウス頭蓋骨由来の未分化骨芽細胞に対する遺伝子導入も行った。導入遺伝子はホタル発光ルシフェラーゼおよび蛍光タンパクであるYFPを用い、それぞれルミノメーター、蛍光顕微鏡にて遺伝子発現を評価した。

また、遺伝子導入条件における細胞への毒性を評価するため、生細胞数の計測をMTTアッセイにより行った。

10) ナノミセル型キャリアの細胞内挙動観察

DNAを2種の波長の異なる蛍光分子で標識することにより、DNAがナノミセルに内包されると、2分子間の蛍光エネルギー移動により波長が変化する。一方DNAがキャリア外に放出されるとこのエネルギー移動は解消されるため、その変化を観察することにより、細胞内でのキャリア挙動、DNA放出をレーザー共焦点顕微鏡を用いて観察した。

11) 遺伝子発現の持続性評価

遺伝子発現の状態をより詳細に確認するため、その発現をmRNAレベルで評価した。ルシフェラーゼ遺伝子を導入し、細胞からmRNAを抽出、ルシフェラーゼ遺伝子mRNAの発現を定量PCR法にて評価した。

C. 研究結果

1, 2) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子キャリアの構造最適化と機能検証

PEG-PLLブロック共重合体に対し、2種類のSH基導入法(SPDP試薬と2-イミノチオレン試薬による方法)を試み、いずれにおいても導入率を制御してSH基を導入することが可能であった。前者ではSH基の導入により荷電密度が減少し、後者では荷電密度が維持される。これらの手法によりジスルフィド架橋を施すことにより、細胞内環境変化(グルタチオン濃度の上昇)に応答して

内包pDNAを制御放出するインテリジェントナノセル型遺伝子キャリアを構築した。

架橋高分子ナノセル型遺伝子キャリアは、細胞外では内包pDNAを安定に保持する一方、細胞内還元環境下では架橋の解離に伴うpDNAの放出制御を通じて、非架橋ナノセル型遺伝子キャリアに比較して一桁以上高い発現効率を実現した。さらにナノセル型遺伝子キャリアを構成するブロック共重合体の連鎖長ならびにジスルフィド架橋導入率と構造安定性、遺伝子発現能との間の構造—機能相関を明らかにするための系統的な研究を行い、ナノセル型遺伝子キャリア内において有効なDNA凝縮を惹起するための臨界鎖長が存在することを明らかにし、DNA凝縮構造の形成と遺伝子発現活性との間の相関も見出した。また架橋導入率には最適値が存在し、その値が細胞種によって異なることも明らかにした。これは細胞内におけるグルタチオン濃度の差などに起因するものと考えられるが、これより架橋導入率の精密な制御によって、特定の細胞集団に遺伝子発現を誘導出来ることを示した。

培養細胞系において良好な遺伝子発現を示した細胞内還元環境応答型ナノセル型遺伝子キャリアのin vivo機能評価においては、マウスの尾静脈投与によって、肝臓実質細胞に様にレポーター遺伝子を発現させ得ることに成功した。また血管壁への遺伝子導入においては、内皮細胞への遺伝子導入が可能であることを実証した。これらの結果を受け、in vivoとin vitroでの機能相関を定量的に評価する目的で、アレイ状に構築した初代肝実質細胞スフェロイドへの遺伝子導入を試み、時間依存的に遺伝子導入が可能であることを見出している。これは、非分裂期にある細胞への遺伝子導入がナノセル型遺伝子キャリアを用いて行えることを示した点で特筆すべきものであり、ナノセル型遺伝子キャリアの細胞内核移行についても新しい知見を与えることが期待される。

さらに架橋型ナノセル型遺伝子キャリアの静脈内投与におけるpDNAの血中安定性をサザンブロッティング法により評価した結果、架橋導入率の上昇に伴うpDNAの血中安定性の向上が確認された。ナノセル型遺伝子キャリアへの架橋導入は、内包DNAの血中安定性を向

上させるために極めて有用であると考えられる。さらに適用可能な投与方法を拓げる目的で、ナノセル型遺伝子キャリアの気管内投与を行い、肺における遺伝子発現を評価した。その結果、ナノセル型遺伝子ベクターは、非架橋ナノセル型遺伝子キャリアや市販の遺伝子導入試薬であるポリエチレンイミンと比較して、顕著に高い遺伝子発現を導くことに成功した。この様に、架橋型ナノセル型遺伝子キャリアは、系中に遊離ポリカチオンを含まないために極めて毒性が低く、in vivo遺伝子導入に適した構造と性能を有することが明らかとなった。

3) 細胞内還元環境応答型ナノセル型遺伝子キャリアの凍結乾燥製剤化の検討

本システムの臨床応用に向けては、保存安定性や投与量の幅広い選択性などの製剤学的要件の満足が必要であり、凍結乾燥製剤化が望まれるが、ナノセル型遺伝子キャリアは凍結乾燥に伴う粒径変化や遺伝子発現活性の減弱が全く認められず、将来の臨床展開においても極めて有利な形態であることが明らかとなった。

4) 細胞内移行促進機能を有するナノセル型遺伝子キャリアの構築

PEG-PBLAブロック共重合への定量的アミノシスによって、側鎖構造単位に高pKa(〜9)と低pKa(〜7)の2種類のアミノ基を有する系がスムーズな細胞質移行を示し、良好な遺伝子発現を導くことを見出した。すなわち一つのカチオン性ユニットへ構造の異なる二種類のアミノ基を導入することにより、DNAとのコンプレックス形成とエンドソーム内pH低下を防ぐバッファー効果とを両立させる機能分担型の分子設計が合目的性を有することが明らかになった。

また、これらの側鎖に2種類のアミノ基を有するブロック共重合体の中でも、ジエチレントリアミン(DET)を導入したブロック共重合体(PEG-DET)が、細胞毒性を示すことなく極めて効率的な遺伝子導入を示すことを明らかにした。市販の遺伝子導入試薬は、初代培養細胞に対して顕著な細胞毒性を示したが、PEG-DETは種々の初代培養細胞(骨芽細胞、線維芽細胞、滑膜細胞)に対して細胞毒性を示すことなく高効率の遺伝子発現を導いた。PEG-DETの遺伝子導入メカニズムに関しては、今後さらなる検討が必要であるが、低毒性と効率的な遺伝子発

現を実現した人工遺伝子キャリアとして高い有用性が期待される。

5) A-B-C型トリブロック共重合体の合成

上記の知見に基づいて、さらに、経静脈全身投与が可能なキャリア系の構築を目指して、生体適合性のポリエチレングリコール、バッファー効果により細胞内移行能を賦与するpKaの低いポリカチオン、DNAを効率的に凝縮させるポリカチオンの3つの異なる機能性セグメントを有するA-B-C型トリブロック共重合体を新規に合成した。トリブロック共重合体は、DNAを凝縮した内核、バッファー能を有する中間層、生体適合性のPEG外殻からなる3層構造を形成し、培養細胞実験において従来のPEG-PLLの50倍以上の遺伝子導入効率を実現した。

6) A-B-C型トリブロック共重合体似よって構築された遺伝子キャリアの担ガンマウスによるin vivo評価

固形ガン(マウス大腸ガンC-26細胞)を皮下移植したマウスに対し、3層構造ナノミセル型遺伝子キャリアを尾静脈内投与した結果、腫瘍部位での選択的かつ効率的遺伝子導入が確認された。対照的にpDNAのガン組織への直接注射においては、3層構造ナノミセル型遺伝子キャリアの10分の1以下の遺伝子発現しか確認されず、市販の遺伝子導入試薬では投与した全てのマウスの死亡が確認された。人工遺伝子キャリアの静脈内投与により大腸ガンに遺伝子発現を認めたのは、世界的に見てもこの研究が初めての例であり、3層構造ナノミセル型遺伝子キャリアは全身投与によるin vivo遺伝子治療を実現する遺伝子デリバリーシステムとしての展開が期待される。

7) 表層にリガンド分子を結合した高分子ナノミセル型遺伝子ベクターの構築

これまでの研究により、遺伝子DNAやオリゴ核酸を効率良く搭載し、高い生理機能を発現するナノミセル型遺伝子キャリアの構造設計が確立したことを受け、ナノミセル型遺伝子キャリア表層へのリガンド分子装着のための分子設計として、 α -末端に各種のパイロット分子を結合可能なブロック共重合体の新規合成ルートの確立を行った。この場合、

数種類の化学反応による修飾を多段階に重ねるという制約のために、リガンドを担持したブロック共重合体の合成は一般には困難を伴うが、既に確立していた合成経路を抜本的に見直し、各々の反応操作が互いに干渉しない新規合成経路を探索することによって、効率良くリガンド導入ブロック共重合体を合成する経路の構築に成功した。これにより、従来法では困難であったブロック共重合体の末端に、ラクトース、ペプチドを導入することに成功した。

この結果、表層にラクトースを導入したナノミセル型遺伝子キャリアが、ラットより調製した初代培養肝実質細胞に対して、高い遺伝子発現効率を示すことを確認した。さらに血管内皮細胞や平滑筋細胞など多くの細胞に発現が認められるインテグリンに対して特異的結合能を有するRGDペプチドを表層に導入したナノミセル型遺伝子キャリアを構築した。RGDペプチド導入ナノミセル型遺伝子キャリアを、ウサギ頸動脈バルーン擦過モデルの内膜肥厚を形成している動脈壁に対して局所投与を行ったところ、従来のシステムと比較して10倍以上高い遺伝子導入効率が実現された。これによりナノミセル型遺伝子キャリアに導入したりガンド分子が生体内においても有効に機能することを確認した。

8, 9) PEG-DET/DNAナノミセル型キャリアによる初代培養株細胞への遺伝子導入

PEG-DET/DNAナノミセル型キャリアにより、皮膚線維芽細胞においてほとんど毒性を示すことなく遺伝子発現が確認された。ルシフェラーゼ遺伝子による評価で、ポリマーのカチオン電荷対DNAの電荷比を80 (N/P=80) にて調製したナノミセルにおいて最も優れた遺伝子発現が得られることが確認され、YFP遺伝子発現の蛍光顕微鏡による観察では、導入後6日で約20%の細胞に遺伝子発現を認めた。

また、未分化骨芽細胞に対してはさらに良好な遺伝子導入が可能であり、導入後3日で約50%の細胞に遺伝子発現が観察された。何れの細胞においても細胞は形態的に遺伝子導入を行っていないコントロール細胞と

くらべほとんど影響は見られず、MTTアッセイによる生細胞数計測にても、コントロールとの有意差を認めなかった。代表的な遺伝子導入用カチオンポリマーであるポリエチレンイミンでは、強い毒性が生じており、対照的な結果となった。

10) ナノミセル型キャリアの細胞内挙動観察

フルオレセインおよびCy3のふたつの蛍光分子で標識したDNAをナノミセル型キャリアに内包し、蛍光分子間のエネルギー移動(FRET)により、キャリアの細胞内移動を観察した。

PEG-DET/DNAナノミセル型キャリアにより遺伝子導入で、24時間後明らかに細胞質内でのDNAの効率よい放出が観察され、本キャリアにより効率よいDNAの細胞内デリバリーが達成されていることが確認された。これは同様の効率的細胞内遺伝子デリバリーが可能なポリエチレンイミンの結果と相関するものであり、本キャリアによっても、細胞内に取り込まれた後、効率よいエンドソーム脱出の起こっていることが示唆された。

11) 遺伝子発現の持続性評価

ナノミセル型キャリアでは非常に低毒性で細胞へ遺伝子導入することが可能のため、キャリア共存下で長時間培養することが可能となる。その結果として、非常に長期間にわたる遺伝子発現が観察される。この発現が実際に核内転写レベルで起こっていることを確認するため、細胞からmRNAを抽出、遺伝子発現を定量PCR法で評価したところ、ナノミセル型キャリアでは、むしろ1日目より3、5日目にかけてmRNAの発現が増加する傾向が観察された。一般的な脂質由来の市販遺伝子導入試薬であるFuGENE6では、mRNAレベルの発現としては、1日目で非常に高い発現が見られるものの、以後急激に減少し、全く異なった発現のパターンとなっていることが明らかとなった。ナノミセル型キャリアでは、核内転写レベルにおいても遺伝子発現が持続することにより、長期にわたる高い遺伝子発現の得られることが確認された。

D. 考察

本研究では実際の治療に用いることが可

能な人工遺伝子ベクターの開発を目的とする。そのための要件として、高い遺伝子導入効率とともに、ほとんど細胞毒性を示さないことが不可欠となる。特に生体由来の初代培養株細胞は、市販遺伝子導入試薬を用いる際も細胞毒性の影響を受けやすいことが知られており、毒性の少なさは重要なポイントとなる。PEG-DET/DNAナノミセル型キャリアは、ほとんど細胞への毒性を示すことなく、良好な遺伝子導入を実現しており、臨床応用を視野に入れたキャリアとして非常に有望なシステムといえる。また、長期間にわたる核内転写の持続という特徴も併せ持つことが明らかとなった。これは例えば細胞分化誘導を行う目的に治療用遺伝子を機能させる際には、非常に重要なポイントとなりうることである。さらにポリマーの構造、鎖長と最適化することにより、生体組織内での遺伝子発現を時間的、空間的にコントロールすることの出来るインテリジェント遺伝子デリバリーシステムへの展開が期待される。

E. 結論

新規合成、最適化したブロック共重合体を用いたナノミセル型遺伝子キャリアにより、皮膚線維芽細胞を含めた初代培養株細胞への低毒性かつ効率よい遺伝子導入が確認された。

F. 健康危険情報

主任研究者が一括して報告。

G. 研究発表

- 論文発表
1. Arnida, Kataoka, K., et al., PEGylated gene nanocarriers based on block cationic bearing ethylenediamine repeating units directed to remarkable enhancement of photochemical transfection. *J. Control. Release*, in press
2. Park, J.-S., Kataoka, K., et al., Preparation and characterization of polyion complex micelles with novel thermo-sensitive poly(2-isopropyl-2-oxazoline) shell via the complexation of oppositely-charged block

- ionomers. *Langmuir*, in press
3. Park, J.-S., Kataoka, K., et al., Precise control of lower critical solution temperature of thermosensitive poly(2-isopropyl-2-oxazoline) via gradient copolymerization with 2-ethyl-2-oxazoline as a hydrophilic comonomer. *Macromolecules*, in press
 4. Nishiyama, N., Kataoka, K., et al., Photochemical enhancement of transgene expression by polymeric micelles incorporating plasmid DNA and dendrimer-based photosensitizer. *J. Drug Target.*, 14: 413-424, 2006
 5. Jang, W.-D., Kataoka, K., et al., Polyion complex micelles for photodynamic therapy: incorporation of dendritic photosensitizer excitable at long wavelength relevant to improved tissue-penetrating property. *J. Control. Release*, 113: 73-79, 2006
 6. Kim, W., Kataoka, K., et al., Development of a fitting model suitable for the isothermal titration calorimetric curve of DNA with cationic ligands. *J. Phys. Chem.*, B110: 10919-10925, 2006
 7. Koide, A., Kataoka, K., et al., Semipermeable polymer vesicle (PICsome) self-assembled in aqueous medium from a pair of oppositely charged block copolymers: physiologically stable micro-/nanocontainers of water-soluble macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 128: 5988-5989, 2006
 8. Kataoka, K., et al., Intracellular inducible alkylation system that exhibits antisense effects with greater potency and selectivity than the natural oligonucleotide. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 45: 3136-3140, 2006
 9. Ali, M. M., Kataoka, K., et al., pH-responsive three-layered PEGylated polyplex micelle based on a lactosylated ABC triblock copolymer as a targetable and endosome-disruptive nonviral gene vector. *Bioconjugate Chem.* 17: 677-688, 2006
 10. Kakizawa, Y., Kataoka, K., et al., Organic-inorganic hybrid-nanocarrier of siRNA constructing through the self-assembly of calcium phosphate and PEG-based block anionomer. *J. Control. Release* 111: 368-370, 2006
2. 学会発表
 1. Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, Society for Biomaterials, 30th Annual Meeting & Exposition, Memphis Cook Convention Center, Memphis, TN, USA, 2005.4.30 (招待講演)
 2. Kazunori Kataoka, Polymeric Micelles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, 5th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, Hakone Hotel Kowaki-en, Janapn, 2005.5.9 (招待講演)
 3. 片岡一則, 高分子ナノミセルデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, インターフェックスジャパン 2005, 東京ビッグサイト, 東京, 2005.5.18 (招待講演)
 4. 片岡一則, 高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子 DNA デリバリー, 第54回高分子学会年次大会, パシフィコ横浜, 神奈川, 2005.5.25 (招待講演)
 5. 片岡一則, 高分子ミセル型ナノキャリアによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, 東京肝臓シンポジウム, 東京プリンスホテル, 東京, 2005.6.4(招待講演)
 6. Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, ESF Research Conference 'Biological Surfaces & Interfaces, Hotel Eden Roc, Sant Feliu de Guixols, Spain, 2005.6.18(招待講演)
 7. 片岡一則, 高分子ミセル型ナノキャリアによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, 第9回がん分子標的治療研究所会総会「新しいドラッグデリバリーシステムの開発」, 京都国立会館, 京都, 2005.6.30(招待講演)
 8. 片岡一則, 遺伝子・核酸医薬デリバリーのための高分子ミセル型ナノキャ

- リア設計, 「がん研究における RNAi の可能性」, 中央大学駿河台記念館, 東京, 2005.7.6(基調講演)
9. 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来型 DDS—ピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計—, 第 2 1 回日本 DDS 学会ワークショップ「ナノテクノロジーの応用」, ハウステンボス全日空 JR ホテル, 長崎, 2005.7.23
 10. Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, The 8th SPSJ International Polymer Conference (IPC2005), Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, 2005.7.29(招待講演)
 11. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来型 DDS—ピンポイント診断・治療のための高分子ミセル型ナノデバイス設計—, 第 3 回 Translational Medicine Seminar, 経団連ベストハウス, 静岡, 2005.7.30(特別講演)
 12. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓くフロンティアメディスン—ピンポイント診断・治療のための高分子ナノデバイス設計—, 第 4 3 回茅コンファレンス, 八ヶ岳ロイヤルホテル, 山梨, 2005.8.23(招待講演)
 13. Kazunori Kataoka, Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery, 11th Asian Chemical Congress/13th General Assembly, Seoul, 2005.8.24(招待講演)
 14. 片岡一則, 高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー, 創薬薬理フォーラム第 1 3 回シンポジウム, 日本薬学会長井記念館, 東京, 2005.9.9(招待講演)
 15. 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来医療—高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー—, 日本油化学会年会, 慶應大学矢吹キャンパス, 横浜, 2005.9.15(特別講演)
 16. 片岡一則, バイオマテリアルが先導するナノ医療: ピンポイント診断・治療のためのナノキャリア設計, 第 4 9 回日本学術会議材料研究連合会議, 京大会館, 京都, 2005.9.16(基調講演)
 17. Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles As Nanocarriers For Gene, Oligonucleotides, and siRNA delivery, 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kyushu University, Fukuoka, 2005.9.20(招待講演)
 18. 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来医療—ピンポイントデリバリーのためのナノデバイス設計—, 第 5 3 回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会, 福井自治会館, 福井, 2005.9.30(特別講演)
 19. Kazunori Kataoka, Block copolymer micelles as nanocarriers for gene and drug delivery -Challenge to intracellular nanomedicine-, 2005 Robinson Symposium, School of Pharmacy, University of Wisconsin, USA, 2005.10.14(招待講演)
 20. Kazunori Kataoka, Nanomaterial and Its Medical Use: Smart Polymeric Micelles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, 36th ICFA Advanced Beam Dynamics Workshop(Nanobeam 2005), Kyoto University-Uji Campus, Kyoto, 2005.10.19(招待講演)
 21. 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来医療—ピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計—, 北海道科学技術ネットワークセッション, 京王プラザホテル札幌, 札幌, 2005.10.25(基調講演)
 22. 片岡一則, 薬物・遺伝子ナノキャリアとしてのブロック共重合体ミセル—高分子が先導するナノ医療システム実現に向けて—, 平成 1 7 年度日本化学会高分子化学コロキウム, 秋田大学工学資源学部, 秋田, 2005.10.28 (招待講演)
 23. 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来型 DDS—ピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計—, 第 2 0 回日本 DDS 学会創立 2 0 周年

記念シンポジウム、お茶の水ガーデンパレス、東京、2005.11.8（招待講演）

24. 片岡一則、ナノテクノロジーが拓くフロンティアメディシン：ピンポイント診断・治療のためのナノキャリア設計、第14回日本コンピュータ外科学会大会、海外職業訓練協会研修施設、千葉、2005.11.20（招待講演）
25. 片岡一則、ナノテクノロジーが拓く未来医療ーピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計ー、（財）ヒューマンサイエンス振興財団第130回研究委員会セミナー、（財）ヒューマンサイエンス振興財団、東京、2005.12.6（招待講演）
26. 片岡一則、ナノバイオテクノロジーが拓くフロンティアメディシンーピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計ー、理研シンポジウム（第6回コンビナトリアル・バイオエンジニアリング/ナノバイオテクノロジージョイントシンポジウム、理化学研究所、和光市、2006.1.12（招待講演）
27. 片岡一則、ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療ーピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計ー、第1回ナノメディスン討論会、岡崎コンファレンスセンター、岡崎、2006.2.12（招待講演）
28. ー薬物・遺伝子のピンポイントデリバリーのためのナノデバイス設計ー、DDS熊本シンポジウム、熊本大学薬学部、熊本、2006.3.13（招待講演）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 片岡一則、位高啓史、西山伸宏、福島重人、張祐銅、宮田完二郎、中西政崇、金山直樹、ポリカチオン荷電性ポリマー及び核酸のキャリアーとしての使用、特願2005-035233
- 片岡一則、大庭誠、西山伸宏、位高啓史、福島重人、金山直樹、ペプチドリガンド

を有するブロック共重合体、特願2005-054260

- 片岡一則、裴潤秀、西山伸宏、福島重人、張祐銅、pH応答性高分子ミセルの調製に用いる新規ブロック共重合体及びその製造法の提供、特願2005-125336

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）
分担研究報告書

骨軟骨再生用担体・細胞シートの開発

分担研究者 岡野 光夫 東京女子医科大学先端生命医科学研究所生体材料工学 教授

研究要旨

骨軟骨細胞増殖・分化に関わる担体の開発と、温度応答性培養皿を用いて作製した皮膚線維芽細胞・骨膜細胞シート中の細胞外マトリックスを新規細胞担体として用いる可能性について体系的な検討を行った。

A. 研究目的

我々は、温度に応じて水との親和性を大きく変化させる温度応答性高分子を培養皿表面に共有結合的に固定化することにより温度応答性培養皿を開発した。この表面は、37℃では市販の培養皿と同程度の弱い疎水性を示し様々な細胞が接着・伸展するが、温度を32℃以下に下げると高度の親水性を示し、トリプシンなどのタンパク質分解酵素を必要とすることなく細胞を脱着させることができる。コンフルエントな細胞層を形成させた後に低温処理すると、全細胞を細胞-細胞間接着により連結した一枚の細胞シートとして脱着・回収をすることができる。骨組織は解剖学的に内外骨膜と呼ばれる結合組織に囲まれている。骨の成長は、骨膜で生じるため、骨膜には骨よりも細胞成分に富んでいる。また、血管と共にコラーゲン線維からなる粗性結合組織を豊富に含んでいる。これまでの研究から、骨膜由来細胞が骨・軟骨形成に必須である細胞増殖・分化に大きく関与していることが示唆されている。骨再生に関する研究では、骨髄細胞を採取し、培養系で増殖させ骨芽細胞に分化させた後、生分解性の足場に播種して三次元培養し、移植する方法が一般的である。本研究では、骨軟骨細胞増殖・分化に関わる担体の開発と、温度応答性培養皿を用いて作製した皮膚線維芽細胞・骨膜細胞シート中の細胞外マトリックスを新規細胞担体として用いる可能性について体系的な検討を目的とした。

B. 研究方法

(1) 骨軟骨細胞増殖・分化に関わる担体の開発

生分解性高分子性細胞担体としてはポリ乳酸、ポリグリコール酸、および両者の共重合体、フィブリンゲルを評価した。ポリ乳酸、ポリグリコール酸、および両者の共重合体は合成直後の状態では非常に疎水性が高く細胞接着性、組織親和性が非常に低いため、アルカリ処理により表面の親水化をおこなった。これらはラット背部ないし腹部皮下に移植し、移植部位の炎症など異物反応を組織学的に評価した。

(2) 皮膚線維芽細胞シート作製法の開発

8週齢雄C57BL/6Nマウス背部皮膚より採取・分離した線維芽細胞を、コラーゲンフィルム（高研社製）上に播種し、FBS添加DMEM培地中でコンフルエントになるまで培養下のち、フィルムごと分離し、増殖・分化・基質産生に影響を及ぼすかを分子生物学的・組織学的に評価した。アデノウイルスにてcaALK6+Runx2を導入後、線維芽細胞をアテロコラーゲン膜上にて培養し骨形質転換を誘導した。石灰化を確認後直径5 mmにカットし、移植片とした。

(3) 培養骨膜シートの作製法の開発

(2)の代替技術として、培養骨膜細胞シートを安定して作製という培養条件を最適化し、生化学的、組織学的に評価すると共に、ラット頭頂骨骨欠損部位に移植した。培養骨膜細胞シートの回収には温度応答性培養皿を用い、低温処理（20℃）により回収した。

C) 定量的 PCR: グアニジン塩酸フェノールにて細胞シートより拡散を抽出し、常法にしたがい逆転写後、TaqMan プローブを用いた定量的 PCR に供した。検討した遺伝子は以下のとおりである。

- type I collagen: 骨基質に最も多量に含まれるタンパク質
- alkaline phosphatase (ALP): 骨芽細胞の初期分化マーカー
- Osteopontin spp1: 骨芽細胞の中期分化マーカー
- Osteocalcin: 骨芽細胞の後期分化マーカー
- Runx2: 骨芽細胞の分化に必要な転写因子
- VEGF: 血管新生因子

D) 培養条件: グリセロリン酸 (骨基質形成の際、リン脂質を供給し石灰化を促進する)、デキサメタゾン (骨芽細胞への分化を促進する)、アスコルビン酸 (コラーゲンのプロリンおよびリジン残基の水酸化を促進し、コラーゲンの合成・分泌、線維形成を促進する) を含む骨形成培地と異なる時間浸透させた以下の 4 群を比較検討した。培養期間の合計はいずれも同一である。

- I 群 通常培地でのみ培養
- II 群 骨形成培地で 24 時間浸透
- III 群 骨形成培地で 72 時間浸透
- IV 群 骨形成培地で 120 時間浸透

C. 研究結果

(1) 骨軟骨細胞増殖・分化に関わる担体の開発

ラット皮下に移植した、生分解性高分子性細胞担体はいずれも、分解にともなって強い炎症反応を惹起した。このような炎症反応は軽度であれば毛細血管網の誘導等で、組織再生に関して優位にはたらくことが期待される。実際に、毛細血管網の誘導が生じることを組織学的に明らかにした。しかし、極少数の幹細胞を播種して移植するような系では、強い炎症反応により移植した幹細胞が障害を受けることが懸念される。アルカリ処理により、ポリ乳酸、ポリグリコール酸および両者の共

重合体の表面を大きく親水化できることが明らかになったが、同時に表面の分解性も著しく増加し、より強い炎症反応が生じることが分かった。今後、アルカリ処理条件の最適化が必要である。

(2) 皮膚線維芽細胞シート作製法の開発

アテロコラーゲンフィルム上に、骨形質転換させた皮膚線維芽細胞シートを作製することに成功した。皮膚線維芽細胞を含む間葉系の細胞は、これまで細胞シートに用いられてきた上皮系あるいは筋肉の細胞と異なり、基質を多く産生しその中に埋入しているため、従来のコーティングでは剥離が困難であることが判明した。対処方として、薄いアテロコラーゲンフィルムを底に敷くことで、細胞シートを一塊として取り出すことができた。さらにこの細胞シートをマウス頭蓋部骨欠損モデルに移植したところ、術後 4 週で、骨再生が認められた。再生骨の長期経過については現在経過観察中である。

(3) 培養骨膜シートの作製法の開発

ラット頭頂骨骨膜より採取した骨膜細胞を酵素処理し初代培養に供した後、継代した 2 代目培養骨膜細胞を温度応答性培養皿に播種すると、コンフルエント到達後、低温処理のみで培養骨膜シートとして回収できる条件を確立した。細胞シート中に含まれる培養骨膜細胞をアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色すると、多数の ALP 陽性細胞が確認された。この観察は、本細胞シート内には骨芽細胞の分解時に必要なニッチェとしての条件を最低限有する細胞外マトリックス環境が培養の間に構築されていることを強く示唆している。ラットへの移植実験からは、本細胞シートは、生分解性高分子性担体のような強い炎症反応などの異物反応を惹起しない (少なくともきわめて軽微である) ことが明らかになっており、細胞シートを新規幹細胞担体として活用しうる可能性を強く示唆している。

骨形成培地に長く浸透するほど初期マーカーの発現が減少し、後期マーカーの発現が強くなることが明らかになった。一方、Runx2 と VEGF の発現には有意な差を認めなかった。

D. 考察

上皮系でない皮膚線維芽細胞のような場合でも、サポートとなる膜状物質を加えることで、細胞シートを回収できる可能性が示された。さらに、骨膜由来細胞シート内の細胞外マトリクスを単独で、あるいは生分解性高分子性担体と組み合わせて活用することにより、従来法ではえられなかった生体親和性が高く、幹細胞維持能を有する新規担体が開発しうることが示唆された。また、骨分化誘導培地との接触時間を十分に最適化する必要があることが示唆された。

E. 結論

アテロコラーゲンフィルム上に、骨形質転換皮膚線維芽細胞シートを作製することに成功し、細胞がその機能を維持していることが明らかとなった。また、骨膜由来細胞シートの新規担体としての有効性を期待しうることができた。

F. 健康危険情報

主任研究者が一括して報告。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Sekine, T. Shimizu, S. Kosaka, E. Kobayashi and T. Okano, "Cardiomyocyte bridging between hearts and bioengineered myocardial tissues with mesenchymal transition of mesothelial cells", *J. Heart Lung Transplant.*, **25**(3), 324-32(2006).
2. T. Shimizu, H. Sekine, Y. Isoi, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, "Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts engineered by the layering of cardiomyocyte sheets", *Tissue Eng.*, **12**(3), 499-507(2006).
3. M. Kanzaki, M. Yamato, H. Hatakeyama, C. Kohno, J. Yang, T. Umemoto, A. Kikuchi, T. Okano, and T. Onuki, "Tissue Engineered Epithelial Cell Sheets for the Creation of a Bioartificial Trachea", *Tissue Eng.*, **12**(5), 1275-1283(2006).
4. T. Ohki, M. Yamato, D. Murakami, R. Takagi, J. Yang, H. Namiki, T. Okano, K. Takasaki, "Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model", *Gut*. 2006 Dec, **55**(12):1704-1710. Epub 2006 May 18.
5. Kubota, K. Nishida, M. Yamato, J. Yang, A. Kikuchi, T. Okano and Y. Tano, "Transplantable retinal pigment epithelial cell sheets for tissue engineering", *Biomaterials*, Jul;**27**(19), 3639-44(2006).
6. Y. Haraguchi, T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, "Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation", *Biomaterials*, **27**(27), 4765-74(2006).
7. Y. Miyahara, N. Nagaya, M. Kataoka, B. Yanagawa, K. Tanaka, H. Hao, K. Ishino, H. Ishida, T. Shimizu, K. Kangawa, S. Sano, T. Okano, S. Kitamura and H. Mori, "Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction", *Nature Medicine*, **12**(4), 459-465(2006).
8. T. Shimizu, H. Sekine, J. Yang, Y. Isoi, M. Yamato, A. Kikuchi, E. Kobayashi and T. Okano, "Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues", *FASEB J.*, **20**(6), 708-710(2006).
9. H. Hatakeyama, A. Kikuchi, M. Yamato and T. Okano, "Bio-functionalized thermoresponsive interfaces facilitating cell adhesion and proliferation", *Biomaterials*, **27**(29), 5069-5078(2006)
10. T. Asano, R. Takazawa, M. Yamato, R. Takagi, Y. Imura, H. Masuda, K. Kihara and T. Okano, "Transplantation of an Autologous Mesothelial Cell Sheet Prepared from Tunica Vaginalis Prevents Post-Operative Adhesions in a Canine Model", *Tissue Eng.*, **12**(9), 2629-37 (2006).
11. D. Murakami, M. Yamato, K. Nishida, T.

- Ohki, R. Takagi, J. Yang, H. Namiki, T. Okano, "The effect of micropores in the surface of temperature-responsive culture inserts on the fabrication of transplantable canine oral mucosal epithelial cell sheets", *Biomaterials*, **27**, 5518-5523(2006).
12. D. Murakami, M. Yamato, K. Nishida, T. Ohki, R. Takagi, J. Yang, H. Namiki and T. Okano, "Fabrication of transplantable human oral mucosal epithelial cell sheets using temperature-responsive culture inserts without feeder layer cells", *J. Artif. Organs.*, **9**(3), 185-91 (2006).
2. 学会発表
1. 岡野光夫, "細胞シート工学" 第47回日本神経学会総会 東京 2006.05.11
2. 井坂珠子, 神崎正人, 大和雅之, 河野千夏, 関根秀一, 高木亮, 畠山英之, 岡野光夫, 大貫恭正, "気漏閉鎖後の肺,胸膜の組織学的,超微細形態の検討" 第23回日本呼吸器外科学会総会 東京 2006.05.25
3. 神崎正人, 大和雅之, 関根秀一, 河野千夏, 高木 亮, 井坂珠子, 菊池明彦, 岡野光夫, 大貫恭正, "細胞シート工学による胸膜の補強" 第23回日本呼吸器外科学会総会 東京 2006.05.25
4. 畠山英之, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, "細胞の機能発現を時空間制御しうるバイオ機能化温度応答性表面の創製と細胞シート工学への展開" 第27回日本炎症・再生医学会 東京 2006.07.11-12
5. 笹川忠, 清水達也, 関谷佐智子, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫, "細胞シート工学を用いた血管系導入型筋芽シートグラフの作製" 第27回日本炎症・再生医学会 東京 2006.07.11-12
6. 井坂珠子, 神崎正人, 大和雅之, 河野千夏, 関根秀一, 岡野光夫, 大貫恭正, "外科手術への皮膚繊維芽細胞シートの導入" 第27回日本炎症・再生医学会 東京 2006.07.11-12
7. 岡野光夫, "細胞シート工学と再生医療" 第22回日本DDS学会 東京 2006.07.08
8. 畠山英之, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫 "細胞の機能発現を時空間制御しうるバイオ機能化温度応答性表面の創製と細胞シート工学への展開" 第22回日本DDS学会 東京 2006.07.08
9. 大木岳志, 大和雅之, 岡野光夫, 高崎健, "細胞シート工学を用いた人工食道潰瘍再生医療への展望" 第61回日本消化器外科学会定期学術総会 横浜. パシフィコ 2006.07.13-15(14)
10. 畠山英之, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, "バイオ機能化パターン温度応答性表面の創製と組織再生への応用 ~細胞の機能発現を時空間制御しうる表面設計~"第35回医用高分子シンポジウム 東京 2006.08-01-02
11. N. Yaji, M. Yamato, M. Hiramoto, A. Kikuchi, H. Namiki, T. Okano and S. Hori, "Transplantaion of Tissue Engineered Retinal Pigment Epithelial Cell Sheets in a Rabbit Model" ARVO Annual Meeting 2006 Fort Lauderdale, USA 2006.05.01
12. R. Takagi, M. Yamato, A. Kushida, K. Nishida, J. Yang, M. Utsumi, C. Kohno, Y. Tano and T. Okano, "Profiling of Extracellular Matrix Molecules Expressed by Mouse Feeder Layer Cells Screened by Limbal Epithelial Cell Colony Forming Assay" ARVO Annual Meeting 2006 Fort Lauderdale, USA 2006.05.01
13. T. Umemoto, M. Yamato, J. Yang, K. Nishida and T. Okano "CDK Inhibitrns Regulate Quiescent State of Limbal Epithelial Side Population Cells" ARVO Annual Meeting 2006 Fort Lauderdale, USA 2006.05.01
14. T. Ohki, M. Yamato, D. Murakami, T. Okano and K. Takasaki, "Endoscopic Treatment of Esophageal Ulcerations Using Cultured Autologous Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets" Regenerate World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine2006 Pittsburgh, USA 2006.04.25-27(26)
15. T. Nozaki, M. Yamato, K. Nishida, C. Kohno, Y. Tano and T. Okano,

- “Subcutaneous regeneration of corneal epithelium by transplantation of cultured corneal epithelial cell sheets” Regenerate World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2006 Pittsburgh, USA 2006.04.25-27(26)
16. H. Sekine, T. Shimizu, M. Yamato, J. Yang, E. Kobayashi and T. Okano, “Pulsatile myocardial tubes fabricated with cell sheet engineering” Regenerate World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2006 Pittsburgh, USA 2006.04.25-27(26)
 17. K. Kano, M. Yamato and T. Okano, “Ectopic transplantation of liver cell sheets by cell sheet engineering” Regenerate World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2006 Pittsburgh, USA 2006.04.25-27(26)
 18. Y. Haraguchi, T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, “The electrophysiological analyses of layered cardiomyocyte sheets” Regenerate World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2006 Pittsburgh, USA 2006.04.25-27(26)
 19. T. Sasagawa, T. Shimizu, K. Sato, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Fujimoto, Y. Sawa, H. Matsuda and T. Okano, “A novel three-dimensional cell sheet manipulation technique: Fabrication of multi-layer human skeletal myoblast sheets for cardiac repair” Regenerate World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2006 Pittsburgh, USA 2006.04.25-27(26)
 20. D. Murakami, M. Yamato, T. Ohki, H. Namiki and T. Okano, “Preparation of transplantable canine oral mucosal epithelial cell sheets” Regenerate World Congress on Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2006 Pittsburgh, USA 2006.04.25-27(26)
 21. J. Kobayashi, K. Itoga, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, “Rapid prototyping of micropatterned cells by liquid-crystal-display projection method” Society for Biomaterials 2006 Annual Meeting Pittsburgh, USA 2006.04.26-29
 22. T. Okano, “Cell Sheets Tissue Engineering for Tissues and Organs” The third Tissue Engineering Symposium Tampere Finland 2006.05.03
 23. H. Sekine, T. Shimizu, M. Yamato, E. Kobayashi and T. Okano, “Bioengineered functional cardiac tube” Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting 2006 Rotterdam, The Netherlands 2006.10.08-11
 24. M. Kanzaki, M. Yamato, H. Sekine, J. Yang, C. Kohno, T. Okano and T. Onuki, “Dynamic living air leak sealants using tissue engineered cell sheets” Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting 2006 Rotterdam, The Netherlands 2006.10.08-11
 25. R. Sawada, T. Shimizu, K. Sakaguchi, K. Iwasaki, T. Okano, M. Umezu, “Novel perfusion bioreactor system increased the thickness of three-dimensional myocardial tissue bioengineered by cell sheet technology” Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting 2006 Rotterdam, The Netherlands 2006.10.08-11
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）
分担研究報告書

骨軟骨欠損モデルの作製とin vivo骨・軟骨再生法の開発③

分担研究者 川口 浩 東京大学大学院医学系研究科・整形外科 助教授

研究要旨

運動器骨・軟骨欠損小動物モデル（マウス、ラット）を作製し、長期自然経過を明らかにした。また、大動物関節軟骨欠損モデルの長期の自然経過を明らかにし、実験を行う場合の至適条件を明らかにした。

A. 研究目的

運動器骨・軟骨欠損モデルの確立を目指した。マウス・ラットの運動器臨界骨・軟骨欠損モデルの長期の自然経過と、実験を行う場合の至適条件を明らかにすることを試みた。次に、これら小動物の基礎データをもとに、臨床応用を視野に入れた大動物（イヌ）関節軟骨欠損モデルの確立を目指した。イヌに軟骨欠損モデルを作製し、その自然経過を追うことで実験を行う場合の至適条件を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

(1) 運動器骨・軟骨欠損小動物モデル

マウスおよびラットの四肢に臨界骨・軟骨欠損を作製し、放射線学的（X線写真、CT）に1、2、3週間、1、2、3、4、5、6ヶ月とフォローした。

- ① 臨界骨欠損モデルでは、マウス及びラット頸骨の中央部3分の1を切除した。
- ② 臨界軟骨欠損モデルでは、マウスおよびラットの膝関節軟骨に歯科用ドリルで直径2mmの円形の穴を全層または半層に穿ち、その時間経過を追った。

(2) 関節軟骨欠損大動物モデル（イヌ）

11ヶ月齢—2歳10ヶ月（平均1歳10ヶ月）の健常ビーグル犬の膝関節軟骨にドリルで円形の穴を全層または半層に穿ち、その時間経過を追った。

術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で軟骨欠損部のCT撮影を行った。（倫理面への配慮）

DNA組み換え実験、動物実験に関しては、各分担研究者の属する機関の組み換えDNA実験規則および、動物実験実施マニュアルに従って行った。

C. 研究結果

(1) 運動器骨・軟骨欠損小動物モデル

このモデルでは、放射線学的には6ヶ月経過しても明らかな治癒は認められなかった。

(2) 軟骨欠損大動物モデル（イヌ）

- ① このモデルでは、放射線学的には、6ヶ月経過しても明らかな治癒は認められなかった。
- ② このモデルでは、半層欠損モデルではマウス、ラットともに2ヶ月経過すると自然治癒が認められるが、全層欠損モデルでは6ヶ月経過しても永久軟骨による修復ではなく、線維性基質による一部修復が観察されたが、欠損部の陥没は残存したままであった。

D. 考察

モデルによっては完全な不可逆性欠損でないことがあるので、観察期間やコントロールに注意する必要がある。臨界骨欠損モデルでは、確実に自然骨修復はないものと思われるが、軟骨欠損モデルでは膝関節の軟骨の厚みがマウスでは約0.2-0.3mm、ラットでは約0.3-0.4mmと薄いので一定の厚みで半層軟骨欠損を作製するためには器具の開発や改善が不可欠であった。しかし、全層軟骨欠損は約1mmの厚みを持つ歯科用バーを用いるこ