

G-119 脱細胞化による新しい動脈グラフトの開発: プタ同種移植実験における石灰化軽減のための方策

国立循環器病センター研究所

湊谷 謙司, 藤里 俊哉, 吉田 謙一, 船本 誠一, 中谷 武嗣, 北村 惣一郎

【目的】我々は同種あるいは異種生体組織からドナー由来細胞を除去した, 脱細胞化生体スキャフォールドを用いた再生型移植組織の開発を行ってきた。これまで脱細胞した下行大動脈の同所同種移植を行ってきたが, スキャフォールドへの自己細胞の浸潤を認めるものの, 血管壁内部での石灰化の所見を認めた。石灰化の原因として脱細胞化過程の問題とスキャフォールドの壁厚が考えられた。そこで本報では, 1) 洗浄法を変えた脱細胞化処理2) 壁厚の薄い肺動脈を下行大動脈位に移植した実験について検討した。【方法】ドナーとなるクラウン系ミニプタから麻酔清潔下にて下行大動脈, 肺動脈を採取した。冷間等方圧加圧装置を用いた超高压印加処理を行い, 以前に使用していた界面活性剤を中止しエタノールを加えた洗浄処理を行うことでドナー由来細胞を除去した。処理後の組織を, 組織学的に観察することで脱細胞化を評価した。同種ミニプタをレシピエントとして用い, 左側臥位第4肋間開胸, 下行大動脈単純遮断下に, 脱細胞化した下行大動脈と肺動脈を移植した。移植3ヶ月後に移植組織を摘出し, 肉眼的, 組織学的に評価した。【結果】処理後の組織内では細胞核は全く染色されず, 血管内腔面では内皮細胞が完全に剥離していた。透過電顕の所見からも, 平滑筋細胞の細胞膜や小器官の消失, 核の変性が確認された。コラーゲン繊維及びエラスチン繊維には若干の走行の乱れが認められたが, 左心系である下行大動脈置換術においても破断等の所見は認められなかった。また細胞質のdebrisも以前の処理法に比べてほとんど認められなかった。摘出されたグラフトに肉眼的には異常は認められず, 吻合部にも問題は認められなかった。血管内腔面は, 内皮細胞で完全に覆われていた。また, 組織内には内腔側から平滑筋細胞の浸潤が認められた。以前の処理法では認められた石灰化は改善しており, 特に肺動脈の下行大動脈移植において, 著明に軽減していた。【結論】超高压処理による脱細胞化されたグラフトは有望である。洗浄処理を変え, スキャフォールドの壁厚を薄くしたことで, 石灰化を軽減せしめたと考える。

G-120 自己細胞を用いた血管再生治療における人工マトリックスの重要性

神奈川県立循環器呼吸器病センター心臓血管外科<sup>1)</sup>, 横浜市立大学医学部人工臓器科学<sup>2)</sup>, 藤沢市民病院心臓血管外科<sup>3)</sup>, 上白根病院循環器科<sup>4)</sup>

市川 由紀夫<sup>1)</sup>, 梶原 博一<sup>1)</sup>, 野・色 泰晴<sup>2)</sup>, 山崎 一也<sup>2)</sup>, 貞島 隆宏<sup>4)</sup>, 國井 佳文<sup>1)</sup>

【目的】生体では常に生理的に再生が行われ各臓器, 組織の機能が恒常的に維持され損傷部位は修復される。この自然治癒力を積極的に利用しようという再生医療が今日注目されている。機能不全に陥った動脈に対して, 本来細胞の持つ修復能力を誘導し血管を再生させその機能を回復させるには何か必要か, in vivoで自己細胞を用いた血管再生治療の結果から考察した。【方法】動脈閉塞疾患の患者自身の細胞を利用した2種類の異なる治療を行い比較した。1. 細切した自己皮下組織を繊維間隙にからませたポリエステル製人工血管を用いて動脈の下肢血行再建術を行い, 遠隔期に摘出した2本のグラフトで組織学的検討を行った。2. 下肢血行再建術が困難な閉塞性動脈疾患患者14例の虚血下肢に自己末梢血単核球を移植し移植前後の臨床症状, 最大歩行距離, 血管造影で検討した。【結果】1. 感染のため移植後4ヶ月に摘出されたgraft内面は光沢を有する白色の平滑な新生内膜で全長が覆われていた。内腔は吻合部付近だけでなくグラフト中央部にも認められ, グラフト吻合部付近にだけ内膜が被覆する通常のグラフトの内腔とはまったく異なっていた。表面に血栓の付着は認めなかった。閉塞のため移植後3ヶ月に摘出されたgraftでは繊維間隙から内面向かい高度の毛細血管新生を認め, さらに全周に弾性板を形成する中膜の再生を認めた。内膜の過形成はあったが人工血管を基材にした血管壁の再構築が認められた。2. 自己末梢血単核球を筋肉内に移植された患者は歩行距離, 歩行速度, 症状の軽快が認められたが, 血管造影で明らかな血管新生を認めなかった。【結論】自己細胞の筋肉への移植で臨床効果は得られたが, 血管造影で確認できるような明らかな血管新生を誘導することはできなかった。それに対して最適な人工血管の基材の検討は必要だが, 現存する材料でマトリックスを構築することで細胞の誘導が可能となり血管組織の再構築は可能になると考えられた。人工臓器をうまく利用し細胞を誘導することで血管組織を再構築でき自然治癒を誘導できる。これまで行われてきた経験では細胞の過形成を予防できず, 今後の細胞の制御をいかに行うかが重要な問題である。

## 超臨界流体下における生体由来組織からの細胞抽出

○寺田彦 (医療機器セ)・澤田和也 (大阪成蹊短大)・吉田謙一 (先端医療財団)・岸田晶夫 (東京医科歯科大)・藤里俊哉 (国立循環器病セ)・永谷憲哉 (国立循環器病セ)・中谷武嗣 (国立循環器病セ)・北村惣一郎 (国立循環器病セ)

Extraction of cell from biological tissue under supercritical fluid condition

Dohiko TERADA (JAAME) Kazuya SAWADA (Osaka Seikei College) Kenichi YOSHIDA (FBRI) Akio KISHIDA (Tokyo Med. Dent. Univ.) Toshiya FUJISATO, Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA (NCVC)

### 1. はじめに

生体内における欠損した組織を、動物由来の組織と置換し、移植後に自己組織化を図る技術が再生医療の一手段として活発に研究されている。この手法においては、移植免疫を抑えるため、動物由来の細胞を除去する(脱細胞化)が必要となる。現在、種々の脱細胞化手法が提案されているが、生体への安全性や細胞成分の完全除去については未だ多くの問題点が残されている。

本研究では、以前より従来の脱細胞化手法に代わる新たな脱細胞化手段として、超臨界流体(二酸化炭素およびフルオロホルム)抽出法の適応について検討進めてきた。これらの媒体は、常温・常圧で気体状態であることから、処理後に自然拡散し、組織内に残存することはない。従って、化学物質の組織内残存を無視することが可能になり、移植における組織片のレシピエントに対する安全性も大きく向上することが期待出来る。さらに、超臨界流体は従来の脱細胞化媒体である液体と比較し、拡散係数が極めて大きく、逆に粘度は低い。その結果、組織内部への媒体の到達が容易となり、処理速度の大幅な短縮も期待される。

本発表では、二酸化炭素系または、フルオロホルム系へ必要に応じエントレーナを共存させ、処理条件を変化させた場合の脱細胞化効果について検討した結果について報告する。

### 2. 実験方法

生体由来試料として用いた組織は、ブタ大動脈((株)ジャパンファーム)である。脱細胞化評価は、移植後の免疫反応や石灰化と密接に関連すると考えられる、細胞核およびリン脂質の残存により評価した。細胞核残存は組織染色法により行い、組織内残存リン脂質の評価は既報[1]に準じて化学分析を行った。超臨界流体処理は、定容高压容器を用い、振とう条件下にて所定の圧力・温度で行った。処理はバッチ形式および定流量のフロー形式で行い、必要に応じエントレーナとして、エタノールを所定量共存させた。

### 3. 結果と考察

超臨界二酸化炭素を単独で媒体として用い検討を行った結果、系の温度や圧力を変化させて行った場合でも、細胞の除去は確認されなかった。そこで、系の極性を上げるため、反応容器中の超臨界二酸化炭素に飽和溶解可能な量のエタノールを共存させ同様の検討を行った。処理後、脱細胞化を確認するため、HE染色により評価を行ったところ、細胞核は染色されなかった。本来何れの媒体にも溶解しない細胞核が、混合流体にすることにより溶解可能な誘電率に達し、溶解したことは興味深い。さらに特筆すべきは、処理時間の短縮であり、僅か15分の処理で細胞核の染色が見られなかった。高い拡散性を有する混合流体が組織内部へ素早く浸透した結果と考えられる。そこで、脱細胞化評価のもう一つの指標である、細胞膜リン脂質の評価も合わせて行った結果、細胞核の除去と同様、短時間で組織内リン脂質量が低下することも確認された。しかしながら、現段階ではフロー形式にて行った場合でも、完全にリン脂質を除去するには至らなかった。

そこで、処理後の降圧条件を変化させて同様に検討を行った結果を図1に示す。図の結果は、組織内部からの抽出物のマイグレーションが、圧力変化に伴う溶媒力の変化に大きく影響を受けることを示唆している。

本発表では、種々の処理パラメータと脱細胞化効果との関連について詳細に発表する。

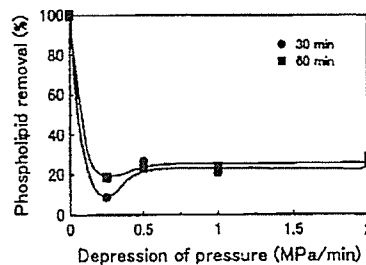


Fig. 1 Variation of residual phospholipids in tissue as a function of depression of pressure

### 参考文献

- [1] 澤田和也ら、平成17年度繊維学会秋季研究発表

## A208 バイオリアクターを用いた血管 scaffold への細胞播種

### Cell seeding onto vessel scaffold using bioreactor

○学 戸川 祐一 (関西大), 江橋 具 (国立循環器病センター),  
吉田 謙一 (先端医療振興財団), 藤里 俊哉 (国立循環器病センター),  
正 大場 謙吉 (関西大), 中谷 武嗣 (国立循環器病センター)

Yuichi TOGAWA, Kansai University, 3-3-35, Yamate-cho, Suita-shi, Osaka

Tomo EHASHI, National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishiro-dai, Suita, Osaka

Ken'ichi YOSHIDA, Foundation for Biomedical Research and Innovation, 2-2, Minatojima Minamimachi  
Chuo-ku, Kobe, Hyogo

Toshia FUJISATO, National Cardiovascular Center, Kenkichi OBA, Kansai University,

Takeshi NAKATANI, National Cardiovascular Center

#### 1. 緒言

心停止者から提供された凍結保存心臓弁は、機械弁に比べ抗血栓性で、異種生体弁に比べ耐久性で、さらに両者に比べて抗感染性で長所を持っているとされる。しかしながら、特に若年者に用いた同種弁は、導管部分の狭窄や石灰化を特徴とする変化によって、比較的早く機能不全を起こすことも報告されている。そこで、我々は凍結保存同種弁から提供者由来の細胞成分や抗原性部位を除去し、コラーゲン線維や弾性繊維、基底膜などの構造マトリックスのみを用いた再生医療用心臓弁組織の開発を行っている。この心臓弁組織ヘレシビエントの自己細胞を組み込むことで、自己修復能や成長性を有する組織工学弁が創製できると期待できる。本報告では、弁組織に比べ、構造が単純である脱細胞化血管 scaffold への血管内皮細胞の播種について検討するとともに、循環型バイオリアクターによる培養についても検討した。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 脱細胞化 scaffold

クラウン系ミニプタ (ジャパンファーム) から大動脈を摘出し、超高静水圧印加処理 (神戸製鋼) を行い、生理食塩水ベースの洗浄液処理にてドナー細胞を除去した組織を scaffold として用いた。

##### 2.2 細胞培養

本実験ではヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。培養には EBM (Endothelial Cell Basal Medium-2) に 2 % FBS および添加因子を加えた培養液を用いた。

##### 2.3 血管 scaffold への細胞播種・培養

アクリルで作製したモジュール内に細胞懸濁液と血管 scaffold を入れ密閉し、図 1 に示した回転型バイオリアクターを用いて、4 時間、縦回転と横回転を同時に行うことで HUVEC を血管 scaffold 表面に播種した。その後、細胞を播種した scaffold を、ガス交換能を有するカルチャーバッグに入れ、1 日間静置状態で培養し、さらに図 2 に示す閉鎖回路を用いた循環型バイオリアクターで培養を継続した。この時、scaffold を二つに切り、循環培養と静置培

養の 2 種類の培養方法の比較をおこなった。循環型バイオリアクターはローラーポンプを使用しており、流速は  $9.95 \times 10^{-3}$  [m/s]、培地量は 300 ml で実験を行った。

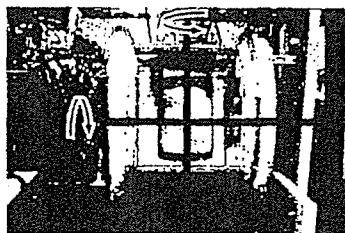


Figure 1. Image of Rotating bioreactor.

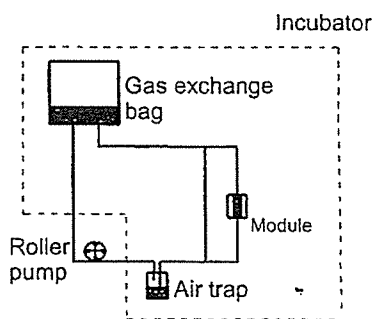


Figure 2. Schematic diagram of Circulation bioreactor.

##### 2.4 評価方法

血管 scaffold 表面の細胞をトルイジンブルー染色し、実体顕微鏡で観察した。

Calcein-AM と PI (Propidium Iodide) で生細胞と死細胞を同時に染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて血管 scaffold 表面の細胞が生存しているかの確認を行った。

### 3. 結果と考察

図3に1日間静置培養した後の血管 scaffold 内壁表面のトルイジンブルー染色画像を示す。HUVEC を播種した血管 scaffold を1日間静置培養することで、血管 scaffold 内壁に HUVEC を付着させることができた。

図4は静置培養1日間、循環培養2日間行ったトルイジンブルー染色画像で、図5は静置培養3日間行ったトルイジンブルー染色画像である。循環培養したもの、静置培養しか行わなかったもの、共に Scaffold 表面が HUVEC により、しっかりと覆われていることが分かる。また、図6、7は Calcein-AM と PI (Propidium Iodide) で生細胞と死細胞を同時に染色した画像で、図6は静置培養1日間、循環培養2日間行ったもの、図7は静置培養3日間行ったものである。図6と図7を比較すると、循環培養2日間行ったものは若干ではあるが、静置培養よりも HUVEC が伸展しているように見える。これは培地を循環させることにより生じた流れにより細胞に剪断応力がかかり、HUVEC が伸展したと考えられる。今後、長期間の培養を行い、剪断応力による内皮細胞の形態変化等についてさらに検討を進めていくことを考えている。

### 4 結論

超高静水圧印加処理と洗浄液による洗浄で脱細胞化した scaffold に HUVEC を播種・培養することができた。さらに循環型バイオリアクターを用いて、HUVEC に剪断応力を与えながら2日間培養すると、HUVEC に伸展が見られた。

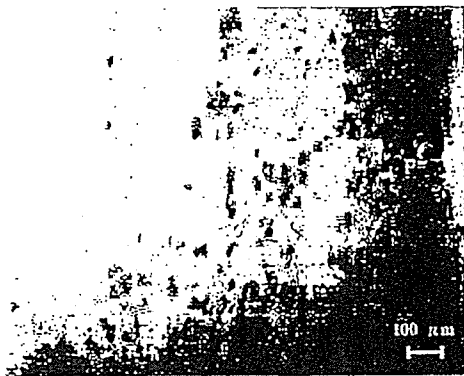


Figure 3. The inner surface of acellular aorta after static culture.

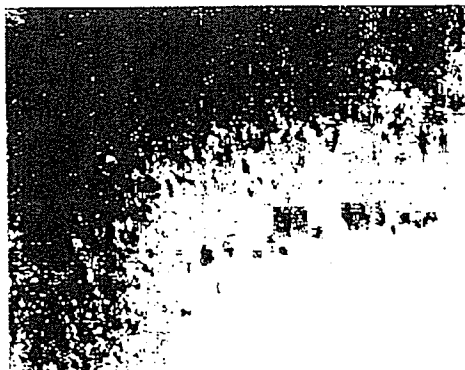


Figure 4. The inner surface of acellular aorta after 2days circulation culture.

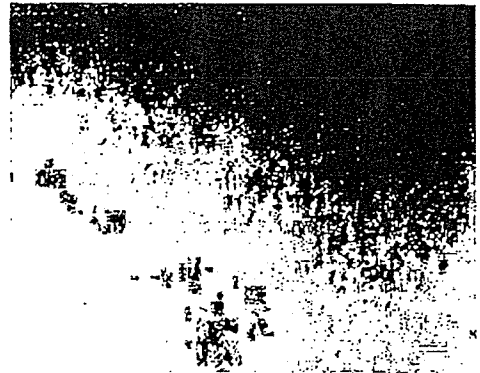


Figure 5. The inner surface of acellular aorta after 3days static culture.



Figure 6. Confocal laser scanning microscopy of the inner surface of acellular aorta after 2days circulation culture.



Figure 7. Confocal laser scanning microscopy of the inner surface of acellular aorta after 3days static culture.

## 再生骨格筋作製を目的とした間葉系幹細胞の伸長培養

○江橋 具<sup>1</sup>, 鎌田和加子<sup>1</sup>, 船本誠一<sup>2</sup>, 吉田謙一<sup>3</sup>,  
岸田晶夫<sup>2</sup>, 永谷憲歳<sup>1</sup>, 中谷武嗣<sup>4</sup>, 藤里俊哉<sup>1</sup>

1; 国立循環器病センター研究所 再生医療部

2; 東京医科歯科大学, 3; 先端医療振興財団

4; 国立循環器病センター 臓器移植部

### 1. 緒言

腫瘍切除や事故などによる筋組織の損失部分の補填、あるいは筋ジストロフィー症などの筋疾患を治療するために、自家筋組織の移植や細胞移植が行われている。しかし、これらの移植による治療法は、患者自身の筋組織から採取するために、患者の QOL の著しい低下が伴う。また、細胞移植では細胞の患者組織内への生着率が低いために効率が悪いことや、近年、心筋の治療などに盛ん研究されている細胞シートでも、大きく厚みのある筋組織を補填するには限界があると考えられる。

そこで本研究は筋組織治療用筋移植片を生体外にて作製することを目的として、骨髄由来間葉系幹細胞の、脱細胞化筋スキャフォールドを用いた三次元培養を行い、このとき細胞に伸長刺激を与えることによる、細胞の増殖や分化への影響について調べた。

### 2. 実験

三次元培養のための細胞の足場となるスキャフォールドは、ミニブタ大腿部骨格筋から作製した。骨格筋は 20 x 10 x 3 mm に薄切したのち、超高静水圧印加処理 (980 MPa, 10 min) と洗浄工程により脱細胞化して、スキャフォールドとした。細胞は、ラット骨髄から取得した間葉系幹細胞を単層培養して増幅させたものを剥離し、遠心操作 (100 x g, 1 min, 6 times) によりスキャフォールドに播種した。細胞播種後 3 日間の静置培養を行うことにより細胞をスキャフォールドに生着させてからスキャフォールドを伸長させた伸長培養と、対照として通常のディッシュによる単層培養、スキャフォールドによる三次元培養で伸長刺激を行わない静置培養を行った。培養 2 週間後の細胞の形態観察や筋細胞の分化マーカーの発現を調べることにより、三次元培養や伸長刺激が、間葉系幹細胞の増殖や分化に及ぼす影響について検討した。

### 3. 結果と考察

超高静水圧印加処理により作製した脱細胞化筋スキャフォールドは、HE 染色による形態学的観察や DNA 量の測定により、良好に脱核されているのが確認された。遠心操作による細胞の播種後 1 日の HE 染色から、細胞はスキャフォールド内の筋細胞であった部分よりも、結合組織などが存在していたと考えられる部分に侵入し、スキャフォールド表面から 100 μm 付近の深い部分にも存在していることがわかった。静置培養 3 日間の細胞生着期間後、伸長培養と、対照としての静置培養を行ったところ、そのまま静置培養を継続した場合は細胞がスキャフォールド骨格の中で丸い形状のまま存在していたものの、3 日間伸長培養をした後には伸長方向と平行な方向に細胞が伸展しているのが観察された。

これらの結果から、スキャフォールドを用いる三次元培養において伸長刺激が、間葉系幹細胞の分化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。



Fig. MSCs inoculated in decellularized muscle scaffold showed extended shapes after three days of elongation culture.

Elongation culture of MSCs for skeletal muscle regeneration in vitro

Tomo EHASHI, Wakako KAMATA, Seiichi FUNAMOTO, Ken'ichi YOSHIDA, Akio KISHIDA,

Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI, Toshia FUJISATO

Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering

National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka

Tel: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5496, E-mail: ehashi@ri.ncvc.go.jp

## 生体組織内コラーゲン構造を利用したバイオスキャフォールドの開発

○ 寺田堂彦<sup>1,2</sup>・澤田和也<sup>3</sup>・緒方裕之<sup>1</sup>  
 吉田謙一<sup>4</sup>・船本誠一<sup>5</sup>・藤里俊哉<sup>1</sup>  
 岸田晶夫<sup>5</sup>・永谷憲歳<sup>1</sup>・中谷武嗣<sup>1</sup>

1. 国立循環器病センター、2. 医療機器センター  
 3. 大阪成蹊短期大学、4. 先端医療振興財団  
 5. 東京医科歯科大学

## 1. 緒言

現在、臨床において人工血管は年間約5万本が使用され、事実上完成段階にある。しかしながら、その成長性の欠如から、小児患者では成長に合わせた再移植が必要であるなどの問題点は残されたままであるため、再生型人工血管の開発が望まれる。血管組織再生のためには細胞の足場(スキャフォールド)が必要不可欠である。スキャフォールドにはポリマーなどの人工材料からなるものと、生体組織からなるバイオスキャフォールドとがあり、我々はこれまで再生型バイオスキャフォールドに関する研究開発を行ってきた。バイオスキャフォールドの利点として、生体適合性、生体吸収性、柔軟性などが挙げられるが、一方で石灰化などに因る狭窄、破断、機能不全などの不具合も認められる。石灰化の機序は未だ不明であるが、移植用組織内に残留している細胞残渣と同様に、エラスチンもカルシウム沈着の起点であると考えられている。つまり、脱細胞化と同時に、脱エラスチン化されたバイオスキャフォールドは非石灰化性を有することが期待される。そこで、生体血管組織の脱エラスチン化手法を開発し、大動物実験により石灰化抑制効果についての検討を行った。

## 2. 実験

血管組織試料としてブタ大動脈(株ジャパンファーム)を用いた。120 °C、24時間の熱脱水架橋(Dehydrothermal treatment, DHT)を施した血管組織に対し、エラスターゼ/トリス緩衝液(elastase 0.57 µg/ml; CaCl<sub>2</sub>, 10 mM; NaN<sub>3</sub>, 0.02%; pH 8)中に浸漬し、37 °Cで72時間振盪処理することによってエラスチンを分解除去した。その後、80 v%エタノールに浸漬し37 °Cで72時間振盪処理することによってリン脂質を抽出除去した。作製された試料に対し、組織学的観察、引張試験、DNA定量、リン脂質定量、コラゲナーゼ分解性試験、ラット皮下およびミニブタ同所性への移植実験を行なった。

## 3. 結果

DHT処理によってタンパク質は安定化するが、酵素的手法によって血管組織からエラスチンは完全に除去され、コラーゲン構造のみが残存した血管構造体を得ることが出来た。エラスチンの分解に伴って力学特性は低下するが、適度に架橋されたコラーゲンが残存することで、血管組織として必要な力学特性を保持することが可能であった。得られた組織のラット皮下移植実験を行い、移植後12週で取り出して組織内Ca量を原子吸光度法で定量したところ、Ca沈着は認められなかった。

ミニブタ下行大動脈より作製した脱エラスチン化組織の同種同所性移植を行い、移植後3ヶ月で取り出したところ、コッサ染色で石灰化は認められなかった。α-SMA、ビメンチン染色により、移植組織内にはレシピエント由来の平滑筋細胞および線維芽細胞が数多く浸潤していることを確認した。しかしながら、若干の内膜の肥厚化が確認された。

本手法により作製されたスキャフォールドは、移植後3ヶ月までに血管壁内の自己細胞化はほぼ達成された。自己細胞化に引き続き、コラーゲンなどの構造タンパクも新たに産生され、徐々に自己組織化されていくことが期待される。今後さらに長期経過を観察する必要はあるが、自己血管組織再生のための非石灰化性バイオスキャフォールドを作製出来る可能性が示唆された。

Development of a bioscaffold composed of original collagenous structure in a biological tissue.  
 Dohiko TERADA<sup>1,2</sup>, Kazuya SAWADA<sup>3</sup>, Hiroyuki OGATA<sup>1</sup>, Ken'ichi YOSHIDA<sup>4</sup>, Seiichi FUNAMOTO  
 Toshia FUJISATO<sup>1</sup>, Akio KISHIDA<sup>5</sup>, Noritoshi NAGAYA<sup>1</sup>, and Takeshi NAKATANI<sup>1</sup>

1 Department of Regenerative Medicine and Tissue engineering, National Cardiovascular Center  
 Research Institute, 2 JAAME, 3 Osaka Seikei College, 4 FBRI, 5 Tokyo Med Dent Univ  
 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita city Osaka 565-8565, Japan

Tel: +81-6-6833-5004(ext. 2362) Fax: +81-6835-5496 E-mail: terada@ri.ncvc.go.jp

## バイオサーファクタントを用いた生体由来 スキャフォールド調製

- 澤田和也 (大阪成蹊短期大学)、寺田堂彦 (医療機器センター)、  
江橋 具 (国立循環器病センター)、吉田謙一 (先端医療振興財団)、  
船本誠一 (東京医科歯科大学)、岸田晶夫 (東京医科歯科大学)、  
藤里俊哉、永谷憲歳、中谷武嗣、北村惣一郎 (国立循環器病センタ  
ー)

### 1. 緒言

欠損した生体組織を動物由来組織と置換し、自己組織化を図る再生医療技術の開発が近年注目されている。生体由来組織は、高分子合成により作成された人工組織に比べ、組織の複雑な形状を保持できることに加え、継続した耐久性を期待出来るなどの利点が多い。一方、生体由来組織を用いる場合、免疫反応を抑えるためにドナー由来の細胞を除去する(脱細胞)ことが必要となる。従来までの主な脱細胞化技術として、細胞毒性を有する合成界面活性剤や化学薬剤を用いた処理が挙げられる。しかし、それらの組織内残存や組織の硬化等の問題が残されている。本研究では、有害な薬剤を用いない新たな脱細胞化手法として、植物由来のバイオサーファクタントを用いて脱細胞化を行った。さらに、脱細胞化組織の生体への安全性を評価するため、ラットへの移植実験を行った。

### 2. 実験

試料として用いた組織は、清潔下に摘出したブタ大動脈((株) ジャパンファーム)である。脱細胞化剤として、リグニンスルホン酸塩(キシダ化学(株))を用い、所定濃度の水溶液を滅菌後使用した。脱細胞化は、ブタ組織をリグニン水溶液に所定期間浸漬することにより行った。脱細胞化評価は、組織染色およびDNAの直接定量により評価した。脱細胞化組織の生体への安全性および石灰化度を評価するため、ラットへの皮下移植を行い、所定期間後に摘出し免疫反応および石灰化度を評価した。免疫反応は組織染色により、石灰化度は組織染色および原子吸光分析法を併用して行った。

### 3. 結果と考察

脱細胞処理を行なうにあたり、リグニンが有する細胞毒性を予め評価した結果、本検討で用いる濃度範囲においては、細胞への毒性は検出されなかった。そこで、ブタより摘出した組織を清潔下にて2週間リグニン水溶液に浸漬を行ったところ、HE染色による細胞核の染色は見られなかった。また、DNAの直接定量も合わせて行った結果、HE染色の結果と同様に脱核化が達成されていることが分かった。そこで、脱細胞化された組織を用い、最長12週間のラットへの皮下移植を行った。図1はその結果の一例であり、組織の石灰化を評価するため、12週間後に摘出した組織の von Kossa 染色結果である。図から明らかなように、上段のコントロールは明らかな石灰化が認められた。一方、下段に示したように、リグニンにより脱細胞化を行った組織には石灰化が見られず、同法により脱細胞化の達成だけでなく、石灰化抑制効果があることも明らかとなった。本発表では、その他免疫反応の結果を含め、バイオサーファクタントを用いた脱細胞化の可能性について発表する。

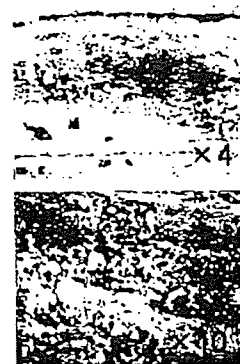


Fig.1 Microscopic images of von Kossa stain  
Samples were isolated from rat after 12 weeks implantation  
upper: control, lower: lignin

#### Preparation of bio-scaffold utilizing bio-surfactant

Kazuya SAWADA, Dohiko TERADA, Tomo EHASHI, Kenichi YOSHIDA, Seiichi FUNAMOTO, Akio KISHIDA, Toshiya FUJISATO, Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA  
Department of Integrated Life, Osaka Seikei college, 3-10-62 Higashiyodogawa-ku Aikawa, Osaka  
533-0007, Japan

Tel:+81-6-6829-2561, FAX:+81-6-6829-2561, E-mail: sawada-k@osaka-seikei.ac.jp

## 超高压誘起 PVA/DNA 遺伝子ベクターへの無機塩付加による 遺伝子導入促進

○木村剛<sup>1)</sup>・小粥康充<sup>2)</sup>・岡田正弘<sup>3)</sup>・古菌勉<sup>3)</sup>・  
六雄伸悟<sup>4)</sup>・吉澤秀和<sup>4)</sup>・藤里俊哉<sup>5)</sup>・岸田晶夫<sup>1)</sup>

1) 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、2) 科学技術振興機構 研究成果活用プラザ大阪 古菌プロジェクト、3) 国立循環器病センター研究所 生体工学部、4) 岡山大学、環境理工学部、5) 国立循環器病センター研究所 再生医療部

### 1. 緒言

エンドサイトーシス経路を介する非ウイルス遺伝子デリバリーでは、エンドソームから細胞質への移行が重要となる。これまで、エンドソームの酸性化をトリガーとし、エンドソーム膜を破壊する遺伝子ベクターの分子設計が行われてきた。膜破壊性のカチオン性両親媒ペプチド、ヒスチジン含有ペプチド、あるいは、プロトスポンジ効果を誘導するカチオン性ポリマーなどである。遺伝子導入促進は達成されているが、そのカチオン性に由来する細胞傷害性が問題として残る。一方、リン酸カルシウムなどの無機塩と DNA との共沈殿物がエンドソームの酸性下で溶解され、エンドソームからの遺伝子の遊離が報告されているが、その再現性、安定性は低い。我々は、細胞障害性の低減を目的に、非電荷ポリマーであるポリビニルアルコール (PVA) を用い、超高压印加法にて誘起される PVA/DNA 複合体の遺伝子ベクターとしての応用を検討している。細胞内導入は達成されるが、有意な遺伝子発現は認められなかった。本研究では、PVA/DNA 複合体への無機塩の付加による遺伝子導入促進について検討した。

### 2. 実験

無機塩として、ハイドロキシアパタイト (HAp) を用いた。改良型マイクロエマルジョン法により、形状および酸溶解性の異なる HAp を調製した。HAp 濃度、分散処理条件の最適化を行い、超高压処理装置 ((株)神戸製鋼所) を用いて 37°C、10,000 atm の超高压処理を施し、HAp 含有 PVA/DNA 複合体を得た。得られた複合体の物性を光学・電子顕微鏡観察、DSC 測定にて解析した。蛍光ラベル化プラスミド DNA を用いて、COS7 細胞への遺伝子導入・発現を検討した。

### 3. 結果と考察

所定濃度の PVA 水溶液に HAp を添加し、超音波処理により高分散溶液を得た。DNA 溶液を混合し、超高压印加処理を施した。SEM 観察では、PVA/DNA 複合体に比べ、HAp を混合した複合体の表面での凹凸が観察され、PVA/DNA 複合体への HAp の含有が明らかとなった。また、得られた HAp 含有 PVA/DNA 複合体溶液の pH 滴定により、HAp の酸溶解性が確認された。蛍光ラベル化 DNA を用いて細胞内導入について検討した結果、HAp 含有 PVA/DNA 複合体の有意な細胞内導入が示された。HAp 含有による有意な遺伝子発現が示されたが、市販の遺伝子導入剤に比して低く、更なる改善が必要である。本研究は、厚生労働省科学研究補助金の助成を受けて行われた。

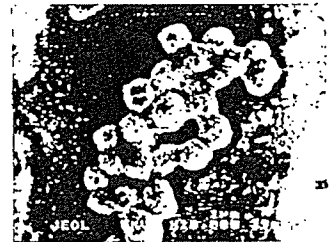


Fig. SEM image of PVA/DNA complexes containing HAp.

## Enhancement of gene transfection using PVA/DNA complex containing inorganic salts formed by ultra high pressure treatment

Tsuyoshi KIMURA<sup>1)</sup>, Yasumichi KOGAI<sup>2)</sup>, Masahiro OKADA<sup>3)</sup>, Tsutomu FURUZONO<sup>3)</sup>, Shingo MUTSUO<sup>4)</sup>, Hidekazu YOSHIZAWA<sup>4)</sup>, Toshiya FUJISATO<sup>5)</sup> and Akio KISHIDA<sup>1)</sup>

1) Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku Tokyo 101-0062, Japan

2) 1Innovation Plaza Osaka, Japan Science and Technology Agency, Osaka, Japan.

3) Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute

4) Department of Material and Energy Science, Okayama University

5) Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,

National Cardiovascular Center Research Institute

Tel: +81-3-5280-8028, Fax: +81-3-5280-8028, E-mail: Kishida.fm@tmd.ac.jp



## 超高压印加法を用いた脱細胞化角膜の作製と物性解析

○橋本良秀<sup>1)</sup>、船本誠一<sup>1)</sup>、木村剛<sup>1)</sup>、  
藤里俊哉<sup>2)</sup>、小林尚俊<sup>1)3)</sup>、岸田晶夫<sup>1)</sup>

1) 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、2) 国立循環器病センター研究所 再生医療部、3) 物質・材料研究機構 生体材料センター

## 1. 緒言

近年、角膜移植技術の向上によりその成功率は90%を超えるが、圧倒的なドナー不足が大きな問題である。この問題に対して、種々の人工角膜の開発が行われているが、移植後の感染や脱落などの課題が残っている。一方、異種組織から細胞を除去し、残存する基材を移植組織として用いる方法が検討されている。これまで我々は、脱細胞化法として、超高压印加により細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣を除去する超高压印加法を考案した。本手法では、細胞残渣の除去による免疫反応の抑制と生体の微小構造の保持による適合性の向上が期待できる。本研究では、超高压脱細胞化法による脱細胞化角膜の調製とその物性解析を行ない、角膜移植片としての可能性を検討した。また、一般的な脱細胞法である界面活性剤を用いた脱細胞化角膜の調整についても比較検討した。

## 2. 実験

生体ブタ眼球を購入し、角膜全層を摘出した。界面活性剤としては、TritonX-100、SDSを用いた。それぞれの1%溶液に角膜を浸漬し、37°Cにて24時間インキュベートした。PBSにて24時間洗浄後、ヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色標本作製し、脱細胞化を評価した。一方、冷間等方圧加圧装置((株)神戸製鋼所)を用いて、種々の温度で4,000あるいは10,000気圧にて10分間の圧力印加を施した。その後、培養液に浸漬し、3日間振盪することで細胞成分の残渣を除去した。得られた脱細胞化角膜標本の組織断面をH-E染色により顕微鏡観察し、脱細胞化を評価した。圧縮試験により力学的物性評価を行った。

## 3. 結果と考察

TritonX-100による脱細胞化では、若干膨張した半透明な角膜が得られた。H-E染色標本観察では、コラーゲン構造の配向は保たれているものの、多数の細胞核が観察され、脱細胞化されていなかった。SDSでは、角膜の円周部の溶解と中央部での有意な膨張、白濁が見られた。また、不完全な脱細胞化とコラーゲン繊維の切断および配向の乱れがH-E染色標本観察で示された。これらの結果より、角膜の脱細胞化においては、界面活性剤の利用は不適であると言える。

超高压処理法による角膜の脱細胞化では、圧力の上昇により透明性は低下し、10,000気圧では白濁した角膜が得られた。圧力印加直後の角膜の膨張は認められず、3日間の洗浄後に約2倍膨張した。H-E染色により、完全な細胞除去が示され、また、コラーゲン繊維の配向は比較的保存されていた。白濁した脱細胞化角膜をグリセロールに浸漬した結果、透明性は回復された。圧縮試験でも、超高压処理による弾性率変化が示されたが、グリセロール浸漬により弾性率は回復し、未処理の角膜に類似した物性が示された。角膜では、細胞による浸透圧調整により透明性が保持されており、上記の結果は、脱細胞化角膜への細胞生着がなされることで、透明性が得られる可能性を示唆している。本研究は、文部科学省科学技術振興調整費の補助を受けて行われた。

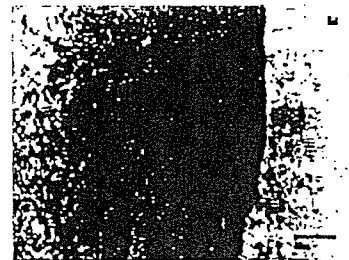


Fig. H-E staining of the decellularized cornea by ultra high pressurization

Preparation of the decellularized cornea by ultra high pressure treatment  
Yoshihide HASHIMOTO<sup>1)</sup>, Seiichi FUNAMOTO<sup>1)</sup>, Tsuyoshi KIMURA<sup>1)</sup>, Toshiya Fujisato<sup>2)</sup>, Hisatoshi KOBAYASHI<sup>1) 3)</sup> and Akio KISHIDA<sup>1)</sup>

1) Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,  
2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku Tokyo 101-0062, Japan

2) Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,  
National Cardiovascular Center Research Institute

3) Biomaterials Center, National Institute for Materials Science

Tel: +81-3-5280-8028, Fax: +81-3-5280-8028, E-mail: Kishida\_fm@tmd.ac.jp

## 高圧印加処理による脱細胞化組織を用いた、 膝関節再建術用の新しい Scaffold の検討

○ 山田康貴<sup>1,5</sup>、木村剛<sup>2</sup>、藤里俊哉<sup>3</sup>、坂根正孝<sup>4</sup>  
宮川俊平<sup>5</sup>、岸田晶夫<sup>2</sup>、植村寿公<sup>1</sup>

- 1 産業技術総合研究所 ナノテクノロジー研究部門  
ナノバイオ・メディカルテクノロジーグループ  
2 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所  
3 国立循環器病センター研究所 先端医工学センター 再生医療部  
4 筑波大学 臨床医学系 整形外科  
5 筑波大学大学院博士課程 人間総合科学研究科 スポーツ医学専攻

### 1. 緒言

膝関節の再建術には一般に自己の組織を用いる自家移植が多く用いられている。しかし、自家移植には、採取部の侵襲性や移植組織として用いる事のできる量に限界があるなどの問題点がある。一方、異種移植は移植後の拒絶反応や感染が問題となっている。近年、異種移植に用いる組織を脱細胞化し、拒絶反応や感染の可能性を無くした移植組織として用いる研究が行われている。我々は高圧印加処理を用いて脱細胞化した膝関節組織の再建術用の新しい scaffold としての可能性を検討した。

### 2. 実験

ブタ後肢から膝蓋骨-膝蓋靭帯-脛骨の複合組織、腱、半月板を採取し、高圧印加処理を行い、脱細胞化を行った。組織学的評価に用いる組織は4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を行った。生化学的評価に用いる組織は、直ちに凍結乾燥させDNA定量を行った。また、高圧印加処理による腱実質物性の評価として、ラット尾より採取した腱を用いて力学的、組織学的評価を行った。Wisterラット尾より腱を採取し、高圧印加処理を行い、引っ張り試験機を用いて力学的強度を測定した。コントロール群として、高圧印加処理を行わない正常の腱を用いた。また、高圧印加処理後の腱を透過型電子顕微鏡(TEM)にて観察を行った。

### 3. 結果と考察

ブタの組織を用いたH-E染色より、高圧印加処理によって膝蓋骨-膝蓋靭帯-脛骨の複合組織、腱、半月板の組織より細胞が除去されていることが明らかになった。(図1)また、DNA定量の結果から正常の組織と比べてDNAが有意に減少していた。



図1：脱細胞化した膝蓋骨

ラットの尾の腱を用いた力学試験では、破断応力が高圧印加処理を行った群の方が処理を行わない正常の腱に比べて有意に高くなった。また、TEMでは高圧印加処理群では核の断片化が観察された。

高圧印加処理によって膝関節を構成する主要組織を脱細胞化が可能であった。また、高圧印加処理を行うことにより、力学的強度が増加することが明らかになった。再生用のスキャホルドとして有用であると考えられる。

Yasutaka YAMADA, Tsuyoshi KIMURA, Toshiya FUJISATO, Masataka SAKANE, Shumpei MIYAKAWA, Akio KISHIDA, Toshimasa UEMURA  
Nanotechnology Research Institute (NRI), Nano-biomedical Technology Group, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8562, Japan  
TEL: +81-29-861-2559 FAX: +81-29-861-2789 yasutaka-yamada@aist.go.jp

## 一般演題抄録

### 1-1 Regenerative small-diameter vascular graft using acellular tissue

Wang Liming, Toshia Fujisato, Dohiko Terada, Takeshi Nakatani

Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,  
National Cardiovascular Center Research Institute

**Background and aim** Although many efforts have been made to generate small-diameter (<6mm) vascular grafts by means of tissue engineering, improvement in patency and functionality still remains a great challenge. We have developed cold isostatic pressing (CIP) method to decellularize porcine aortas and pulmonary arteries for acellular vascular scaffolds. The scaffolds transplanted into the allogeneic miniature pigs have showed good cell repopulation after 6 months. In this experiment, this method was applied to small-diameter vascular grafts harvested from rats.

**Method** Syngenic male SD rats were used as donors of vascular grafts. Under anesthesia, the abdominal and thoracic aortas were exposed and harvested. The abdominal aortas were packed in sterile bags filled with PBS and treated by ultrahigh pressure of 980 MPa at 10°C using a CIP apparatus (Kobe steel LTD, Kobe, Japan) for 10 min. They were then rinsed by PBS-based washing solution for 2 weeks and alcohol aqueous solution for 2 days at 37 °C with gentle stirring. The inner surface of thoracic aorta was scrubbed and endothelial cells were collected. The cells were cultured with endothelial cell basal medium-2 in an incubator at 37 °C with 5%CO<sub>2</sub>. After 3 or 4 passages, the endothelial cells were seeded onto the inner surface of acellular abdominal aorta.

**Results** After decellularization procedure, H.E staining showed that no cells could be found in graft wall, and only fibrous skeleton of vessel was left. The cavity was relatively soft compared with native tissue.

**Conclusion.** This process does not include any detergent, and the treatment is able to sterilize the tissue in addition to decellularization. This treatment maybe applicable for small-diameter vascular tissue regeneration.

# 注射器を用いる新規細胞播種法の開発

国立循環器病センター 研究所 再生医療部

○江橋 具、染川将太、藤里俊哉

## 【緒言】

近年、再生医療の技術を用いた治療法として、細胞を三次元的なスキャフォールドに播種して移植する、あるいは細胞を直接組織に注入する方法が検討されている。例えば、心筋梗塞による心筋傷害部位に、ゲルに細胞を懸濁してパッチ状に貼り付ける方法や、患者の細胞をカテーテルを用いることにより直接筋組織内部に移植する方法が報告されている。われわれはこれまでに、心筋梗塞などの心筋機能低下を治療するためのスキャフォールドとして、脱細胞化筋組織の利用について検討してきた。しかし、脱細胞化心筋組織は組織間隙が小さく密な構造を保持していたため、通常の方法で細胞を播種することが困難であった。

そこで本研究は、脱細胞化心筋組織や生体組織のように空隙率の低いスキャフォールド・組織へ細胞を分散させて播種することが可能で、担体や組織への損傷を最小限に抑えることが可能となる、新規細胞播種法の開発を目的とした。

## 【実験方法】

細胞を播種するスキャフォールドとして、超高静水圧印加処理により脱細胞化したブタ心筋組織を用いた。細胞播種には ShimaJET (U-100 インスリン自己注射用 針無圧力注射器: 島津製作所, 京都) を、また対照として通常の注射針を用いる注射器を使用した。

培養皿から剥離した線維芽細胞を培地に懸濁したのち、ShimaJET の通常的使用方法に従って針無注射器のノズルに充填し、スキャフォールドに細胞を注射した。細胞を播種したスキャフォールドは、培養皿に移して培地を添加し、1 日間培養した後、スキャフォールド内部の細胞の生死を共焦点レーザー顕微鏡にて確認した。

## 【結果と考察】

通常の針を用いる注射器により細胞をスキャフォールドに播種したところ、スキャフォールド内部で細胞懸濁液が液溜まりを形成し、細胞をスキャフォールド内に分散させて播種することは困難であった。また、注射針が通過することによるスキャフォールドの損傷が確認された。一方、針無注射器を用いた場合は、注射器の圧力による細胞への傷害も少なく、播種してからもスキャフォールド内で良好に生存していることが確認された。また、針を使った場合とは異なり、スキャフォールドのさまざまな深さに、個々の細胞が分散して播種されたことがわかった。

以上の結果から、本研究で用いた針無注射器による細胞播種法は、細胞への傷害を引き起こすことなく、三次元的なスキャフォールドの内部に分散して細胞を播種することが可能となった。この手法は、生体組織への直接細胞注入にも応用できる可能性があり、今後、既存の細胞播種・注入法よりも簡便な手法として利用できることが期待できる。

## 一般演題 15

### ブタ脱細胞化角膜による角膜移植用組織の開発と *in vivo* 評価

船本誠一<sup>1)</sup>、橋本良秀<sup>1)</sup>、佐々木 秀次<sup>4)</sup>、木村剛<sup>1)</sup>、藤里俊哉<sup>2)</sup>、小林尚俊<sup>1) 3)</sup>、岸田晶夫<sup>1)</sup>

1) 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 分子制御分野、2) 国立循環器病センター 再生医療部、3) 物質・材料研究機構生体材料センター、4) 東京医科歯科大学 医学部附属病院 眼科

#### 【緒言】

近年、種々の人工角膜の開発が行われているが、移植後の感染や脱落などの課題が残り、長期間有用である人工角膜開発には至っていない。一方、異種組織から細胞を除去し、残存する基材を移植組織として用いる方法が検討されている。これまで我々は、脱細胞化法として、超高圧印加により細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣を除去する超高圧印加法を考案した。本手法では、細胞残渣の除去による免疫反応の抑制と生体の微小構造の保持による適合性の向上が期待できる。本研究では、超高圧脱細胞化法による脱細胞化角膜の作製とその物性解析を行ない、角膜移植片としての可能性を検討した。また、一般的な脱細胞法である界面活性剤を用いた脱細胞化角膜の調整についても比較検討した。

#### 【方法】

成体ブタの眼球((株)東京芝浦臓器)を購入し、角膜を採取した。超高圧印加装置を用い、10℃と30℃にて4,000~10,000気圧の超高圧印加を10分間行った。続いて洗浄液にて3日間の洗浄を行い、細胞残渣を除去した。処理後の組織を組織学的に観察することで脱細胞化を評価した。また、透過率、力学特性の測定およびウサギを用いた *in vivo* 試験により基礎評価を行った。

#### 【結果・考察】

超高圧処理した角膜の脱細胞化を HE 染色にて評価した。脱細胞化角膜では完全な細胞除去が達成され、コラーゲン線維の配向も維持されていた。しかしながら、超高圧処理した角膜は、圧力の上昇に伴う透明性の低下が観察され、力学特性にも変化が見られた。また、3日間の洗浄により膨潤も認められた。これは角膜内皮細胞の損傷によるポンプ機能の停止によるものと考えられる。しかし、ポンプ機能モデルとして白濁した角膜をグリセロール処理した結果、透明性の回復が認められ、力学特性も未処理と比べて変化は見られなかった。ウサギ移植実験では、移植直後の脱細胞化移植片は白濁しているが、移植後4週で移植組織片の白濁が取れ透明な組織片となり、8週間後でも透明性を保っていた。このことより、脱細胞化角膜の角膜移植片としての可能性が示唆された。

O-10-2 ラット骨格筋芽細胞から収縮する筋繊維 P-372 をつくる -電気刺激の分化促進効果-

河原 裕美<sup>1</sup>, 山岡 薫<sup>1</sup>, 梅田 知佳<sup>1</sup>, 吉元 玲子<sup>1</sup>, 佐々木 輝<sup>1</sup>, 呉 樹亮<sup>1</sup>, 新田 純子<sup>1</sup>, 真鍋 朋誉<sup>1</sup>, 岩田 全広<sup>1</sup>, 梶梅 輝之<sup>2</sup>, 弓削 類<sup>2</sup>

<sup>1</sup>広島大学大学院保健学研究科, <sup>2</sup>広島大学大学院医歯薬学総合研究科

【目的】培養筋芽細胞に電気刺激を行い、形態学的、分子生物学的手法を使って筋芽細胞の分化に与える影響を検討した。

【方法】培養細胞は、ラット骨格筋由来の筋芽細胞 L6 株 (IFO 50364) を用いた。実験群は、電気刺激を行った電気刺激群と正常培養した対照群の 2 群に分けた。電気刺激の条件は、矩形波、刺激頻度 0.5 pulse/sec, 持続時間 2.0msec, 電圧 50 V, 刺激時間 5 分/日とした。電気刺激群は、培養開始日から 6, 8, 10, 12 日後に電気刺激を行い、その後は刺激を施行せず培養を続けた。

【結果】電気刺激群では、培養 10 日後と 12 日後の筋管細胞数が対照群と比べ有意に多く、太い筋管細胞が出現した。さらに、培養 18 日後には横紋構造を持った筋線維が自動収縮を始めた。収縮中の培養筋線維の膜電位を計測すると、静止電位の低下と活動電位に近い波形が観察された。筋の分化マーカーのタンパク質発現をみると、電気刺激群では、筋の分化・成熟に関与する myogenin, Myf-6, M-cadherin の発現が強かった。また、電気刺激群では、connexin43 の強い発現が持続した。【考察】本研究で使用した筋芽細胞 (L6) は、通常の培養条件では筋管細胞までしか分化しない。電気刺激を加えることで筋管細胞が成熟するだけでなく、横紋構造を持った筋線維が出現し、自動収縮したことは注目すべき点である。電気刺激という物理的刺激のみで筋細胞の分化・成熟をコントロールできる可能性が示唆された。

O-11-1 リコンビナント細胞外マトリックスタンパク質を用いたカニクイザル ES 細胞の未分化維持培養

佐藤 秀樹<sup>1</sup>, 末盛 博文<sup>1</sup>, 戸口田 淳也<sup>1</sup>, 岩田 博夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大学再生医科学研究所組織修復材料科学分野, <sup>2</sup>京都大学再生医科学研究所産長類胚性幹細胞研究領域, <sup>3</sup>京都大学再生医科学研究所組織再生応用分野

ヒト ES 細胞の樹立、未分化維持培養にはマウス胎児線維芽細胞がフィーダー細胞として使用されてきた。しかし、ヒト ES 細胞の臨床応用を考えると、マウス由来の病原体によりヒト ES 細胞が汚染される危険性のない培養法の確立が望まれている。そこで最近、フィーダー細胞フリーの条件下で完全合成培地を用いて、ヒト ES 細胞の樹立、培養が行われた。しかし、この培養方法ではヒト ES 細胞はヒト由来の細胞外マトリックスタンパク質でコートされた培養基材上で培養されているため、ヒト ES 細胞がヒト由来の病原体に汚染される可能性は否定できない。そこで本研究では、大腸菌により発現されたリコンビナント細胞外マトリックスタンパク質と不死化ヒト間葉系幹細胞の類似培養液を用いて、ヒト ES 細胞と共通点の多いカニクイザル ES 細胞の未分化維持培養を試みた。この培養条件下で 20 回以上の継代を行った ES 細胞について幹細胞マーカーの発現を免疫染色と RT-PCR で解析したところ、SSEA4, Oct3/4, Nanog 陽性であった。また、この ES 細胞をヌードマウスの皮下に移植し、8 週間後に形成されたテラトーマは三胚葉の組織を含んでいた。これらの結果はマウス由来のフィーダー細胞やヒト由来の細胞外マトリックスタンパク質を使用せずに、カニクイザル ES 細胞を長期培養することができたことを示すものであり、ES 細胞の臨床応用への期待を持たせる結果である。

O-10-3 骨格筋再生を目指した骨髄由来間葉系幹細胞の静的伸長培養

江橋 具<sup>1</sup>, 永谷 憲歳<sup>1</sup>, 橋本 成広<sup>2</sup>, 藤里 俊哉<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立循環器病センター研究所再生医療部, <sup>2</sup>大阪工業大学

【目的】腫瘍の摘出などによる組織欠損部位の補填のために、患者の別の部位から組織を移植する治療が行われている。しかしこの場合、健常組織を摘出することによる患者の QOL の低下は著しい。また、糖尿病などが原因の大規模な組織の欠損に対して、現在のところ切除以外の有効な治療法がない。そこで本研究では、これらの治療に用いるための移植用組織を作製することを目的とした、脱細胞化筋スキューフォールドを用いた骨髄由来間葉系幹細胞の培養を行った。間葉系幹細胞は、通常培養により筋細胞へと分化誘導されることが知られているが、本研究では細胞に静的伸長刺激を与えることによる細胞の分化の影響を調べた。

【実験】ラット骨髄由来間葉系幹細胞を分離・培養し、超音波水圧印加処理を用いて作製した脱細胞化筋スキューフォールドに播種して、培養を行った。培養条件として、通常のディッシュによる培養と、スキューフォールドを用いた三次元培養を行い、三次元培養ではさらに伸長刺激を与える群と刺激を与えないコントロール群の三通りを設定した。これらの細胞の筋細胞分化マーカーとなる mRNA の発現量を経時的に測定するとともに、細胞の形態を観察した。

【結果と考察】スキューフォールドを用いた静的伸長刺激では、刺激開始から 3 日目においてほとんどの細胞が伸長方向に伸びた形態を示したことから、伸長刺激により間葉系幹細胞が筋細胞へと分化している可能性が示唆された。

O-11-2 カニクイザル ES 細胞からの無フィーダー培養条件下における継代培養可能な血管内皮細胞への分化誘導

中村 直子<sup>1</sup>, 過足 芳子<sup>1</sup>, 佐伯 久美子<sup>1</sup>, 中原 浩一<sup>1</sup>, 佐伯 晃一<sup>2</sup>, 松山 さと子<sup>2</sup>, 湯尾 明<sup>2</sup>

<sup>1</sup>国立国際医療センター研究所血液疾患研究部

血管はほぼ全ての臓器に存在し、生体は血管を通して栄養の交換を行うため不可欠な組織である。すなわち再生医療場において、血管を構成する主要素である血管内皮細胞の樹立は重要な課題となっている。我々は今回、無血清培養下でカニクイザル ES 細胞から無フィーダー培養条件下で継代可能な血管内皮細胞を高効率に分化誘導する新しい系を確立した。カニクイザル ES 細胞から特定のサイトカイン存在下でハンキドロップ法により胚様体様細胞凝集塊を形成し、ゼラチンコートした血管内皮細胞培養皿で接着培養した。接着した細胞から囊状構造物が出現し、一部に cobblestone 様細胞が充満した。これらの細胞はコロニーアッセイ及び、特殊染色の結果から、骨髄芽球とマクロファージからなる血球集団と結論された。一方の囊状構造物の周辺に広がる接着細胞は western blot 法、免疫染色、FACS 解析により、VE-cadherin 発現が認められた。特に FACS では、VE-cadherin と PECAM1 が同時に発現する細胞 40% 存在しており、従来の報告 (<2%) より高効率であった。またこれらの細胞はコード形成陽性であり、Ac-LDL の取り込み、vWF, eNOS タンパクの発現はほぼ全ての細胞で認められた。これらの性質は 8 回の継代培養、凍結融解後にも維持されていた。現在、ES 由来内皮細胞の in vivo での機能解析中である。

O-15-3 機能性ペプチド配列の融合による新規血管新生  
P-177 生調節タンパク質の設計

中村 真希子<sup>1</sup>, 三重 正和<sup>1</sup>, 中村 真人<sup>1</sup>,  
小島 英理<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻, <sup>2</sup>東京医科歯科大学生体材料工学研究所

【目的】生体内においては、様々な細胞が集合して複雑な組織を形作っている。このような生体内の細胞ネットワークを人工組織に再現するには、細胞の足場となりネットワーク形成のシグナルを導入する細胞外マトリックスタンパク質の役割が非常に重要である。よって、本研究では、血管新生における細胞ネットワーク構築をモデルとし、現在までに同定されている血管新生調節ペプチドを融合させた高機能細胞外マトリックスタンパク質を設計・構築することを目的とした。

【方法】エラステン由来の線り返しペプチドから成る安定構造中にラミニン由来の血管新生調節配列とフィブロネクチン由来の細胞接着性配列を含む融合タンパク質を設計し、大腸菌内で遺伝子工学的に発現させた。得られた融合タンパク質をコートしたプレート上に接着する細胞数を計測することにより、細胞接着能及び細胞増殖能の評価を行った。また、融合タンパク質を添加したMatrigel上に血管内皮細胞を接種し、血管新生マーカー遺伝子の発現をRT-PCR法にて評価した。

【結果と考察】設計した融合タンパク質は、フィブロネクチンと同等の細胞接着能・細胞増殖能を保持しており、同時に血管新生マーカーの発現も促進された。本研究で作製した融合タンパク質は、内部に組み込まれた機能性配列の特性をそれぞれ保持していることから、血管新生を調節できる高機能細胞外マトリックスタンパク質としての有用性が示された。

O-15-5 脱細胞化大動脈組織内の残存リン脂質除去に  
P-198 よるミニプタ同種移植での効果

玉井 克明<sup>1</sup>, 染川 将太<sup>1</sup>, 湊谷 諒司<sup>1</sup>, 吉田 謙一<sup>1</sup>,  
藤里 俊哉<sup>1</sup>, 森反 俊幸<sup>1</sup>, 永谷 憲彦<sup>1</sup>, 岸田 晶夫<sup>1</sup>,  
中谷 武騎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>鈴鹿医療科学大学医工学部臨床工学科, <sup>2</sup>国立循環器病センター, <sup>3</sup>先端医療機材財団, <sup>4</sup>東京医科歯科大学

【目的】脱細胞化組織を用いた再生型組織移植では、移植後に患者細胞が浸潤することで、自己修復の機転や患者の成長に伴う組織の成長が期待できる。我々は、独自技術による脱細胞化処理法(パワーグラフト法)を開発し、動物実験によってその有効性を検討している。移植後の石灰化は脱細胞化組織内の残存リン脂質に起因すると考えられるため、アルコール処理による残存リン脂質の除去を行った。ミニプタ同種移植実験での移植後3ヶ月の結果において、石灰化は僅かにしか認められなかった(昨年度発表)。今回は、6および12ヶ月におけるミニプタ同種移植実験においての石灰化、狭窄の有無について検討した。

【方法】ドナーとなるクラウン系ミニプタ((株)ジャパンファーム)から下行大動脈を採取した。パワーグラフト法を行うことで、組織内細胞を除去した。さらに、アルコール処理で残存リン脂質を除去した。同種ミニプタに下行大動脈置換移植した後、所定期間経過後に摘出し、組織学的に評価した。

【結果】移植後6ヶ月の組織を染色した結果、リン脂質を除去していない組織では石灰化が顕著に見られた。一方、脱細胞化組織の残存リン脂質を除去した組織では吻合部に石灰化が若干認められるが、その他の部位では見られなかった。また狭窄も見られなかった。さらに、移植組織の再細胞化の進行も認められた。現在、移植後12ヶ月の組織についても検討中である。

O-15-4 再生臓器の血管新生  
P-197

永吉 実紀子<sup>1</sup>, 小山 博之<sup>1</sup>, 高戸 毅<sup>1</sup>, 田口 哲志<sup>2</sup>,  
小林 尚俊<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東京大学医学部血管外科, <sup>2</sup>東京大学医学部口腔外科, <sup>3</sup>先端材料研究機構

【目的】再生臓器移植後の生体内での機能維持には、充分な酸素・栄養の供給・不要な代謝産物の除去が必要である。これらの物質の拡散輸送距離は100 $\mu$ m程度であり、それ以上の距離には血流が必要となる。よって、ある程度の大きさの再生臓器の生体内には、再生臓器の周囲・内部に血管を張り巡らせること、つまり再生臓器の血管新生が必要となる。この研究では、再生臓器の血管新生を促進する新しい材料を開発することを目的とする。

【方法】材料に必要な条件は(1)血管壁を取り巻ける二次元構造(2)細胞接着活性部位を持つ(3)プロテアーゼによる消化可能部位を持つ(4)血管新生因子と結合可能。これに従い、我々は天然の細胞外マトリックスと人工の架橋剤を用いた材料を作成した。これをラット腹直筋前鞘下に埋め込み、6日後に摘出しこの材料が生体内での血管新生効果を評価した。また、受精卵の無血管管に埋め込み、2日後に蛍光色素を静注し血管新生効果を評価した。

【結果・考察】マトリックスと架橋剤の比率が適切なものでは、血管新生因子非投与下の材料内でも組織学的に血管構築の増加、ピクセル属性カウント数増加、ヘモグロビン量の増加が認められた。さらにこの材料はbFGFと結合可能であり、bFGF投与下の血管新生が促進された。この結果は、この材料が生体内から材料の血管新生を誘導すると同時に、材料内部での血管化も促進する能力を持つことを示している。

O-15-6 血管新生、血管構造安定化におけるアドレノ  
P-206 メデュリンの役割

新藤 隆行

信州大学大学院医学研究科臓器発生制御医学講座

アドレノメデュリン(AM)は、多彩な生理活性を持つペプチドであり、循環調節や心血管病態に関与している。我々は、AMヘテロノックアウトマウス(AM<sup>-/-</sup>)は、血管発育不全や、著明な尿蛋白によって胎生致死である事から、AMが血管新生作用を有することを明らかにした。そこで、AMの血管再生療法への応用を考え、成体におけるAMの血管新生作用を検討した。マウス動脈結紮による下肢虚血モデルにおいて、AM投与群では、新生が亢進し、血流回復が亢進したが、AMヘテロノックアウトマウス(AM<sup>-/-</sup>)や、AM競合阻害薬のAM22-52投与群では、血管新生が減弱していた。AM投与群では、虚血肢のVEGFが亢進したが、逆にAM<sup>-/-</sup>では発現が低下していた。また、の外因性投与により、AM<sup>-/-</sup>の血管新生減弱は回復したが、GFR-2ノックアウトマウスでは回復が認められなかった。内皮細胞と線維芽細胞の共培養系による検討では、AMとVEGF同時投与により、管腔形成の亢進が認められた。AMは、細胞におけるVEGF発現を亢進させると共に、AMとVEGF同時投与により、Akt活性化の増強が認められた。以上から、AMの血管新生作用の一部は、VEGF-Flk-1-Akt系を介していること、更にAM<sup>-/-</sup>では、その他の血管新生因子、成長因子の発現変化が確認されることから、VEGF以外の因子関与も示唆された。AMの血管再生、血管構造安定化作用は、新たな血管再生療法への応用が期待される。

O-16-5 マウス心筋梗塞モデルにおけるマクロファージ  
P-170 ジコロニー刺激因子 (M-CSF) の作用

高橋 淳文、森本 創、柴 祐司、伊澤 淳、  
伊勢 裕彦、畠 清彦、元吉 和夫、池田 幸一

信州大学大学院医歯学総合研究科循環器病態学分野、<sup>1</sup> 癌研究  
会附属病院化学療法科、<sup>2</sup> 防衛医科大学内科学第三講座

【背景】単球マクロファージ (Mo/MΦ) は心筋梗塞後の炎症反応や血管新生、創傷治癒などの過程に重要な役割を果たしている。本研究では、Mo/MΦ系細胞の分化や増殖を促進するサイトカインであるM-CSFの投与による心筋梗塞後の心機能障害やリモデリングに対する作用について検討した。

【方法・結果】マウス左冠動脈を結紮して心筋梗塞を作製し、当日よりM-CSF (500 μg/kg/day) または生食を5日間投与した。M-CSF投与群では、梗塞領域および線維化の有意な減少と心機能障害の抑制を認め、組織学的には梗塞境界領域へのMo/MΦの浸潤および血管内皮細胞の有意な増加を認めた。フローサイトメトリー解析により、M-CSF群では、末梢血Mo/MΦとCXCR4<sup>+</sup>細胞の有意な増加を認めたが、血管内皮前駆細胞 (CD34<sup>+</sup>/Flk-1<sup>+</sup>) 数には影響を与えなかった。また、梗塞領域ではCXCR4<sup>+</sup>細胞の集積を認め、CXCR4のリガンドであるSDF-1の発現も著明に増加していた。さらに、M-CSFによる心筋梗塞領域の減少と心機能障害の抑制効果は、CXCR4拮抗薬であるAMD3100の投与により有意に抑制された。

【結論】M-CSFは、SDF-1-CXCR4の系を介して心筋梗塞後の心機能障害やリモデリングを改善することが示唆された。

O-16-7 バイオリアクターを用いた脱細胞化 scaffold  
P-173 への細胞播種と培養

戸川 祐一、江橋 具、吉田 謙一、藤里 俊哉、  
大場 謙吉、中谷 武嗣

関西大学大学院工学研究科、<sup>1</sup> 国立循環器病センター、<sup>2</sup> 先端医療振興財団

【目的】現存の異種生体弁は、生体内では異物として存在し、自己化されないため、いずれ石灰化等によって再不全化する。これに対し、同種あるいは異種組織から細胞を除去した組織を scaffold として用いる自己再生型組織移植では、移植後、組織内に患者の細胞が浸潤することでリモデリングされ、自己化されるという利点がある。さらに、脱細胞化 scaffold の移植前に、患者の細胞を組み込んでおくテラーメード型組織移植では、移植後の自己化が促進されると考えられる。本研究では、脱細胞化 scaffold に細胞を付着させることを目的に、弁組織よりも構造が単純である血管 scaffold を用いて内皮細胞の播種・培養について検討した。

【方法】ミニブタから大動脈を摘出し、超高静水圧印加による細胞破壊後、洗浄によってドナー細胞を除去した組織を scaffold として用いた。初めに脱細胞化 scaffold と細胞懸濁液を入れたモジュールを30分毎に45°回転を8回繰り返して、細胞を播種した。その後、静置にて1日間培養し、閉鎖型循環回路を用いて培地を循環させながら培養を継続した。

【結果】脱細胞化血管 scaffold に内皮細胞を播種・培養できた。さらに、循環培養後と静置培養後を比較すると、循環培養後では内皮細胞の記回性が確認できた。これらより、本方法により細胞を付着させた血管 scaffold は、生体内の血管構造に近づいたことが示された。

O-16-6 組織細胞工学を応用したハイブリッド大動脈  
P-166 脈弁の研究開発

尾崎 重之、岩崎 清隆、大関 泰宏、山下 裕正、  
内田 真、堀見 洋衛、岡田 良晴

東邦大学医療センター大塚病院心臓血管外科、<sup>2</sup> 早稲田大学理工学部生命理工学科

【目的】今回我々は独自の研究経験を基盤にし、さらに工学連携のもと耐久性に富むハイブリッド大動脈弁の研究開発に着手して報告する。

【ハイブリッド大動脈弁の研究開発】ハイブリッド大動脈弁の作成に最も重要な技術はドナー大動脈弁の脱細胞化である。完全に脱細胞されることで優れた抗石灰化特性を呈し、耐久性は向上する。しかしながら一方で脱細胞による強度の低下も報告されており、強度を低下せずに脱細胞する手法が必要である。我々が開発したバイオリアクター、マイクロ波照射、拍動圧を用いた脱細胞化法はドナー大動脈弁の完全脱細胞化を可能にし、強度試験でも未処理大動脈弁と強度に差を認めなかった。

【大動物を使った慢性実験】ブタの胸部下行大動脈に脱細胞化したハイブリッド大動脈弁を移植した。移植後3ヶ月、6ヶ月後に経食道エコー検査施行後、弁を取り出し、胸部X線、病理学的検査を施行した。

【結果】経食道エコー検査ではハイブリッド大動脈弁の閉閉は良好で、逆流を全く認めなかった。ハイブリッド大動脈弁は3ヶ月、6ヶ月の移植弁ともに弁尖に亀裂や穿孔などの変化を全く認めなかった。胸部X線では弁尖の石灰化も全く認めなかった。病理学的検査では3ヶ月、6ヶ月ともに石灰化はなく、6ヶ月の移植弁で弁尖の先端まで内皮細胞の被覆が確認された。

【結論】大動物を使った慢性実験でハイブリッド大動脈弁の耐久性が証明された。今後は臨床応用を目指したい。



P-176 生体スキャフォールドの保存に関する検討

田頭 保彰<sup>1</sup>, 木村 剛<sup>1</sup>, 南 広祐<sup>1</sup>, 船本 誠一<sup>1</sup>,  
藤里 俊哉<sup>2</sup>, 岸田 晶夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京医科歯科大学医学部医学科, <sup>2</sup>国立循環器病センター研究  
所再生医療部

【緒言】生体組織から細胞を除去し、残存するマトリックスを細胞の足場材料として用いる脱細胞化組織に関する研究が精力的になされている。その調製については、界面活性剤法、酵素法、超高静水圧印加法など種々の手法が検討されており、良好な結果が数多く報告されている。脱細胞化組織は、生体由来の組織構造を維持する点を特徴とし、それらを広範に利用するためには物性（構造）を損なわずに保存する必要があるが、保存法に関する研究は少ない。そこで本研究では、凍結乾燥を中心とする種々の保存法に関する検討を行った。

【実験】成体ブタ大動脈を購入し、任意のサイズに成形した後、超高静水圧印加法により脱細胞化血管を調製した。種々の凍結プロセスにて血管を凍結し、真空乾燥した。また、自然乾燥、加熱乾燥も行った。得られた乾燥血管の形態変化、膨潤度、力学試験、組織学的評価により乾燥が及ぼす組織構造への影響を検討した。

【結果と考察】自然乾燥、加熱乾燥では血管の収縮が認められ、水で復元させた後においても、若干の膨潤は示されるものの完全な復元に至らなかった。一方、凍結乾燥血管では乾燥前形状が維持され、収縮、亀裂等は認められなかった。また、復元による顕著な変化は見られず、乾燥前とほぼ同様であった。本研究は、ヒューマンサイエンス振興財団、文部科学省科学技術振興調整費、厚生労働省科学研究費の補助を受けて行われた。

P-178 ナノ線維構造を有する組織工学用伸縮性コラーゲン

金山 寿之<sup>1</sup>, 永井 展裕<sup>2</sup>, 柚木 俊二<sup>2</sup>, 森 一生<sup>1</sup>,  
棟方 正信<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院工学研究科生物機能高分子専攻, <sup>2</sup>北海道大学創成科学共同研究機構, <sup>3</sup>井原水産株式会社

【目的】我々の研究室ではゴムのように高い伸縮性を有するコラーゲン線維ゲル (e-gel) を開発した。生分解性を有する伸縮性培養担体の作成例はこれまでにない。本研究では e-gel を新規生体材料へと応用するため、e-gel による伸展培養を行い、細胞応答を調べることを目的とした。

【方法】鮭皮アテロコラーゲン(SAC)の0.5%希塩酸水溶液(pH 3)および水溶性カルボジミド(EDC)含有リン酸 buffer (pH6.8)を調製し、4℃でSACとEDC含有bufferを容量比2:3で混合し架橋SAC gelを作製した。架橋SAC gelを60℃の超純水中で加熱し、e-gelを作製した。e-gelの線維構造を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察し、e-gel上でヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を静置培養し細胞増殖性を評価した。伸展刺激によるHUVECの応答を、SEMによる形態観察とELISA法による内皮細胞特異的なタンパク質発現の定量によって評価した。

【結果】e-gelはコラーゲン線維が網目状に絡み合ったナノ線維構造を有していた。e-gel上でHUVECを培養した結果、Fibronectinをコーティングすることで良好に増殖することが分かった。e-gel上でHUVECに伸展刺激を与えると、細胞は伸展方向と垂直に配向することが確認された。

P-177 機能性ペプチド配列の融合による新規血管O-15-3 新生調節タンパク質の設計

中村 真希子<sup>1</sup>, 三重 正和<sup>1</sup>, 中村 真人<sup>2</sup>,  
小島 英理<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻, <sup>2</sup>東京医科歯科大学生体材料工学研究所

【目的】生体内においては、様々な細胞が集まって複雑な組織を形作っている。このような生体内の細胞ネットワークを人工組織に再現するには、細胞の足場となりネットワーク形成のシグナルを導入する細胞外マトリックスタンパク質の役割が非常に重要である。よって、本研究では、血管新生における細胞ネットワーク構築をモデルとし、現在までに同定されている血管新生調節ペプチドを融合させた高機能細胞外マトリックスタンパク質を設計・構築することを目的とした。

【方法】エラスチン由来の繰り返しペプチドから成る安定構造中にラミニン由来の血管新生調節配列とフィブロネクチン由来の細胞接着性配列を含む融合タンパク質を設計し、大腸菌内で遺伝子工学的に発現させた。得られた融合タンパク質をコートしたプレート上に接着する細胞数を計測することにより、細胞接着能及び細胞増殖能の評価を行った。また、融合タンパク質を添加したMatrigel上に血管内皮細胞を播種し、血管新生マーカー遺伝子の発現をRT-PCR法にて評価した。

【結果と考察】設計した融合タンパク質は、フィブロネクチンと同等の細胞接着能・細胞増殖能を保持しており、同時に血管新生マーカーの発現も促進された。本研究で作製した融合タンパク質は、内部に組み込まれた機能性配列の特性をそれぞれ保持していることから、血管新生を調節できる高機能細胞外マトリックスタンパク質としての有用性が示された。

P-179 AsialoEPO は骨髄幹細胞の末梢血管再生効果を促進する

森 昭三, 澤田 登起彦, 窪田 敬一  
獨協医科大学第2外科

マウス下肢虚血モデルを用いて Asialoerythropoietin (aEPO) の血管再生促進効果について検討した。

【方法】Balb/cの右大腿動脈を結紮し、下肢虚血モデルを作製した。この下肢虚血モデルを4群に分けた。G1(n=15):無処置群, G2(n=15):骨髄幹細胞移植(BMC)群(1×10<sup>6</sup>個/マウス), G3(n=15):BMCに加え、erythropoietin (EPO)を2週間連続投与(500 u/kg)した群, G4(n=15):BMCに加え aEPOを2週間連続投与(500 u/kg)した群。治療開始後第7日および第14日にレーザードップラー血流計を用いて、血流測定を行った。データは虚血肢の健常肢に対する比で表した。

【結果】第7日の血流はG1:0.66±0.15, G2:0.72±0.12, G3:0.78±0.08, G4:0.80±0.11で、G4が他の群より有意に高かった(P=0.007)。さらに第14日の血流はG1:0.68±0.09, G2:0.57±0.15, G3:0.65±0.15, G4:0.83±0.12で、G4が他の群より有意に高かった(P=0.002)。

【結論】マウス下肢虚血において aEPO は骨髄幹細胞移植による血管再生効果を有意に促進した。末梢血管再生療法において aEPO は有望な促進因子となりえることが示唆された。

ポ  
ス  
タ  
ー

P-327 バイオマテリアルを含有する再生軟骨に対する初期生体反応の評価

藤原 夕子, 小笠原 徹, 浅輪 幸世, 高戸 毅, 星 和人

東京大学大学院医学系研究科軟骨・骨再生医療寄付講座(富士ソフト), 東京大学医学部附属病院ティッシュ・エンジニアリング部

再生組織に対する移植後の生体反応は、移植後の再生組織の変形や形成不全の原因となる。しかし、再生組織は、非生物系異物であるバイオマテリアルを足場素材として含有することも多く、それに対する生体反応は通常の組織移植免疫に比べ複雑で不明な点が多い。近年の軟骨再生医療においては多様な軟骨欠損に対処するため、多孔体足場素材の導入が積極的に検討されている。本研究では、生分解性ポリマー多孔体を用いた再生軟骨に対する生体反応の解明の一助として、ヌードマウスを用いた実験でも観察可能な循環系や好中球・マクロファージ系の反応が中心となる初期生体反応を解析した。方法として、ヒト耳介軟骨組織をポリ乳酸多孔体(PLLA)に浸透させ、インプラント型再生軟骨を複製した。再生軟骨をヌードマウスの背部皮下に移植し、経時的に生化学的・組織学的評価を行った。その結果、細胞を投与しないPLLA群では、細胞を投与した再生軟骨群に比べ、移植後2週までに組織Hb量やIL-1量が増加しており、血管透過性亢進やマクロファージ系活性化が示唆された。組織学的には、PLLA群のPLLA周囲には多核巨細胞やマクロファージの集積が観察された一方、再生軟骨群では再生軟骨がPLLAに接して形成されており、軟骨組織の再生を促進することにより、含まれるバイオマテリアルに対する急激な生体反応を抑制できる可能性が推測され、安全性の高い再生軟骨医療が可能になることが示唆された。

P-329 押し出し法による積層三次元造形で複製した足場素材を用いた再生軟骨の検討

田中 晴子, 山岡 尚世, 小笠原 徹, 浅輪 幸世, 高戸 毅, 星 和人

東京大学大学院医学系研究科軟骨・骨再生医療寄付講座(富士ソフト), 東京大学医学部附属病院ティッシュ・エンジニアリング部

【目的】力学強度と三次元形態を有するインプラント型再生軟骨を複製するためには、ハイドロゲルと多孔体の併用による足場素材システムの構築が必要である。同システムにおいて、多孔体には細径・ハイドロゲル混和物を保持し、かつ、再生軟骨に三次元形態を付与する機能が求められる。この条件を満たす多孔体を確立することを目的として、押し出し法による積層造形の導入した足場素材を複製し、その構造と使用方法を検討した。

【方法】多孔体はポリ乳酸を原料とし、押し出し法による積層造形の製造パラメータを設定し、各種の気孔率、気孔径を有するものを複製した。ヒト耳介軟骨細胞をアテロコラーゲンゲルと混和し、多孔体に投与した。多孔体の使用条件として、投与する細胞数や離散数などを数種検討した。これらをヌードマウスの背部皮下に移植し、3ヶ月後に再生軟骨を抽出し観察した。

【結果と考察】気孔率85%以上、気孔径1mm以上の三次元多孔構造をとった多孔体が任意の三次元形状で複製可能であった。気孔は中心部まで完全に通過しており、細胞・細胞間液が十分に浸透した。1000倍増を超えない培養細胞を100万細胞/ml以上で投与することにより生体内での良好な軟骨再生が見られた。一方、気孔率を過度に拡大すると多孔体の剛性低下や再生軟骨の不均一分布などの問題が生じるため、安定した軟骨再生を得るためには多孔体構造の最適化の適切な使用が必要であることがわかった。

P-328 メッシュで被覆したコラーゲンスポンジによるヒト軟骨組織の再生

川添 直輝, 井上 智映子, 赤羽 大時, 東 国平, 白崎 芳夫, 山本 克之, 立石 哲也

物質・材料研究機構構生体材料センター, 筑波大学数理物質科学研究科, 北海道大学大学院情報科学研究科, 産業技術総合研究所人間福祉工学部門

【目的】コラーゲンスポンジは、組織再生における細胞のスクエアーフォールドとして広く利用されている。その理由は、コラーゲンスポンジが、高い細胞親和性をもつことや、細胞を内部まで浸透させる連通孔をもつことによる。しかしながら、従来のスポンジでは、移植した細胞の漏出による播種効率の低下や、収縮による変形という問題があった。そこで本研究では、コラーゲンスポンジを細胞よりも小さい孔径のメッシュで被覆したものを複製し、軟骨組織再生における有用性について検討した。

【方法と結果】ブク皮膚のタイプIコラーゲン溶液をメッシュ被覆モールドに充填し、凍結乾燥法でスポンジを形成させ、グルアルアルデヒドで架橋固定化した。スポンジはモールドと結合し、変形は生じなかった。本スポンジにヒト間葉系幹細胞( $1 \times 10^6$  cells/ml) 1 mlを播種したところ、細胞播種効率は $95 \pm 2.7\%$ で、細胞漏出の抑制効果が確認できた。さらに、軟骨への分化を誘導するため、分化因子TGF- $\beta$ 3, BMP-6を添加して培養を続けた。組織染色、免疫染色、遺伝子発現解析の結果から、分化因子を添加したサンプルは未添加のものに比べ、より多くの軟骨基質が産生し、軟骨組織に特異的な遺伝子が発現していることがわかった。以上のことから、メッシュで被覆したコラーゲンスポンジは、軟骨組織の再生に有効であることが示唆された。

P-330 超高压処理法により複製された脱細胞化骨の細胞培養担体への応用

松本 誠一, 橋本 良秀, 南 広裕, 藤里 俊哉, 木村 剛, 岸田 晶夫

東京医科歯科大学生体材料工学研究所, 国立循環器病センター研究所再生医療部

【緒言】生体組織を構成する細胞外マトリックスは、構造維持だけでなく細胞増殖や幹細胞分化などに影響を及ぼすことが知られている。近年、それらの三次元マトリックス上に細胞を培養する三次元細胞培養に関する研究がなされている。当研究室では、超高压処理により生体組織から細胞除去し、構造組織を維持する脱細胞化組織の三次元細胞培養担体としての応用を検討している。本研究では、超高压処理により複製された脱細胞化骨の三次元細胞培養担体としての応用について検討した。

【方法】成人ブタの大腿骨・肋骨(株)東京芝浦機器を購入し、骨幹、骨頭(海綿骨含む)を任意の形状に加工した。超高压印刷装置を用いて、10,000気圧の超高压圧加処理を行い組織内部の細胞を破壊した。その後、組成の異なる洗浄液にて細胞残渣を除去した。処理後の脱細胞化骨を組織学的に観察し、骨の脱細胞化を評価した。また、得られた脱細胞化骨に間葉系幹細胞(MSC)を播種・培養し、細胞の接着・増殖を蛍光顕微鏡・組織染色にて観察した。

【結果と考察】超高压脱細胞化骨の組織学的評価では顕著な構造変化は認められず、骨髄腔内においても組織構造は維持されていた。また、海綿骨・骨髄腔内の細胞除去が示された。脱細胞化骨に細胞を播種した結果、細胞の生存が確認され、ALP染色細胞も観察された。以上より、脱細胞化骨の三次元細胞培養担体としての可能性が示唆された。

P-367 ブタ皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞シート  
の作製と積層化

常 徳<sup>1</sup>, 清水 達也<sup>1</sup>, 原口 裕次<sup>1</sup>, 坂口 勝久<sup>1</sup>,  
大和 雅之<sup>1</sup>, 梅津 光生<sup>1</sup>, 岡野 光夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京女子医科大学先端生命医科学研究所, <sup>2</sup>早稲田大学大学院  
生命理工学研究科

【背景】近年、ラット及びマウス皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞 Mesenchymal Stem Cell (MSC) による一層細胞シートを移植することにより、心筋梗塞後の心機能が改善されることが報告されたが、今回我々は動物実験としてブタ皮下脂肪組織由来 MSC を用いて、細胞シートを作製し、積層化を試みた。

【方法と結果】生後 8 ヶ月クローン系ミニ豚 (体重 20-30kg) を用い、全身麻酔した後、腹部皮下組織 (3-5g) を採集した。コラゲナーゼタイプ I 25ml を加えて細胞を単離し、遠心操作で (3000rpm 10min 4℃) 細胞を回収した。培養皿 (直径 90mm) に培地 10ml を加え 37℃ で 7 日間培養した。その間 2-3 回培地を交換することにより、培養皿に接着しない細胞は除去された。接着細胞は増殖して培養皿を広く覆い、殆どの細胞は MSC に特異的な表面マーカー CD29, CD90 を発現していた。この MSC を温度応答性培養皿 (直径 35mm) に再播種し、4 日間培養した。培地の温度を 37℃ から 20℃ に下げることにより、MSC は自発的に温度応答性培養皿から剥がれ、一層の MSC シートとして回収された。このようにして回収された二枚の MSC シートを重ねると、すみやかに二枚のシートは接着し、三次元的組織を構築した。

【結論】細胞シートの技術を用い、脂肪組織由来 MSC による重層化細胞シートを作製した。今後、この MSC シートの更なる積層化を行い、その構造と機能を評価する予定である。

P-369 脂肪組織由来 neurosphere のマウス胎児移植

長瀬 敬<sup>1</sup>, 菊地 寿幸<sup>1</sup>, 岩波 明生<sup>1</sup>, 池上 健<sup>1</sup>,  
町田 正文<sup>1</sup>, 岡野 栄之<sup>1</sup>, 松本 大輔<sup>1</sup>,  
吉村 浩太郎<sup>1</sup>, 村瀬 祥子<sup>1</sup>, 重浦 智邦<sup>1</sup>,  
桑名 隆彦<sup>1</sup>, 井上 誠<sup>1</sup>, 長谷川 護<sup>1</sup>

<sup>1</sup>独立行政法人国立病院機構村山医療センター臨床研究センター,  
<sup>2</sup>慶應義塾大学生理学, <sup>3</sup>東京大学形成外科, (株)バイオマスター,  
(株)ディナベック

【目的】本来中胚葉系幹細胞であるはずの真皮や心臓から回収した neurosphere が、外胚葉系の神経幹細胞であるとの報告が最近散見される。そこで幹細胞ソースとして最近注目されている脂肪組織に着目し、脂肪由来 neurosphere (以下 adiposphere: AS) も同様に神経堤の性質を持つかを検討する目的で以下の実験を行った。

【方法】ラット AS での神経幹細胞マーカー (Nestin, Musashi-1) および神経堤幹細胞マーカー (p75NTR, Slug など) の発現を RT-PCR で解析し、ラット胎生 14 日胎児中枢神経由来神経幹細胞 (NSC) におけるこれらの発現と比較検討した。またヒト AS にセンダイウイルスベクターにより GFP 遺伝子を導入し、これを胎生 7.8 日マウス胚頭部に移植して、40 時間前後全胚培養した後の GFP 陽性 AS の状態について観察を行った。

【結果】ラット AS はラット胎児 NSC と同程度の Nestin, Musashi-1 発現を認めたほか、p75NTR, Slug の発現は AS において NSC よりも増強していた。GFP 導入ヒト AS 移植を試みた胎児 9 体のうちの 2 体において、移植細胞の第 2 胚弓内での遊走を認めた。

【考察】AS は p75NTR, Slug 陽性に加え、マウス胎児内で遊走したことから、単なる神経幹細胞というよりもむしろ神経堤幹細胞に近い性質を持つ可能性が示された。

P-368 低血清培養法による脂肪由来間葉系幹細胞  
の急性腎不全に対する効果

尾崎 武徳<sup>1</sup>, 丸山 彰一<sup>1</sup>, 渡辺 達人<sup>1</sup>,  
岩島 重二郎<sup>1</sup>, 安田 香<sup>1</sup>, 山本 徳則<sup>1</sup>, 北川 泰雄<sup>1</sup>,  
後藤 百万<sup>2</sup>, 松尾 清一<sup>3</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学医学部腎臓内科, <sup>2</sup>名古屋大学農学部, <sup>3</sup>名古屋大学  
医学部泌尿器科

【目的】近年、脂肪由来間葉系幹細胞 (ASCs) は様々な臓器において組織再生促進作用をもつことが報告されてきている。名古屋大学農学部の北川らは低血清培養 (2%血清) を行うことにより高血清 (20%血清) で培養したときより分化能の高い間葉系細胞集団が得られることを報告した。今回我々は低血清培養法にて分離培養した ASCs のサイトカイン分泌能について検討し、さらに急性腎不全に対する効果について検討した。【方法】12 週齢のヌードラットの右腎臓を摘出し、1 週間後に葉酸 200mg/kg を尾静脈より投与し、急性腎不全モデルを作成した。葉酸投与 7 時間後に低血清培養にて分離培養したヒト ASCs 4 × 10<sup>6</sup> 個を左腎皮膜下に注入した。コントロールは生理食塩水のみを注入した。経時的に BUN, S-Cr を測定し、比較検討した。また、治療 14 日目にラットを屠殺し腎臓を採取し、ヒト特異的抗体にて免疫染色を行った。ASCs のサイトカイン分泌能については、培養上清中の VEGF, HGF などを ELISA 法にて測定した。【結果】ASCs は in vitro で VEGF, HGF などのサイトカインを分泌していた。細胞治療群ではコントロール群に比べ有意に腎機能の改善を認めた。投与した ASCs は腎実質内への移動はみられず、腎皮膜下に生着していた。

【結論】低血清培養法にて分離培養した ASCs はサイトカイン分泌を介して急性腎不全を改善させる。

P-370 筋芽細胞に対する磁場の影響

高嶺 潤<sup>1</sup>, 江橋 具<sup>1</sup>, 藤里 俊哉<sup>1</sup>, 橋本 成広<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>大阪工業大学大学院, <sup>2</sup>国立循環器病センター

現在、腫瘍切除などにより欠損した筋組織部位を補填するための手段として、再生医療が注目されている。我々は、再生型筋マテリアルの作成を目標とする研究を行っている。ここで、骨組織や筋組織の維持には物理的的刺激が必要不可欠であり、近年何種類かの物理的的刺激による細胞への影響を調べる研究が行われている。本研究は、細胞に接触することなく刺激を与えることができる磁場刺激を筋芽細胞に与えることによる、細胞の増殖率や筋管細胞への分化への影響について検討した。ブタの大腿筋からトリプシン処理により採取した筋芽細胞を、コラーゲンコートディッシュに播種して、4 時間後から磁場曝露を開始した。筋芽細胞の同定には、デスミン染色を用いた。磁場曝露には、ソレノイドコイル用いて磁束密度 2.0mT, 3.0mT 周波数 60Hz, 正弦波で行った。これまで用いてきた装置では、磁場曝露によりインキュベータ内の温度上昇が生じるため、磁束密度によりインキュベータの設定温度を変更し、培地の温度を 37℃ 一定に保つようにした。曝露時間は、24, 48, 72 時間とし、それぞれの時間でディッシュから細胞を剥離、細胞数を数えて増殖率を計測した。また、分化誘導については、筋細胞の分化マーカーの mRNA 発現量や細胞の形態の変化を観察することにより調べた。その結果、本研究では曝露時間が短かったため、細胞形態に変化が認められなかったものの、分化発現への影響が多少あると考えられた。

ポ  
ス  
タ  
ー

P-383 マウス羊膜幹細胞の特性および組織形態学的検討

吉田 淑子, 藤 賛, 岡部 素典, 戸田 文香, 米田 徳子, 野上 真紀子, 樋口 収, 二階堂 敏雄

富山大学大学院医学薬学研究部再生医学, 同産婦人科, 同整形外科, 同小児科

我々はこれまでヒト羊膜に幹細胞が存在することを報告してきた。さらに詳細に研究を進める上でマウスにおける実験系を樹立するために、マウス羊膜内に存在する幹細胞の同定を試み、その特性について、組織学的に検討した。

【材料と方法】マウスはC57BL/6およびICRマウスを使用した。幹細胞の増殖能をみるためにBrdUを妊娠7, 9, 10, 12, 14日目のマウスに一回投与し、妊娠17~19日目に羊膜を採取した。採取羊膜は光学および電子顕微鏡用の材料とし凍結切片や伸展標本等を作製した。Stem cell markerとしてalkaline phosphatase (ALP), Oct3/4, Sca-1, Nanog, SSEA-1, FGFを、分化markerとしてcytokeratin抗体を用い免疫染色を施した。

【結果及び考察】マウス羊膜はヒトと比較し著しく薄い膜状構造を呈し、単層の羊膜上皮細胞とそれを裏打ちする間葉系細胞で構成されていた。免疫染色の結果、ALPの染色性はほとんど認められず、羊膜のほとんどの細胞がSca-1(+)を示した。SSEA-1(-)BrdU(-)およびSSEA-1(+), cytokeratin(-)という二重陽性を示す細胞は存在したが、cytokeratin(+)でBrdU(-)の細胞は認められなかった。Cytokeratinに陽性を示す細胞は分化した羊膜上皮であると考えられた。以上、今回の実験によりマウスの羊膜にも上皮と間葉系の細胞が存在することが明らかであり、BrdU(+)/SSEA-1(+)の細胞群に幹細胞が含まれている可能性が示唆された。

P-385 マウス羊膜から幹細胞の分離

藤 賛, 吉田 淑子, 岡部 素典, 戸田 文香, 樋口 収, 野上 真紀子, 米田 徳子, 二階堂 敏雄

富山大学大学院医学薬学研究部再生医学, 同小児科, 同整形外科, 同産婦人科

Previously, we showed that human amniotic epithelial and mesenchymal cell insulin-producing cells, or myocardial cells. The aim of this study is to isolate stem cells (ASE) from mouse amniotic membranes and to assess their characteristics. The cells with stem cell marker such as SSEA-1 (+) and/or BrdU (-) were existed in the mouse amnion membrane. On the base of these results, we isolated of ASE from the amnion membrane by using MACS or FACS. The cells were isolated with 0.25% trypsin and 0.075% collagenase and stained with anti BrdU, SSEA-1, and cytokeratin (CK) antibodies to confirm the origin. By using the FACS, isolated cells were divided into four classes by the intensity of the SSEA-1 expression and the size of the cells. These were SSEA-1(-)/small, SSEA-1(-)/large, SSEA-1(+)/large, and SSEA-1(+)/small. The cells in the latest class account for 0.5% in all cells and stained positively with anti BrdU antibody, but negative with anti CK antibody. BrdU(+) cells were small size and stained with SSEA-1(+) and CK (-), suggesting that cells surface markers and the cells size are useful for defining mouse ASE from amnion membranes.

P-384 ヒト上皮腫瘍細胞株に由来するがん幹細胞の分離とその性質

ナイラ マホモティ, 宮崎 正博, 片岡 健, 許 南浩  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生物学分野

Recently accumulating evidence increasingly validates the cancer stem cell hypothesis that tumor cells are composed of a rare cell population with some stem cell properties and the remaining majority population. The cancer stem cells are considered to possess self-renewing capacity, thus showing higher tumorigenicity, and to be resistant to chemotherapeutic agents and/or radiation. In the present study, we examined possible utility of Rh-123 for isolation of cancer stem cells. Rh-123 negative cells were isolated from a human prostate cancer cell line (PC3) that expresses the multidrug resistance gene (MDR1) encoding a transmembrane efflux pump p-glycoprotein. The percentage of Rh-123-negative cells in PC-3 cell line was 1-2% at the first sorting. Doubling time of the Rh-123 negative cells was shorter than that of the positive cells. By immunostaining, stem cell markers such as SSEA-4 and SOX-2 were detected in the Rh-123 negative cells but not in the positive counterparts. Therefore, the Rh-123 negative cells may be candidate for cancer stem cells in PC-3 cell line.

P-386 高圧凝縮DNAの構造・機能解析と遺伝子導入への応用

木村 剛, 堀内 可奈, 栗田 公夫, 南 広祐, 六雄 伸悟, 吉澤 秀和, 藤里 俊哉, 岸田 晶夫

東京医科歯科大学生体材料工学研究所, 日本大学理工学部, 岡山大学環境理工学部, 国立循環器病センター研究所再生医療部

【緒言】遺伝子あるいはタンパク質導入による細胞の高次機能化技術は、再生医療分野における重要課題の一つである。非ウイルス遺伝子導入の主流は、正電荷物質との複合化によりDNAを凝縮させて細胞に導入する手法であるが、正電荷に由来する細胞障害性が問題となる。本研究では、新たなDNA凝縮法として高静水圧凝縮法を考案し、DNA構造に及ぼす圧力印加の影響と機能解析について詳細に検討した。

【実験】遺伝子として1kbラダーDNA、プラスミドDNAを用いた。高静水圧印加装置を用いて、温度10、40℃、圧力3.0 GPa、6.000、8.000、10.000気圧、時間1、5、10、20分間と異なる条件にて高静水圧処理を行った。処理液をTm測定、CD測定、アガロースゲル電気泳動、DLS測定にて解析した。また、高圧処理によるDNAの機能解析として、ウサギ網膜赤血球を用いた無細胞系転写・翻訳、核酸分解酵素を用いた分解性試験により検討した。さらに、培養細胞への遺伝子導入を試みた。

【結果と考察】高静水圧印加後のDNAのDLS測定より、DNAの凝縮が確認できた。また、Tm測定、CD測定にて構造変化が示された。高圧凝縮DNAでは、分解酵素耐性と転写・翻訳活性の向上が示され、遺伝子送達への応用の可能性が示唆された。本研究は、厚生労働省科学研究費および文部科学省科学研究費の補助を受けて行われた。