

江橋 具、永谷憲歳、橋本成広、藤里俊哉	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	再生医療	6 増刊号	196 298	2007
染川将太、江橋具、森反俊幸、藤里俊哉	スキャフォールドへの新規細胞播種方法の検討	再生医療	6 増刊号	308	2007
戸川祐一、江橋具、吉田謙一、船本誠一、西岡宏、大場謙吉、藤里俊哉、中谷武嗣	バイオリアクターを用いた脱細胞化 scaffoldへの細胞播種と培養	再生医療	6 増刊号	204 248	2007
高瀬 潤、江橋具、藤里俊哉、橋本成広	筋芽細胞に対する磁場の影響	再生医療	6 増刊号	297	2007
江橋 具、永谷憲歳、橋本成広、藤里俊哉	脱細胞化筋スキャフォールドを用いた骨髄由来間葉系幹細胞の筋分化誘導.	生体医工学	45, Suppl. 1	108	2007
寺田堂彦、澤田和也、緒方裕之、江橋 具、平工香織、鎌田和加子、吉田謙一、船本誠一、永谷憲歳、岸田晶夫、藤里俊哉、中谷武嗣	生体内で自己組織化するバイオ人工血管の開発	生体医工学	45, Suppl. 1	191	2007
寺田堂彦、澤田和也、江橋具、平工香織、鎌田和加子、永谷憲歳、藤里俊哉、中谷武嗣、吉田謙一、船本誠一、岸田晶夫	生体内で再細胞化する無細胞バイオ人工血管の開発	Polymer Preprints, Japan	56(1),	2111	2007
Ehashi T, Nagaya N, Hashimoto S, Fujisato T	Effect of stretch culture of mesenchymal stem cells on their differentiation into skeletal muscle cells	TERMIS-NA,			2007
Ehashi T., Somekawa S., Udagawa H., Fujisato T.	Novel Cell Seeding Method for the Tissue-derived Acellular Scaffolds	Tissue Eng	13	1735	2007
Terada D., Sawada K., Ogata H., Ehashi T., Hiraku K., Kamata W.,	Development of the Regenerative Vascular Graft Having an In Vivo Repopulationality	Tissue Eng	13	1673	2007

Yoshida K., Funamoto S., Nagaya N., Kishida A., Fujisato T., Nakatani T.					
Miskon A, Terada D., Ehashi T., Fujisato T., Mahara A., Uyama H., Yamaoka T	Preliminary Study of In Vitro Niche Effect on Differentiation of Rat Bone Marrow Stem Cells to Cardiomyocytes-Like Cells	Tissue Eng	13	1746	2007
林宏行, 山崎健 一, 小林裕之, 宇 戸禎仁, 江橋具, 近藤英雄, 橋本成 広, 藤里俊哉	電気パルスによる骨 格筋細胞収縮の制御	第5回生活支援 工学系学会連 合大会講演予 稿集		103	2007
Ehashi T, Somekawa S, Udagawa H, Fujisato T	Novel Method for Interspersed Cell Inoculation into the Tissue-derived Scaffold	人工臓器	36(2)	S-99	2007
K Yamasaki, H. Hayashi, S. Uto, T. Ehashi, S. Hashimoto, H. Tsutsui, S. Mochizuki, H. Kondo, M. Yoshiura, T. Fujisato	Control of skeletal muscle cell contraction by electrical pulse	Artificial Organs	Vol.3 1 No.10	65-66	2007
西垣戸麻美、江橋 具、山岡哲二、藤 里俊哉	超高静水圧印加処理 による脱細胞神経グ ラフトの作製	第29回日本バ イオマテリア ル学会大会予 稿集		339	2007
Ehashi T, Hashimoto S, Fujisato T	Acellular skeletal muscle scaffold as an inducer of muscular differentiation	1st Asiam Biomaterials Congress Abstract		264	2007
林宏行、山崎健一 、宇戸禎仁、小林 裕之、江橋 具、 近藤英雄、橋本成 広、藤里俊哉	培養筋管細胞の収縮 動態の定量評価	第20回バイオ エンジニアリ ング講演会講 演論文集	No.07 -49	297- 298	2008

江橋 具、馬原淳、寺田堂彦、藤里俊哉、山岡哲二	毛細血管の再構築を誘導できる新規スキャフォールドの開発	再生医療	7,Suppl	237	2008
西垣戸麻美、江橋具、藤里俊哉、森反俊幸、山岡哲二	超高圧印加処理により作製した脱細胞化神経の移植	再生医療	vol.7, Suppl. 2008. 2	204	2008
T Ehashi, H Hashimoto, T Fujisato.	Elongation of bone marrow cells stimulates differentiation into skeletal muscle cells cultured in the acellular scaffold.				In preparation
Fujisato T, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S.	Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing.	High Press Biosci Biotech	1(1)	161-5	2007
Kimura T, Iwai S, Moritan T, Nam KW, Mutsuo S, Yoshizawa H, Okada M, Furuzono T, Fujisato T, Kishida A.	Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery	J Artif Organs	10	104-08	2007
澤田和也、寺田堂彦、藤里俊哉	繊維と線維（生体繊維の洗浄と再生医療への展開）	繊維と工業	63(5)	120-24	2007
Fujisato T, Funamoto S, Yoshida K, Yamaoka T, Kimura T, Kikuchi M, Kobayashi Y, Kishida A, Nakatani T	Regenerative Tissue Scaffolds Prepared by Gamma Ray Irradiation	The 2007 Annual meeting of The Society for Biomaterials		860	2007
内田 翔、藤里俊哉、小堀哲生、村上章、山岡哲二	オリゴ乳酸-ペプチドコンジュゲートを用いたポリ乳酸スキャフォールドの表面修飾	Polymer Preprints, Japan	56(1)	2104	2007
Terada D, Sawada K, Ogata H, Hiraku K, Kamata W, Yoshida K, Funamoto S, Nagaya N, Kishida A, Fujisato T, Nakatani T	Development of the vascular graft having an in situ repopulationality	TERMIS-NA,			2007

Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S.	Regenerative vascular graft for aortic root reconstruction in porcine model	The Society for Heart Valve Disease 4th Biennial Meeting		323	2007
寺田堂彦、藤里俊哉	移植用生体弁の力学評価	Fiber Preprints, Japan	62(2)	15	2007
藤里俊哉、菊池正博、坂下哲哉、舟山知夫、小林泰彦、船本誠一、木村剛、岸田晶夫、山岡哲二	放射線照射による脱細胞バイオスキャフォールドの調製	第2回高崎量子応用研究シンポジウム			2007
船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、南祐広、望月学、藤里俊哉、木村剛、小林尚俊、岸田晶夫	超高压処理技術を応用した人工角膜の作製と評価	第15回生物関連高压研究会20周年記念シンポジウム		P-1	2007
寺田堂彦、藤里俊哉、中谷武嗣、北村惣一郎	再生型生体弁の特性評価	日本機械学会2007年度年次大会		291-2	2007
山崎健一、林宏行、小林裕之、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉	電気パルスを用いた筋管細胞の収縮制御	第18回バイオフィロンティア講演会		23-24	2007
Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S	Tissue regeneration by acellular scaffolds prepared by detergent-free treatment.	人工臓器	36(2)	S-14	2007
T Kimura, S Iwai, T Moritan, K Nam, S Mutsuo, H Yoshizawa, M Okada, T Furuzono, T Fujisato, A Kishida	Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery	Journal of Artificial Organs	10	104-108	2007
T Kimura, S Funamoto, Y Hashimoto, S Sasaki, M Mochizuki, K Nam, T Fujisato, S Kitamura, H Kobayashi, A Kishida	Preparation and preliminary animal study of decellularized cornea using high hydrostatical pressurization				In preparation
T Fujisato, S Funamoto, K Yoshida, T Yamaoka, T Kimura, M Kikuchi, Y Kobayashi, A Kishida, T Nakatani	Regenerative Tissue Scaffolds Prepared by Gamma Ray Irradiation	The 2007 Annual Meeting of the Society For Biomaterials		No.860	2007

H Kobayashi, T Kimura, S Funamoto, Y Hashimoto, S Sasaki, M Mochizuki, K Nam, T Fujisato	A Kishida, Preparation of decellularized cornea by chemical and physical methods	TERMIS-NA,			2007
寺田堂彦、藤里俊哉	移植用生体弁の力学評価	Fiber Preprints	62(2)	15	2007
Murakoshi A., Kimura T., Funamoto S., Fujisato T., Nakatani T., Kitamura S., Kishida A.	Effect of the Pressurizing Process on the Decellularized Aortic Tissue Using Ultra High Hydrostatic Pressurization	Tissue Eng	13	1680	2007
H Kobayashi, T Kimura, S Funamoto, Y Hashimoto, S Sasaki, M Mochizuki, T Fujisato, A Kishida	Implantation of porcine cornea decellularized by ultra high pressurization to rabbit cornea	Tissue Eng	13	1709-10	2007
Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A	Preparation and characterization of cornea decellularized by ultra high pressurization	Tissue Eng	13	1746-47	2007
寺田堂彦、藤里俊哉 、中谷武嗣、北村惣 一郎	再生型心臓弁の特性評価	日本機械学会2007 年度年次大会講演 論文集	No.07- 1, vol.5	291-292	2007
Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S	Tissue Regeneration by Acellular Scaffolds by Detergent-Free Treatment,	人工臓器	36(2)	S-14	2007
T. Kimura, S. Funamoto, Y. Hashimoto, S. Sasaki, M. Mochizuki, K.W. Nam, T.Fujisato, T.Nakatani, S.Kitamura, H.Kobayashi, A.Kishida	Acellular porcine cornea via ultra-high pressurization as a scaffold for regeneration of cornea	人工臓器	36(2)	S-86	2007
船本誠一、橋本良秀 、南広祐、佐々木秀 次、望月學、藤里俊 哉、木村剛、小林尚 俊、岸田晶夫	組織工学的手法による人 工角膜の開発	第29回日本バイオ マテリアル学会大 会予稿集		126	2007

近藤英雄、北孝之、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉	生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の基礎的検討	第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集		286	2007
奈良雅尚、山崎健一、寺田堂彦、澤田和也、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉	ポリプロピレン繊維を用いた筋芽細胞の三次元培養	第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集		335	2007
T. Kimura, S. Funamoto, Y. Hashimoto, S. Sasaki, M. Mochizuki, K.W. Nam, T. Fujisato, T. Nakatani, S. Kitamura, H. Kobayashi, A. Kishida	Characterization of acellular porcine cornea by ultra-high pressurization as artificial cornea	TERMIS-AP			2007
T. Fujisato, D. Terada, K. Sawada, K. Yoshida, A. Kishida, K. Miyamoto, K. Niwaya, T. Nakatani, S. Kitamura	Evaluation of Acellular Scaffolds for Heart Valve Regeneration	1st Asiam Biomaterials Congress		112	2007
Y. Saitoh, M. Katanoda, H. Yamada, T. Fujisato, T. Kimura, K. A. Kishida, K Takakuda	Reconstruction of small diameter arteries using acellular vessel scaffold	1st Asiam Biomaterials Congress		250	2007
S. Funamoto, Y. Hashimoto, S Sasaki, M. Mochizuki, T. Kimura, T. Fujisato, H. Kobayashi, A. Kishida	Development of Acellular Cornea as an Artificial Cornea	1st Asiam Biomaterials Congress		263	2007
Fujisato T, Terada D, Funamoto S, Minatoya K, Kishida A, Yamaoka T, Nakatani T, Kitamura S	Tissue Regeneration by Decellulitized biological scaffolds prepared by detergent-free treatment	Biologic Scaffold for Regenerative Medicine, 5th Symposium,		12	2007
山崎健一、林宏行、小林裕之、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉	電気パルスを用いた筋管細胞の収縮制御	第18回バイオフロンティア講演会講演論文集		23-24	2007
山崎健一、寺田堂彦、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉	無細胞生体由来組織を用いた筋芽細胞の3次元培養	第10回日本組織工学会抄録集		62	2007

近藤英雄, 北孝之, 山崎健一, 寺田堂彦, 橋本成広, 藤里俊哉	電気インピーダンス法を用いた骨格筋の評価	第18回バイオフロンティア講演会講演論文集		29	2007
橋本良秀, 船本誠一, 佐々木秀次, 望月學, 藤里俊哉, 木村剛, 小林尚俊, 岸田晶夫,	脱細胞化角膜の組織適合性評価、日本再生医療学会雑誌、7、Suppl、260、2008	日本再生医療学会雑誌	7,Suppl	260	2008
村越彩子, 木村剛, 船本誠一, 藤里俊哉、岸田晶夫、	力学特性の制御を目指した脱細胞化血管の調製	日本再生医療学会雑誌	7,Suppl	280	2008
寺田堂彦, 澤田和也、緒方裕之、平工香織、鎌田和加子、吉田謙一、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫、山岡哲二、中谷武嗣	脱エラスチン化血管組織をスキヤフォールドとして用いた動脈組織再生	日本再生医療学会雑誌	7,Suppl	280	2008
玉井克明, 藤里俊哉、岸田晶夫、山岡哲二、	血管組織の新規脱細胞化処理法の検討、	日本再生医療学会雑誌	7,Suppl	280	2008
山崎健一, 寺田堂彦, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉	無細胞生体由来組織を基材としたバイオアクチュエータの開発	第20回バイオエンジニアリング講演会講演論文集	No.07-49	313-314	2008
近藤英雄, 北孝之、山崎健一、寺田堂彦、橋本成広、藤里俊哉	電気インピーダンス法による骨格筋損傷度の評価の試み	第20回バイオエンジニアリング講演会講演論文集	No.07-49	173-174	2008
山崎健一、寺田堂彦、奈良雅尚、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉	脱エラスチン組織ーコラーゲン複合体を足場としたC2C12細胞の3次元培養	日本再生医療学会雑誌	vol.7, Suppl.2 008.2	285	2008
近藤英雄, 北孝之、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉	生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の検討	日本再生医療学会雑誌	vol.7, Suppl.2 008.2	291	2008
林 宏行、山崎健一、小林裕之、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉	電界に対する培養筋管細胞の異方性	日本再生医療学会雑誌	vol.7, Suppl.2 008.2	286	2008
奈良雅尚、山崎健一、寺田堂彦、澤田和也、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉	ポリプロピレン繊維ーコラーゲン複合体を用いた筋芽細胞の3次元培養	日本再生医療学会雑誌	vol.7, Suppl.2 008.2	285	2008

北 孝之、近藤英雄、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉	電気インピーダンス法を用いた培養筋成熟度の評価の試み	日本再生医療学会雑誌	vol.7, Suppl.2 008.2	285	2008
西山慶子、川北悠介、林 宏行、山崎健一、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉	細胞への電気刺激を目的とした電位分布の測定	日本再生医療学会雑誌	vol.7, Suppl.2 008.2	286	2008

III. 研究成果の刊行物・別刷

Preparation of a decellularized tissue as a scaffold for reconstructing skeletal muscle in vitro

TE Ehashi¹, W Kamata¹, S Funamoto², K Yoshida³, A Kishida², N Nagaya¹, T Fujisato¹

¹National Cardiovascular Center, OSAKA, Japan

²Tokyo Medical & Dental Univ, TOKYO, Japan

³Found for Biomed Res & Innovation, KOBE, Japan

The reconstruction of the skeletal muscles has gain special interest recently. The loss of muscle tissue and function is caused of traumatic injuries, tumor resection or muscular dysfunction due to myopathies. These can be treated partly with genetic therapy or transplantation of the native cells or tissues, whereas these therapies have some limitations in restoring the normal function completely. To overcome these limitations, the tissue engineering techniques for reconstructing the skeletal muscle tissues have been studied recently. However, the engineering of skeletal muscle tissue is still challenging due to the complex relationship among muscle cells, micro-vessels and neurons. In this study, the decellularized porcine femoral skeletal muscle tissues were prepared as scaffolds and immature muscle cells were cultured to reconstruct the skeletal muscle tissue in vitro.

The scaffolds were prepared by isostatic ultra-high pressure of 980 MPa at 10.C followed by washing with PBS. Myoblasts were isolated from porcine femoral skeletal muscle tissue by trypsinization, and inoculated in the scaffolds. Cell inoculation was performed by either injecting with collagen gel with needle or centrifugation with medium. To stimulate the cell proliferation and differentiation into the muscle fiber, the scaffolds with cells were stretched up to 110% of original length and relaxed continuously at a frequency of a range from 10 to 100Hz.

The microscopic observation of the decellularized tissue stained with hematoxylin and eosin showed no nucleated cells in the tissue. Furthermore, the amount of DNA in the scaffold dramatically decreased. The mechanical properties of the scaffold were changed in part, but the elastic modulus calculated from the elastic region of its strain-stress curve was almost the same as the native skeletal muscle. The cells cultured both inside and on the surface of the scaffolds in the stretch-and-relax state showed more extended morphologies compared with the cells cultured in the static state.

In conclusion, the skeletal muscle cells that inoculated in and on the decellularized muscle tissue scaffold in the stretch-and-relax condition showed good expansive ability. This culture technique with the decellularized scaffold may have a possibility to reconstruct the skeletal muscle tissue in vitro.

Differentiation of normal human bronchial epithelial cells from explant-outgrowth culture in bilayer co-culture with human foetal lung fibroblasts

MI Hermanns, S Fuchs, M Bock, C Pohl, CJ Kirkpatrick
University of Mainz, MAINZ, Germany

Epithelium-fibroblast interactions have been suggested to play a crucial role in the course of lung epithelial repair and differentiation. To study interactions of lung epithelial cells and fibroblasts, we developed an in vitro co-culture model based on a high-throughput-screening (HTS) 24-well Transwell filter plate. This could be useful for tissue engineering (TE) of upper airways.

After an explant-outgrowth culture of epithelial cells from small bronchi (diameter < 5mm) pure populations of primary isolated normal human bronchial epithelial cells (NHBE) were used to study interactions with a normal human foetal lung fibroblast cell line (Wi-38). To constitute a differentiated phenotype, the epithelial cells were cultivated on an extracellular matrix (collagen type I) and maintained at an air-liquid interface (ALI). Therefore the cells were grown in contact with air by feeding basolaterally with medium. Normal human bronchial epithelial cells were cultured alone, on a permeable filter over fibroblasts, and in bilayer co-culture with fibroblasts. Barrier properties and morphological phenotype were compared for the different culture conditions.

On 24-well Transwell filter plates at the air-liquid interface the NHBE formed confluent layers, expressing the tight junction (TJ) proteins occludin and ZO-1 in continuous circumferential patterns suggestive of functional TJs. This interpretation was supported by the development of a corresponding transepithelial electrical resistance (TER). Maximum TER-values that averaged $1000 \pm 223 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ were found after 14 to 20 days and persisted for up to 28 days in bilayer co-culture with Wi-38. Furthermore, mucus production and cilia formation reappeared in NHBE dependent on the individual donors after 21 to 28 days at ALI in bilayer co-culture. In monoculture or exposed to fibroblast supernatants (growth on permeable filter over Wi-38) the NHBE were less differentiated. These results suggest that fibroblast-secreted factors and air-liquid interface culture promote epithelial growth and differentiation.

In summary, human bronchial epithelial cells from explant-outgrowth culture of small bronchi grown in co-culture with the foetal lung fibroblast cell line Wi-38 at the air-liquid interface mimic the structure of native polarized bronchiolar epithelium. This model could be useful to study cell interactions with suitable biomaterials for TE of the proximal airways.

再生医療・マトリックス

G-115 コバルト60による γ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理

東京医科歯科大学生体材料工学研究所¹⁾, 国立循環器病センター²⁾, 日本原子力研究開発機構³⁾

船本 誠一¹⁾, 江橋 具²⁾, 菊池 正博³⁾, 小林 泰彦³⁾, 山岡 哲二²⁾, 岸田 晶夫¹⁾, 藤里 俊哉²⁾, 中谷 武嗣²⁾

【緒言】我々は、ミニブタ心臓弁や血管、心膜、気管、軟骨等組織から細胞及びウイルス等のドナー由来成分を除去した脱細胞化組織の開発を行ってきた。脱細胞化組織は、臨床で不足している移植用組織や、テーラーメイド型医療において幹細胞等の患者由来細胞を組み込むための生体スキャフォールドとしての利用が考えられる。これまで、独自技術として超高压印加処理を用いた脱細胞化方法について報告を行ってきた。超高压処理技術が食品加工技術である一方、食品保存に使用されている γ 線照射は、線量により組織破壊を伴わない滅菌やウイルスの破壊も行うことできる。そこで細胞への傷害も期待できるもとして、 γ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理を検討した。【実験方法】脱細胞化処理方法は、脱細胞化組織として摘出してきた食用ブタあるいはミニブタ大動脈をPBSに浸漬し、10 Gyから1000 Gyの範囲で γ 線を照射した。続けて、PBSをベースとする洗浄液にて2週間洗浄した。照射直後と洗浄後の処理組織をHE染色で観察するとともに、組織内残留DNA量の測定を行った。また、照射線量による組織の力学特性への影響を、力学試験機を用いて調べた。さらに、処理後の脱細胞化組織をラット皮下に移植し、2週間後に取り出してHE染色やCD68抗体を用いた免疫染色により組織学的に検討した。【結果・考察】HE染色の結果、 γ 線未照射の組織では洗浄後も組織内に核の残存が見られたが、組織の γ 線照射線量が増えるにつれて組織内の核の数が減少していた。組織内残留DNA量も、100 Gy以上では大幅に減少する傾向が見られた。また、 γ 線を用いた脱細胞化組織の力学特性には変化は見られなかった。さらに、移植後2週間の組織のCD68染色の結果、未処理組織では組織内部にCD68陽性細胞が多く見られたのに対し、脱細胞化組織においてはCD68陽性細胞が減少しており特に300 Gyと1000 Gyのものでは組織内部の炎症が大幅に抑制されていた。これらのことからコバルト60による γ 線を用いた脱細胞化処理方法は生体スキャフォールド作製に有効であると示唆された。

G-116 生体内に酷似したバイオリクターシステムによる強度のある3層血管の創生

Laboratory for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School¹⁾, 早稲田大学生命医療工学研究所²⁾, 早稲田大学大学院生命理工学専攻³⁾

岩崎 清隆^{1), 2)}, 小島 宏司¹⁾, 小玉 正太¹⁾, Paz Christina¹⁾, 梅津 光生³⁾, Vacanti Charles¹⁾

【緒言】血管のTissue Engineeringについては世界的に多くの研究がなされているが、動脈系に長期耐えうる臨床用組織工学血管は開発されていない。我々は、生体内と酷似した血圧・血流及びpHや炭酸ガス濃度を調整可能な生理的拍動バイオリクターシステムを開発し、細胞、分解吸収性高分子、及びバイオリクターを駆使し、冠動脈バイパスやシャント用等に應用可能な血管の創生を目指している。【方法】ウシ動脈血管から内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞をそれぞれ採取・初代培養した。Non-wovenポリグリコール酸及びポリ ϵ カプロラク톤の平面状分解吸収性高分子に平滑筋細胞を播種して2日～1週間の平面培養後、外径6mmのチューブに巻き付けさらに2～4週間振盪培養した。その後、線維芽細胞を播種して2日間培養した平面状ポリグリコール酸を外側に巻き付けチューブからはずして血管マウントチャンバに取り付け、内腔に血管内皮細胞混濁培養液を注入し12時間インキュベータで静置した。そして、開発した拍動バイオリクターシステムに組み込み、1週間～19日間、pH7.4、炭酸ガス濃度5%、拍動数70BPM、平均圧力20, 70, 100mmHgで脈圧が ± 20 mmHg程度、流量0.4～0.6L/minのような生体代替環境で拍動培養を行った。【結果及び考察】創った血管を走査型電子顕微鏡で観察した結果、全内腔が内皮細胞で覆われていた。また、組織染色像から、平滑筋細胞層が観察され、3層血管が創生できていることが明らかとなった。また引張試験を行った結果、足場の分解性高分子のみでは血管とは異なる応力-ひずみ特性であったが、バイオリクターを使って創ったEngineered血管はすべて本来の血管と同様の応力-ひずみ特性へ変化することが判明した。さらに、19日間動脈環境で拍動培養した血管の弾性率及び破断強度はウシの動脈血管とほぼ同程度の強度特性を有するまで上がることが明らかとなった。【結語】生理的圧力、流量、pH及び炭酸ガス濃度の環境下で拍動培養可能なバイオリクターシステムを駆使し、動脈血管と同程度の機械的特性を有する3層血管をin vitroで創生することに成功した。今後、動物実験により、長期耐久性を検討していく。

G-117 脱細胞化筋スキャフォールドを用いる筋芽細胞の伸長培養

国立循環器病センター研究所再生医療部¹⁾, 東京医科歯科大学²⁾, 先端医療振興財団³⁾, 国立循環器病センター臓器移植部⁴⁾

江橋 具¹⁾, 鎌田 和加子¹⁾, 船本 誠一²⁾, 吉田 謙一³⁾, 岸田 晶夫²⁾, 中谷 武嗣⁴⁾, 永谷 憲歳¹⁾, 藤里 俊哉¹⁾

【緒言】腫瘍切除や事故による組織の損失や、筋ジストロフィー症などの筋疾患による、筋組織の退縮・機能低下に対する外科的治療として、患者自身の健全組織の移植や細胞移植などが行われている。しかし、これらの治療法を用いても筋組織機能の完全な回復は困難で、患者のQOLも著しく低下する。そこで本研究は、移植用の筋組織を生体外で再構築することを目的として、脱細胞化筋スキャフォールドを用いた再生型筋組織の作製の基礎的検討を行った。【実験方法】組織構築のための細胞の足場となる脱細胞化筋スキャフォールドは、食用ブタの骨格筋組織から、超高静水圧印加法を含む脱細胞化処理により作製した。細胞は、未成熟筋細胞である筋芽細胞あるいは骨髄由来間葉系幹細胞を用い、これらの細胞を、遠心操作や注射器を用いた方法で脱細胞化筋スキャフォールドに播種したのち、三次元培養を行った。このとき、通常の静置培養に加えて、細胞を播種したスキャフォールドを伸展培養装置に装着し、全体を20%まで伸長させる、あるいは伸長-弛緩を繰り返す培養を行い、三次元培養やスキャフォールドの伸長が、細胞の増殖や筋細胞への分化に及ぼす影響について検討した。【結果と考察】作製した脱細胞化筋スキャフォールドの組織学的観察とDNA量の計測から、スキャフォールド内の細胞核は完全に脱化されていることが確認された。脱細胞化筋スキャフォールドへの細胞の播種では、遠心操作や注射器を用いるいずれの方法でも、細胞をスキャフォールド内部にまで播種することができた。細胞播種後24時間静置して細胞を接着させたのち、スキャフォールドを伸長のみ、あるいは伸長-弛緩を一定周期で繰り返す培養を3日間行った結果、細胞の形態は通常の静置培養を行った場合よりも、伸長方向に細長く伸展していたことから、増殖や分化活性が高まる可能性が考えられた。以上の結果から、脱細胞化筋スキャフォールドを用いる筋芽細胞の伸長あるいは伸長-弛緩培養により未成熟な細胞を増殖・分化させて、生体外における再生型筋組織構築の可能性が示唆された。

G-118 組織再生用スキャフォールドのための生分解性薄膜からなる人工毛細血管デバイスの開発

名古屋大学大学院工学研究科

池内 真志, 生田 幸士

【目的】生体外で厚い組織を再生するには、スキャフォールド内部の微小循環が不可欠である。この問題に対し、我々は「人工毛細血管デバイス」を用いた新たなスキャフォールド構造を提案している。人工毛細血管デバイスとは、生分解性樹脂の薄膜で作製されたシート状の微小流路ネットワークである。流路壁の厚さは数 μm で、表面には多数の $1\mu\text{m}$ オーダーの微細孔を有する。そのため、細胞は流路壁面に保持されるが、ガスや培地成分は流路内外を透過できる。この人工毛細血管デバイスと、細胞の層を交互に重ねることにより、スキャフォールド内部の微小循環系を構築し、従来、不可能であった厚い組織を再生することを目指している。本研究では、新たに開発した微細加工法を用いて、人工毛細血管デバイスを作製し、その機能を検証した。

【方法及び結果】人工毛細血管デバイスを作製するために、新原理の微細加工法MeME (Membrane Micro Embossing)を開発した。この手法では、薄膜からなる自由な立体構造を数 μm の分解能で作製することができる。デバイスの材料として、直径 $1\mu\text{m}$ 程度の微細孔を有する多孔質ポリ乳酸薄膜(厚さ $5\mu\text{m}$)を相分離法により作製した。MeME法を用いて、この多孔質ポリ乳酸薄膜からなる、内径 $50\mu\text{m}$ の微小流路のネットワークを作製することに成功した。流路壁の透過性を検証するため、直径 $0.1\sim 15\mu\text{m}$ のビーズの懸濁液を流路外側から滴下した。その結果、 $1\mu\text{m}$ 以下の粒子は流路壁を透過し、それ以上の直径を持つ粒子は、流路壁の表面で保持されることを確認した。これは、流路壁上に細胞が保持され、かつ、培地成分は流路壁を透過することを示している。さらに、この流路表面をコラーゲンで修飾した後、ヒト血管内皮細胞(HUVEC)を培養した結果、一般的な培養容器と同等の細胞密度と増殖率を得た。

【結論】本研究では、新原理のMeME法を用いて、人工毛細血管デバイスの作製が可能であることを示した。さらに、作製したデバイスが、スキャフォールド内の微小循環系に求められるサイズ選択的透過性と細胞培養適合性を有することを実証した。今後、この人工毛細血管デバイスを積層し、厚い組織の培養への有効性を検証する。

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。この心臓弁組織へレシピ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

クラウン系ミニブタ (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 9.95×10^{-3} [m/s]、培地量は 300 ml で実験を行った。

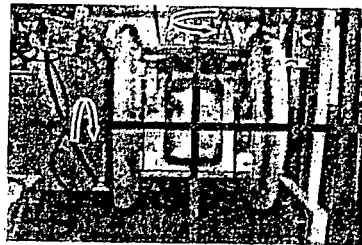


Figure 1. Image of Rotating bioreactor.

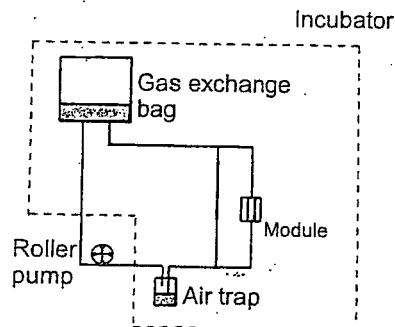


Figure 2. Schematic diagram of Circulation bioreactor.

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。

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¹, 鎌田和加子¹, 船本誠一², 吉田謙一³,
岸田晶夫², 永谷憲歳¹, 中谷武嗣⁴, 藤里俊哉¹

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

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。

O-10-2 ラット骨格筋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¹, 山岡 薫², 梅田 知佳¹, 吉元 玲子¹,
佐々木 輝¹, 呉 樹亮¹, 新田 純子¹, 真鍋 朋誉¹,
岩田 全広¹, 梶梅 輝之², 弓削 類¹

¹広島大学大学院保健学研究科, ²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 2.0 msec, 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 m
yogenin, 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
までにしか分化しない。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スタンパ
P-002 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¹, 末盛 博文², 戸口田 淳也³,
岩田 博夫¹

¹京都大学再生医科学研究所組織修復材料学分野, ²京都大学再
生医科学研究所霊長類胚性幹細胞研究領域, ³京都大学再生医
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順化培養液を用いて, 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
P-374 胞の静的伸長培養

江橋 具¹, 永谷 憲歳¹, 橋本 成広², 藤里 俊哉¹
¹国立循環器病センター研究所再生医療部, ²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, 健康組織を移植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壊死に
対して, 現在のところ切除以外の有力な治療法がない。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製する
ことを目的とした, 脱細胞化筋スキャフォールドを用いる骨
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へ
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, 超高静
水圧印加処理を用いて作製した脱細胞化筋スキャフォールドに
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, スキャフォールドを用いる三次元培養を行い,
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】スキャ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細長
く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
P-010 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, 過足 芳子, 佐伯 久美子, 中原 正子,
佐伯 晃一, 松山 さと子, 湯尾 明

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や空
気の交換を行うため不可欠な組織である。すなわち再生医療の
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作製
は重要な課題となっている。我々は今回, 無血清培養下カニク
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パンギングド
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
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, 内部
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。一方の囊状構造物とその周
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 解析
では, VE-cadherin と PECAM1 が同時に発現する細胞が 10-
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, 凍結融解後にも保持され
ていた。現在, ES 由来内皮細胞の in vivo での機能につき解
析中である。

P-371 ラット筋芽細胞の採取における週齢の及ぼす影響についての検討

才原 良子, 真家 未紀, 瓜田 泰久, 金子 節子, 金子 道夫, 小室 広昭

筑波大学大学院人間総合科学研究科小児外科

【はじめに】筋芽細胞を用いた骨格筋の再生による再生医療は様々な筋疾患や心疾患への応用が可能である。その際、安定的な細胞の確保が必要であることから、筋芽細胞の採取条件の検討を行った。

【方法】生後1日目・2週目・4週目のラットの骨格筋から、プレプレイング法により筋芽細胞を分離した。培養7日目～10日目の細胞を固定しアスミン抗体を用いて免疫染色を行い、筋芽細胞数の比較をした。

【結果】生後1日目・2週目・4週目において、全細胞数に対する筋芽細胞の比率は、それぞれ45%・78%・22%であった。また、細胞増殖速度は筋芽細胞比と同じく生後2週目が一番早く、次に生後1日目、生後4週目の順であった。

【考案】筋芽細胞の増殖能は出生後よりラットの成長と共に次第に高くなり、その後低下することが示唆された。この結果より筋芽細胞を用いた骨格筋の再生療法は小児期の細胞を用いるのがより効率的と考えられた。

【今後の予定】現在、幼若 GFP ラットの骨格筋より筋芽細胞を採取、継代培養で増幅させたのち、非 GFP ラットへ移植しその生着を観察し、筋芽細胞を用いた筋再生の可能性について検討を行っている。

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

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

¹広島大学大学院保健学研究科, ²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 2.0 msec, 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。【考案】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。

P-373 骨格筋の再生過程におけるマクロファージと GDF3 の役割

兼松 将矩, 瀬川 将司, 山本 有希子, 中島 麻里, 佐藤 雅紀, 森川 大亮, 深田 宗一郎, 辻川 和文, 山元 弘

大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野

骨格筋は再生能を有する組織であり、その中心として働くのが筋組織特異的幹細胞-筋衛星細胞-である。更に、この筋再生過程には好中球・マクロファージなどの炎症性細胞の浸潤を伴うことが知られている。特にマクロファージは筋衛星細胞の活性化・増殖・融合に関わる分子を産生していると考えられており、その分子の同定は筋再生促進分子として筋疾患の予防、治療に期待されている。我々は M-CSF の受容体に対する抗体、AFS98 を用いてマクロファージを抑制し、筋再生におけるマクロファージの影響を観察した。その結果、筋障害一週後において顕著な筋管形成の減少が見られ、マクロファージが筋再生、特に融合過程に必須であることが分かった。次に我々は、マクロファージから分泌される筋融合促進因子を同定する目的で、thioglycolate で誘導した腹腔マクロファージと筋再生三日目のマクロファージ、更には筋衛星細胞の遺伝子発現解析を試み、筋再生マクロファージ特異的な分泌分子の探索を行った。その結果 BMP のアンタゴニストとして考えられる GDF3 (growth differentiation factor 3) を同定した。GDF3 は *in vitro* の培養系において BMP4 の筋管形成阻害作用を抑制した。これらの結果は、マクロファージが GDF3 を介して間接的に BMP を抑制し筋管形成を促進することを示唆している。

P-374 骨格筋再生を目指した骨髄由来間葉系幹細胞 O-10-3 胞の静的伸長培養

江橋 具¹, 永谷 憲歳¹, 橋本 成広², 藤里 俊哉¹

¹国立循環器病センター研究所再生医療部, ²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、健全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壊死に対して、現在のところ切除以外の有力な治療法がない。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、脱細胞化筋スキャフォールドを用いる骨髄由来間葉系幹細胞の培養を行った。間葉系幹細胞は、通常試薬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への影響を調べた。

【実験】ラット骨髄由来間葉系幹細胞を分離・培養し、超高静水圧印加処理を用いて作製した脱細胞化筋スキャ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、スキャフォールドを用いる三次元培養を行い、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。

【結果と考案】スキャ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細長く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。

P-411 マイクロゲルプリンターを用いた複数ゲル
素材による3次元構造の構築

西山 勇一¹, 中村 真人², 逸見 千寿香¹, 山口 久美子¹,
望月 修一¹, 瀧浦 晃基¹, 中川 英元¹

¹(財)神奈川科学技術アカデミー中村プロジェクト, ²東京医
科歯科大学生体材料工学研究所

【目的】我々は3次元の厚みを持った生体組織をインクジェ
ット技術を用いて人工的に作製することを目指している。インク
ジェットノズルから打ち出される液滴の大きさは1~数百pl
であり、細胞と同程度の大きさである。したがって、これを積
み重ねれば個々の細胞の配置を制御しながら厚みのある組織を
構築できると考えられる。細胞は生体に対して悪影響の少ない
ゲル前駆体と共に打ち出し、これをゲル化させて安定した3次
元組織の構築を目指す。そこでまずはゲルのみで3次元の様々
な構造を構築することを目的とした。

【方法】打ち出すゲル前駆体はアルギン酸ナトリウム水溶液、
ゲル化には塩化カルシウム水溶液を用いた。試作した装置は
インクジェットノズルを3軸に移動させることが可能なもので、
変位および打ち出しタイミングをPCにより制御した。ノズル
を断続的に運動させながらゲル前駆体を打ち出すことでゲル
の構造物を構築した。

【結果】直径1mm以下の複数のゲルを素材とする管を試作で
きた。これは、交互に素材が入替る縞状のものや、内側と外側
で素材が異なるものである。また、複数の平面を積層した厚み
のある構造などの構築にも成功した。

【考察】管の内側に血管内皮、外側に平滑筋細胞を含む構造を
構築できれば人工的な血管構造もできる可能性がある。また、積
層構造を持つ生体組織は多いため、今回構築できたゲル積層構
造作製技術は様々な組織に応用が可能と思われる。

P-413 細胞接着性ペプチドナノファイバーを利用
した3次元足場材料の構築

西下 直希¹, 平野 義明¹

¹大阪工業大学大学院工学研究科

【目的】Arg-Gly-Asp-Ser- (RGDS) 配列が、細胞接着に
重要であることが知られている。このRGDS配列を足場に用
いることで細胞との親和性を向上させることが期待できる。し
かし、RGDSペプチドそのものは溶解性が高いため他の材
料と組み合わせなければ足場材料としては用いることができな
い。そこで、RGDSに難水溶性ペプチドでありβシート構造
を形成するペプチドを組み合わせたペプチドを設計することで、
βシート構造の相互作用を利用し、さまざまな形状の足場材料
を設計することを目的とした。

【結果】今回合成したペプチドは、Fmocケミストリーを用い
た固相合成法により行った。HPLCで生成した後、アミノ酸
分析・元素分析・MALDI-TOF-MSによりペプチドの合成を
確認した。また、円二色性測定によりβシート構造であること
も確認した。さらに、細胞接着実験の結果、このペプチドは高
い細胞接着性および細胞伸展活性を示した。また、pHなどの
条件をコントロールすることにより、ナノファイバーが可能と
なった。さらに、これらのペプチドを自己組織化させることで
ペプチドスポンジの構築にも成功した。

【考察】この材料は、細胞親和性にも秀で、再生工医学用の足
場材料に利用できると期待できる。また、細胞接着に重要な
RGDSの構造を変化させることで、細胞形態にどのような変
化が見られるのかを分光学的な観点より考察した。

P-412 スキャフォールドへの新規細胞播種方法の
検討

染川 将太¹, 江橋 具², 森反 俊幸¹, 藤里 俊哉²

¹鈴鹿医療科学大学医用工学部臨床工学科, ²国立循環器病セン
ター研究所再生医療部

【目的】我々は、心筋梗塞などの心疾患の治療に用いる脱細胞
化心筋スキャフォールドを作製してきた。しかし、これまでに
スキャフォールドへの細胞播種方法をいくつか検討したものの、
いずれの方法でも細胞接着が困難で、また、スキャフォールド
内部まで細胞を播種することができなかった。そこで本研究は、
心筋スキャフォールド内部に細胞を播種することを目的として、
通常の穿刺針あるいは無針注射器を用いたスキャフォールドへ
の新規細胞播種方法を検討した。

【方法】ブタ心筋を超高静水圧印加処理法により脱細胞化処理
をして、心筋スキャフォールドとした。このスキャフォールド
に穿刺針、もしくは無針注射器を用いて、細胞を播種した。こ
のとき、スキャフォールドの孔の向きに対する細胞注入の方向
などについて検討した。スキャフォールドに播種した細胞は、
染色した後、共焦点レーザ顕微鏡を用いて観察した。また、注
射器を用いることによるスキャフォールドへの物理的影響につ
いて検討した。

【結果・考察】無針注射器で注射した細胞は、心筋スキャフォー
ルドに内部にも存在していることが確認された。また、注射器
によるスキャフォールドの穴は穿刺針と比べ、無針注射器を使
用したときのほうが小さかった。したがって、無針注射器を使
用することにより、最小限の影響でスキャフォールド内部にま
で細胞を播種することが可能となった。

P-414 ACL細胞と生体親和性 scaffold 型 Leeds-
Keio 人工靭帯による靭帯再生

菊地 寿幸¹, 塚崎 哲史², 富士川 恭輔³,

笹崎 義弘¹, シードホム バハ⁴

¹独立行政法人国立病院機構村山医療センター, ²自衛隊横須賀
病院整形外科, ³白井聖仁会病院, ⁴Academic Unit of Muscul
o-Skeletal and Rehabilitation Medicine, Univ. of Leeds,
UK

【目的】我々は ACL (前十字靭帯) 細胞と生体親和性 scaffold
型 Leeds-Keio 人工靭帯(Bio-LK)を用いた靭帯再生を試みて
いる。靭帯は、実質部(線維性組織)と靭帯・骨付着部(enti
thesis)(軟骨組織)といった異なる組織が一つの unit を構成
する特殊な構造を有しており、ACL細胞という単一の細胞か
らそれらを再生させる必要がある。そこで今回は ACL細胞を
用いた靭帯実質部と entheses 再生の可能性について検討した。

【方法】家兔の ACL より単離した細胞をテーブ状 Bio-LK と
ともに遠心し、高密度の細胞塊を作成した。これを DMEM+
10%FBS 内で培養した群を DMEM 群、軟骨分化培地内で培養
した群を CDM 群とし、3週間培養を行った。培養後、プロテ
オグリカン量および DNA 量の計測と樹脂切片による免疫染色、
走査電子顕微鏡による形態観察を行った。【結果】プロテオ
グリカン量は CDM 群で、DNA 量は DMEM 群で有意に高値を
示した。免疫染色ではケラタン硫酸および II 型コラーゲンが
CDM 群に染色され、DMEM 群ではほぼ染色されなかった。
形態観察では、DMEM 群では細胞主体で、CDM 群では基質
によりテーブ全体が覆われていた。【考察】ACL細胞が、異
なる培地によって軟骨様基質と線維性基質を産生することが明
らかとなった。このことから、ACL細胞単独で靭帯実質部お
よび entheses の再生がなされる可能性が示唆された。

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 将文¹, 森本 創¹, 柴 祐司¹, 伊澤 淳¹,
伊勢 裕彦¹, 畠 清彦², 元吉 和夫³, 池田 宇一¹

¹信州大学大学院臓器発生制御医学講座循環病態学分野, ²癌研究
会附属病院化学療法科, ³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⁺細胞の有意な増加を認めたが、血管内皮前駆細胞 (CD34⁺/Flk-1⁺) 数には影響を与えなかった。また、梗塞領域では CXCR4⁺細胞の集簇を認め、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-16-6 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¹, 岩崎 清隆², 大関 泰宏¹, 山下 裕正¹,
内田 真¹, 堀見 洋継¹, 岡田 良晴¹

¹東邦大学医療センター大橋病院心臓血管外科, ²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ついて報告する。

【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クター、マイクロ波照射、拍動流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開閉は良好で、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。

【結語】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。

O-16-7 バイオリ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 祐一¹, 江橋 具², 吉田 謙一³, 藤里 俊哉²,
大場 謙吉¹, 中谷 武嗣²

¹関西大学大学院工学研究科, ²国立循環器病センター, ³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ーラーメイド型組織移植では、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、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と比較すると、循環培養後では内皮細胞の配向性が確認できた。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。

Handwritten notes:
EC scaffold
EC scaffold
は、X
EC scaffold
nanograft + ... ?
(注) 弁

P-172 心不全心において圧容量負荷は心筋再生を抑制する

鈴木 亮, 李 桃生, 大島 真子, 久保 正幸, 濱野 公一

山口大学大学院器官病態外科学心臓外科

【背景】心筋は自己再生能を有するがその割合は少なく、傷害を受けた心筋が臨床上明らかな再生を示すことはない。しかし、補助心臓装置を装着した末期心不全患者において、心機能が回復し、補助心臓装置から離脱できる症例が多数報告されている。このことより我々は過剰な圧容量負荷が心筋再生に悪影響を及ぼしているかと仮定し、検討を行った。

【方法】C57BL/6 マウスを実験に用い、心筋梗塞を作成し、60分後に以下の2群に分けた。unloading群; donorとして梗塞心を摘出し、それを別のマウスの腹腔内へ異所性に心移植を行う。梗塞心の冠血流は保たれたまま、圧容量負荷がかからない状態で拍動する。loading群; 心筋梗塞を作成後、Sham手術(開腹)のみを行う。梗塞心は圧容量負荷がかかった状態で拍動する。心筋梗塞を作成後、3,7,14,28日目に梗塞心を摘出し、圧容量負荷が存在しない状態と存在する状態での心筋の自己再生能について比較した。

【結果】unloading群ではloading群より壁厚が保たれ、梗塞面積も縮小した。Unloading群ではKi-67陽性細胞数が多く、TUNEL陽性細胞数が少なかった。c-kitおよびSca-1陽性幹細胞数はunloading群で有意に多かった。

【結語】圧容量負荷を減らすことにより、心筋の細胞増殖の増加とアポトーシスの減少が生じ、幹細胞も動員され、心筋自己再生の割合を増大させることが示唆された。

P-174 hTERT 遺伝子導入ヒト子宮内膜上皮細胞の血管内皮細胞への分化誘導

高野 令名¹, 村澤 聡^{1,2}, 小山田 晃², 岩崎 弘登², 京 哲¹, 浅原 孝之^{1,2,3}

¹先端医療振興財団先端医療センター血管再生研究グループ, ²理化学研究所神戸研究所幹細胞医療応用研究チーム, ³東海大学医学部再生医療科学, ⁴金沢大学大学院医学系研究科産婦人科

【背景】我々はこれまでにヒト血管内皮前駆細胞(EPC)がラット心筋芽細胞株(H9C2)との共培養の系において心筋、平滑筋、および内皮細胞へ分化することを報告してきた(Murasawa et al. ATVB, 2005)。今回新たな体性幹細胞源としてヒトTERT遺伝子導入により不死化したヒト子宮内膜上皮細胞を用い、血管内皮細胞への分化誘導の可能性について基礎検討を行った。

【方法】H9C2をfeederとして7日間共培養した後、血管内皮細胞への分化誘導をRT-PCR法および免疫細胞染色法により確認した。またfeeder freeの培養系においても血管内皮細胞への分化誘導をRT-PCR法により確認した。免疫不全ヌードラット心筋梗塞モデルに細胞を局所投与、3週間後に心臓を採取し免疫組織染色を行った。

【結果】共培養後のサンプルからRT-PCR法および免疫細胞染色法によりヒト特異的血管内皮マーカーの発現を認めた。またfeeder freeの系においても同様にRT-PCR法によりヒト特異的血管内皮マーカーの発現を認めた。細胞移植したヌードラット心筋梗塞モデルから採取した心臓の免疫組織切片から血管内皮マーカー(vWF)およびヒト特異的マーカー(HNA)陽性の細胞を認めた。また細胞移植したラット心筋虚血境界部位においてcapillary densityの増加を認めた。

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

戸川 祐一¹, 江橋 具², 吉田 謙一³, 藤里 俊哉², 大場 謙吉¹, 中谷 武嗣²

¹関西大学大学院工学研究科, ²国立循環器病センター, ³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配向性が確認できた。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。

P-175 血管疾患への遺伝子治療を目的とした高分子ミセル型遺伝子ベクターの開発

大庭 誠¹, 青柳 和宏², 宮田 完二郎², 西山 伸宏³, 宮田 哲郎⁴, 高戸 毅⁵, 小山 博之¹, 片岡 一則²

¹東京大学医学部附属病院血管再生医療講座, ²東京大学大学院工学系研究科, ³東京大学大学院医学系研究科, ⁴東京大学医学部附属病院血管外科, ⁵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

血管への遺伝子治療において臨床応用可能な遺伝子ベクターの開発は未だ達成されていない。血管壁への遺伝子導入では、血中の酵素や血清蛋白などにより容易に遺伝子が分解されてしまうこと、また血流にのった移動や拡散により標的部位における特定の細胞への取り込みが困難であることから、その遺伝子導入効率は非常に低い。本研究では全身投与で血管疾患部位の標的化が可能な高分子ミセル型遺伝子ベクターの開発を行う。高分子ミセル型遺伝子ベクターとは、ポリエチレングリコール-ポリカチオンブロック共重合体とプラスミド DNA から形成されるポリイオンコンプレックス型ミセルのことである。前述の血管壁への遺伝子導入における問題点の打開策として、ミセル内核に環境応答性の架橋を施すことで血中における内包遺伝子の保護機能、並びにミセル表面に疾患部位を特異的に認識できる標的指向性を付与した。実際に環境応答性の架橋としてジスルフィド架橋を施すことにより、細胞外非還元環境下での内包遺伝子の保護及び細胞内還元環境下での効果的な遺伝子放出挙動を示した。また血管内膜肥厚部位に過剰発現している $\alpha v \beta 3$ インテグリンレセプターを特異的に認識する環状型 RGD ペプチドをミセル表面に付与したところ、レセプター発現細胞特異的に遺伝子導入効率を上昇した。本発表ではさらに、環境応答性及び標的指向性の両機能を兼ね備えた高分子ミセル型遺伝子ベクターについても報告する。