

## オリゴ乳酸-オリゴペプチド結合体によるポリ乳酸スキャホールドの機能化

<sup>1</sup>国循セ研、<sup>2</sup>京工織大院 <sup>1</sup>山岡 哲二 <sup>2</sup>内田 翔  
<sup>2</sup>村上 章 <sup>1</sup>馬原 淳

【緒言】 生体吸収性かつ非毒性であるポリ乳酸系スキャホールドの細胞親和性の改善は、効率よい軟組織再生のために重要であるが、反応性の高い側鎖官能基をもたないポリ乳酸の表面修飾は困難である。これまで、カルボキシル基などの官能基を側鎖に有するモノマーとの共重合や、機能性ペプチドとの混練、あるいは、表面への物理コーティングなどが検討されてきたが、スキャホールドの強度低下や、早すぎる分解速度、あるいは、成分の固定化の不安定性と溶出が問題となっていた。

一方、さまざまな特性を有する生体吸収性材料スキャホールドを用いて、多孔質スキャホールドへと成形加工する方法も多様化しており、これらにも対応できる新たな表面修飾法の開発が望まれる。第一には、ポリ乳酸の極表面のみを加水分解する方法により、スキャホールド表面に官能基を導入する手法、第二には、細胞接着成分である RDG オリゴペプチドとオリゴ乳酸をコンジュゲートした修飾分子を用いることで、細胞接着能力に優れた新たな生分解性スキャホールド表面の構築を進め、その特性を詳細に評価した。

【実験】 ポリ(L 乳酸-co-εカプロラクトン)の多孔質体の表面を、1N の NaOH で 30 分間加水分解することで表面にカルボキシル基を導入した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドでカルボキシル基を活性化後、抗ヒト CD34 マウス IgG 抗体を固定化し、スキャホールド表面に残存した活性化カルボキシル基は、2-アミノエタノールでキャッピングした。固定化された抗体量は、HRP-抗マウス IgG 抗体を用いて間接的に定量した。この抗体修飾スキャホールド上に、CD34 抗原マーカーをもつヒト白血球由来の KG-1a 細胞  $2 \times 10^6$  個/50ml を流速 0.05ml/min で播種した。比較のために、未処理スキャホールドおよびコントロールスキャホールドにも同様の手法により細胞を播種した。

### Olig(lactic acid)/oligo(peptide) conjugates as surface modifiers for poly(lactic acid) scaffolds

\*Tetsuji YAMAOKA<sup>1</sup>, Sho UCHIDA<sup>1,2</sup>, Akira MURAKAMI<sup>2</sup> and Atsushi MAHARA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujisirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, and <sup>2</sup>Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki Sakyo-ku, Kyoto 606-8565, Japan)

Tetsuji YAMAOKA: Tel:06-6833-5012ext2637.FAX:06-6835-5476. E-mail:yamtet@ri.ncvc.go.jp

**Key Word:** scaffold, regenerative medicine, Surface modification, cell culture

**Abstract:** PLLA is widely studied as scaffolds due to its biodegradability and low toxicity, but the adhesion and proliferation of cells on PLLA surface are insufficient. Since surface modification of PLLA which do not possess any functional groups is quite difficult, we developed a novel method for its surface modification using functional peptides. Oligo(lactic acid) was conjugated to the functional peptides to stabilize the peptide on/in the PLLA scaffold. The oligo(lactic acid)-peptide conjugates were added to the PLLA solution, and the solutions were spin coated to prepare the surface-functionalized film. Cells were seeded on the surface-modified film, and their behaviors were evaluated. In addition CD34 immobilization method for preparing the hematopoietic stem cells (HSCs)-specific scaffolds was also proposed.

減圧脱水重縮合によって合成したオリゴ-L-乳酸(OLLA)を無水酢酸と反応し、OH 末端アセチル化オリゴ-L-乳酸(acOLLA)を合成した。その後、Fmoc 固相合成法で合成した細胞接着性 RGD オリゴペプチドを固相担体から切り出すことなく直接オリゴ-L-乳酸をカップリングした。得られたオリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチドコンジュゲート(acOLLA-RGD)をポリ-L-乳酸溶液に添加した。この混合溶液を用いて、スピコート法によりフィルムを作製した。作製したフィルム中でのオリゴ RGD ペプチドの三次元分布パターンを解析し、その安定性についても評価するとともに、作製したフィルムに対して NIH/3T3 細胞を  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 播種し、3 時間後の接着細胞数を WST-1 法により計数することで、細胞表面修飾効率と細胞接着増殖性との相関について検討した。

**【結果・考察】** 表面アルカリ加水分解法により、スキャホールド上に固定化された抗体量は、30ng/スキャホールドであった。図 1 には、各スキャホールド上に接着した細胞数を示した。図より明らかなように、抗体固定化スキャホールド上には、他の約4倍の細胞が吸着した。しかしながら、KG-1a 細胞は浮遊細胞であるので、未処理およびコントロールスキャホールド上に認められた細胞は、非特異的に多孔質構造にトラップされたものと考えられる。そこで、孔径と連通孔構造を制御したところ、この非特異的トラップを90%以上の効率で抑制することに成功した。その結果、in vitro 細胞播種システムでは、CD34 陽性細胞を 80%以上の効率でトラップすることが可能となった。また、イヌ骨髄細胞を用いた in situ テストにおいては、約2%の CD34 陽性細胞を約 20%にまで濃縮することが可能となった。

一方、オリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチドを用いて、作製したスピコートフィルムにおいても、効率よい細胞接着が認められた。図2には、細胞播種 6h 後の細胞接着数の結果を示したが、オリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチドで修飾したフィルム上には、オリジナルの PLLA フィルムの約2倍の細胞接着が認められている。また、オリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチド修飾フィルムを PBS 中に 24 時間浸漬した時の、オリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチドの溶出率は添加量に対してわずか 6%であった。これらの結果は、作製したフィルム表面に、RGD オリゴペプチドセグメントが安定に存在できること、および、リガンド特異的に細胞の接着性が向上することを示している。さらに、RGD オリゴペプチド鎖長及びオリゴ-L-乳酸鎖長の違いが修飾効率に与える影響についても併せて報告する。

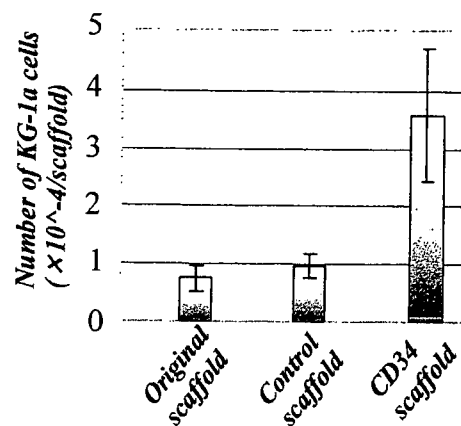


Fig.1 Number of KG-1a cells adhered on the original, control scaffold (hydrolyzed by NaOH, activated by EDC, and capped with 2-aminoethanol), and CD34 scaffold (hydrolyzed by NaOH, activated by EDC, reacted with anti-CD34 mouse IgG antibody, and capped with 2-aminoethanol).  $2 \times 10^6$  KG-1a cells were seeded and cultured for 3hrs, and adherent cells were counted by WST-1 assay.

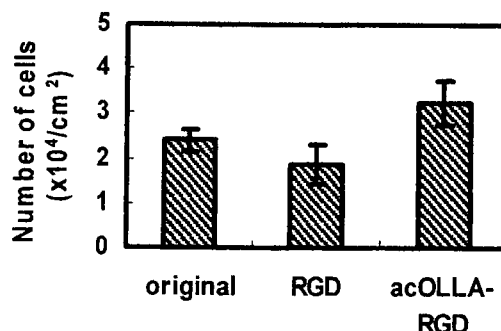


Fig.2 NIH/3T3 cell adhesion on original and acOLLA-RGD(2wt%/PLLA)-modified PLLA films. Cells were seeded at  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and cultured for 3h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> (serum free medium). All values are mean  $\pm$  SD (n=3).

## 細胞移植療法における細胞トラッキング技術

国立循環器病センター研究所<sup>1</sup> 生体工学部・<sup>2</sup>放射線医学部○ 山岡 哲二<sup>1</sup>、鎌田 和加子<sup>1</sup>、橘 洋一<sup>1</sup>、  
圓見 純一郎<sup>2</sup>、飯田 秀博<sup>2</sup>、馬原 淳<sup>1</sup>

【緒言】心筋梗塞やバジュー病など様々な疾患に対する治療法として幹細胞移植が検討され、臨床的有効性も報告されているが、その詳細な治癒メカニズムは明確ではない。すなわち、組織の再生や機能の改善が、移植した細胞自身の増殖と組織化に基づくのか、あるいは、移植した細胞が産生する生理活性物質などに対してレシピエント(移植を受けた患者)が反応することで治癒したパラクライン効果によるかを確定できない。なぜなら、移植した細胞自身の機能を抽出することができないだけでなく、その細胞自身を見分けることさえも困難だからである。特に、自家細胞移植や同種細胞移植では、心機能改善や血管再生などを経時的にモニターすることは可能であるが、そのメカニズム解明となると、所定期間経過後の動物の犠牲死をとまう組織観察においても、異種細胞を免疫染色で見分けることも出来ない。近年、*in vivo* 蛍光イメージング装置が普及し、緑色蛍光タンパクなどで蛍光標識した細胞を移植して追跡する検討がなされているが、蛍光法を利用する限り、限界深度は数 mm 程度であるためにマウスやラット程度の小動物での検討が限界である。このように、細胞移植治療による治癒過程を径時的に追跡・評価が出来ない現状では、細胞移植治療自体の効果を証明できず、臨床への大きな障害となっている。

そこで、我々は、移植細胞をMRIで経時的に追跡することが可能であれば、細胞移植治療の評価に大きく貢献すると考え、新規な細胞標識用MRI造影剤の開発を開始した。この目的を達成するには、移植細胞の細胞質内に長期間安定に磁気活性な分子(ガドリニウム錯体など)を滞留させる技術が必須となる。さらに、細胞の増殖や機能発現を妨げることなく、細胞が死滅した時には、この造影剤が速やかに体外へ排泄されることが必要である。本研究では、これらの特性を備えた新規細胞ラベル用MRI造影剤を開発することにより、大動物のみならず臨床においても利用可能な、移植自己組織追跡システムを開発し、EBM(Evidence Based Medicine)の構築を目指す。

Novel cell tracking system in the field of cell transplantation Tetsuji YAMAOKA<sup>1</sup>, Wakako KAMATA<sup>1</sup>, Yoichi TACHIBANA<sup>1</sup>, Jun-ichiro ENMI<sup>2</sup>, Hidehiro IIDA<sup>2</sup>, and Atsushi MAHARA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering and Department of Investigative Radiology, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujisirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

Tetsuji YAMAOKA: Tel:06-6833-5012ext2637.FAX:06-6835-5476. E-mail:yamtet@ri.ncvc.go.jp

Key Word: MRI, PET, cell tracking, cell transplantation, Gd

Abstract: Recently, cell transplantation for various diseases have been attracting great attention but the role of the transplanted cells was not clarified so far. In the present study new cell labeling materials for the magnetic resonance imaging (MRI) has been developed. The contrast agents based on chelates of gadolinium (Gd) are the most widely applied contrast agents for general clinical MR imaging. Conventional low molecular weight agents, such as Gd-DTPA (diethylenetriaminepentaacetate), are not suitable for cell labeling because they rapidly diffused into the extracellular space. Then, polyvinyl alcohol (PVA) has been selected as carrier materials. The PVA-Gd conjugates showed very low cytotoxicity and very high stability in the cytosolic compartment, indicating that cells labeled with the PVA-Gd conjugates can be traced for long period only when the cells are alive *in vivo*.

**【実験】** 図1に、本システムの概要を示した。ガドリニウム錯体分子の細胞膜透過性を抑制し、かつ、細胞に対する毒性を軽減させるために、ポリビニルアルコール (PVA) を高分子キャリアーとして用い、PVA-Gd コンジュゲートを作製した。PVAは、細胞膜との親和性が極めて小さいことから、一度細胞内に封入すると細胞外への漏出は抑制されると考えられ、側鎖OH基を利用して高密度での Gd 分子導入が可能である。さらに、生体内蓄積性が小さいことから、細胞が死滅した場合には、速やかに体外に排泄されると期待される。ポリ(ビニルアルコール) (DP:1700, DS:98%) に対して、脱水縮合剤として 1,1'-カルボニルビス-1H-イミダゾールを用い、任意の割合で 1,3-プロパンジアミンを反応させた。さらに、側鎖アミノ基に対し、1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA) を導入し、続いて DOTA にガドリニウムを内包させることで、導入率の異なる 3 種類の PVA-Gd を合成した(図2)。NIH-3T3 細胞、および、マウス間葉系幹細胞に PVA-Gd を導入し、細胞内におけるポリマーの挙動、および、MRI 用造影剤としての評価を行った。

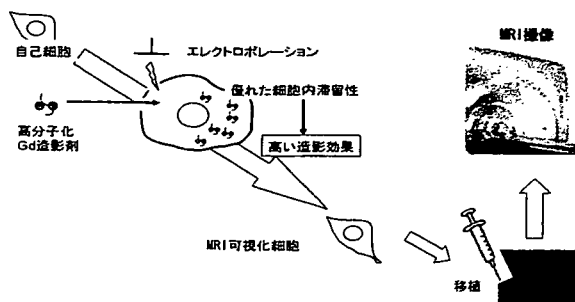


図 1 高分子化ガドリニウム造影剤による細胞追跡システム

ら、細胞が死滅した場合には、速やかに体外に排泄されると期待される。ポリ(ビニルアルコール) (DP:1700, DS:98%) に対して、脱水縮合剤として 1,1'-カルボニルビス-1H-イミダゾールを用い、任意の割合で 1,3-プロパンジアミンを反応させた。さらに、側鎖アミノ基に対し、1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA) を導入し、続いて DOTA にガドリニウムを内包させることで、導入率の異なる 3 種類の PVA-Gd を合成した(図2)。NIH-3T3 細胞、および、マウス間葉系幹細胞に PVA-Gd を導入し、細胞内におけるポリマーの挙動、および、MRI 用造影剤としての評価を行った。

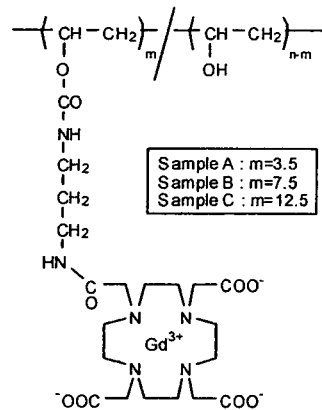


図 2 PVA-Gd コンジュゲート

**【結果・考察】** PVA-Gd コンジュゲートは、この高分子化により、細胞滞留性が向上する反面、細胞内へ送達することも容易ではない。そこで、膜融合脂質担体、電圧ポレーション、あるいはそのポレーションなどの手法により細胞内に高分子化造影剤を送達した。このような物理的・機械的手法を選択することで、細胞の種類を問わず同一条件で、本造影剤をあらゆる細胞に送達することが可能となった。図3は、PVA-Gd コンジュゲートの細胞内分布を可視化する目的で、FITC 標識 PVA-Gd コンジュゲートを NIH-3T3 に導入した位相差および蛍光写真である。FITC-PVA-Gd コンジュゲートが細胞質のみに効率的に分布していることが明らかである。さらに、この細胞の増殖速度は通常の場合と同程度であったことから、細胞の機能にもほとんど影響を及ぼさないと考えられる。また、10 日間にわたって、細胞からの造影剤の有意な漏出は認められなかったことより、1 年程度は、移植細胞を MRI により追跡できる性能を有していると考えている。本造影剤により、大動物を用いた前臨床研究における細胞移植療法治療効果のメカニズム解明が可能になるのみでなく、細胞移植数を最低限に抑えることにより、最低限のリスクで、最大の治療効果を発揮させるための定量的指標を得ることが可能になると期待される。

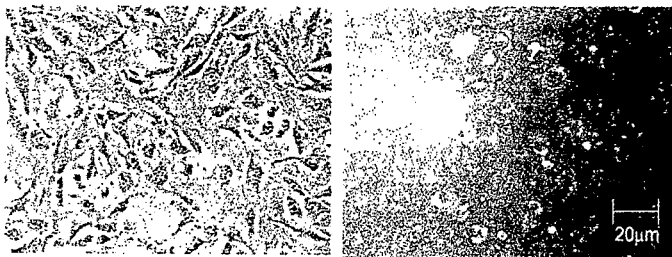


図 3 FITC で可視化した PVA-Gd コンジュゲートで標識下 NIH-3T3 細胞

## MSCの高純度ポピュレーション分離と細胞機能評価

国循セ研 ○馬原 淳・山岡 哲二

【緒言】機能性幹細胞の細胞移植は、組織再生治療を実現化するために最も有力な手法として着目されており、虚血性心疾患に対する治療効果が認められている<sup>1</sup>。分化能力を有する機能性細胞は、組織中に存在する割合が少ない為、移植に必要な細胞数やその純度の確保は移植治療を実現化するためにも重要な問題点となっている。これまでに、骨髓細胞に含まれる接着性細胞画分や Ficoll 法により得られる単核球画分に多く含まれる間葉系幹細胞 (MSC)<sup>2</sup>を用いて移植治療効果の検討や MSC の分化に関する研究が行われてきた。しかし、これらの手法では得られる幹細胞の純度を一定に保つことは難しく、FACS 法などにより特異的な表面マーカーの有無に基づいて細胞を分離した場合でも均一な幹細胞成分を高純度で得ることは極めて難しい。すなわち、分化能力が均一な細胞ポピュレーションをどのように分離するかは、細胞移植治療法のバリデーションを進める上においても重要な課題となる。

そこで本研究では、細胞の分化や機能と密接に関連のある細胞表面マーカーの発現密度に基づいて、細胞を分離できるシステムの開発を行ってきた(図1)。抗体を固定化した表面上で細胞をローリングさせることにより表面マーカーと抗体の連続的な脱着反応を誘起し、細胞を分離する。本発表では、シリコンチューブの内腔に抗マウス CD34 抗体を固定化した細胞分離基材を作製し、マウス由来の間葉系幹細胞 (MSC) を分離した結果について報告する。さらに、分画した細胞の表面マーカー密度とその種類、さらに骨芽細胞への分化誘導能について検討した結果についても併せて報告する。

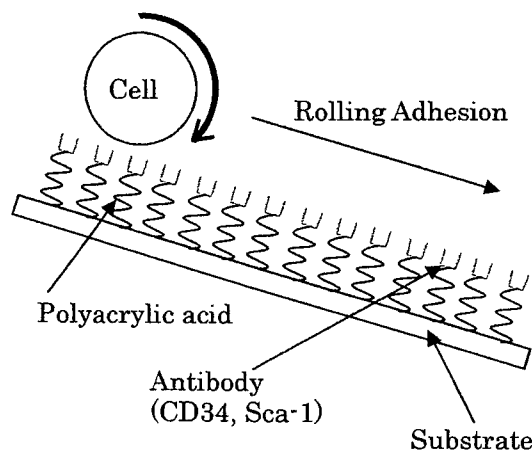


Figure 1. Illustrates of cell separation system. Cell rolling was induced by the shear flow of PBS.

### Purification and evaluation of multipotent stem cells isolated by ligand-immobilized materials

Atsushi MAHARA and Tetsuji YAMAOKA (Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

Tetsuji YAMAOKA: Tel:06-6833-5012ext2637.FAX:06-6835-5476. E-mail:yamtet@ri.ncvc.go.jp

**Key Word:** column / stem cell / cell rolling / subpopulation / antibody / CD34

**Abstract:** We developed the antibody-immobilized column for separation of mesenchymal stem cells (MSC) based on their marker density. In this presentation, the separation profile of MSC and its differentiation ability was reported.

【実験】内径 0.5mm のシリコンチューブに対してオゾン酸化を行い、10%アクリル酸溶液中で加熱することによりポリアクリル酸をチューブ内腔にグラフト重合した。その後、WSCによりカルボキシル基末端を活性化後、抗 CD34 抗体および抗 Sca-1 抗体をチューブ内腔に固定化した。抗体固定化量はホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) を用いて算出した。マウス由来の crude MSC は、C57BL/6 マウスの骨髄組織から培養皿への接着細胞画分を単離することで得た。作製したチューブに対して crude MSC を通液し、分画した各フラクション内に含まれる細胞数および、提示マーカ密度を FACS により評価した。その後、得られた各フラクションに含まれる細胞ポピュレーションを 24 穴プレート (フィブロネクチン処理) で培養し、骨芽細胞分化誘導培地で 4 日間培養した。骨芽細胞に特異的な遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により定量する事で分化効率を評価した。

【結果・考察】抗マウス CD34 抗体を固定化したカラムに対して crude MSC を通液した結果、2つの細胞溶出ピークが存在し、遅延する細胞群 (fraction 5-9) が確認された。しかし、抗体を固定化していないカラムの場合では、この遅延する細胞群は検出されなかった。また FACS の解析結果より、溶出時間の遅延に伴って CD34 提示密度の高い細胞が分画されていることが示唆された (図 2)。抗 Sca-1 抗体を固定化したカラムの場合でも抗 CD34 抗体固定化カラムの場合と同様の結果を得た。これらの結果より、この細胞分離システムを用いることで表面マーカの種類および密度の違いを溶出時間の差により分離できることが示唆された。また、CD34 の発現量は、Sca-1 の発現量と相関していることが判明した。

次に、得られた各フラクションを分化誘導培地で 4 日間培養し、骨芽細胞の分化に特異的な遺伝子発現量を評価した。その結果、fraction 3 および 5 の細胞における Cbfa1 および osteopontin は、カラムで分離する前の細胞ポピュレーションと比較して 10~15 倍の高い発現を示した。これは CD34 および Sca-1 の発現密度で MSC 画分を規定することにより、骨芽細胞への分化能力が高い細胞ポピュレーションを選択的に同定できることが示唆された結果であると考えている。

#### 【参考文献】

1. Miyahara T., et al., *Nature Med.*, **12**, 459-65, 2006
2. Pittenger, M.F., et al., *Science*, **284**, 143-147, 1999

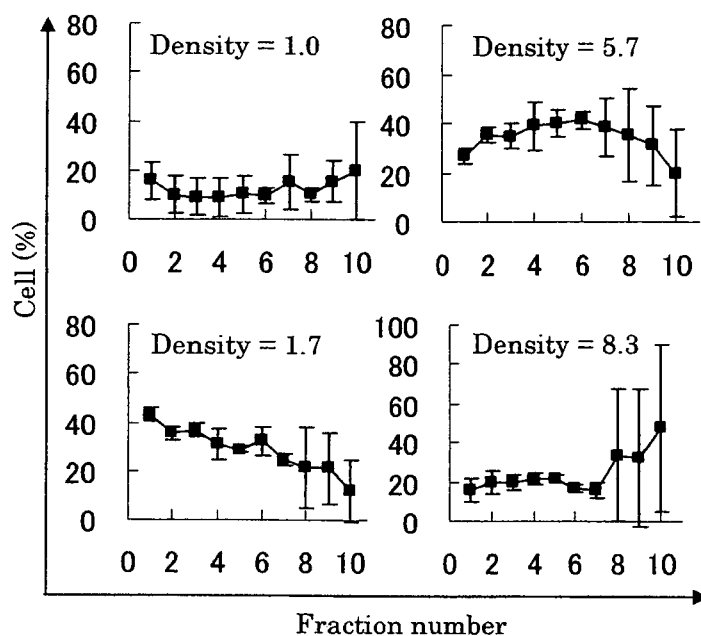


Figure 2 The components of the average marker-density were plotted against the fraction number. The relative density was calculated by 2D-FACS analysis.

## 生体吸収性を有する細胞注入用スキャホールドの開発

京工繊大院・工芸 ○馬城朋之、木村良晴

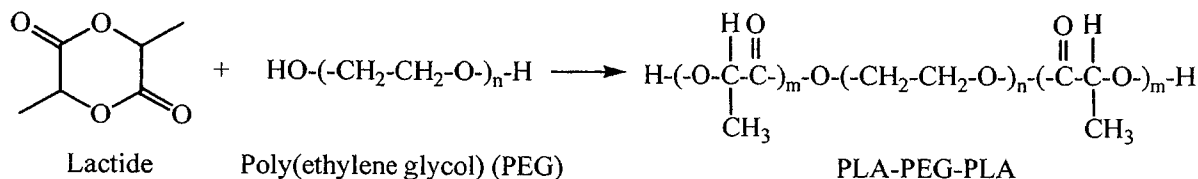
国立循環器病セ研 橘 洋一、馬原 淳、山岡哲二

## 〔緒言〕

ポリ乳酸 (PLA) にはポリ-L-乳酸 (PLLA) とポリ-D-乳酸 (PDLA) の光学異性体が存在し、これらがある条件で混合すると、ステレオコンプレックスが形成することが知られている。我々は、このステレオコンプレックス形成を利用して、外部環境の変化に応じてゾル-ゲル転移するポリマー系を設計し、インジェクション可能な細胞移植材料の開発を進めてきた。特に、PLLA あるいは PDLA と poly(ethylene glycol)(PEG) との ABA 型トリブロックコポリマーを水中に分散した高分子ミセル混合溶液が、体温付近でゾルからゲルへ転移する現象を利用した系が、生体適合性の高い吸収性スキャホールドとなることをこれまでに報告している。本報告では、これまでに報告しているポリマーと PLLA 及び PDLA 鎖長が異なる ABA 型トリブロックコポリマー、及び PEG 鎖長の異なる ABA 型トリブロックコポリマーを合成し、それらのゾル-ゲル転移挙動への影響について検討した。

## 〔実験〕

ABA 型トリブロックコポリマー-PLLA-PEG-PLLA 及び PDLA-PEG-PDLA は、各種 PEG 存在下に所定量の L-lactide と D-lactide を開環重合することにより合成した (Scheme 1)。さらに、これらのコポリマーを氷浴中において超音波照射下で水中に分散させ、高分子ミセルを作製した。そして、それぞれの L 体及び D 体ミセルの分散液を室温で混合した後、37°C の水浴中に浸し、ゲル化挙動を確認した。また DLS により各々のミセルサイズを測定し、それらのゲル化挙動への影響についても検討した。



Scheme 1. Ring-opening copolymerization of enantiomeric lactides in the presence of PEG to obtain PLLA-PEG-PLLA and PDLA-PEG-PDLA.

## Development of cell-injectable scaffolds with bioabsorbability

Tomoyuki MANOSHIRO<sup>1</sup>, Yoshiharu KIMURA<sup>1</sup>, Yoichi TACHIBANA<sup>2</sup>, Atsushi MAHARA<sup>2</sup>, Tetsuji YAMAOKA<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585 <sup>2</sup>National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita-city, Osaka 565-8565) TEL: 075-724-7804, FAX: 075-712-3956, e-mail: [ykimura@kit.ac.jp](mailto:ykimura@kit.ac.jp)

**Key Word** : Polylactide / poly(ethylene glycol) / stereocomplex / scaffold

**Abstract** : PLLA-PEG-PLLA and PDLA-PEG-PDLA were synthesized by ring-opening polymerization of L(D)-lactide in the presence of poly(ethylene glycol) (PEG) using tin octoate as a catalyst. Each of the copolymers was dispersed into a water to obtain an aqueous suspension of the respective copolymers. Mixing of the two enantiomeric suspensions gave a hydrogel depending on the temperature and concentration of the mixed suspensions. We synthesized a series of block copolymers that could quickly occur the sol-gel transition at body temperature. The suspension systems may be applied as the scaffold for cell injection.

[結果・考察]

Table 1. に各種トリブロックコポリマーの合成結果を示す。

Table 1. Synthesis of PLA-PEG-PLA with different composition

entry	Copolymer	Feed ratio	Yield (%)	Composition	PLA-PEG-PLA	Mn* <sup>1</sup> (Da)	Mw/Mn* <sup>2</sup>
		PLA/PEG(w/w)		PLA/PEG(w/w)			
1L	PLLA-PEG-PLLA	38/62	93	36/64	1300-4600-1300	7200	1.1
1D	PDLA-PEG-PDLA	38/62	92	36/64	1300-4600-1300	7200	1.09
2L	PLLA-PEG-PLLA	47/53	92	44/56	1800-4600-1800	8200	1.1
2D	PDLA-PEG-PDLA	47/53	95	44/56	1800-4600-1800	8200	1.1
3L	PLLA-PEG-PLLA	38/62	92	33/67	4900-20000-4900	29800	1.12
3D	PDLA-PEG-PDLA	38/62	91	33/67	5000-20000-5000	30000	1.12
4L	PLLA-PEG-PLLA	40/60	92	36/64	4150-15000-4150	23300	1.19
4D	PDLA-PEG-PDLA	40/60	93	36/64	4150-15000-4150	23300	1.18
5L	PLLA-PEG-PLLA	41/59	91	36/64	2850-10000-2850	15700	1.11
5D	PDLA-PEG-PDLA	41/59	91	37/63	2900-10000-2900	15800	1.1
6L	PLLA-PEG-PLLA	41/59	92	37/63	1750-6000-1750	9500	1.1
6D	PDLA-PEG-PDLA	41/59	92	36/64	1700-6000-1700	9400	1.11
7L	PLLA-PEG-PLLA	36/64	91	30/70	1300-6000-1300	8600	1.07
7D	PDLA-PEG-PDLA	36/64	90	31/69	1350-6000-1350	8700	1.07

\*<sup>1</sup> Determined by <sup>1</sup>H-NMR      \*<sup>2</sup> Determined by GPC in THF

<entry 2L> 及び <entry 2D> の 4wt%分散液を室温で混合し昇温させると 37°Cにおいてゾル-ゲル転移が見られ、ゲル化時間は 5 分であった。これは、これまでに報告している <1L> 及び <1D> を用いた場合のゲル化時間 (10 分) より短縮された (Fig.1)。一方、PEG 鎖を長くした <7L> 及び <7D> を用いてゲル化挙動の確認を検討したところ、4 wt%分散液を室温で混合し昇温させると 37°Cにおいてゾル-ゲル転移が見られ、ゲル化時間は 5 分であった。これらの結果より、PLA 鎖及び PEG 鎖が変化するとミセルの core(PLA)・shell(PEG) のバランスが変化し、ゲル化挙動へ影響を及ぼすと考えられる。更に、<1L,1D> と類似した組成比 (PLA/PEG) である <6L> 及び <6D> を用いてゲル化挙動の確認を行った。その結果、3 wt%分散液を室温で混合し昇温させると、37°Cにおいてゾル-ゲル転移が起こり、ゲル化時間は 2 分となった。しかし、<1L,1D> と類似した組成比 である <3L+3D>, <4L+4D>, <5L+5D> を用いた場合には、それぞれ 1~5 wt%の範囲においてゾル-ゲル転移は見られなかった (Fig. 2)。これらの結果より、ゲル化挙動は、トリブロックコポリマー中の PLA 鎖長、PEG 鎖長を最適化するとコントロールすることが可能であることが示唆された。なお、現在、ミセルサイズのゲル化挙動への影響について研究を進めている。

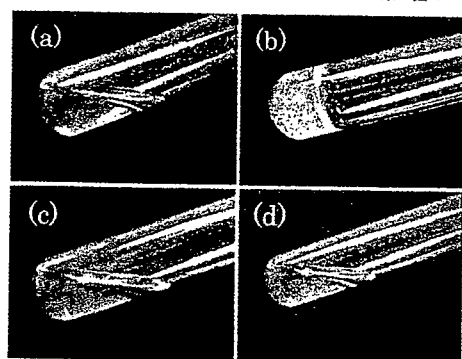


Fig.1. Phase changes of the mixed suspension of PLLA-PEG-PLLA (1300-4600-1300) and PDLA-PEG-PDLA (1300-4600-1300) at (a) 25°C and (b) 37°C as compared with those of the single suspension of PLLA-PEG-PLLA (1300-4600-1300) at (c) 25°C and (d) 37°C.

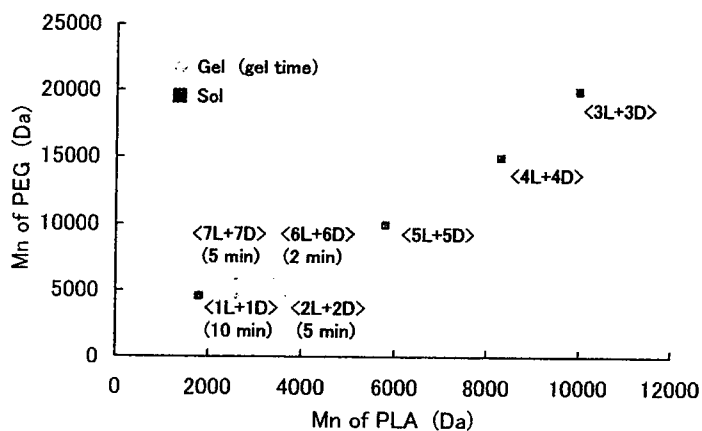


Fig. 2. Gelation behavior of PLA-PEG-PLA with different compositions.



# 新規高分子 MRI 用造影剤による移植細胞トラッキング

国立循環器病センター研究所 <sup>1</sup>生体工学部、<sup>2</sup>放射線医学部

<sup>1</sup>山岡 哲二、<sup>1</sup>橋 洋一、<sup>2</sup>圓見 純一郎、<sup>2</sup>山本 明秀、<sup>2</sup>飯田 秀博

## <緒言>

様々な疾患に対する治療法として細胞移植が検討され、臨床的有効性も報告されている。しかしながら、その組織再生や機能改善が、移植した細胞自身の増殖により機能が回復したためによるのか、あるいは、移植した細胞が産生する生理活性物質などに基づくパラクライン効果によるものかは不明である。なぜなら、移植した細胞自身の機能どころか、その細胞自身を追跡することさえもできないからである。緑色蛍光タンパク質を利用した *in vivo* 蛍光イメージングでは、蛍光の特性のためにラット程度の小動物が限界である。このように、細胞移植治療による治療過程を径時的に追跡・評価が出来ない現状では、細胞移植治療自体の効果を証明できず、臨床への大きな障害となっている。

そこで、我々は、移植細胞をMRIで経時的に追跡するための、新規細胞標識用MRI造影剤の開発を始めた。図1に、本システムの概要を示した。ガドリニウム錯体分子の細胞膜透過性を抑制し、かつ、細胞に対する毒性を軽減させるために、高分子キャリアーを用い、高分子かガドリニウム造影剤を合成した。この高分子化により、細胞滞留性が向上すると同時に、細胞内へ送達することも困難になる。そこで、細胞内に高分子化造影剤を送達した。

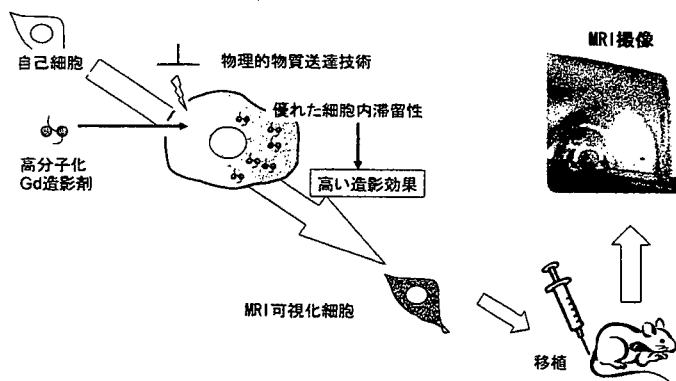


図1 高分子化ガドリニウム造影剤による細胞ラベル技術

## <実験>

非生分解性高分子として知られるポリビニルアルコール (DP:1700, DS:98%) に対して、脱水縮合剤として 1,1'-カルボニルビス-1H-イミダゾールを用い、任意の割合で 1,3-プロパンジアミンを反応させた。さらに、側鎖アミノ基に対し、1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA)を導入し、続いて DOTA 内にガドリニウムを内包させることで、導入率の異なるポリビニルアルコール誘導体を合成した。得られた誘導体の MRI 用造影剤としての評価を行った。また、モデル細胞として NIH-3T3 細胞を用いて、誘導体を細胞内に導入し、細胞内における挙動、及び、細胞の MRI 撮像について検討した。

## <結果・考察>

細胞は NIH-3T3 を用い、得られたコンジュゲートの細胞毒性試験を行ったところ、汎用性造影剤であるマグネビストより毒性が低いことが確認された。さらに、エレクトロポレーション法を用いて細胞内にコンジュゲートを導入した後、毒性及び細胞内滞在性について検討した。この結果、本コンジュゲートを導入した細胞の増殖速度は、導入していない細胞と同程度であり、また、最低 10 日間、コンジュゲートは細胞内に安定に滞在することがわかった。次に、MRI を用いて、コンジュゲートを導入した細胞の撮像を行ったところ、導入していない細胞に比べて輝度の増加が見られ、細胞の撮像に成功した。更に、*in vivo* イメージングについても検討を行った (図2)。

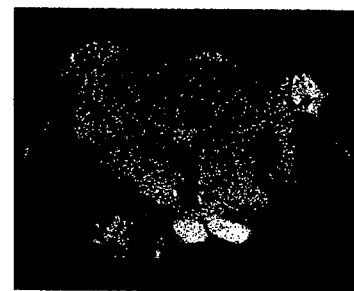


図2 細胞ラベル用新規高分子造影剤を内包した細胞の *in vivo* イメージング

## Cell Purification on the Biologically Active Surfaces

Tetsuji Yamaoka, Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

In the field of regenerative medicine, purification of stem cells is one of the most important issues. Usually, mesenchymal stem cells (MSCs) are isolated by use of their adhering nature onto tissue culture polystyrene dishes and purified with MACS system. However, the isolated cell samples contain many subpopulations. To secure the safety of MSCs transplantation in the clinical stage, it is necessary to develop much more effective strategy for isolating homogeneous population of MSCs.

To separate the subpopulations of the MSCs, we focused on the surface marker density that continuously changes with the differentiation stage of the MSCs. A novel cell separation column that was immobilized with anti CD34 antibody was designed and prepared. When the cells injected to the column, the cells roll on the inner surface of the column under a flow condition like a rolling adhesion phenomenon of the leukocyte in the blood vessel. The antibody density on the column surface was about  $200\mu\text{g}/\text{m}^2$  which was evaluated using horseradish peroxidase-labeled antibody.

Two established cell lines, KG-1a (CD34 positive) and HL-60 (CD34 negative) cells were successfully separated using the column and HL60 was eluted much faster than KG-1a. Cells with high density of CD34 surface marker were contained in the delayed fractions, and the content was increased with fraction number rise. In the next stage, the MSCs were injected into the column and the similarly delayed fractions were observed as well as the results for the established cell line. The CD34 expression level of MSCs in later fractions was much higher than that in the first. The cells in each fraction were exposed to the osteoblastic differentiation medium for four days and the expression of osteoblastic marker gene was measured by real-time PCR analysis. The expression in isolated cells was largely increased compared with that of the original MSCs indicating the cell populations possessing high differentiated ability can be purified with the novel cell separation column.

Author: Tetsuji Yamaoka  
Topic: Biomolecules and cells at the interfaces  
Abstract-title: Cell Purification on the Biologically Active Surfaces  
Keywords: Mesenchymal Stem Cell, Purification, Differentiation,  
Prefer to oral  Prefer to Poster

***Oral : INVITED FROM Japanese Society for Biomaterials***

Mailing Address: Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan  
Telephone/Fax: +81-6-6833-5004 (ex. 2637) / +81-6-6835-5476  
E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

## F1-106

## ポリ乳酸ナノ繊維の機能化

(1国循セ研、2京工織大院) ○山岡哲二<sup>1</sup>、内田 翔<sup>1, 2</sup>、村上 章<sup>2</sup>

【緒言】生体吸収性かつ非毒性であるポリ乳酸系スキャホールドの細胞親和性を改善するためには、フィブロネクチン由来の細胞接着性ペプチドとして広く知られている RGD ペプチドによる表面修飾が有効である。しかしながら、反応性の高い側鎖官能基をもたないポリ乳酸の表面修飾は困難である。我々は、これまでに、表面加水分解などの化学反応による化学修飾法を開発してきた。本研究では、RGD 配列を含むオリゴペプチドの N 末端にオリゴ-L-乳酸(OLLA)ポリ乳酸が結合したブロック共重合体を用いた新たなスキャホールドの表面修飾法を開発した。すなわち、この両親媒性ブロック共重合体をスキャホールド成型前のポリ乳酸溶液中に添加した後に成型することで、スキャホールド表面にオリゴペプチド鎖が集積する。オリゴ乳酸セグメントとポリ乳酸との親和性により、ブロック共重合体の溶出は抑制され、細胞接着性表面修飾が達成されると期待される。

【実験】細胞接着性の RGD 配列を含むオリゴペプチド/オリゴ乳酸ブロック共重合体の化学構造を図 1 に示した。ペプチド合成用固相単体を利用してオリゴペプチドを合成し、続いて、別に合成した OH 末端をアセチルキャップしたオリゴ-L-乳酸(acOLLA)とのカップリングを行った。得られたオリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチド共重合体とポリ乳酸の混合溶液からキャスト法によりフィルムを作製し、フィルム上に所定数の線維芽細胞を播種し、所定時間後に接着細胞数を係数した。

【結果・考察】図 2 には、細胞播種 6h 後の細胞接着数の結果を示した。オリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチドで修飾したフィルム上には、オリジナルの PLLA フィルムの約 2 倍の細胞接着が認められた。また、オリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチド修飾フィルムを PBS 中に 24 時間浸漬した時の、オリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチドの溶出率は添加量に対してわずか 6%であった。これらの結果は、作製したフィルム表面に、RGD オリゴペプチドセグメントが安定に存在できること、および、リガンド特異的に細胞の接着性が向上することを示している。

さらに、RGD オリゴペプチド鎖長及びオリゴ-L-乳酸鎖長の違いが修飾効率に与える影響についても併せて報告する実験中である。

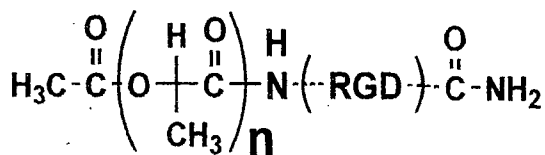


Fig.1 Chemical structure of acOLLA-co-RGD oligo peptide block copolymer.

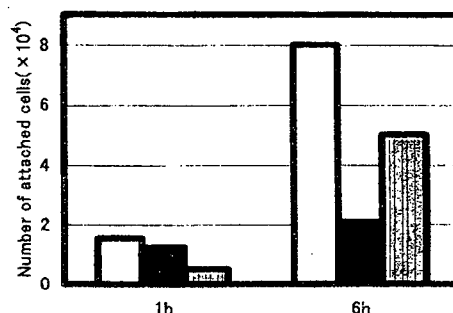


Fig. 2. Attachment of NIH/3T3 cells on PS dish (□), PLLA film (■), and RGD modified film (▨). Cells were seeded at  $1.0 \times 10^6$  cells/film, and cultured for 1 and 6h at 37°C.

## Functionalization of poly(lactic acid) nano fiber

<sup>1</sup>Tetsuji YAMAOKA, <sup>1,2</sup>Sho UCHIDA, and <sup>2</sup>Akira MURAKAMI: <sup>1</sup>National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita 565-8565, Japan, Tel:06-6833-5012, FAX: 06-6835-5476, E-mail:yamtet@ri.ncvc.go.jp, <sup>2</sup>Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology

G-004 Novel strategy for *in vivo* MRI imaging of transplanted autologous cells

<sup>1)</sup>Department of Biomedical Engineering, <sup>2)</sup>Department of Investigative Radiology, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute

Tetsuji Yamaoka<sup>1)</sup>, Yoichi Tachibana<sup>1)</sup>, Jyunichiro Ennmi<sup>2)</sup>, Hidehiro Iida<sup>2)</sup>

**Background:** Recently, there has been an increasing interest in developing the cell transplantation therapy. However, the fate and functionality of the transplanted cells were not clarified yet. It is then necessary to develop a new safe technology to track the transplanted cells using the noninvasive imaging system for a long period of time. To this end, we selected magnetic resonance imaging (MRI) because MRI has been proven to be a particularly powerful tool for visualizing the tissues in a high resolution.

In this study, we have synthesized new contrast agents for cell tracking and detected the cells *in vivo* using MRI.

**Results:** Novel contrast agents for labeling the targeted cells were synthesized by conjugating Gd to poly(vinyl alcohol) (PVA). The relaxivity of these PVA-Gd conjugates was slightly higher as Magnevist, which is typically used imaging agent. The intracellular behaviors of these PVA-Gd conjugates were examined using FITC-labeled PVA-Gd. In this case, not only the viability but also the proliferation rates of cells were not affected by the intracellularly delivered PVA-Gd. Furthermore, these PVA-Gd conjugates were retained stably in the cytosolic compartment up to 10 days. In addition, the *in vivo* imaging by using MRI was achieved.

**Conclusion:** PVA-Gd conjugates were synthesized and evaluated as MRI contrast agents. These PVA-Gd conjugates have high ability as novel contrast agents for cell labeling. These results suggested that the ability of these PVA-Gd conjugates to be employed in the study of biological phenomena using MRI.



*in vivo* imaging

P1-054 Surface modification of PLLA scaffolds using oligo(lactic acid)-peptide conjugates

National Cardiovascular Center Research Institute

Tetsuji YAMAOKA

**Keyword:** Poly (lactic acid) / scaffold / surface modification

In the tissue regeneration, failures in the tissues or organs would be recovered using living cells and artificial extracellular matrix, called scaffold. Poly-L-lactic acid (PLLA) is one of the most widely studied biodegradable polymers as scaffolds because of its excellent properties and the safety in *in vivo* usage. On the other hand, the cell-adhesion property of the PLLA surfaces, which is of prime importance for the scaffolds, is not necessarily satisfactory.

Oligo peptide including Arg-Gly-Asp (RGD) was selected as a model sequence for modifying PLLA scaffolds. RGD oligo peptide was synthesized by the conventional solid-phase F-moc chemistry, and the synthesized peptide was continuously conjugated to the biodegradable hydrophobic moiety. The hydrophobic moiety is expected to stabilize the RGD sequence to the PLLA matrices. These RGD-containing conjugates were added to PLLA solutions, and the mixed solutions were processed into the film, fiber, and porous scaffolds.

The distribution of the conjugates in the scaffolds was evaluated under the confocal laser scanning microscope. The cell adhesion to the modified PLLA scaffold was extensively improved depending on the physicochemical properties and the distribution of the conjugates. It is concluded that these conjugates are useful for modifying PLLA scaffolds without changing the excellent mechanical properties of PLLA.

G-101 Purification and evaluation of MSCs on ligand-immobilized column for cell transplantation

Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita 565-8565, Japan

Atsushi Mahara, Tetsuji Yamaoka

**Aim:** Insufficient purify of mesenchymal stem cell (MSC) is point out to be one of the most critical problems for the autologous cell plantation. To develop a novel cell-purification procedure, we focused on the surface marker density of the MSCs that dramatically changes with their differentiation. In this work, we designed a cell-separation column that was immobilized with antibody against the cell surface marker. The separation profiles of MSCs and the differentiation property of the separated populations were investigated.

**Methods:** Poly (acrylic acid) was grafted on the inner surface of silicone tube with the diameter of 0.5mm, and the anti-CD34 antibody was immobilized on the surface with carbodiimide activation methods. The murine MSCs were injected into the column, and the subpopulation of isolated fractions was evaluated by FACS analysis.

**Results:** When the MSCs were injected into the CD34-immobilized column, the elution time of MSCs was largely delayed with surface marker density. The CD34 and Sca-1 expression of isolated MSCs in the delayed factions were higher than that of the cells eluted rapidly, suggesting that the MSCs were isolated on the novel column depending on the density of surface-marker. The isolated MSCs in each fraction were cultured in the osteoblastic differentiation medium for 4 days. The expression level of osteoblastic-specific gene which correlates with the differentiation tendency was higher than that of unseparated MSCs.

**Conclusion:** Each isolated populations was at different stages in its differentiation, indicating that this separation mechanism is useful for the cell transplantation and fundamental research of MSCs.

## 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

○ 近藤英雄<sup>1</sup>, 北孝之<sup>2</sup>, 寺田堂彦<sup>2</sup>, 山崎健一<sup>1</sup>,橋本成広<sup>1</sup>, 藤里俊哉<sup>1</sup><sup>1</sup>大阪工業大学大学院 工学研究科, <sup>2</sup>大阪工業大学 工学部

## 1. 緒言

電気インピーダンス法とは微小な交流電流を流すことにより生体組織の構造を非破壊的に推定する技術であり, 体脂肪率の測定や患者の浮腫の診断, 乳がんの診断などに用いられている. 先行研究の報告によると, 生体組織の電気インピーダンスは組織内部の水分状態に影響を受けるとされているが, 基礎的な検討や機序の解明に関する報告例は少ない. そこで我々は, 水分量が調節可能な生体高分子ゲルを擬似生体組織とし, 電気インピーダンス法の詳細な検討を行うことが機序解明における一助となると考えた. 従って本研究は, 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な検討を行うことを目的とした.

## 2. 実験方法

生体高分子ゲルとしてゼラチンを使用した. 60°Cに加熱した蒸留水にゼラチン粉末(SIGMA)を加え, 濃度の異なるゼラチン溶液を作製した. 得られた溶液に電解質として塩化ナトリウムを加え, 完全に溶解したのを確認した後, 自作の型に流しこんで4°Cで12時間冷却した. ゲル化したのを確認した後, 電気インピーダンス測定を行った. 測定は空气中, 室温環境下(25±1°C)で行った. φ0.5のステンレス電極をゲルに刺入し, 電圧検出電極 10mVrms 一定のもと周波数 4 Hz から 1 MHz における交流電流を流し, 電気インピーダンスの測定を行った. 得られたデータを PC に保存後, Cole-Cole plot によりデータ解析を行った. また, 万能試験機を用いて圧縮試験を行いゲル強度を測定した.

## 3. 結果および考察

周波数の変化に伴い生体高分子ゲルの電気インピーダンスは変化し, 典型的な円弧の軌跡が得られた. 図1に電気インピーダンスと含水率との関係を示す. 水分量の上昇に伴い電気インピーダンスは低下する傾向が見られた. また, 塩濃度の上昇に伴い電気インピーダンスは低下する傾向が見られた. よって, 本研究で得られた生体高分子ゲルの電気インピーダンスは, 電解質溶液の水分状態に依存することが示された.

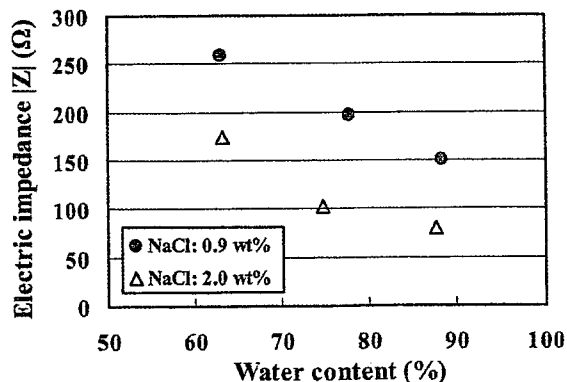


Fig.1 Relation between electric impedance and water content.

Fundamental study on electric impedance method using biopolymer gel

Hideo Kondo<sup>1</sup>, Takayuki Kita<sup>2</sup>, Dohiko Terada<sup>2</sup>, Kenichi Yamasaki<sup>1</sup>,

Shigehiro Hashimoto<sup>1</sup>, Toshiya Fujisato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology

<sup>2</sup>Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

5-16-1, Ohmiya, Asahi-ku, Osaka, 5335-8080, Japan

E-mail: ml206h01@eng.oit.ac.jp Tel:+81-6-6954-4476 Fax: +81-6-6954-4463

## ポリプロピレン繊維を用いた筋芽細胞の三次元培養

○奈良雅尚<sup>1</sup>, 山崎健一<sup>1</sup>, 寺田堂彦<sup>1</sup>, 澤田和也<sup>2</sup>,  
近藤英雄<sup>1</sup>, 橋本成広<sup>1</sup>, 藤里俊也<sup>1</sup>

1 大阪工業大学工学研究科生体医工学専攻

2 大阪成蹊短期大学総合生活学科

## 1. 緒言

生体の筋組織は出力対重量比が大きく、アクチュエータとして優れた特性を有する。培養した筋細胞をアクチュエータ化するためには、筋組織と同様に細胞を高密度に集積させ、一方向に配向させる必要がある。これまでゲルや繊維を用いた培養筋の作製が試みられているが、ゲルを用いた場合には培養筋中の細胞は低密度となり、初期の強度が弱く、バイオアクチュエータとして用いるには難しい。一方、繊維を用いた場合には培養筋中の細胞は高密度となり、繊維そのものが強度を有しているため、バイオアクチュエータ用スキヤフォールドとして有用であると考えられる。繊維を用いた培養筋の研究では、初期の細胞接着数が少なく、培養筋の収縮動態の評価はなされていない。本研究では、コラーゲンゲルをコートした繊維を用いて筋芽細胞の三次元培養を行い、繊維-コラーゲンゲル複合体の有用性と培養筋の収縮動態を評価することを目的とした。

## 2. 実験方法

スキヤフォールドとなる繊維には直径 20  $\mu\text{m}$  のポリプロピレン繊維を用いた。繊維を等間隔に配列させ、その上に Type-I コラーゲンゲルを薄くシート状にコートした。得られたスキヤフォールドに、マウス横紋筋由来の株化細胞である C2C12 細胞を播種した。10%ウシ胎児血清と抗生物質を含む High-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium で 6 日間培養した。6 日後、10%ウシ胎児血清を 7%馬血清に変更し、C2C12 細胞の筋管細胞への分化を促進させた。培養液の交換は 2 日毎に行い、その際に位相差顕微鏡で細胞の形態を観察した。分化誘導してから 1 週間後に電気パルス刺激を行い、培養筋の収縮動態を調べた。

## 3. 結果

作製したスキヤフォールド上では C2C12 細胞が増殖し、6 日目にはコンフルエントになった。馬血清に変更してから 4 日後には筋管細胞に分化している様子が見られた。培養日数の経過に伴い、培養筋が繊維の中央部分に縮む様子が見られた。入力電圧 30 V<sub>pp</sub>、周波数 1 Hz から 3 Hz、パルス幅 20 msec の電気パルスを培養液中に印加したところ、筋管細胞が周波数に同期して収縮する様子が観察された。コラーゲンゲルをコートしていない繊維と比較したところ、コートすることによって初期の細胞接着数が増加することがわかった。電気パルスによって収縮弛緩したことから、ポリプロピレン繊維-コラーゲンゲル複合体は培養筋のスキヤフォールドとして有用であることが示唆された。

Three dimension culture of C2C12 cells on polypropylene fiber scaffold.

Masanao NARA<sup>1</sup>, Kenichi YAMASAKI<sup>1</sup>, Dohiko TERADA<sup>1</sup>, Kazuya SAWADA<sup>2</sup>, Hideo KONDO<sup>1</sup>, Shigehiro HASHIMOTO<sup>1</sup> and Toshia FUJISATO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate school of Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka, 535-8585, Japan

Tell: +81-6-6954-4457, FAX: +81-6-6954-4463, E-mail: m1107h05@eng.oit.ac.jp

<sup>2</sup>Department of Integrated Life, Osaka Seikei College



## In vitro 血管組織再生のための 灌流型バイオリアクター内遺伝子導入システム

○山本敬介<sup>1,2</sup>・馬原淳<sup>1</sup>・平野義明<sup>2</sup>・山岡哲二<sup>1</sup>

<sup>1)</sup> 国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部

<sup>2)</sup> 大阪工業大学大学院工学研究科

### 1. 緒言

三次元の組織構築を試みる場合、静置培養では足場材料の内部まで酸素や栄養が行かないために、十分な細胞増殖速度が得られない。そこで、酸素や栄養をスキャホールド内部にまで供給できるバイオリアクター装置の開発が試みられている。我々は、これまでに、灌流型バイオリアクターを用いた三次元血管組織の再生を検討し、単層培養と同程度の細胞増殖効率を達成してきた。

一方、2005年、Sheaらのグループは、PLG多孔質体に血管内皮増殖因子(VEGF)をコードしたプラスミドを付着させ、マウスに移植することで血管組織再生の亢進を報告した。<sup>1)</sup>しかし、プラスミドのみでは、遺伝子導入効率が極めて低いために、新たに疎水化ポリカチオンキャリアーを設計した。バイオリアクター内で、ヒト平滑筋細胞に対する *in vitro* VEGF 遺伝子導入を試み、VEGF mRNA 発現をリアルタイム PCR 法により評価することで導入条件の最適化を図り、組織再生速度のさらなる向上を目指した。

### 2. 実験

初めに灌流型バイオリアクター内で用いる足場として 2wt%中空ポリ乳酸スキャホールドを作製した。10 $\mu$ g のプラスミド VEGF と新規疎水化ポリカチオンキャリアーである poly(DMAPAA46-co-MPC53-co-stearylacrylate1) (S-polymer) を用いて、アニオンとカチオンの比が 1:12 になるようにスキャホールドに対してコートを行った。また、プラスミド VEGF をコートしたもの、および、未コートのポリ乳酸スキャホールドも用意した。図 1 に示す灌流型バイオリアクター装置に、上記の各スキャホールドを取り付け、これに平滑筋細胞 2.0 $\times$ 10<sup>6</sup>個/mL の懸濁液を 1.1 mL/cm<sup>2</sup>・min の灌流速度で播種し、24 時間後、4.0 mL/cm<sup>2</sup>・min の灌流速度で 48 時間培養を行った。その後、ポリ乳酸スキャホールドに接着した平滑筋細胞から mRNA を抽出し、RT 反応を行った後、リアルタイム PCR を用いて VEGF の発現量の解析を行った。

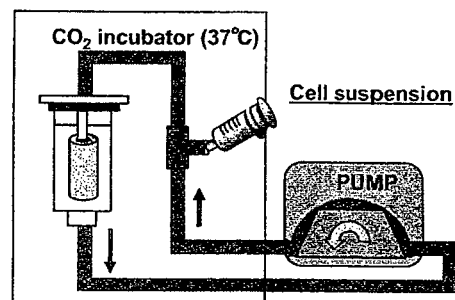


図 1 灌流型バイオリアクター装置

### 3. 結果と考察

pVEGF のみをコートしたものと pVEGF と S-polymer をコートしたものを比較すると、後者において VEGF が高効率で発現することが RT-PCR で確認された。また、S-polymer の共重合組成にも遺伝子発現効率が大きく影響されることも明らかとなった。この事は、DNA 結合ユニットである DMAPAA と親水化ユニットである MPC、および、疎水性ユニットである stearylacrylate のバランスに基づくキャリアーの物理化学的特性の重要性を示唆している。さらに、灌流下での優れた発現効率が確認され、バイオリアクターと増殖因子遺伝子の利用による組織再生の有用性が示された。

### 参考文献

[1] Jang JH, Rives CB, Shea LD. et al. Mol Ther. 2005, 12(3), 475-8

### Gene transfer in the radial-flow perfusion bioreactor for *in vitro* tissue regeneration

Keisuke YAMAMOTO<sup>1,2</sup>, Atsushi MAHARA<sup>1</sup>, Yoshiaki HIRANO<sup>2</sup>, and Tetsuji YAMAOKA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan  
<sup>2</sup>Graduate school of Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi Ward, Osaka City, Osaka Prefecture 535-8585, Japan), <sup>1</sup>Tel: 06-6833-5004 ( 2637 ) Fax:06-6835-5476  
E-mail:yamtet@ri.ncvc.go.jp

ポリ乳酸—ポリエチレングリコール共重合体を用いた  
細胞注入用スキャホールドの開発

○馬城朋之<sup>1</sup>、木村良晴<sup>1</sup>、橘洋一<sup>2</sup>、馬原淳<sup>2</sup>、山岡哲二<sup>2</sup>

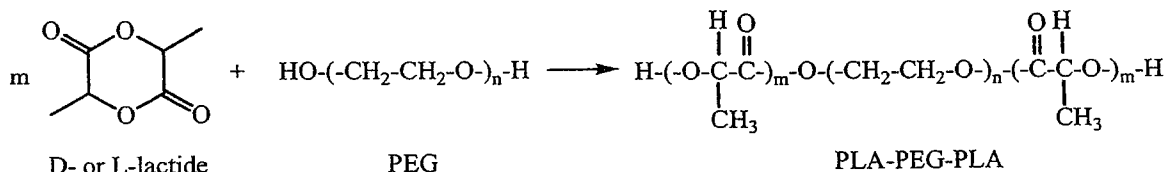
1 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科生体分子工学専攻  
2 国立循環器病センター研究所

1. 緒言

ポリ乳酸 (PLA) にはポリ-L-乳酸 (PLLA) とポリ-D-乳酸 (PDLA) の光学異性体が存在し、これらがある条件下で混合すると、ステレオコンプレックスが形成することが知られている。我々は、このステレオコンプレックス形成を利用して、外部環境の変化に応じてゾル-ゲル転移するポリマー系を設計し、インジェクション可能な細胞移植材料の開発を進めてきた。特に、PLLA あるいは PDLA と poly(ethylene glycol)(PEG) との ABA 型トリブロックコポリマーを水中に分散した高分子ミセル混合溶液の体温付近でゾルからゲルへ転移する現象を利用した系が、生体適合性の高い吸収性スキャホールドとなることをこれまでに報告している。本報告では、これまでに報告しているポリマーと PLLA 及び PDLA 鎖長が異なる ABA 型トリブロックコポリマー、及び PEG 鎖長の異なる ABA 型トリブロックコポリマーを合成し、それらのゾル-ゲル転移挙動への影響について検討した。

2. 実験

各分子量の ABA 型トリブロックコポリマー PLLA-PEG-PLLA 及び PDLA-PEG-PDLA は、PEG 存在下において所定量の L-lactide と D-lactide を開環重合することにより合成した (Scheme 1)。これらのコポリマーを水浴中において超音波照射下で水中に分散させ、高分子ミセルを作製した。そして、それぞれの L 体及び D 体ミセルを室温で混合した後、37°C の水浴中に浸し、ゲル化するまでの時間 (ゲル化時間) を確認した。



Scheme 1. Ring-opening copolymerization of enantiomeric lactides in the presence of PEG to obtain PLLA-PEG-PLLA and PDLA-PEG-PDLA

3. 結果と考察

各分子量の L 体及び D 体ミセルを室温で混合後昇温させると、体温付近でゾル-ゲル転移が見られた。これまでに報告しているポリマーの PLA 鎖長を一定にして、PEG 鎖を長くしたトリブロックコポリマー系のゲル化挙動を確認したところ、ゲル化時間の短縮が確認できた。この結果とこれまでに報告した PLA 鎖を長くするとゲル化時間が短縮するという結果を合わせると、PLA 鎖及び PEG 鎖が変化するとミセルの疎水 (PLA) - 親水 (PEG) バランスが変化し、ミセル崩壊が生じてゲル化挙動に影響が及ぼされたと考えられる。すなわちトリブロックコポリマー中の PLA 鎖長、PEG 鎖長の最適化によりゲル化時間をコントロールできる。

Development of cell-injectable scaffolds using poly (lactic acid) – poly (ethylene glycol)

Tomoyuki Manoshiro<sup>1</sup>, Yoshiharu Kimura<sup>1</sup>, Yoichi Tachibana<sup>2</sup>, Atsushi Mahara<sup>2</sup>, Tetsuji Yamaoka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, TEL: 075-724-7804, FAX: 075-712-3956, e-mail: ykimura@kit.ac.jp,

<sup>2</sup>National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita-city, Osaka 565-8565.

## ポリ乳酸系スキャホールドの高機能化とその評価

山岡 哲二

(国立循環器病センター研究所生体工学部)

**1. 緒言** 1970年代、コラーゲンを足場材料(スキャホールド)とした真皮組織の再生が精力的に検討され、1990年には、ポリグリコール酸不織布をスキャホールドとした組織工学・再生医療が提唱され、時を同じくして胚性幹細胞や組織幹細胞などが見いだされ、再生医工学がさらに注目を集めることになった。再生医療のデビューは華々しいものであったが、その臨床化はなかなか進んでおらず、その一因は、スキャホールドなどの材料開発の遅れ、さらに、その新規材料が使用できるような環境整備の遅れであろう。しかし、最近、培養皮膚の製造販売が承認され、ようやく、再生医療の時代が到来すると期待される。

一方、再生医工学のカバーすべき疾患領域が多様化し、スキャホールドに要求される機能性もますます高度化してきた。我々のグループでは、ポリ乳酸を主成分とする様々な生体吸収性高分子の医療応用を検討し、特に、再生医療を支援する材料設計を進めてきた。本シンポジウムでは、細胞移植を支援するための温度応答型インジェクタブルスキャホールド、周囲組織の再生・浸潤を支援する含水性エラストリックマテリアル、および、細胞特異的表面を有するポリ乳酸系スキャホールドの構築戦略について紹介する。

**2. 感温性インジェクタブルスキャホールド** アルツハイマーや心筋梗塞の治療法として注目されている細胞移植術において、細胞懸濁液を直接組織などに注入した場合には、足場と空間確保の問題から細胞の十分な機能を果たすことはできない。そこで、京都工芸繊維大学木村良晴教授らと共同で、細胞注入を支援する材料の開発、すなわち、温度変化にตอบสนองして水溶液から含水ゲルへ変化する生体吸収性材料の開発を進めている。我々は、光反応性基や、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)などの温度応答性ポリマーなどを利用することなく、ポリ乳酸とポリエチレングリコールという、生体内での利用実績に優れる2つの高分子材料のみを利用した。その結果、ステレオコンプレックス形成という全く新たな温度応答性ゲル化メカニズムに基づくシステムを見出し、32度でゲル化する温度応答性インジェクタブルスキャホールドの開発に成功した(図1)。

得られたゲルの含水率は90%以上であり、その物質透過性に優れること、さらに、細胞毒性を誘発する化学物質を利用していないことから、細胞毒性は極めて低い。これらのインジェクタブルスキャホールドを用いて、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するトランスジェニックマウスをドナーとし、GFP(-)種をレシピエントとした同種移植実験を行い、細胞毒性および細胞生存率などを指標として有効性を評価した結果、優れた細胞親和性を有することが示された。

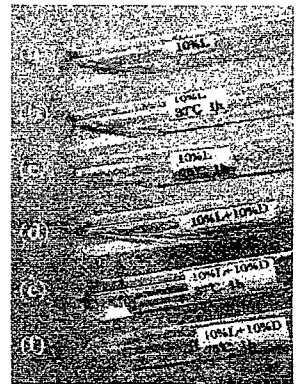


図1 ポリ乳酸-PEG共重合体ミセルからなる感温性ハイドロゲル。L体ミセル；(a) r.t., (b) 37°C for 1 h, (c) 75°C for 1 h, L体ミセル+D体ミセル；(d) r.t., (e) 37°C for 1 h, (f) 75°C for 1 h

**3. 人工真皮用ポリ乳酸系ハイドロゲル** コラーゲンゲルに対しては細胞が活発に浸潤することがあるが、このような、現象を合成ゲルで見出すことは困難である。我々は、軟組織に対するスキャホールドとして、オリゴ乳酸とポリエチレングリコール(PEG)の直接縮合反応によりマルチブロック共重合体の合成に成功した。得られたマルチブロック共重合体では、PEG組成に関係なく分子量 100,000 以上を実現することができ、速い分解速度と親水性表面を有しながらも比較的高い初期破断強度を有する材料特性により、メッシュ、フィルム、不織布、スポンジなどの形状でスキャホールドとして利用できる。その含水性により、極めて組織反応がマイルドであった。PEG組成の上昇とともに、吸水率が上昇し、PN 組成が 87%の場合、平衡膨潤状態で含水率85%に到達した。これらハイドロゲルの多孔質スポンジ構造を作製し、交互浸漬法によりハイドロキシアパタイト(HAp)と複合化し in vitro における細胞接着・増殖性の評価を行った。ラット皮下埋入所定期間後の周囲組織の反応を定量化したところ、含水性マルチブロック共重合体に対してHApを複合化した多孔質材料の場合には、炎症反応およびカプセル化反応がマイルドであり、周囲組織の浸潤も活発であった。さらに、ラット皮膚全層欠損モデルに対して適応したところ、コラーゲン修飾スポンジに匹敵する組織再生効果が確認された。

Highly functional poly(L-lactic acid)-based biomaterials, Tetsuji YAMAOKA (Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Siuta, Osaka 565-8565 Japan, TEL: +81-6-6833-5012 (ext2637), FAX: +81-6-6835-5476, E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp)

## 細胞移植を支援するバイオマテリアル

山岡 哲二

(国立循環器病センター研究所生体工学部)

1. 緒言 再生医療の戦略を整理すると、図1のようになり、本学会で精力的に研究されてきたさまざまな工学的要素技術が投入されている<sup>1)</sup>。細胞成分としては、その安全性、純度、倫理的問題など、臨床化のための課題も多く残されてはいるが、体細胞、ES細胞、組織幹細胞など、多くの優れた細胞ソースに期待がかかっている。1990年より組織工学として検討された戦略は、ポリグリコール酸不織布などに細胞を播種して、*in vitro* や *in vivo* で組織を再生させるものであり、図中の②や③にあたる。

一方、図1の④の細胞移植は、体外に取り出した細胞を欠損部位に注入することで治療効果をねらう方法である。特に自己細胞移植では、倫理面、許認可等におけるハードルも比較的低く、早期に臨床化されると期待され、優れた治療効果も報告されているが、本格的な臨床化に向けてはさまざまな問題が残っている。

本シンポジウムでは、細胞移植を早期に実現させるための課題として、(1)制度的問題の現状と今後、(2)臨床の場における問題点とニーズ、(3)移植細胞を調製するCPCに関して、それぞれのご専門の先生方にご講演を頂く。本講演では、第(4)番目のテーマとして、私たちのグループで進めている細胞移植をサポートする工学技術に関して紹介したい。

2. 新規幹細胞分離システム 例えば、移植する間葉系幹細胞としては、骨髓細胞中の培養基への付着細胞画分や、Ficoll法により単離された単核球画分が用いられているが、この細胞ポピュレーションには、幹細胞成分以外にもさまざまな種類の細胞が混在しており、目的以外の組織細胞へ分化する可能性をも含んでいる。従って、移植する幹細胞成分を高純度で分離することは、細胞移植治療効果の向上のみならず細胞バリエーションにおいても重要な課題となる。

そこで、細胞分化過程と相関が高い細胞表面マーカー密度に着目し、細胞を表面マーカー密度により高速で分離する細胞分離カラムシステムを開発している。本システムでは、平面基板に抗体を高密度で配列した抗体固定化基板を細胞が連続的にローリングすることにより、細胞表面マーカーと固定化リガンドとの連続的な脱着反応を誘起する。この連続的な脱着反応により目的的表面マーカーとその密度を有する細胞ポピュレーションを分離する手法である。開発したカラムを用いることにより、約10分程度の分離時間で、表面マーカー密度によってMSCを分離できること、ならびに分化能力の高い細胞フラクションを選択的に分離できることが明らかとなってきた。

3. 移植細胞のトラッキング 細胞移植による組織再生や機能改善が、移植した細胞自身の正着・分化・増殖により機能が回復したためによるのか、あるいは、移植した細胞が産生する生理活性物質などに対してレシピエントが反応することで治癒したのかは不明である。自家細胞移植や同種細胞移植では、異種細胞を免疫染色で見分けることが困難である。GFP標識細胞をGFP(-)マウスに移植して *in vivo* 蛍光イメージング装置で追跡できるが、小動物が限界である。このように、細胞移植治療による治癒過程を径時的に追跡・評価が出来ない現状では、細胞移植治療自体の効果を証明できず、臨床への大きな障害となっている。

我々は、移植細胞をMRIで経時的に追跡することを可能にする新規な細胞標識用MRI造影剤の開発を開始した。この目的を達成するには、移植細胞の細胞質内に長期間安定に磁気活性な分子(ガドリニウム錯体など)を低毒性のもとに滞留させる技術が必須となる。今回、ガドリニウム錯体分子の細胞膜透過性を抑制し、かつ、細胞に対する毒性を軽減させるために、高分子キャリアーを用い、その細胞内滞留性とMRI撮像実験を進めた。その結果、標識された細胞の増殖性は、コントロールと同程度であり、細胞からの漏出は認められなかった。本造影剤により、大動物を用いた前臨床研究における細胞移植療法治療効果のメカニズム解明が可能になるのみでなく、細胞移植数を最低限に抑えることにより、最低限のリスクで、最大の治療効果を発揮させるための定量的指標を得ることが可能になると期待される。

1) バイオマテリアルサイエンス(石原一彦、畑中研一、山岡哲二、大矢裕一著)、東京化学同人(2003)

Highly functional poly(L-lactic acid)-based biomaterials, Tetsuji YAMAOKA (Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Siuta, Osaka 565-8565 Japan, TEL: +81-6-6833-5012 (ext2637), FAX: +81-6-6835-5476, E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp)