

O-156 Tissue-derived Scaffold for Aortic Root Reconstruction

Toshia Fujisato¹, Toshia Fujisato¹, Ken'ichi Yoshida²,
Dohiko Terada¹, Kazuo Niwaya², Kenji Minatoya²,
Akio Kishida³, Takeshi Nakatani², Soichiro Kitamura²
(Osaka Institute of Technology¹, National Cardiovascular Center², Tokyo
Medical and Dental University³)

OBJECTIVES Biodegradable materials such as polylactide and/or polyglycolide are commonly used for the scaffolds for tissue engineering, whereas it is not easy to have enough mechanical strength especially in the aortic tissue. In this study, tissue-derived scaffold has been developed by an elimination of cellular components by the ultra-high pressure from porcine aortas. **METHODS** Porcine aortas were treated by the ultra-high pressure of 980 MPa followed by rinsing residual cellular components away by PBS-based washing solution and alcohol. This treatment does not include any processes using detergent. The scaffolds were substituted for descending aorta of miniature pigs through left thoracotomy in the surgery carried out with single clamp technique. Postoperative anticoagulation or anti-platelet therapy was not instigated. They were explanted 3, 6, and 12 months after the implantation and examined histologically and immunohistologically. **RESULTS** There were no cellular components observed in the tissues treated. The amounts of DNA and phospholipids were lower than 5% of the native. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes. The inner surface was completely covered with endothelial cells and the inside was infiltrated by smooth muscle cells and fibroblasts after 6 months. The grafts followed host tissue growth about 1.5 times in diameter and length after 12 months. There were calcium deposits slightly observed in the graft especially at the anastomosis. **CONCLUSIONS** This process eliminates cellular components completely and may be useful for having regenerative scaffolds for the vascular tissue regeneration.

S5-1 Novel Cell Tracking System for Autologous Cell Transplantation

Tetsuji Yamaoka¹, Yoichi Tachibana¹, Jyunichiro Ennmi², Hidehiro Iida²

(Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute¹, Department of Investigative Radiology, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute²)

Recently, autologous cell transplantation has been attracting great attention in the field of regenerative medicine. However, the fate and functionality of the transplanted cells are still unknown because no efficient system for tracking the transplanted cells for a long period of time is available. To this end, we designed and developed a novel cell-labeling material for magnetic resonance imaging (MRI). Contrast agents based on chelates of gadolinium (Gd), such as Gd-DTPA (diethylenetriaminepentaacetate), are the most widely used contrast agents clinically. However, these agents are not suitable for cell labelling because they have very short retention time in the cells and must be cytotoxic when delivered into the cells. In order to prolong the retention of the contrast agents, Gd-DTPA molecules were conjugated to the water soluble polymers which has extremely low interaction with the plasma membrane. Among some candidate carrier molecules poly (vinyl alcohol) (PVA) was selected. PVA is highly water soluble and possesses side-chain-type functional groups which can be used for conjugating the DTPA molecules. In addition, since PVA is known to eliminate from the body in the free form as fast as the case of poly (ethylene glycol), only the cells alive in the body can be tracked in vivo. The relaxivity of these PVA-Gd conjugates was slightly higher than the commercially available MRI imaging agent, may be because of the neighboring effect of the Gd molecules. Toxicity of the PVA-Gd conjugates was much lower than the conventional agent, and the PVA-Gd conjugate did not affect the growth rate of the NIH-3T3 cells and mouse mesenchymal stem cells. The PVA-Gd conjugates delivered into the cells were retained in the cytosolic compartment stably for long period of time, and the labeled cells transplanted to model animals could be effectively observed and tracked in vivo.

Syngeneic cell transplantation using PLLA-based injectable scaffold

Tetsuji Yamaoka¹, Tomoko Fujiwara², Tomoyuki Manoshiro³, Yoshiharu Kimura³

¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute,
5-7-1 Fujishiro-dai, Osaka 565-8565, Japan, +81-6-6833-5012, yamtet@ri.ncvc.go.jp

²Department of Chemistry, The University of Memphis,

³Department of Molecular Engineering, Kyoto Institute of Technology

The clinical use of the regenerative medicine has been attracting great attention in this decade, which is, however, limited by both of scientific and regulatory aspects. Among the various protocols in the regenerative medicine, autologous cell transplantation is the most safe and highly anticipated system for curing various diseases including myocardial infarction, arteriosclerosis obliterans, and Parkinson's disease. Mesenchymal stem cells (MSCs) are the most widely studied cell source and usually isolated by use of their adhering nature onto tissue culture polystyrene dishes. However, the isolated cells consist of many subpopulations. For an effective use of these systems, significant problems such as the heterogeneity of the prepared cells and poor efficiency in embedding cells to the site of action must be solved. Moreover, due to the difficulty to follow up the fate of transplanted cell in a non-invasive manner, the mechanisms of the interaction between therapeutic efficacy and function of the cells are unclear. Our recent research accomplishments involve bio-resorbable injectable scaffold for cell transplantation composed of poly(ethylene glycol) and poly(lactic acid)

Among the polylactide (PLA)-based block copolymers thus developed, those comprising hydrophilic poly(oxyethylene) (PEG) show highly biocompatible nature and wide biomedical applicability. We recently discovered a novel thermo-responsive formation of a hydrogel from an enantiomeric mixture of the A-B-A type triblock copolymers, poly(L-lactide)-*block*-poly(oxyethylene)-*block*-poly(L-lactide) (PLLA-PEG-PLLA) and poly(D-lactide)-*block*-poly(oxyethylene)-*block*-poly(D-lactide) (PDLA-PEG-PDLA), for which the stereo-complexation of the PLLA and PDLA segments is the driving force for the gelation[1].

Based on these results, we used an enantiomeric triblock copolymer system for the cell-injection *in vivo* to demonstrate its versatility as the cell-injection vehicle. Thus, the MEF cells were dispersed in a suspension of the A-B-A type triblock copolymers, PLLA-PEG-PLLA and PDLA-PEG-PDLA. The resultant cell suspension was injected in the femoral region of a mouse. After three days, the femoral region was picked out and subjected to the fluorescence microscopy. As shown in Figure 1, the MEF cells can be detected in the sectioned muscular tissue, showing that they survive in the injected hydrogel.

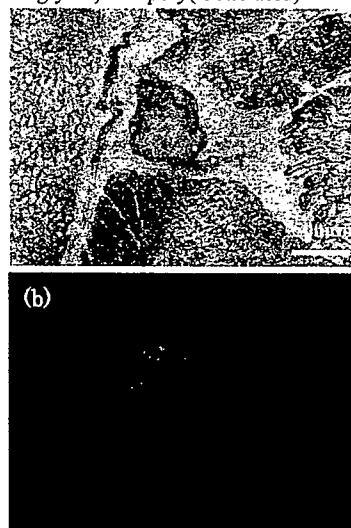


Figure 1. Photos of the sectioned tissue from the femoral region of mouse with (a) optical and (b) fluorescent microscopes. The MEF cells were injected with 9 wt/wt-% mixed suspensions of PLLA-PEG-PLLA and PDLA-PEG-PDLA. Living cells are shining green.

References:

- [1] T.Fujiwara, T.Mukose, T.Yamaoka, H.Yamane, S.Sakurai, Y.Kimura, *Macromol.Biosci* 1,204 (2001)

Evaluation of Acellular Scaffolds for Heart Valve Regeneration

T. Fujisato¹, D. Terada¹, K. Sawada², K. Yoshida³, A. Kishida⁴, K. Minatoya³, K. Niwaya³, T. Nakatani³, and S. Kitamura³

¹Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

²Osaka Seikei College, Osaka, Japan

³National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

⁴Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Introduction

The artificial heart valve is a one of the most successful implantable medical devices. The xenograft valves made of the chemically crosslinked porcine valve or bovine pericardium have good biocompatibility, hemodynamics, and resistant to infections compared with the mechanical valves. However, the durability of the xenograft valve is relatively short in about 15 to 20 years in elderly and 5 to 10 years in pediatric patients by the calcification of the fixed tissue. The regeneration of heart valves using acellular xenogeneic scaffolds has been studied to have more durability with growth potential. It is very important to evaluate acellular xenogeneic scaffolds before clinical application to avoid severe failures such as transfer of unknown animal related infectious diseases. Our tissue processing for decellularization by ultrahigh pressure treatment for the safe valvular tissue regeneration was reported.

Materials and Methods

Porcine heart valves were isolated under the sterile condition from the Clawn miniature pigs (Japan Farm Co., Ltd.). They are then decellularized by our PowerGraft technology. Briefly, the tissues were treated by a cold isostatic pressing (CIP, Kobe Steel Co., Ltd.) of 980 MPa (10,000 atm) at 4°C for demolition of the cells inside followed by rinsing in PBS-based washing solution and ethanol solution at 4°C for 2 weeks with gentle stirring. The tissues treated were subjected to histological study, detection of residual DNA, phospholipids, alpha-galactose, and porcine endogenous retrovirus (PERV), and biomechanical study. The acellular scaffolds were transplanted into the allogeneic miniature pigs. The aortic root was implanted at descending aorta through left thoracotomy in the surgery carried out with single clamp technique. They were explanted 3, 6, and 12 months after the transplantation and examined histologically. All animals were carefully reared in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institute of Health (NIH publication No.85-23, revised in 1985).

Results and Discussion

The tissues were cell free in the HE stained sections by the PowerGraft technology. The amounts of DNA and phospholipids in the tissue treated were almost 0 and about 5% of that in the native tissue, respectively. There was no alpha-galactose (Fig.1) and PERV detected from the acellular tissue by the immunostaining and PCR assay, respectively. It has been reported that the most of viruses including HIV are inactivated by the CIP more than 600 MPa. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus.

The animals survived after the transplantation in the all cases. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes including their anastomosis. The inner surface was smooth and had no thrombus formation. From the immunohistological observation, infiltrations of smooth muscle cells and fibroblasts were identified in the all areas of the grafts at 6 months. The luminal surfaces were completely covered with endothelial cells. Calcium deposits were observed slightly. The sizes of the grafts after 12 months of transplantation were about 1.5 times of those at transplantation.

Conclusions

Porcine cells were removed from the tissue without changing its biomechanical property in a short time by the PowerGraft technology. There was no DNA, alpha-galactose, and PERV detected in the porcine acellular tissues and this indicates the tissues are very safe even for the xenogeneic transplantation. The results in porcine model were encouraging to have durable and safe acellular scaffolds for the valvular tissue regeneration.

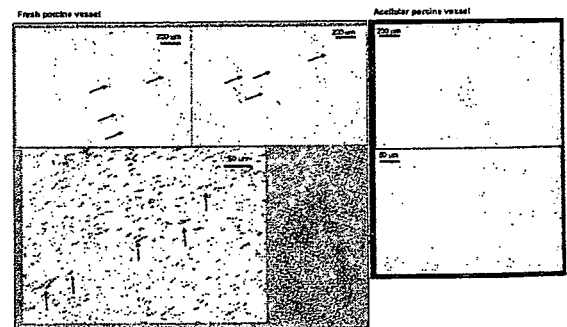


Fig.1 Immunostaining of anti-alpha-galactose in the native (left) and acellular (right) tissues.

Acknowledgements

This study was supported by the Research Grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and the Japan Health Sciences Foundation.

Acellular skeletal muscle scaffold as an inducer of muscular differentiation

T. Ehashi¹, S. Hashimoto², T. Fujisato²

¹; Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute 5-7-1, Fujishiro-dai, Suita, Osaka, JAPAN, 565-8565;

²; Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1, Omiya, Osaka, Osaka, Japan 535-8585

Introduction

Soft tissue-replacement therapies for trauma, tumor, and congenital anomalies are still challenging area in plastic and reconstructive surgeries. In some cases, autologous normal skeletal muscle tissue is transplanted as a surgical flap and this treatment may cause decreasing of patient's quality of life.

Recently, tissue-engineered skeletal muscles using scaffold for treatment of tissue defects have been investigated. In these studies, some kinds of scaffolds including synthetic materials and acellular tissues have been applied as the substrates. Among these scaffolds, acellular skeletal muscles may be a hopeful substratum for skeletal muscle reconstruction both *in vivo* and *in vitro* because the remaining extracellular matrices and paths of nerves in the scaffolds help cellular invasion and reconstruction of tissues. For example, after the acellular tissue transplantation to the tissue defects in animal experiments, proliferated satellite cells may migrate in the scaffold, differentiate into the myoblasts, and form new skeletal muscle. Besides, it is reported that myoblasts have developed into contractile skeletal muscle tissues *in vitro* using acellular tissues.

On the other hands, many researchers reported that stretch-cultured myoblasts on the silicone surface have formed myotubes. Satellite cells or myoblasts therefore are considered to differentiate and be matured by stretch stimulations.

In this study, we cultured myoblasts or mesenchymal stem cells in the acellular skeletal muscle tissue prepared by ultra-high pressure treatment. As a stimulation factor for differentiation or maturation of the cells into the skeletal muscle cells, stretch stimulation was applied. The effects of our acellular scaffold as a substrate in the stretch culture on the cell differentiation and morphology were investigated.

Materials and Methods

Porcine femoral skeletal muscles were sliced into the 3-mm thickness and packed with PBS. These tissues were applied ultra-high pressure at 980 MPa for 10 min to destroy cells, and washed with PBS-based buffer for 3 weeks to remove cell debris in the tissue.

Rat mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated from femoral bone and cultured on the collagen-coated dishes over one month to expand cells.

The MSCs or myoblast cells were seeded into the acellular skeletal muscle scaffold at the density of 1×10^6 cells/scaffold and were cultured statically for 3 days. On the third day, scaffolds with cells were clumped at the both edges, and elongated to 110% of initial length, and kept that length for 3 days (elongation group). In the stretch culture, scaffolds were stretch intermittently for 3 days (stretch group). Non-stretched cultures were made as control groups. The RNAs were extracted from cultured cells and expression of skeletal muscle

differentiation markers were investigated using real time PCR. The cellular morphologies were compared between stimulated and control groups.

Results and Discussion

From the histological observation, no nuclei were observed and DNA amount in the scaffold were dramatically decreased. Extracellular matrices and skeletal muscle cellular skeletons were remained in the scaffolds. These components in the scaffold are thought to maintain elastic modulus of the scaffold after decellularization treatment.

Cultured rat MSCs and myoblasts showed their differentiation ability into the skeletal muscle cells by stimulating factors. MSCs formed myotube 3 weeks after 5-azacytidine stimulation that is generally used. On the other hands, myoblasts changed cell morphology and formed myotube after confluent in the dish culture.

After 3 days of static culture of both cells, all scaffolds were shrunk by the cellular contractile forces. Cells were existed not only the surface but inside of the scaffold. All cells in the scaffolds showed round shape at that time. In the myoblast stretch culture group, cells kept round shape after 3 days of culture. However, in the static culture as a control group, some cells demonstrated giant cytoplasm with the cell nuclei existed near cell membrane similar to the skeletal muscle fiber *in vivo* (Figure). There was no particular change by the stretch stimulation on the myoblasts in the acellular scaffolds. In the elongation culture, MSCs in the scaffolds extended along with elongated direction of the scaffolds. In some areas, cells were fused and showed myotube-like morphology in spite of keeping round shape in the control group.

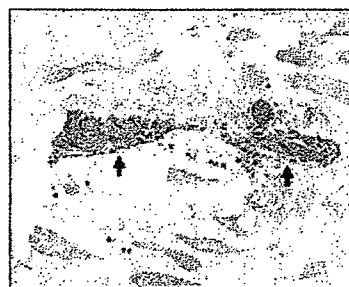


Figure. In the acellular skeletal muscle scaffold, myoblast cells demonstrated skeletal fiber-like morphologies after 6 days of static culture (arrows).

Conclusions

Our acellular skeletal muscle scaffold is thought to affect on myoblast differentiation and maturation. And more, elongating stimulation has possibility to act on the MSCs as an inducer of differentiation into the skeletal muscle cells.

Ligand-immobilized material for isolating mesenchymal stem cells based on their surface marker density

A. Mahara, S. Ichikawa, and T. Yamaoka

National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka, 565-8565 Japan

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) being used for regenerative medicine and cell transplantation were isolated from various tissues such as adipose tissue, cold blood, or bone marrow¹. In many case, MSCs was enriched in the adherent population to plastic culture dish. This procedure is a gold standard method for MSC isolation². Another procedure is the FACS or MACS separation based on the absence or presence of specific cell surface marker. Some combinations of the markers for MSC separation were reported in many groups. However, the consensus combination of the surface marker to identify the MSCs was not figure out. The MSCs collected by these procedures are composed of some populations, and homogeneous MSCs can not be separated by this method.

In this research, we focus on the surface marker density of stem cells for cell separation. The density is directly correlated with the differentiation property of the stem cells. We newly developed separation columns and microchannel for MSCs purification based on the surface marker density.

Experimental and Methods

The bone marrow cells of C57BL/6 mouse (SLC, Japan) were harvested on the plastic culture dish. The adherent population was collected as crude MSCs. The ligand-immobilized column was prepared by the silicone tube with inner diameter of 0.5mm. To introduce the graft chain of polyacrylic acid on the tube surface, the silicone tube was treated with ozone gas for 4 hours, dipped in 10% acrylic acid/methanol solution, and incubated at 60°C. The graft polymerization was confirmed by the toluidine blue staining. Anti-CD34 or Sca-1 antibody was conjugated to the graft chain.

To prepare the microchannel chip material, Au was deposited to the bottom surface of the glass microchannel. Self assemble membrane (SAM) of carboxylic acid-conjugated PEG-thiol was introduced onto the Au-treated microchanle. Antibody was conjugated by the same methods as silicone tube column.

The MSCs (2×10^4 cells, 10 μ L) was injected into the antibody-immobilized column, and PBS buffer was continuously flown into the tube. Each eluted fraction was collected and analyzed. The flow rate was 50 μ L/min between the fraction 1 to 5, and the rate was 600 μ L/min between fractions 6-20. The number and surface marker property of cells in collected fractions were analyzed by FACS system.

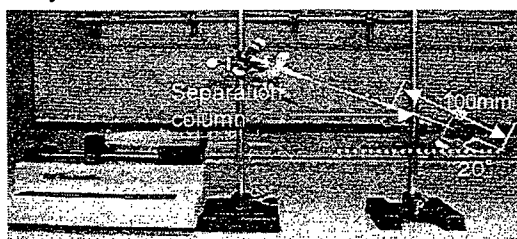


Figure 1 Cell Separation System

Results

The density of immobilized antibody on the column was evaluated using horseradish peroxidase-labeled antibody. The immobilized anti-CD34 antibody density was about 200 μ g/m². However, the immobilized antibody on SAM surface was unstable against the PBS flow. The molecular design of ligand-immobilized SAM surface is now under investigation.

The elution profile of the crude MSCs injected into the antiCD34 or Sca-1 immobilized column were investigated. When the MSCs injected into the unmodified column, all cells were eluted in early fraction. On the other hands, some peaks were detected in the delayed fraction 3 to 9 in the case of antiCD34 or Sca-1 antibody immobilized column. Elution time of these peaks was largely delayed as compared with the unmodified column. To investigate the expression level of surface marker in purified MSCs on the column, 2-dimensional FACS analysis was carried out. Major cell population in purified MSCs in latter fraction was detected in high level of marker expression with increasing the fraction number. The purified MSCs in latter fraction have high expression of CD34 and Sca-1. These results suggested that the MSCs were isolated by cell rolling mechanism of ligand-immobilized material based on the surface marker density.

We investigate the differentiation ability of purified MSCs on ligand-immobilized column. The purified MSCs on the column seeded on fibronectin-coated dish, and the MSCs was treated with the induction medium of osteoblast for 4 days. After the induction, mRNA was isolated from the MSCs. The expression of differentiation marker gene of purified MSCs in each fraction was evaluated by real-time PCR analysis. As the results, the expression level of the gene was largely depended on the fraction number. Especially, the results shown that the purified MSCs in fraction 3 or 5 have high ability for osteoblastic differentiation.

Conclusion

This investigation has shown that the ligand-immobilized column were design for the MSC separation based on the surface marker density. The MSCs was purified on antiCD34 or antiSca-1 antibody immobilized column, and purified MSCs has high ability for osteoblastic differentiation. This novel separation mechanism is useful for the homogeneous MSCs isolation.

Reference

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

Surface Modification of Poly(lactic acid)-based Scaffolds with Oligo(lactic acid)-Oligopeptide Amphiphilic Conjugates

Tetsuji Yamaoka

Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Fujishiro-dai, Suita Osaka 565-8565, Japan

Introduction :

Tissue regeneration using biodegradable scaffolds has been attracting great attention as a new alternating strategy to the artificial organs and organ transplantation. Although PLLA is a biodegradable safe material, this is not necessarily an ideal substance for the scaffold from the viewpoint of the cell compatibility and selectivity. Therefore, great efforts have been put forth in modifying the surface characteristics of the PLLA scaffolds. However, it is quite difficult to modify the PLLA chemically because of the lack of side functional groups.

In the present study, we developed a novel immobilization method of bioactive molecules onto PLLA scaffolds using novel oligo(lactic acid)-oligo peptide amphiphilic conjugates. A solution containing PLLA homopolymer and a small amount of the amphiphilic conjugates were cast, freeze dried, and electrospun, and their characteristics were evaluated especially as the nonwoven nonofiber-type nerve conduit.

Materials and Methods :

Oligo(lactic acid)-oligo peptide amphiphilic conjugates were synthesized by using 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-based stepwise solid-phase system on a Fmoc-PAL-PEG-PS resin. The peptides with the functional sequences (IKVAV) were synthesized by the general protocol and the amino terminus was deprotected with 20% piperidine/DMF without cleaved from the resin. The deprotected amino terminus was reacted with the oligo(lactic acid) with the degree of polymerization is about 19, whose hydroxyl terminus was capped with acetic acid anhydride. Resultant oligo(lactic acid)-oligo peptide amphiphilic conjugates on the resin were washed with DMF, DCM, and methanol and were cleaved from the resin using 85% trifluoroacetic acid (TFA), giving amphiphilic conjugate, OD19-IKVAV. The purity of the conjugates was confirmed by HPLC.

The nerve guide has double layered structure of the nonwoven fabric layers. Both layers were prepared by the electrospinning method as shown in Figure 1.

For preparing the inner layer, 20 % of PLLA solution in hexafluoroisopropanol (HFIP) containing 1 wt % of OD19-IKVAV was spun at the spinning rate of 3 mL/h and at 13kV. The distance between the syringe and target was 10 cm. After 30 sec spinning, the thickness of the inner layer became 20 μ m. Then, PLLA/PEG mixed solution in HFIP at the mixing ratio of 9:1 was spun for 10min resulting in the outer layer with the thickness of 180 μ m. The appearance and the SEM microphotographs of the nonwoven fabrics were also shown in Figure 1.

Rat sciatic nerve model was used for evaluating the nerve conduit. Female Wister rats weighing 180-210 g

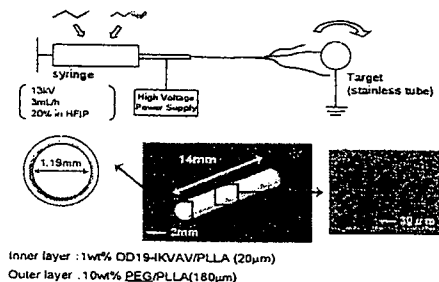


Figure 1. Electro spinning equipment and the double layered nerve guide

were anesthetized with 50mg/kg pentobarbital. The left sciatic nerve was exposed through a gluteal muscle-splitting incision. The sciatic nerve was transected and 10 mm of nerve was removed. Continuity was reestablished by a 14-mm-long nerve guide. Various conduit made of PLLA/ OD19-IKVAV, PLLA, and silicone was evaluated 1 month postoperation.

Results and Discussion :

Amphiphilic conjugates including oligo(lactic acid) segment and the hydrophilic peptides such as RGD or IKVAV were found to be effective modification moieties for the PLA-based biodegradable scaffolds. Especially, the conjugates were uniformly distributed in the PLLA matrices. The release rate of the distributed conjugates was greatly suppressed depending on the hydrophobic-hydrophilic balance of the conjugates.

When nonwoven nanofiber conduit containing OD19-IKVAV amphiphilic conjugates were applied to the rat injured sciatic nerve model, accelerated tissue regeneration in comparison with the case of PLA original conduit has been observed. The regenerated axon seems to grow along with the luminal surface of the nerve conduit. These results suggest that the amphiphilic peptides migrated to the surface of the scaffolds and were stably immobilized due to the hydrophobic interaction (Figure 2).

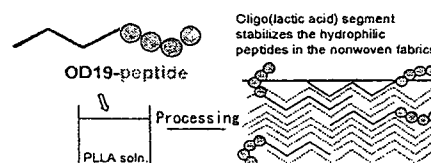


Figure 2. Hydrophobic segment of the amphiphilic conjugates stick in the PLA matrices and suppress the release of the conjugate .

Acknowledgement :

The author particularly indebted to Dr. Hiroyuki Tanaka, Dr. Ko Temporin, and Dr. Tsuyoshi Murase of Osaka University Graduate School of Medicine for the animal experiments.

J-29-G

Continuous Separation of Mesenchymal Stem Cells on Ligand-immobilized Interface

A. Mahara and T. Yamaoka

Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishirodai, Suita-city, Osaka, 565-8565, Japan, yamtet@ri.ncvc.go.jp

[Introduction] Mesenchymal stem cells (MSCs) have high potential as the cell source in autologous cell plantation and regenerative medicine. However, the procedure for the isolation is one of the problems, and it is necessary to develop a novel system for isolating the homogeneous MSCs. In this study, we design the ligand-immobilized interface for the continuous separation of MSCs based on their surface marker density. The anti-CD34 or anti-Sca-1 antibody immobilized columns were synthesized. The isolation property of MSCs on the interface and its differentiation ability were investigated. **[Results and Discussion]** Anti-CD34 or anti-Sca-1 was immobilized on the inner surface of the column. Crude MSCs were prepared from bone marrow of the mouse. Only when the crude MSCs were pass through the antibody-immobilized column, the some delayed peaks were confirmed. The cells in delayed fraction had homogenous density of CD34 and Sca-1. Next, purified MSCs were incubated in the osteoblastic differentiation medium for 4 days. The specific gene expression related to the differentiation was increased to about 10-fold as compared with the crude MSCs. **[Conclusion]** From the above discussion, the purified MSCs on the ligand-immobilized interface was high potential for the differentiation ability.

230 培養筋管細胞の収縮動態の定量評価

Quantitative evaluation of dynamic state of cultured myotube contraction

○ 林宏行 (阪工大院), 正 山崎健一 (阪工大院), 小林裕之 (阪工大院), 宇戸禎仁 (阪工大院),
江橋具 (国立循環器病セ), 正 近藤英雄 (阪工大院), 正 橋本成広 (阪工大院), 藤里俊哉 (阪工大院)

Hiroyuki HAYASHI, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka, 535-8585

Kenichi YAMASAKI, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Hiroyuki KOBAYASHI, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Sadahito UTO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Tomo EHASHI, Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center

Hideo KONDO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Shigehiro HASHIMOTO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Toshia Fujisato, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Key Words: C2C12, Contraction, Electrical pulse, Chronaxie, Actuator

1. 緒言

近年, 医療分野でマイクロマシンが使用されつつある。マイクロマシンを駆動させるためにはアクチュエータが必要となるが, 従来の機械式アクチュエータは大きく, 電源が必要であることから, 小型, 小電力で駆動するアクチュエータの開発が望まれている。生体筋は機械的アクチュエータとは異なり, アクチン, ミオシンの働きにより主に化学エネルギーを機械エネルギーに変換して駆動するため, 小型化および省電力化が可能となる。このことから, 我々は筋芽細胞を培養することによって作製した培養筋をアクチュエータとして利用する試みを進めている。培養筋をアクチュエータとして利用するためには, 培養筋の収縮弛緩を制御する必要がある。これまで筋管細胞や培養筋の収縮弛緩を電気パルスで制御する試み⁽¹⁾が報告されているが, その刺激条件と筋管細胞の収縮弛緩との関係は未だ明らかでない。そこで本研究では, 培養筋の収縮を制御するための刺激の大きさ, 周波数, パルス幅および筋管細胞に対する刺激の方向性について検討し, 筋管細胞収縮の動態変化を定量的に評価した。

2. 実験方法

2-1. 細胞培養

筋芽細胞としてマウス横紋筋由来株化細胞 C2C12 細胞を使用した。C2C12 細胞を 1.0×10^4 cells/cm² の密度で 60 mm コラーゲンコートディッシュに播種した。培養液には 10% ウシ胎児血清, 抗生物質を含む High-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (HG-DMEM) を用い, 37°C, CO₂ 5% の環境下でコンフルエントになるまで培養した。その後, 筋芽細胞の融合を促進させるため, 培養液を 7% ウマ血清, 抗生物質を含む HG-DMEM (DM) に変更し, 引き続き培養した。培養液の交換は 2 日毎に行い, その際に位相差顕微鏡にて細胞の形態を観察した。

2-2. 筋管細胞収縮の周波数応答性の評価

電気パルスに対する筋管細胞収縮の周波数応答性を調べた。図 1 に実験システムの概要図を示す。分化誘導から 6 日後に, ディッシュに白金平板電極を互いに向き合うように設置し, Waveform generator を用いて培養液中にパルス電圧を印加した。電界方向は筋管細胞の長軸に対して平行 (Parallel), および垂直 (Vertical) とした。入力電圧を 20

V_{pp}, パルス幅 10 msec とし, 周波数を 0.5 Hz から 10 Hz まで変化させたときの筋管細胞の収縮の動態を位相差顕微鏡画像で観察し, コンピュータに動画を取り込んだ。取り込んだ動画をフレームごとの静止画に変換し, 画像を Grayscale に変換した。収縮弛緩が見られる細胞の輪郭付近を選択し, その領域の Grayscale の平均値を求めた。さらに, Grayscale の平均値の時間変化をフーリエ変換し, 周波数スペクトルを求めた。

2-3. 基電流およびクロナキシー測定

分化誘導から 6 日後に周波数を 1 Hz とし, 入力電圧およびパルス幅を変化させ, 筋管細胞が収縮弛緩するときのそれぞれの値を調べた。ディッシュと直列に 100 Ω の抵抗を接続し, その両端の電圧を測定することによって回路中に流れる電流を算出した。筋管細胞が収縮弛緩し始めるときの電流とパルス幅との関係 (Strength-Duration curve) を求めた後, 最小二乗法によって Weiss の近似式⁽²⁾に近似し, 基電流とクロナキシーを求めた。実験は 37°C, 大気中で行った。また周囲溶液には 10% ウシ胎児血清, 抗生物質, 25mM HEPES を含む HG-DMEM を使用した。

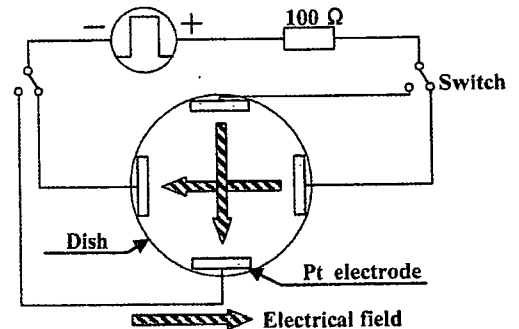


Fig.1 Schematic drawing of experimental system

3. 結果

図 2 にコンフルエント時と分化誘導から 6 日後の C2C12 細胞の位相差顕微鏡画像を示す。コンフルエントに達した後に, 培養液を DM に変更することで, 単核の筋芽細胞が細長い筋管細胞に変化している様子が観察された。

電気パルスを加えた結果, Parallelでは Grayscaleの平均値が周期的に変化したが, Vertical では周期的な変化は見られなかった。また, ここには示していないが 10 Hz では入力開始時に Grayscaleの平均値が上昇し入力停止時に減少した。図3に Grayscaleの平均値の時間変化をフーリエ変換した結果を示す。Parallelの0.5 Hz, 1 Hz, 3 Hzにおいて入力信号と同様の周波数でスペクトルのピークが見られた。しかし, 5 Hzにおいてはピークは確認できなかった。

図4に Parallelおよび Verticalの基電流およびクロナキシーの結果を示した。Parallelの基電流は Verticalに比べて有意に小さかった。また Parallelのクロナキシーは Verticalに比べて小さい傾向を示していた。

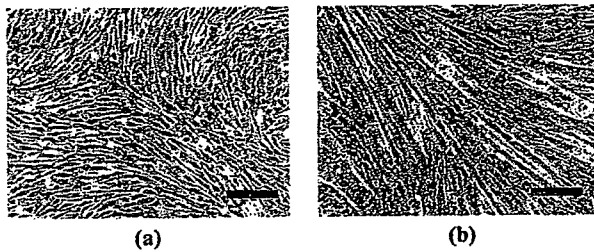


Fig.2 Phase-contrast images of C2C12 cells.
(a) Confluence,
(b) 6 days after differentiation induction,
bar=100 μm

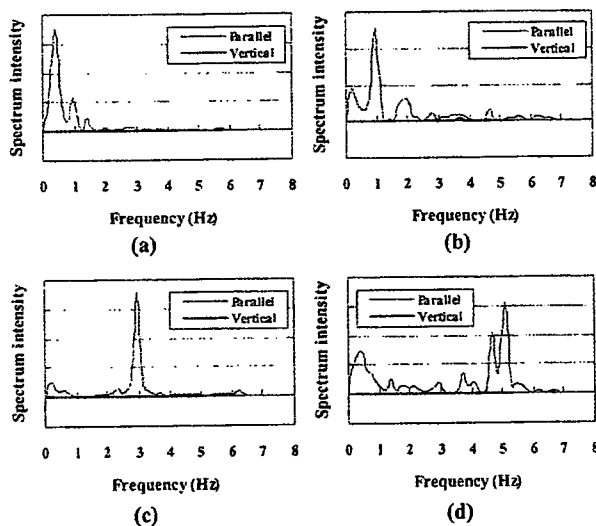


Fig.3 Results of Fourier transform .
(a) 0.5 Hz, (b) 1 Hz, (c) 3 Hz, (d) 5 Hz

4. 考察

本実験において筋管細胞の収縮は0.5 Hzから3 Hzまで周期的に変化した。フーリエ変換の結果, 入力信号と同様の周波数でスペクトルのピークが見られたが, 5 Hzではスペクトルのピークは確認できなかった。また 10 Hzでは入力開始時に Grayscaleの平均値が上昇し入力停止時に減少した。このことより, 周波数5 Hz以上では生体筋で見られる強縮が生じていたと考えられる。生体の運動においては強縮が用いられており, これにより大きな力を発生することができる。よって, 培養筋をアクチュエータとして利用する場合, 周波数による強縮が重要であると考えられる。

パルス電気刺激により, 筋を収縮弛緩させるために必要な電流値を基電流といい, 最小の電気エネルギーで筋を収縮弛緩させるために必要なパルス幅をクロナキシーという⁽²⁾。Parallelは Verticalに比べて基電流およびクロナキシーが小さかった。このことは筋管細胞の長軸に対して平行に電界を生じさせることにより, 低い電気エネルギーで筋管細胞を収縮弛緩させることが可能であることを示唆している。

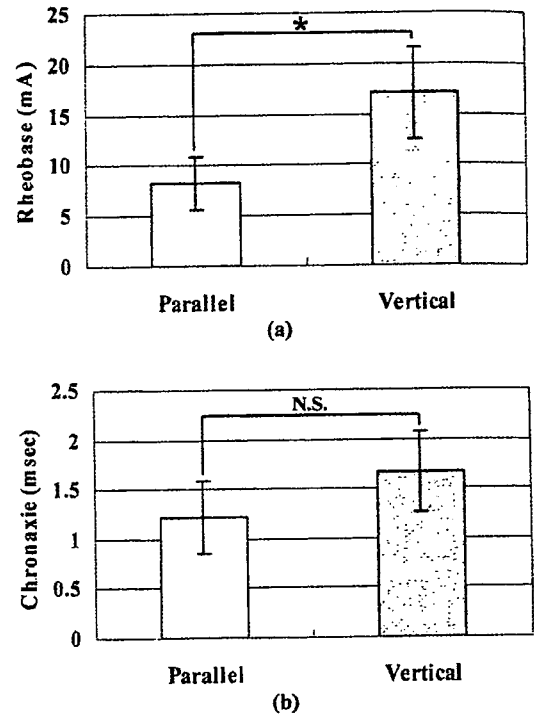


Fig.4 Results of Rheobase and Chronaxie.

(a) Rheobase (* $p < 0.01$, Parallel : $n=9$, Vertical: $n=4$),
(b) Chronaxie ($p=0.081$, Parallel : $n=9$, Vertical: $n=4$)

5. 結言

本実験より, 以下の結言を得た。

1. 電気パルス刺激の周波数により筋管細胞の収縮動態が変化することがわかった。
2. 筋管細胞には電界に対する異方性があり, 筋管細胞の長軸に対して平行に電界を生じさせることにより, 低い電気エネルギーで筋管細胞を収縮弛緩させることが可能であることが示唆された。

謝辞

本研究は文部科学省学術フロンティア「培養筋の医工学応用」の助成により行われた。

参考文献

- (1) Mario Marotta et al. Design and performance of an electrical stimulator for long-term contraction of cultured muscle cells. Bio Techniques 2004 ; 36 : 68-73
- (2) L.A. Geddeset, J.D.Bourliand. The Strength-Duration Curve. IEEE Transactions On Biomedical Engineering. Biol Anim.1985 ; BME-32 ; 6 : 458-459

TISSUE REGENERATION BY DECELLULATIZED BIOLOGICAL SCAFFOLDS PREPARED BY DETERGENT-FREE TREATMENT

Fujisato T¹, Terada D¹, Funamoto S², Minatoya K³, Kishida A², Yamaoka T³, Nakatani T³, Kitamura S³

¹ Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

² Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

³ National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

INTRODUCTORY REMARKS: Decellularized tissues and those recellularization are widely studied to give more durability with potential growth and invisible immunogenicity to the conventional bioprostheses like glutaraldehyde-treated heart valves. Detergents are commonly used for removal of the cells, whereas they are generally cytotoxic and may prevent repopulation after the transplantation. We are investigating efficient processes of decellularization and recellularization of biological tissues to have bioscaffolds with excellent repopulationability after their implantation.

MATERIALS AND METHODS: Porcine pulmonary valves, aortas, connective tissues and other tissues were excised and treated by an ultra-high pressure treatment of 980 MPa at the room temperature. They were then washed with buffer and alcohol with gentle stirring. No detergents were used in the processes. The acellular scaffolds of heart valves and aortas were transplanted to orthotopic positions of miniature pigs. Postoperative anticoagulation or anti-platelet therapy was not instigated. They were explanted 3, 6 or 12 months after the transplantation and examined histologically and immunohistologically.

RESULTS: The leaflet, aorta, and some connective tissues were completely cell free after the treatment. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus of the leaflets treated. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes. The inner surface was completely covered with endothelial cells and the inside was infiltrated by cells from both sides of endothelium and outer tissue after 3 months. It was dominant in the latter. Almost of the tissue including cusps were filled by the cells after 6 months, mainly by smooth muscle cells. The grafts followed the growth of their hosts after 12 months.

DISCUSSIONS: The acellular scaffolds prepared by detergent-free treatment may have a potential for remarkable repopulation after their transplantation.

PRESENTED BY:

Professor Toshia Fujisato
Biomedical Engineering
Osaka Institute of Technology
5-16-1 Omiya, Asahi
Osaka, Japan, 5358585

Phone: 81-6-6954-4746
Email: fujisato@bme.oit.ac.jp

ELECTRO SPUN PLLA NONWOVEN NERVE CONDUIT MODIFIED WITH BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE SEQUENCES

Yamaoka T¹, Uchida S¹, Tanaka H², Temporin K², Murase T², Mahara A¹

¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute,
JAPAN

²Department of Orthopaedics, Osaka University Graduate School of Medicine, Japan

INTRODUCTORY REMARKS: Although PLLA is a safe material as scaffolds, its is not necessarily an ideal substance for leading to the effect tissue regeneration. Then, great efforts have been paid in modifying their surface characteristics. In the present study, we developed a novel immobilization method of bioactive molecules onto PLLA scaffolds using novel oligo(lactic acid)-IKVAV oligo peptide amphiphilic conjugates.

MATERIALS AND METHODS: A solution containing PLLA homopolymer and a small amount of the amphiphilic conjugates were electrospun to prepare nonwoven nonofiber-type nerve conduit. The nerve guide has double layered structure of the nonwoven fabric layers.

Rat sciatic nerve model was used for evaluating the nerve conduit. Female Wister rats weighing 180-210 g were anesthetized with 50mg/kg pentobarbital. The left sciatic nerve was exposed through a gluteal muscle-splitting incision. The sciatic nerve was transected and 10 mm of nerve was removed. Continuity was reestablished by a 14-mm- long nerve guide.

RESULTS: Amphiphilic conjugates including IKVAV sequence were found to be uniformly distributed in the PLLA matrices. The release rate of the distributed conjugates was greatly suppressed depending on the hydrophobic-hydrophilic balance of the conjugates. When nonwoven nanofiber conduit containing OD19- IKVAV amphiphilic conjugates were applied to the rat injured sciatic nerve model, accelerated tissue regeneration in comparison with the case of PLA original conduit has been observed. The regenerated axon seems to grow along with the luminal surface of the nerve conduit. These results suggest that the amphiphilic peptides migrated to the surface of the scaffolds and were stably immobilized due to the hydrophobic interaction.

PRESENTED BY:

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

Phone : 81-6-6833-5012 x2637
Fax: 81-6-6835-5476
Email: yamtet@ri.ncvc.go.jp

一般演題13

異種組織をテンプレートとする組織再生技術の開発

大阪工業大学1)、国立循環器病センター2)、東京医科歯科大学3)、物質材料研究機構4)

○藤里俊哉1)、寺田堂彦1)、湊谷謙司2)、山崎健一1)、林 宏行1)、江橋 具2)、小林尚俊4)、岸田晶夫3)、山岡哲二2)、中谷武嗣2)、北村惣一郎2)

われわれは、異種組織から細胞成分等を除去し、マトリックス成分のみが残存した多孔質構造体を組織再生のテンプレートとして用いる再生医療技術を開発している。移植後に自己組織化され、患者の成長に伴う組織の成長が期待できる。血管、心臓弁の他、角膜や筋肉、神経、皮膚等のテンプレート作成について報告する。

ミニブタやラットから各種組織を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた980MPaの超高压印加による細胞破壊処理、及び残渣成分の洗浄除去処理を行うことで細胞成分を除去した。血管、心臓弁では、組織内のエラスチン線維も酵素によって除去した。得られたテンプレートを、同種あるいは異種動物に同所性に移植した。また、テンプレートへの細胞組み込みについても検討した。

下行大動脈の同種移植では、移植12ヶ月後に移植時の約1.5～2倍の大きさとなり、グラフト前後の血管と完全に一体化していた。内腔は内皮細胞によって覆われ、組織内は平滑筋及び線維芽細胞の浸潤を認めた。角膜実質部ミニブタ組織のウサギへの異種移植では、軽微な炎症反応を認めたものの、透明性を維持しつつ周囲組織に定着していた。筋組織では、筋芽細胞を播種した後で筋管細胞へと分化させることによって、生体外で電気刺激にて収縮挙動を示すことを確認した。

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、科学技術振興調整費、及び文部科学省学術フロンティア事業の補助を受けて実施された。

生体由来素材スキャフォールドを用いた臓組織再生

大阪工業大学、国立循環器病センター1)、東京医科歯科大学2)、物質材料研究機構3)

○藤里俊哉、寺田堂彦、湊谷謙司1)、山崎健一、林 宏行)、近藤英雄、江橋 具1)

小林尚俊3)、岸田晶夫2)、山岡哲二1)、中谷武嗣1)、北村惣一郎1)

われわれは、生物由来素材を臓組織再生用のスキャフォールドとして用いる再生医療技術を開発している。プラスチックや金属などとは異なり、本スキャフォールドは移植後にリモデリングされることによって、患者の成長に伴う臓組織の成長が期待できる。本報告では、血管、心臓弁、筋肉、角膜、皮膚等のスキャフォールド作成と、その細胞ハイブリッド化について述べる。

ミニブタやラットから各種組織を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた980MPaの超高压印加による細胞破壊処理、及び残渣成分の洗浄除去処理を行うことで生物由来素材スキャフォールドを作成した。さらに、血管、心臓弁では、組織内のエラスチン線維も酵素によって除去した。また、市販のコラーゲン溶液から再構成したコラーゲン多孔質体もスキャフォールドとした。スキャフォールドの細胞ハイブリッド化は、回転培養法を用いた表面播種の他、組織内への細胞注入も検討した。

血管、心臓弁では細胞ハイブリッド化せずにスキャフォールドのみの同種移植を行ったところ、移植12ヶ月後に移植時の約1.5～2倍の大きさとなり、スキャフォールド前後の血管と完全に一体化していた。内腔は内皮細胞によって覆われ、組織内は平滑筋及び線維芽細胞の浸潤を認めた。角膜実質部ミニブタ組織のウサギへの異種移植では、軽微な炎症反応を認めたものの、透明性を維持しつつ周囲組織に定着していた。筋組織では、筋芽細胞をハイブリッド化した後で筋管細胞へと分化させると、生体外で電気刺激に応じた収縮挙動を示し、その収縮力を測定することができた。スキャフォールド内部への細胞ハイブリッド化方法として、薬物インジェクタを使用したところ、スキャフォールド内へ注入された細胞の生着が認められた。

生物由来素材スキャフォールドは、種々の臓組織再生のための基材として有効であると考えられる。

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、科学技術振興調整費、及び文部科学省学術フロンティア事業の補助を受けて実施された。

P-166 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

寺田 堂彦^{1,2}, 澤田 和也³, 緒方 裕之⁴, 平工 香織⁴, 鎌田和加子¹, 吉田 謙一¹, 舩本 誠一³, 藤里 俊哉¹, 岸田 晶夫³, 山岡 哲二³, 中谷 武嗣³

¹大阪工業大学工学部生体医工学科, ²ヒューマンサイエンス振興財団, ³大阪成蹊短期大学, ⁴国立循環器病センター, ⁵東京医科歯科大学

現在、臨床においては年間約5万本もの人工血管が使用されている。しかしながら、成長機能の欠如から小児患者への適用には問題が残されており、再生型人工血管の開発が依然として望まれている。我々は再生型人工血管の開発を目的とし、ブタ大動脈組織を由来とするバイオスキヤフォールドに関する研究を行った。血管組織試料としてブタ大動脈（ジャパンファーム）を用いた。120度C、24時間の熱脱水架橋を施した血管組織に対し、エラスターゼ/トリス緩衝溶液（0.57 μg/ml; CaCl₂ 10 mM; NaN₃ 0.02%; pH 8, 37度C）中で72時間振盪処理を行い、エラスチンを分解除去した。その後、エタノール（80 v%; 37度C; 72時間）処理によってリン脂質を抽出除去した。作製した脱エラスチン化動脈組織を用いて同種ミニブタへの置換移植実験を行った結果、移植期間3ヶ月の時点でグラフトに瘤化および石灰化は認められず、無数のレシピエント由来平滑筋細胞の浸潤が確認された。6ヶ月ではグラフト内にわずかに石灰化が認められた。MTC染色では、6ヶ月でエラスチン線維の再形成は認められなかった。弾性線維の豊富な動脈組織の再生には、さらに長期経過の観察が必要であると考えられる。本方法により作製されたグラフトは再細胞化能と石灰化抑制効果を有しており、再生型バイオスキヤフォールドとしての有効性が示された。

P-187 ポリプロピレン繊維-コラーゲンゲル複合体を用いた筋芽細胞の三次元培養

奈良 雅尚¹, 山崎 健一¹, 寺田 堂彦^{1,2}, 澤田 和也³, 近藤 英雄¹, 橋本 成広¹, 藤里 俊哉¹

¹大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ²ヒューマンサイエンス振興財団, ³大阪成蹊短期大学総合生活学科

【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として使用するためには、筋組織と同様に筋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。そこで、培養筋を作製するためのスキヤフォールドとして繊維-ゲル複合体に着目した。繊維-ゲル複合体は繊維そのものが強度を有しており、ある程度大きさを制御することが可能である。さらに、繊維に沿って細胞が配向すると期待される。これらのことから、本研究では繊維-ゲル複合体を用いた筋芽細胞の三次元培養を行い、スキヤフォールドとしての有用性を評価した。【方法】繊維にはポリプロピレン繊維を用いた。繊維を等間隔に配列させ、その上にコラーゲンゲルを形成した。マウス横紋筋由来の株化細胞であるC2C12細胞を播種し、10%ウシ胎児血清と抗生物質を含むHG-DMEMで培養した。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。【結果および考察】スキヤフォールド上で細胞が増殖し、筋管細胞に分化している様子が見られた。入力電圧30 Vp-p, 周波数1 Hz, パルス幅10 msecの電気パルスを培養液中に印加したところ、培養筋が周波数に同期して収縮する様子が観察された。電気パルスによって収縮弛緩したことから、繊維-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。

P-188 脱エラスチン組織-コラーゲンゲル複合体を足場としたC2C12細胞の3次元培養

山崎 健一, 寺田 堂彦, 奈良 雅尚, 近藤 英雄, 橋本 成広, 藤里 俊哉

大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻

【目的】我々はこれまで、脱エラスチン化生体組織を用いて、筋芽細胞を培養してきた。脱エラスチン化生体組織は形状の制御が比較的容易で、強度がコラーゲンゲルに比べて高いという利点がある。しかし、培養筋を占める細胞外基質量が多く、筋の収縮を妨げることが危惧される。一方、コラーゲンゲルは細胞外基質の割合が脱エラスチン化生体組織に比べて少ないが、強度が弱いなどの欠点がある。そこで、互いの利点を生かすために、脱エラスチン化生体組織-コラーゲンゲル複合体を作製し、培養筋としての機能を評価した。【方法】脱エラスチン化生体組織として、ブタの大動脈を使用した。脱エラスチン化生体組織をキルシュナー鋼線に固定し、2つの脱エラスチン化生体組織の間にC2C12細胞を包埋したコラーゲンゲルを形成した。10%牛胎児血清を含むDMEMで3日間培養した後、C2C12細胞の分化を促進させるため7%馬血清を含むDMEMで6日間培養した。培養後、電気パルス刺激を行い、培養筋の収縮弛緩動態を観察した。【結果】培養9日後、ゲルが脱エラスチン化生体組織を覆うように収縮した。電気パルス刺激を与えたところ、培養筋が周期的に収縮弛緩した。【結論】今回用いた複合体scaffoldは培養筋の足場として有用であることが示唆された。今後は強度や収縮力を脱エラスチン化生体組織のみの場合と比較して、詳しく検討する予定である。

林 宏行¹, 山崎 健一¹, 小林 裕之¹, 宇戸 禎仁²,
近藤 英雄¹, 橋本 成広¹, 藤里 俊哉¹

¹大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ²大阪工業大学
大学院工学研究科電気電子工学専攻

【緒言】我々は小型、省電力なアクチュエータ作製を目指し、培養した筋芽細胞から作製した培養筋をアクチュエータとして使用する試みを進めている。培養筋のアクチュエータ化のためには培養筋を構成する筋管細胞の収縮を制御する必要がある。現在、筋管細胞の収縮を電気パルスで制御する試みが報告されているが、その刺激条件と筋管細胞の収縮との関係は未だ明らかでない。そこで本研究では培養筋の収縮を制御するため、電気パルスの刺激の方向性について検討した。【方法】筋芽細胞としてマウス横紋筋由来株化細胞C2C12を使用した。C2C12細胞を筋管細胞へ分化させた後、培養液にパルス電圧を印加した。筋管細胞の収縮に及ぼす電界方向の影響を調べるため、筋管細胞の長軸方向と平行 (Parallel) および垂直 (Vertical) に電界を加えた。周波数を1 Hzとして、パルス幅および刺激回路中に流れる電流を変化させ、筋管細胞が収縮し始めるときの値を調べた。そしてパルス幅と電流の関係から基電流とクロナキシーを求めた。【結果および考察】 Parallelのときは、Verticalより基電流およびクロナキシーが小さかった。このことは、筋管細胞には電界に対する異方性があり、筋管細胞と平行方向に電界を生じさせることで、低いエネルギーで筋管細胞を収縮弛緩させることが可能であることを示唆している。

O-09-3 細胞表面マーカーに基づく間葉系幹細胞の高純度化システムの開発

馬原 淳, 山岡 哲二

国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部

【目的】間葉系幹細胞 (MSC) バリアーションと高純度分離法の開発は、細胞移植治療を実現化する上で極めて重要な課題である。これまでに、MSCの表面マーカーのみならずその発現密度によって細胞を分離するリガンド固定化カラムを開発してきた。本発表では、MSCで発現している種々の抗体発現量に基づいて細胞を分離した結果と分化能力の相関について検討した結果を報告する。【実験】ポリアクリル酸を導入したシリコンチューブ (内径0.5mm) および、シランカップリング剤によりアミノ基を導入したガラスキャピラリーに抗マウスCD34抗体を固定化した。C57BL/6マウスから採取した粗精製の間葉系幹細胞 (MSC) をカラムにより分離し、Osteoblast分化能をPT-PCR法により定量した。【結果】マウスMSCを抗CD34抗体固定化カラムへ通液した結果、表面マーカー密度に基づいて溶出時間が遅延するフラクションを確認した。次に、CD34 Sca-1, CD44の発現密度を評価した結果、カラムにより純化したMSCのCD34 Sca-1発現量とCD44発現量は逆の相関であることが示された。得られたフラクションに含まれるMSCをOsteoblast分化培地で4日間培養し分化関連遺伝子の発現を定量した結果、粗精製のMSCと比較して5-10倍程度高い分化能を有する細胞ポピュレーションを得ることに成功した。

O-10-6 含水性を有するポリ乳酸系材料の抗血栓と組織浸潤性

佐々木 愛¹, 柿木佐知朗¹, 江橋 具², 森反 俊幸³, 山岡 哲二¹

¹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,

²国立循環器病センター研究所再生医療部, ³鈴鹿医療科学大学医学部臨床工学科

【緒言】現在の人工血管は、劣化やそれに伴う経時的な再手術などの問題がある。一方、生体吸収性を有する再生型人工血管、特に小口径の人工血管は難治性冠動脈疾患への応用も期待される。我々は、内層がポリ-L-乳酸(PLLA)とポリエチレングリコール(PEG)とのマルチブロック共重合体、外層がPLLAのナノファイバーからなる二重構造のスキャホールドを開発している。本研究では、その抗血栓吸着性ならびに組織浸潤性について評価した。【方法】PLLAおよびマルチブロック共重合体のクロロホルム溶液から、キャスト法により厚さ150 μ mのフィルムを作製し、さらにエレクトロスピンニング法により、ナノファイバー不織布を作製した。これに対して、ウシ全血およびラットPRP(platelet rich plasma)を所定時間接触させ、血栓吸着性および血小板粘着性を評価した。【結果】キャストフィルムに対するウシ全血試験では、PLLAとマルチブロック共重合体との間に著大な違いが観察された。PLLA上では約2時間で多くの血栓の付着が確認されたが、マルチブロック共重合体では8時間後でも血栓の付着が確認されなかった。マルチブロック共重合体表面は含水したPEGが鎖により覆われており血栓の付着を効果的に抑制したと思われる。またナノファイバー不織布では多孔質構造に物理的に絡み付くように血栓が認められたものの、マルチブロック共重合体の抗血栓付着性が認められ、再生型人工血管材料として有望と思われる。

O-35-1 下肢虚血細胞移植療法におけるEBM確立をめざしたMRI細胞トラッキング技術

橋 洋¹、寺本 昇²、AGUDELO CARLOS¹、
園見純一郎²、飯田 秀博²、山岡 哲二¹

¹国立循環器病センター研究所先進工医学センター生体工学部、
²国立循環器病センター研究所先進工医学センター放射線医学部

近年、再生工医学の進歩により細胞移植治療が数多く検討され、良好な回復結果が報告されている。それに伴い、回復過程の正確な追跡と診断の重要性が高まっている。我々は、非浸襲で、且つ非破壊的に生体内を観察できるMagnetic Resonance Imaging (MRI)に着目し、下肢虚血モデルラットを用いて移植細胞の追跡を行った。移植細胞としては、骨髓由来間葉系幹細胞を用いた。移植細胞を追跡するために、ガドリニウムを中心金属とした長期細胞ラベル化用MRI造影剤を開発し、エレクトロポレーション法を用いて移植細胞に導入した。この手法により、造影剤は細胞内に効率良く導入され、細胞内に12日間安定に存在することがわかった。また、造影剤を内包させることによる、分化への影響について検討した。さらに、ラットの大腿動静脈を結紮し、下肢虚血モデルラットを作成した。虚血作成後、1X10⁶個の細胞の移植を行いレーザードップラー法により血流の回復過程を観察した。同時に、動物用MRIを用いて径時的に移植細胞の追跡を行い、in vivoにおける細胞の状態と回復過程の相関関係について検討した。以上より、非浸襲に移植細胞の影響を評価できることが示唆された。また、本手法は細胞種に依存せずMRI用造影剤の導入が可能であることから、下肢虚血のみでなく、様々な再生移植治療における応用が期待できる。本研究は、厚生労働科学研究費補助金「医療機器開発推進研究事業」によるものである。

O-36-2 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

江橋 具¹、馬原 淳²、寺田 堂彦³、藤里 俊哉³、
山岡 哲二²

¹国立循環器病センター研究所再生医療部、²国立循環器病センター研究所生体工学部、³大阪工業大学大学院生体医工学科

【目的】事故や腫瘍摘出などにより、広範囲にわたって失われた組織を補填する治療として、患者の健全な組織を血管網とともに移植する、筋皮弁術が行われる。しかし、この方法では患者のQOLの低下が著しいことから、合成材料や細胞を用いる再生医療型の治療法が検討されている。巨大な組織を再生するには、組織内部の細胞に栄養を供給するための毛細血管網の構築が不可欠である。しかし、未だ決定的な手法は確立されていないため、生体内あるいは生体外で、いかに毛細血管網を構築するかが注目されている。一方、最近、細胞周囲の微小環境が、未分化細胞の分化・成熟や機能の発現に影響を及ぼすことが報告されてきた。そこで本研究は、脂肪組織を加工することにより、血管構築を誘導できる微小環境を有する新規スキャフォールド作製を目的とした。【方法】ラット皮下脂肪を酵素あるいは有機溶媒を用いて脱脂したのち、組織学的に観察するとともに、空隙率や空孔の大きさを計測、さらに引張や圧力試験により力学特性を調べてスキャフォールドとして適用できるかを検討した。【結果と考察】組織学的検討の結果、脱脂脂肪組織内には、血管網を構築していた基底膜などのマトリクス構造が二次元的に良好に残存していることが確認され、この微小環境構造により、本研究で作製したスキャフォールドが毛細血管網を誘導できる可能性が示唆された。

P-204 ポリエチレングリコールを担体とした細胞追跡用MRI造影剤の開発

橋 洋一¹, 東 晃至³, 平野 義明³, 飯田 秀博², 山岡 哲二¹

¹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, ²国立循環器病センター研究所先進医工学センター放射線医学部, ³大阪工業大学大学院工学研究科

現代医療において画像診断の果たす役割は大きくなってきている。例えば、X線診断法、超音波診断法、核医学診断法（PET, SPECT）及び核磁気共鳴診断法（MRI）などそれぞれの診断法の特徴を生かした医学診断技術の進歩は著しい。特に、MRIは非侵襲的に撮像でき、軟部組織の解像力に優れ、任意の方向での撮像も可能である。我々は、このMRIの特徴を利用し、組織の再生過程における移植細胞の追跡ができると考えた。移植細胞をin vivoにおいて追跡するためには非常に長い時間の可視化が必要となる。そのために、造影剤を細胞内へと送達するだけでなく、更に細胞内に長期間保持できる細胞内滞在型の造影剤の開発が重要である。我々は、これまでにポリビニルアルコールを主鎖としたMRI用造影剤を開発してきた。本研究では、これまでの知見を基に、ポリエチレングリコール（PEG）を用いてMRI用造影剤の開発を試みた。PEGは分子量5000と10000を用い、末端にガドリニウムを中心金属としたキレート錯体を導入した。得られたPEG誘導体の物性（緩和度、細胞毒性など）を検討した。また、PEG誘導体水溶液のMRI撮像を行い、造影剤としての効果を確認した。さらに、細胞内に導入を行い、細胞のMRI撮像を行うと共に、合成した造影剤の細胞内挙動についても検討した。本研究は、厚生労働科学研究費補助金「政策創薬総合研究事業」によるものである。

P-206 高感度 *In vivo* 細胞追跡システムの検討

鎌田和加子¹, 馬原 淳¹, 清野 泰², 森 哲也², 藤林 康久², 山岡 哲二¹

¹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, ²福井大学高エネルギー医学研究センター分子イメージング部門

【目的】細胞移植治療法はパーキンソン病や心筋梗塞の治療法として着目されている。しかし移植後の治療メカニズムは未だ明らかにされておらず、その正確な追跡と定量的な解析が求められている。蛍光発光イメージングでは生体内深部の情報を得ることはできないため、我々は、MRIを用いた細胞追跡システムを開発してきた。さらに、MRIの1つの弱点である感度を補填する目的でPETを用いた移植細胞追跡システムも併せて検討している。【実験】MRIによる細胞追跡には新たに開発した高分子化ガドリニウム¹¹¹を用いた。また、F-18標識エストラジオールで追跡可能な細胞を作製するためにヒトエストロゲンレセプター(hERL)をコードしたプラスミドをNIH/3T3細胞へ導入し、高発現クローンを得た²⁾。リアルタイムPCR法によりhERLの定量ならびに、蛍光標識エストラジオールにより細胞内発現の局在を評価した。【結果と考察】クローニングで得られた細胞は、トランスフェクション前の細胞と比較して40倍のhERLを発現した。さらに共焦点顕微鏡により、形質転換細胞において核付近への蛍光標識エストラジオールの高い集積が確認され、*In vivo* 細胞追跡の可能性が示唆された。

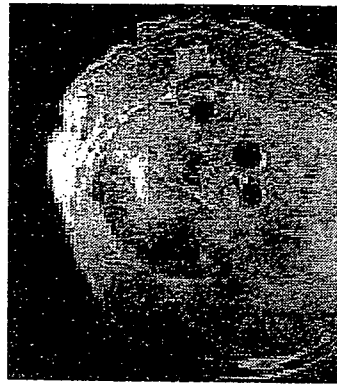
参考文献1) Y. Tachibana et al, The 28 th Annual meeting of Japanese Society for Biomaterials, 2006, 308. 2) T. Furukawa et al. Nucl Med Biol. 2006. 33, 145 - 51.

体内移植の効果、MRIで把握

幹細胞の働き追跡

国立循環器病センター | ガドリニウム封入

国立循環器病センター研究所は、病氣治療のために体内に移植した幹細胞の位置や変化を追跡できる技術を開発した。幹細胞のなかにガドリニウムを入れ、磁気共鳴画像装置(MRI)を使って観察する。成長した細胞が増殖する様子なども把握できるという。幹細胞がどのように機能しているのか解明する研究に役立つと期待している。



マウスに移植した細胞が白くみえる(左端部分、MRIの断層画像)

同研究所生体工学部の山岡哲二部長、橘洋一研究員、放射線医学部の飯田秀博部長らが共同開発した。

研究成果は名古屋市で開催中の高分子討論会で二十一日、発表する。ガドリニウムをポリビニルアルコールと結合させ、移植する幹細胞に封

入する。ポリビニルアルコールはガドリニウムを細胞内に安定して閉じ込め、幹細胞に対する毒性を軽減する役目を果たす。

体内にこの幹細胞を移植した後、MRIの断層画像を使って観察する。ガドリニウムの周囲にある水の分子が白くなって見えるという。マウスの背中に細胞を移植した実験で確認した。半年間ほどはその動向を追跡できるとみている。

事故や病気などで傷ついた臓器や組織を修復する治療法として、様々な組織のもとになる幹細胞を移植する再生医療が注目されている。心筋梗塞(こころそく)やパーキンソン病などの適用が期待されるが、移植した幹細胞が体内でどのような効果を及ぼしているかは詳しく分かっていない。

例えば心筋梗塞の場合、移植後に幹細胞が分化した・増殖して新しい組織を作るのか、周囲の細胞や組織に影響を与えて治癒するのか、現段階ではっきりしない。また、移植した細胞が同じ場所にそのままの姿で残っているかも分からない。開発した技術を利用すれば、幹細胞が増殖した場合にもその様子を観察できる

とみている。幹細胞移植が組織を治癒するメカニズムの解明に役立ち、適切な治療法の選択などにつながることを考えている。今後はイヤブタを使った実験で効果を確認する方針。二年程度をメドに成果を出したい考えだ。