

ウイルス研究、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)、シンポジウム4 C型肝炎

4) 脇田隆宇、C型肝炎ウイルスのウイルス培養とワクチン開発、第67回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(2008, 10.28-30)、シンポジウム4 ウイルス発癌

5) 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部健一、池田正徳、脇田隆宇、加藤宜之、ATM DNA 損傷センサーはC型肝炎ウイルスのRNA複製に必要である、第67回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(2008, 10.28-30)、ワークショップ3-4 HCV

6) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの細胞内粒子形成過程の解析」「感染現象のマトリックス」横糸の会、東京大学医科学研究所(2008, 5.29-30)

7) T Wakita, HCV replication and virus particle formation, The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, (2008 9/7-11)

8) T Wakita. Development of HCV culture system, Workshop/Hepatitis, The 7th Japan-China International Conference of Virology, Tokyo, Japan (June 1-3, 2008)

9) T Wakita. Hepatitis C virus replication and virus particle formation, Symposium: Emerging Viruses and the Control of Viruses, XIVth International Congress of Virology, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey

10) Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Wakita T,

Production and purification of HCV particles from serum-free culture, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10.5-9)

11) Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Li J, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10.5-9)

12) Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, The C-terminal serine cluster of NS5A is a determinant of NS5A-core protein interaction and HCV production, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10.5-9)

13) Murayama A, Date T, Akazawa D, Kato T, Suzuki T, Nomoto A, Wakita T, A single amino acid mutation in core region is important for efficient infectious virus particle production in genotype 2b/2a chimeric HCV, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10.5-9)

13) Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, T Wakita, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzee is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)

14) 高橋仁、尾見法昭、赤澤大輔、中村紀子、望月英典、鈴木哲朗、脇田隆宇、エピトープタグを

付加した組換え HCV 粒子の効率的な産生と性状解析、第 31 回 分子生物学会 神戸 (2008 年 12 月 10 日)

15) H Takahashi, N Omi, D Akazawa, N Nakamura, H Mochizuki, T Suzuki, T Wakita. Analysis of purified recombinant HCV with modified envelope glycoprotein. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. San Antonio, Texas, USA (October 5-9, 2008)

16) アリ フセイン, 齊月, 山口達哉, 下遠野邦忠, 土方誠

不死化肝細胞の中空糸培養によって再現した患者血清由来天然 HCV の感染増殖」(第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008.10.26 岡山コンベンションセンター)

17) HH Aly, Y Qi, K Shimotohno, M Hijikata: A prolonged culture system for the study of the entire life cycle and the pathogenesis of natural HCV infection (第 67 回日本癌学会学術総会 2008.10.29 名古屋国際会議場)

18) HH Aly, K Shimotohno, M Hijikata: Serum derived HCV infection, replication and particle production in immortalized primary human hepatocytes (XIVth International Congress of Virology 2008.8.12 Istanbul)

19) HH. Aly, T Yamaguchi, Y Qi, K Shimotohno, M Hijikata: Development of the novel in vitro system supporting the entire life cycle of natural HCV (15th International Symposium Hepatitis C Virus & Related Viruses 2008.10.7 San Antonio,)

20) 打越学, 伊藤敬義, 井口桃子, 森川賢一,

下間祐, 井廻道夫 HCV 関連リンパ増殖性疾患における血清 B 細胞増殖因子(BAFF/BLyS)、第 94 回日本肝臓学会総会(松山 2008.6)

21) 打越学, 伊藤敬義, 井口桃子, 森川賢一, 下間祐, 井廻道夫 HCV 関連リンパ増殖性疾患における血清 B 細胞増殖因子(BAFF/BLyS)、第 94 回日本消化器病学会総会(福岡 2008.5)

22) 井口桃子, 伊藤敬義, 森川賢一, 打越学, 野沢妃佐子, 島崎とも江, 井廻道夫 C 型慢性肝炎患者における B 細胞 HCV 感染とリンパ増殖性疾患発症についての検討、第 94 回日本消化器病学会総会(福岡 2008.5)

23) Uchikoshi M, Ito T, Shimozuma Y, Inokuchi T, Morikawa K, Nozawa H, Shimazaki T and M.Imawari. Evaluation of Serum B Cell Activating Factor (BAFF/BlyS) as an Immunological Marker for Lymphoproliferative Disorders Associated with Chronic Hepatitis C. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (San Francisco 2008.11).

24) Inokuchi M, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Nozawa H, Shimazaki T, et al. Infection of B Cells with Hepatitis C Virus for the Development of Lymphoproliferative Disorders in Patients with Chronic Hepatitis C. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (San Francisco 2008.11).

25) N Sakamoto, K Mishima, Y Sekine-Osajima, M Nakagawa, M Tasaka, et al.: Establishment and genetic analyses of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. 15th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Oct-4-2008, San Antonio, TX.

26) K Mishima, N. Sakamoto, Y Sekine-Osajima, et al.: Establishment and genetic analyses of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-1-2008, San Francisco, CA.

27) M. Tasaka, N. Sakamoto, M. Nakagawa, Y. Itsui, Y. Nishimura-Sakurai, et al.: Suppression of interferon induction and response pathway by Hepatitis C virus NS4B. Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-1-2008, San Francisco, CA.

およびその利用」

発明者／出願者：山口達哉、土方誠、アリ ハッサン フセイン

2008年6月26日出願 出願番号 特願

2008-167943

G. 知的所有権の出願・登録状況

1) 発明の名称：C型肝炎ウイルス由来のキメラ遺伝子を含む核酸 (1b キメラの高産生変異体)

出願番号 (PCT 出願)：2008-116193 (公開前)

出願日 : 2008. 4. 25

発明者 : 脇田隆宇、赤澤大輔

2) 発明の名称：C型肝炎ウイルス由来の核酸並びにそれを用いた発現ベクター、形質転換細胞及びC型肝炎ウイルス粒子

出願番号 : 2008-335016 (公開前)

出願日 : 2008. 12. 26

発明者 : 脇田隆宇、伊達朋子、高橋仁

3) 感染性C型肝炎ウイルス粒子の製造方法、およびその利用」

発明者／出願者：山口達哉、土方誠、アリ ハッサン フセイン

2008年6月26日出願 出願番号 特願

2008-167942

4) 「C型肝炎ウイルスの感染増殖性の評価方法、

癌、炎症・アレルギー、眼科疾患における創薬ターゲット ト遺伝子の同定

所 属 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部

研究者 田中 輝幸

研究機関 平成19年4月～平成21年3月

研究要旨 癌、炎症・アレルギー、眼科疾患における新規創薬ターゲットの発見を目指し、ハイスループット・トランスフェクションアッセイシステムを構築し、スクリーニングを行いそれぞれの候補遺伝子を見出した。また、遺伝子の機能を欠失あるいは外来遺伝子として新たに導入した個体マウス作製において、従来に比べより有用な方法の構築を目指し、モデルマウスを作製し、その解析を通して有用性について考察した。

分担研究者

- (1) 国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部 浅原 弘嗣、橋本 徳、工藤 寛枝、山下 聡
- (2) 北里大学 理学部 生物科学科分子発生学講座 花岡 和則
- (3) 参天製薬株式会社 研究開発センター 青野 浩之
- (4) 大鵬薬品工業株式会社 創薬研究所 生澤 公一
- (5) 大塚製薬株式会社 探索第三研究所 浅田 真紀、川染 秀樹

A. 研究目的

ヒトゲノムが解読された現在、タンパク質に翻訳される遺伝子の総数は約2万個であることが明らかとなっている。しかし、ゲノム情報から導き出されるタンパク質の一次構造だけでは生体内での機能は知り得ない。それぞれのタンパク質の機能を解明していくことが、ポストゲノム時代の新たな研究課題となっている。

細胞、組織、臓器は複雑な遺伝子発現の調節ネットワークにより秩序だって運命付けられ形成される。すなわち取り返しのつかない調節ネットワークの“ずれ”は結果として疾病を引き起こすこととなる。このことから、組織の形成に重要な遺伝子などの「疾患関連遺伝子」の発現調節に関わる転写因子、シグナル系・レセプター・分泌因子などの全ての調節因子、ならびにそれらの協調作用を含む相互作用が決定されれば、病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの同定にきわめて有用である。

本研究でシステムとして用いる、384 ウェルプレートを用いたハイスループット・トランスフェ

クション機能スクリーニングは、使用するレポーター・ベクターを変更することにより生細胞における様々な遺伝子の発現調節に関わる因子について網羅的な情報を得るための、最も効率的なシステムの1つである。このシステムにより重要な疾患責任遺伝子などの発現に影響する全上流因子をスクリーニングすることが出来る。

本研究ではこのハイスループット・トランスフェクション機能スクリーニングシステムを構築し、癌、炎症・アレルギー、眼科疾患に関わる疾患関連遺伝子の発現制御に関わる調節因子を網羅的に探索し、それらの協調作用を含む全相互作用を決定し、病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの同定を目指す。本研究では特に、骨形成に重要な転写因子Runx2の転写コファクター、軟骨組織形成に重要な転写因子Smad3の転写コファクター、網膜発生に重要なSonic hedgehog (Shh)の上流因子、アレルギー疾患の病態に関わる遺伝子の上流因子の探索に注力して解析を行った。

この研究による成果は、癌、炎症・アレルギー、眼科疾患などの病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの発見に有用なデータベースとして利用できるほか、幅広い疾患に対する創薬アプローチへの応用が期待される。

また、機能未知遺伝子の機能解析において、当該遺伝子を欠損 (Loss of function)、あるいは外来遺伝子として新たに導入 (Gain of function) したマウス個体を作製し、解析する技術は必須となっている。Gain of functionの従来の方法では問題であった1)トランスジーンがマウス染色体にランダムに組み込まれることに起因する位置効果 (position effect) を避けることができないこと、

2)ベクターに組み込む遺伝子サイズの制約から1Mb以上の遺伝子を導入することができないなどの問題点を解決する方法について検討し、より効率的かつ有用な解析を行う方法の構築を行った。

さらに、ヒトの遺伝性難病であるCADASIL(皮質下梗塞および白質脳症を伴う常染色体優性脳動脈症、cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)の原因遺伝子であるNotch3の遺伝子欠損マウスを作製し、網膜の血管に着目し、Whole mount免疫染色など免疫化学的手法を用いてNotch3欠損マウスの表現型を詳細に解析した。

B. 研究方法

(1) ハイスルーブット・トランスフェクションアッセイ

骨形成に重要な転写因子Runx2の転写コファクターの探索を行うため、骨芽細胞の細胞外マトリクス遺伝子OsteocalcinのRunx2結合領域の配列を6個タンデムにつなぎ、下流にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むコンストラクション(6xOSE2-Luc: Osteoblast Specific Element)を使用した。軟骨組織形成に重要な転写因子Smad3の転写コファクターの探索にはSmad3反応性TARE(TGF-beta and Activin Response Element)レポーター・ベクターを使用した。網膜発生に重要なShhの上流因子の探索には、組織特異的エンハンサー領域の下流にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むようにベクターに組み込み使用した。アレルギー・癌の病態に関わる遺伝子の上流因子の探索にはアレルギーの創薬において特に重要と思われる遺伝子を2つに絞り、そのプロモーターを、特に、種間で保存性の高い部分に注目し、下流にルシフェラーゼ遺伝子を含むようなコンストラクションでベクターを作製し、使用した。

それぞれのレポーター・ベクターを使用して最適な解析条件を検討し、決定した条件により、ヒト全長cDNAライブラリの発現ベクターを使用してそれぞれハイスルーブット・トランスフェクションアッセイによりスクリーニングを行った。ヒトcDNAライブラリはヒト遺伝子の全長cDNAが哺乳類細胞で発現可能なベクターに入ったコンストラクトのプラスミドのライブラリを、米国MGC(Mammalian Gene Collection)から入手し、本研究に使用した。

入手した全長cDNAライブラリは、大腸菌に形質転換された状態で96ウェルプレートに配列されているため、一部を別プレート上でLB培地に植菌して培養、増殖させた。大腸菌の増殖後、プレート遠心機で遠心して大腸菌をペレットにし、96ウェルフォーマットの吸引式ミニプレップキ

ットを用いてプラスミド抽出を行った。プレート・リーダーを用いてプラスミドの濃度を測定した後、濃度調整装置によりプラスミドを目的濃度に揃えた。精製したプラスミドは96ウェルプレートから分注機を用いて384ウェルプレートに相当量分注し、解析のテンプレートとした。作製したテンプレートに293T細胞、目的のレポーター・ベクターおよび遺伝子導入試薬を、分注機を用いて分注して細胞に遺伝子導入し、導入した遺伝子の発現に十分な期間培養した後、ルシフェラーゼ検出試薬を加えてルシフェラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、樹立されている培養細胞株を用いて実験を行っており、倫理的には全く問題のない研究である。

(2) 遺伝子改変マウスによる遺伝子機能の解析 1. 人工染色体HAC-DMDを保持したDMD-nullマウスの作製

マウスX染色体のジストロフィン遺伝子領域上流及び下流に、相同組み換えを利用してloxP配列を組み込んだES細胞株に、Cre-リコンビナーゼ発現ベクターを作用させることによりマウスジストロフィン遺伝子が完全に欠失したES細胞株を分離した。このDMD-null ES細胞株にマイクロセル融合法を用いて人工染色体HAC-DMDを導入した。選択培養下で生き残った細胞をクローン株として分離した。キメラマウス形成能の高いES細胞クローンを得るために、分離したES細胞株を再クローニングし、正常核型維持率の高いクローン株を核型解析により選別し、分離した。

自然交配させた妊娠2.5日目のICRマウスから8細胞期胚を採取し、上記HAC-DMDを保持したDMD-null ES細胞をインジェクションした後、インキュベーター内で一晚培養して胚盤胞期胚にしたものを偽妊娠2.5日目のICRマウスの子宮に移植し出生させた。得られたキメラマウスをICRマウスと交配することによって、F1マウスを作製した。

2. Notch3欠損マウスにおける網膜血管の解析

Notch3欠損マウスを作製し、それぞれ野生型、Notch3欠損マウスより眼球を摘出し、Notch3欠損マウスの網膜血管における表現型を詳細に解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、北里大学医学部・病院倫理委員会の承認のもとに行われた。また、本研究で用いた生検試料(DMD由来筋芽細胞)は、国立精神神経セ

ンターとの契約に基づき、連結不可能匿名化された試料として研究に使用した。また、本研究は、一般的なトランスジェニックマウス作成と同等の組み換え実験の法的規制のもとで北里大学組み換え DNA 実験安全指針に則って行われた。実験動物の愛護については、北里大学実験動物愛護指針に基づき、飼育環境・安楽死の方法など十分に配慮した。

C. 研究結果

(1) ハイスループット・トランスフェクションアッセイ

それぞれ、目的の解析で使用するレポーター・ベクターでポジティブ、ネガティブ・コントロールにより解析条件の検討を行い、最適条件を決定した。決定した条件の下、n=2回または3回の同条件でハイスループット・トランスフェクションアッセイを行い、標準化変量を算出、統計処理によりそれぞれの解析において約100程度の候補因子を見出した。

(2) 遺伝子改変マウスによる遺伝子機能の解析

1. 人工染色体HAC-DMDを保持したDMD-nullマウスの作製

DMD-null ES細胞株にマイクロセル融合法を用いてHAC-DMDを導入した後、選択培地で培養して生き残ったクローン細胞を分離し、さらに、再クローニングして核型が正常な細胞株を分離した。これらのES細胞を用いてDMD-nullマウスを作製した。これらのマウスの骨格筋における表現系を詳細に解析した結果、HAC-DMDを保持したDMD-nullマウスでは、DMD-nullマウスで顕著に認められる崩壊した筋組織や再生筋であることを示す中心核繊維は全く認められなかった。これらの筋組織ではヒトジストロフィンタンパクが産生されており、骨格筋の細胞膜にジストロフィンタンパクが局在していることを確認した。

2. Notch3欠損マウスにおける網膜血管の解析

成体のNotch3欠損マウス(KOマウス)から眼を摘出し、免疫組織学的解析を行ったところ、通常の網膜細動脈では、血管を完全に包んでいる1層の血管平滑筋細胞(vSMC)が、KOマウスでは大きく欠損しており、vSMCが網膜細動脈を十分に覆っていないことが観察された。

また、生後4/6日目の仔ではこのvSMCに差が見られなかったが、生後8日目では、KOマウスでvSMCが欠損し始め、15日目では、野生型のvSMCの成熟が著しい一方、KOマウスとの差が明確になった。22日目では、KOマウスと野生型マウスの血管壁は、それぞれ成体のものにか

なり近くなったが、KOマウスでは、成体で見られる大きな欠損部位が見られない代わりに、vSMCの密度の低い箇所が複数確認できた。

また、KOマウスの細動脈では、vSMCの数が著しく減少しており、周皮細胞数はKOマウスでは、細動脈直後の毛細血管に存在する周皮細胞のみ、細胞数が減少していることが判明した。

D. 考察

(1) ハイスループット・トランスフェクションアッセイ

本研究で見出した候補因子は従来のマイクロアレイを用いた研究では決して見いだせない、網羅的解析による貴重なデータであり、これまでとは異なる側面での病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの発見につながるものと考えられる。

また、これまでの解析により候補となった遺伝子のうち、多くの遺伝子がこれまで機能が報告されていない遺伝子であった。これらの遺伝子については、モデル動物を用いた*in vivo*での解析ならびに培養細胞を用いた*in vitro*の解析を行い、機能を明らかにする必要があるが、新たなヒト疾患メカニズムの解明および新規創薬ターゲットの同定につながるものと考えられる。

(2) 遺伝子改変マウスによる遺伝子機能の解析

1. 人工染色体HAC-DMDを保持したDMD-nullマウスの作製

HAC-DMDを保持するDMD-nullマウスの表現型を解析した結果から、HAC-DMD上のヒトジストロフィン遺伝子から産生されるジストロフィンタンパクは、マウス筋繊維表面に局在すること、その結果、筋組織において病状の完全な回復が認められることが判明した。

本研究結果により、異種の染色体の一部を安定な人工染色体に転座させ、ES細胞を介してマウス個体に導入することが可能であり、ノックアウトマウスと組み合わせると当該遺伝子に関してゲノムレベルで「ヒト」化した新しいモデルマウスを作製できることが示された。この新しい実験系は、遺伝子の機能解析に非常に有用なモデル系となることが期待されるだけでなく、ヒト遺伝疾患の新規治療法や新薬の開発にも有用であることが期待される。

2. Notch3欠損マウスにおける網膜血管の解析

今までの研究では、Notch3が血管平滑筋細胞で発現しており、ノックアウトマウスでは動脈を囲む血管平滑筋の形態が異常になり、動脈が静脈に近い形態や遺伝子発現を行うようになることが報告されていた。

本研究では、網膜血管系に注目して研究を行い、網膜細動脈を囲む血管平滑筋細胞だけでなく周皮細胞でも Notch3 が発現しており、Notch3 欠損マウスでは、いずれの細胞も顕著に減少していることが明らかになった。特に、周皮細胞における表現型、すなわち周皮細胞の細胞数や血管系における分布の異常を見出したのは本研究が初めてである。

E. 結論

ポストゲノム時代における、新たなアプローチである全長 cDNA トランフェクションによる機能的スクリーニングのシステムを構築した。自動分注装置などを使用したこのシステムにより、短時間で効率よく、更に低コストで網羅的なスクリーニングを行うことができることが明らかとなった。骨形成に重要な転写因子 Runx2 の転写コファクターの探索、軟骨組織形成に重要な転写因子 Smad3 の転写コファクターの探索、網膜発生に重要な Sonic hedgehog (Shh) の上流因子の探索、アレルギー・癌の病態に関わる遺伝子の上流因子の探索の一次スクリーニングを行い、それぞれ約 100 程度の候補遺伝子を見出すことができた。これらの研究による成果は、病態メカニズム解明および新規治療ターゲットの発見に有用なデータベースとして利用できるほか、幅広い疾患に対する創薬アプローチへの応用が期待される。

また、機能未知遺伝子の機能解析において、当該遺伝子を欠損 (Loss of function)、あるいは外来遺伝子として新たに導入 (Gain of function) したマウス個体を作製し、解析する技術は必須となっている。本研究では、HAC-DMD を保持する DMD-null マウスの作製を通し、従来の Gain of function に比べ、効率的かつ有用な解析法の構築につながる結果を得ることができた。

また、Notch3 欠損マウスの解析を通して新たな表現型を見出すことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Watanabe S, Kondo S, Hayasaka M, Hanaoka K. Functional analysis of homeodomain-containing transcription factor Lbx1 in satellite cells of mouse skeletal muscle. *J Cell Sci*. 2007 Dec 1; 120(Pt 23): 4178-4187. Epub 2007 Nov 14.
- 2 Sakaki N, Okishio K, Ui-Tei K, Saigo K, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Nishimura T, Suda Y, Hayasaka M, Hanaoka K, Hitoshi S, Ikenaka K,

Nishihara S. Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2008 Feb 8; 283(6): 3594-3606.

- 3 Takatoh J, Kudoh H, Kondo S, Hanaoka K. Loss of short dystrophin isoform Dp71 in olfactory ensheathing cells causes vomeronasal nerve defasciculation in mouse olfactory system. *Exp Neurol*. 2008 Sep; 213(1): 36-47. Epub 2008 May 16.
- 4 Miura S, Hanaoka K, Togashi S. Skeletogenesis in *Xenopus toropicalis*: characteristic bone development in an anuran amphibian. *Bone*. 2008 Nov; 43(5): 901-909. Epub 2008 Jul 22.
- 5 Shibasaki Y, Etoh N, Hayasaka M, Takahashi MO, Kakitani M, Yamashita T, Tomizuka K, Hanaoka K. Targeted deletion of the tyrosine IIb Na(+)-dependent Pi-co-transporter, NaPi-IIb, results in early embryonic lethality. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Apr 17; 381(4): 482-486. Epub 2009 Feb 20.

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

癌、炎症・アレルギー、眼科疾患における創薬ターゲット ト遺伝子の同定

所 属 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部

研究者 田中 輝幸

研究要旨 癌、炎症・アレルギー、眼科疾患における新規創薬ターゲットの発見を目指し、ハイスループット・トランスフェクションアッセイシステムを構築し、スクリーニングを行いそれぞれの候補遺伝子を見出した。また、CADASIL の責任遺伝子と考えられている Notch3 遺伝子を欠失した個体マウスを作製し、網膜血管に焦点を絞って解析した。

分担研究者

- (1) 国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部 浅原 弘嗣、山下 聡
- (2) 北里大学 理学部 生物科学科分子発生学講座 花岡 和則
- (3) 参天製薬株式会社 研究開発センター 青野 浩之
- (4) 大鵬薬品工業株式会社 創薬研究所 生澤 公一
- (5) 大塚製薬株式会社 探索第三研究所 川染 秀樹

A. 研究目的

ヒトゲノムが解読された現在、タンパク質に翻訳される遺伝子の総数は約2万個であることが明らかとなっている。しかし、ゲノム情報から導き出されるタンパク質の一次構造だけでは生体内での機能は知り得ない。それぞれのタンパク質の機能を解明していくことが、ポストゲノム時代の新たな研究課題となっている。

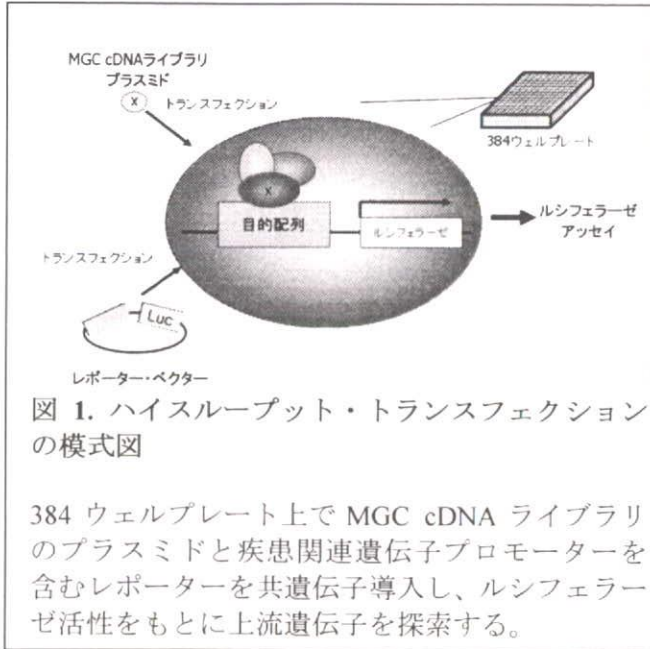
細胞、組織、臓器は複雑な遺伝子発現の調節ネットワークにより秩序だてて運命付けられ形成される。すなわち取り返しのつかない調節ネットワークの“ずれ”は結果として疾病を引き起こすこととなる。このことから、組織の形成に重要な遺伝子などの「疾患関連遺伝子」の発現調節に関わる転写因子、シグナル系・レセプター・分泌因子などの全ての調節因子、ならびにそれらの協調作用を含む相互作用が決定されれば、病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの同定にきわめて有用である。

本研究でシステムとして用いる、384 ウェルプレートを用いたハイスループット・トランスフェクション機能スクリーニングは、使用するレポー

ター・ベクターを変更することにより生細胞における様々な遺伝子の発現調節に関わる因子について網羅的な情報を得るための、最も効率的なシステムの1つである。このシステムにより重要な疾患責任遺伝子などの発現に影響する全上流因子をスクリーニングすることが出来る(図1)。

本研究ではこのハイスループット・トランスフェクション機能スクリーニングシステムを構築し、癌、炎症・アレルギー、眼科疾患に関わる疾患関連遺伝子の発現制御に関わる調節因子を網羅的に探索し、それらの協調作用を含む全相互作用を決定し、病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの同定を目指す。本研究では特に、骨形成に重要な転写因子 Runx2 の転写コファクター、軟骨組織形成に重要な転写因子 Smad3 の転写コファクター、網膜発生に重要な Sonic hedgehog (Shh) の上流因子、アレルギー疾患の病態に関わる遺伝子の上流因子の探索に注力して解析を行った。

この研究による成果は、癌、炎症・アレルギー、眼科疾患などの病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの発見に有用なデータベースとして利用できるほか、幅広い疾患に対する創薬アプローチへの応用が期待される。

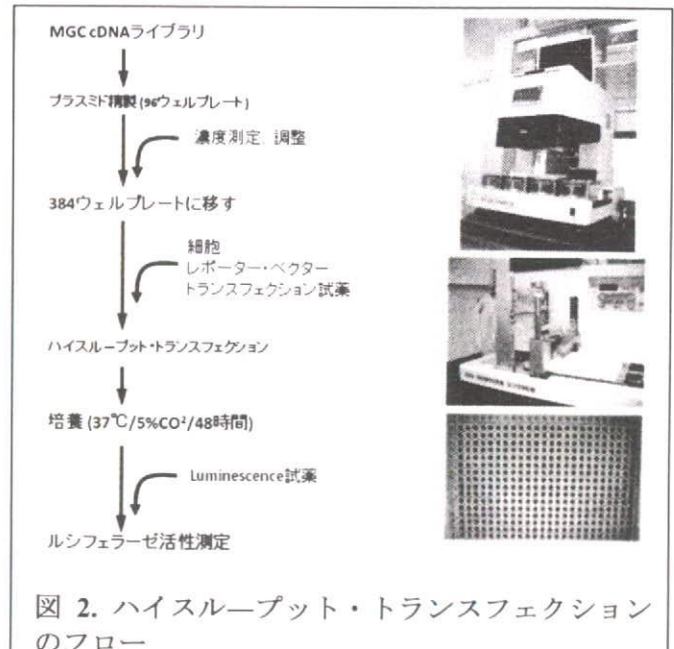


また、ヒトの遺伝性難病である CADASIL (皮質下梗塞および白質脳症を伴う常染色体優性脳動脈症、cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) の原因遺伝子である Notch3 の遺伝子欠損マウスを作製し、網膜の血管に着目し、Whole mount 免疫染色など免疫化学的手法を用いて Notch3 欠損マウスの表現型を詳細に解析した。

B. 研究方法

1. ハイスループット・トランスフェクションアッセイ

骨形成に重要な転写因子 Runx2 の転写コファクターの探索を行うため、骨芽細胞の細胞外マトリクス遺伝子 *Osteocalcin* の Runx2 結合領域の配列を6個タンデムにつなぎ、下流にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むコンストラクション (6xOSE2-Luc: Osteoblast Specific Element) を使用した。軟骨組織形成に重要な転写因子 Smad3 の転写コファクターの探索には Smad3 反応性 TARE (TGF-beta and Activin Response Element) レポーター・ベクターを使用した。網膜発生に重要な Shh の上流因子の探索には、組織特異的エンハンサー領域の下流にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むようにベクターに組み込み使用した。アレルギー・癌の病態に関わる遺伝子の上流因子の探索にはアレルギーの創薬において特に重要と思われる遺伝子を2つに絞り、そのプロモーターを、特に、種間で保存性の高い部分に注目し、下流にルシフェラーゼ遺伝子を含むようなコンストラクションでベクターを作製し、使用した。



入手した MGC cDNA ライブラリより大腸菌を培養、増殖させて遠心機にてペレットにしたのちキットを使用してプラスミドを抽出した。384 ウェルプレートに相当濃度を移し替え、配置させる。それぞれのプラスミドの配置されたウェルに条件検討により決定した相当濃度の細胞、レポーター・ベクター、トランスフェクション試薬を自動分注装置を用いて加えて培養した。48 時間後、検出試薬を加え、ルシフェラーゼ活性を測定した。

ヒト遺伝子の全長 cDNA が哺乳類細胞で発現可能なベクターに入ったコンストラクトのプラスミドのライブラリを、米国 MGC (Mammalian Gene Collection) から入手し、本研究に使用した。入手した全長 cDNA ライブラリは、大腸菌に形質転換された状態で 96 ウェルプレートに配列されているため、一部を別プレート上で LB 培地に植菌して培養、増殖させた。大腸菌の増殖後、プレート遠心機で遠心して大腸菌をペレットにし、96 ウェルフォーマットの吸引式ミニプレップキットを用いてプラスミド抽出を行った。プレート・リーダーを用いてプラスミドの濃度を測定した後、濃度調整装置によりプラスミドを目的濃度に揃えた。精製したプラスミドは 96 ウェルプレートから分注機を用いて 384 ウェルプレートに適量分注し、解析のテンプレートとした。作製したテンプレートに 293T 細胞、目的のレポーター・ベクターおよび遺伝子導入試薬を、分注機を用いて分注して細胞に遺伝子導入し、導入した遺伝子の発現に十分な期間培養した後、ルシフェラーゼ検出試薬を加えてルシフェラーゼ活性を測定した (図 2)。

(倫理面への配慮)

本研究では、樹立されている培養細胞株を用いて実験を行っており、倫理的には全く問題のない研究である。

2. Notch3 欠損マウスにおける網膜血管の解析

Notch3 欠損マウスを作製し、それぞれ野生型、Notch3 欠損マウスより眼球を摘出し、Whole-mount 免疫染色などの免疫組織学的解析を行い、Notch3 欠損マウスの表現型を詳細に解析した。

(倫理面への配慮)

北里大学組み換え DNA 実験安全指針に則って行われた。実験動物の愛護については、北里大学実験動物愛護指針に基づき、飼育環境・安楽死の方法など十分に配慮した。

C. 研究結果

1. ハイスループット・トランスフェクションアッセイ

それぞれ、目的の解析で使用するレポーター・ベクターでポジティブ、ネガティブ・コントロールにより解析条件の検討を行い、最適条件を決定した。決定した条件の下、n=2 回または 3 回の同条件でハイスループット・トランスフェクションアッセイを行い、標準化変量を算出、統計処理によりそれぞれの解析において約 100 程度の候補因子を見出した。

2. Notch3 欠損マウスにおける網膜血管の解析

成体の Notch3 欠損マウス (KO マウス) から眼を摘出し、血管平滑筋細胞 (vSMC) を特異的に標識する抗 α SMA (α smooth muscle actin) 抗体と血管内皮細胞を認識する抗 PECAM-1 (CD31) 抗体を用いた二重染色による解析で、野生型マウス網膜細動脈では、1 層の vSMC が血管を完全に包んでいることが観察されたのに対し、KO マウスでは、vSMC が大きく欠損している部位が複数箇所認められた (図 3)。さらに、それ以外の部位でも小さな隙間が無数に確認でき、vSMC が網膜細動脈を十分に覆えていないことが観察された。

また、生後 4/6 日目の仔ではこの vSMC に差が見られなかったが、生後 8 日目では、KO マウスで vSMC が欠損し始め、15 日目では、野生型の vSMC の成熟が著しい一方、KO マウスとの差が明確になった。22 日目では、KO マウスと野生型マウスの血管壁は、それぞれ成体のものになり近くなったが、Notch3 KO では、成体で見られる大きな欠損部位が見られない代わりに、vSMC の密度の低い箇所が複数確認できた (図 4)。

PI を用いた核染色と免疫染色の二重染色を行った結果、KO マウスの細動脈では、vSMC の核の数が少なく、核と核の間隔が広く空いていることが観察された。細胞数を算定した結果、KO マウスの細動脈では、vSMC の数が著しく減少している事が明らかになった (図 5)。

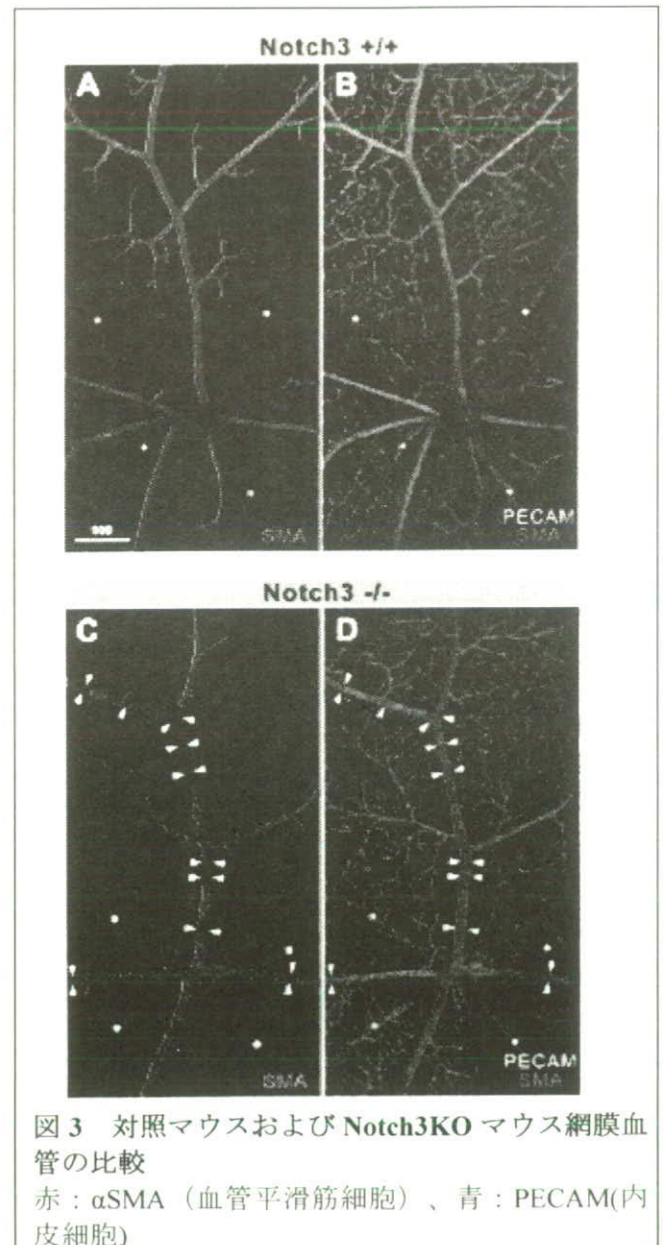


図 3 対照マウスおよび Notch3KO マウス網膜血管の比較

赤： α SMA (血管平滑筋細胞)、青：PECAM(内皮細胞)

また、Notch3、NG2、PECAM-1 のそれぞれを認識する抗体を用いた三重染色により、NG2 陽性の周皮細胞数は KO マウスでは、細動脈直後の毛細血管に存在する周皮細胞でのみ、細胞数が減少していることが判明した (図 6)。

D. 考察

1. ハイスループット・トランスフェクションアッセイ

本研究で見出した候補因子は従来のマイクロ

アレイを用いた研究では決して見いだせない、網羅的解析による貴重なデータであり、これまでとは異なる側面での病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの発見につながるものと考えられる。

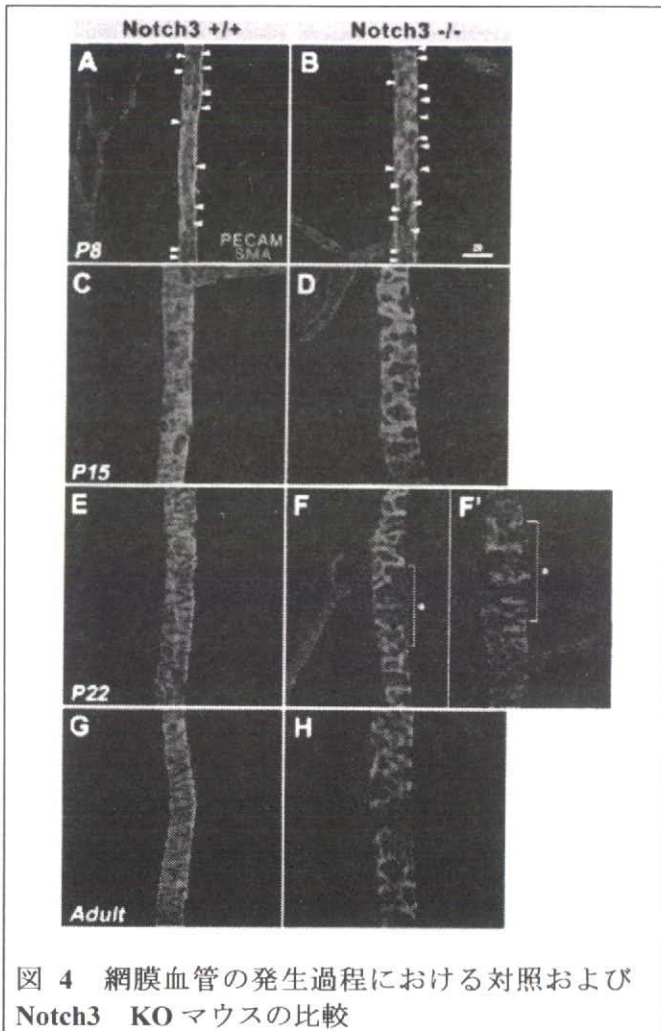


図 4 網膜血管の発生過程における対照および Notch3 KO マウスの比較

また、これまでの解析により候補となった遺伝子のうち、多くの遺伝子がこれまで機能が報告されていない遺伝子であった。これらの遺伝子については、モデル動物を用いた *in vivo* の解析ならびに培養細胞を用いた *in vitro* の解析を行い機能を明らかにする必要があるが、新たなヒト疾患メカニズムの解明および新規創薬ターゲットの同定につながるものと考えられる。

2. Notch3 欠損マウスにおける網膜血管の解析

今までの研究では、Notch3 が血管平滑筋細胞で発現しており、ノックアウトマウスでは動脈を囲む血管平滑筋の形態が異常になり、動脈が静脈に近い形態や遺伝子発現を行うようになることが報告されていた。

本研究では、網膜血管系に注目して研究を行い、網膜細動脈を囲む血管平滑筋細胞だけでなく周

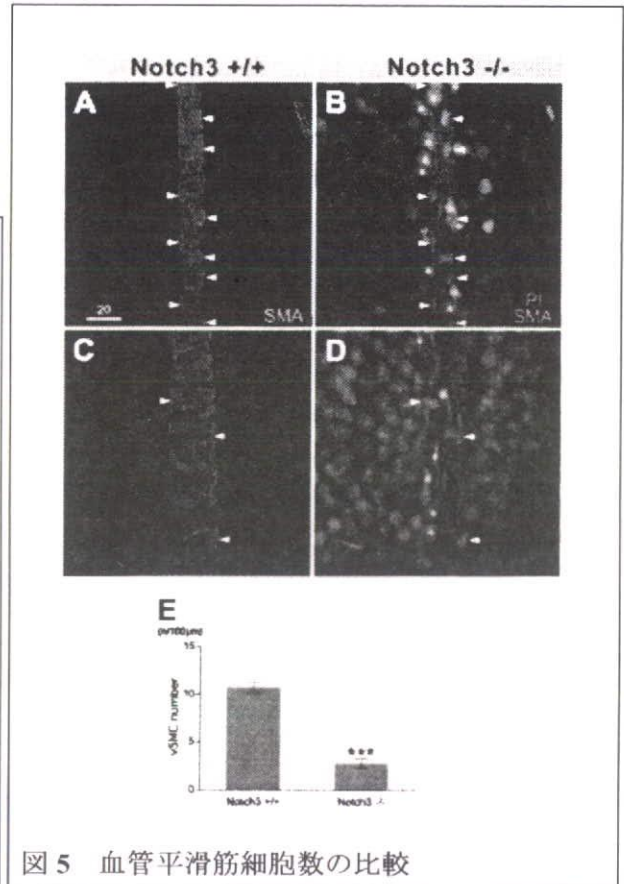


図 5 血管平滑筋細胞数の比較

皮細胞でも Notch3 が発現しており、Notch3 欠損マウスでは、いずれの細胞も顕著に減少していることが明らかになった。特に、周皮細胞における表現型、すなわち周皮細胞の細胞数や血管系における分布の異常を見出したのは本研究が初めてである。本研究で明らかになった周皮細胞の減少という表現型で興味深いことは、著しく数が減少したのは動脈の近傍の毛細血管の周囲に存在する細胞集団のみという事である。動脈近傍の毛細血管の周皮細胞は α 平滑筋アクチン (α SMA) を発現しており、収縮能を持つ事が既に知られている。したがって、この細胞集団は他の周皮細胞と比べ分化段階が進んでおり、vSMC に近い性質を持っていると言える。 α SMA を発現する周皮細胞や vSMC の減少が見られた事は、周皮細胞がこれらの細胞に分化・増殖していく過程で Notch3 が関わっていることを強く示唆していると考えられる。

成体の KO マウスの細動脈に、vSMC の欠けた領域が多数確認されたことは、病理学的見地から重要である。部分的にしる、vSMC が内皮細胞を全く覆っていない箇所があるということは、そこで構造的な脆さに起因する血管の破裂が懸念されることは言うまでもない。しかし今後さらに破裂のリスクが高まる可能性があると考えられる。vSMC や周皮細胞は、内皮細胞と様々な方法を通して密接に相互作用することで、内皮細胞の増

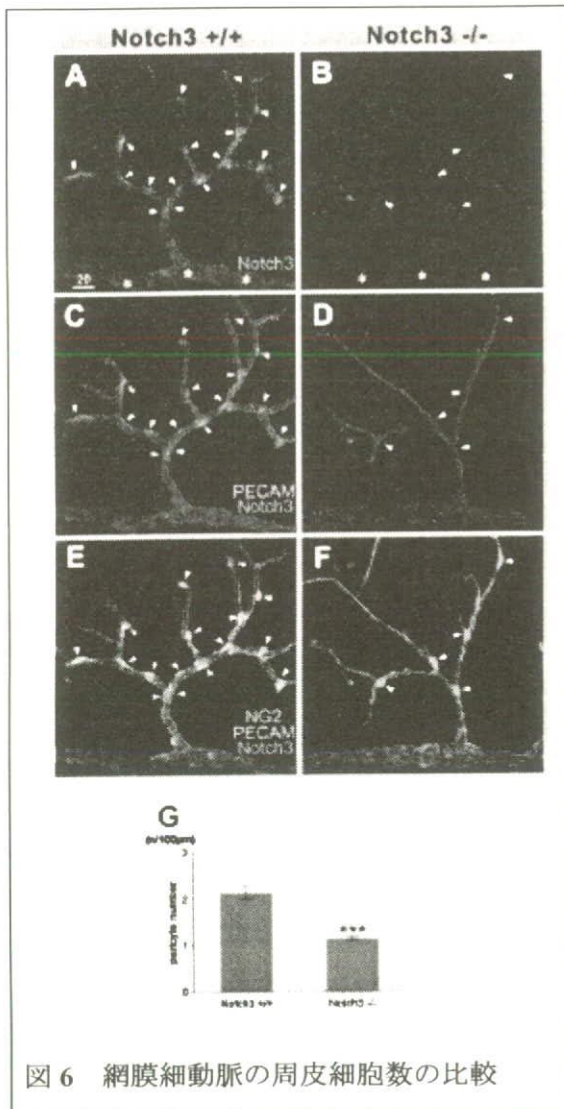


図6 網膜細動脈の周皮細胞数の比較

殖・移動・アポトーシスを制御している。特に、壁細胞により、内皮細胞の増殖が抑制されていることはよく知られている。したがって、vSMCの欠損した部位では、今後、内皮細胞が異常に増殖する可能性がある。もし、今回発見されたようなvSMCの欠損が、脳など他の器官の細動脈でも起きているとすれば、各器官で動脈瘤や他の様々な疾患の原因となる可能性がある。実際、最近になって、CADASILの患者の中で動脈瘤を持つ例が報告されている。したがってNotch3KOマウスにおいて、様々な器官の血管についても異常が無いかが今後さらに調べる必要がある。

E. 結論

ポストゲノム時代における、新たなアプローチである全長cDNAトランスフェクションによる機能的スクリーニングのシステムを構築した。自動分注装置などを使用したこのシステムにより、短時間で効率よく、更に低コストで網羅的なスクリーニングを行うことができることが明らかとなった。骨形成に重要な転写因子Runx2の転写コフ

アクターの探索、軟骨組織形成に重要な転写因子Smad3の転写コファクターの探索、網膜発生に重要なSonic hedgehog (Shh)の上流因子の探索、アレルギー・癌の病態に関わる遺伝子上流因子の探索の一次スクリーニングを行い、それぞれ約100程度の候補遺伝子を見出すことができた。これらの研究による成果は、病態メカニズム解明および新規治療ターゲットの発見に有用なデータベースとして利用できるほか、幅広い疾患に対する創薬アプローチへの応用が期待される。

また、網膜血管網をWhole mount免疫染色法で解析することにより、Notch3ノックアウトマウスにおけるさまざまな新たな表現型を見出すことができた。本研究により発見されたこれらの表現型は、他の研究室によりすでに報告されている“Notch3欠損により動脈が静脈化する”という表現型とは明らかに異なるものである。本研究で明らかになった表現型は、Notch3とその下流にあることが報告されているPDGFR-βの相関を強く示唆するものであり、本研究の成果は、血管新生におけるNotch3の機能解析だけではなく、CADASILの発症機序の解明に大きく寄与するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Takatoh J, Kudoh H, Kondo S, Hanaoka K. Loss of short dystrophin isoform Dp71 in olfactory ensheathing cells causes vomeronasal nerve defasciculation in mouse olfactory system. *Exp Neurol*. 2008 Sep; 213(1): 36-47. Epub 2008 May 16.
- 2 Miura S, Hanaoka K, Togashi S. Skeletogenesis in *Xenopus tropicalis*: characteristic bone development in an anuran amphibian. *Bone*. 2008 Nov; 43(5): 901-909. Epub 2008 Jul 22.
- 3 Shibasaki Y, Etoh N, Hayasaka M, Takahashi MO, Kakitani M, Yamashita T, Tomizuka K, Hanaoka K. Targeted deletion of the tyrosine IIb Na(+)-dependent Pi-co-transporter, NaPi-IIb, results in early embryonic lethality. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Apr 17; 381(4): 482-486. Epub 2009 Feb 20.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

脱細胞化組織を用いた再生医療用生物由来素材の開発 と各種組織移植への展開

所 属 ニプロ株式会社総合研究所
研究者 藤里 俊哉

研究要旨 絶対的なドナー不足である脳死臓器移植、再生医療に用いる足場材料、そして既存の人工臓器・医用材料の欠点を克服するため、新しい生体材料の必要性が高まっている。本研究では、生物由来素材の再生医療への応用を実現するため、同種あるいは異種由来組織から細胞成分を除去した脱細胞化組織の利用について検討している。本年度は、血管、角膜、脳、肝臓組織の脱細胞化処理について詳細に検討するとともに、細胞を播種した培養骨格筋の開発を行った。また、細胞組み込み型再生医療用素材の移植前安全性評価方法として、電気インピーダンス測定法の応用についても検討した。

分担研究者

- | | |
|-----------------|------|
| (1) 東京医科歯科大学 | 岸田晶夫 |
| (2) 国立循環器病センター | 山岡哲二 |
| (3) 物質材料研究機構 | 小林尚俊 |
| (4) ニプロ(株)総合研究所 | 白数昭雄 |
| (5) 大阪工業大学工学部 | 橋本成広 |

A. 研究目的

絶対的なドナー不足である脳死臓器移植、再生医療に用いる足場材料、あるいは既存の人工臓器・医用材料の欠点を克服するため、新しい生体材料の必要性が高まっている。このうち、現在でも必要性の高い血管、気管、食道などの比較的単純な組織構成の臓器の再生のための足場材料は、主として生体内分解吸収性の合成材料が用いた研究が進められている。しかし、ポリ乳酸等の既存の材料は加工が困難で、物性が生体のものとは大きく異なる。また、新規の材料は、安全性に関する試験等に要する期間・費用や、臨床応用後の問題発生時の訴訟リスク等から、大企業でさえも容易に開発できるものではない。我々は、生物組織を脱細胞化処理することによって得られた生物由来素材の応用を進めている。これまでに、肺動脈弁及び大血管において研究を進め、臨床応用の手前まで到達している。本研究では、この基礎技術を、小口径血管や角膜、骨格筋などの他の組織へと応用する。また、同時に、生物由来組織の安全性の確保についても検討を行う。

人工血管は、中大口径のものに限れば既に完成された技術であり、我が国では年間約5万本が使用され、約100億円の市場規模にある。しかし、移植後も異物のままであり、自己細胞の浸潤による自己組織化が達成されないため、移植後の成長性がなく、感染に対しても非常に弱い。冠動脈や末梢血管等で小口径の場合では、自己血管を用いたバイパス術や同種血管の使用が第一選択肢となっている。欧米では組織バンクが商業ベースで行われており、年間数千件以上の提供組織が臨床使用されている。しかし、我が国では年間数十件に留まっており、圧倒的に提供数が不足している。また、我が国では年間2万人以上の患者が、角膜移植の対象疾患で移植治療を待っている。世界的には、角膜の障害による失明は少なくとも10万人以上は存在すると推定されている。移植用角膜の不足が主要因であり、失明患者の救済、失明患者のために費やす社会保障費用削減などの観点から角膜実質代替材料の開発が強く望まれている。前述の循環器組織と同様に、我が国では提供数が不足しているため、年間約千もの角膜組織が輸入されている現状にある。同様に、代用皮膚組織は熱傷や褥瘡の他、がん切除後の組織再建、さらには美容目的に使用され、輸入ヒト組織も使用されている。本研究では、このような同種組織の不足を補うべく、生物由来素材を改変した再生型組織移植技術を開発し、最終的に商品化を目指す。

B. 研究方法

脱細胞化処理：肝臓、大動脈、脳、角膜等の組織を用いた。冷間等方加圧装置、Dr. CHEF(株)神戸製鋼所)を用いて10,000気圧の超高压印加処理を10分間行った。その後、DNase I 含有EBM2培地により2週間洗浄することで細胞残渣を除去し、脱細胞化組織を作製した。

また、培養骨格筋組織の腱用として、脱細胞化処理を施した食用ブタの胸部大動脈を使用した。脱細胞化方法は、昨年度行ったエラストラーゼ消化法を用いた。大動脈を熱架橋した後、エラストラーゼにてエラスチンを分解した。その後、アルコール及びPBSにて試験片を洗浄し、脱細胞化組織を作製した。

構造破壊群の作製：上記の方法で脱細胞化処理した組織に、試験管内で1組織あたり200 μ lの生理食塩水を加え、ホモジナイザーを用いて構造を破壊した。その後5000気圧の超高压印加処理を5分間行い、構造を破壊した組織を滅菌処理した。

マウスへの皮下移植：6週齢のC57BL/6Jマウスを用いた。背側頸部に移植片を1匹につき1個留置した。角膜組織・大動脈組織ともに脱細胞化処理・未処理の組織を留置した。

ラットへの皮下移植：ラットの背部右側の3箇所、左側の3箇所に構造維持群を移植し、構造破壊群を移植した。構造維持群では、深さ3cm程のポケットを作成し、組織片を挿入した。構造破壊群では、構造破壊した組織を20Gの注射針で吸引し、構造維持群の移植位置と対称になるように3cmほど腹部側の皮下組織に、皮下注射した。

培養骨格筋：生検トレパンで直径3mmに成型した脱細胞化組織を人工腱とした。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。2個の人工腱の間にC2C12細胞を包埋したCollagen gel溶液を滴下し、ゲル化させた。その後、10%ウシ胎児血清および抗生物質を含むHigh-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (HG-DMEM) 内で2日間培養した後、筋芽細胞の融合を促進させるため、培養液を7%ウマ血清および抗生物質を含むHG-DMEMに変更し、さらに12日間培養した。

収縮力測定：収縮力測定装置に培養骨格筋を設置した。培養骨格筋の長さを初期長に調整した後に、印加電圧、パルス幅、および周波数をそれぞれ変化させたパルス電圧を与え、等尺性収縮力を測定した。電極には白金平板電極を使用し、収縮力は荷重センサで測定した。

生化学・組織学的評価：タンパク質の発現を

ウェスタンブロッティング法により検出した。一次抗体にはanti- α sarcomeric Actin、anti-Fast Myosin Skeletal Heavy Chain、anti-Slow Myosin Skeletal Heavy Chain、および β -Actinを使用した。また、形態学的に評価するため、HE染色および透過型電子顕微鏡による観察を行った。

光造形構造物の駆動：マイクロ光造形装置を用いて造形物を製作した。培養筋と一体化させ、電気パルス信号を培養液に印加して造形物の駆動の様子を観察した。

電気インピーダンス測定：ケミカルインピーダンスメータ、制御・データ保存用PC、およびインピーダンス測定部から構成した。四電極法を採用して ϕ 0.5のステンレス線を電極として用いた。電圧検出電極30mVrms一定のもと、周波数100Hzから10kHzにおける交流電流(電流密度約0.1mA/cm²以下)を流し、電気インピーダンス測定を行った。得られたデータからCole-Coleの円弧則より、生体組織の電氣的等価回路のパラメータである細胞外液抵抗、細胞内液抵抗、および細胞膜容量を算出した。

(倫理面への配慮)

動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号)及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号)に基づき、各省庁および当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。当該実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて動物の苦痛の軽減に努めるとともに、実験計画を綿密に練ることにより、不要な動物実験を避け必要最低限の頭数で目的を達成するよう努めた。

C. 研究結果

各組織の脱細胞化処理の評価：各組織とも細胞は破壊され、ECMは三次元的な組織構造を保ちながら残存していることが観察された(図1)。

構造維持組織移植片の評価：ECM主体の組織では、移植前の脱細胞化組織のECMが残存することが大きな特徴だった。組織周囲から組織中央に向かって、残存するECMの線維の間隙に入り込むようにして、細胞浸潤および血管新生が観察された。細胞はECM線維間への浸潤は少なく、組織周囲に多くの細胞が集積していた。また、大動脈特有の線維組織の層構造が各所で分断され、このことよりECM線維の破壊が生じていると考えられ、破壊された部位から細胞が内部に浸潤していた。血管新生は組織の周囲に多く生じ、組織内部ではあまり観察されなかった。

細胞主体の組織では、レシピエント側の細胞浸潤、血管新生、及び線維化が顕著であった。脳では、放射状に線維化し、内部にまで細胞が浸潤していた。また、高密度に血管新生が観察された。肝臓では組織全体に広範な繊維化が確認された。高密度に細胞が浸潤している部位も存在したが、大部分は細胞が疎な組織であった。血管新生が多数生じていた(図2)。

構造破壊組織移植片の評価：長さ1mm未満の大動脈組織片は癒痕も観察されず、移植組織は消失していた。脳は構造維持群に比べ、全体が線維化していた。細胞浸潤および血管新生は構造維持に比べ少なかった。また、構造維持群と同様に脂肪細胞様細胞が全体に散在性に観察された。肝臓は線維化が顕著であった。脂肪細胞様の細胞が多く観察され、肝臓特有の構造等は全く観察されなかった(図3)。

細胞浸潤：炎症性細胞のリンパ球・好酸球・マクロファージ、非炎症性細胞の線維芽細胞を観察した。移植片周辺へ遊走・浸潤する炎症性細胞は未処理組織では多く、脱細胞化組織では非炎症性細胞が早期から多く見られた(図4)。

培養骨格筋の収縮力：培養に伴って、コラーゲンゲルが無細胞生体由来組織を覆うように収縮した。また培養4日目以降では、鑷子で再生骨格筋を把持することが可能であった。入力電圧およびパルス幅が大きくなるにつれて等尺性収縮力が大きくなった。3Hz以上の周波数では10Vと50Vで波形が大きく異なった。10Hzでは刺激の間、高い収縮力を維持しており、この値は0.5Hzよりも大きかった(図5、6)。また、培養に伴って等尺性収縮力は高くなった(図7)。

培養骨格筋組織：培養7日目において、コラーゲンゲル内部の多くのC2C12細胞は筋管細胞へと分化し、スキャフォールドの長軸と平行に配向していた。多くは再生骨格筋の表層近傍で見られた。さらに、培養に伴って、筋管細胞数が増加する傾向が見られた。培養に伴い、 α -actinやslow, fast MHCの発現を認めた。培養7日目においては多核の筋管細胞が観察されるが、筋原線維は見られなかった。培養14日目には核の近傍に筋原線維が見られるが、核は細胞の中心部に存在していた。培養21日目においては筋原線維の一部で生体筋に見られるサルコメア構造が確認され、Z線、A帯、およびI帯の区別がつく部分も見られた(図8)。

造形物の駆動：培養筋の収縮に伴い造形物が駆動することを確認できた。弛緩する際に元の状態には戻らず、造形物は次第にほとんど動かなくなった。刺激により構造物は約10°回転し

たことがわかった(図9)。

培養骨格筋組織の評価方法：培養0日目の培養筋とコラーゲンゲルとの間に電気インピーダンスの顕著な差は見られなかった。培養に伴い培養筋の標準化電気インピーダンスは上昇する傾向が見られた。培養過程に伴い細胞内液抵抗は上昇する傾向が見られ、細胞外液抵抗は培養過程に伴い上昇した後、飽和状態に達する傾向が見られた。細胞膜容量においては培養過程に伴う顕著な変化は見られなかった(図10、11)。

D. 考察

マウスあるいはラットへの異種皮下埋植による炎症、血管新生、および細胞浸潤等の組織反応については、細胞外マトリックス(ECM)が主体の血管では、細胞浸潤や血管新生は残存する脱細胞化組織の周囲より間隙方向に起こり、脱細胞化組織の深部への細胞浸潤等は困難であった。一方、細胞が主体の肝臓や脳では、細胞浸潤、血管新生、繊維化が早期に生じ、埋入した脱細胞化組織の深部にも確認されたことから、ECMの存在による組織再生の相違が明らかとなった。角膜では、免疫抗原性をほとんど有さず、容易に細胞が浸潤されることが示された。また、脱細胞化組織の腱および筋芽細胞を組み込んだコラーゲンゲルからなる培養骨格筋組織では、筋管細胞に分化させることによって電気刺激での弛緩収縮が肉眼で確認できる筋組織を作成することができた。脱細胞化組織の広範な応用および臨床使用のためには、脱細胞化処理工程の非破壊的確認検査が必要である。インピーダンス測定によって脱細胞化過程が追跡できることが示唆され、非破壊的検査に有用であると考えられた。

E. まとめ

欧米では化学処理法によって、既にいくつかのグループが再生型血管や心臓弁、皮膚の臨床応用を開始している。一部では、動物由来組織を用いた臨床応用も行われている。本研究における脱細胞化組織は、化学処理法よりも優れた細胞浸潤性や安全性を有しており、先行技術に対して高い競争力をもっていると考える。本研究終了後の早い時点での臨床応用および商品化を目指している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 澤田和也、寺田堂彦、藤里俊哉. 超臨界流体抽出を応用したバイオスキャフォールド調製. *Jasco Report 超臨界特集9*, 111-6. ジャスコレポート社、東京、2007.
- 2) 山岡哲二、木村良晴、藤里俊哉. 医療用バイオベースマテリアル. 木村良晴、小原仁実監修. *バイオベースマテリアルの新展開, XX-XX*. シーエムシー出版、東京、2007.
- 3) 岸田晶夫、藤里俊哉. バイオ材料としての脱細胞化生体組織. 秋吉一成、岸田晶夫監修. *次世代医療のための高分子材料工学*, 55-65. シーエムシー出版、東京、2008.
- 4) 岸田晶夫. 第4章 生体用高分子材料. 田中順三、角田方衛、立石哲也編. *材料学シリーズNo. 33 バイオマテリアル 材料と生体の相互作用*, 131-72. 内田老鶴圃、東京、2008.
- 5) 大西優貴、川北悠介、山崎健一、藤里俊哉、宇戸禎仁. 筋芽細胞の分化と細胞膜電位の変化. *生体医工学* 2008; 46 (1): 64-8.
- 6) 大西優貴、川北悠介、山崎健一、藤里俊哉、宇戸禎仁. C2C12細胞膜電位による分化判定と活性の評価. *電気材料技術雑誌* 2008; 17(1): 38-43.
- 7) 寺田堂彦、木村 剛、岸田晶夫、藤里俊哉. *バイオスキャフォールド*. *バイオマテリアル* 2008; 26(4): 309-19.
- 8) Sawada K, Terada D, Yamaoka T, Kitamura S, Fujisato T. Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue. *J Chem Technol Biotechnol* 2008; 83: 943-9.
- 9) 山崎健一、赤土和也、林 宏行、寺田堂彦、近藤英雄、筒井博司、藤里俊哉. 無細胞生体由来組織とコラーゲングルとを足場とした培養骨格筋を用いたバイオアクチュエータの開発. *生体医工学* 2008; 46(6): 690-7.
- 10) 船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、服部晋也、本田貴子、南 祐広、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 超高压処理技術を応用した人工角膜の作製と評価. *高压バイオサイエンスとバイオエンジニアリング* 2008; 2: 138-44.
- 11) 近藤英雄、寺田堂彦、山崎健一、橋本成広、藤里俊哉. 電気インピーダンス法を用いたゼラチンハイドロゲルの力学特性の評価. *日本機械学会誌* 2009; 75(751-A): 360-5.
- 12) Nam K, Murakoshi A, Kimura T, Fujisato T, Kitamura S, Kishida A. Study on the physical properties of tissue-engineered blood vessels made by chemical cross-linking and polymer-tissue cross-linking. *J Artif Organs* 2009; 12: 47-54.

- 13) Mutsuo S, Yamamoto K, Furuzono T, Kimura T, Ono T, Kishida A. Pressure-induced molecular assembly of hydrogen-bonded polymers. *J Polym Sci Part B: Polym Phys* 2008; 46(7): 743-50.
- 14) Nam K, Kimura T, Kishida A. Controlling coupling reaction of EDC and NHS for preparation of collagen gels using ethanol/water co-solvents. *Macromol Biosci* 2008; 8: 32-7.

2. 学会発表

- 1) Kobayashi H. Research activities of biofunctional materials group. Workshop in Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland, Apr 1, 2008
- 2) Kobayashi H. Top down and bottom up approaches to develop reliable artificial cornea. Workshop in Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland, Apr 1, 2008
- 3) 橋本成広、赤澤堅造、筒井博司、吉浦昌彦、大須賀恵美子、藤里俊哉、辻田勝吉、宇戸禎仁、望月修一、小林裕之、河合俊和、中泉文孝. 医工学系学部における教育. 第47回日本生体医工学会、神戸、2008年5月8～10日
- 4) 川北悠介、大西優貴、山崎健一、宇戸禎仁、藤里俊哉、林 宏行. 培養筋細胞の成長過程及び電気刺激時の膜電位計測. 第47回日本生体医工学会、神戸、2008年5月8～10日
- 5) 山崎健一、林 宏行、小林裕之、宇戸禎仁、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 培養筋管細胞のクロナキシーおよび基電流の時間変化. 第47回日本生体医工学会、神戸、2008年5月8～10日
- 6) 赤土和也、山崎健一、出谷 耕、中尾 誠、吉浦昌彦、筒井博司、藤里俊哉. 骨格筋培養のための機械刺激負荷装置の開発. 第47回日本生体医工学会、神戸、2008年5月8～10日
- 7) 奈良雅尚、山崎健一、寺田堂彦、澤田和也、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. ポリプロピレン繊維-コラーゲングル複合体を用いた筋芽細胞の三次元培養. 第47回日本生体医工学会、神戸、2008年5月8～10日
- 8) 寺田堂彦、澤田和也、緒方裕之、平工香織、鎌田和加子、吉田謙一、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫、山岡哲二、中谷武嗣. バイオスキャフォールドを用いた動脈系血管組織再生. 第47回日本生体医工学会、神戸、2008年5月8～10日
- 9) 山崎健一、寺田堂彦、奈良雅尚、小林裕之、近藤英雄、橋本成広、藤里俊哉. 無細胞生体由来組織を足場とした培養筋の作製. 第47回日本生体医工学会、神戸、2008年5月8～10日
- 10) 近藤英雄、北 孝之、山崎健一、寺田堂彦、橋本成広、藤里俊哉. 電気インピーダンス法を利用し

- た骨格筋損傷度の評価の試み. 第47回日本生体医工学会, 神戸, 2008年5月8~10日
- 11) 近藤英雄, 北 孝之, 寺田堂彦, 山崎健一, 橋本成広, 藤里俊哉. 生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の実験的検討. 第47回日本生体医工学会, 神戸, 2008年5月8~10日
 - 12) Funamoto S, Hashimoto Y, Kimura T, Nam K, Fujisato T, Kishida A. Preparation of Decellularized Bone using Ultra-High Hydrostatic Pressure for Scaffold of Tissue Regeneration. World Biomaterials Congress, Amsterdam, The Netherlands, May 28-Jun 1, 2008
 - 13) Nam K, Murakoshi A, Kimura T, Fujisato T, Kishida A. Controlling Cross-linking Rate of Decellularized Blood Vessel using Collagen Coupling Reaction Technique. World Biomaterials Congress, Amsterdam, The Netherlands, May 28-Jun 1, 2008
 - 14) Ito Y, Kimura T, Higami T, Fujisato T, Kato A, Masuzawa T, Kishida A. Nano-Vibrating Surface for Controlling Cell Function (2). Effects on Cell Differentiation. World Biomaterials Congress, Amsterdam, The Netherlands, May 28-Jun 1, 2008
 - 15) Murakoshi A, Funamoto S, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kimura T, Kishida A. Effect of the Pressurizing Process on the Decellularized Aortic Tissue using Ultra High Pressurization. World Biomaterials Congress, Amsterdam, The Netherlands, May 28-Jun 1, 2008
 - 16) Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, Mochizuki M, Kimura T, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Novel Decellularization Technique of the Cornea using Ultra-high Hydrostatic Pressure. World Biomaterials Congress, Amsterdam, The Netherlands, May 28-Jun 1, 2008
 - 17) Hattori S, Kimura T, Yoshikawa C, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Nam K, Fujisato T, Kitamura S, Kishida A, Honda T, Kobayashi H. Ultra-structure analysis of decellularization of cornea using ultra-high hydrostatical pressurization treatment. World Biomaterials Congress, Amsterdam, The Netherlands, May 28-Jun 1, 2008
 - 18) Nam K, Kimura T, Kishida A. Preparation and characterization of collagen gel designed for tissue membrane. World Biomaterials Congress, Amsterdam, The Netherlands, May 28-Jun 1, 2008
 - 19) Kobayashi H, Hattori S, Yoshilawa C, Honda T. Surface modified Poly(vinyl alcohol) nanofibers for regeneration of corneal stroma. World Biomaterials Congress, Amsterdam, The Netherlands, May 28-Jun 1, 2008
 - 20) 寺田堂彦, 山崎健一, 林 宏行, 橋本成広, 藤里俊哉. 一軸配向性三次元培養のためのコラーゲンスポンジの開発. 平成20年度繊維学会年次大会, 東京, 2008年6月18~20日
 - 21) Hashimoto S, Ohsuga M, Yochiura M, Tsutsui H, Akazawa K, Fujisato T, Mochizuki S, Kobayashi H, Nakaizumi F, Kawai T, Uto S, Tsujita K. Parallel curriculum between application and fundamental subjects with rotational experimental project for multidisciplinary study field of biomedical engineering. The 12 th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Orlando, FL, USA, Jun 29-Jul 2, 2008
 - 22) Kondo H, Hashimoto H, Yamasaki K, Ono K, Okada M, Fujisato T, Kobayashi H, Mochizuki S, Ohsuga M, Yoshiura M, Tsutsui H, Akazawa K, Kawai T, Uto S, Tsujita K, Yamada E, Yamaoka T. Movement of cultured myotube with electrical stimulation. The 12 th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Orlando, FL, USA, Jun 29-Jul 2, 2008
 - 23) Okada M, Hashimoto H, Takase J, Ohsuga M, Nakamura K, Akazawa K, Mochizuki S, Kobayashi H, Fujisato T, Kawai T, Uto S, Tsujita K, Yamada E, Kondo H, Otani H, Yoshinaka K, Yamaoka T. Measurement of periodical contraction of cultured muscle tube with laser. The 12 th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Orlando, FL, USA, Jun 29-Jul 2, 2008
 - 24) Yamada E, Hashimoto H, Inoue D, Kondo H, Mochizuki S, Yamasaki K, Fujisato T, Okada M, Nakaoka H, Ohsuga M. Medium control system for muscle cell culture. The 12 th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Orlando, FL, USA, Jun 29-Jul 2, 2008
 - 25) Yamada E, Hashimoto H, Tachibana K, Okada M, Yamasaki K, Kondo H, Imoto K, Mochizuki S, Fujisato T, Ohsuga M, Otani H. Effect of electric stimulation on adhesion and proliferation of cultured muscle cells. The 12 th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Orlando, FL, USA, Jun 29-Jul 2, 2008
 - 26) Yamasaki K, Hashimoto H, Okada M, Ono K, Fujisato T, Mochizuki S, Yoshiura M, Tsutsui H, Akazawa K. Design of environment for arrangement of cultured muscle cells. The 12 th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and

- Informatics, Orlando, FL, USA, Jun 29-Jul 2, 2008
- 27) 南 広祐, 木村 剛, 岸田晶夫. 組織膜を目指したコラーゲングルの作製と生物学的特性検討Ⅲ. 第37回医用高分子シンポジウム, 東京, 2008年7月28~9日
 - 28) 船本誠一, 橋本良秀, 佐々木秀次, 本田貴子, 服部晋也, 望月 學, 藤里俊哉, 木村剛, 小林尚俊, 岸田晶夫. 脱細胞化角膜を用いた眼科用足場材料の研究. 第37回医用高分子シンポジウム, 東京, 2008年7月28~9日
 - 29) 林 宏行, 山崎健一, 寺田堂彦, 近藤英雄, 奈良雅尚, 橋本成広, 藤里俊哉. 筋芽細胞を用いたバイオアクチュエータの開発. 日本機械学会2008年度年次大会, 横浜, 2008年8月3~7日
 - 30) 山崎健一, 林 宏行, 寺田堂彦, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. 無細胞生体由来組織とコラーゲングルを足場とした骨格筋の再生. 日本バイオマテリアル学会 第3回関西若手研究発表会, 吹田, 2008年8月7日
 - 31) 近藤英雄, 寺田堂彦, 山崎健一, 橋本成広, 藤里俊哉. 電気インピーダンス分光法を用いた生体高分子ゲルの特性評価. 日本バイオマテリアル学会第3回関西若手研究発表会, 吹田, 2008年8月7日
 - 32) Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Hattori S, Mochizuki M, Honda T, Fujisato T, Kishida A. Structure evaluation of porcine cornea decellularized by ultra high hydrostatic pressurization. European Materials Research Society 2008 Fall Meeting, Warsaw, Poland, Sep 15-9, 2008
 - 33) 赤土和也, 山崎健一, 中尾 誠, 寺田堂彦, 藤里俊哉, 吉浦昌彦, 筒井博司. 骨格筋培養のための機械刺激負荷に関する研究. 生体医工学シンポジウム2008, 大阪, 2008年9月19~20日
 - 34) 近藤英雄, 山崎健一, 林 宏行, 寺田堂彦, 橋本成広, 藤里俊哉. 電気インピーダンス法を用いた培養筋の評価の試み. 生体医工学シンポジウム2008, 大阪, 2008年9月19~20日
 - 35) 山崎健一, 赤土和也, 林 宏行, 寺田堂彦, 近藤英雄, 筒井博司, 藤里俊哉. 無細胞生体由来組織とコラーゲングルを足場とした培養筋アクチュエータの開発. 生体医工学シンポジウム2008, 大阪, 2008年9月19~20日
 - 36) 林 宏行, 山崎健一, 寺田堂彦, 近藤英雄, 奈良雅尚, 橋本成広, 藤里俊哉. 配向したコラーゲンスポンジを足場とした筋芽細胞の三次元培養. 第19回バイオフロンティア講演会, 東京, 2008年9月24~5日
 - 37) 服部晋也, 木村 剛, 吉川千晶, 船本誠一, 橋本良秀, 佐々木秀次, 望月 學, 南 広祐, 藤里俊哉, 北村総一郎, 岸田晶夫, 本田貴子, 小林尚俊. 脱細胞化処理による角膜実質の微細線維構造の変化に関する研究. 第57回高分子討論会, 大阪, 2008年9月24~6日
 - 38) 南 広祐, 木村 剛, 岸田晶夫. コラーゲングルの構造特性による物理・生物学的特性評価. 第57回高分子討論会, 大阪, 2008年9月24~6日
 - 39) 橋本良秀, 船本誠一, 佐々木秀次, 望月 學, 服部晋也, 藤里俊哉, 木村 剛, 小林尚俊, 岸田晶夫. 角膜再生用スキャフォールドの開発と機能評価. 第57回高分子討論会, 大阪, 2008年9月24~6日
 - 40) Terada D, Sawada K, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Funamoto S, Kishida A, Yamaoka T, Nakatani T, Kitamura S, Fujisato T. Regenerative arterial graft made of biological tissue. TERMIS-AP 2008, Taipei, Taiwan, Nov 6-8, 2008
 - 41) Hattori S, Kimura T, Yoshikawa C, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Honda T, Kishida A, Kobayashi H. Structural features of decellularized cornea using ultra high hydrostatic pressurization method. TERMIS-AP 2008, Taipei, Taiwan, Nov 6-8, 2008
 - 42) Honda T, Kimura T, Yoshikawa C, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Fujisato T, Hattori S, Kishida A, Kobayashi H. Evaluation of decellularized cornea made by ultra high hydrostatic pressurization method as a scaffold for corneal stroma. TERMIS-AP 2008, Taipei, Taiwan, Nov 6-8, 2008
 - 43) Hayashi H, Yamasaki K, Terada D, Kondo H, Hashimoto S, Fujisato T. Change of contractile property of tissue engineered skeletal muscle during cell culture. TERMIS-AP 2008, Taipei, Taiwan, Nov 6-8, 2008
 - 44) Yamasaki K, Hayashi H, Terada D, Kondo H, Hashimoto S, Fujisato T. Contractile property of tissue-engineered skeletal muscle composed of acellular tissue and collagen gel. TERMIS-AP 2008, Taipei, Taiwan, Nov 6-8, 2008
 - 45) Kondo H, Yamasaki K, Hayashi H, Terada D, Hashimoto S, Fujisato T. Evaluation of tissue-engineered muscle with electrical impedance method. TERMIS-AP 2008, Taipei, Taiwan, Nov 6-8, 2008
 - 46) 山崎健一, 林 宏行, 寺田堂彦, 近藤英雄, 藤里俊哉. 無細胞生体由来組織とコラーゲングルとを足場とした培養骨格筋の収縮特性. 第35回日本臨床バイオメカニクス学会, 大阪, 2008年11月14~5日
 - 47) 根岸 淳, 木村 剛, 南 広祐, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 超高压を利用したPVA-ヘパリン複合体の調

- 製と評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008, 東京, 2008年11月17~8日
- 48) 服部晋也, 本田貴子, 木村 剛, 船本誠一, 橋本良秀, 岸田晶夫, 佐々木秀次, 望月 學, 藤里俊哉, 吉川千晶, 小林尚俊. 高圧印加処理を用いた脱細胞化による人工角膜開発の試み. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008, 東京, 2008年11月17~8日
- 49) 本田貴子, 服部晋也, 吉川千晶, 小林尚俊. ナノファイバーを用いた人工角膜開発の試み. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008, 東京, 2008年11月17~8日
- 50) 寺田堂彦, 藤里俊哉, 中谷武嗣, 北村惣一郎, 増谷有紀. 再生型同種移植弁開発のための脱細胞化ヒト心臓弁の基礎的評価. 第35回日本臓器保存生物医学会定期学術集会, 東京, 2008年11月22~3日
- 51) Kobayashi H. Challenge to develop reliable corneal stroma through tissue engineering approaches. International Workshop on Biomaterials for Tissue Engineering and Biotechnological Applications, Kharagpur, India, Nov 22-4, 2008
- 52) 船本誠一, 佐々木秀次, 橋本良秀, 服部晋也, 本田貴子, 望月 學, 藤里俊哉, 木村 剛, 小林尚俊, 岸田晶夫. 移植用角膜組織作製のための脱細胞化処理方法の検討とin vivo 評価. 第46回日本人工臓器学会大会, 東京, 2008年11月27~29日
- 53) 山崎健一, 林 宏行, 寺田堂彦, 近藤英雄, 藤里俊哉. 生体組織由来人工腱とコラーゲンをを用いた骨格筋の再生. 第46回日本人工臓器学会大会, 東京, 2008年11月27~29日
- 54) 佐合 満, 江橋 具, 玉井克明, 藤里俊哉, 森反俊幸, 山岡哲二. 生体反応を利用した脱細胞化血管の作製. 第46回日本人工臓器学会大会, 東京, 2008年11月27~29日
- 55) 林 宏行, 山崎健一, 寺田堂彦, 近藤英雄, 藤里俊哉. 再生骨格筋の収縮弛緩特性の時間変化. 第46回日本人工臓器学会大会, 東京, 2008年11月27~29日
- 56) 木村 剛, 今野北斗, 船本誠一, 南 広祐, 藤里俊哉, 岸田晶夫. 高圧凝縮遺伝子を用いた遺伝子発現制御. 第46回日本人工臓器学会大会, 東京, 2008年11月27~29日
- 57) Kishida A, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Nam K, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Kobayashi H. Decellularization of Porcine Cornea by Ultra-high Pressurization and In Vivo Study. TERMIS-NA, San Diego, CA, USA, Dec 7-10, 2008
- 58) Kimura T, Konno H, Funamoto S, Nam K, Fujisato T, Kishida A. Effect of condensed DNA by high hydrostatic pressurization on in vivo gene transfection. TERMIS-NA, San Diego, CA, USA, Dec 7-10, 2008
- 59) Terada D, Yamasaki K, Kondo H, Hayashi H, Nara M, Sawada K, Ehashi T, Hashimoto S, Fujisato T. Tissue-Derived Collagen Scaffold for Skeletal Muscle Cells. TERMIS-NA, San Diego, CA, USA, Dec 7-10, 2008
- 60) Terada D, Sawada K, Ogata H, Ehashi T, Hiraku K, Kamata W, Yoshida K, Funamoto S, Kishida A, Yamaoka T, Fujisato T, Nakatani T. Regeneration of Artery by using Biological Grafts Derived From Aortic Tissue. TERMIS-NA, San Diego, CA, USA, Dec 7-10, 2008
- 61) 服部晋也, 木村 剛, 船本誠一, 橋本良秀, 佐々木秀次, 望月 學, 藤里俊哉, 本田貴子, 岸田晶夫, 小林尚俊. 高圧印加処理を用いた脱細胞化角膜の構造解析. つくば医工連携フォーラム, つくば, 2009年1月14日
- 62) 本田貴子, 服部晋也, 吉川千晶, 小林尚俊. 高分子ファイバーを用いた人工角膜開発の試み. つくば医工連携フォーラム, つくば, 2009年1月14日
- 63) 山崎健一, 林 宏行, 寺田堂彦, 近藤英雄, 藤里俊哉. 再生骨格筋の収縮特性. 第21回バイオエンジニアリング講演会, 札幌, 2009年1月23~24日
- 64) 林 宏行, 山崎健一, 寺田堂彦, 近藤英雄, 藤里俊哉. 培養に伴う再生骨格筋の収縮弛緩特性の変化. 第21回バイオエンジニアリング講演会, 札幌, 2009年1月23~24日
- 65) 山崎健一, 林 宏行, 寺田堂彦, 近藤英雄, 藤里俊哉, 中村友浩. 3次元培養骨格筋モデルの生化学的および組織化学的特性. 日本体力医学会第23回近畿地方会, 大阪, 2009年1月31日
- 66) 船本誠一, 佐々木秀次, 橋本良秀, 服部晋也, 本田貴子, 望月 學, 藤里俊哉, 木村剛, 小林尚俊, 岸田晶夫. 脱細胞化技術を用いた移植・再生医療用角膜の開発. 再生医療学会, 東京, 2009年3月5~6日
- 67) 近藤英雄, 寺田堂彦, 山崎健一, 藤里俊哉. 電気インピーダンス法を用いた脱細胞化血管組織の特性評価. 再生医療学会, 東京, 2009年3月5~6日
- 68) 山崎健一, 林 宏行, 中村友浩, 寺田堂彦, 藤里俊哉. 再生骨格筋のタンパク質発現と収縮弛緩特性の変化. 再生医療学会, 東京, 2009年3月5~6日
- 69) 寺田堂彦, 林 宏行, 橋本成広, 藤里俊哉. 一軸配向性組織の三次元培養用スキュアフォールド. 再生医療学会, 東京, 2009年3月5~6日
- 70) 赤土和也, 山崎健一, 中尾 誠, 寺田堂彦, 藤里俊哉, 吉浦昌彦, 筒井博司. 培養骨格筋のアクチユエータ化に関する研究. 再生医療学会, 東京,