

Fig. 1. Circular dichroism spectra of (PPG)₁₀, AG73 and AG73-G₃-(PPG)₅ in water.

point at 220 nm. The results suggest that the CLP region of AG73-G₃-(PPG)₅ also forms the PP-II structure. It is well known that the PP-II structure is the predominant secondary structure in collagen triple-helix. In addition, the PP-II structure of (PPG)_n repetitive sequence exposes hydrophobic five-membered rings of Pro residues. Therefore, it is inferred that (PPG)_n is adsorbed onto PLA films via hydrophobic interaction.

3.2. Surface characterization of peptide-adsorbed PLA films

To compare the hydrophilicity of the peptide-adsorbed PLA film surfaces, the water contact angle was measured (Table 1). The water contact angle of non-adsorbed PLA films was $79.1 \pm 1.2^\circ$, which indicates a hydrophobic surface. After adsorption of (PPG)₁₀, AG73 and AG73-G₃-(PPG)₅, the water contact angle changed to $70.1 \pm 3.9^\circ$, $31.2 \pm 2.1^\circ$ and $55.6 \pm 1.9^\circ$, respectively. The water contact angle drastically decreased with AG73 and AG73-G₃-(PPG)₅ adsorption, but with (PPG)₁₀ adsorption the decrease was considerably less. It seems that the surface wettability of peptide-adsorbed PLA films corresponded to the hydrophilicity of the peptides, i.e. (PPG)₁₀ is more hydrophobic than AG73 and AG73-G₃-(PPG)₅. Safinia et al. reported that the PLA film surface shows a negative ζ -potential at physiological pH [32] because of a carboxyl group at the terminal of the PLA molecule. Therefore, the results suggest that these peptides are adsorbed onto PLA film via hydrophobic or electrostatic interactions.

The XPS N1s spectrum is shown in Fig. 2. The XPS spectra of (PPG)₁₀, AG73- and AG73-G₃-(PPG)₅-adsorbed PLA films exhibited a N1s peak corresponding to amino acids. In order to compare the adsorbed peptide ratio on PLA films, the elemental ratios are summarized in Table 2. N1s was not detected clearly because PLA itself does not contain nitrogen. The N1s/C1s ratios were 0.07, 0.09 and 0.18, and the N1s/O1s ratios were 0.03, 0.04 and 0.09. The N1s/C1s and N1s/O1s ratios were increased with peptide adsorption; in particular, the highest values were shown for AG73-G₃-(PPG)₅. The AG73-G₃-(PPG)₅ might be adsorbed at high density via hydro-

Table 1
Water contact angle of peptide-adsorbed PLA films.

	CA (°)
Non-adsorbed	79.1 ± 1.2
(PPG) ₁₀	70.1 ± 3.9
AG73	31.2 ± 2.1
AG73-G ₃ -(PPG) ₅	55.6 ± 1.9

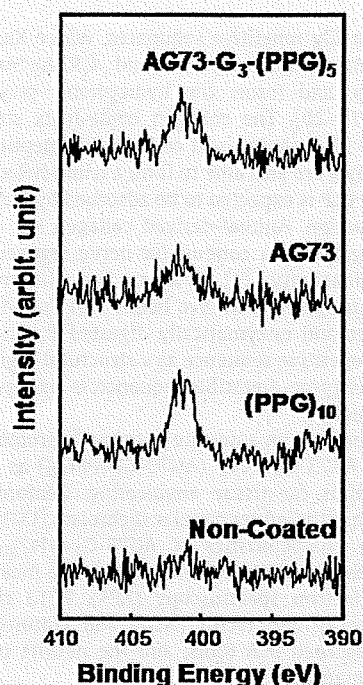


Fig. 2. XPS spectra of the N1s region of peptide-adsorbed PLA films.

Table 2
Elemental ratio of nitrogen to carbon (N1s/C1s) or oxygen (N1s/O1s) measured by XPS.

	PLA	(PPG) ₁₀	AG73	AG73-G ₃ -(PPG) ₅
N1s/C1s	0.01	0.07	0.09	0.18
N1s/O1s	0.00	0.03	0.04	0.09

phobic interaction between (PPG)₅ region and PLA. The reason for the decrease in water contact angle of AG73-G₃-(PPG)₅-adsorbed PLA film (Table 1) is that the hydrophilic AG73 region in AG73-G₃-(PPG)₅ was partially exposed to solution. Ji et al. also indicated that the poly(ethylene oxide-propylene oxide-ethylene oxide) amphiphilic triblock copolymer bearing RGD tripeptides adsorbed onto PLA films through hydrophobic interaction, and its hydrophilic regions were exposed to solution phase [11]. As a result, the AG73-G₃-(PPG)₅ adsorbs via hydrophobic interaction and constructs an ECM-like layer on the PLA film surface.

3.3. Neurite outgrowth activity of peptide-adsorbed PLA films

The morphology of PC12 cells on peptide-adsorbed PLA films is shown in Fig. 3a, and the number of adhered PC12 cells with or without neurites is summarized in Fig. 3b. On the naked and (PPG)₁₀-adsorbed PLA films, PC12 cells (~ 230 cells mm^{-2}) did not adhere well enough, and so neurite outgrowth could not be found. This indicates that (PPG)_n itself does not support bioactivity for cell adhesion or neurite outgrowth. Meanwhile, on AG73- and AG73-G₃-(PPG)₅-adsorbed PLA films, the adhesion of PC12 cells was improved to more than 300 cells mm^{-2} . Neurite outgrowth also occurred, i.e. the number of PC12 cells with neurites was more than 75% on both AG73- and AG73-G₃-(PPG)₅-adsorbed PLA films. In contrast, the mechanisms of adsorption of these films must be different from each other since the physicochemical properties of AG73 and AG73-G₃-(PPG)₅ are quite dissimilar. As mentioned above, they are considered to be adsorbed onto PLA films via

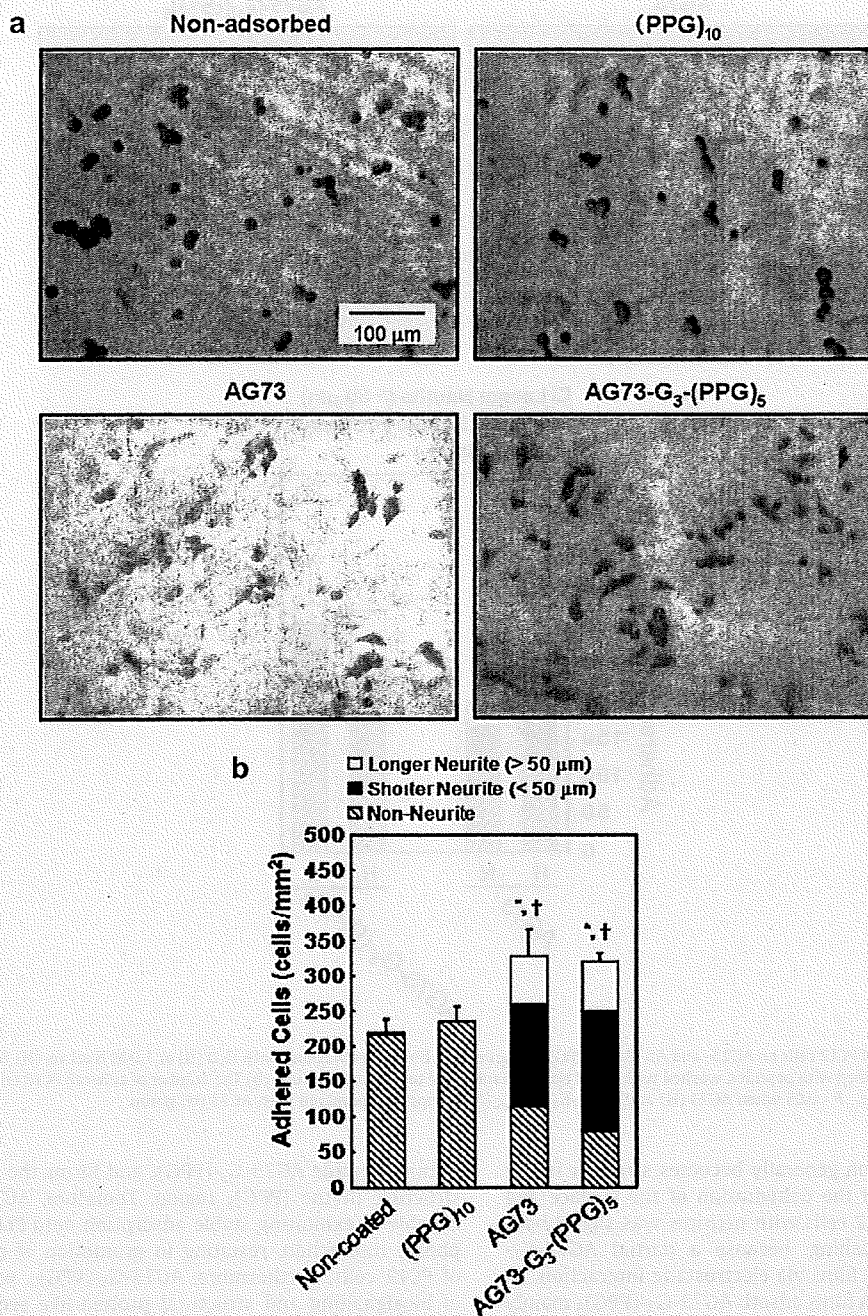


Fig. 3. Neurite outgrowth activity of PC12 cells on peptide-adsorbed PLA films. (a) Morphology of PC12 cells on peptide-adsorbed PLA films after 24 h. (b) The number of adhered PC12 cells on peptide-adsorbed PLA films with and without neurites. $P < 0.05$ when AG73 and AG73-G₃-(PPG)₅ groups compared with non-coated group; $^{\dagger}P < 0.05$ when AG73 and AG73-G₃-(PPG)₅ groups compared with (PPG)₁₀ group.

electrostatic and hydrophobic interactions, respectively. It is anticipated that under physiological conditions, adsorption of AG73-G₃-(PPG)₅ is more stable than that of AG73.

In order to evaluate the stability of the adsorbed AG73-G₃-(PPG)₅, neurite outgrowth assay was performed on AG73 and AG73-G₃-(PPG)₅-adsorbed PLA films after washing with 1.0 M NaCl aqueous solution (Fig. 4). In the case of AG73-adsorbed PLA films, the number of adhered PC12 cells is decreased to below 60% by 1.0 M NaCl washing, but the ratio of PC12 cells with neurites remains unchanged. After 1.0 M NaCl washing, the water contact angles of (PPG)₁₀-, AG73- and AG73-G₃-(PPG)₅-adsorbed PLA films

changed from $70.1 \pm 3.9^\circ$, $31.2 \pm 2.1^\circ$ and $55.6 \pm 1.9^\circ$ to $70.3 \pm 1.5^\circ$, $60.0 \pm 1.3^\circ$ and $54.6 \pm 4.2^\circ$, respectively. That is, the water contact angle of the AG73-adsorbed PLA films was drastically increased by 1.0 M NaCl washing, but that of AG73-G₃-(PPG)₅-adsorbed films was changed a little. These results indicated that adsorbed AG73 seemed to be partially removed by 1.0 M NaCl washing, and the remaining AG73 expressed neurite outgrowth-promoting activity, because AG73 was mainly adsorbed via electrostatic interaction. Meanwhile, the number of adhered PC12 cells was not changed and neurite outgrowth was also found on AG73-G₃-(PPG)₅-adsorbed PLA films after washing with H₂O or 1.0 M

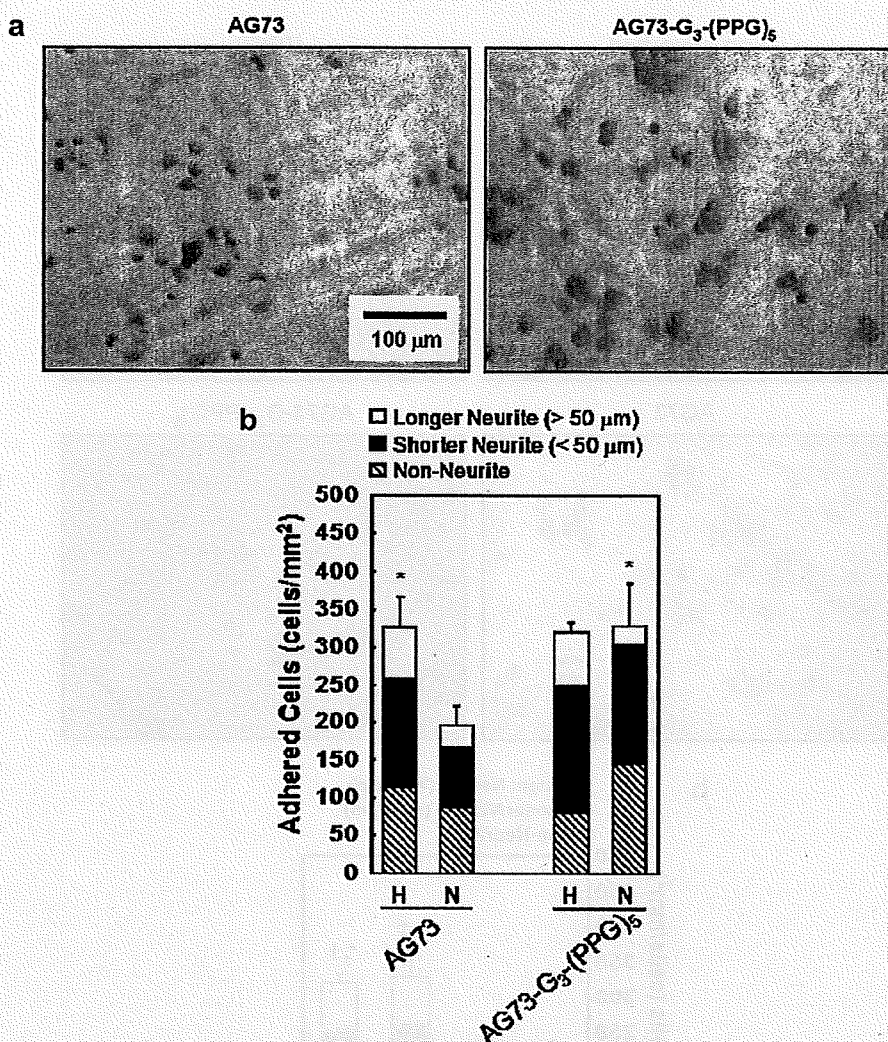


Fig. 4. Neurite outgrowth activity of PC12 cells on AG73- and AG73-G₃-(PPG)₅-adsorbed PLA films after washing with H₂O (H) or 1.0 M NaCl aq. (N). (a) Morphology of PC12 cells after 24 h. PLA films were modified with peptides, washed with 1.0 M NaCl and subjected to PC12 cell culture. (b) The number of adhered PC12 cells on peptide adsorbed PLA films with and without neurites. $P < 0.05$ when AG73 (H) and AG73-G₃-(PPG)₅ (N) groups are compared with AG73 (N) group.

NaCl. Hydrophobic interaction generally becomes stronger in the presence of salts because of the dehydration of the surface and adsorbents. The ratio of PC12 cells with neurites was slightly decreased by 1.0 M NaCl washing, because a partial AG73-G₃-(PPG)₅ was adsorbed by PLA films via electrostatic interaction. As result, it is proposed that PLA films adsorb AG73-G₃-(PPG)₅ mainly by hydrophobic interaction, and an ECM-like layer composed of structural protein and biosignalling sequences is formed. It is known that animal-derived collagen, like laminin, also promotes neurite outgrowth, because it is a fusion protein that combines a structural protein with many biosignal sequences [33]. Neurite outgrowth is mainly promoted by biosignal sequences in collagen, and it must be supported by the structural properties of these sequences. We believe that the structural properties of the ECM-like layer composed of AG73-G₃-(PPG)₅ creates a synergy with AG73 biosignalling for promoting neurite outgrowth.

4. Conclusion

Hydrophobic peptide-based interfacial adsorption onto PLA films and film stability have been characterized. Collagen-laminin

mimics peptide AG73-G₃-(PPG)₅ and forms the hydrophobic PP-II structure in the (PPG)₅ region. Therefore, AG73-G₃-(PPG)₅ was capable of exhibiting stable adsorption onto PLA films via hydrophobic interaction, resulting in promotion of neurite outgrowth of PC12 cells. Furthermore, AG73-G₃-(PPG)₅, which is composed of biosignalling and structural protein-like sequences, forms an ECM-like layer on PLA films. It has recently been noted that the mechanical and morphological properties of ECMs are important for controlling stem cell differentiation [34]. The hydrophobic adsorption of collagen-like peptide is expected to serve as a surface modification technique of PLA films for controlling the biological properties of cells.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Aasako Yamayoshi and Prof. Akira Murakami at the Kyoto Institute of Technology for assistance with the circular dichroism measurements. This work was partly supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) promoted by the Ministry of Education, Culture, Sports and Technology, Japan.

Appendix A. Figures with essential color discrimination

Certain figures in this article, particularly Figs. 3 and 4, are difficult to interpret in black and white. The full color images can be found in the on-line version, at doi: 10.1016/j.actbio.2009.12.001.

References

- [1] Lanza R, Langer R, Vacanti J, editors. Principles of tissue engineering. Amsterdam and Boston, MA: Elsevier/Academic Press; 2007.
- [2] Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. J R Soc Interface 2009;6:S311–24.
- [3] Ma Z, Mao Z, Gao C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. Colloids Surf B Biointerfaces 2007;60:137–57.
- [4] Gupta B, Revagade N, Hilborn J. Poly(lactic acid) fiber: an overview. Prog Polym Sci 2007;32:455–82.
- [5] Jiao YP, Cui FZ. Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. Biomed Mater 2007;2:R24–37.
- [6] Khorasani MT, Mirzadeh H, Irani S. Plasma surface modification of poly(L-lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) films for improvement of nerve cells adhesion. Rad Phys Chem 2008;77:280–7.
- [7] Ma Z, Gao C, Ji J, Shen J. Protein immobilization on the surface of poly(L-lactic acid) films for improvement of cellular interactions. Eur Polym J 2002;38:2279–84.
- [8] Yamaoka T, Hotta Y, Kobayashi K, Kimura Y. Synthesis and properties of malic acid-containing functional polymers. Int J Biol Macromol 1999;25:265–71.
- [9] Yamaoka T, Takebe Y, Kimura Y. Surface modification of poly(L-lactic acid) film with bioactive materials by a novel direct alkaline treatment process. Kobunshi Ronbunshu 1998;55:328–33.
- [10] Zhu H, Ji J, Barbosa MA, Shen J. Protein electrostatic self-assembly on poly(DL-lactide) scaffold to promote osteoblast growth. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2004;71:159–65.
- [11] Ji J, Zhu H, Shen J. Surface tailoring of poly(DL-lactide) by ligand-tethered amphiphilic polymer for promoting chondrocyte attachment and growth. Biomaterials 2004;25:1859–67.
- [12] Matsuno H, Sekine J, Yajima H, Serizawa T. Biological selection of peptides for poly(L-lactide) substrates. Langmuir 2008;24:6399–403.
- [13] Oh SH, Kim JH, Song KS, Jeon BH, Yoon JH, Seo TB, et al. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. Biomaterials 2008;29:1601–9.
- [14] Weeks BS, Nomizu M, Ramachandran RS, Yamada Y, Kleinman HK. Laminin-1 and the RKRLQVQLSIRT laminin-1 α 1 globular domain peptide stimulate matrix metalloproteinase secretion by PC12 cells. Exp Cell Res 1998;243:375–82.
- [15] Koide T. Designed triple-helical peptides as tools for collagen biochemistry and matrix engineering. Philos Trans R Soc B 2007;362:1281–91.
- [16] Abraham LC, Zuena E, Perez-Ramirez B, Kaplan DL. Guide to collagen characterization for biomaterial studies. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2008;87:264–85.
- [17] Jenkins CL, Raines RT. Insights on the conformational stability of collagen. Nat Prod Rep 2002;19:49–59.
- [18] Engel J, Bachinger HP. Structure, stability and folding of the collagen triple helix. Top Curr Chem 2005;247:7–33.
- [19] Okuyama K. Revisiting the molecular structure of collagen. Connect Tissue Res 2008;49:299–310.
- [20] Kakinoki S, Hirano Y, Oka M. On the stability of polyproline-I and II structures of proline oligopeptides. Polym Bull 2005;53:109–15.
- [21] Kobayashi Y, Sakai R, Kaniuchi K, Isemura T. Physicochemical analysis of (Pro-Pro-Gly)_n with defined molecular weight-temperature dependence of molecular weight in aqueous solution. Biopolymers 1970;9:415–25.
- [22] Gough CA, Anderson RW, Bhatnagar RS. The role of bound water in the stability of the triple-helical conformation of (Pro-Pro-Gly)₁₀. J Biomol Struct Dyn 1998;15:1029–37.
- [23] Stetefeld J, Frank S, Jenny M, Schulthess T, Kammerer RA, Boudko S, et al. Collagen stabilization at atomic level: crystal structure of designed (GlyProPro)₁₀ folden. Structure 2003;11:339–46.
- [24] Inada Y, Morimoto S, Moroi K, Endo K, Nakamura T. Surgical relief of causalgia with an artificial nerve guide tube: successful surgical treatment of causalgia (Complex Regional Pain Syndrome Type II) by in situ tissue engineering with a polyglycolic acid-collagen tube. Pain 2005;117:251–8.
- [25] Andair-Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. Int J Biochem Cell Biol 2008;40:1101–10.
- [26] Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic donal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1976;73:2424–8.
- [27] Mochizuki M, Kadoya Y, Wakabayashi Y, Kato K, Okazaki I, Yamada M, et al. Laminin-1 peptide-conjugated chitosan membranes as a novel approach for cell engineering. FASEB J 2003;17:875–7.
- [28] Ichikawa N, Kasai S, Suzuki N, Nishi N, Oishi S, Fujii N, et al. Identification of neurite outgrowth active sites on the laminin α 4 chain G domain. Biochemistry 2005;44:5755–62.
- [29] Collins TJ. ImageJ for microscopy. Biotechniques 2007;43:S25–30.
- [30] Jenness DD, Sprecher C, Curtis J. Circular dichroism of collagen, gelatin, and poly(proline) II in the vacuum ultraviolet. Biopolymers 1976;15:513–21.
- [31] Khew ST, Tong YW. Characterization of triple-helical conformations and melting analyses of synthetic collagen-like peptides by reversed-phase HPLC. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2007;858:79–90.
- [32] Safinia L, Datan N, Hühse M, Mantalaris A, Bismarck A. Towards a methodology for the effective surface modification of porous polymer scaffolds. Biomaterials 2005;26:7537–47.
- [33] David CT, Leonard AF, Salvatore C. Identification of a cell-surface protein involved in PC12 cell-substratum adhesion and neurite outgrowth on laminin and collagen. J Neurosci 1989;9:3287–96.
- [34] Hwang NS, Varghese S, Elisseff J. Controlled differentiation of stem cells. Adv Drug Deliv Rev 2008;60:199–214.

MRI 移植細胞トラッキング：下肢虚血ラットを用いた MSC 移植

国循セ研 生体工学部¹ 国循セ研 放射線医学部²
○橋 洋一¹、圓見 純一郎²、飯田 秀博²、山岡 哲二¹

<緒言>

近年、再生医工学の進歩により細胞移植治療が数多く検討され、心筋障害モデルに対する細胞の移植（例えば心筋細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞）では、心室壁の菲薄化、心拡大の制御により心機能の改善が報告されてきた。しかし、臨床応用への研究が進む中で、組織再生における径時的な機序（移植細胞の分化、可塑性、融合など）は解明されていない。現在では、更なる治療の効率化・安全性の向上のため、回復過程の正確な追跡と診断の重要性が高まっている。

本研究は、移植細胞の追跡と組織再生のイメージングを目指して、MRI に着目し、新たな細胞追跡用 MRI 造影剤の開発し、移植細胞のトラッキングを目的とする。MRI は、非浸襲・非破壊的に特定部位を観察できるだけでなく、任意の方向での撮像が可能であり、汎用性が高いものである。我々は、非生分解性高分子（ポリビニルアルコール）に既存の MRI 用造影剤を導入し、高分子-造影剤コンジュゲートの合成を行った。さらに、得られたコンジュゲートをラット間葉系幹細胞内へ導入し、細胞内における造影剤の挙動及び造影剤を導入した細胞の評価を行った。得られた新規造影剤を用い、ラット間葉系幹細胞を標識し、下肢虚血モデルラットに移植した後に、MRI による細胞追跡を行った。

<実験>

非生分解性高分子として知られてい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、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、MRI 用高分子造影剤を合成した。得られたコンジュゲートの MRI 用造影剤としての評価を行った。また、エレクトロポレーション法を用い、本コンジュゲートをラット間葉系幹細胞内に導入し、ポリマーの細胞内挙動（分化能・増殖能）について検討した。最低 10 日間、高分子造影剤は細胞内に安定に滞在することがわかった。つまり、本高分子造影剤は細胞に対してほとんど影響を与えないといえる。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。虚血モデル作成後、 3×10^7 個の造影剤内包細胞の移植を行った。移植細胞の MRI（1.5 T）観察を行うと同時に、レーザードップラーを用いて血流の回復過程を検討した。

MRI 用高分子造影剤を用いた細胞のラベル化及び in vivo における

移植細胞の追跡

Cell labeling with polymeric MRI contrast agent and in vivo cell tracking

橘 洋一¹⁾、寺本 昇²⁾、圓見 純一郎²⁾、飯田 秀博²⁾、山岡 哲二¹⁾¹⁾ 国循セ研 生体工学部 ²⁾ 国循セ研 放射線医学部Yoichi Tachibana, ¹⁾ Noboru Teramoto, ²⁾ Jyunichiro Ennmi, ²⁾ Hidehiro Iida, ²⁾ Tetsuji Yamaoka ¹⁾¹⁾ Department of Biomedical Engineering, ²⁾ Department of Investigative Radiology, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute.

<緒言>

近年、虚血性疾患に対する治療戦略の一つとして細胞移植療法が注目されており、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、細胞内滞在性を有する MRI 用高分子造影剤を新規に合成した。この新規造影剤で骨髄由来間葉系幹細胞を標識し、in vitro で細胞の撮像を行った。さらに、下肢虚血モデルラットに移植した後に、MRI による細胞追跡を行った。

<結果・考察>

移植細胞を追跡するために、ポリビニルアルコールを主鎖とし、側鎖にガドリニウムを中心金属としたキレート剤を有する、長期細胞ラベル化用 MRI 造影剤を開発した。骨髄由来間葉系幹細胞への導入は電圧ポレーション法を用いた。導入後の細胞をゲル内に封入し、MRI 撮像を行った。この結果、in vitro において、細胞の MRI 撮像に成功した。また、造影剤内包細胞を用いて細胞増殖、造影剤の細胞内滞在性、分化能について検討を行った。その結果、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ところがあった。また、細胞内に造影剤を導入した状態で骨芽細胞へと分化誘導が可能であった。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。虚血モデル作成後、高分子造影剤でラベル化した間葉系幹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 (1.5T) 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、合成した造影剤は細胞の機能に影響しないことがわかった。また、in vivo において非浸襲的に移植細胞の評価ができることが示唆された。また、電圧ポレーション法は細胞種に依存しない MRI 用造影剤の導入法であることから、様々な細胞を用いることが可能である。そのため、幅広い再生移植治療に対応可能であると期待できる。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。

Biosynthesis of Thermoresponsive Artificial ECM Composed of Elastin-like Repetitive Sequence (VPGIG)_n and the Laminin-derived Sequence

S. Kakinoki^{1,2} and T. Yamaoka^{1,2}

¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

²JST, CREST, 5 Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan

Keywords: elastin-like peptide, laminin-derived sequence, thermo-responsiveness, genetically engineering.

An artificial extracellular matrix (aECM) is appeared promising as a scaffold to construct the most suitable extracellular environment for tissue engineering. However, ECM expresses multi-functions due to different kinds of biomacromolecules such as collagen, elastin, laminin, and proteoglycans, aECM should be rationally designed with selection of functions for any purpose. One approach is to construct artificial fusion proteins composed of structural and bioactive sequences.

In the present experiments, an artificial fusion protein composed of the elastin-like sequence and the laminin-derived sequence, was prepared. Elastin-like peptide (ELP), which is the repetitive sequence (VPGIG)_n based on the tropoelastin, forms a β-spiral structure in high temperature resulting in a temperature-dependence phase transition (Yamaoka *et al.*, 2003). Laminin-derived sequence, AG73 (Richard *et al.*, 1996) well-known to be able to promote the neurite outgrowth, is selected as a bioactive sequence.

The fusion proteins, [AG73-(VPGIG)_x]_y, were biosynthesized using *E. coli*. First, oligonucleotide cassettes encoding (VPGIG)₅ which have *Ban I* digestion sites at both termini, were prepared (Fig. 1 (A)). Then, oligonucleotides encoding AG73 sequence, which contain *Sal I*, *Xho I* and *Bbs I* digestion site, were ligated into *Eco RI*/*Bam HI* sites of pUC18 (TAKARA). *Bbs I* digestion site was designed to emerge *Ban I* sticky-end after digestion. DNA cassettes encoding (VPGIG)₅ were inserted into this plasmid pUC18 by *Ban I* sticky-end after *Bbs I* digestion. AG73-(VPGIG)_n DNA inserts were liberated by *Sal I*/*Xho I* digestion. AG73-(VPGIG)_n DNA was ligated into *Xho I* site of pET28a(+) which was introduced His-tag sequence, a HRV3C protease recognition sequence, and *Xho I* digestion site at *Nco I*/*Sal I* site. This plasmid pET28a(+) was used for the transformation of

the *E. coli* expression strain BL21(DE3)pLysS (Novagen). Fermentation was performed in 2xYT medium supplemented with kanamycin at 37 °C. [AG73-(VPGIG)_x]_y expression was induced with the addition of 0.1 M β-isopropyl thiogalactoside (IPTG). [AG73-(VPGIG)_x]_y purification was performed using the thermoresponsive property of ELP or N²⁺ affinity column (Fig. 1 (B)). Purified [AG73-(VPGIG)_x]_y was confirmed by SDS-PAGE and MALDI-TOF/MS measurement. Furthermore, thermoresponsiveness and the neurite outgrowth activity of [AG73-(VPGIG)_x]_y were evaluated.

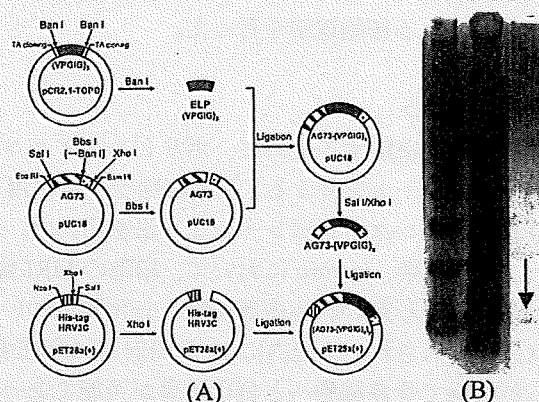


Figure 1. (A) Schematic of construct plasmids encoding [AG73-(VPGIG)_x]_y. (B) SDS-PAGE for AG73-(VPGIG)₁₀ purified by N²⁺ column. (1; Marker (227, 116, 66, 56, 45, 36, 31, 29, 20, 14.3, 6.5 KDa from top to bottom), 2; Bacterial lysate, 3; Purified protein).

Yamaoka, T., Tamura, T., Seto, Y., Tada, T., Kunugi, S., Tirrell, DA. (2003). *Biomacromolecules*, 4, 1680-1685.

Richard, BL., Nomizu, M., Yamada, Y., Kleinman, HK. (1996). *Exp. Cell Res.*, 228, 98-105.

selective adhesion and guided growth of cells. Wettable AA domains also induced phenotypic maturation of vascular cells. These surfaces could be applied in tissue engineering, in a cell microarray technique for advanced genomics and proteomics or for constructing biosensors.

Supported by the Acad. Sci. CR (grants No. KAN400480701 and IQS500110564).

S7.5(O) A01533-04225

Effect of Extracellular Matrix Components on Beating Behavior of Cardiomyocytes and Differentiation Behavior of Stem Cells *in vitro*

Azizi MISKON^{1,2}; Hiroshi UYAMA³;
Tetsuji YAMAOKA¹

1. Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan
2. Department of Electronic Engineering, University Tun Hussein Onn Malaysia, Johor, Malaysia
3. Department of Chemical Engineering, Osaka University, Osaka, Japan

INTRODUCTION :

Producing autologous beating cardiomyocytes is an attractive goal for cell-based therapy. The crucial part is how to differentiate cells to cardiomyocytes *in vitro* and how to maintain the beating.

In the present study, the effect of gelatin, collagen type I, and fibronectin on the differentiation of murine embryonal carcinoma (EC) stem cells (P19.CL6) and rat bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs) to beating cardiomyocytes were studied. P19.CL6 cells and rBMSCs were treated with differentiation medium on gelatin-, collagen type I-, fibronectin-coated and noncoated polystyrene dishes. The effect of these substrates on the beating duration of rat neonatal cardiomyocytes was also investigated, and their differentiation efficiency was evaluated, along with intracellular cardiac marker genes (troponin T type-2 and troponin C type-1), and a cardiac differentiation marker gene (troponin C type-2).

MATERIALS AND METHODS :

rBMSCs and P19.CL 6 were used for evaluating the differentiation behavior. rBMSCs were isolated from Sprague-Dawley (SD) rats (4-week-old, and 1 to 2-days-old).

rBMSCs were induced with our suspension induction. Our suspension induction is as follow: Suspension of rBMSCs (1.0×10^5) at the 4th passage was treated with inducers (10 μ M 5-azacytidine, 300 μ M vitamin-C, and 0.025 mg/mL human b-FGF) for 2 hours under floating condition in an incubator. The treated cells were cultured on the given culture dishes in the presence of inducers for 24 hours and

afterward cultured with the normal medium. The beating colonies were counted, and the beating cells and non-beating cells were separately harvested to quantify the expression of cardiac marker genes.

P19.CL6 cells were plated at a density of 3.7×10^5 cells on the given dishes and treated using 1 % dimethyl sulfoxide. The average number of beating colonies on the first day of detection was counted and the expression of cardiac marker genes and cardiac marker gene were evaluated after 11 days of cultivation.

RESULTS AND DISCUSSION :

In the present study, enhanced differentiation of rBMSCs and P19.CL6 to cardiomyocytes were observed on gelatin-coated dish compared to the other conditions. For rBMSCs, at 4 weeks culture on the gelatin-coated dish after the suspension treatment, about 4.5 ± 0.6 colonies with the size of 400-500 μ m consisting of beating cells were found in each 6 cm dishes. The mRNA level of troponin-T type-2 and troponin C type-1 in the beating cells was much higher than for non-beating cells and was at the similar level to the rat neonatal heart-derived cardiomyocytes. The enhanced differentiation of P19.CL6 cells was also observed on gelatin-coated dishes.

The mechanism of the enhanced differentiation on gelatin-coated substrate is unclear but the mechanical properties (elasticity) and biological activity of the substrates might be influential. The fast differentiation on gelatin- was possibly because of slow cell proliferation on high dynamic storage modulus substrate. These results show that, gelatin was the best substrate for cardiac cell manipulation.

S7.6(O) A01995-04506

Cell-Biomaterial Interaction Study on Different Chemically Modified Poly (L-Lactic Acid) Surface with Relatively Low Cell Seeding Density

Yun XIA; Jie PAN; Subbu VENKATRAMAN;
Freddy BOEY

School of Materials Science and Engineering, Nanyang Technological University, Singapore

Endothelial cell interaction with polymer substrate was intensively studied. Surface chemistry and roughness are two main factors influencing EC-biomaterials interaction. Most of in-vitro studies were done with cell seeding density of 10×10^4 to 20×10^4 cells/cm². Our group speculates this high cell seeding density promotes cyto-compatibility and masks cell-biomaterials interaction at initial contact. In this study, we employed cell seeding density of 5000 cells/cm² to study cyto-response to poly (L-lactic acid) modified by different functional molecules.

高コレステロール血症治療を目指した siRNA デリバリー

○鎌田和加子^{1,3}、橘 洋一¹、姜 貞勲¹、斯波真理子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 バイオサイエンス部

yamtet@ri.ncvc.go.jp

【目的】家族性高コレステロール血症は LDL 受容体遺伝子の欠損あるいは半欠損が原因で起こる遺伝病である。日本人においては、ヘテロ接合体が、500 人に 1 人と高頻度である。ホモ接合体では、比較的年齢の若い時期に循環器系の疾患をきたす可能性が高く、30 代までの生存率は極めて低い。さらに、このような患者では、既存の治療法では十分な治療効果が得られない、あるいは、1 回の治療に数時間かかるなど、身体的、時間的、経済的負担は大きい。これまでに、肝細胞に正常な LDL 受容体を発現させる遺伝子治療も試みられたが、十分な治療効果は得られていない。

そこで、siRNA を用いて、VLDL 主要蛋白であるアポ蛋白 B の合成を阻害することで、血中 LDL 濃度を減少させる検討を進めている。本研究では、VLDL 合成の場である肝実質細胞へ siRNA を効率よく送達するために肝指向性分子としてプルランを選択した。

【実験】プルランは、食品産業で添加物として広く使用されており、血中に投与されると肝臓へ分布することが報告されている¹⁾。そこで、プルラン修飾 siRNA (Pullulan-siRNA) およびプルラン修飾カチオン性キャリア (Pullulan-カチオン性キャリア) を合成し、表 1 に示した組み合わせの条件で、マウス肝細胞を *in vitro* にて、24 時間処理し、その後、ApoB の mRNA 量を RT-PCR にて評価した。なお、siRNA 分子の配列は既報に従った²⁾。

【結果と考察】まず、50nM の Pullulan-siRNA、および、未修飾 siRNA を、カチオン性キャリアを用いて肝細胞に導入した。その結果、いずれの場合も、ApoB の発現を同程度に抑制し、siRNA 効果を保持したままの化学修飾が可能であることが示された。一方、ポリカチオンを用いず同濃度で検討した結果、発現抑制は認められず、現在、発現抑制効果に及ぼす、siRNA 濃度や処理条件の影響について検討を進めている。

表1 組み合わせ条件

siRNA	Pullulan	カチオン性 キャリア
Pullulan-siRNA		+ カチオン性 キャリア
siRNA	+ Pullulan-カチオン性キャリア	
Pullulan-siRNA		no

参考文献

- 1) Yamaoka, T, *et al.* Body distribution profile of polysaccharides after intravenous administration. *Drug Delivery* 1, 75-82 (1993).
- 2) Soutschek, J, *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-178 (2004).

細胞内シグナル応答型遺伝子送達システムとバイオナノカプセルとの融合による肝癌細胞選択的遺伝子デリバリー

◎姜 貞勲^{1,2}、大石 潤¹、山岡 哲二²、新留 琢郎¹、片山 佳樹¹
1九州大学大学院工学研究院応用化学部門分子
2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
jrjhkang@ri.ncvc.go.jp

疾病に特異的な遺伝子を発現させる手法は遺伝子治療において最も重要な課題の一つである。これは細胞を死滅させる薬理活性の強い治療用遺伝子においては、特に重要である。疾病特異的な遺伝子送達の主な戦略は、疾病細胞特異的なリガンド分子を利用するアクティブターゲティング法と疾病細胞特異的なプロモーターを搭載したプラスミド DNA (pDNA) を利用する手法である。最近、我々は、これと全く異なる新しい疾病細胞特異的な遺伝子送達の戦略として、疾病細胞内に存在するシグナル伝達経路の異常を認識する遺伝子転写制御システムを開発した。このシステムは疾病細胞に過剰発現している特定の細胞内シグナル（プロテインキナーゼまたはプロテアーゼ）に応答して遺伝子を発現させるものであり、既に、癌細胞および組織への選択的遺伝子デリバリーに成功した。

本研究では、細胞内シグナル応答型遺伝子送達システムにヒト肝炎ウイルス由来のバイオナノカプセル (BNC) を融合することで、肝癌細胞選択的遺伝子送達システムを構築した。まず、癌で異常発現し、正常組織では発現していないプロテインキナーゼ C α (PKC α) を癌細胞の標的マーカーとして選択した。PKC α 応答型遺伝子送達システムのために、PKC α 選択的カチオン性ヘフチドと PEG を担持した親水性ポリマー (NPEG) を合成した。さらに、ポリマーと pDNA の複合体 (NPEG/pDNA) に、リボソームを介して BNC を結合した (NPEG/pDNA/BNC)。

NPEG/pDNA/BNC を用いた肝癌細胞 (Huh7) への遺伝子導入実験では、遺伝子発現が確認できたが、正常ヒト肝細胞および大腸癌細胞では発現が抑えられた。さらに、組織への導入でも、Huh7 担癌マウスからは遺伝子発現を確認したが、正常組織および他の癌組織 (A131 ヒト扁平上皮癌と A549 肺癌) からは遺伝子発現を示すような結果は得られなかった。

以上の結果から、細胞内シグナル応答型遺伝子送達システムに BNC を融合することで、肝癌細胞選択的遺伝子デリバリーに成功した。本システムは、組織選択的リガンド分子およびホーミングヘフチドとの結合により、種々の組織に対する組織選択性と疾病選択性を高めることが可能であると考えている。

高コレステロール血症治療を目的とした糖修飾 カチオン性キャリアによる siRNA デリバリー

国循環病セ研 生体工学部¹・バイオサイエンス部²、阪大院薬³

○ 鎌田和加子^{1,3}、橋 洋一¹、宮田 浩子²、
斯波真理子²、小比賀 聡³、山岡 哲二¹

【目的】家族性高コレステロール血症は、LDL 受容体遺伝子の欠損あるいは半欠損が原因で起こる常染色体優生遺伝病で、日本の総患者数は 25 万人以上と極めて頻度の高い疾患である。既存の薬剤による治療法では十分な治療効果が得られず、LDL-アフェレーシスは、QOL の低下が避けられない。そこで、siRNA を用いて、VLDL 主要蛋白であるアポ蛋白 B の合成を阻害することで、血中 LDL 濃度を減少させる検討を進めている。本研究では、VLDL 合成の場である肝実質細胞へ siRNA を効率よく送達するために siRNA、および、siRNA カチオン性キャリアに対して肝指向性糖修飾を行った。

【実験】肝指向性糖分子として、肝臓へ分布しやすいことが報告されているプルランを選択した¹⁾。そこで、組成の異なるプルラン修飾 siRNA(Pull-siRNA)、および、プルラン修飾カチオン性遺伝子キャリア(Pull-GC)を、それぞれ 6 種類(Table1)、12 種類合成した。脱水 DMSO 中でプルランと CDI を室温で 6

Table1. Synthesis of Pull-siRNA

sample	pullulan (μmol , unit)	CDI (μmol)	siRNA (nmol)	DMSO (μl)	DEPC (μl)
A	1.08	0.0542	3.25	60	440
B	1.08	0.542	3.25	60	440
C	0.108	0.0542	3.25	60	440
D	0.0108	0.00542	3.25	60	440
E	0.0108	0.00542	3.25	50	0
F	0.0108	0.00542	3.25	0	50

時間反応後、siRNA、または、ポリカチオンを加えた。その後、Pull-siRNA は 40 °C で 2 日間攪拌し、Pull-GC は 24 時間室温で攪拌した。マウス肝細胞 NMuLi を Pull-siRNA にて、24 時間処理後、ApoB の mRNA 量をリアルタイム PCR にて評価した。さらに、C57BL/6 マウスの尾静脈より、

Pull-GC と siRNA の複合体を投与し、24、48、72、96 時間後の総コレステロール値により Pull-GC を評価した。なお、siRNA 分子の配列は既報に従った²⁾。

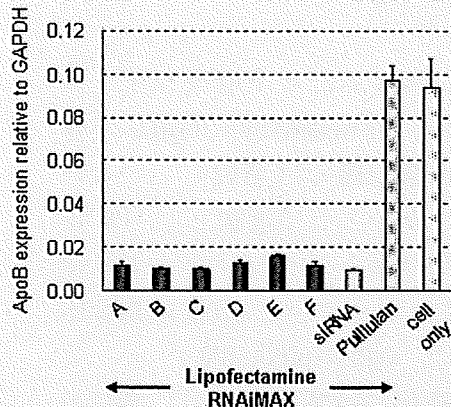


Fig. 1. Expression of ApoB mRNA in NMuLi cells treated with Pull-siRNA using Lipofectamine RNAiMAX for 24 hours. Pull-siRNAs (■), unmodified siRNA (□), without siRNA (▨) and cell only (□).

【結果と考察】50nM の Pull-siRNA、および、未修飾 siRNA を、カチオン性キャリアを用いて肝細胞に導入した結果、いずれの場合も、ApoB の発現を同程度に抑制し、siRNA 効果を保持したままでの化学修飾が可能であることが示された(Figure.1)。一方、ポリカチオンを用いずに 50nM、および、250nM で検討した結果、いずれの場合も発現抑制は認められず、現在、発現抑制効果に及ぼす、siRNA 濃度や処理条件の影響について検討を進めている。発表では、Pull-GC の in vivo での評価についても併せて報告する。

参考文献

- 1) Yamaoka, T, *et al.* Body distribution profile of polysaccharides after intravenous administration. Drug Delivery 1, 75-82 (1993).
- 2) Soutschek, J, *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. Nature 432, 173-178 (2004).

Hepatocyte specific siRNA delivery for treating familial hypercholesterolemia.

Wakako Kamata^{1,3}, Yoichi Tachibana¹, Hiroko Miyata², Mariko Shiba², Satoshi Obika³, Tetuji Yamaoka¹ (1Department of Biomedical Engineering, 2Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute, 3Graduated School of Pharmaceutical Science, Osaka University)

Tel; 06-6338-5012 (Ext. 2637), Fax; 06-6835-5476, e-mail; yamtet@ri.ncvc.go.jp

1) 移植細胞の in vivo トラッキングを可能にする水溶性 MRI 造影剤

(国立循環器病センター) 〇橋 洋一、飯田秀博、山岡哲二
(大阪工業大学) 東 晃至
(関西大学) 平野義明

yamtet@ri.ncvc.go.jp

Tel:06-6833-5012 (内 2637) Fax:06-6835-5476

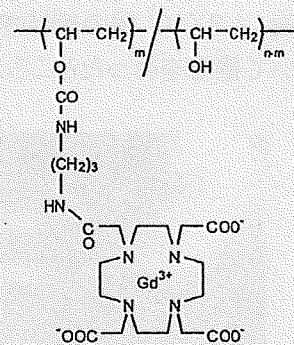
【緒言】

近年、細胞移植治療が数多く検討され、心筋障害モデルに対する心筋細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、平滑筋細胞、骨髄細胞などの移植では、心室壁の菲薄化、心拡大の制御による心機能の改善が報告されてきた。しかし、臨床研究の優れた治療効果が報告され手居る反面、組織再生における移植細胞の分化、可塑性、融合など、径時的な作用機序は解明されていない。現在では、更なる治療の効率化と安全性の向上のために、回復過程の正確な追跡と診断の重要性が指摘されている。

本研究では、移植細胞の追跡と組織再生のイメージングを目指して、MRI(Magnetic Resonance Imaging)に着目した。新たな細胞追跡用 MRI 造影剤を開発し、間葉系幹細胞などの標識手法を確立することで、移植細胞のトラッキングシステム開発を進めている。分子量の異なるポリビニルアルコール側鎖に既存の MRI 用造影剤を導入した高分子-造影剤コンジュゲートを合成し、その造影剤としての諸特性を検討した。また、得られたコンジュゲートをラット間葉系幹細胞内へ導入し、細胞内における造影剤の挙動及び造影剤を導入した細胞の評価を行った。得られた新規造影剤を用い、ラット間葉系幹細胞を標識し、下肢虚血モデルラットに移植した後に、MRI による細胞追跡を行った。

【実験】

分子量の異なるポリビニルアルコールに対して、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、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、MRI 用高分子造影剤を合成した(右図)。得られたコンジュゲートの MRI 用造影剤としての評価を行った。また、細胞内への導入方法として、電位ポレーション法を用いた。本コンジュゲートを NIH-3T3 細胞へ導入し、細胞のラベル化に対する分子量の効果について検討した。また、ラット間葉系幹細胞内に導入し、ポリマーの細胞内挙動(分化能・増殖能)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。虚血モデル作成後、 1.3×10^7 個の造影剤内包細胞をスポンゼル上に播種し、スポンゼルごと移植を行った。移植細胞の MRI(1.5 T) 観察を行うと同時に、レーザードップラーを用いて血流の回復過程を検討した。



【結果・考察】

移植細胞を追跡するために、ポリビニルアルコールを主鎖とし、側鎖にガドリニウムを中心金

属としたキレートを有する、長期細胞ラベル化用 MRI 造影剤 (PVA-Gd) を開発した。NIH-3T3 細胞へのラベル化では、造影剤の分子量の変化による差はほとんど見られなかった。ラット間葉系幹細胞への導入を行い、造影剤内包細胞を用いて細胞増殖、造影剤の細胞内滞在性、分化能について検討を行った。その結果、造影剤は細胞内に効率良く導入され、細胞内に少なくとも 10 日間安定に存在することがわかった (Fig. 1)。また、細胞内に造影剤を導入した状態で骨芽細胞へと分化誘導が可能であった (Fig. 2)。これらの結果より、細胞内に導入された高分子造影剤は、細胞の機能に対して影響をほとんど与えないことがわかった。

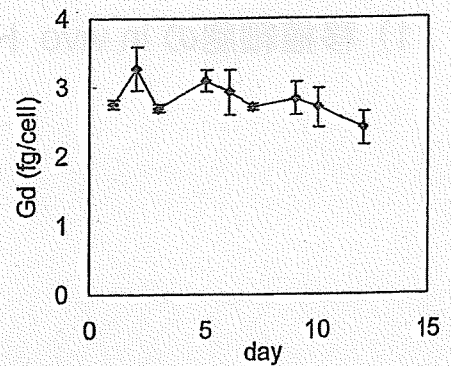


Fig. 1. Stability of PVA-Gd in Rat MSCs after electroporation.

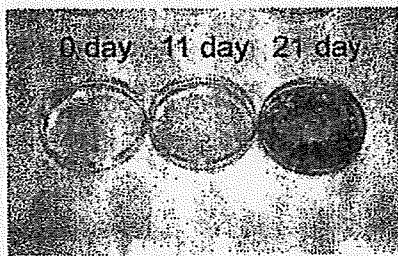
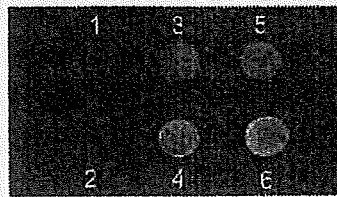


Fig. 2. Osteogenesis of rMSCs labeled with PVA-Gd



1. 2 wt% Agarose
2. 1×10^6 cells +Gel
3. 5×10^6 cells +Gel
4. 7.5×10^6 cells +Gel
5. 1×10^7 cells +Gel
6. 2×10^7 cells +Gel

Fig. 3. MR images of the cells labeled with PVA-Gd in the agarose gel were obtained at 1.5 T. T1-weighted images of the samples were acquired using a 3D spin echo sequence.

さらに、造影剤が導入された細胞の数を変化させ、*in vitro*におけるMRI撮像を行った (Fig. 3)。測定した TR の条件下では、細胞の増加と共に、コントラストの差が明確に現れた。しかし、細胞数が 1×10^6 個の場合、コントロールとほぼ同じであった。この結果より、1.5 T の MRI 装置を用いて、ゲルに内包された細胞をイメージングするためには、 5×10^6 個以上が必要であることがわかった。また、ラットの大腿動静脈を結紮・切除し、下肢虚血モデルラットを作成した。虚血モデル作成後、 1.3×10^7 個の細胞をスポンゼルに播種し (Fig. 4 左) 移植を行った。動物用 MRI (1.5 T) を用いて撮像を行ったところ、*in vivo*においても移植した細胞を観察することができた (Fig. 4 右)。

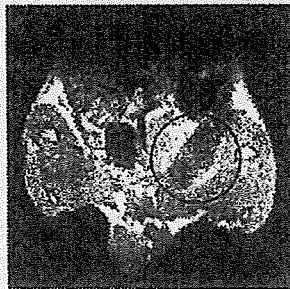
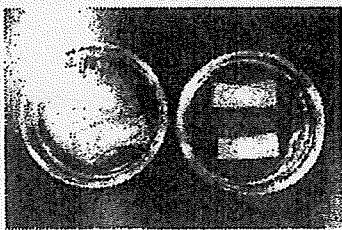


Fig. 4. *In vivo* T1-weighted MR measurements of PVA-Gd in the rMSC (T4) at 1.5 T, using ischemic rat model. Sponge was used as a scaffold. Sequence: spin echo, coronal, slice 1 mm, TR=1500

以上より、非浸襲的に移植細胞の *in vivo* での評価ができること、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、厚生労働科学研究賞補助金「医療機器開発推進研究事業」によるものである。

6) 新規 MRI 造影剤で標識した幹細胞の虚血部移植と in vivo トラッキング

(国立循環器病センター研究所、1.生体工学部、2.放射線医学部)

○山岡 哲二¹・橘 洋一¹・カルロス アグデロ¹・飯田 秀博²

E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

Tel: 06-6833-5012 Fax: 06-6835-5476

【緒言】 近年、心疾患あるいは循環器疾患に対して、心筋細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、平滑筋細胞、骨髄細胞などの、自己細胞を移植する検討が精力的に行われている。臨床例においても著効例が報告され、心室壁の菲薄化や心拡大の抑制と心機能の改善が報告されている。しかしながら、注目を集める成功例の報告の反面、組織が再生したメカニズムの検討は進んでいない。移植細胞の生着率は10%以下ともいわれ、移植細胞が生存する期間、目的の機能細胞へ分化する可能性、移植部位での細胞との融合など、可能性が示唆されているに過ぎず、実証されてはいない。本研究では、移植細胞の追跡と組織再生のイメージングを目指して、MRI(Magnetic Resonance Imaging)に着目し、新たな細胞追跡用 MRI 造影剤の開発し、移植細胞のトラッキングを目的とする。我々は、水溶性に優れ、生体成分との相互作用が小さく、ペンダント型キャリアーとして優れているポリビニルアルコール、あるいは、臨床でも利用可能と期待されるデキストランを選択し、臨床でも用いられているガドリニウム系 MRI 造影剤を導入した高分子-造影剤コンジュゲートを開発している。得られたコンジュゲートをラット間葉系幹細胞 (MSC)、および、ラット内皮細胞前駆細胞 (EPC) へと導入し、細胞内における造影剤の挙動及び造影剤を導入した細胞の生存率、分化、増殖を評価した。得られた新規造影剤にて標識した MSC および EPC を、下肢虚血モデルラットに移植した後に経時的に追跡し、血流改善、血管新生の機序解明を進めた。

<実験>

ポリビニルアルコール (DP:1700, DS:98%) あるいは、心疾患に対するデキストランに対して、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、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、MRI 用高分子造影剤を合成した。得られたコンジュゲートの MRI 用造影剤としての基本特性を評価した。また、幹細胞への導入にはエレクトロポレーション法を選択し、標識細胞内での本コンジュゲ-

トの分布や挙動を観察し、長期の安定性についても評価した。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。虚血モデル作成後、 3×10^7 個の造影剤内包細胞の移植を行った。移植細胞の MRI (1.5 T) 観察を行うと同時に、レーザードップラーを用いて血流の回復過程を検討した。

<結果・考察>

選択したエレクトロポレーション方は、MSC に対しても、EPC に対しても、さらに、その他の樹立細胞株に対しても、低毒性で効率よくコンジュゲート分子を送達できた。作成したコンジュゲート分子に少量の FITC を導入してラット間葉系幹細胞にエレクトロポレーション法により導入した後の、細胞内残留量を経時的に測定した結果を図 1 に示した。造影剤は細胞内に長期間安定に存在できるこ

と、また、細胞増殖速度や分可能には影響しないことが明らかとなった。

さらに、造影剤が導入された細胞の数を変化させ、*in vitro* における MRI 撮像を行った。測定した TR の条件下では、細胞の増加と共に、コントラストの差が明確に現れた。しかし、細胞数が 1×10^6 個の場合、コントロールとほぼ同じであった。この結果より、1.5 T の MRI 装置を用いて、ゲルに内包された細胞をイメージングするためには、 5×10^6 個以上が必要であることがわかった。また、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。虚血モデル作成後、 3×10^7 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 (1.5T) を用いて経時的に移植細胞を追跡した結果、生細胞のみを追跡できるシステムであることが証明され、図 2 に示したように、移植細胞を T1 強調画像により明瞭に追跡することに成功した。MSC および EPC の移植部位残存期間は 2 週間程度であり、EPC に関しては、虚血部位へのマイグレーションの可能性が示唆された。本システムは、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。

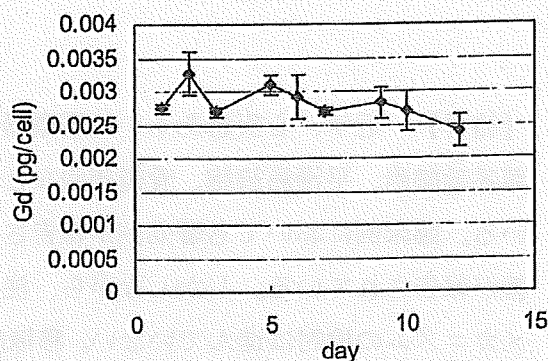


Fig. 1. Stability of FITC-PVA-Gd in Rat MSCs after electroporation.

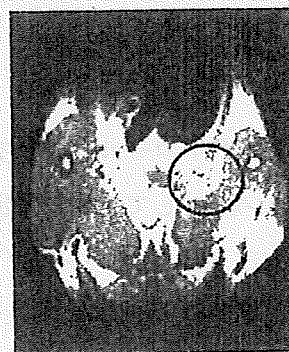


Fig. 2. *In vivo* T1-weighted image of MSC labeled with FITC-PVA-Gd

遺伝子工学的手法を用いた神経再生性マトリックスの作製

○柿木佐知朗^{1,2}、平工香織¹、山岡哲二^{1,2}

¹国立循環器病センター研究所、²JST-CREST

1. 緒言

幹細胞の機能を最大限に発揮した再生医療を実現するためには、それぞれの細胞に応じた最適な細胞外環境を緻密に設計すること、すなわち高機能な人工細胞外基質の開発が重要となる。生体内の細胞外基質では、コラーゲン、エラスチン、ラミニン、プロテオグリカンなど多分子が協同的に高次機能を発現しているため、それらの機能を目的に応じて適宜抽出し、人工細胞外基質を設計することが効果的と考えられる。

本研究では、ラミニンI由来で神経突起伸長活性を有するAG73配列(RKRLQLSIRT)¹⁾とエラスチン骨格配列((VPGIG)_n)^{2,3)}よりなる人工タンパク質の遺伝子工学的手法による合成と神経再生性マトリックスとしての有用性について検討した。

2. 実験

エラスチン骨格配列-ラミニン複合タンパク質 (AG73-(VPGIG)_n) をコードした DNA が挿入されたクローニングベクター(pUC18-(AG73-VPGIG)_n)の作製を介し、最終的に His-tag 配列を有する発現用ベクター(pET-28a+)(His-AG73-VPGIG)_n)を得た。この発現用ベクターで形質転換して得たクローン (*E.coli*[BL21(DE3)pLysS]) を用い、IPTG 添加によって His-AG73-VPGIG)_n の発現を誘導した。得られた粗タンパク質は、His-tag アフィニティーカラムもしくはその感温性を利用した方法で精製を行った。得られた発現タンパク質の *in vitro* 活性は、それをコートしたディッシュに PC12 細胞を播種後に NGF によって分化させ、その神経突起伸長活性より評価した。さらに、His-AG73-VPGIG)_n を複合した神経再生性マトリックスの作製も試みた。

3. 結果と考察

今回作製した pET-28a+)(His-AG73-VPGIG)_n)によって形質転換されたクローンから、IPTG 添加によって His-AG73-VPGIG)_n を発現誘導させ、最終的に高純度の目的タンパク質を得ることに成功した。得られた His-AG73-VPGIG)_n は感温性を示し、その上、PC12 細胞の神経突起伸長活性能を有していることが明らかとなった。さらに、His-AG73-VPGIG)_n の発現条件の最適化とそれを用いた神経再生性マトリックスの作製についても検討を行った。

[参考文献] 1) Richard, B.L. et al., *Exp. Cell Res.*, 228, 98 (1996), 2) D. A. Tirrell et al., *Macromolecules*, 32, 1701 (1999).

3) T. Yamaoka et al., *Biomacromolecules*, 4, 1680 (2003).

Preparation of nerve regenerative matrix by genetic engineering

Sachiro KAKINOKI^{1,2}, Kaori HIRAKU¹, Tetsuji YAMAOKA^{1,2,*}

¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, ²JST, CREST, 5 Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan

*Tel: 06-6833-5012(ext2637), Fax: 06-6835-5476, E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

1118 Molecular Signatures Associated with HWSC-Induced Murine Macrophage Cell Line RAW 264.7 Activation

Kyoung-Hee Seo,¹ Dong-Keun Rhee,¹ Dong-Won Jeon,² and Heung Jae Chun^{1*}

¹Department of Cell & Tissue Engineering, Catholic University, Seoul, Korea

²Department of Clothing & Textiles, Ewha Women's University, Seoul, Korea

(*chunhj@catholic.ac.kr)

Chitin is one of the most abundant biopolymer in the nature, found in the exoskeleton of crustaceans, the cuticles of insects, and the cell walls of fungi. It has many useful biological properties such as biocompatibility, biodegradability, tissue repair property, and antitumor effect. However, the applications of chitin have been limited due to its low solubility in water and most common organic solvents. In this study, highly ordered water-soluble chitin (HWSC) that controlled degree of deacetylation and fractionized single-size about 300,000 MW treated on murine macrophage cell line RAW 264.7. In morphological studies, RAW 264.7 cells treated with HWSC were altered the classical morphology of activated macrophage. After 4 hr almost 80% RAW 264.7 cells treated with HWSC were shown to be activated morphology and after 12 hr start mature form. We also performed microarray analysis to examine the global changes in gene expression induced by HWSC. Comparisons of transcripts that were either up-regulated or down-regulated more than two-fold revealed that 2600 genes distinguish the cell lines treated with HWSC time course from the untreated RAW 264.7 cells. These results suggest that HWSC induces macrophage morphological alteration and exchanges gene expression patterns in RAW 264.7 cells.

1120 Myocardial Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells on Various ECM Proteins

Tetsuji Yamaoka,¹ Azizi Miskon,^{1,2} and Hiroshi Uyama^{2*}

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

²Division of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, Japan

(*yamtet@ri.ncvc.go.jp)

Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) are the attractive cell sources for the recently growing cell transplantation therapy. We have been focusing on autologous cell transplantation for the myocardial infarction. Transplanting the beating cardiomyocytes derived from BMSCs is promising strategies but the cardiac differentiation of the BMSCs is not clearly proved. Wakitani et al. reported that murine BMSCs were expressed cardiac marker gene by treating with DNA-demethylating agent 5-azacytidine. On the contrary, other groups reported 5-azacytidine not to be able to induce the myocardial differentiation of BMSCs under the same condition. In the present study, new induction protocol for BMSC differentiation into spontaneously beating cardiomyocytes was developed. Rat BMSCs were isolated and cultured on the fibronectin coated dish until 4th passage. The BMSCs were treated with the induction medium (5-azacytidine, vitamin-C and human FGF) under the conventional monolayer condition or by our original suspension method. The expression level of the cardiac marker gene, such as TNNC1, TNNC2, TNNT2, TNNT3, of the BMSCs treated by our suspension method is much higher than that for the conventional method. In addition, beating cell colonies were observed only for the suspension method, and the number of the beating colony was greatly affected by the substrates for the postinduction monolayer culture. Although it is quite difficult to prove the beating cells to be the real cardiomyocyte, our result strongly suggests that our suspension method is promising method for BMSC manipulation.

1119 HWSC Induces Murine Macrophage Cell Line RAW 264.7 Classical Activation and Down-Regulates the Levels of Histone H2A mRNA

Kyoung-Hee Seo,¹ Dong-Keun Rhee,¹ Dong-Won Jeon,² and Heung Jae Chun^{1*}

¹Department of Cell & Tissue Engineering, Catholic University, Seoul, Korea

²Department of Clothing & Textiles, Ewha Women's University, Seoul, Korea

(*chunhj@catholic.ac.kr)

Chitin and its deacetylated derivative, chitosan, have many useful bioactivities such as anti-tumor, anti-fungal, and antimicrobial properties, wound healing-promoting property, serum cholesterol-lowering property, and adsorption property for metal ions. Despite the useful properties, the application of chitin has been limited due to its poor solubility in most common organic solvents. Therefore, water-soluble chitin could be advantageous in biomedical applications of chitin. Recently, a few groups reported that the effects of chitin on immune response are size dependent. In order to manifest the diverse functions of chitin, the molecular weight should be optimally satisfied. In our previous studies, highly ordered water soluble chitin (HWSC) was characterized about 300,000 MW in neutral water and induced murine RAW 264.7 macrophage cell activation. Here, we report that the application of a single-size HWSC fraction with about 300,000 MW induced classical activation in the murine RAW 264.7 macrophage cell, accompanied by induction of associated genes, and resulted in perturbation of histone H2A gene expression. These data suggest that about 300,000 MW HWSC is one of the functional chitin molecules responsible for the immune response, especially macrophage classical activation, in animal cells.

1121 Reconstruction of Millimeter Thick Soft Tissues on Highly Porous 3D Scaffolds

Corrado Mandoli,¹ Barbara Mecheri,¹ Giancarlo Forte,² Francesca Pagliari,² Stefania Pagliari,² Felicia Carotenuto,² Roberta Fiaccavento,² Antonio Rinaldi,¹ Paolo Di Nardo,² Silvia Licocchia,¹ and Enrico Traversa^{1,3*}

¹ NAST Center & Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, University of Rome Tor Vergata, 00133 Roma, Italy

² Laboratorio di Cardiologia Molecolare e Cellulare, Dipartimento di Medicina Interna, University of Rome Tor Vergata, 00133 Roma, Italy

³ International Research Center for Materials Nanoarchitectonics (MANA), National Institute for Materials Science (NIMS), Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan

(*traversa@uniroma2.it, traversa.enrico@nims.go.jp)

The lack of a vascular net and poor perfusion is what mostly prevents 3D scaffolds from being used in organ repair for thick tissue reconstruction. Highly-porous scaffolds made of poly-L-lactic acid (PLLA) were prepared by directional thermally induced phase separation (dTIPS), starting from 1,4 dioxane/PLLA solutions. The influence of polymer concentration and temperature gradient, in terms of imposed intensity and direction, on pore size and distribution was studied by comparison with scaffolds prepared by isotropic TIPS. The processing parameters were optimized to achieve an overall porosity for the 3D scaffolds of about 93% with a degree of interconnectivity over 90%. The resulting pore network was characterized by ordered repetitions of closely-packed dendrite-like cavities, each one showing stacks of 20 μm large side lamellar branches departing from 70 μm diameter vertical backbones, strongly resembling vascular patterns. The *in vitro* biological responses after 1 and 2 weeks were evaluated from mesenchymal (bone marrow stromal) cells (MSC) static culturing. A novel vacuum-based deep-seeding method was developed to improve uniform cell penetration down to scaffold thicknesses of over 1 mm. Biological screenings showed significant 3D scaffold colonization even after 18 hours, while cellular retention was observed up to 14 days *in vitro* (DIV). Pore architecture-driven cellular growth was accompanied by cell tendency to preserve their multipotency towards differentiation. Confluent tissues as thick as 1 mm were reconstructed taking advantage of the large perfusion enhanced by the highly-porous microstructure of the engineered scaffolds, which could successfully serve for applications aimed to vascular net and angiogenesis.

細胞ローリングカラムにより純化した間葉系幹細胞の

表面マーカー密度と分化能力解析

国循セ研 馬原 淳・山岡 哲二[○]

【緒言】間葉系幹細胞 (MSC) は骨、軟骨や脂肪細胞へ分化するのみならず骨格筋や神経細胞への分化も可能であることから細胞移植治療の細胞ソースとして着目され、多くの臨床研究も進められている。しかし、培養皿への接着性により分離される MSC は、分化や表面マーカーの点においてヘテロな集団であることが知られており [1]、未だ homogenous な MSC を分離するための手法は確立していない。我々は固定化したリンガンド上において細胞を回転運動 (細胞ローリング) させることで細胞表面マーカー密度の異なる細胞を分離するカラムシステムを開発している。これは、細胞表面に対するリガンドを固定化した界面上を細胞が回転運動することで、表面マーカー分子の密度によって回転速度が変化するため、カラムからの溶出時間の違いにより分離することができる。これまでに、マウスの大腿骨から採取した MSC を用いて抗 CD34 抗体固定化カラム上での細胞分離挙動を評価した。その結果、抗 CD34 抗体固定化カラムにおいて溶出時間の遅延により複数の細胞溶出フラクションを分離できることが明らかとなった。本発表では、抗 CD34 抗体固定化カラムにより分離した細胞の表面マーカー発現量の解析と、得られた細胞を骨芽細胞分化誘導培地で培養したときの遺伝子発現パターンを解析した。また、分化の成熟度を評価するため、細胞へのカルシウム沈着量をアリザリンレッド S により評価した。

Differentiation potential of MSC subpopulations with different surface marker densities purified by cell-rolling column

Atsushi Mahara and Tetsuji Yamaoka

(Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute)

Key Word; MSC, antibody, cell rolling, column, CD34

Tel: 06-6833-5012 ext 2637 Fax: 06-6835-5476 E-mail: yamtet@ri.nccc.go.jp

Abstract: We develop an antibody-immobilized column for stem cell separation. When the cells injected into the column, continuous interaction between cell surface and immobilized antibody were induced. As the results, cell population with different density of surface marker could be isolated on the column. In this report, crude murine MSCs, which was acquired from the adherent population of bone marrow, were isolated on antiCD34 antibody-immobilized column, and differentiation property of the purified MSCs for osteoblast was evaluated. We suggested that two distinctive cell populations with osteoblastic differentiation ability were found in adherent cell populations from bone marrow

【実験】シリコンチューブ (φ0.5mm) 内腔に導入したポリアクリル酸のカルボン酸基をWSCにより活性化し、抗 CD34 抗体を固定化した。分離する細胞は、マウスの大腿骨から採取した骨髄を培養皿へ播種し、培養皿への接着した分画を crude MSC として用いた。抗体固定化カラムに crude MSC を注入し、シリンジポンプから PBS を流して溶出した細胞懸濁液を 12.5μL ずつ回収した。その後、FACS により溶出細胞数と表面マーカー発現密度を解析した。溶出した細胞懸濁液をフィブロネクチンコートディッシュへ播種し、骨芽細胞分化誘導培地で 1 週間培養した。その後、リアルタイム PCR により分化関連遺伝子の発現を評価した。また、細胞へのカルシウム沈着を Alizarine Red S 溶液により染色し評価した。

【結果と考察】 Crude MSC を抗 CD34 抗体固定化カラムへインジェクトし細胞懸濁液を回収した結果、溶出時間が遅延する溶出ピークが示された。これらのフラクションに含まれる細胞の表面マーカーを FACS で解析した結果、溶出時間が遅延するに従って表面マーカー発現密度の高い細胞が含まれていることが示された。次に、得られた細胞フラクションを 1 週間分化誘導し、分化関連遺伝子の発現を定量した結果、フラクション 3 および 6～8 付近の細胞において骨芽細胞の分化に重要な CBFA1 と Osteopontin の発現が示された (Figure 1)。さらに、Alizarine Red S により細胞を染色すると、CBFA1 と Osteopontin の高いフラクションにおいて強い染色が示された [2]。以上のことから、表面マーカーの発現密度は分化能力の違いによって異なることが示

された。特に、crude MSC を CD34 の発現密度によって分離することで、骨芽細胞へ分化しやすい 2 つのポピュレーションを分離することに成功した。これらの細胞は、未分化な MSC と分化の段階が進行した骨芽前駆細胞であると考えている。

【参考文献】

1. Phinney DG, Hill K, Michelson C, DuTreil M, Hughes C, Humphries S, Wilkinson R, Baddoo M, Bayly E. 2006. *Stem Cells* 24(1):186-98.
2. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M and others. 1997. *Cell* 89(5):755-64.

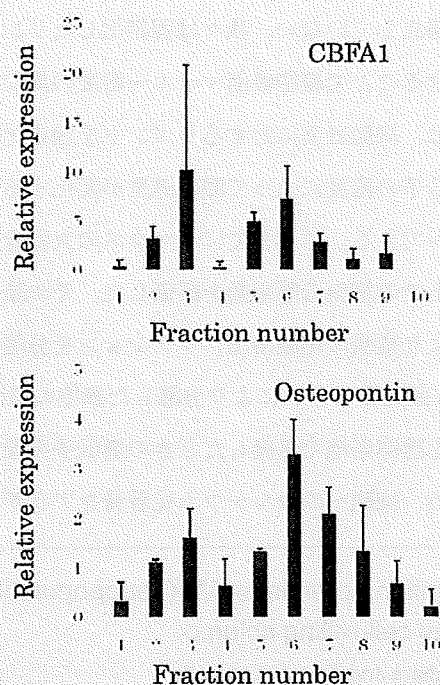


Figure 1 Relative expression of CBFA1 or osteopontin mRNA normalized by GAPDH.

特異的細胞ローリングを誘起する界面構造の設計と細胞分離効率

馬原 淳*・岡田 華奈***・市川 翔子***・森反 俊幸**・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

**鈴鹿医療科学大学 医用工学部 臨床工学科

要旨

我々は、リガンドを固定化した界面により幹細胞を分離する細胞分離カラムシステムを開発している。これは細胞が固定化リガンド上を回転運動(細胞ローリング)することで、抗体発現密度の違いにより細胞ポピュレーションを分離することができる。しかし分離精度の向上には、細胞表面とリガンド界面における特異的相互作用が重要であり、固定化リガンドの配向制御や非特異的な相互作用を低減できる界面設計が必要となる。本発表では、金表面ならびにガラス表面に抗体を単層固定化した種々の界面を作製し、表面性状の評価ならびに細胞分離挙動について評価した。シランカップリング剤によりガラスキャピラリーにアミノ基を導入し、抗体を単層で固定化した。この表面で細胞を分離した結果、細胞ローリングに由来するフラクションを分離することができた。発表では、他の界面構造と分離精度について評価した結果も併せて報告する。

1. はじめに

リガンドが固定化された界面上を細胞が流れる場合に観察される回転運動(細胞ローリング)は、細胞表面と固定化されたリガンドとの連続的な相互作用により誘起される¹。これは、血管内皮細胞に提示されるセレクトインと白血球の表面に提示される糖鎖との相互作用により炎症局所へ白血球がホーミングする現象として有名である。我々はこの現象を、微量量の細胞診断技術や検体となる細胞を非標識で高速分離できるシステムの開発へ応用することを目指している。とりわけ、間葉系幹細胞(MSC)は細胞移植治療の細胞ソースとして着目されており、細胞移植による良好な治療成績も報告されている²。このため移植細胞の迅速診断や分離・精製技術は、細胞移植治療の新たな治療戦略を構築するためにも重要な技術となる。

本研究では、細胞が効率的に細胞ローリングできるための抗体固定化界面の設計として、金修飾表面ならびにガラス表面に種々の方法で抗体を固定化した界面作製し、表面の抗体固定化量と細胞分離挙動について評価した。細胞と界面との非特異的な相互作用は、効率的な細胞ローリングの阻害や、非特異的な細胞の吸着を引き起こし、分離や分析において S/N 比の低下を引き起こす。そこで、金表面への抗体固定化法としてアルカンチオールによる自己組織化膜を構築し抗体を固定化した。一方、ガラス表面へは、種々のシランカップリング剤を選択した。非特異的な相互作用を低減させる目的で、尿素またはフッ素を含むシランカップリング剤を混合し、界面を構築した。本研究では、構築した表面の構造ならびに、間葉系幹細胞(MSC)を用いて、抗 CD34 抗体を固定化したリガンド固定化界面における細胞分離挙動について評価した結果を報告する。

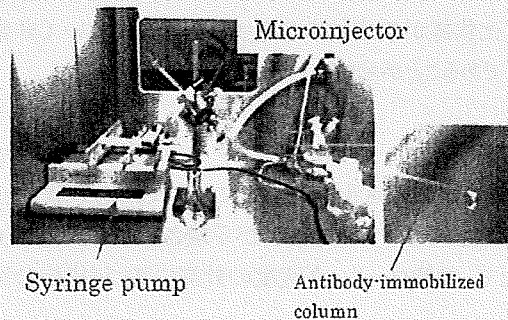


Figure 1 Cell separation system. Glass capillary were connected with syringe pump.