

2. 方法

細胞を分離するためのキャピラリーとして、内径が0.5mm、長さが10cmに対してシランカップリング剤により官能基を導入した。硫酸により洗浄したガラス表面に対して、0.2Mの3-(2-aminoethylamino)propyltriethoxysilane/EtOH溶液を加え、室温で5時間インキュベートし、EtOHで洗浄することでアミノ基を導入した。また、同様の手法によって尿素やフッ素を75%含むシランカップリング剤の混合溶液により表面修飾したキャピラリーも作製した。表面への官能基の導入は、接触角測定とX線光電子分光法(XPS)により評価した。その後、disuccinimidyl tartarateで活性化して抗マウスCD34抗体を固定化し、C57BL/6の骨髄細胞から採取した粗精製のMSCを流すことで、細胞分離プロファイルを検討した。

3. 結果

アミノ基を導入したキャピラリー界面でのXPS分析の結果をFigure 2(A)に示す。シランカップリング剤の処理によりアミノ基由来のピークが400eV付近で観察された。また、蛍光標識抗体を固定化することで、ガラス界面で均一な蛍光発光を観察したことから、この手法により抗体をガラスキャピラリー内腔に均一に導入できたものと考えている。次に、この界面にマウス由来のcrude MSCを流した結果、Figure 2(B)で示すような溶出パターンを得た。抗体を固定化していない条件と比較して、溶出時間が遅延するピークを確認できた。ことから、細胞が固定化抗体と特異的に相互作用することで細胞ローリングしたものと考えられる。

4. 議論

シランカップリング剤で固定化された抗体により、細胞ローリングに由来する溶出時間遅延の細胞フラクションを確認することができた。しかしその割合は全体の10%程度であった。また、細胞が非特異的に吸着することによる回収率の低下も確認されことから、界面における抗体の固定化状態が効率的な細胞ローリングにおいて非常に重要であることが示唆された。

5. おわりに

抗体を単層で固定化した界面において細胞分離プロファイルを検討した結果、MSCは抗体固定化界面上を細胞ローリングできる事が示唆された。非特異的な細胞の吸着や抗体固定化密度をコントロールすることで、細胞ローリング速度の計測に基づく細胞分析デバイスの構築が可能であると考えている。

参考文献

1. A. W. Greenberg, D. K. Brunk and D. A. Hammer, Cell-Free Rolling Mediated by L-selectin and Sialyl Lewis^x Reveals the shear Threshold Effect, *Biophys. J.* 79, 2391-2402 (2000)
2. Y. Miyahara, N. Nagaya, M. Kataoka, B. Yanagawa, K. Tanaka, H. Hao, K. Ishino, H. Ishida, T. Shimizu, K. Kangawa, S. Sano, T. Okano, S. Kitamura, H. Mori, Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction, *Nat. Med.* 12, 459-465 (2006)

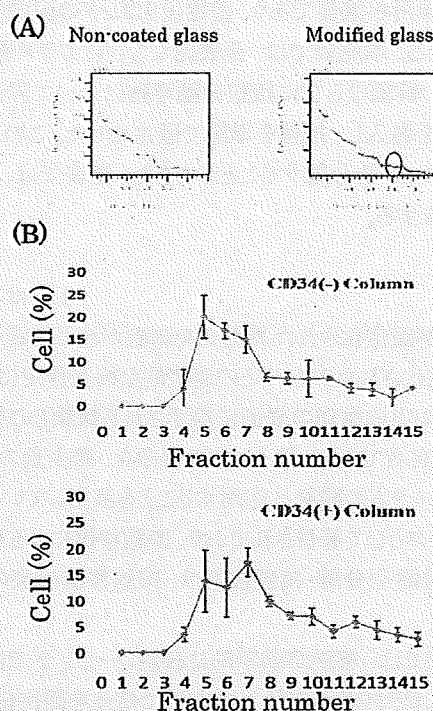


Figure 2 (A) XPS analysis of non-coated or modified glass. (B) Elution pattern of MSCs on anti-CD34 immobilized column.

ス調節方法の開発を試みた。実験方法) ジャックフルーツの種子から、ヒンジ部位の糖鎖であるガラクトース-ガラクトサミン配列を認識するジャカリンを精製した。ヒト末梢血単核球およびTリンパ球、Bリンパ球を分離し、培地に精製したジャカリンを添加し数日間培養し、培地中のサイトカインおよびIgA抗体産生量を測定し、リンパ球の増殖が見られたが、ヘルパーT細胞のバランスが抗体産生の抑制に働き、その結果B細胞のIgA産生も抑制される結果が得られた。以上の結果から、未分化T細胞の分化誘導がジャカリンによって制御可能で、IgA腎症治療に効果が期待できることが明らかになった。

2I2-2₍₁₂₆₎ 細胞外マトリックスにおける間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導制御

馬原 淳, アジジ ミスコン, 山下 敦, ○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

重症心不全の新規治療法として再生医療が注目されており、心筋への細胞移植による心機能の改善も臨床において報告されている。間葉系幹細胞(MSC)は心筋細胞へ分化できることから心不全における細胞ソースとして期待されるものの、その分化誘導効率は低いため十分な治療効果を期待することが難しい。そこで我々は*in vitro*においてMSCから心筋細胞を効率的に分化させることを目的としてMSCが接着する細胞外マトリックスに着目し、心筋細胞への分化誘導制御効果について検討した。*In vivo*において幹細胞の分化は、細胞がおかれた微小環境(ニッチ)により制御されており、液性因子のみならず細胞外マトリックスの分子構造やその物理的性質も分化に寄与している。そこでMSCが接する基材界面としてコラーゲン、フィブロネクチン、ゼラチンを選択し、MSCから心筋細胞への分化を行った。5-azacytidine (10 μM)、アスコルビン酸 (300 μM)、FGF (25ng/ml)を含む培地によりSD ratの骨髄から調製したMSCを懸濁状態(2時間、37℃)で分化誘導し、種々の基材界面で細胞を培養した。その結果、培養3週間後において拍動する細胞コロニーが観察され、特にゼラチン界面で培養した細胞では他の界面と比較して約3.5倍程度の高いコロニー数を認めた。遺伝子発現解析においても心筋細胞マーカーのTroponin T発現を確認したことから、得られたコロニーが心筋細胞を含む細胞ポピュレーションであると考えている。以上の結果より細胞外マトリックスは、MSCから心筋細胞への分化誘導を制御できる可能性が示唆され、ゼラチン界面は心筋細胞への効率的な分化誘導プロトコルの構築に重要な因子であることを見出した。

2I2-3₍₁₆₂₎ エラスチンファイバーマトリックスを用いる血管平滑筋細胞の培養評価

○小西 綾子, 稲熊 章誠, 水谷 直紀, 石原 千明, 宮本 啓一, 堀内 孝
三重大学大学院 工学研究科 分子素材工学専攻 生体材料化学研究室

背景) 冠動脈の動脈硬化は心筋梗塞の原因となるため、代替となる小口径人工血管の開発が望まれている。小口径人工血管開発の最大の問題点である血栓生成を防ぐためには、組織再生誘導による人工血管を開発することが有効であると考えられる。血管は内膜・中膜・外膜の三層から構成されており、その中でも主にエラスチンと平滑筋細胞からなっている中膜は血管の大きな特徴の一つである収縮を担っている。そのため、中膜の構造を再現することが重要であると考えられる。目的) 本研究は組織再生誘導による人工血管の開発を目的とし、特に動脈中膜の再生に適した材料と、血管平滑筋細胞を用いたその培養方法の評価を行った。実験方法) 血管中膜構造はエラスチン弾性構造が同一方向に配向したファイバースト構造の上に平滑筋細胞が存在する微細構造を有している。この構造的再現のため、エレクトロスピンニングによるエラスチンファイバーからなる集積シートを作成した。このシートを用いた平滑筋細胞の三次元培養を、動的状態(伸展刺激)および静的状態で行い細胞形態や分化誘導の程度を検討した。結果・考察) エラスチンファイバーはその作成方法により配向性を調節でき、その繊維に沿って平滑筋細胞の配向性が決定していることがわかった。その際の平滑筋細胞の形態も繊維に沿った中膜構造組織様形態になった。更に、伸展刺激による再生誘導の効果も基材により分化誘導の程度が大きく異なることもわかり、エラスチンファイバーによる有膜組織再生機材として有効性が明らかになった。

2I2-4₍₁₂₇₎ 繊維性 Scaffold 上における細胞挙動の可視化

○野中 一洋*¹, 矢口 俊之*², 野口 展士*¹, 内田 祐也*¹, 橋浦 匠*¹, 大越 隆文*³, 福井 康裕*¹, 舟久保 昭夫*¹

*¹東京電機大学大学院, *²ミシガン大学医学部, *³津田沼中央総合病院

我々は、これまで細胞親和性に優れた細胞の足場(Scaffold)の幾何学的構造を解明するため、基礎評価として、培養状態にある細胞と繊維性 Scaffold から単離させた繊維との関係を一定の時間間隔でタイムラプス撮影し、評価を行ってきた。その結果、細胞に対し非侵襲的に細胞挙動の解析を行うことを可能とした。しかしながら、これまでの評価はあくまで細胞と繊維の相互関係を見ているだけであり、緻密な Scaffold の構造評価とは言い難い。そこで本研究では、細胞の集合体一つの組織とみなし、繊維を密に構築したシャーレ上での細胞移動速度および細胞増殖面積に関して検討を行っ

Poster presentation

P048

DEVELOPMENT OF siRNA CARRIER FOR LIVER TARGETING

Yoichi, Tachibana¹; Wakako Kamata; Jeong-hun Kang¹; Mariko Shiba² and Tetsuji, Yamaoka¹,
¹Department of Biomedical Engineering, and ² Department of Bioscience, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka, 565-8565, Japan.

Recently, there has been an increasing interest in developing various si-RNA therapies. However, si-RNA was unstable in the body. To solve this problem, many cationic carriers were developed to protect the si-RNA. Furthermore, cationic carriers have some functions, such as targeting to the specific tissue, delivering to cells easily, and decreasing the toxicity. It is well known that galactose is endocytosed by galactose receptors of hepatocytes. This endocytic receptor is useful for liver targeting. In this study, we have synthesized cationic carrier for si-RNA delivery which is composed 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA) and 6-o-vinyl adipoyl galactose for targeting liver. Radical polymerization was performed in DMSO using AIBN as an initiator. The reaction was done at 60 °C for 4 hours. After reaction, a mixture was dialyzed with Spectra/Pore membrane (cut-off molecular weight = 1×10^3) and lyophilized. We confirmed that the obtained cationic carriers can make complex with si-RNA for ApoB-1. The hypercholesterolemia can be treated by suppressing ApoB-1 expression level in hepatocytes with the siRNA. The complex was introduced into the hepatocyte, and the expression of ApoB-1 mRNA was measured by RT-PCR method. The effect of DMAEMA / galactose unit ratio on ApoB suppression was investigated, and these cationic carriers can be employed as liver targeting si-RNA carriers.

Presenting Topics:	IV siRNA
Presenting Author:	Yoichi Tachibana
Degree:	Ph. D.
Position:	Research resident
Organization:	Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka, Japan
Tel:	+81-6-6833-5012 ext 2637
Fax:	+81-6-6835-5476
Email:	yamtet@ri.ncvc.go.jp

P-114 Peripheral nerve regeneration using PLA nanofiber conduit modified with neurite outgrowth promoting peptide-oligo (lactic acid) conjugates in the rat

Sachiro Kakinoki^{1,2}, Sho Uchida^{1,3}, Tomo Ehashi^{1,2}, Akira Murakami³ and 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, ³Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585, Japan

Autologous nerve graft has been used for treating injured nerve regeneration. However, the extraction of normal nerve lead to permanent loss of the donor nerve function, and size mismatch between the injured nerve and the graft nerve dimension is also a important problem. Therefore, artificial nerve conduits are widely accepted to bridge the gap between severed nerve stumps as an alternative for nerve transplantation. Poly (L-lactic acid) (PLA) is widely used as the substrate of nerve conduits because of its excellent biodegradability, shaping and molding properties. However, the biological activities are not inherent in PLA.

In the present experiments, amphiphilic conjugates composed of oligo (lactic acid) (OLA; 26 mers) and AG73 (RKRLQVQLSIRT) which is known to promote neurite outgrowth were used to functionalize the surface of PLA conduits. First, OLA was synthesized by direct poly condensation of lactic acid. Then AG73 was synthesized by Fmoc solid phase procedure, and OLA-AG73 conjugate was obtained by the condensation of OLA with the N-terminal of AG73. PLA/OLA-AG73 conduits (length=10 mm, inner diameter=1.0 mm) were prepared by electrospinning procedure and implanted to the 10 mm gap of the rat peripheral nerve, and then, the immunohistochemical analysis and electrophysiological evaluation were performed after 6 months. The results suggested that the PLA/OLA-AG73 conduit enhances the nerve regeneration in comparison with PLA conduit.

[1] Weeks, BS., Nomizu, M., Ramachandran, RS., Yamada, Y., Kleinman, HK., (1998) *Exp Cell Res.*, **243**, 375-382.

[2] Kakinoki, S., Uchida, S., Ehashi, T., Murakami, A., Yamaoka, T., (2009) *Peptide Science 2008*, pp449-450.

Bioactive interface composed of ECM-like peptides on PLA scaffolds for nerve regeneration

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
yamtet@ri.ncvc.go.jp

ABSTRACT SUMMARY

Biomaterials directly contact with cells and tissues through its interface, therefore, the biological properties of biomaterial interface must be controlled in accordance with the purposes. In this study, we designed the bioactive interface on PLA scaffolds using collagen-like or elastin-like peptides (CLP or ELP) with neurite outgrowth promoting sequence. Surface analysis of peptide-coated PLA scaffolds clarified that these peptides stably adsorbed onto PLA scaffold via hydrophobic interaction. Furthermore, neurite outgrowth of PC12 cells was observed on the modified PLA surfaces. These results show that CLP or ELP with neurite outgrowth promoting sequence effectively enhances neurite outgrowth activity on the scaffold interface. The hydrophobic adsorption of CLP or ELP bound to biosignalling molecules has a large potential for interface modification of PLA scaffolds.

INTRODUCTION

A design of bioactive interface on biomaterials is important for the realization of tissue engineering. In the body, cells are involved in the suitable environment consisted of extracellular matrix (ECM) and expressed inherent abilities such as proliferation, migration, and differentiation. That is, biological functions of cells were controlled in surrounding environment, especially, ECM. ECM expresses multi-functions due to different kinds of biomacromolecules such as collagen, elastin, laminin, and proteoglycans, therefore, artificial ECM should be rationally designed as an interface modifier with selection of functions for any purpose. One approach is to construct ECM-like peptides composed of structural and bioactive sequences. In the present experiments, ECM-like peptides composed of the elastin or collagen-like sequences and the laminin-derived neurite outgrowth promoting sequence were prepared in order to construct bioactive interface on PLA scaffolds, and its neurite outgrowth activity was evaluated *in vitro*.

EXPERIMENTAL METHODS

ECM-like peptides were prepared by either chemical or genetic engineering procedures. Peptide composed of neurite outgrowth promoting sequence, which was isolated from the laminin-I (AG73; RKRLQVLSIRT¹), and CLP (AG73-G₃-(PPG)₅) was chemically synthesized by Fmoc solid phase procedure. Another peptide composed of AG73 and ELP (AG73-(VPGIG)_n) was biosynthesized in *E. coli*. (BL21 (DE3) pLysS) transformed with AG73-(VPGIG)_n expression-vector (pET-28a(+)-AG73-(VPGIG)_n)². These peptides were adsorbed onto PLA films in different conditions, and then

surface analysis and neurite outgrowth assay by PC12 cells were performed.

RESULTS AND DISCUSSION

CD spectra of AG73-G₃-(PPG)₅ indicated that this peptide partially forms polyproline-II helix which is hydrophobic and the predominant secondary structure in collagen triple-helix. The surface analysis of the coated samples clarified that AG73-G₃-(PPG)₅ stably adsorbs onto PLA films via hydrophobic interactions. Neurite outgrowth of PC12 cells was improved on AG73-G₃-(PPG)₅ adsorbed PLA films (Fig. 1). On the other hands, genetically engineered AG73-(VPGIG)_n indicated temperature-dependent coacervation which is triggered by the structural transition to β -spiral structure like tropoelastin³. AG73-(VPGIG)_n also adsorbed onto PLA films via hydrophobic interaction with its thermoresponsiveness, and neurite outgrowth of PC12 cells was promoted on this films.

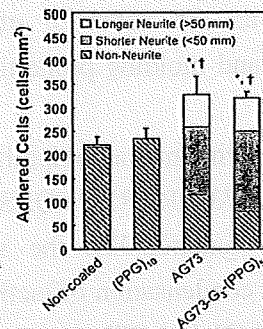


Fig. 1. The number of adhered PC12 cells on CLPs adsorbed PLA films with and without neurites.

* $p < 0.05$ when AG73 and AG73-G₃-(PPG)₅ groups compared with non-coated group, † $p < 0.05$ when AG73 and AG73-G₃-(PPG)₅ groups compared with (PPG)₁₀ group.

CONCLUSION

A design of bioactive interface on PLA scaffolds has been successfully demonstrated by using ECM-like peptides. These peptides stably adsorbed onto PLA scaffold via hydrophobic interaction between structural protein-like regions (CLP and ELP) and PLA surface, and their interface improved neurite outgrowth of PC12 cells. This bioactive interface with ECM-like peptides adsorption is expected to serve a novel technique for controlling the cellular biological properties on PLA scaffolds.

REFERENCES

- Weeks BS, Nomizu M, Ramachandran RS, Yamada Y, Kleinman HK. *Exp. Cell Res.* 243(1998) 375-382.
- Panitch A, Yamaoka T, Fournier MJ, Mason TL, Tirrell DA. *Macromolecules* 32(1999) 1701-1703.
- Yamaoka T, Tamura T, Seto Y, Tada T, Kunugi S, Tirrell DA. *Biomacromolecules* 4(2003) 1680-1685.

065 神経突起伸長活性ペプチド修飾ポリ乳酸
ナノファイバチューブの神経再生能評価

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⁾ JST-CREST、³⁾ 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

柿木佐知朗^{1,2)}、内田 翔³⁾、江橋 具^{1,2)}、
村上 章³⁾、山岡哲二^{1,2)}

修復しきれない末梢神経の損傷・切断が生じた場合、自家神経移植が唯一の対策であるが、再生不全、過誤支配や知覚不全などの後遺症に悩まされる場合が多く十分な治療法とは言えない。そこで、末梢神経の欠損部を連結させるための橋渡しの役目を担う神経誘導チューブの研究が活発に行われている。神経誘導チューブには、生体内分解吸収性、細胞・組織親和性、適度な柔軟性などの特性が求められ、その上、神経再生の際には軸索やシュワン細胞の増殖を促すため内外の物質交換能を保持しつつも外部の結合組織の進入を阻害できる構造を必要とする。本研究では、ポリ乳酸 (PLA) と神経再生性ペプチド複合体のナノファイバよりなる神経誘導チューブを作製し、その神経再生能の評価を行った。PLAは優れた生体内分解吸収性と力学的特性および加工性を有することから組織工学用足場材料として広く用いられているが、細胞親和性に乏しく、かつ特別な生理活性を有していない。すなわち、組織工学用足場材料、とくに神経再生用足場材料としても用いる場合、細胞親和性の向上および神経再生能を付与する必要があるが、PLAは反応性官能基を分子内に有しておらず、その化学修飾は困難である。そこで我々は、PLA系スキャホールドの新たな修飾法として、オリゴ乳酸-生理活性ペプチド複合体を用いた方法を提案してきた。本法は、ポリ乳酸が結晶構造を形成する際に、オリゴ乳酸-生理活性ペプチドのオリゴ乳酸部がその結晶構造に絡み込むような形で混晶を形成することによって安定にポリ乳酸系スキャホールドを機能化するものである。本報告では、オリゴ乳酸-ラミン由来神経突起伸長活性ペプチド複合体 (OLA-AG73) を合成、エレクトロスピンニング法によってPLA/OLA-AG73ナノファイバを基材としたチューブを作製し、それをういてラット坐骨神経欠損部 (1.0 cm) を接合することによって神経再生能を評価した。その結果、PLA/OLA-AG73ナノファイバチューブは、シリコンやPLAのみよりなる同構造体と比較して明らかな神経再生促進効果が認められた。

066 ヒアルロン酸とコラーゲンを基材とした
上皮成長因子含有創傷被覆材の開発

北里大学医療衛生学部人工皮膚研究開発センター

鈴木龍介、松本靖広、黒柳能光

【目的】ヒアルロン酸 (HA) とコラーゲン (Col) を基材とした上皮成長因子 (EGF) 含有創傷被覆材を作成し、EGFのヒト線維芽細胞増殖促進効果を調べ、動物実験において治癒促進効果を調べた。

【方法】1%高分子量HA水溶液と1%Col水溶液を50℃で混合し容器に入れ、-85℃で凍結した後、凍結真空乾燥により高分子量HA・Colスポンジを作成した。紫外線照射によりスポンジ内のCol分子間に架橋を導入した。分子間架橋を導入したHA・Colスポンジを低分子量HA水溶液に浸漬して、凍結真空乾燥により高分子量HA・Col/低分子量HAスポンジ被覆材 (1群) を作成した。また、低分子量HA水溶液にEGFを混合し、同様の方法で高分子量HA・Col/EGF含有低分子量HAスポンジ被覆材 (2群) を作成した。

実験1: ヒト線維芽細胞をフラスコに播種し、翌日1群および2群の被覆材を浸漬した培養液と交換し、培養4日目および7日目の細胞数を測定した。対照群は通常の培養液を使用した。

実験2: SDラットに全層皮膚欠損創を作成した実験と熱傷創を作成した実験を行った。創面に1群および2群の被覆材を適用し、市販のポリウレタン製フィルム被覆材と伸縮性粘着テープで固定した。対照群はポリウレタン製フィルム被覆材と伸縮性粘着テープによる固定のみとした。

【結果】実験1によりEGFの効果を調べた。2群被覆材は、ヒト線維芽細胞の増殖を顕著に促進し、培養4日目において1群被覆材および対照群の約2.5倍の細胞数に達した。創傷被覆材の熱滅菌処理後もEGFの効力は保持されていた。

実験2により基材およびEGFの創傷治癒促進効果を調べた。全層皮膚欠損創および熱傷創において、対照群と比較して1群、2群で創面積が減少した。また、2群において顕著に表皮形成を促進した。

【結論】EGFは上皮系細胞以外に、線維芽細胞の増殖を促進し、さらに、線維芽細胞に刺激を与えて血管新生を促進する細胞成長因子の産生を亢進する。本研究で作成したEGF混合創傷被覆材は、創傷周辺の上皮細胞および創傷面の線維芽細胞に作用して顕著に創傷治癒を促進することが示唆された。

11月13日
第5会場

神経突起伸長活性ペプチドによるポリ乳酸表面の機能化

○柿木佐知朗^{1,2}、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

生体内分解吸収性高分子材料は、組織工学・再生医療において一時的に細胞外マトリックス (ECM)としての機能を担うスキャホールドとして幅広く用いられている。その中でも、ポリ乳酸 (PLA)は、その優れた生体内分解吸収性と力学的強度および加工性を兼備していることから特に多用されているが、細胞・組織との親和性は乏しい。そのため、ポリ乳酸の生理的機能化を目指した諸研究はあるものの、ポリ乳酸自体が反応性官能基を有さないため、その機能化法は制限されてしまう。一方、細胞は、生体内においてコラーゲンやエラスチンなどの構造タンパク質を骨格とした種々生体高分子の複合体である ECM 中で機能を発現している。すなわち、PLA スキャホールド表面に ECM 模倣界面を構築することができれば、その細胞・組織親和性を大きく向上させることが期待される。そこで本研究では、神経突起伸長活性を有するラミニン由来配列 (AG73; RKRLQLSIRT)¹⁾を有するコラーゲンおよびエラスチン様ペプチドを化学的もしくは遺伝子工学的に作製し、その疎水的吸着性もしくは温度応答性を利用した PLA スキャホールド表面の生理的機能化とその評価を試みた。

2. 実験

ラミニン-コラーゲン複合ペプチド (AG73-G₃-(PPG)₅)は、Fmoc 固相合成法によって合成、脱樹脂および HPLC により精製されたものを用いた。ラミニン-エラスチン複合ペプチド (AG73-(VPGIG)₁₀)は、大腸菌発現システムを用いた遺伝子工学的手法により生合成した^{2,3)}。すなわち、クローニングベクター (pUC18-(AG73-(VPGIG)₁₀)を介して、最終的に His-tag 配列を有する発現用ベクター (pET-28a(+)(His-AG73-(VPGIG)₁₀)を作製し、これで形質転換して得たクローン (*E.coli*[BL21(DE3)pLysS])を用いて、IPTG 添加により His-AG73-(VPGIG)₁₀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。これらペプチドを PLA フィルムに吸着させ、その表面解析 (接触角・XPS) および PC12 細胞を用いて神経突起伸長活性の評価を行った。

3. 結果と考察

PLA フィルムに AG73-G₃-(PPG)₅を吸着させた後、純水もしくは 1M NaCl 水溶液で洗浄し、表面解析および PC12 細胞を用いた *in vitro* 評価を行ったところ、AG73 のみでは静電的相互作用を主として PLA へ吸着しているのに対し、AG73-G₃-(PPG)₅は疎水性相互作用を主として安定に PLA 表面に吸着していることを示唆する結果が得られた。一方、大腸菌発現システムによって得られた AG73-(VPGIG)₁₀はエラスチン様反復配列に基づく感温性を示し、それを利用することによって効率的に PLA 表面へ吸着することも各評価結果より示唆された。本研究により、ラミニン/構造タンパク様配列複合ペプチドは、構造タンパク様配列部分の疎水性吸着によって簡便かつ安定に PLA フィルム表面を神経突起伸長活性化できることを明らかとした。

[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).

Surface modification of PLA scaffold by neurite outgrowth promoting peptides

Sachiro KAKINOKI^{1,2} and 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

○田中聖也^{1,2}、柿木佐知朗¹、藤里俊哉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大阪工業大学 工学部 生体医工学科

1. 緒言

近年、β-sheet 形成性ペプチドよりなるインジェクタブルハイドロゲルが数多く報告されている¹。しかしその多くは、生体内のアミノ酸配列を模倣したものではないため、これらのハイドロゲルを生体内に移植した場合、高い抗原性を示すことが懸念される。そこで我々は、生体内に多く存在するタンパク質のβ-sheet 部位のアミノ酸配列を模倣することで、抗原性が低いβ-sheet 形成性インジェクタブルハイドロゲルができるであろうと推測した。そこで本研究では、β₂-ミクログロブリンのanti-parallel β-sheet 部位のアミノ酸配列 (I³⁵EID³⁸/R⁸⁰VKH⁸³) を模倣したβ-sheet 形成性インジェクタブルハイドロゲルの設計を試みた。

2. 実験

β₂-ミクログロブリン模倣ペプチド Ac-(RVKVEIDI)₂-CONH₂ [Peptide A], および Ac-(RVEIKVDI)₂-CONH₂ [Peptide B]は、樹脂に Fmoc-PAL-PEG Resin、縮合剤に DMT-MM を用いた Fmoc 固相法で合成した。ペプチド鎖の伸長後、N 末端をアセチル化し、95%TFA 水溶液で脱樹脂とアミノ酸側鎖の脱保護を行った。得られたペプチドの同定には、MALDI-TOF/MS を用いた。

各ペプチドを、種々の有機溶媒および pH の異なる緩衝液に溶解し、その pH 変化等の操作によってゲル化が起こるかを検討した。

3. 結果と考察

MALDI-TOF/MS の測定結果より、Peptide A および Peptide B の合成を確認した。これらペプチドは、DMSO と強塩基性溶液によく溶解した。DMSO に各ペプチドを溶解し、ペプチドの最終濃度が 0.5w/v% となるように超純水を加えることで、透明で非常に粘度の高いゲル様物質を形成させることに成功した。Peptide A においては、強塩基性溶液にペプチドを溶解した後に塩酸を加えつつ中和していくと、DMSO の場合と同様に、ゲル様物質が形成した。ペプチド溶液中でペプチドが静電的相互作用により凝集し、β-sheet 構造を形成することによって流動性を失い、ゲル様物質になったと考えられる。これらの結果より、β₂-ミクログロブリン中の anti-parallel β-sheet 部位を模倣した Peptide A および Peptide B は、インジェクタブルハイドロゲル担体となりうることを示唆された。

参考文献 1)Y.Zhao, H.Yokoi, M. Tanaka, T. Kinoshita, T. Yan, *Biomacromolecules* (2008),9,1511-1518.

Gelation behavior of injectable hydrogel consisted of β-sheet peptides under various conditions
 Seiya TANAKA^{1,2}, Sachiro KAKINOKI¹, Toshiya FUJISATO² and Tetsuji YAMAOKA¹

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

²Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

Tel:06-6833-5012 (ext.2637), Fax:06-6835-5476, E-mail:yamtet@ri.ncvc.go.jp

M-P08-G

Design of bioactive interface on PLA scaffold by ECM-like peptides adsorption

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

¹⁾Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, ²⁾ JST, CREST, 5 Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan, *yamtet@ri.ncvc.go.jp

Biological reactions against foreign materials are depended onto their interface properties, because these materials directly contact with cells and tissues through the interface. That is, the biological properties of biomaterial interface must be designed in accordance with the purposes. In the body, cells are involved in the suitable environment consisted of extracellular matrix (ECM) and expressed inherent abilities. Therefore, in this study, ECM-like peptides composed of the elastin-like or collagen-like peptide (ELP¹⁾ or CLP) sequences and the laminin-derived neurite outgrowth promoting sequence (AG73²⁾) were prepared and its *in vitro* neurite outgrowth activity was evaluated in order to modify the surface of PLA scaffolds.

Surface analysis of peptide-coated PLA scaffolds clarified that these peptides stably adsorbed onto PLA scaffold via hydrophobic interaction, and neurite outgrowth of PC12 cells was observed on the modified PLA surfaces (Fig. 1 and 2). Results show that CLP or ELP with neurite outgrowth promoting sequence effectively enhances neurite outgrowth activity on the scaffold interface. The hydrophobic adsorption of CLP or ELP bound to biosignalling peptides has a large potential for interface modification of PLA scaffolds.

References: 1) Yamaoka T et al., *Biomacromolecules*, 4, 1680-1685 (2003), 2) Weeks BS et al., *Exp. Cell Res.*, 243, 375-382 (1998).

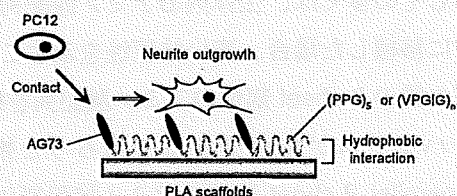


Fig. 1. Bioactive interface on PLA scaffolds by the adsorption of ECM-like peptides.

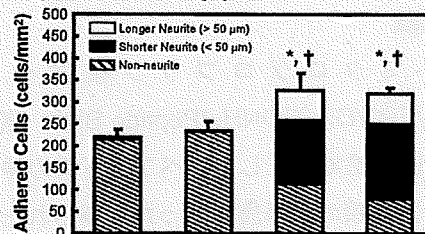


Fig. 2. The number of adhered PC12 cells on CLPs adsorbed PLA films with and without neurites.

* $p < 0.05$ when AG73 and AG73-G₃-(PPG)₅ groups compared with non-coated group, † $p < 0.05$ when AG73 and AG73-G₃-(PPG)₅ groups compared with (PPG)₁₀ group.

口演10 血管2

座長：小山博之（東京大学医学部附属病院 ティッシュ・エンジニアリング部 血管再生医療）

1 新しい脱細胞化技術を用いた小口径血管スキャフォールドの開発

榎原俊介（神戸大学大学院 医学研究科 形成外科学，神戸大学大学院 医学研究科 美容医科学）

2 小口径脱細胞化血管の作製とin vitro/vivo評価

根岸 淳（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所）

3 脱細胞血管に対する石灰化評価とその抑制法

山岡哲二（国立循環器病センター研究所 生体工学部）

4 再生医療への応用を目指した脱細胞血管スキャフォールドデバイス

寺本祐司（防衛医科大学校 分子生体制御学講座）

5 生分解性ハイドロゲル挿入による積層化細胞シートへの血管様管腔構造の作製

松林 康（東京女子医科大学 先端生命医科学研究所，TWIns）

6 血管付3次元組織構築の検討

山口慎介（早稲田大学 先進理工学研究所 梅津研究室，東京女子医科大学 先端生命医科学研究所）

7 立体的な組織の再生を目指した血管誘導ゲルの開発

服部理恵子（東京大学 医学系研究科 外科専攻 口腔外科，東京大学医学部附属病院 ティッシュエンジニアリング部，血管再生医療講座）

O-10-2 小口径脱細胞化血管の作製とin vitro/vivo評価

根岸 淳¹，船本誠一¹，木村 剛¹，樋上哲哉²，

寺本祐夫¹

¹東京医科歯科大学 生体材料工学研究所，²札幌医科大学 第二外

【目的】小口径人工血管は中・大口径に比べ早期血栓を生じやうと、血栓予防可能な材料が望まれている。血栓予防として、血栓性薬剤や抗血栓性高分子の利用、人工血管の内皮化が検討されている。当研究室では、超高压法により調製した脱細胞化大動脈において良好な移植成績と早期内皮化を報告した。内皮化には、基底膜などの生体血管構造が重要と考え、本研究では、小口径脱細胞化血管の調製における超高压・洗浄条件と生体血管構造・物性相関および早期内皮化等の検討を行った。【方法】種々のブタ動脈（頸動脈・胃大網動脈・橈骨動脈）について、組織をトリミング後、血管分枝を結紮した。30℃・10分間・100MPaで超高压処理を行い、種々の条件にて細胞残渣を洗浄し、小口径脱細胞化血管を調製した。脱細胞化評価として、組織学的評価、力学試験による物性評価を行った。in vitro及びin vivo評価として、細胞接着試験・ラット頸動脈移植実験を行い、小口径脱細胞化血管の応用を検討した。【結果と考察】本法により各動脈の細胞除去が可能であった。また、従来の界面活性剤より高い細胞除去効率を示した。脱細胞化組織の構造維持・維持条件が強く影響することが明らかとなった。小口径脱細胞化血管のラット移植実験より、超高压法脱細胞化による免疫反応抑制、開存率向上が示された。以上より、本法によって調製した脱細胞化動脈の小口径人工血管としての応用可能性が示された。

O-10-1 新しい脱細胞化技術を用いた小口径血管スキャフォールドの開発

榎原俊介^{1,2}，石田泰久¹，寺師浩人¹，橋川和信¹，

田原真也¹

¹神戸大学大学院 医学研究科 形成外科学，²神戸大学大学院 医学研究科 美容医科学

【目的】小口径血管を必要とする血行再建術の際に伏在静脈を始めとする自己血管が用いられることが多い。しかし適切な口径ではないこと、血管病変を併発していることなどから目的に合うグラフトが採取できないことは少なくない。一方で、直径6mm以下の口径を持つ人工血管の開発は強度や血栓形成の問題に阻まれている。われわれは界面活性剤を用いない処理方法によりラット動脈の脱細胞化組織を作成し移植後の検討を行ったので報告する。【方法】界面活性剤や凍結融解法を用いない新たな方法(特許申請中)で採取されたラット下行大動脈の脱細胞化処理を行った。処理された脱細胞化血管をラット腹部大動脈に移植した。一定時間の生存期間を置いたのち、移植血管を採取し、組織学的検討を行った。【結果】われわれが開発した脱細胞化処理後の血管は内腔は保たれており、各々の層の基底膜も保存されていた。採取された移植後血管の免疫染色を行った結果、血管内腔面にvWF陽性細胞が、その下層にSMA陽性細胞が層構造を構築して定着しており、血管の再生が示唆された。【考察】生体組織を脱細胞化し、ECMからなるスキャフォールドとして再生医療に用いる試みが数多くなされてきた。既に実用化されている脱細胞化皮膚などは異なり、小口径血管は緻密な上に強度が要求される。われわれが今回作成した脱細胞化血管は、適切な血管再生の足場を提供し、機能的血管と再現できる可能性がある。

O-10-3 脱細胞血管に対する石灰化評価とその抑制法

山岡哲二¹，湊谷謙司²，田中裕史¹，山口晴加³，

黒川理世⁴，森反俊幸³，中谷武嗣¹，藤里俊哉⁴

¹国立循環器病センター研究所 生体工学部，²岩手医科大学，³鈴鹿医療科学大学，⁴大阪工業大学

【緒言】我々はこれまでに、ブタ心臓弁・血管に脱細胞処理を施した再生型人工血管の検討を重ねてきた。その結果開存性は良好で、移植後早期より血管壁に細胞が浸潤して、速やかな自己組織化が認められた。しかしながら、様々な改良にもかかわらず、石灰化を完全に阻止するまでには至っていない。本研究では、脱細胞化血管を作成する際の洗浄液を検討することにより、石灰化の抑制を試みる。【実験】ブタの大動脈血管壁を8mm角に細切し、施圧液と共に袋に入れ、980MPaの圧力を印加し、様々な洗浄液による洗浄を2週間行った。各洗浄液には、所定濃度のDNaseを添加した。洗浄後、リン脂質除去のため、エタノールでの振盪(脂質除去)を行い、生理食塩水に保存した。これらの組織をラット背部皮下に埋入試験時的にX線CTでの撮像から骨塩量を測定し、3ヶ月目には組織を摘出し、組織内の含有カルシウム量を定量した。また、同様にして作成した脱細胞血管をブタ胸部下行大動脈に置換し、3・6・12ヶ月後にその石灰化について検討した。【結果】ラット皮下埋入後に経時的にμX線CTにて評価するシステムは、早期の石灰化を容易に評価できる優れたシステムであった。また、胸部下行大動脈置換実験の結果からも、二価カチオンを含まない洗浄液の使用が石灰化を効果的に抑制することが明らかとなった。

タイトル

幹細胞の心筋分化誘導における細胞培養基質組成と物性の影響

(The effects of chemical and physical properties of matrix surfaces on myocardial differentiation)

著者

山下敦、馬原淳、江橋具、姜貞勲、Miskon Azizi、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

大阪大学大学院 工学研究科 応用化学専攻

区分および発表形式、Key words

発表区分：一般、発表形式：口頭

カテゴリー1：心臓、カテゴリー2：分化誘導

Key words：心筋分化誘導、細胞外マトリクス、細胞培養基質表面

概要

我々はこれまでに、独自に開発した分化誘導方法にて間葉系幹細胞から自律拍動する心筋細胞を得ることに成功していると同時に、培養 Dish 表面にコートされたマトリクスタンパク質組成が心筋細胞への分化および拍動効率に著しい影響を与えることを見出した。つまり、培養基質表面の組成や物性を適切に制御することにより、間葉系幹細胞から自律拍動する心筋細胞への分化誘導およびそれらの長期培養を著しく改善しうる人工ニッチの開発が可能になるものと考えられる。しかしながら、現時点では分化誘導効率は未だ低く、培養基質表面との相互作用により細胞内へ伝達されるシグナルは明らかではない。

本研究では、培養 Dish 表面の組成および物性が、幹細胞から自律拍動する心筋細胞への分化に与える詳細な影響の評価および細胞内への伝達メカニズムの解明から培養条件の飛躍的な改善を目指す。ポリスチレン培養 Dish やゼラチン、フィブロネクチン、Type 1 コラーゲンなどのマトリクスタンパク質をコートした培養 Dish における拍動細胞コロニー数や心筋分化マーカーの発現を詳細に評価した。また、これらマトリクスタンパク質をコートした培養 Dish 表面の物性についても評価したのであわせて報告する予定である。

