

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業：低侵襲・非侵襲医療機器(ナノテクノロジー)研究事業

エコーガンによる低侵襲の胎児期遺伝子治療：胎児腹腔内への非ウイルス性ベクター注入と胎児肝母体外超音波照射による遺伝子機能発現の出生前是正

平成20～22年度 総合研究報告書

研究代表者 千葉 敏雄

平成23(2011)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

| | | |
|---|-------|---|
| エコーガンによる低侵襲の胎児期遺伝子治療：胎児腹腔内への非ウイルス性 ベクター注入と胎児肝母体外超音波照射による遺伝子機能発現の出生前是正 千葉 敏雄 | ----- | 1 |
|---|-------|---|

| | | |
|--------------------|-------|----|
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 15 |
|--------------------|-------|----|

| | | |
|------------------|-------|----|
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 20 |
|------------------|-------|----|

エコーガンによる低侵襲の胎児期遺伝子治療：胎児腹腔内への非ウイルス性ベクター注入と胎児肝母体外超音波照射による遺伝子機能発現の出生前は正

研究代表者 千葉敏雄 独立行政法人国立成育医療研究センター臨床研究センター 副センター長

研究要旨

本研究の目的は、胎児ないし新生児期の治療成績・予後を改善するために、安全・低侵襲性に施行しうる出生前の治療システム・機器を開発することにある。具体的には、1) たとえ一過性にせよ、その効果を発現しうる目的遺伝子の賦与された非ウイルス性ベクターを、2) 母体外からの超音波照射にて標的臓器である胎児肝に集積して破碎し、標的細胞（肝細胞・造血幹細胞）内に導入する。本研究では、各要素技術の開発とその検証を行い、「胎児肝超音波照射による遺伝子機能発現の出生前は正」における新たな可能性を見出すことができた。特に、臨床現場で利用されている超音波造影剤（ソナゾイド）を用いた超音波遺伝子導入/ナビゲーション技術の基盤を構築し、in vitro から in vivo へ展開した。また、成育における細胞資源バンクの整備から、疾患モデル細胞および動物による出生前後の遺伝子機能発現評価系の構築と胎児への安全・低侵襲性を確保できたことは、今後の胎児期遺伝子治療において、多大なる発展に寄与するとともに、継続的な研究を行う必要がある。

B. 研究方法

B-1 超音波ナビゲーション技術の開発

(1) 微小気泡へ作用する音響放射力

本研究では微小気泡として、現在臨床において超音波造影剤として用いられる Sonazoid®（第一三共製薬）を使用した。これはベルフルブタンをリン脂質で安定化した比較的強い強度を持つ平均粒子径 2-3 [μm] の微小気泡であり、生体内へ注入後も数 10 分に渡り安定に存在する。Sonazoid® の顕微鏡写真と模式図を Fig. 1 に示す。

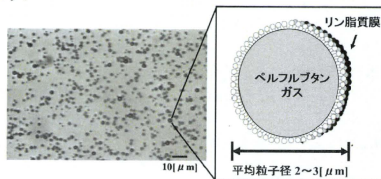


Fig. 1 Microscopic and Schematic image of Sonazoid®

一般に物体が音波の照射を受けた場合、音波が生じる放射力、すなわち音響放射力を受ける。この大きさは流体力学的手法を用いて解析的に求められており、微小気泡のような球体を受ける力は平面進行波の場合、次式で与えられる。

$$F_{ac} = \pi r^2 Y_p P \quad \text{式 (1)}$$

ここで r は球の半径、 P は入射音波の平均エネルギーである。また、 Y_p は音響放射力関数と呼ばれ、球の弾性的性質や媒質中の音波の伝播定数 $k=2\pi/\lambda$ (λ : 波長) などに依存する非常に複雑な関数である。

(2) 微小気泡の捕捉方法

前節で述べた音響放射力を利用し、血液中を流れる微小気泡を捕捉する場合の概念図を Fig. 2 に示す。

分担研究者

| | |
|--------|-----------------------------|
| 梅澤 明弘 | 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所/部長 |
| 松本 洋一郎 | 東京大学大学院工学系研究科/教授 |
| 柳田 晃司 | 東京農工大学大学院生物システム応用科学府/准教授 |
| 望月 剛 | アロカ株式会社研究所/主幹研究員 |
| 宮本 義孝 | 独立行政法人国立長寿医療研究センター研究所/招聘研究員 |

A. 研究目的

近年、欧米では、遺伝性の免疫・血液疾患や先天性代謝異常症に対しては、1. 移植治療（造血幹細胞や肝）、2. 遺伝子治療が一定の成果をおさめているが、1 はドナーのリスクやその慢性的不足と免疫抑制剤の副作用、2 はウイルスベクターの安全性等の課題を抱えている。また、出生後治療だけでは患児への最適な治療時期を失し、医療費のかさむ可能性が高い。そこで、本研究では、異常遺伝子機能の出生前発現を低侵襲性に是正することで、出生後治療・ケアに対する効率の支援と医療費の大幅低減を目指す。

本研究の目的は、出生前治療をより安全・低侵襲に施行し、胎児や新生児の治療成績と予後を改善しうる治療システム・機器を開発することにある。具体的には、1) 標的細胞（胎児）内で一過性に効果を発現しうる目的遺伝子を付随した非ウイルス性ベクター（マイクロバブルなど；胎児腹腔内注入）と、2) これを母体外からの超音波照射にて胎児肝に集積・破碎し、標的細胞（肝細胞・造血幹細胞）に導入するシステムを開発する。本研究は、医工連携研究として産官学相互の融合を図りながら、システム・機器開発、評価・検証、事業化への提案を進めるものである。

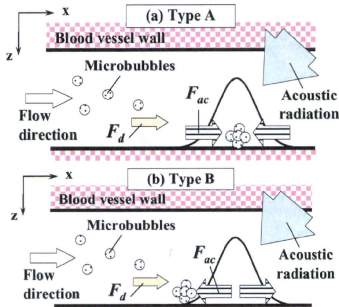


Fig. 2 image of trapping fluid microbubbles with acoustic radiation force

微小気泡が血管内に局所的に形成されたポテンシャルエネルギーの起伏が激しい箇所を通過する際、音響放射力の発生機序が2種類考えられる。タイプAの場合は勾配のピークに向かう力が働くため、Fig. 2中(a)のように微小気泡が捕捉される。また、タイプBの場合はピークから外側に向かう力が働くため、Fig. 2中(b)のように捕捉されると考えられる。どちらの場合も微小気泡が水流から受ける抗力 F_d と音響放射力が拮抗する事で捕捉が行われると考えられる。尚、 F_d はストークスの法則より次式で表される。

$$F_d = 6\pi r\mu v_r \quad \text{式(2)}$$

ここで μ は媒質の粘性率、 v_r は流速である。

(3) 模擬血管による捕捉実験

まず、実験に用いる流路として、超音波透過性に優れたポリエチレングリコール(PEG)を使用し、血管を模した内径2[mm]の直線流路を作成した。微小気泡にはSonazoid®を使用し、付属の注射用水で作成した2[m]の懸濁液を50倍に薄め、濃度約0.0003[ml/kg]の懸濁液を作成した。また、ブタの血液から赤血球を抽出し、同懸濁液に混ぜたものも用意した。光学観測のための実験系をFig. 3に示す。流路は脱気水を満たした水槽の底面に敷かれた吸音板の上に設置し、チューブを使用してポンプと接続した。音源には中心周波数が3-10[MHz]の範囲の複数の集束型超音波トランスデューサを使用し、発信器で生成した波形を、アンプで増幅した信号してトランスデューサに印加した。光学観測には顕微鏡(VC7700, Omron社製)を使用し、流路の底面から観測を行った。

実験手順として、まずトランスデューサによる音波の照射方向を水流 $\theta=60$ [deg]となるように設置した。この際、音圧分布の最大地点が視野中央に位置するように流路とトランスデューサの距離を調整した。続いて作成した流路の上流200[mm]から微小気泡の懸濁液を注入した。ここで注入量は観測視野内を約40[sec]に渡り微小気泡が通過する5[ml]とした。

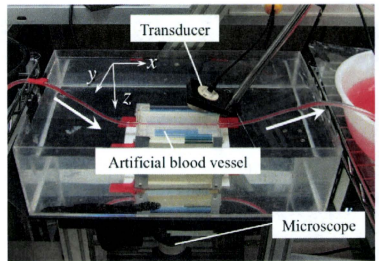


Fig. 3 Configuration between transducer, microscope and the artificial blood vessel

尚、超音波の焦点と観測視野の中央、流路の中心軸の3つが一点で一致するように配置するため、Fig. 4に示すように光学式3次元位置計測装置(POLARIS Viera, NDI社製)を使用した。まず、計測されたトランスデューサの3次元位置と振動子面と焦点の距離から焦点位置を推定した。そして予め計測しておいた観測視野の中心(点P)に焦点が一致するようにトランスデューサの位置を調整した。

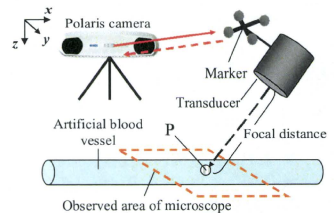


Fig. 4 Positional adjustment of the focal point of acoustic field by using a 3-dimensional optical tracker

B-2 超音波遺伝子導入技術の開発

超音波遺伝子導入実験装置の概略図をFig. 1に示す。マウス性線維芽細胞系NIH3T3を細胞培養容器に培養する。ウェル内の細胞培養液に導入遺伝子とマイクロバブルを混和し、平面超音波を上方より照射する。導入遺伝子は緑色蛍光蛋白質(GFP)プラスミドを、マイクロバブルはSonazoid®を用いる。

超音波の波形をバーストとすることで、Fig. 3のように一定の照射時間に対し照射休み時間を設けることになり、連続波に比べ細胞へのダメージが抑制されるという知見が得られている。本研究ではこのバースト波形に着目し、遺伝子導入率のバースト波形に対する依存性を調査した。

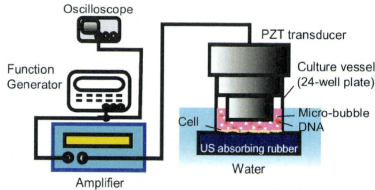


Fig. 1 Experimental apparatus

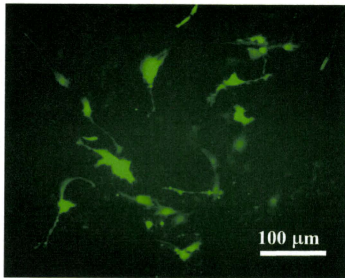


Fig. 2 Fluorescent observation of GFP

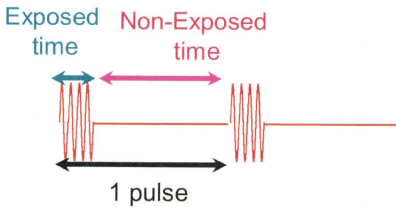


Fig. 3 Burst waveshape

B-3 胎仔肝への超音波併用遺伝子導入手技の開発

超音波を用いた遺伝子導入には、プラスミド DNA (pEGFP-N3, Clontech), 超音波照射装置 (SONITRON 2000V, NEPAGENE) およびマイクロバブルを使用する。このプラスミド DNA には GFP 遺伝子がコードされており、細胞内に導入され遺伝子発現により蛍光タンパクが発現し、導入効率確認の指標となる。また、マイクロバブル (Sonazoid®, GE Healthcare) には遺伝子導入効率を高める効果があり、培養細胞 (HepG2) への遺伝子導入実験より、その効果が確認されている (Fig. 1)。

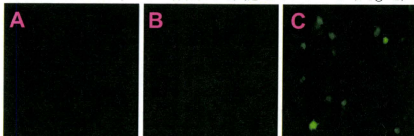


Fig. 1 培養細胞への超音波を用いた遺伝子導入

- A. Sonazoid®のみ
- B. 超音波照射のみ
- C. Sonazoid®+超音波照射

実験により得られた遺伝子導入条件をもとに *in vivo* 妊娠 ICR マウスを用いて胎仔肝への超音波による遺伝子導入実験を行った。Frequency: 1MHz, Intensity: 1W/cm², Duty rate: 50%, Time: 30sec の超音波照射条件で遺伝子導入実験を行った。

実際の手技は、ペントバルビタール麻酔下で、妊娠 ICR マウス (妊娠 15 日目) を開腹後、胎仔肝へプラスミド (5 μg) とマイクロバブル (Sonazoid®) の混合液を注入した直後、子宮外より超音波照射を行い、その後縫合閉腹した。超音波照射 24 時間後に犠死マウスより胎仔肝臓を切除し、蛍光顕微鏡にて GFP の発現を観察した。また、この遺伝子発現期間についても検討した。

B-4 超音波診断装置を用いた標的部位への遺伝子導入の基礎検討

超音波診断装置を用いた生体内でのマイクロバブルの動態

【材料】本研究では、実験動物として、JW うさぎを用いた。超音波造影剤として、臨床検査で使用されているソナゾイド (第一三共株式会社) を用いた。ソナゾイドは、内部気体が C4F10 で、シェルが 2.3~2.9 μm の超音波に対して安定なマイクロバブルである。また、持続的な造影効果 (血管イメージングならびにクーパーイメージング) が得られる特徴を有する。超音波診断装置として ProSound α 10 (日立アロカメディカル株式会社)、超音波プローブはリニア型 (4~13MHz) を用いた。実験はうさぎに静注したソナゾイドの腎臓における動態について検討した。

【方法】イソフルラン麻酔下で、JW うさぎ (3 kg 前後) を水槽中に沈め、耳介周囲静脈よりソナゾイドを注入した。超音波診断装置を用いて、ソナゾイドの腎臓内での動態を観察した。

同様の実験をソナゾイドの濃度を変更して行った。

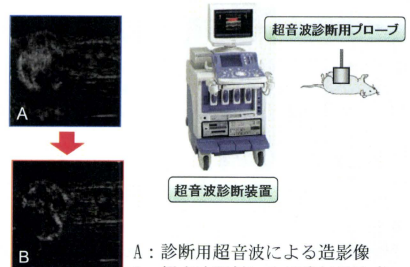


Fig. 1 超音波診断および超音波遺伝子導入による治療を一元化した新しいシステム

B-5 本遺伝子治療における細胞・動物実験, および生物学・医学的検証

肝移植の際, 摘出したドナー肝臓の一部は移植された肝組織の機能上の問題, 解剖学の理由等により一部移植に用いられない肝組織が生じる(余剰肝)。そこで本研究では, 国立成育医療センターにてインフォームドコンセントが得られた, 前述のヒト余剰肝, および肝移植を受けた先天性代謝性肝疾患の患者さんから摘出されたレシピエント肝から効率よく正常な機能を保持した肝細胞を分離・培養, 凍結保存した。

B-6 幹細胞への超音波遺伝子導入・培養・保存方法の検討

ASCs への超音波遺伝子導入

【細胞】マウス皮下脂肪組織 (C57BL/6, 雌, 10 週齢) を採取し, コラゲナーゼを用いて脂肪細胞を分離し SVF を得た。SVF を 37℃, 5%CO₂ 下で培養し, 最終的に, 骨・脂肪に分化可能な ASCs を得た (Fig 1; 脂肪および骨への分化の確認方法として, Oil Red O 染色および Von Kossa 染色を用いた)。以下に, その培養液の組成を示す (DMEM/F12 (Invitrogen), 20%FBS (Bench Mark), 1%Penicillin Streptomycin (Invitrogen))。

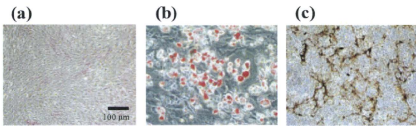


Fig 1. Adipo/osteogenic differentiation of ASCs. (a) The morphology of isolated and cultured ASCs. (b) Adipogenic differentiation of ASCs. The cells were stained with Oil Red O 1 week after adipogenic induction. (c) Osteogenic differentiation of ASCs. The cells were stained with Von Kossa stain 1 week after osteogenic induction. Scale bar, 100 μm.

【材料】哺乳類細胞レポーターベクターとして, Lac Z 遺伝子を含むプラスミド DNA (pCMVβVector (PT2004-5); Clontech) および GFP 遺伝子をコードするプラスミド DNA (pEGFP-N3) を用いた。超音波造影剤として, 臨床検査で使用されているソナゾイド (第一三共株式会社) を用いた。

【方法】96 穴培養皿 (Nunc) 上に, ASCs を播種し (2x10⁴ cells/100μL), 37℃, 5%CO₂ 下で 24 時間培養した。細胞培養後, 培養皿内の各ウェルに対して, 超音波照射条件を設定し, 細胞への遺伝子導入およびダメージを評価した (周波数: 3.1MHz, Duty 比 50%, Burst Rate 2.0Hz, Duration 30sec, 出力強度 1.27 W/cm²)。超音波遺伝子導入装置はソノポール 4000 (KTAC-4000, NEPAGENE), 超音波プローブはドーム前方照射型 8mmT を用いた。細胞生存率の評価方法として, 高感度水浴

性ホルマザンを生成する新規テトラソリウム塩 WST-8 を発色基質として用いた評価方法 (Cell Counting Kit-8; DOJINDO) を利用した。

B-6-1 遺伝子導入実験は, プラスミド DNA とマイクロバブルを混和したのち, 直ちに, 96 ウェル内の ASCs の培地を交換し, 超音波を照射して, マイクロバブルを破砕した。マイクロバブル破砕後, 培地交換を繰り返し, ソナゾイドの被膜 (ホスファチルセルリナトリウム) を除去した。除去後, ウェル内に細胞培養液を加え, 37℃, 5%CO₂ 下で 24 時間培養し, 細胞内への遺伝子の導入を検証した。

B-6-2 誘導多能性幹細胞の凍結保存液の検討

マウス iPS 細胞 (理化学研究所細胞バンクより供与) の凍結保存液として, 培養液, 培養液+10% DMSO, 培養液+10% Glycerol, 培養液+5% DMSO, 培養液+5% Glycerol, 培養液+5% DMSO+5% Glycerol, Cell Freezing Medium-DMSO, Cell Freezing Medium-Glycerol, セルバンカー, セルバンカープラス, セルバンカー-2, セルバンカー-3 を使用した。凍結は, バイセル (BICELL) を用い, 緩速凍結にて -80℃ 下で保存した (1 週間から 1 年間)。融解後, iPS 細胞の生存率を測定し, 1-3 日間培養後, 細胞の形態を観察し, その増殖能を検討した。

(倫理面への配慮)

国立成育医療研究センター

国立成育医療研究センターにおいては, 対象となるヒト細胞に関し, 研究面において既に倫理審査を受け, 承認を受けている (国立成育医療研究センター, 受付番号 25, 26 及び 27, 平成 15 年 1 月承認, 受付番号 49, 平成 15 年 10 月承認, 受付番号 55, 平成 15 年 11 月承認, 受付番号 88, 89, 90, 91 平成 16 年 7 月承認, 受付番号 55, 平成 16 年 11 月追加承認, 受付番号 146, 平成 17 年 4 月承認, 受付番号 156, 平成 17 年 7 月承認, 受付番号 197, 201, 平成 18 年 6 月承認, 受付番号 237, 238 平成 19 年 11 月承認, 受付番号 293, 315, 平成 20 年 10 月承認, 受付番号 350, 平成 21 年 12 月承認, 受付番号 403, 平成 22 年 7 月承認)。

(<http://www.ncchd.go.jp/center/information/ethics/index.html>)

それぞれの組織については, 平成 22 年 11 月 1 日施行された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針 (平成 22 年厚生労働省告示第 380 号)」に従い, 最新の社会的な影響を十分に考慮する。さらに, 倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なる予想されるため, 「厚生労働科学研究に関する指針」に準拠する。

実験動物を用いる研究については, 国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する (承認番号 2003-002, 2005-003)。特に, 動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は, 目的に合致した最小限にとどめる。またその際, 麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は, 管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行

う。

名古屋大学

実験動物に関して、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年法律第105号)、「実験動物の飼養及び管理等に関する基準」(昭和55年総理府告示第6号)及び「名古屋大学動物実験指針」に基づき、適正な使用及び取り扱いを行う。

独立行政法人国立長寿医療研究センター

実験動物を用いる研究については、国立長寿医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

C-1 超音波ナビゲーション技術の開発

(1) 周波数変化による微小気泡の挙動変化
流路内の流速を 20 [mm/sec] とし、超音波を 40 [sec] 照射した時の微小気泡の挙動を観測した。視野中央での最大音圧はそれぞれ 300 [kPa] (MI 値 0.09-0.17) とし、微小気泡が破壊されないよう通常 Sonazoid® の超音波診断で使用される MI 値 0.2-0.3 より低い値とした。周波数が 3 [MHz] と 10 [MHz] 時の観測画像を Fig. 5, Fig. 6 に示す。5 [sec] 時の画像にはシミュレーションより算出された音場を重畳表示した画像をそれぞれ示す。各周波数で微小気泡が捕捉される様子を観測し、また Secondary Bjerknes 力に起因した微小気泡間の引力によるものと見られる微小気泡の集合体形成も見られた。

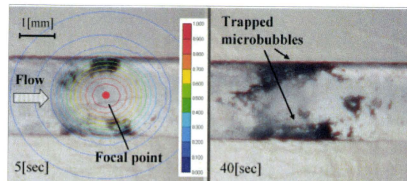


Fig. 5 Trapped microbubbles under ultrasound emission with control frequency of 3 [MHz], in 5 and 40 [s] after start of the emission.

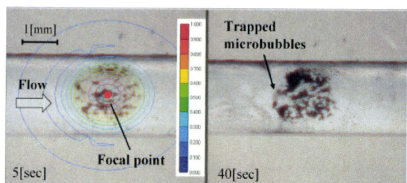


Fig. 6 Trapped microbubbles under ultrasound emission with control frequency of 10 [MHz], in 5 and 40 [s] after start of the emission.

周波数が 3 [MHz] の場合、微小気泡が焦点から離れた位置に捕捉される傾向があった。一方、周波数が 10 [MHz] の場合は焦点付近に捕捉される傾向が見られた。これらの結果を Fig. 2 と比較すると、周波数が 3 [MHz] の場合は焦点から外側に向く力が働いたと見られ、これは 2 節で述べた音響放射力のタイプ A であると考えられる。一方、周波数が 10 [MHz] の場合は焦点に向かう力が働いたと見られ、これは音響放射力のタイプ B であると考えられる。

(2) 周波数による微小気泡の捕捉面積の変化

続いて微小気泡の捕捉量の評価を行った。Fig. 7 に示すように微小気泡が流れていない初期状態と測定画像を差分処理する事により得られる画像をラベリングし、捕捉面積を微小気泡の量と見なして評価した。

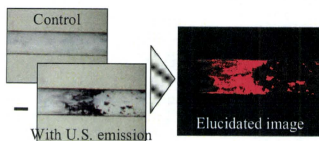


Fig. 7 Image of procedure to evaluate the amount of trapped microbubbles

上記の手法を使用し最大音圧 300 [kPa] において周波数による捕捉面積の変化を測定したグラフを Fig. 8 に示す。エラーバーは値が 4 回の実験の平均値である事を示す。捕捉面積が一番大きかったのは周波数 3 [MHz] の場合であり、10 [MHz] の場合は 40 [sec] において 3 [MHz] の 3 分の 1 以下という結果となった。一方、照射時間に対する捕捉面積の変化については周波数に関係なく 10~30 [sec] において増加する傾向が見られた。また、グラフの横軸右端の OFF は超音波を 40 [sec] で照射終了後、3 [sec] 後に観測した残存微小気泡の面積を示しており、最大捕捉面積に対して半分程度の微小気泡が照射終了後もに残存する事が分かった。

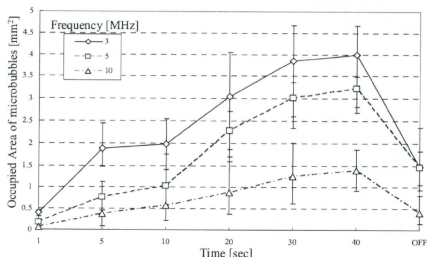


Fig. 8 Occupied area of microbubbles versus emission time of U.S. and frequency

(3) 音圧、照射時間による捕捉面積の変化

4.2 節の結果を受け、最も捕捉面積が大きかった周波数 3 [MHz] のトランスデューサを使用し、焦点の最大音圧を変化させた場合の微小気泡の捕捉面積を測定した。流速 20 [mm/sec] において超音波を 60 [sec] 照射した際の結果を Fig. 9 に示す。尚、エラーバーは 4 回の実験の平均値である事を示す。捕捉面積は音圧の増加に従い増加し、音圧が一番高い 300 [kPa] では一番低い 120 [kPa] に比べ、60 [sec] において約 2.5 倍多く捕捉できる結果となった。

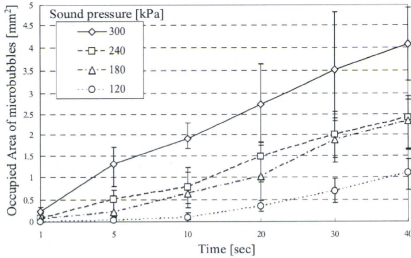


Fig. 9 Variation of occupied area of microbubbles versus emission time of U.S. and sound pressure

次に超音波の照射時間をパラメータとし、周波数 3 [MHz]、音圧 300 [kPa]、流速 20 [mm/sec] の条件で超音波照射時の微小気泡の捕捉面積と照射終了後の変化を観測した。その結果を示したグラフを Fig. 10 に示す。尚、実線は照射時間に対する 1, 5, 10, 20, 30, 40 [sec] の時の微小気泡の捕捉面積を示しており、破線はそれぞれの時刻で超音波の照射を終了し、3 [sec] 経過後も壁面に付着していた微小気泡の面積との差を示す。また、エラーバーは 4 回の実験の平均値である事を示す。

この結果、微小気泡の捕捉面積と残存面積は共に照射時間の増加に従い増加する傾向がある事が分かった。また捕捉面積に対する残存面積の割合を見た場合、どの照射時間においても 4 割程に収まっており、捕捉面積に対し一定の割合で微小気泡が残存した事が分かった。

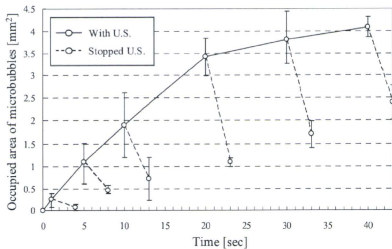


Fig. 10 Variation of occupied area of microbubbles under U.S. emission continuously (bold line), and

decrease after stopping the emission (broken line).

(4) 赤血球を懸濁した微小気泡の捕捉

上記の結果を踏まえ、微小気泡の懸濁液に更に赤血球を混ぜた懸濁液を用いて同様に実験を行った。微小気泡の濃度を 0.15 [L/kg]、赤血球の濃度を 5.4×10^5 [/L] とした懸濁液において、照射超音波の中心周波数を 3 [MHz]、流速を 20 [mm/s] とした時の結果を Fig. 11 に示す。ここで (a) は最大音圧 100 [kPa]、(b) は 300 [kPa] の場合で、照射開始後 40 秒後の顕微鏡画像である。この結果より、音圧に比例して捕捉面積が増大することが分かった。また赤血球を含まない同条件の結果と比較すると、赤血球が存在したことによって、捕捉面積は増大した。

Fig. 12 は、赤血球の濃度に対する捕捉面積の結果を示す。微小気泡の濃度は 0.15 [L/kg]、流速を 20 [mm/s]、最大音圧を 100 [kPa] とし、中心周波数を 2 種類で比較している。こちらの結果においても、赤血球の存在が捕捉面積を増大させる作用があることが分かった。また、照射音波の中心周波数の違いには大差がないことも確認できた。

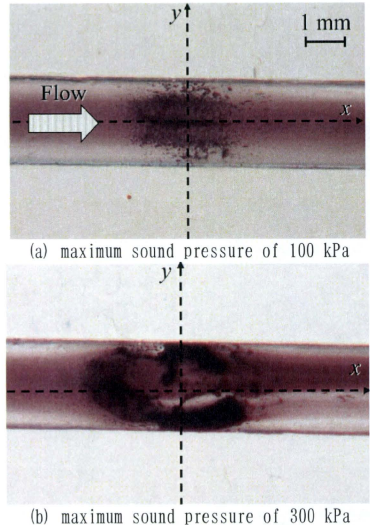


Fig. 11 Microscope images of the observation area after 40 sec after injection under continuous ultrasound emission.

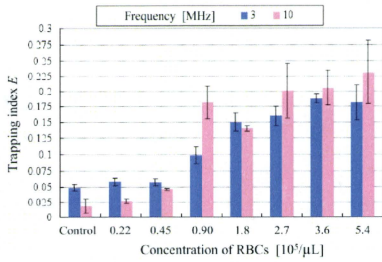


Fig. 12 Trapping index of microbubbles with RBCs versus concentration of RBCs and central frequency of ultrasound emission

Fig. 13 は照射音圧に対する捕捉面積の変化を示す。中心周波数は 3 [MHz]、流速は 20 [mm/s] であり、上記と同様に照射開始後 40 秒後の顕微鏡画像から解析したものである。特に音圧 100 [kPa] 以上の場合において、赤血球の濃度差が 4 倍程度あるにも関わらず、捕捉量には大差がなかった。また赤血球の存在による捕捉量増大の効果は、200 および 300 [kPa] よりも 100 [kPa] の際に際立って観察された。これより、超音波照射下の赤血球及び微小気泡の挙動が非常に複雑であることが示された。

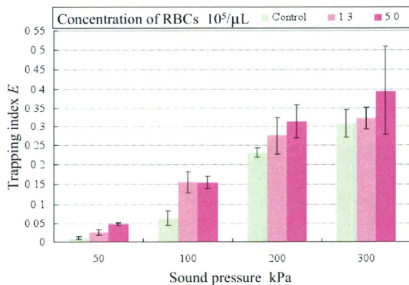


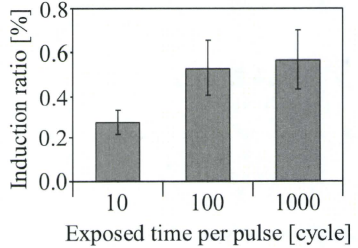
Fig. 13 Trapping index of microbubbles with RBCs versus maximum sound pressure of ultrasound emission and concentration of RBCs

C-2 超音波遺伝子導入技術の開発

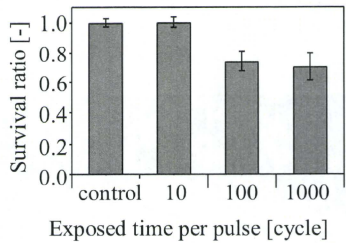
Fig. 4 (a), (b) は照射時間をパラメータとした実験の結果である。これより、照射時間が長いほど、遺伝子導入率が向上し、生存率は低下していることが判る。これは、照射時間の増大に伴い 1 パルス間に生じる細胞膜表面の小孔のサイズが大きくなることに起因すると考察される。

Fig. 5 (a), (b) は照射休み時間をパラメータとした実験の結果を示している。照射休み時間の増加に伴い、遺伝子導入率、細胞生存率ともに向上していることがわかる。これは、十分な照射休み時間を設けることで

細胞へのダメージが抑制されたため、小孔が生じ遺伝子が導入された細胞が生存できるようになったことに起因すると考察される。

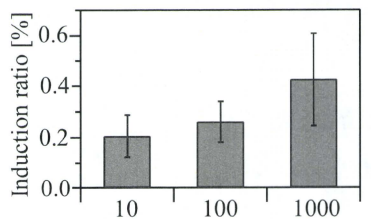


(a)



(b)

Fig. 4 Dependency on exposed time per pulse



(a)

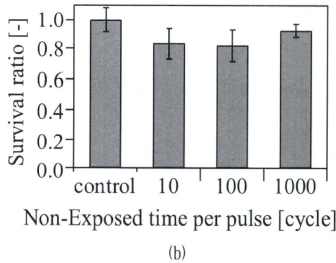


Fig. 5 Dependency on Non-Exposed time per pulse

C-3 胎仔肝への超音波併用遺伝子導入手技の開発

超音波を用いた遺伝子導入後 24 時間経過したマウス胎仔肝臓において、高い GFP 遺伝子の発現が観察された。コントロールとして、混合液注入のみで超音波を照射しなかったサンプル及び超音波照射のみのサンプルにおいては、GFP 遺伝子の発現は低いものであった。(Fig 2)



Fig 2 マウス胎仔肝への超音波を用いた遺伝子導入
A. Sonazoid®のみ B. 超音波照射のみ
C. Sonazoid®+超音波照射

GFP 陽性率は混合液注入のみで超音波照射なしのサンプルにおいて 4% (2/42)、マイクロバブルなしで超音波照射のみのサンプルにおいて 2% (1/36)、と低い陽性率であったが、超音波とマイクロバブルを併用したサンプルにおいて 58% (26/45) と高い陽性率が確認された。(Table 1)

| | GFP 陽性率 |
|-----------------------|----------------|
| 超音波照射のみ | 4% (2/42) |
| マイクロバブルのみ | 2% (1/36) |
| マイクロバブル + 超音波照射 | 58% (26/45) |

Table 1 マウス胎仔肝への遺伝子導入率

次に導入された遺伝子の発現期間について検討した。上記実験と同様に超音波による遺伝子導入を行い、超音波照射後 1 日目から 7 日目 (出生後 3 日目) までのマウス胎仔肝およびマウス出生仔肝サンプルを採取し、蛍光顕微鏡にて GFP 遺伝子の発現を観察した。

超音波照射後 1 日目のサンプルにおいて GFP の発現が確認された。この遺伝子発現は減少しているが超音波照射後 7 日目のサンプルにおいても確認された (Fig 3)。

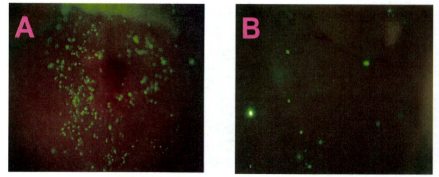


Fig 3 遺伝子発現期間

A. 超音波照射 1 日後 B. 超音波照射 7 日後

C-4 超音波診断装置を用いた標的部位への遺伝子導入の基礎検討

ソナゾイドを用いた超音波診断装置でのうさぎ腎臓の造影に成功した。ソナゾイドの濃度は臨床的に使用される濃度 (15 μ l/Kg) では血管造影が確認された。ソナゾイドの濃度を上げることにより (150 μ l/Kg) 腎臓全体の造影画像が得られた。(Fig 2 A・B)

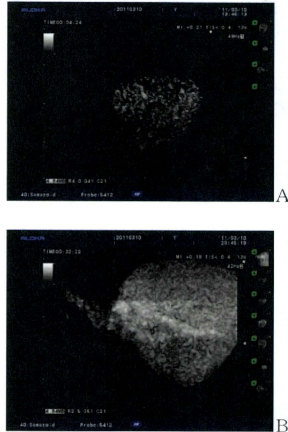


Fig 2 超音波診断装置での造影画像 (うさぎ腎臓)

A 15 μ l/Kg

B 150 μ l/Kg

C-5 遺伝子治療における細胞・動物実験、および生物学・医学的検証

初年度から引き続き、先天性代謝性肝疾患の患者様から摘出されたレシピエント肝より、肝細胞を分離・培養、および増殖させることに成功した。以下に、肝組織の詳細情報を示す。

| 臓器提供者 | 性別 | 病名 | 数 |
|--------|----|----------|---|
| レシピエント | 女 | 胆道閉鎖症 | 5 |
| レシピエント | 男 | 胆道閉鎖症 | 1 |
| ドナー | 女 | 胆道閉鎖症 | 1 |
| ドナー | 男 | 胆道閉鎖症 | 1 |
| レシピエント | 女 | 糖尿病Ⅰ型 | 1 |
| レシピエント | 男 | 糖尿病Ⅰ型 | 1 |
| ドナー | 男 | 糖尿病Ⅰ型 | 2 |
| レシピエント | 男 | 先天性肝線維症 | 1 |
| レシピエント | 女 | プロピオン酸血症 | 1 |

また、初代肝細胞を、1)分離および2)培養後に凍結し、液体窒素下で保管した。その詳細は、以下の通りである。

| | | |
|---------|--------|------------|
| Hep2013 | レシピエント | 肝実質細胞 |
| | レシピエント | 肝非実質細胞分画 1 |
| | レシピエント | 肝非実質細胞分画 2 |
| | レシピエント | 肝非実質細胞分画 3 |
| Hep2015 | ドナー | 肝実質細胞 |
| | ドナー | 肝非実質細胞分画 1 |
| | ドナー | 肝非実質細胞分画 2 |
| | ドナー | 肝非実質細胞分画 3 |
| Hep2017 | レシピエント | 肝非実質細胞分画 1 |
| | レシピエント | 肝非実質細胞分画 2 |
| Hep2018 | レシピエント | 肝非実質細胞分画 |
| Hep2019 | レシピエント | 肝非実質細胞分画 |

得られた初代培養肝細胞の *in vitro* / *in vivo* における特性解析を行った。

(in vitro)

正常肝細胞特異的遺伝子の発現が確認された。

(in vivo)

初代培養肝細胞を、免疫不全マウス (NOG マウス) の大腿四頭筋と頸部皮下に移植した。移植後 4 週間目に摘出した移植組織部位において、抗ヒトアルブミン抗体陽性、抗ヒト肝細胞抗体 (CK8/18) 陽性、PAS 染色陽性を示すヒト細胞を検出した。

B-6 幹細胞への超音波遺伝子導入・培養・保存方法の検討

ASCs への超音波遺伝子導入

ASCs への超音波遺伝子導入手法として、以下の 2 通りの方法を用いた (Fig 2)。Method-1 は、培養皿の細胞接着面側から超音波を照射する方法、Method-2 は、培養皿の細胞接着面と反対側から超音波を照射する方法である。また、Methods-2 を行う際には、培養皿内を調製液で満たし、気泡が入らない様にシーリングした。そして、培養皿を裏返し、細胞接着面にマイクロバブルが接近した (浮上した) 後に、超音波照射を開始し実験を行った。

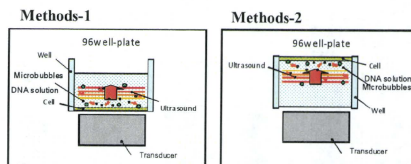


Fig 2. Two methods were used for US exposure. Methods-1: cells were subjected to ultrasound on the attaching side. Methods-2: cells were exposed to ultrasound from the other, non-attached, side.

結果、両手法を比較すると、Methods-2 の方が、ASCs へ効率よく Lac Z 遺伝子を導入することができた。さらに、我々は、Methods-1 のプラスミド DNA/マイクロバブル量を 100 μ l から 30 μ l に変更し、上記と同様の実験を行った。結果、細胞接着面とマイクロバブル間の距離が接近することにより、Methods-1 においても、Methods-2 と同様に、ASCs へ効率よく Lac Z 遺伝子を導入することができた。したがって、本実験では、手法が簡単である Methods-2 を採用することにした。

次に、超音波照射における ASCs への影響を評価した (Fig 3)。培地のみの場合には、細胞に対する影響はほとんどなかった。10%マイクロバブル存在下では、細胞の約 40% がダメージを受けた。さらに、マイクロバブルの割合 (10-40%) を増加させるにつれて、細胞へのダメージの減少とともに、遺伝子導入率も減少した。以上の結果より、細胞への遺伝子導入率が最も高かった、マイクロバブル 10%存在下で本実験を行うことにした。

Fig 4 には、ソナゾイドおよび GFP プラスミド DNA (pGFP-N3: 60 μ g/ml) を用いた超音波照射による ASCs への遺伝子導入実験の結果を示す。ASCs への GFP プラスミド DNA のみによる超音波照射では、GFP 遺伝子の発現は見られなかった (Fig 4: b)。一方、10%マイクロバブル、GFP プラスミド DNA の存在下で超音波照射を行うと、ASCs への GFP 遺伝子の導入が確認された (Fig 4: c, d)。さらに、GFP プラスミド DNA (pGFP-N3: 5-150 μ g/ml) の量を増加させるにつれて、ASCs への遺伝子導入率が高まった。

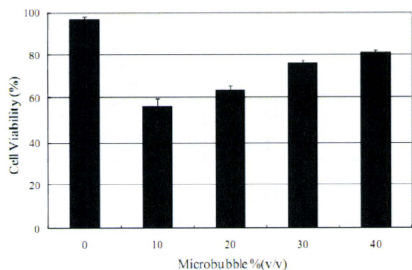


Fig 3. The viability of ASCs before/after sonoporation (0-40%). In these experiments, 2×10^4 cells per well were subjected to US (frequency 3.1 MHz, duty cycle 50%, burst rate 2.0 Hz, intensity 1.27 W/cm^2) for 30 sec.

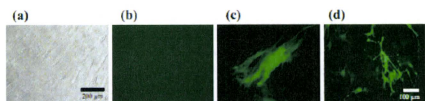


Fig 4. Microscopy after GFP gene transfer. (a) Light microscopy of a normal control sample without sonoporation and GFP gene transfer ($60 \mu\text{g/ml}$). (b) Fluorescent microscopy of a normal control sample without GFP expression. (c, d) Fluorescent microscopy revealed GFP expression after sonoporation with the GFP gene ($60 \mu\text{g/ml}$) and 10% sonazoid. Scale bar, $100\text{-}200 \mu\text{m}$.

C-2 誘導多能性幹細胞の凍結保存液の検討

12種類の凍結保存液を用いて、凍結融解後のiPS細胞の生存率、細胞形態および増殖能を評価したところ、セルバンカープラス、セルバンカー3が細胞の形態も良く、増殖能も高い傾向を示した (Fig 5, Fig 6).

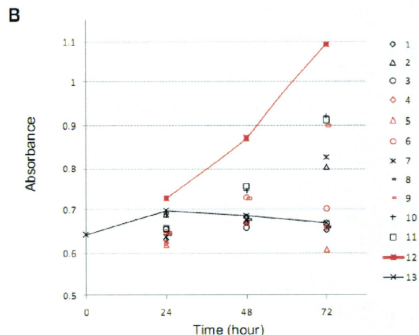
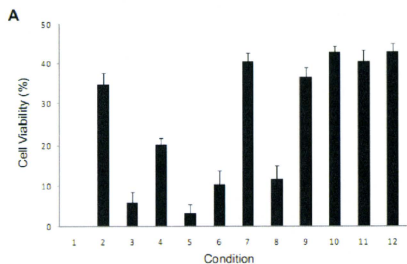


Fig 5: The viability (A) and proliferation (B) of the cryopreserved iPS cells frozen using different preservation solutions. 1; ES culture medium, 2; ES culture medium containing 10% DMSO, 3; ES culture medium + 10% Glycerol, 4; ES culture medium + 5% DMSO, 5; ES culture medium + 5% Glycerol, 6; ES culture medium + 5% DMSO, 5% Glycerol, 7; Cell Freezing Medium-DMSO, 8; Cell Freezing Medium-Glycerol, 9; Cell Banker 1, 10; Cell Banker 1', 11; Cell Banker 2, 12; Cell Banker 3, 13; only MEF feeder cell. The data are the means and SD of three independent experiments.

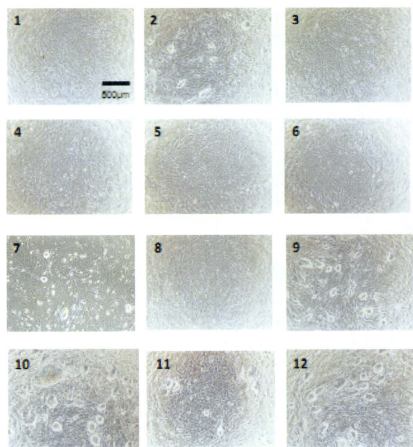


Fig 6: The phase-contrast photomicrographs of iPS cells after cryopreservation (1)-(12). 1; ES culture medium, 2; ES culture medium containing 10% DMSO, 3; ES culture medium + 10% Glycerol, 4; ES

culture medium + 5% DMSO, 5; ES culture medium + 5% Glycerol, 6; ES culture medium + 5% DMSO, 5% Glycerol, 7; Cell Freezing Medium-DMSO, 8; Cell Freezing Medium-Glycerol, 9; Cell Banker 1, 10; Cell Banker 1*, 11; Cell Banker 2, 12; Cell Banker 3. The photomicrographs were taken with (A) x 40 and (B) x 100 objectives. The iPS cells were cultured on mitomycin-treated MEF cells for 3 days after inoculation. Scale bar = 500 μ m.

また、ヌードマウスの皮下に凍結保存・増殖した iPS 細胞を移植すると、三胚葉系の各種組織を含むテラトーマの形成が確認できた (Fig 7)。

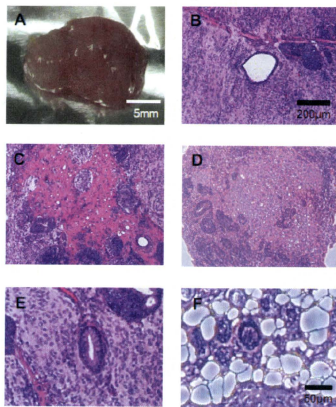


Fig 7: Teratoma formation by iPS cells. Various tissues were present in teratomas derived from iPS cells. (A) Four weeks after the injection, the teratoma was surgically dissected from the mice. (B)–(F) Slides were stained with hematoxylin and eosin. (B) Artery-like structures. (C) Nerve-like structures. (D) Cartilage-like structures. (E) Gut epithelium-like structures. (F) Adipose-like structures.

D-考察

超音波ナビゲーション技術では、生体内における微小気泡の安定及び効率的な捕捉の条件を考察する。周波数には 3 [MHz] などの低い周波数が多い微小気泡を捕捉する事ができ、効率が良いと考えられる。音圧は、可能な限り高い音圧を使用した方が多くの微小気泡を捕捉出来る。照射時間は照射時間が長い方が捕捉出来る量が多くなり、照射時間を長くする事により照射を終了しても照射時と同等の捕捉量を実現出来る。

超音波遺伝子導入技術の開発は、照射時間をパラメータとした結果から、照射時間が長いほど、遺伝子導入率が向上し、生存率は低下していた。これは、照射時間の増大に伴い 1 パルス間に生じる細胞膜表面の小

孔のサイズが大きくなることに起因すると考察される。また、照射休み時間をパラメータとした結果から照射休み時間の増加に伴い、遺伝子導入率、細胞生存率ともに向上している。これは、十分な照射休み時間を設けることで細胞へのダメージが抑制され、小孔が生じ遺伝子が導入された細胞が生存できるようになったことに起因すると考察される。

マウス胎仔肝への超音波併用遺伝子導入手技の開発については、子宮内マウス胎仔の肝に対して、マイクロバブル (ソナゾイド) と DNA プラスミドとの併用による遺伝子導入率の向上が確認された。また、遺伝子の発現は超音波照射から 1 週間後まで確認された。その後は発現が確認されなかったことから、一過性の発現であると考えられる。DNA に組み込まれることなく一過性に発現し消失するため、低侵襲な超音波と組み合わせることでより安全な遺伝子治療を確立できる可能性が示された。

超音波診断装置を用いた標的部位への遺伝子導入の基礎検討では、超音波診断装置 Prosound α 10 を用いてうさぎ腎臓の造影に成功した。また、ソナゾイドの濃度を変更することにより血管から腎臓全体まで造影可能であった。今回の結果から、注入するマイクロバブルの濃度を調節し、超音波造影で確認することにより遺伝子導入をコントロールできる可能性が示唆された。

ヒト肝細胞・組織の供給体制の整備としては、ヒト肝組織 (国立成育医療研究センターにてインフォームドコンセント済み) から得られた肝細胞を収集することに成功した。得られた肝細胞を免疫不全マウスに移植し、体内でヒトアルブミン産生も確認できた。成育疾患の中でも入手困難な先天性代謝異常症のバイオソースを構築することができ、本事業の治療対象である胎児や新生児の治療成績と予後を改善しうる治療システムの開発に大きく寄与すると考えられる。

組織由来幹細胞への超音波遺伝子導入・培養・保存方法の検討においては幹細胞への超音波遺伝子導入法の検討を行った。ソノポレーション後に、ASCs の約 40% はダメージを受けたが、細胞内への遺伝子の取り込みが確認できた。さらに、幹細胞の中でも、有力な細胞ソースである誘導多能性幹細胞 (iPS 細胞) の凍結保存液を検討し、最適な保存液を見出した。誘導多能性幹細胞の品質を確保することができたので、今後の研究に利用されることを期待する。

E-結論

本研究は本年度 (3 年目) で最終年度を迎えたが、各研究課題における要素技術 (超音波ナビゲーション in vitro/超音波遺伝子導入 in vitro, in vivo) はほぼ確立された。「胎児肝超音波照射による遺伝子機能発現の出生前正」における新たな可能性を見出すことができた。特に、臨床現場で利用されている超音波造影剤 (ソナゾイド) を用いた超音波遺伝子導入/ナビゲーション技術の基盤を構築し、in vitro から in vivo へ展開した。超音波ナビゲーション・超音波遺伝子導

入の要素を組み合わせた使用も可能になった。また、成育における細胞資源バンクの整備から、疾患モデル細胞および動物による出生前後の遺伝子機能発現評価系の構築と胎児への安全・低侵襲性を確保できたことは、今後の胎児期遺伝子治療において、多大なる発展に寄与するとともに、継続的な研究を行う必要がある。

F. 健康危険情報
なし

F. 研究発表

F-1. 論文発表

2008 年

- Sullivan S, Ichida JK, Umezawa A, Akutsu H. Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach. *Reprod Biomed Online* 16 (1) 41-502 2008
- Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (35) 12921-12926 2008

2009 年

- Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells *GenesCells* 14 (12) 1395-1404 2009
- Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi J, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation* 78 (2-3) 137-142 2009
- Yazawa T, Inanoka Y, Mizutani T, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K. Liver receptor homolog-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. *Endocrinology* 150 (8) 3885-3893 2009
- Kohji Masuda, Yusuke Muramatsu, Sawami Ueda, Ryusuke Nakamoto, Yusuke Nakayashiki, and Ken Ishihara Active Path Selection of Fluid Microcapsules in Artificial Blood Vessel by Acoustic Radiation Force *Japanese Journal of Applied Physics* 48 (7) 07GK03 2009

2010 年

- Haraguchi Y, Sekine W, Shimizu T, Yamato M, Miyoshi S, Umezawa A, Okano T. Development of a new assay system for evaluating the permeability of various substances through three-dimensional tissue. *Tissue Eng Part C Methods* 16 (4) 685662 2010
- 梶田晃司, 中元隆介, 渡會展之 「超音波による生体内マイクロカプセルの動態制御」非破壊検査 非破壊検査 59 (11) 562-566 2010
- Kohji Masuda, Nobuyuki Watarai, Ryusuke Nakamoto, and Yusuke Muramatsu Production of local acoustic radiation force to constrain direction of microcapsules in flow *Japanese Journal of Applied Physics* 4907HF11 2010
- Miyamoto Y, Teramoto N, Hayashi S, Enosawa S An improvement in the attaching capability of cryopreserved human hepatocytes by a proteinaceous high molecule, Sericin, in the serum-free solution *Cell Transplantation* 19 (6) 701-706 2010
- Yukawa H, Noguchi H, Nakase I, Miyamoto Y, Oishi K, Hamajima N, Futaki S, Hayashi S Transduction of Cell-Penetrating Peptides into Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Transplantation* 19 (6) : 901-909 2010
- Yukawa H, Kagami Y, Watanabe M, Oishi K, Miyamoto Y, Okamoto Y, Tokeshi M, Kaji N, Noguchi H, Ono K, Sawada M, Baba Y, Hamajima N, Hayashi S Quantum dots labeling using octa-arginine peptides for imaging of adipose tissue-derived stem cells *Biomaterials* 31 (14) 4094-4103 2010
- Oishi K, Noguchi H, Saito H, Yukawa H, Miyamoto Y, Murase K, Hayashi S Cell Labeling with a Novel Contrast Agent of Magnetic Resonance Imaging. *Cell Transplantation* 19 (6) 887-892 2010
- 宮本義孝, 大石幸一, 湯川博, 野口洋文, 佐々木真宏, 岩田久, 林榮治 ヒト脂肪組織由来幹細胞における細胞凍結保存液の検討 低温生物工学会誌 56 (1) 55-58 2010

2011 年

- Yazawa T, Kawabe S, Inaoka Y, Okada R, Mizutani T, Imamichi Y, Ju Y, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol Cell Endocrinol* 336 (1-2) 127-132 2011
- Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K,

- Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther* 19 (2) 400-407 2011
- Kohji Masuda, Ryusuke Nakamoto, Nobuyuki Watarai, RenKoda, Yuto Taguchi, Teruyuki Kozuka, Yoshitaka Miyamoto, Takashi Kakimoto, Shin Enosawa, Toshio Chiba Effect of the existence of red blood cell in trapping performance of microbubbles by acoustic radiation force *Japanese Journal of Applied Physics* 50 印刷中 2011
 - Miyamoto Y, Noguchi H, Yukawa H, Oishi K, Matsushita K, Iwata H, Hayashi S Cryopreservation of Induced Pluripotent Stem Cells *Cell Medicine* accept (2011)
 - Miyamoto Y, Oishi K, Yukawa H, Noguchi H, Sasaki M, Iwata H, Hayashi S Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin *Cell Transplantation* accept (2011)
 - Miyamoto Y, Ueno H, Hokari R, Yuan W, Kuno S, Kakimoto T, Enosawa S, Negishi Y, Yoshinaka K, Matsumoto Y, Chiba T, Hayashi S Ultrasound-assisted gene transfer to adipose tissue-derived stem/progenitor cells (ASCs) 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (AIP Conference Proceedings)

F-2. 学会発表

2008年

- Nakamura Y, Yoshinaka K, Takagi S, Matsumoto Y Ultrasound gene transfer into fibroblast cells under microbubble 8th International Symposium on Therapeutic Ultrasound 2008 103 2008
- 橘理恵, 岡本旭生, 葭仲潔, 高木周, 松本洋一郎 超音波印電子導入の蛍光顕微鏡による可視化 可視化情報全国講演会 2008 28 (2) 155-156 2008
- 橘理恵, 岡本旭生, 葭仲潔, 高木周, 松本洋一郎 マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入に関する研究第7回日本超音波治療研究会 2008 CD-ROM 2008

2009年

- 岡本旭生, 橘理恵, 葭仲潔, 高木周, 松本洋一郎, 長棟輝行, 山口哲志 マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入第48回日本生体医工学会大会, タワーホール船堀, 日本生体医工学会誌 47 suppl. 1 300 2009
- 橘理恵, 岡本旭生, 葭仲潔, 高木周, 松本洋一郎 マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入に関する研究 日本超音波医学会第82回学術集会 36Suppleme 56 2009

- 岡本旭生, 橘理恵, 葭仲潔, 高木周, 松本洋一郎 マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入第8回日本超音波治療研究会 2009 2009
- Tachibana R, Okamoto A, Yoshinaka K, Takagi S, Matsumoto Y Micro-Bubble Enhanced Sonoporation AIP CONFERENCE PROCEEDINGS 1215 9TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THERAPEUTIC ULTRASOUND 2009 315-318 2009
- 橘理恵, 岡本旭生, 葭仲潔, 高木周, 松本洋一郎 マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入に関する研究第14回キャピテーションに関するシンポジウム 2009 CD-ROM 2009
- Ryusuke Nakamoto, Kohji Masuda, Nobuyuki Watarai, Yuto Taguchi, Toshikazu Kato, Takashi Yoshinaga, Yoshitaka Miyamoto and Toshio Chiba Evaluation of trapping performance of fluid microcapsules to the parameter variation in acoustic radiation *Proc. of the 30th Symposium on Ultrasonic Electronics* 2009 545-546 2009
- Kohji Masuda, Nobuyuki Watarai, Ren Koda, Ryusuke Nakamoto and Yusuke Muramatsu Production of local acoustic radiation force to constrain microcapsules from diffusion in blood vessel *Proc. of the 30th Symposium on Ultrasonic Electronics* 2009 529-530 2009
- Kohji Masuda, Ryusuke Nakamoto, Yusuke Muramatsu, Yoshitaka Miyamoto, Keri Kim and Toshio Chiba Active Control of Microcapsules in Artificial Blood Vessel by producing Local Acoustic Radiation Force *Proc. of 31st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBS)* 2009 295-298 2009
- 中元隆介, 村松悠佑, 上田沢美, 榎田晃司, 千葉敏雄, 宮本義孝 音響放射力の作用による流路中のマイクロカプセル捕捉法の検討 日本超音波医学会第82回学術集会論文集 36 S305 2009
- 中元隆介, 村松悠佑, 上田沢美, 中屋敷悠介, 榎田晃司, 宮本義孝, 千葉敏雄 局所的音響放射力による流体中のマイクロカプセルの安定な捕捉法の検討 第48回日本生体医工学会大会プログラム・論文集 2009 CD-ROM 2009
- 元文姫, 上野瞳, 穂刈玲, 柿本隆志, 久野周一, 土屋玲子, 宮本義孝, 絵野沢伸, 千葉敏雄. マイクロバブルと超音波による in vivo 遺伝子導入の試み. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜, 2009年12月9-12日
- 穂刈玲, 上野瞳, 元文姫, 久野周一, 柿本隆志, 土屋玲子, 宮本義孝, 絵野沢伸, 千葉敏雄. エコーガンによる非ウイルスベクターの細胞内への導入. 第32

回日本分子生物学会年会. 横浜, 2009年12月9-12日

- ・ 土屋玲子, 上野瞳, 元文姫, 穂苅玲, 久野周一, 柿本隆志, 宮本義孝, 絵野沢伸, 葭仲潔, 松本洋一郎, 千葉敏雄. 第8回日本超音波治療研究会. 東京, 2009年11月28日

2010年

- ・ A. Okamoto¹, R. Tachibana¹, K. Yoshinaka², K. Osada³, S. Takagi¹, K. Kataoka^{2, 3}, U. Chung², and Y. Matsumoto A Study of Micro-bubble Enhanced Ultrasound Gene Induction IFMBE Proceedings Vol. 31 1117-1120 2010
- ・ 岡本 旭生, 橋 理恵, 葭仲 潔, 長田 健介, 高木 周, 片岡 一則, 鄭 雄一, 松本 洋一郎 マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入法の高効率化 キヤピテーションに関するシンポジウム (第15回) A1-3 1-4 2010
- ・ 村松悠佑, 榎田晃司 模擬血管中を流れるマイクロカプセルに対する音響放射力とその影響 超音波抄ノ 22 (1) 105-109 2010
- ・ Ryusuke Nakamoto, Nobuyuki Watarai, Ren Koda, Kohji Masuda, Teruyuki Kozuka, Yoshitaka Miyamoto and Toshio Chiba Effect of the existence of red blood cell in trapping performance of microbubbles by acoustic radiation force Proc. of the 31st Symposium on Ultrasonic Electronics 2010 383-384 2010
- ・ Ren Koda, Nobuyuki Watarai, Ryusuke Nakamoto, Nobuhiko Shigehara, Taku Ohta and Kohji Masuda Observation of aggregation forming of microcapsules under various conditions of ultrasound emission Proc. of the 31st Symposium on Ultrasonic Electronics 2010 387-388 2010
- ・ Kohji Masuda, Ren Koda, Nobuyuki Watarai, Ryusuke Nakamoto, Yoshitaka Miyamoto and Toshio Chiba Attempt for active control of microbubbles in blood flow by forming local acoustic field Proc. of 9th Congress of Asian Federation of Societies for Ultrasound in Med 2010 90 2010
- ・ Kohji Masuda, Nobuyuki Watarai, Ryusuke Nakamoto, Yoshitaka Miyamoto, Keri Kim and Toshio Chiba Study to prevent the Density of Microcapsules from diffusing in Blood Vessel by Local Acoustic Radiation Force Proc of 32nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBS) 2010 402-405 2010
- ・ 榎田晃司, 中元隆介, 江田廉, 渡會展之, 宮本義孝, 千葉敏雄 凝集体形成を利用した微小気泡の生体内超音波制御法の検討 日本超音波医学会第22回関東甲信越地方会学術集会抄録集 2010 60 2010

- ・ 渡會展之, 江田廉, 中元隆介, 榎田晃司, 宮本義孝, 千葉敏雄 血管分岐部での凝集体形成によるマイクロカプセルの流路選択性向上のための実験的検討 日本超音波医学会 第83回学術集会論文集 37 S338 2010

- ・ Wenji YUAN, Takashi KAKIMOTO, Shuichi KUNO, Yoshitaka MIYAMOTO, Shin ENOSAWA, Takashi MOCHIZUKI, Koji MASUDA, Yoichiro MATSUMOTO, Toshio CHIBA: Fetal gene therapy: a combination of non-viral vector and ultrasound irradiation, IFMSS2010, September 2010.

- ・ Miyamoto Y, Ueno H, Hokari R, Yuan W, Kuno S, Kakimoto T, Enosawa S, Yoshinaka K, Matsumoto Y, Chiba T, Hayashi S: Ultrasound-assisted gene transfer to adipose tissue-derived stem/progenitor cells (ASCs). 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (ISTU10), Tokyo Japan, 2010/6/9-12.

- ・ Kakimoto T, Gen B, Kuno S, Hoakri R, Tsuchiya R, Miyamoto Y, Enosawa S, Mochizuki T, Umezawa A, Masuda K, Matsumoto Y, Chiba T: Minimally Invasive Fetal Gene Therapy Using Nonviral Vector by Ultrasound Irradiation. 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (ISTU10), Tokyo Japan, 2010/6/9-12.

2011年

- ・ Okamoto A., Tachibana R., Yoshinaka K., Takagi S., Kataoka K., Matsumoto Y A study of micro-bubble enhanced sonoporation 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (AIP Conference Proceedings) In press (2011)

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

研究成果の刊行に関する一覧表
書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-----|------|-----|-----|-----|
| | | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|--------------------------|----------|-------------|------|
| Sullivan S, Ichida JK, Umezawa A, Akutsu H. | Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach. | Reprod Biomed Online | 16 (1) | 41-50 | 2008 |
| Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. | The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. | Proc Natl Acad Sci U S A | 105 (35) | 12921-12926 | 2008 |
| Takahashi H, Toyoda M, Birumachi J, Horie A, Uyama T, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A | Shortening of human cell life span by induction of p16ink4a through the platelet-derived growth factor receptor beta | J Cell Physiol | 221 (2) | 335-342 | 2009 |
| Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi JI, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A | Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9 | Differentiation | 78 (2-3) | 137-142 | 2009 |
| Yazawa, T, Inanoka Y, Mizutani T, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K | Liver receptor homolog-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells | Endocrinology | 150 (8) | 3885-3893 | 2009 |
| 岡本旭生, 橋理恵, 葭仲潔, 高木周, 松本洋一郎 | マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入 | 第8回日本超音波治療研究会 | 2009 | 18 | 2009 |

| | | | | | |
|---|--|--|---------|-----------|------|
| Kohji Masuda, Yusuke Muramatsu, Sawami Ueda, Ryusuke Nakamoto, Yusuke Nakayashiki, and Ken Ishihara | Active Path Selection of Fluid Microcapsules in Artificial Blood Vessel by Acoustic Radiation Force | Japanese Journal of Applied Physics | 48 (7) | 07GK03 | 2009 |
| Ryusuke Nakamoto, Hayato Yamauchi, Yusuke Muramatsu, Kohji Masuda, Yoshitaka Miyamoto and Toshio Chiba | Evaluation of trapping performance of fluid microcapsules to the parameter variation in acoustic radiation | Proc. of the 30th Symposium on Ultrasonic Electronics, Nov. 2009, Kyoto | 2009 | 545-546 | 2009 |
| Kohji Masuda, Nobuyuki Watarai, Ren Koda, Ryusuke Nakamoto and Yusuke Muramatsu | Production of local acoustic radiation force to constrain microcapsules from diffusion in blood vessel | Proc. of the 30th Symposium on Ultrasonic Electronics, Nov. 2009, Kyoto | 2009 | 529-530 | 2009 |
| Kohji Masuda, Ryusuke Nakamoto, Yusuke Muramatsu, Yoshitaka Miyamoto, Keri Kim, and Toshio Chiba | Study to trap fluid microcapsules in artificial blood vessel by producing local acoustic radiation force | IFMBE Proceedings (World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering) | Vol. 25 | 206-207 | 2009 |
| Kohji Masuda, Ryusuke Nakamoto, Yusuke Muramatsu, Yoshitaka Miyamoto, Keri Kim and Toshio Chiba | Active Control of Microcapsules in Artificial Blood Vessel by producing Local Acoustic Radiation Force | Proc. of 31st Annual International Conference of the IEEE EMBS | 2009 | 295-298 | 2009 |
| 中元隆介, 村松悠佑, 上田沢美, 中屋敷悠介, 梶田晃司, 宮本義孝, 千葉敏雄 | 局所的音響放射力による流体中のマイクロカプセルの安定な捕捉法の検討 | 第 48 回日本生体医工学大会プログラム | 2009 | CD-ROM | 2009 |
| 宮本義孝, 金季利, 上野瞳, 林衆治, 千葉敏雄 | 脂肪組織由来幹細胞を用いた超音波遺伝子導入法の検討 | 第 32 回日本分子生物学会年会 | 2009 | 264 | 2009 |
| Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. | Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. | Genes Cells | 14 (12) | 1395-1404 | 2009 |

| | | | | | |
|---|---|---|----------|-----------|------|
| Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi J, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, <u>Umezawa A.</u> | Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. | Differentiation | 78 (2-3) | 137-142 | 2009 |
| Yazawa T, Inanoka Y, Mizutani T, Kuribayashi M, <u>Umezawa A.</u> Miyamoto K. | Liver receptor homolog-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. | Endocrinology | 150 (8) | 3885-3893 | 2009 |
| 土屋玲子, 上野瞳, 元文姫, 穂苅玲, 久野周一, 柿本隆志, 宮本義孝, 絵野沢伸, 葭仲潔, 松本洋一郎, <u>千葉敏雄</u> | 超音波とマイクロバブルによる胎児遺伝子治療の検討 | 第8回日本超音波治療研究会 | 2009 | 22 | 2009 |
| Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, <u>Umezawa A.</u> | Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development | Hum Mol Genet | 19 (3) | 480-493 | 2010 |
| 宮本義孝, 腰高由美恵, 湯川博, 野口洋文, 岩田久, 小林護, 加茂功, 桜川宣男, 林衆治 | ヒト可溶化羊膜 (HSAP) の脂肪組織由来幹細胞への影響 | 日本再生医療学会雑誌 | 9 Suppl. | 291 | 2010 |
| 宮本義孝, 大石幸一, 湯川博, 野口洋文, 佐々木真宏, 岩田久, 林衆治. | ヒト脂肪組織由来幹細胞における細胞凍結保存液の検討 | 低温生物工学会誌 | 56 (1) | 55-58 | 2010 |
| Wenji YUAN, Takashi KAKIMOTO, Shuichi KUNO, Yoshitaka MIYAMOTO, Shin ENOSAWA, Takashi MOCHIZUKI, Koji MASUDA, Yoichirou MATSUMOTO, Toshiro CHIBA: | Fetal gene therapy: a combination of non-viral vector and ultrasound irradiation | IFMSS2010 | | | 2010 |
| Miyamoto Y, Ueno H, Hokari R, Yuan W, Kuno S, Kakimoto T, Enosawa S, Yoshinaka K, Matsumoto Y, Chiba T, Hayashi S | Ultrasound -assisted gene transfer to adipose tissue-derived stem/progenitor cells (ASCs) | 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (ISTU10) | | | 2010 |

| | | | | | |
|---|---|---|---------|-----------|------|
| Kakimoto T, Gen B, Kuno S, Hoakri R, Tsuchiya R, Miyamoto Y, Enosawa S, Mochizuki T, Umezawa A, Masuda K, Matsumoto Y, Chiba T | Minimally Invasive Fetal Gene Therapy Using Nonviral Vector by Ultrasound Irradiation | 10th International Symposium on Therapeutic Ultrasound (ISTU10) | | | 2010 |
| Haraguchi Y, Sekine W, Shimizu T, Yamato M, Miyoshi S, Umezawa A, Okano T. | Development of a new assay system for evaluating the permeability of various substances through three-dimensional tissue. | Tissue Eng Part C Methods | 16 (4) | 685692 | 2010 |
| A. Okamoto ¹ , R. Tachibana ¹ , K. Yoshinaka ² , K. Osada ³ , S. Takagi ¹ , K. Kataoka ² , U. Chung ² , and Y. Matsumoto | A Study of Micro-bubble Enhanced Ultrasound Gene Induction | IFMBE Proceedings | Vol. 31 | 1117-1120 | 2010 |
| 岡本 旭生, 橋 理恵, 葭仲 潔, 長田 健介, 高木 周, 片岡 一則, 鄭 雄一, 松本 洋一郎 | マイクロバブルを援用した超音波遺伝子導入法の高効率化 | キャビテーションに関するシンポジウム (第15回) | A1-3 | 1-4 | 2010 |
| 榎田晃司, 中元隆介, 渡會展之 | 「超音波による生体内マイクロカプセルの動態制御」非破壊検査 | 非破壊検査 | 59 (11) | 562-566 | 2010 |
| Kohji Masuda, Nobuyuki Watarai, Ryusuke Nakamoto, and Yusuke Muramatsu | Production of local acoustic radiation force to constrain direction of microcapsules in flow | Japanese Journal of Applied Physics | 49 | 07HF11 | 2010 |
| 村松悠佑, 榎田晃司 | 模擬血管中を流れるマイクロカプセルに対する音響放射力とその影響 | 超音波テクノ | 22 (1) | 105-109 | 2010 |
| Ryusuke Nakamoto, Nobuyuki Watarai, Ren Koda, Kohji Masuda, Teruyuki Kozuka, Yoshitaka Miyamoto and Toshiro Chiba | Effect of the existence of red blood cell in trapping performance of microbubbles by acoustic radiation force | Proc. of the 31st Symposium on Ultrasonic Electronics | 2010 | 383-384 | 2010 |
| Ren Koda, Nobuyuki Watarai, Ryusuke Nakamoto, Nobuhiko Shigehara, Taku Ohta and Kohji Masuda | Observation of aggregation forming of microcapsules under various conditions of ultrasound emission | Proc. of the 31st Symposium on Ultrasonic Electronics | 2010 | 387-388 | 2010 |