15 - 24 がん患者QOL向上のための再生医学を用いた 複合組織再建技術の開発に関する研究

主任研究者 東京大学医学部附属病院 高戸 毅

研究成果の要旨

本申請は、再生医学と生体材料工学の最先端の技術を融合させて、がん治療後の複合組織欠損を再建する治療技術を開発することを目的とする。本年度は、組織再生のための三要素である細胞・足場・シグナルのそれぞれについて、

細胞に関しては、ヒト胚性幹細胞操作法の習熟、ヒト間葉系幹細胞の分離と増殖・分化の最適化、ヒト体細胞（骨・軟骨・皮膚）の分離と増殖・分化の最適化

足場に関しては、間葉系への細胞シート法応用、リン酸カルシウム・アテロコラーゲン・PLLAの3次元造形法開発

シグナルに関しては、細胞種を選ばず骨・軟骨誘導する最小シグナルユニットの同定、軟骨の脱分化を抑制する培養法の開発、生体内で安定に機能するプラスミドナノキャリアの開発

これらの成果を組み合わせ、小動物における複合組織欠損モデルに移植

を行い、この結果、小動物における複合組織欠損モデルある程度治療することに成功し、今後の大動物実験を経て、臨床研究につながる道筋をつけることに成功した。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
高戸 毅	東京大学医学部附属病院 教授	顎・顔面の複合組織欠損モデルの作製と、再生組織の移植
中村 耕三	東京大学医学部附属病院 教授	体幹・四肢の複合組織欠損モデルの作製と、再生組織の移植
鄭 雄一	東京大学医学部附属病院 助教授	幹細胞増殖・分化プロトコルの樹立と複合組織3次元培養
片岡 一則	東京大学大学院工学系研究科 教授	ナノミセルを用いた遺伝子導入法の開発
中辻 憲夫	京都大学再生医科学研究所 教授	再生医療細胞源としてのES細胞の作製と操作法
岡野 光夫	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授	複合組織3次元培養のための新規担体の開発
田畑 雅士	国立病院機構都城病院 歯科部長	骨髄間葉系幹細胞から分化させた骨芽細胞とハイドロキシアパタイト生分解性高分子ゲルによる顎骨再建

総括研究報告

1 研究目的

がん切除後に伴い、皮膚・神経・筋肉・骨・軟骨などの複合組織の欠損が生じ、がん患者のQOLを著しく低下させている。このような組織欠損を補うために、自己組織

を移植する様々な技術が開発されてきた。マイクロサージャリーを用いて血行を温存した複合組織移植術により、大きく複雑な組織欠損も修復可能になってきた。さらに

人工関節、人工骨頭、人工血管など多岐にわたる体内埋め込み型デバイスも開発・使用されている。しかし、自家組織移植では、十分な組織量が得られないことが多く、組織採取部に新たな組織欠損や瘢痕を残すこととなり、機能的・形態的にもまだ満足のいく結果が得られていない。他家組織移植は、ドナーの慢性的不足や免疫学的問題など多くの問題を抱えている。人工組織の完成度は高いものの、長期使用によるゆるみ、感染、異物反応など依然として未解決な問題を残している。このため自己への侵襲が可及的に小さく、免疫学的に問題なく、形態的・機能的にも優れた組織修復法の開発が望まれる。本申請は、再生医学と生体材料工学の最先端の技術を融合させて、がん治療後の複合組織欠損を再建する安全かつ安心な治療技術を開発することを目的とする。

2 研究成果

胚性幹細胞（ES細胞）を細胞移植治療に利用する上で霊長類ES細胞の効率的かつ安定した作成方法の確立、ならびにES細胞に対する遺伝子操作技術の確立は重要である。我々は、これまでにカニクイザル胚盤胞から極めて効率の良いES細胞株の樹立方法を開発すると同時に、サルES細胞へのエレクトロポレーション方による遺伝子導入システムを用いて遺伝子改変技術の開発研究を行った。つぎに、サルES細胞株樹立のために最適化した方法を用いて、ヒトES細胞株の樹立を行い、3株の樹立に成功した。未分化マーカー分子の発現、染色体構成、細胞分化能の解析を行ったところ、未分化ES細胞特異的マーカーを発現し、正常2倍体の核型を保持するとともに、多能性をもつことを確認できた。これらの結果により、標準的なヒトES細胞株であると考え、KhES-1、KhES-2 および KhES-3 と命名した。このようなカニクイザルとヒトES細胞株の樹立と特性解析研究を行う中で、樹立培養方法の詳細な最適化を行い、凍結保存方法についても条件の改良を行った結果、安定して凍結融解を行うことが可能になった。

しかしながら、安定して医療応用可能なヒトES細胞を増殖維持するためには、LIF添加で未分化性を維持できないことから、多能性制御機構の解析が必要である。そこで、マウスES細胞においてLIFのレセプターからSTAT3を経由したシグナル伝達系がサルES細胞ではどのように機能しているかについて詳細な解析を行った。

マウスES細胞の場合、LIF-STAT3シグナル伝達経路がその未分化維持に重要な役割を担っており、LIFの持つ分化抑制作用によりマウスES細胞は支持細胞無しに安定して未分化状態を維持することが可能であるのに対して、ヒトを含む霊長類ES細胞ではLIFによる分化抑制効果は認められない。そこでサルES細胞を用いて未分化維持へのLIF-STAT3シグナル伝達経路の関与を検討した。

サルES細胞をLIFで刺激したところ、活性化に伴うSTAT3のリン酸化ならびにリン酸化STAT3の核内への移行が確認され、これと一致してSTAT3標的遺伝子の転写活性化が認められた。未分化維持へのSTAT3の役割を明らかにするためドミナントネガティブSTAT3を強制発現させた結果、これまでの報告と一致してマウスES細胞ではその強制発現によって著しく分化が誘導された。これに対してサルES細胞では、LIF刺激に伴う内源性STAT3のリン酸化、核内への移行および転写活性化はいずれもドミナントネガティブSTAT3強制発現によって阻害されているにもかかわらず、その強制発現株は分化することなく長期間増殖・維持することが可能であった。さらにこれら強制発現株の分化能を胚様体形成により調べたところ、内胚葉・外胚葉・中胚葉の三胚葉への細胞分化が認められ、STAT3シグナルを阻害してもなお多分化能を有することが確認された。

以上の結果から、マウスES細胞と異なり霊長類ES細胞ではLIF-STAT3シグナル伝達経路は機能しているにもかかわらず未分化維持に必須な役割を担っておらず、支持細胞に起因する他のSTAT3非依存的な機構で未分化維持が調節されていることが示された。

これまでに骨芽細胞・軟骨細胞特異的に発現するマーカー遺伝子(COL1-GFP、COL2-GFP)を用いた正確・簡便・非侵襲的な骨芽細胞分化モニタリングシステムを新たに開発し、このシステムを用いて細胞種を問わず短期間で骨芽細胞・軟骨細胞分化を誘導するシグナルを系統的・網羅的に検索した。骨芽細胞・軟骨細胞への分化に深く関与することが指摘されている数種のシグナル(BMP、IGF、Hh、Sox等)を活性化あるいは抑制する遺伝子を発現するアデノウィルスベクターを組み合わせてCOL1-GFP・COL2-GFPES細胞に導入し、骨芽細胞・軟骨細胞分化をGFP蛍光を指標に判定したところ、1週間以内にGFP陽性細胞を認める組合せをそれぞれ同定した。これらの組合せはマウスES細胞・骨髄間葉系幹細胞・ヒト線維芽細胞に対して、マウス初代骨芽細胞・軟骨細胞と同程度の骨芽細胞・軟骨細胞分化マーカーの著しい発現上昇と基質の産生を1週間前後で誘導した。いずれの細胞種においても、単独シグナルの導入では期間内の分化誘導を認めなかった。さらにHeLa細胞などの非中胚葉系細胞株においても、この組合せは速やかに骨芽細胞・軟骨細胞分化マーカーを誘導した。以上より、細胞種を問わず短期間で骨芽細胞・軟骨細胞への分化誘導をするシグナルの組合せを同定した。今年度は、この組合せのうち最小のユニットを同定し、骨分化ではAlk6+Runx2、軟骨分化ではSox9+Sox5/Sox6のどちらかであることを見いだした。また、足場担体の3次元造形に関しては、3次元プリンター(DICO社製Z406;日立造船社製EOSINT P380)を用いて、健側の骨軟骨画像データから患側の欠損を補填する形状のハイドロキシアパタイトあるいは生分解性プラスチックでできた担体の作製に成功し、ビーグル犬による移植実験を施行中である。

温度に応じて水との親和性を大きく変化させる温度応答性高分子を培養皿表面に共有結合的に固定化することにより温度応答性培養皿を開発している。この表面は、37℃では市販の培養皿と同程度の弱い疎水性を示し様々な細胞が接着・伸展するが、温度を32℃以下に下げると高度の親水性を示し、トリプシンなどのタンパク質分解酵素を必要とすることなく細胞を脱着させることができる。コンフルエントな細胞層を形成させた後に低温処理すると、全細胞を細胞・細胞間接着により連結した一枚の細胞シートとして脱着・回収をすることができる。

骨組織は解剖学的に内外骨膜と呼ばれる結合組織に囲まれている。骨の成長は、骨膜で生じるため、骨膜には骨よりも細胞成分に富んでいる。また、血管と共にコラーゲン線維からなる粗性結合組織を豊富に含んでいる。これまでの研究から、骨膜由来細胞が骨・軟骨形成に必須である細胞増殖・分化に大きく関与していることが示唆されている。

生分解性高分子製細胞担体を作製し、小動物(ラット)への移植実験により評価すると共に、温度応答性培養皿を用いて作製した骨膜細胞シート中の細胞外マトリックスを新規細胞担体として用いる可能性について体系的な検討を行った。生分解性高分子性細胞担体としてはポリ乳酸、ポリグリコール酸、および両者の共重合体、フィブリンゲルを評価した。ポリ乳酸、ポリグリコール酸、および両者の共重合体は合成直後の状態では非常に疎水性が高く細胞接着性、組織親和性が非常に低いため、アルカリ処理により表面の親水化をおこなった。これらはラット背部ないし腹部皮下に移植し、移植部位の炎症など異物反応を組織学的に評価した。また、培養骨膜細胞シートを安定して作製するという培養条件を最適化し、生化学的、組織学的に評価すると共に、ラット頭頂骨骨欠損部位に移植した。培養骨膜細胞シートの回収には温度応答性培養皿を用い、低温処理(20℃)により回収した。

なお実験動物を使用した実験に関しては東京女子医科大学動物実験に関する指針に従い、ヘルシンキ宣言の精神を尊重して十分な倫理的配慮のもとに行った。

ラット皮下に移植した、生分解性高分子性細胞担体はいずれも、分解にともなって強い炎症反応を惹起した。このような炎症反応は軽度あれば毛細血管網の誘導等で、組織再生に関して優位にはたらくことが期待される。実際に、毛細血管網の誘導が生じることを組織学的に明らかにした。しかし、極少数の幹細胞を播種して移植するような系では、強い炎症反応により移植した幹細胞が障害を受けることが懸念される。現在、炎症にともなう移植した細胞に対する細胞障害を定量的に計量化する実験を、引き続き展開している。

アルカリ処理により、ポリ乳酸、ポリグリコール酸および両者の共重合体の表面を大きく親水化できることが明らかになったが、同時に表面の分解性も著しく増加し、より強い炎症反応が生じることが分かった。今後、アルカリ処理条件の最適化が必要である。

ラット頭頂骨骨膜より採取した骨膜細胞を酵素処理し初代培養に供した後、継代した2代目培養骨膜細胞を温

度応答性培養皿に播種すると、コンフルエント到達後、低温処理のみで培養骨膜シートとして回収できる条件を確立した。細胞シート中に含まれる培養骨膜細胞をアルカリフォスファターゼ(ALP)染色すると、多数のALP陽性細胞が確認された。この観察は、本細胞シート内には骨芽細胞の分解時に必要なニッチェとしての条件を最低限有する細胞外マトリックス環境が培養の間に構築されていることを強く示唆している。ラットへの移植実験からは、本細胞シートは、生分解性高分子性担体のような強い炎症反応などの異物反応を惹起しない(少なくともきわめて軽微である)ことが明らかになっており、本細胞シートを新規幹細胞担体として活用しうる可能性を強く示唆している。

今年度の研究結果より、骨膜由来細胞シート内の細胞外マトリックスを単独で、あるいは生分解性高分子性担体と組み合わせることで活用することにより、従来法ではえられなかった生体親和性が高く、幹細胞維持能を有する新規担体が開発しうるということが示唆された。以上、骨膜由来細胞シートの新規担体としての有効性を期待しうる結果を得ることができた。

次年度では、皮膚線維芽細胞の骨軟骨分化条件決定した皮膚線維芽細胞シート作製条件検討、及び、本年度の骨膜由来細胞シートの移植担体としての活用について、さらに体系的に追求する予定である。

従来は組織欠損を補う手法として、自家組織移植や人工組織を用いられてきたが、いずれもその機能・形態の両面において課題を残している。また他家組織移植においても、ドナーの慢性的不足や免疫学的問題など多くの問題を抱えている。このような問題を解決するため、本研究では、再生医学と生体材料工学の最先端の技術を融合させて、がん治療後の複合組織欠損を再建する治療技術を開発することを目的としている。本分担研究においては、組織より分離された成体幹細胞に有効な高分子ナノミセルを用いる遺伝子導入方法の開発を目指している。

初年度は、天然の遺伝子ベクターであるウイルスに匹敵する人工遺伝子ベクターシステム構築を目指し、ナノミセル型遺伝子ベクターの従来の基本設計に対し、細胞内還元環境応答機能、細胞内ミクロ環境応答機能、標的認識機能をインテリジェント機能として付与することに注力し、新規カチオン性ブロック共重合体の分子設計・合成、これら高分子とレポーター遺伝子を組み込んだプラスミド DNA (pDNA) からなるナノミセル型遺伝子ベクターの特性解析、培養細胞系での遺伝子発現、細胞内動態による一連の評価を行った。その結果、いずれにおいても遺伝子発現効率を向上させ得る条件を見出し、エンドソームから細胞質へのスムーズな移行とミセル表面層への定量的なリガンド導入による高い標的細胞指向性を兼ね備えたインテリジェント化ナノミセル型遺伝子ベクターの設計指針が確立された。

平成16年度においては初年度に確立した各々のインテリジェント機能を融合させたマルチ機能性ブロック共重合体の分子設計を行い、この自己組織化を利用するこ

とによって、凝縮した遺伝子を内包する高機構化ナノミセル型遺伝子ベクターを構築するとともに、有効な遺伝子導入方法の開発を行い、臨床展開が可能であることの実証を目指し、本システムの *in vivo* における機能の本格的な評価も計画した。以下、その詳細を報告する。

1) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターの構造最適化と機能検証

ポリエチレングリコール-ポリ(L-リジン)(PEG-PLL)ブロック共重合体に対し、PLL 側鎖アミノ基の一部をスルフィド基(SH基)で置き換えジスルフィド架橋を施すことにより、細胞内環境変化(グルタチオン濃度の上昇)に反応して内包 pDNA を制御放出するインテリジェントナノミセル型遺伝子ベクターを構築し、この細胞内機能をレポーター遺伝子の発現効率から評価した。架橋高分子ナノミセル型遺伝子ベクターは、細胞外では内包 pDNA を安定に保持する一方、細胞内還元環境下では架橋の解離に伴う pDNA の放出制御を通じて、非架橋ナノミセル型遺伝子ベクターに比較して一桁以上高い発現効率を実現した。さらにナノミセル型遺伝子ベクターを構成するブロック共重合体の連鎖長ならびにジスルフィド架橋導入率と構造安定性、遺伝子発現能との間の構造-機能相関を明らかにするための系統的な研究を行い、ナノミセル型遺伝子ベクター内において有効な DNA 凝縮を惹起するための臨界鎖長が存在することを明らかにし、DNA 凝縮構造の形成と遺伝子発現活性との間の相関も見出した。また架橋導入率には最適値が存在し、その値が細胞種によって異なることも明らかにした。これは細胞内におけるグルタチオン濃度の差などに起因するものと考えられるが、これより架橋導入率の精密な制御によって、特定の細胞集団に遺伝子発現を誘導出来ることを示した。

培養細胞系において良好な遺伝子発現を示した細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターの *in vivo* 機能評価においては、マウスの尾静脈投与によって、肝臓実質細胞に一樣にレポーター遺伝子を発現させ得ることに成功した。また血管壁への遺伝子導入においては、内皮細胞への遺伝子導入が可能であることを実証した。これらの結果を受け、*in vivo* と *in vitro* での機能相関を定量的に評価する目的で、アレイ状に構築した初代肝実質細胞スフェロイドへの遺伝子導入を試み、時間依存的に遺伝子導入が可能であることを見出している。これは、非分裂期にある細胞への遺伝子導入がナノミセル型遺伝子ベクターを用いて行えることを示した点で特筆すべきものであり、ナノミセル型遺伝子ベクターの細胞内核移行についても新しい知見を与えることが期待される。

一方、ナノミセル型遺伝子ベクターの応用に向けては、保存安定性や投与量の幅広い選択性などの製剤学的要件の満足が必要であり、凍結乾燥製剤化が望まれるが、ナノミセル型遺伝子ベクターは凍結乾燥に伴う粒径変化や遺伝子発現活性の減弱が全く認められず、将来の臨床展開においても極めて有利な形態であることが明らかとなった。さらに架橋型ナノミセル型遺伝子ベクターの静脈内投与における pDNA の血中安定性をサザンブロッティング法により評価した結果、架橋導入率の上昇に伴う

pDNA の血中安定性の向上が確認された。ナノミセル型遺伝子ベクターへの架橋導入は、内包 DNA の血中安定性を向上させるために極めて有用であると考えられる。さらに適用可能な投与方法を拡げる目的で、ナノミセル型遺伝子ベクターの気管内投与を行い、肺における遺伝子発現を評価した。その結果、ナノミセル型遺伝子ベクターは、非架橋ナノミセル型遺伝子ベクターや市販の遺伝子導入試薬であるポリエチレインミンと比較して、顕著に高い遺伝子発現を導くことに成功した。この様に、架橋型ナノミセル型遺伝子ベクターは、系中に遊離ポリカチオンを含まないために極めて毒性が低く、*in vivo* 遺伝子導入に適した構造と性能を有することが明らかとなった。

2) 細胞内移行促進機能を有するナノミセル型遺伝子ベクターの構築と機能評価

特定の細胞内で効率良く遺伝子を発現するナノミセル型遺伝子ベクターの構築には、上記の細胞内環境応答性と共に、細胞内への侵入経路であるエンドソーム小胞から細胞質への移行効率向上が重要である。本研究では、ブロック共重合体への移行促進セグメント導入という方法でこの問題にアプローチしている。

これまでに PEG-ポリ(ベンジルアスパルテート)ブロック共重合体側鎖ベンジル基の定量的アミノリシスによって pKa や疎水性などの異なる各種アミノ基を導入する方法を確立し、この手法で合成した種々のブロック共重合体から DNA 内包ナノミセル型遺伝子ベクターを調製し、培養細胞系を用いた機能評価を展開した結果、側鎖構造単位に高 pKa (~9) と低 pKa (~7) の 2 種類のアミノ基を有する系がスムーズな細胞質移行を示し、良好な遺伝子発現を導くことを見出した。すなわち一つのカチオン性ユニットへ構造の異なる二種類のアミノ基を導入することにより、DNA とのコンプレックス形成とエンドソーム内 pH 低下を防ぐバッファー効果とを両立させる機能分担型の分子設計が合目的性を有することが明らかになった。

16年度には、これらの側鎖に2種類のアミノ基を有するブロック共重合体の中でも、ジエチレントリアミン(DET)を導入したブロック共重合体(PEG-DET)が、細胞毒性を示すことなく極めて効率的な遺伝子導入を示すことを明らかにした。市販の遺伝子導入試薬は、初代培養細胞に対して顕著な細胞毒性を示したが、PEG-DET は種々の初代培養細胞(骨芽細胞、線維芽細胞、滑膜細胞)に対して細胞毒性を示すことなく高効率の遺伝子発現を導いた。PEG-DET の遺伝子導入メカニズムに関しては、今後さらなる検討が必要であるが、低毒性と効率的な遺伝子発現を実現した人工遺伝子ベクターとして高い有用性が期待される。

上記の知見に基づいて、さらに、経静脈全身投与が可能なベクター系の構築を目指して、生体適合性のポリエチレングリコール、バッファー効果により細胞内移行能を賦与する pKa の低いポリカチオン、DNA を効率的に凝縮させるポリカチオンの3つの異なる機能性セグメントを有する A-B-C 型トリブロック共重合体を新規に合成し

た。トリブロック共重合体は、DNA を凝縮した内核、バッファー能を有する中間層、生体適合性の PEG 外殻からなる 3 層構造を形成し、培養細胞実験において従来の PEG-PLL の 50 倍以上の遺伝子導入効率を実現した。さらに固形ガン(マウス大腸ガン C-26 細胞)を皮下移植したマウスに対し、3 層構造ナノミセル型遺伝子ベクターを尾静脈内投与した結果、腫瘍部位での選択的かつ効率的な遺伝子導入が確認された。対照的に pDNA のガン組織への直接注射においては、3 層構造ナノミセル型遺伝子ベクターの 10 分の 1 以下の遺伝子発現しか確認されず、市販の遺伝子導入試薬では投与した全てのマウスの死亡が確認された。人工遺伝子ベクターの静脈内投与により大腸ガンに遺伝子発現を認めたのは、世界的に見てもこの研究が初めての例であり、3 層構造ナノミセル型遺伝子ベクターは全身投与による *in vivo* 遺伝子治療を実現する遺伝子デリバリーシステムとしての展開が期待される。

3) 表層にリガンド分子を結合した高分子ナノミセル型遺伝子ベクターの構築

これまでの研究により、遺伝子 DNA やオリゴ核酸を効率良く搭載し、高い生理機能を発現するナノミセル型遺伝子ベクターの構造設計が確立したことを受け、15 年度からはこれと並行し、ナノミセル型遺伝子ベクター表層へのリガンド分子装着のための分子設計に着手した。まず、末端に各種のパイロット分子を結合可能なブロック共重合体の新規合成ルートの確立を行った。この場合、数種類の化学反応による修飾を多段階に重ねるという制約のために、リガンドを担持したブロック共重合体の合成は一般には困難を伴うが、既に確立していた合成経路を抜本的に見直し、各々の反応操作が互いに干渉しない新規合成経路を探索することによって、効率良くリガンド導入ブロック共重合体を合成する経路の構築に成功した。具体的には、リガンドを導入するための反応性基として従来のアセタール基に加え、脱保護に伴う二量化反応が惹起されないベンジルアセタール基を片末端に導入した PEG を合成し、アセタール基およびベンジルアセタール基とポリアミノ酸側鎖の選択的脱保護を実現するために、温和なアルカリ条件で脱離可能な保護基を有するアミノ酸誘導体(例:トリフルオロアセチル-L-リシン酸無水物)を PEG 末端から重合させた。これにより、従来法では困難であったブロック共重合体の末端に、ラクトース、ペプチドを導入することに成功した。

16 年度には、表層にラクトースを導入したナノミセル型遺伝子ベクターが、ラットより調製した初代培養肝実質細胞に対して、高い遺伝子発現効率を示すことを確認した。さらに血管内皮細胞や平滑筋細胞など多くの細胞に発現が認められるインテグリンに対して特異的結合能を有する RGD ペプチドを表層に導入したナノミセル型遺伝子ベクターを構築した。RGD ペプチド導入ナノミセル型遺伝子ベクターを、ウサギ頸動脈バルーン擦過モデルの内膜肥厚を形成している動脈壁に対して局所投与を行ったところ、従来のシステムと比較して 10 倍以上高い遺伝子導入効率を実現された。これによりナノミセル型遺伝子ベクターに導入したリガンド分子が生体

内においても有効に機能することを確認した。

実際の治療に用いることが可能な人工遺伝子ベクターを開発するためインテリジェント化ブロック共重合体の分子設計を行い、高機能化ナノミセル型遺伝子ベクターを構築するとともに、レポーター遺伝子をコードするプラスミド DNA を内包する高機能化ナノミセル型遺伝子ベクターの *in vitro* 及び *in vivo* 機能評価を通じて、特に後者においてマウス尾静脈投与により肝臓実質細胞、気管内投与により肺、ラットを用いた血管壁への遺伝子導入により血管内皮細胞における遺伝子発現を確認した。また 3 層構造ナノミセル型遺伝子ベクターの尾静脈投与により、固形ガン(マウス大腸ガン C-26 細胞)を皮下移植したマウスの腫瘍部位において選択的かつ効率的な遺伝子導入が確認された。人工遺伝子ベクターの静脈内投与により大腸ガンに遺伝子発現を認めたのは、世界的に見てもこの研究が初めての例である。さらに、より高い標的細胞指向性を兼ね備えた高機能化遺伝子ベクターとして RGD ペプチド導入ナノミセル型遺伝子ベクターを構築し、ウサギ頸動脈バルーン擦過モデルの内膜肥厚を形成している動脈壁に対して局所投与を行ったところ、従来のシステムと比較して 10 倍以上高い遺伝子導入効率を実現された。

上記の通り、高機能化高分子ナノミセル型遺伝子ベクターによる本システムは、高い臨床応用性を有する人工遺伝子ベクターシステムとして位置づけることが出来る。また並行して行われたナノミセル型遺伝子ベクターの凍結乾燥剤化に関する検討により、凍結乾燥の前後で粒径変化や遺伝子発現活性の減弱が全く認められず、将来の臨床展開においても極めて有利な形態であることが明らかとなった。

顎顔面複合組織モデルに関しては、実験動物としては、マウス、ラットなどの小動物で骨あるいは軟骨の単独組織欠損を作製し、ついでそれらの技術を応用し、ウサギやイヌといった大型動物で複合組織欠損を作製した。第一に、マウスにおいて骨の単独欠損を作製した。マウス頭蓋骨にトレパンを用いて骨臨界欠損を作製した。次に、ラットにおいて軟骨欠損を作製した。ラット耳介を部分的に切除し、耳介再生の評価を行った。第二に、ウサギの耳介軟骨にパンチを用いた軟骨・皮下組織臨界欠損モデルを作製し、長期的な観察においても、自然治癒が起こらないことを確認した。第三に大動物であるイヌを用いて顎部に骨および歯牙欠損を作製し、顎骨および周囲軟部組織の再生および歯牙の誘導を評価する実験系を作製した。すなわち、ビーグル犬を用い、乳歯が萌出した直後に、乳歯を抜歯し、その抜歯窩に新生骨を再生させて、その部位での歯の萌出状況、周囲組織の変化を検討する実験系を確立した。また、片側上顎骨臼歯部から切歯側にかけて、上顎骨下縁から上方に下縁と平行に皮膚切開を加え、Premaxillo-maxillary suture を確認し、ついで、Premaxillo-maxillary suture を含む部分に、歯科用バーを用いて、自然治癒が起こらないような大きさの骨

欠損を作製する顎裂欠損モデル作製をした。最後に、ビーグル犬の耳介を切除し、さらに周囲骨を欠損させる複合骨・軟骨複合欠損モデルを作製した。今年度は、これらの実験手技の洗練に努めた他、欠損部位に再生骨・軟骨を移植し、再生部の生着および機能評価を試みた。マウスの頭蓋骨欠損モデルを作製し、ここに骨分化誘導をかけた皮膚線維芽細胞シートを移植した。その結果、4週間で骨が再生されてくることが確認された。

動物モデルに関しては、昨年度、幾つかの体幹・四肢の複合組織欠損マウスモデルを作成した。第一のモデルは、脛骨骨折モデルであり、全身麻酔下、脛骨前面に縦皮切を置き、脛骨全体を展開した。脛骨の前縁(anterior ridge)にて筋膜を小切開し、鑷子の先端で脛骨前面から筋膜を剥離。また、脛骨後面も剥離し先曲がりの鑷子を脛骨後面と筋の間に挿入して展開を確保した。(展開の際には骨や骨膜を傷つけないように努める)脛骨骨幹部中央で、micro sawを用いて骨切、23G針を脛骨近位に骨軸に平行に髓内へ刺入し、髓内釘挿入部を作成した。23G針の内筒を髓内釘として、持針器などで把持しながら、脛骨近位より髓内へ挿入、骨折部を通り遠位骨片髓内へ挿入し、骨折部を固定し皮膚縫合した。第二のモデルは大腿骨骨折モデルである。全身麻酔下、膝から大腿近位まで側方皮切し、大腿四頭筋とハムストリングスの筋間より侵入。骨幹部を展開し骨幹部中央で骨切りを行い、23~26Gの針を骨折部の近位骨片髓腔よりretrogradeに近位方向へ髓内に刺入し、大腿骨近位(おそらく転子部)の皮質骨を貫通させた。retrogradeに髓内釘を近位方向へ挿入し、一旦転子部の骨孔より先端を出してから、反対に(antegradeに)骨折部と遠位骨片髓腔へ刺入し、固定した。第三のモデルは、長管骨骨幹部の骨欠損モデルである。全身麻酔下、脛骨近位に皮切を置き、脛骨近位内側前面を展開、歯科用バー(ドリル)にて円型の骨孔を脛骨近位に穿った(径1mm)。骨孔よりドリルを骨髄内に進め、海綿骨を掘削し、対側の皮質骨の手前まで骨欠損を作製した。第四のモデルは、脛骨の臨界欠損モデルである。全身麻酔下、脛骨前面に縦皮切を置き、脛骨全体を展開し、脛骨または大腿骨骨幹部中央1/3でマイクロソ-にて骨切りし、長さ5mmの全周性の骨欠損を作製した。脛骨・大腿骨近位より髓内釘を挿入して、近位・遠位骨片を固定、閉創して終了した。これらのモデルについて、自然経過をマクロ、放射線学的、組織学的に記載した。今年度は、これらの手技を洗練するとともに、新たなモデルとして、ラット膝関節軟骨全層および半層欠損モデルを作製し、その自然経過をマクロ、放射線学的、組織学的に記載した。

3 倫理面への配慮

DNA 組み換え実験、動物実験に関しては各分担研究者

の属する機関の組み換え DNA 実験規則および動物実験実施マニュアルに従って行う。ヒトの体性幹細胞を分離する実験に関しては、東京大学医学部附属病院で行う。倫理審査委員会に申請書を提出済みである。ヒトは胚性幹細胞を将来使用する場合には、「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に則り、倫理審査委員会の承認を得て行う。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Kondoh K., Takato T., Conduction performance of collateral vessels induced by vascular endothelial growth factor or basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc. Res.* 61(1): 132-142, 2004.
2. Kwase Y., Takato T., Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor- (TGF-) facilitates cell growth. *Experimental Cell Research* 295: 194-203, 2004.
3. Ogasawara T., Takato T., Osteoclast Differentiation by RANKL Requires NF- B-Mediated Downregulation of Cyclin-Dependent Kinase 6 (Cdk6). *Journal of Bone and Mineral Research* 19 (7): 1128-1136, 2004.
4. Hikiji H., Takato T., Absence of Platelet-activating factor receptor protects mice from osteoporosis following ovariectomy. *The Journal of Clinical Investigation* 114(1): 85-93, 2004.
5. Ogasawara T., Takato T., Bone Morphogenetic Protein 2-Induced Osteoblast Differentiation Requires Smad-Mediated Down-Regulation of Cdk6. *Molecular And Cellular Biology* 24(15): 6560-6568, 2004.
6. Ikeda T., Takato T., The combination of SOX5, SOX6, and SOX9(the SOX trio)provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* 50(11): 3561-73, 2004
7. Hoshina K., Takato T., Aortic wall cell proliferation via basic fibroblast growth factor gene transfer limits progression of experimental abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 40(3):

- 512-8, 2004
8. Miyahara T., Takato T.,: Inflammatory signaling pathway containing TRAF6 contributes to neointimal formation via diverse mechanisms. *Cardiovasc Res.* 64(1): 154-64, 2004
 9. Hosaka A., Takato T.,: Gelatin hydrogel microspheres enable pinpoint delivery of basic fibroblast growth factor for the development of functional collateral vessels. *Circulation* Nov 23;110(21):3322-8, 2004
 10. Kondoh K., Takato T., : Conduction performance of collateral vessels induced by vascular endothelial growth factor or basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc Res.* 61(1):132-42, 2004
 11. Abe M., Takato T., : CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res* ;65(3):828-34, 2005
 12. Suenaga H., Takato T., : Aggregate formation of bone marrow stromal cells by rotation culture . *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S*, in press
 13. Ung-il Chung., Takato T.,: Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins *Journal of Orthopaedic Science*, in press
 14. Fujihara Y., Takato T.: Gene Transfer of bFGF to recipient bed improves survival of ischemic skin flap. *British Journal of Plastic Surgery* , in press
 15. Itaka K., Nakamura K., In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine. *J Gene Med* 6:76-84,2004.
 16. Matsubara T, Nakamura K., A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 503-508, 2004.
 17. Shimoaka T, Nakamura K., Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J Biol Chem* 279: 15314-15322, 2004.
 18. Hoshi K, Nakamura K., Deficiency of insulin receptor substrate-1 impairs skeletal growth through early closure of epiphyseal cartilage. *J Bone Miner Res* 19: 214-223, 2004.
 19. Ogasawara T, Nakamura K., Osteoclast differentiation by RANKL requires NF-kB-mediated down-regulation of cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res* 19: 1128-1136, 2004.
 20. Yamada T, Nakamura K., SRC-1 is necessary for skeletal responses to sex hormones in both males and females. *J Bone Miner Res* 19: 1452-1461, 2004.
 21. Akune T, Nakamura K., PPAR insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113: 846-855, 2004.
 22. Seto H, Nakamura K., segregation of the roles of Smad pathways and p38 MAP kinase pathways. *J Clin Invest* 113: 718-726, 2004.
 23. Itaka K, Nakamura K., In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine. *J Gene Med* 6: 76-84, 2004.
 24. Oohori Y, Nakamura K., Retroodontoid pseudotumor resected by a high cervical lateral approach in a rheumatoid arthritis patient: a case report. *J Orthop Sci* 9: 90-93, 2004.
 25. Saito T, Nakamura K., Case of idiopathic thoracic spinal cord herniation with a chronic history. *J Orthop Sci* 9: 94-98, 2004.
 26. Chung U, Nakamura K., Distinct osteogenic mechanisms of bone of distinct origins. *J Orthop Sci* 9: 410-414, 2004.
 27. Kawanishi M, Nakamura K., New Type of biodegradable porous scaffolds for tissue-engineered articular cartilage. *Materials Science and Engineering C* 24: 431-435, 2004.
 28. Ogasawara T ,Nakamura K., Bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation requires smad-mediated down-regulation of cdk6. *Mol Cell Biol* 24: 6560-6568, 2004.
 29. hoda N, Nakamura K., Measurement of

- occipitocervical angle. *Spine* 29: E204-E208, 2004.
30. Seichi A, Nakamura K., Postoperative expansion of intramedullary high-intensity areas on T2-weighted magnetic resonance imaging after cervical laminoplasty. *Spine* 29: 1478-1482, 2004.
 31. Seto H, Nakamura K., Distinct Role of Smad Pathways and p38 Pathways in Cartilage-specific Gene Expression in Synovial Fibroblasts. *J Clin Invest* 113:718-726, 2004.
 32. Goto T, Nakamura K., Spindle cell lipoma of the knee: a case report. *J Orthop Sci* 9: 86-89, 2004.
 33. Goto T, Nakamura K., Simple curettage without bone grafting for enchondromas of the foot. *Arch Orthop Trauma Surg* 124: 301-305, 2004.
 34. Chung U, Nakamura K., Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. *J Orthop Sci* 9:410-414, 2004.
 35. Itaka K., Kataoka, K., Supramolecular nanocarrier of siRNA from PEG-based block cationic copolymer carrying diamine side-chain with distinctive pKa directed to enhance intracellular gene silencing. *J. Amer. Chem. Soc.*, 126 : 13612-13613, 2004.
 36. Park J.-S., Kataoka, K. Versatile Synthesis of End-functionalized Thermosensitive Poly(2-isopropyl-2-oxazolines). *Macromolecules*, 37 : 6786-6792, 2004.
 37. Hayashi H., Kataoka, K., pH-Sensitive nanogel possessing reactive PEG tethered chains on the surface, *Macromolecules*, 37 : 5389-5396, 2004.
 38. Jule E., Kataoka, K., Thermal characterization of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles based on pyrene excimer formation. *J. Controlled Release*, 97 : 407-419, 2004
 39. Kakizawa, Y., Kataoka, K., Block copolymer-coated calcium-phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. *J. Controlled Release*, 97 : 345-356, 2004.
 40. Kakizawa Y., Kataoka, K., Size-controlled formation of a calcium phosphate-based organic-inorganic hybrid vector for gene delivery using poly(ethylene glycol)-*b*-block-poly(aspartic acid). *Advanced Materials*, 16 : 699-702, 2004.
 41. Otsuka H., Kataoka, K., Two-dimensional multiarray formation of hepatocyte spheroids on a microfabricated PEG-brush surface. *ChemBioChem*, 5 : 850-855, 2004.
 42. Katakura H., Kataoka, K., Improvement of retroviral vectors by coating with poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer (PEG-PLL). *J. Gene Medicine*, 6 : 471-477, 2004.
 43. Wakebayashi D., Kataoka, K., Lactose-installed polyion complex micelles incorporating plasmid DNA as a targetable gene vector system: Their preparation and gene transfecting efficiency against cultured HepG2 cells. *J. Controlled Release*, 95 : 653-664, 2004.
 44. Akiyama Y., Kataoka, K., Synthesis of heterotelechelic poly(ethylene glycol) derivatives having α -benzaldehyde and α -pyridyl disulfide groups by ring opening polymerization of ethylene oxide using 4-(diethoxymethyl)benzyl alkoxide as a novel initiator, *Bioconjugate Chemistry*. 15 : 424-427, 2004.
 45. Jaturanpinyo M., Kataoka, K., Preparation of bionanoreactor based on core-shell structured polyion complex micelles entrapping trypsin in the core cross-linked with glutaraldehyde. *Bioconjugate Chemistry*, 15 : 344-348, 2004.
 46. Miyata K., Kataoka, K., Block cationic polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression. *J. Amer. Chem. Soc.*, 126 : 2355-2361, 2004.
 47. Tabuchi M., Kataoka, K., Nano-spheres for DNA separation chips. *Nature Biotechnology*, 22 : 337-340, 2004.
 48. Diab C., Kataoka, K., Microcalorimetric Study of the Temperature-Induced Phase Separation in Aqueous Solutions of Poly(2-isopropyl-2-oxazolines). *Macromolecules*. 37 : 2556-2562, 2004.

49. Ideta R., Kataoka, K., Effective accumulation of polyion complex micelle to experimental choroidal neovascularization in rats. *FEBS Lett.*, 557 : 21-25, 2004.
50. Itaka K., Kataoka, K., In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine. *J. Gene Med.*, 6 : 76-84, 2004.
51. Ishii T., Kataoka, K., Preparation of functionally PEGylated gold nanoparticles with narrow distribution through autoreduction of auric cation by a-biotinyl-PEG-block-[poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate)]. *Langmuir*, 20 : 561-564, 2004.
52. Oishi, M., Kataoka, K., Smart polyion complex micelles for targeted intracellular delivery of PEGylated antisense oligonucleotide with acid-labile linkage. *ChemBioChem*, in press.
53. Cabral, H., Kataoka, K., Preparation and biological properties of dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt) loaded polymeric micelles. *J. Controlled Release*, in press.
54. Wakebayashi, D., Kataoka, K., Polyion complex micelles of pDNA with acetal-poly(ethylene glycol)-poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) block copolymer as gene carrier systems: Physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficacy. *Biomacromolecules*, in press.
55. Umeda K., Nakatsuji N., Development of primitive and definitive hematopoiesis Development of primitive and definitive hematopoiesis from nonhuman primate embryonic stem cells in vitro. *Development* 131, 1869-1879 2004.
56. Haruta M., Nakatsuji N., In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* 45, 1020-1025 2004.
57. Kimura, H., Nakatsuji, N., Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells. *Mol. Cell. Biol.*, 24, 5710-5720 2004.
58. Sumi, T., Nakatsuji, N., STAT3 is dispensable for maintenance of self-renewal in nonhuman primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 22, 861-872 2004.
59. Nakatsuji, N., A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.*, in press.
60. Nakatsuji, N., Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Inv.*, in press.
61. Nakatsuji, N., Spermatogenesis from epiblast and primordial germ cells following transplantation into postnatal mouse testis. *Development*, in press.
62. Nishida, K., Okano, T., "Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface", *Transplantation*, 77(3), 379-385 2004.
63. Itoga, K., Okano, T., "Cell micropatterning using photopolymerization with a liquid crystal device commercial projector", *Biomaterials*, 25, 2047-2053 2004.
64. Takeda, N., Okano, T., "Temperature-responsive polymeric carriers incorporating hydrophobic monomers for effective transfection in small doses", *J. Control. Rel.*, 95(2), 343-355 2004.
65. Tsuda, Y., Okano, T., "Control of cell Adhesion and detachment using temperature and thermo-responsive copolymer grafted culture surfaces", *J. Biomed. Mater. Res.*, 69A(1), 70-78 2004.
66. Tanaka, Y., Okano, T., "Drug Response Assay System in a Microchip Using Human Hepatoma Cells", *Analytical Sciences*, 20, 411-413 2004.
67. Ebara, M., Okano, T., "Temperature-Responsive cell culture surfaces enable "On-Off" affinity control between cell integrins and RGDS ligands", *Biomacromolecules*, 5(2), 505-510 2004.
68. Shiroyanagi, Y., Okano, T., "Urothelium

regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps”, *BJU Int.*, 93, 1069-1075 2004.

69. Itoga, K., Okano, T., “Micropatterned surfaces prepared using a liquid crystal projector-modified photopolymerization device and microfluidics”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 69A(3), 391-397 2004.
70. Akiyama, Y., Okano, T., “Ultrathin poly (*N*-isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control”, *Langmuir*, 20, 5506-5511 2004.
71. Watanabe, K., Okano, T., “Human limbal epithelium contains side population cell expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2”, *FEBS Letters*, 565(2004), 6-10 2004.
72. Otsuka, H., Okano, T., “Two-dimensional multiarray formation of hepatocyte spheroids on a microfabricated PEG-brush surface”, *Chem. Bio. Chem.*, 5(6), 850-855 2004.
73. Ebara, M., Okano, T., “Immobilization of cell-adhesive peptides to temperature-responsive surfaces facilitates both serum-free cell adhesion and non-invasive cell harvest”, *Tissue Engineering*, 10(7), 1125-35 2004.
74. Nishida, K., Okano, T., “Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium”, *N. Engl. J. Med.*, 351 (12), 1187-1196 2004.
75. Ebara, M., Okano, T., “Incorporation of new carboxylate functionalized co-monomers to temperature-responsive polymer-grafted cell surfaces”, *Surface Science*, 570(2004), 134-141 2004.
76. Kikuchi, A. and Okano, T., “Temperature-responsive, polymer-modified surfaces for green chromatography”, *Macromol. Symp.*, 207, 217-227 2004.
77. Yamato, M. and Okano, T., “Cell Sheet Engineering”, *Materialstoday*, May 2004, 42-47 2004.
78. Kikuchi, A. and Okano, T., “Regeneration of

tissues and organs -New technique opens up new possibilities for regenerative medicine through control of interaction of polymers with water-”, *Nitto Denko Technical Report 85*, 42, 44-48 2004.

79. Chung U., Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Endocrine Journal* 51:19-24, 2004.
80. Hoshi K., chung U., Deficiency of insulin receptor substrate-1 impairs skeletal growth through early closure of epiphyseal cartilage. *J Bone Miner Res* 19: 214-223, 2004.
81. Long F, Chung U (Co-first)., Genetic Evidence That Ihh Signaling Is Directly Required For The Osteoblast Lineage In The Endochondral Skeleton. *Development* 131:1309-1318, 2004
82. Seto H, Chung U., Distinct Role of Smad Pathways and p38 Pathways in Cartilage-specific Gene Expression in Synovial Fibroblasts. *J Clin Invest* 113:718-726, 2004.

日本語論文

1. 小笠原 徹、高戸毅、骨再生医療におけるサイクリン依存性キナーゼ (Cdk6) 応用の試み. *日本再生医療学会雑誌* 3:94, 2004
2. 大庭 伸介、高戸毅、COL1 - GFP マーカー遺伝子を用いた骨芽細胞分化十分条件の検索. *日本再生医療学会雑誌* 3:96, 2004
3. 星 和人、高戸毅、ヒト耳介軟骨由来細胞による再生軟骨作製の試み. *日本再生医療学会雑誌* 3:96, 2004
4. 鄭 雄一、高戸毅、「骨軟骨の再生医療」 *現代医療* 36:39-44, 2004
5. 鄭 雄一、高戸毅、「骨・軟骨分化決定因子の解析から再生医学へ」 *分子リウマチ* 2004、印刷中
6. 篠田裕介、高戸毅、「動物の進化と PTH、PTHrP」 *The Bone* 2004、印刷中
7. 松原全宏、高戸毅、「*図解再生医療工学*」 立石哲也、田中順三編著 123,130、工業調査会、東京、2004
8. 大庭伸介、高戸毅、「骨・軟骨の再生医療」 *日本老年医学会雑誌* 41: 582-588、2004