

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」
平成13年度採択研究代表者

岡野 光夫

(東京女子医科大学先端生命医科学研究所 所長・教授)

「新規組織再構成技術の開発と次世代バイオセンサーの創製」

1. 研究実施の概要

再生医療および細胞および再構成組織活用型次世代バイオセンサーを出口として社会に貢献することを目的として、本研究では、ナノメートルに代表されるナノの領域で培養細胞を制御し、従来にない高精度で細胞を活用する新テクノロジーの開発に取り組んでいる。新規開発技術によるヒト臨床応用に成功した他、当初の計画どおり、個々の要素技術の開発に関しては、おおむね達成することができた。今後、技術のさらなる洗練化と、これら要素技術を統合するデバイス化に注力していく。

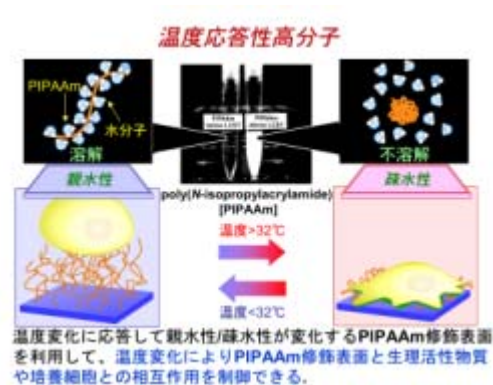
2. 研究実施内容

研究概要

- 1) ナノドメイン操作材料の開発：細胞・組織ナノドメインを制御する新材料を創製する。
- 2) 新規組織再構成技術の開発：ナノドメイン操作材料を用いて組織特異的なナノ構造を培養系で再現する共に、細胞・組織ナノドメインが示す高度にインテリジェントな細胞・組織機能発現の分子機構を理解する。

研究方法

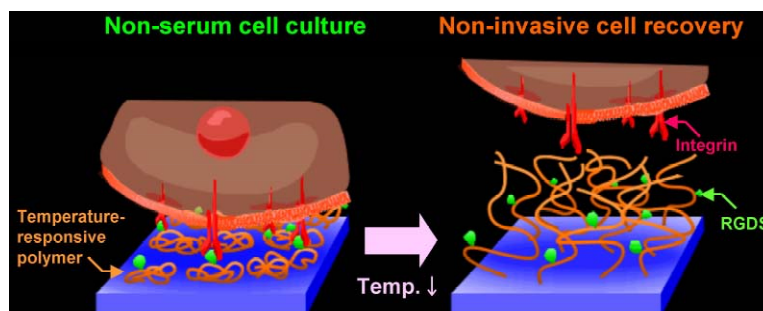
高分子表面およびガラス表面に電子線重合、リビングラジカル重合などの様々な手法を用いてナノメートルレベルで厚みを制御しながら機能性高分子や細胞成長因子等を固定化する新規技術を開発し、これを活用して培養細胞から組織を再構成する新規技術を開発する。作製した再構成組織は適宜、再生医療としてヒト臨床応用に供する他、細胞および再構成組織を活用する次世代バイオセンサーへの応用をあわせて検討する。これらを目的として、UVエキシマーレーザーによるレーザーアブ



レーションなどの表面微細加工技術をバイオ用途に最適化した手法を確立する。これらを駆使して、細胞膜表面に発現する受容体、細胞外マトリックス、細胞接着分子等と特異的に作用する新規材料の創出を目指す。

進捗状況

電子線重合を用いてナノメートルのレベルで厚みを制御して温度応答性高分子に代表される様々な機能性高分子を大面積表面に固定化する技術を洗練するとと



もに、細胞成長因子や細胞外マトリックス分子等の細胞制御因子を固定化した高機能性培養基材を開発してきた。たとえば、温度応答性高分子を固定化した温度応答性培養皿を用いて、非侵襲的に移植可能な細胞シートを作製し、これを用いて組織再生をおこなう技術体系である**細胞シート工学**を世界に先駆けて開発した。皮膚や角膜などでは、すでに臨床応用に成功しており、歯周組織や心筋等、様々な組織で臨床応用を目指した大形動物実験が進行中である。角膜再生に関する報告は、医学会で最高の権威をもつ**New England Journal of Medicine**誌（2003年度のインパクトファクター34.8）に掲載された。

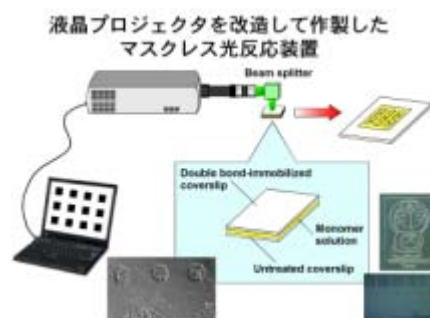
これらの技術をさらに発展させ、細胞や再構成組織中に観察される細胞接着構造や細胞成長因子受容体等のシグナル分子のクラスターリングなどに代表されるナノ構造（細胞ナノドメイン）を積極的に制御することにより、より安全で有効な再生医療を実践すると共に、生きた細胞や組織工学技術を用いて作成した再構成組織を有効に活用する新規バイオセンサーの創成を目的として研究を展開している。

細胞ナノドメイン操作材料としては、代表的な細胞ナノドメインである細胞接着基質との接着構造（接着斑やデスモソームなど）を人工的に操作することを目的として、細胞接着分子由来の細胞接着性ペプチドを温度応答性高分子鎖に分子配向や分子間距離を制御しながら固定化する技術を開発した。これを用いて異種感染の危険性を払拭できない、牛胎児血清等の動物由来製品を一切含むことなく、再生医療に供しうる細胞シートを作製することに成功した。

さらに、組織中でのみ観察される高度な細胞機能の発現には、組織中で共存する複数種の細胞を培養系においても、その位置関係や細胞数の比を精密に制御しながら、その共存を再現する必要があるとの考えから、複数種の細胞を任意の位置に配置させる**マイクロパターン共培養用マイクロパターン化表面**の開発をおこなった。この培養表面を用いる肝実質細胞と血管内皮細胞のマイクロパターン化共培養系では、肝実質細胞の分化機能が優位に亢進することを見出した。

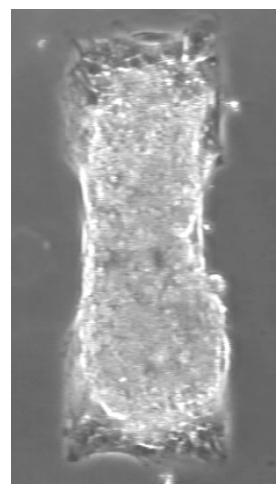
マイクロパターンの作製には金属製マスクを用いた電子線の多段階照射、あるいは電子線重合により作製したナノグラフト表面をUVエキシマーレーザーを用いて局所的にアブレ

ーションし、基板層を再露出させる方法など、様々な手法の開発に成功した。さらに、液晶プロジェクターを改造して作製した**マスクレス光重合装置**を用いて、マイクロパターン作製に用いる光反応性材料と作製法、反応条件の最適化をおこなうことで、デザインの制限なく種々のマイクロパターンを高価なマスクを必要とすることなく作製することに成功した。この方法は、研究開発のフェーズで特に必要な、ラピッドプロトタイピングに特に適している。



本計画の最終目的は、個々の要素技術を一つの基板（チップ）上にコンパクトに配列し、ナノドメインを解した細胞の機能制御・培養から細胞の刺激応答の高感度検出までをオンチップ上でおこなうデバイスの開発にある。このデバイス化に当たり、マイクロ流路内で実現される層流を活用すべく、シリコンエラストマーのポリジメチルシロキサン（PDMS）を用いたマイクロモールドの利用を想定している。これまで、試作的に外注により作製した高価な鋳型を用いてPDMS製マイクロモールドを作製してきたが、マスクレス光重合装置を用いて鋳型を作製し、これを利用してPDMS製マイクロモールドを作製する新規技術を開発した。現在、PDMS製マイクロモールド内で細胞培養を安定におこない、細胞局所的に刺激を負荷し、その細胞応答を計測する新規デバイスを開発中である。たとえば、右図は150～450ミクロンの自立拍動するマイクロ心筋組織であり、この**マイクロ心筋組織が多数整列したマイクロ心筋アレイ**を用いた心毒性アッセイチップの実証試験が進行中である。心毒性により新薬としての開発を断念せざるをえない化合物が多数存在し、それまでの開発経費がすべて無駄になっている現状を考慮すると、このようなマイクロ心筋アレイは非常に有効であると期待できる。

加えて、機能性高分子グラフト層の精度のさらなる向上を目的として**リビングラジカル重合（原子移動ラジカル重合：ATRP）**を用いる方法を開発した。このATRPを用いて、これまでにカラムクロマトグラフィーとして実現してきた温度応答性クロマトグラフィーを、充填剤を用いない中空流路表面で実現することに成功した。すなわち、内径数十から数百マイクロメートルのガラスキャピラリー内腔表面にATRPにより温度応答性高分子を数十ナノメートルの厚みでグラフトし、温度応答性ガラスキャピラリーを作製し、これを用いてクロマトグラフィーをおこなった。グラフト厚は、20ナノから80ナノメートルまできわめて精度良く反応時間依存的に表面リビング重合することにより達成できた。またAFMにより求めた表面のラフネスは2ナノメートル以下であり、従来のラジカル重合では達成できない平坦な高密度高分子ブラシ表面を達成できた。また、この温度応答性ガラスキャピラリーを用いることにより有機溶媒を必要とすることなく温度変化のみでステロイド類を分離することができた。



キャピラリー温度クロマトシステムは、最終形態である統合化チップデバイスに組み込むことを予定しており、これを用いてオンチップ上でマイクロ流路内の微量成分を解析することを目指している。

(3) 細胞ストレス応答物質を検出するための人工酵素の開発とセンサ応用

研究概要

細胞がストレスに応答してATPが漏洩する現象が明らかになってきている。広範な細胞種・ストレス種により惹起される現象であるため、ATPをin situ測定できる技術の開発により、「できることにより、細胞・組織のストレスモニタリングが可能になると考えられる。そこでATPをその場測定することのできるセンサデバイスの開発を目指し、ATPを基質とする人工酵素の開発研究とそのセンサ応用研究を展開してきた。

研究結果

- ① センサ応用を企図した独自の分子設計によるリン酸エステル脱リン酸化（加水分解）活性を発現できる人工酵素の合成に成功した（図1のHPLC分析結果参照）。
- ② この人工酵素はナノキャビティ集積マトリックス構造を有し、マトリックス全体で基質選択性を発現することができる独自の分子設計である。
- ③ リン酸エステル化合物（ATP類、DNA・RNA等）の加水分解産物が産生直後においてのみ（安定なプロトン化イオンになる前においてのみ）、電気化学的な還元を行なうことができることを見出した（JSTにより特許出願済み）（図2に示す反応模式図参照）。

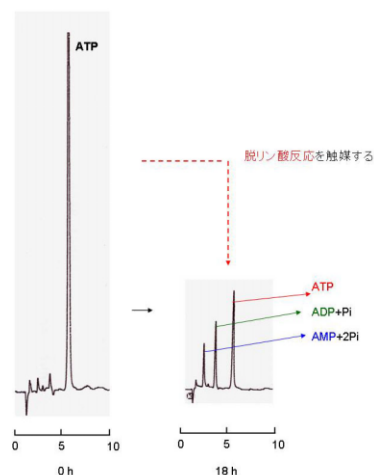


図1 人工酵素PMP complexを反応触媒としたATP脱リン酸(加水分解)反応生成物のHPLCクロマトグラム

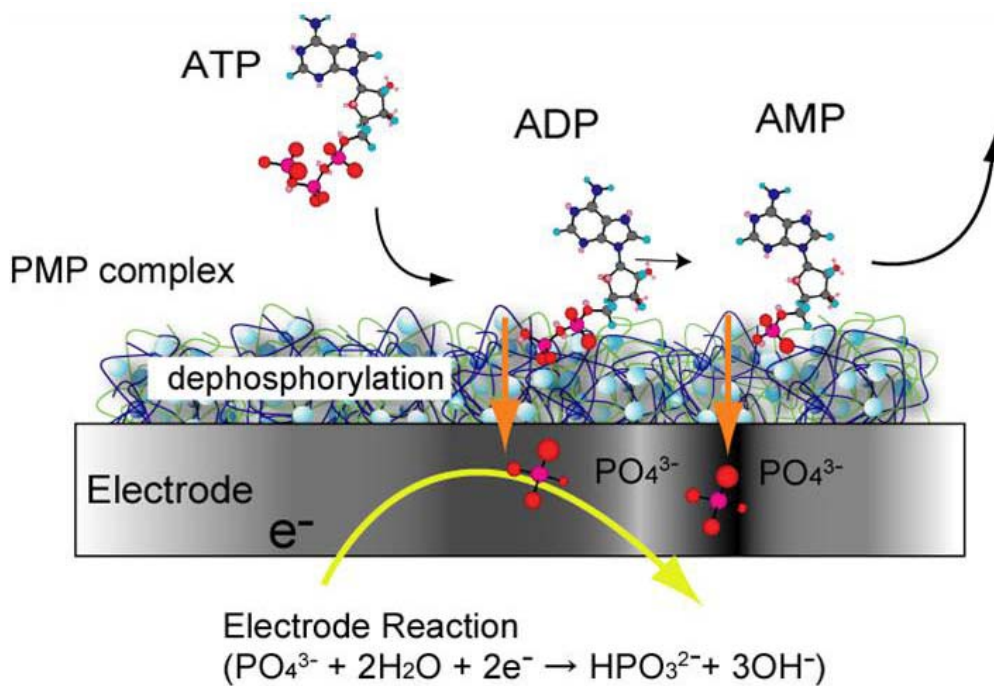


図2 人工酵素PMP complex膜被覆電極(センサデバイス)表面におけるATP検出反応機構の模式図

- ④ この発見に基づき、人工酵素をセンサデバイスに応用したATPセンサの構築に成功(図3の写真参照)。1 nMオーダーのATPを検出可能なアンペロメトリック型センサの構築に成功した。
- ⑤ 細胞ストレス応答漏洩ATPを測定する細胞センシングデバイスの試作を開始(東京女子医大 小林純先生とチーム内連携開発)

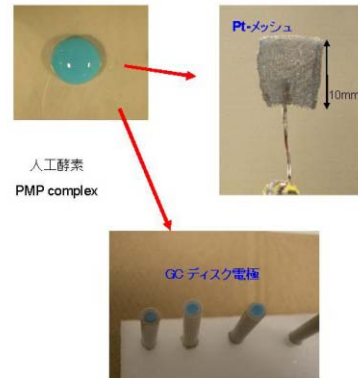


図3 人工酵素(PMP complex)を被覆したセンサデバイス作成プロセス

(4) シナプスモデル細胞の分子育種とシナプス機能モニタリングシステムの構築

研究概要

本研究では、シナプス間の情報伝達において中心的な役割を果たしている、グルタミン酸レセプター(GluR)を細胞表層に提示したシナプスモデル細胞を構築し、それをを用いた神経系医薬スクリーニングのためのhigh-through-put評価システム開発を目的として研究を行った。

研究結果

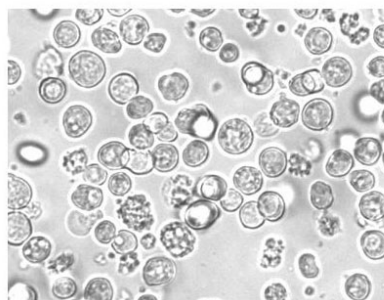
- ① 中枢系におけるシナプス興奮伝達の主要な役割を担い、また薬剤開発の分子ターゲットとしてもトップであるグルタミン酸リガンドチャンネルゲートレセプター (iGluR) に発現および細胞表層提示マーカーとして Green Fluorescent Receptor (GFP) を遺伝子上で結合し、昆虫細胞中で iGluR-GFP フュージョンタンパク質として昆虫細胞中で発現、表層提示することに成功 (図4の蛍光顕微鏡写真参照)
 - ② GFP-iGluR発現提示細胞の分子育種により、評価分子サイトである iGluRの提示量を定量化しながら、チャンネルゲート機能解析を行なうことができる「シナプスモデル細胞」を構築することが出来た。
 - ③ イオントロッピック活性 (リガンド結合により細胞外から細胞内へのイオン流入が起る興奮発火現象) をモニタリングするため、イオン選択性半導体の開発を開始 (理化学研究所 尾笹一成先生とチーム内連携開発)
- (5) 「バイオ関連分子と半導体ナノ構造とのインターフェイス技術の開発」

研究概要

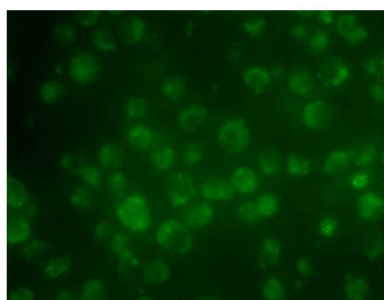
電解質中の HEMT 構造の動作特性について実験を行い、ゲート電圧を印加した場合に見られる特性の時間的な変化の原因が光励起であることを明らかにした。ゲート部分にイオノフォア膜をつけることによる効果を検証した。半導体ナノ粒子の発光特性が基板との距離で変化することを見出し、これが励起光の干渉効果であることを示した。

研究方法

AlGaAs 系の HEMT 構造に In でソース・ドレイン電極を形成し、ゲートを被覆しない状態で電解質 (DMEM) 中に浸し、Ids の時間変化を実測した。昨年度の実験ではゲート電圧を印加する (電解質中に対極を入れて電圧を設定する) と HEMT の劣化が生じた。今年度はその原因を調査した結果、ゲート部分を遮光すると、ゲート電圧を印加した場合にも Ids の変化がかなり低減されることがわかった (図1)。これは光によって HEMT の表面に生じる電子正孔対がゲート電圧との相乗で HEMT の腐食を進行させているためと考えられる。HEMT のゲート部分に Na イオノフォア膜を塗布することで、Na イオンの検出セン



GFP-iGluR発現提示細胞の明視野像



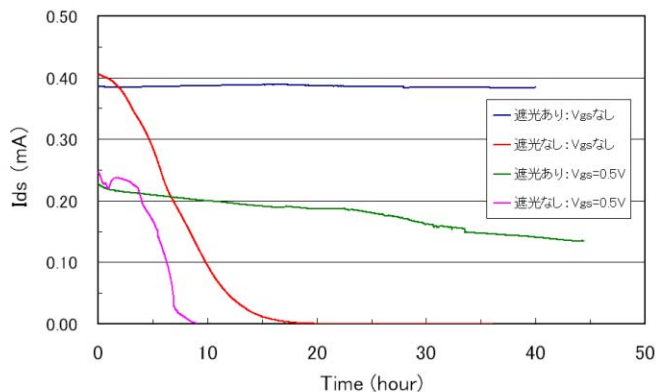
GFP-iGluR発現提示細胞の蛍光像

図4 GFPフュージョンGluR提示細胞の蛍光顕微鏡による発現・提示確認

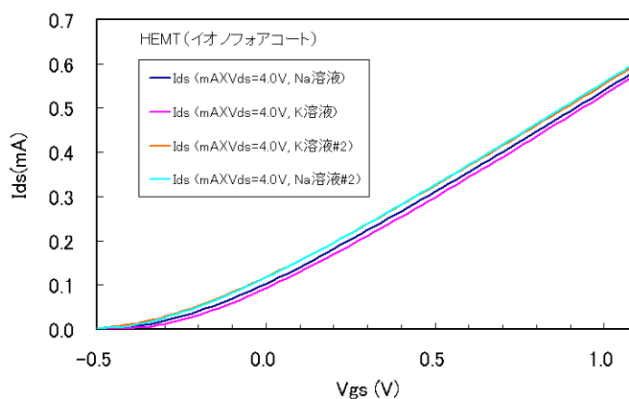
サーの予備的な実験を行った。
この段階ではNa イオンの濃度による I_{ds} の変化はわずかで (図2)、イオノフォア膜や測定電解質の条件の最適化が必要であることがわかった。

半導体ナノ粒子であるCdSe を半導体基板の上に配置し、両者の距離を変えて蛍光特性に現れる変化を調べた。距離と励起波長に依存した蛍光強度の変化が観測され、その依存性は励起光の干渉効果で予測できることがわかった (図3)。この効果を利用すると、ナノサイズの絶縁物パターンの膜厚を計測できることを実証した (図4)。バイオ分子によってナノ粒子と基板とを結合させ、そのバイオ分子が化学変化を起こしたことを (ナノ粒子と基板との乖離による) ナノ粒子の蛍光の変化として捉えられる可能性が大きい。

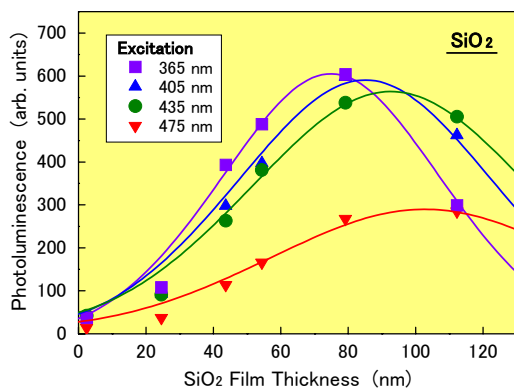
それを検証すべく、ナノ粒子のバイオ分子 (DNA) 修飾を試みた。金基板に配置した相補DNA との結合を調べたが、特異的な結合を実現するためにはより多くのDNA 分子でナノ粒子を修飾することが必要なことが示唆された。



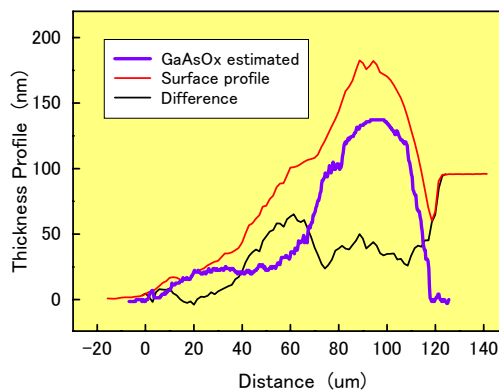
(図1) HEMT 素子の I_{ds} の時間変化 (ゲート電圧と遮光の効果)



(図2) ゲート部分にNa イオノフォアを塗布した HEMT の特性



(図3) SiO_2/Si 基板上的CdSe ナノ粒子の蛍光 (励起波長と SiO_2 膜厚への依存性)



(図4) CdSe ナノ粒子の蛍光変化から GaAsOx 膜厚の推定

(6) 「細胞を用いた毒性試験法の開発」

研究概要

生きた細胞は種々の刺激に対して高度に複雑な生体反応を示すため、極めて高度なインテリジェント材料として利用することができる。生きた細胞のバイオセンサーへの応用は動物実験にかわる代替技術として有望であり、新薬開発のための大規模なスクリーニングや環境評価などへの応用が期待される。本研究は、細胞をインテリジェント材料としての利用を可能にするために、発光あるいは蛍光を発するリポーター遺伝子の導入によって各種遺伝子の発現変化をリアルタイムに解析できるセンサー細胞の創製を目的としている。特に「化学物質の安全性」および「化学物質の医薬効果」といった化学物質機能情報を得るための機能的細胞チップの開発を念頭に置き、各種遺伝子のプロモーターを利用して、複雑な生体反応の結果として生じる細胞毒性を検出するセンサー細胞の構築を目指す。

研究方法

細胞毒性を検出することを目的として、広域なストレスに応答して発現が顕著に誘導されるHSP70B' 遺伝子と、細胞の増殖活性の指標となるS期に特異的に発現するPCNA遺伝子のプロモーターに着目した。これらの遺伝子のプロモーターとレポーター遺伝子と組み合わせることで、細胞のセンサー化を目指した。作成したセンサー細胞の機能を評価するために、細胞内ATP定量に基づいた細胞毒性試験と比較した。

進捗状況

現在までに、HSP70B' 遺伝子のプロモーターを用いることで高感度、かつ迅速な細胞毒性検出が可能であることを示した。また、PCNA遺伝子プロモーターを用いることで作用点の異なる抗癌剤の毒性を区別できる可能性を示した。さらに、これらのプロモーターの下流にGreen Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子を結合することで、生きた状態の単一細胞からこれらのプロモーター活性を検出するセンサー細胞の構築に成功した（研究結果参照）。

研究結果

HSP70B' 遺伝子プロモーターはCdCl₂の添加に応答して顕著に活性が上昇した。このプロモーターの活性の増加を指標としてCdCl₂の細胞毒性を評価したところ、細胞内ATP定量に基づいた細胞毒性試験と比較して約4倍高い感度を示した (Fig. 1)。また、このプロモーターの活性をルシフェラーゼアッセイによって評価するとCdCl₂を添加してから約12時間後に最大の活性を示した。一方、細胞毒性試験では十分な毒性が検出されるまでには24時間以上の暴露時間が必要であった。これらの結果から、HSP70B' 遺伝子のプロモーターを利用することによって細胞毒性を迅速かつ高感度に検出できるセンサー細胞の構築が可能であることが明らかとなった。

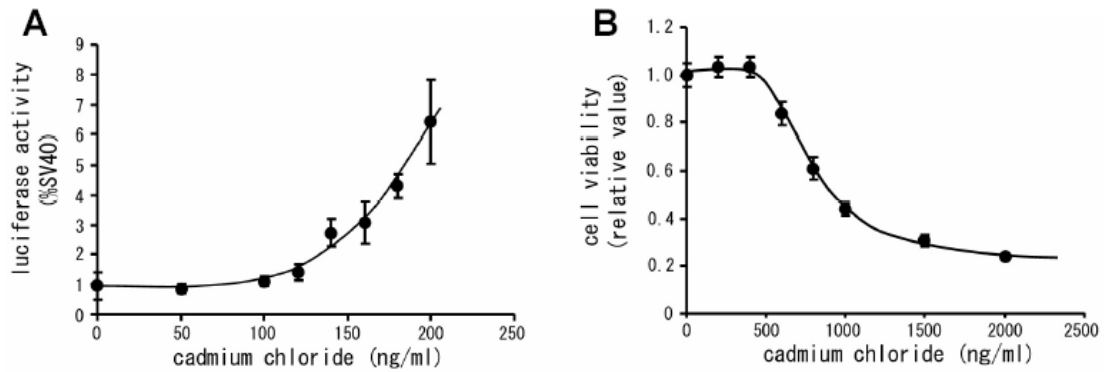


Fig. 1. CdCl₂ の細胞毒性の検出

HepG2 細胞に対する CdCl₂ の細胞毒性を HSP70B 遺伝子の機能的なプロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイ(A)および細胞内 ATP の定量に基づく細胞毒性試験(B)により評価した。CdCl₂ の細胞毒性の検出限界は機能的な HSP70B 遺伝子の機能的なプロモーターを用いて評価した場合 130 ng/ml であったが、細胞内 ATP の定量に基づいた細胞毒性試験によって評価した場合には 530 ng/ml であった。

PCNA 遺伝子のプロモーターは定常状態で高い活性を有していた。抗癌剤として用いられているスタウロスポリンとエトポシドがこのプロモーターの活性に与える影響を調べたところ、細胞内 ATP 定量に基づいた細胞毒性試験で毒性が検出されない濃度、暴露時間において、スタウロスポリンは PCNA プロモーター活性を顕著に減少させたが、エトポシドはその活性に影響を与えなかった (Fig. 3)。これらの結果から、PCNA 遺伝子のプロモーターを利用することで、高感度に抗癌剤の毒性を検出できるだけでなく、作用機序の異なる薬剤の毒性を区別できることが期待された。

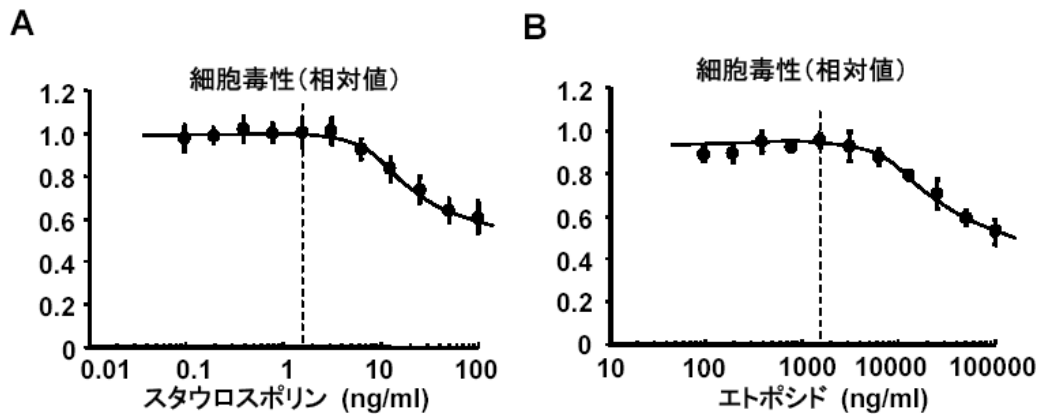


Fig. 2. HepG2 細胞に対する抗癌剤の細胞毒性

細胞内 ATP 濃度の定量を指標とした細胞毒性評価では、スタウロスポリンは 1.6 ng/ml 以下(A)、エトポシドは 160 ng/ml 以下(B)の濃度では毒性が検出できなかった(それぞれの濃度を破線で示す)。

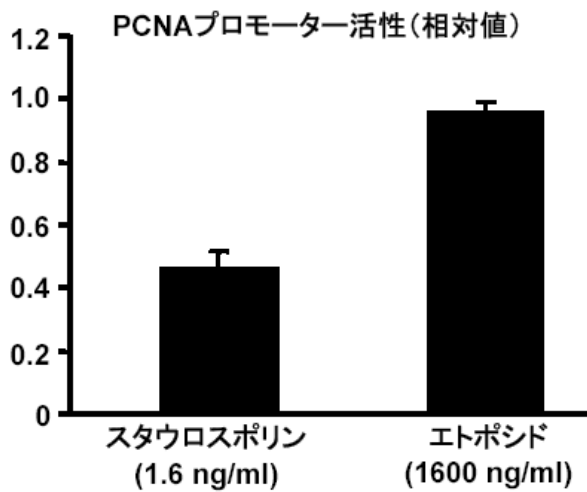


Fig. 3. 抗癌剤の PCNA プロモーター活性に与える影響

細胞毒性を発揮しない濃度のスタウロスポリン (1.6 ng/ml) によって PCNA プロモーター活性は顕著に減少したが、エトポシド (160 ng/ml) は影響を与えなかった。

HSP70B' と PCNA 遺伝子プロモーターそれぞれの下流に GFP 遺伝子を組み込んだプラスミドを構築し HepG2 細胞に一過性に導入した。この細胞に CdCl₂ を暴露し、蛍光顕微鏡下で観察したところ、プロモーターの活性を蛍光として単一の細胞毎に検出することができた (Fig. 4)。この結果から、これらのプロモーターと GFP 遺伝子を組み合わせて作成したセンサー細胞を用いることによって、簡便に高感度な毒性評価試験が実施できる可能性が示唆された。

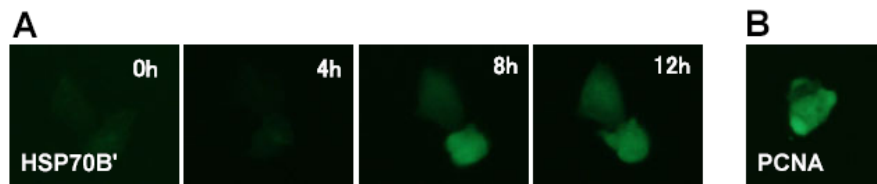


Fig. 4. GFP 遺伝子を用いたプロモーター活性の可視化

HSP70B' と PCNA 遺伝子プロモーターそれぞれの下流に GFP 遺伝子を結合させたプラスミドを構築し、HepG2 細胞に導入した。HSP70B' 遺伝子プロモーターで GFP 遺伝子の発現を制御するプラスミドを導入した細胞を 500 ng/ml の CdCl₂ に暴露したところ、経時的に増加する蛍光が観察された (A)。また、GFP 遺伝子によって PCNA 遺伝子プロモーターの活性も可視化することができた (B)。

今後の研究の予定

現在までに、細胞ストレス (HSP70B')、および細胞増殖 (PCNA) の指標となるプロモーターを用いてセンサー細胞の構築を行ってきた。これらに加えて、アポトーシス誘導遺伝子のプロモーターを用いたセンサー細胞の作成を予定している。今後は、作成したセンサー細胞を用いて、本プロジェクトにおいて確立しつつあるセンシング技術や細胞アレイ化培養技術、微小流路内培養技術と融合させ、複数種のセンサー細胞を集積化させた毒性評価デバイスの開発へ発展させていく予定である。

3. 研究実施体制

女子医大グループ

- ① 研究分担グループ長：岡野 光夫（東京女子医科大学先端生命医科学研究所、教授・所長）
- ② 研究項目：ナノドメイン操作材料の開発、新規組織再構成技術の開発

九工大グループ

- ① 研究分担グループ長：春山 哲也（九州工業大学大学院生命体工学研究科、教授）
- ② 研究項目：細胞応答計測のためのセンシング素子及びシステムの構築

物材研グループ

- ① 研究分担グループ長：谷口 彰良（物質材料研究機構細胞基盤技術グループ、主幹研究員）
- ② 研究項目：細胞を用いた毒性試験法の開発

理研グループ

- ① 研究分担グループ長：尾笹 一成（理化学研究所フロンティア研究システム、先任研究員）
- ② 研究項目：バイオ関連分子と半導体ナノ構造とのインターフェイス技術の開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Y. Tsuda, A. Kikuchi, M. Yamato, Y. Sakurai, M. Umezu and T. Okano, “Control of cell Adhesion and detachment using temperature and thermo-responsive copolymer grafted culture surfaces”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **69A**(1), 70-78 (2004).
- Y. Tanaka, K. Sato, M. Yamato, T. Okano and T. Kitamori, “Drug Response Assay System in a Microchip Using Human Hepatoma Cells”, *Analytical Sciences*, **20**, 411-413 (2004).
- M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai and T. Okano, “Temperature-Responsive cell culture surfaces enable “On-Off” affinity control between cell integrins and RGDS ligands”, *Biomacromolecules*, **5**(2), 505-510 (2004).
- Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, H. Toma and T. Okano, “Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps”, *BJU Int.*, **93**, 1069-1075 (2004).
- K. Itoga, M. Yamato, J. Kobayashi, A. Kikuchi and T. Okano,

“Micropatterned surfaces prepared using a liquid crystal projector-modified photopolymerization device and microfluidics”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **69A**(3), 391-397 (2004).

- Y. Akiyama, A. Kikuchi, M. Yamato and T. Okano, “Ultrathin poly (N-isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/ detachment control”, *Langmuir*, **20**, 5506-5511 (2004).
- K. Watanabe, K. Nishida, M. Yamato, T. Umemoto, T. Sumide, K. Yamamoto, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano and Y. Tano, “Human limbal epithelium contains side population cell expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2”, *FEBS Letters*, **565**, 6-10 (2004).
- H. Otsuka, A. Hirano, Y. Nagasaki, T. Okano, Y. Horiike and K. Kataoka, “Two-dimensional multiarray formation of hepatocyte spheroids on a microfabricated PEG-brush surface”, *Chem. Bio. Chem.*, **5**(6), 850-855 (2004).
- M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai and T. Okano, “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).
- K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, K. Yamamoto, E. Adachi, S. Nagai, A. Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano and Y. Tano, “Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium”, *N. Engl. J. Med.*, **351**(12), 1187-1196 (2004).
- M. Ebara, M. Yamato, S. Nagai, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano, “Incorporation of new carboxylate functionalized co-monomers to temperature-responsive polymer-grafted cell surfaces”, *Surface Science*, **570**(2004)., 134-141 (2004).
- J. Kobayashi, M. Yamato, K. Itoga, A. Kikuchi and T. Okano, “Preparation of microfluidic devices using micropatterning of a photosensitive material by a maskless, Liquid-Crystal-Display projection method”, *Advanced Materials*, **16**(22), 1997-2001 (2004).
- 小林 純, 岡野光夫, “再生医療におけるナノバイオテクノロジー”, *ファルマシア*, **40** (11), 1018-1022 (2004).
- 大和雅之, 岡野光夫, “細胞シート工学”, *Medical Science Digest*, **30**(12), 2-3 (2004).
- 岡野光夫, “細胞シート工学を基盤とする再生医療”, *核医学技術*, **24**(4), 324-325 (2004).
- 原口裕次, 清水達也, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫, “細胞シート工学を用いた

組織再構築および再生医療への応用” , *再生歯誌*, **2**(2), 83-92 (2004).

- A. Kikuchi and T. Okano, “Nanostructured designs of biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs” , *J. Control. Rel.*, **101**(1-3), 69-84 (2005).
- J. Yang, M. Yamato and T. Okano, “Cell sheet engineering - Movin’ on up!” , *re. news*, **2005**(1), 2-3 (2005).
- J. Yang, M. Yamato and T. Okano, “Cell-sheet engineering using intelligent surfaces” , *MRS Bulletin*, **30**(3), 189-193 (2005).
- 春山哲也, “人工系の分子設計とバイオセンシングへの応用” , *Chemical Sensors*, **20**(4), 160-166 (2004).
- T. Haruyama, H. Asakawa, S. Migita, S. Ikeno, “Bio-, Nano-, technology for Cellular Biosensing” , *Current Applied Physics*, **5**, 108-111(2005).
- K. Ozasa, Y. Aoyagi, M. Hara, M. Maeda, A. Yamane, and Y. Arai, “Enhanced photoluminescence of InGaAs quantum dots induced by nanoprobe indentation” , *Physica E*, **21**, 265(2004).
- K. Ozasa, Y. Aoyagi, M. Iwaki, M. Hara, and M. Maeda, “Nanofabrication of cylindrical STEM specimen of InGaAs/GaAs quantum dots for 3D-STEM observation” , *Ultramicroscopy*, **101**, 55(2004).
- 谷口彰良、黒澤康紀、岡野光夫, “細胞シートを用いた重層化培養法による肝細胞と内皮細胞の相互作用” , *再生医療*, **4**, 61-64 (2005).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：3件）