

「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創成」  
平成 18 年度採択研究代表者

小寺 秀俊

京都大学工学研究科・教授

## 再生医療に向けたバイオ/ナノハイブリッドプラットフォーム技術の構築

### 1. 研究実施の概要

本プロジェクトは、当研究グループに属する研究者がこれまで開発してきた細胞計測技術や細胞内への物質導入および MEMS・NEMS の創製技術と再生医療および再生科学を担当するものが有機的に連携し、細胞・組織の再生に関する研究シーズ・ニーズを元に、新たな研究手法としてのマイクロ・ナノシステムの構造と原理およびその使用方法を組織・細胞の再生の的確な実現に向けて進めるものであり、それぞれの研究者が強固に連携して開発を進める。

年次計画としては、最初の 3 年間で各々の要素技術の開発および集積化デバイスの構築を行うとともに、膵島細胞を構成する  $\alpha$  細胞・ $\beta$  細胞・ $\delta$  細胞を対象に、細胞の分離技術さらに配置技術の開発、細胞間相互作用の計測を行う。後半の 3 年では、その計測結果を元に、膵島細胞の分化・増殖の制御を行い、さらに膵島の再構築を目指す。

最初の 3 年の最終年度である平成 20 年度は、平成 18-19 年度に開発したデバイスを用い、デバイス開発と細胞実験を担当する各担当者が連携しながら、実際の膵島細胞（培養細胞および実験動物から採取した細胞）を用いた細胞間相互作用の計測が可能であるようにデバイスの開発および細胞の実験を行い、個々の細胞の計測を可能にした。また、細胞融合による細胞の初期化実験のためのデバイス開発をほぼ終了した。平成 21 年度は開発したデバイスおよび実験装置を用いて、①細胞間相互作用の計測、②細胞再生実験、③細胞の初期化実験を行う。

### 2. 研究実施内容

#### A. 細胞配列・相互作用計測グループ

##### (1) 研究題目：細胞配列・相互作用計測のためのバイオナノプラットフォーム技術の構築

- 1) 細胞間相互作用解析のための集積化マイクロ化学分析システムの開発
- 2) 細胞内物質導入・細胞質移植を通じた分化・増殖の誘導と制御
- 3) 臓器組織の人為的構築

##### (2) 研究の目的および内容

生体から分離した細胞を配置し、長期間培養でき細胞間相互作用の因子分析が可能なマ

マイクロ流体デバイスと細胞保持構造の構築を行う。それを用いて、異なる種類の細胞を所望の位置に配置し、その活性を維持しつつ、細胞個々に各種刺激（化学的・物理的）を加え、細胞間伝達物質を拡散させてしまうことなく隣接する細胞に制御された形で導き、1細胞レベルでの細胞間相互作用の計測を行う。また、1細胞内で起きる刺激応答反応にも着目し、局所薬剤刺激に対する細胞内応答の高空間・時間分解能を持った計測を実現する。さらに、これらデバイスを集積化し、臓器組織の人為的な構築技術を開発することを目標として研究開発を行ってきた。

実際に膵島から分離した細胞間の相互作用・細胞内刺激応答を計測するとともに、再構築による機能発現に関する研究を実施する。また、細胞内物質導入による分化・増殖の誘導の実験を幹細胞などを用いて実施する。細胞・組織の実験は雇用研究員とともに医学研究科の興津、三浦と再生医科学研究所の多田、岩田が担当し、デバイスは雇用研究員とともに小寺、鈴木が主体となり、他の機関のデバイスグループと連携し進めてきた。

### （3）本年度の研究実施項目・概要

最初の3年間で各々の要素技術の開発および集積化デバイスの構築を行うとともに、膵島細胞を構成する $\alpha$ 細胞・ $\beta$ 細胞・ $\delta$ 細胞を対象に、細胞の分離技術さらに配置技術の開発、細胞間相互作用・細胞内刺激応答の計測を行う。後半の3年では、その計測結果を元に、膵島細胞の分化・増殖の制御を行い、さらに膵島の再構築を目指す。平成20年度は平成19年度に行ったデバイスの有効性の検討および問題点の抽出と開発項目の詳細な洗い出しの結果をもとに、単一細胞・複数細胞・組織レベルの実験を継続して行い、デバイスの有効性を検討するとともに、①細胞間相互作用解析・細胞内刺激応答解析、②細胞内物質導入・細胞質移植を通じた分化・増殖の誘導と制御、③臓器組織の人為的構築の実験を進めてきた。

平成21年3月までの研究内容と成果および担当者

- 1)細胞間相互作用解析のための集積化マイクロ化学分析システムの開発（小此木・寺尾・鈴木・岩田・興津・小寺）
- 2)細胞内物質導入・細胞質移植を通じた分化・増殖の誘導と制御（木村・ムラト・小穴・鷲津・岩田・多田・小寺）
- 3)臓器組織の人為的構築（三浦・鈴木・小寺）

テーマ1)と2)は共通のデバイスを用いた実験系であることから、まとめて概要を示し、次に3)の概要を述べる。

- 1)細胞間相互作用解析のための集積化マイクロ化学分析システムの開発
- 2)細胞内物質導入・細胞質移植を通じた分化・増殖の誘導と制御

細胞間相互作用解析のための集積化マイクロ化学分析システムとして、複数の細胞を配列し細胞間相互作用を解析するシステム(1,2-1)と、単一細胞に局所刺激を与え細胞内応答(方向性)を解析するシステム(1,2-2)についてデバイスおよび実験装置を開発し、細胞への刺激応答の実験に関して検討を行った。

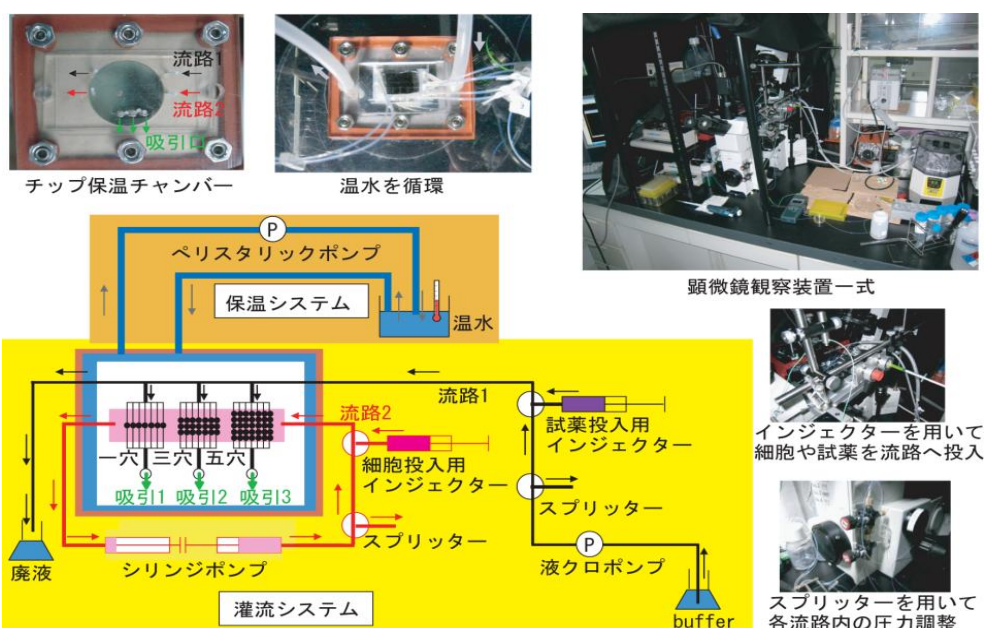
#### 1,2-1)細胞間相互作用解析

膵島の微小循環に依存する液性細胞間相互作用と細胞同士の配置に依存する接触性細胞間相互作用によるインスリン分泌制御の分析デバイスの開発を行い、細胞間相互作用を計測する。マイクロ流路とオリフィスアレイを作製し、マイクロオリフィスに膵 $\beta$ 細胞を吸引・固定し、マイクロ流体回路を用いて細胞を刺激し、細胞からの拡散および細胞を固定した流路における流れ場により細胞間相互作用を計測するためのデバイス開発および計測を行った。開発したデバイスは、これまで困難であった液性・接触性細胞間コミュニケーションを区別して計測が可能である。

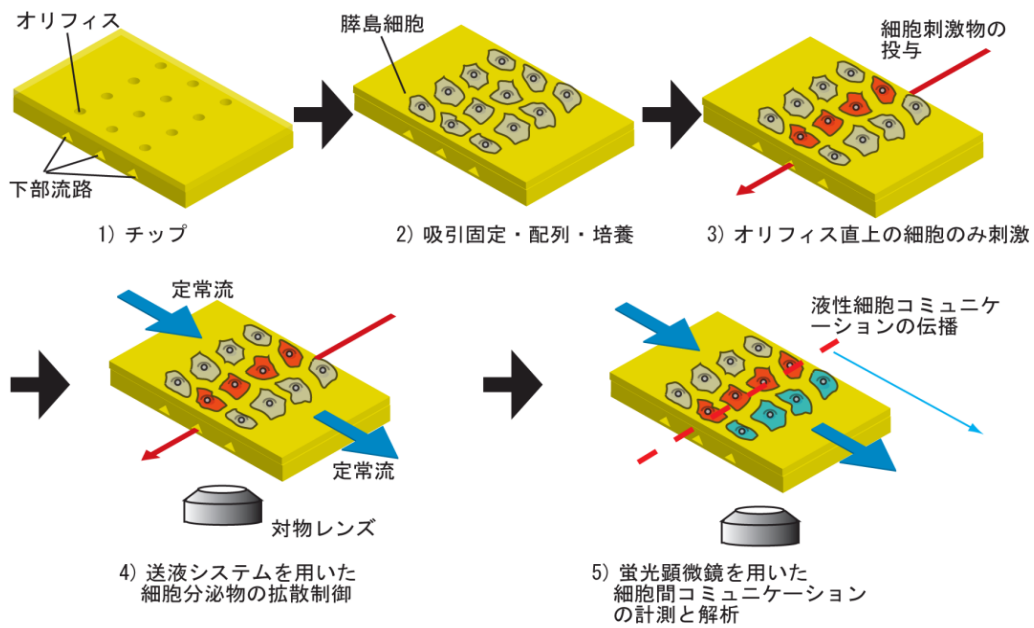
平成20年度は、微小流路内で膵島細胞機能の活性を維持した状態で細胞操作(8,9)し、その結果を微小空間でモニタリングするために、平成19年度に開発した集積化デバイ

スを細胞操作に適した仕様に最適化したことと、そのデバイスを使用した液性細胞間コミュニケーションの観察を行なった。デバイス内で細胞を扱うためには、流路内の液を適切な圧で制御し細胞の位置制御をする必要があるが、従来の送液系は微小流路に低圧で流れる溶液の陽圧—陰圧の測定および制御が技術的に困難であるため、細胞に傷害を与えない適圧下での細胞操作ができなかった。本実験系では、柔軟な PDMS 流路に圧力センサを貼り付けることで流路壁面にかかる圧力の増減から溶液の陽圧—陰圧の測定ができるようになった（図 1-1, 図 1-2 参照）。その細胞に傷害を与えずに細胞を長時間にわたり基板上に把持できる特性により、以下に述べる薬剤刺激による細胞応答反応の経時変化を捕らえることに成功した。

初めに、このデバイスのオリフィスにて捕らえた膵β細胞（MIN6-m9 培養細胞株）のみに薬剤刺激を与えることができるか実験を行なった。その結果、オリフィス上の細胞 1 個のみに与えた薬剤が取り込まれることを確認した（図 1-3 左参照）。さらに、グルコース刺激に依存した細胞内  $Ca^{2+}$  応答を単一細胞レベルにて計測することが昨年末までに実現できた（図 1-3 右参照）。年明け後は、細胞間相互作用の計測を行なうための基礎データを得るため、細胞間相互作用を担う物質であるインスリンを他の薬剤同様に下部流路より導入し、インスリン刺激に対する細胞応答反応の観察を行なった。その結果、細胞が分泌するインスリン濃度レベルでの刺激にて細胞内  $Ca^{2+}$  応答が起こることを確認することができた（図 1-4 参照）。平成 21 年 9 月には細胞が自発的に分泌する刺激物質による細胞間相互作用の計測結果を得る。また、東京大学藤田 G が開発しているセンシングシステムによる計測の組み込みを平成 21 年度に試み、TAS としての装置の構築を行う。



(実験装置概要)



(細胞間相互作用解析のためのマイクロシステム)

図 1-1 細胞間相互作用を計測するための実験装置および開発したデバイス

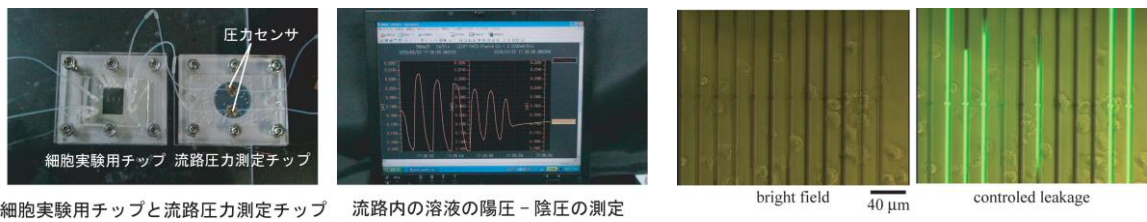


図 1-2 微小流路に低圧で流れる溶液の陽圧-陰圧の測定との試薬漏れの制御

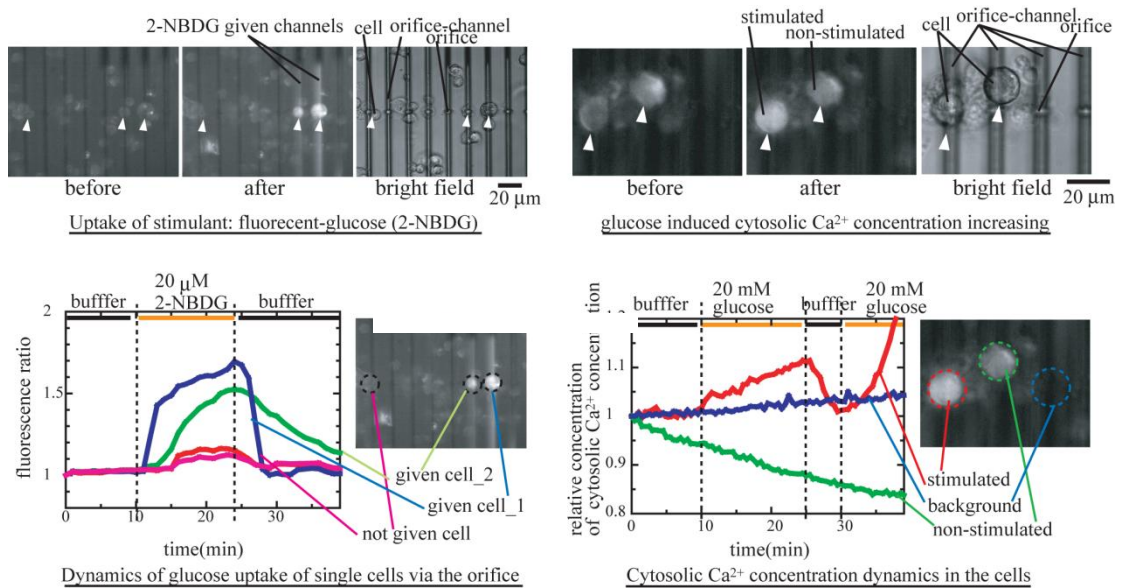


図 1-3 単一細胞への蛍光グルコース投与とグルコース刺激に対する  $Ca^{2+}$  応答

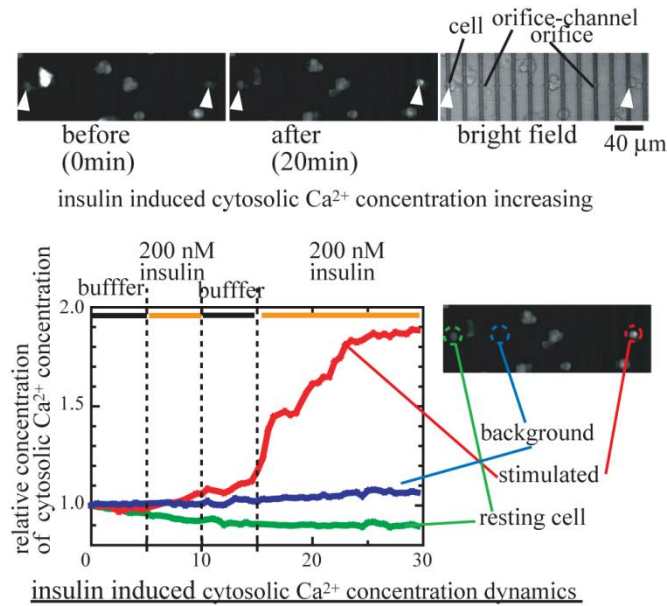


図 1-4 インスリンを介在する細胞間相互作用の計測に向けたインスリン刺激

### 1, 2-2) 細胞内刺激応答解析

生体内の膵島細胞は、血管に接した面でグルコース・液性細胞間伝達物質による刺激にさらされる。しかし、血管から局所的に刺激を受けたときの細胞内での応答反応について *in vitro* で解析する技術は確立されていない。本研究では、局所刺激に対する細胞内応答を解析するため、マイクロ流路技術を利用した局所刺激・応答解析デバイスの開発を行う。膵β細胞 1 個の内部で起きるグルコース刺激応答に焦点を当て、局所グルコース刺激に対する細胞内応答反応（グルコース取り込み、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇、分泌顆粒動態変化）の蛍光実時間観察を行う、デバイスは図 2-1 に示すように、A) 細胞を水平方向に吸引固定することで高倍率対物レンズでの細胞内観察を可能にする。B) 血管を模倣したマイクロ流路から局所的にグルコース刺激を細胞に与える。ことを特徴とする。

平成 20 年度は局所刺激デバイスのプロトタイプ試作及び、デバイスを用いた膵β細胞刺激応答観察を開始することを目標に実験を進めた。

その結果、試作したプロトタイプで、1 細胞の吸引固定に成功し（図 2-2）、刺激物質であるグルコースの細胞内への取り込み過程を 3 次元で蛍光可視化することに成功した（図 2-3）。また、トランスフェクションにより作製した GFP-インスリンを発現する細胞を用いて（図 2-4）、バルクでの刺激応答（インスリン放出）と細胞内の分泌顆粒の動態・分布を 3 次元的に計測する実験系を構築した。

平成 21 年度には、これまでの結果を基に、グルコース局所刺激に対する細胞内応答としてカルシウム濃度変化とインスリン分泌顆粒の動態変化をデバイス中で計測する。平成 21 年 9 月には局所刺激に対するそれらの応答を計測し、結果を得る。また同時に、東京大学藤田 G が開発しているセンシングシステムによる計測の組み込みを試み、TAS としての装置の構築を行う。

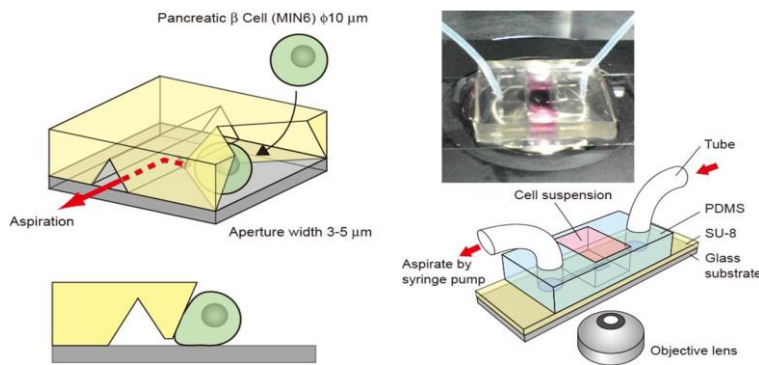


図 2-1 生体模倣デバイスを用いた細胞局所刺激応答計測

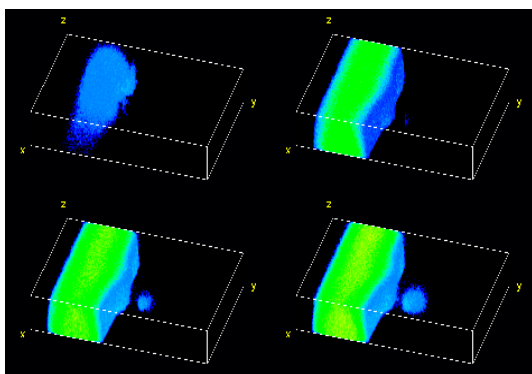


図 2-2 1 細胞吸引固定

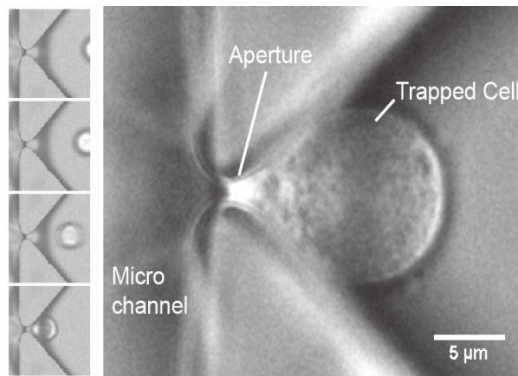


図 2-3 蛍光グルコース取込 4D(x, y, z, t) 計測

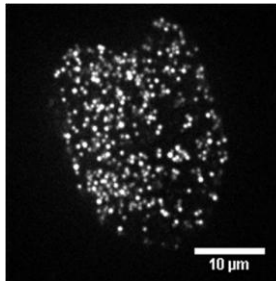


図 2-4 GFP-インスリンによる細胞内分泌顆粒の可視化

### 3) 臓器組織の人為的構築

生体内では、膵島細胞の機能は血管系の構造／機能に大きく依存する。従って、血管や血流と膵島細胞の関連を調べることは、機能する膵島細胞を提供する上で非常に重要になる。本研究では、MEMS 技術を用いたトップダウンアプローチによる工学的にパターンを設計して与える方法と、ボトムアップアプローチによる生物が発生過程で行う自己組織化過程を生かして利用する方法とを融合させることにより、機能する組織構造を *in vitro* で再構成するための基礎技術の開発を行う。平成 20 年度は、形態形成の数理モデル化手法のさらなる構築 (22) と、その結果を微小空間で再現するために昨年度より蓄積中の MEMS デバイス上での細胞培養技術、内皮細胞 (HUVEC) のメッシュワーク構造形成を促進する技術を用いて、*in vitro* で合成した血管系へ培養液を流して機能させることを目標として研究を進めてきた。

平成 20 年度は、内皮細胞のネットワークを実際の流路として機能させるための技術開発を行うため、(1) VEGF (vascular endothelial growth factor) という走化性因子を用いて、デバイスのオリフィスに内皮細胞を誘導する。(2) デバイスの流路内で細胞を培養し、外部の細胞との結合を促進する。(3) マイクロピペットを用いて内皮細胞

のネットワーク構造に直接液流を作る。という3つのアプローチについて検討を行った。図3は、VEGFをカプセル化しマイクロ流路に設けた穴に保持し、HUVECを誘導して管状組織を構築するためのデバイス構造および実験結果を示す。白い波線で示すように血管構造を誘導できている。平成20年度は管状に誘導できる実験方法を構築した。平成21年度は、マイクロ流路・マイクロ穴と誘導し構築した毛細血管系への送液を実施し、平成21年9月には擬似組織の構築を目指した毛細血管系の機能評価のおおよその成果を提示する予定である。

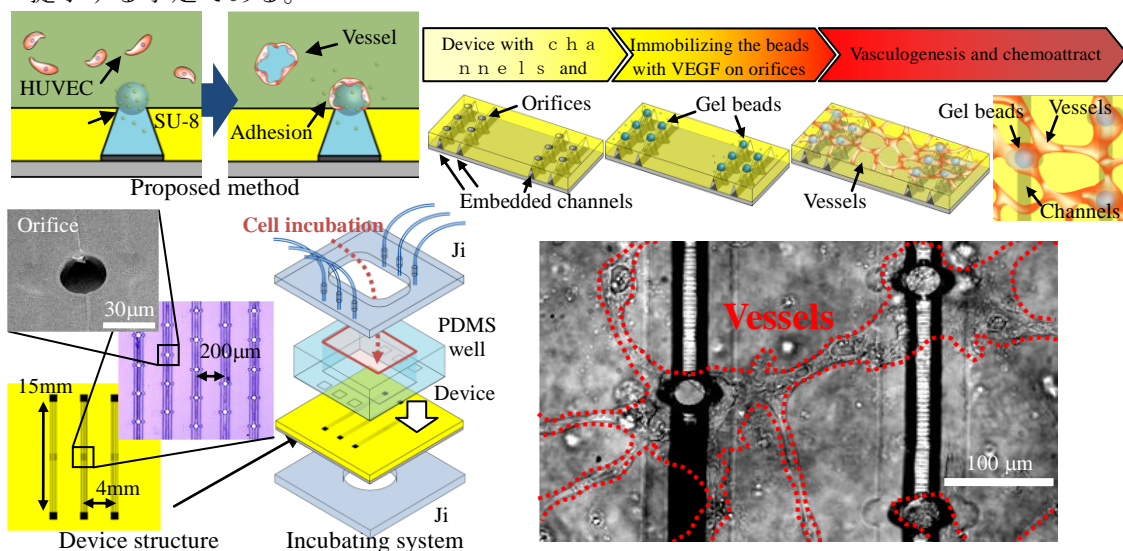


図3 マイクロデバイスによる血管誘導再生

## B. 再生・分化誘導グループ

### (1) 研究題目：再生・分化誘導のためのバイオナノプラットフォーム技術の構築

- 1) 細胞内物質導入・細胞質移植法の開発と細胞分化・増殖の誘導・制御
- 2) 半導体マイクロ・ナノ加工技術の細胞並列同時操作と分子計測への応用

### (2) 研究の目的および内容

分化・増殖にかかわる因子を細胞に定められたタイミングで添加し、細胞の分化・増殖を人為的に制御するための手法、すなわちその場合電圧ポレーションにより因子を細胞にタイミングを制御して導入する手法や、マイクロ構造を利用した細胞手術による細胞質移植法の開発を行う。また、これらの手法を用いて、細胞の分化・増殖の誘導・制御を試みるとともに、臍島細胞再生への応用を行う。さらに、MEMS技術を用いて生体細胞を多数並列に扱うデバイスの製造技術を確立し、それを用いて、細胞の整列捕獲・配置・エンカプシュレーション、同時並列操作（細胞内への各種物質の注入・細胞成分分取など）を行う。また、MEMSセンサを開発し、細胞応答のリアルタイム計測を行う。

細胞内物質導入・細胞質移植法の開発は、東京大学の鷲津・小穴が、MEMS技術による細胞操作は東京大学の藤田・竹内、香川大学の橋口が、分子計測は東京大学の藤田・立命館大学の横川が主体となり、細胞・組織の生物学的・医学的実験に関しては、京都大学のグループ（小寺・岩田・多田・三浦）と連携し推し進めてきた。

### (3) 本年度の研究実施項目・概要

最初の3年間で各々の要素技術の開発および集積化デバイスの構築を行うとともに、精

製可能な因子を導入するためのその場エレクトロポレーション法、および特定されていないあるいは微量で精製不能な因子を導入するための細胞質移植法の開発を行うとともに、細胞の配置・カプセルング技術、および細胞より分泌される分子のリアルタイム計測のための基盤技術の開発を行う。後半の3年では、その成果を元に、膵島細胞の分化・増殖の制御を行い、さらに膵島の再構築を目指す。

平成20年度においては、a) 平成18-19年度に開発した細胞内物質導入法・細胞融合法を用いて、細胞分化・増殖・初期化に関する基礎研究の推進と、それを利用した細胞分化・増殖・初期化の人為的制御の試行。b) 高分解能での位置を特定した刺激のためのAFM一体型ナノ・ディスペンサーの開発。c) 微小カプセル内の血管を含む膵島の3次元組織を再構成法の開発。d) マイクロデバイス内での細胞応答計測法の開発。e) ISFET・カンチレバー・SAWを用いた膵島細胞活動モニタリング法の開発。の各項目について研究開発を行ってきた。

平成20年度における研究内容と成果および担当者

- 1) 細胞内物質導入・細胞質移植のためのマイクロデバイスを用いた高効率細胞融合法の開発 (鷲津・小穴・木村雇用研究員)
- 2) MEMS技術を用いた細胞刺激・細胞内物質注入・細胞局所刺激・細胞手術デバイスの開発 (藤田・橋口)
- 3) 細胞系の組立・カプセルングのためのMEMS技術の開発 (竹内)
- 4) 細胞応答計測のためのMEMSデバイスを用いた分子計測法の開発 (横川)
- 5) 膵β細胞のモニタリングのためのMEMSセンサの開発 (藤田)

以下にその項目別の概要を述べる。

#### 1) 細胞内物質導入・細胞質移植のためのマイクロデバイスを用いた高効率細胞融合法の開発

分化・増殖にかかわる因子を細胞に導入し、細胞の分化・増殖を人為的に制御するために、マイクロオリフィスを用いた方法を提案・開発してきた(19,20)。平成20年度は、融合・細胞質移植の過程を観察できるデバイスを構築し(図4a)、融合のための条件の最適化を行うとともに、融合後のイベントの実時間観察を行った。さらに、このデバイスを用いて融合後の細胞質移植の実証を行った(図4b)。前年度より開発してきた大量並列細胞融合処理デバイスにおいては、オリフィスを配列した絶縁体シートとして、取り扱いやすい新たなシートを実用化するとともに(図4c)、スターラーバーを利用した効率的な融合細胞対の配列方法を開発した(図4d)。また、これまで繊維芽細胞や白血病由来細胞などの細胞株をモデル細胞として融合を行ってきたが、ES細胞と体細胞(繊維芽細胞)においても従来の細胞と同様に融合できることを、両デバイスで実証した。



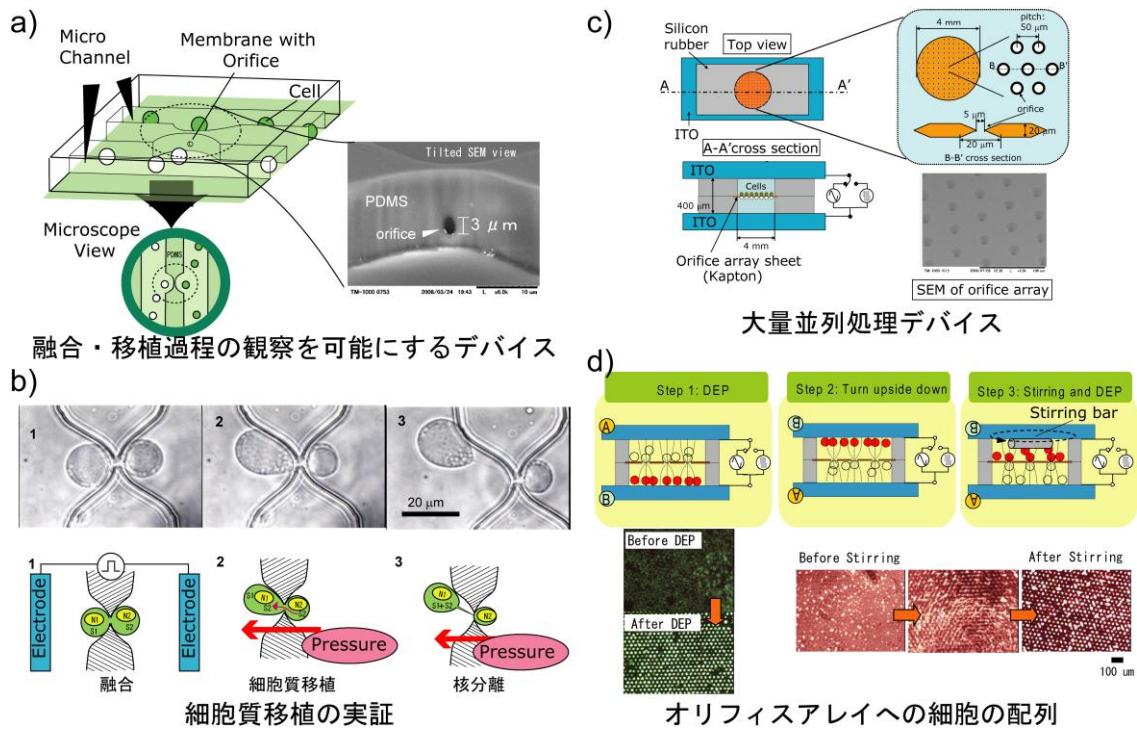


図 4 細胞融合・細胞質移植デバイス

## 2) MEMS 技術を用いた細胞刺激・細胞内物質注入・細胞局所刺激・細胞手術デバイスの開発

平成 19 年度は、ディスペンサと AFM カンチレバーを融合したデバイスを作製するところまで行ったが送液を確認するところまでは至らなかった。平成 20 年度は送液を確認することに注力した。図 5 は 0.27MPa で直径 2  $\mu\text{m}$  程度の開口を設けたディスペンサデバイスに送液した様子である。溶液は先端部の空気を押しながら非常にゆっくりとディスペンサ内に浸透している。空気は先端部の開口から放出されていると考えられ、図 5-(d)では先端部の突起部まで溶液が進入しており、図 5-(e)では完全に空気が放出され、ディスペンサ内が溶液で満たされている状態となっている。しかし、その後ポンプの最大圧力である 0.3MPa まで加圧しても開口部からの溶液のもれは観測できず、ディスペンサとしての機能は観測できなかった。

続いて、より開口を大きく開けたデバイスを作製し実験を行った。図 6 は開口の直径が 5  $\mu\text{m}$  のデバイスによる送液実験の連続写真である。(a)から(d)にかけて、図 6 と同様にディスペンサ中の気泡が少しずつ小さくなっていき、(f)以降は少しずつ溶液が放出されている。この実験より開口部直径が 5  $\mu\text{m}$  であれば、ディスペンサとして働くことが分かった。

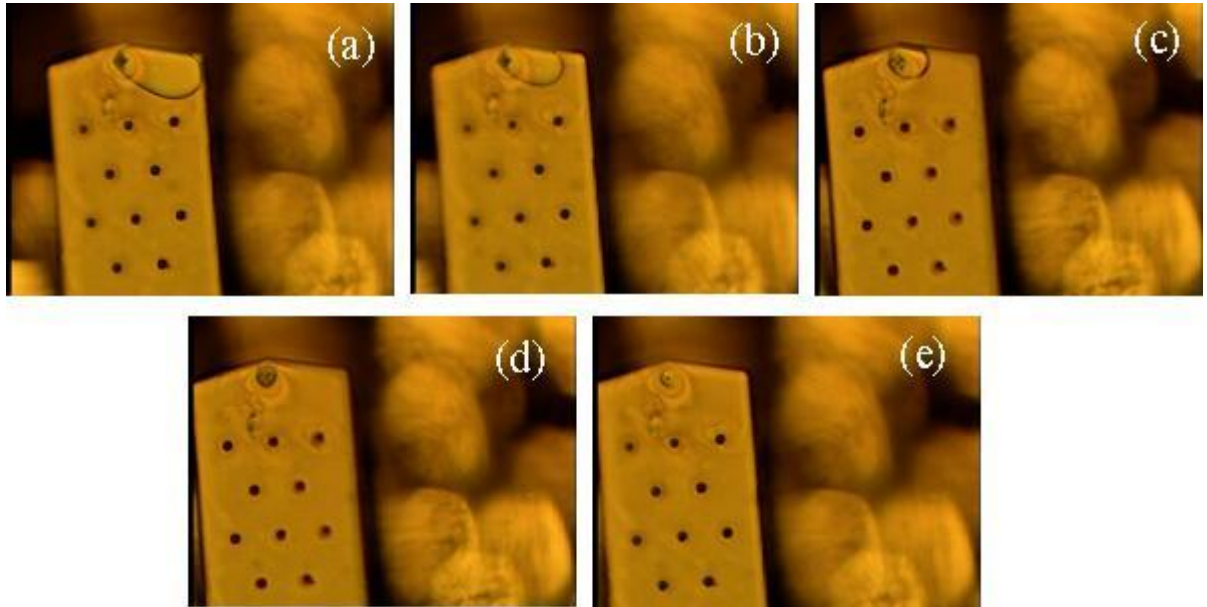


図 5 ディスペンサ内を浸透する溶液の様子。(a)から(e)まで時間は約 3 分。ポンプ圧力は 0.27MPa。

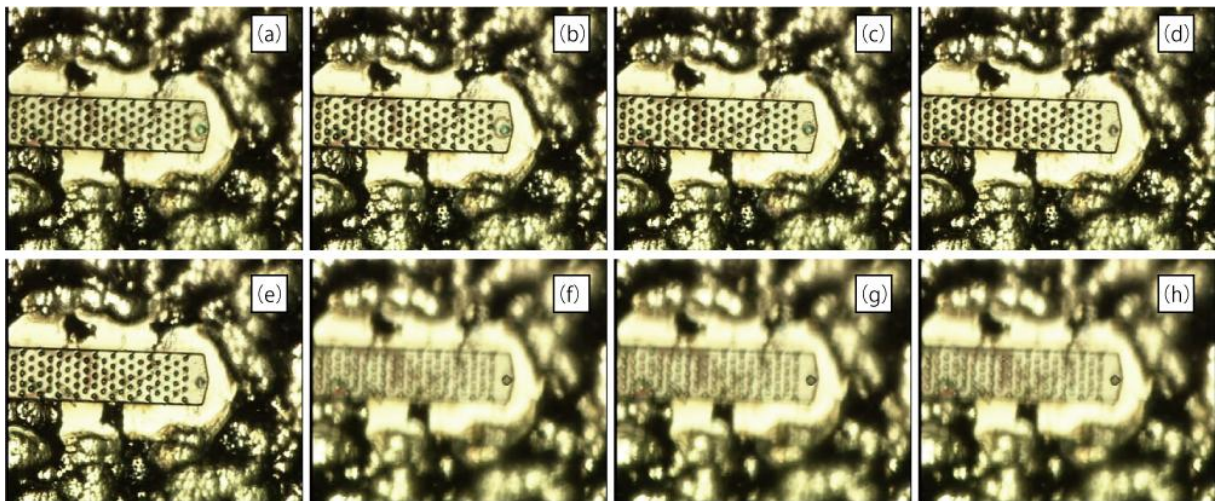


図 6 開口部直径  $5\mu\text{m}$  のディスペンサデバイスによる送液実験の様子。

### 3) 細胞系の組立・カプセル化のための MEMS 技術の開発

細胞カプセル化に関する研究では、3次元マイクロ流路 (22) を利用して、ペプチドゲルによる細胞のカプセル化に成功した。また、カプセル後の生存も確認でき、数日間培養することも可能であり、血管状の構造が形成されることを確認した(図 7 中赤矢印)。これらの技術は、細胞移植や細胞の3次元培養などの基盤技術となりうる。

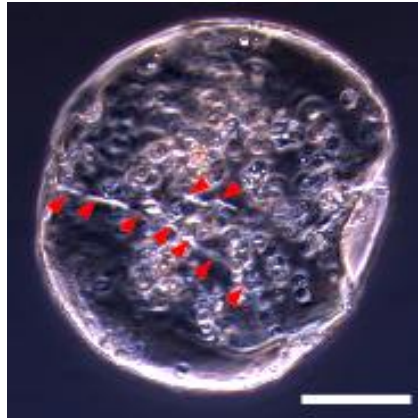


図7 ペプチドゲルによる細胞のカプセル化

#### 4) 細胞応答計測のための MEMS デバイスを用いた分子計測法の開発

平成 20 年度は、昨年度確立した膵β細胞のオンチップ培養系、Ca<sup>2+</sup>濃度のイメージングによる刺激応答検出技術、その全反射蛍光観察用マイクロデバイス (21)、バッファ置換用灌流装置などをデバイス上に統合した。特に、デバイス内に親疎水バルブを配置することで、任意のタイミングで細胞に刺激を与える実験系を確立した。このデバイスを用いて、複数のマイクロチャンバ内で細胞を培養し各細胞クラスタに対し独立に刺激することが可能になった。また別途、定量的にインシュリン放出を計測するためのリアルタイム ELISA のオンチップ化も検討をおこなったが、細胞クラスタからの低濃度のインシュリンに対しては十分な検出感度が得られなかった。

#### 5) 膵β細胞のモニタリングのための MEMS センサの開発

##### (1) カンチレバー振動型インシュリンセンサ

シリコンをマイクロ加工したカンチレバー振動型インシュリンセンサについて、基本的な動作を確認した。カンチレバー表面を酸化し、そこに APTES の自己組織化単分子膜(SAM)を形成し、その上に抗インシュリン抗体を付加した。さらに抗体間に露出した APTES 表面を BSA で覆った。この後、インシュリンを導入し抗体との結合を確かめた。これらの各ステップにおいて、カンチレバーの共振周波数が時間的に低下する様子を、高感度のレーザー振動計測系で検出することができた。

##### (2) 電気化学センサ

プラチナの電極をガラス基板上に形成し、その上にカルシウムイオンを特異的に通過する膜をつけて電気化学センサを構成する。応答性、感度に優れたイオン選択膜の形成プロセスを最適化することで、10<sup>-7</sup> M/L の低濃度まで測定することができた(図 9 参照)。平成 20 年度に国際強化支援の予算をいただき、アドレス回路付き電極アレイをフランスで作成した。現在、デバイスの特性の確認を行っており、平成 21 年 9 月にはグルコース刺激に伴う細胞近傍でのイオン濃度変化についておおよその成果を提示する予定である。

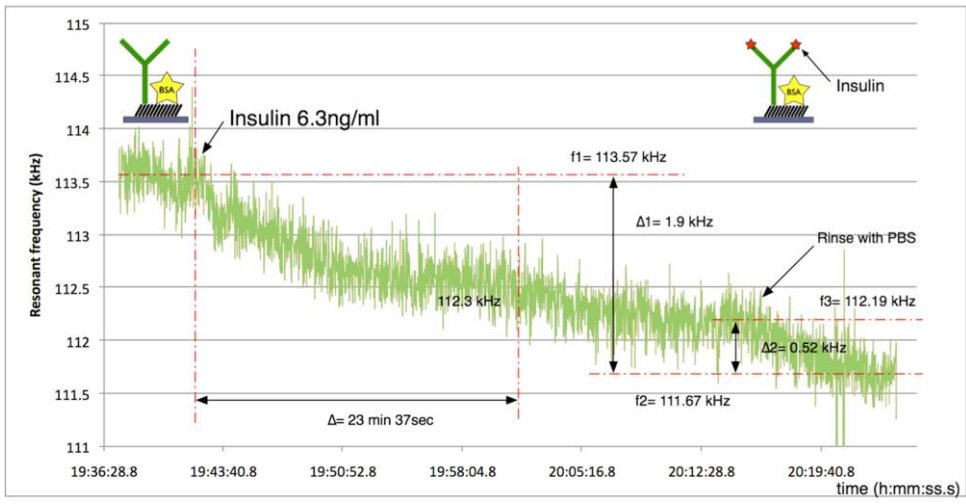
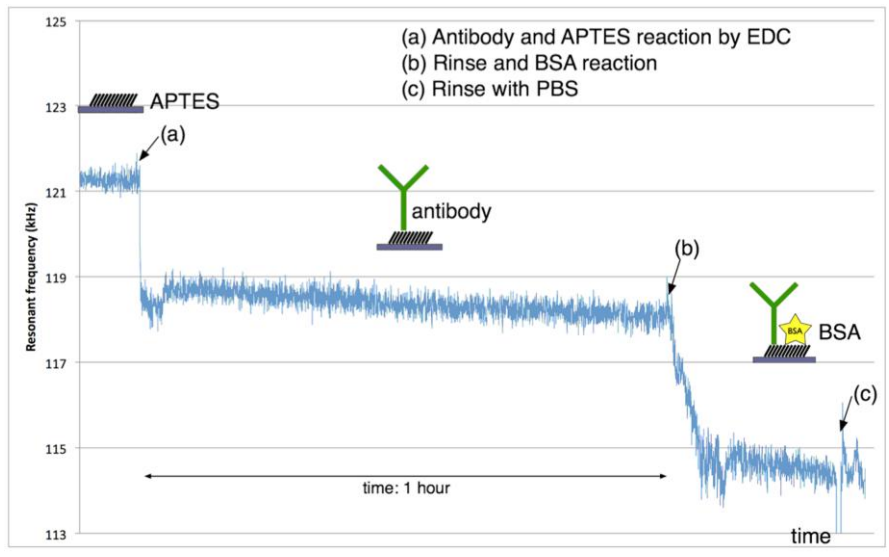


図 8 機能分子によるカンチレバー表面の修飾に伴う、共振周波数の時間変化

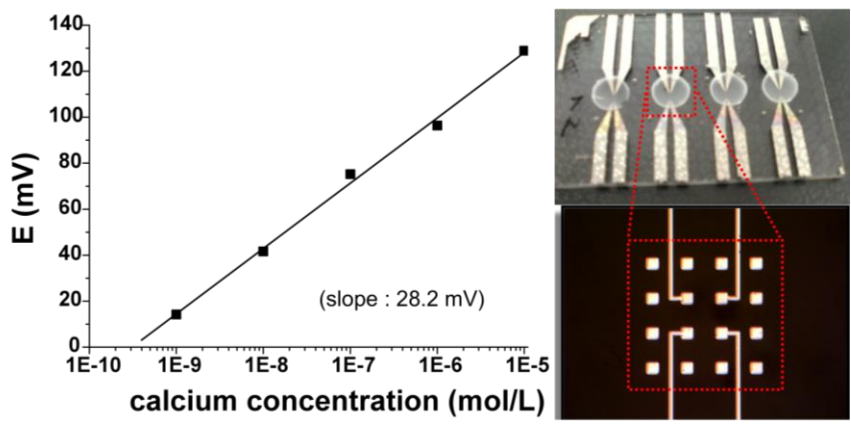


図 9 電極上のイオン選択膜の最適化による低濃度の Ca 溶液測定

### 3. 研究実施体制

#### (1)細胞配列・相互作用計測グループ

①研究分担グループ長:小寺 秀俊(京都大学、教授)

②研究項目

- 1) 細胞間相互作用解析のための集積化マイクロ化学分析システムの開発
- 2) 細胞内物質導入・細胞質移植を通じた分化・増殖の誘導と制御
- 3) 臓器組織の人為的構築

#### (2)再生・分化誘導グループ

①研究分担グループ長:藤田 博之(東京大学、教授)

②研究項目

- 1) 細胞内物質導入・細胞質移植のためのマイクロデバイスを用いた高効率細胞融合法の開発
- 2) MEMS 技術を用いた細胞刺激・細胞内物質注入・細胞局所刺激・細胞手術デバイスの開発
- 3) 細胞系の組立・カプセルングのための MEMS 技術の開発
- 4) 細胞応答計測のための MEMS デバイスを用いた分子計測法の開発
- 5) 膵β細胞のモニタリングのための MEMS センサの開発

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表 (原著論文)

1. Tada T.: Genetic modification-free reprogramming to induced pluripotent cells: fantasy or reality? *Cell Stem Cell* **3**, 121-122 (2008).
2. Otsuji T., Matsumura H., Suzuki T., Nakatsuji N., Tada T., and Tada M.: Rapid induction of large chromosomal deletions by a Cre/inverted loxP system in mouse ES Cell hybrids. *J Mol Biol* **378**, 328-336 (2008).
3. Miyazaki H., Kato K., Teramura Y., and Iwata H.: A collagen-binding mimetic of neural cell adhesion molecule. *Bioconjugate Chem.* **19**, 1119-1123 (2008).
4. Teramura Y., Kaneda Y., Totani T., and Iwata H.: Behavior of Synthetic Polymers Immobilized on Cell Membrane. *Biomaterials*, **29**, 1345-1355 (2008).
5. Teramura Y., Iwata H.: Islets surface modification prevents blood-mediated inflammatory responses. *Bioconjugate Chem.* **19**, 1389-1395 (2008).
6. Totani T., Teramura Y., and Iwata H.: Immobilization of urokinase to islet surface by amphiphilic poly (vinyl alcohol) carrying alkyl side chains. *Biomaterials*, **29**, 2878-2883 (2008).
7. Senez V., Lennon E., Ostrovidov S., Yamamoto T., Fujita F., Sakai Y., and Fujii,T.: Integrated 3-D Silicon Electrodes for Electrochemical Sensing in Microfluidic Environments: Application to Single-Cell Characterization, *IEE Sensors Journal*, **8(5&6)**, 548-557 (2008).
8. Miyano N., Inoue Y., Teramura Y., Fujii K., Iwata H., Kotera H.: Gene transfer device with submicron-needle produced by a self-organization phenomenon in Fe-alloy. *Lab on a Chip*, **8**, 1104-1109 (2008).
9. Fujita S, Ono D, Oshima M, Iwata H: Supercritical CO<sub>2</sub>-assisted embossing for studying cell behaviour on microtextured surfaces. *Biomaterials* **29(34)**: 4494-4500 (2008)
10. Fujita S, Morita Y, Iwata H: High-throughput evaluation of quiescent hematopoietic

- progenitor cells using a micro-multiwell plate . *Anal Bioanal Chem* **391(8)**: 2753-2758 (2008)
11. Nakaji-Hirabayashi T., Kato K., Iwata H.: Essential role of structural integrity and firm attachment of surface-anchored epidermal growth factor in adherent culture of neural stem cells. *Biomaterials* **29**, 4403-4408 (2008).
  12. Nakaji-Hirabayashi T., Kato K., Iwata H.: Self-assembling chimeric protein for the construction of biodegradable hydrogels capable of interaction with integrins expressed on neural stem/progenitor cells. *Biomacromolecules* **9**, 1411-1416 (2008).
  13. Nakaji-Hirabayashi T., Kato K., Arima Y., Iwata H.: Multifunctional chimeric proteins for the sequential regulation of neural stem cell differentiation. *Bioconjugate Chem.* **19**, 516-524 (2008).
  14. Fujimoto H., Kato K., Iwata H.: Use of microarrays in transfection of mammalian cells with dicer-digested small interfering RNAs. *Anal. Biochem.* **374**, 417-422 (2008).
  15. Koda S., Inoue Y., and Iwata H.: Gene transfection into adherent cells using electroporation on a dendrimer-modified gold electrode. *Langmuir*, **24(23)**, 13525–13531 (2008)
  16. Njatawidjaja E, Iwata H: Gene delivery to cells on a miniaturized multiwell plate for high-throughput gene function analysis. *Anal Bioanal Chem*, **392(3)**, 405-408 (2008)
  17. Komada M, Saito H, Kinboshi M, Miura T, Shiota K, Ishibashi M.: Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. **135**, 2717-27 (2008).
  18. Inoue Y, Fujimoto H, Ogino T, Iwata H: Site-specific Gene Transfer with High Efficiency onto a Carbon Nanotube-loaded Electrode. *J R Soc Interface*, **5(25)**: 909-918 (2008)
  19. Techaumnat B, Tsuda K, Kurosawa O, Murat G, Oana H, Washizu M.: High-yield electrofusion of biological cells based on field tailoring by microfabricated structures. *IET Nanobiotechnol*, **2(4)**93-99(2008).
  20. Washizu M. and Techaumnat B.: *Polarization and Membrane Voltage of Ellipsoidal Particle with a Constant Membrane Thickness – a Series Expansion Approach*, *IET Nanobiotechnology*, **2(3)**, 62–71 (2008)
  21. Le N. C. H., Yokokawa R, Dao D. V., Nguyen T. D., Wells J., Sugiyama S.: Versatile Microfluidic Total Internal Reflection (TIR)-based Devices: Application to Microbeads Velocity Measurement and Single Molecule Detection with Upright and Inverted Microscope. *Lab Chip*, **9**, 244-250 (2009).
  22. Miura T, Hartmann D, Kinboshi M, Komada M, Ishibashi M, Shiota K, The cyst-branch difference in developing chick lung results from a different morphogen diffusion coefficient, *Mech. Dev.*, in press.
  23. Fujimoto H., Kato K., Iwata H.: Prolonged durability of electroporation microarrays as a result of addition of saccharides to nucleic acids. *Anal. Bioanal. Chem.*, in press.
  24. Fujimoto H., Kato K., Iwata H.: Electroporation microarray for parallel transfer of small interfering RNA into mammalian cells. *Anal. Bioanal. Chem.*, in press.
  25. Fujita S, Toguchida J, Morita Y, Iwata H: Clonal analysis of hematopoiesis-supporting activity of human mesenchymal stem cells in association with Jagged1 expression and osteogenic potential. *Cell Transplant* : in press
  26. Miyazaki H., Maki T., Kato K., Iwata H.: Surface-displayed antibodies as a tool for simultaneously controlling the arrangement and morphology of multiple cell types with microscale precision. *ACS Applied Mater Interfaces*, in press.
  27. Agudelo C.A., Teramura Y., Iwata H.: Feasibility of cryopreserved agarose-encapsulated islets as a bioartificial pancreas. *Transplantation* in press.
  28. Morimoto Y., Tan W. H., Takeuchi S.: Three-dimensional axisymmetric flow-focusing device using stereolithography. *Biomed. Microdev.*, in press.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)