

「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

京都大学大学院工学研究科・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 α 細胞・ β 細胞・ δ 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方法の構築を行う。後半の 3 年では、前期 3 年の成果を元に、細胞間の相互作用および細胞の融合による初期化を行い、さらに細胞の分化・増殖へのバイオナノハイブリッドプラットフォームの利用を試みる、さらに細胞から組織の再構築を目指す。

平成 21 年度は、平成 18-20 年度に開発したデバイスによって可能となった個々の細胞の計測法を基に、デバイス開発と細胞実験の各担当者が密接に連携しながら、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)を用いて研究を推進し、細胞間相互作用の計測、細胞内応答計測、MEMS センサによる細胞活動の測定を行った。また、これまでに開発した物質導入・細胞融合用デバイスを用いて、細胞分化・増殖・初期化の人為的制御、特に、ES 細胞を用いた細胞融合による細胞初期化の試行を推進した。さらに、膵 β 細胞をインシュリン産生能がある状態でカプセル化することに成功し、マウスの腎皮膜下に導入する実験に着手した。

今後、これらの技術の有効性の検証と改善を行いながら、マイクロデバイスの細胞機能計測・再生医療における有効性を実証していく。

§ 2. 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」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) 細胞系の組立・カプセルングのための MEMS 技術の開発
- 3) 膵β細胞のモニタリングのための MEMS センサの開発

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

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細胞内で生じ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。

実際に細胞間相互作用・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・再生医科学研究所の興津・三浦・

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 α 細胞・ β 細胞・ δ 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、前期3年の成果を元に、細胞間の相互作用および細胞の融合による初期化を行い、さらに細胞の分化・増殖へのバイオナノハイブリッドプラットフォームの利用を試みる、さらに細胞から組織の再構築を目指す。

平成21年度は単一細胞・複数細胞・組織レベルの実験を継続して行い、平成20年度までに開発したデバイスの改良を進めるとともに、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。

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(小此木・寺尾・横川・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・鷺津・岩田・多田・小寺)

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が計測できるデバイスの開発を行い、細胞間相互作用を解析することを目標とした。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・細胞を吸引・固定し、マイクロ流体回路を用いて1つの細胞を刺激し、細胞からの拡散・細胞を固定した流路における流れ場による液性細胞間相互作用、および隣接している細胞間での接触性相互作用を計測するためのデバイス開発および計測をおこなった。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21年度は、平成20年度に開発した集積化デバイスを使用して、液性または接触性細胞間コミュニケーションの観察を行なった。その結果、微小流路内の培養液が培養皿のように静止した状態だと膵 β 細胞(MIN6-m9)周囲の養分が速やかに枯渇し8時間程度で細胞死が起り、生理活性を維持することが困難であることがわかった。細胞間コミュニケーションの観察において細胞が正常に成育し生理活性を維持していることが重要である。そこで微速(流速 500nl/min)で吐水できる

ペリスタリックポンプを作成し流路内の溶液を循環させたところ微小流路内で MIN6-m9 細胞を正常に成育し生理活性を維持させることができた。

以上の方法で細胞を吸引固定後培養した後に、細胞にグルコース刺激与え、細胞から放出されるインスリンにより、またはギャップジャンクションを介して、刺激を受けていない他の細胞が反応するかを計測した。反応の計測には、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を指標にして蛍光顕微鏡観察を行った。その結果が図 A-1である。刺激を与えた細胞(No. 1)と周囲の細胞での細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の観察を行ったところ、刺激を与えた細胞と直接接触している、あるいは他の細胞を介して間接的に接触している細胞においてのみ細胞の Ca^{2+} 応答がみられた。これは、ここで観察された相互作用が接触性であることを意味している。

今年度末までに、このデバイスを用いて、接触性および液性の細胞間コミュニケーションの計測を行い、平成 22 年には刺激を与えた細胞の周囲の細胞で見られる応答反応がどのような細胞機構によって行なわれているのかの解明を試みる。また、東大藤田 G が開発しているセンシングシステムにより、応答反応を示す細胞周囲で生じている物質の濃度変化のリアルタイム計測を行う。

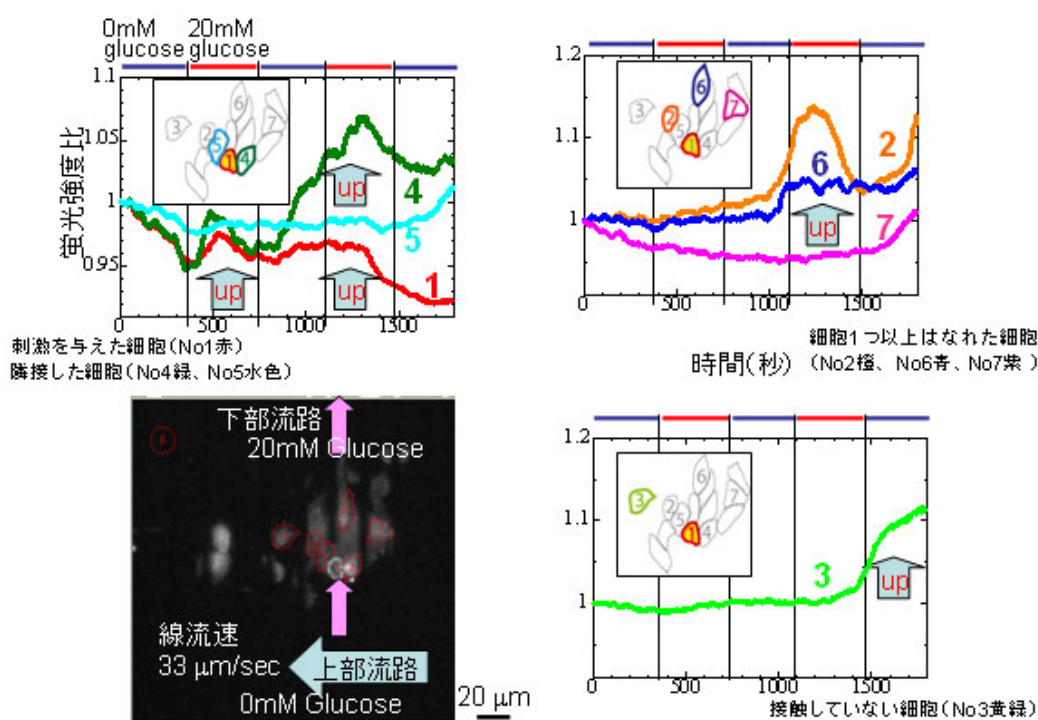


図 A-1 刺激を与えた細胞(No.1)と周囲の細胞での細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の観察

1,2-2)細胞内刺激応答解析

生体内の膵島細胞には極性があり、動脈側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を受け、静脈側血管にインスリン等の分泌を行うとされている。しかしながら、細胞の一部に刺激を受けたとき、細胞がどのように応答するかを単一細胞レベルで解析する技術は未だ確立されていない。本研究では、このような、単一細胞上での局所刺激に対する細胞内応答を高

空間分解能で解析するためのデバイスの開発を行った。デバイスは、図 A-2 に示すように、細胞を水平方向に吸引固定しておき、マイクロ流路から細胞側面に局所的にグルコース刺激を細胞に与え、細胞内の応答を高倍率対物レンズで観察するものである。

平成 21 年度は、平成 20 年度に開発した局所刺激デバイスを実際の実験に用いる細胞に対応して漸次改良しながら、膵・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^{2+} 濃度上昇, 分泌顆粒動態変化)の蛍光実時間観察を行った。図 A-3 は、細胞の蛍光グルコースの取り込み過程を可視化したもので、オリフィスに吸引固定された細胞膜から受動的に取り込まれたグルコースが細胞内に単純拡散により広がっていく様子がとらえられた。また、図 A-4 は細胞膜の一部分をグルコース刺激した時の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の計測結果である。

来年度以降、さらに局所刺激に対する細胞内応答の計測を行い、細胞の極性の形成機構の解析や、膵島組立にかかわる極性の人為的生成などについて研究を進める。

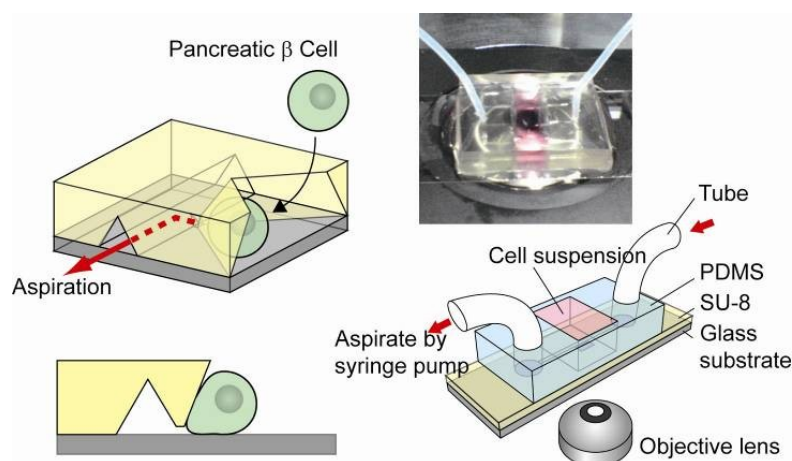


図 A-2 局所刺激応答計測デバイスとその原理

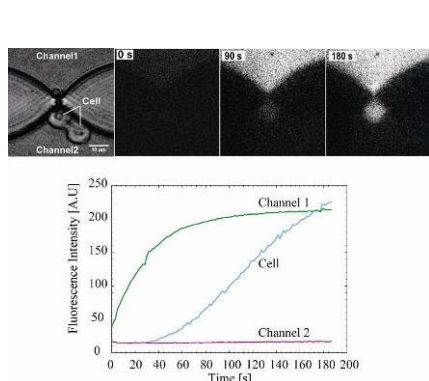


図 A-3 細胞内への蛍光グルコースの取り込みの可視化

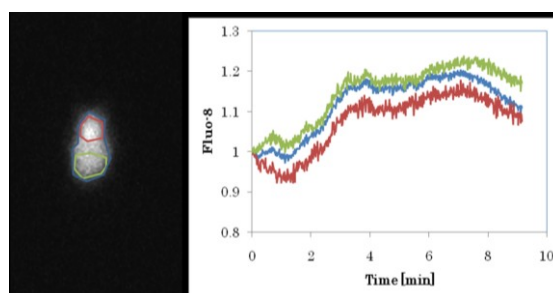


図 A-4 局所グルコース刺激に対する細胞内 Ca^{2+} の応答分布の計測

3)臓器組織の人為的構築(三浦・鈴木・小寺)

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。その基礎技術として、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 21 年度は、前年から引き続き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、オリフィスへのビーズ固定効率評価、走化性因子(VEGF: vascular endothelial growth factor)ゲルビーズによる管状内皮細胞ネットワークのオリフィスへの誘導効率評価を行った。図 A-5 および図 A-6 の誘導効率評価結果より、走化性因子の効果の検証と誘導因子を含むビーズを固定することで設計した構造に内皮細胞ネットワークを集めることが可能であることが分かった。来年度以降、実験回数を増やすと共に、内皮細胞のネットワーク構築の効率を向上し、ネットワーク流路としての機能評価を試みる。

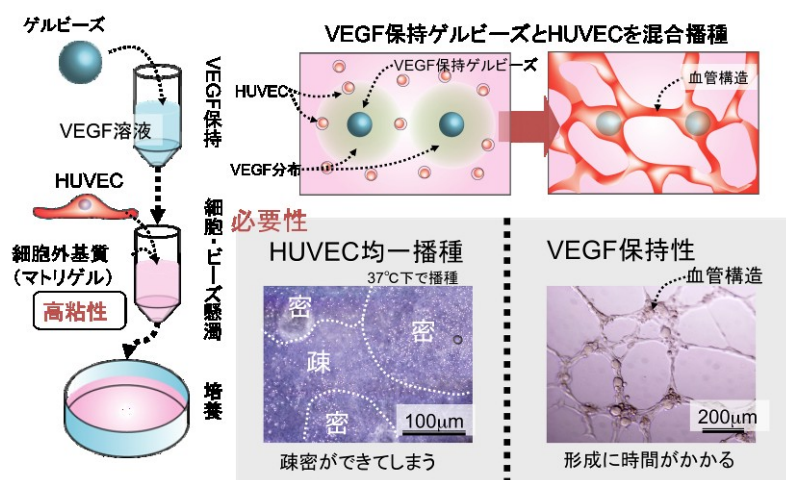


図 A-5 VEGF 保持ゲルビーズによる血管構造の誘導形成

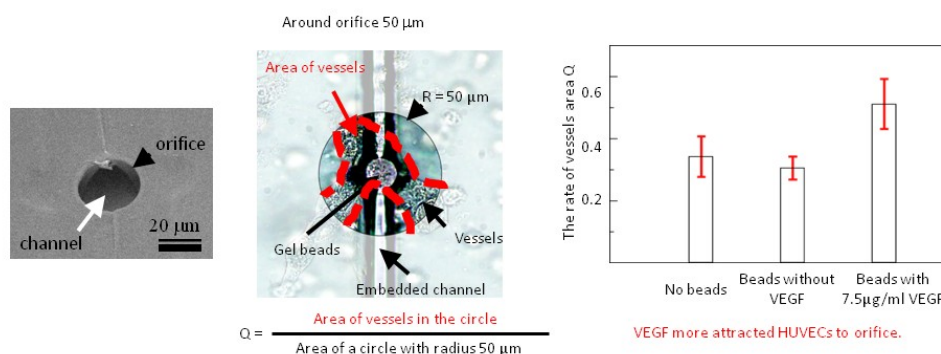


図 A-6 オリフィス付近への内皮細胞ネットワークの誘導効率の評価

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、すなわちその場エレクトロ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・ムラトが、MEMS 技術による細胞操作は東京大学の藤田・竹内、静岡大学の橋口が、分子計測は東京大学の藤田が主体となり、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・横川)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、臍島細胞の分化・増殖の制御を行い、さらに臍島の再構築を目指す。

平成21年度においては、平成20年度までに開発した技術・手法を実際の細胞を用いて研究を推進した。そこで、a)細胞内物質導入法・細胞融合法を用いた細胞分化・増殖・初期化に関する基礎研究の推進、特に、ES細胞を用いた細胞融合による細胞初期化の試行、b)微小カプセルを用いた臍島細胞のカプセル化と生体への応用、c)電気化学 MEMS センサを用いた臍島細胞カルシウム活動の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。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(鷲津・小穴・ムラト・木村)

細胞融合により一方の細胞の持つ分化・増殖にかかわる因子を他方の細胞に導入し、細胞の分化・増殖を人為的に制御するための方法として、マイクロオリフィスを用いた電気細胞融合法を提案・開発してきた。これを実現するためには、たとえば融合細胞の生存性の細胞周期依存性など、融合後の細胞の挙動を明らかにする必要がある、このような観察のためにも、またその実用化のためにも、大量の融合を高収率で行う手法と装置が必要になる。

平成 21 年度においては、まず、融合の高収率化のための新しい電圧波形を考案した。マイクロオリフィスを用いた細胞融合では、高周波電圧による誘電泳動を用いてオリフィスを挟んで細胞対を形成させ、次にパルス電圧を印加して膜電圧を発生させ、膜の可逆的破壊を起こして細胞対を融合させる。しかしながら、膜電圧を発生させるようなパルスは比較的周期が長い(すなわち等価的に周波数が低い)ため、細胞は負の誘電泳動を起こし、せっかく形成された細胞対を分離させてしまう。これに対し、図 B-1 にあるような高周波電圧とパルス電圧の重畳を融合用の電圧波形として用いれば、正の誘電泳動により細胞対を形成したまま膜の可逆的破壊を起こし細胞融合を起こすことができ、ひいては高い融合収率が得られることを、本年度の研究において理論的・実験的に示した。融合の並列化については、融合後の経時観察のための1次元オリフィスアレイとして、100 個あまりのオリフィスを持つ図 B-2 の PDMS 製のチップを開発し、このチップを電極を持つ基板の上に密着させることによりチャンバーを形成して細胞融合を行い(図 B-3 a)、融合した細胞がオリフィスに拘束されることを利用して融合細胞をつり上げ(図 B-3 b)、インキュベータに入れて最適な培養条件で経時観察する(図 B-3 c)方法を開発した¹²⁾。この方法により、融合細胞の挙動を3日間以上にわたり観察することが可能になった。また、より大量の細胞融合を行うための2次元オリフィスアレイに関しては、細胞対が容易に接触できるような厚さ 2-3 μm の薄膜オリフィスアレイシート(図 B-4)を、SU-8 等のフォトレジストを用いて基板上に一括製作し、犠牲層および保持枠を用いて基板から剥離回収する方法を開発した。

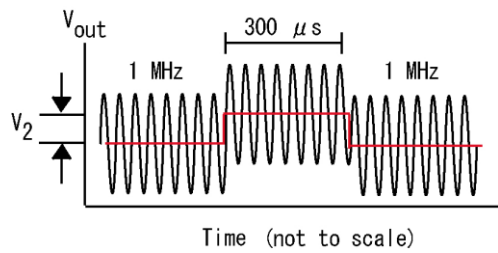


図 B-1 新考案の融合用電圧波形

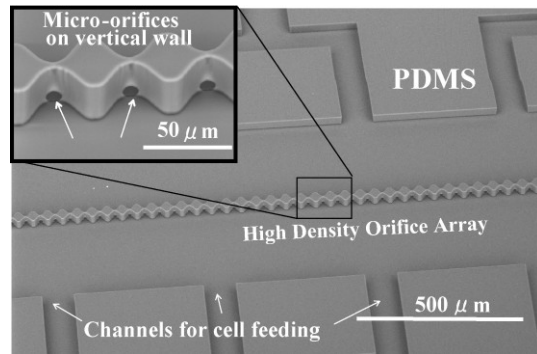


図 B-2 1次元オリフィスアレイ

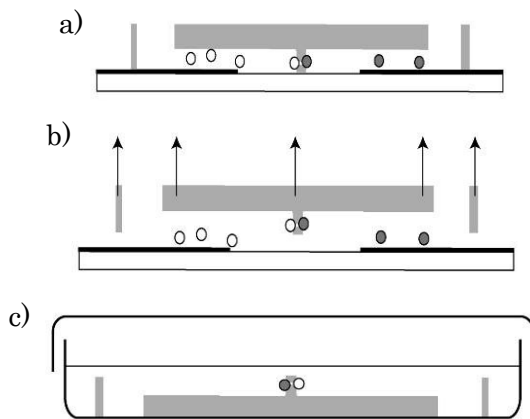


図 B-3 1次元オリフィスアレイによる融合後の細胞の挙動の経時観察

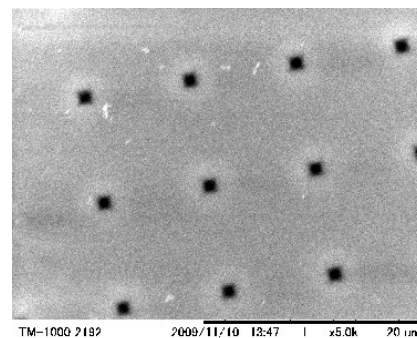


図 B-4 リソグラフィーにより作製された2次元オリフィスアレイのSEM像

SU-8、膜厚 3 μm、1 μm 角、10 μm ピッチ

以上のデバイス・融合パルスを用い、融合細胞の挙動の観察を行った。細胞の初期化に関しては、京都大学多田研究室と共同でES細胞と繊維芽細胞(MEFs)融合後の過程の実時間観察を行った。融合細胞は、図 B-5 に示すように、変形してオリフィスをすり抜け、差し渡し 100 μm 以上の範囲に広く付着し、繊維芽細胞の初期化に必要な 48 時間以上にわたって生存した。今後、Oct4 遺伝子の発現による初期化について観察を行っていく予定である。

また、繊維芽細胞 L929 同士の融合の実験では、a) オリフィス径が 3 μm 以下の場合には、融合細胞の核がオリフィスを通り抜けず、再分離する(図 B-6)か、または両者が分裂すること、分裂は同時に生ずることが多いこと(細胞周期の同期化)、b) オリフィス径が 3 μm 以上の場合には、融合細胞は変形してオリフィスをすり抜け分裂増殖するが、3 分裂(図 B-7)がしばしば観察されること、3 分裂した細胞の 1 つが再び 3 分裂することがあること、などが判明した。これらの現象は、細胞生物学的に興味深いのみならず、融合細胞の分裂の際の染色体の混合・分配の生じ方の解明を通じ、細胞融合を用いた細胞の分化・増殖制御に新しい手法をもたらす可能性があるものと期待される。

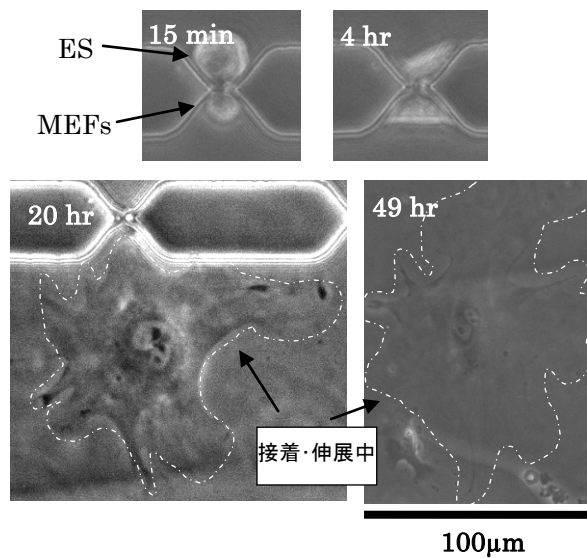


図 B-5 ES 細胞と繊維芽細胞の融合後の過程の実時間観察



図 B-7 融合細胞の3分裂

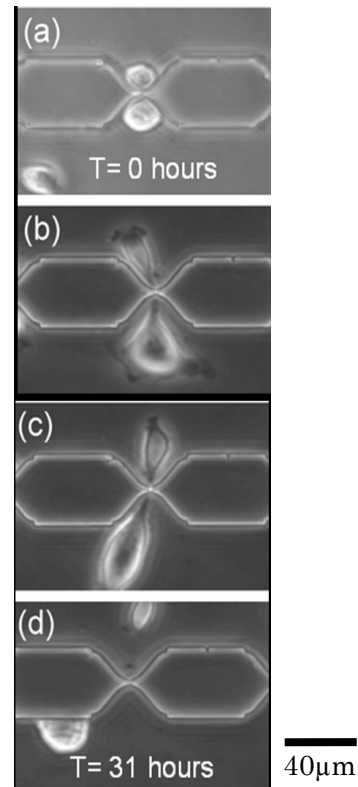


図 B-6 2 μ m 径オリフィスでの融合細胞の再分離

2) 細胞系の組立・カプセルングのための MEMS 技術の開発(竹内)

臓器組織の人為的構築において、生体から分離された細胞、あるいは人為的に分化・増殖された細胞を、最適な配置で組立て、組織を人為的に構築するため、マイクロデバイスを利用した細胞の三次元組立・培養法の開発を行った。細胞の正確かつ生産性の高い配置法、およびカプセルング技術の開発を確立するため、本年度は、これまでに開発した 3 次元マイクロ流路によって、アルギン酸内に MIN6 を内包し PLL コートを施したマイクロカプセルを作成した(図 B-8)6)。さらに、カプセル化した状態で、インシュリンの産生能があることをグルコース付加実験から確認した。また、マウスの腎皮膜下に導入する実験に着手した。

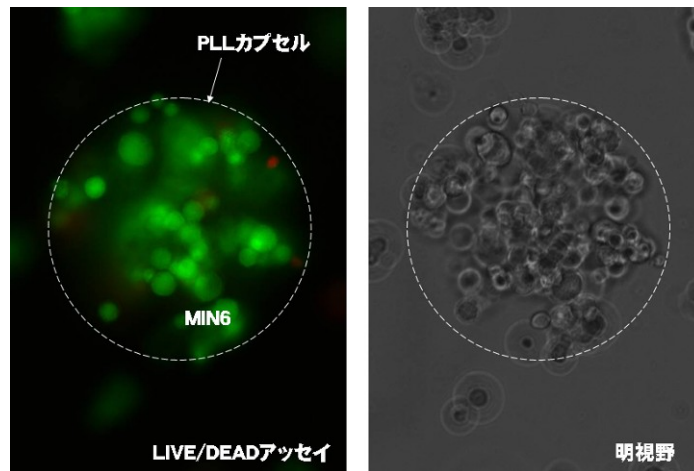


図 B-8 PLL カプセルに内包した MIN6 細胞

3) 膵 β 細胞のモニタリングのための MEMS センサの開発 (藤田・橋口)

平成 21 年の研究は電気化学センサに集中し、カルシウムイオンおよび亜鉛イオンセンサの高感度化や実験システムの安定化、マイクロ流路内での細胞培養環境の確立, などを行ってきた。カルシウムイオン選択性センサは $10^{-7}M$ までの感度を達成できた。亜鉛イオンの場合は様々の膜の成分を試している。

実際の細胞実験への適応性を見るために予備実験として、図 B-9 の電気化学 Ca^{2+} センサデバイス上 (マイクロ流路内) で肝細胞を培養し、 $KCl(20mM)$ で刺激した時のイオンポテンシャルの応答を測定した。その結果、刺激の数分後にカルシウムイオン濃度が振動しながら上昇した応答が計測された (図 B-10、上)。これは、細胞から分泌したカルシウムイオンの積分値だと考えられ、データを微分し、実際のカルシウムイオン濃度値を予測した (図 B-10、下)。

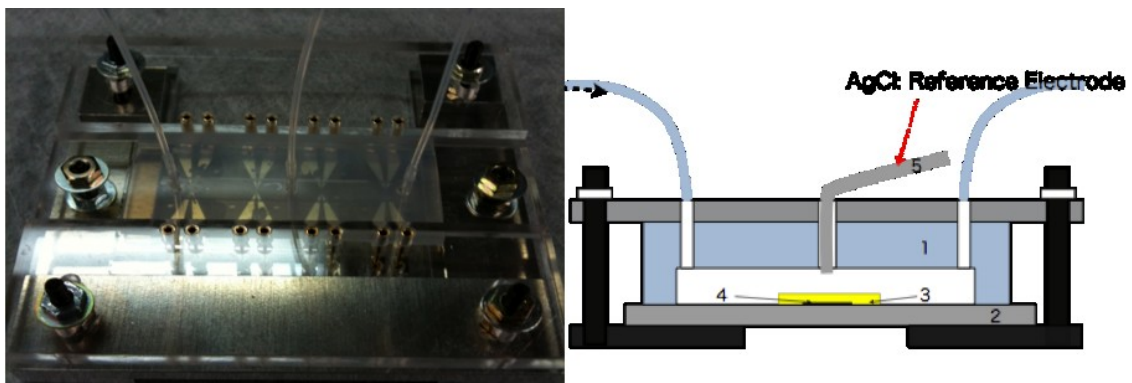


図 B-9 電気化学 Ca^{2+} センサデバイス、写真 (左)、断面図 (右)

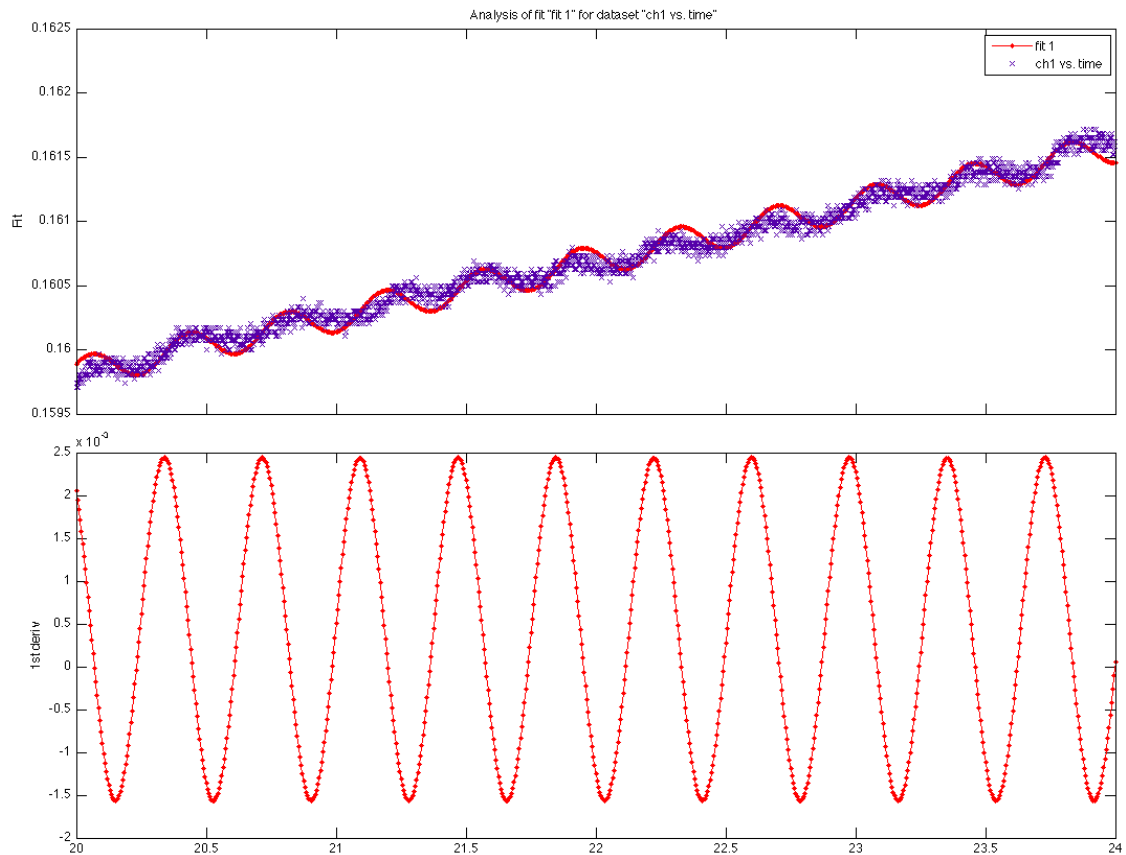


図 B-10 細胞膜外のイオンポテンシャルの応答(上、青線)、データフィッティング(上、赤線)、フィッティングカーブの微分値(下)

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. T. Miura, C. A. Perlyn, M. Kinboshi, N. Ogihara, M. Kobayashi-Miura, G. M. Morriss-Kay, and K. Shiota: "Mechanism of skull suture maintenance and interdigitation", *J Anat* 215(6), 642-655(2009). DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01148.x.
2. S. Yamaguchi., K. Kurimoto, Y. Yabuta, H. Sasaki, N. Nakatsuji, M. Saitou, and T. Tada: "Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells". *Development* 136, 4011-4020(2009). DOI:10.1242/dev.041160.
3. S. Nagata, M. Toyoda, S. Yamaguchi, K. Hirano, H. Makino, K. Nishino, Y. Miyagawa, H. Okita, N. Kiyokawa, M. Nakagawa, S. Yamanaka, H. Akutsu, A. Umezawa and T. Tada: "Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells". *Genes Cells* 14, 1395-1404(2009). DOI: 10.1111/j.1365-2443.2009.01356.x.
4. M. Hung, O. Kurosawa, H. Kabata and M. Washizu: "Stretching DNA Fibers out of a Chromosome in Solution Using Electro-osmotic Flow", *Journal of the Chinese Society of Mechanical Engineers*, Vol.30, No.4, pp.289-295 (2009).

5. H. Oana, A. Kishimura, K. Yonehara, Y. Yamasaki, M. Washizu, and K. Kataoka: "Spontaneous Formation of Giant Unilamellar Vesicles from Microdropletsof Polyion Complex via Thermally Induced Phase Separation", *Angewandte Chemie*, , Vol.48, p.4613-4616 (2009), selected as "hot paper". DOI: 10.1002/anie.200900721.
6. Y. Morimoto, W. H. Tan, and S. Takeuchi: "Monodisperse semi-permeable microcapsules for continuous observation of cells", *Lab on a Chip*, vol. 9, pp. 2217 - 2223, 2009. DOI: 10.1039/b900035f.
7. Y. Morimoto, W. H. Tan, and S. Takeuchi: "Three-Dimensional Axisymmetric Flow-Focusing Device using Stereolithography", *Biomedical Microdevices*, vol. 11, no. 2, pp. 369-377, 2009. DOI: 10.1007/s10544-008-9243-y.
8. N. Kobayashi, T. Yuasa and T. Okitsu: "Regenerative medicine for diabetes mellitus.", *Cell Transplant*; 18(5):491-6. 2009.
9. H. Noguchi, M. Ueda, S. Hayashi, N. Kobayashi, T. Okitsu, Y. Iwanaga, H. Nagata, X. Liu, H. Kamiya, MF. Levy and S. Matsumoto: "Comparison of trypsin inhibitors in preservation solution for islet isolation.", *Cell Transplant* ; 18(5):541-7. 2009.
10. E. Sato, I. Yano, M. Shimomura, S. Masuda, T. Katsura, S. Matsumoto, T. Okitsu, Y. Iwanaga, S. Uemoto and K. Inui: "Larger dosage required for everolimus than sirolimus to maintain same blood concentration in two pancreatic islet transplant patients with tacrolimus.", *Drug Metab Pharmacokinet*; 24(2):175-9. 2009. DOI: 10.2133/dmpk.24.175.
11. T. Yuasa, JD. Rivas-Carrillo, N. Navarro-Alvarez, A. Soto-Gutierrez, Y. Kubota, Y. Tabata, T. Okitsu, H. Noguchi, S. Matsumoto, S. Nakaji, N. Tanaka and N. Kobayashi: "Neovascularization induced around an artificial device implanted in the abdomen by the use of gelatinized fibroblast growth factor 2.", *Cell Transplant*;18(5):683-8. 2009.
12. M. Gel, S. Suzuki, Y. Kimura, O. Kurosawa, B. Tchaumnat, H. Oana, M. Washizu: "Microorifice-Based High-Yield Cell Fusion on Microfluidic Chip: Electrofusion of Selected Pairs and Fusant Viability", *IEEE Trans. Nanobioscience*, Vol.8, No.6, p.300-305 (2009). DOI: 10.1109/TNB.2009.2035252

(4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数(国内 0件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2件)