

「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

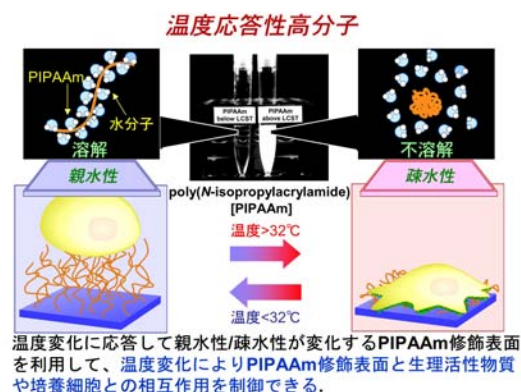
2.1. 女子医大グループ

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



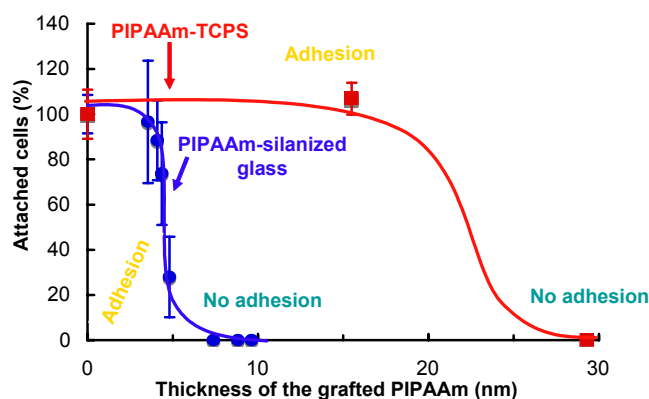
エキシマーレーザーによるレーザーアブレーションなどの表面微細加工技術をバイオ用途に最適化した手法を確立する。これらを駆使して、細胞膜表面に発現する受容体、細胞外マトリックス、細胞接着分子等と特異的に作用する新規材料の創出を目指す。

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(2004 年度のインパクトファクター**38.570**)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。

前年度までは、ポリスチレン培養皿表面に平滑なナノメートルレベルの超薄膜層をグラフトする技術を開発してきた。17 年度からは、細胞－基材間の相互作用を評価する手法を確立するために、全反射照明蛍光顕微鏡で観察可能な温度応答性表面の作製を検討し、その表面特性を明らかにするとともに、これまでのポリスチレン製温度応答性培養皿との違い



について比較した。前年度まで取り組んできた電子線重合法を利用して、ポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）(PIPAAm)をシラン化ガラス表面に均一に、かつ仕込みモノマー条件を変化させることで膜厚 4~10 nm の範囲で精度よくグラフトすることができた。さらに、約 5 nm 以上の PIPAAm 膜厚でのグラフト表面は細胞非接着性となることを見出した。ポリスチレン製温度応答性培養皿の場合、表面上の PIPAAm グラフト層が 20 nm 程度の厚みであったとき、温度変化に応答した細胞接着／脱着を示す。一方、約 30 nm 以上の厚みでは、細胞非接着表面となってしまう。これは、20 nm 程度の厚さではポリスチレン製培養

皿の疎水性界面近傍でグラフトした PIPAAm 鎖の脱水和が促進され、この効果が PIPAAm 最表面にも伝達され細胞接着可能な疎水性表面となるためと考えられる。シラン化ガラス表面とポリスチレン表面はどちらも疎水性を示すことから、シラン化ガラス表面にグラフトされた PIPAAm は、ポリスチレン製培養皿表面上よりも高密度で、かつ水中において分子鎖が水和した膨潤層を形成しやすいものと示唆される。今後は、両者の特性の違いを解明していくとともに、全反射照明蛍光顕微鏡による細胞－温度応答性表面間の細胞外マトリックスや細胞骨格、細胞膜タンパク質などの観察を進めていく。

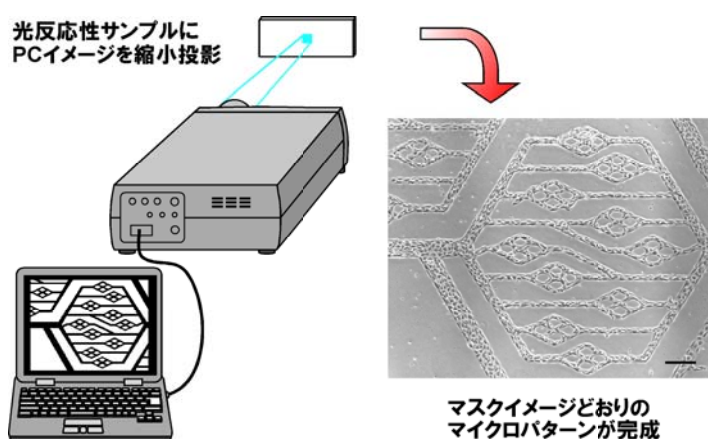
細胞ナノドメイン操作材料としては、代表的な細胞ナノドメインである細胞接着基質との接着構造（接着斑やデスモソームなど）を人工的に操作することを目的として、細胞接着分子由来の細胞接着性ペプチドを温度応答性高分子鎖に分子配向や分子間距離を制御しながら固定化する技術を開発した。これを用いて異種感染の危険性を払拭できない、牛胎児血清等の動物由来製品を一切含むことなく、再生医療に供しうる細胞シートを作製することに成功した。

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によっ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自在に種々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、個々の要素技術の一つの基板（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、シリコー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。

2.2. 九工大グループ

1) 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

昨年度までに、

- ① センサ応用を企図した独自の分子設計、すなわちナノキャビティ自己集積構造によるリン酸エステル脱リン酸化（加水分解）活性を有する人工酵素膜の合成に成功した。
- ② 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（J S Tにより特許出願済み）。
- ③ 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し、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。

17 年度においては、

- ① 人工酵素膜の触媒活性についての動力的解析を行い、人工酵素としては非常に高い触媒活性を有し、かつミカエリスメンテン型触媒活性であることが明らかとなった。
- ② 人工酵素膜のマトリックス構造を強固にし、センサ特性を更に安定させることを検討した。そして高分子による支持構造を加え、更に膜化プロセスを工夫することで、膜毎のセンサ応答誤差が 3 % 以内にできることが示された。
- ③ 現在まで電極をトランスデューサとするセンサ機構を構成して評価していたものに加え、半導体をトランスデューサとして高機能化を図った系を構築した(理化学研究所 尾笹一成先生とチーム内連携研究開発、評価中)。

2) 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

昨年度までに、

- 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、また中枢系薬剤開発の分子ターゲットとしても主座を占めることが見込まれるグルタミン酸リガンドチャネルゲートレセプター (iGluR) を培養と取り扱いが容易な浮遊性異種細胞で発現、細胞表層提示させた「シナプスモデル細胞」の構築に成功した。
- ② イオントロピック活性(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こる興奮発火現象)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研究開発)した。

このそれぞれについて、17 年度に更に研究を推進し、

- ① シナプスモデル細胞機能の評価を、イオントロピック活性をもとに解析を行った。Na⁺キレート蛍光プローブを細胞内に取り込ませ、その蛍光強度(および局在)を蛍光顕微鏡による時間分解観察を行い、イオン流入を評価した。詳細な速度論解析は完了していないが、現在得られている結果により、シナプスモデル細胞はリガンドゲート機能を保持し、機能していることが示された。
- ② ナトリウムイオノフォアをゲート部に塗布することでナトリウムイオン選択性半導体電極の開発を行なった。これにより選択的にナトリウムイオン応答を検出でき、また 10⁻⁶M の濃度の検出感度で検出できることがわかった。これよりモデル細胞が 10 個ほどセンサ上にあれば、イオントロピック活性の評価できることが示された。

2.3. 理研グループ

1) 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

HEMT 構造を細胞培養溶液中で安定して用いるためのゲート表面の修飾を検討し、ブトキシドチタニウム溶液のスピンコーティングによる TiO₂ 膜が有効であることを見出した。

また実際に HEMT 構造をフォトリソグラフィによってパターン化してゲート領域を限定し、その上で細胞を培養しながら電流を長時間モニターする実験に取り組んだ。これと並行して、有機半導体膜をゲート膜とする際の特性や半導体ナノ粒子の発光特性が時間的に変化していく現象を追求した。有機半導体膜の表面電位のパターン化や、ナノ粒子の表面修飾分子の脱離と酸化が発光の減少とブルーシフトについての知見が得られた。

研究実施内容

HEMT 構造を利用した FET 素子においてゲートに保護膜をつけずに電解質中で特性を測定すると、光励起で生じる電子正孔対による表面反応が起こると期待され、それを利用した新しい原理のセンサーが構築できる可能性がある。昨年度はそれを実証するべく電解質中での HEMT 構造の安定性を調べていたが、光励起酸化によって構造が劣化してしまうことが大きな問題であった。今年度は光照射化でも安定した測定を達成するために、ゲート表面に光励起性能を有すると考えられる膜をつける試みを行った。膜の候補として有機半導体膜、導電性高分子(ポリピロール)、GaAs 酸化膜、アモルファス TiO_2 膜を選定し、その効果を実験によって検証した結果、 TiO_2 膜で良好な特性が得られた。この TiO_2 膜は特に細胞に対して毒性を有せず、その表面で細胞培養が可能ながことが分かった。

FET の表面で細胞を培養しながら信号検出を行う場合、ゲート表面部分の様子を一定時間おきに顕微鏡で観察しながら信号モニターを行うことが望ましい。そこで、顕微鏡下で観察しながら細胞が培養できる装置を構築した。その上で、 TiO_2 膜をゲート保護に用いた FET 構造をフォトリソグラフィによって作製し、ゲート領域を限定した上で細胞を培養しながら電流の長時間計測を行う実験を行った。この FET は光に対して応答性を有するため、表面観察時の光照射によって電流の増加が見られるが、長時間にわたって比較的安定したドレインソース電流が測定できている(図 1)。

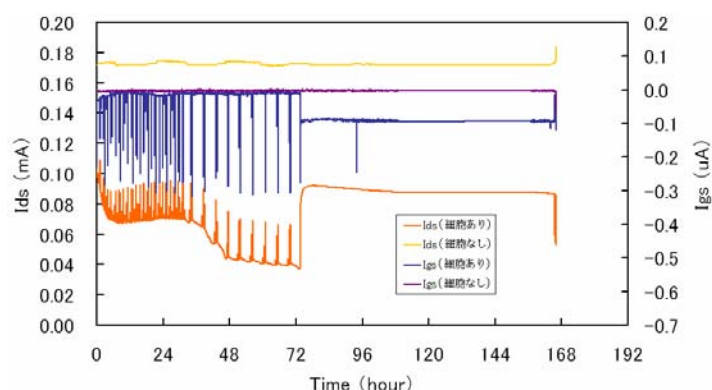


図 1. 細胞/ TiO_2 膜をゲートとした FET 構造の長時間測定。「細胞あり」の場合に見られているスパイクは顕微鏡観察の光の断続による。72 時間以降は光を照射しつづけているため一定となっている。

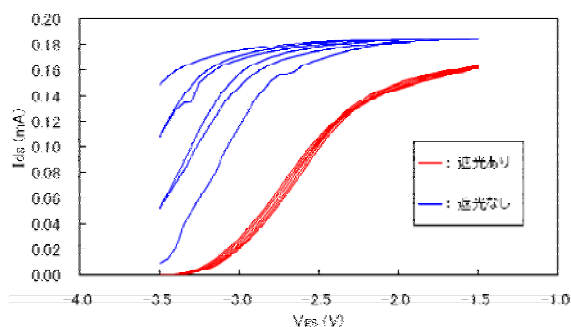


図 2. TiO_2 膜をゲートに用いた場合の I_{ds} - V_{gs} 特性 (光照射と遮光の場合)。

ゲート膜に TiO_2 を用いると、光に対して過渡的な反応が強く出ることもわかった。光のない場合には、 $I_{ds}-V_{gs}$ 特性はヒステリシスとドリフトの少ない特性を示すが、光が当たっていると大きなドリフトを示した(図2)。この原因としては光励起によって生成した正孔が TiO_2 膜と HEMT 表面との界面に蓄積されるためと推定される。その効果の検証やセンサー特性への影響は今後の課題として調べていく必要がある。また、細胞からの信号検出を行うために必要となると思われる酵素膜の作製とその効果の測定について、九工大グループと市販 ISFET を利用した共同研究を進めている。

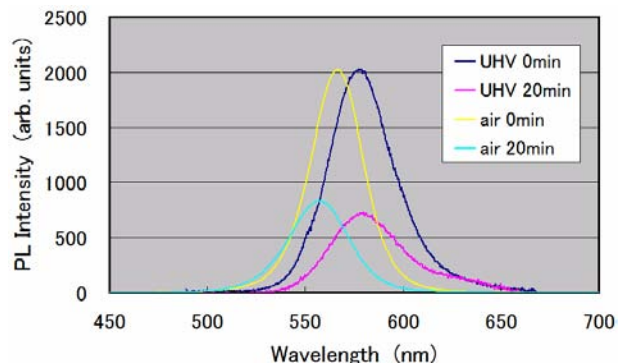


図3. CdSe ナノ粒子の発光スペクトルの時間変化 (大気中と高真空中)。

有機半導体膜をゲート膜とする試みでは、Alq3 膜を対象とした。Alq3 膜は遮光下の真空蒸着形成によって 10V を超える表面電位を示す。その表面に光をパターン照射すると表面電位のパターンが形成可能なが分かった(図3)。この膜をゲートに用いることにより、特性を光によって制御できる FET が実現できる可能性がある。しかし電解質中で用いると、HEMT 表面を保護する機能がなく今回の細胞向けのセンサーとしては不適と判断している。

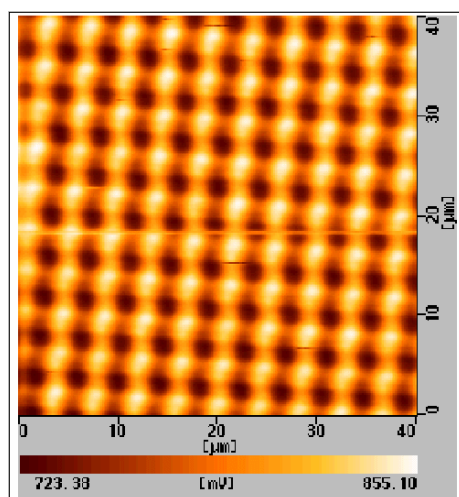


図4. Alq3 の表面電位の光パターン照射によるパターンニング。

また、半導体ナノ粒子の発光特性によって細胞からの分子の検出を行う方向での実験を進め、単一ナノ粒子の発光特性が示す時間変化の原因を探った。発光効率の時間低下はナノ粒子表面の修飾分子が脱離するためであり、発光のブルーシフトはナノ粒子の酸化によるためであることが、高真空中での発光特性変化の追跡によって示された(図4)。このような変化は溶液中でも形を変えて起こるものと推定され、細胞近辺にナノ粒子

を配置した上でその発光特性の時間変化を測定することで、細胞の放出する分子を検出できる可能性がある。そのためには、電解質界面での発光特性の測定と周辺分子の特性への影響を調べることが重要である。

今後の研究計画

バイオ分子を効率的に検出できるゲート機能性膜を選定し、それをゲート部分に用いたセンサーデバイスを試作する。それを用いて細胞の活動を実際に計測する実験を行う。 TiO_2 膜の光応答性と HEMT 素子の特性の関連を調べ、新しい検出素子原理の達成を目指す。CdSe ナノ粒子を半導体基板上に配置し、それに電解質中で電界や周辺分子の変化といった刺激をあたえ、発光特

性にどのような影響がでるかを見極める。その機能をバイオセンサーに利用するための条件を明らかにしていく。

2.4. 物材機構グループ

1) 細胞を用いた毒性試験法の開発

研究目的

材料工学的技術により細胞との親和性が高く、また細胞の形状・配置および機能を制御できる新規な培養基板の作製を試みる一方、分子生物学的技術を用いて薬物等の外部刺激に応答した遺伝子発現の変化を検出するための機能化細胞(センサー細胞)の作製を行う。これらの技術を融合し、種々の環境が細胞・組織に与える影響を簡便かつ経時的にモニターできるバイオセンサーの創製を目指す。

実験方法

・ 高感度なセンサー細胞の作製

ヒト HSP70B'遺伝子プロモーター(-287~+110bp)をストレス応答配列として利用し、これをルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだプラスミドを培養細胞に導入することで毒性センサー細胞を作製した。さらに高感度なセンサー細胞を作製するために以下の通りにヒト HSP70B'遺伝子のストレス応答配列の改変を行った。5'-および 3'-欠損変異体を作製し最小のストレス応答領域を決定した。さらに、ストレス応答を阻害するモチーフ配列を塩基置換によって変異させた。このようにして作製した応答配列をタンデムに連結させ、改変 HSP70B'遺伝子ストレス応答配列とした。

・ 機能化細胞のマイクロパターンニング手法の検討

機能化細胞アレイの構築：細胞非接着性のポリアクリルアミドを電子線重合法によりポリスチレン製培養皿表面上にグラフトし、エキシマレーザーによるポリアクリルアミド薄膜層のアブレーションで、50×50 μm の領域のポリスチレン表面を露出させ、細胞接着表面を有する培養基材を得た。この培養基材上に HepG2 細胞を播種した後、リポフェクション法により GFP 発現プラスミドを導入し、機能化細胞アレイを得た。

マイクロ流路内における機能化細胞マイクロパターンの構築：機能化細胞を用いたハイスループットなバイオセンサー創製を目的として、マイクロパターン化した機能化細胞の構築を可能にする微小流路を利用した新しいプラスミド導入法を検討した。PC 上で描画した 3-inlet, 1-outlet の形状のマイクロパターンイメージを、液晶プロジェクタを改造したマスクレス露光装置によりネガ型 g 線フォトリソを塗布した基材面に縮小投射し、微小流路のマスターモールドを作製した。マスターモールド上に流し込んだ PDMS プレポリマーを加熱し硬化した後にマスターから剥離した。この PDMS を細胞培養基材上に接着させ、PDMS 製微

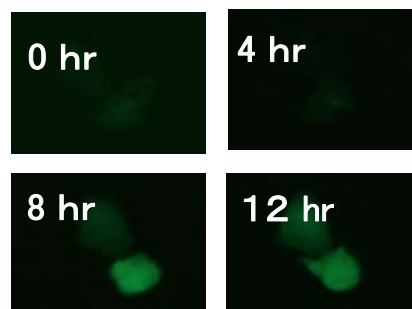


図5 機能化細胞の細胞毒性経時的検出.

小流路チップを得た。微小流路の一方から細胞(NIH-3T3)懸濁液を導入し、液流が停止していることを確認した後、5% CO₂、37℃のチャンバー内で静置した。細胞が十分に伸展した後に流路内の培養液を置換し培養を継続した。これらの細胞に、inlet の一つからリポフェクション試薬とともに GFP 発現プラスミドを、残りの二つからは通常の培養液を導入した。outlet からリポフェクション試薬および培養液を吸引し、微小層流をマイクロ流路内の細胞上に 3 時間維持した。その後、全ての inlet から培養液を導入し、リポフェクション試薬を洗浄し、液流を止めた状態で培養を継続した。

研究結果

機能化細胞の作製：細胞は様々な環境変化に応答して、種々の遺伝子の発現レベルを変化させる。毒性刺激によって生じる遺伝子発現変化を簡便に検出できる機能化細胞を構築することによって、迅速かつ高感度な毒性の検出が行えることが期待される。HSP70B'遺伝子プロモーター(-287 ~ +110bp)とホタルのルシフェラーゼ遺伝子を用いて作製した機能化細胞は cell viability test よりも約 4 倍高い感度で塩化カドミウムの毒性を検出し、また、レポーター遺伝子にクラゲの蛍光タンパクである GFP を用いると、その細胞毒性を経時的に検出することが可能であった(図5)。さらに、改変 HSP70B'遺伝子ストレス応答領域を用いることによって、塩化カドミウムに対する応答性をさらに 2.9 倍向上させることに成功した(図6)。HSP70B'遺伝子は種々のストレスに応答するため、本研究により作製された機能化細胞は、広域な細胞毒性を高感度に検出することを可能にするバイオセンサーへの応用が期待される。

機能化細胞の応用：機能化細胞はバ

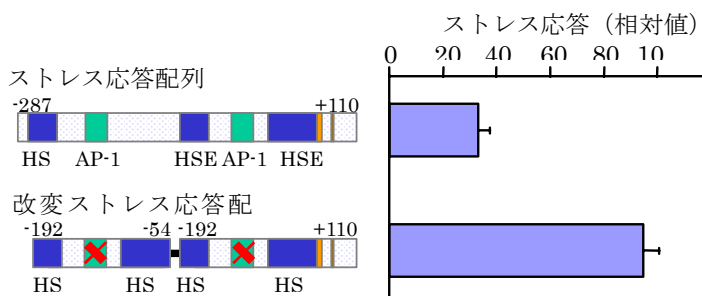


図6. ヒト HSP70B'遺伝子ストレス応答配列の改変による応答性の向上。

ストレス応答配列(ヒト HSP70B'遺伝子-287~+110bp)には HSE と AP-1 のモチーフ配列が含まれる。改変ストレス応答配列ではヒト HSP70B'遺伝子の-192~+110bp の上流に-192~-54bp の配列をタンデムに連結し、AP-1 配列を塩基置換によって変異させた。ストレス応答はこれらの応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、塩化カドミウム暴露(500ng/mL、12 h)の後にルシフェラーゼ活性を定量することで評価した。ストレス応答は定常状態におけるルシフェラーゼ活性に対する相対値で示した。

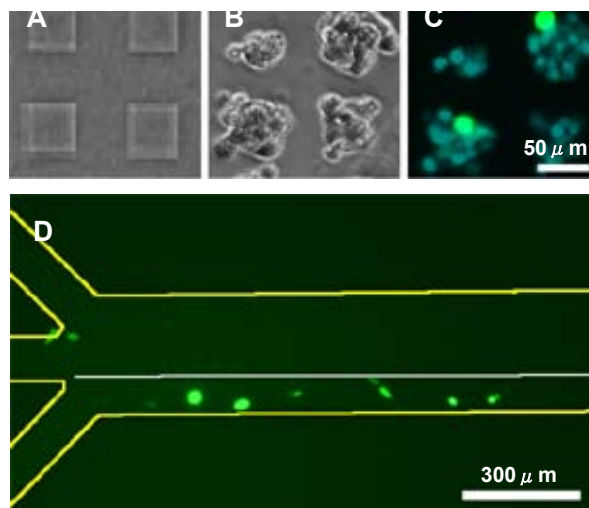


図7 マイクロウェル及びマイクロ流路内でのセンサー細胞の構築。

A: 細胞接着ドメイン, B: マイクロパターン化された HepG2 細胞, C: マイクロパターン化された細胞への GFP 発現プラスミドの導入, D: 微小層流を利用した GFP 発現プラスミド導入のマイクロパターン化。

イオセンサーとしての応用が期待される。機能化細胞をマイクロウェルやマイクロ流路などに構築することができればハイスループットな分析デバイスの創製が可能となる。本研究では、マイクロウェル上に播種した細胞に対して遺伝子導入が可能であること示した(図7A-C)。また、マイクロ流路内に播種した細胞に対して、流路内で構築した微小層流を利用してマイクロパターン化した遺伝子導入を行うことに成功した(図7D)。

結語

本研究において、1)遺伝子導入による高感度な毒性センサー細胞の創製、および 2)遺伝子導入細胞のマイクロパターン化、に成功した。これらの成果は細胞毒性を検出するハイスループットなバイオセンサーを創製する上で重要な技術となることが期待される。

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、所長・教授）
- 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

物材機構グループ

- ①研究分担グループ長：谷口 彰良（物質材料研究機構生体材料研究センター、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（理化学研究所前田バイオ工学研究室、前任研究員）
- 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（原著論文）発表

- 阿部一彦, 菅原基晃, 笠貫 宏, 菊池明彦, 岡野光夫, “ラメラ状のナノドメイン構造表面に対する Methyl- β -cyclodextrin 処理粘着リンパ球の認識応答”, *医学検査*, **54** (2), 111-117 (2005).
- Y. Tsuda, A. Kikuchi, M. Yamato, A. Nakao, Y. Sakurai, M. Umezu and T. Okano, “The use

- of patterned dual thermoresponsive surfaces for the collective recovery as co-cultured cell sheets”, *Biomaterials*, **26** (14), 1885-93 (2005).
- H. Hatakeyama, A. Kikuchi, M. Yamato and T. Okano, “Influence of insulin immobilization to thermoresponsive culture surfaces on cell proliferation and themally induced cell detachment”, *Biomaterials*, **26** (25), 5167-76 (2005).
 - S. Iwanaga, Y. Akiyama, A. Kikuchi, M. Yamato, K. Sakai and T. Okano, “Fabrication of a cell array on ultrathin hydrophilic polymer gels utilising electron beam irradiation and UV excimer laser ablation”, *Biomaterials*, **26** (26), 5395-5404 (2005).
 - M. Hasegawa, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano and I. Ishikawa, “Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model”, *Tissue Eng.*, **11** (3-4), 469-478 (2005).
 - R. Takazawa, M. Yamato, Y. Kageyama, T. Okano and K. Kihara, “Mesothelial cell sheets cultured on fibrin gel prevent adhesion formation in an intestinal hernia model”, *Tissue Eng.*, **11** (3-4), 618-625 (2005).
 - Y. Hayashida, K. Nishida, M. Yamato, K. Watanabe, N. Maeda, H. Watanabe, A. Kikuchi, T. Okano and Y. Tano, “Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface”, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **46** (5), 1632-1639 (2005).
 - T. Akizuki, S. Oda, M. Komaki, H. Tsuchioka, N. Kawakatsu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano and I. Ishikawa, “Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs”, *J. Periodont. Res.*, **40** (3), 245-251 (2005).
 - M. Nakayama, T. Okano, “Polymer terminal group effects on properties of thermoresponsive polymeric micelles with controlled outer-shell chain lengths”, *Biomacromolecules*, **6** (4), 2320-2327 (2005).
 - A. Kushida, M. Yamato, Y. Isoi, A. Kikuchi and T. Okano, “A noninvasive transfer system for polarized renal tubule epithelial cell sheets using temperature-responsive culture dishes”, *Eur. Cell. Mater.*, **10** (2005), 23-30 (2005).
 - T. Umemoto, M. Yamato, K. Nishida, J. Yang, Y. Tano and T. Okano, “p57^{Kip2} is expressed in quiescent mouse bone marrow side population cells”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **337** (1), 14-21 (2005).
 - 阿部一彦, 菅原基晃, 笠貫 宏, 菊池明彦, 岡野光夫, “親水性/疎水性セグメントを交互に配列したナノドメイン構造表面におけるエンドグリコセラミダーゼ□処理粘着リンパ球の電子顕微鏡による解析”, *医学検査*, **54** (9), 1200-1206 (2005).
 - Y. Itabashi, S. Miyoshi, S. Yuasa, J. Fujita, T. Shimizu, T. Okano, K. Fukuda and S. Ogawa, “Analysis of the electrophysiological properties and arrhythmias in directly contacted skeletal and cardiac muscle cell sheets”, *Cardiovasc. Res.*, **67** (3), 561-570 (2005).

- I.A. Memon, Y. Sawa, N. Fukushima, G. Matsumiya, S. Miyagawa, S. Taketani, S. Sakakida, H. Kondoh, A.N. Aleshin, T. Shimizu, T. Okano and H. Matsuda, "Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets", *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **130** (5), 1333-1341 (2005).
- N. Idota, A. Kikuchi, J. Kobayashi, K. Sakai and T. Okano, "Microfluidics valves comprising nanolayered thermoresponsive polymer-grafted capillaries", *Adv. Mater.*, **17** (22), 2723-2727 (2005).
- T. Asano, R. Takazawa, M. Yamato, Y. Kageyama, K. Kihara and T. Okano, "Novel and simple method for isolating autologous mesothelial cells from the tunica vaginalis", *BJU Int.*, **96** (9), 1409-1413 (2005).
- T. Umemoto, M. Yamato, K. Nishida, C. Kohno, J. Yang, Y. Tano and T. Okano, "Rat limbal epithelial side population cells exhibit a distinct expression of stem cell markers that are lacking in side population cells from the central cornea", *FEBS Lett.*, **579** (29), 6569-6574 (2005).
- S. Miyagawa, Y. Sawa, S. Sakakida, S. Taketani, H. Kondoh, I.A. Memon, Y. Imanishi, T. Shimizu, T. Okano and H. Matsuda, "Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium: their integration with recipient myocardium", *Transplantation*, **80** (11), 1586-1595 (2005).
- T. Umemoto, M. Yamato, K. Nishida, J. Yang, Y. Tano and T. Okano, "Limbal epithelial side-population cells have stem cell-like properties, including quiescent state", *Stem Cell.*, **24** (1), 74-85 (2006). (2006/1)
- N. Idota, A. Kikuchi, J. Kobayashi, Y. Akiyama, K. Sakai and T. Okano, "Thermal modulated interaction of aqueous steroids using polymer-grafted capillaries", *Langmuir*, **22** (1), 425-430 (2006).
- Y. Tanaka, K. Morishima, T. Shimizu, A. Kikuchi, T. Okano and T. Kitamori, "Demonstration of a PDMS-based bio-microactuator using cultured cardiomyocytes to drive polymer micropillars", *Lab on a Chip*, **6** (2), 230-235 (2006).
- T. Ide, K. Nishida, M. Yamato, T. Sumide, M. Utsumi, T. Nozaki, A. Kikuchi, T. Okano and Y. Tano, "Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes", *Biomaterials*, **27** (4), 607-614 (2006).
- T. Sumide, K. Nishida, M. Yamato, T. Ide, Y. Hayashida, K. Watanabe, J. Yang, C. Kohno, A. Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano and Y. Tano, "Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces", *FASEB J.*, **20** (2), 392-394 (2006).
- Y. Hayashida, K. Nishida, M. Yamato, J. Yang, H. Sugiyama, K. Watanabe, Y. Hori, N. Maeda, A. Kikuchi, T. Okano and Y. Tano, "Transplantation of tissue-engineered epithelial

- cell sheets after excimer laser photoablation reduces postoperative corneal haze”, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **47** (2), 552-7 (2006).
- H. Kondoh, Y. Sawa, S. Miyagawa, S. Sakakida-Kitagawa, I.A. Memon, N. Kawaguchi, N. Matsuura, T. Shimizu, T. Okano and H. Matsuda, “Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters”, *Cardiovasc. Res.*, **69** (2), 466-475 (2006).
 - Y. Tanaka, K. Morishima, T. Shimizu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano and T. Kitamori, “An actuated pump on-chip powered by cultured cardiomyocytes”, *Lab on a Chip*, **6** (3), 362-368 (2006).
 - S. Sekiya, T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, “Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **341** (2), 573-582 (2006).
 - A. Furuta, S. Miyoshi, Y. Itabashi, T. Shimizu, S. Kira, K. Hayakawa, N. Nishiyama, K. Tanimoto, Y. Hagiawara, T. Satoh, K. Hukuda and T. Okano, “Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo”, *Circ. Res.*, **98** (5), 573-575 (2006).
 - H. Sekine, T. Shimizu, S. Kosaka, E. Kobayashi and T. Okano, “Cardiomyocyte bridging between hearts and bio-engineered myocardial tissues with mesenchymal transition of mesothelial cells”, *J. Heart Lung Transplant.*, **25** (3), 324-332 (2006).
 - 春山哲也, “人工酵素を用いたバイオセンサ”, *BIO INDUSTRY*, **23** (1), 63-68 (2006).
 - S. Ikeno and T. Haruyama, “Biological phosphate ester sensing using an artificial enzyme PMP complex”, *Sens. Actuat. B*, **108**, 608-612 (2005).
 - H. Asakawa, S. Ikeno and T. Haruyama, “The molecular design of a PMP complex and its application in a molecular transducer for cellular NO sensing”, *Sens. Actuat. B*, **108**, 646-650 (2005).
 - K. Ozasa, M. Maeda and M. Hara, “Photoluminescence behavior of CdSe on GaAsOx/GaAs substrates”, *Microelectronics J.*, **36**, 578-580 (2005).
 - K. Ozasa, S. Nemoto, M. Maeda and M. Hara, “Evaluation of insulator thickness through excitation-wavelength dependence of photoluminescence of CdSe/ZnS nanocrystals”, *J. Appl. Phys.*, **98** (8), Art. No. 084312 (2005).
 - K. Wada, A. Taniguchi, L.M. Xu and T. Okano, “Rapid and highly sensitive detection of cadmium chloride induced cytotoxicity using the HSP70B' promoter in live cells”, *Biotechnol. Bioeng.*, **92** (4), 410-415 (2005).

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 1 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)