

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「プロセスインテグレーションによる
機能発現ナノシステムの創製」
研究課題「マイクロ・ナノ統合アプローチによる細
胞・組織 Showcase の構築」

研究終了報告書

研究期間 平成21年11月～平成27年3月

研究代表者：藤井 輝夫
(東京大学生産技術研究所、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本課題では、マイクロ流体デバイスの内部に、人工バイオ界面を組み込むことにより、細胞外微小環境における液性及び流れの条件と、界面における細胞の接着条件とを統合的に設計・制御できるシステムを確立し、これを用いて、ES/iPS 細胞ならびにがん細胞、特に血中循環腫瘍細胞 (CTC: Circulating Tumor Cell) の挙動を仔細に提示、すなわち「Showcase」できるデバイスを実現することを目的として研究を進めてきた。

「人工バイオ界面」とは、ペプチド・アプタマーを提示した材料表面を意味し、ペプチド・アプタマーがもつ特定の標的分子に対する親和性を有する材料表面のことである。芝グループでは、特に「がんに関連した親和性表面」の実現に重きをおき、上皮細胞に特異的なマーカーである EpCAM に注目した。がん細胞表面の EpCAM ならびに ES 細胞等の未分化細胞表面の IGF-1 受容体にアフィニティを有するペプチドの創製に成功した。また同グループでは、得られたペプチドを用いて簡単に「人工バイオ界面」を形成させるために、医療器具のコート剤としても使われている MPC ポリマーと親和性ペプチドの複合体「EpiVeta」を合成し、藤井グループの開発した稀少細胞捕捉デバイスに EpiVeta を均一にコートする条件を探索し、EpCAM 陽性細胞が、ペプチド非提示の場合に比べて、約 2 倍の効率で捕捉されることを確認した。また、この方法をいろいろな材料に適用し、EpCAM 陽性のエクソソームとの相互作用を確認した。

個体組織は外・内・中胚葉の 3 胚葉組織からなり発生初期から三系統に分かれ発生・分化していく。阿久津グループでは、そのような過程を可視化できる幹細胞樹立を試みた。まず、心筋細胞分化可視化 ES 細胞を樹立した上で、2 つの異なる組織を観察評価するためのデュアルレンジ分化可視化細胞として神経・グリア細胞分化可視化 ES 細胞樹立に成功、さらに、デュアルレンジ分化可視化を異なる胚葉かつ生体内制御で重要な神経と心筋細胞への分化を可視化可能な ES 細胞を樹立した。最終的には、個体を構成する 3 組織胚葉である外胚葉・内胚葉・中胚葉それぞれの分化を異なる蛍光色素発色により可視化するトリプルマーカー対応の ES 細胞樹立に成功し、同一の細胞から異なる細胞への分化を同時に観察することが可能となった。これらの細胞を藤井グループが開発したデバイス内に導入して、部位特異的分化誘導実験を行い、異種細胞からなる高次構造体を作製することに成功した。

藤井グループでは、CTC 等の稀少細胞を捕捉するためのデバイス構造の設計・試作を行い、上記の EpCAM をターゲットとする抗体を用いて、がん細胞を特異的に分離できることを確認しており、チーム研究の最終段階として、人工バイオ界面を導入して分離する実験を進めているところである。また、微小環境における液性条件を制御する方法を確立し、上記の多能性幹細胞の分化状態の空間的な制御や特定の組織への部位特異的分化誘導が行えることを示すとともに、網膜組織や神経筋接合等の細胞構造体を形成することに成功した。一方、血管内皮モデルをデバイス内部に形成して、がん細胞と血管内皮との相互作用に対して、ペプチドや抗体がどの程度影響を及ぼすかについて評価する系を立ち上げた。

領域内共同研究として、野地グループと共同でエレクトロアクティブマイクロチャンバアレイ技術を開発し、細胞内の酵素活性や ATP 濃度さらには iPS 細胞における未分化マーカーの発現状態など、様々な 1 細胞解析を実現した。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 細胞組織へのマイクロ流体アプローチの展開(デバイス技術全般、軸索デバイス含む)

概要: マイクロ流体デバイスを微小構造内で細胞を培養する系として利用し、たとえば神経細胞の培養デバイス、尿細管形成用の鋳型構造、肝細胞索を模擬したデバイスなどを実現することにより、既存の方法では行えないような新しい実験系を構築することが可能であることを示した。こうした成果は国際的にも高く評価されており、たとえば Organ on a Chip に関する代表的なレビュー論文において紹介されている。

2. 多能性幹細胞の分化誘導を時空間的に制御する方法の確立

概要: マイクロ流体デバイス内部の液性条件を時空間的に変えることにより、多能性幹細胞の分化誘導を制御できる手法を、それぞれ2次元培養状態と3次元培養(胚様体)状態について実現した。分化状態を部位特異的に制御することは一般に容易ではなく、2次元培養の系で実現できているのは本成果のみである。また、胚様体については、インサート型のデバイスを用いて実際に部位特異的な眼胞形成や神経筋接合の形成など高次細胞構造体を作ること成功している。

3. エレクトロアクティブマイクロウェルアレイによる1細胞解析技術の確立

概要: 多数の細胞を一つずつマイクロウェルの内部に捕捉した上で、細胞を破砕することによって1細胞解析を行うことができるエレクトロアクティブマイクロウェルアレイを実現し、細胞内部の酵素活性や ATP 濃度、さらには未分化マーカーの発現等の解析を行うことに成功した。1細胞解析は現在、世界的にも注目を集めている分野であり、高効率に細胞を捕捉し、なおかつ高感度の解析が行える技術として、学術的にもまた応用上も高く評価されている。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. EpCAM 結合性人工ペプチドの創製と人工バイオ界面への展開

概要: 進化分子工学的手法の1つであるペプチド提示フェージ系を用いて、EpCAM に結合するペプチドの取得に成功した。このペプチドは上皮系のがん細胞の表面に提示される EpCAM に結合するため、血中循環腫瘍細胞を捕捉する際に用いることができる。また、近年急速に注目を集めている、体液中のエクソソームを用いた診断においても、やはり EpCAM 陽性エクソソームを用いた応用展開が期待されている。このペプチドの応用について、複数の企業との共同研究がスタートしている。

2. 複数胚様への分化を可視化するマウスES細胞の樹立

概要: 各種臓器細胞に対応する分化マーカーの発現を蛍光検出できるような分化可視化幹細胞の樹立を進め、個体を構成する3組織胚葉である外胚葉・内胚葉・中胚葉それぞれの分化を異なる蛍光色素発色により可視化するトリプルマーカー対応のES細胞樹立に成功した。1種類の細胞で三胚葉ごとに異なる分化マーカーを有する細胞樹立の報告はこれまでにないため、細胞集団がどのように分化の道筋をたどるのかを明らかにする上で、いわめて貴重なバイオツールになり得る。

3. インサート型胚様体培養デバイス

概要: 胚様体の一部分のみが他の部分と異なる条件となるように培養することができるデバイスを開発し、網膜組織の部位特異的な形成や神経筋接合の形成などに成功した。このデバイスは通常マイクロ流体デバイスと異なり、汎用のカルチャーインサートをベースにしたものであるため、取り扱いが容易で、生物学系の研究者であっても特段の予備知識無しに使用することが可能なもので、様々な培養実験への応用展開が期待される。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「東大生研」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
藤井 輝夫	東京大学生産技術研究所	教授	H21.11～H27.3
酒井 康行	同上	教授	H21.11～H27.3
木村 啓志	同上	協力研究員	H21.11～H27.3
木下 晴之	同上	特任助教	H21.11～H27.3
Mohammad, Mahfuz Chowdhury	同上	特任研究員	H21.11～H26.3
川田 治良	同上	特任研究員	H21.11～H27.3
金田 祥平	同上	特任助教	H22.4～H27.3
何 小明	同上	特任研究員	H22.7～H25.3
中村 寛子	同上	特任研究員	H22.4～H26.3
金 秀炫	同上	特任助教	H22.10～H27.3
小林 麻里奈	同上	M2	H24.4～H26.3

研究項目

- 人工バイオ界面のデバイスへの導入
 - ・ デバイス及び膜材料への固相化法の開発
- デバイス内微小環境制御法の確立
 - ・ 液性条件制御法の確立
 - ・ 接着条件制御法の開発
- 希少細胞捕捉デバイスの開発
 - ・ 捕捉デバイスの設計・製作
 - ・ 捕捉デバイスの評価・改良
- がん転移 Showcase の構築
 - ・ デバイス内血管内皮モデルの構築
 - ・ がん細胞を用いた転移 Showcase→がん転移 Showcase の構築(以下の2項目を統合)
 - ・ CTC を用いた転移 Showcase(当初計画→上の項目に統合)
 - ・ 転移阻害スクリーニング系の構築(当初計画→上の項目に統合)
- ES/iPS 細胞分化誘導 Showcase システムの構築
 - ・ 液性条件制御による分化誘導 Showcase
 - ・ 接着条件を統合した分化誘導 Showcase
- マイクロ流体診断デバイスの開発
- エレクトロアクティブマイクロチャンバアレイの開発

②「がん研」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
芝 清隆	(公財)がん研究会 がん 研究所 蛋白創製研究部	部長	H21.10～
南澤 宝美后	同上	研究助手	H21.10～
菅 加奈子	同上	嘱託研究助手	H21.10～

森本 康介	同上	嘱託研究助手	H22.5～H23.6
國分克寿	同上	嘱託研究員	H21.10～H26.3
日比野和浩	同上	嘱託研究助手	H23.9～
松村 幸子	同上	嘱託研究員	H20.10～
足立 絵瑠	同上	嘱託研究助手	H23.7～H25.3
ヴァンターベルク 久美子	同上	特任研究補助員	H25.6～
吉田 光孝	同上	研究生	H24.4～
岩井 千弥	同上	研究生	H24.10～
山本 恵史	同上	研究生	H26.10～

研究項目

- 人工バイオ界面のデバイスへの導入
 - ・ 腫瘍細胞結合ペプチドの創製
 - ・ 幹細胞結合ペプチドの創製
 - ・ デバイス及び膜材料への固相化法の開発
- デバイス内微小環境制御法の確立
 - ・ 接着条件制御法の開発
- 希少細胞捕捉デバイスの開発
 - ・ 捕捉デバイスの評価・改良
- がん転移 Showcase の構築
 - ・ がん細胞を用いた転移 Showcase→がん転移 Showcase の構築(以下の2項目を統合)
 - ・ CTC を用いた転移 Showcase(当初計画→上の項目に統合)
 - ・ 転移阻害スクリーニング系の構築(当初計画→上の項目に統合)
- 分化誘導 Showcase システムの構築
 - ・ 接着条件を統合した分化誘導 Showcase
- エクソーム研究への展開
 - ・ 人工バイオ界面によるエクソソームの捕捉

③「成育センター」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
阿久津英憲	国立成育医療研究センター研究所	部長	H21.11～
三浦 巧	同上		H21.11～H26.03
町田 正和	同上	研究補助員	H21.11～
小野寺成実	同上	研究員	H24.04～

研究項目

- 分化可視化 ES/iPS 細胞の樹立
 - ・ 分化可視化 ES/iPS 細胞の樹立
 - ・ 分化可視化 ES/iPS 細胞の機能評価
- 分化誘導 Showcase の構築

- 液性条件制御による分化誘導 Showcase
- 接着条件を統合した分化誘導 Showcase

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

(研究チーム外での連携や協働についてご記入ください。ライフ分野では臨床医等を含みます。)

- 東京大学大学院工学系研究科 野地博行 教授、領域内共同研究として、エレクトロアクティブマイクロチャンバアレイを用いた分子及び細胞の計測技術の開発を行った。
- 東京医科歯科大学生体材料工学研究所 宮原裕二 教授、領域内共同研究として、電位計測方式によるマイクロ流体診断デバイスの開発を行った。
- ハーバード大学幹細胞再生医科学専攻 Kevin Eggan 教授、JST-NIH 国際共同研究により、軸索を長く伸長して神経筋接合形成を行うデバイスを製作するとともに、患者由来の細胞に応用する研究を行った。
- がん研究会がん研究所 藤田直也 部長、血管内皮モデル系とがん細胞との相互作用についてアドバイスを受けた。
- がん研究会がん研究所 竹内賢吾 主任研究員、FISH 解析のプロトコルについて指導をうけた。
- 東京都医学総合研究所 大岡静衣 主席研究員、神経細胞に対するポリオウイルス感染に関わる共同研究のために、デバイスを提供した。
- 岐阜大学 応用生物科学部 伊藤准教授、神経細胞に対する狂犬病ウイルス感染に関わる共同研究のために、デバイスを提供した。

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 人工バイオ界面のデバイスへの導入(がん研 芝グループ)

研究実施内容及び成果

【概略】

「人工バイオ界面」とは、ペプチド・アプタマーを提示した材料表面を意味し、ペプチド・アプタマーがもつ特定の標的分子に対する親和性を有する無機材料表面のことである。この「人工バイオ界面」は、マイクロ流体系などのデバイス表面に実装することで、特定の分子に親和性をもったデバイス空間を実現することが本研究項目の目的である。

本研究では、特に「がんに関連した親和性表面」の実現に重きをおき、上皮細胞に特異的なマーカーである EpCAM に注目した。研究は(1) 高性能 EpCAM 結合ペプチドの取得、(2) その他幹細胞などへの結合ペプチドの取得、(3)取得したペプチドのデバイスへの固相化法の確立、(4)稀少細胞捕捉デバイスへの人工バイオ界面の実装、(5)エクソソーム診断装置への人工バイオ界面の利用、といった5つの小項目を中心に進めた。

【実施方法】

(1) がんマーカーの1つとして広く知られる「EpCAM」分子は、そもそもは上皮細胞のマーカーであるが、血管や血球細胞に発現がないために、血中のがんマーカーとして広く使われている。唯一 FDA 認可を受けている血中循環がん細胞(CTC)を用いた診断システムでは、この EpCAM に対する抗体を用いて CTC が分離されている。このような背景のもと、われわれはまず、EpCAM に対する親和性ペプチド(以下、ペプチド・アプタマーと呼ぶ)を、進化分子工学的手法の1つであるペプチド提示フェージ系で取得することから始めた。また、一次進化で取得されたペプチドをリードとして、さらに厳しい条件で二次進化をおこない、より強い結合能力をもつペプチドの取得を進めた。

(2) 幹細胞のための Showcase 研究との連携を考慮して、ES 細胞の維持などに関連した IGF-1R に結合する人工ペプチドの取得も進めた。

(3) 得られたペプチドを用いて簡単に「人工バイオ界面」を形成させるために、医療器具のコート剤としても使われている MPC ポリマーと親和性ペプチドの複合体「EpiVeta」を合成した

(4) (3)で完成した「EpiVeta」を藤井 G で構築した稀少細胞捕捉デバイスに実装し、その効果を評価した。

(5) 当初の予定にはなかったが、この 2,3 年に急激に注目を集め始めた、エクソソームの診断装置の開発での「EpiVeta」の可能性を評価するために、微粒子やプラスチックプレートに「EpiVeta」をコートし、EpCAM 陽性エクソソームとの相互作用を評価した。

【実施内容】

(1) 組換え体を用い発現・精製した EpCAM タンパク質を標的として、ペプチド提示フェージ系による試験管内進化から、EpCAM に結合するペプチドを取得した。さらにこの取得した EpCAM 結合ペプチドを、二次進化させることにより、EpCAM により協力的に結合するペプチド Ep114 を取得した(特許出願)。

(2) ペプチド提示フェージ系による試験管内進化から、IGF-1R に結合するペプチドを取得した(特許出願)。

(3) 得られた Ep114 ペプチドを、リン脂質のヘッド部をミミックした合成高分子として知られる MPC(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)の中の、MPC ブロック、疎水性ブロックと、反応基からなるランダム共重合体にクリック・ケミストリーで結合し、Ep114 のコート剤である「EpiVeta」を作製した(特許出願)。

(4) 藤井グループが作製した CTC 捕捉デバイスに「EpiVeta」をコートし、EpCAM 陽性細胞と陰性細胞の捕捉率を測定した。

(5) 「EpiVeta」をコートしたビーズを作製し、EpCAM 陽性細胞と陰性細胞から放出されるエクソソームに対する親和性を評価した。

【成果】

(1) ペプチド提示ファージ系で取得される「ペプチド・アダプター」は、多くの場合ファージから切り離すことで、その特異的な結合を失う。デバイス表面への「ペプチド・アダプター」の固相は、ファージから切り離したペプチドを用いることになるので、この問題は避けなければならない。この問題を予め解決するために、本研究では、十分に厳しい条件でペプチドの選択をおこない、「強い結合ペプチド」を取得することで、その独立性が得られるであろうとの予測のもと、一次進化で得られたペプチドをリードとして、さらに二次進化させることで、解離定数が 1-2nM レベルの強い結合能力をもったペプチド・アダプター Ep114(図 3. 1-1 参照)を創製することに成功した(特許出願)。期待通り、この Ep114 ペプチドは、プラスチックプレートに固相化した状態でも EpCAM に親和性を示し、その後の研究に支障なく使えることが分かった。

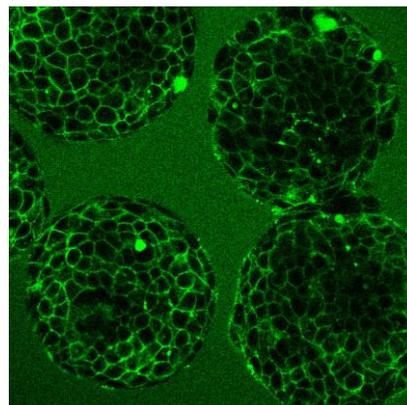


図 3. 1-1. Ep114 による EpCAM 発現細胞の染色。

(2) IGF-1R 結合ペプチドを取得し、特許出願した。

(3) ペプチドを材料表面に固相化するには、i) ビオチン化したペプチドをstreptavidinなどを介して材料表面に固相化する方法、ii) ペプチドに材料表面と結合するような反応基を導入して、化学結合で固相化する方法が主にこれまで使われてきている。しかしながら、i)の方法は、タンパク質であるstreptavidinを用いるために、價格的、および、バイオコンパティビリティ的な問題があり、臨床応用するには問題が多すぎる。また、ii)の方法では、下地となる材料の性質がドミナントになり、結果的に材料表面への非特異的吸着を別途解決しなければならないという問題が残る。今回は、既に非特異的吸着を抑制する目的で、医療器具のコート剤に使われている MPC のブロック重合体に注目し、非特異的吸着を抑えながら、ペプチド・アダプターの特異的吸着性能を十分に引き出せる、新しいタイプのコート剤、「EpiVeta」の作製に成功した。水溶性のペプチドと、非水系の MPC のブロック重合体をコンジュゲートする条件探索の難しい合成反応であるが、試行錯誤の結果、目的のコンジュゲートの合成に成功し、特許出願した。

(4) 藤井グループの開発した楕型稀少細胞捕捉装置に EpiVeta を均一にコートする条件を探索し、EpCAM 陽性細胞が、ペプチド非提示のコントロールに比べて、約 2 倍の効率で捕捉されることを確認した。

(5) Ep114 および、EpiVeta をいろいろな材料に固相化し、EpCAM 陽性のエクソソームとの相互作用を確認した。

【位置づけ】

(1) 全身病である転移がんの診断には、血清や血漿を用いる「液体生検」が極めて重要な位置をしめる。がんが「上皮細胞の悪性腫瘍」であること、血液中には上皮細胞が通常は流れていないことなごから、上皮性マーカーである EpCAM 極めて重要な分子であり、事実、唯一 FDA 認可された循環腫瘍細胞(CTC)の診断装置も、EpCAM に対する抗体を用いて血中のがん細胞を捕捉している。また、近年急速に注目を集めている、体液中のエクソソームを用いた診断においても、やはり EpCAM 陽性のエクソソームの動きに注目が集まっている。従来、EpCAM 分子の検出には抗体分子が用いられており、一部、RNA アダプターの報告があるものの、ペプチドを用いた EpCAM 分子の認識法は知られていなかった。このような中、われわれは EpCAM に対する高い親和性をもったペプチドをいち早く取得し、特許出願できたことは、今後ますますさかんとなる、がん疾患の液体生検装置の開発に、このペプチドが広く利用される可能性がある。事実、この Ep114、および下記の EpiVeta の展開研究で、複数の企業との共同研究がスタートしている。

(2) 幹細胞の維持に必要な IGF-1R に結合するペプチドも、ペプチド提示ファージ系を用いた試験管内人工進化システムで単離することに成功した。特許出願もおこなったが、その国内予備審査の調査段階で、同一のペプチドが韓国で特許出願されていることが判明したために、見なし放棄とすることになった。

(3) ペプチド・アプタマーの材料表面への固相化には、「MPC 重合体を用いたペプチドコート剤」の戦略を採用した。これは当初の計画にはなかった新しい方法であるが、材料として安価な MPC を用いることができ、さらに、MPC がもつ高い「非吸着性」を活用して、「非特異的吸着を抑えた状態で、特異的吸着能をもったペプチドを提示する」といった利点をもっている。また、「疎水的吸着」を利用したバイオ界面形成であるので、コートする材料も、ある程度の疎水性をもてばよいことになり、幅広いデバイスにコートできるといった利点をもつ。「MPC 共重合体」へのペプチドのコンジュゲートは、水中で効率よく反応し、副反応が少ない「クリック・ケミストリー」を用いた。このために、「MPC 共重合体」にはポリエチレンクリコールを介してアジド基を導入し、またペプチド・アプタマーには、合成段階でアルキンを導入した。このアルキンとアジド化合物が付加環化を起こし、1,2,3-トリアゾール環を作る反応(Huisgen 反応)が「クリック・ケミストリー」で、近年バイオ分野でも広く使われ出した手法である。本研究では、EpCAM への親和性界面を形成させる「EpiVeta」を作製したが、用いるペプチドを目的に応じて変えることで、いろいろな親和性界面コート剤を作れるといったプログラム性の高い手法であるので、広く世界中で使われることを期待している。既に、この EpiVeta をシリコンや貴金属系のデバイスに実装する共同研究を複数の企業と開始している。

(4) 稀少細胞の捕捉装置にはいろいろなタイプのもものが提案・製作されているが、今回のようなペプチド・アプタマーを用いた親和性界面を利用するタイプはまだ報告されていない。抗体分子を用いた捕捉装置の場合、抗体の価格が問題となるが、ペプチドの場合は化学合成できるために、今後広く使われていく方法になると期待している。

(5) 研究開始当初は、液体生検の解析対象としては、血中を循環する腫瘍細胞(CTC)が最も有力なものであったが、2011年頃から、細胞が放出する分泌外小胞＝エクソソームが CTC に取って代わり、解析対象として最も重要な生体分子と認識されるようになった。CTC 捕捉のために開発した Ep114 や EpVeta は、そのままエクソソームの診断装置に利用することができる。このため、2013 年度から EpCAM 陽性エクソソームの Ep114 や EpVeta との相互作用を調査する項目を追加し、EpCAM 陽性エクソソームの捕捉に Ep114 や EpVeta が使えることを確認した。現在、エクソソームを用いた診断装置の開発を進める複数の企業との共同研究が進行している。

3.2 分化可視化細胞の樹立(成育センター 阿久津グループ)

研究実施内容及び成果

マイクロ流体デバイスと多能性幹細胞を融合させ細胞発生制御および生細胞による反応性観察を可能とし細胞・組織 Showcase を構築することを目指した。個体組織は外・内・中胚葉の3胚葉組織からなり発生初期から三系統に分かれ発生分化していく。そのため、極めて有用だがこれまでに報告のない3胚葉初期分化マーカーを異なる蛍光色素で可視化できる幹細胞樹立を行い、デバイスと共活用することを目指した。まず、2種系統の心筋細胞分化可視化 ES 細胞を樹立した。Myh6-EGFP-ES 細胞は心筋細胞への分化(拍動性)と EGFP の特異的な発現を確認し、明確な分化可視化を達成した。さらに、2つの異なる組織を観察評価するためのデュアルレンジ分化可視化細胞を実現するために、神経細胞マーカーである $T\alpha-1$ チューブリン遺伝子プロモーター制御のEGFP発現ベクターとグリア線維酸性タンパク質(GFAP)遺伝子プロモーター制御の神経・グリア細胞分化可視化 ES 細胞樹立に成功した。実際に神経分化を行ったところ、図 3.2-1に示すように、神経細胞とグリア細胞への分化に伴って、異なる色の蛍光(神経=緑、グリア=赤)が観察された。これにより、同一の細胞から異なる細胞への分化を同時に観察することが可能となった。デュアルレンジ分化可視化を異なる胚葉かつ生体内制御で重要な神経と心筋細胞分化可視化可能な ES 細胞を樹立した(図 3.2-2)。分化誘導過程を可視化するために、各種臓器細胞に対応する分化マーカーの発現を蛍光検出できるような分化可視化幹細胞の樹立を進め、個体を構成する3組織胚葉である外胚葉・内胚葉・中胚葉それぞれの分化を異なる蛍光色素発色により可視化するトリプルマーカー対応の ES 細胞樹立に成功した(図 3.2-3)。シングル細胞で三胚葉異なる分化マーカーを有する細胞樹立の報告はなく、貴重なバイオツールが作製できた。

また、分化制御を可能としたデバイス開発の成果に伴い、疾患研究などのより

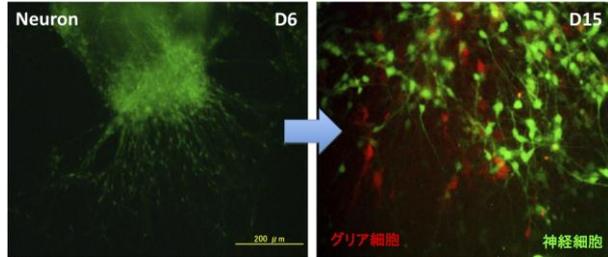


図 3.2-1. 神経細胞・グリア細胞二方向分化の観察 $T\alpha-1$ promoter-GFP と、GFAP promoter-DsRED により、神経細胞は緑、グリア細胞は赤の蛍光を発している。この細胞を用いることにより、同一細胞から二方向への分化観察が可能。

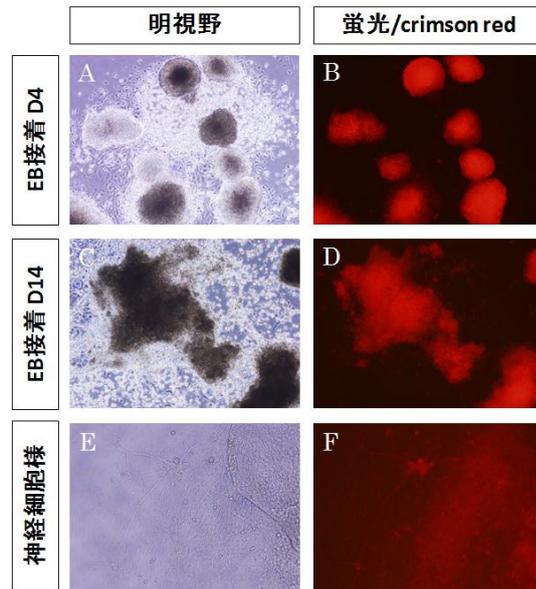


図 3.2-2. 神経-心筋可視化 ES 細胞。

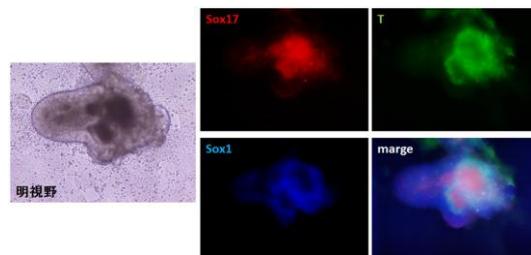


図 3.2-3. トリプルマーカー ES 細胞による分化可視化。分化誘導体で3胚葉(内胚葉; Sox17 赤、中胚葉; T 緑、外胚葉; Sox1 青)異なるマーカー発色が認められる。

出口応用に近いアプローチの必要から新たなヒト神経幹細胞の樹立に成功した(図 3.2-4)。これによりヒト運動神経を従来より効率よくかつ短期間に分化誘導しデバイス内で神経変性疾患を再現できる新規的なバイオツールを創出した(国際出願番号 PCT/JP2014/002089、特願 2013- 82731)。

3.3 希少細胞捕捉デバイスの開発(東京大学 藤井グループ)

研究実施内容及び成果

本研究項目では、マイクロ構造体と流れを利用し、細胞サイズの違いによって細胞を捕捉する手法(トップダウン方式)と希少細胞に対して結合可能なアフィニティを持つ人工バイオ界面によって細胞を捕捉する手法を(ボトムアップ方式)を統合した、新しい細胞分離法を提案し(図 3.3-1)、これを CTC 捕捉に用いた。CTC は表面に特異的な抗原(EpCAM)を持つことと、白血球や赤血球等の血球細胞より CTC は細胞サイズが大きいという特徴を持ち、従来はそのどちら一方のみに着目した分離法が提案されていたが、本研究では、その両者を考慮し、アフィニティ表面を持つマイクロフィルタを用いる細胞分離法(図 3.3-1)を提案した(特願 2012- 234653)。また、アフィニティ表面として、人工ペプチド界面を用いることで、従来の抗体を用いた手法よりもゆるやかに希少細胞を捕捉できるため、希少細胞の生存率の向上が期待できる。

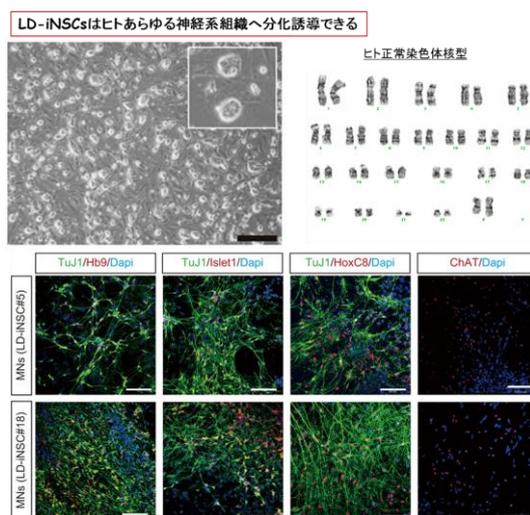


図 3.2-4. ヒト神経系多分化幹細胞あらゆる神経系細胞へ効率よく分化でき、デバイス内神経・筋融合研究へ活用。

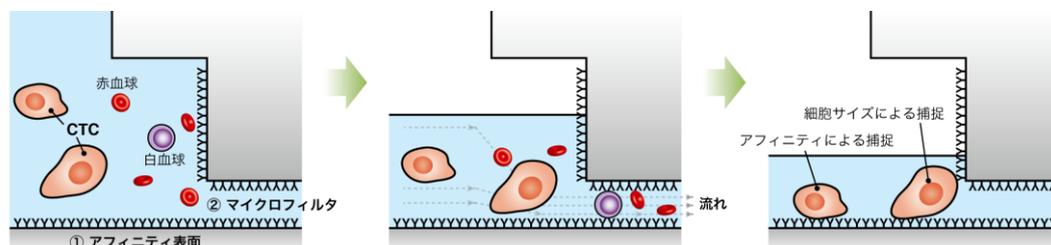


図 3.3-1. アフィニティ表面を持つマイクロフィルタによる CTC 分離法の概念図。

本研究では、抗 EpCA 抗体が固相化された PDMS 表面とガラス表面からなるマイクロフィルタ構造を有する CTC 分離ウェルを製作し、CTC のモデルとして前立線がん細胞(PC3 細胞)をヒト全血中に懸濁した系を用いて、分離ウェルを評価した結果、がん細胞の捕捉分離が可能であり、懸濁したがん細胞の回収率は約 9 割であった。これは、市販の装置(Veridex 社 CellSearch システム)の回収率(約 8 割)を上回るものである。また、アフィニティ表面として、がん研芝グループで取得された EpCAM 結合ペプチドを固相化した表面を持つ分離ウェルで、がん細胞を捕捉可能であることも確認している。

CTC は血液中に数個~数千 1000 個/mL と稀にしか存在せず、市販の装置では、7.5mL の血液サンプルを処理する必要がある。そこで、本研究では、分離ウェルをアレイ化し、各ウェルを流路で接続したデバイスに、血液リザーバーを接続したウェルプレートを開発した。このデバイスにより、10 mL の血液サンプルの処理が 20 分で可能となった。

3.4 デバイス内微小環境制御法の確立(東京大学 藤井グループ)

研究実施方法

デバイス内微小環境制御を行うにあたっては、人工バイオ界面をマイクロ流体デバイスに組み込むことを前提とするため、まず図 3.4-1 に示すような「膜を有するデバイス」を設計・製作し、このデバイスを用いて液性条件ならびに接着条件を制御する方法の確立を試みた。

研究実施内容及び成果

【液性条件制御法の確立】

i) 膜を有するデバイスを用いた多能性幹細胞の液性条件による分化制御法(接着状態(二次元))

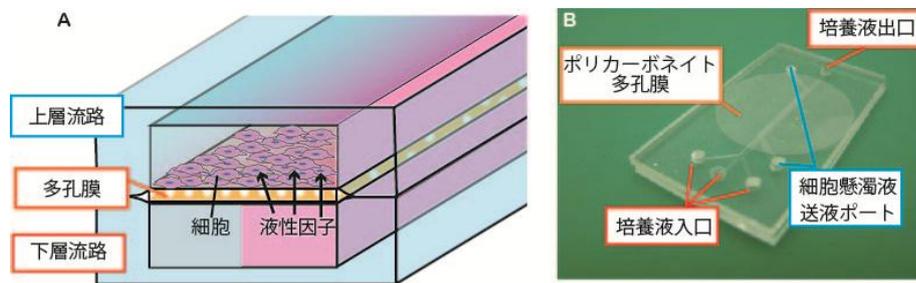


図 3.4-1. 膜を有するマイクロ流体デバイスの概念(A)、実際に製作したデバイス(B)

図 3.4-1 のデバイスは下層流路内で層流操作によって形成された濃度分布を、上層流路内の細胞に対して流れを直接与えることなく作用させることができるデバイスである。実際にマウス iPS 細胞をデバイス内で培養した。実験ではマウス iPS 細胞(未分化マーカー Nanog のレポーターとして GFP が発現する細胞株)を播種し、細胞が接着した後に図 3.4-2A に示す層流パターンを下層流路に送液した。デバイス内で 4 日間培養した結果は図 3.4-2B のようになり、未分化培養液側の GFP の輝度値が大きく、分化培養液側の輝度値が小さくなっていることがわかる。他の層流パターンとして図 3.4-2C の用に培養液を送液すると、細胞の GFP の輝度値分布は図 3.4-2D の様になっており、送液パターンに準ずるように分化状態もパターンされている。これらの結果は分化状態を空間的に制御できることを示している。

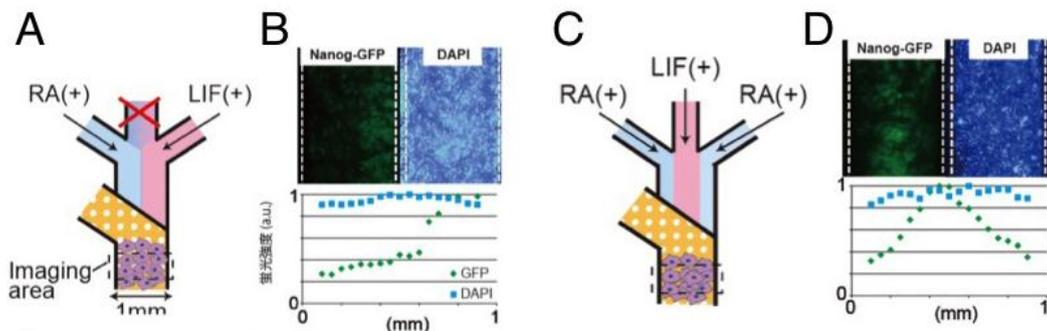


図 3.4-2 膜を有するデバイス上での多能性幹細胞の液性条件による分化・未分化制御.

ii) インサート型デバイスを用いた三次元構造体に対する液性条件による分化制御法(三次元)

本研究では、インサートの底面に直径数百 μm の孔を有する PDMS の薄膜を有するデバイスを開発した(図 3.4-3A)。本インサートをウェルに乗せ、培養液を満たした後にスフェロイドをインサート内に入れると、静水圧によってインサート側からウェル側に流れが発生する。これにより、スフェロイドは流れによって孔付近まで輸送され、最終的に孔の直径より大きいスフェロイドは孔上に固定される(図 3.4-3B)。スフェロイドが固定された後、異なる培養液を満たしたウェルにインサートを移すことで、スフェロイドに対して膜の上下で異なる培養液を作用させることができる。実験ではマウス iPS 細胞(未分化マーカー Nanog のレポーターとして GFP が発現する細胞株)由来の胚様体を用い、胚様体を形成した後、インサート側に分化培養液(神経分化培養液、RHB-A 培養液、StemCells, Inc.)、ウェル側に未分化維持培養液(ESGRO-2i Medium, Merck Millipore)を入れた系で 4 日間培養を行い、最後にインサート内の胚様体を培養皿に取り出し、観察を行った。固定された胚様体は細胞増殖により膜の上下で大きくなるため、最終的に分節型の胚様体となる(図 3.4-3C)。培養後に観察を行った結果、図 3.4-3D に示すように胚様体は分化培養液に曝されていた部位(インサート側)は Nanog が低発現で、未分化維持培養液に曝されていた部位(ウェル側)は Nanog の高発現であった。この結果から、本デバイスを用いることで、一つの胚様体に対して部位特異的に分化状態と未分化状態を誘導できることが示された。

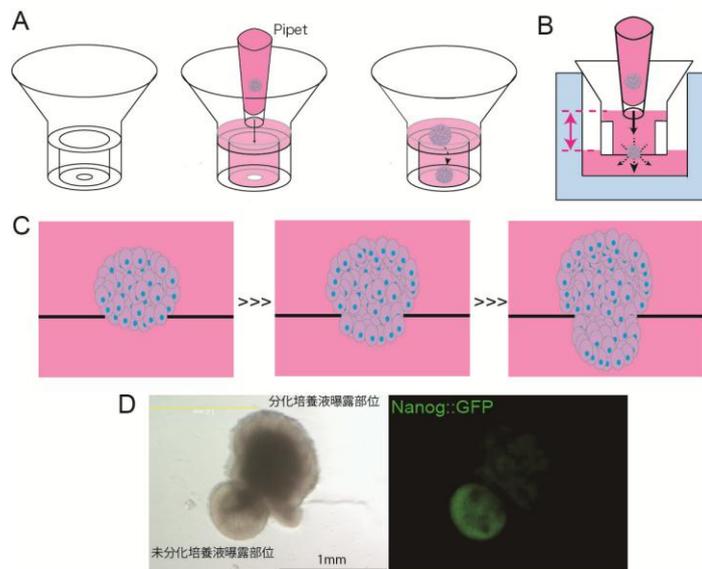


図 3.4-3 インサート型デバイスを用いた三次元構造体分化・未分化制御.

【接着条件制御法の確立】

細胞の接着条件を空間特異的に制御するため、人工ペプチドをデバイス内部の膜上に部位特異的に固相化する方法を確立する。液性条件制御法と同様の方法を用いて、膜上部の流路内部に層流を形成し、各層に異なる種類のペプチドを導入することによって、ペプチドを縞状にパターンニングすることを試みる。また、種々の細胞外マトリックスの細胞接着活性を持つアクティブドメインを切り出した3種類のペプチドと、がん研芝グループが取得したEpCAM結合ペプチド(Ep114)ならびにIGF1-R結合ペプチド(IGF-1R)を固相化した表面を持つマイクロウェル上で多能性幹細胞(Nanog-GFP マウス iPS 細胞)を培養し、その表面を評価した。

膜を有するデバイスの内部に部位特異的にペプチドを固相化することによって接着条件を制御する方法についてモデルペプチドを用いて検討を行った。具体的にはデバイス上層流路にFITC(緑蛍光)で修飾したペプチド(DMPGTVLPK)とRodamine -B(赤蛍光)で修飾したペプチド(GRGDSPK)とをそれぞれ含有する2種類の溶液からなる層流を形成して、これら異なる種類のペプチドを流路内に固相化することを試みた。その結果、図 3.4-4 に示すように、2種類の異なるペプチドを部位特異的に固相化できることが確認された。また、bone sialoprotein および vitronectin 由来のペプチドを固相化した膜表面で、多能性幹細胞(Nanog-GFP マウス iPS 細胞)が培養を試みたところ、ペプチド固相化膜表面で培養が可能であることを確認した。上記培養系で観察された未分化マーカーである Nanog-GFP 由来の蛍光シグナルの分布からは bone sialoprotein 由来ペプチド固相化表面が、vitronectin 固相化表面よりも、未分化維持に効果を持つ可能性が示唆された。これら一連の検討により、ペプチドを部位特異的に固相化して、空間的に特性の異なるパターン化された人工バイオ界面が形成できることを確認した。

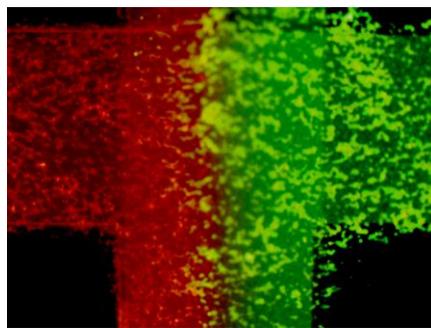
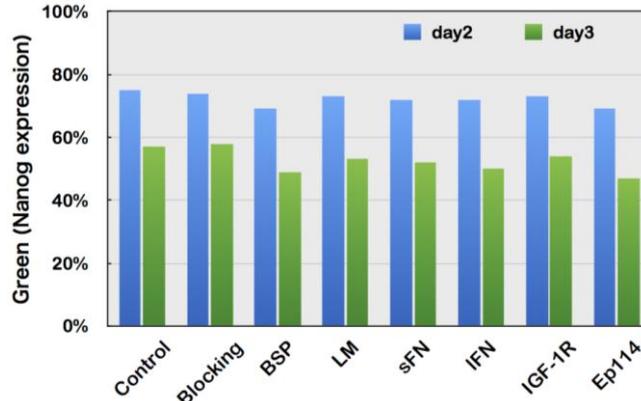


図 3.4-4. 層流を用いたペプチドの部位特異的固相化. 流路幅は 1mm.
(赤:Rodamine-B修飾ペプチド、緑:FITC修飾ペプチド)

多能性幹細胞(Nanog-GFPマウスiPS細胞)のペプチド表面での培養(未分化維持培地)では、図 3.4-5 に示すように、がん研芝グループが取得した Ep114 を固相化した表面では、LM(ラミニン由来ペプチド)、sFN(フィブロネクチン由来ペプチド)を固相化した表面などと同程度の細胞接着性を示すとともに、Nanog-GFP 由来の蛍光シグナルが減少していたことから、Ep114 固相化表面が分化誘導培養に効果を持つ可能性が示唆された。



3.4-5. 各種ペプチド表面で培養されたマウス iPS 細胞の Nanog-GFP 発現量。

3.5 がん転移 Showcase の構築(東京大学 藤井グループ)

静置系については、まず、肝由来細胞(Hep G2)を含むコラーゲンゲル上に周皮細胞(10T1/2)と肝類洞内皮細胞(TMNK-1)を階層的に培養するモデル肝組織を作製した。その内皮側表面にヒト膵臓ガン由来でラットにおいて高い肝転移能を示す MIA PaCa-2 と低い転移能しか示さない BxPC-3 の付着性を調べたところ、周皮細胞が存在する場合のみに *in vivo* の転移能との相関が得られた。TMNK-1 の代わりに臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)を用いても、同様に周皮細胞の影響が観測された。そこで、血管内皮への癌細胞の転移への関与が示されている様々な表面抗原について、それぞれに対する抗体処理で同様の癌細胞付着実験を行うと、類洞内皮に多く発現する VAP-1 と ICAM-1 の高い関与が TMNK-1 被覆モデルでは観測されたが、HUVEC 被覆モデルでは顕著ではなかったことから、製作した周皮細胞+肝類洞内皮細胞の階層的培養肝モデルは、肝特異的ながん細胞の転移を観測可能な系であることが示された(BioMed Research International 誌掲載)。

さらに、簡便なマイクロ流体デバイス(図 3.5-3)を用いて灌流条件下で同様の類洞内皮モデルについて、同じ2種の癌細胞の付着実験を行ったところ、静置培養で見られた両細胞の差異が拡大し(MIA PaCa-2 の付着が亢進)、*in vivo* の転移現象をより良く説明可能であることが示

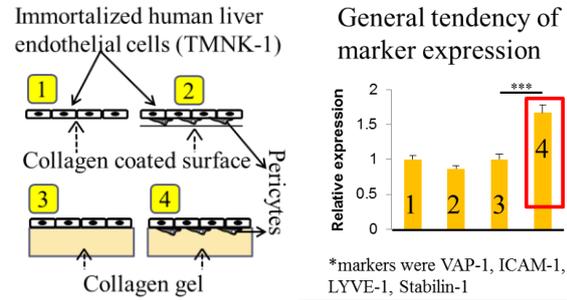


図 3.5-1. HepG3TMNK-1 と 10T1/2 の共培養系(左)と共培養系における VAP-1 と ICAM-1 の発現量(右)。

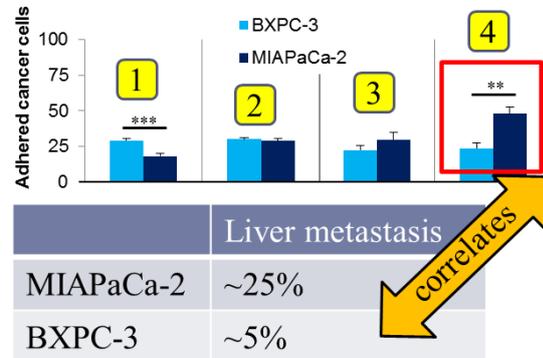


図 3.5-2. 共培養系における転移能評価結果。

唆された。

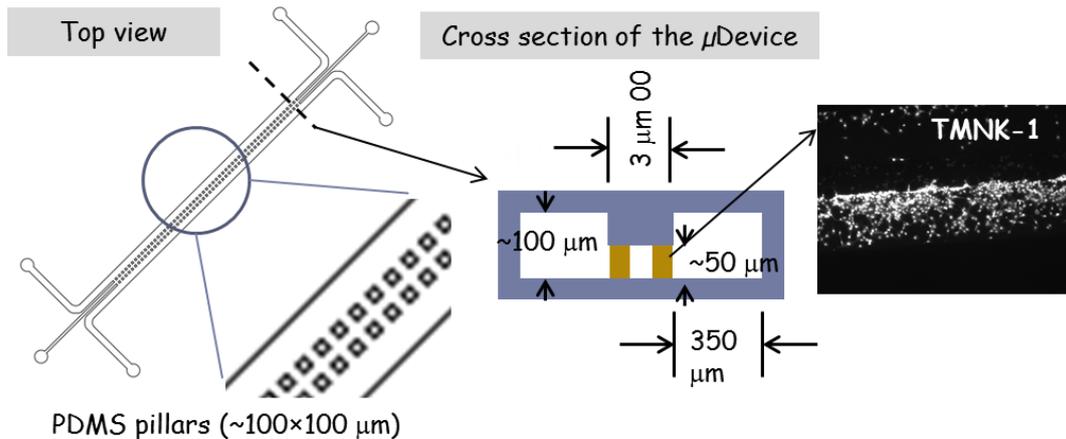


図 3.5-3. がん細胞転移能評価用マイクロ流体デバイス。

3.6 マイクロ流体診断デバイスの開発(東京大学 藤井グループ、宮原チーム)

研究実施内容及び成果

バイオ FET の拡張ゲート電極を集積したマイクロ流体デバイスを製作し、電極上に検出対象となる生体分子や細胞とアフィニティを持つ人工バイオ界面を形成することで、目的分子や目的細胞のリアルタイムに定量・計数するデバイスを開発するための共同研究を実施した。本研究項目は、当初の計画には含まれていなかったが、領域内での共同研究の可能性を探る中から、人工バイオ界面を有するマイクロ流体デバイスの応用の一形態として、宮原チームが有するバイオ FET 技術を統合した診断デバイスを着想したものである。具体的には、バイオ FET を集積化したマイクロ流体デバイスを製作し、その評価のための実験のセッアップを構築した。製作したデバイス上での糖鎖シアル酸定量や細胞計数を通じて、デバイス流路内の流れなどがバイオ FET の測定に及ぼす影響について調査を行ない、希少細胞捕捉デバイスにバイオ FET を導入し、バイオ FET で捕捉した CTC を計数するための基礎的な検討を行った。

3.7 エレクトロアクティブマイクロチャンバアレイの開発(東京大学 藤井グループ、野地チーム)

研究実施内容及び成果

実施方法・実施内容・成果

ES/iPS 細胞の分化誘導を時空間的に制御する際に、細胞の分化状態を定量的にモニタリングするため、単一細胞レベルで、その内容物を解析する方法を考える必要がある。従来の細胞成分分析は細胞集団を対象とするため、反応体積は数 100 μL 程度であり、単一細胞の内容物を取り出すと大幅に希釈されてしまうため、その定量分析は極めて困難である。これに対し、細胞内容物を微小な体積のマイクロチャンバに閉じ込める方法を用いれば、単一細胞の内容物を希釈することなく、定量的な測定を行うことができる。以上のような着想から、野地チームとの領域内共同研究として、単一細胞内容物の解析のためのエレクトロアクティブマイクロチャンバアレイの開発を行った。具体的には、マイクロチャンバアレイに数百～数千個の ES/iPS 細胞を一つずつ捕捉し、それぞれ単一細胞レベルでの計測を行うことによって、細胞集団の分化状態を定量的にモニタリングすることを試みる。解析ターゲットとしては、iPS 細胞の分化状態を考え、未分化マーカーの発現分布変化を捉えるこ

とを目標とする。マイクロチャンバアレイに数千個の細胞を一つずつ捕捉するため、9 mm² に 3500 個のマイクロチャンバを有するデバイスを開発した。マイクロチャンバの底面部分に電極があるため、解析対象細胞を誘電泳動によって効率よくチャンバ内にトラップすることが可能であり、エレクトロポレーションによって細胞の内容物を取り出すことができる(図 3.7-1a)。このデバイスを用い、未分化マーカーと同期するマーカー遺伝子(GFP)を発現する iPS 細胞を一つずつ捕捉し、それぞれ一細胞レベルでの GFP 発現量の定量計測を行うことによって、細胞集団の分化状態を定量的にモニタリングした。培養された iPS 細胞をデバイス内に注入した後、マイクロチャンバ内の電極に交流電圧をかけると、誘電泳動によって浮遊する細胞がマイクロチャンバ内に捕捉される。マイクロチャンバを閉める後、捕捉された細胞に強いパルス電圧をかけると、エレクトロポレーションによって細胞内容物を取り出すことが可能であることを確認した。マイクロチャンバ内の細胞内容物は希釈されず高い濃度であるため、1 細胞内容物の測定が可能である。さらに、マイクロチャンバの体積は一定であるため、測定対象物質(GFP)の検量線を用いて定量的な精密測定が可能である。このエレクトロアクティブマイクロチャンバアレイを用い、分化誘導された細胞集団の GFP 発現量分布の定量的測定を一細胞レベルで達成した(図 3.7-1b)。具体的には、同じ条件で培養された iPS 細胞の中でも、GFP の発現量は 5×10^5 から 3×10^6 分子/細胞で幅広い分布することを確認した。さらに、iPS 細胞が分化すると未分化マーカーの発現量の平均値が減ることだけでなく、未分化マーカーの発現量分布の幅も狭くなることを確認した。

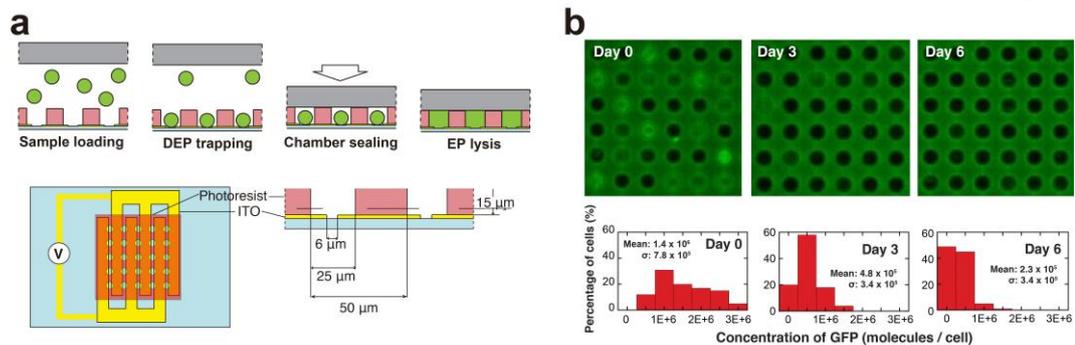


図 3.7-1. エレクトロアクティブマイクロチャンバアレイのコンセプトと構造(a)、iPS 細胞集団の GFP 発現量分布の変化(b)

成果の位置づけ

本研究項目は、ES/iPS 細胞の分化誘導に関する実験を行う際に、細胞集団としての平均的な挙動を解析するだけでなく個々の細胞レベルでの分化状態を調べ、その分布を把握することを目的として、野地チームとの領域内共同研究として追加したもので、当初計画では想定されていなかった研究項目である。前述のように、マイクロチャンバアレイに数百～数千個の iPS 細胞を一つずつ捕捉し、エレクトロポレーションによって iPS 細胞の内容物を取り出すことで、未分化マーカーの発現量の定量的に測定することに成功した。このエレクトロアクティブマイクロチャンバアレイをさらに改良することによって、分化誘導 Showcase によって時空間的に制御された ES/iPS 細胞の分化状態のモニタリングだけでなく、分化誘導蛋白質の発現量の定量測定など、細胞分化に関わる様々な解析に適用可能である。なお、エレクトロアクティブマイクロチャンバアレイの基本技術(Kim et al., Small, 2011)や分化誘導状態の解析(Kim et al., Lab Chip, 2014)については学術論文として出版された。また、1細胞解析に関する書籍(Kim, et al., Single-Cell Analysis Methods and Protocols, Springer Protocols, 2012)に分担執筆者として招かれるなど、国際的に高く評価されている。また、患者から採取した CTC やがんの組織などの臨床サンプルを用いた解析への応用によって、個々の患者の病態を反映したオーダーメイド医療への展開が期待される。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 件、国際(欧文)誌 74件)

1. Sano K, Minamisawa T, Shiba K: Autonomous silica-encapsulation and sustained-release of anti-cancer protein, *Langmuir* 26(4) : 2231-2234 (2010) DOI: 10.1021/la9045226
2. Chowdhury, M.M., Katsuda, T., Montagne, K., Kimura, H., Kojima, N., Akutsu, H., Ochiya, T., Fujii, T., and Sakai, Y., “Enhanced effects of secreted soluble factor preserve better pluripotent state of embryonic stem cell culture in a membrane-based compartmentalized micro-bioreactor”, *Biomed. Microdev.*, Vol. 12, No.6, pp.1097-1105, 2010 (DOI: 10.1007/s10544-010-9464-8).
3. Sasaki, N., Hirano, T., Kobayashi, K., Toyoda, M., Miyakawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Akutsu, H., Umezawa, A., and Nishihara, S., “Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells”, *Biochem, Biophys, Res. Commun.*, Vol.401, No.3, pp. 480-486, 2010 (DOI:10.1016/j.bbrc.2010.09.085).
4. Nishino, K., Toyoda, M., Yamazaki-Inoue, M., Makino, H., Fukawatase, Y., Chikazawa, E., Takahashi, Y., Miyagawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Akutsu, H., and Umezawa, A., “Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts”, *PLoS One*, Vol.5, No.9, pp.e13017, 2010 (DOI: 10.1371/journal.pone.0013017).
5. Adachi, T., Wang, X., Murata, T., Obara, M., Akutsu, H., Machida, M., Umezawa, A., and Tomita, M., “Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture”, *Biotechnol. Bioeng.*, Vol.106, No. 6, pp.860-870, 2010 (DOI: 10.1002/bit.22752).
6. Stadtfeld, M., Apostolou, E., Akutsu, H., Fukuda, A., Follett, P., Natesan, S., Kono, T., Shioda, T., and Hochedlinger, K., “Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells”, *Nature*, Vol.465, No.7295, pp. 175-181, 2010 (DOI: 10.1038/nature09017).
7. Yamada, M., Hamatani, T., Akutsu, H., Chikazawa, N., Kuji, N., Yoshimura, Y., and Umezawa, A., “Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development”, *Hum. Mol. Genet.*, Vol.19, No.3, pp.480-493, 2010 (DOI: 10.1093/hmg/ddp512)
8. Ken-Ichi Sano, Tamiko Minamisawa and Kiyotaka Shiba, “Autonomous Silica Encapsulation and Sustained Release of Anticancer Protein”, *Langmuir* vol. 26, No.4, pp. 2231-2234, 2010 (DOI: 10.1021/la9045226)
9. Toru Tsuji, Yuya Oaki, Masao Yoshinari, Takashi Kato and Kiyotaka Shiba, “Motif-programmed Artificial Proteins Mediated Nucleation of Octacalcium Phosphate on the Titanium Substrates”, *Chemical Communications*, vol. 46, No.36, pp. 6675-6677, 2010 (DOI: 10.1039/C0CC01512A, Communication)
10. Kaneda, S., Ono, K., Fukuba, T., Nojima, T., Yamamoto, T., and Fujii, T., “Pneumatic handling of droplets on-demand on a microfluidic device for seamless processing of reaction and electrophoretic separation”, *Electrophoresis*, Vol.31, pp.3719-3726, 2010 (DOI 10.1002/elps.201000295)
11. Ono, K., Kaneda, S., Shiraishi, T., and Fujii, T., “Optofluidic Tweezer on a Chip”, *Biomicrofluidics*, Vol.4, 043012, 2010 (DOI:10.1063/1.3509436)
12. Evenou, F., Fujii, T. and Sakai, Y., “Spontaneous formation of highly functional three-dimensional multilayer from human hepatoma Hep G2 cells cultured on an oxygen-permeable polydimethylsiloxane membrane”, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(2):311-318 (2010). (doi:10.1089/ten.tec.2009.0042)
13. Matsui, H., Osada, T., Moroshita, Y., Sekijima, M., Fujii, T., Takeuchi, S., and Sakai, Y., “Rapid and Enhanced Repolarization in Sandwich-cultured Hepatocytes on an Oxygen-permeable Membrane”, *Biochem. Eng. J.*, 52, 255-262 (2010). (doi: 10.1016/j.bej.2010.08.018)
14. Toru Tsuji, Kazuo Onuma, Akira Yamamoto, Mayumi Iijima and Kiyotaka Shiba, “Physicochemical Properties of Artificial Proteins that Accelerate Nucleation of Crystalline Calcium Phosphate”, *Journal of Crystal Growth*, Vol.314, Issue 1, pp. 190-195 (2011)

- (doi:10.1016/j.jcrysgro.2010.10.167)
15. Nakao, Y., Kimura, H., Sakai, Y., and Fujii, T., "Bile Canaliculi Formation by Aligning Rat Primary Hepatocyte in a Microfluidic Device", *Biomicrofluidics*, Vol. 5, Issue 2 (2011) 022212, selected for the July 1, 2011 issue of *Virtual Journal of Biological Physics Research* (doi:10.1063/1.3580753)
 16. Kim, S. H., Yamamoto, T., Fourmy, D., and Fujii, T., "Electroactive microwell arrays for highly efficient single-cell trapping and analysis", *Small*, Vol.7, No.22, pp. 3239–3247, 2011 (DOI: 10.1002/smll.201101028)
 17. Kaneda, S., Ono, K., Fukuba, T., Nojima, T., Yamamoto, T., and Fujii, T., "A Rapid Method for Optimizing Running Temperature of Electrophoresis through Repetitive On-Chip CE Operations", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.12, pp. 4271-4281, 2011 (DOI:10.3390/ijms12074271)
 18. Niino, T., Hamajima, D., Montagne, K., Oizumi, S., Naruke, H., Huang, H., Sakai, Y., Kinoshita, H., and Fujii, T., "Laser Sintering Fabrication of Three-dimensional Tissue Engineering Scaffolds with a Flow Channel Network", *Biofabrication*, Vol. 3, 034104, 2011 (DOI:10.1088/1758-5082/3/3/034104)
 19. Evenou, F., Hamon, M., Fujii, T., Takeuchi, S., and Sakai, Y., "Gas-permeable Membrane and Co-culture with Fibroblasts Enable High-density Hepatocyte Culture as Multilayered Liver Tissues", *Biotechnology Progress*, Vol.27, No.4, pp.1146-1153, 2011 (DOI 10.1002/btpr.626)
 20. Evenou, F., Couderc, S., Kim, B.-J., Fujii, T., and Sakai, Y., "Microfibrillated Cellulose Sheets Coating Oxygen-Permeable PDMS Membranes Induce Rat Hepatocytes 3D Aggregation into Stably-Attached 3D Hemispheroids", *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol.22, No.11, pp. 1509-1522(14), 2011 (DOI:10.1163/092050610X513242)
 21. Ostrovidov, S., Sakai, Y. and Fujii, T., "Integration of a Pump and an Electrical Sensor into a Membrane-based PDMS Microbioreactor for Cell Culture and Drug Testing", *Biomedical Microdevices*, Vol.13, pp.847-864, 2011 (DOI 10.1007/s10544-011-9555-1)
 22. Komori, K., Fujii, S., Montagne, K., Nakamura, H., Kimura, H., Otake, K., Fujii, T., and Sakai, Y., "Development of the Well of the Well System-Based Embryo Culture Plate with an Oxygen Sensing Photoluminescent Probe", *Sens. Actuators B*, 162, pp.278-283 2012 (DOI :10.1016/j.snb.2011.12.078).
 23. Murakami, T., Kashiwagi, K., and Shiba, K., "Creation of novel signalling modulators from existing cytokine using scanning motif-programming", *Chem Comm* vol. 47, No.33, pp. 9357-9359, 2011 (DOI: 10.1039/C1CC12214B)
 24. Kasai, T., Matsumura, S., Iizuka, T., Shiba, K., Kanamori, T., Yudasaka, M., Iijima, S., and Yokoyama, A., "Carbon nanohorns accelerate bone regeneration in rat calvarial bone defect", *Nanotechnol* 22: 065102 (8pp), 2011 (DOI: doi:10.1088/0957-4484/22/6/065102)
 25. Matsumura, S., Aoki, I., Saga, T., and Shiba, K., "A tumor-environment-responsive nanocarrier that evolves its surface properties upon sensing matrix metalloproteinase-2 and initiates agglomeration to enhance T2 relaxivity for magnetic resonance imaging", *Mol Pharm* 8(5): 1970-1974, 2011 (DOI: 10.1021/mp2001999)
 26. Nishino, K., Toyoda, M., Yamazaki-Inoue, M., Fukawatase, Y., Chikazawa, E., Sakaguchi, H., Akutsu, H., and Umezawa, A., "DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time", *PLoS Genet.* 7(5), e1002085, 2011 (DOI: 10.1371/journal.pgen.1002085)
 27. Nishi, M., Akutsu, H., Masui, S., Kondo, A., Nagashima, Y., Kimura, H., Perrem, K., Shigeri, Y., Toyoda, M., Okayama, A., Hirano, H., Umezawa, A., Yamamoto, N., Lee, S.W., Ryo, A., "A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency", *J Biol Chem.* 286(13), pp.11593-11603, 2011 (DOI: 10.1074/jbc.M110.187989)
 28. Toyoda, M., Yamazaki-Inoue, M., Itakura, Y., Kuno, A., Ogawa, T., Yamada, M., Akutsu, H., Takahashi, Y., Kanzaki, S., Narimatsu, H., Hirabayashi, J., and Umezawa, A., "Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells", *Genes Cells.* 16(1), pp.1-11, 2011 (DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01459.x)
 29. Gokoh, M., Nishio, M., Nakamura, N., Matsuyama, S., Nakahara, M., Suzuki, S., Mitsumoto, M., Akutsu, H., Umezawa, A., Yasuda, K., You, A., Saeki, K., "Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells.", *Cell Reprogram.* 13(4),

- pp.361-370, 2011 (DOI: 10.1089/cell.2011.0004)
30. Takezawa, Y., Yoshida, K., Miyado, K., Sato, M., Nakamura, A., Kawano, N., Sakakibara, K., Kondo, T., Harada, Y., Ohnami, N., Kanai, S., Miyado, M., Saito, H., Takahashi, Y, Akutsu, H., and Umezawa, A.” Beta-catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion”, *Sci Rep* 1, 68, 2011 (DOI: 10.1038/srep00068)
 31. Egli, D., and Akutsu, H., Aging of the Female Reproductive System. *J Mamm Ova Res.* 28: pp.118-125, 2011 (10.1274/jmor.28.118)
 32. Kaneda, S., Ono, K., Fukuba, T., Nojima, T., Yamamoto, T., and Fujii, T., “Changing the Surface Property in PDMS-Glass Hybrid Microfluidic Devices”, *Analytical Sciences*, Vol.28, pp.39-44, 2012
 33. Chowdhury, M.M., Kimura, H., Fujii, T., and Sakai, Y., “Induction of alternative fate other than default neuronal fate of embryonic stem cells in a membrane-based two-chambered microfluidic device by cell-secreted BMP4”, *Biomicrofluidics*, Vol.6, 014117, 2012 (DOI: 10.1063/1.3693590)
 34. Sugawara, T., Nishino, K., Umezawa, A., and Akutsu, H.,” Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells”, *Stem Cell Res Ther.* 3, 8, 2012 (10.1186/srct99)
 35. Kawada, J., Kimura, H., Akutsu, H., Sakai, Y., and Fujii, T.” Spatiotemporally controlled delivery of soluble factors for stem cell differentiation”, *Lab on a Chip* (2012) 12, pp.4508-4515, 10.1039/C2LC40268H
 36. Desbois, L, Padirac, A., Kaneda, S., Genot, A., Rondelez, Y., Hober, D., Collard, D., and Fujii, T.,” A Microfluidic Device for On-chip Agarose Microbead Generation with Ultralow Reagent Consumption”, *Biomicrofluidics*, Vol.6 (2012) 044101 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4758460>)
 37. M. Hamon, S. Hanada, T. Fujii, and Y. Sakai, ”Direct oxygen supply with polydimethylsiloxane (PDMS) membranes induces a spontaneous organization of thick heterogeneous liver tissues from rat fetal liver cells in vitro,” *Cell Transplant.*, 21(2-3), 401-410 (2012).
 38. H. Matsui, S. Takeuchi, T. Osada, T. Fujii, Y. Sakai, “Enhanced bile canaliculi formation enabling direct recovery of biliary metabolites of hepatocytes in 3D collagen gel microcavities,” *Lab on-a-Chip*, 12, 1857-1864 (2012).
 39. Komori K, Fujii S, Montagne K, Nakamura H, Kimura H, Otake K, Fujii T and Sakai Y. Development of the Well of the Well System-Based Embryo Culture Plate with an Oxygen Sensing Photoluminescent Probe, *Sens. Actuators B*, 162, pp.278-283 2012 (DOI :10.1016/j.snb.2011.12.078).
 40. T. Katsuda, T. Teratani, M. M. Chowdhury, T. Ochiya, and Y. Sakai., “Hypoxia efficiently induces differentiation of mouse embryonic stem cells into endodermal and hepatic progenitor cells,” *Biochem. Eng. J.*, 74, 95-101 (2013).
 41. M. M. Chowdhury, T. Fujii and Y. Sakai, “Importance of a diffusion-dominant small volume to activate cell-secreted soluble factor signaling in embryonic stem cell culture in microfluidic devices: A mathematical model based study,” *J. Biosci. Bioeng.* 116(1):118-125 (2013).
 42. Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Transl Med.* 2, pp.265-273, 2013.
 43. Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T., Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells. *BMC Genetics*, 14, pp.32, 2013.
 44. Kobayashi H, Yanagisawa E, Sakashita A, Sugawara N, Kumakura S, Ogawa H, Akutsu H, Hata K, Nakabayashi K, Kono T., Epigenetic and transcriptional features of the novel human imprinted lncRNA GPR1AS suggest it is a functional ortholog to mouse Zdbf2linc”*Epigenetics*, 8, pp.635-645, 2013.
 45. Okumura N, Akutsu H, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A., β -Catenin Functions

- Pleiotropically in Differentiation and Tumorigenesis in Mouse Embryo-Derived Stem Cells, *PLoS One*, 8, e63265, 2013.
46. Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Nakamura KI, Takubo K., Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization, *Tissue and Cell*, 45, pp.407-413, 2013.
 47. Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S., A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, *Journal of Cell Science*, 126, pp.5391-5399, 2013.
 48. Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome K, Inoue N, Fujiwara S. Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Herpesviridae*, 4, 2, 2013.
 49. Plessy, C., Desbois, L., Fujii, T., and Carninci, P., "Population transcriptomics with single-cell resolution: A new field made possible by microfluidics", *BioEssays* Vol. 35, Issue 2 (2013) pp.131-140
 50. Ono, K., Kaneda, S., and Fujii, T., "Single-step capillary electrophoresis for miniaturized and easy-to-use system", *Electrophoresis*, Vol.34, Issue 6 (2013) pp.903-910
 51. Kim, S.H., Yoshizawa, S., Takeuchi, S., Fujii, T. and Fourmy, D., "Ultra-high density protein spots achieved by on chip digitalized protein synthesis", *Analyst*, Vol.138, Issue16 (2013) pp. 4663-4669
 52. He, X., Kimura, H., and Fujii, T., "A High-throughput Device for Patterned Differentiation of Embryoid Bodies", *Journal of Robotics and Mechatronics*, Vol.25, No.4 (2013) pp.623-630
 53. Yamaoka, S., Ito, N., Ohka, S., Kaneda, S., Nakamura, H., Agari, T., Masatani, T., Nakagawa, K., Okada, K., Okadera, K., Mitake, H., Fujii, T., and Sugiyama, M., "Involvement of Rabies Virus Phosphoprotein Gene in Neuroinvasiveness", *Journal of Virology*, Vol.87, No.22 (2013) pp.12327-12338
 54. Chowdhury, M.M., Danoy, M., Rahman, F., Shinohara, M., Kaneda, S., Shiba, K., Fujita, N., Fujii, T., Sakai, Y. "Adhesion of pancreatic cancer cells in a liver-microvasculature mimicking co-culture correlates with their propensity to form liver-specific metastasis in vivo" *Biomed Res Int* 2014: Article ID 241571 2014
 55. Matsumura, S., Yuge, R., Sato, S., Tomida, A., Ichihashi, T., Irie, H., Iijima, S., Shiba, K., Yudasaka, M. "Ultrastructural localization of intravenously injected carbon nanohorns in tumor" *Int J Nanomedicine* 9(1): 3499-3508 2014
 56. Ito, M., Hayashi, K., Adachi, E., Minamisawa, T., Homma, S., Koido, S., Shiba, K. "Combinatorial contextualization of peptidic epitopes for enhanced cellular immunity" *PLOS ONE*: in press 2014
 57. Shinohara, M., Kimura H., Montagne, K., Komori, K., Fujii, T., and Sakai, Y., "Combination of microwell structures and direct oxygenation enables efficient and size-regulated aggregate formation of an insulin-secreting pancreatic β -cell line", *Biotechnology Progress* (2014) pp.178-187.
 58. Nakayama, H., Kimura, H., Fujii, T., and Sakai, Y., "Image-based evaluations of distribution and cytotoxicity of Irinotecan (CPT-11) in a multi-compartment micro-cell coculture device", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117, 756-762 (2014). (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.11.019)
 59. Horiguchi, M. M. Chowdhury, Y Tabata, Y. Sakai., "Proliferation, morphology and pluripotency of mouse induced pluripotent stem cells (iPSCs) in three different types of alginate beads for mass production," *Biotechnol. Prog.*, 30(4), 896-904 (2014).
 60. Y. Tabata, I. Horiguchi, M. P. Lutolf and Y. Sakai, "Development of bioactive hydrogel capsules for the 3D expansion of pluripotent stem cells in bioreactors," *Biomat. Sci.*, 2, 176-183 (2014).
 61. Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S., An Efficient Method for Differentiation of Human Induced

- Pluripotent Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells Retaining Drug Metabolizing Activity, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 29, pp.237-243, 2014.
62. Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW and Ryo A. "Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors." *Oncogene*, 33: pp. 643-652, 2014.
 63. Ichida JK, TCW J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, Umezawa A, Rubin LL, Bradner JE, Akutsu H[#], Meissner A[#], Eggan K[#] ([#];corresponding author). "Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells." *Nat Chem Biol*, 10: pp.632-639, 2014.
 64. Nishi M, Akutsu H, Kudoh A, Kimura H, Yamamoto N, Umezawa A, Lee SW, Ryo A. "Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell." *Oncotarget*, 5: pp.8665-8680, 2014.
 65. Kim, S.-H., He, X., Kaneda, S., Kawada, J., Fourmy, D., Noji, H., and Fujii, T., "Quantifying Genetically Inserted Fluorescent Protein in Single iPS Cells to Monitor Nanog Expression Using Electroactive Microchamber Arrays", *Lab on a Chip*, Vol.14 (2014) pp. 730-736
 66. Hauser, P.V., Nishikawa, M., Kimura, H., Fujii, T., and Yanagawa, N., "Controlled Tubulogenesis from Dispersed Ureteric Budderived Cells Using a Micropatterned Gel", *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (2014) published online, DOI:10.1002/term.1871
 67. Kimura, H., Ikeda, T., Nakayama, H., Sakai, Y., and Fujii, T., "An On-chip Small Intestine-Liver Model for Pharmacokinetic Studies", *Journal of Laboratory Automation* (2014) doi:10.1177/2211068214557812
 68. Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J. "Removal of Reprogramming Transgenes Improves the Tissue Reconstitution Potential of Keratinocytes Generated From Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Stem Cells Transl Med.*, 3: pp.992-1001, 2014.
 69. Okamoto N, Aoto T, Uhara H, Yamazaki S, Akutsu H, Umezawa A, Nakauchi H, Miyachi Y, Saida T, Nishimura EK. "A melanocyte-melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin." *Pigment Cell Melanoma Res*, 27: pp.1039-1050, 2014.
 70. Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T. "Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Enterocyte-Like Cells Using a Simple Method." *Drug Metab Pharmacokinet*, 29: pp.44-51, 2014.
 71. Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A, "The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice." *Nature communications*, 5: 5464, 2014.
 72. Akutsu H, Machida M, Kanzaki S, Sugawara T, Ohkura T, Nakamura N, Yamazaki-Inoue M, Miura T, Vemurib MC, Rao MS, Miyado K, Umezawa A, "Xenogeneic-free defined conditions for derivation and expansion of human embryonic stem cells with mesenchymal stem cells." *Regenerative Therapy*, 1:pp.18-29, 2015.
 73. Tozawa H, Maekawa T, Kimura H, and Fujii T, "A novel effect of parylene-based surface coating on HepG2 cell function", *Mater Sci Eng C* 46:190-194, 2015.
 74. C. Provin, A. Nicolas, S. Grégoire, T. Fujii, "A Microfluidic Diffusion Cell for Fast and Easy Percutaneous Absorption Assays", *Pharm Res* (2015) doi:10.1007/s11095-015-1654-x

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 木村啓志, 酒井康行, 藤井輝夫, "多孔質膜を有するマイクロチップによる細胞アッセイ", *膜学会誌*, Vol.32, No.6, pp.304-309, 11月, 2009年
2. 酒井康行, 藤井輝夫, 新野俊樹, 再生医療への化学工学の寄与可能性—組織設計・構築と育成—, *再生医療*, 9(3), 361-366 (2010).
3. 芝 清隆, "モチーフ・プログラムド人工タンパク質の医療分野での応用" *YAKUGAKU*

- ZASSHI 129(11) (2009) 1295-1303.
4. 藤井輝夫 (東大), “マイクロ流体デバイスを用いた細胞・組織 Showcase 構築の試み”, 細胞工学, Vol.29, No.4, 3月22日発刊 (2010年)
 5. 紀ノ岡正博, 酒井康行監修, “細胞治療・再生医療のための培養システム”, シーエムシー出版, 大阪 (2010).
 6. Sakai, Y., Huang, H., Hanada, S., Niino, T., “Toward engineering of vascularized three-dimensional liver tissue equivalents possessing a clinically-significant mass”, *Biochem. Eng. J.*, 48, 348-361 (2010). (doi: 10.1016/j.bej.2009.10.010).
 7. Y. Sakai, M. Nishikawa, F. Evenou, M. Hamon, H. Huang, K. P. Montagne, N. Kojima, T. Fujii and T. Niino, In “Liver Stem Cells”, *Engineering of implantable liver tissues (分担執筆)*, Ed. by T. Ochiya, Hamana Press, pp.189-216 (2011).
 8. 勝田毅, 酒井康行, 落谷孝広, “脂肪由来幹細胞による細胞治療の可能性”, *実験医学*, 29(19), 3102-3108 (2011).
 9. 阿久津英憲, 梅澤明弘: 「クローン技術を応用するヒトES細胞の可能性」 *母子保健情報*, 66:80-84, 2012.
 10. 阿久津英憲, 川田治良, 藤井輝夫: 「多能性幹細胞とマイクロデバイスのインテグレーション・アプリケーションの可能性」 *バイオマテリアル-生体材料-*, 30(4), 242-244, 2012.
 11. 阿久津英憲, 福田篤, Dieter Egli. 「クローン胚からのES細胞作製」 *実験医学*, 30(10), 1621-1625, 2012.
 12. 阿久津英憲, 福田篤. 「生殖細胞の分化誘導」 *Medical Science Digest*, 38(6), 253-256, 2012.
 13. 酒井康行, 藤井輝夫, 高酸素透過性シリコーン膜上での重層化細胞シート構築, *膜*, 37(3), 119-124 (2012).
 14. 木村啓志, 酒井康行, 藤井輝夫: “マイクロ流体デバイス技術を応用した *in vitro* 生体モデルの構築”, *先端バイオマテリアルハンドブック*, エヌティーエス出版 (2012) pp.474-477
 15. Kim, S. H., Fourmy, D., and Fujii, T.:” Expanding the Horizons for Single-Cell Applications on Lab-on-a-Chip devices”, in “Single-Cell Analysis: Methods and Protocols”, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 853, Part 3, ed. by S. Lindstrom and H. Andersson, Humana Press (2012) pp. 199-210
 16. 阿久津英憲, 川崎友之, 梅澤明弘: “第3章 「ES/iPS細胞の培養法」”, *The Frontiers in Life Sciences 幹細胞研究と再生医療*, 中内啓光 (編集) 南山堂 pp.35-41, 2013.
 17. 阿久津英憲, 梅澤明弘: 「ES細胞-その基礎と臨床応用に向けた展望-」 *整形・災害外科(再生医療の現況と最前線)*, 56(5), 金原出版, pp.501-506, 2013.
 18. 堀口一樹, 酒井康行, ハイドロゲルカプセルを用いたiPS細胞の培養, *日本バイオマテリアル学会会誌*, 31(3), 171-176 (2013).
 19. 酒井康行, 篠原満利恵, 小森喜久夫, 竹内昌治, 藤井輝夫, 将来のヒト影響評価体系のための理想的な生理学的培養組織モデル, *化粧品学会誌*, 37(4), 280-287 (2013).
 20. Collard, D., Kim, S.-H., Osaki, T., Kumemura, M., Kim, B.-J., Fourmy, D., Fujii, T., Takeuchi, S., Karsten, S. L., and Fujita, H., “Nano bio research approach by microtechnology”, *Drug Discovery Today*, Vol.18, No.11/12 (2013) pp.552-559
 21. 金田祥平, 荒木文子, 中村寛子, 藤井輝夫: “CTC 分離検出マイクロ流体デバイスの開発動向”, *生産研究*, Vol.65, No.3 (2013) pp.3-8
 22. 小林麻里奈, Soo Hyeon Kim, 金田祥平, 藤井輝夫: “単一CTC解析用マイクロチャンバアレイの開発”, *生産研究*, Vol.65, No.3 (2013) pp.9-11
 23. 阿久津英憲, 小野寺成実, 梅澤明弘: 「ヒトES/iPS細胞と生殖補助医療」 *産科と婦人科*, 81(3), 診断と治療社, 295-302, 2014.
 24. 阿久津英憲: 「挑戦する人これが私の医きる道(第3回)阿久津英憲」 *レジデントノート*, 15(18), 羊土社, 2014.
 25. 阿久津英憲・川崎友之: 「ES細胞とiPS細胞, どこがどう違うの?」 *Medical Technology*, 42 (9), 920-926, 2014.
 26. 堀口一樹, 卜部祐輔, 酒井康行, 幹細胞培養技術/培養装置の国内および世界的動向, 生

- 物工学会誌, 92(9), 469-472 (2014).
27. 酒井康行、篠原満利恵、小森喜久夫、藤井輝夫：“2) 酸素供給に基礎を置いた3次元組織設計構築”、遺伝子医学MOOK 別冊「細胞の3次元組織化」、メディカルドゥ(2014) pp.316-322.
 28. 阿久津英憲・川崎友之, 「ES細胞・iPS細胞の基本, ES細胞、iPS細胞で何ができるの? 何が変るの?」 Medical Technology, 42(10), 1037-1042; 2014.
 29. 阿久津英憲・川崎友之, 「ES細胞iPS細胞研究のこれから - 再生医療の実用化に向けたルールを学ぼう」 Medical Technology, 42(11), 1156-1159; 2014.
 30. 堀口一樹, 酒井康行, 「幹細胞の大量培養プロセスの効率化の検討 (分担執筆)」, 動物細胞の培養を成功させる条件設定集～細胞死・細胞凝集・増殖不良・不安定化対策集～, 高木睦編, 技術情報協会, 印刷中.

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 49 件、国際会議 36 件)

1. Kiyotaka Shiba (癌研), ”Fabrication of a 3-dimensional nano-structure using a peptide aptamer and a caged-protein”, 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium, The Korean Peptide and Protein Society, Jeju, Nov. 9 (2009 年)
2. 芝清隆 (癌研), “モチーフ・ペプチドのバイオマテリアルへの利用”, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会, 京都, 11 月 17 日 (2009 年)
3. 阿久津英憲 (成育), “幹細胞を用いた治療への応用”, Japan iPS Cell and Stem Cell Forum 2009 (ライフテクノロジーズジャパン), 東京, 11 月 20 日 (2009 年)
4. Kiyotaka Shiba, “Motif-programming” in polymer science”, 11th Pacific Polymer Conference, Cairns, Dec. 7 (2009 年)
5. 芝清隆, “人工ペプチド・人工タンパク質を用いたメディカルデバイスの作製”, 第 13 回 NAIST 科学技術セミナー, 奈良, 12 月 14 日 (2009 年)
6. 阿久津英憲 (成育), “ヒト ES 細胞と iPS 細胞の比較からみえてくるもの”ニューセラミックス懇話会バリエーションミックス分科会 28 回研究会, 大阪, 1 月 8 日 (2010 年)
7. 酒井康行、新野俊樹, “高代謝形臓器再構築のための担体デザインと三次元造形”, 第 22 回機械工学会バイオエンジニアリング講演会, 岡山, 1 月 9 日 (2010).
8. 阿久津英憲 (成育), “再生医学を導く幹細胞研究のいま”, 第 12 回日本成人先天性心疾患研究会市民公開講座, 大阪, 1 月 10 日 (2010 年)
9. 阿久津英憲 (成育), “ヒト iPS 細胞樹立と性質評価”, スーパー特区フォーラム in 大阪, 大阪, 1 月 15 日 (2010 年)
10. Teruo Fujii (東大), ”Cells and Tissues in Control – From embryos to stem cells”, Lorentz Workshop, Leiden, The Netherlands, Jan. 22 (2010 年)
11. 酒井康行, 亀田一平, 鈴木宏明, Fanny EVENOU, Morgan HAMON, 小森喜久夫, 松井等, 小島信彦, 山本尚子, 津田行子, 関島勝, 藤井輝夫, 竹内昌治, 化学物質の効果毒性評価のための肝組織構築, 第9回日本再生医療学会総会, 2010.3.18, 広島.
12. 藤井輝夫, “マイクロ流体システムのマイクロ化?!に向けて”, 第 21 回 化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 東京, 2010 年 6 月 11 日.
13. Akutsu, H., “Xeno-Free Growth and Expansion of Human Pluripotent Stem Cells”, Commercial Tutorial Directory; The 8th ISSCR Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, June 18, 2010 (Oral).
14. Kiyotaka Shiba, “Mineralization by Artificial Peptides and Proteins”, 4th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics, Yokohama, June 23, 2010
15. Akutsu, H., “Xeno-free Growth and Expansion of Human Pluripotent Stem Cells”, Symposium 7; The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Sapporo, September 3, 2010 (Oral).
16. 阿久津英憲, 「臨床グレード幹細胞樹立の試み」、第 28 回日本ヒト細胞学会学術集会シンポジウム, つくば市, 8 月 23 日, 2010.

17. 阿久津英憲、「網羅的発現解析から見出した ES 細胞と iPS 細胞の相関性と研究者」、第 28 回 JMAC ワーキンググループ会議、東京、9 月 22 日、2010。
18. 藤井輝夫、“マイクロ流体デバイスで代謝系を測る”、「細胞を創る」研究会 3.0、東京、2010 年 11 月 12 日。
19. 藤井輝夫、“マイクロ流体デバイスの応用展開とエレクトロニクス融合への期待”、豊橋技術科学大学エレクトロニクス先端融合研究所(EIIRIS) 開所記念国際シンポジウム、豊橋、2010 年 11 月 16 日。
20. Y. Sakai and T. Niino, “Importance of oxygen supply in liver tissue engineering: Scaffolds having flow channels, oxygen carriers and oxygen-permeable membranes”, BIT Life Sciences’ 3rd Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell-2010, Shanghai, Dec.5 (2010).
21. 阿久津英憲、「臨床応用に使える、ヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞とは何か?」、BTJ プロフェッショナルセミナー、東京、2010 年、12 月 21 日。
22. 芝清隆 「人工バイオ界面を用いたがん診断」 第 7 回ナノバイオ国際シンポジウム 2011 年 2 月 16 日 (東京)
23. 阿久津英憲、「ヒト ES 細胞の臨床応用を可能にする技術開発と課題」再生医療の実現化プログラム関連事業・公開ワークショップ、神戸、2011 年、2 月 17 日。
24. 阿久津英憲、「受精からの発生で理解する幹細胞生物学」日本生殖再生医学会第 6 回学術集会、東京、2011 年、3 月 13 日。
25. Shiba, K., Artificial Biomolecules for Nano- and Micro-Technologies, MMB2011, Lucern, Switzerland, 2011 年 5 月 4 日
26. Akutsu, H., “Development of xeno-free culture systems of human embryonic stem cells for cell therapy”, JST/CIRM Workshop “Early translational research on stem cells”, 2011 年 5 月 16 日
27. 阿久津英憲:「エピゲノムの基礎知識」 エピゲノムワークショップ(座長;河野友宏、阿久津英憲)第 52 回日本哺乳動物卵子学会、大田原、5 月 21 日、2011 年
28. 阿久津英憲:「特別講演 再生医療を見すえたヒト ES 細胞の樹立」日本組織培養学会第 84 回大会、東京、5 月 28 日、2011 年
29. Fujii, T., Microfluidic Cell and Tissue Culture? New Tools for Biological Experimentation ISMM2011, Seoul, Korea, 2011 年 6 月 2 日
30. 阿久津英憲:「難治性疾患に挑む ES/iPS 細胞の可能性」小児交互性片麻痺親の会 2011 年度全体会、大阪、8 月 6 日、2011 年
31. Akutsu, H., “Human ES cell and iPS cell derivation: Clinical application and biological characterization”, 16th World Congress on In Vitro Fertilization, Tokyo, 2011 年 9 月 13 日
32. 酒井康行, 藤井輝夫, 酸素透過性材料を用いた培養組織モデル, シンポジウム「細胞(外)微小環境の制御と医療への応用」, 化学工学会第 43 回秋季大会, 2011.9.16, 名古屋.
33. 阿久津英憲:「ヒト ES/iPS 細胞の疾患モデリング研究への応用」岐阜大・岐阜薬科大連携脳卒中・ALS セミナー、岐阜、10 月 20 日、2011 年
34. Fujii, T., Confining Cellular Machineries into a Large Number of Tiny Containers, Synthesizing life and biological systems, Osaka, Japan, 2011 年 10 月 25 日
35. Y. Sakai, T. Fujii and T. Niino, Scaffolds having flow channels, oxygen carriers and oxygen-permeable membranes, ISCTA Symposium 6: The Tissue Interface: Bioreactors and Scaffolds, 2011 Joint Meeting of Haematology Society of Australia and New Zealand (HSANZ), the Australian & New Zealand Society of Blood Transfusion (ANZSBT) and the Australasian Society of Thrombosis and Haemostasis (ASTH) - the HAA2011 - and •the XIIth Congress of the ISHAPD (International Society of Hematology, Asia-Pacific Division), 30 October to 2 November 2011 Sydney, Australia.
36. 阿久津英憲:「臨床グレード ES 細胞の作製を目指して」理化学研究所筑波研究所、つくば、11 月 7 日、2011 年
37. Y. Sakai, Chemical engineering-based multi-scale optimization of 3D cellular organization and oxygen supply —Engineering highly-metabolic liver tissues—, 2011 Materials Research

- Society Fall Meeting & Exhibit, 2011.11.30, Boston, MA, USA
38. Fujii, T., Cell and Tissue Culture in Structured Microenvironment, MRS 2011 Fall Meeting, Symposium II, Boston, USA, 2011 年 12 月 1 日
 39. 阿久津英憲:「新たなヒト胚作製技術の報告(米国)について」第 64 回生命倫理専門調査会, 中央合同庁舎第 4 号館第 2 特別会議室, 1 月 17 日, 2012 年
 40. 阿久津英憲:「臨床応用を目指すヒト ES 細胞研究の現状」第 15 回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会, 厚生労働省 17 階 専用第 18-20 会議室, 1 月 25 日, 2012 年
 41. 阿久津英憲:「新たなヒト胚作成技術について～SCNT 法による 3 倍体 ES 細胞論文の背景～」1 科学技術・学術審議会 生命倫理・安全部会 特定胚及びヒト ES 細胞等研究専門委員会(第 80 回), 文部科学省 16 階 特別会議室, 1 月 25 日, 2012 年
 42. 酒井康行, 組織工学・Biofabrication・積層造形—大型肝組織構築を例にして—, 第 2 回 Additive manufacturing シンポジウム, 2012.1.25, 東京
 43. 阿久津英憲:「ヒト ES 細胞の臨床応用へ向けた取り組み」バイオリジクスフォーラム第 9 回 学術集会, 東京 タワーホール船堀, 2 月 22 日, 2012 年
 44. Fujii, T., The Power of Microfluidic Approaches in Cell and Tissue Analyses, ISNM2012, Nagoya, Japan, 2012 年 3 月 15 日
 45. 藤井輝夫, “多能性幹細胞の分化制御を目指すデバイス技術”, CREST ナノシステム創製領域公開シンポジウム, 東京, 2012 年 3 月 15 日
 46. 藤井輝夫, 単一分子や単一細胞を扱うマイクロチャンバアレイ技術, 応用物理連合講演会, 東京, 2012 年 3 月 16 日
 47. 芝清隆 「ナノテクノロジーはがんの診断・治療をどう変えていくのか? 」東京歯科大学大学院歯科研究科 口腔がん専門医養成コースフォーラム 2012 年 3 月 28 日(東京)
 48. Akutsu, H., “iPSCs for regenerative medicine”, International Conference on "Stem Cell and Regenerative Medicine: Research to Business", Hyderabad, India, 2012 年 3 月 24 日
 49. 阿久津英憲: 「ゼノフリーヒト ES/iPS 細胞の培養システムの確立」 (シンポジウム) 日本組織培養学会第 85 回大会, 京都 京都大学百周年記念ホール, 5 月 17 日, 2012 年
 50. Y. Sakai, Microtechnologies and chemical engineering for organization of liver tissue, 6th International Conference on Bioengineering and Nanotechnology (ICBN), June 24-27, 2012, Berkeley, CA, USA.
 51. 藤井輝夫, “マイクロ流体デバイスが拓くバイオ・環境関連新技術”, 2012 最先端実装技術シンポジウム, 東京, 2012 年 6 月 14 日
 52. 阿久津英憲: 「ヒト ES 細胞～小児難治疾患へ挑む～」第 48 回大会日本小児循環器学会総会・学術集会, 京都, 7 月 5 日, 2012 年
 53. Y. Sakai, Self-secreted factors, oxygen and 3D culture in stem/progenitor cell-based tissue engineering— mES/iPS, liver and pancreatic β -cells —, University of Texas MD Anderson cancer Center & University of Tokyo Joint Symposium 2012, August 13-14, 2012, Houston, TX, USA.
 54. Akutsu, H. “Human ES cells: aquired pluripotency from blastocysts.” Asia Pacific Initiative on Reproduction 2012, Aug 31, 2012; Osaka, Japan
 55. 芝 清隆, 「モチーフ・プログラミング」研究の活用例、公益社団法人新化学技術推進協会・ライフサイエンス技術部会材料分科会 平成 24(2012)年 10 月 10 日(東京)
 56. Fujii, T.:”Heterogeneity matters ? – Microfluidic approaches to Hi-Fi Analyses”, the 4th International Conference on Foundations of Systems Biology in Engineering (FOESBE2012), Tsuruoka, Japan, 2012 年 10 月 22 日
 57. Kim, S. H., He, X., Kaneda, S., Kawada, J., Fourmy, D., Noji, H., and Fujii, T., “Quantitative analysis of gene expression level of individual iPS cells by using electroactive microwell array”, 第 26 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、沖縄コンベンションセンター、2012 年 10 月 28 日
 58. Fujii, T.,” Microfluidic Approaches to Hi-Fi Cell and Tissue Biology”, IEEE EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference”, Maui, USA, 2012 年 12 月 4 日

59. Kim, S.H., Fujii, T., and Fourmy, D.,” Single cell electrical manipulation allows direct intracellular ATP measurements”, Cold Spring Harbor Laboratory 2013 Meeting on Single Cell Analyses, NY, USA (2013.3.8)
60. 酒井康行, 細胞の三次元高密度化と酸素供給の確保, シンポジウム「再生組織・臓器モデルの三次元構築・培養を如何に達成するか?—工学的アプローチと発生工学的知見の融合を目指して」, 第 12 回日本再生医療学会総会, 2013.3.22-23, 横浜.
61. 酒井康行, “動物実験代替法の理想と到達までの道のり”, 第 38 回日本化粧品学会大会有楽町朝日ホール(東京), 2013 年 6 月 6 日.
62. Y. Sakai, Microfabrication and chemical engineering in organization of liver tissues for various applications, International Symposium on “Grand Challenge for Integration of Stem Cell, Nanomaterials and Biomanufacturing - Looking for Synergy” (SCNB2013), June 3-4, 2013, Shanghai, China.
63. 藤井輝夫: “マイクロフルイディクス/MicroTAS の研究動向”, マイクロ流体解析セミナー, 東京 (2013.6.20)
64. Fujii, T.,” Microfluidic Platforms for Spatiotemporally Resolved Experimentation”, Workshop on Systems Biology of Cellular Signaling, 35th Annual International Conference of IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC2013), Osaka, Japan (2013.7.3)
65. Kim, S. H., Fourmy, D. and Fujii, T., “Large-scale Microchamber Array Allows High-throughput and Parallelized Readouts of Cellular Heterogeneity,” Single Cell Analysis Summit, San Diego, USA (2013.9.12)
66. Fujii, T., “Lab-on-a-Chip Technologies – Pushing the Limit of Understanding “, Lab on a Chip Asia, Singapore (2013.11.12)
67. 藤井輝夫: “ナノバイオのための分析デバイスと医療分野への応用”, GRENE 先進環境材料・デバイス創製スクール「ナノ医学を支えるナノバイオコース」(2013.11.15)
68. Kim, S.H., Fourmy, D. and Fujii, T., “Electroactive microwell array allows quantitative measurement of intracellular materials of individual cells”, 9th Annual International Electromaterials Science Symposium, Leon Kane-Maguire Theatre, AIIM Facility, Innovation Campus, Squires Way, North Wollongong NSW, Australia (2014.2.13)
69. ボトムアップとトップダウンを融合する大型組織構築の方法論—肝のような大型・高密度臓器を例に—, 酒井康行, 扨媛, Stephanie L. U. SUTOKO, 堀本洋平, 安斎正博, 新野俊樹, シンポジウム「工学的細胞操作による創薬研究のための三次元ヒト生体組織体の構築」, 第 13 回日本再生医療学会総会, 2014.3.4-6, 京都
70. 阿久津英憲: 「卵子老化機序解明に向けた ES 細胞の応用」第 32 回日本受精着床学会総会・学術講演会 ワークショップ 2, 東京, 7 月 31 日, 2014 年
71. 薬効・毒性評価のための生理学的培養組織モデル, 酒井康行, 竹内昌治, 藤井輝夫, シンポジウム「トータルバイオプロセスの効率化, サステナビリティ」, 第 66 回日本生物工学会大会, 2014.9.10, 札幌.
72. 再生医療の培養プロセスにおける化学工学の寄与可能性, 酒井康行, 展望講演, シンポジウム「再生医療の高度化に向けた化学工学の役割」, 化学工学会第 46 回秋季大会, 2014.9.18, 福岡.
73. Akutsu, H., “Human Pluripotent Stem Cells for Disease Modeling”, 8th International Symposium of Rare Disease Research, Souel, Korea, 2014 年 9 月 19 日
74. Fujii, T., “Microfluidic Systems for spatiotemporal modulation of cells and tissues”, The 4th International Workshop on Analytical Miniaturization and NANOTECHNOLOGIES (WAM NANO2014), Copenhagen, Denmark (2014)
75. Fujii, T., “Device Technologies for Cell and Tissue Analysis”, International Conference on Solid-State Devices and Materials (SSDM2014), Tsukuba, JAPAN (2014)
76. Fujii, T., “Microfluidic Approaches to High Resolution Analysis and Control of Cells and Tissues”, the 4th International Conference on Microfluidic Chip and Micro/NanoScale Bioseparation Analysis, Wuhan, China (2014)

77. Fujii, T., "Microfluidic Technologies for Cell and Tissue Analyses", the 27th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, Fukuoka, Japan (2014)
78. 阿久津英憲:「生殖医学における ES 細胞とiPS 細胞の意義」第59回日本生殖医学会学術講演会 教育講演3(招待), 東京(2014.12.04)
79. Akutsu, H., "Generation of neural stem cells from human fibroblasts using a defined set of factors" invited speaker, the Brain Conference 2014 (the joint conference of Korean Society for Brain and Neural Science, Korean Society for Neurodegenerative Diseases, and Asian Congress of Neuropathology), Seoul, Korea (2014.11.6-8)
80. 阿久津英憲:「多能性幹細胞応用の再確認:まだある可能性の引き出し」第4回CSJ化学フェスタ2014 シンポジウム(招待), 東京 (2014.10.15)
81. 阿久津英憲:「ヒトES細胞の倫理再考:ヒトES細胞」第26回日本生命倫理学会年次大会 シンポジウム(招待), 浜松 (2014.10.25)
82. 阿久津英憲:「再生医療用間葉系幹細胞製品の供給システムにおける品質評価技術開発」第14回日本再生医療学会総会シンポジウムSY-16, 横浜 (2015.3.21)
83. 酒井康行, 「細胞・組織培養と生理学的酸素供給」, 特別講演, 第12回ガンとハイポキシア研究会, 佐賀(2014.11.21)
84. Sakai, Y., "Stem cell bioprocess for engineering liver and pancreatic beta cell tissues for various applications", Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammation symposium (招待), Berlin(2014.12.16-19)
85. 酒井康行:「企画趣旨説明ならびに再生医療技術の俯瞰」第4回CSJ化学フェスタ2014 シンポジウム(招待), 東京(2014.10.15)

② 口頭発表 (国内会議 12 件、国際会議 20 件)

1. 笠井孝夫、松村幸子、牛島夏未、滝田裕子、飯塚正、芝清隆、湯田坂雅子、飯島澄男、横山 淳郎、"ラット頭蓋骨欠損部においてカーボンナノホーンが骨再生に与える影響", 第 39 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、京都、平成 22 (2010)年 9 月 5 日
2. 阿久津英憲 (成育), "Human Embryonic stem cells and iPS Cells: Potential tool for Low temperature medical experiments", 第 36 回日本低温医学会総会・学術集会シンポジウム, 東京, 11 月 27-29 日 (2009 年)
3. 川田治良 (東大), 木村啓志 (東大), 阿久津英憲 (成育), 酒井康行 (東大), 藤井輝夫 (東大), "マイクロ流体環境を利用した細胞分化制御デバイス", 第 10 回 (社) 計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 東京, 12 月 24-26 日 (2009 年)
4. Toru Tsuji, Kazuo Onuma, Akira Yamamoto, Mayumi Iijima and Kiyotaka Shiba, "Motif-programmed Artificial Proteins with Mineralization Activities", The 16th International Conference on Crystal Growth, Beijing, August 9, 2010
5. Kawada, J., Kimura, H., Akutsu, H., Sakai, Y., and Fujii, T., "Microfluidic Spatial Control of Stem Cell Differentiation", MicroTAS2010, Groningen, The Netherlands, October 4, 2010 (Oral).
6. 辻 融、緒明佑哉、吉成正雄、加藤隆史、芝 清隆, "蛋白質を用いたチタン基板の OCP コーティング", 第5回バイオミネラリゼーションワークショップ、東京、平成 22(2010)年 11 月 6 日
7. 辻 融、緒明佑哉、吉成正雄、加藤隆史、芝 清隆, "モチーフプログラム化人工蛋白質によるチタン基板の OCP コーティング", 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会、奈良、平成 22(2010)年 11 月 29 日
8. Kawada, J., Kimura, H., Akutsu, H., Sakai, Y., and Fujii, T., "Spatially Controlled Differentiation of Pluripotent Stem Cell in Microenvironment", Pacificchem2010, Hawaii, USA, December 16, 2010 (Oral).
9. 中尾洋祐、川田治良、木村啓志、酒井康行、藤井輝夫, "肝細胞索構造を模倣したマイクロ流体デバイス", 第 11 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会、仙台、2010 年 12 月 25 日
10. 川田治良、木村啓志、阿久津英憲、酒井康行、藤井輝夫, "微小空間における流体操作

- を応用した多能性幹細胞の時空間分化誘導”、第 11 回日本再生医療学会総会、横浜、2012 年 6 月 12 日
11. Hibino K, Suga K, Yoshida M, Matsumura S, Shiba K, Versatile coating system for endowing material surfaces with biological affinities, ICBS2013 平成 25(2013)年 3 月 19 日(つくば)
 12. Hibino K, Suga K, Shiba K, Coating agent for peptide aptamers, Microfluidics for Tissue and Cell Applications 平成 24(2012)年 11 月 5 日(東京)
 13. 渡邊真衣、奥下慶子、芝 清隆、朝倉哲郎、絹アミノ酸配列に導入したチタン結合性ペプチド配列 minTBP-1 の作成とキャラクター化、第 61 回高分子討論会 平成 24(2012)年 9 月 6 日(名古屋)
 14. Yamauchi A, Matsumura S, Iizuka T, Shiba K, Yudasaka M, Iijima S, Yokoyama A, The effect of CNHs adsorbed simvastatin on bone regeneration, 第 43 回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム 平成 24(2012)年 9 月 5 日(仙台)
 15. 吉田光孝、菅加奈子、芝 清隆、唾液からのエクソソーム分画の分離、第 4 回日本 iRNAi 研究会 平成 24(2012)年 9 月 1 日(広島)
 16. He, X., Kimura, H., Kawada, J., and Fujii, T.: "A high-throughput platform for patterned differentiation of embryoid bodies using air bubbles", Proceedings of MicroTAS 2012 conference, Okinawa, Japan (November 1, 2012), pp.257-259.
 17. He, X., Kimura, H., Kawada, J., and Fujii, T., "A Newly Developed Microfluidic Device for Patterned Differentiation of Multiple Embryoid Bodies using Air Bubbles", The 14th International Conference of the Chinese Society of Micro/NanoTechnology, Hangzhou, China (2012) 22122
 18. Shiba K, Suga K, Yoshida M. Interaction between exosomes and surfaces of SiO₂ and Al₂O₃, Exosomes and Microvesicles 2012 September 30, 2012 (Orlando)
 19. Sano K, Shiba K, Peptide aptamer recognizes the oxidized surface of inorganic materials, STAC-6 June 27, 2012 (Yokohama)
 20. Shiba K, Suga K, Interaction between exosomes and surfaces of materials. ISEV April 18, 2012 (Gothenburg)
 21. Shiba K, Suga K, Hibino K, Yoshida M, Programmed interface between exosomes and material surfaces ISEV2013 April 18, 2013 (Boston)
 22. Yoshida M, Hibino K, Suga K, Shiba K, Differentiating exosomes into subpopulations, using weak interactions between exosomes and material surfaces, ISEV2013 April 18, 2013 (Boston)
 23. Hibino K, Suga K, Yoshida M, Minamisawa T, Sudo T, Matsumura S, Shiba K, EpiVeta: A coating agent that endows material surfaces with an affinity to EpCAM-expressing exosome, ISEV2013 April 18, 2013 (Boston)
 24. Kim, S.-H., Fujii, T., and Fourmy, D., "Electroactive Microwell Array for Quantitative Measurement of Intracellular ATP at the Single-cell Level", Proceedings of MicroTAS2013 conference, Freiburg, Germany (2013) pp.1335-1337
 25. Kobayashi, M., Kim, S.-H., Kaneda, S., and Fujii, T. "Electroactive Microwell Array For Single Circulating Tumor Cell Analyses", Proceedings of Korea-Japan-Sweden [KJS] Round Table Discussion : From Microfluidics to Cancer Theragonistics, Seoul, Korea (2013), July 2.
 26. Shiba, K., Hibino, K., Suga, K., Minamisawa, T., Matsumura, S., Iwai, K., Yoshida, M., "Capturing EpCAM Positive Exosomes by Peptide Aptamer-Immobilized Materials", Inaugural SOCRATES Scientific Meeting 2013 October 25, 2013 (Singapore)
 27. 小林麻里奈、Kim S.H.、金田祥平、藤井 輝夫：“単一 CTC 解析用デバイスの開発”、2014 年度精密工学会春季大会学術講演会、東京 (2014) pp.441-442
 28. Kim, S.-H., Fujii, T., and Fourmy, D., "Electroactive Microwell Array for Quantitative Measurement of Intracellular ATP at the Single-cell Level", Proceedings of MicroTAS2013 conference, Freiburg, Germany (2013) pp.1335-1337
 29. Kobayashi, M., Kim, S.-H., Kaneda, S., and Fujii, T. "Electroactive Microwell Array For Single Circulating Tumor Cell Analyses", Proceedings of Korea-Japan-Sweden [KJS] Round Table Discussion : From Microfluidics to Cancer Theragonistics, Seoul, Korea (2013), July 2.
 30. Shiba, K., Hibino, K., Suga, K., Minamisawa, T., Matsumura, S., Iwai, K., Yoshida, M., "Capturing EpCAM Positive Exosomes by Peptide Aptamer-Immobilized Materials",

Inaugural SOCRATES Scientific Meeting 2013 October 25, 2013 (Singapore)

31. Kim, S.-H., Kobayashi, M., Kaneda, S., and Fujii, T., "High-efficiency Rare Cell Trapping at the Single-cell Level Using Electroactive Microwell Array", Proceedings of the 6th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM2014), Singapore (2014) pp.206-207
32. 大久保智樹、木下晴之、木村啓志、前川敏郎、黒田真也、藤井輝夫：“マイクロ流体細胞培養システムにおけるシグナル分子濃度波形の制御”、2014年度精密工学会春季大会学術講演会、東京 (2014) pp.445-446

③ ポスター発表 (国内会議 7件、国際会議 43件)

1. J. Kawada, H. Kimura, T. Yamamoto, H. Akutsu, Y. Sakai, T. Fujii, "Controlling differentiation of mouse embryonic stem cells by laminar flow in microenvironment", APBioChEC'09, Kobe, Japan, Nov.25-27 (2009)
2. Kaneda, S., Minamisawa, T., Shiba, K., and Fujii, T., "Adhesion of Cancer Cells to a Peptide Aptamer-Coated Microchannel", ISMM2010, Hong Kong, May 29, 2010.
3. Kawada, J., Kimura, H., Akutsu, H., Sakai, Y., and Fujii, T., "Control of Microenvironment for Differentiation of Mouse Pluripotent Stem Cells", The 8th ISSCR (International Society for Stem Cell Research) Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, June 16-17, 2010.
4. Chowdhury, M.M., Katsuda, T., Kimura, H., Akutsu, H., Ochiya, T., Fujii, T., and Sakai, Y., "Enhanced maintenance of embryonic stem cells pluripotency in a diffusion dominant membrane-based micro-bioreactor culture", The 8th ISSCR Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, June 18-19, 2010.
5. Kaneda, S., Minamisawa, T., Shiba, K., and Fujii, T., "A Peptide Aptamer-coated Surface for Selective Adhesion of Cancer Cells in Blood Cells Suspension", MicroTAS2010, Groningen, The Netherlands, October 5, 2010.
6. Kaneda, S., Minamisawa, T., Shiba, K., and Fujii, T., "Selective Adhesion of Target Cancer Cells from Red Blood Cell Suspension Using a Peptide Aptamer-coated Microfluidic Device", Pacificchem2010, Hawaii, USA, December 17, 2010.
7. Chowdhury, M.M., Fujii, T., and Sakai, Y., "Cell-secreted Soluble Factors Induce Enhanced Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells Towards Mesoderm and Endoderm in a Membrane-based Micro-bioreactor Culture", ISSCR 9th Annual Meeting, Toronto, Canada, June 15-18 (2011).
8. Horiguchi, I., Chowdhury, M.M., Sakai, Y., "Feasibility Of Hydrogel-based Microencapsulation for Propagation and Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells in Scalable Suspension Culture", ISSCR 9th Annual Meeting, Toronto, Canada, June 15-18 (2011).
9. He, X., Kawada, J., Kimura, H., Kinoshita, H., and Fujii, T., "Patterned Differentiation in 3D Format Using Mouse iPS Cells in a Microfluidic Device", International Society for Stem Cell Research (ISSCR) the 9th Annual Meeting, Toronto, Canada, June 15-18 (2011) #3169
10. Kawada, J., Kimura, H., Akutsu, H., Sakai, Y., and Fujii, T., "Observation of Moving Front Where mPSCs' States Switch", International Society for Stem Cell Research (ISSCR) the 9th Annual Meeting, Toronto, Canada (2011) #2234
11. Kawada, J., Kimura, H., Kaneda, S., Akutsu, H., Sakai, Y. and Fujii, T., "Formation of Articulated Embryoid Body (art-EB) for Spatially Controlled Differentiation", Proceedings of MicroTAS2011 conference, Seattle (2011) pp. 846-848
12. He, X., Kawada, J., Kimura, H., Kinoshita, H., and Fujii, T., "Development of a Microfluidic Device for 3D Patterned Differentiation of Mouse iPS Cells", Proceedings of International Conference on Biofabrication 2011, Toyama (2011) p.87
13. Shiba, K., Suga, K., "Interaction between exosomes and surfaces of materials", ISEV, Gothenburg, Sweden, April 18, 2012.
14. Kawada, J., Kimura, H., Kaneda, S., Akutsu, H., Sakai, Y., and Fujii, T., "Generating articulated embryoid body for spatially controlled differentiation", T-2270, Proceedings of International Society for Stem Cell Research 2012, Yokohama, Japan, June 13 - 16, 2012.
15. Kaneda, S., Kawada, J., Araki, A., He, X., and T. Fujii, "Synthetic Peptides and Polyethylene Glycol Surfaces for Micropatterning of Pluripotent Stem Cells", T-2264, Proceedings of International Society for Stem Cell Research 2012, Yokohama, Japan, June 13 - 16, 2012.

16. He, X., Kimura, H., Kaneda, S., Kawada, J., Akutsu, H., Sakai, Y., and Fujii, T., "Patterned Neural and Cardiac Differentiation of One EB of Nanog-iPS Using a Microfluidic Device", T-3303, Proceedings of International Society for Stem Cell Research 2012, Yokohama, Japan, June 13 - 16, 2012.
17. Chowdhury, M.M., T., Fujii, T., and Sakai, Y., "Importance of Size Difference Between Macro- and Micro-Scale Static Cultures to Enable Effect of Cell-Secreted Factors on Mouse Embryonic Stem Cell Behavior - A Mathematical Model Based Study", T-2245, Proceedings of International Society for Stem Cell Research 2012, Yokohama, Japan, June 13 - 16, 2012.
18. Horiguchi, I., Chowdury, M.M., and Sakai, Y., "Proliferation, morphology and undifferentiation of murine IPS cell in alginate base microcapsule", ISSCR 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June 13-16 (2012).
19. Akutsu H. "A Novel Xeno-free Defined Condition for Culture of Human Embryonic Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells with Novel Human Feeder Layers", ISSCR 10th annual meeting, Jun 13-16, 2012, Yokohama, Japan.
20. Kobayashi, M., Kaneda, S., Kim, S. H., and Fujii, T.: "An interdigitated microelectrode array for capture and lysing cell as a tool for downstream analysis of acoustofluidic cell separation", 10th Ultrasonic Standing Network Conference (USWNet 2012), Lund, Sweden (September 21-22, 2012), pp.90-91.
21. Kaneda, S., Araki, A., and Fujii, T.: "An electronic pipette compatible microfluidic chip for continuous processing of size-dependent cell depletion and immunohistochemistry", Proceedings of MicroTAS 2012 conference, Okinawa, Japan (Oct. 28-Nov. 1, 2012), pp.1276-1278.
22. Araki, A., Kaneda, S., and Fujii, T.: "A simple method for cell isolation by utilizing both cell size and affinity to surfaces", Proceedings of MicroTAS 2012 conference, Okinawa, Japan (Oct. 28-Nov. 1, 2012), pp.1702-1704.
23. Kim, S. H., He, X., Kaneda, S., Kawada, J., Fourmy, D., Noji, H., and Fujii, T.: "Quantitative analysis of gene expression level of individual iPS cells by using electroactive microwell array", Proceedings of MicroTAS 2012 conference, Okinawa, Japan (Oct. 28-Nov. 1, 2012), pp.581-583.
24. Kim, S. H., Yoshizawa, S., Takeuchi, S., Fujii, T., and Fourmy, D.: "Cell-free protein synthesis in femtoliter microchambers for arraying ultra-high density protein spots", Proceedings of MicroTAS 2012 conference, Okinawa, Japan (Oct. 28-Nov. 1, 2012), pp.947-949.
25. He, X., Kimura, H., Kaneda, S., Kawada, J., Akutsu, H., Sakai, Y., and Fujii, T.: "Spatially patterned neural and cardiac differentiation of embryoid body (EB) in a microfluidic device", Proceedings of MicroTAS 2012 conference, Okinawa, Japan (Oct. 28-Nov. 1, 2012), pp.1585-1587.
26. Chowdhury, M. M., Kimura, H., Fujii, T., and Sakai, Y.: "Distinct auto-regulation of embryonic stem cell behavior by cell-secreted soluble factors in a membrane-based two-chambered microbioreactor", Proceedings of MicroTAS 2012 conference, Okinawa, Japan (Oct. 28-Nov. 1, 2012), pp.1066-1068.
27. Kaneda, S., Araki, A., and Fujii, T.: "A Multi-Well Microfluidic Plate for Parallelization of Cell Separation and Compartmentalization of Separated Cells", Proceedings of IEEE EMBS Conference on Micro and Nanotechnology in Medicine 2012, Hawaii, USA (Dec. 3-7, 2012), pp. 146
28. Araki, A., Kaneda, S., and Fujii, T.: "A Microfluidic Chip for Capturing Rare Cells Utilizing Both Cell Size and Immunoaffinity", Proceedings of IEEE EMBS Conference on Micro and Nanotechnology in Medicine 2012, Hawaii, USA (Dec. 3-7, 2012), pp. 140
29. Kimura, H., Ikeda, T., Sakai, Y., and Fujii, T.: "On-chip absorption and metabolism model for pharmacokinetic studies", Proceedings of IEEE EMBS Conference on Micro and Nanotechnology in Medicine 2012, Hawaii, USA (Dec. 3-7, 2012), pp. 55
30. Akutsu H, Sugawara T, Takezawa Y, Kawasaki T, Okumura N, Miura T, Miyado K, Umezawa A: Beta catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells (T-2375). 11th ISSCR 2013 Annual Meeting, June 12-15, 2013; Boston, MA, USA.
31. Shiba K, Suga K, Hibino K, Yoshida M, Programmed interface between exosomes and

- material surfaces, ISEV2013 April 18, 2013 (Boston)
32. Yoshida M, Hibino K, Suga K, Shiba K, Differentiating exosomes into subpopulations, using weak interactions between exosomes and material surfaces
ISEV2013 April 18, 2013 (Boston)
 33. Hibino K, Suga K, Yoshida M, Minamisawa T, Sudo T, Matsumura S, Shiba K, EpiVeta: A coating agent that endows material surfaces with an affinity to EpCAM-expressing exosome, ISEV2013 April 18, 2013 (Boston)
 34. 川田治良, 金田祥平, 阿久津英憲, 藤井輝夫: “胚様体に対する空間分化誘導制御”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第27回研究会, 仙台 (2013), pp.86
 35. 小林麻里奈, Kim S.H., 金田祥平, 藤井輝夫: “単一 CTC 解析に向けた誘電泳動力によるマイクロチャンバへの捕捉に関する研究”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第27回研究会, 仙台 (2013), pp.88
 36. Kim, S. H., Fourmy, D. and Fujii, T., Array of single-cell microreactors (SCMR) allows quantitative analysis of intracellular materials at the single-cell level, 定量生物学の会 第六回年会, 大阪大学吹田キャンパス銀杏会館 (チュートリアルと年会), 2013年11月23日
 37. M.M. Chowdhury, S. Kaneda, T. Fujii, Y. Sakai, “A hierarchical co-culture for mimicking liver-specific microvasculature to model liver-specific metastasis”, シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来, 2013年11月25日(月), 東京
 38. Chowdhury M. M., Danoy M., Kaneda S, T. Fujii and Sakai Y, “A hierarchical co-culture for mimicking liver-specific microvasculature to model liver-specific metastasis”, 動物実験代替法学会第26回大会, 2013年12月19-21日, 京都
 39. Nordin, M., Kobayashi, M., Kim, S.H., Kaneda, S., Fujii, T., and Laurell, T., “Integrated Rare Cell Acoustophoresis Preconcentration and Trapping in Electroactive Microwell Array”, JSPS Core-to-Core Program and Specially Promoted Research Joint Symposium (2013) Poster A9
 40. Kawada, J., Kaneda, S., Akutsu, H., and Fujii, T., “Spatially Different Initiation of Embryoid Body”, Poster Abstracts, 11th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research (ISSCR2013), Boston, USA, June 12-15 (2013) F-3168
 41. Kawada, J., Kaneda, S., Kimura, H., Akutsu, H., Sakai, Y., and Fujii, T., “Spatially heterogeneous differentiation in microfluidic platforms”, Cell Symposia – Using Stem Cells to Model and Treat Human Disease, Los Angeles, USA, Nov. 21-23 (2013) P2.05
 42. Kim, S.H., Fourmy, D., and Fujii, T. “Measurement of ATP concentration of individual cells with electroactive microwell array”, Proceedings of the 7th international Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology (MMB2013), Marina del Rey, USA (2013)
 43. Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Umezawa A, Akutsu H : Generation of committed neural progenitors from human fibroblasts by defined factors (F-2142), 12th Annual Meeting of ISSCR, Vancouver, Canada, June 17th-22nd, 2014
 44. Ohka, S., Tan, S.H., Fujii, K., Kaneda, S., Nakamura, H., Fujii, T., Wong, K.T., and Koike, S., “hSCARB2-dependent neural pathway for EV71”, the 18th International Picornavirus Meeting, Blakenberge, Belgium (2014)
 45. Fujiwara, T., Kinoshita, H., Nashibe, K., Fujii, T., and Ohue, H., “Development of Technique to Form a Uniform Photoresist Layer Having over 100 Micrometers Thickness on a Substrate”, Proceedings of the 6th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM2014), Singapore (2014) pp.248-249
 46. Ohkubo, T., Kinoshita, H., Maekawa, T., Kimura, H., Kuroda, S., and Fujii, T., “Microfluidic Cell Culture System for Dynamic Cell Signaling Study”, Proceedings of MicroTAS2014 conference, San Antonio, USA (2014)
 47. Kim, S.-H., Nordin, M., Kobayashi, M., Kaneda, S., Laurell, T., and Fujii, T., “Integration of Acoustophoretic Cell Enrichment and Dielectrophoretic Single Cell Trapping for Highly Efficient Rare-cell Analysis”, Proceedings of MicroTAS2014 conference, San Antonio, USA (2014)
 48. 金秀炫, 金田祥平, 藤井輝夫: “希少細胞解析のための Electroactive microwell array の開発”, 第30回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (30th CHEMINAS), 札幌 (2014)

3P21 (p.112)

49. 金田祥平、藤井輝夫：“マイクロ・ナノ統合アプローチによる細胞・組織 Showcase の構築”、3 研究領域合同第 2 会公開シンポジウム発表要旨集、東京（2014）p.64
50. Kaneda, S., Nakamura, H., Kawada, J., Ono, K., and Fujii, T.,: “Formation of Spatially-Defined Heterogeneous ECM-Coated Surfaces Using Microfluidic Patterning with Capillary Stop Valves to Control Cell Adhesion of Stem Cells”, Proceedings of IEEE Micronanotechnology in Medicine conference 2014, Hawaii, USA (2014), ThBT2.15.

(4)知財出願

①国内出願（8 件）

1. “物質分布制御方法、デバイス、細胞培養方法、細胞分化制御方法”、藤井輝夫、酒井康行、木村啓志、川田治良、阿久津英憲、東京大学、2010 年 1 月 21 日、特願 2010-011178
2. “生物学的対象物の分化制御方法及びその装置”、藤井輝夫、阿久津英憲、酒井康行、金田祥平、木村啓志、川田治良、東京大学、2011 年 9 月 30 日、特願 2011-215851
3. IGF-1R 結合性ペプチド、飯森祐介、山形瑞恵、塩野智隆、芝清隆、2011 年 5 月 25 日、特願 2011-117411
4. “FZD 結合性ペプチド” 飯森祐介、山形瑞恵、塩野智隆、芝清隆、2012 年 4 月 17 日、特願 2012-093982
5. “EpCAMに結合するペプチド”、芝清隆、國分克寿、菅加奈子、2012 年 9 月 14 日、特願 2012-203464
6. “目的細胞の分離方法およびその目的細胞の分離装置”、藤井輝夫、金田祥平、荒木文子、2012 年 10 月 24 日、特願 2012- 234653
7. “EpCAMに結合するペプチド・アダプターとホスホリルコリンポリマー共重合体を含む複合体”、芝清隆、日比野和浩、吉田光孝、2013 年 4 月 12 日、特願 2013-84393
8. “胚様体に対する空間分化誘導制御方法及びその装置”、藤井輝夫、阿久津英憲、川田治良、2013 年 5 月 20 日、特願 2013-105816

②海外出願（1 件）

1. EpCAMに結合するペプチド、芝清隆、國分克寿、菅加奈子、公益財団法人がん研究会【PCT 出願日】2013 年 9 月 12 日【PCT 番号】PCT/JP2013/74655

③その他の知的財産権

(5)受賞・報道等

①受賞

該当なし

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. “…And Microfluidics Help Differentiate Stem Cells” , Chemical & Engineering News, January 3, 2011, p. 24
2. 『食や医療に海底資源の探査！小さな装置が大活躍！』、世の中進歩堂、BS ジャパン、2011 年 1 月 14 日放映
3. 日経産業新聞、先端人(阿久津英憲)、2012 年 3 月 29 日
4. 「細胞 1 つずつ捕捉・分析 微小な穴 1600 個 破壊実験、正確に 東大など」、日本経済新聞(朝刊) (2011. 8. 29) p. 11

③その他
該当なし

(6)成果展開事例

社会還元的な展開活動

- 得られた成果は、Lab on a Chip 誌において出版された Review 論文(Dongeun Huh, et al, “Microengineered physiological biomimicry: Organs-on-Chips”, Lab on a Chip, 2012, 12, 2156-2164)に取り上げられている。
- また、Chemical & Engineering News でとりあげられた。
- 本研究で開発したマイクロ流体デバイス類は、第 28 回医学会総会の博覧会に出展予定であったが、東北地方太平洋沖地震のために、Web&体験博覧会にかたちを変えて出展することとなり、総入場者数としては14,940人の入場があった。
- 研究代表者は2012年10月28日～11月1日に MicroTAS2012(化学・生命科学マイクロシステム国際会議)を沖縄にて開催し、33カ国・地域から921名の参加者を集めた。

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2012年 11月5日	CREST/ERATO/SICP Joint Workshop on Microfluidics for Tissue and Cell Applications	東京大学生産 技術研究所	136人	CREST/ERATO/SICP による研究成果の発表と関連研究分野に関する海外からの招聘者による講演