

厚生労働省科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

**組織工学による血管増生心筋組織の  
構築ならびにその移植による冠血管床の再生**

平成15年度 総括・分担報告書

主任研究者 盛 英三

平成16年3月

## 目次

I. 総括研究報告	
組織工学による血管増生心筋組織の構築ならびにその移植 による冠血管床の再生	1
盛 英三	
II. 分担研究報告	
1. 遺伝子導入による血管内皮前駆細胞の機能強化と 重層化シートへの応用	5
盛 英三	
2. 心筋組織構築のための還流培養装置の開発	8
岡野光夫	
3. 胚性および骨髄幹細胞からの細胞分化誘導法の確立	23
福田恵一	
4. 血管内皮前駆細胞を高機能化する手法の確立	28
浅原孝之	
5. 重層化心筋細胞シート多段階移植による血管増生	30
清水達也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	40

総括研究報告書

組織工学による血管増生心筋組織の構築ならびにその移植による冠血管床の再生

主任研究者 盛 英三 国立循環器病センター研究所心臓生理部長

**研究要旨** 本研究では虚血性心疾患に対する新たな治療法の開発に向けて血管・心筋の再生に関わる幹細胞の研究や遺伝子導入による血管新生促進の研究に卓越した研究者とシート状の細胞を積層化することで三次元組織を再構築するという独自の組織工学的手法「細胞シート工学」を開発した研究者とが共同することで血管床に富んだ心筋組織を再生するための基盤技術を確立することを目的としている。具体的には①血管新生の細胞ソースとして血管内皮前駆細胞を用いさらに非ウイルス性ゼラチンハイドロゲルにより遺伝子導入したうえで心筋組織内に挿入し血管増生を試みる②還流培養装置を開発し重層化組織への酸素・栄養の供給を増大することで組織厚を増大する③in vivo において多段階移植を行うことでより厚い心筋組織を再構築する④胚性幹細胞から心筋細胞の分化誘導を行い心筋組織再構築のための細胞ソースとして用いることを目標としている。本年度は機能強化血管内皮前駆細胞の作成法の確立およびその有効性の確認、還流培養系の確立、in vivo 多段階移植による 1mm 厚の心筋組織の再構築、生理的因子を用いた胚性幹細胞からの効率的な心筋細胞の分化誘導を実現した。

分担研究者

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  
福田恵一 慶應義塾大学医学部  
心臓病先進治療学 講師  
浅原孝之 東海大学医学部  
再生医療科学 教授  
清水達也 東京女子医科大学  
先端生命医科学研究所 講師

A. 研究目的

食生活の欧米化ならびに高齢化に伴い今後虚血性心疾患に伴う重症心不全患者がさらに増加することが予想されている。近年、虚血性心疾患に対する新たな治療法として細胞を直接心筋組織内に注入する細胞移植療法が盛んに研究され、筋芽細胞や骨髄細胞の移植が既に臨床応用されるに至っている。一方、こ

れら単離した細胞の直接注入に関しては移植位置の制御が困難であること、流出・壊死により細胞が損失すること、広範な心筋壊死に対する治療が困難であることなど新たな課題が生じており、虚血性心疾患に対する次世代の再生医療として組織工学（ティッシュエンジニアリング）的な手法により三次元的な心筋組織を体外で再構築し移植する研究が始まっている。分担研究者である岡野らも温度応答性培養皿を用いて作成したシート状の心筋細胞を積層化するという独自の手法を用い、*in vitro*および*in vivo*で自律拍動する3次元心筋組織の作製を実現している。本研究ではこの組織工学的手法を用いた心筋組織再構築法をさらに発展させ血管床を伴ったより厚く高機能な心筋組織を再生し、重症心不全患者に対するより効果的な治療法の確立へむけた基盤技術を確立することを目的とした。

## B. 研究方法

本研究を遂行するにあたり血管・心筋の再生に関わる幹細胞の研究や遺伝子導入による血管新生促進の研究に卓越した研究者らと細胞シートを用いた組織工学的手法を開発した研究者らとでメンバーを構成し多面的なアプローチで研究を行った。初年度は①血管増生を目的に重層化心筋細胞シート間に挿入予定の機能強化血管内皮前駆細胞の作成法を確立すること②還流培養装置を開発し作製された重層化組織への酸素・栄養の供給を増大しより厚い組織を再生すること③重層化細胞シー

トの多段階移植を行うことで血管を伴ったより厚い心筋組織を再生すること④より高機能な心筋組織作製のための細胞ソースとして胚性幹細胞から効率的に心筋細胞を分化誘導する方法を確立することを行った。①に関してはゼラチンハイドロゲルを用いて遺伝子導入を行い最適な条件を検討した。また遺伝子としては血管床の構築を促進するアドレノメデュリンを用いた。またこの機能強化血管内皮前駆細胞の有効性をみるために肺高血圧モデルへの移植実験を行いその治療効果を解析した。②に関しては重層化心筋細胞シートを一定の圧較差で還流可能な新規のバイオリアクターを開発し還流の有無による作成組織像の比較を行った。③は移植した重層化心筋細胞シート（3枚）には1，2日以内に血管網が再構築されるという知見をもとに一つ目の重層化心筋細胞シート移植後、血管網が再構築されるのを待って次の重層化心筋細胞シートを移植するという方法を試みた。多段階で移植した心筋グラフト同士が互いに同期するかどうか、組織学的により厚い組織が再構築されているかどうかを解析した。さらに吻合可能な太さの動静脈上に多段階移植を行い血管付き心筋グラフトの作製が可能か試みた。④についてはマウス胚性幹細胞を用い種々の液性因子を添加し心筋細胞への分化効率を比較するとともに心筋特異的な遺伝子の発現解析を行った。なお動物を使った実験に関しては研究者の所属するそれぞれの施設の動物実験に関する指針に従い、ヘルシンキ宣言の精神

を尊重して実験動物に対する十分な倫理的配慮のもとに行った。

### C. 研究結果

まず血管内皮前駆細胞への遺伝子導入に用いるゼラチンハイドロゲル作成時の至適条件を追求した。その結果カチオン化ゼラチンの収率を約6倍に向上させることが可能となった。次にアドレノメデュリン遺伝子をゼラチンハイドロゲルを用いて血管内皮前駆細胞に導入したところ効率よく導入可能であった。さらに細胞を肺高血圧モデルに移植したところ肺高血圧の軽減が確認され、アドレノメデュリン遺伝子導入血管内皮細胞の有効性が示された。

一方、還流培養装置に重層化心筋細胞シートを固定し1週間培養したところ還流した場合は還流しない場合に比べてより厚い組織切片像を示した。また還流した場合は細胞がより密になっていた。

多段階移植に関しては移植間のインターバルが1, 2日の時は同期して拍動していたが3日の場合は個々別々に拍動していた。組織切片像では壊死を起こすことなくより厚い心筋組織が再生されていた。さらに10回まで反復移植を試みたところ血管床を伴った厚さ約1mmの自律拍動する心筋組織が作成可能となった。また大腿部の動静脈上に多段階移植した心筋グラフトはその動脈からの血液で還流されるとともに異所性に頸部へ再移植することにより拍動を再開した。

胚性幹細胞の心筋細胞の分化誘導に関しては試みた種々の液性因子のうちFactor X投与により分化効率が70-80%と著しく向上した。またFactor X投与により心筋特異的な転写因子の発現が時期的に早くなるとともに発現量も増大した。

以上のようにそれぞれの分担研究においてより厚く高機能な心筋組織再構築に向けての良好な結果を得た。

### D. 考察

虚血性心疾患に対する再生医療として血管新生を目的に骨髄由来の細胞や血管内皮前駆細胞の細胞移植が試みられその有効性が示されている。さらに移植細胞にVEGFなどの血管新生を促進する遺伝子を導入することでより血管を増生しうることが報告されている。これらの研究では移植された細胞そのものが新生血管を構築していることから重層化心筋細胞シート内に血管を構築しうる細胞ソースを導入しさらに血管新生を加速する因子がそれらの細胞から組織内に分泌されればより迅速に血管網が再構築されるものと推察される。実際本年度の研究においてアドレノメデュリン遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞が肺高血圧の病態を改善していることは機能強化血管内皮前駆細胞の有用性を裏付けるものであった。またアドレノメデュリンに関しては強い血管拡張作用によるarteriogenesisの促進を認めたことから作製心筋組織における血管床の構築にも大きく貢献することが期待され

る。

血管内皮前駆細胞の遺伝子の導入法に関してはウイルスでは無くゼラチンハイドロゲルを用いたが遺伝子結合したゼラチンハイドロゲルは血管内皮前駆細胞に貪食される形で取り込まれ効率良く遺伝子導入が行われたことから安全面からも今後の再生医療に有用であると考えられる。

酸素・栄養の透過性の向上を目的とした重層化細胞シートの還流培養に関しては予想通りより厚い心筋組織の作製を可能としたがそのメカニズムとして培養液の圧較差による物理的な負荷による細胞の肥大も一因と考えられた。今後、種々の条件で還流培養を行い圧較差や流量に関し最適な条件を決定するとともに、機能強化血管内皮前駆細胞を導入した重層化心筋組織を還流培養し血管増生の有無を確認する予定である。

一方、*in vivo*においては重層化心筋細胞シートを移植後、血管網の再構築を待ちホストからの血流が確保されてから次の重層化心筋シートを移植することで同期して自立拍動するより厚い心筋グラフトの作製が可能となった。これは重層化細胞シートが温度応答性培養皿から脱着した際にその組織接着面に細胞接着因子が温存されていることで速やかな組織同士の密な接着が可能になったからだと考えられる。さらに吻合可能な太さの動静脈上に異所性に作製した組織内にその動静脈と連結する血管網が再構築され、血管付きグラフトとして再移植可能であったが、この移植法

は他の組織の再生医療においても応用が可能であると考えられる。

心臓の発生過程を考えた場合、心筋細胞のソースに関しては心筋細胞への分化が方向付けられているものの、より幼弱な段階の細胞を用いたほうがより機能的な心筋組織の再構築が可能であると推察される。本年度確立された胚性幹細胞の高効率での心筋細胞への分化誘導は生理的なリガンドを用いたものであり正常発生過程による心筋細胞の回収が可能になると予測され今後重層化心筋細胞シートの細胞ソースとしても有用と考えられる。

#### E. 結論

血管床を伴ったより厚く機能的な心筋組織の再構築を目的として①機能強化血管内皮前駆細胞の作成②還流培養系の確立③多段階移植④心筋細胞ソースとして胚性幹細胞からの心筋細胞分化誘導を行いそれぞれの基本的な技術を確認した。次年度はこれらの手法をさらに発展させるとともに適宜技術融合することにより機能的な心筋組織の構築を試みる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

各分担研究者の報告書参照。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

各分担研究者の報告書参照。

分担研究報告書

組織工学による血管増生心筋組織の構築ならびにその移植による冠血管床の再生：

遺伝子導入による血管内皮前駆細胞の機能強化と重層化シートへの応用

分担研究者 盛 英三 国立循環器病センター研究所心臓生理部長

**研究要旨** ゼラチン-遺伝子複合体他を *in vitro* でヒト血管内皮前駆細胞、骨髄単核球に高い効率で遺伝子を導入する技術を開発した。肺高血圧モデルで、adrenomedulin 遺伝子-ゼラチン複合体により EPC の血管再生機能の強化を実現した。この細胞を心筋シートに挟み込むことで血管に富んだ心筋シートの実現を目指す。

#### A. 研究目的

分担研究者の岡野らはシート状の心筋細胞を積層化することで自律拍動する心筋組織の再構築に成功している。しかしながら、三次元的な心筋組織の再構築には酸素・栄養の透過性に限界がありより厚く機能的な心筋組織の作製のためにいかに血管生を促進し生体と同様な豊富な血管床を再構築するかが最大の課題となっている。本分担研究ではまず、①血管発生に寄与する細胞をさらに遺伝子導入法により機能強化する方法を確立する。そして、②機能強化した血管形成細胞を心筋シートに組み込む技術を開発する研究につなげる。また、将来的には③血管にも心筋にも分化しうる細胞ソースによるシート化にも研究の幅を広げることも考えている。

本年度は①に関連して、生分解性gelatin を用いて、高い導入効率で血管内皮前駆細胞に遺伝子を導入する技術を完成させた。本法は既存のウイルス性ベクターと比較して、安全面で大きな利点があり、一方遺伝子単独投与方法と比べると導入効率において格段に優れている。具体的にはadrenomedulin遺伝子を血管内皮前駆細胞に導入し、肺高血圧モデルで治療効果を検討した。

#### B. 研究方法

血管内皮前駆細胞(EPC)にgelatin—遺伝子(GFP およびadrenomedulin遺伝子)複合体を貪食させ、細胞内での遺伝子発現をGFP遺伝子で検討し、肺高血圧モデル等で細胞-遺伝子ハイブリッド治療の効果を検討する。

### C. 研究結果

1) gelatin-adrenomedulin 遺伝子遺伝子複合体を食食させた血管内皮前駆細胞 (EPC) はラットの肺高血圧モデルで、EPC 単独治療群よりも有意に肺血圧と肺血管抵抗を低下させた。動物の生存期間も延長させた。遺伝子導入による副作用は認められなかった。次世代高分子ベクター (ゼラチン-遺伝子複合体) による安全で高率の高い遺伝子導入法が確立された。

### D. 考察

gelatin—遺伝子複合体による遺伝子導入法は安全でかつ導入効率が高い。adrenomedulin遺伝子をEPCに導入すると肺高血圧の低減に有効であった。これはEPCの血管発生 (新生) 作用と同細胞内で発現するadrenomedulin が補完するためと考えられた。確認されたメカニズムのうち、adrenomedulinの強い血管拡張作用にもとづくarteriogenesisの促進、血管内皮のapoptosis抑制作用、固有のangiogenesis作用などが重要と考えられた。

### E. 健康危険情報

なし。

### F. 結論

自己EPC細胞に次世代高分子ベクター (ゼラチン) を用いてadrenomedulin遺伝子を導入することで、より成熟した血管再生が実現されることを証明した。

### 研究協力者

永谷憲歳 (国立循環器病センター研究所)  
福山直人、田中越郎 (東海大学医学部)

### G. 研究発表

#### 論文発表

1. H. Kitagawa, T. Yamazaki, T. Akiyama H. Mori, K. Sunagawa. Effects of ketamine on exocytotic and non-exocytotic noradrenaline release. *Neurochemistry International*. 2003;42: 261-267.
2. H. Kasahara, E. Tanaka, N. Fukuyama, E. Sato, --H. Mori. Biodegradable Gelatin Hydrogel Potentiates the Angiogenic Effect of FGF4 Plasmid in Rabbit Hindlimb Ischemia. *JACC*. 2003; 41: 1056-1062.
3. N. Nagaya, M. Kanda, M. Uematsu, N. Fukuyama, T. Horio, -- H. Mori. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2003; 108: 889-895.
4. T. Akiyama, T. Yamazaki, H. Mori, K. Sunagawa. Inhibition of cholinesterase elicits muscarinic receptor-mediated synaptic transmission in the rat adrenal medulla. *Auton Neurosci*. 2003; Sep30:107. (2): 65-73.
5. E. Sato, Y. Hayashi, R. Gemer, E. Tanaka, H. Mori, et al. Intense characteristic x-ray irradiation from weakly ionized



- linear plasma and applications. 2003; 20: 154-161.
6. E. Sato, Y. Hayasi, R. Gemer, E. Tanaka, H. Mori, Irradiation of intense characteristic x-rays from weakly ionized linear molybdenum plasma. 2003; 23(2): 123-131.
  7. N. Tokunaga, T. Yamazaki, T. Akiyama, S. Sano, H. Mori. In vivo monitoring of norepinephrine and its metabolites in skeletal muscle. *Neurochemistry International*. 2003; 43: 573-580.
  8. M. Shirai, J. T. Pearson, A. Shimouchi, N. Nagaya, H. Tsuchimochi, I. Ninomiya and H. Mori. Changes in functional and histological distributions of nitric oxide synthase caused by chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries. *Brit J Pharmacol*. 2003; 139: 899-910.
  9. N. Nagaya, H. Okumura, M. Uematsu, W. Shimizu, F. Ono, M. Shirai, H. Mori, et al. Repeated inhalation adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. *Am J Physiol Heart circ Physiol*. 2003;54(5): 2125-2131.
  10. N. Tokunaga, T. Yamazaki, T. Akiyama, H. Mori. Detection of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in rabbit skeletal muscle microdialysate. *J Chromatogr*. 2003;798:163-166.
  11. E. Sato, Y. Hayasi, R. Gemer, E. Tanaka, H. Mori, et al. Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing weakly ionized linear copper plasma. *Rev. Sci. Instrum*. 2003;74:5236-5240.
  12. N. Tokunaga, T. Yamazaki, T. Akiyama, S. Sano, H. Mori. Acute limb ischemia does not facilitate but inhibits norepinephrine release from muscle sympathetic nerve endings in anesthetized rabbit. *J. Cardiovasc Pharmacol*. 2003; 42(Suppl. 1): S7-S10.
  13. 知久正明、西上和宏、盛 英三 他. 放射光および普及型X線源を用いた微小血管造影による再生血管の評価。西村恒彦編 機能代謝画像診断法と分子画像 (177-186) 南山堂 2003.
  14. 藤井隆文, 永谷憲歳, 盛 英三 他. ゼラチンによる遺伝子の徐放化と細胞-遺伝子ハイブリッド治療への応用. ドラッグデリバリーシステムDDS技術の新たな展開とその活用法, メディカル ドゥ, 2003. 遺伝子医学別冊:194-199
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

分担研究報告書

組織工学による血管増生心筋組織の構築ならびにその移植による冠血管床の再生：

心筋組織再構築のための還流培養装置の開発

分担研究者 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

**研究要旨** 我々はシート状の心筋細胞を積層化することで3次元の心筋組織を再構築する独自の研究を展開してきた。これまでに初期の酸素・栄養の透過性に起因する作製組織の厚さの限界があることが明らかとなっているが、本研究ではそれを克服するため還流培養装置を用いて酸素・栄養の透過性の向上を試みた。その結果、還流を行い培養した場合は、還流しない場合に比べ明らかに厚い組織が再生されることが明らかとなった。

**A. 研究目的**

当研究室では細胞をシート状に回収できる温度応答性培養皿を用い細胞シートを積層化することで3次元組織を再構築する手法により種々の組織の再構築を行ってきた。心筋組織に関しても心筋細胞シートを重層化することで電氣的に同期して拍動する組織の再構築が可能となっている。しかしながらこれまでの研究から酸素・栄養の透過性に起因する心筋細胞シート重層化枚数の限界が明らかとなっている。そこで本研究では酸素・栄養の透過性の向上を目的に静置培養ではなく組織を還流しながら培養することを着想した。本年度は重層化心筋細胞シートの還流を可能とす

るための心筋細胞シート重層化マニピュレーターおよび還流用バイオリクターを作製し新規の培養系を確立することを目的とした。

**B. 研究方法**

シート状の細胞の回収には温度応答性培養皿を用いた。この培養器材は通常の培養皿上に温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を電子線照射により表面修飾したもので、通常の培養温度である37℃では細胞接着性であるが、32℃以下の低温処理で細胞非接着性となる。この培養皿に細胞を密に培養すると、低温処理により細胞がその下面の接着因子とともにシート状に培養皿

から脱着する。この培養皿上にコラゲナーゼを用いて単離した新生仔ラット心筋細胞を培養し心筋細胞シートを作製した。培養4日目に新たに開発したスタンプ状の細胞シートマニピュレーターを培養細胞上に接着、その後低温処理を行うことで心筋細胞シートを脱着、同様の操作を繰り返すことで積層化した。次にこの重層化細胞シートを一定の圧較差を保って還流可能なバイオリクターに固定し還流培養を行った。なお実験動物を使用した実験に関しては東京女子医科大学動物実験に関する指針に従い、ヘルシンキ宣言の精神を尊重して十分な倫理的配慮のもとに行った。

### C. 研究結果

新たに作製した細胞シートマニピュレーターを用いることで安定した細胞シートの回収・積層化が可能となった。温度処理の時間に関しては 37°C 1 時間 20°C 1 時間で十分に重層化が可能であることが明らかとなった。還流培養装置に関してはダイアフラムポンプを用い直径 3cm の組織に 0~10cmH<sub>2</sub>O の圧較差を負荷できるものを作製した。この装置を用い重層化心筋細胞シートを 1 週間培養したところ、組織切片上、還流しない場合に比べ明らかに厚い組織が構築されていた。また還流しない場合は細胞間の隙間や結合組織が多いのに対し還流した場合は細胞同士が密着し細胞質成分の多い組織像を示した。

### D. 考察

今回の研究結果より重層化心筋細胞シートを還流培養することでより厚い心筋組織の再構築が可能であることが示された。メカニズム的には酸素・栄養の透過性の向上、老廃物の除去に加え、培養液の圧較差に伴う物理的な負荷も重要であるのではないかと考えられた。次年度は種々の条件で還流培養を行い最適化を図るとともにそのメカニズムを追求する予定である。

### E. 結論

細胞シート工学と独自の還流培養装置を用いることにより、in vitro でより厚い心筋組織の再構築が可能となった。

### 研究協力者

梅津光生 (早稲田大学)  
坂口勝久 (早稲田大学)  
藤本哲男 (芝浦工業大学)  
佐藤和也 (芝浦工業大学)

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 論文発表

1. O. H. Kwon, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano. Accelerated cell sheet recovery by co-grafting of PEG with PIPAAm onto porous cell culture membranes. *Biomaterials*. 2003; 41: 1223-1232.
2. Z. Feng, M. Yamato, T. Akutsu, T. Nakamura

- T. Okano. Investigation on the mechanical properties of contracted collagen gels as a scaffold for tissue engineering. *Artificial Organs*. 2003; 27(1): 84-91.
3. T. Yoshida, T. Aoyagi, E. Kokufuta, T. Okano. Newly designed hydrogel with both sensitive thermoresponse and biodegradability. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 2003; 41: 779-787.
  4. M. Ebara, M. Yamato, M. Hirose, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano. Copolymerization of 2-carboxyisopropylamine with N-Isopropylacrylamine accelerates cell detachment from grafted by reducing temperature. *Biomacromolecules*. 2003; 4: 334-349.
  5. M. Annaka, T. Matsuura, M. Kasai, T. Nakahira, Y. Hara, T. Okano. *Biomacromolecules*. Preparation of comb-type N-isopropylacrylamide hydrogel beads and their application for size-selective separation media. 2003; 4(2): 395-403.
  6. H. Otsuka, E. Uchimura, H. Koshino, T. Okano, K. Kataoka. Anomalous binding profile of phenylboronic acid with N-acetylneuraminic acid (Neu5AC) in aqueous solution with varying pH. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125: 3493-3502.
  7. H. Yamanaka, K. Yoshizako, Y. Akiyama, H. Sota, Y. Hasegawa, A. Kikuchi, T. Okano. Affinity chromatography with collapsibly tethered ligands. *Anal. Chem.* 2003; 75: 1658-1663.
  8. J. Kobayashi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano. Cross-linked thermoresponsive anionic polymer-grafted surfaces to separate bioactive basic peptides. *Anal. Chem.* 2003; 75: 3244-3249.
  9. Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, H. Toma, T. Okano. Transplantable urothelial cell sheets harvested noninvasively from temperature-responsive culture surfaces by reducing temperature. *Tissue Engineering*. 2003; 9(5): 1005-1012.
  10. M. Yamato, C. Konno, S. Koike, Y. Isoi, T. Shimizu, A. Kikuchi, K. Makino, T. Okano. *J. Biomed. Mater. Res.* Nanofabrication for micropatterned cell arrays by combining electron beam irradiated polymer-grafting and localized laser ablations. 2003; 67A: 1065-1071.
  11. T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*. 2003; 24: 2309-2316.
  12. M. Harimoto, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano. Cell sheet engineering: Intelligent Polymer Patterned Surface for Tissue Engineered

Liver. Macromol. Symposia. 2003; 195:  
231-235.

学会発表

1. Society for Biomaterials 29th Annual  
Meeting and Exposition 2003. 04. 30 - 05.  
03 USA

- 1) T. Tsuda, A. Kikuchi, M. Yamato, Y. Sakurai, T. Okano, "Patterned thermo-responsive surfaces for recovery of pattern co-culture cell sheets"
- 2) M. Yamato, C. Konno, S. Koike, T. Shimizu, Y. Isoi, A. Kikuchi, K. Makino, T. Okano, "Nanofabrication for micropatterned cell arrays by combining electron beam irradiated polymer-grafting and localized laser ablation"
- 3) M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano, "Synthetic cell adhesive peptides immobilized temperature responsive culture and reducing temperature"
- 4) A. Kikuchi, R. M. Iskakov, T. Okano, "Thermo-responsive polymer modified alginate gel beads for possible release control of macromolecular drugs"
- 5) Y. Akiyama, M. Yamato, A. Kikuchi, S. Koike, Y. Tsuda, T. Okano, "Micropatterning of biomolecules on

TCPS dish grafted with ultrathin  
PIPAAm layer by utilizing UV laser"

2. The international congress on bio -  
nanointerface 2003. 5. 19-24 Tokyo

• A. Kikuchi, J. Kobayashi, H. Kanawaza,  
T. Okano, "Fabrication of thermo -  
responsive surfaces for green  
chromatography"

- 1) T. Shimizu, "Myocardial tissue reconstruction by cell sheet engineering"
- 2) Y. Tsuda, T. Okano, "Fabrication of dual-patterned thermo-responsive culture dishes for recovery of pattern co-cultured cell sheets"
- 3) M. Ebara, K. Sakai, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, T. Okano, "On-off control of cell adhesion with thermo-responsive nano-structures"

3. 第107回日本眼科学会総会 2003. 4. 17-20 福  
岡

- 1) 林田康隆, 西田幸二, 大和雅之, 渡辺克彦, 前田直之, 渡辺仁, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, "温度応答性培養皿を用いた培養ヒト口腔粘膜上皮シートの作製", 日本眼科学會雑誌, 107, 167 (2003)
- 2) 西田幸二, 大和雅之, 林田康隆, 渡辺克彦, 前田直之, 渡辺仁, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, "温度応

- 答性培養皿を用いて作製・回収したヒト培養角膜上皮シートの組織化学的検討”, 日本眼科学會雑誌, 107, 217 (2003)
4. The first international congress on bio-nanointerface 2003. 5. 19-24 Tokyo
- 1) A. Kikuchi, J. Kobayashi, N. Idota, K. Sakai, H. Kanazawa, T. Okano, “Fabrication of thermo-responsive surface for green chromatography”, Abstracts, 42 (2003)
  - 2) T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, A. Kikuchi, T. Okano, “Myocardial tissue reconstruction by cell sheet engineering”, Abstracts, 112 (2003)
  - 3) K. Morishima, Y. Tanaka, M. Ebara, T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, K. Sato, T. Okano, “Bio-actuated microsystem using cultured cardiomyocytes”, Abstracts, 215 (2003)
  - 4) Y. Tsuda, A. Kikuchi, M. Yamato, Y. Sakurai, T. Okano, “Fabrication of dual-patterned thermo-responsive culture dishes for recovery of pattern co-culture cell sheet”, Abstracts, 219 (2003)
  - 5) M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano, “On-off control of cell adhesion with thermo-responsive nano-structures”, Abstracts, 220 (2003)
5. 7th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems ( $\mu$ -TAS2003) 2003. 10. 5-9 USA
- Y. Tanaka, K. Sato, M. Yamato, T. Okano, T. Kitamori, “Micro Liver System for Bioreactor and Bioconversion”, (2003)
6. 第52回(2003年)高分子学会年次大会 2003. 5. 28-30 名古屋
- 1) 井戸田直和, 小林純, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, “温度応答性キャピラリー表面と生理活性物質との相互作用の検討”, 高分子学会予稿集, 52(4), 788 (2003)
  - 2) 林真由美, 菊池明彦, 秋山義勝, 牧野公行, 岡野光夫, “培養細胞シートの脱着を可能とする温度応答性ポリマー固定化ガラス表面”, 高分子予稿集, 52(4), 791 (2003)
  - 3) 津田行子, 菊池明彦, 大和雅之, 桜井靖久, 岡野光夫, “細胞機能を維持した共培養細胞シートを回収を可能とする温度応答性パターン化培養皿”, 高分子予稿集, 52(4), 792 (2003)
  - 4) 荏原充宏, 酒井清孝, 大和雅之, 青柳隆夫, 菊池明彦, 岡野光夫, “温度による細胞脱着における細胞接着因子の分子鎖長の影響”, 高分子予稿集, 52(4), 792 (2003)

- 5) 秋山義勝, 小池俊輔, 津田行子, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫, 高分子予稿集, 52(4), 792 (2003)
  - 6) 平野覚浩, 大塚英典, 長崎幸夫, 堀池靖浩, 岡野光夫, 片岡一則, “精密微細加工を施した高分子基板上での内皮-肝スフェロイドマイクロアレイ化培養: 細胞機能に及ぼす基板特性の効果”, 高分子予稿集, 52(5), 1090 (2003)
  - 7) 中山正道, 宮崎貴成, 酒井清孝, 横山昌幸, 岡野光夫, “温度応答性高分子ミセルを用いる細胞内薬物分布の制御”, 高分子予稿集, 52(5), 1109 (2003)
  - 8) 遠藤哲也, 小林純, 秋山義勝, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, “温度応答性金属アフィニティー表面の作製”, 高分子予稿集, 52(5), 1148 (2003)
7. 第26回日本気管支学会 2003. 5. 29-30 神奈川
- ・神崎正人, 大和雅之, 小山邦広, 吉田珠子, 桑田裕美, 池田豊秀, 足立孝, 村杉雅秀, 岡野光夫, 大貫恭正, “上皮細胞を有する代用気管のための気管上皮細胞シートの作成”, 日本気管支学会雑誌, 25(3), 194 (2003)
8. 第6回日本組織工学会 2003. 6. 12-13 早稲田
- 1) 高沢亮治, 大和雅之, 白柳慶之, 関根秀一, 岡野光夫, 木原和徳, “中皮細胞ふい部リングルシートによる腹膜再建”, 抄録集, 60 (2003)
  - 2) 松浦忍, 白柳慶之, 高沢亮治, 大和雅之, 岡野光夫, 忠地一輝, 加藤哲郎, 大山力, 佐藤一成, “脊損ラット膀胱に対するbladder acellular matrix graft移植の検討”, 抄録集, 62 (2003)
  - 3) 津田行子, 菊池明彦, 大和雅之, 桜井靖久, 梅津光生, 岡野光夫, “肝細胞アルブミン産生を増強しうるパターン化共培養組織の作製”, 抄録集, 88 (2003)
  - 4) 糸賀和義, 大和雅之, 小林純, 菊池明彦, 岡野光夫, “液晶プロジェクトを改造して作製したマスクレス光反応装置による細胞のマイクロパターンニング”, 抄録集, 89 (2003)
  - 5) 渡辺克彦, 西田幸二, 大和雅之, 林田康隆, 前田直之, 渡辺仁, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, “温度応答性培養皿上で作成した培養角膜上皮シートにおける肝細胞保存状態の検討”, 抄録集, 100 (2003)
  - 6) 林田康隆, 西田幸二, 大和雅之, 渡辺克彦, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, “眼表面再建の為の温度応答性培養皿を用いた培養ヒト口腔粘膜上皮シートの作製”, 抄録集, 101 (2003)

- 7) 角田泰造, 西田幸二, 大和雅之, 井出武, 前田直之, 渡辺仁, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, “温度応答性培養皿を用いた人培養角膜内皮シート回収”, 抄録集, 102 (2003)
- 8) I. Ahmad, Y. Sawa, S. Taketani, S. Miyagawa, M. Yoneda, T. Shimizu, T. Okano, H. Matsuda, “Tissue engineering myoblast sheet improves cardiac performance”, Abstracts, 123 (2003)
- 9) 関根卓也, 清水達也, 岡野光夫, 岩崎清孝, 桜井靖久, 梅津光生, “心筋組織再構築のための機械力学的伸展培養装置の開発及びその機能評価”, 抄録集, 125 (2003)
- 10) 白柳慶之, 大和雅之, 山崎雄一郎, 東間紘, 岡野光夫, “生体内における培養尿路上皮細胞シートの再生”, 抄録集, 128 (2003)
- 11) 荏原充宏, 大和雅之, 青柳隆夫, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, “種々の細胞種の無血清培養を可能にする新規温度応答性培養皿”, 抄録集, 133 (2003)
- 12) 和田健一, 徐麗明, 岡野光夫, 谷口彰良, “遺伝子工学的手法を用いたストレス応答細胞の作成”, 抄録集, 135 (2003)
9. Drug Delivery System 2003. 6. 19-20 京都
- ・武田直也, 横山雅之, 岡野光夫, “疎水基を導入した温度応答性3元ランダム共重合の遺伝子キャリアーへの応用”, 予稿集, 269 (2003)
10. 81st general session of the IADR 2003. 06. 25-28 Sweden
- ・M. Hasegawa, M. Yamato, T. Okano, I. Ishikawa, “Transplantable human periodontal ligament cell sheets: A novel approach for periodontal tissue regeneration”, abstracts, (2003)
11. 第32回医用高分子シンポジウム 2003. 07. 31-08. 01 東京
- 1) 武田直也, 横山昌幸, 岡野光夫, “温度応答性 terpolymer への疎水基導入と遺伝子デリバリー効率へ与える効果”, 要旨集, 11-12 (2003)
- 2) 井戸田直和, 小林純, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, “ぬれを大きく変化させる温度応答性キャピラリーの作製と生体分子との相互作用制御”, 要旨集, 23-24 (2003)
- 3) 中山正道, 横山昌幸, 岡野光夫, “温度応答性高分子ミセルを用いる抗ガン剤の細胞内分布制御”, 要旨集, 51-52 (2003)
- 4) 津田行子, 菊池明彦, 大和雅之, 桜井靖久, 梅津光夫, 岡野光夫, “温度性応答パターン化表面による共培養細胞シートの回収と細胞機能の解



- 析”，要旨集，65-66(2003)
12. 第10回クロマトグラフィースンポジウム  
分離法と質量分析」 2003. 08. 02-03 東京  
・坂本千賀子，岡田裕司，金澤秀子，菊池明彦，岡野光夫，“機能性高分子による高機能表面の医薬品分離への応用”，  
Chromatography, 24. suppl1, 11(2003)
  13. Advanced Technology Applications for  
Combat Casualty Care 2003. 08. 18-22  
Florida  
・T. Okano, “Cell Sheet Engineering for  
Tissue Regeneration”
  14. 日本分析化学会第52年会 2003. 09. 23-25 宮  
城  
・田中有希，佐藤記一，大和雅之，岡野光夫，北森武彦，“培養細胞を用いたバイオマイクロリアクターの開発”，要旨集
  15. 第52回 (2003) 高分子討論会  
2003. 09. 24-26 山口
    - 1) 秋山義勝，菊池明彦，大和雅之，岡野光夫，“熱応答性高分子を用いたナノバイオインターフェイスの機能設計”，予稿集，52(13)，3824-3825(2003)
    - 2) 小池俊輔，大和雅之，牧野公子，岡野光夫，“慣性力ヘッドレイヤーを用いて作製した細胞アレイ”，予稿集，52(13)，3912-3913(2003)
    - 3) 糸賀和義，大和雅之，小林純，菊池明彦，岡野光夫，“液晶プロジェクタを改造して作製したマスクレス光重合装置による細胞のマイクロパターンニング”，予稿集，52(13)，3916-3917(2003)
    - 4) 宮崎貴成，酒井清孝，中山正道，横山昌幸，岡野光夫，“固形癌の治療を目的とした温度応答性高分子ミセルの有用性について”，予稿集，52(13)，3933-3934(2003)
    - 5) 津田行子，菊池明彦，大和雅之，中尾愛子，桜井靖久，梅津光生，岡野光夫，“細胞機能の亢進した共培養細胞シートを作製できるマイクロパターン化温度応答性表面”，予稿集，52(13)，3951-3952(2003)
    - 6) 荏原充宏，酒井清孝，大和雅之，青柳隆夫，菊池明彦，岡野光夫，“RGDおよびPHSRN固定化温度応答性培養皿上での細胞の接着・脱着挙動”，予稿集，52(13)，3953-3954(2003)
    - 7) 遠藤哲也，菊池明彦，小林純，酒井清孝，岡野光夫，“温度応答性を付与した新規金属アフィニティークロマト担体の作製とタンパク質分離”，予稿集，52(14)，4031-4032(2003)
    - 8) 井戸田直和，菊池明彦，小林純，酒井清孝，岡野光夫，“Microfluidicsを利用した温度応答性表面と生理活性物質との相互作用の特性の評価”，予稿集，52(14)，4041-4042(2003)
    - 9) 岩永進太郎，秋山義勝，菊池明彦，大和雅之，酒井清孝，岡野光夫，“バ

- イオナノインターフェイスを用いた新規セルアレイの開発”, 予稿集, 52(14), 4136(2003)
16.  $\mu$ -TAS2003 (7th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems) 2003.10.05-09 California
- Y. Tanaka, K. Sato, M. Yamato, T. Okano, T. Kitamori, “Micro Liver System for Bioreactor and Bioconversion”, abstracts, 74, 1560-1564(2002)
17. US-Japan Symposium on Nanotechnology in Advanced Therapy and Diagnosis 2003.10.09-11 横浜
- 1) Y. Akiyama, S. Iwanaga, A. Kikuchi, M. Yamato, K. Sakai, T. Okano, “Development of novel cell array by utilizing bio-nano interfaces”, Abstract, P11(2003)
  - 2) A. Kikuchi, Y. Tsuda, M. Yamato, Y. Sakurai, M. Umezu, T. Okano, “Nanometer-thick Patterned Dual Thermo-Responsive Surfaces for Heterotypic Cell Sheet Engineering”, Abstract, P12(2003)
18. 第18回日本整形外科学会基礎学術集会 2003.10.16-17 福岡
- 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, “再生医療のための組織形成を可能とする温度応答性表面, 日本整形外科学会雑誌, 77(8), S1063(2003)
19. The International Symposium of Cardiology Frontiers: Cardiomyopathy and Heart Failure 2003 2003.10.17-18 札幌
- T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, A. Kikuchi and T. Okano, “Myocardial Tissue Reconstruction by Cell Sheet Engineering”, Abstract, 30(2003)
20. Sweden-Japan Workshop on Bionanotechnology 2003.11.09-11 Kyoto
- 1) Y. Akiyama, A. Kikuchi, M. Yamato and T. Okano, “Ultra thin thermoresponsive grafted gel for cell adhesion control”, Abstracts, 51-52, (2003)
  - 2) N. Takeda, M. Yokoyama, T. Okano, “Design and Application of Temperature-responsive Copolymers for Effective Transfection Systems to Cell Culture”, Abstracts, 53-54, (2003)
21. ISSP International Workshop 5th Gel Symposium Polymer Gels; Fundamentals and Nano-Fabrications (GelSympo 2003) 2003.11.17-21 Kashiwa
- 1) N. Idota, A. Kikuchi, J. Kobayashi, K. Sakai and T. Okano, “Preparation of Thermoresponsive Hydrogel-grafted Capillary Tubings for Elution Control of Hydrophobic Bioactive Compounds”, Program, 122, (2003)

- 2) M. Ebara, Y. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai and T. Okano, "Novel Thermo-sensitive Nano-structure Hydrogels for Cell Culture", Program, 123, (2003)
- 3) Y. Akiyama, A. Kikuchi, M. Yamato and T. Okano, "Design of intelligent bio-nano interfaces for cell attachment and detachment surfaces", Program, 133-134, (2003)
22. 第24回日本炎症・再生医学会  
2003. 11. 26-27 京都
- 1) 林田康隆, 西田幸二, 大和雅之, 渡辺克彦, 山本和秋, 井手武, 角出泰造, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, "角結膜上皮疾患に対する培養口腔粘膜上皮シート移植術の開発", プログラム予稿集, 452, (2003)
- 2) 西田幸二, 大和雅之, 林田康隆, 渡辺克彦, 山本和秋, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, "難治性角膜疾患に対する培養細胞シート移植", プログラム予稿集, 453, (2003)
- 3) 角出泰造, 西田幸二, 大和雅之, 井手武, 山本和秋, 林田康隆, 渡辺克彦, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, "温度応答性培養皿を用いて作製・回収したヒト培養角膜内皮シートの組織学的検討", プログラム予稿集, 454, (2003)
23. 21COE「実践的ナノ化学」国際シンポジウム 早稲田大学2003 2003. 12. 10-11 東京  
・ 井戸田直和, 菊池明彦, 小林純, 酒井清孝, 岡野光夫, "マイクロ温度応答性LCを目指したインテリジェントキャピラリー表面の調製", プログラム, 103, (2003)
24. 第25回日本バイオマテリアル学会大会  
2003. 12. 16-17 大阪
- 1) 荏原充宏, 大和雅之, 青柳隆夫, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, "温度スイッチによる細胞-基材間の構造制御", 予稿集, 68, (2003)
- 2) 岡野光夫, "バイオマテリアルと組織工学: インテリジェントバイオインターフェイスを用いた細胞シート工学", 予稿集, 72, (2003)
- 3) 平野覚浩, 大塚英典, 長崎幸夫, 堀池靖浩, 岡野光夫, 片岡一則, "基板表面特性のコントロールによる内皮-肝スフェロイド共培養と特異機能の発現", 予稿集, 93, (2003)
- 4) 田中陽, 森島圭祐, 荏原充宏, 清水達也, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫, 北森武彦, "心筋細胞を用いたバイオマイクロアクチュエーターの開発", 予稿集, 185, (2003)
- 5) 西本綾子, 白柳慶之, 大和雅之, 深井文雄, 岡野光夫, "培養平滑筋細胞シートによる平滑筋組織の再生", 予稿集, 201, (2003)
- 6) 横山昌幸, 岡野光夫, 西田博, 富澤康子, 遠藤真弘, 黒澤博身, "高分

- 子ミセルを一成分とする外科用接着剤”，予稿集，212，(2003)
- 7) 秋山義勝，菊池明彦，大和雅之，岡野光夫，“温度応答性高分子を用いたナノバイオインターフェイスの構築”，予稿集，213，(2003)
- 8) 小池俊輔，大和雅之，牧野公子，岡野光夫，“慣性力ヘッドディスプレイを用いて作製したマイクロアレイ”，予稿集，219，(2003)
- 9) 糸賀和義，大和雅之，小林純，菊池明彦，岡野光夫，“液晶プロジェクタを改造して作製したマスクレス光反応装置による細胞のマイクロパターンニング”，予稿集，220，(2003)
- 10) 津田行子，菊池明彦，中尾愛子，大和雅之，桜井靖久，梅津光生，岡野光夫，“マイクロパターン化インターフェイスを用いた共培養組織の機能特性”，予稿集，227，(2003)
- 11) 中山正道，横山昌幸，岡野光夫，“温度により細胞内薬物移行を制御する薬物キャリアー”，予稿集，241，(2003)
- 12) 佐藤和也，藤本哲男，清水達也，磯井由紀，大和雅之，菊池明彦，岡野光夫，“細胞シートマニピュレータを用いた細胞シート接着力の解析”，予稿集，258，(2003)
- 13) 磯井達也，堀川泰弘，清水達也，磯井由紀，大和雅之，菊池明彦，藤本哲男，岡野光夫，“管状心筋組織モデルの作製と力学的機能評価の検討”，予稿集，262，(2003)
- 14) 関根卓也，清水達也，磯井由紀，大和雅之，菊池明彦，“温度応答性培養皿及び伸展培養デバイスを用いた心筋組織の再構築及び作製心筋組織の機能評価”，予稿集，264，(2003)
- 15) 黒澤康紀，白井暢子，田中順三，岡野光夫，谷口彰良，“肝-血管内皮細胞重層化共培養系における肝特異的遺伝子発現の変化”，予稿集，266，(2003)
- 16) 岩永進太郎，秋山義勝，菊池明彦，大和雅之，酒井清孝，岡野光夫，“バイオナノインターフェイスを用いた新規セルアレイの開発”，予稿集，304，(2003)
- 17) 和田健一，徐麗明，田中順三，岡野光夫，谷口彰良，“ストレス応答遺伝子を利用した細胞毒性の検出”，予稿集，336，(2003)
- 18) 井戸田直和，菊池明彦，小林純，酒井清孝，岡野光夫，“水系マイクロLC分離を目指した温度応答性高分子修飾キャピラリーの調製”，予稿集，361，(2003)
25. 第15回高分子ゲル研究討論会  
2004.01.14-15 東京
- 1) 岩永進太郎，酒井清孝，秋山義勝，菊池明彦，大和雅之，岡野光夫，“親