

討. 第63回東京矯正歯科学会大会、平成16年7月8日、東京.

矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、池田敏之、緒方直史、筑田博隆、川口浩、中村耕三、高戸毅、鄭 雄一: Wnt-βカテニンシグナルは軟骨細胞への分化と肥大化を促進的に制御している. 第22回日本骨代謝学会 2004年8月4-7日、大阪.

大庭伸介、池田敏之、亀倉暁、釘宮典孝、筑田博隆、矢野文子、A. C. Lichtler、小笠原徹、星和人、川口浩、中村耕三、高戸毅、鄭雄一: BMPシグナルとRunx2が骨芽細胞への分化のための最低限のシグナルユニットである. 第22回日本骨代謝学会、2004年8月7日、大阪.

Liu G., Hoshi K., Ogasawara T., Takato T., Kawaguchi H., Nakamura K. : Experimental Trials to Make an Implant-type Regenerated Cartilage by Autologous Chondrocytes. 第53回東日本整形外科学会 2004年9月24日、山形.

阿部 雅修、大平美紀、金田篤志、八木由紀子、北野良博、大石祥子、高戸毅、杉村隆、中川原章、牛島俊和: 予後不良な神経芽細胞腫での複数のCpGアイランドの顕著なメチル化. 第63回日本癌学会総会_シンポジウム、2004年10月、福岡.

藤原久子、飯島美代子、高戸毅、豊岡照彦、引地尚子: 東京大学保健センターにおける精密歯科検診の有用性についての検討. 第42回全国大学保健管理研究集会、2004年10月6-7日、大阪.

引地尚子、石井聡、進藤英雄、高戸毅、清水孝雄: Suppression of osteoporosis in ovariectomized mice deficient in platelet-activating factor receptor. 第77回日本生化学大会、2004年10月13-16日 横浜.

Mori Y., Sakiyama M., Susami T., Chikazu D.

Maatsuzaki M., Eguchi T., Saijo H. and Takato T.: Expansion of mandibular V-shaped dental arch using distraction technique in the patient with hypoglossia. 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery & 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. 20-23 Oct, 2004, Chiba, Japan.

Yano F., Ohba S., Fujihara Y., Ogasawara T., Chikazu D., Mori Y., Yonehara Y., Susami T., Takato T.: Canonical Wnt signaling promotes Chondrogenic differentiation and hypertrophy in vitro; 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery & 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons; October 20-23, 2004, Chiba, Japan.

Ohba S., Yano F., Ogasawara T., Chikazu D., Fujihara Y., Mori Y., Yonehara Y., Susami T., Takato T.: Combination of BMP and Runx2 Signalings Constitute the Minimum and Sufficient Unit for Osteogenic Differentiation; 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery & 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. Oct. 20-23, 2004, Chiba, Japan.

Hikiji H., Eguchi T., Saijo H., Koshikiya N., Yonehara Y., Takato T.: The improvement of nonsurgical correction for nasal deformity prior to cheiloplasty. 6th asian congress on oral and Maxillofacial surgery, 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons Oct. 20-23, 2004, Chiba, Japan.

Ogasawara T., Chikazu D., Mori Y., Ohba S., Fujihara Y., Yano F., Yonehara Y., Susami T., Takato T.: Possible Involvement of Cell cycle factors in Osteoblast Differentiation. 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons

22 October, 2004. Chiba, Japan.

Fujihara Y., Eguchi T., Mori Y., Ohba S., Ogasawara T., Yano F., Yonehara Y., Susami T., Takato T.: Gene transfer of bFGF to recipient bed improves the survival of ischemic skin flap. 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 22 October, 2004, Chiba, Japan.

Fujihara H., Mori Y., Eguchi T., Saijo H., Koizumi T., Tsuyama Y., Yonehara Y., Takato T.: Clinical analysis of 146 oral cancer patients. 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2004, October 20-23, Chiba, Japan.

山岡 尚世、小笠原 徹、中塚 貴志、朝戸裕貴、高戸毅、星 和人：インプラント型再生軟骨作製のための足場素材の検討 第13回日本形成外科学会基礎学術集会 10月21日、千葉。

矢野文子、大庭伸介、釘宮典孝、川口浩、中村耕三、高戸毅、鄭 雄一：Wnt- β カテニンシグナルは軟骨細胞への分化と肥大化を促進的に制御している。第19回日本整形外科学会基礎学術集会 2004年10月21-22日東京。

大庭伸介、池田敏之、高戸毅、中村耕三、川口浩、鄭雄一：COL1-GFP マーカー遺伝子導入システムを用いた骨芽細胞への分化シグナルの検索。第19回日本整形外科学会基礎学術集会 2004年10月21-22日、東京。

大庭伸介、池田敏之、亀倉暁、釘宮典孝、筑田博隆、矢野文子、Alex C Lichtler、小笠原徹、星和人、中村耕三、高戸毅、川口浩、鄭雄一：BMPシグナルとRunx2が骨芽細胞分化における最小かつ十分なシグナルユニットである。第6回日

本骨粗鬆症学会、2004年11月17-20日、大宮。

松崎雅子、崎山美雪、須佐美隆史、森良之、今村尚子、荻原祐二、高戸毅：閉塞性睡眠時無呼吸症候群に対するOral Applianceの治療効果。第63回日本矯正歯科学会大会、2004年11月19日、福岡。

荻原祐二、須佐美隆史、松崎雅子、崎山美雪、伊東薫平、森良之、高戸毅：上下顎前歯部歯槽骨延長術により咬合改善をはかった開咬症例。第63回日本矯正歯科学会大会、2004年11月19日、福岡。

高見麻梨子、西條英人、森良之、近津大地、米原啓之、高戸毅：顎下腺に生じたOncocytomaの1例。第178回口腔外科学会関東地方会、2004年11月27日、東京。

Abe, M., Ohira, M., Kaneda, A., Yagi, Y., Fukuda, H., Kitano, Y., Oishi, S., Takato T., Sugimura, T., Nakagawara, A., and Ushijima, T. Methylation status of a genomic region strongly correlates with the prognosis of Neuroblastoma. 6th Joint Conference of the AACR and the JCA, January, 2004, Hawaii.

Ohba S., Ikeda T., Kamekura S., Kugimiya F., Yano F., Lichtler AC., Komori T., Ogasawara T., Hoshi K., Nakamura K., Takato T., Kawaguchi H., Chung UI.: Combination of BMP and Runx2 Signalings Constitute the Minimum and Sufficient Unit for Osteogenic Differentiation through Regulation of Cbfb. 26th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, October 1-5, 2004, Seattle, USA.

Yano F., Ohba S., Kugimiya F., Ikeda T., Ogata N., Nakamura K., Kawaguchi H., Takato T. and Ung-il Chung: The canonical Wnt signaling promotes chondrogenic differentiation and hypertrophy in

vitro. 26th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004. 10. 1-5 , Seattle, Washington, USA.

Chikazu D., Ohba S., Ogasawara T., Katagiri M., Kawaguchi H., Takato T.: Combination of Platelet-Rich Plasma (PRP) and COX-2 Inhibitor Potently Stimulates Mesenchymal Stem Cell Proliferation. 26th Annual Meeting of the ASBMR, October 1-5, 2004, Seattle, Washington, USA.

Takato T., Saijo H. : Rhinoplasty on Patients With Cleft Lip and Palate-Analytic and Technical Refinement-. The 5th Asian Pacific Craniofacial Association Conference October 4-6, 2004 Seoul, Korea.

Saijo H. . Takato T. , Takashi Nakatsuka, Kiyonori Harii : Secondary Mandibular Reconstruction with Free Bone Flap. 5th APCA 2004, 10. 4-6 Korea.

Hikiji H., Ishii S., Takato T., Shimizu T. : Osteoporosis is prevented in ovariectomized mice deficient in platelet-activating factor receptor. 2nd international conference on phospholipases A₂ and 8th international congress on platelet-activating factor and related lipid mediators, Berlin, Oct. 6 -9, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

皮膚の多能性幹細胞の単離・培養と性状解析

分担研究者 大河内仁志 国立国際医療センター
細胞組織再生医学研究部 部長

研究要旨 ヒトおよびマウスの皮膚から多能性幹細胞を分離し、培養法の検討を行った。真皮からの細胞分離には角化細胞の混入が問題となり、脂肪組織からは比較的均一な細胞を分離できたが、内皮細胞の混入の可能性が示唆された。真皮や脂肪組織から得られた細胞を浮遊培養して sphere を形成させたのち、分化条件にすると骨芽細胞、神経細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞等に分化し、多能性をもつことを証明した。

A. 研究目的

皮膚の真皮と脂肪組織から多能性幹細胞の分離を行い、浮遊培養を用いて幹細胞を大量に培養することと多分化能を検討し、幹細胞の性質を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

皮膚から多能性幹細胞の分離・培養

術前に承諾の得られた摘出皮膚（n=5, 40-75 歳）およびマウス（CD57BL/6J）の皮膚を用いた。皮膚は細切し、Hanks Balanced Solution（HBSS）で洗い、0.1%トリプシン溶液にて 37°C60 分静置した。さらに機械的に細切し、trypsin neutralizing solution（TNS）でトリプシンを中和した。細胞はフィルターで濾過し、遠心にて回収した。培養には 2% B27 supplement を含む DMEM/F12 培地を使用し、表皮細胞増殖因子（epidermal growth factor:EGF）を最終濃度 20ng/ml、塩基性繊維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor:bFGF）を 10ng/ml となるように添加し CO₂ インキュベーターで 37 度 5%CO₂ の条件下、浮遊系

培養皿で 2 週間培養した。スフェアの形成数およびスフェア 1 個当たりの大きさを検討した。細胞播種濃度：10 cells/ml

脂肪組織から多能性幹細胞の分離・培養

脂肪組織はコラゲナーゼ処理を行い、遠心すると脂肪細胞は浮遊するので沈殿分画の間葉系幹細胞を分離した。まず FBS 添加 DMEM 培地で T25,T75 の培養皿に培養した。1-3 回継代後、前述の無血清培地で sphere を形成させた。

分化条件下における分化マーカーの検討

形成したスフェアを、EGF、bFGF を除いた 1%ウシ血清を含む DMEM/F12 培地で 1-2 週間培養して分化を誘導し、ニューロンのマーカーの β III Tubulin、MAP2、平滑筋のマーカーの α SMA、脂肪滴を染色する Oil red O を用いて免疫染色を行い各種抗体の陽性細胞の割合を検討した。

「倫理面への配慮」

研究に用いたヒト皮膚および脂肪組織は術前に同意を得た手術標本の一部を使用した。実験にはマウスを用いたが、当研究所の実験動物委員会の規則に従い、動物愛護上の

配慮をもって実験を行った。

C. 研究結果

マウス皮膚より浮遊培養系を用いて、sphereを形成させ、半年以上の長期継代に成功した。ヒト真皮由来の細胞はマウスに比べると増殖が遅く、sphereの形成率も低かった。そこでまず10%FBS添加DMEM中で接着培養して細胞数を増やすことができたが、同時に角化細胞の増殖もみられた。トリプシンに対する感受性の違いにより継代時にほとんどの角化細胞を除くことは可能であった。接着培養で増やした細胞を浮遊培養にしたところ、sphereの形成率はみられたが、継代により増殖力の低下がみられ、4-5代で増殖が停止した。脂肪組織由来の細胞はコラゲナーゼ処理により成熟脂肪細胞と間葉系幹細胞の分離は容易にできた。ただ初代培養においては紡錘形の細胞に混じって敷石状の細胞増殖もみられ、内皮細胞の可能性が示唆された。脂肪組織由来の細胞は長期継代が可能で、骨芽細胞誘導培地にかえるとアルカリフォスファターゼ陽性細胞が多数出現し、4週間後にはカルシウム沈着もみられた。また脂肪細胞誘導培地にてOil Red Oに染まる脂肪滴を含んだ脂肪細胞の分化がみられた。真皮と同様にsphereを形成させて、神経分化条件にすると β III Tubulin、MAP2陽性細胞が出現した。

D. 考察

マウス皮膚より得られるスフェアの形成数は加齢により、減少することを確認しているので、ヒトの細胞がsphereを形成しにくかったことの原因として、今回用いたドナ

一の年齢が影響した可能性が考えられる。今後さらに数を増やして検討する予定である。また初代培養では純粋な幹細胞分画を得ることが難しいので、FACSによる細胞分取法の検討もこれから必要となる。血清存在下では真皮に比べて脂肪組織由来の細胞は比較的増殖能が保たれた。脂肪組織は採取しやすいという利点があるので、無血清の条件でのさらなる検討が必要である。また分化条件下の培養により多分化能を証明した。本来接着細胞を浮遊状態にして培養しているので、脱分化しやすくなっている可能性も否定できない。またアポトーシスが抑制された可能性もある。このメカニズムの解明は細胞の可塑性を考える上で非常に重要である。また皮膚組織から皮膚以外の細胞を誘導できる可能性が示唆されたので、自己の細胞を使った再生医療に応用する道がひらける。今後分化効率を高める研究をすすめれば、幹細胞ソースとして皮膚を用いることができると考えられた。

E. 結論

皮膚から皮膚以外の細胞に分化する多能性幹細胞を単離・培養することができた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawase Y, Yanagi Y, Takato T, Fujimoto M, Okochi H. Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor-beta (TGF-beta) facilitates cell growth. *Exp Cell Res.* 295(1):194-203. 2004
2. Ura H, Takeda F, Okochi H. An in vitro outgrowth culture system for normal human keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2004 35(1):19-28.
3. Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2004 122(3):783-90

4. Itoh M, Hiraoka Y, Kataoka K, Huh NH, Tabata Y, Okochi H: Novel collagen sponge reinforced with polyglycolic acid fiber produces robust, normal hair in murine hair reconstitution model. *Tissue Eng* 10:818-24. 2004
5. Kaburagi Y, Yamashita R, Ito Y, Okochi H, Yamamoto-Honda R, Yasuda K, Sekihara H, Sasazuki T, Kadowaki T, Yazaki Y Insulin- induced cell cycle progression is impaired in Chinese hamster ovary cells overexpressing insulin receptor substrate-3. *Endocrinology* 145:5862-5874, 2004
6. Asano N, Fujimoto M, Yazawa N, Shirasawa S, Hasegawa M, Okochi H, Tamaki K, Tedder TF, Sato S. B Lymphocyte signaling established by the CD19/CD22 loop regulates autoimmunity in the tight-skin mouse. *Am J Pathol.* 165(2):641-50. 2004
7. 大河内仁志 皮膚の多能性幹細胞 医学のあゆみ 211:824-825, 2004

2. 学会発表

1. Yuriko Ito, Shoichiro Yano, Manabu Fujimoto, Tatsuo S Hamazaki, Hitoshi Okochi : SIDE POPULATION CELLS IN THE EPIDERMIS Timberline Symposium 2005 2005年2月ポートランド(米国)
2. 矢野正一郎、藤本学、大河内仁志 Hoechst33342を用いたマウス皮膚幹細胞(Side Population)の取得とその性状解析 第29回日本研究皮膚科学会、京都、4月、2004

3. 大河内仁志 皮膚の多能性幹細胞について 第34回日本皮膚アレルギー学会学術大会、富山、7月、2004
4. 大河内仁志：皮膚の多能性幹細胞と毛乳頭細胞について 国立遺伝学研究所・研究集会「上皮・毛器官の形態形成メカニズム」三島、2月、2004
5. 顔育達、河瀬陽子、浜崎辰夫、玉置邦彦、大河内仁志：皮膚由来幹細胞から神経細胞への分化誘導条件の検討 第4回日本再生医療学会、大阪、3月、2004
6. 河瀬陽子、徳原真、顔育達、高戸毅、水野博司、浜崎辰夫、大河内仁志：ヒト脂肪細胞からの神経細胞誘導 第4回日本再生医療学会、大阪、3月、2004
7. 徳原真、寺島裕夫、齊藤幸夫、清水利夫、河瀬陽子、水野博司、浜崎辰夫、大河内仁志：ヒト大網組織よりの間葉系幹細胞の分離 第4回日本再生医療学会、大阪、3月、2004

G. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨再生法の開発と臨床応用に関する研究

分担研究者 片岡一則 東京大学大学院工学系研究科・医学系研究科教授

研究要旨 本分担研究においては、組織より分離された成体幹細胞に有効な高分子ナノミセルを用いる遺伝子導入方法の開発を目指している。本分担研究で取り組んでいる高分子ナノミセルは、ウイルス(～50ナノメートル)と同等という微小サイズでありながら、分子認識能や環境応答能などのマルチ機能を搭載可能な超機能化システムであり、表面を生体適合化する事も可能である。本研究においては図1に示すように、遺伝子等を内核に搭載した超機能化高分子ミセルの開発を行い、「必要な時(timing)に、必要な部位(location)で、必要な診断や治療(action)」を最小限の副作用で達成する「ナノ遺伝子治療」を創出する。

A. 研究目的

本研究は、がん切除後に伴う複合組織の欠損によるがん患者の QOL 低下を回避するため、組織欠損を補うための新規手法を開発するものである。従来は組織欠損を補う手法として、自家組織移植や人工組織を用いられてきたが、いずれもその機能・形態の両面において課題を残している。また他家組織移植においても、ドナーの慢性的不足や免疫学的問題など多くの問題を抱えている。このような問題を解決するため、本研究では、再生医学と生体材料工学の最先端の技術を融合させて、がん治療後の複合組織欠損を再建する治療技術を開発することを目的としている。本分担研究においては、組織より分離された成体幹細胞に有効な高分子ナノミセル(図1)を用いる遺伝子導入方法の開発を目指している。

本年度は、初年度に引き続き、天然の遺伝子ベクターであるウイルスに匹敵する人工遺伝子

ベクターシステム構築を目指し、ナノミセル型遺伝子ベクターの従来の基本設計に対し、細胞内還元環境応答機能、細胞内マイクロ環境応答機能、標的認識機能をインテリジェント機能として付与することに注力し、新規カチオン性ブロック共重合体の分子設計・合成、これら高分子とレポーター遺伝子を組み込んだプラスミド DNA (pDNA) からなるナノミセル型遺伝子ベクターの特性解析、培養細胞系での遺伝子発現、細胞内動態による一連の評価を行った。その結果、いずれにおい

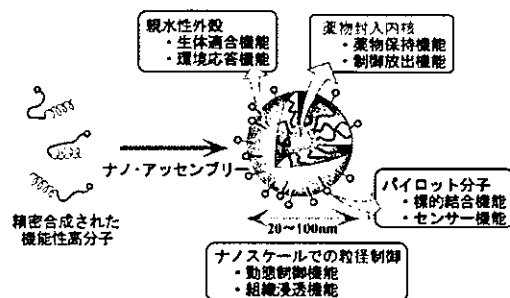


図1 ブロック共重合体のナノアッセムブリーに基づく超機能化高分子ミセルベクターの構築

でも遺伝子発現効率を向上させ得る条件を見出し、エンドソームから細胞質へのスムーズな移行とミセル表層への定量的なりガンド導入による高い標的細胞指向性を兼ね備えたインテリジェント化ナノミセル型遺伝子ベクターの設計指針を確立した。

さらに各々のインテリジェント機能を融合させたマルチ機能性ブロック共重合体の分子設計を行い、この自己組織化を利用することによって、凝縮した遺伝子を内包する高機構化ナノミセル型遺伝子ベクターを構築するとともに、有効な遺伝子導入方法の開発を行い、臨床展開が可能であることの実証を目指し、本システムの *in vivo* における本格的な機能評価も実施した。以下、その詳細を報告する。

B. 研究方法

1) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターの構造最適化

ポリエチレングリコール-ポリ(L-リジン) (PEG-PLL) ブロック共重合体に対し、PLL 側鎖アミノ基の一部をスルフヒドリル基(SH 基)で置き換えジスルフィド架橋を施すことにより、細胞内環境変化(グルタチオン濃度の上昇)に反応して内包 pDNA を制御放出するインテリジェントナノミセル型遺伝子ベクターを構築した。

2) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターの機能検証

インテリジェントナノミセル型遺伝子ベクターの細胞内機能は、ルシフェラーゼをコードした pDNA の発現効率から評価した。主として *in vitro* においては培養 293T 細胞、*in vivo* においてはマウスの尾静注によりレポーター遺伝子を投与し、

肝臓での遺伝子発現により評価した。また架橋型ナノミセル型遺伝子ベクターの静脈内投与における pDNA の血中安定性をサザンブロットング法により評価した。さらに *in vivo* と *in vitro* での機能相関を定量的に評価する目的で、アレイ状に構築した初代肝実質細胞スフェロイドへの遺伝子導入を試みた。

3) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターの凍結乾燥製剤化の検討

遺伝子ベクターの臨床応用への展開を考慮した場合には、保存安定性や投与量の幅広い選択性などの製剤学的要件の満足が必要であり、凍結乾燥製剤化が望まれるため、凍結乾燥前後における遺伝子発現効率を株化細胞実験により、また粒径測定を動的光散乱によって評価した。

4) 細胞内移行促進機能を有するナノミセル型遺伝子ベクターの構築

本システム構築のため、ブロック共重合体へ細胞内移行促進セグメントを導入した。具体的には PEG-ポリ(β -ベンジルアスパルテート) (PEG-PBLA) ブロック共重合体の側鎖のベンジル基に対する定量的アミノリシスによって、pKa や疎水性などの異なる各種アミノ基を導入する方法を確立し、この手法で合成した種々のブロック共重合体から DNA 内包ナノミセル型遺伝子ベクターを調製した。

5) A-B-C 型トリブロック共重合体の合成

全身投与が可能なベクター系の構築を目指して、生体適合性のポリエチレングリコール、バッファ効果により細胞内移行能を賦与する pKa の低いポリカチオン、DNA を効率的に凝縮させるポリカチオンの3つの異なる機能性セグメントを有する A-B-C 型トリブロック共重合体を新規に合

成した。

6) A-B-C 型トリブロック共重合体似によって構築された遺伝子ベクターの担ガンマウスによる in vivo 評価

固形ガン(マウス大腸ガン C-26 細胞)を皮下移植したマウスに対し、3層構造ナノミセル型遺伝子ベクターを尾静脈内投与し、腫瘍部位での遺伝子発現を評価した。

7) 表層にリガンド分子を結合した高分子ナノミセル型遺伝子ベクターの構築

リガンドを導入するための反応性基として従来のアセタール基に加え、脱保護に伴う二量化反応が惹起されないベンジルアセタール基を片末端に導入した PEG を合成し、アセタール基およびベンジルアセタール基とポリアミノ酸側鎖の選択的脱保護を実現するために、温和なアルカリ条件で脱離可能な保護基を有するアミノ酸誘導体(例:ε-トリフルオロアセチル L-リシン酸無水物)を PEG 末端から重合させた。これにより、従来法では困難であったブロック共重合体の末端に、ラクトース、ペプチドを導入することを試みた。

C. 研究結果

1) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターの構造最適化

PEG-PLL ブロック共重合体に対し、2種類の SH 基導入法(SPDP 試薬と 2-イミノチオレン試薬による方法)を試み、いずれにおいても導入率を制御して SH 基を導入することが可能であった。前者では SH 基の導入により荷電密度が減少し、後者では荷電密度が維持される。これらの手法によりジスルフィド架橋を施すことにより、細胞内

環境変化(グルタチオン濃度の上昇)に応答して内包 pDNA を制御放出するインテリジェントナノミセル型遺伝子ベクターを構築した。

2) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターの機能検証

架橋高分子ナノミセル型遺伝子ベクターは、細胞外では内包 pDNA を安定に保持する一方、細胞内還元環境下では架橋の解離に伴う pDNA の放出制御を通じて、非架橋ナノミセル型遺伝子ベクターに比較して一桁以上高い発現効率を実現した。さらにナノミセル型遺伝子ベクターを構成するブロック共重合体の連鎖長ならびにジスルフィド架橋導入率と構造安定性、遺伝子発現能との間の構造-機能相関を明らかにするための系統的な研究を行い、ナノミセル型遺伝子ベクター内において有効な DNA 凝縮を惹起するための臨界鎖長が存在することを明らかにし、DNA 凝縮構造の形成と遺伝子発現活性との間の相関も見出した。また架橋導入率には最適値が存在し、その値が細胞種によって異なることも明らかにした。これは細胞内におけるグルタチオン濃度の差などに起因するものと考えられるが、これより架橋導入率の精密な制御によって、特定の細胞集団に遺伝子発現を誘導出来ることを示した。

培養細胞系において良好な遺伝子発現を示した細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターの in vivo 機能評価においては、マウスの尾静脈投与によって、肝臓実質細胞に一樣にレポーター遺伝子を発現させ得ることに成功した。また血管壁への遺伝子導入においては、内皮細胞への遺伝子導入が可能であることを実証した。これらの結果を受け、in vivo と in vitro での機能

相関を定量的に評価する目的で、アレイ状に構築した初代肝実質細胞スフェロイドへの遺伝子導入を試み、時間依存的に遺伝子導入が可能であることを見出している。これは、非分裂期にある細胞への遺伝子導入がナノミセル型遺伝子ベクターを用いて行えることを示した点で特筆すべきものであり、ナノミセル型遺伝子ベクターの細胞内核移行についても新しい知見を与えることが期待される。

3) 細胞内還元環境応答型ナノミセル型遺伝子ベクターの凍結乾燥製剤化の検討

本システムの臨床応用に向けては、保存安定性や投与量の幅広い選択性などの製剤学的要件の満足が必要であり、凍結乾燥製剤化が望まれるが、ナノミセル型遺伝子ベクターは凍結乾燥に伴う粒径変化や遺伝子発現活性の減弱が全く認められず、将来の臨床展開においても極めて有利な形態であることが明らかとなった。

さらに架橋型ナノミセル型遺伝子ベクターの静脈内投与におけるpDNAの血中安定性をサザンブロッティング法により評価した結果、架橋導入率の上昇に伴うpDNAの血中安定性の向上が確認された。ナノミセル型遺伝子ベクターへの架橋導入は、内包DNAの血中安定性を向上させるために極めて有用であると考えられる。さらに適用可能な投与方法を拡げる目的で、ナノミセル型遺伝子ベクターの気管内投与を行い、肺における遺伝子発現を評価した。その結果、ナノミセル型遺伝子ベクターは、非架橋ナノミセル型遺伝子ベクターや市販の遺伝子導入試薬であるポリエチレンイミンと比較して、顕著に高い遺伝子発現を導くことに成功した。この様に、架橋型ナノミセル型遺伝子ベクターは、系中に遊離ポリカチ

オンを含まないために極めて毒性が低く、in vivo 遺伝子導入に適した構造と性能を有することが明らかとなった。

4) 細胞内移行促進機能を有するナノミセル型遺伝子ベクターの構築

PEG-PBLA ブロック共重合への定量的アミノシスによって、側鎖構造単位に高 pKa(〜9)と低 pKa(〜7)の2種類のアミノ基を有する系がスムーズな細胞質移行を示し、良好な遺伝子発現を導くことを見出した。すなわち一つのカチオン性ユニットへ構造の異なる2種類のアミノ基を導入することにより、DNA とのコンプレックス形成とエンドソーム内 pH 低下を防ぐバッファー効果とを両立させる機能分担型の分子設計が合目的性を有することが明らかになった。

また、これらの側鎖に2種類のアミノ基を有するブロック共重合体の中でも、ジエチレントリアミン(DET)を導入したブロック共重合体(PEG-DET)が、細胞毒性を示すことなく極めて効率的な遺伝子導入を示すことを明らかにした。市販の遺伝子導入試薬は、初代培養細胞に対して顕著な細胞毒性を示したが、PEG-DET は種々の初代培養細胞(骨芽細胞、線維芽細胞、滑膜細胞)に対して細胞毒性を示すことなく高効率の遺伝子発現を導いた。PEG-DET の遺伝子導入メカニズムに関しては、今後さらなる検討が必要であるが、低毒性と効率的な遺伝子発現を実現した人工遺伝子ベクターとして高い有用性が期待される。

5) A-B-C 型トリブロック共重合体の合成

上記の知見に基づいて、さらに、経静脈全身投与が可能なベクター系の構築を目指して、生体適合性のポリエチレングリコール、バッファー効果により細胞内移行能を賦与する pKa の低い

ポリカチオン、DNA を効率的に凝縮させるポリカチオンの3つの異なる機能性セグメントを有する A-B-C 型トリブロック共重合体を新規に合成した。トリブロック共重合体は、DNA を凝縮した内核、バッファー能を有する中間層、生体適合性の PEG 外殻からなる3層構造を形成し、培養細胞実験において従来の PEG-PLL の50倍以上の遺伝子導入効率を実現した。

6) A-B-C 型トリブロック共重合体によって構築された遺伝子ベクターの担ガンマウスによる *in vivo* 評価

さらに固形ガン(マウス大腸ガン C-26 細胞)を皮下移植したマウスに対し、3層構造ナノミセル型遺伝子ベクターを尾静脈内投与した結果、腫瘍部位での選択的かつ効率的な遺伝子導入が確認された。対照的に pDNA のガン組織への直接注射においては、3層構造ナノミセル型遺伝子ベクターの 10 分の1以下の遺伝子発現しか確認されず、市販の遺伝子導入試薬では投与した全てのマウスの死亡が確認された。人工遺伝子ベクターの静脈内投与により大腸ガンに遺伝子発現を認めたのは、世界的に見てもこの研究が初めての例であり、3層構造ナノミセル型遺伝子ベクターは全身投与による *in vivo* 遺伝子治療を実現する遺伝子デリバリーシステムとしての展開が期待される。

7) 表層にリガンド分子を結合した高分子ナノミセル型遺伝子ベクターの構築

これまでの研究により、遺伝子 DNA やオリゴ核酸を効率良く搭載し、高い生理機能を発現するナノミセル型遺伝子ベクターの構造設計が確立したことを受け、ナノミセル型遺伝子ベクター表層へのリガンド分子装着のための分子設計とし

て、 α -末端に各種のパイロット分子を結合可能なブロック共重合体の新規合成ルートの確立を行った。この場合、数種類の化学反応による修飾を多段階に重ねるという制約のために、リガンドを担持したブロック共重合体の合成は一般には困難を伴うが、既に確立していた合成経路を抜本的に見直し、各々の反応操作が互いに干渉しない新規合成経路を探索することによって、効率良くリガンド導入ブロック共重合体を合成する経路の構築に成功した。これにより、従来法では困難であったブロック共重合体の末端に、ラクトース、ペプチドを導入することに成功した。

この結果、表層にラクトースを導入したナノミセル型遺伝子ベクターが、ラットより調製した初代培養肝実質細胞に対して、高い遺伝子発現効率を示すことを確認した。さらに血管内皮細胞や平滑筋細胞など多くの細胞に発現が認められるインテグリンに対して特異的結合能を有する RGD ペプチドを表層に導入したナノミセル型遺伝子ベクターを構築した。RGD ペプチド導入ナノミセル型遺伝子ベクターを、ウサギ頸動脈バルーン擦過モデルの内膜肥厚を形成している動脈壁に対して局所投与を行ったところ、従来のシステムと比較して10倍以上高い遺伝子導入効率を実現された。これによりナノミセル型遺伝子ベクターに導入したリガンド分子が生体内においても有効に機能することを確認した。

D. 考察

本研究では実際の治療に用いることが可能な人工遺伝子ベクターを開発するためインテリジェント化ブロック共重合体の分子設計を行い、高機能化ナノミセル型遺伝子ベクターを構築するとともに、レポーター遺伝子をコードするプラスミド

DNA を内包する高機能化ナノミセル型遺伝子ベクターの *in vitro* 及び *in vivo* 機能評価を通じて、特に後者においてマウス尾静脈投与により肝臓実質細胞、気管内投与により肺、ラットを用いた血管壁への遺伝子導入により血管内皮細胞における遺伝子発現を確認した。また3層構造ナノミセル型遺伝子ベクターの尾静脈投与により、固形ガン(マウス大腸ガン C-26 細胞)を皮下移植したマウスの腫瘍部位において選択的かつ効率的遺伝子導入が確認された。人工遺伝子ベクターの静脈内投与により大腸ガンに遺伝子発現を認めたのは、世界的に見てもこの研究が初めての例である。さらに、より高い標的細胞指向性を兼ね備えた高機能化遺伝子ベクターとして RGD ペプチド導入ナノミセル型遺伝子ベクターを構築し、ウサギ頸動脈バルーン擦過モデルの内膜肥厚を形成している動脈壁に対して局所投与を行ったところ、従来のシステムと比較して10倍以上高い遺伝子導入効率が実現された。

並行して行われたナノミセル型遺伝子ベクターの凍結乾燥製剤化に関する検討により、凍結乾燥の前後で粒径変化や遺伝子発現活性の減弱が全く認められず、将来の臨床展開においても極めて有利な形態であることが明らかとなった。

E. 結論

上記の通り、複数のインテリジェント機能を融合させたマルチ機能性ブロック共重合体の精密な分子設計により、高機能化インテリジェント高分子ナノミセル型遺伝子ベクターの構築が可能となり、*in vitro* 及び *in vivo* の評価により、本システムを高い臨床応用性を有する人工遺伝子ベクターシステムとして位置づけることが出来ることが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Osada, Y. Yamasaki, S. Katayose, K. Kataoka: A synthetic block copolymer regulates S1 nuclease fragmentation of super-coiled plasmid DNA, *Angew. Chem., Int'l. Ed.*, in press
- 2) M. Oishi, S. Sasaki, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Smart polyion complex micelles for targeted intracellular delivery of PEGylated antisense oligonucleotide with acid-labile linkage, *ChemBioChem*, in press
- 3) K. Uchida, H. Otsuka, M. Kaneko, K. Kataoka, Y. Nagasaki, A reactive poly(ethylene glycol) layer to achieve specific surface plasmon resonance sensing with a high S/N ratio: the substantial role of a short underbrushed PEG layer in minimizing nonspecific adsorption. *Anal. Chem.*, 77(4), 1075-1080 (2005)
- 4) S. Fukushima, K. Miyata, N. Nishiyama, N. Kanayama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEGylated polyplex micelles from triblock cationomers with spatially-ordered layering of condensed pDNA and buffering units for enhanced intracellular gene delivery, *J. Am. Chem. Soc.*, 127(9), 2810-2811 (2005)
- 5) M. Oishi, Y. Nagasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Lactosylated Poly(ethylene glycol)-siRNA conjugate through acid-labile β -thiopropionate linkage to construct pH-sensitive polyion complex micelles achieving enhanced gene

- silencing in hepatoma cells, *J. Am. Chem. Soc.*, 127(6), 1624-1625 (2005)
- 6) W.-D. Jang, N. Nishiyama, G.-D. Zhang, A. Harada, D.-L. Jiang, S. Kawauci, Y. Morimoto, M. Kikuchi, H. Koyama, T. Aida, K. Kataoka, Supramolecular nanocarrier of anionic dendrimer porphyrins with PEGylated cationic block co-polymer to enhance intracellular photodynamic efficacy, *Angew. Chem., Int'l. Ed.*, 44(3), 419-423 (2005)
- 7) K. Itaka, N. Kanayama, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka, Supramolecular nano-carrier of siRNA from PEG-based block cationer carrying diamine side-chain with distinctive pKa directed to enhance intracellular gene silencing, *J. Am. Chem. Soc.*, 126(42), 13612-13613 (2004)
- 8) Y. Kakizawa, K. Miyata, S. Furukawa, K. Kataoka, Size-controlled formation of a calcium phosphate-based organic-inorganic hybrid vector for gene delivery using poly(ethylene glycol)-*block*-poly(aspartic acid), *Advanced Materials*, 16(8), 699-702 (2004)
- 9) K. Miyata, Y. Kakizawa, N. Nishiyama, A. Harada, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Block cationer polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression, *J. Amer. Chem. Soc.*, 126(8), 2355-2361 (2004)
- 10) M. Tabuchi, M. Ueda, N. Kaji, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, Y. Baba, Nano-spheres for DNA separation chips, *Nature Biotechnology*, 22(3), 337-340 (2004)
- 11) R. Ideta, Y. Yanagi, Y. Tamaki, F. Tasaka, A. Harada, K. Kataoka, Effective accumulation of polyion complex micelle to experimental choroidal neovascularization in rats, *FEBS Lett.*, 557(1-3), 21-25 (2004)
- 12) K. Itaka, A. Harada, Y. Yamasaki, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka, *In situ* single cell observation by fluorescence re-sonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear poly-ethylenimine, *J. Gene Med.*, 6(1), 76-84 (2004)
2. 学会発表
- 1) Kazunori Kataoka: 「Smart Poly-meric Micelles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery」 8th European Symposium on Con-trolled Drug Delivery, Hotel Oranje, Noordwijk aan Zee, The Nether-lands, 2004.4.8. (招待講演)
- 2) 片岡一則: 「薬物・遺伝子キャリアとして機能する高分子ナノミセル ―ピンポイント DDS への挑戦―」日本医工学治療学会第20回学術大会シンポジウム, リーガロイヤルホテル広島, 広島, 2004.4.23. (招待講演)
- 3) 片岡一則: 「薬を運ぶ高分子ナノミセル ―EPR 効果による癌のミサイル攻撃―」前田浩教授退官記念講演会, ホテル日航熊本,

- 熊本, 2004.4.24. (招待講演)
- 4) 片岡一則:「フロンティア・ナノメディスンに向けた精密高分子界面の設計」第9回「生命をはかる」研究会, 化学会館, 東京, 2004.4.26. (招待講演)
- 5) Kazunori Kataoka:「Development of Intelligent Nanocarriers for Gene and Drug Delivery ~ Challenges to Pin-point DDS ~」7th Pharma Science Forum: Innovative DDS from the Fusion of Nanotechnology and Biotechnology, Hokkaido University, Japan, 2004.5.8. (招待講演)
- 6) 片岡一則:「高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー - ナノテクノロジーが拓くフロンティアメディスン -」JST-SORST ジョイントシンポジウム「DNA コンジュゲートケミストリー」, コクヨホール, 東京, 2004.5.25. (招待講演)
- 7) Kazunori Kataoka:「Micellar Carriers for Targeted Drug Delivery」Short Course at GPEN (Globalization of Pharmaceuticals Education Network) 2004, Kyoto University Centennial Hall, Japan, 2004.5.28. (招待講演)
- 8) Kazunori Kataoka:「Nanotechnology-based Drug and Gene Targeting」Young Scientist Workshop, 31st Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Honolulu, Hawaii, 2004.6.12. (招待講演)
- 9) 片岡一則:「高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー - ナノテクノロジーが拓くフロンティアメディスン -」東京大学 COE(化学・材料系)「動的分子論に立脚したフロンティア基礎化学」・「化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成」合同シンポジウム, 東京大学弥生講堂, 東京, 2004.6.26. (招待講演)
- 10) Kazunori Kataoka:「Totally Synthetic Polymer Gels Responding to External Glucose Concentration: Their Preparation and Application to On-Off Regulation of Insulin-Release」40th IUPAC International Symposium on Macromolecules (MACRO 2004) Topic 5: Polymers for Advanced Applications, Paris, France, 2004.7.8. (招待講演)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 1) 2004.4.16. 出願、PEG-機能性核酸コンジュゲート、長崎幸夫、片岡一則他、科学技術振興機構、出願番号 2004-122124
- 2) 2004.5.26. 出願、安定化高分子ミセル、片岡一則、山崎裕一他、東京大学 TLO、PCT/JP2004/007583
- 3) 2004.8.13. 出願、2本鎖オリゴ核酸を担持したポリオンコンプレックスおよびその製造法とそれを含む医薬組成物、片岡一則、位高啓史他、東京大学 TLO・科学技術振興機構、PCT/JP2004/ 011957
- 4) 2004.9.1. 出願、PEO と二本鎖核酸のコンジュゲート、長崎幸夫、片岡一則他、科学技術振興機構、出願番号 2004-254824

分担研究報告書

皮膚細胞を細胞源とする新規骨・軟骨産生法の開発と臨床応用：

骨軟骨細胞増殖・分化に関わる担体の開発

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 我々は温度応答性培養皿を用いて温度を下げるという非侵襲的な操作のみで回収した細胞シートを移植に供することで、皮膚表皮や角膜上皮再生の臨床応用に成功してきた。本研究では、生分解性高分子製担体の作製と評価をおこなうと共に、これまでの成果を発展させ、温度応答性培養皿を用いて作製した間葉系細胞シートによる、細胞自身が合成・分泌した細胞外マトリックスを担体として用いる新規技術の開発をあわせておこなった。

A. 研究目的

我々は、温度に応じて水との親和性を大きく変化させる温度応答性高分子を培養皿表面に共有結合的に固定化することにより温度応答性培養皿を開発した。この表面は、37℃では市販の培養皿と同程度の弱い疎水性を示し様々な細胞が接着・伸展するが、温度を32℃以下に下げると高度の親水性を示し、トリプシンなどのタンパク質分解酵素を必要とすることなく細胞を脱着させることができる。コンフルエントな細胞層を形成させた後に低温処理すると、全細胞を細胞-細胞間接着により連結した一枚の細胞シートとして脱着・回収をすることができる。

骨組織は解剖学的に内外骨膜と呼ばれる結合組織に囲まれている。骨の成長は、骨膜で生じる

ため、骨膜には骨よりも細胞成分に富んでいる。また、血管と共にコラーゲン線維からなる粗性結合組織を豊富に含んでいる。これまでの研究から、骨膜由来細胞が骨・軟骨形成に必須である細胞増殖・分化に大きく関与していることが示唆されている。

本研究では、生分解性高分子製細胞担体を作製し、小動物(ラット)への移植実験により評価すると共に、温度応答性培養皿を用いて作製した骨膜細胞シート中の細胞外マトリックスを新規細胞担体として用いる可能性について体系的な検討をおこなっている。

B. 研究方法

生分解性高分子性細胞担体としてはポリ乳酸、

ポリグリコール酸、および両者の共重合体、フィブリンゲルを評価した。ポリ乳酸、ポリグリコール酸、および両者の共重合体は合成直後の状態では非常に疎水性が高く細胞接着性、組織親和性が非常に低いため、アルカリ処理により表面の親水化をおこなった。これらはラット背部ないし腹部皮下に移植し、移植部位の炎症など異物反応を組織学的に評価した。

また、培養骨膜細胞シートを安定して作製する培養条件を最適化し、生化学的、組織学的に評価すると共に、ラット頭頂骨骨欠損部位に移植した。培養骨膜細胞シートの回収には温度応答性培養皿を用い、低温処理(20℃)により回収した。

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

ラット皮下に移植した、生分解性高分子性細胞担体はいずれも、分解にともなって強い炎症反応を惹起した。このような炎症反応は軽度であれば毛細血管網の誘導等で、組織再生に関して優位にはたらくことが期待される。実際に、毛細血管網の誘導が生じることを組織学的に明らかにした。しかし、極少数の幹細胞を播種して移植するような系では、強い炎症反応により移植した幹細胞が障害を受けることが懸念される。現在、炎症にともなう移植した細胞に対する細胞障害を定量的に計量化する実験を、引き続き展開している。

アルカリ処理により、ポリ乳酸、ポリグリコール酸

および両者の共重合体の表面を大きく親水化できることが明らかになったが、同時に表面の分解性も著しく増加し、より強い炎症反応が生じることが分かった。今後、アルカリ処理条件の最適化が必要である。

ラット頭頂骨骨膜より採取した骨膜細胞を酵素処理し初代培養に供した後、継代した2代目培養骨膜細胞を温度応答性培養皿に播種すると、コンフルエント到達後、低温処理のみで培養骨膜シートとして回収できる条件を確立した。細胞シート中に含まれる培養骨膜細胞をアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色すると、多数の ALP 陽性細胞が確認された。この観察は、本細胞シート内には骨芽細胞の分解時に必要なニッチェとしての条件を最低限有する細胞外マトリクス環境が培養の間に構築されていることを強く示唆している。ラットへの移植実験からは、本細胞シートは、生分解性高分子性担体のような強い炎症反応などの異物反応を惹起しない（少なくともきわめて軽微である）ことが明らかになっており、本細胞シートを新規幹細胞担体として活用しうる可能性を強く示唆している。

D. 考察

今年度の研究結果より、骨膜由来細胞シート内の細胞外マトリクスを単独で、あるいは生分解性高分子性担体と組み合わせて活用することにより、従来法ではえられなかった生体親和性が高く、幹細胞維持能を有する新規担体が開発しうることが示唆された。

次年度では、鄭、星らが皮膚線維芽細胞の骨軟骨分化条件決定した皮膚線維芽細胞シート作製条件検討、及び、本年度の骨膜由来細胞シートの移植担体としての活用について、さらに体系的に追求する予定である。

E. 結論

骨膜由来細胞シートの新規担体としての有効性を期待しうる結果を得ることができた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Y. Tsuda, A. Kikuchi, M. Yamato, Y. Sakurai, M. Umezu and T. Okano, "Control of cell Adhesion and detachment using temperature and thermo-responsive copolymer grafted culture surfaces", *J. Biomed. Mater. Res.*, 69A(1), 70-78 (2004).
2. Y. Tanaka, K. Sato, M. Yamato, T. Okano and T. Kitamori, "Drug Response Assay System in a Microchip Using Human Hepatoma Cells", *Analytical Sciences*, 20, 411-413 (2004).
3. M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai and T. Okano, "Temperature-Responsive cell culture surfaces enable "On-Off" affinity control between cell integrins and RGDS ligands", *Biomacromolecules*, 5(2), 505-510 (2004).
4. Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, H. Toma and T. Okano, "Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps", *BJU Int.*, 93, 1069-1075 (2004).
5. K. Itoga, M. Yamato, J. Kobayashi, A. Kikuchi and T. Okano, "Micropatterned surfaces prepared using a liquid crystal projector-modified photopolymerization device and microfluidics", *J. Biomed. Mater. Res.*, 69A(3), 391-397 (2004).
6. Y. Akiyama, A. Kikuchi, M. Yamato and T. Okano, "Ultrathin poly (N-isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control", *Langmuir*, 20, 5506-5511 (2004).
7. K. Watanabe, K. Nishida, M. Yamato, T. Umemoto, T. Sumide, K. Yamamoto, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano and Y. Tano, "Human limbal epithelium contains side population cell expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2", *FEBS Letters*, 565(2004), 6-10 (2004).
8. M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai and T. Okano, "Immobilization of cell-adhesive peptides to temperature-responsive surfaces facilitates both serum-free cell adhesion and non-invasive cell harvest", *Tissue Engineering*, 10(7), 1125-35 (2004).
9. K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K.

- Watanabe, K. Yamamoto, E. Adachi, S. Nagai, A. Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano and Y. Tano, "Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium", *N. Engl. J. Med.*, 351 (12), 1187-1196 (2004).
10. M. Ebara, M. Yamato, S. Nagai, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano, "Incorporation of new carboxylate functionalized co-monomers to temperature-responsive polymer-grafted cell surfaces", *Surface Science*, 570 (2004), 134-141 (2004).
11. J. Kobayashi, M. Yamato, K. Itoga, A. Kikuchi and T. Okano, "Preparation of microfluidic devices using micropatterning of a photosensitive material by a maskless, Liquid-Crystal-Display projection method", *Advanced Materials*, 16 (22), 1997-2001 (2004).
12. M. Yamato and T. Okano, "Cell Sheet Engineering", *Materialstoday*, May 2004, 42-47(2004).
13. 清水達也, 岡野光夫, "細胞シート工学を応用した組織再構築", *BIO Clinica*, 19(10), 74-78 (2004).
14. A. Kikuchi and T. Okano, "Regeneration of tissues and organs -New technique opens up new possibilities for regenerative medicine through control of interaction of polymers with water-", *Nitto Denko Technical Report* 85, 42, 44-48 (2004).
15. 小林 純, 岡野光夫, "再生医療におけるナノバイオテクノロジー", *ファルマシア*, 40 (11), 1018-1022 (2004).
16. A. Kikuchi and T. Okano, "Nanostructured designs of biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs", *J. Control. Rel.*, 101(1-3), 69-84 (2004).
17. 岡野光夫, "細胞シート工学を基盤とする再生医療", *核医学技術*, 24 (4), 324-325 (2004).
18. J. Yang, M. Yamato, T. Okano, "Cell-Sheet Engineering Using Intelligent Surfaces", *MRS Bulletin*, 30, 189-193, 2005.

学会発表

1. 第47回日本形成外科学会総会・学術集会
2004. 4. 7-9 東京
・ 副島一孝, 藤澤大輔, 本田隆司, 井砂司, 大和雅之, 岡野光夫, 野崎幹弘, "感温性ゲルを用いて作成した培養表皮による瘢痕の治療", 抄録集, 260 (2004).
2. 7th World Biomaterials Congress 2004.
5. 17-21 Sydney
1) K. Morishima, Y. Tanaka, M. Ebara, T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano and T. Kitamori, "Cellular imprinting method for fabrication of cell-actuated 3D microstructures using cultured cardiomyocytes", *Transaction [CD-ROM]*, 243 (2004).

- 2) Y. Tsuda, A. Kikuchi, A. Nakao, M. Yamato, Y. Sakurai, M. Umezu and T. Okano, "Increased cell functionalities with patterned Co-cultures utilizing dual thermo-responsive polymer grafted surfaces", Transaction [CD-ROM], 246 (2004).
 - 3) Y. Shirai, Y. Kurosawa, T. Okano and A. Taniguchi, "Endothelial cell marker gene expression on double-layered co-culture utilizing thermo-responsive culture dish", Transaction [CD-ROM], 315 (2004).
 - 4) M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai and T. Okano, "Low temperature triggered cell release from temperature-responsive culture surfaces as a sensitive index for cell adhesion strength revealed by fibronectin synergy sequence co-immobilization", Transaction [CD-ROM], 780 (2004).
 - 5) Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, H. Toma and T. Okano, "Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps", Transaction [CD-ROM], 1010 (2004).
 - 6) Y. Tanaka, K. Morishima, M. Ebara, T. Shimizu, M. Yamato, M. Tokeshi, T. Okano and T. Kitamori, "Fabrication of bio microactuator using cultured cardiomyocytes and PDMS microstructures", Transaction [CD-ROM], 1357 (2004).
 - 7) T. Shimizu, Y. Isoi, H. Sekine, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, "Bioengineered vascularized myocardial tissue by multi-step transplantation of layered cell sheets", Transaction [CD-ROM], 1722 (2004).
 - 8) K. Sato, T. Shimizu, Y. Isoi, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Fujimoto and T. Okano, "Novel cell sheet manipulator to fabricate three-dimensional tissue and to quantify cell sheet adhesiveness", Transaction [CD-ROM], 1849 (2004).
 - 9) Y. Kurosawa, Y. Shirai, T. Okano and A. Taniguchi, "Expression of liver specific genes in double layered co-culture of rat hepatocytes and human umbilical vein endothelial cells by cell sheet engineering", Transaction [CD-ROM], 1857 (2004).
3. 第53回高分子学会年次大会 2004. 5. 25-27
神戸
- 1) 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, "パターン化温度応答性培養皿による高機能化共培養細胞シートの回収", 高分子学会予稿集, 53(1), 1879 (2004).
 - 2) 武田直也, 谷治尚子, 尾関泰之, 坂本千賀子, 吉田貴恒, 金澤秀子, 並木秀男, 堀貞夫, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, "高分子の静電的固定による温度応答性培養皿表面の改質と細胞接着性に与える効果", 高分子学会予稿集, 53(1), 2191 (2004).

4. 第21回日本呼吸器外科学会総会 2004. 5. 27-29 神奈川
 ・神崎正人, 大和雅之, 関根秀一, 松本卓子, 清水達也, 小山邦広, 菊池明彦, 岡野光夫, 大貫恭正, “温度応答性培養皿による肺細胞シート作成と気漏閉鎖への細胞シートの応用”, 日本呼吸器外科学会雑誌, 18(3), 160 (2004).
5. Regenerate Tissue Engineering The Human Body 2004. 6. 9-12 Seattle, Washington
 ・T. Umemoto, M. Yamato, K. Nishida, K. Watanabe, Y. Tano and T. Okano, “Limb epithelial side population cells have stem cell-like phenotypes”, Program, 8 (2004).
6. 第7回日本組織工学会 2004. 7. 1-2 東京
 1) 関根秀一, 清水達也, 磯井由紀, 大和雅之, 菊池明彦, 小林英司, 岡野光夫, “重層化心筋細胞シートの多段階移植による血管付心筋グラフトの作製”, プログラム・抄録集, 77 (2004).
 2) 関谷佐智子, 清水達也, 関根秀一, 磯井由紀, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫, “移植心筋グラフトでの血管構築メカニズムの解析”, プログラム・抄録集, 78 (2004).
 3) 神崎正人, 大和雅之, 関根秀一, 井坂珠子, 清水達也, 菊池明彦, 岡野光夫, 大貫恭正, “細胞シート工学による新規気漏閉鎖術の開発”, プログラム・抄録集, 85 (2004).
 4) 角出泰造, 西田幸二, 大和雅之, 井手 武, 前田直之, 渡辺 仁, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, “ヒト培養角膜内皮細胞シートにおける Na/K ATPase pump siteの検討”, プログラム・抄録集, 87 (2004).
 5) 野崎貴之, 大和雅之, 西田幸二, 串田 愛, 長井 慈, 田野保雄, 岡野光夫, “温度応答性培養皿上で作製した培養角膜上皮細胞シートの凍結保存方法の検討”, プログラム・抄録集, 88 (2004).
 6) 梅本晃正, 大和雅之, 西田幸二, 河野千夏, 渡辺克彦, 田野保雄, 岡野光夫, “角膜輪部上皮SP細胞における幹細胞・前駆細胞マーカーの発現解析”, プログラム・抄録集, 89 (2004).
 7) 畠山英之, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, “細胞接着・増殖能を賦活化する温度応答性表面による組織構築の促進”, プログラム・抄録集, 150 (2004).
 8) Imran A. Memon, Yoshiki Sawa, Satoshi Taketani, Shigeru Miyagawa, Hikaru Matsuda, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, “Tissue cardiomyoplasty with potential autologous myoblast sheets regenerated impaired myocardium”, Program, 164 (2004).
7. 第25回日本炎症・再生医学会 -炎症の人為的制御- 2004.7. 13-14 東京
 1) 関谷佐智子, 清水達也, 関根秀一, 磯井由紀, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫, “移植心筋グラフトにおける血管新生”, 炎症・再生, 24 (4), 441 (2004).
 2) 関根秀一, 清水達也, 磯井由紀, 大和雅之, 菊池明彦, 小林英司, 岡野光夫, “細胞シ-