

## 細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発

所属 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部  
研究者 山口 照英

研究要旨 幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞・組織加工医薬品の品質・安全性確保技術や製品の評価技術の開発を目的として、ヒト臍帯血や末梢血造血幹細胞から CD31 強陽性の血管内皮前駆細胞を *in vitro* で誘導し、その特性解析を行った。誘導した CD31 強陽性細胞は、VE カドヘリン陰性、CD45 陽性、コネクシン (Cx) 37 陽性であることが明らかになり、CD31 強陽性細胞は非常に初期の血管内皮前駆細胞であることが示唆された。

血管内皮細胞や血管内皮前駆細胞の有用性評価手法の確立を目指し、毛細血管系の *in vitro* 作成技術の開発を行った。光触媒を用いたパターン化技術を応用した基盤への微細加工技術を開発し、*in vitro* で自在に毛細血管網を作成する技術を開発できた。*In vitro* での毛細血管網の構築過程は、種々のサイトカインの影響など生体での素過程を反映していることが確認され、血管内皮細胞や血管内皮前駆細胞の有用性評価に適応可能であることが示唆された。

### 分担研究者

- (1) 東京医科歯科大学 森田 育男
- (2) 大日本印刷株式会社 服部 秀志

### A. 研究目的

近年、幹細胞学や発生学の急速な進歩やバイオテクノロジー応用技術の発展により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に用いる細胞組織利用医薬品等の開発が急速に進んでいる。このように細胞や組織を医療に用いることができれば、ガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、重篤な肝疾患、神経疾患、熱傷、創傷等に対してきわめて有効な治療法（いわゆる再生医療）になる可能性が高い。本邦においても、様々な形での細胞組織利用医薬品等の開発が進められているところであるが、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題は多い。本研究では、細胞組織利用医薬品の品質や安全性の確保、また有効性等を適切に評価できる試験法の開発を行うとともに、開発した評価技術を用いてより安全性が高く高品質の製品の实用化に向けた基盤技術の開発につなげていくことを目的としている。

本年度は、細胞組織利用医薬品の品質・安全性等の確保の一環として、ヒト末梢血及び臍帯血造血幹細胞から血管内皮前駆細胞 (EPC) を誘導する系の確立を行うとともに、誘導した血管内皮前駆細胞の内皮細胞への分化能を指標として、その特

性指標の探索を行った。

血管内皮細胞や血管内皮前駆細胞の有用性評価手法の確立を目指し、毛細血管系を自在に作成する技術を開発した。

### B. 研究方法

#### (1) 臍帯血と末梢血から CD31 強陽性血管内皮前駆細胞 (EPC) の誘導とその分離

ヒト末梢血あるいは臍帯血より単核球分画を分離した後、AC133 マイクロビーズ分離キット (Milteny Biotec) を用い、AC133 陽性細胞を分離した。分離した臍帯血と末梢血 AC133 陽性細胞は、20%胎児血清 (FBS)、VEGF 単独、あるいはトロンボエチン (TPO) や幹細胞因子 (SCF) を含む EBM-2 培地に浮遊させ、所定の期間 (1 から 3 週間) 培養した。EPC を分離するために培養開始 1 週間後、細胞を回収し FITC 標識抗 CD31 抗体で染色した後、ヴァンテージ SE により、CD31 強陽性分画をソーティングした。血管内皮細胞への誘導に際しては、フィブロネクチン上でさらに 1 - 2 週間培養を継続した。

#### (2) 血管内皮細胞の単離

ウシ血管内皮細胞はウシ頸動脈より単離した。また、ヒト血管内皮細胞は、ヒト臍帯より、トリプシン・EDTA を還流させることにより単離した。単離した血管内皮細胞は、ウシ血管内皮細胞の場合は 5%胎児ウシ血清 (FBS) 含有 MEM 培地を用いて培養した。ヒト血管内皮細胞はコラーゲンコートしたディッシュを用いて、10%FBS、ECGS 含有

M-199 培地を用いて培養し、継代数 3 代までのものを用いた。

### (3) 光触媒法を用いた血管内皮細胞接着用基板のパターン化

ガラス性基材にフッ素系シランカップリング剤塗布し、疎水性のコーティングを行った。これに、パターン化のための光触媒含有層付きフォトマスクを施すために、光触媒酸化チタンコーティング剤をイソプロピルアルコールで希釈したものをスピコートすることにより作製した。パターン化は、フッ素系シランカップリング剤を塗布した基材上に前記光触媒含有層付きフォトマスクを、光触媒層が基材と相対するように配置し、紫外線を照射して行った。

### (4) 血管内皮細胞の基板上でのパターン化と基板上に培養した血管内皮細胞のマトリゲルへの転写

(3) で作成したパターン化基盤の上に、血管内皮細胞を播種した。播種後、パターン化基盤の上に接着した血管内皮細胞をマトリゲルコートガラス版上に重ね、この状態でさらに 24 時間培養した。その後、基盤をはがすことにより、血管内皮細胞はマトリゲルに転写される。この転写工程中に血管内皮細胞は管腔形成した。

### (5) 倫理面への配慮

ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で行った。

## C. 研究結果

### (1) 臍帯血及び末梢血由来 AC133 陽性細胞の SCF、TPO 増殖促進作用の比較と出現する細胞の解析

我々はすでに末梢血の造血幹細胞を多く含むとされている AC133 陽性細胞を *in vitro* で VEGF 存在下に培養することにより血管内皮前駆細胞へ誘導できること、その特性指標として CD31 強陽性であることなどを報告してきた。今回、SCF や TPO 等の増殖因子を添加することにより、このような血管内皮前駆細胞の誘導や増幅がどの様に影響されるか、またそれ以外の細胞の誘導や増殖にどのような影響があるかについて検討した。

臍帯血と末梢血の AC133 陽性細胞を同じ密度にコラーゲンタイプ IV 上で 6 日間培養し、細胞増殖能と AC133 陽性細胞と CD31 強陽性細胞の出現頻度

等について、VEGF 単独を対照群(コントロール)とし、VEGF に TPO と SCF を添加して培養した群(Mix)と比較検討した(図 1)。その結果、末梢血 AC133 陽性細胞も臍帯血 AC133 陽性細胞も対照群に比べ TPO 及び SCF が存在すると増殖が促進され、特に臍帯血 AC133 陽性細胞では細胞数の増加が顕著なことが明らかになった(図 1 A)。また、出現してくる CD31 強陽性細胞は末梢血においても臍帯血においても TPO 及び SCF 存在下に培養したときの方が高いことが分かった(図 1 B 及び C)。一方、AC133 陽性細胞の増加は末梢血で混合群が 0.93%から 1.37%に増加している。臍帯血では AC133 陽性細胞の出現は 13.47%と 13.03%とあまり変化がないが認められなかった。AC133 陽性細胞には多能性細胞を多く含むとすることを考慮すると、これらの条件下では、EPC の誘導と同時に多能性造血細胞の増幅も起こっていると推定された。

次にこのような VEGF 単独、VEGF に SCF 及び TPO を添加して培養した AC133 細胞から誘導されてくる接着細胞の特性解析を行った。末梢血及び臍帯血 AC133 細胞を、VEGF 単独、VEGF に SCF 及び TPO を添加して 2 週間培養し、接着している細胞の血管内皮細胞のマーカーの発現を調べた(図 2)。その結果両細胞由来の殆どの接着細胞は、ともに eNOS や KDR 等を強く発現していることが明らかになった。VEGF 単独に比較して、VEGF に SCF 及び TPO を添加した場合の方が、より多くの eNOS や KDR 陽性細胞が出現した。一方、臍帯血由来 AC133 細胞では eNOS や KDR 陽性細胞のクラスター様の細胞増殖が認められ、そのクラスターの数も VEGF に SCF 及び TPO を添加した場合の方が高かった。

### (2) SCF や TPO で出現する EPC の解析

以上のように、VEGF 単独に比較し、SCF や TPO を添加することにより、より多くの EPC や血管内皮細胞の誘導が可能であることが示された。そこで、SCF と TPO のどちらがより EPC の誘導に重要な働きをしているのかを明らかにする目的で、それぞれを単独で添加したときの CD31 強陽性細胞の誘導と細胞数の増加について検討した。その結果、末梢血 AC133 細胞は、SCF 添加群の方が TPO 単独よりも増殖促進が強く、また両者を同時に添加して培養するとより増殖が促進された。一方、各条件下で CD31 強陽性細胞の出現比率を解析したところ、TPO を添加した方がより強い促進が認められた。この結果より、SCF は細胞数の増加に、TPO は EPC への分化により強い促進作用を持つ可

能性が示唆された。

### (3) Cx37 を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後の KDR 陽性細胞の解析

すでに我々は CD31 強陽性細胞分画に EPC が多く含まれるばかりでなく同時に Cx37 や Cx40 も発現していることを明らかにしている。Cx37 は血管内皮細胞への分化に伴い発現が消失することから、Cx37 発現を指標として EPC を分画できる可能性が考えられた。そこで、ヒト末梢血由来 AC133 陽性細胞を分離して、タイプ IV コラーゲン上で培養し、7 日目に抗 CD31 抗体及び抗 Cx37 抗体と反応させた後、磁気ビーズを用いて分画した。それぞれの陽性細胞分画を FN 上にさらに 1 週間培養し、KDR の発現を解析した。図 3A に示すように CD31 陽性及び Cx37 陽性の両細胞とも多くの KDR 陽性接着細胞の出現が認められた。下の図 3B は 3 回の実験から、KDR 陽性細胞を数え、定量化したもので、両細胞とも同じように効率よく KDR 陽性細胞が誘導可能であると考えられた。

### (4) 臍帯血由来 AC133 陽性細胞における Lox-1 発現の経時変化と Lox-1 を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後の CD31 発現解析

Lox-1 は血管内皮細胞に特異的に発現していることが知られているが、血管内皮細胞への分化過程のどのよう<sup>に</sup>に発現誘導されてくるかについては不明である。末梢血由来 AC133 陽性細胞を分画後、タイプ IV コラーゲン上で培養後 1 週間の Lox-1 発現をフローサイトメーターで解析した。Lox-1 の発現は経時的に増加するが、Lox-1 と CD31 を同時に免疫染色し FACS で解析すると CD31 強陽性細胞は Lox-1 弱陽性細胞であることが明らかとなった。さらに、CD31 強陽性細胞を培養すると、培養経過とともに Lox-1 の発現は弱陽性から陽性へと変化した。

### (5) EPC の VE-カドヘリンや CD45 の発現解析

EPC の VE-カドヘリンの発現について、抗 CD31 抗体と抗 VE-カドヘリン抗体を用いて 2 カラー分析を行った。CD31 強陽性細胞は、VE-カドヘリン陰性であることが明らかになった。一方、白血球共通抗原である CD45 の発現について CD31 の発現との関係を調べたところ、誘導した CD31 強陽性細胞は全て、CD45 陽性であった。以上の結果から、CD31 強陽性細胞という特性指標を持つ細胞は、いわゆる early EPC の性質をもつものと考えられた。

### (6) 血管内皮細胞の基板上でのパターン化と基板上に培養した血管内皮細胞のマトリゲルへの転写

血管内皮細胞を用いて *in vitro* で自在に血管網を作成する技術開発を試みた。本方法は、パターン化基盤に播種した細胞を組織、コラーゲン、マトリゲル、他の細胞上に転写する方法であり、従来の概念とは全く異なった発想である。パターン化された親水性部分のみに細胞は接着し、さらにその基盤への細胞接着は非常に弱いため、パターン化された培養基板に播種された血管内皮細胞は、パターンを保ったまま生体適合性のある材料もしくは組織そのものに転写することができる。その際、もともと細胞が基盤と付いていた接着分子は、組織へ転写される際には組織と結合する部分に移動する。その結果として、細胞は基盤を離れ、組織と結合するようになる。その過程を図 4 に示す。

### (7) 管腔構造の証明

(6) で作成した管腔様構造物が、本当に管腔を形成しているかを確認するために、位相差蛍光顕微鏡、電子顕微鏡、およびマイクロインジェクション法を用いた。その結果を図 5 に示す。さらに、カルセインのマイクロインジェクションにより、蛍光物質が管腔内を通過して移動している像が得られたことより、上記方法で作成した管腔構造物は機能を持った管腔を形成していたことが明らかとなった。

### (8) 本毛細血管作成に及ぼす血管新生調節因子の影響

今回開発した毛細血管網作成法の血管内皮細胞の性能評価法としての妥当性を明らかにするために、既知血管新生調節因子をこの系に添加し、解析した。すなわち、種々の血管新生調節因子の遺伝子を HeLa 細胞に導入し、各因子を産生させた後、本基盤に培養した血管内皮細胞を HeLa 細胞上に重層させ、管腔形成への影響を調べた。その結果を図 6 に示す。

この図からも明らかのように、血管新生促進因子である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 添加により管腔が形成されるが、この形成に要する時間の短縮、作成した管腔の易漏さが特徴として挙げられる。さらに、アンジオポエチン-1 の同時処理によりタイトな管腔が形成され、leaky さがなくなることが明らかとなった。一方、アンジオポエチン-2 ではできあがった管腔は枝分かれが多くなることが明らかとなった。以上の結果は、この管腔形成過程が生体内と同じ素過程で行われていること、およびその受容体発現等が正常であることを意味している。

#### D. 考察

細胞治療に用いられる細胞・組織は、幹細胞や前駆細胞を素材として、誘導剤による処理、遺伝子工学的改変、あるいは他の細胞との相互作用などにより目的とする細胞へ分化等をさせ、治療目的に適した細胞・組織へと加工される場合が想定される。細胞治療においてその有効成分としての細胞の品質や有効性を担保する指標としての細胞特性の解析、あるいはその規格の設定に加えて、培養や種々の加工において、目的とした機能が付与されているか、さらには加工の過程において望ましくない細胞特性の変化や機能変化が起きていないかを明らかにすることが、細胞治療を安全に行うために必要となってくる。

本研究では、末梢血あるいは臍帯血の造血幹細胞を分離し、血管内皮前駆細胞（EPC）への分化誘導系を確立するとともに、その分化過程を詳細に解析することにより、EPC としての有用性をあらかじめ判定できるような細胞指標の提示を試みようとしている。すでに報告した末梢血 AC133 陽性細胞から CD31 強陽性の EPC 誘導系を用いて、この CD31 強陽性細胞の EPC としての特性解析を行うとともにその品質や有効性の指標を明らかにすることを試みた。

まず臍帯血及び末梢血 AC133 陽性細胞からの *in vitro* での EPC 誘導に対する増殖因子の影響について解析した。特に、VEGF に加え SCF や TPO などのサイトカインの影響について解析したところ、VEGF 単独に比較して、SCF や TPO を添加することにより細胞数の顕著な増加が認められ、さらに CD31 強陽性細胞の比率の増加が認められた。細胞数の増幅に関しては SCF と TPO を相加的な作用を示すが、CD31 強陽性細胞の出現に関して、SCF は殆ど影響しないにもかかわらず、TPO は顕著な促進効果を示した。これらの結果より、TPO は EPC の誘導に主な作用を持ち、SCF は血管内皮前駆細胞よりも造血幹細胞や多能性幹細胞の増幅に主たる作用を持つのではないかと考えられた。両因子を同時に添加することにより、細胞数の増加と血管内皮前駆細胞の誘導の両方が亢進されると考えられた。この TPO と SCF の作用をさらに解析するために、VEGF 単独と SCF 及び TPO 存在下での血管内皮前駆細胞から血管内皮細胞への分化を解析したところ、SCF や TPO を添加したときにより強い eNOS や KDR 陽性の接着細胞の誘導が認められた。また、臍帯血 ACA133 陽性細胞を培養した場合には

クラスター様の細胞増幅が認められ、TPO と SCF 添加により eNOS や KDR の発現ばかりでなくクラスター数及びクラスターの大きさ（細胞数）も顕著に亢進していた。この結果から、AC133 細胞から *in vitro* での EPC の誘導に SCF や TPO が重要な働きをすることが明らかになった。EPC を血管再生治療に用いる場合、*in vitro* で増幅できればより高い治療効果が期待でき、本研究で示された結果は EPC の有用性確保のために重要な結果と考えられる。今後、増幅された EPC の機能解析を行う予定である。

次に EPC は CD31 強陽性であることをすでに報告しているが、品質や有用性評価指標としてのより広範な特性指標の解析を行った。特に、CD31 強陽性細胞のコネキシン 37、VE-カドヘリン、Lox-1、CD45 などの発現について解析を行った。その結果、Lox-1 は弱陽性であり、血管内皮細胞への分化誘導にともないより発現が増強すること、VE-カドヘリン陰性、CD45 陽性であることが示された。コネキシン 37 陽性細胞を分画してさらに培養を続けると接着性の KDR 陽性細胞が出現してくることから、CD31 強陽性と同様に非常に有用な特性指標になる可能性が高いことが示された。また、VE-カドヘリン陰性で CD45 陽性であることから、AC133 陽性細胞から誘導される CD31 強陽性細胞は early EPC としての性質を持っているものと推定された。

今回開発したパターン化した基盤上に血管内皮細胞を培養して、思い通りに管腔を形成させる方法は、世界で初めての方法で、本方法を用いることにより単離した細胞の有効性が評価できるようになった。実際に臨床で用いられる血管内皮細胞前駆細胞、単核細胞等の有用性評価にこの系を用いることの妥当性の検証は来年度以降に行う予定である。

また、本研究の応用範囲は広く、1) 新たな血管新生調節因子の探索、2) 管腔形成遺伝子の同定、3) 角膜内皮細胞を用いた角膜移植法、4) 歯周疾患手術後の GTR 膜への応用などがあげられる。例えば 1) の場合には、HeLa 細胞への未知遺伝子の random 導入法が考案されている。また、2) に関しては、本方法の管腔形成過程には血清や血管新生促進因子の添加が必要ないことより、管腔形成特異的因子の同定は他の系に比較して容易である。現在、特異遺伝子の探索を遺伝子アレイを用いて行っているところである。

## E. 結論

幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞・組織加工医薬品等の製造過程における品質・安全性確保技術や製品の評価方法に関する研究として、ヒト末梢血及び臍帯血幹細胞として AC133 細胞を CD31 強陽性の血管内皮前駆細胞 (EPC) へ分化誘導を行う諸条件の解析を行うとともに、EPC としての特性解析を行った。その結果、効率よく EPC 誘導を行うために SCF や TPO が有用であることを明らかにした。また EPC の特性指標として、CD31 強陽性の他に、コネキシン 37 陽性、Lox-1 弱陽性、VE-cadheirn 陰性を用いることができることを明らかにし、誘導された EPC が early EPC としての性質を持つことを示唆した。

In vitro で自在にパターン化された毛細血管網を形成する技術を確立した。本法を用いることにより、血管内皮前駆細胞等の有用性評価に用いることができるものと期待されている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa, T., Suzuki, T., Nishimaki-Mogami, T., Sato, Y., Sawada, J., Inoue, K., Shudo, K., Ohno, Y., Yamaguchi T., HX531, RXR antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 using surface plasmon resonance. *J. Steroid Biochem Mol* in press.
- 2) Hosono T., Mizuguchi H., Katayama K., Xu Z.L., Sakurai F., Ishii-Watabe A., Kawabata K., Yamaguchi T., Nakagawa S., Mayumi T., Hayakawa T. Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, 15, 813-819 (2004)
- 3) Uchida, E., Sato, K., Iwata, A., Ishii-Watabe, A., Mizuguchi, H., Hikata, M., Murata, M., Yamaguchi, T., Hayakawa, T.: An improved method for detection of replication competent retrovirus in retrovirus vector products, *Biologicals*, 32, 139-146 (2004)
- 4) Kusui, K., Sasaki, H., Adachi, R., Matsui, S., Yamamoto, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., Suzuki, K.; Ribosomal protein S18 identified as a cofilin-binding protein by using phage display library. *Mol. Cell. Biochem.*, 262, 187-193 (2004)
- 5) Nakamura M, Kobayashi A, Takagi F, Watanabe A, Hiruma Y, Ohuchi K, Iwasaki Y, Horie M, Morita I, Takatani S. Biocompatible Inkjet Printing Technique For Designed Seeding Of Individual Living Cells. *Tissue Engineering* in press
- 6) Asami-Miyagishi R, Iseki S, Usui M, Uchida K, Kudo H, Morita I. Expression and function of PPAR $\gamma$  in rat placental development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315(2):497-501, 2004
- 7) Tanaka N, Sato T, Fujita H, Morita I. Constitutive expression and involvement of cyclooxygenase-2 in human megakaryocytopoiesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24(3): 607-612, 2004
- 8) Hiruma Y, Nakahama K, Fujita H, Morita I. Vitamin K<sub>2</sub> and geranylgeraniol, its side component, inhibited osteoclast formation in a different manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 314(1): 24-30, 2004
- 9) Onodera M, Horiuchi Y, Nakahama K, Muneta T, Mano Y, Morita I. Induction of cyclooxygenase-1 in cultured synovial cells isolated from rheumatoid arthritis patients. *Inflamm Res.* 53(6):217-22, 2004
- 10) Arikawa T, Omura K, Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.*, 200:400-406, 2004
- 11) Nakamura M, Kobayashi A, Hiruma Y, Morita I, Takatani S. Computer-Aided 2 Dimensional Capillary Vasculature Designing and Engineering. *ASAIO J.* 50(2):167, 2004
- 12) 森田育男. COX-2 の生理作用. 特集/COX-2 阻害薬 up to date. *Pharma Medica* 22(12):15-17, 2004
- 13) 森田育男. 関節リウマチと高度不飽和脂肪酸 -細胞学的アプローチ、特集/脂質と疾病予防 2. *食品と開発* 39(2): 9-11, 2004
- 14) 森田育男. COX-3/医学用語解説. *炎症と免疫* 12(3): 122-124, 2004

- 15) 森田育男. 印刷技術による毛細血管の再生／TOPICS. *医学のあゆみ* 2004
- 16) 森田育男. 印刷技術を利用した血管形成. *治療* (南山堂) 2004
- 17) 森田育男. シクロオキシゲナーゼのアイソザイム. 特集 I / NSAIDs の再評価. *炎症と免疫* 12(5):527-535, 2004
- 18) 森田育男. 毛細血管の再生技術を開発—大日本印刷と共同で—/読者の広場. *東京医科歯科大学同窓会会報*. 150. 平成16年9月号
- 19) 森田育男. 細く優しくし、命をつなぐ. *人工血管／技術&イノベーション. Nikkei Business*. 11月15日号. 9, 2004
- 20) 小林暁子, 森田育男. 印刷技術による毛細血管の再生. *医用工学・医療情報学. 医学のあゆみ* 211(7):769-771, 2004.11
- 21) 森田育男, 中村真人. In vitro でパターンニングされた毛細血管の作成. 第25回日本炎症・再生医学会. 2004年7月, 東京. *炎症・再生* 24(4):419. 2004
- 22) 中村真人, 小林暁子, 高城富美男, 岩崎泰彦, 森田育男, 高谷節雄. インクジェットによる Tissue Engineering. *人工臓器* 33(2):S-128, 2004.
- 23) 中村真人, 渡辺昭彦, 小林暁子, 肥留間祐子, 高城富美男, 片岡弘之, 岩崎泰彦, 森田育男, 高谷節雄. Computer Aided Tissue Engineering: インクジェットによる二次元生体組織プリンティング. *生体医工学* 42(suppl.1):245, 2004

## 2. 学会発表

- 1) Kanayasu-Toyoda, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Uchida, E., Hayakawa, T. and Yamaguchi, T. Effect of siRNA of PKC $\epsilon$  on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. **第77回日本生化学大会**
- 2) 中村真人, 渡辺昭彦, 高城富美男, 小林暁子, 肥留間祐子, 大内克洋, 森田育男, 高谷節雄. Computer-Aided-Tissue-Engineering のためのバイオインクジェットプリンティング. **第3回日本再生医療学会総会**, 千葉 2004年3月
- 3) 渡辺昭彦, 中村真人, 高城富美男, 肥留間祐子, 小林暁子, 岩崎泰彦, 森田育男, 大内克洋, 高谷節雄. インクジェットプリントによる細胞マイクロ播種法の研究—血管内皮細胞のバイアビリティ—. **第3回日本再生医療学会総会**, 2004年3月, 千葉 2004年3月
- 4) Kobayashi A, Hiruma Y, Miyake H, Hattori H,

Nakamura M, Akiyoshi K, Takeda S, Morita I, "A new technology for fully designed capillary formation in vitro", *The 13<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting*, 1-5 June, 2004, Toronto, Canada

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特許出願

- 1) 特願 2004-163512
- 2) 特願 2004-162900
- 3) 特願 2004-129721
- 4) 特願 2004-117175

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

図1. AC133陽性細胞をSCFやTPO共存下で培養した際  
一週間後に出現するCD31強陽性細胞とAC133陽性細胞の解析

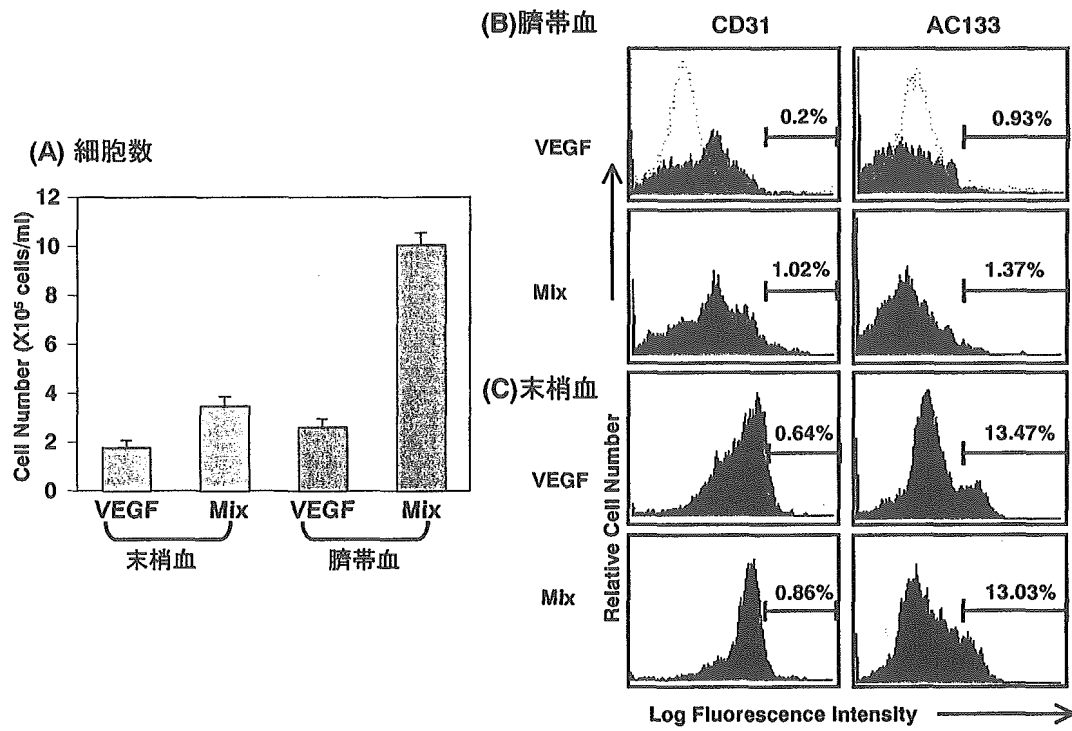


図2. AC133陽性細胞をSCFやTPO共存下で培養した際  
接着する細胞の解析

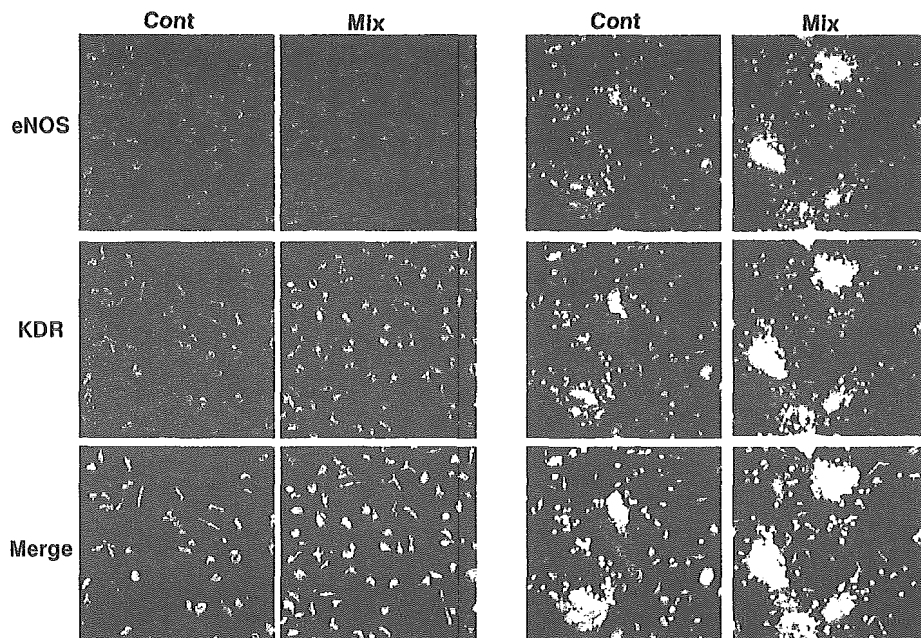


図3. CD31及びCx37抗体を用いて磁気ビーズ分画後  
 接着したKDR陽性細胞の比較

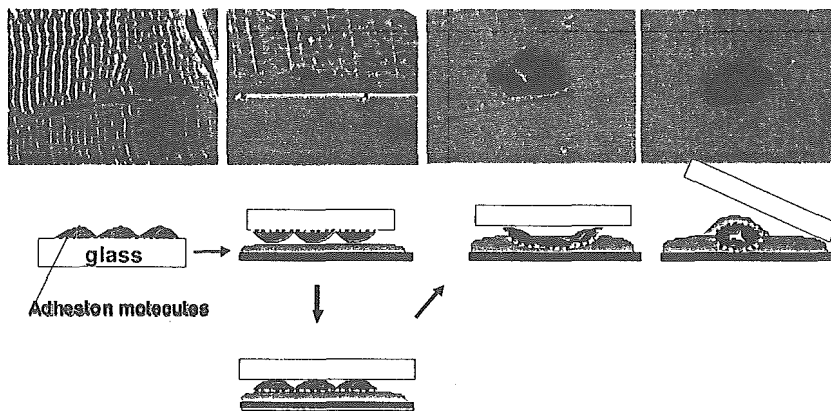
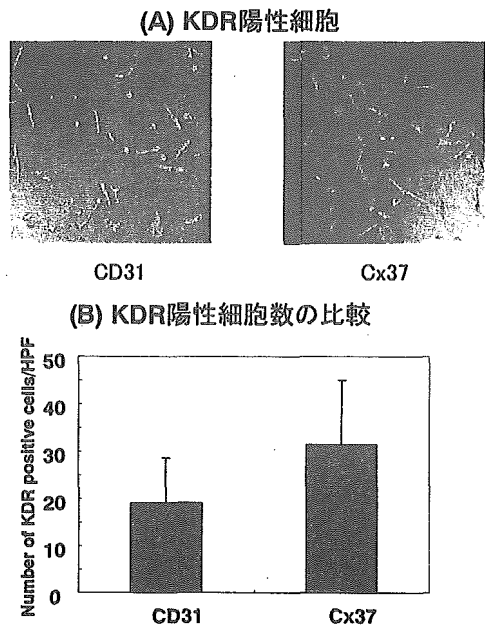


図4. パターン化基板上的血管内皮細胞の挙動と管腔形成過程



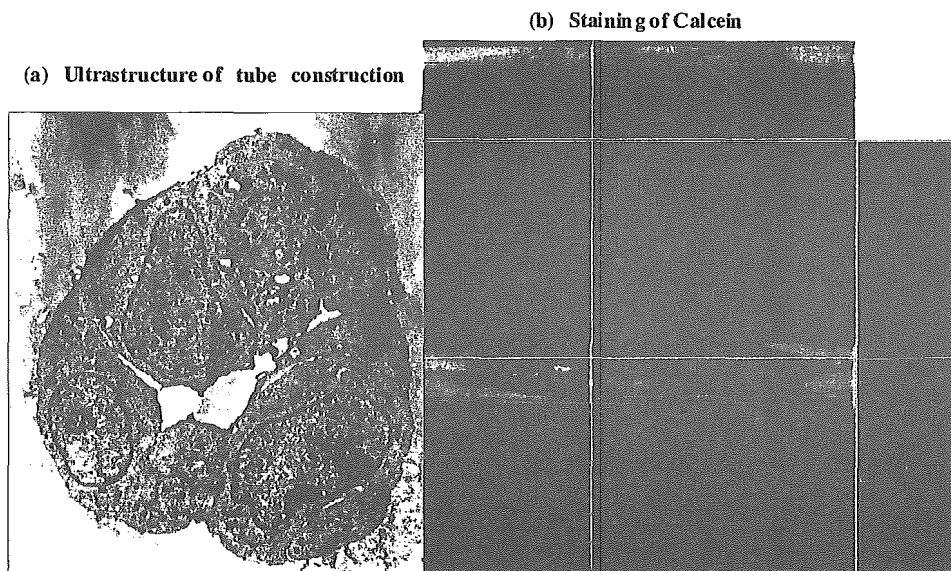


図5. (a) 電子顕微鏡、(b) Calcein で染色した血管内皮細胞による管腔構造物の位相差レーザー顕微鏡による管腔の証明

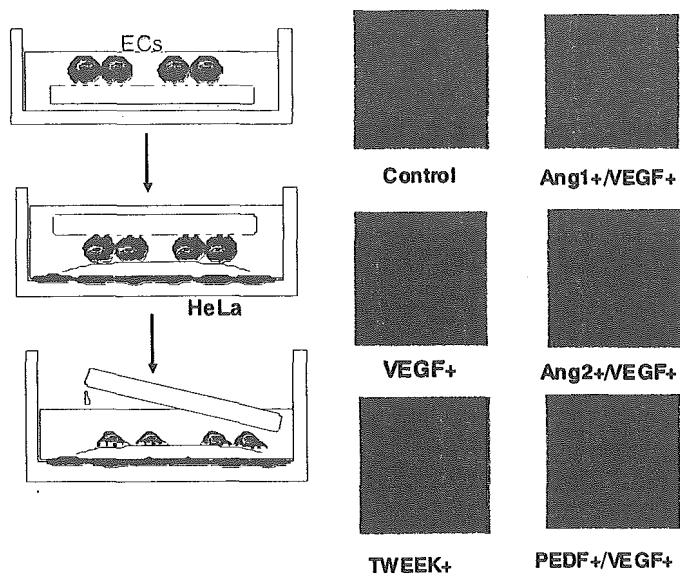


図6. 各種血管新生調節因子による管腔形成への影響