

温度応答性培養皿を利用した肝実質細胞と
非実質細胞の新規共培養法の開発

(課題番号 13308055)

平成13年～平成15年度科学研究費補助金

(基盤研究(A)(2))

研究成果報告書



平成16年3月

研究代表者 岡野光夫

(東京女子医科大学 医学部 教授)

はしがき

本研究成果報告書は、平成 13 年度、平成 14 年度、および平成 15 年度日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究(A)(2)）（課題番号 13308055）により行った「温度応答性培養皿を利用した肝実質細胞と非実質細胞の新規共培養法の開発」に関する研究成果をまとめたものである。

本研究の遂行に当たり、東京女子医科大学医学部 青柳隆夫助教授（現鹿児島大学教授）、早稲田大学理工学部 酒井清孝教授、梅津光生教授、櫻井靖久教授からの助言、ご助力を得たことを付記し、ここに感謝申し上げます。

平成 15 年度科学研究費補助金（基盤研究(A)(2)）研究成果報告書

課題名：温度応答性培養皿を利用した肝実質細胞と非実質細胞の新規共培養法の開発

課題番号：13308055

研究組織：

研究代表者：岡野光夫（東京女子医科大学・医学部・教授）
研究分担者：横山昌幸（東京女子医科大学・医学部・助教授）
研究分担者：菊池明彦（東京女子医科大学・医学部・助教授）
研究分担者：大和雅之（東京女子医科大学・医学部・助教授）
研究分担者：清水達也（東京女子医科大学・医学部・講師）
研究分担者：秋山義勝（東京女子医科大学・医学部・助手）
研究分担者：串田 愛（東京女子医科大学・医学部・助手）

研究経費：（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費
平成 13 年度	21,000	6,300
平成 14 年度	10,300	3,090
平成 15 年度	9,500	2,850
総 計	40,800	12,240

研究発表

（1）学会誌等

1. Ai Kushida, Masayuki Yamato, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: the noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces", J. Biomed. Mater. Res., **54**, 37-46 (2001).
2. Masayuki Yamato, Oh Hyoeng Kwon, Motohiro Hirose, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Novel Patterned cell co-culture utilizing thermally responsive grafted polymer surfaces", J. Biomed. Mater. Res., **55**, 137-140 (2001).
3. Jun Kobayashi, Akihiko Kikuchi, Kiyotaka, Sakai, Teruo Okano, "Aqueous chromatography utilizing pH-/temperature-responsive polymers as column matrix surfaces for separation of ionic bioactive compounds", Anal. Chem., **73**(9), 2027-2033 (2001).
4. Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, "Two-dimensional manipulation of cardiac

- myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile activity”, *Tissue Engineering*, **7**(2), 141-151 (2001).
5. Kazuyuki Nakajima, Shizuyo Honda, Yasuko Nakamura, Fernanzo Lopez-Redondo, Shinichi Kohsaka, Masayuki Yamato, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “Intact microglia are cultured and non-invasively harvested without pathological activation using a novel cultured cell recovery method”, *Biomaterials*, **22**, 1213-1223 (2001).
 6. Hodenori Otsuka, Yukio Nagasaki, Yasuhiro Horiike, Teruo Okano, Kazunori Kataoka, “Novel micropatterned surface fabricated from heterobifunctional poly(ethylene glycol)/polylactide block copolymers for patterned cell culture”, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **14**(1), 101-104 (2001).
 7. Masayuki Yamato, Mika Utsumi, Ai Kushida, Chie Konno, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by only reducing temperature”, *Tissue Engineering*, **7**(4), 473-480 (2001).
 8. 大和雅之・岡野光夫, “細胞シート工学による新しい組織・臓器構築”, *臨床外科*, **56**(1), 53-60 (2001).
 9. 大和雅之・岡野光夫, “ティッシュ エンジニアリング”, *未来材料*, **1**(3), 33-38 (2001).
 10. Masayuki Yamato, Tatsuya Shimizu, Masami Harimoto, Motohiro Hirose, Ai Kushida, Oh Hyeong Kwon, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, “Cell sheet engineering: toward the next generation tissue engineering”, in *Tissue Engineering for Therapeutic Use 5.*, Eds., Y. Ikada, N. Ohshima, eds., 93-100 (2001).
 11. 大和雅之・岡野光夫, “細胞基質との接着”, *再生医工学*, 33-44 (2001).
 12. 岡野光夫, “温度応答性高分子の動的特性とそのバイオメディカル応用”, *高分子*, **50**, 438-441 (2001).
 13. 岡野光夫・大和雅之, “組織工学を支える細胞シート工学”, *組織培養工学*, **27**(10), 21-29 (2001).
 14. 播元政美・岡野光夫, “再生医工学の現状と展望”, *化学と生物*, **39**(10), 671-677 (2001).
 15. 大和雅之・Maya A. Nandkumar・岡野光夫, “細胞シート工学: その肺再生への可能性”, *分子呼吸器病*, **5**(5), 87-90 (2001).
 16. 岡野光夫・大和雅之, “細胞シートと再生医療”, *今日の移植*, **14**(5), 549-553 (2001).
 17. T. O. Collier, J. M. Anderson, A. Kikuchi, T. Okano, “Adhesion behavior of monocytes, macrophages and foreign body giant cells on poly(N-isopropylacrylamide) temperature-responsive surfaces”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **59**, 136-143 (2002).
 18. M. Yamato, C. Konno, M. Utsumi, A. Kikuchi, T. Okano, “Thermally responsive polymer-grafted surfaces facilitate patterned cell seeding and co-culture”, *Biomaterials*, **23**, 561-567 (2002).
 19. M. A. Nandkumar, M. Yamato, A. Kushida, C. Konno, M. Hirose, A. Kikuchi, T. Okano, “Two-dimensional cell sheet manipulation of heterotypically co-cultured lung cells utilizing temperature-responsive culture dishes results in long-term maintenance of differentiated epithelial cell function”, *Biomaterials*, **23**, 1121-1130 (2002).
 20. T. Shimizu, M. Yamato, T. Akutsu, T. Shibata, Y. Isoi, A. Kikuchi, M. Umezumi, T. Okano, “Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **60**, 110-117 (2002).
 21. T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, T. Akutsu, T. Setomaru, K. Abe, A. Kikuchi, M. Umezumi, T. Okano, “Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces”, *Circ. Res.* **90**, e40-e48 (2002).
 22. M. Harimoto, M. Yamato, M. Hirose, C. Takahashi, Y. Isoi, A. Kikuchi, T. Okano, “Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **62**(3), 464-470 (2002).
 23. 菊池明彦, 岡野光夫, “分子や細胞の接着を温度変化で制御する高分子表面”, *表面*, **40**(1), 1-12 (2002).
 24. T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, A. Kikuchi, T. Okano, “Cardiac tissue engineering based on novel cell-sheet manipulation techniques utilizing temperature-responsive culture surfaces”, In “*Tissue Engineering for Therapeutic Use 6*”, Y. Ikada, Y. Umakoshi and T. Hotta, Eds., Elsevier, Amsterdam, pp.57-66 (2002).
 25. M. Harimoto, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, “Double layered co-culture of hepatocytes and endothelial cell sheets by cell sheet engineering”, In “*Tissue Engineering for Therapeutic Use 6*”, Y. Ikada, Y. Umakoshi and T. Hotta, Eds., Elsevier, Amsterdam, pp.117-121 (2002).
 26. A. Kushida, M. Yamato, Y. Isoi, A. Kikuchi, T. Okano, “Two-dimensional renal cell-sheet manipulation for a novel bioartificial renal tubule”, In “*Tissue Engineering for Therapeutic Use 6*”, Y. Ikada, Y. Umakoshi, T. Hotta, Eds., Elsevier, Amsterdam, 123-128 (2002).
 27. A. Kikuchi, T. Okano, “Intelligent thermoresponsive polymeric stationary phases for aqueous chromatography of

- biological compounds”, *Prog. Polym. Sci.*, **27**, 1165-1193 (2002).
28. 清水達也, 岡野光夫, “臓器別の現状と工学技術の必要性-心筋組織再生と工学技術-”, *医科器械学*, **72**(7), 352-354 (2002).
 29. 清水達也, 岡野光夫, “心筋組織再生とバイオマテリアル”, *バイオマテリアル-生体材料-*, **20**(3), 182-189 (2002).
 30. 大和雅之, 岡野光夫, “医療用デバイス・再生医療への挑戦: ナノティッシュエンジニアリング”, *機能材料*, **22**(8), 54-60 (2002).
 31. 大和雅之, 岡野光夫, “医療分野で活躍するマイクロマシン技術”, *クリーンテクノロジー*, 2002. 8., 25-28 (2002).
 32. 清水達也, 岡野光夫, “組織工学によるバイオ人工心臓”, *救急・集中治療*, **14**(10), 1077-1085 (2002).
 33. 清水達也, 岡野光夫, “心筋組織の再構築-細胞シートの再生と応用-”, *Heart View*, **6**(10), 30-37 (2002).
 34. 清水達也, 岡野光夫, “細胞シート工学による心筋組織モデルおよび移植心筋グラフトの作製”, *BME*, **16**(8), 40-45 (2002).
 35. T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, “Tissue engineering for myocardial regeneration”, *J. Artif. Organs*, **5**, 216-222 (2002).
 36. 清水達也, “細胞シート工学による心筋組織再生技術”, *化学と生物*, **40**, 48-52 (2002).
 37. 清水達也, “温度応答性培養皿を用いた細胞シート工学による心筋組織の構築”, *インテリジェント材料*, **11**, 17-20 (2002).
 38. 清水達也, “心筋の組織再生”, *東京女子医科大学雑誌*, 72153-72160 (2002).
 39. 清水達也, “心臓血管系における組織工学”, *Tokyo Heart Journal*, XXII, 79-86 (2002).
 40. 清水達也, “細胞シート用材料”, *再生医療工学の最先端*, 筏義人編, シーエムシー出版, 東京, 29-35 (2002)
 41. 菊池明彦, “細胞の接着・脱着を制御する温度応答性表面”, *日本接着学会誌*, **38**(10), 382-389 (2002).
 42. O. H. Kwon, A. Kikuchi, M. Yamato and T. Okano, “Accelerated cell sheet recovery by co-grafting of PEG with PIPAAm onto porous cell culture membranes”, *Biomaterials*, **24**, 1223-1232 (2003)
 43. Z. Feng, M. Yamato, T. Akutsu, T. Nakamura and T. Okano, “Investigation on the mechanical properties of contracted collagen gels as a scaffold for tissue engineering”, *Artificial Organs*, **27**(1), 84-91 (2003)
 44. T. Yoshida, T. Aoyagi, E. Kokufuta and T. Okano, “Newly designed hydrogel with both sensitive thermoresponse and biodegradability”, *J. Polym. Sci. Part A : Polym. Chem.*, **41**, 779-787 (2003)
 45. M. Ebara, M. Yamato, M. Hirose, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai and T. Okano, “Copolymerization of 2-carboxyisopropylacrylamide with N-isopropylacrylamide accelerates cell detachment from grafted surfaces by reducing temperature”, *Biomacromolecules*, **4**, 334-349 (2003)
 46. J. Kobayashi, A. Kikuchi K. Sakai and T. Okano, “Cross-linked thermoresponsive anionic polymer-grafted surfaces to separate bioactive basic peptides”, *Anal. Chem.*, **75**, 3244-3249 (2003)
 47. Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, H. Toma and T. Okano, “Transplantable urothelial cell sheets harvested noninvasively from temperature-responsive culture surfaces by reducing temperature”, *Tissue Engineering*, **9**(5), 1005-1012 (2003)
 48. M. Yamato, C. Konno, S. Koike, Y. Isoi, T. Shimizu, A. Kikuchi, K. Makino and T. Okano, “Nanofabrication for micropatterned cell arrays by combining electron beam irradiated polymer-grafting and localized laser ablations”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **67A**, 1065-1071 (2003)
 49. 清水達也, 岡野光夫, “Tissue engineering による心筋組織の再生”, *日本再生医療学雑誌*, **2**(1), 45-50 (2003)
 50. 菊池明彦, 岡野光夫, “水系で生理活性物質を分離するグリーンクロマトグラフィー”, *バイオマテリアル-生体材料-*, **21**(2), 133-141 (2003)
 51. 岡野光夫, “再生医療への挑戦”, *炎症・再生*, **23**(2), 72-73 (2002)
 52. 清水達也, 岡野光夫, “冠動脈の臨床(上)-21世紀の診断治療体系-, VI. 血管新生・再建療法, 虚血性心疾患に対する tissue engineering”, *日本臨床*, **61**(4), 710-715 (2003)
 53. 菊池明彦, 岡野光夫, “再生医療を支える医工学技術”, *日本再生医療学会雑誌*, **2**(2), 157-161 (2003)
 54. T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, “Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction”, *Biomaterials*, **24**, 2309-2316 (2003)
 55. 岡野光夫, “医学と工学の融合: バイオメディカルエンジニアリング(BME)の切り開く新しい世界への期待”, *BME*, **17**(1), 33-35 (2003)

56. 岡野光夫, 大和雅之, “細胞から臓器をつくる”, 日経サイエンス, **6**, 43-46 (2003)
57. 大和雅之, 岡野光夫, 「温度応答性高分子ナノグラフト表面」, 蛋白質 核酸 酵素, **48**(11), 1602-1608 (2003)
58. M. Harimoto, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, “Cell sheet engineering: Intelligent polymer patterned surfaces for tissue engineered liver”, *Macromol. Symp.*, **195**, 231-235 (2003)
59. 白柳慶之, 岡野光夫, “第8章 再建・再生医療 3. 尿路の再生医療”, 先端医療シリーズ 24・泌尿器科 泌尿器疾患の最新医療, 吉田修, 東間紘, 村井勝 編集主幹, 株式会社寺田国際事務所 先端医療技術研究所, 311-316 (2003).
60. K. Itoga, M. Yamato, J. Kobayashi, A. Kikuchi and T. Okano, “Cell micropatterning using photopolymerization with a liquid crystal device commercial projector”, *Biomaterials*, **25**(11), 2047-2053 (2004)
61. K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, Y. Isoi, N. Maeda, H. Watanabe, S. Nagai, A. Kikuchi, Y. Tano and T. Okano, “Functional bioengineered human corneal epithelial sheet grafts from limbal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface”, *Transplantation*, **77**(3), 379-385 (2004)
62. Y. Tsuda, A. Kikuchi, M. Yamato, Y. Sakurai, M. Umezumi and T. Okano, “Control of cell adhesion and detachment using temperature and thermoresponsive copolymer grafted culture surfaces”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **69A**, 70-78 (2004)
63. Mitsuhiro Ebara, Akihiko Kikuchi, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano, “III-2. Fast shrinkable materials”, in “Reflexive polymers and hydrogels: Understanding and designing fast responsive polymeric systems”, by Nobuhiko Yui, Randall J. Mersny, Kinam Park, Eds., CRC Press, Boca Raton, FL., Chapter 12, pp. 219-244 (2004).
64. 吉田亮, 岡野光夫, “機能性高分子 <バイオミメティックおよびバイオメディカル機能> —先端技術を切り開く—”, *高分子*, **51**(5), 330-331 (2002)
65. 岡野光夫, “学会誌新スタートにあたって-21世紀の先端医療を支える日本バイオマテリアル学会-“, *バイオマテリアル—生体材料*, **20**(3) 145-146 (2002)
66. 岡野光夫, “バイオマテリアルの進歩とハイブリッド型人工臓器”, *再生医学・再生医療, 現代化学増刊***41**, 181-183 (2002)
67. 岡野光夫, “組織工学の最新テクノロジーと再生医療”, *Bioベンチャー*, **3-4**, 28-31 (2003)
68. 岡野光夫, “21世紀の先端医療: ポストゲノム, 再生医療のための新しいテクノロジー”, *ヘルスケア改革の流れ-時代が求めるヘルスケア戦略-, メディカルトリビューン*, 70-79 (2002)
69. A.V. Kabanov, T. Okano, “Challenges in Polymer Therapeutics, -State of the Art Prospects of Polymer Drugs-”, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, **519**, 1-27 (2003)
70. 青柳隆夫, 菊池明彦, 岡野光夫, “インテリジェント高分子ゲルの生医学への展開”, *先端化学シリーズIII 糖鎖/バイオマテリアル/分子認識/バイオインフォマティクス*, 日本化学会編, 東京, **3**, 143-149 (2003).
71. 岡野光夫, “医学と工学の融合: バイオメディカルエンジニアリング(BME)の切り開く新しい世界への期待”, *BME*, **17**(1), 33-35 (2003)
72. 大和雅之, 岡野光夫, “温度応答性高分子ナノグラフト表面”, 蛋白質 核酸 酵素, **48**(11), 1602-1608 (2003)
73. 大和雅之, 岡野光夫, “組織再生工学: 組織工学・再生医療の現状と将来”, *現代医療*, **35**(3), 66-67 (2003)
74. 荻原充宏, 大和雅之, 菊池明彦, 酒井清孝, 岡野光夫, “細胞シート工学のためのインテリジェント培養皿の開発”, *生物工学会誌*, **81**(11), 478-480 (2003)
75. 白柳慶之, 岡野光夫, “特集・高齢者医療における再生医療 Short Topics: 細胞シート工学の再生医療への応用”, *Geriatric Medicine*, **41**(12), 1843-1846 (2003)
76. 長谷川昌輝, 大和雅之, 石川烈, 岡野光夫, “Topics: 歯周組織の再生医療”, *医学のあゆみ*, **207**(12,13), 1011-1012 (2003)
77. 大和雅之, 岡野光夫, “再生医学研究の現状と将来展望: 消化器組織構築のバイオマテリアル”, *Frontiers in Gastroenterology*, **9**(1), 62-68 (2004)
78. 岡野光夫, 大和雅之, “Newsフラッシュ—生理活性因子で移植用組織を培養 定着しやすい細胞シート作製へ 成功率高い差異性医療技術を実現”, *ナノテク専門ニューズレター 日経・先端技術*, **57**, 1-2 (2004)

(2) 口頭発表

1. 第50回高分子学会年次大会 2001.5.23-25 大阪
 - 1) 荏原充宏・酒井清孝・廣瀬志弘・大和雅之・青柳隆夫・岡野光夫, “温度応答性高分子の水和の加速化と細胞脱着に与える影響”, 予稿集, **50(5)**, 1061 (2001).
 - 2) 播元政美・大和雅之・廣瀬志弘・菊池明彦・岡野光夫, “温度応答性高分子導入培養皿を用いた肝細胞一内皮細胞積層共培養系の構築”, 予稿集, **50(5)**, 1062 (2001).
 - 3) 廣瀬志弘・大和雅之・菊池明彦・岡野光夫, “温度応答性高分子をパターン状に固定化した培養皿を用いた新規細胞共培養法の構築”, 予稿集, **50(5)**, 1064 (2001).
 - 4) 串田 愛・大和雅之・磯井由紀・菊池明彦・岡野光夫, “温度応答性高分子をグラフトした培養皿からの尿管上皮細胞シートの回収とバイオ人工腎への展開”, 予稿集, **50(5)**, 1065 (2001).
2. 第4回日本組織工学会 2001.7.6-7 神奈川
 - 1) 播元政美・大和雅之・廣瀬志弘・菊池明彦・岡野光夫, “肝細胞層および内皮細胞層からなる二重層共培養系”, プログラム・抄録集, 34 (2001).
 - 2) 串田 愛・大和雅之・磯井由紀・菊池明彦・岡野光夫, “細胞シート工学のバイオ人工腎への応用”, プログラム・抄録集, 45 (2001).
3. 第50回高分子討論会 2001.9.12-14 東京
 - 1) 青柳隆夫・岡野光夫・荏原充宏・酒井清孝・吉田貴恒・國府田悦男, “鋭敏な温度応答性を有する高分子の機能化のためのモノマーの設計”, 高分子学会予稿集, **50(12)**, 3537-3538 (2001).
 - 2) 荏原充宏・酒井清孝・大和雅之・青柳隆夫・岡野光夫, “温度応答性培養皿への細胞接着因子の導入と細胞接着/脱着制御”, 高分子学会予稿集, **50(12)**, 3539-3540 (2001).
 - 3) 菊池明彦・津田行子・大和雅之・岡野光夫, “転移温度の異なる温度応答性高分子修飾表面の調製”, 高分子学会予稿集, **50(12)**, 3541-3542 (2001).
4. 化学工学会第34回秋季大会 2001.09.28-30 北海道
 - 1) 荏原充宏, 酒井清孝, 青柳隆夫, 岡野光夫, “温度応答性ハイドロゲルへのカルボキシル基の導入法と膨潤/収縮制御”, 要旨集, R305 (2001).
5. 第2回心血管再生医学研究会 2001.10.13 大阪
 - 1) 清水達也・大和雅之・菊池明彦・岡野光夫, “温度応答性培養皿を用いた細胞シート工学による Cardiac Tissue Engineering”, p.6 (2001).
6. 第23回日本バイオマテリアル学会大会 2001.10.22-23 京都
 - 1) 津田行子・菊池明彦・大和雅之・岡野光夫, “転移温度の異なる温度応答性パターン化表面の作製と細胞シート工学”, 予稿集, 156 (2001).
 - 2) 荏原充宏・酒井清孝・大和雅之・青柳隆夫・岡野光夫, “細胞接着因子を導入した温度応答性培養皿による細胞の接着脱着制御”, 予稿集, 204 (2001).
 - 3) 串田 愛・大和雅之・磯井由紀・菊池明彦・岡野光夫, “尿管上皮細胞シートの二次元マニピュレーションと細胞極性”, 予稿集, 205 (2001).
 - 4) 播元政美・大和雅之・菊池明彦・岡野光夫, “肝細胞一内皮細胞重層化共培養”, 予稿集, 209 (2001).
7. 第39回日本人工臓器学会大会 2001.11.4-6大阪
 - 1) 宮川 繁・澤 芳樹・竹谷 哲・清水達也・岡野光夫・松田 暉, “重症心不全に対する肝細胞増殖因子遺伝子導入及び Tissue Engineering を応用した新しい心筋再生法の開発”, プログラム, S-3 (2001).
 - 2) 清水達也・大和雅之・菊池明彦・岡野光夫, “細胞シート工学による Cardiac Tissue Engineering”, プログラム, S-3 (2001).
 - 3) 串田 愛・大和雅之・菊池明彦・岡野光夫, “温度応答性培養皿から回収し、多孔性膜に再接着させた尿管上皮細胞シートの細胞極性”, プログラム, S-46 (2001).
 - 4) 阿久津拓光・清水達也・大和雅之・菊池明彦・梅津光生・岡野光夫, “伸展培養装置を用いた新生仔ラット配向心筋細胞シートの作製”, プログラム, S-47 (2001).
 - 5) 宮川 繁・澤 芳樹・清水達也・岡野光夫・竹谷 哲・松田 暉, “重症心不全に対する組織工学を応用

した心筋再生に関する検討—心筋細胞シートによる細胞供給システムの開発”, プログラム, S-48 (2001).

8. 第22回日本炎症・再生医学会 2001.7.2-3 東京
 - 1) 岡野光夫・大和雅之, “細胞シート工学による肝小葉構造の再生”, プログラム予稿集, **21**(4), 423 (2001).
9. 第4回日本組織工学会 2001.7.6-7 神奈川
 - 1) 岡野光夫, “細胞シート工学の創成”, プログラム・抄録集, 20 (2001).
10. 第17回日本 DDS 学会 2001.7.12-13 大阪
 - 1) 大和雅之, “細胞成長因子細胞外マトリックス分子徐放システムとしての再構成組織移植”, プログラム予稿集, **16**(4), 275 (2001).
11. 第9回高分子 ABC 研究会講座 2001.7.31 奈良
 - 1) 岡野光夫, “インテリジェント表面とその臓器再生への応用”, 講演要旨集, 1-6 (2001).
12. フロンティアフォーラム 2001.8.21-22 東京
 - 1) 岡野光夫, “驚異の再生医療: 21世紀のティッシュエンジニアリング”, (2001)
13. 第7回国際マイクロマシンシンポジウム 2001.10.31-11.01 東京 The seventh International Micromachine Symposium
 - 1) Teruo Okano, Masayuki Yamato, “Future perspective of micromachine technology in medical fields”, Proceedings, 29-33 (2001).
14. 第15回高分子ゲル研究会講座 2001.11.26 東京
 - 1) 岡野光夫, “ゲルの生医学分野におけるナノテクノロジー”, 講演要旨集, 1-4 (2001).
15. 第10回ポリマー材料フォーラム 2001.11.29-30 名古屋
 - 1) 岡野光夫, “再生医工学: 温度応答性表面による細胞シート工学の創製”, 講演要旨集, 21-22 (2001)
16. 第31回日本創傷治癒学会 2001.12.6-7 東京 The 31st Japanese Society for Wound Healing
 - 1) 岡野光夫, “細胞シート工学: 再生医療の新しいアプローチ”, 講演要旨集, 21 (2001).
17. 第11回インテリジェント材料シンポジウム 2002.03.14 東京
 - 1) 播元政美, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫, “温度応答性培養皿を用いた血管内皮細胞の重層化共培養” 要旨集, 78-79 (2002).
 - 2) 津田行子, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, “インテリジェント温度応答性パターン化表面の共培養シートの脱着” 要旨集, 80-81 (2002).
 - 3) 荏原充宏, 酒井清孝, 大和雅之, 青柳隆夫, 岡野光夫, “ペプチド固定化温度応答性培養皿の設計と無血清条件下での細胞シートの作製” 要旨集, 82-83 (2002).
18. 28th Annual Meeting and Exposition of Society for Biomaterials 2002.04.24-27 Florida
 - 1) M. Yamato, T. Shimizu, A. Kikuchi, T. Okano, “Micropatterned cell co-culture by utilizing electron-beam initiated polymer grafting and limited laser ablation”, Transactions, 14 (2002).
 - 2) A. Kushida, M. Yamato, Y. Isoi, A. Kikuchi, T. Okano, “Two-dimensional cell-sheet manipulation of renal tubule epithelial cells for a bioartificial Kidney”, Transactions, 695 (2002).
19. The 66th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2002.04.24-26 Sapporo
 - 1) T. Shimizu, T. Okano, “In vivo survival and beating of tissue engineered cardiac grafts by novel technology “Cell sheet Engineering””, Abstracts, 147 (2002).
 - 2) T. Shimizu, T. Okano, “In vitro fabrication of three-dimensional heart muscle model for measuring isometric contractile force by novel tissue engineering technology”, Abstracts, 189 (2002).
 - 3) S. Miyakawa, Y. Nawa, S. Ohtake, S. Taketani, H. Matsuda, T. Shimizu, T. Okano, “A tissue engineered contractile cardiac graft improves the cardiac performance in infarct rat heart”, Abstracts, 835 (2002).
20. 第51回高分子学会年次会 2002.05.29-31 横浜
 - 1) 小池俊輔, 牧野公子, 大島広行, 大和雅之, 高橋智恵, 菊池明彦, 岡野光夫, “電子グラフトと UV レーザーアブレーションによる細胞培養基板の超微細加工”, 予稿集, **51** (5), 964 (2002).
 - 2) 菊池明彦, 岡野光夫, 赤田優子, 牧野公子, 大島広行, “細胞吸・脱着に及ぼす温度応答性高分子の表面導

- 入構造の影響”, 予稿集, **51** (5), 965 (2002).
- 3) 津田行子, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, “温度応答性パターン化表面の調製とパターン化共培養シートの回収”, 予稿集, **51** (5), 965 (2002).
- 4) 荏原充宏, 酒井清孝, 大和雅之, 青柳隆夫, 岡野光夫, “RGD 固定化温度応答性培養皿の設計と無血清培養への応用”, 予稿集, **51** (5), 966 (2002).
21. 第 51 回高分子討論会 2002. 10. 02-04 九州
- 1) 津田行子, 菊池明彦, 大和雅之, 櫻井靖久, 岡野光夫, “温度応答性コポリマーを用いたパターン化表面の設計と共培養細胞組織の回収”, 予稿集, **51**(12), 3420-3421 (2002).
- 2) 荏原充宏, 酒井清孝, 大和雅之, 青柳隆夫, 菊池明彦, 秋山義勝, 岡野光夫, “細胞接着/成長因子固定化温度応答性培養皿の創製”, 予稿集, **51**(13), 3422-3423 (2002).
- 3) 木原隆典, 廣瀬志弘, 大和雅之, 今村保忠, 林 利彦, “IV型コラーゲン会合体を基材とした培養による血管内皮組織構造の形成”, 予稿集, **51**(13), 3489-3490 (2002).
- 4) 播元政美, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫, “重層化組織構築のための温度応答性培養皿の利用”, 予稿集, **51**(13), 3525-3526 (2002).
- 5) 小池俊輔, 遠藤淳也, 牧野公子, 大島広行, 大和雅之, 高橋智恵, 秋山義勝, 菊池明彦, 岡野光夫, “電子線グラフトと UV エキシマーレーザーアブレーションによる超微細加工細胞培養基板の作製”, 予稿集, **51**(13), 3540-3541 (2002).
- 6) 大塚英典, 長崎幸夫, 岡野光夫, 堀池靖浩, 片岡一則, “表面微細加工に基づく肝フェロイドアレイの構築と医学分野への展開”, 予稿集, **51**(13), 3572-3573 (2002).
- 7) 平野覚浩, 大塚英典, 長崎幸夫, 堀池靖浩, 岡野光夫, 片岡一則, “肝スフェロイドアレイ形成における培養基板特性及び培養条件の影響”, 予稿集, **51**(13), 3574-3575 (2002).
21. 第 40 回日本人工臓器学会 2002. 10. 02-04 札幌
- 1) 播元政美, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫, “細胞シート重層化共培養環境による肝実質細胞の機能制御”, 予稿集, **31**(2), 158 (2002).
- 2) 関根秀一, 大和雅之, 長井 慈, 菊池明彦, 都築正和, 岡野光夫, “酸素プラズマによる最小人工血管の表面修飾”, 予稿集, **31**(2), 197 (2002).
22. Cardiac BioInterventions (CBITM2002) 2002. 10. 04-05 San Francisco
- 1) T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, A. Kikuchi, M. Umezu, T. Okano, “Long survival of tissue-engineered pulsatile cardiac tissue grafts”, *Heart Surg. Forum*, **6**, 4 (2002).
- 2) S. Miyakawa, Y. Sawa, S. Taketani, I. Memon, T. Shimizu, T. Okano, H. Matsuda, “A tissue engineered contractile cardiac graft improves the cardiac performance in infarct rat heart”, *Heart Surg. Forum*, **6**, 3 (2002).
23. The 75th Scientific Sessions of American Heart Association 2002. 11. 17-20 Chicago
- 1) T. Shimizu, M. Yamato, T. Sekine, Y. Isoi, A. Kikuchi, M. Umezu, T. Okano, “Isometric contractile force measurement and cell alignment of bioengineered cardiac muscle by novel tissue engineering technology”, *Supplement to Circulation*, **106**(19), II-52 (2002).
- 2) T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, A. Kikuchi, T. Okano, “Tissue-engineered cardiac grafts survive and preserve their beating up to 6 months in rat subcutaneous tissues”, *Supplement to Circulation*, **106**(19), II-464 (2002).
- 3) S. Miyakawa, Y. Sawa, H. Takano, S. Sakakida, S. Taketani, I Memon, T. Shimizu, T. Okano, “Efficacy of a novel cellular cardiomyoplasty using cardiac sheet for myocardial regeneration : compared with needle injection”, *Supplement to Circulation*, **106**(19), II-420 (2002).
24. 第 24 回日本バイオマテリアル学会大会 2002. 11. 29-30 東京
- 1) 津田行子, 菊池明彦, 大和雅之, 櫻井靖久, 岡野光夫, “温度応答性パターン化表面を用いた共培養シートの作製”, 予稿集, 146 (2002).
- 2) 大塚英典, 平野覚浩, 長崎幸夫, 堀池靖浩, 岡野光夫, 片岡一則, “PEG ブラシ表面の微細加工に基づく肝スフェロイドアレイの構築と医療分野への展開への展開”, 予稿集, 151 (2002).
- 3) M. Ebara, K. Sakai, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Aoyagi, T. Okano, “Creation of novel culture dishes for realizing both

non-serum cultivation and non-invasive cell recovery”, Abstracts, 182 (2002).

4) 播元政美, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫, “細胞シート重層化共培養系と細胞外マトリックス”, 予稿集, 240 (2002).

5) 小池俊輔, 大和雅之, 高橋智恵, 菊池明彦, 秋山義勝, 牧野公子, 大島広行, 岡野光夫, “電子線グラフトとUV レーザーアブレーションを用いたナノ加工細胞培養基板”, 予稿集, 246 (2002).

25. IUPAC Polymer Conference on the Mission and Challenges of Polymer Science and Technology (IUPAC-PC2002)
2002. 12. 02-05 Kyoto

1) J. S. Bae, O. H. Kwon, I. K. Kang, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, “Design and synthesis of novel cell culture surface for accelerated cell sheet recovery”, Abstracts, 614 (2002).

26. 5th Annual Meeting of the Tissue Engineering Society International 2002. 12. 08-10 Kobe

1) Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, A. Kikuchi, H. Toma, T. Okano, “Multilayered urothelium regeneration by grafting cultured urothelial cell sheets onto a demucosalized gastric flap”, Abstracts, 1126 (2002).

2) Y. Tsuda, A. Kikuchi, M. Yamato, Y. Sakurai, T. Okano, “Preparation of dual-patterned thermo-surfaces for detachment of pattern co-cultured cell sheets”, Abstracts, 1140 (2002).

3) M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano, “RGDS-immobilized temperature-responsive surface for non-serum cultivation and non-invasive cell recovery”, Abstracts, 1149 (2002).

4) M. Harimoto, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, “Hepatocyte behavior under the layered cell sheets co-culture”, Abstracts, 1219-1220 (2002).

5) T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, “Fabrication of multi-layered and neovascularized myocardial tissue by cell sheet engineering”, Abstracts, 1246 (2002).

27. 第 14 回血管内皮細胞からみた糖尿病合併症研究会 2002. 02. 15 岡山

1) 岡野光夫, “再生医療と細胞シート工学”

28. 京都における再生医学研究の現場から 2002. 02. 28 京都

1) 岡野光夫, “組織工学と再生医学”

29. 第 11 回インテリジェント材料シンポジウム 2002. 03. 14 東京

1) 岡野光夫, “インテリジェント材料が変革する組織・臓器の再生医療”, 要旨集, 13-14 (2002).

30. 日本医工学治療学会 第 18 回学術大会 21 世紀の医療と医工学 2002. 03. 15-16 三重県

1) 岡野光夫, “再生医工学のテクノロジー”, 要旨集, 40 (2002).

2) 大和雅之, “ナノテクノロジーと再生医工学”, 要旨集, 41 (2002).

31. 日本化学会第 81 春季年会(2002) 2002. 03. 26 東京

1) 岡野光夫, “インテリジェント表面を利用した組織 ; 臓器の再生” (2002).

32. The 66th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2002. 04. 24-26 札幌

1) T. Okano, “Cardiac tissue reconstruction based on cell sheet engineering”, Abstracts, 6 (2002).

33. The 4th Annual Meeting of Korean Tissue Engineering Society 2002. 05. 04 Korea

1) T. Okano, “Cell sheet engineering : intelligent polymer patterned surface for tissue engineered liver”, Abstracts, 1-3 (2002).

34. 第 55 回東京心臓の会 2002. 05. 25 東京

1) 清水達也, “心臓血管系における組織工学”, Tokyo Heart Journal XX II, 79-86 (2002).

35. 日本学術会議合同シンポジウム, 人間と工学の接点, 2002. 06. 17 東京

1) 岡野光夫, “細胞から組織、臓器を再生するテクノロジー”, 論文集, 33-34 (2002).

36. 第 23 回日本炎症・再生医学会 2002. 07. 02-03 東京

1) 岡野光夫, “再生臓器工学の進歩と未来”, 要旨集, 320 (2002).

2) 岡野光夫, 清水達也, 大和雅之, “細胞シート工学と心筋組織再生”, 要旨集, 320 (2002).

37. 39th International Symposium on Macromolecules 2002. 07. 07-12 China

1) T. Okano, “Cell sheet engineering intelligent polymer surface for tissue engineered”, Abstracts, 873 (2002).

38. 10th Annual Advances in Tissue Engineering Short Course 2002. 08. 14-17 Houston

- 1) T. Okano, "Intelligent materials for tissue engineering"
39. 1st Joint Japan-Sweden Workshop on Bioelectronics 2002. 08. 30 Sweden
- 1) T. Okano, "Cell sheet engineering for new tissue and organs : Electrical synchronization of two layered cardiomyocyte cell sheets"
40. 第 40 回日本人工臓器学会 2002. 10. 02-04 札幌
- 1) 西田幸二, 大和雅之, 林田康隆, 渡辺克彦, 菊池明彦, 岡野光夫, 田野保雄, "角膜移植から角膜再生医療への展開", 予稿集, 31(2), 81 (2002).
- 2) 竹谷 哲, 澤 芳樹, 宮川 繁, 米田雅博, I. M. Ahmad, 清水達也, 岡野光夫, "重症心不全に対する心筋細胞シートによる心筋再生法の開発", 予稿集, 31(2), 82 (2002).
- 3) Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, A. Kikuchi, H. Toma, T. Okano, "Multilayered urothelium regeneration by grafting cultured urothelial cell sheets onto a demucosalized gastric flap", 予稿集, 31(2), 107 (2002).
41. 第 38 回日本移植学会総会 2002. 10. 18 東京
- 1) 岡野光夫, "組織・臓器再生のための細シート工学" 学会雑誌, 37, 210 (2002).
42. ナノ・インテリジェント材料/システム国際シンポジウム 2002. 10. 30 東京
- 1) 岡野光夫, "細胞シート工学とナノテッセエン지니어リング", 予稿集, 3-7 (2002).
43. The 11th Workshop on Functional Polymer Materials Nano-Biomaterials for Drug, Gene and Cell Therapy 2002. 11. 01 ソウル
- 1) T. Okano, "Cell sheet engineering", Abstracts, 123-145 (2002).
44. 第 41 回日本網膜硝子体学会総会 第 19 回眼病理セミナー 2002. 11. 08-10 東京
- 1) 岡野光夫, "細胞シート工学による眼組織再生", 抄録集, 22 (2002).
45. 日本口腔インプラント学会第 22 回関東甲信越支部総会学術大会 2002. 11. 10 東京
- 1) 岡野光夫, "細胞シートからの組織・臓器の再生", 抄録集, 16-17 (2002).
46. 第 8 回国際マイクロマシン・ナノテクシンポジウム-マイクロマシン技術-ナノテクを支える次代の産業技術基盤- 2002. 11. 14 東京
- 1) 岡野光夫, 大和雅之, "21 世紀のバイオ・ナノテクノロジー セロミックス", 抄録集, 83-87 (2002).
47. 第 22 回キャピラリー電気泳動シンポジウム 2002. 12. 04-06. 東京
- 1) 岡野光夫, 菊池明彦, "インテリジェントナノ界面とバイオセパレーション", 要旨集, 15-16 (2002).
48. IUPAC Polymer Conference on the Mission and Challenges of Polymer Science and Technology (IUPAC-PC2002) 2002. 12. 02-05 Kyoto
- 1) T. Okano, M. Yamato, "Temperature-responsive surfaces for engineered tissues and organs", Abstracts, 559 (2002).
49. Gels, Genes, Grafts & Giants Transitioning Biomaterials in the 21st Century 2002. 12. 17-20 Hawaii
- 1) T. Okano, "Intelligent surfaces for cell sheet engineering" Abstract, 11-12 (2002).
50. 16th International Symposium on Microscale Separations and Analysis 2003. 1. 18-23 USA
- 1) Y. Tanaka, M. Goto, K. Sato, M. Yamato, T. Okano, T. Kitamori, "Micro Cell Culture and Life Supporting System for Bioreactor and Bioassay", Abstracts, 86 (2002).
51. International Symposium on Fusion of Nano and Bio Technologies 2003. 3. 9-10 筑波
- 1) Kohji Nishida, Masayuki Yamato, Yasuo Tano, Teruo Okano, "Functional bioengineering human corneal sheet using a temperature-responsive cell culture surface", Abstracts, 9(2003).
- 2) Masayuki Yamato, "Intelligent nano-surfaces for oligo-cell biology and tissue engineering", Abstracts, 17(2003).
- 3) Mitsuhiro Ebara, Masayuki Yamato, Takao Aoyagi, Akihiko Kikuchi, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano, "On-off control of cell adhesion with thermo-responsive nano-structures", Abstracts, 38(2003).
- 4) Yukiko Tsuda, Akihiko Kikuchi, Masayuki Yamato, Yasuhisa Sakurai, Teruo Okano, "Nano-scale thick-patterned thermo-responsive surfaces for pattern co-cultured cell sheet engineering", Abstracts, 39(2003).
52. 日本再生医療学会 2003. 3. 11-12 神戸
- 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, "無血清条件下における細胞培養および回収を実現する新規培養皿の開発", 抄録集, 102(2003).

- 2) 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, 荏原充宏, 津田行子, “ナノオーダーサイズの厚みを有する温度応答性ゲル表面への細胞接着性評価”, 抄録集, 103 (2003).
 - 3) 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, 津田行子, 櫻井靖久, “共培養細胞シートの脱着を可能とするパターン化温度応答性表面”, 抄録集, 103 (2003).
 - 4) 白柳慶之, 大和雅之, 山崎雄一郎, 東間紘, 岡野光夫, “培養膀胱上皮細胞シートを用いた新たな膀胱再建術の開発”, 抄録集, 142 (2003).
 - 5) 長谷川昌輝, 大和雅之, 菊池明彦, 石川烈, 岡野光夫, “細胞シート工学に基づく歯周組織再生療法”, 抄録集, 113 (2003).
 - 6) 久保田享, 西田幸二, 渡辺克彦, 田野保雄, 大和雅之, 岡野光夫, “温度応答性培養皿を用いたラット網膜色素上皮細胞シートの作成・回収”, 抄録集, 135 (2003).
 - 7) 西田幸二, 林田康隆, 渡辺克彦, 田野保雄, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫, “角膜上皮疾患に対する培養角膜上皮シート移植法の開発”, 抄録集, 135 (2003).
 - 8) 井出武, 西田幸二, 角出泰造, 田野保雄, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫, “温度応答性培養皿上で作製した培養角膜内皮細胞シートの細胞密度と細胞外基質”, 抄録集, 136 (2003).
 - 9) 宮川繁, 澤芳樹, 竹谷哲, Imran Memon, 清水達也, 岡野光夫, 宮元裕治, 松田暉, “重症心不全に対する心筋シート移植による心筋再生効果の検討”, 抄録集, 168 (2003).
53. 第12回インテリジェント材料/システムシンポジウム 2003. 3. 17 東京
- 1) 津田行子, 菊池明彦, 大和雅之, 櫻井靖久, 岡野光夫, “二次元パターン化共培養細胞シートの回収を可能とするインテリジェント表面”, 抄録集, 54-55(2003).
 - 2) 関根卓也, 清水達也, 大和雅之, 菊池明彦, 梅津光生, 岡野光夫, “温度応答性培養皿及び伸展培養デバイスを用いた組織工学的的手法による心筋組織の再構築及びその機能評価”, 抄録集, 60-61(2003).
54. 日本化学会第83春季年会(2003) 2003. 3. 18-21 東京
- 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, “無血清条件下での細胞培養と非侵襲的な細胞の回収を実現する新規培養皿の創製”, 835 (2003).
55. The 1st International Symposium on Developmental Biology and Tissue Engineering 2003. 3. 24 Tokyo
- 1) M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano, “Cell sheet construction technologies under serum-free conditions for their safety of clinical application”, Abstracts, P20 (2003)
56. 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) 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”
57. 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) M. Yamato, “Intelligent biointerfaace for tissue engineering and cell chips”, Abstracts, 109 (2003)
 - 3) T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, A. Kikuchi, T. Okano, “Myocardial tissue reconstruction by cell sheet engineering”, Abstracts, 112 (2003)
 - 4) 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)
 - 5) 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)

- 6) 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)
58. 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)
58. 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, 牧野公子, 大島広行, 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, 櫻井靖久, 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)
59. 第 26 回日本気管支学会 2003. 5. 29-30 神奈川
- 1) 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)
60. 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, "中皮細胞フィブリング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, 櫻井靖久, 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", 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幹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の回収", 抄録集, 102 (2003)
 - 8) Imran Ahmad, Yoshiki Sawa, Satoshi Taketani, Shigeru Miyagawa, Masahiro Yoneda, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Hikaru 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, 櫻井靖久, 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)
61. 81st general session of the IADR 2003. 06. 25-28 Sweden
- 1) M. Hasegawa, M. Yamato, T. Okano, I. Ishikawa, “Transplantable human periodontal ligament cell sheets: A novel approach for periodontal tissue regeneration”, abstracts, (2003)
62. 第 32 回医用高分子シンポジウム 2003.07.31-08.01 東京
- 1) 津田行子, 菊池明彦, 大和雅之, 櫻井靖久, 梅津光生, 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)
63. Advanced Technology Applications for Combat Casualty Care 2003. 08. 18-22 Florida
- 1) Teruo Okano, “Cell Sheet Engineering for Tissue Regeneration”
64. 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, “液晶プロジェクト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) 津田行子, 菊池明彦, 大和雅之, 中尾愛子, 櫻井靖久, 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
65. US-Japan Symposium on Nanotechnology in Advanced Therapy and Diagnosis 2003.10.09-11 横浜
- 1) Masayuki Yamato, “Nano-Tissue Engineering Utilizing Intelligent Materials”, Abstract, P6(2003)
- 2) Yoshikatsu Akiyama, Shintaroh Iwanaga, Akihiko Kikuchi, Masayuki Yamato, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano, “Development of novel cell array by utilizing bio-nano interfaces”, Abstract, P11(2003)
- 3) Akihiko Kikuchi, Yukiko Tsuda, Masayuki Yamato, Yasuhisa Sakurai, Mitsuo Umezu, Teruo Okano, “Nanometer-thick Patterned Dual Thermo-Responsive Surfaces for Heterotypic Cell Sheet Engineering”, Abstract, P12(2003)
66. 第 12 回日本形成外科学会基礎学術集会 2003.10.09-10 東京
- 1) 大和雅之, “再生医療のための細胞シート工学”, 抄録集, 60, (2003)
67. 第 18 回日本整形外科学会基礎学術集会 2003.10.16-17 福岡
- 1) 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)
68. The International Symposium of Cardiology Frontiers: Cardiomyopathy and Heart Failure 2003
2003.10.17-18 札幌
- 1) Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Yuki Isoi, Akihiko Kikuchi and Teruo Okano, “Myocardial Tissue Reconstruction by Cell Sheet Engineering”, Abstract, 30(2003)
69. Sweden-Japan Workshop on Bionanotechnology 2003.11.09-11 Kyoto
- 1) Yoshikatsu Akiyama, Akihiko Kikuchi, Masayuki Yamato and Teruo Okano, “Ultra thin thermoresponsive grafted gel for cell adhesion control”, Abstracts, 51-52, (2003)
70. ISSP International Workshop 5th Gel Symposium Polymer Gels; Fundamentals and Nano-Fabrications (GelSymposium 2003) 2003.11.17-21 Kashiwa
- 1) 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)

- 2) 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)
71. 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)
72. 第25回日本バイオマテリアル学会大会 2003.12.16-17 大阪
- 1) 大和雅之, "オリゴ細胞生物学および細胞利用型次世代バイオセンサーを目指すナノバイオファブリケーション", 予稿集, 61, (2003)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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キュエーターの開発", 予稿集, 185, (2003)
- 6) 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)
- 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ペンサー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) 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)
- 12) 碓井達也, 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
73. ワークショップ「21世紀の細胞利用テクノロジー」 2003. 2. 10 東京,
- 1) 岡野光夫, 基調講演 "再生医療応用テクノロジー", 資料集, (2002)
- 2) 大和雅之, "21世紀の細胞利用テクノロジー", 資料集, (2002)

74. nano tech 2003 +Future ナノテクノロジーに関する国際会議および国際展示会 2003. 2. 26-28
東京
- 1) 岡野光夫, “Fusion of intelligent polymers and cell by nanotechnology”, Abstracts, 158-159
75. 第 26 回日本医学会総会 2003. 3. 4-6 福岡
- 1) 岡野光夫, 大和雅之, 清水達也, “4. 人工臓器, 再生医療と人工臓器”, 要旨, 243 (2003)
76. 国際再生医療 Expo 2003. 3. 10-12 神戸
- 1) 長谷川昌輝, 大和雅之, 菊池明彦, 石川烈, 岡野光夫, “細胞シート工学に基づく歯周組織再生療法” (2003)
77. 日本再生医療学会 2003. 3. 11-12 神戸
- 1) 清水達也, 大和雅之, 磯井由紀, 菊池明彦, 岡野光夫, “細胞シート工学による心筋組織再構築”, 要旨集, 60 (2003)
78. The 1st International Symposium on Developmental Biology and Tissue Engineering 2003. 3. 24 横浜
- 1) Teruo Okano, Masayuki Yamato, “Cell sheet engineering for tissue and organ regeneration”, Abstracts, S80 (2003)
79. 第 11 回関東脳 SPECT 研究会 2003. 3. 29 東京
- 1) 岡野光夫, “再生医療の現状と展望” (2003)
80. The international congress on bio - nanointerface 2003. 5. 19-24 Tokyo
- 1) T. Okano, “Cell Manipulation” (2003)
81. IADR 81st general session 2nd meeting of the pan European federation 2003, 6, 25-28
- 1) M. Hasegawa, M. Yamato, T. Okano, I. Iseki, “Transplantable human periodontal ligament cell sheets: A novel approach for periodontal tissue regeneration” (2003)
82. 第 6 回日本組織工学会 2003. 06. 12-13 早稲田
- 1) 大和雅之, “膀胱上皮細胞シートを用いた膀胱拡大術”, 抄録集, 37 (2003)
- 2) 清水達也, 大和雅之, 磯井由紀, 菊池明彦, 岡野光夫, “細胞シート工学による心筋組織の再構築”, 抄録集, 49 (2003)
- 3) 宮川繁, 澤芳樹, 竹谷哲, 清水達也, 岡野光夫, 松田暉, “重症心不全に対する最王シートを用いた新しい心筋再生法の開発”, 抄録集, 50 (2003)
83. 第 10 回皮膚創傷治療フォーラム 2003. 06. 28 東京
- 1) 岡野光夫, “細胞シート工学-再生医療の新しいアプローチ”, 抄録集, 12-13 (2003)
84. 第 40 回日本臨床分子医学会学術総会 2003. 7. 10-11 東京
- 1) 岡野光夫, “細胞シート工学による組織/臓器の構造と機能再生” (2003)
85. 第 14 回東京ペイ心臓カンファレンス 2003. 7. 19 東京
- 1) 清水達也, “Myocardial Tissue Engineering-細胞シート工学による心筋組織再構築-”, 予稿集, 6 (2003)
86. Advanced Polymeric Materials and Technology (APMT-2003) 2003. 08. 4-7 Korea
- 1) Teruo Okano, “Intelligent Surfaces for Cell Sheet Engineering”, Abstract, 56(2003)
87. Advanced Technology Applications for Combat Casualty Care 2003. 08. 18-22 Florida
- 1) Teruo Okano, “Cell Sheet Engineering for Tissue and Organ Regeneration”, (2003)
88. 1st COE 21 International Symposium on Human-Friendly Materials Based on Chemistry 2003. 08.27-28 Tokyo
- 1) Teruo Okano, “Intelligent Biointerface for Tissue and Organ Regeneration”, Abstract, 3-4(2003)
89. Fifth International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers 2003. 09. 10-13 Italy
- 1) Teruo Okano, “Intelligent Surfaces for Cell Sheet Engineering”, Abstract, IL11(2003)
90. The Korean Society for Biomaterials 2003. 09. 19-20 Korea
- 1) Teruo Okano, “Recent Progress of Tissue Engineering”, Abstract, 2(2003)
91. US-Japan Symposium on Nanotechnology in Advanced Therapy and Diagnosis 2003.10.09-11 横浜
- 1) Teruo Okano, “Bio-Nano-Designed Surfaces for Regenerative Medicine”, Abstract, 24(2003)
92. 医療機器フォーラム設立記念シンポジウム「21 世紀の医療機器 Tissue Engineering —開発と評価」
2003.10.25 東京
- 1) 岡野光夫, “細胞シートによる組織・臓器の再生”, プログラム, 16-17, (2003)

93. 第 41 回日本人工臓器学会大会 2003.10.30-11.01 仙台
- 1) 岡野光夫, “細胞シートを利用したティッシュエンジニアリング”, 人工臓器, **32**(2), S-19(2003)
 - 2) 白柳慶之, 大和雅之, 東間紘, 岡野光夫, “膀胱の再生医療”, 人工臓器, **32**(2), S-22(2003)
 - 3) 宮川繁, 澤芳樹, 宮本裕治, 福嶋教偉, 榊田悟, 松宮護郎, 榊雅之, 竹谷哲, 近藤晴彦, イムラン・メモン, 泰広樹, 清水達也, 岡野光夫, 松田暉, “重症心不全に対する細胞シートを用いた新しい心筋再生法の開発”, 人工臓器, **32**(2), S-36(2003)
 - 4) 菊池明彦, 津田行子, 櫻井靖久, 梅津光生, 大和雅之, 岡野光夫, “パターン化温度応答性表面からの高機能パターン化共培養組織の回収”, 人工臓器, **32**(2), S-65(2003)
94. 2nd Swiss-Japanese Workshop on Biomaterials 2003.11.05-07 Tukuba
- 1) Teruo Okano, “Cell Sheet Engineering for Tissue and Organ Regeneration”, Program, 72(2003)
95. Sweden-Japan Workshop on Bionanotechnology 2003.11.09-11 Kyoto
- 1) Teruo Okano, “Interlligent Biointerface for Tissue and Organ Regeneration”, Abstracts, 22-23, (2003)
96. 第三回山梨再生・移植研究会 2003.11.11 山梨
- 1) 岡野光夫, “細胞シート工学による組織・臓器の再生”, (2003)
97. 第 19 回マイクロ化学懇話会 2003.11.14 埼玉
- 1) 岡野光夫, “再生医療を切り開くインテリジェント表面”, 資料集, (2003)
98. 社団法人化学工学会関東支部 第 7 回イブニングセミナー 2003.11.14 東京
- 1) 岡野光夫, “細胞シート工学による再生医療”, (2003)
99. 第 8 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 2003.11.18-19 東京
- 1) 岡野光夫, “インテリジェント表面による組織・臓器の再生”, 講演要旨集, 6-7, (2003)
100. ISSP International Workshop 5th Gel Symposium Polymer Gels; Fundamentals and Nano-Fabrications (GelSymposium) 2003.11.17-21 Kashiwa
- 1) Teruo Okano, “Intelligent Surfaces for Switching Attachment and Detachment of Cells”, Program, 58-59, (2003)
101. 第 8 回産業界総合研究所人間福祉医工学研究部門研究フォーラム - 医療に活きるナノテクフォーラム - 2003.11.28 東京
- 1) 岡野光夫, “パターン化細胞表面の作製とその医療への応用”, (2003)
102. 第 4 回心血管再生医学研究会 (CVR) 2003.11.29 大阪
- 1) 岡野光夫, “組織工学を切り開く細胞シート操作テクノロジー”, (2003)
103. 東京理科大学 DDS 研究部門発足記念シンポジウム DDS 研究の展望 2003.12.24 東京
- 1) 岡野光夫, “細胞シートによる組織・臓器の再生”, プログラム, 6-7, (2003)
104. 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, “親水性ポリアクリルアミド超薄膜と UV エキシマレーザーを利用したセルアレイの開発”, 講演要旨集, 75-76, (2004)
 - 2) 秋山義勝, 菊池明彦, 大和雅之, 岡野光夫, “超薄膜化した温度応答性グラフトゲルの機能制御”, 講演要旨集, 109-110, (2004)
 - 3) 菊池明彦, 津田行子, 中尾愛子, 大和雅之, 櫻井靖久, 梅津光生, 岡野光夫, “ナノメートル厚の超薄膜ゲルからなるパターン化温度応答性表面を用いた共培養組織の再生”, 講演要旨集, 111-112, (2004)

I. はじめに

1. 研究背景
2. 研究目的

1.1 研究背景

われわれの体を構成する組織・臓器・器官が傷害を受け、その機能が損なわれたとき、移植医療はきわめて有効である。特に、近年の免疫抑制技術の進歩とともに移植手術の成功率は年々増加傾向にあり、その有効性はますます大きなものとなってきている。しかし、世界的にみてもまだ深刻な組織や臓器のドナー不足のため、すべての患者を治療することは不可能である。この代替医療技術として、1960年代から、機械的・物理化学的な機能の代行を担う人工臓器による治療が発展し、人工心臓・人工血管・人工肺・人工関節などが臨床応用されてきた。一方で、これらの人工臓器では完全に生体機能を代替できるわけではなく、ごく一部の機能のみを代替するにすぎない。さらにいえば、耐久性・生体適合性等の未解決の問題も多く残っており、今なおこれらの問題点を解決すべくさまざまな研究が行われている。

このような背景の中で、生体機能を発現するために、細胞あるいは生体組織をそのまま利用する必要性が見いだされ、培養細胞と天然あるいは合成ポリマーなどの人工材料とを組み合わせる利用するバイオハイブリッド人工臓器が開発された。さらに、この考えを発展させて、*in vivo* あるいは *in vitro* で組織様構造を形成・再構築し、生体内で高機能の組織を再構築させることを主眼とした組織工学（ティッシュエンジニアリング）の概念が提唱され、1990年代に入り世界的

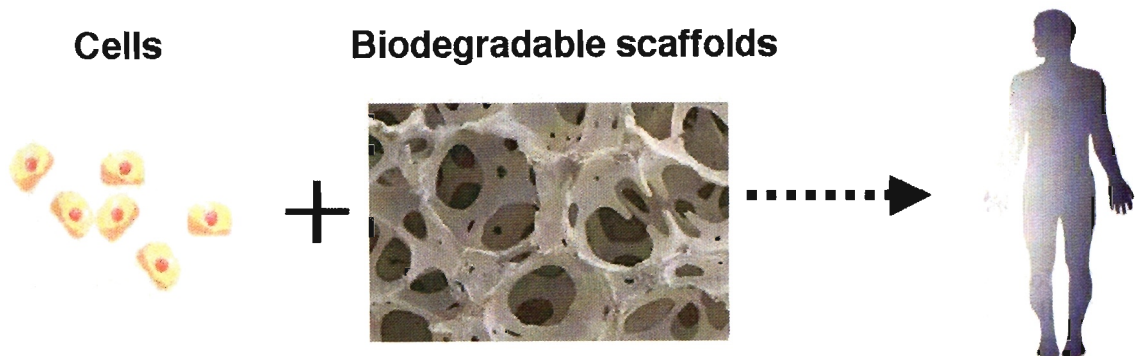


Figure 1 Concept of general tissue engineering using biodegradable polymer scaffolds.

に活発な研究が展開されている。

皮膚のような比較的簡単な二次元構造体ではなく、三次元構造体の組織構築となると、細胞の塊を作っただけでは内側への酸素・栄養分の供給不足により細胞の生存が妨げられるため、三次元構造体の組織構築はきわめて難しいとされていた。

1990年代に Figure 1 に示すように Langer と J.P. Vacanti らが繊維状、あるいは多孔性の生分解性高分子（グリコール酸と乳酸の共重合体）上に細胞を播種し、その後生体内へ戻すというコンセ

プトに基づく革新的な三次元組織構築法を提案した²⁾。足場はポーラスな構造を有するため、内部の細胞への酸素透過性・栄養供給率ともに優れており、また、移植後は足場の高分子が徐々に分解され、コラーゲン・エラスチン・などの結合組織へと置き換わり三次元組織構造体の再構築が達成できる。さらに、Vacanti³⁾はこの手法を用いてヒトの耳の形に成型した生分解性ポリマー上に軟骨細胞を播種し再生軟骨様組織を作製した。以来、国内外における組織工学の研究では、細胞の足場として三次元に成形した生分解性ポリマーを用いる手法が主流になっており、すでにこの手法を用いて、軟骨⁴⁾、骨⁵⁾、血管⁶⁻⁹⁾、膀胱¹⁰⁾、気管¹¹⁻¹⁵⁾などの再生が示されている。しかし、生分解性ポリマーを足場とする方法は現時点で次のような問題点が指摘されている。

- (i) 足場内部への細胞の播種が困難
- (ii) 生体へ生着しづらい
- (iii) 移植後のポリマーによる炎症反応
- (iv) ポリマーの分解と細胞による組織構築のタイミングの制御が難しい
- (v) 細胞成分の多い組織構築には不適切（結合組織の割合が多くなってしまう）

特に(v)の問題点に関しては、細胞が主構成成分である心臓・肝臓・腎臓等の組織構築を図る上で非常に重要であり、生分解性ポリマーを用いる手法にとって代わる新たな方法が切望されている。

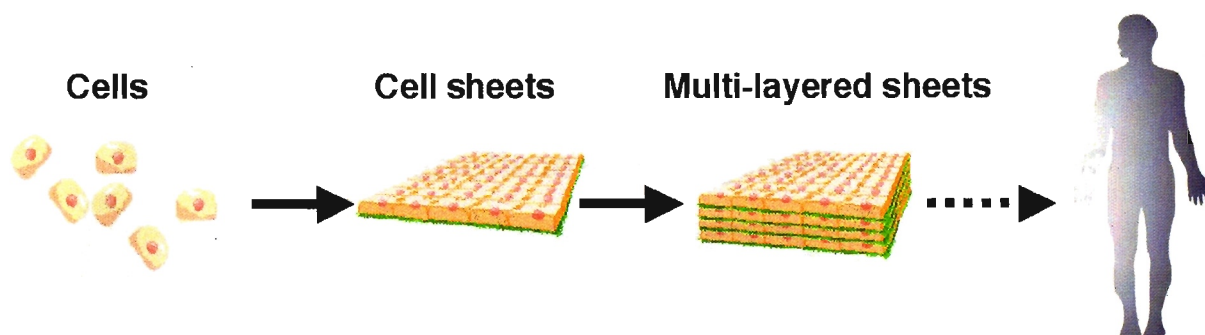


Figure 2 Concept of “cell sheet engineering” as a new method for tissue reconstruction with cultured cell sheets.

【細胞シート工学】

われわれは新規な組織構築法として「細胞シート工学」の新概念を提唱している。我々¹⁶⁾は、温度応答性高分子を固定化した培養基材を開発し、この基材表面で培養・増殖させた細胞を非侵襲的にシート状で剥離回収することに世界に先駆けて成功した^{17, 18)}。そして、新規な組織構築法のひとつとして、Figure 2 に示すように培養皿から非侵襲的に回収した細胞シートを一つのユニットとして重層化させ、組織の三次元構造を構築する手法が検討されている^{19, 20)}。細胞シートを用いる組織構築法には、次のような利点があげられる。

- (i) 細胞シートは細胞成分のみで構成されているため、移植後の生体への生着性が良好

- (ii)細胞シートを重層化し三次元組織を構築できる
- (iii)種々の細胞シートの組み合わせが可能である

温度応答性高分子として知られるポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)(Figure 3a)は、32°Cに下限臨界溶液温度(Lower critical solution temperature: LCST)をもち、Figure 3cに示すようにLCST以下では、イソプロピル基周辺の水分子同士が水素結合により籠状構造をとり安定化し、この疎水性水和により見かけ上親水性化して水に溶解する。一方で、LCST以上では温度上昇による水分子の運動性の増大と水素結合の解離が生じこの籠状構造が壊れ、もはや保護されなくなった疎水基同士が集合してIPAAm鎖が収縮し、脱水和することが知ら

れている²¹⁾。このため、このポリマーの水溶液はFigure 3bに示すようにLCST以下では、水に溶解し無色透明であるが、LCST以上では水に不溶となり、その水溶液は白く濁る。さらに、これらの水和・脱水和はせまい温度範囲で可逆的に変化する。このようなユニークな性質をもつPIPAAmは、薬の徐放を温度で制御可能とするドラッグデリバリーシステム²²⁻²⁴⁾、水系で生体関連物質を分離・精製できるクロマトグラフィーシステム²⁵⁻³¹⁾、また、酵素反応を温度で制御可能とする酵素バイオコンジュゲートシステム³²⁻³⁷⁾などの研究分野で応用されている。

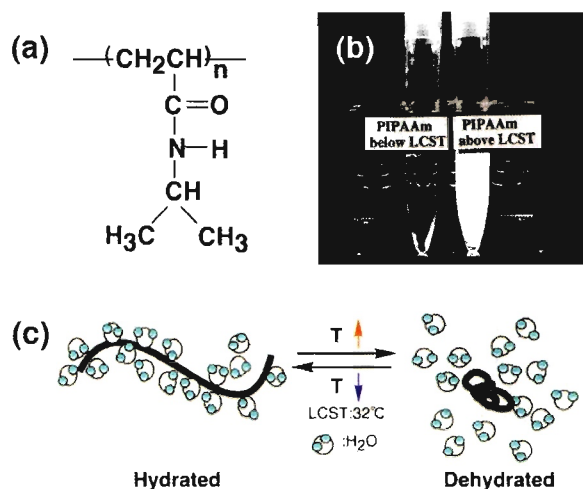


Figure 3 Properties of thermo-responsive polymer poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm): (a) chemical structure of PIPAAm. (b) Behavior of PIPAAm dissolved in water with temperature changes. (c) Structural changes of PIPAAm molecules with temperature changes.

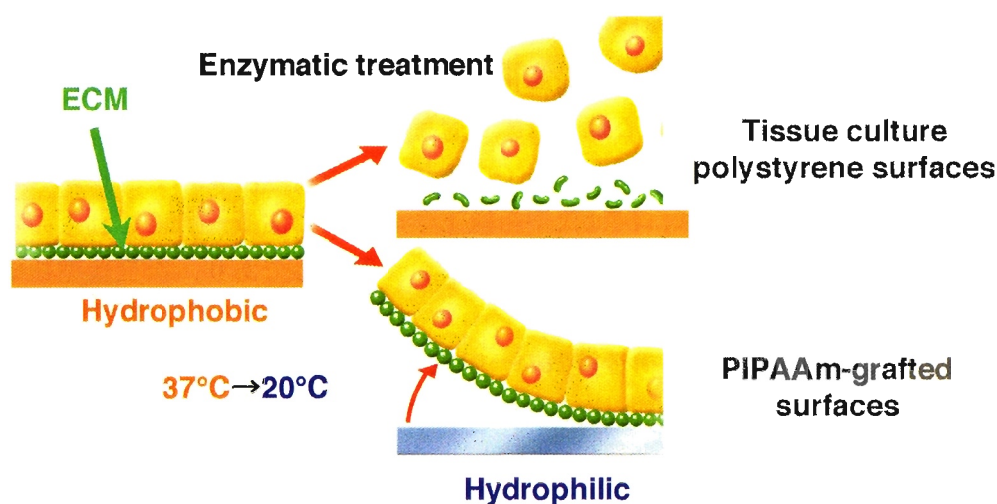


Figure 4 Cell sheet recovery system from PIPAAm-grafted surfaces showing surface wettability changes with temperature.

【PIPAAm 固定化温度応答性培養皿】

培養細胞のシート状での回収は PIPAAm を市販の培養皿表面に共有結合的に極薄に固定化した培養基材の開発によりはじめて実現できる。 PIPAAm を電子線重合法によりポリスチレン製組織培養皿 (Tissue culture grade polystyrene: TCPS) 上に共有結合的に固定化させた温度応答性培養表面は、PIPAAm の転移温度である 32°C 以上ではポリマーが脱水和し疎水性を、32°C 以下ではポリマーが水和し親水性を示す。 PIPAAm の温度変化に応答した親水性／疎水性変化を利用し、温度変化による培養細胞の基材表面への接着・脱着制御が可能であることが示された^{16, 38, 39)}。

市販の TCPS 上で細胞-細胞間が形成され培養皿一面になるまで培養した細胞を回収するには、通常、細胞と基材の接着を担うフィブロネクチンやコラーゲンなどの細胞外マトリックス(ECM)を分解するためにトリプシンなどを用い酵素処理を行う。しかし、Figure 4 の上段に示すように、酵素処理を行うと細胞が分泌した細胞外マトリックス(ECM)ばかりでなく細胞-細胞間結合も切断され、培養細胞は、一つ一つのばらばらな細胞浮遊液として回収される。一方、PIPAAm 固定化培養皿を用いると、培養温度を 32°C 以下、例えば 20°C に下げるだけで表面の PIPAAm が水和し表面が親水性化するため細胞は接着力を維持できなくなり、細胞層がその下面に ECM を保持したまま自発的に脱着しシート状で回収できた⁴⁰⁾。さらに、この ECM が「糊」の役割を果たし、細胞シートの重層化^{19, 20)}、あるいは、移植後の生体内組織への生着性が良いことが示された^{19, 41)}。

生体組織構造模倣系としての共培養技術

(a) 組織学的観点からのアプローチ

生体は約 60 兆個の多種類の細胞からなり、それぞれ特定の機能を発現する組織、あるいは臓器を形成し、生体の恒常性を維持している。組織の再構築を図る上で、目的とする組織の構造を模倣し、より生体内の細胞に近い機能を持たせることが一つの方法論として検討されている。

組織工学研究の現状は、軟骨・骨・角膜・皮膚などの比較的単純な構造を有する組織の構築は比較的容易で、臨床段階、あるいは、すでに商品化されているものもある。しかし、結合組織が多く占める軟骨組織などとは対照的に、心臓・肝臓・腎臓などは細胞成分の占める割合が高く、また、多種類の細胞により複雑な組織構造となっている⁴²⁾。このため、これらの複雑な構造を有する組織の構築はまだ研究段階にあり、次世代型組織工学の対象である。特にこれらの組織は、組織の生理機能と恒常性維持のため、栄養分や老廃物の収支が盛んであり、次世代型組織の構築には、血管系の構築が不可欠であると考えられている。

このような背景のもと、近年生体組織構造模倣の一手段として、細胞のパターン化培養技術と、さらに、数種類の細胞を任意の配列で培養するパターン化共培養技術に関する研究が注目を集め始めている。

Bhatia ら、あるいは我々が提案したいずれのシステムも生体構造を模倣した細胞の解析系モデルとして大変有効である。一方で、パターン化共培養により細胞機能を増強させた共培養組織を、一枚のシート状で回収することができれば、複雑な組織構造・機能を有する三次元組織構築の実現に大きく貢献すると考えられる。そこで、本研究では、パターン化共培養細胞シートの構築が可能な培養基材の開発を目的とし、肝実質細胞と非実質細胞とのパターン化共培養の実現を目指した。

パターン化共培養細胞シート構築の構想案

本研究でパターン化共培養細胞シートの構築を行うにあたり、開発しようとする培養基材の概要と、その基材を用いた培養システムを Figure 7 に示す。基本的には Figure 6 に示したこれまでに我々が開発した培養基材をさらに発展させ、温度変化により培養表面の親水性／疎水性を制御し、二種類の細胞の共培養とシート状での回収を可能とするものである。以下に詳細を述べる。

【培養基材】：転移温度の異なる温度応答性高分子をパターン状に固定化した表面を調製する。転移温度を T_2 にもつ PIPAAm とさらに低温側の T_1 に転移温度を有する共重合体を用いる。

【Stage1】 これらの表面は培養温度が $T_2 < T < T_1$ では共重合体ドメインのみが疎水性を示し、PIPAAm ドメインは親水性となるため播種した一種類目の細胞 A は共重合体ドメインのみに接着する。

【Stage2】 培養温度を上げて $T_2 < T_1 < T$ にすると、両ドメインが疎水性を示し、二種類目の細胞 B は疎水性となった PIPAAm ドメインへ接着する。

【Stage3】 全面が温度応答性高分子で覆われているため、培養温度を下げて $T < T_1 < T_2$ とすると両ドメインが親水性化し、パターン化共培養細胞層がシート状で剥離・回収できる。

以上より、この構想案をもとに本研究は以下に示す事項を研究の目的とした。

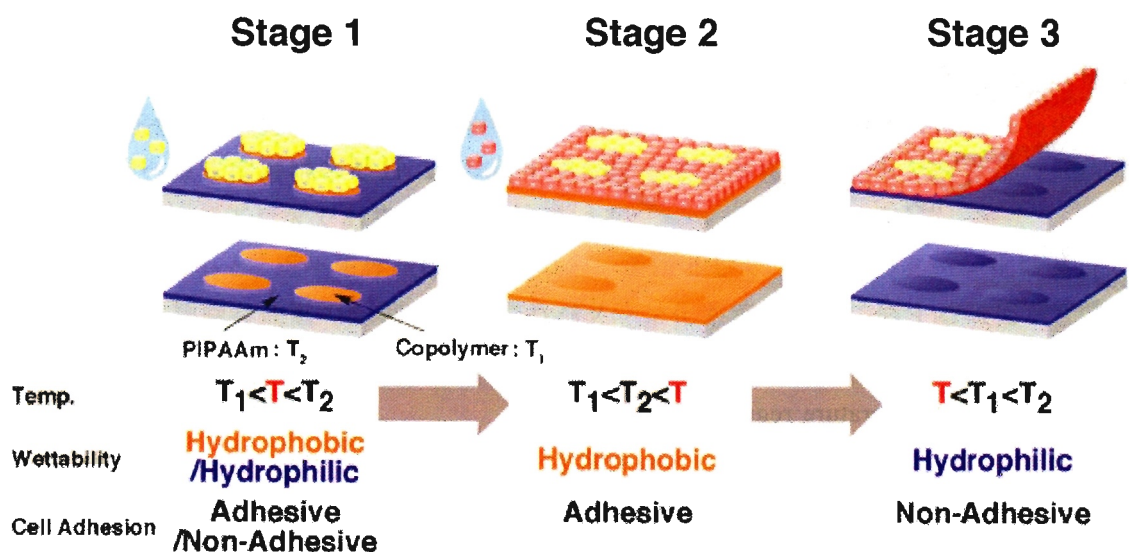


Figure 7 Concept of this study for recovery of co-cultured cell sheets.

(i) 細胞シートの接着／脱着が任意の温度で制御可能な培養表面の作製：疎水性モノマーである *n*-ブチルメタクリレート (*n*-butyl methacrylate: BMA) を共重合させ温度応答性高分子の転移温度を制御した温度応答性表面を調製し、任意の温度での細胞の接着／脱着制御の可能性を検討する。

(ii) 複数種の細胞の共培養と共培養細胞シートの回収が可能な温度応答性パターン化表面の作製：(i)での検討結果をもとに、PIPAAm と転移温度の異なる温度応答性高分子とをパターン状に固定化した温度応答性パターン化培養皿を調製し、共培養細胞シートの構築を目指す。

(iii) 共培養シートの細胞機能評価：調製した共培養細胞シートの細胞機能を蛍光免疫染色法などにより評価し、より細胞機能の向上した細胞シートを構築するための培養基材の検討と提案を行う。

上記3項目のうち(i)に関しては、以下の結論を得た。すなわち、

(i) PIAAm 固定化表面が親水性状態を示す 28°C で、IB5 固定化表面は疎水性を示し、細胞接着性を有する表面であることが判明した。

(ii) 疎水性の BMA ユニットの 20°C での細胞の脱着速度を PIPAAm に比して低下させた。

(iii) 各温度でのぬれ性の値は、必ずしも表面と細胞脱着の関係と一致しないことが明らかになった。

(iv) BMA 含量の多い表面ほど、細胞シートの脱着が生起するまでに要する時間と細胞シートの脱着に要する時間が長かった。

以上のことから細胞の接着と脱着は、表面にグラフトしたコポリマー中の BMA 含量の調節により制御しうることがわかった。PIPAAm 分子のパターン固定技術を用いることで、PIPAAm と IBX をパターン状に固定化した表面を作製できれば、二種類の細胞の二次元配置によるパターン化共培養とそのシート状での回収が可能になると考えられる。そこで、本研究では、転移温度の異なる2種類の温度応答性高分子を修飾したパターン化温度応答性培養皿を調製し、本培養皿上で、培養温度の制御に基づく細胞の部位選択的接着挙動の解析、ならびに肝実質細胞と非実質細胞（血管内皮細胞）との共培養の実現を目指した。以上のように作製した共培養組織の生理機能に関しても併せて検討を加えた。

II. 研究成果

第 1 章

温度応答性パターン化培養皿の調製

1.1 目的

1.2 実験材料

1.3 IB5 ドメインを PIPAAm 温度応答性表面に固定化したパターン化表面の調製

1.4 温度応答性パターン化表面の調製

1.5 ATR-FTIR 法によるグラフトポリマー量の定量

1.6 X 線光電子分光分析による P(IPAAm-BMA)共グラフト表面の解析

1.7 小括

1.1 目的

組織工学の基盤技術のひとつとして、生体組織・器官を模倣し、細胞の機能発現とその長期維持を可能とする複数種の細胞の共培養技術に関する研究が注目されてきている。これまで報告された共培養法では多くの場合、細胞接着分子をパターン状に基材に固定し、細胞と接着分子表面の相互作用を制御し二種類の細胞を各ドメイン上に接着・培養するものであり⁴⁴⁾、この手法は細胞機能を増強させる手法として非常に有効であることが示されつつある。一方で、このような共培養細胞層をシート状で回収できれば、得られた細胞層を1つのユニットとした新しい組織構築を実現できると考えた。

我々はこれまでに、BMA の組成を変化させながら IPAAm との共重合体を固定した表面を EB 重合法により調製し、PIPAAm 表面では細胞が接着性を示さない 32°C 以下の温度(28°C)であっても、共重合体表面上では細胞が接着し、かつ、20°C の低温処理により接着細胞が脱着させうることを示した。

そこで本章では、二種類の細胞のパターン化共培養と単層シートでの回収が可能な培養基材を作製するために、BMA を利用して転移温度の異なる温度応答性高分子をパターン状に修飾した表面を作製し、その表面解析を行った。

1.2 実験材料

1.2.1 試薬

(1) *N*-イソプロピルアクリルアミド(*N*-isopropylacrylamide: IPAAm); Kohjin Co.より供与

* *n*-ヘキサン溶液から再結晶したものを使用した。

(2) *n*-ブチルメタクリレート(*n*-butyl methacrylate: BMA); Tokyo Chemical Industries, Inc.

* 窒素気流下で減圧蒸留したものを使用した。

1.2.2 使用機器

- (1) エリアビーム型電子線照射装置(EBC-200, Nissin-High Voltage Co., Ltd., Kyoto)
- (2) 全反射型フーリエ変換赤外分光光度計(ATR-FTIR, Valor-III, JASCO, Tokyo)
- (3) 超音波カッター(SUW30, Suzuki Motor Co., Shizuoka)
- (4) FACE 接触角計(CA-X, Kyowa Interface Science, Co., Saitama)
- (5) X線光電子分光分析装置(ESCALA 250, Thermo Electron Corporation, UK)

1.3 IB5ドメインを PIPAAm 温度応答性表面に固定化したパターン化表面の調製

1.3.1 実験目的

細胞は 27°C で PIPAAm 表面へは接着性を示さないが、IB5 表面では接着性を示す。そこで、PIPAAm と IB5 の性質を持つポリマーをパターン状に TCPS 上へ固定化できれば、共培養と共培養細胞シートの回収が可能な培養基材を作製できると考えられる。しかし、PIPAAm と IB5 をミリメートル、あるいは、マイクロメートルオーダーで TCPS 上へ EB 重合法により固定化することは現状の実験室レベルでは困難である。そこで、本実験では、あらかじめ調製した PIPAAm 固定化表面上に IB5 モノマー溶液を展開し、マスクを用いた EB 重合法によるパターン化表面を調製し、その表面特性解析を行うことを目的とした。

1.3.2 実験方法

あらかじめ調製し洗浄・乾燥を施した PIPAAm 固定化表面上に、BMA5 mol%を含む IPAAm 溶液を 30 μ L 展開した。その上に ϕ 1 mm の穴を多くもつ多孔性アルミニウム板を置き、EB(0.3 MGy, 150 kV)を照射し、PIPAAm ドメインと島状の IB5 を PIPAAm 上にグラフトしたドメインとから構成されるパターン化表面を調製した。

EB 照射後、メタノール中で一晩浸漬した。その後、表面のメタノールをよく切り、4°C の精製水中に一晩浸漬し、冷水で十分に噴射洗浄した。最後に一晩 25°C で減圧乾燥した。

1.3.3 実験結果

PIPAAm ドメインと島状の IB5 を PIPAAm 固定化表面上にグラフトしたドメインとから構成されるパターン化表面を調製した。27°C での細胞のパターン化表面への接着性を検討したところ、ロット間でばらつきがあり、細胞が IB5 ドメインのみに選択的に接着する表面もあれば、どちらのドメインにも細胞が接着性を示さないものもあった。

また、37°C で、PIPAAm ドメインのみに細胞が接着性を示し IB5 ドメインへは接着性を示さないものもあった。

1.3.4 考察

PIPAAm 表面上へ BMA を含む IPAAm がさらに重合されることにより、IB5 ドメイン全体の PIPAAm 固定化量が増大し、

- (i) 27°C において細胞が接着性を示さない、
- (ii) 37°C において IB5 on PIPAAm ドメインには細胞が接着せず、PIPAAm ドメインのみに細胞が

接着する、

という結果に至ったのではないかと考えられた。このため、細胞接着性のロット間のばらつきは、展開した IB5 モノマー溶液の EB 照射による重合の不均一性によるグラフト量の相違が原因であると考えた。我々⁶⁰⁾は同様の手法で、PIPAAm 固定化表面上に IB モノマー溶液を展開し、24×24mm のカバーガラスを介して EB 照射することで四角のパターン化表面を調製し、IB5 ドメインの PIPAAm の固定化量を ATR-FTIR 法で測定したところ、下地の PIPAAm 上にグラフトされる IB5(PIPAAm 換算)固定化量はロット間でばらつき、再現性がないことを確認した。このばらつきの原因として、PIPAAm 上に展開した IB5 モノマー溶液のマスク孔内のメニスカス形成に伴う液膜の厚さ変化が可能性として考えられた。

1.4 温度応答性パターン化表面の調製

1.4.1 実験目的

第 1.3 節の実験結果から、あらかじめ固定化した PIPAAm に BMA 成分のみが重合、共固定されればよいと考え、あらかじめ調製した PIPAAm 固定化表面に BMA モノマー溶液のみを展開し、マスクを介した EB 重合法でパターン化表面を作製した。

1.4.2 実験方法

【パターン化温度応答性培養皿の調製】

PIPAAm ドメインと $\phi 1$ mm の P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインから構成される温度応答性パターン化培養皿の調製方法を Figure 1.1 に示す。まず、PIPAAm 固定化表面を EB 重合法で調製し、4°C の精製水で十分に洗浄後一晩減圧下で乾燥した。続いて、あらかじめ調製した PIPAAm

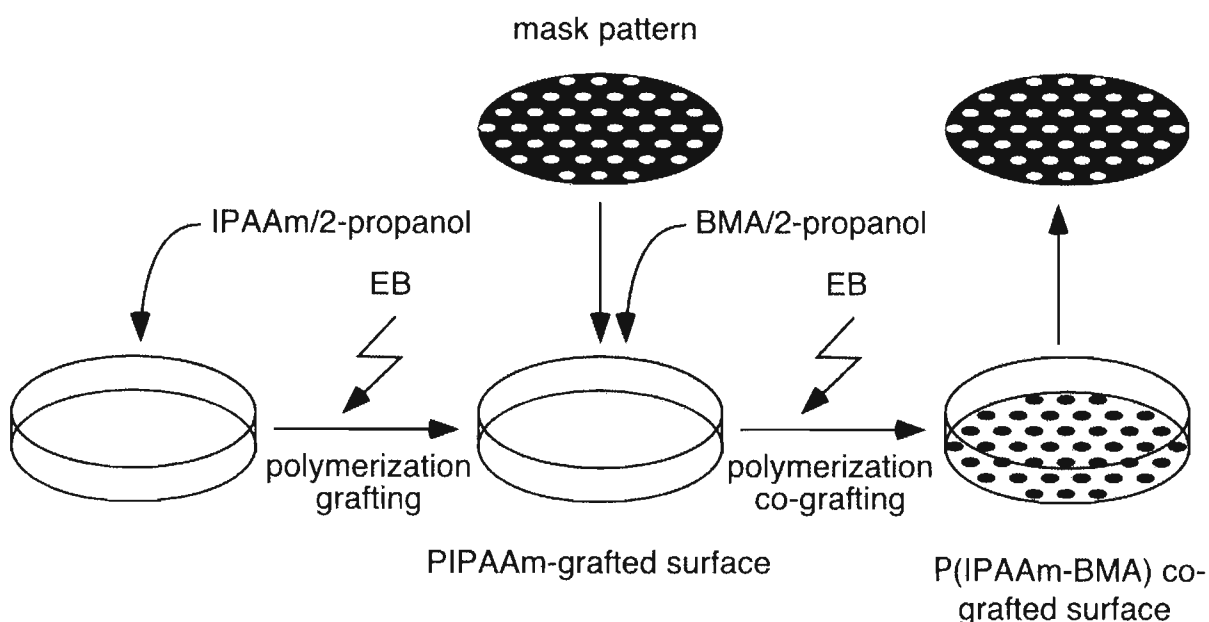


Figure 1.1 Schematic diagram of the preparation of patterned dual-thermoresponsive polymer grafted dishes.

固定化表面へ BMA の 2-propanol 溶液 (2 w/w/%^{a)}) を 30 μ L 展開した。その上に ϕ 1 mm の穴を多くもつ多孔性金属板を置き、EB(0.3MGy, 150kV)を照射することで、PIPAAm 表面に BMA を共グラフトしたドメインと PIPAAm ドメインから構成される海島表面を作製した。EB 照射後、メタノール中で一晚浸漬した。その後、表面のメタノールをよく切り、4°C の精製水中に一晚浸漬し、冷水で十分に噴射洗浄した。最後に一晚 25°C で減圧乾燥を行った。

a) IB5 表面を作製した際の仕込みの BMA 含量とほぼ同量に相当する 2 w/w%にした。

【ATR-FTIR, XPS 測定用サンプルの調製】

ATR-FTIR 測定、および XPS 測定において、 ϕ 1 mm の P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインの解析は測定範囲が小さすぎるためその測定はきわめて難しい。そこで、BMA 展開後にマスクをせずに EB 照射して調製した全面が P(IPAAm-BMA)共グラフト層で覆われている表面を作製した。

4.4.3 実験結果

多孔性金属マスクを用いた EB 重合により、PIPAAm と P(IPAAm-BMA)共グラフトドメイン^{b)} の海島パターンで構成された温度応答性パターン化表面を作製した。調製表面の模式図を Figure 1.2 に示す。

b) 厳密には完全な IPAAm と BMA との共重合ではないため、「共グラフト」という用語を用いることにする。

【調製表面上のパターンフォーメーションの確認】

多孔性金属マスクを用いた EB 重合により、PIPAAm と P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインの海島パターンで構成された温度応答性パターン化表面を作製した。調製表面を冷水にさらして空气中へ引き上げた直後、Figure 1.3 に示すように ϕ 1 mm のパターン形成が肉眼で観察できた。これは各ドメインの水に対するぬれ性の違いにより生じたものと考えられる。

【細胞接着挙動】

次章で詳述するが、本調製表面は、27°C で細胞が P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインのみに選択的に接着性を示し、一方で、37°C で P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインと PIPAAm ドメインの両方に細胞が接着した。これは目標としたパターン化表面の基本構想を充たす結果である。さらに、細胞接着挙動において、ロット間でのばらつきもみられなかった。

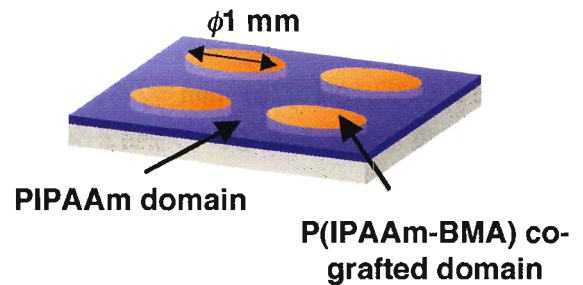


Figure 1.2 Diagram of prepared patterned dual thermoresponsive surfaces.

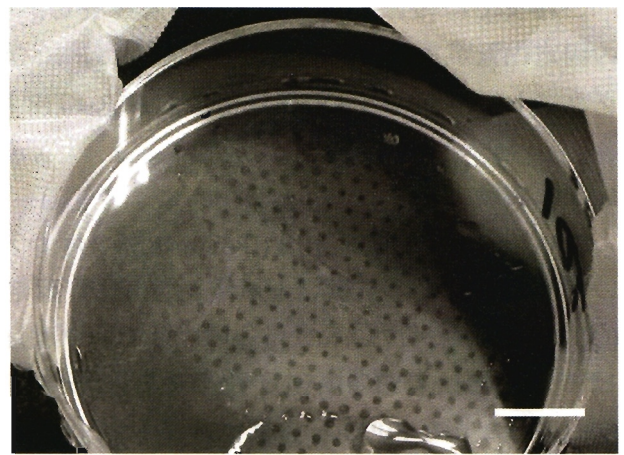


Figure 1.3 Macroscopic view of prepared patterned dual thermoresponsive surface immediately after washed with cold water. Scale bar = 1 cm.

1.4.4 考察

Figure 1.3 で示された $\phi 1$ mm のパターン形成は、各ドメインの水に対するぬれ性の違いによりみられた現象と考えられる。つまり、 $\phi 1$ mm の P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインが疎水性状態をとるため撥水し、一方で、PIPAAm ドメインは親水性状態をとり水になじみやすく、結露して不透明性が上昇したためパターン形状が可視化されたと考察した。

1.5 ATR-FTIR 法によるグラフトポリマー量の定量

1.5.1 実験目的

これまでに報告したように、接着・脱着が生起しうる温度応答性培養皿の調製には PIPAAm の固定化量が重要な因子となる。そこで、BMA を共グラフトする前の PIPAAm 固定化表面と共グラフト後の PIPAAm の固定化量を ATR-FTIR 法により定量することを目的とした。

1.5.2 実験方法

PIPAAm 固定化表面と P(IPAAm-BMA)共グラフト表面のグラフトポリマー量を ATR-FTIR を用いて測定した。本実験においても、BMA 固定化量が少ないため、BMA のエステルカルボニル(COO)由来する 1750cm^{-1} 付近の吸収ピーク強度が弱く、ポリスチレン由来の一置換ベンゼン環のピーク(1600cm^{-1})と PIPAAm 由来アミド I カルボニルのピーク(1650cm^{-1})の強度比($I_{1650/1600}$)から単位面積あたりの PIPAAm と共グラフトポリマーの固定化量を算出した。

1.5.3 実験結果

BMA を共グラフトする前の PIPAAm 固定化表面と共グラフト後の PIPAAm の固定化量を ATR-FTIR 法により定量した。Table 1.1 に定量結果を示す。参考に IB5 表面の PIPAAm 固定化量も併せて記載した。

共グラフト前の PIPAAm 固定化表面の PIPAAm 固定化量 $1.81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、BMA の共グラフト重合後は $1.80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ とほぼ同値を示した。つまり、共グラフトの前後で PIPAAm のグラフト量は変化しなかった。

1.5.4 考察

共グラフトの前後で PIPAAm 固定化量が変化しなかったことから、BMA の共グラフト過程での EB 照射に伴う PIPAAm の顕著な破壊・分解はなかったと考えられる。すなわち、基材表面の物性を変化させない程度の電子線照射量で表面が修飾されていることが明らかとなった。

Table 1.1 Grafted polymer densities on prepared surfaces determined by ATR-FTIR

Surfaces	Amount of grafted PIPAAm ^a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
PIPAAm	1.81 ± 0.05
P(IPAAm-BMA)	1.80 ± 0.04
IB5	2.00 ± 0.02^b

^aData are expressed as the mean of three samples with standard error of mean.

1.6 X線光電子分光分析による P(IPAAm-BMA)共グラフト表面の解析

1.6.1 実験目的

本実験では、P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインにおける AR-XPS 測定を行うことで、深さ方向における TCPS 上に固定化された IPAAm と BMA の組成比を解析した。

1.6.2 実験方法

P(IPAAm-BMA)共グラフト表面における深さ方向の元素組成比を X 線光電子分光分析装置 (ESCALA 250; Thermo Electron Corporation)(X 線: AlK α , 1486.6eV, 300W)を用いて解析した。高速度走査による広エネルギー範囲の走査によって調製表面の元素を同定し、その組成を決定した。その後、低速走査を行い特定元素について解析した。まず、結合エネルギーが 0-1200eV の測定スペクトルを測定サンプルに対して 75 \sim 15 $^\circ$ の take-off アングルで解析した。さらに、炭素原子の 1s 軌道電子(C1s)領域に対する高解像度のスペクトルをピーク分離することにより P(IPAAm-BMA)中の深さ方向における BMA の存在比を解析した。

1.6.3 実験結果

【P(IPAAm-BMA)共グラフト表面の元素組成】

まず、ワイドスキャンにより各サンプルの構成元素を測定した。Table 1.2 より、検出された元素は C, N, O の 3 種類のみであった。つまり、これらは IPAAm, BMA, ポリスチレンの構成元素であり、他の元素が検出されなかったことから、表面調製過程において表面の汚染が起きなかったといえる。

Table 1.2 より、共グラフト表面の深さ方向に対する構成元素 C, N, O 比は、深さが浅くなるにつれ、最表面側ほど N %が増加した。つまり、最表面側ほど IPAAm の割合が増加した。

Table 1.2: Angle dependent compositional changes of IPAAm and BMA onP (IPAAm-BMA) co-grafted thermoresponsive surfaces by angle resolved XPS analyses.

angles (deg)	relative depth (-)	C (%)	O (%)	N (%)	CONH ¹⁾	COO ¹⁾	BMA/IPAAm	π - π^* shake up
90	1	82.1	11.1	6.3	n.d.	n.d.	-	n.d.
75	0.97	82.2	10.7	7	0.12	0.04	-	0.02
60	0.87	82.2	11.2	6.6	0.13	0.02	-	0.02
45	0.71	80.2	12.6	7.3	0.12	0.02	-	0.02

30	0.5	78.7	12.4	8.9	0.17	0.09	0.53	n.d. ²⁾
25	0.42	79.3	12.5	8.2	0.18	0.03	0.17	n.d.
20	0.34	78.6	12.2	9.2	0.18	0.06	0.33	n.d.
15	0.26	78.4	12.2	9.4	0.19	0.04	0.21	n.d.
Calculated atomic composition of the surface co-grafted polymers		75.2	12.7	12.1				-

1) Determined by peak deconvolution of C 1s.

2) n.d.: not detected.

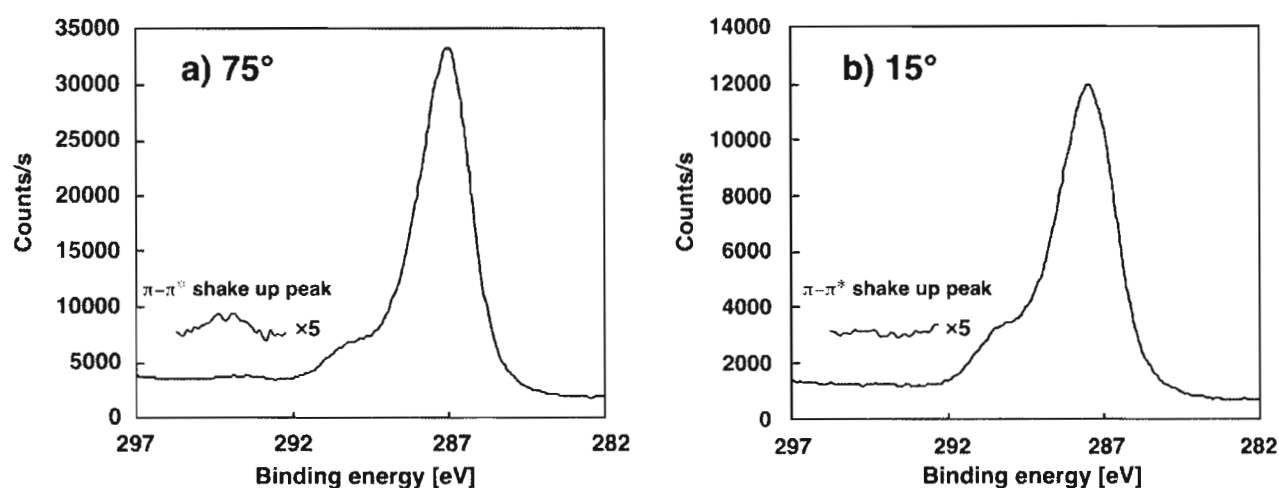


Figure 1.4 XPS spectra at a) 75° and b) 15° by high resolution acquisitions of C1s.

【P(IPAAm-BMA)共グラフト層と PSt 層の境界】

Figure 1.4a 中で結合エネルギー292~296eVにみられる π - π^* shake up peakはポリスチレンのベンゼン環に由来する。このスペクトルを元に P(IPAAm-BMA)共グラフト層と下地の TCPS 層の境界領域を推定できる。実際に、 π - π^* shake up peak が 45~75°の測定範囲で検出された (Table 1.2, Figure 1.4a)。この範囲では、基材のポリスチレン層と表面にグラフトしたポリマー層とが共存していると考えられる。一方で、15~30°範囲では π - π^* shake up peak は検出されなかった (Table 1.3, Figure 1.4b)ことから、15~30°の測定範囲で得られた結果が、P(IPAAm-BMA)共グラフト層のみに由来すると判断できる。

【P(IPAAm-BMA)共グラフト層における IPAAm/BMA 組成比】

P(IPAAm-BMA)中の IPAAm と BMA の存在比を見積もるために、得られた深さ方向における 282 ~ 287eV 範囲のスペクトルにおいて、C1s に対するピーク分離を行った。

IPAAm ユニット由来のアミドカルボニル(CONH)と BMA 側鎖由来のエステルカルボニル(COO)は、C 元素 1s 軌道電子が異なる結合エネルギーをもつ。よって C1s に対するピーク分離を行うことで、IPAAm と BMA の組成比を算出した。Table 1.2 に示したように、下地のポリスチレン側へいくほど BMA の含量が高くなり、最表面側ほど IPAAm が増加する傾向を示した。

1.6.4 考察

共重合体表面は深さ方向における C, N, O 比が一定であるのに対し、共グラフト表面は最表面側ほど IPAAm の割合が増加する傾向を得た。つまり、共重合体表面は IPAAm と BMA が均一に分布しているのに対し、共グラフト表面では、最表面側は IPAAm の連続層が覆うような状態にあると考えられる。共重合体表面では、溶液中で IPAAm と BMA が均一に混ざり合っているため、均一に重合・固定されたが、共グラフト表面は共グラフト後、冷水で洗浄するため、疎水性である BMA は TCPS 側へ凝集し、冷水中で水和している IPAAm 連鎖はグラフト層の上層に濃縮される。最終的に、この状態で乾燥されるため、BMA が TCPS 側に、IPAAm が最表面側に濃縮された構造を有する結果に至ったと考えられる。

大部分の PIPAAm 連鎖は最表面で温度応答性を示し、一方で、疎水性の BMA ユニットは共固定により PIPAAm 連鎖の自由度を制限し PIPAAm 鎖の疎水性を高めるため、共グラフト層の温度応答性を制御していると考えられた。

1.7 小括

(i) BMA モノマー溶液を PIPAAm 固定化表面上に展開し、多孔性マスクを介して EB 照射して温度応答性パターン化表面を調製した。

(ii) ATR-FTIR 測定結果より調製した P(IPAAm-BMA)共グラフト表面では、PIPAAm 含量に変化がなかったことから、BMA を共グラフトする際に照射した EB による PIPAAm 層への障害は起こらなかった。

(iii) AR-XPS 測定結果より、P(IPAAm-BMA)共グラフト表面は TCPS 側に BMA が多く分布し、最表面側に PIPAAm が濃縮された構造をとっていることが示された。

以上より、PIPAAm と BMA との共グラフト体がパターン状に固定されたパターン化表面を調製し、共グラフトドメインにおける表面構造を明らかにした。

第 2 章

温度応答性パターン化表面によるパターン化共培養細胞シートの回収

- 2.1 目的
- 2.2 実験材料
- 2.3 温度応答性パターン化表面上での細胞接着の温度依存性
- 2.4 肝実質細胞の P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインへの選択的接着
- 2.5 共培養系における培地の検討
- 2.6 パターン化共培養と共培養細胞シートの回収
- 2.7 フィブロネクチンコーティングによる選択的接着性の向上
- 2.8 様々な細胞種の組み合わせによるパターン化共培養
- 2.9 小括

2.1 目的

我々^{45, 46)}は PIPAAm を TCPS 上にパターン状に固定化した培養皿上を用いて、32°C と 20°C の温度変化に対する PIPAAm ドメインの親水性/疎水性制御により二種類の細胞のパターン化共培養を実現した。このパターン化共培養は、32°C を境に可逆的に親水性/疎水性状態へと変化する PIPAAm ドメインと常時疎水性状態を示す TCPS ドメインの表面状態変化を利用し、細胞を播種する順番を分けることにより達成された。ここでは、第 1 章で調製した PIPAAm, と P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインとから構成される温度応答性パターン化表面上で、二種類の細胞のパターン化共培養と共培養細胞層のシート状での剥離回収を目的とした。

2.2 実験材料

2.2.1 試薬

- (1)ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)高グルコース濃度(4,500 mg/mL); Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- (2)ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水溶液(PBS); Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- (3)ウシ胎児血清(FBS); Morgate Exports Pty. Ltd. (Australia)
- (4)ペニシリン-ストレプトマイシン溶液(ペニシリン:5,000U/mL, ストレプトマイシン:5,000 μ g/mL); Gibco Laboratories (U.S.A.)
- (5)トリプシン EDTA 溶液(0.5%トリプシン, 5.3mMEDTA/4Na) (10X); Gibco Laboratories (U.S.A.)
- (6)組織固定用パラホルムアルデヒド; Wako Pure Chemical Industries
- (7) TritonX-100; Wako Pure Chemical Industries
- (8) ウシ胎児血清アルブミン; Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- (9)ウサギ抗ラットアルブミン血清(5 mg/mL); Valeant Pharmaceuticals, Inc.
- (10)ヤギ FITC 標識化抗ウサギイムノグロブリン(IgG, IgM, IgA)抗体(43.5 mg/ml); Valeant

Pharmaceuticals, Inc. (U.S.A.)

(11) ローダミンファロイジン(200 U/mL); Molecular Probes, Inc. (U.S.A)

(12)Hoechst33258, pentahydrate (bis-benzimide)(1 mg/mL); Molecular Probes, Inc. (U.S.A.)

(13)Stabilized bovine fibronectin; Biomedical Technologies Inc. (U.S.A.)

(14)インスリン; Wako Pure Chemical Industries

(15)コレラトキシン; Gibco BRL (U.S.A.)

(16)硫酸ゲンタマイシン(×100); Wako Pure Chemical Industries

2.2.2 細胞

(1) ウシ冠動脈由来内皮細胞 (HH JCRB0099, lot no. 121495); (財)ヒューマンサイエンス研究資源バンク

※ 一週間に一度 1/4 の割合で継代し、細胞培養実験には継代数 15~25 のものを使用した。培地については DMEM に対して 10%FBS を含むものを調製し、使用した。

(2) 初代ラット肝実質細胞(HC)

初代ラット肝細胞(HC)は 5 週令・オスの Wistar ラットから、コラゲナーゼ灌流法による Seglen 法⁶¹⁾を改変した手法で単離した。単離した HC の生存性についてトリパンブルー染色試験により、このうち 95%が常に生存していることを確かめた。培地については、Tateno, Yoshizato⁶²⁾らが開発した初代肝実質細胞用培養液を調製し使用した。培地組成を以下に示す。括弧内の数値は DMEM 中の各成分の濃度である。

【HC 用培地の各成分組成】

DMEM, FBS(10%), ペニシリン(100 U/mL), ストレプトマイシン(100 mg/mL), EGF(10 ng/mL), ニコチンアミド(10 mmol/L), L-アスコルビン酸 2 リン酸(0.2 mmol/L), ジメチルスルホキシド(1%)

(3) ヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cell; HUVEC)

【HUVEC 用培地の各成分】

EBM-2, FBS(5%), hFGF-B, VEGF, R3IGF-1, アスコルビン酸, ヘパリン, hEGF, ハイドロコルチゾン, ゲンタマイシン/アンフォテリシン-B(GA-1000)

(4) 初代培養ウサギ角膜上皮細胞

初代培養ウサギ角膜上皮細胞(cornea epithelium cells; CEPC)をウサギの角膜から酵素処理により単離した。

【CEPC 用培地の各成分組成】

DMEM230 mL と Ham's F12 培地 230 mL を混合したものに以下の添加因子を加えた。FBS(5%), ペニシリン(100 U/mL), ストレプトマイシン(100 mg/mL), インスリン(5 µg/mL), コレラトキシン(0.1 µg/mL), 硫酸ゲンタマイシン(40 µg/mL), ジメチルスルホキシド(0.5%), EGF(10 ng/mL)

2.2.3 使用機器

- (1) 位相差顕微鏡(Eclipse TE300, Nikon)
- (2) デジタルカメラ(Fine Pix S1Pro, Fujifilm)

2.3 温度応答性パターン化表面上での細胞接着の温度依存性

2.3.1 実験目的

調製した温度応答性パターン化培養皿上にウシ冠動脈由来内皮細胞(EC)を播種し、種々培養温度を変えたときの EC の各ドメインへの接着挙動を解析することでパターン化表面の共培養システムへの応用の可能性を検討することを目的とした。

2.3.2 実験方法

EC を調製したパターン化表面上へ 2.0×10^5 cells/cm² の密度で播種し、37°C あるいは 27°C で培養した。培養 3 日後の EC の接着挙動を位相差顕微鏡で観察した。

2.3.3 実験結果

【27°C と 37°C での細胞の接着挙動】

異なる培養温度での細胞の接着挙動に関する実験結果を Figure 2.1 に示す。Figure 2.1a はパターン化表面調製時に使用した金属製マスクの位相差顕微鏡像である。培養温度 37°C では、Figure 2.1b に示すように EC は PIPAAm と P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインとを区別することなく培養皿全面に接着した。一方で、27°C では、Figure 2.1c に示すように EC は $\phi 1$ mm の P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインのみに接着し、PIPAAm ドメインへは接着しなかった。さらに 27°C のまま 1 週間培養を続けても、EC は $\phi 1$ mm のドメインを越えて増殖しなかった。

【培養温度変化による細胞の接着領域制御】

27°C で 3 日間培養することにより P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインへ選択的に接着した培養皿(Figure 2.1c)を 37°C のインキュベーターへ移動したところ、1 日後、EC は P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインを越えて増殖を開始し(Figure 2.1d)、3 日後には最終的に培養皿表面全体を覆いコンフルエントに達した(Figure 2.1e)。さらに、温度を 37°C から 20°C に下げると内皮細胞層はシート状で剥離し、一枚の細胞シートとして回収することができた(Figure 2.1f)。

2.3.4 考察

37°C では、PIPAAm ドメイン、共グラフトドメインともに比較的疎水性状態にあり細胞が培養皿全体に接着性を示した(Figure 2.1b)。一方、27°C では、PIPAAm は水和し親水性状態をとったのに対し、共グラフトドメインは BMA ユニットが PIPAAm 鎖の運動性を抑制し、PIPAAm 鎖の疎水性を高めるため、共グラフト層は全体として疎水性を維持し、結果として細胞は共グラフト層のみに接着性を示したと考えられる。

また、細胞が共グラフトドメインのみに選択的に接着しているこの培養皿を 37°C のインキュベーターへ移すと、親水性であった PIPAAm ドメインが比較的疎水性の表面状態に移行し、接

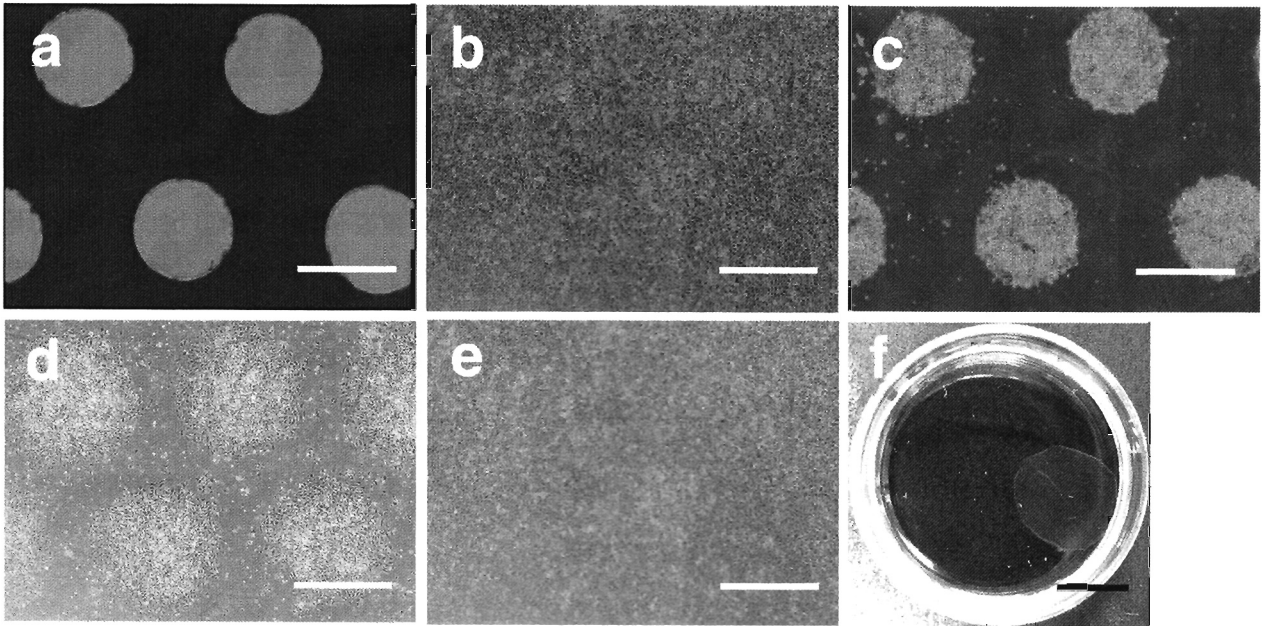


Figure 2.1 Temperature regulated adhesion of ECs on patterned dual thermoresponsive surfaces: a. Patterned metal mask with $\phi 1$ mm holes. ECs morphologies cultured on pattern-grafted dishes for 3 days b. at 37°C and c. at 27°C . d. Grown ECs on P(IPAAm-BMA) co-grafted domains 1 day after transfer to 37°C . e. Complete surface coverage of the ECs after 3 days at 37°C . f. Reducing culture temperature led cell monolayer detachment spontaneously from the hydrated surfaces. Scale bars: a-e. 1 mm, and f. 1 cm.

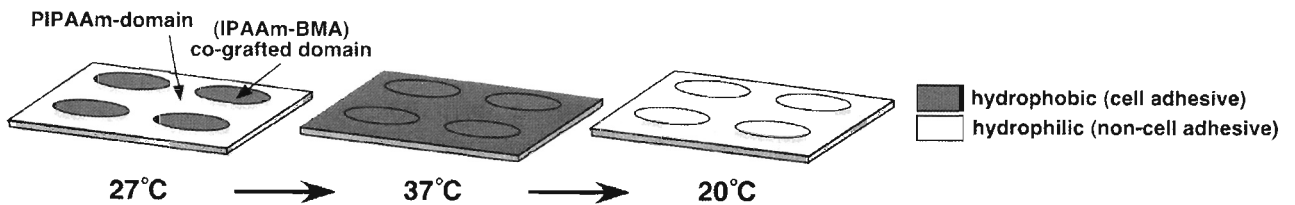


Figure 2.2 Temperature-regulated surface property alteration for the patterned thermo-responsive surfaces.

着細胞が $\phi 1$ mm の共グラフトドメイン領域を越えて、PIPAAm ドメインへ増殖を開始したと考えられる。さらに、この表面は 20°C の低温処理により PIPAAm、共グラフトドメインともに親水性に変化し、コンフルエントに培養した細胞層のシート状での剥離を促した。XPS 解析結果によると、このとき共グラフトドメインは IPAAm の連続層が、接着している培養細胞層側の近傍に集中しているため、BMA ユニットの存在にも関わらず 20°C で伸長した PIPAAm 鎖の影響により接着細胞の脱着が促されたと考察した。

以上の実験結果をまとめると、本温度応答性パターン化表面の各表面状態の温度依存性は Figure 2.2 のように表される。 27°C では共グラフトドメインのみが疎水性（細胞接着性）状態をとり、さらに高温の 37°C では全面が疎水性、そして低温の 20°C では全面が親水性（細胞非接着性）状態をとる。この温度に依存した表面状態の変化を利用すれば、共培養細胞シート回収システムを実現しうることが示唆された。

2.4 肝実質細胞の P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインへの選択的接着

2.4.1 実験目的

プライマリ肝実質細胞(HC)は、増殖性に乏しく、コンフルエント濃度で播種した場合、4日後の細胞数は1日培養して接着した細胞数の約5割に低下し、その機能も低下するといわれている⁶³⁾。実際に、肝細胞を市販の培養皿上で37°Cで培養すると、播種直後は、細胞は丸い形態で培養皿表面に接着し、約培養3日間は細胞間に隙間があり、細胞間が密になったコンフルエント状態を得ることはできず、およそ培養4~5日間後程でコンフルエント状態を得ることができる。そこで本実験では、肝細胞を播種後、およそ培養4日間でP(IPAAm-BMA)共グラフトドメインへ細胞を「均一」かつ「密」に接着させるための培養条件を検討することを目的とした。

2.4.2 実験方法

本実験で試みた実験方法と種々培養条件を以下に示す。

【肝細胞の共グラフトドメインへの選択的接着を可能とする培養皿の前処理条件の検討】

10%FBS含有DMEM 2 mLをパターン化培養皿に加え27°Cで2 hあるいは27°Cで一晩静置したものと、コントロールとして前処理なしのものを用意した。そこへ第2.2.2項で詳述した方法で単離したラットプライマリ肝実質細胞(HC)を 1.0×10^5 cells/cm²の密度で播種し、27°CでHC用培地中で培養した。6時間後HCの培養表面に対する接着挙動を位相差顕微鏡で観察した。

【HCを播種後の培養温度の検討】

培養温度27°C、一晩10%FBS含有DMEMで前処理したパターン化培養皿上にHCを 1.0×10^5 cells/cm²の密度で播種し、27°Cで6時間培養し、HCをP(IPAAm-BMA)共グラフトドメインのみに接着させた。培地交換後、以下の3種類の温度条件で4日間培養を行い、位相差顕微鏡でHCの接着・増殖挙動を観察した。培地交換は毎日行った。

【条件A】: 37°Cで4日間培養

【条件B】: 27°Cで2日間培養後、さらに37°Cで2日間培養

【条件C】: 27°Cで4日間培養

2.4.3 実験結果

【培養皿の前処理条件の検討結果】

種々の前処理後に播種したHCの6時間後の接着挙動をFigure 2.3に示す。10%FBS含有DMEMによる前処理を27°Cで一晩行った表面では、細胞は共グラフトドメインのみへ選択的に接着した。一方、10%FBS含有DMEMによる27°Cでの前処理が2時間の表面(Figure 2.3b)と前処理を行わなかった表面(Figure 2.3c)へは、細胞はいずれのドメインに対しても接着しなかった。

【播種後の培養温度の検討結果】

10%FBS含有DMEMを用いて27°Cで一晩前処理を行ったパターン化表面へHCを播種し、27°Cで6時間培養することでHCをP(IPAAm-BMA)共グラフトドメインへ選択的に接着させた。この時点で、細胞はまだ丸い形態を示しており、細胞と細胞の間には隙間がみられた(Figure 2.4 上段)。

その後、各温度条件で HC を培養し続けたときの HC の接着挙動を Figure 2.4 に示した。

【条件 A】: 培養温度を上げ 37°C で 2 日間培養すると、HC の伸展は促進され細胞間は密になった。しかし、培地交換で除去しきれなかった未接着の細胞*が疎水性化した PIPAAm ドメインへ接着した。さらに、2 日間 37°C で培養を続けると、HC が $\phi 1$ mm の共グラフトドメインを越えて増殖し、均一なパターン化培養を得ることができなかった。

*HC は EC のように培養初期段階では接着強度が強くないため、培地交換は丁寧に行う必要があった。また、何度も培地交換をすると接着した細胞は剥離してしまうため、培地交換は 1 回とし、これが培地中に非接着の細胞が残る原因となった。

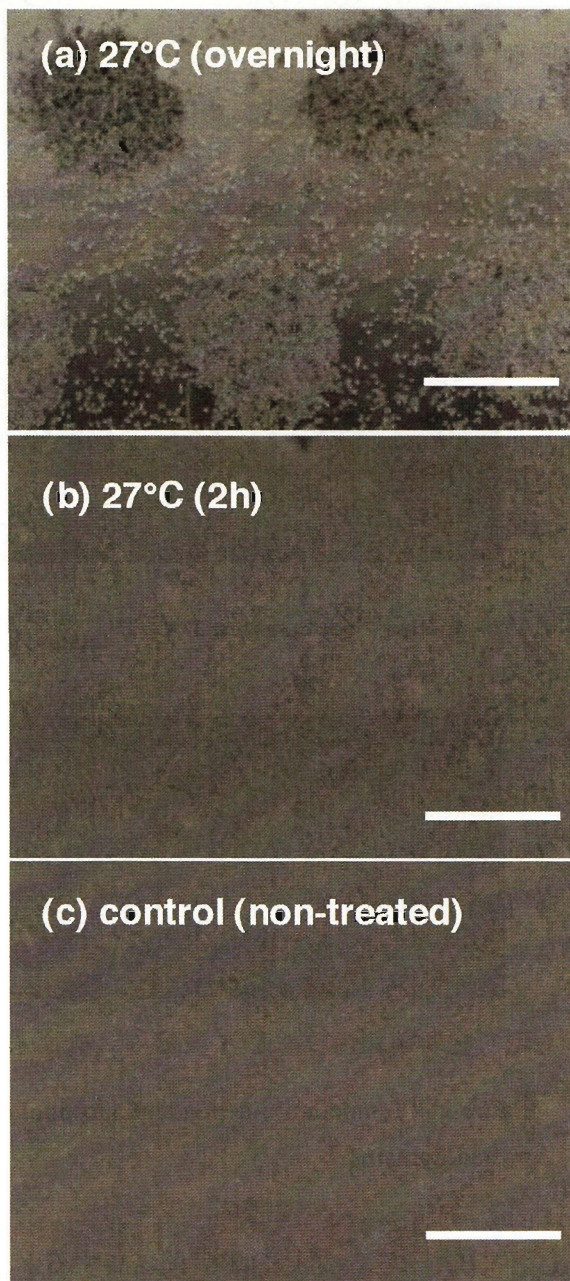


Figure 2.3 Seeded HC morphologies onto patterned dual thermoresponsive surfaces after 6h-cultivation at 27°C. Patterned dual thermo-responsive surfaces were pre-incubated in DMEM including 10% FBS (a) at 27°C overnight, (b) at 27°C for 2h and (c) not treated before HC seeding. Bars: 1 mm.

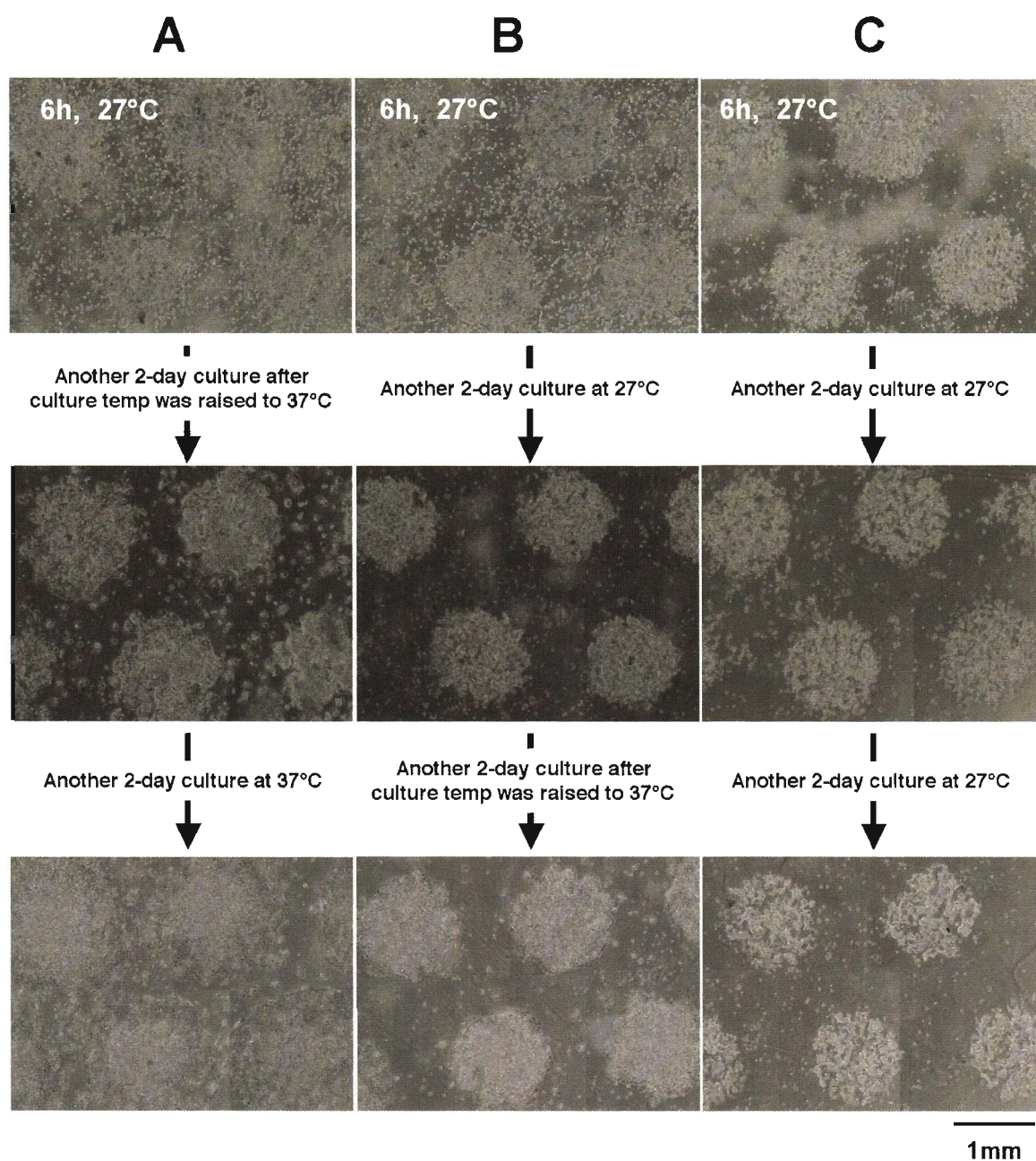


Figure 2.4 Temperature-dependent morphologies of selectively cultured HCs to P(IPAAm-BMA) co-grafted domains.

【条件 B】: 27°C のまま 2 日間培養すると, HC の伸展は遅れるが PIPAAm は親水性状態にあるので, 細胞は PIPAAm ドメイン内へは進入しなかった. その後, 培養温度を 37°C に上げて 2 日間培養すると, HC の伸展が促され細胞間の隙間がなくなり, かつ $\phi 1$ mm の範囲を越えて増殖することはなかった.

【条件 C】: 初めの 2 日間の HC の接着挙動は条件 B と同様であるが, 残りの 2 日間も 27°C のままにしておくと, HC は $\phi 1$ mm の共グラフトドメインを越えて広がることはないが, HC は伸展せず, 結果として細胞間の隙間が埋まらなかった.

2.4.4 考察

【培養皿の前処理条件の検討】

FBS 中には、細胞接着および伸展に関与するフィブロネクチン(fibronectin)が同定されており⁶⁴⁾、細胞接着に関与するドメインは Arg-Gly-Asp-Ser のアミノ酸配列が必須構造であることが明らかにされている⁶⁵⁾。FBS 含有培地で 27°C で前処理を行うことにより、FBS 中のフィブロネクチンが、27°C で疎水性である P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインのみへ吸着し、その結果、播種した細胞が選択的にこのドメインのみへ接着したと考えられる。しかし、前処理時間が短い 2 時間の場合は、未処理の表面と同様に細胞が接着性を示さなかったため、この条件では、P(IPAAm-BMA)共グラフトドメイン上へ HC の接着を促す十分なタンパク吸着が得られなかったと考えられる。尚、同様に 37°C で 2 時間前処理を行った場合は、細胞は全面へ接着し、共グラフトドメインへ選択的に接着させることはできなかった。よって、以後、HC を選択的に共グラフトドメインへ接着させるには、パターン化表面を 10%FBS 含有 DMEM により 27°C で一晩前処理を行うことにした。

【播種後の培養温度の検討】

一般に、通常の 1×10^5 cells/cm² の細胞播種密度で、37°C で培養した場合、静止期の G₀ 期にある HC が *in vitro* で増殖期の G₁ 期に移行するのに要する時間は 40 時間以上であることが Tomita ら⁶⁶⁾の研究によりわかっている。本実験では条件 A と B の結果より、HC を伸展させるためには、少なくとも 37°C で 2 日間以上培養する必要性があるという Tomita らの研究結果を支持する結果を得た。

一方で、HC の増殖は、厳密な細胞密度依存性の調節を受けていることが Nakamura ら⁶⁷⁾によって報告されており、HC の G₀→G₁ ステップに要する時間は通常の 1/2 の細胞密度では 20 時間、1/4 の細胞密度では 5 時間であるとされている。また、播種密度を通常の 1×10^5 cells/cm² より高くすると、細胞の接着率が低下したり、細胞が凝集して伸展せず、球状のまま死滅する細胞が多くなる⁶³⁾。本実験では、培養面積 9.6 cm² の TCPS 表面に対して 1×10^5 cells/cm² の細胞密度で播種を行った。これに対し、実際に HC が接着する共グラフトドメインの総面積は 1/4 の 2.4 cm² であるため、過剰量の細胞を播種したことになる。そこで、播種する細胞密度を 1/4 に低下させることで、細胞の接着率の向上を図れる可能性がある。なお、本研究では、細胞播種密度に関する検討は行わなかった。

2.5 共培養系における培地の検討

2.5.1 実験目的

【肝臓のはたらきと構造】

肝臓は血管と体内における中間代謝の中心をなし、主に

- (i) 糖や脂質などの合成・貯蔵栄養素の処理
- (ii) 解毒機能
- (iii) 代謝機能
- (iv) 血清たんぱく（アルブミン）の合成

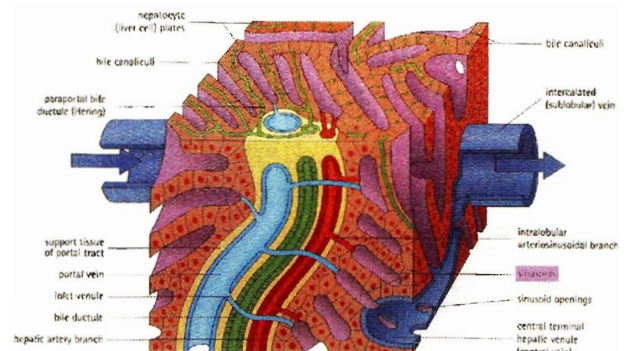


Figure 2.5 The structure of the liver.

(v) 血液凝固作用・血液量の調節

(vi) 生体防御作用

などの生体が生命を維持していくための重要な機能を数多く兼ね備える。

肝臓は Figure 2.5 に示すように、最小構造単位である肝小葉が多数集合した構造をとっており、肝小葉中には類洞とよばれる毛細血管が多数入り組んだ構造をとっている。また、Figure 2.6 に示すよう、類洞は、肝実質細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞から構成され、血液と肝実質細胞との物質交換など肝臓にとって重要な役割を果たしている。

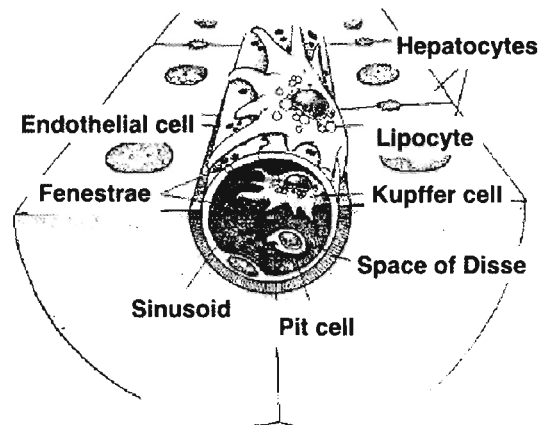


Figure 2.6 Schematized diagram of the liver sinusoid⁴⁴⁾.

【共培養実験における細胞の選択】

二種類の細胞による共培養系を構築するにあたり、ラット初代肝実質細胞(HC)とウシ冠動脈由来内皮細胞(EC)の細胞種を選択した。これらの細胞を選択した理由は、様々な機能を持ち合わせる

HC を非実質細胞と共培養することにより、肝小葉組織構造の構築と、HC の細胞機能性変化の評価を行うためである。しかし、非実質細胞であるラットの血管内皮細胞を単離する方法は確立されておらず、代わりにウシの血管内皮細胞(EC)を用いることにした。

【共培養実験における培地の選択】

細胞の培養には各々の細胞の性質にあった培地が開発されている。一般的にウシ血管内皮細胞は増殖性の高い細胞であり、血清成分のみが入った一般的な培地で培養可能であるのに対し、成熟ラット初代肝実質細胞はほとんど増殖性を示さず、Tateno, Yoshizato ら⁶²⁾が開発した数種類の増殖因子を添加した培地を用いることで培養期間の延長が可能であることが示されている。そこで本実験では、この二種類の細胞のパターン化共培養を行うにあたり、HC と EC のランダム共培養系で両方の細胞が長期に生存できる培地条件を検討することを目的とした。

5.5.2 実験方法

血管内皮細胞(EC)用培地とラット初代肝実質細胞(HC)用培地の調製方法については第 2.2.2 項に示した。検討するべき培地条件は以下に示す3種類とした。

(i) HC 用培地と EC 用培地の 1:1 混合培地

(ii) HC 用培地のみ

(iii) EC 用培地のみ

(i)~(iii)の培地に、HC が 2.5×10^5 cells/mL, EC が 2.5×10^5 cells/mL の細胞懸濁液を調製し、これらを 1:1 の割合で混合した細胞懸濁液を調製した。これらを TCPS 上へ 2 mL ずつ播種するこ

とで 1×10^5 cells/cm² の細胞密度で 37°C のインキュベーター内で培養し、2 日に 1 度培地交換を行った。そして、培養 1, 3, 5, 7, 9 日後の培養細胞を位相差顕微鏡で観察した。検鏡は培養皿のフタに印をつけ、毎回同じ位置の写真を撮影した。

2.5.3 実験結果

Figure 2.7 に HC 用培地, HC 用培地と EC 用培地を 1:1 の割合で混合した培地, EC 用培地で HC と EC を培養したときの培養期間に対する培養細胞の位相差顕微鏡像を示す。図中において、丸い細胞が HC, 細長い細胞が EC である。

培養 1 日後から、EC 用培地系では HC 用培地系と混合培地系に比べ、HC の数が若干少なかった。培養 5 日後ではこの差は明らかで、EC 用培地系では HC はほとんどみられず、培養 7 日間以降では培養皿全体が EC で占められていた。一方で、HC 用培地と混合培地では、培養 5 日間後から HC の割合が減少し始めたが、時間経過に対する HC と EC の存在比は大きく変化せず、培養 9 日後も HC は EC と共存していた。以上より、HC と EC の両方の細胞が長期に共存できる培地は HC 用培地、あるいは混合培地であった。

2.5.4 考察

肝細胞の培養維持には HC 用培地が必須であることが判明した。HC 用培地中には、EGF、ニコチンアミド、L-アスコルビン酸 2 リン酸、ジメチルスルホキシドなどの種々の添加因子が含まれているが、これらの添加因子の濃度が半分になっても EC-HC ランダム共培養系における HC の生存性には 9 日間という培養期間では大きな影響はみられなかった。以上の結果から、本研究では次項で示したパターン化共培養において HC 用培地を用いることにした。

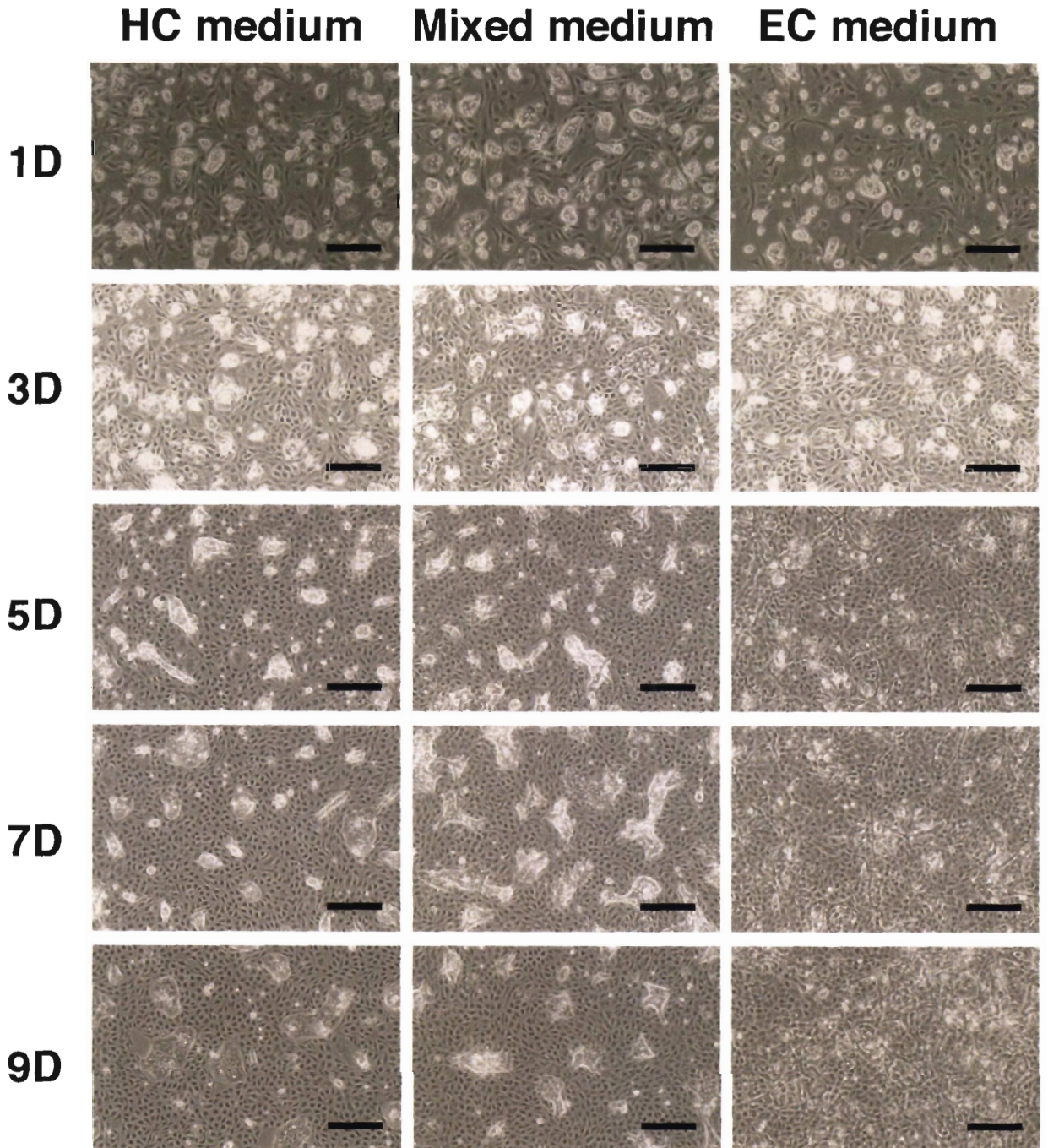


Figure 2.7 Time-dependent morphologies of random co-cultured HCs and ECs in various prepared cell culture medium.

2.6 パターン化共培養と共培養細胞シートの回収

2.6.1 実験目的

本実験では、調製した温度応答性パターン化表面上で、培養温度を 27°C, 37°C, 20°C と変化させることで、HC と EC のパターン化共培養と共培養細胞シートの回収を行うことを目的とした。

2.6.2 実験方法

【細胞播種順序の検討】

EC と HC の播種する順番を変えた手法を試み、各細胞播種順序でのパターン化共培養系構築の可能性を検討した。

(a) EC→HC の順番

第 2.3.2 項で示した方法と同様に EC を調製したパターン化表面上へ 2.0×10^5 cells/cm² の密度で播種し、10%含有 DMEM 中、27°C で 2 日間培養し、EC を P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインへ選択的に接着させた。その後、HC を 1.0×10^5 cells/cm² の密度で播種し、培養温度を上げて 37°C で培養した。HC 播種後は HC 用培地を用いた。

(b) HC→EC の順番

第 2.4.2(1)で示した条件 B の方法と同様に、調製したパターン化培養皿上へ 10%FBS 含有 DMEM を 2 mL 加え、27°C で一晩プレインキュベーションを行った。HC を 1.0×10^5 cells/cm² の密度で播種し、27°C で培養した。5 時間後に接着した細胞が剥がれないように丁寧に培地交換を行い 2 日間 27°C で培養した。37°C でさらに 2 日間培養し、HC が P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインのみに接着した状態を得た。その後、EC を 1.0×10^5 cells/cm² の密度で播種し 37°C で培養を続けた。

【共培養細胞層の蛍光免疫染色】

パターン化温度応答性表面上で共培養した細胞層の蛍光免疫染色方法を以下に示す。

- (1)培養皿に接着した細胞層を 37°C に加温した PBS で洗浄した。
- (2)4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液を 1 mL 加え 25°C で 20 分間静置し、細胞層の固定を行った。その後 PBS で洗浄した。
- (3)0.5%Trioton X-100/PBS を 1 mL 加え 2 分間処理し、その後 PBS で洗浄した。
- (4)0.1%BSA/PBS を 1mL 加え、1 時間処理した。
- (5)抗ラットアルブミンポリクローナル抗体(5 mg/mL)を 1:500 希釈で 4°C で一晩反応させた。
- (6)PBS で洗浄後、FITC 標識化抗ウサギ抗体(40 mg/mL)を 1:1000 希釈で 25°C で 2 時間反応させた。また、このとき、ローダミンファロイジン(200 U/mL)を 1:100 希釈で同時に反応させた。
- (6)ヘキスト 33258(1 mg/mL)を 1:500 希釈で 5 分間 25°C で反応させた後、PBS で洗浄し、共培養細胞層を蛍光顕微鏡で観察した。

2.6.3 実験結果

【細胞播種順序の検討】

(a) EC→HC の順番

Figure 2.8 に EC→HC の細胞播種順序でパターン化共培養を試みた結果を示す。27°C の培養で初めに播種した EC が P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインのみに選択的に接着した培養皿 (Figure 2.8a)に HC を播種し、37°C で培養した。培養 1 日後の位相差顕微鏡による観察結果を Figure 2.8b に、2 日後の結果を Figure 2.8c に、3 日後の結果を Figure 2.8d に示す。播種した HC は 37°C で疎水性化した PIPAAm ドメインだけでなく、すでに接着している EC の上にも接着し安定な 2 次元パターン化共培養を実現することはできなかった。Figure 2.8c, d から、さらに培養を続けると EC が $\phi 1$ mm の領域を越えて PIPAAm ドメインへ増殖し、3 日後には EC がほぼ培養皿全面を覆う結果となった。以上の結果より EC→HC の播種順序では二次元パターン化共培養を実現できなかった。

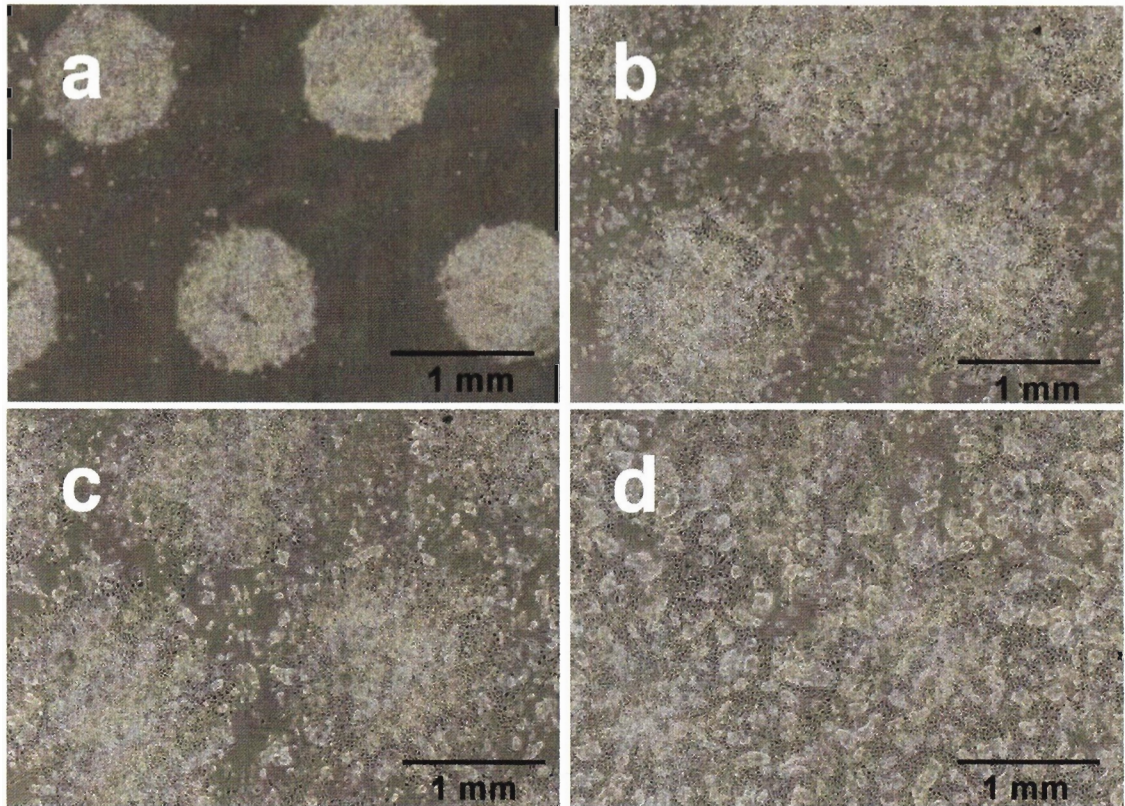


Figure 2.8 Unsuccessful 2-dimensional patterned co-culture of ECs and HCs on patterned dual thermoresponsive surfaces. a. Selective adhesion of ECs onto P(IPAAm-BMA) co-grafted domains cultured at 27°C for 2 days. b. Secondary seeded HCs randomly adhered to both hydrophobized PIPAAm regions and already cultured ECs after 1-day co-culture at 37°C. c. Both HCs and ECs proliferated over the surfaces after 2-day co-culture. d. Both cell types proliferated then ECs almost covered entire surfaces after 3-day co-culture.

(b) HC→EC の順番

HC を播種し 27°C で培養すると、HC は P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインのみへ選択的に接着し、27°C で 2 日間培養後、さらに 37°C で 2 日間培養を行い Figure 2.9a に示すような HC 同士が接着し、隙間のない状態を得た。続いて、2 番目の細胞種である EC を播種し、培養温度を 37°C に上げて培養した。EC は 37°C で疎水性化した PIPAAm ドメインのみへ接着し、すでに共グラフトドメイン上に接着している HC 上へは接着性を示さず Figure 2.9b, c に示すように HC と EC の二次元パターン化共培養が実現できた。

共培養後に培養温度を 37°C から 20°C まで下げて各ドメインを親水性化させると、共培養細胞層は Figure 2.9d, e に示すように HC と EC のパターン形状を保持したままカーテンをめくるように温度応答性パターン化培養皿から剥離し始め、収縮を伴い最終的には培地中へ浮遊し、シート状での回収が可能であった。また、回収した細胞層は他の表面へ移動して培養を続けることが可能であった。

【共培養細胞層の蛍光免疫染色】

Figure 2.10 に HC→EC の播種順序で実現したパターン化共培養細胞層の肝アルブミン(Figure 5.10b)、細胞核(Figure 5.10c)およびアクチンフィラメント(Figure 2.10d)について、FITC 標識化抗ラットアルブミン抗体、Hoechst33258 およびローダミンファロイジンで三重染色した結果を示す。Figure 2.10c, d の核染色、アクチン染色結果より、全面に細胞が接着していることが認められた。これに対し、HC のみが発するアルブミンに関する染色は位相差顕微鏡像と同

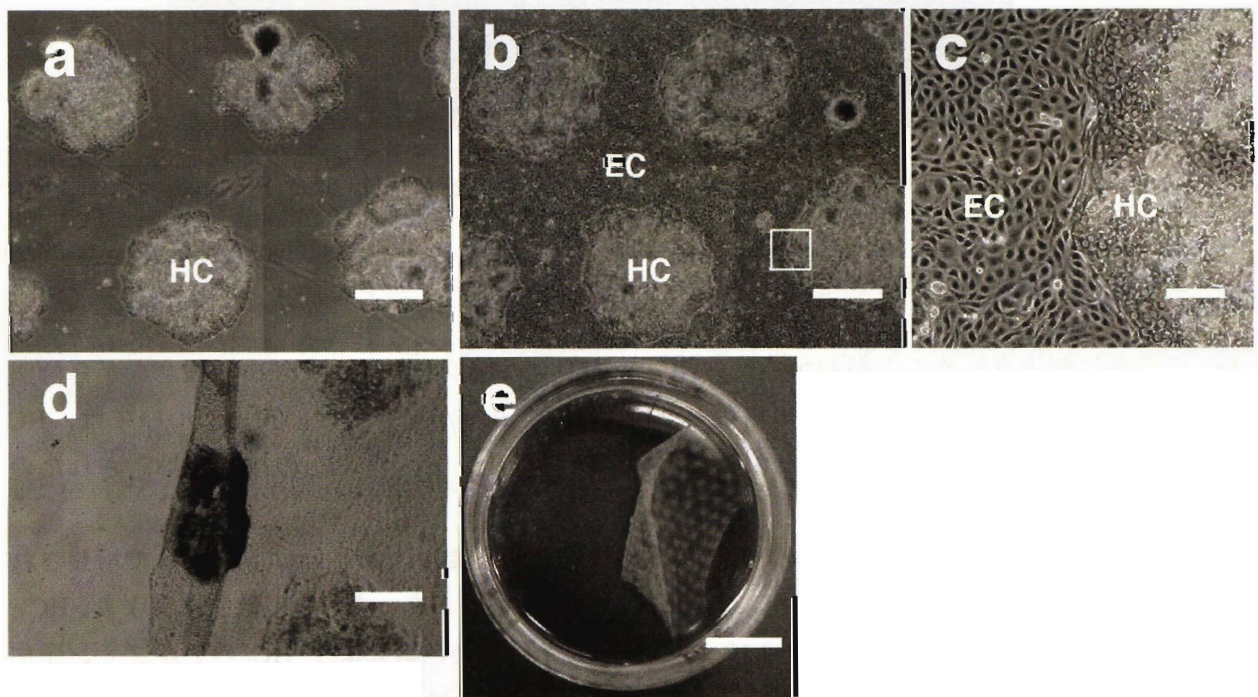


Figure 2.9 Patterned co-culture of HCs and ECs: a. Selective adhesion of rat primary hepatocytes onto P(IPAAm-BMA) co-grafted domains cultured at 27°C for 2 days and at 37°C for additional 2 days. b. Secondary seeded ECs distinctly adhered to hydrophobized PIPAAm regions and co-cultured with HCs at 37°C in an organized pattern. c. Magnified view of periphery of patterned co-culture. (square region in b.) d. Reducing temperature to 20°C induced spontaneous detachment of pattern co-cultured cell monolayer. e. Macroscopic view of detaching co-cultured cell monolayer from patterned dishes. Scale bars: a, b and d: 0.5 mm, c: 0.2 mm, and e: 1 cm.

様の位置にみられた。以上より、HC と EC の棲み分けでき、パターン化共培養の実現が確認できた。

5.6.4 考察

調製した温度応答性パターン化表面上で温度変化により各ドメインの親水性／疎水性を制御し、2種類の細胞のパターン化共培養と共培養細胞シートの回収が可能であった。

EC と HC の二次元パターン化共培養を実現するためには、2種類の細胞を播種する順序が HC

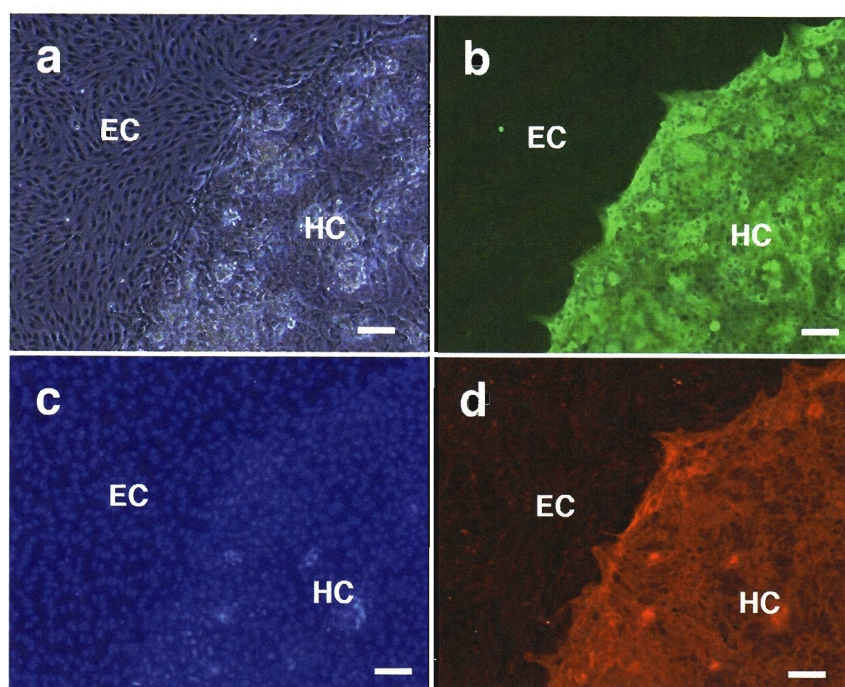


Figure 2.10 Fluorescence microphotographs of co-cultured cells 3-day after EC seeding. a. Phase contrast. b. Albumin positive hepatocytes in green fluorescence with albumin negative ECs. c. Nuclei staining of both cell types with Hoechst 33258 (blue). d. Cytoskeletal actin microfilament of both cell types with rhodamine-phalloidin (red). Scale bars: 100 μm .

→EC の順番に制限されることがわかった。HC が EC 上へ接着傾向を示す理由は残念ながら解明されていないが、一方で、あらかじめ培養した HC 上に EC が接着しない理由については、HC が細胞非接着性であるアルブミンを分泌しているために、HC 上への EC の接着が抑制されたのではないかと類推している。

本共培養システムは 27°C という本来細胞が体内で存在する温度、あるいは *in vitro* で培養される温度(37°C)より 10°C も低い温度で HC を 2 日間培養する必要があった。この低温培養より、HC へのダメージが心配されたが、Figure 2.10 に示した蛍光免疫染色結果より HC のアルブミン産生が観察されたこと、また、第 3.3 節で後述するが、本共培養系は HC のみを単独で培養した場合よりも長期間培養可能であったことから、低温培養による大きなダメージはないと判断した。

2.7 フィブロネクチンコーティングによる選択的接着性の向上

2.7.1 実験目的

第 2.4 節では、27°C での P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインへの HC の接着性を可能とする

ために、パターン化培養皿を 10%FBS 含有 DMEM で 27°C 一晩前処理を行う必要があることを示した。しかし、HC の接着性は弱く、培地交換により接着していた HC が剥離してしまうことがあった。そこで本実験では、細胞接着性タンパク質のフィブロネクチン(FN)でパターン化培養皿を前処理することにより、HC の 27°C での強固な初期接着を実現することを目的とした。

2.7.2 実験方法

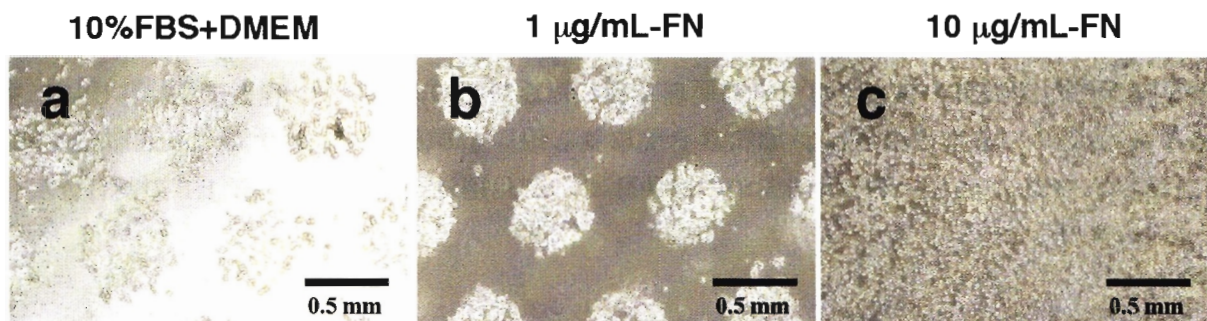


Figure 2.11 Microscopic views of adhered HCs cultured to the dual patterned thermo-responsive surfaces pre-incubated with a. DMEM including 10%FBS, b. fibronectin solution (1 $\mu\text{g/mL}$) and c. a higher concentrated fibronectin solution (10 $\mu\text{g/mL}$) overnight.

市販の FN 溶液(5 mg/mL)を PBS で希釈し、1 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ と濃度の異なる FN 溶液を調製した。調製した FN 溶液を 1 mL ずつパターン化培養皿に加え、27°C で一晩インキュベーションを行った。翌日、培養皿内の FN 溶液を除去後、HC を播種し、通常通り HC 用培養液で 27°C で 5 時間培養後、培地交換を行い、1 日間培養した。

2.7.3 実験結果および考察

培養 1 日後の HC の接着形態を位相差顕微鏡で観察した結果を Figure 2.11 に示す。FN 濃度が高い 10 $\mu\text{g/mL}$ 溶液で前処理を行った場合、細胞は共グラフトドメインと PIPAAm ドメインの区別なく全面に接着した。一方で、低い濃度条件(1 $\mu\text{g/mL}$)では共グラフトドメインに選択的に接着し、かつ、10%FBS 含有 DMEM で前処理を行った場合よりも多くの細胞が接着し、接着強度も強固であり、培地交換を行っても剥離することはなかった。

濃度を制御した FN で前処理を行うことで、共グラフトドメインへの HC の選択的接着強度の向上が可能であった。第 5.4 節で FBS による前処理の検討結果を述べたが、FBS 中の FN 量を調査することは不可能であった。

2.8 様々な細胞種の組み合わせによるパターン化共培養

2.8.1 実験目的

本実験では、ラット初代肝実質細胞(HC)とヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)との組み合わせと、ウサギ角膜上皮細胞とウシ冠動脈由来内皮細胞(EC)との組み合わせでパターン化共培養の可能性を検討することを目的とした。

2.8.2 実験方法

【HC-HUVEC のパターン化共培養】

第 2.6.3 項(b)と同様の方法で HC を温度応答性パターン化表面上へ播種し、27°C で 2 日間、さらに 37°C で 2 日間培養することで、HC を P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインのみに選択的に接着させた。その後、HUVEC を 1.0×10^5 cells/cm² の密度で播種し 37°C で 2 日間培養を行った。共培養中の培地は HC 用培地と HUVEC 用培地を 1:1 の割合で混合したものを使用した。

【CEPC-EC のパターン化共培養】

10%FBS 含有 DMEM で 27°C、一晩前処理を行った温度応答性パターン化表面上に、CEPC を 1.5×10^5 cells/cm² の密度で播種し 27°C で 3 日間培養した。その後、EC を 1.0×10^5 cells/cm² の密度で播種し、37°C で培養した。共培養中の培地は CEPC 用培地と EC 用培地を 1:1 の割合で混合したものを使用した。

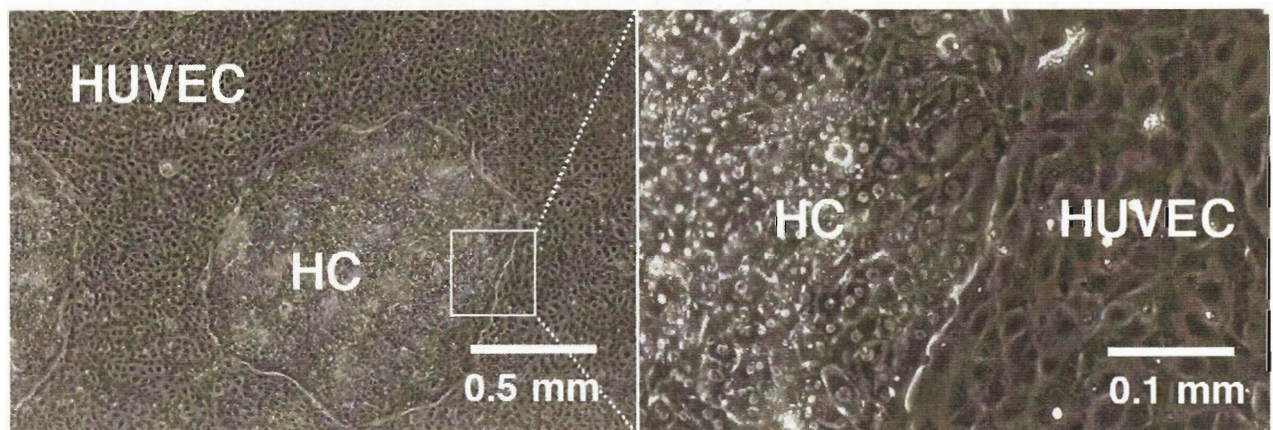


Figure 2.12 Microscopic views of patterned co-culture of HC and HUVEC on patterned dual thermoresponsive surfaces. Right. Magnified view of periphery in patterned co-culture (square region in left photographs.)

2.8.3 実験結果

【HC-HUVEC のパターン化共培養】

HC が P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインのみに接着していた状態に HUVEC を播種して 37°C で培養すると、Figure 2.12 に示すように HUVEC は疎水性化した PIPAAm ドメイン状へ接着し、HC と HUVEC のパターン化共培養を実現できた。

【CEPC-EC のパターン化共培養】

CEPC を 27°C の条件で P(IPAAm-BMA)共グラフトドメイン上のみへ接着させるには、温度応答性パターン化培養皿を 10%FBS 含有 DMEM での前処理を行う必要があった。その後、CEPC を播種し 27°C で 3 日間培養すると CEPC は P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインのみへ接着し、 $\phi 1$ mm のドメイン内で増殖し、 $\phi 1$ mm の範囲を超えることはなかった。培養 3 日間で Figure 2.13a に示すようにドメインの端に位置する CEPC の重層化が確認された。その後 EC を播種すると EC は疎水性化した PIPAAm ドメインのみへ選択的に接着し、CEPC と EC のパターン化共培養が実

現できた(Figure 2.13b). 共培養開始 3 日後, Figure 2.13b に示すように, CEPC ドメインが縮小する傾向がみられたが, 11 日後には CEPC ドメインは拡大した.

5.8.4 考察

様々な種類の細胞種でパターン化共培養ができることが示された.

角膜の最大の特徴は無血管組織ということであるが, 通常の生理的状态では角膜と結膜の境界に位置する輪部が結膜上皮の角膜への侵入を防いでいる. しかし, ステューブン・ジョンソン症候群, 翼状片, 眼涙天疱瘡などの角膜疾患は, 血管を保持する結膜が本来血管のない角膜へ侵入し, 角膜の結膜化により角膜に血管が新生し視機能に障害をきたす. 現状では眼内血管新生の発生機序の解明, 発生予防ないし治療法の確立が求められており, CEPC-EC パターン化共培養系はこれらのメカニズムの解明のための有効な手段のひとつとして利用できる可能性がある.

2.9 小括

- (i) 調製表面の各培養温度での細胞接着性/非接着を検討した結果, 調製表面は, 27°C で P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインが疎水性を示し, PIPAAm ドメインは親水性を示した. また, 37°C では両ドメイン共に疎水性を示し, 20°C では全面が親水性を示した.
- (ii) HC を共グラフトドメインへ選択的に細胞間の隙間がなくなるように密に接着させるには, パターン化表面を 10%FBS 含有 DMEM で 27°C 条件で一晩前処理し, HC を播種後, 27°C で 2 日間, さらに 37°C で 2 日間培養する必要があった.
- (iii) 温度制御により肝細胞を先に P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインへ接着させ, その後 EC を播種することで HC と内皮細胞の二次元パターン化共培養を実現できた. また, 20°C の低温処理を施すことで, 共培養細胞層をシート状で回収可能であった.
- (iv) HC-HUVEC, CEPC-EC の組み合わせによるパターン化共培養を実現できた. これにより, 様々な種類の細胞の組合せによるパターン化共培養シートを作製できることが示唆された.

以上より、本章では培養条件を種々検討し、調製した温度応答性パターン化表面上で、本研究の目的のひとつである、パターン化共培養細胞シートの構築に成功した。

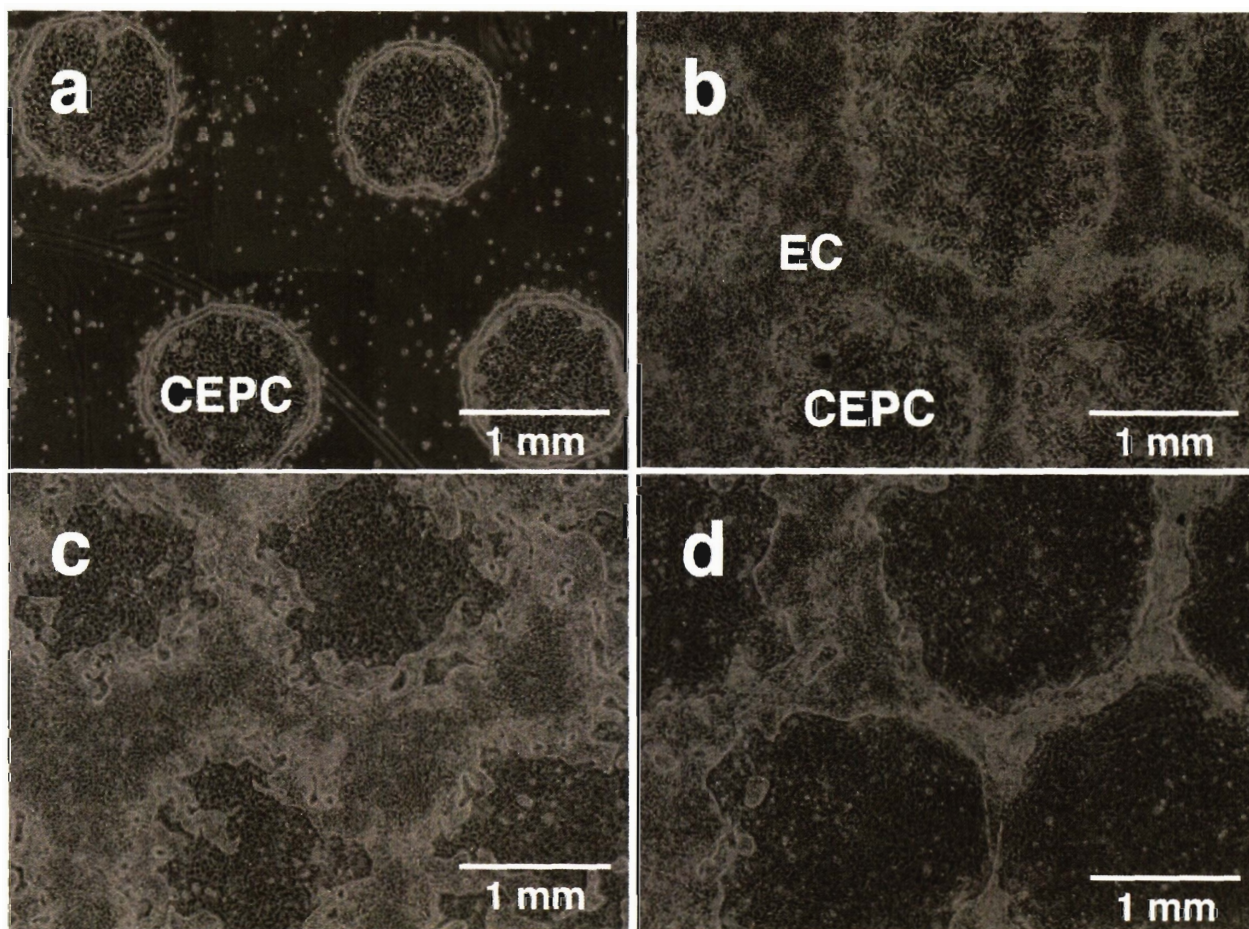


Figure 2.13 Microscopic views of patterned co-culture of CEPCs and ECs on patterned dual thermoresponsive surfaces. a. Selective adhesion of CEPC onto P(IPAAm-BMA) co-grafted domains cultured at 27°C for 3 days. b. Secondary seeded ECs distinctly adhered to hydrophobized PIPAAm regions and co-cultured with CEPCs at 37°C for 1-day co-culture in an organized pattern. c. 3-day co-culture. d. 11-day co-culture.

第3章

高機能性パターン化共培養細胞シートの開発

- 3.1 目的
- 3.2 実験材料
- 3.3 パターン化共培養系における長期培養の検討
- 3.4 共培養系における肝アルブミンの観察
- 3.5 高機能性共培養細胞シートの調製
- 3.6 小括

3.1 目的

HC をラット肝上皮細胞など他の細胞種と共に培養することで、HC のアルブミン合成能、尿素合成能、P450 活性などの細胞機能が向上し、長期培養可能であることが示されている⁶⁸⁾。本章では、パターン化共培養細胞層の HC の機能評価を行うと共に、より細胞機能の向上した共培養細胞シートの構築方法を検討することを目的とした。

3.2 実験材料

3.2.1 試薬

- (1)ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)高グルコース濃度(4,500 mg/mL); Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- (2)ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水溶液(PBS); Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- (3)ウシ胎児血清(FBS); Morgate Exports Pty. Ltd. (Australia)
- (4)ペニシリン-ストレプトマイシン溶液(ペニシリン:5,000 U/mL, ストレプトマイシン:5,000 µg/mL); Gibco Laboratories (U.S.A.)
- (5)トリプシン EDTA 溶液(0.5%トリプシン, 5.3 mM EDTA/4Na) (10X); Gibco Laboratories
- (6)組織固定用パラホルムアルデヒド; Wako Pure Chemical Industries
- (7) TritonX-100; Wako Pure Chemical Industries
- (8) ウシ胎児血清アルブミン; Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- (9)ウサギ抗ラットアルブミン血清(5 mg/mL); Valeant Pharmaceuticals, Inc. (U.S.A.)
- (10)ヤギ FITC 標識化抗ウサギイムノグロブリン(IgG, IgM, IgA)抗体(43.5 mg/ml); Valeant Pharmaceuticals, Inc. (U.S.A.)
- (11) ローダミンファロイジン(200 U/mL); Molecular Probes (U.S.A.)
- (12)Hoechst33258, pentahydrate (bis-benzimide) (1 mg/mL); Molecular Probes, Inc. (U.S.A.)
- (13) RNA 抽出用試薬 ISOGEN; Nippongene Co.
- (14)ラット尿中アルブミン定量用キット; Nephrot II; Exocell, Inc (U.S.A.)
- (15)尿素窒素測定用キット; 尿素窒素 B-テストワコー, Wako Pure Chemical Industries

(16)リアルタイム PCR 測定キット; qPCR™Mastermix Plus for SYBR®Green I QuickGoldStar, Eurogentec (Belgium)

3.2.2 細胞

(1) ウシ冠動脈由来内皮細胞 (HH JCRB0099, lot no. 121495); (財)ヒューマンサイエンス研究資源バンク

※ 一週間に一度 1/4 の割合で継代し, 細胞培養実験には継代数 15~25 のものを使用した. 培地 については DMEM に対して 10%FBS を含むものを調製し, 使用した.

(2)ラットプライマリ肝実質細胞(HC)

ラットプライマリ肝細胞(HC)の単離方法と培地の調製は第 2.2.2 項で詳述した方法で行った.

3.2.3 使用機器

(1)位相差顕微鏡(Eclipse TE300, Nikon)

(2)デジタルカメラ(Fine Pix S1Pro, Fujifilm)

(3) 共焦点レーザー顕微鏡(TCS-PS, Leica)

(4) マイクロプレートリーダー分光光度計 (SPECTRAmax™250, Molecular Devices Co.)

3.3 パターン化共培養系における長期培養の検討

3.3.1 実験目的

本実験では, HC と EC とのパターン化共培養系における HC の長期培養の可能性を検討することを目的とした.

3.3.2 実験方法

【パターン化共培養】

第 2.6.2 項(b)と同様の方法で HC と EC とのパターン化共培養を行った. HC を温度応答性パターン化表面上へ播種し, 27°C で 2 日間, 37°C で 3 日間培養し, HC を共グラフトドメインへ選択的に接着させた後, EC を播種し, HC とのパターン化共培養を行った. 共培養後の HC ドメインを経時的に観察しデジタルカメラで検鏡像を撮影した. 観察後, NIH Image(version 1.61 Macintosh)を用い, 画像上で HC 接着ドメインの面積を計測し, 以下の式を用い, 共培養 2 日後の HC 接着面積に対する各培養期間の HC 接着率を算出した.

$$\text{HC 接着率[\%]}=(A \div B) \times 100$$

ここで, A: HC 接着ドメイン面積(cm²), B: 共培養 2 日後の HC 接着ドメイン面積(cm²)とした.

【蛍光免疫染色】

第 2.6.2 項(2)で詳述した方法と同様の方法で共培養細胞層をパラホルムアルデヒドで固定し,

肝アルブミン、アクチンフィラメント、細胞核の3重染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

3.3.3 実験結果

Figure 3.1に培養日数に対するHC接着ドメインの形態を位相差顕微鏡で観察した結果を示す。また、HCの培養日数に対するHCの接着率をFigure 3.2に示す。培養日数が増加するにつれ、HCのドメインは小さくなり、ECの接着領域が増大した(Figure 3.1)。HCのみをTCPS上に培養した培養皿では、培養7日間で細胞が死滅し接着細胞の表面からの欠落が生じた。一方、パターン化共培養系では、HCの培養期間が11日間(共培養7日間)でHCドメインの中心に位置する細胞が欠落し、HCドメイン内に穴が生じた。この日を境に多くのHCが培養表面から剥離をはじめ、HCの接着率は急激に減少し(Figure 3.2)、最終的に17日間の培養で、ほぼすべてのHCが剥離した。以上より、本共培養系ではECと共培養することで単独培養系と比べおよそ4日間(最高で7日間であった。)長くHCの培養を維持できた。

Figure 3.3にHCが剥離した部分の共培養細胞層の免疫染色像を示す。HCとECとの境界部分に存在するHCは、ECの肝ドメインへの侵入を防ぐかのように細長い形態をとっていた。

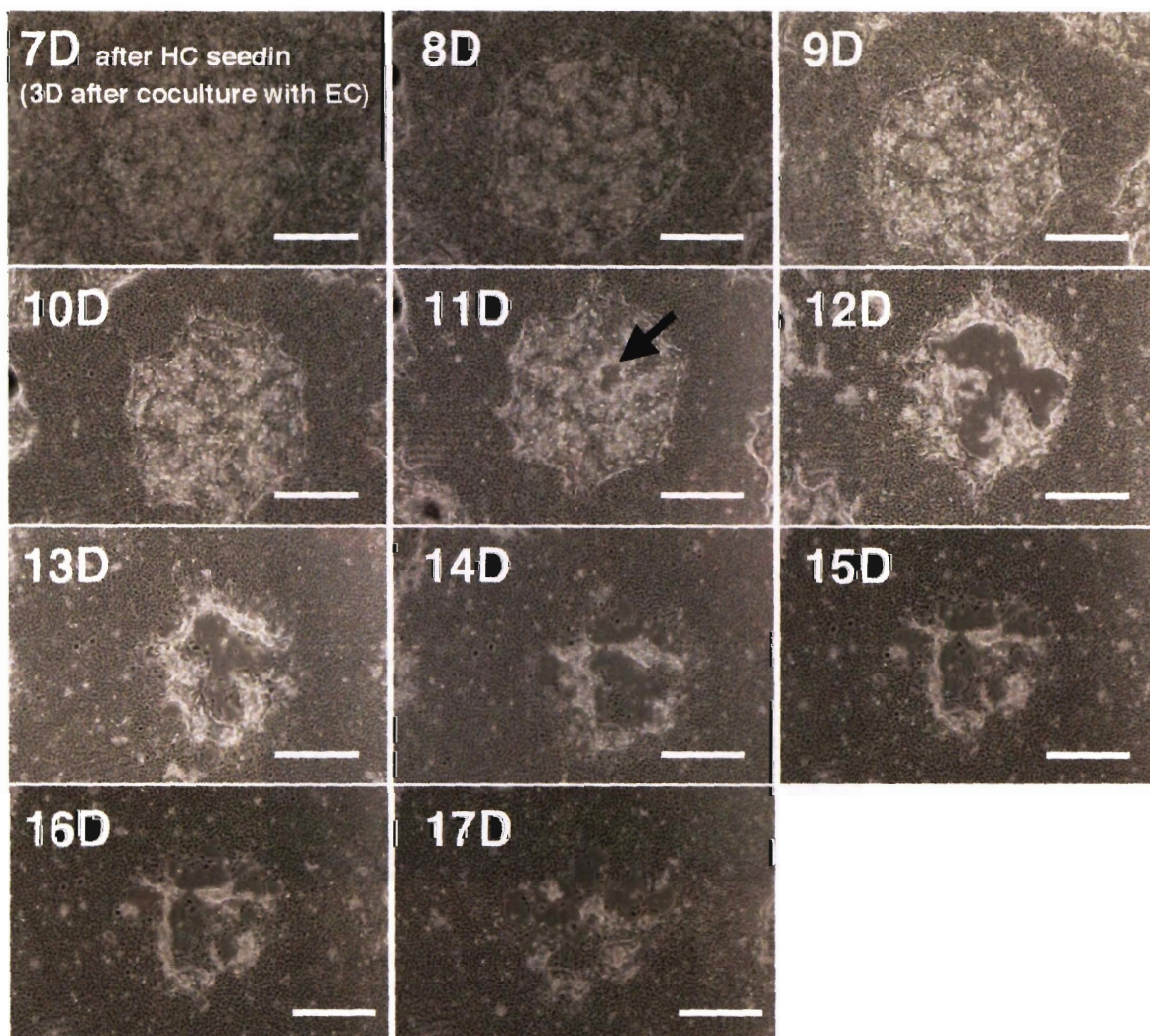


Figure 3.1 Phase contrast microphotographs of the time dependent morphologies of HC domains in patterned co-culture of HCs and ECs at 37°C. HC detachment was observed after 11-day culture (after 7-day co-culture with ECs). Scale bars: 500 μ m.

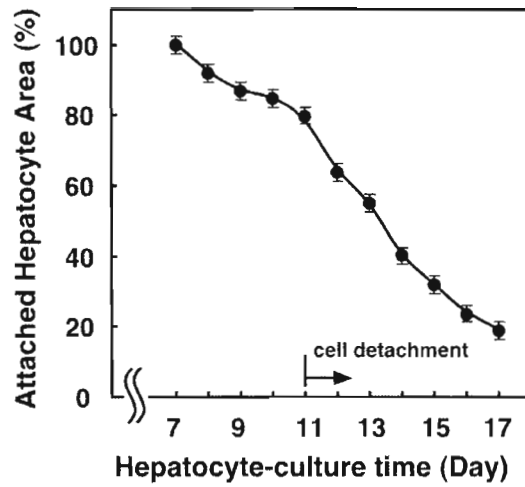


Figure 3.2 Time dependent attached HC area in patterned co-culture of HCs and ECs.

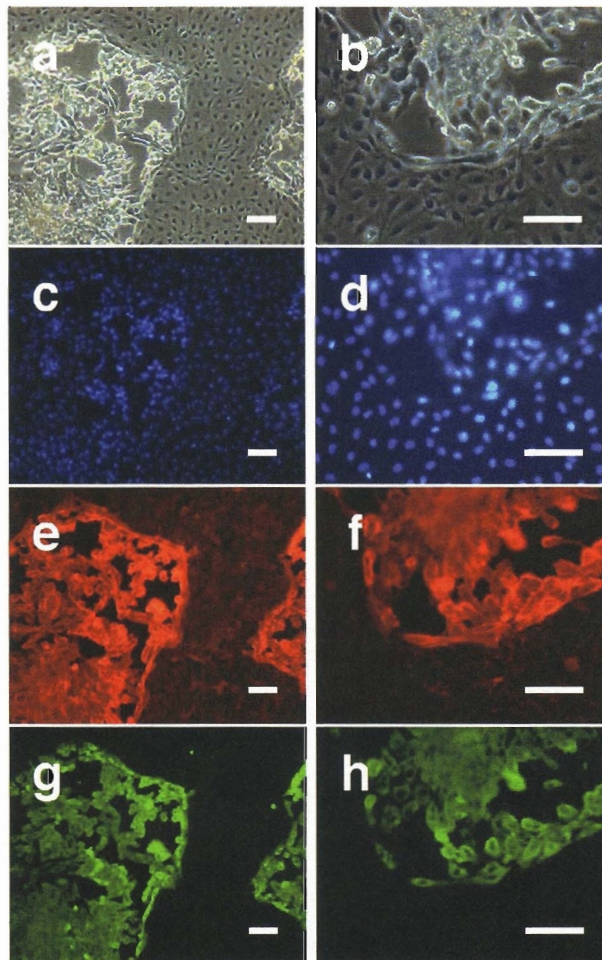


Figure 3.3 Fluorescence microphotographs of co-cultured cells 13-day after HC seeding. a,b. Phase contrast micrographs. c,d. Nuclei staining of both cell types with Hoechst 33258 (blue). e,f. Cytoskeletal actin microfilament of both cell types with rhodamine-phalloidin (red). g,h. Albumin positive hepatocytes in green fluorescence with albumin negative ECs. Scale bars: 50 μ m.

3.3.4 考察

共培養の培養日数が増加するにつれ、HC ドメインが小さくなる傾向を示した。これは EC の増殖により HC ドメインが圧迫されたためと考えられる。実際に、高い増殖能を有する継代数の低い EC ほど HC のドメイン縮小効果が観察された。また、非常に高い確率で HC ドメインの中心に位置する細胞から剥離が始まり、EC との境界部分に存在する HC はなかなか剥離しなかった。これにより、HC-EC 近接領域では EC から何らかの影響を受け、長期に生存し機能を発現したと考えられる。HC-EC 間相互作用の検証は次節で議論する。

3.4 蛍光免疫染色による肝アルブミンの観察

3.4.1 実験目的

前節で、HC と EC とのパターン化共培養では、EC との境界領域に存在する HC ほど長期間培養可能であることが示された。本実験はこの事実と細胞機能との関係を調査する目的で、肝アルブミンの蛍光免疫染色を行い蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡による HC の観察を行うことを目的とした。

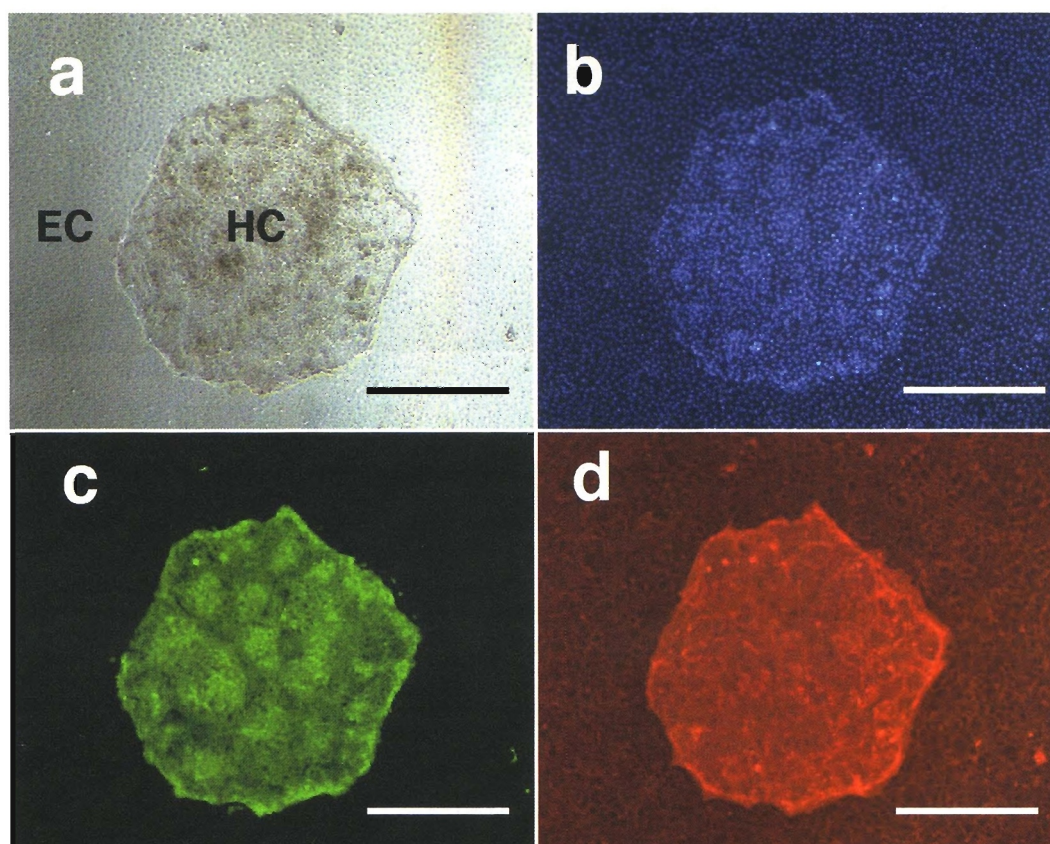


Figure 3.4 Fluorescence microphotographs of co-cultured cells 3-day after EC seeding. a. Phase contrast micrograph. b. Albumin positive hepatocytes in green fluorescence with albumin negative ECs. c. Nuclei staining of both cell types with Hoechst 33258 (blue). d. Cytoskeletal actin microfilament of both cell types with rhodamine-phalloidin (red). Scale bars: 100 μ m.

3.4.2 実験方法

第 2.6.3 項 b と同様の方法で、HC と EC のパターン化共培養を $\phi 1$ mm パターン化温度応答性表面上で行った。EC を播種して 2 日間共培養後の培養皿上に接着した共培養細胞層を第 2.6.2 項(2)で詳述した方法と同様の方法でパラホルムアルデヒドにより固定し、肝アルブミン、アクチンフィラメント、細胞核の 3 重染色を行った。染色したパターン化共培養細胞層を蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3.4.3 実験結果

【蛍光顕微鏡観察】

HC-EC のパターン化共培養細胞層の 3 重染色結果を Figure 3.4 に示す。Figure 3.4c にみられるように、EC との境界領域に存在する HC は緑色の蛍光色が強く、この領域の HC は特に高いアルブミン産生を有すると判断した。また、Figure 3.4b で細胞核を観察すると、特に HC-EC 境界部分で細胞核密度が高く、また、Figure 3.4d より、境界部分では HC の細胞骨格の発達が顕著であった。

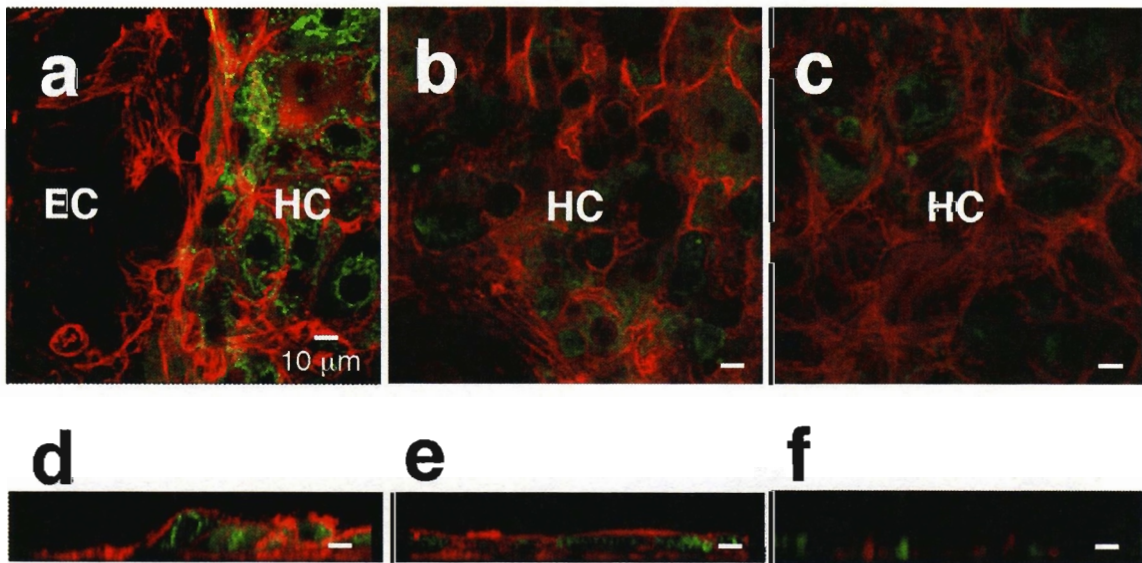


Figure 3.5 Immuno-fluorescence confocal laser micrographs of co-cultured cells 3-day after EC seeding. Hepatic albumin was stained with green fluorescence and cytoskeletal actin microfilament of both cell types was stained with rhodamine-phalloidin (red). a. Periphery of cultured ECs and HCs. b. The center part of HC cultured domains. c. Monocultured HCs. d. Cross sectional view of a. e. Cross sectional view of b. f. Cross sectional view of c.

【共焦点レーザー顕微鏡による肝アルブミンの局所的観察】

$\phi 1$ mm パターン化共培養細胞層の HC と EC との境界領域(Figure 3.5a), $\phi 1$ mm HC ドメインの中心(Figure 3.5b), および TCPS 上で HC のみを培養したもの(Figure 3.5c)を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果を示す。FITC 標識化アルブミンの蛍光強度から、EC-HC の境界部分の HC は高いアルブミン産生を示し、さらに、同じパターン化共培養系の HC ドメインの中心部分、あるいは HC を単独で培養した系よりも高いアルブミンの産生を示した。また、Figure 3.5a-c を xzy

方向から観察した像を Figure 3.5d-f に示す. 境界部分の HC は他の部分よりも細胞の高さが高く、盛り上がった形態を示した.

6.4.4 考察

蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡による観察結果より, EC との境界部分に存在する HC は特に高いアルブミン産生能を示すことが判明した. これにより HC と EC 間の相互作用は細胞間の距離に依存することが明らかである.

通常, 肝組織では肝実質細胞と非実質細胞は直接の cell-cell contact を形成せず, 細胞間相互作用は, ディッセ腔というお互いが合成分泌するコラーゲン, ラミニン, フィブロネクチン, プロテオグリカンなどの細胞外マトリックスタンパク質(ECM)を介して行われる⁶³⁾. *in vivo* では 1 年以上の長い寿命をもつといわれる肝実質細胞が *in vitro* では 1 週間ほどで死滅する 1 つの理由として, HC がディッセ腔の細胞間基質から引き離されたことがあげられている. 実際に, Rojkind ら⁶⁹⁾は, 肝組織から抽出した ECM でコートした培養皿上に HC を培養すると, HC は 5 ヶ月以上培養可能であるとともに, その機能をも向上しうることを示した. そこで, 本共培養系では, HC を EC とともに培養することで, HC と EC 間に ECM が形成され, HC のみを単独で培養したときよりも HC の延命効果とアルブミン産生の細胞機能向上効果が生じたと考えられる. しかし, $\phi 1$ mm の HC ドメインの中心では, HC-EC 境界部分に比べ, 早期に細胞の欠落が生じたことから, ECM の効果は特に HC-EC 境界部分で著しく, 境界部分から遠ざかるほどその効果は減少傾向にあることが示唆された.

これまでに, 細胞接着ドメインのサイズを変化させ細胞の形態の制御が可能であり, これにより細胞の増殖性, アポトーシス, 分化能の制御が可能であることが報告されている⁷⁰⁻⁷²⁾. 細胞は扁平の形態では増殖能が高く, 立方体のキボイダル状態では分化能が高いことが示されており, 本共培養系では, Figure 3.5d より HC-EC 境界部分の HC はキュボイダル状であった. よってこの細胞形態が細胞アルブミン産生の向上をもたらす結果になったと考えられる. キュボイダル形態は HC-EC 間で合成された ECM, さらに, EC の増殖による HC ドメインへの圧迫により, HC の形態変化を引き起こされた可能性があげられる.

以上より, パターンサイズを小さくし, 共培養細胞層中の HC-EC の境界部分を増やしてやれば, 共培養細胞層全体としての機能向上を実現できる可能性が示唆された.

3.5 パターンサイズ縮小による高機能性共培養細胞シートの調製

3.5.1 実験目的

前節で, パターン化共培養細胞組織の EC-HC 境界領域に存在する HC は高アルブミン産生能を示すことが蛍光免疫染色結果より認められた. そこで, 本実験では, HC と EC の細胞比は同じままでパターンサイズを $\phi 1$ mm から $\phi 0.5$ mm へと小さくしたパターン化共培養系を調製し, 共培養細胞層中の単位面積あたりの EC-HC 境界領域を増加させた系での HC の細胞機能を評価することを目的とした.

3.5.2 実験方法

【 $\phi 0.5$ mm パターン化表面の調製】

第 1.4.2 項で詳述した方法と同様の方法で、 $\phi 0.5$ mm の穴を多く持つアルミニウム製マスクを用いて、P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインが $\phi 0.5$ mm のパターン化温度応答性表面を調製した。

【蛍光免疫染色】

第 2.6.3 項 b と同様の方法で、HC と EC のパターン化共培養を $\phi 1$ mm および $\phi 0.5$ mm パターン化温度応答性表面上で行った。HC を播種して 2 日間共培養後の培養皿上に接着した共培養細胞層を第 2.6.2 項(2)で示した方法で固定し、肝アルブミン、アクチンフィラメント、細胞核に対して 3 重染色を行い蛍光顕微鏡で観察した。

【培養上清中の肝アルブミン量の測定】

(a) サンプルの調製

$\phi 1$ mm および $\phi 0.5$ mm パターン化温度応答性表面上での HC と EC とのパターン化共培養を行い、EC を播種して 1 日後、培地交換により非接着の EC を除いた。さらに 2 日間共培養を行い、培養上清を採取し、これをサンプルとした。コントロールとして、HC のみを TCPS 上で同期間単独培養したものを用意した。

(b) 肝アルブミンの定量

培養上清中に分泌されたアルブミン量を、ラット尿中アルブミン定量用キットを用い、サンドイッチ ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)法で測定した。詳細は以下に示す。

抗ラットアルブミン抗体を結合させた 96well プレートに標準ラットアルブミン溶液または試料、試料希釈液、酵素標識抗原液を希釈倍率 1/10 で注入し、30 分間室温でインキュベートした。続いてウェル内の溶液をすべて除去し、各ウェルを PBS で洗浄した。基質発色剤を注入し、正確に 5 分間室温でインキュベート後、反応停止液を加えマイクロプレートリーダー分光光度計で波長 450 nm における吸光度を測定し、解析・定量した。

【培養上清中の尿素窒素量の測定】

(a) サンプルの調製

$\phi 1$ mm および $\phi 0.5$ mm パターン化温度応答性表面上での HC と EC とのパターン化共培養を行い、EC を播種して 1 日後、培地交換により非接着の EC を除いた。Yanagi, Ohshima ら⁷²⁾の手法をもとに 1 mM NH_4Cl を含む HC 用培地を 2 mL 加え、24h 後の培養上清を採取し、これをサンプルとした。コントロールとして、HC のみを TCPS 上で同一期間単独培養したものを用意し、さらに、バックグラウンド測定として、EC のみを培養した培養上清を用意した。

(b) 尿素窒素量の測定

尿素窒素測定用キットを用い、ウレアーゼ・インドフェノール法で培養上清中の尿素窒素濃度を測定した。詳細は以下に示す。

Table 3.1 Sequences of PCR primers

Target molecules	P1(forward primer)	P2 (reverse primer)	Size of PCR product	Annealing Temp.
GAPDH	5'-GCC CCC AAC ACT GAG CAT -3'	5'-CCA GGC CCC TCC TGT TGT -3'	66 bp	60°C
Albumin	5'-AGA AGC TTG GAG AGT ATG GAT TCC -3'	5'-GTC GAC ACC TGA GGT GCT TTC -3'	73 bp	60°C
OCT	5'-CCT GCA AGA GGA CGA AAA ACC -3'	5'-GCA CTA GGG ATG TGT TTA CAA TTT CA -3'	112 bp	60°C

試料 200 μ L にキット中のウレアーゼ-緩衝液 2 mL を加えよく混合し、37°C で 15 分間加温した。これにキット中の発色剤を 2 mL 加えよく混合し、37°C で 10 分間加温してインドフェノールを生成させた。これをマイクロプレートリーダー分光光度計で、波長 570 nm における吸光度を測定し、解析・定量した。

【培養 HC の核数の計測】

細胞核数あたりの肝アルブミン分泌量、尿素合成量を算出するため、内皮細胞を播種する前の培養細胞核をヘキスト 33342 で染色し、蛍光顕微鏡で観察し核数をカウントした。(コンフルエントに培養されているため、細胞の「数」をカウントすることは困難であった。肝細胞は多核細胞である。)

【リアルタイム PCR 法による肝アルブミンと OCT の mRNA 発現量の定量】

ϕ 0.5 mm, ϕ 1 mm の共培養系および HC 単独培養系の肝アルブミンおよびオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ(OCT)に対する mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。リアルタイム PCR 解析を行うにあたり、RNA の抽出、cDNA の合成についての手順を以下に記す。

共培養 2 日後の培養細胞層を PBS で洗浄し、RNA 抽出用試薬 Isogen を 1.2 mL を加え細胞を可溶化し、セルスクレイパーで培養細胞掻き取り採取した。これを 26G シリンジでホモジネートした。ここへ 0.2 mL のクロロホルムを加えて攪拌し、12,000g, 4°C, 15 分間の遠心分離を行った。上清を別のチューブに移し、2-プロパノール 0.8 mL を加えて攪拌後、12,000g, 4°C, 15 分間の遠心分離を行った。上層を捨て、70%エタノールを 1 mL 加えて攪拌し、再び 7,500g, 4°C, 5 分間の遠心分離を行った。このときの上清を捨て、RNA のペレットを DEPC 処理水 20 μ L に溶解し、溶液の吸光度を吸光光度計(260 nm-280 nm)で求め、Total RNA の濃度が 1 μ g/mL となるように DEPC 処理水で調整した。

Total RNA 4 μ L を分取し、ランダムヘキサマー 4 μ L, dNTP 1 μ L, DEPEC 処理水 1 μ L を加えて全量を 10 μ L とし、65°C で 5 分間加温後、氷上にて 1 分間冷却した。続いて 10 \times RT buffer 2 μ L, MgCl₂ 4 μ L, DTT 2 μ L, Rnase out 1 μ L を加えて攪拌し、25°C で 2 分間保持した。Super Script IIRT を 1 μ L 加え 25°C で 5 分間保持し、42°C で 50 分間逆転写反応させ、70°C で 15 分加温した。その後氷上で冷却し、Rnase H を 1 mL 加え攪拌し、37°C で 20 分間反応させたものを cDNA として 20°C で保存した。

さきに得られた cDNA 1 μ L あるいはスタンダードプラスミドに SYBR-Green 10 μ L, 10 pmol/ μ L Primer Forward 1 μ L, 10 pmol/mL Primer Reverse 1 μ L, 精製水 7 μ L を加え、PCR 用 96well ディッシュに分注し、ABI PRISM 7000sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いて mRNA 発現量を測定した。

肝アルブミンおよびオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼに特異的な遺伝子配列を含むプラスミドを作成し、段階希釈したものをスタンダードとして用い、ラット GAPDH 発現量で補正した。Table 3.1 に PCR プライマーの塩基配列を示した。なお、異種間で相同性の低い 3'非翻訳領

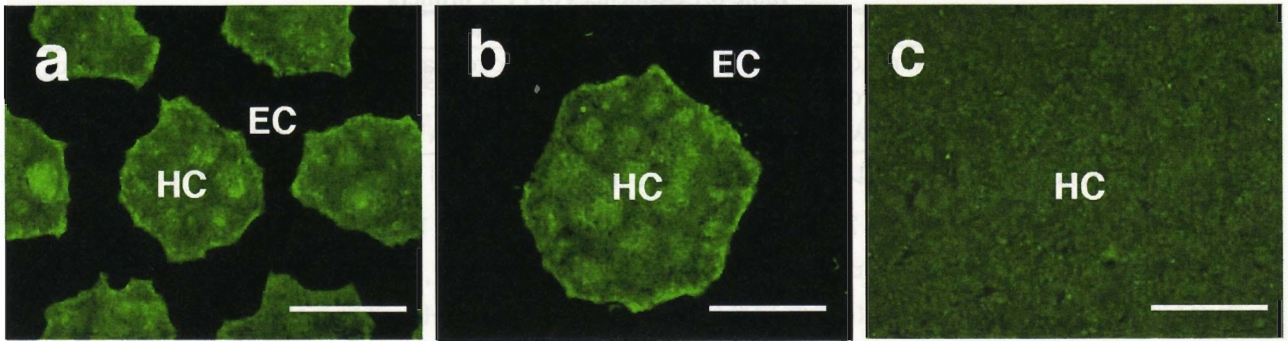


Figure 3.6 Fluorescent visualization of hepatic albumin in various culture systems. a. ϕ 1 mm-patterned co-culture. b. ϕ 0.5mm-patterned co-culture. c. HC monoculture. Bars: 1mm.

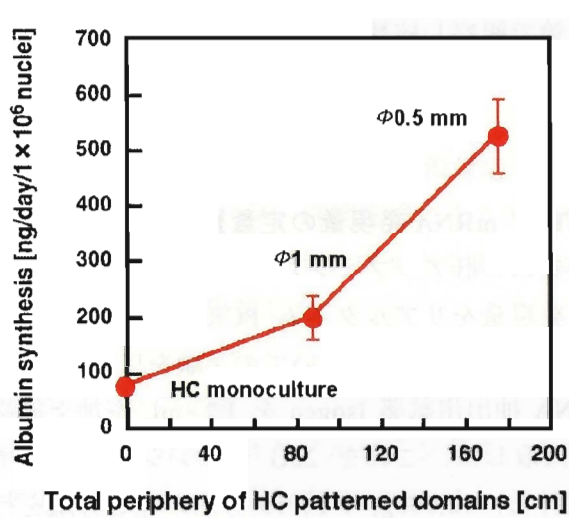


Figure 3.7 Albumin syntheses in various culture systems.

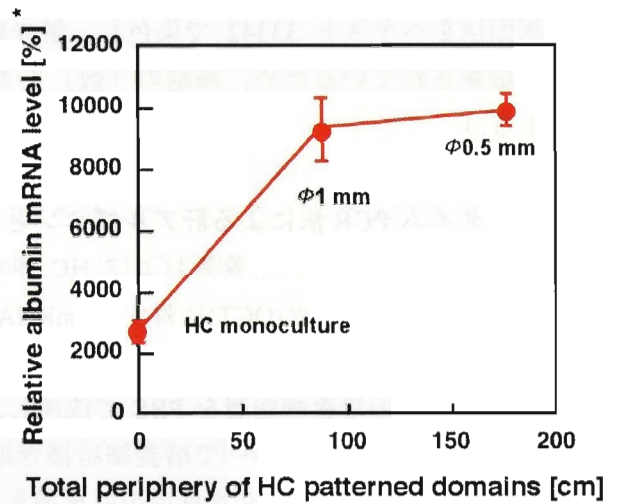


Figure 3.9 Relative albumin mRNA in various culture systems. Standardized by GAPDH mRNA.

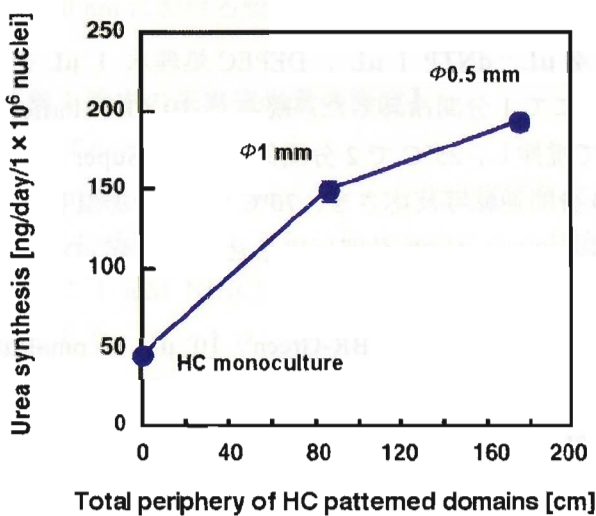


Figure 3.8 Urrea syntheses in various culture systems.

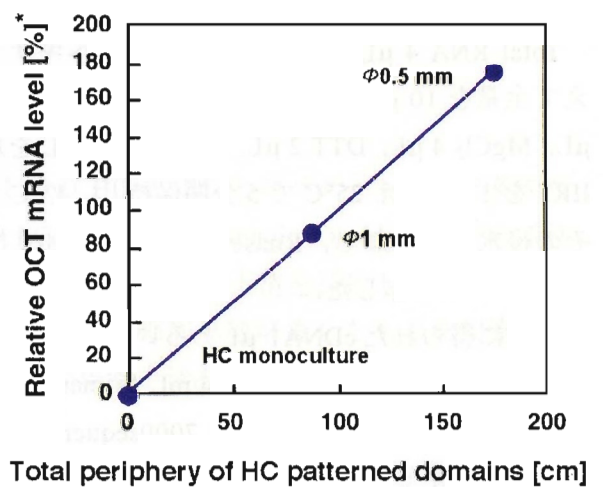


Figure 3.10 Relative OCT mRNA in various culture systems. Standardized by GAPDH mRNA.

6.5.3 実験結果

【パターンサイズの異なる共培養系の構築とアルブミンの蛍光免疫染色像】

$\phi 0.5$ mm の穴を多く持つアルミニウム製マスクを用いることにより、P(IPAAm-BMA)共グラフトドメインが $\phi 0.5$ mm のパターン化温度応答性表面を調製し、この表面上で HC と EC のパターン化共培養を行うことが可能であった。Figure 3.6 に $\phi 0.5$ mm, $\phi 1$ mm の共培養系および HC 単独培養系の肝アルブミンに対する免疫染色結果を示す。Figure 3.6a より $\phi 0.5$ mm パターン化共培養系においても、HC-EC 境界領域の HC は緑色の蛍光強度が高く、高いアルブミン産生を有していた。

【各培養系における単位面積あたりの細胞核数】

Table 3.2 に各培養系での単位面積あたりの培養細胞核数を示す。 $\phi 0.5$ mm と $\phi 1$ mm の共培養系、HC 単独培養系での単位面積あたりの HC の核密度はほぼ同じであった。

【培地中の肝アルブミンの定量】

Figure 3.7 に肝アルブミン定量結果を示す。共培養系における HC は、HC 単独培養系に比べ高次のアルブミン合成能を示した。また、共培養系におけるパターンのサイズで比較すると、パターンサイズが小さい $\phi 0.5$ mm 共培養系が $\phi 1$ mm 共培養系に比べ約 2.5 倍のアルブミン合成能を示した。

【培地中の尿素窒素の定量】

Figure 3.8 に尿素窒素濃度の定量結果を示す。共培養系は HC 単独培養系に比べ、圧倒的に尿素合成能が高いことが明らかであった。さらに、パターンサイズの異なる共培養系を比較すると、サイズの小さい $\phi 0.5$ mm 共培養系の細胞は $\phi 1$ mm に比べ高い尿素合成能を示した。よって、アルブミン合成能と同様に、尿素合成能に関しても、パターンサイズの縮小による細胞機能亢進効果が観察された。

【リアルタイム PCR 法による肝アルブミンと OCT の mRNA の定量】

Figure 3.9 と Figure 3.10 にリアルタイム PCR 法による 2 日間共培養した HC のアルブミンおよび HC のアンモニア代謝系で働く酵素である OCT に関する mRNA の定量結果を示す。アルブミン、OCT のどちらに関しても、HC 単独共培養系よりも共培養系は高い mRNA 発現を示した。パターンのサイズで比較すると、アルブミン mRNA に関しては、 $\phi 0.5$ mm と $\phi 1$ mm で大きな差はみられなかったが、OCT mRNA に関しては、パターンサイズの小さい $\phi 0.5$ mm の方が $\phi 1$ mm 共培養系に比べ高い発現を示した。OCT に関しては、本実験では培養時に培地にアンモニアを添加しなかったため、全体の OCT mRNA 発現レベルが低かった。今後アンモニアを添加し、発現レベルを上げて測定し、比較・検討する必要がある。

Table 3.2 The number of nucleus per unit area in various culture types

Culture type	The number of nucleus ^a ($\times 10^3$ nuclei/cm ²)
$\phi 0.5$ mm	191 \pm 16.6
$\phi 1$ mm	187 \pm 5.86
HC monoculture	211 \pm 6.01

^aData are expressed as the mean of five samples with standard error of mean.

6.5.4 考察

Bhatia ら^{43, 44, 74)}は、コラーゲンをガラス表面にパターン状に固定化した表面上で、HC と繊維芽細胞(3T3)のパターン化共培養を可能とし、HC と 3T3 の細胞比は同じまま、HC ドメインの直径を 0.36, 0.10, 0.490, 6.80, 17.80 mm と種々変化させた共培養系を作製し、HC-3T3 の異種細胞間相互作用領域の変化に対する HC の特異機能 (アルブミン合成, 尿素合成など) を解析した。HC のみをパターン化培養した系よりも、3T3 との共培養系ではアルブミン・尿素合成量ともに上昇し、さらに、パターンサイズが小さい共培養系(ϕ 0.36, 0.10, 0.490 mm) はパターンサイズの大きい共培養系(6.80, 17.80 mm)よりも約 2 倍以上の合成能を示した。また、HC と 3T3 の ϕ 0.490 mm パターン化共培養系の肝アルブミンを染色結果より、共培養後 1 日では HC ドメイン全体の肝細胞が活性を示したが、6 日後では、HC-3T3 境界部分から 3~4 列目の HC のみがアルブミン活性を維持し続けたことが明らかとなり、細胞の分化機能維持における異種細胞間相互作用の重要性が報告された。本実験でも、Bhatia らと同様にパターンサイズを ϕ 1 mm から ϕ 0.5 mm に縮小し、共培養細胞層中の HC-EC の境界部分を増やすことで、異種細胞間相互作用による細胞機能向上を獲得し、細胞機能を亢進させた高機能化共培養細胞シートの構築が可能であった。また、HC の長期培養維持(Figure 6.1, 6.3), 高アルブミン活性 (Figures 3.4~3.6)が HC-EC の近接領域のみに限定されてみられたことから、EC から出される HC の分化シグナルの浸透および伝達可能距離には限界があることが判明した。これにより、 ϕ 0.5 mm よりもさらに小さなパターン化表面を調製することで、さらに細胞機能を向上させたパターン化共培養細胞シートを構築できることが示唆された。

6.7 小括

- (i) 本共培養系では EC と共培養することで単独培養系と比べおよそ 4 日間 (最高で 7 日間) 長く HC の培養を維持できた。
- (ii) 蛍光顕微鏡観察結果および共焦点レーザー顕微鏡結果より、EC との境界領域に存在する HC ほど高いアルブミン産生能を示した。
- (iii) パターンサイズを小さくし、共培養細胞層中の EC-HC 境界部分を増やすことで、共培養細胞層の全体としてのアルブミン、尿素合成能等の機能向上を実現できた。

参考・引用文献

1. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331-343.
2. Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-926.
3. Jeffrey Kransner, The replacements- Why the Vacanti brothers are the Fab Four of tissue engineering- Boston Sunday Globe, March 11, 2001; D4
4. Cao Y, Vacanti J, Paige K, Upton J, Vacanti C. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 1997;100:297-302.
5. Vacanti C, Bonassar L, Vacanti M, Shufflebarger J. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N Engl J Med* 2001;344:1511-1514.
6. Niklason L, Gao J, Abbott W, Hirschi K, Houser S, Marini R, Langer R. Functional arteries grown *in vitro*. *Science* 1999;284:489-493.
7. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue engineered pulmonary artery. *New Eng J Med* 2001;344:532-533.
8. Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'oka T, Ikada Y, Kurosawa H. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts *in vivo*. *Circulation* 2003;108:1729-1734.
9. Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T. Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. *Biomaterials* 2003;24:2303-2308.
10. Oberpenning F, Meng J, Yoo J, Atala A. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol* 1999;17:149-155.
11. Sekine T, Nakamura T, Ueda H, Matsumoto K, Yamamoto Y, Takimoto Y, Kiyotani T, Shimizu Y. Replacement of the tracheobronchial bifurcation by a newly developed Y-shaped artificial trachea. *ASAIO J* 1999;45:131-134.
12. Nakamura T, Teramachi M, Sekine T, Kawanami R, Fukuda S, Yoshitani M, Toba T, Ueda H, Hori Y, Inoue M, Shigeno K, Taka T, Liu Y, Tamura N, Shimizu Y. Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dogs. *Int J Artif Organs* 2000;23:718-724.
13. Sekine T, Nakamura T, Shimizu Y, Liu Y, Ueda H, Matsumoto K. Experimental carinal replacement with an Y-shaped collagen-conjugated prosthesis. *Thorac Cardiovasc Surg* 2000;48:125-129.
14. Liu Y, Nakamura T, Yamamoto Y, Matsumoto K, T S, Ueda H, Shimizu Y. A new tracheal bioartificial organ: evaluation of a tracheal allograft with minimal antigenicity after treatment by detergent. *ASAIO J* 2000;46:536-539.
15. Kojima K, Bonassar L, Roy A, Vacanti C, Cortiella J. Autologous tissue-engineered trachea with sheep nasal chondrocytes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:1177-1184.
16. Yamada N, Okano T, Sakai H, Karikusa F, Sawasaki Y, Sakurai Y. Thermo-responsive polymer surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol Chem, Rapid Commun* 1990;11:571-576.
17. Kikuchi A, Okuhara M, Karikusa F, Sakurai Y, Okano T. Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9:1331-1348.

18. Kushida A, Yamato M, Konno C, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces. *J Biomed Mater Res* 1999;45:355-362.
19. Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezu M, Okano T. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002;90:e40-e48.
20. Harimoto M, Yamato M, Hirose M, Takahashi C, Isoi Y, Kikuchi A, Okano T. Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res* 2002;62:464-470.
21. Heskins M, Guillent JE, James E. Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide). *J Macromol Sci Chem* 1968;A2:1441-1445.
22. Bae YH, Okano T, Kim SW. Temperature dependence of swelling of crosslinked poly(*N,N'*-alkyl substituted acrylamides) in water. *J Polym Sci: Polym Phys* 1990;28:923-936.
23. Bae YH, Okano T, Kim SW. "On-off" thermocontrol of solute transport I. Temperature dependence of swelling on *N*-isopropylacrylamide networks modified with hydrophilic components in water. *Pharmaceu Res* 1991;8:531-537.
24. Bae YH, Okano T, Kim SW. "On-off" thermocontrol of solute transport II. Solute release from thermosensitive hydrogels. *Pharmaceu Res* 1991;8:624-628.
25. Gewehr M, Nakamura K, Ise N, Kitano H. Gel permeation chromatography using porous glass beads modified with temperature-responsive polymers. *Makromol Chem* 1992;193:249-256.
26. Hosoya K, Sawada E, Kimata K, Araki T, Tanaka N, Frechet JMJ. *In situ* surface-selective modification of uniform size macroporous polymer particles with temperature-responsive poly-*N*-isopropylacrylamide. *Macromolecules* 1994;27:3973-3976.
27. Hosoya K, Kimata K, Araki T, Tanaka N, Frechet JMJ. Temperature-controlled high-performance liquid chromatography using a uniformly sized temperature-responsive polymer-based packing material. *Anal Chem* 1994;67:1907-1911.
28. Kanazawa H, Yamamoto K, Matsushima Y, Takai N, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. Temperature-responsive chromatography using poly(*N*-isopropylacrylamide)-modified silica. *Anal Chem* 1996;68:100-105.
29. Kanazawa H, Kashiwase Y, Yamamoto K, Matsushima Y, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. Temperature-responsive liquid chromatography. 2. Effects of hydrophobic groups in *N*-isopropylacrylamide copolymer-modified silica. *Anal Chem* 1997;69:823-830.
30. Kikuchi A, Okano T. Intelligent thermoresponsive polymeric stationary phase for aqueous chromatography of biological compounds. *Prog Polym Sci* 2002;27:1165-1193.
31. Malmstadt N, Yager P, Hoffman AS, Stayton PS. A smart microfluidic affinity chromatography matrix composed of poly(*N*-isopropylacrylamide)-coated beads. *Anal Chem* 2003;75:2943-2949.
32. Chilkoti A, Chen G, Stayton PS, Hoffman AS. Site-specific conjugation of a temperature-sensitive polymer to a genetically-engineered protein. *Bioconjugate Chem* 1994;5:504-507.
33. Matsukata M, Take Y, Aoki T, Sanui K, Ogata N, Sakurai Y, Okano T. Temperature modulated solubility-activity alterations for poly(*N*-isopropylacrylamide)-lipase conjugates. *J Biochem* 1994;116:682-686.
34. Stayton PS, Shimoboji T, Long C, Chilkoti A, Chen G, Harris JM, Hoffman AS. Control of protein-ligand

- recognition using a stimuli-responsive polymer. *Nature* 1995;378:472-474.
35. Matsukata M, Aoki T, Sanui K, Ogata N, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. Effect of molecular architecture of poly(*N*-isopropylacrylamide)-trypsin conjugates on their solution and enzymatic properties. *Bioconjugate Chem* 1996;7:96-101.
 36. Ding Z, Long CJ, Hayashi Y, Bulmus EV, Hoffman AS, Stayton PS. Temperature control of biotin binding and release with a streptavidin-poly(*N*-isopropylacrylamide) site-specific conjugate. *Bioconjugate Chem* 1999;10:395-400.
 37. Hoffman AS, Stayton PS, Bulmus V, Chen G, Chen J, Cheung C, Chilkoti A, Ding Z, Dong L, Fong R, Lackey CA, Long CJ, Press OW, Shimoboji T, Shoemaker S, Yang HJ, Monji N, Nowinski RC, Cole CA, Priest JH, Harris JM, Nakamae K, Nishino T, Miyata T. Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins. *J Biomed Mater Res* 2000;52:577-586.
 38. Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(*N*-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* 1993;27:1243-1251.
 39. Okano T, Yamada N, Okuhara M, Sakai H, Sakurai Y. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials* 1995;16:297-303.
 40. Kushida A, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: The noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces. *J Biomed Mater Res* 2001;54:37-46.
 41. Nishida K. Tissue Engineering of the Cornea. *Cornea* 2003;22:S28-S34.
 42. ひとの組織学, 梶々谷博・熊谷佑子・松並平晋, メディカルサイエンス社, 1999, 38, 124.
 43. Bhatia S, Yarmush M, Toner M. Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: hepatocytes and 3T3 fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 1997;34:189-199.
 44. Bhatia S, Balis U, Yarmush M, Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 1999;13:1883-1900.
 45. Yamato M, Kwon OH, Hirose M, Kikuchi A, Okano T. Novel patterned cell coculture utilizing thermally responsive grafted polymer surfaces. *J Biomed Mater Res* 2001;55:137-140.
 46. Yamato M, Konno C, Utsumi M, Kikuchi A, Okano T. Thermally responsive polymer-grafted surfaces facilitate patterned cell seeding and co-culture. *Biomaterials* 2002;23:561-567.
 47. Takei YG, Aoki T, Sanui K, Ogata N, Okano T, Sakurai Y. Temperature-responsive bioconjugates. 2. Molecular design for temperature-modulated bioseparations. *Bioconjugate Chem* 1993;4:341-346.
 48. Iwata H, Oodate M, Uyama Y, Amemiya H, Ikada Y. Preparation of temperature-sensitive membranes by graft polymerization onto a porous membrane. *J Membr Sci* 1991;55:119-130.
 49. Feil H, Bae YH, Feijen J, Kim SW. Effect of comonomer hydrophilicity and ionization on the lower critical solution temperature of *N*-isopropylacrylamide copolymers. *Macromolecules* 1993;26:2496-2500.
 50. Sakai H, Doi Y, Okano T, Yamada N, Sakurai Y. Thermo-responsive polymer surfaces for cell culture: Analysis of the surfaces and control of the cell attachment/detachment. In *Advanced Biomaterials in Biomedical Engineering and Drug Delivery Systems*, Ogata N, SW Kim, Feijen J, Okano T eds. Springer-Verlag, Tokyo 1996;229-230.
 51. Briggs D, Seah MP. *Practical Surface Analysis, Second Ed. Vol.1- Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy*: John Wiley & Sons, Inc.; Abington. 1990.

52. Childs MA, Matlock DD, Dorgan JR. Surface morphology of poly(caprolactone)-*b*-poly(dimethylsiloxane)-*b*-poly(caprolactone) copolymers: effects on protein adsorption. *Biomacromolecules* 2001;2:526-537.
53. van Wachem PB, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, van Aken WG. Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces with different wettabilities. *Biomaterials* 1985;6:403-408.
54. van Wachem PB, Hogt AH, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, van Aken WG. Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. *Biomaterials* 1987;8:323-328.
55. Lee JH, Park JW, Lee HB. Cell adhesion and growth on polymer surfaces with hydroxyl groups prepared by water vapour plasma treatment. *Biomaterials* 1991;12:443-448.
56. Tamada Y, Ikada Y. Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen. *J Biomed Mater Res* 1994;28:783-789.
57. Hirose M, Kwon OH, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Creation of designed shape cell sheets that are noninvasively harvested and moved onto another surface. *Biomacromolecules* 2000;1:377-381.
58. Kwon OH, Kikuchi A, Yamato M, Sakurai Y, Okano T. Rapid cell sheet detachment from poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted porous cell culture membranes. *J Biomed Mater Res* 2000;50:82-89.
59. Kwon OH, Kikuchi A, Yamato M, Okano T. Accelerated cell sheet recovery by co-grafting of PEG with PIPAAm onto porous cell culture membranes. *Biomaterials* 2003;24:1223-1232.
60. 山谷 一朗 異なる相転移温度をもつ温度応答性高分子をグラフトしたパターン化表面の調製と共培養細胞シートの作製 2001年度東京理科大学卒業論文.
61. Seglen P. Preparation of isolated rat liver cells. *Method Cell Biol* 1976;13:29-83.
62. Tateno C, Yoshizato K. Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes. *American Journal of Pathology* 1996;148:383-392.
63. 中村敏一 初代培養肝細胞実験法: (株)学会出版センター1987.
64. Hook M, Rubin K, Oldberg A, Obrink B, Vaheri A. Cold-insoluble globulin mediates the adhesion of rat liver cells to plastic Petri dishes. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;79:726-733.
65. Pierschbacher M, Ruoslahti E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:5985-5988.
66. Tomita Y, Nakamura T, Ichihara A. Control of DNA synthesis and ornithine decarboxylase activity by hormones and amino acids in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 1981;135:363-371.
67. Nakamura T, Tomita Y, Ichihara A. Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. *J Biochem (Tokyo)* 1983;94:1029-1035.
68. LeCluyse LE, Bullock PL, Paskinson A. Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function in long-term cultures of rat hepatocytes. *Adv Drug Deliv Reviews* 1996; 22: 133-186
69. Rojkind M, Gatmaitan Z, Mackensen S, Giambrone M, Ponce P, Reid L. Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1980;87:255-263.
60. O'Neill C, Jordan P, Ireland G. *Cell* 1986;44:489-496.
71. Singhvi R, Kumar A, Lopez GP, Stephanopoulos GN, Wang DID, Whitesides GM, Ingber DE. Engineering Cell Shape and Function. *Science* 1994;264:696-698.
72. Lu L, Kam L, Hasenbein M, Nyalakonda K, Bizios R, Gopferich A, Young JF, Mikos AG. Retinal pigment epithelial cell function on substrates with chemically micropatterned surfaces. *Biomaterials* 1999;20:2351-

2361.

73. Yanagi K, Ohshima N. Improvement of metabolic performance of cultured hepatocytes by high oxygen tension in the atmosphere. *Artif Organs* 2001;25:1-6.
74. Bhatia S, Balis U, Yarmush M, Toner M. Probing heterotypic cell interactions: hepatocyte function in microfabricated co-cultures. *J Biomater Sci Polymer Ed* 1998;9:1137-1160.