

# 伊藤「再生医療バイオリアクター」プロジェクト

プロジェクトリーダー 伊藤 嘉浩

## 【基本構想】

これまで半世紀にわたり、人類は病気で機能障害や機能不全に陥った生体組織・臓器の治療のために近代的な人工臓器や臓器移植を進展させてきた。しかし、人工臓器はまだ不備が多く、臓器移植ではドナーの不足が深刻である。そこで最近「再生医療」という細胞を積極的に利用して、生体機能の再生をはかる医療が考えられるようになった。バイオ（ハイブリッド）人工臓器や幹細胞取り扱いの目覚ましい技術の発展により、臨床応用される分野が生まれつつある一方、研究途上の分野もあり、その成果が待たれ大きな期待が寄せられている。

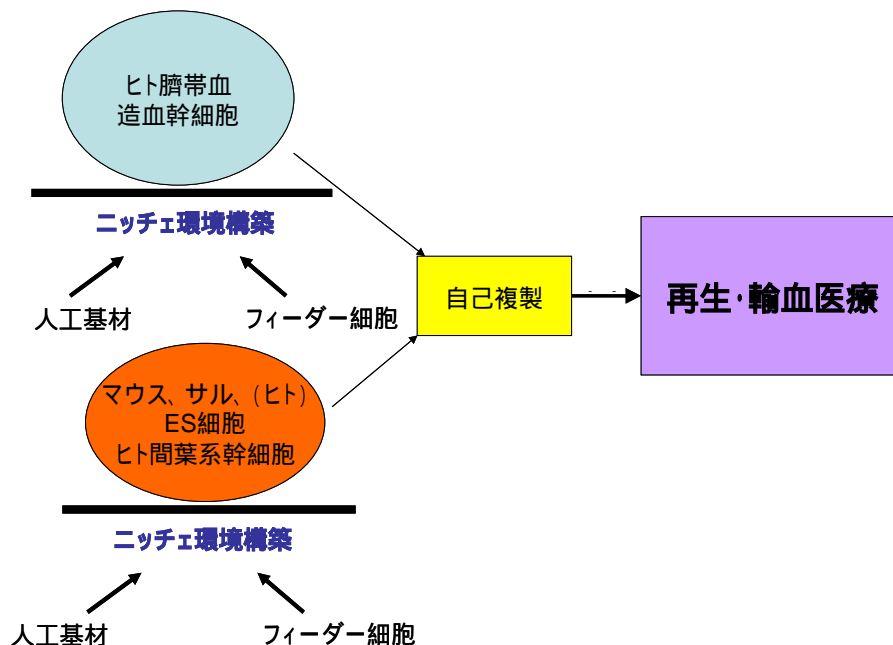
本プロジェクトでは、独自に開発したサイトカイン固定化材料を核として、再生医療で重要となるヒト幹細胞を、安全かつ迅速に供給できるようにするバイオリアクターの開発を目標とする。これまで、生体外での細胞培養は長い歴史をもち、この技術により生命科学は飛躍的な進歩を遂げてきた。今や実験手段として細胞培養は日常的な技術になっているが、通常は、動物から採取した血清や異種動物由来の細胞を培養液に共存させて行われている。しかし、ヒト幹細胞を培養し、医療に用いるためには、安全な培養が最も重要である。異種動物由来の血清や細胞の使用は、これまでしばしば指摘され問題になってきたようにウイルスやプリオン感染、さらに未知の病原体による感染を招く恐れがある。そこで、これら異種動物由来の生体成分を混在させない完全な人工幹細胞培養系を確立することを目的とする。

## 1. 平成 16 年度の研究目的

本プロジェクトは平成 14 年度からスタートし、本格的な再生医療のために必要な幹細胞の培養技術の確立を目指す。再生医療は、1997 年のクローン羊の出現や 1998 年のヒト胚性幹細胞（ES）細胞の樹立、そして 2005 年にはヒト ES 細胞への核移植も報告されるなどで、実現への期待が高まってきた。再生医療では、不全に陥った臓器の代わりに、新に幹細胞から作成した臓器を置き換える

治療を目指す。このような医療の実現のための一つの大きな課題は、非常に僅かしかない幹細胞を未分化状態を保ったまま効率よく増やすことである。

本プロジェクトは医工学連携によって応用性の高い研究開発を目的とする。培養系を開発する幹細胞としては、特に臨床応用が早期に望める臍帯血造血幹細胞を、一方では、応用には長期的な展望が必要となる ES 細胞を選ぶ。同時に、治療ばかりでなく診断において重要となる細胞



診断用バイオチップの開発も念頭に入れる。平成 16 年度も 15 年度までと同様に、図に示すような概略(1,2 に対応)で以下の目的のために研究を行った。

- 1) ヒト臍帯血造血幹細胞の増幅のためのヒト・ストローマ細胞の調製とサイトカイン固定化材料の開発
- 2) 胚性幹 (ES) 細胞の増幅システムの開発
- 3) 再生医療用の新しい生体材料の開発
- 4) 診断用マイクロチップの開発

## 2. 平成 16 年度の研究成果

常勤研究員 5 名を中心に神奈川サイエンスパーク (KSP) 東棟 3 階を拠点に研究活動を行った。ヒト臍帯血・造血幹細胞については日本赤十字社東京都血液センターならびに埼玉医科大学・池淵研二教授 (非常勤研究員) と共同で、サル ES 細胞については東京都立科学技術大学・宮本寛治教授 (非常勤研究員) と共同で研究を行った。再生医療用の生体材料開発と診断用バイオチップの開発は、理化学研究所 (プロジェクトリーダーが主任研究員を務める) と共同で研究を行った。

### 1) ヒト臍帯血造血幹細胞の増幅のための固定化ヒト・ストローマ細胞系およびサイトカイン固定化材料の開発

(野川誠之)

白血病治療は、骨髄移植、末梢血幹細胞移植から、臍帯血移植へと展開されてきた。臍帯血は、これまで廃棄されていたものを使用できる上に、組織適合性が寛容で冷凍保存も可能で今後の発展が期待されている。しかし一般に採取可能な臍帯血からは充分量の造血幹細胞が得られず、成人の治療には困難が伴っている。そこで、本プロジェクトでは、造血幹細胞が増殖しやすい環境を、人工材料を用いて構築し、バイオリアクターとして開発することを目的としている。

平成 16 年度は、新たに不死化したヒト間葉系幹細胞をフィーダー細胞として調製した。一方、そして、フィーダー細胞を選択し、これを人工基材表面に固定化できる方法を開発し、固定化サイトカインによる血液細胞の増幅活性を調べた。さらにフィーダー細胞の膜タンパク質である Notch リガンドの固定化も行い、その活性についても検討を行った。

また、幹細胞増殖に重要とされる転写系タンパク質の細胞内への導入を行い、増幅率を向上させることができた。

### 2) ES 細胞培養のための基材開発

(金野智浩)

マウス ES 細胞は 1981 年に樹立され、現在ではトランスジェニック・マウスの作成などの広く用いられている。

本プロジェクトでは、特にバイオマテリアルがマウス ES 細胞の増殖に与える影響について詳しい検討を行った。ES 細胞が接着しにくい材料を用いることにより、特定の胚葉体 (EB) 形成ができることを明らかにし、簡単に EB 形成ができる手法を考案した。また、ES 細胞培養でもフィーダー細胞が重要な働きを担っているため、これをフィーダー細胞を用いない培養法の確立を目指し、化学固定化フィーダー細胞を調製し、その性能を評価した。

また 1996 年にクローン羊が生まれ、1998 年にはヒト ES 細胞が樹立され、今年になって終にヒト ES 細胞のクローニング (核移植) が成功した。しかし一方で、ヒト ES 細胞培養で動物由来血清やフィーダー細胞を使用している場合、ヒト型でない修飾がされてしまうという報告も今年明らかにされた。そのため、本プロジェクトでは、ヒト ES 細胞用 (実際の実験にはサル ES 細胞を使用) に、ヒト由来 (羊膜上皮) 細胞をフィーダーに用いることに成功してきた。本年度は特に、その使いやすさを高める検討を行った。

### 3) 再生医療用の新しい生体材料の開発

(北嶋隆、蓮田寛和)

再生医療では、幹細胞と、成長因子、そしてマトリックスが重要な因子となることが知られている。そこで本プロジェクトでは、成長因子とマトリックスを組み合わせた新しい再生医療材料の開発を本年度からの新しい課題として研究を行った。具体的には、成長因子を化学的に結合した材料の創成、生物学的 (タンパク質工学) に結合した材料の創成に各々行った。

化学的にマイクロパターン状に固定化させた血管内皮細胞成長因子領域上では血管内皮細胞の選択的な増殖とマイクロパターン形成が観測された。これにより、大きな組織でも、あらかじめ設計したパターンに血管内皮細胞を成長させ、毛細血管を形成させて組織への栄養補強を可能にできると考えられる。

また、タンパク質工学で作成した結合性成長因子は、マトリックス上に長時間存在することで、生物活性を高めることがわかった。これまでは、成長因子とマトリックスの複合体を作成して、成長因子の徐放による治療効果の長期化を行ってきたが、さらに長期間の治療効果が期待されるようになった。

### 4) 診断用マイクロチップの開発

(大村馨、大村美由紀)

最近のバイオテクノロジーは、材料の微細加工やナノテクノロジーの発展により新しい展開を生み出している。DNA マイクロアレイやプロテインチップの出現は、バイオテクノロジーと微細加工技術の融合の賜物である。本プロジェクトのキイテクノロジーの一つである光固定化

法を用いて、多種類の抗体、タンパク質、糖化合物をマイクロアレイしたバイオチップの製造法ができることがわかった。本年度は、この技術を応用してアレルギー診断用チップの開発を目指した研究を行い、評価を行った。また、表面プラズモン共鳴 (SPR) や水晶発振子マイクロバランス (QCM) を測定する際のチップとしての利用の可能性も現れ、製品化に向けた検討を行った。

この研究は、平成 15-17 年度の科学技術振興機構の「大学発ベンチャー創出事業」に採択され、開発を行った。

# 再生医療のための血管新生因子融合蛋白の開発

北嶋 隆

## 1. はじめに

組織を再生させるためには、構成する「細胞」と、それを増やした機能分化させるための「因子類」(サイトカイン・増殖因子) さらに細胞の「足場となる材料」(細胞外マトリックス)の3つが重要な要素である。組織再生を目指す治療法においては、損傷した組織の細胞を増やすことが第一に必要なため、「増殖因子類」と「足場材料」を組み合わせた培養基材の開発が求められている。このための技術として、本プロジェクトでは、これまでに培養器表面に、増殖因子を共有結合で固定化する方法を確立してきた(蓮田らの報告書参照)。固定化により、因子類を単に培養液に繰り返し添加するの比べ、少ない用量で活性が持続するという利点がある。ただし、このような化学的な固定化方法は、蛋白質である「増殖因子」に対して少なからず分子構造の変化をもたらすため、活性の低下が起こる可能性がある。また蛋白分子が基材に対して固定化される方向はランダムとなるため、活性部位が固定化されて、活性を示さない分子が生じる可能性もある。

我々は、化学的な固定法とは別に、「増殖因子を遺伝子工学的に改変し、培養基材に対して強固に結合する性質を付与する」という方法も検討してきた[1]。具体的には、コラーゲン結合性のアミノ酸配列と増殖因子類とを融合させた分子を設計してきた。このような融合蛋白は、コラーゲン/ゼラチンがコートされた表面であれば強固に結合可能である。しかも結合はコラーゲン結合性のアミノ酸配列を介して行われるため、増殖因子自体は基材とは結合しておらずその活性に影響が現れない。これまでに設計製造したものとして上皮成長因子(EGF)[2]など幾つかのものがある。本研究では、この方法をもとに血管新生因子融合蛋白質を製造し、その効果と再生医療における有用性について検討した。

### 1.1 血管新生因子

本プロジェクトでは、これまで特に血液細胞を増殖させる技術の開発進めてきたが、心・血管系の疾患もその重篤さ、患者数の多さから、再生医療の大きな研究対象の一つとして認識している。

血管病変の主なものは、血管の閉塞・消滅などによりその下流の組織への血液供給が途絶えることによる。その結

果として組織の壊死が起こる。心筋への血液供給を担っている冠動脈が閉塞する場合は、とくに重大で、心筋の壊死から心筋梗塞、心不全につながる。こうした病変に対して、血管新生因子は、内皮細胞を増殖させ、また新たな血管を誘導する働きがあることから、その治療への応用が期待されている。とくに、損傷血管の修復(内表面を覆う内皮細胞の再生)あるいは、虚血部位に新しい血管を誘導する(血管新生)ための治療法が検討されてきている。

主要な血管新生因子として、VEGF(血管内皮細胞増殖因子)、HGF(肝増殖因子)、FGF(線維芽細胞増殖因子)が知られている。

### 1.2 コラーゲン結合性融合蛋白

血管新生因子の効果については動物実験で確かめられてきている。しかし因子の安定性、効果持続性の点で十分な効果を得るためには、大量にあるいは、頻回に投与する必要があると考えられる。また、蛋白としての血管新生因子の代わりにその遺伝子を投与する方法も検討されているが、遺伝子の導入効率が高くないため、同じく多量に投与する必要がある。遺伝子導入から蛋白発現までの時間経過が必要なため、即効性の点でも課題が残る

これらの課題を解決する手段として、我々は血管新生因子をコラーゲン結合型融合蛋白質に改変する試みを行ってきた。今回は、HGF(肝増殖因子)をコラーゲン結合型に改変した融合蛋白質が、血管病変に対してどのように応用できるか検討してきた結果を報告する。

(なお、VEGF、FGFについても製造は可能となっており、同様の検討を進めている)。

## 2. 実験と結果

### 2.1 コラーゲン結合性 HGF 融合蛋白の製造

以下に融合蛋白質の構造を示す(図1)。



図1 コラーゲン結合性 HGF の構造

この融合蛋白質を製造するために、まず、コラーゲン結合性配列としてファイブロンネクチン(Fn)のコラーゲン結合性アミノ酸配列(FNCBD)をコードする遺伝子と HGF のアミノ酸配列をコードする遺伝子を融合させ、これを発現ベクターに組み込み込んだ。この発現ベクターを、昆虫細胞 Sf9 に導入することで、細胞外に多量に分泌される HGF 融合蛋白質を得る事ができた。精製はヘパリンアフィニティーによって行った。

この融合蛋白質の基本的な特性として以下の点を確認した。

1) 用量依存的にコラーゲンに結合する活性を持つ。その結合性は強固で、高塩濃度でも解離することは無かった。コラーゲンから解離させるためには、8 M 尿素のような変性剤が必要であった。

2) 内皮細胞に対する増殖活性は、天然型のそれと同等か上回っていた。

3) 増殖活性は安定であり、例えば 37 °C に保管した場合でも、少なくとも 1 週間はその活性の低下が認められず、培地に添加しても保管前とほぼ同等の活性を示した(図 2)。

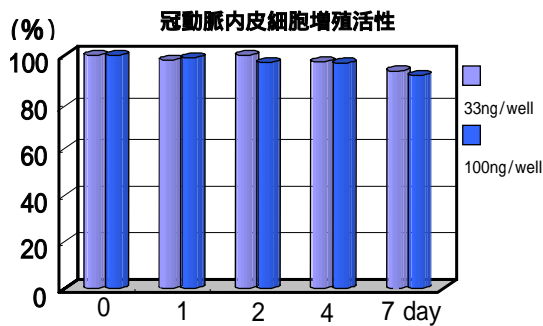


図 2 活性の安定性

従って、設計の通り、強固なコラーゲン結合性と、安定な内皮細胞増殖活性を併せ持つ融合蛋白質が製造されていることが確認された。

## 2.2 HGF 融合蛋白質を固定化した培養基

HGF 融合蛋白質(Fn-HGF)は、コラーゲンに固定化させた状態でも活性をしめした。図 3 に見られるように、融合 Fn-HGF を固定化した培養基に、内皮細胞(冠動脈由来)

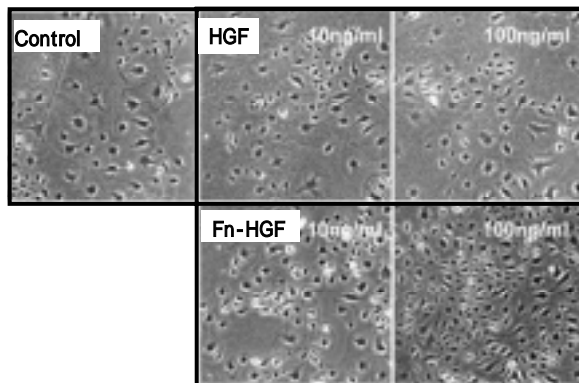


図 3 固定化された HGF 融合蛋白質の増殖効果

を播種すると、固定化量に対応して増殖が認められた(5日後)。一方 HGF のコラーゲンへの結合はわずかであるため、内皮細胞は 5 日経過後でも、播種したままの数であった。

コラーゲンに固定化されたこの融合蛋白質は、少なくとも 1 週間は 60% 以上の増殖活性を持続して示した。また、増殖した内皮細胞の上にコラーゲンゲルを重層すると、血管網に類似した形状の内皮細胞ネットワークを形成させることができた。その形状は、HGF 融合蛋白質の増殖効果が持続することによって細胞数が増えたため、より複雑になっていた。

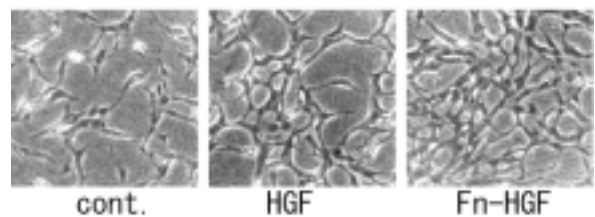


図 4 血管内皮細胞のネットワーク形成

これらの結果から、コラーゲンコートをした表面に、HGF 融合蛋白質を結合させた容器は、血管内皮細胞を増やすための培養基・バイオリクターとして応用できる可能性があると考えられる。

以上の検討では、すでに内皮細胞に分化した細胞(臍帯血内皮細胞や冠動脈内皮細胞)を用いているが、今後はいわゆる幹細胞から、内皮細胞の前駆細胞を誘導し、かつ、大量に増幅する効果をもつかを明らかにしていく必要がある。

臍帯血には造血幹細胞の他に、種々の細胞に分化しうる細胞が含まれていることが明らかになりつつあり、造血系の再生医療の他にも応用が期待される。内皮細胞への分化能をもつ細胞の存在も報告されている[3]-[5]。我々も、臍帯血から、造血幹細胞(CD34 陽性細胞)を純化する際に残った CD34 陰性の細胞を内皮専用培地で長期間、培養すると、内皮細胞が出現することを確認している。専用培地には血管新生因子(VEGF、FGF など)が含まれているが、これらの因子をコラーゲン結合型に改良することでより少ない用量で培地交換が不要な、血管新生・再生治療用の新しい培養基を作れる可能性があると考えている。

すでに、骨髄、臍帯血の細胞をそのまま虚血部位に移植するだけでも血管新生が誘導され一定の血流改善があり、壊死を防ぐ効果があるとの報告もなされている[6][7]。上に述べたような HGF 融合蛋白質(あるいは他の血管新生因子)を固定化した培養器で、内皮前駆細胞だけを分化・増幅できれば、より少ない骨髄細胞あるいは臍帯血などの採取量で負担の少ない細胞移植治療が実現されることが期待される。

## 2.3 自己再生能をもつ人工血管の開発

以上の様に、HGF 融合蛋白質は、治療用の細胞を増殖



させる培養基に応用する可能性が見えてきたが、固定化させる基材を培養容器ではなく、体内に移植する材料に代えるという展開も考えられる。

代表的な循環器系の疾患である、冠動脈の閉塞に対する治療法としてステントやバルーンによる拡張術がある。しかしこれらの方法も、冠動脈自体が劣化している場合には適用が難しい。このため、他の部位の生体血管を切り出し、冠動脈として置き換える治療法(バイパス手術)が行われている。しかしこうした患者の場合、他の部位の血管も脆弱であることや、繰り返しの治療で採取できない場合などがあり、最終的には人工材料で作られた血管が必要になってくる。ただし、現状では、冠動脈のような内径3 mm以下に適用できる人工血管は実用化されていない。これはどのような人工材料も生体内ではやがて血栓が付着し、小口径であるが故に早期に閉塞してしまうためである。

そこで我々は、移植後早期に人工血管内面に内皮細胞が生着して被覆する機能を人工血管に持たせることが解決になると考えた。つまり、自らがその内表面を自己再生するような人工血管である。

内皮細胞は生体血管において、種々の機能を持つが、血栓付着を防ぐ機能(抗血栓性)が重要な機能の一つである。このような細胞を早期に移植血管の内面に生着させる事ができれば、長期間閉塞しない(開存する)血管になると予想される。そこで人工血管表面が早期に内皮細胞で被覆させるために、HGF 融合蛋白を固定化することを検討した。

HGF 融合蛋白質は、コラーゲンコートされた表面であれば、どのような材料にでも固定化が可能である。残念ながら、小口径用に開発されている人工血管は ePTFE (延伸テトラフルオロエチレン) 製か、ポリウレタン製である。これらの材料表面は撥水性が強く、コラーゲンコートが困難であった。そこで一旦この基材表面に両親媒性のポリマー PAU をコートした。このポリマーはポリウレタンとポリアミノ酸の共重合体である[8]。ウレタン部分が人工血管基材に接着し、ポリアミノ酸の部分がコラーゲンに対する親和性を示す。このコーティングにより、コラーゲンを安定にコートすることが可能となった。少なくとも2週間程度はコラーゲンコートの脱落が無いことが確認された。

この結果をうけて、図5のような構造をもつ人工血管を作製した。基材は ePTFE 管 (Goretex 社製) で PAU とコラーゲンが順次コートされたものであり、さらに HG 融合蛋白がコラーゲンに固定化されている。

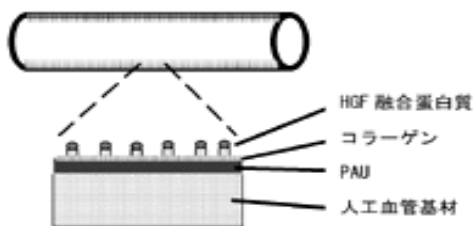


図5 血管新生因子固定化人工血管

固定化されたHGF融合蛋白は、毎分100mlの流速

下でも、2週間脱離しないことを確認した(図6;固定化直後(0)および、1,7,14日間、流液中においた血管の一部を、抗HGF抗体で染色。染色の程度が固定化直



図6 固定化HGFの人工血管上の安定性

後から殆ど変わっていない)。

またこの人工血管の上で内皮細胞を増殖させることが可能であることも確認した。

この様にして設計された人工血管を、イヌ下肢大腿動脈に置換移植した(内径3mm、長さ30mm)。移植後1週間では、血管内面に内皮細胞は確認されなかったが、2週間では、上流側吻合部より3mmまで内皮細胞が進展してきた。さらに4週間では、移植血管の中央部において内皮細胞の存在が確認された。(図6は端より15mmの切片像で、矢印が内皮細胞)。一方コラーゲンコートのみあるいはPAUコートのみの場合には、中央部には内皮細胞は認められなかった。

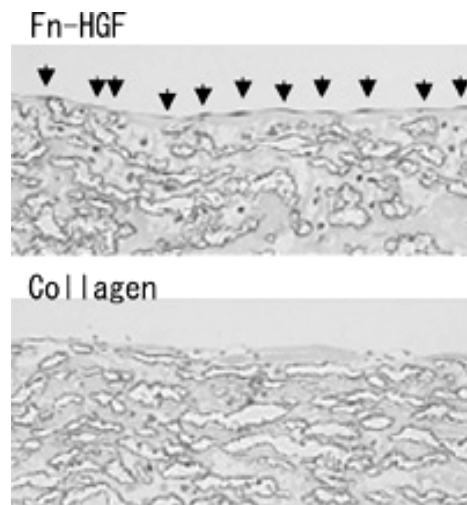


図7 HGF固定化血管(Fn-HGF)における内皮再生

4週間後の人工血管全長に対して10等分した部位それぞれの切片像から、内皮細胞の存在割合を計測し、被覆率として表すと図8のようになった。対照の人工血管では殆ど内皮化が進んでいないのに対し、HGF固定化人工血管では、全長にわたり内皮細胞による被覆が進んでいることが示された。すなわち、HGFを固定化した人工血管は自らのその表面に内皮細胞層を形成させる機能(つまり自己再生能)を持つものといえそうである。

内皮細胞の進展は両端の生体側血管から進展してくるだけでなく、血流中を循環している内皮あるいはその前駆細胞が、付着し人工血管上で生育したものと推定される。

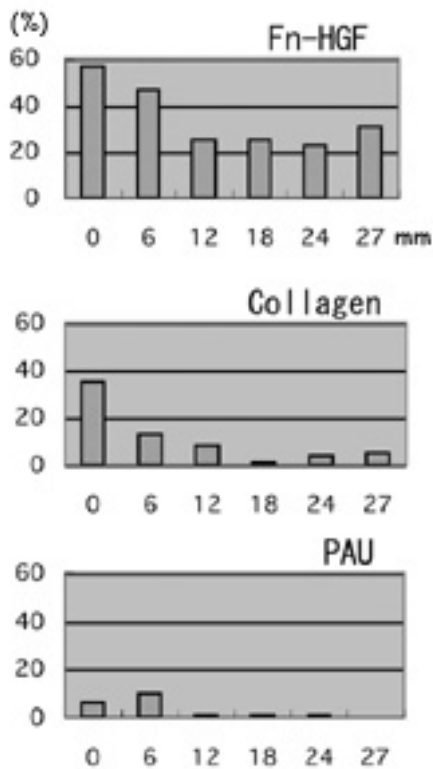


図8 内皮細胞による被覆率

以上のようにHGF固定化の効果は期待できるものであるが、問題点が無いわけではない。現状では、移植直後の血栓付着から閉塞してしまう例が半数におよび、4週後まで観察できた例は少ないのである。ただし閉塞する割合はHGF固定化血管でも対照の血管でも同頻度でおきていた。つまり血管新生因子の固定化で移植直後の血栓付着まで防ぐことはできなかったのである(短期間に内皮細胞が増えることはないので当然ではあるが)。今後は、抗凝固剤の投与など、初期血栓を抑制する方策を組み合わせた方法が必要となってくると考えている。

### 3. 考察と今後の展開

以上、増殖因子をコラーゲン結合性に改変した融合蛋白質の効果およびその応用について検討してきた。再生医療の分野で増殖因子が重要であることは以前より認識されてきたところである。しかしながら、蛋白質としての不安定性のため(半減期が短く)活性が持続せず、実際に医療応用が進んでいない。また目的とする部位以外にも効果を及ぼす副作用の問題点もあった。

コラーゲン結合性にすることでこれらの問題点を解決できる可能性があると考えられる。第一に増殖因子としての安定性を高めることができた(効果の持続性)。またコラーゲンコートが可能な基材であれば固定化することが可能である。そして固定化するには単にコラーゲンコート上に添加するだけでよく、蛋白質の構造や活性に影響を与えることが少ないという利点をもつ。こうしたことから、以下の可能性が示されたと考える。

- 1) 治療用細胞を増殖させるための培養器開発への応用。
  - 2) 自己再生能をもつ移植材料への適用。
- またこれに加えて、
- 3) 薬剤的な応用も可能である。なぜなら組織の損傷の際にはコラーゲンが露出するため、コラーゲン結合性に改変した因子は、損傷部位に特異的に結合し、その部位のみで効果を発揮すると考えられるからである(難治性皮膚創傷に対する効果として検証済み[9])。

本報告書では、HGF融合タンパク質を、心・血管治療へ応用する例についてのみふれたが、HGFについては、造血幹細胞の増殖にも関わっているという報告がある。コラーゲン結合性に改変する方法は、血管新生因子以外にも適用可能であり、現在、特に造血幹細胞の増幅にかかわる因子類の遺伝子工学的改変を進めている。

次年度これらを組み込んだ幹細胞培養基の検討を進めていく予定である。

#### 【参考文献】

- [1] 北嶋 伊藤、再生医療 2,53, 2005
- [2] Ishikawa ら, J.Biochem. 129,627,2001
- [3] Hur,ら, Arterioscler Thromb Vasc. Biol., 24, 288, 2004.
- [4] Yoo ら, Stem Cells,21,228,2003
- [5] Fan ら, Acta Pharmacol Sin 24, 212, 2003
- [6] Tateishi-Yuyama ら, Lancet 360, 427,2002
- [7]Assumus ら, Circulation 106,63, 2002
- [8]Uchida ら, J. Polymer Sci A 37,383
- [9]Ishikawa , ら Artificial Organ 27,147,2003

# 血管内皮成長因子を固定化した血管形成のための基材

蓮田 寛和・北嶋 隆

## 1. はじめに

血管の構築は、再生医学において重要な組織再生のひとつに挙げられる。臓器の構成や再生において、毛細血管をはりめぐらせることは、栄養分の補給やガス交換のために必須で血管内皮細胞の成長制御は本質的な問題となる。血管内皮成長因子(VEGF)は、Gospodarowicz ら<sup>1)</sup>と Ferrara と Henzel<sup>2)</sup>によって発見された分子量が約 46KDa で、血管内皮細胞に作用するタンパク質として知られている。

本研究では、VEGF を紫外線照射によって固定するゼラチンを用いて(マイクロパターン状に)固定化した基材を作成し、その基材を用いてヒト臍帯血管内皮細胞(HUVECs)の培養を行い、成長制御と血管形成の誘導を試みた。

## 2. 実験と結果

### 2.1. VEGF の固定化

紫外線照射により固定するゼラチン(Az-gel)の合成<sup>3)</sup>を行い VEGF の固定化した。ヒト組換え VEGF<sub>121</sub>、組換えヒト VEGF レセプター-2 を R&D システム社より購入した。

細胞培養用プラスチック上または、スライドガラス、カバーガラスをオクタデシルトリエトキシシラン(ODS)でシランカップリング処理した上に Az-gel と VEGF を混合してキャストした。その後、乾燥し光マスクを用いてマイクロパターン状もしくは、光マスクを用いずスポット状に紫外線照射して固定化した。(図 1)

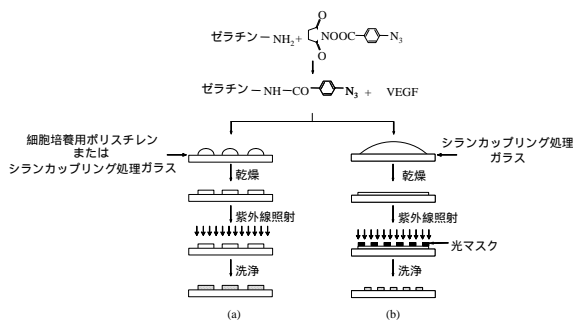


図 1 Az-gel を用いた VEGF の固定化方法

(a) スポット状固定化; (b) マイクロパターン状固定化

固定化 VEGF の確認を行うために、VEGF レセプター-2 (KDR/Fc)との相互作用を免疫染色法で確認した。70%エタノール洗浄した固定化 VEGF を VEGF レセプター-2 と反応させ後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ活性のある 2 次抗体と反応させて DAB 溶液で染色した。(図 2) コントロールとして 70%エタノール無処理の固定化 VEGF を用いた。

その結果、固定化 VEGF はエタノール処理、無処理の両方で固定化されていること確認できた。また、VEGF の

固定化量依存的に VEGF レセプターとの結合が観察され、Az-gel を用いて固定化された VEGF が VEGF レセプター-2 と相互作用していることが確認された。

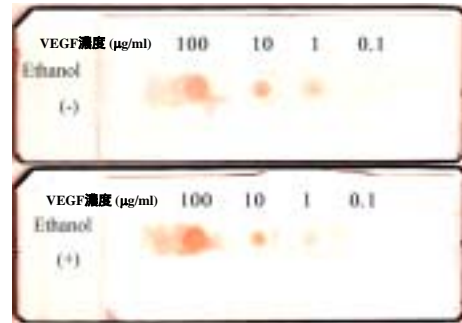


図 2 固定化 VEGF の染色

### 2.2. VEGF の固定化基材を用いた臍帯血管内皮細胞培養

臍帯血管内皮細胞 (HUVECs)は、BME-2-MV 培地を用いて培養していた細胞を使用した。細胞培養用プラスチックに VEGF と Az-gel の濃度を変えてスポット状に固定化した基材上で HUVECs の培養を行った。(図 3)

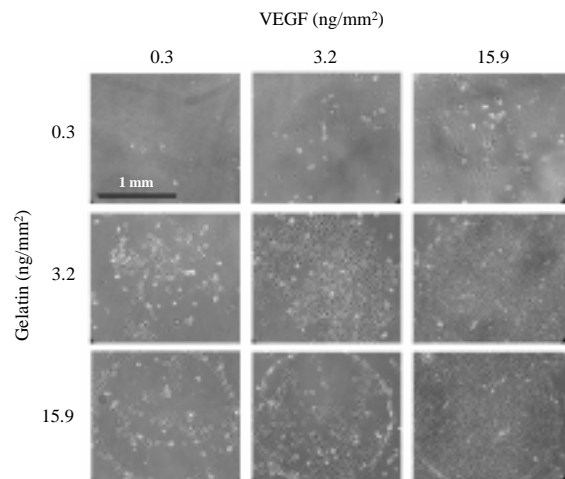


図 3 Az-gel, VEGF の固定化量の違いによる HUVECs の培養

HUVECs を播種して培養 7 日後、VEGF の固定化量が 0.3ng/mm<sup>2</sup>、Az-gel の固定化量が 3.2ng/mm<sup>2</sup> で細胞の増殖がみられたが、0.3、15.9ng/mm<sup>2</sup> の場合、Az-gel が少ない、または多すぎるために細胞の増殖は見られなかった。VEGF の固定化量を多くすると Az-gel 固定化量が 0.3ng/mm<sup>2</sup> で増殖は見られなかったが、その他の固定化量で増殖が見られた。

Az-gel の固定化量を 15.9ng/mm<sup>2</sup> にして VEGF 固定化量を 0.3,3.2,15.9ng/mm<sup>2</sup> にした際の HUVECs の固定化スポットの被服率を位相差顕微鏡によって算出した結果を図 4



に示した。

VEGF の固定化量に依存して被覆率は高くなり、 $15.9\text{ng}/\text{mm}^2$  の固定化量のストッポ被覆率は 7 日後のほぼ 100% になり 10 日目まで活性が維持されていた。0.3 および  $3.2\text{ng}/\text{mm}^2$  の固定化量の被覆率は経時的に上昇した。

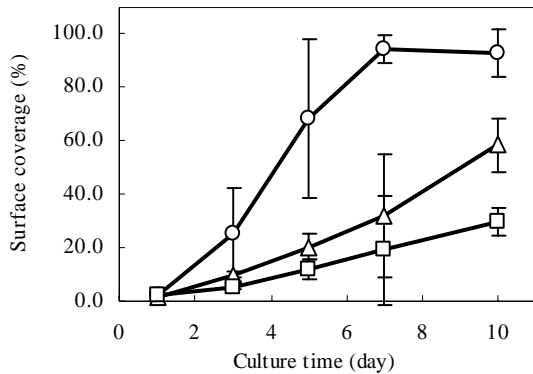


図4 VEGF 固定化スポットの HUVECs の被覆率  
VEGF 固定化量 ( ,0.3; ,3.2; ,15.9ng/mm<sup>2</sup>)

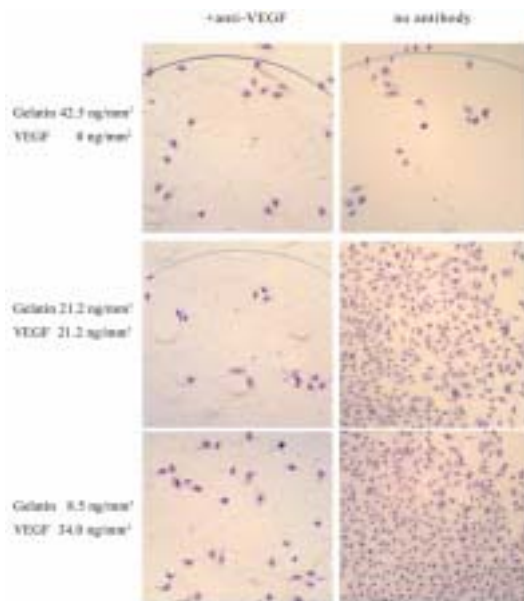


図5 固定化 VEGF 基材に抗 VEGF 抗体存在下での HUVECs の培養

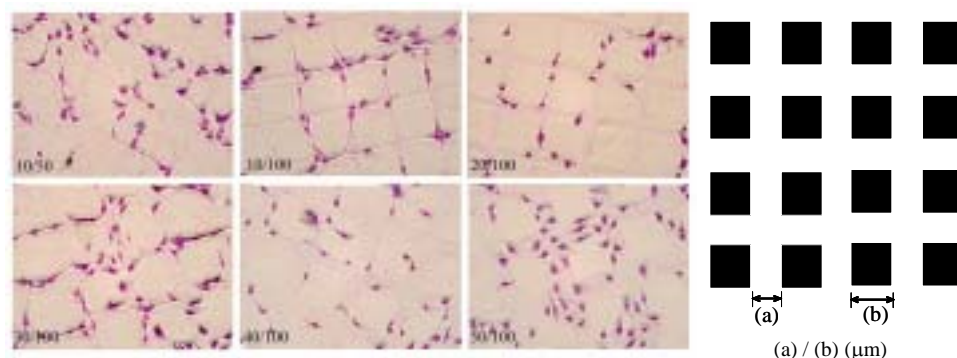


図6 シランカップリング処理したカバーガラス上にマイクロパターン状 VEGF 固定化基材上での HUVECs の培養

抗 VEGF 抗体を固定化 VEGF に作用させた後に HUVECs の培養を行った。(図 5) その結果、抗 VEGF 抗体で処理した固定化 VEGF では HUVECs の増殖が見られず、抗 VEGF 抗体で未処理の固定化 VEGF では HUVECs の増殖が確認された。

血管形成を誘導のために、VEGF をマイクロパターン状に固定化した。(図 6) その結果、固定化領域の幅が  $30\mu\text{m}$  で非固定化領域の幅  $100\mu\text{m}$  の時、平面的であるが最も管形成が促進された。

### 3. 考察および今後の展望

本研究では、VEGF の固定化を行い、HUVECs の成長制御と血管形成を試みた。紫外線照射によって固化するゼラチンを用いて ODS 処理したガラスおよび細胞培養プラスチック上に VEGF の固定化を可能にした。固定化した VEGF は、エタノール処理を行っても VEGF レセプターと相互作用していることが確認されたことから、この固定化方法を用いたタンパク質の固定化は有用な方法であることが示唆された。

VEGF の固定化基材上で HUVECs を培養したところ、濃度依存的に細胞の増殖が見られた。マイクロパターン状に VEGF を固定化し、血管形成を試みた結果、固定化領域と非固定化の幅を調節することにより血管内皮細胞の成長を制御することに成功した。しかし、本研究で作成された VEGF の固定化基材では、平面的な細胞の培養しか行えず、立体的な血管形成までには至らなかった。今後、この VEGF 固定化基材を用いた立体的な培養を行い血管内皮細胞の血管形成を目指していきたい。

### 参考文献

- Gospodarowich D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:7311-7315
- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1989;161:851-858
- Ito Y, Hasuda H, Yamauchi T, Komatsu N, Ikebuchi K. Immobilization of erythropoietin to culture erythropoietin-dependent human leukemia cell line. Biomaterials 2004;25:2293-2298

# ヒト胎盤細胞を利用したヒト造血幹細胞増殖用

## フィーダーの開発

中川和浩、山本幸弘、山田知明、宮本寛治

### 1. はじめに

我々はこれまで、ヒト胎盤細胞(ヒト羊膜細胞、ヒト絨毛膜板細胞)がフィーダー細胞として利用できるか検討を行ってきた。その結果、ヒト胎盤細胞は霊長類 ES 細胞(カニクイザル ES 細胞)の未分化増殖能を有していることがわかった。ヒト胎盤由来のフィーダー細胞には、本来医療用廃棄物として処理されているため、使用の際に倫理的な問題が少ない。ヒト ES 細胞培養の際に、ヒト ES 細胞への動物性病原体感染等の危険性を防ぐことができる。

これらの研究結果より、ヒト胎盤細胞が ES 細胞だけでなく、ヒト体性幹細胞に対しても特異な機能を有する可能性があると考えた。そこで、本研究では、体性幹細胞の一例として、末梢血、臍帯血液から純化したヒト造血幹細胞に対するヒト胎盤細胞の支持能力を検討し、ヒト羊膜細胞フィーダーを利用した培養法の開発を試みた。

### 2. 実験

#### 2.1 ヒト胎盤細胞の分離、培養

ヒト胎盤細胞は東京都立科学技術大学及び病院の倫理委員会の承認後、提供者等のインホームドコンセントを得て、提供されたヒト胎盤から外科的に羊膜と絨毛膜板を分離し、その後、0.025% trypsin-EDTA 溶液と 0.05% collagenase type 溶液を用いて細胞を単離した。単離した胎盤細胞をコンフルエントになるまで数日間培養した後、フィーダー細胞として使用した。

#### 2.2 ヒト造血幹細胞の純化

ヒト造血幹細胞は提供されたヒト末梢血液 3 検体(YM-1、KH-1、SH-1)と、ヒト臍帯血液 3 検体(CB618、CB625、CB924)から単核球を分離した後、免疫磁気ビーズ法を用いて各検体からそれぞれ CD34 陽性細胞を純化した。

#### 2.3 ヒト造血幹細胞のヒト胎盤細胞フィーダーとの共培養

ヒト羊膜細胞、ヒト絨毛膜板細胞フィーダー上でヒト造血幹細胞を数日間共培養し、ヒト胎盤細胞の支持能力を検討した。培養培地は、KSR を添加した無血清培地(X-VIVO 10)を使用した。検討項目として、共培養後の細胞数のカウントによる増殖能の検討と細胞表面マーカーによる細胞評価を行った。

#### 2.4 ヒト胎盤細胞フィーダーとの共培養後の細胞の樹状細胞(Dendritic Cell: DC)への分化誘導

ヒト羊膜細胞フィーダー上において共培養された後の細胞の分化能について検討を行った。本研究では、樹状細胞(Dendritic Cell: DC)への分化誘導を行い、共培養後の細胞が DC への分化能を有しているのかを細胞の形態学的観察と細胞表面マーカー検査により検討した。

### 3. 結果

ヒト羊膜細胞フィーダー(図1)との14日間の共培養により、末梢血液由来造血幹細胞は15~23倍程度に有意に増殖することが判明した(図2)。また、臍帯血液由来造血幹細胞においても同様の結果を得た。一方、絨毛膜板フィーダーと共培養とフィーダーフリーの条件では、ヒト造血幹細胞に対する明らかな変化は確認されなかった。



図1 ヒト羊膜細胞フィーダー

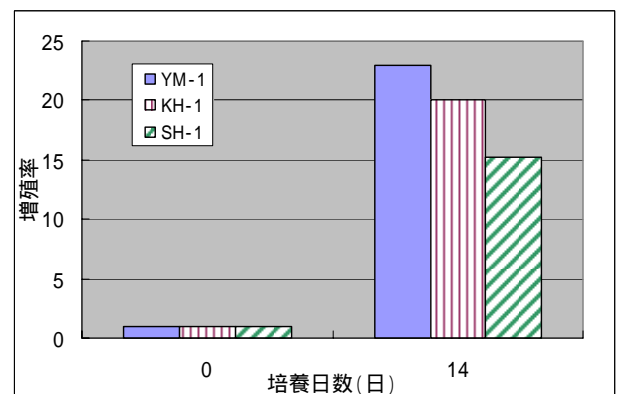


図2 ヒト末梢血液由来造血幹細胞の増殖率

ヒト羊膜細胞フィーダーとの共培養後に増殖したヒト造血幹細胞由来の細胞の細胞表面マーカー検査から、CD34 陽性細胞の減少が確認され、造血幹細胞から分化していることが判明した。また、種々の細胞表面マーカーとサイトグラムにより単球系細胞に分化していることが判明した(図3)。

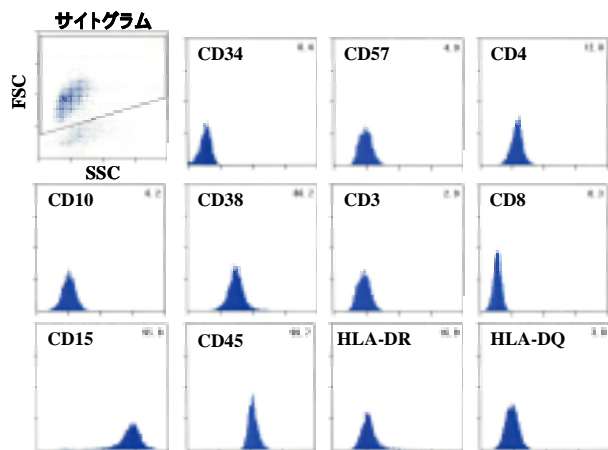


図3 共培養後の細胞表面マーカー検査結果 (YM-1)

DC 分化誘導 14 日後の細胞の形態学的観察において、樹状細胞に特有な突起を確認することができ、樹状細胞に分化したことが判明した(図4)。また、分化誘導後の細胞表面マーカー検査によっても樹状細胞へと分化したことが確認できた(図5)。

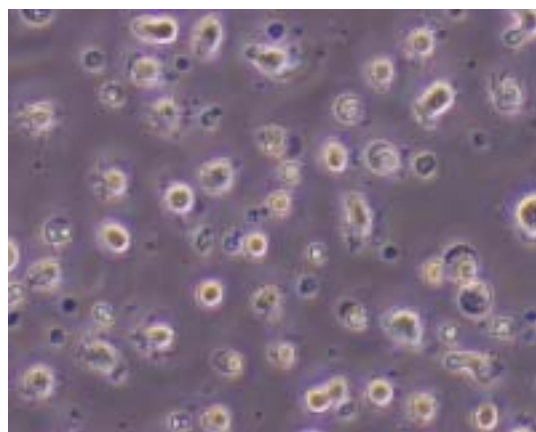


図4 DC 分化誘導後の細胞形態 (YM-1)

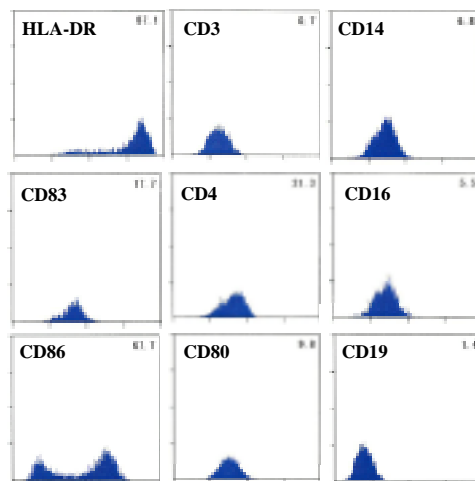


図5 DC 分化誘導後の細胞表面マーカーの検査結果 (YM-1)

#### 4. 考察と今後の展望

これらの結果は、ヒト羊膜細胞フィーダーがヒト末梢血液、臍帯血液造血幹細胞を単球に分化増幅させる能力を有していることを示している。また、ヒト羊膜細胞フィーダーによって分化増殖した細胞は、DC 分化誘導培養により DC への分化能を持っていることを確認できた。これらのことから、ヒト羊膜細胞フィーダーがヒト造血幹細胞を DC への分化能を有した単球前駆細胞に分化、増殖させる因子を培養培地中に分泌している可能性が考えられる。このヒト羊膜細胞フィーダーの分泌している因子を分画し、同定することができれば、フィーダーレスな単球細胞を生産する培養システムの確立に利用することができると考えられる。今後、ヒト羊膜細胞の持つヒト造血幹細胞を単球に分化増殖させる因子の同定を試みる予定である。

#### 【参考文献】

1. Miyamoto K, Hayashi K, Suzuki T, Ichihara S, Yamada T, Kano Y, Yamabe T and Ito Y. Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells. *Stem Cells*, 22: 3-10, 2004
2. 中川和浩, 山本幸弘, 山田知明, 宮本寛治, 小暮勝広, 山辺敏雄, 伊藤嘉浩. ヒト胎盤由来細胞を利用したヒト造血幹細胞増殖用フィーダーの開発. 再生医療 第4回日本再生医療学会総会プログラム・抄録. Vol.4, Suppl, 214, 2005

# Notch-Ligand を固相化した培養基材上での造血細胞増幅

野川 誠之

## 1. はじめに

細胞機能を制御できるサイトカインなどの液性因子は通常、培地に添加して用いる。既に我々は、高分子を利用して固相化した液性因子が細胞増殖活性を持つことを明らかにしている。さらに、この技術を用いて種々のタンパク質をマイクロアレイ化することでセルチップとして応用できた<sup>1,2)</sup>。造血細胞への適用も可能であり、エリスロポエチン(EPO)を固相化したアジド化ゼラチン上で、EPO 固定領域のみでのヒト白血病由来細胞株 UT7-EPO の細胞増殖を観測した<sup>3)</sup>。また、ヒトイムノグロブリンのFc部位をG-CSFと結合させたキメラタンパク質G-CSF/Fcは、ProteinGプレートに高い配向性で固定化され、G-SCF依存性白血病由来細胞株FDGR3細胞を効率よく増殖させることができた。

本研究では、生理活性物質として造血幹細胞の増幅に有効であることが知られているNotch-ligandに注目し<sup>4)</sup>、Notch-ligandのキメラタンパクであるdelta-1を固相化した基材上でのヒト白血病由来細胞株TMD-7<sup>5)</sup>と臍帯血由来CD34<sup>+</sup>の培養を試みた。

## 2. 実験と結果

### 2.1. notch-ligand 依存性細胞株の増幅

ヒト白血病由来細胞株TMD-7はNotch-ligandを吸着させた培養プレート上で高い細胞増殖活性を示す。Notch-ligandのdelta-1は末端にヒトイムノグロブリンのFc部位を持つキメラタンパクであり、抗ヒトIgG(Fc)抗体をあらかじめ吸着させたプレートにdelta-1を添加して固

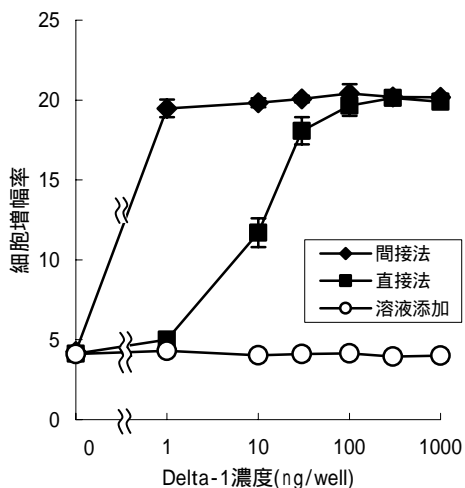


図1 TMD-7細胞増殖におけるdelta-1の効果

相化することで(間接法)高い配向性と高密度固定化が期待される。そこで、delta-1を間接法により固相化した基材上でのTMD-7の細胞増殖活性をMTT法により評価し、delta-1を通常の液体培地に添加した場合、培養プレートに直接吸着させた場合と比較した。図1に示すように、半接着細胞であるTMD-7細胞は溶液で添加した場合には細胞増幅効果は観察されず、固定化した場合のみで濃度依存的に細胞が増殖した。細胞の形態を観察したところ、TMD-7はdelta-1が固相化されていた場合にのみ非常によく細胞が伸展しており、溶液添加の場合にはわずかな伸展しかなかった。さらに、キメラタンパクの固定化法を比較すると、間接法で固相化したほうが直接法よりも数十倍程度低濃度で細胞増殖を示しており、間接法によるキメラタンパクの固相化は細胞増殖にとって非常に効率のよい方法と考えられた。

### 2.2. 臍帯血由来CD34<sup>+</sup>の増幅

次に、造血幹細胞を含む集団であるCD34<sup>+</sup>細胞の増幅に上記のTMD-7細胞培養系を適用した。CD34陽性細胞は臍帯血から免疫ビーズ法により純化し、1%ウシアルブミン、10ng/mlのサイトカイン(SCF, TPO, Flt3 ligand)を

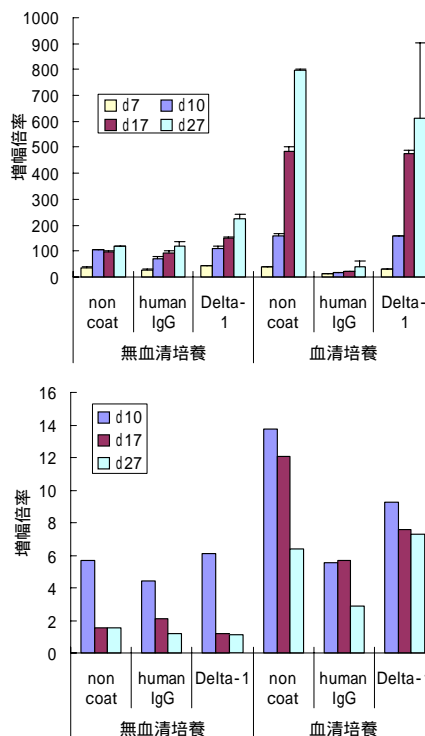
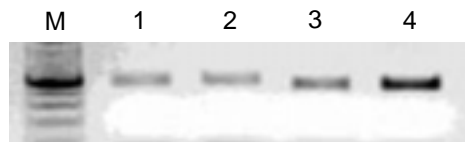


図2 臍帯血CD34<sup>+</sup>の培養 造血細胞増幅率(a)  
CD34<sup>+</sup>細胞増幅率(b)



添加した血清培地（20%血清入り $\alpha$ MEM培地）もしくは無血清培地（XVIVO10）で週2回の培地交換を行いながら27日間培養した。delta-1固相化の効果は細胞増幅率を指標に、delta-1固相化がない場合とヒトIgGを固相化した場合と比較することで評価した。

その結果、図2に示すように無血清培養では造血細胞の増幅は観察されたもののdelta-1固相化の効果は観察されず、CD34陽性細胞の増幅も10日目をピークに減少し、2週間目以降にはほとんどの細胞が分化してしまった。一方、血清培養ではヒトIgGを固相化した場合のみ造血細胞が増殖しないが、他の2群では無血清培養より細胞が増殖した。しかし、CD34陽性細胞は無血清培養と同様に増幅せず、delta-1固相化の効果も有意差が認められなかった。細胞培養4日後におけるHES-1のmRNA発現はdelta-1固相化群でのみ観察されていることから（図3）CD34<sup>+</sup>細胞がdelta-1による刺激を受けていることは明らかではあるが、今回の培養系では造血幹細胞の増幅には結びつかなかった。



M: marker, lane 1: G3PDH (non-coat), lane 2: G3PDH (delta-1), lane 3: HES-1 (non-coat), lane 4: HES-1 (delta-1)

図3 臍帯血CD34<sup>+</sup>培養4日後のHES-1 mRNAの発現

### 2.3. アジド基を導入したヘパリン・ヒアルロン酸を利用した新規の造血細胞培養基材の開発

細胞外マトリックスの成分であるヘパリンやヒアルロン酸などの酸性多糖は、造血細胞の増幅に有効である<sup>6)</sup>。多糖の効果的な細胞培養基材表面への固定化をめざし、多糖への光反応性基（アジドフェニル基）の導入を行った。吸光度測定によりアジド基導入の確認を行い、フォトマスクを用いて1mg/mlの濃度でストライプパターンを形成させた。カチオン性色素（ブリリアントグリーン）とアニオン性色素（インジコカルミン）で染色を行い、カチオン性色素の緑色でのみ染色されることを確認した。合成したアジド化ヘパリン・ヒアルロン酸は光固定化時にanti-human IgG(Fc)を加えて固定化を行い、さらにdelta-1を加えることで糖表面にdelta-1を導入した。作成した表面でTMD-7細胞を培養してTCPS上に間接法でdelta-1を導入した場合と比較した。その結果（図4）TCPSへの間接固定に比較してより高濃度のdelta-1が必要であるものの、ヘパリン、ヒアルロン酸表面ではdelta-1濃度依存的な強度変化が観察できた。そこで、このdelta-1固相化多糖基材を用いて、臍帯血由来CD34<sup>+</sup>細胞

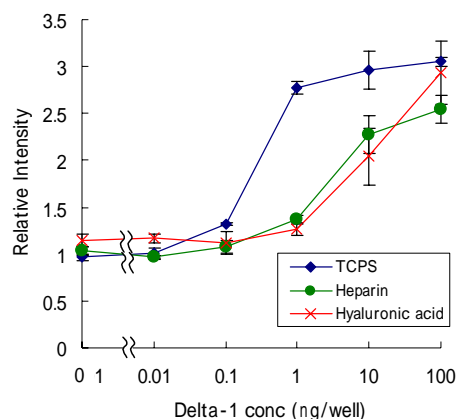


図4 アジド化多糖で固相化したdelta-1上でのTMD-7細胞の培養

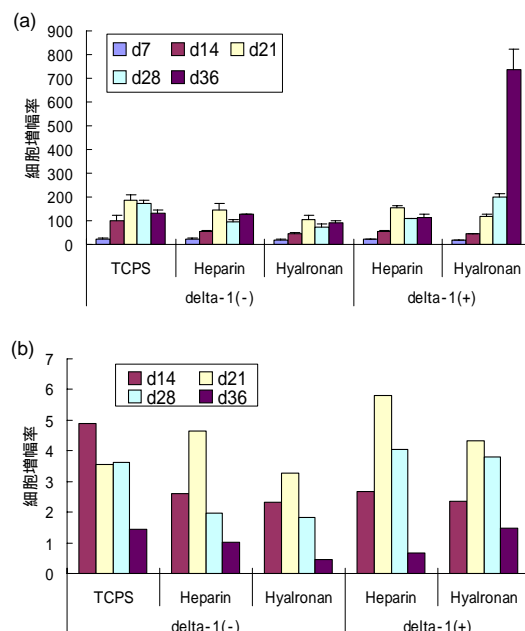


図5 アジド化多糖で固相化したdelta-1上での臍帯血CD34<sup>+</sup>の培養  
造血細胞増幅率(a)、CD34<sup>-</sup>細胞増幅率(b)

の培養をサイトカイン添加無血清培地で行った（図5）。その結果、Delta-1固定化ヒアルロン酸上では4週間目以降に造血細胞の増幅が他の群より顕著に観察されたものの、CD34<sup>+</sup>の増幅率はマトリックスの違いやdelta-1の有無で大きな差が観察できなかった。単一な細胞集団である株細胞と異なり、臍帯血は雑多な細胞集団のため幹細胞のみの増幅は極めて困難であると考えられる。現在は幹細胞集団としてCD34を指標にしているが、幹細胞増幅のためには複数のマーカーによる更なる純化を行う必要があると考えている。

### 3. 考察および今後の展望



本研究では、生理活性物質の固相化技術を用いた造血細胞の増幅用基材の開発を試みている。G-CSF や Notch-Ligand などの生理活性分子のマトリックスへの固定化により、造血系の細胞株の細胞増殖が可能となった。しかしながら、臍帯血由来 CD34 陽性細胞のようなプライマリーを用いた実験では生理活性物質の刺激は伝わっているものの有意な細胞増幅効果は観察できなかった。数多くの新しい知見が報告されている幹細胞研究の進展により、優れた培養系の構築のための情報が増えつつあり、今後は、様々なサイトカインや膜タンパク質を組み合わせた新しい細胞培養システムに関する研究を推進する必要があると考えられる。

#### 【参考文献】

1. Y. Ito, M. Nogawa, M. Takeda, T. shibuya, Photo-reactive polyvinylalcohol for photo-immobilized microarray, *Biomaterials*. 26(2005), 211-6.
2. Y. Ito, M. Nogawa, Preparation of a protein micro-array using a photo-reactive polymer for a cell-adhesion assay, *Biomaterials*. 24(2003), 3021-6.
3. Y. Ito, H. Hasuda, T. Yamauchi, N. Komatsu, K. Ikebuchi, Immobilization of erythropoietin to culture erythropoietin-dependent human leukemia cell line, *Biomaterials* 25 (2004) 2293-2298.
4. L. M. Calvi, G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg, D. T. Scadden, Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche, *Nature* 425 (2003) 841-846.
5. S. Tohda, S. Sakano, M. Ohsawa, N. Murakami, N. Nara, A novel cell line derived from de novo acute myeloblastic leukaemia with trilineage myelodysplasia which proliferates in response to a Notch ligand, Delta-1 protein, *Br J Haematol*. 117 (2002) 373-8.
6. SV. Madihally, AW. Flake, HW. Matthew, Maintenance of CD34 expression during proliferation of CD34+ cord blood cells on glycosaminoglycan surfaces, *Stem Cells* 17 (1999) 295-305.

# 細胞固定化基材の調製と ES 細胞の分化抑制培養

金野 智浩

## 1. はじめに

再生医療は 21 世紀の高度先端医療の一翼を担うものとして期待されている。胚性幹細胞 (ES 細胞) や造血幹細胞など再生医療で有用とされる細胞を生体外で有効利用し、治療に役立てるためには、それらを培養するためのバイオリアクターが必要とされる。

ES 細胞は増殖抑制した初代マウス胚線維芽細胞 (フィーダー細胞) 上で培養することで未分化性を維持することが可能である。しかし再生医療でターゲットとされる霊長類 ES 細胞に展開する場合、異種動物由来のフィーダー細胞の使用は安全性の観点から避けられるべきである。フィーダー細胞が ES 細胞の未分化性を支持する機構として大きく二つ考えられる。一つはフィーダー細胞の細胞膜に特異的に発現している水不溶性タンパク質による分化抑制機構 (ES 細胞との直接接触)。他方はフィーダー細胞が培養液中に分泌する水溶性タンパク質 (サイトカイン類) による分化抑制機構である。本研究では細胞固定化剤として汎用的に使用されているグルタルアルデヒドを用いてフィーダー細胞を化学的に固定化 (架橋) した細胞固定化基材を調製した。調製した固定化基材上では膜タンパク質などの既に存在していたタンパク質は保持される一方で、分泌物などの代謝産物の放出が抑止された状態になると考えられる。また、化学固定フィーダー細胞は細胞間で架橋されるために、通常の細胞剥離操作に用いられる酵素分解処理 (トリプシン処理) に対しても耐性を有すると考えられる。細胞培養の継代時にフィーダー細胞の混入が防げることも期待できる。さらに、通常のフィーダー細胞は ES 細胞播種時に毎回調製する必要があるが、固定化基材では代謝産物などの産生は抑止されるため、凍結保存も可能である。

## 2 実験と結果

### 2 - 1 PMEF の培養

初代マウス胚線維芽細胞 (PMEF) は 0.1wt%ゼラチン吸着基材上で 37°C, 5%CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養した (培養液: DMEM+10%FBS)。

### 2 - 2 MMC フィーダー細胞の調製

PMEF の増殖抑制 (MMC フィーダー細胞の調製) は以下のように行った。サブコンフルエントに達した PMEF の培地を 10mg/mL マイトマイシン C (MMC) を含む Opti-MEM に交換した。上記培養液中で 3 時間培養することで PMEF の増殖能を抑止した MMC フィーダーを調製した。MMC 処理後、DMEM + 10%FBS を用いて洗浄した。

### 2 - 3 グルタルアルデヒド処理によるフィーダー細胞の固定化 (GA 固定化基材の調製)

サブコンフルエントに達した PMEF を PBS で 3 回洗浄した。2.5%グルタルアルデヒドの PBS 溶液に交換した後、30 分間室温で放置した (固定化)。固定化後、PBS で十分に洗浄し、GA 固定化基材を調製した。

### 2 - 4 凍結乾燥 (保存) フィーダーの調製

GA 固定化基材の保存安定性を検討するために、固定化基材を純水で洗浄した後、凍結乾燥した (GA-FD)。同様に MMC フィーダーも純水で置換後、凍結乾燥した (MMC-FD)。

### 2 - 5 トリプシン処理に対する耐性評価

MMC フィーダーまたは GA 固定化基材に通常の細胞剥離操作 (トリプシン処理) を行い、処理前後における基材の状態を位相差顕微鏡で観察した。

### 2 - 6 ES 細胞培養

マウス ES 細胞を MMC フィーダー、MMC-FD、GA 固定化基材、GA-FD、ゼラチン吸着シャーレ上に播種した (培養液: KnockoutR DMEM+KnockoutR serum replacement, 100mM L-glutamate, 100mM 2-mercaptoethanol, 1000U/mL leukemia inhibitory factor) 培養液は毎日交換した。経時的に位相差顕微鏡で観察した。培養 4 日後に各表面における ES 細胞の未分化性の確認をアルカリフォスファターゼ染色により行った。また、ES 細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法により Oct3/4 の発現確認を行った。

### 2 - 7 結果と考察

図 1 に MMC フィーダー細胞と GA 固定化基材の位相差顕微鏡写真、およびトリプシン処理前後の写真を示す。GA 固定化基材は PMEF 表面に存在しているタンパク質間で化学的に架橋されていることからトリプシン処理を行っても剥離することはなく、基材表面に安定に固定化されていることを確認した。

ES 細胞の分化抑制培養は基材上での接着培養により行われる。播種した ES 細胞の初期接着性は MMC フィーダー > GA-FD > GA 固定化基材 > MMC-FD > ゼラチン吸着基材の順であった。図 2 に培養 4 日後の細胞数計測の結果を示す。増殖数は MMC フィーダーが最も高く、他の表面では有意な差は確認できなかった。

図 3 に培養 4 日後の位相差顕微鏡による形態観察の結果を示す。ゼラチン吸着基材上の ES 細胞は形成するコロニーコロニーが偏平化し巨大化している様子が観察された。MMC フィーダー上の ES 細胞も培養が長期化するに従い、

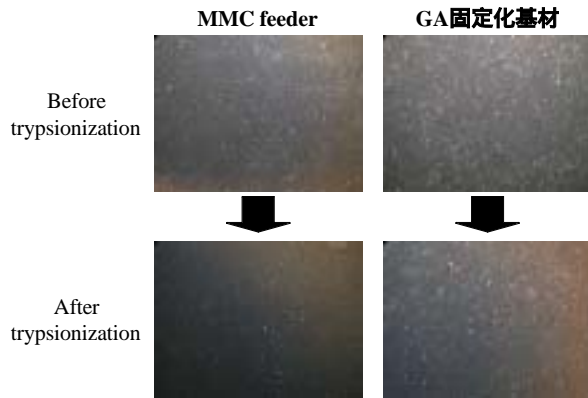


図1 トリプシン処理前後におけるMMCフィーダー細胞およびGA固定化基材の位相差顕微鏡写真

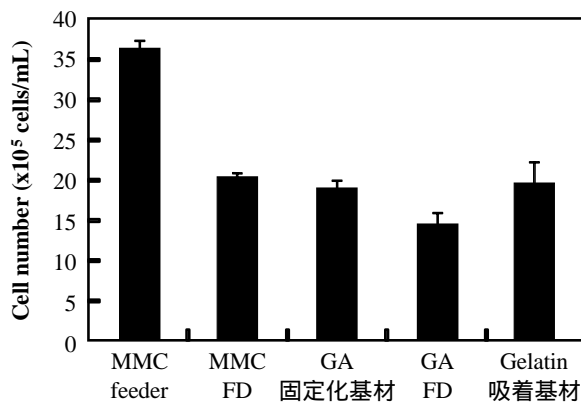


図2 培養4日後の各種表面上におけるES細胞増殖数

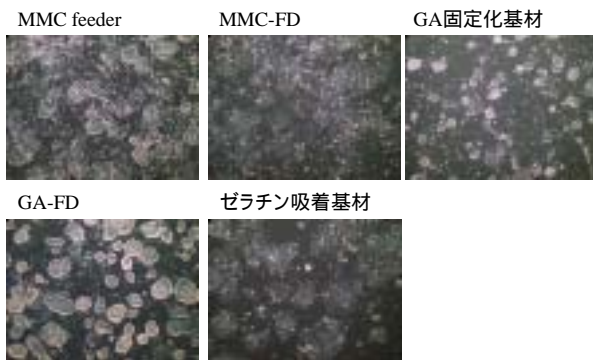


図3 各種表面上におけるES細胞の位相差顕微鏡像(培養4日後)

形成したコロニー同士で融合して巨大化している様子が観察された。GA固定化基材上のES細胞は形成したコロニーサイズがMMCフィーダー上のそれよりも小さかったが、明瞭な輪郭を有している様子が観察された。ES細胞の未分化性評価法の一つにアルカリ性フォスファターゼ(ALP)染色が挙げられる。未分化ES細胞はALP染色により赤く染色できることが知られている。培養4日後の各種表面上におけるES細胞のALP染色の結果、およびその画像解析結果を図4、図5に示す。最も良く染色されたのはGA-FD上のES細胞コロニーであった。一方、MMCフィーダー上のES細胞はコロニー中央部で染色されたが周

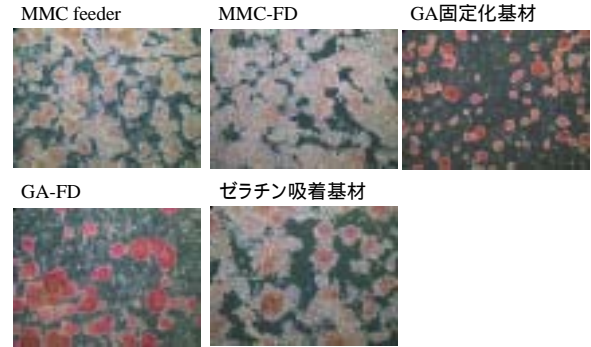


図4 培養4日後における各種表面上のES細胞のアルカリフォスファターゼ染色後の位相差顕微鏡像

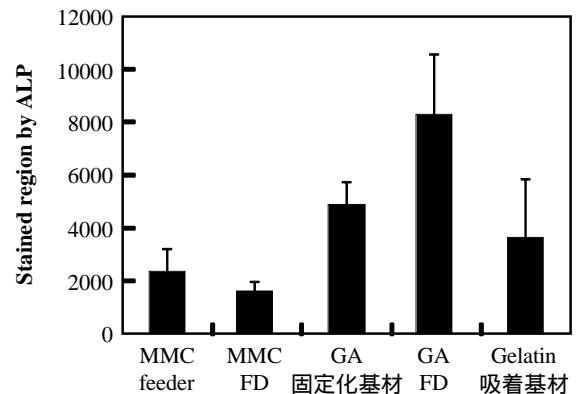


図5 アルカリフォスファターゼ染色の画像解析結果

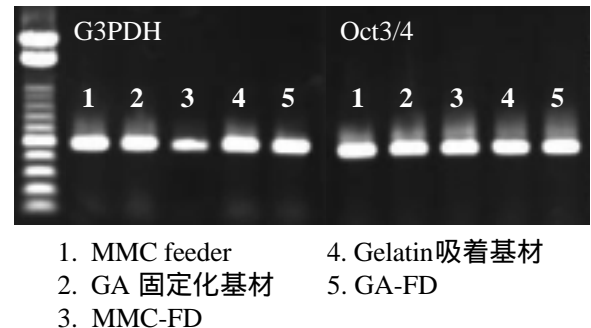


図6 培養4日後の各種表面上のES細胞のRT-PCR解析結果

辺領域の細胞は染色されることがなかった。これはMMCフィーダー上のES細胞は増殖活性が高く、過成長による未分化コロニー間の融合により形成コロニーが巨大化したため、未分化性を消失したものと考えられる。一方、GA-FD上では各ES細胞同士がコンパクトに凝集している点で特長的であった。ES細胞の未分化性を示す指標として転写因子Oct3/4の発現が挙げられる。各種表面上のES細胞のOct3/4発現をRT-PCR法により検討した。図6に培養4日後の各種表面上のES細胞のRT-PCR解析の結果を示す。全ての表面上のES細胞からOct3/4の発現を認めた。培養条件としてLIF存在下で行っていたため、形態的には分化しており、アルカリフォスファターゼ活性は低下しているものの、転写因子の発現レベルでは未分化性を示したと考えられる。

これらの結果から、GA 固定化基材は ES 細胞の増殖活性という点においては MMC フィーダーに劣るが、未分化性を維持した培養が十分に可能であると考えられる。また、凍結保存後においても利用することが可能であることがわかった。

### 3 結論と今後の展望

グルタルアルデヒドを用いることで、代謝産物の産生を抑制した細胞固定化基材を調製した。固定化基材は通常の細胞剥離操作に使用されるトリプシンに対しても耐性を有しており、ES 細胞の継代時に混入することはない。また、凍結保存も可能であり、ES 細胞培養の煩雑性の一つであ

る、フィーダー細胞の調製のステップを簡略化できると期待される。ES 細胞の増殖活性は MMC フィーダーに比べると低下するものの、ゼラチン吸着基材と同程度であり、十分に培養基材として使用できると考えられる。未分化性についてもアルカリフォスファターゼ染色、Oct3/4 の発現を認めたことから ES 細胞の分化抑制培養に化学固定化基材が適応可能であると考えられる。今後はこの固定化培養基材上での霊長類 ES 細胞培養を行い、固定化条件の最適化などを検討していく必要があると考えられる。

# リン脂質極性基の集積化表面上における

## ES 細胞からの胚様体形成

金野 智浩

### 1. はじめに

胚性幹細胞(ES 細胞)は全ての細胞の源とされる細胞であり、未来型再生医療を具現化するためには ES 細胞の未分化・分化を制御する培養系を確立することが急務である。ES 細胞から各種分化細胞への分化誘導のファーストステップは、前駆体である ES 細胞の凝集塊(胚様体、EB)を作製することにはじまる。通常はハンギングドロップ法やペトリ皿上での浮遊培養により EB を作製しているが、前者では形成効率の低さや、後者では EB サイズの不均一性などが問題としてあげられる。各種分化細胞への前駆体である EB を効率的に作製し、そのサイズを規格化することができれば、生物学的な分化誘導研究なども加速化できると期待される。一方、これまでにバイオマテリアルの分野では血液適合性ポリマーに関する研究が隆盛を極めた。とりわけ、培養基材表面へのリン脂質極性基の高集積化は優れた非特異的タンパク質の吸着抑制特性を示すことが明らかにされている。ここではリン脂質極性基を側鎖に有する 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)を一成分とした MPC ポリマーを用いて培養基材表面にリン脂質極性基の高集積化表面を作製し、その表面上で ES 細胞培養を行うことで効率的な EB 形成を促すことを検討した。

### 2. 実験と結果

#### 2.1 リン脂質極性基の高集積化表面の作製

リン脂質ポリマーとして MPC と *n*-ブチルメタクリレートとの共重合体(PMB30, MPC mole fraction 30)を使用した。市販の 96 穴 U 字型マイクロプレートに 0.5wt% PMB30 のエタノール溶液でコーティングし、一晚減圧乾燥して PC サーフフェイス培養基材を調製した。

#### 2.2 ES 細胞培養(胚様体の形成)

ES 細胞を疎水性ポリスチレン上および PC サーフフェイス上で浮遊培養した(培養液: DMEM+10%FBS)。細胞播種数は  $2.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^4$ ,  $1.3 \times 10^4$ ,  $6.3 \times 10^3$ ,  $3.1 \times 10^3$ ,  $1.6 \times 10^3$  cells/well とした。経時的に位相差顕微鏡を用いて細胞凝集の様子を観察した。培養 4 日後にクリスタルバイオレット法を用いて胚様体内部の細胞数をカウントした。また、培養 4 日後に RT-PCR 法を用いて各種表面で形成した EB に由来する転写因子(Oct3/4, Cdh-1, Pax6)の発現を検討した。

### 2.3 結果

図 1、図 2 に各種表面上での ES 細胞の位相差顕微鏡写真を示す。PC サーフフェイス上の ES 細胞は播種直後から迅速に細胞間会合し、培養 1 日後には胚様体の形成が確認された。特に基材のウェル形状を U 字型にしたことで、既存の疎水性ポリスチレン上とは明確に異なり、播種 10 分後には各ウェルの中心部に細胞が凝集する様子が観察された。また、形成する胚様体は各ウェルに単一である様子が観察された。特に細胞播種数に応じて任意のサイズの胚様体を均一に作成することができた(図 3)一方、疎水性ポリスチレン上では各ウェルに複数個の細胞凝集体が形成し、それらがさらに凝集することで胚様体形成している様子が観察された。細胞増殖数は、初期播種数が多いほど、

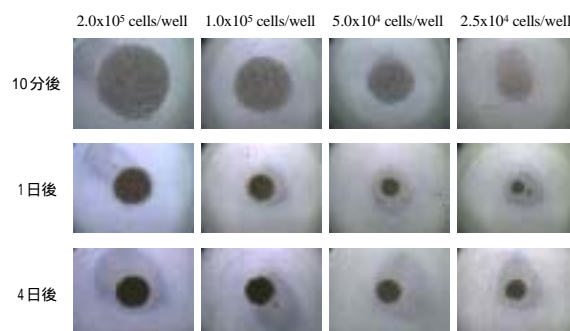


図 1 PC サーフフェイス上(96 穴 U 字型プレート)での ES 細胞の凝集の様子(播種 10 分後、1 日後、4 日後)

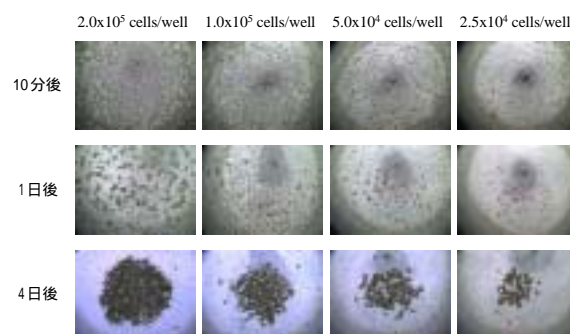


図 2 疎水性ポリスチレン上(96 穴 U 字型プレート)での ES 細胞の凝集の様子(播種 10 分後、1 日後、4 日後)



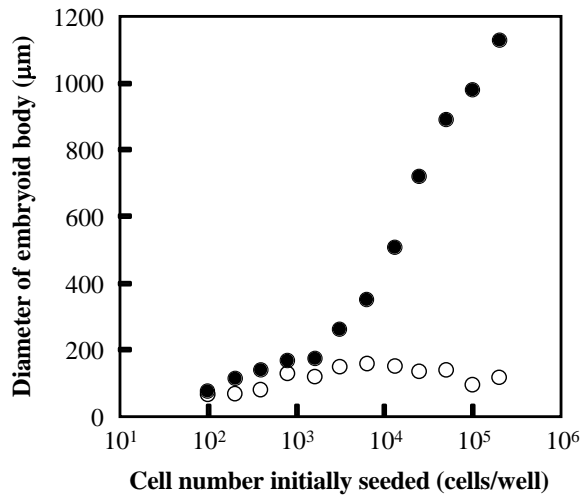


図3 培養4日後に形成した胚様体のサイズ(直径)と播種細胞数の関係( PC表面、疎水性ポリスチレン)

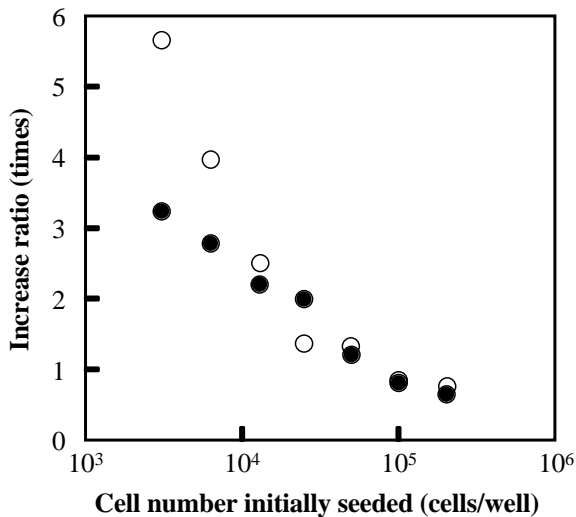


図4 培養4日後における細胞数と初期播種細胞数の関係( PC表面、疎水性ポリスチレン)

つまり形成する胚様体が大きいかほど増幅しにくい傾向にあることがわかった(図4)。

形成した胚様体から RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて発現している転写因子を評価した(図5 a-c)。PC 表面上で胚様体からは細胞間接着に関与する E-カドヘリンの転写因子(Cdh-1)が強く発現していることが確認できた(図5 c)。一方、疎水性ポリスチレン上での胚様体からは、神経細胞に分化する際に発現するとされている転写因子(Pax6)が PC 表面と比べると顕著に発現していた(図5 b)。つまり、PC 表面は ES 細胞の細胞間相互作用を亢進する結果、迅速な胚様体形成を促し、非特異的な分化の確率を低減させていると考えられる。一方、疎水性ポリスチレンは、細胞接着を抑制しやすい傾向にあるものの、細胞はウェル内で局所的に凝集し、複数の胚様体が形成され、同時に非特異的な分化のシグナルが入っていると考えられる。

PC 表面上で形成した胚様体に対して神経細胞

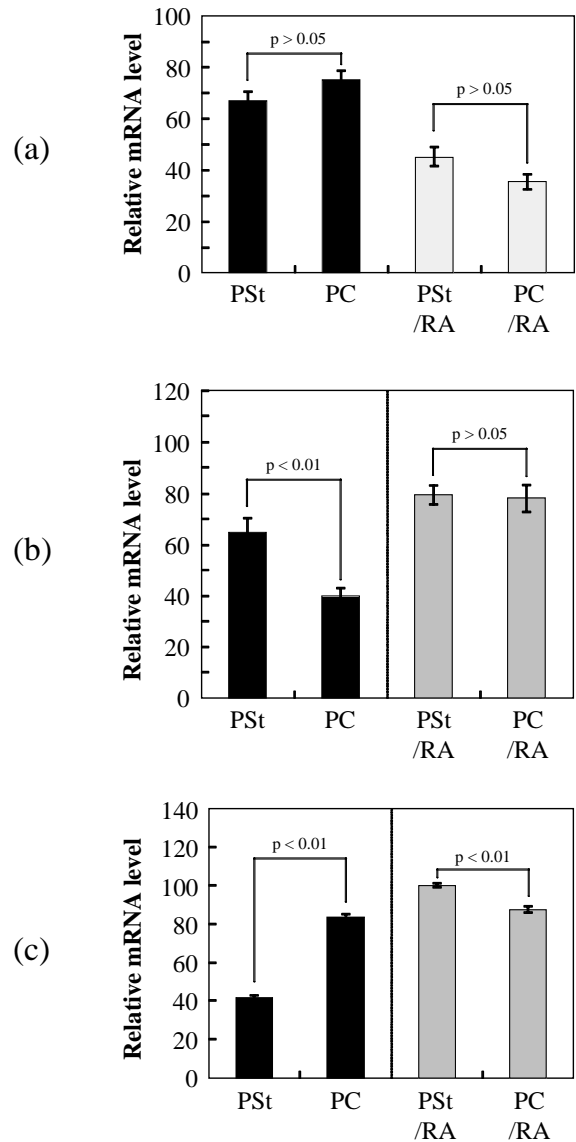


図5 培養4日後の胚様体で発現している転写因子の RT-PCR による発現強度の画像解析結果(a: Oct3/4, b: Pax6 c: Cdh-1)

へのシグナルとされるレチノイン酸を添加すると、Pax6 の発現を認めた、また未分化性を支持する指標である Oct3/4 の発現は刺激後に低下していることを認めた。これらの結果から、PC 表面上で形成した胚様体は外部からの分化誘導シグナルも十分に受けられると考えられる(図5 a)。

PC 表面上では播種した細胞数に従い、形成する胚様体のサイズも制御することが可能である。つまり、既存の方法による胚様体形成では規格化できなかったが、リン脂質極性基の集積化表面を用いることで、生物学的研究のボトルネックとされる基材上での細胞動態の制御が可能になったと考えられる。規格化された胚様体を以降の分化誘導研究に用いることで、生物学的な研究に拍車がかかることが期待される。

### 3. 考察及び今後の展望

リン脂質ポリマーをコーティングしたPCサーフェイス基材はこれまでに血液適合性表面として高い評価を得ているが、そればかりでなく、非特異的な外部因子(非特異的に吸着したタンパク質による刺激や培養基材自身の物理化学的特性による刺激)の導入を抑止したい培養系においても有効であることが示された。つまり、ES細胞からの各種分化細胞への誘導においては、ファーストステップとして外部環境からの非特異的な刺激を抑止し、細胞間相互作用を亢進させる必要がある。この目的のためには細胞膜を構成している基盤成分であるリン脂質極性基の高集積化は有効である。特に96穴U字型プレートを用いる

ことで、各ウェル内に単一の胚様体をサイズ制御して作製することが可能であった。再生医療の分野では生物学的研究の成果が注目される傾向にあるが、細胞が生体外において接触する界面である培養基材の創製なしでは生体外での細胞機能制御は困難である。新規な基材の提供は生物学的分野におけるボトルネックを解決するのに有望であると考えられる。

#### 【参考文献】

1. T.Konno, K.Akita, K.Kurita, Y.Ito, *J.Biosci.Bioeng.*, in press

## 業 績

### 【原著論文】

1. Y. Ito, H. Hasuda, T. Yamauchi, N. Komatsu, K. Ikebuchi, "Immobilization of erythropoietin to culture erythropoietin-dependent human leukemia cell line," *Biomaterials*, 25, 2293-2298 (2004)
2. Y. Ito, H. Hasuda, "Immobilization of DNAzyme as a thermo-stable enzyme," *Biotechnol. Bioeng.*, 86, 72-77 (2004)
3. I.-K. Kang, G.J. Kim, O.H. Kwon, Y. Ito, "Co-culture of hepatocytes and fibroblasts by micro-patterned immobilization of b-galactose derivatives *Biomaterials*, 25, 4299-4301(2004)
4. Y. Ito, M. Nogawa, H. Sugimura, O. Takagi, "Photodegradation micropatterning of adsorbed collagen by vacuum ultraviolet light," *Langmuir*, 20, 4299-4301 (2004)
5. K. Miyamoto, K. Hayashi, T. Suzuki, S. Ichihara, T. Yamada, Y. Kano, T. Yamabe, Y. Ito, "Human Placenta Feeder Layers Support Undifferentiated Growth of Primate Embryonic Stem Cells," *Stem Cells.*, 22, 433-440 (2004)
6. M. Casolaro, S. Bottari, A. Cappelli, R. Mendichi, and Y. Ito, "Vinyl polymers based on L-histidine residues. Part 1: The thermodynamics of poly(ampholyte)s in the free and in the cross-linked gel form," *Biomacromolecules*, 5, 1325-1332 (2004)
7. I. S. Lee, O. H. Kwon, W. Meng, I.-K. Kang, and Y. Ito, "Nanofabrication of microbial polyester by electrospinning promotes cell attachment," *Macromol. Res.*, 12, 374-378 (2004)
8. H. Makino, H. Hasuda, and Y. Ito, "Immobilization of leukemia inhibitory factor (LIF) to culture murine embryonic stem cells," *J. Biosci. Bioeng.*, 98, 374-379 (2004)
9. Y. Ito, H. Hasuda, M. Morimatsu, N. Takagi, and Y. Hirai, "A microfabrication method of a biodegradable polymer chip for a controlled release system," *J. Biomater. Sci., Polym. Edn.*, in press (2005)
10. T. Konno, K. Akita, K. Kurita, Y. Ito, "Formation of embryoid bodies by mouse embryonic stem cells on plastic surfaces," *J. Biosci. Biotechnol.*, in press (2005)
11. Y. Ito, H. Hasuda, M. Kamitakahara, C. Ohtsuki, M. Tanihara, I.-K. Kang, and O. H. Kwon, "A composite of hydroxyapatite with electrospun biodegradable nanofibres as a tissue engineering material," *J. Biosci. Biotechnol.*, in press (2005)
12. Y. Ito, H. Hasuda, H. Terada, T. Kitajima, "Culture of human umbilical vein endothelial cells on immobilized vascular endothelial growth factor," *J. Biomed. Mater. Res.*, in press (2005)
13. M. Casolaro, E. Paccagnini, R. Mendichi, and Y. Ito, "Stimuli-responsive polymers based on L-phenylalanine residues: The protonation thermodynamics of free polymers and cross-linked hydrogels," *Macromolecules*, in press (2005)
14. Y. Ito, M. Nogawa, M. Takeda, and T. Shibuya, "Photo-reactive polyvinylalcohol for photo-immobilized microarray," *Biomaterials*, 26, 211-216 (2005)
15. T. Konno, H. Hasuda, K. Ishihara, and Y. Ito, "Photo-immobilization of a phospholipids polymer," *Biomaterials*, 26, 1381-1388(2005)
16. H. Hasuda, O. H. Kwon, I.-K. Kang, and Y. Ito, "Synthesis of photoreactive pullulan for surface modification," *Biomaterials*, 26, 2401-2406 (2005)
17. Y. Miyamoto, N. Teramoto, Y. Imanishi, and Y. Ito, "In vitro adaptation of a ligase ribozyme for activity under a low pH condition," *Biotechnol. Bioeng.*, 90, 36-45 (2005)

18. Y. Ito, H. Hasuda, H. Terada, T. Kitajima, "Culture of human umbilical vein endothelial cells on immobilized vascular endothelial growth factor," J.Biomed.Mater.Res., in press (2005)
- イオテクノロジーへの応用」バイオインダストリー, 21(11), 28-36 (2004)
14. 伊藤嘉浩, 金野智浩, 宮本寛治, 「E S細胞培養技術」バイオインダストリー, 21(12), (2004)
15. 伊藤嘉浩, 「DNA コンピュータを内臓したインテリジェント DDS」高分子, 53(8), 607 (2004)
16. 伊藤嘉浩, 野川誠之, 金野智浩, 牧野弘, 蓮田寛和, 宮本寛治, 池淵研二, 「幹細胞の体外培養のためのバイオマテリアル」再生医療学会誌, 3(2),55-61 (2004)
17. Y. Ito and E. Fukusaki, "DNA as a nanomaterial," J. Mol. Catal. Enz., B28, 155-166 (2004)
18. 伊藤嘉浩  
「マイクロアレイ・バイオチップ最前線」  
バイオサイエンスとインダストリー, 62(3), 171-174 (2004)
19. 伊藤嘉浩  
「再生医工学のためのバイオマテリアル表面」  
表面科学, 25(1), 16-22 (2004)
20. 伊藤嘉浩  
Design and synthesis of functional polymers by in vitro selection  
Polym. Adv. Technol. 15, 3-14 (2004)
21. 伊藤嘉浩, 野川誠之, 金野智浩, 牧野弘, 蓮田寛和, 宮本寛治, 池淵研二  
「微細加工によるティッシュエンジニアリング用マテリアルの設計・開発」  
再生医療, 3(2), 55-61(2004)
22. 伊藤嘉浩, 吉田亮  
機能性ゲルの微細加工  
高分子, 53(5), 340(2004)
- 【総説】
1. 伊藤嘉浩, 「幹細胞の体外増幅」, Organ Biology ,12(1), 47-55 (2005)
2. 伊藤嘉浩, O. H. Kwon, I.-K. Kang, 「再生医療用ナノファイバー」, バイオインダストリー, 22(5), 41-46 (2005)
3. 横山昌幸, 伊藤嘉浩, 「特集にあたって」, バイオインダストリー, 22(4), 7-8 (2005)
4. 伊藤嘉浩, 「再生医療バイオリアクタープロジェクト」, KAST レポート, 16(2), 8-11 (2005)
5. 伊藤嘉浩 「再生医療のための材料開発」, 未来材料, (2005)
6. 北嶋隆, 伊藤嘉浩 「成長因子組み込み材料」再生医療学会誌, 4(1), 53-61 (2005)
7. 伊藤嘉浩, 「「なんでもマイクロアレイ」バイオチップ」工業材料, 53(1), 12-13 (2005)
8. 伊藤嘉浩, 「MEMS によるドラッグ・デリバリー・システム(DDS)チップの開発」工業材料, 52 (12), 10-11 (2004)
9. 伊藤嘉浩, 「再生医療工学のためのバイオマテリアル」工業材料, 52 (11), 12-13 (2004)
10. 野川誠之, 伊藤嘉浩, 「固定化成長因子」遺伝子医学 Mook , 1, 88-93(2004)
11. 伊藤嘉浩, 「ナノメディシンにおける理工学者の役割」バイオマテリアル, 22, 383-384 (2004)
12. 伊藤嘉浩, 山内哲也, 大村馨, 「光固定化法を用いたマイクロアレイ・チップの創製」高分子論文集 ,61(11), 501-510(2004)
13. 伊藤嘉浩, 平井義彦, 「ナノ・インプリント技術のバ
- 【書籍】
1. 伊藤嘉浩 「クローン、抗原、抗体抗原反応、高分子アクチュエータ、細胞治療、触媒抗体、バイオチップ、ハイブリッド人工臓器、表面改質、免疫複合体」 「高分子辞典(第3版)」高分子学会編集、朝倉書店、印刷中 (2005)

2. 伊藤嘉浩「マイクロパターン技術」「再生医療」田畑義彦、赤池敏宏編集、コロナ社、印刷中(2005)
3. 伊藤嘉浩「マイクロアレイ・バイオチップ最前線」「バイオテクノロジー総覧」日本能率協会総合研究所、p.662-670 (2005)
4. 伊藤嘉浩「再生医療材料」「図解高分子新素材のすべて」国武豊喜監修、工業調査会、p.94-97 (2005)
5. 伊藤嘉浩、「マイクロコンタクトプリンティング」「ナノバイオ辞典」、山根恒夫、松永是監修、テクノシテム、印刷中(2005)
6. 伊藤嘉浩「マイクロアレイ概説」「コンビナトリアル・バイオエンジニアリングの最前線」植田充美監修、シーエムシー出版、p. 252-263 (2004)
7. 伊藤嘉浩「マイクロアレイ作成法」「コンビナトリアル・バイオエンジニアリングの最前線」植田充美監修、シーエムシー出版、p. 264-272 (2004)
8. 伊藤嘉浩、「細胞工学材料」「高分子材料・技術総覧」、高分子材料・技術総覧編集委員会、産業技術サービスセンター、p.615-622 (2004)
9. 金野智浩  
酸素複合固定化ナノ粒子の創製と機能  
「バイオエンジニアリングマテリアル」石原一彦監修、フロンティア出版、p.169-176(2004)

#### 【口頭発表】

1. 伊藤嘉浩  
Cultivation of Blood-Derived Cells on Cytokine-immobilized Surface  
第7回世界バイオマテリアル学会、平成16年5月、オーストラリア・シドニー
2. 金野智浩、坂野誠治、東田修二、伊藤嘉浩  
膜タンパク質をコンジュゲートしたポリマーマトリックスの調整とモデル造血幹細胞の培養  
第53回高分子学会年次大会、平成16年5月、神戸
3. 金野智浩、伊藤嘉浩、平澤綾香、堀里美、栗田公夫  
エキシマー光分解による親水・疎水傾斜表面の作製

#### と機能評価

- 第53回高分子学会年次大会、平成16年5月、神戸
4. 伊藤嘉浩、蓮田寛和、高木啓行、平井義彦  
ナノインプリント表面の作成とその上での細胞動態  
第53回高分子学会年次大会、平成16年5月、神戸
5. 蓮田寛和、伊藤嘉浩  
光反応性プルランの合成とマイクロパターン状固定化  
第53回高分子学会年次大会、平成16年5月、神戸
6. 伊藤嘉浩、蓮田寛和  
DNAzyme 固定化電極の作成  
第53回高分子学会年次大会、平成16年5月、神戸
7. 伊藤嘉浩、蓮田寛和、平井義彦  
生分解性 DDS チップ  
第20回 DDS 学会、平成16年7月、東京
8. 伊藤嘉浩  
Cell Culture on Cytokine-immobilized Materials  
Gordon Research Conference:“Signal Transduction by Engineered Extracellular Matrices” 平成16年6月、米国・Lewiston
9. 伊藤嘉浩  
再生医療材料、バイオチップのための表面創成  
高分子表面研究会、平成16年6月、東京
10. 伊藤嘉浩  
再生医療材料、バイオチップのための表面創成  
慶応大学理工学部・特別講義、平成16年7月、東京
11. 金野智浩、坂野誠治、東田修二、伊藤嘉浩  
Notch ligand コンジュゲート高分子マトリックスの調整と血球系細胞による認識と増殖活性に与える影響  
第25回日本炎症・再生医学会、平成16年7月、東京
12. 伊藤嘉浩  
幹細胞増幅のための人工ニッチェの構築  
第25回日本炎症・再生医学会、平成16年7月、東京
13. 金野智浩、新保裕子、伊藤嘉浩  
光反応性バイオコンジュゲートマトリックスの調整とES細胞培養  
第33回医用高分子シンポジウム、平成16年7月、



東京

14. 野川誠之, 伊藤嘉浩, 池淵研二  
造血細胞培養のための人工気質構築の試み  
第 33 回医用高分子シンポジウム, 平成 16 年 7 月,  
東京
15. 伊藤嘉浩  
Design of Biomaterials for Regenerative Medicine  
The 14<sup>th</sup> International Symposium on Fine  
Chemistry and Functional Polymer, 平成 16 年 8 月,  
中国・内蒙古・フフホト
16. 伊藤嘉浩, 太田鋼, 大村美由紀, 大村馨  
光固定化法による「なんでもマイクロアレイ法」の開  
発  
コンピナトリアルケミストリー研究会, 平成 16 年 9  
月, 神奈川 (KSP)
17. 金野智浩, 新保裕子, 伊藤嘉浩  
光反応性ポリマーマテリアル表面上での ES 細胞動  
態評価  
第 53 回高分子討論会, 平成 16 年 9 月, 北海道
18. 秋田邦彦, 栗田公夫, 金野智浩, 伊藤嘉浩  
化学固定したフィーダー細胞表面における ES 細胞  
動態評価  
平成 16 年度 神奈川県産学公流研究発表会, 平成 16  
年 10 月, 神奈川
19. 金野智浩, 新保裕子, 伊藤嘉浩  
種々のポリマー表面上でのマウス ES 細胞培養  
日本バイオマテリア学会シンポジウム 2004, 平成  
16 年 11 月, つくば
20. 野川誠之, 池淵研二, 伊藤嘉浩  
In vitro expansion of human hematopoietic cells by  
using the artificial substrates  
第 4 回アジア生体材料国際シンポジウム, 平成 16 年  
11 月, つくば
21. 金野智浩, 秋田邦彦, 栗田公夫, 伊藤嘉浩  
Preparation of chemically modified feeder cell for  
culture of mouse ES cell  
第 4 回アジア生体材料国際シンポジウム, 平成 16 年  
11 月, つくば
22. 伊藤嘉浩, 太田鋼, 大村美由紀, 大村馨  
Microarray Immobilization of Allergens for Allergy  
Diagnosis  
第 4 回アジア生体材料国際シンポジウム, 平成 16 年  
11 月, つくば
23. 蓮田寛和, 寺井博, 北嶋隆, 伊藤嘉浩  
Micropatterning of VEGF for culture of vascular  
endothelial cells.  
第 4 回アジア生体材料国際シンポジウム, 平成 16 年  
11 月, つくば
24. 蓮田寛和, 伊藤嘉浩, 平井義彦  
Biodegradable DDS chip  
第 4 回アジア生体材料国際シンポジウム, 平成 16 年  
11 月, つくば
25. 蓮田寛和, 伊藤嘉浩, 上高原理暢, 大槻主税, 谷原正  
夫, Oh Hyeong Kwon, Inn-Kyu Kang  
Composite of biodegradable nanofiber with  
hydroxyapatite  
第 4 回アジア生体材料国際シンポジウム, 平成 16 年  
11 月, つくば
26. 伊藤嘉浩, 太田鋼, 大村美由紀, 大村馨  
光固定化法を用いたアレルギー・マイクロアレイ・チ  
ップの開発  
第 54 回日本アレルギー学会総会, 平成 16 年 11 月, 横  
浜
27. 原雄介, 伊藤嘉浩, 酒井崇匡, 吉田亮  
生体環境下で駆動する新規自励振動型高分子の分子設  
計  
第 14 回「非線形反応と協同現象」研究会, 平成 16 年 12  
月, 大阪
28. 中川和浩, 山本幸弘, 山田知明, 宮本寛治, 小暮勝広,  
山辺敏雄, 伊藤嘉浩  
ヒト胎盤由来細胞を利用したヒト造血幹細胞増殖用  
フィーダーの開発  
第 4 回日本再生医療学会総会, 平成 17 年 3 月, 大阪
29. 金野智浩, 伊藤嘉浩  
ES 細胞増幅培養のためのサイトカインコンジュゲー  
ト基材の創製  
第 4 回日本再生医療学会総会, 平成 17 年 3 月, 大阪
30. 蓮田寛和, 北嶋隆, 伊藤嘉浩  
固定化 VEGF による血管内皮細胞培養

第 4 回日本再生医療学会総会，平成 17 年 3 月，大阪

31. 北嶋隆，伊藤嘉浩，児玉亮  
血管新生因子の固定化によって内皮化を促進する人工血管  
第 4 回日本再生医療学会総会，平成 17 年 3 月，大阪

32. 原雄介，酒井崇匡，伊藤嘉浩，吉田亮  
Novel self-oscillating polymer acting under biological condition and direct observation of the self-oscillation behavior by AFM  
日本化学会第 85 春季年会（2005），平成 17 年 3 月

#### 【特許】

- (1) 国内特許出願 3 件  
(2) 国外特許出願 1 件