

15-24 がん患者の QOL 向上のための再生医学を用いた複合組織再 建技術の開発に関する研究

主任研究者 東京大学医学部附属病院 高戸 毅

研究成果の要旨

これまで樹立に成功したヒト ES 細胞株の安定した継代維持法を確立し、サブラインの一部については、単一細胞への解離継代が可能であることを明らかにした。我々の ES 細胞株は世界的比較においても標準的な ES 細胞株の特性をもつことが確認された。間葉系幹細胞の培養皿の開発に関しては、生体細胞膜の類似成分である MPC でコーティングすることで接着性を調節することに成功した。足場素材の 3 次元造形に関しては、ラピッドプロトタイピングの技術を応用して、生体材料であるリン酸カルシウムを、CT 画像データに基づいて自由に造形する方法を開発した。ナノキャリアの開発に関しては、デバイスへのインテリジェント機能の創り込みを効率的に推進し、*in vivo* をも含めた生物学的効果の確認に成功した。自己由来培養細胞シートを内視鏡的に移植する新しい治療法の開発に成功した。動物モデルに関しては、上記のように三次元造形したリン酸カルシウム製の担体を、イヌの頭蓋欠損モデルに移植し、骨のみならず血管や骨髄が再生することを確認した。これらの知見を総合して複合組織再建技術の開発に取り組んでいる。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
高戸 毅	東京大学医学部附属病院顎口腔外科 歯科矯正歯科 教授	大・小動物における顎・顔面の複合組織欠損モデルの作成と、再生組織の移植
中村 耕三	東京大学医学部附属病院整形外科 教授	大・小動物における体幹・四肢の複合組織欠損モデルの作成と、再生組織の移植
片岡 一則	東京大学大学院工学系研究科	ナノキャリアを用いたインビボ遺伝子導入法の最適化
中辻 憲夫	京都大学再生医科学研究所 所長	再生医療細胞源としての ES 細胞の増殖・分化法の確立
岡野 光夫	東京女子医科大学先端生命医科学研究 所 所長	間葉系細胞培養に適した培養皿表面処理の開発
鄭 雄一	東京大学大学院医学系研究科疾患生 命工学センター 助教授	細胞シート法及び 3 次元造形法を応用した治療移植片の 作製と、その評価

研究報告

1 研究目的

がん切除後に伴い、皮膚・神経・筋肉・骨・軟骨などの複合組織の欠損が生じ、がん患者の QOL 向上を著しく低下させている。このような組織欠損を補うために、自己組織を移植する様々な技術が開発されてきた。マイク

ロサージャーリーを用いて血行を温存した複合組織移植術により、大きく複雑な組織欠損も修復可能になってきた。さらに人工関節、人工頭骨、人工血管など多岐にわたる体内埋め込み型デバイスも開発・使用されている。しかし、自家組織移植では、十分な組織量が得られないことが多く、組織採取部に新たな組織欠損や痕を残すこととなり、機能的・形態的にもまだ満足のいく結果が得られていない。他家組織移植は、ドナーの慢性的不足や免疫学的問題など多くの問題を抱えている。人工組織の完成度は高いものの、長期使用によるゆるみ、感染、異物反応など依然として未解決な問題を残している。このため、自己への信襲が可及的に小さく、免疫学的に問題なく、形態的・機能的にも優れた組織修復法の開発が望まれる。本申請は、再生医学と生体材料工学の最先端の技術を融合させて、がん治療後の複合組織欠損を再建する安全かつ安心な治療技術を開発することを目的とする。

2 研究方法

本年度の研究方法は、ES 細胞樹立培養方法の詳細な最適化を行い、凍結保存方法についても条件の改良を行った。樹立した3細胞株について、長期間増殖継代したのちでも染色体型が正常に保持されているかの検討が重要であることから、1-2年以上の連続的継代を続けたのちの細胞株について、詳細なGバンド解析を行った。世界各国の75株のヒトES細胞株との詳細な特性解析比較を行った。3株の中でも比較的安定して増殖維持可能な株について、さらに安定増殖可能なサブラインを得ることを目指して、多数のサブラインのスクリーニングを実施した。

今年度は PEG-P(Asp(DET))の化学構造と遺伝子発現機能との相関を解明することを目的に、化学構造が異なる側鎖を持つブロック共重合体とそれに対応するホモポリマーを、それぞれ PEG-P(Asp)と P(Asp)に対するアミノリシス反応より合成し、それらの機能について各種評価法を用いて検討を行った。比較検討のために各々のカチオン性セグメントの重合度を100程度に揃え、PEG-P(Asp(DET))および PEG-P(Asp(DPT)) (PEG 分子量12000, ポリアミノ酸重合度98)、並びに対応するホモポリマーとして P[Asp(DET)]ホモポリマーおよび P[Asp(DPT)]ホモポリマー(重合度101)を合成した。ナノミセル型遺伝子ベクターの有用性について、生体内の組織に近い3次元スフェロイド細胞培養系を用いた評価を行った。ヒト肝がん細胞 Huh-7 細胞をスフェロイド作製

用96穴プレート(住友ベークライト)に播種、培養することで直径100 μ mのガンスフェロイドを調製した。蛍光タンパク質 YFP を発現するプラスミドを内包したポリプレックスをスフェロイドと24時間接触させ、その一定時間後の YFP の発現をレーザー共焦点顕微鏡(CLSM)により観察した。P[Asp(DET)]および P[Asp(DPT)]ホモポリマーからなるポリプレックスの単層培養およびスフェロイド培養 Huh-7 細胞に対する遺伝子導入効率を行った

間葉系細胞培養に関しては TCPS (コーニング社製)にメタノール/2-プロパノール溶液(1:1 (v/v))で溶解させたアクリルアミドモノマー溶液(5wt%~25wt%)を25 mL 塗布し、電子線照射によりポリアクリルアミド(PAAm)を TCPS 表面上にグラフトした(PAAm-TCPS)。PAAm-TCPS を洗浄、乾燥後、2-プロパノールに溶解させた IPAAm モノマー溶液(20, 55, 65wt%)を塗布、電子線照射を行い PAAm-TCPS 表面上に PIPAAm をグラフトした(PIPAAm-PAAm-TCPS)。得られたサンプルは同様に洗浄、乾燥し、表面濡れ性およびポリマーグラフト量の測定(FT-IR / ATR)を行った。また、ウシ血管内皮細胞(EC)を作製した表面上で培養を行い、細胞シートの回収能について評価をおこなった。

担体の三次元造形に関しては、さまざまな種類のリン酸カルシウムの粉末を材料として用い、硬化液をプリントヘッドから噴射する粉体積層造形法を用いることで、生体材料の直接造形を試みた。粉体のサイズ、硬化液の成分などのパラメーターを変化させて最適化を行った。間葉系幹細胞用の培養皿に関しては、MPCの濃度を0.1%から5%まで変化させてコーティングを行った。

昨年度得られた小動物の基礎データをもとに、今年度は臨床応用を視野に入れた大動物(イヌ)頭蓋欠損モデルを作成し、欠損部に適合した担体の基礎データ収集を試みた。11ヶ月齢-2歳10ヶ月(平均1歳10ヶ月)の健常ビーグル犬の頭蓋骨に1辺15mmの骨欠損を作製した。骨欠損部のCTデータをもとに、骨欠損部の形状に成形された α -TCP製のテーラーメイド担体を作製した。作製にはインクジェットプリンターを用いた3次元積層法を用いた。対照には市販のハイドロキシアパタイトブロック(HAブロック)を切削加工したものを用いた。 α -TCP担体とHAブロックを骨欠損部に移植し、術直後及び術後1週・2週・3週・4週・8週・12週・16週・20週・24週で一般健康状態・血液検査・骨欠損部のCT撮影を行った。また24週時に頭蓋骨を採取し担体の組織学的検討を行った。

担体の三次元造形に関しては、さまざまな種類のリン

酸カルシウムの粉末を材料として用い、硬化液をプリントヘッドから噴射する粉体積層造形法を用いることで、生体材料の直接造形を試みた。粉体のサイズ、硬化液の成分などのパラメーターを変化させて最適化を行った。

3 研究成果

本年度の成果は、ES 細胞樹立培養方法の詳細な最適化を行い、凍結保存方法についても条件の改良を行った結果、安定して凍結融解を行うことが可能になった。1-2年以上の連続的継代を続けたのちの細胞株について、詳細なGバンド解析を行ったところ、3株すべてについて、染色体の異常は検出されなかった。我々の3株はすべて、世界的比較においても標準的なES細胞株の特性をもつことが確認できた。3株の中でも比較的安定して増殖維持可能な株について、さらに安定増殖可能なサブラインが得られ、一部については、単一細胞への解離継代を長期間行っても、未分化性を維持できることが明らかになった。これらのサブラインは親株と同等の分化能を示し、ES細胞としての特性を保持していることが示された。

カチオン性ポリマーとpDNAとの複合体は10mMトリス緩衝溶液(pH7.4)中で、DNAとポリマーを様々なN/P比(DNAのリン酸残基に対するカチオン性アミノ基のモル数)で混合することにより調製した。N/P比を変化させたところ、いずれの評価においてもPEG-DETと同等の結果が得られた。粒径についてはDETホモポリマーのみ、有意な増大が認められたが、他のカチオン性ポリマーについては100nm程度の平均粒径が得られ、このことはブロック共重合体及びDPTホモポリマーが血中全身投与に適するナノミセル型遺伝子ベクターを提供することを意味する。電位評価では、いずれのホモポリマーも化学量論的混合比を超えると、40mV程度の大きな表面電位を呈し、血管内循環には適さないことが理解される。ブロック共重合体では、いずれも絶対値は小さな値を示し、先の粒径の評価と併せて考慮すると、ナノミセル型遺伝子ベクターの物性評価の観点からは血中全身投与にはブロック共重合体との複合体が適すると結論される。またMTTアッセイによる細胞生存率の評価では、DPTの系はホモポリマーもブロック共重合体も顕著な毒性を示した。以上の評価より、DPTのカチオン構造が細胞毒性を発現することなく、血中循環に適するナノミセル型遺伝子ベクターを提供することが明確となった。単層培養実験においては、P[Asp(DPT)]はN/Pの増加に伴う細胞毒性を示し、顕

著な遺伝子導入活性は認められなかった。一方、P[Asp(DET)]は細胞毒性を示すことなくLPEIやBPEIと同等の遺伝子発現活性を示した。一方、スフェロイド培養実験においては、P[Asp(DPT)]とLPEIおよびBPEIは細胞毒性を示し、スフェロイドが崩壊することが確認された。これに対し、P[Asp(DPT)]はN/P=40ではスフェロイドが崩壊したが、それ以下のN/P比では、毒性を示すことなく、4-8日間に渡り顕著なYFPの発現を示した。このようにスフェロイド培養を用いることで、従来の単層培養では困難であった長期における遺伝子発現評価と感度に優れた毒性評価が可能となった。その結果、低毒性と高い遺伝子発現活性を兼ね備えたP[Asp(DET)]が優れた合成ベクターであることが明らかとなった。次に、PEG-b-P[Asp(DET)]およびPEG-b-P[Asp(DPT)]ブロック共重合体の遺伝子発現評価を同様に行った結果を図3に示す。その結果、PEGとポリカチオンとをブロック化し、その自己集合体である高分子ミセルを形成することでポリプレックスの細胞毒性が著しく減少することが確認された。さらに、スフェロイド培養実験において、PEG-b-P[Asp(DET)]は、高いN/P比においても、スフェロイドを崩壊させることなく、明確なYFPの発現を示した。PEG-b-P[Asp(DPT)]は、N/P=10ではスフェロイドの崩壊が確認されなかったが、遺伝子発現はほとんど確認することができなかった。これらの結果は、ポリカチオンのPEG化を行い、高分子ミセルを形成させることで、毒性が著しく減少することと、高分子ミセル型ベクターにおいてもP[Asp(DET)]は極めて優れたポリカチオンであることを示唆している。

作製したPAAm-TCPSの表面の濡れ性、PAAmグラフト量および細胞接着性の結果をTable 1に示す。仕込みのAAMモノマー濃度が増加するとともにPAAmのグラフト量は増加し、PAAm-TCPS表面はより親水性な性質を示した。PAAmのグラフト密度が0.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上の条件で細胞非接着表面となり、この時の接触角は15°付近であった。Fig. 1に022PAAm-TCPSおよび030PAAm-TCPSに55wt%IPAAmでEB照射を行った場合の培養皿表面の経時変化に伴う細胞接着の変化を示す。022PAAm-TCPSおよび030PAAm-TCPSに対するPIPAAmのグラフト量はそれぞれ1.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (120PIPAAm-022PAAm (●))、1.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (110PIPAAm-030PAAm (■))でありほぼ同量であった。比較のためにTCPS (◆) および160PIPAAm-TCPS (▲) (PIPAAmグラフト量: 1.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) についても同様に評価を行った。播種6時間後の細胞接着性は120PIPAAm-022PAAm, TCPS, 160PIPAAmは同等な性能を示

したが、PAAmのグラフト量が多い 110PIPAAm-030PAAmでは劣っていた。PAAmのグラフト量が $0.33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上の PAAm-TCPS 表面にPIPAAmのグラフトを行った場合やPIPAAmのグラフト量が $1.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上では細胞接着が確認できなかった点、同量のPIPAAmをTCPSにグラフトした場合 (160PIPAAm (▲)) では細胞接着および脱着可能であった点を考えると、先にグラフトしたPAAmが細胞接着に影響を与えていることを示唆している。表面濡れ性の結果はこれら細胞接着性能の結果を支持する傾向を示した。細胞接着性が良好であった 120PIPAAm-022PAAm(●) を使い細胞シートの剥離能の評価を行った (Fig. 2)。細胞シートは 160PIPAAm (◆) よりも 120PIPAAm-022PAAmから迅速に剥離することが確認できた。

リン酸カルシウムとしては、 α -TCP の微小粉体を用い、コンドロイチン硫酸を硬化液として用いることで、3次元インクジェットプリンターで患部形状に合致したテーラーメイド担体を作ることに成功した。この担体は、外形のみならず、内部構造も自由に設計・制御することができ、既存のブロック状の担体や、ペーストに比して特に操作性に関して優位性が示された。間葉系幹細胞用の培養皿に関しては、MPC の濃度を 2%程度にすることで、ある程度の接着性と、シートにする際の剥離性の両者を確保することができた。

3次元造形した α -TCP 担体の移植に関して、術中合併症はなく、術後の健康状態・血液検査値に関しても大きな異常は認められなかった。CT 撮影の結果、 α -TCP 担体内孔の狭小化と周囲骨との架橋形成が認められ骨再生を誘導していることが示唆された。組織学的検索から、 α -TCP 担体内孔と周囲に骨様組織が誘導されていることが確認された。さらに α -TCP 担体内部に骨髓腔の形成が認められた。大動物骨欠損モデルにおいて、 α -TCP テーラーメイド担体により、骨組織のみならず、血管や骨髓組織の再生も確認された。安全性と併せて、さらに長期にわたる経過の観察が必要であると考えられる。

4 倫理面への配慮

倫理面への配慮については、DNA 組み換え実験、動物実験に関しては各分担研究者の属する機関の組み換え DNA 実験規則および動物実験実施マニュアルに従って行う。ヒトの体性幹細胞を分離する実験に関しては、東京大学医学部附属病院で行う。倫理審査委員会に承認済みである。(東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会承認番号 622-1)。ヒト胚性幹細胞の使用に関しては、

「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に則り倫理審査委員会の承認を得、また大臣確認も終わり、近く細胞の分与を申請する予定である。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Abe, M., Takato, T., et al., CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.* 65(3):828-34, 2005
2. Eguchi, T., Takato, T., et al., Total reconstruction of the upper lip after resection of a malignant melanoma. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 39:45-47, 2005 (CASE REPORT)
3. Fujihara, Y., Takato, T., et al., Gene Transfer of bFGF to recipient bed improves survival of ischemic skin flap. *British Journal of Plastic Surgery* 58:511-517, 2005.
4. Yano, F., Takato, T., et al., The canonical Wnt signaling pathway promotes chondrocyte differentiation in a Sox9-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 333(4):1300-1308, 2005.
5. Yamaoka, K., Takato, T., et al., Sakurai H., Shimamura H. and Ishibashi H.: Coloring and Blocking of In-line Filters when Total Parenteral Nutrition Solutions Are Supplemented with Vitamins and Trace Elements. *医療薬学 (Japanese Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences)* 31(8):620-624, 2005.
6. Iida, H., Takato, T., et al., Molecular and pharmacological characteristics of transient voltage-dependent K(+) currents in cultured human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Br J Pharmacology* 146(1):49-59, 2005.
7. Suenaga, H., Takato, T., et al., Aggregate formation of bone marrow stromal cells by rotation culture. *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.* (in press)
8. Takahashi, T., Takato, T., et al., Synergistic Effects of FGF-2 with Insulin or IGF-I on the Proliferation of Human Auricular Chondrocytes. *Cell Transplant* (in press).

9. Kugimiya, F., Nakamura, K., et al., Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP)2 and BMP6 in bone formation. *J Biol Chem* 2005 (in press)
10. Ohashi, S., Nakamura, K., et al., Effect of Vascularity on Canine Distracted Tibial Callus Consolidation. *Clin Orthop Relat Res* 438: 253-259, 2005
11. Matsudaira, K., Nakamura, K., et al., Spinal stenosis in grade I degenerative lumbar spondylolisthesis: a comparative study of outcomes following laminoplasty and laminectomy with instrumented spinal fusion. *J Orthop Sci* 10: 270-276, 2005
12. Takeshita, K., Nakamura, K., et al., Can laminoplasty maintain the cervical alignment even when the C2 lamina is contained? *Spine* 30: 1294-1298, 2005
13. Akiyama, T., Nakamura, K., et al., In vitro and in vivo assays for osteoclast apoptosis. *Biol Proced Online* 7: 48-59, 2005
14. Ikeda, T., Nakamura, K., et al., Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J Bone Miner Metab.* 23: 337-340, 2005
15. Seichi, A., Nakamura, K., et al., Revision cervical spine surgery using transarticular or pedicle screws under a computer-assisted image-guidance system. *J Orthop Sci.* 10: 385-390, 2005
16. Kawaguchi, H., Nakamura, K., et al., Distinct effects of PPARgamma insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *J Bone Miner Metab.* 23: 275-279, 2005
17. Yano, F., Nakamura, K., et al., The canonical Wnt signaling pathway promotes chondrocyte differentiation in a Sox9-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 1300-1308, 2005
18. Kamekura, S., Nakamura, K., et al., Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 632-641, 2005
19. Chikuda, H., Nakamura, K., et al., Mutation in cGMP-dependent protein kinase II causes dwarfism in a rat mutant KMI through uncoupling of proliferation and differentiation of chondrocytes. *J Bone Miner Metab* 23: 200-204, 2005
20. Anamizu, Y., Nakamura, K., et al., Klotho insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn cells: *Acta Neuropathol (Berl)* 109: 457-466, 2005
21. Moro, T., Nakamura, K., et al., Inhibition of Cdk6 expression through p38 MAP kinase is involved in differentiation of mouse prechondrocyte ATDC5. *J Cell Physiol* 204: 927-33, 2005
22. Yamaguchi, M., Nakamura, K., et al., Insulin receptor substrate-1 is required for bone anabolic function of parathyroid hormone in mice. *Endocrinology* 146: 2620-26208, 2005
23. K. Miyata, K. Kataoka, et al., Practically Applicable cross-linked polyplex micelle with high tolerability against freeze-drying for in vivo gene delivery. *J. Contrl. Rel.*, in press.
24. Y Bae., K. Kataoka, et al., Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery, *Molecular BioSystems*, 1(3), 242-250 2005
25. W.-D. Jang, K. Kataoka, et al., Suparmolecular nanocarrier of anionic dendrimer porphyrins with PEGylated cationic block copolymer to enhance intracellular photodynamic efficacy, *Angew. Chem., Int' l. Ed.*, 44(3), 419-423 2005
26. S. Fukushima., K. Kataoka., PEGylated Polyplex Micelles from Triblock Cationomers with Spatially Ordered Layering of Condensed pDNA and Buffering Units for Enhanced Intracellular Gene Delivery, *J. Amer. Chem. Soc.*, 127(9), 2810-2811 2005
27. N. Nishiyama, Arnida, W. -D. Jang, K. Date, K. Miyata, K. Kataoka, Photochemical enhancement of transgene expression by polymeric micelles incorporating plasmid DNA and dendrimer-based photosensitizer. *J. Drug Target.* in press
28. N. Kanayama, S. Fukushima, N. Nishiyama, K. Itaka, W. -D. Jang, K. Miyata, Y. Yamasaki, U. Chung, K. Kataoka, PEG-based biocompatible block cationer

- with high-buffering capacity for the construction of polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells. *ChemMedChem* in press
29. R. Ideta, F. Tasaka, W. -D. Jang, N. Nishiyama, G. -D. Zhang, A. Harada, Y. Yanagi, Y. Tamaki, T. Aida, K. Kataoka, Nanotechnology-based photodynamic therapy for neovascular disease using a supramolecular nanocarrier loaded with a dendritic photosensitizer. *Nano Lett.* 5 (12) 2426-2431 (2005)
 30. K. Miyata, Y. Kakizawa, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, T. Watanabe, M. Kohara, K. Kataoka, Freeze-dried formulations for in vivo gene delivery of PEGylated polyplex micelles with disulfide crosslinked cores to the liver. *J. Control. Release* 109 (1-3) 15-23 (2005)
 31. N. Nishiyama, A. Iriyama, W. -D. Jang, K. Miyata, K. Itaka, Y. Inoue, H. Takahashi, Y. Yanagi, Y. Tamaki, H. Koyama, K. Kataoka, Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer. *Nat. Mater.* 4 (12) 934-941 (2005)
 32. X. Yuan, Y. Yamasaki, A. Harada, K. Kataoka, Characterization of stable lysozyme-entrapped polyion complex (PIC) micelles with crosslinked core by glutaraldehyde. *Polymer* 46 (18) 7749-7758 (2005)
 33. Y. Bae, W. -D. Jang, N. Nishiyama, S. Fukushima, K. Kataoka, Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Molecular BioSystems* 1 (3) 242-250 (2005)
 34. K. Osada, Y. Yamasaki, S. Katayose, K. Kataoka, A synthetic block copolymer regulates S1 nuclease fragmentation of supercoiled plasmid DNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44 (23) 3544-3548 (2005)
 35. S. Fukushima, K. Miyata, N. Nishiyama, N. Kanayama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEGylated polyplex micelles from triblock cationomers with spatially ordered layering of condensed pDNA and buffering units for enhanced intracellular gene delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (9) 2810-2811 (2005)
 36. X. Yuan, A. Harada, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Stabilization of lysozyme-incorporated polyion complex micelles by the ω -end derivatization of poly(ethylene glycol)-poly(α , β -aspartic acid) block copolymers with hydrophobic groups. *Langmuir* 21 (7) 2668-2674 (2005)
 37. S. Takae, Y. Akiyama, H. Otsuka, T. Nakamura, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Ligand density effect on biorecognition by PEGylated gold nanoparticles: regulated interaction of RCA120 lectin with lactose installed to the distal end of tethered PEG strands on gold surface. *Biomacromolecules* 6 (2) 818-824 (2005)
 38. Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, Y. Matsumura, K. Kataoka, Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: Tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy. *Bioconjug. Chem.* 16 (1) 122-130 (2005)
 39. W. -D. Jang, N. Nishiyama, G. -D. Zhang, A. Harada, D. -L. Jiang, S. Kawauchi, Y. Morimoto, M. Kikuchi, H. Koyama, T. Aida, K. Kataoka, Supramolecular nanocarrier of anionic dendrimer porphyrins with cationic block copolymers modified with poly(ethylene glycol) to enhance intracellular photodynamic efficacy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44 (3) 419-423 (2005)
 40. H. Cabral, N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Koyama, K. Kataoka, Preparation and biological properties of dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt)-loaded polymeric micelles. *J. Control. Release* 101 (1-3) 223-232 (2005)
 41. Hatano, S., Nakatsuji, N., et al., and Tada. T. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mech. Dev.* 122, 67-79 2005
 42. Takagi, Y., Nakatsuji, N., et al., Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* 115:102-109 2005
 43. Kuroda, T., Nakatsuji, N., et al., Octamer and Sox

- elements are required for transcriptional *cis*-regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2475-2485 2005
44. Yamaguchi, S., Nakatsuji, N., et al., Nanog expression in mouse germ cell development. *Mech. Dev. Gene Expression Patterns* 5, 639-646 2005
45. Ishii, T., Nakatsuji, N., et al., In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 309, 68-77 2005
46. Itabashi, Y., Okano, T., et al., A new method for manufacturing cardiac cell sheets using fibrin-coated dishes and its electrophysiological studies by optical mapping, *Artificial Organs*, 29, 95-103, 2005
47. Tsuda, Y., Okano, T., et al., The use of patterned dual thermoresponsive surfaces for the collective recovery as co-cultured cell sheets, *Biomaterials*, 26, 1885-93, 2005
48. Hatakeyama, H., Okano, T., Influence of insulin immobilization to thermoresponsive culture surfaces on cell proliferation and thermally induced cell detachment, *Biomaterials*, 26, 5167-76, 2005
49. Iwanaga, S., Okano, T., et al., Fabrication of a cell array on ultrathin hydrophilic polymer gels utilizing electron beam irradiation and UV excimer laser ablation, *Biomaterials*, 26, 5395-5404, 2005
50. Hasegawa, M., Okano, T., et al., Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model, *Tissue Engineering*, 11, 469-478, 2005
51. Takazawa, R., Okano, T., Mesothelial cell sheets cultured on fibrin gel prevent adhesion formation in an intestinal hernia model, *Tissue Engineering*, 11, 618-625, 2005
52. Hayashida, Y., Okano, T., et al., Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface, *IOVS*, 46, 1632-1639, 2005
53. Ayano, E., Okano, T., et al., Analysis of herbicides in water using temperature-responsive chromatography and an aqueous mobile phase, *J. Chromatography A*, 1069, 281-285, 2005
54. Ishibashi, Y., Okano, T., et al., Regulation of sialyl-Lewis x epitope expression by TNF- α and airway carcinoma cell line, *Glycoconjugate Journal*, 22, 53-62, 2005
55. Opanasopit, P., Okano, T., Influence of serum and albumins from different species on stability of camptothecin-loaded micelles, *J. Control. Rel.*, 104, 313-321, 2005
56. Akizuki, T., Okano, T., Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs, *J. Periodont. Res.*, 40, 245-251, 2005
57. Nakayama, M., Okano, T., Polymer terminal group effects on properties of thermoresponsive polymeric micelles with controlled outer-shell chainlengths, *Biomacromolecules*, 6, 2320-2327, 2005
58. Kushida, A., Okano, T., A noninvasive transfer system for polarized renal tubule epithelial cell sheets using temperature-responsive culture dishes, *European Cells and Materials*, 10, 23-30, 2005
59. Umemoto, T., Okano, T., p57Kip2 is expressed in quiescent mouse bone marrow side population cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(1), 14-21, 2005
60. Kikuchi, A., Okano, T., Nanostructured designs of biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs, *J. Control. Rel.*, 101, 69-84, 2005
61. Yang, J., Okano, T., Cell sheet engineering - Movin' on up!", *re. news*, 2005, 2-3, 2005
62. Yang, J., Okano, T., Cell-sheet engineering using intelligent surfaces, *MRS Bulletin*, 30, 189-193, 2005
63. Yang, J., Okano, T., Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds, *Biomaterials*, 26, 6415-6422, 2005
64. N. Idota, A. Kikuchi, J. Kobayashi, K. Sakai and T. Okano, "Microfluidics Valves Comprising Nanolayered Thermoresponsive Polymer-Grafted Capillaries", *Advanced Materials*, 17(22),

- 2723-2727(2005).
65. T. Asano, R. Takazawa, M. Yamato, Y. Kageyama, K. Kihara and T. Okano, "Novel and simple method for isolating autologous mesothelial cells from the tunica vaginalis", *BJU Int.*, 96, 1409-1413(2005).
66. T. Umemoto, M. Yamato, K. Nishida, C. Kohno, J. Yang, Y. Tano, T. Okano, "Rat limbal epithelial side population cells exhibit a distinct expression of stem cell markers that are lacking in side population cells from the central cornea", *FEBS Lett.*, 579(29), 6569-6574(2005).
67. Kugimiya, F., Chung U., et al., Mechanism of osteogenic induction by FK506 via BMP/Smad pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, in press.
68. Ikeda, T., Chung U., et al., Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J Bone Miner Metab* 23:337-40, 2005.
69. Kugimiya, F., Chung U., Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP)2 and BMP6 in bone formation. *J Biol Chem* 2005 Aug 18; [Epub ahead of print]
70. Yano, F., Chung U., The canonical Wnt signaling pathway promotes chondrocyte differentiation in a Sox9-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 333(4):1300-8, 2005.
71. Kamekura, S., Chung U., et al., Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage* 13(7):632-41, 2005.
72. Kawaguchi, H., Chung U., et al., Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T, and Nakamura K. Distinct effects of PPAR α insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *J Bone Miner Metab* 23(4):275-9, 2005.
73. Chikuda, H., Chung U., et al., Mutation in cGMP-dependent protein kinase II causes dwarfism in a rat mutant KMI through uncoupling of proliferation and differentiation of chondrocytes. *J Bone Miner Metab* 23(3):200-4, 2005.
74. Yamaguchi, M., Chung U., et al., Insulin receptor substrate-1 is required for bone anabolic function of parathyroid hormone in mice. *Endocrinology* 146(6):2620-8, 2005.
75. Moro, T., Chung U., et al., Inhibition of Cdk6 expression through p38 MAP kinase is involved in differentiation of mouse prechondrocyte ATDC5. *J Cell Physiol* 204(3):927-933, 2005.

日本語論文

1. 江口智明、高戸毅、森良之、依田哲也、小泉敏之、津山泰彦、近津大地、西條英人：下顎枝矢状分割法術後おとがい神経麻痺の臨床的検討。形成外科 48 (2) : 137-143, 2005
2. 引地尚子、小泉敏之、西條英人、高戸毅：Hotz型口蓋床の顎裂における効用。形成外科 48 (3) : 239-245, 2005
3. 江口智明、引地尚子、西條英人、時岡一幸、高戸毅：口唇形成術前外鼻矯正を行った片側唇裂・口蓋裂症例の外鼻形態－術後3年の評価－。日本形成外科学会会誌 25(5) : 315-321, 2005
4. 小林 純、岡野光夫、細胞シート工学と再生医療への応用、高分子、54、394-397、2005
5. 大和雅之、岡野光夫、角膜上皮幹細胞、分子細胞治療、4、54-58、2005
6. 清水達也、岡野光夫、心筋再生の現状と今後の展望、再生医療、4、39-46、2005
7. 大和雅之、岡野光夫、再生医療の現状と将来、バイオサイエンスとインダストリー、63、531-536、2005
8. 大和雅之、岡野光夫、細胞シート工学による組織再生へのチャレンジ、日本歯科医師会雑誌、58、19-27、2005
9. 中山正道、岡野光夫、ナノ粒子を用いるドラッグデリバリーシステム、癌と化学療法、32、935-940、2005