

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500436

研究課題名（和文） 再生医療用ナノブラシ固定化細胞培養基盤の調整と幹細胞保持並びに培養

研究課題名（英文） Preparation of cell culture dishes immobilized nanobrush for regenerative medicine and preservation and culture of stem cells

研究代表者

樋口 亜紺 (HIGUCHI AKON)

独立行政法人国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部 共同研究員

研究者番号：30189766

研究成果の概要（和文）：

親水性セグメント—疎水性セグメント—親水性セグメントよりなる三元共重合体は、親水性ドメイン並びに疎水性ドメインを有する温度応答性高分子である。一般に、親疎水性ドメインを有する表面は、単に親水性の表面より生体適合性が優れていることが報告されている。しかしながら、表面基板の縦方向に親疎水性ドメインを有する生体適合性材料は、これまで研究されてこなかった。本申請研究は、様々なセグメント長（分子量）並びに様々な親疎水性量比を有する親疎水三元共重合体（プルロニック）を表面反応により細胞培養基板上に固定化することにより、ナノブラシ状親疎水三元共重合体固定化細胞培養基板（ナノブラシ固定化細胞培養基板）を調製した。いかなる分子設計の親疎水三元共重合体を用いてナノブラシ固定化細胞培養基板を調製するのが、造血幹細胞の保持・培養に適しているかを検討することが本申請研究の第1の目的とした。親疎水三元共重合体の温度応答性を利用して、ナノブラシ固定化細胞培養基板上に培養した細胞の剥離操作に、従来のトリプシン処理ではなく、細胞培養基板温度を低温にさせるのみで細胞剥離を効率良く行うことの実証と細胞剥離のための最適なナノブラシ固定化細胞培養基板の調製を第2の目的とした。親水性部位が70%有し、分子量が1万の三元共重合体を適度な密度で固定化させた基板上において、最も造血幹細胞の保持・培養に優れていた。高密度のナノブラシ固定化細胞培養基板上での造血幹細胞の保持・培養は、適しておらず、最適なナノブラシ固定化密度の存在が本研究で明らかとなった。

様々な細胞外マトリックス（ジェラチン、コラーゲン、ラミニン、ビトロネクチン、フィブロネクチン、マトリゲル）をポリスチレン製基板上に共有結合並びにコーティング法にて固定化させた。いずれの基板上に間葉系幹細胞を培養しても、間葉系幹細胞の表面マーカーの発現率に、顕著な違いは見られなかった。ジェラチン並びにビトロネクチンをコーティングした細胞培養基板上では、骨芽細胞への分化は促進されたが、様々な細胞外マトリックスを共有結合で固定化させた基板上では、骨芽細胞への分化は促進されなかった。一方、様々な細胞外マトリックスを共有結合で固定化させた基板上では、神経細胞への分化が促進されていた。特に、マトリゲル固定化基板並びにラミニン固定化基板で顕著であった。さらに、プルロニックを細胞外マトリックスとともに固定化させた基板では、細胞培養液を4度に低下させることにより、間葉系幹細胞の細胞剥離を引き起こすことが可能であった。

研究成果の概要（英文）：

The triblock copolymer Pluronic, composed of polyethylene oxide (PEO, hydrophilic segment)-polypropylene oxide (PPO, hydrophobic segment)-PEO (hydrophilic segment) triblocks, exhibits amphiphilic properties, and is temperature responsive polymer having low critical solution temperature (LCST). The surface having hydrophilic and hydrophilic domains is known to show biocompatibility than the surface having only hydrophilic domain. However, the biocompatible materials having amphiphilic domains in perpendicular to the surface have not yet investigated. In this project, amphiphilic triblock copolymer (pluronic) having several segment length (molecular weight) and amphiphilic content was designed and grafted on cell culture dishes by surface reaction, and thus, the cell culture dishes prepared from amphiphilic triblock copolymer was developed (cell culture dishes having nanosegments). One of the goal of this project is to investigate the optimal molecular design of

cell culture dishes having nanosegments, which was prepared from amphiphilic triblock copolymers.

The second goal of this project is that detachment of the cells cultured on cell culture dishes grafted nanobrush, which is composed of amphiphilic triblock copolymer having LCST, was investigated without using trypsin in cell detachment and that the optimal design of cell culture dishes having nanobrush was investigated. Preservation of hematopoietic stem cells were efficiently possible on the dishes immobilized triblock copolymer having 70% hydrophilic domain and 10,000 dalton of molecular weight. The dishes having high density of nanobrush were not suitable to culture and preserve the hematopoietic stem cells.

Several extracellular matrices (ECMs, gelatin, collagen, laminin, vitronectin, fibronectin, and matrigel) were immobilized on polystyrene dishes by covalent bonding and coating method. The surface marker of mesenchymal stem cells (MSCs) cultured on different dishes immobilized ECMs show comparable expression. MSCs cultured on gelatin and vitronectin-coating dishes tended to differentiate into osteoblasts in differentiation medium. However, MSC cultured on ECM-grafted dishes did not promote to differentiate into osteoblasts. MSCs cultured on ECM-grafted dishes were found to promote differentiation into neural cells. Especially, MSCs cultured on matrigel- and laminin-grafted dishes showed higher differentiation into neural cells. MSCs cultured on ECM and pluronic grafted dishes can be detached from the dishes by decreasing temperature of dishes at 4 °C

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

#### 研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード： バイオマテリアル、再生医療、造血幹細胞、ナノブラシ、生体適合性材料、細胞培養基板

#### 1. 研究開始当初の背景

E S (胚性幹) 細胞並びに間葉系幹細胞は、次世代の医療技術である再生医療において必須な細胞源であるが、幹細胞の未分化状態での保持、培養、継体操作は、いまだ困難を極めており、通常の細胞培養技術では、行うことができない。例えば、造血幹細胞をいまだに生体外で増殖することは困難である (Alvarado-Moreno A et al., *Stem Cells Dev.*, 16(2), 223 (2007))。この一因として造血幹細胞が細胞培養基板に接着すると、直ちに分化してしまい、幹細胞特性を消失してしまうためと考えられている。本申請者は、親疎水三元共重合体 (プルロニック) を表面反応により固定化させたナノブラシ固定化細胞培養基板を調製し、通常の細胞である繊維芽細胞を培養し、形態観察を行ったところ、細胞の形態が球状であり基板接着性が著しく弱く、未分化状態に保持していることを発見した。本申請研究の予備実験として、この

ナノブラシ固定化細胞培養基板上で臍帯血を保持させたところ、1週間後でも、造血幹細胞の数が、50%以上維持しており、造血幹細胞の生存度も90%以上であった。一方、市販のバイオイナート基板上に保持された臍帯血中では、一日後にすでに造血幹細胞数は20%以下であり、生存度も20%以下であった (A. Higuchi et al., *Biomacromolecules*, 7, 1083-1089 (2006))。すなわち、ナノブラシ固定化細胞培養基板上に培養した造血幹細胞は、基板に接着せずに、長期間未分化状態で保つことが可能であることが明らかとなった。しかしながら、最適な、親疎水度、ナノセグメント長を有するナノブラシ固定化細胞培養基板を調製しておらず、この最適化を行うことが本申請研究の目的でもある。

通常、E S (胚性幹) 細胞は、継体操作の時に用いられるトリプシン処理に弱く、幹細胞の継体操作は、スクラッチしてE S細胞を剥離させなくてはならず、操作性に問題があった。本申請研究のナノブラシ状親疎水性セ

グメントは、温度応答性高分子でもあることから、ナノブラシ固定化細胞培養基板上に培養した幹細胞剥離に、従来のトリプシン処理ではなく、細胞培養基板温度を低温にさせるのみで幹細胞剥離を効率良く行うことが可能となる。これまで、NIPPAM等のビニル系温度応答性高分子を細胞培養基板上に表面固定化した細胞基板を用いて、温度変化による細胞剥離を行うことが報告されてきた(K. Nishida et al., N. Engl. J. Med., 351(12), 1187 (2004))が、NIPPAM自身は、通常の高分子であり、幹細胞特異的認識部位を有していない。本研究では、ES細胞、間葉系幹細胞等の幹細胞を特異的に認識結合させる細胞外マトリックス並びにカドヘリン(E-カドヘリン、N-カドヘリン)を親疎水三元共重合体とともに固定化させて、幹細胞培養の環境を向上させるとともに、細胞培養基板温度を低温にさせるのみで幹細胞剥離を効率良く行うことを研究目的とした。

## 2. 研究の目的

本申請研究は、様々なセグメント長(分子量)並びに様々な親疎水性量比を有する親疎水三元共重合体(プルロニック)を表面反応により細胞培養基板上に固定化することにより、ナノブラシ固定化細胞培養基板を調製する。いかなる分子設計の親疎水三元共重合体を用いてナノブラシ固定化細胞培養基板を調製するのが、造血幹細胞の保持に適しているかを検討し、明らかとする。

親疎水三元共重合体の温度応答性を利用して、ナノブラシ固定化細胞培養基板上に培養した細胞の剥離操作に、従来のトリプシン処理ではなく、細胞培養基板温度を低温にさせるのみで細胞剥離を効率良く行えることを、明らかとさせる。また、細胞剥離のためのナノブラシ固定化細胞培養基板の最適な分子設計(ナノブラシ固定化表面濃度、ナノブラシ長、ナノブラシの親疎水性量比、の最適化)を明らかとさせる。

ES(胚性幹)細胞、間葉系幹細胞等の幹細胞を特異的に認識結合させる細胞外マトリックスを親疎水三元共重合体とともに固定化させて、幹細胞培養の環境を向上させるとともに、細胞培養基板温度を低温にさせるのみで幹細胞剥離を効率良く行えることを明らかとさせる。また、幹細胞剥離のための最適な細胞外マトリックス・ナノブラシ固定化細胞培養基板の最適な分子設計(固定化量、表面固定化修飾法、ナノブラシ固定化条件の最適化)を明らかとさせる。

## 3. 研究の方法

本申請研究は、様々なセグメント長(分子量)並びに様々な親疎水性量比を有する親疎水三元共重合体(プルロニック)を表面反応により細胞培養基板上に固定化したナノブラシ状親疎水三元共重合体固定化細胞培養基板(ナノブラシ固定化細胞培養基板)を調製する。いかなる分子設計の親疎水三元共重合体を用いてナノブラシ固定化細胞培養基板を調製するのが、造血幹細胞の保持に適しているかを検討した。

親疎水三元共重合体の温度応答性を利用して、ナノブラシ固定化細胞培養基板上に培養した幹細胞の剥離操作に、従来のトリプシン処理ではなく、細胞培養基板温度を低温にさせて幹細胞剥離を行った。すなわち、様々な反応条件にてナノブラシ固定化細胞培養基板を作成して幹細胞剥離実験を行うことにより、幹細胞剥離のためのナノブラシ固定化細胞培養基板の最適な分子設計(ナノブラシ固定化表面濃度、ナノブラシ長、ナノブラシの親疎水性量比、の最適化)を考察した。

ES(胚性幹)細胞、間葉系幹細胞等の幹細胞を特異的に認識結合させる細胞外マトリックスを親疎水三元共重合体とともに固定化させたナノブラシ固定化細胞培養基板を調製した。この細胞培養基板上に幹細胞を培養し、基板温度を低温にさせて幹細胞剥離を行った。幹細胞培養並びに剥離のための最適なナノブラシ固定化細胞培養基板の最適な分子設計(固定化量、表面固定化修飾法、ナノブラシ固定化条件の最適化)を本研究で明らかとさせた。

具体的研究方法:

### A) ナノブラシ固定化細胞培養基板の調製

親水性セグメント—疎水性セグメント—親水性セグメントよりなる親疎水三元共重合体として、ポリエチレンオキド—ポリプロピレンオキド—ポリエチレンオキドよりなるプルロニックを選択した。また、親水性高分子としてポリエチレンオキド、疎水性高分子としてポリプロピレンオキドを選択した。プルロニック、ポリエチレンオキド並びにポリプロピレンオキド(ナノブラシ)を細胞培養フラスコに固定化させるためには(ナノブラシ固定化細胞培養基板の調製)、始めにナノブラシを高分子反応を用いて活性化させる必要がある。以下にこの活性化方法(カルボニルイミダゾール化方法)を記述する。

#### a) カルボニルイミダゾール化プルロニックの調製

精製したプルロニックをテトラヒドロフランに溶解させた溶液中に、テトラヒドロフランに溶解させたカルボニルジイミダゾール溶液をゆっくり滴下

させる。この混合溶液を8時間、25度で反応させた後に、エーテル中に滴下させて、カルボニルジイミダゾール化プルロニックを調製した。その後、テトラヒドロフランとエーテルを用いてカルボニルジイミダゾール化プルロニックを精製させ、真空中で乾燥させた。

#### **b) カルボニルイミダゾール化ポリエチレンオキシドとポリプロピレンオキシドの調製**

精製したポリエチレンオキシド並びにポリプロピレンオキシドをジメチルホルムアミドに溶解した以外は、カルボニルイミダゾール化プルロニックの調製と同様の方法でカルボニルジイミダゾール化ポリエチレンオキシド並びにカルボニルジイミダゾール化ポリプロピレンオキシドを調製した。

得られたカルボニルイミダゾール化プルロニック、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシドのカルボニルイミダゾール反応率をNMRにより算出する。カルボニルイミダゾール化プルロニック、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシドをメタノール中に様々な濃度(0.1-100mg/ml)になるように溶解させ、ポリリジン固定化細胞培養フラスコに注入することにより、プルロニック固定化細胞培養フラスコ、ポリエチレンオキシド固定化細胞培養フラスコ並びにポリプロピレンオキシド固定化細胞培養フラスコ(ナノブラシ固定化細胞培養基板)を調製した。

#### **B) ナノブラシ固定化細胞培養基板のキャラクタリゼーション**

上記で調製したナノブラシ固定化細胞培養基板の表面分析を、表面電位計、赤外分光光度計(ATR法)、X線光電子分析装置を用いて行い、プルロニック、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシドの表面密度を定量する。さらに、上記で調製したナノブラシ固定化細胞培養基板の水に対する接触角を0度~37度で計測して、接触角の温度依存性を検討した。

#### **C) ナノブラシ固定化細胞培養基板上での造血幹細胞保持**

本申請研究に使用することが明記された同意書に署名したボランティアから臍帯血を供給していただいた。また、市販の造血幹細胞を使用した。セグメント鎖(分子量)並びに表面固定化量の異なるナノセグメントが固定化されたナノブラシ固定化細胞培養フラスコ中に臍帯血または造血幹細胞を挿入した。この時、4度と20度並びに37度の各温度で臍帯血を保持した。12時間おきに、臍帯血中の造血幹細胞の形態を倒立型顕微鏡で観察するとともに数と生存度をフローサイトメトリーより計測した。

#### **D) ナノブラシ固定化細胞培養基板上での間葉系幹細胞の培養と細胞剥離**

マウス大腿骨中よりディスプレイ注射器を用いて骨髓液を抽出した。また、脂肪由来細胞により脂肪由来幹細胞を抽出した。ナノブラシ固定化細胞培養基板(セグメント鎖(分子量)、表面固定化量並びに親疎水性度の異なるナノブラシ固定化細胞培養フラスコ)24穴中に、マウス大腿骨中より得た骨髓液または、脂肪由来幹細胞を注入した。その後、牛胎児血清10%含有DMEM細胞培養培地を1.5ml注入し、細胞培養器中にて二酸化炭素5%、温度37度の条件下で細胞培養を行った。2日後に培地交換を行うことにより、骨髓液中の血球細胞はすべて除去された。純化された間葉系幹細胞を1週間培養を行った。1日ごとにCCDカメラ付倒立型顕微鏡を用いて間葉系幹細胞の形態観察を行った。1週間後に、ナノブラシ固定化細胞培養フラスコを低温(4度の冷蔵庫中)に20分間保持し、ナノブラシの水和に基づく膨潤による細胞剥離実験を行う。この細胞剥離操作前後の幹細胞数を倒立型顕微鏡で計測することにより、細胞剥離度を下式に基づき計測する。

細胞剥離度(%) = (1 - 細胞剥離後の細胞残存数 / 細胞剥離前の細胞残存数) x 100

間葉系幹細胞の細胞剥離度と(a)ナノブラシセグメントの分子量、(b)ナノブラシセグメント表面固定化量(c)ナノブラシセグメントの親疎水性度、との関係を考察した。

#### **E) 細胞外マトリックス固定化細胞培養基板の調製**

ES細胞、間葉系幹細胞等の幹細胞を特異的に認識結合させる細胞外マトリックスを親疎水三元共重合体とともに固定化させたナノブラシ固定化細胞培養基板を調製する。上記平成20年研究計画・方法に記載の方法によりナノブラシ固定化細胞培養基板を調製する。次に細胞外マトリックスを水溶性カルボジイミドとの反応により活性化させる。ナノブラシ固定化細胞培養基板中に所定量のカルボジイミド化細胞外マトリックス水溶液を導入して、ナノブラシ固定化細胞培養フラスコを調製する。

F)細胞外マトリックス固定化細胞培養基板のキャラクタリゼーション(樋口担当): 上記で調製したカドヘリン・ナノブラシ固定化細胞培養基板の表面分析を、表面電位計、赤外分光光度計(ATR法)、X線光電子分析装置を用いて行い、プルロニック、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシドの表面密度を定量する。また、細胞外マトリックス抗体を用いて、酵素免疫法(ELISA)(A. Higuchi et al., Biomaterials, 24, 3235 (2003))により細胞外マトリックス表面固定化量を算出する。

さらに、上記で調製したナノブラシ固定化細胞培養基板の水に対する接触角を0度～37度で計測して、接触角の温度依存性を検討した。

#### F) 細胞外マトリックス・ナノブラシ固定化細胞培養基板上での間葉系幹細胞の培養と細胞剥離

脂肪組織より常法により脂肪由来幹細胞を抽出した。調製した細胞外マトリックス・ナノブラシ固定化細胞培養基板(セグメント鎖(分子量)、表面固定化量並びに親疎水性度の異なるナノセグメント並びに様々な表面濃度の細胞外マトリックスを固定)24穴中に、脂肪由来幹細胞を注入し、細胞培養器(申請機器)中にて二酸化炭素5%、温度37度の条件下で細胞培養を行った。純化された間葉系幹細胞を1週間培養し、倒立型顕微鏡を用いて間葉系幹細胞の形態観察を行った。間葉系幹細胞の細胞形態並びに増殖性と細胞外マトリックス表面固定化濃度との関係を考察した。1週間後に、ナノブラシ固定化細胞培養基板を低温(4度の冷蔵庫中)に20分間保持し、ナノブラシの水和に基づく膨潤による細胞剥離実験を行った。間葉系幹細胞の増殖性並びに幹細胞剥離度と(a)ナノブラシセグメントの分子量、(b)ナノブラシセグメント表面固定化量(c)ナノブラシセグメントの親疎水性度、との関係を考察した。

### 4. 研究成果

#### A) ナノブラシ固定化細胞培養基板の調製並びにキャラクターゼーション

親水性セグメント-疎水性セグメント-親水性セグメントよりなる親疎水三元共重合体として、ポリエチレンオキド-ポリプロピレンオキド-ポリエチレンオキドよりなるプルロニックを選択した。また、親水性高分子としてポリエチレンオキド、疎水性高分子としてポリプロピレンオキドを選択した。イミダゾール化プルロニック、ポリエチレンオキド並びにポリプロピレンオキドを調製したところ、NMR測定より7.1, 7.4, 8.2ppmにイミダゾール特有のピークが観察され、イミダゾール化がほぼ80%生じていることを確認した。このイミダゾール化プルロニック、ポリエチレンオキド並びにポリプロピレンオキド(ナノブラシ)を細胞培養デッシュに固定化させることが可能であった。プルロニック固定化量は、XPS測定により確認した。プルロニック F68(分子量10000、親水性ポリエチレンオキド80%)をポリリジン固定化デッシュに固定させたところ、プルロニック固定化量が、8.7 nmol/cm<sup>2</sup> (PL68-0.1), 34.0 nmol/cm<sup>2</sup> (PL68-1.0),

47.5 nmol/cm<sup>2</sup> (PL68-10), 52.7 nmol/cm<sup>2</sup> (PL68-50), 55.2 nmol/cm<sup>2</sup> (PL68-100), 64.5 nmol/cm<sup>2</sup> (PL68-500)のデッシュを調製することが可能であった。また、プルロニック F127(分子量10,000、親水性ポリエチレンオキド70%)をポリリジン固定化デッシュに固定させたところ、プルロニック固定化量が、1.8 nmol/cm<sup>2</sup> (PL127-0.1), 2.8 nmol/cm<sup>2</sup> (PL127-0.25), 4.2 nmol/cm<sup>2</sup> (PL127-0.5), 35.0 nmol/cm<sup>2</sup> (PL127-10)のデッシュを調製することが可能であった。

ナノセグメント固定化デッシュの水に対する接触角は、以下の結果が得られた。

(1) 37度における水に対する接触角;

62度(PLL)、43度(PL68-0.1)、37.5度(PL68-1.0)、36.5度(PL68-10)、35.5度(PL68-50)、32.5度(PL68-100)、32度(PL68-500)、48度(PL127-0.1)、46度(PL127-0.25)、47度(PL127-0.5)、42.5度(PL127-1.0)、41度(PL127-10)

(2) 25度における水に対する接触角;

63.5度(PLL)、43.0度(PL68-0.1)、37.5度(PL68-1.0)、36.0度(PL68-10)、32.5度(PL68-50)、31.0度(PL68-100)、30度(PL68-500)、51.5度(PL127-0.1)、44度(PL127-0.25)、40度(PL127-0.5)、38.5度(PL127-1.0)、34度(PL127-10)

(3) 4度における水に対する接触角;

37度(PLL)、21度(PL68-0.1)、21度(PL68-1.0)、19度(PL68-10)、16.5度(PL68-50)、16.5度(PL68-100)、16度(PL68-500)、27度(PL127-0.1)、24度(PL127-0.25)、23度(PL127-0.5)、16度(PL127-1.0)、11.5度(PL127-10)

以上より、PL68-10、PL68-50、PL68-500、PL127-0.5、PL127-1.0並びにPL127-10デッシュは、温度を4度に低下させると、表面親水性が増加する(水に対する接触角の低下)ことが確認できた。

#### B) ナノブラシ固定化細胞培養基板上での造血幹細胞保持

ナノセグメント固定化デッシュ(PL127-10)並びに市販のポリスチレン製細胞培養デッシュ中に臍帯血を直接挿入し、37度で4日間培養を行った。コントロール実験であるポリスチレン製細胞培養デッシュ中の臍帯血を1日間培養を行うと、臍帯血中に生存している造血幹細胞は、5-10%まで減少していた。一方、ナノセグメント固定化デッシュ(PL127-10)中の臍帯血では、培養1日後に70%、4日後に21%の造血幹細胞が生存していた。

ナノセグメント固定化デッシュ (PL127-1, PL127-10, PL127-50, PL68-1, PL68-10, PL68-50)、市販のポリスチレン製細胞培養デッシュ、さらに市販のバイオイナーテデッシュ (Nunc 社製、並びにハイドロセル (セルシード社製)) を用いて、臍帯血を低温である 4 度で 5 日間培養を行った。その結果、市販のポリスチレン製細胞培養デッシュ並びに市販のバイオイナーテデッシュ中の臍帯血における生存造血幹細胞数は、ほぼ同数であり 15%前後であった。一方、ナノセグメント固定化デッシュ (PL127-1, PL127-10, PL68-1, PL68-10) 中の臍帯血における生存造血幹細胞数は、50-65%前後であった。従って、造血幹細胞の保持の観点からは、市販のバイオイナーテデッシュより、本研究で調製したナノセグメント固定化デッシュのほうが、よりバイオイナーテナ特性を有していることが明らかとなった。

プルロニックナノセグメントが高密度で固定化されているナノセグメント固定化デッシュ (PL127-50, PL68-50) では、造血幹細胞の保持率が低下しており、市販のバイオイナーテデッシュと同程度の 15%であった。このことから、造血幹細胞の保持に用いられるバイオマテリアルは、最適な表面密度でナノセグメントを固定化されていることが重要であることが明らかとなった。この原因として、フレキシブルな細胞培養基板上に固定化されたナノセグメントは、造血幹細胞の生存度に貢献するが、過密に固定されたナノセグメント固定化基板では、ナノセグメントのフレキシブルな運動が抑制されるために、造血幹細胞の生存度が低下するためであると考察した。

プルロニック F127 並びに F68 と分子量が同等であるポリエチレングリコール (PEG) 6000 を細胞培養基板上に、プルロニック固定化表面反応と同様な反応を行うことにより、ポリエチレングリコール固定化基板を調製した。ポリエチレングリコール固定化基板上に培養した臍帯血中の生存造血幹細胞数は、5%前後であり、親水性セグメントを培養基板にグラフトしただけでは、バイオイナーテナ培養基板を調製することはできず、親水セグメント—疎水セグメント—親水セグメントを培養基板にグラフトすることが重要であることが明らかとなった。

### C) ナノブラシ固定化細胞培養基板上での間葉系幹細胞の培養と細胞剥離

様々な細胞外マトリックス (ジェラチン、コラーゲン、ラミニン、ビトロネクチン、フ

ィブロネクチン、マトリゲル) をポリスチレン製基板上に共有結合並びにコーティング法にて固定化させた。いずれの基板上に間葉系幹細胞を培養しても、間葉系幹細胞の表面マーカーの発現率に、顕著な違いは見られなかった。ジェラチン並びにビトロネクチンをコーティングした細胞培養基板上では、骨芽細胞への分化は促進されたが、様々な細胞外マトリックスを共有結合で固定化させた基板上では、骨芽細胞への分化は促進されなかった。一方、様々な細胞外マトリックスを共有結合で固定化させた基板上では、神経細胞への分化が促進されていた。特に、マトリゲル固定化基板並びにラミニン固定化基板で顕著であった。さらに、プルロニックを細胞外マトリックスとともに固定化させた基板では、細胞培養液を 4 度に低下させることにより、間葉系幹細胞の細胞剥離を引き起こすことが可能であった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 29 件)

- 1) A. Higuchi, Q.-D. Ling, S.-T. Hsu, Akihiro Umezawa, Biomimetic Cell Culture Proteins as Extracellular Matrices for Stem Cell Differentiation, *Chemical Reviews*, 112 (2012) in press, <http://dx.doi.org/10.1021/cr3000169> <SCI, Impact factor= 33.033>
- 2) A. Venault, Y. Chang, D. Wang, D. Bouyer, A. Higuchi, J. Lai, PEGylation of anti-biofouling polysulfone membranes via liquid- and vapor-induced phase separation processing, *J. Membr. Sci.*, (2012), doi:10.1016/j.memsci.2012.02.019, in press.
- 3) L.-Y. Chen, Y. Chang, J.-S. Shiao, Q.-D. Ling, Y. Chang, Y. H. Chen, D.-C. Chen, S.-T. Hsu, H. H. Lee, A. Higuchi, Effect of the surface density of nanosegments immobilized on culture dishes on ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood, *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 1749-1758.
- 4) Y. Chang, Y. Chang, A. Higuchi, Y. Shih, P.-T. Li, W.Y. Chen, E.-M. Tsai, G.-H. Hsiue, Bioadhesive Control of Plasma Proteins and Blood Cells from Umbilical Cord Blood onto the Interface Grafted with Zwitterionic Polymer Brushes, *Langmuir*, 28 (2012) 4309-4317. <SCI, Impact factor= 4.268>
- 5) A. Higuchi, P.-Y. Shen, J.-K. Zhao, C.-W. Chen, Q.-D. Ling, H. Chen, H.-C. Wang, J.-T. Bing, S.-T. Hsu, Osteoblast Differentiation of Amniotic Fluid-Derived Stem Cells

- Irradiated with Visible Light, *Tissue Engineering*, Part A, 17(21-22) (2011) 2593-2602 <SCI, Impact factor= 4.636>
- 6) **A. Higuchi**, J.-H. Lee, Y. Wang, W.-Y. Chen, Q.-D. Ling, Y. Chang, Evaluation of Bioactivity and Effect of Polymeric Stabilizers During Heat Treatment for the Unfolded Fraction of Human Epidermal Growth Factor, *Sen'i Gakkaishi*, 67(8) (2011) 185-191. <SCI, Impact factor= 0.202>
  - 7) **A. Higuchi**, L. Chen, J. Shiao, Q.-D. Ling, Y.-A. Ko, Y. Chang, Y. Chang, J.-T. Bing, S.-T. Hsu, Separation and Cultivation of Hematopoietic Stem Cells from Umbilical Cord Blood by Permeation through Membranes with Nano-Segments, *Current Nanoscience*, 7(6) (2011) 908-914. <SCI, Impact factor= 1.879>
  - 8) **A. Higuchi**, S.-C. Huang, P.-Y. Shen, Q.-D. Ling, J.-K. Zhao, Y. Chang, H.-C. Wang, J.-T. Bing, S.-T. Hsu, Differentiation Ability of Amniotic Fluid-derived Stem Cells Cultured on Extracellular Matrix-immobilized Surface, *Current Nanoscience*, 7(6) (2011) 893-901. <SCI, Impact factor= 1.879>
  - 9) **A. Higuchi**, Q.-D. Ling, Y.-A. Ko, Y. Chang, A. Umezawa, Biomaterials for the feeder-free culture of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, *Chemical Reviews*, 111 (2011) 3021-3034 <SCI, Impact factor= 33.033>
  - 10) Q.-D. Ling, L.-Y. Ho, Y.-A. Ko, Y. Chang, **A. Higuchi**, Visible Light Regulated Gene Expression and Neurite Outgrowth of Nerve Cells, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 44, 171-178 (2011) <SCI, Impact factor= 0.442>
  - 11) **A. Higuchi**, C.-W. Chuang, Q.-D. Ling, S.-C. Huang, L.-M. Wang, H. Chen, Y. Chang, H.-C. Wang, J.-T. Bing, Y. Chang, S.-T. Hsu, Differentiation Ability of Adipose-derived Stem Cells Separated from Adipose Tissue by A Membrane Filtration Method, *J. Membrane Sci.*, 366 (2011) 286-294. <SCI, Impact factor= 3.673>
  - 12) **樋口亜紺**, iPS 細胞とマテリアル研究—ヒト iPS 細胞のフィーダーフリー培養用バイオマテリアル、*医学のあゆみ*, 239(14), 1345-1351 (2011)
  - 13) **樋口亜紺**, ヒト ES 細胞, iPS 細胞のフィーダーフリー培養用バイオマテリアル (1) —細胞外マトリックス固定化基板、*医学のあゆみ*, 238(13), 1165-1170 (2011)
  - 14) **樋口亜紺**, ヒト ES 細胞, iPS 細胞のフィーダーフリー培養用バイオマテリアル (2) —グリコサミノグリカンならびに合成高分子固定化基板、*医学のあゆみ*, 238(13), 1171-1175 (2011)
  - 15) Y. Chang, W. Yandi, W.-Y. Chen, Y. Shih, C. Yang, Y. Chang, Q.-D. Ling, **A. Higuchi**, Akon, Tunable-Bioadhesive Copolymer Hydrogels of Thermoresponsive Poly(N-isopropyl acrylamide) Containing Zwitterionic Polysulfobetaine, *Biomacromolecules*, 11, 1101-1110 (2010). <SCI, Impact factor= 5.325>
  - 16) **A. Higuchi**, M. Tamai, Y. Tagawa, Y. Chang, Q.-D. Ling, Surface Modification of Polymeric Membranes for Low Protein binding, *Membrane Water Treatment*, 1(2), 103-120 (2010)
  - 17) **A. Higuchi**, M. Tamai, Y.-A. Ko, Y. Tagawa, Y.-H. Wu, B. D. Freeman, J.-T. Bing, Y. Chang, Q.-D. Ling, Polymeric Membranes for Chiral Separation of Pharmaceuticals and Chemicals, *Polymer Review*, 50, 113-143 (2010). <SCI, Impact factor= 8.000>
  - 18) **A. Higuchi**, S.-T. Yang, P.-T. Li, M. Tamai, Y. Tagawa, Y. Chang, Y. Chang, Q.-D. Ling, Shih-Tien Hsu, Direct Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Stem Cells from Umbilical Cord Blood on Membranes, *J. Membrane Sci.*, 351, 104-111 (2010) <SCI, Impact factor= 3.673>
  - 19) Y.-H. Wu, Y.-L. Liu, Y. Chang, **A. Higuchi**, B. D. Freeman, Effect of UV Intensity on Structure, Water Sorption, and Transport Properties of Crosslinked N-vinyl-2-pyrrolidone/N,N'-methylenebisacrylamide Films, *J Membrane Sci.*, 348(1-2), (2010) 47-55. <SCI, Impact factor= 3.673>
  - 20) **A. Higuchi**, H. Ling-Yi, L. Y. Huang, H. Chen, Y.-J. Chen, Q.-D. Ling, Measurements of Movement and Diffusion Coefficients of Single Cells on Polymeric Surface from Image Analysis, *J Biomat. Sci., Polym. Ed.*, 21, 1545-1558 (2010). <SCI, Impact factor= 1.842>
  - 21) Y. Chang, W.-L. Chu, W.-Y. Chen, J. Zheng, L. Liu, R. Ruaan, **A. Higuchi**, A systematic SPR study of human plasma protein adsorption behavior on the controlled surface packing of self-assembled poly(ethylene oxide) triblock copolymer surfaces, *J. Biomed. Mat. Res.*, 93A, 400-408 (2010) <SCI, Impact factor= 3.044>
  - 22) **A. Higuchi**, S.-T. Yang, Y.-D. Siao, P.-V. Hsieh, H. Fukushima, Y. Chang, W.-Y. Chen, Peroxidase Activity of DNA aptamer-Pt Complexes Prepared with Cisplatin, *J. Biomat. Sci., Polym. Ed.*, 21 (2010) 67-82. <SCI, Impact factor= 1.842>
  - 23) **A. Higuchi**, S.-T. Yang, P.-T. Li, Y. Chang, E. M. Tsai, Y. H. Chen, Y. Chen, H.-C. Wang, S.-T. Hsu, Polymeric Materials for Ex vivo Expansion of Hematopoietic Progenitor and Stem Cells, *Polymer Reviews*, 49(3) 2009, 181 - 200. <SCI, Impact factor= 8.000>



- 24) **A. Higuchi**, S.T. Yang, P.T. Li, Isolation and ex vivo expansion of hematopoietic stem cells from umbilical cord blood by membrane filtration method through surface-modified polyurethane foaming membranes, *J. Bioscience Bioeng.*, 108, S29-S30 (2009) <SCI, Impact factor= 1.707>
- 25) **A. Higuchi**, S.-T. Yang, P.-T. Li, H. Chen, R. Ruaan, W.-Y. Chen, Y. Chang, Y. Chang, E. M. Tsai, Q.-D. Ling, H.-C. Wang, S.-T. Hsu, Separation of hematopoietic stem and progenitor cells from human peripheral blood through polyurethane foaming membranes modified with several amino acids, *J. Appl. Polym. Sci.*, 114(2), 671-679 (2009). <SCI, Impact factor= 1.240>
- 26) Y. Chang, W.-Y. Chen, W. Yandi, Y.-J. Shih, W.-L. Chu, Y.-L. Liu, R. Ruaan, **A. Higuchi**, Dual-Thermoresponsive Phase Behavior of Blood Compatible Zwitterionic Copolymers Containing Nonionic Poly(N-isopropyl acrylamide), *Biomacromolecules*, 2009, 10, 2092–2100. <SCI, Impact factor= 5.325>
- 27) **A. Higuchi**, S.-T. Yang, P.-T. Li, R.-C. Ruaan, W.-Y. Chen, Y. Chang, Y. Chang, E. M. Tsai, Y. H. Chen, H.-C. Wang and S.-Ti. Hsu, Q.-D. Ling, Permeation of blood cells from umbilical cord blood through surface-modified polyurethane foaming membranes, *J. Membrane Sci.* 339 (2009) 184-188. <SCI, Impact factor= 3.673>
- 28) Y.C. Chiag, Y. Chang, **A. Higuchi**, W.Y. Chen, R.C. Ruaan, "Sulfobetaine grafted poly(vinylidene fluoride) ultrafiltration membranes exhibit excellent antifouling property" *J. Membrane Sci.*, 339 (2009) 151–159. <SCI, Impact factor= 3.673>
- 29) **A. Higuchi**, Y.-D. Siao, P.-V. Hsieh, H. Fukushima, Y. Chang, W.-Y. Chen, Preparation of Fractioned DNA aptamer-Pt complex through Ultrafiltration and the Colorimetric Sensing of Thrombin, *J. Membrane Sci.*, 328 (2009) 97–103. <SCI, Impact factor= 3.673>

[学会発表] (計 38 件)

1. **Akon Higuchi**, Differentiation Ability of Adipose-derived Stem Cells Separated from Adipose Tissue by a Membrane Filtration Method, Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society North America (TERMIS-NA), December 11-14, 2011, Houston, TX, USA.
2. **Akon Higuchi**, Differentiation ability of amniotic fluid-derived stem cells cultured on extracellular matrix-immobilized surface, the 242nd ACS National Meeting, August 28-September 1, 2011, Denver, Colorado, USA.
3. **Akon Higuchi** and C.-W. Chung, Differentiation ability of adipose-derived stem cells separated from adipose tissue by membrane filtration method, the Asia Pacific Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), August 3-5, 2011, Singapore, Singapore.
4. **Akon Higuchi**, Jun-Kai Zhao, Differentiation Ability and Pluripotency of Amniotic Fluid-derived Stem Cells Cultured on Extracellular Matrix-immobilized Surface, the Asia Pacific Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), August 3-5, 2011, Singapore, Singapore.
5. Shiao Jui-Shiang, **Akon Higuchi**, Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells on the surface having nano-segments and extracellular matrix proteins, the Asia Pacific Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), August 3-5, 2011, Singapore, Singapore.
6. Chen-han Wu, **Akon Higuchi**, Purification of human adipose tissue-derived stem cells by membranes filtration method, the Asia Pacific Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), August 3-5, 2011, Singapore, Singapore.
7. Chung-Ming Huang, **Akon Higuchi**, Preservation and cultivation of stem cells on the surface having nano-segments, the Asia Pacific Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), August 3-5, 2011, Singapore, Singapore.
8. **A. Higuchi**, Differentiation Ability of Adipose-derived Stem Cells Separated from Adipose Tissue by A Membrane Filtration Method, The International Congress on Membranes and Membrane Processes 2011 (ICOM2011), July 23-29, 2011, Amsterdam, Holland.
9. **Akon Higuchi** and Po-Yen Shen, Osteoblast Differentiation of Human Amniotic Fluid-derived Stem Cells Irradiated with Visible Light, 9<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cells, June 15-18, 2011, Toronto, Canada.
10. **A. Higuchi**, Differentiation of Amniotic Fluid-derived Stem Cells Cultured on Surface Immobilized Extracellular Matrix, Key Stone Symposia on Molecular and Cellular Biology, "Stem Cells in Development, Tissue, Homeostasis and Disease", January 30-February 4, 2011, Santa Fe, New Mexico, USA.
11. **Akon Higuchi**, Separation and



- Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells by Membrane Filtration Method, The 6th 2010 Annual Meeting of Korean Society of Stem Cell Research, October 22, Seoul, Korea
12. **A. Higuchi**, Analysis of Cancer Stem Cells in Colon Cancer Cells Being Dosed with Anti-cancer Drugs The New York Stem Cell Foundation's fifth annual translational stem cell research conference on October 12-13, 2010, New York, USA.
  13. **Akon Higuchi**, Preservation of hematopoietic stem cells from umbilical cord blood stored in a surface having polymer nano-segments, Separation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells by Membrane Filtration Method, The Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (Termis) 2010 Asia pasific meeting, September 15-19, 2010, Sydney. Australia
  14. **Akon Higuchi**, Preservation of Hematopoietic Stem Cells from Umbilical Cord Blood Stored in a Surface Derivatized with Polymer Nanosegments, The Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (Termis) 2010 Asia pasific meeting, September 15-19, 2010, Sydney. Australia
  15. Po-Yen Shen & **Akon Higuchi**, Can visible light enhance pluripotent gene expression and improve the differentiation ability of amniotic fluid stem cells? The Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (Termis) 2010 Asia pasific meeting, September 15-19, 2010, Sydnet. Australia
  16. Wan-Chun Yu and **Akon Higuchi**, Purification and Characterization of Cancer Stem Cells in Colon Cancer Cells Treated by Anti-Cancer Drugs, The Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (Termis) 2010 Asia pasific meeting, September 15-19, 2010, Sydnet. Australia
  17. Li-Ying Chen, Pei-Tsz Li & **Akon Higuchi**, Cultivation of hematopoietic stem cells on the surface-mosdified materials having nano-segments and extracellular matrix proteins, The Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (Termis) 2010 Asia pasific meeting, September 15-19, 2010, Sydnet. Australia
  18. Shiau-Chian Huang, Han-Chow Wang, and **Akon Higuchi**, Effect of micro-environment on pluripotent gene expression and differentiation of mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic-fluid, The International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 8th Annual Meeting, , June 16-19, San Francisco, USA. 2010
  19. Pei-Tsz Li, Li-Ying Chen, and **Akon Higuchi**, Purification and cultivation of hematopoietic stem cells through surface-modified membranes having nano-segments and extracellular matrix proteins from umbilical cord blood, The International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 8th Annual Meeting, , June 16-19, 2010, San Francisco, USA.
  20. **Akon Higuchi**, Preservation of hematopoietic stem cells from umbilical cord blood stored in a surface having polymer nano-segments, The International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 8th Annual Meeting, , June 16-19, 2010, San Francisco, USA.
  21. Hsin Ling Hsieh, Wen-Yih Chen, and **Akon Higuchi**, Drugs in a culture medium of Lovo Cells Enhance production of Carcinoembryonic Antigen and Identification of Colon Cancer Stem Cells, 2nd TERMIS World Congress in conjunction with 2009 Seoul Stem Cell Symposium (TERMIS WC2009), August 31 - September 3, 2009, Seoul, Korea
  22. Chuang Chung Wei, and **Akon Higuchi**, Isolation of Adipose Tissue-derived Stromal Cells from Adipose Tissues by Filtration Method through Porous Membrane having Nano-segments and Their Characteristics, 2nd TERMIS World Congress in conjunction with 2009 Seoul Stem Cell Symposium (TERMIS WC2009), August 31 - September 3, 2009, Seoul, Korea
  23. Pei-Tsz Li, Siou-Ting Yang, and **Akon Higuchi**, Separation of Hematopoietic Stem cells from Human Peripheral Blood and Umbilical Cord Blood through Surface-modified Polyurethane Forming Membranes, 2nd TERMIS World Congress in conjunction with 2009 Seoul Stem Cell Symposium (TERMIS WC2009), August 31 - September 3, 2009, Seoul, Korea
  24. Shiau-Chian Haung, Han-Chow Wang, and **Akon Higuchi**, Effect of Micro-environment on Pluripotent Gene Expression and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Second-trimester Amniotic Fluid, 2nd TERMIS World Congress in conjunction with 2009 Seoul Stem Cell Symposium (TERMIS WC2009), August 31 - September 3, 2009, Seoul, Korea
  25. **Akon Higuchi**, Pei-Tsz Li, and Siou-Ting Yang, Preservation of Hematopoietic Stem Cells from Umbilical Cord Blood Stored in a Surface Derivatized with Polymer Nanosegments, 2nd TERMIS World Congress in conjunction with 2009 Seoul

- Stem Cell Symposium (TERMIS WC2009), August 31 - September 3, 2009, Seoul, Korea
26. Siou-Ting Yang, Pei-Tsz Li, **Akon Higuchi**, Separation and ex vivo expansion of hematopoietic stem cells from human blood by membrane filtration method and magnetic associated sorting method, The Fifth Conference of Aseanian Membrane Society (AMS5), Kobe, Japan, July 2009. (**Best Student Present Poster Award at AMS5-MSA**)
  27. Ling-Yi Ho, Qing-Dong Ling, **Akon Higuchi**, Visible light regulates gene expression and neurite outgrowth of nerve cells cultured on collagen-coated membranes, The Fifth Conference of Aseanian Membrane Society (AMS5), Kobe, Japan, July 2009. (**Best Student Present Poster Award at AMS5-MSA**)
  28. Jen-Hao Lee, Toshiko Abe, Motohisa Matsuzaki, **Akon Higuchi**, Stabilization of human epidermal growth factor (hEGF) and its bioassay, The Fifth Conference of Aseanian Membrane Society (AMS5), Kobe, Japan, July 2009.
  29. **Akon Higuchi**, Permeation and isolation of hematopoietic stem cells and blood cells from umbilical cord blood through surface-modified polyurethane membranes having nanosegments, The Fifth Conference of Aseanian Membrane Society (AMS5), Kobe, Japan, July 2009.
  30. **Akon Higuchi**, Pei-Tsz Li, Siou-Ting Yang, PRESERVATION OF HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELLS FROM UMBILICAL CORD BLOOD STORED IN A SURFACE DERIVATIZED WITH POLYMER NANOSEGMENTS, International Symposium of Stem Cells and Bioengineering, Taian, Taiwan, May, 2009.
  31. **樋口亜紺**, 高分子ナノセグメント固定化表面上における臍帯血中造血幹細胞の保持、高分子討論会、2009年9月
  32. **樋口亜紺**, 福嶋久, DNA 酵素結合アプター分析からスロンピンの比色分析、高分子討論会 (58th Symposium on Macromolecules, Polymer Society of Japan(2009)), 2009年9月
  33. **樋口亜紺**, 臍帯血からの造血幹細胞の膜分離法を用いた直接増殖法、高分子討論会 (60th Symposium on Macromolecules, Polymer Society of Japan(2019)), 2010年9月
  34. **樋口亜紺**, Separation of Mesenchymal Stem Cells from Adipose tissue by Membrane Filtration Method and Their Differentiation Ability、高分子討論会(60th Symposium on Macromolecules, Polymer Society of Japan(2019))、2010年9月
  35. **Akon Higuchi**, Chung-Wei Chuang, Differentiation Ability of Adipose-derived Stem Cells Separated from Adipose Tissue by a Membrane Filtration Method, 膜 Symposium 2010, 2010年11月20日
  36. **Akon Higuchi**, Differentiation Ability of Adipose-derived Stem Cells Separated from Adipose Tissue by a Membrane Filtration Method, 第60回高分子年次学会, 2011年5月, 大阪、日本
  37. Wan Chun Yu, **Akon Higuchi**, Purification and characterization of Cancer Stem Cells in Colon Cancer Cells Cultured under Several Conditions, 第60回高分子年次学会, 2011年5月, 大阪、日本
  38. Po-Yen Shen, Han-Chow Wang, **Akon Higuchi**, Osteoblast Differentiation of Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Irradiated with Visible Light, 第60回高分子年次学会, 2011年5月, 大阪、日本
- [図書] (計 2 件)
- 1) **樋口亜紺**, 医療分野における材料と機能膜 (樋口亜紺監修)、シーエムシー出版、p. 1-328, 2011年
  - 2) **Akon Higuchi**, Separation & Purification of Stem and Blood cells by Porous Polymeric Membranes, Comprehensive Membrane Science and Engineering (Eds. E. Driolli, L. Giorno), Elsevier, Cambridge, MA, ISBN-13: 978-0-444-53204-6. 2010, August.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

樋口亜紺 (HIGUCHI AKON)

独立行政法人国立成育医療研究センター・  
生殖・細胞医療研究部・共同研究員

研究者番号：30189766