再生医療と幹細胞研究に関連した高分子材料

岩田博夫*・有馬祐介**

Polymeric Materials for Stem Cell Research and Regenerative Medicine

Hiroo IWATA and Yusuke ARIMA
Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University
E-mail: iwata@frontier.kyoto-u.ac.jp

Abstract: Stem cells, such as embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells, are an attractive cell source for regenerative medicine. For medical use of stem cells, many technologies need to be developed by both biological and engineering approaches. Design of substrates for stem cell culture is one of the important issues in the stem cell research. In this article, we review recent progress in materials research associated with stem cell research.

Keywords: Stem Cell/Regenerative Medicine/Culture Substrate

1. はじめに

細胞生物学のデータの過半はポリスチレン表面で収集されてきたと言っても過言でない。きわめて不自然な状態であるとの指摘、また、幾度となくもっと優れた培養基材があるはずだと言われながら、現在でも大半の細胞培養実験ではポリスチレン製のフラスコやシャーレが使われている。しかし、幹細胞と再生医療の注目度が非常に高まり、状況が少し変わってきた。幹細胞を用いた再生医療を行うためには、幹細胞を未分化の状態で数を増やす、望みの機能をもった細胞へと分化させる、その後、治療に用いる組織を作製するなどの最低三つのことを行う必要がある。幹細胞を用いた再生医療を実現するため、新しい高分子材料の探索が行われるようになってきた。研究の現状を概観する。

iPS細胞¹⁾の報道に見られるように、多能性幹細胞-再生医療はもっともホットな研究領域である。専門家が最先端の幹細胞とそれを用いた再生医療の研究を紹介した本²⁾が出版されている。しかし、融合領域研究では、片方の研究者にとっては今さら説明するまでもないと思っている常識的なことが、共同研究者にとってはよく理解できないこと

として残ってしまうことがある。再生医療の実現を目指す高分子材料側の研究者にとっては、まさにそのようなことがたくさん残っている領域である。

2. なぜいま幹細胞研究か

ヒトの体は約260種類の細胞からなり、その総数は約60兆個もある。これらの細胞はすべて1個の受精卵から胚発生の過程で生まれてきた。また、体内のいずれの細胞も同じDNA(遺伝情報)をもっている。しかし、それぞれの細胞が異なる性格を有するのは、発現している遺伝子の組み合わせが異なるためである。最近新聞などでiPS細胞をはじめ多くの幹細胞の名前を目にすることも多いと思う。細胞を分化能で分類すると、1) 多能性幹細胞、2) 組織幹細胞、3) 前駆細胞、4) 成熟細胞に大別される。胚性幹細胞(ES細胞)やiPS細胞が分類される多能性幹細胞は、条件さえ整えば体を構成するすべての細胞に分化することができる細胞である。組織幹細胞は、成体の中に存在し限定された組織、たとえば神経幹細胞では神経組織を構成する神経細胞やグリア細胞にのみ分化できる細胞である。また、

* (左)

京都大学再生医科学研究所(606-8507 京都市左京区聖護院川原町53)・教授、工学博士。1978年 京都大学大学院工学研究科博士課程高分子化学専攻単位取得退学。専門は再生医学、医用高分子。

** (右)

同上・科学技術振興助教、博士(工学)。2004年 京都大学大学院工学研究科博士後期課程高分子化学専攻単位取得退学。専門は医用高分子、表面科学。

4. 幹細胞を用いた再生医療での合成高分子の役割

幹細胞を用いた再生医療を実現するためには、幹細胞を入手し、幹細胞を増殖させ、治療に使える機能細胞に分化誘導し、さらに、機能が十分に発揮できる状態で細胞を移植しなければならない。合成高分子材料は、最初の幹細胞入手以外の三つのステップで重要な役割を担っている。

4.1 細胞の確保

幹細胞を細胞培養液に分散しプラスチック製のシャーレに播種する。細胞はシャーレの底面に張り付いて自己増殖また分化を開始する。幹細胞の機能を制御する方法としては、①細胞増殖因子などの水溶性の生理活性分子を培養液に加える、②シャーレ表面の物理化学的処理、または、生理活性分子の表面への固定化、③自分自身また近くの細胞が分泌する分子の影響を積極的に用いるなどがある。これら三つの中で、合成高分子が関与するのはおもに②である。

4.1.1 高分子材料と細胞との相互作用

まず合成高分子と細胞との相互作用の基本的なことを復習しておく。細胞培養液には、食塩などの無機塩類、各種アミノ酸などの栄養と数種のビタミンからなる基本培養液に牛胎児血清や各種細胞増殖因子などが加えられている。培養液に分散された細胞をプラスチック製のシャーレに入れると、図1(A)に示したようにまずシャーレ表面へ培養液中のタンパク質が吸着し、次いで吸着タンパク質層上に細胞の接着が起こる⁷⁾。もう少し細胞の接着部位を細かく見ると、図1(B)のように細胞膜にある膜タンパク質のインテグリンがタンパク質吸着層中のフィブロネクチンなどの細胞接着糖タンパク質と相互作用することで細胞が接着している。さらに時間が経過すると細胞自身がフィブロネクチンなどを分泌して自身の環境を整える。ここで、心に

図1 (A) 人工材料へのタンパク質吸着(実線)および細胞接着(点線)⁷⁾、およびその概念図。(B) 人工材料表面へ吸着したタンパク質と細胞との相互作用。

とどめておかなければならないことは、細胞は決して人工材料に直接接着することではなく、必ずタンパク質層を介して接着することである。

4.1.2 アレイを用いた幹細胞培養基材のスクリーニング

幹細胞培養基材を開発する効率的な方法は、数多い候補材料の中から可能性のあるものを絞り込み(スクリーニング)、次に絞り込んだ材料について詳細な解析を行うことである。1枚の基板に微量の材料をスポットし、数十～数千のスポットを配置したアレイを作製する。その上で細胞培養を行い、数日後細胞の状態を評価する。異なる材料上での細胞の挙動を一目で評価できるため、たいへん都合がよい。

ヒトES細胞の増殖と分化を制御するための材料の効率的なスクリーニング法がAndersonらにより報告されている⁸⁾。25種のアクリル系モノマーを組み合わせた1,700種以上の混合溶液を25×75mmのガラス板にアレイ状にスポットし、これをアルゴン雰囲気下で重合した。このガラス板上にヒトES細胞を播種して培養を行った。この方法の効率の良い点は、モノマーの状態で混合し、1,700種以上の高分子のスポットを一度の重合操作で作製できることである。彼らは細胞の増殖を顕著に促進するスポット、また、分化を促進するスポットを見いだしている。これらのスポットのモノマー組成の情報をいれば、幹細胞の増殖また分化に適した材料を合成できる。さらに彼らは、培養液に加える増殖因子などを変えることで、望む方向へ分化させる基材と培養液の組み合わせを効率よくスクリーニングできるとしている。この研究は、幹細胞の分化を制御する合成高分子を見いだせる方法として魅力的である。しかし、図1(A)のように、細胞は吸着タンパク質層を介して材料と相互作用しており、高分子材料が細胞に与える影響は間接的である。さらに、吸着タンパク質層は培養液に加えた牛胎児血清に由来する。従来から幾度となく指摘されているように、牛血清は細胞培養時の大きな不安定要因であり、異なる牛血清を用いたときに同じ結果が得られるかが不安である。

材料の物理化学特性を変えて間接的に細胞機能を制御するよりは、前もって材料表面に細胞と相互作用する分子を固定化し、その表面で幹細胞を培養するほうが確実性が高いと考えられる。加藤ら⁹⁾は、フィブロネクチンなど4種の細胞接着因子と神経増殖因子(NGF)など4種の細胞増殖因子単独またはそれらの混合物計25個をアレイ状に固定化した後、その上で神経幹細胞の培養を行い、幹細胞数を増加させる、または、分化を促進する培養基材の探索を行った(図2(A))。たとえば、フィブロネクチンと毛様体由来神経栄養因子(CNTF)の混合物のスポット上では神経幹細胞はアストロサイトに分化していくことがわかった。Soenら¹⁰⁾は固定する因子をmorphogenやシグナルタンパク質にも広げ、44組の因子の組み合わせたアレイ基板を作製し、神経幹細胞の挙動を詳しく調べている。また、

図2 アレイを用いた細胞培養基材のスクリーニング

(A) 細胞接着因子と細胞増殖因子の混合物を固定化したスポット上で2日間培養した神経幹細胞⁹⁾。神経系細胞で特異的に発現している β -チューブリンとアストロサイトで発現しているGFAPの免疫染色を行い、神経幹細胞の分化を調べた（カラーは原著を参照）。LN: ラミニン, FN: フィブロネクチン, Pro-L, F: プロネクチン-L, F, PEI: ポリエチレンジミン, EGF: 上皮細胞増殖因子, CNTF: 毛様体由来神経栄養因子, NGF: 神経成長因子, NT-3: ニューロトロフィン-3。スケールバー: 200 μ m。 (B) 支持細胞探索アレイ²²⁾。3種の細胞を左図のパターンに接着させ、その上でマウスES細胞の培養を8日間行う。その後、神経系細胞で発現している β -チューブリンの免疫染色を行った。PA6: マウス頭蓋骨由来骨髄間質細胞株, HEK: ヒト胎児腎由来上皮細胞株, HUVEC: ヒト臍帯静脈内皮細胞。

Flaim ら¹¹⁾はコラーゲンのタイプI, IIIとIV, 細胞接着タンパク質のラミニンとフィブロネクチンの31個の各種混合物をやはりアレイ状に配置してマウスES細胞を培養している。レチノイン酸を添加した培養液を用いて、ES細胞の分化を調べ、タイプIコラーゲンとフィブロネクチンの混合スポット上で肝臓細胞への分化効率が高かったと報告している。

細胞膜のインテグリンは細胞接着糖タンパク質の分子鎖の一部分と相互作用している。そのもっとも有名なアミノ酸配列がRGD（アルギニン-グリシン-アスパラギン酸）である。このトリペプチドを合成高分子の材料の表面に固定化すると、細胞はよく接着するようになる。そのほかにも細胞接着に関与する多くのオリゴペプチドが報告されてきた。Kiessling ら¹²⁾は、ラミニン由来のオリゴペプチドを末端につけた種々のアルカンチオールを合成し、これをアレイ状にスポットした基板を作製し、ES細胞の培養基材のスクリーニングを行い、ES細胞がよく接着し未分化状態を維持した状態で増殖するオリゴペプチドを見いだしている。

アレイを用いたスクリーニングは効率がいいが、難点は、多くの細胞は1~2日に1回分裂を起こすので、少し長期の培養が必要な実験系では細胞がスポットからあふれ出してしまう。泥臭いようではあるが、従来から行われてきたシャーレを用いた評価も捨てがたい利点がある。

4.1.3 未分化維持用培養基材

現在、ヒトES細胞もiPS細胞もマウス胎児線維芽細胞の上で培養することで、多分化能を維持した未分化状態で増殖させている。すなわち、マウス胎児線維芽細胞が分泌する何らかの因子により、多能性幹細胞の未分化状態が維持されている。しかし、エイズや狂牛病に見られるように、動物由来のウイルスやタンパク質がヒトに致死性の病気を

引き起こしたことから、ヒトの治療には動物由来の細胞やタンパク質に接触させたことのない細胞を用いることが望ましい。このため、動物由来の細胞やタンパク質を含まないヒトES細胞の培養系の開発が行われている。培養液についてはすでに市販されているものもある¹³⁾。なかでもLudwig ら¹⁴⁾により開発された線維芽細胞増殖因子(bFGF) 100 ng/mLとトランスフォーミング成長因子- β (TGF- β) 0.6 ng/mLを添加した培養液は、動物由来成分をまったく含ずヒトES細胞を未分化のまま維持できる培養液である。ただ、残念なのはES細胞をシャーレに接着させるためにマウス肉腫由来の細胞外マトリックス(マトリジェル)でシャーレ表面をコートする必要がある。このため完全に動物由来タンパク質との接触がないヒトES細胞の培養系が確立できているわけではない。動物由来成分を含まない培養基材の開発の必要性は認識されているものの、その報告例は少ない。

細胞と合成高分子の相互作用では、上記したように吸着タンパク質層が介在する。合成高分子を精密に設計し合成したとしても、その幹細胞への影響は吸着タンパク質を介する間接的なものであり、直接的な影響を幹細胞に与えることはできない。その解決策として、前項でも述べたが生物学の知見を用いて細胞の機能にとって大事なタンパク質また相互作用部位のオリゴペプチドを固定化することで、細胞の機能を制御できる培養基材を作製する試みがある。たとえば、赤池ら¹⁵⁾は、細胞間接着因子であるカドヘリンと免疫グロブリンのFc部分の融合タンパク質をつくり、これを固定化した培養基材上でマウスES細胞を培養したところ、長期間未分化状態で維持さらに増殖させることができたと報告している。加藤ら¹⁶⁾は、上皮細胞増殖因子(EGF)を配向固定した基材上でラットの神経幹細胞を培養

すると、純度 95%以上の純度で神経幹細胞を未分化状態で増殖させ、さらに継代培養を行うことで神経幹細胞を大量に調製できることを報告している。佐藤ら¹⁷⁾は、ヒト間葉系幹細胞の馴化培地を作製し、この馴化培地を用いてサル ES 細胞を細胞接着トリペプチド RGD を固定化した基材上で培養すると、未分化状態で増殖させること、さらに 22 回継代した後もテラトーマ形成能を維持していたと報告している。この系は、動物由来のタンパク質の混入がきわめて少ない培養系である。

4.1.4 分化誘導

幹細胞から治療に役立つ機能（たとえばインスリンを分泌する機能）をもった細胞を分化誘導する試みは多数ある。発生過程の知見をもとに時間の経過とともに順次種々のシグナル因子を培養液に加えるなどの工夫がされている。しかし、培養基材にはさほど多くの注意が払われていない。ここでは、培養基材の特性を巧みに制御することで幹細胞の分化を制御した研究例を二つ紹介する。

Chen ら¹⁸⁾は、細胞の接着面積を制御することで間葉系幹細胞の分化方向を制御できることを示した。ポリジメチルシロキサン (PDMS) で微細なパターンのスタンプをつくる。これにフィブロネクチン (FN) の溶液を塗り、平坦な別の PDMS の表面に押し付けて FN を吸着固定したマイクロパターンをつくる。FN が吸着していない部分へは界面活性剤 Pluronic F108 を吸着させ細胞接着を防ぐ。この FN のマイクロパターン上で間葉系幹細胞を培養すると、細胞接着部位が小さいスポット上では間葉系幹細胞は細胞が広がるができず球状の形態をとる。この状態で培養を続けると脂肪細胞へと分化した。一方、接着面積が広いスポット上では細胞は広がった扁平な形態をとり、骨芽細胞へと分化した。彼らは、培養基材上での細胞の広がり幹細胞の運命に大きな影響を及ぼすことを明確に示した。

Discher ら¹⁹⁾は、培養基材の柔らかさが間葉系幹細胞の分化に与える影響を調べている。まずポリアクリルアミドの架橋密度を変えることで種々の硬さの異なるゲルを作製し、次に、細胞接着性を付与するために表面にコラーゲンを固定化する。この表面で間葉系幹細胞の培養を行ったところ、脳の組織のように柔らかいゲル (1 kPa) 上では神経系の細胞へ、より弾性が増したゲル (10 kPa) 上では筋肉系の細胞へ、さらに硬いゲル (100 kPa) 上では骨系の細胞へと分化していくと報告している。

4.1.5 三次元培養

体の中では細胞は三次元的に他の細胞の近傍に位置し、それらの相互作用により細胞運命が決められている。現在多用されているポリスチレン製のシャーレに接着した状態での細胞培養は、体の中の細胞の状態とは異なる状態であり、三次元培養方法の確立が望まれている。三次元培養の試みはなかったわけではない。古くは 2, 3 千個の肝細胞からなる凝集体 (スフェロイド) を形成させた後培養を行う

と、肝細胞の機能を長期間維持できると報告されてきた²⁰⁾。ES 細胞を凝集体 (胚様体) 状で培養し分化を促進する。また、神経幹細胞を凝集体 (ニューロスフェア) 状で培養し、神経幹細胞数を増加させるなどの試みが行われてきた。いずれの場合も凝集体の直径は数百 μm 程度であり、それ以上大きくなると中心部への酸素供給が不十分になり、細胞が壊死に陥る。酸素供給は再生医療の臨床応用でも大きな足かせとなっている。In vitro で組織再生に成功している組織は皮膚、粘膜、角膜など非常に薄いフィルム (シート) 状の二次元組織のみである²¹⁾。

体の中で細胞は相互にその機能を決めている。また、ES 細胞または iPS 細胞を未分化の状態で維持・増殖させるときには、マウス胎児線維芽細胞の上で培養することが行われている。ES 細胞または iPS 細胞から機能をもった細胞を分化誘導するときにも、他種の細胞の上で幹細胞を培養する。これらは擬似三次元培養である。山添ら²²⁾は細胞間の組み合わせを効率良く調べるための手法として、細胞アレイを用いた方法を提案している。種々の細胞をアレイ状にスポットしたあと培養することで細胞アレイを作製し、さらにこの上に ES 細胞を播種し所定期間培養する。図 2(B) に示した例は、神経系細胞への分化誘導を調べた例であり、PA6 細胞は ES 細胞を効率良く神経系細胞へ分化誘導していることがわかる。

5. 移植用材料

幹細胞から分化誘導した機能細胞を治療に役立つ状態で移植する必要がある。ポリ乳酸やポリグリコール酸とその共重合体、コラーゲンやゼラチン、またはリン酸カルシウム系のセラミックスから作製した足場 (スカホールド) に細胞を播種した後移植する試みは古くから行われてきた。すでに多くの成書²³⁾もあるので割愛する。

現在、幹細胞を用いた医療への期待の大きい疾患は、糖尿病、パーキンソン病と脊髄損傷であろう。前二者は、従来行われてきた亡くなられた方から分離した細胞の移植による治療実績から、幹細胞由来のインスリンまたはドーパミンを分泌する細胞を移植できればかなり大きな治療効果が期待できる。しかし、多くの問題も残されている。移植直後に多くの細胞が死滅し、残っているのは移植細胞の 20~30% 程度ではないかと言われている。これは細胞移植部位での酸素供給の不足、血液凝固系や補体系の活性化さらに炎症反応によって移植細胞が障害されるためだとされている。移植初期の非特異的な細胞障害に引き続き、ホストの免疫系による拒絶反応が起きる。患者自身の iPS 細胞由来の細胞を移植する場合には拒絶反応は起きないが、1 型糖尿病のように自己免疫疾患の治療の場合、自己免疫反応により移植細胞が攻撃される。移植細胞をこれらの攻撃から保護する工夫が必要である。

図3 (A) 腭ランゲルハンス島 (腭島) の表面修飾による血液凝固の抑制²⁴⁾。(B) 腭島の表面修飾に用いたポリビニルアルコール (PVA) 誘導体。(C) 未処理腭島およびウロキナーゼ固定化腭島を用いたフィブリンプレートアッセイ。ウロキナーゼの作用によりフィブリン (血栓の主成分) を溶解させることができる。

最近、細胞膜を修飾し上記問題を解決しようとする提案がなされている (図3)。寺村ら²⁴⁾は、図3(B)に示したように側鎖に長いアルキル鎖とチオール基を有するポリビニルアルコールを用いて、細胞表面に血栓を溶解する酵素ウロキナーゼを固定化した。血管内に細胞を移植したときに起こる血液凝固を防止しようとの試みである。世界の数グループで移植細胞の生着率の向上のため同様の試みが行われているが、いまだ、臨床例も少なく今後の結果を踏まえてさらなる改良が必要であろう。

6. おわりに

幹細胞を用いた再生医療では、細胞の増殖と分化誘導と時間のかかるステップがあるため、医療の必須要件“必要となすにすぐ入手できる (off the shelf)”ことをいかに実現するのが大きな問題である。“off the shelf”を実現するためには、多能性幹細胞から組織幹細胞を分化誘導し、この凍結ストックをつくり (組織幹細胞バンク)、必要に応じて組織幹細胞から1, 2段の操作で細胞数を増やしさらに機能細胞へと分化誘導して治療に使うのが現実的であろう。しかし、もっともよく研究されているES細胞でさえ、組織幹細胞を分化誘導し、組織幹細胞の状態で維持増殖できたとする組織例は限られている。体の中で組織幹細胞は細胞外マトリックスと保育細胞からなるニシェ (Niche) に存在する。ニシェから出た組織幹細胞は前駆細胞へと分化するとも言われている。これらのことを考えるとES細胞から分化誘導した組織幹細胞を液性の因子のみで維持・増殖させることはできず、人工のニシェの環境で組織幹細胞を保育することが必要だろう。人工のニシェ作製の観点から培養基材の開発を見直し、さらに発展させることは実用

上の必要性はもとより基礎研究としても魅力的であり、今後高分子化学者への期待が高い研究課題である。

謝辞 京都大学再生医科学研究所幹細胞研究センター准教授の末盛博文博士には幹細胞について多くのことをご教授いただいた。紙面を借りて謝意を表します。ここに紹介したわれわれの研究の多くは文部科学省神戸地域知的クラスター創成事業“細胞の2, 3-Dディスプレイとその次世代分析システムへの展開”と文部科学省リーディングプロジェクト“ナノテクノロジーを活用した人工臓器の開発”で行った研究の成果である。改めて感謝いたします。

文 献

- 1) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka: *Cell*, **131**, 861 (2007)
- 2) たとえば、山中伸弥, 中内啓光編集: 再生医療へ進む最先端の幹細胞研究 (実験医学増刊 Vol. 26-5), 羊土社, 2008
- 3) H. Matsumura, M. Tada, T. Otsuji, K. Yasuchika, N. Nakatsuji, A. Surani, T. Tada: *Nature Methods*, **4**, 23 (2007)
- 4) H. Suemori, K. Yasuchika, K. Hasegawa, T. Fujioka, N. Tsuneyoshi, N. Nakatsuji: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**, 926 (2006)
- 5) M. Kanatsu-Shinohara, K. Inoue, J. Lee, M. Yoshimoto, N. Ogonuki, H. Miki, S. Baba, T. Kato, Y. Kazuki, S. Toyokuni, M. Toyoshima, O. Niwa, M. Oshimura, T. Heike, T. Nakahata, F. Ishino, A. Ogura, T. Shinohara: *Cell*, **119**, 1001 (2004)
- 6) B. A. Reynolds, W. Tetzlaff, S. A. Weiss: *J. Neurosci.*, **12**, 4565 (1992)
- 7) Y. Arima, H. Iwata: *J. Mater. Chem.*, **17**, 4079 (2007)
- 8) D. G. Anderson, S. Levenberg, R. Langer: *Nature Biotechnol.*, **22**, 863 (2004)
- 9) M. Nakajima, T. Ishimuro, K. Kato, I.-K. Ko, I. Hirata, Y. Arima, H. Iwata: *Biomaterials*, **28**, 1048 (2007)
- 10) Y. Soen, A. Mori, T. D. Palmer, P. O. Brown: *Mol. Syst. Biol.*, **2**, doi: 10.1038/msb4100076 (2006)
- 11) C. J. Flaim, S. Chien, S. N. Bhatia: *Nature Methods*, **2**, 119 (2005)
- 12) R. Derda, L. Li, B. P. Orner, R. L. Lewis, J. A. Thomson, L. L. Kiessling: *ACS Chem. Biol.*, **2**, 347 (2007)
- 13) Technology Feature: *Nature*, **451**, 859 (2008)
- 14) T. E. Ludwig, M. E. Levenstein, J. M. Jones, W. T. Berggren, E. R. Mitchen, J. L. Frane, L. J. Crandall, C. A. Daigh, K. R. Conard, M. S. Piekarczyk, R. A. Llanas, J. A. Thomson: *Nature Biotechnol.*, **24**, 185 (2006)
- 15) M. Nagaoka, U. Koshimizu, S. Yuasa, F. Hattori, H. Chen, T. Tanaka, M. Okabe, K. Fukuda, T. Akaike: *PLoS ONE*, **1**, e15 (2006)
- 16) T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato, Y. Arima, H. Iwata: *Biomaterials*, **28**, 3517 (2007)
- 17) H. Sato, H. Suemori, J. Toguchida, H. Iwata: *Tissue Engineering*, **13**, 1539 (2007)
- 18) R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, C. S. Chen: *Dev. Cell*, **6**, 483 (2004)
- 19) A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher: *Cell*, **126**, 677 (2006)
- 20) J. Landry, D. Bernier, C. Ouellet: *J. Cell Biol.*, **101**, 914 (1985)
- 21) J. Yang, M. Yamato, T. Shimizu, H. Sekine, K. Ohashi, M. Kanzaki, T. Ohki, K. Nishida, T. Okano: *Biomaterials*, **28**, 5033 (2007)
- 22) H. Yamazoe, H. Iwata: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 292 (2005)
- 23) Y. Ikada: “Tissue Engineering: Fundamentals and Applications,” Academic Press, 2006
- 24) T. Totani, Y. Teramura, H. Iwata: *Biomaterials*, **29**, 2878 (2008).