

機能性磁性ナノ粒子を用いた三次元組織構築技術

井藤 彰,^{*,a} 本多裕之,^b 上平正道^a

Construction of 3D Tissue-Like Structure Using Functional Magnetite Nanoparticles

Akira ITO,^{*,a} Hiroyuki HONDA,^b and Masamichi KAMIHIRA^a

^aDepartment of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Kyushu University, 744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan, and ^bDepartment of Biotechnology, School of Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan

(Received August 1, 2007)

Magnetic nanoparticles for medical applications have been developed by many researchers. Since these nanoparticles have unique magnetic features not present in other materials, they can be applied to special medical techniques. Magnetite cationic liposomes (MCLs), one group of the cationic magnetic particles, can be used as carriers to introduce magnetite nanoparticles into target cells since their positively charged surface interacts with the negatively charged cell surface. Magnetite nanoparticles conjugated with antibodies (antibody-conjugated magnetoliposomes, AMLs) are applicable to introduce magnetite nanoparticles specifically into target cells, even when target cells coexist with other kinds of cells. Since the cells labeled with magnetite nanoparticles could be manipulated using magnets, we applied this technique to tissue engineering and termed it ‘magnetic force-based tissue engineering (Mag-TE)’. Both magnetic force and functionalized magnetite nanoparticles were used in a process of tissue engineering: construction of multilayered cell sheet-like structures and tubular structures. Thus, the applications of these functionalized magnetite nanoparticles with their unique features will further improve tissue engineering techniques.

Key words—magnetic nanoparticle; 3-D cell culture; tissue engineering; liposome; magnetite

1. はじめに

Tissue engineering の定義は、「生命科学と工学の協力によって生体の機能を維持し、また失われた機能を代替する臓器あるいは物質を創造するための学際的研究分野」であり、¹⁾ 医学と工学の融合分野といった、筆者ら工学部の研究者にとっても、最もエキサイティングな研究領域の1つである。

筆者らは生物化学工学に携わる研究者として、「細胞を物理的にハンドリングする」といった生物プロセス工学的な視点から、より高度な臓器構築が要求される次世代の Tissue engineering におけるキーテクノロジーになると考えられる「細胞の配置・配列技術」について、磁性ナノ粒子を用いた細胞の磁気誘導の研究開発を行っており、磁性ナノ粒子 (mag-

netic nanoparticles) と磁力 (magnetic force) を用いた tissue engineering 技術として “Mag-TE” という技術を開発している。Mag-TE は、磁性ナノ粒子であるマグネタイトを細胞内に取り込ませることによって細胞を磁気標識し、磁石を目的の位置に設置して、磁力で細胞を引き付けることによって、細胞を任意の場所に配置・接着させて、細胞を高密度に集積させる、²⁻⁵⁾ あるいは、細胞からなる三次元組織を構築する手法である。⁶⁻¹²⁾ その中でも、三次元組織の構築法は、次世代の Tissue engineering にとって大変重要な技術であり、さらには医療のみならず、動物実験代替法等の薬学分野にも応用できる非常に魅力的なテーマである。本稿では、今まで筆者らが行った Mag-TE 法を用いた三次元組織構築法の研究に焦点を当てて紹介する。

2. 機能性磁性ナノ粒子

磁性粒子は、磁束密度の高い方へ引き寄せられる性質を持つため、DNA 分子から細胞まで幅広い生体物質の磁気分離の分野において、盛んに研究が行われてきた。最近では、核磁気共鳴画像 (Magnet-

^a九州大学大学院工学研究院化学工学部門 (〒819-0395 福岡市西区元岡 744), ^b名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻 (〒464-8603 名古屋市千種区不老町)

*e-mail: akira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S45 で発表したものを中心に記述したものである。

ic resonance imaging; MRI) の造影剤やがんの温熱療法といった医療分野においても利用されてきている。¹³⁾ 磁性体であるマグネタイト (Fe_3O_4) は、鉱物として自然界に存在しており、生体内にも微量に存在していることが知られている。筆者らはマグネタイトをナノメートルサイズの球形に成形したものをを用いて、標的の細胞へ特異的に集積させることができる機能性磁性ナノ粒子としてのリポソーム封入型磁性ナノ粒子の開発を行ってきた。

われわれのグループは、カチオニックリポソームにマグネタイトのナノ粒子を包埋することで、正電荷脂質包埋型マグネトリポソーム (magnetite cationic liposome; MCL, Fig. 1) を開発した。¹⁴⁾ MCL は正電荷を持っているために、一般的に表面に負電荷を持っているほとんどの細胞に結合することができ、さらにリポソームの効果として、マグネタイトをエンドサイトーシス等の作用で細胞内に導入することができる。一方、多種類の細胞が混在する場合には目的の細胞だけを選択的に結合させることはできない。そこで筆者らは、中性の電荷を持つリポソームでマグネタイトを包埋し、さらに表面に細胞特異的な抗体を結合させることで、抗体結合型マグネトリポソーム (antibody-conjugated magnetoliposome; AML, Fig. 1) を開発した。^{3,15,16)} このように、細胞にマグネタイトを取り込ませて磁気ラベルし、細胞を磁気操作するための材料としての機能性磁性ナノ粒子を開発した。筆者らは今までに、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) の表面抗原である CD105 に対する抗体を結合させた AML を用いて、ヒト骨髓液中から MSC を分離し、さらに、磁力で MSC の培養面積を規定することで、細胞の

播種密度を高くし、オートクライン作用などの細胞間相互作用を利用して、数少ない骨髓中の MSC を増幅するための有効な培養方法を開発した。³⁾ 一方、先述したように、MCL はほとんどの細胞に結合することができるため、特異性を要する細胞の分離には向かないが、汎用性を有するため、標的細胞を分離・増幅したのちのプロセス (本稿で解説する三次元構築技術) における細胞の磁気ラベルには、威力を発揮する。

3. 表皮細胞シートの構築

培養細胞を *in vitro* で自然沈降によって積み上げていっても、その上下の細胞同士が即座に接着して重層化することはない。それは、タンパク質分解酵素を用いた細胞回収法では細胞が接着するための細胞外マトリックス (Extracellular matrix; ECM) が分解されてしまうことによる。筆者らは、磁性微粒子で細胞を標識し、磁力で引き付けることにより、細胞間を密に長時間維持することによる三次元培養が可能となり、細胞間接着を促進させて三次元重層組織を構築することができるのではないかと考えた。そこで、表皮角化細胞を Mag-TE 法によって重層化させることで、表皮細胞をシート状に成形して培養表皮シートが構築できるかを検討した。⁶⁾

培養表皮は Tissue engineering の分野で最も開発が進んでいる組織である。表皮角化細胞の初代培養は、線維芽細胞が混入してしまい、培養を続けると線維芽細胞の増殖が優勢になってしまう。1975 年に Rheinwald と Green は、放射線照射して不活性化したマウス線維芽細胞をヒト表皮角化細胞の初代培養に混ぜることで、ヒト線維芽細胞の増殖を抑えることに成功し、さらにマウス線維芽細胞が死滅す

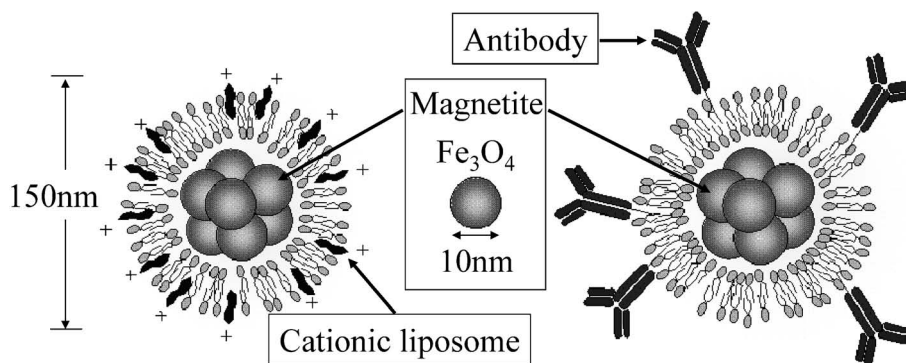


Fig. 1. Functional Magnetite Nanoparticles

Magnetite cationic liposomes (MCLs, left figure) and antibody-conjugated magnetoliposomes (AMLs, right figure) are illustrated.

ると表皮角化細胞が重層化することから培養表皮シートが作製可能であることを報告した.¹⁷⁾ この技術は培養表皮シートの優れた作製方法として現在も利用されているが、異種細胞であるマウスの細胞がヒト表皮シートに混入する危険性が考えられる。また、この技術におけるもう1つの改良すべき点は、作製したシートを酵素処理で培養表面から剥がす工程にある。表皮角化細胞は足場依存性の細胞であることから、作製したシートは培養表面に接着タンパク質を介して接着している。したがって、接着面から剥離させるためにはディスパーゼ等のプロテアーゼを用いる必要があるが、この酵素処理によって培養表皮シートの細胞間の結合が切断されて、シートの強度が弱くなってしまふ。したがって、酵素処理なしで培養細胞シートを回収できれば、シートの強度を損なうことがなく、しかも酵素を添加してさらに洗浄除去するといった工程を除くことができるため、大変有用であると考えられる。そこで筆者らは、Mag-TE 法によって、マウスの細胞を用いずに表皮角化細胞を重層化させて培養表皮シートを作製し、さらに酵素を用いないでシートを剥離することができるかどうか検討した。

Mag-TE 法による培養表皮シート作製法の概念図

を Fig. 2(A)に示した。MCL を添加することによって磁気ラベルした細胞を、タンパク質や細胞がほとんど吸着しない材質でできた超低接着性の培養皿に、コンフルエント時の細胞数の5倍の細胞数で播種し、円柱磁石を培養皿底面に設置して1日培養したところ、均一な5層からなる細胞シートが形成された (Fig. 2(B))。また、このシートの細胞間結合を電子顕微鏡で観察したところ、接着斑であるデスモソームが観察された (Fig. 2(C))。このことから、Mag-TE で作製した細胞シートは、磁力で凝集しているだけではなく、細胞同士が接着タンパク質を介して能動的に結合していると考えられる。作製したシートは、超低接着性表面上で磁力によって物理的に集積させて培養しているため、磁力を解除することで、酵素処理なしで培養表皮シートが回収できた。さらに、Mag-TE 法で作製した培養表皮シートは、シート形成後もマグネタイトを含んでいたことから、作製したシートが棒磁石を用いることで回収できるかを検討した。結果として、培養皿の底面に設置した磁石を外すことで表皮細胞シートを培養表面から剥離させることができ、培養液の表面に棒磁石を近づけたところ、棒磁石にシートを引き寄せて回収することができた。培養組織は脆弱な場合が多

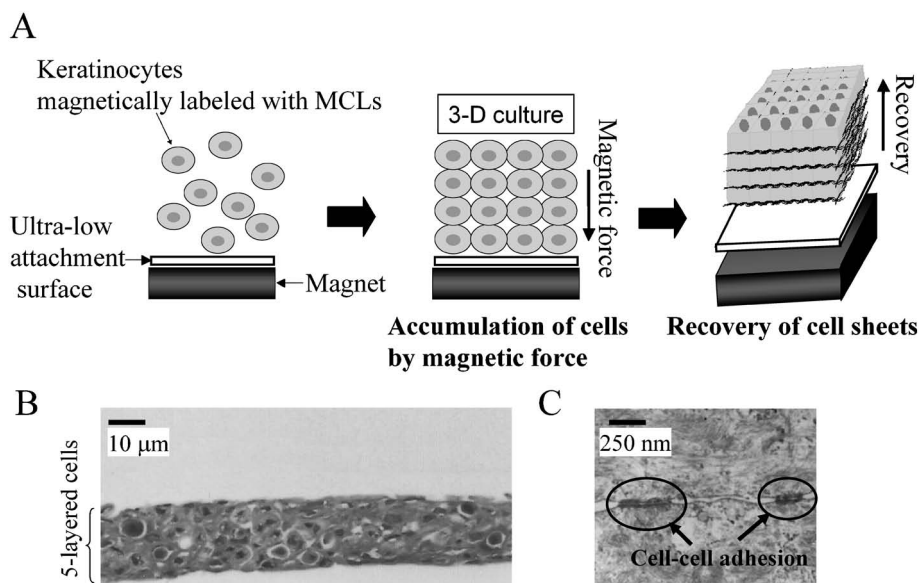


Fig. 2. Construction of Keratinocyte Sheets by Mag-TE

(A) Schematic of Mag-TE for keratinocyte sheets. After addition of the MCLs, keratinocytes were seeded into an ultra-low-attachment plate whose surface was comprised of a covalently bound hydrogel layer that is hydrophilic and neutrally charged. A cylindrical neodymium magnet was then placed at the reverse side of the low-attachment plate to provide magnetic force vertical to the plate, and the cells were cultured. At 1 day after the start of culture, the magnet placed at the reverse side of the ultra-low-attachment plate was removed. Then, the keratinocyte sheets constructed by Mag-TE were harvested. (B) Bright-field photographs of hematoxylin and eosin-stained cross-sections of keratinocyte sheets constructed by Mag-TE. Keratinocytes labeled with MCLs formed even 5-layered sheets. (C) Transmission electron microscope observation revealed desmosomes connecting adjacent cells in sheets fabricated by Mag-TE.

いことから、このように磁力で培養組織を回収できる点は Mag-TE 法の大きな利点であり、また、培養組織の回収を自動化した培養装置及びシステムの開発に結び付く可能性がある。

4. 肝臓様組織の構築

生体組織は複数種類の細胞が情報伝達しながら機能していることから、複数種類の細胞を三次元的に配置する技術の開発が望まれている。例えば肝臓は、肝実質細胞と非実質細胞といった複数種類の細胞からなり立っており、それらを共培養することによって肝機能が促進されるといった報告がある。¹⁸⁾そこで筆者らは、Mag-TE 法によって、肝臓のような複数種類の細胞が三次元的に綿密に相互作用することによって機能が発揮される器官が、重層組織として構築できるかについて調べた。⁷⁾

まず、細胞を磁気ラベルするために、MCL をヒト大動脈血管内皮細胞 (human aortic endothelial cell; HAEC) の培養液に添加した。磁気ラベルした HAEC を、単層培養したラット肝実質細胞上に添加し、磁石を培養皿底面に設置して培養したところ、培養皿全体に渡って均一に HAEC が沈降し、肝実質細胞に接着した (Fig. 3)。一方、磁石を用いない場合には、HAEC は肝実質細胞上に接着し

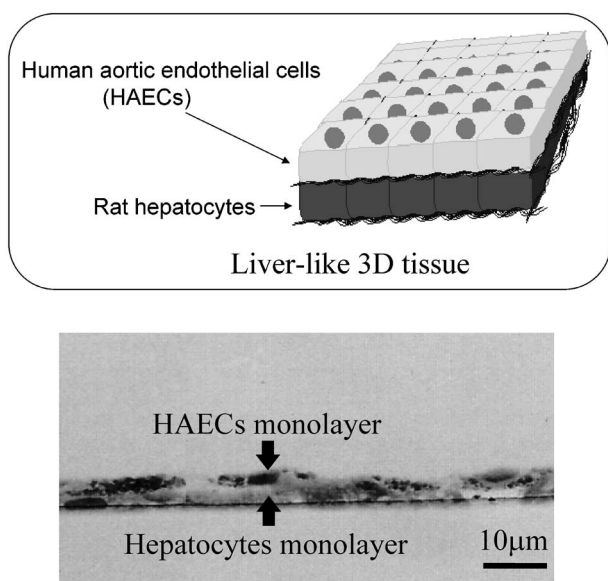


Fig. 3. Construction of 3-D HAEC and Hepatocyte Co-cultures by Mag-TE

HAECs were incubated in medium containing MCLs for 8 h and seeded onto rat hepatocyte monolayers, then a magnet was positioned. A bright-field photograph of hematoxylin and eosin-stained sections of co-cultured hepatocytes and HAECs with a magnet is shown. In the presence of a magnet, HAECs evenly attached to the hepatocyte layer throughout the wells.

なかった。次に、肝実質細胞の細胞層上に HAEC を磁力で重層化した 2 種類の細胞からなる三次元共培養において、肝実質細胞の機能が亢進するか検討した。肝機能の評価としてアルブミン生産を測定したところ、Mag-TE 法で共培養を行うことでアルブミン生産能は有意に増加することが分かった。以上の結果から、Mag-TE 法を用いることで、通常三次元的には接着しない細胞同士 (肝実質細胞と HAECs) を磁力によって接着させることができ、この三次元共培養によって、肝実質細胞の機能を亢進させることができた。

5. 心筋細胞シートの構築

心臓病は日本人の 3 大死因の 1 つであり、年間 15 万人以上が亡くなっている。筆者らは、Mag-TE により心筋組織を再構築した「機能する」心筋細胞シートの創製を目指した。

MCL で心筋細胞を磁化し、心筋細胞シートを作製した (Fig. 4(A)).¹⁰⁾ 作製した心筋細胞シートは、8 層の均一な細胞シートであることが、細胞シートの断面の顕微鏡写真により確認された。

心臓は一定のリズムで拍動しているが、これは連結した心筋細胞の間にギャップ結合が存在するため、活動電位が細胞から細胞へと急速に広がるからである。そこで、作製した心筋細胞シートの内部にギャップ結合が存在するかどうか調べるために、免疫組織染色を行ったところ、心筋細胞シート内部にギャップ結合タンパク質であるコネキシン 43 が存在することが分かった。さらに、活動電位が心筋細胞シート内を伝わっていることを、微小電極アレイ上で心筋細胞シートを作製して調べた。Figure 4 (B)には、64 個の微小電極の中から、隣り合った位置にある 6 つの電極 (電極番号 10, 18, 26, 34, 42, 50) から得られた波形を示す。電極番号が若い順に波形が左から右にシフトしていく様子が確認された。これらのことから心筋細胞シート内にはギャップ結合が存在し、実際に活動電位も伝わっていることが分かった。これらの結果から、Mag-TE で作製した心筋細胞シートは、電気的な結合を持った「機能する」組織になり得ると考えられる。

6. 間葉系幹細胞 (MSC) シートの構築

MSC は骨髄中に存在する体性幹細胞で、骨芽細胞、骨細胞、軟骨細胞などに分化することが知られており、比較的容易に採取できるため、Tissue en-

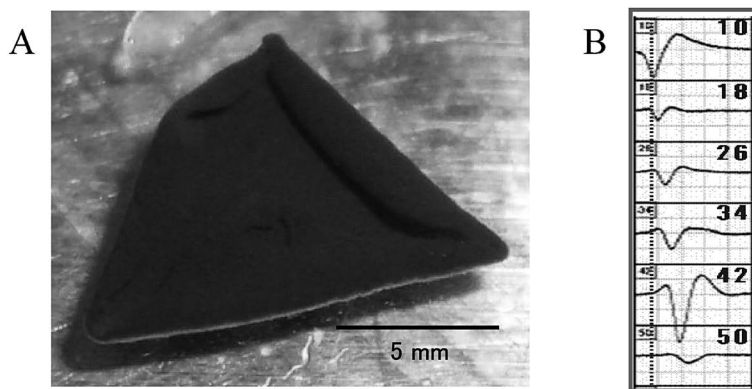


Fig. 4. Construction of Cardiomyocyte Sheet by Mag-TE

(A) Bright-field photograph of cardiomyocyte sheet constructed by Mag-TE. (B) Representative of signals (from microelectrode nos. 10, 18, 26, 34, 42, 50) by cardiomyocytes within the sheet constructed by Mag-TE, acquired by the multielectrode extracellular potential mapping with 8 by 8 microelectrodes.

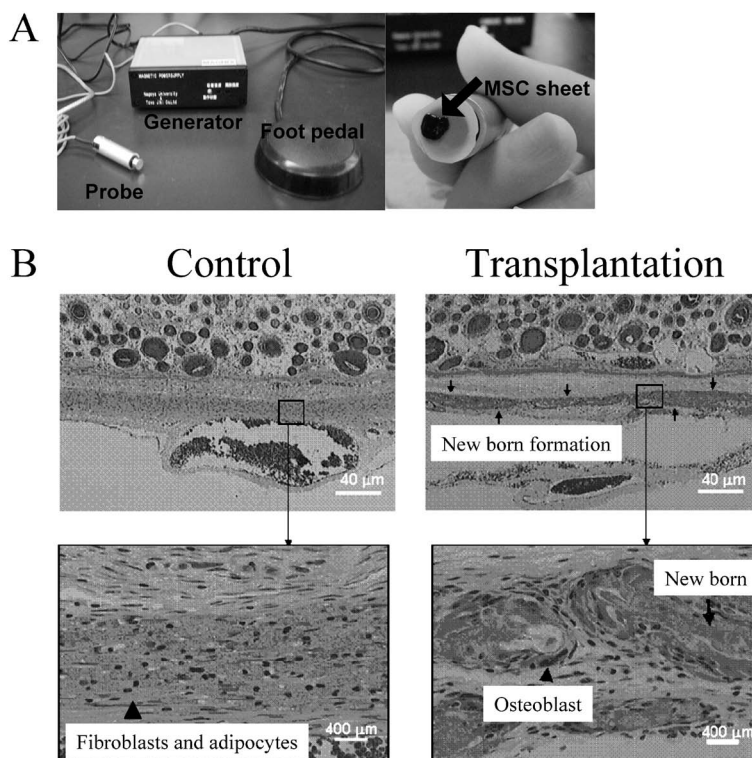


Fig. 5. Transplantation of Mesenchymal Stem Cell Sheets Constructed by Mag-TE

(A) An electromagnet for transplantation of MSC sheets. (B) Histological analysis (hematoxylin and eosin staining) of *in vivo* bone formation by MSC sheets on day 14 after transplantation. Low- and high-power histology of defects without implanted MSC sheets (control) and with implanted MSC sheets are shown. Numerous fibroblasts and adipocytes were observed in the control. When MSC sheets were transplanted, new bone formation and osteoblasts were apparently observed throughout the defect site.

gineering において非常に有効な細胞源として注目を集めている。筆者らは、Mag-TE により MSC のシートを作製し、さらに分化させることで骨組織の再生を試みた。¹¹⁾

作製した MSC シートは、細胞培養皿上で適切な条件下で培養すると、骨芽細胞シートに分化した。さらに、MSC シートをラット頭蓋骨に作製した骨

欠損部に移植して、骨組織が再生されるか調べた。Figure 5 (A) に示すように、Mag-TE で作製した MSC シートを、独自に開発した電磁石で回収・運搬して、患部に移植した。移植 14 日後に、移植した部分で骨組織が再生しているかを調べたところ、コントロールのシート移植なしのラットでは、骨芽細胞、骨細胞がみられなかったのに対し、シートを

移植したラットでは、シートを移植した部分に骨芽細胞と新生骨が観察された (Fig. 5(B)). これらの結果から, Mag-TE で作製された MSC シートは, 骨の Tissue engineering に有用である可能性が示された.

7. 毛細血管網を含む細胞シートの構築

これまで述べたように, 様々な種類の三次元組織の構築を行ってきた. しかし, それらは分厚い組織ではなく細胞シートであり, 厚さが数百 μm を超える分厚い組織を構築するためには, 酸素や栄養を組織内部に供給する血管を, 作製した組織内に含ませる必要がある. そこで, 筆者らは, Mag-TE により皮膚線維芽細胞シートを作製し, この細胞シート内に血管内皮細胞を混ぜて培養し, 毛細血管を形成させることを目指した.¹²⁾

毛細血管が形成されるためには, 血管内皮細胞の周りの環境が重要である. しかし, 一般的な細胞回収法では酵素処理を行うため, 細胞外マトリックスなどの重要な成分を分解してしまう. 一方, 前述した通り, Mag-TE では, 作製した細胞シートが酵素処理を行わずに回収できるため, 正常ヒト皮膚線維

芽細胞シート内にはフィブロネクチンや I 型コラーゲンといった毛細血管を形成させるのに重要な ECM が多く含まれていることが観察された. そこで, 皮膚線維芽細胞シートに血管内皮細胞を混ぜて培養したところ, 血管内皮細胞に管状構造を形成させ (Fig. 6(A)), さらに網目状のネットワークを形成させることに成功した (Fig. 6(B)).

8. 管状組織の構築

Mag-TE を用いることで, 様々な三次元組織が構築可能であることを示した. 上述したような, 表皮のような単一細胞を重層化させることで機能が促進される組織や, 肝臓といった複数の種類の細胞が綿密に相互作用することによって機能が発揮される組織が, 三次元重層組織として構築できた. さらに, 本手法の最大の利点として, 磁力を用いることで, 重力方向以外の標的部位にも目的細胞を特異的に配置・配列できることがある. このことにより, 細胞を自然沈降させても構築が不可能な形状の組織を構築することができる.

従来 of Tissue engineering 技術で, 血管や尿管のような管組織を形成させるには, 管状のポリマーに

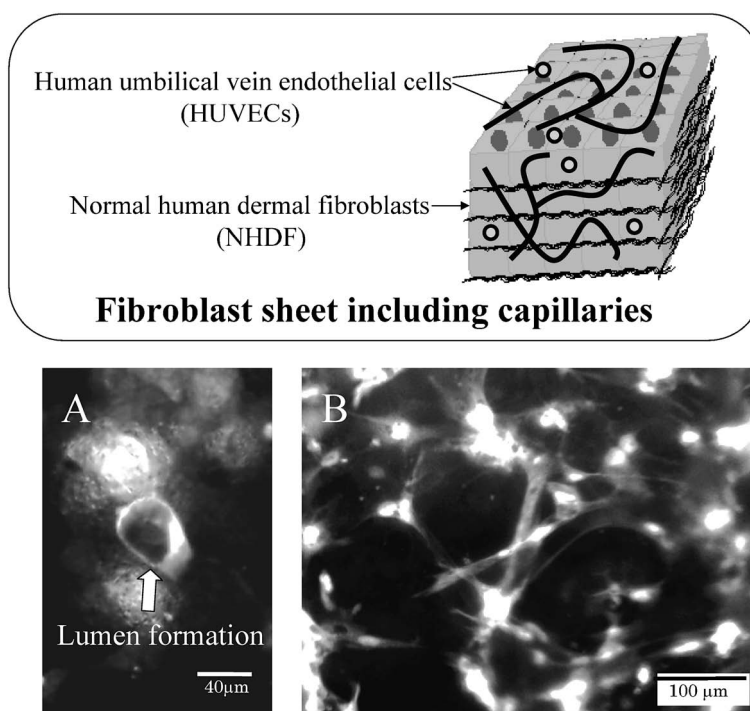


Fig. 6. Incorporation of Capillary-like Structures into Dermal Cell Sheets Constructed by Mag-TE

Two major morphologic changes that regulate HUVEC tube development include lumen formation and sprouting, which control how HUVECs interconnect into 3-D networks. Fluorescence microscopic images of HUVECs co-cultured with NHDF sheets revealed lumens consisting of two HUVECs (A), as well as sprouting with long cord-like structures (B).

細胞を自然沈降させて接着させる方法しかなかった。この場合、細胞を均一にポリマーに接着させることが困難であり、また、多くの細胞はポリマーに接着しないで流れていってしまうといった問題点があった。そこで、筆者らは、管の軸を磁石にすることによって、機能性磁性微粒子でラベルした細胞をロスすることなく、確実に標的した位置に細胞を配列でき、軸の磁石を引き抜くことで管構造が完成するのではないかと考え、Mag-TEを管状組織構築に応用した。⁹⁾ Figure 7(A)にMag-TEによる管状組織構築法の概念図を示す。MCLで磁気ラベルしたイヌの移行上皮細胞 (urothelial cell; UC) の上から、棒磁石を挿入したシリコンチューブを転がしたところ、シリコンチューブ表面に細胞が吸着した。この細胞をコラーゲンで覆い、芯になっているシリコンチューブを引き抜くことによって、管状構造を構築することができた。Mag-TE法で作製した管状構造は、UCからなる5層の多細胞層構造を取っており、生体組織と類似した尿管構造を構築すること

ができた (Fig. 7(B))。血管は、血管内皮細胞 (endothelial cells; EC) からなる内膜、血管平滑筋細胞 (smooth muscle cells; SMC) からなる中膜、線維芽細胞 (Fibroblast; FB) からなる外膜、といった3種類の細胞層が多層構造で構成されている。筆者らは、MCLをヒトEC、ヒトSMC、マウスFBのそれぞれの細胞に取り込ませて、それらを順番に棒磁石を挿入したシリコンチューブに巻き付けていくことによって、3種類の細胞層構造からなる血管組織を構築することに成功した (Fig. 7(C))。

9. 結語

生体組織や臓器は三次元細胞組織であることから、細胞は、細胞シートのような三次元構造を取らせることで、より本来の性質に近づくと考えられる。つまり、細胞シートの構築は、細胞に本来の機能を発揮させ、生体組織・臓器を再生・再構築する上で非常に重要な技術である。筆者らは現在、従来のTissue engineering技術では構築不可能な複雑な構造と機能を持つ器官構造を再構築することを目標

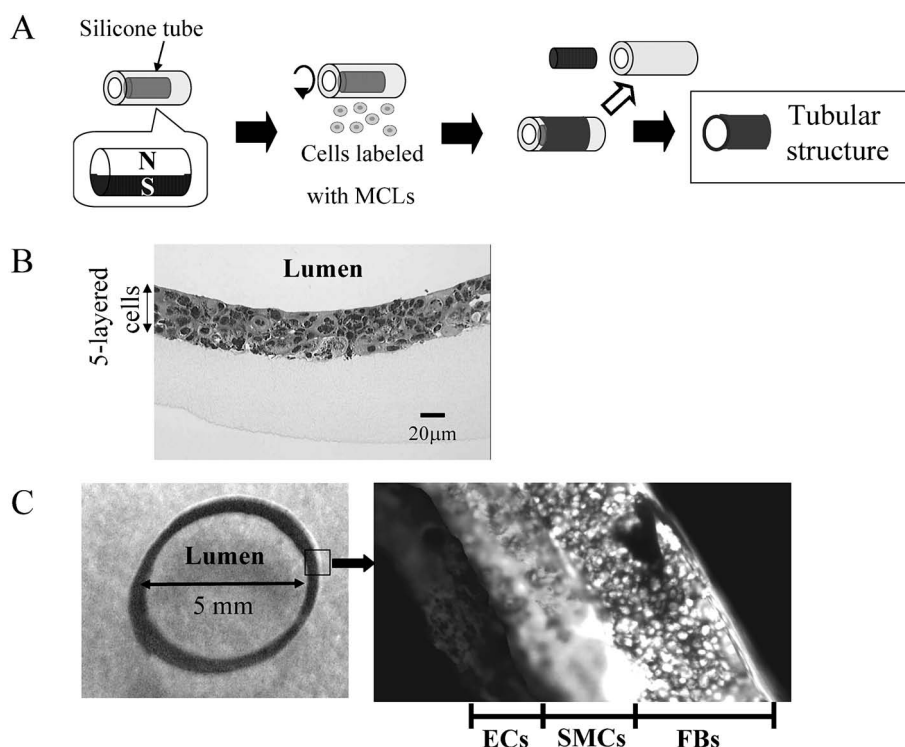


Fig. 7. Construction of Tubular Tissues by Mag-TE

(A) Procedure for construction of tubular structures by Mag-TE. A cylindrical magnet whose magnetic poles were on its curved surface was inserted into a silicon tube. Then, this magnet/tube combination was rolled over the magnetically labeled cells. The canine urothelial cells were used for construction of a tissue-engineered ureter. For the construction of blood vessels, the endothelial cells (ECs) were applied first, followed by application of the smooth muscle cells (SMCs) and fibroblasts (FBs). After 1-d culture period, the silicon tube and cylindrical magnet were pulled out of the cell construct, producing tubular constructs of tissue engineered urothelial and vascular tissue. (B) Bright-field micrograph of hematoxylin/eosin-stained cross-sections of urothelial tissue constructed Mag-TE. (C) Fluorescence microscopy of the vascular tissue constructed by Mag-TE.

に、Mag-TE 法をいろいろな臓器再生に展開しつつある。

REFERENCES

- 1) Langer R., Vacanti J. P., *Science*, **260**, 920–926 (1993).
- 2) Ito A., Hibino E., Honda H., Hata K., Kagami H., Ueda M., Kobayashi T., *Biochem. Eng. J.*, **20**, 119–125 (2004).
- 3) Ito A., Hibino E., Shimizu K., Kobayashi T., Yamada Y., Hibi H., Ueda M., Honda H., *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **75**, 320–327 (2005).
- 4) Ino K., Ito A., Honda H., *Biotechnol. Bioeng.*, **97**, 1309–1317 (2007).
- 5) Ito A., Ino K., Kobayashi T., Honda H., *Biomaterials*, **26**, 6185–6193 (2005).
- 6) Ito A., Hayashida M., Honda H., Hata K., Kagami H., Ueda M., Kobayashi T., *Tissue Eng.*, **10**, 873–880 (2004).
- 7) Ito A., Takizawa Y., Honda H., Hata K., Kagami H., Ueda M., Kobayashi T., *Tissue Eng.*, **10**, 833–840 (2004).
- 8) Ito A., Hibino E., Honda H., Kobayashi C., Terasaki H., Kagami H., Ueda M., Kobayashi T., *Tissue Eng.*, **11**, 489–496 (2005).
- 9) Ito A., Ino K., Hayashida M., Kobayashi T., Matsunuma H., Kagami H., Ueda M., Honda H., *Tissue Eng.*, **11**, 1553–1561 (2005).
- 10) Shimizu K., Ito A., Lee J. K., Yoshida T., Miwa K., Ishiguro H., Numaguchi Y., Murohara T., Kodama I., Honda H., *Biotechnol. Bioeng.*, **96**, 803–809 (2007).
- 11) Shimizu K., Ito A., Yoshida T., Yamada Y., Ueda M., Honda H., *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **82**, 471–480 (2007).
- 12) Ino K., Ito A., Kumazawa H., Kagami H., Ueda M., Honda H., *J. Chem. Eng. Jpn.*, **40**, 51–58 (2007).
- 13) Ito A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T., *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 1–11 (2005).
- 14) Shinkai M., Yanase M., Honda H., Wakabayashi T., Yoshida J., Kobayashi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 1179–1183 (1996).
- 15) Shinkai M., Le B., Honda H., Yoshikawa K., Shimizu K., Saga S., Wakabayashi T., Yoshida J., Kobayashi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **92**, 1138–1145 (2001).
- 16) Ito A., Kuga Y., Honda H., Kikkawa H., Horiuchi A., Watanabe Y., Kobayashi T., *Cancer Lett.*, **212**, 167–175 (2004).
- 17) Rheinwald J. G., Green H., *Cell*, **6**, 331–343 (1975).
- 18) Bhatia S. N., Balis U. J., Yarmush M. L., Toner M., *FASEB J.*, **13**, 1883–1900 (1999).