

岩田博夫・加藤功一・中路 正

Hiroo Iwata, Koichi Kato, and Tadashi Nakaji-Hirabayashi

京都大学再生医科学研究所

1. 緒言

脳および脊髄を含む中枢神経組織は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトから構成されている。これらの細胞は、神経幹細胞と呼ばれる未熟な細胞が分化することによって産み出される。近年、神経幹細胞に関する生物学の目覚ましい発展に伴い、パーキンソン病をはじめとする中枢神経疾患の治療に大きな期待が寄せられるようになった [1-3]。現在、世界各国で盛んに研究が進められている細胞移植療法では、神経幹細胞あるいは少し分化の進んだ神経前駆細胞などが、損傷を受けた組織あるいはその周辺部位へ注入される。動物を用いた治療実験では多くの成功例が報告されているが、そのような治療法を一般の医療とするには、解決しなければならない課題もまだまだ多いのが現状である。

中枢神経疾患の再生医療を実現するには、少なくとも次の二つの課題を克服しなければならない。まず、移植細胞源となる神経幹細胞の確保である [2]。安全かつ信頼性の高い医療を実現するには、性状の均質な神経幹細胞を大量に調製するための手段が不可欠である。従来、ニュースフェア培養と呼ばれる細胞培養法が神経幹細胞を得るための標準的方法として広く用いられてきた。しかしながら、その方法によって得られる細胞集団には神経幹細胞の他に分化の進行した細胞も多く含まれ、一度に得られる神経幹細胞の数は決して多くはなかった。もう一つの課題は、移植細胞の生存率の向上である。移植された神経幹／前駆細胞の生存率はホスト組織内で急速に低下し、期待通りの治療効果を得ることが難しい。一時的な接着足場の喪失や、炎症性細胞の攻撃などが細胞死の原因であると推測されている [4,5]。

上記の二つの課題に対して、我々は、生体内において細胞の機能制御に深く関わる増殖因子に着目し、神経幹細胞の増殖および生存を高度に制御できる新たなバイオマテリアルの設計に取り組んできた。

移植細胞源の確保に関して、神経幹細胞の増殖を強力に促進する上皮細胞増殖因子 (EGF) を表面に固定した細胞培養基材を設計した。表面固定された EGF が、細胞内へ効率よく増殖シグナルを与えることができるよう、遺伝子工学的手法によって EGF 分子の末端にオリゴヒスジン配列を融合し、これを利用して基材表面に EGF を配向固定した。さらに、EGF 受容体の二量化を伴うシグナル伝達を促進するため、自発的な二量体形成能をもつ EGF を設計した。これには、分子間で coiled-coil の形成が可能な α ヘリックス配列を EGF に組込んだ。

一方、移植細胞の生存維持を目的として、細胞死を抑制することで知られる脳由来

神経栄養因子 (BDNF) を取り上げ、これを組込んだヒアルロン酸 (HAc) ハイドロゲルを設計した。この内部に移植細胞を包含することで、BDNF の生存促進効果を期待でき、また、ハイドロゲル状の構造によって炎症性細胞の攻撃から内部の細胞を保護することができるものと期待した。BDNF の HAc ゲルへの複合化には、BDNF に融合したオリゴヒスチジン配列と、予め HAc に結合させた亜鉛イオンとのキレート形成反応を利用した。また、細胞に障害を与えることなく HAc に架橋を導入するため、両末端にオリゴヒスチジンをもつポリペプチドを合成した。

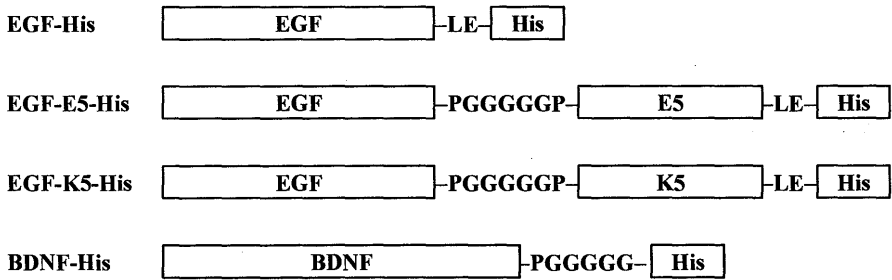
本報告では、上記の二つのバイオマテリアルに関して、それらの合成および *in vitro* にける機能評価の結果について述べる。

2. 実験

2-1. 遺伝子工学的手法によるキメラタンパク質の合成

本研究で合成したタンパク質の構造を図 1 に示す。EGF [6,7] および BDNF [8] の C 末端にヘキサヒスチジン (His) を導入した。また、分子間 coiled-coil によってヘテロ二量体を形成する α ヘリックス配列[E5, (KELASVE)₅およびK5, (EKLASVK)₅]を EGF と His の間に介在させた自己二量化 EGF を合成した [9]。さらに、架橋剤として、両末端に His をもつ E10 [(KELASVE)₁₀] を合成した。これらのタンパク質の合成には大腸菌発現系を用いた。

(A) 増殖因子キメラタンパク質



(B) 架橋性ポリペプチド

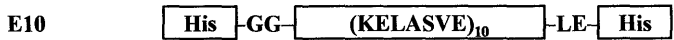


図 1. 設計した細胞増殖因子キメラタンパク質および架橋性ポリペプチドの構造。

EGF および BDNF をコードする DNA は、cDNA ライブラリーを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により調製した。一方、人工的な配列である E5、K5、および E10 の調製には、それらをコードする合成 DNA 配列を用いた。E5 および K5 に対する DNA をオーバーラップ伸張 PCR 法によって EGF 遺伝子と連結し、目的とする

キメラ遺伝子を合成した。各遺伝子を His をコードする配列をもつプラスミド DNA に挿入した。これらのプラスミドを大腸菌内で発現させ、目的とするタンパク質を得た。大腸菌から抽出したタンパク質は、ニッケルイオンを担持したアフィニティーカラムを用いて精製し、透析法によりリフォールディングさせた。

2-2. EGF キメラタンパク質の表面固定

金薄膜を蒸着したガラス基板 ($22 \times 26 \times 0.5 \text{ cm}^3$) の表面に 16-mercaptohexadecanoic acid (COOH-thiol) および(1-mercaptopundec-11-yl)triethylene glycol (TEG-thiol) の混合自己組織化単分子膜 (混合 SAM) を形成させた。これにより表面に導入されたカルボキシル基にカルボジイミド法によって *N*-(5-Amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid (NTA) を結合させた。その後、表面の NTA に Ni^{2+} イオンをキレート化させた。次に、この基板を EGF キメラタンパク質溶液に浸漬し、EGF キメラタンパク質をキレート結合により固定した。図 2 にその概略図を示す。最後に、結合しなかったタンパク質を除去するため、基板をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した。固定された EGF キメラタンパク質の表面密度は、表面プラズモン共鳴分析法 [10] によって測定した。

固定化 EGF が作用する微小領域の範囲を調べるため、基板上の特定の領域 ($3 \times 18 \text{ mm}^2$) にのみ EGF キメラタンパク質を固定した基板を作製した。これには、光パターニング法を利用して、海領域に 1-hexadecanethiol の SAM、島領域に上述の混合 SAM を形成させた基板を用いた。島領域に EGF キメラタンパク質をキレート結合を介して固定し、海領域には細胞接着性を付与するためフィブロネクチン (FN) を吸着させた。

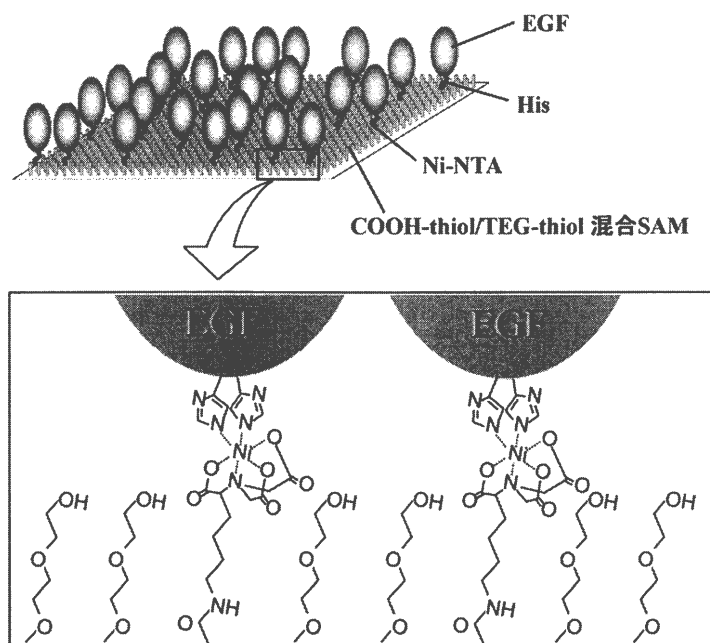


図 2. EGF キメラタンパク質を配向固定した基材表面の概念図。

2-3. Zn^{2+} 化 HAc (Zn^{2+} -NTA-HAc) の合成

図 3 に示すように、活性エステル化法を用いて、HAc に含まれるカルボキシル基に NTA を結合させた。反応液を蒸留水に対して透析することで未反応の NTA を除去した後、 ZnSO_4 を添加することで Zn^{2+} -NTA-HAc を得た。限外ろ過により未反応の Zn^{2+} イオンの除去および濃縮を行った。

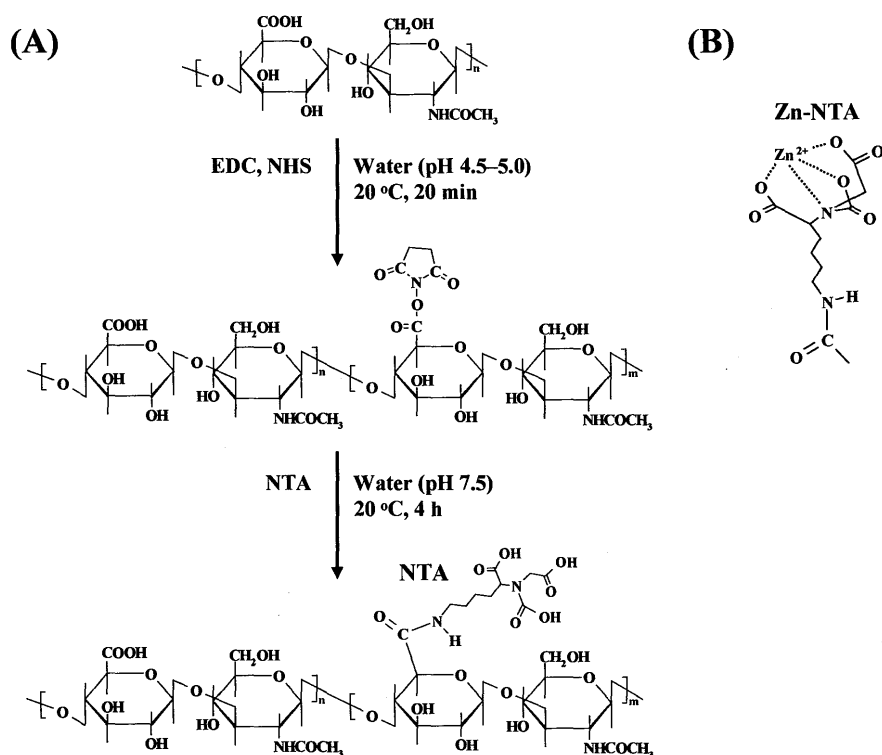


図 3. (A) NTA-HAc の合成スキームおよび (B) Zn^{2+} -NTA の構造.

2-4. 多重内部反射赤外吸収分光分析 (MIR-IRAS)

MIR-IRAS 分析装置 [11] を用いて、固定化 EGF キメラタンパク質の水中における二次構造を分析した。まず、両端に 45° のエッジをもつシリコン基板の表面にシランカップリング処理を行うことでカルボキシル基を導入した。その後、前述の方法に従い、EGF キメラタンパク質を配向固定した。この基板について MIR-IRAS 分析を行った。NTA 化表面をレファレンスとし、重水中にて測定した。

2-5. 円二色性 (CD) スペクトル測定

EGF-E5-His および EGF-K5-His による二量体 (dEGF-His) の形成について調べるため、それらの等モル混合物について CD スペクトルを測定した。EGF-E5-His (2.2 mM) および EGF-K5-His (2.2 mM) を含む PBS 溶液を調製し、JASCO J-805 を用いて測定した。光路長は 1 mm であり、20 °C にて 8 回の積算を行った。

2-6. 架橋 HAc の粘度および濁度

種々の濃度の E10 を混合した Zn^{2+} -NTA-HAc 溶液の粘度および濁度を測定した。所定濃度の E10 を混合した Zn^{2+} -NTA-HAc 溶液 (0.6%) を内径 1.0 mm の石英キャピラリー内に注入した。溶液が 10 cm の距離を垂直落下する時間 (t) を測定し、式 (1) により相対粘度 (η/η_0) を算出した。

$$\eta/\eta_0 = t/t_0 \quad (1)$$

ここで、 η_0 は溶媒 (PBS) の粘性率 ($0.01 \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [12]、 t_0 は PBS の落下時間である。一方、それらの溶液について、490 nm の光の透過率を測定することにより濁度を求めた。

2-7. 神経幹細胞の培養

EGF キメラタンパク質固定基板：ラット胎児 (胎生 16 日) の線条体より細胞を採取し、浮遊状態で培養した。培地には、B27 サプリメント (2%)、EGF (20 ng/mL)、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF, 20 ng/mL)、GlutaMAX (3 mM)、ヘパリン (5 $\mu\text{g/mL}$)、ペニシリン (100 U/mL)、ストレプトマイシン (100 $\mu\text{g/mL}$) を含む DMEM/F12 培地を用いた。得られた細胞凝集体 (ニューロスフェア) をトリプシン処理により単個細胞に分散させた。この細胞を $3.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ の密度で EGF キメラタンパク質を固定した基材上に播種し、EGF および bFGF を省いた上記の培地中で 4~5 日間培養した。タンパク質の固定領域を限定した基板の場合には、 $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の密度で細胞を播種し、3 日間培養した。

HAc ハイドロゲル： Zn^{2+} -NTA-HAc 溶液に 1/5 量の 5 倍濃縮培地 (EGF および bFGF を含まない)、および E10 (150 $\mu\text{g/mL}$)、BDNF-His (120 $\mu\text{g/mL}$) を添加した。その混合液を 24-well ポリスチレン細胞培養プレートの各ウェルに添加し、37 °C で 1 時間放置することでゲル化させた。生成したゲル上に、ニューロスフェア形成細胞を $2.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の密度で播種し、3 時間培養した。その後、底面のゲルと同成分の混合液を細胞上に重層し、1~3 日間インキュベートした。

2-8. 蛍光免疫染色

細胞の分化状態を調べるため、神経幹細胞内に特異的に発現するネスチン、および、神経細胞内に特異的に発現する β -チューブリン III の蛍光免疫染色を行った。まず、基板上で培養した細胞を固定した後、界面活性剤処理により細胞膜の透過性を亢進させた。次に、非特異的な抗体の吸着を抑制するためブロッキング処理を行った後、ネスチン (1:200, mouse monoclonal Rat 401, BD pharmingen, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.) およびチューブリン (1:600, rabbit polyclonal, Covance, Princeton, NJ, U.S.A.) に対する抗体を結合させた。遊離の抗体を洗浄して除去した後、蛍光標識された抗 IgG 抗体を結合させた。最後に、Hoechst により細胞の核を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

2-9. 細胞の生存率

HAc ゲル内で培養した細胞を calcein-AM および propidium iodide 溶液に 30 分間暴露し、生細胞を calcein-AM (緑色蛍光) で、死細胞を propidium iodide (赤色蛍光) で染色した。さらに、Hoechst により細胞の核 (青色蛍光) を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

3. 結果および考察

3-1. EGF キメラタンパク質の配向固定

EGF キメラタンパク質溶液の CD スペクトルを図 4 に示す。EGF-His の CD スペクトルは、天然の EGF のスペクトル [13] と良い一致を示した。EGF-E5-His のスペクトルでは、ランダム構造由来の 198 nm の負のコットン効果が観測された。EGF-K5-His では、222 nm に α ヘリックス構造由来の負のコットン効果が観測された。EGF-E5-His と EGF-K5-His との等モル混合溶液では、222 nm の負のコットン効果が大幅に増大し、198 nm の負のコットン効果の消失した。この結果は、E5 と K5 間の coiled-coil 形成にもとづきヘテロ二量体が形成されたこと示唆する。

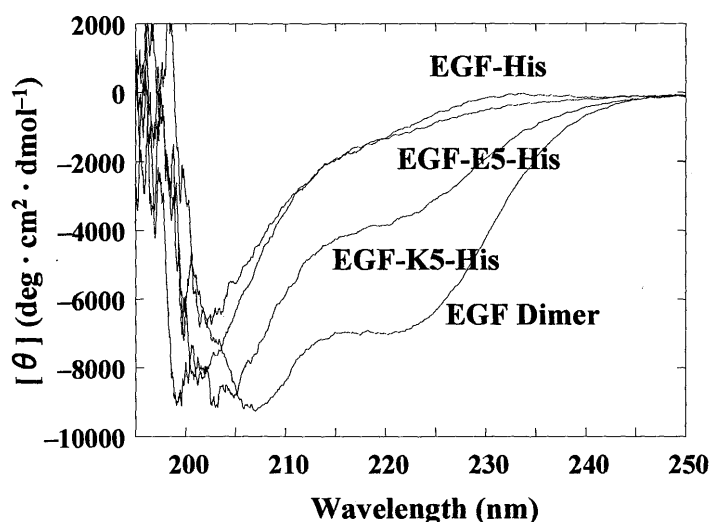


図 4. EGF キメラタンパク質の CD スペクトル.

これらの EGF キメラタンパク質を Ni^{2+} イオンを固定した表面にキレート結合を介して配向固定した。固定化されたタンパク質の表面密度を SPR 法によって測定した結果、 $0.32 \sim 0.35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。

固定されたタンパク質の構造に関する情報を得るため、EGF-His を固定した基板について MIR-IRAS スペクトルを測定した。その結果、アミド I およびアミド II 吸収帯に EGF-His に由来するピークが観測され、EGF-His の固定化されていることがわかった。図 5 には、MIR-IRAS 分析で得られたアミド I 吸収帯のスペクトルを示す。Gaussian

関数法により分離した各ピークの面積比より、固定化 EGF-His に含まれる二次構造の組成を求めた。表 1 に示すように、キレート結合を介して配向固定された EGF-His の二次構造組成は、Yang らによって報告された溶液中の EGF に関する二次構造組成 [14] とよく一致した。この結果は、EGF-His が、基板上に固定された後にもその高次構造を維持していることを示唆している。

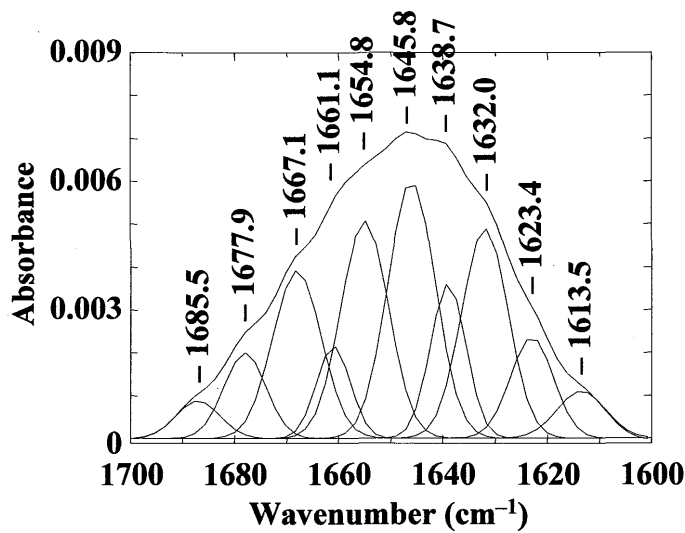


図 5. 配向固定した EGF-His の MIR-IRAS スペクトル (アミド I 吸収帯).

表 1. 基板上に配向固定した EGF-His および溶液中の天然型 EGF の二次構造組成

状態	二次構造 (%)				
	β-Sheet	Loop	Reverse turn	Random coil	Side-chain
溶液中 ^a	40.6	13.0	25.0	16.5	4.9
配向固定	40.9	13.9	24.3	17.1	3.8

^a 文献 [14] より引用.

3-2. EGF キメラタンパク質固定基板上での神経幹細胞の増殖

EGF キメラタンパク質を配向固定した基材上における神経幹細胞の増殖曲線を図 6A に示す。細胞の増殖速度は、dEGF-His 固定化表面上において最も大きく、細胞数は 4 日間の培養で約 60 倍に増加した。これ対して、EGF キメラ蛋白質を単量体として固定した場合 (EGF-His、EGF-K5-His、EGF-E5-His) には、細胞数は 4 日間の培養で 30～45 倍に増加した。標準的な培養法であるニューロスフェア培養法によって同様の実験を行った結果、細胞数の増加は 4 日間で 9 倍であった。

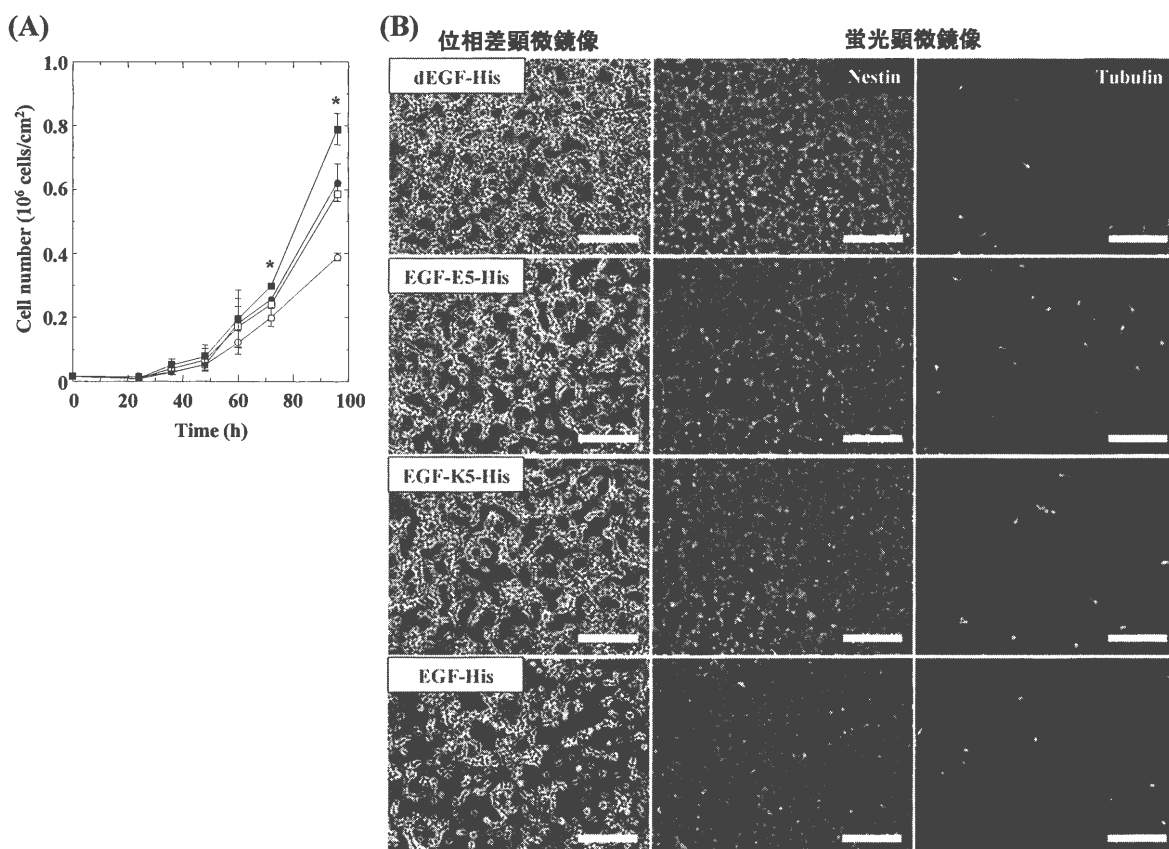


図 6. EGF キメラタンパク質を配向固定した表面上での細胞培養試験結果. (A) 細胞増殖曲線 (データは平均値±標準偏差, $n = 3$). ■ : dEGF-His, ● : EGF-E5-His, □ : EGF-K5-His, ○ : EGF-His. *有意差あり ($p < 0.05$). (B) EGF キメラタンパク質を配向固定した基材上で 4 日間培養した細胞の位相差顕微鏡像およびネスチンとチューブリンの蛍光免疫染色像. スケールバー : 100 μm .

次に、4 日間培養後の未分化・分化マーカーの発現について調べた。結果を図 6B に示す。いずれの基板上においても、ほとんどの細胞が未分化細胞のマーカーであるネスチンを発現し、分化細胞のマーカーであるチューブリンを発現する細胞は極めて少なかった。これらの写真をもとに、未分化細胞の割合を求めた結果、dEGF-His 固定化表面上では $98.3 \pm 0.6\%$ が神経幹細胞であることがわった。単量体で固定した場合においても 90%以上が神経幹細胞であった (EGF-His : $90.1 \pm 3.5\%$ 、EGF-K5-His : $96.7 \pm 1.0\%$ 、EGF-E5-His : $96.7 \pm 1.8\%$)。一方、ニューロスフェア培養法における幹細胞の割合は 50~60%であった。

以上のように、EGF キメラタンパク質を配向固定した基材上では、神経幹細胞が選択的に増殖した。これは、EGF 受容体を高頻度に発現する神経幹細胞が、固定化 EGF との相互作用によって基材上に選択的に捕捉され、また、EGF にもとづく増殖シグナルが効果的に伝達されるためと考えられる。二量体を形成して固定された EGF では、受容体を介したシグナル伝達がさらに効果的に起こるため、神経幹細胞がよりいっそ

う選択的かつ活発に増殖したものと思われる。

ところで、生体内において EGF は、溶液状態として存在し、EGF 受容体との相互作用を通じてその機能を発揮することが知られている。そこで、固定化 EGF キメラタンパク質の作用についてより深い理解を得るため、細胞培養下における固定化 EGF キメラタンパク質の遊離の可能性について、表面の微細加工法を利用して調べた。その結果、図 7 に示すように、EGF キメラタンパク質の作用範囲は固定された領域に限定されることがわかった。すなわち、EGF キメラタンパク質が固定化された状態で細胞に作用していることが示唆された。

以上の結果、EGF キメラタンパク質を配向固定した基材を用いることで、従来のニューロスフェア培養法に比べて格段に純度が高く、また、より短い時間内に神経幹細胞を獲得できることが示された。

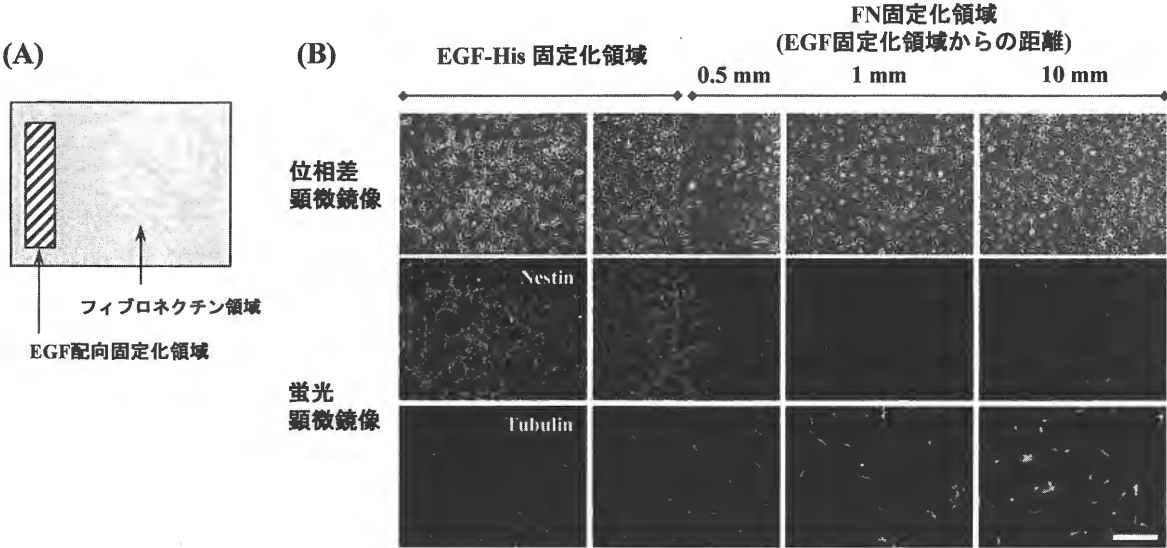


図 7. EGF-His の固定化の安定性に関する試験結果. (A) EGF-His 固定化領域を限定した基板の概略図. (B) 基板上的異なる領域における位相差顕微鏡像およびネスチンとチューブリンの蛍光免疫染色像. スケールバー : 100 μm .

3-3. Zn^{2+} -NTA-HAc への BDNF-His の担持

合成した NTA-HAc を赤外分光法および核磁気共鳴法により分析した結果、HAc 1 ユニット当たり 3 分子の NTA の導入されたことがわかった。この Zn^{2+} -NTA-HAc の溶液に BDNF-His を加え複合体を調製した。図 8 には、透析法によって、複合体からの BDNF-His の遊離について調べた結果を示す。 Zn^{2+} -NTA-HAc と複合体を形成した BDNF-His は、12 日後にも安定に担持されていることがわかる。一方、 Zn^{2+} イオンを結合させていない NTA-HAc と BDNF-His を混合した場合には、約 3 日間でほぼすべての BDNF-His が遊離した。これらの結果から、BDNF-His は、 Zn^{2+} -NTA-HAc 中の Zn^{2+} イオンと His とのキレート結合により安定に担持されることが示された。

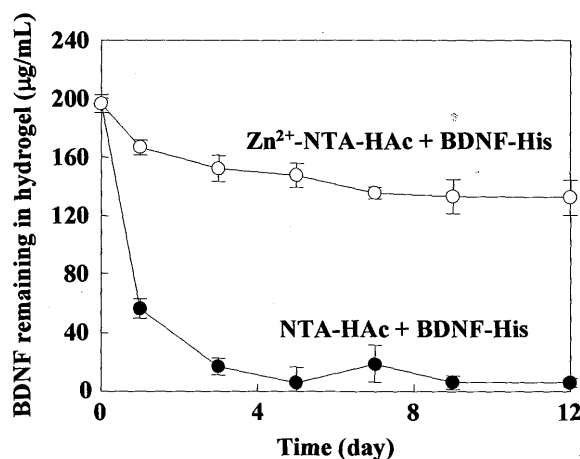


図 8. Zn^{2+} -NTA-HAc (○)または NTA-HAc (●)からの BDNF-His の遊離試験結果 (データは平均値 $\pm$ 標準偏差, $n = 3$).

3-4. Zn^{2+} -NTA-HAc の架橋

Zn^{2+} -NTA-HAc と E10 との混合溶液について行った粘度測定の結果を図 9 に示す。図からわかるように、E10 の濃度の増加に伴い η / η_0 は増加したが、150 $\mu\text{g/mL}$ を境に η / η_0 は急激に減少した。同様の混合溶液について濁度測定を行った結果、E10 の濃度が 150 $\mu\text{g/mL}$ 以上になると濁度が急激に上昇した。このことから、150 $\mu\text{g/mL}$ 以上の E10 濃度における η / η_0 の減少は、E10 による架橋が過多に起こり、 Zn^{2+} -NTA-HAc が凝集体を形成することが原因であると考えられる。

神経幹細胞移植では、キャリアとなるゲル内に細胞を少なくとも 24 時間程度滞留させることが必要である。そこで、細胞を剛球体であると仮定し、ストークスの定理より得られる式 (2) を用いて、細胞が 24 時間以上滞留できるゲル状物質の相対粘度

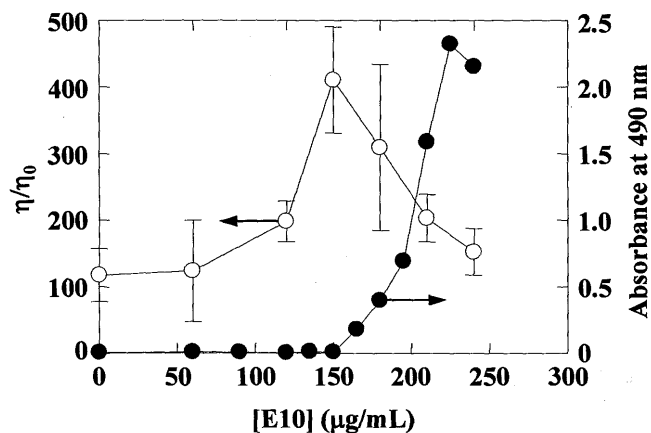


図 9. E10 濃度と Zn^{2+} -NTA-HAc 溶液の粘度 (○, $n = 5$) および濁度 (●, $n = 2$) の関係. $[\text{Zn}^{2+}\text{-NTA-HAc}] = 0.6\%$, 溶媒: PBS.

を見積もった。

$$\frac{4}{3}\pi r^3(\rho_c-\rho_m)g=6\pi\eta r v \tag{2}$$

ただし、 r は細胞の半径 (5×10^{-4} cm)、 ρ_c および ρ_m はそれぞれ細胞 (1.074 g/cm³) [15] および溶媒 (1.000 g/cm³) の密度であり、 g は重力加速度である。また、細胞がゲル中を 24 時間で 1 cm 沈降する時の沈降速度は $v = 1.16 \times 10^{-6}$ cm/s であるから（細胞の沈降速度が $v = 1.16 \times 10^{-6}$ cm/s であれば、細胞がゲル中を 24 時間で 1 cm 沈降する）、ゲルの相対粘度 η/η_0 が 347 以上であれば細胞は 24 時間で 1 cm 以上沈降しない。図 9 からわかるように、0.6%の Zn²⁺-NTA-HAc に 150 μg/mL の E10 を添加して作製したゲルでは、24 時間以上にわたって細胞を滞留させることのできる十分な粘度を有する。

3-5. BDNF 担持 HAc ゲル中での細胞生存率の向上

E10 (150 μg/mL) の添加によって架橋し、さらに、BDNF-His (120 μg/mL) を担持させたゲル内でニューロスフェア形成細胞を培養した。1～3 日間の培養後、細胞の生存率を測定した。結果を図 10 に示す。BDNF を担持したゲル中では、3 日後でも約 60%の細胞が生存しているのに対し、BDNF を担持していない HAc ゲル中では、培養 1 日で半数の細胞が死滅し、3 日後には、生細胞率が 25%程度に低下した。この結果

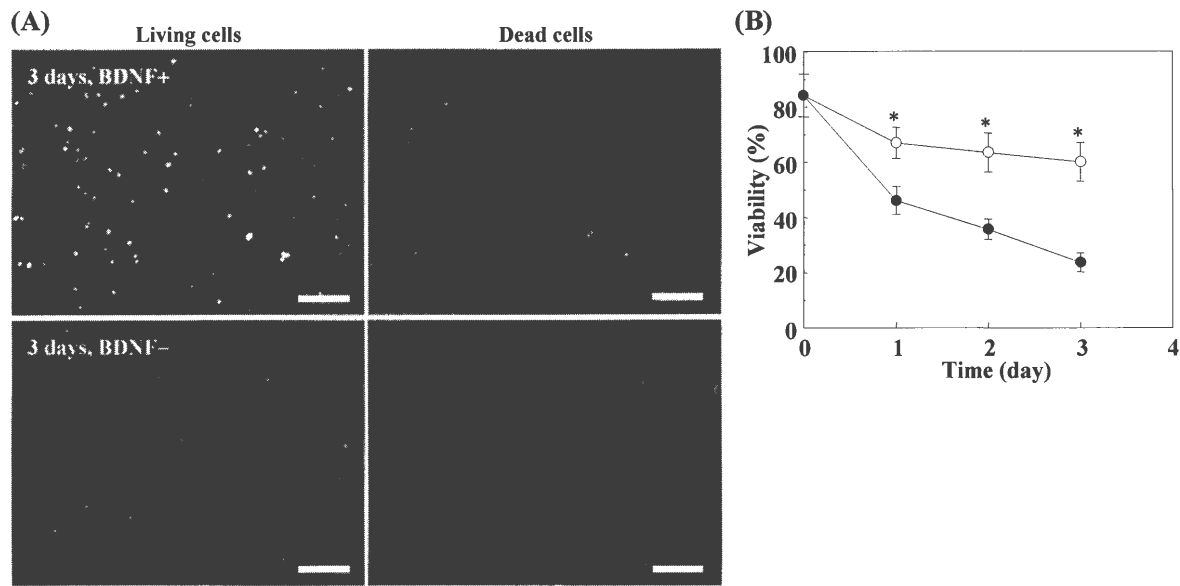


図 10. HAc ゲル内で培養した細胞の生存率に及ぼす担持 BDNF-His の効果. (A) BDNF 担持または非担持 HAc ゲル中で 3 日間培養した細胞の顕微鏡像. 左は生細胞 (calcein-AM), 右は死細胞 (propidium iodide) の蛍光顕微鏡写真である. スケールバー : 100 μm. (B) BDNF 担持 (○) または非担持 (●) HAc ゲル中で培養した細胞の生細胞率 (データは平均値±標準偏差, n = 4). *有意差あり (p < 0.01).

から、BDNF を担持することによって、ゲル中に埋入した細胞の生存率が有意に向上することが明らかとなった。

4. まとめ

神経幹細胞の大量確保、および、移植細胞の生存率の向上を目的として、細胞増殖因子を組み込んだバイオマテリアルを設計した。

EGF キメラタンパク質に融合された His を利用して基板上に配向固定する方法は、EGF の構造維持と安定な固定化にとって有利であった。EGF キメラタンパク質の配向固定された表面では、神経幹細胞が選択的に増殖した。とくに、二量体形成能を有する EGF キメラタンパク質を用いることで選択的増殖の効率が向上した。本研究で設計した基材を用いた培養法は、従来のニューロスフェア培養法と比較して、神経幹細胞の大量確保の点で格段に優れた方法である。

一方、HAc をベース材料とするハイドロゲルの作製では、HAc に固定した Zn^{2+} イオンとポリペプチドに含まれる His とのキレート形成反応を利用して、架橋の導入および BDNF の担持が可能であった。BDNF を担持させたゲル内では、ニューロスフェア形成細胞の生存率が、対象群に比べて高く維持された。細胞死を抑制できる移植用キャリア材料としての可能性が示された。

5. 参考文献

- [1] Kim, S. U. Human neural stem cells genetically modified for brain repair in neurological disorders. *Neuropathology* **2004**, 24, 159–171.
- [2] Goldman, S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 862–871.
- [3] Takegi, Y.; Takahashi, J.; Saiki, H.; Morizane, A.; Hayashi, T.; Kishi, Y.; Fukuda, H.; Okamoto, Y.; Koyanagi, M.; Ideguchi, M.; Hayashi, H.; Imazato, T.; Kawasaki, H.; Suemori, H.; Omachi, S.; Iida, H.; Itoh, N.; Nakatsuji, N.; Sasai, Y.; Hashimoto, N. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* **2005**, 115, 102–109.
- [4] Piccini, P.; Pavese, N.; Hagell, P.; Reimer, J.; Björklund, A.; Oertel, W. H.; Quinn, N. P.; Brooks, D. J.; Lindvall, O. Factors affecting the clinical outcome after neural transplantation in Parkinson's disease. *Brain* **2005**, 128, 2977–2986.
- [5] Kim, D. E.; Tsuji, K.; Kim, Y. R.; Mueller, F. J.; Eom, H. -S.; Synder, E. Y.; Lo, E. H.; Weissleder, R.; Schellingerhout, D. Neural stem cell transplant survival in brains of mice. *Radiology* **2006**, 241, 822–830.
- [6] Nakaji-Hirabayashi, T.; Kato, K.; Arima, Y.; Iwata, H. Oriented immobilization of epidermal growth factor onto culture substrates for the selective expansion of neural stem cells. *Biomaterials* **2007**, 28, 3517–3529.

- [7] Nakaji-Hirabayashi, T.; Kato, K.; Arima, Y.; Iwata, H. Essential role of structural integrity and firm attachment of surface-anchored epidermal growth factor in adherent culture of neural stem cells. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4403–4408.
- [8] Nakaji-Hirabayashi, T.; Kato, K.; Iwata, H. Preparation of hyaluronic acid hydrogels loaded with genetically-engineered brain-derived neurotrophic factor as carriers for improving neural cell survival. *Biomaterials*, submitted.
- [9] Nakaji-Hirabayashi, T.; Kato, K.; Iwata, H. Surface-anchoring of spontaneously dimerized epidermal growth factor for highly selective expansion of neural stem cells. *Bioconjugate Chem.*, in press.
- [10] Arima, Y.; Ishii, R.; Hirata, I.; Iwata, H. Development of surface plasmon resonance imaging apparatus for highthroughput study on protein-surface interactions. *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* **2006**, *4*, 201–207.
- [11] Miyamoto, K.; Yamada, P.; Yamaguchi, R.; Muto, T.; Hirano, A.; Kimura, Y.; Niwano, M.; Isoda, H. In situ observation of a cell adhesion and metabolism using surface infrared spectroscopy. *Cytotechnology* **2007**, *55*, 143–149.
- [12] Lide, D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics 76th Edition: A Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data*; CRC Press: Florida, 1995; p 10 (Chapter 6).
- [13] Prestrelski, S. J.; Arakawa, T.; Wu, C. -S. C.; O’Neal, K. D.; Westcott, K. R.; Narhi, L. O. Solution structure and dynamics of epidermal growth factor and transforming growth factor α . *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 319–322.
- [14] Yang, C. -H.; Wu, P. -C.; Huang, Y. -B.; Tsai, Y. -H. A new approach for determining the stability of recombinant human epidermal growth factor by thermal Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy. *J. Biomol. Struc. Dynam.* **2004**, *22*, 101–110.
- [15] Palmer, T. D.; Markakis, E. A.; Willhoite, A. R.; Safar, F.; Gage, F. H. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 8487–8497.