

21に示した。15thの肢芽器官で濃染された軟骨像が観察される(図21)。

胎齢14thおよび15th前肢を培地が入った培養ボトルにそれぞれ直接加えて回転培養すると、指に相当する部分は、元比べて細くなっていき、付け根の部分は、濃染された軟骨像が観察されたものの、機械的刺激により形態は変形していた(図22)。次に、袋状PP膜内に胎児から切りだした前肢をいれて、袋の口をシーラーで閉じて、培地の入った培養ボトル内にいれて、回転培養すると、形状は袋なしの場合に比べて正常に近い形を残し、かつ、付け根部分は濃染した軟骨像が観察された(図22)。この袋状PP膜には形態維持能が期待されたので、*in vivo*埋入試験に使用することとした。

図23は、Naive F344ラットの血液中のCD4とCD8陽性Tリンパ球サブセットの割合を示した。コントロール群は、袋状PP膜のみをF344ラットの腹腔内に埋入した結果であり、Test群は、胎児肢芽器官を袋状内にいれ、埋入した時の結果である。Test群では、CD8陽性細胞が増加する傾向がみられた(図23)。

14thの肢芽器官を袋状PP膜内に入れてF344ラットの腹腔内に埋入し、1週間後、袋をとりだし、内部の肢芽器官を固定し、アルシアンブルー染色したところ、形態は埋入時の原型を留めていなかった(図24)。

この袋状PP膜は、内部器官の形態維持能が劣ることから、修飾ポリウレタンで袋の外面を被覆化した後、異系(Brown-Norway)ラットの肢芽器官を袋内にいれて、F344ラットの腹腔内に埋入した結果

を図25、図26に示した。

図25の黒バーのtest群は、修飾ポリウレタンコート膜を用いた結果である。この場合、修飾ポリウレタン膜は、内部に組織を含む場合と入っていないもの(=含まないもの)との間で、CD8が増加する傾向がなかった。しかし、PP膜(白抜きバー)では、対照群に比べて、内部に組織を含む場合には、CD8陽性細胞が増加した(図25)。

CD4に関しては群間で大きな差異はなかった(図25)。袋内部の器官は、PP膜内では、原型を留めていなかったが、修飾ポリウレタン膜内部の器官では、元の形態を維持していた(図26)。

次に異種動物であるICRマウスについて同様にPP膜および修飾ポリウレタン膜を用いて解析した。その結果、CD4細胞のTリンパ球はいずれの群でも変化はなかったが、PP膜では、袋内にICRマウスの肢芽器官をいれて埋入するとCD8陽性Tリンパ球が増加する傾向がみられた(図27)。しかし、修飾ポリウレタン膜での実験では(黒バー)、対照群に比べ、試験群ではCD8陽性細胞が減少していた。

一方、袋内部の器官を固定し、アルシアンブルー染色した結果、やはり、PP膜に比べて、修飾ポリウレタン膜の方が形態維持能が高いことが確認された(図28)。

9. FLASH標識法に関する研究

9-1. TNF- α へのタグペプチド付加の分子設計

TNF- α (tumor necrosis factor: 腫瘍壊死因子)は活性化マクロファージなどが産生するサイトカインであるが、ある種の

腫瘍細胞ではアポトーシスを誘発し、細胞壊死作用を有する。157個のアミノ酸からなり、分子量は約17,000のタンパク質である。アポトーシス誘導活性以外にも転写因子であるNF- κ Bの活性化といった多様な生物活性を有する。TNF- α が活性を示すには3量体となってレセプターに結合する必要があるが、図29中の小さな点で表わされたアミノ酸は3量体になる時やレセプターに結合する際に認識される部位であると考えられている(EMBO Journal, 10, 827-836 (1991))。そのためタグを付加する際はこれらの認識部位を妨げないようにする必要がある。またN-末端側には分泌シグナルがあるため、N-末端周辺にタグペプチドを付加することによってタンパク質の分泌に異常が生じる可能性が考えられた(図30)。したがって、活性に影響することなくタグペプチドを付加するサイトとしては、EF-loopへの挿入、あるいはC-末端への付加が考えられた。この二つのうち、EF-loopへの挿入はTNF- α の立体構造を不安定化する可能性があるため、C-末端にタグペプチドを付加した融合タンパク質を作製することとした。

具体的にはTNF- α 配列の3'末端近くにBsrDI部位およびKpnI部位があるので(図31)、この間にFLASHの配列(図31)を挿入した。図32にpTNF-tag発現プラスミドの作製法をまとめて図示した。

9-2. TNF- α -tag発現プラスミドの作製

図32に従って操作を行い、各段階ごとに0.7%アガロースゲルでの電気泳動を行いプラスミドやフラグメントのサイズを確認するとともに、合成オリゴヌクレオチドをリンカーとして組み込んだ際には

シーケンスを行ってその結果からも塩基配列を確認した。次に市販キットを用いて、大量のpTNF-tag発現プラスミドを得た。

9-3. TNF- α -Tagの発現の確認

9-2で得た発現プラスミドおよびコントロール細胞にはpShuttleをHeLa細胞にトランスフェクトしてその発現を確認した。トランスフェクト後1日経過して細胞を観察すると、pTNF-tagをトランスフェクトした細胞では一部の細胞で明らかな細胞死が観察された(図33)。2日後ではpCMV-TNFにおいても細胞死が観察され、pTNF-tagでは50%以上の細胞が死亡していた。そこで2日目の培養液について、ウェスタンブロットによってTNF- α の発現を確認した。その結果、pTNF-tagをトランスフェクトした細胞の培養液上清には、17kD付近にTNF- α 抗体によって染色されるバンドが確認された。一方、pCMV-TNFをトランスフェクトした細胞の培養液上清にも、同様のバンドが観察されたが、その量は少なかった(図34)。

9-4. pTNF-tagによって発現したタンパク質の細胞壊死作用の確認

9-3で得た培養液について、マウスL929細胞への細胞毒性を測定した。pTNF-tagをトランスフェクトした細胞の培養液上清は、L929細胞数に対して明らかな細胞壊死作用を示した。一方pCMV-TNFを発現させた細胞の培養液上清の効果は弱いものであった(図35)。そこで次に市販の組換えヒトTNF- α (和光純薬製)との比較を行った。すなわちウェスタンブロットにおいて、上記pTNF-tagをトランスフェクトした細胞の培養液上清

の染色は 5ng/ml の TNF- α とほぼ同様であった。そこでコントロールである pShuttle をトランスフェクトした細胞の培養液上清に 5ng/ml の TNF- α を添加した溶液と pTNF-tag をトランスフェクトした細胞の培養液上清を比較してみたところ、ほぼ同等の細胞壊死活性が示された(図 3 5)。以上の結果から、TNF- α -tag タンパク質は TNF- α と同等な生物活性を有することが推測された。

9-5. 発現した TNF- α -Tag タンパク質の FLAsH による標識

各ベクターをトランスフェクトした HeLa 細胞の培養液上清をとり、昨年度確立したと同様の方法で FLAsH 標識を試みた(図 3 6)。図 3 6 の左は pTNF-tag をトランスフェクションした細胞の培養液の FLAsH 添加後の蛍光スペクトルである。508nm 励起によって 535nm 付近に蛍光ピークが観察された。一方、図 3 6 の右は pShuttle をトランスフェクションした細胞の培養液について同様に FLAsH を添加してみたものであるが、この場合でも 70% 程度であるが同様の蛍光スペクトルが観察された。この結果は培養液中に FLAsH 陽性の物質がある可能性を示唆している。FLAsH 陽性の物質としてはポリペプチドが考えられる。そこで培養液を分画分子量 12,000~14,000 の半透膜で透析し、さらに分画分子量 5000 の限外ろ過メンブレンで濃縮した後に同様の FLAsH 処理を行ってみたが、このような処理をしない場合とほぼ同様の結果が得られた。

10. ヒト末梢血幹細胞の培養と血管内皮細胞の分化誘導

近年、血液幹細胞の新規表面抗原として

AC133 が有用であることが報告されるようになってきた。また、AC133 血管内皮前駆細胞にも発現が認められるとする報告もある。昨年度は、ヒト末梢血より AC133 及び CD34 陽性細胞を分離し、VEGF 存在下にフィブロネクチン上に 2 週間培養し、血管内皮細胞への分化誘導を試みた。その結果 AC133 陽性細胞のほうが血管内皮細胞様の接着細胞が多く観察されたことを報告した(図 3 7)。これらの接着細胞が血管内皮細胞としての特性を備えているかを同定するために、CD31、Tie2、KDR/flk-1、eNOS 免疫染色により解析した。その結果、図 3 8 に示すように、多くの接着細胞が、CD31、Tie2、KDR 及び eNOS を発現していることが確認された。従って、AC133 陽性細胞から VEGF 存在下に分化してくる接着細胞は内皮細胞と推定された。

11. AC133 細胞の血管内皮細胞への分化誘導の時間経過

次にヒト末梢血幹細胞として AC133 細胞を用いて血管内皮細胞へと分化誘導した際の、分化指標がどのように発現してくるのかを時間を追って解析した。図 3 9 に示すように、VEGF 存在下に培養すると、1 週間目に接着細胞が認められるようになり、2 週間目では紡錘型に伸展した細胞と、比較的円形に伸展した細胞が認められるようになった。図 3 9 (a) に示すように、CD31 は培養 1 週間後に最も強く発現しており、培養経過とともにむしろその発現は低下する傾向が認められた。一方、KDR/flk-1 は培養 2 週間後に最も強い蛍光が観察された(図 3 9 (b))。一方、eNOS は 1 週から 3 週まで顕著な変化はみられ

なかったが、比較的強い発現が2週間目に見られた(図39-(c))。マクロファージ・顆粒球系の表面抗原として知られているCD11bの発現は全培養期間を通じて殆ど観察されなかった(図39-(d))。

一方、ヒト臍帯血AC133細胞を用いて同様の検討を行った。図40-(a)に示すように、CD31の発現は5日から9日に強く発現し、その後は発現が低下していった。KDR/flk-1の発現は図40-(b)に示すように、15日目に最も強く発現していた。

8. CD31 強陽性細胞の分画と培養

上記の結果より、ヒト末梢血及び臍帯血AC133細胞をVEGF存在下に培養すると、CD31が他のマーカーに先立って発現してくることから、CD31が血管内皮細胞への分化能の指標となるのではないかと想定し、CD31発現と分化能の関連について検討した。ヒト末梢血AC133陽性細胞をフィブロネクチンあるいはタイプIVコラーゲンプレートを用いてVEGF存在下、6日間培養すると、両細胞とも殆どが浮遊細胞のままであり、一部の細胞が接着していた。特に、タイプIVコラーゲンプレートを用いて培養した細胞の方が、フィブロネクチンプレートを用いて培養した細胞より伸展が弱い傾向が認められた(図41-(a))。しかし、接着細胞のCD31の発現を調べたところ、フィブロネクチンプレートを用いた細胞とタイプIVコラーゲンプレートを用いた細胞で大きな差異は認められなかった(図41-(b))。また、6日目の細胞を回収し、CD31の発現をフローサイトメーターを用いて解析すると、どちらのプレートを用いて培養した細胞もCD31の発現強度は同程度であった(図42-(a))。培養

開始から6日目までのCD31の発現を調べたところ、培養経過とともにCD31の発現が増加し、特に強陽性の細胞の比率が増加してくることが明らかになった(図42-(b)上)。そこで、容易に細胞が回収できることから、タイプIVコラーゲンコート上で6日間培養したAC133陽性細胞を選び、CD31の発現を指標として強陽性、陽性、陰性細胞を分離することにした。図42-(b)下に示すように、ヒト末梢血AC133陽性細胞をタイプIVコラーゲン上で培養すると、CD31の発現量の異なる細胞が出現する。これらの細胞をセルソーターで分画し、洗浄後、フィブロネクチンプレートを用いてVEGF存在下1週間培養した。その結果、図43に示すように、CD31強陽性細胞からは多くの接着細胞が出現し殆ど浮遊細胞は見られなかった(図43-a)、逆にCD31陽性細胞や陰性細胞では接着細胞が殆ど認められなかった(図43-b)。さらに、CD31強陽性細胞から出現してくる接着細胞はKDR/flk-1やeNOSを強く発現していた。

一方、ヒト臍帯血AC133陽性細胞を培養した場合も同様の結果が得られ、培養初期に出現してくるCD31強陽性細胞を分画しVEGF存在下に培養を続けるとKDR/FLK-1やeNOSを発現する接着細胞の出現が認められた(図44)。以上の結果からAC133陽性細胞をVEGF存在下に培養した時に出現してくるCD31強陽性細胞は血管内皮細胞前駆細胞の性質を持つと考えられた。

1.2. 生分解性ポリマーのヒト及びラット軟骨前駆細胞の分化・増殖への影響

図45に示す化学構造をもつ生分解ポ

リマーと L 乳酸共重合体及びフラーレンを用いて軟骨前駆細胞の分化・増殖への影響を調べた。図 4 6 に示すように、60 μ g/ml P(LA-CL)₂₅ 10000 を添加すると、ヒト軟骨細胞への分化に対しては影響しないが、ラットでは軟骨分化を 4.5 倍程度促進した。P(LA-CL)₂₅ 10000 は、ヒト及びラット軟骨前駆細胞の増殖に対しては影響を認めなかった。一方、同じ構成モノマーからなるが、重合比が異なる P(LA-CL)₅₀ 18000 では、ラット細胞での軟骨分化促進作用は、認められず、逆に増殖をコントロールの半分程度阻害することが明らかになった。ヒト細胞での軟骨分化と増殖には、殆ど影響はなかった(図 4 7)。フラーレンは、マウスで著しい軟骨分化を促進することから、水溶性フラーレン C60 DMA について調べた。ラットでは、やはり軟骨分化を 2 倍程度に促進していたがヒトでは、逆に軟骨分化阻害作用が観察された(図 4 8)。表 9 にこれら 3 物質でのヒトおよびラット軟骨分化過程に及ぼす影響をまとめた。

1.3. 小型肝細胞特異的分子の同定

図 4 9 は成熟肝細胞と小型肝細胞由来タンパク質の二次元電気泳動の蛋白質スポットを比較したものである。その結果、分子量 35kDa のやや酸性よりのスポットが成熟肝細胞においてはみられず、小型肝細胞において見られた。その他のスポットに関しては、有意な差異は見出されなかった。なお、異なる日に調製した成熟肝細胞と小型肝細胞においても同様な結果が得られた。

図 5 0 はそのタンパク質を還元 S-カルボキシメチル化後トリプシンで消化し、その断片化ペプチド混合物を MALDI-TOF/MS

で測定した質量スペクトルを示している。

表 1 0 に、得られた質量値から Mascot システムを用いたペプチドマスフィンガープリンティング法による結果をまとめた。得られた質量値は予測されるアネキシン III の質量値と極めてよく一致しており、本スポットはアネキシン III と同定された。

D. 考察

現在、ウイルス検出法として最も高感度な方法は PCR 法などの NAT 法である。しかし、ウインドウ期の存在やサンプリング上の問題もあり NAT 法を用いても必ずしもすべてのウイルスを検出するとは限らず、さらなる高感度化が求められている。ウイルスやウイルスゲノムの濃縮には、従来、超遠心法やポリエチレングリコール法あるいはアルコール沈殿法などが用いられているが、超遠心法は HCV や HGV 等のウイルスのようにウイルス粒子の比重が軽い場合などは適用が困難である。また、現在用いられている方法は操作が非常に煩雑であり、NAT 法のような高感度検出系においては目的試料以外からの汚染の可能性も多くなるという大きな欠点がある。さらに、HTLV-I, II のように対象とする細胞のごく一部にしかウイルスが感染していないようなケースにおいてもより適切な濃縮法の開発が望まれている。従って、出来る限り操作が簡便でかつ確実なウイルスあるいはウイルスゲノムの濃縮法は NAT 法の高感度化には必須のテーマである。そこで、本研究では、NAT 法によるウイルス検出の高感度化を目指してウイルス濃縮法の開発を行った。昨年度は、ポリエチレンイミン磁気ビーズやスルホ

ン酸磁気ビーズを用いて、エンベローブウイルスや非エンベローブウイルスを濃縮することができることを明らかにした。本年度は、両磁気ビーズを用いたウイルス濃縮について詳細な検討を行った。定量的PCR解析より、ポリエチレンイミン磁気ビーズを用いると、100倍から1000倍の濃縮が可能であることが示された。特に強調すべき点として、通常の操作では検出限界以下のウイルスしか存在しない場合にも、濃縮を行うことにより検出限界のさらなる高感度化が行えることが示されたことである。一方、ポリエチレンイミン磁気ビーズを用いて濃縮できない非エンベローブウイルスは2価イオン存在下にスルホン酸磁気ビーズを用いることにより濃縮が可能であり、10-100倍ほどの検出感度の高感度化が可能であった。この検出限界の高感度は、ウイルス検出において最も重要な要素であり、培養上清にわずかにしか含まれないようなウイルスでも、濃縮により確実にウイルスが検出できれば、ウイルス安全性は飛躍的に向上することが期待される。

ポリエチレンイミン磁気ビーズによるウイルス濃縮では通常の培養に用いる濃度の血清が存在しても影響を受けなかった。データには示さなかったが、スルホン酸磁気ビーズでも同様の結果が得られている。さらに、複数のウイルスが存在していてもポリエチレンイミン磁気ビーズを用いて同時に濃縮が可能であった。ポリエチレンイミン磁気ビーズやスルホン酸磁気ビーズの濃縮機構として図5-1のようなモデルが想定される。すなわち、ポリエチレンイミン磁気ビーズでは、ウイルスを

コートするリン脂質やウイルスエンベローブタンパク質のシアル酸などに結合し、スルホン酸磁気ビーズも、2価イオンを介してリン脂質やシアル酸などに結合すると思われる。また、非エンベローブウイルスでは、2価イオンを介してコートタンパク質に結合するのではないかと想定される。

一方、ポリエチレンイミン磁気ビーズによるウイルス濃縮を応用して、ポリエチレンイミン結合セファロースを用いて細胞懸濁液からウイルスを除去することを試みた。その結果、効率よく細胞懸濁液からウイルスの除去が可能であった。このポリエチレンイミン結合セファロースは、細胞治療において潜在的に存在するウイルスを除去できる技術となる可能性があり、今後その有用性についてさらに検討を重ねていく予定である。

細胞の同一性や純度の試験に際して、あるいは培養等の製造過程において、目的とする細胞の遺伝的性質の変化や望ましくない細胞特性の変化が生じていないかを的確に検出することは、細胞治療の安全性確保上極めて重要である。細胞の安全性確保のための遺伝的安定性の確認や同一性の確認には、核型分析、さらには多型配列解析が有用とされている。しかし、G-バンド解析、CGH解析あるいはm-FISHそれぞれ単独では特有の欠点が指摘されている。昨年度は、これらの染色体解析法を相互補完的に駆使することにより細胞の遺伝的性質の解析にどの程度有用であるのか、モデル細胞を用いて検討し、これらの手法を組み合わせることにより、より確実に転座等を検出できることを示した。

本年度は、骨髄系細胞の HL-60 細胞とその亜株で高増殖性の HL-60RG 細胞に G-バンド解析、CGH 解析、m-FISH を組み合わせることにより見出した遺伝的差異を明らかにする目的で c-myc プローブを用いた FISH 解析を行った。HL-60 細胞は白血病由来細胞であり染色体変異も多いことが明らかになったが HL-60RG 細胞との差異は比較的わずかであった。注目すべき差異としては、第 9 染色体への第 8 染色体の一部の挿入、第 11 染色体への第 13 染色体の転座が見出された。前者については、c-myc プローブによる FISH 解析と G-バンド解析を組み合わせることにより、第 9 染色体への第 8 染色体の挿入が、c-myc を含む領域の転座であることが示された。また、FISH 解析で検出される c-myc プローブのシグナル強度が非常に強いことより、第 8 染色体の c-myc を含む領域が増幅して第 9 染色体に挿入されていることも示された。以上の結果より、G-バンド解析、CGH 解析、m-FISH 解析に加えオンコ遺伝子プローブを組合わせた遺伝的解析手法が、細胞の遺伝的変異を検出するのに非常に有用であると考えられた。

細胞・組織加工医薬品等の特性指標として細胞が産生する種々のサイトカインや増殖因子等のタンパク質プロファイルの解析が考えられる。本研究では、モデル細胞として HL-60RG 細胞を用いて、培養上清中に産生されるタンパク質を高分解能 2 次元電気泳動法で分離し、分離の良好なスポットを選び、各スポットをトリプシン消化して得られたペプチド断片混合物を MALDI-TOF-MS を用いたペプチドマスマフィンガープリンティング法によりタン

パク質の帰属の決定を行った。その結果 17 種類のタンパク質の帰属を決定することができた。今後さらに、2 次元電気泳動により分離した培養上清タンパク質について PMF 法を利用して帰属を決定し、ファイリングを行っていく。このような解析を行うことにより、細胞由来タンパク質の帰属をデータライブラリーを用いて決定できる系を確立する予定である。

細胞治療薬の評価において重要なことは、目的タンパク質の同定はもちろんのことであるが、目的タンパク質の詳細な構造やその変化を明らかにすることである。昨年度はマイクロカラム(内径 1 mm)を用いた LC/MS によるペプチド/糖ペプチドマッピング、及び LC/MS/MS による糖ペプチド選択的解析法を検討し、これらが目的タンパク質の恒常性評価、糖鎖結合位置、及び予備的な糖鎖構造解析法として有用であることを示した。本年度は、細胞分泌微量タンパク質の分析に応用することを目的として、キャピラリー LC/MS の導入による微量化を検討した。まず、糖鎖部分の恒常性評価に応用することを目的として、キャピラリー LC/MS を用いた糖鎖マッピング法を検討した。その結果、モデルとして用いた rhTM の糖鎖構造を微量で簡単に解析することができた。ペプチド/糖ペプチドマッピングを用いて糖タンパク質を解析する際、糖鎖の不均一性によりペプチド/糖ペプチドマップや糖ペプチドのマスマスペクトルが複雑になり、解析が困難になる場合が多い。従って、糖鎖構造解析法の開発は、糖鎖部分の恒常性を評価するという点からだけでなく、ペプチド/糖ペプチドマッピングの解析を容易にさせると

いう点からも有用であると思われる。

さらに、キャピラリーLC/MSによるペプチド/糖ペプチドマッピング、及びLC/MS/MSによる糖ペプチド選択的解析法を検討し、マイクロボアカラムを用いた場合の10分の1量のrhTMでマイクロLC/MSで得られたものと同様なペプチド/糖ペプチドマップ、及び糖ペプチドマップが得られることを確認した。今回開発した一連の操作、すなわち、キャピラリーLC/MSによる糖鎖マッピング、及びペプチド/糖ペプチドマッピング、並びにプリカーサーイオンスキャンによる糖ペプチド選択的解析法によって、細胞治療用医薬品が分泌する目的タンパク質の特性解析が可能になると期待される。来年度は、実際に、細胞由来タンパク質の構造解析に応用する予定である。

細胞・組織のがん化を予測する評価技術開発に関する研究の一環として様々な断片長のhTERTプロモーター欠失変異体を用いた検討より、hTERT遺伝子の5'上流286bpのプロモーター領域から構成されるレポーター遺伝子が有用であることが明らかになった。今後さらに、細胞のがん化を予測評価法としての有用性を確認していく予定である。

一方、hTERTの転写制御に関与すると推定されたシスエレメントの存在が確認された。特に、A549細胞、HeLa細胞、HepG2細胞において、pGL3-1119の転写活性化能が著しく低下しており、このプロモーター領域内(-1119bp~-286bp)には、転写を抑制的に制御する転写因子が結合していると考えられる。最近、この領域内に結合してhTERTプロモーターの転写

活性を抑制する2種類の転写因子が同定されており、これらは、WT1(Wilms' tumor 1)とMZF-2(Myeloid-specific zinc finger protein2)であることが判明した。しかしながら、これらの転写因子は細胞種特異的に機能していることも指摘されており、現時点ではこれら転写因子以外にもhTERTプロモーターの転写抑制に関与している因子が存在していることが推測される。また、コアプロモーターの転写抑制に関与している因子が存在していることが推測される。また、コアプロモーター領域内にも、様々な転写因子の潜在的結合部位が位置していると考えられる。実際に、この領域内には、Myc/Max、Sp1、N-Myc、MZF1、c-Ets-1、 δ -EF1、MyoD、NF- κ B、USF、IRF-1などの潜在的結合部位が存在していることがデータベース検索により判明した。特に、Myc/MaxおよびSp1の関与はすでに報告されており、hTERT遺伝子の転写制御とc-Mycとの関与は直接的であると考えられている。hTERTプロモーターは、がん細胞において非常に高い特異性を示すプロモーターである。また、hTERTプロモーターは生殖幹細胞においても機能することが知られており、がん細胞および生殖幹細胞におけるその制御機構の違いを明らかにすることで、生殖幹細胞を用いた再生医学の分野や、特異的抗がんシステムの構築が可能になるものと思われる。

細胞等による望ましくない免疫反応の検出技術開発に関する研究の一環として、PP膜と修飾ポリウレタンでコートした膜の免疫隔離能の比較を行った。その結果、PP膜で、同系、異系、異種から採取した

器官を埋入した群では、採取した器官の原形を留めず、著しい形態異常が観察されが、修飾ポリウレタンでコートした膜では、原形を留め、形態保持機能の著しい改善を認めたと。即ち、外からの免疫的な攻撃を防ぐ免疫隔離膜としての機能を示した。一方、埋植ラットでの CD4/CD8 は、PP 膜では、膜単独と膜内に器官を埋入した群では、膜内に異系ラット、異種マウスの肢芽器官を埋入した群の方が、CD8 陽性細胞の割合が高かった。しかし、修飾ポリウレタンコート膜を使用した場合には、PP 膜単独と修飾ポリウレタンコート膜内器官埋入群との間で CD8 陽性細胞の割合に有意な差はなかった。したがって、この新規免疫隔離膜を用いることにより、レシピエント動物からの補体等の非特異的反応による攻撃を受けることなく、細胞由来タンパク質等によって惹起される液性免疫反応の影響をモデル動物を用いて評価できる可能性が示された。

細胞から分泌される目的生理活性タンパク質の生体内の動態解析法の開発を目指して、2つの2連のシステイン間に2つのアミノ酸があるような一次構造(-CCXXCC-, Xはシステイン以外の任意のアミノ酸)を含む α -ヘリックスに特異的に配位して、強い蛍光を生じる Fluorescein 誘導体 FIAsh を利用した蛍光標識法の開発に関する検討を行った。この方法が成立するには、

(1)上記構造を含むタグペプチドを付加した目的タンパク質の FIAsh 標識が定量的であること

(2)目的タンパク質へのタグペプチドの付加が、目的タンパク質の機能に影響をお

よぼさないこと

(3)目的タンパク質へのタグペプチドの付加が、目的タンパク質そのものの動態に影響をおよぼさないこと

という条件をクリアーすることが好ましい。初年度は(1)についての検討を行い、血清中のタンパク質の定量的な標識条件を確立した。

そこで本年度は分泌タンパク質 TNF- α をモデルにして、機能に影響することなく上記構造を導入する方法を検討した。

TNF- α については C-末端へのタグペプチドの導入を行い発現させた。タグペプチド付きの TNF- α 発現用プラスミドをトランスフェクトさせた HeLa 細胞では、培養直後から細胞の壊死が観察された。さらにウェスタンブロットによって培養液中に TNF- α 抗体によって染色される約 17kD のタンパク質の分泌が確認された。またこの培養液はマウス L-929 細胞に対して細胞壊死作用を示すことも確認された。ウェスタンブロットでの染色を基準にして TNF- α との細胞壊死作用の強さを比較しても、ほぼ同様であることが推察された。今後生成したタンパク質につき大量に発現させ、精製して解析する予定であるが、タグペプチドを付加させることによる細胞壊死作用への影響は小さいものと思われる。

細胞治療薬・医療用具に用いられる細胞・組織は、幹細胞や前駆細胞を素材として、誘導剤による処理、遺伝子工学的改変、あるいは他の細胞との相互作用などにより目的とする細胞へ分化等をさせ、治療目的に適した細胞・組織へと加工される場合が想定される。このような加工において、目

的とした機能が付与されているか、さらには加工の過程において望ましくない細胞特性の変化や機能変化が起きていないかを明らかにすることが、細胞治療を安全に行うために必要となってくる。

本研究では、ヒト末梢血血液幹細胞及びヒト臍帯血幹細胞を分離し、その血管内皮細胞への分化誘導系を確立するとともに、その分化過程を詳細に解析することにより、血液幹細胞としての有用性をあらかじめ判定できるような細胞指標の提示を試みようとしている。昨年度開発した、ヒトAC133陽性細胞より血管内皮細胞への誘導系は臍帯血でも適応可能であることが明らかになり、ソースの異なる2つのAC133細胞を用いても分化誘導初期にCD31陽性細胞が出現し、その発現は他の分化指標よりも優先して出現することが明らかになった。さらに、このCD31の発現を指標として、CD31強陽性細胞及び、陽性細胞、陰性細胞をセルソーターを用いて分離し、その血管内皮細胞への分化能を調べたところ、CD31強陽性細胞から多くの接着細胞が出現し、かつ出現する接着細胞は血管内皮細胞の指標であるKDRやeNOSを強く発現する細胞であることが明らかになり、CD31が血管内皮細胞への分化能の指標となることが示された。今後は、このCD31強陽性細胞の管腔形成能やin vivo血管形成能について検討を行う予定である。

一方、主として血管内皮細胞への分化誘導では、フィブロネクチンやタイプIVコラーゲンをコートしたプレートを用いて培養したが、KDR等の多くの分化指標の出現を引き起こすにはフィブロネクチンが最も優れていた。このことは、in vitro

での血管内皮への最終分化にはフィブロネクチンとの結合刺激が重要であることを示している。一方、タイプIVコラーゲンを用いた場合には、CD31などの初期の分化誘導は可能であるが、それ以降の分化誘導はできなかった。しかし実際に、血管内皮誘導能を指標として治療を行うことを想定すると、今回示したようにむしろin vitroでは最終分化を抑制でき、細胞の回収が容易なタイプIVコラーゲン上で培養し、CD31強陽性細胞を分取することが合理的であると思われる。

近年、小型肝細胞が肝幹細胞として細胞治療薬への応用が期待されていることから、小型肝細胞と成熟肝細胞で発現が異なるタンパク質を探索し、その品質評価の指標としての応用を目指した研究が活発に行われている。それらの研究の多くは小型肝細胞を培養し、分化した成熟肝細胞特異的あるいは肝細胞において普遍的に発現する既知のマーカートンパク質の発現を検討しようというものである。その結果、アルブミン、トランスフェリン、サイトケラチン8、サイトケラチン18など肝細胞における普遍的なマーカーは全て小型肝細胞に存在することが明らかになっている。また、分化型肝細胞のマーカーである α 1-アンチトリプシン、コネクシン32は培養初期には発現がみられず、培養時間の経過に伴い発現細胞が増加する傾向がみられている。一方、小型肝細胞においてのみ発現がみられるタンパク質はこれまで同定されていない。

小型肝細胞と成熟肝細胞で発現が異なっているタンパク質の探索に関する研究が進んでいない理由の一つとして探索の

対象となる既知のマーカートンパク質の数が限られていることが考えられる。そこで我々は肝細胞を成熟肝細胞と小型肝細胞に分画し、高分解能2次元電気泳動法を用いた解析を試みた。その結果、アネキシンIIIが小型肝細胞に特異的に発現していることが今回初めて明らかになった。本知見は小型肝細胞が今後細胞治療薬として応用される場合にその品質評価の指標としてアネキシンIIIが有用である可能性を示唆している。今後、ヒトの小型肝細胞においても同様な検討を行い、その品質評価の指標としての有用性について更に検討を行う必要がある。

今回小型肝細胞における特異的な発現が明らかになったアネキシンIIIは10種類のアネキシンファミリーの1つである。アネキシンはクロマフィン細胞の分泌顆粒をCa²⁺依存的に凝集させる因子として発見された因子である。その後、ホスホオリパーゼA2活性阻害、顆粒凝集、膜融合作用が多くのアネキシンに共通の作用と推定され、膜輸送の制御、炎症反応、血液凝固反応、細胞情報伝達、癌、自己免疫疾患等に関与することが示唆されている。しかしながら、種々のアネキシンの中でアネキシンIIIに特異的な機能は細胞からの各種生体内因子の分泌促進作用しか知られていない。今後、小型肝細胞におけるアネキシンIIIの特異的な発現の意義について、新たなアネキシンIIIの機能の探索も含めて詳細な検討が必要である。

組織工学に使用される生分解性材料を細胞の足場となる骨格材料としたとき、細胞が骨格材料に付着し、増殖する過程で材料を分解し、その結果、生成される低分子量

ポリマーの影響を評価することが重要であると考えられる。しかし、この方面の研究は殆どなされていない。

組織工学材料として、様々なタイプの生分解性ポリマーが使用され、研究されているが、代表的な生分解性ポリマーの分解産物である低分子量ε-カプロラクトンとL-乳酸共重合体等を用いた。昨年度は、ラット胎児細胞由来軟骨前駆細胞の分化能への影響を明らかにした。今年度は、ヒト軟骨前駆細胞の高密度培養での分化および増殖に及ぼす作用を調べ、ラット由来細胞との反応評価の違いについて検討した。

ポリ乳酸とεカプロラクトンとの共重合体(重量比75:25)分子量10000のもの{P(LA-CL)₇₅ 10000}、ポリ乳酸とεカプロラクトンとの共重合体(重量比50:50)分子量18000のもの{P(LA-CL)₅₀ 18000}は、合成したものを使用した。軟骨細胞としては、ヒト関節軟骨を用いて、高密度培養法により、ヒト関節軟骨の分化に及ぼす影響を調べた。その結果、P(LA-CL)₇₅ 10000では、軟骨分化は抑制され、コントロールの90%程度の分化にとどまった。ラット胎児軟骨前駆細胞では、顕著な分化促進作用を認めたことより、細胞の採取組織や、種の違いにより、オリゴマーに対する反応は、異なることが明らかになった。一方、P(LA-CL)₅₀ 18000を試験した結果では、ヒト軟骨細胞は、コントロールと同程度の分化レベルであった。P(LA-CL)₇₅ 10000とP(LA-CL)₅₀ 18000の細胞の増殖に及ぼす影響に関しては、ヒト軟骨細胞に対して、7-5%程度の増殖抑制が観察されたが、ラット胎児軟骨前駆細胞に対しては、P(LA-CL)₇₅ 10000でコントロールの25%阻害、P(LA-CL)₅₀ 18000では、

コントロールの40%阻害を示した。

従って、同じ濃度レベルの共重合体オリゴマーについて比較した結果では、ラットおよびヒト細胞間では、細胞分化や増殖能に及ぼす影響が著しく異なることが明らかになった。

E. 結論

(1) ウイルス等の感染性危険因子の高感度検出のための基盤技術の開発や評価方法に関する研究として、ポリエチレンイミン磁気ビーズ及びスルホン酸磁気ビーズを用いたウイルス濃縮技術に関する詳細な検討を行った。ポリエチレンイミン磁気ビーズは、主としてエンペローブウイルスに対して優れたウイルス濃縮効果を示すこと、また100倍から1000倍の濃縮効果が得られるとともに検出限界の大幅な高感度化が可能であることを見出した。また、複数のウイルスを同時に濃縮可能なことも明らかにした。一方、スルホン酸磁気ビーズは非エンペローブウイルスの濃縮にも適応可能であり、検出限界の高感度化も可能であった。これらのウイルス濃縮法は、遠心操作も必要なく短時間の操作でウイルスを濃縮することができるもので、簡便性・迅速性にも優れており、これらの濃縮法を組み合わせることにより、ウイルス検出のための NAT の高感度化が可能であることが示された。

(2) 染色体解析による細胞の同一性・純度・遺伝的安定性評価技術の開発を目指して、モデル細胞として HL-60 細胞及びその亜株である高増殖性 HL-60RG 細胞を用いて検討した。G-バンド染色、マルチカラー FISH (m-FISH)、CGH 法を組み合わせた染色体解析により、HL-60RG 細胞では、9 番染色体

9q13 部位に 8 番染色体の一部が挿入されていることを昨年見出していたが、本年度はさらに c-myc プローブと G-バンド解析を組み合わせることにより第 8 染色体の c-myc を含む領域が増幅して第 9 染色体に挿入されていることを明らかにした。以上の結果より、G-バンド解析、CGH 解析、m-FISH 解析、オンコ遺伝子 FISH 解析を組み合わせると、細胞の遺伝的変異を検出するのに非常に有用であると考えられた。

(3) 細胞由来タンパク質プロファイルを指標とする細胞特性の迅速・高感度解析法の開発として、モデル細胞を用い、培養上清に分泌される増殖因子等を濃縮し、イモビラン 2 次元電気泳動により、2 次元上で分離したスポットを質量分析により解析する方法を確立した。

さらに、キャピラリー LC/MS による目的タンパク質の構造解析法は、細胞治療用細胞の品質評価法として有用となることが確認された。

(4) 細胞・組織のがん化を予測する評価技術の開発に関する研究の一環として ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子 (hTERT) のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子とをつないだレポーター遺伝子を作製し、様々な種類のがん細胞株および正常細胞における hTERT プロモーターの転写活性化能について評価した。その結果、がん細胞特異的にレポーター遺伝子の活性化が起こることが確認され、その有用性が確認された。

(5) 細胞等による望ましくない免疫反応の検出技術開発に関する研究の一環として、修飾ポリウレタンをコートした免疫隔離膜が非特異的な免疫反応を防ぐことが明

らかになり、新規免疫隔離膜が液性免疫の影響を評価する上で有用であることが示唆された。

(6) 細胞由来目的タンパク質の体内動態の新規評価法として、目的タンパク質に Fluorescein 誘導体 FLAsH 反応性のタグペプチドを結合させる方法を開発するとともに、モデルタンパク質として TNF- α にタグペプチドを導入しても、細胞からの分泌性や生物活性が保持されていることが確認された。

(7) 幹細胞や前駆細胞を素材とする細胞・組織加工医薬品等の製造過程における品質・安全性確保技術や製品の評価方法に関する研究として、ヒト末梢血幹細胞及び臍帯血 AC133 細胞を用いた血管内皮細胞への分化誘導系を確立し、その分化誘導初期に出現する CD31 強陽性細胞が血管内皮への分化能を持つことを見出し、CD31 の発現が血管内皮分化能をもつ細胞の優れた特性指標となることを見いだした。また、肝幹細胞と細胞治療への応用が期待されている小型肝細胞の特性指標解析を行い、アネキシン III が有用な指標となる可能性が見出された。さらに、細胞培養におけるスカフォールドの生分解性ポリマーのラット及びヒト軟骨前駆細胞の分化・増殖に対する影響を調べたところ種間で異なる作用をもつことを見出した。この結果より、組織工学利用医療用具の評価を行う上で、動物モデルでの結果をヒト臨床効果の予測に利用するときは、その作用が種間で異なる可能性を考慮する必要性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表及び著書

- 1) K. SATOH, A. IWATA, M. MURATA, M. HIKATA, T. HAYAKAWA, T. YAMAGUCHI; Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Clin. Microbiol.*, (submitted)
- 2) Toshie KANEYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi OSHIZAWA and Takao HAYAKAWA: CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells, *British J. Hematol.*, (submitted)
- 3) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Masashi HYUGA, Sumiko Hyuga, and Takao HAYAKAWA : Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (Submitted)
- 4) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Sumiko Hyuga, and Takao HAYAKAWA : The usefulness of sugar mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals* (Submitted)
- 5) Naoya KOIZUMI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Tetsuji HOSONO, Akiko Watabe-ISHII, Eriko UCHIDA,

- Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE and Takao HAYAKAWA: Efficient Gene Transfer by Fiber-Mutant Adenoviral Vectors Containing RGD Peptide, *Biochim Biophys Acta*, 1568, 13-20 (2001)
- 6) Kouji MARUYAMA, Yasuto AKIYAMA, Noriko NARA-ASHIZAWA, Takashi HOJO, Jin-YAN CHENG, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA and Ken YAMAGUCHI: Adenovirus-mediated MUC1 gene transduction into human blood-derived dendritic cells, *J. Immunotherapy*, 24, 345-353 (2001)
- 7) Miyako OHTA, Nana KAWASAKI, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, 910, 1-11 (2001)
- 8) Nana KAWASAKI, Yuji HAISHIMA, Miyako OHTA, Satsuki ITO, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Structure analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin, *Glycobiology* (in press)
- 9) Naoki OKADA, Tomomi SAITO, Yasushige MASUNAGA, Yukiko TSUKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Kohei MORI, Yuka OKADA, Takuya FUJITA, Takao HAYAKAWA, Tadanori MAYUMI, and Akira YAMAMOTO: Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate anti-tumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells, *Cancer Res.* 61, 7913-7919 (2001)
- 10) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA, Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline controllable expression system, *Biochim Biophys Acta*, 1568, 21-29 (2001)
- 11) Zhili XU, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA: Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors, *Gene*, 272, 149-156 (2001)
- 12) Akiko EGUCHI, Teruo AKUTA, Hajime OKUYAMA, Takao SENDA, Haruhiko YOKOI, Hachiro INOKUCHI, Shigeo FUJITA, Takao HAYAKAWA, Katsuo TAKEDA, Mamoru HASEGAWA and Mahito NAKANISHI: Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, 276, 26204-26210 (2001)
- 13) Sumiko HYUGA, Nana KAWASAKI, Masashi HYUGA, Miyako OHTA, Rie SHIBAYAMA, Toru KAWANISHI, Sadako YAMAGATA, Tetsuya YAMAGATA and Takao HAYAKAWA: Ganglioside GD1a Inhibits HGF-Induced Motility and Scattering of Cancer Cells through Suppression of Tyrosine-Phosphorylation of c-Met,

- Int. J. Cancer*, 94, 328-334 (2001)
- 14) Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY, and Takao HAYAKAWA: Approaches for generating recombinant adenovirus vectors, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 52, 165-176 (2001)
 - 15) Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Mark A. KAY, Takao HAYAKAWA: A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob, *Gene Ther.*, 8, 730-735 (2001)
 - 16) Naoki OKADA, Yukiko TSUKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Kohei MORI, Tomomi SAITO, Takuya FUJITA, Akira YAMAMOTO, Takao HAYAKAWA, and Tadanori MAYUMI: Efficient gene delivery into dendritic cells by fiber-mutant adenovirus vectors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282, 173-179 (2001)
 - 17) Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY, Takao HAYAKAWA: In vitro ligation-based cloning of foreign DNAs into the E3 as well as E1 deletion region for generation of recombinant adenovirus vector, *Bio Techniques*, 30, 1112-1116 (2001)
 - 18) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Improvement of Adenovirus Vectors for Gene Transfer, *Animal Cell Technology* (in press)
 - 19) Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Takao HAYAKAWA: CAR- or α v integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice, *Gene Ther.* (submitted)
 - 20) Zhi-Li Xu, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA : Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector, *J. Control Release*, (in press)
 - 21) Eriko UCHIDA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE and Takao HAYAKAWA: Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells, *Biol. Pharm. Bull.* (submitted)
 - 22) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes, *Gene*, (in press)
 - 23) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITO and Takao HAYAKAWA: Analysis of glycopeptides and glycoproteins by liquid chromatography/mass

- spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Methods Molecular Biology* (in press)
- 24) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA : Tet-Off System is More Effective than Tet-On System for Regulating Transgene Expression in Single Adenoviral Vector, *J. Gene. Med.* (in press)
- 25) Yuji NAGAYAMA, Eijun NISHIHARA, Hiroyuki NAMBA, Haruhiko YOKOI, Mamoru HASEGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Hirofumi HAMADA, Shunichi YAMASHITA and Masami NIWA: Targeting the Replication of Adenovirus to p53-Defective Thyroid Carcinoma with a p53-Regulated Cre/loxP System, *Cancer Gene Therapy*, 8, 36-44 (2001)
- 26) Sachiko MATSUI, Reiko ADACHI, Kaoru KUSUI, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi KASAHARA, Takao HAYAKAWA and Kazuhiro SUZUKI: U73122 inhibits the dephosphorylation and translocation of cofilin in activated macrophage-like U937 cells, *Cell. Signalling*, 13, 17-22 (2001)
- 27) Masato TAKAHASHI, Naohiko SEKI, Toshinori OZAKI, Masaki KATO, Tomoko KUNO, Takahito NAKAGAWARA, Ken-ichi WATANABE, Koh MIYAZAKI, Miki OHIRA, Shunji HAYASHI, Mitsuchika HOSODA, Hisashi TOKITA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Satoru TODO, Akira NAKAGAWARA: Identification of the p33^{ING1}-regulated genes which include *cyclin B1* and proto-oncogene *DEK* by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NmuMG, *Cancer Res.* (in press)
- 28) Takahito NAKAGAWA, Masato TAKAHASHI, Toshinori OZAKI, Ken-ichi WATANABE, Satoru TODO, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, and Akira NAKAGAWARA: Autoinhibitory Regulation of p73 by Δ Np73 to Modulate Cell Survival and Death Through p73-Specific Target Element Within the Δ Np73 Promoter, *Molecular and Cellular Biology*, (in press)
- 29) Yuka OKADA, Naoki OKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Koichi TAKAHASHI, Nobuyasu MIZUNO, Takuya FUJITA, Akira YAMAMOTO, Takao HAYAKAWA, and Tadanori MAYUMI: Tumor necrosis factor α -gene therapy for an established murine melanoma using RGD (Arg-Gly-Asp) fiber-mutant adenovirus vectors, *Jap. J. Cancer Res.* (in press)
- 30) Teruo AKUTA, Hajime OKUYAMA, Hachiro INOKUCHI, Yosuke SUZUKI, Akiko EGUCHI, Takao SENDA, Emi NAGOSHI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Katsuo TAKEDA, Mamoru HASEGAWA and Mahito NAKANISHI: Active Nuclear Transport of Phage-Based Artificial Nucleocapsid, *J. Biol. Chem.* (submitted)
- 31) Toshie KANAYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi OSHIZAWA, Mieko

- KOGI, Eriko UCHIDA and Takao HAYAKAWA: The Role of p70 S6 Kinase Cascade on Neutrophilic Differentiation and Proliferation of HL-60 Cells - Study on Transferrin Receptor-Positive and -Negative Cells from Dimethylsulfoxide and Retinoic Acid-Treated HL-60 Cells, *J. Biol Chem.*, (submitted)
- 32) Takao HAYAKAWA: Biotech Process Evaluation, *Proceedings of the Fifth International Conference on Harmonization* San Diego 2000, Ed. By M. Cone, Regulatory Affairs Journals LTD, pp. 73-77 (2001)
- 33) Sachiko Matsui, Sachiko Matsumoto, Reiko Adachi, Kaoru Kusui, Akiko Hirayama, Hidemi Watanabe, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Teruhide Yamaguchi, Tadashi Kasahara, and Kazuhiro Suzuki : LIM Kinase 1 Modulates Opsonized Zymosan-triggered Activation of Macrophage-like U937 Cells. POSSIBLE INVOLVEMENT OF PHOSPHORYLATION OF COFILIN AND REORGANIZATION OF ACTIN CYTOSKELETON. *J. Biol. Chem.*, 277, 544-549 (2002)
- 34) H. Hisamitsu, H. Ohata, T. Kawanishi, T. Iwamoto, M. Shigekawa, H. Amano, S. Yamada, and K. Momose : A mechanism of Ca²⁺ release from Ca²⁺ stores coupling to the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cultured smooth muscle cells, *Life Sci.*, 69, 2775-2787 (2001)
- 35) Haruko MASUMIYA, Junya KASE, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA, Setsuya MIYATA, Yoichi SATO, Ryu NAKAMURA, Hikaru TNAKA and Koki SHIGENOBU, Effect of T-type and L-type Ca²⁺ channel blockade on early phase Ca²⁺ transients In rat atrial and ventricular cardiomyocytes, *Bioimages*, 9, 87-93 (2001)
- 36) Ryusuke Nakaoka , Toshie Tsuchiya, and Akitada Nakamura, Different neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films, *J. Biomedical Materials Research*, submitted.
- 37) Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya, Ligand-dependent transcriptional down-regulation of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator causes 3-methylcholanthrene resistances in Balb/c 3T3 A31-1-1 cell, *Biosc. Biotech. Biochem.* submitted.
- 38) Taizo Sumide and Toshie Tsuchiya, Effects of multi-purpose solutions (MPS) for hydrogel contact lenses on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes, *J. Biomedical Materials Research*, submitted.
- 39) J.U.Park, Toshie Tsuchiya, and Akira Ichikawa, Chondroitin sulfate inhibits the GJIC function resulting in reducing the bFGF-and KGF-production in NHDF cells but enhance the stability of both

- cytokines, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* submitted.
- 40) Toshie Tsuchiya, Yoshiaki Ikarashi, Takao Uchima, Hisashi Doi, Akitada Nakamura, Yuichi Ohshima, Masato Fujimaki, Kazuhiro Toyoda, Michihito Takahashi, Takayuki Yoneyama and Hitoshi Hamanaka, A method to monitor corrosion of chromium iron alloys by monitoring the chromium ion concentration in urine, *J. Long-Term Effects of Medical Implants.* submitted.
- 41) Ryusuke Nakaoka and Toshie Tsuchiya, Studies on the Biocompatibility of Biomaterials: Effect of Various Types of Biomaterial Microspheres. Proc. Fourth Pacific Rim Int. conf. On Advanced Materials and Processing (PRICM4), *The Japan Institute of metals*, 2001, 189-191.
- 42) Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya, Studies on the tumor promoting mechanism of hard and soft segment models of polyetherurethane: Tyr265 phosphorylation of connexin43 is a key step in the GJIC inhibitory reaction induced by polyetherurethane. *J. Biomedical Materials Research*, accepted.
- 43) Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya, Effect of γ ray irradiated poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* accepted.
- 44) Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya, Change in the Particle Size Distribution of poly(L-lactide) Wear Debris by γ -Ray Irradiation. *Bull. Natl. Inst. Health Sic.*, vol 119 in press.
- 45) Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya, Increase of Gap Junctional Intercellular communication by High Molecular Weight Hyaluronic Acid Associated with FGF-2 and KGF-Production in Normal Human Dermal Fibroblasts. *TISSUE ENGINEERING* in press.
- 46) Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya, A strategy for the suppression of tumorigenesis induced by biomaterials: Restoration of transformed phenotype of polyetherurethane-induced tumor cells by Cx43 transfection. *Cytotechnology* in press.
- 47) Muhamad Shahidur Rahman and Toshie Tsuchiya, Enhancement of Chondrogenic Differentiation of Human Articular Chondrocytes by Biodegradable Polymers. *TISSUE ENGINEERING*. 2001,7(6),781-790.
- 48) Toshie Tsuchiya, Yuka Itahashi, Tomoko Ichikawa and Akira Ichikawa, STUDIES ON THE BIOCOMPATIBILITY OF ARTIFICIAL ORGANS AND TISSUE ENGINEERED PRODUCTS:

- EMBRYONIC NEURONAL CELL DIFFERENTIATION ON THE VARIOUS KINDS OF BIODEGRADABLE POLYMERS. *Animal Cell Technology*, in press.
- 49) Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya, Increase in gap-junctional intercellular communications(GJIC) on normal human dermal fibroblasts(NHDF) on surfaces coated with high molecular weight hyaluronic acid (HMWHA), *J. Biomedical Materials Research*, in press.
- 50) Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Keisuke Sakaguchi and Akitada Nakamura, Studies on in vitro evaluation for the biocompatibility of various biomaterials: Inhibitory activity of various kinds of polymer microspheres on metabolic cooperation. *J. Biomed Mater Research*, 2001, 57, 279-284.
- 51) Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Akitada Nakamura, The inhibitory mechanism of gap junctional intercellular communication induced by polyethylene and the restorative effects by surface modification with various proteins *J. Biomed Mater Research*, 2001, 57, 567-574.
- 52) Taizo Sumide, Toshie Tsuchiya, Evaluation of chemical disinfectants for hydrogel contact lenses by metabolic cooperation assay.(Japanese) *J. of Japanese Society for Biomaterials* ,2001, 19, No.3, 93-97.
- 53) Takumi. Miura, Yoshinori. Katakura, Katsuhiko. Yamamoto, Norihisa. Uehara, Toshie Tsuchiya, Sanetaka Shirahata, Neural stem cells loses telomerase activity upon differentiation into astrocytes. *Cytotechnology* 37, No.1-3, in press .
- 54) Akira Ichikawa, Toshie Tsuchiya, Reversion of transformed phenotype of polyetherurethane-induced tumor cells Cx43 transfection. *Animal Cell Technology*, in press .
- 55) Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya, Effects of biomaterials and nutrient factors on chondrogenesis of human chondrocytes. *Animal Cell Technology*, in press .
- 56) Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya, In vitro culture of human chondrocytes(1): A novel enhancement action of ferrous sulfate on the differentiation of human chondrocytes. *Cytotechnology*, in press .
- 57) 早川堯夫、山口照英、石井(渡部)明子、押澤 正:核酸増幅法によるウイルスゲノム等検出に関するフィージビリティスタディ、*医薬品研究* (印刷中)
- 58) 早川堯夫、山口照英、押澤 正:日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究—ウイルス安全性確保の基本要件—、*医薬品研究* 33、210-230 (2002)
- 59) 早川堯夫、石井(渡部)明子:生物薬品

- の開発の現状とトランスレーショナル
リサーチへの条件、*医学のあゆみ*. 200、
539-544 (2002)
- 60) 早川堯夫：バイオテクノロジー応用医薬
品/生物起源由来医薬品の製造に用いる
細胞基材に対するマイコプラズマ否定
試験、*日本薬局方技術情報(JPTI)* 2001、
JPTI 編集委員会編, pp.278-284 (2001)
じほう, 東京
- 61) 早川堯夫：バイオテクノロジーを応用し
た医薬品の品質および安全性確保の評
価科学, *PDA Journal of GMP and
Validation in Japan*, 3, 57-64(2001)
- 62) 早川堯夫, 水口裕之：遺伝子治療用医薬
品の実用化と一層の進展に向けて—次
世代アデノウイルスベクターの開発—,
医薬ジャーナル, 37(5), 1514-1546
(2001)
- 63) 豊田淑江, 山口照英, 内田恵理子, 押澤
正, 早川堯夫：好中球機能分化と増殖
の制御, *炎症* 12巻, 101-109 (2001)
- 64) 早川堯夫：細胞基材の品質・安全性評価,
バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川
堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.33-49
(2001), エル・アイ・シー, 東京
- 65) 早川堯夫：感染性物質概論：バイオ医薬
品の品質・安全性評価, 早川堯夫, 山崎
修道, 延原正弘編, pp.101-122 (2001),
エル・アイ・シー, 東京
- 66) 早川堯夫：製品の特性解析・品質規格,
安定性及び Comparability: *バイオ医
薬品の品質・安全性評価*, 早川堯夫, 山
崎修道, 延原正弘編, pp.205-230
(2001), エル・アイ・シー, 東京
- 67) 早川堯夫：細胞・組織利用医薬品等の品
質・安全性の確保, *バイオ医薬品の品
質・安全性評価*, 早川堯夫, 山崎修道,
延原正弘編, pp.397-419 (2001), エ
ル・アイ・シー, 東京
- 68) 川崎ナナ, 早川堯夫：糖鎖構造解析, *バ
イオ医薬品の品質・安全性評価*, 早川堯
夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.255-284
(2001), エル・アイ・シー, 東京
- 69) 土屋利江, 中岡竜介, 朴正雄, 市川明,
細胞によるバイオマテリアルの評価法,
バイオインダストリー, 2001, 10,
81-93.
- 70) 土屋利江, “微粒子工学大系 第 II 巻
応用技術”, 無機微粒子の安全性と生体
適合性, *フジ・テクノシステム*, 東京
(2002) pp. 743-748.

2. 学会発表

- 1) 沢井 勇, 斎藤芳郎, 川崎ナナ, 伊藤
さつき, 早川堯夫, 高橋和彦：ヒト
selenoprotein P の糖鎖構造解析. 第 38
回日本生化学会北海道支部例会 (2001, 7)
- 2) 川崎ナナ, 配島由二, 太田美矢子, 伊
藤さつき, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯
夫：LC/MS 及び NMR を用いたエリスロ
ポエチンの硫酸化糖鎖の構造解析. 第 74
回日本生化学会大会 (2001, 10)
- 3) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 日向昌司, 太
田美矢子, 日向須美子, 早川堯夫：LC/MS
及び LC/MS/MS を用いた組換え型ヒトフ
ォリスタチンの糖鎖構造解析. 第 74 回日
本生化学会大会 (2001, 10)
- 4) 沢井 勇, 斎藤芳郎, 川崎ナナ, 伊藤
さつき, 早川堯夫, 高橋和彦：ヒト
selenoprotein P の糖鎖構造解析. 第 74
回日本生化学会大会 (2001, 10)
- 5) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 太田美矢子,