

SV40 プロモーター制御下に組み込んだベクターであり、各 well におけるトランスフェクション効率を標準化するための内部対照用のベクターとして用いた。

細胞を PBS(-) で洗浄後、lysis buffer を加えて細胞抽出液を調製した。Luciferase Assay Reagent II を加えルミノメーターでホタルルシフェラーゼ活性の発光量を測定した。引き続き、同じサンプルに対して Stop & Glo Reagent を加え、同様な方法で、ウミシイタケルシフェラーゼの発光量を測定した。hTERT プロモーターの活性値は、ホタルルシフェラーゼ測定値をウミシイタケルシフェラーゼ測定値で除した値をそのプロモーターの比活性とし、評価した。

hTERT プロモータールシフェラーゼコンストラクトの構造を図 10 に示した。ATG 翻訳開始点の上流 25 塩基目を hTERT プロモーター領域の 3' 末端とし、図 10 に示したような様々な断片長のプロモーター欠失変異体を PCR により調製し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を有するプラスミド pGL3-basic に挿入し、それぞれのルシフェラーゼコンストラクトを構築した。

がん細胞株 A549 および正常線維芽細胞株 TIG-1 について、hTERT mRNA の発現は、A549 において確認された。この hTERT mRNA の発現を転写レベルで解析するために、hTERT プロモーター活性を評価した。まず、図 10 に示したように、hTERT の ATG の上流領域 (-1391bp ~ -25bp) を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミド (pGL3b-1391) を構築し、A549 がん細胞および TIG 正常細胞へトランスフェクシ

ョンした。その結果、この -1391bp ~ -25bp の領域は、がん細胞に機能する hTERT のプロモーターであることが判明した。即ち、hTERT の発現制御は、mRNA の安定性のような転写後のレベルで制御されているのではなく、むしろ転写レベルで主に制御されていると考えている。また、pGL3b-1391 の hTERT プロモーター領域を一方向へ短縮した欠失変異体についても、同様のレポーターアッセイを行い、転写活性化能について検討した。その結果、がん細胞株 A549、HeLa、HepG2、および SK-MEL-28 において、様々なプロモーター断片間で、転写活性化能の違いが示された。特に、pGL3-286 のコンストラクトにおいて最も高く転写活性が誘導された。一方、プロモーター領域が 286 bp よりも長いコンストラクト (pGL3-1119 ~ 583) に関しては、pGL3-286 のプロモーター活性と比較し、最大で約 40% の転写抑制効果が認められた。従って、この -1119bp ~ -286bp の塩基配列内には、hTERT プロモーターを抑制するエレメントが存在しているものと推測された (図 10)。

hTERT mRNA は、A549 がん細胞で発現しており、hTERT のプロモーター活性化と一致した。TIG-1 正常細胞では、いずれも検出されなかったことより、hTERT は、主に転写レベルでその発現が制御されていると示唆された。また、様々な断片長の hTERT プロモーター欠失変異体を用いた実験より、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、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。

この hTERT プロモーターは、がん細胞に特異的なプロモーターである可能性が高い(図 10)。

3. 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

Wistar-imamichi ラットの胎齢 13、14、15、16、17 th の胎児前肢を切り出し固定し、Alcian blue 染色をした標本を図 11 に示した。15 th の肢芽器官で濃染された軟骨像が観察される(図 11)。

胎齢 14 th および 15 th 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、元に比べて細くなっているが、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 12)。次に、袋状 PP 膜内に胎児から切り出した前肢をいれて、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 12)。そこで、この袋状 PP 膜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 13 は、Naïve 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(図 13)。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 13)。

14 th 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、Alcian blue 染色した結果、形態は埋入時の原型を留めていなかった(図 14)。

そこで、次に、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表面を被覆化した後、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 15、図 16 に示した。

図 15 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(=含んでいないもの)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 15)。

CD4 に関しては群間で大きな差異はなかった(図 15)。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 16)。

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 17)。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。

次に、袋内部の器官を固定し、

Alcian blue 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 18)。

4. 細胞や前駆細胞等を素材とした細胞・組織加工医療用具等の製造過程

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

試験に使用した 3 物質の化学構造を図 19 に示した。図 20 は、P(LA-CL) 25 10000 を $60 \mu\text{g/ml}$ で試験すると、ヒト軟骨細胞では、促進も抑制もみとめられなかったが、ラットでは、増殖は、殆どコントロール (100%) との違いは認められなかったが、軟骨分化を 4.5 倍程度促進した。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 21)。

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 22)。表 1 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。

D. 考察

1. ウイルス等の感染危険因子を排除するための基盤技術に関する研究

HIV-1 はリンパ球系およびマクロファージで増殖し、皮膚細胞に直接

感染し増殖することはない。しかし、皮膚移植などでウイルス汚染があった皮膚組織が使用された場合皮膚組織内の血管から感染する可能性は否定できない。ヒト皮膚組織は上層は上皮角化細胞、下層はコラーゲン内に皮膚繊維芽細胞が埋まった構造である。我々はコラーゲンスポンジおよびコラーゲンハニカムとヒト皮膚繊維芽細胞を用いて皮膚モデルの作成を試み、コラーゲンハニカムで皮膚モデルを作成することが出来た。ハニカムは CLS-01 に比べてポアサイズが大きく、ポアが一方向に並んだ構造であるため栄養補給が容易であるので、ポアの内面にヒト皮膚繊維芽細胞が接着し易く細胞の増殖が促進されたのであろうと考えられた。

最近、新素材として注目されている生分解性ポリマーは組織再生の空間確保用分解吸収性バイオマテリアルである。今回用いた 4 種類のポリマーは、いずれも皮膚細胞の足場として使用される可能性のあるポリマーであるが、通常、足場として使用される場合には、高分子量のものが使用される。しかし、これらの高分子量材料は、細胞が接着し、培養される過程で徐々に分解して低分子量化し、溶解性のオリゴマーとなる。この低分子量化したオリゴマーの方が、細胞内に取り込まれやすいため、細胞に対する影響を評価しやすい。そこで、本研究では、溶液状態でその影響を評価可能な低分子量の生分解性ポリマーを皮膚細胞に添加した。すなわち、このように液性であるためヒト皮膚繊維芽細胞との混合培養は容易であったが、コラーゲンのような動物由来材料ではなく合成材料 (合成脂肪酸族ポリエステル) であるため、まず、ポリマーの細胞毒

性について検討する必要があった。培養細胞の毒性試験法には、簡単な操作でアイソトープを用いないで行うことが出来る MTT アッセイがよく知られているが、今回我々はより簡単な操作で出来る Aramar blue アッセイを用いて細胞の毒性及び増殖能を測定した。このアッセイは MTT アッセイとは異なり Aramar Blue 液が水によく溶けるためフラスコ及びプレート内の培養細胞ばかりでなく、ハニカムのような立体構造 (3D) 内の細胞動態を調べるのにとっても便利な測定方法であると思われた。

ウイルス汚染を想定してハニカムと NHDF の皮膚モデル内に MT-4 及び OM10.1 を接種した場合、3 日目までは細胞の増殖性が認められたが、それ以降は急速に死滅し増殖能は未接種の NHDF のみよりも低下した (図 1,2)。HIV-1p24 抗原は 2 日目まで陽性だったが 3 日目以降は低下して陰性となった (図 3)。図には示していないがハニカム非存在下で NHDF に MT-4 及び OM10.1 を接種した場合は両細胞ともに 1 週間以上増殖能があった。従ってハニカムの内では接種細胞の増殖が抑制され、死滅した細胞の影響により皮膚モデルを構成している NHDF の増殖も抑制されたと考えられた。

各生分解性ポリマーと NHDF の皮膚モデルに MT-4 が接種された場合の NHDF と MT-4 の増殖性は $P(LA-CL)_{25} 10000 > DMSO > P(LA-CL)_{50} 18000 > PLLA 5000 = PGA 3000$ の順でポリマーの種類によって若干異なった (図 5)。OM10.1 が共存した場合は各ポリマー間で増殖性に差がなかった (図 6) が、図 7 に示すように HIV-1p24 抗原に差が見られた。

HIV-1 抗原量は $P(LA-CL)_{25} 10000 > P(LA-CL)_{50} 18000 > DMSO > PGA 3000 = PLLA 5000$ の順であった。これらのことよりポリマーの構造の違いが NHDF よりも OM10.1 の増殖性に影響を与えていることが明らかになった。ポリマー-3 の L-乳酸-ε-カプロラクトン共重合体 $M_w=10000$ ($P(LA-CL)_{25} 10000$) は、細胞の増殖性及び HIV-1 の検出度が高いポリマーであった。

以上のことよりコラーゲンハニカム又は生分解性ポリマーを用いてヒト皮膚モデルを作成でき、これらのヒト皮膚モデルは感染細胞の動態及び HIV-1 の検出に応用できることがわかった。また生分解性ポリマーの方が、液性のためかハニカムよりも HIV-1 の抗原量が多かった。しかし、生分解性ポリマーは種類により HIV-1 感染細胞 OM10.1 の増殖に影響するためウイルス感染・検出にあたってはこのことを考慮しなければならないと思われた。

2. 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

hTERT mRNA は、がん細胞特異的に発現しており、この結果は hTERT のプロモーター活性化と相関していた。即ち、hTERT は主に転写レベルでその発現が制御されていると示唆された。また、様々な断片長の hTERT プロモーター欠変異体を用いた実験により、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 (-1119 bp -286 bp) 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 protein 2) 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。

3. 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

PP 膜では、同系、異系、異種から採

取した器官埋入群では、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た。しかし、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。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。

4. 細胞や前駆細胞等を素材とした細胞・組織加工医療用具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

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て、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が、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)₂₅ 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10000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結果、P(LA-CL)₂₅ 10000では、軟骨分化は抑制され、コントロールの90%程度の分化に留まった。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。しかし、細胞の増殖に及ぼす影響は、P(LA-CL)₂₅ 10000とP(LA-CL)₅₀ 18000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では、P(LA-CL)₂₅ 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を排除するための基盤技術に関する

る研究

コラーゲンハニカムに NHDF 細胞を播種して培養し、作製したヒト皮膚モデルへの HIV 感染細胞 OM10.1 及び HTLV-1 感染細胞 MT-4 の接種実験では、6 日目に両者とも未接種の皮膚モデルよりも増殖能が低下した。HIV-1p24 抗原量は OM10.1 の増殖と相関した。4 種類の生分解性ポリマーは、600 μ g/ml 以下では毒性がなくこれらを用いた皮膚モデルではウイルス感染細胞の未接種、接種による増殖能に差がなかったが、OM10.1 接種実験で HIV-1p24 抗原量に差が認められた。

今回示した組織工学的モデルは、感染細胞の動態及び HIV-1 の検出に応用できた。生分解性ポリマーは種類により HIV-1 の増殖に影響することが明らかになった。

2. 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

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を取得し、その構造を解析した。また、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も評価した。

がん細胞株と正常細胞における hTERT mRNA の発現の違いは、主に転写レベルで制御されていることが、hTERT プロモーターを利用したルシフェラーゼアッセイにより明らかとなった。

hTERT プロモーターの欠失変異体を利用したレポーターアッセイの結果より、-286bp - -25bp の領域が hTERT のコアプロモーター領域であると考えられた。更に、-1119bp - -286bp の塩基配列内には、hTERT プ

ロモーターを著しく抑制しうるエレメントが存在していることも判明した。

hTERT プロモーターの配列情報をもとに、転写因子の結合部位をデータベースを用いて検索した結果、この領域内には、様々な転写因子の潜在的結合部位が確認された。特に、転写開始点の上流付近には、Myc/Max、Sp1、N-Myc、MZF1、c-Ets-1、 δ -EF1、MyoD、NK- κ B、USF、IRF-1 など数多くの転写因子の潜在的結合部位が存在していることが確認された。

3. 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

2種の免疫隔離膜を使用して、ラット腹腔内での器官の形態に及ぼす効果を調べた結果、特殊な陰イオン性修飾ポリウレタン膜をPP膜に被覆コートすると、形態保持機能を示し、cytotoxic T lymphocyteの増加を抑制した。

4. 細胞や前駆細胞等を素材とした細胞・組織加工医療用具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

細胞・組織加工医療用具の前臨床評価試験として、細胞を組み込んだ生分解性ポリマーからなる足場について、動物をモデルとして評価が行われる。ヒトと動物では、組織構造の違い等から、細胞・組織加工医療用具の *in vivo* 評価が異なる可能性がある。本研究では、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、ラットおよびヒト細胞間で、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。組織工学利用医

療用具の評価を行う上で、動物モデルからヒト臨床使用するとき、分化・増殖機能が両種間で異なる可能性を考慮する必要がある。

F. 研究発表

(ア) 論文発表

1. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, and Akitada Nakamura, Different neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films, *J. Biomedical Materials Research*, submitted.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
 7. 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.
 8. Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya, Studies on the tumor promoting mechanism of hard and soft segment models of polyetherurethane : Tyr265 phosphorylation of connmexin43 is a key step in the GJIC inhibitory reaction induced by polyetherurethane. J. Biomedical Materials Research, accepted.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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 .
 12. Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya, A strategy for the suppression of tumorigenesis induced by biomaterials: Restoration of transfoemed phenotype of polyetherurethane-induced tumor cells by Cx43 transfection. .Cytotechnology in press .
 13. Muhamad Shahidur Rahman and Toshie Tsuchiya, Enhancement of Chondrogenic Differentiation of Human Articular Chondrocytes by Biodegradable Polymers. TISSUE ENGINEERING. 2001,7(6),781-790.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
18. 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.
 19. 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.
 20. 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 .
 21. Akira Ichikawa, Toshie Tsuchiya, Reversion of transformed phenotype of polyetherurethane-induced tumor cells Cx43 transfection. *Animal Cell Technology*, in press .
 22. Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya, Effects of biomaterials and nutrient factors on chondrogenesis of human chondrocytes. *Animal Cell Technology*, in press .
 23. 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
 24. 土屋利江：“金属系バイオマテリアルの基礎と応用” 発癌性・変異原性・催奇形性、角田方衛、筏 義人、立石 哲也編、アイピーシー、東京(2000) pp.408-422
 25. Toshie Tsuchiya, A useful marker for evaluating the tissue engineering products: gap junctional communication for assessment of the tumor-promoting action and desruption of cell differentiation in the tissue engineering products., *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 2000,11,947-959.
 26. Yoshiaki Ikarashi, Toshie Tsuchiya, Masa-aki Kaniwa and Akitada Nakamura, Activation of osteoblast-like MC3T3-E1 cell responses by poly(lactide). *Biol. Pharm. Bull.* 2000, 23, 1470-1476.
 27. Toshie Tsuchiya, Sayed M. A. and Akitada Nakamura, Tumor promoting mechanisms of biomaterials: No involvement of mutation in cx43 gene in the tumorigenesis induced by polyurethanes in vitro., *Animal Cell Technology*, 1999, pp.181-185.
 28. Yoshiaki Ikarashi, Toshie Tsuchiya and Akitada Nakamura, Effect of heat treatment of poly(L-Lactide) on the response of osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*, 2000, 21, 1259-1267.
 29. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya and Akitada Nakamura, Studies on the mechanisms of tumourigenesis induced by polyetherurethane in rats: Production of superoxide, tumor necrosis factor, and interleukin 1 from macrophages cultured on different polyetherurethanes., *J.Biomed. Master. Res.* 2000, 49, 99-105.
 30. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya and Akitada Nakamura, Studies on tumor promoting activity of polyethylene immobilized with various proteins. *Biomedical Materials Research in Asia (IV)* 2000, pp.122-123.

(イ) 学会発表

1. Toshie Tsuchiya and Tadahiko Mashino : A remarkable promoting action of a aqueous fullerene derivative on the chondrogenesis in rat limb bud cell culture system. International Tissue Engineering Conference, Dec. 2000 Orland,
2. Muhammad Shaidur Rahman, Toshie Tsuchiya: In vitro culture of human chondrocytes (1): Effects of factors on chondrogenesis for tissue engineering. 日本バイオマテリアル学会 2000年 11月 横浜。
3. 長田和浩、土屋利江、市川 明: 人工臓器を生体に適用する際に引き起こされる免疫原性の評価系の確立と応用に関する研究(1) 日本バイオマテリアル学会 2000年 11月 横浜
4. 土屋利江、松岡厚子、市川 明: 生分解性高分子ポリ乳酸およびポリウレタン材料上で分離された Balb/3T3 細胞由来形質転換巢の DNA チップを用いる遺伝子発現解析 日本バイオマテリアル学会、2001年 10月 京都
5. Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya: Studies on the suppression of tumorigenesis induced by biomaterials: Reversion of transformed phenotype of tumor cells induced by biomaterials. International Gap-junction Conference. Aug. 2001, Hawaii.
6. 市川 明、土屋利江: ポリウレタンの発癌プロモーター作用機構: ポリウレタンのギャップ結合細胞間連絡阻害要因はコネキシンのチロシンリン酸化である。コネキシン研究会、2001年 12月、宝塚
7. Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya and Akira Ichikawa: Studies

on the enhancement of mechanical strength and differentiation of human articular chondrocytes. 日本バイオマテリアル学会、2001年 10月 京都

8. 鈴木寿子、土屋利江、吉原なみ子: ヒト皮膚モデルを用いた HIV-1 および HTLV-1 感染持続細胞の動態に関する研究(1) 日本バイオマテリアル学会 2001年 10月 京都

9. 中岡竜介、土屋利江: 種々の微粒子状物質によるヒト骨芽細胞の分化への影響と細胞間連絡機能との関連 日本バイオマテリアル学会 2001年 10月 京都

G. 知的財産権の出願・登録状況

(ア) 特許出願

発明の名称: 宿主内埋め込み用構造体および繁殖方法

(イ) 実用新案登録

なし

(ウ) その他

なし

協力研究者

白畑 実隆

(九州大学大学院農学研究院 遺伝子資源工学部門、細胞制御工学教室)

市川 明

(国立医薬品食品衛生研究所、現: 京都工芸繊維大学 繊維学部)

吉原なみ子

(国立感染症研究所 エイズ研究センター)

Growth of MT-4 in the human dermal model in vitro (Honeycomb+NHDF)

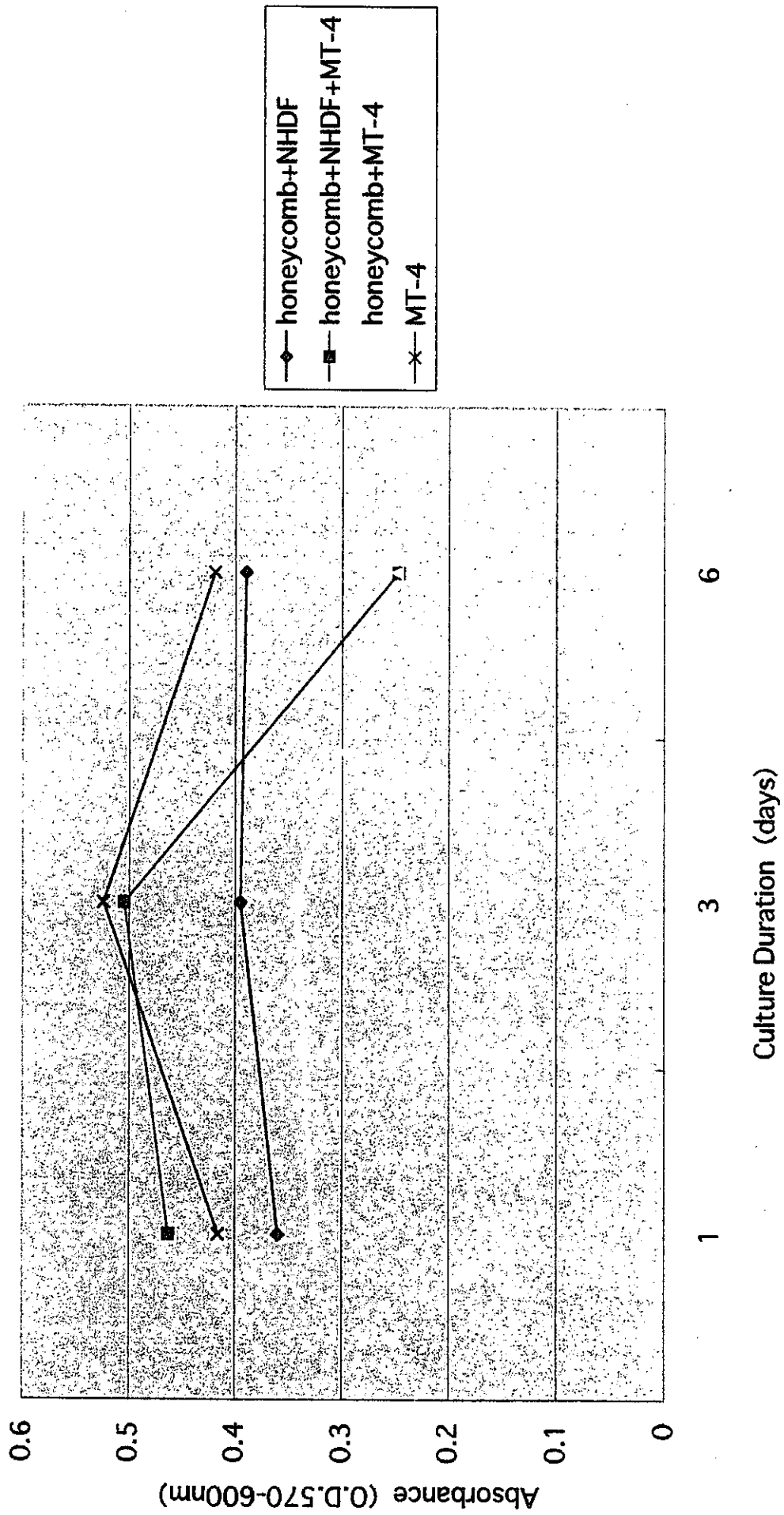


図1 ハニカムを用いた皮膚モデルへのMT-4の接種と増殖変化

Growth of OM10.1 in the human dermal model in vitro (Honeycomb+NHDF)

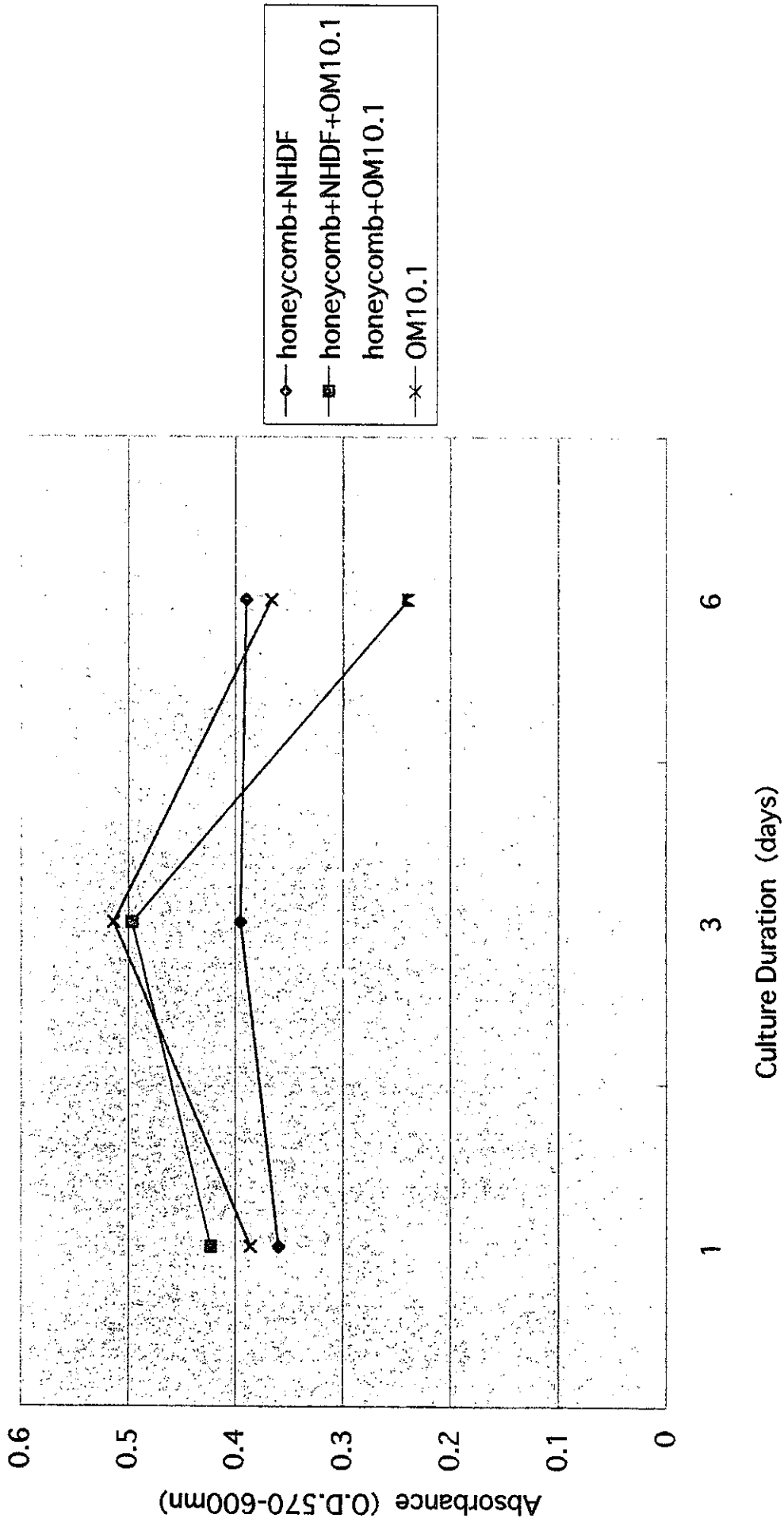


図2 ハニカムを用いた皮膚モデルへのOM10.1の接種と増殖変化

HIV-1p24Ag in the human dermal model in vitro (Honeycomb+NHDF) using OM10.1

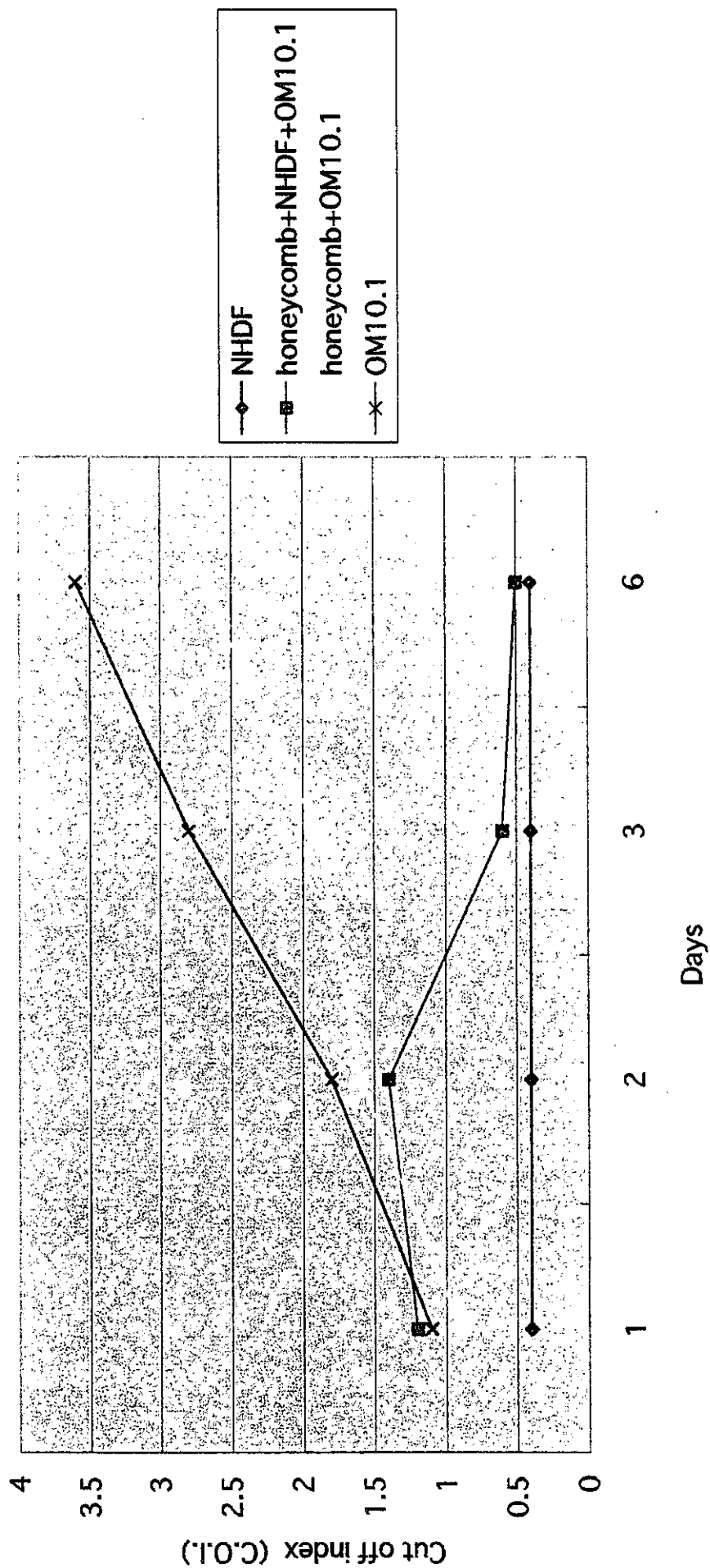


図3 ハニカムを用いた皮膚モデルへのOM10.1接種とHIV-1p24抗原の検出

Growth of NHDF in Polymer1-4 (600 μ g/ml)

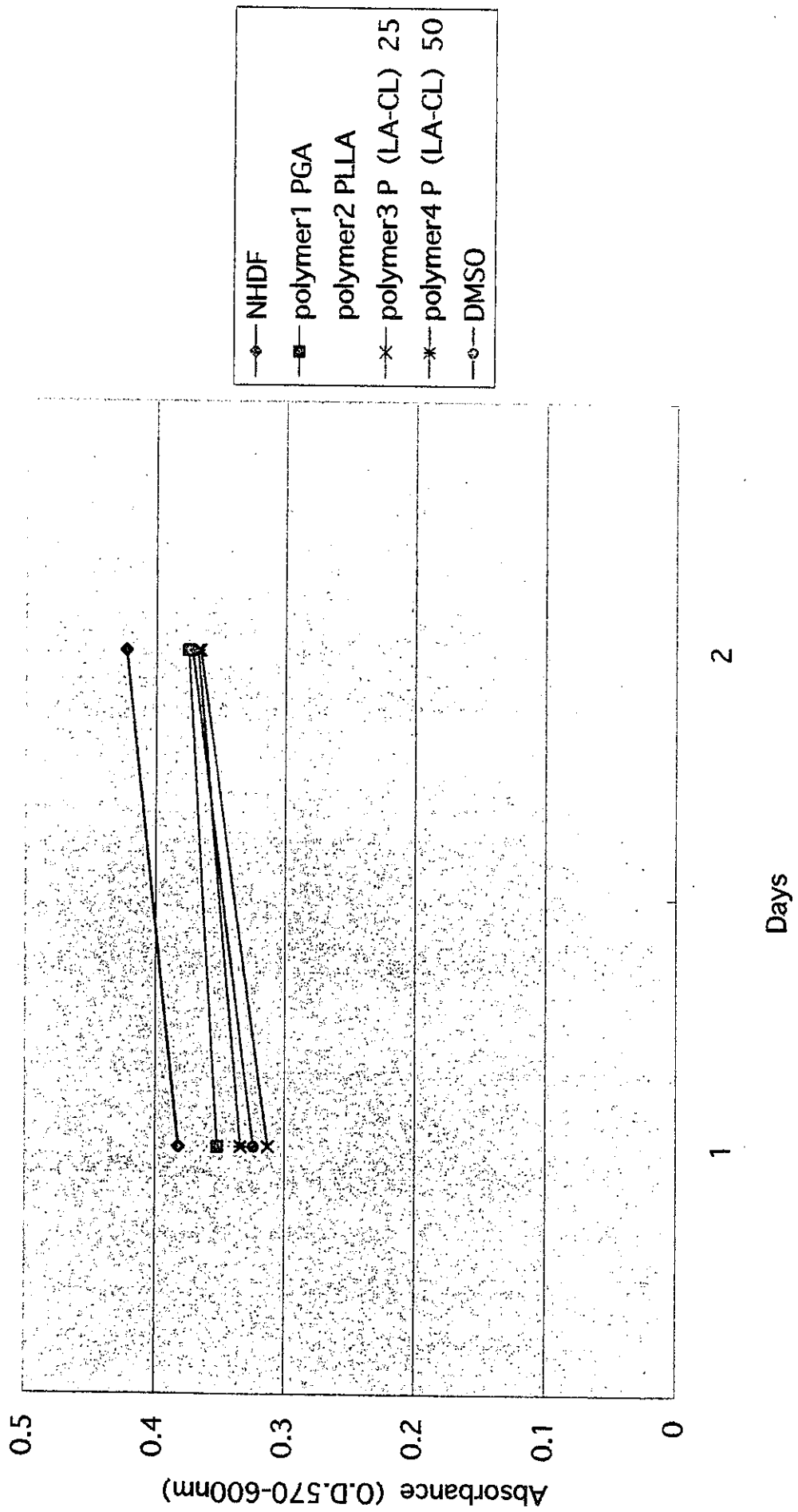


図4 生分解性ポリマーによるヒト皮膚繊維芽細胞の増殖変化

Growth of NHDF+MT-4 in Polymer1-4 (600 μ g/ml)

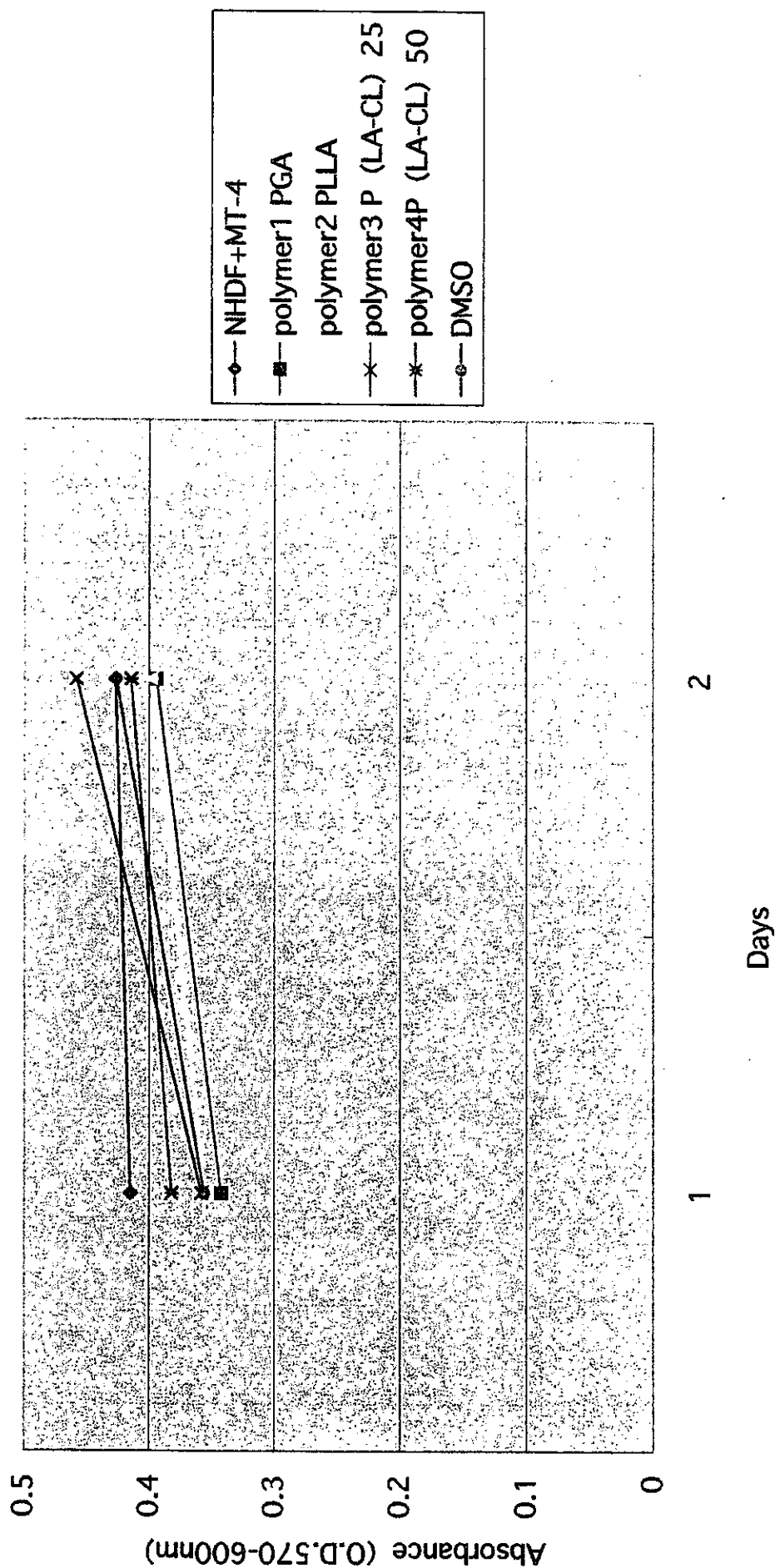


図5 生分解性ポリマーによるヒト皮膚繊維芽細胞とMT-4の増殖変化

Growth of NHDF+OM10.1 in Polymer1-4 (600 μ g/ml)

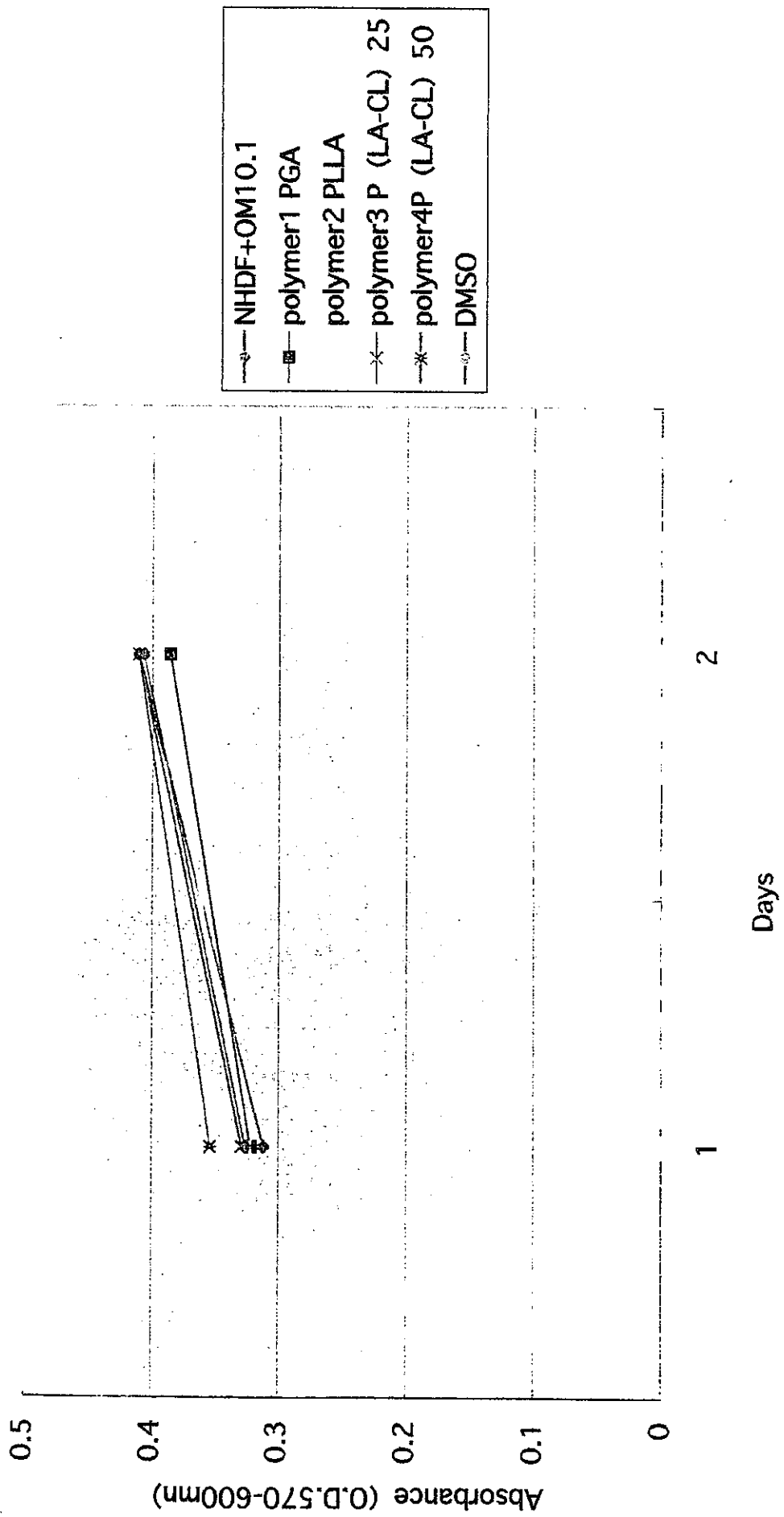


図6 生分解性ポリマーによるヒト皮膚繊維芽細胞とOM10.1の増殖変化

HIV-1 p24Ag in Polymer1-4 (600 μ g/ml) +NHDFusing OM10.1

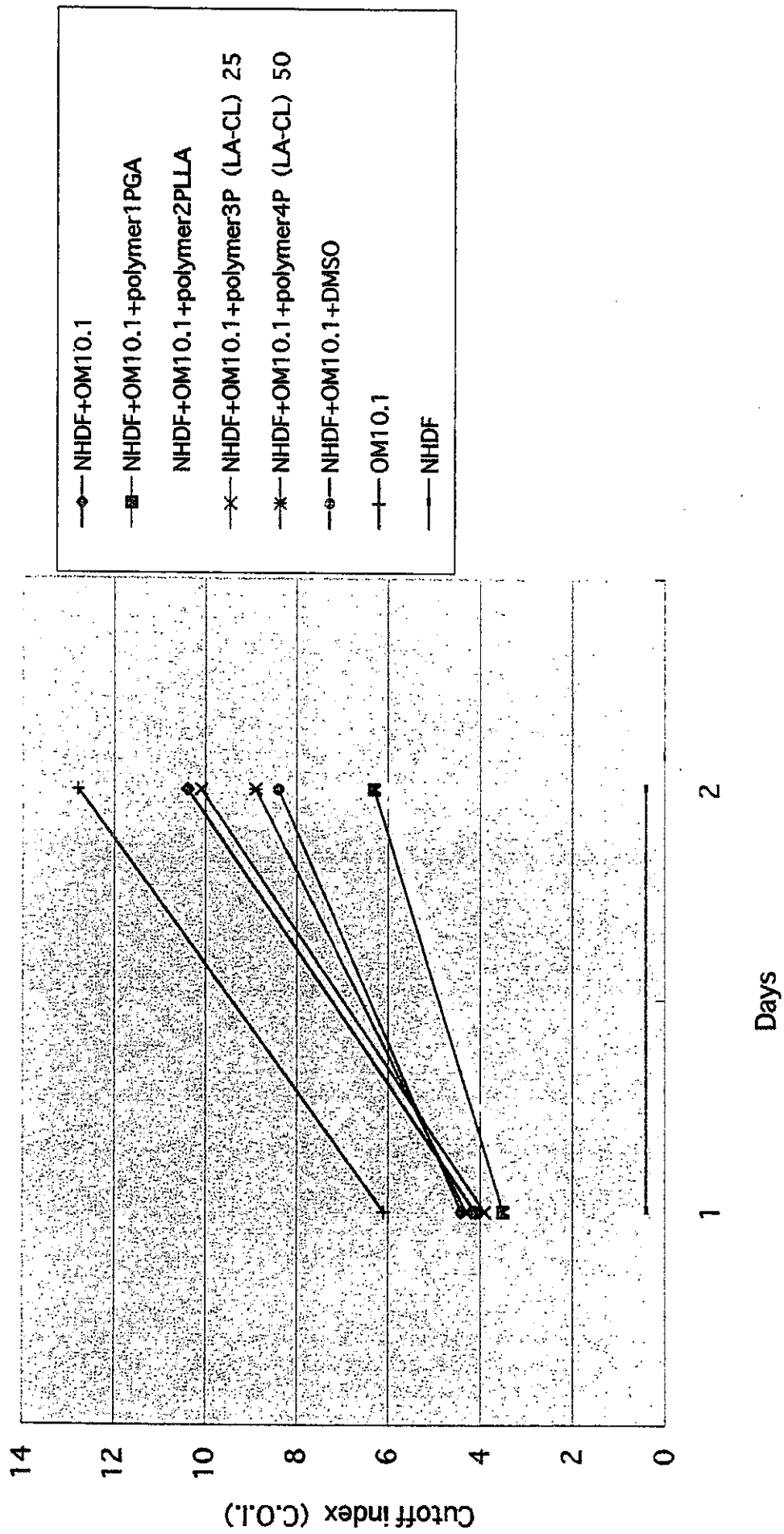
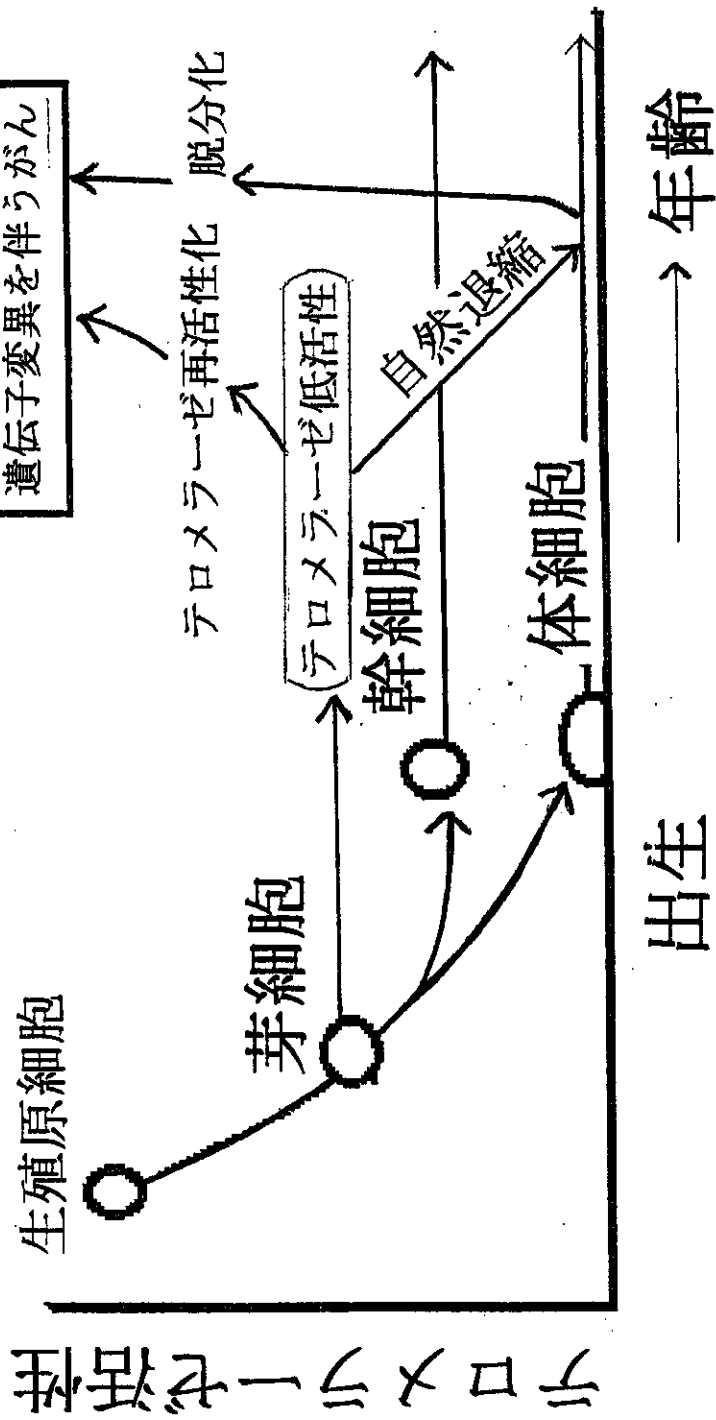


図7 生分解性ポリマー共存下でのヒト皮膚繊維芽細胞へのOM10.1接触と HIV-1p24抗原の検出

発生分化とがんの発生モデル



檜山英三&檜山桂子

がんとテロメア・テロメラーゼ 図 一部改変

図8 発生分化とがん発生におけるテロメラーゼ活性変化

テロメラーゼホロエンザイム

蛋白質サブユニット **h TERT**
human telomerase reverse transcriptase

コアエンザイム

RNA サブユニット h TR
human telomerase RNA component

テロメラーゼ付属蛋白質 h TEP1

テロメア結合蛋白質 h TRF1, h TRF2

テロメラーゼ活性:**h TERT** mRNA 発現量: **h TERT** プロモーター活性
ほぼ相関性あり、

h TERT プロモーター転写活性: がん細胞で転写レベルで
活性化する機構有り

テロメラーゼ活性を指標としたリスク評価法を確立
がん特異的**h TERT** プロモーターを用いたがん化リスク評価系の確立

図9 がん化細胞における hTERT プロモーター活性発現

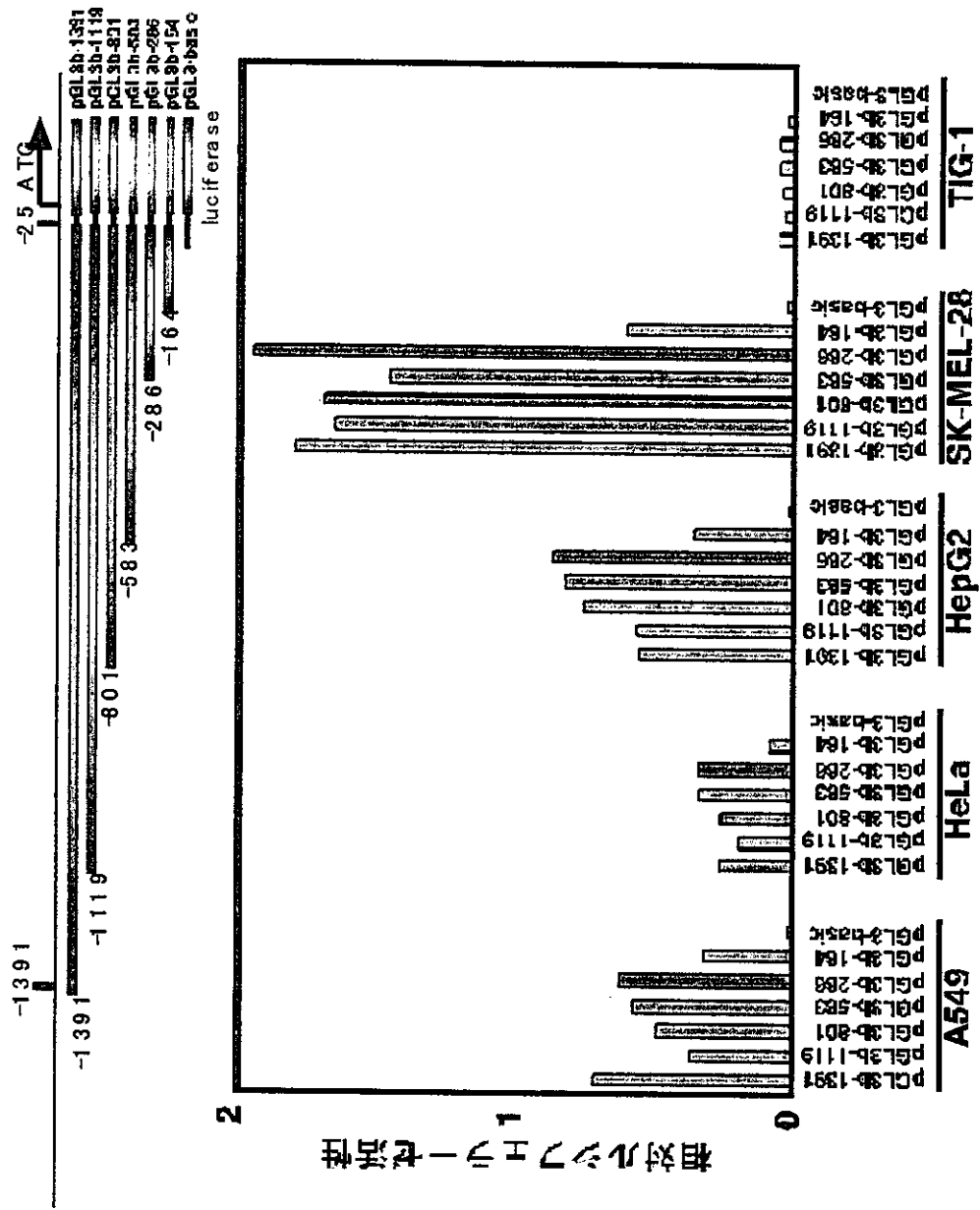


図10 hTERT プロモーターのガン細胞特異的活性化