

表 3.
 図 7 中のピークの糖鎖構造、分子量理論値、及び実測値

Peak No.	Carbohydrate composition ^a	Sugar type ^b	Theoretical mass ^c	Observed <i>m/z</i>	
				M ⁺	M ²⁺
1	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc]	FucBiNA	2080.9	2081.1	1041.5
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc]	FucTriNA, FucBiLacNA	2446.3		1224.1
2	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc]	FucBiNA	2080.9	2080.1	1041.6
3	[Fuc][Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc]	FucBi(1)NA	1715.6	1716.7	
	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2373.3	1187.4
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	FucTriNA ₂ , FucBiLacNA ₂	2737.5		1369.9
4	[Fuc][Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc]	FucBi(1)NA	1715.6	1716.6	
	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2373.0	1186.9
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	FucTriNA ₂ , FucBiLacNA ₂	2737.5		1369.6
5	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2373.0	1186.9
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	FucTriNA ₂ , FucBiLacNA ₂	2737.5		1369.7
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	FucTriNA ₃	3028.8		1515.7
6	[Fuc][Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc]	FucBi(1)NA	1715.6	1716.5	
	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2372.9	1187.8
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	FucTriNA ₃	3028.8		1515.9
7	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	FucTriNA ₃	3028.8		1516.4
	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2372.2	1187.5
8	[Fuc][Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₃	FucTriLacNA ₃ , FucTetraNA ₃	3394.1		1698.3

^a Fuc, fucose; Hex, hexose; HexNAc, *N*-acetylhexsamine; NeuAc, *N*-acetylneuramic acid.

^b Bi, biantennary; Tri, Triantennary; Tetra, tetraantennary; Lac, *N*-acetyllactosamiae; NA, NeuAc; FucBi(1),

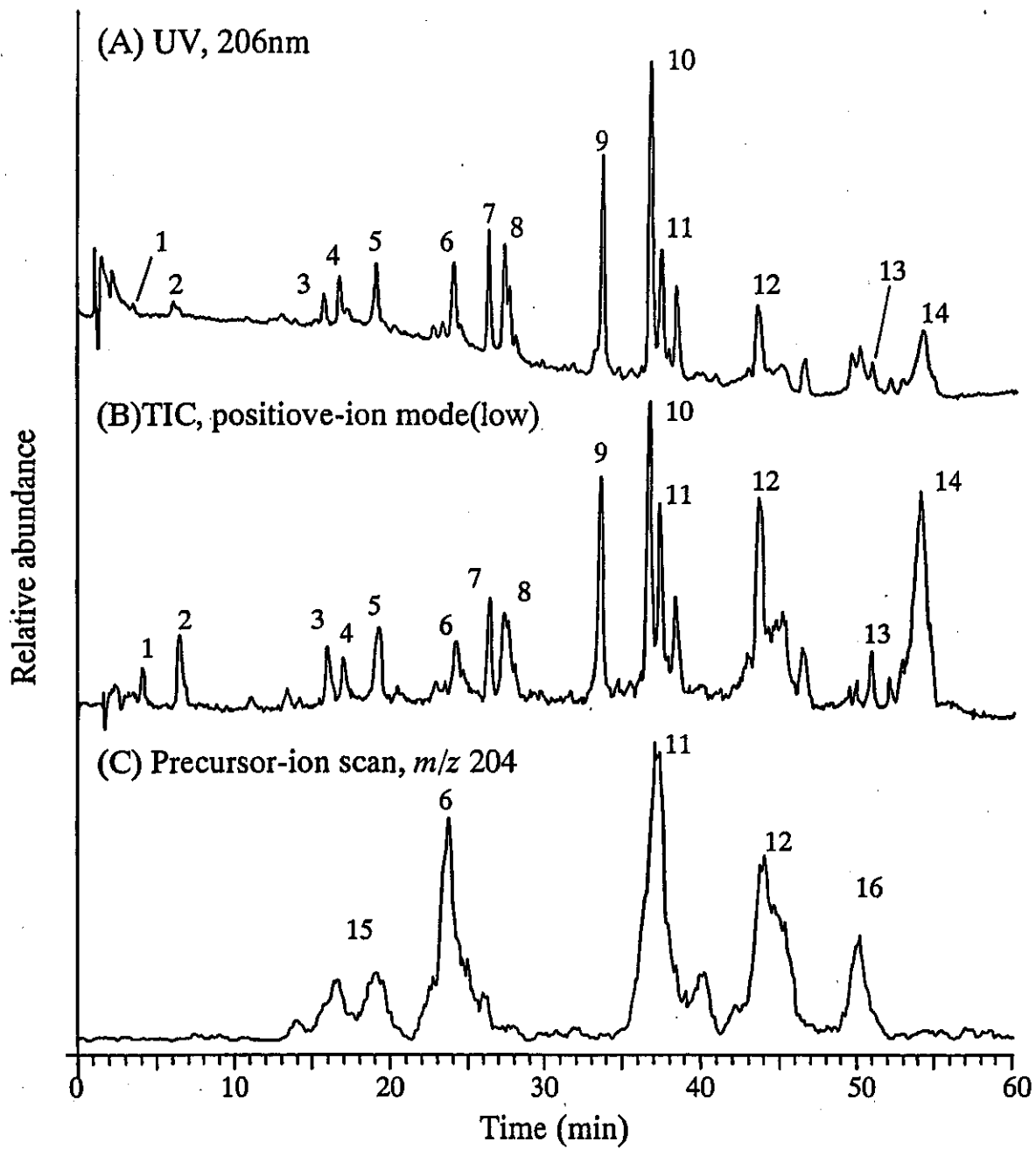
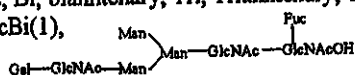


図9 トリプシン消化rhTMのペプチド/糖ペプチドマッピング
 (A) UV; (B), LC/MS; (C), precursor-ion scan (LC/MS/MS)

表 4
 図9中のピークのアミノ酸残基、糖鎖構造の帰属と理論値、及び実測値

Peak in Fig.1	Peptide No.	Amino acid residues	Carbohydrate structure ^a	Theoretical mass ^b	Observed m/z value				
					M ⁺	M ²⁺	M ³⁺	M ⁴⁺	M ⁵⁺
1	K17	298-304		809.9	810.6				
2	K10	104-106		431.5	432.3				
	K22	457-466		1090.1	1090.5	546.0			
3	K8	84-88		554.7	555.6				
4	K2	39-45		813.0	813.6	407.4			
5	K15	247-260		1476.5	1476.9	739.2			
6	K9 ^c	89-103	FucBiNA ₂	4084.0		2043.4	1362.3		
			FucBiNA	3792.7		1897.8	1265.2		
			FucBi	3501.4		1751.5	1168.7		
			FucBiLacNA ₃ , FucTriNA ₃	4740.5			1582.1		
			FucBiLacNA ₂ , FucTriNA ₂	4449.3			1484.6		
			FucBiLacNA, FucTriNA	4158.0			1387.7		
			FucBi(1)NA	3427.4		1714.6			
7	K18	305-321		2093.1	2093.7	1047.3			
8	K14	220-246		2886.0		1444.1	963.1		
9	K16 ^c	261-297	Glc	4516.5		2259.3	1506.3		
10	K19 ^d	322-353	OH	3916.0		1958.8	1306.2		
	K6	68-82		1651.9	1652.2	826.9			
11	K20 ^c	354-385	FucBiNA ₂	6204.3			2069.7	1552.7	1242.0
			FucBiNA	5913.0			1972.2	1479.3	
			FucBiLacNA ₂ , FucTriNA ₂	6569.6				1643.7	1315.0
			FucBiLacNA, FucTriNA	6278.3				1570.9	
			FucBi(1)	5256.4				1315.0	
			Bi	5475.6			1826.7		
12	K13	183-219		3704.2			1853.7	1235.9	
			FucBiNA ₂	6487.6			2164.4	1623.0	
			FucBiNA	6196.3			2067.0	1550.4	
			FucBiLacNA ₂ , FucTriNA ₂	6852.9			2286.0		
			FucBi(1)NA	5831.0			1945.1		
13	K3	46-65		1900.1	1901.7	951.4			
14	K11	107-143		4042.4		2023.3	1348.9		
	K12	144-182		4113.6		2057.6	1371.5		

^a Fuc, fucose; Glc, glucose; Bi, biantennary; Tri, Triantennary; Tetra, Tetraantennary; NA, N-acetylneuramic acid; Lac, N-acetyllactosamine; FucBi(1),



^b Average mass value.

^c Glycopeptide.

^d Hydroxylated peptide.

細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する基盤研究

分担研究者：新見伸吾（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部診断用医薬品室長）

研究要旨

細胞・組織加工医薬品の品質評価法の開発を目的として肝細胞の幹細胞と考えられている小型肝細胞と成熟肝細胞でその発現が異なるタンパク質の探索を試みた。成熟ラット肝臓から分離した小型肝細胞と成熟肝細胞からそれぞれから抽出したタンパク質を二次元電気泳動にかけ両者で発現量の異なるスポットを得た。そのスポットはやや酸性よりの分子量 35kDa のタンパク質であり、その発現は小型肝細胞においては検出されたが、成熟肝細胞では検出されなかった。そのスポットをゲルから切り出してトリプシン消化し、得られた断片ペプチド混合物を MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) で測定し、質量スペクトルを得た。得られた質量値を元にデータベース検索を行った結果、そのタンパク質はアネキシンⅢと同定された。以上の結果から、小型肝細胞の細胞・組織加工医薬品としての臨床応用において、アネキシンⅢがその品質評価の指標として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

対象疾患ごとに必要な治療用細胞を大量生産・再構築することにより、それらの細胞が有する機能を利用することによって再生医療が実現しようとしている。特に肝疾患においては死亡者が毎年4万人ともいわれ、そのうち60歳以下の肝移植適応患者は年間3,500～5,000人と見積もられている。しかし適応拡大による移植症例数の急激な増加はドナー肝の有効利用を目的とした分割肝移植や生体部分肝移植などの工夫にもかかわらず、深刻なドナー不足をもたらしている。最近、全肝移植までのブリッジ、肝不全の際の代謝補助、代謝疾患のための全肝移植に置き換わる方法として、肝細胞

移植が有効であるといわれている。さらに、肝細胞移植に加えより高度な肝機能を発揮させるため、組織工学的手法を用いて正常肝に類似した組織を体内あるいは体外で構築し利用することも考えられている。しかしながら、臓器移植同様、肝細胞移植に用いるための肝細胞の不足は明らかであることから、ヒト肝細胞の培養、増殖、凍結保存技術の開発は大きな課題であり、現在様々の検討が行われている。

最近、特に肝細胞移植への応用が期待されているのは小型肝細胞である。小型肝細胞は成熟ラットの肝臓の非実質画分にその存在が見出された。小型肝細胞をある特殊な培地で培養すると、コロニーを形成し、

さらに培養を続けるとこの細胞が積み重なるようになって管状あるいは嚢胞状構造を形成する。また、小型肝細胞は増殖能力が成熟肝細胞に比べてはるかに旺盛であり、継代培養も可能である。その表現系並びに超微細構造は成熟肝細胞と類似している点が多い。最近、ヒトにおいても小型肝細胞の存在が報告されている。

このような小型細胞を細胞治療薬へと応用しようとする場合、重要な点の一つはその品質評価をどのように行うかである。特に成熟肝細胞とは表現系において類似している点が多いためその識別は困難である。現在までに小型肝細胞特異的に発現しているタンパク質を見出し、それを品質確保のマーカーとして使用しようとする研究が数多く行われている。しかしながら、未だ有用なマーカーとして使用可能なタンパク質は見出されていない。そこで、本研究においては小型肝細胞と成熟肝細胞において発現しているタンパク質を二次元電気泳動により比較することにより両者で発現の異なっているタンパク質を見出し、質量分析によりその同定を試みた。

B. 研究方法

1. 成熟及び小型肝細胞の調製

コラゲナーゼ灌流法により調製した細胞懸濁液を 50g×1分遠心した。沈殿として得られた肝細胞を培地にて懸濁後同様な遠心操作を3回繰り返して成熟肝細胞を得た。成熟肝細胞はその細胞懸濁液を45%パーコール密度勾配で50g×10分遠心し沈殿とすることにより更に精製を行った。一方、成熟肝細胞調製時の各遠心上清を集め、150g×5分遠心した。沈殿として得られた小型

肝細胞と他の非実質細胞を培地にて懸濁後同様な遠心操作を3回繰り返した。沈殿として得られた細胞を懸濁後50g×2分遠心し小型肝細胞を得た。小型肝細胞はその細胞懸濁液を45%パーコール密度勾配で50g×24分遠心し沈殿とすることにより更に精製を行った。

2. 二次元電気泳動のためのサンプル調製

沈殿として得られた成熟及び小型肝細胞をPBSで洗浄後、チオウレアを含む溶解バッファーで細胞を溶かした。細胞溶解物を20,000g×60分遠心しその上清を回収した。上清は使用するまで-70°Cで保存した。なお、個々のサンプルにおけるタンパク濃度はBiorad protein assay kitで測定した。

3. 二次元電気泳動

各蛋白質サンプルをゲル膨潤バッファーと共にImmobiline Dry Strip (Immobiline NL, 13cm, Amersham Biosciences社)に添加して一晩放置した。なお、図1に示した実験においてはゲルあたり100μgのサンプルを使用し、Immobiline Dry StripはpH3-10のものを用いた。また、質量分析用のサンプル調製においてはゲルあたり300μgのサンプルを使用し、Immobiline Dry StripはpH4-7のものを用いた。1次元目の等電点電気泳動はCool Phorestar電気泳動装置(アナティック社)で行い、二次元目のSDS-PAGEは、10-20%のグラジエントゲル(バイオクラフト社)で行った。二次元電気泳動で分離したタンパク質スポットは銀染色あるいはCBB染色で検出した。

4. 二次元解析タンパク質のトリプシンによるゲル内消化

目的スポットを切り出し 20%メタノール・5%酢酸を加え室温で 10 分振盪した。この操作を 3 回繰り返した後 MilliQ 水を加え、室温で 10 分振盪した。この操作をさらに 2 回繰り返した後、アセトニトリルを加え、室温で 10 分振盪した。アセトニトリルを除いた後、減圧濃縮遠心器でゲルを乾固させた。次に、10mM ジチオスレイトール、100mM 炭酸水素アンモニウムを加え、56°C で 60 分インキュベーションした。チューブを室温に戻した後溶媒を除き先程と等量の 55mM ヨードアセトアミド、100mM 炭酸水素アンモニウムを加えて室温で 45 分反応させた。溶媒を除き 100mM 炭酸水素アンモニウムを加えて、室温で 5 分振盪し、さらにアセトニトリルを加え 5 分振盪した。この操作を二回繰り返し、減圧濃縮遠心器でゲルを乾固させた。乾固したゲルを氷上に置き 0.4 μ g のトリプシンを含むトリプシン消化バッファー (40mM 炭酸水素アンモニウム、10%アセトニトリル) を 20 μ l 加えた。45 分間インキュベーションして消化バッファーをゲルに膨潤させた後、さらに 30 μ l のトリプシンを含まない消化バッファーを加え、37°C で一晩インキュベーションした。

5. ゲルからのトリプシン消化ペプチドの抽出

20mM 炭酸水素アンモニウムを加え室温で 20 分振盪し上清を回収した。5%ギ酸、50%アセトニトリルを加え、さらに 20 分振盪し、上清を回収した。この操作を 2 回繰り返して全ての上清を集め、減圧濃縮遠心

器で乾燥後 0.1%トリフルオロ酢酸に溶かした。

6. 質量分析計による蛋白質の同定

ペプチド断片を含む溶液を ZipTip μ C18 (ミリポア社) で洗浄後、5 μ l の 0.1%トリフルオロ酢酸、50%アセトニトリルでペプチドを溶出した。上記溶液 0.5 μ l を MALDI target にアプライし、マトリックスとして α -シアノ- β -ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) の 0.1%トリフルオロ酢酸、50%アセトニトリル飽和溶液を重層した。MALDI TOF-MS (AXIMA-CFR, 島津製作所) を用いて質量分析を行い、得られたペプチド断片の質量数から、Mascot システム (Matrix Science 社) を用いたデータベース検索を行い、蛋白質の同定を試みた。

C. 研究結果

図 1 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みられた。少なくとも肉眼上、その他のスポットに関して両者で濃さは変わらなかった。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 2 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 は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示している。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

近年小型肝細胞の細胞治療薬への応用が期待され、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タ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の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。

このように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は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タ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、プロテオーム解析を試みた。その結果、アネキシンⅢが小型肝細胞においてのみ発現す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 Ca^{++} 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、ホスフォリパーゼ A_2 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。

E. 研究成果

1. Niimi, S., Oshizawa, T., Naotsuka, M., Ohba, S., Yokozawa, A., Murata, T., Hayakawa, T.: Establishment of a standard assay for human thrombomodulin and determination of the activity of the Japanese reference standard. *Biologicals* 30, 69-76 (2002)

2. Nagano, M., Nakamura, T., Niimi, S., Fujino, S., Nishimura, T., Murayama, N., Ishida, S., Ozawa, S., Saitou, Y., Sawada, J.: Substitution of arginine for cystein 643 of the glucocorticoid receptor reduces its steroid-binding affinity and transcriptional activity. *Cancer Lett.* in press (2002)
3. Niimi, S., Horikawa, M., Seki, T., Ariga, T., Kobayashi, T., Hayakawa, T.: Effect of activins AB and B on DNA synthesis stimulated by epidermal growth factor in primary cultured rat hepatocytes Effect of activins AB and B on DNA synthesis stimulated by epidermal growth factor in primary cultured rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, in press 25 (2002)
4. Kobayashi, T., Niimi, S., Hyuga, M., Hayakawa, T., Left lobe-specific increase of HGF and follistatin mRNA in relation to the rat liver regeneration
14th International Congress of Developmental Biology (2001.7)
5. 新見伸吾, 堀川麻衣, 関泰一郎, 有賀豊彦, 小林 哲, 早川堯夫 初代培養ラット肝細胞における EGF による DNA 合成促進に対するアクチビン AB,B の作用 第 8 回肝細胞研究会 (平成 13 年 6 月)
6. 新見伸吾, 風間宏美, 稲川雅美, 関泰一郎, 有賀豊彦, 日向昌司, 早川堯夫 MRC-5 細胞における TPA 依存的な HGF 産生促進に対するアクチビンの作用 第 74 回日本生化学会大会 (平成 13 年 10 月)
7. 後藤洋子, 新見伸吾, 早川堯夫, 宮下徳治 ラクトース修飾フィブロインの機能評価—レクチン及び肝細胞との相互作用 第 10 回ポリマー材料フォーラム (平成 13 年 11 月)

表 1 小型肝細胞二次元電気泳動で特異的な発現が観察された 35kDa 蛋白質のトリプシンによるゲル内消化物からの観察及び計算されたペプチドのマス

<i>m/z</i> observed	<i>m/z</i> expected	<i>m/z</i> calculated	assigned amino acid residues		assigned peptide sequence
			Start	End	
943.38	942.37	942.44	212	218	LTFDEYR
946.47	945.46	945.50	250	258	NTPFLAGR
1073.54	1072.53	1072.58	281	289	SEIDLLDIR
1180.50	1179.49	1179.55	265	275	GAGTDEFTLNR
1229.60	1228.59	1228.68	281	290	SEIDLLDIRR
1336.53	1335.52	1335.63	128	138	EISQAYYTAYK
1370.59	1369.58	1369.65	60	70	QYQEAYEQALK
1464.66	1463.65	1463.73	128	139	EISQAYYTAYKK
1711.77	1710.76	1710.78	140	154	NLRDDISSETSGDFR
1754.90	1753.89	1753.94	231	246	GELSGHFEDLLAVVR
1882.79	1881.78	1881.91	191	205	WGTDKFKFTEILCLR
2034.84	2033.83	2033.98	11	29	GTINNYPGFNPSVDAEAIR

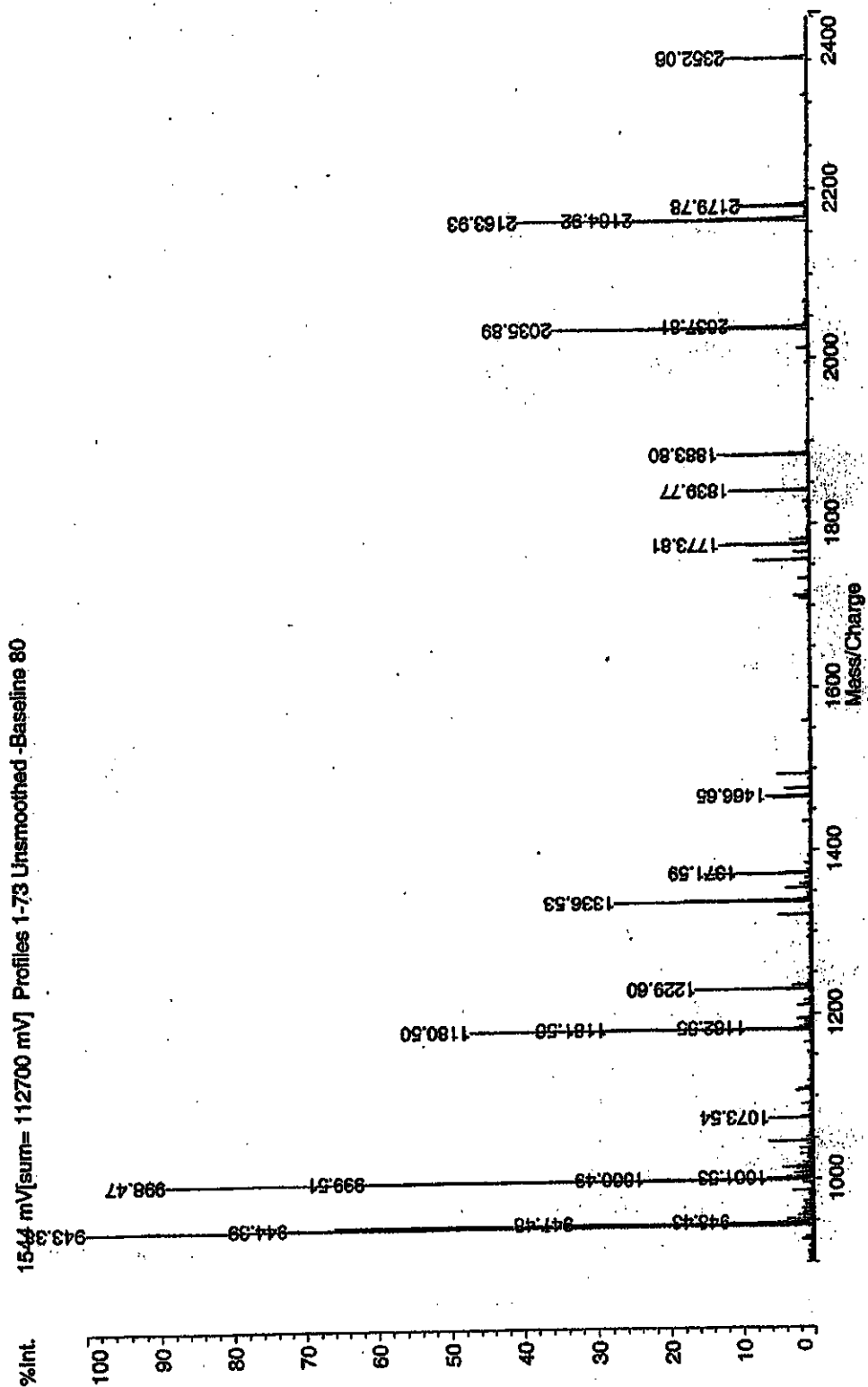


図2 小型肝細胞由来タンパク質の二次元電気泳動で特異的な発現が観察された35kDa
タンパク質のトリプシンによるゲル内消化物の質量スペクトル

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者指名	論文タイトル	編集者名	書籍名	出版社名、出版地、出版年、ページ
Takao HAYAKAWA; , Ed. By, ,	Biotech Process Evaluation	M. Cone	<i>Proceedings of the Fifth International Conference on Harmonization San Diego 2000</i>	Regulatory Affairs Journals LTD , 2001, pp. 73-77
早川堯夫	細胞基材の品質・安全性評価	早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘	バイオ医薬品の品質・安全性評価,	エル・アイ・シー、 東京、2001、pp33-49
早川堯夫	感染性物質概論	早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘	バイオ医薬品の品質・安全性評価,	エル・アイ・シー、 東京、2001、 pp101-122
早川堯夫	細胞・組織利用医薬品等の品質・安全性の確保	早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘	バイオ医薬品の品質・安全性評価	エル・アイ・シー、 東京、2001、 pp397-419
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	バイオ医薬品の品質・安全性評価	エル・アイ・シー、 東京、2001、 pp255-284
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	JPTI 編集 委員会編	日本薬局方技術情報 (JPTI)	じほう、東京、2001、 pp278-284
土屋利江	無機微粒子の安全性と生体適合性		微粒子工学大系 第II巻 応用技術	フジ・テクノシステム、東京、2002、 743-748

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号、ページ、出版年
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.	<i>J. Clin. Microbiol</i>	Submitted
Toshie KANEYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi OSHIZAWA and Takao HAYAKAWA	CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peropheral blood as ehdothelial-precursor cells	<i>British. J. Hematol.</i>	Submitted
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.	<i>J. Chromatogr. A</i>	Submitted

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.	<i>Biologicals</i>	Submitted
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	<i>Biochim Biophys Acta</i>	1568, 13-20 2001
Kouji MARIYAMA, 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	<i>J. Immunotherapy</i>	24, 345-353 2001
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	<i>J. Chromatogr. A.</i>	910, 1-11 2001
Nana KAWASAKI, Yuji HAISHIMA, Miyako OHTA, Satsuki ITO, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA	Structure analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin	<i>Glycobiology</i>	in press
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	<i>Cancer Res.</i>	61, 7913-7919 2001
Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA	Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline controllable expression system	<i>Biochim Biophys Acta</i>	1568, 21-29 2001
Zhili XU, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA	Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors	<i>Gene</i>	272, 149-156 2001
Akiko EGUCHI, Teruo AKUTA, Hajime OKUYAMA, Takao SENDA, HaruhikoYOKOI, 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	<i>J. Biol. Chem.</i>	276, 26204-26210 2001
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	<i>Int. J. Cancer</i>	94, 328-334 2001

Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY, and Takao HAYAKAWA	Approaches for generating recombinant adenovirus vectors	<i>Adv. Drug Deliv. Rev.</i>	52, 165-176 2001
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	<i>Gene Ther.</i>	8, 730-735 2001
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	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	282, 173-179 2001
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	<i>Bio Techniques</i>	30, 1112-1116 2001
Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA	Improvement of Adenovirus Vectors for Gene Transfer	<i>Animal Cell Technology</i>	in press
Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Takao HAYAKAWA	CAR- or av integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing TGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice	<i>Gene Ther.</i>	submitted
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	<i>J. Control Release,</i>	submitted
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	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	submitted
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	<i>Gene</i>	in press
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	<i>Methods Molecular Biology</i>	In press
Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA	Tet-Off System is More Effective than Tet-On System for Regulating Transgene Expression in Single Adenoviral Vector	<i>J. Gene. Med.</i>	In press

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	<i>Cancer Gene Therapy</i>	8, 36-44 2001
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	<i>Cell. Signalling</i>	13, 17-22 2001
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 <i>cyclin B1</i> and proto-oncogene <i>DEK</i> by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NmUMG	<i>Cancer Res.</i>	in press
A. 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	<i>Molecular and Cellular Biology</i>	in press
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	<i>Jap.J. Cancer Res.</i>	in press
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	<i>J. Biol. Chem</i>	submitted
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	<i>J. Biol Chem.</i>	submitted

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
H. Hisamitsu, H. Ohata, T. Kawanishi, T. Iwamoto, M. Shigekawa, H. Amano, S. Yamada, and K. Momose	A mechanism of Ca ²⁺ release from Ca ²⁺ stores coupling to the Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger in cultured smooth muscle cells	Life Sci.	69, 2775-2787 2001
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 Ca ²⁺ channel blockade on early phase Ca ²⁺ transients In rat atrial and ventricular cardiomyocytes	Bioimages	9, 87-93 2001
Ryusuke Nakaoka , Toshie Tsuchiya, and Akitada Nakamura,	Different neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films	J. Biomedical Materials Research	submitted
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
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
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
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

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)	<i>The Japan Institute of metals</i>	189-191, 2001
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.	<i>J. Biomedical Materials Research</i>	accepted
Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya	Effect of γ ray irradiated poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells.	<i>J. Biomater. Sci. Polymer Edn.</i>	accepted
Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya	Change in the Particle Size Distribution of poly(L-lactide) Wear Debris by γ -Ray Irradiation.	<i>Bull. Natl. Health Sic.</i>	vol 119 in press
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.	<i>TISSUE ENGINEERING</i>	in press
Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya	A strategy for the suppression of tumorigenesis induced by biomaterials: Restoration of transfected phenotype of polyetherurethane-induced tumor cells by Cx43 transfection.	<i>Cytotechnology</i>	in press
Muhamad Shahidur Rahman and Toshie Tsuchiya	Enhancement of Chondrogenic Differentiation of Human Articular Chondrocytes by Biodegradable	<i>Polymers. TISSUE ENGINEERING</i>	7(6), 781-790, 2001
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.	<i>Animal Cell Technology</i>	in press
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)	<i>J. Biomedical Materials Research</i>	in press

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.	<i>J. Biomed Mater Research</i>	57, 279-284, 2001
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	<i>J. Biomed Mater Research</i>	57, 567-574, 2001
Taizo Sumide, Toshie Tsuchiya	Evaluation of chemical disinfectants for hydrogel contact lenses by metabolic cooperation assay.	<i>(Japanese) J. of Japanese Society for Biomaterials</i>	19, No.3, 93-97, 2001
Takumi. Miura, Yoshinori. Katakura, Katsuhiko. Yamamoto, Norihisa. Uehara, Toshie Tsuchiya	Sanetaka Shirahata, Neural stem cells loses telomerase activity upon differentiation into astrocytes.	<i>Cytotechnology</i>	37, No.1-3, in press
Akira Ichikawa, Toshie Tsuchiya	Reversion of transformed phenotype of polyetherurethane-induced tumor cells Cx43 transfection.	<i>Animal Cell Technology</i>	in press
Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya	Effects of biomaterials and nutrient factors on chondrogenesis of human chondrocytes.	<i>Animal Cell Technology</i>	in press
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.	<i>Cytotechnology</i>	in press
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	<i>医薬品研究</i>	印刷中
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―	<i>医薬品研究</i>	印刷中
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	<i>医学のあゆみ</i>	印刷中
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	<i>PDA Journal of GMP and Validation in Japan</i>	3, 57-64, 2001
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―	<i>医薬ジャーナル</i>	37(5), 1514-1546 2001
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	<i>炎症</i>	12 巻, 101-109 2001
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	<i>バイオインダストリー</i>	10, 81-93, 2001

20010492

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。