

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究）
分担研究報告書

原子間力顕微鏡等を用いたナノレベルイメージングによる分子の構造解析

分担研究者 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所 療品部長

研究要旨 イオン・チャンネル形成型 ATP 受容体（P2X2 受容体）を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の表面において、チャンネル受容体蛋白質を AFM で観察可能であることを示した。ナノ粒子フラーレンは、可視光照射下においてのみ、微生物阻害活性を示した。フラーレンの選択的生体内移動性を向上させるため、フラーレンを内包する包接化合物をコアとしたナノカプセルのデザインを分子力場計算を用いて行った。自己組織化膜を利用して、種々の官能基を持つ表面を作製した。磷酸基、硫酸基表面で、細胞増殖が抑制され、骨分化が促進された。新規治療効果が期待されるヘパリン誘導体と bFGF の共存下、ヒト皮膚繊維芽細胞で、Annexin II などの膜タンパク質が顕著に誘導されていることをプロテオミクス手法で初めて明らかにした。

A. 研究目的

AFM 観察により、水溶液中の生きたタンパク質を個別に観察し、1 個の受容体と 1 分子の薬物との相互作用様式の測定を可能とする。

ナノ粒子フラーレンの光増感活性酸素発生能と光抗菌作用との関連を明確にする。体内移動性と組織選択性を有する合成ナノカプセルを創製する。

種々の官能基を持つ表面を調製し、表面上の細胞の機能変化から、組織再生に有用なナノ表面官能基を明らかにし、新規組織工学材料を創製する。更に、材料と接触することで、変動する細胞中のマーカータンパク質群を見だし、その挙動を可視化し、蛋白分子レベルで高度に制御された新たな医療材料開発に役立つことを目的とする。

B. 研究方法

AFM を用いたアフリカツメガエル卵母細胞表面観察では、P2X2 プラスミドよりインビトロ合成した RNA を卵母細胞に注入し、18℃でインキュベートした。AFM 観察は、乾燥標本をデジタル・イ

ンスツルメンツ社の MMAFM 型 SPM ユニットを用いてタッピング・モードで行った。

一重項酸素生成能、活性酸素種は、近赤外発光法やスピントラップ ESR 法、NBT 法で測定した。B.subtilis を用いて光抗菌作用を調べた。包接化合物のデザインを分子力場計算を用いて行った。

ガラスに金蒸着後、各種チオール類を含むエタノール溶液で、メチル基、アミノ基、カルボキシル基および水酸基をもつ自己組織化膜（SAM）を調製した。水酸基 SAM 材料から、Phosphoryl chloride や DMF-SO₃ などで、磷酸基および硫酸基を導入し、接触角測定、ESCA による表面元素解析による表面変化と官能基の確認を行った。

治療効果を期待できる条件下で発現し、有効なマーカーとなり得るタンパク質群を確実に突き止めることを目指した。そこで、多くのタンパク質を迅速に解析するのみでなく、ディファレンシャルディスプレイ法にフォーカストプロテオミクスの概念を組み合わせ、ヒト皮膚繊維芽細胞に発現している膜タンパ

ク質に焦点を当て、プロテオミクス手法で調べた。

C. 研究結果

1) P2X2 受容体を発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞の表面を AFM で観察する実験では、乾燥させた表面上に外径 20nm、内径 10nm ほどの環状様の構造が見出された。この構造は密集してクラスターを形成しているように見受けられた。分子生物学的手法を用いた P2X2 受容体の変異体作製において、これまでの実験結果から 333 番目のアスパラギン残基に着目した。その結果、アラニン置換による抑制効果の減弱から、カチオンとの静電的相互作用の減少が考えられた。負の電荷としてアルギニン(asparagine)をアスパラギン酸あるいはグルタミン酸で置換した。アスパラギン酸では、 Ca^{2+} 、 La^{3+} による抑制効果は増強されたが、グルタミン酸では、殆ど変化しなかった。従って、抑制効果の強弱は、静電的な相互作用だけではない。次に、333 番目に、電気的に中性アミノ酸残基を導入した。その結果 Ca^{2+} による抑制効果は、グリシン>アラニン>バリン>ロイシン>イソロイシンと側鎖の大きさにほぼ従った。256 番目のトリプトファンをロイシンに替えると ATP に対する電流応答は完全に消失した。256 番目のトリプトファンは P2X2 受容体のチャネル活性に必須であることが判明した。

2) 光照射下 C60 から、有機溶媒中で一重項酸素が効率よく生成した。水溶液中では、生体分子との反応性が高いスーパーオキシドを生成し、C60 濃度依存的に光抗菌作用を検出した。スイッチング機能を有するフラーレンを内包する包接化合物をデザインするために、t-butyl 基を有するアゾベンゼンを合成し、走査型トンネル顕微鏡 (STM) による単分子レベルでの構造変化の観察を試みている。

3) ガラス表面に蒸着した金の厚みが増すほど、接触角が大きくなった。ガラス表面へのメチル基、リン酸基、硫酸基などの

導入を ESCA で確認した。各官能基を導入した表面の接触角は、ガラス<硫酸基<リン酸基<水酸基<カルボキシル基<アミノ基<メチル基の順に大きくなった。ヒト骨芽細胞をこれらの表面上で培養すると細胞の増殖度及び形態が異なった。培養 1 日目では、リン酸基表面では、細胞は丸く、硫酸基表面で細胞の伸展がおさえられていた。しかし、骨芽細胞の分化に関しては、アルカリフォスファターゼ活性およびカルシウム沈着量の増大が顕著であった。

4) ヘパリン誘導体と bFGF の共存下、ヒト皮膚繊維芽細胞を培養し、2 次元電気泳動で発現誘導されたスポットのタンパクを In-gel Digestion し、得られた断片化ペプチドの MALDI-TOF/MS スペクトルをポジティブイオンモードで測定した。得られたデータを MASCOT のペプチドマスフィンガープリントモードに入力し、候補蛋白を検索した結果、Annexin II が第一候補として出力された。

D. 考察

1) 大腸菌を利用した ATP 受容体タンパク質発現・精製法の検討では、ヒスチジンタグをつけたタンパク質の発現を確認できた。しかし、精製度は AFM 観察に不十分であった。また、野生型 P2X2 受容体を結さつしたプラスミドは、大腸菌に致死性であった。精製時使用する界面活性剤により、タンパク質の活性が失われるなどの理由から、大腸菌に比べて、精製がより容易である真核生物の細胞利用が望ましい。現在アフリカツメガエル卵母細胞を利用した精製法を検討中である。ATP 受容体を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の表面観察では、乾燥させた表面上に外径 20nm ほどの環状様の構造が見いだされた。これはこれまでに報告されているニコチン様アセチルコリン受容体などのチャネルの外径とほぼ一致している。この程度の大きさの膜タンパク質が AFM で観察可能であることが示された。

2)光増感ナノ粒子フラーレンの活性酸素種は、有機溶媒中では、一重項酸素、水溶液中では、還元型活性酸素ラジカル種を生成し、生体内では生体分子に反応性の高い活性酸素種の生成が示唆された。光抗菌活性も確認されたことより、フラーレンが光増感型抗菌医療材料として有用である。

3)各種官能基を導入した表面上にヒト正常骨芽細胞を播種し、観察したところメチル基表面では、細胞は付着しにくく凝集した。ヒト骨芽細胞はリン酸基と硫酸基表面で分化を著しく促進した。細胞接着に関わるタンパク質類の表面への接着挙動やその状態を、AFM等を利用した手法を用いてナノレベルで解析し、新規材料を開発する。

4)ヒト皮膚繊維芽細胞は、あらたな治療効果が期待されるヘパリン誘導体とbFGF共存下において、複数の蛋白質群を発現誘導した。中性から酸性領域の蛋白質の変動は比較的少なく、Annexin IIなどの塩基性蛋白質の発現量が著しく増加した。これらの蛋白質の同定が正しいかどうか、各蛋白質に対する抗体を用いて、ウェスタンブロット法で調べている。

E. 結論

AFM観察に必要な構造を有するATP受容体タンパク質を発現/精製するためには、大腸菌発現系の利用は困難であり、真核細胞の利用が望ましい。チャネル受容体の大きさのタンパク質がAFMで観察可能であること。チャネル開口部の残基がカルシウム接近の立体障害となること。細胞外領域の保存性の高いトリプトファン残基がチャネル活性に必須であることが示された。

顕著な微生物成長阻害を示すC60を母核とする新規ナノカプセルを合成中である。

金蒸着表面に自己組織化膜を利用して6種類の官能基を持つ表面を作製した。その表面上で、正常ヒト骨芽細胞を

培養した結果、第一にリン酸基表面で、第二に硫酸基表面が著しく骨分化を促進した。

治療効果を期待できる培養条件でAnnexin II等の顕著な発現をプロテオミクス手法で明らかにした。材料開発への応用が期待される。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表 1 論文発表

- ① K. Nakazawa, H. Ojima, Y. Ohno, A highly conserved tryptophane residue indispensable for cloned rat neuronal P2X receptor activation. *Neurosci. Lett. Elsevier*, 324:141-144, 2002
- ② K. Sato, N. Matsuki, Y. Ohno, K. Nakazawa, Effects of 17beta-estradiol and xenoestrogens on the neuronal survival in the organotypic hippocampal culture. *Neuroendocrinology*, 76:223-234, 2002
- ③ K. Nakazawa, H. Sawa, H. Ojima, R. Ishii-Nozawa, aK. Takeuchi, Y. Ohno, Size of side-chain at channel pore mouth affects Ca²⁺ block of P2X₂ receptor. *Eur.J.Pharmacol.* 449:207-211, 2002
- ④ Takahashi, T. Yamakoshi, Y. Ge, W.-Y. Sugita, J. Okayama, K. Koizumi, T. High-Pressure Mediated Asymmetric Diels-Alder Reaction of Chiral Sulfinyl Acrylate Derivatives and Its Application to Chiral Synthesis of (-)-COTC and (-)-Gabosine C, *The Japan Institute of Heterocyclic Chemistry*, 56: 209 - 220, 2002
- ⑤ Kai, Y., Komazawa, Y., Miyajima, A.; Miyata, N.; Yamakoshi, Y.* [60]Fullerenes as a Novel Photoinduced Antibiotic, *Marcel Dekker, Inc.* 11, 79-87, 2003
- ⑥ Nakakoka, R., Tsuchiya, T., Akitada Nakamura, Neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films, *J. Biomed. Mater. Res* 62, In press.

- ⑦ Nakakoka, R., Tsuchiya T., Biocompatibility of various kinds of polymers microspheres Estimated from their effects on Gap junctional intercellular communication of fibroblasts. *Materials Transactions*, 43, 3122-3127, 2002
- ⑧ 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. Biomed Mater Res.* 62:157-162, 2002
- ⑨ Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya: Increase in Gap Junctional Intercellular communication by High Molecular Weight Hyaluronic Acid Associated with FGF-2 and KGF-Production in Normal Human Dermal Fibroblasts. *TISSUE ENGINEERING*, 8:419-427, 2002
- ⑩ 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.* 13: 153-166, 2002
- ⑪ 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*, 8,419-427, 2002
- ⑫ Sumide, T. & Tsuchiya, T. Effects of multi-purpose solutions (MPS) for hydrogel contact lenses on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes. *J. Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 64B, 57-64, 2003
- ⑬ Toshie Tsuchiya, Yuka Itahashi, 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*, 12, 253-256, 2002
- ⑭ Muhammad Shahidur Rahman, Toshie Tsuchiya Effects of biomaterials and nutrient factors on chondrogenesis of human chondrocytes. *Animal Cell Technology*, 12: 235-239, 2002
- ⑮ Jeongung Park, and Toshie Tsuchiya, Tumor-Promoting Activity of 48 kDa Molecular Mass Hyaluronic Acid. *Materials Transactions*, 43: 3128-3130, 2002
- 2 学会発表
- ① 中澤憲一、生島裕恵、野澤玲子、竹内幸一、大野泰雄. 第76回日本薬理学会年会 (2003.3) P2X2受容体細胞外領域の高保存性トリプトファン残基のチャンネル活性化における必要性.
- ② 生島裕恵、中澤憲一、野澤(石井)玲子、竹内幸一、大野泰雄. 第76回日本薬理学会年会 (2003.3) P2X2受容体活性化における細胞外ループ内ジスルフィド結合近隣アミノ酸の役割
- ③ Nishikawa, K., Tominaga, N., Yamakoshi, Y., Otomo, R. The 10th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas. (Vancouver, 11-16, June, 2002) Change of Ultrastructure and Accumulation of Polyphosphate in *Chlamydomonas acidophila*.
- ④ 山越葉子、甲斐陽子、宮島敦子、土屋利江. 日本薬学会第123年会. (長崎 27-29 March 2003.) フラレーン(C₆₀)の微生物増殖阻害活性について.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表雑誌 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|--|---|------------------------|-----|-------------|------|
| Koide Y, Hasegawa T, Takahashi A, Endo A, Mochizuki N, Nakagawa M, Nichide A. | Development of novel EDG3 antagonists using a 3D database search and their structure-activity relationships. | J Med Chem. | 45 | 4629-4638 | 2002 |
| Nagashima KI, Endo A, Ogita H, Kawana A, Yamagishi A, Kitabatake A, Matsuda M, Mochizuki N. | Adaptor protein Crk is required for ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells. | Mol. Biol. Cell | 13 | 4231-4242 | 2002 |
| Onishi H, Ohki T, Mochizuki N, Morales MF. | Early stages of energy transduction by myosin: roles of Arg in switch I, of Glu in switch II, and of the salt-bridge between them. | Proc Natl Acad Sci USA | 99 | 15339-15344 | 2002 |
| Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M. | Activation of Rac and Cdc42 video imaged by Fluorescent Resonance Energy Transfer-Based single molecule Probes in the membrane of living cells. | Mol. Cell. Biol. | 22 | 6582-6591 | 2002 |
| Endo A, Nagashima K, Kurose H, Mochizuki S, Matsuda M, Mochizuki N. | Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. | J Biol Chem. | 277 | 23747-54 | 2002 |
| Shinohara M, Terada Y, Iwamatsu A, Shinohara A, Mochizuki N, Higuchi M, Gotoh Y, Ihara S, Nagata S, Itoh H, Fukui Y, Jessberger R. | SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling. | Nature | 416 | 759-63 | 2002 |

| | | | | | |
|---|--|-------------------------------|-----|----------|----------|
| Post GR, Swiderski C, Waldrop BA, Salty L, Glembotki CC, Wolthuis RM, <u>Mochizuki N.</u> | Guanine nucleotide exchange factor-like factor (Rlf) induces gene expression and potentiates alpha 1-adrenergic receptor-induced transcriptional responses in neonatal rat ventricular myocytes. | J Biol Chem. | 277 | 15286-92 | 2002 |
| Katagiri T, Sakakibara A, Takahashi T, <u>Nakamura S,</u> Hattori S | Ack1 upregulates integrin-mediated adhesion of T cells upon TCR stimulation | J. Biol. Chem | | in press | |
| Koshiha M, Kikuchi T, Yohda M, <u>Nakamura S</u> | Inversion of the anatomical lateralization of chick thalamofugal visual pathway by light experience | Neurosci. Lett. | 318 | 113-116 | 2002 |
| Hoshino M, <u>Nakamura S</u> | The Ras-like small GTP-binding protein Rin is activated by growth factor stimulation | Biochem. Biophys. Res. Comm. | 295 | 651-656 | 2002 |
| Ohsaki K, Osumi N, <u>Nakamura S</u> | Altered whisker patterns induced by ectopic expression of Shh are topographically represented by barrels | Developmental Brain Res. | 137 | 159-170 | 2002 |
| Koshiha M, <u>Nakamura S,</u> Deng C, Rogers LJ | Light-dependent development of asymmetry in the ipsilateral and contralateral thalamofugal visual projections of the chick | Neurosci. Lett. | 336 | 81-84 | 2002 |
| Korth C, <u>Kaneko K,</u> Groth D, NHeye N, Telling G, Mastrianni J, Parchi P, Gambetti P, Will R, Ironside J, Heinrich C, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB | Abbreviated transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to mice expressing a novel chimeric prion protein transgene | Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. | | | in press |

| | | | | | |
|---|--|---------------------------------|-----|-------------|------|
| Furuta M, Ito T, Eguchi C, Tanaka T, Wakabayashi-Takai E, <u>Kaneko K</u> | Two-Dimensional Electrophoresis/Phage Panning (2D-PP): A Novel Technology for Direct Antibody Selection on 2-D Blots | J. Biochem (Tokyo). | 132 | 245-251 | 2002 |
| Tanaka T, Ito T, Furuta M, Eguchi C, Toda H, Wakabayashi-Takai E, <u>Kaneko K</u> | In Situ Phage Screening. A method for identification of subnanogram tissue components in situ | J. Biol. Chem. | 277 | 30382-30387 | 2002 |
| Perrier V, <u>Kaneko K</u> , Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB, Wallace AC | Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice | Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. | 99 | 13079-13084 | 2002 |
| Peretz D, Williamson RA, <u>Kaneko K</u> , Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB | Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity | Nature | 412 | 739-743 | 2001 |
| Laws DD, Bitter HM, Liu K, Ball HL, <u>Kaneko K</u> , Wille H, Cohen FE, Prusiner SB, Pines A, Wemmer DE | Solid-state NMR studies of the secondary structure of a mutant prion protein fragment of 55 residues that induces neurodegeneration | Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A | 98 | 11686-11690 | 2001 |
| Nakajima K, Tohyama Y, <u>Kohsaka S</u> , Kurihara T | Ceramide activates microglia to enhance the production / secretion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) without induction of deleterious factors in vitro | J. Neurochem | 80 | 697-705 | 2002 |
| Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, <u>Kohsaka S</u> , Imai Y | Macrophage/microglia-specific protein Ibal enhances membrane ruffling and rac Activation via phospholipase C- γ -dependent pathway | J. Biol. Chem. | 277 | 20026-20036 | 2002 |

| | | | | | |
|---|---|----------------------------------|------------|-------------|------|
| Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K | Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration | J. Neurosci. | 22(21) | 9228-9236 | 2002 |
| Koizumi S, Saito Y, Nakazawa K, Nakajima K, Sawada JI, Kohsaka S, Illes P, Inoue K | Spatial and temporal aspects of Ca ²⁺ signaling mediated by P2Y receptors in cultured rat hippocampal astrocytes | Life Sci. | 20;72(4-5) | 431-442 | 2002 |
| <u>S. Wakabayashi</u> , et al. | Two Fundamental Regulatory Factors of the Na ⁺ /H ⁺ Exchangers: The Proton and CHP. In "The Sodium-Hydrogen Exchange. From Molecule to its Role in Disease" | Kluwer Academic Publishers | | (in press). | 2003 |
| <u>S. Wakabayashi</u> . et al. | Evidence for involvement of the putative first extracellular loop in differential volume-sensitivity of the Na ⁺ /H ⁺ exchangers NHE1 and NHE2 | Biochemistry | 42 | 1086-1094 | 2003 |
| <u>S. Wakabayashi</u> , et al. | Expression of Calcineurin B Homologous Protein 2 Protects Serum Deprivation-Induced Cell Death by Serum-Independent Activation of Na ⁺ /H ⁺ exchanger | J. Biol. Chem | 277 | 43771-43777 | 2002 |
| <u>S. Wakabayashi</u> , et al. | Mutations of Arg440 and Gly455/Gly456 Oppositely Change pH-Sensing of Na ⁺ /H ⁺ Exchanger NHE1. | J. Biol. Chem | | in press | 2003 |
| <u>H. Inoue</u> , et al | Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression by Fluid Shear Stress in Vascular Endothelial Cells. | Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. | 22 | 11415-11450 | 2002 |

| | | | | | |
|---|--|----------------------------|------|------------|------|
| H. Inoue, et al. | Deoxycholic acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent induction of caspases, COX-2 promoter activity and the transcription factors NF- κ B and AP-1 | Carcinogenesis | 23 | 839-845 | 2002 |
| S. Takeda, A. Yamashita, K. Maeda, and Y. Maeda | Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca ²⁺ -saturated form | Nature | | In press. | |
| S. Takeda, et al. | Crystal structure of troponin ternary complex | Biophys. J | 82 | 170a | 2002 |
| E. Sato, H. Mori, et al | Quasi-monochromatic parallel radiography achieved with a plane-focus x-ray tube | SPIE | | (in press) | 2003 |
| H. Kasahara, H. Mori, et al. | Biodegradable Gelatin Hydrogel Potentiates the Angiogenic Effect of FGF4 Plasmid in Rabbit Hindlimb Ischemia | J. Am. Coll Cardiol | 41 | 1056-1062 | 2003 |
| E. Sato, H. Mori, et al | Quasi-monochromatic radiography using a high-intensity quasi-x-ray laser generator | Physics of Medical Imaging | 4682 | 538-548 | 2002 |
| T. Kawada, H. Mori, et al. | Disruption of vagal efferent axon and nerve terminal function in the postischemic myocardium | Am. J. Physiol | 283 | H2687-2691 | 2002 |
| N. Nagaya, H. Mori, et al | Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats | Am. J. Physiol | | (in press) | 2003 |
| T. Pearson, H. Mori, et al | Future Investigations of Micro-Macro Level Cardiac Functions Using X-ray Diffraction | BME | 16 | 29-35 | 2002 |
| K. Nakazawa H. Ojima Y. Ohno | A highly conserved tryptophane residue indispensable for cloned rat neuronal P2X receptor activation. | Neurosci. Lett | 324 | 141-144 | 2002 |
| K. Sato N. Matsuki Y. Ohno K. Nakazawa | Effects of 17 β -estradiol and xenoestrogens on the neuronal survival in the organotypic hippocampal culture. | Neuroendocrinology | 76 | 223-234 | 2002 |

| | | | | | |
|---|---|---|-----|-----------|----------|
| K. Nakazawa H. Sawa H. Ojima R. Ishii-Nozawa K. Takeuchi Y. Ohno | Size of side-chain at channel pore mouth affects Ca ²⁺ block of P2X ₂ receptor. | Eur. J. Pharmacol | 449 | 207-211 | 2002 |
| Takahashi T., Yamakoshi, Y., Okayama K., Yamada J., Wei-Ying Ge, Koizumi T. | High-Pressure Mediated Asymmetric Diels-Alder Reaction of Chiral Sulfinyl Acrylate Derivatives and Its Application to Chiral Synthesis of (-)-COTC and (-)-Gabosine C. | Heterocycles | 56 | 209-220, | 2002 |
| Kai, Y., Komazawa, Y., Miyajima, A.; Miyata, N.; Yamakoshi, Y.* | [60]Fullerenes as a Novel Photoinduced Antibiotic. | Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures | 11 | 79 - 87 | 2003 |
| Nakakoka, R., Tsuchiya, T., Akitada Nakamura. | Neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films. | J. Biomed. Mater. Res | 62 | | In press |
| Nakakoka, R., Tsuchiya, T. | Biocompatibility of various kinds of polymer microspheres Estimated from their effects on Gap junctional intercellular communication of fibroblasts. | Materials Transactions | 43 | 3122-3127 | 2002 |
| 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. Biomed Mater Res. | 62 | 157-162 | 2002 |
| Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya | Increase in Gap Junctional Intercellular communication by High Molecular Weight Hyaluronic Acid Associated with FGF-2 and KGF-Production in Normal Human Dermal Fibroblasts. | TISSUE ENGINEERING | 8 | 419-427 | 2002 |
| 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. | 13 | 153-166 | 2002 |
| 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. Biomed Mater Res | 60 | 541-547 | 2002 |
| Sumide, T. & Tsuchiya, T | Effects of multi-purpose solutions (MPS) for hydrogel contact lenses on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes. | J. Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater | 64B | 57-64 | 2003 |

| | | | | | |
|--|--|------------------------|----|-----------|------|
| <u>Toshie Tsuchiya,</u> <u>Yuka Itahashi</u> | 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 | 12 | 253-256 | 2002 |
| Muhammad Shahidur Rahman, <u>Toshie Tsuchiya</u> | Effects of biomaterials and nutrient factors on chondrogenesis of human chondrocytes. | Animal Cell Technology | 12 | 235-239 | 2002 |
| Jeong Ung Park, <u>Toshie Tsuchiya</u> | Tumor-Promoting Activity of 48 kDa Molecular Mass Hyaluronic Acid. | Materials Transactions | 43 | 3128-3130 | 2002 |