

の発現が血管内皮前駆細胞の特性を示すものと考えられる。我々の今回のデータより、血管内皮前駆細胞の特性指標としてこれらのCx発現が非常に有用であることが強く示唆された。現在臍帯血 AC133 細胞の血管内皮細胞誘導率を用いても Cx の発現変化を解析しており、Cx の発現の有用性について詳細な検討を行っている。

次に臍帯血は、AC133 陽性細胞及び CD34 陽性細胞の比率が高く(図 46)、臍帯血は血液幹細胞の比率が多いとする報告を良く一致していた。このように、臍帯血が血液幹細胞を多く含むとすれば血管内皮前駆細胞の誘導も多いのではないかと想定し、末梢血 AC133 細胞と比較した。その結果、臍帯血 AC133 細胞と末梢血 AC133 細胞を SCF、TPO、VEGF 存在下で培養した時の増殖能は、臍帯血 AC133 細胞の方がはるかに高いことが判明した(図 47)。一方、培養 6 日目では、CD31 強陽性細胞の比率は臍帯血 AC133 細胞と末梢血 AC133 細胞で差異は認められなかった(図 48)。また、臍帯血 AC133 細胞由来 CD31 強陽性細胞をソーティングし、ファイブネクチン上で培養を続けると血管内皮細胞の出現率は CD31 陽性細胞に比べ顕著に多いことが明らかになった(図 49)。以上の結果より、臍帯血 AC133 陽性細胞は末梢血に比べ細胞の増殖性が高く、その増殖性の高さに故に、より血管内皮前駆細胞を誘導できることが示された。

血管内皮の特異的な酸化LDLレセプターであるLox-1の特性指標としての有用性について検討を行い、Lox-1がAC133陽性細胞を培養後顕著に発現が増加することを見いだした。また、培養後5日目にLox-1陽性細胞を分離したところ、CD31強陽性細胞を顕著に含むことが明らかになった。現在Lox-1陽性細胞と陰性細胞の血管

内皮分化能の比較を行い、その特性指標としての有用性を確認しているところである。

9. P19 細胞の神経細胞分化誘導過程における細胞特性解析

P19 細胞の神経細胞への分化誘導には、レチノイン酸と細胞の凝集が必要であることが知られている。本研究から、細胞と培養するプレート面との接着度も効率的分化誘導に重要であることが示唆された。すなわち、P19 細胞を効率よく、またより均一に神経細胞に分化した集団を得るため、レチノイン酸処理後、トリプシンで細胞をばらし、細胞間相互作用ができる程度の細胞密度で通常の培養用プレートで培養するという方法を確立した。

神経分化マーカーの解析から、オリゴデンドロサイトに関しては検討していないが、P19 細胞から分化誘導した神経細胞はアストロサイトではなくニューロンが主であることが判明した。また、一般に細胞は分化誘導に伴い増殖停止に向かうが、レチノイン酸存在下で7日間培養するとDNA複製関連因子PCNAが減少しニューロン特異的なMAP2Bが発現してくることから、6日目から7日目の間に増殖から分化へのスイッチングが起こったと考えられる。分化培地に移し誘導をかけた場合、神経細胞特異的タンパク質がすぐに発現してくるにもかかわらず、PCNAやDNAポリメラーゼのサブユニットの減少がすぐに観察されなかった。盛んに増殖している細胞集団が存在している可能性もあるが、分化誘導培地に移す場合には、スイッチングのシグナルが異なるのかもしれない。増殖制御に関わる因子に関しては、分化に伴い発現してくるものと、そうでないものがあった。Kip1、RB2 の発現は分化進行と相関性があり、これらの遺伝子発

現を調節する因子が分化を制御している可能性がある。

再生医療に用いられる細胞の遺伝子レベルの発現やタンパク質レベルの発現を網羅的に調べることにより、細胞特性の解明にもつながる。これらの解析から神経前駆細胞の細胞特性指標を明らかにすることができれば、細胞組織利用医薬品としての品質確保や有効性評価の面から非常に有用である。幹細胞の一種である P19 細胞から神経細胞へ分化誘導していく過程の遺伝子レベル・タンパク質レベルの発現の網羅的解析は、これまでに DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の検討が行われており、いくつかの知見が得られている。しかし、マイクロアレイ解析の弱点である発現量の少ないものでの検討がまだなされていない。また翻訳後修飾のあるタンパク質については適応できない。

本年度行った 2 次元電気泳動によるタンパク質レベルの網羅的解析では、P19 細胞から神経細胞へ分化誘導していく過程の分化誘導初期（レチノイン酸処理後 1 日目）から分化能を備った 4 日目までに注目して解析を行った。早い段階での変動を捉えることで鍵となるタンパク質を見いだすためである。P19 細胞をレチノイン酸による分化誘導刺激すると 1 日目からコントロールと比較して細胞質のタンパク質、核や細胞内器官タンパク質いずれも明らかに相違した再現性あるスポットが観察された。いずれのスポットもタンパク質はまだ未同定であるが、分化の誘導に関わっている因子である可能性がある。ここで用いた細胞の段階的抽出法による解析では、可溶化しにくい細胞膜画分を完全に回収しきれず、分化を運命づけられた細胞を選別するのに有効な細胞表面マーカーの同定のためには、

細胞抽出法を工夫する必要がある。

タンパク質や機能はまだ不明であるが、変動のあるスポットは再現性があり、これらのスポットのタンパク質の解析から、細胞特性を評価できる可能性が示された。

また、ここでは報告していないが、レチノイン酸で同じく神経細胞に分化するヒト胚性腫瘍細胞 NT2 でも、分化誘導させる方法を確認しており、ヒトとマウスでの比較評価の検討が期待できる。さらに、遺伝子発現の微量なものでもまた、未知の遺伝子でも探索できる SAGE による解析も今後行う予定である。

10. P19 CL6 細胞の心筋分化細胞の特性解析

心筋細胞は出生前には分裂増殖能を持つが、出生と同時に速やかにその分裂能は消失する。また、心筋細胞は骨格筋細胞と異なり近傍に衛星細胞のような未分化細胞を持つことはない。したがって心筋梗塞等でひとたび心筋細胞が失われた場合には傷害部位の筋細胞は再生せず、直接心機能不全に結びつく。再生医療として最近、幹細胞を *in vitro* で心筋細胞へ分化させた上で傷害部位に移植することにより心機能を回復させる方法が提唱されている。心筋細胞の移植は心筋梗塞治療における一つの breakthrough の可能性として現在脚光を浴びているが、心筋細胞移植を実用化するにあたっては、幹細胞から目的とする細胞（=心筋細胞）への効率的な分化誘導の技術が不可欠であり、また細胞移植の安全性を評価・確保するためには心筋細胞分化の機序をより詳細に理解しておく必要がある。分化させた心筋細胞の均一性や細胞特性指標の探索も重要な課題である。

通常の幹細胞から心筋細胞を誘導させる場

合は、分化誘導剤の他に細胞塊 (embryoid body) を分化誘導初期に形成させる必要がある。しかし、CL6 細胞は embryoid body を形成させる必要がなく心筋細胞に分化できる。また、feeder 細胞も必要としないことから、初期の心筋分化機構の解析をより簡単に行うことができると思われる。しかしこれまで分化誘導後の CL6 細胞の表現型について十分な解析が行われてきていなかった。本研究における心筋マーカー遺伝子の発現、蛍光抗体染色、および活動電位の検討から、CL6 細胞を DMSO 存在下 16 日間培養することで得られた自動能を持つ心筋様細胞の表現型は、幼若度の高い心房筋細胞に類似した特徴を持つことが初めて明らかとなった。なお、通常的心筋細胞では稀とされる早期後脱分極を高頻度で生ずることが判明した。早期後脱分極は QT 延長症候群と密接に関連することが知られている。したがって、CL6 細胞は心筋分化研究のみならず QT 延長および不整脈研究のツールとしても有用である可能性も考えられる。

今後は、分化初期の細胞系譜決定過程 (4 日間) まで、あるいはその後の分化効率を高めるのに必要な時期での遺伝子レベルおよびタンパク質レベルの解析を行うことで、分化誘導に必要な因子、分化の特性指標の探索、分化効率を高める因子などの同定が心筋分化細胞の特性評価のために必要になってくる。

1.1. 幹肝細胞の特性指標の探索

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たものである。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 - μ -アンチトリプシン、コネキシン 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、小型肝細胞にのみ特異的に発現するタンパク質はこれまで同定されていない。

これまでに我々は肝細胞を成熟肝細胞と小型肝細胞に分画し、プロテオームによる網羅的解析及び免疫化学的解析を試み、Anx III が小型肝細胞において特異的に発現することを初めて明らかにした。本年度は両細胞における Anx III 発現レベルの違いが mRNA レベルによるものかどうか、他のマーカー遺伝子の発現と比較しながら RT-PCR により調べた。その結果、Anx III 発現の違いは mRNA レベルの違いによることが明らかになった。また、本結果は RT-PCR による Anx III mRNA レベルの測定により小型肝細胞と成熟肝細胞が識別できることを示している。

一方、上記したように、分化型肝細胞のマーカーは一般的に小型肝細胞の培養初期において発現がみられないと言われている。そこで典型的な肝細胞の分化マーカーである TAT と T0 について小型肝細胞の特性指標としての有用性についても検討した。その結果、両細胞において同様な強度の PCR 産物がみられたことから、その有用性は認められない。

現在、全ての小型肝細胞において Anx III の発現がみられるかどうか、小型肝細胞におけるア

ルブミンとAnxⅢの同時免疫組織染色により検討中である。また、インビボで発ガン物質等の投与により肝幹細胞が増殖することが知られているが、このような系における肝幹細胞でのAnxⅢの発現についても検討中である。今回肝幹細胞として小型肝細胞に着目して検討を行ったが、肝臓由来のもので小型ではないが肝幹細胞としての表現型を有するもの、小型ではあるが我々が解析を行った小型肝細胞との異同が明確でないもの、骨髄由来の肝幹細胞等様々な種類の肝幹細胞の存在が知られている。今後ヒト肝幹細胞の品質評価への応用を目指して、これら肝幹細胞についてもAnxⅢの発現を検討する必要がある。

1.2. ヒト軟骨細胞の分化に及ぼす液性因子等についての評価

自家移植の軟骨移植は、軟骨欠損の再生のために整形外科の治療において一般的に行われる処置である。新鮮な自家移植の軟骨の供給は限られているため、in vitroでの軟骨組織の増幅と誘導法の開発が精力的に行われている。いくつかの成長因子は軟骨細胞の代謝や分化を制御していることが知られている。本研究において、FeSO₄単独やbFGFとの組み合わせによって軟骨細胞の分化が有意に促進され、両者とも細胞増殖はcontrolレベルを保っていた。形態的には、FeSO₄、特にbFGFとの組み合わせによって、ECM産物がcontrolに比べ多いことが示された。またalcian blueを用いても確認することができた。FeSO₄単独やbFGFとの組み合わせがin vitroにおける軟骨細胞分化を促進させることを見出したが、同様な効果がin vivoにおいても示されるかどうかは、今のところ明らかではない。

FeSO₄による細胞増殖と分化の影響の検討は本研究が初めてである。さらに、ヒトの膝関節の軟骨細胞に対してもFeSO₄処理によって同様の分化促進作用を見出している (data not shown)。ただし、細胞増殖については本研究結果とは逆に、促進させる作用があった。

FeSO₄による軟骨形成促進作用は、以下のように考えられる。硫酸イオン分子がアデノシン5'-ホスホ硫酸 (APS) を形成するためにATPと相互作用し、さらに硫酸イオン分子が3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸 (PAPS) の蓄積に相互作用する。PAPSは活性型の硫酸であり、コンドロイチン硫酸転移酵素がPAPSの硫酸基をコンドロイチン中のN-アセチルガラクトサミンへ転移しコンドロイチン硫酸を形成する。プロテオグリカン中には、コンドロイチン硫酸が多量に存在している。このため、FeSO₄がAPSやPAPSの蓄積のための硫酸の供給物となり、最終的にプロテオグリカンを形成するのではないかと推察した。本研究で用いた硫酸は硫酸第一鉄のみであるが、硫酸第一鉄の形での鉄は通常貧血の治療のために使用されており、すでにヒトが副作用なく大量の硫酸第一鉄を消費できることが明らかにされている。本研究では、ヒト軟骨細胞の組織工学におけるFeSO₄の有効性を初めて明らかにすることができた。

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、新たに開発したPEI磁気ビーズによるウイルス濃縮法の機構解析を行い、陽イオン解離基を高密度に持つPEIが濃縮に有用であること、抗体が同時に濃縮されることなどを明らかにした。また、これらの解析結果の応用として抗ウイルス抗体を添加して

ウイルス濃縮を行うことでさらなる高感度化が可能なることを明らかにした。さらに、PEI 磁気ビーズはヒトウイルスである HBV や HCV の濃縮にも適応可能であることを明らかにした。

(2) 複数の STR マーカーを組合わせてマイクロサテライト多型を検出することにより、細胞の同一性等の確認試験に非常に有用であることを明らかにすることができた。また、STR マーカーを利用することにより細胞亜株間の遺伝的変異も検出可能なことを示すことができ、細胞の変異を検出するのに有用な手法となり得る可能性が示された。

(3) 細胞特性評価の一環として、サイトカインアレイの細胞由来タンパク質プロファイリングへの有用性を評価するために、モデル細胞及び血管内皮前駆細胞等への適応について解析した。サイトカインアレイは細胞が産生するサイトカインの網羅的解析を可能とし、簡便・迅速性にも優れていることを明らかにした。しかし、細胞特性解析法として用いるには、定量性や個々のサイトカインの検出感度の評価等のさらなる改良が必要であることも明らかになった。

(4) 細胞治療の有効成分としてのタンパク質プロファイル評価と糖鎖修飾を含むタンパク質の特性解析法としてタンパク質のトリプシン消化物を LC/MS/MS で分析する手法の開発を行い、タンパク質一次構造、糖鎖結合部位、及び部位特異的糖鎖構造の解析が可能なることを示した。

CapGCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法をマウス腎臓から N-グリコナーゼで切り出した糖鎖解析に適用し、その有用性を明らかにした。これらの方法を利用することによって、細胞・組織機能の本体であるタ

ンパク質や、細胞の様々な機能を調節している糖鎖の評価を基本とした細胞・組織利用医薬品の特性・品質評価が可能になると思われる。

(5) ポリ-L-乳酸 (PLLA) による BALB/cL マウスのがん系を用いて非常に初期の皮下細胞においてギャップジャンクション依存性細胞間情報伝達及びコネキシン遺伝子の発現の抑制と TGF- β の産生能の亢進が見られることを明らかにし、がん化の予測指標となる可能性を示唆することができた。

(6) また、テロメア結合タンパク質 (TRF1) が細胞の不死化と密接に関連することを明らかにすることができ、TRF1 が細胞のがん化指標として非常に有用であることを示された。

(7) 新たに開発した免疫隔離膜を用いてドナー骨髄細胞とレシピエントリンパ球細胞との *in vitro* での相互作用の解析を行い、新規免疫隔離膜を用いることにより、ドナー細胞の生存率の上昇とレシピエントリンパ球による拒絶反応時によって惹起されるサイトカインの産生等を抑制することが可能であることを示した。これらの結果より、開発した免疫隔離膜を用いることにより細胞性免疫反応を起こさず移植する細胞によって引き起こされる可能性のある液性免疫の評価が可能なることが確認された。

(8) 細胞治療の有効成分としての目的タンパク質の分離および MALDI-TOF-MS の高感度化のために磁性ナノ粒子が有用であることを明らかにし、目的タンパク質の体内動態解析への有用性を示唆した。さらに、トランスフェリンやポリエチレングリコール等の高分子をあらかじめマトリックスに添加することにより質量分析の高感度化が可能なることを明らかにした。

(9) ヒト血液幹細胞から血管内皮前駆細胞への分化誘導系の解析より、血管内皮前駆細胞の細胞指標として、CD31に加えLox-1やコネキシン37、コネキシン40が有用であることを明らかにした。

(10) マウス胚性腫瘍細胞P19細胞をモデルに、神経細胞および心筋細胞に効率的に分化させる技術を確立した。種々の分化マーカーの解析から、神経細胞に分化誘導したP19細胞は主としてニューロンに分化することが明らかになった。2次元電気泳動によるプロテオーム解析より、分化誘導過程初期から変動のあるタンパク質を見だし、これらの誘導初期に発現してくるタンパク質が神経前駆細胞の特性指標になる可能性が示された。また、P19細胞のサブクローンCL6細胞の心筋細胞分化モデルとしての特性を明らかにする目的で、CL6細胞から自動能を持つ心筋様細胞に分化させた細胞の心筋マーカー遺伝子の発現、蛍光抗体染色、および活動電位の検討を行い、心筋様細胞の表現型は、幼若度の高い心房筋細胞に類似した特徴を持つことを初めて明らかにした。

(11) 小型肝細胞に特異的なアネキシンⅢの発現は転写レベルで制御されていることを明らかにし、肝幹細胞指標としての有用性が確認された。(11) ヒトの関節の軟骨細胞(HAC)の増殖や分化に及ぼす塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)と硫化第一鉄(FeSO₄)の影響について検討を行い、FeSO₄がHACの軟骨形成への顕著な促進効果を持つことを初めて明らかにした。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表及び著書

- 1) Yuka Okada, Naoki Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Tadanori Mayumi, Nobuyasu Mizuno : An investigation of adverse effects caused by the injection of high-doseTNFa-expressing adenovirus vector into established murine melanoma, *Gene Ther.* **10**, 700-705 (2003)
- 2) Fuminori SAKURAI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA: Efficient gene transfer into human CD 34⁺ Cells by an Adenovirus type 35 vector, *Gene Ther.* **10**, 1041-1048 (2003)
- 3) Naoya KOIZUMI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko Watabe-ISHII, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Takao HAYAKAWA: Generation of Fiber-Modified Adenovirus Vectors Containing Heterologous Peptides in both HI Loop and C-terminus of the Fiber Knob, *J. Gene Med.* **5**, 267-276 (2003)
- 4) Kazufumi KATAYAMA, Koichiro WADA, Atsushi NAKAJIMA, Sachiko YOSHIDA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Shinsaku NAKAGAWA, Takashi KADOWAKI, Ryoza NAGAI, Yoshinori KAMISAKI, Richard S. BLUMBERG, Tadanori MAYUMI: A Novel PPAR γ -Gene Therapy to Control Inflammation Associated with Inflammatory Bowel Disease, *Gastroenterology*, **124**, 1315-1324 (2003)
- 5) Yuji Nagayama, Kazuhiko Nakao, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Masami Niwa: Enhanced antitumor effect of

- combined replicative adenovirus and non-replicative adenovirus expressing interleukin-12 in an immunocompetent mouse model, *Gene Ther.*, **10**, 1400-1403 (2003)
- 6) Tetsu KOBAYASHI, Shingo NIIMI, Toru KAWANISHI, Masamichi FUKUOKA, Takao HAYAKAWA: Changes of Peroxisome Proliferator-activated Receptor-regulated Gene Expression and Inhibin/Activin-follistatin System Gene Expression in Rat Testis After an Administration of Di-n-butyl Phthalate, *Toxicol. Letter*, **138**, 215-225 (2003)
- 7) Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Miyako OHTA, Takao HAYAKAWA: Microanalysis of N-linked Oligosaccharides in a Glycoprotein by Capillary Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Biochem.*, **316**, 15-22 (2003)
- 8) Yuji NAGAYAMA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Masami NIWA, Sandra M. McLachlan, Basil RAPOPORT: Prevention of Autoantibody-Mediated Graves'-like Hyperthyroidism in Mice with Interleukin-4, a Th2 Cytokine, *J. Immunol.*, **170**, 3522-3527 (2003)
- 9) Naoki OKADA, Yasushige MASUNAGA, Sayaka IYAMA, Takashi TSUDA, Naoki MORI, Akinori SASAKI, Yuka OKADA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Shinsaku NAKAGAWA, Tadanori MAYUMI, Takuya FUJITA, Akira YAMAMOTO : Murine Dendritic Cells Transduced with Human gp100 Gene by RGD Fiber-mutant Adenovirus Vectors Are Highly Efficacious in Generating Anti-melanoma, *Gene Ther.*, **10**, 1891-1902 (2003)
- 10) Zhi-Li Xu, Hiroyuki MIZUGUCHI, Tadanori MAYUMI, Takao HAYAKAWA : Woodchuck Hepatitis Virus Post-transcriptional Regulation Element Enhances Transgene Expression from Adenovirus Vectors, *Biochim Biophys Acta*., **1621**, 266-271 (2003)
- 11) T. Morioka, H. Koyama, H. Yamamura, S. Tanaka, S. Fukumoto, M. Emoto, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, I. Kojima, K. Takahashi, Y. Nishizawa : Role of H1-Calponin in Pancreatic AR42J Cell Differentiation into Insulin-producing Cells. *Diabetes.*, **52**, 760-766 (2003)
- 12) Zhi-Li Xu, Hiroyuki MIZUGUCHI, Tadanori MAYUMI, Takao HAYAKAWA: Regulated Gene Expression from Adenovirus Vectors: A Systematic Comparison of Various Inducible Systems, *Gene.*, **309**, 145-151 (2003)
- 13) R. Nakano, T. Nakagawa, S. Imazu, K. Katayama, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, Y. Tsutsumi, S. Nakagawa, T. Mayumi: A novel T7 system utilizing mRNA coding for T7 RNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 974-978 (2003)
- 14) Kita A., Uotani S., Kuwahara H., Takahashi R., Oshima K., Yamasaki H., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nagayama Y., Yamaguchi Y., Eguchi K.: Vanadate enhances leptin-induced activation of JAK/STAT

- pathway in CHO cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 805-809 (2003)
- 15) Itoh A., Okada T., Mizuguchi H., Hayakawa T., Mizukami H., Kume A., Takatoku M., Komatsu A., Hanazono Y., Ozawa K. A soluble CAR-SCF fusion protein improves adenoviral vector-mediated gene transfer to c-Kit-positive hematopoietic cells. *J. Gene Med.*, **5**, 929-940 (2003)
 - 16) Gao J-Q, Tsuda Y., Katayama K., Nakayama T., Yoshie O., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S.: Antitumor effect by interleukin-11 receptor α -locus chemokine/CCL27, introduced into tumor cells through a recombinant adenovirus vector. *Cancer Res.*, **63**, 4420-4425 (2003)
 - 17) Okada N., Masunaga Y., Okada Y., Iiyama S., Tsuda T., Matsubara A., Mori N., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A. Gene transduction efficiency and the state of maturation in mouse dendritic cells infected with conventional or RGD fiber-mutant adenovirus vectors. *Cancer Gene Ther.*, **10**, 421-431 (2003)
 - 18) Hiroyuki MIZUGUCHI, Zhi-Li Xu, Fuminori Sakurai, Tadanori MAYUMI, Takao HAYAKAWA: Tight positive regulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing both the rtTA and tTS expression cassettes in separate genome regions. *Hum. Gene Ther.*, **14**, 1265-1277 (2003)
 - 19) Abiru N., Sun F., Kawasaki E., Yamasaki H., Oshima K., Nagayama Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Miao D., Liu E., Eisenbarth G.S., Eguchi K. *In vivo* expression of B:9-23 peptide/I-A^{b7} complex may abrogate the inhibition of diabetes induced by RGD-fiber-mutant adenovirus in NOD mice. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1005, 218-221 (2003)
 - 20) Kunihiko Tanaka, Shinichiro Towata, Kazuhiko Nakao, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Masami Niwa¹, Nobuko Ishii, Yuji Nagayama : Thyroid Cancer Immuno-Therapy with Retroviral and Adenoviral Vectors Expressing Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor and Interleukin-12 in a Rat Model, *Clinical Endocrinology*, **59**, 734-742 (2003)
 - 21) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITO, Takao HAYAKAWA: Analysis of glycopeptides and glycoproteins by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Methods Molecular Biology*, **251**, 263-274 (2003)
 - 22) Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Takahashi K., Hayakawa T., Mayumi T., Mizuno N. Optimization of antitumor efficacy and safety of *in vivo* cytokine gene therapy using RGD fiber-mutant adenovirus vector for preexisting murine melanoma. *Biochim. Biophys. Acta*, **1670**, 172-180 (2004)
 - 23) Kazufumi Katayama, Koichiro Wada, Hiroyuki Miyoshi, Kozo Ohashi, Masashi Tachibana, Rie Furuki, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Atsushi Nakajima, Takashi Kadowaki, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Yoshinori Kamisaki, Tadanori Mayumi ; RNA interfering approach for clarifying PPAR γ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA, *FEBS Lett* , 560,

- 178-182 (2004)
- 24) Nakamura T., Peng K-W., Vongpunsawad S., Harvey M., Mizuguchi H., Hayakawa T., Cattaneo R., Russell S.J. Antibody-targeted cell fusion, *Nature Biotech.*, 22, 331-336 (2004)
- 25) Okada N., Gao J-Q., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Anti-tumor activity of chemokine is affected by both kinds of tumors and the activation state of the host's immune system: implications for chemokine-based cancer immunotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317, 68-76 (2004)
- 26) Toru KAWANISHI, S. ISHIZAKI, N. KAWASAKI, R. SHIBAYAMA, Hiroshi. KAWAI, H. OHATA, K. MOMOSE, Takao HAYAKAWA, Abnormal fluorescence spectra of carboxy SNARF-1 acetoxymethyl acetate ester-loaded hepatocytes -Biotransformation of Carboxy SNARF-1, a pH probe- *Pflugers Archiv. Eur. J. Physiol* (in press)
- 27) Gao J-Q, Alexandre L.S., Tsuda Y., Katayama K., Eto Y., Sekiguchi F., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakayama T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Tumor-suppressive activities by chemokines introduced into OV-HM cells using fiber-mutant adenovirus vectors. *Pharmazie.*, 59, 238-239 (2004)
- 28) Jun OKABE, Akiko EGUCHI, Renu WADHWA, Randeep RAKWAL, Rumi TSUKINOKI, Takao HAYAKAWA and Mahito NAKANISHI: Limited Capacity of the Nuclear Matrix to Bind Telomere Repeat Binding Factor TRF1 May Restrict the Proliferation of Mortal Human Fibroblasts, *Human Molecular Genetics*, (in press)
- 29) 水口裕之、早川堯夫；アデノウイルスベクター：Mebio、21(4)、8-16 (2004)
- 30) Eto Y., Gao J-Q, Sekiguchi F., Kurachi S., Katayama K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Neutralizing antibody evasion ability of adenovirus vector induced by the bioconjugation of MPEG-SPA. *Biol. Pharm. Bull.*, (in press)
- 31) Masashi HYUGA, Satsuki ITO, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Akiko ISHII, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Analysis of Site-Specific Glycosylation in Recombinant Human Follistatin Expressed In Chinese Hamster Ovary Cells, *Biologicals*, (in press)
- 32) 早川堯夫：我が国発のゲノム創薬基盤研究への期待、ヒューマンサイエンス、14、3 (2003)、(財) ヒューマンサイエンス振興財団、東京
- 33) 早川堯夫：品質 (Quality) 分野[バイオ]、ICH 6 最前線 -国際調和の新潮流-、日刊薬業別冊、特別企画、pp.137-144 (2003)、(株) じほう、東京
- 34) 早川堯夫：米国における新薬開発の動向、大阪医薬品協会会報、662、1-18 (2004)
- 35) 早川堯夫；バイオ創薬の新たな展開と効果的な推進に向けて、*Drug Delivery System*, 19(2), 18 (2004)
- 36) 早川堯夫：“臨床試験 2003” バイオテクノロジー応用医薬品、内藤周幸編、薬事日報社、東京(2003) pp.155-179
- 37) 水口裕之、早川堯夫:遺伝子機能解析のための遺伝子導入ベクター -ウイルスベク

- ターを中心として-, 蛋白質核酸酵素, 48, 1653-1662 (2003)
- 38) 水口裕之、早川堯夫: アデノウイルススペクター: 最近の進歩、分子細胞治療, 2, 200-207 (2003)
- 39) 早川堯夫: バイオ創薬におけるレギュラトリーサイエンスの新展開、衛研報告, 121, 128-143 (2003)
- 40) 早川堯夫: バイオテクノロジー応用医薬品、臨床試験、内藤周幸編、pp.155-179 (2003)、薬事日報社、東京
- 41) 早川堯夫、永田龍二: 細胞・組織加工医薬品・医療機器の品質管理, Clinical Neuroscience (in Japanese) 21(10), 1195-1197 (2003)
- 42) 川崎ナナ、橋井則貴、伊藤さつき、日向昌司、川西 徹、早川堯夫: LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによるグライコム解析. 生物物理化学, 48, 5-10 (2004)
- 43) 早川堯夫、永田龍二: バイオリジクスの品質と安全性評価、薬の安全性 (長尾 拓編)、pp.33-51 (2004) 南山堂、東京
- 44) 早川堯夫、石井明子: バイオ医薬品の現状と将来、*J.Integrated Med.*, 14(2), 142-143 (2004)
- 45) 早川堯夫、石井明子: 組換え医薬品、薬学教科書シリーズ (日本薬学会編)、東京化学同人、東京 (印刷中)
- 46) Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography/ mass spectrometry, *J. Electrophoresis*, 48, (2004) 印刷中
- 47) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, and Takao HAYAKAWA: Analyses of glycoproteins and glycopeptides by liquid chromatography/mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Methods Molecular Biology*, 251, HPLC of Peptides and Proteins, Edited by M. I. Aguilar, 263-274 (2003)
- 48) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. *Biochem. Pharmacol.* 66:133-140, 2003
- 49) Iwata,A., Satoh,K., Murata,M., Hikata,M., Hayakawa,T., Yamaguchi,T.; Virus concentration using sulfonated magnetic beads to improve sensitivity in nucleic acid amplification tests. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1065-1069 (2003)
- 50) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Hayakawa T: CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells. *J Cell. Physiol.* 195:119-129, 2003.
- 51) Niimi, S., Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Harashima, M., Seki, T., Ariga, T.,

- Kawanishi, T., Hayakawa, T.: Specific expression of annexin III in rat small hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 300, 770-774 (2003)
- 52) Iwata, A., Satoh, K., Yamaguchi, T., Tomoda, A.; Antiviral activity of 2-amino-4,4a-dihydro-4a,7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one on polyiovirus. *Tbhoku J. Exp. Med.* 200, 161-165, 2003
- 53) Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Suzuki, K., Yamamoto, Y., Hayakawa, T.; Possible Involvement of Optimally Phosphorylated L-plastin in Activation of Superoxide Generating NADPH Oxidase. *J. Biochem.*, 134, 827-834 (2003)
- 54) Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T. Characterization of in vitro and in vivo gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector. *Mol. Ther.*, 8, 813-821 (2003)
- 55) Koizumi, N., Mizuguchi, H., Sakurai, F., Yamaguchi, T., Watanabe, Y., Hayakawa, T.; Reduction of natural adenovirus tropism to mice liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and α 5 β 1 integrin-binding ablation. *J. Virol.* 77, 13062-13072 (2003)
- 56) Satoh, K., Iwata, A., Murata, M., Hikata, M., Hayakawa, T., Yamaguchi, T.; Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Virol. Methods*, 114, 11-19, 2003
- 57) Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Iwata, A., Nagata, R., Satoh, K., Fan, K., Murata, M., Mizuguchi, H., Kawasaki, N., Kawanishi, T., Yamaguchi, T., Hayakawa, T.; Detection of Replication-Competent Adenoviruses Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR Combined with Glass Beads-Based DNA Extraction. *Mol. Therapy*, 8, 1009-1016 (2003)
- 58) Tomofumi Fujino, Yoji Sato, Mizuho Une, Toshie Kanayasu-Toyoda, Teruhide Yamaguchi, Koichi Shudo, Kazuhide Inoue, and Tomoko Nishimaki-Mogami; In vitro farnesoid X receptor ligand sensor assay using surface plasmon resonance and based on ligand-induced coactivator association. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* In press
- 59) Xu, Z., Mizuguchi, H., Sakurai, F., Koizumi, N., Hosono, T., Kawabata, K., Watanabe, Y., Yamaguchi, T., Hayakawa, T. : Approaches to Improving the kinetics of adovirus-delivered genes and gene products. *Adv Drug Del Rev.* In press.

- 60) 川西 徹、松木 滋、品質に関するトピックの動向 -Q5E:バイオ医薬品のコンパナビリティ-、医薬品研究、34, 508-512 (2003)
- 61) Tetsu Kobayashi, Hiroshi Kawai, Takuo Suzuki, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa, Improved sensitivity of insulin in MALDI-TOF MS by premixing matrix CHCA with transferrin, *Rapid Communication in Mass Spectrometry* (in press)
- 62) 山口照英、内田恵理子：生物薬品のウイルス安全性を目的とした核酸増幅検査 (NAT) のフィージビリティースタディー。医薬品研究、34, 763-769 (2003)
- 63) Gotoh Y, Niimi S, Hayakawa T, Miyashita T, Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocytes attachment. *Biomaterilas* 2004:25 1131-1140
- 64) Zhan L, Sakamoto H, Sakuraba M, Wu de S, Zhang LS, Suzuki T, Hayashi M, Honma M., Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat Res.*, 557, 1-6. (2004)
- 65) Yamada K, Suzuki T, Hakura A, Mizutani T, Saeki K.: Metabolic activation of 10-aza-substituted benzo[a]pyrene by cytochrome P450 1A2 in human liver microsomes. *Mutat Res.* 557, 159-165. (2004)
- 66) Thybaud V, Dean S, Nohmi T, de Boer J, Douglas GR, Glickman BW, Gorelick NJ, Heddle JA, Heflich RH, Lambert I, Martus HJ, Mirsalis JC, Suzuki T, Yajima N.: In vivo transgenic mutation assays., *Mutat. Res.*, 540, 141-151 (2003)
- 67) Itoh T, Kuwahara T, Suzuki T, Hayashi M, Ohnishi Y.: Regional mutagenicity of heterocyclic amines in the intestine: mutation analysis of the *cII* gene in lambda/lacZ transgenic mice, *Mutat. Res.*, 539, 99-108. (2003)
- 68) 鈴木孝昌：変異原性 (イニシエーター) から見たリスク評価. *Environ. Mutagen. Res.*, 25, 181-186 (2003)
- 69) 鈴木孝昌：トランスジェニックマウス変異原性試験の有用性に関する研究. *Environ. Mutagen. Res.*, 25, 119-125 (2003)
- 70) 土屋利江「図解 再生医療工学」 「第7章 再生医療とその周辺 再生医療をとりまく規制とその現状・今後」を分担執筆 (2004)印刷中
- 71) 土屋利江 細胞組織医療機器等の製品化のためのガイドライン・環境整備について、高分子、53巻、3月号 (2004) 144-146
- 72) 土屋利江 細胞組織医療機器等の品質・安全性確保について、再生医療 3巻、2月号 (2004) 107-110
- 73) Nagahata. M, Tsuchiya, T. et. al. A novel function of N-cadherin and Connexin43 :Marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed with sulfated hyaluronan. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun. in press.
- 74) Matsuoka A., Tsuchiya T. Gene expression changes in Balb/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane film. *J. Biomed. Mater. Res.* in press.
- 75) 柳楽 勤、土屋利江、メカニカルストレスに対する細胞応答の分子機構、生体物理刺激と生体反応、フジテクノシステム 印刷中
- 76) Okada E., Komazawa, Y., Kurihara, M., Inoue H., Miyata N., Okuda H., Tsuchiya T., Yamakoshi Y., Synthesis of C60 derivatives for photoaffinity labeling. *Tetrahedron Letters*, in press.
- 77) Tsuchiya T., A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products., *ASTM* in press.
- 78) Haishima Y., Hasegawa . C., Yagami T., Tsuchiya T., Matsuda, R., Hayashi Y., Estimation of uncertainty in kinetic-colorimetric assay of bacterial endotoxin. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 32, 495-503 (2003).
- 79) Katakura Y, Nakata E, Tabira Y, Miura T, Teruya K, Tsuchiya T, Shirahata S, Decreased tumorigenicity in Vivo When Transforming Growth Factor β Treatment Causes Cancer Cell Senescence, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 815-821, (2003)
- 80) Ahmed S and T Tsuchiya, Different expression on Gap junctional protein connexin43 in two strains of mice after one-month Implantation of Poly-L-Lactic acid. *Animal cell technology*, accepted.
- 81) Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya, Evaluation of the cornea cells affected by multi-purpose solutions for contact-lens. *Animal cell technology*, accepted.
- 82) Rahman MS, Bunu Y, Matsuoka A, Ichikawa A, Sakai M, Ikeda H, Tsuchiya T, Evaluation of the immuno-protective effects of the new-type of bags using elisa and facs-analysis. *Animal cell technology*, accepted
- 83) Tsuchiya T, Sakai M, Ikeda H, Mashino T, Banu Y, Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method. *Animal cell technology*, in press.
- 84) Tsuchiya T, Ikarashi Y, Uchima T, Doi H, Nakamura A, Ohshima Y, Fujimaki M, Toyoda K, Kobayashi E, Yoneyama T, and Hamanaka H, A method to monitor corrosion of chromium iron alloys by monitoring the chromium ion concentration in urine. *Mater Trans.* in press.
- 85) Yang J, Ichikawa A, Tsuchiya T, Change of the cellular function by connexin gene transfection in a hepatoma cell line. *Animal cell technology*, in press 18. Yang J,

- Ichikawa A, Tsuchiya T, A novel function of connexin32: marked enhancement of liver function in a hepatoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 307, 80-85.
- 86) Nakamura A, Kanazawa Y, Sato H, Tsuchiya T, Ikarashi Y, W H.D Jong, K E. Andersen, B B. Knusen, Ebaluation of Allergic Potential of Rubber Products: Comparison of Sample Preparation Methods for the Testing of Polymeric Medical Devices. *J Toxicology*, 2003, 22, 169-185
- 87) Nakaoka R, Tsuchiya T, Nakamura A, Neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films. *J Biomed Mater Res*, 2003, 64A, 439-446
- 88) Nakagawa Y, Murai T, Hasegawa C, Hirata M, Tsuchiya t, Yagami T, Haishima Y, Endotoxin Contamination in Wound Dressings Made of Natural Biomaterials. *J. Biomedical Materials Research Applied Biomaterials*, 2003, 66B, 347-355
- 89) Isama K, T Toshie, Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*, 2003, 24, 3303-3309
- 90) Taizo Sumide and Toshie Tsuchiya, Effect of multi-purpose solutions (MPS)for hydrogel contact lenses on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes. *J. Biomedical Materials Research Applied Biomaterials*, 2003, 64B, 57-64
- ## 2. 学会発表
- 1) 早川 堯夫：バイオ医薬品の製法変更における諸問題：日本動物細胞工学会研究会 (2003.4)
 - 2) 高 建青, 形山和史, Soares, A.L., 水口裕之, 早川 堯夫, 中山隆志, 義江 修, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作：ケモカイン及びサイトカイン発現アデノウイルスベクターの併用による癌遺伝子治療の最適化, 日本薬剤学会第 19 年会 (2003.4)
 - 3) 小泉直也, 増山 茜, 近藤昌夫, 藤井まき子, 水口裕之, 早川 堯夫, 中島恵美, 宇都口直樹, 渡辺善照：ヒト胎盤由来細胞へのアデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率の検討, 日本薬剤学会第 19 年会 (2003.4)
 - 4) 早川 堯夫：バイオロジクスの進展に向けて：バイオロジクスフォーラム第 1 回学術集会(2004.2)
 - 5) 川崎ナナ, 早川 堯夫：LC/MS を用いた糖鎖のプロファイリングと構造解析. 第 53 回電気泳動学会シンポジウム (2003 年, 大阪)
 - 6) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 蜂須賀暁子, 橋井則貴, 澤田純一, 川西 徹, 早川 堯夫：2次元電気泳動及び LC/MS を用いた糖ライコーム解析. 科学研究費補助金特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第一回夏期シンポジウム (2003 年, 浜松)

- 7) 川崎ナナ：糖タンパク質の質量分析. 横浜バイオテクノロジー懇談会平成15年度第1回リカレント講座「マススペクトロメトリーとプロテオミクス—蛋白質研究の最前線」(2003年, 横浜)
- 8) Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Jin Yuan, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Akiko Ishii, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Isotope tag method for quantitative oligosaccharide analyses by LC/MS. 第76回日本生化学会大会 (2003年, 横浜)
- 9) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Masashi Hyuga, Toru Mawanishi, Takao Hayakawa: Oligosaccharide profiling of cell membrane by LC/MS. 第76回日本生化学会大会 (2003年, 横浜)
- 10) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Analysis of IgLON family protein in rat brain by gel electrophoresis and capillary LC/MS. 第76回日本生化学会大会 (2003年, 横浜)
- 11) Kayoko Takagi, Reiko Teshima, Haruyo Okunuki, Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa, Jun-ichi Sawada: Digestive stability and allergenic potential of chicken egg white ovomucoid and their pepsin-fragments. 第76回日本生化学会大会 (2003年, 横浜)
- 12) Akiko Ishii-Watabe, Edwin Chang, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa, John Cooke: Transcriptional profiling in nicotine-treated human microvascular endothelial cells. 第76回日本生化学会大会 (2003年, 横浜)
- 13) 川崎ナナ:糖鎖関連医薬品の現状と課題. 第3回糖鎖科学名古屋拠点研究会(2004年, 名古屋)
- 14) 川崎ナナ:糖タンパク質性医薬品の質量分析. 日本薬学会第124年会(2004年, 大阪)
- 15) 橋井則貴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 日向昌司, 川西 徹, 早川堯夫:糖鎖プロファイリングを用いた差異解析に基づくグリコーン解析. 日本薬学会第124年会(2004年, 大阪)
- 16) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 蜂須賀暁子, 手島玲子, 澤田純一, 川西 徹, 早川堯夫:2次元電気泳動とLC/MSを用いたラット脳内 GPI アンカー型タンパク質の解析. 日本薬学会第124年会(2004年, 大阪)
- 17) 原園 景, 川崎ナナ, 川西 徹, 早川堯夫:LC/MS/MSによる apolipoprotein B100の部位特異的糖鎖構造解析. 日本薬学会第124年会(2004年, 大阪)
- 18) 藤野智史、宇根瑞穂、豊田淑江、山口照英、井上和秀、最上(西巻)知子:表面プラズモン共鳴センサーを用いた核内受容体 FXR リガンド結合の測定. 日本薬学会123年会. (2003. 3. 23, 長崎)
- 19) Kanayasu-Toyoda, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Uchida, E., Hayakawa, T. and Yamaguchi, T: Role of PKC α on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. The 6th World Congress on Inflammation. (2003. 8. 5 Vancouver, Canada).
- 20) Kanayasu-Toyoda, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Uchida, E., Hayakawa, T. and Yamaguchi, T Role of PKC α on G-CSF

- signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. 第 76 回日本生化学大会. (2003. 10. 16、横浜)
- 21) Fujino T, Sato Y, Une M, Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Shudo K, Inoue K and Nishimaki-Mogami T.: In vitro FXR ligand sensor assay using surface plasmon resonance and based on ligand-induced coactivator association. 第 76 回日本生化学大会. (2003. 10. 17、横浜)
- 22) 有川稔多加、豊田淑江、山口照英、小村健、早川堯夫、森田育男；血管内皮細胞化に伴う各種コネクシンの発現変化 第 24 回日本炎症・再生医学会. (2003. 11. 26、京都)
- 23) 小林 哲、河合 洋、鈴木琢雄、川西 徹、早川堯夫：MALDI-TOF MS におけるタンパク質のシグナル増強、日本薬学会第 124 年会、大阪 (2004, 3)
- 24) 小林 哲、河合 洋、鈴木琢雄、川西 徹、早川堯夫：Protein signal enhancement in MALDI-TOF MS、第 52 回質量分析総合討論会、名古屋 (2004, 6)
- 25) Watanabe, K., Ono, K., Miyazawa, H., Kikuchi, Y., Yamaguchi, T., Shimizu, S., and Sato, Y. : Myosin isoform expression in murine embryonal carcinoma cells after cardiac differentiation. 第 76 回日本薬理学会年会 (2003 年 3 月)
- 26) Mori, S., Ishida, S., Shinozaki, Y., Sawada, J., Miyazawa, H., Yamaguchi, T., Inoue, K. and Sato, Y. : Microarray analysis of thyroid hormone actions in rat aortic smooth muscle cells. 第 76 回日本薬理学会年会 (2003 年 3 月)
- 27) 渡邊圭、小野景義、宮澤宏、木内祐二、山口照英、清水俊一、佐藤陽治：心筋へ分化した胎児性癌化細胞の表現型の検討 第 123 回日本薬学会年会 (2003 年 3 月)
- 28) 宮澤宏、山口照英：P19 細胞神経分化誘導時のタンパク質プロファイルの解析 第 26 回日本分子生物学会年会 (2003 年 12 月)
- 29) Niimi S, Oshizawa T, Yamaguchi T, Harashima M, Seki T, Ariga T, Kawanishi T, Hayakawa T, Specific expression of annexin III in rat small hepatocytes. 第 76 回 日本生化学会大会 (2003 年 10 月)
- 30) Harashima M, Nagaoka Y, Niimi S, Seki T, Ariga T, Kawanishi T, Hayakawa T, The mechanism of inhibition of dexamethasone-dependent induction of tyrosine aminotransferase activity by lactacystin, a proteasome specific inhibitor. 第 76 回 日本生化学会大会 (2003 年 10 月)
- 31) 新見伸吾、押澤 正、山口照英、原島 瑞、関泰一郎、有賀豊彦、川西 徹、早川堯夫、ラット肝細胞におけるアネキシンⅢの特異的な発現 第 10 回 肝細胞研究会 (2003 年 7 月)
- 32) 原島 瑞、新見伸吾、長岡陽子、関泰一郎、有賀豊彦、川西 徹、早川堯夫、初代培養ラット肝細胞においてプロテアソーム特異的阻害剤であるラクタシスチンはグルココルチコイド依存的なチロシンアミノトランスフェラーゼの誘導を阻害する第 10 回 肝細胞研究会 (2003 年 7 月)

- 月)
- 33) 土屋利江:「医療機器及び細胞組織医療製品の安全性・有効性の基本的な考え方」
2nd BMC-NIMS シンポジウム 平成 16 年 3 月 つくば
- 34) 土屋利江:「再生医療のための細胞の評価と標準化」 第 4 回分子・細胞医療における ME 研究会 平成 16 年 2 月 東京
- 35) Toshie Tsuchiya : Standards and guidelines for the second development of the medical devices and tissue engineered products. High-level workshop on international standards for medical technologies 2004. 2. Geneva, Switzerland
- 36) 土屋利江:「医療機器、細胞組織医療機器の製品化のための規制環境の整備について」 日中シンポジウム 平成 16 年 2 月 北京、中国
- 37) 土屋利江:「再生医療実用化への課題」 第 3 回再生医療学会総会「再生医療フォーラム」 平成 16 年 3 月 幕張
- 38) 土屋利江:「医療機器、細胞組織医療機器の製品化のための規制環境の整備について」 第 3 回再生医療学会総会パネルディスカッション 平成 16 年 3 月 幕張
- 39) 土屋利江:「細胞間結合機能の評価」 第 3 回再生医療学会 NEDO サテライトシンポジウム 平成 16 年 3 月 幕張
- 40) 鈴木寿子、土屋利江、吉原なみ子: コラーゲンスポンジを用いたバイオヒト皮膚モデルにおける HIV-1 検出法の検討 第 17 回日本エイズ学会 平成 15 年 11 月
- 41) Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya : Effect of the catalyst used in the biodegradable polymers on chondrogenesis of human articular cartilage 第 3 回再生医療学会総会 平成 16 年 3 月 幕張
- 42) 柳楽勤、土屋利江、阿部康次、長幡操: 陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞及びヒト間葉系幹細胞の分化促進効果 第 3 回再生医療学会総会 平成 16 年 3 月 幕張
- 43) 澤田留美、土屋利江、伊藤友実、松田良枝、松岡厚子: ヒト幹細胞を用いた細胞組織医療機器の安全性評価に関する研究 (1) 第 3 回再生医療学会総会 平成 16 年 3 月 幕張
- 44) Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya : Studies on the different tumorigenic activities of PLLA between two strains of mice 第 3 回再生医療学会総会 平成 16 年 3 月 幕張
- 45) Jun Yang, Toshie Tsuchiya : Enhancement of E-cadherin expression and liver functions of HepG2 in alginate gel 第 3 回再生医療学会総会 平成 16 年 3 月 幕張
- 46) 松岡厚子、配島由二、長谷川千恵、土屋利江: 医療材料関連物質による核内倍加の誘発 第 32 回日本環境変異原学会 平成 15 年 11 月 津
- 47) Sadami Tsutsumi and Toshie Tsuchiya: Recent Japanese regulations for tissue engineered medical products and trials for evaluation of their mechanical properties. 2nd Japanese-Swiss Workshop on Biomaterials 2003. 11. Tsukuba
- 48) 土屋利江:「組織工学材料と細胞組織医療機器の標準化: 国際的な動向とわが国の

- 現在・近未来について」 第3回日本バイオマテリアル学会シンポジウム 平成15年9月 札幌
- 49) 伊佐間和郎、配島由二、土屋利江：ガンマ線照射コラーゲンの骨芽細胞に及ぼす影響 第25回日本バイオマテリアル学会大会 平成15年12月 大阪
- 50) Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya : The different effects of PLLA plates on surrounded tissues between two strains of mice 第25回日本バイオマテリアル学会大会 平成15年12月 大阪
- 51) Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Sadami Tsutsumi : Different action on the chondrogenesis of human articular chondrocytes with two types of hyaluronic acid 第25回日本バイオマテリアル学会大会 平成15年12月 大阪
- 52) 柳楽勤、土屋利江、阿部康次、長幡操：陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞の分化促進及び細胞間連絡機構抗進効果 第25回日本バイオマテリアル学会大会 平成15年12月 大阪
- 53) バヌーナスリン、土屋利江：起源の異なるヒアルロン酸のヒト軟骨細胞の増殖と分化に及ぼす相反する効果 第6回日本組織工学会大会 平成15年6月 東京
- 54) 柳楽勤、スーザンマチュー、山越葉子、土屋利江：正常ヒト皮膚繊維が細胞のギャップ結合細胞間連絡機能に及ぼす温度応答性ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドの促進効果 第6回日本組織工学会大会 平成15年6月 東京
- 55) 柳楽勤、土屋利江、阿部康次、長幡操：陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞の分化促進効果 第6回日本組織工学会大会 平成15年6月 東京
- 56) 土屋利江：医療機器に関連した薬事法改正と有効性・安全性・品質確保の考え方について 第133回日本金属学会2003年秋季大会 平成15年10月 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2001-311484 ギャップ機能亢進剤

特願 2001-311485 ギャップ機能抑制剤

特願 2002-78407 宿主内埋め込み用構造体および繁殖方法

特願 2003-8855 ギャップ機能抑制剤

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. リアルタイム PCR 及び RT-PCR によるウイルスゲノム定量に用いてプライマー及びプローブ

| | Primer and probe set |
|---------------|--|
| HSV-1 | 5'-GCGTCATGGTCATGGCAAG-3' 5'-TTGACTCTACGGAGCTGGCC-3' FAM-labeled 5'-TGGAGCTGATGCCGTAGTCGG-3' |
| Sindbis virus | 5'-CAGGACGTCTATAACGCTCC-3' 5'-GAGAACATGAACTGGGTGGTGTC-3' |
| HBV | 5'-ACTCTTGGACTCBCAGCAATG 5'-CTTTATACGGGTCAATGTCCA FAM-labeled 5'-CTTTTTACCTCTGCCTAATCATTTCWTGTCA |
| HCV | 5'-TGCGGAACCGGTGAGTACA 5'-CTTAAGGTTTAGGATTCGTGCTCAT FAM-labeled 5'-CACCTATCAGGCAGTAACCAC AAGGCC |

表2 PowerPlex16 STRマーカーの種類と染色体上の位置

| Dye | Fluorescein | | | | |
|----------------------|-------------|---------|-------------|---------|--------|
| STR marker | D3S1358 | TH01 | D21S11 | D18S51 | PentaE |
| Chromosomal location | 3p | 11p15.5 | 21q11-21q21 | 18q21.3 | 15q |

| Dye | JOE | | | | | |
|----------------------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|---------|
| STR marker | D5S818 | D13S317 | D7S820 | D16S539 | CSF1PO | Penta D |
| Chromosomal location | 5q23.3-32 | 13q22-q31 | 7q11.21-22 | 16q24-qter | 5q33.3-34 | 21q |

| Dye | TMR | | | | |
|----------------------|-------------------|------------|---------|------------|------|
| STR marker | Amelogenin | vWA | D8S1179 | TPOX | FGA |
| Chromosomal location | Xp22.1-22.3 and Y | 12p12-pter | 8q | 2p23-2pter | 4q28 |

表3 17番染色体上のオリジナルなSTRマーカー

| Dye | 6-FAM | | | |
|----------------------|---------|------------|------------|---------------|
| STR marker | 115B3 | THRA1 | 42D6 | AFM044 xg3 |
| Chromosomal location | 17p13.3 | 17p11.2-12 | 17p21.3-22 | 17qter |

| Dye | HEX | | |
|----------------------|------|---------------|---------------|
| STR marker | CHLC | AFM234 xc9 | AFM210 xa5 |
| Chromosomal location | - | 17q | 17qter |

| Dye | TET | | |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| STR marker | AFM248 yq9 | AFM107 yb8 | AFM049 xc1 |
| Chromosomal location | 17q21 | 17q | 17q |

表4 17番染色体STRマーカー増幅に用いたプライマー

| | | primer | primer sequence |
|-------------------|----|--------------|---------------------------|
| Teromere | 1 | 115B3-ca | AAAGATCCTTATTGCCACTTTACTG |
| | | 115B3-gt2 | CTCTTACCTTGCTGGTGAGATTG |
| Centroromere | 2 | THRA1-AC | CTGCGCTTTGCACTATTGGG |
| | | THRA1-TG | CGGGCAGCATAGCATTGCCT |
| | 3 | CHLC forward | GCCAACAGAGCAAGACTGTC |
| | | CHLC reverse | GGAAACAGTTAAATGGCCAA |
| | 4 | AFM248yg9a | GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG |
| | | AFM248yg9m | ACACAGACTTGTCTACTGCC |
| | 5 | 42D6-CA | CCTGGTCTAGGAAGAGTGTCA |
| | | 42D6-GT | GTGTAAGCATCTGTGTATACTAC |
| | 6 | AFM234xc9a | TCCACCTGTCCTGGTAAA |
| | | AFM234xc9m | AGTGCTGCGTCTTACAACCT |
| TK-1 (17q23.2) | 7 | AFM107yb8a | ACTCCAATCAAGTTTGTACTGAGA |
| | | AFM107yb8m | CTGCATACGAAGGGTAGGAC |
| | 8 | AFM049xc1a | ATCCCTGGAGAGTGAAAATG |
| | | AFM049xc1m | AAGGCCAACCTGAAAATAA |
| | 9 | AFM210xa5a | GCCACCTGCCCTCAA |
| | | AFM210xa5m | CTGCCAGCAGAGGCCA |
| | 10 | AFM044xg3a | GAGTCTCCTAAATGCTGGGG |
| | | AFM044xg3m | AGCTCCTGCACAGTTCTTAAATA |