

た。細胞播種2時間後(細胞の定着の時期)には、細胞が凝集することを示した。また、顕微鏡観察によりFeSO₄、特にbFGFとの組み合わせによって、ECM産物がcontrolよりも多いことが示唆された。この現象はalcian blueを用いて生化学的にも確認された。また、FeSO₄とbFGFとの組み合わせによる効果は相乗効果ではなく相加効果であったと思われる。本研究において、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。細胞培養に対するbFGFの効果についてはまだまだ議論の余地がある。ヒトの軟骨細胞においてbFGFがマトリックス合成に対して影響を与えないという報告もある。また、ヒトの鼻の中隔の軟骨においてもbFGFが細胞増殖を上昇させることはなかったと報告されている。本研究において、bFGFはHACの増殖をわずかに下げ、反対に分化をわずかに促進した。この結果は、bFGFが軟骨細胞の増殖を促進するというこれまでの報告とは異なる。しかし、本研究における分化の促進は、軟骨細胞欠損部へのbFGFの投与により軟骨細胞の分化とマトリックス合成が促進したという最近の報告と一致している。細胞の増殖や分化に対するbFGFの一定しない効果は、違う臓器や組織由来の軟骨を用いて検討していることが一因かもしれない。これまでに、bFGFの効果として、ヒトの耳の軟骨細胞の増殖は上げるが、ヒトの鼻の中隔の軟骨細胞では増加が見られない、といった報告もある。また、同じウサギ由来の肋骨と耳の軟骨を用いた実験で、その細胞増殖への

bFGFの効果が違うことも報告されている。bFGFの軟骨の増殖や分化に与える影響は、その添加量も関連している。低濃度のbFGF(10ng/mL)は軟骨のマトリックス産生を促進するが、高濃度(1000ng/mL)では阻害するという報告など、bFGFの添加濃度による違いが指摘されている。

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。発達段階や大人の軟骨中のコンドロイチン硫酸の局在とFeSO₄の軟骨細胞との関連に興味を抱き、本検討を行った。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増加した。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。一方、金属材料から放出される銀、

銅、水銀、ニッケルのようなイオンは、たとえ低濃度で使用しても有害な生物学的な影響を持つ。以上のように、FeSO₄の分化誘導反応と同時に生物学的な安全性から、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した。

5. マウス幹細胞の神経分化とテロメラーゼ活性との関係についての評価

神経幹細胞は、未分化状態を維持したまま、無限に増殖できるという自己複製能を有している。さらに、神経幹細胞は、中枢神経系を構成する3種類の細胞（ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト）へと分化することも出来るため、今後の中枢神経系の再生医療への応用において、大きな可能性を秘めていると考えられている。しかしながら、神経幹細胞を大量に、かつ均一な未分化集団として調製することは必ずしも容易ではなく、神経幹細胞の詳細な分化系譜についてはほとんど明らかにされていない。従って、現在、神経幹細胞の増幅や分化を維持する因子の同定、ならびにその制御メカニズムを解明することが非常に重要な研究課題となっている。本研究では、マウス神経幹細胞（SFME細胞）の分化系譜におけるテロメラーゼ活性の制御機構について解析を行った。一般に、未分化幹細胞、生殖細胞及び癌細胞のように無限増殖能を有している細胞では、顕著なテロメラーゼの活性化が認められる。そこで、未分化状態のSFME細胞におけるテロメラーゼの活性化レベルをTRAPアッセイにより測定したところ、高度のテロメラーゼ活性が検出された。この結果は、SFME細胞には無限増殖能が潜在的に備わっていることを示唆している。実際に、SFME細胞

は無血清培養下では、老化あるいはクライシス（細胞死滅）を抑えることなく、未分化状態を維持したまま長期にわたって継代培養を行うことが出来ることが確認されている。すなわち、このSFME細胞における無限寿命性はテロメラーゼの活性化によって保護されているものと考えられる。また、本実験から、TGF- β 刺激によってSFME細胞がアストロサイトへと分化することも示された。また、これまでもSFME細胞は、血清の添加によりアストロサイトへ分化することも報告されている。以上のことにより、SFME細胞は、神経幹細胞の分化制御機構を解明する上で、汎用性の高いモデル細胞となることが期待される。

神経幹細胞はさまざまな因子に応答して、前駆細胞を経てニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへと分化する。また、この神経前駆細胞の分化誘導時には、テロメラーゼ活性が減退するという事も確認されている。これらの報告と一致して、TGF- β によりアストロサイトへと分化したSFME細胞においても、テロメラーゼ活性の著しい抑制が示された。即ち、神経幹細胞の分化に伴ったテロメラーゼ活性の低下は、その細胞に分化とともに有限寿命が付与されたことを意味しており、やがては細胞老化を迎えるものと推測される。一般に、アストロサイトは種々のサイトカイン（IL-1 β , IL-6など）を分泌し、神経細胞を保護していると考えられている。従って、アストロサイトの分裂加齢に伴った機能変化は、非分裂細胞である神経細胞の生存維持にも異常をきたし、脳の老化進行に影響を与えるものと考えられる。今後、神経細胞の老化メカニズムを研究する上でも、ア

ストロサイトの有限寿命化に関する分子機構解明が必要になると考えられる。また、同時に、*mTERT*の発現も TGF- β により抑制されることが示された。さらにこのアストロサイトへの分化に伴う *mTERT*の発現抑制は、主に転写レベルで制御されていることもプロモーターアッセイの結果により判明した。以上の結果より、TGF- β によるテロメラーゼ活性の抑制は、*mTERT*の発現抑制と相関していることが示唆された。最近、Armstrong らは、分化に伴った *mTERT*の発現抑制には *c-myc*の発現低下が関与しているかもしれないと報告している。しかしながら、*mTERT*の転写抑制への *c-Myc*の直接的関与については未だ証明されていない。本実験からも、アストロサイトへ分化した SFME 細胞における *c-myc*の発現量は、著しく低下していたことが確認された。さらに、*mTERT*プロモーター領域内には、2つの *c-Myc*結合部位 (E-box) が存在していることも確認された。それ故に、SFME 細胞の分化に伴った *c-myc*の発現低下が誘因となって *mTERT*の転写が抑制されたのではないかと推測される。しかしながら、この点に関しては確証を得るまでには至っておらず、今後、神経幹細胞の分化に伴う *mTERT*転写抑制と *c-Myc*との相関についてさらなる解析が必要になると考えられる。

以上の結果より、TGF- β はヒト肺がん細胞株 (A549細胞)のみならず神経幹細胞 (SFME 細胞)においても、テロメラーゼ活性ならびにテロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。即ち、TGF- β のシグナル伝達系は、テロメラーゼ活性を特異的に抑制し、その

細胞へ有限寿命を付与させるのではないかと推察される。しかしながら、神経幹細胞の分化に伴ったテロメラーゼ活性の抑制機構については、単にその現象を捉えただけに過ぎず、さらなる解析が必要になると考えられる。今後、この分野における研究がさらに進展すれば、神経幹細胞の増殖、分化を維持している因子の同定ならびにその機構解明へ向けて大きく貢献できると期待される。

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研究

コラーゲンスポンジにより作製した *in vitro* バイオヒト皮膚モデルを用いて 10^{0-5} 個の HIV 感染細胞汚染時の細胞動態の観察及び HIV-1 検出を行うことができた。RT-PCR 法では、HIV は10個の OM10.1 接種後3日目から検出され、P24 抗原検出法の千倍の感度を示した。さらに一個から数個の OM10.1 接種で6日目に HIV を検出できた。以上の結果より、*in vitro* バイオヒト皮膚モデルによる実験方法は組織工學品のウイルス検出検査に応用可能であろうと考えられた。

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

BALB/cJ マウスの皮下に PLLA を埋植した後の早い段階で、TGF- β_1 の分泌レベルの増加に依存してギャップ結合タンパク質 Cx43 の発現が抑制された結果、GJIC の機能が低下した。それと同時に Cx43 mRNA の発現が腫瘍形成し易い BALB/cJ マウスでは抑制されたのに対し、腫瘍形成しにくい SJL/J マウスでは抑制されないことを見

出した。in vitro の BALB/cJ マウス細胞において TGF- β ₁ もまた Cx43 mRNA の発現及び GJIC 機能を抑制することも判明した。以上の結果は、PLLA による腫瘍形成の新しいメカニズムを示すであろう。この様に、発癌に対する感受性の違う 2 つのマウスの系統間での PLLA 埋植による作用の違いを初めて明らかにした。

3. in vitro 系での免疫隔離膜の機能に関する研究

同種間の臓器や組織移植後の免疫反応の軽減に対する SPU コーティングの有効性についてラットのリンパ球を用いた in vitro の系で検討した。その結果、SPU コーティングがドナー細胞の生存率を高めることを示した。また、レシピエントリンパ球の TNF- α と IFN- γ の産生量が免疫隔離膜の SPU コートにより減少傾向を見出した。さらに、CD4 陽性と CD8 陽性のレシピエントリンパ球細胞の数もまた、SPU コートによって上昇する傾向を見出した。以上のことから、SPU コートによってドナーとレシピエントのリンパ球間の免疫反応を最小限に抑えていると考えられ、SPU コートが移植時における拒絶反応を抑制するのに役立つ可能性を見出した。

4. 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

ヒト軟骨の培養において FeSO₄ が軟骨形成を促進させる可能性を見出した。その分化誘導反応と同時に生物学的な安全性から、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した。今後は in vivo における FeSO₄ の時間依存的、濃度依存的な効果についても検討していく必要があるであろう。また、初代の未分化細胞へ

の影響や、他の分子との相互作用なども検討すべきであろう。

5. マウス幹細胞の神経分化とテロメラーゼ活性との関係についての評価

TGF- β は SFME 細胞のアストロサイトへの分化誘導を促す共に、SFME 細胞のもつテロメラーゼ活性をも低下させることが判明した。すなわち、無限増殖性の SFME 細胞に有限寿命が付与されたことを示唆している。さらに TGF- β によるテロメラーゼの活性抑制は、*mTERT* の発現低下に伴って誘導された現象であることが示唆された。また、テロメラーゼの活性化に重要とされている *c-myc* の発現も、TGF- β 処理によって低下していたことが示され、テロメラーゼ活性の減退は、*c-myc* の発現低下に依存して誘導された現象であると推定された。また、*mTERT* プロモーター領域内には *c-Myc* の結合部位 (E-box) が 2 つ存在していたことも判明した。TGF- β による *mTERT* の発現抑制は、*c-myc* の発現低下に起因した *mTERT* 転写抑制機構によって誘導された現象であるものと考えられる。以上の結果より、TGF- β による *mTERT* の発現抑制は、主に転写レベルで誘導されていること、さらにはこの転写抑制には、少なくとも *c-myc* の発現低下が関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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

2. 土屋利江「医療材料・医療機器の安全

- 性と生体適合性」を編集 (2003. 11)
3. 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
4. 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
5. 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.
6. 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.
7. 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
8. 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.
9. Tsuchiya T., A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products., *ASTM* in press.
10. 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).
11. 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).
12. 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.
13. Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya, Evaluation of the cornea cells affected by multi-purpose solutions for contact-lens. *Animal cell technology*, accepted.
14. 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
15. 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
16. 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.

17. 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
 19. 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
 20. 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
 21. 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
 22. 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
 23. 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. 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
 2. 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
 3. 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
 4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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

8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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
22. 柳楽勤、スーザンマチュウ、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

23. 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

24. 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得予定

特願 2001-311484 ギャップ機能亢進 2.

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

協力研究者

澤田 留美

(国立医薬品食品衛生研究所 療品部)

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 細胞制御学教室)

吉原なみ子

(国立感染症研究所 エイズ研究センター)

図1. ヒト皮膚繊維芽細胞(NHDF)とOM10.1の
添加培養における細胞増殖

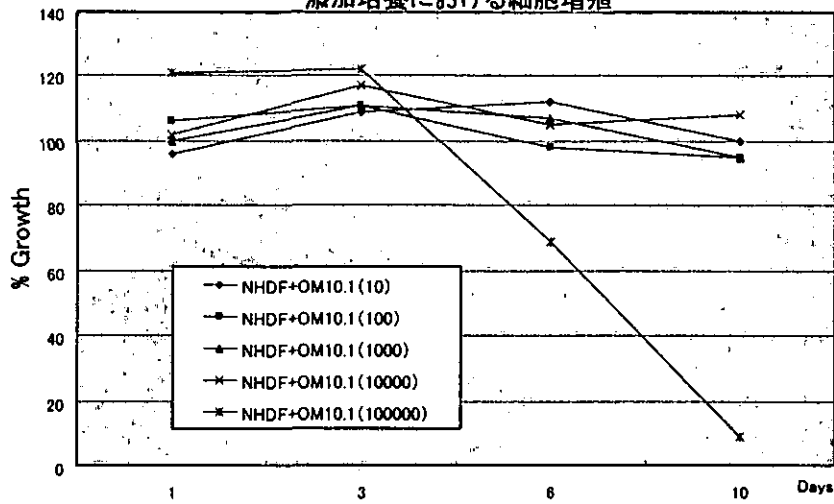


図2. バイオヒト皮膚モデル(HDM)+OM10.1 における細胞増殖

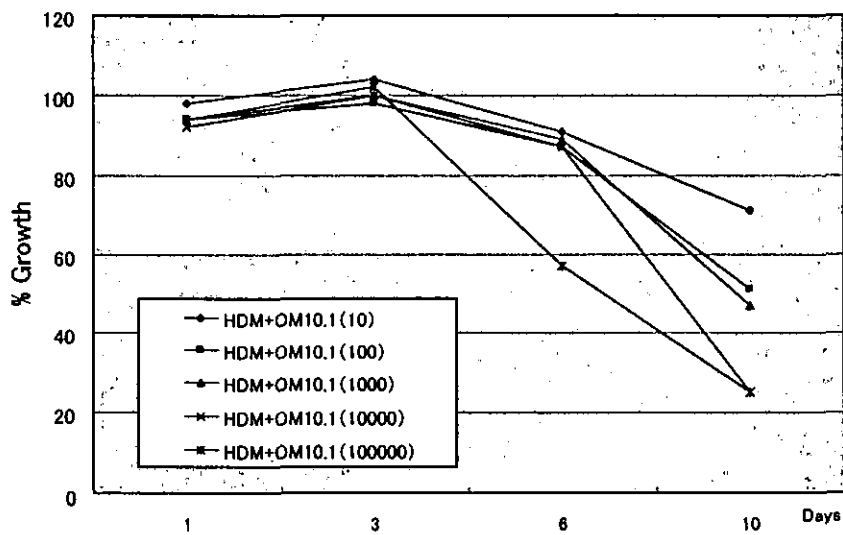


図3. HDM+OM10.1における細胞増殖

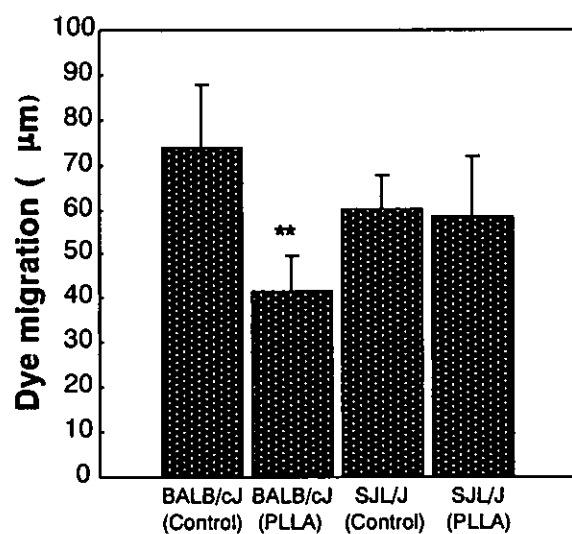
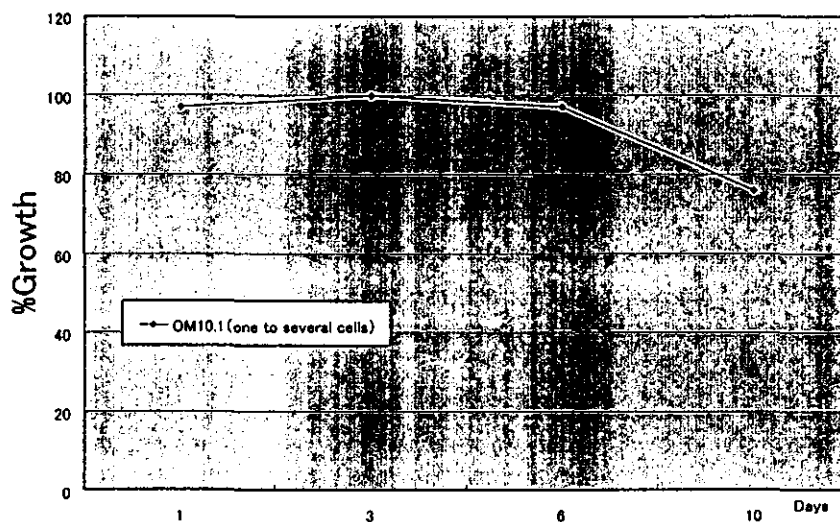


図4 ギャップ結合細胞間連絡機能(GJIC)に対するPLLA埋植の影響

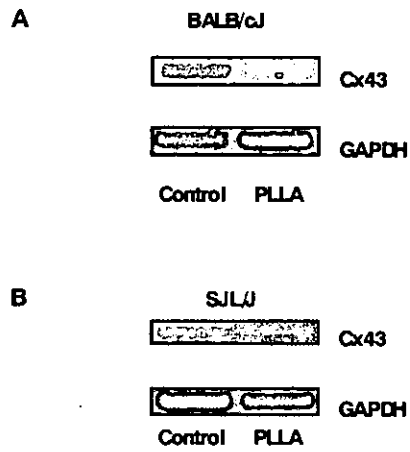


図5 コネキシン43(Cx43)のmRNA発現レベル

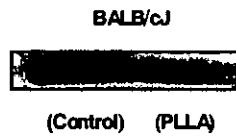


図6 コネキシン43(Cx43)のタンパク質レベル

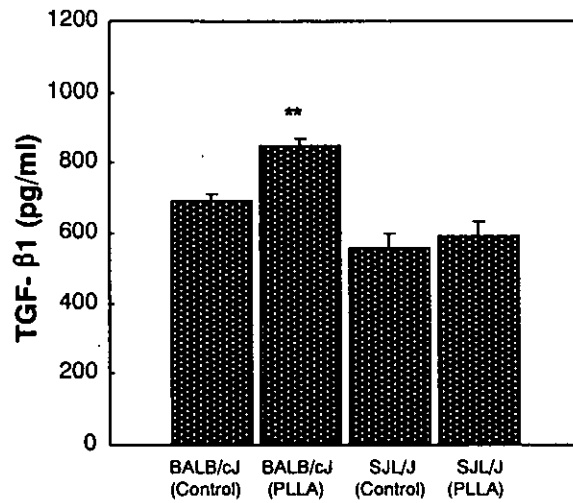


図7 TGF-β分泌に及ぼすPLLA埋植の影響

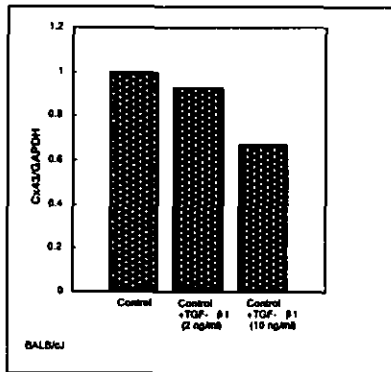
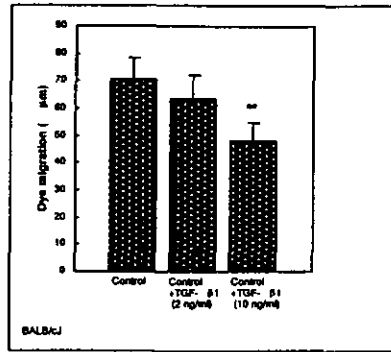


図8 細胞間情報伝達機能(GJIC)とCx43 mRNA発現に及ぼすTGF-βの影響

Cell Viability Assay

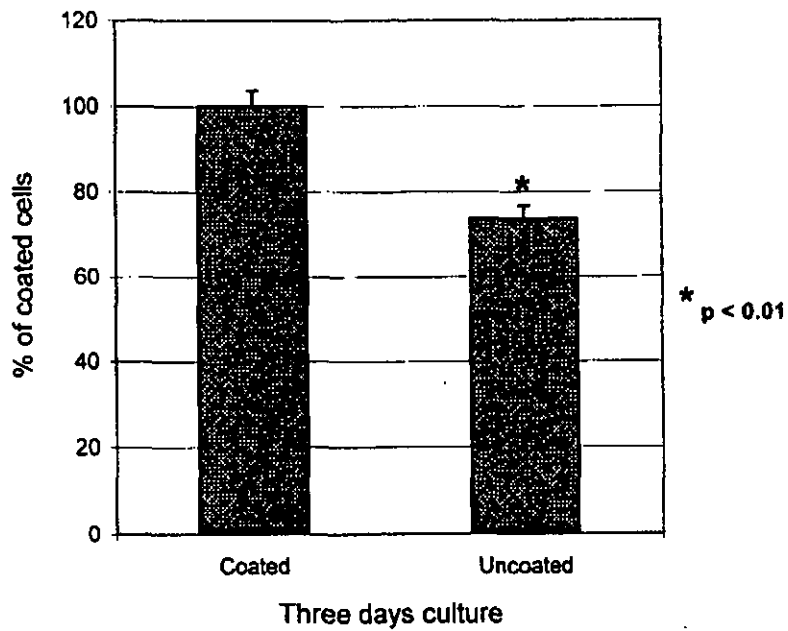


図9 骨髓リンパ球(BML)細胞の生存率

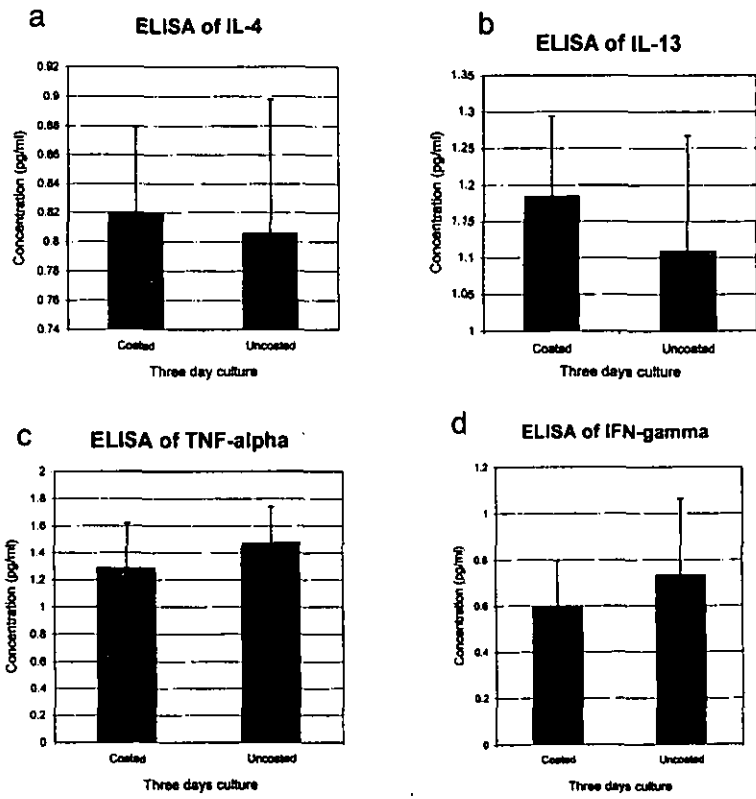


図10 リンパ球細胞中のサイトカイン産生

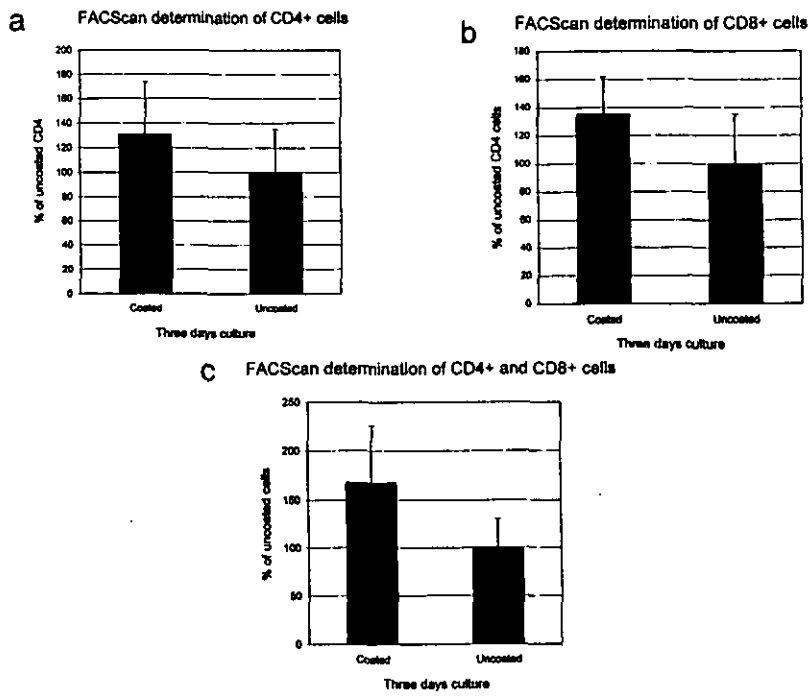


図11 リンパ球細胞中のCD4陽性細胞とCD8陽性細胞の測定

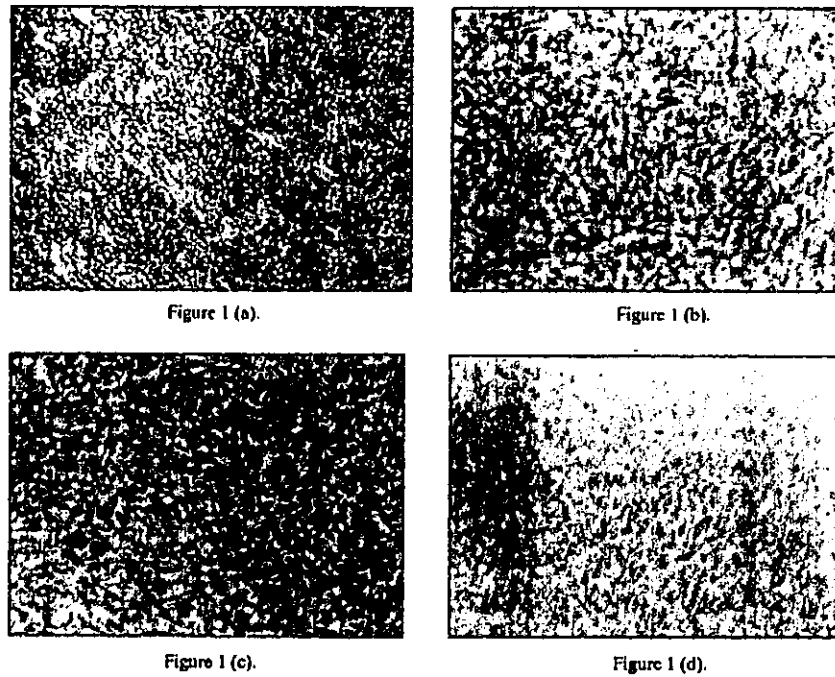


図12 ヒト軟骨細胞の形態に及ぼす液性因子等の影響

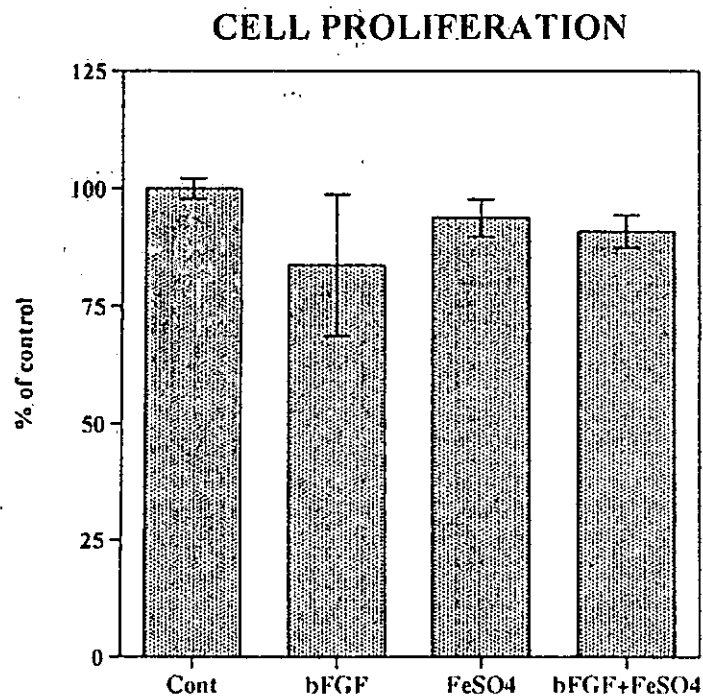


図13 ヒト軟骨細胞の増殖に及ぼす液性因子等の影響について

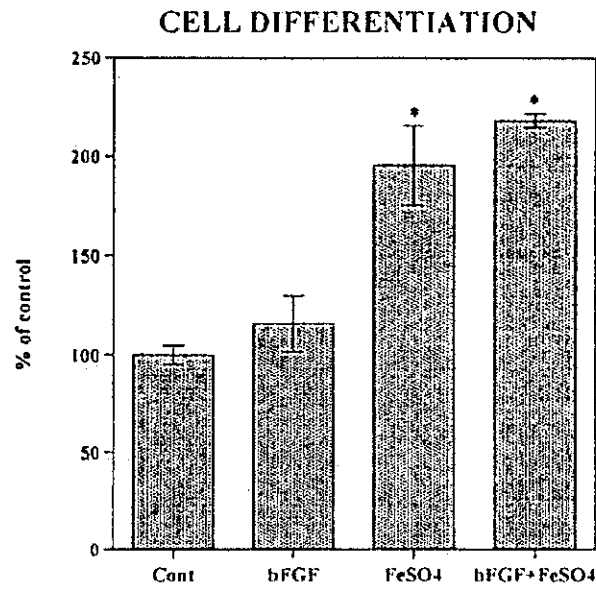


図14 ヒト軟骨細胞の分化に及ぼす液性因子等の影響について

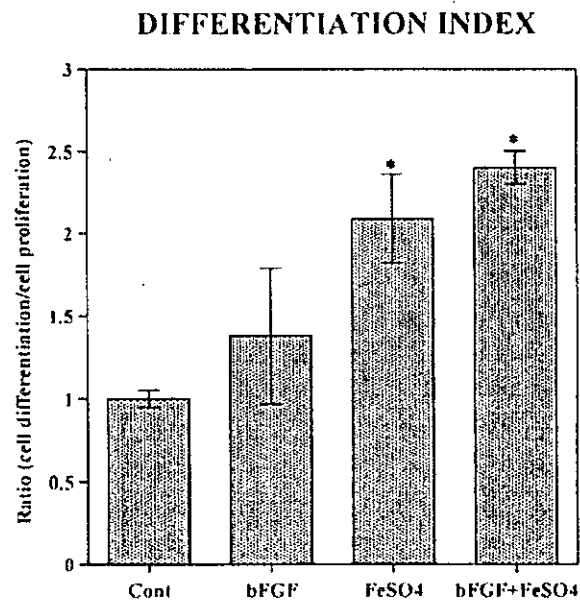


図15 細胞の分化index

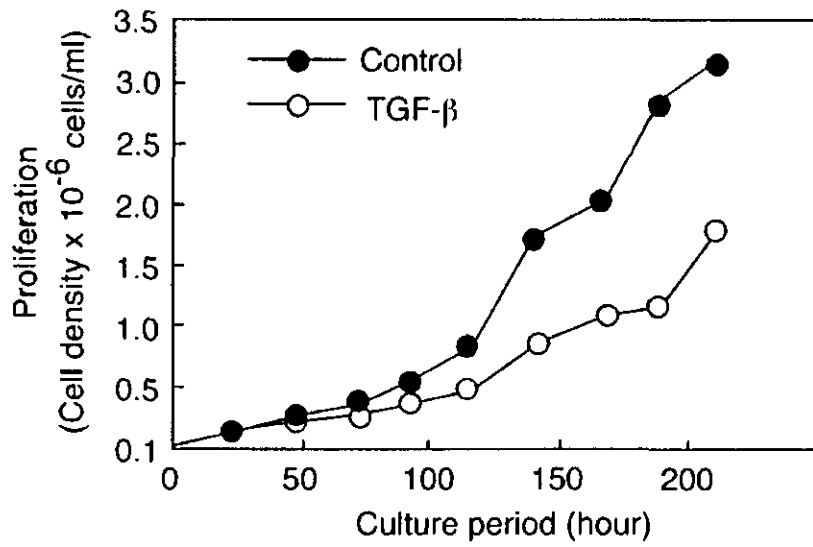


図16 SFME細胞の増殖に及ぼすTGF-βの影響

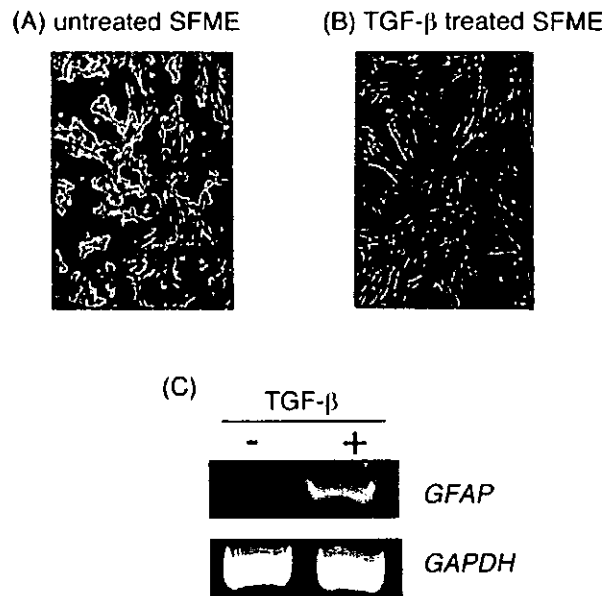


図17 TGF-β処理によるSFME細胞への影響



図18 SFME細胞におけるテロメラーゼ活性に及ぼすTGF- β の影響

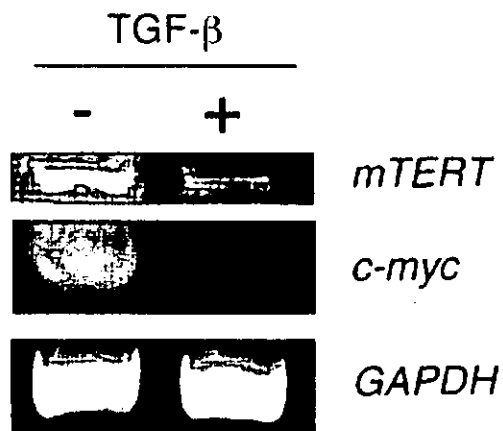


図19 mTERT及びc-myc発現に及ぼすTGF- β の効果

表2. In vitro のバイオヒト皮膚モデル(HDM) におけるOM10.1の HIV-1p24Agと RT-PCR

days after culture (cells)	1		3		6		10	
	p24Ag	PCR	p24Ag	PCR	p24Ag	PCR	p24Ag	PCR
1. OM10.1 (10 ¹)	0.3	-	0.3	+	0.4	-	0.3	-
2. OM10.1 (10 ²)	0.4	-	0.4	+	0.4	+	0.4	+
3. OM10.1 (10 ³)	0.4	+	0.6	+	0.6	+	1.6	+
4. OM10.1 (10 ⁴)	0.6	+	4.1	+	5.1	+	3.1	+
5. OM10.1 (10 ⁵)	3.6	+	11	+	15.5	+	11.7	+

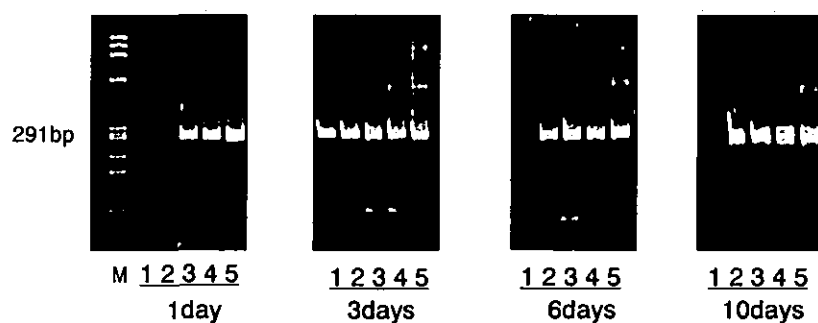


表3. バイオヒト皮膚モデル(HDM)+OM10.1 におけるRT-PCR の結果
(one to several cells)

days after culture	1	3	6	10
HIV positive rate	0/10	0/10	2/10	0/10

細胞タンパク質プロファイル評価技術の開発

分担研究者： 川崎ナナ （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第一室長）

協力研究者： 原園 景 （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

協力研究者： 橋井則貴 （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

研究要旨 本研究は細胞組織利用医薬品の特性・品質解析法として、プロテオミクス・グライコミクスの手法を用いた細胞組織タンパク質プロファイル評価技術、糖鎖プロファイル評価技術、及び目的タンパク質の特性解析技術の開発を目的としている。本年度はまず、細胞タンパク質のトリプシン消化物を LC/MS/MS で分析することによる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の開発を行い、 α フェトプロテインとセルロプラスミンの一次構造、糖鎖結合部位、及び部位特異的糖鎖構造の解析、及びヒト血清タンパク質のプロファイリングと血清中ハプトグロビン由来糖ペプチドの解析に成功した。つぎに、前年度開発した CapGCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法の細胞組織利用医薬品の糖鎖プロファイル評価法としての実行可能性を探るため、マウス腎臓から N-グリカナーゼで切り出した糖鎖のプロファイリングに応用し、腎臓に特徴的な糖鎖プロファイルが得られることを確認した。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と思われる。

A. 研究目的

細胞組織利用医薬品の特性・品質解析として、全発現タンパク質のプロファイル評価、細胞組織の識別やタンパク質の機能調節に関与している糖鎖のプロファイル評価、並びに、活性本体である目的タンパク質の特性解析が重要である。我々はこれまで、プロテオミクス・グライコミクスのアプローチを利用した発現タンパク質のプロファイリング及び糖鎖部分を含む目的タンパク質の特性解析法の開発を行ってきた。プロテオーム解析方法の一つとして従来から、分離能に優れた 2 次元ゲル電気泳動法 (2D-GE) により発現タンパク質を分離し、ゲル内タンパク質を質量分析法 (MS) で同定する方法が用いられている。我々は、平成 12-14 年度本研究において、2D-GE を用いたタンパク質のプロファイル解析、

及びゲル内消化と LC/MS を用いた目的糖タンパク質の特性解析を検討し、モデル組織として用いたラット脳の目的タンパク質群のプロファイリングとゲル内タンパク質の糖鎖構造解析に成功した。

プロテオーム解析のもう一つの方法として、最近、2D-GE を使用せず、タンパク質の消化物を直接 LC/MS/MS で解析する方法が注目されている。2D-GE を用いた場合に比べゲルからの回収操作がないため、簡便且つ少ないサンプル量でタンパク質同定ができるという利点がある。しかし、現在のところ、糖鎖を含む翻訳後修飾されたタンパク質の同定及び翻訳後修飾の解析ができるまでには至っておらず、実際、プロテオミクスの分野において、糖タンパク質の解析は取り残されているのが現状である。

本年度我々は、2D-GE を使わず、細胞発現タンパ