

などで目的タンパク質を精製した後に 2D-GE を行うのが一般的であるが、今回用いたサンプルのように難溶性タンパク質を含む場合は同様の方法を利用することができない。今回示した SDS-PAGE による粗精製、及びゲル染色とレクチンプロットを同一ゲルで行うことはゲル-PVDF 膜間の matching 精度を高めるために非常に有用であると考えられる。

以上のように、CapGCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法によって、従来のプロテオミクス的手法では困難であった細胞発現糖タンパク質糖鎖の差異解析が可能となった。さらに 2D-GE 及びレクチンプロットを組み合わせることによって、目的糖タンパク質の同定が可能であることが実証された。

(3) グライコフォーム解析

2D-GE によるグライコフォーム解析とゲル内糖タンパク質の糖鎖解析

2D-GE はタンパク質発現解析の手法として最もよく用いられている方法、最近では、複数の蛍光色素を利用した 2D-DIGE などが注目を集めている。しかし、前述したように、糖タンパク質の場合、2D-GE においてグライコフォームが分離された train 状スポットとして現れるため、発現解析が複雑となる。従来のプロテオミクス的手法では、どのスポットを分析・検索しても同じタンパク質が同定されるだけで、スポットの変化、すなわちグライコフォーム分布の変化と疾患の関係に関する情報を得ることはできない。2D-GE によってグライコフォームのプロファイリングを行い、ゲル内糖タンパク質の糖鎖構造を明らかにすることができれば、疾患関連糖タンパク質の同定だけでなく、疾患と糖鎖の関係の解明にもつながると考えられる。

一般に 2D-GE とクマシーブルー (CBB) 染色によって検出可能な糖タンパク質量は 1 μ g 程度といわれているが、ゲルからの回収率や操作中の損失等を考慮に入れると、サブマイクログラムのタンパク質に由来する糖鎖を解析できる分析システムが必要となる。我々は、前述した GCC-LC/MS を用いた糖鎖

プロファイリング法のゲル内糖タンパク質糖鎖解析における可能性を調べ、細胞由来糖タンパク質のグライコフォームプロファイリングと糖鎖構造解析に利用した。

1) ゲル内糖タンパク質糖鎖の解析

エリスロポエチンには 3 本の N 結合型糖鎖が結合し、糖鎖は分子全体の 40% を占めている。糖鎖の大部分はシアル酸が複数結合した比較的大きな酸性糖鎖である。2 μ g のエリスロポエチンを SDS-PAGE で展開し、ゲル内 PNGase F 消化により糖鎖を切り離し、超音波処理により糖鎖を抽出した。NaBH₄ 還元糖鎖を CapGCC-LC/MS で分析したところ Fig. 23(A)(2) のような糖鎖プロファイルが得られ、ゲルから抽出された EPO の糖鎖の分離パターンは、泳動前の分離パターン (Fig. 23(A)(2)) とほぼ同様であることが確認された。また、ピーク面積比から、ゲル内糖タンパク質の約 60% の糖鎖が回収されていることが明らかになった。

つぎに、エリスロポエチンよりも分子量が大きく、中性糖鎖である高マンノース型を含む 3 本の N 結合糖鎖が付加しているヒト黒色腫細胞産生ヒト組織プラスミノゲンアクチベータ (t-PA) を用いて同様の実験を行った。その結果、タンパク質や結合糖鎖の種類が異なっても、ゲル内糖タンパク質糖鎖を回収し、解析できることが確認された (Fig. 23(B))。

2) 2D-GE によるグライコフォーム解析とゲル内糖タンパク質の糖鎖解析

ラット脳を用いて 2D-GE によるグライコフォームプロファイリングとゲル内糖タンパク質の糖鎖解析を行った。細胞・組織中にはハウスキーピングタンパク質が多く存在し、抽出物をそのまま 2D-GE に添加した場合、それらの妨害により、目的糖タンパク質及びその関連タンパク質のプロファイルを作成できないケースが想定される。また、2D-GE にアプライできるサンプル量も限られていることから、対象タンパク質の特性に応じて粗分画を行っておく

必要がある。前述した CHO 細胞の場合は SDS-PAGE により粗分画を行ったが、ここでは脳に存在する GPI アンカー型糖タンパク質を分析対象とし、脱脂、非イオン性界面活性剤 Triton X-114 による膜画分の可溶化、Triton X-114 の温度依存性相分離による膜画分の回収、及び PIPLC 消化を行い、GPI アンカー型糖タンパク質を含む膜タンパク質可溶性部分を分画した (Fig. 24)。

可溶性膜タンパク質画分を 2D-GE で展開し CBB 染色したところ、Fig. 25(A) に示す泳動図が得られ、多数のスポットが確認された。ゲル片を切り出し、ゲル内トリプシン消化を行い、LC/MS/MS を用いた配列解析とデータベース検索を行った結果、Fig. 25(A) の通り同定された。50 kDa 付近に検出され、LAMP, NTM, OBCAM, 及び Kilon と同定されたタンパク質は、Ig ドメインを 3 個持つ GPI アンカー型タンパク質 IgLON スーパーファミリーと呼ばれるタンパク質で、主に神経組織に発現し、神経網形成等に重要な役割を担っていると考えられている。一次構造の相同性が高いことから、個々に単離するのは難しく、これまで糖鎖構造を含め詳細構造は明らかにされていなかった。今回、2D-GE を行うことによって、神経網形成に関連する一連のタンパク質のプロファイリングを行い、タンパク質同定を行うことができた。IgLON が多くのスポットとして検出されたのはグリコフォームが分離したためと考えられたので、LC/MS によって、グリコフォームの糖鎖構造を調べた。

代表例として、Fig. 25(B) に、あるスポットの糖鎖プロファイルを示す。各ピークの m/z 値をもとに糖鎖構造を解析した結果、主要なピークは、主に脳特異的に発現していることが報告されている BA-2 糖鎖であることが示唆された。その他、高マンノース型糖鎖 (M5, M6, M7, 及び M9)、ハイブリッド型、及び複合型糖鎖も検出された。検出された糖鎖の中には、フコースを 2 分子以上含むと推定されるものもあり、非還元末端側にフコース残基を持つことが示唆された。脳には Le^x 構造を有する糖鎖が

多く存在することが報告されており、今回の結果はそれらの報告によく一致している。また、硫酸基が結合していると推定される糖鎖も検出された。今回の手法を用いることによって、細胞、組織由来の糖タンパク質のグリコフォームのプロファイリングと各スポットの同定、及び糖鎖構造解析が可能であることが示された。

3) 2D-DIGE を用いた糖タンパク質の発現解析とゲル内糖タンパク質特性解析への応用

2D-GE を用いた定量的プロテオーム発現解析法として、前述したように 2D-DIGE が注目されている。我々は、この方法が糖タンパク質のグリコフォーム分布の変化、あるいは糖鎖の変化を捉えることができるかどうかを、再び GnT-III 遺伝子導入細胞を用いて評価した。ここでは、GnT-III 遺伝子導入 HepG2 細胞を用いた。

Fig. 26 は Cy3 標識した HepG2 膜画分、及び Cy5 標識 HepG2III 膜画分を 1 枚のゲルで同時に展開したものを、同時表示ゲル画像として示したものである。黄色のスポットは発現量がほぼ同一のタンパク質であり、赤または緑色のスポットは発現量が増加または減少しているタンパク質を示している。DIGE による発現タンパク質の差異解析では、ラベル化効率、蛍光検出感度の調節などの実験上のばらつきを考慮する必要がある。今回の実験のばらつきの検定を行った結果、HepG2 の 2S.D. は約 1.32 であり、HepG2III の 2S.D. は約 1.27 であった。そこで、2 種類のサンプル間で発現量差が 1.4 倍以上のスポットを GnT-III 遺伝子導入の影響により変化したスポットとして、それらのタンパク質の同定を行った。その結果、HepG2 に対して HepG2III の発現量が減少しているスポットは 133 スポット (5.3%)、増加しているスポットは 57 スポット (2.3%) であった。これらのスポットの中で特に変化の大きいスポットは No.539 (+2.26), 819 (-1.74), 1543 (-2.30), 1741 (-2.78) 及び 2151 (-2.21) であった (Fig. 26)。

次にこれらのスポットについて、LC/MS/MS によ

るタンパク質同定を試みた結果、トランスフェリン (No.539) , 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase (No.819) , アクチン (No.1543) , cytosolic malate dehydrogenase (No.1741) , 及び glutathione-s-transferase like (No.2151) と同定された。

ここで特に注目されるのは No.539 のスポットで、これはグライコフォームが分離したと思われる train スポットを構成するスポットの1つであると考えられた。トランスフェリンは肝臓で合成され、2箇所の鉄結合部位を有する分子量約 80 kDa の鉄輸送タンパク質で、健康人のトランスフェリンには主要な糖鎖として Asn-413 及び Asn-611 の2箇所にジシアロ複合型 2 本鎖糖鎖が結合している。一方、肝癌患者由来のトランスフェリンには bisected 複合型 2 本鎖糖鎖が結合していることから、GnT-III 活性と肝癌化の関連性が指摘されている。本研究ではコントロールとして HepG2 細胞を使用しているため、コントロールにも bisected 糖鎖を持つトランスフェリンが存在すると予測されるが、HepG2III では train 状スポットの中の No.539 のみ発現量が増加し、残りの train 状スポットについては逆に減少傾向がみられた。これは HepG2 細胞に GnT-III 遺伝子を導入することによって、糖鎖の不均一性に変化が生じていることを示唆しているものと考えられる。糖タンパク質の糖鎖には不均一性が存在し、正常細胞ではその不均一性は一定に保たれているが、ある種の疾患では不均一性に変化が生じることが知られている。DIGE システムは単にタンパク質の差異解析だけではなく、糖タンパク質のグライコフォームの定量解析にも有用であると考えられる。

(IV) 疾患関連タンパク質の機能解析に向けた遺伝子発現制御系の開発

遺伝子・タンパク質の機能解明は、DNA チップ、in silico 解析等によるトランスクリプトーム、プロテオーム解析などにより絞り込み、推定が行われているが、決め手となるのは、標的細胞や in vivo に候

補遺伝子を導入して発現させ、その機能を直接評価する実証的解析である。しかし、in silico、トランスクリプトーム、プロテオーム解析法の急速な進展に比し、実証的解析系の開発は極めて遅れている。これは適切な遺伝子導入・発現技術の開発が遅れているためであり、高効率の遺伝子導入活性を有し、目的遺伝子の発現を可逆的に、かつ定量的に調節し、細胞機能の変化を直接解析できる基盤技術の開発は極めて重要である。そこで、既存のベクターでは最も遺伝子導入効率が優れているとされているアデノウイルスベクターをベースにして、薬剤反応性の転写活性化因子の遺伝子とその応答配列を含んだプロモーターをもつ目的遺伝子を単一のベクターに搭載し、外的に加えた薬剤により目的遺伝子の発現制御が可能となるベクターシステムの開発を行った。

本年度は、分担研究者らがこれまでに開発済みのアデノウイルスゲノムの2領域あるいは3領域に同時に外来遺伝子を挿入できる発現制御型アデノウイルスベクターの更なる有効性、汎用性の拡大を目的に、発現誘導能に優れた tet-on 系の開発、第2世代の rITTA 遺伝子 (2nd generation rITTA ; rITTA 遺伝子) に数 bp の mutation が挿入) , および変異ファイバーを用いたベクターシステムの開発、およびその有用性の実証を行った。

発現誘導能に優れた tet-on システムを搭載したアデノウイルスベクターの開発については以下の点に改良を加えた。1) rITTA の発現レベルを上昇させ、2) テトラサイクリン制御性のサイレンサーである tTS を用いることで basal 活性を抑え、3) かつ単一のアデノウイルスベクターで3者(目的遺伝子、rITTA 遺伝子、tTS 遺伝子) の遺伝子を発現させることである。

1) については、E3 欠損領域に挿入した rITTA 発現単位 (CMV プロモーターにより制御されている) にイントロンAの配列を付与した。2, 3) については、3者(目的遺伝子、rITTA 遺伝子、tTS 遺伝子) の遺伝子を単一のベクターで発現させる様々なベクターを作製した。このため、まず3者の遺伝子をアデノ

ウイルスゲノムの異なった領域に独立に搭載できるトリプル遺伝子発現系からなるアデノウイルスベクターを開発した (Fig. 27). E1/E3 欠損領域に加え我々が注目した領域は E4 領域と 3' ITR の間の領域であり, この部位に制限酵素ユニーク部位の XbaI 部位を挿入した. 作製したベクタープラスミド pAdHM48 は E1 欠損領域に I-CeuI, SmaI, P1-SceI 部位を, E3 欠損領域に Csp45I 部位を, E4 領域と 3' ITR の間の領域に XbaI 部位を有しており, それぞれの領域に簡便な *in vitro* ライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用して外来遺伝子を挿入できる.

このシステムを利用して目的遺伝子 (ルシフェラーゼあるいは SEAP; テトラサイクリン誘導性プロモーターにより制御) を E1 欠損領域に, イントロン A を付与した rITA 遺伝子 (CMV プロモーターにより制御) を E3 欠損領域に, tTS 遺伝子 (EF1 α プロモーターにより制御) を E4 領域と 3' ITR の間の領域に同時に搭載させたアデノウイルスベクターを開発した. 本改良型 *tet-on* システムを搭載したアデノウイルスベクター (Ad-rITA-tTS-L, Ad-rITA-tTS-SEAP) は, レポーター遺伝子としてルシフェラーゼあるいは SEAP 遺伝子のどちらを用いても, 種々の細胞株で 60-2500 倍以上の高い遺伝子発現制御能を示した (Fig. 28-31). この遺伝子発現誘導能は, tTS 発現単位を有せず, E3 欠損領域に rITA 発現単位だけを有したベクター (AdOn-L4, AdOn-SEAP4) に比べ遙かに (1-2 オーダー) 優れていた. 一方, アデノウイルスゲノムの同一領域 (E1 あるいは E3 欠損領域) に IRES (internal ribosome entry site) 配列や両方向性プロモーターを用いて複数の外来遺伝子を搭載させたベクターでは高い発現制御能を示さず (Fig. 28, 29), 個々の遺伝子を独立に, 異なった領域で発現させることが重要なことが判明した.

さらなる発現誘導能の上昇を目的に変異 rITA の機能を検討した. 各ベクターの遺伝子発現・誘導特性を SK HEP-1 で検討したところ, tTS 遺伝子を有していない Ad-M2-SEAP4, Ad-S2-SEAP4 では, AdOn-SEAP4 と比較し顕著な変化は認められなかつ

た. 一方, tTS 遺伝子を有した Ad-rITA-tTS-SEAP, Ad-M2-tTS-SEAP, Ad-S2-tTS-SEAP では, オリジナルの rITA を用いた Ad-rITA-tTS-S に比べ, inducer であるドキシサイクリンに対して高い感受性を示し, 1-2 オーダー低いドキシサイクリン濃度で, SEAP の発現制御が認められた. 発現誘導能 (最大活性とバックグラウンド活性の比) に関しては, Ad-rITA-tTS-SEAP, Ad-M2-tTS-SEAP, Ad-S2-tTS-SEAP では 1000 倍以上の誘導能を示した (ベクター間で顕著な変化は認められなかった). 一方, tTS 遺伝子を有していないベクターは発現誘導能は低く, 数十倍程度であった (Fig. 32).

次に *in vivo* での検討を行った. 各アデノウイルスベクターをマウスに尾静脈内投与し, 経日的に血中 SEAP レベルを測定した. アデノウイルスベクターはマウスに尾静脈内投与すると, 95%以上の活性が肝臓で認められることが判明しているため, 本実験では主に肝臓で産生され血液中に分泌された SEAP を測定していることになる. ドキシサイクリンをマウスに drinking water として投与したところ, 変異 rITA と tTS 遺伝子を有した Ad-M2-tTS-SEAP, Ad-S2-tTS-SEAP においては, ドキシサイクリンに依存して, 血中 SEAP レベルの上昇が認められた. ドキシサイクリンを除去すると (通常の drinking water を与えると), 血中 SEAP レベルは低下した. AdOn-SEAP4, Ad-rITA-tTS-SEAP, Ad-M2-SEAP4, Ad-S2-SEAP4 ではドキシサイクリンによって血中 SEAP レベルの上昇は認められなかった (Fig. 33). これは, *in vitro* での実験結果で明らかとなったように, Ad-M2-tTS-SEA と Ad-S2-tTS-SEAP では, 他のベクターに比べ, ドキシサイクリンに対して高い感受性を示すことを反映しており, Ad-M2-tTS-SEAP と Ad-S2-tTS-SEAP 以外のベクターでは, *in vivo* において遺伝子発現の制御が認められるのに必要な最低限度のドキシサイクリン濃度に達していないことが考えられた. 以上の結果より, 変異 rITA と tTS 遺伝子を同時に有したアデノウイルスベクターは *in vitro*, *in vivo* の両条件下において, 極めて効率良

く遺伝子発現レベルを制御できることが明らかとなった。

一方、アデノウイルスベクターによる効率の良い遺伝子導入には、標的細胞がアデノウイルス受容体 (CAR; coxsackievirus-adenovirus receptor) を発現していることが必要である。そのため、アデノウイルス受容体 (CAR; coxsackievirus-adenovirus receptor) 発現が乏しい細胞 (造血幹細胞をはじめとする血液細胞, 樹状細胞, 気道上皮細胞, 平滑筋細胞, 血管内皮細胞, 骨格筋細胞, 一部の癌細胞, 多くのマウス由来株化細胞など) には効率良く感染できないことが問題点となっている。そこで、アデノウイルスベクターのファイバーノブの HI ループに αv インテグリン ($\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$) との親和性を有した RGD 配列を組み込んだベクターや、ファイバー部分だけを CAR とは異なった受容体である CD46 を認識して感染する 35 型アデノウイルスのファイバーに置換したベクターを作製し、これらのベクターを発現制御型ベクターと組み合わせたベクターの開発を行った。これにより、より広範な細胞に高効率遺伝子導入・発現が可能なアデノウイルスベクターの開発が期待できる。

まずは、E3 欠損領域に tTA 遺伝子を挿入した tet-off 系の発現制御型アデノウイルスベクターとの組み合わせを行った。作製したベクターの機能を HeLa 細胞 (CAR 陽性, インテグリン陽性, CD46 陽性), LNZ308 細胞 (CAR 陰性, インテグリン陽性, CD46 陽性), NIH3T3 細胞 (CAR 陰性, インテグリン陽性, CD46 陰性) で検討したところ、従来のファイバーをもった AdOff-S6 では、CAR 陽性の HeLa 細胞でのみ高い発現誘導能を示した。RGD ペプチドを付与したファイバーをもった AdRGD-Off-S6 では、いずれの細胞においても高い発現誘導能を示し、35 型アデノウイルスのファイバーをもった AdF35-Off-S6 では、CD46 陽性の HeLa 細胞と LNZ308 細胞で高い発現誘導能を示した。従って、期待通り感染域を制御することが可能となった (Fig. 34, 35)。

ファイバー遺伝子はウイルス後期遺伝子の L5 領

域に位置し、その構造はテール, シャフト, ノブの領域に分けられる。CAR と結合するのは C 末端のノブ領域である。本研究で用いたファイバー改変アデノウイルスベクターは、ファイバー領域の外来ペプチドの挿入部位として適したノブの HI ループに RGD ペプチドを遺伝子工学的に付与させることで、多くの細胞で発現している αv インテグリンを認識して感染できる。また、35 型アデノウイルス由来のファイバーを付与したベクターは CD46 を認識して感染できる (従来型アデノウイルスベクターは 5 型アデノウイルスを基盤としている)。これらの技術を組み合わせることにより、標的細胞特異性の制御が可能となり、CAR 陰性細胞を含む多くの細胞で効率の良い目的遺伝子の発現制御が可能となった。

E. 結論

(I) タンパク質発現解析システムの構築

2D-LC を利用したタンパク質の精細分離による解析システム、及び LC/MS/MS を用いた ICAT 法によるショットガンペプチド解析の基礎的検討を行った。

(II) タンパク質発現情報と遺伝子発現情報比較システムの構築

疾患と関連するタンパク質や遺伝子の発現量の変化、及びタンパク質の翻訳後修飾について網羅的かつ効率的にプロファイリングするための自動化システムを構築した。

(III) 疾患関連グライコーム解析技術の開発

LC/MS, LC/MS/MS, 及び 2D-GE 等を用いた糖ペプチド, 糖鎖, 及びグライコフォーム解析に基づく疾患関連グライコプロテーム・グライコーム解析法の開発と実行可能性について検討し、1) ペプチド/糖ペプチドの LC/MS/MS 測定において、糖鎖 B イオンを指標とした糖ペプチドイオンの特定、及び糖鎖構造推定とペプチド同定が可能であること、2) GCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法と 2D-GE によって、細胞発現タンパク質結合糖鎖の差異解析と特定糖鎖を有するタンパク質の同定が可能であること、3) 2D-GE と LC/MS によるゲル内糖

タンパク質糖鎖解析によって、グライコフォームプロファイリング及び糖鎖解析が可能であることを実証した。これらの方法は、疾患に関連する糖タンパク質や結合糖鎖の探索に役立つものと期待される。

(IV) 疾患関連タンパク質の機能解析に向けた遺伝子発現制御系の開発

目的遺伝子を E1 欠損領域に、tet-on システムのための転写活性化因子の rITa 遺伝子を E3 欠損領域に、転写抑制因子の tTS 遺伝子を E4 領域と 3' ITR の間の領域に同時に搭載させたアデノウイルスベクターを開発し、発現誘導能に極めて優れていることを明らかにした。さらに mutant rITa を用いることで、ドキシサイクリンに対する感受性が増大し、より低濃度の薬剤で目的遺伝子の発現制御が可能となった。また、発現制御型アデノウイルスベクターのファイバー領域に RGD ペプチドを付与したり、35 型アデノウイルスのファイバーに置換することにより、CAR 陰性の細胞に対しても α_v インテグリンや CD46 を認識して効率良く目的遺伝子の発現制御が可能なベクターの開発に成功した。

E. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yuka Okada, Naoki Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Tadanori Mayumi, Nobuyasu Mizuno : An investigation of adverse effects caused by the injection of high-dose TNF α -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) Toshie KANEYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi OSHIZAWA, Takao HAYAKAWA: 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)
- 5) Kazufumi KATAYAMA, Koichiro WADA, Atsushi NAKAJIMA, Sachiko YOSHIDA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Shinsaku NAKAGAWA, Takashi KADOWAKI, Ryozo 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)

- 9) 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)
- 10) Shingo NIIMI, Tadashi OSHIZAWA, Teruhide YAMAGUCHI, Mizuho HARASHIMA, Taiichiro SEKI, Toyohiko ARIGA, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Specific Expression Of AnnexinIII In Rat Small Hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 770-774 (2003)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) Fuminori SAKURAI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Teruhide YAMAGUCHI, Takao HAYAKAWA: Characterization of in vitro and in vivo gene transfer properties of adenovirus subtype 35 vector, *Mol. Ther.*, **8**, 813-821 (2003)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Akiko IWATA, Ryuji NAGATA, Kouei SATOH, Kejun FAN, Mitsuhiro MURATA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, Teruhide YAMAGUCHI, Takao HAYAKAWA: Detection of Replication-Competent

- Adenoviruses Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR, *Mol. Therapy*, 8 (6), 1009 - 1016 (2003)
- 21) 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)
 - 22) 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 rTA and tTS expression cassettes in separate genome regions. *Hum. Gene Ther.*, 14, 1265-1277 (2003)
 - 23) K., SATOH, Akiko IWATA, M., MURATA, M., HIKATA, Takao HAYAKAWA, Teruhide YAMAGUCHI; Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Virol. Methods.*, 114, 11-19 (2003)
 - 24) Akiko IWATA, K., SATOH, M., MURATA, M., HIKATA, Takao HAYAKAWA, Teruhide YAMAGUCHI; Virus Concentration Using Sulfated Magnetic Beads to improve Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 1065-1069 (2003)
 - 25) Koizumi N., Mizuguchi H., Sakurai F., Yamaguchi T., Watanabe Y., Hayakawa T. Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and av integrin-binding ablation. *J. Virol.*, 77, 13062-13072 (2003)
 - 26) 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^{E7} 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)
 - 27) 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)
 - 28) 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)
 - 29) Y. Gotou, Shingo NIIMI, Takao HAYAKAWA, T. Miyashita, Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials* , 25, 1131-1140 (2003)
 - 30) Tadashi OSHIZAWA, Teruhide YAMAGUCHI, K., Suzuki, Y., Yamamoto, Takao HAYAKAWA: Possible Involvement of Optimally Phosphorylated L-plastin in Activation of Superoxide Generating NADPH Oxidase. *J. Biochem.*, 134, 827-834 (2003)
 - 31) Toshie KANAYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI , Tadashi OSHIZAWA, Eriko UCHIDA, Takao HAYAKAWA: 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)
 - 32) 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)
- 33) 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)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) 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)
- 37) Gotoh Y, Niimi S, Hayakawa T., Miyashita T, Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocytes attachment. *Biomaterials*:25 1131-1140 (2004)
- 38) 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, 5-10 (2004)
- 39) 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)
- 40) 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)
- 41) 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)
- 42) 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)
- 43) Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Shingo NIIMI, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Enhancement of hepatocyte growth factor-induced cell scattering in N-acetylglucosaminyltransferase III-transfected HepG2 cells, *Biol. Pharm. Bull.* (in press)
- 44) 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)
- 45) 水口裕之、早川堯夫: アデノウイルスベクター: 最近の進歩、分子細胞治療, 2(3), 200-207 (2003)
- 46) 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)

- 47) 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
- 48) 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)
- 49) 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
- 50) 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)
- 51) 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)
- 52) 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)
- 53) 早川堯夫、永田龍二: バイオロ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
- 54) 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)
- 大、東京
- 4) Hiroyuki Mizuguchi, Fuminori Sakurai, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa; Characterization of In Vivo Gene Transfer Property of an Adenovirus Serotype 35 Vector. *American Society of Gene Therapy, 6th Annual Meeting*, 2003. 6., Washington DC
- 5) Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa; Efficient Gene Transfer into Human CD 34⁺ Cells and Cultured Blood Cell Lines by an Adenovirus Serotype 35 Vector. *American Society of Gene Therapy, 6th Annual Meeting*, 2003. 6., Washington DC
- 6) 佐々木明德、岡田直貴、大久保米起、岡田裕香、中山隆志、義江 修、水口裕之、早川堯夫、中川晋作、真弓忠範、藤田卓也、山本 昌; 樹状細胞免疫療法の有効性改善を目指したケモカイン発現ベクターの併用; **第19回日本DDS学会**、2003年6月19-20日、京都
- 7) 飯山さやか、岡田直貴、舛永安繁、西田雅也、岡田裕香、水口裕之、早川堯夫、中川晋作、真弓忠範、藤田卓也、山本 昌; IL-12 遺伝子を導入した樹状細胞の表現型と腫瘍免疫誘導能の解析; **第19回日本DDS学会**、2003年6月19-20日、京都
- 8) 細野哲司、水口裕之、石井(渡部)明子、山口照英、早川堯夫; siRNA 発現アデノウイルスベクターによる RNAi 効果に関する検討; **第19回日本DDS学会**、2003年6月19-20日、京都
- 9) 櫻井文教、水口裕之、山口照英、早川堯夫; 35型アデノウイルスベクターの in vivo 遺伝子発現及び体内動態に関する検討; **第19回日本DDS学会**、2003年6月19-20日、京都
- 10) 古木理恵、形山和史、立花雅史、大橋興三、堤康央、中川晋作、水口裕之、早川堯夫、真弓忠範; 改良型アデノウイルスベクターを用いた胎盤への遺伝子導入; **第19回日本DDS学会**、2003年6月19-20日、京都

2. 学会発表

- 1) 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年4月、京都
- 2) 高 建青、形山和史、Alexandre Learth Soares、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年4月、京都
- 3) 早川堯夫: バイオ医薬品における製造法変更の諸問題、**第9回動物細胞工学シンポジウム**、日本細胞動物工学会、2003年4月22日、東京工

- 11) 衛藤佑介、関口文子、高建青、形山和史、堤康央、櫻井文教、水口裕之、早川堯夫、真弓忠範、中川晋作；遺伝子治療の最適化を目指したポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターの血中滞留性に関する検討；**第19回日本DDS学会**、2003年6月19-20日、京都
- 12) 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**、2003、6、名古屋
- 13) 早川堯夫；生物由来製品、**第41回JAPIC講演会**、2003年7月28日、薬学会館、東京
- 14) Kazufumi Katayama, Koichiro Wada, Atsushi Nakajima, Sachiko Yoshida, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Masashi Tachibana, Shinsaku Nakagawa, Takashi Kadowaki, Yoshinori Kamisaki, Richard S. Blumberg, Tadanori Mayumi；A novel direction for gene therapy of inflammatory bowel disease (IBD).；**30th Annual Meeting and Exposition, Controlled Release Society, Glasgow**, 2003. 7., Scotland
- 15) Zhi-Li Xu, Hiroyuki Mizuguchi, Fuminori Sakurai, Teruhide Yamaguchi, Tadanori Mayumi, Takao Hayakawa；Improved tetracycline-inducible regulation system by a single self-containing adenovirus vector；**第9回日本遺伝子治療学会**；2003年7月18-20日、東京
- 16) Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa；Characterization of In vivo Gene Transfer Property of an Adenovirus Serotype 35 Vector；**第9回日本遺伝子治療学会**；2003年7月18-20日、東京
- 17) Naoya Koizumi, Hiroyuki Mizuguchi, Fuminori Sakurai, Teruhide Yamaguchi, Yoshiteru Watanabe, Takao Hayakawa；Reduced natural adenovirus (Ad) transduction to mouse liver by Ad vectors containing CAR-binding ablated Ad type 5 fiber knob, Ad type 35 fiber shaft, and Ad type 5 penton base with the deletion of RGD motif；**第9回日本遺伝子治療学会**；2003年7月18-20日、東京
- 18) Akiko Ishii-Watabe, Eriko Uchida, Akiko Iwata, Kouei Satoh, Kejun Fan, Mitsuhiro Murata, Hiroyuki Mizuguchi, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa；Detection of Replication-Competent Adenoviruses Spiked in Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR Combined with Glass Beads-Based DNA Extraction；**第9回日本遺伝子治療学会**；2003年7月18-20日、東京
- 19) Jian-Qing Gao, Yasuhiro Tsuda, Kazufumi Katayama, Takashi Nakayama, Yutaka Hatanaka, Yoichi Tani, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Osamu Yoshie, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa；Anti-tumor effect by a CC chemokine, CCL27, introduces into tumor cells through a recombinant adenovirus vector.；**第9回日本遺伝子治療学会**；2003年7月18-20日、東京
- 20) 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、東京
- 21) 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シル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、東京
- 22) 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を用いたグライコム解析. **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
- 23) Kanayasu-Toyoda, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Uchida, E., Hayakawa, T., Yamaguchi, T.: Role of PKC ϵ on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. **The 6th World Congress on Inflammation.**, 2003. 8. 5, Vancouver, Canada
- 24) 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ー蛋白質研究の最前線」**、2003年、横浜
- 25) 早川堯夫、水口裕之: 創薬研究に役立つ新規アデノウイルスベクター; **創薬薬理フォーラム第11回シンポジウム**; 2003年9月4-5日、東京
- 26) 早川堯夫: バイオロジクスのトランスレーショナルリサーチにおける基本的要素、**創薬薬理フォーラム第11回シンポジウム**、2003年9月4日、東京
- 27) 水口裕之、櫻井文教、渡辺善照、早川堯夫; 感染能を欠損させたアデノウイルスベクターの開発 -ターゲットイングベクターの開発に向けて-; **第62回日本癌学会総会**; 2003年9月25-27日、名古屋
- 28) 萩山裕之、上阪 等、水口裕之、早川堯夫、宮坂信之; アデノウイルスベクター発現カセット改変による滑膜線維芽細胞における導入遺伝子の発現効率の向上; **第31回日本臨床免疫学会総会**; 2003年10月9-10日、東京
- 29) 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10月、大阪
- 30) 早川堯夫: バイオ創薬の現状と将来、**徳島大学薬学部創立80周年記念シンポジウム**、2003年10月11日、徳島
- 31) Hiroyuki Mizuguchi, Zhi-Li Xu, Fuminori Sakurai, Teruhide Yamaguchi, Tadanori Mayumi, Takao Hayakawa; Development of capsid-modified single adenovirus vectors displaying tight tetracycline-inducible gene expression and broader tropism; **第76回日本生化学会大会**; 2003年10月15-18日、横浜
- 32) 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10月15-18日、横浜
- 33) 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10月15-18日、横浜
- 34) 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10月15-18日、横浜
- 35) 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10月15-18日、横浜
- 36) 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10月15-18日、横浜
- 37) 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15-18日、横浜
- 38) 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15-18日、横浜
- 39) Kanayasu-Toyoda, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Uchida, E., Hayakawa, T. Yamaguchi, T Role of PKC ϵ on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. ; **第76回日本生化学会大会**; 2003年10月15-18日、横浜
- 40) 水口裕之、櫻井文教、山口照英、早川堯夫; 35型アデノウイルスを基本骨格としたベクターの開発とその遺伝子導入特性; **第51回日本ウイルス学会学術集会・総会**; 2003年10月27-29日、京都
- 41) Takao Hayakawa: New Challenging Areas of Biologicals and Related Issues, *The 6th International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, November 15, 2003, Osaka,
- 42) 早川堯夫: 米国における新薬開発の動向、**第3回創薬基盤技術の開発に関するシンポジウム**、2003年11月18日、大阪
- 43) 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
- 44) 岡田裕香、鈴木加恵、田中早紀、高橋幸一、水野亘、岡田直貴、水口裕之、早川堯夫、真弓忠範; 改良型アデノウイルスベクターを用いたメタノーマ遺伝子治療の最適化; **第53回日本薬学会近畿支部総会・大会**; 2003年11月、大阪
- 45) 早川堯夫: バイオロジクスのウイルス安全性、**第18回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー**、HS財団、2004年1月20日、東京
- 46) 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
- 47) 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回学術シンポジウム**、2004年2月13日、東京
- 48) 櫻井文教、水口裕之、川端健二、佐々木朋美、福島敬、山口照英、早川堯夫; 35型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入における CD46の関与; **第8回遺伝子医療研究会**; 2004年3月6日、大阪
- 49) 早川堯夫: 国際化時代におけるバイオ創業の推進とレギュラトリーサイエンス、**日本薬学会第124年会**、2004年3月29日、大阪
- 50) 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ライコーム解析法の開発、**日本薬学会第124年会**; 2004年3月、大阪
- 51) 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3月、大阪
- 52) 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3月、大阪
- 53) 石井明子、内田恵理子、岩田明子、永田龍二、佐藤功栄、范 可君、村田充弘、水口裕之、川崎ナナ、川西 徹、山口照英、早川堯夫; アデ

ノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルスの迅速高感度検出法の開発；**日本薬学会第 124 年会**、；2004 年 3 月、大阪

- 54) 小泉直也、水口裕之、櫻井文教、近藤昌夫、山口照英、渡辺善照、早川堯夫；CAR、インテグリン、ヘパラン硫酸との結合性を除去したアデノウイルスベクターの体内動態；**日本薬学会第 124 年会**、；2004 年 3 月、大阪
- 55) 櫻井文教、水口裕之、川端健二、佐々木朋美、福島敬、山口照英、早川堯夫；35 型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入における CD46 の関与；**日本薬学会第 124 年会**、；2004 年 3 月、大阪
- 56) 細野哲司、水口裕之、福島敬、佐々木朋美、石井(渡部)明子、形山和史、中川晋作、山口照英、真弓忠範、早川堯夫；siRNA 発現アデノウイルスベクターによる RNAi 効果に関する検討；**日本薬学会第 124 年会**、2004 年 3 月、大阪
- 57) 平田圭一、宇都口直樹、松山淳史、水口裕之、早川堯夫、丸山一雄；トランスフェリン修飾リポソームを用いたアデノウイルスベクターの感染能制御に関する基礎検討；**日本薬学会第 124 年会**、2004 年 3 月、大阪
- 58) 岡田裕香、岡田直貴、水口裕之、鈴木加恵、田中早紀、高橋幸一、早川堯夫、真弓忠範、水野亘恭；腫瘍特異的プロモーターを搭載した RGD ファイバーミュータントアデノウイルスベクターのメラノーマ自殺遺伝子治療における有用性；**日本薬学会第 124 年会**、2004 年 3 月、大阪
- 59) 井上恵美子、岡田直貴、飯山さやか、松井あや、岡田裕香、水口裕之、早川堯夫、中川晋作、真弓忠範、藤田卓也、山本 昌；抗原遺伝子と IL-12 遺伝子を共導入した樹状細胞の T 細胞感作・活性化能；**日本薬学会第 124 年会**、2004 年 3 月、大阪
- 60) 森 直樹、岡田直貴、是友良介、岡田裕香、中山隆志、義江 修、水口裕之、早川堯夫、中川晋作、真弓忠範、藤田卓也、山本 昌；リンパ組織移行性を増強した樹状細胞ワクチンの創製；**日本薬学会第 124 年会**、2004 年 3 月、大阪
- 61) 佐々木明德、岡田直貴、丹羽正和、岡田裕香、中山隆志、義江 修、畑中 豊、谷 洋一、水口裕之、早川堯夫、中川晋作、真弓忠範、藤田卓也、山本 昌；ケモカイン発現ベクターの腫瘍内投与を併用した樹状細胞ワクチンの抗腫瘍効果；**日本薬学会第 124 年会**、2004 年 3 月、大阪
- 62) 大橋興三、形山和史、和田孝一郎、三好浩之、水口裕之、立花雅史、古木理恵、中島 淳、門脇 孝、堤康央、中川晋作、早川堯夫、真弓忠範；shRNA 発現レンチウイルスベクターを用いた PPAR・ノックダウン法の確立；**日本薬学会第 124 年会**、2004 年 3 月、大阪
- 63) 形山和史、三好浩之、水口裕之、立花雅史、大橋興三、古木理恵、川端健二、堤康央、中川晋作、早川堯夫、真弓忠範；shRNA 発現レンチウイルスベクターの作製と機能評価；**日本薬学会第 124 年会**、2004 年 3 月、大阪
- 64) 衛藤佑介、倉知慎之輔、高建青、形山和史、堤康央、水口裕之、早川堯夫、中川晋作、真弓忠範；ポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターの体内動態に関する検討；**日本薬学会第 124 年会**、2004 年 3 月、大阪
- 65) 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**、2004 年 3 月、大阪
- 66) 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 3 月、大阪
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

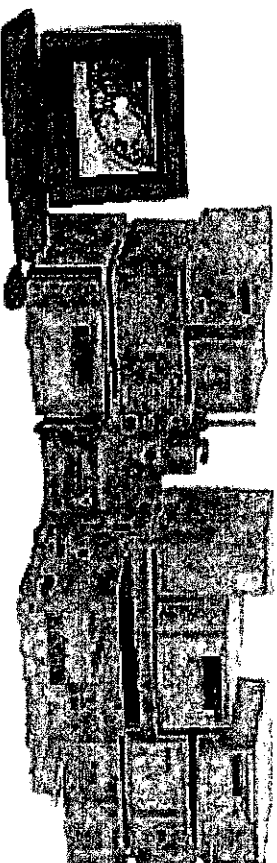
3. その他

特になし

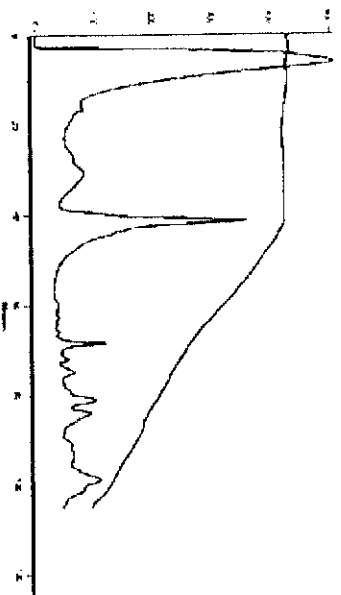
Fig. 1 二次元電気泳動の代替としての二次元LCによるタンパクの分離

ProteoSep Technology

タンパク質 2D-LC 解析システム (MS機器)

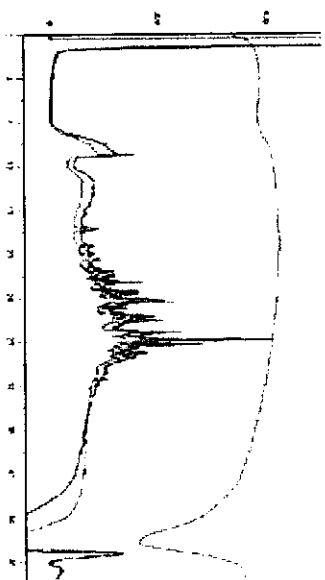


Chromato Focusing
(or Gel Filtration, SCX)



一次元目

RP Chromatography

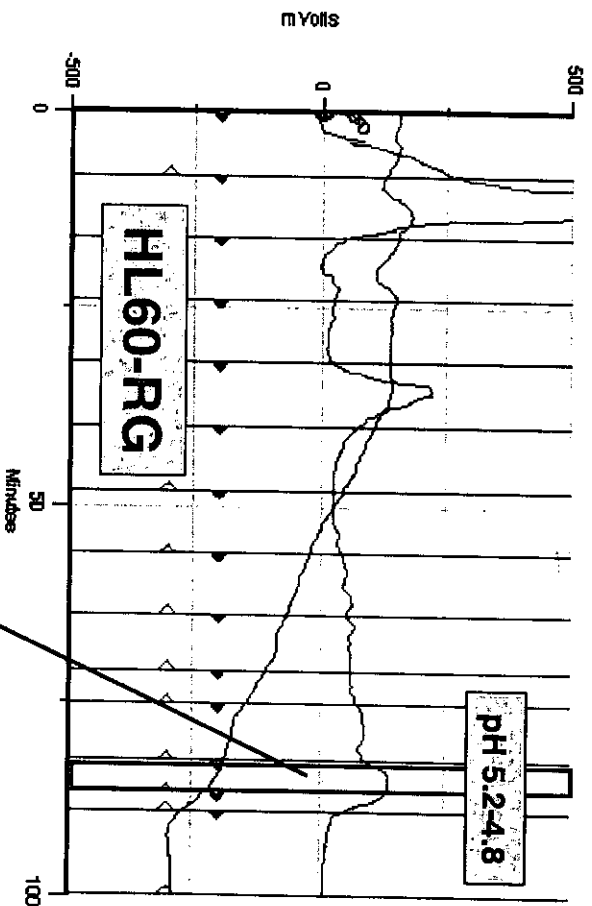
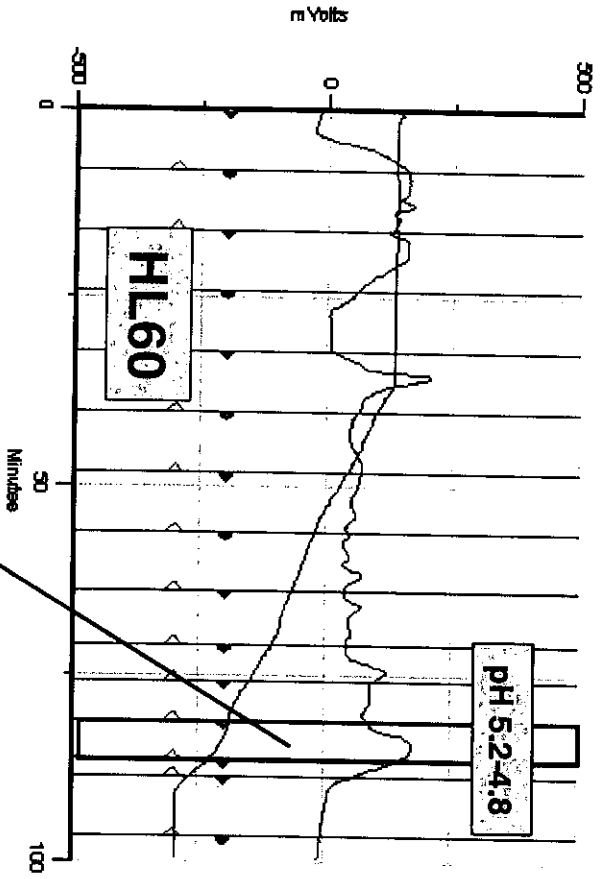


二次元目

UV or 蛍光
Detection

Fig. 2 2次元液体クロマトグラフィーを利用した細胞破碎液タンパク質の分離

(1次元目 PIクロマトフオーカシングによる分離)



UV
pH

(2次元目 逆相クロマトによる分離)

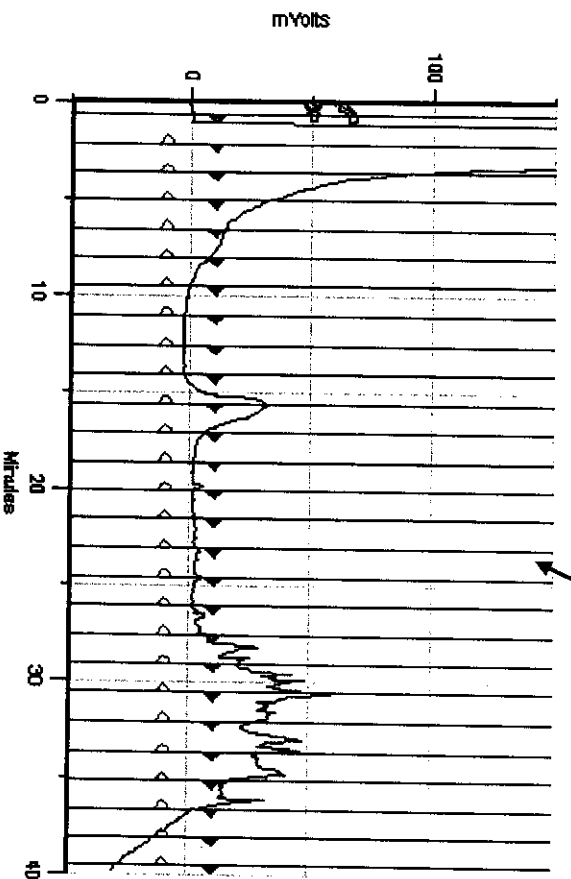
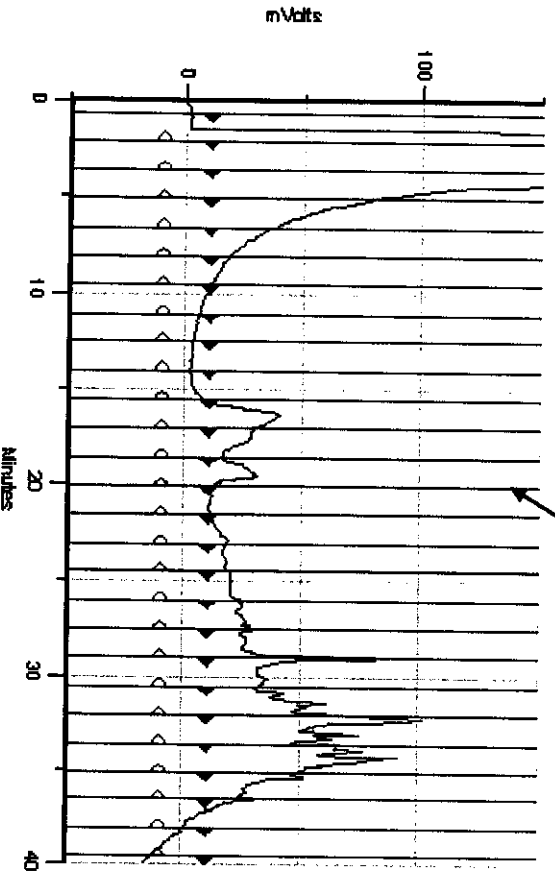


Fig. 3 デイフラレンシナル蛍光ラベル化による定量比較

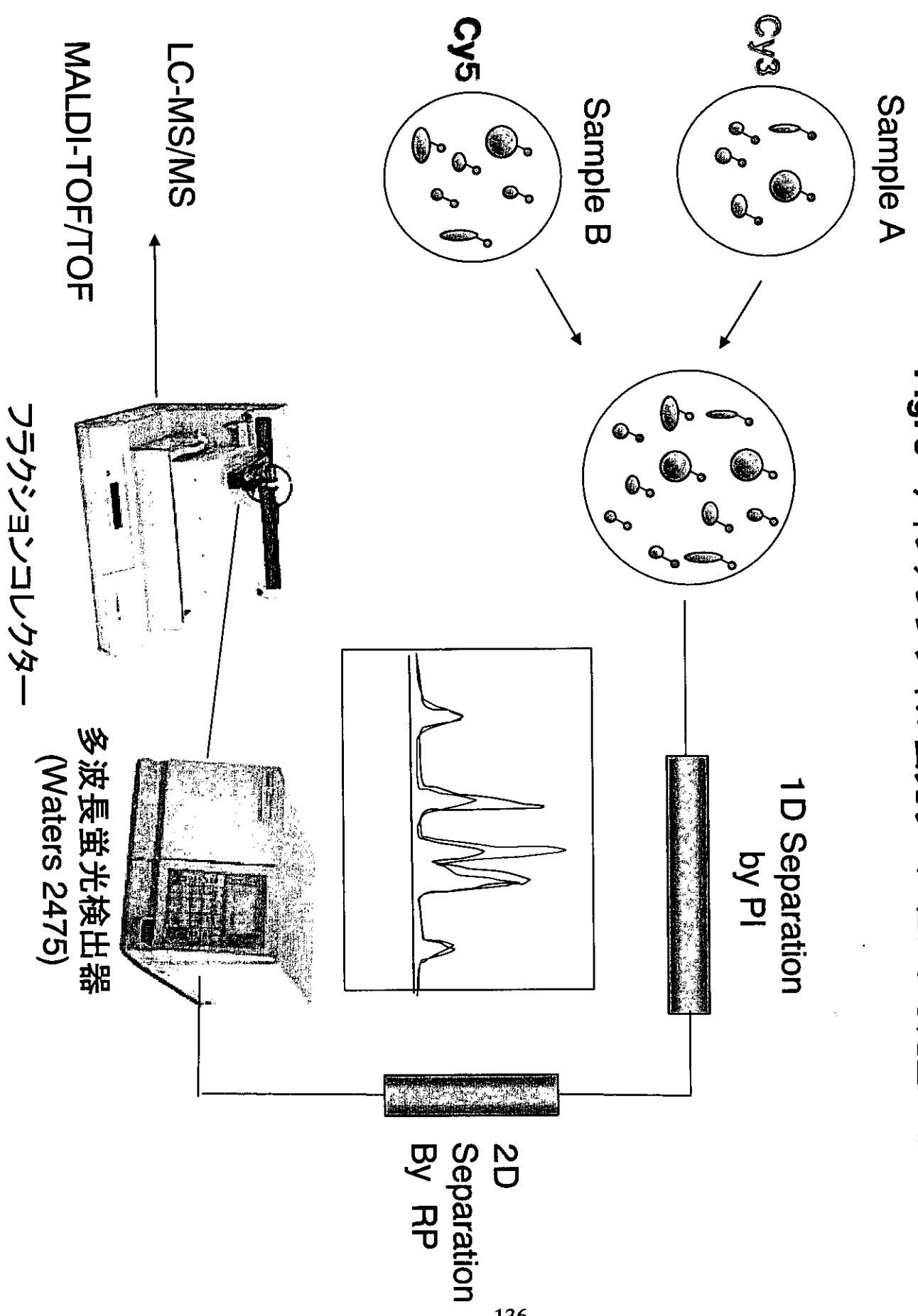


Fig. 4 SDS-PAGEゲルを組み合わせた解析法

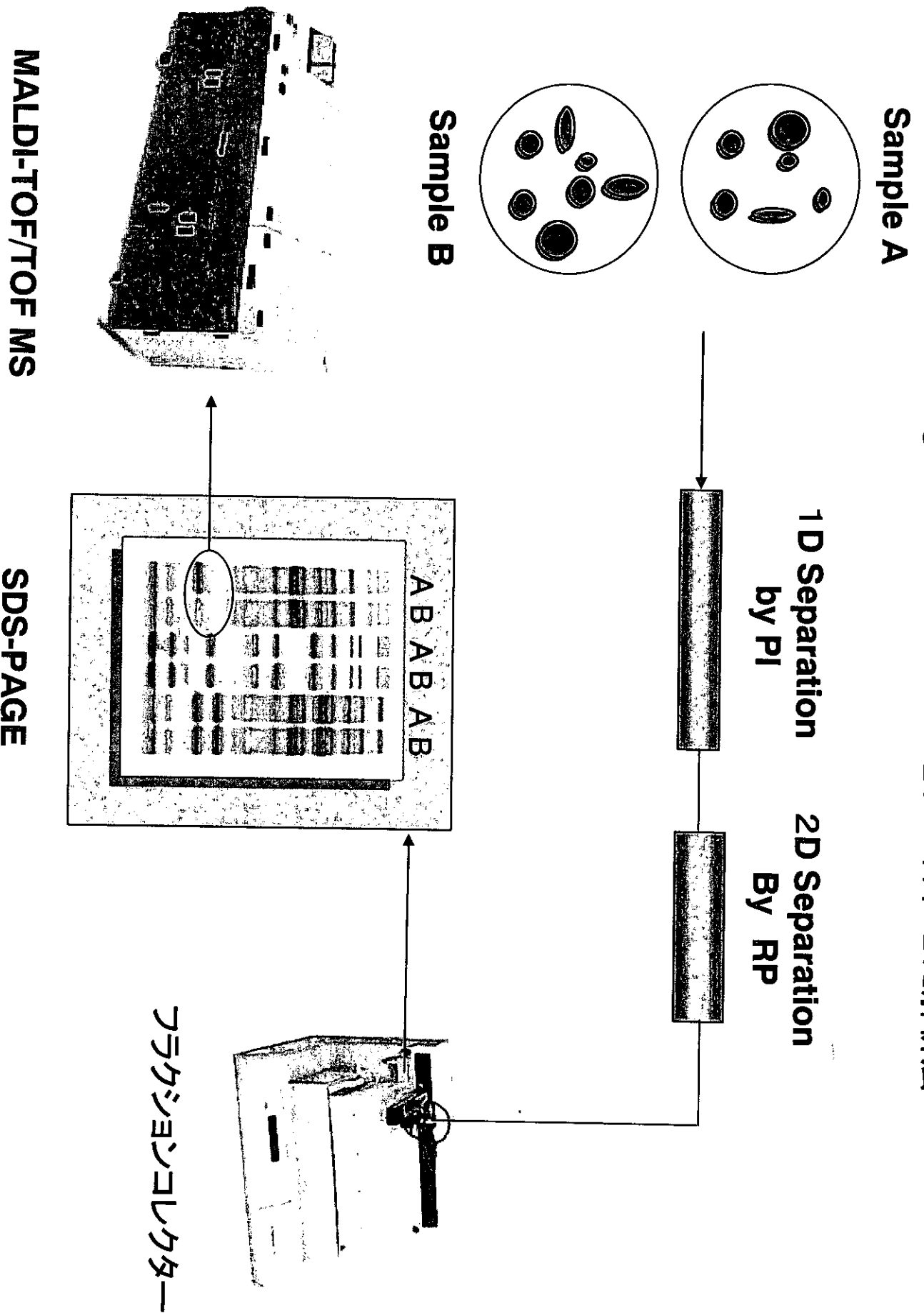


Fig. 5 ICAT法を用いた網羅的蛋白発現解析

