

来原料を排除することが可能であり、ヒト由来原料で懸念されるヒトに感染性を有するウイルス等の混入の危険もない。従って、細胞組織利用医薬品の製造に必要なタンパク質性の因子を組換えタンパク質として供給することは、安全性確保のために非常に有効な手段であると考えられる。また、組換えタンパク質は目的に応じて人為的に構造を改変することができるという利点を持っている。改変型組換えタンパク質が関連する天然型タンパク質を上回る効果を示すという例も少なからずあり、一例を挙げれば、細胞接着を評価した本実験では優れた効果が認められなかった Retronectin (Fibronectin の構造の一部を持つ改変型 Fibronectin) は、レトロウイルスベクターを用いた幹細胞への遺伝子導入において Fibronectin 以上の導入促進効果を有し、レトロウイルスを用いた遺伝子治療に汎用されているものである。

本実験では、低濃度でポリスチレンディッシュへのコーティングに用いた場合に Pronectin F および Pronectin F PLUS が、Fibronectin を上回る細胞接着能を示した。これは Fibronectin が分子内に細胞接着配列 RGD を 1 箇所持つのに対して、Pronectin F および Pronectin F PLUS では分子内に多数 (13 個) の RGD 配列を持つためではないかと考えられる。しかしながら、低濃度条件下における細胞接着の効率以外は、組換え人工タンパク質がヒト血漿由来 Fibronectin より優れているという結果はこれまでのところ得られていない。

ディッシュへのコーティングに用いて評価した場合に、Pronectin F PLUS が Fibronectin に近い性質を示したことを述

べたが、培地中に添加して用いた場合には、両者の性質に差異が認められた。Fibronectin は血清と同様、培地に添加した場合も細胞接着タンパク質として有効に作用するのに対して、Pronectin F PLUS は、培地に添加した場合は無効であった (data not shown)。Pronectin F PLUS は、培地に添加した場合は細胞側に優先的に結合してしまい、その状態で培養ディッシュへの結合がおこらず、接着タンパク質として機能しないためではないかと考えられる。

Pronectin F PLUS を製造するための Pronectin F への化学処理は、最初に専用の溶媒に溶解する必要のある Pronectin F の水溶性を増し、水への溶解を可能にする目的で施されている。その結果、培養液中への添加による利用ができなくなっていたが、本実験で明らかになったように、おそらくはその正電荷のために、細胞の接着性が增强されていた。トロンピン刺激以外に、細胞に shear stress を負荷した場合などにも、Pronectin F と Pronectin P PLUS への細胞の接着強度の違いが現れるのではないかとと思われる。

血管内皮細胞に関連する細胞組織利用医薬品あるいは再生医療では、血管内皮前駆細胞を用いた血管形成が大きな注目を集めている。本実験でモデルとして用いたような分化成熟した血管内皮細胞自体が細胞組織利用医薬品として用いられる例は少ないが、米国では、支持体上に培養した血管内皮細胞を心臓バイパス手術等における血管の再狭窄、血栓形成の防止のための各種生理活性物質の産生源として利用する試みが臨床で行われているとの報告がある。また、厚みのある組織を *in vitro* で構築する場合

には組織内に血管を形成させる必要があるが、その際には分化成熟した血管内皮細胞を用いることができると報告されている。従って、上記のような用途に用いられる血管内皮細胞を Pronectin F PLUS を用いた無血清培養系で供給することで、安全性の向上を計ることが可能であると思われる。血管内皮以外の細胞への応用については未検討であるが、その他の細胞への適用を検討することにより、応用の可能性が広がると思われる。

製品の安全性と一定性確保の観点から使用が望ましいと考えられる無血清培養系であるが、株化細胞の場合と異なり、細胞組織利用医薬品として用いられるような正常細胞の培養が可能な無血清培地の確立は難しく、細胞組織利用医薬品を安全なものとしていくために乗り越えなければならない大きなハードルの1つとなっている。本実験で用いた血管内皮細胞用無血清培地は、製品として市販されているものであるが、血管内皮細胞の機能の指標として PGI₂ 産生能を評価した場合に、接着タンパク質として Fibronectin を用いた場合でも、培養2日目以降はトロンビン刺激に応じた PGI₂ 産生促進が認められず、無血清培養を行うことで、トロンビン刺激から PGI₂ 産生に至る過程のいずれかのステップが働かなくなっていることが示唆された。無血清培地の問題点として、本系に特有の現象であるか、あるいは、他の無血清培養系においても同様の現象がみられるのか、特定の成分を培地に添加することによって PGI₂ 産生能が回復するか等について、今後検討が必要と考えられる。

組換え人工タンパク質は、目的に合わせ

た設計が可能な機能性高分子として、大きな可能性を秘めている。本実験で明らかになった Pronectin F PLUS の Fibronectin 代替品としての有用性については、長期間培養を続けた場合の血管内皮細胞への影響や、他の細胞系での効果の検討など、さらなる検証を重ねることが望ましいと考える。また、Fibronectin 以上に有用な組換え人工タンパク質の創製にも興味を持たれるところである。

E. 結論

1) 細胞組織利用医薬品のウイルス安全性に関する研究として、ウイルスの高感度検出のための PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法の最適化条件の検討を行い、①分子量 70,000 の PEI 磁気ビーズを用いて弱酸性条件で濃縮を行った場合が最も高いウイルス濃縮効率を得られること、②ウイルス濃縮時に補体や IgM 抗体が同時に濃縮されること、③PEI 磁気ビーズ単独で濃縮できないウイルスも IgM 抗体や補体を添加して免疫複合体を形成させることにより濃縮可能であることを明らかにした。また、PEI 磁気ビーズによるウイルス濃縮法がヒト感染性ウイルスである HAV、HBV、HCV にも適用可能であり、細胞組織利用医薬品のウイルス安全性確保上問題となるヒト感染性ウイルスの高感度検出にも有用な方法であることを明らかにした。

2) SNP チップを用いた解析により、LOH 解析とともに染色体コピー数の変化の検出に有効であることが示された。今後、細胞治療における細胞の遺伝的安定性の検証法として、CGH アレイとともに有効なツールとしてその利用が期待できる。

また、遺伝子発現解析と組み合わせることにより、染色体異常検出能について詳細な検討を加えることができた。

3) CARF は p53 の制御を介してアポトーシスに関与することが知られていたが、TRF1 との相互作用することにより細胞老化に関与する可能性があることが明らかとなった。

4) CD31 陽性細胞の IL-8 産生能が極めて高いことが明らかとなった。IL-8 が early EPC の品質評価の重要な指標となりうる。

5) マウス腎臓をモデル細胞組織として用いて、LC/MSⁿ を用いた糖鎖プロファイリング法は細胞組織発現糖タンパク質由来糖鎖の網羅的解析に応用可能であることを確認した。また、MSⁿ によって生じた任意の糖鎖構造に特徴的なイオンを診断イオンとして利用することによって、全糖鎖の中から、その糖鎖構造を持つ糖鎖のみを特異的に検出し、詳細な構造を明らかにできることを見出した。さらに、マウス ES 細胞の分化マーカーとして利用されている Lewis x (Le^x) 糖鎖抗原をモデル糖鎖として、Le^x 診断イオンを用いて、マウス腎臓由来糖鎖の中から Le^x 結合糖鎖のみを選択的に検出し、その構造を明らかにできることを確認した。LC/MSⁿ が細胞組織発現糖タンパク質糖鎖の網羅的解析及び糖鎖抗原特異的解析法として利用可能であることが確認されたことから、今後、細胞組織利用医薬品の特性解析、品質評価、同等性評価、及び分化・癌化マーカーの探索に応用できるものと期待される。

6) 35 型 Ad を基盤とした遺伝子導入用ベクターは、5 型 Ad ベクターと比較し造血幹細胞を含む画分である CD34 陽性細胞に対し優れた遺伝子導入効率を示すことが明らかとなった。さらに HDAC 阻害剤として

FR901228 を用いることで、さらに高効率な遺伝子発現が可能になった。今後、造血幹細胞の niche における接着に関与する分子を効率良く遺伝子発現させることによる移植効率の向上を目指す予定である。

7) ヒト臍帯血より OEC を高い確率で誘導できる条件を明らかにした。今後さらに確実に OEC を誘導可能な条件を明らかにするためには OEC を増加させるための有効な因子の添加、あるいは培養環境を変えていくことが重要と考えられた。

8) 心筋分化誘導後の心筋細胞マーカー遺伝子の発現量、すなわち「心筋細胞への分化のしやすさ」と正に相関する遺伝子である CMP 遺伝子の中でも、特に相関の有意性が高い遺伝子 CMP1、CMP2、CMP3、CMP5 および CMP13 について、その発現を RNA 干渉により抑制し、その心筋細胞分化過程への影響を評価した。その結果、今回検討した CMP 遺伝子は幹細胞の心筋細胞への分化において促進的な役割を果たしていることが示唆され、幹細胞におけるこれら遺伝子の発現量は心筋細胞分化能を予測する指標として有用であると考えられた。

9) TRP カチオンチャネルのアゴニスト、中でも TRPV1 チャネルのアゴニストであるカプサイシンには幹細胞から脂肪細胞を誘導する作用があることが明らかとなった。したがって、TRP カチオンチャネルの発現を指標として脂肪細胞分化能の高い幹細胞集団の分離ができる可能性があると考えられた。

10) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の無血清培養系を用いて、細胞接着活性を持つ組換え人工タンパク質のヒト血漿由来

Fibronectin の代替品としての有用性を検討し、細胞接着配列 RGD と silk fibroin 由来の繰り返し配列を持つ人工タンパク質に親水性を増すための化学処理が施された Pronectin F PLUS が、細胞の接着、増殖、機能のいずれにおいても Fibronectin に近い性質を示すことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Kato TA, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K. Nitrogen-substitution effect on in vivo mutagenicity of chrysene. *Mutat Res.*, 586, 1-17. (2005)
- 2) Kawakami T, Hoshida Y, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ikenoue T, Obi S, Sato S, Teratani T, Shiina S, Kawabe T, Suzuki T, Hatano N, Taniguchi H, Omata M. Proteomic analysis of sera from hepatocellular carcinoma patients after radiofrequency ablation treatment. *Proteomics*. 16, 4287-4295. (2005)
- 3) Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa T, Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Sato Y, Sawada J, Inoue K, Shudo K, Ohno Y, Yamaguchi T. HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 as detected by surface plasmon resonance. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005 94:303-9.
- 4) Akira HARAZONO, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Glycobiology*. 15, 447-462 (2005)
- 5) Kayoko TAKAGI, Reiko TESHIMA, Haruyo OKUNUKI, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA, Yuichi KOHNO, Atsuo URISU, and Jun-ichi SAWADA: Kinetic analysis of peptide digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential pepsin fragments, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 136, 23-32 (2005)
- 6) Jin YUAN, Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1067, 145-152 (2005)
- 7) Hideki TAGAWA, Yasuhiko KIZUKA, Tomoko IKEDA, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Hidetake KURIHARA, Maristela Lika ONOZATO, Akihiro TOJO, Tasuo SAKAI, Toshisuke KAWASAKI

- Shogo OKA, and: A non-sulfated form of the HNK-1 carbohydrate is specifically expressed in mouse kidney, *J. Biol. Chem.*, 280, 23876-23883 (2005)
- 8) Makoto HIRANO, Bruce Yong MA, Nana KAWASAKI, Kazumichi OKIMURA, Makoto BABA, Tomoaki NAKAGAWA, Keiko MIWA, Nobuko KAWASAKI, Shogo OKA, Toshisuke KAWASAKI: Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteases meprin α and β , *J. Immunol.*, 175, 3177-3185 (2005)
- 9) Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Glycomic/glycoproteomic analysis by LC/MS: Analysis of glycan structural alternation in the cells. *Proteomics*, 5, 4665-4672 (2005)
- 10) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Akira HARAZONO, Noritaka HASHII, Yukari MATSUIISHI, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/ multiple tandem mass spectrometry. Analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1094, 105-1017 (2005)
- 11) Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Akira HARAZONO, Noritaka HASHII, Yukari MATSUIISHI, Takao HAYAKAWA, and Toru KAWANISHI: Mass spectrometry of glycoprotein, *Trends in Glycosci. Glycotech.* 17, 193-203 (2005)
- 12) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫: 糖タンパク質の質量分析, 「糖鎖科学の展開」谷口直之, 伊藤幸成監修, エヌ・ティー・エス, 東京 pp69-75, (2005)
- 13) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Akira HARAZONO, Yukari MATSUIISHI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: N-linked oligosaccharide analysis by liquid chromatography with graphitized carbon column/ liner ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes, *J. Chromatogr. A*, 1103, 296-306 (2006)
- 14) Akira HARAZONO, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Noritaka HASHII, Akiko ISHII-WATABE Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 348, 259-268 (2006)
- 15) Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Akira HARAZONO, Yukari MATSUIISHI, Takao HAYAKAWA and Toru KAWANISHI: Specific detection of Lewis

- x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography/multiple-stage tandem mass spectrometry, *Rapid commun. Mass spectrom.*, 19, 3315-3321 (2005)
- 16) Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH and Toru KAWANISHI: LC/MS strategies in the characterization of glycoproteins, *Encyclopedia of mass spectrometry*, Vol. 8, Elsevier, *in press*
- 17) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 川西 徹: LC/MSを用いたグリコーム解析, *臨床化学*, 34, 309-318 (2005)
- 18) 川崎ナナ: LC/MSⁿによる糖タンパク質糖鎖の解析, *未来を拓く糖鎖科学*. 永井克孝監修, 20-21, 金芳堂 (2005)
- 19) Kawabata K., Sakurai F., Koizumi N., Hayakawa T., Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. *Mol. Pharm.*, *in press*.
- 20) Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors: comparison of promoter activities. *Gene Ther.*, 12, 1424-1433 (2005)
- 21) Minamisawa S, Uemura N, Sato Y, Yokoyama U, Yamaguchi T, Inoue K, Nakagome M, Bai Y, Hori H, Shimizu M, Mochizuki S, Ishikawa Y. Post-transcriptional down-regulation of sarcolipin mRNA by triiodothyronine in the atrial myocardium. *FEBS Lett.* 2006 (*in press*)
- 22) Tamehiro N, Sato Y, Suzuki T, Hashimoto T, Asakawa Y, Yokoyama S, Kawanishi T, Ohno Y, Inoue K, Nagao T, Nishimaki-Mogami T. Riccardin C: a natural product that functions as a liver X receptor (LXR) α agonist and an LXR β antagonist. *FEBS Lett.* 2005; 579: 5299-304.
- 23) Sato Y, Nakamura R, Satoh M, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Nagao T, Ohno Y. Thyroid hormone targets matrix Gla protein gene associated with vascular smooth muscle calcification. *Circ Res.* 2005; 97: 550-7.
- 24) Nishida M, Tanabe S, Maruyama Y, Mangmool S, Urayama K, Nagamatsu Y, Takagahara S, Turner JH, Kozasa T, Kobayashi H, Sato Y, Kawanishi T, Inoue R, Nagao T, Kurose H. G alpha 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2005; 280: 18434-41.
- 25) Akiko Ishii-Watabe, Takuo Suzuki, Tetsu Kobayashi, Teruhide Yamaguchi, Toru Kawanishi:

- Evaluation of fibronectin-like cell adhesive proteins in serum-free culture of human endothelial cells. (*in preparation*)
- 26) Takuo Suzuki, Tomoko Nishimaki-Mogami, Hiroshi Kawai, Tetsu Kobayashi, Youichi Shinozaki, Yoji Sato, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Kazuhide Inoue, Yasuo Ohno, Takao Hayakawa, and Toru Kawanishi: Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using GFP derivatives, *Phytomedicine* (*in press*)
- 27) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki Satsuki Itoh, Masashi Hyuga, Toru Kawanishi and Takao Hayakawa: Glycoproteomic analysis by LC/MS: Analysis of glycan structure alteration in the cells. *Proteomics*, (*in press*)
- 28) Shingo NIIMI, Mizuho HARASHIMA, Masaru GAMOU, Masashi HYUGA, Taiichiro SEKI, Toyohiko ARIGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Expression of Annexin A3 in Primary Cultured Parenchymal Rat Hepatocytes and Inhibition of DNA Synthesis by Suppression of Annexin A3 Expression Using RNA Interference, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 4242-428 (2005)
- 29) Hiroshi. Kawai, Takuo Suzuki, Tetsu Kobayashi, Haruna Sakurai, Hisayuki Ohata, Kazuo Honda, Kazutaka Momose, I Namekata, Hikaru Tanaka, Koki Shigenobu, Ryu. Nakamura, Takao Hayakawa, and Toru Kawanishi: Simultaneous real-time detection of initiator and effector-caspase activation by double FRET analysis. *J. Pharmacol.Sci.* **97**: 361-368 (2005)
- 30) Niimi, S., Harashima, M., Takayama, K., Hara, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T. and Hayakawa, T: Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells, *J Biochem (Tokyo)*, **137**, 579-586 (2005)
- 31) 川西 徹: バイオロジクスのトランスレーショナルリサーチ *日薬理誌* **126**, 427 (2005)
- 32) 新見伸吾、原島瑞、川西徹 早川堯夫、抗体医薬の現状と展望 *医薬品研究* **36**, 163-193 (2005)
- 33) 新見伸吾、原島瑞、日向昌司、野間誠司、川西徹 早川堯夫、肝幹細胞に関する研究の現状と肝疾患の細胞治療への応用の展望 *医薬品研究* **36**, 481-496 (2005)
- 34) Iwata A, Yamaguchi T, Sato K, Yoshitake N, Tomoda A. Suppression of proliferation of poliovirus and porcine parvovirus by novel phenoxazines, 2-amino-4,4 alpha-dihydro-4 alpha-7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one and 3-amino-1,4 alpha-dihydro-4

- alpha-8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one. *Biol Pharm Bull* 2005;28:905-7.
- 35) Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, Koizumi N, Kawabata K, Yamaguchi T, Nakagawa S, Watanabe Y, Mayumi T, Hayakawa T RNA interference of PPARgamma using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene* 2005;348:157-65.
- 36) Yamamoto Y, Akita Y, Tai S, Fukasaku S, Yamaguchi T, Oshizawa T, Yamaoka K, Shimamura M, Hazato T. Two-dimensional electrophoretic analysis of disease-associated proteins in human cerebrospinal fluid from patients with rheumatoid arthritis *J Electrophoresis* 2005;49:23-27
- 37) Kawabata K, Sakurai F, Yamaguchi T, Hayakawa T, Mizuguchi H. Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. *Mol Ther.* 2005;12:547-54.
- 38) Mizuguchi H, Xu ZL, Sakurai F, Kawabata K, Yamaguchi T, Hayakawa T. Efficient regulation of gene expression using self-contained fiber-modified adenovirus vectors containing the tet-off system. *J Control Release.* 2005;110:202-11.
- 39) Xu ZL, Mizuguchi H, Sakurai F, Koizumi N, Hosono T, Kawabata K, Watanabe Y, Yamaguchi T, Hayakawa T. Approaches to improving the kinetics of adenovirus-delivered genes and gene products. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:781-802.
- 40) 水沢左衛子、岡田義昭、堀内善信、田中建志、佐藤功栄、金子健二、佐々木祐子、田中利明、伴野丞計、友水健雄、速水照一、土方美奈子、平子一郎、真弓忠範、三上貢一、三代俊治、宮本誠二、牟田健吾、Thomas Weimer、Todd Gierman、小室勝利、山口照英 C型肝炎ウイルス RNA の遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製 *輸血学会雑誌* 2006 (in press)
2. 学会発表
- 1) 内田恵理子、小木美恵子、米須杏子、永田龍二、村田充弘、日方幹雄、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：医薬品のウイルス安全性確保のための高感度ウイルス検出法の開発ーポリエチレンイミン結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法のヒトウイルスへの適用ー；日本薬学会第126年会 2006年3月
- 2) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：造血支持能を持つフィーダー細胞の解析について；第5回日本再生医療学会総会；2006年3月
- 3) 鈴木孝昌、欒洋、Palanisamy 田中剛太郎、中嶋圓、浜田修一、三浦知弘、降旗千恵 Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS: Quantitative RT-PCR analysis on the selected genes by the GeneChip 日本環

- 境変異原学会第 34 回大会(2005.11)
- 4) 夔 洋, 本間正充, Suresh Thirupathi, 小木 美恵子, 山口照英, 鈴木孝昌 Application of CGH and SNP arrays for chromosome analysis 日本環境変異原学会第 34 回大会(2005.11)
 - 5) 鈴木孝昌, 降旗千恵 Transcriptomics – Can gene expression profiles distinguish the genotoxic hepatocarcinogens? 日本環境変異原学会第 34 回大会(2005.11)
 - 6) 三浦知弘, 夔 洋, 戸部香織, 仲地豊, 近藤恭光, 鈴木孝昌, 田代英夫, 降旗千恵 DNA マイクロアレイを用いた非遺伝子傷害性肝発癌物質投与マウス肝臓における遺伝子発現解析 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)
 - 7) 原田基裕, 戸部香織, 仲地豊, 近藤恭光, 中嶋圓, 浜田修一, 鈴木孝昌, 兵庫淳志, 田代英夫, 榊佳之, 降旗千恵 Original oligonucleotide microarray による 5 種類の遺伝子傷害性肝発がん物質と phenobarbital と ethanol の遺伝子発現解析 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)
 - 8) 宮島正樹, 夔 洋, 渡辺貴志, 鈴木孝昌, 村上勝彦, 野村靖幸, 降旗千恵 大脳萎縮を示す老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse: SAM) SAMP10 の原因遺伝子に関する大集積 DNA マイクロアレイを用いた解析 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)
 - 9) 鴻野貴司, 夔 洋, 鈴木孝昌, 野村靖幸, 太田浩良, 降旗千恵 8ヶ月齢の老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse: SAM) SAMP8 海馬における Transthyretin の発現低下 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)
 - 10) Toshie Kanayasu-Toyoda, Tomofumi Fujino, Tadashi Oshizawa, Takayoshi Suzuki, Tomoko Nishimaki-Mogami, Yoji Sato, Jun-ichi Sawada, Kazuhide Inoue, Koichi Shudo, Yasuo Ohno, Teruhide Yamaguchi HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 as detected by surface plasmon resonance 第 78 回日本生化学会大会(2005.10)
 - 11) Declan Mulhern, Shinya Yokokawa, Hitoshi Shimizu, Arihiro Kohara, Takayoshi Suzuki, Haruhiko Okuda, Naoki Miyata, Shin-ichi Ninomiya and Tetsuji Sudo Gene expression profiles of hepatotoxin-treated human hepatocytes can be used to cluster unknown compounds according to their mode of actions 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会(2005.6)
 - 12) 横川 伸也, Declan Mulhern, 清水 和, 小原 有弘, 北島 正人, Jose Martin Ciloy, 鈴木 孝昌, 奥田 晴宏, 宮田 直樹, 二宮 真一, 須藤 哲司 網羅的遺伝子発現解析データを用いた肝毒性予測モデルの構築 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会(2005.6)
 - 13) Takayoshi Suzuki Organ-specific toxicity of aristolochic acid; studied by the transgenic mouse mutation assay and the DNA microarray 2nd International Conference and

- Exposition on the Modernization of Traditional Chinese Medicine (成都、中国)
- 14) Suzuki, T., Luan, Y., Honma, M., Kogi, M., and Yamaguchi, T. Application of microarrays for chromosome analysis 第9回国際環境変異原学会サテライトシンポジウム"トキシコゲノミクス" (ハワイ、米国)
 - 15) C Furihata, K Tobe, Y Nakachi, Y Kondoh, M Nakajima, S Hamada, C Namiki, T Suzuki, A Hyogo, M Hoshino, M Harada, T Tashiro, H Ito, H Inazumi, Y Sakaki and H Tashiro Original oligonucleotide microarray-baesd gene expression profile induced by genotoxic carcinogens and Phenobarbital in mouse liver 第9回国際環境変異原学会サテライトシンポジウム"トキシコゲノミクス" (ハワイ、米国)
 - 16) 鈴木孝昌 変異原処理による in vivo/in vitro 遺伝子発現 日本動物実験代替法学会第19回大会(2005.12)
 - 17) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 原園 景, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: リニアイオントラップ型 MS を用いたゲル内糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析. 第53回質量分析総合討論会 (2005, 5, 19) 大宮
 - 18) 橋井則貴, 伊藤さつき, 川崎ナナ, 原園 景, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: multiple-stage tandem mass spectrometry (MSⁿ)による Lewis^x の特異的解析. 第53回質量分析総合討論会 (2005, 5, 19) 大宮
 - 19) 福原 潔, 石井明子, 川崎ナナ, 川西 徹, 宮田直樹, 奥田晴宏: 脂溶性平面型カテキンの抗酸化作用とがん細胞増殖阻害効果. 第64回日本癌学会学術総会 (2005, 9, 14-16)札幌
 - 20) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹: LC/ESI/MS/MS によるタンパク質混合物中のヒト血漿ビトロネクチンの部位特異的糖鎖解析. 第25回日本糖質学会 (2005, 7, 20)大津
 - 21) 佐野琴音, 宮本泰則, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 玉井幸恵, 加藤恵己, 赤松 暢, 内堀・岩城はるひ, 浅沼公恵, 鈴木理沙, 小川温子: 肝再生時のビトロネクチン糖鎖がマトリックスリガンド結合と細胞伸展活性に与える影響. 第25回日本糖質学会 (2005, 7, 20)大津
 - 22) 川崎ナナ, 橋井則貴, 松石 紫, 伊藤さつき, 原園 景, 川西 徹: LC/MSⁿによる糖鎖の構造特異的検出. 日本プロテオーム機構第3回大会 (2005, 8, 1)横浜
 - 23) 永石貴之, 野村和子, 水口惣平, 出嶋克史, 川崎ナナ, 松石 紫, 野村一也: 線虫の糖鎖付加タンパク質の決定. 日本プロテオーム機構第3回大会 (2005, 8, 1)横浜
 - 24) 野村和子, 水口惣平, 永石貴之, 安藤恵子, 三谷昌平, 平林義雄, 松石 紫, 川崎ナナ, 野村一也: *C. elegance* を用いた糖鎖の網羅的機能解析—二次元電気泳動(2D-DIGE)による定量解析. 日本プロテオーム機構第3回大会 (2005, 8, 1)横浜
 - 25) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Akira

- HARAZONO, Yukari MATSUIISHI, Akiko HACHISUKA, Reiko TESHIMA, Jun-ichi SAWADA, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Glycosylation analysis of IgLON family glycoprotein in rat brain by LC/MSn. 第 77 回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸
- 26) Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Akira HARAZONO, Satsuki ITOH, Yukari MATSUIISHI, and Toru KAWANISHI: Decrease in alpha-glucosidase II expression in the kidney of a MRL/lps murine model of human systemic lupus erythematosus (SLE). 第 77 回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸
- 27) Risa INOUE, Motoki TERADA, Kay-Hooi Khoo, Nana KAWASAKI, Bruce Y. MA, Shogo OKA, Toshisuke KAWASAKI, Nobuko KAWASAKI: Isolation of glycoproteins carrying the characteristic MBP-ligands oligosaccharide from the human colon cancer cells. 第 77 回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸
- 28) Miho ASAHI, Kotone SANO, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Maiko YANAGIBASHI, Haruhi UCHIBORI-IWAKI, Haruko OGAWA: Characterization of glycan moieties of fibronectin and vitronectin during liver regeneration. 第 77 回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸
- 29) 佐野琴音, 内堀一岩城はるひ, 浅沼公恵, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 鈴木理沙, 玉井幸恵, 加藤恵己, 赤松 暢, 小川温子: 肝再生時ビトロネクチンの部位特異的糖鎖修飾ならびに糖鎖構造変化が多量体形成に与える影響. 文部科学省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 3 回夏期シンポジウム(2005, 8) 浜松
- 30) 福原 潔, 中西郁夫, 石井明子, 川崎ナナ, 川西 徹, 浦野四郎, 小澤俊彦, 宮田直樹, 伊古田暢夫, 奥田晴宏: カテキンの立体構造固定による抗酸化効果の増強と生物作用. 第 20 回生体機能関連化学シンポジウム (2005, 9, 17) 名古屋
- 31) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 松石 紫, 川西 徹: 自己免疫疾患モデルマウス腎臓における糖鎖異常. 第 1 回臨床プロテオーム研究会 (2005, 10, 15) 東京
- 32) 澤田 均, 澤 彩映子, 伊藤さつき, 川崎ナナ: マボヤ卵黄膜上の精子レセプターHrVC700 の糖鎖構造. 日本動物学会第 76 回大会 (2005, 10, 6-8)つくば
- 33) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 原園 景, 川西 徹: LC/MS のグライコムクスへの応用. 文部科学省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 4 回公開シンポジウム (2006, 1, 31) 名古屋
- 34) 水口裕之; overview 『ウイルス・非ウイルスベクター開発研究の最前線と臨

- 床・産業化への道』; 日本薬学会 126 年会; 2006 年 3 月 28-39 日、仙台
- 35) 水口裕之; 遺伝子機能解析のための次世代アデノウイルスベクターの開発; 第 69 回新適塾「21 世紀の薬箱」; 2006 年 1 月 31 日、大阪
- 36) 水口裕之; 次世代アデノウイルスベクターの開発基盤研究; 九州大学母子総合研究リサーチコアカンファレンス (九州大学医学部特別講演); 2006 年 1 月 17 日、福岡
- 37) 水口裕之; 遺伝子治療研究における薬学の役割: ベクター開発の重要性; 平成 17 年度大阪大学薬学部卒業後研修会「食・健康と薬学」; 2005 年 12 月 2 日、大阪
- 38) 水口裕之; 改変アデノウイルスベクターによる遺伝子導入制御; 「生物医工学サロン」第 17 回集会; 2005 年 11 月 9 日、大阪
- 39) 櫻井文教、川端健二、山口照英、早川堯夫、水口裕之; 新規アデノウイルスベクターを用いたヒト造血前駆細胞への遺伝子導入の最適化; 第 64 回日本癌学会総会; 2005 年 9 月 14-16 日、札幌
- 40) 水口裕之; カプシドタンパク質の改変によるアデノウイルスベクターの遺伝子導入制御; 遺伝子・デリバリー研究会 第 5 回 夏期セミナー; 2005 年 8 月 2 日、箱根
- 41) 水口裕之; 次世代アデノウイルスベクターの開発と遺伝子機能解析、遺伝子治療、ワクチン等への応用; 彩都シンポジウム&サイエンスセミナーSP; 2005 年 7 月; 大阪
- 42) Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Teruhide Yamaguchi, Takao Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi; Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction in human hematopoietic progenitors; 第 11 回日本遺伝子治療学会; 2005 年 7 月、東京
- 43) 山崎幸苗, 河野泰広, 吉田ひろみ, 佐藤陽治, 上林正巳 フェルラ酸アミド誘導体と不飽和脂肪酸によるアディポネクチンの産生増強日本農芸化学会 2006 年度大会 (2006 年 3 月)
- 44) Sato Y, Nagao T. Matrix Gla Protein Gene Identified as a Direct Target of Thyroid Hormone in Vascular Smooth Muscle Cells. 第 70 回記念日本循環器学会総会・学術集会 (2006 年 3 月)
- 45) 吉田ひろみ, 為広紀正, 最上知子, 井上和秀, 大野泰雄, 長尾拓, 佐藤陽治 Capsaicin による PPAR γ と PPAR α 活性制御 日本薬学会第 126 年会 (2006 年 3 月)
- 46) Hiraiwa M, Saito M, Nakahara T, Sato Y, Nagao T, Sakamoto K, Ishii K. All-trans retinoic acid reduces neuronal cell death induced by intravitreal injection of NMDA in the rat retina 第 79 回 日本薬理学会年会 (2006 年 3 月)
- 47) Yoshida H, Tamehiro N, Nishimaki-Mogami T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Sato Y. PPAR γ partial agonist activity and PPAR α inverse agonist activity of capsaicin 第 79 回 日本薬理学会年会 (2006 年 3 月)

- 48) Yamazaki Y, Kawano Y, Yoshida H, Sato Y, Uebayashi M. Natural and synthetic phenolic amides and esters with adiponectin production enhancing activity in cultured human preadipocytes and diabetic mice. The 10th Adiposcience Symposium (2005年8月)
- 49) 佐藤 光利, 中村 亮, 藤下 加代子, 森 聡子, 石田 誠一, 山口 照英, 井上 和 秀, 長尾 拓, 大野 泰雄, 佐藤 陽治
ラット血管平滑筋における甲状腺ホルモンの石灰化抑制作用 第7回応用薬理学シンポジウム (2005年8月)
- 50) 南沢 享, 横山 詩子, 佐藤 陽治, 岩本 眞理, 横田 俊平, 石川 義弘 . ビタミンAがラット動脈管遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響 第4回小児心臓血管発生研究会 (2005年7月)
- 51) 吉田 ひろみ, 為広 紀正, 橋本 敏弘, 最上知子, 山口 照英, 大野 泰雄, 長尾 拓, 浅川 義範, 井上 和秀, 佐藤 陽治
イチヨウ成分ギンコール酸とその類似体のPPAR γ ならびにPPAR α 活性化に対する作用 第112回日本薬理学会関東部会 (2005年6月)
- 52) 佐藤 陽治 血管石灰化と甲状腺ホルモン 第112回日本薬理学会関東部会シンポジウム (2005年6月)
- 53) 石井明子, 鈴木琢雄, 小林 哲, 山口 照英, 川西 徹 : 細胞接着活性を持つ組換え人工タンパク質の有用性評価 日本薬学会 第126年会 仙台 (2006, 3)
- 54) 小林 哲, 鈴木琢雄, 石井明子, 川西 徹 : MALDI-TOF MSにおけるタンパ
- ク質のシグナル増強 Part3 日本薬学会 第126年会 仙台 (2006, 3)
- 55) 鈴木琢雄, 桜井教美, 河合 洋, 石井明子, 小林 哲, 大幡久之, 本田一男, 川西 徹 : Bioimaging of caspase activation during ER stress-induced cell death. 第79回 日本薬理学会年会 横浜 (2006, 3)
- 56) 鈴木琢雄, 桜井教美, 河合 洋, 石井明子, 小林 哲, 大幡久之, 本田一男, 川西 徹 : 小胞体ストレスによるカスパーゼ活性化のイメージング 第14回日本バイオイメージング学会 東京 (2005, 10)
- 57) 小林哲, 河合洋, 鈴木琢雄, 石井明子, 早川堯夫, 川西 徹 : MALDI-TOF MSにおけるタンパク質シグナルの増強 Part 2 質量分析総合討論会 埼玉 (2005, 5)

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 特記事項なし

表 1 ウイルス検出に用いたプライマー及びプローブ

HSV-1

F-Primer: 5'-GCGTCATGGTACTGGCAAG-3'

R-Primer: 5'-TTGACTCTACGGAGCTGGCC-3'

Probe: 5'- FAM-TGGAGCTGATGCCGTAGTCGG- TAMRA-3'

SV-40

F-Primer: 5'-GACATTCCTAGGCTCACCTCAC-3'

R-Primer: 5'-ACCTTGCCAAACTGTCCCTTAAA-3'

Probe: 5'- FAM-CTTGAAAGAAGAACCCAAAGA- TAMRA-3'

Adenovirus

F-Primer: 5'-TCCGGTCCTTCTAACACACCTC-3'

R-Primer: 5'-ACGGCAACTGGTTTAATGGG-3'

Probe: 5'- FAM-TGAGATACACCCGGTGGTCCCGC-3'

PPV

F-Primer: 5'-AACAACTACGCAGCAACTCCAATA-3'

R-Primer: 5'-ACGGCTCCAAGGCTAAAGC-3'

Probe: 5'- FAM-AGGAGGACCTGGATTT- MGB-3'

Poliovirus

F-Primer: 5'-CCCGAGAAATGGGACGACTA-3'

R-Primer: 5'-TGGAGCTGTTCCGTAGGTGTAA-3'

Probe: 5'- FAM-ACATGGCAAACCTCATCAAATCCATCAATC-MGB-3'

HAV

F-Primer : 5'-GGTAGGCTACGGGTGAAAC-3'

R-Primer: 5'-AACAACTCACCAATATCCGC-3'

Probe : 5'- FAM-CTTAGGCTAATACTTCTATGAAGAGATGC- TAMRA

HBV

F-Primer: 5'-GGACCCCTGCTCGTGTTACA-3'

R-Primer: 5'-GAGAGAAGTCCACCMCGAGTCTAGA-3'

Probe: 5'- FAM-TGTTGACAARAATCCTCACCATACCRCAGA- TAMR

HCV

F-Primer: 5'-TGC GGA ACC GGT GAG TAC A-3'

R-Primer: 5'-CTTAAGGTTTAGGATTCGTGCTCAT-3'

Probe: 5'-FAM-CACCCTATCAGGCAGTACCACAAGGCC-TAMRA-3'

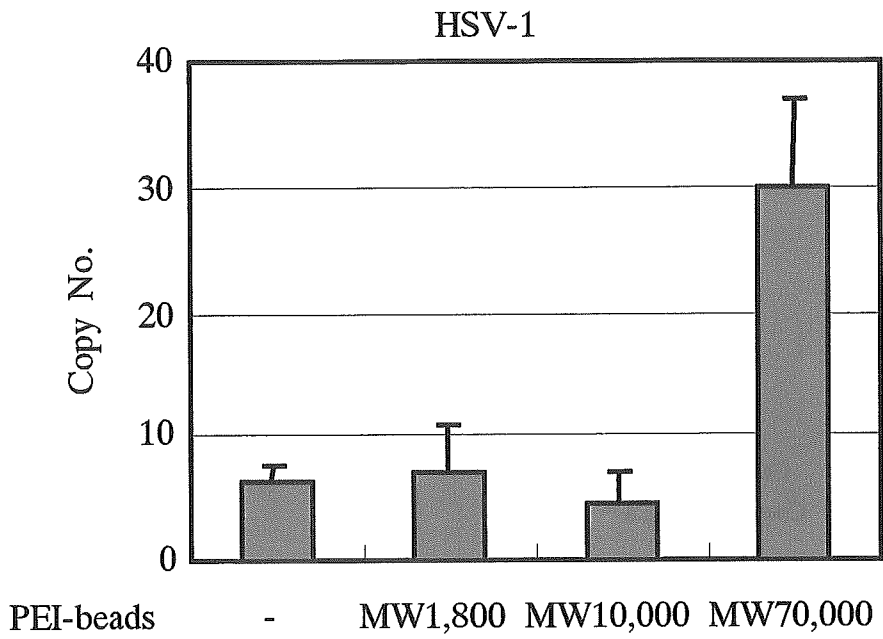


図.1 ポリエチレンイミンの分子量とウイルス濃縮効率

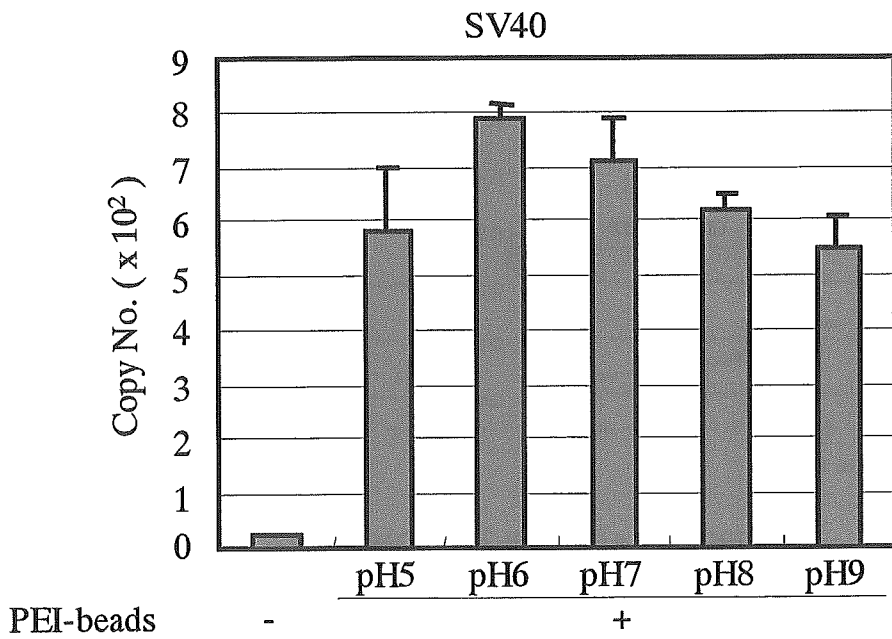


図.2 PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮効率のpHによる変化

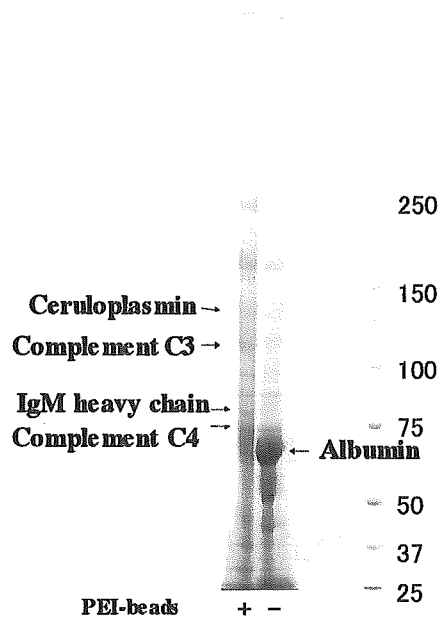


図.3 PEI磁気ビーズにウイルスと共に濃縮される血清成分中の蛋白質のMS/MSによる同定

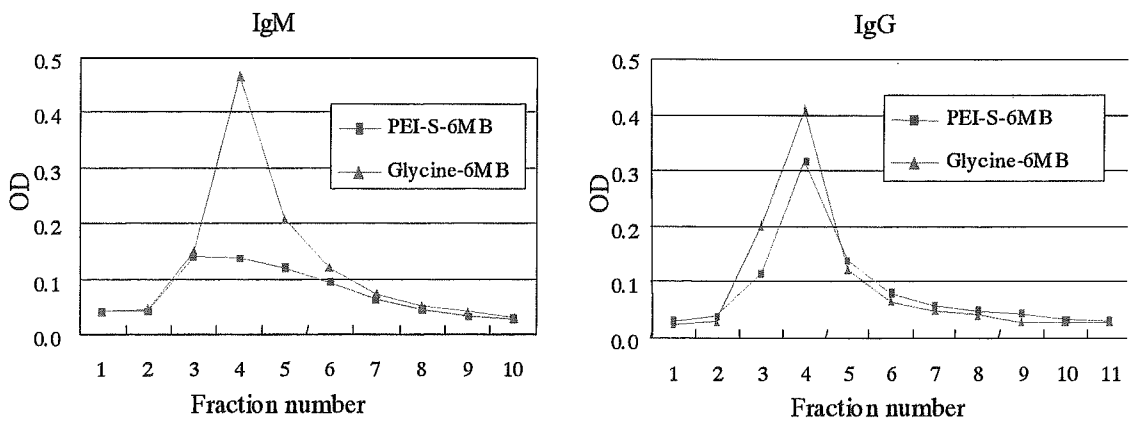


図.4 PEI-セファロースカラムへの抗体の吸着

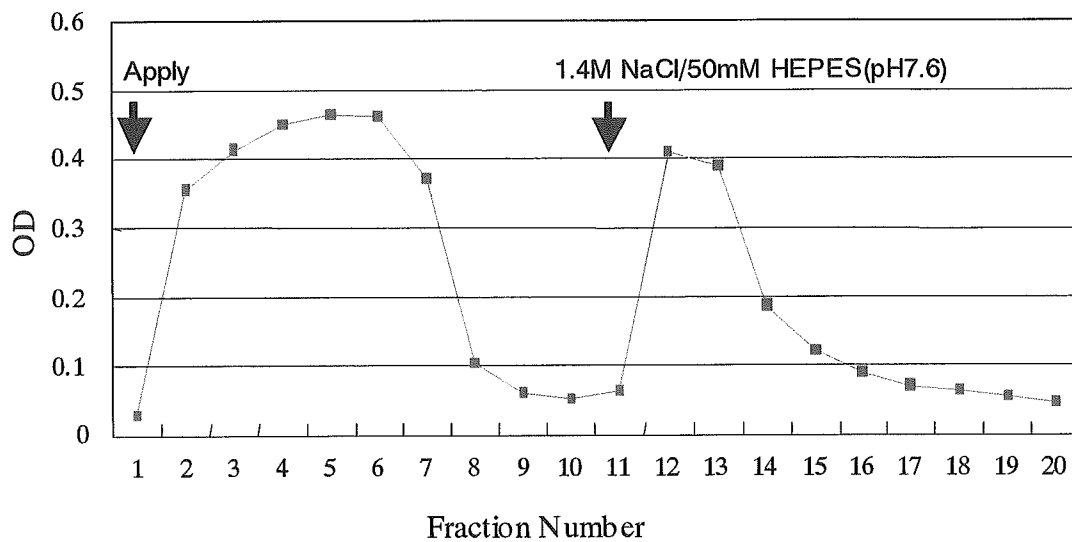
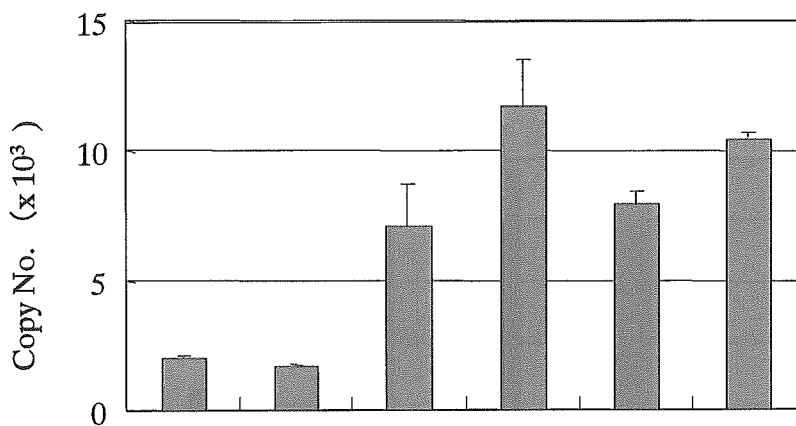


図.5 PEI-セファロースカラムによる抗マウスIgG-ウサギIgM抗体の精製



PEI-beads	-	+	+	+	+	+
Anti-poliovirus MoAb (IgG)	-	-	+	+	+	+
Anti-mouse IgG-rabbit IgM	-	-	-	+	-	-
C1+C4	-	-	-	-	+ (r.t.)	+ (37°C)

図.6 抗体、補体存在下でのPEI磁気ビーズによるポリオウイルスの濃縮

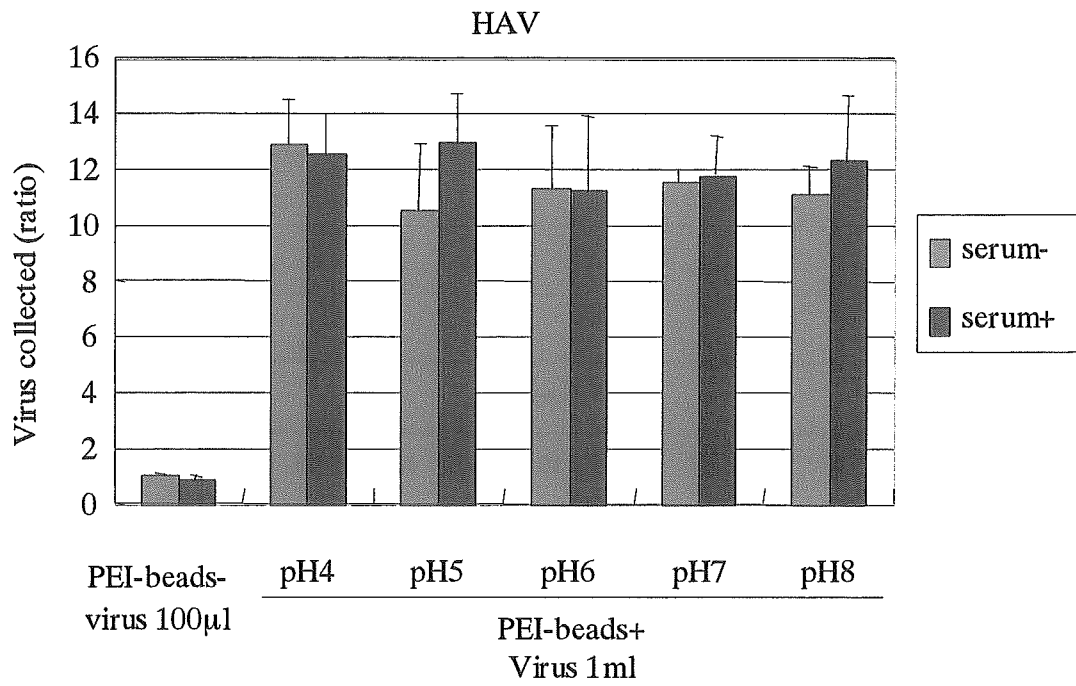


図.7 PEI磁気ビーズによるHAVの濃縮

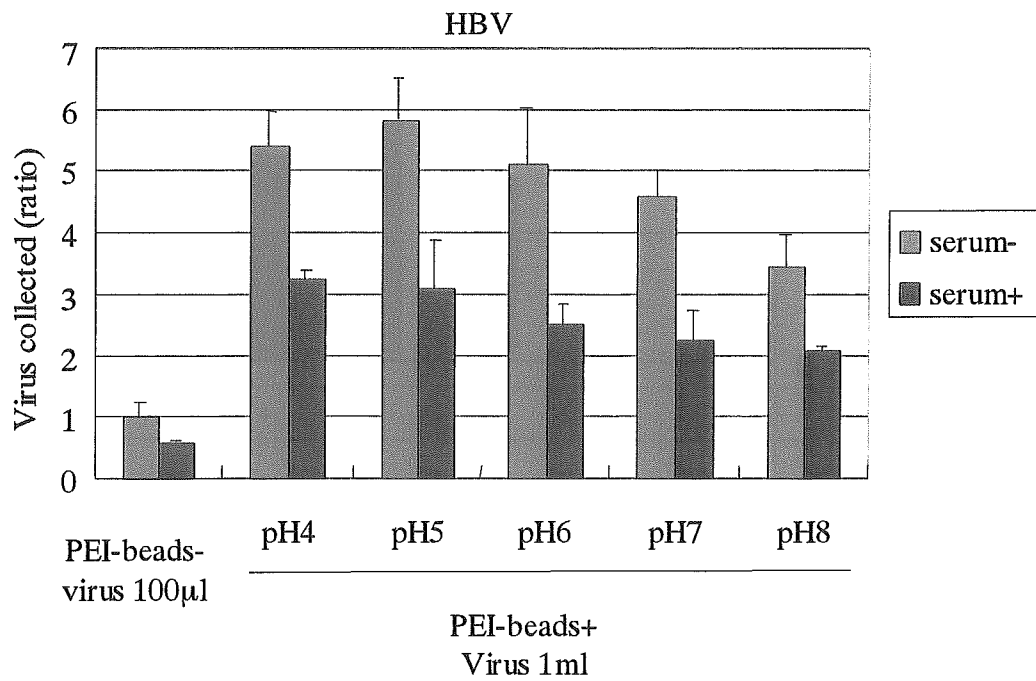


図.8 PEI磁気ビーズによるHBVの濃縮

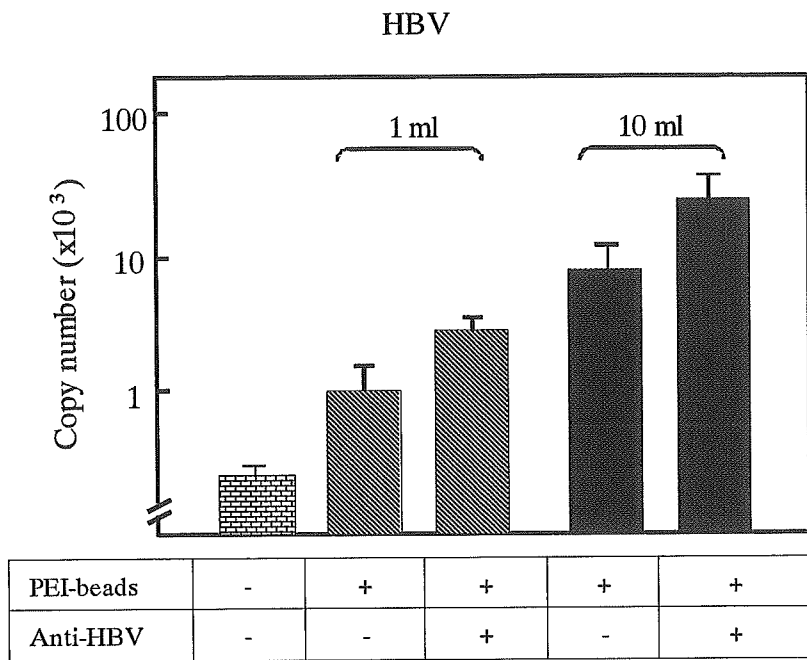


図.9 PEI磁気ビーズによるHBVの濃縮に対する抗HBV抗体の影響

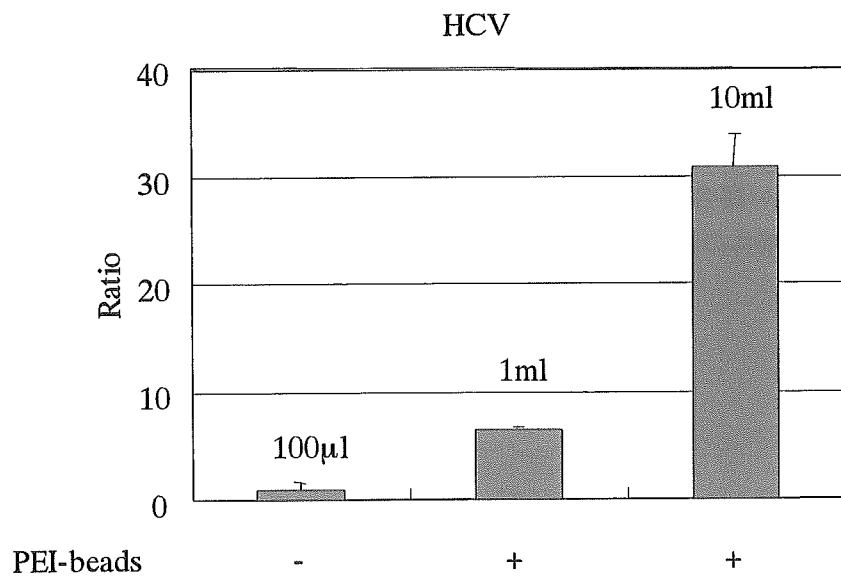


図.10 PEI磁気ビーズによるHCVの濃縮

表 2 PEI 磁気ビーズによって濃縮されるウイルス

ウイルス	宿主	ウイルス ゲノム	脂質膜	サイズ (nm)	PEI-磁気 ビーズ濃縮
モデルウイルス					
サイトメガロウイルス (CMV)	サル	DNA	+	180-200	+
ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1)	ヒト	DNA	+	150-200	+
水疱性口内炎ウイルス (VSV)	ウシ	RNA	+	70-150	+
マウス白血病ウイルス	マウス	RNA	+	80-110	+
Sindbis ウイルス	ヒト	RNA	+	60-70	+
アデノウイルス 5 型	ヒト	DNA	-	70-90	+
SV-40 ウイルス (SV-40)	サル	DNA	-	40-50	+
ブタパルボウイルス (PPV)	ブタ	DNA	-	18-24	+*
ポリオウイルス	ヒト	RNA	-	25-30	+**
ヒト感染性ウイルス					
ヒト免疫不全ウイルス (HIV)	ヒト	RNA	+	80-100	+
B 型肝炎ウイルス (HBV)	ヒト	DNA	+	40-45	+
C 型肝炎ウイルス (HCV)	ヒト	RNA	+	40-50	+
A 型肝炎ウイルス (HAV)	ヒト	RNA	-	25-30	+*

* : 条件により濃縮されない場合もある

** : IgM 抗体又は抗体と補体の添加により濃縮可能