

- Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H.: Demonstration of flash K-edge angiography utilizing gadolinium-based contrast medium. *SPIE*, 5580:817-823, 2005
- 22) Obara, H., Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Ojima, H., Takayama, K., Ido, H.: Superposition of x-ray spectra using a double-target plasma tube. *SPIE*, 5580:824-831, 2005
- 23) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.: Compact monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode molybdenum tube. *Med. Phys.*, 32:49-54, 2005
- 24) Sagae, M., Sato, E., Tanaka, E., Hayasi, Y., Mori, H., Kawai, T., Ichimaru, T., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.: Quasi-monochromatic X-ray generator utilizing graphite cathode diode with transmission-type molybdenum target. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 44:446-449, 2005
- 25) Hattan, N., Kawaguchi, H., Ando, K., Kuwabara, E., Fujita, J., Murata, M., Suematsu, M., Mori, H., Fukuda K.: Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc. Res.*, 65:334-344, 2005
- 26) Yada, T., Shimokawa, H., Hiramatsu, O., Kajita, T., Shigeto, F., Tanaka, E., Shinozaki, Y., Mori, H., Kiyooka, T., Katsura, M., Ohkuma, S., Masami, Goto, Ogasawara, Y., Fumihiko, K.: Beneficial effect of hydroxyfasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo. *JACC*, 45:599-607, 2005
- 27) Fujii, T., Nagaya, N., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y., Nishigami, K., Ishibashi-Ueda, H., Shirai, M., Itoh, T., Ishino, K., Sano, S., Kangawa, K., Mori, H.: Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 288: H1444 - H1450, 2005
- 28) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.: High-speed K-edge angiography achieved with tantalum K-series characteristic x rays. *SPIE*, 5745: 810-817, 2005
- 29) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Takayama, K.: High-speed enhanced K-edge angiography utilizing cerium plasma x-ray generator. *Opt.Eng.*, 44:049001(1-6), 2005
- 30) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Takayama, K.: Clean monochromatic x-ray irradiation from weakly ionized linear copper plasma. *Opt.Eng.*, 44:049002(1-6), 2005
- 31) Kawada, T., Yamazaki, T., Akiyama, T., Shishido, T., Mori, H., Sugimachi, M.: Myocardial interstitial choline and glutamate levels during acute myocardial ischemia and local ouabain administration. *Acta.Physiol. Scand.*, 184:187-193, 2005
- 32) Hirata, A., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Fujita, M., Tsukamoto, O.: Erythropoietin just before reperfusion reduces lethal arrhythmias and infarct size via phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts. *Cardiovasc.Drugs.Ther.*, 19:33-34, 2005
- 33) Kitagawa, H., Yamazaki, T., Akiyama, T., Sugimachi, M., Sunagawa, K., Mori, H.:

- Microdialysis separately monitors myocardial interstitial myoglobin during ischemic and reperfusion. *Am.J.Physiol.Heart.Circ.Physiol.*, 289:H924-H930, 2005
- 34) Nagaya, N., Kangawa, K., Itoh, T., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y., Fujii, T., Uematsu, M., Ohgushi, H., Yamagishi, M., Tokudome, T., Mori, H., Miyatake, K., Kitamura, S.: Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 112:1128-1135, 2005
- 35) Kuroko, Y., Fujii, T., Yamazaki, T., Akiyama, T., Ishino, K., Sano, S., Mori H.: Contribution of catechol O-methyltransferase to the removal of accumulated interstitial catecholamines evoked by myocardial ischemia. *Neuroscience Letters*, 388:61-64, 2005
- 36) Ben Ammar, Y., Takeda, S., Sugawara, M., Miyano, M., Mori, H., Wakabayashi, S.: Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the human calcineurin homologous protein CHP2 bound to the cytoplasmic region of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1. *Acta Cryst. Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, F61:956-958, 2005
- 37) Sato, E., Yamadera, A., Ichimaru, T., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K.: Conventional Enhanced K-edge angiography Utilizing cerium x-ray generator. *原子核研究*, 49:69-74, 2005
- 38) Sato, E., Tanaka, E, Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.: Preliminary experiment for producing higher harmonic x rays utilizing copper plasma triode. *原子核研究*, 49:61-67, 2005
- 39) Ichimaru, T., Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Takayama, K.: Quasi-monochromatic fine polycapillary imaging utilizing a computed radiography system. *Bull.Health, Sci. Hirosaki*, 4:83-91, 2005
- 40) Ichimaru, T., Yamadera, A., Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Sato, S., Takayama, K.: Cone-beam K-edge angiography utilizing cerium x-ray tube in conjunction with cerium oxide filter. *Bull.Health, Sci. Hirosaki*, 4:93-100, 2005
- 41) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Ito, F., Takayama, K., Onagawa, J., Ido, H.: Variations in cerium x-ray spectra and enhanced K-edge angiography. *Jpn.J.Appl.Phys.*, 44:8204- 8209, 2005
- 42) Sato, E., Hayasi, Y., Kimura, K., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Onagawa, J., Ido, H.: Enhanced K-edge angiography utilizing tantalum plasma x-ray generator in conjunction with gadolinium-based contrast media. *Jpn.J.Appl.Phys.*, 44:8716-8721, 2005
- 43) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawakami, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Ichimaru, T., Takayama, K., Ido, H.: Enhanced magnification angiography including phase-contrast effect using a 100-um focus x-ray tube. *SPIE*, 5918:591811;1-9, 2005
- 44) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Ichimaru, T., Takayama, K., Ido, H.: Monochromatic x-ray generator utilizing angle dependence of bremsstrahlung x-ray distribution. *SPIE*, 5918:591819;1-7, 2005
- 45) Sato, E., Hayasi, Y., Germer, R., Kimura, K.,

- Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido H.: Energy-selective gadolinium angiography utilizing a stroboscopic x-ray generator. SPIE, 5920:59200V;1-8, 2005
- 46) Sato, E., Hayasi, Y., Germer, R., Obara, H., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.: Preliminary study for producing higher harmonic hard x-rays from weakly ionized copper plasma. SPIE, 5920:59200U;1-7, 2005
- 47) Obara, H., Sato, E., Hayasi, Y., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Takayama, K., Ido, H.: Superposition of x-ray spectra using a brass-target plasma triode. SPIE, 5920:59200W;1-8, 2005
- 48) Sato, E., Hayasi, Y., Germer, R., Kimura, K., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Ido, H.: Enhanced K-edge plasma angiography achieved with tungsten Karays utilizing gadolinium-based contrast media. SPIE, 5920:592012;1-8, 2005
- 49) Sato, E., Hayashi, Y., Germer, R., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Ichimaru, T., Takayama, K., Onagawa, J., Ido, H.: Monochromatic flash x-ray generator utilizing a disk-cathode silver tube. Opt.Eng., 44:096501(1-6), 2005
- 50) Sato, E., Yamadera, A., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Ito, F., Inoue, T., Ogawa, A., Sato, S., Takayama, K., Onagawa, J., Ido, H.: X-ray spectra from cerium target and their application to cone beam K-edge angiography. Opt.Eng., 44:096502(1-6), 2005
- 51) Schwenke, D.O., Pearson, J.T., Tsuchimochi, H., Mori, H., Shirai, M.: Exogenous nitric oxide centrally enhances pulmonary reactivity in the normal and hypertensive rat. Clinical and experimental pharmacology and physiology, 32:952-959, 2005
- 52) Sato, E., Tanaka, T., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Takahashi, K., Sato, S., Takayama, K.: X-ray spectra from characteristic x-ray generator with a molybdenum tube. Annual Report of Iwate Medical University, School of Liberal Arts and Sciences, 40:1-7, 2005
- 53) Sato, E., Tanaka, E., Mori, H., Kawai, T., Inoue, T., Ogawa, A., Takahashi, K., Sato, S., Takayama, K.: Measurement of cerium x-ray spectra using a cerium oxide powder filter and enhanced K-edge angiography. Annual Report of Iwate Medical University, School of Liberal Arts and Sciences, 40:9-15, 2005
- 54) Takeda, S.: Crystal structure of troponin and the molecular mechanism of muscle regulation. Journal of Electron Microscopy 52(Suppl.1):i-35-41, 2005
- 【総説】  
Nagaya, N., Mori, H., Murakami, S., Kangawa, K., Kitamura, S.: Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. (Invited Review)  
Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol., 288:R1432-R1437, 2005
- (研究業績「和文」)  
【原著】  
佐藤英一、林 保臣、小原春雄、田中越郎、盛英三、河合敏昭、井上 敬、小川 彰、佐藤成大、市丸俊夫、高山和喜、臼杵辰巳、佐藤公悦：シンクロトロンにかわる医用単色X線装置の開発と応用。医学物理, 25:25-38, 2005

## 【総説】

- 1) 久光隆、若林繁夫：トランスポータ研究のいま—Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体を中心に、化学と生物、44(1)：56-65、2006
- 2) 宮原義典、盛英三、永谷憲歳：特集Ⅱ 第68回日本循環器学会学術集会2. 日本型移植医療をどう作るか—細胞・組織・臓器 心血管疾患における細胞—遺伝子ハイブリッド治療. 循環器専門医、13:33-39、2005
- 3) 井上裕康：赤ワインに含まれるポリフェノール・レスベラトロールに関する最近の話題. ビタミン、78: 621-623、2004
- 4) 増田道隆、小形尚子、望月直樹：PECAM-1を介した血管内皮細胞のメカノセンシング. 日薬理誌、124: 311-318、2004
- 5) 盛英三、望月直樹、武田壮一、井上裕康、中村俊、土屋利江：ナノレベルとイメージングによる分子構造と機能の解析、日本臨牀、64巻2号：358-364、2006

## 学会発表：

### 【海外】

- 1) Mori, H., Chiku, M., Nishigami, K.: Novel micro-angiography for clinical therapeutic angiogenesis. 2nd World Congress on Regenerative medicine (Leipzig, Germany, 2005.5)
- 2) Sukmawan, R., Yada, T., Neishi, Y., Kume, T., Toyota, E., Shinozaki, Y., Mori, H., Akasaka, T., Ogasawara, Y., Yoshida, K.: Edaravone preserves coronary microvascular endothelial function under ischemia reperfusion injury in vivo beating canine heart by scavenging reactive oxygen species. American Heart

Association (Dallas, Texas, 2005.11)

- 3) Yada, T., Shimokawa, H., Hiramatsu, O., Goto, M., Ogasawara, Y., Kajiyama, F., Mori, H., Shinozaki, Y.: Cardioprotective role of hydrogen peroxide as an endogenous EDHF, during ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo. American Heart Association (Dallas, Texas, 2005.11)
- 4) Yada, T., Shimokawa, H., Hiramatsu, O., Goto, M., Ogasawara, Y., Shinozaki, Y., Mori, H.: Role of hydrogen peroxide as an Endogenous EDHF during pacing-induced metabolic dilatation in canine coronary microcirculation in vivo. American Heart Association (Dallas, Texas, 2005.11)
- 5) Akiyama, T., Yamazaki, T., Mori, H.: Large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels regulate the in vivo sympathetic ganglionic transmission. American Heart Association (Dallas, Texas, 2005.11)

### 【国内】

- 1) 松原孝宜、金相佑、盛英三、井上裕康：Expression and purification of proteins related to arachidonate cascade for development of novel drugs. 第4回ナノテクノロジー総合シンポジウム（東京、2月）
- 2) 武田壮一：「バイオシグナルの統合と治療応用に関する研究会」招待講演「構造を放射光で見る」第44回 日本エム・イー学会大会（日本生体医工学会）、（筑波、4月）
- 3) Takeda, S., Masuda, M., Sone, M., Kamioka, Y., Ohki, T., Mori, H., Mochizuki, N.: Crystal structure of Endophilin BAR domain: two mechanisms to drive membrane curvature. 第五回日本蛋白質科学会（福岡市、6月）

- 4) Ammar, Y.B., Takeda, S., Mori, H.,  
Wakabayashi, S. : Crystal structure of CHP2  
complexed with cytoplasmic binding region of  
Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1. 第五回日本蛋白質  
科学会（福岡市、6月）
- 5) Igarashi, T., Takeda, S., Araki, S., Oishi, Y.,  
Mori, H. : 血管内皮細胞のアポトーシスを誘  
導するヘビ毒メタロプロテアーゼの X 線結  
晶構造解析. 第五回日本蛋白質科学会年会  
（福岡、6月）
- 6) 武田壮一、増田道隆、曾根麻奈美、上岡雄  
治、大木高志、盛英三、望月直樹：エンド  
フィリン BAR ドメインの結晶構造：脂質二  
重膜を曲げる二つの機構. 日本生物物理学  
会第 43 回年会（札幌市、11月）
- 7) 五十嵐智子、武田壮一、荒木聡彦、大石裕  
子、盛英三：血管内皮細胞のアポトーシス  
を誘導するヘビ毒メタロプロテアーゼの X  
線結晶構造解析. 日本生物物理学会第 43 回年  
会（北海道、11月）
- 8) Masuda, M., Takeda, S., Sone, M., Kamioka,  
Y., Ohki, T., Mori, H., Mochizuki, N.:  
Endophilin BAR domain uses two mechanisms  
to drive membrane curvature. 日本細胞生物  
学会（大宮市、6月）
- 9) 五十嵐智子、武田壮一、盛英三：Crystal  
structure of the N-terminal domain of human  
cardiac troponin C in complex with  
acalcium-sensitizer; trifluoperazine. The  
22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Section of  
the International Society of Heart Research  
（大阪、12月）

#### H. 知的財産権の出願・登録

出願番号：特願2005-19802

Mono-layered mesenchymal stem cells

ナノ構造に基づく医用材料の開発

分担研究者 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所 療品部長

（協力研究者：中澤憲一、中岡竜介、柳楽 勤、玉井将人）

研究要旨 原子間力顕微鏡（AFM）を利用してイオン・チャンネル形成型の ATP 受容体（P2X2 受容体）タンパク質の像を水中で観察し、この受容体が直径約 10 ナノメートルの円筒型であり、中央にイオン・チャンネル孔を有することを初めて直接的に示した。ATP 受容体チャンネルの電位依存性ゲートを解析し、この機構が4状態モデルで説明できることを示した。NMR 解析で DMSO 中のプロトンシグナルがモデル・ペプチドの構造を解明する系として有用であることを示した。ナノレベルで改良した医用材料として、アルギン酸に2種類の細胞接着関連ペプチドを修飾したものを調製し、その両者から調整したゲル上に正常ヒト骨芽細胞を培養し、細胞機能への影響と細胞-ペプチド間相互作用とを検討した。陰イオン修飾ヒアルロン酸は、正常ヒト表皮角化細胞の分化制御に関わる遺伝子の発現を増加させて分化を著しく促進し、細胞間連絡機構を亢進し、ヒト間葉系幹細胞の分化および増殖も促進した。ニオブイオン導入アパタイトおよび硫酸イオン導入アパタイトを新規に合成した。これらの新規アパタイトナノ粒子は HA p 単一相よりも高い骨形成能を有しており、新規な骨再生用スキャホールドとしての応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

原子間力顕微鏡（AFM）は水溶液中の“生きた”タンパク質を個別に観察するという利点を有している。これは、AFM がカンチレバーと呼ばれるプローブで観察対象に直接接触することにより、その姿を描き出すことができるためである。カンチレバーに修飾をほどこすことにより1個の受容体タンパク質と1分子の薬物との相互作用様式を測定することが可能である。多数の均一な分子集団として受容体を扱ってきたが、AFM は、1分子レベルの“ナノ”の視点を導入することにより、医薬品開発に新たな視界を与える。受容体としては神経、筋、免疫等広く存在が知られている細胞外 ATP 受容体を研究対象とする。本年度は、受容体タンパク質試料の水中 AFM 観察を初めて試みるとともに、分子生物学的手法を用いた受容体タンパク質の構造・機能相関の研究の発展を目指した。

テクノロジーの進歩により生体を構成するタンパク質の詳細な構造が明らかになってきているが、材料表面に吸着したタンパク質の構造変化とその材料特性との関連について検討したものは少ない。生体内の細胞は、材料表面に吸着したタンパク質の構造を認識して生体反応を行う。材料特性とタンパク質構造変化との関連を見出し、医用材料を改良する手段を生み出すことが目的である。特定の組織構築に必要な生体成分の機能を最大に発揮するナノ材料ができれば、新規な医用材料の開発に繋がる。現在までに、材料に硫酸基およびリン酸基を導入することで骨分化の促進が認められたものの更なる改良が必要であることが明らかとなり、細胞接触性ペプチドを用いた改質を行って調整した多糖ゲルにより、細胞の機能が制御できる可能性を明らかにしてきた。今年度は、昨年度と同じペプチド修飾アルギン酸のナノレベルでの改良を行い、ヒト細胞機能への影響

と細胞-ペプチド間相互作用とについて検討した。

再生医療で使用される生体由来材料には、病原体による感染リスクがある。この感染リスク軽減化のために、人工素材を開発する。細胞内分子挙動を制御し、効率的に組織再生を行う機能性物質の開発も目的とする。特に今年度は、骨再生用スキャホールドの開発を目指し、ナノテクノロジーを駆使して新規なアパタイトベースの新規セラミックス材料の創製を試み、骨芽細胞との相互作用について検討した。

## B. 研究方法

1) ATP 受容体 (ラット P2X2 受容体) の cDNA は米国の研究者より入手し、pVL-1393 ウイルスベクター (BD Bioscience Clontech 社) にサブクローニングした。この再構築ウイルスを昆虫由来細胞株 Sf9 に感染させ、細胞を培養した。培養した細胞を遠心により沈澱採取し、Triton X-100 を含む溶解バッファーに懸濁した。この液を遠心し、上清をポリアクリルアミド・ゲル上で電気泳動し、抗ヒスチジン・タグ抗体により受容体タンパク質の存在を確認した。受容体タンパク質の精製はキレーティング・セファローズ FF カラムで行なった。ニッケルを結合させたカラムに試料を浸透させ、結合した受容体タンパク質をイミダゾール濃度を漸次増加させたバッファーを用いて溶出した。タンパク質量は 595 nm の吸光度より求めた。AFM 観察では、タンパク質溶液は水で適切な濃度に希釈し、劈開した雲母表面上に滴下した。滴下溶液を減圧下で乾燥させ、この標本を観察に供した。観察は Digital Instruments 社の MultiMode Nanoscope III, および Asylum Research 社の MFP-3D を用いて、タッピング・モードおよび AC モードで行なった。

分子生物学的手法を用いた受容体の構造-機能相関の研究では、P2X2-BS II を用いて変異導入 (アミノ酸残基置換) をクイック・チェンジ部位特異的変異導入キットまたはエクサイト部位特異的変異導入キット (いずれも Stratagene 社) を用いて PCR 法で行なった。変

異導入の成否は塩基配列解析で確認した。野生型、変異型受容体の RNA はそれぞれのプラスミドを Not I で直鎖化し、これを鋳型としてインビトロ合成した。コラゲナーゼ処理により濾胞細胞を除去したアフリカツメガエル卵母細胞に、実体顕微鏡下、RNA を注入し、受容体を発現させた。この卵母細胞に双ガラス電極膜電位固定法を適用し膜電流測定を行なった。

NMR 解析では、P2X2 受容体のサブクラス間できわめて保存性の 247 および 248 番目のグリシン残基を含む部分と同じアミノ酸配列を持つ人工ペプチドを作製、これを種々の溶液中でプロトンおよび  $^{13}\text{C}$  の NMR 測定をした。

2) アルギン酸は、医用グレードで分子量 30 万のものを入手し用いた。このアルギン酸に、フィブロネクチン中に存在する細胞接着関連配列であるアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 及びプロリン-ヒスチジン-セリン-アルギニン-アスパラギン (PHSRN) を含むペプチドを共有結合でアルギン酸に修飾した。得られたアルギン酸の水溶液から、RGD 及び PHSRN 修飾アルギン酸単独、さらに両者を種々の比で混合した溶液から数種類のゲルカルシウムイオンを架橋により調整した。

細胞には、市販の正常ヒト軟骨細胞及び骨芽細胞 (BioWhittaker 社) を使用した。なお、実験にはそれぞれの細胞の継代数が 6 代目までのものを用いた。調製したアルギン酸ゲル上で、これらの細胞の培養を 2-4 週間行った。各材料上での細胞接着状態を経時的に位相差顕微鏡で観察しながら培養を行い、培養終了後、培地中に TetracolorOne (生化学工業) を添加して培養した後の上清の 450nm での吸光度を測定して、細胞の相対的な数を評価した。

骨芽細胞分化への影響は、昨年度と同様の方法でのアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性評価により行った。加えて、細胞からのオステオカルシン産生量を ELISA 法により評価することを試みた。

軟骨細胞の分化への影響は、分化マーカーの発現変化から検討した。所定時間経過後のゲル上の細胞からの全 RNA を回収し、逆転写反応

後の Real Time PCR により、軟骨の分化マーカーである type-II 及び type-X collagen と aggrecan の mRNA 発現量を評価した。これらの結果から、作製したアルギン酸ゲルの細胞機能への影響を検討した。

これらとは別に修飾ペプチド末端に 2 種類の蛍光色素を結合させたアルギン酸を調整し、それらからなるゲル上で細胞培養を行った場合の蛍光を観察し、細胞-ペプチド間相互作用を検討することを試みた。

3) 陰イオン修飾ヒアルロン酸をコーティングした培養ディッシュ上で正常ヒト表皮角化細胞を培養し、DNA チップおよびプロテオミクス技術により細胞内分子の挙動を解析し、細胞を精密に制御する技術の開発を試みる。

4) 骨再生用スキャホールドの開発については、これまでの研究により、高濃度のリン酸イオンは骨芽細胞の分化を阻害することが明らかになったため、HAp のリン酸サイトに異種イオンを導入することを試みた。今年度は生体成分であり、安全性の高い硫酸イオンおよび骨芽細胞の分化を促進するニオブ酸イオンに着目し、これらの陰イオンの HAp 構造中への取り込みについて検討した。骨再生用スキャホールドは、共沈法により合成した。溶液の組成を制御することにより各種の無機イオンの取り込み効果について検討した。得られたセラミックス粒子を成形焼結することによりタブレットを作製し、その上に骨芽細胞を培養することで新規セラミックス材料の骨形成能（増殖能、分化能）を評価した。

### C. 研究結果

1) 希釈した水溶液を雲母上に滴下し、これを AFM で観察したところ、見かけ上の直径が約 20 nm 程度の均一な粒子が散在する像が得られた。粒子の高さは約 3 nm であった。イオン強度を上げ、ATP を添加した場合、タンパク質が高密度で一様に整列した 2 次元結晶に近い像が得られた。この表面を拡大観察したところ、個々のタンパク質は直径約 10 ナノメートルの円筒状であり、中央にイオン・チャンネル

孔を有することが確認された。また、ATP を添加しない場合にはこのような整列したタンパク質像は得られなかったことから、ATP の結合により受容体タンパク質の構造が均一になることが示唆された。その他、表面を NTA 加工したチップ上でヒスチジンタグを利用してタンパク質を高密度に結合させる実験も試みたが、結合は認められたものの、チップの起伏のため高い解像度は得られなかった。

野生型の P2X2 受容体をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、ATP を投与した場合、ナトリウムおよびカルシウムの透過による内向き電流が惹起された。この電流が持続している間に過分極側（マイナス側）に矩形波を加えると、約 40 ms の時定数で電流が増大した。よって、P2X2 受容体チャンネルには電位により開くゲートがあると考えられた。このゲートの電位依存性は、開く時と閉じる時では異なっており、単なる開閉の 2 状態では説明できなかった、このことおよび電位依存性の成分の大きさならびに活性化速度が ATP の濃度に依存することから、ATP に対する親和性が電位によって変わるという 4 状態のモデルを提案した。このモデルおよび速度論的実験データを用いて計算すると親和性の差は約 3 倍であり、この差は電位依存性の成分の大きさの ATP 濃度依存性をほぼ過不足なく説明しうるものであった。

P2X2 受容体のモデルペプチドを用いた実験では、水中、メタノール中および DMSO 中でプロトンおよび  $^{13}\text{C}$  の NMR 測定を行なった。最もシグナルが明瞭に検出できたのは、DMSO 中のプロトン・シグナルであった。薬物と受容体の結合は水中ではなくタンパク質中で起こるため、基本的には疎水的環境下である。よって、DMSO 中の測定は結合状態に近いものを反映すると考え、ペプチドに ATP の塩基部分であるアデニンを加えた測定を行なった。データは現在解析中である。

2) 細胞接着性配列 RGD を含むペプチドのアルギン酸分子中への導入反応を行いゲルを調整した結果、ヒト細胞においても、その接着性は未反応のゲルに比較して著しく改善された。ま



た、RGD と協同して細胞接着に働くことが知られている PHSRN を導入したアルギン酸によるゲルの作製も行った。PHSRN そのものは細胞接着性配列ではないので、予想通りこのゲル上への細胞接着の改善は芳しいものではなかった。また、両者が同時に存在するゲルを2つのアルギン酸を混合して作製したところ、当初期待した細胞接着性の著しい改善は見られなかったものの、特定の混合比では細胞の接着量が増大することが認められた。

細胞接着に大きな変化は見られなかったものの、RGD と PHSRN が同時に存在しているゲル上の細胞は、ペプチドそれぞれが単独で存在しているゲルとは異なる分化挙動を示す結果を得た。まず、軟骨細胞に関しては、ディッシュ上、あるいは RGD 修飾アルギン酸ゲル上での細胞と比較して、typeII collagen 及び aggrecan mRNA の発現が増強された。特に、特定の存在比のゲル上での Type-II collagen の増殖は著しいものであった。これに対して、type-X collagen の発現はいずれの場合にも認められず、関節由来の軟骨細胞としての分化状態がより維持された状態であることを示唆するものであった。

ヒト骨芽細胞の場合には、RGD による接着細胞数、ALP 活性、さらにオステオカルシン産生の増加が認められ、2種類のペプチドが同時に存在するゲル上では、これらの値がさらに増加する結果が得られた。この場合にも、上述した軟骨細胞と同様に、RGD を PHSRN が特定の比で存在するアルギン酸ゲル上で、その増強は最大となることを示唆する結果を得た。

3)陰イオン修飾ヒアルロン酸をコーティングした培養ディッシュは、正常ヒト表皮角化細胞の複数の分化マーカーの発現を亢進して分化を著しく促進し、増殖を抑制していた。陰イオン修飾ヒアルロン酸は角化細胞の WNT4、MKK6 等の角化細胞の分化に関わる遺伝子発現を増加させ、そのシグナル伝達の上流に存在する可能性がある細胞膜タンパク質 NOTCH3 の発現を増加させていた。ヒアルロン酸への陰イオン修飾が、それらの遺伝子発現の誘導する因子

であると推定された。

細胞は、ヒアルロン酸をコーティングした培養ディッシュには接着しない。陰イオン修飾ヒアルロン酸はさらに細胞間連絡機構を亢進した。また、陰イオン修飾ヒアルロン酸を添加することで未分化状態および分化誘導状態のヒト間葉系幹細胞の増殖が促進され、さらに骨芽細胞分化誘導培地に添加することで、ヒト間葉系幹細胞の分化および増殖を著しく促進した。

4)骨再生用スキャホールドとしての各種イオン導入型ハイドロキシアパタイトは共沈法により合成した。共沈時の溶液成分の組織を制御することにより、これらのイオンが構造置換された新規な HAp ナノ粒子の合成に成功した。ニオブイオンが導入された HAp 上で培養された骨芽細胞はアパタイトと比べ約 2 倍のカルシウムの沈着量が多くなっており、骨芽細胞の骨形成能を促進することが明らかとなった。さらに硫酸イオンが導入された HAp は、骨芽細胞の増殖および分化ともに促進し、極めて高い骨形成能を有していることが明らかとなった。

## D 考察

1) AFM を利用したタンパク質の形状観察では、塩濃度を上げた状態で、ATP を加えることにより、タンパク質が高密度で一様に配列した像が得られた。このような配列はタンパク質の AFM 観察では理想的とされる 2次元結晶 (2D crystal) に似ており、プローブの z 軸方向の動きを極小に抑えることができるため、高分解能の観察が期待できる。事実、このタンパク質の像を拡大して観察したところ、個々の受容体タンパク質の像を得ることができ、さらにはこのタンパク質の中央にチャンネル孔があることが明らかとなった。このような高分解能の AFM 観察は P2X 受容体はもちろん、他のイオン・チャンネル形成型の神経伝達物質の受容体を含めても初めてのことである。ATP を添加しない場合にはこのような配列は認められなかった。このことは、ATP の結合前の受容体タンパク質が比較的不均一であるのに対し、ATP が結合すると均一化するためであると考えら

れる。神経細胞を用いた実験でも ATP の添加で受容体の会合状態が変化することは観察されているが、今回の発見は受容体タンパク質が何か別の“接着因子”がなくてもリガンドの結合により自ずと会合状態を変化させることを示唆するもので興味深い。

分子生物学的手法を用いた P2X2 受容体タンパク質の電位依存性ゲートの研究では、定量的な解析結果からこのゲート機構が、高親和性の開閉、および低親和性の開閉に4つの状態から成るモデルで説明できることが示された。また、このモデルと速度論的実験データは ATP に対する濃度依存性を過不足なく説明することができ、このモデルの正当性を支持している。電位依存性があるということは、タンパク質内で電荷を有するアミノ酸残基が存在し、細胞膜内で電位に応じて移動することを示唆している。電位依存性のスロープはカルシウム・チャンネルなどの電位依存性チャンネルに比べて緩やかであり、これらのチャンネルに5個近くあるとされる電位感受性電荷(ゲード電荷)よりは数は少ないと考えられる。

NMR によるモデル・ペプチドでは DMSO 中でのプロトンのシグナルが明瞭に観察され、以降、疎水環境下での結合を検討するのにふさわしい系となることが示された。シグナルと個々のアミノ酸残基を対応させる行ない、それぞれの相対的位置関係を明らかにし、3次元的な像をコンピュータ上に描かせること、および、この手法によりアデニン部分との相互作用を解析することを今後の目標としている。

2) 現在までの結果から、安全性を考慮して採用した多糖材料への官能基導入とその複合化による材料の利用では、その期待される機能を有効に発揮することは困難であることが分かった。その原因の一つとして、昨年度使用した高分子電解質錯体材料では、架橋点に機能性の官能基を使用しているため、その効果が打ち消されたことが考えられる。そこで、前年度よりカルシウムイオンで架橋させられゲルを形成するアルギン酸分子を用い、2種類の協同作用する細胞接着関連ペプチドによる改質を行っ

て検討を行ってきている。この改善に利用している細胞接着ペプチドである RDG が結合する細胞膜タンパク質、インテグリンからのシグナル伝達は細胞機能に大きな影響をもたらすが、フィブロネクチン中の RGD 配列だけでなく PHSRN 配列もそのインテグリンとの結合に重要であることが報告されている。よって、本研究では、RGD に加え、この PHSRN 配列をもつ2種類のペプチドを材料に修飾させて、新たな機能性材料を開発することを試みてきた。

前年度、このように調整したアルギン酸ゲルでは、修飾したペプチドの種類やその組み合わせに応じて細胞挙動が異なることを動物由来の細胞を用いて明らかにした。昨年度の結果から、動物細胞よりもヒト細胞を用いた場合の方が、より臨床に近い結果を得ることが出来ることが考えられるので、今年度は、現実的な利用を想定して、ヒト由来正常細胞を用いての検討を中心に行った。昨年度とは異なり、接着においても、細胞の分化においても PHSRN と RGD とを共存させることでその挙動を制御できる可能性を示す結果を得た。

ヒト正常軟骨細胞を RGD 及び PHSRN を修飾したものを混合して調整したアルギン酸ゲル上で培養した場合には、RGD と PHSRN の存在比が2:1の時に軟骨分化マーカーである type-II collagen と aggrecan の mRNA 発現の極大が見られた。また、肥大軟骨細胞のマーカーである typeX collagen の発現が全く認められなかったことから、軟骨としての分化状態がより維持されウシ軟骨細胞のように肥大化しないことが示唆された。興味深いことに、RGD 修飾アルギン酸のみで調整したゲル上で培養した場合と比較しても、特定の混合比では分化マーカーの発現が増大しているだけでなく、接着し増殖した細胞の数は多くなっていることが認められ、両ペプチドの共存による細胞接着及び分化の促進が可能であることが示された。また、ヒト骨芽細胞の場合にも、両ペプチドの特定の存在比をもつゲル上での接着細胞数の増加と分化の促進が認められた。よって、RGD と PHSRN を担体中に導入することで、その接

着性改良と分化状態の維持、あるいは増強が可能であることが認められ、この材料が骨及び軟骨再生用の材料として有望であることが示唆された。

このペプチド導入による細胞挙動制御の機構についてナノイメージング手法である FRET を利用して観察を行ったところ、細胞機能の促進が見られた材料上では、細胞接着部ではペプチドが集中し、RGD と PHSRN との距離が nm オーダーになることが示された。このことは、接着後、細胞がインテグリン 1 分子で RGD と PHSRN 両方を認識するようになることを示すものである。よって、設計時の考え通り、この細胞-ペプチド間相互作用により細胞分化を促すシグナル伝達を効率よく誘導する材料が調製できたと考えられる。このように、接着ペプチドのナノオーダーでの導入制御を行うことが、新規な再生医療用担体の調製には重要な要素の 1 つであると言えよう。来年度はさらにナノイメージング技術を利用して詳細な検討を行い、分化誘導能に優れた再生医療用担体用材料の設計及び調製に重要な知見を積み上げていき、新規で安全な材料の設計を行いたいと考えている。

3)陰イオン修飾ヒアルロン酸は、異なる細胞種の分化を促進し、さらに組織再生において重要な細胞間連絡機構を賦活する機能性物質であり、再生医療において重要な働きをする有望な機能性物質であると考えられる。

4)ニオブイオンが導入されたアパタイト (NbHAp) は骨芽細胞の分化を促進した。これまでの研究によりニオブイオンは骨芽細胞の分化を促進することが報告されている。本研究で NbHAp の溶出イオンを検討した結果、ニオブイオンは  $10^{-4\text{m}}\text{mol/L}$  程度溶出しており、このニオブイオンにより骨芽細胞の分化を促進したと考えられた。また硫酸イオンが導入されたアパタイト ( $\text{SO}_4^{2-}\text{HAp}$ ) は骨芽細胞の増殖および分化を促進した。特定の増殖因子の吸着実験から、 $\text{SO}_4^{2-}\text{HAp}$  は HAp よりも増殖因子を吸着する効果が認められた。このように材料表面へ、血清中に含まれる増殖因子が吸着するこ

とにより増殖が促進されたと考えられた。

## E 結論

1)本年度の研究により、ATP 受容体タンパク質の個々の構造を解明し、直径約 10 ナノメートルの中央にイオン・チャネル孔を有する円筒型であることを初めて明らかにした。また、受容体の会合状態から、ATP が結合することにより、結合前は比較的不均一だった受容体の構造が均一化することが示唆された。また、分子生物学的手法を用いた ATP 受容体の構造-機能相関の研究では、電位依存ゲートの性質を定量的に解析し、この機構を説明する 4 状態モデルを提唱した。NMR 解析では DMSP 中のプロトン・シグナルがモデル・ペプチドの構造決定に利用可能であることを示した。

2)多糖材料であるアルギン酸に細胞接着配列である RGD 及び PHSRN を持つペプチドを修飾したものを調整した。調製した 2 種類のアルギン酸を混合して、ゲルを調製したところ、細胞接着ペプチドの種類と組み合わせを制御することで、ゲル上のヒト正常細胞の接着と分化が制御できることを見いだした。また、その細胞機能は、実際の細胞接着部分における 2 種類のペプチドの相互間距離に影響を受けることが示唆された。

3)陰イオン修飾ヒアルロン酸は、異なる細胞種の分化を促進し、さらに組織再生において重要な細胞間連絡機構を賦活する機能性物質であり、再生医療において重要な働きをする有望な機能性物質であると考えられる。

4)本研究で合成された新規アパタイトナノ粒子は HAp 単一相よりも高い骨形成能を有しており、新規な骨再生用スキャホールドとしての応用の可能性が示唆された。また既に HAp セラミックスを用いた人工骨が市販されているが、これらの製品に置き換わる人工骨用の新規材料としても期待できる。

## F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表  
(研究業績「欧文」)

【原著】

- 1) Yuping Li, Tsutomu Nagira, Toshie Tsuchiya: The effect of hyaluronic acid and insulin secretion in HIT-T15 cells through the enhancement of gap-junctional intercellular communications. *Biomaterials*, 27, 1437-43, 2005.
- 2) Tsutomu Nagira, Susan Bijoo Matthew, Yoko Yamakoshi and Toshie Tsuchiya: Enhancement of Gap Junctional Intercellular Communications if Normal Human Dermal Fibroblasts Cultured on Polystyrene Dishes Grafted with poly-*N*-isopropylacrylamide(PIPAAm). *Tissue Engineering*, 11, 1392-7, 2005
- 3) Nakazawa, K., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, T. and Ohno, Y. Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. *European Journal of Pharmacology*, 518, 107-110, 2005
- 4) Nakazawa, K. and Ohno, Y. Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. *European Journal of Pharmacology* 508, 23-30, 2005
- 5) Okada E, Komazawa Y, Kurihara M, Inoue H, Miyata N, Okuda H, Tsuchiya T, Yamakoshi Y: Synthesis of C60 Derivatives for Photoaffinity Labeling. *Tetrahedron Lett*, 45: 527-529, 2004.
- 6) Nakaoka R, and Tsuchiya T: Enhancement of differentiation and homeostasis of human osteoblasts by interaction with hydroxyapatite in microsphere form. *Key Engineering Mater.*, 309 - 311, 1239-1296, 2006
- 7) Nakaoka R, Ahmed S, Tsuchiya T: Hydroxy apatite microspheres enhance gap junctional intercellular communication of human osteoblasts composed of connexin 43 and 45. *J Biomed Mater Res*: 74A: 181-186, 2005
- 8) Nagahata M, Nakaoka R, Teramoto A, Abe K, Tsuchiya T: The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes. *Biomaterials*, 26, 5138-5144, 2005.
- 9) Nagira T, S B Matthew, Yamakoshi Y, and Tsuchiya T: Enhancement of Gap Junctional Intercellular Communication of Normal Human Dermal Fibroblasts Cultured on Polystyrene Dishes Grafted with Poly-*N*-isopropylacrylamide (PIPAAm). *Tissue Engineering*, Submitted.
- 10) Isama K , Tsuchiya T : Osteoblast differentiation and apatite formation on gamma-irradiated PLLA sheets. *Key Engineering Materials*, 288-289, 408-412, 2005.
- 11) Tsuchiya T: A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products. *ASTM STP 1452*: 254-261, 2004.
- 12) Nagahata M, Tsuchiya T, et al: A novel function of N-adherin and Connexin 43: Marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed with sulfated hyaluronan. *Biochem Biophys Res Commun*, 315: 603-611, 2004.
- 13) Matsuoka A, Tsuchiya T: Gene expression changes in Balb/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane film. *J Biomed Mater Res*, 68A: 376-382, 2004.
- 14) Ahmed S, and Tsuchiya T: Different expression on Gap junctional protein connexin43 in two strains of mice after one-month Implantation of Poly-L-Lactic acid. *Animal cell technology*, 13: 481-485, 2004.
- 15) Park J U and Tsuchiya T: Evaluation of the cornea cells affected by multi-purpose solutions for contact-lens. *Animal cell technology*, 13: 5065-509, 2004.
- 16) 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*, 13: 475-479, 2004.
- 17) Yang J, Ichikawa A, Tsuchiya T: Change of the cellular function by connexin gene transfection in a hepatoma cell line. *Animal cell technology*, 13: 293-297, 2004.
  - 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*, 307: 80-85, 2003.
  - 19) Nakaoka R, Tsuchiya T, Nakamura A: Neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films. *J Biomed Mater Res*, 64A: 439-446, 2003.
  - 20) Isama K, Tsuchiya T: Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*, 24: 3303-3309, 2003.
  - 21) Sumide T, and Tsuchiya T: 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*, 64B: 57-64, 2003.
  - 22) Tamai M, Nakaoka R and Tsuchiya T: In vitro study on the osteogenesis of normal human osteoblasts cultured on the discs of various kinds of calcium phosphate ceramics, *Archives of Bioceramics Research*, Vol.5, 158-161, 2005
  - 23) Tamai M, Nakaoka R, Isama K and Tsuchiya, Novel calcium phosphate ceramics : The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts, *Key Engineering Mater.*, 309-311: 97 – 100, 2005.
  - 24) Tamai M, Nakaoka R, Tsuchiya T: Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics, *Key Engineering Mater.*, 309 – 311, 263 – 266, 2005.
  - 25) Yuping Li, Toshie Tsuchiya, Rumi Sawada, Misao Nagashata-Ishiguro, Jun Yang, Tomomi Ito, Tsutomu Nagira: The effect of sulfated hyaluronan on TGF- $\beta$  2 expression involved in the cardiac tissue development and remodeling, *Tissue Engineering*, Submitting.
  - 26) Naohito Nakamura, Tsutomu Nagira, Toshie Tsuchiya: Remarkable Cytotoxicities and the Suppression of Netin Gene Expression by Biodegradable Oligomers and their Catalysts in Normal Human Astrocytes, Submitting.
  - 27) Nakazawa, K., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, T. and Ohno, Y. Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. *European Journal of Pharmacology*, 518, 107-110, 2005
  - 28) Nakazawa, K. and Ohno, Y. Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. *European Journal of Pharmacology* 508, 23-30, 2005
  - 29) Nakazawa K, Ohno Y: Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. *Eur J Pharmacol*, 2005(in press)
  - 30) Nakazawa, K., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, T. and Ohno, Y. Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. *European Journal of Pharmacology*, 518, 107-110, 2005
  - 31) Nakazawa, K. and Ohno, Y. Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. *European Journal of Pharmacology* 508, 23-30, 2005
  - 32) Nakazawa K, Ojima H, Ishii-Nozawa R, Takeuchi K, Ohno, Y: Amino acid substitutions from an indispensable disulfide bond affect P2X2 receptor activation. *Eur J Pharmacol*, 483: 29-35, 2004.
  - 33) Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Saito H, Ohno, Y, Ito Y: Hydrogen peroxide

modulates whole cell  $Ca^{2+}$  currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. *Neurosci Lett*, 356: 25-28, 2004

- 34) Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Saito H, Ohno Y, and Ito Y: Modulation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  current by 4-hydroxynonenal in dentate granule cells. *Biol Pharm Bull*, 27: 174-179, 2004.
- 35) Nakazawa K, Ohno Y: Desensitization of P2X2 receptor/channel pore mutants. *Eur J Pharmacol*, 495: 27-33, 2004.
- 36) Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Ohno Y, Ito Y: 4-Hydroxynonenal modulates the long-term potentiation induced by L-type  $Ca^{2+}$  channel activation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci Lett*, 370: 155-159, 2004.
- 37) Nakazawa K, Ohno Y: Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. *Eur J Pharmacol*, 2005(in press)

(研究業績「和文」)

【原著】

- 1) 山越葉子: 単分子アノマニピュレーションを目指した超化学分子とナノテクノロジーを用いた解析. 機能性人工レセプター Molecular Gripper の設計合成及び画像化. 季刊フラーレン, Vol.11 No.2, 169-177, 2003.
- 2) 長幡 操, 寺本 彰, 阿部康次, 中岡竜介, 土屋利江: ラット頭蓋冠由来骨芽細胞の ALPase 活性を促進する硫酸化ヒアルロン酸の効果 繊維学会誌, 印刷中
- 3) 柳楽 勤, 土屋利江: メカニカルストレスに対する細胞応答分子機構、「生体物理刺激と生体反応」フジテクノシステム pp.667-677.2004.
- 4) 土屋利江: バイオマテリアルの安全性について一組織工学用材料を中心として、再生歯誌、2,1-8,2004.

【学会発表】

- 1) 中澤憲一, 生島裕恵, 大野泰雄 “P2X2 受容体の必須な細胞外ジスルフィド結合の下流領域アミノ酸置換による性質の変化” 第 110 回日本薬理学会関東部会、2004 年 6 月
- 2) 中澤憲一, 大野泰雄 “P2X 受容体チャネル孔変異体に観察される脱感作および不活性化様機構の解析” 第 78 回日本薬理学会年会、2005 年 3 月
- 3) 行方衣由紀, 田中(飯田)直子, 栗原正明, 佐藤由紀子, 山越葉子, 田中光, 重信弘毅, 中澤憲一 “P2X 受容体の ATP 結合部位の構造解析” 第 78 回日本薬理学会年会、2005 年 3 月
- 4) 行方衣由紀, 田中(飯田)直子, 栗原正明, 佐藤由紀子, 山越葉子, 田中光, 重信弘毅, 中澤憲一 “NMR と計算による P2X 受容体の ATP 結合部位の構造解析” 日本薬学会第 125 年会、2005 年 3 月
- 5) Nishikawa K, Tominaga N, Otomo R, Yamakoshi Y: Polyphosphate Metabolism in *Chlamydomonas acidophila* in Phosphate-limited Conditions under Heavy Metal (Cd) Stress. The 2003 Annual meeting of the American Society of Plant Biologists. (Honolulu, July, 2003.)
- 6) 山越葉子, 甲斐陽子, 宮島敦子, 土屋利江: フラーレン (C60) の微生物増殖阻害活性について. 日本薬学会第 123 年会. (長崎, March, 2003.)
- 7) Nishikawa K, Tominaga N, Yamakoshi Y, Otomo R: Change of the Ultrastructure and Accumulation of Polyphosphate in *Chlamydomonas acidophila*. The 10th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*. (Vancouver, June, 2002.)
- 8) 矢上 健, 配島由二, 土屋利江ら.: ラテックスアレルギーとしての isoflavone reductase、第 53 回日本アレルギー学会総会 (23-25, Oct, 2003)

- 9) 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 (12-13June,2003)
- 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  
ト表皮角化細胞の分化促進及び細胞間連  
絡機構亢進効果, 第 25 回日本バイオマテ  
リアル学会, (16-17,Dec.2003)
- 11) 中岡竜介、土屋利江: 軟骨組織再生を目指  
した新規アルギン酸ゲルの *in vitro* 機能評  
価、第 8 回日本組織工学会 (東京、2005 年  
9 月)
- 12) 中岡竜介、土屋利江: ナノ蛍光イメージ  
ングによる細胞-多糖 Scaffold 間相互用観察  
の試み、第 27 回日本バイオマテリアル学  
会大会 (京都、2005 年 11 月)
- 13) 賀喜白乙、中岡竜介、土屋利江: 外科手術  
材料の安全性に関する研究 (1): 細胞毒  
性試験による評価、第 27 回日本バイオマ  
テリアル学会大会 (京都、2005 年 11 月)
- 14) 賀喜白乙、中岡竜介、土屋利江: 吸水性局  
所止血材料と吸水性癒着材料防止材料の  
安全性に関する研究 (1) 細胞毒性による  
評価、第 43 回日本人工臓器学会 (東京、  
2005 年 12 月)
- 15) Nakaoka R, Tsuchiya T: Enhancement of  
differentiation and homeostasis of human  
osteoblasts by interaction with hydroxyapatite  
in microsphere form. *Bioceramics* 18. (Kyoto,  
December, 2005)
- 16) 中岡竜介、長幡操、寺本彰、阿部康次、土  
屋利江: 高分子電解質錯体上での骨芽細胞  
の機能変化とその安全性の予測、日本バイ  
オマテリアル学会シンポジウム 2004 (つく  
ば、2004 年 11 月)
- 17) 中岡竜介、Susan Hsiong、土屋利江、David  
J. Mooney: 細胞接着ペプチド修飾アルギン  
酸ゲル上での細胞機能変化、日本バイオマ  
テリアル学会シンポジウム 2004 (つくば、  
2004 年 11 月)
- 18) 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  
ト表皮角化細胞およびヒト間葉系幹細胞  
の分化促進効果、第 3 回日本再生医療学会  
総会, (May,2004)
- 19) 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ヒト間  
葉系幹細胞の分化促進効果、第 26 回日本  
バイオマテリアル学会, (Dec.2004)
- 20) 柳楽 勤、土屋利江、石黒操、陰イオン修  
飾ヒアルロン酸によるヒト間葉系幹細胞  
の増殖および分化促進効果、第 4 回日本再  
生医療学会総会 (May, 2005)
- 21) Nagira T, Nagahata M, Tsuchiya T:  
Enhancement of cell differentiation in Normal  
Human Epidermal Keratinocytes and Human  
Mesenchymal Stem Cells by  
the anionic-modified hyaluronan. 第 3 回ナノ  
テクノロジー総合シンポジウム (JAPAN  
NANO 2005), (Feb, 2005)
- 22) 土屋利江: 再生医療デバイス実用化のため  
に、みらいせん展健康系イベントシンポジ  
ウム (11, Aug, 2004)
- 23) 土屋利江: 医療機器としての人工臓器の開  
発、みらいせん展健康系イベントシンポ  
ジウム (7, Aug, 2004)
- 24) 柳楽勤、土屋利江、石黒操、陰イオン修飾  
ヒアルロン酸によるヒト間葉系幹細胞の  
増殖および分化促進効果、第 4 回日本再生  
医療学会
- 25) M. Tamai, R. Nakaoka and T. Tsuchiya, "*In  
vitro* study on the osteogenesis of normal  
human osteoblasts cultured on the discs  
various kinds of calcium phosphate ceramics"  
Asian Bioceramics Symposium, Hokkaido,  
Japan, Oct. 2005.
- 26) M. Tamai, R. Nakaoka, K. Isama and T.  
Tsuchiya, "Novel calcium phosphate ceramics:  
The remarkable promoting action on the  
differentiation of the normal human  
osteoblasts" *Bioceramics* 18, Kyoto, Japan,  
December 2005.
- 27) M. Tamai, R. Nakaoka and T. Tsuchiya,

“Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics” Bioceramics 18, Kyoto, Japan, December 2005.

#### 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 2003-8855 ギャップ機能抑制剤

特願 2004-193233 ギャップ機能抑制剤、細胞増殖促進剤および硫酸化ポリフコース

特願 2004-167632 生体吸収性を有する新規材料、その製造方法、及びその用途

特願 2004-330417 生体組織補填材および生体組織補填体

特願 2005-025603 ヒト細胞の培養方法、培養容器および生体組織補填体

特願 2005-126591 生体組織補填材の製造方法

特願 2005-294058 生体組織補填材とその製造方法

Docket No.19296 Materials for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing materials for repairing biological tissues.

11・270.081 Materials for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing materials for repairing biological tissues.

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



別紙 4  
研究成果の刊行に関する一覧表 (分子機能イメージング循環系)  
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Linguh H, Tsuda M, Makino Y, Sakai M, Watanabe T, Ichihara S, Sawa H, Nagashima K, <u>Mochizuki N</u> , Tanaka S.	Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS.	Oncogene		In press	2005
Sakurai A, Fukuhara S, Yamagishi A, Sako K, Kamioka Y, Masuda M, Nakaoka Y, <u>Mochizuki N</u> .	MAGI-1 is required for Rap1 activation upon cell-cell contact and for enhancement of VE-cadherin-mediated cell adhesion.	Mol. Biol. Cell		In press	2005
Maeng YS, Min JK, Kim JH, Yamagishi A, <u>Mochizuki N</u> , Kwon JY, Park YW, Kim YM, Kwon YG.	ERK is an anti-inflammatory signal that suppresses expression of NF-kappaB-dependent inflammatory genes by inhibiting IKK activity in endothelial cells.	Cell Signal		In press	2005
Somekawa S, Fukuhara S, Fujita H, Masuda M, Saito Y, <u>Mochizuki N</u> .	Enhanced functional Gap junction neofunction by PKA-dependent and Epac-Rap1-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes.	Circ. Res.	92	655-662	2005
Cho CH, Kim KE, Byun J, Jang HS, Kim DK, Baluk P, Baffert F, Lee GM, <u>Mochizuki N</u> , Kim J, Jeon BH, McDonald DM, Koh GY.	Long-term and sustained COMP-Ang1 induces long-lasting vascular enlargement and enhanced blood flow.	Circ Res.	97	86-94	2005
Fujita H, Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Kamioka Y, Nakaoka Y, Masuda M, <u>Mochizuki N</u> .	Local activation of Rap1 contributes to directional vascular endothelial cell migration accompanied by extension of microtubules on which RAPL, a Rap1-associating molecule, localizes.	J. Biol. Chem	280	5022-5031	2005
Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, <u>Mochizuki N</u> .	Cyclic AMP potentiates VE-cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through Epac-Rap1 signaling pathway.	Mol. Cell Biol.	25	136-146	2005

## 研究成果の刊行に関する一覧表 (分子機能イメージング神経系)

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kusumi A, Suzuki K, Kondo J, Morone N, Umemura Y.	Protein-Lipid interactions in the formation of raft microdomains in biological membranes.	Lukas K. Tamm	Protein-Lipid Interactions: From Membrane Domains to Cellular Networks	Wiley-VCH	Germany	2005	307-336

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohira K, Kumanogoh H, Sahara Y, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M	A truncated tropo - myosine - related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1.	J. Neurosci.	25	1343-1353	2005
Wang Y.L, Liu W, Sun Y.J, Kwon J, Setsuie R, Osaka H, Noda M, Aoki S, Yoshikawa Y, Wada K	Overexpression of ubiquitin carboxyl -terminal hydrolase L1 arrests spermatogenesis in transgenic mice.	Mol. Reprod. Dev.	73	40-49	2006
Sakurai M, Ayukawa K, Setsuie R, Nishikawa K, Hara Y, Ohashi H, Nishimoto M, Abe T, Kudo Y, Sekiguchi M, Sato Y, Aoki S, Wada K	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation.	J. Cell Sci.	119(Pt1)	162-171	2006
Kwon J, Sekiguchi S, Wang Y.L, Setsuie R, Yoshikawa Y, Wada K	The region- specific functions of two ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes along the epididymis.	Exp. Anim.	55(1)	35-43	2006

Mi W, Beirowski B, Gillingwater T.H, Adalbert R, Wagner D, Grumme D, Osaka H, Conforti L, Arnhold S, Addicks K, <u>Wada K</u> , Ribchester R.R, Coleman M.P	The slow Wallerian degeneration gene, WldS, inhibits axonal spheroid pathology in gracile axonal dystrophy mice.	Brain	128	405-416	2005
Manago Y, Kanahori Y, Shimada A, Sato A, Amano T, Sato Y, Setsuie R, Sakurai M, Aoki S, Wang Y.L, Osaka H, <u>Wada K</u> , Noda M	Potential of ATP-induced currents due to the activation of P2X receptors by ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1.	J. Neurochem.	92	1061-1072	2005
Setsuie R, Kabuta T, <u>Wada K</u>	Does Proteasome Inhibition Decrease or Accelerate Toxin-Induced Dopaminergic Neurodegeneration?	J. Pharmacol. Sci.	97	457-460	2005
Kwon J, Mochida K, Wang Y.L, Sekiguchi S, Sankai T, Aoki S, Ogura A, Yoshikawa Y, <u>Wada K</u>	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis.	Biol. Reprod.	73	29-35	2005
Enomoto A, Murakami H, Asai N, <u>Morone N</u> , Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M	Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE.	Dev. Cell	9	389-402	2005
Arimura N, Menager C, Kawano Y, Yoshimura T, Kawabata S, Hattori A, Fukata Y, Amano M, Goshima Y, Inagaki M, <u>Morone N</u> , Usukura J, Kaibuchi K	Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones.	Mol. Cellular Biol.	25	9973-9984	2005

## 別紙 4

## 研究成果の刊行に関する一覧表（新たなイメージング技術の開発）

## 【雑誌】

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
A. Miyawaki, T. Nagai and H. Mizuno	Engineering fluorescent proteins	Adv. Biochem. Eng. Biotechnol	95	1-15	2005

## 【書籍】

著者名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者 名	書籍名	出版社 名	出版 地	ページ	出版年
永井健治、宮 脇敦史	GFPを利用した 蛍光バイオセ ンサーの作成 法と生体機能 の可視化	月原富 武、新延 道夫	遺伝子医学 Mook別 冊/分子生物 学実験シ リーズ 図・写真で 観るタンパ ク質構造・ 機能解析実 験実践ガイ ド	メディ カル ドゥ	大阪	173- 182	2005
A. Miyawaki, T. Nagai and H. Mizuno	Genetic Probes for Calcium Dynamics	Yuste,R et al.	Imaging Neurons-A Laboratory Manual	Cold Spring Harbor Laborato ry Pr		579- 588	2005