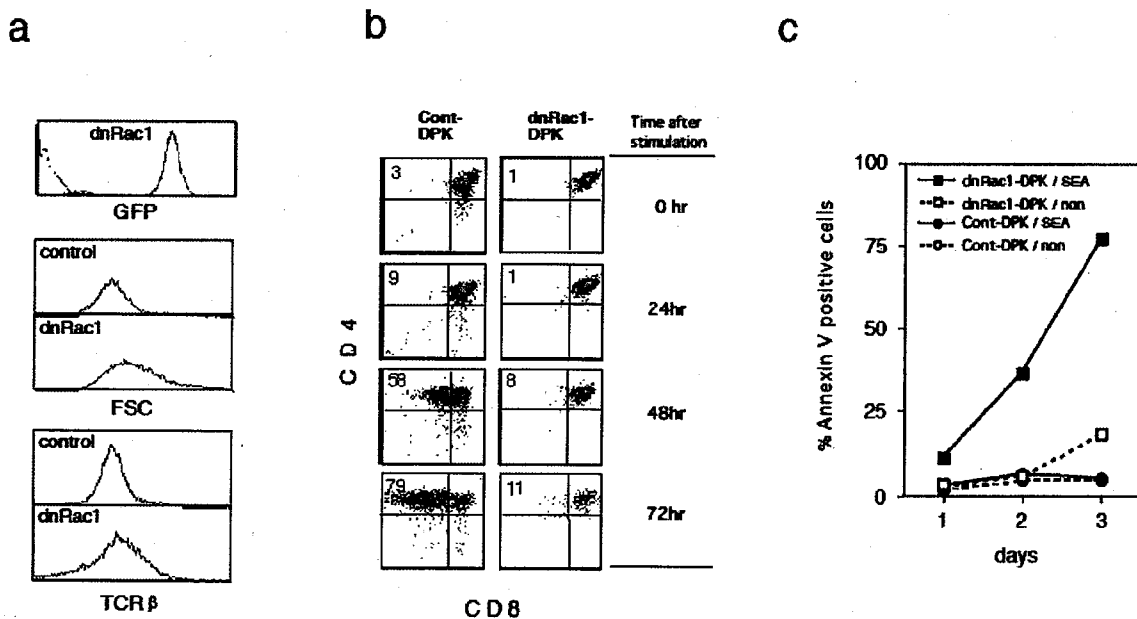
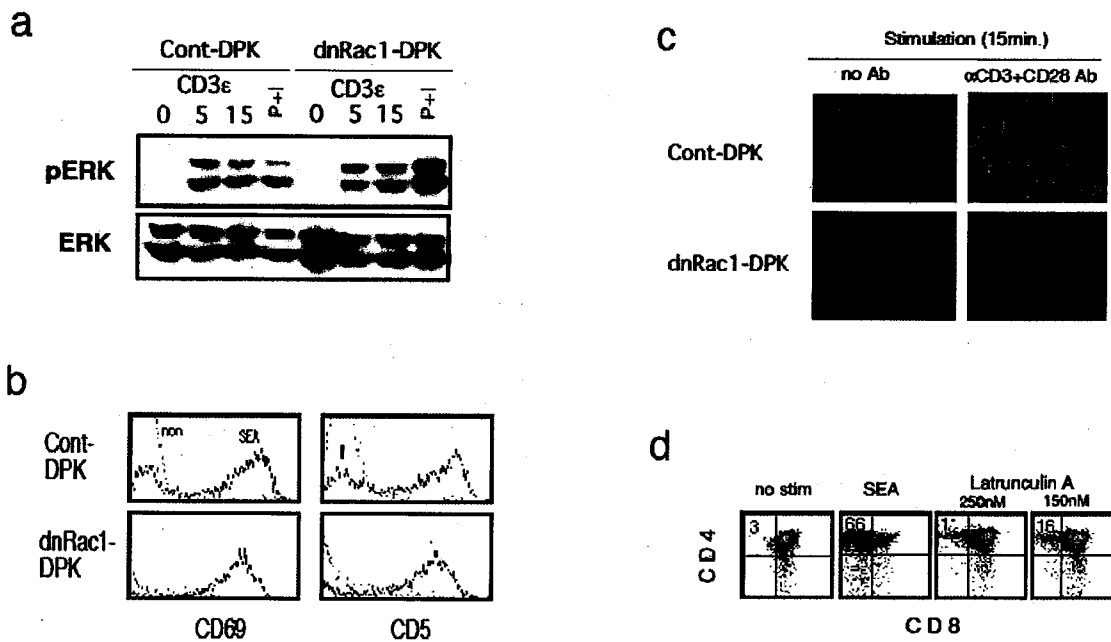


【図3】 dn-Rac1 の存在下において、TCR 誘発アポトーシスが増加することを示す図である。dnRac1-GFP で形質導入された Pax5^{-/-}プロB細胞由来胸腺細胞およびコントロールのベクターで形質導入された Pax5^{-/-}プロB細胞由来胸腺細胞は、プレートにコートされた種々の抗体または 10ng/ml PMA と 1μg/ml A23187 により、それぞれ6時間の間、活性化された。図3には、GFP 陽性で CD4、CD8 ダブル ポジティブな細胞のアネキシン V (Annexin V) 染色プロファイルが示されている。



【図4】 ドミナント ネガティブ Rac1 (Dominant negative Rac1) が CD4-SP の分化をブロックし、DPK 細胞のアポトーシスを増加させることを示す図である。

- (a) dnRac1 形質導入 DPK 細胞の GFP、FSC および TCRβ の発現を示す図である。
- (b) ベクター (pMXs-PREP) と pMXs-PREP-dnRac1 形質導入 DPK 細胞を、DC-I および 100ng/ml SEA と いっしょに共培養した。指定した培養時間ごとに細胞を回収し、フローサイトメトリーにより分析した。図4のbには GFP 陽性細胞のフェノタイプが示されている。
- (c) dnRac1 の存在下において、TCR 活性化がアポトーシスを誘起することを示す図である。GFP ポジティブ dnRac1 またはコントロールのベクターにより形質導入した DPK 細胞を、指定の培養時間ごとに回収して Annexin V で染色し、Annexin V で染色された細胞の比率を、それぞれのグループごとにグラフ上にプロットした。



【図 5】 dnRac1 (dominant negative Rac1) は TCR 依存性の初期 MAPK 活性化 (TCR-dependent early MAPK activation) を阻害しないが、TCR メディエイトド アクチン重合 (TCR-mediated actin polymerization) は阻害することを示す図である。

- (a) anti-CD3 ϵ 抗体により、DPK 細胞は活性化されることを示す図である。指定時間 (分) 後に、細胞上清 (cell lysates) を調製し、anti-phospho-ERK または anti-ERK 抗体を用いて、ウェスタン プロットにより分析した。
- (b) 16 時間培養後の dnRac1-DPK 細胞上の CD5 および CD69 の発現量の分析を、FACS により行なった。APC 存在下で 16 時間培養後の細胞数を、SEA 非存在下の結果を点線で、SEA 存在下の結果を実線で示してある。
- (c) TCR メディエイトド アクチン重合は、dnRac1 により阻害されることを示す図である。dnRac1 コントロールのベクターまたは dnRac1 により形質導入した DPK 細胞を、anti-CD3 および CD28 モノクローナル抗体を塗布したカバースリップ上で 15 分間培養後、固定化と permeabilized した後、重合したアクチン繊維を検出するため、Alexa594 コンジュゲイテッド ファロイディンで染色した。
- (d) CD4-SP 細胞の発生 (Generation) がアクチン重合に必要であることを示す図である。アクチン重合のインヒビターである Latruncullin A を、図 5 d に示した量の存在下に、DC-I および SEA と一緒に、DPK 細胞を 3 日間、共培養した。

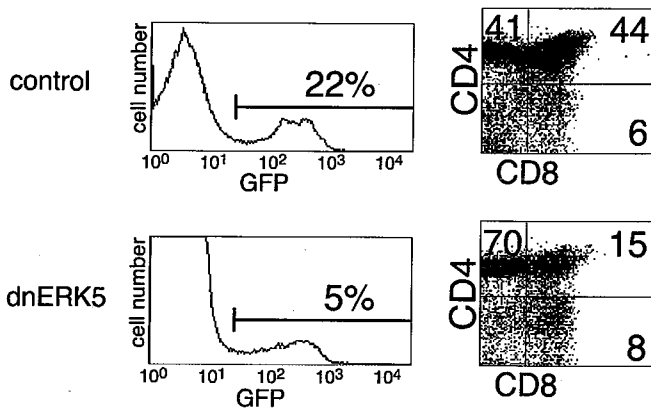
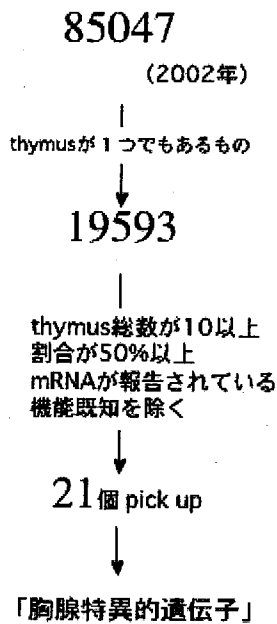


図4. dnERK5発現胸腺細胞のフローサイトメトリー解析

【図6】 CD4陽性Tリンパ球の分化機能を幹細胞の遺伝子操作により改変

UniGene クラスター



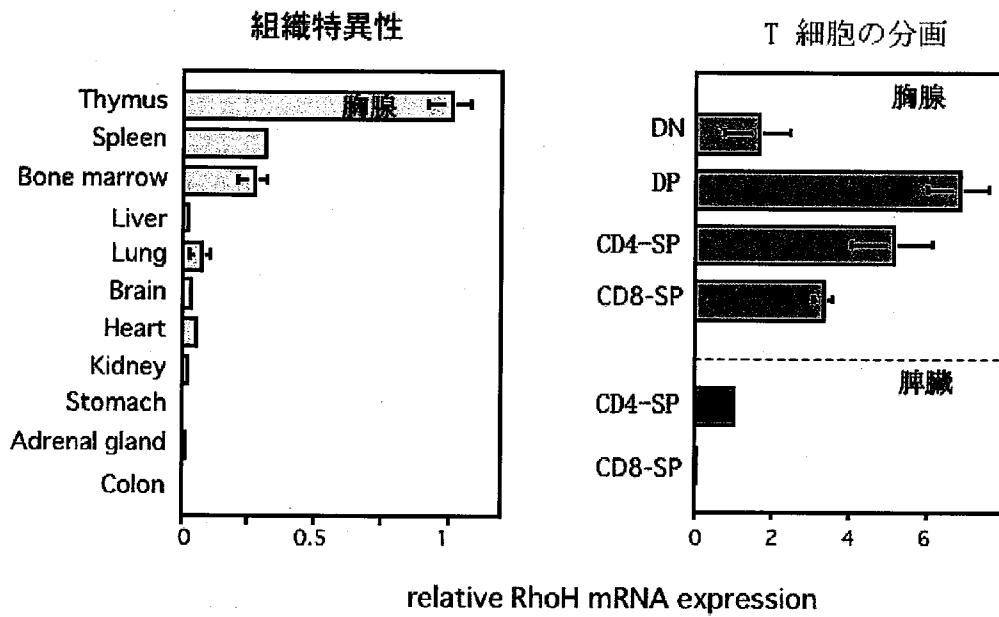
胸腺特異的遺伝子 ISC-1 ~ ISC-21

UniGene	Title	Total	Thy	%	Sp1	T	L.N.
ISC-1	Mm.20523 84% similar to human ataxin-6 protein	44	42	73	0	0	2
ISC-2	Mm.32324 77% similar to human QAA0748 proc	54	33	61	9	5	5
ISC-3	Mm.24839 Purinergic receptor P2Y, G-protein cou	47	31	51	11	0	1
ISC-5	Mm.25125 63% similar to CD165	28	24	86	1	0	0
ISC-4	Mm.123021 31% similar to human basement membl	55	60	94	1	0	0
ISC-7	Mm.122349 23% similar to blue prussian homolog	15	15	100	0	0	0
ISC-6	Mm.122294 33% similar to ras-GAP	119	84	80	6	0	5
ISC-8	Mm.27497 31% similar to regulated TBC protein	57	34	60	4	0	1
ISC-9	Mm.22836 xfr20c	22	13	60	0	0	6
ISC-10	Mm.132421 73% similar to human UIMSH3 nucleot	53	27	64	5	3	0
ISC-11	Mm.447 50% similar to Interferon activated ge	96	10	10	64	1	2
ISC-12	Mm.144978 topothecain protein	20	16	80	0	0	0
UniGene	Title	total	thy	sp1	ln	sm	rn
ISC13	Mm.284102 AA67506: Expressed sequence A3637	236	109	0	234	58	11
ISC14	Mm.131264 S83040S83068c: RHEN cDNA 58304c	79	390	152	117	0	3
ISC15	Mm.288312 181004201406): RHEN cDNA 18100c	94	280	57	39	0	6
ISC16	Mm.140015 C19a3, A2ra5	43	240	0	39	0	1
ISC17	Mm.32009 S83040S83068c: RHEN cDNA 58304d	38	200	0	0	0	1
ISC18	Mm.116116 Rho27: F-box protein 27	52	170	0	0	0	4
ISC20	Mm.275372 Dmrt2: Tarrs	47	140	0	0	0	2
ISC21	Mm.38617 Ptdsl1: Tern7	45	140	0	0	0	4

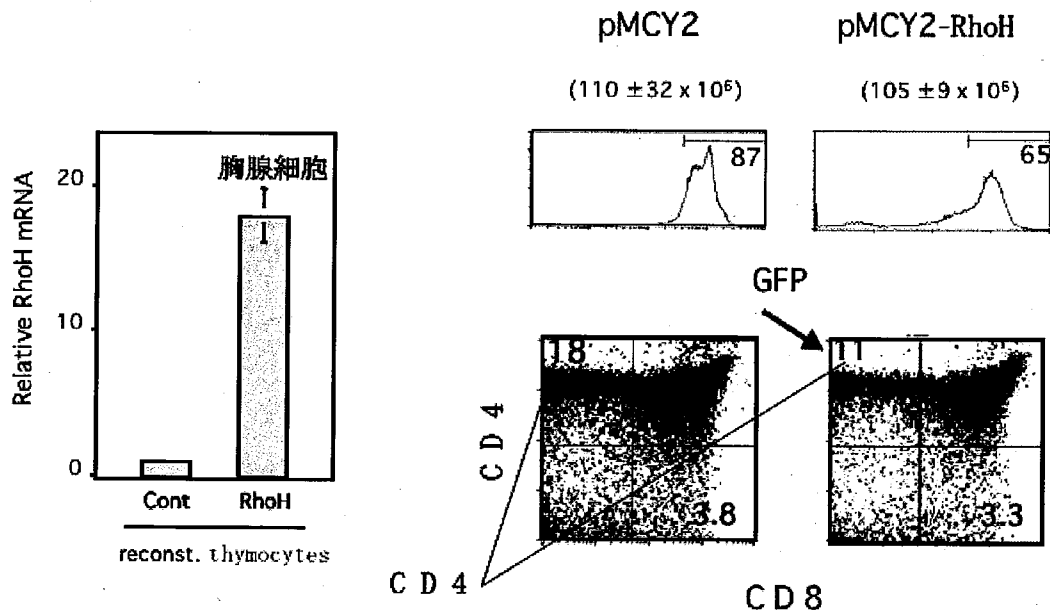
ISC-1 = RhoH

Rhoファミリーに属する低分子Gタンパク
GTPase活性なし
Racの活性化を抑制
LFA-1の活性化を抑制

【図7】 「胸腺特異的遺伝子」のin silico抽出

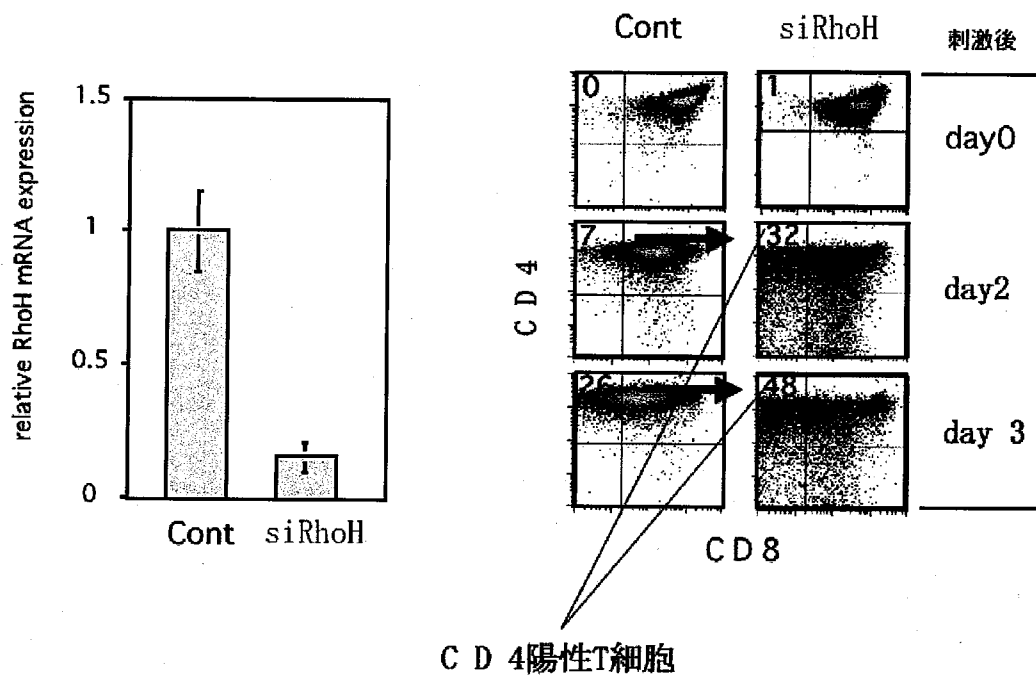


【図8】 RhoHは胸腺および骨髄に特異的に発現している



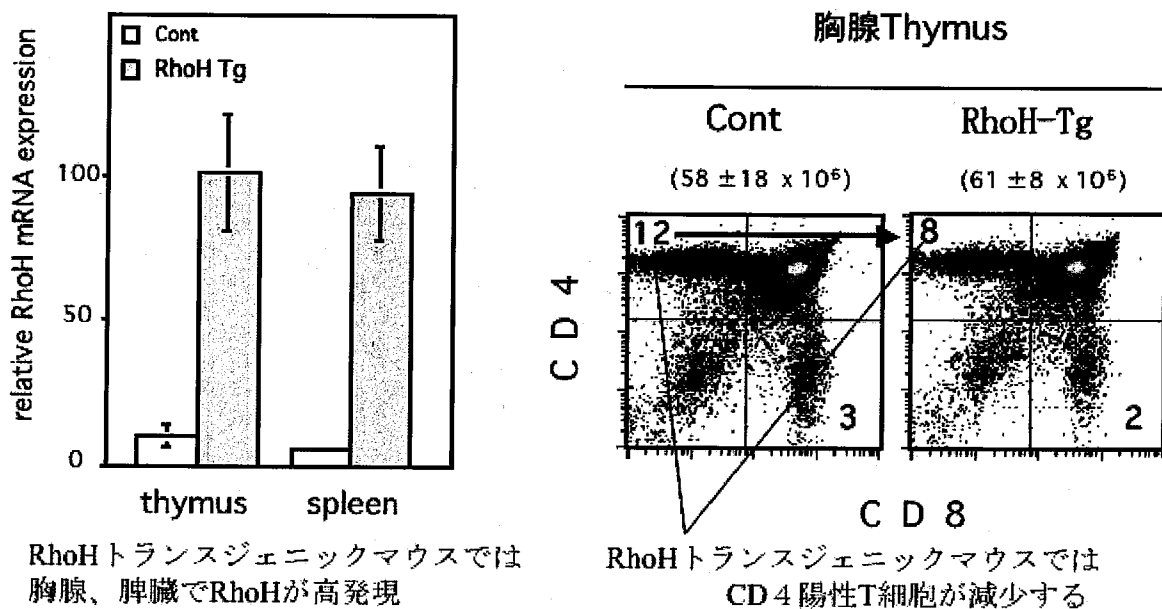
胸腺細胞におけるRhoHの過剰発現で
CD4陽性T細胞が減少

【図9】 Pax5欠損プロB細胞“再構築”胸腺細胞におけるRhoHの過剰発現



【図10】 RhoHをノックダウンするとCD4-SPの分化が促進される

RhoHトランスジェニックマウス (hCD2-LCR)



【図11】 RhoHトランスジェニックマウスの作製

厚生労働科学研究研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業)

幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液の開発に関する研究 分担研究報告書

マウス幹細胞から造血・免疫系細胞への分化誘導技術の開発

—細胞の多分化能の維持機構の解明—

分担研究者 鈴木春巳 山口大学医学部医学科 生殖・発達・感染医科学講座

共同研究者 小田浩代¹、酒井幸平¹、北村俊雄²、小安重夫³、Meinrad Busslinger⁴、

Jonathan Kaye⁵、白井 睦訓¹、

1. 山口大学医学部医学科 生殖・発達・感染医科学講座

2. 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター

3. 慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室

4. ウィーンバイオセンター 分子病理学研究所

5. スクリップス研究所 (米国、ラホヤ)

研究要旨

Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB 細胞を、1ヶ月程度 *in vitro* で培養したところ、多分化能を失い T 細胞への分化能が完全に失われてしまうことが明らかとなった。我々はこの長期の *in vitro* 培養中に T 細胞への分化能力を維持させる作用をもつサイトカインを探索する目的で、培養後の T 細胞の再構築を指標として各種サイトカインのスクリーニングを行った。その結果、培養液中に LIF を添加した場合にのみ、*in vitro* で長期培養後も T 細胞への分化能力が高く維持されていることを見いだした。一旦分化能力を失った ProB 細胞に再度 LIF を作用させても T 細胞への分化能は回復しなかったことから、LIF は直接 T 細胞系列への分化を促進するというよりは、未分化細胞における T 細胞系列への分化能力を維持させる作用があるものと考えられた。LIF 添加培養によって ProB 細胞中で GATA 遺伝子の発現上昇がみられた。LIF 処理した ProB 細胞は *in vitro* 培養後 NK 細胞への分化が確認できたが、マクロファージへの分化はみられなかった。LIF で処理した Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB 細胞の DNA マイクロアレイ解析で関与する転写制御因子や分化制御因子の絞り込みを行った。また LIF で処理した Pax5 遺伝子欠損マウス由来 ProB 細胞とその培養に用いるフィーダー細胞である ST2 細胞では LIF レセプターの発現は上昇しており、さらにその作用効果を解析中である。

A.研究目的

幹細胞が多系列への分化能を保持しながら自己複製できるメカニズムの解明は、人工血液の開発を目指す再生医療技術の開発において非常に重要である。免疫担当細胞を含めて全ての血球は骨髄中の造血幹細胞から分化するが、この多系列分化能と自己複製能の維持機構はよくわかっていない。本研究ではこの多系列分化能と自己複製能の維持機構をマウスモデルを中心に解明して造血幹細胞の安定培養供給技術や *in vitro* 分化誘導と *in vivo* への移植による免疫細胞、特に T リンパ球の分化誘導・制御技術の開発と人工血液医療への応用を試みる。

B.研究方法

長期 *in vitro* 培養後の Pax5 欠損 proB 細胞の T 細胞分化能をみる目的で、Pax5 欠損 proB 細胞を分離採取直後または ST2 間質細胞を、IL7 など添加一ヶ月培養後に致死量以下で放射線照射した RAG2 欠失マウスに投与して3週間後、再構築した胸腺細胞をフローサイトメトリーによって解析した。

LIF による Pax5 欠損 proB 細胞の T 細胞生成のポテンシャルを *in vitro* 長期培養の間維持させることができるかをみる目的で、Pax5 欠損 proB 細胞を ST2 間質細胞、IL7 に加えて表記の種々のサイトカインを添加してそれぞれ一ヶ月 *in vitro* 培養、 10^7 細胞を致死量以下で放射線照射した RAG2 欠失マウスに注入して3週間後、再構築したドナー由来の胸腺細胞をフローサイトメトリーによって解析して細胞数を測定した。

さらに、分離採取した Pax5 欠損 proB 細胞を ST2 間質細胞を、IL7 存在下に LIF 添加有り又は無しで1ヶ月 *in vitro* 培養した状

態で、或は (LIF 添加無しで T 細胞分化能を失った状態で)もう1ヶ月 LIF 添加を追加したカクテルで培養後、 10^7 細胞を致死量以下で放射線照射した RAG2 欠失マウスに注入して3週間後、再構築したドナー由来の胸腺細胞をフローサイトメトリーによって解析して細胞数を測定した。

LIF による NK 細胞やマクロファージへの分化能の維持をみる目的で、Pax5^{-/-} proB 細胞を LIF 存在下、非存在下で1ヶ月培養し、NK やマクロファージのリニエージを *in vitro* 分化させるプロトコールで培養した。NK 細胞の分化には IL-7 を抜いた後 IL-2 を加えて15日間培養した。マクロファージの分化には前記の IL-2 のかわりに M-CSF を加えて培養した。

LIF で処理した Pax5 欠損 proB 細胞における遺伝子発現変化をみる目的で、Pax5^{-/-} pro-B 細胞を LIF 添加、非添加で一ヶ月培養して、この細胞から全 RNA 抽出した。Notch1, Bmi-1、CXCR4 mRNA の発現量をリアルタイム RT-PCR 解析で測定した。各検体の b-actin mRNA に対する相対的 mRNA 値を表示した。GATA3 タンパクの発現は、Pax5^{-/-} proB 細胞を LIF 存在、非存在下で培養し、その細胞ライゼートを GATA3 特異的抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。

LIF で処理した Pax5 欠損 ProB 細胞の DNA マイクロアレイ解析は、Pax5^{-/-} proB 細胞を LIF 存在下、非存在下に *in vitro* で1ヶ月培養後、日立 Ace ジーン(マウス3万遺伝子)を用いて行った。

in vitro 培養での造血幹細胞への LIF の影響は、GFP トランスジェニックマウス骨髄から Sca1⁺ 細胞からソートして LIF の有り

又は無しで3日間培養した。培養した造血幹細胞は、致死量以下で放射線照射したRAG^{-/-}マウスに注入し、36日後に再構築した胸腺細胞と脾細胞をフローサイトメトリーで解析した。

DNA マイクロアレイ解析は常法に従って行った。

C. 研究結果

Pax5 はB細胞系列への分化に必須のマスター転写因子の一つであるが、同時にB細胞以外の様々なリニエージの分化を抑制するリプレッサーとして働いていることもよく知られている(図1)。実際、Pax5 遺伝子をノックアウトしたマウスから得られたプロB細胞は、プロB細胞でありながらB細胞以外の様々な血球系細胞へと分化する能力を保持していることが示されている。したがって、このプロB細胞は造血幹細胞に極めて近い性質を持つ培養細胞であると言ってよく、人工血液研究モデルの材料としても適していると考えられる。最近では Pax5 の上流因子である E2A 遺伝子を欠損したプロB細胞も同様の分化多能を持つことが報告されており、多分化能を持つ幹細胞様の培養細胞が注目されている。実際、我々は Pax5 ノックアウトプロB細胞を RAG2 ノックアウトマウスに移入し、3週後にフローサイトメトリー解析を行ったところ、野生型と同様の胸腺が再構築できることを確認している。ところが、この細胞を *in vitro* で培養し続けると、急速にT細胞への分化能力を失い、一ヶ月間の培養後には胸腺を再構築する能力が完全に失うことが明らかとなった(図2)。

そこで、*in vitro* の培養系にサイトカイン

等を加えることによりT細胞への分化能が維持できるのではないかと考え、様々なサイトカインを加えて一ヶ月間培養した後に胸腺の再構成実験を行なった。その結果、意外なことにLIFを加えただけでProB細胞のT細胞への分化能が長期間維持できることが明らかとなった。LIFはES細胞を未分化状態に保つのに必須のサイトカインであることはよく知られているが、LIFが造血系の細胞の分化維持に関わっているという報告はない。次にLIFの効果が多分化能を維持させるのか、あるいはT細胞系列へと分化を積極的に推進させるのかどうかについて検討した。LIF無しで一ヶ月培養して一旦分化能を失ってしまった細胞にLIFを添加してもT細胞分化能は回復しなかったことから、LIFはT細胞への分化を積極的に推進するというよりは、T細胞への分化能を維持する作用を持つものであると考えられた。

次に、T細胞以外のリニエージの分化に対するLIFの作用の検討を行った。*in vitro* 分化誘導系によってプロB細胞からNK細胞へと分化を誘導することができるが、このNK細胞への分化はT細胞分化能と同じくLIF無しで喪失し、LIF添加によって維持された。一方、マクロファージへの分化能はLIF添加によって逆に失われてしまうことが明らかとなった。したがって、LIFはプロB細胞の多様なリニエージへの分化能を全て維持させるというよりは、T細胞やNK細胞への分化を特異的に維持することが考えられた。

次のステップはLIFがT細胞系列への分化を維持する分子メカニズムを解明することである。LIFを添加することにより、プロB細胞にどのような変化が起こるかをまず検討し

た。T細胞リニエージへのコミットメントに関与することが知られているいくつかの遺伝子についてその発現が変化するかどうかの検討を行った。T細胞系列への分化を制御していることが知られている Notch1 の発現は、LIF 添加によりかえって減少していた。しかしながら、同じくT細胞分化に必須の転写因子である GATA3 の発現は LIF 添加により増大していた。また、造血幹細胞の未分化性の維持に関与することが知られている Bmi1 や Hoxb4 の発現は増大しておらず、未分化性の維持に関与する分子メカニズムはまだ解明できていない。そこで、LIF の添加培養によってどのような遺伝子の発現が変化するかを DNA マイクロアレイを用いて網羅的な検討を行った。まだ解析途中ではあるが、これらのうちのいくつかの遺伝子に注目して解析を進めていく予定である。

LIFがPax5ノックアウトプロB細胞という特殊な細胞だけでなく、骨髄中の造血幹細胞の分化能維持にも関与するかどうかを、GFPトランスジェニックマウスの造血幹細胞を用いて検討した。GFPマウスより得たScal陽性の骨髄細胞を造血幹細胞のソースとして用い、*in vitro*でLIFと共に6日間培養した後、放射線照射したRAG2欠損マウスに移入した。まだ解析したマウスの総数は少ないが、LIFを添加培養した造血幹細胞はT細胞へと分化する数が増大していた。これらの結果から、LIFは造血幹細胞においてもT細胞系列への分化を促進する作用があることが示された。

LIFが幹細胞様のPax5欠失ProB細胞に直接作用しているのか、それとも培養に用いているフィーダー細胞のST2間質細胞を介して作用しているのかは不明であったので、ま

ずLIFレセプターをPax5欠失ProB細胞とST2間質細胞で解析した。LIFレセプター発現は、両細胞のうちST2間質細胞でより高度に発現していた。また、LIFはPax5欠失ProB、ST2間質細胞でSTAT3のリン酸化を誘導していた。特にST2間質細胞では高度なリン酸化を誘導することがわかった。現在、このLIFレセプターからのシグナルがどのような機構でPax5欠失ProB細胞の未分化性の維持を制御しているのかを解析中である。他方、Pax5欠損プロB細胞株にケモカインのCCR7を高発現させてRAG2欠損マウスに移植すると、移植後の胸腺再構築T細胞数は50倍程度に著しく増加することを見いだしており、CCR7を利用して幹細胞の胸腺へのホーミングを強く誘導して効率良いT細胞分化の制御ができる可能性が見えて来た(図なし)。

D. 考察

Pax5ノックアウトプロB細胞において培養系にLIFを添加することによりT細胞への分化能を*in vitro*で長期間維持できることを初めて明らかにした。またこの分化能の維持は全てのリニエージにおいて有効なのではなく、T細胞およびNK細胞への分化を維持する作用があることが明らかとなった。さらに、Pax5プロB細胞のみならず、骨髄中の造血幹細胞のT細胞系列への分化もLIFによって維持増強されたことから、*in vitro*における造血系細胞の未分化能の維持、T細胞系列への分化の制御にLIFが利用できる可能性が示唆された。造血幹細胞の未分化性と自己複製能の維持は未解明な部分が多いが、Wnt受容体からNotch1に至るシグナル伝達経路やN-cadherin, b-cateninを介するシグナルの

関与が主要なものと考えられてきた (図9)。我々の成果は、LIFによるLIFR/gp130を介するSTAT3活性化、GATA3の発現上昇が、造血幹細胞の未分化性と自己複製能の維持に重要な役割をしていることを示唆するものである。今後、LIFからGATA3に至る経路とWnt等の他のシグナル伝達経路とのクロストークの関与も含めて解析していくことの必要性が示唆された。

E. 結論

LIF共存下で培養することにより、Pax5欠損プロB細胞はT細胞への分化能力を*in vitro*で長期間維持することができ、LIF添加によりPax5欠損プロB細胞においてGATA3の発現が増加していた。LIFはPax5欠損プロB細胞のT細胞への分化能のみならず、NK細胞への分化能も維持させたが、逆にマクロファージへの分化能は喪失させた。LIFには特にT細胞系列で造血幹細胞の多分化能を維持、亢進させる作用があることが示唆された (図11)。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

本計画に密接に関連した業績

- Suzuki H, Oda H, Sakai K, Azuma Y, Sugi K, Kitamura T, Kaye J, Shirai M. Rac1-mediated actin polymerization and Bcl-2 induction are critical for differentiation of CD4 single-positive T cells.

J. Leukocyte Biology 投稿後 REVISE 中

- Sakai K, Suzuki H, Oda H, Akaike T, ,

Azuma Y, Murakami T, Sugi K, Ito T, Ichinose H, Koyasu S, Shirai M. Phosphoinositide 3-kinase in nitric oxides synthesis in macrophage critical dimerization of inducible nitric oxide synthase.

J. Biol. Chem. 投稿後 REVISE 中

- Eshima K, Suzuki H, Shinohara N. Cross-positive selection of thymocytes expressing a single T cell receptor by multiple major histocompatibility complex molecules of both classes: Implications for CD4+ vs. CD8+ lineage commitment

J. Immunol. (2006) 176: 1628-1636

- Inouye S, Izu H, Takaki E, Suzuki H, Shirai M, Yokota Y, Ichikawa H, Fujimoto M, Nakai A. Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1.

J Biol Chem. 2004 ;279:38701-9.

計画の基礎成果となった申請前年度の論文

- Naohide Watanabe, Hideaki Nakajima, Hidenori Suzuki, Atsushi Oda, Yumiko Matsubara, Masaaki Moroi, Takashi Kadowaki, H Suzuki, Shigeo Koyasu, Yasuo Ikeda, Makoto Handa

Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85a null platelets characterized by an impaired response to GP VI stimulation
Blood (2003) 102: 541-548.

- H Suzuki, Satoshi Matsuda, Yasuo Terauchi, Mari Fujiwara, Toshiaki Ohteki, Tomoichiro Asano, Timothy W. Behrens, Taku Kouro, Kiyoshi Takatsu, Takashi Kadowaki, Shigeo Koyasu

PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction
Nature Immunol. (2003) 4: 280-286.

2. 学会発表

第35回日本免疫学会総会 2005.12 横浜

- 鈴木春巳、小田浩代、酒井幸平、北原誠司、白井睦訓

胸腺細胞の分化におけるRhoHの機能

- 小田浩代、鈴木春巳、酒井幸平、北原誠司、

白井睦訓

LIFはPax5欠損プロB細胞および造血幹細胞のT細胞への分化能をex vivoで維持することができる

第34回日本免疫学会総会・学術集会（札幌）

2004.12.1-3

学術集会記録 第34巻

・鈴木春巳、小田浩代、酒井幸平、白井睦訓

「LIFはPax5プロB細胞のT細胞系列への分化能を制御する」P67

・小田浩代、酒井幸平、白井睦訓、鈴木春巳

「FoxP3遺伝子の強制発現によるT細胞シグナル伝達の制御」P144

・酒井幸平、鈴木春巳、小田浩代、白井睦訓

「クラミジアの感染排除における一酸化窒素合成を介したPI3キナーゼの役割」P291

第27回日本分子生物学会年会

2004.12.8-11 神戸市

プログラム・講演要旨集

・井上幸江、藤本充章、高木栄一、鈴木春巳、白井睦訓、横田義史、市川仁、中井彰

「熱ショック応答と免疫応答のクロストーク」p29

H.知的財産権の出願・登録情報

【特許の取得】

申請中

・発明者 白井睦訓、鈴木春巳他 権利者 山口大学「新規T細胞機能遺伝子探索技術の開発とそれを利用した新規T細胞分化遺伝子」

申請準備中

・発明者 白井睦訓、鈴木春巳他 権利者 山口大学「サイトカインを利用した新規造血・免疫系幹細胞の分化技術と人工血液医療への応用」

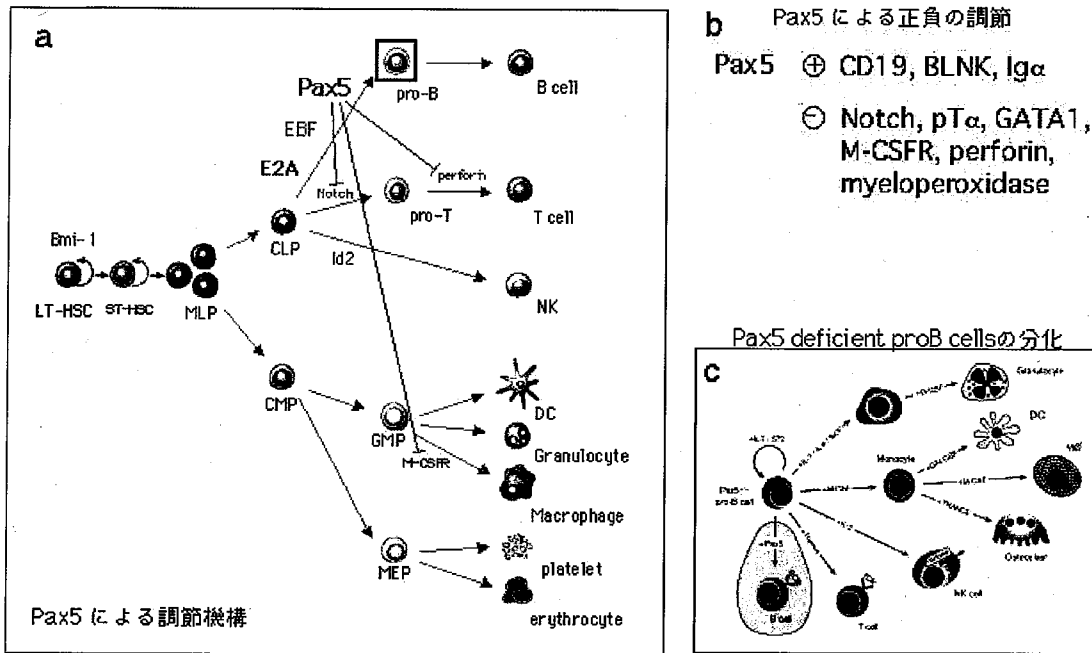


図1 Pax5 の役割 (a,b)とPax5⁺ proB cells (造血幹細胞様培養細胞: Hematopoietic stem cell like cells) の分化 (c)

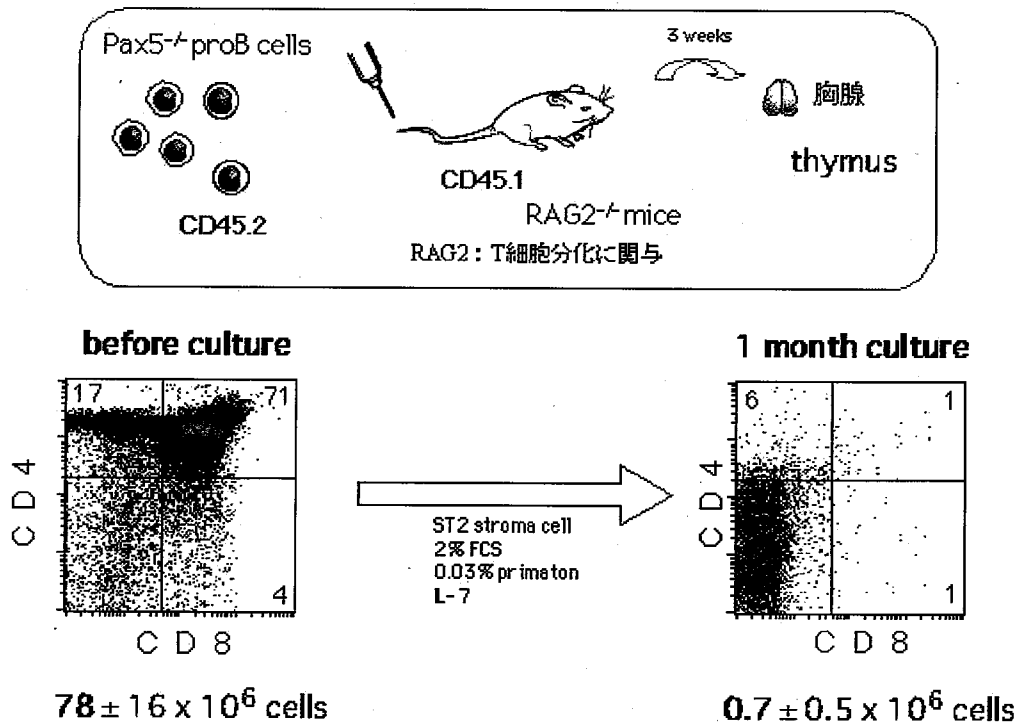
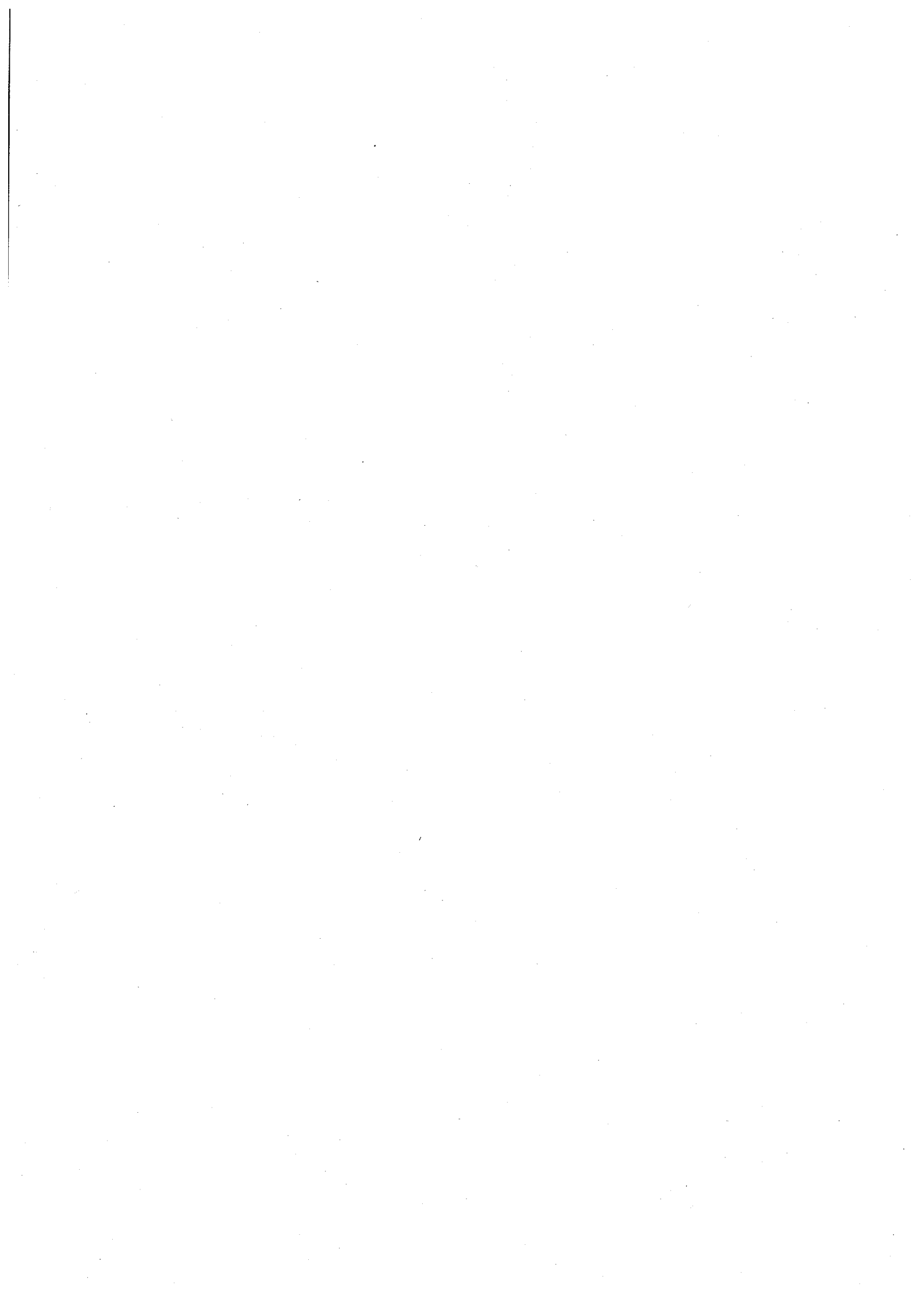
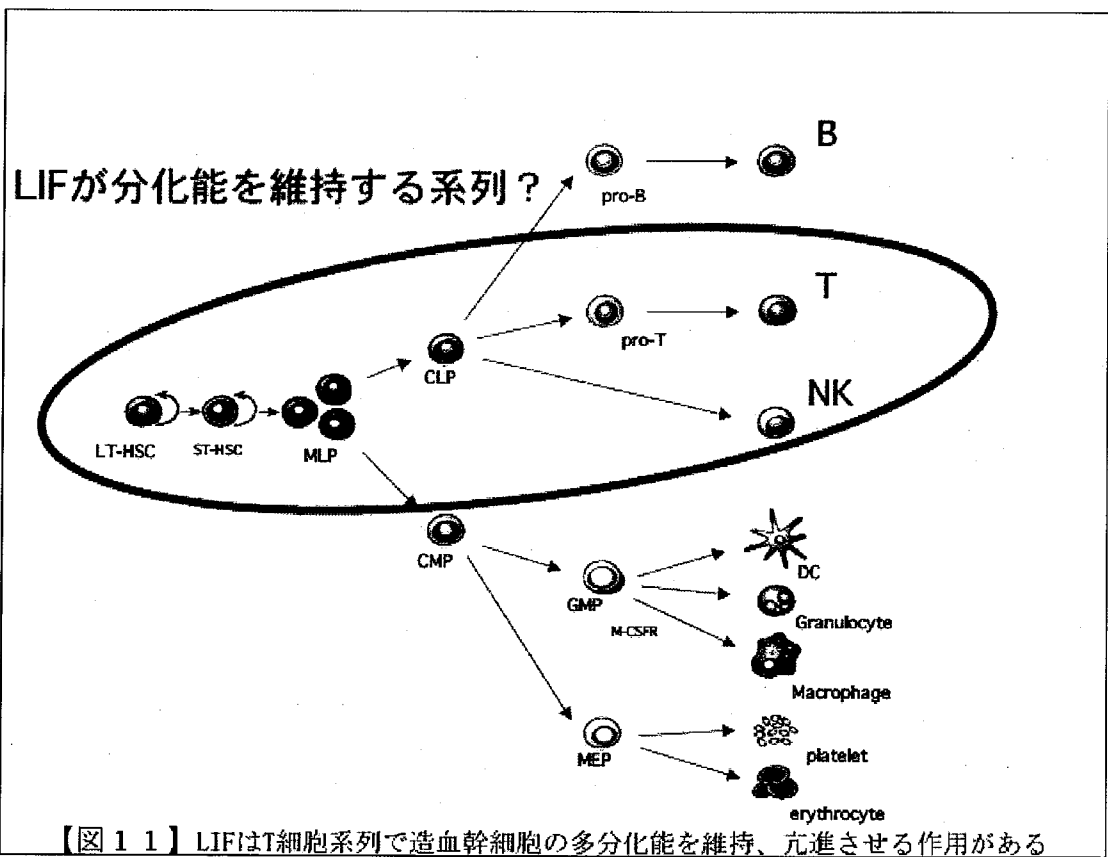


図2 Pax5欠損プロB細胞株はin vitro長期培養でT細胞分化能を失う









研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

【 雑誌 】

著者名	論文題目	雑誌名	巻	頁	西暦年号
Suzuki H, Oda H, Sakai K, Azuma Y, Sugi K, Kitamura T, Kaye J, Shirai M.	Rac1-mediated actin polymerization and Bcl-2 induction are critical for differentiation of CD4 single-positive T cells.	J.Leukocyte Biology			投稿後 REVISE 中
Sakai K, Suzuki H, Oda H, Akaike T, Azuma Y, Murakami T, Sugi K, Ito T, Ichinose H, Koyasu S, Shirai M.	Phosphoinositide 3-kinase in nitric oxides synthesis in macrophage critical dimerization of inducible nitric oxide synthase.	J.Biol. Chem.			投稿後 REVISE 中
Shirai M 他 15 名最終著者	Genome sequence of the cat pathogen, <i>Chlamydomphila felis</i>	<i>DNA Research</i>			2006 in press
Shirai M 他 8 名最終著者	Serotonin and melatonin, neurohormones for homeostasis, as novel inhibitors of infections by the intracellular parasite chlamydia	J.Antimicrob.Chemother.	56	861-8.	2005
Shirai M, 他 16 名 13 番目	Clinical implication of acute hyperglycemia as an independent predictor for mortality after acute myocardial infarction in the coronary intervention era	Am Heart J.	150	814-20	2005
Shirai M, 他 16 名 13 番目	Beneficial effect of preinfarction angina on in-hospital outcome is preserved in elderly patients undergoing coronary intervention for anterior acute myocardial infarction.	Circulation Journal.	69	630-5	2005
Shirai M, 他 17 名 14 番目	Effects of glucose abnormalities on in-hospital outcome after coronary intervention for acute myocardial infarction.	Circulation Journal.	69	375-9	2005

著者名	論文題目	雑誌名	巻	頁	西暦年号
Inouye S, Izu H, Takaki E, Suzuki H, Shirai M, Yokota Y, Ichikawa H, Fujimoto M, Nakai A	Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1.	J. Biol. Chem.	279	38701-9	2004
Kojima S, Sakamoto T, Ishihara M, Kimura K, Miyazaki S, Tei C, Hiraoka H, Sonoda M, Tsuchihashi K, Yamagishi M, Inoue T, Asada Y, Ikeda Y, Shirai M, Ogawa H	The white blood cell count is an independent predictor of no-reflow and mortality following acute myocardial infarction in the coronary interventional era.	Ann Med.	36	153-60	2004
Takahashi T, Yujiri T, Shinohara K, Inoue Y, Sato Y, Fujii Y, Okubo M, Zaitzu Y, Ariyoshi K, Nakamura Y, Nawata R, Oka Y, Shirai M, Tanizawa Y.	Molecular mimicry by <i>Helicobacter pylori</i> CagA protein may be involved in the pathogenesis of <i>H. pylori</i> -associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura.	British J. Hematol.	124	91-6	2004
Fukuoka K, Sawabe A, Sugimoto T, Koga M, Okuda H, Kitayama T, Shirai M, Komai K, Komemushi S, Matsuda K.	Inhibitory Actions of Several Natural Products on Proliferation of Rat Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Hsp60 from <i>Chlamydia pneumoniae</i> J138.	J Agric Food Chem.	52	6326-9	2004
Naohide Watanabe, Hideaki Nakajima, Hidenori Suzuki, Atsushi Oda, Yumiko Matsubara, Masaaki Moroi, Takashi Kadowaki, Harumi Suzuki, Shigeo Koyasu, Yasuo Ikeda, Makoto Handa	Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85a null platelets characterized by an impaired response to GP VI stimulation	Blood	102	541-8	2003
Harumi Suzuki, Satoshi Matsuda, Yasuo Terauchi, Mari Fujiwara, Toshiaki Ohteki, Tomoichiro Asano, Timothy W. Behrens, Taku Kouro, Kiyoshi Takatsu, Takashi Kadowaki, Shigeo Koyasu	PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction	Nature Immunol.	4	280-6	2003