

対象として下記のウイルスを選定した。1. ヒトサイトメガルウイルス (CMV) 2. エプスタイン・バーウイルス (EBV) , 3. ヒトヘルペスウイルス6型 (HHV-6) , 4. ヒトヘルペスウイルス7型 (HHV-7) 5. BKウイルス (BKV) 6. JCウイルス (JCV) 7. アデノウイルス (ADV) 8. B型肝炎ウイルス (HBV) 9. ヒトパルボウイルス19型 (ParvoB19) 10. ヒトT細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1) 11. 同2型 (HTLV-2) 12. ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) 13. 同2型 (HIV-2)。またヒト遺伝子

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の検出系を測定系が正しく動いていることを示すポジティブコントロールとして加えた。

## 2. 検査系の感度測定

検査系の感度を測定するため、披検ウイルス陰性が確認されている細胞のDNA0.5μgに各ウイルスのスタンダードDNAを50コピー加えた測定用サンプルを各種ウイルス毎に作成した。作成したサンプルを使用した検討の結果、ウイルススタンダードを加えなかった場合は全て陰性だったが、ウイルススタンダードDNAを加えたサンプルは、すべて陽性シグナルが検出され、測定系は全てのウイルスに対して50コピー/ウエルの測定感度を持つことが確認された。

## 3. 特異性 (交差反応性) の検討

検査結果が陽性の際に他のウイルスが誤って検出される交差反応の有無を確認するため、披検ウイルス陰性が確認されている細胞のDNA0.5μgに各ウイルスのスタンダードDNAを100~10000コピー加えた測定用サンプルを各種ウイルス毎に作成した。測定の結果は、例えばCMVのスタンダードDNAウイルスを加えた場合にはCMVの測定用ウエルからのみ陽性シグナルを検出できたが、他のウイ

ルス検出用のウエルからは陽性シグナルが検出できず、全て陰性と判定された。検査対象の13種につき同様の測定を行なったが、すべてスタンダードDNAを加えたウイルスの検出用ウエルのみ陽性で、他の12種類のウイルス検出用ウエルは陰性だった。したがって、検査対象の13種類のウイルスに関しては交差反応性が無く、検査系が特異的にウイルスを検出できていることが示された。

## 4. ADV サブタイプの検出率、測定感度の確認

ADVは50種類以上のサブタイプが存在するため、本検査系で検出できるサブタイプとその測定感度を検討した。

まず、鋳型になるオリゴDNAを合成し、各種サブタイプに対応したプライマー(下表)によりPCR増幅後クローニングしてスタンダードを作成した。そのスタンダードを用いて検出の可否及び検出感度を測定した。

primerF1-gacatgacttttgaggtgga
primerF2-gacatgacoccttgaggtgga
primerF3-gacatgacoccttcgaggtgga
primerF4-gacatgacttttgaggtoga
primerF5-gacatgaatttogaagtoga
primerF6-gacatgacatttgaggtgga
primerR1-togatgacgcgcgcggtg
primerR2-togatgatgcgcgcggtg
primerR4-togatgacgcgcgcggtg
primerR5-togatgatgcgcgcgatg

測定の結果、下図のようにADVのサブタイプ14,35が本検査系では検出できないが、他の主要なサブタイプは何れも10コピー/ウエルの感度で検出することが可能であることが明らかとなった。

std	対応タイプ	確認	/Tube
F1-R1	1,2,3,5,7,16,21,40	○	10 copy
F2-R2	6,11,34	○	10 copy
F2-R4	8	○	10 copy
F2-R5	14,35	×	10 copy
F3-R1	10,17,19,28,37,48	○	10 copy
F6-R3	12	○	10 copy

## 5. HIV-1 サブタイプの検出率、測定感度の確認

英国の国立生物学的標準管理研究所 (National Institution for Biological Standards and Control : NIBSC) から入手した HIV-1 Genotype Panel (NIBSC code 01/466) を用いて測定した結果を以下に示す。陽性血清から RNA 抽出後に逆転写して本検査系にて定量した。その結果、本検査系によりメジャーな HIV-1 サブタイプである M グループをすべて検出でき、定量結果もほぼ同等の結果だった。しかし、O および N グループは検出できなかった。また、添付の陰性血清は本検査系による検査でも陰性の結果が得られた。(測定結果は 3 回測定した平均値を記入。WHO data は添付された複数のラボでの全ての測定結果の中央値)。

HIV1 genotype	測定結果 Copy/ml	WHO data Copy/ml
A	3.E+03	2.E+03
B	8.E+02	1.E+03
C	3.E+03	3.E+03
D	8.E+03	3.E+03
E	6.E+03	3.E+03
F	2.E+04	3.E+03
G	2.E+03	2.E+03
H	2.E+03	4.E+03

## 6. HIV-2 サブタイプによる交差及び特異性確認

HIV-2 の検査系は、HIV-2 genotype A (strain ROD), genotype B(strain EHO)は陽性と検出された。しかし、HBV, HCV 及び HIV1 genotype A-F,M,O は陰性だった。

### D: 臨床検体を用いた測定

各ウイルスによる感染症と確定診断された患者の末梢血から DNA を抽出し、本検査系により、ウイルスの検出を試みた。合計 50 例行なったところ、全ての例で起因ウイルスを

診断されていたウイルスを検出することができた。

### F: 考察

#### 1. ウイルス検査項目の設定

検査項目としては、今回の DNA ウイルス 13 種類に加えヒトパピローマウイルス (HPV) を加えることを検討している。HPV はがんウイルスとして知られており、がん組織由来の細胞にその遺伝子が存在している可能性がある。さらに、子宮頸癌由来の株化細胞である HeLa 細胞中には HPV18 型遺伝子が確認されているが、各研究室で培養されている細胞の中には HeLa 細胞が混入し、HeLa 細胞に置き換わっている例が多数あることが報告されているため、HPV の検出は重要である。しかし、HPV には 80 種類以上のサブタイプがあることが報告されており、それら全てを網羅した検査系を構築することは難しい。現在、HPV18 型を含む数種類の型を検出できる検査系は動いているので、HeLa 細胞の混入の有無の検討は行なえるが、他のサブタイプをできるだけ多く検出することが可能な共通プライマーの開発を進めている。さらに、今後 RNA ウイルスを加えてより多くのウイルスを網羅的に検出・半定量できる検査系の開発を進めていく予定である。

#### 2. HIV-1 の検出

現在の検査系では、検出できる HIV-1 は主に M グループであるが、HIV-1 には他にも多数の遺伝子型が存在する。したがって、さらに多くの遺伝子型を検出できるようにする検査系の改良が必要である。しかし、現在臨床検査に用いられている主要な HIV-1 検査キットは M グループのみを検査対象としていることもあり、現在の検査系でも実用上問題とな

る事は少ないと考えている。

### 3. 特異性に関して

今回検討した限りにおいては、各プライマー、プローブ間に交差反応性はなく、特異的に被検ウイルスを検出できると考えている。今後検査系の特異性、正確性を高めていくためには、陽性シグナルが出た場合、増幅産物の遺伝子配列の決定、陽性ウイルスに対する他のプライマー・プローブを使用した検査、などの検証実験を重ねていく必要があると考えている。

### G: 結論

マルチプレックス PCR 法を応用した実用的

ウイルス検査法を確立し、バンクが保有している培養細胞に対するウイルス検査体制を確立することを目的に研究を行なった。その結果、13種類のウイルス(CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, BKV, JCV, ADV, HBV, ParvoB19, HTLV-1, -2, HIV1, HIV-2)を10コピー/wellの感度で同時・半定量測定系を開発に成功した。

H: 健康危険情報

なし

I: 研究発表

なし

ヒトゲノム解析研究に資するヒト遺伝性疾患細胞の不死化と品質管理に関する研究

分担研究者 藤堂 剛 京都大学放射線生物研究センター 教授

### 研究要旨

今年度は、これまで京都大学放射線生物研究センターで行ってきたヒト遺伝性疾患患者由来細胞の収集・維持・管理及び配布の事業を、人的要因などの理由から終了することに伴い、細胞を移管する作業を行った。約70種類に及ぶヒト遺伝性疾患や腫瘍の患者、およびその両親や兄弟姉妹などから得た線維芽細胞やリンパ球、及びそれらから樹立した細胞株など、合計約2000種の細胞、約1万本の凍結チューブを医薬基盤研の細胞バンクに移管した。日本人患者細胞の収集とその維持は、我が国における各種疾患の特性解析に必須であり、細胞バンクの意義の重要性を示している。

#### A. 研究目的

ヒトゲノムの全塩基配列が決定され、21世紀における重要課題はヒト遺伝子の多様性とその機能の解明であると言われている。ヒト遺伝病の細胞はポスト・ゲノム研究戦略の重要な研究資源となる。ヒトの遺伝子の構造と機能は長い進化の上に成り立っているものであり、その遺伝的多様性と機能のダイナミズムは生物種固有であるのみならず、人種固有のものがある。従って、我が国におけるポスト・ゲノム研究戦略には日本人に基づく研究資源が要求される。

京都大学放射線生物研究センターでは、これまでに多数のヒト遺伝性疾患患者由来細胞を収集し、その性質の分析と配布を行ってきた。しかしながら、人的要因などにより細胞の維持管理・供給活動の継続が困難となったため、今年度これらの細胞を独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部門細胞資源研究室（細胞バンク）に移管することとし、そのための作業を行った。

#### B. 細胞の移管

医薬基盤研究所に移管するにあたり、医薬基盤研究所と京都大学の双方の倫理委員会に移管の承認申請を行った。医薬基盤研究所研究倫理審査委員会から2006年5月30日に承認を得て、京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会から2006年7月20日に承認を受けた。さらに、知的財産権の問題を検討するために京都大学「医学領域」産学連携推進機構と話し合いを行い、移管についての覚書を取り交わした。

実際の細胞の移動は、細胞数が余りにも多数であるため、京大放生研で細胞を保存している液体窒素容器約20個を2006年9月4日にそのまま医薬基盤研に運搬し、そこで医薬基盤研の液体窒素容器に移す作業を行い、2007年1月19日に全ての細胞を移動する作業を完了した（図参照）。

#### C. 細胞の整理

バンクへの細胞の寄託には、保存細胞の確認が必要であるが、放射線生物研究セン

ターでは非常に長期にわたって保存しているため、細胞保存ノートと実際との間に大きな乖離が見られる。この問題の解決のため、数年前から細胞保存ノートを元に細胞と保存場所のデータベース化に取り組んできた結果、昨年度ようやく一通りの入力を終えた。これをもとに、京大放生研の液体窒素容器から医薬基盤研の液体窒素容器に移動する際にデータベースとの対応の点検を行いつつ、細胞の整理を行った。

今回移管した細胞は、約70種類に及ぶヒト遺伝性疾患や腫瘍について、患者本人、およびその両親や兄弟姉妹などの血縁者から得た細胞である。大部分は線維芽細胞やリンパ球などの初代培養細胞である。一部それら初代培養細胞にSV40、EBウイルス、hTERTを感染させて不死化した細胞株などを含んでいる。細胞の種類は、数え方にもよるが、総計約2000種、凍結チューブの本数は1万本以上にのぼる（表参照）。

収集された細胞には、疾患の診断が明確になされ、原因遺伝子に病因となる突然変異が検出されているものもあるが、全く原因の分かっていない細胞も含まれている。これは、ある疾患の患者であることが推察されたため、その診断の確認のため、放射線生物研究センターに染色体検査を依頼してきた検体のうち、当該疾患の示す染色体異常が検出できず、疾患名が確定できなかったものを含んでいるためである。

現在なお細胞の整理を行っているところであるが、細胞の分類基準を一律に設定するのは困難である。例えば、同一患者由来であっても組織が異なる場合に、異なる細胞として数えている場合とそうでない場合とが混在している。こうした点については、さらに詳細に検討して統一した分類基準を設定する必要がある。

これらの細胞についてのより詳細な情報は医薬基盤研究所細胞資源研究室と京都大学放射線生物研究センターのホームページにて公開する予定である。

#### D. 考察

今回の細胞移管に当たっては、倫理委員会の承認を得ることに加えて、京都大学の産学連携に関連して知的財産権の移譲についても対応することが必要であった。国立大学が独立行政法人化した現状では、細胞の寄託に当たってこれらの問題をクリアすることが今後求められるものと想定され、そのためのおおよそのガイドラインを作成することが必要ではないかと考えられる。

本年度、京都大学放射線生物研究センターから移管した細胞は、長年にわたって収集された細胞であり、その学術的価値は極めて大きい。特に生命倫理についての基準が厳格化されたことから、今後これだけの規模のヒト細胞を収集することは不可能であると考えられる。従って、この細胞コレクションを医薬基盤研究所の細胞バンクに加えることが出来たことは、これら細胞資源の安定的供給にとって大きな意味を持っている。

しかも、これら細胞は種々の遺伝性疾患患者に由来するものであるが、これらの疾患の中には原因となる遺伝子が特定されていないものも多数含まれている。これらの疾患細胞を用いた研究は、発症原因の解明や、診断・治療方法の開発などに大きな役割を果たすと思われる。また前述のように、何らかの症状を示しているにも関わらず、染色体異常などの挙動が既知の疾患と一致しない未知の疾患の患者細胞も含まれている。これらの細胞の研究によって新たな疾患の発見につながる可能性がある。このように、今回移管された細胞コレクションが、我が国の国民の健康・福祉の向上に多大な貢献することが期待される。

国立大学の独立行政法人化により、これまで大学の個々の研究室において、研究者個人の努力によって収集されてきた貴重な生物資源の維持・管理は極めて厳しい環境に置かれている。こうした状況下において

は、これらの貴重な生物資源の保存のために、バンク事業の果たす役割は今後ますます大きくなると思われる。

## E. 結論

今回、約 70 種類に及ぶヒト遺伝性疾患や腫瘍の患者、およびその両親や兄弟姉妹などから得た線維芽細胞やリンパ球、及びそれらから樹立した細胞株など、合計約 2000 種の細胞、約 1 万本の凍結チューブを医薬基盤研の細胞バンクに移管した。

ヒトの遺伝病細胞は研究資源として極めて重要な位置を占める。わが国におけるポストゲノム研究を推進する上で、多くの研究者にとって利用しやすい形の細胞を樹立し、供給することは極めて重要な意義がある。今回、京都大学放射線生物研究センターの細胞医薬基盤研究所細胞バンクへ移管したことにより、研究者の利用がさらに拡大し、国民の健康増進に関する研究が大きく発展することが期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Li J, Uchida T, Todo T, Kitagawa T.: Similarities and differences between cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase and (6-4) photolyase as revealed by resonance Raman spectroscopy: Electron transfer mechanism from FAD cofactor to UV-damaged DNA. *J Biol Chem*. 281(35):25551-25559. 2006
2. Li J, Uchida T, Ohta T, Todo T, Kitagawa T. : Characteristic Structure and Environment in FAD Cofactor of (6-4) Photolyase along Function Revealed by Resonance Raman Spectroscopy. *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys*. 110(33):16724-16732, 2006.
3. Zikihara K, Iwata T, Matsuoka D, Kandori H, Todo T, Tokutomi S.: Photoreaction cycle of the light, oxygen, and voltage domain in FKF1 determined by low-temperature

absorption spectroscopy. *Biochemistry*. 45(36):10828-10837, 2006.

4. Yamamoto J, Hitomi K, Todo T, Iwai S: Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing the Dewar valence isomer of the (6-4) photoproduct and their use in (6-4) photolyase studies. *Nucleic Acids Res*. 34(16):4406-4415, 2006.
5. Maeda A, Tsujiya S, Higashide T, Toida K, Todo T, Ueyama T, Okamura H, Sugiyama K. Circadian intraocular pressure rhythm is generated by clock genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 47(9):4050-4052, 2006.
6. Abe T, Ishikawa T, Masuda T, Mizusawa K, Tsukamoto T, Mitani H, Yanagisawa T, Todo T, Iigo M. Molecular analysis of Dec1 and Dec2 in the peripheral circadian clock of zebrafish photosensitive cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 351(4):1072-1077, 2006.
7. Taniguchi Y, Takeda S, Furutani-Seiki M, Kamei Y, Todo T, Sasado T, Deguchi T, Kondoh H, Mudde J, Yamazoe M, Hidaka M, Mitani H, Toyoda A, Sakaki Y, Plasterk RH, Cuppen E. Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis. *Genome Biol*. 7(12):R116, 2006.
8. Schleicher E, Hitomi K, Kay CW, Getzoff ED, Todo T, Weber S. ENDOR differentiates complementary roles for active site histidines in (6-4) photolyase. *J Biol Chem*. 282(7):4738-4747, 2006.
9. Tanida M, Yamatodani A, Niiijima A, Shen J, Todo T, Nagai K. Autonomic and cardiovascular responses to scent stimulation are altered in cry KO mice. *Neurosci Lett*. 413, 177-182, 2006.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 (独)医薬基盤研究所への寄託作業手順

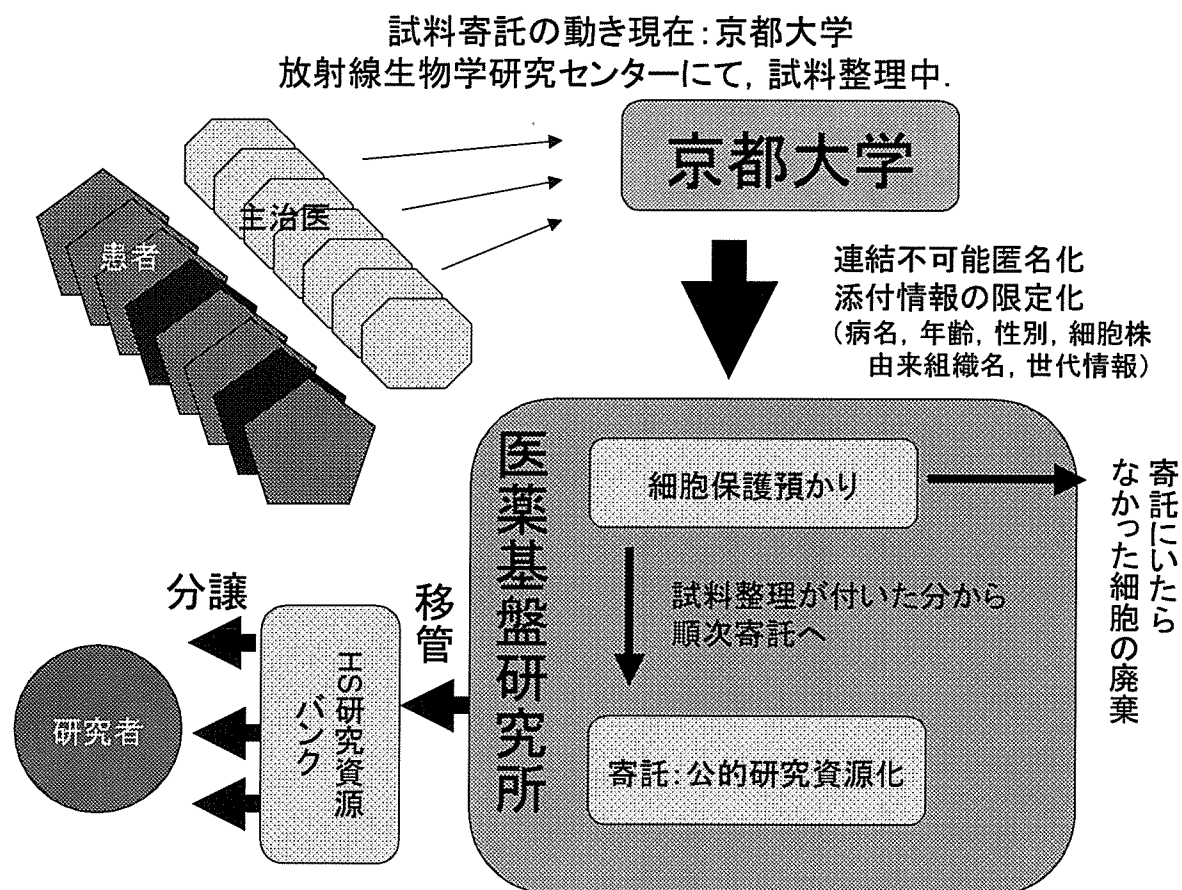


表 (独)医薬基盤研究所への寄託細胞一覧

disease	proband					father				mother				other				total
	primary fibroblas	SV	hTERT	lymph	othe	primary fibroblas	SV	hTERT	lymph	primary fibroblas	SV	hTERT	lymph	primary fibroblas	SV	hTERT	lymph	
Xeroderma pigmentosum	331	16	18	14		13				17				2				411
Fanconi anemia	59	39	5	24	1	19	8		10	23	9		12	11	6	1	8	235
Aplastic anemia(High SCE)	3	3		4		1	1			2	1		1	1				18
Aplastic anemia (Unknown etiology)	33	1		14		9	1		6	22	1		9	7			6	109
Ataxia telangiectasia	30	6	4	13		2		1		7	1	3	5	5	1	4	1	83
Bloom syndrome	11	2	2	5		1												21
Cockayne syndrome	56	9	6			3				9								83
Ichthyosis	1									1								2
Bullous congenital ichthyosiform erythroderm	1																	1
Incontinentia pigmenti	4																	4
Rothmund-Thomson Syndrome	4	5																9
Cole-Engman Syndrome (Dyskeratosis Congenita)	1																	1
Albinism	1																	1
argininemia	1																	1
gangliosidosis	1																	1
XY gonadal dysgenesis	1																	1
Desynaptic man	3																	3
$\alpha$ -glucosidase defect	1																	1
Menkes kinky hair disease	1																	1
Lipid Storage Myopathy	2																	2
Lesch-Nyhan syndrome	1									1								2
Maple syrop urine disease	1																	1
Progeroid	1																	1
Pyruvate Kinase Deficiency	1																	1
Familial polyposis coli	40	4	4							2				21				71
Gaedner's syndrome	4													1				5
Peutz-Jeghers syndrome	12	3	2			1				1								19
Dyschromatosis	3					1												4
Aniridia-Wilms tumor	1																	1
Retinoblastoma	490	19	10	19	2	41	1		10	42	1	1	9	6				651
Fibrous histiocytoma	1																	1
Malignant Melanoma	1																	1
Multiple anomaly syndrome	1									1								1
Small cell carcinoma	1																	1
Osteosarcoma	1																	1
Famirial leukemia	7					3				3				10				23
carcinoma of the breast	1																	1
Sipple syndrome	13																	13
Wilms tumor	1			1														2
Brain tumor (familial)	1																	1
Rectum krebs	1																	1
Male Turner	3																	3
Ascites	1																	1
Basal cell Nevus Syndrome	1	2	1															4
Hydroa	2																	2
Bowen disease	2																	2
Familial stomach cancer	1																	1
Familial metachronous cancer	1																	1
Glycogen storage disease	1																	1
Gardner Syndrome		3																3
Down's syndrome	5			3		2				1		1						12
Neuroblastoma	1																	1
Nijmegen breakage syndrome	1																	1
Neurofibromatosis	2									1								3
hydatidiform mole	1																	1
Hepatoblastoma	3			1														4
Beckwith-Wiedemann syndrome	2					1				1								4
Multiple sclerosis	1																	1
Medullary Carcinoma of thyroid	2					1				1				1				5
Porokeratosis of Mibelli	2																	2
Shwachman syndrome	1			1														2
Tuberous scerosis	2																	2
Epidermodysplasia verruciformis	14																	14
Recklinghausen	1																	1
Werner syndrome	1																	1
Multiple Cancer	1																	1
Turner	1																	1
Congenital anomaly (Mutant karyotype)	34			7		1		1										43
Acute myelogenous leukemia(AML)					3													3
other	41	1	2	28	1	4		5		6		8	3			4		103
total	1256	113	54	137	4	103	11	1	32	140	13	4	45	68	8	5	19	2013



ヒトゲノム研究に提供する幹細胞の迅速同定に利用する  
モノクローナル抗体の開発に関する研究

分担研究者 梅澤 明弘 国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部 部長

研究要旨：ヒト幹細胞は、再生医療という治療戦略の一翼を担っている。その中において、ヒト幹細胞に対するモノクローナル抗体作成は、細胞同定のプローブとして利用可能であることのみならず、細胞を検定する際に極めて重要な意義を有する。ヒト間葉系幹細胞を免疫し、新たなモノクローナル抗体を作成した。細胞移植との関連性を踏まえ、作成したモノクローナル抗体の有用性を今後明らかにする。

A. 研究目的

自身の性質を保持して自己複製しながら、何種類もの細胞に分化する能力を持つ幹細胞は、胚性幹細胞と組織幹細胞に分類される。これらは再生医療への応用が期待され、今後細胞バンクにおける重要な資源となると予想される。そこで、これらに特化した品質管理手法として『胚性幹細胞』と『組織幹細胞』を区別するためのモノクローナル抗体を作成する研究を実施した。

B. 研究方法

ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞を免疫原として、モノクローナル抗体を作成した。スクリーニングには、ヒト間葉系幹細胞の膜に染色されるモノクローナル抗体を選別した。得られたモノクローナル抗体を用いて、種々のヒト間葉系幹細胞を染色し、その有用性を検討した。

(倫理面への配慮)

1. ヒト細胞に対する倫理

当研究所においては、ヒト細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号25、26及び27、平成15年1月承認、受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認、受付番号88、89、90、91平成16年7月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認）。これらについては、樹立細胞の公的細胞バンクへの寄託についても

審査され承認を得ている。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う予定である。

2. 動物に対する倫理

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号2003-002, 2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

(1) 細胞治療用ヒト間葉系細胞の調整とプロファイリングと公的細胞バンク登録

既に国立成育医療センター・倫理委員会（受付番号25, 26, 27, 49, 55, 全て平成15年、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認）にて、承認を受けたヒト由来組織（成育バイオリソース：月経血、臍帯血、末梢血、胎盤、子宮内膜、指、眼球、軟骨等）の間葉系細胞を単離、培養を行った。さらに新たに単離した間葉系細胞に対しても、同様に後の研究を進めるための蓄積をはかる。そのデータを利用して、これらの細胞が多分化能を有す

状態を保つ培養条件、方法等を確立し、公的細胞バンクへの情報を提供した。さらに、網羅的発現遺伝子解析 (Affymetrix社) ならびにモノクローナル抗体を用いた既知の分子発現解析を行っており、一部はホームページ (<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/omezawa/link.html>) 上で公開し、それらはデータベースとして構築した。また、一部は公的データベース (GEO) に登録した。

#### (2) モノクローナル抗体の作成

ヒト大腿骨骨頭部より採取した骨髄間質細胞をパピローマウイルスE6, E7遺伝子及びhTERT遺伝子を導入することで、不死化させた。不死化させた細胞のうち、UE7T-13細胞を免疫原とした。UE7T-13細胞の膜表面に反応するモノクローナル抗体5C7, 5D9, 5G6, 5G7, 6D3を得た。

#### D. 考察

ヒト間葉系幹細胞の同定に用いるモノクローナル抗体の開発研究は、一般的な開発研究の方法に準じて予備試験から本実験へと実施することになるが、少なくとも本研究にて得られたモノクローナル抗体は再生医療のバリデーションに利用できる可能性がある。当初は少数のサンプルで実施し、方法が確立したと考えられる結果を得た段階で、細胞バンクで保存している全ての培養細胞を対象に普遍性を検討すると同時に、利用者に提供するデータを得ることとする。また、これらのデータはWEBを通じて迅速に公開するものとするのが大事である。

細胞治療はすでに始まっている。米国では間葉系幹細胞に純化しないままの骨髄細胞を用いて、*in vivo*において中枢神経細胞、心筋細胞、肝細胞に分化したという報告があったほか、国立循環器病センターにおいても拡張型心筋症患者の救命策として骨髄間質細胞の移植が始まった。ただし、これらが「研究」段階から「製品」へ進化するためには用いる細胞の安定的供給体制の構築とともに細胞の標準化・バリデーション方法を確立することが急務である。これらの間葉系細胞を用いた細胞治療の実現化に向けて、本研究で得られたモノクローナル抗体は骨髄間葉系細胞を用いた研究成果を生かす意味でも極めて重要な意味をもつ。

また、本研究成果は間葉系幹細胞に限定されず、広く造血幹細胞、神経幹細胞、神経幹細胞、血管内皮幹細胞など、さまざまな細胞のバリデーションに応用できる。科学的共通基盤に基づいた再生医療の推進が、治療効果の判定に有用であるばかりか、社会的信頼を得、国民の合意形成にも貢献すると考えられる。現状では日本のみならず、米国FDAでもバリデーションの方法論について模索中であり、世界

的な基準でのバリデーション方法になりえる可能性を秘める。

再生医療製品の市場規模は潜在的世界市場で10兆円超、国内で潜在の対象患者数165万人、1兆円との推計がある。米国ではこれまでにFDAが承認した再生医療・組織工学製品の4品目の2002年の総売上高は5,250万ドル(約60億円)まで成長しているとの報告もある(NEDO 組織・臓器再生の早期実用化を目指した再生評価技術の動向調査)。本研究によって確立されたバリデーション法が世界的に認められたときには、この巨大市場の一端を確保できる。

#### E. 結論

独自に確立した間葉系細胞培養システムを用いて、骨髄由来の間葉系細胞を単離し、増殖させ、細胞移植の供給源とする細胞提供システムを速やかに構築した。また、公的細胞バンクに寄託する倫理的手続きを終了し、寄託を開始した。また、ヒト間葉系幹細胞を免疫し、新たなモノクローナル抗体を作成した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells. *Mol. Biol. Cell*, in press.
2. Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem.* in press.
3. Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration* 27(1):28-36. 2007
4. Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res.* 2006
5. Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ. A comparison of

neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. Stem Cells. 24(10):2270-8. 2006

6. Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and Umezawa A  
Increased mobilization of c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>(KSL) cells and colony-forming units in spleen(CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. J. Cell Physiol. 208:188-194. 2006
7. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. Endocrinology. 147(9):4104-11. 2006
8. Fukuhara Y, Li XK, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuoka K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, Umezawa A, Okano H, Takahashi T, Okuyama T. Histopathological and behavioral improvement of murine mucopolysaccharidosis type VII by intracerebral transplantation of neural stem cells. Mol Ther. 13(3):548-55. 2006

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  
なし

研究要旨：近年、細胞治療研究、創薬における薬効・安全性のスクリーニング等で、多分化能を有するヒト未分化細胞（幹細胞）を利用する研究者のニーズが高まっている。それに伴って、性状が明らかで、品質管理の行き届いたヒト幹細胞の供給が待ち望まれており、細胞の提供先として、細胞バンクの果たす役割が、今後益々重要となっている。ほとんどのヒト幹細胞は、培地に成分未知物質を含む血清を添加することやフィーダー細胞を幹細胞と一緒に培養する方法が取られている。しかし、これらの方法は、培養の煩雑さ、血清成分による細胞の未分化能の消失や染色体異常発生の可能性、生物材料から持ち込まれるウイルス、マイコプラズマなど感染の危険性、といった問題を抱えている。細胞バンクが提供するヒト幹細胞は、継代培養しても遺伝的に正常性を維持し、かつ未分化能を有する、「品質」が標準化された細胞である必要がある。本研究では、ヒト未分化細胞の増殖に必要な生理活性因子を探索するとともに、これらの因子を活用した無血清培地の開発を行う。

#### A. 研究目的

無血清培地の開発には、目的とする細胞の増殖を効果的に促進する細胞増殖因子を同定するとともに、細胞増殖に有効な血清機能代替物質を探索することが重要な鍵となる。本研究の対象細胞であるヒト間葉系幹細胞（hMSC）に対する細胞増殖因子については、これまでに線維芽細胞増殖因子（FGFs）や血小板由来増殖因子（PDGF）などが報告されている。しかしながら従来の細胞増殖因子探索においては、血清を含む培地で検討されていることが多いため、血清中に含まれる細胞増殖因子や未知成分の影響により、個々の細胞増殖因子の本質的作用について明らかにすることが困難であった。本研究では多種類の遺伝子組換え型ヒト細胞増殖因子について、独自に開発した無血清培養検定法を用いて探索を行うことで、hMSC に対する細胞増殖因子を検討する。また、血清の持つ生理機能に

は、栄養素や細胞増殖因子の供給等の他に、血清タンパク質における脂質や微量金属の担体機能、さらに抗酸化物質による細胞の酸化障害の抑制等が知られている。血清中の成分は、細胞の生存や増殖にとって極めて重要な働きをしているが、細胞培養に用いるにあたっては、ロットにより生物活性が大きく異なることや、未知ウイルス等の存在が否定できない等問題点も多い。本研究では、血清機能について分別し、それぞれの機能を代替する非動物由来物質について検討を行う。さらに、これらの検討において、有効性が確認された細胞増殖因子や血清機能代替物質を利用した合成培地の試作を行うことを目的とする。

#### B. 研究方法

本研究ではインフォームドコンセントのもとで採取され、製品化されたhMSC（Cambrex 社）を使用した。hMSC の増殖アッセイは、 $\alpha$  MEM

培地にポリビニルピロリドン、インスリン、既知脂肪酸混合物を添加した増殖検定用無血清基本培地に種々の細胞増殖因子や血清代替物質等の検定物を添加した培地で行った。実験は、24 ウェル、96 ウェル培養プレートまたは 35mm 直径の培養ディッシュに hMSC を 5000 細胞/cm<sup>2</sup> で播種後、37°C、5%CO<sub>2</sub>/air のインキュベーター内で培養し、培養開始後 4-11 日目に細胞数を計測、または、Cell counting kit (同仁化学)を用いた吸光度法で検定物の hMSC に対する増殖促進作用について計測した。計測は1検定物あたり 3 ウェルで行い、平均値および標準誤差を示した。検定対象細胞成長因子は、いずれもヒト型組換え体の epidermal growth factor (EGF)、platelet derived growth factor-bb (PDGF)、fibroblast growth factor-1(FGF1)、fibroblast growth factor-2 (FGF2)、fibroblast growth factor-4 (FGF4)、fibroblast growth factor-7 (FGF7)を使用した。

また、血清機能成分代替検定物質として、デキサメサゾン、クエン酸鉄、鉄-EDTA 錯体、アスコルビン酸リン酸エステル塩を使用した。

### C. 研究結果

無血清培地においては、添加された細胞増殖因子が最大限の生理活性を発揮するために糖質コルチコイド等の細胞生存維持ホルモンが必要な場合が多い。しかしながら、hMSC においては糖質コルチコイドであるデキサメサゾンは *in vitro* における骨分化誘導因子 (1×10<sup>-7</sup>M)として知られている。そこで、細胞増殖因子の活性発現に対する必要性や最少必要量について検討をおこなった。図1に EGF、PDGF、および FGF2 の hMSC 増殖促進作用に及ぼす各種濃度のデキサメサゾンの影響を示

した。基本培地に各種組替え型細胞増殖因子を添加した場合、基本培地と比較して PDGF 添加群と FGF2 添加群においてそれぞれ培養後に 2.1 倍、1.8 倍の細胞数を示し、デキサメサゾンの非存在下においても細胞増殖促進活性を示すことが判った。基本培地に添加したデキサメサゾンはどの濃度においても増殖促進は見られず、デキサメサゾン単独の細胞増殖促進作用はないことが確認された。EGF、PDGF、FGF2 それぞれの細胞増殖促進活性に及ぼすデキサメサゾンの効果については、いずれの増殖因子の場合においてもデキサメサゾン濃度依存的に細胞増殖促進作用が增强された。特に FGF2 に対するデキサメサゾンの効果は顕著であり、1×10<sup>-8</sup>M、および 1×10<sup>-7</sup>M 添加でそれぞれ無添加に比べて 3.6 倍および 4.2 倍の細胞数となった。以後の実験においては、細胞増殖因子の増殖促進活性を誘導し、かつ細胞分化を最低限に抑える目的でデキサメサゾン濃度を 1×10<sup>-8</sup>M とした。

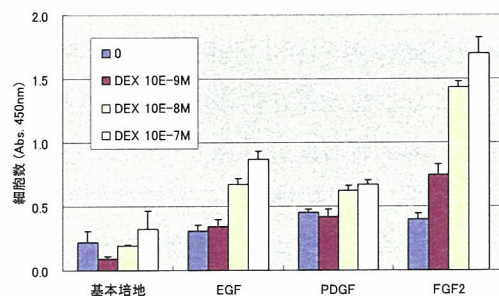


図1. 各種細胞増殖因子の増殖促進作用に及ぼすデキサメサゾンの影響(4日間培養)

FGF2 が hMSC に対して高い増殖促進活性を有することが明らかとなったので、他の FGF ファミリー (FGF1, FGF4, FGF7) の増殖促進活性についても検討した(図2)。

FGF ファミリーの中では、FGF2 と FGF1 に高い増殖促進活性が認められ、4 日間の培養後に



において、基本培地に対してそれぞれ 4.7 倍、4.3 倍の細胞数となった。また FGF4 においても 2.4 倍となり、増殖作用が認められた。表皮角化細胞増殖因子として知られる FGF7 には、hMSC に対する増殖促進作用は認められなかった。

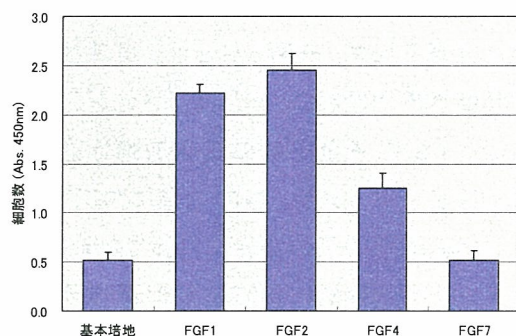


図2. FGF 細胞増殖因子ファミリーの hMSC に対する増殖促進活性(4日間培養)

これまでの結果より、FGF2が低濃度のデキサメサゾン存在下において hMSC に対して高い増殖促進作用を発揮することが、無血清培養系を用いた探索結果から明らかとなった。この増殖促進作用をさらに強め、血清含有培地に匹敵する増殖効果を得るために、血清機能成分を代替する物質の探索を行った。本研究においては、鉄の担体として重要な役割を果たしているトランスフェリンの機能を代替する物質として鉄錯体であるクエン酸鉄、および EDTA 錯体について検討した。また、抗酸化作用があり、コラーゲン合成にも必須の成分であるアスコルビン酸の作用について、安定型アスコルビン酸であるアスコルビン酸リン酸エステル塩を用いて検討を行った。

鉄錯体物の hMSC 増殖に及ぼす効果について図3に示す。検定した3種類の鉄錯体物は、弱いながらも FGF2 による hMSC 増殖促進作用を増強する

効果を有することが明らかとなった。その効果は、クエン酸鉄において 5uM でほぼ最大に達し、無添加の約 1.25 倍の細胞数となった。他の 3 価鉄、2 価鉄の EDTA 錯体についても同等の効果が認められたが、至適濃度範囲はクエン酸鉄に比べて狭いことも判明した。

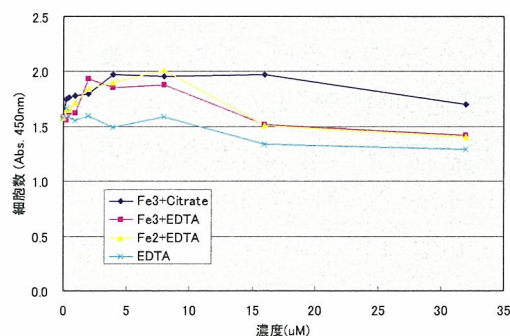


図3. 鉄錯体物の hMSC 増殖に及ぼす効果(4日間培養)

また、アスコルビン酸リン酸エステル塩においても hMSC 増殖促進作用が認められた(図4)。増殖促進作用は濃度依存的であり、0.25mM でその作用は最大となり、無添加の約 1.7 倍の細胞数となった。

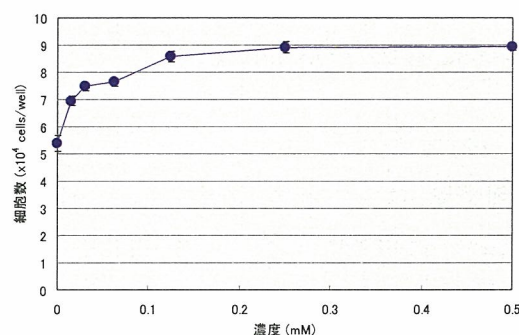


図4. アスコルビン酸リン酸エステル塩の hMSC 増殖に及ぼす効果(7日間培養)

これまでの検討結果をもとに、hMSC の体外増殖培養用無血清培地を試作し、その培養性能を、現在一般的に使用されている 10%ウシ胎児血清添加  $\alpha$  MEM 培地と比較した(図5)。 $4.35 \times 10^4$  cells/dish (35mm 直径)で播種した

hMSC は、11 日間の培養期間中増殖を続け、この無血清培地で細胞数は  $1.23 \times 10^6$  に達した。この値は、10%ウシ胎児血清添加  $\alpha$  MEM 培地で培養した場合の細胞数  $2.08 \times 10^6$  に対して約60%の細胞数であった。

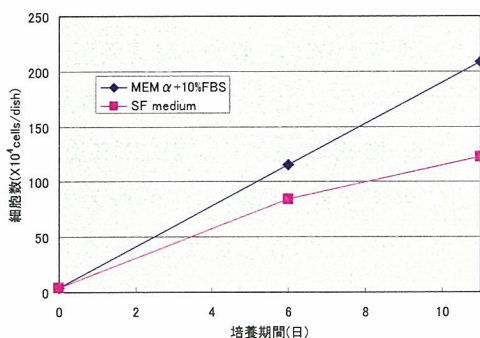


図5. 無血清培地および血清培地による hMSC の増殖培養

図6に培養6日目における血清培地(A)および無血清培地(B)で培養した hMSC の形態像を示す。

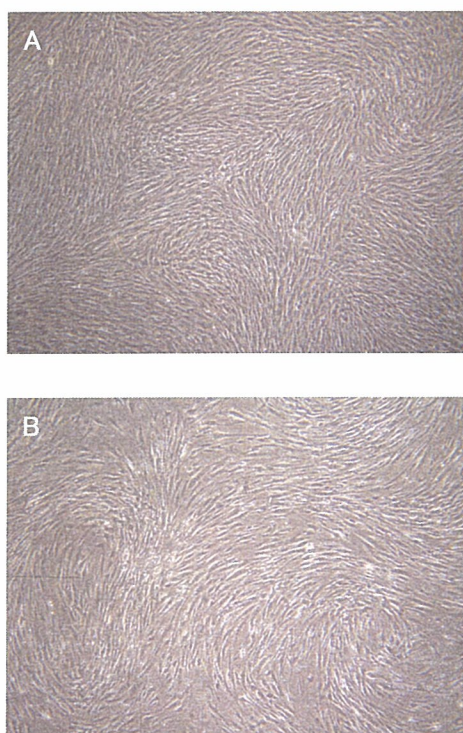


図6. 血清培地(A)および無血清培地(B)で培養した hMSC の形態像

どちらも線維芽細胞様の典型的な間葉系幹細胞形態を示しているが、無血清培地で培養した細胞は細胞密度が低いにも関わらず、培養面から脱落した死細胞も観察された。

#### D. 考察

現在、hMSC の培養は、培地にウシ胎児血清を 10~20%という高濃度で添加して培養する方法が一般的に行われている。しかし、血清は成分や濃度が未知のものが多く含まれており、ロットによる生物活性の変動も大きい。アルブミンやトランスフェリン等の血清から精製された血清由来成分を添加した無血清培地の開発も行われているが、これら血清由来成分においても完全に未知ウイルスの存在を否定することは出来ないのが現状である。これらの問題点を解決し、標準化された培養システムを構築するには、すべての成分が既知の物質から構成され、動物由来成分を使用しない完全合成培地の開発が重要な課題であると考えられる。

本研究では、hMSC の体外増殖培養を可能とする完全合成増殖培地の開発を目指し、細胞増殖を特異的に促進する細胞増殖因子、および血清機能を代替する非動物由来物質の探索と検討を行った。本研究に用いた無血清培養検定法では、基礎培地として hMSC の体外増殖において最も血清要求性が低いことが確認された  $\alpha$  MEM 培地を選択した。また、従来より無血清培地において生理活性物質の安定化や脂質の供給源として利用されているアルブミンの機能代替物質として、高分子化合物であるポリビニルピロリドンと既知脂質のエマルジョン混合物を添加し、さらに組替え型インスリンを添加することで基本培地とした。

本無血清培養系を用いることで、未知成分からの影響を受けずに、検定対象物質の作用を効果的に検出することが可能となった。

hMSC の細胞増殖を促進する細胞増殖因子の探索の結果、FGF2 と PDGF に強い促進活性があることが明らかとなった。また、単独では効果が認められなかった EGF を含め、これらの細胞増殖因子の活性は、デキサメサゾンにより増強されることも明らかとなった。無血清培地において効果的に細胞増殖を実現するためには、デキサメサゾンは必須の因子であると考えられる。一方、デキサメサゾンは hMSC の骨分化を誘導する因子として知られている。未分化状態での増殖が求められる hMSC の増殖培養においては、デキサメサゾンの添加量は分化を誘導する濃度以下でなくてはならない。本研究で検討したデキサメサゾン濃度のうち、最大の増殖促進活性増強効果を示した  $10^{-7}$ M は、in vitro の hMSC 骨分化誘導に用いられている濃度であり、未分化維持を期待できないと思われる。1/10 濃度 ( $10^{-8}$ M) の低濃度デキサメサゾンにより十分な細胞増殖因子における増殖促進作用を増強する効果が認められた。この濃度は 10%FBS を含有する培養液中の糖質コルチコイドと同等であると考えられ、分化誘導作用は低いものと思われるが、低濃度デキサメサゾン含有無血清培地で増殖した hMSC の未分化維持状態については今後十分に検証する必要があると考える。

hMSC の体外増殖において、FGF2 が EGF や PDGF に比べて強力な増殖促進作用を有することが明らかとなった。FGF2 が属する、いわゆる FGF ファミリーは現在 22 種類の存在が明らかとなっており、多くの細胞に対して増殖や機能発現に重要な役割を果たしていること

が知られている。FGF ファミリーは受容体を共有してシグナル伝達を行っているため、異なるファミリー分子同士が同様な作用を持つことも多い。本研究では、hMSC に対して FGF1、FGF4、FGF7 の増殖促進作用について検討を行った。FGF1 においても FGF2 と同等の細胞増殖促進作用が認められた。組替え型 FGF1 は分子の安定化や受容体結合にムコ多糖体であるヘパリンを必要とする場合が多く、その必要量は細胞によって異なる。hMSC の場合においても FGF1 の作用を最大限に引き出すためには、2ug/mL 程度のヘパリンが必要であった(データ未掲載)。ヘパリンは動物由来成分であり、合成培地の成分としては不適格であるため、FGF ファミリーの中ではヘパリンに依存せずに細胞増殖促進作用を発揮する FGF2 が hMSC 増殖用合成培地成分として適していることが示唆された。

鉄は呼吸酵素の構成金属として酸化・還元反応に参与する重要な金属であり、培養細胞においてもその供給は生存や増殖に必要である。細胞は鉄結合たんぱく質であるトランスフェリンを介して鉄を得ており、血清機能成分であるトランスフェリンは、無血清培養の際にも培地に添加することが多い。イオンとして培地中に存在する鉄を細胞が利用することは可能であるが、培地中では 2 価鉄イオンは非常に不安定であり、急速に酸化されて不溶性の 3 価鉄イオンとなるため、効果は期待できない。本研究では、不溶性の 3 価鉄をクエン酸や EDTA 等と錯体を形成することによって可溶化したものがトランスフェリンの機能を代替するかについて検討を行った。クエン酸鉄、EDTA 鉄ともに明らかな hMSC に対する増殖促進効果が認められ、錯体化することによって細胞への鉄供給が可能と考えられる。適切な鉄錯



体物を選択することで、トランスフェリンの機能を代替できることが示唆された。

アスコルビン酸は生体内において、抗酸化物質、コラーゲン合成、生体異物の代謝、アミノ酸やホルモンの代謝等多くの生理的役割を果たしているが、ヒトにおいては合成できないため、無血清培養においても培地に添加を考慮されるべき物質の一つである。しかし、アスコルビン酸は培地中では金属イオン等によって容易に分解されてしまうため、その効果は短時間で消失してしまう。本研究においては、安定型アスコルビン酸として知られるアスコルビン酸誘導体の一種であるアスコルビン酸リン酸エステル塩(AA-P)の hMSC に対する効果を検討した。AA-P は hMSC に対して、強い増殖促進効果を示した。このことは、hMSC の増殖や生存にアスコルビン酸が重要であることを示していると考えられる。これまでの研究によってヒト線維芽細胞の無血清培養においても AA-P が強い増殖促進効果を有していることが示されており、アスコルビン酸に対する高い要求性は間葉系細胞に共通する性質であることも示唆された。また、本研究で基礎培地として使用している  $\alpha$ MEM には構成成分として 0.28mM のアスコルビン酸が存在しているにも関わらず、添加した AA-P が濃度依存的に効果を示すことから、構成成分アスコルビン酸の効果が低下していることも考えられた。一方、培地に添加した AA-P の効果は、4°C で 30 日間保存した無血清培地においても認められている(データ未掲載)。これらの結果から、AA-P は hMSC の増殖用合成培地の血清機能代替物質として極めて有効なものであると考えられる。

これまでの研究結果をもとに、hMSC の増殖用合成培地を試作し、増殖性能について 10%

FBS 含有  $\alpha$ MEM 培地(血清培地)と比較を行った。播種直後の hMSC は合成培地においても血清培地と同等の培養ディッシュへの接着性を示した。播種細胞がすべて接着、増殖したとの前提ではあるが、合成培地で培養した hMSC は 11 日間の培養で、4.8 回の細胞分裂を行い、約 28 倍に増殖したことになる。これは血清培地の 5.5 回分裂、細胞数 48 倍には及ばないが、複数回の細胞分裂が合成培地によって誘起されたことを示している。また、合成培地で培養中した hMSC の細胞形態も血清培地で培養した形態と同様に典型的な間葉系細胞の形態を維持していることも示された。本研究により、成分既知で動物由来成分を含まない合成培地で hMSC の増殖培養が可能であることが示され、今後、hMSC の培養へ応用することで、標準化された培養システムの構築へ貢献することが期待される。

今後は血清の有する機能をさらに詳細に分類し、それぞれの機能を代替する物質を探索し、また、基礎培地の成分(無機塩類、アミノ酸、ビタミン、核酸、糖類等)を調製することによって、血清培地と同等の増殖性能を有する合成培地を開発することが可能になると考えている。また、幹細胞の性質上、未分化性を維持していることは極めて重要なことである。合成培地の開発においても、構成成分が hMSC の未分化性に与える影響については詳細に検証することが必要であると思われる。

ヒト幹細胞等の未分化細胞に対するニーズは今後ますます高まることが予想され、これらの細胞を研究資源として提供する細胞バンクの役割もますます重要となっている。本研究目的であるヒト幹細胞培養用合成培地の開発は、現在広く利用されている血清培地に代わる革新的培地として注目され、ヒト幹細胞が本

来保有する未分化状態を維持した標準化された体外培養法の確立に大きな貢献が期待される。

#### E. 結論

ヒト間葉系幹細胞の体外増殖用合成培地の開発を目的として、細胞増殖因子、及び血清機能を代替する物質の探索・検討を行った。細胞増殖因子としては FGF2 が最も強い増殖促進作用を有していることが明らかとなった。また、クエン酸鉄錯体が血清成分であるトランスフェリンの代替として効果を持つこと、さらにアスコルビン酸リン酸エステル塩が増殖促進効果を安定的に発揮する物質として有効であることを明らかにした。これらの細胞増殖因子や血清機能物質を用いて試作した合成培地を用いた hMSC の培養試験を行い、成分既知かつ動物由来成分を用いない合成培地でも hMSC の増殖培養が可能であることを確認した。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### 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  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Li J, Uchida T, <u>Todo T</u> , Kitagawa T.	Electron transfer mechanism from FAD cofactor to UV- damaged DNA. Similarities and differences between cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase and (6-4) photolyase as revealed by resonance Raman spectroscopy	J Biol Chem.	281(35)	25551- 25559	2006
Li J, Uchida T, Ohta T, <u>Todo T</u> , Kitagawa T.	Characteristic Structure and Environment in FAD Cofactor of (6-4) Photolyase along Function Revealed by Resonance Raman Spectroscopy.	J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys.	110(33):	16724- 16732	2006
Zikihara K, Iwata T, Matsuoka D, Kandori H, <u>Todo T</u> , Tokutomi S.:	Photoreaction cycle of the light, oxygen, and voltage domain in FKF1 determined by low- temperature absorption spectroscopy.	Biochemistry	45(36)	10828- 10837	2006
Yamamoto J, Hitomi K, <u>Todo T</u> , Iwai S	Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing the Dewar valence isomer of the (6-4) photoproduct and their use in (6-4) photolyase studies.	Nucleic Acids Res.	34(16)	4406-4415	2006
Maeda A, Tsujiya S, Higashide T, Toida K, <u>Todo</u> <u>T</u> , Ueyama T, Okamura H, Sugiyama K.	Circadian intraocular pressure rhythm is generated by clock genes.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	47(9)	4050-4052	2006
Abe T, Ishikawa T, Masuda T, Mizusawa K, Tsukamoto T, Mitani H, Yanagisawa T, <u>Todo T</u> , Iigo M.	Molecular analysis of Dec1 and Dec2 in the peripheral circadian clock of zebrafish photosensitive cells.	Biochem Biophys Res Commun.	351(4)	1072-1077	2006
Taniguchi Y, Takeda S, Furutani-Seiki M, Kamei Y, <u>Todo T</u> , Sasado T, Deguchi T, Kondoh H, Mudde J, Yamazoe M, Hidaka M, Mitani H, Toyoda A, Sakaki Y, Plasterk RH, Cuppen E.	Generation of medaka gene knockout models by target- selected mutagenesis	Genome Biol.	7 (12)	R116	2006
Schleicher E, Hitomi K, Kay CW, Getzoff ED, <u>Todo T</u> , Weber S.	ENDOR differentiates complementary roles for active site histidines in (6-4) photolyase	J Biol Chem	282(7)	4738-4747	2006

Tanida M, Yamatodani A, Nijima A, Shen J, <u>Todo T</u> , Nagai K	Autonomic and cardiovascular responses to scent stimulation are altered in cry KO mice	Neurosci Lett	413	177-182	2006
Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and <u>Umezawa A</u>	Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells	Mol. Biol. Cell,			2007 in press.
Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, <u>Umezawa A</u> .	Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts.	J Cell Biochem.			2007 in press
Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, <u>Umezawa A</u> .	Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells.	Exp Cell Res.	313	698-706	2007
<u>Umezawa A</u> , Toyoda M.	Two MSCs : Marrow stromal cells and mesencymal stemc ells.	Inflammation and Regeneration	27(1)	28-36.	2007
Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, <u>Umezawa A</u> , Young MJ.	A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells.	Stem Cells.	24(10)	2270-8.	2006
Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and <u>Umezawa A</u> .	Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin-(KSL)cells and colony-forming units in spleen(CFU-S)following de nove formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossificaion.	J. Cellular Physiology	208.	188-194	2006
Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, <u>Umezawa A</u> , Miyamoto K.	Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells.	Endocrinology	147(9)	4104-11	2006
Fukuhara Y, Li XK, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuoka K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, <u>Umezawa A</u> , Okano H, Takahashi T, Okuyama T.	Histopathological and behavioral improvement of murine mucopolysaccharidosis type VII by intracerebral transplantation of neural stem cells.	Mol Ther.	13(3)	548-55	2006