

の HCV 試料について検討したところ、濃縮効率に差があるもののいずれも PEI ビーズにより 1ml(10 倍量)からの濃縮で 5 倍以上に濃縮可能であることを確認した。理論値の 10 倍以上のウイルス濃縮効果が得られるケースもあったが、これはウイルス濃縮中に RNase のような阻害物質が試料から除去されるためではないかと推測される。

以上の結果より、PEI ビーズによるウイルス濃縮法は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 HAV、HBV、HCV にも適用可能であること、特に HAV、HCV はヒト血漿試料からも効率よく濃縮可能であることから、これらウイルスの患者血漿を用いた高感度スクリーニング試験にも有用な方法であることが示唆された。

D-2. 細胞の同一性や遺伝的安定性評価手法の開発および細胞のガン化予測指標の探索

細胞治療に用いる細胞の遺伝的安定性の確認は、その品質や安全性確保の観点から非常に重要である。特に、種々の幹細胞を増殖、分化させた後生体に戻すという治療においては、*in vitro*での培養や細胞の処理によって染色体異常等の遺伝的変化が起こらないことを確認することは重要である。そこで、遺伝的な安定性を治療前に確認しておくことが必要となり、そのために有効な試験法に関して検討してきた。我々は既に、細胞の同一性の検証のためには複数の STR マーカーを用いた解析が有効であることを示したが、同一起源の細胞においても、染色体転座や欠失、増幅、LOH といった異常を持つ可能性があり、特に細胞のがん化形質の獲得へとつながる可能性もあること

から注意が必要である。染色体の欠失は、がん抑制遺伝子の不活性化を、増幅は *myc* 等のがん遺伝子の活性化を引き起こし、がん化へとつながる引き金になると考えられる。染色体の増減に関する情報を得る上で、簡便でより詳細な方法として、BAC クローンを使った CGH アレイや SNP 検出用の GeneChip が有用であることを我々は既に示した。今回さらに詳細な検討が可能となるカスタムメイドの oligoCGH アレイを用いて、遺伝子増幅のメカニズムに迫るとともに、さらに高密度の SNP 検出用の GeneChip を使用した間葉系幹細胞の培養過程での染色体安定性の確認への適用について検討を行った。

モデル細胞として HL60 細胞を取り上げ、*c-myc* 遺伝子の増幅領域の解析においては、これまでの解析で完全に解明できなかった DM の構造の全貌を明らかにすることができた。各増幅領域のジャンクションについては、CGH アレイからの詳細なデータを元に設計した PCR プライマーにより、シーケンズレベルでの解明に成功した。Fig.63 にそのジャンクション配列の特徴を示した。まず、その一つとしてジャンクションの部分の短い相同配列が見られた。これは非相対的組み換えがおきる引き金となっていると予想される。また、もう一つの特徴として、ジャンクションの近傍に回文構造や、相補的配列が認められ、これらが立体的に高次構造を取るための原因となっていると考えられ、離れた増幅領域を結びつけるための一助になっていると考えられる。実際に得られた増幅領域のゲノム上の位置を元にモデルを作成し、各ジャンクション同志を立体的に近傍に持ってきた際には、比較

的コンパクトにまとまったタマネギ状のバブル構造を取らせることができ、増幅領域がループアウトしたような立体構造を作ることができた。こうした、ループアウトした高次構造が、組み換えにより切り出される、若しくはこの構造の中で、ジャンクション部分で乗り越えを起こしながら DNA 複製が行われることにより、全体として約 2Mb からなる閉じた環状の DNA 構造単位がゲノムより切り出され、これが DM 染色体の起源となったと予想される。通常、余分な DNA 断片は DNA 分解酵素により速やかに消化されると考えられるが、環状の比較的大きな構造体として生成したためにそうした分解を受けず、細胞の中に残り、DM 染色体になっていったと考えられる。そして、はじめは一つの単位であった DM 染色体が、複製、細胞分裂の過程で不均等に分配されていき、コピー数の多い細胞が増殖的優位性を持ったために、DM 染色体の数が増える方向で蓄積して行ったと考えている。また、環状の構造のために、一つの鋳型から複数コピーの複製が行われ増幅が起きたと考える事もできる。セントロメアを持たない構造でどうして DM 染色体として安定に保たれるかは謎であるが、CGH アレイの有用性を示す重要な結果である構造単位としての DM 染色体の全貌が明らかになった意義は大きい。

oligoCGH を使った詳細な増幅単位の解析は、こうしたメカニズムを解析する上で有用であることがわかったが、細胞全体としての評価をする場合には、ゲノム全体を網羅的に解析可能な CGH アレイが必要となる。今回、そのツールとして、5 万箇所 SNP を同時に検出可能な GeneChip を使っ

て、ヒト間葉系幹細胞の培養過程における染色体変化を検討した。まず、遺伝的変化が起きうるかを調べるために、長期培養したロットに関して、その最初と最後でのゲノム変化を解析してみた。すると、二つの染色体において明らかな CGH シグナルの変化（異常）が検出され、その後のマルチカラー-FISH による染色体解析により、染色体異常が確認された。CGH アレイで検出されるためにはその異常がある程度の範囲の細胞に及んでいる必要があり、実際に G-banding による核型解析からも、26 継代目の細胞ではほぼ全ての細胞が染色体異常を持つことが確認された。6 継代目の細胞には 50 細胞の観察からは異常が確認されておらず、この間の 20 世代の間に一部に起きた異常が全体へと広がったと考えられる。そのため、この異常細胞が増殖優位性を持つと考えられるとともに、全体のポピュレーションを占めるまでにはある程度の時間がかかるため、比較的早い段階で（最初からの可能性を含め）異常が発生したと考えることもできる。現在、この経時変化を追うために、凍結保存してあった継代途中の細胞を用いて FISH 解析による検討を行っている。また、増殖優位性に関して考察するため、増加が起きていた染色体領域に含まれる遺伝子が注目されるが、一つの候補として既に乳癌等で増幅が知られている EGFR が 7 番染色体セントロメア付近の 7q12 ローカスに存在し、その関与が示唆される。

D-3. 細胞由来生理活性物質のプロファイリング技術や構造解析技術の開発

D-3-1. トリプシン消化細胞表面ペプチド

を指標とした細胞特性解析

継代時のトリプシン処理液を用いたプロテオーム解析は、非破壊的な手法として貴重な細胞等での特性解析に役立つと考えられる。今回オンラインナノ LC-MS/MS を用いた解析により、非常に高感度にペプチドを検出可能であることがわかり、この手法が有望であることが示唆された。細胞膜表面のタンパク質由来のペプチドが特性解析として期待されるが、MS/MS 測定による同定を同時に行う解析では、ヒットするペプチド数があまり多くないため、想定される膜タンパク質は一部を除き同定されなかった。今後は、MS/MS 測定に頼らず、親イオン (TOF-MS) データにおいてペプチドを網羅的に検出し、そのパターンの比較から発現の差および細胞固有のシグナルを検出していききたい。このためには、それに適したデータ解析手法が必要であり、現在オリジナルなソフトウェアの開発を進めている。まだ、試験的な段階ではあるが、今回2種のフィーダー細胞の特性の要因となっている発現差のあるタンパク質として、フィブロネクチンが捕まった。今後は、その発現量に関して、タンパクレベルでの確認を行うとともに、機能的な役割についても検討を行いたい。

D-3-2. 細胞表面糖鎖の構造・不均一性の解析技術の開発

NeuGc は、ウシなど様々な動物で産生されるが、ヒトでは産生されないために、ヒトに対して抗原性を示すことが知られている。2005年 Martin らによって、ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) 培養過程で、異種血清やフィーダー細胞から NeuGc が混入するこ

とが報告されて以来、NeuGc が細胞治療薬の有効性や安全性へ及ぼす影響が懸念されるようになってきた。NeuGc の有効性や安全性への影響を正しく評価するにあたって、細胞治療薬に含まれる NeuGc の量を正確に測定する必要がある。

細胞中のシアル酸の定量法として、DMB 誘導体化と LC/蛍光検出法を組み合わせた方法がよく用いられている。DMB 誘導体化と LC/蛍光検出法に MS 及び MS/MS を組み合わせると、分子量やフラグメントからシアル酸分子種を同定することができる。しかし、既存の分析法の検出感度 (検出限界 5 pmol) は、細胞治療薬の品質評価法としては十分ではなく、分析の微量化が求められていた。

本研究において、高分解能質量分析が可能な FTMS を用いて SIM により質量範囲を制限して測定することにより、NeuGc 及び NeuAc の 0.0078-50 pmol の範囲で直線性が得られることが確認された。NeuGc 及び NeuAc の定量限界は 26.3 fmol 及び 16.9 fmol であり、本分析法が微量シアル酸の分析に適していることが確認された。

さらに、この分析法を用いて、FCS 及びヒト血清添加培地を用いて培養した HL-60 細胞の細胞膜画分の NeuGc 及び NeuAc を定量し、僅か 2.5×10^3 個の細胞を使って、NeuGc の含量を測定できることを確認した。本分析法は感度及び特異性が高いことから、細胞治療薬の NeuGc の定量に応用可能であることが示唆された。

尚、今回開発した定量法を用いて、ヒト血清添加培地で培養したヒト培養細胞からも NeuGc が検出されたという結果は、

細胞治療薬の製造工程において、NeuGcの混入を完全に避けることは難しいことを示唆していると思われる。細胞治療薬の安全性及び有効性を保証するために、細胞に取り込まれた NeuGc の量を正確に測定した上で臨床データや免疫原性の有無について、正しく評価する必要があるだろう。

我々は、平成 12 年度から厚生労働省の再生医療の品質・安全性評価に関わる研究班において、LC/MS を用いた独自の糖鎖プロファイリング法を確立し、細胞発現生理活性物質の構造特性解析や、分化・がん化指標の探索に応用してきた。本年度は、細胞特性確認試験法としての糖鎖プロファイリング法の有用性を評価する目的で、HL-60 細胞を用いて、培養条件の変化によって生じた細胞の変化を糖鎖プロファイリングによって捉えることができるかどうかを調べた。

その結果、培養条件によって生じた細胞の変化は、糖鎖プロファイルの変化として表れること、さらに、LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングは、それを鋭敏に検出できることが確認された。今回の結果は、LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングが細胞特性確認試験法として適用可能であることを示唆していると思われる。

厚生労働省は BSE 等の問題から、血清は増殖や加工の過程で必須でなければ使用しないこととする通達を出しており、現在、多くの機関で細胞培養の無血清化が検討されている。一方で、細胞治療薬の製造における恒常性を確保するために、様々な開発企業や研究機関で、自己血清から異種血清への変更も検討されている。細胞中の糖鎖

の解析は、細胞の特性確認試験だけでなく、最適培養条件のスクリーニングなどにも利用できる可能性は高い。また、今後はプロテオグリカンや糖脂質分子等についても、品質特性評価指標としての有用性を検討していく必要があるだろう。

D-4. 細胞特性指標の探索

D-4-1. 血管内皮細胞の効率的誘導法の確立および製造工程関連要件の検討

FDA の細胞治療新薬治験申請に関するガイドライン案によると、細胞組織利用医薬品を治験申請する際、その製造工程に関しては、細胞原料（組織や細胞の種類）、細胞の採取方法、細胞誘導の方法、ドナースクリーニングの方法、細胞バンクシステム、試薬（細胞の増幅、分化、選択、精製、および、他の重要な製造工程において必須な要素であり、最終製品には含まれないもの。例：血清、トリプシン、成長因子、サイトカイン、モノクローナル抗体、抗生物質、細胞分離装置、培地、培地成分）、添加剤など、製造に用いられる全ての要素や試薬等について記載が必要であり、製造における全ての工程の妥当性を評価しておくことも必要であるとされている。製品の試験としては、微生物試験（無菌試験、マイコプラズマ試験、迷入ウイルス試験）や、確認試験、純度試験、生存率試験、力価など、製品の特性を示す試験が必要とされている。

血管内皮前駆細胞を細胞組織利用医薬品として用いることを考えると、ドナーは患者自身であると想定されるため、製造工程関連の要素としては細胞誘導の方法が特に重要であり、また、最終製品の安全性、力価、純度に影響する試薬、添加剤なども重

要な要素になると考えられる。一方で、確認試験や力価などの製品の品質特性を示す規格および試験方法を設定するには、細胞誘導の方法が確立され、目的とする細胞の特性指標が明らかになっていなければならないことから、現状では、血管内皮前駆細胞の誘導方法の確立と細胞特性指標の探索が最も重要な課題であると考えられる。安全性確保上の最重要課題である細菌・ウイルス等の混入の問題については、試薬からの感染性物質の混入の他、培養の工程中に感染性物質が迷入することのないような対策を講じる必要がある。牛胎児血清の使用は BSE や糖鎖抗原の問題で安全性上の懸念事項となるが、BSE 安全国由来製品の使用や患者由来血清を用いることでこの問題を避けられると考えられる場合もある。

EPC の調製においては細胞数の確保が課題であるが、本研究により造血因子 TPO が AC133 陽性細胞の増殖を促進することを見出し、EPC 増幅法の確立に向けた重要な知見を得ることができた。AC133 陽性細胞の増殖および TPO 受容体発現の解析から、AC133 陽性細胞は培養開始 3 日目までに TPO 応答性を獲得し、その後、CD31 強陽性細胞へ分化増殖していると考えられた。また、AC133 陽性細胞の増殖に必要な TPO の濃度は 5~10ng/ml であったが、特に CD31 強陽性細胞を増幅したい場合は、50ng/ml と高濃度を用いる方がよいと考えられた。

昨年度までに我々は、細胞特性指標探索のための細胞由来生理活性物質プロファイリング技術としてサイトカインアレイが有用であることを報告し、AC133 由来 CD31 強陽性 EPC の特性指標として IL-8 を同定

した。今年度は、IL-8 の細胞機能への影響を解析し、OEC の遊走促進効果を持つことを明らかにすることができた。血液由来細胞から分化誘導した EPC と OEC を同時に投与することで、血管再生の効率を上げることができる可能性も考えられる。フローサイトメトリーによる解析で OEC が IL-8 受容体を発現していることが明らかとなったが、OEC の細胞集団の中で IL-8 受容体を発現している細胞の割合は 26.7%であったことから、IL-8 受容体陽性 OEC のみを分離して用いることで、血管再生の効率を上昇させられる可能性も考えられる。

単核球画分全体を出発材料として EPC を調製する方法においては、画分中に含まれる血小板が EPC への分化誘導を促進する効果を持つことが明らかになった。血小板の混入率が EPC への分化の変動要因の一つになると考えられるため、製品の品質特性に影響する製造工程中の要素として、血小板混入量を測定することが望ましいと思われる。マグネティックソーティングなどにより単核球から特定の細胞種を分離して用いる場合、血小板の混入はほとんどなくなると思われるが、分離後の細胞に血小板を再添加することで EPC への分化を促進できる可能性が考えられる。血小板は、適切な方法を用いれば血液から容易に調製できるため、患者由来の EPC 産生促進物質として有効に利用できる可能性がある。生体内において、活性化血小板が EPC のホーミングに関与しているという報告もあり、血管再生のメカニズムの点からも血小板と EPC の相互作用に興味を持たれる。

血小板に存在する接着分子 P-selectin の細胞外ドメインのみを持つ可溶性組換え P-

selectin が EPC 産生促進効果を示すことが明らかになったが、P-selectin のリガンドとしてはシアリルルイス X 構造を持つ糖鎖を有するタンパク質 PSGL1 が知られている。単核球の PSGL1 に由来するシグナルが血管内皮前駆細胞への分化を促進している可能性が考えられ、そのシグナルの解明が分化誘導の機構解明につながると思われる。EPC 調製法における有用性としては、凍結した細胞以外に材料が得られないような場合に、血小板の代替品として P-selectin を用いることが考えられる。血小板と P-selectin の効果を比較した場合、FN への接着および分化を促進される細胞の種類や、分化した EPC の特性などの差異については今後の検討課題であるため、得られる知見に基づき、目的の特性を有する細胞を得るのに適した方法を選択していく必要がある。

OEC の誘導系については、heparin および hydrocortisone の影響に関する解析を進めると共に、誘導効率を向上させる方法の探索を行う必要がある。OEC は培養用ウェルの端の方に出現することが多いため、FN に非常に弱く接着している細胞が、培養開始1週間～10日後ぐらいに何らかのシグナルを引き金に分化増殖を始めているように思われる。特定の細胞種を分離し、培地交換を極力行わないといった方法も OEC 誘導に有効であるかもしれない。播種する細胞種を限定できれば、目的外の細胞が混入する可能性も少なくなると考えられる。しかし、OEC の分化増殖の引き金として、その他の細胞の senescence に伴い放出されている因子が必要であるような場合は、このストラテジーは成り立たないため、考え

られる可能性をそれぞれ検証していく必要がある。OEC の senescence については、文献的にも統一した見解が得られていないことから、培養条件と各種老化マーカーの関連などを解析し、OEC としての機能を十分に維持した継代数までに十分な細胞数を得られる方法を確立していく必要がある。

社会の高齢化、あるいは、肥満や生活習慣病患者の増加などを背景に、動脈硬化に基づく虚血性疾患は今後も増加すると予想され、血管再生医療への社会的要望も高まっている。患者血液由来の細胞を分化増殖させることによって調製する血管内皮前駆細胞は、細胞採取に伴う負担が少なく、また、自己の細胞を利用するため拒絶反応など免疫系の問題も生じないことから、細胞組織利用医薬品としての有用性が高いと考えられるため、細胞組織利用医薬品の品質・安全性確保のための評価系確立のモデルとして、今後も解析を進めていく予定である。

D-4-2. 分化予測バイオマーカーの同定法の検討および心筋細胞分化予測マーカーの探索

D-4-2-1. 心筋細胞分化能と関連する遺伝子

P19 細胞と CL6 細胞、および Neomycin 耐性遺伝子を含む CL6 細胞サブラインの CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 の 6 種類の細胞の心筋細胞分化能を検討するために、定量性リアルタイム RT-PCR を用いて心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を測定した。ここで測定したマーカーは心筋線維遺伝子としてミオシン軽鎖 2a(MLC2a)、ミオシン軽鎖 2v(MLC2v)、 α

ミオシン重鎖(α MHC)、 β ミオシン重鎖(β MHC)の 4 種、心筋細胞分化関連転写因子として Nkx2.5、GATA4、MEF2C の 3 種である。しかし、これら 7 種のマーカーから得られたデータをそのまま用いて分析するには資料の数が多く複雑すぎる上、個々のマーカー遺伝子の発現にどの程度の重み付けをした上で解釈してよいかは明らかではない。そこで、これらのデータから本質的な情報を引き出すためにこれらを主成分分析した。算出された主成分が資料の情報をどれくらい説明しているかの目安を与える、すなわち主成分の妥当性を表す寄与率を見ると、第 1 主成分は 7 個ある資料のうち約 4.4 個の情報すなわち資料の本質の約 63%を説明しており、第 2 主成分は約 1.2 個の情報すなわち資料の本質の約 17%を説明していることが認められ、この 2 つの主成分で資料の本質の 80%以上が説明されることがわかる。算出された第 1 および第 2 主成分の式を視覚化した図である変量プロットを見ると、第 1 主成分は各変量の係数全てが正に出ていることから心筋細胞の分化の指標となることが考えられる。GATA4、MEF2C および Nkx2.5 は心筋細胞分化の比較的初期に発現が見られるマーカーであり、心筋線維遺伝子の MLC2a、MLC2v、 α MHC、 β MHC は心筋細胞分化の比較的後期に発現が見られることが知られている。なかでも β MHC はマウスでは胎生期の心筋に発現し、出生後は α MHC に置換される。第 2 主成分では GATA4、MEF2C および Nkx2.5 の係数は負の値であり、心筋線維遺伝子の係数はすべて正の値である上、 β MHC が α MHC よりも低い係数を割り当てられていることから、第 2 主成分は

心筋細胞の成熟の指標となることが考えられる。本研究では分化誘導後における自律拍動する小結節出現までの日数および出現した小結節の数に加え、この第 1 主成分の得点を心筋細胞分化能の指標とした。

次に分化前の遺伝子発現を評価するために、マイクロアレイによる解析を行った。得られたデータにフィルターをかけて心筋細胞分化能との相関のあるものを検出した。まず、遺伝子の発現が見られる Probe Set を選ぶためにフィルター①をかけた。次に、細胞株による遺伝子発現の差を比較するためには細胞株間で差があるものを選ぶ必要があるのでフィルター②をかけた。その次に、細胞株間での差が小さいと相関がないものまで相関があるとして検出されてしまう危険性があるので細胞株間での差が平均で 50%ずつあれば大きな差が出ると仮定、すなわち最大の平均値と最小の平均値に 2.5 倍の差があればよいと仮定しフィルター③をかけた。最後に、フィルター④をとって定量リアルタイム RT-PCR で得られた第 1 主成分の最大値、第 2 主成分の最大値、さらに自律拍動する小結節出現までの日数、自律拍動する小結節数に対してピアソンの順位相関係数を算出し、有意な相関があるものを選び出した。ここで、相関係数として順位相関を選択した理由は、分化前における特定の遺伝子発現が心筋細胞分化に影響する場合、分化前の遺伝子発現量と分化効率は必ずしも線形の相関を示すとは限らないためであり、また、いくつかの飛離れた値が存在する場合には、例えば相関が線形であったとしても、ピアソンの積率相関係数などの間隔尺度・比尺度間の相関係数の場合はそれらの値に引きずられて

不当に高い相関係数が得られてしまうからである。

この結果、Table 2 に示すような 24 遺伝子が検出された。このうち、CMP2 と CMP13 は 2 種類のプローブセットで検出されており、心筋細胞分化との相関関係については信頼度が特に高いと考えられた。

D-4-2-2. CMP 遺伝子と心筋細胞分化との因果関係の評価

CMP 遺伝子は未分化細胞の心筋細胞分化能と相関関係が認められるが、これらが実際に心筋細胞分化に関与しているという因果関係を説明するには、相関関係のみでは不十分であるといえる。そこで、筆者らは RNAi を用いて、各 CMP 遺伝子の機能を阻害し、心筋細胞への分化に影響を与えているかどうかを評価することを試みた。RNAi を用いて、各 CMP 遺伝子をノックダウンした結果、CMP11、CMP19、CMP22 を除く全ての遺伝子で、有意な発現の抑制が認められた。

Table 3 より、CMP1、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP8、CMP9、CMP10、CMP13、CMP18、CMP20、CMP24 は、その機能を阻害することにより心筋細胞分化が抑制され、逆に、CMP7、CMP12、CMP16、CMP17、CMP21、CMP23 は、その機能を阻害することにより、心筋細胞分化が促進されることが明らかとなった。これらの結果より、上記遺伝子は心筋細胞分化過程において有意な生理的役割を担っていることが示唆される。

ここで、心筋細胞分化能の指標となる第 1 主成分との相関性を考えてみると、正の相関が得られた遺伝子、すなわち、心筋細胞に分化しやすいものほど発現が多いもの

は、分化を促進する方向に働き、その発現を抑制することで、分化が抑制されると考えられる。逆に、負の相関が得られたものは、心筋細胞に分化しにくいものほど発現が多く、分化を抑制する方向に働き、発現の抑制により分化が促進されると考えられる。これを基に、Table 2 と Table 3 を比較してみると、CMP6、CMP7、CMP8、CMP9、CMP12、CMP16、CMP21、CMP24 においては、相関関係と RNAi を用いて機能を阻害した結果は矛盾しているように見える。しかし、心筋細胞分化に寄与することが既に知られている遺伝子の中には Wnt や BMP のように心筋細胞分化過程の特定のタイミングで一過性に機能が調節されることが必要な遺伝子も存在する。従って、RNAi を用いて遺伝子の機能を比較的長期に抑制した場合と、特異的なブロッカー等を用いて一過性に抑制した場合とでは、分化への影響が異なる可能性があり、今後、詳細な検討が必要である。

CMP23 は、その機能の阻害により、自律拍動する小結節数、および、心筋細胞特異的マーカー遺伝子の α MHC、 β MHC、MLC2v は有意な増加が認められた。それにも関わらず、MLC2a は有意な減少が認められた。心房筋を特徴付ける MLC2a が減少し、心室筋を特徴付ける MLC2v が増加したことは、心室筋の特異的な誘導に重要な因子である可能性を示しており、心不全の治療に有用な情報と考えられる。

D-5. 免疫原性の新規評価技術・新規免疫機能制御技術の開発

35 型 Ad ベクターの遺伝子導入機構を明らかにすることは、35 型 Ad の特性の解明

に繋がるだけではなく、より高性能なベクター開発に向けて必要不可欠である。一般に使用されている5型Adベクターの感染機構については多くの報告があり、第一受容体である coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR)にファイバーノブが結合した後、ペントンベースのRGD配列が α_v インテグリンに結合することにより内在化を受け、感染にいたることが知られている。一方で、①subgroup Bに属する35型AdのペントンベースにもRGD配列が存在する、②造血幹細胞において幾つかのインテグリンが発現している、③subgroup B Adの受容体であるCD46が細胞膜上で一部のインテグリンと会合していることから、35型Adによるヒト造血幹細胞への遺伝子導入においてもペントンベース・RGD配列とインテグリンとの結合が関与することが推察された。そこで本研究では、35型Adベクターによるヒト骨髄由来CD34陽性細胞への遺伝子導入におけるインテグリンの関与について検討を行い、35型Adベクターの遺伝子導入に $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが関与していることを明らかにした。

本研究において、ペントンベース・RGD配列の改変により35型Adベクターの細胞表面接着量および細胞内取り込み量は変化しなかった。SegermanやTuveらはEDTAを用いてインテグリンとの結合に必須である金属イオンをキレートした場合においても、35型Adの細胞への接着に影響を及ぼさないことを報告している。従って、35型Adベクターの細胞表面への接着および細胞内への取り込みにはCD46との結合が重要であり、インテグリンとペントンベース・RGD配列との結合は関与しないものと

考えられる。しかしながらRGDペプチドにより遺伝子導入阻害が見られたこと、RGD配列改変により遺伝子導入効率が大きく減弱したことから、細胞内在化以降の過程にRGD配列とインテグリンとの結合が大きく関与していることが示唆された。5型Adベクターの場合、ペントンベースと $\alpha_v\beta_5$ インテグリンの結合がベクター粒子のエンドソームからの脱出を促進することが報告されていることから、35型Adベクターにおいても細胞内に取り込まれた後にエンドソーム膜を破壊し細胞質へ脱出する過程に $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの結合が関与しているのではないかと考えられる。これまでに $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを受容体とするウイルスとしては、他にもヘルペスウイルス、ウエストナイルウイルスが報告されているが、これらのウイルスは $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを細胞表面への接着および細胞内への侵入に利用しており、その点で35型Adはこれらのウイルスと大きく異なっている。しかし35型Adにとって $\alpha_v\beta_3$ インテグリンはあくまでも第二受容体であり、その感染にはCD46が必須であると思われる。我々は35型Adベクターを $\alpha_v\beta_3$ インテグリンは発現しているが、CD46を発現していないマウス黒色腫細胞B16に作用させたが、ほとんど遺伝子発現は得られなかった (data not shown)。

Shayakhmetovらは5型Adベクターと5型Adベクターのノブを35型Adのノブに置換し、さらにペントンベース・RGD配列を欠損させたAdベクターを作製し、遺伝子導入効率を検討している。その結果、5型AdベクターではペントンベースRGD配列の欠損により遺伝子導入効率に変化は認

められなかったが、35型ファイバーノブを有する5型AdベクターはRGD配列の欠損により有意に遺伝子導入効率が低下したと報告している。今回の検討においても、35型Adベクターのペントンベース・RGD配列を欠損させることにより、ヒト骨髄由来CD34陽性細胞においては83%阻害がかかっていることから、35型Adベクターの遺伝子導入におけるペントンベースRGD配列とインテグリンとの結合の寄与は5型Adベクターより大きいと言える。つまり、第一受容体として何を認識するかによってインテグリンの寄与の程度が異なっているものと思われる。

結合する受容体により細胞内輸送機構も異なってくると考えられる。5型Adベクターの場合、CARと結合した後、RGD配列とインテグリンとの結合によりphosphatidylinositol-3-kinaseが活性化され、アクチンの重合が促進されることによりクラスリン被覆小胞が形成され、細胞内に取り込まれる。35型Adベクター取り込みにおいてクラスリン被膜小胞が形成されるかどうかは不明であるが、Crismeen-Irwinらは、CD46を受容体とする麻疹ウイルスがCD46との結合を介してマクロピノサイトーシスにより取り込まれることを報告している。35型Adベクターは5型Adベクターの細胞内取り込みとは異なり、マクロピノサイトーシスにより取り込まれているためにペントンベース・RGD配列を欠損させても細胞内取り込み量に差が見られなかったのかも知れない。

RGDペプチドとRGD配列を認識するインテグリンとの親和性はRGDに続く4番目のアミノ酸に影響を受けること、35型

Adベクターのペントンベースに含まれるRGDN (N=Asn)配列は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンとの親和力が強いという報告がある。ヒト骨髄由来CD34陽性細胞では $\alpha_5\beta_1$ インテグリンが高発現していたことから、当初35型Adベクターの遺伝子導入に関するインテグリンは $\alpha_5\beta_1$ ではないかと推察していた。 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンは5型Adの細胞表面への結合にも関与することが報告されている。しかし、 α_5 および β_1 インテグリン、いずれの阻害抗体を用いても35型Adベクターの遺伝子導入阻害は認められなかった。なぜ $\alpha_5\beta_1$ インテグリンが35型Adベクターによる遺伝子導入に関与していないのかについては不明である。もしかすると、35型Adはエンドソームからの脱出などの細胞内輸送にのみインテグリンを利用しており、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンは細胞内輸送には関与しないのかもしれない。今回得られた成果は、インテグリン配列を利用した、造血幹細胞への高効率に導入可能なベクターの開発において重要な知見である。

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ビーズを用いたウイルス濃縮法のヒト肝炎ウイルスへの適用について検討した。その結果、PEIビーズを用いたウイルス濃縮法はヒト肝炎ウイルスのHAV、HBV、HCVにも適用可能であること、特にHAV、HCVはヒト血漿試料から効率よく濃縮可能であることから、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これらウイルスの高感度検出やスクリーニングに有用な方法であることが示唆

された。

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、細胞治療に用いる培養細胞の遺伝的安定性の検証法として、その利用が期待できる。また、oligoCGH アレイはカスタムデザインが可能なアレイとして、より詳細な解析が可能であり、がん遺伝子増幅の解析にも有効であることが示された。また、ヒト間葉系幹細胞の長期培養で、染色体変化が観察され、SNP アレイの有用性が示された。

3) 細胞継代時のトリプシン処理液を用いたプロテオーム解析が細胞特性解析に有用であることが示された。また、LC/MS を用いて、細胞治療薬の製造工程由来不純物として懸念されている NeuGc の微量定量法を開発し、モデルヒト細胞中に含まれている微量の NeuGc を定量できることを確認した。さらに、分担研究者らが独自に開発した糖鎖プロファイリング法を用いてモデル細胞の糖鎖を解析し、糖鎖プロファイリング法は細胞特性確認試験法としての応用可能性が高いことを確認した。

4) 血管内皮前駆細胞をモデルとした研究においては、①AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性 EPC の誘導系を用いた検討から、Thrombopoetin が促進効果を持つことを示し、EPC 誘導効率向上のための方策を提示した。②単核球からの EPC 誘導系では単核球画分に含まれる血小板が EPC 誘導促進作用を持つことを明らかにした。③CD31 強陽性 EPC の特性指標である IL-8 が OEC の遊走促進作用を示すことを示し、EPC と OEC の併用により血管再生の効率が向上する可能性を示した。さらに、④OEC 誘導

系においては、目的以外の細胞の出現する可能性があること、継代に伴い senescence に特徴的な細胞形態の変化が認められることを明らかにした。

また、心筋細胞分化予測バイオマーカーの同定法の検討を行い、未分化段階を含む分化過程において、細胞における複数の特定遺伝子 (CMP 遺伝子群) の発現量が、細胞の心筋分化活性と有意な相関を示すという知見を得た。これと同時に、本研究で検出された複数の CMP 遺伝子の中には、未分化細胞の心筋細胞への分化において有意な生理的役割を果たしているものが存在することが示唆された。これらのことから、CMP 遺伝子およびその遺伝子産物をマーカーとして用いることにより、細胞の心筋分化活性を的確に検出することができる可能性があると考えられた。しかし、CMP 遺伝子が P19 系列以外の未分化細胞・幹細胞あるいは他の動物種でも同様の機能を果たすか、また、各 CMP 遺伝子の心筋細胞分化に対する詳細な機能については、多くが不明でありさらなる検討が必要である。

5) 免疫原性の新規評価技術・新規免疫機能制御技術の開発に関する研究においては、35 型 Ad ベクターによるヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入において、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとペントンベース・RGD 配列との結合が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。現在、骨髄 niche への接着に関与する分子を発見する 35 型 Ad ベクターの作成に取り組んでおり、今後その機能について検討する予定である。

F. 健康危険情報

遺伝子組み換え実験については、研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令並びに国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え安全管理規則」に則って実施した。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) Niimi, S., Harashima, H., Yamaguchi, T.: Study of hepatocytes using RNA interference. *Journal of Organ Dysfunction*, (in press)
- 2) Mizuguchi H., Funakoshi N., Hosono T., Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T. Rapid construction of small interfering RNA-expressing adenovirus vectors on the basis of direct cloning of short hairpin RNA-coding DNAs. *Hum. Gene Ther.*, 18, 74-80 (2007)
- 3) Koizumi N., Yamaguchi T., Kawabata K., Sakurai F., Sasaki T., Watanabe Y., Hayakawa T., Mizuguchi H. Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production, *J. Immunol.*, 178, 1767-1773 (2007)
- 4) 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 downregulation of sarcolipin mRNA by triiodothyronine in the atrial myocardium. *FEBS Lett*, 580, 2247-2252 (2006)
- 5) 山口照英：ICH 遺伝子治療専門家会議 シカゴミーティングと今後の展望. *ファルマシア*, 42(4), 357-360 (2006)
- 6) 山口照英：医薬品各条の改正点－生物薬品. *薬局*, 57, 89-95 (2006)
- 7) 内田恵理子、石井明子、山口照英：遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保. *日本臨床ウイルス学会誌* (in press)
- 8) 山口照英：Gene Therapy Discussion Group の動向について. *医薬品研究*, 38, 50-59 (2007)
- 9) Eriko Uchida, Mieko Kogi, Tadashi Oshizawa, Koei Satoh, Akiko Iwata, Mitsuhiro Murata, Mikio Hikata, Teruhide Yamaguchi: Optimization of the virus concentration method using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads and its application to the detection of human hepatitis A, B and C viruses, *Journal of Virological Methods* (in press)
- 10) Teruhide Yamaguchi, Eriko Uchida: Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products, *Current Cancer Drug Targets*, 7, 203-208 (2007)
- 11) 内田恵理子、石井(渡部)明子、山口照英：遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保, *臨床とウイルス* (in press)
- 12) 川崎ナナ、内田恵理子、宮田直樹：薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第9回、*Pharm Tech Japan*, (in press)
- 13) 内田恵理子、川崎ナナ、宮田直樹：薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第5回、*Pharm Tech Japan*, 22 (13), 2483-2491 (2006)
- 14) Kanayasu-Toyoda, T., Suzuki, T., Oshizawa, T., Uchida, E., Hayakawa, T., Yamaguchi, T. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase C α in neutrophilic differentiation cells. *J. Cell Physiol.*, 211: 189-196, 2007.
- 15) Zhan, L., Honma, M., Wang, L., Hayashi, M., Wu, D., Zhang, L., Rajaguru, P.,

- Suzuki, T. Microcystin-LR is not Mutagenic in vivo in the *MacZ* Transgenic Mouse (MutaTMMouse). *Genes and Environment*, 28: 68-73, 2006.
- 16) Dertinger, S.D., Bishop, M.E., McNamee, J.P., Hayashi, M., Suzuki, T., Asano, N., Nakajima, M., Saito, J., Moore, M., Torous, D.K., Macgregor, J.T. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. *Toxicol Sci.* 94: 83-91, 2006.
 - 17) Yoshinao Wada, Parastoo Azadi, Catherine E. Costello, Anne Dell, Rudolf Geyer, Kazuki Kakehi, Niclas G. Karlsson, Koichi Kato, Nana Kawasaki, Kay-Hooi Khoo, Soohyun Kim, Akihiro Kondo, Kazuyuki Nakamura, Hisashi Narimatsu, Milos V. Novotny, Nicolle H. Packer, Helene Perreault, Jasna Peter-Katalinic, Gottfried Pohlentz, Vernin N. Reinhold, Pauline M. Rudd, Akemi Suzuki, And Naoyuki Taniguchi: Mass spectrometry of glycoprotein glycans: HUPO HGPI (Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative) Multi-institutional study. *Glycobiology*, in press
 - 18) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MSⁿ for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides, *Methods in Molecular Biology*, in press
 - 19) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Toru Kawanishi: LC/MS strategies in the characterization of glycoproteins, *Encyclopedia of mass spectrometry*, Vol. 8, Elsevier, in press
 - 20) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MS of oligosaccharides. *Glycoscience Lab. Manual.*, Ed. Naoyuki Taniguchi, in press
 - 21) 川崎ナナ, 早川堯夫: 糖鎖構造解析, バイオ医薬品の品質, 安全性評価, 早川堯夫監修, エル・アイ・シー (東京) 印刷中
 - 22) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. 実験医学増刊号, 印刷中
 - 23) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第7回, *Pharm. Tech. Japan*, 23, 81-87 (2007)
 - 24) Yanyang Zhao, Satsuki Itoh, Xiangchun Wang, Tomoya Isaji, Eiji Miyoshi, Yoshinobu Kariya, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Naoyuki Taniguchi, and Jianguo Gu: Deletion of core fucosylation on $\alpha\beta 1$ integrin down-regulates its functions, *J. Biol. Chem.*, 281, 38343-38350 (2006)
 - 25) Yanyang Zhao, Yakatoshi Nakagawa, Satsuki Itoh, Kei-ichiro Inamori, Tomoya Isaji, Yoshinobu Kariya, Akihiro Kondo, Eiji Miyoshi, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Naoyuki Taniguchi, Jianguo Gu: N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on $\alpha\beta 1$ integrin-mediated cell migration. *J. Biol. Chem.*, 281: 32122 - 32130 (2006)
 - 26) 川崎ナナ, 原園 景, 川西 徹: 糖タンパク質性医薬品の試験法に関する研究 - LC/MS/MS を用いたペプチドマッピング. *医薬品研究*, 37, 438-447 (2006)
 - 27) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 日向昌司, 川西 徹: 局方組換えタンパク質

- 性医薬品の糖鎖試験法に関する研究—
LC/MSn を用いた糖鎖プロファイリン
グ. *医薬品研究*, 37, 448-456 (2006)
- 28) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 山口
照英: 細胞治療薬の品質・安全性評価に
おける糖鎖解析の重要性とLC/MSの応
用可能性. *Functional Glycomics*,
News Letter No.9, 17-24 (2007)
- 29) Akiko Ishii-Watabe, Toshie
Kanayasu-Toyoda, Takuo Suzuki,
Tetsu Kobayashi, Teruhide
Yamaguchi, Toru
Kawanishi influences of the
recombinant artificial cell adhesive
proteins on the behavior of human
umbilical vein endothelial cells in
serum-free culture. *Biologicals* (in
press)
- 30) Martin K. Ng, Jenny Wu, Edwin
Chang, Bing-Yin Wang, Regina
Katzenberg-Clark, Akiko
Ishii-Watabe, John P. Cooke: A
Central Role for Nicotinic Cholinergic
Regulation of Growth Factor-Induced
Endothelial Cell Migration.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27(1),
106-112 (2007)
- 31) Akira Harazono, Nana Kawasaki,
Satsuki Itoh, Noritake 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)
- 32) 堤康夫, 石井明子, 早川堯夫 バイオ医
薬品の品質・安全性評価 増補改訂版
機能性人工タンパク質 エル・アイ・シ
ー 印刷中
- 33) 石井明子, 鈴木琢雄, 川西 徹, 山口照
英, 早川堯夫 バイオ医薬品の品質・安
全性評価 増補改訂版 植物を用いた
医薬品の現状と品質・安全性の確保 エ
ル・アイ・シー 印刷中
- 34) Onohara N, Nishida M, Inoue R,
Kobayashi H, Sumimoto H, Sato Y,
Mori Y, Nagao T, Kurose H. TRPC3
and TRPC6 are essential for
angiotensin II-induced cardiac
hypertrophy. *EMBO J.* 2006;25:
5305-16.
- 35) Nagamatsu Y, Nishida M, Onohara N,
Fukutomi M, Maruyama Y,
Kobayashi H, Sato Y, Kurose H.
Heterotrimeric G protein G
alpha13-induced induction of cytokine
mRNAs through two distinct
pathways in cardiac fibroblasts. *J
Pharmacol Sci.* 2006;101:144-50.
- 36) Yoshida T, Inoue R, Morii T,
Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y,
Tominaga M, Shimizu S, Sato Y, Mori
Y. Nitric oxide activates TRP
channels by cysteine S-nitrosylation.
Nature Chem Biol. 2006;2:596-607.
- 37) Suzuki T, Nishimaki-Mogami T,
Kawai H, Kobayashi T, Shinozaki Y,
Sato Y, Hashimoto T, Asakawa Y,
Inoue K, Ohno Y, Hayakawa T,
Kawanishi T. Screening of novel
nuclear receptor agonists by a
convenient reporter gene assay
system using green fluorescent
protein derivatives. *Phytomedicine.*
2006;13:401-11.
- 38) Tozaki-Saitoh H, Koizumi S, Sato Y,
Tsuda M, Nagao T, Inoue K. Retinoic
acids increase P2X2 receptor
expression through the 5'-flanking
region of P2rx2 gene in rat
phaeochromocytoma PC12 cells. *Mol
Pharmacol* 2006;70:319-28.
- 39) Sakurai F., Murakami S., Kawabata
K., Okada N., Yamamoto A., Seya T.,
Hayakawa T., Mizuguchi H. Crucial

- role of the short consensus repeats 1 and 2 of human CD46 on infection of subgroup B adenovirus serotype 35. *J. Control. Release.*, 113, 271-278 (2006)
- 40) Sakurai F., Kawabata K., Koizumi N., Inoue N., Okabe M., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice. *Gene Ther.*, 13, 1118-1126 (2006)
- 41) Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. Characterization of adenovirus serotype 35 vectors using genetically modified animals and nonhuman primates. *Yakugaku Zasshi.* 126, 1013-1019 (2006)
- 42) 櫻井文教・水口裕之;新しいアデノウイルスベクターの開発、バイオサイエンスとインダストリー、64(5)、11-16 (2006)
- 43) 水口裕之;アデノウイルスベクター開発の最前線、バイオテクノロジージャーナル、印刷中
- 44) 川端健二・櫻井文教・水口裕之;改良型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子デリバリー、Drug Delivery System、印刷中
- AC133 陽性細胞より分化する血管内皮前駆細胞(EPC)の分化促進作用、日本薬学会第 127 年会 (2007. 3. 28, 富山)
- 3) 山口照英:先端技術応用医薬品のウイルス等の安全性確保. 第 47 回日本臨床ウイルス学会、特別講演.(2007.6.3、東京)
- 4) 日向昌司, 新見伸吾, 野間誠司, 川西 徹, 山口照英, 早川堯夫, 原島 瑞, 高山和子, 原 真由美, 関 泰一郎, 有賀豊彦: トロンボモジュリンはマウス乳癌細胞の浸潤能を亢進する. 第 7 回ファーマコヘマトロジーシンポジウム (2006, 6, 30) 東京
- 5) 原島 瑞, 新見伸吾, 小柳仁美, 日向昌司, 関泰一郎, 有賀豊彦, 川西 徹, 山口照英, 早川堯夫: 初代培養ラット肝細胞において増殖抑制条件では Annexin A3 の発現が抑制される. 第 13 回肝細胞研究会 (2006, 7)
- 6) 伊藤由真, 渡邊武紀, 長友俊介, 関泰一郎, 新見伸吾, 川西 徹, 山口照英, 早川堯夫, 有賀豊彦: マウス胎児肝の形成過程における Annexin A3 の発現. 第 13 回肝細胞研究会 (2006, 7)
- 7) 内田恵理子, 佐藤功栄, 岩田明子, 山口照英: パーフルオロオクタン酸(PFOA)による新規ウイルス不活化法の開発;第 54 回日本ウイルス学会学術集会; 2006 年 11 月 19 日、名古屋
- 8) 内田恵理子, 山口照英: バイオ医薬品/生物製品のウイルス安全性に関する国際動向;第 6 回日本医薬品等ウイルス安全性シンポジウム; 2006 年 12 月 1 日、東京
- 9) 古田美玲, 内田恵理子, 押澤正, 山口照英: 放射照射による Op9 細胞の造血支

G-2. 学会発表

- 1) Kanayasu-Toyoda T., Suzuki T., Oshizawa T., Uchida E., Hayakawa T., and Yamaguchi T: Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase C α ; in neutrophilic differentiation cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. (2006. 6. 21, Kyoto)
- 2) 豊田淑江, 押澤正, 石井明子, 鈴木孝昌, 山口照英: Thrombopoietin(TPO)による

- 持能の誘導; 第6回日本再生医療学会総会、2007年3月13日、横浜
- 10) 内田恵理子、小木美恵子、佐藤功栄、岩田明子、山口照英: 生物薬品のウイルス安全性確保: 生物薬品のウイルス除去のためのポリエチレンイミン結合カラムの開発、2007年3月28日、富山
- 11) 鈴木孝昌, 欒 洋, 田邊思帆里, 佐藤陽治, 小木美恵子, 山口照英 ヒト間葉系幹細胞培養時の染色体安定性の解析 第5回日本再生医療学会総会 (2007年3月)
- 12) Takayoshi Suzuki: Toxicogenomic approach in mutation research International conference on Biomarkers in Health and Environmental Management and XXXII EMSI Annual Meeting (2007年1月)
- 13) 鈴木孝昌, スレッシュ・ティルパッティ, 小木美恵子, 山口照英, 本間正充, 欒 洋 染色体を覗ずに染色体を診る技術としてのCGHおよびSNPアレイの有用性 日本環境変異原学会第35回大会 (2006年11月)
- 14) スレッシュ・ティルパッティ, 押澤 正, 山田勉也, 佐伯憲一, 山口照英, 鈴木孝昌 プロテオミクスを用いた変異原研究に有用なバイオマーカーの探索 日本環境変異原学会第35回大会 (2006年11月)
- 15) T. Suzuki, Y. Luan, M. Honma, S. Thirupathi, M. Kogi, T. Yamaguchi CGH AND SNP ARRAYS ARE POWERFUL TOOLS FOR CHROMOSOME ANALYSIS EMS Annual Meeting 2006 (2006年9月)
- 16) C. Furihata, K. Tobe, T. Watanabe, S. Maeda, M. Hirayama, M. Harada, M. Nakajima, S. Hamada, C. Namiki, T. Suzuki, Y. Nakachi, Y. Kondoh, T. Tashiro and C. Furihata Differentially expressed genes in mouse liver induced by N-nitroso carcinogenic compounds, phenobarbital and ethanol. 第20回国際生化学・分子生物学会 (2006年6月)
- 17) S. Yokokawa, D. Mulhern, Y. Ohshima, Y. Adachi, A. Kohara, T. Suzuki, H. Okuda, N. Miyata, S. Ninomiya T. Sudo Environmental factors outweigh drug-response factors at early time points in toxicogenomic experiments. 第33回日本トキシコロジー学会学術年会 (2006年7月)
- 18) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹: LC/MSⁿを用いた部位特異的糖鎖構造解析. 第6回日本蛋白質科学年会 (2006, 4)
- 19) Kotone Sano, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Yasunori Miyamoto, Haruko Ogawa: Reduced glycosylation of vitronectin modulates the tissue lytic system and stellate-cell spreading during liver regeneration. International Symposium on Extracellular Glycomatrix in Health and Disease. (2006, 6, 15-17) Awajishima
- 20) Yanyang Zhao, Jianguo Gu, Xiangchun Wang, Tomoya Isaji, Eiji Miyoshi, Yoshinobu Kariya, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Naoyuki Taniguchi: Deletion of core fucosylation on $\alpha 3\beta 1$ integrin

- down-regulates its functions. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 21) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Akira Harazono, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Toru Kawanishi: Differential analysis of *N*-linked oligosaccharides in kidney of human systemic lupus erythematosus (SLE) model mouse by LC/MS. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 22) Kotone Sano, Kimie Asanuma, Nana Kawasaki, Fumio Arisaka, Haruko Ogawa: How Glycosylation Activates Multifunctional Extracellular Matrix Glycoprotein, Vitronectin, during Liver Regeneration. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 23) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Yukari Nakajima, Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Takao Hayakawa, Toru Kawanishi: Glycosylation analysis of IgLON family glycoproteins in rat brain by LC/MSⁿ (II). 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 24) Yasuhiko Kizuka, Nobuaki Maeda, Nana Kawasaki, Toshisuke Kawasaki, Shogo Oka: A unique type of HNK-1 carbohydrate expressed on phosphacan is biosynthesized by GlcAT-P. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 25) Makoto Baba, Bruce Y. Ma, Matsuishi Yukari, Nana Kawasaki, Makoto Hirano, Nobuko Kawasaki, Shogo Oka, Toshisuke Kawasaki: The lectin jacalin induces T lymphocyte activation through CD45 signaling. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 26) Makoto Hirano, Yong B. Ma, Nana Kawasaki, Kazumichi Okimura, Nobuko Kawasaki, Shogo Oka, Toshisuke Kawasaki: Mannan-binding protein binding to metalloproteases mepirin α and β results in the proteolytic activity inhibition and the complement activation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 27) Nobuko Kawasaki, Risa Inoue, Motoki Terada, Kay-Hooi Khoo, Nana Kawasaki, Bruce Y Ma, Toshisuke

- Kawasaki: Characteristic endogenous ligands for mannan-binding protein expressed on SW1116 human colon cancer cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 28) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 山口照英, 早川堯夫, 川西 徹: LC/MS を用いた血清糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析. Pharmacotherapeutics シンポジウム (2006, 6, 30) 東京
- 29) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 川西 徹, 山口照英: LC/MS/MS を用いたヒト血清グライコプロテオームの解析. 日本ヒトプロテオーム機構第4回大会 (2006, 7, 18-19) 東京
- 30) 佐野琴音, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 安川然太, 佐藤ちひろ, 北島 健, 旭 美穂, 宮本泰則, 小川温子: 肝再生におけるマトリックス分子フィブロネクチンの糖鎖変化の定量解析とその意義. 平成14~18年度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回夏期シンポジウム (2006, 8, 8-9) 浜松
- 31) 野村一也, 水口惣平, 野村和子, 出嶋克史, 永石貴之, 村田大輔, 安藤恵子, 三谷昌平, 瀬古 玲, 山下克子, 泉川友美, 北川裕之, 菅原一幸, 川崎ナナ, 松石 紫, 榎 娟大, 成松 久: 遺伝子破壊による線虫糖鎖関連遺伝子の機能解析. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
- 32) 旭 美穂, 佐野琴音, 橋井則貴, 伊藤さつき, 川崎ナナ, 柳橋麻衣子, 宮本泰則, 小川温子: 肝再生過程におけるラット血漿フィブロネクチンの糖鎖構造. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
- 33) 吉田奈央, 竹原弥生, 佐野琴音, 向山恵津子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 穂山 浩, 吉岡靖雄, 米谷民雄, 小川温子: スギヒラタケレクチンの精製とその糖特異性. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
- 34) 井上里抄, Kay-Hooi Khoo, 寺田基剛, 川崎ナナ, Ma Bruce Yong, 川崎敏祐, 川崎伸子: 血清マンナン結合タンパク質 (MBP) に結合するヒト結腸ガン細胞上のリガンド糖タンパク質. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
- 35) 馬場亮人, Ma Bruce Yong, 松石 紫, 川崎ナナ, 平野 真, 川崎伸子, 川崎敏祐: レクチン jacalin による CD54 を介した T 細胞の活性化に関する研究. 第26回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
- 36) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園景, 中島 紫, 山口照英: 細胞治療/再生医療における糖鎖解析の重要性と糖鎖を利用した細胞特性解析への挑戦. 第4回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム (2006, 10, 23, 24) 東京
- 37) Akiko Ishii, Takuo Suzuki, Tetsu Kobayashi, Teruhide Yamaguchi, Toru Kawanishi influences of the recombinant extracellular matrix

- proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells. 第20回国際生化学・分子生物学会議 2006年6月18~23日 京都
- 38) 鈴木琢雄、櫻井教美、石井明子、小林 哲、大幡久之、本田一男、川西 徹、山口照英：「小胞体ストレスとTNF- α 処理時の単一細胞内カスパーゼ3、9活性化の解析」日本薬学会 第127年会 2007年3月 富山
- 39) 小林 哲、鈴木琢雄、石井明子、川西 徹、山口照英：MALDI-TOF MSにおけるタンパク質のシグナル増強 Part4 日本薬学会 第127年会 2007年3月 富山
- 40) Yukimi Sakurai, Takuo Suzuki, Hiroshi Kawai, Akiko Ishii, Tetsu Kobayashi, Hisayuki Ohata, Kazuo Honda, Teruhide Yamaguchi, Toru Kawanishi : SIMULTANEOUS IMAGING OF CASPASE 9 AND 3 ACTIVATION IN ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS-INDUCED CELL DEATH. 第80回日本薬理学会年会 2007年3月 名古屋
- 41) 櫻井教美、鈴木琢雄、河合 洋、石井明子、小林 哲、大幡久之、本田一男、山口照英、川西 徹：小胞体ストレスによるアポトーシス誘導時のカスパーゼ3,9活性化の解析 バイオイメージング学会 2006年10月 盛岡
- 42) 長谷川哲也、細野哲司、佐藤光利、山口照英、佐藤陽治：DNA マイクロアレイを用いた心筋細胞分化予測指標の探索。日本薬学会第127年会、富山(2007年3月)
- 43) 田邊思帆里、佐藤陽治、鈴木孝昌、長尾拓、山口照英：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の品質管理に関するゲノムプロファイリング。日本薬学会第127年会、富山(2007年3月)
- 44) Nishida M, Onohara N, Inoue R, Sumimoto H, Sato Y, Mori Y, Nagao T, Kurose H. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. 第80回日本薬理学会年会、名古屋(2007年3月)
- 45) Suda R, Onohara N, Sato Y, Nishida M, Kurose H. Inhibition of angiotensin II signaling by ATP-induced NFAT activation in cardiac fibroblasts. 第80回日本薬理学会年会、名古屋(2007年3月)
- 46) Narita Y, Onohara N, Nishida M, Sato Y, Nagao T, Kurose H. Role of Galpha12/13 in angiotensin II-induced cardiac fibrosis in mice. 第80回日本薬理学会年会、名古屋(2007年3月)
- 47) Sato Y, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Yamaguchi T. Search for cardiomyogenesis marker genes in multipotent cells. 第80回日本薬理学会年会、名古屋(2007年3月)
- 48) Tanabe S, Sato Y, Nagao T, Yamaguchi T. Analysis for quality control markers in gene expression profiles of human bone marrow mesenchymal stem cells. 第80回日本薬理学会年会、名古屋(2007年3月)
- 49) 田邊思帆里、佐藤陽治、山口照英：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の培養状態に関

- わる品質特性指標の探索. 第6回日本再生医療学会総会, 横浜 (2007年3月)
- 50)佐藤陽治, 田邊思帆里, 山口照英: トランスクリプトーム解析によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の品質特性の探索. 第6回日本再生医療学会総会, 横浜 (2007年3月)
- 51)長谷川哲也, 細野哲司, 佐藤光利, 山口照英, 佐藤陽治: 未分化細胞における心筋分化予測マーカー遺伝子の探索. 第6回日本再生医療学会総会, 横浜 (2007年3月)
- 52)Tanabe S, Yamaguchi T, Nagao T, Sato Y: Passage-dependent alterations in gene expression profiles of human bone marrow mesenchymal stem cells. 日本分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋 (2006年12月)
- 53)Kurose H, Suda R, Tanabe S, Onohara N, Mangmool S, Nagamatsu Y, Sato Y, Nagao T, Nishida M. Rac up-regulates angiotensin II type I receptors through ROS and NF-kappaB-dependent interleukin-1beta production in rat cardiac fibroblasts. The American Heart Association Scientific Sessions 2006, Chicago, USA (2006年11月)
- 54)Sato M, Nakamura R, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Sato Y. Thyroid Hormone Suppresses Calcification of Blood Vessel through Matrix Gla Protein. The 5th Joint Seminar, Kunming, China (2006年10月)
- 55)Tozaki-Saito H, Tsuda M, Inoue K, Koizumi S, Shinozaki Y, Sato Y. Upregulation of microglial P2X4 receptors by retinoic acid. Neuroscience 2006, the 36th annual meeting of Society for Neuroscience, Atlanta, USA (2006年10月)
- 56)Sato M, Nakamura R, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Ohno Y, Nagao T, Sato Y. Prevention of vascular smooth muscle calcification by thyroid hormone. The XVth International Congress of Pharmacology, Beijing, China (2006年7月)
- 57)村上さや香, 櫻井文教, 川端健二, 岡田直貴, 藤田卓也, 山本昌, 水口裕之; 35型アデノウィルスベクター遺伝子導入機構の解明—インテグリンの関与に関する検討—; 第2回創剤フォーラム若手発表討論会 (京都); 2006年10月13-14日
- 58)Fuminori Sakurai, Kimiyo Akitomo, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi; Downregulation of CD46 by adenovirus serotype 35 vectors; 第12回日本遺伝子治療学会 (東京); 2006年8月24-26日
- 59)Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Takao Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi; Adenovirus Serotype 35 Vector-mediated Gene Transfer into Human and Mouse Hematopoietic Progenitors; The first FIP-APSTJ joint workshop on gene delivery (Sapporo) ; 2006年7月10-12日
- 60)村上さや香, 櫻井文教, 川端健二, 岡田