

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た。この受容体は作動薬である ATP 存在下で直径約 10 ナノメートルの円筒型の集合体となるが、遮断薬であるスラミンを存在させた場合には集合体上となるものの、明確な円筒型を取らないことが判明した。シリコンウエハー表面を化学処理した観察では、受容体タンパク質の結合は認められたものの、雲母上のような高い解像度は得られなかった。モデルペプチドの NMR 解析では変異の導入でアデニンとの相互作用に変化が生じることが示された。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、その両者から調製したゲル中に正常ヒト骨芽及び軟骨細胞を培養し、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 観察を継続するとともに、モデルペプチドの NMR 構造解析を利用した ATP 結合様式の推定を試みた。

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、実際の臨床応用を想定して、昨年度と同じペプチド修飾アルギン酸からなるゲル中に細胞を封入したものを調製し、その内部のヒト細胞機能変化と細胞-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・セファロース 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または化学処理をしたシリコンウエハー表面に

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、これを鑄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 ¹³C 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) を含むペプチドをカルボジイミドによる反応でアルギン酸のカルボキシル基に修飾した。得られたアルギン酸から水溶液を調製し、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後にカルシウムイオン架橋により数種類のゲルを調製した。この際、水溶液中に細胞を懸濁しておくことで、細胞を封入したゲルの調製も行った。

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。これらの細胞を調製したアルギン酸ゲル中に封入し、2-4 週間培養を行った。各材料中での細胞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。また、培養終了後のゲルを Alizarin Red により染色して、種々のゲル中に沈着したカルシウム量を定性的に比較した。

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、EDTA によりゲルを溶解して回収した細胞からの全 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製し、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) 再生医療によって骨組織を再生する場合、細胞活動の足場となるスキャホールドは極めて重要な役割を果たす。早期の治癒のためには、周辺組織との親和性はもちろんのこと骨芽細胞の骨形成機能を

促進するような材料特性も求められる。そのため、骨の発生機構に基づいてスキャホールド材料の設計が望まれるが、骨組織の発生において重要な石灰化についてはいまだ不明な点が多い。そこで本研究では、MSC から分化した骨芽細胞の石灰化現象を可視化することによって石灰化機構を理解し、骨の発生過程に立ち返ったスキャホールドの開発を試みた。

C. 研究結果

(1) 昆虫細胞 Sf9 を用いた系により発現・精製した P2X 受容体タンパク質を、イオン強度を高めた状態で水中にて原子間力顕微鏡観察を行なった。この状態で P2X 受容体タンパク質は劈開雲母上で疑似 2 次元結晶状となり、ナノメートルレベルの分解能の像が得られる。前年度までにこの受容体の内在性作動薬である ATP 存在下において、タンパク質が直径 10 ナノメートルの中央にイオン・チャンネル孔を有する円筒状であることが示されている。これに遮断薬であるスラミンを添加して観察したところ、疑似 2 次元様のタンパク質の配列は形成されたが、明確な円筒状の構造は認められなかった。このことから、遮断薬は単に ATP の結合を阻害するのではなく、受容体タンパク質の構造を変化させる可能性が示唆された。雲母ではなく、表面加工を施したシリコンウエハー上で観察を行なった場合、アミド結合により受容体タンパク質の高密度な結合が認められたが、シリコンウエハーの凹凸が雲母より大きく、高い解像度は得られなかった。

モデルペプチドを用いた NMR 測定による ATP の分子認識の研究では、アミノ酸の置換によりペプチドとアデニン部分との相互作用が変化することが認められた。NMR シグナルをもとにペプチドとアデニン部分の相互作用をコンピュータ計算により画面表示したところ、アミノ酸置換を加えると、アデニン部分との相互作用の際にペプチドの構造変化が必要となることが判明した。

(2) 今回用いたいずれの細胞も、アルギン酸ゲル

中に封入して立体的に培養することが可能であることが認められた。しかしながら、未修飾及び PHSRN 修飾アルギン酸ゲル中に封入した細胞の生存率は低くなることが示唆された。一方で、細胞接着性を高めたアルギン酸ゲル中に細胞を封入すると、コントロールである通常の培養皿上での細胞よりも低いものの、ある程度細胞の生存率が改善することが認められた。さらに、2種類のペプチドが同時に存在するゲル中に細胞を培養した場合、軟骨細胞の場合には分化マーカーである type-II 及び aggrecan mRNA の発現が、骨芽細胞の場合には、ALP 活性、カルシウム沈着量。さらにオステオカルシン産生が著しく増強されることが認められた。この増強効果は、ゲル調製時の修飾アルギン酸の RGD と PHSRN 存在比に大きく影響を受けた。

これら、2種類のペプチドと細胞との相互作用を観察するために、蛍光色素をさらに修飾したアルギン酸を、さらにはそれらからなるゲルを調製して共焦点レーザー顕微鏡により培養した細胞との相互作用観察を行った。その結果、細胞接着部分に修飾ペプチドが集積し、場合によっては2種類のペプチドが非常に近接して存在する像が観察された。

(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 Notch1-Wnt3-Betacatenin の経路を刺激して角化細胞の分化を促進したと推定される。さらに Wnt4 は Wnt3 の発現を抑制する負の制御因子であり、Wnt3 と Wnt4 の拮抗が重要な分化制御機構であると考えられる。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り、特に陰イオン修飾の度合いにより Wnt3 の発現と活性が大きく影響を受け、この Wnt3 が分化促進の特に重要な要因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) ヒト正常間葉系幹細胞 (hMSC, Cambrex 社) を 35mmφ のスライドガラス付の培養皿に細胞を播種し、骨芽細胞分化誘導培地 (10%FCS 含有) で培養した。石灰化によって産生されたリン酸カルシウムはアリザリンレッド染色によって可視化した。アルカリホスファターゼは、PIERCE 社の 1StepNBT/BCIP を用いて染色した。カルシウムイオンはインビトロジェンの Fluo-4 を用いて染色した。核は Hoechst33258 を用いて可視化した。カルシウムイオンと核の観察は、蛍光顕微鏡あるいは共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて観察した。蛍光像を得るときは染色液をフェノールレッドフリーの培地に交換して観察した。

D. 考察

(1) AFM を利用したタンパク質の形状観察では、遮断薬であるスラミン共存下で受容体タンパク質の会合は認められたものの、イオン・チャネル構造である円筒型の形状は認められなかった。ATP が存在しない状態では、この受容体タンパク質は不揃いであり、一様な会合は見られない。スラミンの共存で認められた会合は、スラミンの遮断作用が単なる ATP 結合阻害ではなく、別のある種の会合状態を導くことを示している。すなわち、基本的な古典薬理学的モデルで仮定される結合-非結合の 2 状態 (競合的阻害) とは異なり、少なくとも 1 つの阻害状態が存在することを示唆する。このことはこれまで競合的に作用すると考えられてきたスラミンの作用様式と相反する結果であり、古典的モデルからの推測が必ずしも適切でないことを意味する。このような受容体タンパク質の形状から導かれる推測は、通常のマクロスコピックな薬理的作用の定量的解析から得られ

る情報とは全く異なっており、ナノレベル解析の重要性を示すものと言える。このような方法を用いることにより、ナノの視点から薬理学が進展し、“ナノ薬理学”の誕生も期待される。また、このような受容体単分子の形状変化の同定を目的とし、薬物の作用を“作動型”、“遮断型”に分類すれば、微量のサンプルを短時間でスクリーニングすることも可能となり、並列処理との併用でハイスループット化も可能となるであろう。シリコンウエハー上での観察では高分解能が得られなかった。これは、シリコンウエハーの表面が劈開した雲母に比べて凹凸が大きく、Z 軸方向の解像度が高くないことが原因と考えられる。シリコンウエハー表面は化学加工が可能で魅力的な素材であるが、今後加工が必要な場合には雲母表面上に self-assembled monolayer (SAM) を用いるなどの工夫が必要と思われる。モデルペプチドを用いた NMR 観察では、アデノシンとの会合様式が変異導入により変化することが示された。この変化は結合エネルギーの上昇を意味すると考えられ、変異導入による ATP の薬理作用の低下（あるいは消失）の説明となりうる。このような NMR 解析が今後薬理作用をナノレベルで理解する上で有用となることが期待される。

(2) 現在まで、カルシウムイオンで架橋さ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 RGD 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。細胞接着性配列 RGD を含むペプチドをアルギン酸分子中に導入してゲルを調製したところ、その接着性が未反応の

ゲルに比較して著しく改善されること、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を RGD 修飾アルギン酸と混合して作製したゲル上では、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ることに関しては、昨年度までの検討で明らかになっている。今年度は、臨床応用を念頭に置いて、細胞をゲル中に封入した場合に、上述した平面培養時と同様に細胞分化の促進が認められるかどうかを中心に検討を行った。

細胞をゲル中に封入して立体培養を行い検討したが、平面培養時と同様に、修飾されたペプチドの種類とその混合比に応じて細胞分化挙動が影響を受けることが明らかになった。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中で培養した場合には、平面培養時と同様に、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、立体的に培養した場合でも、ヒト軟骨細胞を用いた場合にはウシ軟骨細胞のように肥大化しないことが示唆された。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中での分化促進が認められた。これらの結果は平面培養時に得られた結果とほぼ同じであった。すなわち、当初の修飾設計時に想定していたように、RGD とインテグリンとの結合を PHSRN が補助することでその結合が増強され、その結果としてインテグリンから始まるシグナルカスケードが活性化され分化が促進されたものと予想される。そのことを確認する目的で、昨年度に引き続き、蛍光色素を利用した Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) による細胞と両ペプチドとの相互作用観察を試みたところ、両ペプチドが存在する場合、まれにその相互距離が数 nm と近接しているものが観察された。また、細胞接着下部でそれ

らのペプチドが局在化していることも見いだした。しかしながら、この観察からはその両ペプチドが近接して存在している度合いと細胞挙動変化との間に関連は見いだせなかった。これは、調製したゲルの蛍光強度が比較的弱かったこと、ゲルの表面の凹凸が大きいためわずかな相互距離変化を観察することが困難であること、などが考えられる。このことは、細胞中のインテグリンから始まるシグナルカスケードの変化を追うことでも確認できると考えられるため、現在、その検討を行っている。

これらの結果から、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。

なお、修飾アルギン酸ゲルを用いて立体的に細胞を培養したほうが、分化をより促進する傾向も認められた。このことは、細胞がより生体内に近い状態で培養されたほうが、そのphenotypeの維持に好ましいことを示唆するものであり、今後、さらなる検討が必要であろう。

(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) 本研究の培養条件下では、正常にhMSCから骨芽細胞へ分化誘導されることを確認した。アルカリホスファターゼは培養5日目で細胞膜全体に産生されていた。さらに培養を続け2週間培養すると、石灰化組織が析出していた。析出した石灰化組織は1-50 μm の球状粒子であった。本研究では特に、この析出した球状粒子の生成機構について検討した。石灰化機構を検討するにあたり、カルシウムイオンの挙動について検討した。共焦点レーザー顕微鏡観察より、細胞内にカルシウムリッチな細胞内小器官(カルシウム小胞体)が存在することを見出した。1

週間培養したhMSCの微分干渉像から核の周りから5 μm 程度の球状の析出物がいくつも観察された。遠心分離によって単離した球状粒子の透過型電子顕微鏡像観察より、この球状の析出物はアモルファスリン酸カルシウム(ACP)であると考えられた。このACPは、カルシウム小胞体が細胞膜からbuddingし、そこでアルカリホスファターゼ由来の無機リン酸と反応することで形成されると推察された。ACPを産生した後の細胞挙動を培養中の細胞をin situ観察より、ACPを形成後骨芽細胞は細胞死に至り、ACPを自ら産生した細胞外マトリックスに沈着させることが分かった。

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、中央にイオン・チャンネル孔を有する円筒型の形状は作動薬に特有である可能性を示した。NMR解析ではモデル・ペプチドとアデニンのとの相互作用は変異導入で変化することが示された。以上の方法はナノレベルの薬理学への新たな進展に寄与するものと考えられる。

(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製した。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、ゲル上及びゲル内部のヒト正常細胞の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種類のペプチドの局在とそれらの相互距離に影響を受けることが示唆された。さらなるin vivoでの詳細な検討は必要なものの、これまでのin vitroで得た結果から、本研究のコンセプトで調製した材料は、優れた組織誘導能を持つ再生医療用担体の材料となりうることが示された。

また、細胞を立体的に培養することでそのphenotypeの維持、あるいはその分化が促進されるに繋がることを示唆され、材料設計だけでなく用途

に応じてその培養方法を改良する必要性も示唆された。

(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) 本研究の MSC の分化過程のイメージングより石灰化の初期過程についての知見を得た。骨芽細胞へ分化誘導された MSC は、はじめアルカリホスファターゼが細胞膜表面に産生し、細胞内部にカルシウム小胞体が形成される。次いで、このカルシウム小胞体は細胞外へ放出され、この過程で、カルシウム小胞体は無機リン酸が取り込まれ、カルシウムイオンと反応することによって ACP が合成されると考えられた。一方、細胞は ACP を合成したのち、核の消滅そして細胞膜の破裂を伴って細胞死に至る。この過程で、ACP が細胞外マトリックスへ沈着し、さらに沈着した ACP が HAp へと転化することによって骨が形成されると考えられた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

① 論文発表 (研究業績「欧文」)

【原 著】

1. Nakamura N, Nagira T, Tsuchiya T: Remarkable Cytotoxicities and the Suppression of Netin Gene Expression by Biodegradable Oligomers and their Catalysts in Normal Human Astrocytes. Submitting.
2. Li Y, Tsuchiya T, Sawada R, Nagashata-Ishiguro M, Yang J, Ito T, Nagira T: The effect of sulfated hyaluronan on TGF- β 2 expression involved in the cardiac tissue development and remodeling. Tissue Engineering, Submitting.
3. Nagira T, Matthew SB, Yamakoshi Y, 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.
4. Nagira T, Nagahata-Ishiguro M, Tsuchiya T: Effects of sulfated hyaluronan on keratinocyte differentiation and Wnt and Notch gene expression. Biomaterials, 28(5): 844-850, 2007.
5. Tamai M, Nakaoka R, Tsuchiya T: Synthesis of novel β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of osteogenic properties. J. Artificial organs., 2006 (in press).
6. Usami M, Mitsunaga K, Nakazawa K: Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for developmental toxicity studies. Toxicology In Vitro, 2006 (in press).
7. Tamai M, Nakaoka R, Isama K, Tsuchiya T: Novel Calcium Phosphate Ceramics: The Remarkable Promoting Action on the Differentiation of the Normal Human Osteoblasts. Key Engineering Materials, 309-311(1): 97-100, 2006.
8. Nakaoka R, Tsuchiya T: Enhancement of Differentiation and Homeostasis of Human Osteoblasts by Interaction with Hydroxyapatite in Microsphere Form. Key Engineering Materials, 309-31(2): 1293-1296, 2006.
9. Nakaoka R, Hsiong S, DJ. M: Regulation of chondrocyte differentiation via co-culture with osteoblasts. Tissue Engineering, 12(9): 2425-2433, 2006.
10. Li Y, Nagira T, Tsuchiya T: The effect of hyaluronic acid on insulin secretion in HIT-T15 cells through the enhancement of gap-junctional intercellular

- communications. *Biomaterials*, 27(8): 1437-1443, 2006.
11. Nakazawa K, Ohno Y: Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. *Eur J Pharmacol*, 2005 (in press).
 12. Tamai M, Nakaoka R, 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 Bio Ceramics Research (5th Asian Bio Ceramics Symposium, ABC2005)*, 5: 158-161, 2005.
 13. Nakazawa K, Yamakoshi Y, Tsuchiya T, Ohno Y: Purification and aqueous phase atomic force microscopic observatio of recombinant P2X receptor. *Eur J Pharmacol*, 518: 107-110, 2005.
 14. Nakazawa K, Ohno Y: Characterization of voltage-dependent gating of P2X2 receptor/channel. *Eur J Pharmacol*, 508(1-3): 23-30, 2005.
 15. Nakaoka R, Ahmed S, Tsuchiya T: Hydroxy apatite microspheres enhance gap junctional intercellular communication of human osteoblasts composed of connexin 43 and 45. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 74A (2): 181 - 186, 2005.
 16. Nagira T, Matthew SB, Yamakoshi Y, Tsuchiya T: Enhancement of gap junctional intercellular communication of normal human dermal fibroblasts cultured on polystyrene dishes grafted with poly-N-isopropylacrylamide. *Tissue Eng*, 11(9-10): 1392-1397, 2005.
 17. Nagahata M, Nakaoka R, Teramoto A, Abe K, Tsuchiya T: The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes. *Biomaterials*, 26(25): 5138-5144, 2005.
 18. Isama K, Tsuchiya T: Osteoblast Differentiation and Apatite Formation on Gamma-Irradiated PLLA Sheets. *Key Engineering Materials*, 288-289: 409-412, 2005.
 19. 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.
 20. Tsuchiya T: A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products. *Tissue Engineered Medical Products*: 254-261, 2004.
 21. 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.
 22. 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(1): 29-35, 2004.
 23. Nakazawa K, Ohno Y: Desensitization of P2X2 receptor/channel pore mutants. *Eur J Pharmacol*, 495(1): 27-33, 2004.
 24. Nagahata M, Tsuchiya T, Ishiguro T, Matsuda N, Nakatsuchi Y, Teramoto A, Hachimori A, Abe K: A novel function of N-cadherin and Connexin43: marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed to sulfated hyaluronan. *Biochem Biophys Res Commun*, 315(3): 603-611, 2004.
 25. Matsuoka A, Tsuchiya T: Gene expression changes in BALB/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane films. *J Biomed Mater Res A*, 68(2): 376-382, 2004.
 26. Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Saito H, Ohno Y, Ito Y: Modulation of voltage-gated Ca²⁺ current by 4-hydroxynonenal in dentate granule cells. *Biol Pharm Bull*, 27(2): 174-179, 2004.
 27. Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Saito H, Ohno Y,

- Ito Y: Hydrogen peroxide modulates whole cell Ca²⁺ currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. *Neurosci Lett*, 356(1): 25-28, 2004.
28. Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Ohno Y, Ito Y: 4-Hydroxynonenal modulates the long-term potentiation induced by L-type Ca²⁺ channel activation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci Lett*, 370(2-3): 155-159, 2004.
29. Ahmed S, 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.
30. Yang J, Ichikawa A, Tsuchiya T: A novel function of connexin 32: marked enhancement of liver function in a hepatoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 307(1): 80-85, 2003.
31. 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, 2003.
32. Sumide T, Tsuchiya T: Effects of multipurpose solutions (MPS) for hydrogel contact lenses on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 64B (2): 57-64, 2003.
33. Park JU, Tsuchiya T: Evaluation of the cornea cells affected by multi-purpose solutions for contact -lens. *Animal cell Technology*, 13: 505-509, 2003.
34. Nakaoka R, Tsuchiya T, Nakamura A: Neural differentiation of midbrain cells on various protein-immobilized polyethylene films. *J Biomed Mater Res A*, 64(3): 439-446, 2003.
35. Isama K, Tsuchiya T: Enhancing effect of poly (L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*, 24(19): 3303-3309, 2003.
- (研究業績「和文」)
- 【原 著】
1. 山越葉子, 中澤憲一, 土屋利江: 原子間力顕微鏡, 特集号 分子イメージングー現状と 展望, 日本臨床, 2006. 印刷中.
 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, 61: 98-102, 2005.
 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の分子機構. 生体物理刺激と生体反応 (Ed by 大森豊明), フジテクノシステム, 東京, 2004.
 4. 土屋利江: バイオマテリアルの安全性について 組織工学用材料を中心として. 日本再生歯科医学会誌, 2: 1-8, 2004.
- 【総 説】
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, 11(2): 169-177, 2003.
- ② 学会発表
1. Nakaoka R, Tsuchiya T: "Enhancement of differentiation and homeostasis of human osteoblasts by interaction with hydroxyapatite in microsphere form", *Bioceramics* 18, Kyoto, 2005.12.
 2. Tamai M, Nakaoka R, Isama K, Tsuchiya T: "Novel calcium phosphate ceramics: The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts", *Bioceramics* 18, Kyoto, 2005.12.
 3. Tamai M, Nakaoka R, Tsuchiya T: "Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics",

- Bioceramics 18, Kyoto, 2005.12.
4. Tamai M, Nakaoka R, Tsuchiya T: "*In vitro* study on the osteogenesis of normal human osteoblasts cultured on the discs various kinds of calcium phosphate ceramics", Asian Bioceramics Symposium, Hokkaido, 2005.10.
 5. 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), 2005.2.
 6. 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, 2003.7.
 7. Nishikawa K, Tominaga N, Yamakoshi Y, Otomo R: "Change of Ultrastructure and Accumulation of Polyphosphate in Chlamydomonas acidophila", The 10th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas, Vancouver, 2002.6.11-16.
 8. 中岡竜介, Hsiong S, Mooney D, 土屋利江: "骨芽細胞と軟骨細胞との共培養による骨-軟骨複合組織の再生に関する研究", 第9回日本組織工学会, 京都, 2006.9.
 9. 佐藤薫, 大野泰雄, 中澤憲一: "エストロゲンは歯状回顆粒細胞からの BDNF release を PKA 依存的に促進する", 第79回日本薬理学会年会, 2006.3.
 10. 中澤憲一, 山越葉子, 土屋利江, 大野泰雄: "原子間力顕微鏡観察による P2X2 受容体が孔形成タンパク質であることの確認", 第79回日本薬理学会年会, 2006.3.
 11. 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, 2005.12.
 12. 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, 2005.11.
 13. 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, 2005.3.
 14. 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, 2005.3.
 15. 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, 2005.3.
 16. 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, 2003.3.27-29.
 17. 中岡竜介, Hsiong S, 土屋利江, Mooney DJ: "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, 2004.11.
 18. 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, 2004.11.
 19. 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, 2005.11.
 20. 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, 2005.9.

21. 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, 2005.3.
22. 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, 2004.12.
23. 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, 2004.8.11.
24. 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, 2004.8.7.
25. 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, 2004.6.
26. 矢上健, 配島由二, 土屋利江, 他: "ラテックスアレルゲンとしての isoflavone reductase", 第 53 回日本アレルギー学会総会, 2003.10.23-25.
27. 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, 2004.5.
28. 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, 2003.12.16-17.
29. 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, 2003.6.12-13.

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

1. 特願 2001-311484: ギャップ機能亢進剤
2. 特願 2001-311485: ギャップ機能抑制剤
3. 特願 2003-8855: ギャップ機能抑制剤
4. 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
5. 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
6. 特願 2004-330417: 生体組織補填材および生体組織補填体
7. 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
8. 特願 2005-126591: 生体組織補填材の製造方法
9. 特願 2005-294058: 生体組織補填材とその製造方法
10. Docket No.19296: Materials for repairing biological tissues, product for repairing biological tissues, and method of manufacturing materials for repairing biological tissues.
11. 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、分子構造イメージングX線回折)

書籍

	著者名	タイトル	書籍全体編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
1	Takeda S	Preparation of protein crystals for X-ray structural study	Wang Q	Method in Molecular Medicine: Cardiovascular Disease	Humana Press		2006	291-303

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻名	ページ	出版年
1	Min JK, Cho YL, Choi JH, Kim YM, Kim JH, Yu YS, Rho J, Mochizuki N, Kim YM, Oh GT, Kwon YG	Receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL) increases vascular permeability; Impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice	Blood			2007, on line
2	井上裕康	PPAR と誘導型シクロオキシゲナーゼの関係	医学のあゆみ	220(1)	93-98	2007
3	Mishima M, Wakabayashi S, Kojima C	Solution structure of the cytoplasmic region of Na ⁺ /H ⁺ exchanger 1 complexed with essential cofactor calcineurin B homologous protein 1	J. Biol. Chem.			2006 (in press)
4	Kogata N, Arai Y, Pearson JT, Hashimoto K, Hidaka K, Koyama T, Somekawa S, Nakaoka Y, Ogawa M, Adams RH, Okada M, Mochizuki N	Cardiac ischemia activates vascular endothelial cadherin promoter in both preexisting vascular cells and bone marrow cells involved in neovascularization	Circ Res	98 (7)	897-904	2006
5	Callegari E, Norata GD, Inoue H, Catapano AL	Oxidized-HDL3 modulates the expression of Cox-2 in human endothelial cells	Int J Mol Med	18 (1)	209-213	2006
6	Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, Xu R, Inoue H, Arditi M, Dannenberg AJ, Abreu MT	Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine	Gastroenterology	131 (3)	862-877	2006
7	Hisamitsu T, Ben Ammar Y, Nakamura TY, Wakabayashi S	Dimerization is crucial for the function of the Na ⁺ /H ⁺ Exchanger NHE1	Biochemistry	45	13346-13355	2006
8	Kobayashi Y, Katanosaka Y, Iwata Y, Shigekawa M,	Identification and characterization of GSRP-56, a novel Golgi-localized spectrin-repeat	Exp. Cell Res.	312	3152-3164	2006

	<u>Wakabayashi S</u>	containing protein				
9	Nakamura TY, Jeromin A, Smith G, Kurushima H, Koga H, Nakabeppu Y, <u>Wakabayashi S</u> , Nabekura J	Novel Role of Neuronal Ca ²⁺ Sensor-1 as a Survival Factor Up-Regulated in Injured Neurons	J. Cell Biol.	172 (7)	1081-1091	2006
10	Park W, Lim W, Cho J, <u>Inoue H</u> , Rhyu MR, Lee Y	Inhibitory effects of ginsenoside-Rb1 on activation of the 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced cyclooxygenase-2 promoter	Planta Med	72 (3)	272-275	2006
11	Igarashi T, Oishi Y, Araki S, Mori H, Takeda S	Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of two vascular apoptosis-inducing proteins (VAPs) from Crotalus atrox venom	Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun	62 (Pt 7)	688-691	2006
12	Sato E, Hayasi Y, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S, Takayama K, Ido H	K-edge angiography utilizing a tungsten plasma x-ray generator in conjunction with gadolinium-based contrast media	Rad.Phys.Chem.	75	1841-1849	2006
13	Amino M, Yoshioka K, Tanabe T, Tanaka E, Mori H, Furusawa Y, Zareba W, Yamazaki M, Nakagawa H, Honjo H, Yasui K, Kamiya K, Kodama I	Heavy ion radiation up-regulates Cx43 and ameliorates arrhythmogenic substrates in hearts after myocardial infarction	Cardiovasc Res	72 (3)	412-421	2006
14	Ben Ammar Y, Takeda S, Hisamitsu T, Mori H, <u>Wakabayashi S</u>	Crystal structure of CHP2 complexed with NHE1-cytosolic region and an implication for pH regulation	Embo J	25 (11)	2315-2325	2006
15	Enomoto T, Sato E, Sumiyama Y, Aizawa K, Watanabe M, Tanaka E, Mori H, Kawakami H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S	Enhanced magnification angiography using 20-um-focus tungsten tube	Jpn. J. Appl. Phys.	45	8005-8009	2006
16	Fukuyama N, Onuma T, Jujo S, Tamai Y, Suzuki T, Sugio Y, Tabata Y, Ishihara Y, Takano J, Mori H	Efficient preparation of cationized gelatin for gene transduction	Tokai J Exp Clin Med	31 (2)	49-52	2006
17	Fukuyama N, Tanaka E, Tabata Y, Fujikura H, Hagihara M, Sakamoto H, Ando K, Nakazawa H, Mori H	Intravenous injection of phagocytes transfected ex vivo with FGF4 DNA/biodegradable gelatin complex promotes angiogenesis in a rat myocardial ischemia/reperfusion injury model	Basic Res Cardiol		8	2006 online

18	Goto T, Fukuyama N, Aki A, Kanabuchi K, Kimura K, Taira H, Tanaka E, Wakana N, Mori H, Inoue H	Search for appropriate experimental methods to create stable hind-limb ischemia in mouse	Tokai J Exp Clin Med	31(3)	128-132	2006
19	Hirata A, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Wakeno M, Myoishi M, Tsukamoto O, Okada K, Koyama H, Komamura K, Takashima S, Shinozaki Y, Mori H, Shiraga M, Kitakaze M, Hori M	Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs	J Am Coll Cardiol	48 (1)	176-184	2006
20	Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Li M, Ariumi H, Mori H, Sunagawa K, Sugimachi M	Vagal stimulation suppresses ischemia-induced myocardial interstitial norepinephrine release	Life Sci	78 (8)	882-887	2006
21	Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Uemura K, Kamiya A, Shishido T, Mori H, Sugimachi M	Effects of Ca ²⁺ channel antagonists on nerve stimulation-induced and ischemia-induced myocardial interstitial acetylcholine release in cats	Am J Physiol Heart Circ Physiol	291 (5)	H2187-2191	2006
22	Kimura K, Goto T, Yagi K, Furuya H, Jujo S, Itoh J, Sawamura S, Koide S, Mori H, Fukuyama N	Biphasic Action of Inducible Nitric Oxide Synthase in a Hindlimb Ischemia Model	J.Clin.Biochem.Nutr.	38 (2)	95-102	2006
23	Kuroko Y, Tokunaga N, Yamazaki T, Akiyama T, Ishino K, Sano S, Mori H	Effect of sustained limb ischemia on norepinephrine release from skeletal muscle sympathetic nerve endings	Neurochem Int	49	448-453	2006
24	Masuda M, Takeda S, Sone M, Ohki T, Mori H, Kamioka Y, Mochizuki N	Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms	Embo J		1-9	2006
25	Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H	Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction	Nat Med	12 (4)	459-465	2006
26	Miyahara Y, Ohnishi S, Obata H, Ishino K, Sano S, Mori H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N	Beraprost sodium enhances neovascularization in ischemic myocardium by mobilizing bone marrow cells in rats	Biochem Biophys Res Commun	349 (4)	1242-1249	2006

27	Sato E, Hayashi Y, Germer R, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S, Takayama K, Onagawa J	X-ray Spectra from Weakly Ionized Linear Copper Plasma	Japanese Journal of Applied Physics	45 (6A)	5301-5306	2006
28	Sato E, Hayashi Y, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S, Takayama K, Onagawa J, Ido H	Preliminary study for producing higher harmonic hard x-rays from weakly ionized nickel plasma	Rad.Phys.Chem.	75	1812-1818	2006
29	Sato E, Sugiyama H, Ando M, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Takayama K, Onagawa J, Ido H	Tunable narrow-photon-energy x-ray generator utilizing a tungsten-target tube	Rad. Phys. Chem.	75	2008-2013	2006
30	Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Izumisawa M, Takahashi K, Sato S, Ichimaru T, Takayama K	Demonstration of enhanced K-edge angiography using a samarium target x-ray generator	SPIE	6319 (63190L)	1-6	2006
31	Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Izumisawa M, Takahashi K, Sato S, Ichimaru T, Takayama K	Enhanced real-time magnification angiography utilizing a 100- μ m-focus x-ray generator in conjunction with an image intensifier	SPIE	6319 (63190J)	1-7	2006
32	Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Izumisawa M, Takahashi K, Sato S, Ichimaru T, Takayama K	Super-characteristic x-ray generator utilizing a pipe and rod target	SPIE	6319 (63190Q)	1-6	2006
33	Sato E, Tanaka E, Mori H, Kawai T, Inoue T, Ogawa A, Sato S, Takayama K, Onagawa J	Characteristic X-ray Generator Utilizing Angle Dependence of Bremsstrahlung X-ray Distribution	Japanese Journal of Applied Physics	45 (No. 4A)	2845-2849	2006
34	Suenaga M, Kaneko Y, Kadokawa J, Nishikawa T, Mori H, Tabata M	Amphiphilic poly(N-propargylamide) with galactose and lauryloyl groups: synthesis and properties	Macromol Biosci	6 (12)	1009-1018	2006
35	Takahama H, Minamino T, Hirata A, Ogai A, Asanuma H, Fujita M, Wakeno M, Tsukamoto O, Okada K, Komamura K, Takashima S,	Granulocyte colony-stimulating factor mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury via phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in canine hearts	Cardiovasc Drugs Ther	20 (3)	159-165	2006

	Shinozaki Y, Mori H, Mochizuki N, Kitakaze M					
36	Takeda S, Igarashi T, Mori H, Araki S	Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold	Embo J	25 (11)	2388-2396	2006
37	Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Haruna Y, Morita Y, Kashihara N, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F	Cardioprotective role of endogenous hydrogen peroxide during ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo	Am J Physiol Heart Circ Physiol	291 (3)	H1138-1146	2006
38	井上裕康, 中田理恵子, 竹内悠, 塚本朋子, 堀田真理子, 名村尚武	植物性ポリフェノールによる核内受容体 PPAR の活性化	脂質生化学研究	48	131-134	2006
39	久光隆, 若林繁夫	トランスポータ研究のいま ■ Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体を中心に	化学と生物	44 (1)	56-65	2006
40	菅弘之, 盛英三, 馬場嘉信, 杉町勝	ナノメディシン・プロジェクト ー厚生労働省指定型ナノメディシン・プロジェクトを中心にしてー	分子心血管病	7(4)	327-339	2006
41	盛英三, 武田壮一, 五十嵐智子, 柴田洋之	特発性心筋症の原因解明と治療法開発に向けた構造生物学的アプローチ	医学のあゆみ	217 (8)	819-824	2006
	盛英三, 武田壮一, 若林繁夫, 井上裕康, ユーセフベンアマー, 松原孝宜, 五十嵐智子, 柴田洋之	疾患関連蛋白のサブナノ構造イメージングと分子標的薬剤の開発; ナノイメージング構造	分子心血管病	7(4)	340-346	2006
	盛英三, 望月直樹, 武田壮一, 井上裕康, 中村俊, 土屋利江	特集: ナノテクノロジーと医療 ナノレベルイメージングによる分子構造と機能の解析	日本臨床	64	358-364	2006

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神経系)

書籍

	著者名	タイトル	書籍全体 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版 年	ペー ジ
1	Wada K, Yamada K, Santo-Yamad a Y, Maeno H, Wada E, Sekiguchi M	Altered emotional behaviors in mammalian bombesin receptor knockout mice: implication for the molecular pathogenesis of stress-induced psychiatric disorders in humans. In PTSD	Kato N, Kawata M, Pitman RK	Brain Mechanisms and Clinical Implications	Springer	東京	2006	83-88

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻名	ページ	出版年
1	Ohira K, Funatsu N, Homma K, Sahara Y, Hayashi M, Kaneko T, Nakamura S	Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices	Eur. J. Neurosci.	25	406-416	2007
2	Setsuie R, Wang YL, Mochizuki H, Osaka H, Hayakawa H, Ichihara N, Li H, Furuta A, Sano Y, Sun YJ, Kwon J, Kabuta T, Yoshimi K, Aoki S, Mizuno Y, Noda M, Wada K	Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant	Neurochem. Int.	50	119-129	2007
3	Amano T, Aoki S, Setsuie R, Sakurai M, Wada K, Noda M	Identification of a novel regulatory mechanism for norepinephrine transporter activity by the IP3 receptor	Eur. J. Pharmacol.	536 (1-2)	62-68	2006
4	Fukazawa N, Ayukawa K, Nishikawa K, Ohashi H, Ichihara N, Hikawa Y, Abe T, Kudo Y, Kiyama H, Wada K, Aoki S	Identification and functional characterization of mouse TPO1 as a myelin membrane protein	Brain Res.	1070	1-14	2006
5	Kabuta T, Suzuki Y, Wada K	Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy and the proteasome	J. Biol. Chem.	281	30524-30 533	2006
6	Kwon J, Sekiguchi S, Wang YL, 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
7	Morone N, Fujiwara T, Murase K, Kasai SR, Ike H, Yuasa S, Usukura J, Kusumi A	Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography	J. Cell Biol.	174	851-862	2006

8	Naito S, Mochizuki H, Yasuda T, Mizuno Y, Furusaka M, Ikeda S, Adachi T, Shimizu HM, Suzuki J, Fujiwara S, Okada T, Nishikawa K, Aoki S, Wada K	Characterization of multimetric variants of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in water by small-angle neutron scattering	Biochem. Biophys. Res. Commun.	339 (2)	717-725	2006
9	Nakada C, Morone N, Kusumi A	[Membrane skeleton: interaction of the plasma membrane with the cytoskeleton]	Tanpakushitsu Kakusan Koso	51	672-682	2006
10	Noda M, Kettenmann H, Wada K	Anti-inflammatory effects of kinins via microglia in the central nervous system	Biol. Chem.	387 (2)	167-171	2006
11	Ohira K, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M	TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells	Biochem. Biophys. Res. Commun.	342 (3)	867-874	2006
12	Sakurai M, Ayukawa K, Setsuie R, Nishikawa K, Hara Y, Ohashi H, Nishimoto M, Abe T, Kudo Y, Sekiguchi M, Sato Y, Aoki S, Noda M, Wada K	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation	J. Cell Sci.	119 (Pt 1)	162-171	2006
13	Sano Y, Furuta A, Setsuie R, Kikuchi H, Wang YL, Sakurai M, Kwon J, Noda M, Wada K	Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3-deficient mice	Am. J. Pathol.	169 (1)	132-141	2006
14	Sato A, Arimura Y, Manago Y, Nishikawa K, Aoki K, Wada E, Suzuki Y, Osaka H, Setsuie R, Sakurai M, Amano T, Aoki S, Wada K, Noda M	Parkin potentiates ATP-induced currents due to activation of P2X receptors in PC12 cells	J. Cell. Physiol.	209	172-182	2006
15	Sun YJ, Nishikawa K, Yuda H, Wang YL, Osaka H, Fukazawa N, Naito A, Kudo Y, Wada K, Aoki S	Solo/Trio8, a membrane-associated short isoform of Trio, modulates endosome dynamics and neurite elongation	Mol. Cell Biol.	26 (18)	6923-6935	2006
16	Tomita S, Sekiguchi M, Wada K, Nicoll RA, Brecht DS	Stargazin controls the pharmacology of AMPA receptor potentiators	Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.	103 (26)	10064-10067	2006
17	Wang YL, Liu W, Sun YJ, 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 (1)	40-49	2006
18	Yamauchi R, Wada E, Yamada D, Yoshikawa M, Wada K	Effect of beta-lactotensin on acute stress and fear memory	Peptides	27	3176-3182	2006
19	Yoshida M, Yonetani A, Shirasaki T, Wada K	Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy	Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.	290 (2)	R449-455	2006

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	発表雑誌名	巻名	ページ	出版年
1	Kazuno AA, Munakata K, Nagai T, Shimozono S, Tanaka M, Yoneda M, Kato N, Miyawaki A, Kato T	Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics	PLoS Genet.	2 (8)	e128	2006
2	永井健治	今、蛍光タンパク質で何ができるか？（原著）	生化学	78	519-523	2006
3	永井健治	円順列 GFP 変異体を利用した機能プローブの作製法と2波長励起1波長取得レーザー共焦点イメージング（総説）	実験医学（別冊）染色体・バイオイメージング実験ハンドブック		210-215	2006
4	永井健治	生細胞内で働く分子を可視化する（総説）	Bionics	7月号	30-35	2006
5	永井健治	序：組織・個体レベルでの機能イメージングに向けて（総説）	細胞工学	25	1010-1013	2006
6	永井健治	電顕に期待するもの（総説）	細胞工学	25	1192-1193	2006
7	永井健治	HaloTag テクノロジーが拓くさまざまな蛍光イメージングの可能性（総説）	バイオテクノロジー	6	745-750	2006
8	永井健治	FRET の上手な使い方（総説）	蛋白質核酸酵素（別冊）細胞核の世界ーダイナミクスから病態まで	51	1989-1997	2006

研究成果の刊行に関する一覧表 (ナノ構造に基づく医用材料の開発)

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌名	巻名	ページ	出版年
1	山越葉子, 中澤憲一, 土屋利江	原子間力顕微鏡 (総説)	日本臨床			2006. 印刷中
2	Usami M, Mitsunaga K, Nakazawa K	Two-demensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for develepmental toxicity studies	Toxicology In Vitro			2006 (in press)
3	Tamai M, Nakaoka R, Tsuchiya T	Synthesis of novel β-tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of osteogenic properties	J. Artificial organs.			2006 (in press)
4	Banu N, Tsuchiya T	Markedly different effects of hyaluronic acid and chondroitin sulfate-A on the differentiation of human articular chondrocytes in micromass and 3-D honeycomb rotation culture	J. Biomed. Mater. Res.			2006 (accepted)
5	Nagira T, Nagahata-Ishiguro M, Tsuchiya T	Effects of sulfated hyaluronan on keratinocyte differentiation and Wnt and Notch gene expression	Biomaterials	28 (5)	844-850	2007
6	Ahmed S, Tsuchiya T	A mouse strain difference in tumorigenesis induced by biodegradable polymers	J. Biomed. Mater. Res.	79A	409-417	2006
7	Ahmed S, Tsuchiya T, Kariya Y	Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: Enhancement of proliferation of human mesenchymal stem cells by the new polysaccharides	Animal Cell Technology	14	81-85	2006
8	Banu N, Tsuchiya T, Ahmed S, Sawada R	Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: effects of a catalyst used in the synthesis of biodegradable polymer on the chondrogenesis of human articular cartilage	Animal Cell Technology	14	87-92	2006
9	Banu N, Tsuchiya T, Sawada R	Effects of a biodegradable polymer synthesized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular chondrocytes	J Biomed Mater Res A	77 (1)	84-89	2006