

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡澄江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究	合田幸広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美健彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里勝利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山行雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口照英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎ナナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 576

細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
研究者 山口 照英

研究要旨 血管内皮前駆細胞(EPC)の有用性確保に関する研究として、Thrombopoietin が EPC の誘導促進効果を示すこと、EPC の特性指標である IL-8 が Out-growth Endothelial Cell の走化性を促進することを明らかにした。また、細胞のマイクロパターンングが可能な微細加工基盤の作製技術を確立した。作製した基盤を利用して *in vitro* で血管内皮細胞をパターン化することにより毛細血管を形成させ、下肢虚血モデルマウスに移植して、その有用性を示した。

分担研究者

- (1) 東京医科歯科大学 森田 育男
(2) 大日本印刷株式会社 服部 秀志

A. 研究目的

近年、幹細胞学や発生学の急速な進歩やバイオテクノロジー応用技術の発展により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に用いる細胞組織利用医薬品の開発が急速に進んでいる。このように細胞や組織を医療に用いることができれば、ガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、重篤な肝疾患、神経疾患、熱傷、創傷等に対してきわめて有効な治療法（いわゆる細胞治療・再生医療）になる可能性が高い。本邦においても、様々な形での細胞組織利用医薬品の開発が進められているところであるが、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題は多い。本研究では、細胞組織利用医薬品の品質や安全性の確保、また有効性等を適切に評価できる試験法の開発を行うとともに、開発した評価技術を用いて、より安全性が高く高品質の製品の実用化に向けた基盤技術の開発につなげていくことを目的としている。

細胞組織利用医薬品として血管内皮前駆細胞を用いた虚血性疾患の治療薬開発が精力的に進められている。しかし、その特性、増幅機構、あるいは誘導機構については十分に解明されている訳ではない。EPC には、培養開始 3～5 日目に出現する Endothelial Progenitor Cells (EPC) と呼ばれる細胞と、培養開始 2～3 週間後に出現する Outgrowth Endothelial Cells (OEC) と呼ばれる細胞の 2 種類があることが知られている。EPC は血管形成を促進するサイトカイン類を分泌する細胞であり、OEC は

それ自身が血管を形成しうる細胞であるとされ、特性解析も進みつつあるが、今後の課題として、EPC/OEC の効率のよい誘導法の確立、細胞の品質特性に影響を与える製造工程中の因子の解明、生体内での EPC/OEC の機能解析法の確立等が求められている。本年度は、これらの課題解決に向けて、AC133 陽性細胞からの EPC 誘導系における Thrombopoietin (TPO) の効果、CD31 強陽性 EPC の特性指標としての高い IL-8 産生能と、IL-8 による OEC 遊走に対する効果について検討を行った。

また、血管内皮細胞を所望のパターンで培養でき、且つ、その細胞を速やかに管腔化させ組織などへ転写することを可能にする微細加工基盤の作製技術の確立を目的として、独自の微細加工技術である光触媒を用いたパターンング技術（光触媒リソグラフィ）を応用して、エチレングリコール系材料を用いてコーティング加工した細胞パターンング基盤を開発した。さらに、体外で作成した管腔構造物が、*in vivo* で実際に血流増加をもたらすか、および本方法が再生医療として用いられるべき細胞の評価系として用いることが可能であるかについて検討した。

B. 研究方法

1) 臍帯血あるいは末梢血 AC133 陽性細胞から CD31 強陽性細胞の調製

ヒト末梢血液より分離したパuffyコートあるいは臍帯血から Lymphoprep tube を用いて単核球分画を単離し、AC133 マイクロビーズ分離キットで標識後、Auto MACS (Milteny Biotec) を用いて AC133 陽性細胞を分離した。

AC133 陽性細胞は 20% FBS、50 ng/ml VEGF、50 ng/ml TPO、50 ng/ml SCF を含む EBM-2 培地に浮遊させ、タイプ IV コラーゲンでコートした 24

穴のマルチウェルに分注し、1週間培養した。細胞を回収し、洗浄後、抗 CD31 抗体-FITC、抗 CD110 (TPO 受容体) 抗体-APC、抗 CD133/2 抗体-PE、抗 VE-Cadherin (CD144) 抗体-PE を用いて免疫染色し、フローサイトメーターにより解析した。

2) OEC 及び HUVEC の IL-8 受容体発現の解析

OEC あるいは HUVEC を非酵素的にはがし、洗浄後、浮遊細胞と抗 IL-8 受容体抗体を 4°C、30 分で抗原抗体反応させた。細胞を 1% BSA-PBS(-) で洗浄し抗 IgG 抗体-FITC を 4°C、30 分反応させ洗浄後、フローサイトメーターで解析した。

3) 細胞遊走

細胞遊走はボイデンチャンバー法を用いた。48 穴のマイクロウェルの下室に種々の濃度の IL-8 を含んだ 2% EBM-2 培地を加えた。上室には OEC を 1 ウェルあたり 2×10^4 /well 個播種した。上室と下室の間に $0.8 \mu\text{m}$ のポアがあるフィルターを用いた。37°C、4 時間 CO₂ インキュベーター内で遊走させた後、フィルター上部についた細胞をはがし、遊走してきた下側の細胞を固定・染色し、細胞数を数えた。

4) 細胞パターンニング基盤の開発

浸漬法により、ガラス表面にエポキシシランを付加しエポキシ化基盤を作製した。エポキシ化基盤を触媒量の硫酸を含むテトラエチレングリコール (TEG) に浸漬し、80°C で 20 分間付加反応させることにより基盤の TEG 化を行った。パターンニングのための光触媒含有層付きフォトマスクは、クロムを遮光層とする一般的なフォトマスクに光触媒酸化チタンコーティング剤をスピニングして作製した。パターンニングは、TEG 化基盤上に前記光触媒含有層付きフォトマスクを、光触媒層が基盤と相対するように配置し、紫外線をマスク背面から照射することにより行った。

5) In vitro で作成した管腔構造物の動物移植実験

17 本の直線をパターンニングした基板上 (70 μm 幅の親水部と 300 μm 幅の疎水部) に血管内皮細胞を培養した後、in vitro で羊膜に転写し、前もって管腔を形成させたのち、この血管付き羊膜シートを下肢の血管を結紮した免疫不全マウスに移植した。昨年度のレーザードップラー法だけでなく、運動機能、形態変化なども同様に経日的に観察した。

6) 再生医療に用いるべき細胞の有用性に関する研究

ヒト末梢血あるいは臍帯血から Lymphoprep tube を用いて単核球分画を得た。また、ヒト血管内皮細

胞はより臍帯をトリプシンで処理することにより得た。得られた単核球は EGM-2 bullet kit を含む EBM-2 培地に攪拌したのち、フィブロネクチンコートしたディッシュ上で培養した。early Endothelial progenitor cells (earlyEPC)は、5~7 日後に、lateEPC はさらに培養を継続し、12~14 日後に得た。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会による審査・承認を得た上で行った。

C. 研究成果

C-1. AC133 陽性細胞由来 EPC の誘導系における TPO の効果

我々はこれまで、ヒト末梢血あるいは臍帯血から分画した AC133 陽性細胞から EPC を分化・誘導する系を確立し、AC133 陽性細胞に由来する CD31 強陽性細胞が活性の高い EPC であることを報告してきた。また、昨年度までの検討で、移植される患者の負担やリスクを軽減するため *in vitro* で EPC を増幅する物質を探索した結果、TPO が AC133 陽性細胞から分化する CD31 強陽性細胞画分を増加させることを見出した。今年度はその TPO の EPC 増幅効果を詳細に検討し、経時的変化と濃度依存性を明らかにした。

AC133 陽性細胞を 1 週間培養後、抗 CD31 抗体-FITC で免疫染色し、フローサイトメーターで解析した結果、CD31 強陽性細胞は末梢血では 0.46%、臍帯血では 0.35%であった。SCF 添加では末梢血では 0.47%、臍帯血では 0.30%とあまり増加しないのに対し、TPO を加えると末梢血では 2.30%、臍帯血では 2.60%と増加した。細胞総数と FACS により示される割合から CD31 強陽性細胞の絶対数を計算すると、TPO を添加することで CD31 強陽性細胞が 10 倍以上増加することが明らかとなった (Fig. 1A)。

TPO を添加した時の細胞総数の経時的な変化を解析したところ、3 日目まではほとんど変化しないのに対し、その後急速に増加することが明らかになった (Fig.1B)。この培養 3 日目 AC133 陽性細胞由来細胞の TPO 受容体の発現を解析したところ、末梢血と臍帯血のいずれにおいても CD31 陽性細胞と

AC133 陽性細胞はともに TPO 受容体を発現していることから、TPO は AC133 陽性と CD31 陽性細胞の両方からに対して、CD31 強陽性細胞への分化を促している可能性が考えられた。

次に、添加する TPO の濃度を検討した。その結果、5ng/ml の TPO により細胞総数が約 2 倍の上昇を示した (Fig. 2 左)。TPO の濃度を 10ng/ml から 50ng/ml に上昇させても細胞総数の顕著な増加は観察されなかったが、CD31 強陽性細胞の絶対数を計算すると末梢血では CD31^{bright}VEcad⁺細胞が、臍帯血では CD31^{bright}VEcad⁺細胞と CD31⁺brightVEcad⁻細胞が、TPO の濃度に依存して増加した (Fig. 2 右)。VE カドヘリン (VEcad) は EPC の分化段階のマーカーであり、EPC としての分化が進むと VEcad 発現が増加すると考えられることから、末梢血では、TPO によって分化の進んだ EPC 細胞の割合が高い細胞集団 EPC を調製できると考えられた。

C-2. IL-8 の OEC 遊走促進効果

昨年度までに我々は、CD31 強陽性 EPC が大量 (ng/ml レベル) の IL-8 を分泌することを見出し、EPC は、その特性指標として高い IL-8 産生能を持つことを明らかにしている。一方、生体において、EPC と OEC は協調的に働きながら血管形成を促進していると考えられるが、その機構は明らかでない。そこで、ケモカインである IL-8 が OEC の遊走を促進する可能性を考え、OEC における IL-8 受容体発現、および、OEC 遊走に対する IL-8 の効果を検討した。

臍帯血単核球を 2 週間培養すると、CD31 陽性、eNOS 陽性の均一な細胞集団 OEC が得られる。この細胞を非酵素的に剥離して細胞浮遊液とし、IL-8 受容体の発現をその抗体を用いて解析した (Fig. 3)。その結果、OEC は IL-8 受容体を発現していることが明らかとなった。IL-8 受容体は OEC のみならず、代表的な組織由来血管内皮細胞である HUVEC (臍帯静脈血管内皮細胞) でも発現しており、OEC と HUVEC で発現量に差は認められなかった。IL-8 による OEC の遊走促進効果を検討したところ、Fig. 4 に示すように、0.1 ng/ml という低濃度の IL-8 で OEC の遊走が有意に促進され、1.0 ng/ml で最大効果を示した。10.0ng/ml では遊走が促進されておらず、OEC 遊走における IL-8 の濃度依存性は遊走促進因子として典型的なベル・シェイプとなった。

C-3. 微細加工基盤作製技術の確立

血管内皮細胞を所望のパターンで培養でき、且つ、その細胞を速やかに管腔化させ組織などへ転写することを可能にする微細加工基盤 (Fig. 5) の作製を目的として、エチレングリコール系材料を用いた基盤のコーティング条件を検討した結果、Fig. 6 に示したように、再現性よくエポキシコーティング及び TEG コーティングができる条件を見出した。Fig. 7 には、典型的な AFM 像を示した。コーティングにより、ナノメートルレベルの凹凸が生じることがわかった。分子モデルから、コーティングの厚さは、およそ 2 nm 程度と推測された。

パターンニング基盤のタンパク質吸着性と細胞接着性を確認した結果を Fig. 8 に示す。蛍光色素修飾タンパク質 (FITC-BSA) の吸着像より、TEG コーティング部には FITC-BSA の吸着が少ない一方、光触媒処理部 (酸化分解部) にはよく吸着していることがわかる。この結果と、BAEC の接着像から、パターンニング基盤表面の光触媒処理部に培地中のタンパク質が物理吸着し、その上に細胞が接着することが推測される。

本基盤 (TEG 基盤) と昨年までのフッ素系材料を用いた基盤 (FAS 基盤) の性能を細胞パターンニングという観点で比較した。BAEC を 48 時間パターン培養した結果を Fig. 9 に示した。FAS 基盤を用いた場合、24 時間程度なら BAEC パターンをよく維持するが、培養時間が長くなるに従い、増殖の影響などで BAEC パターンは乱れる。一方、TEG 基盤の場合、48 時間たっても全く BAEC パターンの乱れはなく、16 時間後の時と比較すると、BAEC がパターン内で増殖していることがわかった。

TEG 基盤は細胞パターンの維持だけでなく、細胞転写を高速化し、2~4 時間程度の保持で BAEC パターンが、再現性よく基盤からマトリゲルに移ることがわかった。マトリゲルへの転写によって、BAEC パターンが管腔化することを確認するために、calcein-AM で細胞を染めて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Fig. 10 に示したように、BAEC パターン内部にコード状の空隙があることが証明された。

C-4. In vitro で作成した管腔構造物の動物移植実験

レーザー Doppler による血流の測定において、結紮した下肢の血流が羊膜のみを移植 (control) した動物と比較し、構築した血管を付けた羊膜においては、明らかな回復が認められた。そこで、この血流

回復が運動機能にどのような影響を与えるかに関し、検討を行った。その結果、Fig. 11 に示すように、血管付き羊膜を移植した群では、速やかな運動機能の回復が認められ、すでに手術後3日において、運動機能の回復が認められた。一方、羊膜のみを移植した群では、血管付き羊膜群の3日目と同じ状態になるのに10日を要し、14日目の観察においても羊膜のみの移植群ではまだ足を引ずる動物が認められたが、血管付き羊膜移植群ではほとんどすべての動物の運動機能は正常に回復していた。従って、本研究で用いたこの *in vitro* 血管形成法は *in vivo* において血管として十分に機能するものであり、この *in vitro* 血管形成法が十分に細胞の *in vivo* における有効性を担保することが明らかとなった。

C-5. 再生医療に用いるべき細胞の有用性に関する研究

ヒト末梢血から得られた early EPC は単独で tube forming activity を持たず、ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) の管腔構造物にも付着するのみであったが、late EPC は HUVEC 同様に tube 形成し、さらに HUVEC と連携して管腔構造物を構成した (Fig. 12)。

また、HUVEC で作成した管腔構造物の形態に対する影響を調べたところ、Fig. 13 に示すように early EPC は HUVEC の管腔の sprouting を促進し、新たな HUVEC による枝分かれを促進したが、late EPC は HUVEC の管腔構造物の中に取り込まれ、構造物の一部となった。これらの現象は他の細胞では認められないことより、本方法を用いることにより、再生医療で用いられる EPC の有効性を評価することが可能であることが示された。

D. 考察

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ら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、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。

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と考えられる。また、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。

微細加工基盤を利用して作成された血管の動物への移植実験の結果から、この血管が生体内においても機能を持っていることも確認できた。しかも、この方法では他の細胞移植法よりも速やかに効果が判別できることより、細胞の有用性の判断に用いることが可能であると思われる。また、本技術を用いることにより、EPC や OEC の機能的な差異についての解析が可能であり、EPC は管腔形成に対して補助的な作用を有していることが示唆された。

E. 結論

細胞組織利用医薬品の製造方法や規格設定の評価方法の開発に関する研究として、血管内皮前駆細胞をモデルとした研究を行い、以下の結果を得た。

1) AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性 EPC の誘導

- 系において、Thrombopoietin 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) CD31 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唆した。
 - 3) 細胞マイクロパターンニングが可能な微細加工基盤作製技術を確立した。
 - 4) 作製した基盤を利用して毛細血管を形成させ、下肢虚血モデルマウスに移植して、その有用性を示した。
 - 5) 微細加工基盤上で細胞を培養、転写することにより、採取した細胞の血管新生能を調べることができることを示した。
- F. 研究発表**
1. 論文発表
 - 1) Ishii-Watabe,A., Kobayashi,T., Suzuki,T. Yamaguchi,T., Kawanishi,T., Influences of the recombinant artificial cell adhesive proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells in serum-free culture. *Biologicals*, (in press)
 - 2) 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)
 - 3) Uchida,E. Kogi,M. Oshizawa,T. Furuta,B. Satoh,S. Iwata,A. Murata,M. Hikata,M, Yamaguchi,T.: 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)
 - 4) Niimi,S., Harashima,, Yamaguchi,T.: Study of hepatocytes using RNA interference. *Journal of Organ Dysfunction*, (in press)
 - 5) 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, *Journal of Cellular Physiology*. **211**, 189-196, (2007)
 - 6) Yamaguchi, T. Uchida,E.; Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products. *CCDT Journal*, **7**, 203-208, (2007)
 - 7) 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)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) 山口照英：医薬品各条の改正点－生物薬品。 *薬局*, **57**, 89-95 (2006)
 - 11) Chen BK, Huang CC, Chang WC, Chen YJ, Kikkawa U, Nakahama KI, Morita I, Chang WC. PP2B-mediated Dephosphorylation of c-Jun C-Terminus Regulates Phorbol Ester-induced c-Jun/Sp1 Interaction in A431 Cell. *Mol Biol Cell*. 2007 in press
 - 12) Xu JW, Morita I, Ikeda K, Miki T, Yamori Y. C-reactive protein suppresses insulin signaling in endothelial cells. ---Role of Syk tyrosine kinase *Mol Endocrinol*. 2006 in press
 - 13) Kojima T, Nakahama K, Yamamoto K, Uematsu H and Morita I. Age- and cell cycle-dependent changes in EPC-1/PEDF promoter activity in human diploid fibroblast-like (HDF) cells. *Mol. Cell. Biochem.*, **293**(1-2): 63-69, 2006
 - 14) Hong J, Yokomakura A, Nakano Y, Ishihara K, Kaneda M, Onodera M, Nakahama K, Morita I, Miikura K, Ahn J-W, Zee OP and Ohuchi K. Inhibition of vascular-type (H⁺)-ATPase by the cytostatic macrolide apicularen A and its role in apicularen A-induced apoptosis in RAW 264.7 cells. *FEBS Lett.*, **580**(11):2723-2730, 2006
 - 15) Yoshimura H, Nakahama K, Safronova O, Tanaka N, Muneta T and Morita I. Transformation growth

- factor-b stimulates IL-1b-induced monocyte chemoattractant protein-1 in human synovial cells via the ERK/AP-1 pathway. *Inflammation Res.*, 55(12): 543-549, 2006
- 16) Ohno-Matsui K, Mori K, Ichinose S, Sato T, Wang J, Shimada N, Kijima A, Mochizuki M and Morita I. In vitro and in vivo characterization of iris pigment epithelial cells cultured on amniotic membranes. *Mol. Vis.*, 12:1022-32, 2006
- 17) 森田育男. 第 39 回河口湖心臓討論会. 38(2):151-216, 2006. 日本心臓財団
2. 学会発表
- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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. *Pharmaco-Hematology シンポジウム* (2006, 6.30 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)
- 6) 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下では Annexin A3 の発現が抑制される. 第 13 回肝細胞研究会 (2006, 7 旭川)
- 7) 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 旭川)
- 8) 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)
- 9) 内田恵理子, 山口照英: バイオ医薬品/生物薬品のウイルス安全性に関する国際動向. 第 6 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム. (2006.12.1 東京)
- 10) 古田美玲, 内田恵理子, 押澤正, 山口照英: 放射照射による Op9 細胞の造血支持能の誘導; 第 6 回日本再生医療学会総会, (2007, 3,13-14 横浜)
- 11) 豊田淑江, 押澤正, 石井明子, 鈴木孝昌, 山口照英: Thrombopoietin(TPO)による 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)
- 12) 大河内則彦, 黒田正敏, 服部秀志, “血管内皮細胞の高速転写を可能にするパターンニング基板の開発”, 第 55 回高分子討論会, 9月 20-22 日, 2006、富山.
- 13) Hattori H, Okochi N, Kuroda M, Hase M, “Cell transfer printing technology”, Gordon Research Conference “Biointerface Science”, October 22-27, 2006 Les Diablerets, Switzerland.
- 14) 服部秀志, 大河内則彦, 黒田正敏, 長谷政彦, “細胞転写印刷技術”, 日本動物実験代替法学会第 20 回大会, 12 月 8, 9 日, 2006、東京.
- 15) 土屋雄彦, 林 秀隆, 浅川恭行, 前村俊満, 間崎和夫, 中浜健一, 田中政信, 竹田 省, 森田育男, 久保春海. 卵巣腫瘍における血管新生調節因子の発現パターンの解析. 第 58 回日本産科婦人科学会学術講演会. 横浜. 2006 年 4 月 22~25 日
- 16) 水野暁子, 森田育男, 竹田 省. パターンニングされた毛細血管の作成とその応用. 第 58 回日本産科婦人科学会学術講演会. 横浜. 2006 年 4 月 22~25 日
- 17) Safronova O, Pleumsampant S, Nakahama K, Morita I. Regulation of chemokine gene expression by hypoxia via cooperative activation of NF- κ B and HDAC. Keystone symposia (D3) “NF- κ B: 20 years on the road from biochemistry to pathology”. Banff,

- Alberta, Canada, March 23-28, 2006
- 18) Safronova O, Pleumsampant S, Nakahama K, Morita I. NF- κ B signaling activated by hypoxia differently mediates *in vitro* and *in vivo* gene targeting. Keystone symposia (D3) "NF- κ B:20 years on the road from biochemistry to pathology". Banff, Alberta, Canada, March 23-28, 2006
- 19) Onodera M, Nakahama K, Sato T, Morita I. Effects of N-3 polyunsaturated fatty acids on the susceptibility to VEGF through downregulation of VEGFR-2 expression. 14th International Vascular Biology Meeting, The Netherlands, June 6-10, 2006
- 20) Kobayashi A, Kuwana R, Hattori H, Ota M, Takeda S, Morita I, Ichinose S. *In vitro* capillary engineering and angioplasty. 14th International Vascular Biology Meeting, The Netherlands, June 6-10, 2006
- 21) Kojima A, Nakahama K, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Morita I. Contribution of connexin 43 for the differentiation of primary cultured human retinal pigment epithelium cells. Development/Cell differentiation3: Neural, sensory and neural crest. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan, June 18-23, 2006
- 22) ブルムサンパン・シリーラット. 低酸素における MCP-1 産生低下機序の解明—HDAC の関与. 第 27 回日本炎症・再生医学会. 東京. 2006 年 7 月 11~13 日
- 23) Mukai N, Kobayashi A, Kuwana R, Amagasa T, Morita I. Comparison of early with late endothelial progenitor cells in tube formation activity *in vitro*. The Nexus of Histochemistry and Molecular Genetics, The Seventh Joint Meeting of The Histochemical Society and The Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry, Hawaii, August 23-27, 2006
- 24) Sireerat Pleumsampant.. Hypoxia activated histone deacetylase through CK2-dependent mechanism. Session 2. Super Students Symposium 1. 東京医科歯科大学 21 世紀 COE プログラム (平成 15 年度採択) 歯と骨の分子破壊と再構築のフロンティア、ゲノム歯骨科学とナノサイエンスの研究教育拠点. 東京. 2006 年 8 月 2 日
- 25) 向井奈々、小林暁子、安部まゆみ、森田育男. 血管内皮細胞前駆細胞の血管新生への関与. 第 36 回血管研究会. 東京. 2006 年 11 月 2 日
- 26) 向井奈々. 印刷技術を用いた *in vitro* 毛細血管構築法と再生医療に適した血管内皮前駆細胞の選択. 先端歯学スクール 2006 学生発表. 先端歯学国際教育研究ネットワーク. 三浦. 2006 年 11 月 29 日 (最優秀賞)
- 27) 向井奈々、小林暁子、桑名るみ子、天笠光雄、森田育男. 2 つの異なるタイプの血管内皮前駆細胞 early EPC および late EPC の tube forming activity の検討. 第 14 回日本血管生物医学会. 東京. 2006 年 12 月 13~15 日
- 28) 吉田武史、大野京子、小島有里子、島田典明、望月 學、森田育男. ヒト網膜色素上皮細胞における Amyloid β 負荷時の血管新生関連因子の遺伝子発現変化. 第 14 回日本血管生物医学会. 東京. 2006 年 12 月 13~15 日
- 29) 小島有里子、中浜健一、大野京子、森 圭介、望月 學、森田育男. コネキシン 43 の網膜色素上皮細胞分化への関与と脈絡膜新生血管における役割. 第 14 回日本血管生物医学会. 東京. 2006 年 12 月 13~15 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願番号：特願 2001-111306

起案日：平成 19 年 1 月 18 日

発明者：森田育男

発明の名称：血管新生抑制剤

特許出願人：株式会社スピルリナ研究所

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社