

さらに Bcl-xL および Bcl-FNK の発現により細胞が抗アポトーシス能を獲得するかどうかが検討するため、トポイソメラーゼ I 阻害剤である Camptotecin 存在下において培養した。その結果、Camptotecin 10 μ M 存在下において Mock ならびに Ad35-GFP 作用群においてはそれぞれ 57%、75% の生存率であったのに対し、Ad35-BclFNK 作用群では 88% の生存率を示した (Fig.3)。従って CD34 陽性細胞に対し Bcl-FNK を発現させることにより、抗アポトーシス能を獲得することが示された。

次に Bcl-xL および Bcl-FNK の発現が細胞の分化・増殖に与える影響について明らかにするため、コロニーアッセイを用いて遺伝子導入細胞のコロニー形成能について検討した。その結果、遺伝子導入 2 日後の細胞ではどの群においても同程度のコロニー形成が観察されたが、遺伝子導入 8 日後の細胞をコロニーアッセイにかけたところ、Ad35-BclFNK 作用群においては他群と比較し、有意に高いコロニー形成能を示した (Fig.4)。一方で、Ad35-BclxL 作用群においては有意な差は認められなかった。以上の結果より、Bcl-xL の活性増強体である Bcl-FNK を強制発現させることにより、CD34 陽性細胞の分化能・増殖能が一定期間液体培養後も維持されることが示唆された。

そこで、Bcl-FNK 発現 35 型 Ad ベクターを作用させた CD34 陽性細胞を、放射線照射した NOG マウスに移植し正着するかどうかが検討した。移植 20 週後に末梢血、骨髄、胸腺、脾臓に含まれるヒト由来の血液細胞を解析したところ、末梢血、胸腺、脾臓においてはヒト由来の細胞は検出されなかったものの、骨髄では少ないながらも (1%以

下) ヒト CD45 陽性細胞が検出され、CD34 陽性細胞が正着していることが示唆された (Fig.5)。さらに各種抗体を用いて解析したところ、CD19/CD10 陽性細胞および CD33 陽性細胞が検出されたことから、B 細胞および Myeloid 細胞に分化していることが示唆された。なお、T 細胞 (CD3 陽性細胞) および造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) は検出されなかった。

D. 考察

造血幹細胞は患者より採取しやすく、また表面マーカーが既に同定されていること、また高い分化能・自己増殖能を有することから、最も早い段階から注目され臨床応用されてきた幹細胞である。すでに白血病などの難治性疾患において造血幹細胞移植は優れた治療効果を収めている。しかしながら造血幹細胞は液体培養中に急速にその分化能を失うことが報告されているとともに、移植後、骨髄の niche にたどりつくことが出来ず細胞死にいたる恐れがある。従って、造血幹細胞の移植効率向上は治療効果を左右する極めて重要な要素であるとともに、移植効率向上に向けて有効な解決法の開発が期待される。そこで本研究では、造血幹細胞を含む画分であるヒト骨髄 CD34 陽性細胞への遺伝子導入に優れた 35 型 Ad ベクターを用いて、CD34 陽性細胞に Bcl-xL およびその活性増強変異体 Bcl-FNK を導入し、その細胞特性について検討した。

Bcl-FNK は Bcl-xL の 3 アミノ酸 (Y22F、G26N、R165K) を置換することにより分子内の水素結合を 3 箇所消失させている。これにより Bcl-xL のターゲットであるミトコンドリア外膜に存在する VDAC

(Voltage-dependent anion channel) への親和性が増強し、高い抗アポトーシス活性を示すと考えられる。本研究においても、Ad35-BclFNK 作用群は Ad35-BclxL 作用群よりも高い抗アポトーシス能を示すとともに、一定期間培養後も高いコロニー形成能を示した。Bcl-FNK 発現による CD34 陽性細胞の分化能維持について、その詳細なメカニズムについては不明であるが、過去の研究より未熟な造血前駆細胞では Bcl-xL が発現していること、マウス骨髄細胞にレトロウイルスベクターを用いて Bcl-xL を発現させることにより移植効率が向上したことが報告されている。本研究においてもより強い活性を持つ Bcl-FNK を発現させることにより、培養中に発現低下していく Bcl-xL を補っているものと考えられる。

今回、Ad35-BclxL および Ad35-BclFNK 作用群では Ad35-GFP 作用群および mock 群と比較すると若干増殖速度の低下が観察された。これに関しては Bcl-xL が細胞周期に入るのを遅らせる役割を持つことが報告されたことから、細胞周期に入るのが遅れたためと思われる。しかしながら、Ad ベクターの場合、細胞分裂によりゲノムが希釈されて遺伝子発現効率が低下していくことから、増殖速度が低下することにより遺伝子発現の延長が期待される。また、最終的には遺伝子発現が減少することにより増殖速度は回復すると予想されることから、大きな問題にはならないと思われる。

Bcl-FNK 発現 35 型 Ad ベクターを作用させた CD34 陽性細胞を放射線照射した NOG マウスに移植したところ、骨髄においてヒト CD45 陽性細胞および B 細胞、Myeloid 細胞が検出されたことから、移植細胞が正着

し、さらに分化したものと思われる。今回は予備的検討であるため、Bcl-FNK 遺伝子導入により移植効率が向上したかどうかは不明であるが、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入細胞が正着能・分化能を有することが示された。今後さらに例数を重ねることにより、移植効率について検討していく予定である。

造血幹細胞への遺伝子導入にはこれまでレトロウイルスベクター（もしくはレンチウイルスベクター）が汎用されてきた。しかしながらレトロウイルスベクターは遺伝子が宿主細胞の染色体に挿入されることにより細胞が癌化する恐れがあること、抗アポトーシス遺伝子は癌細胞で高発現していることから、本研究に関してはレトロウイルスベクターの使用は極めて危険であると思われる。さらに血液細胞は分化するに従い、Lineage によっては Bcl-xL の発現が減少することから、恒常的な Bcl-xL の発現は血液細胞の分化に影響を与える恐れがある。そこで本研究においては、一時的な遺伝子発現が可能な 35 型 Ad ベクターを用いた。我々は 35 型 Ad ベクターは CD34 陽性細胞に対し高い遺伝子導入活性を有すること、遺伝子導入細胞が分化能・増殖能を保持することを明らかにしており、35 型 Ad ベクターは造血幹細胞への抗アポトーシス遺伝子導入に最も優れたベクターであるといえる。

E. 結論

ヒト造血幹細胞を含む画分であるヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞に対し、高効率な遺伝子導入可能な 35 型 Ad ベクターを用いて抗アポトーシス遺伝子である Bcl-FNK を発

現させることにより、CD34 陽性細胞に抗アポトーシス能を付与することに成功した。さらに遺伝子導入後、CD34 陽性細胞が一定期間培養後も分化能・増殖能を維持していることを見出した。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

1. Murakami S., Sakurai F., Kawabata K., Okada N., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mizuguchi H. Interaction of penton base Arg-Gly-Asp motifs with integrins is crucial for adenovirus serotype 35 vector transduction in human hematopoietic cells. *Gene Ther.* 14; 1525-33 (2007).

2. Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. Adenovirus vectors composed of subgroup B adenoviruses. *Curr. Gene Ther.* 7; 229-38 (2007).

3. Sakurai F., Akitomo K., Kawabata K., Hayakawa T., Mizuguchi H. Downregulation of human CD46 by adenovirus serotype 35 vectors. *Gene Ther.* 14; 912-9 (2007).

4. 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*、7(2)、168-173 (2007)

5. 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*、22(2)、148-154 (2007)

6. 櫻井文教; ウイルスベクター、*Drug Delivery System*、22(2)、154 (2007)

7. 水口裕之、櫻井文教、川端健二; カプシドタンパク質改変アデノウイルスベクター、*遺伝子医学 MOOK 別冊 絵で見てわかるナノDDS*、235-242 (2007)

2. 学会発表

1. 櫻井文教、川端健二、岡田直貴、藤田卓也、山本昌、早川堯夫、水口裕之 The crucial role of penton base RGD motifs in adenovirus serotype 35 vector transduction in human hematopoietic cells. 第66回日本癌学会学術総会(横浜) 2007年10月3-5日

2. 櫻井文教、村上さや香、川端健二、岡田直貴、藤田卓也、山本昌、水口裕之 35型アデノウイルスベクター感染におけるインテグリンの関与 第7回遺伝子・デリバリー研究会(東京) 2007年5月17日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

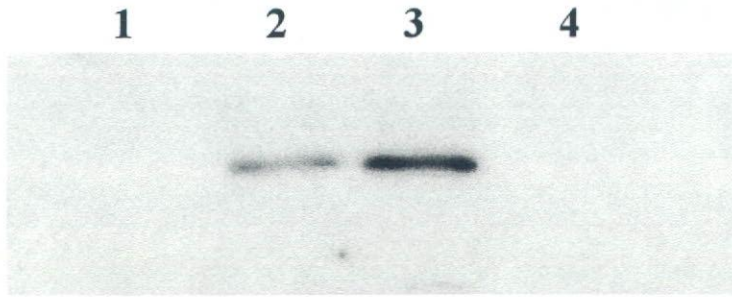


Fig.1 Expression of Bcl-xL and Bcl-FNK following Ad35 vector transduction in human bone-marrow CD34+ cells. Lane 1; mock, lane 2; Ad35-BclxL, lane 3; Ad35-BclFNK, lane 4; Ad35-GFP. The CD34+ cells were transduced with Ad35 vectors at 6000 VP/cell for 6 hr. Following a 48 hr-incubation, the cells were collected and expression of Bcl-xL and Bcl-FNK was assessed by Western blotting analysis. One representative experiment of three is shown.

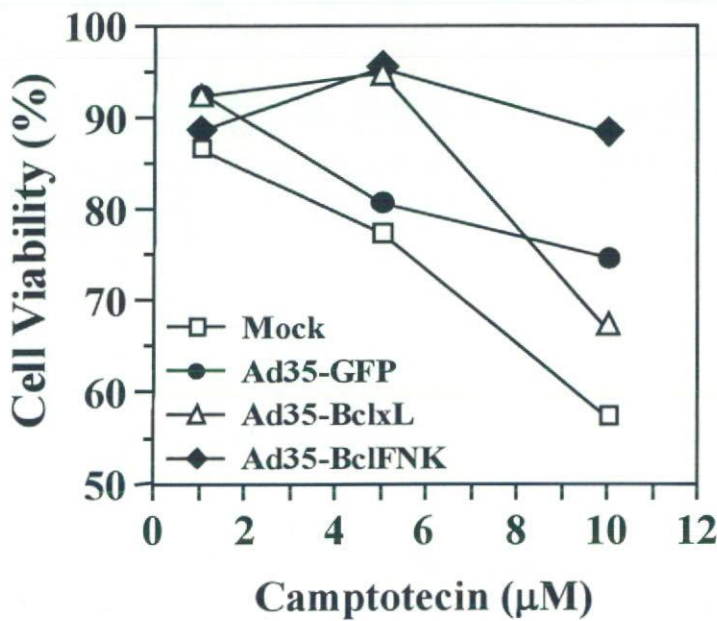


Fig.2 Survival of human bone-marrow CD34+ cells in the presence of Camptotecin. The CD34+ cells were transduced with Ad35 vectors at 6000 VP/cell for 6 hr. Following a 6 day-incubation, Camptotecin was added to the cells at the indicated concentrations, and incubated for 48 hrs. Viability of the cells was assessed by trypan blue exclusion assays. The results shown are mean of two experiments.

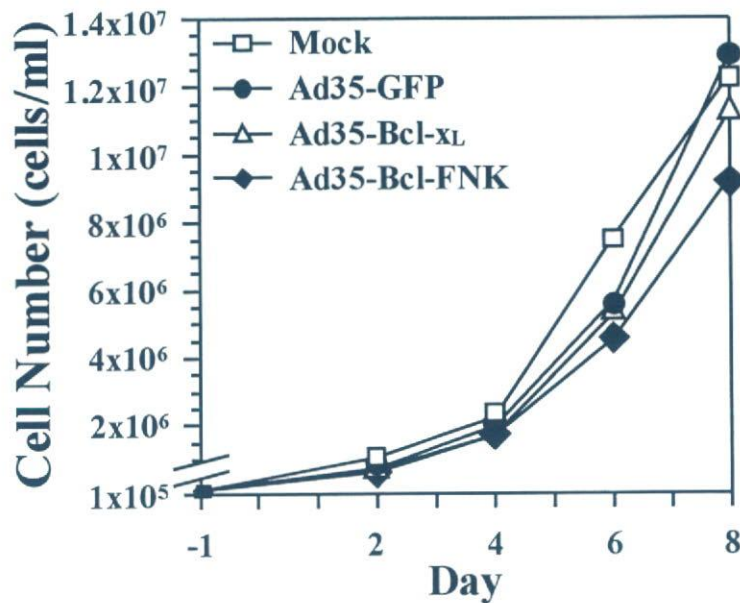


Fig.3 Growth ratio of human bone-marrow CD34+ cells following Ad35 vector Transduction. The CD34+ cells were transduced with Ad35 vectors at 6000 VP/cell for 6 hr. Cell numbers were measured at the indicated time points. The results shown are mean of 2 experiments.

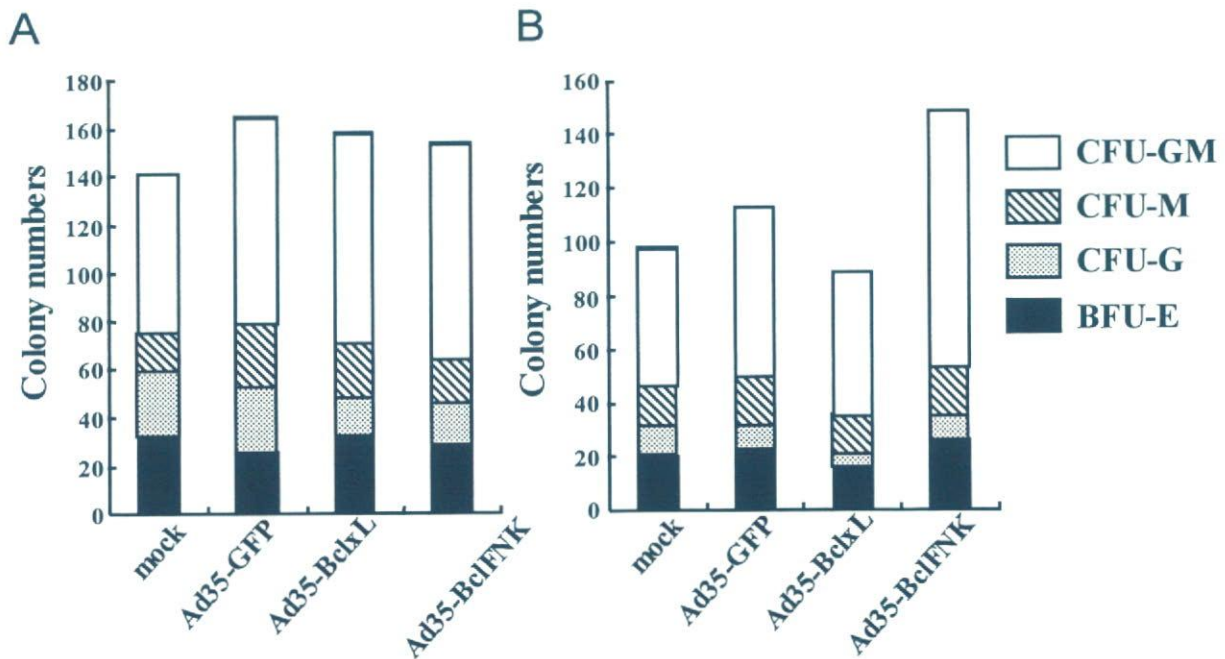


Fig.4 Colony forming assay of human bone-marrow CD34+ cells following Ad35 vector Transduction. The CD34+ cells were transduced with Ad35 vectors at 6000 VP/cell for 6 hr. The cells were collected and subjected to colony forming assay at (A) 2 days or 8 days after transduction. The results shown are the mean of 4 experiments .

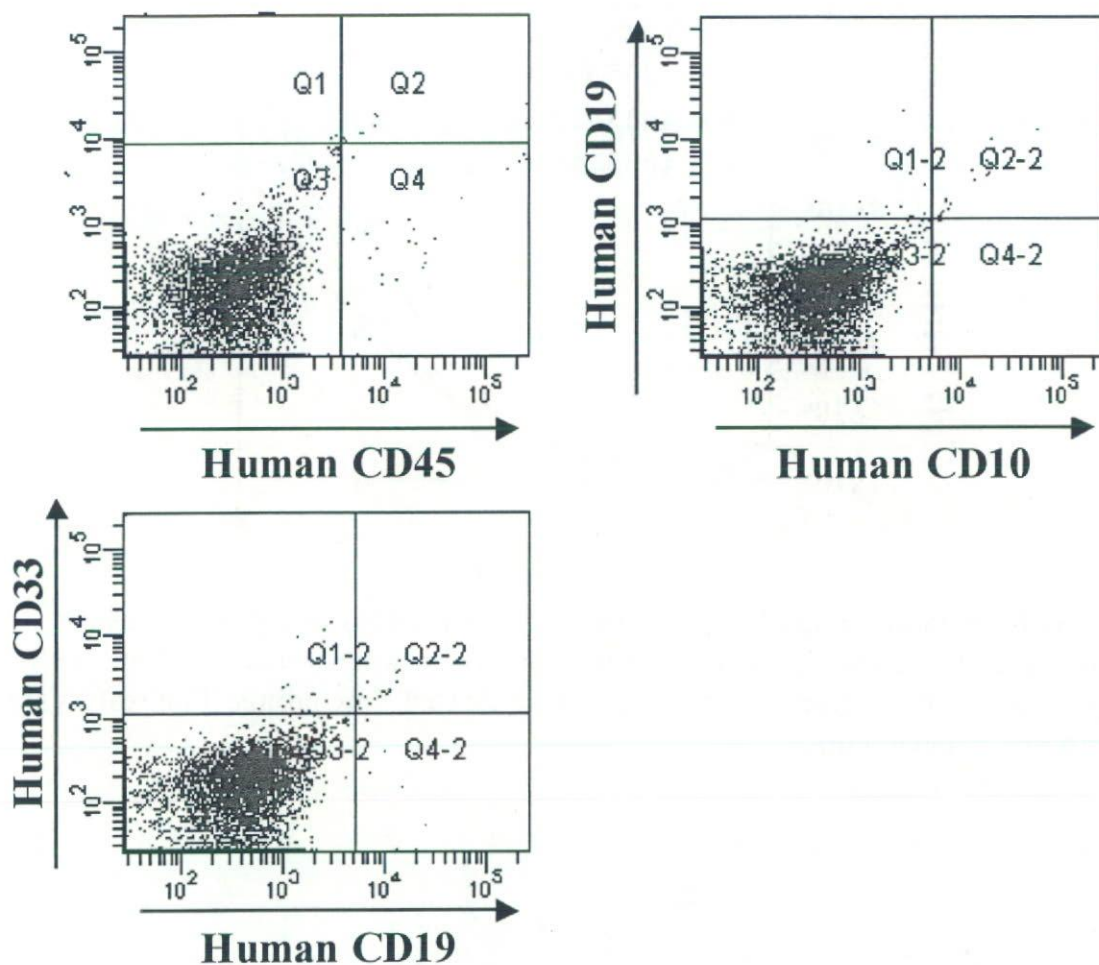


Fig.5 Analysis of human hematopoietic cells in NOG recipients. The CD34⁺ cells were transduced with Bcl-FNK-expressing Ad35 vectors at 6000 VP/cell for 6 hr. Following a 48 hr-incubation, 1×10^5 cells were transplanted into irradiated NOG mice. Bone marrow cells were recovered and analyzed using flowcytometry 20 weeks after transplantation.

細胞特性解析技術の開発に関する研究

分担研究者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第二室長

協力研究者 豊田淑江 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

細胞・組織加工利用医薬品として血管再生療法での応用が期待される血管内皮前駆細胞 (early Endothelial Progenitor Cells: early EPC、および、Outgrowth Endothelial Cells: OEC) について、効率のよい誘導法の確立、ならびに、品質管理に有用な特性指標を明らかにすることを目的に、血液由来細胞からの分化誘導法と誘導された細胞の特性に関する検討を行った。本年度は、Thrombopoietin (TPO) が AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性 early EPC の誘導を促進することを見出すと共に、その情報伝達経路に Akt と STAT3 が関わっていることを明らかにし、TPO への反応性や TPO 受容体である Mpl の発現が early EPC の新たな特性指標となる可能性を示した。また、OEC 誘導系において、OEC コロニー出現数、増殖、管腔形成能への培地組成の影響を検討して OEC 培養条件の最適化を進めた結果、誘導効率と拡大効率を大幅に改善することができた。さらに、OEC の特性指標の候補となる遺伝子 3 つを見出した。

A. 研究目的

骨髄単核球や末梢血単核球、あるいは G-CSF で動員した末梢血 CD34 陽性細胞等を局所に投与することにより虚血部位での血管の再生を促進する血管再生療法は、我が国で最も盛んに臨床研究が行われている再生医療の一つである。その有効率は高く、骨髄単核球を用いた治療では、パージャー病で 8~9 割、閉塞性動脈硬化症でも 5 割程度とされており (*)、臨床研究の対象が既存の治療法では回復が期待できない患者に限られていることを考えると、その有用性が非常に高いものであることが伺われる。しかし、骨髄採取等の患者への負担や、幹細胞の異所性分化の懸念があることに加えて、投与された細胞集団のうち、どのような細胞が、どのように働いて奏功しているのかという有効性のメカニズムが不明であるという問題がある。

細胞を用いた血管再生療法で血管形成が促進

される機構としては、投与された細胞集団に含まれる血管内皮前駆細胞の起源となる細胞が局所で分化し、血管形成を促進する因子を放出することや、血管内皮細胞に分化して血管を形成すること等が考えられる。一方、*in vitro* では、血液から単核球あるいは特定の表面マーカーを持つ細胞を分離し、VEGF 等の存在下で培養すると、培養開始 1 週間程度で early EPC、2~3 週間目から late EPC (Outgrowth Endothelial Cells: OEC) と呼ばれる 2 種類の血管内皮前駆細胞が誘導されることが知られている。それぞれの細胞の特性に関して詳細は明らかになっていないが、early EPC は血管形成を促進するサイトカイン類を分泌する性質をもち、OEC はそれ自身が管腔形成能を持つ細胞であるとされていることから、*in vivo* においても、early EPC や OEC が血管再生に寄与していると考えられる。

したがって、患者から採取した血液細胞を原料として early EPC や OEC を調製し、品質・有効性・安全性の確保された細胞・組織加工医薬品として供給することができれば、現在の血管再生療法よりも低侵襲で有効性・安全性の高い方法として、血管再生療法を広く一般に提供することが可能になると考えられる。本研究では、細胞・組織加工医薬品の品質・有効性・安全性確保のための手法の確立を目標として、血管内皮前駆細胞の分化誘導法の確立と、誘導された細胞の特性解析を行っている。本年度は、(1) Thrombopoietin による early EPC の誘導に関する検討、(2) OEC の誘導条件の最適化と特性指標に関して検討を行った。

(*医学のあゆみ 223, 938, 2007)

B. 研究方法

1) 試薬

TPO は、キリン・アムジェン社より提供された。VEGF は、Strathmann Biotec 社より得た。AC133 細胞分離キット、抗 CD133/2 抗体・フィコエリスリン (PE) は Milteny Biotec から購入した。抗 CD110 (TPO レセプター) 抗体・アロフィコシアニン (APC)、抗 CD31 抗体・フルオレッセインイソチオシアネート (FITC) あるいは PE、抗 CD34 抗体・FITC、抗 CD45 抗体・FITC、抗 STAT3 抗体、抗リン酸化 Akt (Ser473) 抗体・APC は、BD Biosciences Pharmingen より得た。抗 VEGF 受容体-2 (VEGFR-2/Flk-1/KDR) (Santa Cruz Biotechnologies 社) と抗ヒト内皮 NO 合成酵素 (eNOS) 抗体 (Cayman Chemical) を用いた。抗リン酸化 Akt (Ser473) 抗体、抗-Akt 抗体、抗リン酸化 STAT3 (チロシン 705) 抗体は、Cell Signaling Technology から求めた。フィブロネクチン (FN) -、IV型コラーゲン・コートプレートは、イワキ社から購入した。抗 CD14 抗体・PE は、Dako Cytomation から得た。

2) 単核球細胞の分離

インフォームドコンセントを得て採取された

臍帯血は、東京赤十字血液センター、臍帯血バンクより提供された。末梢血パフィーコートは、埼玉赤十字血液センターより提供された。

血液サンプルは、2mM の EDTA を含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) で希釈し、リンフォプレップチューブ (Axis-Shield PoC AS) (密度= 1.077) に充填し、800g、18°C、20 分の遠心により、単核球細胞を集めた。細胞を磁気ビーズで標識する場合は、分画用溶液 {2mM の EDTA、0.5% のウシ血清アルブミン (BSA) ・PBS} で洗浄した。

3) AC133 陽性細胞の分離

AC133 陽性細胞を分離するため、AC133 マイクロビーズ分離キットを用い抗 AC133 抗体・マイクロビーズと 4°C、30 min で反応させた。陽性細胞の分離は、Auto MACS (Milteny Biotec) を用いて行った。臍帯血と末梢血 AC133 陽性細胞は 20% 牛胎児血清 (FBS)、50 ng/ml VEGF、50 ng/ml TPO を含む EBM-2 培地に浮遊させ培養した。FN コートディッシュは蛍光免疫染色による接着細胞の解析用に、IV型コラーゲンコートディッシュはフローサイトメーターの解析用に用いた。

4) フローサイトメーターによる解析

細胞を回収し、洗浄後、抗 CD31 抗体・FITC あるいは PE、抗 CD14 抗体・FITC、抗 CD45 抗体・FITC、抗 CD110 (TPO 受容体) 抗体・APC、抗 CD133/2 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。すべての細胞は 7-amino actinomycin D (7-AAD) で染色し、陽性の細胞は死細胞として、解析の際、除去した。細胞内のリン酸化 Akt の解析は、細胞を固定・浸透化した後、免疫染色した。

5) 臍帯血と末梢血の CD31 強陽性・陽性細胞における各種サイトカインの産生

培養 1 週間後の AC133 陽性細胞を抗 CD31 抗体・FITC で免疫染色後、FACS Aria (BD Biosciences) により分画した。CD31 強陽性・陽性細胞を 20% FBS-EBM2 培地に浮遊し、96 穴

のマルチウェルに培養した。培養4日後に培養上清を集め、 -20°C の冷凍庫に保存した。サイトカインの測定はBio-Plex サイトカインアッセイの方法に従った。

6) 接着細胞の免疫染色

FNコートディッシュ上でAC133陽性細胞を2週間培養後、細胞層をPBSで3回洗った。冷却したエタノール(-20°C)で固定後、細胞層をPBSで3回洗った。1% BSAを用いて細胞を 4°C 、1時間、ブロッキングした。次に 4°C 、1時間、それぞれの第1抗体でインキュベートした。PBSで洗浄後に、 4°C 、1時間、抗マウスIgG抗体-FITCまたは抗ウサギIgG抗体-Rhodaminでインキュベートした。PBSで洗浄後、Zeiss LSM 510を用いて解析した。

7) 細胞の可溶化サンプルの作成とイムノブロット

AC133陽性細胞を、20%FBS-EBM2培地に浮遊3日間培養し、細胞を集め、1%BSA-EBM2培地中に1-3時間、培養し、血清の影響を除いた。細胞(1×10^6)を、50ng/mlのTPO、50ng/mlのVEGFまたは両者で刺激した後、回収した。細胞は1/100(v/v)蛋白質分解酵素阻害薬カクテルと1/100(v/v)ホスファターゼ抑制薬カクテル(Sigma Chemical)を含む可溶化バッファー(1%トリトンX-100、10mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH 7.5、1mM EDTA、5mM EGTA、10mM MgCl_2 、50mM β -グリセロリン酸)で溶解した。サンプルはウェスタンブロットにより解析した。

8) OECの誘導

臍帯血から調製した単核球を培地(Endothelial Basal Medium-2, 2% FCS, VEGF, bFGF, EGF, R3-IGF1, ascorbic acid, \pm hydrocortisone, \pm heparin)に懸濁し、FNコート6wellプレート(ベクトン・ディッキンソン社製)に播種した。播種細胞数は、 1×10^7 cells/well程度とした。通常は、培養開始1日後に、培地を除いてPBS(-)で1回

washし、新鮮培地を添加した。その後、培養開始7日目までは毎日培地交換を行い、以降は1週間に2回、培地を交換した。顕微鏡による観察でOECのコロニー数を計測し、光顕画像を撮影した。

9) マトリゲルを用いた管腔形成アッセイ

BD社より購入したマトリゲルを氷上で一晩かけて融解し、冷却した24穴プレートに300ul/well分注した。 37°C のインキュベーター中に30分静置してゲル化させた。10cmディッシュで培養していたOECをトリプシンを用いて回収し、血清入り培地で洗浄した後、5%FCSを含むEBM-2(増殖因子の添加なし)に懸濁した。マトリゲルをゲル化させたwellに 1×10^5 個の細胞を播種し、 37°C の CO_2 インキュベーターで一晩培養した。形成された管腔の写真有位相差顕微鏡Axiovert2000で撮影した。一部の実験では、マトリゲル中の増殖因子含量を低下させたGrowth Factor Reduced (GFR)マトリゲルを用いた。各細胞の管腔形成能は、顕微鏡写真1視野(2.35mm^2)にあるtubeの長さ和本数を顕微鏡画像解析ソフトAxioVisionを用いて測定することにより定量化した($n=4$)。

10) OEC特性指標の探索

特定の細胞あるいは情報伝達経路に関わる遺伝子84個の発現プロファイルを1枚のPCRプレートで測定することのできるSuper Array社のRT2 Profiler PCR Arrayを用い、血管内皮細胞の機能に関わると考えられている遺伝子の発現プロファイルを行った。Real-Time PCRの装置はABI7000を用いた。 β アクチンを内部標準として、各遺伝子について β アクチンとのCt値の差を求め、 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ を各遺伝子と β アクチンの発現量の比とした。HUVECをコントロールとして、OECにおける各遺伝子の発現量を比較した。各細胞について3枚のプレートを用いて解析した。プレート間での反応の一定性は、各プレートに3well設けられているPositive PCR Control (PPC)の

Ct 値から判断したが、全てのプレートで threshold を一定にしたとき、PPC の Ct 値は全てのプレートを通じて一定していた (20.63 ± 0.19)。

C. 研究結果

血管内皮前駆細胞 (EPC) の起源となる細胞には多くの種類があり、CD34、AC133、CD14 等の表面マーカーをもつ細胞と考えられている。EPC には少なくとも 2 つのタイプがあり、1 つは増殖能が低く、自身は管腔形成能をもたないが、インターロイキン-8 (IL-8)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、血管内皮成長因子 (VEGF) を放出する紡錘状の形をした early EPC である。もう 1 つは、高い増殖能と管腔形成能をもち、敷石状を呈した OEC である。OEC は多くの均一な細胞数が得られるので扱いやすいが、出現時期が 2-3 週間と遅く、また、出現頻度も低い。Early EPC は不均一ではあるが培養 1-2 週間で出現する。

移植のために十分な数の EPC を得ることは、細胞治療で非常に重要である。EPC は多くの物質、例えば G-CSF、GM-CSF、VEGF、EPO、スタチン等によって、骨髄から動員される。しかし、患者に過度に負担をかけることなく、できるだけ多くの EPC を得るためには、生体外すなわち *in vitro* で EPC を分化・増殖を促進する方法を確立することが望ましい。新たな EPC 増幅方法をあきらかにできた場合、増幅した EPC が従来の EPC と同等の性質を持っているのかの検証も必要となる。その検証が得られた場合には、解析によって得られた様々な細胞特性が、新たな EPC の品質特性となることが考えられ、細胞の品質管理の点からも有用である。

C-1. Thrombopoietin による early EPC の分化誘導と特性解析

トロンボポエチン (TPO) は従来血小板産生を促進する因子として知られ、また造血幹細胞の自

己複製を促進する因子としても知られている。我々は以前の研究で、AC133 陽性細胞から early EPC への分化過程を詳細に検討した結果、CD31 強陽性細胞が early EPC であることを報告した。本年度の研究で、我々は AC133 陽性細胞から early EPC への分化・増殖の過程における TPO の効果を解析し、TPO は VEGF よりも強く early EPC の分化・増殖を促進する重要な役割を果たすことを明らかにしたので報告する。

C-1-1. AC133 陽性細胞由来 early EPC の特性

AC133 陽性細胞を VEGF 存在下に fibronectin または typeIV コラーゲン上で培養すると、CD31 の発現分布は Fig. 1 のようになり、CD31 強陽性細胞が early EPC である。Early EPC は様々なサイトカインを産生すると考えられることから、CD31 陽性細胞と CD31 強陽性細胞を分画し、産生するサイトカインを比較した (Fig. 2)。その結果、末梢血と臍帯血のいずれを原材料とした場合にも、CD31 強陽性細胞が CD31 陽性細胞よりも多量のサイトカインを産生しており、特に IL-8 や MCP-1 の産生量が多いことが明らかになった。このことから CD31 強陽性細胞が early EPC としての性質を示すことがわかる。

C-1-2. TPO による CD31 強陽性 early EPC の分化誘導

AC133 陽性細胞に VEGF のみを添加、あるいは、VEGF と TPO の両者を添加して fibronectin プレート上で 2 週間培養したところ、VEGF 単独群に比して、VEGF+TPO 添加群で KDR 陽性、eNOS 陽性の接着した細胞が増加した (Fig. 3)。末梢血由来細胞と臍帯血由来細胞のいずれを原材料とした場合も同様の結果が得られた。フローサイトメトリーによる解析では、TPO の添加により CD31 強陽性細胞が 0.51% から 2.80% に増加していた (Fig. 8b 参照)。したがって、TPO は AC133 陽性細胞から early EPC への分化・増殖を促進することが明らかとなった。

先の検討は対照群に VEGF を添加し、VEGF

に TPO を加えて比較検討したが、次に AC133 陽性細胞から early EPC に分化・増殖する作用が TPO 単独で行われるのかどうか、また、VEGF との比較についても検討した。その結果、AC133 陽性細胞に VEGF を加えて一週間培養しても細胞総数 (Fig. 4a) は対照群と比べて増加しなかったが、フローサイトメーター (Fig. 4b) で CD31 強陽性細胞の割合を解析すると約 1.5 倍とわずかではあるが上昇しており、CD31 強陽性細胞数 (Fig. 4c) は対照群に比べて有意に増加していた。一方、TPO を加えて培養すると、細胞総数は約 2 倍増加 (Fig. 4a) し、CD31 強陽性細胞の割合は約 13 倍近く上昇しており (Fig. 4b)、CD31 強陽性細胞数 (Fig. 4c) は 20 倍以上の増加が観察された。また、VEGF と TPO を同時に添加すると細胞総数がさらに増加し、両者の作用により CD31 強陽性細胞数は相乗的に増加していた (Fig. 4c)。

TPO と VEGF を添加した AC133 陽性細胞において、細胞総数を経時的に観察すると、3 日以降に急激に上昇した (Fig. 5a)。AC133 陽性細胞を単核球から分離した直後は、CD110 (TPO 受容体) は全く発現していなかった (データは示さず)。しかし、培養 3 日後、CD31 陽性、CD110 陽性細胞が末梢血では 1.74%、臍帯血では 1.78% であり (Fig. 5b)、AC133 陽性、CD110 陽性細胞の割合は増加することから、EPC は AC133 陽性細胞から CD110 陽性細胞を経て分化していく可能性が考えられた。

C-1-3. TPO の情報伝達経路

次に AC133 陽性細胞が TPO の刺激を受けた際の情報伝達経路について検討した。Fig. 5 に示すように、AC133 陽性細胞は培養 3 日以降に急激に上昇し、なおかつ培養 3 日目には TPO 受容体を発現しているため、培養 3 日後の細胞を用いた。Fig. 6a に示すように、PI3K/Akt 経路の活性化として重要な Akt の 473 番目のセリンの強いリン酸化が 15 分で観察された。また、TPO は JAK/STAT 経路を活性化することも報告されている。STAT3

の 705 番目のチロシンのリン酸化もやはり Akt と同様に 15 分で観察 (Yamaguchi, et al. 1999、Kanayasu-Toyoda, et al. 1999) されることから、PI3K/Akt 経路と JAK/STAT 経路の両経路を TPO と VEGF で刺激して 15 分後に比較検討した。その結果、Akt の 473 番目のセリンのリン酸化は VEGF より TPO のほうが強く、両者で細胞を同時に刺激するとさらに強いリン酸化が起こった (Fig. 6c)。これは EPC の分化・増殖促進作用に一致している。また、フローサイトメーターによる解析では、Akt のリン酸化は CD31 陽性細胞でも AC133 陽性細胞でも、ともに観察された (Fig. 6b)。一方、STAT3 の 705 番目のチロシンのリン酸化は TPO で刺激した時のみ観察された。PI3K をその阻害剤であるワートマニンで抑制すると、末梢血・臍帯血ともに CD31 強陽性細胞の産生は有意に減少した (Fig. 7)。しかし、その阻害が完全でなく部分的であったことを考えると、EPC 産生促進には PI3K/Akt 経路と JAK/STAT 経路の両経路の活性化が重要と考えられた。また、TPO が VEGF より強い EPC 産生促進作用をもつのは TPO 単独で両経路の活性化ができることが一因であると考えられた。

C-1-4. TPO を用いて分化させた early EPC の特性

AC133 陽性細胞に VEGF 単独あるいは VEGF+TPO を添加して 1 週間培養後、抗 CD45 抗体-FITC で染色してフローサイトメーターで解析したところ、対照群 (VEGF のみ、Fig. 8a 上段) も TPO 処理群 (VEGF+TPO、Fig. 8a 下段) も殆どすべての細胞が白血球共通抗原である CD45 陽性であった。したがって、VEGF 処理した場合も TPO 処理した場合も AC133 陽性細胞から分化する細胞は全て血球系のマーカーを発現しており、我々が以前から報告してきた CD31 強陽性細胞は血球系であることが示された。これに対して、成熟した血管内皮細胞は CD45 陰性であることが知られており、OEC も CD45 陰性細胞がほとんどである (Mukai N. et al. Exp. Cell Res.

314, 430, 2007)。血球系細胞と血管内皮細胞は共通の母細胞 (Hemangioblast) から発生するが、血管内皮前駆細胞と言われる細胞の中でも、early EPC と OEC は分化系統が異なる細胞であることが示唆された。

Early EPC には、血球系に属する単核/マクロファージ系細胞の表面マーカーである CD14 を発現する細胞に由来するものがあると報告されている。そのため、AC133 陽性細胞由来 early EPC の CD14 発現を検討した。しかし、Fig. 8b に示すように、いわゆる transdifferentiation (分化転換) により単核/マクロファージ系から分化する early EPC とは異なり、AC133 陽性細胞由来 early EPC は CD14 陰性であった。このことから、血球系に属する EPC である early EPC には、CD14 陽性と陰性の複数の分化系統に属するものがあると考えられた。

C-2. OEC 誘導に関する解析

C-2-1. 血管内皮細胞用培地に添加される heparin, hydrocortisone の OEC 誘導への影響

OEC は単核球の長期培養により得られる細胞であり、それ自身が管腔を形成し得ることから血管再生療法への応用が期待されているが、その出現頻度は低く、幹細胞が多く含まれる臍帯血由来単核球を用いても、多い場合で、 1×10^7 個の単核球から1個～数個のコロニーが出現する程度である。実際の治療に用いるには、臍帯血より幹細胞の少ない末梢血から確実に OEC を誘導する必要があるため、誘導効率の上昇が必須である。また、長期培養による染色体の変化も懸念されるため、最初に多くの OEC コロニーを得て、少ない継代数で十分な細胞数を得ることが望ましい。

血管内皮細胞の培養には一般的に、基本培地として、MCDB131 の改変培地である Endothelial Basal Media-2 を用い、2% FCS, VEGF, bFGF, R3-IGF1, EGF, ascorbic acid, heparin, hydrocortisone が添加される。添加されるものはいずれも血管内皮細胞の増殖や機能維持に必要であるが、heparin は血管内皮細胞の種類 (由来

する組織) によっては添加しない方が適している場合があり、また、heparin と hydrocortisone には血管新生を抑制する作用があることが知られている。一方、培養による EPC の誘導を初めて報告した Asahara らの方法では、上記の培地添加物から heparin と hydrocortisone を除外したものが用いられている。このような経緯によるものと思われるが、これまでに報告されている OEC に関する論文では、heparin, hydrocortisone の扱いがまちまちである。Heparin も hydrocortisone も細胞の特性に影響を与える生理活性物質であることから、OEC 誘導系における heparin および hydrocortisone の影響について、誘導効率と細胞の特性に与える影響を評価することとした。昨年度の検討により、hydrocortisone が OEC 誘導に抑制的に働くことが示唆されたが、試験したロットが3ロットと十分でなかったため、本年度はさらに5ロットで同様の検討をすることにより、hydrocortisone の効果を確かめた。

Fibronectin でコーティングした 6well プレートに Lymphoprep で調製した単核球画分を播種し、heparin および hydrocortisone の影響を調べるために両者を単独あるいは共に含む培地を調製して培養を行った。培地交換は、培養開始1週間後までは毎日、その後は1週間に2回行った。5つのロットについて、培養開始1ヵ月後までに出現したコロニー数をカウントしたところ、Fig.9 のような結果となり、得られたコロニー数が全体として少なかったものの、hydrocortisone を含まない培地が OEC 誘導に適しているという昨年度の結果を支持する結果が得られた。Hydrocortisone は抗炎症作用を持ち、血管内皮に対しては接着分子の発現を抑制する作用を持つと考えられることから、hydrocortisone 不含培地を用いることで、fibronectin への細胞の接着が強められることにより接着細胞が増えることが誘導効率改善の要因であると考えられる。

C-2-2. CD45 陰性画分を用いた OEC 誘導

OEC の起源となる細胞についてはこれまでの

ところ明確に同定されていないが、CD45 陰性の画分に OEC の起源となる細胞が存在することが報告された (Timmermans F. et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1572, 2007)。CD45 は白血球共通抗原とも言われ、リンパ球と単球には強く発現していることから、単核球画分に含まれるほとんどの細胞は CD45 陽性である。そのため、CD45 陰性画分を用いることにより、夾雑細胞の少ない状態で OEC を誘導することが可能になると考えられた。

一方、これまで、培養開始 1 週間の間は頻りに培地交換をする方がよいという報告を元に、培養上清中に OEC 誘導を抑制する因子が存在することも考え、最初の 7 日間、毎日全量の培地交換を実施していた。しかし、OEC コロニーは培養 well の端に出現することが多いことから、血管内皮の形質を獲得するまでの間は接着が弱く、接着し続けられた細胞が分化・増殖して OEC のコロニーを形成すると考えると、OEC の起源となる細胞が接着細胞の形質を獲得するまでの間、できるだけ静置した状態で培養を続けることが望ましいとも考えられた。そこで、CD45 陰性画分を用いた実験では、弱く接着した細胞が培地交換の際に洗浄されないよう、細胞接着を維持した状態 (培地を全量交換せず、2ml 中 1.5ml を交換) での培養を試みることにした。

その結果、ロットによる差が大きいものの、1 ロットの臍帯血由来の細胞から 100 個以上の OEC コロニーが得られるというこれまでに例のない高い効率で OEC を誘導することができた (Table 1)。

その後の検討で、最適と思われる条件で実験を行っても、誘導される OEC コロニー数に関してロットによる差が非常に大きいことから、現在、OEC を効率よく誘導するための主要因は何であるか、検討を続けているところである。Table 1 の実験では、hydrocortisone を day7 以降に添加することとコロニーの高頻度の出現が相関していたため、hydrocortisone の添加のタイミングが重要である可能性が考えられた。しかし、同一ロ

ットを用いて、hydrocortisone 非添加、添加、day7 以降のみ添加、の 3 群について比較を行ったところ (各 4well)、hydrocortisone 非添加と day7 以降の添加では差がなく、hydrocortisone の day7 以降の添加は OEC 誘導の主要因ではないと考えられた (Fig. 10)。また、CD45 陰性画分を分離する操作を行っているが、回収率が実際の CD45 陰性画分よりかなり高いことから、用いた細胞の CD45 陰性細胞としての純度は高くないと考え、細胞分画と OEC 誘導効率の関連についても検証中である。

C-2-3. OEC 誘導後の培養条件の最適化

昨年度までの検討において、単核球から出現した OEC コロニーを拡大していく際に、早期に増殖が停止するコロニーが高頻度に見られた (Fig. 11a)。培養ディッシュのコーティングタンパク質や継代方法を変更しても改善はみられなかったが、培地に添加する血清を組織由来血管内皮細胞である HUVEC 用に至適化された培地 (EGM-2) に含まれる 2% から 10% に変更することで、拡大の成功率が 12% から 83.3% に改善された (Fig. 11b)。その後の検討でも、10% 血清入り培地ではほぼすべての OEC 株が問題なく拡大できている。

血清濃度の変更が細胞の特性に与える影響を調べるため、2% 血清を含む条件下で継代培養していた OEC 株について、血清濃度を 2%、5%、10%、20% にして培養したところ、2% 血清で培養している細胞では、細胞老化の特徴である増殖停止と細胞の肥大化が最も早く見られ、増殖が停止した細胞では老化マーカーである senescence associated- β -galactosidase の活性染色陽性となった (Fig. 12)。血清濃度 2% で培養している細胞の増殖が停止した時点でも、血清濃度 5% 以上では増殖能が維持された (Fig. 12)。また、膜透過性の亢進した死細胞を検出する 7-AAD による染色で細胞の viability に対する血清濃度の影響を調べたところ、細胞の生存率も血清濃度が高い方がよいという結果となった (Fig. 13)。

細胞の増殖能と機能はしばしば逆相関すると

言われていることから、OEC の機能の指標としてマトリゲル上での管腔形成アッセイにより、OEC の機能に対する血清濃度の影響を調べた。2%、5%、10%、20%の血清濃度で培養した OEC のマトリゲル上での管腔形成能を比較したところ、管腔形成能に顕著な差はなく、培養中の血清濃度は OEC の管腔形成能に影響しないと考えられた (Fig. 14)。

これらの結果に基づき、OEC の拡大培養においては血清濃度を 10%とすることとした。OEC 誘導時の血清濃度については、血清濃度が低い方がよいという報告 (Gulati R. et al. *Circ. Res.* 93, 1023, 2003) に基づき、これまでのとおり 2%としている。

C-2-4. OEC の特性指標の探索

臍帯血単核球の培養により取得した OEC 株 6 種類について、長期培養における増殖特性とマトリゲル上での管腔形成能を評価した (Figs. 15, 16)。Fig. 16 に示すように、組織由来血管内皮細胞であるヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 HUVEC と同程度の管腔形成能を示す株が 1 つ (2R-3-2)、中程度の管腔形成能を示す株が 4 つ (S5, S2-12, S2-22, S2-31)、管腔形成能がほとんどない株が 1 つ (S3) であった。

FACS により血管内皮細胞の代表的なマーカーである CD31、KDR、eNOS の発現を調べたところ、全ての細胞株でその発現が陽性であった (Fig. 17)。管腔形成能を持たない S3 株においても、低いながら CD31、KDR、eNOS の発現は認められた。

これらの OEC 株の中から、管腔形成能が高い 2R-3-2、管腔形成能が中程度の S2-22、管腔形成能が低い S3 を選び、OEC 3 株と HUVEC について、特性指標候補遺伝子の発現比較を行った。用いた 4 種類の細胞のマトリゲル上の管腔形成能について、形成された tube の長さおよび本数を顕微鏡画像解析ソフト AxioVision を用いて顕微鏡の視野 (2.35mm²) ごとに定量した結果を Fig. 18 に示す。

血管内皮細胞に発現している 84 個の遺伝子について、4 種類の細胞における発現量を Real Time PCR により定量比較した。各細胞における β アクチンの発現量と各遺伝子の発現量の比を、HUVEC をコントロールとして比較したところ、細胞の管腔形成能と相関すると考えられる遺伝子が 2 つ (Gene1, 2)、管腔形成能と逆相関すると考えられる遺伝子が 4 つ (Gene3~6)、管腔形成能との相関はないものの HUVEC と比較して OEC で顕著に発現の高い遺伝子が 1 つ (Gene7)、見出された (Fig. 19)。また、Gene7 ほど発現量の差が顕著でないものの、HUVEC に対して OEC3 株で共通して発現が高い遺伝子が他に 7 つ見出された。Gene1, 2, 7 の 3 つは、OEC の特性指標として有用である可能性が高いと考え、OEC の機能との関連を検討中である。

D. 考察

Ex vivo で調製した血管内皮前駆細胞を細胞・組織加工医薬品として用いるための製法・品質関連の課題には、以下のようなものがあると考えられる。

Early EPC 関連

- ・増幅法の確立
- ・CD31 強陽性細胞の分取法の確立
- ・管腔形成促進能の評価系の確立 (OEC との共培養によるアッセイ等)
- ・管腔形成促進能と関連する特性指標の同定
- ・少数の細胞で実施可能な品質試験の開発

OEC 関連

- ・誘導効率の改善
- ・管腔形成能と関連する特性指標の同定
- ・培養期間と細胞特性の関連

本研究ではこれらの課題解決に向けて有用な知見を得ることができた。Early EPC では得られる細胞数が限られていることから、実用化に向けては増幅法が最重要課題である。巨核球の分化増殖因子として知られている TPO が early EPC の

増幅に有効であったという知見は、血液細胞の分化に関する生物学の分野でも重要な発見である。これまでの検討では、TPOにより増幅した early EPC と VEGF 単独で増幅した early EPC の特性に違いは認められておらず、early EPC としての性質を保持した細胞を TPO により増幅することが可能であると考えている。本研究により明らかになった TPO 受容体の発現や TPO への応答性は、early EPC の新たな特性指標としても有用であろう。

CD31 強陽性細胞は高活性な early EPC であり血管再生療法に有用であると考えられるが、CD31 発現を指標とした場合は分取に FACS が必要であるため、臨床応用を考えるとより簡便な方法で分取できることが望ましい。そのため、CD31 強陽性細胞に特異的なマーカーを探索し、同定されたマーカーを利用してマグネティックソーティングにより分取する方法を現在検討中である。

Early EPC では CD31、MCP-1、IL-8、TPO 受容体の発現が特徴的であり、これらが特性指標として有用である可能性を示した。この中でも特に、MCP-1 や IL-8 は細胞遊走促進作用を持つため、early EPC の機能すなわち有効性と関連した特性指標として有用であると考えられる。

Early EPC は現在のところ継代培養ができないため、得られる細胞は貴重である。品質管理試験に用いることのできる細胞に限られるため、特性解析した結果をもとに、少数の細胞で評価が可能な品質試験法を確立することも重要である。

OEC の分化誘導においては、培地交換法と血清濃度という極めて基本的な点での改良ながら、誘導効率と拡大効率を改善することができた。CD45 陰性画分の利用の有用性に関しては、分画された細胞の純度を測定するなど、検討を続けているところである。

最近、OEC の培養中には高頻度に染色体変異が起こることが報告された (Corselli M. et al. *Exp. Hematol.* 36, 340, 2008)。我々の系でも同様のことが起こっているかどうかは確認してい

ないが、培養期間は短い方が染色体変異の懸念は少ない。短い培養期間で臨床上必要とされる細胞数を得るためには、最初に多くのコロニーを得ることが必須である。1つの細胞から 1×10^6 個の細胞が得られる時点では、population doubling level (PDL) は 20 に達している。最初に 100 個のコロニーを得ることができれば、細胞総数が 1×10^6 個になる時点での PDL は 14 である。OEC をヒトに投与した報告はないため、実際に必要とされる細胞数は明らかでないが、マウスの実験では $2 \sim 5 \times 10^5$ 個程度の細胞が投与されている。品質評価の観点からは、継代数に依存した細胞特性の変化を明らかにし、品質面から許容される PDL の範囲を明らかにしていく必要があると考えている。

OEC は均質な細胞であるとされているが、これまで樹立した株を見ていると、出現するコロニーごとに形態が多少異なり、増殖特性や管腔形成能にもばらつきがあるようである。そのため、特性指標としては機能と関連のあるものを選択することが望ましいと考え、管腔形成能の異なる OEC 株の遺伝子発現プロファイルを比較した。管腔形成能との相関がある Gene1,2 および OEC で高発現している Gene 7 は特性指標として有用であると考え、OEC の機能との関連を検討中である。管腔形成能とは相関がないものの、OEC で顕著に発現量が高い Gene7 は、管腔形成能以外の点で、組織由来血管内皮細胞である HUVEC との特性の違いを反映したものである可能性もある。

2007 年は、我が国で初めての細胞・組織加工医薬品である培養皮膚製品の承認、ヒト iPS 細胞の作製成功、ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（案）の公表など、再生医療関係のトピックが相次いだ。我が国では再生医療の臨床研究が盛んに行われているが、その成果を広く一般に提供していくためには、治療効果の期待される細胞を、薬事法の規制下に細胞・組織加工医薬品として開発

することにより、その品質・有効性・安全性を確保することが望ましい。先端的な医療では特に、安全性の点では未知・未経験の要素が多いことから、治療の実施に際して、少なくとも一定の有効性を担保し、リスク・ベネフィットを明らかにする必要がある。有効性のメカニズムが明らかでない血管再生医療ではこの点の課題解決が特に求められていることから、今後、有効性と関連する特性指標の探索を継続していきたいと考えている。

E. 結論

細胞・組織加工医薬品の品質管理において有用な特性指標の探索および品質試験法の開発に関連する研究として、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) TPO が *in vitro* でより効率良く AC133 陽性細胞から early EPC への分化・増殖を促進することを明らかにした。TPO の EPC 分化・増殖促進作用は VEGF よりも強く、TPO と VEGF を AC133 陽性細胞に同時に添加すると EPC は相乗的に増加した。
- 2) AC133 陽性細胞由来 early EPC は TPO 受容体である Mpl を発現していた。TPO と VEGF の細胞内伝達を比較すると VEGF は AKT のリン酸化のみを促進するのに対し、TPO は AKT のリン酸化のみならず、STAT3 のリン酸化も促進した。さらに TPO と VEGF の同時に添加するとそれぞれ単独で添加した場合に比べ、より強い AKT のリン酸化が観察された。以上のことから、TPO は PI3K/AKT と JAK/STAT 経路を介し EPC の分化・増殖を促進していることを明らかにできた。
- 3) TPO への反応性やその受容体である Mpl の発現は、early EPC の新たな特性指標として有用であると考えられた。
- 4) OEC の誘導方法を改良し、昨年度までと比較して高い効率で OEC を誘導することができ

た。ロット間の差を越えて、安定して OEC を得る方法を引き続き検討中である。

- 5) 10% 血清入り培地を利用することで誘導された OEC コロニー拡大の成功率を高めることができ、得られた OEC コロニーを確実に拡大することが可能になった。
- 6) OEC の管腔形成能を反映した特性指標の候補となる遺伝子を 2 つ、管腔形成能との相関はないが、HUVEC と比較して OEC で顕著に発現量の高い特性指標候補遺伝子 1 つを見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表、総説
 - 1) Nana Mukai, Taichi Akahori, Motohiro Komaki, Qin Li, Toshie Kanayasu-Toyoda, Akiko Ishii-Watabe, Akiko Kobayashi, Teruhide Yamaguchi, Mayumi Abe, Teruo Amagasa, Ikuo Morita: A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res.* 314, 430-440 (2008)
 - 2) Toshie Kanayasu-Toyoda, Akiko Ishii-Watabe, Takayoshi Suzuki, Tadashi Oshizawa, and Teruhide Yamaguchi: A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133 positive cells. *J. Biol. Chem.* 282, 33507-14 (2007)
 - 3) 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* 35 (4), 247-257 (2007)
- 4) Kawai H, Suzuki T, Kobayashi T, Ishii-Watabe A, Sakurai H, Ohata H, Honda K, Momose K, Hayakawa T, Kawanishi T. Caspase Cascade Proceeds Rapidly After Cytochrome c Release From Mitochondria in Tumor Necrosis Factor- α -Induced Cell Death. *J Pharmacol Sci.* 103(2), 159-67 (2007)
 - 5) 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)
 - 6) 山口照英、石井明子 細胞・組織加工医薬品の品質と安全性確保への提言 PHARMSTAGE (印刷中)
 - 7) 山口照英、石井明子 次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験について -TGN1412 が薬の開発に与えたインパクト- 毒性質問箱 第10号 p.1-p.33 サイエンティスト社、2007
 - 8) 石井明子、鈴木琢雄、川西 徹、山口照英、早川堯夫 バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保 P.702-718 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、2007
 - 9) 堤康夫、石井明子、早川堯夫 バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保 p.369-378 機能性人工タンパク質 エル・アイ・シー、2007
 - 10) 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 臨床とウイルス 35, 278-290, 2007
- エチン (TPO) の血管内皮前駆細胞(EPC)増幅作用における新しい役割 第7回 日本再生医療学会総会 2008年3月
 - 2) 鈴木浩子、石井明子、豊田淑江、田村悦臣、山口照英: ヒト臍帯血単核球由来 Outgrowth Endothelial Cell の誘導法確立と特性解析 日本薬学会 第128年会 2008年3月
 - 3) 豊田 淑江、石井 明子、鈴木 孝昌、押澤 正、山口 照英: トロンボポエチン (TPO) による、in vitro での血管内皮前駆細胞(EPC)の増幅作用 第80回日本生化学会大会 2007年12月
 - 4) 石井明子、豊田淑江、鈴木琢雄、小林 哲、山口照英: 細胞組織利用医薬品としての血管内皮前駆細胞の誘導法確立と特性解析 第51回日本薬学会関東支部大会 2007年10月
 - 5) 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: カスパーゼ 3,9(8)活性化の単一細胞内同時測定による小胞体ストレスと TNF- α 誘導アポトーシスの比較 バイオイメーキング学会 2007年10月
 - 6) 豊田淑江、石井明子、鈴木孝昌、押澤正、山口照英: トロンボポエチン (TPO) による in vitro での血管内皮前駆細胞 (EPC) の増幅作用 第28回日本炎症・再生医学会 2007年8月

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

2. 学会発表

- 1) 豊田淑江、石井明子、山口照英: トロンボポ

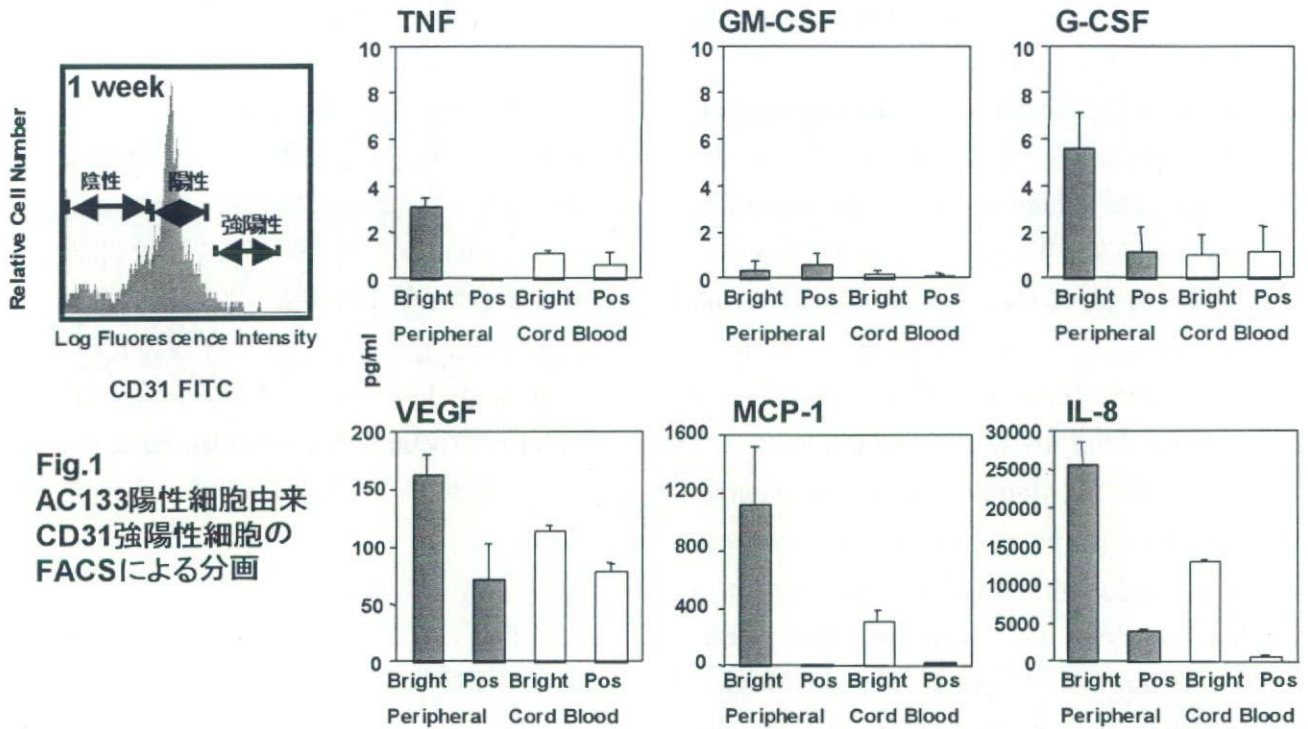


Fig.2 EPCが放出するサイトカインの解析

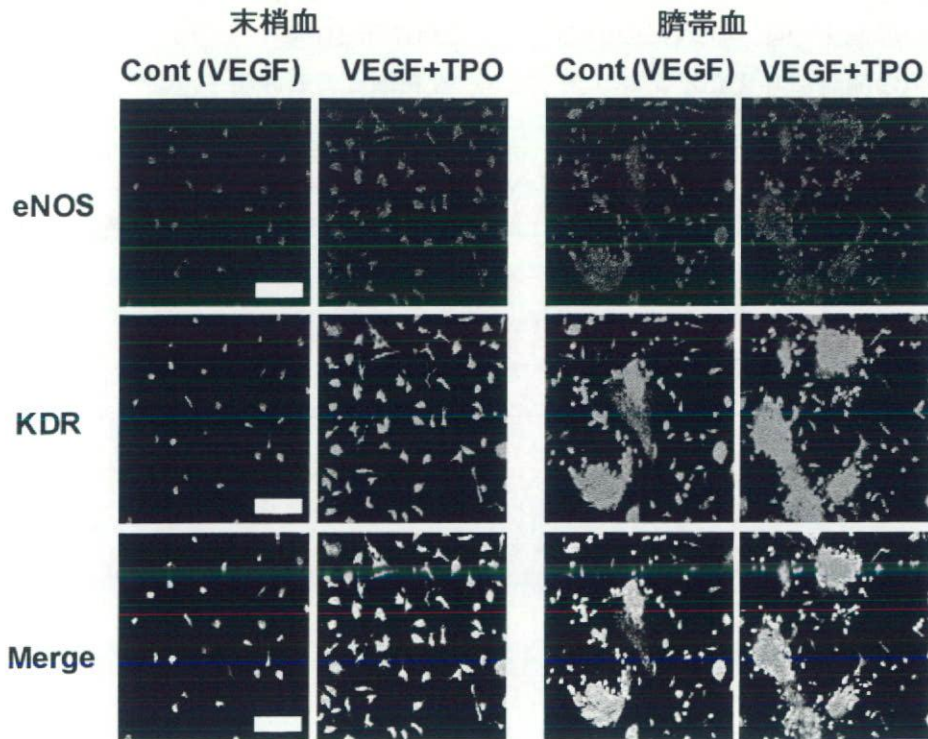
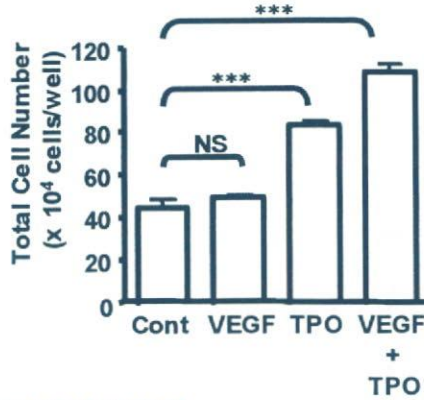
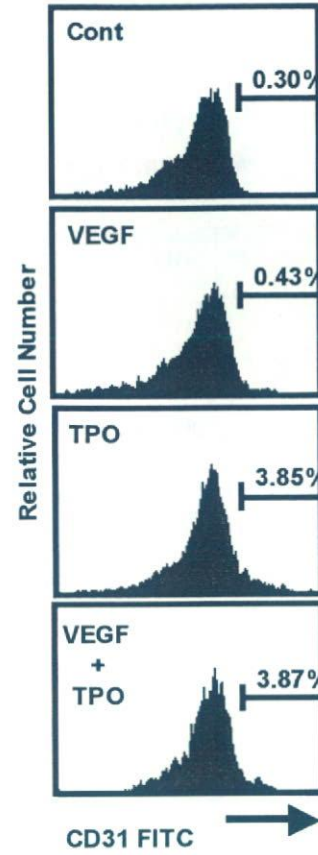


Fig.3 TPOのEPCの増幅作用

a. 細胞総数



b. フローサイトメーターの解析



c. CD31強陽性細胞数

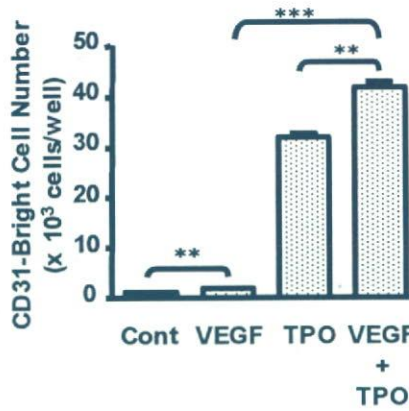
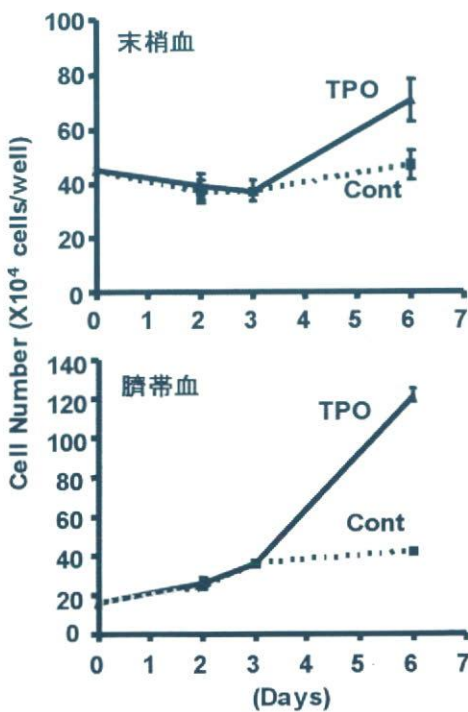


Fig.4 EPC増幅作用におけるTPOとVEGFの比較

a. 細胞総数の経時的変化



b. 3日間培養後のTPO受容体の発現

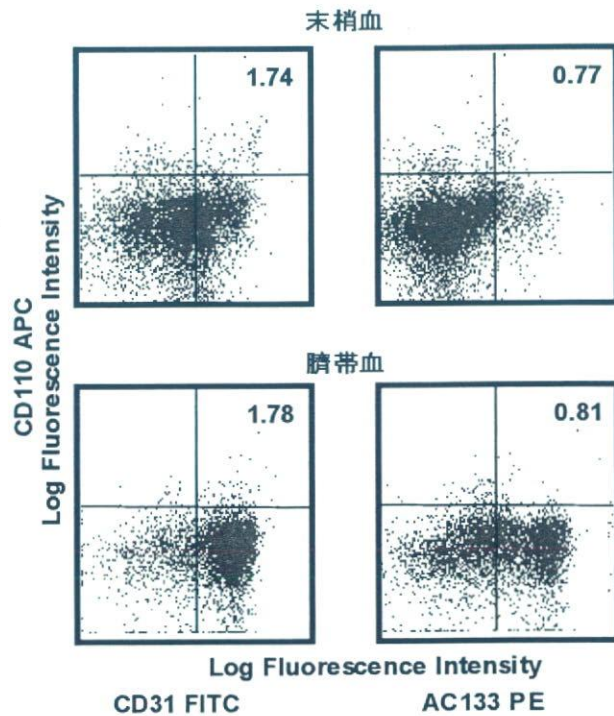


Fig.5 AC133⁺細胞におけるTPO添加によるEPC増幅作用の経時的変化