

現量の高い特性指標候補遺伝子1つを見出した。

C-6 細胞組織利用医薬品の製造方法や規格設定の評価手法の開発に関する研究

C-6-1 未分化細胞の分化能予測マーカーの探索

C-6-1-1 P19 系列細胞の心筋細胞分化

P19 系列細胞の心筋細胞分化を観察した結果、分化誘導処理後、約4日でコンフルエントとなり、約10日で自律拍動する小結節が認められるようになった。この自律拍動する小結節は、時間とともにその数が増え、約16日でその数の増加がプラトーになった。CL6G52は、自律拍動する小結節の出現とともに、GFPの発現が認められた(Fig.117A-C)。小結節の数が、0.016個/cm²以上(6穴細胞培養用マルチウェルプレート1枚につき1つ以上)ある時を「少ない」、0.098個/cm²以上(6穴細胞培養用マルチウェルプレートのウェル1つにつき1つ以上)ある時を「中程度」、157個/cm²以上(顕微鏡視野(×200)を1面につき1つ以上)ある時を「多い」と定性的に定義し、それぞれを1、2、3とした場合、分化誘導後の自律拍動する小結節数の時間変化は細胞株により異なっていた(Fig.117D)。

C-6-1-2 分化誘導後の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現

各細胞株の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を比較するために、分化誘導した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種類の細胞からtotal RNAを抽出し、定量リアルタイム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。このことにより、細胞株の違いによって心筋細胞特異的マーカー発現の時間経過や発現量に相違があることが確認された(Fig.118)。

心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現を心筋細胞分化と関連付けて解釈する際、個々の心筋細

胞特異的マーカー遺伝子の発現量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、得られた多くのデータをよりわかりやすくするために主成分分析し、これによって産出された主成分から細胞株による分化の違いについて比較検討した。心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現量を主成分分析したところ、寄与率63%の第1主成分と寄与率17%を説明する第2主成分が算出された(Fig.119)。寄与率と変量プロットを見ると、資料の本質の約63%を説明する第1主成分は全ての変量の係数が正であり、資料の本質の約17%を説明する第2主成分は心筋細胞分化の比較的初期に発現が見られる心筋細胞特異的マーカー遺伝子の係数が負に、比較的後期に見られる心筋細胞特異的マーカー遺伝子の係数が正に出ている(Fig.119AおよびB)。個々のサンプルにおける各心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現を統合して主成分得点として表すと細胞株による心筋細胞への分化能の違いがより明確に見られるようになった(Fig.119CおよびD)。

C-6-1-3 心筋細胞分化能と相関関係の認められた遺伝子の検出

P19細胞とCL6細胞、Neomycin耐性遺伝子を含むCL6細胞サブラインのCL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52の6種類について、①分化誘導後の心筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現の第1主成分の最大値、②第2主成分の最大値、③自律拍動する小結節出現までの日数および④出現した自律拍動する小結節の数、の4項目について、GeneChipの遺伝子発現シグナルとの間のスピアマンの順位相関とその有意確率を算出し、心筋細胞分化と相関する遺伝子を探索した。その結果、第1主成分、自律拍動する小結節出現までの日数、出現した収縮小結節の数の3項目が発現シグナル値と相関するプローブセットが24個検出された(Table 15)。これには、第2主成分と有意に相関するものも含まれていた。

C-6-1-4 CMP 遺伝子発現阻害と心筋細胞分化効率

RNAi を行うことで、各 CMP 遺伝子をノックダウンし、心筋細胞分化効率への影響を検討した。実際に各遺伝子が RNAi によりノックダウンされていることを確認するために、定量性リアルタイム RT-PCR でノックダウン効率を測定した。その結果、ネガティブコントロールと比較して、CMP1 で 45%、CMP2 で 13%、CMP3 で 43%、CMP4 で 45%、CMP5 で 27%、CMP6 で 19%、CMP7 で 30%、CMP8 で 25%、CMP9 で 15%、CMP10 で 12%、CMP11 で 86%、CMP12 で 51%、CMP13 で 51%、CMP14 で 60%、CMP15 で 37%、CMP16 で 53%、CMP17 で 19%、CMP18 で 35%、CMP19 で 28%、CMP20 で 46%、CMP21 で 55%、CMP22 で 86%、CMP23 で 29%、CMP24 で 34%まで発現を抑制することができた。t 検定の結果、11、19、22 を除く 19 個の CMP 遺伝子で有意な発現の抑制が認められた(Fig.120)。

CMP 遺伝子のノックダウンにより心筋細胞分化にどのような影響が出るかを、自律拍動する小結節数および心筋細胞特異的のマーカ遺伝子 4 種類を測定することによって検討した。まず、自律拍動する小結節数を測定した結果を Fig.121 に示す。Two-Way Repeated Measures ANOVA で検定した結果、CMP1、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP9、CMP10、CMP13、CMP18、CMP24 のノックダウンにより、ネガティブコントロールと比較して有意な小結節数の減少が認められた。逆に、CMP7、CMP12、CMP16、CMP17、CMP21、CMP23 では有意な増加が認められた。また、CMP8、CMP14、CMP15、CMP20 では有意な変化が認められなかった。次に、分化誘導後 14 日目における、心筋細胞特異的のマーカ遺伝子を測定した結果を Figs.122-125 に示す。t 検定の結果、 α MHC では、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP10、CMP13、CMP18 で有意な減少が、CMP12、CMP23 で有意な増加が認められた。 β MHC では、CMP2、CMP13 で有意な減少

が、CMP16、CMP17、CMP23 で有意な増加が認められた。MLC2a では、CMP2、CMP4、CMP8、CMP10、CMP20、CMP23 で有意な減少が、CMP16 で有意な増加が認められた。MLC2v では、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP10、CMP13 で有意な減少が、CMP7、CMP12、CMP16、CMP23 で有意な増加が認められた。これらの結果をまとめたものを、Table 16 に示す。

C-6-2 細胞組織利用医薬品の品質特性の探索

C-6-2-1 GeneChip解析のアーチファクトの評価

GeneChipを用いた実験における測定アーチファクトには3種類ある。すなわち、「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」、「測定機器の検出限界未満のノイズ」、および「測定機器由来のシグナルのばらつき」である。

C-6-2-1-1 非特異的なハイブリダイゼーション

「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」を評価する方法として、GeneChipおよびGCOSプログラムによる“Absolute Analysis”の結果を採用した。“Absolute Analysis”はGeneChipの各プローブセットに対応する転写産物が実際に発現しているか否かを、プローブセット内のパーフェクトマッチプローブ由来蛍光シグナルと mismatch プローブ由来蛍光シグナルとを比較することにより、定性的に判定する解析である。判定は“Present”、“Marginal”または“Absent”として出力される。本研究では、検討した6ロットで“Present”の判定が認められないプローブセットの蛍光シグナルを、非特異的なハイブリダイゼーションによるものと判断した。

C-6-2-1-2 検出限界

いかなる測定系にも検出限界が存在する。普段あまり省みられることはないが、GeneChipとスキャナーを用いた測定系も例外ではない。ISOお

よびIUPACの定義に基づくICHの定義によれば、検出限界は、

$$L_c=3.3x_{sm}/a (>検出不可可能) \dots①$$

とされる。 L_c は「濃度推定値の検出限界」、 s_m は測定値の標準偏差、 a は検出限界付近の検量線の傾きである。「測定値の検出限界」を $L_m (=axL_c)$ とすると、

$$L_m=3.3x_{sm}$$

となるので、測定値のCV値を CV_m とすれば①式は以下の②式のように書き換えることができる。

$$CV_m=s_m/L_m=0.3 (<検出不可可能) \dots②$$

つまり、「測定値の検出限界」とは、測定値のCV値(CV_m)が0.3となる点を指すことになる。

使用した6ロットのhMSC(継代数7)の中の1つから合成された単一のcRNAサンプルを用いて、繰り返し測定を行った結果をFig.126に示す。同一サンプルの繰り返し測定における測定値の標準偏差は、平均値が増加するに従って増加する傾向が認められた(Fig.126a)。これとは対照的に、CV値は平均値が増加するに従って減少する傾向が認められた(Fig.126b)。Fig.126cはFig.126bのグラフの横軸を線形目盛りとし、平均値の低い部分を拡大したものである。これから判断すると、 CV_m の移動平均値(100データ)が0.3を通過するのは測定シグナルが60のときであることが明らかとなった。同一ロットの継代数9のサンプルを繰り返し測定した場合も同様の結果が得られた(データ省略)。

C-6-2-1-3 測定機器由来のばらつき

いかなる測定機器から得られた観測値にも必ず測定誤差が含まれるのは不可避である。複数のサンプルを測定する場合の観測値の標準偏差を

SD_m 、このうちサンプル由来の標準偏差を SD_s 、測定機器由来の標準偏差を SD_a とした場合、以下の③式が成り立つ。

$$SD_m^2=SD_s^2+SD_a^2 \dots③$$

単一サンプルを繰り返し測定した場合には、サンプル由来の標準偏差がないと仮定できるので、観測値の標準偏差はそのまま測定機器由来の標準偏差と考えてよい。Fig.127aはFig.126aのグラフの縦軸と横軸を両対数目盛りでプロットしなおしたものである。Fig.127aより、検出限界以上の平均値に関しては、「測定機器由来の標準偏差の対数」が「平均値の対数」と比例関係にある傾向が明らかとなった。この比例関係をさらに見やすくするために、「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数の比」を「平均値の対数」についてプロットしたのがFig.127bである。Fig.127bより、「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」は平均値に依らず一定である傾向がより明らかとなった。しかし、「平均値の対数」に対する「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」の分布が平均値を挟んで対称な分布を示している保証はまだない。そこで、「平均値の順位」に対する「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」をプロットすると、長方形の分布が得られた(Fig.127c)。即ち、「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」の分布は平均値を挟んで対称であることが明らかとなった。この結果から、検出限界以上では「測定機器由来の標準偏差の対数と平均値の対数との比」は平均値に依らず一定であると判断できる。つまり、単一サンプルを繰り返し測定した場合の測定機器由来の標準偏差(SD_a)と平均値(Mean)との間には、

$$\log[SD_a]/\log[Mean]=C(\text{constant})$$

の関係が成立する。すなわち、

$$SD_d = \text{Mean}^C \quad \dots \textcircled{4}$$

となり、 SD_d はシグナルの平均値の関数として近似できる。従って、サンプル由来の標準偏差は、③式に④式を導入することにより、

$$SD_s = (SD_m^2 + \text{Mean}^{2C})^{1/2} \quad \dots \textcircled{5}$$

によって観測値から算出できる。なお、同一ロットの継代数9のサンプルを繰返し測定した場合も同様の結果が得られた（データ省略）。

C-6-2-1-4 アーチファクト除去の効果

複数ロット間の遺伝子発現のばらつきについてのGeneChip解析を行う際に、以上の結果に基づいて、アーチファクトの除去を行った。すなわち、「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」を除去するために、「Absolute Analysis」の結果、検討したどのロットからも「Present」の判定が得られなかったプローブセットをその後のオントロジー解析から除外した。「測定機器の検出限界未満のノイズ」を除去するためには、測定した複数ロットのシグナルの平均値が60 ($CV_m=0.3$) 未満のプローブセットをオントロジー解析から除外した。今回の6ロットのhMSCの遺伝子発現解析では、上記2条件のいずれかのために棄却されたプローブセットは全54,675個の60%で、解析に適すると判断されたプローブセットは全体の40%であった。また、「測定機器由来のシグナルのばらつき」を除去するために、CV値を算出する際には観測値の標準偏差 (SD_m) ではなく、⑤式によるサンプル由来の標準偏差 (SD_s) を採用した。

複数ロット間の遺伝子発現のばらつきを評価する上で、3種のアーチファクトが及ぼす影響を評価するために、各アーチファクトを考慮した場合と考慮しない場合とで、CV値の順位を比較した。CV値のプローブセット上位1000に含まれる

プローブセットの共通性を見ると、「GeneChipに対する非特異的なハイブリダイゼーション由来のシグナル」および「測定機器の検出限界未満のノイズ」のCV値に与える影響が大きいことが明らかとなった (Fig.128)。

C-6-2-2 ばらつきの大きな生理機能

培養された複数ロットのhMSCにおいて発現のばらつきが大きい遺伝子が、どのような生理機能と関連しているかを検討するために、GOTMを用いた遺伝子オントロジー解析を行った。3種のアーチファクトを考慮したうえで、まず6ロット（継代数7）のCV値上位1,000位までのプローブセットを抽出した。同様にして継代数9の細胞についても上位1,000位までのプローブセットを抽出した。継代数7と9のCV値上位1,000位のリストに共通して含まれるプローブセット、即ち継代数によらずに大きなばらつきを示すプローブセットは428セットであった。この428プローブセットについて、GOTMを用いてGene Ontology Treeを描出し、GeneChip全体のオントロジー解析結果と比較して有意 ($P<0.01$) に濃縮の見られる生理機能を探索した (Fig.129)。その結果、「Biological Process」に関しては、「development」、「pregnancy」、「circulation」、「defence response」等のオントロジークラスターが検出された (Fig.129a)。また、「Molecular Function」に関しては、「carbohydrate binding」、「carbocyclic acid binding」、「phospholipid binding」、「growth factor binding」、「structural molecule activity」等のオントロジークラスターが検出された (Fig.129b)。「Cellular Component」については、「soluble fraction」、「RNA polymerase complex」、「extracellular matrix」等のオントロジークラスターが検出された (Fig.129c)。

次に、有意 ($P<0.01$) に濃縮の見られる「Biological Process」中のオントロジークラスターについて、Fig.130のようにして、クラスター

一間の相関を検討した。その結果、スピアマンの相関係数の有意水準 (P値) を0.1%として評価した場合、Table 17のような結果となり、様々なクラスターと有意な相関を示すクラスターだけでなく、“blood pressure regulation”のように他のクラスターとの相関が認められない、すなわち独自のばらつきを示すクラスターが存在することが明らかとなった。

C-6-3 細胞組織利用医薬品の製造方法や規格設定の評価手法の開発に関する研究についての考察

C-6-3-1 未分化細胞の分化能予測マーカーの探索

C-6-3-1-1 心筋細胞分化能と相関する遺伝子

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をとして定量性リアルタイム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スピアマ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 15 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。

C-6-3-1-2 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、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 16 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 15 と Table 16 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ことが示唆され、心不全の治療に有用な情報と考えられる。

C-6-3-2 細胞組織利用医薬品の品質特性の探索

細胞組織加工医薬品の品質管理上の大きな問題として、意図した薬効以外の品質特性の把握が困難であることが挙げられる。トランスクリプトームをはじめとする、いわゆる”Omics”は、細胞の表現型や遺伝子型を網羅的俯瞰することが可能なツールとして、創薬ターゲット探索、バイオマーカー探索や遺伝子多型解析等、先端医薬品開発の各方面で利用されており、本研究中の心筋細胞分化活性バイオマーカーの探索においても、そ

の有用性が明らかとなった。しかし、細胞組織加工医薬品の品質管理を目的として直接“Omics”を利用する試みも、あるいは、原料・製造工程もしくは製品の品質管理に必要な品質特性を探索する手段として間接的に“Omics”を利用する試みもあまり見られていない。これは“Omics”が依然として高価なアプローチであるという費用的な問題点、および様々なプラットフォーム間のデータの標準化方法が確立されていない点によるところが大きい。しかし、トランスクリプトームをはじめとして、“Omics”のコストパフォーマンスは改善され続けており、またマイクロアレイデータの標準化の試みも米国を中心に進行中である。こういった現状および将来の動向を見据えた上で、品質評価および品質特性探索における“Omics”の有用性が一旦確立されれば、その応用は急速に広がっていく可能性がある。米国FDAは既に2006年より、Critical Path Initiativeの活動の一環として、生物製剤を製造するために用いられる細胞(cell substrate)の品質評価のためのマイクロアレイ利用法について、研究を開始している。その流れは近い将来細胞組織加工医薬品の品質管理にも波及する可能性が高い。

創薬ターゲット探索やバイオマーカー探索を目的とした、いわば「標的遺伝子探索」のためのトランスクリプトーム解析と、品質特性探索を目的とした、いわば「製品間のばらつき探索」のためのトランスクリプトーム解析との間の大きな違いは擬陽性シグナルの取り扱い方にある。トランスクリプトーム解析を用いた「標的遺伝子探索」における擬陽性シグナルは、定量性RT-PCR、RNAiなどの他の様々な方法によってその真偽を再確認することが可能であるため、ある程度許容できる。一方、「製品間のばらつき探索」のためにトランスクリプトーム解析を行う場合には、擬陽性シグナルは可能な限り回避しなければならない。その理由は、シグナルの平均値が低い遺伝子については、CV値(=標準偏差/平均値)が自ずと大きくなる傾向があるからである。つまり、

アーチファクト評価をより慎重に行う必要がある。そこで今回、本分担研究において、GeneChipを用いた実験における3種の測定アーチファクトについて検討を行った結果、測定機器の検出限界および測定機器由来誤差は単一サンプルの繰り返し測定により算出可能であることが明らかとなった。また、CV値の評価には「非特異的ハイブリダイゼーションによるシグナル」と「検出限界以下のノイズ」を除去することが重要であること、また同時に、3種の測定アーチファクトのなかでも「測定機器由来のシグナルのばらつき」は比較的影響が少ないことも明らかとなった。

遺伝子オントロジー解析を行った結果、6ロットのCV値の高いプローブセットについて、有意に関連性高いオントロジーが検出された。“development”や“defence response”およびその下位の階層のオントロジーがばらつきの大きい生理機能として検出されたことは、hMSCの再生医療および移植医療における用途を考慮した場合に重要である。次に、検出されたオントロジークラスター間の相関を、主成分分析による第一主成分の算出、および各ロットの第一主成分のスピアマン順位相関係数の算出によって評価した。相関係数として順位相関を選択した理由は、クラスター間の相関は必ずしも線形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。

オントロジークラスター間の相関関係の評価は、意図した薬効が予期せぬハザードと関連している可能性を吟味する上で重要と考えられる。たとえば、今回の結果では、hMSCにおいてばらつきの大きい生理機能と考えられる“immune response”が別のばらつきの大きい生理機能“coagulation”と有意に関連していることが示唆された。したがって、hMSCの免疫調節機能を

応用した医薬品においては血液凝固関連への影響も吟味する必要がある可能性がある。また、オントロジ―“blood pressure regulation”も関連遺伝子の発現のばらつきの大い生理機能として検出されたが、このオントロジークラスタ―は他どのクラスタ―とも相関しない、いわば孤立したクラスタ―であった。すなわち、このオントロジ―に関する細胞表現型のばらつきについては、ほかの生理機能のばらつきから類推することが困難であり、特別に試験系を構築して評価する必要がある可能性があると考えられる。

C-6-4 細胞組織利用医薬品の製造方法や規格設定の評価手法の開発に関する研究についてのまとめ

細胞の心筋分化活性の指標となるマーカーの探索はこれまでも国内外で盛んに行われている。心筋分化活性の指標となるマーカーは、高い心筋分化能を有する未分化細胞を分離する技術、さらには特異的かつ効率的な心筋細胞分化誘導技術への応用につながる。しかしながら、未分化段階も含めた分化過程において用いる、細胞の心筋分化活性の指標となるマーカーは依然として存在していない。従来の研究では、未分化細胞に対して心筋分化誘導刺激を施した後、分化過程の初期に発現が変動する遺伝子を探索する手法が取られていた。このため、得られたマーカーは「既に開始してしまった心筋細胞分化の初期過程」のマーカーではあっても、分化誘導前の「未分化細胞が有する心筋細胞への分化活性」についてのマーカーではない。心疾患の適切な治療のためには、未分化細胞の品質評価および心筋分化能の高い未分化細胞の分離が必要とされる。したがって、未分化段階も含めた分化過程において、細胞の心筋分化活性の検出に用いることが可能なマーカーが依然として求められている。本研究において筆者らは、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。先端医薬品である細胞治療薬の品質と再生医療の有効性・安全性を確保するのはフロンティア領域であるがゆえに未知の要素が多く単純ではない。重症心不全に対するより良い治療法の確立のために本研究の進展を含め、今後さらなる多角的な研究が必要とされる。

また、「細胞組織利用医薬品の品質特性の探索」に関しては、本研究により、トランスクリプトーム解析は細胞組織加工医薬品の品質のばらつきの所在、即ち品質特性の候補を同定するツールとして有用であること、およびその際にはサンプル以外に由来する誤差を慎重に吟味することが重要であることが示唆された。本研究のようなトランスクリプトーム解析によって同定された品質特性候補が真の品質特性であるか否かの評価には、遺伝子オントロジ―解析で検出された生理機能において実際にばらつきが存在することを生理学的実験によって示し、そのばらつきが製品の有効性および安全性と関連するか否かに関してさらなる検討を加えていく必要がある。

C-7 おわりに

本研究では当初計画に見合った成果が得られた部分は数多い。しかし、がん細胞由来細胞株や動物細胞株など、モデル系での評価にとどまっている研究もある。そのような研究に関しては、製品として臨床応用されるヒト細胞を用いた評価

を行う必要がある。また、免疫原性評価のための動物モデル開発に関してはまだ基盤技術が完成した段階(基礎的な技術検討段階)であり、更なる進展が望まれる。細胞組織利用医薬品の開発は急速に進んでいるが、その恒常的な品質・安全性・有効性を担保するための製造方法の妥当性の確認や、特性解析データ等に基づいた規格試験法の設定については依然として未知・未経験な要素が多い。細胞組織利用医薬品の安全性・品質確保のためには、さらなる高感度ウイルススクリーニング法の開発や高感度腫瘍原性検出法の開発等を通じ、製造方法の評価法および規格試験法に盛り込むべき純度・細胞特性・生物活性等について、より深い検討が必要と考えられる。

D. 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。

E. 研究発表

1. 論文発表

Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Kato TA, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K. Nitrogen-substitution effect on in vivo mutagenicity of chrysene. *Mutat Res*, 586, 1-17. (2005)

Kawakami T, Hoshida Y, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ikenoue T, Obi S, Sato S, Teratani T, Shiina S, Kawabe T, Suzuki T, Hatano N, Taniguchi H, Omata M. Proteomic analysis of sera from hepatocellular carcinoma patients after radiofrequency ablation treatment. *Proteomics*. 16, 4287-4295. (2005)

Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa T, Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Sato Y, Sawada J, Inoue K, Shudo K, Ohno Y, Yamaguchi T. HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 as detected by surface plasmon resonance. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005 94:303-9.

Akira HARAZONO, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Glycobiology*. 15, 447-462 (2005)

Kayoko TAKAGI, Reiko TESHIMA, Haruyo OKUNUKI, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA, Yuichi KOHNO, Atsuo URISU, and Jun-ichi SAWADA: Kinetic analysis of peptide digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential pepsin fragments, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 136, 23-32 (2005)

Jin YUAN, Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1067, 145-152 (2005)

Hideki TAGAWA, Yasuhiko KIZUKA, Tomoko IKEDA, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Hidetake KURIHARA, Maristela Lika ONOZATO, Akihiro TOJO, Tasuo SAKAI, Toshisuke KAWASAKI Shogo OKA, and: A

non-sulfated from of the HNK-1 carbohydrate is specifically expressed in mouse kidney, *J. Biol. Chem.*, 280, 23876-23883 (2005)

Makoto HIRANO, Bruce Yong MA, Nana KAWASAKI, Kazumichi OKIMURA, Makoto BABA, Tomoaki NAKAGAWA, Keiko MIWA, Nobuko KAWASAKI, Shogo OKA, Toshisuke KAWASAKI: Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteases meprin α and β , *J. Immunol.*, 175, 3177-3185 (2005)

Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Glycomic/glycoproteomic analysis by LC/MS: Analysis of glycan structural alternation in the cells. *Proteomics*, 5, 4665-4672 (2005)

Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Akira HARAZONO, Noritaka HASHII, Yukari MATSUIISHI, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/ multiple tandem mass spectrometry. Analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1094, 105-1017 (2005)

Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Akira HARAZONO, Noritaka HASHII, Yukari MATSUIISHI, Takao HAYAKAWA, and Toru KAWANISHI: Mass spectrometry of glycoprotein, *Trends in Glycosci. Glycotech.* 17, 193-203 (2005)

川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫: 糖タンパク質の質量分析, 「糖鎖科学の新展開」 谷口直之, 伊

藤幸成監修, エヌ・ティー・エス, 東京 pp69-75, (2005)

Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Akira HARAZONO, Yukari MATSUIISHI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: N-linked oligosaccharide analysis by liquid chromatography with graphitized carbon column/ liner ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes, *J. Chromatogr. A*, 1103, 296-306 (2006)

Akira HARAZONO, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Noritaka 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)

Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Akira HARAZONO, Yukari MATSUIISHI, Takao HAYAKAWA and Toru KAWANISHI: Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography/multiple-stage tandem mass spectrometry, *Rapid commun. Mass spectrom.*, 19, 3315-3321 (2005)

川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 川西 徹: LC/MS を用いたグライコーム解析, *臨床化学*, 34, 309-318 (2005)

川崎ナナ: LC/MSⁿによる糖タンパク質糖鎖の解析, 未来を拓く糖鎖科学. 永井克孝監修, 20-21, 金芳堂 (2005)

- Kawabata K, Sakurai F, Koizumi N, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. *Mol Pharm.* 2006;3:95-103.
- Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors: comparison of promoter activities. *Gene Ther.*, 12, 1424-1433 (2005)
- Tamehiro N, Sato Y, Suzuki T, Hashimoto T, Asakawa Y, Yokoyama S, Kawanishi T, Ohno Y, Inoue K, Nagao T, Nishimaki-Mogami T, Riccardin C: a natural product that functions as a liver X receptor (LXR) α agonist and an LXR β antagonist. *FEBS Lett.* 2005; 579: 5299-304.
- Sato Y, Nakamura R, Satoh M, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Nagao T, Ohno Y. Thyroid hormone targets matrix Gla protein gene associated with vascular smooth muscle calcification. *Circ Res.* 2005; 97: 550-7.
- Nishida M, Tanabe S, Maruyama Y, Mangmool S, Urayama K, Nagamatsu Y, Takagahara S, Turner JH, Kozasa T, Kobayashi H, Sato Y, Kawanishi T, Inoue R, Nagao T, Kurose H. G α 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2005; 280: 18434-41.
- Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Hyuga M, Kawanishi T, Hayakawa T. Glycomic/glycoproteomic analysis by liquid chromatography/mass spectrometry: analysis of glycan structural alteration in cells. *Proteomics.* 2005;5:4665-72.
- Shingo NIIMI, Mizuho HARASHIMA, Masaru GAMOU, Masashi HYUGA, Taiichiro SEKI, Toyohiko ARIGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Expression of Annexin A3 in Primary Cultured Parenchymal Rat Hepatocytes and Inhibition of DNA Synthesis by Suppression of Annexin A3 Expression Using RNA Interference, *Biol. Pharm. Bull*, 28, 4242-428 (2005)
- Hiroshi. Kawai, Takuo Suzuki, Tetsu Kobayashi, Haruna Sakurai, Hisayuki Ohata, Kahzuo Honda, Kazutaka Momose, I Namekata, Hikaru Tanaka, Koki Shigenobu, Ryu. Nakamura, Takao Hayakawa, and Toru Kawanishi; Simultaneous real-time detection of initiator- and effector-caspase activation by double FRET analysis. *J. Pharmacol.Sci.* 97: 361-368 (2005)
- Niimi, S., Harashima, M., Takayama, K., Hara, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T. and Hayakawa, T: Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells, *J Biochem (Tokyo)*, 137, 579-586 (2005)
- 川西 徹: バイオロジクスのトランスレーショナルリサーチ *日薬理誌* 126, 427 (2005)
- 新見伸吾、原島瑞、川西徹 早川堯夫、抗体医薬の現状と展望 *医薬品研究* 36, 163-193 (2005)

新見伸吾、原島瑞、日向昌司、野間誠司、川西徹
早川堯夫、肝幹細胞に関する研究の現状と肝疾患
の細胞治療への応用の展望 *医薬品研究* 36,
481-496 (2005)

Iwata A, Yamaguchi T, Sato K, Yoshitake N,
Tomoda A. Suppression of proliferation of
poliovirus and porcine parvovirus by novel
phenoxazines, 2-amino-4,4 alpha-dihydro-4
alpha-7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one and
3-amino-1,4 alpha-dihydro-4
alpha-8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one. *Biol
Pharm Bull* 2005;28:905-7.

Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, Koizumi
N, Kawabata K, Yamaguchi T, Nakagawa S,
Watanabe Y, Mayumi T, Hayakawa T RNA
interference of PPARgamma using
fiber-modified adenovirus vector efficiently
suppresses preadipocyte-to-adipocyte
differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene*
2005;348:157-65.

Yamamoto Y, Akita Y, Tai S, Fukasaku S,
Yamaguchi T, Oshizawa T, Yamaoka K,
Shimamura M, Hazato T. Two-dimensional
electrophoretic analysis of disease-associated
proteins in human cerebrospinal fluid from
patients with rheumatoid arthritis *J
Electrophoresis* 2005;49:23-27

Kawabata K, Sakurai F, Yamaguchi T,
Hayakawa T, Mizuguchi H. Efficient gene
transfer into mouse embryonic stem cells with
adenovirus vectors. *Mol Ther.* 2005;12:547-54.

Mizuguchi H, Xu ZL, Sakurai F, Kawabata K,
Yamaguchi T, Hayakawa T. Efficient regulation
of gene expression using self-contained

fiber-modified adenovirus vectors containing
the tet-off system. *J Control Release.*
2005;110:202-11.

Xu ZL, Mizuguchi H, Sakurai F, Koizumi N,
Hosono T, Kawabata K, Watanabe Y,
Yamaguchi T, Hayakawa T. Approaches to
improving the kinetics of adenovirus-delivered
genes and gene products. *Adv Drug Deliv Rev.*
2005;57:781-802.

水沢左衛子, 岡田義昭, 堀内善信, 田中建志, 佐
藤功栄, 金子健二, 佐々木祐子, 田中利明, 伴野
丞計, 友水健雄, 速水照一, 土方美奈子, 平子一
郎, 真弓忠, 三上貢一, 三代俊治, 宮本誠二, 牟田
健吾, WeimerThomas, GiermanTodd, 小室勝利
and 山口照英 (2005). C型肝炎ウイルス RNA の
遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製.
日本輸血学会雑誌, 51, 515-519.

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)

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)

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)

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)

山口照英: 医薬品各条の改正点—生物薬品. *薬局*, 57, 89-95 (2006)

内田恵理子、川崎ナナ、宮田直樹: 薬の名前 ステムを知らば薬がわかる 第5回、*Pharm Tech Japan*, 22 (13), 2483-2491 (2006)

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 (Muta™Mouse). *Genes and Environment*, 28: 68-73, 2006.

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.

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*, 2007;17:411-22.

Nana Kawasaki, Satsuki Itoh and Toru Kawanishi: LC/MS strategies in the characterization of glycoproteins, *Encyclopedia of mass spectrometry*, Vol. 8: Hyphenated, Editor Wilfried M. A. Gross & Richard M. Caprioli, Methods, Elsevier Science, Oxford,

923-930 (2006)

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) 308-329

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)

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)

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)

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)

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)

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 pheochromocytoma PC12 cells. *Mol Pharmacol* 2006;70:319-28.
- 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- Ng MK, Wu J, Chang E, Wang BY, Katzenberg-Clark R, Ishii-Watabe A, Cooke JP. A central role for nicotinic cholinergic regulation of growth factor-induced endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(1):106-12.
- 山口照英
ヒト細胞治療薬の品質と安全性確保について。
Bio Clinica. 2007;27:67-74.
- Ishii-Watabe A, Kanayasu-Toyoda T, Suzuki T, Kobayashi 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.* 2007;35(4):247-57.
- Yamaguchi T, Uchida E. Regulatory aspects of oncolytic virus products. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007;7(2):203-8.
- Sakurai F, Kawabata K, Mizuguchi H. Adenovirus vectors composed of subgroup B adenoviruses. *Curr Gene Ther.* 2007;7(4):229-38.
- 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 2007;22(2):148-54.

山口照英、内田恵理子

日米EU医薬品規制調和国際会議遺伝子治療専門家会議の活動と遺伝子治療薬の規制における国際動向。

Drug Delivery System 2007;22-6:651-9.

Sakurai F, Akitomo K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H.

Downregulation of human CD46 by adenovirus serotype 35 vectors.

Gene Ther. 2007;14(11):912-9.

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. 2007;14(21):1525-33.

Watanabe T, Tobe K, Nakachi Y, Kondoh Y, Nakajima M, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Maeda S, Tadakuma A, Sakurai M, Arai Y, Hyogo A, Hoshino M, Tashiro T, Ito H, Inazumi H, Sakaki Y, Tashiro H, Furihata C.

Differential Gene Expression Induced by Two Genotoxic N-nitroso Carcinogens, Phenobarbital and Ethanol in Mouse Liver Examined with Oligonucleotide Microarray and Quantitative Real-time PCR.

Genes and Environment. 2007;29:115-27.

Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, Yamaguchi T.

A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133-positive cells.

J Biol Chem. 2007;282(46):33507-14.

Nishida M, Onohara N, Sato Y, Suda R, Ogushi M, Tanabe S, Inoue R, Mori Y, Kurose H.

Galpha12/13-mediated up-regulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation.

J Biol Chem. 2007;282(32):23117-28.

Kanayasu-Toyoda T, Suzuki T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T, Yamaguchi T.

Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase Ciota in neutrophilic differentiation cells.

J Cell Physiol. 2007;211(1):189-96.

Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Katagiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T.

Study on the quality control of cell therapy products. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry.

J Chromatogr A. 2007;1160(1-2):263-9.

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 IL-6 production.

J Immunol. 2007;178(3):1767-73.

Niimi S, Harashima M, Hyuga M, Yamguchi T. Study of hepatocytes using RNA interference.

J Organ Dysfunction. 2007;3:164-82.

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-alpha-induced cell death. *J Pharmacol Sci.* 2007;103(2):159-67.

Uchida E, Kogi M, Oshizawa T, Furuta B, Satoh K, 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. *J Virol Methods.* 2007;143(1):95-103.

Sanda T, Okamoto T, Uchida Y, Nakagawa H, Iida S, Kayukawa S, Suzuki T, Oshizawa T, Suzuki T, Miyata N, Ueda R.

Proteome analyses of the growth inhibitory effects of NCH-51, a novel histone deacetylase inhibitor, on lymphoid malignant cells. *Leukemia.* 2007;21(11):2344-53.

Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M.

Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat Res.* 2007;619(1-2):113-23.

Shinozaki Y, Sato Y, Koizumi S, Ohno Y, Nagao T, Inoue K.

Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from

oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of c-jun-N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience.* 2007;147(1):153-63.

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.

News Letter 糖鎖フラッシュ号, Functional Glycomics. 2007;9:35-41.

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. 2007;23(2):81-87.

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. 2007;23(4):101-9.

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12回
Pharm Tech Japan. 2007; 23(8): 85-93.

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15回
Pharm Tech Japan. 2007;23(11):93-100.

内田恵理子
遺伝子治療薬開発の現状と品質・安全性確保における国際的動向.
Pharmstage. 2007;7(9):1-5.

Yokoyama U, Sato Y, Akaike T, Ishida S, Sawada J, Nagao T, Quan H, Jin M, Iwamoto M, Yokota S, Ishikawa Y, Minamisawa S.

Maternal vitamin A alters gene profiles and structural maturation of the rat ductus arteriosus. *Physiol Genomics.* 2007;31(1):139-57.

山口照英、土屋利江
細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性とその有用性評価

YAKUGAKU ZASSHI. 2007;127(5):839-40.

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
2007;7(2):168-73.

山口照英
Gene Therapy Discussion Group の動向について.

医薬品研究 2007;38:50-59.

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 2007;25:1127-36.

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.
臨床ウイルス学会誌 2007;35:278-90.

Mukai N, Akahori T, Komaki M, Li Q, Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Kobayashi A, Yamaguchi T, Abe M, Amagasa T, Morita I.
A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells.
Exp Cell Res. 2008;314(3):430-40.

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18回
Pharm Tech Japan. 2008;24(1):101-5.

Kizuka Y, Kobayashi K, Kakuda S, Nakajima Y,

Kawasaki N, Oka S.
Laminin-1 is a novel carrier glycoprotein of non-sulfated HNK-1 epitope in mouse kidney
Glycobiology. (in press)

Haghighi K, Chen G, Sato Y, Fan GC, He S, Kolokathis F, Pater L, Paraskevaidis I, Jones WK, Dorn II GW, Th Kremastinos D, Kranias EG.

A human phospholamban promoter polymorphism in dilated cardiomyopathy alters transcriptional regulation by glucocorticoids.
Hum Mutat. (in press)

川崎ナナ, 石井明子, 山口照英
糖鎖と生物薬品.
J Applied Glycoscience. (in press)

Kawasaki N, Itoh S, Yamaguchi T.
LC/MSn for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides.
Methods in Molecular Biology. (in press)

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21回
Pharm Tech Japan. (in press)

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. (in press)

Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Harazono A, Takakura D, Yamaguchi T.
Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products.
Trends in Glycosci. Glycotech. (in press)

川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英

糖鎖異常の網羅的解析.

蛋白質核酸酵素増刊号「糖鎖情報の独自性と普遍性」(in press)

Itoh S, Takakura D, Kawasaki N, Yamaguchi T. Glycosylation analysis using LC/MS and LC/MSn. Site-specific glycosylation analysis of a glycoprotein.

The protein Protocols Hand-book. Third Edition. Published by Humana Press, USA. Edited by John Walker. (in press)

Kawasaki N, Itoh S, Yamaguchi T.

LC/MS of oligosaccharides.

Glycoscience Lab. Manual., Ed. Naoyuki Taniguchi, in press

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)

堤康夫、石井明子、早川堯夫

機能性人工タンパク質

バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保 p.369-378 エル・アイ・シー、2007

川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英

抗体医薬品の LC/MS.

「抗体医薬品の最前線」植田充美監修, シーエムシー出版, 東京, 105-115, (2007)

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・臨床試験についてー TGN1412 事故が医薬品開発に与えたインパクト.

「谷本学校毒性質問箱」、サイエンティスト社、東京、10、1-34、(2007)

石井明子、鈴木琢雄、川西 徹、山口照英、早川堯夫

植物を用いた医薬品の現状と品質・安全性の確保
バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保
P.702-718 エル・アイ・シー、2007

2. 学会発表

内田恵理子、小木美恵子、米須杏子、永田龍二、村田充弘、日方幹雄、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：医薬品のウイルス安全性確保のための高感度ウイルス検出法の開発ーポリエチレンイミン結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法のヒトウイルスへの適用ー；日本薬学会第126年会2006年3月

古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：造血支持能を持つフィーダー細胞の解析について；第5回日本再生医療学会総会；2006年3月

鈴木孝昌, 欒 洋, Palanisamy 田中剛太郎, 中嶋圓, 浜田修一, 三浦知弘, 降旗千恵 Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS: Quantitative RT-PCR analysis on the selected genes by the GeneChip 日本環境変異原学会第34回大会(2005.11)

欒 洋, 本間正充, Suresh Thiruppathi, 小木 美恵子, 山口照英, 鈴木孝昌 Application of CGH and SNP arrays for chromosome analysis 日本環境変異原学会第34回大会(2005.11)

鈴木孝昌, 降旗千恵 Transcriptomics – Can gene expression profiles distinguish the genotoxic hepatocarcinogens? 日本環境変異原学会第34回大会(2005.11)

三浦知弘, 欒 洋, 戸部香織, 仲地豊, 近藤恭光, 鈴木孝昌, 田代英夫, 降旗千恵 DNA マイクロアレイを用いた非遺伝子傷害性肝発癌物質投与マウス肝臓における遺伝子発現解析 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)

原田基裕, 戸部香織, 仲地豊, 近藤恭光, 中嶋圓, 浜田修一, 鈴木孝昌, 兵庫淳志, 田代英夫, 榊佳之, 降旗千恵 Original oligonucleotide microarray による 5 種類の遺伝子傷害性肝発がん物質と phenobarbital と ethanol の遺伝子発現解析 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)

宮島正樹, 欒 洋, 渡辺貴志, 鈴木孝昌, 村上勝彦, 野村靖幸, 降旗千恵 大脳萎縮を示す老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse: SAM) SAMP10 の原因遺伝子に関する大集積 DNA マイクロアレイを用いた解析 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)

鴻野貴司, 欒 洋, 鈴木孝昌, 野村靖幸, 太田浩良, 降旗千恵 8 ヶ月齢の老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse: SAM) SAMP8 海馬における Transthyretin の発現低下 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12)

Toshie Kanayasu-Toyoda, Tomofumi Fujino, Tadashi Oshizawa, Takayoshi Suzuki, Tomoko Nishimaki-Mogami, Yoji Sato, Jun-ichi Sawada, Kazuhide Inoue, Koichi Shudo, Yasuo Ohno, Teruhide Yamaguchi HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 as detected by surface plasmon resonance 第 78 回日本生化学会大会(2005.10)

Declan Mulhern, Shinya Yokokawa, Hitoshi Shimizu, Arihiro Kohara, Takayoshi, Suzuki, Haruhiko Okuda, Naoki Miyata, Shin-ichi

Ninomiya and Tetsuji Sudo Gene expression profiles of hepatotoxin-treated human hepatocytes can be used to cluster unknown compounds according to their mode of actions 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会(2005.6)

横川 伸也, Declan Mulhern, 清水 和, 小原 有弘, 北島 正人, Jose Martin Ciloy, 鈴木 孝昌, 奥田 晴宏, 宮田 直樹, 二宮 真一, 須藤 哲司 網羅的遺伝子発現解析データを用いた肝毒性予測モデルの構築 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会(2005.6)

Takayoshi Suzuki Organ-specific toxicity of aristolochic acid: studied by the transgenic mouse mutation assay and the DNA microarray 2nd International Conference and Exposition on the Modernization of Traditional Chinese Medicine (成都、中国)

Suzuki, T. , Luan, Y. , Honma, M. , Kogi, M. , and Yamaguchi, T. Application of microarrays for chromosome analysis 第 9 回国際環境変異原学会サテライトシンポジウム"トキシコゲノミクス" (ハワイ、米国)

C Furihata, K Tobe, Y Nakachi, Y Kondoh, M Nakajima, S Hamada, C Namiki, T Suzuki, A Hyogo, M Hoshino, M Harada, T Tashiro, H Ito, H Inazumi, Y Sakaki and H Tashiro Original oligonucleotide microarray-based gene expression profile induced by genotoxic carcinogens and Phenobarbital in mouse liver 第 9 回国際環境変異原学会サテライトシンポジウム"トキシコゲノミクス" (ハワイ、米国)

鈴木孝昌 変異原処理による in vivo/in vitro 遺伝子発現 日本動物実験代替法学会第 19 回大会(2005.12)

伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 原園 景, 松

石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: リニアイオントラップ型MSを用いたゲル内糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析. 第53回質量分析総合討論会 (2005, 5, 19) 大宮

橋井則貴, 伊藤さつき, 川崎ナナ, 原園 景, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: multiple-stage tandem mass spectrometry (MSⁿ)によるLewis^xの特異的解析. 第53回質量分析総合討論会 (2005, 5, 19) 大宮

福原 潔, 石井明子, 川崎ナナ, 川西 徹, 宮田直樹, 奥田晴宏: 脂溶性平面型カテキンの抗酸化作用とがん細胞増殖阻害効果. 第64回日本癌学会学術総会 (2005, 9, 14-16)札幌

原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹: LC/ESI/MS/MSによるタンパク質混合物中のヒト血漿ビトロネクチンの部位特異的糖鎖解析. 第25回日本糖質学会 (2005, 7, 20)大津

佐野琴音, 宮本泰則, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 玉井幸恵, 加藤恵己, 赤松 暢, 内堀・岩城はるひ, 浅沼公恵, 鈴木理沙, 小川温子: 肝再生時のビトロネクチン糖鎖がマトリックスリガンド結合と細胞伸展活性に与える影響. 第25回日本糖質学会 (2005, 7, 20)大津

川崎ナナ, 橋井則貴, 松石 紫, 伊藤さつき, 原園 景, 川西 徹: LC/MSⁿによる糖鎖の構造特異的検出. 日本プロテオーム機構第3回大会 (2005, 8, 1)横浜

永石貴之, 野村和子, 水口惣平, 出嶋克史, 川崎ナナ, 松石 紫, 野村一也: 線虫の糖鎖付加タンパク質の決定. 日本プロテオーム機構第3回大会 (2005, 8, 1)横浜

野村和子, 水口惣平, 永石貴之, 安藤恵子, 三谷昌平, 平林義雄, 松石 紫, 川崎ナナ, 野村一也: *C. elegans*を用いた糖鎖の網羅的機能解析—二次元電気泳動(2D-DIGE)による定量解析. 日本プロテオーム機構第3回大会 (2005, 8, 1)横浜

Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Akira HARAZONO, Yukari MATSUIISHI, Akiko HACHISUKA, Reiko TESHIMA, Jun-ichi SAWADA, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Glycosylation analysis of IgLON family glycoprotein in rat brain by LC/MSⁿ. 第77回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸

Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Akira HARAZONO, Satsuki ITOH, Yukari MATSUIISHI, and Toru KAWANISHI: Decrease in alpha-glucosidase II expression in the kidney of a MRL/lps murine model of human systemic lupus erythematosus (SLE). 第77回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸

Risa INOUE, Motoki TERADA, Kay-Hooi Khoo, Nana KAWASAKI, Bruce Y. MA, Shogo OKA, Toshisuke KAWASAKI, Nobuko KAWASAKI: Isolation of glycoproteins carrying the characteristic MBP-ligands oligosaccharide from the human colon cancer cells. 第77回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸

Miho ASAHI, Kotone SANO, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Maiko YANAGIBASHI, Haruhi UCHIBORI-IWAKI, Haruko OGAWA: Characterization of glycan moieties of fibronectin and vitronectin during liver regeneration. 第77回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸