

## E. 結論

### E-1 感染性因子の安全性評価技術開発

HBV の濃縮・高感度検出法として、ポリ-L-リジン結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を開発し、低濃度キャリアの高感度ウイルススクリーニング法としての有用性を確認した。また、パルボウイルス B19 の *in vitro* 持続感染系を確立した。

### E-2 *in vitro* 造腫瘍性評価技術開発

細胞組織製品の造腫瘍性を評価することを目的とした *in vitro* 試験系として、軟寒天コロニー形成試験を用いた場合の、悪性細胞検出能を評価することを目的に、3種のハイスループット軟寒天コロニー形成試験系、すなわち CBA-130 (細胞溶解+蛍光検出)、CBA-140 (生細胞回収+蛍光検出) および CBA-140+CellTiter Glo (生細胞回収+化学発光検出) の3試験系のバリデーションを行った。その結果、悪性細胞 (Hela 細胞) の検出限界および検出感度の点では CBA-140+CellTiter Glo が最も優れていたが、悪性細胞 (Hela 細胞) への選択性および悪性細胞 (Hela 細胞) の検出精度においては CBA-130 が優れていることが明らかとなった。すなわち、検出感度や検出限界の優劣と悪性細胞選択性および悪性細胞検出精度の優劣は必ずしも正には相関しないことが示唆された。つまり、細胞組織製品の造腫瘍性検出という観点からすれば、蛍光から化学発光へ細胞検出系の変更は、性能の向上をもたらすことはないと考えられた。今後は様々な細胞種を使用して CBA-130 のバリデーションを行うと同時に、悪性細胞を高選択的 (特異的) かつ高精度で検出するために、軟寒天層封入細胞の培養条件の

最適化を行うことが必要となる。

### E-3 染色体安定性等の評価技術開発

SNP チップを用いた解析により、LOH 解析とともに染色体コピー数の変化の検出に有効であることが示され、細胞治療に用いる培養細胞の遺伝的安定性の検証法として、その利用が期待できる。一方、一細胞レベルでの染色体異常を観察しうる簡便な手法としての小核試験の適応に関する基礎的な検討を行い、間葉系幹細胞の自然小核誘発頻度に関するデータを得るとともに、この手法が培養環境の安全性の評価に向けて有効である可能性が示唆された。

LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析によるバイオマーカー開発に関して、間葉系幹細胞のホールプロテオーム解析により、数多くのペプチドシグナルの検出とタンパク質の同定が可能となっており、細胞膜表面の特異抗原の解析にも有効であることがわかった。今後、独自のデータ解析ソフトウェアの開発を進め、自動化を行うことにより、各種比較プロテオーム解析を行い、培養細胞の品質、有効性、安全性の評価に有用なバイオマーカーの開発を進めたい。

### E-4 同等性評価方法の開発

培養条件の異なる MSC の糖鎖プロファイリングにより、細胞同等性評価指標候補糖鎖を見出した。また、MSC の分化能保持予測のためのマーカー糖鎖探索の基礎的研究として、MSC の軟骨、骨、及び脂肪細胞への分化程度を定量的に解析する方法を確認した。さらに、神経分化能予測指標探索のために適した神経分化方法を確認した。

## E-5 免疫学的安全性評価に関する基盤技術開発

CXCL12 発現 Ad ベクターをマウスに投与することにより、造血幹細胞を含む多種の血液細胞が骨髄 niche から遊離してくることが示された。これらの結果は、今後のヒト血液細胞を有するマウスの作製にとり非常に有用な知見であると考えられる。

## E-6 特性解析・品質管理に関する研究

細胞・組織加工医薬品の品質管理において必要とされる確認試験法や力価試験法の確立に資する研究として、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) 単核球由来 early EPC の分化系を確立した。形態と細胞表面マーカーCD45 および CD31 発現の観点から、AC133 陽性細胞由来 early EPC が単核球由来 early EPC と類似した性質を示すことを明らかにした。
- 2) Early EPC と late EPC の遺伝子発現プロファイルが大きく異なっていることを明らかにし、MMP-9 や CXCL9、CXCL10、IL-8 といったケモカイン類等が early EPC の血管形成促進作用に寄与している可能性を示した。
- 3) Late EPC の遺伝子発現プロファイルは組織由来の血管内皮細胞である HUVEC と類似していたが、late EPC では MMP-1 の発現が顕著に高いことを見出した。
- 4) 細胞外マトリックスに対する浸潤活性が、組織由来の血管内皮細胞と比較して

early EPC と late EPC でともに高いことを示した。

## E-7 細胞特性・品質解析技術の開発

これまで高感度分析が困難であり、糖鎖解析に1週間以上を要していたO結合型糖鎖の解析を3日以内に完了する技術を開発できた。また、生体試料中に存在する微量の糖鎖を網羅的かつ定量的に解析できることも判明した。さらに、各種細胞間でムチン型糖鎖の糖鎖プロファイルは明確に異なることも判明した。また、特定細胞における特異的なムチン型糖鎖の存在を検出できることも明らかになった。これらの結果は、本技術が、ムチン型糖鎖の糖鎖プロファイルという観点から、各細胞の特性解析、同定・確認、細胞間の差異、品質管理、細胞の機能と細胞を構成する糖タンパク質の関係、さらには各種疾患における原因糖鎖や疾患マーカーの探索など、きわめて広範囲に応用できる可能性を示している。再生医療の実用化においては、製品の品質、安全性を確保する上で、原材料としての細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、あるいは混在する可能性のある細胞の様々な特性を把握し、これらの細胞を、同定・確認、識別したり、細胞の品質を管理するための迅速、簡便、かつ特異的・定量的な方法の確立が必要不可欠である。細胞のムチン型糖鎖プロファイルを分析する本技術は、そのような条件を充たし、再生医療実用化研究を推進し、支える基盤技術として期待できる。

## E-8 iPS細胞の同一性・同等性評価/特性解析法の開発

iPS細胞は、体細胞をES細胞に近似させる細胞制御技術である。今回、様々な年齢の日本人からもiPS細胞の樹立は可能であ



り、それらの特性差は極めて小さいことが確認された。本邦における iPS 細胞に立脚した細胞組織加工医薬品の開発に資する基盤的知見が得られた。

#### E-9 おわりに

本研究では、当初計画に見合った成果が得られている部分は数多い。しかし、がん細胞由来細胞株など、まだモデル系での評価にとどまっている研究もある。がん細胞由来細胞株などは、陽性もしくは陰性対照として試験系の性能評価に不可欠のものであるが、今後は実際に製品として臨床応用されるヒト細胞を用いた評価もより積極的に行う必要があると考えられる。

細胞・組織加工医薬品の開発は国内外で急速に進んでいるが、その品質・安全性を担保するためには、原材料となる細胞・組織の適格性評価、原材料の品質管理・培養方法を含めた製造方法の恒常性の確保、工程評価等の妥当性の検証、中間製品の品質管理、最終製品の規格設定および品質管理などが必要である。これら各ステップにおける規格設定は、未知・未経験および製品の多様性などの要因から一律に行えるものではない。したがって、細胞・組織加工医薬品の品質・安全性を評価・確保するには、品質・安全性試験法の高感度化・高精度化を図ると共に、様々な細胞種・製法・特性および適用法を持つ製品それぞれに応用する際の、試験法の性能と限界をより深く見極めるための研究が今後必要と考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Nishimaki-Mogami T, Tamehiro N, Sato Y, Okuhira K, Sai K, Kagechika H, Shudo K, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Ohno Y, Inoue K, Sawada J.

The RXR agonists PA024 and HX630 have different abilities to activate LXR/RXR and to induce ABCA1 expression in macrophage cell lines. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76 :1006-13

Itoh S, Hachisuka A, Kawasaki N, Hashii N, Teshima R, Hayakawa T, Kawanishi T, Yamaguchi T.

Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography and multiple-stage mass spectrometry. *Biochemistry* 2008; 47 :10132-54

Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Takakura, D., Qin, Y., Xiaoyu, H., Yamaguchi, T.

The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals. *Biol Pharm Bull.* (in press)

Sano K, Asahi M, Yanagibashi M, Hashii N, Itoh S, Kawasaki N, Ogawa H.

Glycosylation and ligand-binding activities of rat plasma fibronectin during liver regeneration after partial hepatectomy. *Carbohydr Res.* 2008; 343 :2329-35

Aiba K, Nedorezov T, Piao Y, Nishiyama A, Matoba R, Sharova LV, Sharov AA, Yamanaka S, Niwa H, Ko MS.

Defining developmental potency and cell lineage trajectories by expression profiling of differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res.* (in press)

Nishida M, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Saito H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T, Kurose H. P2Y6 receptor-Galpa12/13 signaling in cardiomyocytes triggers pressure

overload-induced cardiac fibrosis.

*EMBO J.* 2008; 27 :3104-15

Mukai N, Akahori T, Komaki M, Qin Li, 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 :430-40

Sakurai F, Nakamura SI, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H.

Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction following direct administration into organs of nonhuman primates. *Gene Ther.* (in press)

Kizuka Y, Kobayashi K, Kakuda S, Nakajima Y, Itoh S, Kawasaki N, Oka S. Laminin-1 is a novel carrier glycoprotein for the nonsulfated HNK-1 epitope in mouse kidney.

*Glycobiology* 2008; 18 :331-38

Haghighi K, Chen G, Sato Y, Fan GC, He S, Kolokathis F, Pater L, Paraskevaidis I, Jones WK, Dorn GW 2nd, Kremastinos DT, Kranias EG.

A human phospholamban promoter polymorphism in dilated cardiomyopathy alters transcriptional regulation by glucocorticoids.

*Hum Mutat.* 2008; 29 :640-7

Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Nakajima Y, Kawanishi T, Yamaguchi T.

Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: relative quantification of N-glycans using an isotope-tagging method. *Immunology.* 2008; 126 :336-45

Tanabe S, Sato Y, Suzuki T, Suzuki K, Nagao T, Yamaguchi T.



- Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture.  
*J Biochem.* 2008; 144 :399-408
- Urayama S, Harada Y, Nakagawa Y, Ban S, Akasaka M, Kawasak N, Sawada H. Ascidian Sperm Glycosylphosphatidylinositol-anchored CRISP-like Protein as a Binding Partner for an Allorecognizable Sperm Receptor on the Vitelline Coat.  
*J Biol Chem.* 2008; 283 :21725-33
- Harazono A, Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Matsuishi-Nakajima Y, Kawanishi T, Yamaguchi T. Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry.  
*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008; 869 :20-30
- Suzuki T, Tamehiro N, Sato Y, Kobayashi T, Ishii-Watabe A, Shinozaki Y, Nishimaki-Mogami T, Hashimoto T, Asakawa Y, Inoue K, Ohno Y, Yamaguchi T, Kawanishi T. The novel compounds that activate farnesoid x receptor: the diversity of their effects on gene expression.  
*J Pharmacol Sci.* 2008; 107 :285-94
- Harashima M, Harada K, Ito Y, Hyuga M, Seki T, Ariga T, Yamaguchi T, Niimi S. Annexin A3 Expression Increases in Hepatocytes and is Regulated by Hepatocyte Growth Factor in Rat Liver Regeneration,  
*J Biochem.* 2008; 143 :537-45
- Yamada K, Kinoshita M, Hayakawa T, Nakaya S, Kakehi K. Comparative studies on the structural features of O-glycans between leukemia and epithelial cell lines.  
*J Proteome Res.* (in press)
- Watanabe, K., Hyuga, S., Hyuga, M., Sekiguchi, A., Endo, M., Tsuda, T., Oikawa, T., Yamaguchi, T., and Hanawa, T. Unkeito, a traditional Kampo formula, exhibits a selective estrogen receptor modulator-like activity. - Prevention of osteoporosis in ovariectomized mice -  
*J Trad Med.* (in press)
- Kawasaki N., Itoh S., Yamaguchi T. LC/MSn for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides.  
*Methods Mol Biol.* 2009; 534 :1-10
- Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Transduction properties of adenovirus serotype 35 vectors after intravenous administration into nonhuman primates.  
*Mol Ther.* 2008; 16 :726-33
- Watanabe T, Tanaka G, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Nakajima M, Furihata C. Dose-dependent alterations in gene expression in mouse liver induced by diethylnitrosamine and ethylnitrosourea and determined by quantitative real-time PCR.  
*Mutat Res.* 2009; 673 :9-20
- Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I, Mori Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound.  
*Proc Natl Acad Sci USA.* (in press)
- Okita, K., Nakagawa, M., Hong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors.  
*Science.* 2008; 322 :949-53

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 Glycosci Glycotech.* 2008; 20 :97-116

Satoh K, Iwata-Takakura A, Yoshikawa A, Gotanda Y, Tanaka T, Yamaguchi T, Mizoguchi H.

A new method of concentrating hepatitis B virus (HBV) DNA and HBV surface antigen: an application of the method to the detection of occult HBV infection.  
*Vox Sanguinis.* 2008; 95 :174-80

川崎ナナ, 石井明子, 山口照英  
糖鎖と生物薬品.

*Journal Applied Glycoscience.* (in press)

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24回

*Pharm Tech Japan.* 2008; 24 :1605-11

蜂須賀暁子, 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28回

*Pharm Tech Japan.* 2008; 24 :2515-23

川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹  
薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第21回

*Pharm Tech Japan.* 2008; 24 :651-6

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

*PHARMASTAGE* 2008; 7 :1-6

原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 小林 哲, 石川リカ, 高井俊紀, 古賀明子, 岡本寿美子, 山口秀人, 濱詰康樹, 佐藤貴之, 窪田雅之, 掛樋一晃, 木下充弘, 島 圭介, 山

田真希, 山口照英

質量分析法を用いたペプチド及びタンパク質性医薬品の確認試験法に関する研究.  
*医薬品研究* 2008; 39(10) :627-46

掛樋一晃, 木下充弘, 橋井則貴, 川崎ナナ, 寺尾敏光, 河合健蔵, 余田 光, 山口照英  
ヘパリンナトリウム純度試験に関する研究 (第3報) キャピラリー電気泳動法によるヘパリンナトリウム不純物の分析.

*医薬品研究* 2008; 39(11) :713-20

川崎ナナ, 橋井則貴, 杉本直樹, 高倉大輔, 秦 艶, 細山沙織, 戸井田敏彦, 山口照英  
ヘパリン純度試験に関する研究(4) 合成過硫酸化コンドロイチン硫酸の日局標準品としての適用性の評価.

*医薬品研究* 2008; 39(11) :721-29

新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英, 早川堯夫

癌に対する抗血管新生療法の現状と展望 その1

*医薬品研究* 2008; 39 :1-37

新見伸吾, 原島瑞, 日向昌司, 山口照英, 早川堯夫

癌に対する抗血管新生療法の現状と展望(その2).

*医薬品研究* 2008; 39(6) :359-87

橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 川原信夫, 正田卓司, 杉本直樹, 靄島由二, 品川麻衣, 榎葉信久, 宮田一義, 塚本秀樹, 千秋和久, 長谷川泰介, 河合健蔵, 余田 光, 木下充弘, 掛樋一晃, 合田幸広, 奥田晴宏, 棚元憲一, 山口照英

ヘパリン純度試験に関する研究 (第1報) 1H-NMRによるヘパリンナトリウム純度試験に関する研究

*医薬品研究* 2008; 39 :651-59

橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 福原 潔, 品川麻衣, 榎葉信久, 有村雅敏, 辰巳昌史, 奥田晴宏, 山口照英  
ヘパリン純度試験に関する研究 (第2報) 1H-NMRによるヘパリンカルシウム純度試験に関する研究



医薬品研究 2008; 39 :660-64

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」 2008; 53 :1690-96

山口照英, 石井明子

早期臨床開発段階でのバイオ医薬品の品  
質・安全性確保

臨床評価 (in press)

Kawasaki N, Itoh S, Yamaguchi T  
LC/MS of oligosaccharides, Glycoscience  
Lab. Manual, Ed. Naoyuki Taniguchi, (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)

川崎ナナ, 石井明子, 荒戸照世, 山口照英  
抗体医薬品の構造及び品質特性解析 抗体  
医薬品製造の留意点～承認申請をふまえて  
～ サイエンス&テクノロジー社 (印刷中)

## 2. 学会発表

Katsuhisa Tashiro, Kenji Kawabata,  
Asami Ino, Haruna Sakurai, Fuminori  
Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi: Efficient  
Differentiation into Osteoblastic Lineage  
from Both Mouse Embryoid Bodies and  
Bone Marrow Stromal Cells by  
Adenovirus Vectors, 11th Annual Meeting  
of American Society of Gene Therapy,  
Boston, USA, 2008年5-6月

Ken Nishimura, Manami Ohtaka, Hiroaki  
Segawa, Birei Furuta, Eriko Uchida,  
Toshie Kanayasu-Toyoda, Teruhide  
Yamaguchi, and Mahito Nakanishi :  
CHARACTERIZATION OF NOVEL  
DEFECTIVE SENDAI VIRUS VECTORS  
CAPABLE OF PERSISTENT

EXPRESSION OF THERAPEUTIC  
GENES. American Society of Gene  
Therapy 11th Annual Meeting (2008.5.31  
Boston, USA)

Ken Nishimura, Manami Ohtaka, Hiroaki  
Segawa, Birei Furuta, Eriko Uchida,  
Toshie Kanayasu-Toyoda, Teruhide  
Yamaguchi, and Mahito Nakanishi :  
CHARACTERIZATION OF NOVEL  
DEFECTIVE SENDAI VIRUS VECTORS  
CAPABLE OF PERSISTENT  
EXPRESSION OF THERAPEUTIC  
GENES. 第14回日本遺伝子治療学会総会  
(2008.6.13 札幌)

Nishimura K, Ohtaka M, Segawa H,  
Furuta B, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T,  
Yamaguchi T, Nakanishi M:  
Characterization of Novel Defective  
Sendai Virus Vectors Capable of  
Persistent Expression of Therapeutic  
Genes. ASGT 11th annual meeting, Boston  
(2008年5月)

Takuo Suzuki, Akiko Ishii-Watabe, Tetsu  
Kobayashi, Toshie Kanayasu-Toyoda,  
Minoru Tada, Toru Kawanishi and  
Teruhide Yamaguchi : Affinity of  
therapeutic monoclonal antibodies and  
fusion proteins to neonatal Fc receptor  
(FcRn) 日本薬物動態学会 第23回年会  
2008年10月 熊本

T. Suzuki, M. Kogi, M. Honma, S. Tanabe,  
T. Yamaguchi SNP and CGH array  
analysis on amplification profile of the  
c-myc gene. 第67回日本癌学会学術総会  
(2008年10月)

Suzuki, T., T. Suresh, T. Oshizawa, K.  
Ramesh, K. Suzuki Proteomics approach  
to find new biomarkers for genotoxicity in  
mouse urine. 欧州環境変異原学会 2008  
(2008年9月)

Takahashi, K., Yokura, M., Okada, A.,  
Tanaka, T., Ichisaka, T., and Yamanaka,  
S. : Induction of Pluripotent Stem Cells  
from Japanese Skin. 第31回日本分子生

物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9 神戸)

Yanagino S, Satoh M, Suzuki K, Sato Y. Thyroid hormone targets genes associated with arterial elasticity. 第 82 回日本薬理学会年会 (平成 21 年 3 月 16-18 日, 横浜)

スレッシュ ティルパッティ, ラメッシュ ドス, 押澤 正, 鈴木和博, 鈴木孝昌 プロテオミクス手法を用いた遺伝子傷害性の新しいバイオマーカー探索 日本環境変異原学会第 37 回大会 (2008 年 12 月)

伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 篠原 聡, 山口照英: ヒト間葉系幹細胞の Thy-1 の糖鎖構造解析, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (2008.12.9-12) 神戸

押澤正, 豊田淑江, 内田恵理子, 鈴木孝昌, 鈴木和博, 山口照英: カルシウム結合タンパク質 S100A8 は HL-60 細胞の好中球様分化において増殖・分化に重要な働きをする, 第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008), (2008 年 12 月 9-12 日, 神戸)

菊池 裕, 中島 治, 山崎 壮, 手島玲子, 棚元憲一, 石黒直隆, 山口照英: ウシ角膜細胞株 BCE C/D-1b が発現するスプライス変異型 GPI アンカー欠損プリオンタンパク質 mRNA の解析, 2008 年プリオン研究会, (2008.8.29-30, 北海道 上川郡 新得町)

菊池 裕, 遊佐精一, 中島 治, 手島玲子, 山口照英: GPI アンカー欠損型プリオンタンパク質産生に関与する低酸素誘導因子の発現解析, 第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会, (2008, 12, 9-12) 神戸

橋井則貴, 川崎ナナ, 篠原 聡, 秦 艶, 黄 笑宇, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖プロファイル指標とした細胞治療薬の特性解析. 第 8 回日本再生医療学会総会 (2009.3.5・東京)

橋井則貴, 川崎ナナ, 篠原 聡, 秦 艶,

黄 笑宇, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖を指標とした細胞治療薬の特性解析, 日本薬学会第 129 年会 (2009.3.京都)

橋井則貴, 川崎ナナ, 中島 紫, 伊藤さつき, 山口照英: d<sub>5</sub>-フェニルヒドラジンを用いた同位体標識法及び液体クロマトグラフィー/質量分析による糖鎖の定量解析, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (2008, 12, 9-12) 神戸

原園 景, 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 低分子量ヘパリンの酸加水分解及び HPAEC-PAD を用いた確認試験及び純度試験法の検討. 日本薬学会第 129 年会 (2009.3.京都)

原島 瑞, 新見伸吾, 原田佳呼, 日向昌司, 関泰一郎, 有賀豊彦, 山口照英: ラット肝再生モデルにおいて HGF は肝細胞における AnnexinA3 の発現を促進させる. 第 15 回肝細胞研究会, (2008.6.27・静岡)

原島 瑞, 新見伸吾, 長岡陽子, 斉藤千恵子, 布留川みな子, 関泰一郎, 有賀豊彦, 山口照英: 初代培養ラット肝細胞におけるグルコシルコリド依存的チロシンアミノトランスフェラーゼおよびトリプトファンオキシゲナーゼ mRNA レベルの増加のプロテアソーム阻害剤による阻害. 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会合同大会 BMB2008. (2008 年 12 月 12 日・神戸)

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膜タンパク質のプロテオーム解析. 第 8 回日本再生医療学会総会 (2009.3.5・東京)

降旗千恵, 渡辺貴志, 夏目匡克, 中嶋圓, 濱田修一, 多田隈英未, 櫻井幹也, 花原泉, 小枝暁子, 佐久間智宏, 大信田系裕, 前田晃央, 成見香瑞範, 真田尚和, 平山満朝, 大山ワカ子, 岡田恵美子, 本田大士, 須藤鎮世, 鈴木孝昌 トキシコゲノミクスに関する JEMS/MMS 共同研究 (2008 年): 遺伝子傷害性および非遺伝子傷害性肝がん原物質についての精選した 27 遺伝子に関する



- qPCR 法による遺伝子発現解析 日本環境変異原学会第 37 回大会 (2008 年 12 月)
- 佐藤 陽治 細胞組織加工医薬品の品質・安全性確保に関する最近の動向 日本トキシコロジー学会「応用トキシコロジーリカレント講座」(平成 20 年 9 月 11 日, 京都)
- 山口 照英, 内田 恵理子: 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保. 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 東京 (2008 年 6 月)
- 山口照英: Quality, Safety and Efficacy of Follow-on Biologics. 第 3 回 PMDA 国際バイオロジクスシンポジウム (PMDA 3rd International Symposium) (2009.2.12・東京)
- 山口照英: バイオ医薬品の品質保証. 東京大学セミナー (2008.5.19・東京)
- 山口照英: バイオ後続品に対する日本のアプローチ. 政策研究大学院大学バイオ医薬品の知的財産と評価に関するシンポジウム「セッション 4: バイオ医薬品の安全性・有効性確保に関する規制」(2009.2.19・東京)
- 山口照英: バイオ後続品の品質、安全性及び有効性の確保方策について. 日本公定書協会第 27 回新薬審査部門定期説明 (2008.10.16・大阪, 10.21・東京)
- 山口照英: バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための要件. バイオロジクスフォーラム第 5 回学術集会 (2009.2.3・東京)
- 山口照英: 医薬品及び治験薬の品質保証と開発時の CMC 研究・第 5 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム (2008.12.12・東京)
- 山口照英: 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保. 第 35 回トキシコロジー学会学術年会 (2008.6.26・東京)
- 山口照英: 臨床初期におけるバイオ医薬品の品質・安全性確保～バイオ医薬品の開発初期での品質・安全性確保. 第 2 回 APD D ミニシンポジウム (2008.8.9・東京)
- 山田佳太, 渡部沙木絵, 大西康太, 山本晃祐, 木下充弘, 森嶋祥之, 早川堯夫, 掛樋一晃 ヒト血清糖タンパク質糖鎖の網羅解析: 糖鎖バイオマーカーの可能性 BMB2008 横浜
- 山田佳太, 渡部沙木絵, 大西康太, 山本晃祐, 木下充弘, 森嶋祥之, 早川堯夫, 掛樋一晃 ヒト血清糖タンパク質糖鎖の網羅解析: 糖鎖バイオマーカーの可能性 第 28 回日本糖質学会 つくば
- 山田佳太, 木下充弘, 米澤 傑, 早川堯夫, 掛樋一晃 キャピラリー電気泳動を用いる O-結合型糖鎖の高速プロファイリング 第 28 回日本糖質学会 つくば
- 小林 哲, 鈴木琢雄, 石井明子, 川崎ナナ, 山口照英: プロタミンの MALDI-TOF MS におけるマトリックスの影響. 第 56 回質量分析総合討論会 (2008.5.15・つくば)
- 新井祐子, 多田隈英未, 渡辺貴志, 浜田修一, 鈴木孝昌, 中嶋圓, 降旗千恵 ジエチルニトロソアミン投与マウス肝臓における、遺伝子発現の経時変化および用量依存性変化の解析 BMB2008 (2008 年 12 月)
- 秦 艶, 橋井則貴, 川崎ナナ, 山口照英: 強陰イオン交換 HPLC を用いたヘパリンナトリウム確認試験及び限度試験に関する研究. 日本薬学会第 129 年会 (2009.3.京都)
- 西村 健, 大高真奈美, 瀬川宏知, 内田恵理子, 塙(古田)美玲, 豊田淑江, 山口照英, 中西真人: 細胞質持続発現型 RNA ベクターの性質検討と医療応用に向けた研究. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学学会大会・合同大会 (2008.12.9-12 神戸)
- 浅野哲秀, 西川貴史, 笠松俊夫, 青儀巧, 岡宏明, 小島肇, 伊東悟, 鈴木孝昌, 原巧, D. Gibson, 林 真 皮膚細胞を用いる小核試験—開発と検証— 日本環境変異原学会第 37 回大会 (2008 年 12 月)

多田隈英未、櫻井幹也、渡辺貴志、鈴木孝昌、成見香瑞範、浜田修一、平山満朝、真田尚和、小枝暁子、中嶋圓、大信田系裕、佐久間智宏、降旗千恵 遺伝子傷害性肝発がん物質および非遺伝子傷害性肝発がん物質投与マウス肝臓における遺伝子発現の比較解析 BMB2008 (2008年12月)

大高真奈美、西村健、瀬川宏知、内田恵理子、塚(古田)美玲、豊田淑江、山口照英、中西真人：持続発現型センダイウイルスベクターの性質検討とその応用。第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008.10.26-28 岡山)

田代克久、井野麻美、川端健二、桜井晴奈、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骨芽細胞への高効率分化誘導法の開発。第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、神戸 (2008年12月)

田邊思帆里、佐藤陽治、鈴木孝昌、鈴木和博、山口照英：ヒト間葉系幹細胞における培養分化マーカー同定に関する遺伝子発現プロファイリング。BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (2008.12.10))

田邊思帆里、佐藤陽治、鈴木孝昌、欒 洋、鈴木和博、山口照英：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞に関するゲノムプロファイリング。日本ケミカルバイオロジー研究会第3回年会 (2008.5.19)

内田 恵理子：医薬品のウイルス安全性確保：NATによるC型肝炎ウイルス検出の評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発。日本薬学会第129年会シンポジウム、京都 (2009年3月)

日向昌司、日向須美子、原島 瑞、山口照英、新見伸吾：アネキシンA3のノックダウンはHuH7細胞の腫瘍形成を抑制する。日本薬学会第129年会 (2009.3.京都)

豊田淑江、石井明子、鈴木 浩子、李勤、田

村悦臣、森田育男、山口照英：血管内皮前駆細胞である Early EPC と Outgrowth Endothelial Cell の特性解析 第81回日本生化学会大会 (2008年12月 神戸)

木下充弘、梶 直孝、劉 人慈、山田佳太、早川 堯夫、掛 樋一 晃 Ion pair Chromatography/ESI-IT-TOF MS を用いるグリコサミノグリカン類の構造解析 第28回日本糖質学会 つくば

柳野 紗智子、佐藤 光利、鈴木 和博、佐藤陽治血管平滑筋における弾性関連遺伝子の甲状腺ホルモンによる制御 日本薬学会第129年会 (平成21年3月26-28日、京都)

鈴木孝昌、降旗千恵 Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS 日本環境変異原学会第37回大会 (2008年12月)

鈴木孝昌、小泉朋子、本間正充、中嶋圓、濱田修一、渡辺貴志、降旗千恵 トキシコゲノミクスに関する JEMS/MMS 共同研究 II: 遺伝子障害性発癌物質の迅速スクリーニング系としての TaqMan Low Density Array の評価 日本環境変異原学会第37回大会 (2008年12月)

鈴木孝昌、小木美恵子、小原有弘、本間正充、田邊思帆里、山口照英：SNP および CGH アレイを用いた c-myc 遺伝子増幅に関する詳細解析。第67回 日本癌学会学術総会 (2008.10.28)

鈴木孝昌、田邊思帆里、小木美恵子、押澤正、佐藤陽治、山口照英、鈴木和博：ヒト間葉系幹細胞の染色体安定性の解析。第8回日本再生医療学会総会 (2009.3.5・東京)

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 の特性指標の探索と機能解析 第8回日本再生医療学会総会 2009年3月 東京

鈴木琢雄、石井明子、多田 稔、小林 哲、豊田淑江、川西 徹、山口照英：抗体医薬



品およびFcドメイン融合タンパク質医薬品のFc受容体FcRnとの結合親和性比較. 日本薬学会第129年会(2009.3.京都)

櫻井幹也, 多田隈英未, 花原泉, 渡辺貴志, 鈴木孝昌, 降旗千恵 マウス肝臓における遺伝子傷害性肝発がん物質 Chrysene 投与後短時間での遺伝子発現解析 BMB2008 (2008年12月)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

「核初期化方法」(PCT/JP2008/070365)

「Nuclear reprogramming factor and induced pluripotent stem cells」(米国出願 No.12/213,035) (山中)

「Method for nuclear reprogramming」(米国仮出願 No.61/193,363) (山中)

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

Table I-1 PLL 磁気ビーズによる HBV DNA の濃縮

Sample no.	原液 (copies/ml)	10 倍濃縮液 (copies/ml)	濃縮効率*
1	1.6E+06	7.8E+06	0.49
2	4.2E+05	2.1E+06	0.50
3	9.0E+04	5.7E+05	0.63
4	2.2E+04	1.6E+05	0.73
5	4.6E+03	3.5E+04	0.76

\*濃縮効率= 10 倍濃縮液 (copies/ml)/ (原液(copies/ml) x 10)

Table I-2 PLL 磁気ビーズによる HBV DNA 濃縮に及ぼす抗 HBs 抗体の影響

原液	10 倍濃縮液		
HBV DNA (copies/ml)	HBsAb (mIU)	HBV DNA (copies/ml)	濃縮効率
120	0	860	0.72
	1024	1400	1.17
	1792	1300	1.08

Table I-3 PLL 磁気ビーズによる HBsAg の濃縮に及ぼす HCV 及びパルボウイルス B19 の影響

ウイルス希釈用血漿	AxSYM (s/n <sup>b</sup> )	
	種々の血漿を用いた HBsAg の希釈液	HBsAg 希釈液の 10 倍濃縮
正常血漿	1.39	3.80
HCV 陽性血漿	1.18	3.47
Parvovirus B19 陽性血漿	1.31	3.77



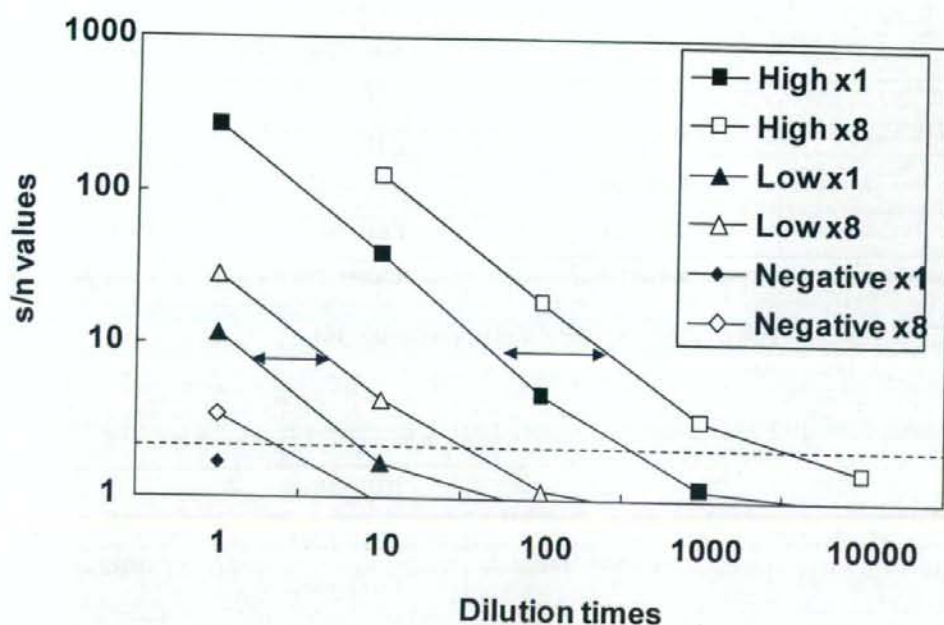


Fig. I-1 HBVsAg の PLL 磁気ビーズによる濃縮

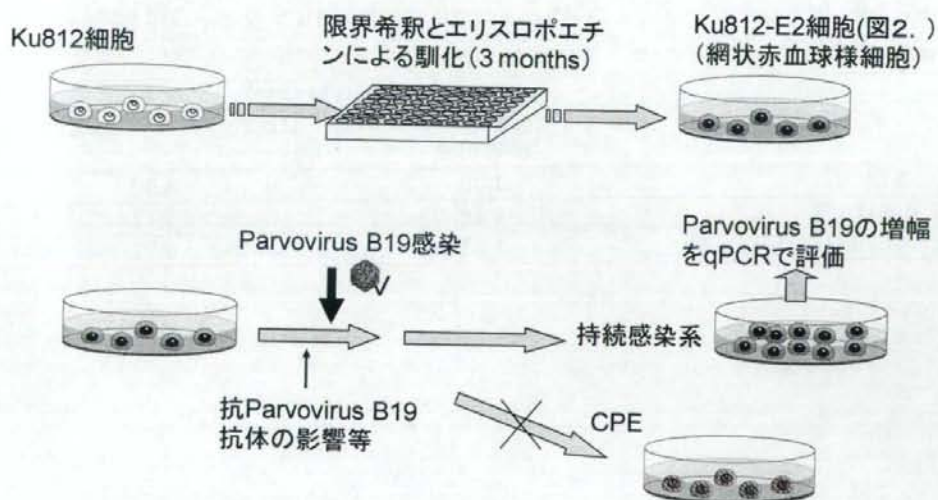
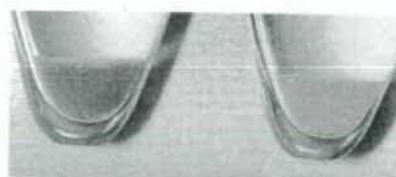


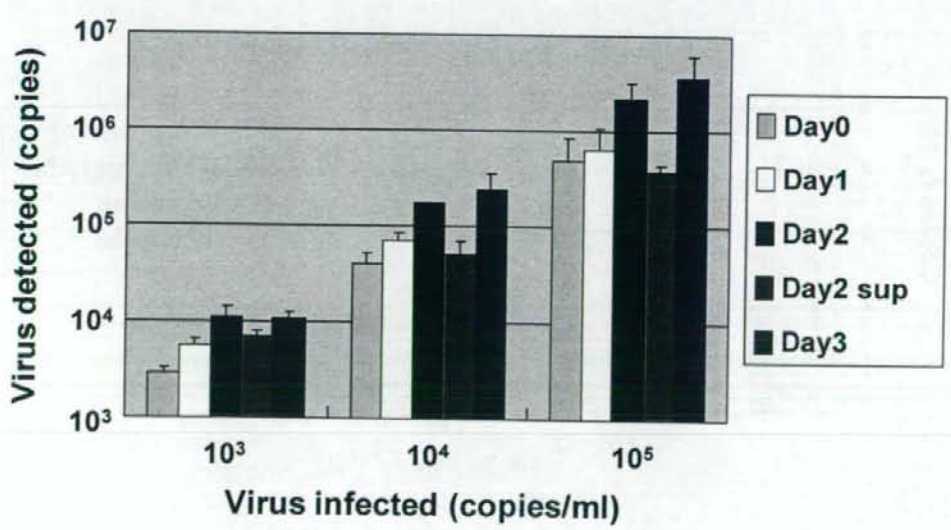
Fig. I-2 Parvovirus B19 インビトロ感染系の確立



**Ku812-E2 細胞    Ku812 細胞**

Ku812細胞とKu812-E2細胞、それぞれ $10^7$ 細胞を遠心して沈殿させた。Ku812-E2細胞は網状赤血球様にヘモグロビンを産生している。

**Fig. I-3 Ku812 と Ku812-E2 細胞の比較**



**Fig. I-4 Ku812-E2 細胞への ParvovirusB19 の感染増幅**



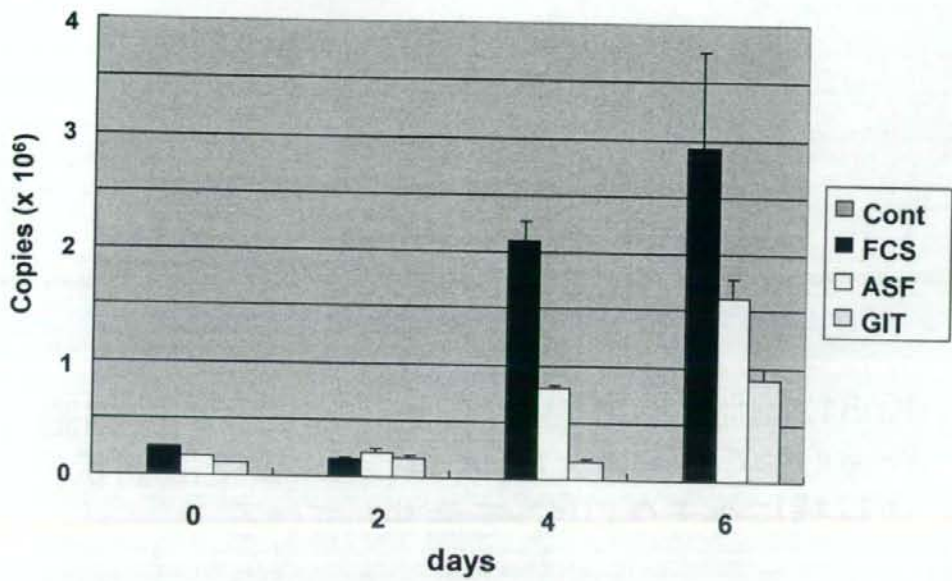


Fig. I-5 Ku812-E2 細胞での ParvovirusB19 の増幅に及ぼす培地の影響

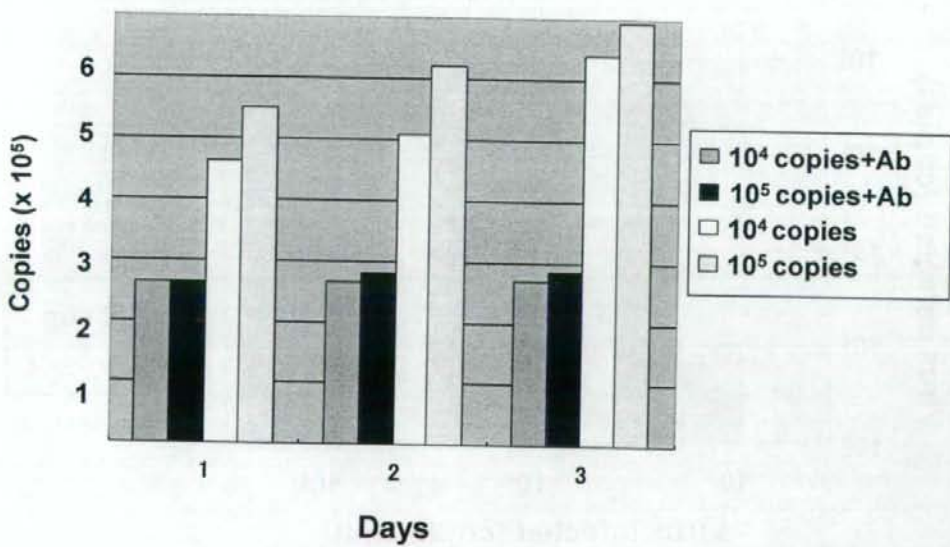


Fig. I-6 Ku812-E2 細胞での ParvovirusB19 の増幅と抗体の影響

Table II-1 使用した hMSC のドナーに関する情報

ID	Lot# of Manufacturer	Age (Years)	Race	Sex
C	5F0138	19	Black	Male
B	4F0312	27	Black	female
H	4F0760	25	Caucasian	female

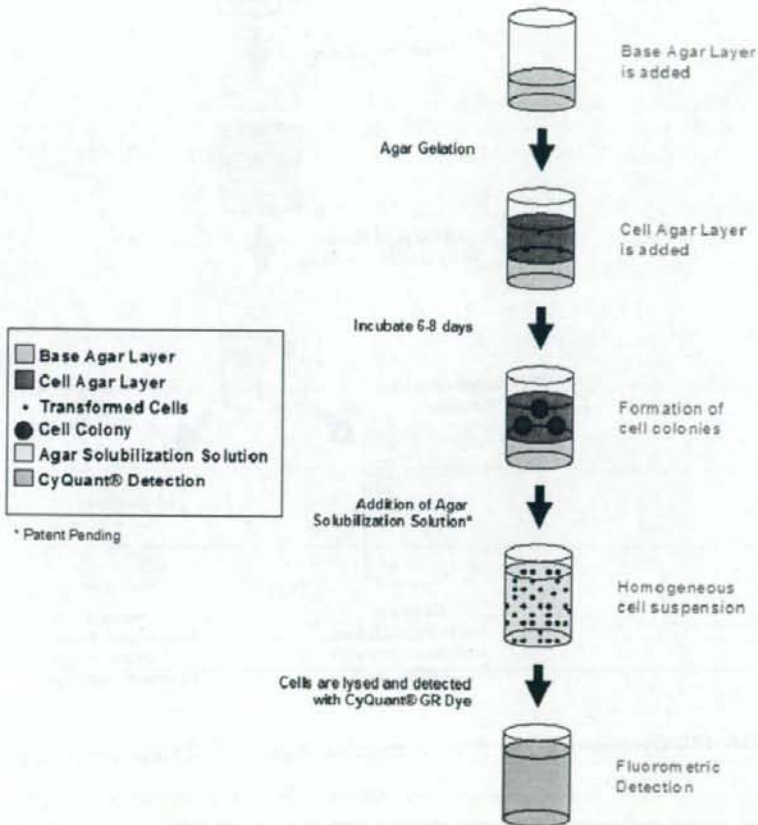
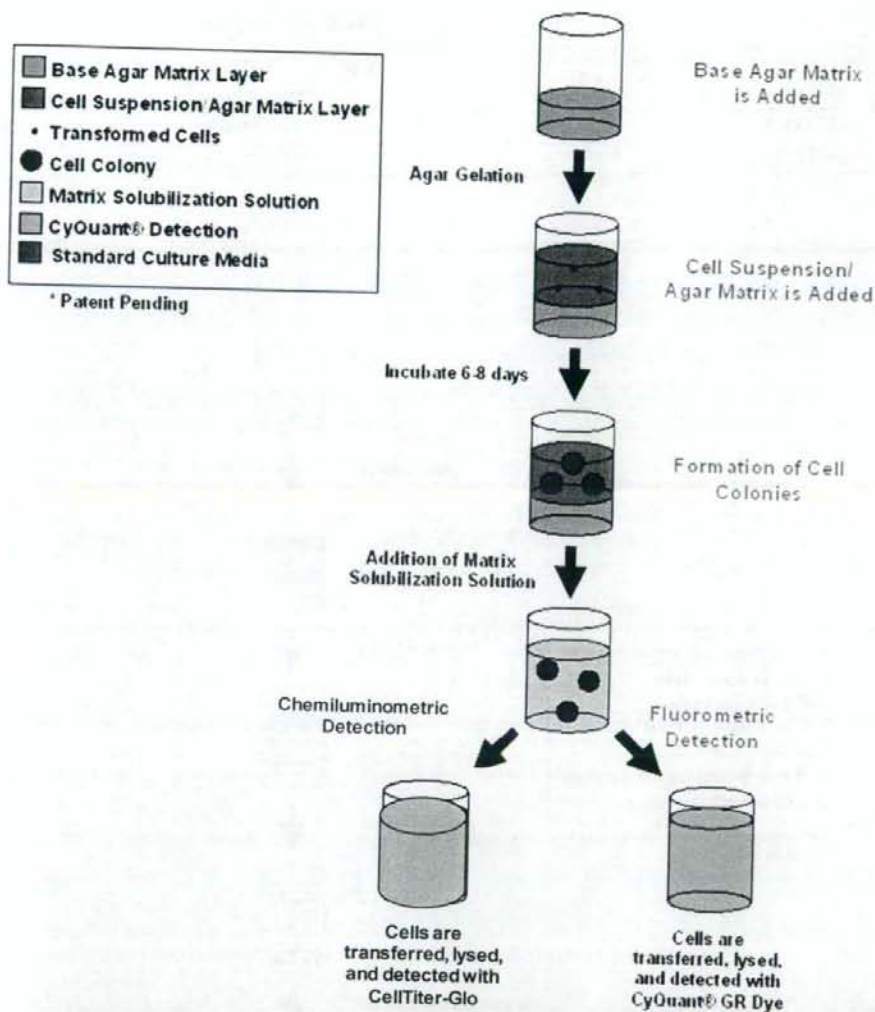


Fig. II-1 CBA-130 CytoSelect Cell Transformation Assay の測定原理

CBA-130 では、軟寒天層を可溶化した際に細胞を生きのまま回収できない。細胞数の評価は CyQuant GR を使用した蛍光検出により行う。





**Fig. II-2 CBA-140 CytoSelect Cell Transformation Assay (Cell Recovery) の測定原理**  
 軟寒天層を可溶化した際に細胞は生きたまま回収可能。オリジナルプロトコールでは CyQuant GR を使用した蛍光検出により細胞数を評価する（最下段右）。本研究ではこれに加え、CellTiter Glo による化学発光検出により細胞数を評価する系も検討した（最下段左）。

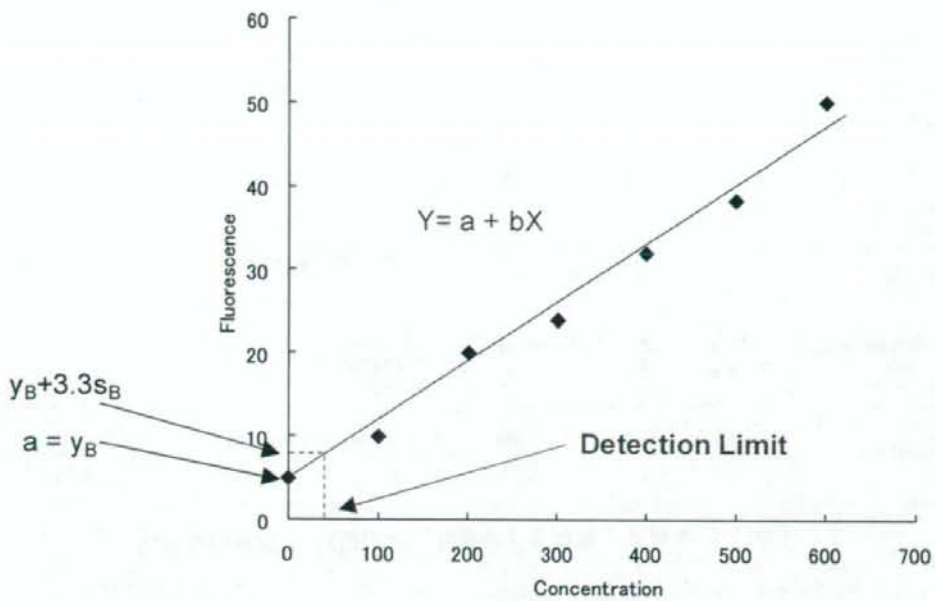


Fig. II-3 本研究における「検出限界」の定義の概念図

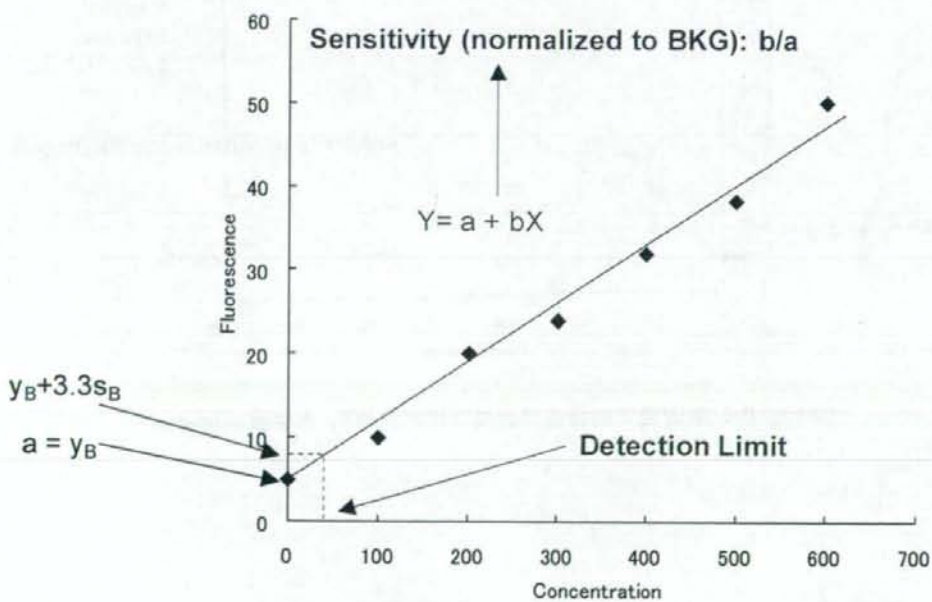


Fig. II-4 本研究における「感度」の定義の概念図



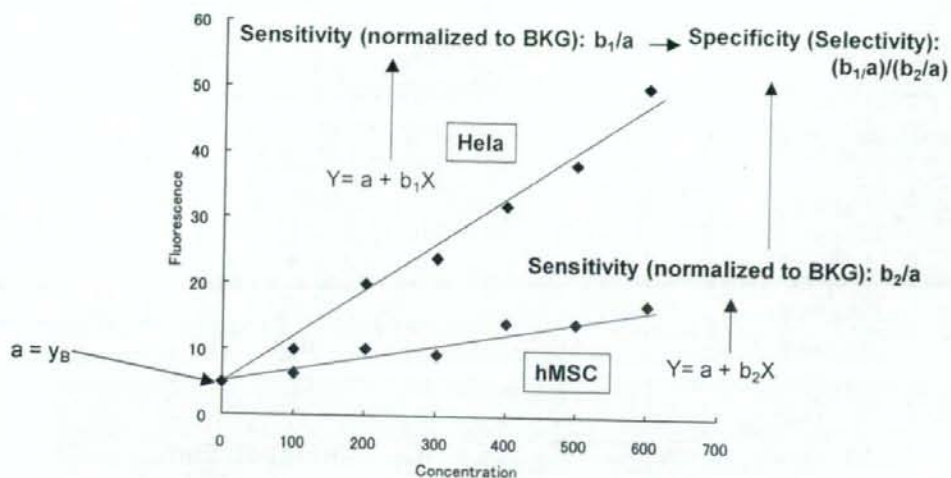


Fig. II-5 本研究における「特異性（選択性）」の定義の概念図

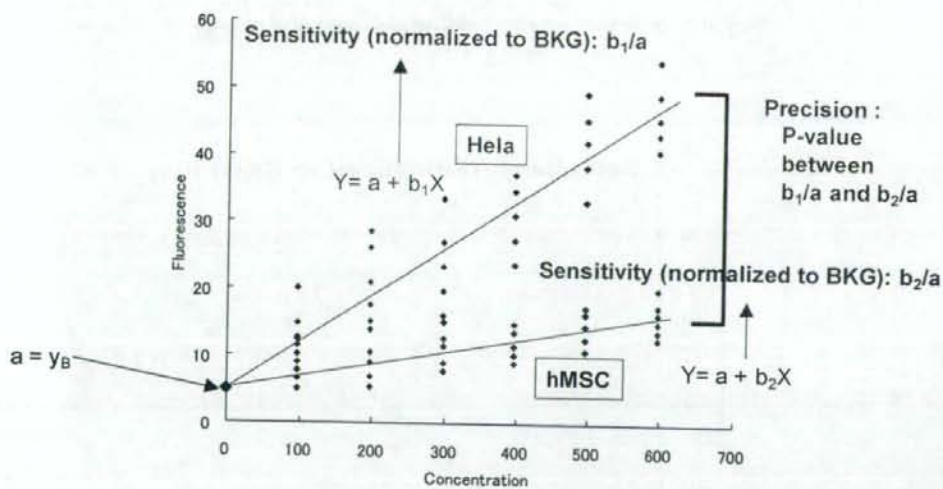
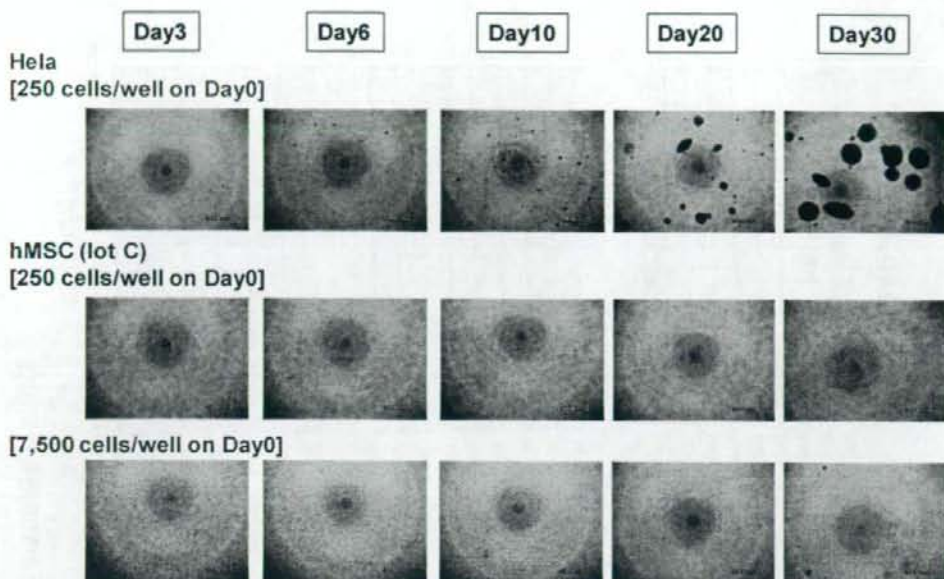


Fig. II-6 本研究における「精度（併行精度）」の定義の概念図



**Fig. II-7 軟寒天中のコロニー形成の時間経過**

Hela 細胞は時間依存的にコロニーの形成・拡大が認められたが、hMSC (Lot C)では高密度に播種してもコロニー形成は認められなかった。