

## D. 考察

### D-1 感染性因子の安全性評価技術開発

マイコプラズマの迅速検査法として、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法と 3 種類の PCR 法（局方 Nested PCR 法、リアルタイム PCR 法、PCR-ELISA 法）を、*M. fermentans* をモデルに使用して比較検討した。

マイコプラズマの酵素活性に基づく MycoAlert 法は、特別な処理を必要とせず生きたマイコプラズマを 30 分程度で測定可能であり、マイコプラズマ否定試験として局方に収載されている方法の中で最も迅速な PCR 法よりもさらに簡便で迅速な検査法である。検出感度は、カタログ値では、20 CFU/ml の *M. hyorhinis* 及び *Acoleplasma laidlawii* を検出可能とあり、培養法、DNA 染色法、PCR 法と比較して同等以上の感度があるとされる。しかし、今回の検討の結果、MycoAlert 法による検出には  $10^3 \sim 10^4$  CFU/ml 以上のマイコプラズマが必要であり、他の 3 種類の PCR 法と比較して 100~1000 倍以上検出感度が低いことが明らかになった。MycoAlert 法は酵素活性を発光量として測定しており、ルミノメーターの検出感度が低いとマイコプラズマの検出感度も低くなる。しかし使用したルミノメーターの感度検定を実施したところ、ATP 濃度で  $10^{-17}$  M まで測定可能であったことから、ルミノメーターの性能に問題があるわけではなく、MycoAlert 法そのものの検出感度が低いものと考えられた。

EP のマイコプラズマ試験法には、NAT を培養法又は DNA 染色法の代替法として用いるための条件として、*A. laidlawii*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M.*

*pneumoniae* 又は *M. gallisepticum*, *M. arginini* の 6 種類（製造工程で鳥類由来製品の利用、接触がある場合は *M. synoviae*、昆虫または植物由来製品の利用、接触がある場合は *Spiroplasma citri* を加えた 7 種類）をマイコプラズマ標準品に用いて培養法又は DNA 染色法と NAT との比較試験を実施し、培養法の代替法として用いるには、検出限界として 10 CFU/ml、DNA 染色法の代替法として用いるには、100 CFU/ml を検出できることを示す必要があるとしている。今回の結果より、MycoAlert 法は 100 CFU/ml の *M. fermentans* を検出できないことが明らかになり、培養細胞のルーチンのモニタリングとして高度に汚染された細胞を迅速に発見するには有効な方法と思われるが、あくまでも研究用としての用途に限られ、細胞の品質管理試験に用いるには妥当ではないことが示された。

3 種類の PCR 法は、いずれも 45 CFU/ml の *M. fermentans* を検出可能であったが、今回は 45 CFU/ml 以下の検討を行わなかったため、各試験法の検出限界は明らかにならなかった。しかし、局方 nested PCR 法は、1st PCR の段階で 45 CFU/ml の *M. fermentans* を検出できており、2nd PCR により少なくとも 10 倍以上は感度が上昇すると考えられることから、他のバリデーションにも適合すれば EP の基準でも培養法の代替法として使用できる可能性がある。

一方、リアルタイム PCR 法と PCR-ELISA 法については、精製マイコプラズマ DNA を用いて PCR 反応あたりの検出限界を検討したところ、リアルタイム PCR 法は *M. hyorhinis*, *M. orale* とともに 100 fg/reaction まで検出可能であった。しかし、

PCR-ELISA 法は、*M. hyorhinis* DNA が 1 pg/reaction, *M. orale* DNA は 10 pg/reaction 必要であり、リアルタイム PCR 法は 10 倍から 100 倍感度が高いことが明らかになった。PCR-ELISA 法は研究用試薬として販売されているが、リアルタイム PCR 法は細胞基材の品質管理試験用に最適化されていることから検出感度にも差が出たものと思われる。リアルタイム PCR 法は、PCR で増幅したものをオープンにすることなく測定可能であり、nested PCR 法のようにキャリーオーバーによる偽陽性の恐れが少なく、電気泳動の手間もなく測定可能で優れた方法と思われるが、SYBR Green で検出するため、試料は細胞由来 DNA の混入のない培養上清しか使えない。多くのマイコプラズマは細胞表面で増殖するが、マイコプラズマの種類によっては細胞表面ではなく細胞の中で増殖するものもあるとされ、このようなマイコプラズマの検出には向かないおそれがある。リアルタイム PCR 法を細胞基材の品質管理試験として用いるためには、使用者が細胞基材や培養液からの抽出効率も含めて、実際に厳密なバリデーションを実施して測定感度や測定法としての妥当性を明らかにすることが必要である。

#### D-2 細胞の遺伝的安定性等に関する検討

各種体性幹細胞を含む細胞治療用の細胞を、*in vitro*において培養する場合には、必ずいくつかの危険性が伴う。特に、染色体の不安定性が懸念されており、がん化につながる初期変化として、その検出は重要な課題となる。我々はヒト骨髄由来間葉系幹細胞 hMSC を用い、長期培養による遺伝的安定性を SNP チップをはじめとするアレイ

CGH の手法を用いて検討を行った。その結果、頻度は低かったが、解析した 1 例においてゲノムのコピー数の変化が認められ、マルチカラー-FISH 法による染色体解析において、7 番および 17 番染色体の転座および増幅を伴う異常を検出した。染色体特異的セントロメア FISH 法を用いて、比較的初期に起きた異常が細胞集団の中へ広がっていくことが確認されたが、いつこの異常が起きたかをはっきりさせるため、同一ロットを他の研究者から入手し、長期培養により同一の異常が出現するかを確認した。その結果、予想されたとおり、全く同じと考えられる異常が、大部分の細胞に観察され、この異常が細胞購入時に既に存在したことが証明できた。これまでに報告されたこのロットの増殖曲線を良く見ると、培養途中で立ち上がりを見せており（矢印）、この時期に異常細胞のポピュレーションが拡大したことが推察される（図 11）。同様の変化は、新たに療品部より入手した同一ロットの細胞を再培養した際にも観察され、異常の出現は増殖曲線からも予測された。異常の出現時期を見ると今回再培養した際にはその時期が早くなっているが、これは今回通常と比べ、比較的コンフルエントに近い状態で継代したことが影響したと考えられる。

残念ながら、異常が観察された細胞の由来については性別、年齢、人種程度の情報しか得られないため、癌などの疾患や治療歴が無かったかを知ることはできなかったが、細胞の提供者の体内に既にこうした異常が存在した可能性もあり、それを取り出して培養したことにより、増殖性による選択圧がかかり、異常細胞の割合が増大して

いったと考えられる。これまでの検討で、この異常をもった細胞は不死化まではされていないことがわかっているが、がん化に向けたステップを踏み出しているとも考えられる。今後、細胞を利用した医薬品の製造においては、こうした異常を発生させる可能性を最大限除き、より良い品質の細胞を供給する必要がある。その意味で、低頻度から増殖性の異常をもった細胞を検出できる手法の確立が望まれる。理想的には低頻度な異常細胞をオールマイティーに高感度検出できる試験法が望まれるが、現状では難しいと考えられるため、増殖性を生かして、一定期間継代をして異常を増幅した後検出することが現実的な対処法であると考えられる。自家細胞からの移植のように時間的な制限がある場合には難しいが、汎用性のあるバンキングした幹細胞を利用する場合などに対しては、こうした検査を課することは必要であると考えられる。

今回確認された染色体異常は、品質管理という観点とは別に、その成因や増殖性のメカニズムに関しても非常に興味もたれる。これまでの解析で、増幅部位に存在する遺伝子、および発現変化をする遺伝子群に関しての知見が得られているが、増殖性を説明するには至っていない。また、CGH解析の結果から、増加したマーカー染色体は7番染色体由来と考えられたが、今回のセントロメア FISHの結果から、セントロメアは17番染色体由来であることが確認された。ただし、m-FISHの結果からは他の部分に対しては7番染色体由来である可能性も考えられる。今後、クロモソームペインティング、切断点のシーケンス解析などで、詳細な染色体異常の解析を行なうこ

とにより、異常成因に対して理解を深めたい。特に、17番染色体は複雑なリアレンジメントを起こしていることが予想され、p53遺伝子等の関与も含めて、シーケンスレベルでの異常の解析が期待される。

次に、プロテオーム解析を用いた細胞の品質および有効性に関する評価のための検討を進め、Progenesis ソフトウェアの導入により、ノンラベル法によるサンプル間の定量比較が可能となった。これにより、今後、細胞、組織加工医薬品の品質評価に有用なバイオマーカーの開発につながると期待される。使用した LTQ-Orbitrap 質量分析機は、高分解能、および高感度であり、ゆえに得られるデータの複雑性が高まることによりこれまでデータ解析の部分が研究を進める上で課題となっていたが、Progenesis ソフトウェアの導入により、この部分が効率化できた。ピークの認識等に関しまだ改良の余地があるものの、マニュアルでの検証を加えることにより、バイオマーカーの検索に関して、実用可能なレベルにあることが確認できた。本ソフトウェアは2次元電気泳動で培われた技術を元に画像ベースでのピークの検出およびアライメントを行なっている点が特徴であるが、我々が独自に開発してきたソフトウェア mzMore は、数値データを直接取り扱っているという違いがあり、今後は Progenesis での経験を生かし、数値データを扱う利点を強調できる形で独自の開発を進めたい。LTQ-Orbitrap と Progenesis を組み合わせることにより、間葉系幹細胞のホールプロテオーム解析で、1万を超えるペプチドシグナルを検出可能であることがわかった。タンパク同定に関しても、複数のデータを

Progenesis でまとめて MASCOT 検索を行なうことにより、同定数の向上が可能となり、千以上のタンパク質の同定を行なうことができた。今回はモデルケースとして、3対3のデータ比較であったが、本ソフトウェア上では、さらに多くの LC・MS データの定量比較と統計解析が可能であり、今後はバイオマーカー検出に向けた検討を進める予定である。

さらに、今回同定されたペプチドシグナルは、検出されたペプチド数からすると半分以下であり、今後はマーカー候補に絞った MS/MS 測定を行なうことで、さらに同定効率を上げることが課題である。また、一方で細胞由来のペプチドを網羅的に同定しリファレンスデータベースを作成することも有用であると考えられることから、今後この両面からのアプローチを行なっていきたい。

今回、継代数の違いによる変化をモデルケースとして解析したが、ペプチドレベルでは 2 群間で明瞭な変化を示すペプチドが多く観察されたが、同定のついたタンパクレベルでの変化としては、はっきりとした変化は少なかった。その中で、発現変化のあったタンパク質として注目されるのは、細胞の増殖性に関与するタンパク質、および細胞骨格タンパクの変化である。前者は継代により発現が低下することにより、増殖性の低下、後者は培養による細胞の形態変化につながっている可能性があり、今後さらに解析例を増やすことにより検証を行ないたい。

またこの比較プロテオーム解析により、今後染色体異常の見られたロットに関して正常細胞との間で発現の変化するタンパク

質を明らかにする計画である。遺伝子発現解析の結果とあわせて、増殖性獲得のメカニズムの解明を行なうとともに、異常細胞の検出に有効なバイオマーカーとしての利用も期待できる。全く新規のタンパク質がマーカーとして検出されれば、異常細胞を低頻度から高感度に測定できる可能性もあり、期待が持たれる。

### D-3-1 MSC 及び N2d の糖鎖差異解析

定量的糖鎖プロファイリング法を用いて、MSC 及び N2d 糖鎖の差異解析を行った結果、MSC が神経細胞様に分化すると、3 及び 4 個のシアル酸が付加した 3 本鎖糖鎖の発現量が有意に減少すること、逆に Lac をもった 3 及び 4 本鎖糖鎖が増加することが明らかとなった。一般に、複合型 3 及び 4 本鎖糖鎖の分岐鎖は、それぞれ  $\beta$ 1-4-N-アセチルグルサミン転移酵素(GnT-IV) 及び  $\beta$ 1-6-N-アセチルグルサミン転移酵素 V (GnT-V) による GlcNAc の付加により伸長される。一方、Lac 側鎖は、 $\beta$ 1-3 N-アセチルグルサミン転移酵素( $\beta$ 3GnT) による GlcNAc の付加により伸長する。本研究の結果から、MSC を神経様細胞に分化させたときに、これらの糖転移酵素に何らかの変化が生じている可能性が示唆された。今後、これら酵素の活性あるいは発現量の変化と糖鎖プロファイルの変化、さらには神経様分化との関連性について調べる必要があると思われる。

Heiskanen らは、MSC を骨細胞に分化させると、高マンノース型糖鎖、及び Lac あるいは  $\alpha$ 2-3 NeuNAc をもつ糖鎖が減少すること、逆に硫酸エステル化された糖鎖が増加することを報告している(2009, *Glycoconj J*)。MSC を神経様細胞に分化させると、高

マンノース型糖鎖はほとんど変化せず、Lacをもつ糖鎖は増加していたことから、MSCは分化の方向により異なる糖鎖プロファイルを示すものと考えられ、糖鎖プロファイルは、MSCの分化誘導に対して鋭敏に反応する特異性の高い指標であることが示唆された。

### D-3-2 MSC 及び N2d のタンパク質発現差異解析

本研究では、両細胞の表層タンパク質について、アガロースゲル二次元電気泳動及び LC/MS/MS による発現差異解析を行った。その結果、神経様分化に伴い増加する 13 個のタンパク質、及び減少する 2 個のタンパク質を同定することができた。

タンパク質 A は、ウエスタンブロットによっても、神経様分化に伴い増加することが明らかになったことから、MSCの神経様分化を評価するための指標として利用できる可能性が高い。一方で、タンパク質 A のノックダウンは、神経誘導後の形態学的変化に影響しなかったことから、タンパク質 A は、神経様分化には直接関与していないことが示唆された。

ECM は細胞の増殖、分化及び接着等様々な現象に関与することが知られている。フィブロネクチン(FN)、コラーゲン、ラミニン及びプロテオグリカンなどのECMの構成成分をコートしたディッシュでMSCの分化誘導を行うと、分化させる細胞の種類、及びコートしたECM構成成分の組み合わせにより誘導効率が異なることが報告されている。例えば、I型コラーゲンは、骨芽細胞への分化は促進するが、軟骨芽細胞への分化には影響しないこと、またラミニンは脂肪細胞

への分化を抑制することなどが報告されている。以前に我々は、FN コートしたディッシュを用いてMSCの神経様分化誘導実験を行ったときに、MSCの増殖速度は増加するが、神経様細胞への分化効率が著しく低下することを確認している(データ示さず)。本研究において神経様分化に伴いFNの発現量が減少していたことは、興味深い結果である。

タンパク質 17 については、神経の変性に関係することが報告されているが、タンパク質 16, 24, 28(1), 29~31, 44 及び 45(2) については、神経分化との関連性は明らかにされていない。今後、これらのタンパク質の神経分化過程における機能について詳細に検討する予定である。また、今回我々は、高分子量タンパク質 (150kDa 以上) の差異解析を行うために、一次元目の等電点電気泳動にアガロースゲルを使用した。アガロースゲルは解像度が低いこと、また発現量の変化が予想される低分子量タンパク質の解析には適していないことから、今後はドライストリップゲルを用いた分解能の高い二次元電気泳動による差異解析も実施する必要があると考えられる。

近年、ES 細胞、iPS 細胞等の幹細胞における未分化性指標及び分化能予測指標の開発、及び目的幹細胞の分離技術に関する研究が盛んに行われている。一方で、MSCは幹細胞としての定義そのものが曖昧であり、未だ特異性の高い指標は見出されていない。これは、MSCが骨髄、臍帯血及び脂肪組織など、どの組織から分離されたかにより、細胞特性指標の発現パターンが異なることが影響していると思われる。また、MSCとして組織から分離された細胞は不均一な集

団であり、必ずしも単一の細胞で構成されていないことも MSC の細胞特性解析を難しくしている要因の一つになっている。本研究により見出された MSC と N2d を識別するための分子は、本実験で使用した MSC を用いたときの指標候補である。これらの指標を一般化するためには、起源、培養条件及び誘導条件の異なる MSC についても同様に評価し、共通性を確認することが不可欠であろう。

#### D-4 免疫原性の事前評価法の開発に関する基盤研究

ヒト血液系を有するキメラマウスを作製して細胞組織加工医薬品の免疫原性を評価するには、まず、外来造血幹細胞をマウスの骨髄ニッチに高効率に生着させる技術の確立が必須である。本研究では Ad ベクターを用いて造血幹細胞の生存・増殖・生着に重要である CXCL12 や VEGF、Ang-1 などのサイトカインをマウスの生体内で発現させることにより、マウスの造血幹細胞を骨髄から遊離させ、外来造血幹細胞の生着率を向上させることを目的としている。

昨年度までに Ad-CXCL12 をマウスに投与することにより、造血幹細胞などの未熟な細胞を含む血液細胞が骨髄から遊離することを示した。また、CXCL12 は B 細胞分化に必須であることから B 細胞の動態についても解析したところ、骨髄においては成熟 B 細胞が減少していたのに対し、脾臓においては B 前駆細胞が増加するという現象を見出した。そこで本年度は、Ad-CXCL12 投与により、B 細胞の動態の変化が液性免疫に

影響をおよぼしているかどうか検討した。

まず Ad-CXCL12 投与後のマウスの脾臓の組織切片を作製し、免疫抗体染色により B 前駆細胞が生着しているかどうか検討したところ、通常は成熟 B 細胞が存在する B 細胞領域に IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> の B 前駆細胞が存在することが明らかとなった。近年、B 前駆細胞は CXCL12 の受容体である CXCR4 を発現していること、そして骨髄中 CXCL12 高発現細胞がプレプロ B 細胞のニッチとして機能していることが報告されている。したがって、Ad-CXCL12 投与により血漿中 CXCL12 濃度が骨髄中の CXCL12 を上回ったため、B 前駆細胞が骨髄から動員されてきたものと考えられる。しかし、B 細胞が脾臓などのリンパ組織へ移入するには CXCL13 と CXCR5 のシグナルが重要であり、B 前駆細胞は CXCR5 の発現レベルが低いことが報告されている。したがって、CXCL13-CXCR5 のシグナル以外の経路が存在し、それに応答して B 前駆細胞は脾臓内に移入していると考えられるが、その詳細は不明である。

Ad-CXCL12 投与により B 細胞の動態が変化していたことから、TD 抗原または TI 抗原に対する液性免疫に影響を与えているかどうか検討した。その結果、コントロールベクター群と比較し、TD 抗原および TI 抗原に対する抗体産生量が変化していることが示された。脾臓のマージナルゾーン B 細胞や腹腔内の B-1 細胞は TI 抗原に対して効率良く抗体産生を行うことが知られている。

したがって、マウス生体への Ad-CXCL12 の投与により、これらの細胞が増加していることが考えられ、今後の検討課題である。なお、TD 抗原に対する抗体産生量が著明に低下している理由も不明である。今後、Ad-CXCL12 投与後の骨髄や脾臓、末梢血中のプラズマ細胞（抗体産生細胞）の動態について解析を進める予定である。

Ad-CXCL12 の投与により造血幹/前駆細胞を骨髄から遊離させることが可能であることから、外来造血幹細胞の骨髄ニッチへの生着が可能とあると考えられるものの、上述のように B 細胞の動態にも影響をおよぼしていることが示された。したがって、Ad-CXCL12 を用いる系では内在性 B 細胞の影響を考慮する必要がある。CXCL12 以外にも VEGF や Ang-1、Stem Cell Factor (SCF) などのサイトカインも骨髄から造血幹/前駆細胞を遊離させる作用を有している。Ad-VEGF をマウスへ投与することにより、血漿 VEGF 濃度を約 100ng/mL にまで上昇させることが可能であるため、今後は Ad-VEGF 単独投与、あるいは Ad-CXCL12 や Ad-Ang-1 との共投与により血液細胞の動態を解析するとともに外来骨髄細胞、外来造血幹細胞を移植による生着率を検討する予定である。また、近年、インターフェロン (IFN)  $\alpha$  が G0 期の造血幹細胞を G1 期へ移行させる作用があることが明らかにされた。IFN $\alpha$  と Ad-CXCL12 や Ad-VEGF を併用することで、これまでよりも効率良く造血幹細胞を骨髄から遊離させることが可

能であることが考えられるため、今後検討していきたい。

#### D-5 間葉系幹細胞由来生理活性物質プロファイリング法の検討

培養細胞が培地中に分泌するサイトカイン類等の生理活性物質の検出・測定は従来 ELISA を用いて行われることが多かったが、種類の多いサイトカイン類を網羅的に解析しようとする場合にスループットの点で問題があった。その点、多種類の抗サイトカイン抗体をプラットフォーム上に集積させたサイトカイン抗体アレイはハイスループットにサイトカイン含量・濃度のプロファイリングが可能であり、細胞の特性解析を行う上で有用なツールとなる可能性がある。

RayBiotech 社のサイトカイン抗体アレイは ELISA よりも、1) ハイスループット (1 サンプルで同時に多数のサイトカインの検出が可能)、2) 高感度 (例えば MCP-1 の場合、サイトカイン抗体アレイでは 4pg/mL までが測定可能なのに対し、通常の ELISA では 40pg/mL 程度の濃度がなければ明瞭なシグナルは得られない)、3) 検出域が広い (例えば IL-2 の場合、25k~250,000 pg/mL の検出域を持つのに対し、通常の ELISA の場合、100~1000 倍の検出域である)、4) ばらつきが少ない、5) 短時間で簡単、といった点で優れていると言われている。そこで、本研究では、hMSC の虚血環境下での生理的挙動を評価する場合における、このサイトカイン抗体アレイの有用性を検討した。虚血環境は低酸素・グルコース欠乏 (HGD, Hypoxia and Glucose Deprivation) 処理によって *in vitro* で再現した。

サイトカイン抗体アレイによる測定では、

HGD 処理群はコントロール群と比較して、PIGF のサイトカインの分泌上昇が認められた。RT-PCR の結果から、この分泌上昇は PIGF の遺伝子発現上昇を伴っていることが明らかとなった。しかし、ELISA による測定では HGD 処理群ならびにコントロール群において、PIGF は検出限界未満であった。これらの結果からすれば、サイトカイン抗体アレイは確かに高感度の検出系であることが示唆される。しかし、特性指標候補として PIGF を捉えた場合、今回 ELISA で確認された程度の極めて低濃度の PIGF がはたして生理的意義があるかという点が問題となる。さらに大きな問題としては、HGD 処理群とコントロール群との間での培地中 VEGF 濃度の差異に関して、サイトカイン抗体アレイによる検出と ELISA による検出とで結果に乖離があったことが挙げられる。VEGF は低酸素刺激により細胞での発現および分泌が増加する因子として良く知られており、低酸素・グルコース欠乏処理において言わば陽性コントロール的なものととらえることができる。ELISA の結果ならびに RT-PCR の結果は、虚血刺激による分泌・遺伝子発現上昇を示しており、従来の数多くの報告と矛盾しない。一方、サイトカイン抗体アレイでは、HGD 処理群における VEGF 分泌の増加は全く認められなかった。

これらの結果の乖離の原因の可能性の一つとしては、抗体の特異性の差異が挙げられる。すなわち、サイトカイン抗体アレイ中の抗 VEGF 抗体が VEGF に対して十分な特異性を持たず、非特異的なシグナルが検出されているのかもしれない。VEGF は狭義の VEGF である VEGF-A の他、VEGF-B、

VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PIGF-1、PIGF-2 の 7 つのアイソフォームがあり、これらの中には VEGF ファオルタナティブ スプライシング (Alternative splicing) によりいくつかのバリエーションを持つものも存在する。本研究で用いた ELISA アッセイの中に含まれる抗 VEGF 抗体は VEGF<sub>165</sub>/PIGF、VEGF-B<sub>167</sub>、VEGF-C ならびに VEGF-D とは交叉反応しないことが知られているが、サイトカイン抗体アレイ中の抗 VEGF 抗体の各アイソフォーム/バリエーションに対する選択性は明らかではない。従って、サイトカイン抗体アレイと ELISA との間の結果の乖離の原因の別の可能性としては、VEGF 抗体の VEGF アイソフォームまたはそのバリエーションへの選択性の差によることも考えられる。

#### D-6 血管内皮前駆細胞の特性解析指標の探索

血管内皮前駆細胞 (EPC) には少なくとも 2 つのタイプがあることが知られている。1 つは増殖能が低く、自身は管腔形成能をもたないが、血管形成に関与するサイトカイン等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 late EPC である。Early EPC と late EPC の定義は現在に至っても明確でなく、EPC に関する論文においても、early EPC と late EPC のどちらに関する研究であるのかが表題や要旨からは明らかでなく、method の内容から読者が判断しなければならない状況にある。したがって、EPC の分化誘導に関わる基礎的研究の観点はもとより、再生医療における実用化に向けた品質管理法の観点からも、



early EPC と late EPC の差異を明確にし、それぞれの特性を明らかにすることが重要である。

我々は EPC の発見当初から幹細胞である AC133 陽性細胞を起源とする EPC に関する研究を進め、トロンボポエチンを AC133 陽性細胞に添加すると early EPC 産生が増加すること等を明らかにしてきた (Kanayasu-Toyoda et al., J Cell Physiol. 195, 119, 2003, J Biol Chem 282, 33507, 2007)。一方で、単核球を起源として early EPC の調製が可能であることなどが明らかになり、単核球を投与する臨床研究や先進医療も多く行われるようになってきた。AC133 陽性細胞が単核球画分に含まれる細胞であること、また昨年度及び今年度の研究により AC133 陽性細胞由来 early EPC と単核球由来 early EPC は類似した性質を持つことが明らかになったこと (図 2-4)、単核球由来 early EPC の方が細胞数の確保が容易であること等を考慮し、early EPC については、単核球から分化誘導される細胞を用いて解析を進めることとした。

図 5 に示したように、early EPC と HUVEC では遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが明らかになった。Early EPC ではサイトカイン類の他に MMP-9 の産生が高く、MMP-9 が特性指標として有用である可能性が考えられた。MMP-9 は、基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンを分解することが知られている。また、MMP-9 は、c-kit リガンドを切断して可溶性リガンドとして放出させることにより、骨髄由来血管内皮前駆細胞の動員に関わることが報告されており (Heissig et al. Cell 109 625

2002)、MMP-9 のこれらの活性が、early EPC の血管形成促進作用に寄与している可能性が考えられる。MMP-9 は好中球やマクロファージにおいても発現が高いことが知られていることから、MMP-9 の発現の点でも、early EPC が血球系に近い特性を持つことが示唆された。

MMP-9 は転移能が高いガン細胞では細胞表面に存在することが報告されている (Yu et al. Gene Dev. 2000 14 163)。図 7-9 で示したように early EPC の細胞表面には MMP-9 が存在しており、early EPC は late EPC や組織由来血管内皮細胞と比較して高い浸潤活性を示した (図 10)。さらに、early EPC では、培養上清中には検出されない MMP-2 も細胞膜に存在していることが示された。CD44 は膜貫通型糖タンパク質で、細胞の分化、増殖、運動性に関わっており、腹腔マクロファージや乳癌細胞、黒色腫細胞では MMP-9 と CD44 が結合していることが報告されている (Yu et al. Gene Dev. 2000 14 163, Bansal Plos ONE 4 e4911 2009)。CD44 は early EPC において大量に産生される MMP-9 のみならず、産生量の少ない MMP-2 とも相互作用し、これらのプロテアーゼを細胞膜に留める役割を担っている可能性が考えられる。膜表面に存在する MMP-9 は IL-8 や IL-1 $\beta$  のプロセッシングに関わり、より生物活性の高い IL-8 や IL-1 $\beta$  を放出する役割があるという報告 (Steen et al. Blood 96 2673 2000, Schönbeck et al. J Immunol 161 3340 1998) があることから、これらの作用が協調的に作用して血管新生促進作用をもたらすものと思われる。したがって、early EPC において、MMP-2/MMP-9 が細胞膜に存在することが

early EPC の血管形成促進能と関連した重要な特性である可能性がある。

ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保に関する指針では、細胞・組織加工医薬品の品質管理においては、確認試験として、目的とする細胞・組織の形態学的特徴、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、その他の適切な遺伝型あるいは表現型の指標を選択して、目的とする細胞・組織であることを確認することが求められている。本研究の結果、early EPC の細胞表面に存在し、細胞浸潤能との関連が示唆された MMP-2 及び MMP-9 は、early EPC を特徴づける生化学的指標として用いることができる可能性がある。

平成 21 年末には、厚生労働省より「細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確認申請書記載要領案」が公表され、治療効果が期待される細胞を医薬品として開発するための規制環境整備が進んでいる。Early EPC は調製可能な細胞数が限られていることから、実用化に向けては、特性指標の同定と共に、限られた細胞数で実施可能な品質試験の確立も必要になると考えられる。特性指標検出法の開発も視野に入れ、EPC の品質試験法に有用な特性指標の探索と機能解析を継続していきたいと考えている。

#### D-7 O 結合型糖鎖解析技術の開発

本研究では細胞の糖タンパク質糖鎖解析を再生医療実用化のための細胞特性解析技術として応用するため、ムチン型糖鎖の比較糖鎖プロファイリングのための技術を開発した。その結果、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーを用いて、細胞由

来の GAGs およびムチン型糖鎖の分離法を検討し、培養癌細胞中の O-結合型糖鎖の一斉解析法を確立することができた。本研究により、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 O-結合型糖鎖を網羅的かつ定量的に解析できるようになった。

## E. 結論

### E-1 感染性因子の安全性評価技術開発

培養細胞を汚染するマイコプラズマの迅速検査法として、PCR 法 3 種類と酵素活性に基づく方法について比較検討した結果、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法は、PCR 法よりもさらに迅速かつ簡便で、生きたマイコプラズマを検出する利点があるが、検出限界は PCR 法よりもかなり劣り、ルーチンの検査でマイコプラズマに高度に汚染した細胞を見つけるには有用だが、細胞組織加工医薬品の品質管理試験としては妥当ではないことが明らかになった。一方、PCR 法のうち、Nested PCR 法とリアルタイム PCR 法は十分な感度を持つ可能性が示唆されたが、マイコプラズマ迅速試験法として品質管理に用いるには、複数のマイコプラズマ標準品を使用し、DNA の抽出効率も含めて十分なバリデーションにより妥当性を示す必要がある。

### E-2 染色体安定性等の評価技術開発

以前の研究において頻度は低いものの、hMSC 細胞の安定した異常として観察された染色体変化は、同一起源の細胞を用いて同一の異常が観察されたことより、細胞購入時より存在したことを証明することができた。生体内、もしくは hMSC の分離、樹立時にこうした増殖性の異常が発生していたという事実は、今後治療に用いる細胞の由来、および樹立時にその品質に対してより注意が必要であることを示唆している。現状では、低頻度からすべての異常を検出することは難しいため、増殖優位性を指標として、一部の細胞を用いて少し継代を進めた後、共通性のある異常を示さないこと

を確認した後にそのロットを利用するといった品質評価が望ましいと考えられる。

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いたが、細胞間の定量比較のためには、膨大なマスマスペクトルデータの効率的な解析が課題となっていた。今回市販のソフトウェアである Progenesis LC-MS の利用により、ノンラベルによる定量比較がある程度可能であることが示され、今後細胞の品質評価に有効なバイオマーカーの検索に活路が開かれた。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-3 同等性評価方法の開発

同位体標識 PHN を用いた定量的糖鎖プロファイリング法を用いて、神経様に分化した MSC では、トリシアロ及びテトラシアロ複合型 3 本鎖糖鎖が減少していることを明らかにした。また、MSC の神経分化前後の細胞表層タンパク質の発現差異解析を行い、タンパク質 A が増加すること、及び ECM を構成するタンパク質の発現が変動することを見出した。これらの分子は、MSC と分化誘導した細胞の識別や分離に利用できるものと期待される。

### E-4 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。なお、B 細胞の動態に影響

をおよぼしていることを考慮する必要はあるものの、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有用な知見であると考えられる。

#### E-5 間葉系幹細胞の特性解析・品質管理に関する研究

hMSC の薬効・効力には、生体内で hMSC 自身が分泌するサイトカイン類等の生理活性物質が大きく寄与していると言われている。従って、hMSC を生体に投与した場合、投与部位ないしホーミングしていく部位における hMSC の生理的挙動を評価することは、細胞・組織加工医薬品としての hMSC の有効性・安全性および品質を評価する際に重要と考えられる。たとえば hMSC は虚血性疾患の治療を目的に虚血部位に投与されることがあるが、そのような場合には、虚血部位に存在する hMSC がら分泌されるサイトカイン類等の生理活性物質の分泌プロファイルの評価することが、hMSC の特性解析指標の同定並びに品質管理のための規格設定のためには重要となってくる。そこで、本研究では、hMSC の虚血環境下での生理的挙動を評価する場合における、このサイトカイン抗体アレイの有用性を検討した。その結果、ELISA では検出できなかった虚血環境下での PIGF の分泌亢進が観察されるなど一定の有用性が示唆されたものの、従来から知られている虚血による VEGF の分泌亢進は観察されず、データの信頼性を確保するには、サイトカイン抗体

アレイ上にある抗体の特異性を詳細に検討するなどの対策が必要であると考えられた。

#### E-6 血管内皮前駆細胞の特性解析・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) 形態と細胞表面マーカー CD45、CD31 及び eNOS 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 HUVEC 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見出し、early EPC において MMP-9 が高発現していることを mRNA 及びタンパク質レベルで明らかにした。
- 3) Early EPC では MMP-9 のみならず、MMP-2 も細胞膜に存在していることを明らかにした。
- 4) Early EPC が高い細胞外マトリックス浸潤活性を持ち、MMP-9 及び MMP-2 が浸潤能に関連した機能的特性指標であることを明らかにした。

#### E-7 細胞特性・品質解析技術の開発

本研究で開発した技術は、O-結合型糖鎖の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有する。

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、細胞の品質を管理するための迅速、簡便、かつ特異的・定量的な方法として、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 おわりに**

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引き続き必要だと考えられる。

#### **F. 健康危険情報**

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

内田恵理子：“第8章 細胞基材のマイコプラズマ試験”、先端バイオ医薬品の評価技術、山口照英監修、シーエムシー出版、東京(2010)、pp151-167

内田恵理子：“20. バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験”、日本薬局方技術情報 2010 追補 (JPTI2010) 第15改正第一追補/第二追補対応、(財)日本公定書協会編、(株)じほう、東京(2010)、pp85-91

内田恵理子、山口照英：医薬品のウイルス安全性確保：核酸増幅検査 (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、YAKUGAKU ZASSHI, 130 (2), 163-169 (2010)

宮田直樹、川崎ナナ、内田恵理子、蜂須賀曉子：平成19年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告：日本薬局方の名称関連項目の科学的整備に関する研究、医薬品研究, 40, 587-598 (2009)

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、Pharmstage, 9 (2), 1-5 (2009)

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.* 673: 9-20, 2009.

Yamaguchi T, Suzuki T, Arai H, Tanabe S, Atomi Y. Continuous mild heat stress induces differentiation of mammalian myoblasts, shifting fiber type from fast to slow. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298 : C140-C148, 2010.

Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Akira Harazono, Toru Kawanishi, Teruhide Yamaguchi: Identification of glycoproteins carrying a target glycan-motif by liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry. Identification of Lewis x-glycoproteins in mouse kidney. *J. Proteome Res.*, 8, 3415-3429 (2009).

Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Daisuke Takakura, Yuan Qin, Huang Xiaoyu, Teruhide Yamaguchi: The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.*, 32 (5) 796-800 (2009)

Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Toru Kawanishi, Teruhide Yamaguchi: Alteration of N-glycosylation in the kidney of systemic lupus erythematosus model mouse. Relative quantification of N-glycans by using isotope tagging method. *Immunology*, 336-345 (2009).

川崎ナナ、糖鎖関連医薬品の開発と分析化学、*ぶんせき*, 421(1), 17-22 (2010).

Tashiro K., Inamura M., Kawabata K., Sakurai F., Yamanishi K., Mizuguchi H. Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells*, 27, 1802-1811 (2009)

Tashiro K, Kondo A, Kawabata K, Sakurai H, Sakurai F, Yamanishi K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Efficient osteoblast differentiation from mouse bone marrow stromal cells with polylysine-modified adenovirus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379, 127-132 (2009)

Nishida M, Suda R, Nagamatsu Y, Tanabe S, Onohara N, Nakaya M, Kanaho Y, Shibata T, Uchida K, Sumimoto H, Sato Y, Kurose H. Pertussis toxin

upregulates angiotensin type 1 receptors through Toll-like receptor 4-mediated Rac activation. *J Biol Chem* 2010 (in press)

Sakamoto K, Hiraiwa M, Saito M, Nakahara T, Sato Y, Nagao T, Ishii K. Protective effect of all-trans retinoic acid on NMDA-induced neuronal cell death in rat retina. *Eur J Pharmacol.* 2010 (in press)

Nishida M, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima N, Ide T, Inoue R, Kurose H. Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr69 is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. *J Biol Chem* 2010 (in press)

佐藤陽治 ヒト幹細胞からの肝細胞分化誘導とその創薬非臨床試験への応用 *実験医学 (増刊)* 2010;28:334-338.

西田基宏, 佐藤陽治, 仲矢道雄, 黒瀬等 Gタンパク質共役型受容体-TRPC チャンネルタンパク複合体形成による心肥大シグナル制御 *日本薬理学雑誌* 2009;134:131-6.

Tanabe S, Sato Y, Suzuki K. Characteristics of stem cells based on expression profile of molecular markers. *Res. Adv. in Biochemistry.* 2009:1-8.

Fujishita K, Ozawa T, Shibata K, Tanabe S, Sato Y, Okuda T, Maeda S, Koizumi S. Grape seed extract (GSE) acting on astrocytes reveals neuronal protection against oxidative stress via interleukin-6-mediated mechanisms. *Cell Mol Neurobiol.* 2009;29:1121-9

佐藤陽治 ヒト細胞・組織加工医薬品などの安全性確保 *医学のあゆみ* 2009;229:893-896.

Takuo Suzuki, Akiko Ishii-Watabe, Minoru Tada, Tetsu Kobayashi, Toshie Kanayasu-Toyoda, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Importance of FcRn in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc

domain of human IgG1: A comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human FcRn. *J.Immunol.* 184(4), 1968-76 (2010)

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* 36, 611-627 (2009)

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* p.119-132 (2009)

Kakoi N, Kinoshita M, Kawasaki N, Yamaguchi T, Hayakawa T, Kakehi K. Capillary electrophoresis analysis of contaminants in heparin sodium for the Japanese pharmacopoeia purity test. *Yakugaku Zasshi.* 2009, 129(10), 1255-1264.

Yamada K, Watanabe S, Kita S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K. Determination of Tn antigen released from cultured cancer cells by capillary electrophoresis. *Anal Biochem.* 2010, 396(1), 161-163.

Kinoshita M, Ohta H, Higaki K, Kojima Y, Urashima T, Nakajima K, Suzuki M, Kovacs KM, Lydersen C, Hayakawa T, Kakehi K. Structural characterization of multibranched oligosaccharides from seal milk by a combination of off-line high-performance liquid chromatography-matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry and sequential exoglycosidase digestion. *Anal Biochem.* 2009, 388(2), 242-253.

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.* 2009 Feb;8(2):521-37.

## 2. 学会発表

眞田由親、新村卓也、井関寛、内田恵理子、山口照英、小木美恵子：HL60細胞におけるDimethyl Sulfoxideによる分化誘導とc-mycの変化について、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月、横浜

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による探索、日本薬学会第130年会、2010年3月、岡山

鈴木孝昌, Suresh Thiruppathi, 押澤正, Ramesh Doss, 田邊思帆里, 佐藤陽治, 鈴木和博 細胞・組織加工医薬品の品質評価および標準化に向けたプロテオーム解析技術の利用 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会 (2009年7月)

T. Suzuki, A. Kohara, A. Ramadan, Y. Kikuchi, M. Honma, M. Hayashi Comparative study on in vivo genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for the Balkan Endemic Nephropathy. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009年8月)

C. Furihata, T. Watanabe, A. Tadakuma, M. Kido, Y. Ishikawa, M. Natsume, M. Nakajima, T. Suzuki, S. Hamada, A. Koeda, K. Narumi, K. Oshida, A. Maeda, M. Hirayama, T. Sakuma, H. Sanada, I. Hanahara, M. Sakurai, W. Ohyama, E. Okada, H. Honda, S. Sutou Differential gene expression and gene networks induced with genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in mouse liver examined by quantitative real-time PCR. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009年8月)

H. Takasawa, H. Suzuki, I. Ogawa, Y. Shimada, K. Kobayashi, Y. Terashima, H. Matsumoto, R. Ohta, K. Oshida, J. Tanaka, C. Aruga, N. Ikeda, T. Suzuki, T. Hagiwara, S. Hatakeyama, K. Nagaoka, J. Yoshida, T. Imamura, A. Miyazaki, Y. Saitou, S. Minowa, M. Kawabata, M.

Hayashi Summary of collaborative studies of liver micronucleus assay in young rats · JEMS/MMS Collaborative Study Group. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009年8月)

T. Suzuki, Y. Luan, A. Kohara, M. Kogi, S. Tanabe, M. Honma, T. Yamaguchi, K. Suzuki Patterns of c-myc amplification revealed by the CGH array. Workshop: Genomics in Cancer Risk Assessment (2009年8月)

C. Furihata, T. Watanabe, K. Suenaga, H. Takasawa, A. Tadakuma, M. Kido, Y. Ishikawa, M. Natsume, M. Nakajima, T. Suzuki, S. Hamada, A. Koeda, K. Narumi, K. Oshida, A. Maeda, M. Hirayama, T. Sakuma, H. Sanada, I. Hanahara, M. Sakurai, W. Ohyama, E. Okada, H. Honda, S. Sutou Comparative analysis of gene expression and network between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in mouse and rat liver examined by quantitative real-time PCR. Workshop: Genomics in Cancer Risk Assessment (2009年8月)

T. Suzuki Genomic and Proteomic Approach in Toxicology. International Conference on Environment, Occupational & Lifestyle Concerns (2009年9月)

T. Suzuki Proteomics approach to find new biomarkers for toxicity. International Conference on Molecular Tools in Environmental Toxicology (2009年9月)

鈴木孝昌 個の医療の実現に向けて必要となる診断技術 第46回全国衛生化学技術協議会年会(2009年11月)

鈴木孝昌, 小原有弘, ラマダンアリ, 菊池裕, 本間正充, 林真 バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシンA 日本環境変異原学会第38回大会(2009年11月)



スレッシュ ティルパッティ, ラメッシュ  
ドス, 押澤 正, 宮澤明史, 鈴木和博,  
鈴木孝昌 ショットガンプロテオミクスに  
よる変異原研究・遺伝子傷害性物質処理した  
マウス尿を使った検討 日本環境変異原学  
会第 38 回大会(2009 年 11 月)

降旗千恵, 渡辺貴志, 末永和也, 高沢博  
修, 鈴木孝昌, 夏目匡克, 中嶋圓, 濱田修  
一, 多田隈英未, 小枝暁子, 成見香瑞範,  
大信田系裕, 前田晃央, 平山満朝, 佐久  
間智宏, 真田尚和, 大山ワカ子, 岡田恵  
美子, 本田大士, 須藤鎮世 トキシコゲ  
ノミクスに関する JEMS/MMS 共同研究  
(2009 年): ラットとマウス肝臓における  
qPCR 法による遺伝子発現比較解析 日本  
環境変異原学会第 38 回大会(2009 年 11 月)

鈴木孝昌, 小原有弘, 小木美恵子, 田邊思  
帆里, 本間正充 8 番染色体特異的 CGH ア  
レイ解析による各種がん細胞株での c-myc  
遺伝子領域増幅形式の解析 第 68 回 日本  
癌学会学術総会 (2009 年 10 月)

西川可穂子, 山下香織, 石井暁子, 伊藤友  
美, Thiruppathi Suresh, 鈴木孝昌, 藤原  
葉子 高脂肪食マウス肝臓におけるプロテ  
オーム解析 - 食餌性レスベラトロールの  
評価 - 日本農芸化学会 2010 年度大会  
(2010 年 3 月)

川崎ナナ: 糖タンパク質性医薬品の開発と  
質量分析. 第 7 回日本糖質科学コンソーシ  
ウムシンポジウム, 大阪(2009, 12, 7,8)

Kenji Kawabata, Katsuhisa Tashiro,  
Mitsuru Inamura, Fuminori Sakurai,  
Hiroyuki Mizuguchi, Adenovirus  
vector-mediated differentiation into  
adipocytic and osteoblastic lineages from  
mouse induced pluripotent stem (iPS)  
cells. 12th Annual Meeting of American  
Society of Gene Therapy, San Diego, USA,  
2009 年 5-6 月 (ポスター発表)

稲村 充, 川端 健二, 櫻井 文教, 形山  
和史, 林田 みどり, 松村 紘子, 古江一  
楠田美保, 水口裕之, 未分化ヒト ES 細胞か

ら中内胚葉へのラミニンによる分化促進効  
果、日本組織培養学会第 82 回大会、栃木、  
2009 年 5 月 18-19 日 (口頭・ポスター発表)

稲村 充, 川端 健二, 形山 和史, 梅澤  
明弘, 阿久津英憲, 林田 みどり, 松村 紘  
子, 古江一楠田美保, 水口裕之, ヒト ES 細  
胞や iPS 細胞からの内胚葉系細胞および肝  
細胞への分化誘導法の開発、第 16 回肝細胞  
研究会、山形、2009 年 6 月 26-27 日 (ポ  
スター発表)

4. 田代 克久, 稲村 充, 川端 健二, 櫻  
井 文教, 水口 裕之, アデノウイルスベ  
クターによるマウス iPS 細胞への高効率遺  
伝子導入法の確立と分化誘導への応用、第  
25 回日本 DDS 学会学術集会、東京、2009  
年 7 月 3-4 日 (ポスター発表)

Katsuhisa Tashiro, Mitsuru Inamura,  
Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai,  
Hiroyuki Mizuguchi, Adipocyte and  
osteoblast differentiation from mouse  
induced pluripotent stem cells by efficient  
adenoviral transduction, 7th Annual  
Meeting of International Society of Stem  
Cell Research, Barcelona, Spain, 2009 年 7  
月 (ポスター発表)

Mitsuru Inamura, Katsuhisa Kawabata,  
Fuminori Sakurai, Kazufumi Katayama,  
Midori Hayashida, Hiroko Matsumura,  
Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi,  
Laminin promotes human embryonic  
stem cell differentiation into  
mesodendoderm, 7th Annual Meeting of  
International Society of Stem Cell  
Research, Barcelona, Spain, 2009 年 7 月  
(ポスター発表)

川端 健二, 田代 克久, 水口 裕之, ア  
デノウイルスベクターを用いた iPS 細胞へ  
の遺伝子導入の最適化と分化誘導、第 82 回  
日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 21-24  
日 (シンポジウム、口頭発表)

稲村 充, 川端 健二, 櫻井 文教, 形山  
和史, 林田 みどり, 松村 紘子, 古江一  
楠田美保, 水口裕之, 未分化ヒト ES 細胞か

ら中内胚葉へのラミニンによる分化促進効果、ファーマ・バイオフィオーラム 2009 第 8 回、名古屋、2009 年 11 月 14-15 日ポスター発表)

Katsuhisa Tashiro, Mitsuru Inamura, Norihisa Furukawa, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi, Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human induced pluripotent stem cells, 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月 9-12 日 (ポスター発表)

田代 克久、稲村 充、形山 和史、櫻井 文教、古江-楠田美保、川端 健二、水口 裕之、アデノウイルスベクターを用いた未分化ヒト ES/iPS 細胞への高効率遺伝子導入、日本薬学会第 130 年会、岡山、2010 年 3 月 28-30 日 (ポスター発表)

千蔵 さつき、仲矢 道雄、佐藤 陽治、小柳 悟、大戸 茂弘、西田 基宏、黒瀬 等 Metoprolol の長期投与が心臓に及ぼす影響 日本薬学会 第 130 年会 (平成 22 年 3 月、岡山)

西田 基宏、佐藤 陽治、上村 綾、仲矢 道雄、黒瀬 等 圧負荷による P2Y6 受容体-G12/13 蛋白質経路を介した心臓の線維化 第 82 回日本生化学会大会 (平成 21 年 10 月 21-24 日、神戸) 生化学 2009; 81:366

佐藤 陽治 血管の『しなやかさ』と甲状腺ホルモン 日本薬学会薬理系薬学部会 生体機能と創薬シンポジウム 2009 (平成 21 年 8 月 26-27 日、東京)

Nishida M, Sato Y, Nakaya M, Inoue K, Inoue R, Mori Y, Kurose H. Formation of P2Y2 receptor-TRPC5-eNOS signal complex defines ATP-stimulated anti-hypertrophic responses in rat neonatal cardiomyocytes. Fukuoka Purine 2009 (Joint with JSPS Core-to-Core Program A Satellite Symposium for IUPS2009) (July, Fukuoka, 2009)

Nishida M, Sato Y, Uemura A,

Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Inoue K, Kurose H. P2Y6 receptor-Ga12/13 signaling triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. Fukuoka Purine 2009 (Joint with JSPS Core-to-Core Program A Satellite Symposium for IUPS2009) (July, Fukuoka)

Kurose H, Nishida M, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T. Cardiac fibrosis triggered by P2Y6-Ga12/13 signaling in cardiomyocytes. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009, July, Kyoto).

鈴木 孝昌, Suresh Thirupathi, 押澤 正, Ramesh Doss, 田邊 思帆里, 佐藤 陽治, 鈴木 和博 細胞・組織加工医薬品の品質評価および標準化に向けたプロテオーム解析技術の利用 日本ヒトプロテオーム機構 (JHUPO) 第 7 回大会 (平成 21 年 7 月 27-28 日、東京)

豊田淑江、北川博子、石井明子、多田 稔、鈴木 琢雄、小林 哲、山口照英：血管内皮前駆細胞の機能解析-Early EPC を中心に 第 9 回日本再生医療学会総会 2010 年 3 月 広島

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：抗体医薬品と Fc ドメイン融合タンパク質医薬品における胎児性 Fc 受容体 (FcRn) 親和性の差異に関する検討 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 岡山

多田 稔、伊藤さつき、川崎ナナ、石井 明子、鈴木 琢雄、小林 哲、豊田 淑江、山口照英：Notch リガンド糖タンパク質 Jagged1 の Allagille 症候群関連変異体の機能解析 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 神戸

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 および FcγRI)との結合特性比較 第 82 回日本生化学大会 2009 年 10 月 神戸

北川博子、豊田淑江、石井明子、鈴木琢雄、多田 稔、小林 哲、山口照英：血管内皮細胞である Early EPC の機能解析 第 82 回日本生化学大会 2009 年 10 月 神戸

小林哲、鈴木琢雄、石井明子、川崎ナナ、山口照英：MALDI-TOF MS におけるマトリックスの塩基性アミノ酸残基に対する影響 質量分析討論会 2009 年 5 月 大阪

田中佑樹、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 ヒト組織球性リンパ腫細胞に発現する Polylectosamine-Carrier Protein のグライコプロテオーム解析 第 129 回日本薬学会年会

梶直孝、木下充弘、川崎ナナ、早川堯夫、掛樋一晃 ヘパリンナトリウム純度試験へのキャピラリー電気泳動法の適用について 第 129 回日本薬学会年会

仲西暁良、木下充弘、浦島匡、早川堯夫、掛樋一晃 アジアゾウミルク中の高分子中性オリゴ糖の構造解析 第 129 回日本薬学会年会

山本晃裕、山田佳太、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疾患マーカーとしての可能性 第 129 回日本薬学会年会

能登啓介、奥田茜、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 加齢マーカーとしての糖鎖の可能性 第 129 回日本薬学会年会

山田佳太、渡辺沙木絵、木下充弘、中家修一、早川堯夫、掛樋一晃 Tn 抗原の化学的分析法 第 129 回日本薬学会年会

山田佳太、木下充弘、中家修一、早川堯夫、掛樋一晃 癌細胞上に発現するムチン型糖鎖の比較解析 第 129 回日本薬学会年会

山田佳太、渡辺沙木絵、木下充弘、中家修

一、早川堯夫、掛樋一晃 培養癌細胞中の O 結合型糖鎖の網羅解析 第 29 回日本糖質学会年会

山田佳太、宇佐美克明、早川堯夫、掛樋一晃、入村達郎 エボラウイルス表面糖タンパク質中の N・及び O 結合型糖鎖解析 第 29 回日本糖質学会年会

能登啓介、奥田茜、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 加齢に伴うラット血清糖タンパク質糖鎖の変化・加齢マーカーとしての糖鎖の可能性 第 29 回日本糖質学会年会

田中佑樹、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 ヒト組織球性リンパ腫細胞に発現する Polylectosamine-Carrier Protein のグライコプロテオーム解析 第 59 回日本薬学会近畿支部大会

木下充弘、能登啓介、奥田茜、渡部沙木絵、早川堯夫、掛樋一晃 加齢により変動する血清糖タンパク質糖鎖の解析と加齢マーカーとしての可能性の検証 第 59 回日本薬学会近畿支部大会

田中佑樹、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 キャピラリー電気泳動を用いたヒト組織球性リンパ腫細胞に発現する Polylectosamine-Carrier Protein のグライコプロテオーム解析 第 82 回日本生化学会大会

梶直孝、山田佳太、田中佑樹、岩本竜昇、木下充弘、三善英知、森脇健太、早川堯夫、掛樋一晃 フコシル化を回復させた HCT116 細胞上に観察される糖タンパク質糖鎖 第 82 回日本生化学会大会

能登啓介、奥田茜、渡部沙木絵、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 加齢に伴うラット血清糖タンパク質糖鎖の変化 第 82 回日本生化学会大会

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

名称：幹細胞から肝細胞への分化誘導方法

出願番号：特願 2009-247342

出願日：2009/10/28

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明者：水口裕之、川端健二、稲村充、古江美保

### 2. 実用新案登録 なし

### 3. その他 なし