

分化させると、dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1 及び dHex1Hex6HexNAc5NeuNAc1-3 の結合量が増加すること、及び Hex6HexNAc5NeuNAc3-4 が減少することを明らかにした。この結果は、昨年度に実施した定量的糖鎖プロファイリングの結果とよく一致していた。一方、神経細胞に特徴的に発現している糖鎖として、HNK-1 糖鎖やポリシアル酸付加糖鎖が知られているが (Morita, I., *et al. J. Biochem.*, 2008; Yanagishita, M., *et al. Glycobiology* 2007)、それらの糖鎖は検出されなかった。HNK-1 糖鎖やポリシアル酸付加糖鎖は、神経回路形成や神経細胞接に関係することが示唆されていることから、本研究で調製した神経様分化細胞は、機能的には未成熟な段階の細胞である可能性が示唆された。

MSC 及び骨分化細胞の糖鎖構造及び分布の変化については、(Heiskanen, A., *et al., Glycoconj. J.*, 2009) らが、MSC を骨分化させると、高マンノース型糖鎖の結合量が減少し、dHex0-1Hex5HexNAc4、dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1 及び dHex0-1Hex6HexNAc5 の結合量が増加することを明らかにしている。本研究では、dHex0-1Hex5HexNAc4、dHex1Hex5HexNAc4NeuNAc1 及び Hex6HexNAc5 については同じ傾向を示したが、高マンノース型糖鎖及び dHex1Hex6HexNAc5 の変化はみられなかった。さらに、本研究で最も変化のみられた Hex6HexNAc5NeuNAc3-4 は Heiskanen らの報告では検出されていなかった。この原因としては、MSC の細胞株や分化誘導法等の違いが考えられた。

D-3-2 PCA による細胞の識別

本研究では、糖鎖分布の比較に使用した糖鎖のピーク面積情報を用いて PCA を行い、分化前後の細胞の識別を試みた。スコアプロットにおいて、神経様分化細胞及び骨分化細胞は MSC とは異なる位置にプロットされることが確認され、LC/MS による糖鎖解析法と PCA を組み合わせた手法は、幹細胞と加工細胞の識別方法として有用であることが確認された。

D-4 免疫原性評価のための基盤技術開発

ヒト血液系を有するキメラマウスを複製して細胞組織加工医薬品などの医薬品の *in vivo* における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 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。そこで本年度では Ad-CXCL12 投与後に外来骨髄細胞を移植した場合の移植率について検討を行った。その結果、Ad-Luc 投与後に骨髄細胞を移植した群においては、外来造血幹細胞がほ

とんど生着しなかったのに対し、Ad-CXCL12 投与後に移植した群においては約半数のマウスにおいて生着がみとめられた (Table 8)。したがって、Ad-CXCL12 投与したマウスの骨髄では造血幹細胞の空きニッチが形成され、その結果、外来造血幹細胞が生着したものと考えられる。しかしながら、Ad-CXCL12 投与マウスにおける移植率 (キメリズム) は 0.06% と極めて低いものであったため、Ad-CXCL12 の単独投与では生着率向上は困難であることが推察される。今回は骨髄微小環境を維持するために X 線照射を行っていないことから、レシピエントマウスの血液細胞が残っており、そのために移植率が低くなったものと考えられる。したがって、Ad-CXCL12 投与した後に、さらに抗がん剤を投与することにより、骨髄から遊離したレシピエントの血液細胞を死滅させ、その後外来造血幹細胞を移植することで、生着率の向上に繋がることを期待される。

本年度はさらに、VEGF 発現 Ad ベクターをマウス生体へ投与した際の血液細胞の動態についても解析を進めた。その結果、CXCL12 と同様に、骨髄から造血幹細胞を含む血液細胞が遊離し、末梢血へ動員されることが明らかとなった (Fig. 16, 17)。したがって、CXCL12 と同様に、VEGF は骨髄の造血幹細胞ニッチを形成させるのに有用であることと考えられる。また、Ad-VEGF 投与時には、Ad-CXCL12 投与時とは異なり、Flt-1 陽性細胞が末梢血にお

いて増加することが示された (Fig. 18)。Flt-1 陽性細胞中には骨髄再構築能を有する造血幹細胞も含まれていることが過去に報告されている (Hattori K. et al., 2002 Nat. Med.)。したがって、Ad-VEGF 投与により末梢血へ動員される Flt-1 陽性細胞中にも造血幹細胞が含まれている可能性もあるため、今後、移植実験を行い、確認する必要がある。また、上述のように Ad-CXCL12 の単独投与では移植率を向上させることが困難であるため、今後、Ad-CXCL12 と Ad-VEGF の共投与時の血液細胞の動態を解析するとともに、Ad-CXCL12 と Ad-VEGF を共投与したマウスに外来造血幹細胞を移植することにより、生着率が向上するか否か検討する必要がある。

本年度はさらに、ES、iPS 細胞由来血液細胞を細胞組織加工医薬品のモデルとして使用するため、ES、iPS 細胞から血液細胞への分化誘導法の開発も試みた。その結果、造血系サイトカインを作用させる従来の誘導法と比較し、Ad ベクターを用いて HoxB4 遺伝子を一過性に導入することにより、効率良く血液細胞を誘導可能であることが明らかとなった (Fig. 19)。今後、実際に医薬品のモデルとなるか否か、移植することにより明らかになると思われる。

D-5 細胞特性・品質解析技術の開発(1)

D-5-1 虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の遺伝子発現変化

虚血環境下での MSC による血管新生

や組織修復には、MSC から分泌されるサイトカインが関与していると言われてい
る。これらの生理的過程において特定のサイトカインを持続的に分泌するには、転写
レベルでの調節が必要である可能性が高い。そこで本研究では、コントロール群お
よび虚血群における血管新生関連遺伝子発現量を比較することで、虚血後の hMSC
において有意に発現が上昇するサイトカイン類の遺伝子を同定することを試みた。

PCR Array を用いた遺伝子発現変化に対する検討では、6 ロット全てにおいて
遺伝子発現が上昇していたサイトカイン遺伝子は 5 種類であり、虚血環境下での
hMSC による血管新生や組織修復には、hMSC から分泌されるレプチン、VEGF、
PlGF、アンジオゲニン、TGF- β 1 のこれら 5 種類のサイトカインが、寄与してい
る可能性があると考えられる。

虚血条件下において遺伝子発現が上昇する機序の一つとして、低酸素誘導因子
(HIF-1 : Hypoxia-inducible factor-1) の関与が考えられる。HIF-1 は、通常酸
素環境下においては分解されやすく、その機能が抑制されている状態であることが
知られている。しかし、HIF-1 を分解する酵素は酸素濃度依存的に働くため、低酸
素状態では分解が抑制され、HIF-1 の発現が上昇する。HIF-1 は核内へと移行し、
低酸素応答性領域 (HRE : Hypoxia Responsive Element) に結合することで、
遺伝子の転写調節に関与すると考えられている。HRE の配列としては 5'-RCGTG-3'
が知られているが、この配列は Leptin、VEGF、PlGF、Angiogenin の mRNA の上流にも存在する。また、

HIF-1 により発現が誘導されるとの報告もあることから、これら 4 種類の遺伝子
については HIF-1 を介した機序により、遺伝子発現上昇が見られたと考えられる。

ただし、遺伝子発現変化が大きいものであっても、Ct 値が大きいものに関しては
遺伝子発現量が少ないと考えられ、また遺伝子発現量はサイトカイン分泌と必ず
しも相関しない可能性も残されている。つまり、hMSC からのサイトカイン分泌量
を知るには、遺伝子発現量からの検討のみでは不十分と考えられる。従って、有意な
発現上昇が見られたサイトカイン遺伝子については、実際のサイトカイン分泌量を
検討する必要があると考えられる。そこで次に、虚血条件下における hMSC のサイ
トカイン分泌変化に関する検討を行った。

D-5-2 虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の血管新生関連サイトカイン分泌変化

虚血後の hMSC において遺伝子発現に有意な上昇が見られた 5 種類のサイトカ
インの内、分泌量および分泌変化率にも有意な増加が認められたものは VEGF とレ
プチンの 2 種類であった。

PlGF、アンジオゲニン、TGF- β 1 に関しては、虚血群での遺伝子発現の上昇が見
られたにも関わらず、実際のサイトカイン分泌においては有意な増加は認められな
かった。その理由としては、遺伝子発現の上昇に遅れてサイトカイン分泌が起こる
ことから、24 時間の培養時間では十分な分泌量を得られなかった可能性、あるいは
代償的に分泌を抑制する何らかの機序が存在する可能性が考えられる。

RT-PCR では Ct 値が比較的lowかった TGF- β 1 が、ELISA では検出出来なかった原因としては以下の可能性も考えられる。TGF- β は一般的な分泌タンパク質と同様にプレ-プロ構造で生合成され、分泌されたプロタンパク質は分子内で切断されることで活性型 TGF- β が完成する。一方、プロタンパク質の N 末端側が除去されない場合は、Latency Associated Protein (LAP) が活性型 TGF- β をマスクする潜在型として存在する。つまり、TGF- β は生合成されただけでは活性が生じず、LAP を除去することで初めてその活性が現れることになる。本研究で用いた ELISA 系では潜在型 TGF- β は検出出来ないとされており、産生された多くの TGF- β が潜在型であったために ELISA では検出出来なかった可能性もある。

体内における血中濃度は、レプチンがおよそ 1,000 ~ 60,000pg/mL (1 ~ 60ng/mL)、VEGF がおよそ 200~1,100 pg/mL とされることから、今回のモデル系において生理的レベルに相当する分泌が得られたのは VEGF のみであると考えられる。このことから、VEGF は虚血刺激によって hMSC から分泌され、生理的効果を発揮する主要なサイトカインの一つであることが示唆される。VEGF については様々なアイソフォームが存在することも知られており、今回用いた ELISA では、そのうち VEGF₁₆₅ が測定の対象であった。VEGF₁₆₅ は比較的優位な効果を持つことが報告されているが、VEGF 遺伝子の発現上昇は他の VEGF アイソフォームの分泌にも影響すると考えられるため、これらの分泌量についてはさらなる検

討が必要とされる。また、生体内の局所においてはより低いサイトカイン濃度であっても生理活性を及ぼす可能性があると考えられるため、今回の実験系においては低い分泌レベルであったレプチンをはじめ、他のサイトカインの役割についてはさらなる検討が必要と考えられる。

一方、虚血時の hMSC による VEGF 分泌には、その量および変化率に有意なロット差が認められた。hMSC を虚血性疾患治療用の細胞・組織利用医薬品として考えた場合、ロット間における VEGF 分泌能の差は、投与された部位における hMSC の血管新生等の生理・薬理作用に影響を及ぼす可能性がある。移植後に十分な治療効果を得るためには、投与される細胞がどの程度の修復能力を持つかを予め知ることが重要であり、hMSC のサイトカイン分泌能および虚血環境応答性を評価するための指標が必要であると考えられる。虚血後の VEGF 分泌能の差は、全てのロットを同一条件下にて培養した結果より認められたものであることから、ロット間における VEGF 分泌能の差は培養前、つまりは hMSC の虚血前における何らかの遺伝子発現量の差に関連する考えられた。そこでこの仮説に基づき、虚血前における遺伝子発現量と虚血条件下のサイトカイン分泌との相関関係を検討し、虚血後における hMSC の VEGF 分泌能と相関する遺伝子の探索を行った。

D-5-3 虚血後における hMSC の VEGF 分泌能と相関する遺伝子の探索

虚血前の遺伝子発現量について解析を行い、虚血後の VEGF 分泌と相関する遺

伝子を解析した結果、Table 14 に示す 17 個の遺伝子 (VSR 遺伝子) が同定された。虚血前遺伝子発現量と虚血後 VEGF 分泌の相関関係の評価に関しては、いくつかのフィルターを利用した。

まず、遺伝子の発現が見られる Probe Set を選択することを目的として、フィルター①をかけた。続いて、ロット間でのばらつきが小さい場合、信頼性の高い相関関係が得られにくくなる傾向が高くなることから、発現量にロット間でのばらつきが大きい遺伝子を抽出するために、フィルター②をかけた。さらに、フィルター③としてスピアマンの順位相関係数を算出し、PS#7 および PS#9 に共通して虚血後の VEGF 分泌量および虚血による VEGF 分泌変化率に有意な正の相関を持つ遺伝子を選び出した。相関係数として順位相関を選択した理由は、hMSC の虚血前における特定の遺伝子発現が虚血後の VEGF 分泌に影響する場合、虚血前の遺伝子発現量と虚血後の VEGF 分泌は必ずしも線形の相関を示すとは限らないためである。

hMSC を細胞・組織利用医薬品と考える場合、「虚血後の VEGF 分泌量」はその薬効・力価の尺度となり得ると考えられる。一方、「虚血による VEGF 分泌変化率」は治療反応性・虚血部位選択性の尺度となり得ると考えられる。また、PS#7 および PS#9 での VSR 遺伝子の発現量が、ともに PS#9 の細胞虚血後の VEGF 分泌量および虚血による VEGF 分泌変化率と有意に相関することから、VSR 遺伝子の発現量と VEGF の虚血応答との相関は、継代によるアーチファクトではなく、継代操作に拘わらず引き継がれる細胞固有の性質

と考えられる。また、VSR12、VSR16、VSR17 を除く遺伝子は虚血抵抗性に関しては逆に有意な負の相関を示し、生存している細胞が少ないほど、VEGF 分泌は上昇する結果となった。このことより、VEGF の分泌上昇は単なる細胞数の増加によるものではないことと、むしろ虚血ストレスの影響を受けやすい hMSC ほど VEGF 分泌が増加しやすいことが示唆される。

VSR 遺伝子について、これまでに得られている報告は次の通りである。

- VSR1 (AF4/FMR2 family, member 3) は、リンパ系組織に特異的な遺伝子として同定され、組織特異的に核転写活性化因子をコードする遺伝子であると言われている。また、通常の乳腺上皮細胞での発現よりも乳がん細胞での発現が高いとの報告があり、乳がんの発生において関与していることも示唆されている。血管新生への関与については現在のところ不明である。
- VSR2 (ataxin 1) は、神経変性疾患の一種である脊髄小脳変性症を引き起こすタンパク質をコードする遺伝子として知られている。しかし、その機能は現在のところはっきりしていない。
- VSR3 (chloride intracellular channel 3) は、胎盤において高い発現が見られることが報告されており、細胞内の塩素イオンを調整することで、様々な細胞プロセスに関与している可能性が示唆されている。血管新生への関与については不明である。
- VSR4 (cytokine-like 1) は、骨髄由来

の CD34 陽性細胞を特徴付けるとして同定された遺伝子である。軟骨形成において発現が劇的に増加し、間葉系細胞の軟骨分化に関与することが示唆されている。血管新生への関与については、現在のところ不明である。

- VSR5 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) は、マイクロプロセッサと呼ばれるタンパク質複合体のサブユニットをコードする遺伝子であり、タンパク質をコードしない小さな RNA 分子であるマイクロ RNA の成熟に関与していると言われている。血管新生への関与については現在のところ不明である。
- VSR6 (endoplasmic reticulum aminopeptidase 2) は、アミノペプチダーゼをコードする遺伝子であり、小胞体内腔画分に可溶性タンパク質として存在することが報告されている。インターフェロン γ によって誘発されることが知られており、小胞体において抗原性のペプチド生成過程に関与していることが示唆されている。
VSR6 と同じファミリーに属する他のアミノペプチダーゼに関して、血管内皮前駆細胞を VEGF で刺激した際に発現が上昇することや、発現低下時においては VEGF 刺激による血管新生が阻害されることなどが報告されており、VSR6 についても VEGF 分泌に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。
- VSR7 (family with sequence similarity 101, member B) については、その発現とラット腰椎の骨密度と

の関連を示唆する報告が見られるが、詳細な機能については未知である。

- VSR8 (gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog) は、骨形成を抑制するタンパクをコードする遺伝子として知られているが、近年 VEGF 受容体 2 を刺激することで、VEGF と同様の血管新生効果を示すことも報告されており、VEGF 分泌との関連は不明であるが、血管新生促進因子として機能する可能性がある。
- VSR9 (hyaluronan and proteoglycan link protein 1) は、関節軟骨で超高分子複合体を構成するリンクタンパク質をコードする遺伝子として知られている。小腸や胎盤、胚および心臓などでも発現が報告されている他、中皮腫においての過剰発現より、腫瘍化への関与も示唆されている。血管新生への関与については現在のところ不明である。
- VSR10 (inhibin, beta E) は、主に内分泌腫瘍に見られる他、扁平上皮癌においても発現が見られ、細胞の形質転換において重要な役割が示唆されているが、その詳細な機能については不明である。
- VSR11 (keratin associated protein 1-1) は、髪の毛の繊維を構築するケラチンの関連タンパク質をコードする遺伝子であるが、血管新生への関与については現在のところ不明である
- VSR12 (hypothetical LOC339290) の機能については未知である。
- VSR13 (M-phase phosphoprotein 6) は、核小体に特異的なエキソソームの補助因子として知られており、リボソ

ーム RNA の成熟に重要な役割を果たしていることが示唆されている。血管新生への関与については現在のところ不明である。

- VSR14 (poly(A) binding protein, cytoplasmic 4-like) の機能については未知である。
- VSR15 (programmed cell death 6 pseudogene) は、アポトーシスに関係するタンパク質をコードする遺伝子として知られており、肝がんおよび肺がん細胞において発現が上昇することが報告されている。血管新生への関与について現在のところ不明である。
- VSR16 (pellino homolog 2 (Drosophila)) は、核内転写因子 NF- κ B による活性化の中間体であることが報告されており、その情報伝達経路を構成する要素であることが示唆されている。血管新生への関与について現在のところ不明である。
- VSR17 の機能については未知である。

また、VSR 遺伝子と低酸素の関連については、HIF-1 により誘導される遺伝子として VSR10 および VSR16 に関する報告がわずかにあるものの、その関係については現在のところ不明である。VEGF 分泌への関与をはじめ VSR 遺伝子の役割については今後さらなる検討が必要と考えられる。

以上のように、虚血時の VEGF 分泌応答と相関が得られる遺伝子が複数同定された。同定された遺伝子は、全て正の相関を持つものであることから、その発現が高いほど虚血後の hMSC からの VEGF 分泌

は増加する可能性が高い。

hMSC の虚血応答性 VEGF 分泌に対する VSR 遺伝子の機能的関与を明らかにすることは、hMSC の作用機序の理解や品質確保のために有用である。本研究では、hMSC からの VEGF 分泌と VSR 遺伝子の発現量との相関が明らかとなったが、因果関係の証明には至っていない。今後は RNAi 等を用い、VSR の機能的役割の検討が必要と考えられる。

D-6 細胞特性・品質解析技術の開発(2)

昨年度の本研究により、early EPC の細胞表面に MMP-9/MMP-2 が存在すること、及び、early EPC には高い浸潤能があることが明らかとなった。本年度は、early EPC が虚血部位に最初に到着する細胞であるという仮説 (Fig. 32) のもと、浸潤には遊走が関与していることや early EPC が血球系細胞であることを考え、遊走に関するシグナル伝達について解析を進めた。

Early EPC は VEGF に応答して遊走する。しかし、Early EPC は IL-8 受容体を発現していながら (Fig. 34) IL-8 に応答した遊走反応は示さない (Fig. 33)。Early EPC の殆どが CD14 陽性細胞である (Fig. 31)。Early EPC と対照的に、末梢血から分離した直後の CD14 陽性細胞は IL-8 に応答し、IL-8 の濃度に依存した遊走を示す (Fig. 35)。したがって、CD14 陽性細胞が early EPC へ分化する過程で IL-8 に対する遊走能を失うが、VEGF に対する遊走能は失わない可能性が考えられた。これらのことから、early EPC は虚血組織に多く産生される VEGF に応答し、細胞表面に局在する MMP-9/MMP-2 の作用により、

虚血部位に到着する可能性が考えられる (Fig. 32)。Early EPC には VEGF に対する遊走シグナル分子として血球系に多く発現する p110 PI3K δ が強く発現し (Graupera et al. Nature 453 662 2008)、機能している (Fig. 37, 38, 39)。Late EPC、HUVEC、HCAEC では p110 PI3K α が発現しており、PI3K アイソフォームの違いが early EPC を特徴づける特性指標の一つと考えられる。

Early EPC の *in vivo* での血管形成促進効果は、ヌードマウスの背部への細胞/マトリゲルの移植により示すことができた (Fig. 41)。血管再生療法は移植した細胞が自ら血管を作るより、血管再生促進因子を放出させる細胞を移植する方が治療効果が高いと考えられているため (伊澤淳 実験医学 血管研究と血管治療 高倉伸幸編集 28 2861 2010)、early EPC は血管再生療法に有用な細胞であると考えられた。

Late EPC に関する検討では、オクルディンが管腔形成に関わる機能的特性指標であることを示すことができた。オクルディンは tight junction タンパクであり (Tsukita et al. Oncogene 27 6930 2008)、脳の血管において (Hawkins and Davis Pharmacol Rev 57 173 2005)、内皮細胞どうしが接着している辺縁に連続的に発現している (Hirase et al. J Cell Sci 110 1603 1997)。このことからオクルディンは血液脳関門の重要な働きをしていると考えられている。一方、脳血管以外の内皮細胞ではオクルディンは辺縁に不連続的に発現し、また、オクルディンをノックアウトした ES 細胞では tight junction が形成される報告 (Saitou et al. J Cell Biol

141 397 1998) もあり、オクルディンの役割については明確ではなかった。我々が示した管腔形成の顕著な促進効果はオクルディンの新たな役割と言える。Late EPC を細胞組織加工医薬品として用いる場合には、オクルディンの発現を確認することが、血管形成能保持の確認に有用であると考えられる。

D-7 細胞特性・品質解析技術の開発(3)

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、O-結合型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング技術を開発し、10 種類のヒト培養癌細胞をモデルにムチン型糖鎖の解析へと応用した。その結果、上皮系癌細胞に含まれる O-結合型糖鎖はムチン型糖鎖とグリコサミノグリカン型のいずれについても、血球系癌細胞に比べ糖鎖含量が高いことがわかった。また、ムチン型およびグリコサミノグリカン型のみでは識別が困難な細胞種についても、両糖鎖情報を組み合わせることで識別可能となることがわかった。

E. 結論

本研究では、E 型肝炎ウイルス (HEV) の核酸増幅検査 (NAT) による測定の評価に用いる標準パネルの樹立に関する検討を行い、HEV-NAT 評価用標準パネルを樹立した。本パネルは、今後の公開により幅広い活用が期待される。

また、安定性評価技術開発研究においては、1) ナノ LC-MS を用いた高感度分析により、間葉系幹細胞のハイスループットなプロテオーム解析が可能となり、今後再

生医療の実現に向けた細胞の標準化および品質チェックへの応用が期待できること、2) 間葉系幹細胞に特徴的な表面 CD マーカーを網羅的に検出できることを明らかにすると同時に、3) 安定同位体ラベルをした合成ペプチドを内部標準として用いることにより、10 種の hMSC 特異的 CD 分子種を、質量分析装置により同時に定量可能な試験系を確立した。また、4) 細胞のゲノム安定性の解析手法として、次世代シーケンサーの活用が注目されること、および 5) 各種幹細胞株の樹立とその後の培養過程は、わずかに存在する増殖性の変異を選択する危険性を秘めており、注意が必要であることを明らかにした。

同等性・特性解析指標の探索手法の開発研究においては、LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングにより、MSC、神経様分化細胞及び骨分化細胞では糖鎖プロファイルが異なることを確認した。さらに糖鎖プロファイルについて PCA を行うことにより、MSC、神経様分化細胞及び骨分化細胞は異なる位置にプロットされることを確認した。N 結合型糖鎖の分布は、MSC 由来加工細胞の分化指標として有用であり、LC/MS による糖鎖プロファイリングと PCA を組み合わせた方法は、MSC の分化を評価する方法として利用できることが示唆された。

免疫原性評価のための基盤技術開発研究においては、移植効率は低かったものの CXCL12 発現 Ad ベクターをマウスに投与した後に、外来骨髄細胞を移植することにより、レシピエントへ生着することが示

された。今後、VEGF を含むその他のサイトカインや抗がん剤と併用する等、移植条件を最適化することにより、ヒト血液細胞を有するマウスの高効率作製法の開発に繋がるものと思われる。

細胞特性・品質解析技術の開発の一環として、MSC を細胞治療薬として培養・製造する際にその虚血応答性サイトカイン分泌を予測しうる細胞特性指標の探索を試みた。MSC は、虚血性疾患に対して修復効果を示すことが数多く報告されている。また、MSC は虚血状態においても数日間生存する能力があることが知られている。MSC による虚血組織保護・修復については、組織細胞への分化のみならず、そのパラクリン効果が近年重要視されており、修復効果の一つである血管新生については MSC より分泌されるサイトカインが大きな役割を果たしていると考えられている。

本研究では酸素濃度 1%、グルコースなしの擬似的虚血条件を用いて、通常条件との比較により虚血状態における hMSC から放出される血管新生関連因子の種類および分泌量を検討した。遺伝子発現が有意に上昇した血管新生関連因子(サイトカイン類)を対象として ELISA により実際の分泌量を測定した結果、VEGF については有意な増加が認められ、生理的レベルに相当する分泌量が得られた。VEGF は、1) VEGF 発現プラスミドを用いた心筋虚血の遺伝子治療に効果が認められること、2) VEGF 発現量が多く見られるブタ MSC 培養上清は hMSC 培養上清と比較して、心筋症モデル動物において有意な心機能維持効果を有するとともに、VEGF

を強制発現させた hMSC 培養上清はブタ MSC 培養上清と同等の心機能維持効果を示すこと、3)ラット骨髄由来 MSC の心筋虚血再還流障害に対する急性予防効果は MSC の VEGF 発現量に依存することなどから、MSC による虚血心筋保護効果において主要な役割を担っているものと考えられる。ただし、MSC の投与は VEGF 分泌量換算では、VEGF タンパク質を単独投与する場合に比べて、非常に低い用量で薬効があるとされており、他に分泌される生理活性物質との協調効果も示唆されている。

ELISA において有意な増加が見られたレプチンについては、今回の実験系では十分な濃度を得ることは出来なかったが、レプチンの存在が VEGF の発現を上昇させるとの報告もあることから、今後さらなる検討を行いその意義を評価する必要があると考えられる。

複数のロットを用いて検討を行った結果、虚血後の VEGF 分泌量および虚血による分泌変化率に有意なロット差が認められる結果となった。ロット間におけるこれらの差は、hMSC 移植後に生じる血管新生の程度、ひいては治療効果に影響を及ぼす可能性が考えられる。十分な治療効果を確保するためには投与される細胞の修復能力を予め把握することが重要であり、そのための特性解析指標が必要と考えられる。そこで、虚血後の VEGF 分泌の差は hMSC の虚血前における遺伝子発現量の差に関連するという仮説を立て、虚血環境下（低酸素分圧・グルコース欠乏下）の VEGF 分泌応答と関連する遺伝子を探索・同定した。ここで同定された遺伝子を、

VSR 遺伝子と名づけた。

VSR 遺伝子は、hMSC による治療効果のない虚血部位における hMSC の VEGF 分泌能を予測するための特性指標（バイオマーカー）の候補であると考えられる。治療効果の把握により、効果が低いと予想される場合に対しては hMSC の機能を高めるなどの対策を予め立てることが可能となり、十分な治療効果を持つ hMSC を投与することにつながることを期待される。VSR 遺伝子については機能が未知なものも多く、hMSC からの VEGF 分泌に対してどのように関与しているかはさらなる検討が必要である。また、特性指標としての妥当性を評価するためには、VSR 遺伝子の発現量と *in vivo* における虚血組織保護効果との相関を検討するとともに、別に用意したロット群を用いての交差妥当性を検証するなど、詳細な検討が必要とされる。

心筋梗塞や慢性虚血性心疾患に対する MSC を用いての臨床試験が進行中であり、近い将来新たな治療法が誕生することが期待される。MSC の投与方法としては静脈内への注入あるいは心筋内への直接注入が検討されており、一方、使用する MSC としては骨髄あるいは脂肪由来のものなどが候補として挙げられている。MSC を医薬品として使用するに当たっては、そのメカニズムを解明することを初め、高い純度および十分な量の細胞数を単離する方法や最適な投与方法の確立、細胞の供給源の確保などが必要と考えられ、検討すべき課題はまだ数多く存在している。虚血性疾患治療用の細胞・組織利用医薬品を利用した再生医療の実現のために、本研究を含め、今

後さらなる研究が進められることが望まれる。

また、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) **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に加えて、浸潤に伴う遊走のシグナル伝達には血球に多く発現する **p110 PI3K δ** が関与することを示した。
- 2) ノードマウスの背部に **early EPC** を含むマトリゲルを移植する *in vivo* の血管形成活性評価系を開発した。
- 3) **Late EPC** の管腔形成能と発現量が相関するオクルディンが、管腔形成に寄与する機能的特性指標であることを明らかにした。

さらに、**O-結合型糖鎖プロファイリング**による細胞特性・品質解析技術に関する研究を行い、細胞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、各種細胞間で **O-結合型糖鎖の糖鎖プロファイル**解析が、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明らかにした。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 **O-結合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。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ken Nishimura, Masayuki Sano, Manami Ohtaka, Birei Furuta, Yoko Umemura, Yoshiro Nakajima, Yuzuru Ikehara, Toshihiro Kobayashi, Hiroaki Segawa, Satoko Takayasu, Hideyuki Sato, Kaori Motomura, Eriko Uchida, Toshie Kanayasu-Toyoda, Makoto Asashima, Hiromitsu Nakauchi, Teruhide Yamaguchi and Mahito Nakanishi: Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming, *J Biol Chem.* 2011;286:4760-71.
2. 小木 美恵子、石丸 幸大、西脇 基晃、宮脇 英明、内田 恵理子、得永 嘉昭：遺伝子導入用インパルス応力波素子開発のための実験的検討、*信学技報 US2010-97*, 31-34 (2011)
3. 奥田晴宏、川崎ナナ、内田恵理子、山

- 本美智子、宮田直樹：薬の名前 ステムを
 知れば薬がわかる 第 50 回、
 Pharm Tech Japan, 26(10),
 1927-1936 (2010)
4. 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)
 5. 鈴木孝昌 日本の体外診断用医薬品の規制をめぐる動向～DNAチップを用いた遺伝子型判定装置に関する評価指標の策定 PHARMSTAGE 7 月号 1-2 (2010)
 6. Tashiro K., Kawabata K., Inamura M., Takayama K., Furukawa N., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa H., Furue-Kusuda M., Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram.*, 12, 501-507 (2010)
 7. Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther.* 19, 400-407 (2011).
 8. Kawabata K., Inamura M., Mizuguchi H. Efficient hepatic differentiation from human iPS cells by gene transfer. *Liver Stem Cells: Methods and Protocols*, Humana Press, USA (part of the Springer publishing group), in press.
 9. 川端健二、田代克久、水口裕之、iPS細胞への遺伝子導入を用いた分化誘導の最適化、薬学雑誌、130、1527-1534 (2010)
 10. 佐藤 陽治 再生医療・細胞治療の規制等に関する欧米の動向—臨床応用に関する規制当局の支援の比較—ヒューマンサイエンス 2011;22(2):28-32.
 11. 佐藤 陽治 再生医療・細胞治療の規制に関する国際動向 月刊ファームステージ 2011 年 3 月号 PHARMSTAGE 2011;10(12):1-2.
 12. Jin MH, Yokoyama U, Sato Y, Shioda A, Jiao Q, Ishikawa Y, Minamisawa S. DNA microarray profiling identified a new role of growth hormone in vascular remodeling of rat ductus arteriosus. *J Physiol Sci.* 2011;61:167-79.
 13. 佐藤 陽治, 鈴木 和博, 早川 堯夫 EUにおける細胞・組織加工製品の規制動向 医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス 2011;42:142-8.
 14. 西田 基宏, 齋木 翔太, 北島 直幸, 仲矢 道雄, 佐藤 陽治, 黒瀬 等 TRPC チャネルのリン酸化による心

- 血管機能制御 YAKUGAKU ZASSHI 2010;130:1427-33.
15. 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;285:15268-77.
 16. 石井明子、川崎ナナ: バイオ治験薬の品質安全性確保 ファームテクジャパン 16, 69-80 (2010)
 17. Yamada K, Hyodo S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K. Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples. *Anal Chem.* 2010 82(17):7436-7443.
 18. Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K. Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Biomed Chromatogr.* 2011;25(5):588-93.
2. 学会発表
1. 押澤正、豊田淑江、内田恵理子、鈴木孝昌、山口照英、鈴木和博: カルシウム結合蛋白質 S100A8 による HL-60 細胞の増殖抑制、第 11 回 Pharmac-Hematology シンポジウム、2010 年 6 月、東京
 2. 内田恵理子、古田美玲、鈴木和博、佐藤功栄、岩田明子、山口照英: 抗体医薬品のウイルス安全性確保のためのウイルス除去カラムの開発、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010 年 12 月、神戸
 3. 古田美玲、内田恵理子、豊田淑江、中西真人、西村健、大高真奈美、山口照英: 持続発現型センダイウイルスベクターの CGD 遺伝子治療への応用、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010 年 12 月、神戸
 4. 押澤正、豊田淑江、内田恵理子、鈴木孝昌、山口照英、鈴木和博: 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 (その 3)、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010 年 12 月、神戸
 5. 小木美恵子、石丸幸大、西脇基晃、宮脇英明、内田恵理子、得永嘉昭: 遺伝子導入用インパルス応力波素子開発のための実験的検討、電子情報通信学会超音波研究会、2011 年 1 月、京都
 6. 小木美恵子、西脇基晃、會澤康治、内田恵理子、得永嘉昭: 遺伝子導入用インパルス応力波の創発に関する基礎研究、日本音響学会 2011 年春季研究発表会、2011 年 3 月、東京
 7. 會澤康治、西脇基晃、小木美恵子、

- 内田 恵理子, 得永 嘉昭: 遺伝子導入用レーザー誘起インパルス応力波発生素子に関する研究、第 58 回応用物理学関係連合講演会、2011 年 3 月、横浜
8. 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機能解析、第 10 回日本再生医療学会総会、2011 年 3 月、東京
 9. 内田恵理子、岡田義昭、水澤左衛子、柚木幹広、辻川宗男、皆木隆男、稲田耕一、小西久郎、五十嵐正志、鈴木光、嘉悦洋、下瀬克郎、萩原克郎、安江博、生田和良、鈴木和博、山口照英: E 型肝炎ウイルスの核酸増幅検査 (NAT) 評価用標準パネルの樹立、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月、静岡
 10. 鈴木孝昌、押澤 正、スレッシュ テイルパッティ、宮澤明史、辻 勉、鈴木和博 定量解析ソフトウェアを用いたノンラベル法による比較プロテオーム解析・細胞・組織加工医薬品の品質評価へのアプローチ 日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会 第 6 回日本臨床プロテオーム研究会連合大会 (2010.7) (浦安)
 11. 鈴木孝昌、降旗千恵 Proteome analysis for urinary biomarkers specific to genotoxic hepatocarcinogens 第 69 回日本癌学会学術総会大会 (2010.9) (大阪)
 12. 鈴木孝昌 バルカン腎症とアリストロキア酸とお菊虫 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11) (神戸)
 13. 鈴木孝昌, スレッシュ テイルパッティ, 押澤 正, 宮澤明史, 辻 勉, 内野 正, 五十嵐良明, 西村哲治, 鈴木和博 尿プロテオーム解析を用いた砒素の生体影響評価のためのバイオマーカー探索 日本環境変異原学会第 39 回大会 (2010.11) (つくば)
 14. 鈴木孝昌、押澤 正、スレッシュ テイルパッティ、田邊思帆里、宮澤明史*、辻 勉*、鈴木和博 質量分析装置を用いた間葉系幹細胞特異的 CD マーカーの網羅的検出と定量 第 10 回日本再生医療学会総会 (2011.3) (新宿)
 15. 鈴木孝昌 Rodent Micronucleus Tests - Past, Present, and Future - International Workshop on "Micronucleus Assays with Buccal Cells for Human and Environmental Monitoring " (2011.2) (Tiruchirappalli, India)
 16. Hashii, N., Huang, X., Kawasaki, N., Yamaguchi, T.: Differential glycan analysis during neural differentiation of human mesenchymal stem cells by quantitative glycan profiling using liquid chromatography/mass spectrometry. The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010) 幕張 (2010. 8, 1-6)
 17. Hashii, N., Huang, X., Yamaguchi, T., Kawasaki, N.: Identification of cell therapeutic products from stem

- cells based on glycans. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会 神戸 (2010. 12, 7-10)
18. Hashii, N., Huang, X., Kawasaki, N., Yamaguchi, T.: Quantitative glycan analysis during neural differentiation of human mesenchymal stem cells by liquid chromatography/mass spectrometry. The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies Honolulu (2010. 12. 15-20)
 19. 野中昭希、田代克久、山口朋子、西川恵三、水口裕之、川端健二; 生体内 VEGF 過剰発現による造血幹細胞の動員効果、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月 28-31 日 (口頭発表)
 20. 田代克久、大森美幸、櫻井文教、山口朋子、西川恵三、川端健二、水口裕之、HoxB4 遺伝子の一過性発現によるマウス ES/iPS 細胞から血液細胞への分化誘導、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月 28-31 日 (ポスター発表)
 21. 川端健二、水口裕之、遺伝子導入を用いた iPS 細胞の肝細胞への高効率分化誘導法、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、2011 年 3 月 1 日-2 日 招待講演
 22. 川端健二、高効率遺伝子導入法によるヒト iPS 細胞の肝分化誘導法の開発、スーパー特区フォーラム in 大阪、大阪、2011 年 1 月 26 日 招待講演
 23. Katsuhisa Tashiro, Miyuki Omori, Tomoko Yamaguchi, Keizo Nishikawa, Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi, Induction of hematopoietic differentiation from mouse embryonic and induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction., 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸、2010 年 12 月 7-10 日 (ポスター発表)
 24. 田代克久、川端健二、櫻井文教、水口裕之、幹細胞の分化誘導系におけるアデノウイルスベクターの有用性、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、大阪、2010 年 10 月 30 日 (口頭発表)
 25. 川端健二、iPS 細胞の分化誘導系を用いた創薬への可能性、第 89 回彩都バイオサイエンスセミナー、大阪、2010 年 10 月 14 日 招待講演
 26. 川端健二、遺伝子導入を用いた iPS 細胞の高効率分化誘導法、遺伝子デリバリー研究会第 10 回夏期セミナー、滋賀、2010 年 9 月 1-2 日 招待講演
 27. 吾月 遥, 佐藤 光利, 田邊 思帆里, 山口 照英, 早川 堯夫, 鈴木 和博, 佐藤 陽治 虚血環境下におけるヒト間葉系幹細胞(hMSCs)VEGF 分泌能関連遺伝子日本薬学会第 131 回年会 (2011.3) (静岡)
 28. 野田 誠, 仲矢 道雄, 佐藤 陽治, 西田 基宏, 黒瀬 等 心筋梗塞における GRK5 の役割日本薬学会第 131 回年会 (2011.3) (静岡)
 29. Saiki S, Nishida M, Watanabe K,

- Nakaya M, Sato Y, Kurose H. Involvement of endothelial nitric oxide synthase in therapeutic vascular maturation by cilostazol. 第 84 回日本薬理学会年会 (2011.3) (東京)
30. Kitajima N, Nishida M, Watanabe K, Nakaya M, Kiyonaka S, Sato Y, Mori Y, Kurose H. Suppression of fibrosis underlies prevention of dilated cardiomyopathy by TRPC channel inhibition. 第 84 回日本薬理学会年会 (2011.3) (東京)
31. Mishima T, Nishida M, Kuwahara K, Nakaya M, Sato Y, Shibata T, Uchida K, Kurose H. Ga12/13 mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis through 4-hydroxy-2-nonenal production in cardiac fibroblasts. 第 84 回日本薬理学会年会 (2011.3) (東京)
32. Atsuki H, Satoh M, Tanabe S, Yamaguchi T, Hayakawa T, Suzuki K, Sato Y. Genes associates with VEGF secretional capacity of human mesenchymal stem cells under ischemic condition. 第 84 回日本薬理学会年会 (2011.3) (東京)
33. Toyotaka M, Nishida M, Ogushi M, Suda R, Saiki S, Nakaya M, Sato Y, Inoue K, Kurose H. Local S-nitrosylation of NF- κ B defines ATP-induced down-regulation of angiotensin type1 receptors. 第 84 回日本薬理学会年会 (2011.3) (東京)
34. 佐藤 陽治 再生医療・細胞治療の実用化に関する海外の規制 第 10 回日本再生医療学会総会 (平成 23 年 3 月 1 日, 東京)
35. 安田 智, 長谷川 哲也, 細野 哲司, 佐藤 光利, 山口 照英, 鈴木 和博, 佐藤 陽治 マウス胚性癌細胞および胚性幹細胞における心筋分化マーカーの探索 第 10 回日本再生医療学会総会 (平成 23 年 3 月 1 日, 東京)
36. 吾月 遥, 佐藤 光利, 田邊 思帆里, 山口 照英, 早川 堯夫, 鈴木 和博, 佐藤 陽治 ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の虚血条件下における VEGF 分泌能予測因子に関する検討 第 10 回日本再生医療学会総会 (平成 23 年 3 月 2 日, 東京)
37. 佐藤 陽治 再生医療の国際動向からみたわが国の目指すべき道 バイオロジクスフォーラム第 8 回学術集会 (平成 23 年 2 月 2 日, 東京)
38. 佐藤 陽治 再生医療・細胞治療製品の規制に関する国際動向 アカデミアにおける臨床研究・治験に関する薬事の基本と実例講習会 (文部科学省 橋渡し研究支援推進プログラム) (平成 23 年 2 月 1 日, 大阪)
39. 斎木 翔太, 西岡 絹江, 有吉 麻里奈, 佐藤 陽治, 仲矢 道雄, 西田 基宏, 黒瀬 等 ホスホジエステラーゼ 3 阻害による PKA 依存的な TRPC6 チャネルのリン酸化を介した血管収縮抑制効果 BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 平成 22 年 12 月 7-10 日, 神戸)
40. 北島 直幸, 渡邊 邦宏, 佐藤 陽治,

- 仲矢 道雄, 西田 基宏, 黒瀬 等
Suppression of myocardial dysfunction by phosphodiesterase 3 inhibition in MLP-deficient mice BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 平成 22 年 12 月 7-10 日, 神戸)
41. 吾月 遥, 佐藤 光利, 田邊 思帆里, 山口 照英, 早川 堯夫, 鈴木 和博, 佐藤 陽治 虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞のサイトカイン分泌プロファイリング第 31 回日本臨床薬理学会年会 (平成 22 年 12 月 12 月 1-3 日, 京都)
 42. 佐藤 陽治 再生医療の実用化に向けた規制に関する国際比較 第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 (平成 22 年 11 月 11-12 日, 神戸)
 43. Satoh M, Yanagino S, Nishimaki-Mogami S, Suzuki K, Sato Y. Thyroid hormone up-regulates elastin and lysyl oxidase genes in rat aorta. WorldPharma2010 (16th IUPHAR WorldCongress of Basis and Clinical Pharmacology), Copenhagen, Denmark (2010 年 7 月 17-23 日) Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2010;107(Suppl.1):563.
 44. Tanabe S, Sato Y, Suzuki T, Yamaguchi T, Suzuki K. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of surrogate markers for in vitro culture stage. WorldPharma2010 (16th IUPHAR WorldCongress of Basis and Clinical Pharmacology), Copenhagen, Denmark (2010 年 7 月 17-23 日) Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2010;107(Suppl.1):608.
 45. 佐藤 陽治 再生医療・細胞治療製品の規制に関する国際動向 第 12 回未来医療交流会/第 5 回未来医療市民公開シンポジウム (平成 22 年 6 月 23 日, 大阪)
 46. Nishida M, Kitajima N, Nakaya M, Ide T, Sato Y, Kurose H. Inhibition of phosphodiesterase 5 prevents cardiac hypertrophy through phosphorylation of TRP6 at Thr69. 20th ISHR World Congress (2010 年 5 月 13-16 日, 京都)
 47. Mishima T, Nishida M, Makaya M, Ide T, Sato Y, Kurose H. Galpha12/13 mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis through production of reactive oxygen species. 20th ISHR World Congress (2010 年 5 月 13-16 日, 京都)
 48. 豊田淑江, 石井明子, 鈴木琢雄, 多田稔, 小林 哲, 川崎ナナ, 山口照英: 血管内皮前駆細胞における MMP-2/MMP-9 の役割 第 83 回日本生化学会 第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 神戸
 49. 三ツ井洋輔, 山田佳太, 椿直孝, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃 グライコミクスによる癌細胞の個性解析とグライコプロテオミクスへの展開第 11

- 回関西グライコサイエンスフォーラム、平成 22 年 5 月 15 日、大阪市立大学 (大阪)
50. Y. Mitsui, Y. Tanaka, K. Yamada, S. Hara, M. Kinoshita, T. Hayakawa, K. Kakehi. Targeted glycoproteomics of polylactosamine-carrier proteins expressed on human histocytic lymphoma cells. The 25th International Carbohydrate Symposium、平成 22 年 8 月 4 日、幕張メッセ (千葉)
51. K. Yamada, K. Kamisue, S. Watanabe, M. Kinoshita, T. Hayakawa, K. Kakehi. A considerable amount of free glycans derived from glycoproteins are present in sera. The 25th International Carbohydrate Symposium、平成 22 年 8 月 4 日、幕張メッセ (千葉)
52. Nakanishi, M. Sato, M. Kinoshita, K. Kakehi, T. Hayakawa. Analysis of Characteristics of Cells using Glycans as Marker Molecules. The 25th International Carbohydrate Symposium、平成 22 年 8 月 4 日、幕張メッセ (千葉)
53. 仲西暁良、佐藤葵、木下充弘、森山博由、早川堯夫、掛樋一晃 キャピラリー電気泳動を用いる糖鎖を指標とする細胞評価法 - 再生医療実用化に向けた基礎検討 - 第 30 回 キャピラリー電気泳動シンポジウム平成 22 年 11 月 17 日、長良川国際会議場 (岐阜)
54. 仲西暁良、佐藤葵、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 糖鎖を指標とする細胞の個性解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、平成 22 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド (兵庫)
55. 三ツ井洋輔、山田佳太、梶直孝、田中佑樹、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 グライコプロテオミクスによるポリラクトサミン型糖鎖キャリアタンパク質の解析、学会名：第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、平成 22 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド (兵庫)
56. 三ツ井洋輔、山田佳太、田中佑樹、梶直孝、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 癌特異的糖タンパク質のグライコプロテオーム解析、日本薬学会 第 131 年会、平成 23 年 3 月、ツインメッセ静岡 (静岡)
57. 三ツ井洋輔、原沙弥香、山田佳太、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 ヒト胃癌細胞中の高フコシル化糖タンパク質の探索、日本薬学会 第 131 年会、平成 23 年 3 月、ツインメッセ静岡 (静岡)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
該当なし

Table 1 HEV 標準パネル候補品の内容

	パネル名	クラスター	由来	容量
1	HEV swJR-P5	G3jp	実験感染ブタ糞便	0.5ml/tube
2	HEV swJB-E10	G3sp	実験感染ブタ糞便	0.5ml/tube
3	HEV swJB-E10cul	G3sp	A549 細胞培養上清	0.5ml/tube
4	HEV swJB-M8	G3us	実験感染ブタ糞便	0.5ml/tube
5	HEV swJB-H7	G4jp	実験感染ブタ糞便	0.5ml/tube
6	Negative control	—	希釈用ヒト血清	0.5ml/tube

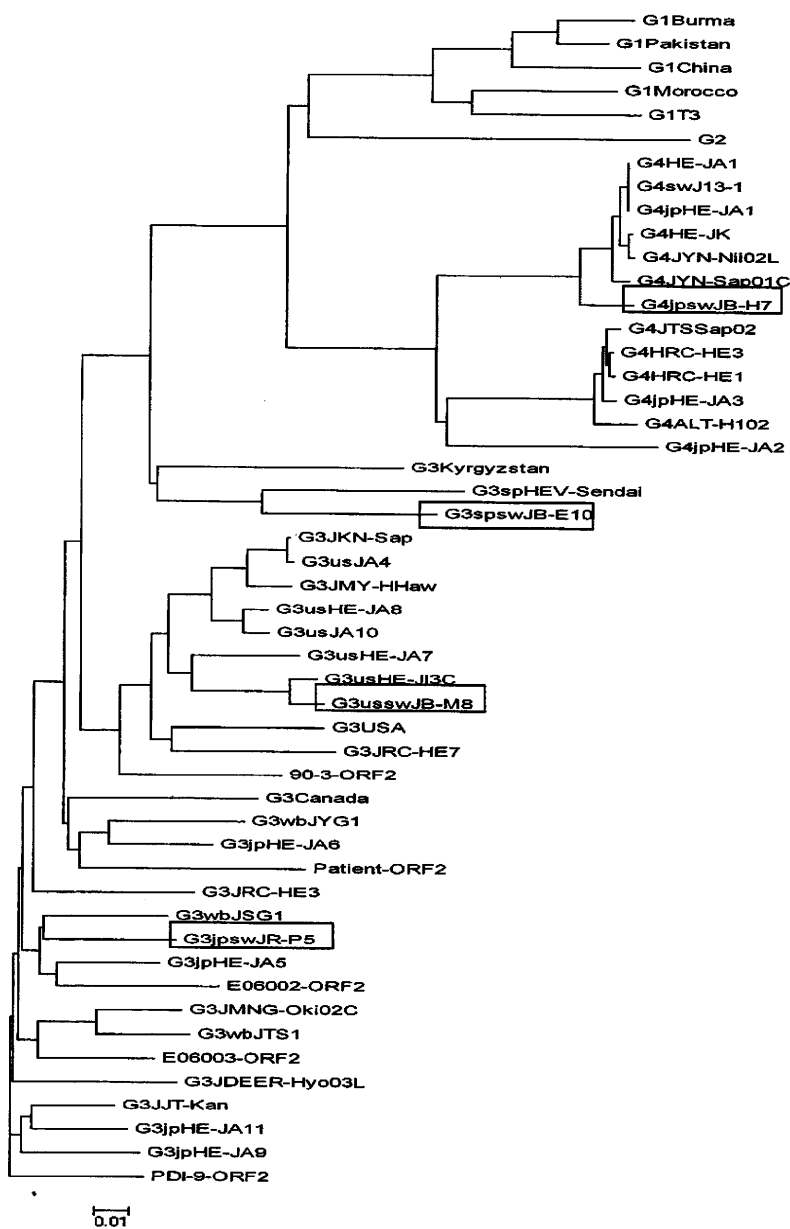


Fig. 1 HEV パネルの系統樹

Table 2 HEV 定量に用いるプライマー及びプローブ

	名称	サイズ	配列番号	配列
Sense primer	HE86	18mer	5286-5303	5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'
Antisense primer	HE87	18mer	5355-5338	5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3'
Probe (swJB-M8 以外)	FHE88	18mer	5309-5326	5'-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-TAMRA-3'
Probe (swJB-M8 用)	FHE100	18mer	5309-5326	5'-FAM-TGATT <u>CC</u> CAGCCCTTCGC-TAMRA-3'

配列番号は GeneBank AB073912 の番号に準じた

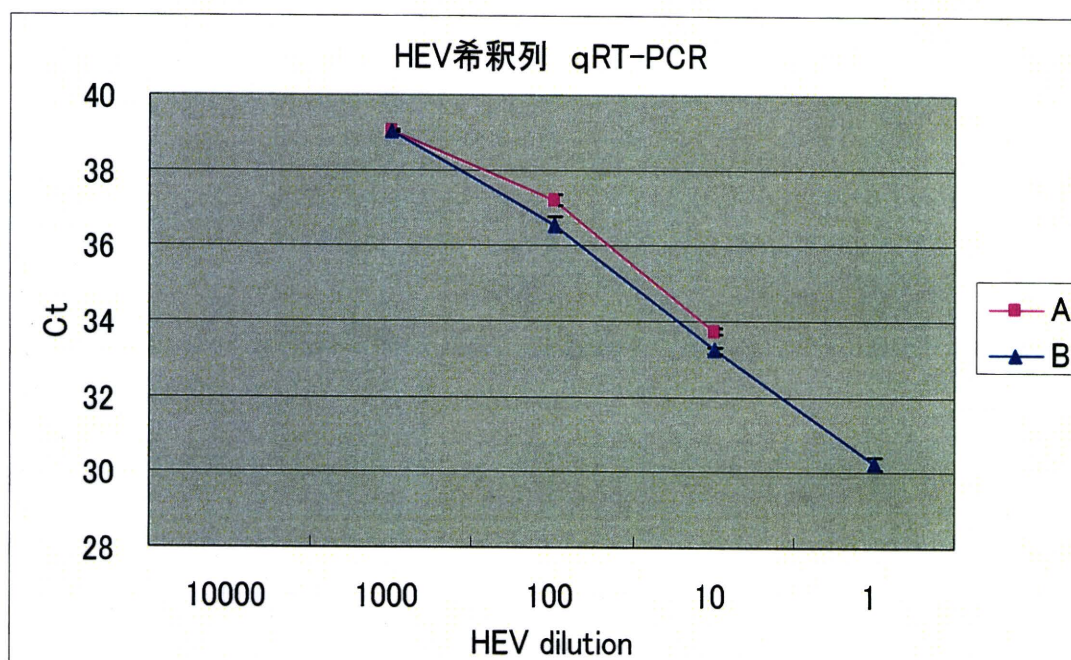


Fig. 2 HEV パネル候補品 (swJB-H7) の均一性試験

A : HEV 原液より RNA を抽出後に 10 倍希釈列を調製し、qRT-PCR を実施

B : HEV の 10 倍希釈列から HEV RNA を抽出し、qRT-PCR を実施