

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、虚血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 (C-4 参照) では *in vitro* 虚血処理による PIGF 分泌亢進は認められなかった。また、特性指標候補として PIGF を捉えた場合、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、虚血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も、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、虚血群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 (VEGF-1) 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 VEGF₁₆₅/PIGF、VEGF-B₁₆₇、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 との間で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-6-2 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-6-3 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値が比較的低かった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-6-4 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、表 28 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は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は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-7 細胞組織加工医薬品の特性解析・品質管理に関する研究

成体における血管形成は従来、既存の血管内皮細胞遊走・増殖により新たな血管が形成される血管新生 (angiogenesis) の機序により生じるものと考えられていたが、骨髄に由来する EPC が成体の循環血液中に存在することが報告され、胎生期にのみ認められるとされていた血管発生 (vasculogenesis) の機序を介して血管内皮前駆細胞が成体での血管形成に関わるという概念が提唱された。それ以来、EPC を用

いた血管再生療法の開発が試みられ、EPC あるいは EPC の起源細胞を含む細胞画分を用いた臨床研究等が展開されている。

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。Early EPC は不均一ではあるが培養 1-2 週間で出現する。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。Late EPC は多くの均一な細胞数が得られるので扱いやすいが、出現時期が 2-3 週間と遅く、出現頻度も低い。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 EPC に関する研究に着手し、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てきた (Kanayasu-Toyoda et al., J Cell Physiol. 195, 119, 2003, J Biol Chem 282, 33507, 2007)。2000 年以降、EPC には 2 種類の細胞 (early EPC と late EPC) が存在することや (Lin Y. et al. J. Clin. Invest. 105, 71, 2000)、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、EPCの起源細胞や調製法に関する知見は変遷してきた。また、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、AC133陽性細胞を起源とするearly EPCと単核球を起源とするearly EPCは類似した性質を持つこと、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た。

図92に示したように、early EPCとlate EPC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、MMP-9、CXCL10、CXCL9、TNF、IL-1 β 、TYMP、IFN γ 、IL-8、CCL2などの発現が高く、これらが特性指標として有用である可能性が考えられる。これらの中でも特に、IL-8やCCL2は血管内皮細胞の遊走や増殖を促進することが知られており、early EPCの血管新生促進作用に寄与している可能性が高い。他に興味深い知見として、early EPCがMMP-9を高発現していたことがあげられる。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よく知られているが、その他に、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いる(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94-96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98)。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 β 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 β 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考えられた。

次に、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のもと(図101)、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(図103)IL-8に応答した遊走反応は示さない(図102)。Early EPCの殆どがCD14陽性細胞である(図83)。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(図104)。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(図101)。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(図106、107、109)。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(図91)。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おり(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。

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。本研究で明らかになった特性指標分子は、early EPCあるいはlate EPCの確認試験や力価試験において有用であると考えられる。すなわち、early EPCで高発現しているMMP-9やケモカイン類は特徴的産生物質として、late EPCの

管腔形成能と発現量が相関していたオクル
ディンは生化学的指標として用いることが
できる可能性がある。

D-8 人工多能性幹細胞の品質・安全性に関する研究

iPS 細胞は、個人の年齢や性別にかかわらず樹立が可能であった。樹立された日本人 iPS 細胞は、形態学的特徴、ES 細胞マーカー、細胞表面抗原、*in vitro* および *in vivo* の分化能の点で、ほぼ同様であり、ES 細胞に比肩するものであった。本研究は、樹立直後の細胞の解析であったが、継代を重ねていった場合、核型も含めて細胞表面抗原や網羅的遺伝子発現状況などに変動がないか、今後研究を行っていく必要があると考えられる。

D-9 細胞特性・品質解析技術としての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、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た。結果、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が明らかとなった。

E. 結論

本研究で得られた結果より、以下のよう

な結論が得られる。

E-1 細胞組織加工医薬品のウイルス安全性評価技術の開発

HBV の濃縮・高感度検出法として、PLL 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、PVB19 の *in vitro* 持続感染系を確立した。マイコプラズマの迅速検査法のうち、酵素活性に基づくマイコプラズマ検出法は、PCR 法よりも検出感度がかかなり劣ること、及び Nested PCR 法とリアルタイム PCR 法は十分な感度を持つ可能性を示した。さらに、HEV-NAT 評価用標準パネルを樹立した。

E-2 細胞組織利用医薬品の同一性・安定性評価手法の開発に関する研究

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。用いた細胞に内在性の染色体異常が採取時に存在している場合があることを意味しており、今後細胞培養工程評価において内在性の異常か否かを慎重に判断することが必要であることを示唆している。

他方、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、膨大なマススペクトルデータの効率的な解析が課題となっていた。これに対しては、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。ナノ LC-MS を用いることにより、間葉系幹細胞のハイスループットな高感度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。一方、MS/MS 測定を用いたタンパク同定により、間葉系幹細胞に特徴的な表面 CD マーカー分子を網羅的に検出できた。そして、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できた。

E-3 細胞組織加工医薬品の同等性評価技術の開発

(1) 定量的糖鎖プロファイリングにより、MSC の神経様分化前後の細胞で糖鎖プロファイルが変化することを明らかにした。(2) 糖鎖プロファイルの主成分分析 (PCA) により、MSC、神経様分化細胞及び骨分化細胞を区別できることを確認した。糖鎖プロファイリングと PCA を組み合わせた手法は、MSC の分化能を評価する方法として利用できる可能性が実証された。

E-4 細胞組織加工医薬品の免疫学的安全性評価に関する基盤技術開発

CXCL12 発現 Ad ベクターや VEGF 発現 Ad ベクターをマウスに投与することにより、造血幹細胞を含む種々の血液細胞が骨髄ニッチから遊離してくることが示された。ま

た、移植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、ドナー細胞がレシピエントへ生着することが示された。本研究結果はヒト血液細胞を有するマウスを作製するうえで非常に有用な知見であると考えられる。今後、種々のサイトカイン・ケモカインと抗がん剤を併用する等、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。

E-5 細胞組織加工医薬品の造腫瘍性・異常増殖性評価技術の開発に関する研究

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) と正常細胞 (hMSC) と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のパリテ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-6 細胞・組織加工医薬品等の品質評価技術の開発に関する研究

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。そこで筆者は、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 による治療効果ないし虚血部位における 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。

なお、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、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 PlGF 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-7 細胞組織加工医薬品の特性解析・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) 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、early EPC の血管形成促進作用には MMP-9 や CXCL9、CXCL10、IL-8 といったケモカイン類等が寄与している可能性を示した。
- 3) Early EPC が高い細胞外マトリックス浸潤活性を持ち、細胞表面に存在する 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。浸潤に伴う遊走のシグナル伝達物質は血球に多く発現する p110 PI3K

δであることを示した。

- 4) 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* の血管形成の活性評価系を開発した。
- 5) Tight junction 関連タンパク質であるオクルディンが late EPC の機能評価因子になり得ることを明らかにした。

E-8 人工多能性幹細胞の品質・安全性に関する研究

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。本研究では、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 細胞特性・品質解析技術としての糖鎖解析技術の開発

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。

本研究により得られたこれらの成果は、感染性危険因子の高感度・高精度検出法や細胞組織加工医薬品の造腫瘍性・遺伝的安定性・同等性評価手法、あるいは細胞の特性解析、製造方法の妥当性や品質規格の設定に関する手法の確立など、細胞・組織加工医薬品等の品質、安全性等を確保するための基盤技術として今後、活用されていくとともに、これらをもとに新たな技術開発が展開されて行くものと期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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
- 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.* 2010; 298: C140-C148
- 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.* 2010; 12: 501-507
 - 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.* 2011; 19: 400-407
 - 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
 - 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
 - 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.
 - 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
 - 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 電子情報通信学会技術研究報告 2011; 110(366): 31-34
 - 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 ステムを知られば薬がわかる 第50回 Pharm Tech Japan 2010; 26(10): 1927-1936
 - 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 2010; 7月号: 1-2
 - 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 2010; 130: 1527-1534
 - 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
 - 佐藤 陽治 再生医療・細胞治療の規制に関する国際動向 PHARMSTAGE 2011; 10(12): 1-2
 - 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
 - 西田 基宏, 斎木 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
 - 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 2010; 16: 69-80
 - 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 determined by ethylnitrosourea and determined by quantitative real-time PCR. *Mutat Res.* 2009; 673: 9-20
 - 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.* 2010; 298: C140-C148
- 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.* 2009; 8: 3415-3429
 - 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.* 2009; 32 (5): 796-800
 - 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* 2009; 126(3): 336-345
 - 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.* 2009; 27: 1802-1811
 - 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.* 2009; 379: 127-132
 - 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; 635(1-3): 56-61
 - 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; 285(17): 13244-53
 - 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
 - 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.* 2010; 184(4): 1968-76
 - Kakoi N, Kinoshita M, Kawasaki N, Yamaguchi T, Hayakawa T, Kakehi K. Capillary electrophoresis analysis of contaminants in heparin sodium 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; 8(2): 521-37
 - Tanabe S, Sato Y, Suzuki K. Characteristics of stem cells based on expression profile of molecular markers. *Res. Adv. in Biochemistry.* 2009; : 1-8
 - 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* 2010; 130 (2): 163-169
 - 宮田直樹, 川崎ナナ, 内田恵理子, 蜂須賀暁子 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* 2009; 40: 587-598
 - 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* 2009; 9 (2): 1-5
 - 川崎ナナ 糖鎖関連医薬品の開発と分析化学 *ぶんせき* 2010; 421(1): 17-22
 - 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
 - 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
 - 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* 2009; 36: 611-627
 - 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
 - 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.* 2009; 16(1): 73-80
 - Nishida M, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Saito H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T, Kurose H. P2Y6 receptor-Galpha12/13 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: 430-440
 - 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.* 2009; 16(2): 297-302
 - 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
- Haghghi K, Chen G, Sato Y, Fan GC, He S, Kolokathis F, Pater L, Paraskevaïdis 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, Kawasaki 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
 - Watanabe K, Hyuga S, Hyuga M, Sekiguchi A, Endo M, Tsuda T, Oikawa T, Yamaguchi T, Hanawa T. Unkeito, a traditional Kampo formula, exhibits a selective estrogen receptor modulator-like activity. - Prevention of osteoporosis in ovariectomized mice? *J Trad Med.* 2009; 26(1): 18-24
 - 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. 2009; 106(13): 5400-5405
- Okita K, Nakagawa M, Hong H, Ichisaka T, 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
 - 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
 - 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, 齋島由二, 品川麻衣, 榛葉信久, 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, 榛葉信久, 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, 石井明子, 山口照英 糖鎖と生物薬品 Journal Applied Glycoscience. 印刷中
 - 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
 - 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
 - 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 2009; 36: 611-27

2. 学会発表

- 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 Pharmaco-Hematology シンポジウム、2010 年 6 月、東京
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- 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)
 - 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
 - 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
 - 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)
 - 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)
 - 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
 - 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
 - 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)
 - 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)
 - 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)
 - 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)
 - 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)
 - 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)
 - 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)
 - 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)
 - 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