

Fig. 10 三種のアッセイ系の感度

培養期間依存的に HeLa 細胞の感度は増加した。CBA-140 は CellTiter Glo とのコンビネーションにより HeLa 細胞および hMSC (Lot C) の感度を顕著に上げた。

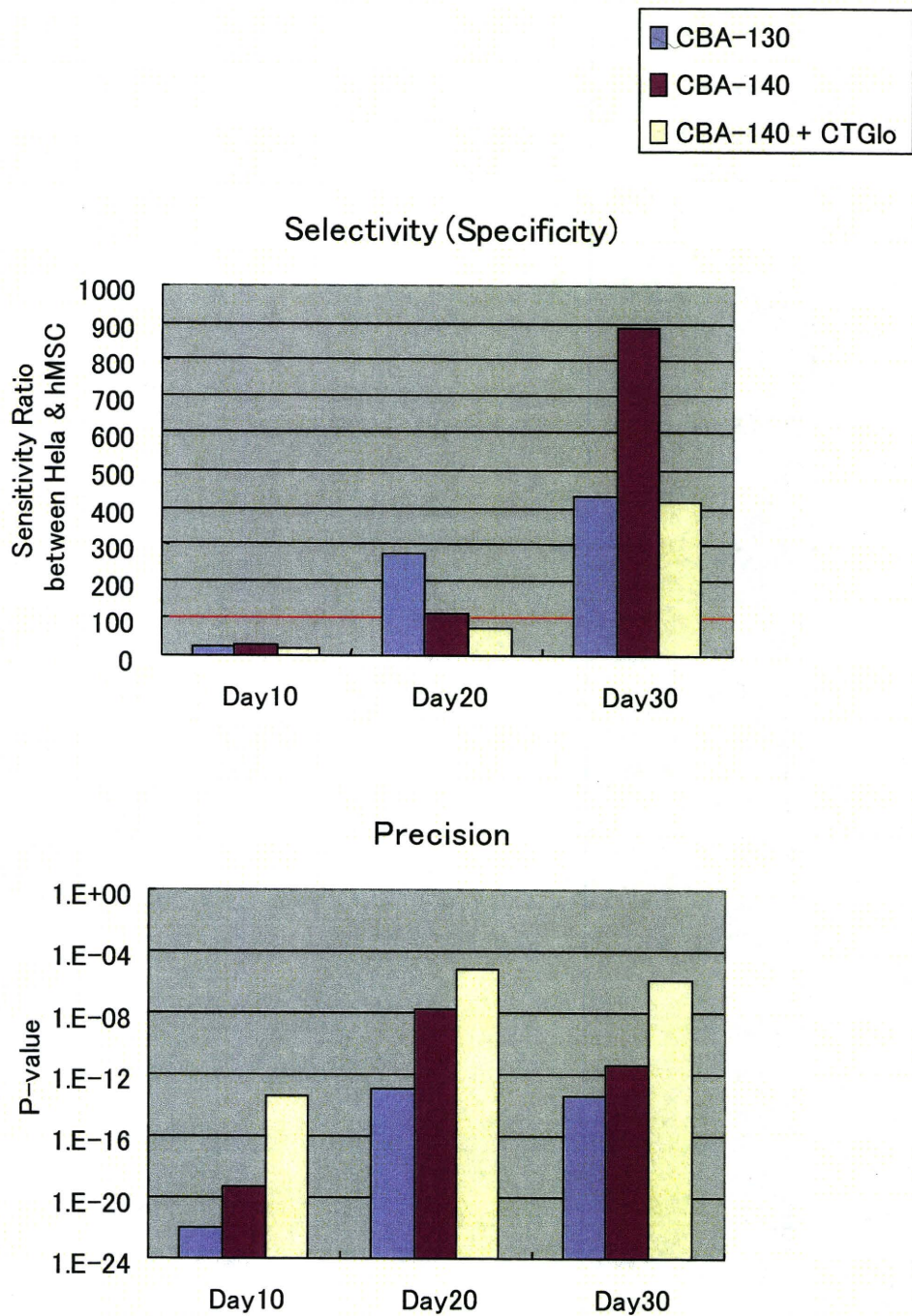


Fig. 11 三種のアッセイ系の HeLa 細胞に対する選択性（上）および精度（下）
 hMSC (Lot C)と比較した場合、培養期間依存的に HeLa 細胞に対する選択性は増加した。100 倍以上の HeLa 細胞選択性を実現するには、10 日以上培養が必要であった。また、HeLa 細胞の検量線と hMSC (Lot C)の検量線との間では、培養 20 日目および 30 日目において、CBA-130 は CBA-140 および CBA-140 と CellTiter-Glo とのコンビネーションに比べて低い P 値を示した。

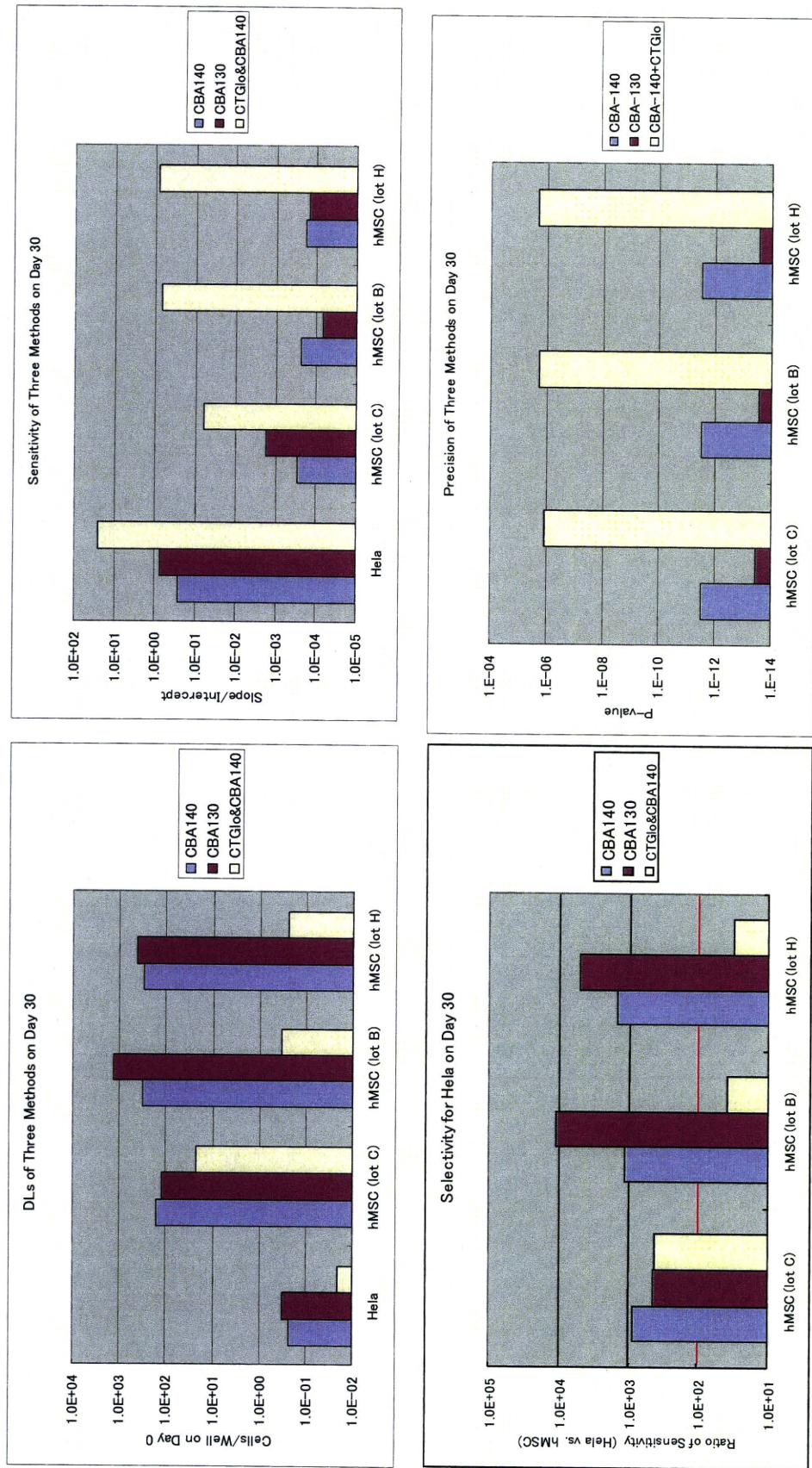


Fig. 12 hMSCの製造ロット（ドナー）の差による各アッセイ系の特性

培養30日目において、Lot Cに加えて、Lot BおよびHで各アッセイ系の特性を検討した。検出限界と感度の点ではCBA-140とCellTiter-Gloのコンビネーションが優れるが、HeLa細胞への選択性および精度に関してはCBA-130が優れていた。

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

研究分担者 佐藤 陽治 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・第2室・室長

研究要旨

ヒト間葉系幹細胞（hMSC）は心筋梗塞等の虚血性疾患に対して修復効果を示し、有力な新規治療ツールの一つとして期待されている。従来、hMSCの虚血組織保護・再生作用の機序についてはhMSCの組織細胞への分化によるものと考えられてきたが、近年ではhMSCから分泌されるサイトカインの役割が重要視されており、修復効果の一つである治療的血管新生についても密接に関与することが示唆されている。従って、hMSCを虚血性疾患に対する細胞・組織利用医薬品と考えた場合、ドナーの差やロット差によりサイトカイン分泌能に大きな差が生じることは、hMSCによる治療効果に影響を及ぼす可能性があり、品質管理上の問題となると考えられる。本研究では、虚血条件下におけるhMSCのサイトカイン分泌プロファイリングおよび複数ロットのhMSCにおけるサイトカイン分泌能の差を検討し、虚血後のサイトカイン分泌能予測因子について同定を試みた。DNAマイクロアレイを用い、54,613種類のcDNA配列（Probe Set）について虚血前の遺伝子発現量と虚血後のVEGF応答の相関を検討し、正の相関（ $p < 0.01$ ）を示す遺伝子17種（VSR1～17）を同定した。虚血時のVEGF応答性と相関するVSR遺伝子は、hMSCの虚血組織保護効果予測因子として有用である可能性があり、これらの遺伝子発現量をhMSCの虚血部位における治療効果予測マーカーとすることにより、hMSCの一定の治療効果を担保するための品質管理法が開発されることが期待される。

研究協力者

安田 智
国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部 主任研究官

佐藤 光利
東邦大学大学院薬学研究科
薬物安全性学教室 准教授

吾月 遥
東邦大学大学院薬学研究科
薬物安全性学教室 修士2年

A. 研究目的

ヒト骨髄中には造血幹細胞と間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cell: hMSC) という 2 種の体性幹細胞が存在する。前者は骨髄中で自己複製しながら血球前駆細胞を産生する。骨髄中の造血幹細胞の維持には骨髄ストローマ細胞が必要である。骨髄ストローマ細胞は複雑な三次元網目構造を形成しており、造血幹細胞はその構造の中で未分化状態を維持したり分化したりしている。骨髄ストローマ細胞の一部の細胞集団は、培養条件によって骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞などの間葉系細胞へと分化することから、間葉系幹細胞と呼ばれている。間葉系幹細胞については、その造血支持能に注目し、hMSC 併用移植による移植後造血系再構築促進効果が検討されている。また、骨再生・軟骨再生を目的とした再生医療に用いる細胞の供給源としても期待され、さらに、hMSC の免疫抑制能と炎症・組織障害部位への集積性に着目した移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) や虚血性心疾患・末梢動脈疾患の治療に関する研究が活発化しており、有効性を示唆する報告も多い。

しかしながら、こうした hMSC の有効性に関する報告に関しては、その機序が必ずしも明らかではなく、従ってリスク評価に限界がある点が問題である。すなわち、hMSC を細胞・組織加工製品ないしその原材料として利用する場合には、可能な限り作用機序の解明を行い、有効性/安全性評価ないし品質評価のための細胞特性指標を同定することが重要である。たとえば、虚血性疾患の治療を目的とし、虚血部位に hMSC を投与し組織保護・再生等の治療効

果が認められる報告は数多いが、その機序については不明なことが多い。

hMSC の虚血性疾患に対する作用機序については、虚血部位に移動した hMSC が組織へと組み込まれ、組織細胞へと分化するためであると従来考えられてきた。しかし近年、1) 移植後の hMSC の分化割合が低い、2) hMSC の培養上清やサイトカインの直接投与によっても同様の効果が得られるなどの報告から、局所あるいは遠くに存在する目標部位に対してサイトカインを放出することで治療効果に貢献していることも示唆されている。hMSC からのサイトカイン分泌の役割が注目されており、中でも、修復効果の一つとして知られる治療的血管新生については、サイトカインの関与が大きいと考えられている。しかし、hMSC による虚血性組織の修復についての実態はまだ明らかになっておらず、虚血性疾患に対するその有効性を理解するためには、投与された細胞が置かれるストレスの多い環境下での細胞の挙動を理解することが重要となる。

そこで本研究では、*in vitro* で擬似的に再現した虚血条件下において hMSC を培養し、同時に通常条件で培養したものと比較を行うことで、虚血ストレスに対する hMSC の応答性を検討した。中でも血管新生関連因子に着目し、虚血条件下において特異的に分泌増加する血管新生関連サイトカインを探索し、遺伝子発現量が有意に増加したサイトカインに対して、さらに ELISA を実施し、実際の分泌量を含めた検討を行うことで、虚血ストレス下における hMSC の血管新生関連サイトカインに対する分泌プロファイリングを試みた。

hMSC を虚血性疾患治療用の細胞・組織利用医薬品と考えた場合には、ドナーの差やロット差によって製品の力価、あるいは力価に反映され得る生理活性物質の分泌能に大きな差が生じることが品質管理上の課題となり得る。加齢により hMSC の染色体上に変化が生じることが報告されており、この変化が細胞の生理的機能に影響を与え、潜在的に hMSC による細胞治療の効果を制限することも懸念される。成長因子や薬剤の併用、遺伝子導入などにより、hMSC の機能を高める試みも数多く行われているが、いずれにしても移植後に十分な治療効果を得るためには、使用される hMSC 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 による効果を予測するためには、目的に則した幹細胞の特性解析指標が必要であると考えられる。

そこで本研究では、血管新生関連サイトカイン分泌能を予測するための指標を同定する目的で、まず、複数ロットの hMSC を同一条件下において培養し、ロット間におけるサイトカイン分泌能の差に対する検討を試みた。次に、ロット間におけるサイトカイン分泌能の差は、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という仮説を立て、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統計学的に解析し、hMSC の虚血環境における血管新生関連サイトカイン分泌能と相関する遺伝子を探索・同定した。

B. 研究方法

B-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

B-1-1 使用細胞および細胞培養

骨髄由来 hMSC は、Lonza 社より入手した。各ロットの年齢・性別・人種に関する情報は表 1 の通り。

虚血条件下における hMSC の血管新生関連遺伝子発現変化を検討する目的で、hMSC (継代数 9 (PS#9)) を 1×10^4 cells/well となるよう 96 穴細胞培養プレート上に撒き、MSCBM [Lonza] に MSCGM SingleQuots [Lonza] を加えて調整した基本培地中で 37°C、5% CO₂ の条件下で 80% コンフルエントになるまで培養した。その後、培養した上記の 96 穴細胞培養プレートを、コントロール群および虚血群に分け、表 2 に示す通常条件または擬似的虚血条件においてさらに 24 時間培養し、Total RNA を抽出した。6 つのロット (A, B, C, F, G, H) について、同様の実験を行った。

B-1-2 細胞の生存試験

虚血 (低酸素・グルコース欠乏) 処理開始を時間 0 として、細胞の生存の時間経過を評価した。細胞の生存評価は CyQuant 細胞増殖アッセイキット (Invitrogen) を用いた。核酸に結合した CyQuant 色素の蛍光はマルチラベルカウンター ARVOsx (PerkinElmer) を用いて測定した。

B-1-3 培養細胞からの Total RNA の抽出

培養細胞からの Total RNA の抽出は、MagAttract RNA Cell Mini M48 Kit [QIAGEN]、BioRobot M48 Workstation [QIAGEN] を使用し、QIAGEN 社のマニ

マニュアルに従って行った。RNA サンプル濃度は 260nm の吸光度を測定することで評価し、260nm の吸光度と 280nm の吸光度の比が 1.6 以上であることを指標に純度を確認した。吸光度測定は NanoDrop ND-1000 [Thermo] を用いて行った。抽出した RNA サンプルは -80°C にて冷凍保存した。

B-1-4 虚血後における血管新生関連遺伝子発現量の測定

血管新生関連遺伝子発現量を網羅的に解析するために、RT² Profiler PCR Array Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors [SA Biosciences, cat# PAHS-072] を用いた。測定した遺伝子は表 3 の通りである。

各ロットについて RNeasy Mini Kit [QIAGEN] を用いてサンプルを濃縮し、Total RNA が 1µg/10pL となるよう調整した後、SA Biosciences 社のマニュアルに従い、各 RNA サンプルから cDNA を合成した。

次いで、合成した cDNA を用いて同マニュアルに従い溶液を調整後、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System [Applied Biosystems] にて RT-PCR を行い、各サイクルについてリアルタイムでモニターした。サーマルサイクラーの条件設定は表 4 の通りである。

クオリティーコントロールとして、上記のサイクリングプログラム後すぐに融解曲線プログラムを実行し、プレート上の各ウェルの PCR 産物に対して融解曲線を作成した。融解曲線の温度微分曲線において、80°C 以上に出現するピークが 1 つだけであ

ることを指標に PCR 産物の特異性を確認した。

検出された PCR シグナルからベースラインを設定し、これをもとに PCR 産物の増幅が指数関数的に起こる領域でシグナルの閾値を設定した。シグナルの閾値に到達するサイクル数 (Ct : Threshold Cycle) を算出し、Ct 値 > 35 の遺伝子については発現がないものとみなした。各遺伝子の mRNA 発現量を補正するための内部標準としては β -actin, β 2-microglobulin、Hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1、Ribosomal protein L13a の発現量を測定した。データの正規化には、RT² Profiler PCR Array Data Analysis [SA Biosciences, <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>] を使用した。

B-1-5 統計解析

統計ソフトウェア Sigma Stat [SYSTAT Software] または Microsoft Excel [Microsoft] を用いて、コントロール群および虚血群に対する Paired t-test により検定を行い、有意水準を危険率 1% 未満 ($p < 0.01$) として評価した。RT² Profiler PCR Array は多変量解析 (multivariate index assay) の一種と考えられ、84 種の因子についての検定を同時に行う。そこで、期待擬陽性数を下げる目的で、有意水準は一般的な「危険率 5% 未満 ($p < 0.05$)」よりも厳密にした。

B-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

B-2-1 使用細胞および細胞培養

虚血条件下における hMSC の血管新生関

連サイトカイン分泌変化を検討する目的で、B-1-1と同様にhMSC (PS#9)を96穴細胞培養プレート上で培養後、さらに通常条件または擬似的虚血条件下で24時間培養し、培養上清を回収した。回収した上清サンプルは-80℃にて冷凍保存した。

B-2-2 サイトカイン抗体アレイによる評価

サイトカイン抗体アレイはRayBiotech社のHuman Cytokine Antibody Array AAH-CYT-5を用いた。サンプルは低酸素・グルコース欠乏処理をしたhMSCの培地1mLを用いた。サイトカイン抗体アレイの測定に関しては製造元のマニュアルに従った。アレイ上に結合したサイトカインの由来の化学発光シグナルの測定は、ルミノ・イメージアナライザーLAS-3000 (FUJIFILM)を用いて行った。

B-2-3 虚血後における血管新生関連サイトカイン分泌量の測定

虚血後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について、実際の分泌量およびその変化率を検討するために、Quantikine ELISA Kit [R&D]を用いてB-1-1で回収した培養上清中のVEGF濃度を測定した。測定は、R&D社のマニュアルに従って行った。使用したELISA Kitは表5の通りである。

B-2-4 統計解析

群間の差に対する統計学的検定は、統計ソフトウェアSigma Stat [SYSTAT Software] またはMicrosoft Excel [Microsoft]により行った。

血管新生関連サイトカインの濃度データ

についてはTwo-way ANOVAを行い、有意差が認められた場合には、多群比較のpost-hoc testとしてStudent-Newman-Keul testを行った。

血管新生関連サイトカインの濃度変化率は、虚血群の濃度とコントロール群の濃度という2つの独立変数の比である。すなわち、各濃度の対数を新たな独立変数とすれば、濃度変化率の対数はこれら2つの新しい独立変数の差で表わされる。一般に、2つの独立変数の差の平均値は各独立変数の平均値の差として求められる。また、2つの独立変数の差の標準偏差は、各独立変数の標準偏差の平方和の平方根として求められる。2つの独立変数の差の自由度は各独立変数の自由度(標本数-1)の和となる。これらをもとに、One-way ANOVAを行うことにより、血管新生関連因子の濃度変化率のロット間の差を評価した。有意水準は危険率5%未満($p < 0.05$)とした。

B-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

B-3-1 虚血前遺伝子発現量と虚血後VEGF分泌の相関関係の評価

虚血後において有意なロット差が認められたVEGF分泌に対して、VEGF分泌能を予測する因子となり得る遺伝子を探索するために、6ロットのhMSCにおける虚血前の遺伝子発現量と虚血後のVEGF分泌について相関関係を検討した。

虚血前の遺伝子発現量は、本研究で用いた6ロットのhMSC (PS#7およびPS#9)とGeneChip HG-U133Plus2.0 [Affymetrix (54,613 Probe Sets, 41,080 Reference Sequence Transcripts)]を用い

て筆者の所属する研究室で過去に測定されたデータを利用した。このデータは hMSC の Total RNA から Affymetrix 社の Two-cycle プロトコールならびにハイブリダイゼーションの定法に従って遺伝子発現シグナルを取得し、これを GCOS ソフトウェア [Affymetrix] を用いて解析したものである。現在、データは米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースである Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) に登録されている (Series# GSE7637, Sample# GSM184654-GSM184665)。なお、データの正規化には内部標準 Probe Set リストである MSK ファイル [Affymetrix] を用い、目標強度 (target intensity) は 10,000 としてある。この GeneChip データに次に示すフィルターをかけ、虚血後の VEGF 分泌量または変化率と相関のある遺伝子を抽出した。ここで抽出された遺伝子を、便宜上 VEGF 分泌能予測候補遺伝子 (VSR 遺伝子: VEGF Secretion Related Candidate Gene) と名づけた。

・フィルター①

GeneChip HG-U133Plus2.0 における各 Probe Set のシグナルは Absolute Analysis (発現の有無を判定する解析) の結果、「発現があるもの: P (Present)」、「発現があるかわからないもの: M (Marginal)」あるいは「発現がないもの: A (Absent)」として判定がなされる。6 ロットのうち半数以上 (つまり 3 ロット以上) で P と判定された Probe Set については、hMSC においてその Probe Set がコードする遺伝子が発現していると判断した。逆に 6 ロットのうち P

判定されたものが 2 ロット以下の場合は、hMSC においてその Probe Set がコードする遺伝子の発現はないと判断した。

発現が見られる Probe Set については次のフィルターをかけ、発現が見られない Probe Set は棄却した。

・フィルター②

細胞特性指標の大切な要件の一つにシグナル/ノイズ比が大きいことが挙げられる。逆に細胞特性指標候補のロット間のばらつきが小さいことは、シグナル/ノイズ比が低くなることを意味することから避けるべきと考えられる。そこで、発現量データのロット間のばらつきが十分に大きい遺伝子を抽出する目的で、各ロットにおける発現量 (シグナル) の平均値の最低値と最高値の比が 3.0 倍以上ある Probe Set については次のフィルターをかけ、差が 3.0 倍より小さいものは棄却した。

・フィルター③

PS#7 または PS#9 における各 Probe Set の発現量と、治療効果をより直接的に反映すると考えられる PS#9 の hMSC における虚血後の VEGF 分泌量または変化率との間でスピアマンの順位相関係数を算出した。有意水準は危険率 1% 未満 ($p < 0.01$) で評価し、以下 4 つの組み合わせ全てにおいて有意な正の相関がある Probe Set を抽出した。

- ① PS#9 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血時の VEGF 分泌量
- ② PS#9 における遺伝子発現量 vs. PS#9 での虚血による VEGF 分泌変化率
- ③ PS#7 における遺伝子発現量 vs. PS#9

での虚血時の VEGF 分泌量

④ PS#7 における遺伝子発現量 vs. PS#9
での虚血による VEGF 分泌変化率

スピアマンの順位相関係数および有意確率 (p 値) の算出は、群馬大学社会情報学部・青木繁伸「統計学自習ノート」の「スピアマンの順位相関係数」の項 <http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/lecture/Soukan/spearman.html> に基づき、Microsoft Excel [Microsoft] を用いて行った。

また、虚血後の VEGF 分泌におけるロット差が、単なる細胞数の増加によるものではないことを確認するために、CyQUNANT Cell Proliferation Assay Kit [Invitrogen] を用いて、虚血 24 時間後の hMSC の生存率 (= 虚血群の細胞数/コントロール群の細胞数 = 虚血抵抗性) を測定し、同様に各 Probe Set の発現量との間のスピアマンの順位相関係数を算出し、 $p < 0.01$ で評価した。

B-3-2 統計解析

群間の差に対する統計学的検定は、統計ソフトウェア Sigma Stat [SYSTAT Software] または Microsoft Excel [Microsoft] により行った。

(倫理面への配慮)

Lonza 社の hMSC はヒト由来細胞であるが、提供者の同意を取り適切に細胞を採取していることが確認されている。このため国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規程に倫理審査該当品目とはならなかった。

C. 研究結果

C-1. 低酸素・グルコース欠乏処理による細胞の生存

虚血 (低酸素・グルコース欠乏) 条件下での、6 ロットの hMSC の生存の時間経過を図 1 に示す。コントロール群の生存率は比較的一定であったが、Repeated Measures One-way ANOVA を行ったところ、虚血群とコントロール群と比較した場合、細胞生存率に優位 ($P < 0.05$) な差異が認められた。同時点における 2 群間の比較をした場合には、低酸素・グルコース欠乏処理開始後 48 時間で優位な差が認められた。これらの結果より、サイトカインの測定用の培養上清は低酸素・グルコース欠乏処理開始後 24 時間の時点で回収することとした。

C-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

通常条件または擬似的虚血条件培養後に回収した hMSC より Total RNA を抽出し、RT² Profiler PCR Array によって血管新生関連遺伝子の発現量を測定することで、コントロール群および虚血群における発現量を比較し、虚血後において有意に上昇するサイトカイン遺伝子を検討した。

RT² Profiler PCR Array Angiogenic Growth Factors & Angiogenesis Inhibitors により 84 種の血管新生関連遺伝子の発現量を検討したところ、虚血後における hMSC では、レプチン (Leptin)、血管内皮細胞成長因子 A (VEGF-A : Vascular Endothelial Growth Factor-A、以降 VEGF と省略する)、胎盤成長因子 (PlGF : Placental Growth Factor)、アン

ジオゲニン (Angiogenin)、 β 1 型形質転換成長因子 (TGF- β 1: Transforming Growth Factor-beta1) の遺伝子発現に有意な上昇が認められた (図 2~7)。

C-3 サイトカイン抗体アレイによるサイトカイン放出プロファイルの検討

RayBiotech 社のサイトカイン抗体アレイを用いて、24 時間の低酸素・グルコース欠乏処理 (HGD)を行った場合の細胞上清とコントロールの細胞上清とで、含有されるサイトカインのプロファイルを比較した。化学発光量を定量したところ、HGD 群においてコントロール群と比べて有意な上昇 ($P < 0.05$ [Paired t-test]) が認められたのは、PlGF、osteoprotegerin、osteopontin、TGF- β 2、および FGF-4 であった (図 8)。細胞が低酸素環境に暴露されると産生および分泌が増加するサイトカインとしてよく知られている VEGF に関しては、HGD 群とコントロール群とで差が認められなかった。

C-4 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認められたレプチン、VEGF、PlGF、アンジオゲニン、TGF- β 1 の 5 種類のサイトカインについて、通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後に回収した培養上清中の濃度を測定することで、hMSC から実際に分泌されるサイトカイン濃度を検討した。

レプチンは、虚血群においてロット F およびロット H で分泌量および分泌変化率に有意な増加が認められた。それぞれのレプ

チン濃度は 11.3 pg/mL (ロット F)、8.9 pg/mL (ロット H) であった。他の 4 ロットにおいては有意な差は認められなかった (図 9, 10)。

VEGF は、虚血群において全ロットで分泌量および分泌変化率に有意な増加が認められた。それぞれの VEGF 濃度は、1489 pg/mL (ロット A)、994 pg/mL (ロット B)、1780 pg/mL (ロット C)、1355 pg/mL (ロット F)、817 pg/mL (ロット G)、1410 pg/mL (ロット H) であった。また、各ロットにおける VEGF 分泌量および分泌変化率には有意なロット差が見られた (図 11, 12)。

PlGF は、コントロール群および虚血群における有意な差がないか、あるいはコントロール群での増加が見られる結果となった (図 13)。

アンジオゲニンおよび TGF- β 1 については検出限界未満であった。それぞれの検出限界濃度は、6.0 pg/mL (アンジオゲニン)、4.6 pg/mL (TGF- β 1) であった。

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

虚血後の VEGF 分泌について有意なロット差が見られたことから、①PS#9 における遺伝子発現量と虚血時の VEGF 分泌量、②PS#9 における遺伝子発現量と虚血による VEGF 分泌変化率、③PS#7 における遺伝子発現量と PS#9 における虚血時の VEGF 分泌量、④PS#7 における遺伝子発現量と PS#9 における虚血による VEGF 分泌変化率、これら 4 つの組み合わせについてスピアマンの順位相関係数とその有意確率を算出し、hMSC における VEGF 分泌能

と相関する遺伝子を探索した。

その結果、全ての組み合わせにおいて有意な相関が認められた Probe Set が 22 個検出された。このうち、VSR6、VSR8、VSR15 は 2 つの Probe Set、VSR9 は 3 つの Probe Set が重複してコードする遺伝子であり、検出された遺伝子は全部で 17 個であった (表 1 0, 1 1)。

一方、VSR12、VSR16、VSR17 を除く 14 遺伝子は、虚血下における生存率 (= 虚血抵抗性) に対しては、有意な負の相関を示した (表 1 2)。

D. 考察

D-1 サイトカイン抗体アレイによるサイトカイン放出プロファイルの検討

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、PlGF-1、PlGF-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/PlGF、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-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-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。

PIGF、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、レプチンがおおよそ1,000~60,000pg/mL(1~60ng/mL)、VEGFがおおよそ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-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、表 10 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質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。

E. 結論

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 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。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. 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;635:56-61.
8. 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;285:13244-53.
9. 早川堯夫, 梅澤明弘, 山中伸弥, 小澤敬也, 大和雅之, 澤芳樹, 山口照英, 松山晃文, 佐藤陽治, 中内啓光: 組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する研究(その1) ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案(中間報告) *再生医療* 2010;9:116-27.
10. 早川堯夫, 梅澤明弘, 山中伸弥, 小澤敬也, 大和雅之, 澤芳樹, 山口照英, 松山晃文, 佐藤陽治, 中内啓光: 組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する研究(その2) ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案(中間報告) *再生医療* 2010;9:128-38.
11. 早川堯夫, 梅澤明弘, 山中伸弥, 小澤敬也, 大和雅之, 澤芳樹, 山口照英, 松山晃文, 佐藤陽治, 中内啓光: 組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する研究(その3) ヒト(自己) iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案(中間報告) *再生医療* 2010;9:139-51.
12. 早川堯夫, 梅澤明弘, 山中伸弥, 小澤敬也, 大和雅之, 澤芳樹, 山口照英, 松山晃文, 佐藤陽治, 中内啓光: 組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する研究(その4) ヒト(同種) iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案(中間報告) *再生医療* 2010;9:152-65.
13. 早川堯夫, 梅澤明弘, 山中伸弥, 小澤敬也, 大和雅之, 澤芳樹, 山口照英, 松山晃文, 佐藤陽治, 中内啓光: 組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する研究(その5) ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案(中間報告) *再生医療* 2010;9:166-80.
14. 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.
15. 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.
16. Tanabe S, Sato Y, Suzuki K. Characteristics of stem cells based on expression profile of molecular markers. *Res. Adv. in Biochemistry.* 2009:1-8.
17. 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
18. 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.

G-2 学会発表

1. 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