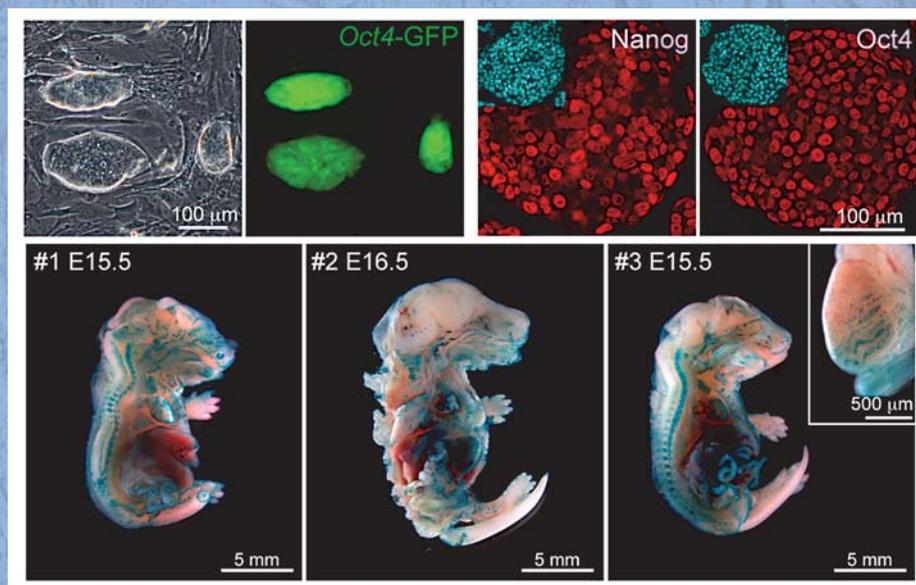


京都大学

再生医科学研究所年報

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences
Kyoto University



〈第14卷〉

2011
平成23年

表紙写真

「低 Sox2 発現誘導による iPS 細胞の多分化能」

マウス体細胞は、Oct4, Sox2, Klf4 転写因子の一過的強制発現により iPS 細胞に再プログラム化される。Sox2 の低レベル発現により高品質の iPS 細胞が出現する事実を、蛋白質発現やキメラマウス作製能により証明した。キメラ胚では iPS 細胞由来組織が青く染め出されている。GFP, Green Fluorescence Protein; Nanog & Oct4, 未分化細胞マーカー蛋白質

目 次

1. 巻 頭 言	1
2. 京都大学再生医科学研究所概要	
2-1 沿 革	2
2-2 教員数等	2
(1) 教 員	2
(2) 大学院生・研修員・研究生等	2
2-3 組 織 図	3
3. 研究概要と研究業績	
生体機能学研究部門	
細胞機能調節学分野 (准教授 細川 暢子)	4
生体微細構造学分野 (講 師 平芳 一法)	10
生体機能調節学分野 (教 授 坂口 志文)	13
生体システム制御学分野 (教 授 長澤 丘司)	19
生体組織工学研究部門	
生体分子設計学分野 (教 授 開 祐司)	24
生体材料学分野 (教 授 田畑 泰彦)	30
組織修復材料学分野 (教 授 岩田 博夫)	52
生体物性学分野 (客員教授 鳥光 慶一、佐藤 正明)	59
再生統御学研究部門	
発生分化研究分野 (教 授 中辻 憲夫)	70
再生増殖制御学分野 (教 授 瀬原 淳子)	76
再生免疫学分野 (助 教 藤本 真慈)	81
再生医学応用研究部門	
生体修復応用分野 (准教授 高橋 淳)	84
組織再生応用分野 (教 授 戸口田淳也)	89
器官形成応用分野 (准教授 角 昭一郎)	95
臓器再建応用分野 (准教授 中村 達雄)	99
附属再生実験動物施設 (准教授 近藤 玄)	107
附属幹細胞医学研究センター	
霊長類胚性幹細胞研究領域 (准教授 末盛 博文)	112
幹細胞分化制御研究領域 (准教授 山下 潤)	116
幹細胞加工研究領域 (准教授 多田 高)	125
細胞プロセッシング研究領域 (客員教授 高橋 恒夫)	129
附属ナノ再生医工学研究センター	
ナノバイオプロセス研究領域 (教 授 楠見 明弘)	132
シミュレーション医工学研究領域 (准教授 玄 丞休)	137
ナノバイオメカニズム研究領域 (助 教 都賀谷紀宏)	146
バイオメカニクス研究領域 (教 授 安達 泰治)	148
技 術 部	156
4. 学 術 集 会	157
5. 共 同 研 究	163
6. 協議員・教職員・その他構成員名簿	179

1. 巻 頭 言

昨年度末に死者と行方不明者を合わせて20,629人にもなる東日本大震災が発生しました。亡くなられた方、また、関係者の方に心よりお悔やみ申し上げます。さらに、原子力発電所事故による放射性物質による汚染が未だ続いており、泥炭の苦しみを舐めておられる皆様にも心よりお見舞い申し上げます。東日本大震災のニュースに接するたびに、“日常と変わらず研究していいのだろうか、他にすべきことがあるのでは”と悩まれた学生また研究者の方も多と思います。この様な大変な年にもかかわらず、例年と同じように研究ができ、さらに、皆様へのご報告である研究所年報をお送りすることができ、関係者の方々への感謝でいっぱいです。

さて、米アップル社のスティーブ・ジョブズ前最高経営責任者（CEO）が56歳で亡くなられました。米アップル社の斬新なPCの製品に接し、また、そのユーザーとしてその浮き沈みを同時代的に経験してきた世代の者にとっては一際感慨深いものがあります。米アップル社は、独自の工場を持たず、世界中の企業150社以上から部品調達し、さらに、組み立ても他社に委託してPCやiPhoneを製造しています。米アップル社の製品には“Designed by Apple in California. Assembled in China”などと刻印されています。

大学の多くの研究室は、教育的な見地と研究費が限られていることもあり、出来る限り自前で実験を行っています。見方によると我が京都大学は1000以上もの小企業の集まりのようです。基礎研究はかなり個人の能力に依存するところがあるので、多少の弊害はあるものの決して悪い体制ではありません。しかし、多様な知識や技能を集積して達成しなければならない応用研究においては、大学のこの体制は極めて非効率的です。PCと電話のある机にポツリと研究者一人がいる研究室もあっていような気がします。この研究者が研究のデザインをして、実験は学内の優れた実験技術を有する多数の研究室で分散的に実行され、その研究成果を研究のデザインをした研究者が取りまとめる。その論文には“Designed and Assembled by Dr. xx. Curried out in Kyoto University”と刻印される。このような研究体制もあっていいのではないのでしょうか。ここまで書いてきて、それは研究所長の仕事だと気が付き、同時に個性豊かな研究所の先生方の顔が浮かんできました。来年度は研究所の総力を注入し、世の中に多少なりとも還元できる研究成果を挙げるべく努力いたしますので、今後とも変わらぬご支援をいただけますようよろしくお願いいたします。

岩田 博夫

2. 京都大学再生医科学研究所概要

2-1 沿革

本研究所は、平成10年4月9日に設置された。その前身である胸部疾患研究所は、昭和16年3月に「結核の予防及び治療」を主軸とする結核研究所として設置され、昭和42年6月には結核胸部疾患研究所に名称変更、さらに昭和63年4月には「胸部疾患に関する学理及びその応用の研究」を目的とした胸部疾患研究所への全面改組が行われたが、胸部疾患に関する研究・治療を取り巻く社会的要請の変化から、胸部疾患研究所は57年間にわたる使命を終え、平成10年度より、同研究所基礎系分野及び臨床系分野の一部を人工臓器の研究・開発に関して顕著な業績を挙げてきた生体医療工学研究センターと統合し、さらに実地臨床医学を行う医学研究科との協力により、「生体組織及び臓器の再生に関する学理及びその応用の研究」を目的とする再生医科学研究所に改組・転換された。

改組・転換に伴い、胸部疾患研究所の臨床系分野の一部と研究所附属病院は、大学院医学研究科・医学部並びに医学部附属病院へとそれぞれ引き継がれた。

本研究所は、平成10年4月の発足時は5大研究部門と附属再生実験動物施設で組織された。その後、平成14年4月に附属幹細胞医学研究センターが設置され、平成16年4月に研究部門の再編（1大研究部門減）の実施によりナノ再生医工学研究センターが設置された。平成16年10月には、住友電気工業（株）の寄附による寄附研究部門が4年間の時限で設置された。現在4大研究部門（生体機能学、生体組織工学、再生統御学、再生医学応用）、3附属施設となっている。平成17年10月から平成22年3月まで、工学研究科、医学研究科とともに、ナノメディシン融合教育ユニットに参加した。

本研究所は、生命科学、医学、工学などの研究所が結集して再生医学の学際的基礎研究を推し進め、その成果の医学応用をめざすとともに、ヒトES細胞株の樹立機関として、樹立・特性解析を行ったES細胞を、全国の研究機関へ分配するナショナルバイオリソース事業を実施している。

また平成20年10月には共同利用・共同研究拠点の認定を文部科学大臣より受け、再生医学・再生医療に関する共同研究を実施している。

主な建物は、再生医科学研究所西館、再生医科学研究所東館（旧生体医療工学研究センター）、ES細胞研究棟（平成14年施工）、南部総合研究実験棟（ウイルス研、医学研究科との3部局合同使用）（平成14年施工）の4棟となっている。

2-2 教員数等

(1) 教員（平成24年1月1日現在）

現員	教授	准教授	講師	助教	小計	特任講師	特任助教	合計
	10 (2)	13 (1)	2	7	32 (3)	1	2	35 (3)

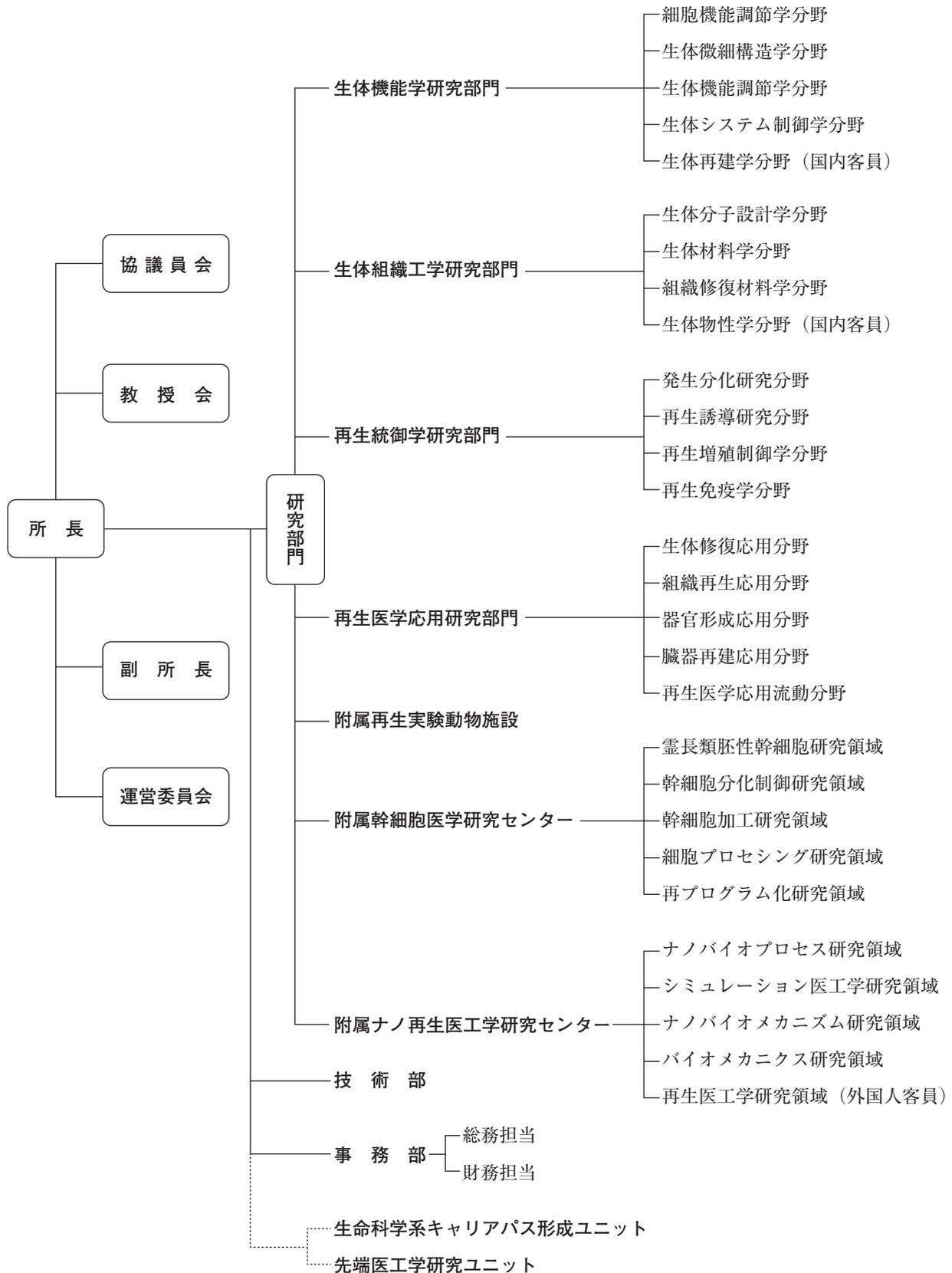
() 内は客員で外数

(2) 大学院生・研修員・研究生等（平成24年1月1日現在）

大学院生	研修員	研究生	外国人共同研究者等
98	6	8	4

2-3 組織図

(平成24年1月1日現在)



3. 研究概要と研究業績

生体機能学研究部門

細胞機能調節学分野

Department of Molecular and Cellular Biology

准教授 細川 暢子

Assoc. Prof. Nobuko Hosokawa

【研究概要】

細胞機能調節学分野では、分子シャペロンタンパク質やレクチンの機能解析を中心に、再生現象の分子基盤とも言うべきタンパク質の生合成・再生・品質管理の機構について研究を進めている。

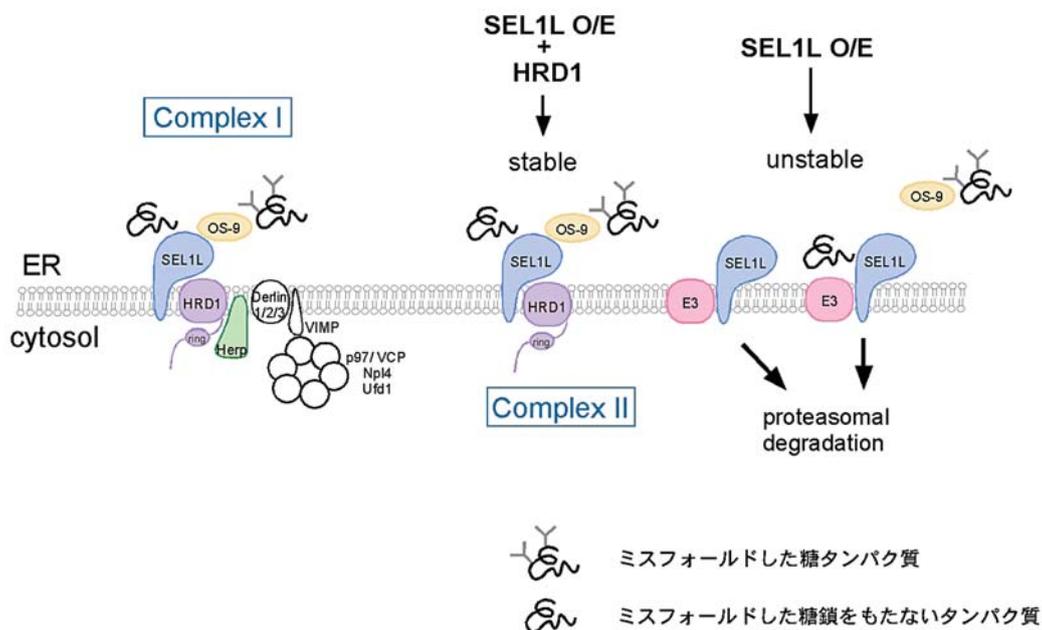
細胞内で生合成されたタンパク質は、正しい高次構造を取ってはじめて機能することができる。タンパク質が正しい高次構造を形成するためには、分子シャペロンタンパク質の介助が必要であること、また生合成の過程でしばしばタンパク質は高次構造形成に失敗する事が明らかになってきた。ミスフォールドしたタンパク質は、再度フォールディング・サイクルに入るか、場合によっては細胞内分解される必要がある。このように、正しい高次構造をもったタンパク質を生合成・再生し、ミスフォールドしたタンパク質を処理するメカニズムは、タンパク質の品質管理機構と呼ばれている。小胞体では、多くの分泌タンパク質や膜タンパク質の生合成が行われており、これらのタンパク質の高次構造形成は小胞体品質管理機構 (ERQC: endoplasmic reticulum quality control) によって担われている。小胞体内でミスフォールドしたタンパク質はサイトゾルへ引き出された後、ユビキチン-プロテアソーム系で分解され、小胞体関連分解 (ERAD: endoplasmic reticulum-associated degradation) と呼ばれている。私たちは、ERQC および ERAD の作用機序の解明を、細胞、分子ならびに個体レベルで行っている。このメカニズムは、遺伝子レベルで変異をもったタンパク質が ERAD 機構によって分解されたり、あるいは ERQC の破綻が糖尿病や神経変性疾患などさまざまな疾患を引き起こすことが明らかにされ、病態解明や疾病治療の面からも注目されている。また、小胞体で生合成されるタンパク質の多くは N 結合型糖鎖をもった糖タンパク質であり、従って小胞体品質管理においては、糖鎖のトリミングと、特定の構造をもった糖鎖を認識するレクチンが、タンパク質のフォールディングや分解を制御することが知られている。

私たちは、哺乳類小胞体に存在する分子シャペロンタンパク質やレクチン、酵素、小胞体膜上に存在するユビキチンリガーゼ複合体などのタンパク質品質管理に関わる分子を中心に研究を進めている。小胞体関連分解を促進する EDEM タンパク質 (endoplasmic reticulum degradation enhancing α -mannosidase-like protein) や、新規 ERAD レクチン OS-9 と XTP3-B、HRD1-SEL1L ユビキチンリガーゼ複合体の機能解析を行い、糖タンパク質のもつ糖鎖構造とこれを認識するレクチンを明らかにした。また、小胞体膜上の ERAD 複合体の解析を行った結果、動的な調節を受けている可能性が示された。さらに現在、小胞体ストレスで発現誘導を受ける新たな遺伝子の機能解析についても研究を進めている。

The major focus in the Department of Molecular and Cellular Biology is to study the regulation and function of molecular chaperones/stress proteins and lectins, and the mechanism of protein quality control.

Newly synthesized proteins obtain their native conformations by the assistance of molecular chaperones. However, the process of protein folding is error-prone, and polypeptides that failed to obtain native structures enter the refolding cycle or are subjected to intracellular protein degradation. Many secretory proteins and membrane proteins are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER), and their folding is regulated by the ER quality control (ERQC). Terminally misfolded polypeptides in the ER are degraded by the cytoplasmic proteasomes after retrotanslocation through the ER membrane, a mechanism known as ER-associated degradation (ERAD). Many works have clarified the importance of ERAD of misfolded proteins and the disruption of ERQC in genetic diseases, neurodegenerative disorders, and diabetes mellitus. Since most of the proteins synthesized in the ER are *N*-glycosylated, ERQC of glycoproteins are regulated by the processing of the *N*-glycans and the recognition of specific *N*-glycans by the lectins.

We are analyzing the function of mammalian EDEMs (ER degradation enhancing α -mannosidase-like proteins), ERAD lectins OS-9 and XTP3-B, and HRD1-SEL1L ubiquitin-ligase complex embedded in the ER membrane. Recently, we clarified the *N*-glycan structures that are used as the glycan-tags for the glycoprotein ERAD, as well as lectins that recognize the ERAD signals. We also analyzed the ERAD complex containing HRD1-SEL1L in the ER membrane, and found that the formation of ERAD complex is dynamically regulated. Analyses



小胞体膜上に存在する ERAD 複合体

小胞体膜にはユビキチンリガーゼ (E3) が存在し、小胞体でミスフォールドしたタンパク質をユビキチン化し、プロテアソームによる分解へと導く。リングドメインを持つユビキチンリガーゼ HRD1 は SEL1L と結合し、HRD1-SEL1L を中心として大きな ERAD 複合体が形成される。ERAD 複合体の形成、機能は、ダイナミックな制御を受けている。

ERAD complex on the ER membrane

Ubiquitin ligases (E3 enzymes) embedded in the ER membrane ubiquitinate misfolded ER proteins for proteasomal degradation. HRD1 is a ubiquitin ligase containing a ring-domain, and makes a stoichiometric complex with SEL1L. ERAD complexes are dynamically formed in the ER membrane nucleated on the HRD1-SEL1L complex to regulate the protein degradation.

on proteins that are upregulated by ER stress are also underway.

(文責 細川 暢子)

小胞体内で発生するタンパク質凝集メカニズムの研究に従事している。現在のところ研究対象とするアンチトリプシン欠損症は、遺伝性タンパク質凝集疾患の一つとして特に欧米で患者が多く（有名なZ変異は4%がheterozygote、0.1%がhomozygoteで保持）、早急な疾病メカニズムの解明、治療法の開発が待たれている。本疾患は患者の肝細胞、特に小胞体内にアンチトリプシン封入体の蓄積がみられることを特徴とする。その結果引き起こされる典型的な病態として肝機能の不全が挙げられ、また同時に血中へのアンチトリプシン分泌量が低下することから、エラスターゼ阻害未遂による肺気腫を引き起こすことが知られている。まず、試験管内で誘導できるアンチトリプシン凝集体形成機構について、X線結晶構造解析をベースとし検討を行なったところ、アンチトリプシンは単一のタンパク質でありながら、条件によって図に示したような2種類の凝集メカニズムが可能であることが明らかとなった（A：分子中央の構造モチーフが隣の分子に挿入、B：分子C末が挿入）。各分子はまるでパズルを完成するごとく、その分子構造の一部を隣の分子と共有することで規則正しい凝集体形成を実現しており、これは現在までの漠然としたタンパク質凝集のイメージ、例えば「異常な」と称される、とはずいぶん異なるものであった。次に、これら2種の凝集メカニズムの発生を区別できるSS結合変異体システムを構築し、アンチトリプシン欠損症で最も多いZ変異体が、酵母、ほ乳類細胞においてどのように凝集を行なうかを検討した。結果、Bが主要なメカ

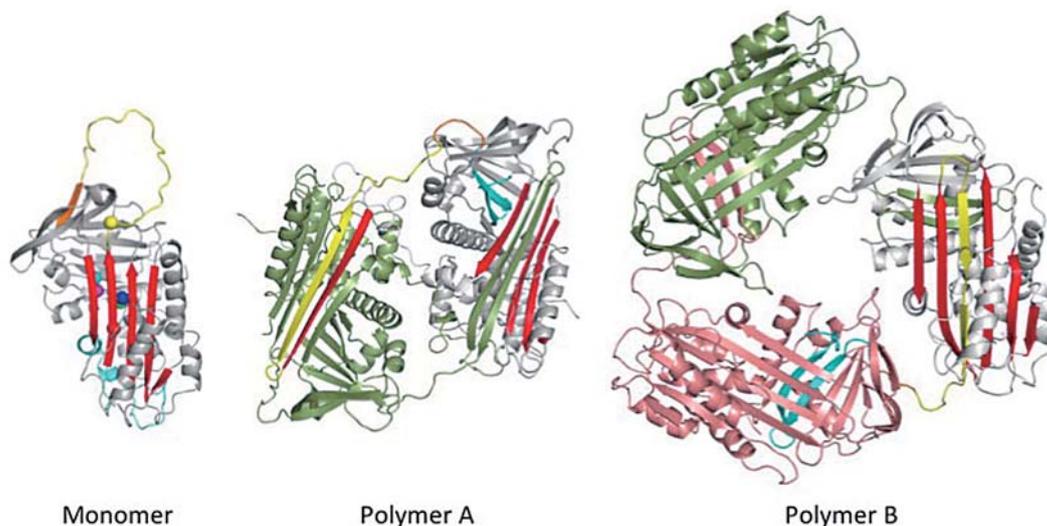


図 アンチトリプシンの天然構造と2種類のポリマー構造

アンチトリプシンは分子中央の赤で示された β -シートとセリンプロテアーゼインヒビターとしての機能に重要な黄色で示された反応中心ループを特徴とする（Monomer）。 Guanidinium塩酸条件下では、アンチトリプシンはその反応中心ループと β シートの一部が隣の分子に挿入し、分子間フォールディングを完成した、ポリマー構造を完成する（Polymer A）。一方で、熱条件下では、水色で示された分子のC末部分を隣の分子の背中の β シートに挿入し、ポリマー構造を完成する。なお、アンチトリプシン欠損症の患者には Polymer B のメカニズムにより凝集体が蓄積するようである。

Figure the native and two different polymer structures of α_1 -antitrypsin

α_1 -antitrypsin has very characteristic structural components such as the central β -sheet A shown in red and the reactive center loop shown in yellow, both of which are of great importance in its potent function that can inhibit serine proteases (Monomer). Under a denaturant condition like in the presence of Guanidine Hydrochloride, α_1 -antitrypsin can complete molecular linkage by inserting the reactive center loop and the part of b-strand into the central β -sheet A (polymer A). We call this as an intermolecular folding. On the other hand, under a heat condition, α_1 -antitrypsin can finish polymerization via a linkage of C-terminal part of the molecule shown in cyan (polymer B). In this case, the reactive center loop is incorporated into the original molecule yet still gain an energetic advantage as a protomer conformation. As a molecular basis of α_1 -antitrypsin deficiency, polymer B is very likely a toxic aggregation on diseases.

ニズムと判明した。最終的には、2種の凝集メカニズムを区別できる抗体を入手し、実際に肝硬変を患った方々由来の凝集体についても検討を行ったが、結果は同じであった。以上から、アンチトリプシン欠損症の分子基盤は、Z変異がアンチトリプシンの天然構造への迅速なフォールディングを妨げ、分子のC末部分を露出したフォールディング中間体の蓄積が小胞体内で起こった結果、分子間でフォールディングを完成して凝集体形成に至ることにあると予測された。また構造学的には、凝集に際し分子中央の β シートを形成するストランドの数が天然構造における5本から6本へ拡張していることは、凝集体形成が熱力学的に好まれることを示唆しており、本疾患でZ変異体が細胞内に不可逆的に凝集、蓄積する理由として妥当である。一方で、正常なアンチトリプシンのフォールディングにおいては、このように熱力学的に好ましいと思われる凝集体の形成を、小胞体の品質管理機構がいかにして回避しアンチトリプシンを天然構造へと導いているのかが興味深いところである。以上の研究成果は、私が2011年4月まで在籍した英国ケンブリッジ大学のJames Huntington研究室との共同研究による。感謝申し上げたい。

I am studying a mechanism for protein aggregation in ER. The current interest has been an underlying molecular mechanism for the α_1 -antitrypsin deficiency that is very popular as one of the protein aggregation related diseases especially in North Europe (4% is heterozygote and 0.1% is homozygote in Caucasian) and would be applicable to prevent or treat this deficiency. α_1 -antitrypsin deficiency is typically characterized by the intracellular deposition of the α_1 -antitrypsin aggregates and inclusion bodies in patient hepatocyte. This seems to be a direct cause for the juvenile cirrhosis and alternatively the emphysema due to the lack of the secreted α_1 -antitrypsin in plasma that inhibits a neutrophil elastase. With a great help by James Huntington's laboratory where I had belonged to until the April 2011, we first examined how α_1 -antitrypsin can polymerize *in vitro* on the basis of X-ray crystallographic techniques. We found α_1 -antitrypsin can polymerize via two distinct mechanisms depends on conditions, but both occur structurally in a very similar manner. It seems like a protein puzzle that each protein shares structural components to form a protomer unit; polymer A uses the motif in the central β -sheet A for molecular linkage and polymer B uses in the C-terminal part of the molecule. Moreover, the structure of the polymer very resembles to the native monomer α_1 -antitrypsin, which was indeed a surprise for us contrary to the general assumption we had for the way of protein aggregation like "abnormal". Secondary, we developed the method to distinguish these aggregation mechanisms by introducing SS trapping techniques and evaluated how the most abundant mutant Z α_1 -antitrypsin behaves on aggregation in yeast and mammalian cell systems. The result clearly showed polymer B was dominant in both systems. Finally we also confirmed that polymer B was accumulated in the liver inclusions from the Z- α_1 -antitrypsin patient by using a monoclonal antibody that is also sensitive to distinguish the mechanisms. Collectively, it was concluded that the formation of polymer B would be a major cause for α_1 -antitrypsin deficiency. We also deduced that Z mutation disturbs the correct folding of α_1 -antitrypsin in the ER and accumulates the folding intermediate, where C-terminal part of the molecule may be exposed, and thereby α_1 -antitrypsin had to complete its folding by sharing structural components between molecules. From the structural point of view, it is interesting to mention α_1 -antitrypsin does b-expansion in the central β -sheet A from 5 to 6 strands on aggregation. This indicates the formation of aggregates would be energetically preferred and it is thus consistent with *in vivo* observation that Z-mutant aggregate and further accumulate irreversibly. Now, it is also curious how the ER quality control bypass this energetically favorable event on the normal folding of α_1 -antitrypsin. I really acknowledge Dr. Jams Huntington and his colleagues to

accomplish the above studies.

(文責 山崎正幸 特定准教授 (白眉) (兼任 次世代研究者育成センター))

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

(1) 原著論文

Iida, Y., Fujimori, T., Okawa, K., Nagata, K., Wada, I., and Hosokawa, N.*: SEL1L protein critically determines the stability of the HRD1-SEL1L endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) complex to optimize the degradation kinetics of ERAD substrates. *J. Biol. Chem.*: **286**, 16929-16939 (2011)

Yamasaki, M., Sendall, T., Pearce, M., Whisstock, J., Huntington, J.: Molecular basis of α_1 -antitrypsin deficiency revealed by the structure of a domain-swapped trimer. *EMBO rep.*: **30**, 1011-1017 (2011).

(2) 著書および総説

細川暢子: [みにれびゅう] ERAD (小胞体関連分解) を制御するレクチン OS-9 と XTP3-B 生化学、第 83 巻 第 1 号、44-49 (2011)

Hosokawa, N.: Isolation and binding assay of EDEMs. GlycoPOD web site (Ed. T. Kawasaki): <9>-9 (2011)

Huntington, J., Yamasaki, M.: Serpin polymerization in vitro. *Methods Enzymol.*: **501**, 379-420 (2011).

◆ 学会等の発表 ◆

(1) 学会・研究会発表

Fujimori, T., Kamiya, Y., Kato, K., Nagata, K., Hosokawa, N.: Functional analysis of MRH domain-containing lectin XTP3-B in the endoplasmic reticulum quality control. The 31st Naito Conference on Glycan Expression and Regulation [III] Metabolites, Stress response, Microdomains, and Beyond. (2011.9.13-16 Sapporo) (ポスター発表)

Fujimori, T., Kamiya, Y., Kato, K., Nagata, K., Hosokawa, N.: The novel role of MRH domain-containing lectin XTP3-B in endoplasmic reticulum quality control. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011.12.13-16 横浜) (口頭及びポスター発表)

藤森力, 神谷由紀子, 加藤晃一, 永田和宏, 細川暢子: 小胞体品質管理におけるレクチン XTP3-B の新たな役割. 平成 23 年度京都大学再生医科学研究所学術講演会 (2011.12.26 京都) (ポスター発表)

Yamasaki, M., Timothy J. Sendall, T. J., Mary C. Pearce, M. C., Whisstock, J. A., Huntington, J. A.: The Molecular Basis of α_1 -Antitrypsin Deficiency. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011.12.13-16 横浜) (口頭発表及びポスター)

山崎正幸: 先天性肝硬変の原因となる凝集体構造. 平成 23 年京都大学再生医科学研究所学術講演会 (2011.12.26 京都) (ポスター発表)

(2) 講演・シンポジウム

- Hosokawa, N.: Lectins and enzymes that regulate the mammalian glycoprotein quality control.: The 31st Naito Conference on Glycan Expression and Regulation [II] Metabolites, Stress response, Microdomains, and Beyond. (2011.9.13-16 Sapporo)
- 細川暢子：小胞体における糖鎖修飾とタンパク質品質管理機構．第84回日本生化学会大会シンポジウム「糖鎖修飾：システムズバイオロジーへの展望」(2011.9.22 京都)
- Hosokawa, N.: Roles of *N*-glycans in the regulation of mammalian glycoprotein quality control. 第34回日本分子生物学会年会シンポジウム “Glycoprotein quality control: Biosynthesis, molecular recognition and physiological roles of *N*-glycans” (2011.12.16 横浜)
- 山崎正幸：Point mutation が引き起こす小胞体でのタンパク質凝集とその病変．大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質の異常凝集の原理と制御」(2011.4.27 吹田)
- 山崎正幸:「分子間フォールディング」によるタンパク質のポリマー化．第11回日本蛋白質科学会年会 (2011.6.7-9 吹田)
- 山崎正幸：小胞体内におけるタンパク質の規則正しい凝集とその疾患．第2回生命機能研究会 (2011.8.31 神戸)
- 山崎正幸：我々にとって有害なタンパク質構造とは？ 栄養学をはんなりと研究する会 (2011.9.10 名古屋)
- Yamasaki, M., Sendall, T. J., Mary C. Pearce, M. J., Whisstock, J. A., Huntington, J. A.: The Molecular Basis of α_1 -Antitrypsin Deficiency. The 6th International Symposium on the Chemistry and Biology of Serpins (2011.10.23-26 Chapel Hill, USA)

生体微細構造学分野 Department of Ultrastructural Research

講師 平芳 一法

Lect. Kazunori Hirayoshi

【研究概要】

ショウジョウバエの発生やストレス応答などに関与する遺伝子の多くは、GAGA 因子依存的遺伝子として知られている。GAGA 因子は、転写制御領域に存在する GAGA 配列に特異的に結合し、クロマチンリモデリングに必要な因子をリクルートするとともに、転写活性そのものへの関与等、広範な機能が示唆されている。また、ストレス蛋白質では、転写伸長開始直後に転写を一旦停止するポーズドポリメラーゼという現象が知られているが、GAGA 因子は、このポーズドポリメラーゼの成立に関与する重要な因子と認識されている。つまり、GAGA 因子は、転写、特に伸長反応を考える上で重要な因子と考えられる。この因子の生体内における機能を明らかにするため、GAGA 因子特異的な RNA アプタマーを取得し、詳細な解析を続けている。

我々が選別・取得した RNA アプタマー（蛋白質に特異的に結合する機能性 RNA）は、他の因子あるいは自己の重合化に関与する POZ ドメインを中心とした領域に結合し、転写を阻害する。転写複合体は、複数の因子によって成立し、因子間のコミュニケーションによって高度な制御がなされている。つまり、アプタマーによる転写阻害は、転写複合体中の GAGA 因子を介した複合体の形成因子間の関係を齟齬にすることにより、生じたものと思われる。すでに取得していた主要な基本転写因子である TBP（TATA binding protein）に対するアプタマーを併用した解析により、GAGA 因子が、TBP の転写複合体上へのリクルートにも関与していることを明らかにした。

昨年、GAGA 配列に変異を導入し、GAGA 因子が DNA に直接結合できない GAGA 因子依存的な遺伝子でも GAGA 因子がその転写複合体中に含まれる可能性を報告した。本年は、転写複合体を回収した後、免疫学的な方法で実際に含まれていることを証明し、GAGA 因子依存的な遺伝子における、GAGA 因子の作用機作の新しい局面を明らかにした。

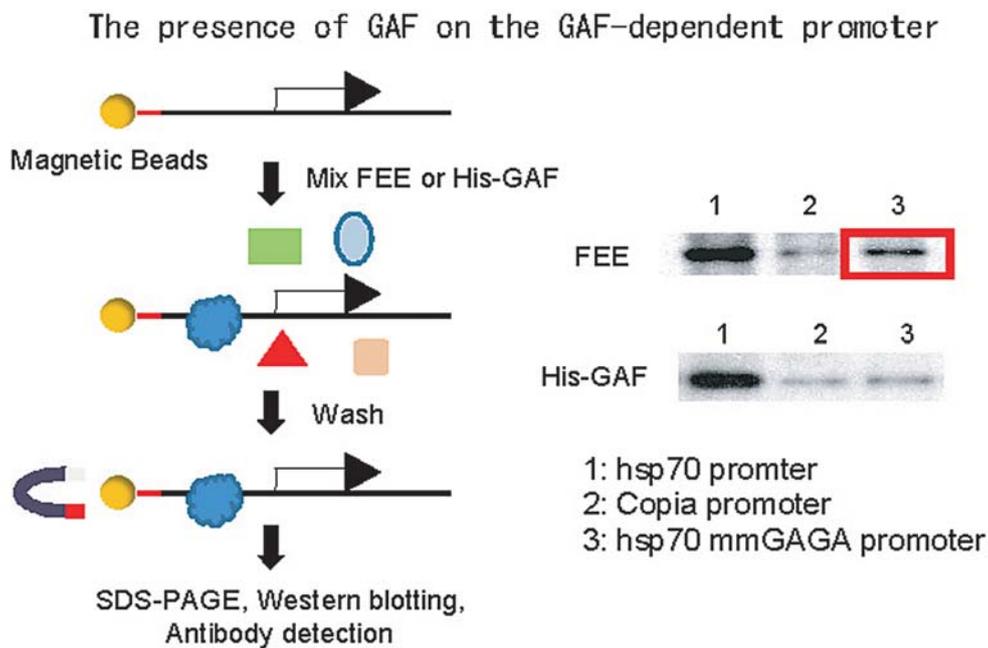
RNA アプタマーそのものの活用方法として、異なる結合領域を持つアプタマーを一つの分子として機能させることにより、抗体とは異なるユニークな活用方法を示した。この方法は、細胞内で、本来結合することができない分子を任意に結合させることができる。この分子を用いれば、人工的な複合体を細胞内で構築することも可能になる。また、RNA を利用した分子故に、生体内では一定時間で分解される。これらの特徴を生かし、必要なときのみ働く、副作用の少ない薬剤として活用することも可能であり、近年注目されている抗体医薬と同等あるいはそれ以上の機能が期待される。RNA アプタマーの活用方法を模索している。

Many genes respond to development or stress response in *Drosophila* is known as GAGA factor (GAF) dependent gene. GAF binds to GAGA element in the promoter and recruits chromatin remodeling factors. It has been reported that this factor involves a nucleosome remodeling at promoter region, a formation of promoter proximal pausing of RNA polymerase II, and the transcription elongation. To analyze the role of GAF in the transcription complex precisely, we use RNA aptamers as molecular forceps. We obtained two kinds of aptamer which bind to GAF with a high affinity. These aptamers bound to the POZ domain of GAF, where is critical

for the protein-protein interaction, but not to the zinc finger and the glutamine rich domain. These aptamers inhibited the *in vitro* transcription with the naked DNA as a template. One aptamer showed the inhibitory effects on the transcription from the promoters containing GAGA elements when adding the aptamer before the transcription initiation. The other showed the inhibitions after the transcription initiation. The effect of this aptamer was independent of whether the presence or absence of the GAGA element at the promoter region. However this effect was observed only on the transcription from the GAF-dependent promoter, not from the GAF-independent promoter.

We showed the direct evidence to suggest the presence of GAF in the transcription complex of GAF dependent gene by the isolation of transcription complex.

These results suggest the functions of GAF in initiation, elongation or re-initiation steps via the interaction



GAGA 因子依存性転写制御領域における GAGA 因子の存在

試験管内転写の結果 GAF が GAF 依存性遺伝子の転写制御領域において、GAGA 配列非依存的に存在することが示唆されたため、その可能性を固相 DNA 蛋白質複合体を用いて解析した。ビオチン化した DNA (GAF 依存性、非依存性転写制御領域) を磁気ビーズに結合した。この DNA とショウジョウバエ胚抽出液あるいは組み換え His 標識 GAF を混合、洗浄後、免疫ブロッティング法で解析した。Hsp70 転写制御領域では、胚抽出液、組み換え GAF 共に GAF の存在が確認された。GAF 非依存性の Copia では胚抽出液、組み換え GAF 共にバックグラウンド程度のシグナルしか観察されず、結合は認められない。Hsp70 転写制御領域の GAGA 結合領域を欠損した mmGAGA 遺伝子では胚抽出液では、Hsp70 の半分程度の GAF の存在が観察された。しかし、組み換え GAF ではバックグラウンド程度のシグナルしか観察されず、結合は認められなかった。これは、GAF は mmGAGA 遺伝子では、GAGA 配列に直接結合するのではなく、複合体に含まれた形で、GAF 依存性遺伝子の転写制御領域に取り込まれていることを示すものである。

The presence of GAF on the GAF-dependent promoter

The results of the *in vitro* transcription suggest the presence of GAF on the GAF-dependent promoter with the DNA independent manner. To check this possibility, we tried to the solid-phase DNA-protein complex assay. Biotinylated DNA (Gaf dependent, independent promoter) was attached on the magnetic beads. This template was incubated with the Fly embryo extract (FEE) or recombinant His-tagged GAF. After washing the beads, proteins on the DNA were analyzed by the western blotting.

As shown above, GAF in FEE was on the hsp70 promoter, and a little amount of GAF, as the same level as the background, was on the Copia promoter. Hsp70 mmGAGA gene involved the GAF in the protein complex. The intensity of the signal on the mmGAGA was as about half as that on hsp70 gene, but clearly stronger than that on Copia gene. On the other hand, His-GAF did not bind to mmGAGA promoter. This result suggests that GAF is on the mmGAGA DNA. These result suggests that GAF is present only on the GAF dependent genes by not only binding to the GAGA element but also interacting with other factor (s) in the transcription apparatus.

with other factors in the transcription apparatus, which imply the importance of GAF as a regulator throughout the whole process of transcription

RNA aptamer is expected as a substituent of antibody therapy. We succeeded to establish the multi-recognition molecule that recognizes the different molecule. To expand the application of RNA aptamer as a cure drug or examination reagent, we tried to establish the construct protocol for more effective aptamers.

【業績目録】

◆ 学会等の発表 ◆

学会発表

法邑 賢一・平芳 一法：PIC 形成過程における TBP/GAF 間相互作用の役割 第34回日本分子生物学会物学会年会、(2011.12.13. ~ 16. 横浜)

生体機能調節学分野 Department of Experimental Pathology

分野主任 教授 坂口 志文

Prof. Shimon Sakaguchi

【研究概要】

(1) 免疫寛容の基礎的研究

正常な免疫系は、非自己抗原に対して免疫応答を示すが、正常自己構成成分に対しては反応しない。また、アレルギーに見られる過剰な免疫応答を阻止する機構を有している。このような免疫自己寛容、免疫恒常性維持の基礎的メカニズムとして、制御性 T 細胞による抑制的制御が重要である。その機能異常は自己免疫病、アレルギーの原因となる。制御性 T 細胞は転写因子 Foxp3 を特異的に発現するが、機能、表現型の安定性を保つためには epigenetic な変化が必要である。本年度、制御性 T 細胞の発生・分化における epigenetic 変化を解析した。Methylated DNA immunoprecipitation sequencing (MeDIP-Seq) および Bisulfite sequencing 法により DNA メチル化状態をグローバルにまた特定の遺伝子について解析した。その結果、制御性 T 細胞に特徴的に発現し機能に必須の遺伝子（例えば、Foxp3, CTLA-4, GITR, Eos, Helios, CD25）の CpG 脱メチル化が安定な制御性 T 細胞の発生、機能維持に重要であること、制御性 T 細胞の細胞系譜の決定には、これらの遺伝子の脱メチル化が、Foxp3 遺伝子の発現と独立して必要であることを見出した。また、胸腺での制御性 T 細胞の発生には、自己抗原の認識による T 細胞抗原レセプターを介した刺激が、Foxp3 遺伝子の発現と制御性 T 細胞機能関連遺伝子の脱メチル化の両方に不可欠であることを見出した。これらの知見は、機能的に安定な制御性 T 細胞の作製によるヒト免疫応答の制御に重要である。

(2) 自己免疫、腫瘍免疫、移植免疫の基礎的研究

ヒト疾患における制御性 T 細胞の役割について研究を継続した。本邦に多い成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (adult T cell leukemia/lymphoma) の多くは Foxp3 を発現し、制御性 T 細胞が腫瘍化したものである可能性について解析を進めた。さらに、ATLL 細胞に発現する腫瘍抗原を検索するべく、患者血清を用いて、Seromics による網羅的蛋白アレイを行ったところ、多くの患者血清中に、がん一精巣抗原 (Cancer-testis (CT) antigen) に対する抗体が出現していることを見出した。NY-ESO-1 などの CT 抗原は、ほかのヒト癌組織にも発現しているが 80% 以上の ATLL 細胞にも発現していた。CT 抗原は、他の白血病細胞には発現しておらず、極めて ATLL に特徴的である。また、患者リンパ球には、CT 抗原に反応し、サイトカインを産生する T 細胞も検出できた。これらの結果は、ATLL に対して、CT 抗原ワクチンによる免疫療法が有効である可能性を意味する。

(3) 新しい動物モデルを用いた関節リウマチの原因・発症機構の研究

SKG マウスは、免疫病理学的にヒトの関節リウマチと酷似する慢性関節炎を自然発症する。その原因遺伝子は、T 細胞抗原レセプター (T cell receptor, TCR) 直下に位置するシグナル分子である ZAP-70 であり、その SH2 ドメインの一塩基変異によって関節炎が誘導される。本年度、ZAP-70 遺伝子の変異のみならず、TCR 直下のどのようなシグナル分子であっても、TCR シグナルを一定程度弱体化すれば自己免疫性関節炎が誘導できる可能性について検討した。Tet-on システムにより正常な ZAP-70 遺伝子をトランスジェニックマウスとして発現し、内因性 ZAP-70

を欠損するマウスを作製した。餌に含まれる Doxycycline (Dox) 量を変えることで ZAP-70 分子の発現量を調節した。その結果、低濃度 Dox の餌で維持したマウスは高率に関節炎を発症したが、高濃度の餌では発症しなかった。関節炎のみならず、高率に間質性肺炎、また一部に炎症性腸炎の発症が見られた。発症した病変は T 細胞によって他のマウスに移入可能なことから、これらの病変は自己反応性 T 細胞による自己免疫病であることが証明された。この結果は、TCR 近傍の様々なシグナル分子の機能変異によって自己免疫病の誘導が可能であることを意味する。実際、ヒトのゲノム相関解析 (genome-wide association study, GWAS) で、ZAP-70 と相互作用するシグナル分子の変異が報告されており、我々の実験結果は、ヒトの自己免疫疾患の理解に重要と考える。

This department studies: (i) the cellular and molecular basis of immunologic self-tolerance and the etiology of autoimmune disease; (ii) the strategy for eliciting effective immune responses to autologous tumor cells, or inducing immunologic tolerance to organ transplants, by manipulating the mechanism of immunologic self-tolerance; and (iii) the cause and pathogenetic mechanism of rheumatoid arthritis by utilizing an animal model established in our laboratory.

One aspect of immunologic self-tolerance (i.e., immunological unresponsiveness of the normal immune system to normal self-constituents) is actively maintained through a T cell-mediated dominant control of self-reactive T cells by naturally occurring regulatory CD4⁺ T cells (Tregs). We previously showed that the transcription factor Foxp3 is a master regulator of their development and function.

This year, we have attempted to understand the molecular mechanism by which the cell fate of Tregs is determined. We have shown that Treg development is achieved by the combination of two independent processes, *i.e.*, the expression of Foxp3 and the establishment of Treg-type CpG hypomethylation, both induced by TCR stimulation. The demethylation began in the thymus and continued to proceed in the periphery, and could be fully established without Foxp3 protein. Either Foxp3 expression or Treg-type hypomethylation alone was insufficient for establishing full Treg phenotype and function. Thus, those T cells in which the two events have concurrently occurred as a result of TCR stimulation are developmentally set into the Treg lineage. These findings can be exploited for constructing functionally stable Treg cells for clinical use.

Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) is an intractable hematologic malignancy caused by human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1), which infects approximately 20 million people worldwide. This year, we have explored the possible expression of cancer/testis (CT) antigens by ATLL cells, as CT antigens are widely recognized as ideal targets of cancer immunotherapy against solid tumors. We found that a high percentage (more than 80%) of ATLL cases expressed CT antigens at the mRNA level. CT antigen expression was confirmed by immunohistochemistry. This contrasts with other types of lymphoma or leukemia, which scarcely express these CT antigens. Humoral immune responses, particularly against NY-ESO-1, were detected in 10% of ATLL patients and NY-ESO-1-specific CD8⁺ T cell responses were observed in more than half of ATLL patients. NY-ESO-1-specific CD8⁺ T cells recognized autologous ATLL cells and produced effector cytokines. Thus, ATLL cells characteristically express CT antigens and therefore vaccination with CT antigens can be an effective immunotherapy of ATLL.

SKG mentioned spontaneously develop T cell-mediated autoimmune arthritis immunopathologically similar to rheumatoid arthritis (RA) in humans. This year, we have attempted to determine how T cell receptor (TCR)

signaling controls immunological self-tolerance and homeostasis. We gradationally expressed zeta-associated protein-70 (ZAP-70), a TCR-proximal signaling molecule, in developing T cells by tetracycline-inducible gene expression. As a result of the experiments, T cells produced in a low range of ZAP-70 expression were highly self-reactive and contained few natural regulatory T (Treg) cells, leading to spontaneous development of a variety of autoimmune and immunopathological diseases including autoimmune arthritis and inflammatory bowel disease. Increase in ZAP-70 expression inhibited disease development by facilitating negative selection of pathogenic self-reactive T cells, positive selection of less self-reactive ones, and the generation of natural Treg cells. Thus, reduction of TCR-proximal signaling in developing T cells evokes autoimmune/inflammatory diseases and normalization of the signaling prevents them. This finding will help our understanding how genetic variations in TCR signaling molecules contribute to the development of autoimmune disease such as rheumatoid arthritis.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Sakaguchi, S., Powrie, F., Ransohoff, R. M. Re-establishing immunological self-tolerance in autoimmune disease. *Nat Med*. In press.

Wing, K., Yamaguchi, T., Sakaguchi, S. Cell-autonomous and -nonautonomous functions of CTLA-4 for negative control of immune responses. *Trends Immunol.* 32:428-433, 2011.

Sakaguchi, S., Wing K. Damping by depletion. *Science.* 332:542-543, 2011.

Ohkura, N., Sakaguchi, S. Maturation of effector regulatory T cells. *Nat Immunol.* 12:283-284, 2011.

Yoshioka, Y., Ono, M., Osaki, M., Konishi, I., Sakaguchi, S. Differential effects of inhibition of bone morphogenic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation. *Eur J Immunol.* In press.

Keith, R. C., Powers, J. L., Redente, E. F., Sergew, A., Martin, R. J., Gizinski, A., Holers, V. M., Sakaguchi, S., Riches, D. W. A Novel Model of Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease in SKG Mice. *Exp Lung Res.* In press.

Ohe, H., Waki, K., Yoshitomi, M., Morimoto, T., Nafady-Hego, H., Satoda, N., Li, Y., Zhao, X., Sakaguchi, S., Uemoto, S., Bishop, G. A., Koshihara, T. Factors affecting operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation: impact of early post-transplant events and HLA match. *Transpl Int.* 25:97-106, 2012.

Sinclair, C., Saini, M., van der Loeff, I. S., Sakaguchi, S., Seddon, B. The long-term survival potential of mature T lymphocytes is programmed during development in the thymus. *Sci Signal.* 4 (199):ra77, 2011.

Yamaguchi, T., Wing, J. B., Sakaguchi, S. Two modes of immune suppression by Foxp3 (+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol.* 23:424-430, 2011.

Sakaguchi, S., Tanaka, S., Tanaka, A., Ito, Y., Maeda, S., Sakaguchi, N., Hashimoto, M. Thymus, innate immunity and autoimmune arthritis: interplay of gene and environment. *FEBS Lett.* 585:3633-3639, 2011.

Wing, J. B., Sakaguchi, S. TCR diversity and Treg cells, sometimes more is more. *Eur J Immunol.* 41:3097-3100, 2011.

Ohkura, N., Hamaguchi, M., Sakaguchi, S. FOXP3 (+) regulatory T cells: control of FOXP3 expression by

- pharmacological agents. *Trends Pharmacol. Sci.* 32:158-66, 2011.
- Keller, K. K., Stengaard-Pedersen, K., Dagnæs-Hansen, F., Nyengaard, J. R., Sakaguchi, S., Hauge, E. M. Histological changes in chronic autoimmune SKG-arthritis evaluated by quantitative three-dimensional stereological estimators. *Clin. Exp. Rheumatol.* 29:536-43, 2011.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. Pillars Article: Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor α -Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. *J. Immunol.* 1995. 155: 1151-1164. *J. Immunol.* 186:3808-21, 2011.
- Ohe, H., Li, Y., Nafady-Hego, H., Kayo, W., Sakaguchi, S., Wood, K., Calne, R., Uemoto, S., Koshiba, T. Minimal but essential doses of immunosuppression: A more realistic approach to improve long-term outcomes for pediatric living-donor liver transplantation. *Transplantation.* 91:808-810, 2011.
- Satou, Y., Yasunaga, J., Zhao, T., Yoshida, M., Miyazato, P., Takai, K., Shimizu, K., Ohshima, K., Green, P. L., Ohkura, N., Yamaguchi, T., Ono, M., Sakaguchi, S., Matsuoka, M. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog.* 7 (2):e1001274, 2011.
- Miyara, M., Gorocho, G., Ehrenstein, M., Musset, L., Sakaguchi, S., Amoura, Z. Human FoxP3 (+) regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* In press.
- Miyara, M., and Sakaguchi, S. FoxP3+CD4+ regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol. Cell. Biology.* 89 (3):346-51, 2011.
- Kurotaki, D., Kon, S., Bae, K., Ito, K., Matsui, Y., Nakayama, Y., Kanayama, M., Kimura, C., Narita, Y., Nishimura, T., Iwabuchi, K., Mack, M., van Rooijen, N., Sakaguchi, S., Uede, T., and Morimoto, J. CSF-1-dependent red pulp macrophages regulate CD4 T cell responses. *J. Immunol.* 186:2229-2237, 2011.
- Peterson, L. K., Shaw, L. A., Joetham, A., Sakaguchi, S., Gelfand, E. W., and Dragone, L. L. SLAP Deficiency Enhances Number and Function of Tregs Preventing Chronic Autoimmune Arthritis in SKG Mice. *J. Immunol.* 186:2273-81, 2011.
- Côté, A. L., Zhang, P., O'Sullivan, J. A., Jacobs, V. L., Clemis, C. R., Sakaguchi, S., Guevara-Patiño, J. A., and Turk, M. J. Stimulation of the glucocorticoid-induced TNF receptor family-related receptor on CD8 T cells induces protective and high-avidity T cell responses to tumor-specific antigens. *J. Immunol.* 186:275-83, 2011.
- Sakaguchi, S. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods in Molecular Biology.* 77: 1-13, 2011.

2) 総説

濱口真英, 坂口志文: Foxp3⁺ 制御性 T 細胞による炎症制御 実験医学 Vol.29 No.10 (40-45) 2011

橋本 求, 坂口志文: 補体活性化産物 C5a による Th17 細胞の誘導 臨床免疫・アレルギー科 Vol.55 No1 (102-108) 2011

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

田中 淳: A critical range of ZAP-70 produces immunodeficiency and autoimmunity. Kyoto T Cell Conference 第

21 回学術集会 (2011. 6. 10-11. 京都)

大倉永也 : Epigenetic code for the development of regulatory T cells. Kyoto T Cell Conference 第 21 回学術集会 (2011. 6. 10-11. 京都)

TANAKA Atsushi, NOMURA Takashi, AKIZUKI Shuji, SAKAGUCHI Noriko, SAKAGUCHI Shimon: A critical range of ZAP-70 produces immunodeficiency and Autoimmunity. 第 40 回日本免疫学会学術集会 (2011. 11.27-29 幕張)

NISHIKAWA Hiroyoshi, MAEDA Yuka, ISHIDA Takashi, SUGIYAMA Daisuke, ITO Asahi, MORI Fumihiko, UEDA Ryuzo, SAKAGUCHI Shimon: Comprehensive analyses of humoral and cellular immune responses against cancer/testis antigen in adult T cell leukemia/lymphoma patients. 第 40 回日本免疫学会学術集会 (2011. 11.27-29 幕張)

SATOH Takayuki, CHAMOTO Kenji, WAKITA Daiko, KUBOTA Natuki, SUMIDA Kentaro, MASUKO Kazutaka, SAKAGUCHI Shimon, KITAMURA Hidemitsu, NISHIMURA Takashi: Cellular and Molecular mechanisms underlying the refractoriness of CD133⁺ cancer stem-like cells to CD8⁺ T cells-mediated immunosurveillance. 第 40 回日本免疫学会学術集会 (2011. 11.27-29 幕張)

OSAKI Motonao, SAKAGUCHI Shimon: Analysis of a CTLA-4 splice variant in regulatory T cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会 (2011. 11.27-29 幕張)

YAMAGUCHI Tomoyuki, SAKAGUCHI Shimon: Construction of regulatory T cells without Foxp3 by targeting IL-2 and CTLA-4 in conventional T cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会 (2011. 11.27-29 幕張)

MAEDA Yuka, NISHIKAWA Hiroyoshi, TANEMURA Atsushi, SUGIYAMA Daisuke, KATAYAMA Ichirou, SAKAGUCHI Shimon: Possible roles of regulatory T cells for the development of exhausted type CD8⁺T cells in human melanoma tissue. 第 40 回日本免疫学会学術集会 (2011. 11.27-29 幕張)

Yuka Meda, Hiroyoshi Nishikawa, Atsushi Tanemura, Daisuke Sugiyama, Ichiro Katayama and Shimon Sakaguchi: Immunosuppression by regulatory T cells in malignant melanoma. Joint Symposium of Seoul St. Mary's Hop, Osaka Univ. Postech. (2011. 12. 19. Seoul, Korea)

Masahide Hamaguchi, Naganari Ohkura, Hiromasa Morikawa, Kyoko Sugimura, Atsushi Tanaka, Yoshinaga Ito, Motonao Osaki, Yoshiaki Tanaka, Riu Yamashita, Naoko Nakano, Jochen Huehn, Tim Sparwasser, Kenta Nakai, and Shimon Sakaguchi: Concurrent epigenetic conversion and Foxp3 expression have complementary roles in the development of regulatory T cells. Joint Symposium of Seoul St. Mary's Hop, Osaka Univ. Postech. (2011. 12. 19. Seoul, Korea)

2) 講演・シンポジウム

坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 5 回移植免疫を学ぶ会 (2011.2.4. 名古屋)

Shimon Sakaguchi: Biology of Regulatory T Cells BMT Tandem Meetings (2011.2.17-21. Hawaii, USA)

Shimon Sakaguchi: T cell signaling, regulatory T cells, and self-tolerance. Advances in Targeted Therapies (2011. 4. 6-10. Dubrovnik, Croatia)

坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 62 回未来医療セミナー (2011.4.20. 大阪)

Shimon Sakaguchi: TCR signaling and autoimmune arthritis. Australian Rheumatology Association 52nd Annual Scientific Meeting (2011. 5. 14-17. Brisbane, Australia)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T Cells for immunological self-tolerance and immune homeostasis. 14th Australasian Autoimmunity Workshop (2011. 5.18-19. Brisbane, Australia)

坂口志文：T細胞シグナル、制御性T細胞、自己免疫病 東京大学大学院GCOEセミナー(2011. 5. 26. 東京)

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御 久留米大学大学院講義(2011.6.1. 久留米)

Shimon Sakaguchi: Therapeutic modalities–future prospects The Herrenhausen Symposium on Autoimmunity (2011.6.20-23. Seon, Germany)

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御 第21回日本サイトメトリー学会学術集会(2011.6.25-26. 京都)

坂口志文：制御性T細胞による腫瘍免疫応答の制御 第15回日本がん免疫学会総会(2011.6.30-7.1. 千里)

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御 日本免疫学会第13回免疫サマースクール(2011.8.1-4. 蔵王)

Shimon Sakaguchi: Autoimmune arthritis caused by systemic alteration of the T cell immune system 39th Congress of the German Society of Rheumatology (2011.8.31-9.3. Munich, Germany)

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御 東京大学医科学研究所大学院特別セミナー(2011.9.12. 東京)

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御 自治医科大学大学院特別セミナー(2011.9.27. 栃木)

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御 第47回日本移植学会総会(2011.10.4-6. 仙台)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T Cells for immunological tolerance and immune homeostasis. 8th Nestle International Nutrition Symposium Nutrition & the Immune System(2011. 10.19-21. Lausanne, Switzerland)

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御 第61回日本アレルギー学会(2011.11.10-12. 東京)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis. Institut Pasteur, Immunology Department Seminar (2011. 11.21. Paris, France)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis. Institut Federatif de Recherche Biomedicale de Toulouse INSERM (2011. 11.22. Toulouse, France)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T Cells for the control of physiological and pathological immune responses. 6th European Workshop on Immune-Mediated Inflammatory Diseases (2011. 11. 23-25. Nice, France)

Naganari Ohkura: Epigenetic code for the development of regulatory T cells 第40回日本免疫学会学術集会(2011. 11.27-29 幕張)

Shimon Sakaguchi: Control of Immune Responses by Regulatory T Cells.10th Faculty Research Symposium Frontiers in Biomedical Research (2011. 12. 9. Hong Kong, China)

Shimon Sakaguchi: Induction of tumor immunity by targeting regulatory T cells. Joint Symposium of Seoul St. Mary's Hop, Osaka Univ. Postech. (2011. 12. 19. Seoul, Korea)

(受賞)

2011年度 朝日賞

生体システム制御学分野 Department of Medical Systems Control

分野主任 教授 長澤 丘司

Prof. Takashi Nagasawa

【研究概要】

リンパ球を含むすべての血液細胞やその前駆細胞は、骨の中心部の骨皮質に囲まれた空間である骨髄で造血幹細胞から一生涯にわたり恒常的に産生される。造血幹細胞や前駆細胞は、骨髄の中に想定されているニッチ (niche) と呼ばれる特別な微小環境で維持され、その増殖・分化が調節されていると推測されてきたがこの造血ニッチの実体は長年不明であった。2003年、米国の Li らは、骨辺縁の骨芽細胞の一種であり N カドヘリンを高発現する SNO 細胞が造血幹細胞ニッチを形成することを報告し注目された (Zhang, J. et al., *Nature* 425, 836-841 (2003))。一方、米国の Morrison らは、造血幹細胞の多くは骨髄腔内で網の目のように分布する洞様毛細血管の周囲に存在することを報告した (Kiel, M.J. et al., *Cell* 121, 1109-1121 (2005))。しかし、Li らの報告の根拠となった造血幹細胞の組織学的観察法は十分とは言えず (Kiel, M.J. et al., *Nature* 449, 238-242 (2007))、いずれの報告においてもそれぞれのニッチ細胞の機能が証明されるには至っていなかった。

私たちは、これまでに、ケモカイン CXCL12 とその生理的受容体 CXCR4 が、胎生期における造血幹細胞の骨髄へのホーミング (細胞が臓器に移動、定着すること)、成体骨髄での造血幹細胞と形質細胞 (最終分化し抗体産生に特化した B 細胞) の維持や B 細胞 (抗体を産生する主要な免疫担当細胞) と形質細胞様樹状細胞 (pDC) (I 型インターフェロンを多量に産生する抗ウイルス免疫に重要な免疫担当細胞) の産生に必須であることを明らかにした (Nagasawa, T. et al. *Nature* 382, 635-638 (1996); Tachibana, K. et al. *Nature* 393, 591-594 (1998); Egawa, T. et al. *Immunity* 15, 323-334 (2001); Ara, T. et al. *Immunity* 19, 257-267 (2003); Sugiyama, T. et al. *Immunity* 25, 977-988 (2006); Kohara, H. et al. *Blood* 110, 4153-4160 (2007))。さらに、CXCL12 の生理的な発現細胞を可視化することができる CXCL12 遺伝子座に GFP 遺伝子を挿入したマウス (CXCL12-GFP ノックインマウス) を用いて、成体骨髄において骨髄腔内にびまん性に分布し CXCL12 を高発現する細網細胞 (以下 CXCL12-abundant reticular (CAR) 細胞) が存在することを見出した。また、洞様毛細血管の大部分は CAR 細胞に取り囲まれており、造血幹細胞を濃縮する分画内の細胞、早期の B 細胞の前駆細胞や形質細胞、pDC の大部分が CAR 細胞の長い細胞突起に接着しており CAR 細胞が造血幹細胞・前駆細胞のニッチである可能性を示唆した (Tokoyoda, K. et al. *Immunity* 20, 707-718 (2004); Sugiyama, T. et al. *Immunity* 25, 977-988 (2006); Kohara, H. et al. *Blood* 110, 4153-4160 (2007))。

*

最近、私たちは、CAR 細胞の実体を明らかにし、CAR 細胞の生体でのニッチとしての機能を証明するため、ヒト特異的なジフテリア毒素 (DT) 受容体遺伝子を用いて DT により CAR 細胞の特異的細胞死を誘導することができるマウス (以後 CAR 細胞欠損マウス) を作製し解析した (Omatsu, Y. et al. *Immunity* 33, 387-399 (2010))。その結果、CAR 細胞は、造血幹細胞の増殖と未分化性の維持に必須であること、B 細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞の増殖にも必須であること、造血に必須のサイトカインである CXCL12、SCF の骨髄での主たる産生細胞であることを明らかにした。また、CAR 細胞欠損マウスの骨髄細胞は、試験管内培養系で産生される骨芽細胞、脂肪細胞の細胞数が著明に減少しており、個々の CAR 細胞の大部分が骨芽細胞、脂肪細胞の発生に必須の転写因子の遺伝子を

両方発現し、試験管内培養で骨芽細胞または脂肪細胞に分化したことから、CAR 細胞は骨芽細胞・脂肪細胞共通前駆細胞であることが示された (Omatsu, Y. et al. *Immunity* 33, 387-399 (2010))。

*

本年度、私たちは、CXCL12-CXCR4 シグナルの免疫担当細胞産生における新しい機能について検討した。骨髄で産生される主要な免疫担当細胞としては、B 細胞、pDC の他に NK 細胞が知られている。NK 細胞は腫瘍やウイルス感染に対する生体防御に重要な役割を担う主要な免疫担当細胞のひとつであり、その産生に必須のサイトカインとして Flt3L と IL-15 が知られていた。私たちは、成体で CXCR4 の欠損を誘導したマウスを解析し、NK 細胞数が著減していること、中でも IFN- γ を産生する NK 細胞の割合が減少していることを見出し、CXCL12-CXCR4 シグナルが NK 細胞の産生に必須の役割を果たすことを明らかにした。さらに、骨髄における CAR 細胞が IL-15mRNA を高発現し、NK 細胞の約 80% と接着していることを明らかにし、CAR 細胞が NK 細胞の発生を支持するニッチェ細胞であることを示唆した (Noda, M. et al. *Blood* 117, 451-458 (2011))。以上より、CXCL12-CXCR4 シグナルが造血幹細胞の維持の他、B リンパ球、pDC、NK 細胞など骨髄で分化するすべての免疫担当細胞の産生に必須であるサイトカインであることが明らかになった。同時に、CAR 細胞は、造血幹細胞の他、骨髄で分化するすべての免疫担当細胞のニッチェを形成する細胞であることが示唆された。

*

私たちの研究によって、CAR 細胞は、造血幹細胞の増殖と未分化性の維持、造血前駆細胞の増殖に必須のニッチェとして働く骨芽細胞・脂肪細胞共通前駆細胞であることが明らかになり、造血を支持する骨髄のニッチェ細胞についての理解が大きく進んだ (Nagasawa, T. et al. *Trends Immunol.* 32: 315-320 (2011))。現在、正常と疾患における造血制御の全貌を明らかにすることを大きな目標にして、CAR 細胞発生の分子機構、CAR 細胞の作用機構と標的細胞の特異性決定機構、炎症や感染症での造血調節における CAR 細胞の機能とこれを制御する分子機構、CAR 細胞の白血病幹細胞ニッチェとしての機能等の重要な問題に取り組んでいる。

Chemokines are a large family of small structurally related cytokines that are thought to regulate cell trafficking and utilize seven-transmembrane spanning G-protein-coupled receptors (GPCR). We identified CXC chemokine ligand 12 (CXCL12), also known as stromal cell-derived factor (SDF)-1 as pre-B-cell growth stimulating factor and found that CXCL12 and its primary receptor CXCR4 are essential for hematopoiesis, including colonization of bone marrow by hematopoietic stem cells (HSCs) during ontogeny, maintaining a pool of HSCs in adult bone marrow and development of B cells, plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and NK cells as well as cardiogenesis and organ vascularization during ontogeny (Nagasawa, T. et al. *Nature* 382, 635-638 (1996); Tachibana, K. et al. *Nature* 393, 591-594 (1998); Egawa, T. et al. *Immunity* 15, 323-334 (2001); Ara, T. et al. *Immunity* 19, 257-267 (2003); Sugiyama, T. et al. *Immunity* 25, 977-988 (2006); Kohara, H. et al. *Blood* 110, 4153-4160 (2007); Noda, M. et al. *Blood* 117, 451-458 (2011)).

On the other hand, we have identified a small population of non-hematopoietic cells expressing high amounts of CXCL12, termed CXCL12-abundant reticular (CAR) cells with long processes. We have revealed that CAR cells were scattered throughout bone marrow and that most HSCs, early B cell precursors, the end-stage B lymphocytes, plasma cells, pDCs and NK cells were attached to the processes of CAR cells, suggesting that CAR cells function as the special microenvironments, termed 'niches' for HSCs, B cells, pDCs and NK cells (Tokoyoda, K. et al. *Immunity* 20, 707-718 (2004), Sugiyama, T. et al. *Immunity* 25, 977-988 (2006)). Although it has been

reported that a population of osteoblasts, termed spindle-shaped N-cadherin-positive osteoblastic (SNO) cells (endosteal niches) or endothelial cells (vascular niches) function as niches for HSCs, we hypothesize that CAR cells are a key component of HSC niches, including both endosteal and vascular niches in adult bone marrow (Sugiyama, T. et al. *Immunity* 25, 977-988 (2006)). These results raise a question what is the nature and in vivo function of CAR cells.

To address this issue, we generated mice that allow selective ablation of CAR cells within bone marrow and determined the nature and in vivo function of CAR cells as a niche for HSCs and lympho-hematopoietic progenitors (Omatsu, Y. et al. *Immunity* 33, 387-399 (2010)). Short-term ablation of CXC chemokine ligand (CXCL) 12-abundant reticular (CAR) cells in vivo did not affect candidate niches, bone-lining osteoblasts or endothelial cells but severely impaired the adipogenic and osteogenic differentiation potential of marrow cells and production of SCF and CXCL12, and led to a marked reduction in cycling lymphoid and erythroid progenitors. HSCs from CAR cell-depleted mice were reduced in number and cell size, were more quiescent and had increased expression of early myeloid selector genes, similar to the phenotype of wild-type HSCs cultured without a niche. Thus, the niche composed of adipo-osteogenic progenitors is required for proliferation of HSCs and lymphoid and erythroid progenitors as well as maintenance of HSCs in an undifferentiated state, although HSC quiescence can be maintained by non-niche environments (Omatsu, Y. et al. *Immunity* 33, 387-399 (2010); Nagasawa, T. et al. *Trends Immunol.* 32, 315-320 (2011)).

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

(*corresponding author)

1) 原著論文

- Noda, M., Omatsu, Y., Sugiyama, T., Oishi, S., Fujii, N., *Nagasawa, T.
CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK cell development in adult mice.
Blood 117 (2); 451-458, 2011.
- Hiratsuka, S., Duda, DG., Huang, Y., Goel, S., Sugiyama, T., Nagasawa, T., Fukumura, D., *Jain, RK.
C-X-C receptor type 4 promotes metastasis by activating p38 mitogen-activated protein kinase in myeloid differentiation antigen (Gr-1)-positive cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 108 (1); 302-307, 2011.
- Lei, Y., Ripen, AM., Ishimaru, N., Ohigashi, I., Nagasawa, T., Jeker, LT., Bösl, MR., Holländer, GA., Hayashi, Y., de Waal Malefyt, R., Nitta, T., *Takahama, Y.
Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development.
J. Exp. Med. 208 (2); 383-394, 2011.

2) 英文総説

- Nagasawa, T., Omatsu, Y., Sugiyama, T.
Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells.
Trends Immunol. 32 (7): 315-320, 2011.
- Sugiyama, T., Nagasawa, T.
Emergency evacuation! Hematopoietic niches induce cell exit in infection.
Immunity 34 (4): 463-465, 2011.

3) 和文総説

- 長澤 丘司、“免疫記憶に関わる細胞移動ダイナミクス研究の現状と今後の展望”実験医学 vol 29 No 17 (増刊); 114-119 (2011)
- 長澤 丘司、“骨髄の造血幹細胞ニッチェによる造血・炎症制御”実験医学 vol 29 No 17 (増刊); 151-155 (2011)
- 長澤 丘司、“脂肪・骨前駆細胞 CAR 細胞と造血幹細胞・前駆細胞ニッチ”医学のあゆみ 239; 169-170 (2011)
- 長澤 丘司、“生理活性物質ケモカイン”ものづくり技術からみる再生医療、田畑 泰彦 監修 57-66 (2011)
シーエムシー出版

◆ 学会等の発表 ◆

招待講演

- T. Nagasawa
The 23th Korean Society of Bone Metabolism Autumn Scientific Congress, Satellite Symposium: Bone and Hematopoietic System. “Adipo-osteogenic progenitors constitute reticular niches for hematopoietic stem and progenitor cells” (November 19, 2011, Seoul, Korea)
- T. Nagasawa
40th Annual Scientific Meeting of the ISEH-Society for Hematology and Stem Cells, Break out session: Microenvironment. “CXCL12 and reticular niches for hematopoietic stem and progenitor cells” (August 26 (25-28), 2011, Vancouver, Canada)
- 長澤 丘司
セミナー “造血幹細胞・免疫担当細胞を制御する骨髄のニッチェ”
(2011/12/21 理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター、横浜)
- 長澤 丘司
九州大学大学院歯学研究院セミナー “間葉系幹・前駆細胞と造血幹細胞ニッチェ (niche)” (2011/12/15 九州大学 福岡)
- 長澤 丘司
第 14 回癌と骨病変研究会 教育講演 “脂肪・骨前駆細胞 CAR 細胞と造血幹細胞ニッチェ” (2011/11/18 千代田放送会館 東京)
- 長澤 丘司
第 13 回血液細胞療法フォーラム “骨髄の造血幹細胞・前駆細胞ニッチェの実体と機能を考える” (2011/10/22)

ホテルグランビア大阪（大阪）

・ 長澤 丘司

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 順天堂大学大学院医学研究科 老人性疾患病態・治療研究センター実施 キックオフシンポジウム“骨髄の造血幹細胞前駆細胞ニッチの実体と機能”(2011/10/13 順天堂大学 東京)

・ T. Nagasawa

Key forum in developmental biology and regenerative medicine. - Supported by Global COE and IMEG, Kumamoto University. “Bone Marrow Niches for Hematopoietic Stem and Progenitor Cells”(Sept. 8-9, 2011, Kumamoto, Japan)

・ 長澤 丘司

第44回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 ランチョンセミナー “骨髄の間質系前駆細胞と造血幹細胞ニッチ”(2011/07/14 国立京都国際会館 京都)

・ 長澤 丘司

第1回愛媛大学医学部 分子病態医学セミナー、“免疫・血液系の幹細胞と前駆細胞産生の司令塔～骨髄造血ニッチの実体と機能を考える～”(2011/06/07 愛媛大学医学部 東温 愛媛)

・ Takashi Nagasawa

第32回 日本炎症・再生医学会、シンポジウム Bone inflammation, “Bone marrow niches for hematopoietic stem and progenitor cells”(2011/06/03 国立京都国際会館 京都)

・ 長澤 丘司

第10回日本再生医療学会、シンポジウム 組織幹細胞研究の最前線 “骨髄の造血幹細胞、前駆細胞を維持するニッチ”(2011/03/02 京王プラザホテル 東京)

・ 長澤 丘司

大阪大学大学院生命機能研究科コロキウム、“免疫・血液系の幹細胞・前駆細胞を制御する骨髄ニッチ～その実体と機能～”(2011/01/19 大阪大学 大阪)

生体組織工学研究部門

生体分子設計学分野 Department of Cellular Differentiation

分野主任 教授 開 祐司

Prof. Yuji Hiraki

【研究概要】

本研究分野では、組織血管化、軟骨・腱・靭帯形成とその再生修復の分子機構の解明を主たるテーマとして、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュなどの動物モデル、細胞培養系を駆使して分子レベルでの解析を行っている。現在の研究テーマは、以下の通りである。

1. Chondromodulin-I に関する研究

(1) 血管新生抑制因子 Chondromodulin-I (ChM-I) の血管内皮細胞に対する作用に関する研究

我々は、ウシ胎仔骨端軟骨から血管新生抑制因子 ChM-I を精製・クローニングした。ChM-I は主に軟骨や心臓弁などの無血管に保たれる間葉組織に特異的に発現し、血管内皮細胞の遊走・増殖・管腔形成阻害活性を示す。さらに、ChM-I ノックアウトマウスの解析では、加齢に伴い心臓弁に異常な血管化が惹起されることから、ChM-I が組織の無血管性の維持に重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかし、血管内皮細胞に対する ChM-I の作用機序については十分に解析されていない。そこで、組換えヒト ChM-I タンパク質 (rhChM-I) を調製し、ChM-I によって誘導される最も初期の血管新生抑制応答である細胞遊走の阻害作用について詳細に検討した。rhChM-I は Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) のみならず、Fibroblast Growth Factor-2 や Insulin-like Growth Factor-I など種々の遊走刺激へのヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs) のケモタキシスを阻害した。rhChM-I 存在下では VEGF-A 刺激に伴う HUVECs のアクチン細胞骨格および接着斑の再構成は著明に阻害され、Rac1 およびアクチン脱重合因子 cofilin の活性制御に異常が認められた。これらの結果を支持するように、タイムラプスにより HUVECs の細胞運動を観察すると、rhChM-I 処理細胞では、VEGF-A によって誘導される持続的な葉状仮足の形成が阻害され、一過性の仮足形成が高頻度に認められて、細胞の移動速度、定方向性が顕著に低下していた。以上の結果より、ChM-I は刺激依存的なアクチン細胞骨格の再構成を阻害することにより葉状仮足の伸長を不安定化して、細胞の運動性を抑制することが明らかとなった。このような遊走阻害作用は、線維芽細胞などに対してはほとんど認められず種々の血管内皮細胞において選択的に認められたことから、ChM-I の作用は血管内皮細胞に対する特異な作用機序を介していると考えられた。

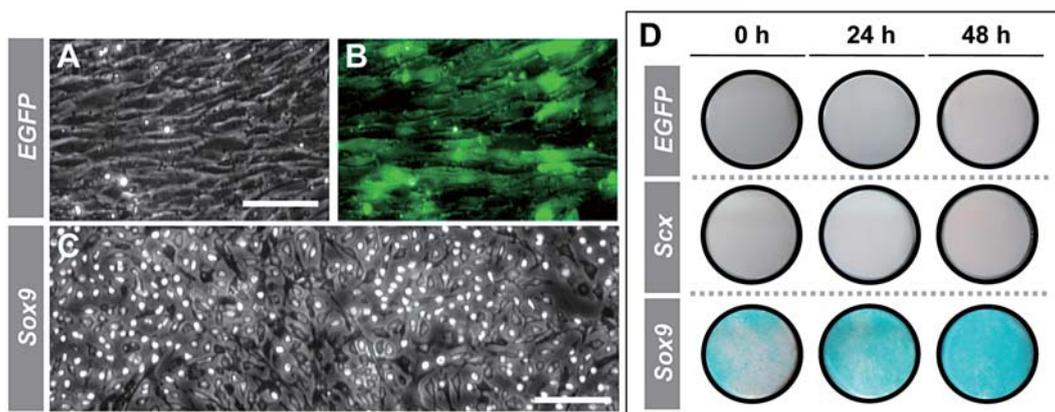
(2) ChM-I の活性ドメイン構造に関する研究

ChM-I は 120 アミノ酸から成る糖タンパク質で、N 型糖鎖結合部位を含む N 末端側の親水性ドメイン (ドメイン 1) と、C 末端側にある疎水性のシステインリッチドメイン (ドメイン 2) から構成されている。我々はこれまでに CHO 細胞や 293-F 細胞などの哺乳細胞発現系を用いて糖鎖修飾されているヒト組換え ChM-I タンパク質 (G-hChM-I) を発現し、軟骨細胞および血管内皮細胞に対する生物活性を明らかにしてきた。一方、大腸菌 *E. coli* を用いてヒト組換え ChM-I タンパク質を発現させると、糖鎖修飾を欠いた ChM-I (NG-hChM-I) を得ることができる。G-hChM-I

と同様に、NG-hChM-I は弱いながら軟骨細胞のコロニー形成促進作用および血管内皮細胞の管腔形成阻害作用を示した。この活性は V8 プロテアーゼによる限定分解によって糖鎖修飾部位を含むドメイン 1 の一部を欠失させた Δ N-hChM-I においてもほとんど変わらないことから、ドメイン 2 が ChM-I の活性ドメインであることが示唆された。これらのタンパク質の CD スペクトルを測定し、二次構造を解析した結果、ドメイン 1 内の糖鎖修飾はタンパク質の溶解性だけでなく、ChM-I が活性なドメイン構造を獲得するのに必要な機能ドメインであることが明らかとなった。現在、変異体タンパク質および合成ペプチドを用いて活性ドメイン構造の解析を進めている。ChM-I は、関連遺伝子である Tenomodulin を除くと、これまでに知られている血管新生抑制因子とホモロジーを示さないことから、その活性ドメインは血管新生抑制活性を有する新たなペプチド薬として応用が期待される。

2. Sox9 (SRY-related high-mobility group box-containing gene 9) による腱細胞から軟骨細胞への分化転換

Sox9 は、軟骨細胞分化に必須の転写因子である。我々は、Sox9 の強制発現によって腱細胞が軟骨細胞へと直接に分化転換することを見出した。ニワトリ胚において、Sox9 は軟骨組織で強い発現が認められた。その一方で、腱細胞分化の早期及び後期のマーカー遺伝子である *Scleraxis* (*Scx*) 及び *Tenomodulin* (*Tnmd*) が発現する腱組織では、Sox9 の発現は検出されなかった。レトロウイルスを用いてニワトリ胚の前肢全体に Sox9 を強制発現させると、腱・靭帯、軟骨膜・骨膜、筋上膜、及び真皮といった線維性の結合組織において異所性の軟骨形成が誘導された。ニワトリ胚から分離した腱細胞では、basic helix-loop-helix 型転写因子である *Scx*, *Paraxis*, *Twist1*, 及び *Twist2* の強制発現により *in vitro* で *Tnmd* の発現が顕著に上昇した。しかし、Sox9 を強制発現すると、腱細胞での *Tnmd* 及び *Scx* の発現が低下し、*Type II collagen* 及び *Chondromodulin-I* などの成熟軟骨細胞マーカー分子の発現が誘導された。また、Sox9 を強制発現した腱細胞では、細胞形態が線維芽細胞様の紡錘型から軟骨細胞様の多角型へと変



Sox9 による腱細胞の軟骨細胞への分化転換

ニワトリ胚の四肢から分離した腱細胞を 2×10^5 cells/well の密度で 6-well プレートに播種し、10% のウシ胎児血清を含む α MEM 培地中で培養した。70% コンフルエントに達した時点において、RCAS-EGFP, RCAS-Scx, または RCAS-Sox9 のレトロウイルスベクターをリポフェクション法により導入した。2 回の継代を行ってコンフルエントに達した後、0.5% のウシ胎児血清を含む α MEM 培地中で 48 時間培養した。(A-C) RCAS-EGFP (A, B) または RCAS-Sox9 (C) を導入した腱細胞の形態を示す。コンフルエントから 24 時間後には、85% 以上の腱細胞において EGFP の発現が検出された (B)。(D) EGFP, Scx, または Sox9 を過剰発現した培養腱細胞を、コンフルエント到達後 0 時間、24 時間及び 48 時間においてアルシアンブルーで染色した。目盛尺は 100 μ m を示す。

Accumulation of cartilage matrix in passaged tenocyte cultures overexpressing Sox9.

Tenocytes were seeded at a density of 2×10^5 cells/well in a 6-well plate with α MEM medium containing 10% FBS. Upon reaching 70% confluence, the tenocytes were transfected with RCAS-EGFP, RCAS-Scx, or RCAS-Sox9 retroviral vectors. After two passages, the cultures that reached confluence were switched to α MEM medium containing 0.5% FBS and maintained for 48 hours. (A-C) Cell morphologies of the tenocytes infected with RCAS-EGFP (A, B) or RCAS-Sox9 (C) at 24 hours after reaching confluence. EGFP expression was detectable in more than 85% of the cells transfected with RCAS-EGFP (B). (D) Alcian blue staining of cultures overexpressing EGFP, Scx or Sox9 from 0 to 48 hours after confluence. Scale bars, 100 μ m.

化し、さらに軟骨性の細胞外基質の蓄積も検出された。以上の結果から、*in vitro* 及び *in vivo* において、臍細胞は *Sox9* により軟骨細胞へと分化転換する特性を有していることが明らかとなった。

3. 軟骨性骨原基の血管侵入障壁に関する研究

内軟骨性骨形成では、血管侵入を契機に、無血管の軟骨から骨・骨髄への置換が開始される。この軟骨への血管侵入は、時間的にも空間的にも極めて厳密に制御されているが、その分子機構には不明な点が多い。そこで、軟骨に発現している VEGF-A isoform をマウス及びニワトリ胚前肢に過剰発現させることによって血管新生を亢進させ、内軟骨性骨形成の進展に伴う軟骨の血管侵入抵抗性の変化を解析した。その結果、いずれの VEGF-A isoform を過剰発現させても、軟骨と軟骨膜を含む軟骨周囲組織は無血管に保たれていた。すなわち、内軟骨性骨形成の初期には、軟骨と軟骨周囲組織という2種類の異なった血管侵入障壁が存在することが明らかになった。しかしながら、骨髄の形成に続いて、heparin や neuropilin と相互作用する VEGF-A₁₄₆、VEGF-A₁₆₆、VEGF-A₁₉₀ を過剰発現している前肢では、早期に軟骨膜が血管化された。一旦、軟骨膜が血管化されると、骨髄では *MMP9* 陽性の破骨細胞が出現し、血管侵入部位では骨格系細胞で *MMP9* や *MMP13* の遺伝子発現を誘導する TGF- β のシグナリングが活性化され、軟骨への血管侵入が誘導された。一方、heparin に結合しない VEGF-A₁₂₂ や neuropilin と相互作用する領域を欠失した VEGF-A₁₆₆ Δ E₁₆₂-R₁₆₆ を過剰発現させても、早期の軟骨膜血管化や軟骨への血管侵入は観察されなかった。従って、軟骨への血管侵入に先立つ軟骨膜血管化では、無血管の軟骨周囲組織が VEGF-A の isoform 特異的な応答能を獲得し、血管侵入抵抗性を失うプロセスが存在することが明らかになった。

The proper growth and differentiation signaling from the surrounding extracellular environment regulates tissue formation and its functions. We are aiming at the elucidation of molecular interactions and signaling networks underlying vascularization of mesenchymal tissues and formation of skeletal tissues such as cartilage, bone and tendon/ligaments. Our current research efforts are focused on the following studies.

1. Functional analysis of Chondromodulin-I (ChM-I)

(1) The inhibitory actions of ChM-I on the motility of vascular endothelial cells

We have previously purified and cloned ChM-I as an angiogenesis inhibitor from fetal bovine cartilage based on the growth inhibitory activity of vascular endothelial cells (ECs). ChM-I is expressed in the avascular zones of cartilaginous molds and cardiac valves, and has been shown to inhibit the migration, proliferation, and tube morphogenesis of cultured ECs. The aged mice lacking ChM-I exhibit abnormal angiogenesis in cardiac valves, suggesting the essential role of ChM-I in maintaining the tissue avascularity. Despite these evidences showing the activity of ChM-I *in vivo* and *in vitro*, the molecular mechanism of the ChM-I actions remains to be elucidated. To address this issue, we have prepared recombinant human ChM-I (rhChM-I) and examined its effects on migration of ECs, an early regulatory step in angiogenesis. In a modified Boyden chamber assay, ChM-I inhibited the chemotactic migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) as well as by Fibroblast Growth Factor-2 and Insulin-like Growth Factor-I. The inhibitory action involved the disturbed reorganization of actin cytoskeleton and focal adhesions in VEGF-A-stimulated ECs. We found that rhChM-I suppressed the VEGF-A-induced activation of Rac1 and the phosphorylation of cofilin, which leads to the dysregulation of actin polymerization. Consistent

with these observations, time-lapse microscopic analysis revealed that ChM-I inhibited the persistent extensions of lamellipodia and evoked frequent alterations of moving front, coincident with the reduced motility and directionality of ECs upon VEGF-A stimulation. These data showed that ChM-I impaired the VEGF-A-stimulated motility of ECs through the destabilization of lamellipodial extensions. The inhibitory action was selective to the endothelial cell type, but not to other cell types such as fibroblastic cells, suggesting that ChM-I acts through an endothelial cell-specific signal pathway that regulates the motility of ECs.

(2) The analysis of domain structure of ChM-I

ChM-I (120 amino acids in human and mouse) is a glycoprotein consisting of the N-terminal hydrophilic domain with an N-glycosylation site (domain 1), and a hydrophobic cysteine-rich domain located at the C-terminus (domain 2). Domain 2 is well conserved across species and is highly similar to the C-terminal cysteine-rich domain of Tenomodulin (Tnmd), a ChM-I related angiogenesis inhibitor. Using a glycosylated form of recombinant human ChM-I (G-hChM-I) expressed in CHO cells or 293-F cells, we have demonstrated the various bioactivities of ChM-I on chondrocytes and vascular endothelial cells. On the other hand, the non-glycosylated form of human ChM-I expressed in *E. coli* (NG-hChM-I) exhibited the similar bioactivity, but the activity was distinctly lower than that of G-hChM-I. Truncation of the domain 1 containing the N-glycosylation site by limited digestion with V8 protease had no apparent effect on the bioactivity of NG-hChM-I, indicating that domain 2 is an active domain of this protein. Circular dichroism (CD) measurements revealed that N-glycosylation in domain 1 is critical for the structural integrity for biological function as well as the protein solubility. Current works focus on the analysis of active domain of ChM-I using its mutant proteins and synthetic peptides. So far, no sequence and structural similarity of ChM-I and Tnmd to any known angiogenesis inhibitor has been reported. Thus, the active domain of ChM-I is expected to be a novel anti-angiogenic peptide drug with promising activity for the angiogenesis-related diseases including solid tumors and rheumatoid arthritis.

2. Conversion of tenocytes into chondrocytes by *SRY-related high-mobility group box-containing gene 9 (Sox9)* overexpression.

Progenitors for the tendons, ligaments, cartilage, and bone are all derived from the same origins including the sclerotome, lateral plate mesoderm, and neural crest. These progenitor populations migrate and populate their prospective regions to give rise ultimately to each primordium. During limb formation, lateral mesoderm-derived tendon and ligament progenitors as well as chondroprogenitors express *Sox9*, a key transcription factor for chondrogenesis. Upon cell-fate determination, *Sox9* expression is markedly upregulated in chondroprogenitors and promotes the progression of chondrogenic differentiation, whereas in tendon and ligament progenitors this expression diminishes upon cell differentiation. We demonstrate that *Sox9* mediates the direct conversion of tenocytes to chondrocytes through an intermediate state in which both differentiation programs are active. *Sox9* is abundantly expressed in cartilage but is undetectable in limb tendons that express *Scleraxis (Scx)* and *Tenomodulin (Tnmd)*, tendon-specific early and late molecular markers, respectively. Upon forced expression of *Sox9* in the chick forelimb, ectopic cartilage formation is preferentially observed in fibrous tissues including the tendons, ligaments, perichondrium/periosteum, dermis, and connective tissues in muscle. *Tnmd* expression in tenocytes isolated from the limb tendons was markedly upregulated by forced expression of basic helix-loop-

helix activators including *Scx*, *Paraxis*, *Twist1*, and *Twist2*. In contrast, the overexpression of *Sox9* in monolayer tenocytes resulted in the downregulation of *Tnmd* and *Scx* expression during passaging in culture, and the induction of cartilage molecular markers such as *type II collagen* and *Chondromodulin-I*. This *Sox9*-driven switching from a tenocytic to a chondrocytic gene expression profile was associated with a dramatic change from a spindle to a polygonal cellular morphology. The extracellular accumulation of cartilage-characteristic proteoglycans was also observed. These data suggest that tenocytes have a strong potential for conversion into chondrocytes through the activities of *Sox9* both *in vitro* and *in vivo*.

3. Analysis of the anti-angiogenic property of the cartilaginous bone primordia during endochondral bone formation

During endochondral bone formation, vascular invasion initiates the replacement of avascular cartilage by well-vascularized bone and bone marrow. Vascular invasion into the cartilaginous bone primordium occurs in a strictly spatio-temporally defined manner, but the molecular mechanism for this process is still poorly understood. By utilizing a VEGF-A mediated gain-of-function approach in mouse and chick models, we investigated the cellular and molecular events associated with angiogenic switching during endochondral bone formation. Cartilage-specific overexpression of VEGF-A₁₆₄ in transgenic mice results in the hypervascularization of soft connective tissues away from cartilage. Unexpectedly, perichondrial tissue remained avascular in addition to cartilage. Hypervascularization of soft tissues similarly occurred when various VEGF-A splicing variants (VEGF-A₁₂₂, VEGF-A₁₄₆, VEGF-A₁₆₆, VEGF-A₁₉₀) were overexpressed in the chick forelimb, but perichondrial tissue and cartilage were completely devoid of blood vessels. However, following formation of the bony collar in the middle of cartilaginous bone primordia, anti-angiogenic properties in perichondrial tissue were lost and perichondrial angiogenesis was accelerated by VEGF-A₁₄₆, VEGF-A₁₆₆, or VEGF-A₁₉₀. Once the perichondrium was vascularized, osteoclast precursors were recruited from the circulation to the bony collar to differentiate into *MMP9* positive osteoclasts and then the induction of *MMP9* and *MMP13* was observed in association with the activation of TGF- β signaling. Neither perichondrial angiogenesis nor the subsequent cartilage vascularization was accelerated by the non-heparin-binding VEGF-A₁₂₂ or by the VEGF-A₁₆₆ Δ E₁₆₂-R₁₆₆ lacking a neuropilin-binding motif. Thus, perichondrial angiogenesis is a prerequisite event for the subsequent vascular invasion into cartilage and is differentially regulated by VEGF-A isoforms.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Jun Kondo, Hiroyuki Shibata, Shigenori Miura, Akira Yamakawa, Koji Sato, Yoshiki Higuchi, Chisa Shukunami, and Yuji Hiraki: A functional role of the glycosylated N-terminal domain of chondromodulin-I. *J. Bone Miner. Metab.* **29**:23-30 (2011)

Satoshi Kudo, Hiroshi Mizuta, Katsumasa Takagi, and Yuji Hiraki: Cartilaginous repair of full-thickness articular cartilage defects is induced by the intermittent activation of PTH/PTHrP signaling. *Osteoarthritis*

Cartilage 19:886-894 (2011)

Pado Alberton, Cvetan Popov, Markus Pragert, Julia Kohler, Chisa Shukunami, Matthias Schieker, and Denitsa Docheva: Conversion of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Tendon Progenitor Cells by Ectopic Expression of Scleraxis, Stem Cells Dev. (in press)

Shigenori Miura, Chisa Shukunami, Kaori Mitsui, Jun Kondo and Yuji Hiraki: Localization of chondromodulin-I at the feto-maternal interface and its inhibitory actions on trophoblast invasion *in vitro*. BMC Cell Biol. 12:34-47 (2011)

2) 著書

なし

3) 総説

なし

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

滝本品:内軟骨性骨形成過程においてコンドロモジュリン-IはN-末端領域の切断によって不活性化される.第7回 Skeletal Research Meeting (2011. 5. 28. 京都)

滝本品,宿南知佐,三浦重徳,近藤淳,佐野寛子,田中英之,開祐司:内軟骨性骨形成におけるコンドロモジュリン-IのN末端領域の切断による不活性化.第12回運動器科学研究会(2011. 9. 2-3. 高知)

滝本品:軟骨性骨原基の2つの血管侵入障壁.第14回骨発生・再生研究会(2011. 11. 12. 東京)

2) 講演・シンポジウム

宿南知佐「腱・靭帯形成の制御」第18回プロテオグリカンフォーラム 結合組織細胞外マトリックス形成の制御 東京医科歯科大学1号館9階特別講堂(2011. 2. 19. 東京)

開祐司「軟骨から骨ができる話」京都大学再生医科学研究所第6回公開講演会(京都大学百周年時計台記念館1階百周年記念ホール(2011. 7. 9. 京都)

宿南知佐「腱・靭帯形成におけるScxとSox9の役割」第12回運動器科学研究会(2011. 9. 2. 高知)

宿南知佐「腱・靭帯の形成と再生」第26回日本整形外科基礎学術集会 シンポジウム6:運動器の再生(2011. 10. 21. 前橋)

学外の講義

開祐司(2011年)平成23年5月12日九州大学歯学部「口腔発達学」特別講義「軟骨の形成と骨への置換」

宿南知佐(2011年)平成23年5月19日九州大学歯学部「口腔発達学」特別講義「腱・靭帯形成と再生のための分子生物学」

開祐司(2011年)平成23年6月20日-7月18日(週1回の5回講義)龍谷大学大学院理工学研究科「共生学特論」(全15回講義のうち5回を分担)

生体材料学分野 Department of Biomaterials

分野主任 教授 田畑 泰彦

Prof. Yasuhiko Tabata

【研究概要】

本研究分野の目的は、医療（治療、診断、予防）に応用可能あるいは基礎生物医学研究に役立つ方法、手段、および技術を材料科学の立場に立って研究開発していくことである。生体材料（バイオマテリアル）とは、体内で使用したり、あるいはタンパク質、細胞などの生体成分と直接に接触する状態で用いられる材料のことであり、本研究分野においては、高分子、金属、セラミックス、およびそれらのコンポジットからなる生体材料のデザインと創製を行い、得られた生体材料の基礎生物医学および医療への応用を目指している。具体的には、生体組織・臓器の再生治療（一般には、再生医療と呼ばれている）および再建外科治療に用いられる医用材料、人工臓器のための生体材料、あるいは薬物・遺伝子治療、予防ワクチン、および診断（分子イメージング）効率の向上を目指したドラッグデリバリーシステム（DDS）のための生体材料の研究開発を行っている。加えて、幹細胞の分子生物学、生化学、細胞生物学の研究、および細胞培養のために必要不可欠な生体材料についての研究開発も進めている。

再建外科治療をアシストする生体材料の生体適合性はまだまだ低く、その代行できる生物機能も単一であることから、臨床上、患者に高い Quality of Life (QOL) を与えることが困難である場合が多い。また、臓器移植もドナー不足に加えて、免疫拒絶抑制剤の副作用にとまなう問題もある。このように、再建外科と臓器移植との現在の2大先端外科治療に限界が見えてきている。このような状況の中で生まれてきたのが再生治療である。再生治療とは、細胞の増殖・分化能を活用、生体本来のもつ自然治癒力を介して、生体組織の再生修復によって病気を治療しようという試みである。この再生治療の試みが医療応用できるようになれば、再建外科と臓器移植治療に続く第3の治療法となることは疑いない。この再生治療は生体材料に依存しない点、免疫抑制剤を必要としない点で、前述の2大治療法とは大きく異なる。再生治療の目的は、細胞の増殖分化能力を利用した生体組織の再生誘導と臓器機能の代替による病気の治療である。この実現には、再生現象にかかわる増殖・分化ポテンシャルの高い（幹）細胞とその周辺環境の基礎生物医学研究が必要であることはいまでもないが、それに加えて、細胞の増殖、分化を促し、生体組織の再生を誘導するための環境（場）を与えることが不可欠である。別な言い方をすれば、再生治療とは、細胞やその周辺環境をうまく設定することによって、本来、体のもっている自然治癒力を高めて、病気の治療を行うという、体にやさしい理想的な治療法である。この生体組織 (Tissue) の再生誘導の場を構築するための医学 (Engineering) 的な技術・方法論が生体組織工学 (Tissue Engineering) である。

生体組織工学の基本アイデアは、生体組織の構成成分である細胞、細胞の増殖・分化のための足場、および生体シグナル因子（細胞増殖因子と遺伝子）をうまく組み合わせることで、生体組織の再生誘導を実現することである。このためには生体材料の利用が必要不可欠であり、特に、体内で分解吸収され消失する材料（生体吸収性材料）と3つの要素とを組み合わせ、生体組織の再生を誘導する。この再生誘導に適切な生体吸収性を金属やセラミックスにもたせることは難しく、この観点から、生体組織工学では主として高分子材料が利用されている。生体吸収性材料の利点は、材料の体内での役割が果たされた後に、その場から消失するため、再び取り除く必要がなく、また、材料が吸収されるために、材料が生体組織・臓器の再生過程を妨げないことである。生体材料が生体組

織の再生修復とともに吸収されれば、材料に対する問題となる生体反応の心配もなく、また、生体材料が体内に存在する細胞を活性化し、病気を治すことができれば、免疫拒絶反応もなく、理想的な治療法となる。DDS（ドラッグデリバリーシステム、薬物送達法）および生物医学研究のための材料にも生体吸収性が要求される場合が多い。

本研究分野では、生体吸収性の高分子材料を中心とした生体組織・臓器の再生治療のための生体材料、薬物、遺伝子治療、予防、診断、などに必要な DDS のための生体材料、分子生物学、生化学、細胞生物学、細胞培養、および幹細胞研究（再生研究）のための生体材料、あるいは外科および内科治療補助のための生体材料の研究を行っている。以下にその内容をより詳しく述べる。

1) 生体組織の再生治療のための生体材料

血液細胞以外のほとんどの細胞は、体内では細胞外マトリックス（タンパク質と多糖からなる3次元のハイドロゲル様構造体）と呼ばれる増殖・分化のための足場材料に接着して存在、その生物機能を発現している。そのため、生体組織が大きく欠損した場合には、この足場も失われるため、欠損部に細胞のみを補うだけでは生体組織の再生誘導を望めない場合が多い。そこで、再生誘導を期待する部位に細胞の増殖・分化を促すための仮の足場を与える必要がある。本研究分野では、この細胞の足場としての3次元あるいは多孔質構造をもつ生体吸収性の成形体（人工細胞外マトリックス）をデザイン、創製している。しかしながら、いかに足場が優れていても、細胞の数が少なかったり、細胞を増殖させるための生体シグナル因子が足りなければ、生体組織の再生誘導は望めないであろう。このような場合、細胞の増殖・分化を促す細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を用いるのが1つの現実的な解決法である。しかしながら、これらの生体シグナル因子は体内での寿命が短く不安定であるため、その利用には投与上の工夫が必要である。この工夫がDDSである。たとえば、生体吸収性材料に細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を包含させ、再生部位で徐々に放出（徐放）する。この徐放化技術によって、生体シグナル因子の生物活性が効率よく発揮され、その結果として、種々の生体組織・臓器の再生誘導が促進されることがわかってきている。現在、この細胞増殖因子の徐放化技術を利用した血管、骨、歯周組織などの再生誘導治療の臨床研究が始まっている。本研究分野では、再生治療に必要不可欠な細胞足場および徐放化担体のための生体材料をデザイン、創製している。

一般に、拡張型心筋症、慢性腎炎、肝硬変、肺線維症など慢性疾患では、病的部位が線維性組織で占められ、臓器機能が不全に陥っていることが多い。そこで、内科的な薬物、遺伝子治療によって、この線維性組織を消化分解することができれば、周辺の正常組織の再生誘導能によって病的部位は再生修復され、慢性線維性疾患の内科的な再生治療が実現できる。本研究分野では、このアイデアを基に病的部位への薬物・遺伝子のターゲティングおよび局所徐放化による難治性慢性線維性疾患に対する内科的再生治療を行っている。この再生治療の概念は、体のもつ自然治癒力を活用するという点で、上述の足場やDDS技術を用いた外科的再生治療と同じであり、今後は外科治療だけでなく、内科治療に対しても、重要となっていくであろう。例えば、自然治癒力を高めて、難治性慢性疾患の悪化進行を抑制することができれば、患者への福音はきわめて大きいと考えられる。

2) 幹細胞工学および基礎生物医学研究のための生体材料

再生治療には、2つのアプローチがある。1つは前述の生体組織工学をベースとした生体組織の再生治療である。もう1つが、増殖・分化ポテンシャルの高い幹細胞を利用する細胞移植治療である。後者のためには、臨床応用可能な十分な数と質のそろった細胞を調製することが重要となる。本研究分野では、この細胞移植治療に不可欠である幹細胞、前駆細胞、および芽細胞などを効率よく得ることを目的として、それらの細胞の単離、増殖、分化のための培養基材および培養技術について研究開発を行っている。従来の細胞培養法に加えて、種々の生体材料からな

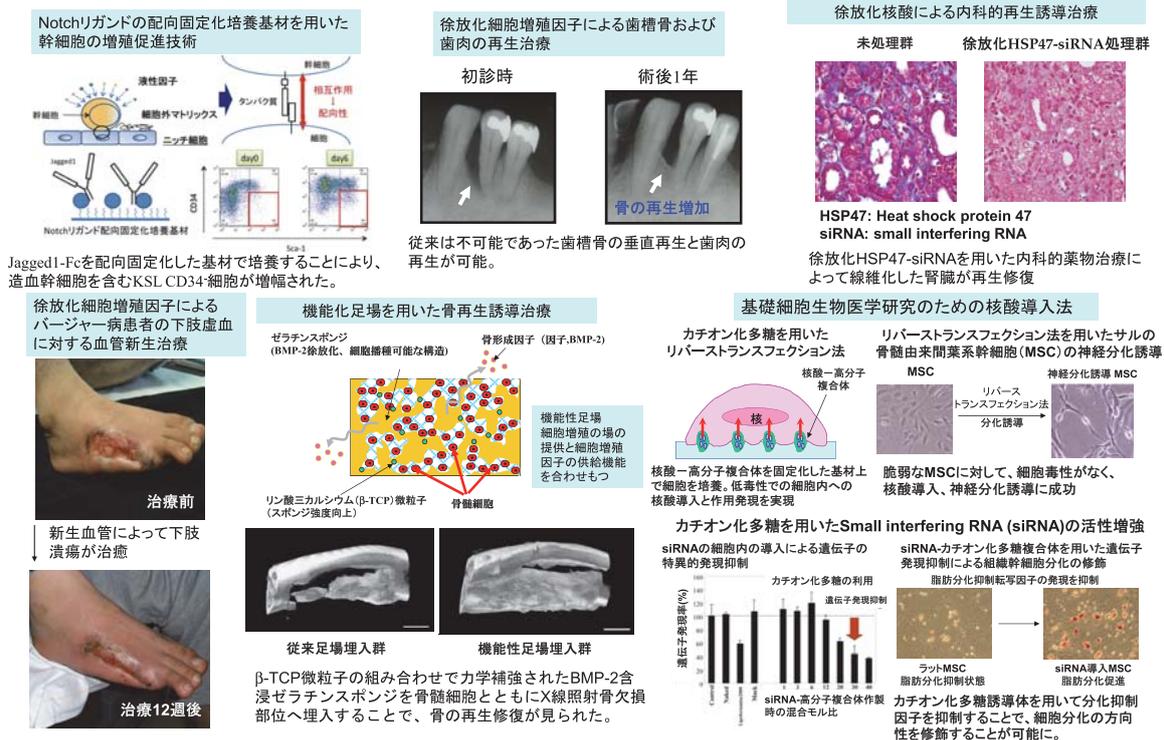
る培養基材あるいは培養装置（バイオリアクタ）の組み合わせによる細胞培養技術の確立を目指している。これらの一連の研究は、単に再生治療のために利用可能な細胞を得ることを目的としているだけでなく、広く、細胞の増殖・分化、形態形成に関する生物医学の基礎研究（再生研究）にも応用できる生体材料、技術、方法論を提供することも大きな目的である。この技術は細胞を用いた薬の代謝、毒性を評価する創薬研究にも応用できる。加えて、細胞機能の解析および細胞の遺伝子改変を目的として、遺伝子導入、発現のための非ウイルスキャリアーのデザインと創製を行っている。これらの細胞に対する生体材料技術は、前項1)の治療の目的にも利用できる。

幹細胞を利用した細胞移植治療では、時として、細胞の再生誘導能力不足が問題となる場合がある。これを解決する1つの方法として、遺伝子導入による幹細胞の活性化（遺伝子による機能改変）が有望であり、広く行われている。これまでに、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入が行われているが、ウイルスを用いていることから、その臨床応用はきわめて難しい。そこで、非ウイルスキャリアーを用いた幹細胞の生物機能の活性化法の研究開発が強く望まれている。この1つの成果として、遺伝子を幹細胞内で徐放化する技術を開発した。この技術を利用することによって、ウイルスと同程度あるいはそれよりも高いレベルの遺伝子発現が実現できた。さらに、遺伝子により活性化した幹細胞を用いることによって、より高い細胞移植治療効果が認められることがわかった。また、遺伝子と非ウイルスキャリアーとが固定化された基材上で細胞を培養、さらにバイオリアクタを組み合わせることによって、細胞への遺伝子導入発現効率を高める（Subfection: substrate-mediated transfection）技術も開発した。非ウイルス性キャリアーを用いて、プラスミドDNAやsiRNAを細胞内に効率よく取り込ませ、細胞の生物機能や分化を制御することも可能となっている。これらの一連の物質導入技術は、細胞の生物機能の改変に有用であり、その対象となる物質は遺伝子だけでなく、small interfering RNA (siRNA)などの核酸物質、低分子、ペプチド、タンパク質などの細胞内導入法としても利用可能である。

3) ドラッグデリバリーシステム (DDS) のための生体材料

薬物が効くのは、薬物とその作用部位に適切に作用するからである。しかしながら、現実には、薬物は部位選択性がなく、その薬理作用を発現させるために大量投与が行われている。これが薬物の副作用の主な原因となっている。そこで、薬物を必要な部位へ、必要な濃度で、必要な時期にだけ働かせるための試みが行われている。これがDDSである。DDSの目的は、薬物の徐放化、薬物の長寿命化、薬物の吸収促進、および薬物のターゲティングなどである。いずれの目的にも、薬物を修飾するための生体材料が必要である。本研究分野では、生体材料学の観点からの治療薬物と治療遺伝子のためのDDS研究を行っている。

これまでの研究の経緯から、DDSの対象薬物は治療薬に集中していた。DDSの基本アイデアは、生物活性をもつ物質を全て薬物と考え、これらの物質と生体材料とを組み合わせることで、物質の生物活性を高めることである。つまり、DDSの対象となる薬物は、治療薬だけではなく、予防薬、診断薬、化粧品成分、ヘルスケア物質などを含んでいる。われわれは、このような基本アイデアからDDSを考え、これを実現するための材料、技術、方法論についての研究開発を進めている。例えば、全身あるいは局所粘膜ワクチン薬、および核磁気共鳴イメージング (MRI)、超音波診断薬などに対して、DDS技術を適用すれば、予防ワクチンおよび診断効果は高まる。また、化粧品、ヘルスケア成分へのDDS技術の適用は、それらの生物効果を高めることができる。このように、DDSとは、生物活性をもつ全ての物質に適用でき、自然科学領域において普遍的な技術である。生物作用をもつ物質の徐放化、可溶化、安定化、およびターゲティングなどのDDS技術、方法論についても研究を進め、物質活性の増強を目指している。



4) 外科・内科治療アシストのための生体材料

本研究分野は、高分子、金属、セラミックス、およびそれらの複合材料を医療に応用していくという、本研究所の前身である生体医療工学研究センターの材料科学研究の流れを引いている。その中で、生体内で吸収する性質をもつ高分子材料を中心として、外科・内科治療の補助のための生体材料の研究開発を行っている。

上記の研究内容について、材料科学的な観点から、基礎および応用研究を行っている。得られた研究成果を基に、様々な生体組織、臓器（皮膚、骨、心臓冠動脈、脂肪、軟骨、神経、歯周組織、毛髪、心筋、腎臓など）の再生誘導のメカニズムの解明、その臨床応用、あるいは DDS 技術、方法論を用いた薬物治療、予防、診断などについて、医学部、歯学部、獣医学部、企業との共同研究を通じた、応用研究を展開している。加えて、得られた材料や技術の生物医学の基礎研究への応用についても共同研究を通して検討を進めている。

The main objective of our department is to investigate and develop methods, procedures, and technologies which are applicable to basic and clinical medicines as well as basic researches of biology and medicine from the viewpoint of material sciences. The materials to use in the body and to contact biological substances, like proteins and cells, are defined as biomedical materials and biomaterials. In our department, various types of biodegradable and non-biodegradable biomaterials of polymers, metals, ceramics, and their composites, are being designed and created aiming at their clinical applications as well as the development of experimental tools necessary for basic researches of medicine and biology which scientifically support clinical medicine. We are actively proceeding research and development (R & D) of biomaterials to assist reconstructive surgery and apply to drug delivery systems (DDS) for improved therapeutic efficacy. However, it is often difficult for patients to improve their Quality of Life (QOL) only by the therapeutic procedure of reconstructive surgery because the biomaterials applied are of poor biocompatibility and functional substitutability. For organ transplantation,

there are several problems to be resolved, such as the lack of donor tissue and organ or the adverse effects of immunosuppressive agents. The two advanced medical therapies currently available are clinically limited in terms of the therapeutic procedure and potential. In these circumstances, a new therapeutic trial, in which disease healing can be achieved based on the natural healing potential of patients themselves, has been increasingly expected. This is termed the therapy of regenerative medicine where the regeneration of tissues and organs is naturally induced to therapeutically treat diseases by artificially manipulating the cell potentials of proliferation and differentiation. The objective of regenerative therapy is to regenerate injured or lost tissues and substitute organ functions by making use of the natural self-healing potential of patients themselves. The therapy of regeneration medicine is quite different from the reconstructive surgery and organ transplantation from the viewpoint that neither biomaterials and medical devices nor immunosuppressive agents are needed. The basic idea of regeneration therapy is to give cells a local environment which is suitable to promote their proliferation and differentiation, resulting in the cell-based induction of tissue and organ regeneration. It is tissue engineering that is a biomedical technology or methodology to create this environment for the natural induction of tissue regeneration. Generally, there are three factors necessary to induce tissue regeneration, such as cells, the scaffold for cell proliferation and differentiation, and biosignaling molecules of growth factors and the related gene, which are fundamentally 3 components constituting the body tissue. For successful regenerative therapy of tissue and organ, it is indispensable to efficiently combine various biomaterials with the body components. Among biomaterials, biodegradable biomaterials play an important role in this medical applications. Since there are few metals and ceramics with biodegradable nature, polymer materials of biodegradability are generally preferable for this purpose. The combination of polymers with metals or ceramics is effective in preparing material composites of suitable biodegradability. If a biomaterial is degraded to disappear in the body, it is not always necessary to retrieve the material from the body after the function expected is accomplished. In addition, the material should be degraded at the right time profile not to physically impair the natural process of tissue regeneration by the material remaining. Biodegradable biomaterials well-designed are indispensable for the research and development (R&D) of regeneration therapy, DDS or the basic research of cell biology and medicine (regeneration research).

Our research goal is to design and create biomaterials from polymers and the composites with metals or ceramics which are practically applicable for regeneration therapy, stem cell technology, DDS, and medical therapy of reconstructive surgery and internal medicine. More detailed explanation about every project is described.

1) Biomaterials for Regeneration Therapy

It is well recognized that cells are present in the living tissue interacting with the extracellular matrix (ECM) of natural scaffold for their proliferation, differentiation, and morphogenesis. When the body tissue is largely lost, the ECM itself also disappears. In such a case, only by supplying cells to the defect, we cannot always expect the tissue regeneration at the large defect. One of the possible ways to achieve successful tissue regeneration is to provide a temporary scaffold for the proliferation and differentiation of cells to the defect. We are designing and creating 3-dimensional and porous constructs of biodegradability as this temporary cell scaffold which is an artificial ECM. However, if the number of cells and the amount of biosignaling molecules are not large enough to

promote the cell activities, only the supply of a scaffold to the tissue defect will not induce the tissue regeneration. As one trials to break through the situation, it practically possible to make use of growth factors for promoted proliferation and differentiation of cells. It is, however, necessary for in vivo use of growth factors to contrive their administration form because of the in vivo short half-life and instability. One possible answer for that is to use the controlled release of growth factor or the related gene at the tissue site to be regenerated over an extended time period by incorporating the factor or gene into an appropriate carrier. This release technology enables the growth factor to efficiently enhance the biological activity, resulting in promoted cell-induced tissue regeneration. We are designing and preparing the biodegradable carrier of growth factors and genes from gelatin and its derivatives. A new therapy to naturally induce tissue and organ regeneration by the controlled release of various biologically active growth factors has been achieved and the therapeutic potentials have been scientifically demonstrated through animal experiments. Among the tissue regeneration trials, clinical experiments of angiogenic and bone regeneration therapies have been started by the controlled release technology of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor (IGF) -1, and platelet-rich plasma (PRP) to demonstrate the good therapeutic efficacy.

Generally, in the chronic fibrotic disease, such as diluted cardiomyopathy, liver cirrhosis, lung fibrosis, and chronic nephritis, the damaged portion of organ is often occupied with the fibrous tissue, which often causes organ dysfunction. It is highly possible that if the fibrosis is enzymatically digested by a proper way, the fibrotic site is naturally regenerated and repaired on the basis of the inherent regenerative potential of the surrounding normal tissue and consequently the organ function is regenerated and recovered. The systems of drug targeting and the local release with polymers of an organ affinity are being designed and prepared to achieve the regeneration therapy for chronic disease based on the natural healing potential of patients. Based on the drug administration therapy which has been clinically used in internal medicine, this is called as physical regenerative therapy of internal medicine. This is a therapeutic approach which is different from the conventional regenerative therapy of surgery where cells, the scaffold, and signal molecules or the combinations are surgically applied to a tissue defect for regeneration induction thereat. The two surgical and physical regeneration therapies are conceptually identical from the viewpoint of the positive use of natural healing potential. In addition, the basic idea of regenerative therapy will be combined with interal medical therapy to open a new therapeutic field in the future. For example, the combination with aneurysm catheter therapy has been tried, and consequently the aneurysm occlusion by the regenerated tissue-based organization has been succeeded by the bFGF release system. On the other hand, a new cell culture technology is being developed to enhance the cellular expression level of nucleic acid compounds, such as decoy DNA and small interfering RNA (siRNA), with non-viral gene carriers.

2) Biomaterials for Stem Cells Technology and Basic Researches of Cell Medicine and Biology (Regeneration research)

There are two approaches to realize regeneration medical therapy. One is the tissue engineering-based therapeutic approach described above. The other is the transplantation therapy of cells which have a potential to induce tissue regeneration. For the latter approach, it is of prime importance to efficiently obtain and prepare cells with a high potential of proliferation and differentiation, such as stem cells, precursors, and blastic cells. In this

department, the technology and methodology of cell culture with various biomaterials and bioreactors have been explored to efficiently isolate, proliferate, and differentiate stem cells, precursors, and blast cells. A series of this study not only aims at the preparation of cells suitable for the therapy of regenerative medicine, but also research and development (R&D) of materials, technologies, and methodologies for basic medicine and biology. They are also applicable for the research of drug discovery to evaluate their metabolism and toxicity. In addition, non-viral vectors for plasmid DNA and siRNA have been investigated to design the DDS system for gene transfection which can biologically analyze the functions of stem cells and genetically engineer cells to activate the biological functions for cell therapy. For example, a new system for the controlled release of plasmid DNA inside cells has been developed to succeed in enhancing the level of gene transfection and the consequent gene expression as high as or higher than that of viral vector system. In addition, a new technology of cell culturing on plasmid DNA-coated substrates has been designed and enhanced the level of gene expression as well as prolonged the expressed period. This reverse transfection system (SubFection: substrate-mediated transfection) was effective in the gene transfection for stem and matured cells which have not been readily transfected by the conventional method. This can be applied for the cell internalization of low-molecular weight compounds, peptides, proteins, and nucleic acids (siRNA and decoy DNA). We cannot only enhance the biological activities of plasmid DNA and siRNA with the non-viral vectors for stem cells, but also modify their biological functions and differentiation fate.

3) Biomaterials for DDS

Generally there are few drugs which have a specific selectivity for the site of action. Therefore, the high-dose administration of drugs is necessary to achieve their *in vivo* therapeutic efficacy, while this often causes the adverse effects of drugs. DDS is a biomaterial-technology which allows a drug to act at the right time the right site of action at the necessary concentration. The objective of DDS includes the controlled release of drug, the prolongation of drug life-time, the acceleration of drug permeation and absorption, and the drug targeting. Various biomaterials are inevitably required to achieve every DDS objective. In this department, various research projects of DDS for drug and gene therapies have been being carried out from the viewpoint of polymer material sciences. Our definition of "drug" is not limited only to therapeutic substances, but the drug includes every substance which has a certain biological activity and function, such as diagnostic and preventive drugs, cosmetics, and health care substances etc. The DDS technology and methodology can be also applied for preventive and diagnostic substances to enhance the *in vivo* efficacy of vaccination and diagnosis, such as magnetic resonance imaging (MRI), ultrasound diagnosis or molecular imaging. We are developing DDS technology and methodology which are applicable to the research and development of cosmetics and health care sciences. The basic idea of DDS is to efficiently enhance the biological functions of a certain substance by the combination with biomaterials. DDS is defined as an universal technology or methodology which can apply to every research field of natural sciences.

4) Biomaterials for Surgical and Physical Therapies

This department is partly originated from the division of Molecular Design and Biomaterials of the former Research Center for Biomedical Engineering where the medical applications of polymer materials have been investigated extensively. Among the research activities, we continue to molecularly design and create

biomaterials mainly from biodegradable polymers aiming at the development of assistant materials in surgical and physical therapies.

From the viewpoint of biomaterial sciences, we are actively proceeding comprehensive biological and medical researches on the scaffold for the cell proliferation and differentiation, the DDS of growth factors and the related genes, and the material-based technology or methodology to use stem, precursor, and blast cells or in addition, their medical applications. Through several R&D collaborations with medical, dental, and veterinary schools as well as private companies, we are planning to apply our basic research results to realize the regeneration induction therapy of various tissues and organs, such as the skin, fat, bone, cartilage, nerve, hair, blood vessels, periodontium, myocardium, and kidney. DDS technologies are also being investigated for their applications of therapeutic, prophylactic, and diagnostic medicines. Some biomaterials are necessary and applicable to further develop the basic researches of cell medicine and biology.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Kido, Y., Jo, J., Tabata, Y.: A gene transfection for rat mesenchymal stromal cells in biodegradable gelatin scaffolds containing cationized polysaccharides. *Biomaterials*. **32** (3):919-25 (2011)
- Liu, J., Tabata, Y.: Photodynamic antitumor activity of fullerene modified with poly(ethylene glycol) with different molecular weights and terminal structures. *J Biomater Sciences Polym Eds*. **22**:297-312 in press
- Higashiyama, R., Nakao, S., Shibusawa, Y., Ishikawa, O., Moro, T., Mikami, K., Fukumitsu, H., Ueda, Y., Minakawa, K., Tabata, Y., Bou-Gharios, G., Inagaki, Y.: Differential contribution of dermal resident and bone marrow-derived cells to collagen production during wound healing and fibrogenesis in mice. *J invest Dermatol*. **131** (2):529-36 (2011)
- Ratanavaraporn, J., Furuya, H., Kohara, H., Tabata, Y.: Synergistic effects of the dual release of stromal cell-derived factor-1 and bone morphogenetic protein-2 from hydrogels on bone regeneration. *Biomaterials*. **32**(11):2797-811 (2011)
- Chew, S.A., Kretlow, J.D., Spicer, P.P., Edwards, A.W., Baggett, L.S., Tabata, Y., Kasper, F.K., Mikos, A.G.: Delivery of plasmid DNA encoding bone morphogenetic protein-2 with a biodegradable branched polycationic polymer in a critical-size rat cranial defect model. *Tissue Eng Part A*. **17** (5):751-63 (2011)
- Sasaki, N., Tsuzuki, N., Otsuka, K., Yamada, K., Haneda, S., Furuoka, H., Tabata, Y.: Effect of gelatin β -tri-calcium phosphate sponge containing bone morphogenetic protein-2 on an equine metacarpal bone defect. in press
- Takafuji, Y., Jo, J., Tabata, Y.: Simple PEG modification of DNA aptamer based on copper ion coordination for tumor targeting. *J Biomater Sciences Polym Eds*. **22** (9):1179-95 in press
- Fujii, H., Matsuyama, A., Komoda, H., Sasai, M., Suzuki, M., Asano, T., Doki, Y., Kirihata, M., Ono, K., Tabata, Y., Kaneda, Y., Sawa, Y., Lee, C.M.: Cationized gelatin-HVJ envelope with sodium borocaptate improved the BNCT efficacy for liver tumors in vivo. *Radiat Oncol*. **6**:8 (2011)
- Ratanavaraporn, J., Damrongsakkul, S., Kanokpanont, S., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Osteogenic differentiation of

- bone-marrow-derived stem cells cultured with mixed gelatin and chitoooligosaccharide scaffolds. *J Biomater Sciences Polym Eds.* **22** (8):1083-98 (2011)
- 田畑泰彦、村上裕子、糸岡朝樹、山本雅哉：軟らかさの異なるハイドロゲル細胞培養基材の作製. *日本化学繊維研究所講演集.* **68**:99-104 (2011)
- Matsuse, D., Kitada, M., Ogura, F., Wakao, S., Kohama, M., Kira, J., Tabata, Y., Dezawa, M.: Combined transplantation of bone marrow stromal cell-derived neural progenitor cells with a collagen sponge and basic fibroblast growth factor releasing microspheres enhances recovery after cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A.* **17** (15-16):1993-2004 (2011)
- He, C.X., Li, N., Hu, Y.L., Zhu, X.M., Li, H.J., Han, M., Miao, P.H., Hu, Z.J., Wang, G., Liang, W.Q., Tabata, Y., Gao, J.Q.: Effective gene delivery to mesenchymal stem cells based on the reverse transfection and three-dimensional cell culture system. *Pharm Res.* **28** (7):1577-90 (2011)
- 田畑泰彦：からだは材料の軟らかさを認識する. *実験医学.* **29** (8):1265-66 (2011)
- Shi, M., Kretlow, J.D., Spicer, P.P., Tabata, Y., Demian, N., Wong, M.E., Kasper, F.K., Mikos, A.G.: Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate / gelatin / antibiotic constructs for craniofacial tissue engineering. *J Control Release.* **152** (1):196-205 (2011)
- Origuchi, T., Jo, J., Hirano, Y., Tabata, Y.: Enhanced tumor imaging efficacy of 5-aminolevulinic acid complexed with iron oxide nanoparticles. *International Journal of Nanotechnology.* **8** (1-2):146-58 (2011)
- Kempf, M., Miyamura, Y., Liu, P.Y., Chen, A.C.H., Nakamura, H., Shimizu, H., Tabata, Y., Kimble, R.M., McMillan, J.R.: A denatured collagen microfiber scaffold seeded with human fibroblasts and keratinocytes for skin grafting. *Biomaterials.* **32** (21):4782-92 (2011)
- Hayashi, K., Tabata, Y.: Preparation of stem cell aggregates with gelatin microspheres to enhance biological functions. *Acta Biomater.* **7** (7):2797-803 (2011)
- Tanaka, K., Nagata, D., Hirata, Y., Tabata, Y., Nagai, R., Sata, M.: Augmented angiogenesis in adventitia promotes growth of atherosclerotic plaque in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* **215** (2):366-73 (2011)
- Kawamura, I., Takemura, G., Tsujimoto, A., Watanabe, T., Kanamori, H., Esaki, M., Kobayashi, H., Takeyama, T., Kawaguchi, T., Goto, K., Maruyama, R., Fujiwara, T., Fujiwara, H., Tabata, Y., Minatoguchi, S.: Treatment of leg ischemia with biodegradable gelatin hydrogel microspheres incorporating granulocyte colony-stimulating factor. *J Cardiovasc Pharmacol.* **57** (4):416-23 (2011)
- Kohara, H., Tabata, Y.: Enhancement of ectopic osteoid formation following the dual release of bone morphogenetic protein 2 and Wnt1 inducible signaling pathway protein 1 from gelatin sponges. *Biomaterials.* **32**(24):5726-32 (2011)
- Kusuhara, H., Itani, Y., Isogai, N., Tabata, Y.: Randomized controlled trial of the application of topical b-FGF-impregnated gelatin microspheres to improve tissue survival in subzone II fingertip amputations. *J Hand Surg Eur Vol.* **36** (6):455-60 (2011)
- 田畑泰彦：組織工学のための簡単なバイオリアクターモジュール 酸素勾配、ヒト間葉系幹細胞分化、血管網前形成の解析システム. *再生医療－日本再生医療学会雑誌.* **10** (3) 8月号 :82 (2011)
- Fukata, N., Uchida, K., Kusuda, T., Koyabu, M., Miyoshi, H., Fukui, T., Matsushita, M., Nishio, A., Tabata, Y., Okazaki, K.: The effective therapy of cyclosporine A with drug delivery system in experimental colitis. *J*

Drug Target. **19** (6):458-67 (2011)

Watanabe, R., Hayashi, R., Kimura, Y., Tanaka, Y., Kageyama, T., Hara, S., Tabata, Y., Nishida, K.: A novel gelatin hydrogel carrier sheet for corneal endothelial transplantation. *Tissue Eng Part A*. **17**(17-18):2213-19(2011)

Liu, J., Tabata, Y.: Effect of modification manner on the photodynamic antitumor activity of chitosan modified sialic acid pullulan. *J Biomater Sciences Polym Eds*. **22** (16):2147-63 (2011)

Doi, N., Jo, J., Tabata, Y.: Preparation of biodegradable gelatin nanospheres with a narrow size distribution for carrier of cellular internalization of plasmid DNA. *J Biomater Sciences Polym Eds*. in press

Peng, L.H., Tsang, S.Y., Tabata, Y., Gao, J.Q.: Genetically-manipulated adult stem cells as therapeutic agents and gene delivery vehicle for wound repair and regeneration. *J Control Release*. in press

Tadokoro, M., Matsushima, A., Kotobuki, N., Hirose, M., Kimura, Y., Tabata, Y., Hattori, K., Ohgushi, H.: Bone morphogenetic protein-2 in biodegradable gelatin and β -tricalcium phosphate sponges enhances the in vivo bone-forming capability of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. in press

Kojima, S., Sugiyama, T., Takai, S., Jin, D., Shibata, M., Oku, H., Tabata, Y., Ikeda, T.: Effects of gelatin hydrogel containing chymase inhibitor on scarring in a canine filtration surgery model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **52** (10):7672-80 (2011)

田畑泰彦：PEG修飾がタンパク質の生理活性をも変える。 *実験医学*. **29** (18) 11月号 :2983-84 (2011)

Okamoto, S., Ikeda, T., Sawamura, K., Nagae, M., Hase, H., Mikami, Y., Tabata, Y., Matsuda, K., Kawata, M., Kubo, T.: Positive effect on Bone fusion by the combination of platelet-rich plasma and a gelatin β -tricalcium phosphate sponge: A study using a posterolateral fusion model of lumbar vertebrae in rats. *Tissue Eng Part A*, **18** (1-2):157-66 (2011).

Shiraishi, K., Endoh, R., Furuhashi, H., Nishihara, M., Suzuki, R., Maruyama, K., Oda, Y., Jo, J., Tabata, Y.: A facile preparation method of a PFC-containing nano-sized emulsion for theranostics of solid tumors. *Int J Pharm*. **421** (2):379-87 (2011)

Takagi, G., Miyamoto, M., Tabata, Y., Mizuno, K.: Therapeutic vascular angiogenesis for vasculitis related peripheral artery disease. *Advances in the diagnosis and treatment of vasculitis*. 211-220 (2011)

Kawabata, S., Asano, K., Tabata, Y.: Electrodeposition of pronectin for titanium to augment the gingival epithelium adhesion. *J Tissue Eng Regen Med*. 1-5 (2011)

Okamoto, T., Saito, T., Tabata, Y., Uemoto, S.: Immunological tolerance in a mouse model of immune-mediated liver injury induced by 16,16 dimethyl PGE₂ and PGE₂-containing nanoscale hydrogels. *Biomaterials*. **32** (21):4925-35 (2011)

Liu, J., Jo, J., Kawai, Y., Aoki, I., Tanaka, C., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Preparation of polymer-based multimodal imaging agent to visualize the process of bone regeneration. *Journal of Controlled Release*. In press

Ishimoto, T., Nakano, T., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Biomechanical evaluation of regenerating long bone by nanoindentation. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. **22** (4): 969-976 (2011)

Henderson, P.W., Singh, S.P., Krijgh, D.D., Yamamoto, M., Rafii, D.C., Sung, J.J., Rafii, S., Rabbany, S.Y., Spector, J.A.: Stromal-derived factor-1 delivered via hydrogel drug-delivery vehicle accelerates wound healing in vivo. *Wound Repair Regen*. **19** (3):420-425 (2011)

山本雅哉：分泌蛋白質を濃縮することができるマイクロパターン化細胞足場材料を用いた肝組織様細胞凝集体の形

成誘導. 再生医療. 10 (2):79 (2011)

Uesugi, Y., Kawata, H., Saito, Y., Tabata, Y.: Ultrasound-responsive thrombus treatment with zinc-stabilized gelatin nano-complexes of tissue-type plasminogen activator. *J. Drug Target*. In press

Saito, T., Tabata, Y.: Preparation of gelatin hydrogels incorporating low-molecular-weight heparin for anti-fibrotic therapy. *Acta Biomaterialia*. In press

Toda, H., Yamamoto, M., Kohara, H., Tabata, Y.: Orientation-regulated immobilization of Jagged1 on glass substrates for ex vivo proliferation of a bone marrow cell population containing hematopoietic stem cells. *Biomaterials*. 32 (29):6920-6928 (2011)

Ishikawa, H., Jo, J., Tabata, Y.: Liver anti-fibrosis therapy with mesenchymal stem cells secreting hepatocyte growth factor. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*. In press

Tara, S., Takagi, G., Miyamoto, M., Kirinoki-Ichikawa, S., Yamamoto, T., Takano, H., Takagi, I., Yasutake, M., Tabata, Y., Mizuno, K.: Novel approach to ischemic skin ulcer in systemic lupus erythematosus: Therapeutic angiogenesis by controlled-release basic-fibroblast growth factor. *Geriatr Gerontol Int*. 11:527-530 (2011)

Sakuraba, H., Fujiwara, N., Sasaki-Oikawa, A., Sakano, M., Tabata, Y., Otsu, K., Ishizeki, K., Harada, H.: Hepatocyte growth factor stimulates root growth during the development of mouse molar teeth. *J. Periodontal Res.* e-pub, Aug. 21 (2011)

Fujita, N., Matsushita, T., Ishida, K., Sasaki, K., Kubo, S., Matsumoto, T., Kurosaka, M., Tabata, Y., Kuroda, R.: An analysis of bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein 2 from a biodegradable sponge composed of gelatin and β tricalcium phosphate. *J Tissue Eng Regen Med*. In press

Hussain, A., Bessho, K., Takahashi, K., Tabata, Y.: Magnesium Calcium Phosphate as a Novel Component Enhances Mechanical/Physical Properties of Gelatin Scaffold and Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*. in press

Takagi, G., Miyamoto, M., Tara, S., Takagi, I., Takano, H., Yasutake, M., Tabata, Y., Mizuno, K.: Controlled-release basic fibroblast growth factor for peripheral artery disease: comparison with autologous bone marrow-derived stem cell transfer. *Tissue Eng Part A*. 17:2787-2794 (2011)

Kurita, J., Miyamoto, M., Ishii, Y., Aoyama, J., Takagi, G., Naito, Z., Tabata, Y., Ochi, M., Shimizu, K.: Enhanced vascularization by controlled release of platelet-rich plasma impregnated in biodegradable gelatin hydrogel. *Ann Thorac Surg*. 92:837-844 (2011)

2) 著書

田畑泰彦: 第5章 ペプチド・タンパク性医薬品をはじめとする高分子物質の注射投与後の体内動態制御ならびに標的指向化 2. 生体吸収性ハイドロゲルを用いた細胞増殖因子の徐放化と生体組織の再生誘導治療. 遺伝子医学 MOOK 別冊 ペプチド・たんぱく性医薬品の新規 DDS 製剤の開発と応用. (2011)

田畑泰彦: 再生医療とそれを支える生物医学の基礎研究に必要な DDS 技術. *Drug Delivery System*. 26 (5):494-501 (2011)

田畑泰彦: 序論 ものづくり技術からみる再生医療. ものづくり技術からみる再生医療 - 細胞研究・創薬・治療 -. 1-9 (2011)

- 山本雅哉、田畑泰彦:生体吸収性ハイドロゲルを用いた生理活性物質の徐放化による骨再生.「機能性食品素材の骨と軟骨への応用」(石見佳子、上原万里子監修、シーエムシー出版、東京) 11-24 (2011)
- 山本雅哉、田畑泰彦:第1編:再生医療に必要な“材料”とは 第9章 DDS・徐放化技術. ものづくり技術からみる再生医療 -細胞研究・創薬・治療-. 87-98 (2011)
- 城潤一郎、田畑泰彦:第2編:再生医療に必要な“技術”とは 第4章 細胞の遺伝子改変技術. ものづくり技術からみる再生医療 -細胞研究・創薬・治療-. 125-132 (2011)
- 田畑泰彦:第3編:ものづくり技術を生かした再生医療の臨床応用 第2章 再生治療に必要なドラッグデリバリーシステムとバイオマテリアル技術. ものづくり技術からみる再生医療 -細胞研究・創薬・治療-. 193-201 (2011)
- 宮本正章、高木 元、水野博司、田畑泰彦、水野杏一:第3編:ものづくり技術を生かした再生医療の臨床応用 第6章 細胞と細胞増殖因子を用いた難治性皮膚潰瘍治療. ものづくり技術からみる再生医療 -細胞研究・創薬・治療-. 220-226 (2011)
- Takagi, G., Miyamoto, M., Tabata, Y., Mizuno, K.: Therapeutic Vascular Angiogenesis for Vasculitis Related Peripheral Artery Disease. *J Vasc Surg.* **48** (6 Suppl):53-60 (2011)

3) 総説

- 田畑泰彦:バイオマテリアルを用いた生体シグナル因子徐放による再生誘導治療. *PEPARS.* **50**:82-89 (2011)
- Mimura, T., Tabata, Y., Amano, S.: Transplantation of corneal stroma reconstructed with gelatin and multipotent precursor cells from corneal stroma. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering; From Cells to Organs / Book 2.* in press
- Tabata, Y.: Biomaterials design of culture substrates for cell research. *Inflammation and Regeneration.* **31**(2):137-45 (2011)
- 田畑泰彦:ものづくり技術からみた再生医療. *再生医療-日本再生医療学会雑誌.* **10** (4) 11月号:12-16 (2011)
- 田畑泰彦:骨髄由来細胞を用いた再生医療フロンティア. 第110回日本皮膚科学会総会学術大会号. **121** (13):3179-81 (2011)
- 田畑泰彦:組織工学をベースとした再生医療. *あいみつく.* **32** (4):70-74 (2011)
- 山本雅哉:細胞周辺環境としての機能性バイオマテリアル足場の開発. *バイオマテリアル.* **29** (1):41-47 (2011)
- Kitamura, C., Nishihara, T., Terashita, M., Tabata, Y., Jimi, E., Washio, A., Hirata, S.: Regeneration approach for dental pulp and periapical tissues with growth factors, biomaterials, and laser irradiation. Special issue “Polymers for Oro-Dental and Cranio-Maxillo-Facial Applications”, *Polymers.* **3** (4):1776-1793 (2011)
- 高松聖仁、上村卓也、岡田充弘、中村博亮、田畑泰彦、筏 義人:bFGF と生体吸収性材料を用いた末梢神経修復. *整形・災害外科.* **54**:1008-1009 (2011)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 山本雅哉、稲生佳菜子、田畑泰彦:糖添加により除去可能な細胞足場材料を利用した細胞凝集体の形成、第32回日本炎症・再生医学会 (2011.6.2-3 京都)

- Yamamoto, M., Tabata, Y.: Design of biomaterial scaffolds to control the proliferation and differentiation of stem cells. 研究所ネットワーク国際シンポジウム (2011.6.9-10 東京)
- Yamamoto, M., Inoo, K., Tabata, Y.: Preparation of gelatin hydrogel microspheres with the property of sugar-responsive water-solubilization. Gordon Research Conference on Biomaterials and Tissue Engineering (2011.7.31-8.5 Holderness)
- Yamamoto, M., Itooka, T., Tabata, Y.: Morphological change of epithelial cells by stiffness alteration of culture substrates. The 3rd Asian Biomaterials Congress (2011.9.15-17)
- Inoo, K., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Fabrication of cell aggregates with gelatin hydrogel microspheres having the property of sugar-responsive water-solubilization. Biofabrication 2011 (2011.10.6-8 Toyama)
- Toda, H., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Fabrication of hydrogels with elasticity changeable by alkaline phosphatase. BMES 2011 Annual Meeting (2011.10.12-15 Hartford)
- 山本雅哉、Ratanavaraporn, J., 松井 誠、田畑泰彦:ゼラチンハイドロゲルを用いた複数の細胞増殖因子の徐放化. 第1回 DDS 徐放化再生医療研究会 (2011.12.2-3 東京)
- Yamamoto, M., Ratanavaraporn, J., Tabata, Y.: Enhanced osteogenesis and angiogenesis of bone marrow-derived cells by controlled release of growth factors and chemokines to induce bone regeneration. TERMIS-NA 2011 (2011.12.11-14 Houston)
- Inoo, K., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Sugar-responsive water-solubilization of gelatin hydrogel microspheres in cell aggregate. The 11th US-Japan Symposium on Drug Delivery System (2011.12.16-20 Maui)
- Toda, H., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Orientation-regulated immobilization of Notch ligand on cell substrates for ex vivo proliferation of a cell population containing hematopoietic stem cell. The 11th US-Japan Symposium on Drug Delivery System (2011.12.16-20 Maui)
- 上杉佳子、川田啓之、城潤一郎、斎藤能彦、田畑泰彦:超音波応答型ナノ DDS の血栓症治療への応用、第3回融合ナノ基盤工学研究部門成果報告会 (2011.3.8 京都)
- 上杉佳子、川田啓之、城潤一郎、斎藤能彦、田畑泰彦:血栓症の治療を目指した超音波応答型ナノ DDS の開発、日本薬学会第131年会 (2011.3.28-31 静岡)
- Uesugi, Y., Kawata, H., Jo, J., Saito, Y., Tabata, Y.: Ultrasound-responsive thrombus treatment with zinc-stabilized gelatin nano complexes of tissue-type plasminogen activator. 研究室ネットワーク国際シンポジウム (2011.6.9 東京)
- 上杉佳子、川田啓之、城潤一郎、斎藤能彦、田畑泰彦:超音波応答型ナノ DDS の血栓症治療への応用、第27回日本 DDS 学会 (2011.6.9-10 東京)
- 上杉佳子、川田啓之、城潤一郎、斎藤能彦、田畑泰彦:血栓症の治療のための超音波応答型ナノ DDS の開発、第40回医用高分子シンポジウム (2011.7.25-26 大阪)
- Uesugi, Y., Nagae, Y., Tabata, Y.: Preparation of carbohydrate-binding dextran for positron emission tomography diagnosis. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society 2011 AP meeting (2011.8.3-5 Singapore)
- 上杉佳子、森田美枝、城潤一郎、南昌人、富田佳紀、湯浅 聡、矢野哲哉、田畑泰彦:光音響イメージングのための分子プローブの開発、第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)
- Uesugi, Y., Nagae, Y., Tabata, Y.: Molecular design of carbohydrate-binding dextran for positron emission

- tomography diagnosis. 2011 The 11th US-Japan Symposium on Drug Delivery System (2011.12.16-20 Maui)
- 松井 誠、田畑泰彦：ゼラチンハイドロゲルを用いた bFGF と多血小板血漿の組み合わせ徐放の血管新生効果、第 10 回日本再生医療学会総会 (2011.3.1-2 東京)
- 松井 誠、田畑泰彦：ゼラチンハイドロゲルを用いた bFGF と多血小板血漿の組み合わせ徐放の血管新生効果、京都大学工学研究科高等研究院生体医工学研究部門 京都大学グローバル COE プログラム「物質科学の新基盤構築と次世代育成国際拠点」平成 22 年度研究発表交流会 (2011.5.18 京都)
- 松井 誠、古谷洋之、田畑泰彦：ゼラチンハイドロゲルを用いた徐放化多血小板血漿による骨再生効果、第 32 回日本炎症・再生医学会 (2011.6.2-3 京都)
- 松井 誠、田畑泰彦：ゼラチンハイドロゲからの bFGF と多血小板血漿組み合わせ徐放による血管新生効果、第 27 回日本 DDS 学会 (2011.6.9-10 東京)
- Matsui, M., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Enhanced angiogenesis by dual release of platelet-rich plasma and basic fibroblast growth factor from gelatin hydrogels. 研究所ネットワーク国際シンポジウム (2011.6.9-10 東京)
- 松井 誠、古谷洋之、田畑泰彦：ゼラチンハイドロゲからの多血小板血漿 (PRP) 徐放による血管新生効果、第 3 回 PRP 療法研究会 (2011.11.20 大阪)
- 松井 誠、古谷洋之、田畑 泰彦：ゼラチンハイドロゲルを用いた多血小板血漿 (PRP) と塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の組み合わせ徐放による骨再生効果、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)
- 松井 誠、田畑泰彦：ゼラチンハイドロゲからの多血小板血漿 (PRP) 徐放による血管新生効果、第 1 回 DDS 徐放化再生医療研究会 (2011.12.2-3 東京)
- 齊藤高志、田畑泰彦：siRNA 局所徐放のためのゼラチンハイドロゲルの作製、第 60 回高分子年次大会 (2011.5.25 大阪)
- 齊藤高志、田畑泰彦：生体吸収性ゼラチンハイドロゲルを利用した siRNA の徐放、第 27 回日本 DDS 学会 (2011.6.9 東京)
- 齊藤高志、田畑泰彦：腹膜抗線維化治療のための低分子量ヘパリン徐放化ゼラチンハイドロゲル調製、第 8 回泌尿器科再建再生研究会 (2011.6.11 京都)
- 齊藤高志、田畑泰彦：ゼラチンハイドロゲルを用いた siRNA の活性増強・延長、融合ナノ基盤工学研究部門 第 4 回交流会若手研究者交流会 (2011.7.22 京都)
- 齊藤高志、田畑泰彦：活性延長のための siRNA 徐放化ゼラチンハイドロゲル調製、日本バイオマテリアル学会 第 6 回関西若手研究発表会 (2011.8.12 大阪)
- 齊藤高志、田畑泰彦：活性型ビタミン D3 内包ゼラチンスポンジスキヤホールドを用いた組織幹細胞の骨分化、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21 京都)
- Saito, T., Tabata, Y.: Preparation of gelatin hydrogels containing nano-complexes of siRNA and cationized gelatin. KIPS-ESPCI (2011.11.28 京都)
- 田島脩平、田畑泰彦：細胞機能改変を目指した生体吸収性ゼラチン粒子を含んだ細胞集合体の作製、第 10 回日本再生医療学会 (2011.3.1-2 東京)
- 田島脩平、田畑泰彦：生体吸収性ゼラチンハイドロゲル粒子を含んだ細胞集合体の作製、第 60 回高分子学会 (2011.5.25-27 大阪)
- 田島脩平、田畑泰彦：細胞機能改変を目指した生体吸収性ゼラチン粒子を含む細胞集合体の作製、第 32 回日本炎症

再生医学会 (2011.6.2-3 京都)

田島脩平、田畑泰彦：生体吸収性ゼラチン粒子を利用した乳腺上皮細胞の培養と集合体形成、第6回日本バイオマテリアル学会関西若手研究会 (2011.8.12 大阪)

田島脩平、田畑泰彦：生体吸収性ゼラチン粒子を含む乳腺上皮細胞集合体の作製、第33回日本バイオマテリアル学会 (2011.11.21-22 京都)

戸田裕之、山本雅哉、田畑泰彦：アルカリホスファターゼ刺激に応答して硬さの変化するハイドロゲルの作製、第10回日本再生医療学会総会 (2011.3.1-2 東京)

戸田裕之、山本雅哉、田畑泰彦：アルカリホスファターゼに応答し硬さの変化するハイドロゲルの作製、第60回高分子年次大会 (2011.5.25-27 大阪)

戸田裕之、山本雅哉、小原洋志、田畑泰彦：細胞シグナルタンパク質を配向固定化した異なる軟らかさをもつハイドロゲルの作製、第27回日本炎症・再生医学会 (2011.6.2-3 京都)

戸田裕之、山本雅哉、田畑泰彦：ephrinB2-Fc を配向固定化したポリアクリルアミドハイドロゲル培養基材の作製、日本バイオマテリアル学会 第6回関西若手研究発表会 (2011.8.12 広島)

戸田裕之、山本雅哉、田畑泰彦：アルカリホスファターゼ刺激により硬さの変化するハイドロゲル培養基材の作製、第60回高分子討論会 (2011.9.28-30 岡山)

戸田裕之、山本雅哉、田畑泰彦：硬さの異なるハイドロゲル上への Eph シグナルタンパク質の配向固定化、第32回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)

Toda, H., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Fabrication of phosphatase-responsive hydrogels from a phosphate group-containing methacrylate. KIPS-ESPCI Workshop on Polymer Science 2011 (2011.11.28-29 Kyoto)

戸田裕之、山本雅哉、田畑泰彦：様々な機能をもつ間葉系幹細胞培養のための硬さの異なるハイドロゲルの作製、高等研究院生体医工学研究部門・先端医工学研究ユニット・G-COE 化学系医工学研究交流会 (2011.12.6 京都)

戸田裕之、山本雅哉、田畑泰彦：細胞シグナルタンパク質配向固定化培養基材上での造血幹細胞および間葉系幹細胞の培養、2011年度再生研若手発表会 (2011.12.26 京都)

堀江理恵、齊藤高志、佐藤圭祐、伊藤壽一、田畑泰彦：疎水性局所麻酔薬の水可溶化とハイドロゲルからの徐放、第32回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)

岡本竜弥、斎藤高志、田畑泰彦、上本伸二：コンカナバリン誘導急性肝障害マウスに対する PGE2 の障害抑制効果と新規 Drug Delivery System の応用、第10回日本再生医療学会総会 (2011.3.1 東京)

岡本竜弥、田畑泰彦、上本伸二：マウス実験的大腸炎に対する Prostaglandin E2 receptor subtype 4 (EP4) agonist-PLGA microsphere の障害抑制効果、第32回日本炎症・再生医学会 (2011.6.3 京都)

Okamoto, T., Saito, T., Tabata, Y., Uemoto, S.: 16,16 dimethyl PGE2 and PGE2-containing nano-sized hydrogel administration induces tolerance in a mouse model of immune-mediated liver injury. The Transplantation Society (TTS) Basic Science Symposium (BSS) 2011 (2011.6.12 Cape cod, USA)

Okamoto, T., Saito, T., Tabata, Y., Uemoto, S.: Prevention of TNBS-induced experimental colitis by oral administration of PLGA microsphere containing Prostaglandin E2 receptor subtype 4 (EP4) agonist. Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST) 2011 (2011.9.27 Seoul)

岡本竜弥、上本伸二、田畑泰彦：Prostaglandin E2 receptor subtype 4 (EP4) agonist-PLGA microsphere によるマウス実験的大腸炎の抑制効果、第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.22 京都)

- 平井健次郎、坂井義治、田畑泰彦：徐放化 bFGF ゼラチンハイドロゲルシートを用いた腸管吻合部創傷治癒促進、第 10 回日本再生医療学会総会（2011.3.1-2 東京）
- Hirai, K., Tabata, Y., Sakai, Y.: Promotion of wound healing in intestinal anastomosis with gelatin hydrogel incorporating basic fibroblast growth factor. 46th Annual Congress of the European Society for Surgical Research (2011.5.25-28 Aachen)
- 平井健次郎、田畑泰彦、坂井義治：徐放化 bFGF ゼラチンハイドロゲルシートを用いた腸管吻合部創傷治癒促進効果の検討、第 66 回日本消化器外科学会総会（2011.7.13-15 名古屋）
- 平井健次郎、坂井義治、田畑泰彦：徐放化 bFGF ハイドロゲルシートを用いた腸管吻合部創傷治癒促進、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会（2011.11.21-22 京都）
- 郡司周太郎、田畑泰彦、坂井義治：ゼラチン微粒子を用いた高用量シスプラチン徐放化製剤による癌性腹膜炎治療、第 66 回日本消化器外科学会総会（2011.7.13-15 名古屋）
- 郡司周太郎、田畑泰彦、坂井義治：ヒアルロン酸-カチオン化ゼラチンナノ粒子による CD44 陽性癌細胞に対するドラッグデリバリー、第 33 回日本バイオマテリアル学会（2011.11.21-22 京都）
- 中村陽子：皮弁生着率向上のための bFGF とストロマ細胞由来因子の組み合わせ徐放化、日本再生医療学会（2011.3.1-2 東京）
- 中村陽子：bFGF とストロマ細胞由来因子の組み合わせ徐放化による血管新生と皮弁生着率、日本形成外科学会基礎学術集会（2011.10.6-7 東京）
- 中村陽子：bFGF とストロマ細胞由来因子の組み合わせ徐放化による血管新生と皮弁生着率の検討、日本バイオマテリアル学会（2011.11.21-22 京都）
- 古谷洋之、金子和夫、田畑泰彦：卵巣摘出マウスにおける bFGF 徐放化ゼラチンハイゲルゲルによる骨再生修復、第 10 回日本再生医療学会（2011.3.1-2 京都）
- 古谷洋之、金子和夫、田畑泰彦：骨再生に与える bFGF の徐放期間の影響、第 33 回日本バイオマテリアル学会（2011.11.21-22 京都）
- 石川英史、城潤一郎、田畑泰彦：スベルミン導入プルランを用いた機能増強幹細胞移植による肝線維化抑制、第 10 回日本再生医療学会総会（2011.3.1-2 東京）
- 石川英史、城潤一郎、田畑泰彦：肝線維化の細胞移植治療のためのスベルミン導入プルランの作製、第 60 回高分子年次大会（2011.5.25-27 大阪）
- 石川英史、城潤一郎、田畑泰彦：コアセルベーション法による siRNA 含有ナノ粒子の作製、第 27 回日本 DDS 学会学術集会（2011.6.9-10 東京）
- 石川英史、田畑泰彦：siRNA の徐放期間制御のためのゼラチンナノ粒子の作製、日本バイオマテリアル学会 第 6 回関西若手研究発表会（2011.8.12 大阪）
- 石川英史、田畑泰彦：siRNA の細胞内徐放化のためのゼラチンナノ粒子の作製、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会（2011.11.21-22 京都）
- 糸岡朝樹、村上裕子、山本雅哉、田畑泰彦：硬さの異なる高分子ハイドロゲル上での乳腺上皮細胞の上皮間葉転換、第 10 回日本再生医療学会総会（2011.3.1-2 東京）
- 糸岡朝樹、山本雅哉、田畑泰彦：糖に応答して柔らかさの変化するハイドロゲル足場の作製、第 60 回高分子学会年次大会（2011.5.25-27 大阪）
- 糸岡朝樹、山本雅哉、田畑泰彦：塩基性線維芽細胞増殖因子を傾斜固定化したアルギン酸スポンジの作製、日本バ

- イオマテリアル学会 第6回関西若手研究発表会 (2011.8.12 大阪)
- 糸岡朝樹、山本雅哉、田畑泰彦:異なる濃度勾配をもつ細胞増殖因子傾斜固定化アルギン酸スポンジ内での間葉系幹細胞の培養、第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)
- 稲生佳菜子、山本雅哉、田畑泰彦:糖に応答して水可溶化するゼラチンハイドロゲル粒子の作製、第60回高分子年次大会 (2011.5.25-27 大阪)
- 稲生佳菜子、山本雅哉、田畑泰彦:3次元細胞集合体形成のための糖応答性ハイドロゲル足場材料の作製、第6回日本バイオマテリアル学会 関西若手研究発表会 (2011.8.12 大阪)
- 稲生佳菜子、山本雅哉、田畑泰彦:細胞凝集体構築のための糖添加により水可溶化するゼラチンハイドロゲル足場の作製、第60回高分子討論会 (2011.9.28-30 岡山)
- 稲生佳菜子、山本雅哉、田畑泰彦:細胞培養基材としての糖応答性水可溶化ハイドロゲルの作製、第33回日本バイオマテリアル学会 (2011.11.21-22 京都)
- 上田真澄、田島脩平、田畑泰彦:異なる基材上での細胞への遺伝子導入、日本バイオマテリアル学会 第6回関西若手研究発表会 (2011.8.12 大阪)
- 上田真澄、田島脩平、田畑泰彦:三次元ゼラチン足場を用いた細胞への遺伝子導入、第33回日本バイオマテリアル学会 (2011.11.21-22 京都)
- 佐藤圭祐、齊藤高志、田畑泰彦:難水溶性低分子薬物ピオグリタゾンの徐放化ハイドロゲルの作製、第57回高分子研究発表会 (2011.7.15 兵庫)
- 佐藤圭祐、齊藤高志、田畑泰彦:難水溶性低分子薬物ピオグリタゾンの徐放化ハイドロゲルの作製、第5回日本バイオマテリアル学会関西若手研究会 (2011.8.12 大阪)
- 佐藤圭祐、齊藤高志、田畑泰彦:生体吸収性ハイドロゲルを利用した難水溶性低分子薬物ピオグリタゾンの徐放、第33回日本バイオマテリアル学会 (2011.11.21-22 京都)
- 村上政広、齊藤高志、田畑泰彦:スフィンゴシン-1-リン酸アゴニスト徐放化ゼラチンハイドロゲルの作製、第6回関西若手研究発表会 (2011.8.12 京都)
- 村上政広、齊藤高志、田畑泰彦:S1Pアゴニスト徐放化ゼラチンハイドロゲルを用いたマクロファージ遊走、第32回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)
- 柚本 聡、田畑泰彦:化学修飾によるプロネクチンFの細胞接着性の変化、第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)
- 宮澤敦子、浅野一成、松野智宜、田畑泰彦、佐藤田鶴子:第二象牙質形成促進のためのゼラチンハイドロゲルからのシンバスタチン徐放、第10回日本再生医療学会総会 (2011.3.1-2 東京)
- 宮澤敦子、浅野一成、松野智宜、田畑泰彦、佐藤田鶴子:ゼラチンハイドロゲルからのシンバスタチン徐放による象牙質形成促進、第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)
- Kuroda, R., Ishida, K., Fukui, T., Matsumoto, T., Matsushita, T., Tei, T., Sasaki, K., Kubo, S., Asahara, T., Kurosaka, M., Tabata, Y.: Regenerative Medicine Using Biodegradable Gelatin Hydrogel in Orthopaedic Surgery. 32nd Annual Meeting of the Japanese Society of Inflammation and Regeneration: JSIR2011, 1st Meeting of Asian-Pacific Federation of Inflammation and Regeneration: APFIR 2011 (2011.6.2 京都)
- 岡 真也、黒田良祐、田畑泰彦:高分子ゼラチンハイドロゲルを用いた整形外科領域の再生医療研究、第1回DDS徐放化再生医療研究会 (2011.12.03 東京)
- Fukui, T., Ii, M., Shoji, T., Matsumoto, T., Mifune, Y., Kawakami, Y., Kuroda, T., Akimaru, H., Kawamoto, A., Saito,

- T., Jo, J., Tabata, Y., Kurosaka, M., Kuroda, R., Asahara, T.: Therapeutic Effect of Low Dose Simvastatin-conjugated Gelatin Hydrogel for Fracture Healing via Activating Endothelial Progenitor Cells and Osteoblasts. 2011 Orthopaedic Research Society Annual Meeting (2011.1.13-16 Long Beach CA)
- Fukui, T., Ii, M., Shoji, T., Matsumoto, T., Mifune, Y., Kawakami, Y., Kuroda, T., Akimaru, H., Kawamoto, A., Jo, J., Tabata, Y., Kurosaka, M., Kuroda, R., Asahara, T.: Local Administration of Low Dose Simvastatin-conjugated Gelatin Hydrogel contributes to Fracture Repair via Angiogenesis Concerning EPC and Osteogenesis. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2011 Asia Pacific Meeting (2011.8.3-5 Singapore)
- 高橋亮介、園田 浩、齊藤 拓、田畑泰彦、久田明子：ナノピラー細胞培養シートを用いた創薬スクリーニング向け肝細胞スフェロイド培養、第168回東京医科大学医学会総会（2011.11.5 東京）
- Hussain, A., Bessho, K., Takahashi, K., Tabata, Y.: A new gelatin scaffold of three layers for the regeneration of oseocondral defect. 第10回日本再生医療学会総会（2011.3.1-2 東京）
- Hussain, A., Bessho, K., Takahashi, K., Tabata, Y.: Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in novel gelatin magnesium calcium phosphate scaffold. 第33回日本バイオマテリアル学会大会（2011.11.21-22 京都）
- 田村佳代、高橋克、東郷由弥子、田畑泰彦、別所和久：FGF徐放化生体吸収性ゼラチンハイドロゲルによる歯槽骨の再生治療、第33回日本バイオマテリアル学会大会（2011.11.21-22 京都）
- Takagi, G., Miyamoto, M., Takagi, I., Tara, S., Ichikawa-Kirinoki, S., Tabata, Y., Mizuno, K.: The Mechanism of Local Therapeutic Angiogenesis to the Systemic Vascular Function for Limb Ischemia. 3rd International conference on drug discovery & therapy (2011.2.10 Dubai, UAE)
- 金指幹元、宮本正章、日下輝雄、田畑泰彦、五味一博：DDS徐放化多血小板血漿の歯周組織再生療法への応用に向けた多血小板血漿応用例の7年経過例、第1回DDS徐放化再生医療研究会（2011.12.3 東京）
- Inoue, A., Arai, Y., Takahashi, KA., Honjo, K., Terauchi, R., Tonomura, H., Tabata, Y., Kubo, T.: The protective effect of gelatin hydrogel-bone morphogenetic protein-7 system on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. 2011 World Congress on Osteoarthritis (2011.9.15-18 San Diego)

2) 講演・シンポジウム

- 田畑泰彦：生体材料と再生医学、岩手医科大学歯学部講義（2011.1.13 盛岡）
- 田畑泰彦：生体機能性高分子 - からだを治すポリマー - 生物医学研究から先端医療までを支える高分子技術、平成22年度KIPS高分子講座2010（2011.1.19 京都）
- Tabata, Y.: Regeneration therapy based on biomaterials. Institute of Pharmaceutics, Zhejiang University (2011.1.25-27 Hangzhou)
- 田畑泰彦：もの作りからみた再生医療 - 再生治療と細胞研究 -、第9回ナノファイバー研究会（2011.1.28 大阪）
- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生治療と細胞研究、第29回日本接着歯学会学術大会（特別講演）（2011.2.5 岡山）
- 田畑泰彦：バイオマテリアルを利用した最先端再生治療と今後の展開、第19回日本熱傷学会近畿地方会（特別講演）（2011.2.19 大阪）
- 田畑泰彦：細胞研究のためのバイオマテリアル技術、医工学フォーラム - 2010年度特別学術講演会 -（2011.2.23 京都）

- 田畑泰彦：再生医療の最前線 -電子・セラ技術の適用可能性-、イビデン株式会社技術講演会（2011.3.3 大垣）
- 田畑泰彦：再生医療と糖鎖工学、ILS 株式会社講演会（2011.3.4 守谷）
- 田畑泰彦：再生治療の形成外科への応用、慶應大学形成外科学教室（2011.3.8 東京）
- 田畑泰彦：モノ作り技術からみた再生医療～医工連携のすすめ～、「しが医工連携ものづくりクラスター」-地域イノベーションクラスタープログラム（グローバル型）平成 22 年度研究成果報告会（基調講演）（2011.3.18 大津）
- Tabata, Y.: Hydrogel technology necessary for tissue regeneration therapy and stem cell biology. International Symposium Polymer Gel Research Cluster（招待講演）（2011.4.1 Daegu）
- 田畑泰彦：再生医療におけるバイオマテリアルの重要性、ニプロ株式会社講演会（2011.4.14 草津）
- 田畑泰彦：バイオマテリアル（生体材料）からみた再生医療、鳥取大学農学部 獣医内科学特別講義（2011.4.19 鳥取）
- 田畑泰彦：もの作り技術からみた再生医療 -細胞研究、創薬研究、再生治療-、安全性評価研究会 春のセミナー（2011.4.23 大阪）
- 田畑泰彦：バイオマテリアル（生体材料）からみた再生治療と生物医学研究、生物物理学セミナー（2011.4.26 京都）
- 田畑泰彦：ドラッグデリバリーシステム（DDS）技術からみた先端医療と生物医学研究、平成 23 年度「再生医療サポートビジネス懇話会」（2011.4.28 京都）
- Tabata, Y.: New generation of biomaterials. The 1st QU Tissue Engineering Symposium（招待講演）（2011.5.10 Qassim）
- Tabata, Y.: Dental and medical applications of biomaterials. The 1st QU Tissue Engineering Symposium（招待講演）（2011.5.10 Qassim）
- Tabata, Y.: Tissue engineering technology indispensable for regeneration therapy. 4th International Conference on Tissue Engineering（2011.6.2 Chania）
- Tabata, Y.: Biomaterials indispensable for tissue regenerative therapy and stem cell biology. 2011 International Forum on Biomedical Textile Materials（招待講演）（2011.6.8 Shanghai）
- 田畑泰彦：DDS 技術を利用した生体組織再生治療、第 27 回日本 DDS 学会学術集会（2011.6.10 東京）
- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた DDS 技術とその再生治療・生物医学研究への応用、第 27 回日本 DDS 学会学術集会（2011.6.10 東京）
- 田畑泰彦：再生治療の今と展望、泌尿器科再建再生研究会（2011.6.11 京都）
- 田畑泰彦：自然治癒力を高めて病気を治す ～再生医療の実際～、芦屋市立公民館講座「芦屋川カレッジ」（2011.6.15 芦屋）
- 田畑泰彦：先端医療を支えるバイオマテリアル（生体材料）と DDS の最前線、東京大学 GCOE ナノバイオ工学講義（2011.6.16 東京）
- 田畑泰彦：臨床応用されているバイオマテリアル技術、「がん微小環境」班会議・第一回公開ワークショップ（2011.6.17 東京）
- 田畑泰彦：生物医学・医療のための高分子材料、第 46 回高分子の基礎と応用講座（2011.6.17 大阪）
- 田畑泰彦：バイオマテリアルを利用した再生医療と今後の治療展開、第 54 回関西胸部外科学会学術集会（特別講演）（2011.6.30 高松）
- Tabata, Y.: Bed-to-bench translational research for biomaterial-based regeneration therapy. 20th Anniversary of

- Seoul National University Hospital Biomedical Research Institute (招待講演) (2011.7.1 Seoul)
- 田畑泰彦：生体材料から見た再生医療の最前線、鹿児島大学セミナー (2011.7.11 鹿児島)
- 田畑泰彦：自然治癒力を利用した再生治療の実際、第 82 回骨粗鬆症・生活習慣病健康セミナー (2011.7.14 大阪)
- 田畑泰彦：バイオマテリアルを用いた創傷治癒の新展開、第 9 回京滋創傷治癒研究会 (2011.7.21 京都)
- 田畑泰彦：再生医療の最前線と今後の展望、同志社大学生命医科学部講義 (2011.7.22 京田辺)
- 田畑泰彦：材料工学技術からみた再生医療と幹細胞研究の最前線、平成 23 年度 第 2 回生命融合科学教育部セミナー
第 2 回生命工学科セミナー (共催) (2011.7.25 富山)
- Tabata, Y.: Liver anti-fibrosis therapy with mesenchymal stem cells secreting hepatocyte growth factor. 38th
Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2011.8.2 USA)
- Tabata, Y.: Preparation of cells aggregate containing gelatin hydrogel microspheres to enhance their biological
activity. TERMIS 2011 Asia Pacific Meeting (2011.8.4 Singapore)
- 田畑泰彦：もの作りからみた再生医療分野、JSR 株式会社講演会「医療関連材料と開発の進め方」(2011.8.9 東京)
- Tabata, Y.: Clinical experiences with Drug Delivery Systems for regenerative medicine applications. Advances in
Tissue Engineering (2011.8.12 Houston)
- 田畑泰彦：再生医療分野における DDS 素材、日油株式会社講演会 (2011.8.25 東京)
- Tabata, Y.: Overview of tissue engineering researches. Gao 研合同セミナー (2011.8.29-30 Hangzhou)
- 田畑泰彦：再生医療実現のためのバイオマテリアル技術、味の素株式会社イノベーション研究所講演会 (2011.9.1 東
京)
- Tabata, Y.: Controlled release of neuropeptide substance P to induce angiogenesis. 24th European Conference on
Biomaterials (2011.9.6 Dublin)
- Tabata, Y.: Regenerative medicine from the viewpoint of biomaterials. The 3rd Asian Biomaterials Congress (招
待講演) (2011.9.15-17 Busan)
- 田畑泰彦：再生治療のフロンティアと未来、第 75 回日本皮膚科学会東部支部学術大会 (特別講演) (2011.9.18 前橋)
- 田畑泰彦：モノづくり技術が支える再生医療の実用化 - 細胞研究、創薬研究、治療 -、専門家との直接意見交換シ
ンポジウム in KRP Part IV (2011.9.21 京都)
- 田畑泰彦：バイオマテリアルから見た先端医療と基礎生物医学研究、サンメディカル株式会社講演会 (2011.9.27 守
山)
- Tabata, Y.: Tissue engineering indispensable for regenerative therapy and stem cell research. International
Conference on Tissue Engineering & Regenerative (招待講演) (2011.9.30 Rourkela)
- 田畑泰彦：バイオマテリアルと再生医療、大阪大学歯学部講義 (2011.10.5 大阪)
- 田畑泰彦：最先端医療と生物医学研究を支えるバイオマテリアル、神戸大学大学院講義 (2011.10.6 神戸)
- Tabata, Y.: Bone regeneration by cell scaffold combined with growth factor release. bone-tec 2011 (2011.10.14
Hanover)
- 田畑泰彦：バイオマテリアル技術からみた先端医療と生物医学研究、関西電力全社技術発表会 (特別講演) (2011.10.18
大阪)
- 田畑泰彦：材料科学からみた再生医療と細胞研究、新化学技術推進協会講演会 (2011.10.19 東京)
- Tabata, Y.: What is Biomaterial? Silpakorn University (2011.10.28 Bangkok)
- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生治療の最前線、第 23 回北海道 MMC 研究会 (特別講演) (2011.10.29 札

幌)

田畑泰彦：再生医療現場 NOW ～使えます！御社の技術が研究現場で～、京都市リサーチパーク モノづくりの明日を考えるシンポジウム（基調講演）（2011.10.31 京都）

田畑泰彦：先端医療としての再生医療、岩手医科大学講義（2011.11.4 盛岡）

田畑泰彦：再生医療の最前線、株式会社ファーマフーズ講演会（2011.11.7 京都）

田畑泰彦：モノづくり技術からみた再生医療（再生治療、生物医学研究、創薬研究）、京都市リサーチパーク 再生医療の全体像を見わたせる分かりやすい解説講座（2011.11.8 京都）

田畑泰彦：医療機器と再生医療、京都府立医科大学講義（2011.11.9 京都）

田畑泰彦：生体吸収性ハイドロゲル粒子を用いた細胞集合体の調製、第 69 回日本化学繊維研究所講演会（2011.11.9 京都）

Tabata, Y.: Better biomaterials for engineering tissue. Days of Molecular Medicine 2011（招待講演）（2011.11.11 Hong Kong）

Tabata, Y.: Applications of Biomaterials Technology to Bio-Imaging and Intervention Fields. CMC International Radiology Symposium 2011（招待講演）（2011.11.12 Seoul）

田畑泰彦：Signal 因子とドラッグデリバリー、日本歯科大学講義（2011.11.15 東京）

田畑泰彦：モノづくり技術が支える再生医療、「しがぎん」エコビジネスフォーラム 2011 第 4 回サタデー起業塾（2011.11.19 草津）

田畑泰彦：DDS 技術からみた再生治療のフロンティア、桜井靖久名誉教授追悼シンポジウム（2011.12.2 東京）

田畑泰彦：バイオマテリアル技術を利用した再生医療、第 1 回 DDS 徐放化再生医療研究会（特別講演）（2011.12.3 東京）

田畑泰彦：分子プローブの DDS 技術、CK プロジェクト医工合同会議（2011.12.28 京都）

Yamamoto, M., Tabata, Y.: Development of functional biomaterials to modulate cell behaviors. Gao 研(浙江大学薬学研究院) 合同セミナー（2011.1.26 Hangzhou）

山本雅哉、田畑泰彦：バイオマテリアル・DDS を中心とした再生医療に必要なモノづくり。（招待講演）再生医療分野モノづくりシンポジウム（2011.2.10 京都）

山本雅哉、田畑泰彦：バイオマテリアルを基盤としたドラッグデリバリーシステム・再生医療。独立行政法人放射線医学総合研究所分子イメージング研究センターセミナー（2011.6.8 千葉）

Yamamoto, M., Toda, H., Itooka, T., Tabata, Y.: Design of hydrogels with different stiffness as a culture substrate to control cell behaviors.（招待講演）14th Asian Chemical Congress（2011. 9.5-8 Bangkok）

Yamamoto, M., Tabata, Y.: Biomaterial technologies for regeneration therapy, cell research, and drug discovery. Damrongsakkul（Chulalongkorn University セミナー）（2011.9.7 Bangkok）

山本雅哉：バイオマテリアル分野からみた再生医療の現状。（招待講演）京都市リサーチパーク 再生医療の全体像を見わたせる分かりやすい解説講座（2011.11.8 京都）

山本雅哉：人工細胞外環境としてのバイオマテリアル。（招待講演）大阪大学蛋白質研究所セミナー 幹細胞を制御する環境因子の分子基盤（2011.11.30-12.1 大阪）

山本雅哉：再生医療のためのバイオマテリアル。（招待講演）日本材料学会 第 34 回材料講習会（2011.12.2 京都）

齊藤高志、田畑泰彦：局所 hypoxia 誘導による血管新生のためのデフェロキサミン含有ゼラチンハイドロゲルの作製、第 32 回日本炎症・再生医学会（2011.6.3 京都）

Takagi, G., Miyamoto, M., Tara, S., Takagi, I., Takano, H., Yasutake, M., Tabata, Y., Mizuno, K.: Total Management of Ischemic Wound in an Era of Therapeutic Angiogenesis. The 75th Annual Science Session of Japan Circulation Society. Symposium. (2011.3.18 Yokohama)

高木 元、宮本正章、田畑泰彦、水野杏一：重症下肢虚血に対する集学的治療の紹介、第2回 East Downtown Conference（東京都墨田区医師会）（2011.7.8 東京）

高木 元、宮本正章、田畑泰彦、水野杏一：循環器医師による糖尿病治療、ノバルティス株式会社講演会（2011.7.27 東京）

高木 元、宮本正章、田畑泰彦、水野杏一：再生医療科のあゆみ、第9回東北循環器研究会（2011.9.10 仙台）

高木 元、宮本正章、田畑泰彦、水野杏一：PAD up to date 包括的治療法の紹介、飯能日高地区学術講演会（埼玉県飯能市医師会）（2011.9.15 飯能）

組織修復材料学分野 Department of Reporative Materials

分野主任 教授 岩田 博夫
Prof. Hiroo Iwata

【研究概要】

当研究分野では、病気や怪我の治療に役立つ人工材料を創り出すための研究を行っています。それらの材料は人体の中で機能したり、体外での細胞操作・分析に効力を発揮するなど、その目的と機能は様々です。当研究分野ではおもに、高分子を中心とする有機材料や、細胞や生体分子を制御・分析するための様々な技術を駆使することによって、それらの研究を進めています。このような研究を通じて、再生医療や低侵襲手術のような高度先進医療に貢献したいと考えています。

材料-生体システム間相互作用の解析

体内に人工材料を埋込むと異物を排除しようと様々な生体反応が起こります。人工血管や人工心臓などを体内で長期間機能させるには、これらの生体反応を深く理解しコントロールする必要があります。当研究室では、様々な分析手法を用いて人工材料表面で生体反応が起こる仕組みを調べています。また、病気の判定基準となる血液中のバイオマーカーを高感度で検出できる装置を開発し、患者のそばですぐに結果を出せる検査システムの確立を目指しています (図1)。

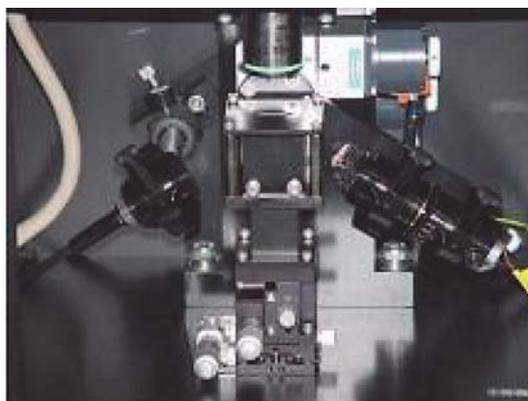


図1. 血液中のバイオマーカーを迅速・高感度計測するための装置。

細胞表面修飾とその応用

細胞移植による臓腑や中枢神経の再生医療に大きな期待が寄せられています。しかし、移植された細胞の機能を高く維持するには、細胞がレシピエントの生体防御機構からの攻撃に打ち勝たなければなりません。これには両親媒性高分子からなる薄膜によって細胞を被覆する方法が有効であることを示してきました (図2)。また、細胞の表面修飾技術を応用すれば、細胞間の接着を引き起こすことが可能です。この技術を利用することで、ES細胞やiPS細胞の分化誘導について調べることができ、再生医療への新しい知見を得ることが期待できます。

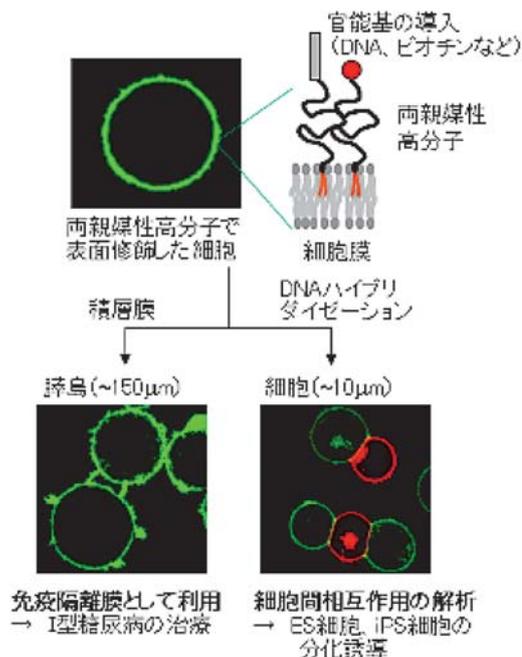


図2. 両親媒性高分子薄膜による細胞の被覆。

ES細胞/iPS細胞の凍結保存技術の確立

ES細胞やiPS細胞を利用した再生医療を確立するには、安

定した細胞供給が必要になります。当研究分野では、細胞の生存率を高く維持しながら凍結保存することに成功し、その技術の実用化に向けて研究を進めています。

血管内手術用具の開発

患者への負担の大きい外科的治療に対して、カテーテルを血管内に挿入して動脈瘤などを治療する方法（血管内治療）が注目されています。動脈瘤に詰め物をしてしまうコイル塞栓術と血管の正しい流れを確保するカバードステント留置術の二つの方法で（図3）、多様な形状をもつ動脈瘤の破裂を未然に防ぐデバイスを開発しています。これには、血液や血管表面と材料との相互作用や、材料の力学的・化学的性質を考慮したデバイス設計が求められます。

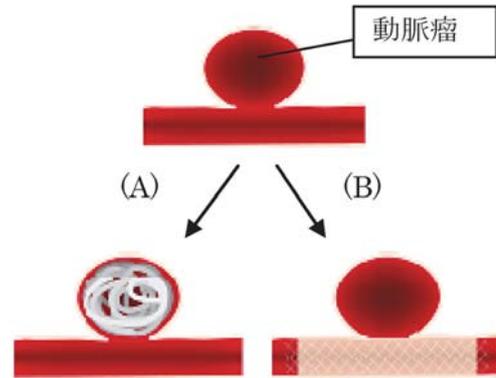


図3. (A) コイル塞栓術および (B) カバードステント留置術の模式図。

中枢神経の再生医療に向けた機能材料の設計

中枢神経疾患の一つであるパーキンソン病を、細胞移植によって治療する試みがなされています。しかし、そのような治療法を普及させるには、移植細胞源となる神経幹細胞の大量確保や、移植細胞の生着率向上を可能にする技術が確立されなくてはなりません。当研究分野では、大量の移植細胞を効率よく調製するための細胞培養デバイスの設計を行うとともに、移植細胞を保護するための蛋白質性材料の開発に取り組んでいます。これらの機能材料の構成要素には、合理的にデザインされた人工蛋白質が有用です（図4）。

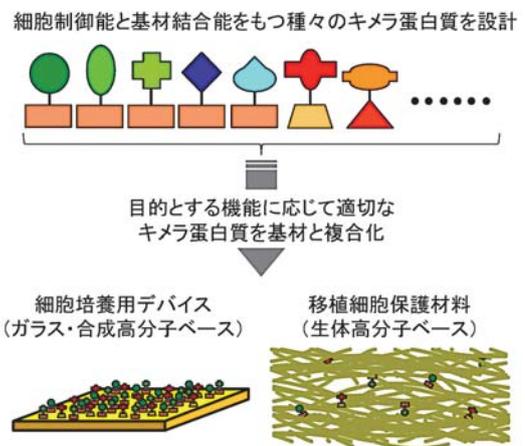


図4. キメラ蛋白質を構成要素とするデバイスおよび機能材料の設計。

細胞チップ分析技術の確立

多種類の生体分子の機能を迅速に分析するための細胞チップの開発を行っています。アルカンチオール自己組織化単分子膜のマイクロパターンをもつ基板材料を利用して多種類のDNA, RNA, 蛋白質など配列固定し、それらを同時に細胞に作用させることで、固定された分子の生物学的機能を並列分析することが可能です（図5）。細胞チップ分析法は、生物学研究のみならず、再生医療、医薬品開発、臨床検査などの様々な分野に大きなインパクトを与えるものと期待しています。

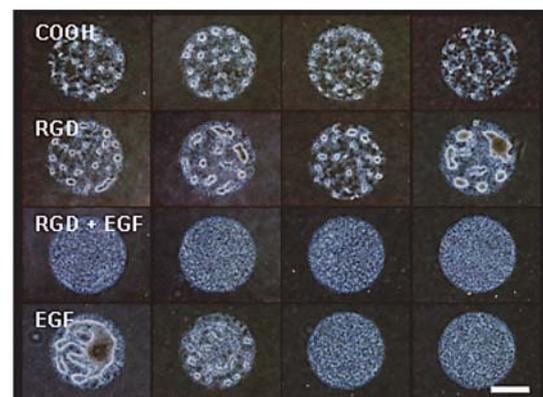


図5. 細胞チップによる蛋白質性材料のハイスループット機能アッセイの一例。

Our research group intends to develop engineered materials that contribute practically and efficiently to the advanced therapeutic interventions for the treatment of diseases and traumatic injuries. These materials are expected to exhibit diverse functions in vitro or in vivo. Fundamental and applied studies are undertaken to

realize such biomaterials, taking advantage of organic materials, namely polymeric materials and state-of-the-art techniques for analyzing and handling biomolecules and cells.

Research subjects currently undertaken in our department are listed below.

Surface chemistry of biomedical materials

Protein adsorption, complement activation, cell adhesion are involved in the initial reactions against man-made materials with living bodies. It is necessary to elucidate these mechanisms in relation to the surface properties so as to rationally design biocompatible surfaces of synthetic implants. Most of information on the biological reactions against artificial polymeric materials has been accumulated from studies with polymeric materials. However, polymer surfaces could not be assumed rigid and immobile at equilibrium. The polymer molecules in the vicinity of the surface or interface would exhibit motion and relaxation in response to the different interfacial environments. Thus, it is difficult to prepare model surfaces using polymeric materials for studies of protein adsorption and cell adhesion. Self-assembled monolayers of alkanethiols formed on a gold thin film provide well-defined model surfaces suitable for studies on interfacial phenomena and intermolecular interactions. The surface plasmon resonance technique can be applied to analyze the interfacial phenomena under water. We have been studying protein adsorption, complement activation, and cell adhesion on well-defined surfaces made of self-assembled monolayers using the surface plasmon resonance technique as well other analysis techniques highly sensitive for interfacial molecular events.

Polymeric materials for cell transplantation therapy

Islets of Langerhans have been transplanted to treat insulin-dependent diabetes patients. Adult pancreatic β cells are known to have a poor growth capacity. Islets containing β cells from cadaver donors or animals should be employed. In bioartificial pancreas, islets are encapsulated into a semi-permeable membrane and then implanted into the diabetic patients to protect them from immune rejection. The semi-permeable membrane permits permeation of oxygen and nutrient which are necessary for islet survival, but prohibits contact of islet cells with components of the host immune system. We encapsulated islets into agarose-based microbeads and induced normalization of blood glucose levels of diabetic recipient mice by implanting 1000 microencapsulated hamster islets into the peritoneal cavity.

Several research groups showed that transplantation of neural stem cells (NSCs) or NSC-derived progenitors to the site of lesions was effective for structural and functional restoration of the central nervous system. However, clinical applications of NSC further require methodological advances especially for controlling the engraftment, proliferation, migration, and differentiation of NSCs. Our approach is to construct composite biomaterials that consist of extracellular matrix (ECM) components and signaling molecules such as growth factors and cell adhesion molecules. We are employing genetic engineering to design rationally such composite biomaterials.

Cell processing technology for regenerative medicine

Cells and ECMs are important components for regenerative medicine. In recent years, many research groups

have devoted enormous efforts to establish *in vitro* culture conditions in which stem cells, such as ES cells and tissue-derived stem cells, differentiate into various functional cells. Those cells are expected to be very useful for treatment of various diseases. Many kinds of stromal cells have been used to differentiate stem cells to functional cells. However, most of stromal cells preferentially used are derived from mice. Some authorities who are in charge of regulatory issue have pointed out the difficulty to rule out the possibility that retrovirus incorporated in mouse gene will be activated and transferred to stem cells and functional cells derived from stem cells. One of our research activities is focused on the development of stromal cell free culture systems used for the induction of ES cells to various functional cells. ES cells cultured on the substrate, onto which bioactive molecules isolated from stromal cells, are immobilized effectively differentiated to dopaminergic neurons.

Conventional cell culture substrates are not always suitable for cells used for regenerative medicine. Neurons differentiated from ES cells *in vitro* are very difficult to be collected from a cell culture flask without deterioration of cell functions, because long axons from neurons are easily damaged during detachment of neural cells from the cell culture substrate. Cell sheets but not single cells are needed in some instance, such as regeneration of a skin and a mucous membrane. We have been examining a film of cellulose derivatives for a cell culture substrate. Cells cultured on it are removed by cellulose-degrading enzyme, cellulase, without damaging cells on the substrate.

Cell chips for high-throughput functional screening

Transfectional array: Functional characterization of human genes may be one of the most challengeable tasks in the post-genome era. Due to a huge number of novel genes discovered in genomics, high-throughput methods are required to express or silence in parallel thousands of genes in living cells. The objective of our study is to fabricate transfectional arrays through patterning of self-assembled monolayers on a gold substrate and the subsequent site-specific spotting of different expression vectors or short interfering RNAs.

Antibody array: Recent progress in stem cell research provides us with promising options of cell sources for use in tissue engineering. However, insufficient knowledge about specific surface antigens expressed on most of stem cells limits their application in regenerative medicine. To solve this problem, we developed a high-throughput analytical method for typing multiple membrane proteins. Our method is based on solid-phase cytometry using an antibody array prepared on a patterned alkanethiol monolayer.

ECM array: Arrays that display a panel of biologically-active substances on a flat plate are promising due to their potential use in functional screening over multiple samples in a parallel fashion. We developed cell-based arrays that displayed combinatorially various ECM-growth factor composites and used them for parallel and rapid screening biomaterials that serve to maintain NSCs and direct the differentiation of NSCs.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

岩田 博夫, 桜井 研吾, 寺村 裕治: DNA のパターン描画による細胞アレイの作成. 日本化学繊維研究所講演集, 68, 89-98 (2011)

- Murakami T., Arima Y., Toda M., Takiguchi H., Iwata H.: Effect of dielectric spacer thickness on signal intensity of surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. *Anal. Biochem.*, **421**, 632-639 (2012).
- Egawa E. Y., Kato K., Hiraoka H., Nakaji-Hirabayashi T., Iwata H.: Enhanced proliferation of neural stem cells in a collagen hydrogel incorporating engineered epidermal growth factor. *Biomaterials*, **32**, 4737-4743 (2011).
- Konagaya S, Kato K, Nakaji-Hirabayashi T, Iwata H.: Design of culture substrates for large-scale expansion of neural stem cells. *Biomaterials*, **32**, 992-1001 (2011)
- Konagaya S, Kato K, Nakaji-Hirabayashi T, Arima Y, Iwata H. Array-based functional screening of growth factors toward optimizing neural stem cell microenvironments. *Biomaterials*, **32**, 5015-5022 (2011)
- Takemoto, N., Teramura, Y., and Iwata, H.: Islet surface modification with urokinase through DNA hybridization. *Bioconjugate Chem.*, **22**, 673-678 (2011)
- Sakurai K, Teramura Y, Iwata H.: Cells immobilized on patterns printed in DNA by an inkjet printer. *Biomaterials*, **32** (14), 3596-3602 (2011)
- Chen H, Teramura Y, Iwata H: Co-immobilization of urokinase and thrombomodulin on islet surfaces by poly (ethylene glycol) -conjugated phospholipid. *J. Control. Release.* **150**, 229-34 (2011)
- Chen H, Teramura Y, Iwata H: Immobilization of anticoagulant-loaded liposomes on cell surfaces by DNA hybridization. *Biomaterials*. **32**, 7971-7 (2011)
- Luan N. M., Teramura Y., Iwata H.: Layer-by-layer co-immobilization of soluble complement receptor 1 and heparin on islets. *Biomaterials* **32** (27), 6487-6492 (2011)
- Luan N. M., Teramura Y., Iwata H.: Immobilization of soluble complement receptor 1 on islets. *Biomaterials*, **32** (20), 4539-4545 (2011)
- 河野恵子, 滝口裕実, 桑島 修一郎, 岩田博夫, 小寺秀俊, 和佐清孝: 3次元ナノテクスチャー表面をもつファイア単結晶基板上の表面プラズモン共鳴. *表面科学*, **32** (1), 45-51 (2011)
- Teramura Y., Iwata H.: Improvement of graft survival by surface modification with poly (ethylene glycol) -lipid and urokinase in intraportal islet transplantation. *Transplantation* **91** (3), 271-2781 (2011)
- Nishigaki T., Teramura Y., Nasu A., Takada K., Toguchida J., Iwata H.: Highly efficient cryopreservation of human induced pluripotent stem cells using a dimethyl sulfoxide-free solution. *Int. J. Dev. Biol.* **55** (3), 305-311 (2011)
- Hisano N., Iwata H., Teramura Y., Chen H., Ikada Y.: Kinetic analyses of disulfide formation between thiol groups attached to linear poly (acrylamide). *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **49** (3), 671-679 (2011)

2) 著書

- K. Kato, H. Iwata: High-throughput analyses of gene functions on a cell chip by electroporation, "Methods in Molecular Biology; Cell-Based Microarrays: Methods and Protocols" (Ella Palmer, ed., Springer, Heidelberg, Germany) Vol. 706, pp.181-190 (2011).

3) 総説

- Arima Y., Toda M., Iwata H.: Surface plasmon resonance in monitoring of complement activation on biomaterials. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **63**, 988-999 (2011).

Arima Y., Kato K., Teramura Y., Iwata H.: Design of biointerfaces for regenerative medicine. *Adv. Polym. Sci.*, 247, 167-200 (2012).

有馬祐介, 寺村裕治, 岩田博夫: 表面修飾による生体反応のコントロール, *高分子*, 717, 733-735 (2011).

竹本直紘, 岩田博夫: インスリン分泌細胞の機能維持を目指したバイオ人工膜-細胞表面修飾. *医学のあゆみ*, 238, 1201-1206 (2011).

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

寺村裕治, 岩田博夫: 再生医療のための細胞表面修飾. 第26回生体・生理工学シンポジウム (2011.9.20 草津)

Kato K., Konagaya S., Nakaji-Hirabayashi T., Iwata H.: Growth factor-immobilized culture substrates for the selective expansion of human neural progenitor cells. The 2nd Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine (2011.2.24-25, Taipei)

Arima Y., Murakami T., Toda M., Iwata H.: Highly sensitive detection of tumor markers using surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. The 2nd Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine (2011.2.24-25, Taipei)

有馬祐介, 岩田博夫: 自己組織化単分子膜への細胞接着性タンパク質吸着および細胞接着, 第60回 高分子学会年次大会 (2011.5.25-27 大阪)

有馬祐介, 岩田博夫: 表面官能基の異なる自己組織化単分子膜へのフィブロネクチン/ビトロネクチンの吸着および細胞接着, 第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)

戸田満秋, 有馬祐介, 岩田博夫: 表面プラズモン場励起蛍光法を用いたバイオマーカーの高感度検出の試み, 第21回バイオ・高分子シンポジウム (2011.7.25-26 大阪)

Toda M., Arima Y., Iwata H.: Quantitative Measurement of Alpha-Fetoprotein and Prostate Specific Antigen using Surface Plasmon Field Enhanced Fluorescence Spectroscopy. 3rd Asian Biomaterials Congress (2011.9.15-17, Korea)

Chen H., Teramura Y., Iwata H.: Immobilization of liposomes on the islet surface for extended release of anticoagulant. 第60回高分子学会年次大会 (2011.5.25-27, Osaka)

陳 顯, 寺村裕治, 岩田博夫: DNA ハイブリダイゼーションにより膵島表面に固定されたリポソームからの抗凝固剤徐放. 第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)

小長谷周平, 加藤功一, 小村 嵩, 岩田博夫. iPS細胞から誘導した神経幹/前駆細胞を増幅するための培養基材. 第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)

小長谷周平, 加藤功一, 小村 嵩, 岩田博夫. 人工多能性幹細胞から分化誘導した神経前駆細胞を増幅するための培養基材の設計. 日本バイオマテリアル学会 北陸若手研究発表会 準備会 (2011.12.22 福井)

Takemoto N., Teramura Y., and Iwata H.: Formation of islet and Sertoli cells complex by DNA hybridization. 第60回高分子学会年次大会, (2011.5.25-27 大阪)

Takemoto N., Teramura Y., and Iwata H.: Cell Aggregate formation of islets and Sertoli cells. 13th World Congress of IPITA International Pancreas and Islet Transplant Association, (2011.6.1-4 Prague)

滝井健人, 竹本直紘, 岩田博夫: 膵ランゲルハンス氏島細胞とセルトリ細胞の複合細胞凝集体の形成. 第33回日本

バイオマテリアル学会大会, (2011.11.21-22 京都)

櫻井研吾, 寺村裕治, 岩田博夫: DNA ハイブリダイゼーションによる細胞の固定化と接着挙動解析、日本バイオマテリアル学会 第6回関西若手研究発表会 (2011.8.12 大阪)

櫻井研吾, 寺村裕治, 岩田博夫: DNA ハイブリダイゼーションによる細胞アレイの作製と接着挙動解析、第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)

櫻井研吾, 寺村裕治, 岩田博夫: ssDNA-PEG 脂質が誘導する細胞の配列とその接着挙動、日本バイオマテリアル学会 北陸若手研究発表会準備会 (2011.12.22 福井)

古田雅典, 有馬祐介, 岩田博夫: カルボキシメチル化ポリビニルアルコールを用いたイムノアッセイ、第60回高分子学会年次大会 (2011.5.25-27 大阪)

古田雅典, 有馬祐介, 岩田博夫: カルボキシメチル化ポリビニルアルコールを用いたイムノアッセイ、日本バイオマテリアル学会第6回関西若手研究発表会 (2011.8.12 大阪)

古田雅典, 有馬祐介, 岩田博夫: カルボキシメチル化ポリビニルアルコールを用いたイムノアッセイ、第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)

古田雅典, 有馬祐介, 岩田博夫: 表面プラズモン共鳴を用いたイムノアッセイの高感度化、日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会準備会 (2011.12.22 福井)

2) 講演・シンポジウム

岩田博夫: 脳血管内治療用デバイスの開発 - ニーズ、シーズ、思いつき - . 第41回近畿脳神経血管内手術法ワークショップ (2011. 1. 9 鳥羽) (特別講演)

Iwata H.: Cell surface modification with polymers for biomedical studies. The 2nd Taiwan-Japan Symposium on nanomedicine (2011.2.25 Taiwan)

岩田博夫: 細胞表面の修飾とその細胞療法への応用. 日本バイオマテリアル学会九州ブロックキックオフシンポジウム (2011. 3.23 福岡)

Iwata H.: Cell surface modification for prolongation of islet graft survival. 13th World Congress of IPITA International Pancreas and Islet Transplant Association, (2011.6.4 Prague) (招待講演)

Iwata H.: Cell surface modification with polymers for biomedical studies. The 2nd International Symposium on Recent Advances in Sciences (2011.10. 4 Taiwan) (招待講演)

Iwata H.: Cell Surface Modification with Polymers for Biomedical Studies. 4th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry (2011.10. 9 広島) (招待講演)

岩田博夫: 医用高分子 ——生体適合性について. KIPS 高分子講座 (2011.10.19 京都)

岩田博夫: 外見を取り繕う - 表面修飾 - . 第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.22 京都) (特別講演)

岩田博夫: バイオマテリアルから再生医療へ. 日本バイオマテリアル学会 北陸若手研究発表会 (2011.12.22 福井) (基調講演)

Kato K., Konagaya S., Nakaji-Hirabayashi T., Iwata H.: Modulation of neural stem cells on culture substrates with surface-anchored growth factors. 2011 Annual Meeting of Formosa Association of Regenerative Medicine (2011.2.26 Taiwan) (招待講演)

有馬祐介: 表面プラズモン共鳴を用いたバイオセンシング - バイオマテリアル研究および臨床検査への応用 -, 有機発光デバイスの発光の増強方法を開拓する II (2011.3.7 京都) (招待講演)

生体物性学分野（国内客員） Department of Mechanical Properties

客員教授 鳥光 慶一

Visiting Prof. Keiichi Torimitsu

【研究概要】

生体における情報伝達機能の解明とその利用を目標に、神経関連の受容体タンパク質を中心に原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて構造と機能の相関性について解明を進めており、バイオミメティックなインターフェイスデバイスの創製につなげることが目標である。

研究は、(1) 液中高速 AFM による受容体タンパク質の動的構造の観察と機能相関 (2) PEDOT-PSS を用いた生体適合性の高い電極による *in vivo* 神経活動計測 (3) ナノキャビティ構造・脂質膜及び受容体タンパク質を用いたモデルシナプス構築 (4) 神経幹細胞の分化と電気計測について研究を進めた。一方、本年度もオックスフォード大を始めとする海外研究機関との共同研究にも努めた。

(1) 液中高速 AFM による受容体タンパク質の動的構造観察

溶液中での高速 AFM の利用は、生理条件下における受容体タンパク質のリガンド応答等、ナノ構造の変化をリアルタイムで観察できる有効な手段である。特に、細胞外ドメインにおける Dimer-dimer での応答様式や、動き回る様子など、構造変化と機能との相関性について解析を進めることで、情報伝達/処理の仕組みを理解し、デバイス構築につなげるように研究を進めている。さらに、応答様式を明らかにするため、遺伝子改変により、細胞外ドメインを変化させた受容体についての解析を進めている。

(2) PEDOT-PSS を用いた生体適合性の高い電極による *in vivo* 神経活動計測

導電性高分子 PEDOT-PSS は生体適合性が高く、電極と併せて使用することで長期間（数ヶ月以上）に渡る神経活動計測/刺激を可能にしている。本年度、金属電極へのコーティングや、繊維と組み合わせたフレキシブル電極を作製し、コラーゲン電極を含め *in vivo* 実験を行った。計測のワイヤレス化を進め、神経活動計測/刺激に成功し、埋込測定的基础検討が可能となった。

(3) ナノキャビティ構造・脂質膜を用いたモデルシナプス構築

基板上に大きさが数百ナノメートルのナノキャビティ構造を作製し、その上に脂質膜をかぶせることでナノキャビティの閉空間を作製、チャンネルタンパク質を埋込むことで、キャビティ内外への分子輸送に取り組んだ。受容体タンパク質は、まだであるが、キャビティ内の電極を用いた電気計測によるイオン動態について準備を進めている。

(4) 神経幹細胞の分化と電気計測

神経幹細胞の育成状態、分化の評価系としての電気計測の可能性について検討を進めた。EGF 制御と MEA 計測を組み合わせることで、細胞状態の電氣的把握に取り組み、評価系としての有効性を検討した。

Our interest is to understand the information processing mechanism in the brain, and to develop devices that can communicate with the brain using receptor proteins. The key idea behind this research is the fusion of a receptor conformation/function and a synaptic connection/function. We are studying the conformational changes induced by neurotransmitter reception to enable us to understand the relationship between conformational

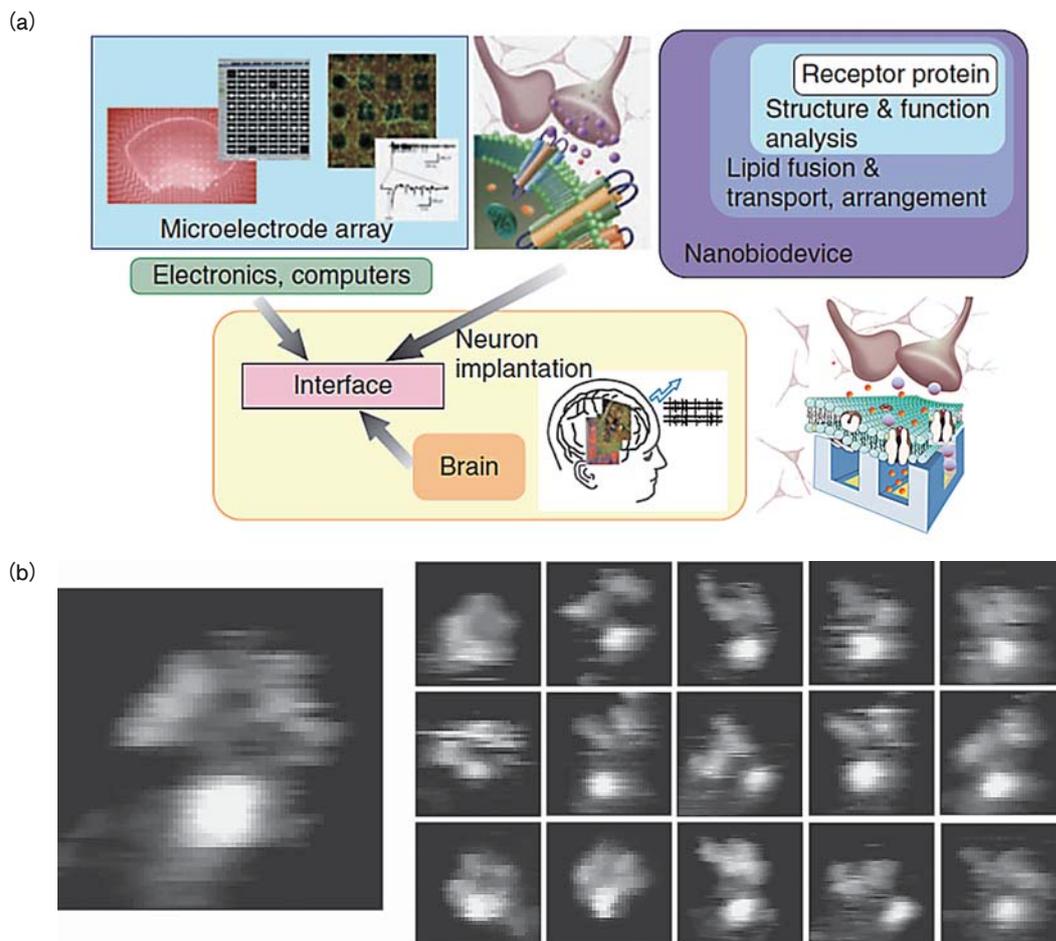


図 受容体タンパク質を使った研究目標 (a) と、NMDA 受容体の液中 AFM による観察 (原著論文 (2) より引用) (b)

change and function.

Here I describe our study of (1) the conformational analysis of purified/reconstituted receptor protein by AFM, (2) the in vivo measurement of neural activity using a PEDOT-PSS modified electrode, (3) a bio-mimetic synapse using a lipid bilayer with a nano-cavity, and (4) the differentiation and electro-activity of neurostem cells. Some studies were carried out in collaboration with foreign universities, such as the University of Oxford and the University of Adelaide

(1) Conformational analysis of purified/reconstituted receptor protein using AFM

Although we know that receptor protein is very important as regards information processing, it is extremely difficult to visualize the conformational changes in a receptor under physiological conditions. We have succeeded in visualizing those of NMDA and AMPA receptors under physiological conditions in real time by using high-speed atomic force microscopy. The mechanism of the receptor responses to ligands was investigated

As a dimer-dimer like interaction was observed in the extracellular domain, further studies will be required if we are to understand the mechanism of the ligand binding response. We collaborated with Oxford Univ. on the analysis of AMPA receptors and determined the domain effect on receptor localization.

(2) In vivo measurement of neural activity using PEDOT-PSS modified electrode

Constructing an interface between neurons and electrical instruments is one of our goals as regards

developing tools for communicating with the brain. We used conducting polymer hydrogels PEDOT-PSS to modify the electrode in order to achieve better biocompatibility and low impedance. The major challenges are to obtain a longer connection under in vivo conditions and to realize wireless capability with a miniaturized device for an implantable interface. Preliminary results have indicated successful recordings in the rat nervous system.

(3) Bio-mimetic synapse using lipid bilayer with nano-cavity

A nano-cavity accommodating an electrode was coated with a lipid bilayer containing protein. The structure is very close to that of postsynaptic cells (a biomimetic post-synapse). At this stage we could only introduce a model protein such as gramicidin into the lipid bilayer and observe a fluorescence change. We are planning to use a neurotransmitter receptor to measure the electrical responses.

(4) Differentiation and electro-activity of neurostem cells

We tried to monitor the neurostem cell differentiation by using MEA. A preliminary measurement comparing the neurostem cell development with and without EGF showed that electro-evaluation is effective in relation to neurostem development.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

原著論文

- (1) Y. Kashimura, K. Furukawa and K. Torimitsu, Electrostatic control of lipid bilayer self-spreading using a nanogap gate on a solid support, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 6118-6121, 2011
- (2) Y. Shinozaki, K. Sumitomo, A. Tanaka, N. Kasai, and K. Torimitsu, Examination of ion channel protein orientation in supported lipid bilayers, *Appl. Phys. Express*, **4**, 107001-1-3, 2011
- (3) K. Sumitomo, A. McAllister, Y. Tamba, Y. Kashimura, A. Tanaka, Y. Shinozaki, K. Torimitsu, Ca²⁺ ion transport through channels formed by α -hemolysin analyzed using a microwell array on a Si substrate, *Biosensors and Bioelectronics*, **31**, 445-450, 2012
- (4) H. Nakashima, M. Higgins, C. O'Connell, K. Torimitsu, G. Wallace, Liquid deposition patterning of conducting polymer ink onto hard and soft flexible substrates via Dip-Pen nanolithography, *Langmuir*, **28**, 804-811, 2012

◆ 学会等の発表 ◆

学会・研究会発表

- N. Kasai, M. Seyama, Y. Iwasaki, S. Inoue, T. Horiuchi, T. Miura, J. Takahashi, E. Tamechika, K. Torimitsu, Functional examination of GPCRs using an SPR sensor, *Biophysical Society 55th Annual Meeting*, Baltimore, USA, 2011.3.5-3.9
- K. Sumitomo, Arianna McAllister, Y. Tamba, Y. Shinozaki and K. Torimitsu, Analysis of ion channel activities in lipid bilayers suspended over microwells on Si substrates, *Biophysical Society 55th Annual Meeting*, Baltimore, USA, 2011.3.5-3.9
- C. S. Ramanujan, N. Kasai, J. Baranovic, K. Torimitsu and J. F. Ryan, High speed AFM imaging of glutamate

receptor activation, *Biophysical Society 55th Annual Meeting*, Baltimore, USA, 2011.3.5-3.9

J. Baranovic, C.S. Ramanujan, N. Kasai, D. R. Madden, K. Torimitsu and J. F. Ryan, Structural and functional characterization of reconstituted GluA2 tetramers, *Biophysical Society 55th Annual Meeting*, Baltimore, USA, 2011.3.5-3.9

講演・シンポジウム

K. Torimitsu, Fast scanning AFM of ionotropic receptors, *Biophysical Society 55th Annual Meeting*, Baltimore, USA, 2011.3.5-3.9 (招待講演)

生体物性学分野（国内客員） Department of Mechanical Properties

客員教授 佐藤 正明

Visiting Prof. Masaaki Sato

【研究概要】

力学的刺激を受けた細胞が形態的および機能的に応答する機構を解明すべく研究を行っている。血管内皮細胞は生体内において血液の流れによるせん断応力、血管壁の変形による引張・圧縮応力、血圧による静水圧を同時に受けて機能している。流れによるせん断応力については世界的にも良く研究されているが、未だ不明の点も多い。特に力を感じる候補部位と考えられている細胞間接着部位、焦点接着斑およびストレスファイバーなどに焦点を当て、シグナル伝達経路やストレスファイバーの収縮機構の解明に力を注いでいる。本報告では、これらの点を主に紹介する。細胞の力学応答機構に関しては、安達泰治教授との共同研究を促進し、論文発表も行った。

この他、血管内留置用ステントの設計理論の開発、大動脈瘤の破裂機構の解明、脊髄のバイオメカニクス解析なども併せて行ってきた。

(1) 細胞の初期配置とせん断応力に対する応答性

せん断応力にさらされた内皮細胞は流れ方向に伸長および配向するが、その過程は細胞の初期配置に応じて異なることが知られている。形態変化に重要な役割を果たす Rac1 活性や RhoA 活性は、形態変化過程において動的に変化する。そこで我々はせん断応力が負荷された内皮細胞において生じる Rac1 および RhoA 活性の時間変化を測定し、初期配向方向に注目して解析を行った。その結果、図 1 に示すように、流れ方向に対し予め水平に配向した細胞と垂直に配向した細胞では異なる活性変化を示すことが明らかになった。水平方向に配向した細胞では上流側で RhoA 活性上昇が、下流側で Rac1 活性上昇がそれぞれ生じ、さらに細胞の下流側で顕著な葉状仮足の形成が観察

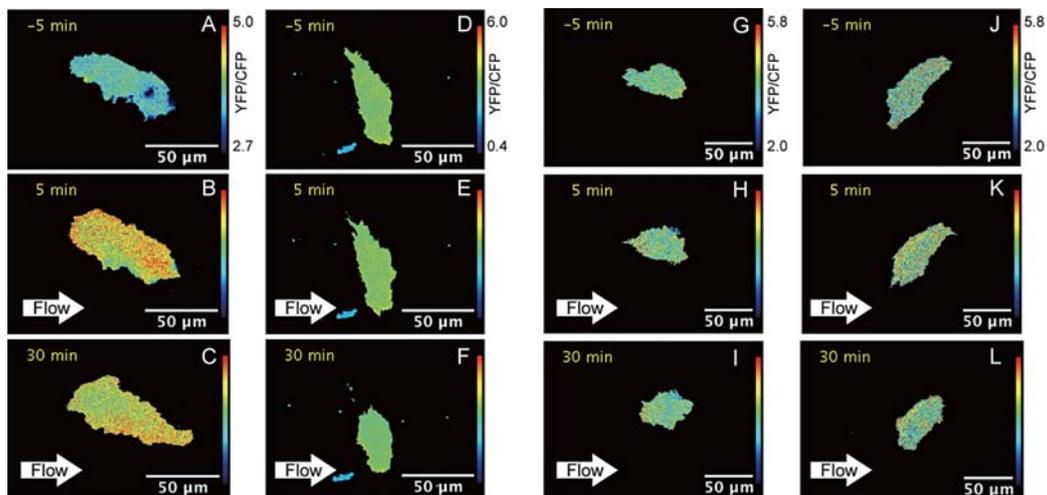


図 1 代表的な FRET 画像。(A-F) Raichu-Rac1、(G-L) Raichu-RhoA。(A-C, G-I) 流れに平行配置、(D-F, J-L) 流れに直交配置。暖色ほど高い活性状態を表す。

Fig. 1 Representative time-lapse images of FRET observation for (A-F) Raichu-Rac1 and (G-L) Raichu-RhoA. (A-C, G-I) "parallel" and (D-F, J-L) "perpendicular" cells. Warmer color indicates higher activity of Rac1 or RhoA.

された。一方、垂直方向に配向した細胞では上流部での RhoA 活性上昇のみが生じ、Rac1 活性は変化しなかった。さらにアクチン細胞骨格を脱重合させ同様の実験を行ったところ、下流側でのみ生じた Rac1 活性上昇が細胞全体で生じるようになった。また、RhoA 活性上昇が著しく抑制されることを明らかにした。これらの結果から、細胞の配向方向がせん断応力負荷によって生じる局所的な Rac1 および RhoA 活性上昇に影響を与えることが明らかになり、この現象はアクチン細胞骨格を介した細胞内の力学伝達によって生じる可能性が示唆された。

(2) ミオシン軽鎖の脱リン酸化に依存しないストレスファイバーの分解機構

非筋型の細胞が力を受けて形態的に適応する過程で、アクチンストレスファイバーは動的に形態的变化を起こす。例えば、細胞が一方向に収縮による力刺激を受けた場合、収縮方向に配向していたストレスファイバーは速度依存性に、また選択的に分解されることが知られているが、その機構については不明である。われわれは MgATP によるミオシンの架橋サイクルがいかにストレスファイバーの分解に関与しているかをまず調べた。生理的な範囲の MgATP の濃度（以下 [MgATP] と表記）において、ストレスファイバーは収縮を誘発される。しかしながら、図 2 に示すようにその生理的な濃度よりも少し高い [MgATP] では、ストレスファイバー内のアクチンの周期的

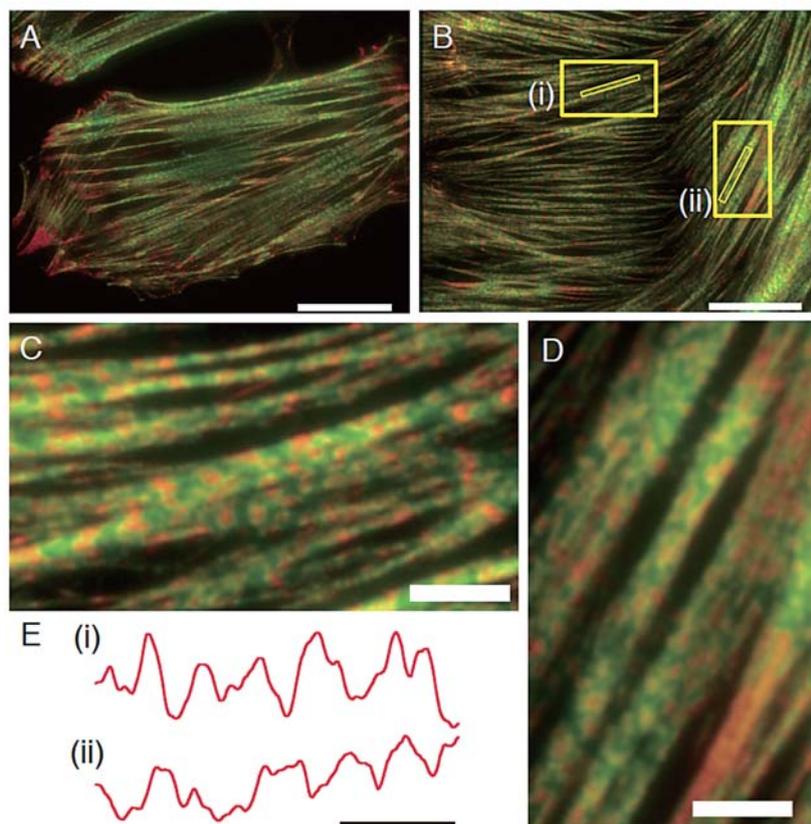


図 2 ストレスファイバー内のサルコメア構造。(A, B): 細胞内のストレスファイバー。緑はアクチン、赤は α -アクチニン。(C, D): それぞれ (B) 中の (i)、(ii) の拡大図を示す。(C) ではアクチンと α -アクチニンが規則的に配列しているのに対し、(D) では不規則な状態であることがわかる。それぞれのストレスファイバーの α -アクチニンの染色程度をグラフ化したのが (E) である。図中のバーは、(A, B) では 20 μ m、(C-E) では 4 μ m を示す。

Fig. 2 Characterization of sarcomere-like structures in SFs. (A, B): SFs in cells (A) and de-roofed cells (B) were dual-labeled with actin-binding phalloidin (green) and anti- α -actinin (red). (C, D): Some SFs displayed relatively regular striations along the long axis (C, magnified view of (i) in B containing apparently thin fibers), while in the others patches assessed by anti- α -actinin were non-uniform across their width (D, (ii) in B containing relatively thick fibers). (E) Intensity profiles of anti- α -actinin staining along the lengths of two representative SFs indicate that peak-to-peak distance was on the order of 1 μ m in (i) of B, whereas irregular distances were observed even along the long axis in (ii). Bars, A and B, 20 μ m; C-E, 4 μ m.

なパターンが線維に沿って現れるが、数秒以内に長軸方向にランダムに分散した。その分散したパターンの長さはストレスファイバーのサルコメア長とほぼ同じであった。これらの実験結果は、MgATPに結合した非筋型ミオシンIIは、サルコメア構造を構成している個々のアクチンフィラメントから分離し、その結果としてアクチンが脱重合したものではなく、むしろ物理的に結合が外れ、分解されたものであることを示唆している。この急速なストレスファイバーの分解は、ミオシン軽鎖の脱リン酸化によらず起こっていることがわかる。アクチンとミオシンの相互作用に関して、[MgATP]の上昇は、機能的にはアクチンとミオシンの架橋数の減少と等価であると考えられる。ミオシンに対する荷重負荷によって、アクチンとミオシンの架橋状態が減少することが知られている。以上の点から、アクチンとミオシンの架橋数を減少させることによって、細胞の一方方向への収縮によって誘発されるストレスファイバーの急速でかつ方向依存的な分解が促進されることが説明できると考えている。

Studies in our laboratory have been carried out to elucidate the mechanosensing mechanisms of morphological and functional changes of cells exposed to mechanical forces. Vascular endothelial cells located at the innermost layer of vessel wall are always exposed to shear stress by blood flow, to tensile/compressive stress by vessel deformation and to hydrostatic pressure by blood pressure. Although endothelial cells have been well investigated from the point of view of mechanobiology by many researchers, the details of the mechanisms are not clear yet. We are focusing on the roles of cell-cell junction, focal adhesion and stress fiber as the candidates of mechanosensor in views of signal transduction and force transmission through stress fiber. In this report, I mainly introduce the results of these research areas. I have had important collaborations with Professor T. Adachi in this mechanosensing field.

In addition, we have developed the design theory for intravascular stent, and analyzed the rupture mechanism of aortic aneurysm and the deformation of spinal cord from the point of view of biomechanics.

(1) Initial Orientation of Endothelial Cell and the Response to Fluid Shear Stress

Vascular endothelial cells (ECs) exposed to fluid shear stress (FSS) become elongated and aligned to the direction of flow. However, the process of morphological change in individual cells is different depending of their initial shape. Rac1 and RhoA, members of the family of Rho GTPases, play important roles in cellular morphological changes but are thought to be activated differently in the process. Here, we measured changes in Rac1 and RhoA activities with a focus on the effect of cell orientation when exposed to FSS as shown in Fig.1. In ECs initially oriented parallel to the direction of flow, RhoA and Rac1 were activated primarily in the upstream and the downstream regions of cells, respectively, accompanied by the formation of lamellipodia in the direction of flow. On the other hand, in cells oriented perpendicular to the direction of flow, FSS caused RhoA activation in the upstream region but did not change Rac1 activity. Furthermore, treatment with cytochalasin D inhibited the localization of Rac1 activation and suppressed RhoA activation by FSS. These results indicate that cell orientation affects the local activation of Rac1 and RhoA when induced by forces transmitted through the actin cytoskeleton under a FSS condition.

(2) Disassembly Mechanism of Actin Stress Fiber Induced in Different Way from Myosin Light Chain Dephosphorylation

Dynamic remodelling of actin stress fibers (SFs) allows non-muscle cells to adapt to applied forces such as uniaxial cell shortening. However, the mechanism underlying rapid and selective disassembly of SFs oriented in the direction of shortening remains to be elucidated. Here, we investigated how myosin crossbridge cycling induced by MgATP is associated with SF disassembly. Moderate concentrations of MgATP, or [MgATP], induced SF contraction. Meanwhile, at [MgATP] slightly higher than the physiological level, periodic actin patterns emerged along the length of SFs and dispersed within seconds as shown in Fig.2. The actin fragments were diverse in length, but comparable to those in characteristic sarcomeric units of SFs. These results suggest that MgATP-bound non-muscle myosin II dissociates from the individual actin filaments that constitute the sarcomeric units, resulting in unbundling-induced disassembly rather than end-to-end actin depolymerization. This rapid SF disassembly occurred independent of dephosphorylation of myosin light chain. In terms of effects on actin-myosin interactions, a rise in [MgATP] is functionally equivalent to a temporal decrease in the total number of actin-myosin crossbridges. Actin-myosin crossbridges are known to be reduced by an assisting load on myosin. Thus, the present study suggests that reducing the number of actin-myosin crossbridges promotes rapid and orientation-dependent disassembly of SFs after cell shortening.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Nishio, K., Ueki, Y., Sakamoto, N., Sato, M.: Effect of initial orientation of vascular endothelial cells on activation of RhoGTPases induced by fluid shear stress. *Cell. Molec. Bioeng.* 4:160-168 (2011)
- Sugita, S., Adachi, T., Ueki, Y., Sato, M.: A novel method for measuring tension generated in stress fibers by applying external forces. *Biophys. J.* 101:53-60 (2011)
- Ozawa, H., Matsumoto, T., Ohashi, T., Sato, M., Itoi, E.: Stretch along the craniocaudal axis improves shape recoverability of the spinal cord. *J. Biomech.* 44:2313-2315 (2011)
- Matsui, T. S., Kaunas, R., Kanzaki, M., Sato, M., Deguchi, S.: Nonmuscle myosin II induces disassembly of actin stress fibers independently of myosin light chain dephosphorylation. *Interface Focus* 1:754-766 (2011)
- Matsumoto, T., Yamamoto, M., Seo, S., Sato, J., Kato, Y., Sato, M.: Effects of hypertension on morphological, contractile and mechanical properties of rat aortic smooth muscle cells. *Cell. Molec. Bioeng.* 4:340-347 (2011)
- Huang, W-J., Sakamoto, N., Hanamura, K., Miyazawa, R., Sato, M.: Role of intercellular junctions in the redistribution of focal adhesions and orientation of vascular endothelial cells exposed to cyclic stretch. *Cell. Molec. Bioeng.* 4:368-378 (2011)
- Oya, K., Sakamoto, N., Ohashi, T., Sato, M.: Combined stimulation with cyclic stretching and hypoxia increases production of matrix metalloproteinase-9 and cytokines by macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 412:678-682 (2011)
- Uda, Y., Poh, Y-C., Chowdhury, F., Wu, D.C., Tanaka, T.S., Sato, M., Wang, N.: Force via integrins but not cadherins

- decreases Oct3/4 expression in embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **415**:396-400 (2011)
- Sakamoto, N., Kiuchi, T., Sato, M.: Development of an endothelial-smooth muscle cell coculture model using phenotype-controlled smooth muscle cells. *Ann. Biomed. Eng.* **39**:2750-2758 (2011)
- Yoshino, D., Sato, M.: Design method of self-expanding stent suitable for diverse clinical manifestation based on mechanical properties. *Cardiovasc. Eng. Tech.* (in press)
- Yoshino, D., Sato, M., Inoue, K.: Estimation of force on vascular wall caused by insertion of self-expanding stents. *Proc. Inst. Mech. Eng., Part H, J. Eng. Med.* (in press).
- Ohashi, K., Fujiwara, S., Watanabe, T., Kiuchi, T., Sato, M., Mizuno, K.: LIM-kinase-mediated cofilin phosphorylation decelerates actin retrograde flow in lamellipodia. *J. Biol. Chem.* (in press)
- Deguchi, S., Matsui, T. S., Sato, M.: Simultaneous contraction and buckling of stress fibers in individual cells. *J. Cell. Biochem.* (in press)
- Sugita, S., Matsumoto, T., Ohashi, T., Kumagai, K., Akimoto, H., Tabayashi, K., Sato, M.: Evaluation of rupture properties of thoracic aortic aneurysms in a pressure-imposed test for rupture risk estimation. *Cardiovasc. Eng. Tech.* (in press).

2) 総説・著書

- Long, M., Sato, M., Lim, C.T., Wu, J., Adachi, T., Inoue, Y.: Advances in experiments and modeling in micro- and nano-biomechanics - A mini review. *Cell. Molec. Bioeng.* **4**:327-339 (2011)
- Ohashi, T., Sato, M.: Chapter 23: Endothelial cell responses to fluid shear stress: From Methodology to Applications, in "Single and two-Phase Flows on Chemical and Biomedical Engineering", Bentham e Books (in press)
- Yoshino, D., Sato, M.: Design and evaluation of self-expanding stents suitable for diverse clinical manifestation based on mechanical engineering. *InTech* (in press)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Ohashi, K., Abiko, H., Tsuji, T., Naotsuka, M., Hiataru, R., Sakamoto, N., Sato, M., Mizuno, K.: Identification of Rho-GEFs that are involved in mechanotransduction of vascular endothelial cells. The 6th International Symposium on Biomechanics in Vascular Biology and Cardiovascular Disease (2011.4.14-15 Rotterdam)
- 小澤浩司, 坂元尚哉, 嶺岸由佳, 佐藤正明, 中村豪, 日下部隆, 相澤俊峰, 井樋栄二: 頸髄症における髄内応力からみた頸椎アライメントと除圧効果の関係. 第40回日本脊椎脊髄病学会 (2011.4.21-23 東京)
- 大橋俊朗, 田中綾一, 佐藤正明: Simultaneous measurement of morphology and traction forces of sheared endothelial cells. 第50回日本生体医工学会大会 (2011.4.29-5.1 東京)
- 坂元尚哉, 韓笑波, 佐藤正明: 空間的せん断応力勾配負荷による内皮細胞間接着部のチロシンリン酸化. 第50回日本生体医工学会大会 (2011.4.29-5.1 東京)
- 阿武俊郎, 坂元尚哉, 佐藤正明: PI3K 活性阻害内皮細胞のせん断応力環境下における仮足形成の定量解析. 第50回日本生体医工学会大会 (2011.4.29-5.1 東京)
- 西尾和真, 植木洋輔, 坂元尚哉, 佐藤正明: せん断応力負荷による内皮細胞内 RhoGTPase 活性変化に対して初期

- 形態が及ぼす影響. 第50回日本生体医工学会大会 (2011.4.29-5.1 東京)
- 酒井康夫, 佐藤正明, 沼田徳暁: コラーゲン・トリペプチドの変形性膝関節症 (OA) および軟骨細胞に対する効果. 第65回日本栄養・食糧学会大会 (2011.5.13-15 東京)
- 大橋俊朗, 田中綾一, 前田英次郎, 佐藤正明: マイクロピラーデバイスによる流れ負荷血管内皮細胞の牽引力計測. 第34回日本バイオレオロジー学会年会 (2011.6.3-4 大阪)
- 出口真次, 松井翼, 佐藤正明: 細胞張力ホメオスタシスの分子メカニズムに関する研究. 2011年生物物理学会・東北支部講演会 (2011.6.17 仙台)
- Sakamoto, N., Han, X-B., Sato, M.: Response of vascular endothelial cells to spatial gradient of fluid shear stress, 1st Annual World Congress of Molecular & Cell Biology (2011.8.6-8 Beijing)
- Deguchi, S., Matsui, T.S., Kaunas, R., Sato, M.: Nonmuscle myosin II-based regulation of cellular tensional homeostasis. 第49回日本生物物理学会 (2011.9.16-18 姫路)
- Matsui, T.S., Sato, M., Deguchi, S.: Nonmuscle myosin II induces rapid disassembly of stress fibers independently of myosin regulatory light chain dephosphorylation. 第49回日本生物物理学会 (2011.9.16-18 姫路)
- 西尾和真, 坂元尚哉, 出口真次, 佐藤正明: ストレスファイバーの収縮活性が RhoGTPase 活性変化に及ぼす影響. 第22回バイオフィロンティア講演会 (2011.10.7-8 津)
- Sato, M., Ueki, Y., Uda, Y., Sakamoto, N.: Strain measurement in stress fiber of living endothelial cell subjected to shear stress. 2011 Biomedical Engineering Society Annual Meeting (2011.10.12-15 Hartford)
- Nishio, K., Ueki, Y., Sakamoto, N., Sato, M.: The initial orientation of endothelial cells affects RhoGTPases activation induced by fluid shear stress. 2011 Biomedical Engineering Society Annual Meeting (2011.10.12-15 Hartford)
- Chubachi, S., Sato, M., Sakamoto, N.: Role of microtubules in focal adhesion turnover in vascular endothelial cells exposed to shear stress. 2011 Biomedical Engineering Society Annual Meeting (2011.10.12-15 Hartford)
- Furusawa, T., Sato, M., Unuma, H.: Non-absorbable GBR membrane based on PET sheet coated with readily soluble calcium phosphate. The 11th Asian BioCeramics Symposium in conjunction with the 22nd Symposium on Apatite (2011.11.30-12.2 つくば)
- Deguchi, S., Matsui, T.S., Sato, M.: Adaptation of nonmuscle cells to mechanical environment. International Symposium on Mechanobiology (2011.11.4-8 Shanghai)
- Deguchi, S., Matsui, T.S., Kaunas, R., Sato, M.: Cellular tensional homeostasis regulated by nonmuscle myosin-II. International Symposium on Mechanobiology (2011.11.4-8 Shanghai)
- Yuan, L., Sakamoto, N., Song, G.B., Sato, M.: Low shear stress enhances human mesenchymal stem cell migration through MAPK activity. Stem Cell Programming & Reprogramming (2011.12.8-10 Lisbon)
- 2) 講演・シンポジウム**
- Sato, M.: Mechanical property of stress fiber and its role on mechanotransduction in cell response to mechanical stimulation. The 6th International Symposium on Biomechanics in Vascular Biology and Cardiovascular Disease (招待講演) (2011.4.14-15, Rotterdam)
- 佐藤正明: 内皮細胞の力学応答に関するメカノバイオロジー. 「生命科学における走査プローブ法と光ピンセット」ワークショップ (招待講演) (2011.9.28 東京)

佐藤正明：循環器疾患への生体工学からのアプローチ. 第28回循環器懇話会（特別講演）（2011.11.11 松島）

佐藤正明：医工連携の経緯と現状. 福島県第2回医工連携人材育成セミナー（招待講演）（2011.12.5 福島）

佐藤正明：医療機器事業参入に向けて. 福島県第2回医工連携人材育成セミナー（招待講演）（2011.12.19 福島）

再生統御学研究部門

発生分化研究分野

Department of Development and Differentiation

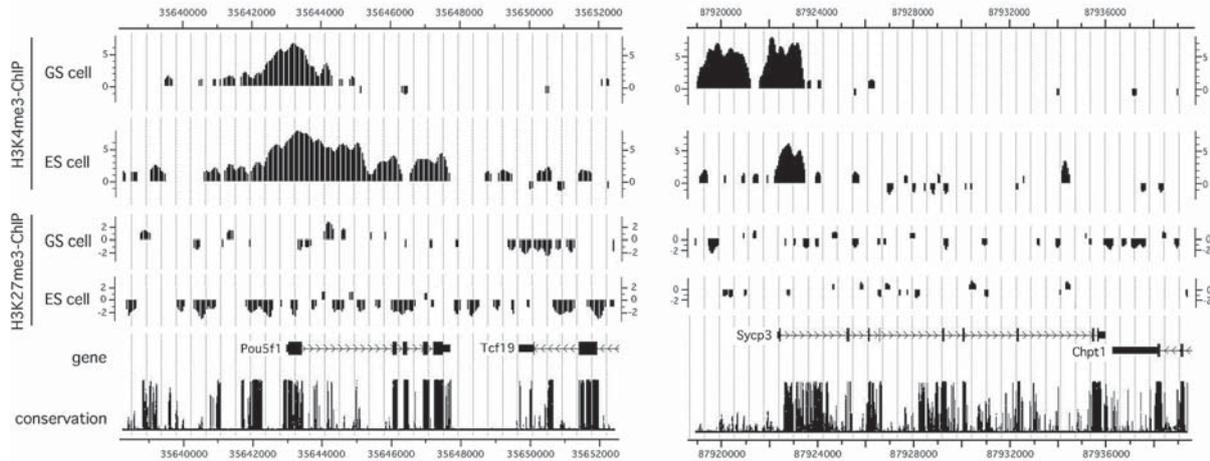
分野主任 教授 中辻 憲夫

Prof. Norio Nakatsuji

【研究概要】

個体を構成する細胞系譜は全て一つの受精卵から多能性幹細胞、組織幹細胞等を経て成熟分化を行う。各種の体細胞はそれぞれ特異的な機能発現を行い生体の恒常性を維持する一方、生殖細胞は発生初期に多能性幹細胞から体細胞とは系譜が分かれ、配偶子形成プロセスを通じてゲノム情報の維持と再編、エピゲノム修飾の再構成等を行い、次の個体発生の為の遺伝プログラムを継承する。これら幹細胞-生殖細胞サイクルにおけるゲノム、エピゲノムプログラムは個体及び種が成立する根幹として厳密に制御される一方、その破綻は広範な疾患、例えば発生異常、遺伝病、癌、不妊等の病態の起因となる。当研究グループは幹細胞-生殖細胞の発生分化とゲノム-エピゲノム制御機構の特性解明、またその理解に基づく細胞-ゲノムの人為操作の技術基盤の創出を目指し、分子生物学、生化学、遺伝学、オミクス解析、また新たな実験系の開発を併せて研究を進めている。

(1) 生殖顆粒構成分子によるレトロトランスポゾン抑制とゲノム保護：生殖細胞に顕著に観察される構造的特徴に生殖顆粒 RNP 構造が挙げられる。我々はマウス生殖顆粒の特異的な構成分子をコードする tudor 関連 Tdrd 遺伝子群の機能解析を進めている。Tdrd1、6、7、9 ノックアウトマウスを作製した所、これら遺伝子のホモ欠損個体はいずれも雄生殖細胞の分化に異常を示す事が明らかとなった。このうち TDRD1、9 はマウス piwi ファミリー MILI、MIWI2 と相互作用し、雄生殖幹細胞において piRNA 経路を介してレトロトランスポゾン LINE-1 の RNA、エピゲノムレベルでの抑制に機能する。生殖幹細胞の LINE-1 制御の破綻は減数分裂期で同レトロトランスポゾンの過剰発現を招き、ゲノム DNA 障害による広範な細胞死を誘起する。一方、TDRD6、7 は精子細胞の半数体成熟に働く。Tdrd6、7 ノックアウトマウスでは精子細胞に特徴的な生殖顆粒である chromatoid body の形成不全が観察されるが、Tdrd1、9 とは異なりレトロトランスポゾンのエピゲノム制御の破綻は検出されない。Chromatoid body は体細胞の processing body、stress granule と分子構成が類似しており、現在 TDRD6、7 と生殖細胞の RNA 制御、ストレス反応等について解析を進めている。(2) 減数分裂を制御する開始シグナルとクロマチン動態：幹細胞-生殖細胞サイクルにおいてゲノム情報の安定な継承は個体、種の成立に重要である一方、配偶子形成過程では減数分裂による 1 倍体化と相同遺伝子組換えによって遺伝情報の多様性が生まれる。減数分裂の制御機構の研究は主に酵母等の単細胞生物を用いて行われており、多細胞生物において詳細な分子基盤の解明は進んでいない。我々は精原幹細胞由来の樹立細胞株を用いて体細胞型増殖から第 1 減数分裂前期を誘導する実験条件を作出した。この培養実験系を用いて減数分裂を促進および抑制するシグナル経路を同定したので、分子から個体レベルでの詳細な研究を進めている。一方、クロマチン動態との関与が推測される遺伝子群を蛋白質ドメイン構造、発現パターン、進化的保存等によりゲノムデータベースからスクリーニングし、遺伝学的、生化学的解析を進めている。これらの研究により哺乳類の相同遺伝子組換えや半数体化を制御する分子基盤を明らかにし新たなゲノム操作技術への応用を目指す。(3) 幹細胞ゲノム恒常性の分子ネットワーク：ES 細胞のゲノム恒常性には幾つかの特徴的な性質が有る。ES 細胞



マウス胚性幹 (ES) 細胞と生殖幹 (GS) 細胞のヒストン修飾の ChIP-seq 解析

ChIP-seq analysis of mouse embryonic stem (ES) cells and germline stem (GS) cells for histone H3 modifications

は明確な分裂寿命が認められずゲノム損傷による G1 チェックポイントが観察されない。ES 細胞の DNA 変異率は $10e-6$ 程度と見積もられており、他の体細胞の約 $10e-4$ と比べて約 2 桁程度低い。また ES 細胞の DSB 修復は他の分化細胞と比べて HR 経路が NHEJ 経路よりも優位に利用される。更に ES 細胞の染色体不安定性のスペクトルは分化体細胞とは異なる。これらの ES 細胞と分化体細胞の相違はゲノム損傷応答の違いと考えられるがその分子機序は殆ど明らかになっていない。我々はゲノムワイドなマルチオミクス解析を徹底して行う事で ES 細胞のゲノム損傷に対する修復ダイナミクス、例えば損傷認識、クロマチン動態、シグナル伝達クロストーク等、の分子ネットワークの全体像を得る事を目指して研究を進めている。

The germline is the cell lineage that gives rise to full ontogenesis of individuals and transmits genetic information to next generations. During the differentiation of germ cells, important biological processes take place, such as epigenetic reprogramming, establishment of pluripotency and genetic DNA recombination. Our current research focuses on the molecular characterization of germinal granules/nuage, germline-specific ribonucleoprotein (RNP) assemblies in the cytoplasm, and the regulation of meiotic entry and chromatin dynamics.

One structural characteristic observed in the germline is a cytoplasmic RNP domain called germinal granules or nuage. The germinal granule/nuage is evolutionarily conserved in divergent animals, suggesting its essential and common role in the germline, but the precise molecular and physiological function (s) remains unclear. We are working on tudor-domain containing (Tdrd) genes, mainly Tdrd1, 6, 7 and 9, which encode for specific components of mammalian germinal granules/nuage. Gene-targeted disruption of Tdrd1, 6, 7 and 9 all led to male-specific sterility due to postnatal defects in spermatogenesis. Among these, TDRD1 and TDRD9 cooperate with piwi proteins, MILI and MIWI2, respectively, and function non-redundantly in retrotransposon silencing at RNA and epigenetic levels in spermatogonial stem cells and subsequent spermatogenesis. In contrast, Tdrd6 and 7 function in haploid spermiogenesis. Tdrd6 and 7 mutants show abnormal spermatid differentiation with aberrant chromatoid body architectures. Chromatoid bodies, a specialized form of germinal granules/nuage in spermatids, share some of their components with somatic processing bodies (p bodies), a form of RNP implicated

in degradation or translational control of mRNA. We are addressing the possible function of TDRD6 and 7 in the regulation/metabolism of RNA.

Molecular mechanisms controlling meiotic entry and chromatin dynamics are important research subjects in cell and developmental biology. We previously showed that primordial germ cells autonomously enter into meiosis when cultured in vitro and identified a factor that suppresses this meiotic transition from mitosis. Recently, we established another in vitro culture system that induces meiosis initiation of an established germline stem cell line derived from spermatogonia. By using this culture system, we identified signaling molecules that promote or inhibit meiosis from mitotic spermatogonial stem cells. We are undertaking biochemical and genetic characterization of these signaling pathways in vitro and in vivo.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

(1) 原著論文

- Fujiwara, M., Yan, P., Otsuji, T. G., Narazaki, G., Uosaki, H., Fukushima, H., Kuwahara, K., Harada, M., Matsuda, H., Matsuoka, S., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., Ikeda, T., Sakata, R., Mummery, C. L., Nakatsuji, N., Yamanaka, S., Nakao, K. and Yamashita, J. K. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A. *PLoS One* 6, e16734 (2011)
- Sengoku, S., Sumikura, K., Oki, T. and Nakatsuji, N. Redefining the concept of standardization for pluripotent stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports* 7, 221-226 (2011)
- Nagae, G., Isagawa, T., Shiraki, N., Fujita, T., Yamamoto, S., Tsutsumi, S., Nonaka, A., Yoshida, S., Matsusaka, K., Midorikawa, Y., Ishikawa, S., Soejima, H., Fukayama, M., Suemori, H., Nakatsuji, N., Kume, S. and Aburatani, H. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2710-2721 (2011)
- Adachi, K., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Kawase, E. The role of SOX2 in maintaining pluripotency and differentiation of human embryonic stem cells. In "Stem Cells in Clinic and Research" pp. 169-184 (Ed. Ali Gholamrezanezhad) (InTech). ISBN: 978-953-307-797-0 (2011).
- Sakurai, K., Shimoji, M., Aiba, K. and Nakatsuji, N. Efficient Integration of Transgenes and Their Reliable Expression in Human Embryonic Stem Cells. In "Embryonic Stem Cells: Basic Biology to Bioengineering" pp. 105-122 (Ed. Michael S. Kallos) (InTech). ISBN: 978-953-307-278-4 (2011)
- Sasaki, N., Ishii, T., Kamimura, R., Kajiwar, M., Machimoto, T., Nakatsuji, N., Suemori, Ikai, I., Yasuchika, K. and Uemoto, S. Alpha-fetoprotein-producing pancreatic cancer cells possess cancer stem cell characteristics. *Cancer Letters* 308, 152-161 (2011)
- The International Stem Cell Initiative: Amps, K., Andrews, P.W., Anyfantis, G., Armstrong, L., Avery, S., Baharvand, H., Baker, J., Baker, D., Munoz, M.B., Beil, S., Benvenisty, N., Ben-Yosef, D., Biancotti, J.C., Bosman, A., Brena, R.M., Brison, D., Caisander, G., Camarasa, M.V., Chen, J., Chiao, E., Choi, Y.M., Choo, A.B.H., Collins, D., Colman, A.I., Crook, J.M., Daley, G.Q., Dalton, A., De Sousa, P.A., Denning, C., Downie, J., Dvorak, P., Montgomery, K.D., Feki, A., Ford, A., Fox, V., Fraga, A.M., Frumkin, T., Ge, L., Gokhale,

- PJ., Golan-Lev, T., Gourabi, H., Gropp, M., Lu G., Hampl, A., Harron, K., Healy, L., Herath, W., Holm, F., Hovatta, O., Hyllner, J., Inamdar, MS., Irwanto, AK., Ishii, T., Jaconi, M., Jin, Y., Kimber, S., Kiselev, S., Knowles, BB., Kopper, O., Kukhareenko, V., Kuliev, A., Lagarkova, MA., Laird, PW., Lako, M., Laslett, AL., Lavon, N., Lee, DR., Lee, JE., Li, CL., Lim, LS., Ludwig, TE., Ma, Y., Maltby, E., Mateizel, I., Mayshar, Y., Mileikovsky, M., Minger, SL., Miyazaki, T., Moon, SY., Moore, H., Mummery, C., Nagy, A., Nakatsuji, N., Narwani, K., Oh, SKW., Oh, SK., Olson, C., Otonkoski, T., Pan, F., Park, IH., Pells, S., Pera, MF., Pereira, LV., Qi, O., Raj, GS., Reubinoff, B., Robins, A., Robson, P., Rossant, J., Salekdeh, GH., Schulz, TC., Sermon, K., Mohamed, JS., Shen, H., Sherrer, E., Sidhu, K., Sivarajah, S., Skottman, H., Spits, C., Stacey, GN., Strehl, R., Strelchenko, N., Suemori, H., Sun, BW., Suuronen, R., Takahashi, K., Tuuri, T., Venu, P., Verlinsky, Y., Ward-van Oostwaard, D., Weisenberger, DJ., Wu, Y., Yamanaka, S., Young, L. and Zhou, Q. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nature Biotechnology* 29, 1132–1144 (2011)
- Uosaki, H., Fukushima, H., Takeuchi, A., Matsuoka, S., Nakatsuji, N., Yamanaka, S. and Yamashita, J. K. Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression. *PLoS One* 6, e23657 (2011)
- Aizawa, E., Hirabayashi, Y., Iwanaga, Y., Suzuki, K., Sakurai, K., Shimoji, M., Aiba, K., Wada, T., Tooi, N., Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Mitani, K. Efficient and accurate homologous recombination in hESCs and hiPSCs using helper-dependent adenoviral vectors. *Molecular Therapy*, In press (2011)
- Pillai RS, Chuma S. piRNAs and their involvement in male germline development in mice. *Dev Growth Differ.* 2012 Jan 6 (in press).
- Morozumi Y, Ino R, Takaku M, Hosokawa M, Chuma S, Kurumizaka H. Human PSF concentrates DNA and stimulates duplex capture in DMCI-mediated homologous pairing. *Nucleic Acids Res.* 2011 Dec 9.(in press)
- Reuter M, Berninger P, Chuma S, Shah H, Hosokawa M, Funaya C, Antony C, Sachidanandam R, Pillai RS. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature.* 2011 Nov 27;480 (7376):264-7.
- Tanaka T, Hosokawa M, Vagin VV, Reuter M, Hayashi E, Mochizuki AL, Kitamura K, Yamanaka H, Kondoh G, Okawa K, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Sachidanandam R, Hannon GJ, Pillai RS, Nakatsuji N, Chuma S. Tudor domain containing 7 (Tdrd7) is essential for dynamic ribonucleoprotein (RNP) remodeling of chromatoid bodies during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 28;108 (26):10579-84.
- Watanabe T, Chuma S, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Totoki Y, Toyoda A, Hoki Y, Fujiyama A, Shibata T, Sado T, Noce T, Nakano T, Nakatsuji N, Lin H, Sasaki H. MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline. *Dev Cell.* 2011 Mar 15;20 (3):364-75.
- Yabuta Y, Ohta H, Abe T, Kurimoto K, Chuma S, Saitou M. TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice. *J Cell Biol.* 2011 Mar 7;192 (5):781-95.

(2) 著書

(3) 総説

門田真、饗庭一博、中辻憲夫：ES細胞（胚性幹細胞）研究 日本臨牀 第69巻 第12号（平成23年12月号）別刷
特集：幹細胞治療

◆ 学会等の発表 ◆

(1) 学会・研究会発表

中馬新一郎．哺乳類生殖幹細胞株の減数分裂誘導とクロマチン動態の制御．特定領域遺伝情報場第4回領域会議
（6.12-14, 2011, 北海道）

Shinichiro Chuma. Mammalian tudor related genes in the male germline. 44th Meeting of SSR (7.31-8.4, 2011,
Portland)

中馬新一郎．生殖幹細胞の増殖から減数分裂移行を制御するシグナル伝達クロストーク．特定領域細胞増殖制御第5
回領域会議（9.7-9, 2011, 米子）

Shinichiro Chuma. Germline tudor genes, germinal granules and spermatogenesis in mice. CSHA conference
（10.11-15, 2011, Suzhou, China）

中馬 新一郎．The germline stem cell cycle in mammalian developmen. 特定領域遺伝情報場第2回異分野融合
workshop（11.29, 2011, 大阪）

Shinichiro Chuma. Germline tudor family genes, retrotransposon silencing and spermatogenesis in mice. 日本分子
生物学会第34回年会（12.16, 2011, 横浜）

両角 佑一、伊能 諒平、高久 誉大、中馬 新一郎、胡桃坂 仁志．PSF stimulates the recombination reactions mediated
by DMC1 in vitro. 日本分子生物学会第34回年会（12.15, 2011, 横浜）

中馬新一郎．Mammalian tudor family genes in the male germline. 理研 BRC（12.19, 2011, 筑波）

細川美穂子、田中敬、林瑛理、篠原美都、篠原隆司、中辻憲夫、中馬新一郎．マウス生殖幹細胞株の体細胞型増殖
から第一減数分裂前期への移行．特定領域生殖サイクル若手勉強会 2011（7.13-15, 2011, 大阪）

細川美穂子、田中敬、林瑛理、篠原美都、篠原隆司、中辻憲夫、中馬新一郎．マウス生殖幹細胞の体細胞型増殖か
ら第一減数分裂前期への移行．特定領域研究生殖サイクル第4回公開シンポジウム（11.17-18, 2011, 大阪）

細川美穂子、刀谷在美、田中敬、林瑛理、篠原美都、篠原隆司、中辻憲夫、中馬新一郎．マウス生殖幹細胞株の体
細胞型増殖から第一減数分裂前期への移行．再生研若手発表会（12.26, 2011, 京都）

(2) 講演・シンポジウム

中辻憲夫：世界で始まったES/iPS細胞の実用化～細胞治療と新薬スクリーニング～．第10回国際バイオ EXPO.
特別講演（2011.7.1. 東京）

Nakatsuji, N.: Chemical biology and model cell production using pluripotent stem cells. Heidelberg-Kyoto Joint
Symposium “Crossing Boundaries: Stem Cells, Materials, and Mesoscopic Sciences” (2011.7.23. Heidelberg)

Nakatsuji, N.: Multi-disciplinary research and application of pluripotent stem cells for disease mechanism research
and drug discovery. iCeMS and MRC-CRM Joint Symposium “Next Generation Stem Cells: Tools and
Technologies” (2011.7.25. Edinburgh)

中辻憲夫：ES細胞とiPS細胞の現在と未来：物質科学-細胞科学の融合と医学創薬への応用．第63回コロイドお

よび界面化学討論会. 総合講演 (2011.9.8. 京都)

Nakatsuji, N.: Leading International Institutions and Their Strategies for Advancing Regenerative Medicine. 2011 World Stem Cell Summit. Plenary Discussion (2011.10.5. Pasadena)

中辻憲夫：多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) の大きな能力と限らない可能性. 世界トップレベル研究拠点プログラム (WPI) 6 拠点合同シンポジウム. (2011.11.12. 福岡)

Nakatsuji, N.: Stem cells, cell-material integration, and mesoscopic sciences. German-Japan Round Table 2011 “From the Early Universe to the Evolution of Life” Keynote Lecture (2011.12.1. Heidelberg)

中辻憲夫：国際的学際研究拠点の立ち上げから考えた科学者の社会的責任. 科学技術社会論学会第 10 回年次研究大会. 記念講演 (2011.12.4. 京都)

Nakatsuji, N.: Chemical Control of Human Pluripotent Stem Cell Differentiation and Creation of Neurodegenerative Disease Model Cells. 11th iCeMS International Symposium “Chemical Control of Cells” (2011.12.6. Kyoto)

再生増殖制御学分野 Department of Growth Regulation

分野主任 教授 瀬原 (藤沢) 淳子
Prof. Atsuko Sehara (Fujisawa)

【研究概要】

はじめに

発生過程では固有の形や大きさを持った臓器が生ずる。骨格筋など特定の臓器では、それが傷害を受けると再生するが、筋再生においては、筋衛星細胞と呼ばれる幹細胞が活性化され、それが発生過程と類似した細胞分化と形態形成のプロセスによって骨格筋を作り直すことが知られる。

我々の研究室は、主に発生生物学・細胞生物学の立場から、(1) 筋分化・筋形成機構、筋再生機構、(2) 形態形成における細胞間シグナリング・接着の制御機構としてのプロテアーゼ制御、の研究を行っている。主にマウスを用いた分子遺伝学的手法や培養系による研究とともに、近年はゼブラフィッシュを用いて、生きた個体でのバイオイメージングによって形態形成過程を蛍光蛋白質により可視化し、発生や再生の新しい仕組みを明らかにしつつある。

(1) **筋分化と筋形成・再生機構**：筋形成は、中胚葉由来の多能性細胞から筋芽細胞が生じ、それが互いに融合して筋管を形成し、さらに神経支配を受け筋収縮を繰り返す中で成熟して機能的な筋肉となっていく。転写因子 Pax3/Pax7 を発現する筋前駆細胞から、Myf5/MyoD を発現する筋芽細胞が生まれる仕組み、筋芽細胞が互いに融合して細長い筋管を形成する仕組み、筋成熟の仕組み、などの未知な問題に取り組んでいる。一方、筋再生は、骨格筋が壊されたときに幹細胞である筋衛星細胞が活性化され、それを修復する機構である。筋衛星細胞の、自己複製と分化(筋芽細胞の産生)という幹細胞としての特質の獲得機構、そしてその幹細胞の産生と活性化の機構の問題に取り組んでいる。

(2) **形態形成における細胞間シグナリング・接着のプロテアーゼ制御**：これは膜型シグナル分子や接着因子の脂質二重層近傍における切断(ectodomain shedding)を介して、細胞間シグナリングの制御や接着制御に関与する、ADAMと呼ばれる膜型プロテアーゼファミリーに着目した研究である。テーマ(1)の中から発展させてきた研究であり、筋形成にとどまらず、発生の時間的空間的制御、不可逆的な制御としてきわめて大切な制御であることを明らかにしてきた。メルトリン α (ADAM12)、 β (ADAM19)、ADAM8、ADAM10などについて、いくつかの形態形成に焦点を当てた研究を行っている。

紙面の関係上そのすべてをここで紹介するのは難しいため、年報ではひとつのテーマに関してやや詳しく紹介することになっている。今年、培養細胞を用いた筋形成機構解明の試みについて、助教の栗崎知浩が中心となっておこなった研究を紹介する。

筋形成機構の研究

骨格筋は、運動器官であると同時に基礎代謝を担う発熱器官でもあり、アミノ酸やグリコーゲンの貯蔵庫でもあり、全身に広がる重要な組織である。ヒトではこの骨格筋は数十から数百個もの筋細胞同士が細胞膜融合を起こすことにより形成されるが、その分子機構はよくわかっていない。我々は、この筋細胞融合を制御している分子機構の解明を目指している。

これまでにウイルス感染における Fusion peptide、受精における Izumo、破骨細胞形成における DC-STAMP といった細胞融合に必要な膜分子が同定されてきているが、筋細胞融合に関してはそのような分子は見つかっていない。筋芽細胞は数日という比較的長い時間をかけて非同調的に一部の細胞だけが融合能を獲得し細胞融合を起こす。我々は、筋融合の分子機構が明らかになっていない理由の一つが、この非同調性であると考え、また融合能を獲得した筋細胞だけを取得する方法がないことに着目し、この問題を解決する為に融合能をもつ筋細胞を特異的に認識する抗体の取得を目指した (図 1)。

最初に我々は、筋形成が MyoD ファミリーに属する転写因子 myogenin に依存することに着目し、myogenin 遺伝子上流領域に GFP をつないだコンストラクトをマウス筋芽細胞株 C2 に導入し、分化状態を GFP で可視化できる筋芽細胞株 mgd4EGFP-C2 を作製した。この細胞は、細胞分化を誘導すると筋融合がスタートする前にまず単

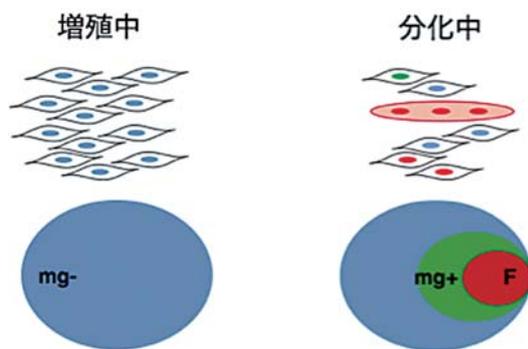


図 1 筋分化細胞集団は均一ではない
増殖中の未分化筋芽細胞は誘導により、一部の細胞だけが筋細胞へ分化し、更にその中の一部の細胞が Prefusion myoblast となり融合する。これまで Prefusion myoblast の分子マーカーは報告されていなかった。mg-: 未分化筋芽細胞、mg+: 筋細胞、F: Prefusion myoblast。

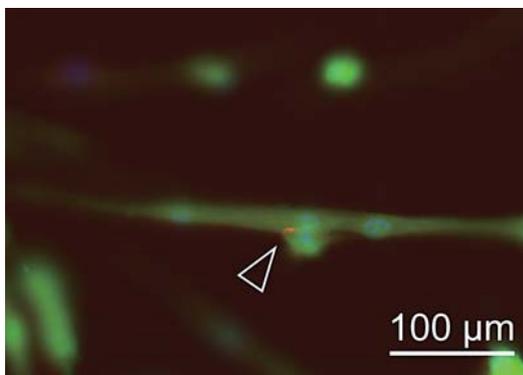
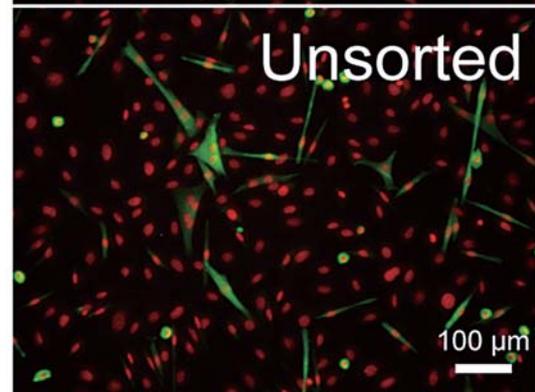
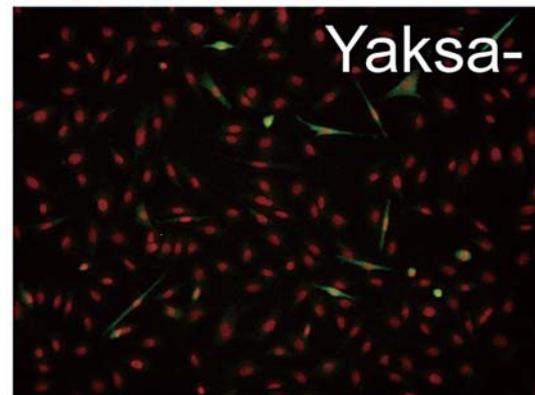
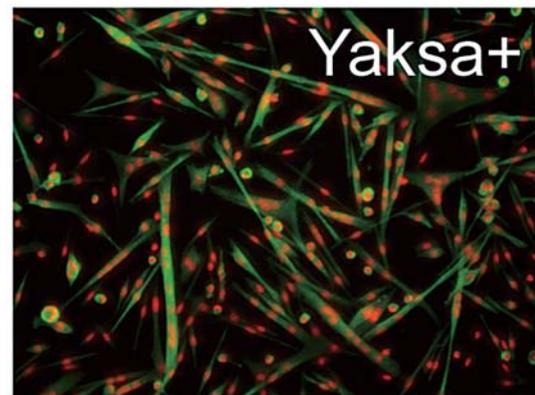


図 3 Yaksa 抗体は融合部位を可視化できる
細胞質を GFP (緑)、核を Hoechs (青) で可視化した分化筋細胞の融合過程。△筋細胞と多核筋管の接着部位が Yaksa 抗体 (赤) で可視化される。

図 2 Yaksa 抗体は融合活性を有する細胞と特異的に反応する Yaksa 抗体結合細胞は 8 時間以内に融合するが、非結合細胞は融合しない。

核細胞の段階で GFP が活性化された。これらの GFP (+) 細胞を単離し、これを抗原として分化筋細胞の表層抗原に対するモノクローナル抗体ライブラリーを作製し、スクリーニングにより融合活性を持つ単核細胞 (Prefusion Myoblast) と特異的に結合する抗体を取得、樹立し Yaksa 抗体と名付けた (図 2)。この Yaksa 抗体を用いて、融合活性を持つ細胞だけを調製することが可能になっただけでなく、融合が起きつつある部位を可視化することも出来た (図 3)。この抗体の利用により、筋融合開始直前に発現する遺伝子の解析、融合部位に集積するタンパク質の解析、筋融合過程のイメージングなどが可能になると考える。

次に cDNA array を用いて Prefusion Myoblast で特異的に発現する約 500 個の遺伝子を特定し、さらにその遺伝子を Gene Ontology database を利用した annotation 解析を行った。この解析をもとに、また Yaksa 抗体を利用し、筋融合に関与する分子群を解明したい。

(English)

We are interested in molecular and cellular mechanisms of organ development and regeneration, especially from an aspect of cell-cell interactions required for morphogenesis and their spatial and temporal regulation. Our research is now focusing on following topics: (1) molecular mechanisms of skeletal myogenesis and muscle regeneration, and (2) regulatory roles of ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) family proteins in cell-cell interactions and the ectodomain shedding during development. Although the third topic is originally studied in the first topic, we and others revealed that

Myoblast fusion is essential to form the multi-nucleated muscle fibers that provide the contractile strength of skeletal muscle. In an attempt to know molecular mechanisms of myogenic fusion, we established a novel monoclonal antibody, Yaksa that is specific to a subpopulation of myogenic cells. The Yaksa antigen is not expressed on the surface of growing myoblasts but only on a subpopulation of myogenin-positive myocytes. When Yaksa antigen-positive mononucleated cells were freshly prepared from a murine myogenic cell by a cell sorter, they fused with each other and formed multinucleated myotubes shortly after replating while Yaksa antigen-negative cells scarcely generated myotubes. These results suggest that Yaksa could segregate fusion-competent, mononucleated cells from fusion-incompetent cells during muscle differentiation. The Yaksa antigen was also expressed in developing muscle and regenerating muscle in vivo and it was localized at sites of cell-cell contact between mono-nucleated muscle cells and between mono-nucleated muscle cells and myotubes. Thus, Yaksa that marks prefusion myocytes before myotube formation can be a useful tool to elucidate the cellular and molecular mechanisms of myogenic cell fusion.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

(1) 原著論文

Frohlich, C., Nehammar, C., Albrechtsen, R., Kribqvist, P., Kveiborg, M., Sehara-Fujisawa, A., Mercurio, AM., Wewer, UM. ADAM12 produced by tumor cells rather than stromal cells accelerates breast tumor progression. *Mol. Cancer Res.* **9** (11):1449-61 (2011)

Kurisaki, T., Masuda, A., Nakagiri, S., Hayata, Y., Kuhara, M., Kishi, Y., Sehara-Fujisawa, A.. Generation of a

monoclonal antibody reactive to prefusion myocytes. *J. Muscle Res, Cell Motil.* **32**: 31-38 (2011)

Sunadome, K., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Kondoh, K., Sehara-Fujisawa, A., Nishida, E.. ERK5 Regulates Muscle Cell Fusion through Klf Transcription Factors. *Dev. Cell* **20** (2): 192-205 (2011)

(3) 総説

飯田敦夫、瀬原淳子：ADAM8 プロテアーゼによる血液循環開始の制御、II. 冠循環の基礎 冠循環系の生理学、日本臨牀（日本臨牀社）、**69** 巻 増刊号 7、P37-41 (2011)

飯田敦夫：生きた個体で観察する血球の起源、実験医学（羊土社）、**Vol.29, No.1** (1月号)、55-56 (2011)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Iida A, Sakaguchi K, Nishimura D, Iwaki A, Yonemura S, Kawahara A, Sehara A.. Release of blood-vessel adhesion regulates both blood circulation start and angiogenesis in zebrafish. Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists (2011.3.23 Dresden, Germany)

Atsuo Iida. Release of blood-vessel adhesion regulates both blood circulation start and angiogenesis in zebrafish. 第44回発生生物学会年会 (2011.5.18 沖縄)

Takahiko Sato, Didier Rocancourt, Solveig Thorsteinsdottir, Margaret Buckingham. A Pax3/Dmrt2/Myf5 regulatory cascade functions at the onset of myogenesis. 第44回発生生物学会年会 (2011.5.18 沖縄)

Yosuke Hiramuki, Takahiko Sato, Margaret Buckingham, Atsuko Sehara. Identification of miRNA players in muscle stem cells based on Pax3 expression. (Pax3 を発現する骨格筋幹細胞における miRNA の同定) 第44回発生生物学会年会 (2011.5.18 沖縄)

Yoshitaka Kimura, Takahiko Sato, Tomohiro Kurisaki, and Atsuko Sehara-Fujisawa. A novel cell population, myogenin-negative cells, required for myogenesis. 第44回発生生物学会年会 (2011.5.18 沖縄)

Iida A, Kawahara A, Sehara A.. Live imaging of cytoskeletal behaviors at the onset of blood circulation in zebrafish. 第63回日本細胞生物学会 (2011.6.27 北海道)

荒井宏行、佐藤文規、瀬原淳子：ADAM プロテアーゼの役割からみる心臓の弁形成機構の解明、第16回日本プロテアーゼ学会学術集会 (2011.8.26 大阪)

友澤 杏奈、飯田 敦夫、川原 敦雄、瀬原 淳子：Roles of ADAM10/Kuzbanian in vasculogenesis of zebrafish, 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.8 静岡)

飯田 敦夫、坂口 和弥、友澤 杏奈、川原 敦雄、瀬原 淳子：A novel erythroblast-mediated angiogenic regulation in zebrafish, 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.9 静岡)

Atsuo Iida, Kazuya Sakaguchi, Daigo Nishimura, Anna Tomosawa, Atsuo Kawahara, Atsuko Sehara-Fujisawa. 生きたゼブラフィッシュを用いて血管形成の新しいメカニズムに迫る (Live zebrafish sheds light on novel mechanisms on blood vessel formation)、第84回日本生化学会大会 (2011.9.21 京都)

酒井大史、佐藤貴彦、櫻井英俊、庄子栄美、Didier Montarras, 瀬原淳子：the engraftment of fetal skeletal muscle progenitors into muscular dystrophy models. The 21th CDB Meeting, The 1st CDB-Regeneration Biology Study Group meeting (2011.11.24 兵庫)

Hiroshi Sakai, Takahiko Sato, Hidetoshi Sakurai, Didier Montarras, Margaret Buckingham, Atsuko Sehara-

Fujisawa. Engraftment of embryonic and fetal myoblasts into dystrophic mice. 第34回日本分子生物学会年会 (2011.12.13 神奈川)

飯田 敦夫, 友澤 杏奈, 坂口 和弥, 瀬原 淳子: Primitive erythroblasts control a timing for blood vessel sprouting in zebrafish development, 第34回日本分子生物学会年会 (2011.12.13 神奈川)

栗崎知浩, 中井雄治, 瀬原淳子、融合活性マーカーを用いた筋細胞融合制御遺伝子の探索、第34回日本分子生物学会年会 (2011.12.13 神奈川)

Tomosawa Anna, Atsuo Iida, Akira Kakizuka, Atsuko Sehara. Roles of ADAM10/kuzbanian in vasculogenesis of zebrafish. 第34回日本分子生物学会年会 (2011.12.13 神奈川)

2) 講演・シンポジウム

Atsuko Sehara-Fujisawa. "The Role of ADAM and RIP Proteases in Development and Beyond" (Discussion Leader) Gordon Research Conferences "Regulated Proteolysis of Cell Surface Proteins" (2011.7.10 Davidson, USA)

Atsuko Sehara-Fujisawa. A roles of ADAM8 in the onset of blood circulation. The 7th Aso International Meeting (2011.7.30 熊本)

Atsuko Sehara-fujisawa. Roles of ADAM19 in nervous system development in zebrafish. Gordon Research Conference "Metalloproteinase Research at the intersection of Basic Science and Applied Medicine" (2011.8.7 Smitnfield, USA)

Atsuko Sehara-Fujisawa. Roles of Meltrin beta (ADAM19) in development of peripheral nervous system. The 5th Asia-Oseania Zebrafish Meeting (2011.8.27 北京、中国)

Atsuo Iida, Kazuya Sakaguchi, Anna Tomozawa, Daigo Nishimura, Atsuo Kawahara, Atsuko Sehara-Fujisawa. A Role of ADAM8 in the Onset of Blood Circulation. KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine-Supported by Global COE and IMEG, KumamotoUniversity (2011.9.9 熊本)

Tomohiro Kurisaki, Yuji Nakai, Atsuko Sehara. A digestive enzyme to function in myoblast fusion. 筋生化学国際シンポジウム (2011.10.28 東京)

Daigo Nishimura, Hiroshi Sakai, Takahiko Sato, Atsuo Iida, Fuminori Sato, and Atsuko Sehara-Fujisawa. Roles of ADAM8 for skeletal muscle regeneration. The Second Pacific Symposium on Vascular Biology (2011.10.30 済州、韓国)

再生免疫学分野 Department of Immunology

助教 藤本 真慈

Assis. Prof. Shinji Fujimoto

【研究概要】

マウス胸腺リンパ腫 TCR β 鎖遺伝子座の解析から、2種類ある DJ allele では V to DJ 再構成のおこりかたが同じではないことを明らかにした。

マウス T 細胞レセプター β 鎖遺伝子 (*Tcrb*) の可変領域は、V、D、J、3つのセグメントが集まって構成される。胸腺細胞における *Tcrb* の再構成は2段階で、まず両方の allele で D to J 再構成がおこる。次にどちらか一方の DJ allele において V to DJ 再構成が開始される (mono-allelic initiation)。最初の V to DJ 再構成に成功すれば、すなわち TCR β 鎖分子を細胞表面に発現することができれば、もう一方の DJ allele ではもはや V to DJ 再構成がおこらない。最初の V to DJ 再構成に失敗すれば、もう一方の DJ allele で V to DJ 再構成がおこり (automatic 2nd allele initiation)、最終的に TCR β 鎖分子を細胞表面に発現することができた細胞だけが次の分化段階へすすむことができる。V to DJ 再構成に成功して VDJ⁺ になる確率を 1/3 とし、mono-allelic initiation と automatic 2nd allele initiation を前提とすれば、V to DJ 再構成を開始した胸腺細胞の 1/3 が VDJ⁺/DJ となる。残り 2/3 の胸腺細胞では再構成に失敗して VDJ⁻ になるがもう一方の allele における V to DJ 再構成の結果、当初の 2/9 の胸腺細胞が VDJ⁺/VDJ⁻ となり次の分化段階にすすむ。このとき V to DJ 再構成がおこった DJ allele の割合は、70% になる。実際、 $\alpha\beta$ T 細胞 212 について解析されたデータから全 allele に占める VDJ allele の割合を算出すると、72% であった。したがって、V to DJ 再構成にあたって mono-allelic initiation と automatic 2nd allele initiation は正しいと考えられてきた。

われわれが調べた ENU で誘発したマウス胸腺リンパ腫 33 における VDJ allele の割合は 71% で、 $\alpha\beta$ T 細胞における値とよく一致していた。これまでにわれわれは DJ allele が2種類存在することを示し (図)、D to J 再構成の結果 DJ (I) allele と DJ (II) allele の比が 62~65 : 35~38 になることを見いだした。そこで、それぞれの DJ allele における V to DJ 再構成についても mono-allelic initiation と automatic 2nd allele initiation が成立していることを確認しようとした。ところが驚いたことに、DJ (I) allele と DJ (II) allele とでは V to DJ 再構成のおこった割合が異なっており、前者では 76~77%、後者では 61~64% であった。

以上のことより、胸腺リンパ腫のもとになった胸腺細胞において 1. DJ (I) / DJ (I) および DJ (I) / DJ (II) であった細胞の一部では、V to DJ 再構成が両方の allele で開始されたこと (bi-allelic initiation) (補遺 A)、2. DJ (II) / DJ (II) および DJ (I) / DJ (II) であった細胞で最初の V to DJ 再構成に失敗したものの一部は、もう一方の DJ (II) allele で V to DJ 再構成がおこらず (VDJ⁻/DJ (II)) 生き残れなかったこと (no 2nd allele initiation) (補遺 B)、が強く示唆された。これまでに ENU 処理は *Tcrb* 再構成に影響しないことが判明しているため、正常な T 細胞分化の過程でも bi-allelic initiation と no 2nd allele initiation がおこりうると推定できる。

We have revealed that two types of TCR β gene DJ alleles are not equivalent for V to DJ rearrangement by analyzing TCR β loci of murine thymic lymphomas.

T cell receptor β chain (TCR β) variable genes are assembled from V, D and J gene segments through a somatic recombination process. TCR β gene (*Tcrb*) assembly in thymocytes is ordered; first, D to J rearrangement occurs on both alleles, second, it is assumed that one of the alleles initiates V to DJ rearrangement (mono-allelic initiation). If the first V to DJ rearrangement is successful to encode a suitable TCR β chain molecule, V to DJ rearrangement on the other allele is inhibited. If not, the second V to DJ rearrangement occurs (automatic 2nd allele initiation) and cells that can express TCR β chain molecules on the surface are allowed to further develop. The frequency of successful V to DJ recombination is one third. Thus, with mono-allelic initiation and automatic 2nd allele initiation, one third of the thymocytes are with VDJ⁺/DJ configuration. If the remaining two thirds of the cells with VDJ⁻/DJ configuration undergo V to DJ rearrangement on the alternate allele, two ninths of the cells will be with VDJ⁺/VDJ⁻ configuration. Therefore, 70% of DJ alleles undergo V to DJ rearrangement. Actually, the percentage of VDJ alleles from 212 $\alpha\beta$ T cells was 72%. Hence mono-allelic initiation and automatic 2nd allele initiation for *Tcrb* V to DJ rearrangement has been assumed to be correct.

Analyzing *Tcrb* loci of 33 ENU-induced thymic lymphomas uncovered that V to DJ assembly occurred on 71% of DJ alleles, consistent with that from normal $\alpha\beta$ T cells. As shown in Figure, DJ alleles are composed of two kinds of constructs: DJ (I) and DJ (II). In order to verify mono-allelic initiation and automatic 2nd allele initiation for both types DJ alleles, we calculated the portion of VDJ (I) and VDJ (II) alleles separately. Surprisingly, the percentage of VDJ (I) alleles was 76~77% and that of VDJ (II) alleles was 61~64%.

These data strongly suggest that a part of DJ (I) / DJ (I) and DJ (I) / DJ (II) cells initiated V to DJ rearrangement on both alleles simultaneously (bi-allelic initiation) (Supplement A), and that a part of DJ (II)

D to J rearrangementの結果、2種類のconstructsが生じる。
DJ (I) and DJ (II)

それに続くV to DJ rearrangementにより、合計3種類のconstructsが生じる。
VDJ (I₁), VDJ (I₂) and VDJ (II)

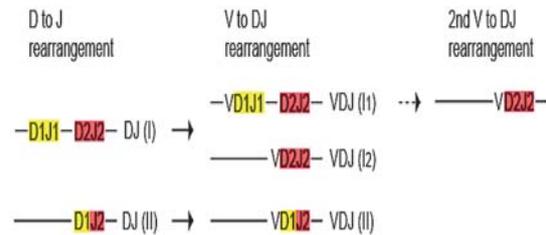


図 TCR β locus の DJ allele と VDJ allele
TCR β 遺伝子において、最初の D-J 再構成で 2 種類の DJ allele ができる。次の V-DJ 再構成で、DJ (I) allele からは 2 種類、DJ (II) allele からは 1 種類の合計 3 種類の VDJ allele ができる。

補遺 A. V to DJ再構成が、一部の胸腺細胞ではmono-allelicではなくbi-allelicに開始され、その割合が"s" ($0 \leq s < 1$)であると仮定する。

mono-allelicにV to DJ再構成を開始した胸腺細胞

$$\begin{aligned} \text{VDJ}^+ / \text{DJ} & (1-s) \times 1/3 \\ \text{VDJ}^+ / \text{VDJ}^- & (1-s) \times 2/9 \end{aligned}$$

bi-allelicにV to DJ再構成を開始した胸腺細胞

$$\begin{aligned} \text{VDJ}^+ / \text{VDJ}^+ & s \times 1/9 \text{ (しかし生き残れない)} \\ \text{VDJ}^+ / \text{VDJ}^- & s \times 2 \times 2/9 \\ \text{VDJ}^- / \text{VDJ}^- & s \times 4/9 \text{ (しかし生き残れない)} \end{aligned}$$

したがってこの場合、V to DJ再構成をおこなったDJ alleleの割合をKで表すと、

$$K = (7+s)/(10-2s) \quad (0.70 \leq K < 1)$$

補遺 B. 最初のV to DJ再構成でTCR β 鎖遺伝子を発現できなかった胸腺細胞はすべてもう一方のalleleでV to DJ再構成を開始する、と考えられてきた。しかし一部の胸腺細胞では開始されず、その割合が "t" ($0 \leq t < 1$) であると仮定する。

$$\begin{aligned} \text{VDJ}^+ / \text{DJ} & 1/3 \\ \text{VDJ}^- / \text{DJ} & 2/3 \times t \text{ (しかし生き残れない)} \\ \text{VDJ}^+ / \text{VDJ}^- & 2/3 \times (1-t) \times 1/3 \end{aligned}$$

したがってこの場合、V to DJ再構成をおこなったDJ alleleの割合をKで表すと、

$$K = (7-4t)/(10-4t) \quad (0.70 \geq K > 0.50)$$

/ DJ (II) and DJ (I) / DJ (II) cells did not undergo V to DJ rearrangement on the DJ (II) allele after the first non-productive rearrangement (no 2nd allele initiation) (Supplement B) and could not survive. Because ENU treatment does not affect on *Tcrb* rearrangement, it is probable that bi-allelic initiation and no 2nd allele initiation occur in a part of normal thymocytes.

【業績目録】

◆ 学会等の発表 ◆

(1) 学会・研究会発表

藤本真慈、柿沼志津子、島田義也：TCR β 鎖遺伝子 D to J 再構成によって生じる 2 種類の DJ allele の比率. Kyoto T Cell Conference 第 21 回学術集会 (2011.6.10-11. 京都)

FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko: Ratio of two types of murine TCR β DJ alleles after D to J rearrangement. 第 40 回日本免疫学会学術集会 (2011.11.27-29. 千葉)

FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko, SHIMADA Yoshiya: TCR β gene D to J rearrangement in thymic lymphomas induced by X-ray irradiation is indistinguishable from that by ENU, but V to DJ rearrangement is not. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011.12.13-16. 横浜)

藤本真慈：TCR β 鎖遺伝子再構成に関するパラダイムシフト. 京都大学再生医科学研究所平成 23 年度学術講演会 (2011.12.26. 京都)

再生医学応用研究部門

生体修復応用分野 Department of Biological Repair

分野主任 准教授 高橋 淳

Assoc. Prof. Jun Takahashi

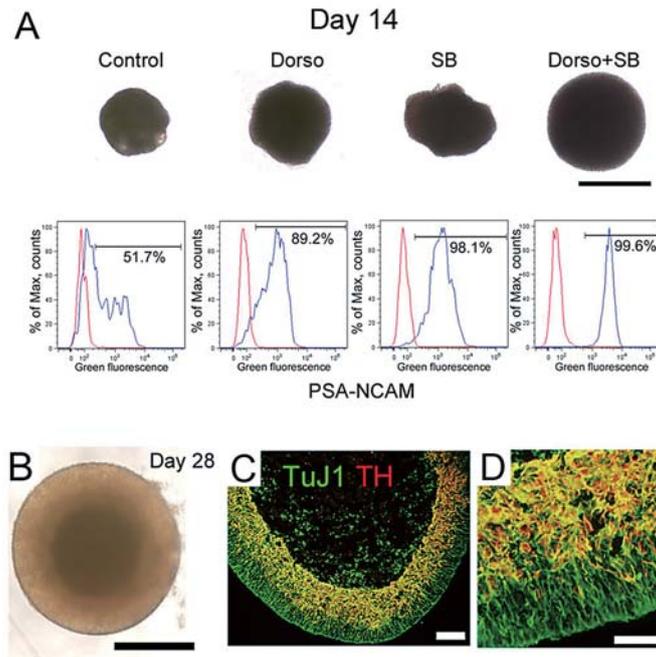
【研究概要】

我々は、胚性幹細胞（ES細胞）と人工多能性幹細胞（iPS細胞）を用いた神経難病治療法開発を目指している。なかでも、胎児黒質細胞移植によって臨床経験が蓄積されているパーキンソン病を主な対象疾患として、ドーパミン神経細胞の誘導、細胞移植による神経症状の改善に関する研究を行っている。この細胞移植療法においては、効率的な神経誘導、腫瘍形成抑制のための細胞選別、移植細胞の生存維持、長期効果と安全性の確認など検討すべき点が多々あり、現在はこれらをひとつひとつ解決している。将来的には、細胞移植や脳深部刺激療法などを含めた総合的な神経難病治療に繋げたいと考えている。

2011年は、低分子化合物を用いてBMPシグナルとTGF β /Activin/Nodalシグナルの両方を阻害することにより、ES、iPS細胞（ヒトES細胞3株とヒトiPS細胞4株）からの神経分化誘導効率が向上することを報告した（図1）。この方法はPA6フィーダー細胞を用いた方法（SDIA法）とフィーダー細胞を用いない浮遊培養法、両方の神経分化誘導において細胞の生存率と神経分化効率を向上させた。また、細胞移植においてはホスト脳環境を整えることも重要である。マウスES細胞から誘導した神経前駆細胞をマウス脳に移植しサイトカインの発現を調べたところ、IL-1 β 、IL-4、IL-6の発現が上昇することが明らかとなった。これらのうち、IL-6が神経前駆細胞の神経分化を抑制しグリア分化を促進した。そこで、細胞移植時に抗IL-6受容体抗体を同時に加えたところ、移植片への炎症細胞集積が抑えられ6週間後の移植片内の神経細胞やドーパミン神経細胞の割合が増加することが明らかとなった（図2）。しかもこの効果は免疫抑制剤（サイクロスポリン）の全身投与をずっと続けた場合と同程度であった。細胞移植は必ず脳損傷による炎症を伴うので、細胞移植時における抗IL-6受容体抗体の使用は有用であると考えられる。

We are developing a cell replacement therapy for the neurological disorders by using stem cells, especially embryonic stem cells (ES cells) and induced pluripotent stem cells (iPS cells). The main target is Parkinson's disease, and our research focuses on induction of dopaminergic (DA) neurons from these cells and transplantation of the cells into the brain to improve neurological symptoms. So far, we have demonstrated that transplantation of monkey ES cell-derived neurons improved the Parkinsonian symptoms of the monkey models. In addition, we have revealed a method to prevent tumor formation. Now, we are inducing DA neurons from human ES and iPS cells, and developing a safe and efficient method for clinical application of these cells.

In 2010, we have reported that a combination of small-molecule inhibitors of BMP (Dorsomorphin) and TGF β /activin/nodal (SB431542) signals promotes highly efficient neural induction from both human ESCs and induced pluripotent stem cells (iPSCs). The combination of small molecules had effects on both cell survival and purity of neural differentiation, under conditions of stromal (PA6) cell coculture and feeder-free floating aggregation culture,

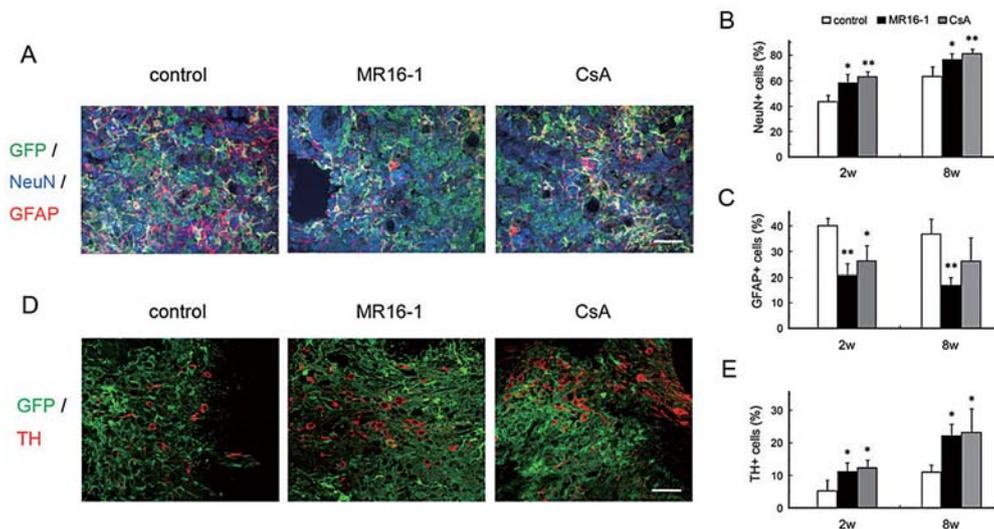


(図 1) 浮遊培養による効率的な神経分化誘導

(A) 14 日目のヒト ES 細胞由来 sphere、および PSA-NCAM によるフローサイトメトリー (B) 28 日目の sphere (C, D) 35 日目の sphere の免疫染色。緑=神経全般のマーカーである TuJ1。赤=ドーパミン神経細胞マーカーである TH。

Fig. 1 Efficient neural induction by dual inhibition in a feeder-free culture

(A) Phase contrast images of representative aggregates by 253G4 cells (upper), and histograms of flow cytometry with PSA-NCAM antibody (blue line; lower) after 14 days of differentiation. Red line: negative control stained with secondary antibodies only. (B) Phase contrast image of an aggregate at day 28. (C, D) Immunofluorescence images of a sliced aggregate at day 35, showing TuJ1+ (green) and TH+ (red) cells in the outer layer. Scale bars= 500 μ m (A, B), 100 μ m (C), and 50 μ m (D).



(図 2) 抗 IL-6 受容体抗体 (MR16-1) とサイクロスポリン (CsA) の神経 / グリア分化に対する効果

(A) 移植 8 週間目の脳切片の免疫三重染色。緑=移植細胞 (GFP でラベル)。青= NeuN (神経細胞マーカー)。赤= GFAP (アストロサイトのマーカー)。(D) 移植 8 週間目の脳切片の免疫二重染色。緑=移植細胞 (GFP でラベル)。赤= TH (ドーパミン神経細胞のマーカー)。(B, C, E) 移植細胞に対する神経細胞 (B)、アストロサイト (C)、ドーパミン神経細胞 (D) の割合。

Fig. 7. Effects of MR16-1 and CsA on the neural/glia cell fate of NPCs *in vivo*

(A) Triple-labeled immunofluorescence images of GFP+ (green), NeuN+ (blue), and GFAP+ (red) cells treated with or without MR16-1 or CsA at 8 weeks. Scale bar = 50 μ m. (D) Double-labeled immunofluorescence images of GFP+ (green) and TH+ (red) cells treated with or without MR16-1 or CsA at 8 weeks. Scale bar = 50 μ m. The percentages of NeuN+/GFP+ (B), GFAP+/GFP+ (C), and TH+/GFP+ (E) cells among the total GFP+ cell population are presented as means \pm SEM. n = 5 for each group. Values were compared at each time point (* P < 0.05, ** P < 0.01 compared with control samples, ANOVA).

for all seven pluripotent stem cell lines that we studied, including three ESC and four iPSC lines. Small molecule compounds are stable and cost effective, so our findings provide a promising strategy for controlled production of neurons in regenerative medicine.

We also investigated the cytokines that affect graft cell survival and differentiation, by using stromal cell-derived inducing activity to induce the differentiation of neural progenitor cells (NPCs) from mouse ES cells and by transplanting the NPCs into mouse brain. Examination of surrounding brain tissue revealed elevated expression levels of interleukin (IL) -1β , IL-4, and IL-6 in response to NPC transplantation. Among these, only IL-6 reduced neuronal differentiation and promoted glial differentiation in vitro. When we added anti-IL-6 receptor antibodies to NPCs during transplantation, this single and local blockade of IL-6 signaling reduced the accumulation of host-derived leukocytes, including microglia. Furthermore, it also promoted neuronal differentiation and reduced glial differentiation from the grafted NPCs to an extent similar to that with systemic and continuous administration of cyclosporine A. These results suggest that local administration of anti-IL-6 receptor antibodies with NPCs may promote neuronal differentiation during the treatment of neurological diseases with cell replacement therapy.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Saiki H, Miyamoto S, Takahashi J. Survival of human induced pluripotent stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons in the brain of a primate model of Parkinson's disease. *J Parkinson's Disease* 1 (4): 395-412 (2011)
- Gomi M, Aoki T, Takagi Y, Nishimura M, Ohsugi Y, Mihara M, Nozaki K, Hashimoto N, Miyamoto S, Takahashi J. Single and local blockade of IL-6 signaling promotes neuronal differentiation of transplanted ES cell-derived neural precursor cells. *J Neurosci Res* 89 (9): 1388-1399 (2011)
- Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong Hyenjong, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S. A more efficient method to generate integration-free human iPSCs. *Nat Methods*, 8 (5): 409-412 (2011)
- Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Nishimura K, Takahashi J. Small molecule inhibitors of BMP and Activin/Nodal signals promote highly efficient neural induction from human pluripotent stem cells. *J Neurosci Res* 89(2): 117-126 (2011)

2) 総説

- 土井大輔、高橋 淳：再生医療—臨床応用へ向けての現状と課題（パーキンソン病） 総合リハビリテーション Vol.39 No.1: 31-36 (2011)
- 土井大輔、高橋 淳：パーキンソン病に対する細胞移植治療 脳神経外科速報 Vol.21 No.9: 1018-1025 (2011)
- 西村周泰、高橋 淳：iPS細胞のパーキンソン病への応用 細胞 Vol.43 No.10: 19-22 (2011)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

森実飛鳥、土井大輔、菊地哲広、吉川達也、五味正憲、高橋 淳：ヒト ES 細胞を用いたカニクイザルパーキンソン病モデルへの細胞移植 第 10 回 日本再生医療学会総会 (2011.03.01 東京)

森実飛鳥、土井大輔、菊地哲広、吉川達也、尾上浩隆、林 拓也、川崎俊之、高橋 淳 カニクイザルパーキンソン病モデルへの ヒト ES 細胞由来ドーパミン神経細胞の移植 Transplantation of stem cell-derived dopaminergic neurons in primate brains 第 70 回日本脳神経外科学会総会 (2011.10.12 横浜)

Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Yoshikawa T, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Sasai Y, Suemori H, Takahashi J.: One -year observation of dopaminergic neurons derived from human embryonic stem cells in primate models of Parkinson's disease. The ISSCR 9th annual meeting (2011.6.16 Toronto, Canada)

Morizane A, Takahashi J: Research for stem cell therapy with primate Parkinsonian model. 第 6 回研究所ネットワーク国際シンポジウム (2011.6.9 東京)

土井大輔、菊地哲弘、森実飛鳥、高橋 淳：表面抗原を用いたヒト多能性幹細胞由来のドーパミン神経細胞純化方法の検討 第 10 回日本再生医療学会総会 (2011.3.1-2 東京)

Doi D, Kikuchi T, Morizane A, Takahashi J.: Sorting and transplantation of dopaminergic progenitor cells derived from human pluripotent stem cells. The 9th annual meeting of ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 2011 (2011.6.14-18 Tronto, Canada)

土井大輔、森実飛鳥、菊地哲広、吉川達也、宮本 享、高橋 淳：表面抗原を用いたヒト 多能性幹細胞由来のドーパミン神経細胞純化方法の検討 第 70 回日本脳神経外科学会総会 (2011.10.12-14 横浜)

西村周泰、高橋 淳：iPS 細胞由来ドーパミン神経細胞移植におけるホスト脳環境の影響。 第 34 回日本神経科学大会 (2011.9.17 横浜)

Nishimura K, Takahashi J.: Acute alteration in host brain environment accelerates the maturation and differentiation of grafted iPSC-derived dopaminergic neurons. The 21st CDB Meeting The 1st CDB-Regeneration Biology Study Group meeting "from Regeneration Biology to Regenerative Medicine (I)". (2011.11.24-25 Kobe, Japan)

Kikuchi T, Morizane A, Okita K, Inoue H, Takahashi J.: Induced pluripotent stem cells derived from Parkinson's disease patient differentiated into midbrain dopaminergic neurons. International Society for Stem Cell Research 9th Annual meeting (2011.6.15-18. Toronto, Canada)

小倉 綾、森実飛鳥、中島悠介、宮本享、高橋淳：神経前駆細胞脳内移植後の腫瘍化・過増大の制御における Notch inhibitor の有効性 第 10 回日本再生医療学会総会 (2011.3.1-2 東京)

Ogura A, Morizane A, Nakajima Y, Miyamoto S, Takahashi J.: Inhibition of Notch Signaling Prevents Human induced Pluripotent Stem Cell-derived Neuronal Progenitors From Undergoing Overgrowth *in vivo* ISSCR 2011 (2011.6.14-18, Tronto, Canada)

佐俣文平、土井大輔、尾野雄一、高橋淳：幹細胞から分化誘導した中脳ドーパミン神経細胞の濃縮。 第 10 回日本再生医療学会総会 (2011.3.1 東京)

2) 講演・シンポジウム

- 高橋 淳：Challenges towards ES cell therapy for Parkinson's disease 第6回研究所ネットワーク国際シンポジウム（2011年6月10日 東京）
- 高橋 淳：パーキンソン病に対するES, iPS細胞移植治療の開発 第26回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会（2011年6月25日 東京）
- 高橋 淳：ES, iPS細胞を用いた神経再生医療 社団法人日本脳神経外科学会第70回学術総会（2011年10月14日 横浜）
- 高橋 淳：霊長類モデルを用いたパーキンソン病に対する幹細胞移植治療の前臨床研究 第7回霊長類医学フォーラム（2011年11月18日 つくば）
- 高橋 淳：パーキンソン病に対する幹細胞移植治療 堺市難病支援ネットワーク医療講演会（2011年11月19日 堺）
- 高橋 淳：パーキンソン病に対する多能性幹細胞移植治療の開発研究 ヒトES/iPS細胞：産業応用最前線セミナー～細胞治療と創薬スクリーニング～（2011年12月12日 東京）

組織再生応用分野 Department of Tissue Regeneration

分野主任 教授 戸口田淳也

Prof. Junya Toguchida

【研究概要】

本研究分野の目標は間葉系組織の増殖分化機構を理解することで、間葉系組織の臨床病態を分子レベルで明らかにし、それに基づいて新規の治療法を開発することである。以下のテーマについて現在研究を遂行している。

1. 間葉系幹細胞の増殖及び分化制御機構の解明

骨髄間質細胞中には、間葉系組織の様々な細胞に分化可能な組織幹細胞である間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell, MSC) が存在しているとされている。しかし MSC の本態に関しては未解明な点が多く、MSC を用いた間葉系組織の再生医療を科学的根拠に基づいた医療とするためには、その理解が必須である。我々は京都大学医学部整形外科学教室との共同研究として、MSC の初代培養を行い、増殖及び分化能に関する解析を行ってきた。増殖制御機構に関しては、細胞周期制御因子である p16 遺伝子の発現亢進が細胞老化を誘導し、増殖停止をもたらす主因であることを報告した。続いて低酸素環境での培養により、p16 遺伝子の発現亢進が阻害でき、細胞老化に至ることなく、かつ分化能を維持したまま長期間増殖を継続できること、更に低酸素により ERK の活性が阻害され、それが p16 遺伝子の発現亢進阻害の一因であることを見出した。現在、低酸素環境による選択的細胞増殖の可能性に関して検討している。

2. 間葉系幹細胞の肉腫起源細胞及び肉腫幹細胞としての意義について

癌の起源細胞が各組織に存在する組織幹細胞であることを示す報告が相次いでおり、MSC の場合、間葉系組織由来の腫瘍、すわなり肉腫の起源細胞になりうる。同時に MSC は、造腫瘍能が高く、化学療法に対して抵抗性である肉腫幹細胞の起源細胞ともなりうる。言い換えれば、肉腫幹細胞で特異的に発現しているマーカーは、MSC を同定するマーカーとなる可能性がある。そこで我々は現在、肉腫の代表的なものである骨肉腫と MSC の両者で発現している遺伝子である p75NGFR に注目し、これを指標として MSC と骨肉腫幹細胞の関連性を解析している。

3. MSC を用いた骨壊死病態に対する新規治療法の臨床応用

MSC を用いた再生医療の実践として、骨壊死病変に対する細胞移植治療法の開発に取り組んでいる。イヌを用いた基礎実験のデータに基づき、京都大学医学部附属病院内の分子細胞治療センターを使用する臨床治験を「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に基づいた臨床研究として京都大学医学部医の倫理委員会及び厚生労働大臣諮問委員会に申請し、平成 19 年 11 月 25 日国内初の承認を受けた。平成 20 年 2 月 5 日に第一例の治療を開始し、平成 21 年 12 月末までに 15 例の治療を施行した。大腿骨頭壊死症例 10 例に関しては全例術後 2 年経過時点の評価が終了し、良好な成績が得られており、その結果に基づいて、先進医療への申請を計画している。

4. 骨軟骨再生に対するプロスタノイド受容体作動性物質の応用

細胞を用いた再生医療と同時に、薬剤等による *in situ* での組織再生の探求も重要な課題である。我々は生理活性物質であるプロスタノイドに注目し、その受容体特異的作動薬の応用を検討してきた。プロスタグランジン E2 受容体の中の EP2 受容体に特異的に作用するアゴニストにより、軟骨細胞の増殖が促進されることを報告し、この知見に基づいて家兎を用いた *in vivo* 治療実験を行った。まず軟骨欠損を作成し、修復過程に対する EP2 アゴニ

ストの作用を検討した。その結果、関節軟骨の修復が促進され、かつ正常な骨軟骨境界構造が構築され、長期に渡り関節構造が維持されることを見出した。続いて前十字靭帯切離及び内側半月板部分切除による外傷変性モデルを作成し（図 1A）、直後より EP2 アゴニストを投与し、変性の進行に対する効果を検討した。その結果、投与量依存性に変性が軽減されることが判明した（図 1B）、免疫組織学的解析及び *in vitro* 培養系での実験結果より、この変性予防作用は MMP-13 産生の抑制を介した作用であると想定された。これらの結果より、この EP2 アゴニストは、臨床応用が期待できる薬物であると考えている。

5. iPS 細胞を用いたアプローチによる研究

平成 19 年 11 月に山中伸弥教授らによって樹立されたヒト iPS 細胞は、自家多能性幹細胞を用いた再生医療を可能とする画期的な細胞である。我々は平成 22 年 4 月 1 日に設立された京都大学 iPS 細胞研究所の一員として、iPS 細胞に関する研究を行っている。現在のテーマは、同一ドナーの異なる組織から樹立した iPS 細胞の組織依存性の検討及び骨軟骨関連難治性疾患患者から樹立された iPS 細胞を用いた病態解明と創薬である。

(文責 戸口田淳也)

The objectives of our department are to disclose the pathology of disorders in mesenchymal tissues at molecular level and to develop new therapeutic modalities by understanding physiological growth and differentiation of mesenchymal cells. Following projects are currently undertaken.

1. Regulation of growth and differentiation potential of mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells(MSC), which exist in bone marrow stromal tissues, have a potential to differentiate to cells of various types in mesenchymal tissues. However, many fundamental features of, are still unknown,

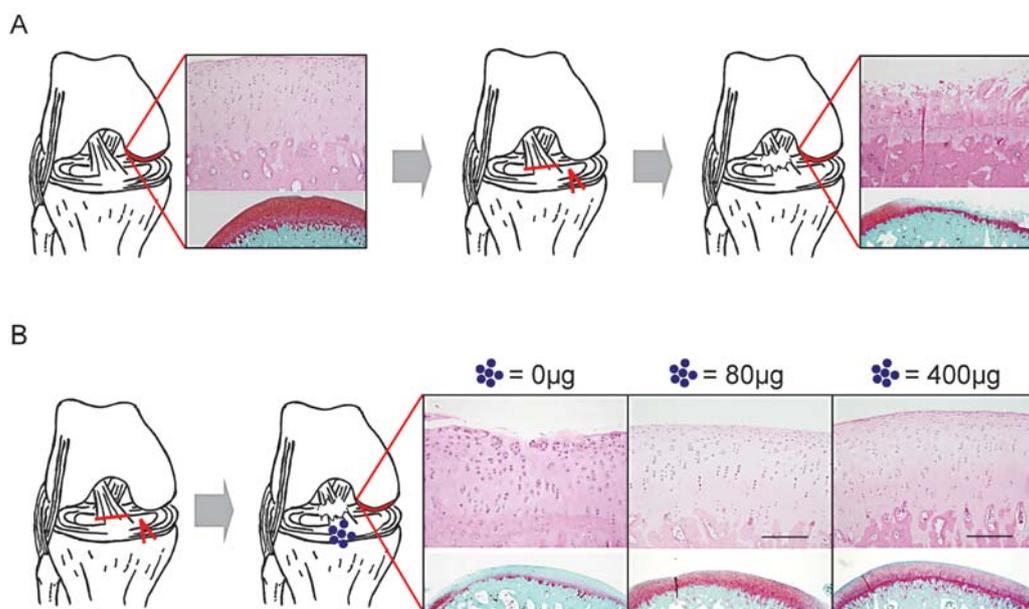


図 1. EP2 アゴニストの軟骨変性阻害効果。A. 家兎外傷性膝関節変性モデル。前十字靭帯を切離し、更に内側半月板を部分切除することにより、膝関節は著しく不安定となり、その結果、4 週間後には著しい関節軟骨の変性が発生する。B. EP2 アゴニストによる治療実験。徐放剤化（青丸）された EP2 アゴニストの投与により、濃度依存性に軟骨変性が軽減された。

Figure 1. Therapeutic effect of EP2 agonist for cartilage degeneration. A. Traumatic degeneration model in rabbit knee joints. The joint instability due to the transaction of anterior cruciate ligament and partial resection of medial meniscus induces severe degeneration of articular cartilage after 4 weeks. B. Therapeutic effect of EP2 agonist. EP2 agonist was administrated in sustained release tablets (blue dots), and cartilage degeneration was rescued dose-dependently.

which are crucial for the development of regeneration therapy using MSC as the evidence based medicine. In collaboration with the Department of Orthopaedic Surgery in Kyoto University Hospital, we have analyzed the growth and differentiation potential of primary human MSCs. As for the growth regulation, we found that increased expression of the p16 gene, which is a key regulator of cell cycle, was the main cause inducing the senescence and growth arrest of MSC. We also found that the hypoxic culture condition inhibited the upregulation of the p16 gene, and retained MSCs in the senescence-free state with multidirectional differentiation properties. We also found that hypoxia down-regulated the activity of ERK, which, at least in part, involved in the down-regulation of the p16 gene. We are currently investigating whether hypoxic culture can select particular types of cells.

2. MSC as cell-of-origin and tumor-initiating cells of sarcomas

A number of recent reports suggest that cancer cells are derived from stem cells in each tissue. Therefore MSC can be cell-of-origin of sarcomas, which are malignant tumors developing in mesenchymal tissues. Also MSC can be tumor-initiating cells of sarcomas, which are highly tumorigenic and resistant to chemotherapeutic drugs. In other words, markers for sarcoma initiating cells can be used to identify MSC among stromal cells. We are currently focusing of p75NGFR, which is expressed on both MSC and osteosarcoma, a representative sarcoma derived from bone marrow stromal cells.

3. Clinical trial of the new treatment for osteonecrosis using MSC.

As the clinical application of MSC, we have engaged in the development of cell transplantation therapy for osteonecrosis. Based on the results obtained by the animal experiments using dogs, we established the protocol for the clinical trial in collaboration with Center for Cellular and Molecular Therapy in Kyoto University Hospital, which followed the guideline for the clinical trial using somatic stem cells issued by the the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW). After the examination of ethical committee of Kyoto University and MHLW, our protocol was approved on November 25, 2007, and the first case was registered on November 31, 2007. Since then 15 cases have been treated until the end of December 2010. All of 10 cases of femoral head necrosis were followed at least 24 months, showing satisfactory results. Based on the data of this intermediate evaluation, we are going to submit this method as an advanced therapy for MHLW.

4. Application of agonist for the PGE2 receptors for the articular cartilage repair

In addition to the development of cell therapy, it is also important to develop the *in situ* treatment using drugs or small molecular materials. We have focused on prostanoids, which belong to physiological active materials, and applied receptor agonists for the regeneration therapy. First we focused on EP2, which is one of four types of prostaglandin E2 receptor, and reported that the agonist specific to EP2 stimulated the growth of mouse and human chondrocytes extracted from articular cartilage. Based on these results, we have performed the *in vivo* experiments using rabbits. At first, we created the osteochondral defects and investigated the effect of EP2 agonist for tissue regeneration. As a result, in combination with appropriate drug carriers, EP2 agonist enhanced the cartilage regeneration *in vivo*, and contributed to reconstruct the osteo-chondral boundary, which is important factor to maintain normal structure of articular cartilage. Next, we created traumatic degeneration model by the dissection of anterior cruciate ligament and partial resection of medial meniscus and investigated the preventive effect of EP2 agonist (Fig. 1A). We found that administration of EP2 agonist prevented the degeneration of

articular cartilage dose-dependently. Immunohistochemical analyses and in vitro experiments suggested that the preventive effect of EP2 agonist is through the inhibition of MMP-13 expression, which is one of major protease to break cartilage matrix. These data suggest that this receptor-specific agonist is a promising molecule for clinical application.

5. Research related to iPS cells

Human iPS cells, which were established by Prof. Shinya Yamanaka on November 2007, are pluripotent stem cells enabling the regenerative medicine using patients' own cells. We have been engaging the research related to iPS cells as members in the Center for iPS Research and Application, Kyoto University, which was established on April 1, 2010. Current theme are to find cell-of origin-dependent characteristics of iPS cells using genetically matched iPS cells established from different tissues of same donors and to investigate the pathology and to develop new therapeutic drugs for intractable bone and cartilage diseases using patients-derived iPS cells.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

(1) 原著論文

1. Uejima D, Nishijo K, Kajita Y, Ishibe T, Aoyama T, Kageyama, Iwaki H, Nakamura T, Iida, Yoshiki T, and Toguchida J. Involvement of a cancer biomarker C7orf24 in the growth of human osteosarcoma. *Anticancer Res.* **31**: 1297-305 (2011)
2. Furu M, Kajita Y, Nagayama S, Ishibe T, Shima Y, Nishijo K, Uejima D, Takahashi R, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, Nakashima Y, Ikegawa M, Imoto S, Katagiri T, Nakamura Y, Toguchida J. Identification of AFAPIL1 as a prognostic marker for spindle cell sarcomas. *Oncogene* **30**: 4015-25 (2011)
3. Mitsui H, Aoyama T, Furu M, Ito K, Jin Y, Maruyama T, Kanaji T, Fujimura S, Sugihara H, Nishiura A, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J. EP2 receptor-selective agonist prevents the degeneration of articular cartilage in rabbit knees with traumatic instability. *Arthritis Res Ther* **13**: R146 (2011)
4. Masago Y, Hosoya A, Kawasaki K, Kawano S, Nasu A, Toguchida J, Fujita K, Nakamura H, Kondoh G, Nagata K. Molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation. *J Cell Science*, in press.
5. 青山朋樹、笠井泰成、上田路子、山田実、戸口田淳也、前川平、井沼俊明、高橋稔、海平和男. 再生医療に用いる生体由来物搬送容器ユニットの開発. *バイオインダストリー* **28**: 29-34 (2011)
6. 青山朋樹、中村孝志、前川平、戸口田淳也. 間葉系幹細胞を用いた骨壊死治療. *オルソタイムズ* **5**:2 (2011)
7. 戸口田淳也、青山朋樹、後藤公志、柿木良介、笠井泰成. 大腿骨頭無腐性壊死症に対する細胞治療. *日本臨床* **69**: 2225-30 (2011)
8. 戸口田淳也. 第44回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会を開催して. *日本整形会誌* **85**: 885-7 (2011)

◆ 学会等の発表 ◆

(1) 学会・研究会発表

- 那須輝、加藤友久、山本拓也、中村孝志、戸口田淳也。同一ドナーの異なる組織から樹立した iPS 細胞の比較検討。第 10 回日本再生医療学会 (2011.3.2 東京)
- 三井裕人、青山朋樹、小林恭介、早川和男、笠原崇、伊藤錦哉、布留守敏、丸山隆幸、金治敏也、杉原光、藤村心成、大塚隆信、中村孝志、戸口田淳也。ウサギ外傷性軟骨変性モデルを用いたプロスタグランジン E2 EP2 受容体特異的作動薬の検証。第 24 回日本軟骨代謝学会 (2011.3.5 福岡)
- 渡邊健一郎、加藤格、平松英文、足立壮一、中山富貴、仲俣岳晴、坪山直生、戸口田淳也。骨軟部腫瘍に対する整形外科・小児科共同の取り組み。第 21 回京都がん研究会プログラム (2011.3.25 京都)
- Hayakawa K, Kato T, Nasu A, Ikeya M, Otsuka T, Toguchida J. Generation of canine iPS cells and their characteristics. 第 9 回 ISSCR (2011.6.17 Toronto)
- 玉置さくら、加藤友久、梶田洋一郎、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也。SYT-SSX のエピゲノム発現制御機構への関与。第 44 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2011.7.14 京都)
- 中山富貴、仲俣岳晴、岡本健、戸口田淳也。骨腫瘍切除後の処理骨による再建 - アンケートによる実態調査。第 44 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2011.7.14 京都)
- 那須輝、布留守敏、吹上謙一、中山富貴、中村孝志、古瀬幹夫、戸口田淳也。神経鞘由来腫瘍におけるクロードイン 19 の発現様式。第 44 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2011.7.14 京都)
- 岡本健、中山富貴、仲俣岳晴、坪山直生、戸口田淳也、渡邊健一郎、中村孝志。Etoposide を使用した高悪性度骨肉腫に対する化学療法の成績。第 44 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2011.7.14 京都)
- 小西英一、岡本健、仲俣岳晴、中山富貴、戸口田淳也。日本における MFH 診断例数の変遷とその影響 - 日本整形外科学会のアンケート調査結果をもとに。第 44 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2011.7.15 京都)
- 仲俣岳晴、中山富貴、岡本健、坪山直生、戸口田淳也。悪性骨・軟部腫瘍に対する化学療法施行体制 - アンケートによる実態調査。第 44 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2011.7.15 京都)
- 戸口田淳也、青山朋樹、根尾昌志、前川平。間葉系幹細胞を用いた骨再生医療の開発。第 29 回日本骨代謝学会 (2011.7.28 大阪)
- Matsumoto Y, Ikeya M, Nasu A, Asaka I, Otsuka T, Hsiao E, Toguchida J. Application of iPS cells to the research of fibrodysplasia ossificans progressive. ASBMR 2011 (2011.9.17 San Diego)
- 玉置さくら、加藤友久、梶田洋一郎、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也。SYT-SSX のエピゲノム発現制御機構への関与。第 70 回日本癌学会総会 (2011.10.3 名古屋)
- 那須輝、布留守敏、吹上謙一、中山富貴、中村孝志、古瀬幹夫、戸口田淳也。神経鞘由来腫瘍におけるクロードイン 19 の発現様式。第 70 回日本癌学会総会 (2011.10.4 名古屋)
- 早川和男、加藤友久、那須輝、大塚隆信、戸口田淳也。イヌ体細胞組織からの iPS 細胞の樹立。第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2011.10.20 前橋)
- Kato T, Tamaki S, Takahashi K, Aoi T, Yamanaka S, Karin M, Toguchida J. Role of IKK/NF- κ B signaling axis during the cell reprogramming. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011.12.13 横浜)
- Hayakawa K, Kato T, Nasu A, Ikeya M, Otsuka T, Toguchida J. Generation of canine iPS cells and their characteristics. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011.12.13 横浜)

Tamaki S, Kato T, Kajita Y, Toguchida J. Epigenetic regulation of FZD10 by SYT-SSX fusion oncogene during the lineage commitment. 第34回日本分子生物学会年会 (2011.12.16 横浜)

(2) 講演・シンポジウム

戸口田淳也. 幹細胞研究の現況と展望 - 組織幹細胞から iPS 細胞まで. 第187回北陸整形外科集談会 (2011.1.16 金沢)

戸口田淳也. 幹細胞を用いた再生医療の現況と展望. 京都府社会保険診療報酬支払基金審査委員会学術講演会 (2011.1.26 京都)

戸口田淳也. 間葉系幹細胞 - 肉腫の起源と再生医療. 第1回整形外科骨転移フォーラム (2011.3.5 名古屋)

戸口田淳也. 幹細胞による再生医療の現状と展望. 第15回藤井寺・羽曳野症例検討会 (2011.3.12 大阪)

Toguchida J. Tissue stem cell and sarcoma stem cell. Annual Congress of the Korean Bone and Joint Tumor Society (2011.4.15 Suwon)

戸口田淳也. 幹細胞を用いた再生医療の現況と展望. 第8回泌尿器科再建再生研究会イブニングセミナー (2011.6.11 京都)

戸口田淳也. 間葉系幹細胞 - 再生医療と肉腫研究への応用. BD 学術セミナー (2011.9.12 大阪)

戸口田淳也. iPS 細胞で難病に挑む - iPS 細胞 X FOP (進行性骨化性線維異形成症). 患者さんと研究者が繋がるシンポジウム (2011.10.2 神戸)

戸口田淳也. 再生医療をめぐる期待と現実. 第42回聖隷浜松病院病院学会 (2011.10.9 浜松)

戸口田淳也. 運動器腫瘍の細胞と遺伝子. 第1回名古屋運動器腫瘍セミナー (2011.11.19 名古屋)

器官形成応用分野 Department of Organ Reconstruction

准教授 角 昭一郎

Assoc. Prof. Shoichiro Sumi

【研究概要】

本分野では、糖尿病の再生医療を中心的な研究テーマとしており、全世界で増加している糖尿病に対して、希望すればいつでも受けられる安全で根治的な治療法の開発を目指して研究を行っている。重症の糖尿病で、インスリン補充療法による血糖コントロールが困難な場合、膵臓や膵島の移植が適応となる。しかし、ドナー不足と永続的な免疫抑制という移植医療に共通の問題は避けられず、いつでも受けられる安全な治療法という理想からは大きな隔りがある。また、低侵襲の移植医療として大きな期待を担ってきた膵島移植は、長期的な有効性に疑問が持たれるなどなお解決されるべき問題が多い。このような状況の中、糖尿病の再生医療には大きな期待が寄せられている。

膵島再生医療を実現する道筋としては、最も直接的に自己の膵島再生を促進する方法、自己または他者に由来する組織幹細胞あるいはES（胚性幹）細胞やiPS（人工多能性幹）細胞から膵島様細胞を分化誘導する方法、さらに、ヒト以外の異種動物の膵島を分離して利用する方法などが研究されている。しかし、自己由来の細胞ではなく、他者や異種の細胞を移植する場合には拒絶反応の対象となり、また、治療対象となる重症糖尿病の多くが自己免疫の関与する1型糖尿病であることを考慮すると、膵島や膵島様細胞を患者の免疫機構から保護する対策が必要である。本分野では、免疫隔離能を有する各種の半透膜やゲルで膵島や膵島様細胞を包んで拒絶反応を抑制することで、免疫抑制を行うことなく膵島移植と同等の治療効果が期待されるバイオ人工膵の研究を行っている。実際に、国外ではマイクロカプセル化膵島の腹腔内移植による糖尿病治療の臨床研究がすでに行われており、一定の成果をあげている。しかし、マイクロカプセル化膵島は一度移植すると完全に除去することが困難であり、この点で安全性に限界がある。

本分野では、ラットやブタの膵島分離法を確立し、これらを用いてマイクロカプセル化膵島の研究を行って来た。マイクロカプセル化膵島は、前述のマイクロカプセル化膵島とは対照的に、回収や交換が可能であり、臨床応用にはより有利と考えられる。過去には、メッシュ補強ポリビニルアルコール（PVA）バッグやポリスチレンスルホン酸混合アガロースゲルによるカプセル化など、各種のマクロデバイスの研究開発を行うとともに、あらかじめ血管誘導処置を施した皮下組織にこのようなデバイスを移植することで異種膵島による長期の血糖正常化が達成されることをマウス糖尿病モデルの治療実験で明らかにしてきた。近年では、イヌなど大型動物や最終的な目標であるヒトに応用可能な大型のバイオ人工膵を作製することをめざした新しい独自のバイオ人工膵作成技術として、膵島の凍結保存法と凍結によるPVAのゲル化を組み合わせた作製法を開発して、その有用性をマウスおよびラットの糖尿病モデルへの移植実験で確認している。即ち、膵島凍結保存液にPVAを溶解した粘性の高い溶液に膵島を浮遊させ、この液体をメッシュで補強してシート状に成形した後、凍結・溶解してゲル状のバイオ人工膵シートを作成する。この方法によれば、デバイスの面積や厚さを自由にコントロールすることが可能で、将来の大型化に大きく道を拓くものと考えている。また、PVAマイクロカプセル化膵島は凍結保存が可能で、この点では、輸送・蓄積・品質管理などに対応できるという臨床応用に適した大きな利点を有している。

本年は、*in vitro* でより生理的な膵島様細胞を誘導する目的で、細胞塊作製の研究を行い、MIN6細胞で細胞塊を形成させることにより、膵島特異的な遺伝子発現の増強と、より生理的なブドウ糖-インスリン分泌反応曲線およびインスリン分泌反応の迅速化を実現することに成功した。今後はこのような細胞のPVAマクロカプセル化による糖尿病治療を目指して研究を展開する予定である。これと並行して、東北大学・後藤昌史教授・坂田直昭助手らと共同で、ブタ膵島を遠隔地から輸送し、これをPVAマクロカプセル化する研究を、ペット動物の糖尿病治療等への応用を視野に入れて進めている。

膵島細胞は*in vitro* では増殖せず長期培養が困難であるが、高い増殖能を有する間葉系幹細胞とを細胞融合させることで、より糖尿病治療に適した細胞を作製する研究に取り組み、電氣的に細胞融合した細胞が*in vitro* で長期にインスリン分泌能を維持するとともに移植効果も良好であることを示唆する結果を得ている。さらに、マウスES細胞をdefinitive endodermを経て膵臓の細胞や肝細胞へと分化誘導する研究を行っており、PDX1やインスリンを発現する細胞を安定的に効率良く誘導できる培養条件の設定をめざして実験を続けている。

Our final goal is to establish regenerative medicine for diabetes mellitus, which should be a safe and effective therapy available whenever and wherever required for a growing number of diabetes patients worldwide. In severely diabetic patients, pancreas or islet transplantation is indicated, if good control of blood glucose levels is not available. However, donor shortage and complications due to immunosuppressive therapy are inevitable problems of allo-transplantation. In addition, islet transplantation that drew attention as a promising curable treatment has become less attractive because of rather a short duration of insulin-free period after transplantation. Therefore, current transplantation therapies are still far from our dream. In such circumstances, much expectations are placed on regenerative medicine for diabetes mellitus.

In order to develop regenerative medicine for diabetes mellitus, there are several different approaches such as enhancement of patient's own islet regeneration, auto- or allo-geneic islet-like cells differentiated from somatic, embryonic or induced pluripotent stem cells *in vitro* and xeno-geneic islets isolated from the pancreas of animals e.g. pigs. However, as long as non-self cells are used and even autologous cells are used to type-1 diabetes that has autoimmune background, efficient immunosuppression should be required. In order to avoid it, we are diligently studying bio-artificial pancreas, in which islet cells are encapsulated by several kinds of semi-permeable membrane or hydrogel and thereby protected from host immune responses. In fact, clinical trial of micro-encapsulated porcine islets are ongoing in a few foreign countries, showing certain beneficial effects. However, micro-encapsulated islets do not allow complete retrieval, which may lower the safety level.

We have established isolation method of porcine pancreatic endocrine cells as well as rat islets. Using these islets, we have successfully shown the efficacy of several macro-devices of bio-artificial pancreas. In contrast to micro-encapsulation, macro-devices are retrievable and exchangeable, which is important advantage toward clinical application. In our past studies, mesh-reinforced polyvinyl alcohol (PVA) tube and bag, rod-shaped device of agarose containing polystyrene sulfonate, anti-complement substance, and so on were investigated in allo- and xeno-geneic situations. We have also shown that the subcutaneous site pretreated for angiogenesis can be successfully used for transplantation site of these devices, leading to long-term normalization of blood glucose levels in diabetic mice. Recently we developed a novel method to make a sheet-shaped PVA-macroencapsulated islets by a combination of the freezing technique of islets and the phenomenon that PVA solution becomes gel

by freezing and thawing. Briefly, islets are suspended in islet freezing solution containing PVA and this viscous solution is molded into a mesh-reinforced sheet and then frozen. This method enables us to make a device of any size with any shape that may be applicable to bigger animals and humans. PVA-macroencapsulated islets are unique cryo-preservable bio-artificial pancreas that allows easy shipping, accumulation and quality-control of the device, which is suitable for clinical usage.

In the year 2011, we studied the merit of cell cluster formation for procession of islet-like cells with more physiological function. We found that formation of cell cluster of MIN6 cells enhances islet specific gene expression, more physiological glucose-insulin response curve and more rapid insulin release in response to glucose stimulation. We will PVA-macroencapsulate these *in vitro* processed cells and study the feasibility of them for diabetes therapy. In addition, we are studying PVA-macroencapsulation of porcine islets that is shipped from Sendai in collaboration with Professor Masashi Goto and Dr. Naoaki Sakata of Tohoku University for the realization of diabetes therapy in pet animals.

Other related researches are as follows. We have established a method of cell fusion between islet cells and mesenchymal stem cells and obtained results suggesting that such cells show persistent insulin-release *in vitro* and more efficient after transplantation. Furthermore, we are studying beta-cell and hepatocyte differentiation from mouse ES cells through definitive endoderm to establish the stable and efficient differentiation method.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

(1) 原著論文

- Sumi S. Regenerative medicine for insulin deficiency: creation of pancreatic islets and bioartificial pancreas. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 18: 6-12, 2011.
- Yang KC, Qi Z, Yanai G, Shirouzu Y, Lu DH, Lee HS, Sumi S. Cell coupling regulates Ins1, Pdx-1 and MafA to promote insulin secretion in mouse pancreatic beta cells. Process Biochemistry 46: 1853-1860, 2011.
- Shirouzu Y, Ohya Y, Hayashida S, Asonuma K, Inomata Y. Difficulty in sustaining hepatic outflow in left lobe but not right lobe living donor liver transplantation. Clin Transplant 25: 625-32, 2011.
- Qi Z, Yamamoto C, Imori N, Kinukawa A, Yang KC, Yanai G, Ikenoue E, Shen Y, Shirouzu Y, Hiura A, Inoue K, Sumi S. Immunoisolation effect of polyvinyl alcohol (PVA) macro-encapsulated islets in type 1 diabetes therapy. Cell Transplant. (In press)

(2) 著書・総説等

- 角 昭一郎. 総説：ポリビニルアルコール - マクロカプセル化膵島開発の現況. 胆膵の病態生理 27: 41-46, 2011.
- 角 昭一郎. バイオ人工膵. 胆と膵 32 (11): 1237-1241, 2011.
- Sakata N, Sumi S, Yoshimatsu G, Goto M, Unno M. EDITORIAL: Encapsulated islets transplantation-past, present and future- World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology (in press)

◆ 学会等の発表 ◆

(1) 学会・研究会発表

漆智、角昭一郎、楊凱強、柳井伍一、日裏彰人、白水泰昌. 膵島保存における PVA マクロカプセル化膵島の応用.

第 42 回日本膵臓学会大会. (弘前市) 2011 年 7 月 30 日

角 昭一郎、白水 泰昌、柳井 伍一. 現行膵島の問題点と今後の方向性. ワークショップ: 膵・膵島移植の今後の展

開. 第 47 回日本移植学会総会 (仙台市) 2011 年 10 月 5 日

(2) 講演・シンポジウム

角 昭一郎. 糖尿病治療を目指した PVA マクロカプセル化膵島の研究について. 医工学フォーラム 2010 年度特別
学術講演会. (京都市) 2011 年 2 月 23 日

Sumi S. Cryo-preserved Macro-Encapsulated Islets for Diabetes Therapy. The 2nd Taiwan-Japan Symposium on
Nanomedicine. (Taipei, Taiwan) Feb. 24, 2011

角 昭一郎. 糖尿病の再生医療. 第 1 回 同志社大学 成体医療材料研究センターシンポジウム. (京都府田辺市)
2011 年 2 月 26 日

角 昭一郎、漆 智、楊 凱強、柳井 伍一、白水 泰昌. ET-Kyoto 液を用いたポリビニルアルコール (PVA) マクロカ
プセル化膵島の改良. 京都臓器保存セミナー. (京都市) 2011 年 3 月 19 日

角 昭一郎. 膵臓外科から糖尿病再生医療へ. ミニレクチャー: 私の膵疾患研究 ―臨床との接点―. 第 42 回日
本膵臓学会大会. (弘前市) 2011 年 7 月 29 日

Sumi S. Keynote Lecture: Regenerative Medicine for Diabetes Mellitus. 22nd European Students' Conference.
(Berlin, Germany) Sep. 21-24, 2011

臓器再建応用分野 Department of Bioartificial Organs

准教授 中村 達雄

Assoc. Prof. Tatsuo Nakamura

【研究概要】

臓器再建応用分野では、生体内再生“*in situ* Tissue Engineering”の概念に基づいて再生医学を推進し、人類の幸福に貢献することを研究の第一目標にしています。これによって、未だ治療法がない症例や、或いは移植ドナー不足のため治療が受けられない患者さんが救われることを目指しています。さらに、再生医療が普及すると高騰を続けている医療費が抑制されることが期待されると考えています。

人間の体には、本来、再生能が備わっており、我々はそれらを引き出す新しい手法を開発しています。それが生体内再生 *in situ* Tissue Engineering です。すなわち、自己の細胞が増殖、分化できる適切な足場を体内に与えることによって、損傷を受けた自己の臓器が本来の構造と機能を再生出来るようにしています。研究の方法としては、再生医学の3つの柱である (1) 足場、(2) 細胞、(3) 増殖・成長因子を生体内で働かせる生体内再生“*in situ* Tissue Engineering”という手法を独自に開発し、それを進めています。具体的には、同種・異種の臓器や組織から酵素処理で免疫原性を完全に無くしたコラーゲンを抽出し、それを用いて作製した細胞外マトリックスや、或いは組織から細胞を完全に除去することにより作製した細胞外基質、さらには生体内で分解吸収される合成高分子を用い、それらに増殖因子などを除放させる DDS (薬物送達システム) を組み合わせることによって、欠落した組織や臓器が再生する枠組みを生体内に作ります。この枠組みを『足場』とし、生体内の幹細胞が増殖、分化することにより、自己の組織や臓器が再生復元されます。また、これらと平行して、iPS 細胞や脂肪由来幹細胞を樹立・増殖させて組織再生に用いる研究や、瘢痕状になった細胞外マトリックスを融かして再び本来の性状に戻す研究も進めています。

現在行っている研究対象は下記のように分類されます。

- ①角膜、心膜、胸膜、腹膜、脳硬膜などの膜系
- ②血管、気管、喉頭、消化管などの管状臓器
- ③外力の加わる組織 (骨、永久歯、歯根膜)
- ④末梢神経
- ⑤脊髄・大脳などの中枢神経系
- ⑥泌尿器系組織
- ⑦肺、腎臓、肝臓、甲状腺、上皮小体、脾臓などの実質性代謝臓器
- ⑧脂肪組織や筋肉組織、皮膚、その他軟組織
- ⑨人工臓器の開発や造影剤の研究
- ⑩手術器具・手術術式の研究
- ⑪バイオマテリアルの研究
- ⑫ロボット手術の研究

当分野の研究の根幹概念は、細胞が増殖、再分化して、元の臓器を復元させうる“場”(環境)を人工的に体の中

に作れば、哺乳動物の臓器や組織も両生類のイモリのように再生復元させることが出来るというメカニズムを医学に応用するものです。このような生体内再生“*in situ* Tissue Engineering”は世界に先駆けて我々が提唱してきた方法であり、人工気管や人工神経などはすでに臨床応用され、これによって救われる患者さんの数も着々と増えてきています。この新しい技術は21世紀の医療の中心的柱になるものと考えています。

In situ Tissue Engineering: We have devised a completely new approach to the development of artificial organs. The main procedure using tissue engineering for tissues and internal organs involves the removal of the cell component from auto- or allo-organs to obtain only the extracellular matrix, so-called refined extracellular matrix (ECM) and reconstitutes the solid structure from the extracted collagen. This ECM or reconstituted structure is then employed as scaffolding, which after implantation into the patients is used for the regeneration or re-differentiation of tissue. Organs made of self-cells thus regenerate. Organs that regenerate in this manner not only possess highly differentiated tissue structures, but also show functional recovery, because all the cells are derived from the patients themselves. Whether or not our new method is practicable will depend mainly on the intrinsic regeneration capacity of each tissue. Up to now, in higher mammals including man, it has been believed that highly differentiated organs lose their ability to regenerate. We consider that mammals do not, in fact, lose this potential, and that the potential is hidden by excessively rapid wound healing around the failing tissues. In this sense, if we can provide good conditions using refined ECM, we can induce this hidden potential even in higher mammals. We have already carried out successful trials at regenerating peripheral nerves, the esophagus, the trachea, and blood vessels with this method. A similar method is also applicable to other soft tissue organs such as the liver, heart, and lung, as well as the spinal cord. These results will be welcomed by patients who are dependent on palliative life-support systems, or transplantation candidates who are waiting for suitable donors. An additional benefit is that patients will be freed from the side effects of immunosuppressive drugs. The judgment of the brain death can then be discussed separately from the issue of transplantation, and will become a personal problem. Further more, this new approach help to reduce ever-expanding medical costs, which are in danger of destroying our health insurance system in the near future.

No study based on these concepts has ever been done either in Japan or abroad. In this sense, our pioneering work is expected to be a major area of medical science for the coming generation.

Strategy and targets of our study

The target organs currently being considered for this development project are the heart, heart valves, esophagus, stomach, intestine, gallbladder, trachea, lung, liver, kidney, peripheral nerves, spinal cord, cornea, tendons, ligaments, cartilage, bone, fatty tissue, periodontal tissue, and permanent teeth. We plan to employ the two major methods as described below.

ECM Method

To obtain the purified extracellular matrix, cell components are completely removed from homo or allo-organs. The solid structure is reconstituted from the ECM and extracted collagen. Growth factors are then applied to facilitate cell proliferation. Then this ECM-collagen-growth factor composite is implanted into the

living body as a temporary scaffolding for new organ regeneration. Besides this, bioabsorbable materials will also be applied instead of purified ECM as a bulk structure for organ regeneration. Both extracted collagen and growth factors are should facilitate cell proliferation and cell redifferentiation, leading to regeneration of organs completely composed of cells derived from patients.

in situ Tissue Engineering and Field theory

Cells (or living tissues) of patients are complexed (mixed) with purified ECM or bioabsorbable material. Using this complex, reconstruction of the failing tissues or organs will be attempted. Mesenchymal stem cell (MSC) obtained from the bone marrow is now applied to this method.

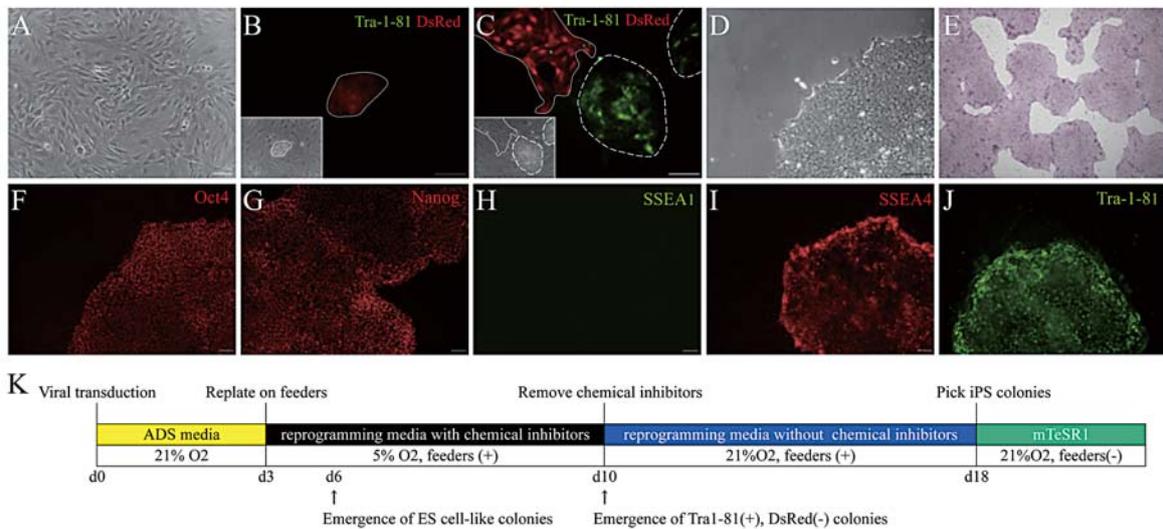


図 1：低酸素環境下で化学阻害薬を併用することにより樹立されたヒト iPS 細胞と誘導スケジュール

・ iPS 細胞誘導法に関する研究

体細胞に特定の多能性関連遺伝子を導入することで人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が誘導される。iPS 細胞は多能性を維持しながら無限に増殖し、胎盤以外の生体を構成するすべての細胞へと分化することが可能である。iPS 細胞技術を応用することにより、患者個人の体細胞から大量の移植用細胞を確保することが可能となるだけでなく、医学研究に必要な十分量の疾患特異的細胞を得ることができる。しかしながら、レトロウィルスを用いた標準的樹立法ではヒト iPS 細胞誘導までに約 1 ヶ月間必要である。このことは治療、研究の両面における主な問題点の一つである。本年度は誘導条件の最適化を試みることで、ヒト iPS 細胞樹立に要する期間を大幅に短縮することに成功した。ヒト脂肪幹細胞 (ADS 細胞) に濃縮レトロウィルス上清を用いて Oct4, Sox2, Klf4, L-Myc を導入し、生理的低酸素下 (5% O₂) において 5 種類の化学阻害薬 (GSK3beta 阻害薬 CHIR99021、MAPK/ERK 阻害薬 PD0325901、TGF-beta 阻害薬 A83-01、ヒストン脱アセチル化阻害薬 酪酸、ROCK 阻害薬 Y-27632) を一定期間作用させた。遺伝子導入後 6 日目からヒト ES 細胞様のコロニーが出現し、10 日目には導入遺伝子の抑制 (サイレンシング) と多能性マーカー Tra-1-81 の発現が確認された。樹立された細胞は増殖能、形態、全遺伝子発現パターン、多能性関連マーカー、全ゲノムレベルでのメチル化状態、生体内外での分化能において ES 細胞と類似していた。我々が開発した手法を用いることにより短期間で高品質なヒト iPS 細胞を樹立することが可能となる。

Induced pluripotent stem (iPS) cells are generated from somatic cells by the forced expression of a defined set of pluripotency-associated transcription factors. Human iPS cells can be propagated indefinitely, while maintaining the capacity to differentiate into all cell types in the body except for extra-embryonic tissues. This technology not only represents a new way to use individual-specific stem cells for regenerative medicine but also constitutes a novel method to obtain large amounts of disease-specific cells for biomedical research. Despite their great potential, the long reprogramming process (up to 1 month) remains one of the most significant challenges facing standard virus-mediated methodology. This year, we reported the accelerated generation of human iPS cells from adipose-derived stem (ADS) cells, using a new combination of chemical inhibitors (GSK3 β inhibitor CHIR99021, MAPK/ERK inhibitor PD0325901, TGF- β inhibitor A83-01, HDAC inhibitor sodium butyrate, ROCK inhibitor Y-27632) under a setting of physiological hypoxia (5% O₂) in conjunction with retroviral transduction of Oct4, Sox2, Klf4, and L-Myc. Under optimized conditions, we observed human embryonic stem (ES)-like cells as early as 6 days after the initial retroviral transduction. This was followed by the emergence of fully reprogrammed cells bearing Tra-1-81-positive and DsRed transgene-silencing properties on day 10. The resulting cell lines resembled human ES cells in many respects including proliferation rate, morphology, pluripotency-associated markers, global gene expression patterns, genome-wide DNA methylation states, and the ability to differentiate into all three of the germ layers, both in vitro and in vivo. Our method offers a powerful tool for rapidly generating bona fide human iPS cells.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1. 原著論文

中村達雄：肺における再生医療. *Clinical Engineering*, **22**:32-36 (2011)

Nakamura, T., Omori, K., Kanemaru, S.: Tissue-engineered airway and "in situ tissue engineering". *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. **59**:91-97 (2011)

Ohno, S., Hirano, S., Tateya, I., Kojima, T., Ito, J.: Management of vocal fold lesions in difficult laryngeal exposure patients in phonomicrosurgery. *Auris Nasus Larynx*. **38**:373-80 (2011)

Ohno, S., Hirano, S., Kanemaru, S., Kitani, Y., Kojima, T., Tateya, I., Nakamura, T., Ito, J.: Implantation of an atelocollagen sponge with autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for treatment of vocal fold scarring in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. **120**:401-8 (2011)

Ohno, S., Hirano, S., Kanemaru, S., Tateya, I., Kitani, Y., Kojima, T., Nakamura, T., Ito, J.: Prevention of buccal mucosa scarring with transforming growth factor β 3. *Laryngoscope*. **121**:1404-9 (2011)

Ohno, S., Hirano, S., Kanemaru, S., Kitani, Y., Kojima, T., Ishikawa, S., Mizuta, M., Tateya, I., Nakamura, T., Ito, J.: Transforming Growth Factor β 3 for the prevention of vocal fold scarring. *Laryngoscope*. (in press)

Honda, M., Nakamura, T., Hori, Y., Shionoya, Y., Yamamoto, K., Nishizawa, Y., Kojima, F., Shigeno, K.: Feasibility study of corticosteroid treatment for esophageal ulcer after EMR in a canine model. *Journal of Gastroenterology*. **46**:866-72 (2011)

Honda, M., Hori, Y., Nakada, A., Uji, M., Nishizawa, Y., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N.,

- Sato, T., Nakamura, T.: Use of adipose-derived stromal cells for prevention of esophageal stricture after circumferential EMR in a canine model. *Gastrointestinal Endoscopy*. **73**:777-84 (2011)
- Honda, M., Hori, Y., Shionoya, Y., Yamamoto, K., Kida, N., Kojima, F., Nakamura, T.: Fluid overload deteriorate the chylothorax. *Disease of Esophagus*. (in press)
- Yamamoto, K., Kojima, F., Tomiyama, K., Nakamura, T., Hayashino, Y.: Meta-analysis of therapeutic procedures for acquired subglottic stenosis in adults. *Ann Thorac Surg*. **91**:1747-53 (2011)
- Yamamoto, K., Tomiyama, K., Mitsuoka, M.: Total cricoectomy and laryngotracheal reconstruction for subglottic stenosis with glottic involvement. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. **13**:351-3 (2011)
- Shimada, H., Hashimoto, Y., Nakada, A., Shigeno, K., Nakamura, T.: Accelerated generation of human induced pluripotent stem cells with retroviral transduction and chemical inhibitors under physiological hypoxia. *BBRC*. (in press)
- Hirasaki, Y., Fukunaga, M., Kidokoro, A., Hashimoto, A., Nakamura, T., Tsujimoto, H., Hagiwara, A.: Development of a novel antiadhesive material, alginate flakes, ex vivo and in vivo. *Surg today*. **41**: 970-7 (2011)
- Kojima, T., Kanemaru, S., Hirano, S., Tateya, I., Ohno, S., Nakamura, T., Ito, J.: Regeneration of radiation damaged salivary glands with adipose-derived stromal cells. *Laryngoscope*. **121**: 1864-1869 (2011)
- Kojima, T., Kanemaru, S., Hirano, S., Tateya, I., Suehiro, A., Kitani, Y., Kishimoto, Y., Ohno, S., Nakamura, T., Ito, J.: The protective efficacy of basic fibroblast growth factor in radiation-induced salivary gland dysfunction in mice. *Laryngoscope*. **121**: 1870-1875 (2011)
- Hashimoto, A., Kuwabara, M., Hirasaki, Y., Tsujimoto, H., Torii, T., Nakamura, T., Hagiwara, A.: Reduction of air leaks in a canine model of pulmonary resection with a new staple-line buttress. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **142**: 366-71 (2011)
- 東高志、中井隆介、渡邊誠、茂野啓示：多次元 MRI を用いた顎機能診断への期待。 *歯界展望* . **117**: 795-816 (2011)
- 佐野明美、金子真弓、茂野啓示：極めたい！長期症例における DH ワーク&テクニック (1) 治療計画が頭に浮かぶ歯周組織審査チャート&採り方のコツ！ . *デンタルハイジーン* . **31**:648-654 (2011)
- 佐野明美、金子真弓、茂野啓示：極めたい！長期症例における DH ワーク&テクニック (2) 長期症例に学ぶすべての治療の前に必要なモチベーションとその実際 . *デンタルハイジーン* . **31**:768-774 (2011)
- 佐野明美、金子真弓、茂野啓示：極めたい！長期症例における DH ワーク&テクニック (3) 歯周治療を成功させるキュレットワーク「押さえる」「探る」「確かめる」～長期にわたり歯周組織を管理する . *デンタルハイジーン* . **31**:880-886 (2011)
- 佐野明美、金子真弓、茂野啓示：極めたい！長期症例における DH ワーク&テクニック (4) ～再評価とチーム医療が支える～治療が活きる高度な DH ワーク . *デンタルハイジーン* . **31**:1002-1008 (2011)
- 佐野明美、金子真弓、茂野啓示：極めたい！長期症例における DH ワーク&テクニック (5) 歯周外科処置における歯科衛生士の役割－歯周外科の知識から患者説明のポイントまで－ . *デンタルハイジーン* . (in press)
- 佐野明美、金子真弓、茂野啓示：極めたい！長期症例における DH ワーク&テクニック (6) 完 長期メンテナンスの極意～患者教育と手技のポイント～ . *デンタルハイジーン* . (in press)

2. 著書

- 中村達雄：感染性心内膜炎。「疾患を有する高齢者が来院したら？—歯科医師・スタッフが知っておきたいポイント

- ト—) (編著: 佐藤田鶴子、発行: 株式会社ヒョーロン・パブリッシャーズ、全197頁) 73-78 (2011)
- 中村達雄: 感染性心内膜炎. 「疾患・病態を有する高齢者への歯科における対応」(編著: 佐藤田鶴子、発行: 株式会社ヒョーロン・パブリッシャーズ、全197頁) 74-78 (2011)
- 稲田有史: 複合性局所疼痛症候群 (CRPS) の診断と治療 V. CRPS の手術療法. 「日整会広報室ニュース」(社団法人日本整形外科学会) 84:6 (2011)
- 稲田有史: 神経再生療法. 「神経障害性疼痛」(編: 眞下節、克誠堂出版株式会社) 380-387 (2011)

3. 総説

- 稲田有史、諸井慶七郎、中村達雄、森本茂、古家仁: 人工神経を中心とする生体内再生治療を用いた複合性局所疼痛症候群 (CRPS) の治療. 整形外科. 62: 809-814 (2011)
- 稲田有史: 機能再建のマイスターは何をみているのか. DOCTOR'S NETWORK. 45: 23-27 (2011)

◆ 学会等の発表 ◆

1. 学会・研究発表会

- 中村達雄: 生体内再生 (in situ Tissue Engineering) と末梢神経の再生医療. 第11回長崎障害者支援再生医療研究会 (2011.4.26 長崎) 特別講演
- Nakada, A., Shigeno, K.: Utility of a Slightly Modified Collagen Scaffold. Bio Japan 2011 World Business Forum (2011.10.5-7 Yokohama) 招待講演
- 大野覚: 組織工学的手法を用いた癩痕声帯治療: 骨髄由来間葉系幹細胞とアテロコラーゲンスポンジの有用性. 第18回京都耳鼻咽喉科研究会 (2011.4.2 京都)
- 大野覚、平野滋、金丸眞一、木谷芳晴、児嶋剛、楯谷一郎、北村守正、伊木健浩、石川征司、伊藤壽一: Transforming Growth Factor $\beta 3$ による癩痕声帯の予防. 第23回日本喉頭科学会総会・学術講演会 (2011.4.22 旭川)
- Ohno, S., Hirano, S., Kanemaru, S., Kitani, Y., Kojima, T., Tateya, I., Nakamura, T., Ito, J.: Implantation of an Atelocollagen Sponge with Bone Marrow-Derived Stromal Cells for the Treatment of Vocal Fold Scarring. The 91st Annual Meeting of The American Broncho-Esophagological Association. (2011.4.28 Chicago)
- 大野 覚、平野 滋、金丸眞一、楯谷一郎、北村守正、木谷芳晴、児嶋 剛、伊木健浩、石川征司、伊藤壽一: アテロコラーゲンスポンジを足場材料とした骨髄由来間葉系幹細胞移植による癩痕声帯治療. 第112回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 (2011.5.20 京都)
- Ohno, S., Hirano, S., Kanemaru, S., Tateya, I., Kada, S., Ito, J.: Transforming Growth Factor beta3 for the prevention of vocal fold scarring. The Voice Foundation's 40th Annual Symposium: Care of the Professional Voice (2011.6.2 Philadelphia)
- 楯川幸弘、中田顕、中村達雄: 胆管内無水エタノール注入によるラット肝硬変モデルの作製: 胆道閉鎖症の病態に近づけるか? . 第38回日本胆道閉鎖症研究会 (2011.12.10 名古屋)
- 本多通孝: バイオスカホールドを用いた全周性・血管茎付き人工小腸の作成. 第7回日本消化管学会総会 (2011.2 京都)
- 本多通孝: 脂肪由来幹細胞治療による食道ESD後狭窄の予防. 第10回日本再生医療学会総会 (2011.3 東京)
- 本多通孝: 全周性人工小腸の作成と消化吸収機能の評価. 第66回日本消化器外科学会総会 (2011.7 名古屋)

- 本多通孝：内視鏡治療後の消化管潰瘍に対する再生医療の応用. 第 41 回日本創傷治癒学会総会 (2011.12 名古屋)
- 稲田有史：神経障害性疼痛に対する治療戦略. リリカ発売記念講演会 (2011.1.29 奈良)
- 稲田有史：静脈穿刺後神経障害は、穿刺が原因か否か？－日赤献血事業での末梢総和仮説の検証－. 平成 22 年度宮城基幹センター地域内検診業務に係る研修会 (2011.2.17-18 仙台) 特別講演
- 稲田有史、諸井慶七郎：診断に難渋する 13 歳男児の右肘 110 度屈曲位反転現象. 第 24 回奈良手の外科懇話会 (2011.2.19 奈良)
- 稲田有史：神経障害性疼痛の再生治療. 学術フロンティア推進事業 (ブレインメディカルリサーチセンター) 終了報告会 (2011.3.24 守口)
- 稲田有史：静脈穿刺後神経障害は、穿刺が原因か否か？－日赤献血事業での末梢総和仮説の検証－. 平成 23 年度第 1 回検診医師研修会 (2011.5.26 神戸) 特別講演
- 稲田有史：CRPS 病態別外科的治療. 第 9 回整形外科痛みを語る会 (2011.6.25-26 松山) 特別講演
- 稲田有史：神経損傷への戦略. 第 3 回日本重度四肢外傷セミナー (2011.7.16-17 札幌) 特別講演
- 稲田有史、中村達雄、諸井慶七郎、古家仁、森本茂：静脈後穿刺後神経障害は、穿刺が原因か否か？－第一報日赤献血事業での末梢総和仮説の検証－. 第 33 回日本疼痛学会 (2011.7.22-23 松山)
- 稲田有史、中村達雄、諸井慶七郎、古家仁、森本茂：静脈穿刺後神経障害は、穿刺が原因か否か？－日赤献血事業での末梢総和仮説の検証－. 第 54 回日本手外科学会学術集会サテライトシンポジウム (2011.8.19 青森)
- 稲田有史：穿刺後の総和神経障害について－献血後神経障害は穿刺が原因か否か？－. (2011.9.15 大阪) 特別講演
- 稲田有史、中村達雄、諸井慶七郎、森本茂：外傷性末梢神経分岐部・高位欠損治療に使用された PGA-Collagen tube 内で本当に神経は再生したのか？－2 症例の 8 年 follow-up から. 第 38 回日本マイクロサージャリー学会学術集会 (2011.11.10-12 新潟)
- 稲田有史、中村達雄、諸井慶七郎、森本茂：献血後神経障害は、穿刺が原因か否か？－第一報日赤献血事業での末梢総和仮説の検証－. 第 35 回日本血液事業学会総会 (2011.10.20-22 埼玉)
- 面川庄平、小島康宣、村田景一、仲の健一、稲田有史：月状三角骨不安定症に対する背側手根靭帯を用いた靭帯再建術. 第 54 回日本手外科学会学術集会サテライトシンポジウム (2011.8.19 青森)
- 岩下恵子、菅野和加子、山西弘美、石田宏美、嶋裕子、森田倫史、稲田有史：過去約 2 年間に神経損傷・神経障害の疑いで病院を受診した当センター 10 症例の検討. 第 35 回日本血液事業学会総会 (2011.10.20-22 埼玉)
- 南垣内夏子、菅野和加子、山西弘美、石田宏美、岩下恵子、中西秀行、高木潔、嶋裕子、森田倫史、稲田有史：献血者における上司の Subclinical な状態に出現頻度. 第 35 回日本血液事業学会総会 (2011.10.20-22 埼玉)
- Shimada, H., Hashimoto, Y., Nakada, A., Shigeno, K., Nakamura, T.: Investigation of optimized conditions for RNA-based cellular reprogramming. ISSCR (2011.6.15-18 Toronto)
- 島田英徳、橋本典也、中田顕、茂野啓示、中村達雄：イヌ iPS 細胞から神経堤細胞への分化誘導. 第十回日本再生医療学会 (2011.3.1-2 東京)
- 茂野啓示：Periodontal implantology for a sustainability of implant treatment. ナショナルカムログCongress 2011 (2011.10.30 東京) 招待講演
- Kawai, T., Mizuno, S., Nishizawa, Y., Nakamura, T.: Measurement method for internal organs elasticity from stepout phenomenon of stepper motor. Int J CARS Computer Assist Radiol Surg (2011.6.22-25 Berlin)
- 西澤祐吏、中村達雄、河合俊和、橋田淳、申明奎：内視鏡下手術支援ロボット LODEM を用いた腹腔鏡下手術コンセプト. 日本内視鏡外科学会 (2011.12.7 大阪)

- 西澤祐吏、中村達雄：肛門機能の再生に関する研究. 2011年度 京都大学再生研若手発表会 (2011.12.26 京都)
- 申明奎、河合俊和、中島徳士、西澤祐吏、中村達雄：手術支援マニピュレータにおける既存鉗子ワイヤ駆動システムと着脱機構. 第29回日本ロボット学会学術講演会 (2011.9.7-9 東京)
- 申明奎、河合俊和、西澤祐吏、中村達雄：術具着脱式スライダクランク型マニピュレータの提案. 日本コンピュータ外科学 (2011.11.22-24 東京)
- 西尾建佑、河合俊和、西澤祐吏、中村達雄：ステッピングモータによる臓器硬さ自動計測システムの開発. 日本コンピュータ外科学 (2011.11.22-24 東京)
- 橋田淳、河合俊和、西澤祐吏、中村達雄：ローカル操作型着脱式術具マニピュレータの提案. 第50回生体医工学会 (2011.4.29-5.1 東京)
- 橋田淳、河合俊和、西澤祐吏、中村達雄：内視鏡視野内でのローカル操作型マニピュレータ平面制御. 第23回ロボティクス・メカトロニクス講演会 (2011.5.26-28 岡山)
- 橋田淳、申明奎、河合俊和、西澤祐吏、中村達雄：ローカル操作型マニピュレータのユーザインタフェース開発とin-vivo評価. 第29回日本ロボット学会学術講演会 (2011.9.7-9 東京)

2. 講演・シンポジウム

- 稲田有史：皮弁による再建. 第3回日本重度四肢外傷セミナー (2011.7.16-17 札幌)
- 稲田有史、中村達雄、諸井慶七郎、古家仁：外傷後難治性疼痛への挑戦－整形外科医の成功と苦悩の変遷. 日本賠償科学会第59回研究会 (2011.12.3 東京)
- 本多通孝：脂肪組織由来間葉系細胞の自家移植による食道ESD後狭窄の予防. 第97回日本消化器病学会総会 (2011.5 東京)
- 本多通孝：食道良性狭窄の生じるメカニズムと内視鏡治療の開発. 第81回消化器内視鏡学会総会 (2011.8 名古屋)
- 西澤祐吏：肛門機能の温存から再生・再建へ. 第13回シフラの会 (2011.12.20 東京)

附属再生実験動物施設

Laboratory of Animal Experiments for Regeneration

施設長・教授 長澤 丘司

Acting Head, Prof. Takashi Nagasawa

【再生実験動物施設の現状について】

附属再生実験動物施設では、平成 22 年度イヌ；106 頭、サル；4 頭、ウサギ；23 羽、ラット；93 匹、マウス；11,985 匹が実験動物として飼養された（京都大学動物実験委員会「動物実験に関する自己点検・評価報告書」平成 23 年 7 月版による）。これらの実験動物の日常的な飼育・管理を専任准教授 1 名・技術職員 3 名・非常勤職員 16 名で行っている。

当研究所で動物実験を行うにあたっては、生命倫理・動物福祉に十分な理解と配慮をして実施する事が大前提である。この原則を周知・徹底させるため、動物実験に従事する者は、動物実験に関する法規制・内規、動物実験実施にあたっての原則、実験動物の取り扱い方等についての全学講習および所内講習を受講することが義務付けられている。南部総合研究実験棟・動物飼育室を利用する者は、これに加えて、SPF (Specific Pathogen Free) マウスの取り扱いについて実地講習を受けなければならない。また、動物実験を実施するには、動物実験計画書を当研究所の動物実験委員会に提出し、厳格な審査を受け承認を得ることが必要である。

南部総合研究実験棟（2002 年 12 月設置、再生医科学研究所、ウイルス研究所、医学部の 3 部局による共同研究実験棟）マウス飼育室は稼働を開始してから 7 年が経過した。現在、SPF マウス飼育室全 16 室中、再生研；11 室、ウイルス研；4 室、医学部；1 室、を使用している。本マウス飼育棟では SPF マウスのみが飼育され、動物実験が行われている。搬入できるマウスは、指定実験動物供給業者から購入可能な SPF マウス及び当施設等において体外受精・受精卵移植によるクリーンアップを受け SPF 化されたマウスのみ限定されている。また、飼育室に持ち込む生物試料（細胞・血清等）も、事前に当施設による検疫を受けることが義務付けられた。これらの厳格なる管理の下、現在までのところ、感染事故等の深刻な問題は起きていない。ただ、共同実験棟マウス飼育室においては、SPF マウスの微生物汚染を防止するためには、動物飼育員、利用者各人の十分な注意が必要であるが、多数の人間が入り出す以上、いつ何時汚染事故が生じるかしのれない。不幸にして、幾つかの他校動物実験施設で微生物汚染事故が発生したことが報告されている。それらの苦い経験から、SPF マウスの微生物汚染の発生原因、汚染拡大様式、汚染除去法などを十分に学び、万一汚染が生じた時のことも想定し、汚染を最小限度に封じ込める等の対策について、本動物施設でも予め具体的な方策を立てておくことが必要であろう。一方、稼働し始めて明らかとなってきた設計、建築、設備上の種々の問題点、すなわち、室温・風量制御、凍結防止対策の不備等も徐々に把握されつつあり、対応可能になってきた。また、施設運営に関しても、3 部局共同の建物であるため、当初、運営・予算の執行における困難さが指摘されてきたが、試行錯誤ながらも克服されつつある。ただ、独立法人化後の運営交付金の削減により、安定した施設運営が困難になりつつあり、このような恒常的施設運営のための別枠の予算措置が講じられることを期待するものである。

東館動物施設は、副施設長による管理のもと、時代の要請に適合した飼育施設に変貌しつつある。すなわち、指紋認証制による利用者登録の導入、サル飼育室の改良、遺伝子改変動物飼育に適合したマウス・ラット室の改造等

である。また、イヌについても、飼育数と出入の厳密なる把握により、スムーズな登録と狂犬病予防注射が可能になった。しかしながら、施設・備品の老朽化が進行しつつあり、問題発生時に、まさに自転車操業的に対応しているのが現状である。また、毎年度予算的にも逼迫しており、このような対応がいつまで続けられるか予測不能である。今後は、大規模な改装を念頭においた施設運営が望まれる。

【研究概要】

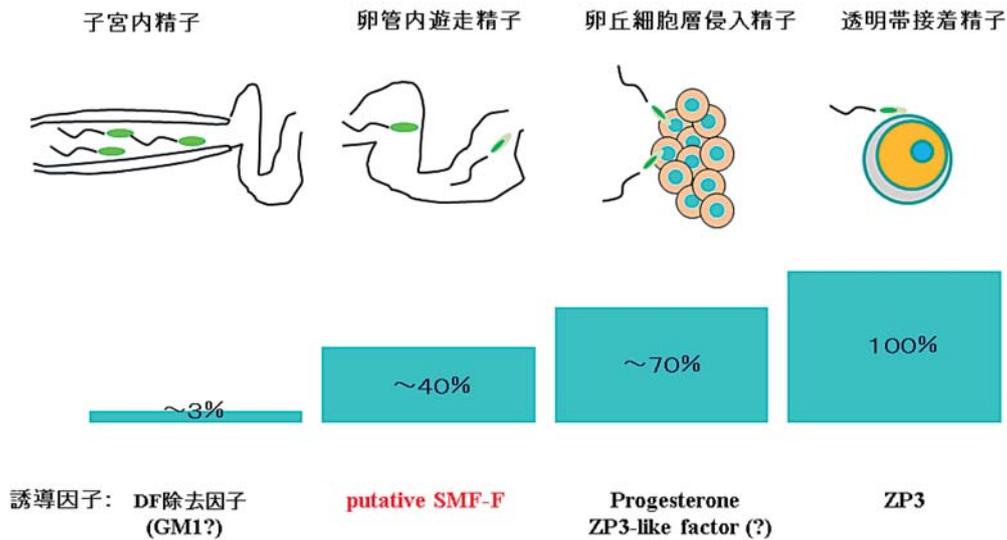
再生実験動物施設は、再生医科学研究所の附属施設として、研究実施に不可欠である動物実験に関する全般的な管理業務（再生研の動物実験計画書の審査に係る業務、動物実験に関する講習会の開催、再生研における実験動物の維持、管理など）と共に、一研究分野として以下の研究活動を行っている。

研究テーマ 1. GPI アンカー型タンパク質の代謝メカニズムと受精

現在の当研究室のメインテーマは、膜結合タンパク質の一種であるグリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質 (GPI-AP) の代謝メカニズムの解明とその生殖細胞系列での生物学的意義の探究である。このため、まず、個体内での GPI-AP の局在を網羅的に解析するために、GPI アンカー型 GFP レポーター蛋白質 (EGFP-GPI) を構築した。これを導入したトランスジェニックマウスでは、予想以上に EGFP-GPI が、外分泌腺や精巣において遊離していることを見出した (Kondoh G. et al. *FEBS Lett.* 458, 299-303, 1999)。

以後、この現象に特に着目し、マウス精巣生殖細胞より GPI-AP 遊離因子の精製・構造解析を行った。その結果、この因子のひとつとしてアンジオテンシン変換酵素 (ACE) を単離した。すなわち、この酵素には、アンジオテンシン I やブラディキニンなどの昇圧ペプチドの活性を制御するのみならず、多くの GPI-AP を細胞膜より遊離する新たな活性を持つことが明らかとなった。また、今回同定した活性は、ジペプチジルカルボキシペプチダーゼとしてこれらのペプチドを分解するための活性中心とは別の部位に位置し、また、GPI-AP のペプチド部分ではなく、GPI アンカーそのものを切断することも突き止めた。一方、ACE ノックアウトマウスでは、精子—透明体結合不全による雄性不妊が知られている。そこで、このマウスの精子をジペプチダーゼ不活性型 ACE で処理したところ受精能が回復した。このことから、ACE は *in vivo* で GPI-AP 遊離活性 (GPIase) があり、この活性をもって受精に重要な役割を担っていることが示唆された (Kondoh G. et al. *Nat. Med.*, 11, 160-166, 2005)。また、GPI アンカーの生合成に関わる PGAP1 遺伝子ノックアウトマウスでも、ACE ノックアウトマウスと酷似の雄性不妊を示し、同じく精子膜上の GPI-AP が貯留傾向にある。これらのことから精子膜からの GPI-AP 遊離が精子の受精能獲得の重要なステップである可能性が示唆された。

そこで、この過程を追跡する GPI アンカー型 GFP (EGFP-GPI) Tg マウスを用い、精子における GPI-AP 遊離と受精能獲得との相関を詳細に解析した。まず、精巣上体精子を採取し、精子成熟を誘導する methyl- β -cyclodextrin (M- β -CD) を含む培養液で培養したところ、時間経過とともに蛍光の減衰が見られた。また、Hyal5,Prss21 などの内在性 GPI-AP も顕著に遊離した。このとき同時にラフトマーカである GM1 の局在を蛍光標識したコレラトキシン (CTB) で染色したところ、精子頭部膜ラフトの特異的な局在変化が見られた。M- β -CD 単独処理ではこれらの変化は見られたが、もうひとつの精子成熟誘導試薬である BSA 単独では有意な変化が見られなかった。そこで BSA に加えカルシウムイオノフォア処理することで強制的に先体反応を促進したところ、上記精子膜変化が顕著に見られた。これらのことから精子膜変化は先体反応に伴って起こることが示唆された。また、M- β -CD 処理群につき Izumol の局在変化を指標に先体反応が起こっているかを調べたところ、有意な先体反応が観察された。すなわ



雌生殖器における精子膜反応と受精能獲得。これまでの研究で、我々は、精子成熟と相関して、1. 精子膜のラフト局在変化、2. 先体反応、3. GPI アンカー型タンパク質遊離が連鎖的に起こることを見出し、この一連の反応を精子膜反応 (sperm membrane reaction) と呼んでいる。この反応は、子宮内ではほとんどおこらないが、卵管内遊走精子の約 40%、卵丘細胞層侵入精子の約 70%、そして透明帯接着精子のすべてでおこっていることを観察した。すなわち精子膜反応は、雌生殖路の各所で階層的に起こり、精子の受精能獲得に必須であることが示唆された。現在、我々は、この反応が飛躍的に誘導される卵管内環境に注目し、これを引き起こす卵管内因子 (仮称 SMF-F) の同定を試みている。

ち、M-β-CD は従来から言われている capacitation 誘導に加えて先体反応も促進することがわかった。我々は、上記精子膜変化に先体反応を加えた一連の現象を精子膜反応 (sperm membrane reaction, SMR) と呼称し、射出精子での解析を行った。その結果、SMR は子宮内精子ではほとんど見られなかったが、卵管内遊走精子の約 40%、卵丘細胞層侵入精子の約 70%、また透明帯接着精子の全てで観察され、SMR は卵管内で階層的に起こることが示唆された (Watanabe H. and G. Kondoh *J. Cell Sci.*, 124, 2573-2581, 2011)。次に、これらの変化を誘導する生体内因子を同定するため、3 条件 (1. 発情未交配、2. 精管結紮雄マウスと交配、3. 正常雄マウスと交配) の雌から子宮卵管移行部組織を採取し、マイクロアレイ比較解析を行った。条件 2 と条件 3 の違いは、条件 3 では精子および精巣上体分泌物による刺激が加わることにある。そこでこれらの間の遺伝子発現プロファイルを比較すると、210 個の遺伝子が 3 > 2 の発現上昇を示した。さらに構造的に分泌型もしくは膜結合型タンパク質をコードするものを選び出した。現在、その中から仮称 Sperm Maturation Factor of Female (SMF-F) に着目して解析を進めている。

研究テーマ 2. 遺伝子改変マウス作出技術の簡易化

遺伝子改変マウスの作出には、何段階ものプロセスが存在し、多くの時間・労力・経費を必要とする。なかでも特に問題になるのが、ターゲティングベクターの作製、ES 細胞の培養そしてキメラマウス作出の諸段階であろう。我々は、これらのステップにおける“時間と労力のかからない技術の採用や改良”を心掛けてきた。ターゲティングベクターの作製においては、BAC クローンに基づく大腸菌内組み換えシステム (リコンビネーリング) を採用し、従来に比べて四分の一の時間短縮に成功した。また、キメラマウスの作出においては、凝集法を改良し、高価なインジェクション機器の購入や煩雑なメンテナンスのいらぬ方法を可能にした (Kondoh G. et al. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 39, 137-142, 1999)。これらの技術集約のもとに、過去 7 年間で 20 件の遺伝子改変マウス作出に参加した。

Mammalian sperm undergo multiple maturation steps after leaving testis to be competent for fertilization. Serial important changes occur in the female reproductive tract on sperm, although the molecular mechanisms underlying these processes remain unclear. To investigate the sperm membrane remodeling upon sperm maturation, we developed transgenic mouse lines carrying glycosylphosphatidylinositol (GPI) -anchored enhanced green fluorescent protein (EGFP-GPI) and traced the fate of this fluorescent protein during the fertility acquiring sperm process *in vitro* and *in vivo*. When the green-fluorescent sperm were treated with compounds for promoting acrosome reaction, EGFP-GPI was released from the sperm surface cross-linked with characteristic relocation of a lipid raft marker ganglioside GM1. Sperm ejaculated into the uterus strongly expressed EGFP-GPI in the head region, while a part of the oviductal sperm lost fluorescence in an angiotensin-converting enzyme (ACE) -dependent manner. Moreover, the sperm on the zona pellucida of eggs in the oviduct were found to be exclusively GFP low. These results suggested that sperm undergoing GPI-AP release associated with reorganization of lipid raft and acrosome reaction acquire fertilization potential.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

(1) 原著論文

1. Watanabe, H., and G. Kondoh: Mouse sperm undergo GPI-anchored protein release associated with lipid raft reorganization and acrosome reaction to acquire fertility. *J. Cell Sci.*, 124-15, 2573-2581 (2011).
2. Tanaka, T., M. Hosokawa, V-V. Vagin, M. Reuter, E. Hayashi, A-L. Mochizuki, K. Kitamura, H. Yamanaka, G. Kondoh, K. Okawa, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, R. Sachidanandam, G-J. Hannon, R-S. Pillai, N. Nakatsuji, and S. Chuma: *Tdrd7* is essential for dynamic RNP remodeling of chromatid bodies, during spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108-26, 10579-10584 (2011).
3. Kadonosono, T., T. Kuchimaru, S. Yamada, Y. Takahashi, A. Murakami, H. Watanabe, T. Tani, M. Inoue, T. Tsukamoto, T. Toyoda, T. Tanaka, K. Hirota, K. Urano, K. Machida, T. Eto, T. Ogura, H. Tsutsumi, M. Ito, M. Hiraoka, G. Kondoh, and S. Kizaka-Kondoh. Detection of the onset of ischemia and carcinogenesis by hypoxia-inducible transcription factor-based in vivo bioluminescence imaging. *PLoS ONE*, 6 (11), e26640 (2011).
4. Masago Y., A. Hosoya, K. Kawasaki, S. Kawano, A. Nasu, J. Toguchida, K. Fujita, H. Nakamura, G. Kondoh, and K. Nagata. Molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation. *J. Cell Sci.*, in press.
5. Ishimura, A., K-I. Minehata, M. Terashima, G. Kondoh, T. Hara, and T. Suzuki. Jmjd5, an H3K36me2 histone demethylase, modulates embryonic cell proliferation through the regulation of Cdkn1a expression. *Development*, in press.
6. Orihashi, K., H. Tojo, K. Okawa, Y. Tashima, T. Morita, and G. Kondoh. Mammalian carboxylesterase (CES) releases GPI-anchored proteins from the cell surface upon lipid raft fluidization. *Biol. Chem.*, in press.

◇ 学会等の発表 ◇

(1) 学会・研究会発表

- 1、渡邊 仁美、近藤 玄 マウス雌生殖器における精子膜変化。第 58 回日本実験動物学会、2011、東京都。
- 2、渡邊 仁美、近藤 玄 マウス雌生殖路内における精子膜変化。第 14 回日本 IVF 学会、2011、東京都。(優秀発表賞受賞)
- 3、近藤 玄、渡邊 仁美 Sperm membrane remodeling in the female reproductive tract to acquire fertility. 第 34 回日本分子生物学会、2011、横浜市。
- 4、折橋 郁、東城 博雅、大川 克也、田寫 優子、森田 隆、近藤 玄 哺乳類カルボキシエステラーゼ (Ces) は、ラフト流動化依存的に細胞表面より GPI アンカー型タンパク質を遊離する。第 34 回日本分子生物学会、2011、横浜市。

(文責：近藤 玄)

連絡先：e-mail kondohg@frontier.kyoto-u.ac.jp

Tel: 075-751-4860 or 4861

附属幹細胞医学研究センター Stem Cell Research Center

霊長類胚性幹細胞研究領域 Laboratory of Embryonic Stem Cell Research Center

分野主任 准教授 末盛 博文

Assoc. Prof. Hirofumi Suemori

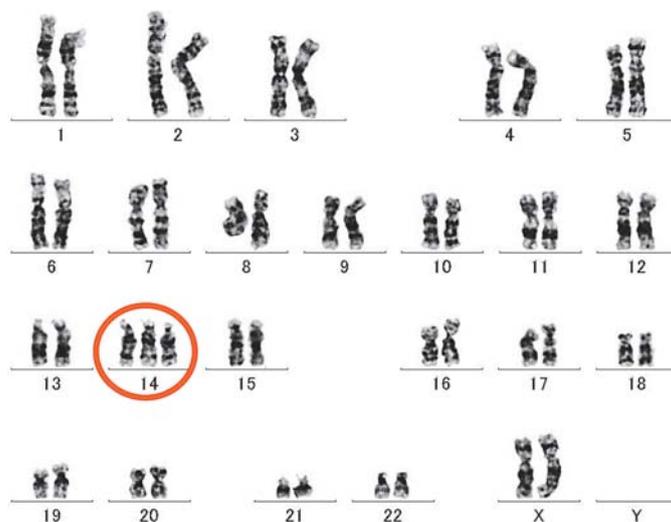
【研究概要】

ヒト ES 細胞株の樹立と特性解析

霊長類胚性幹細胞研究領域ではヒト ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究を行っている。これまでに 5 株のヒト ES 細胞株を樹立しうち 3 株は 2004 年 3 月から、2 株は 2009 年 4 月から分配を行っている。これまでに 50 件以上の研究計画に対して細胞株を分配し多くの研究成果が上げられている。

ヒト ES 細胞の長期培養によるゲノムの変化に関する大規模比較研究

イギリス Sheffield 大学などの機関を中心とした International Stem Cell Initiative において、ヒト ES 細胞の医療応用に際して必要となる特性解析の標準化等が進められており、我々もこの共同研究に参加している。この活動の一環として世界各国の多数のヒト ES 細胞について継代維持過程におけるゲノムの変化について網羅的な解析が行われた。その結果、いくつかの染色体やあるいはごく小さな染色体領域について主に増幅が高頻度で見られることが明らかにされた。(Nature Biotechnology 2011 29:1132-1144)。多くの細胞株に共通して見られる変化として、染色体 1, 12, 17 番の増幅や、20 番染色体の一部微少領域の増幅があることが示された。この成果はヒト ES/iPS 細胞の培養技術開発や、安全性の高い医療応用に有益な情報になると期待される。



図：ヒト ES 細胞の長期培養により生じる染色体変化の一例
比較的まれな例であるが、14 番染色体がトリソミーとなっている。

Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Stem Cell Research Center.**Establishment and analysis of human ES cell lines.**

Embryonic stem (ES) cell lines are pluripotent stem cell lines which can be propagated indefinitely in culture retaining their differentiation potency into every cell types of tissues in the body. Since establishment of human ES cell lines were reported, clinical use of functional tissues and cells from human ES cells are expected. In Japan, there have been many demands for use of human ES cells on basic and pre-clinical researches. We started to establish human ES cell lines using donated frozen embryos in January 2003 and successfully established 5 human ES cell lines. We have distributed these cell lines to over 50 researches.

Comparative analysis of genetic stability of human ES cell lines

As a part of ISCI activities, we have participated in a international comparative study on genetic stability of human ES cell lines during prolonged maintenance in culture. The study revealed that most cell lines remained karyotypically normal, but changes in karyotype during prolonged culture, especially in chromosomes 1, 12, 17 and 20. Copy number analysis using SNP arrays also showed that amplification of a small genomic region on chromosome 20 was found in over 20% of cell lines. These findings will contribute to safer clinical application of pluripotent stem cells.

【業績目録】**◆ 誌上発表 ◆****原著論文**

1. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Fujita T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Nonaka A, Yoshida S, Matsusaka K, Midorikawa Y, Ishikawa S, Soejima H, Fukayama M, Suemori H, Nakatsuji N, Kume S, Aburatani H. *Hum Mol Genet.* 2011 Jul 15;20(14):2710-21.
2. Simple and highly efficient method for production of endothelial cells from human embryonic stem cells. Tatsumi R, Suzuki Y, Sumi T, Sone M, Suemori H, Nakatsuji N. *Cell Transplant.* 2011;20 (9):1423-30.
3. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. The International Stem Cell Initiative, Amps K, Andrews PW, Anyfantis G, Armstrong L, Avery S, Baharvand H, Baker J, Baker D, Munoz MB, Beil S, Benvenisty N, Ben-Yosef D, Biancotti JC, Bosman A, Brena RM, Brison D, Caisander G, Camarasa MV, Chen J, Chiao E, Choi YM, Choo AB, Collins D, Colman A, Crook JM, Daley GQ, Dalton A, De Sousa PA, Denning C, Downie J, Dvorak P, Montgomery KD, Feki A, Ford A, Fox V, Fraga AM, Frumkin T, Ge L, Gokhale PJ, Golan-Lev T, Gourabi H, Gropp M, Guangxiu L, Hampl A, Harron K, Healy L, Herath W, Holm F, Hovatta O, Hyllner J, Inamdar MS, Irwanto AK, Ishii T, Jaconi M, Jin Y, Kimber S, Kiselev S, Knowles BB, Kopper O, Kukhareenko V, Kuliev A, Lagarkova MA, Laird PW, Lako M, Laslett AL, Lavon N, Lee DR, Lee JE, Li C, Lim LS, Ludwig TE, Ma Y, Maltby E, Mateizel I, Mayshar Y, Mileikovsky M, Minger SL, Miyazaki T, Moon SY, Moore H,

- Mummery C, Nagy A, Nakatsuji N, Narwani K, Oh SK, Oh SK, Olson C, Otonkoski T, Pan F, Park IH, Pells S, Pera MF, Pereira LV, Qi O, Raj GS, Reubinoff B, Robins A, Robson P, Rossant J, Salekdeh GH, Schulz TC, Sermon K, Mohamed JS, Shen H, Sherrer E, Sidhu K, Sivarajah S, Skottman H, Spits C, Stacey GN, Strehl R, Strelchenko N, Suemori H, Sun B, Suuronen R, Takahashi K, Tuuri T, Venu P, Verlinsky Y, Oostwaard DW, Weisenberger DJ, Wu Y, Yamanaka S, Young L, Zhou Q. *Nat Biotechnol.* 2011 Nov 27;29 (12):1132-1144.
4. Efficient and Accurate Homologous Recombination in hESCs and hiPSCs Using Helper-dependent Adenoviral Vectors. Aizawa E, Hirabayashi Y, Iwanaga Y, Suzuki K, Sakurai K, Shimoji M, Aiba K, Wada T, Tooi N, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K. *Mol Ther.* 2011 Dec 6.
5. Alpha-fetoprotein-producing pancreatic cancer cells possess cancer stem cell characteristics. Sasaki N, Ishii T, Kamimura R, Kajiwaru M, Machimoto T, Nakatsuji N, Suemori H, Ikai I, Yasuchika K, Uemoto S. *Cancer Lett.* 2011 Sep 28;308 (2):152-61
6. A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito MK. *PLoS One.* 2011;6 (7):e22261. Epub 2011 Jul 27.

総説

末盛博文「脊椎損傷・網膜色素変性症・・・、ES細胞の可能性と最新事情」*ビオフィリア* Vol.7 No3、22-25
9/10

◆ 学会等の発表 ◆

- Dissection of the early cardiac developmental process from human embryonic stem cells using a model system that recapitulates the embryogenesis Kaori Yamauchi, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori International Society for Stem Cell Research 9th Annual Meeting (6/15-18, Toronto)
- Fluorescent chemical probes for human stem cells Nao Hirata, Masato Nakagawa,3 Yuto Fujibayashi,4 Kaori Yamauchi,5 Asako Murata,1,6 Eihachiro Kawase,5 Shin-ichi Sato,1,2 Shin Ando,1,2 Young-Tae Chang,7 Hirofumi Suemori,5 Norio Nakatsuji,1,5 Kazumitsu Ueda,1,4 Shinya Yamanaka,1,3 Motonari Uesugi 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (11/29-12/2 Tokyo)
- SnoN represses mesendodermal genes in human ES cells Norihiro Tsuneyoshi, Tomoyuki Sumi, Akila Sadasivam, Jennica Tan Ee Kim, Norio Nakatsuji, Hirofumi Suemori, Norris Ray Dunn Stem Cell Society Singapore (SCSS) Symposium 2011 (11/17 - 18, Singapore)
- SnoN suppresses mesendodermal gene expression in human ES cells. N. Tsuneyoshi, T. Sumi, N. Nakatsuji, H. Suemori, N.R. Dunn Stem Cell Programming & Reprogramming (12/8-10, Lisbon)
- クロマチン制御によるヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞の成熟化 尾辻智美、黒瀬裕子、末盛博文、中辻憲夫、多田政子 第10回日本再生医療学会総会 (3/1-2、東京)
- ヒト ES 細胞の未分化性維持因子の探索を目的とした high content analysis (HCA) 熊谷英明、末盛博文、上杉志成、中辻憲夫、川瀬栄八郎 第34回日本分子生物学会年会 (12/13-16、横浜)
- ヒト ES 細胞から definitive endoderm への高率な誘導方法の構築 武内大輝、中辻憲夫、末盛博文 第34回日本

分子生物学会年会 (12/13-16、横浜)

講演

Hirofumi Suemori Changes Expression Of Chromatin Modification Factors During The Early Embryonic Germ Layer Determination. International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities (1/24-26, Awaji)

幹細胞分化制御研究領域 Laboratory of Stem Cell Differentiation

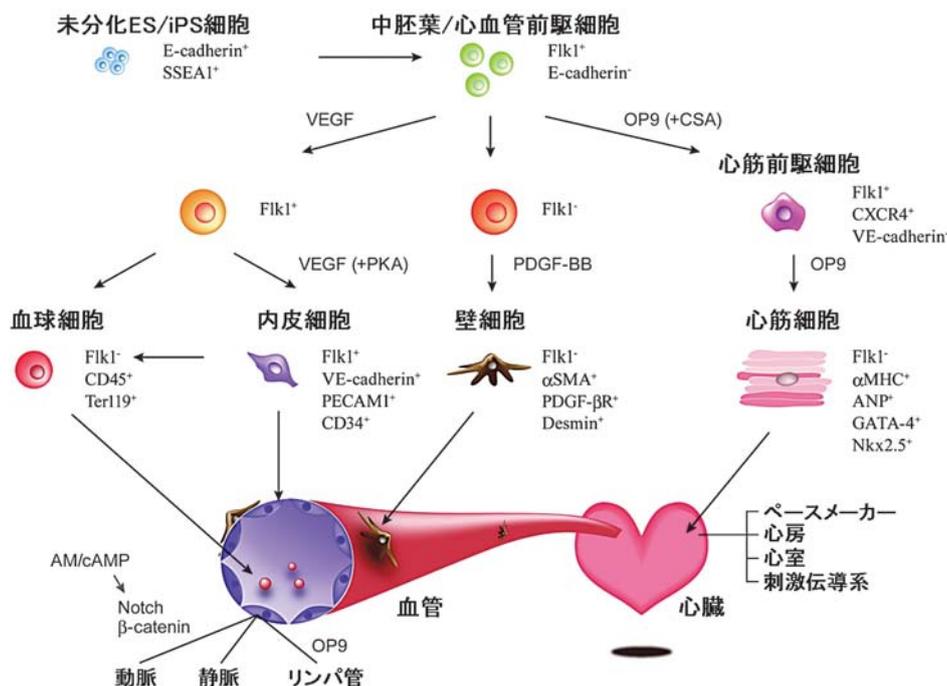
分野主任 准教授 山下 潤
Assoc. Prof. Jun K. Yamashita

【研究概要】

幹細胞分化制御研究領域では、ES細胞（胚性幹細胞:embryonic stem cells）及びiPS細胞（人工多能性幹細胞:induced pluripotent stem cells）を用いて、心血管系の細胞分化・再生に関する研究を行っている。

ES細胞は、全ての種類の細胞に分化することができるいわゆる「万能」幹細胞と考えられている。この全能性(pluripotency)をin vitroにおいて引き出し、分化誘導した細胞を再生治療に用いようとする試みが様々な臓器、細胞をターゲットに行われている。我々は、ES細胞を用いて中胚葉由来組織である血管および心臓の分化研究を行ってきた。

血管は、内腔を一層におおう内皮細胞とそれを外から取りまく壁細胞の2種類の細胞からなっている。その中を流れる血球細胞を含めてこれら血管構成細胞は互いに密接に連携しあい血管を形作る。VEGFの受容体の一つであるFlk1は血球・血管系細胞の最も早期の分化マーカーおよび中胚葉のマーカーと考えられている。我々は、ES細胞を用いてin vitroにおいて中胚葉、さらには血管の構成細胞である血管内皮細胞と壁細胞（血管平滑筋細胞およびペリサイト）を選択的に分化誘導し、最終的に血管としての高次構造をin vitroおよびin vivoにおいて構築すること、いわば血管の発生過程を再現することに成功した（Yamashita, Nature, 2000.）。このin vitro分化系では、Flk1陽性細胞を共通の前駆細胞として、内皮細胞、壁細胞、血球細胞が分化し、さらにそれらの細胞が血管としての高次構造を形成する。また、中胚葉由来の細胞の一つである心筋細胞も同様にFlk1陽性細胞から分化誘導することと



共に新しい心筋前駆細胞の同定に成功している (Yamashita, FASEB J, 2005)。動静脈リンパ管内皮細胞分化や心筋ペースメーカー細胞などさらに多様な心血管細胞の分化誘導を行っている (Yamashita, Trends Cardiovasc Med, 2007; Yanagi, Stem Cells, 2007 他) (図)。最近我々は、免疫抑制剤のサイクロスポリン A が Flk1 陽性中胚葉細胞に特異的に作用し、心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化を促進する、という全く新しい作用を見出した (Yan, Biochem Biophys Res Commun, 2009)。本研究をもとに心筋細胞の効率的分化を誘導する低分子化合物の探索を行っている。また、血管内皮細胞分化を培養下において構成的に再現することにより、cAMP シグナルの意義を次々に明らかにした。すなわち、Protein kinase A が血管前駆細胞の VEGF への感受性を変化させて内皮細胞分化を促進していること (Yamamizu, Blood, 2009)、同作用が CREB による転写因子 Etv2 発現誘導によること (Yamamizu, Stem Cells, in press)、痛覚に関与するオピオイドが cAMP シグナルを抑制することにより内皮分化・血管形成に抑制的に作用していること (Yamamizu, Blood, 2011 表紙)、及び Notch と β -catenin が直接相互作用することにより動脈内皮への運命決定を行っていることを新たに示した (Yamamizu, J Cell Biol, 2010)。

さらに、最近本研究所山中伸弥教授によって樹立された人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いて同様の実験システムを構築し、新たな心血管再生研究を開始している。ES 細胞研究において蓄積したノウハウを用いていち早くマウス iPS 細胞を用いた心血管系細胞の分化誘導に成功した (Narazaki, Circulation, 2008)。またサイクロスポリン A の作用を応用し、ヒト iPS 細胞からの機能心筋細胞を誘導することにも成功した (Fujiwara, PLoS One, 2011)。さらに高効率な新しいヒト iPS 細胞の心筋分化法と誘導心筋細胞の純化法の開発にも成功した (Uosaki, PLoS One, 2011)。

このように我々の ES 細胞を用いた in vitro 分化系は、種々の循環器系の細胞群を系統的に分化誘導することができ、心血管の発分化過程を培養下に恣意的に操作しながらしかも経時的に観察できる。従って、この分化系を用いることにより心臓血管の発分化のメカニズムを細胞レベル、分子レベルで検討し、ノックアウトマウスの形質解析に依存していた分化の分子機構の解析を in vitro で行うという新しいアプローチが可能になったと考えられた。またこれらの知見を様々な形で再生医療を中心とした応用研究に展開することができる。

現在、この ES 細胞 in vitro 分化系を用いて、以下のようなプロジェクトを遂行及び予定している。

1. ES 細胞 /iPS 細胞 in vitro 分化系を用いた心血管細胞分化多様化の分子機構の解析

- 1) DNA チップを用いた網羅的心血管分化関連遺伝子の同定
- 2) RNA 干渉を用いた in vitro 遺伝子機能解析系の構築 (Hiraoka-Kanie, Biochem Biophys Res Commun, 2006)
- 3) 動静脈・リンパ管内皮特異的分化誘導と内皮細胞多様化機構の解析 (Yurugi-Kobayashi, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006; Kono, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006; Yamashita, Trends Cardiovasc Med, 2007; Yamamizu, J Cell Biol, 2010)
- 4) cAMP 及び PKA による血管内皮細胞の分化能調節機構 (Yamamizu, Blood, 2009; Yamamizu, Stem Cells, in press)
- 5) 血管内皮分化及び血管形成におけるオピオイドの意義 (Yamamizu, Blood, 2011 表紙) (星薬科大学との共同研究)
- 6) 物理的刺激の血管内皮分化多様化における意義 (Yamamoto, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005) (東京大学との共同研究)
- 7) ES/iPS 細胞分化過程におけるエピジェネティクス解析 (東京大学との共同研究)

2. 誘導血管細胞の血管再生への応用

- 1) 移植ドナー細胞の最適な分化段階の決定 (Yurugi-Kobayashi, *Blood*, 2003)。
- 2) 人工生体材料を用いたハイブリッド人工血管 (Huang, *J Artif Organ*, 2005)。
3. ES 細胞 /iPS 細胞からの心筋細胞の分化誘導と再生治療応用
 - 1) 2次元培養による新しいES細胞からの心筋細胞分化誘導法の開発と新しい心筋前駆細胞の同定 (Yamashita, *FASEB J*, 2005)。
 - 2) 心筋細胞 *in vitro* 分化系を用いた心筋分化・多様化の分子機構の解析
 - 3) ES 細胞由来心筋細胞自動形成機構の解析 (Yanagi, *Stem Cells*, 2007)
 - 4) サイクロスポリン A を用いた新しい高効率心筋前駆細胞・心筋細胞分化誘導法 (Yan, *Biochem Biophys Res Commun*, 2009) (京都大学心臓血管外科との共同研究)
 - 5) 新しい心臓再生治療への応用。i) 心筋前駆細胞移植。ii) ES/iPS 細胞由来心臓血管細胞を用いた心臓組織シート移植 (東京女子医大・京都大学心臓血管外科との共同研究)
 - 6) サル ES 細胞からの血管分化誘導
サル ES 細胞からの血管分化誘導に成功した (Sone, *Circulation*, 2003) (京都大学臨床病態医科学との共同研究)
 - 7) ヒト ES 細胞からの血管分化誘導
京都大学臨床病態医科学申請の輸入ヒト ES 細胞を用いた血管分化研究に参画 (Sone, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007; Yamahara, *PLoS One*, 2008)。
 - 8) ヒト ES 細胞からの心筋細胞分化誘導
ヒト ES 細胞使用計画「ヒト ES 細胞を用いた心臓血管細胞分化機構に関する研究」(研究代表者・山下 潤、平成 17 年 3 月 10 日文部科学大臣承認)
ヒト ES 細胞を用いた心臓血管分化研究を行っている。
 - 9) マウス iPS 細胞を用いた心臓血管分化系の構築 (Narazaki, *Circulation*, 2008; *Best Paper Award* in Basic Science category, *Circulation* 2008)
 - 10) ヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化誘導法の開発
サイクロスポリン A 法の応用 (Fujiwara, *PLoS One*, 2011)。(臨床病態医科学との共同研究)
新しい高効率心筋分化誘導法の開発と VCAM1 を表面抗原として用いた新しい心筋細胞純化法の開発 (Uosaki, *PLoS One*, 2011)
ヒト iPS 細胞分化における心筋前駆細胞の誘導と純化
 - 11) iPS 細胞分化システムのケミカルバイオロジー及び創薬応用 (Nakao, *Bioorg Med Chem Lett*, 2008) (早稲田大学他との共同研究)
 - 12) 心筋細胞分化・増殖を促進する新しい化合物の探索・同定

Main theme of our research: Elucidation of cellular and molecular mechanisms of cardiovascular development and the application to cardiovascular regeneration using *in vitro* differentiation system of embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells.

Previously, we established a novel *in vitro* vascular differentiation system of ES cells (Yamashita, *Nature*, 2000). Using ES cell-derived Flk1 (VEGF receptor-2) -positive mesodermal cells as starting material, we can

induce all of the vascular cellular compartments, that is, endothelial cells, mural cells (vascular smooth muscle cells and pericytes) and blood cells. Vessel-like structures of endothelial cell tube with mural cell attachment and blood cell inside are formed from Flk1+ cell aggregates in 3-D culture. Thus, this *in vitro* system should reproduce the early process of vascular development. And we also demonstrated that the transplanted vascular cells induced by this system could contribute to developing vasculature *in vivo*. Moreover, we have succeeded in inducing cardiomyocytes from Flk1+ cells, and identifying a novel cardiac progenitor cells (Yamashita, *FASEB J*, 2005). Recently, we succeeded in inducing arterial, venous, and lymphatic endothelial cells (Yamashita, *Trends Cardiovasc Med*, 2007 etc). All of cardiovascular cellular components, thus, could be induced in our *in vitro* differentiation system. (Fig. 1). Recently, we found that an immunosuppressant, cyclosporin-A, possesses a novel effect to potently induce cardiomyocytes and cardiac progenitors from Flk1+ mesoderm cells (Yan, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006). Using our constructive induction system for vascular cells, we recently demonstrated critical roles of cAMP/PKA signaling in endothelial cell differentiation and diversification. That is, protein kinase A (PKA) enhances vascular progenitor potential to endothelial competent through dual upregulation of VEGF receptors, Flk1 and neuropilin1, in Flk1+ cells (Yamamizu, *Blood*, 2009). This effect is mediated by CREB-induced gene expression of an Ets family transcription factor, Etv2 (Yamamizu, *Stem Cells*, in press). A neurophysiological modifier, opioid system, is found to regulate endothelial cell differentiation and early vascular formation through inhibition of cAMP/PKA pathway (Yamamizu, *Blood*, 2011; cover image). We also demonstrated that Notch and β -catenin directly interact in Flk1+ cells and determine arterial endothelial cell fate (Yamamizu, *J Cell Biol*, 2010).

Recently, we have started new research with the use of novel adult tissue derived pluripotent stem cells, induced pluripotent stem (iPS) cells, and succeeded in systematic cardiovascular cell differentiation of mouse

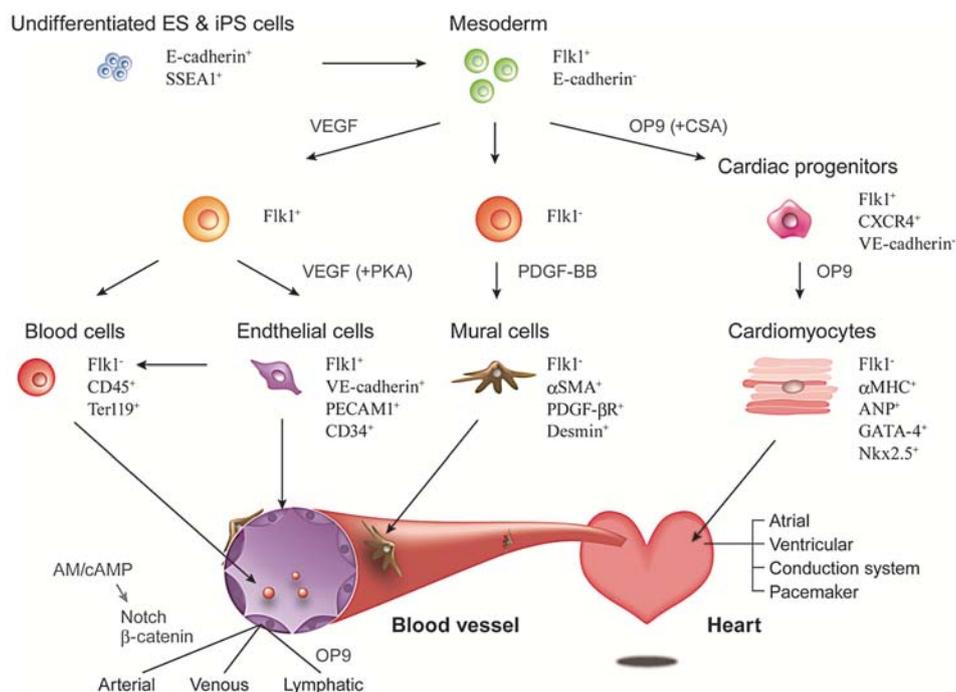


Fig. 1: Cardiovascular development in ES and iPS cell *in vitro* differentiation system

iPS cells (Narazaki, *Circulation*, 2008). We recently succeeded in inducing functional cardiomyocytes from human iPS cells using cyclosporin-A method (Fujiwara, *PLoS One*, 2011). We further succeeded in efficiently inducing cardiomyocytes from human iPS cells and identifying a cell surface molecule, VCAM1, for purification of cardiomyocytes (Uosaki, *PLoS One*, 2011).

In this system, we can manipulate the fate of cell differentiation, observe the behavior of differentiating cells, purify and obtain cells at various differentiation stages. This system provides us possibilities to dissect the mechanisms of cardiovascular development from new aspects, and offers novel potentials for cardiovascular regeneration.

Research Projects:

1. Elucidation of cellular and molecular mechanisms of cardiovascular cell differentiation and specification using ES cell *in vitro* differentiation system.

- 1) Comprehensive molecular cloning of genes for endothelial cell differentiation by global gene expression profile with DNA chip
- 2) Novel *in vitro* functional assay system using vector-based siRNA expression (Hiraoka-Kanie, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006).
- 3) Specific induction of various endothelial cells types (i.e., arterial, venous, and lymphatic) and investigation of the mechanisms for endothelial specification (Yurugi-Kobayashi, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; Kono, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; Yamashita, *Trends Cardiovasc Med*, 2007; Yamamizu, *J Cell Biol*, 2010).
- 4) PKA in the regulation of vascular progenitor potential (Yamamizu, *Blood*, 2009; Yamamizu, *Stem Cells*, in press)
- 5) Significance of opioids in endothelium differentiation and vascular formation (Yamamizu, *Blood*, 2011; cover image) (collaboration with Hoshi University)
- 6) Significance of rheological force on endothelial differentiation and diversification (Yamamoto, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005) (Collaboration with University of Tokyo)
- 7) Global analysis of epigenetics in ES/iPS cell differentiation (Collaboration with University of Tokyo)

2. Application of induced vascular cells to vascular regeneration

- 1) Evaluation of appropriate differentiation stage of donor cells for cell transplantation. (Yurugi-Kobayashi, *Blood*, 2003).
- 2) Development of novel hybrid vessels with ES cells and artificial scaffolds (Huang, *J Artif Organ*, 2005).

3. Cardiomyocyte induction from ES/iPS cells and application to regeneration

- 1) Establishment of a novel cardiomyocyte induction system in 2-dimensional culture (Yamashita, *FASEB J*, 2005).
- 2) Dissection of cellular and molecular mechanisms of cardiomyocyte differentiation
- 3) Ion channels to reconstitute automaticity of ES cell-derived cardiomyocytes (Yanagi, *Stem Cells*, 2007)
- 4) Specific and efficient expansion of cardiac progenitor cells and cardiomyocytes by cyclosporine-A (Yan,

Biochem Biophys Res Commun, 2009) (collaboration with Department of Cardiac Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine)

- 5) Application to cardiac regeneration
 - i) Cardiac progenitor therapy.
 - ii) Cardiac tissue sheet transplantation with defined cardiovascular cell population (collaboration with Tokyo Women's Medical University; Department of Cardiac Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine)
- 6) Vascular cell differentiation from monkey ES cells (Sone, **Circulation**, 2003) (Collaboration with Department of Medicine and Clinical Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine).
- 7) Vascular cell differentiation from human ES cells (Sone, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2007; Yamahara, **PLoS One**, 2008) (Collaboration with Department of Medicine and Clinical Sciences)
- 8) Cardiomyocyte differentiation using human ES cells
Our human ES cell research project "Research for differentiation mechanisms of cardiovascular cell differentiation using human ES cells" has been approved by the Science Ministry of Japan (2005.3.10).
- 9) Establishment of cardiovascular cell differentiation system of mouse iPS cells (Narazaki, **Circulation**, 2008; **Best Paper Award** in Basic Science category, **Circulation** 2008).
- 10) Cardiovascular cell differentiation and regeneration from human iPS cells. Application of cyclosporin-A method (Fujiwara, **PLoS One**, 2011) (Collaboration with Department of Medicine and Clinical Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine)
Novel efficient cardiomyocyte induction and purification method with VCAM1 (Uosaki, **PLoS One**, 2011)
- 11) Application of iPS cell differentiation system to chemical biology and drug screening (Nakao, **Bioorg Med Chem Lett**, 2008) (Collaboration with Waseda University)
- 12) Screening and identification of small molecules for cardiomyocyte differentiation and proliferation

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

原著論文

(*corresponding author)

1. Yamamizu K, Matsunaga T, Katayama S, Kataoka H, Takayama N, Eto K, Nishikawa SI, Yamashita JK*. PKA / CREB signaling triggers initiation of endothelial and hematopoietic cell differentiation via Etv2 induction. **Stem Cells**, in press
2. Uosaki H, Fukushima H, Takeuchi A, Matsuoka S, Nakatsuji N, Yamanaka S, Yamashita JK*. Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression. **PLoS One**, 6: e23657. 2011
3. Yamamizu K, Furuta S, Katayama S, Narita M, Kuzumaki N, Imai S, Nagase H, Suzuki T, Narita M*, Yamashita JK*. The kappa opioid system regulates endothelial cell differentiation and pathfinding in vascular development. **Blood**, 118: 775-785, 2011 <Cover image>

4. Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK*. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A. *PLoS One*, 6: e16734, 2011

英文総説

1. Uosaki H, Yamashita JK*. Chemicals Regulating Cardiomyocyte Differentiation. In Craig Atwood. *Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis*. Chapter 24, p471-p486. InTech, 2011 (*Review*).
2. Yamamizu K, Yamashita JK*. Roles of cyclic adenosine monophosphate signaling in endothelial cell differentiation and arterial-venous specification during vascular development. *Circ J*, 75: 253-260, 2011 (*Review*)

和文総説

1. 山下 潤. 「内皮細胞分化」血管生物医学事典（日本血管生物医学会・編）第3章, p158-159, 2011. 朝倉書店
2. 山水康平、山下 潤. 「動静脈分化」血管生物医学事典（日本血管生物医学会・編）第3章, p166-167, 2011. 朝倉書店
3. 山水康平、山下 潤. 「血管ガイダンス」血管生物医学事典（日本血管生物医学会・編）第3章, p170-171, 2011. 朝倉書店
4. 山下 潤. 「CXCL12/CXCR4」血管生物医学事典（日本血管生物医学会・編）第4章, p257-258, 2011. 朝倉書店
5. 山下 潤. 「iPS細胞からの心筋分化・血管分化」医学の歩み別冊「次世代iPS医療」（梅澤明弘・企画）239, 1416-1421, 2011
6. 山下 潤. 「ES細胞とiPS細胞からの心筋再生」循環器再生医学の現状と展望（室原豊明・編）Chapter 3, p115-124, 2011. メディカルレビュー社
7. 山下 潤. 「ES細胞/iPS細胞を用いた心血管再生はどこまでできたか」Heart View 特集「血管・心筋再生はどこまでできたか」15: 40-45, 2011
8. 山下 潤. 「iPS細胞を用いた心筋再生」心臓「iPS細胞の循環器疾患への応用」（企画：山下 潤）43: 4-9, 2011

◆ 学会等の発表 ◆

(○: 発表者)

(1) 学会・研究会発表

1. ○山水 康平、山下 潤. Novel roles of cAMP signaling in endothelial cell differentiation and diversification from vascular progenitors. 第7回心血管幹細胞研究会. 2010. 1. 16. 東京
2. ○Uosaki H, Yamashita JK. Expanding embryonic stem cell-derived cardiomyocytes by small molecules. Keystone symposia (Cardiovascular Development and Repair) (poster). 2010. 3. 3. Keystone, USA.
3. ○Uosaki H, Yamashita JK. Small Molecules Regulating Differentiation and Proliferation of Embryonic Stem Cell-derived Cardiomyocytes. 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2010. 3. 7.

Kyoto

4. ○魚崎英毅、山下 潤. 低分子化合物を用いた ES 細胞由来心筋細胞の分化・増殖制御. 第 9 回日本再生医療学会総会. 2010. 3. 18. 広島
5. ○山水 康平, 川崎 京子、片山 志織、渡部 徹郎、山下 潤. PKA は血管前駆細胞において VEGF 感受性を亢進し、内皮細胞分化を促進する. 第 9 回日本再生医療学会総会. 2010. 3. 18. 広島
6. ○山水康平, 川崎京子、片山志織、渡部徹郎、山下 潤. Adrenomedullin/cAMP/PKA pathway enhances vascular progenitor potential through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1. Presentation of Young Investigator Award. 第 14 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会. 2010. 3. 31. 奈良
7. ○Uosaki H, Yamashita JK. Chemical biological approach to enhance proliferation of cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. International Society for Stem cell Research 8th Annual meeting (poster). 2010. 6. 18. San Francisco, USA.
8. ○Yamamizu K, Furuta S, Kuzumaki N, Natsuaki M, Katayama S, Furuya M, Yajima M, Imai S, Nagase H, Suzuki T, Narita M, Yamashita JK. Kappa opioid receptor regulates endothelial cell differentiation and vascular formation via VEGF receptors expression. International Society for Stem cell Research the 8th Annual Meeting (poster), 2010. 6. 18. San Francisco, USA
9. ○Yamamizu K, Furuta S, Kuzumaki N, Katayama S, Suzuki T, Narita M, Yamashita JK. Kappa opioid system regulates vascular development via VEGF receptors expression. The 16th International Vascular Biology Meeting. 2010. 6. 22. Los Angeles, USA
10. ○ Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Yamamizu K, Furuta S, Imai S, Okano H, Yamashita JK, Suzuki T, Narita M. Opioid system regulates neural and endothelial cell differentiation from ES cells. International Narcotics Research Conference (INRC) 2010 Meeting (poster). 2010. 7.12. Malmö, Sweden
11. ○山水 康平、山下 潤. アドレノメデュリン /cAMP シグナルの血管内皮細胞分化及び血管多様化機構における新しい役割の解明. Presentation of Young Investigator Award. The 8th Metabolic Syndrome Conference. 2010. 7. 17. 京都
12. ○福島 弘之、魚崎 英毅、山下 潤. ES 細胞を用いた心筋分化を促進する化合物の探索. 第 31 回日本炎症・再生医学会 (ポスター). 2010. 8. 5. 東京
13. ○Uosaki H, Fujiwara M, Yamashita JK. Small molecules inducing robust proliferation of embryonic stem cell or induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. American Heart Association scientific session (poster). 2010. 11. 17. Chicago, USA
14. ○山水 康平、古田 貞由、片山 志織、成田 道子、葛巻 直子、今井 哲司、長瀬 博、鈴木 勉、成田 年、山下 潤. 血管内皮細胞分化および血管走行制御におけるオピオイドの役割. Presentation of Young Investigator Award. 第 18 回日本血管生物医学会学術集会. 2010. 12. 3. 大阪
15. ○山水 康平、古田 貞由、片山 志織、成田 道子、葛巻 直子、今井 哲司、長瀬 博、鈴木 勉、成田 年、山下 潤. 発生過程の血管内皮細胞分化および血管走行におけるオピオイドの役割. 第 33 回日本分子生物学会年会. 2010. 12. 10. 神戸
16. ○山水 康平、古田 貞由、片山 志織、成田 道子、葛巻 直子、今井 哲司、長瀬 博、鈴木 勉、成田 年、山下 潤. 血管形成におけるオピオイドの新しい役割. 再生医科学研究学術講演会 2010 (ポスター). 2010. 12. 13. 京都

(2) 講演・シンポジウム

1. 山下 潤. ES 及び iPS 細胞を用いた心血管分化再生研究. 芝蘭会産学情報交流会. 2011. 2. 7. 京都
2. Yamashita JK. Pluripotent stem cell research for cardiovascular cell differentiation and regeneration. The 14th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference. "Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells: Derivation and Characterization" 2011. 2. 24. Bethesda, USA
3. Yamashita JK. Development of cardiac regeneration strategies with pluripotent stem cells. JST/CIRM Workshop. "Early Translational Research on Stem Cells" 2011. 5. 16. Kobe, Japan
4. 山下 潤. 心臓再生へ向けた多面的アプローチ～ ES/iPS 細胞を用いた細胞治療と創薬研究～. 第 24 回北摂循環器研究会. 2011. 5. 24. 吹田
5. 山下 潤. iPS 細胞の基礎と応用. 再生医療学会エデュケーショナルセミナー. 2011. 5. 31. 東京
6. 山下 潤. ES/iPS 細胞を用いた再生医療－心血管再生を中心に－. 神戸薬科大学第 37 回卒後研修講座. 2011. 6. 5. 神戸
7. 山下 潤. 心臓再生へ向けた多面的アプローチ～ ES/iPS 細胞を用いた創薬研究と細胞治療～. 文部科学省私立大学学術高度化推進事業ハイテクリサーチセンター整備事業・第 4 回シンポジウム. 2011. 6. 25. 東大阪
8. Yamashita JK. Cardiovascular regeneration with ES & iPS cells. The 8th Korea-Japan Joint Symposium of Vascular Biology. 2011. 8. 25. Busan, Korea
9. 山下 潤. ES・iPS 細胞を用いた心臓再生の試み. 第 15 回日本心不全学会シンポジウム「心不全における再生治療 up to date」2011. 10. 14. 鹿児島
10. 山下 潤、渡部徹郎. 日本分子生物学会ワークショップ「Dynamic linkage of vascular system and organ functions-novel roles of blood vessels in health and disease」オーガナイザー. 2011. 12. 13. 横浜
11. 山下 潤. ES/iPS 細胞とケミカルバイオロジー - 新しい心臓再生治療における低分子化合物のポテンシャル -. 早稲田大学先進理工学部講演会. 2011. 12. 20. 東京

幹細胞加工研究領域 Laboratory of Stem Cell Engineering

分野主任 准教授 多田 高
Associate Prof. Takashi Tada

【研究概要】

背景)

受精から始まる個体発生は、たった一個の細胞の細胞分裂による数十兆個への増殖と共に、巧妙に制御された細胞分化によってもたらされる。この過程で、受精卵は、体を形つくる全ての種類の細胞に分化可能な多能性が失われ、限られた役割を果たすべく特殊化した細胞へと分化そして老化してゆく。一般に、分化は後戻りのできないプロセスとの概念が固定されていた。我々は、多能性幹細胞 (pluripotent stem cell) の一種である胚性幹 (ES) 細胞と体細胞を細胞融合すると、体細胞核ゲノムのエピジェネティクスが書き換えられ未分化細胞様に再プログラム化されることを世界に先駆けて発見した (Tada et al. (2001) Curr. Biol.)。この結果は、分化細胞を直接培養条件下で多能性幹細胞に再プログラム化可能であること、また ES 細胞には体細胞の再プログラム化に必要な因子があることを示していた。現在では、ES 細胞から同定された因子 (Oct4, Sox2, Klf4 & c-Myc) の強制発現により体細胞が多能性幹細胞 (人工多能性幹 (iPS; induced pluripotent stem) 細胞) に再プログラム化されることが明らかになっている (Takahashi & Yamanaka (2006) Cell)。体細胞の多分化能の獲得には Oct4, Sox2, Nanog が鍵となる転写因子として考えられているが、再プログラム化機構は未だ解き明かされていない。

目的)

- 1) 体細胞が多能性幹細胞に再プログラム化されるメカニズム
- 2) 再プログラム化に関わる因子の働き
- 3) 再プログラム化の医学応用技術の開発

重要性)

基礎生物医学の観点から、再プログラム化メカニズムは、生命を次世代につなぐ仕組みを解き明かすための鍵となる。一方、医学応用の観点から、再プログラム化による個人体細胞からの多能性幹細胞の作製成功は、拒絶反応を伴わない移植分化細胞の医療応用の扉を開き、再生医療の現実性を高める大きな一歩である。医療応用に向けて、解決しなければならない問題に焦点を絞り、一歩一歩クリアーすることで基礎研究の社会への貢献が実現できる。

Pluripotency of mouse iPS cells generated with Oct4, Klf4 and low Sox2

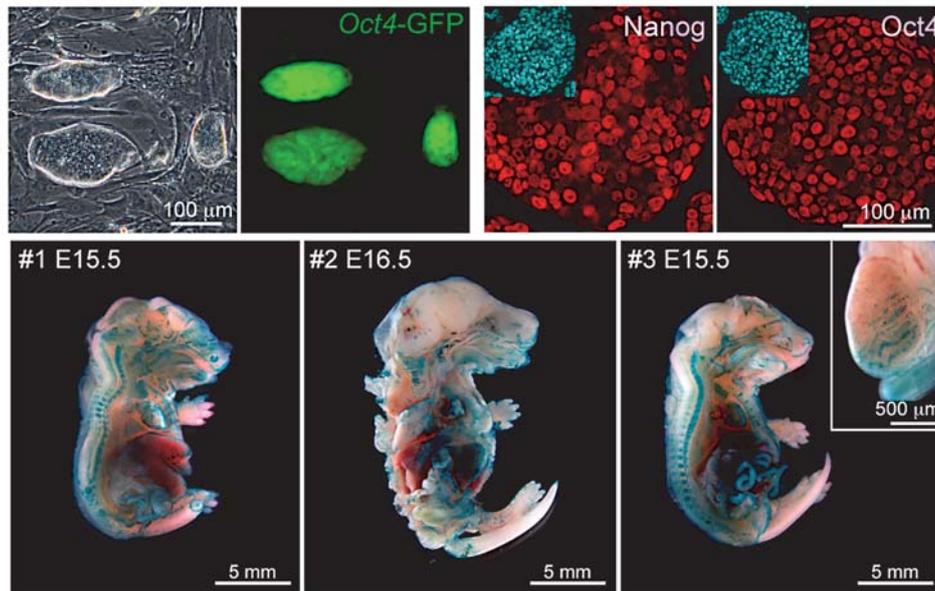


図 1. 低発現レベルの Sox2 を用いて誘導された iPS 細胞の多分化能

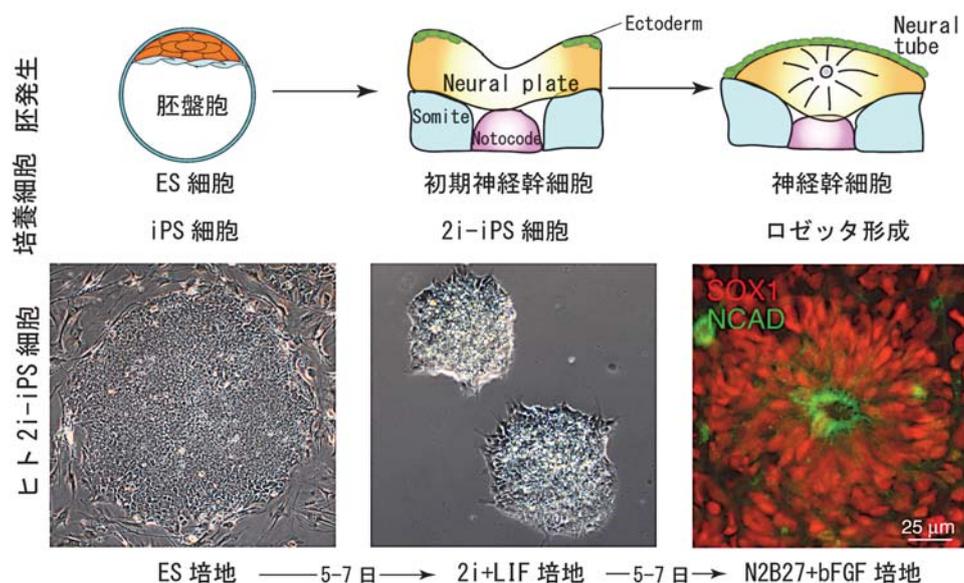


図 2. リン酸化阻害低分子化合物によるヒト iPS 細胞からの初期神経細胞の誘導

Background)

Our body is built by an incredible variety of cell and tissue types, which develop from a single fertilized egg through embryogenesis. Determination of the cell fate is epigenetically regulated through activation or repression of specific genes. Nuclear reprogramming is a phenomenon that a specialized somatic cell acquires pluripotential competence, which is defined by multi-lineage differentiation, due to reset of epigenetic memory of the somatic cell. We found that embryonic stem (ES) cells, which have the robust capability of self-renewal with pluripotency under culture conditions, retain the nuclear reprogramming activity as shown by cell fusion with a somatic cell (Tada et al. (2001) Curr.Biol.). These findings have indicated the reality of direct reprogramming of

somatic cell under a culture condition with factors isolated from ES cells. Tremendously, it has been discovered that defined factors Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc highly expressed in ES cells are sufficient for triggering nuclear reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem (iPS) cells (Takahashi and Yamanaka (2006) Cell). It has been shown that Oct4, Sox2 and Nanog cooperatively function as key transcription regulators in the repression of somatic cell genes and the activation of stem cell genes in pluripotent stem cells.

Reprogrammed somatic genome through cell fusion with ES cells function in cell differentiation similar to the ES genome. Comparative analyses of epigenetic modifications of the somatic genome before and after cell fusion with ES cells demonstrated that the nuclear reprogramming is induced at least through two steps; a) erasure of the somatic cell memory accompanied with global chromatin de-condensation and b) acquirement of the pluripotent stem cell memory. However, the pathway from somatic cell to pluripotent stem cell is largely unknown.

Aims)

- 1) Understanding of molecular mechanisms involved in nuclear reprogramming of somatic cells
- 2) Understanding of molecular function of stem cell factors in maintaining pluripotency and self-renewal
- 3) Development of nuclear reprogramming technologies toward clinical applications

Importance)

In the field of basic stem cell biology, understanding of the molecular mechanisms of nuclear reprogramming of somatic cells to pluripotent stem cells will shed light on the central dogma, the succession of life. In the field of regenerative medicine, the reality of personal iPS cells from individual somatic cells through nuclear reprogramming rises the great hopes on regenerative medicine in near future. Toward realizing the regenerative medicine, further study will be required to overcome several ethical and practical obstacles.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

(1) 原著論文

Cheng, L.T., Nagata, S., Hirano, K., Yamaguchi, S., Horie, S., Ainscough, J., Tada, T.: Cure of ADPKD by selection for spontaneous genetic repair events in Pkd1-mutated iPS cells. PLoS One: in press (2011)

Hirano, K., Nagata, S., Yamaguchi, S., Nakagawa, M., Okita, K., Kotera, H., Ainscough, J., Tada, T.: Human and Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Are Differentially Reprogrammed in response to Kinase Inhibitors. Stem Cells Dev.: in press (2011)

Yamaguchi, S., Hirano, K., Nagata, S. and Tada, T.: Sox2 expression effects on direct reprogramming efficiency as determined by alternative somatic cell fate. Stem Cell Research 6: 177-186 (2011)

(2) 著書

Ainscough, J., Yamanaka, S., Tada, T.: "Nuclear reprogramming and stem cells" 332 pages (Humana Press, USA)

(2011)

Tada, T., Ainscough, J., Yamanaka, S.: Epilogue. In "Nuclear reprogramming and stem cells" ed. by Ainscough, J., Yamanaka, S., Tada, T. (Humana Press, USA): 277-278 (2011)

Kunio, H., Tada, T.: Cell fusion-mediated nuclear reprogramming of somatic cells. In "Nuclear reprogramming and stem cells" ed. by Ainscough, J., Yamanaka, S., Tada, T. (Humana Press, USA): 59-70 (2011)

Toyoda, M., Nagata, S., Makino, H., Akutsu, H., Tada, T., Umezawa, A.: Generation of induced pluripotent stem cell from human amnion cells. In "Lineage-specific differentiation of human embryonic and induced pluripotent stem cells methods and protocols" ed. by Ye, K. and Jin, S. (Humana Press, USA): 249-264 (2011)

多田 高: ヒト iPS 細胞の迅速な初期神経幹細胞分化: マウス iPS 細胞とのリン酸化阻害剤への反応性の違い, 「医学のあゆみ - 次世代 iPS 医療 -」 (梅澤明弘 企画) in press (医学のあゆみ 東京医科歯科出版, 東京 2011)

多田 高: 多能性幹細胞, 「DOJIN BIOSCIENCE シリーズ 『エビジェネティクス』」 (田嶋正二 編集) in press (化学同人, 京都 2011)

多田 高: x 幹細胞の染色体・細胞核, 「DOJIN BIOSCIENCE シリーズ 『染色体の細胞核のダイナミクス』」 (平岡泰・原口徳子 編集) in press (化学同人, 京都 2011)

◆ 学会等の発表 ◆

(1) 学会・研究会発表

Cheng Li-Tao, 長田翔伍, 平野邦生, 山口新平, 多田 高: マウス iPS 細胞における Pkd1 遺伝子の遺伝的異常の自発的正常化: 「第 44 回日本発生生物学会総会」 (2011.5.18-21, 那覇)

平野邦生, 長田翔伍, 山口新平, 中川 誠, 沖田圭介, 小寺秀俊, Justin Ainscough, 多田 高: リン酸化阻害剤によるヒトとマウス iPS 細胞での異なるリプログラミング運命: 「第 83 回日本遺伝学会総会」 (2011.9.20-22, 京都)

多田 高: マウスエピブラストにおける Nanog 遺伝子の発現と機能: 特定領域「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」 (2011.11.17-18, 大阪)

Hirano K., Nagata, S., Yamaguchi, S., Nakagawa, M., Okita, K., Kotera, H., Ainscough, J., Tada, T.: Human and mouse induced pluripotent stem cells are differentially reprogrammed in response to kinase inhibitors: 「第 34 回日本分子生物学会年会」 (2011.12.13-16, 横浜)

Sun, L.T., Yamaguchi, S., Tada, T.: Function and expression regulation of Nanog in mouse epiblast: 「第 34 回日本分子生物学会年会」 (2011.12.13-16, 横浜)

細胞プロセッシング研究領域 Laboratory of Cell Processing

客員教授 高橋 恒夫

Visiting Prof. Tsuneo A Takahashi

客員准教授 楠田 (古江) 美保

Visiting Assoc. Prof. Miho Furue Kusuda

特任講師 川瀬 栄八郎

Lect. Eihachiro Kawase

【研究概要】

細胞プロセッシング研究領域は、ヒト ES 細胞の臨床応用を目指しその基盤技術の研究開発を行うべく設置された部門である。ES 棟に細胞処理施設 (CPC : Cell Processing Center) を設置し、その管理を行うとともに、臨床応用可能な医薬品 GMP に準拠したヒト ES 細胞リソースの供給を目指している。CPC は空調管理、清浄度管理、及び作業管理を含む、医薬品 GMP ハードに準拠した施設としている。また CPC には、細胞調製室、閉鎖系として独立して細胞の調製・培養が可能な Cell-processing Isolator システム、細胞保存室等を備えている。

2011 年度は、これまで樹立されたヒト ES 細胞株を医薬品 GMP レベルで使用できるように動物由来成分を除去する「クリーンアップ」の検討を行うとともに、新たに医薬品 GMP レベルでのヒト ES 細胞株の樹立を行う為の検討を開始している。臨床レベルで使用するためのヒト ES 細胞株の樹立、培養、操作、品質保証、安全性確保等にわたる取扱基準規格を構築に関する協議を関係各局と行いつつ、将来のヒト ES 細胞バンクの準備をすすめている。

また、臨床応用に必要な動物由来成分を用いない完全合成培地、合成基質によるヒト ES 細胞の培養を検討している。これら試験の評価に必要な基準は、国際的に通用するレベルを目指している。この為我々は、ISCBI (International Stem Cell Banking Initiative) による ES 細胞バンキングの国際基準策定会議に参画し、研究レベルでのヒト ES 細胞のバンキングに関する品質基準を作成した。現在、臨床レベルでのヒト ES 細胞バンキングの品質基準の策定に参画している。

The Laboratory of Cell Processing was established to develop technologies to produce and supply human embryonic stem cells (hES cells) with clinical grade. The cell processing center (CPC), located in the ES building in the Institute was built to establish hES cell lines for clinical use satisfying the standards of Good Manufacturing Practices (GMP) and do research to achieve the goal. The CPC meets the hardware standard of GMP such as air conditioning, air cleanliness, work management, etc. The CPC is consisted of several rooms; cell processing room, room for Cell-Processing Isolator in which cells can be processed and cultured in a complete closed system, cell storage, computer-controlled monitoring room, supply room, etc.

Following the government's approval as a cell processing facility to establish hES cell lines, we have started research on the establishment, culture and banking of clinical grade hES.

For clinical application of hES cells, several issues remain to be solved such as development of complete-defined culture medium and feeder-cell free substrates. To verify these factors we should establish a standard that reaches international levels. To achieve that purpose we have been working as a member of working groups of the International Stem Cell Forum (ISCF) and banking group of ISCBI (International Stem Cell Banking Initiative). Recently the ISCBI established "Consensus Guidance for Banking and Supply of Human Embryonic Stem Cell Lines for Research Purposes" as a first fruit, and we are working to establish guidelines for clinical use of human ES cells.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

原著論文

Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Tashiro K, Katayama K, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H, Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction. PLoS One. 2011;6 (7):e21780.

Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Katayama K, Higuchi M, Tashiro K, Nonaka A, Sakurai F, Hayakawa T, Kusuda Furue M, Mizuguchi H. Efficient Generation of Functional Hepatocytes From Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4 α Transduction. Mol Ther. 2012 Jan;20 (1):127-37.

菅 三佳, 高田 圭, 小原 有弘, 末盛 博文, 青井 貴之, 中村 幸夫, 古江 - 楠田 美保, ヒト多能性幹細胞の命名法の国際統一企画案について 再生医療 2012 Feb; 11 (1):72-77

Aizawa E, Hirabayashi Y, Iwanaga Y, Suzuki K, Sakurai K, Shimoji M, Aiba K, Wada T, Tooi N, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, and Mitani K, Efficient and Accurate Homologous Recombination in hESCs and hiPSCs Using Helper-Dependent Adenoviral Vectors. Molecular Therapy, 2012;20 (2):424-431.

Adachi K, Suemori H, Nakatsuji N, and Kawase E, 1 The role of SOX2 in maintaining pluripotency and differentiation of human embryonic stem cells. In "Stem Cells in Clinic and Research" pp., 2011:169-184 (Ed. Ali Gholamrezanezhad) (InTech). ISBN: 978-953-307-797-0.

その他

高田圭, 高橋恒夫, 末盛博文, 中辻憲夫, 研究使用を目的としたヒト胚性幹細胞株のバンキングと分配のための総合指針 再生医療 2011 Nov;10 (4):79-96

◆ 学会等の発表 ◆

長基康人, 田代克久, 高山和雄, 大橋一夫, 櫻井文教, 立花雅史, 古江 (楠田) 美保, 川端健二, 水口裕之, 3次元共培養法によるヒト ES・iPS 細胞由来肝細胞の効率的な分化誘導法の開発, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 28-31 日 (札幌)

高山和雄, 稲村 充, 川端健二, 菅原道子, 菊池きよ美, 櫻井文教, 古江 - 楠田美保, 水口裕之, FOXA2・HNF1 α 遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞の分化誘導, 日本薬学会第 132 年会, 2012

年 3 月 28-31 日 (札幌)

保村佳孝, 木下充弘, 館山大揮, 古江美保, 森山博由, 早川堯夫, 掛樋一晃, 再生医療実用化に向けた幹細胞の安全性評価における複合糖質糖鎖の利用, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 28-31 日 (札幌)

HNF4 α 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの成熟肝細胞への高効率分化誘導, 高山和雄, 稲村充, 川端健二, 形山和史, 櫻井文教, 古江-楠田美保, 水口裕之, 第 18 回肝細胞研究会, 2011 年 6 月 24-25 日 (東京)

Hirata N, Nakagawa M, Fujibayashi Y, Yamauchi K, Murata A, Kawase E, Sato S, Ando S, Young-Tae Chang, Suemori H, Nakatsuji N, Ueda K, Yamanaka S, Uesugi M. Fluorescent chemical probes for human stem cells. AIMECS11 8th AFMC International Medical Chemistry Symposium. (Tokyo, 2011, 11, 29).

Suzuki K, Hirabayashi Y, Aizawa E, Iwanaga Y, Tokumitsu A, Sakurai K, Shimoji M, Aiba K, Wada T, Tooi N, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N and Mitani K, Homologous Recombination in human pluripotent stem cells using helper-dependent adenovirus vectors, 9th International Society for Stem Cell Research (Toronto, 2011, 6, 17).

附属ナノ再生医工学研究センター Research Center for Nano Medical Engineering

ナノバイオプロセス研究領域 Department of Nano Bioprocess

分野主任 教授 楠見 明弘

Prof. Akihiro Kusumi

【研究概要】

1. 生きている細胞中での1分子観察と操作法の開発

世界的には、in vitro での1分子観察と操作ができる研究室は増えてきている。しかし、私達の研究室の特徴は、1分子観察と操作を生細胞中でおこなうことで、それによって、1分子細胞生物学が可能になった。具体的には生きている細胞中の1分子を、マイクロ秒レベルの時間分解能、ナノメートルレベルの空間精度で追跡し、さらに、それらの分子の活性化（反応）までも1分子毎に見る方法を開発してきた（これらは世界でも我々のみ）。これは、ナノサイエンス／ナノテクノロジーとの融合領域として、1分子ナノバイオロジー、1分子細胞生物学という新しい学問分野の創造につながりつつある。

なお、以下の発見は、1分子法を使って初めて可能になったものであり、単なる生細胞中でのイメージングや多数分子の計測では不可能であったものばかりである。

2. 細胞膜の基本的な構造と、働き方について

細胞膜は2次元の液体（連続体）と考えられてきた。しかし、私達は、(1) 細胞膜はコンパートメント化されていること、(2) これは細胞膜に取り込まれた全ての分子に対して働くこと、(3) その機構は、基本的にはアクチン膜骨格によるもので、膜骨格とそこに結合した膜貫通型タンパク質が拡散障壁として働くこと、などを示した。これは、シンガー－ニコルソンモデルに重要な変更を迫るものであり、膜の構造と働き方について、基本的なパラダイムシフトを起こした研究である。

さらに最近、電子線トモグラフィー法を用いて、細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化することに成功した。細胞膜試料として、細胞膜の内側表面を急速凍結ディープエッチ白金レプリカに写し取ったものを用いた。これによって、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めたところ、それが、膜分子の拡散によって得られたコンパートメントの大きさとピッタリと一致した（図1参照）。

受容体はシグナルを受けた後、会合して運動を停止するものが多いが（シグナルが来た位置を数十秒程度記憶する）、これは、会合体が膜骨格によるコンパートメントに閉じ込められるか、膜骨格に結合することによることがわかった。さらに、神経細胞の細胞膜には脂質をも通さない拡散障壁が生じるが、これも、アクチン膜骨格とここに結合する膜貫通型タンパク質が密に集合することによって出来ることを示した。

3. シグナル伝達の基本的な仕組みについて

シグナル伝達は、多くの場合、シグナル分子のランダムな拡散運動と衝突によって担われると考えられてきた。

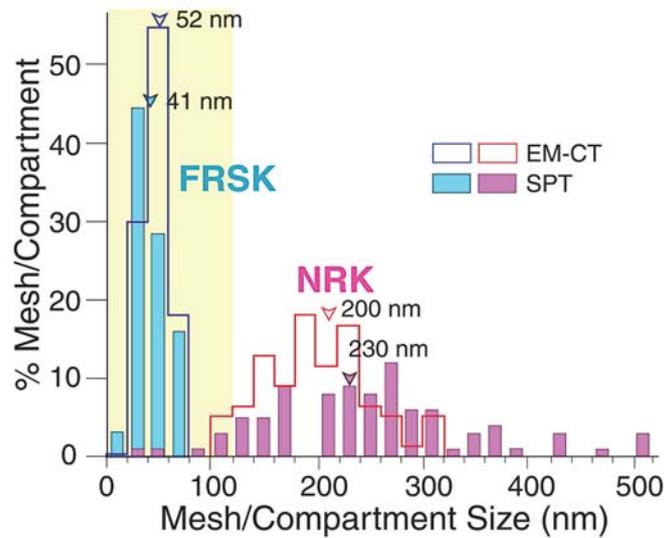


図 1

細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化し、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めた。網目の大きさの分布を、オープンバーで示す。赤が NRK 細胞、青が、FRSK 細胞。さらに、細胞膜中のリン脂質の拡散運動から求めたコンパートメントの大きさの分布を、クローズドバーで示す。両者は、各々の細胞でよく一致する。このように、網目やコンパートメントの大きさが大きく異なる 2 種の細胞で、それぞれ一致が見られたことは、膜骨格フェンスとそれに結合した膜貫通型タンパク質のピケットモデルを強く支持する。

近年の、多くの足場タンパク質の発見は、これとは全く逆に、上流と下流の分子は、足場タンパク質が関与する場合にはずっと結合しているものであり、シグナルが来たら、固体の電気回路のように、シグナルを伝えるものであると考えられるようになった。しかし、私達は、ある分子が活性化されると、それに結合する足場タンパク質、下流分子などが急速に集まって信号複合体を形成すること、それらの多くは安定ではなく 1 秒以下の寿命で分解（不活化）する、ことを見いだした（Ras-Raf の系、ラフトの関与する系）。すなわち、1 回毎のシグナル伝達は量子化されており、多数分子の平均として観察される生化学やイメージングによるシグナル変化は、これらの量子的なパルス状のシグナルの和であり、それを担うのがこれらの短寿命シグナル複合体であることが示された。これは、シグナル系のシステムとしての働き方を理解するためには、極めて重要な知見で、きわめて動的なシグナル分子の組織化によるシステム動作の一端が見えてきたと言える。

[Summary of Research]

Paradigm shift of the concept of the plasma membrane structure

The plasma membrane has been considered to be a two dimensional liquid, with their constituent molecules, membrane proteins and lipids, diffusing freely in the plasma membrane, the Singer-Nicolson model widely accepted for these 30 years. However, we found that the plasma membrane is partitioned into many small compartments, and both membrane lipids and proteins undergo short-term confined diffusion within a compartment, and long-term hop diffusion between the compartments. These membrane compartments are delimited by the membrane skeleton and the transmembrane proteins anchored to the membrane skeleton (Fujiwara et al., 2002; Murase et al., 2004; Kusumi et al., 2005; Morone et al., 2006). This entails a paradigm shift for the concept of the plasma membrane, from the continuous 2-dimensional fluid to the compartmentalized,

structured system. This could be found because we have developed high time resolution (25 microseconds) single-molecule tracking techniques (Kusumi et al., 2005). If more than one molecule is observed at the same time, the single hop event would be masked by averaging over all the molecules under observations. Without high-time resolutions, the residency time within a compartment for 1 ms to 1 s could not be detected.

Single-molecule force microscope

An ultra-sensitive, single-molecule optical force scanning probe microscope was developed that uses a single membrane molecule as a probe. This microscope measures the interaction force between the membrane-molecule probe with the membrane skeleton mesh in live cells, and, by mapping the force, images of the membrane skeleton that interact with the membrane molecule were obtained (Ritchie et al., in preparation). A theoretical framework was developed to understand/predict the behavior of single membrane molecules being dragged by the optical trap (Ritchie et al. in preparation).

Detection of transient interactions of two species of molecules in living cells

Two species of molecules were labelled in different colors, and a method to detect their colocalization at the level of single molecules was developed for the first time (Koyama et al., 2005).

Single-molecules FRET imaging of H-Ras activation in living cells

The activation of H-Ras, a GTP-binding protein involved in the signaling pathways for cell proliferation and reorganization of the cytoskeleton, was visualized at the level of individual molecules using a technique called single-molecule fluorescence resonance energy transfer (single-molecule FRET; Murakoshi et al., 2004; Kusumi and Murakoshi, 2005). Activation of H-Ras takes place only temporarily (< 2 s), and is accompanied by transient immobilization, which is likely due to the transient formation of an activated-Ras signaling complex with scaffolding proteins.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文・総説

R. S. Kasai, K. G. N. Suzuki, E. R. Prossnitz, I. Koyama-Honda, C. Nakada, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi. Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J. Cell Biol.* 192, 463-480 (2011).

X. Li, L. Liu, L. Wang, K. Kamei, Q. Yuan, F. Zhang, J. Shi, A. Kusumi, M. Xie, Z. Zhao, and Y. Chen. Integrated and diffusion-based micro-injectors for open access cell assays. *Lab Chip* 11, 2612-2617 (2011).

A. Hagiwara, Y. Tanaka, R. Hikawa, N. Morone, A. Kusumi, H. Kimura, and M. Kinoshita. Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. *Cytoskeleton* 68, 512-525 (2011).

Z. Kalay, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi. Cytoskeleton-induced meso-scale domains. In "Cellular Domains", Chapter 1, I. R. Nabi Ed., Wiley pp. 3-22 (2011).

A. Kusumi, K. G. N. Suzuki, R. S. Kasai, K. Ritchie, and T. K. Fujiwara. Hierarchical meso-scale domain organization of the plasma membrane. *Trends Biochem. Sci.* 36, 604-615 (2011).

2) 和文総説

鈴木健一、田中賢治、楠見明弘：化学固定後でさえも膜分子は動いている．生物物理 5月号．51 (5):226-227 (2011)

鈴木健一、楠見明弘：免疫染色のための細胞膜分子の固定法：抗体による凝集問題の回避．

Close Up 実験法シリーズ 215. 実験医学 6月号．29 (6): 1441-1446 (2011)

◆ 学会等の発表 ◆

招待講演のみを記載する

1) 国際学会・外国の学会

1A) 国外開催

R. S. Kasai and A. Kusumi. Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. Liposomes in Jerusalem 2011. Jerusalem, Israel. May, 2011.

A. Kusumi. Organizing principle of the plasma membrane: three-tiered meso-scale domain architecture revealed by single-molecule tracking. Closing Plenary Lecture. The 8th European Biophysics Congress (held by European Biophysical Societies' Association). Budapest, Hungary. August 2011.

A. Kusumi. Signal transduction facilitated by raft-based interactions as revealed by single-molecule imaging. The 1st POSTECH International Symposium on Bio-Imaging. Pohang, Korea. September 2011.

A. Kusumi. Lipid-stabilized dynamic homo-dimers of GPI-anchored receptors convert into oligomeric signaling clusters. The 51st Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. "Clathrin-Independent Endocytosis" Special Interest Subgroup Meeting. Denver, U.S.A. December 2011.

1B) 国内開催

A. Kusumi. Raft-facilitated protein interactions for signal transduction as revealed by single-molecule imaging. The 30th Naito Conference. "Membrane Dynamics and Lipid Biology [II]: Domains, Droplets and Diseases." Sapporo Japan. June, 2011.

A. Kusumi. Three-tiered hierarchical meso-scale domain architecture of the plasma membrane: single-molecule studies. "Murata ERATO Project International Symposium on Lipid Structures in and around Proteins". Osaka, Japan. November, 2011.

A. Kusumi. GPI-anchored receptors are poised to form signaling rafts: dynamic homo-dimer rafts in steady-state cells. The JSPS/iCeMS International Symposium. "ABC2011 in Kyoto – ABC Proteins/Membrane Meso-domains/ES-iPS cells". Kyoto, Japan. November 2011.

2) 国内での招待講演

楠見明弘：細胞膜の動的構造と機能・・2次元の変な液体の働かせ方、国際高等研究所「諸科学の共通言語としての数学の発掘と数理科学への展開」第3回研究会（2011.1.5 京都）

楠見明弘：Ligand-induced transformation of short-lived GPI-anchored protein homo-dimer rafts into greater signaling rafts: a single-molecule tracking study、第116回日本解剖学会総会／第88回日本生理学会大会合同大会 シンポジウム 31 「Dynamics of the localization and function of the lipids and proteins on the

biomembrane」(2011.3.25 横浜)(東日本大震災のため誌上開催)

楠見明弘：細胞のシグナル変換機構の研究に時間軸を入れる：1 蛍光分子イメージングによる研究、ライカー再生研
バイオイメージングセミナー「イメージングから迫る生命のダイナミクス」(2011.6.7 京都)

楠見明弘：Single-molecule tracking studies on the mechanisms for generating stabilized signaling rafts: ligand-
induced cooperative action of protein-protein and raft-lipid interactions、第 63 回日本細胞生物学会大会 シ
ンポジウム S2「Frontier in Imaging Technology for Cell Biology」(2011.6.27 札幌)

楠見明弘：Organizing principles of the plasma membrane: three-tiered meso-scale domain architecture revealed
by single-molecule tracking、第 84 回日本生化学会大会 シンポジウム 3S3p「Cholesterol in Brain Diseases」
(2011.9.23 京都)

鈴木健一、安藤弘宗、河村奈緒子、Rahul, Chadda、坪井久恵、池田泰祐、石田秀治、木曾真、楠見明弘：蛍光標識
ガングリオシドの合成と 1 分子追跡によるシグナルラフト形成機構の解明、第 84 回日本生化学会大会 シン
ポジウム 4S7a「細胞膜脂質ダイナミクスが担う膜ドメインのリモデリング」(2011.9.24 京都)

楠見明弘：細胞膜のメゾドメインを 1 分子追跡で調べる、第 25 回分子シミュレーション討論会 (2011.12.7 東京)

シミュレーション医工学研究領域

Department of Medical Simulation Engineering

准教授 玄 丞侏

Assoc. Prof. Suong-Hyu Hyon

【研究概要】

本研究室では、生体組織と力学的に調和する生体材料や人工臓器の開発など生体機能の再生を目的とした診断・治療の支援を行うために、コンピュータ科学や材料工学の手法を用いて、以下のような基礎的ならびに応用的研究を行っている。

1. 生体組織の力学的適応変形に関するシミュレーション

生体組織の力学的特性の解明を基本として、特に骨のモデリングならびにリモデリング現象など生体組織の力学的合理性の適応変形過程などについて数値シミュレーションを行っている。その結果、等応力分布あるいは等歪エネルギー密度分布などの制約関数に従って、各種骨組織の形態が形成されていることが示唆され、この制約の下に、生体組織と力学的に調和する人工関節等のインプラントのデザインの創生を試みている。(新エネルギー・産業技術総合開発機構助成金)

2. 人工歯根周囲における歯根膜の再生

現在の人工歯根は、天然歯根のように歯根膜を持たず、直接顎骨に固定させるので、咀嚼時の動的荷重が緩衝されず直接顎骨に伝わる。その結果、歯槽骨に過大な応力が発生して骨吸収が起こり、ゆるみが生じる危険性が高い。そこで、チタン製人工歯根をポリマーで被覆し、表面処理により細胞接着性タンパク質であるコラーゲンを固定化し、さらにその上に歯根膜細胞を培養し、歯根膜ならびにセメント質の再生を図っている。(文部科学省科学研究費補助金)

3. MR Elastography (MRE) による in vivo 弾性率データの計測、解析および検証

磁気共鳴弾性率計測法 (MRE) は、MRI をベースとする新たな測定技術であり、これによる体内組織・器官の非侵襲性弾性率計測の手法を確立し、医療研究支援用の生体組織データベースを構築する。また触感デバイスを用いた人工現実感 (VR) による VR モデルシステムを開発している。(医学研究科情報学専攻との共同研究)

4. 人工関節軟骨・人工椎間板などの医療用ハイドロゲル

関節軟骨が持つ優れた力学的特性を具備した人工関節軟骨材を開発することにより、関節の病変部のみを置換し健全な軟骨下骨梁を残す新しい人工関節軟骨の開発を目指している。当研究室にて新しく開発した高強度・高弾性率ポリビニルアルコールハイドロゲルは人工関節軟骨・椎間板材料として有望である。(医学研究科整形外科学講座との共同研究、厚生労働省科研費)

5. 耐摩擦・摩耗特性に優れた人工関節用ポリエチレン

人工関節の摺動部に使用される超高分子量ポリエチレンの摩耗粉により発生する不良肉芽組織が骨吸収を惹起する異物反応が問題となっている。そこで、物理的な改良法により最終成形物に分子配向と結晶面配向を導入することにより、耐摩耗性の改良を試み、良好な結果が得られていた。本技術とライセンスは米国バイオメット社に移転され臨床応用された。

6. ポリフェノールによる細胞増殖制御と生体組織の長期間保存

緑茶ポリフェノール成分であるエピガロカテキンガレート（EGCG）が細胞・組織の保護作用を持つことを発見し、生体組織の保存に応用する研究を行っている。角膜に関しては、既存の角膜保存液は約1週間の保存期間であったが、EGCGを添加することにより2週間の保存期間でも上皮、内皮ともに形態、機能を維持することができる保存液を開発した（京都府立医科大学眼科教室共同研究）。

末梢神経を約4週間保存し、その後移植することで拒絶無く生着させる事が可能であることを見出した（京都大学医学部整形外科共同研究）。

脾臓は凍結解凍によりダメージを受けインスリン分泌能などが低下するため臨床用には凍結保存法は採用されていない。我々は凍結障害を防止し、形態・機能共に維持したまま保存することが可能であることを示した（京都大学医学部移植外科共同研究）。

EGCGで組織を処理することにより移植後の急性期拒絶を抑える可能性を見出した。マウスリンパ球の表面抗原の解析を行い、EGCGが免疫細胞の抗原認識を一部阻害することが原因であることを突きとめ、リンパ球移植実験で効果を確認した。この技術を用いることにより将来的に免疫抑制剤の投与量を減少させることが期待される。

EGCGで移植用血管を処理することで移植後の内膜肥厚を抑制し狭窄を予防できることを発見した。これにより心臓疾患治療のための冠動脈バイパス手術の成功率を高めることが可能である（京都大学医学部心臓血管外科共同研究）（日本科学技術振興機構プレベンチャー事業、文部科学省科学研究費基盤研究B）

7. 人体に優しい義歯床

現在、臨床で広く使用されている義歯床として、加熱重合タイプのポリメチルメタクリレート（PMMA）と、射出成型タイプのポリサルホン（PS）やポリカーボネート（PC）が知られている。加熱重合タイプのPMMAは、重合に伴う収縮率が高く、耐衝撃性等の力学的特性に劣る上、特に残留モノマーが多いため、使用時に残留モノマーの溶出によるアレルギー反応が惹起されることが指摘されており、生体に対する安全性の問題が残っている。

そのため、これに替わる材料としてPSやPCが射出成型用義歯床として使用されるようになって来た。ところがPSは耐衝撃性に劣り、またPCについても、残留モノマーであるビスフェノールが、近年環境ホルモンとしての毒性が大きく取り上げられている。さらにPMMA補修部材としての接着性が悪い為、人体にとって安全で、しかも耐衝撃性等の力学的特性に優れ、残留モノマーが少ない義歯床が切望されてきた。

本研究では、残留モノマーが極めて少なく、刺激や毒性のない人体に優しいのみならず、耐衝撃性や高曲強度で、耐久性に優れた射出成型タイプの義歯床を開発し、臨床の場に提供できた。（近畿経済産業局速攻型地域新生コンソーシアム研究開発事業）

8. 生分解性を有する2液反応型の新規医療用接着剤

生体接着剤の中で多くの分野で大量に使用されているのはフィブリン糊である。しかし、血液凝固作用を利用した血液製剤であるため、C型肝炎の感染症問題が非常に大きな社会問題となっている。現状は、各病院ともフィブリン糊の使用に際して、患者よりC型肝炎のリスクがあることを理解している旨の承諾書を取った上で使用されており、フィブリン糊に代わる安全性の高い医療用シーラントの出現が切望されている。また、フィブリン糊の接着力は低く創傷面から剥がれやすいこと、および生体内での分解が早すぎることも問題視されている。

現在までの研究で、分解速度が任意にコントロール可能であること、フィブリン糊より柔軟性が高いこと、毒性が極めて低いこと、フィブリン糊より接着力が高いこと、食品添加物を原料とするため安価で提供できることなどが分かった。更に、心臓血管外科領域での血管の止血、胸部疾患外科領域での肺の空気漏れ閉塞、および消化器外科領域での肝臓の止血など種々の用途での動物実験の良好な結果に基づいて、新規医療用接着剤として実用化でき

臨床応用の可能性を見出した。(新エネルギー・産業技術総合開発機構 NEDO：イノベーション推進事業平成 21 年～23 年度)

9. DMSO・血清フリーの不凍ポリアミノ酸によるヒト ES / iPS 細胞の凍結保存

培養細胞を利用した研究は生物学や医学分野において欠かせないものであり、各種細胞の維持、保管は主に液体窒素などを用いた低温保存により行われている。培養細胞だけでなく、受精卵や精子などの生殖細胞や血液細胞なども凍結保存されている。また、再生医療に有用な幹細胞も移植前には凍結保存されることが想定される。その際、細胞の機能や生存率をできるだけ維持するため、凍結に由来する様々な障害を防止する目的で凍害防御剤を添加する必要がある。凍害防御剤としてはジメチルスルホキシド (DMSO) やグリセリンなどが挙げられる。DMSO は細胞内に浸透し氷晶の形成を抑制することで凍結時の細胞へのダメージを軽減していると言われ、またグリセリンは細胞を脱水すると共に細胞内において水の結晶化を抑制していると言われる。しかし DMSO は毒性が高く解凍時に速やかに除去する必要があり、また細胞によっては分化に影響を及ぼすなどの問題点があるため、毒性が低く効果の高い凍害防御剤の開発が望まれている。当研究室では、世界で初めて異種たんぱく質の血清フリーで、しかも DMSO と同等以上の凍害防御機能のある高分子化合物を開発した。(文部科学省再生医療実現化プロジェクト：平成 20 年～24 年度、文部科学省科学研究費基盤研究 B：平成 22 年～24 年度、NEDO ヒト ES 細胞産業応用促進基盤技術開発事業：平成 23 年～27 年度)

1. Simulation of Biomechanical Adaptation Process of the Living Tissues.

Numerical simulations are carried out especially on the modeling and remodeling phenomena of the bones as the biomechanical adaptation. With constraint functions such as stress distribution or strain energy density distribution, it is indicated that the form of the bone has been modeled, and the design of artificial dental roots which dynamically harmonizes with the living tissue under this constraint has been tried. (Supported by New Energy and Industrial Technology Development Organization)

2. Regeneration of the periodontal Membrane around Dental Implant Roots.

The present artificial dental root is fixed directly in the alveolar bone without having periodontal ligament like natural tooth root, the stresses are directly transmitted without any damping effect. The excessive stresses in the alveolar bone may arise and cause the bone resorption by which the loosening of the implants occurs. Therefore, we have been attempting that the dental implant made of titanium is covered with a polymer, and the collagen which is the cell adhesive protein is fixed by some surface treatments, and in addition, the periodontal ligament cell is cultivated on the surface for regeneration of the periodontal membrane. (Supported by Ministry of Culture, Science and Education)

3. MR Elastography Measurement, Analysis and Verification.

Magnetic resonance elastic modulus measurement method (MRE) of the elastic modulus is a new measuring technique based on the MRI, and it establishes the technique of the noninvasive elastic modulus measurement of the living tissue and organ in vivo. Database construction for the medical research support, and virtual reality (VR) system using the haptic device are investigated. (Joint Research with Information Division, Kyoto University)

4. New Artificial Articular Cartilage and Intervertebral Disk.

Development of the artificial cartilage and intervertebral disk is necessary in order to recover support

and mobility simultaneously in joints and spine which received the damage. We examined the possibility of the application of polyvinyl alcohol hydrogel which can control the mechanical strength by the change of water content and is excellent in the biocompatibility. It replaces only lesion part and leaves the sound subchondral bone. The high strength and high elastic modulus of the polyvinyl alcohol hydrogel newly developed in this department is promising as artificial articular cartilage and intervertebral disk material. (Supported by Japan Ministry of Health, Labour and Welfare)

5. Polyethylene for Artificial Joints with High Wear Resistance.

The wear particles of polyethylene are produced by the friction between the metal and UHMWPE when artificial joint used for the long term. It is known that the osteolysis occurs by foreign body granulation tissue which the wear particle induces. The development of new UHMWPE for artificial joint which controlled super structure by the crystallization under molecular orientation is being tried in order to improve abrasion resistance of UHMWPE.

6. Proliferation Control of Mammalian Cells and Tissue Preservation for Long Term.

EGCG, a green tea polyphenol, not only improves preservation of non-frozen tissues such as cornea, nerves, and pancreatic but solves some potential problems pertaining to transplantation and cardiovascular medicine. EGCG with its immuno-suppressive and anti-proliferative effects prevents graft rejections in various tissues and neo-intimal hyperplasia in vein grafts, respectively. Therefore, the use of EGCG for preserving the living tissues and controlling their cellular responses will provide us a starting point to advance the future of regenerative medicine. (Supported by Japan science and technology)

7. The gentle denture base in human body

Today, we are researching and developing novel thermoelastic denture base composed of polymethylmethacrylate (PMMA) as a main component for injection molding. Denture base is generally employed polycarbonate (PC) as thermoelastic resin. However, PC is eluted in one's mouth, bis-phenol A of an environmental pollution, and furthermore, poor adhered to PMMA resin of repair adhesive. Heat-polymerized type PMMA mainly employed as denture base, is eluted in one's mouth a lot of monomer and oligomer, which come from residue product of polymerization, and is anxious to cause an allergy. We are researching and developing novel thermoelastic denture base which overcomes disadvantages of traditional denture resin. (Supported by Kinki area economy department of industry)

8. Biodegradable Medical Adhesives

The closing, sealing, and bonding of wounds and defects in various types of tissue still remain problem areas in the field of medicine. To bond a soft tissue interface, numerous studies have been conducted to develop either synthetic or semi synthetic tissue adhesives. Cyanoacrylate, aldehyde-based, and fibrin glue have all been developed for clinical usage. However, some problems have led to limitations in their application, such as toxicity and virus infection.

We recently developed functional medical adhesive of dextran based reactive glue, consisting of aldehyded dextran and ϵ -poly(L-lysine), two kinds of medical and food additives, as starting materials. Biocompatibility assay indicated that the functional medical adhesive showed excellent biocompatibility with in vitro and in vivo and most of the functional medical adhesive was histologically degraded within 4 weeks. The excellent performance

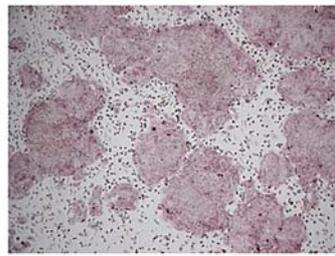
was observed in comparison to the use of conventional fibrin glue . (Supported by New Energy and Industrial Technology Development Organization)

9. Antifreeze Polyamino Acid with the Cryoprotective Function

Cryoprotective agents (CPAs) such as dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, ethylene glycol, and propylene glycol have been used for the cryopreservation of cells and tissues. DMSO is the most effective CPA but shows high cytotoxicity and can effect differentiation. ϵ -poly-L-lysine (PLL) derivatives show higher cryopreservation efficiency than the conventional CPAs. Culture medium solutions with 7.5 w/w% of PLL whose amino groups of more than 50 mol% were converted to carboxyl groups by succinic anhydride showed higher post-thaw survival efficiency of L929 cells than those of current CPAs without the addition of any proteins. In addition, rat mesenchymal stem cells were cryopreserved more effectively than with DMSO and fully retained the potential

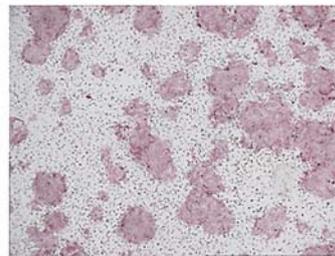
カルボキシル化ポリ-L-リジンを用いた細胞凍結保存液のhES細胞に対する保存効果

(1) PLL(0.65)+EG+Suc



AP染色
細胞: KhES3 (P13)

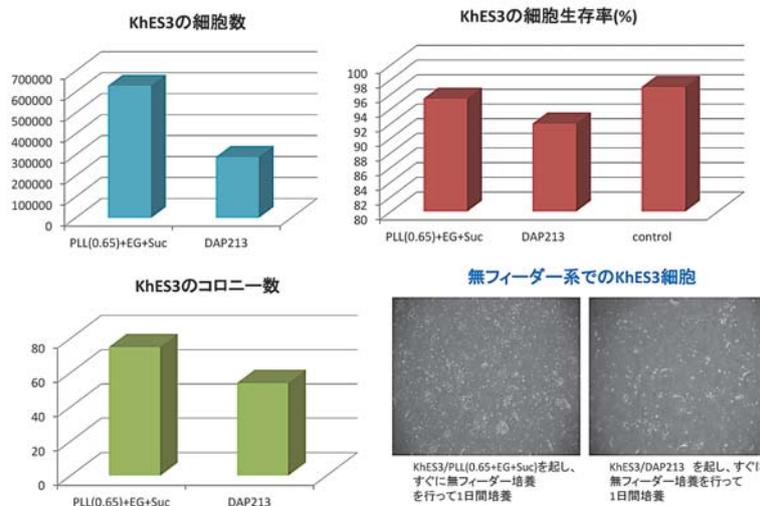
(2) DAP213



凍結: PLL (0.65)+EG+Suc、またはDAP213で凍結
凍結期間: 液体窒素中で1日
培養: SNLフィーダー細胞をまいたディッシュへ播種
または、無フィーダー系で培養
実験: AP染色
細胞の計測 (トリプシン処理後、トリパブル染色)
顕微鏡下での形態観察
免疫染色 (Oct3/4, Nanog, SSEA4, Tra-1-60)

ヒトES細胞のガラス化凍結保存において、不凍ポリアミノ酸(カルボキシル化ポリ-L-リジン)を用いた新規ガラス化保存液が、従来のDAP213に比べて優れた保存効果が認められた。

図 1 :



ヒトES細胞のガラス化凍結保存において、不凍ポリアミノ酸を用いた新規ガラス化保存液が従来のDAP213に比べて、解凍後の細胞数、コロニー数、及び細胞生存率が高かった。

図 2 :

for proliferation and differentiation. Furthermore, many kinds of cells could be cryopreserved with PLL having the appropriate ratio of COOH groups, regardless of the cell types, including adhesive and floating cells, human and mouse derived cells, primary cells and established cell lines. The properties might be associated with the antifreeze protein properties. These results indicate that these polymeric extracellular CPAs may replace current CPAs and the high viability after thawing and non-necessity of serum ensure that these CPAs may be used in various preservation fields. (Supported by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan)

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

(1) 原著論文

- Matsumura, K., Bae, J.-Y., Kim, H.-H., Hyon, S.-H. : Effective vitrification of human induced pluripotent stem cells using carboxylated ϵ -poly-L-lysine. *Cryobiology* **63** 76-83 (2011)
- Kakuta, Y., Okumi, M., Isaka, Y., Tsutahara, K., Abe, T., Yazawa, K., Ichimaru, N., Matsumura, K., Hyon, S.-H., Takahara, S., Nonomura, N. : Epigallocatechin-3-gallate protects kidneys from ischemia reperfusion injury by HO-1 upregulation and inhibition of macrophage infiltration. *Transplantation International* **24** (5), 514-522 (2011)
- Yanagi, S., Matsumura, K., Marui, A., Morishima, M., Hyon, S.-H., Ikeda, T., Sakata, R. : Oral pretreatment with an appropriate dose of a green tea polyphenol facilitates cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in an isolated rat heart model. *J Thorac Cardiovasc Sur* **141** 511-517 (2011).
- 加藤希理子, 松村和明, 中島直喜, 玄丞然, 北條正樹 : ステレオコンプレックスポリ乳酸繊維複合体を用いた骨固定材の開発 日本機械学会第21回バイオフィロンティア講演会講演論文集 No.10-72, 27-28 (2010)
- Kobayashi, M., Matsumura, K., Hyon, S.-H. : A preliminary in vivo study of artificial meniscus using the uniaxial oriented reinforced compressive polyvinyl alcohol hydrogel. *Trends Biomater. Art organs*. **25** (3), 107-111 (2011)
- 小林正典, 近藤政芳, 玄丞然 : 変形性膝関節症治療における関節内潤滑剤のトライボロジー効果についての検証 (ウサギを用いた動物実験での評価) 日本機械学会誌 **77** (780) 247-251 (2011)
- 水野仁二, 玄丞然, 松村和明, 乾裕昭, 菊地瑛子, 野口香里, 丹知百合, 赤石一幸, 阿部崇, 安齋憲, 村山嘉延 : ARTのためのクライオナノホールコンテナと不凍ポリアミノ酸(カルボキシル化 Poly-L-Lysine)を用いた低毒性, 完全無血清のガラス化保存システムの開発. 日本受精着床学会雑誌 **28** (1) : 23-30 (2011)
- Sano, K., Temma, T., Azuma, T., Nakai, R., Narazaki, M., Kuge, Y., Saji, H. : A Pre-targeting Strategy for MR Imaging of Functional Molecules Using Dendritic Gd-Based Contrast Agents. *Mol Imaging Biol*. **13**(6):1196-203 (2011)
- Ino, T., Nakai, R., Azuma, T., Kimura, T., Fukuyama, H. : Brain activation during autobiographical memory retrieval with special reference to default mode network. *Open Neuroimag J*. **5**:14-23 (2011).
- Nakamura, J., Nakajima, N., Matsumura, K., Hyon, S.-H. : In vivo cancer targeting of water-soluble taxol by folic acid immobilization. *J Nanomedicine Nanotechnology* **2** (1) 1000106 (2011)
- Park, B.-J., Taguchi, H., Kamei, K., Matsuzawa, T., Hyon, S.-H., Park, J.-C. : In vitro antifungal activity of

- epigallocatechin 3-*o*-gallate against clinical isolates of dermatophytes. *Yonsei Med J* **52** (3) 535-538 (2011)
- Han, D-W., Lee, M-H., Kim, H- H., Hyon, S-H., Park, J-C. : Epigallocatechin-3-gallate regulates cell growth cell cycle and phosphorylated nuclear factor- κ B in human dermal fibroblasts. *Acta Pharmacologica Sinica* 1-10 (2011)
- Lee, J-H., Kim, H-L., Lee, M-H., Taguchi, H., Hyon, S-H., Park, J-C. : Antimicrobial effect of medical adhesive composed of aldehyded Dextran and ϵ -Poly (*L*-Lysine). *J. Microbiology and Biotechnology* **21** (11) 1199-1202 (2011)
- Lee, J- H., Jung,T-G., Hwang, D-Y., Kang, H-G., Park, J-C., Han, D-W., Hyon, S-H. : Evaluation of wound closure and antihemorrhagic efficiency of medical adhesive composed of Aldehyded Dextran and Poly (*L*-lysine). *Biomaterials Research* **15** (3): 129-135 (2011)
- 赤石一幸, 水野仁二, 丹知百合, 菊地瑛子, 野口香里, 安齋 憲, 玄 丞休, 松村和明, 乾 裕昭:安全な凍結保存を目指した当院の取り組み. *日本臨床エンブリオロジスト学会雑誌* **13** 50-56 (2011)
- 田中基嗣, 水谷将之, 加藤希理子, 玄 丞休, 近田英一, 北條正樹, 金原勲:静水压押出成形 SCPLA/PLLA 複合材料の圧縮破壊挙動の評価. *日本材料学会第 60 期学術講演会講演論文集* (2011)
- 田中基嗣, 水谷将之, 加藤希理子, 玄 丞休, 近田英一, 北條正樹, 金原勲:静水压押出成形 SCPLA/PLLA 複合材料の圧縮破壊挙動に及ぼす加水分解の影響. *日本機械学会 M&M2011 材料力学カンファレンス講演論文集* (2011)
- Inui, H., Mizuno, J., Hyon, S-H., Matsumura. K. : Development of a low toxicity and completely serum-free vitrification system combining a cryo-nano-hole vitrification container with antifreeze polyamino-acid (carboxylated poly-l-lysine) for art. *Journal of REPRODUCTION ENGINEERING*, (in Press) (2011)
- Takagi, K., Tsuchiya, T., Araki, N., Yamasaki, N., Nagayasu, T., Hyon, S-H., Nakajima. N. : Novel biodegradable powder for preventing postoperative pleural adhesion. *Journal of Surfical Research* (in Press) (2011)
- Kanamune, J., Kina, T., Iwanaga, Y., Noguchi, H., Matsumura, K., Uemoto, S., Hyon, S-H: Attenuation of murine GVHD by a tea polyphenol. *Cell Transplantation* (in Press) (2011)

(2) 著書

- S-H Hyon : Cryopreservation of Skin Tissue. 「SKIN GRAFTS — INDICATIONS, APPLICATIONS AND CURRENT RESEARCH」 319-338 (2011)
- 内藤泰行, 河内明宏, 三木恒治, 中島直喜, 玄 丞休 : 第 29 節 止血材 泌尿器科医の立場から. 「医療材料【外科製品・生体材料】の臨床ニーズ集」(株技術情報協会、東京) 231-235 (2011)

(3) 総説

- 松村和明, 玄 丞休 : 不凍ポリアミノ酸の再生医療と食品工業への展開. *バイオインダストリー* MAY.2011 35-42 (2011)
- 玄 丞休 : 生体内分解吸収性高分子材料の臨床応用. *成型加工* **23** MAY 2011.
- 玄 丞休, 松村和明 : 不凍ポリアミノ酸を用いたヒト iPS 細胞の凍結保存. *医学のあゆみ* **238** (13) 1212-1214 (2011)
- 東 高志, 中井隆介, 渡邊 誠, 茂野啓示 : 顎機能診断・咬合診断への新たな扉 座談会 多次元 MRI を用いた顎

機能診断への期待. 歯界展望 117 (5) 795-816 (2011)

◆ 学会等の発表 ◆

(1) 学会・研究会発表

Hyon, S-H., Matsumura, K., : Novel cryoprotective agent (CPA) of stem cell for regenerative medicine. World Biobanking Summit (2011.6.30-7.1 Hamburg)

Hyon, S-H., Matsumura, K., : Creation of antifreeze polyaminoacid with cryoprotective function. Ice-Binding Protein Conference (2011.8.3-6 Ontario)

松村和明, 林 文晶, 長島 敏雄, 玄 丞然 : 凍結保護活性を持つカルボキシル化ポリリジン溶液の固体 NMR 測定による凍結時の挙動の評価. 第 56 回低温生物工学会大会 (2011.7.7-8 盛岡)

松村和明・林文晶、長島敏雄、玄 丞然：凍結保護能を持つ両性電解質高分子の凍結時挙動の固体 NMR による解析. 第 60 回高分子討論会 (2011.9.28-30 岡山)

Matsumura, K., Hyon, S-H : Effective Cryopreservation of the stem cell for a regeneration medicine. 4th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell (2011.11.11-13 Beijing)

松村和明, 林 文晶, 長島敏雄, 玄 丞然 : 細胞凍結保護ポリマーの凍結挙動. 第 33 回日本バイオマテリアル学会 (2011.11.21-22 京都)

田中基嗣, 水谷将之, 加藤希理子, 玄 丞然, 近田英一, 北條正樹, 金原 勲 : 静水圧押出成形 SCPLA/PLLA 複合材料の圧縮破壊挙動の評価. 日本材料学会第 60 期学術講演会 (2011.5.25-27 大阪)

田中基嗣, 水谷将之, 加藤希理子, 玄 丞然, 近田英一, 北條正樹, 金原 勲 : 静水圧押出成形 SCPLA/PLLA 複合材料の圧縮破壊挙動に及ぼす加水分解の影響. 日本機械学会 M&M2011 材料力学カンファレンス (2011.7.16-18 北九州)

Tanaka, M., Hachiya, Y., Hojo, M., Hyon, S-H., Konda, M., Kimpara, I. : Influence of structural anisotropy on compressive fracture properties of hydrostatic-pressure-extrusion-molded HAP/PLLA composite. The 18th International Conference on Composite Materials (2011.8.21-26 Jeju)

Tanaka, M., Hachiya, Y., Hojo, M., Hyon, S-H., Konda, M., Kimpara, I. : Effect of hydrolysis on anisotropy in compressive fracture properties for hydrostatic-pressure-extrusion-molded HAp/PLLA composites. The International Conference on Advanced Technology in Experimental Mechanics (2011.9.19-21 Kobe)

Tanaka, M., Mizutani, M., Kato, K., Hyon, S-H., Konda, M., Hojo, M., Kimpara, I. : Influences of microstructural anisotropy and hydrolysis on compressive fracture behavior of hydrostatic-pressure-extrusion-molded SCPLA/PLLA composite. Proceedings of the 8th Korea-Japan Joint Symposium Materials 67-68. (2011.11.17 Changwon)

中井隆介, 東 高志, 玄 丞然 : Multi-section 動的撮像と高解像度 3 次元撮像を用いた下顎運動と咬筋の解析. 平成 23 年度日本歯科理工学会 近畿・中四国支部夏期セミナー (2011.8.28-9 兵庫)

中井隆介, 東 高志, 茂野啓示, 瀧澤 修, 都賀谷紀宏, 玄 丞然 : 多断面動的撮像・高解像度 3 次元撮像を用いた下顎の開閉口運動と咬筋の解析. 第 39 回日本磁気共鳴医学会大会 (2011.9.29-1 小倉)

加藤希理子, 中島直喜, 玄丞然 : ステレオコンプレックス繊維メッシュを用いたポリ乳酸複合材料の開発. 日本バイオマテリアル学会第 6 回関西若手研究発表会 (2011.8.12 大阪)

加藤希理子, 中島直喜, 山本智義, 玄丞然: 骨固定用デバイスとしてのステレオコンプレックスポリ乳酸の力学的特性評価. 第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)

竹内敦史, 高山了, 松村和明, 中島直喜, 玄丞然: 人工関節用超高分子量ポリエチレンの放射線照射. 第85回人工関節の機能高度化研究会 (2011.1.29 岡山)

竹内敦史, 玄丞然: 人工関節用超高分子量ポリエチレンの加速酸化. 日本バイオマテリアル学会 第6回関西若手研究発表会 (2011.8.12 京都)

竹内敦史, 玄丞然: 人工関節用超高分子量ポリエチレンの圧縮成形による耐摩耗性の向上. 第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21-22 京都)

Han, D-W., Hyon, S-H.: Physicochemical, biomechanical and biological characterizations of EGCG-eluting PLCL for biodegradable stent application. The 3rd Asian Biomaterials Congress (2011.9.16 Busan)

大橋明浩, 小林正典, 中島直喜, 玄丞然: 変形性膝関節症治療用関節注入剤としてのポリエチレングリコールの機能評価. 第38回日本臨床バイオメカニクス学会 (2011.11.18-19 神戸)

本田佳之, 中島直喜, 玄丞然: ポリエチレングリコールを用いた人工膝関節内潤滑剤の開発 (超高分子量ポリエチレンの摩耗評価). 第38回日本臨床バイオメカニクス学会 (2011.11.18-19 神戸)

(2) 講演・シンポジウム

玄丞然: 生体内分解吸収性医用材料の基礎研究から臨床応用まで 「第54回日本形成外科学会総会・学術集会」 (招待講演) (2011.4.13 徳島)

Suong-Hyu Hyon: Establishment of effective cryopreservation method of a human iPS cell and an embryonic stem cell. 「The 3rd Asian Biomaterials Congress」 (招待講演) (2011.9.16 Busan)

Suong-Hyu Hyon: Antitumor activities of green tea polyphenol fatty acid monoester derivatives in vitro and vivo. 「2011 Chinese Pharmaceutical Conference / Plenary Presentation」 (招待講演) (2011.10.13 Shanghai)

玄丞然: 吸収性生体材料の基礎から臨床応用 「第56回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会」 (招待講演) (2011.10.23 徳島)

Suong-Hyu Hyon: From the basic research of the biomaterials to clinical applications. 「2011 ITREN 8th Symposium International Workshop」 (招待講演) (2011.10.27 Cheonan)

Suong-Hyu Hyon: Novel medical adhesive "LYDEX" of a Non-hematogenous product. 「The 12th Pacific Polymer Conference」 (招待講演) (2011.11.16 Jeju)

ナノバイオメカニズム研究領域 Department of Nano Biomechanism

助教 都賀谷 紀宏

Assis. Prof. Toshihiro Togaya

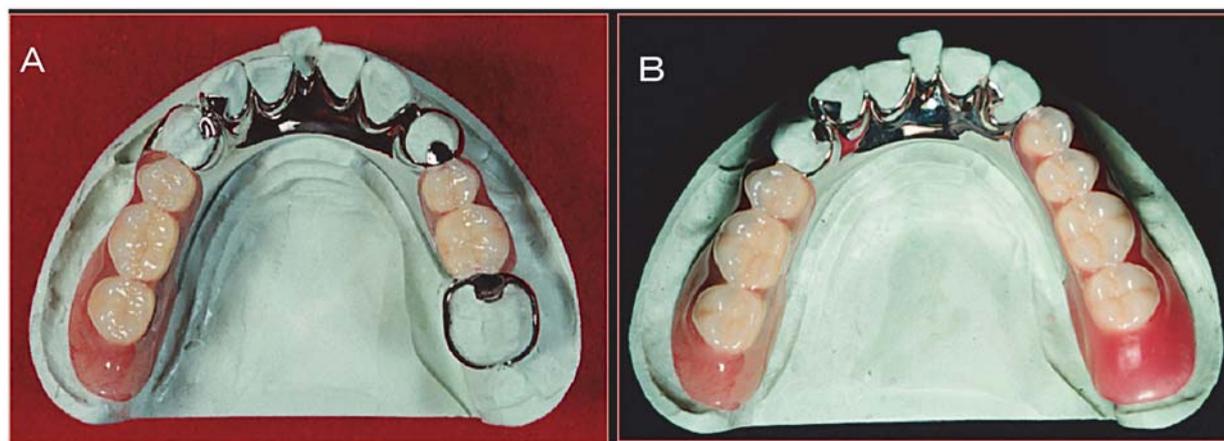
【研究概要】

歯の欠損は、歯科口腔機能の障害や低下のみならず、審美性の低下ももたらし、生活の質の低下にも結びつく。近年、高齢化に伴い、従来から用いられている義歯の需要も伸びてきている。また、欠損補綴分野でのインプラントの普及も著しいものがある。このような状況のなか、歯科補綴物の品質に対する要求はより高まってきており、特にインプラントのような人工歯根を用いた場合、その上部構造（義歯）には、高い精度が要求される。

本研究分野では、歯科補綴物に用いられる材料の成形加工法について、レーザー加工法を中心として検討し、生物学的適合性、力学的適合性および形態的適合性に優れた高精度歯科補綴物の製作システムについて研究している。また、これらの歯科補綴物製作を担当する歯科技工士の高齢化や若手技工士の離職率の高さが社会問題になりつつあり、熟練技工士の技術の伝承をいかに行うか、次世代の技工士をいかに養成するか、という社会学的問題についても検討している。

Restoration and maintenance of oral function (ingestion, mastication, swallowing and phonation) are essential for ADL (activity of daily living) and QOL (quality of life) especially in the elderly. The goal of our study is to establish the fabrication systems of precision dental prostheses, which have excellent biological-, mechanical- and morphological-compatibility.

On the other side, there is a big social problem in the manufacturing industry of the dental prostheses in Japan. The society tends to be composed by elderly dental technicians, and many young people in this field quit work because they do not feel financially stable. We are also investigating such a sociological problem.



レーザー加工によってリフォームされた義歯。鈎歯が抜歯されたため、この部分だけ義歯を作製し直し、旧義歯と接合した。これまでは一から作り直さなければならなかったものがリフォームで済み、患者の満足度も高い。
A：リフォーム前 B：リフォーム後

【業績目録】

◆ 学会等の発表 ◆

(1) 学会・研究会発表

中井隆介, 東 高志, 茂野啓示, 瀧澤 修, 都賀谷紀宏, 玄 丞侏: 多断面動的撮像・高解像度3次元撮像を用いた下顎の開閉口運動と咬筋の解析, 第39回日本磁気共鳴医学会大会 (2011.9.29-10.1 小倉)

(2) 講演・シンポジウム

都賀谷紀宏: 平成22年度横浜市歯科技工士会学術大会「レーザー溶接と歯科技工パラダイムシフト」(2011.2.27 横浜市)

都賀谷紀宏: 歯科技工・レーザー溶接セミナー2011「歯科技工パラダイムシフトとレーザー溶接」(特別講演) (2011.3.13 名古屋市)

都賀谷紀宏: 歯科技工・レーザー溶接入門セミナー「歯科技工・パラダイムシフトへの誘い」(特別講演) (2011.7.23 名古屋市)

都賀谷紀宏: 第5回歯科レーザー溶接フォーラム「知っておきたいレーザー溶接の基礎」(基礎講座) (2011.10.22 名古屋市)

都賀谷紀宏: 第5回歯科レーザー溶接フォーラム「歯科技工パラダイムの転換－潮流に流されないために－」(特別講演) (2011.10.22 名古屋市)

バイオメカニクス研究領域 Department of Biomechanics

分野主任 教授 安達 泰治

Prof. Taiji Adachi

【研究概要】

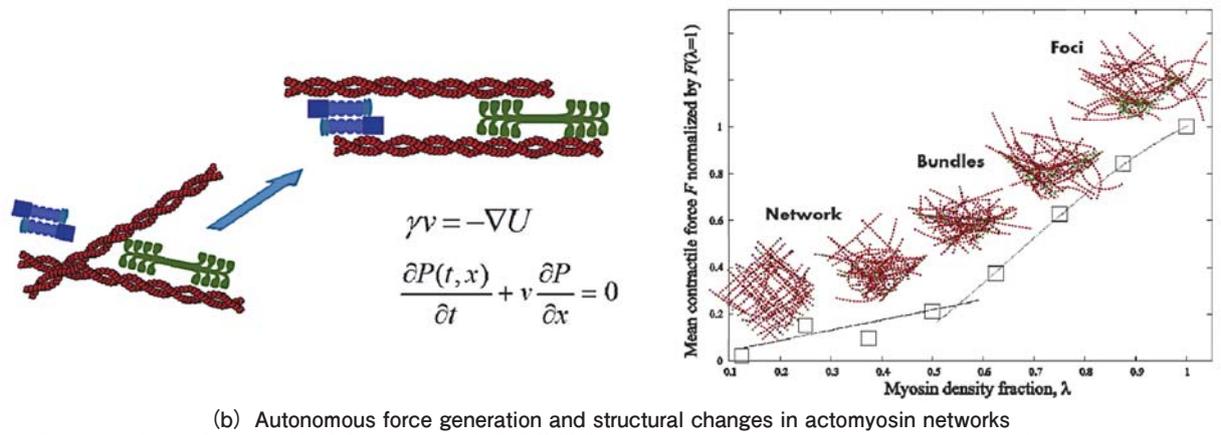
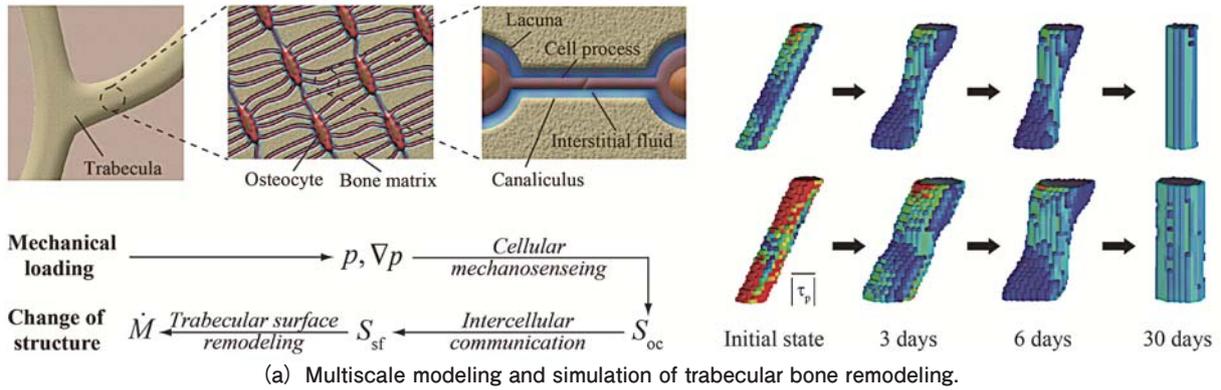
本研究領域は、生体組織の適応的なりモデリングや形態形成、再生過程において、細胞が分子レベルで力学的刺激を感知し、その情報を細胞の活動に結びつけるメカニズムの解明を目指している。力学的な環境の変化に対する生体の適応的な応答現象は、マクロには生体組織の構造・機能の変化として現れるが、その理解には、細胞・分子レベルにおけるミクロな要素過程とそれらが形成するシステムとしての理解が重要となる。そこで我々は、生体の持つ「力学環境への適応性」と「構造・機能の階層性」に着目し、各種力学を基礎として、実験と数理モデリング・計算機シミュレーションを組み合わせたバイオメカニクス・メカノバイオロジー研究を進めている。

(1) 骨細胞メカノセンシングと骨梁リモデリングのバイオメカニクス

骨のリモデリングによる形態適応の過程は、様々な骨系細胞の活動により調節されている。それらの中で、破骨細胞・骨芽細胞による骨吸収・骨形成活動が、骨基質の中に埋め込まれて存在する骨細胞のメカノセンサーネットワークシステムにより制御されている可能性が指摘されている。例えば、いくつかの実験的・理論的検証により、骨に生じたひずみに誘起される骨細管-骨小腔内の微小な流体の流れが、骨細胞に対する力学刺激として作用することが予想される。これまで、骨の中に存在する細胞のレベルから海綿骨の骨梁レベルへと至る骨構造の階層性を考慮した骨梁リモデリングの数理モデルを提案してきた。このモデルは、骨細管内を流れる流体が、骨細胞の細胞突起表面に対してせん断力を与え、これが力学刺激として骨細胞に感知されると考えるモデルである。このモデルの妥当性を検証するため、流体の粘性に起因すると考えられるリモデリング現象の速度依存性、すなわち、骨に作用する力・変形の速度が、どのように骨梁のリモデリングに影響を与えるかについて検討した。ここでは、1本の骨梁が単軸の繰返し荷重を受ける場合を想定し、その荷重周波数が、骨梁リモデリングに与える影響を数理モデリングと計算機シミュレーションを通じて検証した。その結果、リモデリングにより骨梁が荷重軸方向に配向し、さらに、作用する荷重周波数の増加に伴い、リモデリング平衡における骨梁の直径が増加することが示された。このことは、提案した数理モデリングとシミュレーションが、骨梁のリモデリングによる形態適応における荷重速度依存性を上手く表現できることを示すものである。

(2) アクチン収縮によるアクチン細胞骨格構造変化のバイオメカニクス

アクチン収縮は、アクチン細胞骨格構造のダイナミックな変化に欠かせない重要な機構であり、細胞変形や細胞移動などの力学的な細胞機能の実現に必要不可欠である。これら機能の理解には、アクチン細胞骨格を動的な力学構造システムとして捉え、システムの有する階層的構造とそこから生まれる複雑な全体像との関係をバイオメカニクスの観点から理解することが重要となる。そこで本研究では、粗視化分子動力学法に基づき、アクチン、ミオシン、および、 α -アクチニンの運動を表す数理モデルを提案した。まず、本数理モデルを用いた計算機シミュレーションにより、ミオシンのモーター運動による (i) アクチンフィラメントの滑り運動、および、(ii) ネット



図：骨のリモデリングによる形態適応とアクチン細胞骨格構造システムのダイナミクス：マルチスケールバイオメカニクスとメカノバイオロジー
 Fig: Multiscale biomechanics and mechanobiology studies of bone adaptation and actin cytoskeletal dynamics: Modeling and simulation from molecular level to functional cellular and tissue level.

ワーク構造内のフィラメント変形を計算機上に再現することに成功し、数理モデルの妥当性を確認した。次に、移動性細胞内のアクチン細胞骨格構造のダイナミクスを対象に、ミオシンおよび α -アクチニンの濃度とアクチン細胞骨格構造との関連について、本数理モデルを用いた計算機シミュレーションにより検討を行った。その結果、ミオシン濃度の増加は、アクチンフィラメントの変形や滑り運動を活発にし、細胞骨格構造にネットワーク型からバンドル型への変化を生じさせることが示唆された。実際の移動性細胞内のアクチン細胞骨格構造の観察結果においても、ネットワーク型からバンドル型への空間的構造変化とミオシン濃度の空間的な増加傾向との相関が示されており、シミュレーション結果は、その力学的機構を示唆するものである。さらに、アクチン細胞骨格構造に作用するアクトミオシン収縮力を調べたところ、収縮力はミオシン濃度に単調比例するのではなく、アクトミオシン収縮の場となるアクチン細胞骨格構造そのものにも依存し、双線形関係を示すことが明らかとなった。これらの結果は、1分子スケールにおける生化学的因子と細胞スケールにおける力学的因子との階層を超えた相互作用を例示するものであり、力学的な細胞機能の創発に重要な役割を果たしていることが期待される。

In functional adaptation by tissue remodeling and regeneration, the mechanism by which local mechanical cue is sensed by cells and tissues remodel their structure to meet their functional demands remains unclear because of the complex hierarchical system in spatiotemporal scales. To better understand the mechanoregulation of tissue adaptation by remodeling, morphogenesis, and regeneration, bridging spatial and temporal scales from microscopic molecular and cellular activities to macroscopic tissue behaviors is very important. Based on

multiscale system biomechanics, our department is involved in integrated researches of modeling and simulation combined with experiments, focusing on mechano-biochemical couplings in the dynamics of structure-function relationships in tissues and cells.

(1) Biomechanics of bone adaptation: Effects of loading frequency on the functional adaptation of trabeculae predicted by bone remodeling simulation

The process of bone remodeling is regulated by metabolic activities of many bone cells. While osteoclasts and osteoblasts are responsible for bone resorption and formation, respectively, activities of these cells are believed to be controlled by a mechanosensory system of osteocytes embedded in the extracellular bone matrix. Several experimental and theoretical studies have suggested that the strain-derived interstitial fluid flow in lacuno-canalicular porosity serves as the prime mechanical cue for bone remodeling. Previously, we constructed a mathematical model for trabecular bone remodeling that interconnects the microscopic cellular activities with the macroscopic morphological changes in trabeculae through the mechanical hierarchy. This model assumes that fluid-induced shear stress acting on osteocyte processes is a driving force for bone remodeling. To investigate the effects of loading frequency, which is thought to be a significant mechanical factor in bone remodeling, we simulated morphological changes of a three-dimensional single trabecula under cyclic uniaxial loading with various frequencies. The results of the simulation show the trabecula reoriented to the loading direction with the progress of bone remodeling. Furthermore, as the imposed loading frequency increased, the diameter of the trabecula in the equilibrium state was enlarged by remodeling. These results indicate that our simulation model can successfully evaluate the relationship between loading frequency and trabecular bone remodeling.

(2) Biomechanics of myosin-dependent rearrangement and force generation in an actomyosin network

Actomyosin contractility is a major force-generating mechanism that drives rearrangement of actomyosin networks; it is fundamental to cellular functions such as cellular reshaping and movement. Thus, to clarify the mechanochemical foundation of the emergence of cellular functions, understanding the relationship between actomyosin contractility and rearrangement of actomyosin networks is crucial. For this purpose, in this study, we present a new particulate-based model for simulating the motions of actin, non-muscle myosin II, and α -actinin. To confirm the model's validity, we successfully simulated sliding and bending motions of actomyosin filaments, which are observed as fundamental behaviors in dynamic rearrangement of actomyosin networks in migrating keratocytes. Next, we simulated the dynamic rearrangement of actomyosin networks. Our simulation results indicate that an increase in the density fraction of myosin induces a higher-order structural transition of actomyosin filaments from networks to bundles, in addition to increasing the force generated by actomyosin filaments in the network. We compare our simulation results with experimental results and confirm that actomyosin bundles bridging focal adhesions and the characteristics of myosin-dependent rearrangement of actomyosin networks agree qualitatively with those observed experimentally.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

(1) 原著論文

- Hidetaka Yamaoka, Shinji Matsushita, Yoshitaka Shimada, Taiji Adachi: Multiscale Modeling and Mechanics of Filamentous Actin Cytoskeleton. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, in press.
- Satoru Okuda, Takashi Uneyama, Yasuhiro Inoue, Yuichi Masubuchi, Masaki Hojo: Soft-core Interaction between Entanglement Segments for Primitive Chain Network Simulations. *Journal of the Society of Rheology, Japan*, in press.
- Hiroshi Miyoshi, Taiji Adachi, Jungmyoung Ju, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, Go Uchida, Yutaka Yamagata: Characteristics of Motility-based Filtering of Adherent Cells on Microgrooved Surfaces. *Biomaterials*, in press.
- Masaki Hojo, Yukinobu Matsushita, Mototsugu Tanaka and Taiji Adachi: Interfacial Fatigue Crack Propagation in Microscopic Model Composite Using Bifiber Shear Specimens. *Composites Part A*, in press.
- Mototsugu Eiraku, Taiji Adachi, Yoshiki Sasai: Relaxation-Expansion Model for Self-Driven Optic-Cup Morphogenesis. *BioEssay*, 34: 17-25 (2011-11).
- Takafumi Miyazato, Masaki Hojo, Michinaka Sugano, Taiji Adachi, Yasuhiro Inoue, Koji Shikimachi, Naoki Hirano, Shigeo Nagaya: Mode I Type Delamination Fracture Toughness of YBCO Coated Conductor with Additional Cu Layer. *Physica C*, 471-21/22: 1071-1074 (2011-11).
- Kennedy O. Okeyo, Masuzo Nagasaki, Junko Sunaga, Masaki Hojo, Hidetoshi Kotera, Taiji Adachi: Effect of Actomyosin Contractility on Lamellipodial Protrusion Dynamics on a Micropatterned Substrate. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 4-3: 389-398 (2011-9).
- Mian Long, Masaaki Sato, Chwee Teck Lim, Jianhua Wu, Taiji Adachi, Yasuhiro Inoue: Advances in Experiments and Modeling in Micro- and Nano-Biomechanics: A Mini Review. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 4-3: 327-339 (2011-9).
- Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, Masaki Hojo: Effects of Loading Frequency on Functional Adaptation of Trabecula Predicted by Bone Remodeling Simulation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4-6: 900-908 (2011-8).
- Shukei Sugita, Taiji Adachi, Yosuke Ueki, Masaaki Sato: A Novel Method for Measuring Tension Generated in Stress Fibers by Applying External Forces. *Biophysical Journal*, 101-1: 53-60 (2011-7).
- Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Coarse-grained Brownian Ratchet Model of Membrane Protrusion on Cellular Scale. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 10-4: 495-503 (2011-7).
- Yasuhiro Inoue, Shunsuke Tsuda, Koji Nakagawa, Masaki Hojo, Taiji Adachi: Modeling Myosin-dependent Rearrangement and Force Generation in an Actomyosin Network, *Journal of Theoretical Biology*, 281-1: 65-73 (2011-7).
- Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Masaki Hojo, Masahiro Sokabe, Taiji Adachi : Effect of Tensile Force on the Mechanical Behaviour of Actin Filaments. *Journal of Biomechanics*, 44-9: 1776-1781 (2011-6).
- Mototsugu Eiraku, Nozomu Takata, Hiroki Ishibashi, Masako Kawada, Eriko Sakakura, Satoru Okuda, Kiyotoshi

Sekiguchi, Taiji Adachi, Yoshiki Sasai: Self-organizing Optic-cup Morphogenesis in Three-dimensional Culture. *Nature*, 472: 51-56 (2011-4).

Shunsuke Baba, Yoshiya Hahimoto, Takeomi Inoue, Daisuke Kimura, Saeko Sumikura, Yomi Sonoda, Yoichi Yamada, Kenji Ito, Masaki Hojo, Taiji Adachi: Evaluation of a 3-D, Woven-fabric, Composite Scaffold Using Experimental Canine Models of Bone Defects in Mandibles. *Journal of Oral Tissue Engineering*, 8-3: 212-221 (2011-3).

◆ 学会等の発表 ◆

(1) 学会・研究会発表

田原大輔, 柴田竜也, 堀川 武, 安達 泰治: 骨再構築シミュレーションによる海綿骨の形態変化を考慮した力学的特性評価. 日本機械学会第 23 回バイオエンジニアリング講演会 (2011.1.8-9 熊本).

長崎益三, 須長純子, 北條正樹, 小寺秀俊, 安達泰治: アクチン細胞骨格構造の再編成に与える細胞内力学因子の役割. 日本機械学会第 23 回バイオエンジニアリング講演会 (2011.1.8-9 熊本).

三好洋美, 朱 正明, 山形 豊, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, 安達泰治: マイクロ構造化基質の移動性細胞フィルタリング機能の評価. 日本機械学会第 23 回バイオエンジニアリング講演会 (2011.1.8-9 熊本).

出路丈時, 井上康博, 安達泰治, 北條正樹: アクチンフィラメントの熱ゆらぎと膜突出との関連: ブラウン動力学シミュレーションによる検討. 日本機械学会第 23 回バイオエンジニアリング講演会 (2011.1.8-9 熊本).

保屋野貴匡, 坪田健一, 三好洋美, 安達泰治, 劉 浩: アメーバ運動における白血球形状の三次元計測. 日本機械学会第 23 回バイオエンジニアリング講演会 (2011.1.8-9 熊本).

Sung-Woong Han, Taiji Adachi: Interaction Measurement of Actin Filament and Actin Binding Protein Using an AFM. XIII. Annual Linz Winter Workshop Advances in Single-Molecule Research for Biology & Nanoscience (2011.2.4-7 Linz, Switzerland).

松下慎二, 井上康博, 安達泰治: 張力作用下におけるアクチンフィラメントの分子構造ゆらぎと力学特性. 次世代スーパーコンピュータプロジェクト「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発」シンポジウム: 第 3 回バイオスーパーコンピューティングシンポジウム (2011.2.21-22 神戸).

安達泰治: 細胞力学シミュレーション: アクチン細胞骨格構造システムのバイオメカニクス. 理研シンポジウム: VCAD システム研究 2010 (VCAD の未来) (2011.3.3-4 和光).

井上康博: 細胞力学シミュレーションの今後の展開. 理研シンポジウム: VCAD システム研究 2010 (VCAD の未来) (2011.3.3-4 和光).

山岡英孝, 安達泰治: 微小構造を有する連続体力学の幾何構造とアクチン細胞骨格の数値モデルへの適用. 理研シンポジウム: VCAD システム研究 2010 (VCAD の未来) (2011.3.3-4 和光).

韓 成雄, 安達泰治: 原子間力顕微鏡を用いたアクチンとアクチン結合蛋白質の相互作用測定. 理研シンポジウム: VCAD システム研究 2010 (VCAD の未来) (2011.3.3-4 和光).

三好洋美, 安達泰治: 細胞移動運動の時空間制御メカニズムの考察とその医工学応用可能性. 理研シンポジウム: VCAD システム研究 2010 (VCAD の未来) (2011.3.3-4 和光).

田原大輔, 安達泰治: 骨リモデリングによる骨梁形態変化を伴う海綿骨の力学的特性変化. 理研シンポジウム: VCAD システム研究 2010 (VCAD の未来) (2011.3.3-4 和光).

- 杉田修啓, 安達泰治, 植木洋輔, 佐藤正明: 微小外部力負荷によるアクチンストレスファイバ内張力の測定法開発. 理研シンポジウム: VCAD システム研究 2010 (VCAD の未来) (2011.3.3-4 和光).
- 井上康博, 出路丈時, 安達泰治: V-ActinBD を用いた細胞膜突出の分子機構の検討. 理研シンポジウム: VCAD システム研究 2010 (VCAD の未来) (2011.3.3-4 和光).
- Simona Patriche, Shinji Matsushita, Mihaela Banu, Bogdan I. Epureanu, Taiji Adachi: Atomistic Mechano-Chemical Modeling of Kinesins. *Bioinspiration, Biomimetics, and Bioreplication*, SPIE (2011.3.6-10 San Diego, USA).
- 田原大輔, 名倉 健, 堀川 武, 安達泰治: 骨再構築シミュレーションに基づく骨粗鬆骨の力学的特性評価. 第 31 回日本骨形態計測学会 (2011.5.20-22 岐阜).
- 上岡 寛, 亀尾佳貴, 今井裕一, 安達泰治, 山城 隆: 三次元再構築された骨細管モデル内における流れ解析の試み. 第 31 回日本骨形態計測学会 (2011.5.20-22 岐阜).
- 三好洋美, 朱 正明, 山形 豊, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, 安達泰治: アクチン細胞骨格構造に着目した細胞 - 基質相互作用の解析. バイオレオロジー学会 (2011.6.3-4 大阪).
- Hiroshi Miyoshi, Jungmyoung Ju, Yutaka Yamagata, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, Taiji Adachi: Quantitative analysis of the responses of migratory cells to microstructured surfaces. 第 63 回日本細胞生物学会 (2011.6.27-29 札幌).
- Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi: Mathematical Modeling of Trabecular Bone Remodeling Induced by Osteocytic Response to Interstitial Fluid Flow. 8th European Conference on Mathematical and Theoretical Biology, and Annual Meeting of the Society for Mathematical Biology (ECMTB2011) (2011.6.28-7.2 Krakow, Poland).
- Taiji Adachi, Yoshitaka Kameo, Ken-ichi Tsubota: A Hypothesis of Structural Optimality in Bone: Modeling Osteocyte Network as a Mechanosensory System. 11th US National Congress on Computational Mechanics (USNCCM-11) (2011.7.25-29 Minneapolis, USA).
- 田原大輔, 安達泰治: 計算バイオメカニクスによる骨梁骨の形態変化と力学的特性変化の評価: リモデリングから見た骨脆弱性とは. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 (2011.7.28-30 大阪).
- Taiji Adachi: Multiscale Biomechanics of Actin Cytoskeleton in Migrating Cells: From Cells to Molecules. KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine (2011.9.8-9 Kumamoto).
- 奥田 覚, 井上康博, 永樂元次, 笹井芳樹, 安達泰治: シート状多細胞組織の形態発生に関する数理モデルの検討. 日本機械学会 2011 年度年次大会 (2011.9.12-15 東京).
- 松下慎二, 井上康博, 曾我部正博, 安達泰治: アクチンフィラメントの引張-ねじり連成挙動の評価. 日本機械学会 2011 年度年次大会 (2011.9.12-15 東京).
- 石橋弘輝, 亀尾佳貴, 安達泰治: シグナル伝達機構を考慮した骨梁リモデリングシミュレーション. 日本機械学会 2011 年度年次大会 (2011.9.12-15 東京).
- 村田勝章, 須長純子, 佐藤正明, 安達泰治: 局所的な力学刺激に対する骨細胞の一酸化窒素産生挙動. 日本機械学会 2011 年度年次大会 (2011.9.12-15 東京).
- 三好洋美, 朱 正明, 山形 豊, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, 安達泰治: マイクロ構造化表面における細胞の運動特性の解析. 日本機械学会 2011 年度年次大会 (2011.9.12-15 東京).
- 密山泰用, 井上康博, 石田和希, 北條正樹, 単繊維間樹脂流動によるボイド発生機構のマイクロ流体実験モデルによる検討. 日本機械学会 2011 年度年次大会 (2011.9.12-15 東京).
- Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Masahiro Sokabe, Taiji Adachi: Extension-torsion Coupling Behavior of Single

- Actin Filament. 第 49 回日本生物物理学会年会 (2011.9.16-18 姫路).
- Hiromi Miyoshi, Jungmyoung Ju, Taiji Adachi, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, Yutaka Yamagata: Analysis of the Contribution of the Actin Cytoskeletal Structure to Cell Migration in Controlled Micro-environments. 第 49 回日本生物物理学会年会 (2011.9.16-18 姫路).
- Hiroshi Kamioka, Yoshitaka Kameo, Yuichi Imai, Astrid D. Bakker, Rommel G Bacabac, Takashi Yamashiro, Taiji Adachi, Jenneke Klein-Nulend: Microscale Fluid-flow Analysis in Osteocyte Canaliculi Using High-resolution Image-based Models. American Society of Bone and Mineral Research (2011.9.16-21 San Diego, USA).
- Daisuke Tawara, Takeshi Horikawa, Taiji Adachi: Estimation of Changes in Mechanical Properties of Trabecular Bone by Remodeling. 2011 World Congress on Advances in Structural Engineering and Mechanics (ASEM 11) (2011.9.18-23 Seoul, Korea).
- 渡邊直人, 坪田健一, 三好洋美, 安達泰治, 劉 浩: ヒト線維肉腫細胞の力学状態に与える焦点接着斑の影響. 日本機械学会第 22 回バイオフィロントニア講演会 (2011.10.7-8 津).
- 鈴木健介, 須長純子, 安達泰治: マウス胚性腫瘍細胞の神経様細胞への分化誘導と運動観察. 日本機械学会第 22 回バイオフィロントニア講演会 (2011.10.7-8 津).
- 中川光司, 井上康博, 奥田 寛, 安達泰治: 細胞分裂における収縮環による細胞変形のシミュレーション. 日本機械学会第 22 回バイオフィロントニア講演会 (2011.10.7-8 津).
- 上岡 寛, 今井裕一, 亀尾佳貴, 安達泰治, 山城 隆: 高詳細骨細管モデルを用いた流れ解析の試み. 第 70 回日本矯正歯科学会大会 & 第 4 回国際会議 (2011.10.17-20 名古屋).
- Sung-Woong Han, Taiji Adachi: Actin Filament and Various Binding Protein Interaction Measurement Using an AFM and Its Applications: 11th International Discussion & Conference on Nano Interface Controlled Electronic Devices (2011.10.19-22 Dazaifu).
- Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Masahiro Sokabe, Taiji Adachi: Effect of Tension on the Stiffness of Actin Filaments. International Symposium on Mechanobiology (2011.11.4-8 Shanghai, China).
- Sung-Woong Han, Taiji Adachi: Development of an Actin Dynamics Measurement Method Using an Atomic Force Microscopy. 2011 Joint of Korea/Japan/Taiwan Chemical Engineering Conference (2011.11.10-12 Busan).
- 亀尾佳貴, 安達泰治, 上岡 寛: 骨細管イメージベースモデルを用いた間質液流れシミュレーション. 第 38 回日本臨床バイオメカニクス学会 (2011.11.18-19 神戸).

(2) 講演・シンポジウム

- Taiji Adachi, Yoshitaka Kameo, Jenneke Klein-Nulend, Hiroshi Kamioka: Microscale Flow Analysis in Bone Canaliculi Using High-resolution Image-based Models. Workshop: Microscale Modeling in Biomechanics and Mechanobiology (2011.5.30-6.1 Ericeira, Portugal) (Invited Talk).
- Taiji Adachi: Computer Simulation of Bone Remodeling and Regeneration for Porous Scaffold Design. International Conference on Tissue Engineering (ICTE2011) (2011.6.2-4 Lisbon, Portugal) (Keynote).
- Taiji Adachi, Yoshitaka Kameo, Masaki Hojo: Poroelastic Modelling of Trabecular Bone Adaptation Stimulated by Flow-induced Shear Stress on Osteocytic Process Membrane in Lacuno-canalicular System. IV International Conference on Computational Methods for Coupled Problems in Science and Engineering (Coupled Problem 2011) (2011.6.20-22 Kos Island, Greece) (Keynote Lecture).

安達泰治: 生体システムの構造・機能適応ダイナミクスの力学的理解: 骨とアクチン細胞骨格. 第59回レオロジー討論会 (2011.10.6-8 桐生) (特別講演).

井上 康博: アクチン細胞骨格のバイオメカニクスシミュレーション. 第14回信州大学超精密技術研究センター講演会 (2011.9.2 長野) (Invited).

Taiji Adachi, Kennedy O. Okeyo, Masuzo Nagasaki, Junko Sunaga, Masaki Hojo, Hidetoshi Kotera: Effect of Cell-substrate Interactions and Actomyosin Contractility on Lamellipodial Protrusion Dynamics on a Micro-stamped Surface. International Symposium on Mechanobiology (2011.11.4-8 Shanghai, China) (Invited).

Yasuhiro Inoue, Shunsuke Tsuda, Koji Nakagawa, Masaki Hojo, Taiji Adachi: Particulate-based Simulation of Myosin-dependent Rearrangement Dynamics of Actomyosin Networks. International Symposium on Mechanobiology (2011.11.4-8 Shanghai, China) (Invited).

Sung-Woong Han, Kyohei Morita, Taiji Adachi: Detection of Filamentous Actin and the Binding Protein Interaction Using an Atomic Force Microscopy. International Conference on Advanced Electromaterials (ICAE2011) (2011.11.7-10 Jeju, Korea) (Invited).

井上 康博: アクチン細胞骨格の動力学シミュレーション. 日本バイオインフォマティクス学会 第4回JSBi応用システムバイオロジー研究会 (2011.11.7 Kobe) (Invited).

Taiji Adachi, Kennedy O. Okeyo: Biomechanical Regulation of Actin Cytoskeleton Dynamics in Migrating Cells. Eighth International Conference on Flow Dynamics (8th ICFD) (2011.11.9-11 Sendai) (Invited Speaker).

技 術 部

Division of Technical Support

【研究支援概要】

2011年は1月より12月末までに8分野240件の利用があり、再生実験試料等の特殊な組織標本作製なども含め、個々の研究者の要望に応じてきた。また、固定、包埋から染色、封入までの病理組織標本作製や免疫染色などの技術指導も行ってきた。

- ・パラフィン切片作製、凍結切片作製、ブロックの作製、脱灰標本の作製
- ・一般染色 (Hematoxylin-Eosin stain)
- ・特殊染色 (Azan stain, Alcian blue stain, Berlin blue stain, Dahl's method, Elastica-Van Gieson stain, Giemsa stain, Kluver-Barrera stain, Masson's trichrome stain, Maxwell's stain, Nissl's stain, PTAH, Toluidine blue stain, Safranin O-Fast green stain, Villanueva bone stain, von Kossa's method, Silver stain)
- ・免疫染色 (α SMA, Desmin, vWF VIII, Vimentin, CD68, CD31, EP2, Collagen type-I, Type-II, MAP2, HBME-1, GFP, Cytokeratin, Synaptopodin 等)

また松下は実験病理組織指導技術士資格取得や京大安全教育を受講するなどの自己研鑽を積んだ。

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

松下隆寿、小岸久美子：組織形態計測時における面積補正について—ホルマリン系固定液における組織の変形（膨張・収縮）—、平成22年度熊本大学総合技術研究会報告集、95（2011）

小岸久美子、松下隆寿：脱灰による軟骨組織の染色性への影響—Safranin O-Fast Green 染色、Toluidine blue 染色を用いての検討—、平成22年度熊本大学総合技術研究会報告集、95（2011）

◆ 学会等の発表 ◆

松下隆寿、小岸久美子：組織形態計測時における面積補正について—ホルマリン系固定液における組織の変形（膨張・収縮）—、平成22年度熊本大学総合技術研究会（2011.3.17 熊本）

小岸久美子、松下隆寿：脱灰による軟骨組織の染色性への影響—Safranin O-Fast Green 染色、Toluidine blue 染色を用いての検討—、平成22年度熊本大学総合技術研究会（2011.3.17 熊本）

4. 学術集会

京都大学再生医科学研究所
「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」
平成 23 年度 学術講演会

開催日：2011 年 12 月 26 日（月）

場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

開会の挨拶 所長 岩田 博夫（京都大学再生医科学研究所）

セッション 1

座長：松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所 所長）

「ゼブラフィッシュが語る ADAM プロテアーゼの役割と機能」

瀬原 淳子（京都大学再生医科学研究所 教授）

「3D 幹細胞培養での器官原基の自己組織化」

笹井 芳樹（理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
器官発生研究グループ グループ・ディレクター）

ポスターセッション

セッション 2

座長：北村 隆行（京都大学大学院工学研究科 教授）

「生体システムの構造・機能適応ダイナミクスの力学的理解」

安達 泰治（京都大学再生医科学研究所 教授）

「哺乳類と魚の背骨はどこが違うのか：異種間ゲノム工学による脊椎形成の分子機構の研究」

國府 力（大阪大学大学院医学系研究科 特任講師）

「器官原基再生からアプローチした機能的な器官再生」

辻 孝（東京理科大学総合研究機構 教授 同大学院基礎工学研究科 教授）

閉会の挨拶 副所長 開 祐司（京都大学再生医科学研究所）

【ポスターセッション】

- ポスター 1
タンパク質はいかに凝集するか？先天性肝硬変の原因となる凝集体構造 山崎 正幸
- ポスター 2
小胞体品質管理におけるレクチン XTP3-B の新たな役割 藤森 力
- ポスター 3
Analyses of communication between GAF and TBP by RNA aptamers 法邑 賢一、平芳 一法
- ポスター 4
細胞周辺環境としての機能性バイオマテリアル足場材料の開発 山本 雅哉、田畑 泰彦
- ポスター 5
細胞機能改変を目指した生体吸収性ゼラチン粒子を含む細胞集合体の作製 田島 脩平
- ポスター 6
表面プラズモン場励起蛍光分光法を用いた腫瘍マーカーの高感度計測
○有馬 祐介、村上 隆史、戸田 満秋、岩田 博夫
- ポスター 7
Xenotransplantation of sCR1-conjugated agarose microencapsulated islet ○ Minh Nguyen Luan, Hiroo Iwata
- ポスター 8
A Novel cell population, myogenin-negative cells, required for myogenesis 木村 剛隆
- ポスター 9
TCR β 遺伝子再構成に関するパラダイムシフト 藤本 真慈
- ポスター 10
Human and Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Are Differentially Reprogrammed in Response to Kinase Inhibitors
平野 邦生
- ポスター 11
Function and Regulation of Nanog in Mouse Epiblast Sun Liang Tso
- ポスター 12
MRI を用いた顎口腔領域の撮像手法および画像解析手法の開発 中井 隆介
- ポスター 13
骨固定用デバイスとしてのステレオコンプレックスポリ乳酸の力学的特性 加藤 希理子
- ポスター 14
Computational biomechanics for large deformations of multiple-cell aggregates during tissue morphogenesis
奥田 覚

京都大学再生医科学研究所「若手発表会」

開催日：2011年12月26日（月）

場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

開会の挨拶 所長 岩田 博夫（京都大学再生医科学研究所）

セッション1 座長：飯田 敦夫（再生増殖制御学分野）
那須 輝（組織再生応用分野）
松下 慎二（バイオメカニクス研究領域）

分子動力学シミュレーションを用いたアクチンフィラメントのバイオメカニクス
松下 慎二（バイオメカニクス研究領域）

ゼラチンハイドロゲルを用いた低分子薬の徐放化とその活性評価
齊藤 高志（生体材料学分野）

細胞シグナルタンパク質配向固定化培養基材上での造血幹細胞および間葉系幹細胞の培養
戸田 裕之（生体材料学分野）

A bi-functional recombinant protein for NCAM adhesion on collagen scaffold
Edgar Yuji Egawa（組織修復材料学分野）

Isolation of wild type iPS cells genetically restored from Pkd1 heterozygous iPS cells in mouse
程 李涛（幹細胞加工研究領域）

セッション2 座長：細川 美穂子（発生分化研究領域）
武内 大輝（霊長類胚性幹細胞研究領域）

マウス雌生殖器官における精子膜変化
渡邊 仁美（附属再生実験動物施設）

マウス生殖幹細胞株の体細胞型増殖から第一減数分裂前期への移行
細川 美穂子（発生分化研究分野）

Efficient production and transplantation of mesencephalic dopaminergic neuron from embryonic stem cells
佐保 文平（生体修復応用分野）

睪島細胞と間葉系幹細胞での電気的融合細胞を用いた1型糖尿病への効果の検討
柳井 伍一（器官形成応用分野）

ヒト多能性幹細胞からインスリン産生細胞への高効率な誘導法構築の試み
武内 大輝（霊長類胚性幹細胞研究領域）

セッション3 座長：土井 健人（幹細胞分化制御研究領域）
酒井 大史（再生増殖制御学分野）

血管形成を制御する新規 microRNA の同定
土井 健人（幹細胞分化制御研究領域）

ゼブラフィッシュ胚を用いた臍形成の解析
島村 仁子（生体分子設計学分野）

筋再生における ADAM8 の機能解析
西邨 大吾（再生増殖制御学分野）

Isolation of skeletal muscle progenitors from mouse embryos for skeletal muscle regeneration
酒井 大史（再生増殖制御学分野）

肛門機能の再生に関する研究
西澤 祐史（臓器再建応用分野）

【ポスターセッション】

- ポスター 1
Sperm membrane remodeling in the female reproductive tract to acquire fertility
渡邊 仁美 (附属再生実験動物施設)
- ポスター 2
Pax3 を発現する骨格筋幹細胞における miRNA の同定
平向 洋介 (再生増殖制御学分野)
- ポスター 3
ゼブラフィッシュを用いた血管形成のイメージングと膜型プロテアーゼ ADAM10/Kuzbanian の機能解析
友澤 杏奈 (再生増殖制御学分野)
- ポスター 4
人工関節用摺動部材の耐摩耗性改善
竹内 敦史 (シミュレーション医工学研究領域)
- ポスター 5
Urokinase-Immobilization on Islet Surface through DNA Hybridization for Graft Survival
竹本 直紘 (組織修復材料学分野)
- ポスター 6
iPS 細胞から分化誘導した神経前駆細胞を増幅するための培養基材の設計
小長谷 周平 (組織修復材料学分野)
- ポスター 7
Investigation of optimized conditions for RNA-based cellular reprogramming
島田 英徳 (臓器再建応用分野)
- ポスター 8
ゼブラフィッシュをモデルとした血管・血球形成のライブイメージング
飯田 敦夫 (再生増殖制御学分野)
- ポスター 9
哺乳類カルボキシエステラーゼ (Ces) は、ラフト流動化依存的に細胞表面より GPI アンカー型タンパク質を遊離する
折橋 郁 (附属再生実験動物施設)
- ポスター 10
RSK4 acts as a novel and negative regulator in endothelial cell differentiation via cAMP/PKA dependent pathway
松永 太一 (幹細胞分化制御研究領域)
- ポスター 11
低分子化合物を用いた多能性幹細胞由来心筋細胞の効率的分化誘導法の確立
福島 弘之 (幹細胞分化制御研究領域)

京都大学再生医科学研究所平成 22 年度 共同研究会

開催日：2011 年 6 月 9 日（木）
場 所：京都大学再生医科学研究所

開会挨拶

岩田 博夫（京都大学再生医科学研究所 所長）

森田 隆（大阪市立大学大学院医学研究科 教授）
「精原細胞のニッチとしてのセルトリ細胞の遺伝子発現解析」

柿沼 志津子（（独）放射線医学総合研究所 チームリーダー）
「マウス胸腺リンパ腫細胞における未分化状態の維持と分化に関するニッチの因子」

平澤 恵理（順天堂大学大学院医学研究科 先任准教授）
「細胞外マトリックス分子、パルカンの幹細胞ニッチとしての生物学的意義の解明」

浅原 弘嗣（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授）
「腱、軟骨の再生を促す分子ネットワークの解明と応用」

川上 浩一（国立遺伝学研究所 教授）
「脊椎動物の骨格筋の形成・成熟・維持機構の研究」

國府 力 特任講師（大阪大学大学院医学系研究科 特任講師）
「骨格組織構築に関与する幹細胞群の移動と局在」

閉会挨拶

戸口田 淳也（京都大学再生医科学研究所 副所長）

京都大学再生医科学研究所 「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」 第 6 回公開講演会 身体と再生 — トップダウンかボトムアップか —

開催日：2011 年 7 月 9 日（土）
場 所：京都大学百周年時計台記念館 1 階百周年記念ホール

開会挨拶

「よりよいインスリン依存型糖尿病の治療にむけた細胞操作」

再生医科学研究所 岩田 博夫 教授

「軟骨から骨ができる話」

再生医科学研究所 開 祐司 教授

分野主催のセミナー

開催日	講演者・所属	演 題	セミナー名	主催分野
2011. 1.18	山岡 英孝 (理化学研究所)	アクチンフィラメントの連続体モデル	第3回バイオメカニクスセミナー	バイオメカニクス研究領域
	韓 成雄 (理化学研究所)	アクチンとアクチン結合タンパク質の相互作用測定と応用		
	三好 洋美 (理化学研究所)	細胞移動運動の制御メカニズム		
	田原 大輔 (龍谷大学理工学部)	アクチン細胞骨格の構造変化とアクチン重合観察の挑戦		
	杉田 修啓 (名古屋工業大学)	微小外力負荷によるアクチンストレスファイバ内張力の測定法開発		
	坪田 健一 (千葉大学大学院工学研究科)	形と物質点に着目した細胞運動の in vitro 観察と力学モデリング		
	井上 康博 (京都大学大学院工学研究科)	アクチンの力学—生化学連成による細胞運動のシミュレーション		
2011. 2. 9	小守 壽文 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)	Bc12 ファミリー分子による骨芽細胞、骨量制御	京都大学再生医科学研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2011. 2.18	小亀 浩市 (国立循環器病研究センター)	血栓を防ぐメタロプロテアーゼ ADAMTS13	第3回細胞機能調節学セミナー	細胞機能調節学分野
2011. 3. 7	Bogdan Epureanu (Departments of Mechanical Engineering, University of Michigan)	Optimal Feedback for Interrogating Nonlinear Systems	第4回バイオメカニクスセミナー	バイオメカニクス研究領域
2011. 3.11	池川 志郎 (独)理化学研究所ゲノム医科学研究センター)	ヌクレオチド代謝関連遺伝子と骨・関節疾患: 異所性骨化を中心に	京都大学再生医科学研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2011. 3.18	鄭 雄一 (東京大学大学院工学系研究科)	骨形成性シグナルネットワークの解析と高機能人工骨の開発	京都大学再生医科学研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2011. 4.15	武田 洋幸 (東京大学大学院理学系研究科)	zic 遺伝子が創る新しい背側のアイデンティティ	再生増殖制御学分野セミナー	再生増殖制御学分野
2011. 4.21	太田 信 (東北大学流体科学研究所)	脳動脈瘤用ステントデザインの設計方法	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2011. 5.13	Yannick Loosli (Institute for Biomechanics, Swiss Federal Institute of Technology Zurich)	An Integrative Approach Using Numerical Models to Bridge Spatiotemporal Interactions of Subcellular Processes: Cell Spreading	第5回バイオメカニクスセミナー	バイオメカニクス研究領域
2011. 5.30	Peilin Chen (Research Center for Applied Sciences, Academia Sinica)	Investigation of Cell-Substrate Interactions by Advanced Nanotechnology	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2011. 7.13	上田 太郎 (産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門)	アクチンフィラメントの構造多型の機能的意義	第6回バイオメカニクスセミナー	バイオメカニクス研究領域
2011.10.14	堀 裕一 (神戸大学大学院保健学研究科)	膀胱の幹細胞研究: 再生医学と癌	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2011.10.21	木戸秋 悟 (九州大学先端物質化学研究所)	メカノバイオマテリアル: 細胞運動・機能を操作する微視的培養力学場設計	第7回バイオメカニクスセミナー	バイオメカニクス研究領域
2011.11.16	上岡 寛 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)	骨細胞のバイオイメージングによる機能解析	第8回バイオメカニクスセミナー	バイオメカニクス研究領域
2011.12.22	井上 敬 (京都大学大学院理学研究科)	単細胞から多細胞へ—細胞性粘菌が教えてくれること	京都大学再生医科学研究所特別セミナー	生体分子設計学分野

5. 共同研究

2010 年度共同研究報告（研究期間 2010 年 4 月～2011 年 3 月）

【3 次元ナノファイバー足場内における幹細胞分化に関する研究】

○研究代表者：小林 尚俊 グループリーダー（(独) 物質・材料研究機構生体材料センター）

再生医科学研究所共同研究者：田畑 泰彦 教授（生体材料学分野）

○研究経過及び研究成果：

ナノファイバーの 3 次元構造体は、既に動物実験レベルで組織再生用足場として優れた機能を有する可能性が示されている。本研究では、ナノファイバー構造体と組織幹細胞との相互作用を詳細に検討することでナノファイバーの組織再生足場としての機能発現のメカニズムを検討することを目的として、ナノファイバーからなる各種モデル構造体の作成を行い、ナノファイバー構造体と MSC 細胞との相互作用に関して系統的な検討を行う。その手始めとして今年度は、ポリグリコール酸 (PGA) とコラーゲンからなるナノコンポジットファイバーに関して、そのファイバー径と構造が幹細胞の接着と増殖に与える影響について評価した。

培養基板の作製

1. 材料

ファイバー回収用基板としてφ15mm 円形カバーガラス (Matsunami) を使用した。シランカップリング剤としてチソ株式会社製サイラエース S810 を用いた。末端にマレイミド基を有するポリエチレングリコールとして日油株式会社製 SUNBRIGHT ME-050MA を用いた。ポリグリコール酸 (PGA) は Sigma-Ardrich 社から購入した。I 型コラーゲンとして日本ハム社製ブタ皮コラーゲンを使用した。エレクトロスピンニング用溶媒として 1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP, Wako) を用いた。ポリウレタンシールとして 3M 社製 Tegaderm film を用いた。

2. ポリエチレングリコール化ガラス基板の作製

UV-O₃ 洗浄処理したカバーガラスを 0.5% シランカップリング剤溶液で 2 分間処理した後、0.005M マレイミド末端ポリエチレングリコール (PEG) 溶液に 30 分間浸漬した。風乾後、超純水で水洗し、実験に供した。

3. エレクトロスピンニング

3.1 紡糸溶液

PGA/HFIP 溶液 (100 mg/ml) とコラーゲン /HFIP 溶液 (100 mg/ml) を体積比 6 対 4 で混合して紡糸溶液とした。

3.2 紡糸

3.2.1 不織布

シリンジポンプ (kd science) を用いて、紡糸溶液を 25G ステンレスニードルから吐出速度 0.2ml/h で吐出した。高電圧印加装置 (日本スタビライザ) をステンレスニードルに接続し、接地したアルミホイル平板をコレクターとした。コレクター上に PEG 化カバーガラスを設置し紡糸することで不織布試料を回収した。印加電圧、紡糸距離および紡糸時間は 15 kV、130 mm、3 時間として不織布試料を作製した。

3.2.2 配向不織布

印加電圧、吐出速度、紡糸距離、紡糸時間をそれぞれ 15 kV、0.2ml/h、130 mm、3 時間とした。ステンレスニードルは 25G を使用した。回転ドラムコレクター (φ100 mm、MECC) に PEG 化カバーガラスを設置し、回転速度 3000 rpm させて配向不織布試料を作製した。

3.2.3 ナノファイバーモノフィラメント

印加電圧、吐出速度、紡糸距離、紡糸時間をそれぞれ 15 kV、0.2ml/h、130 mm、1 秒間とした。ステンレスニードルは 25G を使用した。回転ディスクコレクター (φ200 mm、MECC) に PEG 化カバーガラスを設置し、回転速度 3000 rpm させて配向不織布試料を作製した。

3.2.4 サブマイクロファイバーモノフィラメント

印加電圧、吐出速度、紡糸距離、紡糸時間をそれぞれ 15 kV、0.2ml/h、50 mm、5 秒間とした。ステンレスニードルは 22G を使用した。回転ドラムコレクター (φ100 mm、MECC) に PEG 化カバーガラスを設置し、回転速度 3000 rpm させて配向不織布試料を作製した。

3.3 アニール処理およびポリウレタンシール貼付け

ファイバーを回収した PEG 化カバーガラスを真空オーブンに入れ、110°C で 24 時間のアニール処理をした。打抜きポンチを用いて Tegaderm film を打抜き、φ14 mm の円形ポリウレタンシールを作製した。φ2 mm の生検トレパンを用いて円形シール内に等間隔に観察用窓を 7 か所作り、アニール処理したカバーガラスに貼りつけ、細胞培養実験中に PEG 化ガラス表面からのファイバーの剥離、脱落を防止した (図 1)。

4. 走査型電子顕微鏡観察

エレクトロスピンニングによって紡糸された繊維の走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察像を図 2a-d に示す。また、SEM 像をもとに画像解析ソフトを用いて計測した各繊維径を表 1 に示す。不織布試料は平均直径 118 nm の繊維がランダムに絡み合った状態であった。配向不織布試料は平均直径 209 nm の繊維が比較的一方向へ配向しており、その繊維間隔は一つの細胞が複数の繊維へ亘って接着できる程度に狭いものであった。ナノファイバーモノフィラメント試料は平均直径 125 nm の直線状の単繊維が得られていた。サブマイクロファイバーモノフィラメント試料は平均直径 324 nm の直線状の単繊維が得られていた。

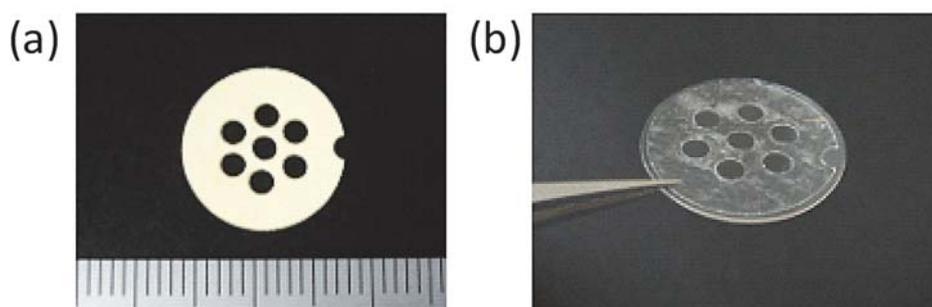


図 1 (a) 剥離防止用ポリウレタンシール (b) ポリウレタンシールを張り付けた培養用ガラス基板

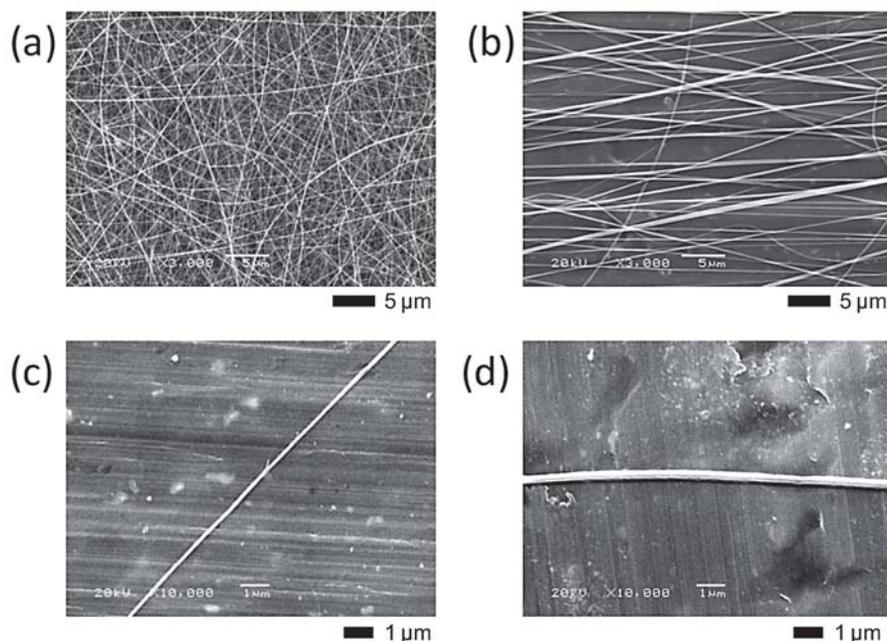


図 2 エレクトロスピンニング法により作製された PGA- コラーゲン繊維の走査型顕微鏡像 (a) 不織布 (b) 配向不織布 (c) ナノファイバーモノフィラメント (d) サブマイクロファイバーモノフィラメント

表1 各エレクトロスパンファイバーの平均直径

	Non-woven	Non-woven aligned	Single nanofiber	Single sub-microfiber
Diameter, nm	118	209	125	324

5. 細胞培養

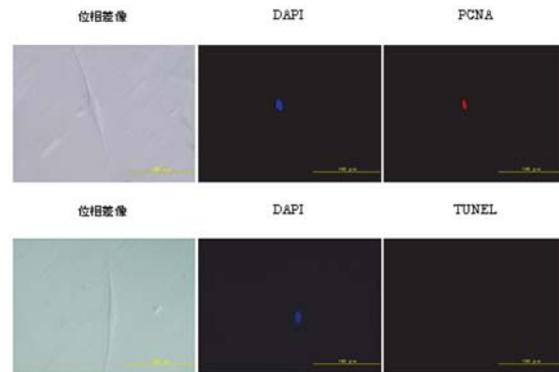
幹細胞は理研セルバンクより購入したヒト間葉系幹細胞株 (UBET-6) を使用した。幹細胞の培養には POWEREDBY10 培地 (メド城取、東京) を用いた。各サンプル上に作成した直径 2mm の 7 個の小穴全体に対し、幹細胞 1000 個を含む細胞懸濁液をサンプル上に滴下した。播種後 4 時間経過した後、接着しなかった余剰の細胞を除去するために、サンプルを培地で 1 回洗浄し、その後、必要十分量の培地内でサンプルを 72 時間、CO2 インキュベーター内で培養した。ナノファイバーモノフィラメントおよびサブマイクロファイバーモノフィラメント上に接着した細胞は、培養終了時である 72 時間後まで、細胞培養チャンバーを付属した位相差顕微鏡にて継続的な細胞の動態も観察した。培養が終了したサンプルは PBS にて 3 回洗浄後、メタノールおよび 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて固定した。

6. 染色を用いたファイバー上での細胞挙動同定

メタノール固定したサンプルは、細胞増殖性を観察するために、抗 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) マウスモノクローナル抗体を一次抗体として用い免疫染色を行った。一次抗体は 200 倍に希釈し、室温で 1 時間反応させた。二次抗体には AlexaFluor546 goat-anti mouse IgG を 200 倍に希釈したものを室温で 30 分間反応させた。インビトロジェン社の Prolong gold antifade with DAPI を用いて、細胞の核を青色、上記の抗 PCNA 抗体に結合した細胞は赤色に発色させた。

パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて固定したサンプルはファイバー上での細胞のアポトーシスを調査するためにロシュ社の In situ cell death detection kit, Fluorescein を用いて染色した。PCNA 染色と同様に Prolong gold antifade with DAPI を用いて行い、細胞の核を青色、アポトーシスを起こしている細胞の核を緑色に発色させた。

上記の染色を施したサンプルは蛍光顕微鏡を用いて、それぞれのサンプル上での細胞の増殖・アポトーシスの状態を観察した。

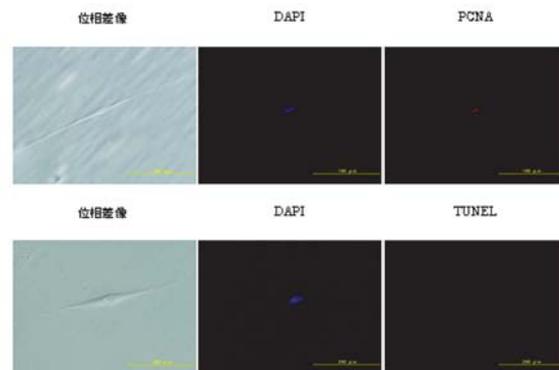


ナノファイバーモノフィラメント上に接着した細胞の染色結果

7. 蛍光顕微鏡観察

ナノファイバーモノフィラメント上に接着した細胞はファイバーに沿って細胞が通常の細胞培養ディッシュ上では認めることのできないほど高度に伸長していた。72 時間後の細胞ではナノファイバーモノフィラメント上に接着したほとんどの細胞において PCNA 陽性を認めたが、アポトーシスを生じている細胞は認められなかった。また、連続観察による結果では、継続的に、ファイバーに接着した細胞の片端が破断された後に、再び同部位に接着していく挙動を繰り返しており、72 時間までの継続観察内で細胞分裂像は認められなかった。

サブマイクロファイバーモノフィラメント上に接着し



サブマイクロファイバーモノフィラメント上に接着した細胞の染色結果

た細胞でもナノファイバーモノフィラメントに接着した細胞と同様に、細胞はファイバーに沿って高度に伸長していた。また、サブマイクロファイバー上で認められた細胞も多数 PCNA 陽性を呈していたが、その数はナノファイバーに比べて少なかった。サブマイクロファイバー上でもアポトーシスを生じている細胞は認められなかった。連続観察では、継時的に細胞のファイバー接着部の両端が破断し、ファイバー上において細胞は球形の形状をとるが、分裂には至らず再びファイバー上に伸展する行動を繰り返す像が認められた。

不織布に接着した細胞は、それぞれの細胞が紡錘形および卵円形に伸展していた。PCNA 染色はそれぞれの細胞で陽性から陰性と異なる態度を示した。不織布上でもアポトーシスを生じている細胞はほとんど認められなかった。

配向不織布上に接着した細胞は、多数の線維にまたがり接着し、モノフィラメント上に接着した細胞よりも幅広な紡錘形を呈していた。配向不織布上でも PCNA 染色態度は不織布と同様に細胞毎に異なる染色態度を示していた。また、アポトーシスを生じている細胞はほとんど認められなかった。

以上の結果をまとめると、今回の結果ではファイバーモノフィラメント上に接着した細胞は不織布状の細胞よりも高率に抗 PCNA 抗体に対して陽性を示し、モノフィラメント上に接着する細胞では、より細いファイバー上で抗 PCNA 抗体に対する陽性率が高かった。また、モノフィラメント上の細胞においても不織布状の細胞においても 72 時間の培養期間内にアポトーシスを生じることはなかった。

モノフィラメント上の MSC は、サブミクロンからトゥルーナノオーダーのファイバー径上において、分裂準備のような挙動をとるが、本観察時間の範囲内では分裂することなく再びファイバー上へ伸長していた。染色の結果と合わせると、分裂準備に入った後伸長した細胞はアポトーシスを生じることなくそのまま分裂準備期を維持していることが示唆された。

今後は、ナノファイバー高次構造体の構造が間葉系幹細胞の分化にどの程度影響を及ぼすのかという点に関して引き続き研究を展開するために、各種紡糸法を駆使して、生体適合性ナノファイバーを合成するとともに、これまでに構築した 3 次元構造化の技術を用いて生体構造を模倣したナノファイバーベースの幹細胞足場としての 3D 空間を創成する研究に展開する予定である。

○研究成果の公表

第 60 回高分子討論会で発表予定。

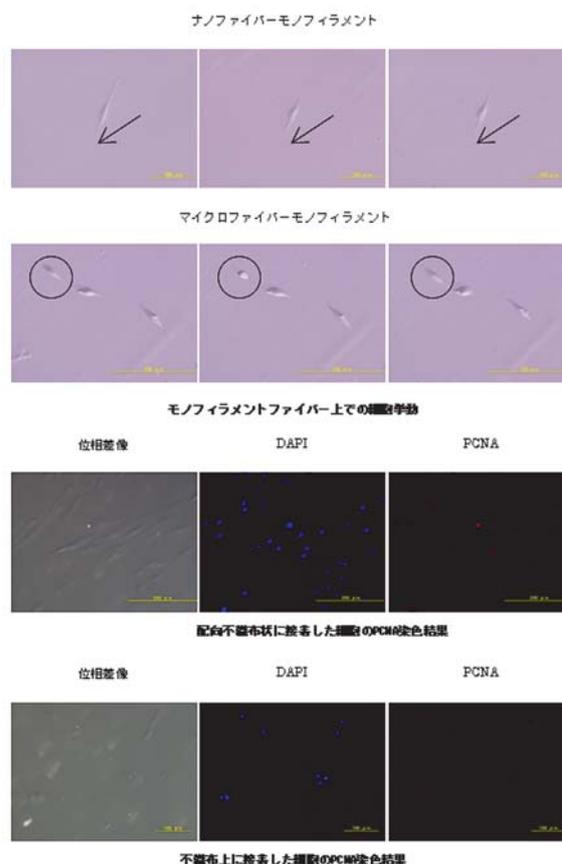
【マウス胸腺リンパ腫細胞における未分化状態の維持と分化に関するニッチの因子】

○研究代表者：柿沼 志津子 チームリーダー ((独)放射線医学総合研究所)

再生医科学研究所共同研究者：藤本 真慈 助教 (再生免疫学分野)

○研究経過及び研究成果：

幹細胞は未分化状態のまま自己複製するとともに、ある条件下では種々の異なった分化系列の成熟細胞をつくりだすことができる。未分化状態の維持と分化の切り替えには、幹細胞をとりまく場 (ニッチ) からのシグナルが大きな役割を果たしている。われわれはこれまでに、未分化状態の細胞群と分化した細胞群が混在している胸腺リン



パ腫を見出した。このような胸腺リンパ腫を材料として、未分化状態の維持と分化に関与するニッチ側の因子を明らかにすることを本共同研究の目的とした。

本研究では、DNA ミスマッチ修復遺伝子である *Mlh1* 欠損マウスを用いた。*Mlh1* 欠損マウスは、胸腺リンパ腫と脾臓リンパ腫を自然誘発する。そこで、これらのリンパ腫について、DNA を用いて TCR と IgH の遺伝子再構成の状態を解析し、T 系列あるいは B 系列の腫瘍であるかの判定をするとともに、クローンであるか否かを明らかにした（共同研究者）。一方、リンパ腫の RNA を用いて T 細胞の分化段階の指標となる CD4 と CD8 の発現レベルおよびリンパ腫の原因遺伝子 *Ikaros* の変異解析を行った（研究代表者）。

胸腺リンパ腫は全てクローナルなタイプの T 細胞リンパ腫で CD4 と CD8 の両方を発現した。一方、脾臓リンパ腫のうち半分は T 細胞リンパ腫で CD4 のみを発現し、残りの半分は、B 細胞リンパ腫であった。どちらも、遺伝子再構成のタイプはクローナルであった。*Ikaros* は、Notch1 と相互作用して胸腺内 T 細胞分化（コミットメント）に関わる重要な転写因子であるが、胸腺リンパ腫で高頻度に変異（Kakinuma, Oncogene, 2007）が認められた。しかし、脾臓リンパ腫では T、B いずれのタイプの細胞にも変異は認められなかった。胸腺では未分化（CD4/8DP）な細胞が増殖し、脾臓では分化した（CD4SP）細胞が増殖して T 細胞リンパ腫になったと推察された。以上の結果から、これらのリンパ腫の発生分化、増殖は、場（ニッチ）特異性が関与することが示唆された。

○研究成果の公表

< 発表論文 >

1. He D., Uehara Y., Furuya M., Ikehata H., Komura J., Yamauchi K., Kakinuma S., Shang Y., Shimada Y., Otsuyama A., Norimura T. and Ono T. Effects of calorie restriction on the age-dependent accumulation of mutations in the small intestine of lacZ-transgenic mice, *Mech Ageing Dev* 132 (2011) 117-122.
2. Kokubo T., Kakinuma S., Kobayashi T., Watanabe F., Iritani R., Tateno K., Nishimura M., Nishikawa T., Hino O. and Shimada Y. Age dependence of radiation-induced renal cell carcinomas in an Eker rat model, *Cancer Sci* 101 (2010) 616-623.
3. Ishida Y., Takabatake T., Kakinuma S., Doi K., Yamauchi K., Kaminishi M., Kito S., Ohta Y., Amasaki Y., Moritake H., Kokubo T., Nishimura M., Nishikawa T., Hino O. and Shimada Y. Genomic and gene expression signatures of radiation in medulloblastomas after low-dose irradiation in *Ptch1* heterozygous mice, *Carcinogenesis* 31 (2010) 1694-1701
4. Miyoshi-Imamura T., Kakinuma S., Kaminishi M., Okamoto M., Takabatake T., Nishimura Y., Imaoka T., Nishimura M., Murakami-Murofushi K. and Shimada Y. Unique characteristics of radiation-induced apoptosis in the postnatally developing small intestine and colon of mice, *Radiat Res* 173 (2010) 310-318.
5. Yamaguchi Y., Takabatake T., Kakinuma S., Amasaki Y., Nishimura M., Imaoka T., Yamauchi K., Shang Y., Miyoshi-Imamura T., Nogawa H., Kobayashi Y. and Shimada Y. Complicated biallelic inactivation of *Pten* in radiation-induced mouse thymic lymphomas, *Mutat Res* 686 (2010) 30-38.

< 学会発表 >

1. 柿沼 志津子、滝本 美咲、藤本 真慈、甘崎 佳子、鬼頭 靖司、太田 有紀、島田 義也：Mlh1 欠損マウスのリンパ腫発生における被ばく時年齢依存性、第 20 回 KTCC 学術集会、京都市、2010.06
2. 平野 しのぶ、柿沼 志津子、甘崎 佳子、藤本 真慈*、樋野 興夫*、島田 義也：放射線と化学物質の複合曝露によって誘発されたマウス胸腺リンパ腫における Notch1 遺伝子の変異解析、第 20 回 KTCC 学術集会、京都市、2010.06
3. Misaki Takimoto, Shizuko Kakinuma, Yoshiko Amasaki, Youtarou Kodama, Takashi Takabatake, Mayumi Nishimura, Masahiro Fukushi*, Yoshiya Shimada: Lymphoma development after In utero exposure to radiation in *Mlh1*^{-/-} mice, The Third Asian and Oceanic Congree on Radiation Protection, 東京都江戸川区, 2010.05
4. Shizuko Kakinuma, Misaki Takimoto, Shinobu Hirano, Akifumi Nakata, Youtarou Kodama, Yoshiko Amasaki, Yi Shang, Mitsuaki Yoshida, Mayumi Nishimura, Yoshiya Shimada: Age dependence of T-cell lymphoma

induction by radiation exposure in Mlh1-deficient mice, 21st Meeting of the European Association for Cancer Research, オスロ, 2010.06

5. 砂押 正章、平野 しのぶ、甘崎 佳子、西村 まゆみ、島田 義也、立花 章、柿沼 志津子:放射線誘発胸腺リンパ腫の被ばく時年齢依存性の解析 (2) Kras と p53 の変異解析、日本放射線影響学会第 53 回大会、京都市、2010.10
6. 柿沼 志津子、澤井 知子、甘崎 佳子、西村 まゆみ、島田 義也:化学発がん物質や放射線による胸腺リンパ腫の発生にはなぜ閾値が生じるか?、10 周年記念国際シンポジウム / 第 9 回研究報告会、東京都、2010.08
7. 柿沼 志津子、塚本 智史、太田 有紀、鬼頭 靖司、西村 まゆみ、島田 義也:ISS 搭載凍結生殖細胞から発生したマウスを用いた宇宙放射線の生物影響研究の実現に向けて、日本宇宙生物科学会第 24 回大会、仙台、2010.09

【骨格組織構築に関与する幹細胞群の移動と局在】

○研究代表者: 國府 力 特任准教授 (大阪大学先端科学イノベーションセンター)

再生医科学研究所共同研究者: 宿南 知佐 准教授 (生体分子設計学分野)

○研究経過及び研究成果:

平成 22 年度の短期共同研究課題では、まず、骨格系細胞 (軟骨細胞と骨芽細胞) の前駆細胞が存在する硬節のマスター遺伝子 *pax1* のゼブラフィッシュ胚での発現局在を解析した。ゼブラフィッシュではゲノム重複によって *pax1a* と *pax1b* の 2 つの *pax1* 遺伝子が存在する。ゼブラフィッシュ胚での whole mount in situ hybridization の結果、硬節、咽頭嚢、脊索等において、それぞれ特徴的な発現パターンを示すことが明らかになった。特に、これまでゼブラフィッシュの硬節マーカーは *pax1* ではなく *twist1b* と考えられてきたが、今回の研究で *pax1a* も、膜性骨化する魚類特有の硬節で発現していることが初めて示された。また、*pax1b* はマウス *Pax1* と異なり脊索でも一過性に発現していた。脊索の機能のある部分は進化の過程で脊椎によって代替されてきたと考えられるが、骨髄のない脊椎骨を有する魚類においては、陸棲脊椎動物で脊椎が担う役割の一部を今なお脊索が担っている可能性が示唆された。

次に、独自のトランスポゾン技術 (= Local Hopping Enhancer Detector (LHED) 法) によって同定したマウス *Pax1* ゲノム領域の複数のエンハンサーエレメントを、Tol2 トランスポゾン・システムに基づくトランスジェニック・ゼブラフィッシュ胚を用いて機能解析した。その結果、興味深いことに、マウスの硬節エンハンサーのうち陸棲動物のみが保有するゲノム断片をゼブラフィッシュ胚に導入すると、ゼブラフィッシュ硬節でも高いエンハンサー活性を示すことが観察された。この結果は、新たな硬節エンハンサーの獲得が脊椎動物の水棲から陸棲への進化プロセスに関与し、陸棲動物の中軸骨格形成に重要な役割を果たした可能性を示唆するものである。

以上の結果から、*Pax1* ゲノム領域の異種間にまたがる包括的な機能解析が、骨髄を含む幹細胞ニッチとしての中軸骨格の形成過程を理解する上で有力な切り口となり得ることが示された。今後も引き続き、異種間のゲノム構造と機能を比較するユニークな実験アプローチにより、骨髄・骨格組織構築の成り立ちと分子機構を明らかにして行く。

○研究成果の公表

1. Horie K, **Kokubu C.** and Takeda J. (2010) Functional genomics in the mouse using the Sleeping Beauty transposon system. *Methods Enzymol*; 477:71-89.

ゼブラフィッシュ胚での *pax1a* 及び *pax1b* の発現局在は遺伝子の機能解析を行った後に、論文発表を計画している。また、硬節エンハンサーに関する解析も論文発表に向けて準備を進めている。

【マシブレインインターフェースを活用した神経ネットワークの構築】

○研究代表者: 鳥光 慶一 主任研究員 (NTT 物性科学基礎研究所)

再生医科学研究所共同研究者: 岩田 博夫 教授 (組織修復材料科学分野)

○研究経過及び研究成果:

本研究では、胚性神経幹細胞の成長および分化に伴う電気的变化および活動制御を目的に研究を進めた。

研究を開始するにあたり、NTT 物性科学基礎研究所においては、今まで胚性神経幹細胞の取り扱いがなかったため、その安定的維持および生育を図るため京大再生研岩田教授の研究室で確立している神経幹細胞維持生育技術を習得するところからスタートした。これは、電気計測については、NTT 物性科学基礎研究所において実施するため、細胞の取り扱いに慣れておく必要があったためである。

当初、神経幹細胞については、保存冷凍細胞を解冻して生育したが、本共同研究中にラット胚からの神経幹細胞調整法を習得することでオンサイトでの維持管理が可能となった（図1）。

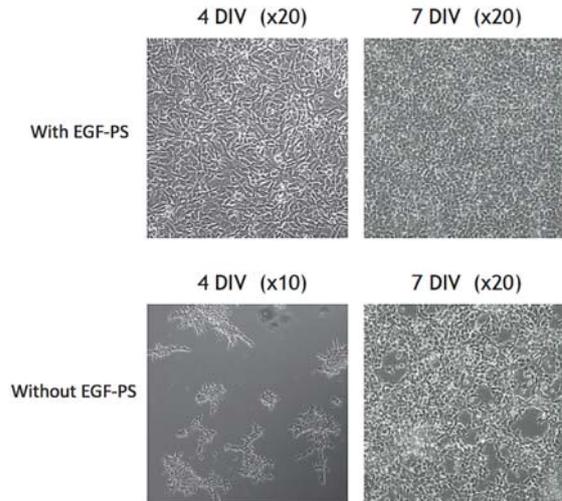


図1 神経幹細胞培養

一方、電極については、半導体微細加工技術により導電性のITO膜をベースにした多点微小電極アレイを作製した。本電極アレイは、大きさ20-50 μm の64極の電極からなる基板（ガラス基板）であり、表面を絶縁膜で保護してある。各電極は、導電性の高分子ゲルであるPEDOT-PSSを電解重合してあり、これにより数k Ω ～数十k Ω 程度までインピーダンスを低減させることが可能となっている。

本研究では、以上の様に作製した電極基板上にラットE15胚から調整した神経幹細胞を成長させ、成長および分化に伴う電気的变化を調べた。測定にあたり、細胞の順調な生育は必須である。電極基板は今までの経験で、神経細胞にとって生体適合性が高いものの、神経幹細胞に対しては経験がないため通常同様、PDL/ラミン処理を行った。従って、EGF除去と同じ環境になるため、神経幹細胞は分化が促進された状態になっているものと考えられる。現在、ネスチン、チューブリン、GFAPを染色することで、幹細胞、神経細胞、非神経細胞それぞれの分化状態を確認している。

次の図2に電位計測の結果を示す。

計測は、まだプレリミナリーなものであるが、培養開始後4日ほどで電気活動が観測され始め（図2左）、11日目で神経活動特有のパターンが観測された。チャンネル（電極）間で差はあるものの、活動の際に生じる電位が80 μV 程度から180 μV 程度の約2.2倍大きくなっていることが明らかとなった。また、当初は、神経活動の際観測される典型的な同期したパルス状の活動は観測されず、離散的な傾向が見られた。11日の結果は、通常の大脳皮質や海馬の培養に比べると電極あたりの神経活動が極めて活発である。EGFが除去された状態であるので、分化が進み、神経が急速に増えたことを反映しているのであろうと考えられる。一方で、電極間相互での同期は観測されず、神経回路自体の形成はあまり促進されてはいない。今後、計測数を増やす必要はあるものの、電極（ch）毎の活動が

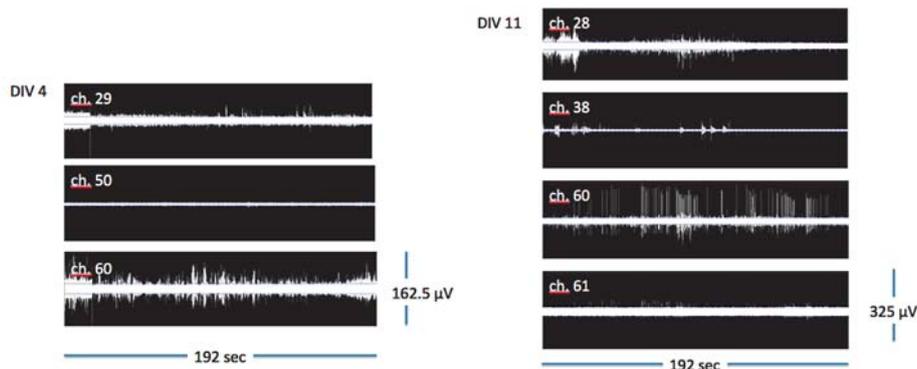


図2 神経幹細胞の電気活動計測

一様でないこと、回路特有の電気活動が観測されないことから、細胞自身、高いアクティビティを保ったまま、かなり活発に動き回っていることが予想される。

実際、タイムラプス観察で細胞の動きを観察すると、活発に動き回る様子が観測される。この動きにもある傾向が見受けられることから、現在、染色による細胞の分化と電位計測との関連性解明とともに、GAD67 ノックインマウスを使用して、抑制性と興奮性神経細胞への分化／発達の違いや非神経細胞など細胞の種類による成長／分化に伴う動態観察を行っている。

○研究成果の公表

(1) K. Torimitsu, Functional analysis of receptor protein for biomimetic device formation - structure and function -, *The 4th Mt. Lofty workshop on frontier technologies for nervous system function and repair*, Adelaide, Australia, 2010.12.17 -12.19

N. Nakano, T. Iwata, A. Shimada, N. Kasai and K. Torimitsu, A custom CMOS LSI design of head stage multi-channel amplifier for brain machine interface, *41st SFN Annual meeting, Neuroscience 2011*, 2011.11.12-16(予定)

【幹細胞—ニッチ間相互作用とその制御の分子メカニズムの構造生物学的解明】

○研究代表者：高木 淳一 教授（大阪大学蛋白質研究所）

再生医科学研究所共同研究者：瀬原 淳子 教授（再生増殖制御学分野）

○研究経過及び研究成果：

幹細胞ニッチの分子実体は細胞外マトリックスやニッチ細胞上の接着分子であることが予想されるが、これらの働きを分子レベルで理解するには、細胞の中で起こるシグナル伝達のみを解析するだけでは足りない。本研究では、細胞—ニッチ間の相互作用とその制御に関わる分子（接着分子およびプロテアーゼ）の構造生物学的解析を通して、「細胞によるニッチの認識」を原子レベルで理解し、その人工的制御の可能性を探ることを目的とした。

インテグリンや Ig ファミリーの接着受容体、あるいは各種の ADAM プロテアーゼなどの膜蛋白質の細胞外領域を動物細胞発現系で生産・精製し、これらを生産・精製した大阪大学で結晶化と構造解析するとともに、得られた組み換え可溶性蛋白質の細胞に対する作用を、再生研瀬原研究室でゼブラフィッシュを用いて調べてきた。細胞外マトリックスや膜型受容体を切断する ADAM プロテアーゼの基質認識機構を、精製組み換え蛋白質の構造情報と生化学的実験を組み合わせるとともに、得られた構造的基盤に基づいて変異体をデザインし、これを細胞や個体に戻してその仮説の検証を行う予定である。

○研究成果の公表

<発表論文>

1. Tanaka, H., Nogi, T., Yasui, N., Iwasaki, K. and Takagi, J. (2011) Structural Basis for Variant-Specific Neuroligin-Binding by α -Neurexin. *PLoS One*, 6, e19411.
2. Nishimasu, H., Okudaira, S., Hama, K., Mihara, M., Dohmae, N., Ishitani, R., Takagi, J., Aoki, J., Nureki, O. (2011) Crystal structure of Autotaxin, a secreted lysophospholipase D that generates GPCR-signaling lipid mediator. *Nature Struct. Mol. Biol.*, 18, 205-212.
3. Nakata, Z., Nagae, M., Yasui, N., Bujo, H., Nogi, T., and Takagi, J. (2011) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of human LR11 Vps10p domain. *Acta Crystallographica*. F67, 129-132.
4. Nogi, T., Yasui, N., Mihara, E., Matsunaga, Y., Noda, M., Yamashita, N., Toyofuku, T., Goshima, Y., Kumanogoh, A. and Takagi, J. (2010) Structural basis for semaphorin signaling through the plexin receptor. *Nature*, 467, 1123-1127.
5. Kishimoto-Okada, A., Murakami, S., Ito, Y., Horii, N., Furukawa, H., Takagi, J., Iwasaki, K. (2010) Comparison of the envelope architecture of E. coli using two methods: CEMOVIS and cryo-electron tomography. *J. Electron Microscop.* 59, 419-426.
6. Sasaki, T., Takagi, J., Giudici, C., Yamada, Y., Arikawa-Hirasawa, E., Deutzmann, R., Timpl, R., Sonnenberg, A.,

- Bächinger, H.P., Tonge, D.(2010)Laminin-121-Recombinant expression and interactions with integrins. *Matrix Biology*, 29, 484-493.
7. Tabata, S., Nampo, M., Mihara, E., Tamura-Kawakami, K., Fujii, I., and Takagi, J.(2010) A rapid screening method for cell lines producing singly-tagged recombinant proteins using the "TARGET tag" system. *J. Proteomics*, 73, 1777-1785.
 8. Yasui N, Nogi T, Takagi J. (2010) Structural basis for specific recognition of reelin by its receptors. *Structure*, 18, 320-331.
 9. Yasui N, Mihara E, Nampo M, Tamura-Kawakami K, Unno H, Matsumoto K, Takagi J. (2010) Detection of endogenous LRP6 expressed on human cells by monoclonal antibodies specific for the native conformation. *J. Immunol. Methods*, 352, 153-160.

<学会発表>

1. 高木淳一、加藤博章：構造解析を目指した高難度組換え蛋白質生産の最前線、第10回日本蛋白質科学会年会ワークショップ（2010年6月18日 北海道）
 2. 高木淳一：糖蛋白質の動物細胞発現と新規アフィニティータグシステムをもちいた1段階精製、第10回日本蛋白質科学会年会ワークショップ（2010年6月18日 北海道）
 3. Junichi Takagi : Ligand binding mechanism of lipoprotein receptor family proteins revealed by three-dimensional structure analyses. Gordon Research Conference (Lipoprotein metabolism) (2010年6月23日 Waterville Valley, USA)
 4. Junichi Takagi : Tags for easy detection, purification, and soluble expression of mammalian extracellular proteins. The Bioprocessing Summit, "Affinity Tag Protein Purification" (2010年8月24日 Boston, USA)
 5. Junichi Takagi : Challenges in structural analysis of extracellular protein complexes: protein production, crystallography, and EM. Faculty Seminar, Boston University School of Medicine, Department of Physiology and Biophysics. (2010年8月25日 Boston, USA)
 6. 高木淳一：軸索ガイダンスを司るセマフォリンシグナルの構造的基盤、蛋白研セミナー・包括脳ネットワーク神経細胞プロテオミクス研究会「神経科学と構造生物学の融合」(2010年10月28日 大阪)
 7. Junichi Takagi : Combination of Correlative Light-Electron Microscopy and X-ray Crystallography Revealed a Unique Trans-Synaptic Adhesion Architecture. The 2010 Asian Crystallographic Association Conference (AsCA2010), Minisymposium "Combining Methods/New Tools in Structural Biology" (2010年11月2日 Busan, South Korea)
 8. Junichi Takagi : Structural basis for semaphorin signaling through the plexin receptor. International GCOE Symposium: Morphogenesis and Signaling -From Proteins, Organelles to Organisms- (2010年11月9日 兵庫)
- 高木淳一：セマフォリンシグナルを伝達するプレキシン受容体活性化の構造的基盤、平成23年度細胞外環境シンポジウム（2011年2月16日）

【細胞外マトリックス分子、パルカンの幹細胞ニッチとしての生物学的意義の解明】

○研究代表者：平澤 恵理 前任准教授（順天堂大学大学院医学研究科）

再生医科学研究所共同研究者：長澤 丘司 教授（生体システム制御学分野）

○研究経過及び研究成果：

近年、幹細胞ニッチが細胞治療等新しい治療法のターゲットとして着目されている。これまで成体では新生しないとされていた脳においても成体神経新生の存在が明示され、そのニッチが着目される。基底膜等を構成する細胞外マトリックス、特にプロテオグリカンはニッチ構成の重要な要素と考えられるがその分子基盤は不詳である。中でも基底膜型ヘパラン硫酸プロテオグリカン、パルカンは成長因子等との多様な結合活性から、特に着目すべき分子である。本研究では、その遺伝子改変マウスの解析から明確な基底膜構造を持たない脳、骨髄、軟骨における細

胞外マトリックス分子のニッチとしての存在意義を示し、幹細胞の増殖、分化の制御を目指した。パールカン機能完全欠損マウス及び、軟骨以外でパールカンを欠損するマウスを使用して、順天堂大学では成体神経新生と膝関節滑膜細胞を、京都大学では骨髄造血能を解析し、その知見を情報交換することで、共通あるいは固有のニッチ機能を明らかにするための共同研究である。年度途中より、順天堂大学血液内科高久も参加し、京都大学において情報交換を行なった。高久らは、米国 NIH にて骨髄内パールカンがマトリックスネットワークを構築していることを示しており (Takaku et al Blood 2010), これと整合して長澤らは CAR 細胞でのパールカンの特異的発現を免疫染色、定量 RT-PCR で確認した (未発表データ他)。更に順天堂大学で骨髄の近傍の膝関節滑膜細胞でもパールカンの強い発現が免疫組織化学染色で観察され、滑膜細胞の幹細胞の分離・同定とその分化誘導機構の解明に挑戦する研究も開始した (協力研究者: 順天堂大学整形外科 金子、石島)。また、骨髄におけるヘパラン硫酸鎖の局在を免疫組織化学的に観察したところ、パールカン欠損骨髄ではその局在形式に変化を認めた (未発表データ)。これらの知見は、今後の共同研究推進に重要な結果と思われた。一方、成体の神経幹細胞からの神経新生におけるパールカンの働きについても以下の方法により、新しい知見が得られた (論文投稿準備中)。サイトカインの脳室内投与 (ICV) は手技が確立されており、我々も基礎データを多く持つのでこれを行なう。同時に BrDU を投与することにより、サイトカイン刺激により増殖した細胞をマークする。BrDU 陽性細胞を分化マーカーで経時的に追い、その運命を確認、神経幹細胞は抗 CD133 抗体でマークする。その増殖能は BrDU / CD133 二重陽性細胞で検討する。この結果、パールカン欠損脳では FGF-2 による成体の神経幹細胞からの神経新生促進能が有意に低下している可能性が示唆された。その分子機構については、さらに in vitro の系を使った実験が必要と思われた。本研究期間終了後も引き続き長澤研究室と共同研究を継続し、基底膜プロテオグリカンの組織幹細胞維持における作用と作用機構を骨髄と脳で明らかにして行く予定である。

○研究成果の公表

平澤

Perlecan participates in maintenance and activation of CD133-positive quiescent neural stem cells in adult brain
Aurelien Kerever, Frederic Mercier, Yuka Oda, Bernard Zalc, Yohei Okada, Yoshihiko Yamada and Eri Arikawa-Hirasawa (論文投稿準備中)

長澤

The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche.
Omatsu, T., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., *Nagasawa, T.

Immunity (2010) Sep 24. 33; 387-399.

協力研究者 高久 (参考)

Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy.
Takaku T, Malide D, Chen J, Calado RT, Kajigaya S, Young NS.

Blood (2010) Oct 14;116 (15):e41-55. Epub 2010 Jul 20

【矯正歯の移動モデルを用いた歯根膜幹細胞ニッチの解析】

○研究代表者：山本 照子 教授 (東北大学大学院歯学研究科)

再生医科学研究所共同研究者：開 祐司 教授 (生体分子設計学分野)

○研究経過及び研究成果：

正常マウスを用いて、再現性に優れたマウスの歯の移動モデルを確立した。この実験モデルでは、6週齢マウスを用いて NiTi ワイヤーにより作成した装置を上顎切歯に装着し、第一臼歯を舌側に3週間移動させながら歯根膜、歯槽骨の改造現象を分子・組織形態学的に解析することが出来る。並行してレポーターマウスを用いて生理的条件下で歯周組織の解析を行った。すなわち、ScxGFP Tgを用いて、歯周組織における Scx と Osteopontin、MMP13の局在を蛍光免疫染色によって解析した。さらに、近接切片を用いて、TRAP 染色による破骨細胞の局在解析とトルイジンブルー染色及び HE 染色による組織染色を行った。非脱灰凍結切片の骨標本は、粘着フィルムを用いた川本法によって作製した。その結果、ScxGFP Tg の歯周靭帯の線維芽細胞及び象牙芽細胞において、明瞭な GFP の

発現が検出された。また、象牙芽細胞における GFP の発現は、歯冠部では低く、歯根部では高い傾向が認められた。MMP13 の局在及び TRAP 陽性の破骨細胞は、共に、各歯根の遠心側の歯槽骨表面に多い傾向が認められ、生理的な歯の移動や挺出による歯根膜の変化が反映されていると考えられた。12 週齢になると、Scx の発現は、吸収面の歯周靭帯で高い傾向が認められた。従って、歯に矯正力のような力学的負荷を加えた場合、歯周靭帯における Scx の発現レベルは、破骨細胞の出現によって歯槽骨の吸収が起こる圧迫側で高く、骨形成が起こる牽引側で低くなることが予想された。

○研究成果の公表

初年度は、該当なし。(力学的移動負荷条件下での解析に進んだ後、論文発表を計画している。)

【精原細胞のニッチとしてのセルトリ細胞の遺伝子発現解析】

○研究代表者：森田 隆 教授 (大阪市立大学大学院医学研究科)

再生医科学研究所共同研究者：近藤 玄 准教授 (附属再生実験動物施設)

○研究経過及び研究成果：

精原細胞は有糸分裂と減数分裂の二種類の分裂形態をとり、さらに精子へと分化、変態を起こす。このような生殖細胞の周囲に存在するセルトリ細胞は生殖細胞に微小環境を与えるニッチとして重要である。我々はいろんな状況におけるセルトリ細胞の遺伝子発現を解析することにより、セルトリ細胞から発せられるシグナルが、常に一定の微小環境を保つものか、あるいは生殖細胞に対して動的に変化するものかを明らかにすることが目的である。

我々は、セルトリ細胞を野生型マウスの精巣から分離し、その遺伝子発現の検討を始めた。精巣を Collagenase 処理し、Leydig cell 分画としその後、Hyaluronidase 処理により、生殖細胞を回収し、その残渣を Sertoli cell 分画として集めた。

一方、同様の処理により回収されたセルトリ細胞の細胞株として樹立された 2 株 (Tajima et al. Development, 1991) についても培養し細胞を集めた。これらの細胞から Total RNA を抽出精製し、Agilent Gene Chip により、遺伝子発現を解析し、比較した。

その結果、精巣を分画して得られたセルトリ細胞の遺伝子発現と、そこから樹立された細胞株のうちの 1 つが非常によく似ていることが分かった。もう一方の細胞株や Leydig cell や germ cell とは、異なっていた。

現在これらの遺伝子の特徴を精査し、セルトリ細胞特異的であることを in situ hybridization や抗体を用いた方法で確認する予定である。

また、これらの遺伝子発現がセルトリ細胞に特異的であることが明らかになれば、発現の強い遺伝子を選んで抗体を作製し、精巣での発現の局在を解析できる。初期の目的であった Dmcl1 ノックアウトマウスなど精子形成を停止する条件下での種々の遺伝子発現の変化を追うことにより、セルトリ細胞のニッチとしての機能を解析できると考えられる。

○研究成果の公表

Gene Expression of Mouse Sertoli cells (準備中)

【脊椎動物の骨格筋の形成・成熟・維持機構の研究】

○研究代表者：川上 浩一 教授 (国立遺伝学研究所)

再生医科学研究所共同研究者：瀬原 淳子 教授 (再生増殖制御学分野)

○研究経過及び研究成果：

筋形成および骨格筋と腱の相互作用に関する共同研究を進めている。

川上グループで、トランスポゾン Tol2 を用いて GFP が挿入されたトランスジェニックフィッシュを確立し、その中で骨格筋や腱で発現しているラインを川上グループと瀬原グループで解析している。骨格筋で発現する 1 ラインに関して、筋形成に関わることがわかったことから、その分子機構をゼブラフィッシュを用いて調べるとともに、マウス筋衛星細胞を用いて筋形成に対する効果を調べ、同じ機構がほ乳類でも保存されているかを検証中である。一方、腱で発現する 1 ラインに関しては、挿入部位の転写因子に関して筋形成や腱形成への関与を調べるとと

もに、このラインを用いて、ライブイメージングにより、臍がどのように発生し形態形成を行うのかを検討中である。また、筋形成とその維持には神経筋接合部の形成も重要であり、それに関連して GFP- トランスジェニックラインを用いて、末梢神経系形成における ADAM19 の役割を再評価し、新たな知見を得た。

○研究成果の公表

<発表論文>

1. Muto A, Ohkura M, Kotani T, Higashijima S, Nakai J, Kawakami K. (2011) Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108 (13), 5425-5430.
2. Tsujita T, Li L, Nakajima H, Iwamoto N, Nakajima-Takagi Y, Ohashi K, Kawakami K, Kumagai Y, Freeman BA, Yamamoto M, Kobayashi M. (2011) Nitro-fatty acids and cyclopentenone prostaglandins share strategies to activate the Keap1-Nrf2 system: a study using green fluorescent protein transgenic zebrafish. *Genes Cells*, 16 (1), 46-57.
3. Hu, S.Y., Liao, C.H., Lin, Y.P., Li, Y.H., Gong, H.Y., Lin, G.H., Kawakami, K., Yang, T.H., and Wu, J.L. (2011) Zebrafish eggs used as bioreactors for the production of bioactive tilapia insulin-like growth factors. *Transgenic research*, 20, 73-83.
4. Suzuki, Y., Urasaki, A., Asami, Y., Isaka, K., and Kawakami, K. (2010) Efficient gene transfer to endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa) by Tol2 transposable element: a possible vector for gene therapy for implantation failure. *The Journal of Tokyo Medical University*, 68, 396-402.
5. Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., Sassa, T., Amo, R., Shiraki, T., Kawakami, K., Hosoya, T., Higashijima, S., and Okamoto, H. (2010) The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nature Neuroscience*, 13, 1354-1356.
6. Kawakami, K., Abe, G., Asada, T., Asakawa, K., Fukuda, R., Ito, A., Lal, P., Mouri, N., Muto, A., Suster, M.L., Takakubo, H., Urasaki, A., Wada, H., and Yoshida, M. (2010) zTrap: zebrafish gene trap and enhancer trap database. *BMC Developmental Biology*, 10 (1), 105
7. Hu, S.Y., Lin, P.Y., Liao, C.H., Gong, H.Y., Lin, G.H., Kawakami, K., and Wu, J.L. (2010) Nitroreductase-mediated gonadal dysgenesis for infertility control of genetically modified zebrafish. *Marine Biotechnology*, 12, 569-578.
8. Asakawa, K., and Kawakami, K. (2010) A transgenic zebrafish for monitoring in vivo microtubule structures. *Developmental Dynamics*, 239, 2695-2699.
9. Chen, Y.C., Wu, B.K., Chu, C.Y., Cheng, C.H., Han, H.W., Chen, G.D., Lee, M.T., Hwang, P.P., Kawakami, K., Chang, C.C., and Huang, C.J. (2010) Identification and characterization of alternative promoters of zebrafish Rtn-4/Nogo genes in cultured cells and zebrafish embryos. *Nucleic Acids Research*, 38, 4635-4650.
10. Imai, F., Yoshizawa, A., Fujimori-Tonou, N., Kawakami, K., and Masai, I. (2010) The ubiquitin proteasome system is required for cell proliferation of the lens epithelium and for differentiation of lens fiber cells in zebrafish. *Development*, 137, 3257-3268.
11. Rodríguez-Marí, A., Cañestro, C., Bremiller, R.A., Nguyen-Johnson, A., Asakawa, K., Kawakami, K., and Postlethwait, J.H. (2010) Sex Reversal in Zebrafish fancl Mutants Is Caused by Tp53-Mediated Germ Cell Apoptosis. *PLoS Genetics*, 6:e1001034.
12. Bussmann, J., Bos, F.L., Urasaki, A., Kawakami, K., Duckers, H.J., and Schulte-Merker, S. (2010) Arteries provide essential guidance cues for lymphatic endothelial cells in the zebrafish trunk. *Development*, 137, 2653-2657.
13. Yamamoto, M., Morita, R., Mizoguchi, T., Matsuo, H., Isoda, M., Ishitani, T., Chitnis, A.B., Matsumoto, K., Crump, J.G., Hozumi, K., Yonemura, S., Kawakami, K., and Itoh, M. (2010) Mib-Jag1-Notch signalling regulates patterning and structural roles of the notochord by controlling cell-fate decisions. *Development*, 137, 2527-2537.
14. Sinha, D.K., Neveu, P., Gagey, N., Aujard, I., Le Saux, T., Rampon, C., Gauron, C., Kawakami, K., Leucht, C., Bally-Cuif, L., Volovitch, M., Bensimon, D., Jullien, L., and Vriza, S. (2010) Photoactivation of the CreER (T2)

- recombinase for conditional site-specific recombination with high spatiotemporal resolution. *Zebrafish*, 7, 199-204.
15. Pujol-Martí, J., Baudoin, J.P., Faucherre, A., Kawakami, K., and López-Schier, H. (2010) Progressive neurogenesis defines lateralis somatotopy. *Developmental Dynamics*, 239, 1919-1930.
 16. Grabundzija, I., Irgang, M., Mátés, L., Belay, E., Matrai, J., Gogol-Döring, A., Kawakami, K., Chen, W., Ruiz, P., Chuah, M.K., Vandendriessche, T., Izsvák, Z., and Ivics, Z. (2010) Comparative Analysis of Transposable Element Vector Systems in Human Cells. *Molecular Therapy*, 18, 1200-1209.
 17. Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y., and Miura, M. (2010) Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining in utero electroporation with the Tol2 transposon-mediated gene transfer system. *Genes to Cells*, 15, 501-512.
 18. Sumiyama, K., Kawakami, K., and Yagita, K. (2010) A simple and highly efficient transgenesis method in mice with the Tol2 transposon system and cytoplasmic microinjection. *Genomics*, 95, 306-311.
 19. Wada, H., Ghysen, A., Satou, C., Higashijima, S.I., Kawakami, K., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (2010) Dermal morphogenesis controls lateral line patterning during postembryonic development of teleost fish. *Developmental Biology*, 340, 583-594.

<学会発表>

1. Kawakami, K. : Transgenesis and genome analysis with the Tol2 transposable element in mice and zebrafish. FASEB Summer Research Conferences, Genome Engineering: Research and Therapeutic Applications. (2010年6月6日-11日 Colorado, USA)
2. Appelbaum, L. et al : Modulation of Melatonin secretion and Sleep consolidation by the Hypocretin-Pineal Gland circuit. 9th International Conference on Zebrafish. (2010年6月16日-20日 Madison, USA)
3. Muto, A. et al : Visualization of Neuronal Activity in Zebrafish Spinal Neurons with an Improved GCaMP. 9th International Conference on Zebrafish. (2010年6月16日-20日 Madison, USA)
4. Lal, P. et al : Functional regionalization of the adult zebrafish brain by the gene trap, enhancer trap and GAL4-UAS approaches. 9th International Conference on Zebrafish. (2010年6月16日-20日 Madison, USA)
5. Kondo, S. et al : The Role of Potassium Channels in Stripe Pattern Formation. 9th International Conference on Zebrafish. (2010年6月16日-20日 Madison, USA)
6. Asakawa, K. et al : The functions of the hindbrain revealed by the Gal4-UAS system. 9th International Conference on Zebrafish. (2010年6月16日-20日 Madison, USA)
7. Fukuda, R. et al : G protein alpha 12 involved in the heart tube formation via SIP signaling. 9th International Conference on Zebrafish. (2010年6月16日-20日 Madison, USA)
8. Kawakami, K. : zTrap and NIGKOF: Resources for Gene Trap and Enhancer Trap Lines and Knockout Fish. 9th International Conference on Zebrafish. (2010年6月16日-20日 Madison, USA)
9. Yano, T. et al : Developmental Properties of the Fin Mesenchyme in Zebrafish. 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. (2010年6月20日-23日 京都)
10. Takeuchi, M. et al : Efficient phenotypic rescue of the zebrafish hematopoietic mutant using Tol2-mediated transgenesis. 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. (2010年6月20日-23日 京都)
11. Kawakami, K. : The Tol2 transposon system: a useful tool for gene transfer and transgenesis. 第16回日本遺伝子治療学会学術集会 (2010年7月1日-3日 栃木)
12. Kawakami, K. : zTrap and NIGKOF: databases for gene trap, enhancer trap and knockout zebrafish. Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting. (2010年8月5日-8日 Albuquerque, USA)
13. Kawakami, K. : Transposon-mediated genetic methods in zebrafish and their application to the study of functional neural circuits. 2010 Taiwan Zebrafish Developmental Biology Meeting. (2010年8月17日 台北)

14. 揚妻正和ら：恐怖条件付けにともなった行動の選択は手綱核により制御される、第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会（2010年9月2日-4日 兵庫）
15. 武藤彩ら：改良型 GCaMP を用いたゼブラフィッシュ脳機能の解析、第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会（2010年9月2日-4日 兵庫）
16. 喜多善亮ら：小脳ニューロンの時空間的な発生制御—子宮内電気穿孔法を用いた解析—、第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会（2010年9月2日-4日 兵庫）
17. 浅川和秀ら：ゼブラフィッシュ Gal4-UAS 法を用いた後脳機能の遺伝学的解剖、第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会（2010年9月2日-4日 兵庫）
18. 高久保瞳ら：Gal4 遺伝子トラップ法により作製されたトランスジェニックゼブラフィッシュのトランスポゾン挿入部位の解析、第16回小型魚類研究会（2010年9月18日-19日 埼玉）
19. 阿部玄武ら：*tcf7/lef1/sox4a* cooperatively regulate *fgf24* expression during zebrafish fin development. 第16回小型魚類研究会（2010年9月18日-19日 埼玉）
20. 浅川和秀ら：糖鎖結合タンパク質遺伝子 *lman2la/VIPL* の変異は逃避行動のラテラリティーに異常を引き起こす、第16回小型魚類研究会（2010年9月18日-19日 埼玉）
21. Tsetsckhladze, Z. et al. : Potential transposon excision from the alb b4 allele of *slc45a2* in zebrafish. 5th aquatic animal model for human disease（2010年9月20日 Corvallis, USA）
22. Kreneisz, O. et al. : Knockdown of the vertebrate $\alpha 4a$ glycine receptor subunit causes hyperekplexia-related tactile-evoked locomotor defects in zebrafish. Zebrafish Norwegian Network（2010年10月29日-31日 Oslo, Norway）
23. Sumiyama, K. et al. : A simple and highly efficient transgenesis method in mice with the Tol2 transposon system and cytoplasmic microinjection. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会（2010年12月7日-10日 兵庫）
24. 中村遼平ら：脊椎動物の外部形態を制御する転写因子 *Zic1/Zic4* の発現制御機構の解析、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会（2010年12月7日-10日 兵庫）
25. 佐藤文規ら：Zebrafish を用いた神経のミエリネーション可視化による膜型プロテアーゼ ADAM19 の機能の解明、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会（2010年12月7日-10日 兵庫）
26. Asakawa, K. et al. : Genetic dissection of the hindbrain functions by the Gal4-UAS system in zebrafish.
27. 荻野一豊ら：ゼブラフィッシュ胚でのグリシン作動性シナプスのライブイメージング、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会（2010年12月7日-10日 兵庫）
28. Okigawa, S. et al. : DeltaA and DeltaD act cooperatively to maintain V2 interneuron progenitors. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会（2010年12月7日-10日 兵庫）
29. Sumiyama, K. et al. : A simple and highly efficient transgenesis method in mice with the Tol2 transposon system and cytoplasmic microinjection. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会（2010年12月7日-10日 兵庫）
30. Kawakami, K.:The Tol2-mediated Gal4-UAS system and its application to the study of functional neural circuits in zebrafish. Imaging Structure and Function in the Zebrafish Brain（2010年12月13日-15日 Lisbon, Portugal）
31. 川上浩一：トランスポゾンを用いた遺伝学的アプローチによるゼブラフィッシュ機能的神経回路研究、脳の発達と機能：最近の研究進歩（2011年1月22日 東京）
32. Postlethwait, J.H. et al. : Fanconi Anemia: Insights into mechanisms of sex determination and cancer. The 4th strategic conference of zebrafish investigators.（2010年1月29日-2月2日 Asilomar, USA）
33. Kawakami, K.:The Tol2-mediated Gal4-UAS methods and their application to the study of neural circuits. The 4th strategic conference of zebrafish investigators.（2010年1月29日-2月2日 Asilomar, USA）

【腱、軟骨の再生を促す分子ネットワークの解明と応用】

○研究代表者：浅原 弘嗣 部長（国立成育医療研究センター研究所）

再生医科学研究所共同研究者：戸口田 淳也 教授（組織再生応用分野）

○研究経過及び研究成果：

腱、軟骨および筋肉の発生・分化に関与する遺伝子を同定するために、約 1,600 の転写制御因子の Whole mount *in situ* hybridization (WISH) データベース "EMBRYOS" を構築した (Yokoyama et al., 2009)。その結果、四肢で特徴的な発現をしている複数の因子を同定した。また、ヒト軟骨細胞の網羅的な遺伝子プロファイリングを行い、軟骨細胞で発現の高い遺伝子を同定した。これらの機能解析や、因子間のネットワークを解析し、腱や軟骨などの発生メカニズムの解明を目指した。

ヒト軟骨細胞の網羅的な遺伝子プロファイルにて得られた遺伝子の中で、ヒト間葉系幹細胞に比べ発現が高い miRNA を同定し、Real Time PCR にて同様にヒト軟骨細胞で発現が高いことを観察した。この miRNA は霊長類でのみ同定されており、戸口田研究室との共同研究にて、ヒト間葉系幹細胞を用いた軟骨分化モデルで発現の増減を解析し、強制発現、発現抑制の実験にてこの miRNA の軟骨分化への影響を調べることを計画し、現在検討中である。

WISH データベースより腱に発現する転写因子としてホメオボックス遺伝子である Mohawk (Mkx) が同定された。この遺伝子のノックアウトマウスを作製・解析した結果、腱の低形成が観察され、Mkx が腱分化に重要な転写因子であることを示した (Ito et al., 2010)。さらにこの転写因子の腱発生・再生における機能について解析するために、Cre 特異的に Mkx を過剰発現するように遺伝子を改変したマウスを作製し、11 ラインのマウスを取得した。これらについて Cre が、腱前駆体マーカーである Scx と同じ発現様式を示す ScxCre マウスと掛け合わせ、Mkx の発現を Real Time PCR 等により調査し、腱組織で Mkx を高発現するラインの選択を現在行っている。

WISH データベースより筋特異的に発現する転写抑制因子 RP58 についてノックアウトマウスの作製・解析し、RP58 が筋分化に重要な因子で、筋分化を阻害する遺伝子で癌にも関わることが示唆されている Id 遺伝子を抑制していることを明らかにした (Yokoyama et al., 2009)。この RP58 が、癌に関わることが示唆されている Id 遺伝子の抑制に働くことから、小児悪性腫瘍で軟部悪性腫瘍としては小児期で最も頻度の高い疾患である横紋筋肉腫との関連について調査するために、横紋筋肉腫サンプルの収集と RT-PCR 等による RP58 の発現量の調査を計画した。

○研究成果の公表

- 1 Ito Y, Toriuchi N, Yoshitaka T, Ueno-Kudoh H, Sato T, Yokoyama S, Nishida K, Akimoto T, Takahashi M, Miyaki S, Asahara H. The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107 (23): 10538-10542.
- 2 Yokoyama S, Ito Y, Ueno-Kudoh H, Shimizu H, Uchibe K, Albin S, Mitsuoka K, Miyaki S, Kiso M, Nagai A, Hikata T, Osada T, Fukuda N, Yamashita S, Harada D, Mezzano V, Kasai M, Puri PL, Hayashizaki Y, Okado H, Hashimoto M, Asahara H. A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. *Dev Cell*. 2009; 17 (6): 836-848.

2011 年度共同研究課題一覧

○短期研究課題

研究代表者	再生医科学研究所共同研究者	研究課題
八木田 和弘 教授 (京都府立医科大学大学院医学研究科)	近藤 玄 准教授 (附属再生実験動物施設)	キメラマウス胚を用いた概日時計発生過程のリアルタイムイメージング
川上 徹 准教授 (大阪大学蛋白質研究所)	開 祐司 教授 (生体分子設計学分野)	自己活性化型 Cys-Pro エステルユニットを利用した細胞表面タンパク質の標識法の開発と軟骨前駆細胞の同定への応用
平野 義明 教授 (関西大学化学学生命工学部)	田畑 泰彦 教授 (生体材料学分野)	細胞移植治療を目指したペプチドによる細胞凝集塊の誘導
鳥光 慶一 主席研究員 (NTT 物性科学基礎研究所)	岩田 博夫 教授 (組織修復材料学分野)	機能的神経ネットワーク構築のための生物学および工学

○長期研究課題 (2011 年度～2013 年度)

研究代表者	再生医科学研究所共同研究者	研究課題
吉田 松生 教授 (基礎生物学研究所)	長澤 丘司 教授 (生体システム制御学分野)	マウス精子形成を支える幹細胞の自己複製・分化と挙動におけるケモカインの寄与

○長期研究課題 (2009 年度～2011 年度)

研究代表者	再生医科学研究所共同研究者	研究課題
川上 浩一 教授 (国立遺伝学研究所)	瀬原 淳子 教授 (再生増殖制御学分野)	脊椎動物の骨格筋の形成・成熟・維持機構の研究
浅原 弘嗣 教授 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)	戸口田 淳也 教授 (組織再生応用分野)	腱、軟骨の再生を促す分子ネットワークの解明と応用

○長期研究課題 (2010 年度～2012 年度)

研究代表者	再生医科学研究所共同研究者	研究課題
山本 照子 教授 (東北大学大学院歯学研究科)	開 祐司 教授 (生体分子設計学分野)	矯正的歯の移動モデルを用いた歯根膜幹細胞ニッチの解析
森田 隆 教授 (大阪市立大学大学院医学研究科)	近藤 玄 准教授 (附属再生実験動物施設)	精原細胞のニッチとしてのセルトリ細胞の遺伝子発現解析

6. 協議員・教職員・その他構成員名簿

(平成 24 年 1 月 1 日現在)

◆ 京都大学再生医科学研究所協議員 (所外) ◆

小 西 郁 生 (京都大学大学院医学研究科教授)
 長 田 重 一 (京都大学大学院医学研究科教授)
 吉 崎 武 尚 (京都大学大学院工学研究科教授)
 北 村 隆 行 (京都大学大学院工学研究科教授)
 西 田 栄 介 (京都大学大学院生命科学研究科教授)

◆ 京都大学再生医科学研究所運営委員 (所外) ◆

大 隅 典 子 (東北大学大学院医学系研究科教授)
 妙 中 義 之 (国立循環器病センター研究所副所長)
 高 戸 毅 (東京大学大学院医学系研究科教授)
 長 田 重 一 (京都大学大学院医学研究科教授)
 西 川 伸 一 (理化学研究所発生・再生科学総合研究センター副センター長
 幹細胞研究グループグループディレクター)
 西 田 幸 二 (大阪大学大学院医学系研究科教授)
 月 田 早智子 (大阪大学大学院生命機能研究科教授)

◆ 京都大学再生医科学研究所教職員等 ◆

所長 (兼) : 岩 田 博 夫 副所長 (兼) : 關 祐 司, 戸口田 淳 也

■ 生体機能学研究部門 ■

〈細胞機能調節分野〉

准教授：細川暢子 特定准教授 (白眉) (兼：次世代研究者育成センター)：山崎正幸 事務補佐員：今井飛鳥
 大学院生：藤森 力
 講師：平芳一法 研修員：法邑賢一
 助教：藤本真慈

〈生体微細構造学分野〉

(欠員中)

〈生体機能調節学分野〉

客員教授：坂口志文 助教：伊藤能永 講師 (非常勤)：坂口敦子, 大倉永也
 事務補佐員：小長谷菜美 教務補佐員：松浦真由美
 大学院生：大崎一直, 秋月修治, 森川洋匡, 坂井 薫, 島津 裕, Nicholas Crabb

〈生体システム制御学分野〉

教授：長澤丘司 助教：杉山立樹 研究員 (学術支援)：尾松芳樹 事務補佐員：坂田 彩
 特定研究員 (G-COE)：△中川俊徳
 大学院生：長岡 真, 下戸 学, 金成香奈子, 清家正成

〈生体再建学分野（国内客員）〉

（欠員中）

■ 生体組織工学研究部門 ■

〈生体分子設計学分野〉

教授：開 祐司 准教授：宿南知佐 講師（非常勤）：近藤 淳，鄭 雄一，小守壽文，池川志郎
教務補佐員：滝本 晶 技術補佐員：杉山弘美 大学院生：島村仁子，赤路佐希子，郭 龍
特定研究員（学術支援）：三浦重徳 研究生：杉本由紀 特別研究学生：川津正慶

〈生体材料学分野〉

教授：田畑泰彦 准教授：山本雅哉 講師（非常勤）：小川佳宏，中村雅也，金田安史
事務補佐員：岩根由依 技術補佐員：吉田久子
大学院生：高木智紹，齊藤高志，戸田裕之，田島脩平，河井可奈江，岡本滝弥，平井健次郎，郡司周太郎，隅田 仁，
中村陽子，古谷洋之，石川英史，糸岡朝樹，稲生佳菜子，佐藤圭祐，上田真澄，村上政広 学部生：高堂泰輔，達富幹生，
長谷川誠
受託研究員：福西賢晃，柚本 聡，豊島永実子，駒田行哉，北澤 学
特定研究員：上杉佳子 研究員（産官学連携）：松井 誠
共同研究研究担当者：三田恵理
日本学術振興会外国人特別研究員：TAN Guak Kim 特別研究学生：宮澤敦子
日本学術振興会特別研究員：富高あさひ

〈組織修復材料学分野〉

教授：岩田博夫 助教：有馬祐介 講師（非常勤）：鳥光慶一，岡崎正之
事務補佐員：鈴木義子 教務補佐員：寺川公美子
大学院生：EGAWA Edgar Yuji，小長谷周平，竹本直紘，櫻井研吾，古田雅典，前田晋，相山 裕
特定研究員（学術支援）：北村成史 研究員（研究機関）：河野恵子
研究員（科学研究）：Nguyen Minh Luan
研究員（産官学連携）：兎玉智信

〈生体物性学分野（国内客員）〉

教授：佐藤正明

■ 再生統御学研究部門 ■

〈発生分化研究分野〉

教授：中辻憲夫 准教授：中馬新一郎 研究員（科学研究）：*細川美穂子
教務補佐員：森部江美子 技術補佐員：田中ます子 事務補佐員：酒井睦美，廣富ひとみ
大学院生：熊谷英明，望月綾子，林 瑛理，刀谷在美

〈再生誘導研究分野〉

（欠員中）

〈再生増殖制御学分野〉

教授：瀬原淳子 助教：栗崎知浩 特定研究員（学術支援）／特任助教：飯田敦夫
特定研究員（科学研究）：栗崎智美 特定研究員（科学研究）：佐藤文規 特定研究員（G-COE）：佐藤貴彦
事務補佐員：倉澤祥子
技術補佐員：黒田信子，坂口大史，寒川裕之

大学院生：木村剛隆，坂口和弥，西邨大吾，平向洋介，荒井宏行，庄子栄美

〈再生免疫学分野〉

(欠員中)

■ 再生医学応用研究部門 ■

〈生体修復応用分野〉

准教授：高橋 淳 特定研究員（産官学連携）：西村周泰，菊地哲広

特定研究員（最先端研究）：◇森實飛鳥，◇土井大輔，◇元野 誠

事務補佐員：五味淵淑子 技術補佐員：窪田 慶，勝川美都子，◇山崎絵海

大学院生：吉川達也，吉川 綾，小芝 泰，佐俣文平

〈組織再生応用分野〉

教授：戸口田淳也 講師：加藤友久 特定研究員（グローバル COE）：金 永輝

研究員（グローバル COE）：那須 輝 研究員：小泉智恵

事務補佐員：安田尚代，芳野麻里絵 技術補佐員：小林由紀子，永田早苗，平賀理香

大学院生：早川和男，玉置さくら，Elalaf Hassan，小林恭介，松本佳久，横山宏司，澤野貴之，福田 誠，日根野 翔，高原直子

〈器官形成応用分野〉

准教授：角 昭一郎 講師（非常勤）：砂村真琴，日裏彰人，小川知彦，白水泰昌

事務補佐員：菊地裕子 研究生：星野順一 研修員：柳井伍一

〈臓器再建応用分野〉

准教授：中村達雄 講師（非常勤）：早川克己，稲田有史，堀 義生，茂野啓示，萩原明於

事務補佐員：矢延聡枝 技術補佐員：石田久恵 大学院生：島田英徳，木田直樹，本多通孝，小島史嗣，若槻麻里子

研究生：町口敏彦，畑山敬秀，瀬川篤典，宇治正人，金子真弓

研修員：井上祐利，中田 顕 特別研究学生：西澤祐史，笹内杏子

〈再生医学応用流動分野〉

(欠員中)

■ 附属再生実験動物施設 ■

施設長（兼）：長澤丘司 副施設長（兼）：戸口田淳也 准教授：近藤 玄 技術職員：出口央士，渡邊仁美，萩原智幸

技能補佐員：古脚智英，人見博子，石丸英典，西山尚之，柴田 豊，森本幸子，竹明フサ，向 一哲，永井智美，柴田康太郎，

佐々木 勉

■ 附属幹細胞医学研究センター ■

センター長（兼）：中辻憲夫

〈霊長類胚性幹細胞研究領域〉

准教授：末盛博文 連携准教授：佐藤恵子 特定研究員（NBRP）：宮崎隆道

特定研究員（産官学連携）：山内香織 教務補佐員：采女久実子，後藤律子 大学院生：武内大輝

〈幹細胞分化制御研究領域〉

准教授：山下 潤 研究員（iPS 細胞研究）：◇武田匡史 日本学術振興会特別研究員：山水康平

大学院生：松永太一，福島弘之，熊本博美

教務補佐員：村山千里，志野瑞穂，片山志織 研究生：劉 娅婧 研修員：星野託広

〈幹細胞加工研究領域〉

准教授：多田 高 外国人共同研究者：程 李涛, Sun Liang Tso, Kanemori Michele
研究員（産官学連携）：福地恵美 大学院生：平野邦生, 長田翔伍

〈細胞プロセッシング研究領域〉

教授（客員）：高橋恒夫 准教授（客員）：古江-楠田美保 特定講師（特別教育研究）：川瀬栄八郎
特定研究員（特別教育研究）（CPC 主任）：高田 圭 特定研究員（特別教育研究）：平井雅子 技術補佐員：濱生麻里

〈再プログラム化研究領域（客員）〉

（欠員中）

■ 附属ナノ再生医工学研究センター ■

センター長（兼）：楠見明弘

〈ナノバイオプロセス研究領域〉

教授：楠見明弘 准教授：*鈴木健一 特任講師：*藤原敬宏 助教：笠井倫志
特定研究員（WPI）：*謝 敏, *幸重美津子 研究員：*Rahul Chaolola
大学院生：根本悠字里, 工藤恭彦, 後神秀考, 白居祐希, 角山貴昭, 吉田謙太, 塚本美久, 陳 莉敏, 宮原愛美, 石川慶郎,
守谷隆一
民間等共同研究員：*渋谷周作
教務補佐員：*坪井久恵, *土方博子, *廣瀬幸一朗, *Ankita Chadda, *平本菜央, *近藤愛子
技術補佐員：*柴田明裕

〈シミュレーション医工学研究領域〉

准教授：玄 丞然 講師（非常勤）：茂木伸夫, 中島直喜, 松村和明
事務補佐員：小柴里美 技術補佐員：李 浚載
大学院生：加藤希理子, 竹内敦史
特定研究員（産官学連携）：東 高志 研究員（研究機関）：中井隆介

〈ナノバイオメカニクス研究領域〉

助教：都賀谷紀宏

〈バイオメカニクス研究領域〉

教授：安達泰治 准教授：井上康博 講師（非常勤）：小野謙二, 上岡 寛, 木戸秋 悟
特定研究員（最先端・次世代研究）：韓 成雄
教務補佐員：須長純子 事務補佐員：菊地裕子
大学院生：松下慎二, 奥田 覚, 村田勝章, 石橋弘輝, 中川光司, 近藤由章, 鈴木健介, 森田恭平
学部生：竹中健太郎, 藤井徹矢, 藤井洋介, 牧 功一郎

〈再生医工学研究領域（外国人客員）〉

（欠員中）

■ 技術部 ■

再雇用職員：松下隆壽, 小岸久美子

■ 事務局 ■

事務長：森 勝二

専門職員（総務担当）：簀谷文一 主任：服部和枝 事務補佐員：戸倉理恵子 派遣職員：前田亜矢乃

専門職員（財務担当）：田井陸之 事務職員：飯田圭輔 事務補佐員：緒方康子

※：物質－細胞統合システム拠点所属 ◇：iPS 細胞研究所所属

△：医学研究科所属

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences
Kyoto University 2011

京都大学再生医科学研究所年報 2011

2012年4月5日印刷 2012年4月10日発行

発行 京都大学再生医科学研究所

京都市左京区聖護院川原町53 〒606-8507

印刷 株式会社 田中プリント

