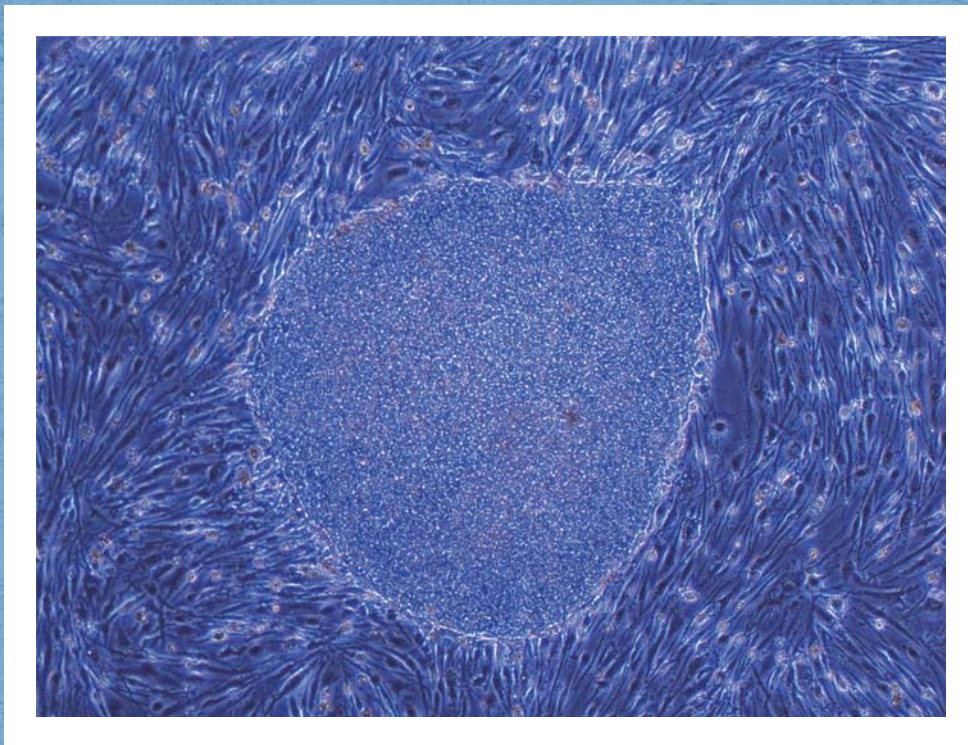


京 都 大 学

再生医科学研究所年報

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences
Kyoto University



〈第11卷〉

2008

平成20年

表紙写真

「c-Myc 遺伝子を用いずに作製したヒト iPS 細胞」

マウス iPS 細胞の研究結果より、iPS 細胞の誘導に用いているレトロウイルス由来の c-Myc 遺伝子が原因でマウス生体内において腫瘍化を引き起こす事が分かっている。再生医療への応用を考えると解決しなければならない問題である。樹立方法を改良する事で c-Myc を用いずにマウス iPS 細胞の樹立に成功した。この iPS 細胞を用いる事で腫瘍化の低減にも成功した。ヒトにおいてもレトロウイルスの c-MYC を用いずに iPS 細胞を樹立する事に成功した。この iPS 細胞はヒト ES 細胞と同様の分化能力を持っている。

写真は、c-MYC を用いずに樹立されたヒト iPS 細胞を支持細胞（フィーダー細胞）上で培養している写真。真ん中のコロニーがヒト iPS 細胞のコロニー。ヒト ES 細胞と似たコロニーの形態を示す。

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	4
生体微細構造学分野	10
生体機能調節学分野	12
生体システム制御学分野	19
生体再建学分野	22
生体組織工学研究部門	
生体分子設計学分野	26
生体材料学分野	33
組織修復材料学分野	55
生体物性学分野	62
再生統御学研究部門	
発生分化研究分野	65
再生誘導研究分野	70
再生増殖制御学分野	79
再生免疫学分野	84
再生医学応用研究部門	
生体修復応用分野	88
組織再生応用分野	91
器官形成応用分野	97
臓器再建応用分野	101
附属再生実験動物施設	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	111
幹細胞分化制御研究領域	114
幹細胞加工研究領域	122
細胞プロセッシング研究領域	126
再プログラム化研究領域	128
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	133
シミュレーション医工学研究領域	138
ナノバイオメカニズム研究領域	147
再生医工学研究領域	148
寄附研究部門	
組織分化制御学研究部門	150
技術部	153
4. ナノメディシン融合教育ユニット	154
5. 学術集会	
5-1 京都大学再生医科学研究所設立 10周年記念国際シンポジウム	155
5-2 セミナー	159
5-3 研究発表会	161
5-4 学術講演会・シンポジウム・研究会等	162
6. 共同研究	165
7. 協議員・運営委員・教職員等名簿	166

1. 巻 頭 言

平成20年度は、再生医科学研究所が設立されて10周年に当たります。再生医科学研究所は、平成10年に、胸部疾患研究所の基礎部門と生体医療工学研究センターが発展的に統合するかたちで、「再生医学の学理の追求とその応用」を基本理念とする研究所として設立されました。この10年、再生医科学の基盤研究、組織工学研究、また臨床応用研究で活発な研究活動を展開し、再生医学・医療の進歩に顕著な貢献をしてきたものと考えます。この間、再生医科学研究所に対する研究所内外からの温かい御支援に改めて感謝致します。

平成20年度、再生医科学研究所は、文部科学省から「共同利用・共同研究拠点」の認定を受けました。この拠点化の意義は、再生医学・医療への社会的期待が高まる中、当研究所に集約された再生医学の知識・技術を基に、我が国における再生医学・医療の先端融合的共同研究のキーステーションとなることにあります。言い換えれば、再生医療に関わる個々の学問分野の発展のみならず、再生医学の基礎から応用にまたがる総括的研究、異なる学問分野からなる横断的・学際的研究を、研究者コミュニティに開かれた共同研究としてさらに開拓、発展させることを目的としています。同時に、そのような再生医学・医療を積極的、意欲的に担う研究者の育成・教育を積極的に推進するよう研究者コミュニティから期待されています。拠点化によって、共同研究のみならず、再生医学に関する情報発信、教育活動、再生医療技術の標準化を推進し、若手研究者、異分野研究者が、新しいアイデアで意欲的に再生医学研究に参入してくる機会となるよう研究所を運営したいと考えます。

再生医科学研究所は、学際的、融合的な研究を尊ぶ京都大学の学風のもと、基礎生物学、医学、工学など異なる学術的背景を有する研究者により構成される総合研究所です。この多様性を維持しつつ、全国的な共同研究・共同利用を展開することで、研究所の新たな飛躍を期待します。

平成21年 1 月

所 長 坂 口 志 文

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成績を挙げて来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所との協力により、「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月には、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細胞株の国内唯一の樹立機関として、樹立・特性解析を行ったES細胞を、文部科学大臣が確認したヒトES細胞使用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（旧胸部疾患研究所附属病院の後身である医学部附属病院南西病棟と合同使用）、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年竣工）、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年竣工）の4棟となっている。

2-2 教 員 数 等

(1) 教 員（平成21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
	11(2)	12(3)	1	11	35(5)	1	3	39(5)

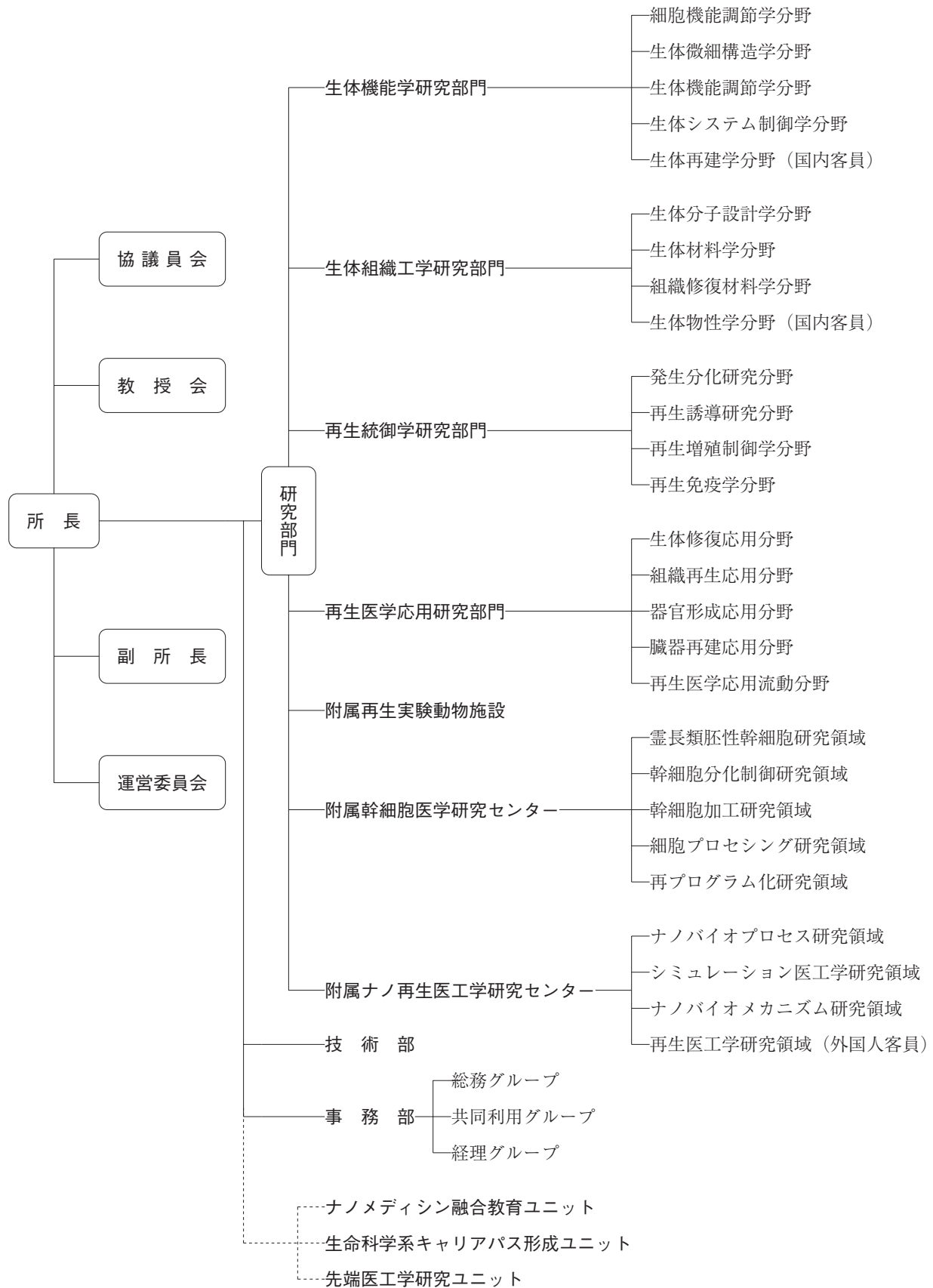
（ ）内は客員で外数

(2) 大学院生・研修員・研究生等（平成21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
131	5	8	4

2-3 組 織 図

(平成21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

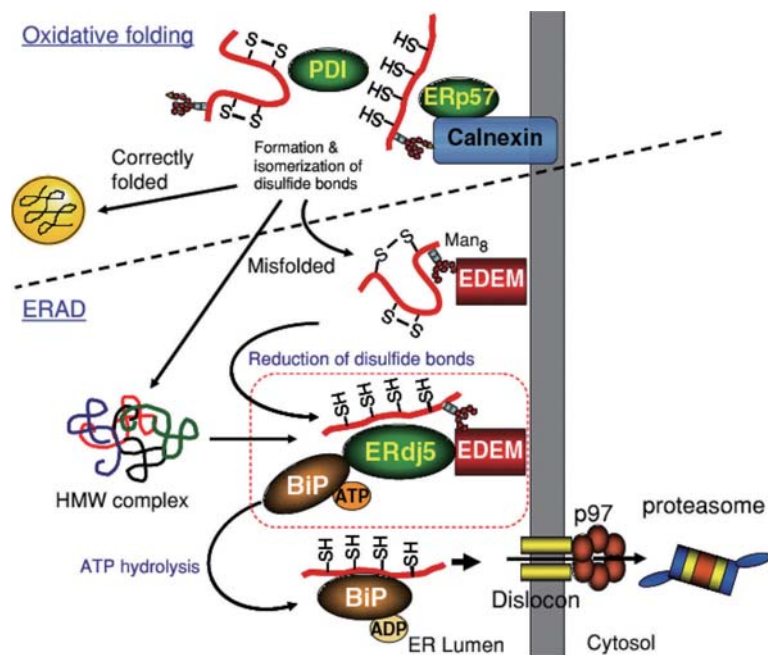
分野主任 教授 永田 和宏

Prof. Kazuhiro Nagata

【研究概要】

細胞機能調節学分野では、分子シャペロ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合成・再生・品質管理の機構について、以下の3つの大きなテーマに添って研究を進めている。

第1のテーマは、小胞体における productive folding に関する研究であり、コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の機能解析を中心に研究を進めている。HSP47 はコラーゲンの正常な合成・分泌にとって必須の分子シャペロンであることを明らかにしてきたが、HSP47 は組織の繊維化にとっても重要な寄与をし、HSP47 の発現を抑制することによって繊維化の進行を遅らせることができる。HSP47 ノックアウトマウスおよび HSP47 ノックアウト ES 細胞や繊維芽細胞を用いた研究より、HSP47 が I 型および IV 型コラーゲンの分子成熟（3 本鎖形成）に必須の分子シャペロンであることを明らかにし、基底膜やコラーゲン繊維の形成に必須であることを明らかにした。また HSP47 ノックアウト細胞においては未熟なコラーゲンが小胞体に凝集体として蓄積するが、これらのコラーゲンはオートファジーによって分解を受けることを明らかにした。コラーゲン遺伝子は正常でもその高次構造形成に必須の分子シャペロン欠損によって起こる異常コラーゲンの分解を示した訳だが、さらにコラーゲン遺伝子の突然変異による病態においても、凝集体を作るコラーゲンはオートファジーで分解されることも示すことができた。



新生ポリペプチドの品質管理と ERdj5 を介した ERAD 機構

小胞体へ運ばれた新生ポリペプチドはカルネキシンや PDI, ERp57 などの分子シャペロン・酸化還元酵素によってフォールディングが成される。一方、ミスフォールドした糖タンパク質は EDEM によって糖鎖構造が認識され、分解系へと運ばれる。EDEM と結合した ERdj5 は分解基質の S-S 結合を解離し、BiP と共役し逆行輸送チャンネルに運ばれ、サイトゾルへ排出される。

従来コラーゲンの遺伝病として知られる骨形成不全症における変異コラーゲンは小胞体関連分解によって分解され、と考えられていたが、凝集をつくるような変異コラーゲンはオートファジー分解を受けることを示したもので、コラーゲン関連疾患の治療戦略を考える上でも重要な発見である。

(文責・永田)

第2のテーマとして、小胞体品質管理 (ERQC)、小胞体関連分解 (ERAD) の作用機序の解明を、分子、細胞ならびに個体レベルで行っている。ERQC、ERAD に関しては、遺伝子レベルで mutation 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 の破綻が疾患を引き起こすことが明らかにされ、臨床・疾病治療の面からも注目されている。ERAD に関わる EDEM ホモログタンパク質は、酵母では1種類、哺乳類では3種類あることが明らかになっている。いずれも糖タンパク質の ERAD を促進するが、その分子メカニズムは異なっているようなので、その違いを明らかにするとともに、EDEM ファミリーを包括する機能の解明を行いたいと考えている。さらに、ERQC における N 結合型糖鎖の役割、タンパク質の小胞体からの逆行輸送に関与する分子、小胞体膜上でタンパク質をユビキチン化する分子の研究など、独自の視点に立った研究を進めている。最近、新規小胞体レクチンタンパク質が小胞体膜に存在するユビキチンリガーゼと複合体を形成し、ミスフォールドタンパク質品質管理の足場を提供していることを明らかにした。この新規レクチンが認識する糖鎖構造を生化学的に解析することによって、糖鎖認識を介した小胞体品質管理機構の解明を行っている。

(文責・細川)

第3のテーマである小胞体内のジスルフィド還元酵素 ERdj5 の機能に関して以下のことを明らかにした。ERdj5 はミスフォールドタンパク質の分子間ジスルフィド結合を還元することで凝集体形成を抑制し、小胞体関連分解 (ERAD) を促進する。糖鎖を持つミスフォールドタンパク質の ERAD においては、ERdj5 はレクチン様分子 EDEM、分子シャペロン BiP と ERAD 複合体を形成することで ERAD を効率化し、分解を促進していることを既に明らかにした。新たに糖鎖を持たないミスフォールドタンパク質の分解において、ERdj5 が BiP と相互作用することで ERAD を促進していることを明らかにした。ERdj5 は BiP と相互作用することで BiP による ERdj5 への基質のリクルート、ERdj5 によるミスフォールドタンパク質複合体のジスルフィド結合還元による単量体化、BiP による ERdj5 からの基質のリリースを効率良く行うことで ERAD を促進している。

(文責・寶閑)

The major focus in the Department of Molecular and Cellular Biology is to study the stress response and the regulation and function of molecular chaperone/stress proteins. We are working mainly on the four topics in this field.

We found and cloned the gene of a novel stress protein HSP47 which resides in the endoplasmic reticulum (ER) acting as a collagen-specific molecular chaperone in the pathway of collagen biosynthesis, processing and secretion. HSP47 specifically and transiently binds to various types of collagen in the ER. In addition to the binding specificity to collagen, the expression of HSP47 is always closely correlated with those of collagens during the normal development of mouse embryo as well as in the pathophysiological conditions including liver and renal fibrosis.

We already succeeded in making knockout mice lacking *hsp47* gene, which resulted in causing the embryonic lethality at 10.5 dpc in *hsp47*^{-/-} homozygotic mice. In these homozygotic mice, the maturation of type I collagen

was abnormal and the immature form of procollagen accumulated in the tissues. Using *hsp47*^{-/-} ES cells, we found this year that type IV collagen secreted from *hsp47*-null cells could not form correct triple helices and the basement membrane was not formed in the embryoid bodies from those cells. We also observed the impairment of basement membrane formation in mouse embryos, thus these findings reveal that the knockout of a chaperone protein HSP47 causes the abnormality in molecular maturation of its substrate, and HSP47 is essential for mouse normal development. In those knockout mice, type IV collagen was observed to accumulate in the ER causing an ER stress, and apoptosis was also observed in those embryos after 10.5 dpc.

(By K. Nagata)

Another project we are working on is the molecular mechanism of ERQC (ER quality control) and ERAD (ER-associated degradation). Many works have clarified the importance of ERAD of misfolded proteins and the disruption of ERQC in genetic diseases and neurodegenerative disorders. We have previously cloned a mouse gene EDEM, which is involved in the ERAD of glycoproteins. There are three EDEM homolog proteins in mammals and one paralog in yeast. Although all of the homologs enhance glycoprotein ERAD, the molecular mechanism whereby each protein works seems to be different. We are now investigating the functional divergence as well as the comprehensive mechanism of these EDEM family proteins. We are also working on the involvement of *N*-linked sugars in the ERQC, the molecular mechanism of retrotranslocation of misfolded substrates, and the molecules responsible for the ubiquitination of ERAD substrates on the ER membrane. Recently, we have found that two novel mammalian lectins make a complex with a membrane-embedded ubiquitin ligase HRD1, forming an ER quality-control scaffold. Biochemical analysis of the oligosaccharide structures that these ER lectins recognize has further clarified the mechanism how glycoprotein ERAD is regulated through the processing and recognition of the *N*-glycans.

(By N. Hosokawa)

We have identified ERdj5, a disulfide reductase as a novel factor in the ER-associated. ERdj5 promotes ERAD by cleaving of intermolecular disulfide bonds of misfolded proteins and preventing their oligomer and aggregate formation. And also ERdj5 forms an ERAD complex with EDEM, which recognizes misfolded proteins via their *N*-glycan portions, and a molecular chaperone, BiP. The ERAD complex accelerates ERAD of glycosylated proteins. We have found that interaction of ERdj5 with BiP promotes ERAD of non-glycosylated proteins: BiP recruits misfolded proteins to ERdj5; ERdj5 catalyses reduction of intermolecular disulfide bonds of the misfolded proteins; BiP releases the misfolded proteins from ERdj5.

(By J. Hoseki)

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

N. Hosokawa, I. Wada, K. Nagasawa, T. Moriyama, K. Okawa and K. Nagata: Human XTP3-B forms an endoplasmic

- reticulum quality control scaffold with the HRD1-SEL1L ubiquitin ligase complex and BiP. *J Biol Chem.* **283**(30): 20914–24 (2008)
- D. Morito, K. Hirao, F. Tokunaga, N. Hosokawa, D.M. Cyr, K. Tanaka, K. Iwai and K. Nagata: Gp78 cooperates with RMA1 in ER-associated degradation of CFTR Δ F508. *Mol. Biol. Cell.* **19**: 1328–1336 (2008)
- R. Ushioda, J. Hoseki, K. Araki, G. Jansen, D. Thomas and K. Nagata: ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science* **321**(5888): 569–572 (2008)
- S. Hirayama, Y. Yamazaki, A. Kitamura, Y. Oda, D. Morito, K. Okawa, H. Kimura, D.M. Cyr, H. Kubota and K. Nagata: MKKS is a centrosome-shuttling protein degraded by disease-causing mutations *via* CHIP-mediated ubiquitination. *Mol. Biol. Cell.* **19**: 899–911 (2008)
- J. Nakamura, M. Fujimoto, K. Yasuda, K. Takeda, S. Akira, T. Hatayama, Y. Takagi, K. Nozaki, N. Hosokawa and K. Nagata: Targeted disruption of Hsp110/105 gene protects against ischemic stress. *Stroke* **39**: 2853–2859 (2008)
- Y. Ishikawa, J. Vranka, J. Wirz, K. Nagata and HP. Bächinger: The rough endoplasmic reticulum-resident FK506-binding protein FKBP65 is a molecular chaperone that interacts with collagens. *J Biol Chem.* **283**(46): 31584–31590 (2008)
- T. Kakugawa, S. Yokota, H. Mukae, H. Kubota, N. Sakamoto, S. Mizunoe, Y. Matsuoka, J. Kadota, N. Fujii, K. Nagata and S. Kohno: High serum concentrations of autoantibodies to HSP47 in nonspecific interstitial pneumonia compared with idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med.* in press
- S. Nakayama, H. Mukae, N. Sakamoto, T. Kakugawa, S. Yoshida, H. Soda, H. Oku, Y. Urata, T. Kondo, H. Kubota, K. Nagata and S. Kohno: Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF- β 1-stimulated human lung fibroblasts. *Life Sci.* **82**: 210–217 (2008)

2) 著書および総説

- 永田和宏：序：分子シャペロン. 分子細胞治療「特集：分子シャペロン」Vol. 7, No. 4 (2008)
- 永田和宏：タンパク質の一生. 岩波新書 (2008)
- 永田和宏, 中野明彦, 米田悦啓, 須藤和夫, 室伏擴, 榎森康文, 伊藤維昭 (訳)：ルーイン細胞生物学. 東京化学同人 (2008)
- N. Hosokawa and K. Nagata: M-type lectins as novel components of secretory pathways. "ANIMAL LECTINS A Functional View" (Eds Gerardo R. Vasta, Hafiz Ahmed) CRC Press in press
- N. Hosokawa: Degradation of misfolded plicoproteins in the endoplasmic reticulum. "Experimental Glycoscience: Glycology" (Eds N. Taniguchin et al.) Springer pp. 207–210 (2008)
- 寶関 淳, 永田和宏：小胞体関連分解 (ERAD) を担うジスルフィド還元酵素 ERdj5. 実験医学「細胞内の輪廻転生 タンパク質の分解機構」Vol. 26, No. 2: 342–348 (2008)
- 遠藤斗志也, 小椋 光, 永田和宏, 森 和俊, 田口英樹, 吉田賢右 (編)：キーワード：蛋白質の一生. 蛋白質核酸酵素増刊 Vol. 53, No. 8 (2008)
- 潮田 亮, 永田和宏：還元酵素 ERdj5 を介した新しい小胞体関連分解機構の解明. 細胞工学 Vol. 27, No. 12: 1292–1293 (2008)
- 石田義人, 永田和宏：細胞外マトリックス産生. 遺伝子医学 MOOK 別冊「ますます重要になる細胞周辺環境の科学技術」. in press

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Nobuko Hosokawa, Ikuo Wada, Yukiko Kamiya, Koichi Kato and Kazuhiro Nagata: Quality control of proteins in the endoplasmic reticulum. 京都大学再生医科学研究所設立10周年記念国際シンポジウム, 京都市, 2008.12.4

細川暢子, 和田郁夫, 長澤孝治, 森山達哉, 大川克也, 永田和宏: 新規レクチンによる小胞体タンパク質品質管理機構. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会一般口頭発表およびポスター発表, 神戸市, 2008.12.9-12

Jun Hoseki: ERdj5 is required as a disulfide reductase for ER-associated degradation of misfolded proteins. G-COE International Symposium "Frontier of Organelle Dynamics and Protein Functions for young scientists & graduate students", Nagoya, 2008.3.12

Jun Hoseki, Ryo Ushioda, Kazutaka Araki, Gregor Jansen, David Thomas and Kazuhiro Nagata: ERdj5 is required as a disulfide reductase for ER-associated degradation of misfolded proteins. Cold Spring Harbor Meeting "Molecular Chaperones and stress Response", Cold Spring Harbor(USA), 2008.4.30-5.4

寶関 淳, 潮田 亮, 新木和孝, 萩原誠智, Gregor Jansen, David Y Thomas, 永田和宏: 小胞体関連分解を担うジスルフィド還元酵素 ERdj5. 第8回日本蛋白質科学会年会, 東京都, 2008.6.12

Daisuke Morito, Kazuyoshi Hirao, Yukako Oda, Nobuko Hosokawa, Fuminori Tokunaga, Douglas M. Cyr, Keiji Tanaka, Kazuhiro Iwai and Kazuhiro Nagata: Gp78 cooperates with RMA1 in ER-associated degradation of CFTRDF508. Cold Spring Harbor Meeting "Molecular Chaperones and stress Response", Cold Spring Harbor (USA), 2008.4.30-5.4

北村 朗: 生細胞内分光イメージング法を用いた変異 SOD1 タンパク質の凝集ならびに脱凝集課程の時空間的解析. 再生研若手発表会, 京都市, 2007.3.29

北村 朗, 久保田広志, 松本 弦, 稲田のりこ, 金城政孝, Richard I. Morimoto, 永田和宏: 分光イメージング法を用いた変異 SOD1 タンパク質凝集形成と脱凝集過程の解析. 理研シンポジウム「蛍光相関分光で見る生体系の情報伝達 (5)」, 和光市, 2008.2.22

北村 朗, 久保田広志, 稲田のりこ, 松本 弦, Richard I Morimoto, 金城政孝, 永田和宏: 分光イメージング法を用いた変異型 SOD1 の凝集体形成と凝集中間体構造の解析—凝集中間体と細胞毒性の関係について—. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会一般口頭発表およびポスター発表, 神戸市, 2008.12.9-12

石田義人, 北村 朗, 平野泰弘, 白 燦基, 竹安邦夫, 金城政孝, 久保田広志, 永田和宏: コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の *in vitro* 解析. 理研シンポジウム「蛍光相関分光で見る生体系の情報伝達 (5)」, 和光市, 2008.2.22

Yoshihito Ishida, Akitsugu Yamamoto, Akira Kitamura, Tamotsu Yoshimori, John F. Bateman, Hiroshi Kubota and Kazuhiro Nagata: Misfolded collagens accumulated in the ER by the absence of HSP47 are disposed via autophagy-lysosome. Cold Spring Harbor Meeting "Molecular Chaperones and stress Response", Cold Spring Harbor (USA), 2008.4.30-5.4

石田義人: 小胞体に蓄積するミスフォーディングコラーゲンの構造と分解経路の仕分け. 特定領域研究「タンパク

質の社会」若手ワークショップ, 千葉市, 2008.9.25-27

石田義人, 山本章嗣, 北村 朗, Shireen R Lamande, 吉森保, John F Bateman, 久保田広志, 永田和宏: 小胞体に蓄積するミスフォールドコラーゲンの構造依存的な分解経路の仕分け. 第3回臨床ストレス応答学会大会, 秋田市, 2008.11.15

石田義人, 久保田広志, 北村 朗, 山本章嗣, John Bateman, 吉森 保, 永田和宏: 小胞体に蓄積した変異コラーゲンの分解: オートファジーと ERAD の使い分け. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会一般口頭発表, およびポスター発表, 神戸市, 2008.12.9-12

潮田 亮, 寶関 淳, 永田和宏: ERdj5 を介した非糖鎖修飾タンパク質の小胞体関連分解機構の解明. 特定領域研究「タンパク質の社会」班会議, 沖縄市, 2008.11.23-26

Shoshiro Hirayama, Yuji Yamazaki, Akira Kitamura, Yukako Oda, Daisuke Morito, Katsuya Okawa, Hiroshi Kimura, Douglas M. Cyr, Hiroshi Kubota and Kazuhiro Nagata: MKKS is a centrosome-shuttling protein whose disease-causing mutants are degraded via quality control E3 enzyme CHIP. Cold Spring Harbor Meeting "Molecular Chaperones and stress Response" Cold Spring Harbor (USA), 2008.4.30-5.4

Kazutaka Araki, Shunichiro Iemura, Tohru Natsume and Kazuhiro Nagata: Proteomics approach towards understanding the endoplasmic reticulum (ER) redox network in mammalian cells? Interraction proteome summer school "from Functional Proteomics to Systems Biology", Spetses (Greece), 2008.9.21-27

真砂有作, 河野章悟, 那須 輝, 青山朋樹, 藤田克昌, 近藤 玄, 永田和宏: 軟骨形成・内軟骨性骨化における HSP47 の重要性. 第3回臨床ストレス応答学会大会, 秋田市, 2008.11.15

杉浦仁美, 新木和孝, 寶関 淳, 永田和宏: チオレドキシン様ドメインを持つ小胞体膜タンパク質 TMX4 の機能解析. 特定領域研究「タンパク質の社会」班会議, 沖縄市, 2008.11.23-26

杉浦仁美, 新木和孝, 寶関 淳, 永田和宏: チオレドキシン様ドメインを持つ小胞体膜タンパク質 TMX4 は酸化還元酵素として機能する. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会一般口頭発表およびポスター発表, 神戸市, 2008.12.9-12

萩原誠智, 寶関淳, 新木和孝, 潮田 亮, 永田和宏: 小胞体関連分解を担う還元酵素 ERdj5 のドメイン解析. 特定領域研究「タンパク質の社会」班会議, 沖縄市, 2008.11.23-26

内藤素子, 久保田広志, 石河利弘, 吉川勝宇, 山脇聖子, 鈴木茂彦, 永田和宏: 大腸菌多機能プロテアーゼ/シャペロン HtrA/DegP のヒトホモログの一つ HteA1 の発現はケロイドの病期と予後に関する. 第3回臨床ストレス応答学会大会, 秋田市, 2008.11.15

良川須美, 内海真穂, 山口芳樹, 栗本英治, 石田義人, 本間貴之, 寶関 淳, 西川良美, 小出隆規, 永田和宏, 加藤晃一: 分子シャペロン Hsp47 のコラーゲン結合部位の同定. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会一般口頭発表およびポスター発表, 神戸市, 2008.12.9-12

2) 招待講演・シンポジウム

永田和宏: ERAD に働く分子たち: 小胞体膜の内と外. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質の膜透過と膜挿入の分子メカニズム—その核心に迫る」, 吹田市, 2008.1.14

永田和宏: タンパク質品質管理とその破綻としての病態. 「細胞ストレスと疾患」講演会, 札幌市, 2008.4.9

Kazuhiro Nagata, Yusaku Masago, Yoshihito Ishida: Revisiting of collagen-specific molecular chaperone HSP47: Alternative degradation pathway of misfolded procollagen in the ER; ERAD and autophagy. Cold Spring Harbor Meeting "Molecular Chaperones and stress Response", Cold Spring Harbor (USA), 2008.5.1

- 永田和宏：小胞体におけるタンパク質の品質管理機構。第60回弘前大学遺伝子施設セミナー，弘前市，2008.5.9
- 永田和宏：細胞?驚異のミクロコスモス。京都府立嵯峨野高等学校特別講義，京都市，2008.10.23
- 永田和宏：分子シャペロンと神経変性疾患。京都大学医学研究科大学院教育コース（神経科学），京都市，2008.10.27
- 永田和宏：Life of proteins：Folding, quality control and diseases。京都大学医学研究科大学院教育コース「細胞生物学・細胞生理学コース」，京都市，2008.11.29
- Kazuhiro Nagata, Ryo Ushioda, Kazutaka Araki, Jun Hoseki: Components required for degradation of misfolded proteins in the ER: Ternary complex composed with EDEM, ERdj5 and Bip。第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会シンポジウム，神戸市，2008.12.10
- Kazuhiro Nagata: Quality control of newly synthesized proteins in the ER。京都大学再生医科学研究所設立10周年記念国際シンポジウム，京都市，2008.12.4
- 細川暢子：新規小胞体レクチンによる糖タンパク質の品質管理機構。第6回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム，東京都，2008.12.3
- 久保田広志：タンパク質フォールディング異常病と分子シャペロンによる制御。東大生命環境科学系セミナー，東京都，2008.3.7

生体微細構造学分野

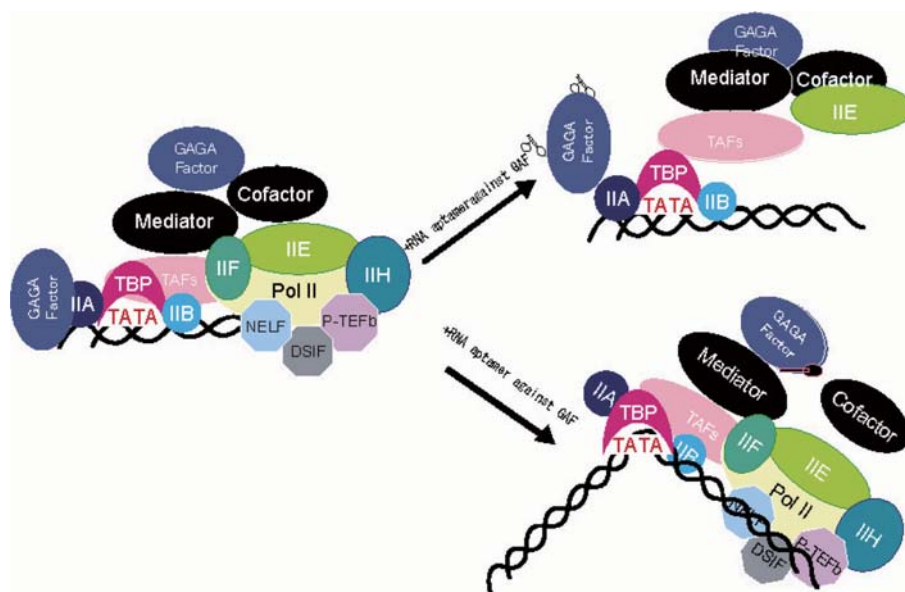
Department of Ultrastructural Research

講師 平芳 一法
Lect. Kazunori Hirayoshi

【研究概要】

当研究室では、機能性 RNA 分子 RNA アプタマーを用いた転写機構、特に基本転写機構の解析を主要なテーマとしている。転写は、発生、分化の運命の決定をはじめとして、生命現象の制御に関わっており、生命科学にとって基本的な問題であり続けている。近年の研究から、転写は大きく二段階で制御されていると考えることができるようになってきた。遺伝子 DNA を転写できないように保持する高次に折りたたまれたクロマチン構造を介した制御。転写可能になった遺伝子 DNA から mRNA の読み出しを制御する機構である。エピジェネティックな制御にも関わるクロマチン構造の維持による遺伝子の不活化を乗り越え、転写可能な状態をつくるために、クロマチン構造を解きほぐす因子が必要である。ショウジョウバエでは、この過程に関与する因子として知られているのが GAGA 因子である。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ことが知られているが、転写の実質酵素である RNA Polymerase II に転写の開始から終了まで結合していることが報告されており、さらに広範な機能が予想され、転写の全体像を考える上でも重要な因子と考えられる。われわれは GAGA 因子特異的なアプタマーを取得し、詳細な解析に着手した。

GAGA 因子は、DNA への結合に重要な Zn ドメイン、他の因子あるいは自己の重合化に関与する POZ ドメイン、グルタミン酸残基に富み、重合化、試験管内での転写活性化に関与することが報告されている Q rich ドメインという3つの機能ドメインからなる。われわれの取得したアプタマーは POZ ドメインを中心とした領域に結合



Aptamer 特異的な阻害効果

in vitro 転写から得られた結果を基に、GAGA 因子に対する特異的なアプタマーが転写複合体の中で機能している様子を模式的に示した。2 種類のアプタマー (🔴, 🔵) はそれぞれ違う部位で機能し、GAGA 因子が転写の異なったステージで機能していることを明らかにした。

Aptamer specific inhibitory effect

Figure schematically shows inhibitory effect of each GAGA specific aptamers (🔴, 🔵) in the transcription complex. Two aptamers show their effect on the different locus and it clarify the different function of GAGA factor in the transcription.

し、転写を阻害する。つまり、複数の因子によって形成される転写複合体中で、GAGA 因子を介した転写因子の結合を阻害することにより、転写を阻害するものと思われることから、GAGA 因子が転写を推進するうえで、重要な働きをしていることを明らかにした。さらに興味深いことに、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が、その依存性は、転写制御領域に存在する GAGA 因子のみでなく別の機構によっても決定されていることを明らかにした。その機構自体を解明するには至っていないが、今回の研究で、分子ピンセットとして、生体内の蛋白質相互作用を解析するのに有効な方法であることを示したアプタマーの使用により、今後明らかにできることと考えている。

一連の実験に解析ツールとして使用した RNA aptamer は、近年注目されている抗体医薬に代わるものとして期待される。抗体と同様に特定分子に結合するが、その結合力はむしろ強く、生産性、細胞内での扱いに優れているなどの特徴から、医薬品としての応用が期待される。分子の修飾による特異性の増大など、応用に向けて種々の努力がなされているが、我々は、生体内で効率的に働く aptamer 分子の構築を試みている。多量体を作成することで、阻害剤としての効果が著しく増大することを明らかにした。生体内では一定時間で分解されるという特徴を生かし、必要なときにのみ働く、副作用の少ない薬剤となるよう、上述の方法を含め、その分子の有効な構築を試みている。

We analyze the transcription mechanism by using RNA aptamers, especially focused on the GAF this year. *Drosophila* GAF (GAGA factor) is well known as a multifunctional factor. 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. In addition, the characteristic glutamine rich domain of GAF has a potential to activate the transcription by stabilizing the PIC. GAF is also reported that travels with RNA

polymerase II all way down to the 3' end of the gene. To analyze the role of GAF in the transcription complex precisely, we tried a new analytical approach with RNA aptamer as a 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, which is important for the protein-protein interaction, but not to the zinc finger and the glutamine rich domain, although aptamers weakly prevented the GAF from binding to the GAGA element. Interestingly, these aptamers inhibited the *in vitro* transcription on the naked DNA 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. These results suggest the functions of GAF in initiation, elongation or reinitiation steps via the interaction 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. 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: 転写過程における GAGA 因子の機能解析. 第31回日本分子生物学会物学会年会 (2008.12.9-12. 神戸)

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。本年度は、制御性T細胞による抑制機構の分子的基础について解析を進めた。制御性T細胞の免疫学的特徴のひとつは、CTLA-4 (cytotoxic T cell-associated antigen-4) 分子の構成的高発現である。制御性T細胞の発

生・分化のマスター制御遺伝子である Foxp3 遺伝子プロモーター下に Cre 分子を発現させたノックインマウス, CTLA-4 遺伝子部位に loxP を挿入したマウス系統を確立し, 制御性T細胞特異的に CTLA-4 分子を条件的に欠損させたマウスを作製した。このマウスは, 制御性T細胞全体を欠損させたマウスと酷似した様々な自己免疫病, 高免疫グロブリン血症を高率に発症した。試験管内での抑制活性も顕著に低下していた。また, この試験管内抑制の分子機構として, 抗原提示細胞上に発現する副刺激分子 CD80, CD86 の発現抑制が重要との結果を得た。以上の知見は, CTLA-4 が, 制御性T細胞による抑制を媒介する重要分子であることを意味する。

2. 自己免疫, 腫瘍免疫, 移植免疫の基礎的研究

内在性制御性T細胞の増殖あるいは抑制機能の強化を図り, 自己免疫病の予防・治療, 移植臓器の拒絶反応の抑制, 移植免疫寛容の導入が可能である。上述のように, 制御性T細胞特異的 CTLA-4 欠損マウスは, 様々な自己免疫病を自然発症する。同時に, このマウスは, 自家腫瘍を強力に拒絶する。即ち, 制御性T細胞に発現する CTLA-4 を介して, 自己免疫のみならず腫瘍免疫応答の制御が可能である。

移植免疫について, 現在までに, 移植臓器の拒絶に働くエフェクターT細胞との均衡を後者の優勢に導けば, 移植免疫寛容が成立するとの実験事実を示してきた。今年度, 抗原刺激に際し, 抗 CD4 抗体が, 制御性T細胞と比較して, エフェクターT細胞の増殖をより抑制する結果, 相対的に抗原特異的制御性T細胞の増加に至り, 免疫寛容を誘導できるとの結果を得た。さらに, 抗 CD40L 阻害抗体, また免疫抑制剤 rapamycin にも同様の効果があることを示した。

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

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マウスモデル (SKG マウス) を確立し, その原因・発症機構を解析している。本年度, 関節炎を惹起できるT細胞クローンを複数確立し, これらのクローンの免疫学的性状を解析した。興味深いことに, いずれも, 関節炎のみならず間質性肺炎をも惹起した。すなわち, ヒトの関節リウマチに見られる間質性肺炎の発症機構は従来不明とされてきたが, 関節炎と同様の機序で自己免疫性肺炎が起き得る可能性を示した。さらに, このモデルにおける制御性T細胞の関与を解析し, その異常が関節炎発症に寄与する可能性を示した。

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.

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 basis of the suppressive function of Tregs. We established conditional knockout (KO) mice in which Cre was expressed under the Foxp3 promoter and the CTLA-4 gene was floxed. The Treg-specific CTLA-4 conditional KO mice thus prepared spontaneously developed severe autoimmune diseases, including autoimmune myocarditis, and hyper-globulinemia E, suggesting that they are prone

to develop not only autoimmune disease but also allergy. CTLA-4-deficient Tregs also showed impaired suppressive function in vitro. Notably, the mice exhibited strong tumor immunity against syngeneic tumors. These results collectively indicate that CTLA-4 play a crucial role in Treg-mediated suppression and that blockade of CTLA-4 can enhance immune responses, including tumor immunity, via attenuating Treg-mediated suppression. In addition to these studies on autoimmunity and tumor immunity by utilizing CTLA-4 CKO mice, we have attempted to induce transplantation tolerance in normal animals by tipping the balance between antigen-specific Tregs and effector T cells towards the dominance of the former. We showed that cell-nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody (mAb), anti-CD40L blocking mAb, and also rapamycin, an immunosuppressive drug, can all suppress the proliferation of effector T cells more potently than antigen-reactive Foxp3⁺ natural Tregs, enriching the latter and thereby establishing transplantation tolerance. This preparation of Treg dominance by exploiting the differences in the sensitivity of Tregs and effector T cells to various reagents is, we believe, a general mechanism of transplantation tolerance.

We are also investigating the cause and pathogenetic mechanism of rheumatoid arthritis (RA) by analyzing a mouse model (called SKG mice) established in our laboratory. SKG mice, which have a mutation of the gene encoding ZAP-70, a T cell-specific signaling molecule, spontaneously develop autoimmune arthritis chiefly mediated by IL-17-secreting CD4⁺ T cells. This year, we established T cell clones from arthritis lesions of SKG mice and showed that they were able to elicit arthritis when transferred to syngeneic T cell-deficient athymic nude mice. Interestingly, these clones induced not only arthritis but also interstitial pneumonitis, indicating a single self-reactive specificity can cause both diseases. The results provide novel insights into the mechanism of RA-associated interstitial pneumonitis, whose cause and mechanism has been clinically obscure and will contribute to designing therapeutic measures to both diseases.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura and S. Sakaguchi, : CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* **322**: 271-275, 2008
- S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura and M. Ono: Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**: 775-787, 2008
- Y. Onishi, Z. Fehervari, T. Yamaguchi and S. Sakaguchi: Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **29**: 10113-10118, 2008
- S. Sakaguchi: Regulatory T cells in the past and for the future. *Eur. J. Immunol.* **38**: 901-937, 2008
- K. Nagahama, Z. Fehervari, T. Oida, O. Ogawa and S. Sakaguchi: Differential control of alloantigen-specific regulatory T cells and effector T cells by anti-CD4 and other agents in establishing transplantation tolerance. *Int. Immunol.* In press.
- C. Wakasa-Morimoto, T. Toyosaki-Maeda, T. Matsutani, R. Yoshida, S. Nakamura-Kikuoka, M. Maeda-Tanimura, H.

- Yoshitomi, K. Hirota, H. Hashimoto, H. Masaki, F. Fujii, T. Sakata, Y. Tsuruta, R. Suzuki, N. Sakaguchi and S. Sakaguchi: Arthritis and pneumonitis produced by the same T-cell clones from mice with spontaneous autoimmune arthritis. *Int. Immunol.* **20**: 1331-1342, 2008
- M. Miyara, K. Wing and S. Sakaguchi: Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3⁺ regulatory T cell activation and expansion. *J. Aller. Clin. Immunol.* In press.
- M. Miyara and S. Sakaguchi: Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Encyclopedia of Molecular Medicine* In press.
- Z. Fehervari and S. Sakaguchi: T lymphocytes: Regulatory. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley Interscience, 2008. Available at www.els.net
- T. Sakiham, T. Sato, H. Iwanari, T. Kitamura, S. Sakaguchi, T. Kodama and T. Hamakubo: A simple detection method for low-affinity membrane protein interactions by baculoviral display. *PLoS ONE*. **3**(12): e4024, 2008
- N. Satoda, T. Shoji, Y. Wu, T. Fujinaga, F. Chen, A. Aoyama, J.T. Zhang, A. Takahashi, T. Okamoto, I. Matsumoto, H. Sakai, Y. Li, X. Zhao, T. Manabe, E. Kobayashi, S. Sakaguchi, H. Wada, H. Ohe, S. Uemoto, J. Tottori, T. Bando, H. Date, and T. Koshiba: Value of FOXP3 expression in peripheral blood as rejection marker after miniature swine lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant* **27**: 1293-301, 2008
- M. Yoshitomi, T. Koshiba, H. Haga, Y. Li, X. Zhao, D. Cheng, A. Miyagawa, H. Sakashita, T. Tsuruyama, M. Ueda, K. Wood, S. Sakaguchi T. Manabe, K. Tanaka and S. Uemoto: Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression following liver transplantation. *Transplantation* In press.
- Y. Li, X. Zhao, D. Cheng, H. Haga, T. Tsuruyama, K. Wood, S. Sakaguchi, K. Tanaka, S. Uemoto and T. Koshiba: The presence of FOXP3 expressing T cells within grafts of tolerance human liver transplant recipients. *Transplantation* In press
- S. Sharma, AL. Dominguez, SZ. Manrique, F. Cavallo, S. Sakaguchi and J. Lustgarten: Systemic targeting of CpG-ODN to the tumor microenvironment with anti-neu-CpG hybrid molecule and T regulatory cell depletion induces memory responses in BALB-neuT tolerant mice. *Cancer Res.* **68**: 7530-7540 (2008)

2) 総 説

- 坂口志文, 池田和真: 制御性T細胞. 今日の移植 Vol. 21: No. 3, 201-211 (2008).
- 前田伸治, 坂口志文: 制御性T細胞 (Treg) と IL-17 産生ヘルパー T細胞 (Th17) による免疫バランスとその制御. 医学のあゆみ Vol. 226 No. 4, 273-276 (2008)
- 大西 康, 坂口志文: 制御性T細胞と樹状細胞のクロストーク, 樹状細胞による免疫制御と臨床応用. 実験医学 Vol. 26 No. 20 (増刊): 75-81 (2008)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Kajsa Wing, Paz Prieto-Martin, Yasushi Onishi, Takashi Nomura and Shimon Sakaguchi: The role of CTLA-4 specifically for CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells *in vivo*. World Immune Regulation Meeting-II (2008.3.17-20 Davos Switzerland)
- Makoto Miyara, Tomoko Shima, Akihiko Kitoh, Yumiko Yosioka, Akira Niwa, Cecile Taflin, Toshio Heike, Dominique

- Valeyre, Alexis Mathian, Zahir Amoura, Tatsutoshi Nakahata, Tomoyuki Yamaguchi, Takashi Nomura Kajsa Wing, Guy Gorochoy, Masahiro Ono and Shimon Sakaguchi: Functional delineation and differentiation dynamics of FoxP3-expressing subpopulation of CD4⁺ T cell in humans. World Immune Regulation Meeting-II (2008.3.17-20 Davos Switzerland)
- 鬼頭昭彦, 小野昌弘, 直江吉則, 矢口浩子, 大倉永也, 北林一生, 塚田俊彦, 野村尚史, 宮地良樹, 谷内一郎, 坂口志文: Foxp3⁺ 制御性T細胞の生体内抑制機能には Runx complex が必須である. 第18回 Kyoto T Cell Conference (2008.6.13-14. 京都)
- 前田伸治, 秋月修治, 橋本 求, 野村尚史, 坂口教子, 坂口志文: TCR シグナル伝達の補正による SKG マウス 自己免疫性関節炎の発症抑制, 第18回 Kyoto T Cell Conference (2008.6.13-14. 京都)
- 山口智之, 岸 歩美, 坂口志文: Foxp3 による免疫制御のメカニズム/How does Foxp3 control Treg suppression? 第38回日本免疫学会学術集会 (2008.12.1-3. 京都)
- Akihiko Kitoh, Masahiro Ono, Yoshinori Naoe, Hiroko Yaguchi, Naganari Ohkura, Issei Kitabayashi, Toshihiko Tsukada, Takashi Nomura, Yoshiki Miyachi, Ichiro Taniuchi and Shimon Sakaguchi: Runx 複合体は CD4⁺ FoxP3⁺ 制御性T細胞の生体内抑制活性に必須である/Runx complexes are required for CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T-cell function *in vivo*, 第38回日本免疫学会学術集会 (2008.12.1-3. 京都)
- Paz Prieto-Martin, Kajsa Wing, Tomoyuki Yamaguchi, Takashi Nomura and Shimon Sakaguchi: CTLA-4 expression on Foxp3⁺ regulatory T cells plays a key role in tumor immunity and autoimmunity, 第38回日本免疫学会学術集会 (2008.12.1-3. 京都)
- 野村尚史, 秋月修治, 前田伸治, 橋本 求, 斉藤 隆, 坂口教子, 坂口志文: TCR シグナル不全による制御性T細胞分化障害と自己免疫病の発症・Autoimmune disease caused by Treg insufficiency due to defective TCR signaling, 第38回日本免疫学会学術集会 (2008.12.1-3. 京都)
- 橋本 求, 廣田圭司, 吉富啓之, 前田伸治, 寺平 晋, 野村尚史, 坂口教子, 岩倉洋一郎, 三森経世, 坂口志文: SKG マウスの関節炎発症における dectin-1 依存的, 非依存的な経路の解析/Dectin-1-dependant and -independent pathway for the induction of arthritis in SKG mice, 第38回日本免疫学会学術集会 (2008.12.1-3. 京都)
- 前田伸治, 田中 聡, 廣田圭司, 橋本 求, 寺平 晋, 秋月修治, 野村尚史, 上田龍三, 坂口教子, 坂口志文: TCR シグナル伝達の補正による SKG マウス自己免疫性関節炎の発症抑制/Rescue of autoimmune arthritis in SKG mice by normalization of TCR signal transduction, 第38回日本免疫学会学術集会 (2008.12.1-3. 京都)
- Yoshinaga Ito, Takashi Usui, Shio Kobayashi, Mikiko Iguchi, Hiromu Ito, Hiroyuki Yoshitomi, Takashi Nakamura, Motomu Hashimoto, Noriko Sakaguchi, Shimon Sakaguchi and Tuneyo Mimori: $\gamma\delta$ T 細胞はコラーゲン誘発性関節炎局所における主要な IL-17 産生細胞である/Gamma delta T cells are the predominant IL-17-producing cells in affected joint of collagen-induced arthritis, 第8回日本免疫学会学術集会 (2008.12.1-3. 京都)
- 荒川明子, 小野昌弘, 藤井弘子, 中村元信, 坂口志文, 宮地良樹: 円形脱毛症患者の制御性T細胞減少/Altered frequency of regulatory T cells in alopecia areata patient, 第38回日本免疫学会学術集会 (2008.12.1-3. 京都)
- 山口智之, Paz Prieto-Martin, Kajsa Wing, 大西 康, 坂口志文: 制御性T細胞による免疫制御の機序「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第5回(最終)公開シンポジウム (2008.12.15. 品川)
- 小野昌弘, 鬼頭昭彦, 直江吉則, 矢口浩子, 大倉永也, 北林一生, 塚田俊彦, 野村尚史, 宮地良樹, 谷内一郎, 坂口志文: Foxp3⁺ と AML1/Runx1 の相互作用による制御性T細胞の機能制御, 「免疫難病・感染症等の先進

医療技術」第5回（最終）公開シンポジウム（2008.12.15. 品川）

前田伸治, 田中 聡, 廣田圭司, 橋本求, 寺平 晋, 秋月修治, 野村尚史, 上田龍三, 坂口教子, 坂口志文：
TCR シグナル伝達の補正による SKG マウス自己免疫性関節炎の発症抑制「免疫難病・感染症等の先進医療
技術」第5回（最終）公開シンポジウム（2008.12.15. 品川）

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, 富山大学医学部大学院特別セミナー（2008.1.7. 富山）

坂口志文：関節リウマチとT細胞異常, 第12回リウマチフォーラム（2008.1.19. 東京）

坂口志文：制御性T細胞と免疫寛容, 東京大学2008年基礎統合講義（2008.2.6. 東京）

Shimon Sakaguchi: The Role of Natural Regulatory T Cells in Autoimmunity, 12th International Conference on
Lymphocyte Activation and Immune Regulation (2008.2.8-10. California, USA)

坂口志文：制御性T細胞と自己免疫病, 第8回神経・筋の免疫疾患を考える会（2008.2.23. 大阪）

山口智之：CD25⁺CD4⁺ 制御性T細胞と腫瘍免疫, 第5回日本免疫治療学研究会学術集会（2008.3.1. 横浜）

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for self-tolerance and immune homeostasis, "Immunology and Imaging", Kick-
off Symposium of WPI Immunology Frontier Research Center (2008.3.27-28. Osaka)

Shimon Sakaguchi: Role of regulatory T cells in tolerance and autoimmunity, EurAPS International Symposium on
Molecular Background of Tolerance and Autoimmunity (2008.4.10. Helsinki, Finland)

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御, 第6回愛知免疫アレルギーを語る会（2008.5.9. 名古屋）

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for self-tolerance and immune homeostasis, 2nd International Conference on
Cutaneous Lupus Erythematosus (2008.5.11-13. Kyoto)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis, International Investigative
Dermatology 2008 (2008.5.14-17. Kyoto)

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御, 第12回京都分子血液フォーラム（2008.6.21. 京都）

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御, 第4回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム（2008.7.
11. 広島）

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御, 第23回老化促進モデルマウス（SAM）研究協議会（2008.7.17-18.
京都）

坂口志文：からだを守る免疫の不思議, 京都大学再生医科学研究所第3回公開講演会（2008.7.26. 京都）

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御, 第13回京都外科侵襲研究会（2008.8.2. 京都）

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御, 日本免疫学会免疫サマースクール2008（2008.8.24-27. 淡路島）

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for self-tolerance and immune homeostasis, 13th Congress of the Asia Pacific
League of Association for Rheumatology (APLAR2008) (2008.9.23-27. Yokohama)

坂口志文：制御性T細胞を標的とした癌免疫の可能性について, 癌治療開発を目指した最前線セミナー（2008.9.
25. 東京）

Shimon Sakaguchi: The role of CTLA-4 in self-tolerance and immune homeostasis mediated by regulatory T cells,
The 10th International Symposium on Dendritic Cells (2008.10.1-5. Kobe)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis, The 11th Kyoto University
International Symposium 2008 Frontier Bioscience in Modern Medicine (2008.10.9-11. Shanghai China)

Masahiro Ono: The molecular basis of the function of Foxp3-expressing regulatory T cells, The 4th International

Conference on Gene Regulation in Lymphocyte Development (2008.10.11-16, Rhodes Greece)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis, The 4th Congress of the Federation of Immunology Societies of Asia-Oceania 2008 (2008.10.17-20, Taipei Taiwan)

Shimon Sakaguchi: Keynote Lecture: Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis, International Conference on Regulatory T Cells and Clinical Application in Human Diseases (2008.10.25-27, Beijing China)

Shimon Sakaguchi: T Reg Cells, Primer on Tumor Immunology and Biological Therapy of Cancer, iSBTc (2008.10.30, San Diego USA)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis, International Conference on Immune Regulation in Health and Disease, Japan-German Immunology Seminar 2008 (2008.11.3-6, 福岡)

坂口志文: 制御性T細胞による免疫応答制御, 特に腫瘍免疫について, 第2回21世紀血液免疫研究会 (2008.11.8, 東京)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells: Key controllers of immune responses, The 7th Kimishige and Teruko Ishizaka Lecture in Immunology 2008, La Jolla Institute for Allergy and Immunology (2008.11.12, La Jolla USA)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for the control of immunological diseases, 2008 Keio Medical Science Prize Commemorative Symposium (2008.11.22, 東京)

坂口志文: 制御性T細胞による免疫恒常性の維持, 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2008.11.27-29, 東京)

Tomoyuki Yamaguchi: Construction of Treg cells without Foxp3, 第38回日本免疫学会学術集会 (2008.12.1-3, 京都)

Shimon Sakaguchi: Development and function of Foxp3-expressing regulatory T cells for self-tolerance and immune homeostasis, BMB2008 (2008.12.9-12, 神戸)

坂口志文: 制御性T細胞による免疫応答制御, 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第5回(最終)公開シンポジウム (2008.12.15, 品川)

坂口志文: 制御性T細胞による免疫応答制御, 第2回三重造血器・固形腫瘍免疫研究会 (2008.12.19, 津)

坂口志文: 制御性T細胞による免疫応答制御, 大阪大学大学院セミナー (2008.12.22, 吹田)

◆ 受 賞 ◆

2008年度 慶応医学賞

生体システム制御学分野

Department of Immunobiology and Hematology

分野主任 教授 長澤 丘司

Prof. Takashi Nagasawa

【研究概要】

造血幹細胞は、骨髄で、リンパ球を含むすべての血液細胞を一生にわたり恒常的に産生し続ける代表的な組織幹細胞であり、血液学や幹細胞生物学の研究対象として重要であるだけでなく、臨床医学においては再生医療における細胞移植療法のプロトタイプである骨髄幹細胞移植に用いられ、白血病をはじめとする悪性腫瘍（がん）の薬剤による完全治癒に大いに貢献している。造血幹細胞は、骨髄の中に想定されているニッチ（臓器内で必須の分子を供給する特別な微小環境）で、必須の分子を産生するストローマ細胞と呼ばれる由来が不明の間質細胞により維持されていると推測されて来た。2003年に Li らは骨辺縁の骨芽細胞が造血幹細胞ニッチであると報告したが、2005年に Morrison らは、造血幹細胞を濃縮する分画の可視化に成功し、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し、骨辺縁の造血幹細胞は少数であると報告した。しかし、いずれの報告においても、造血幹細胞が十分に可視化されたとは言い切れない他、ニッチ細胞の機能も証明されておらず、ニッチが産生する造血幹細胞の増殖や維持に必須のシグナルも十分明らかでない。

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、胎児肝、骨髄での B リンパ球の産生や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）に必須であることを明らかにし、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、CXCL12 を高発現する細胞が胎児骨髄の血管周囲に局在し、造血幹細胞のホーミングにおけるニッチとして働いている可能性を示した（T. Nagasawa, et al., *Nature* **382**: 635-638 (1996) ; K. Tachibana, et al., *Nature* **393**: 591-594 (1998) ; T. Egawa, et al., *Immunity* **15**: 323-334 (2001) ; T. Ara, et al., *Immunity* **19**: 257-267 (2003)）。また、成体骨髄においては、間質の細網細胞（ストローマ細胞）の一部に CXCL12 を高発現する細胞（以下 CXCL12-abundant reticular (CAR) 細胞）が存在することを見出し、早期の B リンパ球前駆細胞や、二次リンパ器官で抗原と反応することにより最終分化し骨髄に戻ってくる形質細胞（抗体産生に特化した細胞）、未分化造血細胞分画の大部分の細胞が CAR 細胞に接着していることを見出した（K. Tokoyoda, et al., *Immunity* **20**: 707-718 (2004)）。

さらに、CXCL12 欠損マウスと CXCR4 欠損マウスは胎生期に致死であるため、誘導性遺伝子欠損マウスシステムを用いて成体の CXCR4 遺伝子を欠損させることにより、CXCL12-CXCR4 シグナルが、成体骨髄での造血幹細胞数の維持に必須であることを明らかにした。一方、造血幹細胞を濃縮する分画内の細胞が、一部の骨辺縁付近に局在する細胞を含むその大部分が CAR 細胞と接着していること、洞様毛細血管の大部分は CAR 細胞に取り囲まれていることを示し、骨髄腔内にびまん性に分布し CXCL12 を高発現する CAR 細胞が造血幹細胞ニッチの本質的な構成細胞であることを示唆した（T. Sugiyama, et al., *Immunity* **25**: 977-988 (2006)）。

しかし、私たちの研究を含め、これまでの造血幹細胞ニッチと造血幹細胞の局在を報告した論文では、造血幹細胞を含むがより多くの前駆細胞を含む細胞分画を観察したものであり、造血幹細胞そのものを可視化したとは言いにくい。また、上述した Morrison らの造血幹細胞可視化法は、複数の SLAM ファミリー分子（CD150, CD48,

CD41) をマーカーとして用いるが、陽性細胞と陰性細胞の区別が容易でなく技術的にも十分とは言えない。そこで、本年、私たちは、造血幹細胞をより確実に可視化し、造血幹細胞とそのニッチの骨髄における局在を解明するため、造血幹細胞に特異的に発現する遺伝子のプロモーターを用いた造血幹細胞可視化法の検証を進めている。また、私たちが造血幹細胞ニッチの重要な構成細胞であると提唱している CAR 細胞がどのような細胞であるかについての研究をも進行させている。従来の骨髄の付着系の細胞は、その解析の大部分が単一細胞レベルではなく細胞集団を用いた解析であり、種々の遺伝子発現や分化能を持つ細胞が混在している可能性が除外できないので、それらの性状は明確となっていないのが現状である。そこで私たちは、CAR 細胞の本態を明らかにするため CAR 細胞の遺伝子発現や性状、分化能を細胞一個レベルで解析している。

一方、これまでの私たちの知見から、CAR 細胞は、造血幹細胞、B リンパ球（前駆細胞、形質細胞）、形質細胞様樹状細胞（pDC）など複数の血液細胞種のニッチとして働いていることが明らかになってきた。これより、複数の血液細胞種が CAR 細胞とどのように相互作用するのか、CAR 細胞ニッチの中に細胞種特異的部位が存在するのかという興味深い問題が生じてきた。B リンパ球は骨髄で産生された後、二次リンパ組織へ移動し、そこでさらに成熟し、成熟 B リンパ球の一部は骨髄に戻り免疫監視を担う。2008 年 Jung らは、樹状細胞を特異的に欠損させると骨髄の成熟 B リンパ球数が著明に減少すること、骨髄の樹状細胞と成熟 B リンパ球が洞様毛細血管周囲に局在することを見出し、骨髄の洞様毛細血管周囲の樹状細胞が成熟 B リンパ球のニッチとして働いていると報告した（A. Sapoznikov, et al., *Nat. Immunol.* **9**: 388-395 (2008)）。この知見と、大部分の洞様毛細血管が CAR 細胞の突起に取り囲まれていること、骨髄の成熟 B リンパ球は CXCL12-CXCR4 シグナルを必要とするという既知の知見を考え合わせ、私たちは、洞様毛細血管の周囲の樹状細胞の近傍に局在する CAR 細胞は、樹状細胞と共に成熟 B リンパ球のニッチを形成する、すなわち、異なるニッチ細胞との組み合わせの特異性が CAR 細胞のニッチ機能の特異性を規定しているという仮説を提唱した（T. Nagasawa, *Nat. Immunol.* **9**: 345-346 (2008)）。

Chemokines are a family of small structurally related molecules that are thought to regulate cell trafficking. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12), also known as stromal cell-derived factor and pre-B-cell growth stimulating factor (SDF-1/PBSF) and its primary receptor CXCR4 are essential for colonization of bone marrow by hematopoietic cells including hematopoietic stem cells (HSCs) during ontogeny and development of B lymphocytes (T. Nagasawa, et al., *Nature* **382**: 635-638 (1996); K. Tachibana, et al., *Nature* **393**: 591-594 (1998); T. Egawa, et al., *Immunity* **15**: 323-334 (2001); T. Ara, et al., *Immunity* **19**: 257-267 (2003)). In recent years, we have revealed that a small population of stromal cells expressing high amounts of CXCL12, which we call CXCL12-abundant reticular (CAR) cells were scattered throughout adult bone marrow and that the early B cell precursors and the end-stage B lymphocytes, plasma cells were attached to CAR cells, suggesting that CAR cells function as the special microenvironments 'niches' for B lymphocytes (K. Tokoyoda, et al., *Immunity* **20**: 707-718 (2004)).

On the other hand, it has been reported that HSCs reside near bone surfaces and/or near the vasculature in the marrow. However, the nature and molecular regulatory mechanism of niches for HSC maintenance remains unclear. Recently, we have shown that the induced deletion of CXCR4 in adult mice resulted in severe reduction of HSC numbers. Most cells in HSC fractions were found in contact with CAR cells, some of which surrounded sinusoidal endothelial cells or were located near the endosteum. These findings indicate that CXCL12-CXCR4 signaling plays an essential role in maintaining the quiescent HSC pool and suggest that CAR cells are also a key component of HSC niches, including both vascular and endosteal niches in adult bone marrow (T. Sugiyama, et al., *Immunity* **25**:@

977-988 (2006)). These raise a question what is the nature of CAR cells. To address this issue and the possibility that distinct kinds of cells are included in the CXCL12/GFP^{hi} CAR cell fraction, we are analyzing the expression of various lineage specific genes in CAR cells and characteristics of CAR cells at the single cell level.

Furthermore, our findings that CAR cells function as the niches for HSCs, B cells, including earliest precursors and plasma cells and plasmacytoid dendritic cells (pDCs), which are thought to play central roles in antiviral immunity (K. Tokoyoda, et al., *Immunity* **20**: 707-718 (2004); T. Sugiyama, et al., *Immunity* **25**: 977-988(2006); H. Kohara, et al., *Blood* **110**: 4153-4160 (2007)) raise another question how CAR cells regulate distinct kinds of blood cells. In 2008, Jung and colleagues have shown that perivascular clusters of dendritic cells (DCs) function as niches for mature B cells in the bone marrow (A. Sapozhnikov, et al., *Nat. Immunol.* **9**: 388-395 (2008)). Considering that CXCR4 is essential for bone marrow mature B cells and that most vascular sinuses in the bone marrow are surrounded by CAR cells, perivascular CAR cells near DCs might function as niches for mature B cells. In this case, several types of cells supply the different requisite factors and constitute specific niches for mature B cells in the bone marrow although endothelial cells-derived essential factors are unclear. Thus we hypothesized that a combination of cellular components of niches might determine the specificity of niche-blood cell interaction (T. Nagasawa, *Nat. Immunol.* **9**: 345-346 (2008)).

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- T. Nagasawa: New niches for B cell. *Nat. Immunol.* **9**: 345-346 (2008)
- S. Mikami, H. Nakase, S. Yamamoto, Y. Takeda, T. Yoshino, K. Kasahara, S. Ueno, N. Uza, S. Oishi, N. Fujii, T. Nagasawa and T. Chiba: Blockade of CXCL12/CXCR4 axis ameliorates murine experimental colitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **327**: 383-392 (2008)
- DH. Tanaka, M. Yanagida, Y. Zhu, S. Mikami, T. Nagasawa, J. Miyazaki, Y. Yanagawa, K. Obata and F. Murakami: Random walk behavior of migrating cortical interneurons in the marginal zone: time-laps analysis in flat-mount cortex. *J. Neurosci.* (in press)

2) 和文総説

- 長澤丘司: ケモカイン SDF-1/PBSF 私の発見体験記. *実験医学* **26**(13): 2142-2144 (2008)
- 長澤丘司, 杉山立樹: 造血幹細胞のストローマ性ニッチ. *細胞工学* **27**(7): 670-675 (2008)
- 長澤丘司, 杉山立樹: 造血幹細胞のニッチとケモカイン CXCL12. *実験医学* **26**(5) (増刊): 93-99 (2008)
- 長澤丘司: 造血幹細胞の最近の進歩—造血幹細胞のホーミング. *再生医療* **7**(2): 67-72 (2008)
- 長澤丘司: 骨髄の造血幹細胞ニッチとケモカイン CXCL12. *腎と骨代謝* **21**(1): 51-60 (2008)

◆ 学会等の発表 ◆

招待講演

- T. Nagasawa: The chemokine CXCL12-CXCR4 signaling and niches for hematopoietic stem cell and B cell

- development. 第3回研究所ネットワーク国際シンポジウム (2008.2.2. 別府)
- 長澤丘司：血液免疫学の最新状況と今後のあり方に関する講演，“造血幹細胞，リンパ球のニッチとケモカイン CXCL12”. 千葉大学医学部 (2008.6.3. 千葉)
- T. Nagasawa: Osteoimmunology, CXCL12 and bone marrow niches for hematopoietic stem cells and lymphocytes. 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, Symposium (2008.9.25. Yokohama, Japan)
- T. Nagasawa: The chemokine CXCL12 and bone Marrow niches for hematopoietic stem cells and lymphocytes. The 11th Kyoto University International Symposium 2008 (2008.12.10. Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai, China)
- 長澤丘司：造血幹細胞・Bリンパ球ニッチとケモカイン CXCL12/CXCR4 シグナル. 関西医科大学大学院企画セミナー (2008.11.21. 守口)
- 長澤丘司：“組織幹細胞とニッチ”，“造血幹細胞のニッチとケモカイン CXCL12”. 第31回日本分子生物学会年会，第81回日本生化学会大会合同大会，シンポジウム (2008.12.10. 神戸)
- T. Nagasawa: The chemokine CXCL12 and bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. Annual Symposium in Immunology in honor of Prof. Michael Sela (2008.12.14. The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel)

生体再建学分野

Department of Tissue Reconstruction

客員准教授 池川 志郎

Visiting Assoc. Prof. Shiro Ikegawa

【研究概要】

変形性関節症，椎間板ヘルニア，後縦靱帯骨化症，強直性脊椎炎といった骨・関節の難病，生活習慣病の遺伝的要因を明らかにすることを目指している。これらの疾患は，いずれも多くを苦しめている「ありふれた」疾患 (common disease) である。たとえば，変形性関節症は，我が国だけでも，1,000万人以上もの患者がいる。椎間板ヘルニアで手術を受ける患者は年間5万人以上である。これら骨・関節の common disease/生活習慣病は，痛みや関節の機能障害のために多くの患者の QOL を損なっている。また，加齢と共にその頻度が急速に増大するものが多く，高齢化社会の到来と共に，病気に苦しむ患者だけでなく，社会全体にとっても大きな問題になっている。しかし，どれも目下の所，根本的な治療手段がない。

これらの疾患は，複数の遺伝因子（疾患感受性遺伝子）と環境因子（運動，栄養などの）の相互作用により発症する多因子遺伝病と考えられる。分子遺伝学，ゲノム医学の手法を用いて，目の前の現実の患者の病気を出発点に，感受性遺伝子を同定し，分子レベルで病態を解明し，画期的な診断法・治療法を開発したい。またその過程で，骨格の形成や骨・軟骨の成長，発達のメカニズムを解明していきたい。

Recent advance in molecular genetics has revealed genetic factors, play a critical role in etiology and

pathogenesis of "common" diseases. Our goal is to clarify the genetic factors implicated in the etiology of common bone and joint diseases including osteoarthritis. Though genetic analysis including genome-wide linkage and association studies, we will identify and characterize susceptibility genes of the diseases and clarify their molecular mechanism.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

原著論文

- N. Fukui, Y. Miyamoto, M. Nakajima, Y. Ikeda, A. Hikita, H. Furukawa, H. Mitomi, N. Tanaka, Y. Katsuragawa, S. Yamamoto, M. Sawabe, T. Juji, T. Mori, R. Suzuki and S. Ikegawa: Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* **58**(12): 3843-3853 (2008)
- T. Fukada, N. Civic, T. Furuichi, S. Shimoda, K. Mishima, H. Higashiyama, Y. Idaira, Y. Asada, H. Kitamura, S. Yamasaki, S. Hojyo, M. Nakayama, O. Ohara, H. Koseki, HG. Dos Santos, L. Bonafe, R. Ha-Vinh, A. Zankl, S. Unger, ME. Kraenzlin, JS. Beckmann, I. Saito, C. Rivolta, S. Ikegawa, A. Superti-Furga and T. Hirano: The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS ONE* **3**(11): e3642 (2008)
- J. Dai, D. Shi, P. Zhu, J. Qin, H. Ni, Y. Xu, C. Yao, L. Zhu, H. Zhu, B. Zhao, J. Wei, B. Liu, S. Ikegawa, Q. Jiang and Y. Ding: Association of a single nucleotide polymorphism in growth differentiate factor 5 with congenital dysplasia of the hip: a case-control study. *Arthritis Res Ther* **10**(5): R126 (2008)
- D. Shi, H. Ni, J. Dai, J. Qin, Y. Xu, L. Zhu, C. Yao, Z. Shao, D. Chen, Z. Xu, L. Yi, S. Ikegawa and Q. Jiang: Lack of association between the CALM1 core promoter polymorphism (-16C/T) and susceptibility to knee osteoarthritis in a Chinese Han population. *BMC Med Genet* **9**: 91 (2008)
- R. Dieguez-Gonzalez, M. Calaza, D. Shi, I. Meulenbelt, J. Loughlin, A. Tsezou, J. Dai, KN. Malizos, EP. Slagboom, M. Kloppenburg, K. Chapman, Q. Jiang, D. Kremer, JJ. Gomez-Reino, N. Nakajima, S. Ikegawa and A. Gonzalez: Testing the druggable EDG2 knee OA genetic factor for replication in a wide range of sample collections. *Ann Rheum Dis.* (2008)
- Y. Miyamoto, D. Shi, M. Nakajima, K. Ozaki, A. Sudo, A. Kotani, A. Uchida, T. Tanaka, N. Fukui, T. Tsunoda, A. Takahashi, Y. Nakamura, Q. Jiang and S. Ikegawa: Common variants in DVWA on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis. *Nat Genet* **40**(8): 994-998 (2008)
- MJ. Rock, J. Prenen, VA. Funari, TL. Funari, B. Merriman, SF. Nelson, RS. Lachman, WR. Wilcox, S. Reyno, R. Quadrelli, A. Vaglio, G. Owsianik, A. Janssens, T. Voets, S. Ikegawa, T. Nagai, DL. Rimoim, B. Nilius and DH. Cohn: Gain-of-function mutations in TRPV4 cause autosomal dominant brachyolmia. *Nat Genet* **40**(8): 999-1003 (2008)
- A. Miyake, G. Nishimura, T. Futami, H. Ohashi, K. Chiba, Y. Toyama, T. Furuichi and S. Ikegawa: A compound heterozygote of novel and recurrent DTDST mutations results in a novel intermediate phenotype of Desbuquois dysplasia, diastrophic dysplasia, and recessive form of multiple epiphyseal dysplasia. *J Hum Genet* **53**(8): 764-768 (2008)

- S. Mori, I. Kou, H. Sato, M. Emi, H. Ito, T. Hosoi and S. Ikegawa: Association of genetic variations of genes encoding thrombospondin, type 1, domain-containing 4 and 7A with low bone mineral density in Japanese women with osteoporosis. *J Hum Genet* **53**(8): 694-697 (2008)
- D. Shi, T. Nakamura, M. Nakajima, J. Dai, J. Qin, H. Ni, Y. Xu, C. Yao, J. Wei, B. Liu, S. Ikegawa and Q. Jiang: Association of single-nucleotide polymorphisms in RHOB and TXNDC3 with knee osteoarthritis susceptibility: two case-control studies in East Asian populations and a meta-analysis. *Arthritis Res Ther* **10**(3): R54 (2008)
- A. Tsezou, T. Furuichi, M. Satra, P. Makrythanasis, S. Ikegawa and KN. Malizos: Association of KLOTHO gene polymorphisms with knee osteoarthritis in Greek population. *J Orthop Res* **26**(11): 1466-1470 (2008)
- Y. Hirose, K. Chiba, T. Karasugi, M. Nakajima, Y. Kawaguchi, Y. Mikami, T. Furuichi, F. Mio, A. Miyake, T. Miyamoto, K. Ozaki, A. Takahashi, H. Mizuta, T. Kubo, T. Kimura, T. Tanaka, Y. Toyama and S. Ikegawa: A functional polymorphism in THBS2 that affects alternative splicing and MMP binding is associated with lumbar-disc herniation. *Am J Hum Genet* **82**(5): 1122-1129 (2008)
- Ikegawa S.: Expression, regulation and function of asporin, a susceptibility gene in common bone and joint diseases. *Curr Med Chem* **15**(7): 724-728 (2008)
- I. Meulenbelt, JL. Min, S. Bos, N. Riyazi, JJ. Houwing-Duistermaat, HJ. van der Wijk, HM. Kroon, M. Nakajima, S. Ikegawa, AG. Uitterlinden, JB. van Meurs, WM. van der Deure, TJ. Visser, AB. Seymour, N. Lakenberg, R. van der Breggen, D. Kremer, CM. van Duijn, M. Kloppenburg, J. Loughlin and PE. Slagboom: Identification of DIO2 as new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum Mol Genet* **17**(12): 1867-1875 (2008)
- H. Mototani, A. Iida, M. Nakajima, T. Furuichi, Y. Miyamoto, T. Tsunoda, A. Sudo, A. Kotani, A. Uchida, K. Ozaki, Y. Tanaka, Y. Nakamura, T. Tanaka, K. Notoya and S. Ikegawa: A functional SNP in EDG2 increases susceptibility to knee osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet* **17**(12): 1790-1797 (2008)
- YQ. Song, KM. Cheung, DW. Ho, SC. Poon, K. Chiba, Y. Kawaguchi, Y. Hirose, M. Alini, S. Grad, AF. Yee, JC. Leong, KD. Luk, SP. Yip, J. Karppinen, KS. Cheah, P. Sham, S. Ikegawa and D. Chan: Association of the asporin D14 allele with lumbar-disc degeneration in Asians. *Am J Hum Genet* **82**(3): 744-747 (2008)
- T. Furuichi, K. Maeda, CT. Chou, YF. Liu, TC. Liu, Y. Miyamoto, A. Takahashi, K. Mori, K. Ikari, N. Kamatani, H. Kurosawa, H. Inoue, SF. Tsai and S. Ikegawa: Association of the MSX2 gene polymorphisms with ankylosing spondylitis in Japanese. *J Hum Genet* **53**(5): 419-424 (2008)
- K. Chapman, A. Takahashi, I. Meulenbelt, C. Watson, J. Rodriguez-Lopez, R. Egli, A. Tsezou, KN. Malizos, M. Kloppenburg, D. Shi, L. Southam, R. van der Breggen, R. Donn, J. Qin, M. Doherty, PE. Slagboom, G. Wallis, N. Kamatani, Q. Jiang, A. Gonzalez, J. Loughlin and Ikegawa S.: A meta-analysis of European and Asian cohorts reveals a global role of a functional SNP in the 5' UTR of GDF5 with osteoarthritis susceptibility. *Hum Mol Genet* **17**(10): 1497-1504 (2008)
- S. Unger, F. Antoniazzi, M. Brugnara, Y. Alanay, A. Caglayan, K. Lachlan, S. Ikegawa, G. Nishimura, B. Zabel, J. Spranger and A. Superti-Furga: Clinical and radiographic delineation of odontochondrodysplasia. *Am J Med Genet A* **146**(6): 770-778 (2008)
- Q. Jiang, D. Shi, M. Nakajima, J. Dai, J. Wei, KN. Malizos, J. Qin, Y. Miyamoto, N. Kamatani, B. Liu, A. Tsezou, T. Nakamura and Ikegawa S.: Lack of association of single nucleotide polymorphism in LRCH1 with knee osteoarthritis susceptibility. *J Hum Genet* **53**(1): 42-47 (2008)

◆ 学会等の発表 ◆

講演・シンポジウム

池川志郎：骨・関節疾患の遺伝子解析. 第21回日本軟骨代謝学会（2008.3.21. 京都）

池川志郎：骨・関節の炎症性疾患のゲノム解析. 第29回日本炎症・再生医学会（2008.7.10. 東京）

池川志郎：ゲノム科学研究の基礎と骨・関節疾患への応用. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会（2008.10.23. 奈良）

池川志郎：骨関節疾患のゲノム解析. 第1回基礎と臨床を結ぶ分子病態研究会（2008.10.11. 東京）

池川志郎：小児整形と遺伝子解析. 第4回あいち小児整形外科セミナー（2008.11.9. 愛知）

池川志郎：股関節疾患の遺伝子解析一日常臨床から分子病態へ. 宮城股関節研究会特別講演会（2008.12.13. 仙台）

S. Ikegawa: From Genome to Disease, Gene to Medicine: Identification of susceptibility genes for common bone and joint diseases and clarification of molecular pathogenesis. (Invited Lecture) (2008.1.18. Nanjing)

S. Ikegawa: Of Human, of Mouse: Integrated approach of human and mouse genetics toward bone and joint diseases. 「Invited Lecture」(2008.1.19. Nanjing)

S. Ikegawa: Association study of Bone and Joint Diseases. (Invited Lecture) (2008.1.20 Nanjing)

S. Ikegawa: From Human, from Mouse: Integrated approach of human and mouse genetics toward the gene for bone and joint diseases. 「The 17th International Rheumatology Symposium」(Invited lecture) (2008.4.22. Sapporo)

S. Ikegawa: From Human, from Mouse: Integrated approach of human and mouse genetics toward the gene for bone and joint diseases. 「Symposium on developmental genomics & skeletal research」(Invited lecture) (2008.5.5. HongKong)

S. Ikegawa: Genetic analysis of bone and joint diseases; From human, from mouse. 「From genome to bone and joint diseases」(Invited lecture) (2008.9.26. Yokohama)

S. Ikegawa: From genome to bone and joint diseases. 「APLAR 2008 JCR Clinical Course Lecture」(Invited lecture) (2008.9.26. Yokohama)

S. Ikegawa: Genomics analysis of bone and joint diseases: Integrated approach from human and mouse genetics toward the disease genes and molecular pathogenesis of the diseases. 「The International Symposium-Workshop on Advanced Bone and Joint Science (ABJS) Japan Society for the Promotion of Science」(2008.12.3. Tokyo)

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

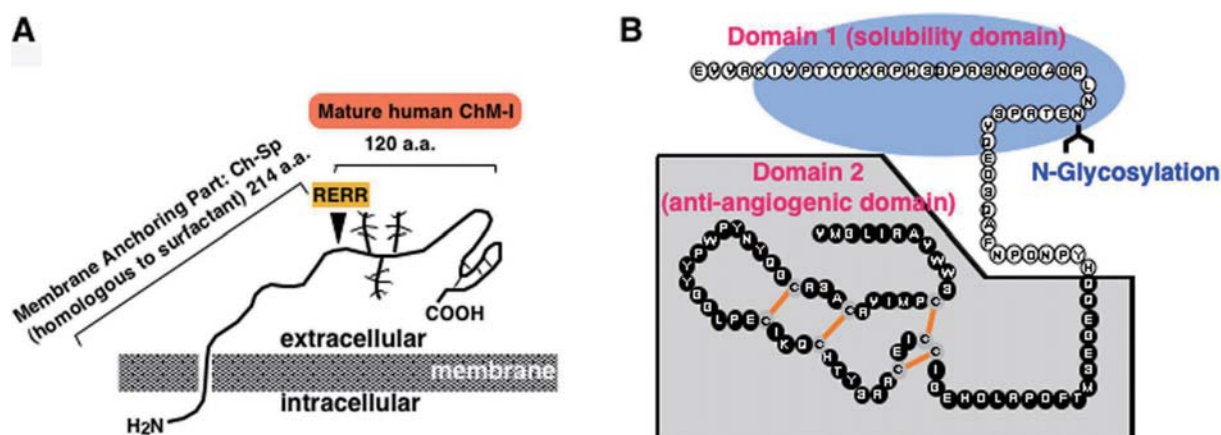
【研究概要】

本研究分野では、組織血管化、軟骨・腱・靱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、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) 骨折治癒過程における Chondromodulin-I の役割

我々は、ウシ胎仔骨端軟骨から軟骨細胞の増殖・分化成熟を正にモジュレートする因子として Chondromodulin-I (ChM-I) を精製・クローニングした。次いで、血管内皮細胞の増殖を阻害する分子をウシ胎仔骨端軟骨から精製し、血管新生因子として ChM-I を同定した。ChM-I は、II 型の膜貫通型蛋白質として合成され、4つのジスルフィド結合を有するC末端側の120アミノ酸残基（ヒト、マウス）が細胞外へ分泌される。ChM-I は軟骨、胸腺、眼、心臓弁の無血管領域に特異的に発現しているが、ChM-I 欠損 (ChM-I^{-/-}) マウスでは、発生過程においてこれ



ChM-I 前駆体と成熟型 ChM-I の構造

(A) ヒト ChM-I 前駆体は334アミノ酸からなる II 型膜貫通タンパク質である。Furin 様のプロセシング配列 (RERR, 矢頭) 部位で切断され、120アミノ酸からなる C 末端側が、成熟型 ChM-I として細胞外へ分泌される。(B) 成熟型ヒト ChM-I は、N-結合型糖鎖を含む N 末端側の可溶性ドメイン (D1 ドメイン) と C 末端側の疎水性ドメイン (D2 ドメイン) からなる。血管新生抑制活性を担う疎水性の D2 ドメインにある 8 つのシステイン残基は、脊椎動物の種間で極めてよく保存され 4 つのジスルフィド結合を形成している。

Human ChM-I precursor and mature ChM-I.

(A) Human ChM-I precursor is a type II transmembrane protein consisting of 334 amino acid residues. Mature ChM-I (120 amino acid residues) is secreted from chondrocytes after cleavage at a processing site (RERR, arrowhead) by proprotein convertases such as furin. A membrane anchored portion is designated as chondrosurfactant protein (Ch-SP). (B) Mature ChM-I is a 25-kDa glycoprotein that is composed of an N-terminal hydrophilic domain with a N-glycosylation site (solubility domain, domain 1) and a C-terminal hydrophobic anti-angiogenic domain (domain 2). Eight cysteine residues in domain 2 are well conserved across species.

らの組織形成に明らかな異常は見出されなかった。しかしながら、ChM-I^{-/-} マウスでは、出生後に低代謝回転型の骨代謝を示し骨の代謝バランスがシフトして骨量が増加することから、ChM-I は bone remodeling factor として作用することが新たに示唆された。また、老化した ChM-I^{-/-} マウスにおいて、血管侵入を伴う大動脈弁の石灰化、肥大化、或いは不整脈等、大動脈狭窄症の初期症状と似た症状が観察されることから、ChM-I が心臓弁の無血管性維持に直接関与することが明らかになっている。そこで、本年度は、C57BL/6 バックグラウンドの ChM-I^{-/-} マウス（9～10週齢）に創外固定器を装着後、右脛骨を骨折させて、骨折治癒過程における ChM-I の役割を明らかにした。野生型マウスでは、骨膜上に形成された軟骨性仮骨に、II 型コラーゲンや ChM-I を発現する細胞が出現し、X 型コラーゲンを発現する肥大化軟骨細胞へと分化成熟を遂げ、骨に置換されて骨折断端が癒合する。一方、ChM-I^{-/-} マウスでは、骨折部周囲の軟骨性仮骨の形成には影響がなかったが、骨膜上の軟骨性外仮骨の形成が著明に阻害され、骨折断端の癒合が顕著に遅延した。骨膜上の軟骨性外仮骨では、II 型コラーゲン、X 型コラーゲンの遺伝子発現の顕著な低下がみられ、軟骨細胞の肥大化が観察されなかった。興味深いことに、ChM-I^{-/-} マウスでは、軟骨性外仮骨の代わりに骨髄内に過剰な骨性内仮骨が形成されるが、骨折後10～21日にかけて TRAP 陽性、Mmp9 陽性の破骨細胞が増加すると、骨性内仮骨は再吸収された。以上の結果から、ChM-I は、骨膜由来の軟骨細胞の肥大化細胞への分化成熟に関与していることが示唆された。

2) Chondromodulin-I の代謝に関する研究

ChM-I はヒト、マウスでは334アミノ酸残基からなる膜貫通型前駆体のC末端部分としてコードされ、furin 認識切断部位 RERR でのプロセッシングと糖鎖修飾を受けることにより成熟型（120アミノ酸残基、分子量約 25 kDa）として細胞外に分泌される。一方、軟骨組織中には成熟型以外にも、その限定分解産物と考えられる short form ChM-I（分子量約 14 kDa）が検出される。我々はこの分子種を単離、同定すべく種々の抗ペプチド ChM-I 抗体および抗 ChM-I モノクローナルを作製した。その結果、14 kDa 分子種はドメイン2を主とするN末端欠失分子種（ΔNChM-I）であることが示唆された。また、組換え ChM-I は matrix metalloproteinase-13 によって、ドメイン1が切断された。今後、抗 ChM-I モノクローナル抗体を用いたアフィニティー精製により軟骨基質から 14 kDa ChM-I を精製して構造決定を行うとともに、ChM-I の代謝制御機構とその生理的意義を明らかにしていく。

2. Tenomodulin に関する研究

1) 心臓弁における Tenomodulin の発現とその役割

我々は、ChM-I の関連遺伝子として Tenomodulin (TeM) をクローニングし、ChM-I と高い相同性を有するシステイン残基に富むC末端領域に血管新生抑制活性があることを明らかにしてきた。TeM は腱、靱帯、筋上膜、角膜、強膜のような強靱結合組織において発現するが、最近、心臓の腱索においても発現することを新たに見出した。血管網の豊富な心臓の中にあって、ChM-I が発現する心臓弁と TeM が発現する腱索は例外的に無血管であり、これらの組織の血管化は様々な心疾患を惹起する。腱索は弁の機能を支持する組織であり、その断裂は僧帽弁閉鎖不全症の主たる要因であることが知られているが、腱索の断裂と血管新生との関係は不明な点が多い。腱索では、TeM は表層のエラスチン高発現層において高レベルで発現していた。腱索間質細胞の培養上清は *in vitro* において、血管内皮細胞の管腔形成および遊走を顕著に阻害し、これらの阻害活性は RNAi を用いた TeM のノックダウンにより部分的に消失した。従って、TeM は、腱索において血管新生抑制因子として機能することが示唆された。腱索が断裂すると TeM の発現が消失する一方で、vascular endothelial cell growth factor-A (VEGF-A) と matrix metalloproteinases (MMPs) が高いレベルで発現し、正常組織には観察されない血管新生と炎症性細胞の浸潤が認められた。さらに、腱索の TeM 発現層を除去すると、血管新生が亢進し VEGF-A および MMPs の発現

が検出されるようになった。以上の結果より、TeM の発現消失、血管新生および MMPs の活性化が腱索の断裂に相関していることが示唆された。

2) 腱・靱帯特異的な転写制御領域の解析

腱・靱帯は、骨格と筋肉、骨格と骨格とを結合し、運動機能の発現に不可欠の役割を果たしている。腱・靱帯は、栄養血管が極めて乏しいため、外傷などの瞬間的な外力によって、一旦、損傷すると、機能的、生体力学的に十分に再生させることは極めて困難である。これらの組織の機能障害は関節症などとも密接に関連しており、運動器の組織再生の重要な標的となっている。しかしながら、これまで、腱・靱帯細胞を特徴付ける特異的な分子マーカーが知られていなかったため、その分化誘導機構の解析はほとんどなされていなかった。一方、我々が ChM-I 関連遺伝子としてクローニングした Tenomodulin (TeM) は、II 型膜貫通型の血管新生抑制因子であり、腱・靱帯を含む強靱結合組織の分化に伴って特異的に発現する。そこで、腱・靱帯形成の分子機構の一端を明らかにすることを目指して、マウス TeM 遺伝子の組織特異的な発現制御を担う転写制御領域について解析を行っている。これまでに、CapSite Hunting 法により、TeM 遺伝子の転写開始点を、翻訳開始点の上流 -58 bp および -84 bp に同定し、その -25 bp 上流には TATA box 配列を見出した。初代トランスジェニックマウス胚を用いて、TeM 遺伝子の転写開始点上流 -11 kb から +11.6 kb までの領域についてエンハンサー活性の検定を行い、-11 kb から +3 kb までの領域に、腱・靱帯に特異的な転写制御活性があることを見出している。さらに、この領域を約 1 kb に細分化したゲノム DNA 断片を Luciferase レポーター遺伝子上流に導入し、*in vitro* で転写活性を検定した。ラットの四肢の腱から分離した腱細胞、線維芽細胞株 NIH3T3 および前駆軟骨細胞株 ATDC5 において解析した結果、TeM を発現している腱細胞でのみ活性が見られる領域が複数同定された。

3. 関節軟骨の修復に関する研究

血管に富み旺盛な再生能力をもつ骨組織とは対照的に、関節軟骨は、無血管である為に極めて修復が難しい組織である。一旦、関節軟骨が損傷されると、容易に変形性関節炎へ移行し、硝子軟骨による再生は極めて困難である。従って、関節軟骨は、運動器の中でも、組織再生の重要な標的となっている。関節軟骨全層欠損モデルでは骨髄由来未分化間葉系細胞が修復に関与しているが、欠損の大きさに依存して、線維組織で充填されるか硝子軟骨で充填されるかの二様の修復形態をとることが知られている。我々は、この *in vivo* モデルを用いて、関節軟骨の再生制御に関する基礎研究を展開し、欠損部に遊走する骨髄由来未分化間葉系細胞の凝集領域の形成が再生修復の誘導に極めて重要である事を示した。また、副甲状腺ホルモン受容体 1 (PTHr1) が修復組織に誘導される軟骨前駆細胞の細胞表面マーカーとして有用である事も明らかにした。さらに、線維芽細胞成長因子 2 (FGF-2) が、骨髄から PTHr1 陽性未分化間葉系細胞を動員・増殖させる事により軟骨性の間充組織凝集を促して軟骨性の再生修復を誘導する内因性因子であることを明らかにした。

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 mesenchymal vascularization or cartilage, bone and tendon/ligament formation. Our current research efforts are focused on the following studies.

1. Functional analysis of Chondromodulin-I

1) The role of Chondromodulin-I during the processes of fracture healing

Chondromodulin-I (ChM-I) is a glycoprotein purified from bovine epiphyseal cartilage on the basis of growth stimulating activity for chondrocytes and later identified as an angiogenesis inhibitor. Mouse ChM-I (120 amino acids) is synthesized as the C-terminal portion of the precursor protein consisting of 334 amino acids and secreted from chondrocytes after cleavage at the processing signal (RERR) by a proprotein convertase. ChM-I is predominantly expressed in the avascular tissues such as cartilage, eye, and cardiac valves. Mice lacking the ChM-I gene (ChM-I^{-/-}) develops normally, but adult ChM-I^{-/-} mice shows significant increase in bone mineral density with lowered bone resorption with respect to formation, indicating that ChM-I plays an important role as a bone remodeling factor. Furthermore, aged ChM-I^{-/-} mice showed aortic valve thickening, calcification and turbulent flow, indicative of early changes in aortic stenosis with enhanced VEGF-A expression, pathological angiogenesis, lipid deposition and calcification in the cardiac valves. These findings demonstrate that ChM-I has a pivotal role in maintaining valvular normal function by preventing angiogenesis that may lead to valvular heart diseases. To explore the role of ChM-I in bone repair, we compared fracture healing in ChM-I^{-/-} mice with that in wild-type mice using a stabilized tibial fracture model. ChM-I mRNA and protein localized in the external cartilaginous callus in the reparative phase of fracture healing. Radiological examination showed a delayed union in ChM-I^{-/-} mice although the fracture site was covered with both external and internal calluses. ChM-I null mutation reduced external cartilaginous callus formation as judged by marked decrease of type X collagen alpha 1 (col10a1) expression and total amount of cartilage matrix. Interestingly, the majority of chondrocytes in the periosteal callus failed to differentiate into mature chondrocytes in ChM-I^{-/-} mice, while the hypertrophic maturation of chondrocytes between the cortices was not affected. These results suggest that ChM-I is involved in hypertrophic maturation of periosteal chondrocytes. Although a direct effect of ChM-I on bones is still unclear, bony callus formation increased while external cartilaginous callus decreased in ChM-I^{-/-} mice. We conclude that in the absence of ChM-I, predominant primary bone healing occurs due to an indirect effect induced by reduction of cartilaginous callus rather than to a direct effect on osteogenic function, resulting in a delayed union.

2) Metabolism of Chondromodulin-I

ChM-I is a 25-kDa glycoprotein that is secreted from chondrocytes after post-translational modification and cleavage from the transmembrane precursor protein at the site (RERR) for proprotein convertases like furin. Recently, we found a short form of ChM-I (approx. 14 kDa) in cartilage extracts. For further characterization of ChM-I and its metabolites, we generated anti-ChM-I peptide antibodies and anti-ChM-I monoclonal antibodies. Using these antibodies, we demonstrated that the short form of ChM-I is an N-terminus truncated form of ChM-I. Moreover, matrix metalloproteinase-13 cleaved recombinant human ChM-I to give rise to an N-terminal truncated ChM-I. Now we are planning to isolate the short form of ChM-I from cartilage extracts using an affinity chromatography with anti-ChM-I monoclonal antibody for the structural determination of a naturally-occurring ChM-I short form.

2. Functional analysis of Tenomodulin

1) The role of Tenomodulin in chordae tendineae cordis of the heart.

We have previously reported Tenomodulin (TeM) showing homology to the cysteine-rich anti-angiogenic domain of ChM-I. The ChM-I like cysteine-rich domain at the C-terminus of TeM has the anti-angiogenic activity as

evidenced by inhibition of angiogenesis both *in vivo* and *in vitro*. TeM is expressed in the dense-connective tissues such as tendon, ligament, epimysium of muscle, cornea and sclera of the eye, all of which are known to be hypovascular. Recently, we found that TeM was also expressed in chordae tendineae cordis (CTC) of the heart. Although the heart is a well-vascularized organ, ChM-I-expressing cardiac valves and TeM-expressing CTC are devoid of blood vessels. Aberrant angiogenesis in these avascular tissues causes various heart diseases. CTC maintain the cardiac valvular function, and its rupture is a well-known cause of mitral regurgitation, but it is not clear whether angiogenesis in CTC correlates with its rupture. Immunohistochemical analysis revealed that TeM was abundantly expressed in the elastin-rich subendothelial outer layer of CTC. Conditioned medium of cultured CTC interstitial cells strongly inhibited tube formation and migration of vascular endothelial cells. These effects were partially inhibited by small-interfering RNA against TeM. We then carried out immunohistochemical analysis of ruptured CTC obtained from the autopsy or surgical specimen. In the ruptured CTC, marked downregulation of TeM and abnormal angiogenesis was observed in association with strong expression of VEGF-A and MMPs, and infiltration of inflammatory cells. In an anesthetized canine model, we removed the TeM-rich layer of CTC by filing and found that loss of TeM layer induces angiogenesis and MMP activation. These findings suggested that local absence of TeM, angiogenesis and MMP activation are associated with the rupture of CTC.

2) Characterization of tendon and ligament specific enhancer of the mouse TeM gene

Tendons and ligaments are composed of regularly aligned thick type I collagen fibers and play a significant role in the musculoskeletal biomechanics. Tendons physically connect muscles to skeletal structures to act as a mechanical transmitter. Ligaments link bones together and maintain them at their correct anatomical positions during movement of the body. Despite their important roles as locomotive organs, very little is known about the molecular basis of tendon/ligament development due to a lack of the specific marker. We cloned TeM as a related gene of ChM-I that is a cartilage derived angiogenesis inhibitor. TeM is predominantly expressed in dense connective tissues including tendons and ligaments. Its expression is induced during tendon/ligament development and is closely associated with the mature phenotype of tendon/ligament fibroblasts. To study the transcription factors that are involved in development and maintenance of tendon and ligament, we analyzed the transcriptional regulation for the mouse TeM gene. Using the CapSite Hunting method, we identified two transcriptional start sites of the mouse TeM gene at positions -58 bp and -84 bp upstream of the translational start site. A putative TATA box was found at -25 bp upstream from the distal transcription start site. We then tested the enhancer activity of the mouse TeM genomic fragment extending from -11 kb to +3 kb in transgenic mouse embryos by using a LacZ reporter cassette with the hsp68 minimal promoter. This genomic fragment showed an activity to drive the tendon/ligament specific expression *in vivo*. To identify the regions responsible for the enhancer activity, we cut the 14 kb genomic region into -1 kb DNA fragments to construct a series of luciferase reporter vectors and tested them in TeM-expressing cells (cultured tenocytes) and non-expressing cells (fibroblastic NIH3T3 and chondrogenic ATDC5 cells). We found that several fragments could drive the specific activation of the reporter gene in tenocytes, but not in NIH3T3 and ATDC5 cells.

3. Regenerative repair of articular cartilage

In contrast to the well-vascularized bony tissue, articular cartilage has a very limited capacity for repair. Upon

injury, cartilaginous lesion easily causes osteoarthritis. Therefore, articular cartilage has been an important therapeutic target in the field of regenerative medicine. Full-thickness defects penetrating articular cartilage undergo repair that results in either the generation of fibrous tissue or hyaline cartilage, depending on the size of defects. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells have known to participate in these repair processes. Taking advantage of this tissue-repair system as a model, we are studying the regulation of regeneration of cartilage *in vivo*. We reported that the pre-cartilaginous mesenchymal condensation is critical for induction of the regenerative repair response in the defect cavities. We also demonstrated that parathyroid hormone receptor 1 (PTHr1) is a novel cell-surface marker for chondroprogenitor cells in the reparative tissue in the defects. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) was found to be a potent endogenous inducer for cartilaginous repair by stimulating the recruitment and expansion of PTHr1-positive cell populations to facilitate chondrogenic mesenchymal condensation in the defects.

【業績目録】

◆ 誌 上 発 表 ◆

1) 原著論文

- Y. Nemoto, K. Inohaya, Y. Hiraki and A. Kudo: Expression of marker genes during otolith development in medaka. *Gene Expression Patterns* **8**: 92-95 (2008)
- C. Shukunami, A. Takimoto, S. Miura, Y. Nishizaki and Y. Hiraki: Chondromodulin-I and Tenomodulin are differentially expressed in the avascular mesenchyme during mouse and chick development. *Cell Tissue Res.* **332**: 111-122 (2008)
- Y. Anraku, Mizuta H., S. Kudo, E. Nakamura, K. Takagi and Y. Hiraki: The chondrogenic repair response of undifferentiated mesenchymal cells in rat full-thickness articular cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage* **16**: 961-964 (2008)
- A. Yamauchi, Y. Hosokawa, G. Louit, T. Asahi, C. Shukunami, Y. Hiraki and H. Masuhara: Nanoparticle injection to single animal cells by focused femtosecond laser-induced impulsive force. *Applied Physics A* **93**: 39-43 (2008)
- K. Kusafuka, K. Muramatsu, M. Kasami, K. Kuriki, K. Hirobe, I. Hayashi, H. Watanabe, Y. Hiraki, C. Shukunami, T. Mochizuki and T. Kameya: Cartilaginous features in matrix-producing carcinoma of the breast: four cases report with histochemical and immunohistochemical analysis of matrix molecules. *Modern Pathology* **21**: 1282-1292 (2008)
- N. Kimura, C. Shukunami, D. Hakuno, M. Yoshioka, S. Miura, D. Docheva, T. Kimura, Y. Okada, G. Matsumura, T. Shin'oka, R. Yozu, J. Kobayashi, H. Ishibashi-Ueda, Y. Hiraki and K. Fukuda: Local tenomodulin absence, angiogenesis, and MMP activation are associated with the rupture of the chordae tendineae cordis. *Circulation* **118**: 1737-1747 (2008)
- K. Yukata, Y. Matsui, C. Shukunami, A. Takimoto, T. Goto, Y. Nishizaki, Y. Nakamichi, T. Kubo, T. Sano, S. Kato, Y. Hiraki and N. Yasui: Altered fracture callus formation in chondromodulin-I deficient mice. *Bone* **43**: 1047-1056 (2008)
- Y. Anraku, H. Mizuta, A. Sei, S. Kudo, E. Nakamura, K. Senba and Y. Hiraki: Analyses of early events during

chondrogenic repair in rat full-thickness articular cartilage defects. J Bone Min Metab (in press)

開 祐司：基礎医学研究者として『人間・科学・宗教オープン・リサーチ・センター』に参画する【1】 文部科学省高度化推進事業 オープン・リサーチ・センター整備事業 2007年度報告書「仏教生命観に基づく人間科学の総合研究」, pp.133-141 (2008)

2) 総 説

開 祐司：ミニレクチャー 1 軟骨内骨化における血管侵入抵抗性の成立とコンドロモジュリンの作用 第11回 Vitamin K & Aging 研究会記録集（監修：折茂肇，エイザイ株式会社），pp.1-7（2008）

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

近藤俊哉，宿南知佐，開 祐司，野田 亮：膜結合型 MMP 制御因子 RECK のマウス胎生期軟骨における発現とその軟骨形成における機能. 第21回日本軟骨代謝学会学術集会（2008.3.21-22. 京都）

開 祐司，宿南知佐，西崎有利子，古山明子，野津裕之，森 肇：細胞外環境下で不溶性な立方体蛋白質結晶への FGF-2 のマイクロ固定化と細胞培養系の特異的空間制御（Immobilization and spatially restricted actions of FGF-2 into cubic proteinous microcrystals that are insoluble in a physiological cellular environment）第40回日本結合組織学会学術大会・第55回マトリックス研究会大会合同学術集会（2008.5.29-31. 東京）

西崎有利子，杉本由紀，開 祐司，宿南知佐：Tenomodulin 遺伝子の腱・靱帯特異的な転写制御領域の解析（Characterization of tendon and ligament specific enhancer of the mouse tenomodulin gene）第40回日本結合組織学会学術大会・第55回マトリックス研究会大会合同学術集会（2008.5.29-31. 東京）

村松浩二，草深公秀，嵩眞佐子，久力 権，渡辺秀人，開 祐司，宿南知佐，望月 徹，亀谷 徹：乳腺原発 matrix-producing carcinoma (MPC) の基質の性状. 第40回日本臨床分子形態学会（2008.10.3-4. 福岡）

三谷玄弥，佐藤正人，小久保舞美，宿南知佐，菊池鉄太郎，持田譲治：ヒト前十字靱帯細胞シート，滑膜組織における tenomodulin の発現状況. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会（2008.10.23-24. 京都）

古松毅之，迫間巧将，吉田 晶，伊達宏和，鉄永智紀，雑賀建多，阿部信寛，宿南知佐，雨宮三千代，島野 仁，尾崎敏文：Scleraxis と Sox9 による軟骨細胞分化調節. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会（2008.10.23-24. 京都）

油形公則，松井好人，宿南知佐，滝本 晶，後東知宏，西崎有利子，中道裕子，久保貴博，開 祐司，加藤茂明，安井夏生：骨延長術における chondromodulin-I の役割. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会（2008.10.23-24. 京都）

油形公則，松井好人，宿南知佐，廣橋 紀，開 祐司，安井夏生：腱の骨（軟骨）付着部における tenomodulin と chondromodulin-I 遺伝子の局在. 第2日本整形外科学会基礎学術集会（2008.10.23-24. 京都）

2) 講演・シンポジウム

開 祐司：ミニレクチャー 1. 「軟骨内骨化における血管侵入抵抗性の成立とコンドロモジュリンの作用」 第11回 Vitamin K & Aging 研究会（2008.2.16. 東京）

Yuji Hiraki: Tissue-specific angiogenesis inhibitors in hypovascular connective tissues: chondromodulin-I and tenomodulin. The U.S.-JAPAN Cooperative Cancer Research Program Workshop 2008（2008.3.19-21. 京都）

宿南知佐：腱・靱帯に発現する血管新生抑制因子：Tenomodulin. 第40回日本結合組織学会学術大会・第55回マ

トリックス研究会大会合同学術集会（2008.5.13. 東京）

開 祐司：軟骨形成・維持と ECM 環境. 第29回日本炎症・再生医学会シンポジウム 4 「運動器の再生医療」
（2008.7.9. 東京）

宿南知佐：ニワトリ胚を用いた軟骨性骨原基の血管侵入障壁の解析. 第29回日本炎症・再生医学会シンポジウム 5
「モデル生物を使った血管・リンパ管発生メカニズム」（2008.7.9. 東京）

開 祐司：内軟骨性骨形成の制御（軟骨形成・維持と血管侵入障壁）. 愛媛大学大学院医学系研究科セミナー
（2008.10.2. 愛媛）

開 祐司：内軟骨性骨形成と血管形成. 金沢大学がん研究所セミナー（2008.10.10. 金沢）

開 祐司：結合組織の血管侵入抵抗性と軟骨形成. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会シンポジウム 4 （2008.
10.24. 京都）

生体材料学分野

Department of Biomaterials

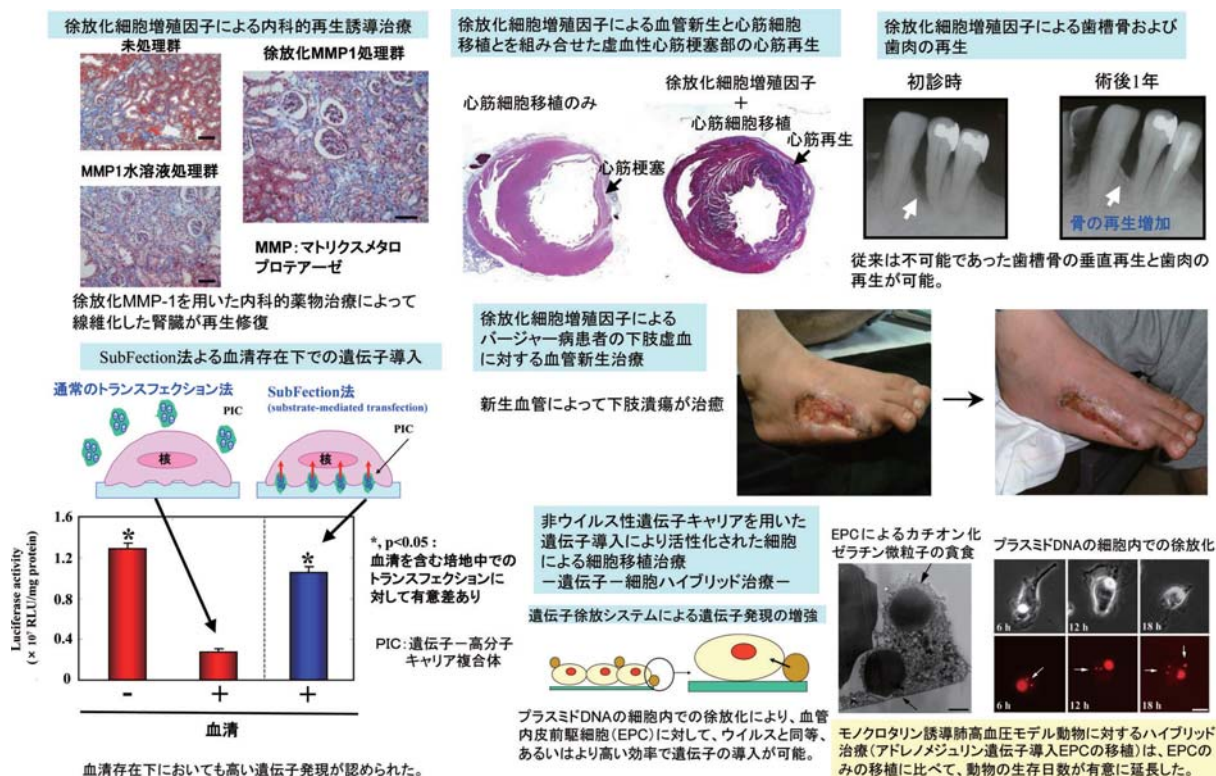
分野主任 教授 田畑 泰彦

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。生体材料とは、体の中で使用したり、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況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・臓器の再生誘導治療（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もなう問題もある。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状況の中で生まれてきたのが、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。この再生誘導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。この再生誘導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。再生誘導治療の目的は、細胞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うまでもないが、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、再生誘導治療とは、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工学 (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ていくことによって、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、生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、材料の生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、細胞を患者自身から採取することができれば、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、生体吸収性的高分子材料を中心とした生体組織・臓器の再生誘導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. 生体組織の再生誘導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、生体内では細胞外マトリックスと呼ばれる増殖・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生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，この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誘導治療が実現できる。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誘導治療を行っている。この再生誘導治療の概念は，生体のもつ再生誘導能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誘導治療と同じであり，今後は外科治療だけではなく，内科治療に対しても，重要となっていくと考えられる。

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

再生誘導治療には，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誘導治療である。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，単に再生誘導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はなく，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。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研究開発も行っている。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，ウィルスベクターを用いた遺伝子導入が行われているが，ウィ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，ウィ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. 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であった。しかしながら、DDS とは生物活性をもつ物質を全て薬物と考え、それと生体材料とを組み合わせることで、薬物の生物活性を高めることを目的とした技術・方法論である。つまり、DDS の対象物は、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である。このような観点から、われわれは DDS を考え、そのための材料、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、普遍的な技術である。その適用によって、物質の生物作用を高めることができる薬物の可溶化、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 research 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 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 investigating biomaterials to assist reconstructive surgery and to apply to drug delivery systems (DDS) for the biomaterials-based improvement of 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 substitution. 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 explored. This is termed the therapy of regenerative medicine, where the regeneration of tissues and organs is naturally induced to therapeutically treat diseases by artificially promoting the proliferation and differentiation of cells. The objective of regenerative therapy is to regenerate injured or lost tissues and substitute organ functions by making use of cells. The regenerative medical therapy 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 regenerative 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 all 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 have been mainly used for this purpose. 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 allow to physically impair the natural process of tissue regeneration by the material remaining. Thus, biodegradable biomaterials are indispensable for the research and development (R & D) of regenerative medical therapy, DDS or basic biology and medicine.

Our research goal is to design and create biomaterials mainly from polymers which are practically applicable for regenerative medical 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 the Therapy of Regenerative Medicine

It is well recognized that cells are present in the living tissue interacting with the extracellular matrix (ECM) of natural scaffold for the proliferation and differentiation of cells or their 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, even if a superior scaffold is supplied to the tissue defect, the tissue regeneration will not be achieved without the number of cells and the amount of biosignaling molecules large enough for cell proliferation. It is one of the practically possible ways 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 way to break through the problem 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 exert the biological activity, resulting in promoted 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 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) and the good therapeutic efficacy is demonstrated.

Generally, in the chronic fibrotic disease, such as dilated 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. We are designing and preparing a system of drug targeting and the local release with polymers of an organ affinity 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 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 regenerative 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 internal 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 Medicine and Biology

There are two approaches to realize regeneration medical therapy. One is the tissue engineering-based therapeutic approach described above. The other is cell transplantation therapy 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 blastic 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. 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, we have developed a new system for the controlled release of plasmid DNA inside cells and succeeded 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 with or without the combination of bioreactor systems has been developed and enhanced the level of gene expression as well as prolonged the expressed period. This reverse transfection system (SubFection: substrate-mediated transfection) is effective in the gene transfection for stem and matured cells which have not been readily transfected by the conventional method while it can be applied for cell internalization of low-molecular weight compounds, peptides, proteins and nucleic acids (siRNA and decoy DNA).

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 an engineering trial 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 are carried out from the viewpoint of polymer material sciences. Our definition of "drug" is not limited only to therapeutic substances, but it means every substance with a certain biological activity and function. 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 also developing DDS technology and methodology which are applicable to the research and development of cosmetics and health care sciences. DDS is defined as an universal technology and methodology to efficiently enhance the biological functions of a certain substance by the combination with biomaterials and can universally apply to any research field of which the final goal is to enhance the biological functions of substances used.

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 and 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 as well as the DDS technologies for therapeutic, prophylactic and diagnostic medicines, while some biomaterials are applicable for basic of medicine and biology as the research tools.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- 田畑泰彦：治療薬の *in vivo* イメージング (Theragnosis DDS). 実験医学. **26**(1) : 45-46 (2008)
- 田畑泰彦：幹細胞の足場の関与と重要性. 日本臨床 **66**(5) : (2008)
- 田畑泰彦：DDS からみた再生治癒促進治療 (再生医療). Medical Science Digest. **34**(3) : 103-106 (2008)
- 田畑泰彦, 永根健太郎, 城 潤一郎：幹細胞への核酸導入のためのカチオン化多糖誘導体の合成. 日本化学繊維研究所講演集 **65** : 73-82 (2008)
- 田畑泰彦：ナノテクノロジー足場材料が神経再生を促す. 実験医学 **26**(14) : 2213-2214 (2008)
- 田畑泰彦：患者のための「再生医療」をゆめで終わらせないために. 再生医療—日本再生医療学会雑誌. 11月季刊号. **7**(4) : (2008)
- 田畑泰彦：材料技術が支える先端医療—研究開発, 事業化への商社の大きな役割. 日本貿易会月報, 2008年12月号 (No. 665), 30-32
- 田畑泰彦：生体材料学 (バイオマテリアル). 炎症・再生医学事典, 15-20 (2008)
- 山本雅哉：DDS. バイオマテリアル **26**(5) : 382-383 (2008)
- DK. Thakor, YD. Teng and Y. Tabata: Neuronal gene delivery by negatively charged pullulan-spermine/DNA anioplexes. Biomaterials **30**(9) : 1815-1826
- J. Jo and Y. Tabata: Non-viral gene transfection technologies for genetic engineering of stem cells. Eur J Pharm Biopharm. **68** : 90-104 (2008)
- 城 潤一郎, 田畑泰彦：再生誘導治療の観点からの DDS. 臨床血液 **49**(5) : 302-310 (2008)
- T. Okasora, J. Jo and Y. Tabata: Augmented anti-tumor therapy through natural targetability of macrophages genetically engineered by NK4 plasmid DNA. Gene Therapy **15**(7) : 524-30 (2008)
- M. Nakamura, J. Jo, Y. Tabata and O. Ishikawa: Controlled delivery of T-box 21 siRNA ameliorates autoimmune alopecia (alopecia areata) in C3H/HeJ mouse model. The American Journal of Pathology **172**(3) : 650-8 (2008)
- S. Inoue, Y. Iida, Y. Otani, Y. Hirano and Y. Tabata: Adhesion behavior of human adipo-stromal cells on self-assembled monolayers with different surface densities or gradients RGD peptide. J. Biomater. Sci. Polymer Edn **20** : 495-510 (2009)
- S. Inoue, M. Imamura and Y. Tabata: Adipogenic differentiation of adipo-stromal cells incubated with basic fibroblast growth factor in the solution and coated form. Journal of Biomaterials Science **20** : 483-494 (2009)

- S. Inoue, M. Imamura, A. Umezawa and Y. Tabata : Attachment, proliferation, and adipogenic differentiation of adipostromal cells on self-assembled monolayers of different chemical compositions. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* **19**(7): 893-914 (2008)
- S. Inoue, M. Imamura, Y. Hirano and Y. Tabata : Adhesion and proliferation of human adipo-stromal cells for two- or three dimensional poly (ethylene terephthalate) substrates with or without RGD immobilization. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* (in press)
- J. Tazaki, T. Akazawa, M. Murata, M. Yamamoto, Y. Tabata, J. Hino, M. Arisue and T. Shibata : Comparison of HAp and β -TCP in BMP-2 dose-response and release study. *Key Engineering Materials* 361-363, 1033-1036 (2008)
- N. Ichinohe, T. Takamoto and Y. Tabata : Proliferation, osteogenic differentiation, and distribution of rat bone marrow stromal cells in nonwoven fabrics by different culture methods. *Tissue Engineering* **14**(1): 107-116 (2008)
- N. Ichinohe, Y. Kuboki and Y. Tabata : Bone regeneration using titanium nonwoven fabrics combined with FGF-2 release from gelatin hydrogel microspheres in rabbit skull defects. *Tissue Engineering Part A* **14**(10): 1663-1671 (2008)
- N. Nishishita, J. Jo, M. Yamamoto, Y. Tabata and Y. Hirano : The gene transfection using cell attachment peptides for gene therapy. *Peptide Science* **2007**: 443-446 (2008)
- 李 志旭, 中野貴由, 豊澤 悟, 田畑泰彦, 馬越佑吉 : 大理石骨病 (op/op) マウスの大腿骨骨幹中央断面部での生体アパタイト結晶の配向性分布. *日本金属学会誌* **72**(2) : 85-90 (2008)
- E. Tamura, H. Fukuda, Y. Tabata and M. Nishimura : Use of the buccal fat pad for vocal cord augmentation. *Acta Oto-Laryngologica* **128**(2): 219-224 (2008)
- E. Tamura, H. Fukuda and Y. Tabata : Intracordal injection technique : materials and injection site. *Tokai J Exp Clin Med.* **33**(3): 119-123 (2008)
- Z. Xia, K. Abe, A. Furusu, M. Miyazaki, Y. Obata, Y. Tabata, T. Koji and S. Kohno : Suppression of renal tubulointerstitial fibrosis by small interfering RNA targeting heat shock protein 47. *Am J Nephrol.* **28**(1): 34-46 (2008)
- K. Morimoto, S. Chono, T. Kosai, T. Seki and Y. Tabata : Design of cationic microspheres based on aminated gelatin for controlled release of peptide and protein drugs. *Drug Delivery.* **15**(2): 113-117 (2008)
- Y. Fujihara, H. Koyama, M. Ohba, Y. Tabata, H. Fujihara, Y. Yonehara and T. Takato : Controlled delivery of bFGF to recipient bed enhances the vascularization and viability of an ischemic skin flap. *Wound repair and regeneration* **16**(1): 125-131 (2008)
- 土肥 眞, 田畑泰彦 : DDSを応用した関節炎の実験的制御. *Medical Science Digest* **34**(3): 107-110 (2008)
- 宮本正章, 高木 元, 高野仁司, 川中秀和, 大坪春美, 水野博司, 田畑泰彦, 水野杏一 : 皮膚組織の再生医療. *Medical Science Digest* **34**(3): 119-122 (2008)
- 米田正始, 田畑泰彦 : 血管領域の再生医療. *Medical Science Digest* **34**(3): 123-126 (2008)
- QQ. Zhao, JL. Chen, M. Han, WQ. Liang, Y. Tabata and JQ. Gao : Combination of Poly (ethylenimine) and Chitosan Induces High Gene Transfection Efficiency and Low Cytotoxicity. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **105**(1): 65-68 (2008)
- Y. Shibusawa, I. Negishi, Y. Tabata and O. Ishikawa : Mouse model of dermal fibrosis induced by one-time injection of

- bleomycin-poly (L-lactic acid) microspheres. *Rheumatology* **47**: 454-457 (2008)
- K. Morimoto, N. Fukushi, S. Chono, T. Seki and Y. Tabata: Spermined dextran, a cationized polymer, as absorption enhancer for pulmonary application of peptide drugs. *Pharmazie* **63**: 180-184 (2008)
- Y. Kimura, A. Hokugo, T. Takamoto, Y. Tabata and H. Kurosawa: Regeneration of anterior cruciate ligament by biodegradable scaffold combined with local controlled release of basic fibroblast growth factor and collagen wrapping. *Tissue Engineering Part C: Methods* **14**(1): 47-57 (2008)
- H. Igai, S. S. Chang, M. Gotoh, Y. Yamamoto, M. Yamamoto, Y. Tabata and H. Yokomise: Tracheal cartilage regeneration and new bone formation by slow release of bone morphogenetic protein (BMP)-2. *ASAIO J.* **54**(1): 104-108 (2008)
- S. S. Chang, H. Igai, N. Misaki, M. Gotoh, Y. Yamamoto, Y. Tabata and H. Yokomise: Closure of the pleural dead space after pneumonectomy in a rabbit model: Use of bioabsorbable lactic acid and caprolactone copolymer cubes. *ASAIO J.* **54**(1): 109-114 (2008)
- S. Sato, Y. Nitta, Y. Saiki, S. Kawamoto, A. Iguchi, M. Kaku, Y. Tabata and K. Tabayashi: Enhanced perigraft angiogenesis prevents prosthetic graft infection. *Annals of thoracic surgery* (in press)
- 宮本正章, 高木 元, 高野仁司, 川中秀和, 大坪春美, 水野博司, 田畑泰彦, 水野杏一: 皮膚組織の再生医療. *Medical Science Digest* **34**(3): 25-28 (2008)
- T. Nishikawa, H. Nakagami, A. Maeda, R. Morishita, N. Miyazaki, T. Ogawa, Y. Tabata, Y. Kikuchi, H. Hayashi, Y. Tatsu, N. Yumoto, K. Tamai, K. Tomono, Y. Kaneda. : Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties. *J. Cell. Mol. Med.* **12**(3): 1-13 (2008)
- M. Nakamura, J. Jo, Y. Tabata and O. Ishikawa: Controlled delivery of T-box 21 siRNA ameliorates autoimmune alopecia (alopecia areata) in C3H/HeJ mouse model. *Am J Pathol.* **172**(3): 650-658 (2008)
- J. Ratanavaraporn, S. Kanokpanont, Y. Tabata and S. Damrongsakul: Effect of acid type on physical and biological properties of collagen scaffold. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, **19**(7): 945-952 (2008)
- N. Mohan, P. D. Nair and Y. Tabata: A 3D biodegradable protein based matrix for cartilage tissue engineering and stem cell differentiation to cartilage. *J Mater Sci: Mater Med.* (in press)
- Y. Shibusawa, I. Negishi, Y. Tabata and O. Ishikawa: Mouse model of scleroderma induced by one-time injection of bleomycin-poly (L-lactic acid) microspheres. *Rheumatology* **47**(4): 454-457 (2008)
- 石川 治, 渋谷弥生, 根岸 泉, 田畑泰彦, 竹原和彦: プレオマイシン含有ポリ乳酸マイクロスフェアの単回注射による皮膚線維化モデルマウスの作製. 厚生労働科学研究費・難治性疾患克服研究事業「強皮症における病因解明と根治的治療法の開発」平成19年度 総括・分担研究報告書 (9-13)
- H. Kobayashi, S. Minatoguchi, S. Yasuda, N. Bao, I. Kawamura, M. Iwasa, T. Yamaki, S. Sumi, Y. Misao, H. Ushikoshi, K. Nishigaki, G. Takemura, T. Fujiwara, Y. Tabata and H. Fujiwara: Post-infarct treatment with an erythropoietin-gelatin hydrogel drug delivery system for cardiac repair. *Cardiovasc Res.* Jun. 9: (2008)
- Bir SC, M. Fujita, A. Marui, K. Hirose, Y. Arai, H. Sakaguchi, Y. Huang, J. Esaki, T. Ikeda, Y. Tabata and M. Komeda: New therapeutic approach for impaired arteriogenesis in diabetic mouse hindlimb ischemia. *Circulation Journal* **72**(4): 633-640 (2008)
- ZS. Patel, M. Yamamoto, H. Ueda, Y. Tabata and AG. Mikos: Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomaterialia* **4**(5): 1126-1138 (2008)

- ZS. Patel, H. Ueda, M. Yamamoto, Y. Tabata and AG. Mikos: In vitro and in vivo release of vascular endothelial growth factor from gelatin microparticles and biodegradable composite scaffolds. *Pharmaceutical Research* **25**(10): 2370-78
- ZS. Patel, S. Young, Y. Tabata, JA. Jansen, MEK. Wong and AG. Mikos: Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone*. **43**(5): 931-940 (2008)
- N. Nitta, A. Seko, A. Sonoda, S. Ohta, T. Tanaka, M. Takahashi, K. Murata, S. Takemura, T. Sakamoto and Y. Tabata: Is the use of fullerene in photodynamic therapy effective for atherosclerosis? *Cardiovasc Intervent Radiol*. **31**(2): 359-366 (2008)
- N. Nitta, S. Ohta, T. Tanaka, R. Takazakura, Y. Nagatani, N. Kono, A. Sonoda, A. Seko, A. Furukawa, M. Takahashi, K. Murata and Y. Tabata: Gelatin microspheres: initial clinical experience for the transcatheter arterial embolization. *Eur J Radiol*. 2008 Sep. **67**(3): 536-540 (2008)
- N. Nitta, S. Ohta, T. Tanaka, R. Takazakura, T. Toyama, A. Sonoda, A. Seko, A. Furukawa, M. Takahashi, K. Murata, Y. Kurumi, T. Tani, T. Sakamoto and Y. Tabata: An initial clinical study on the efficacy of cisplatin-releasing gelatin microspheres for metastatic liver tumors. *Eur J Radiol*. (in press)
- S. Ohta, N. Nitta, A. Sonoda, A. Seko, T. Tanaka, M. Takahashi, S. Takemura, Y. Tabata and K. Murata: Prolonged local persistence of cisplatin-loaded gelatin microspheres and their chemoembolic anti-cancer effect in rabbits. *Eur J Radiol*. (in press)
- A. Sonoda, N. Nitta, S. Ohta, A. Seko, JI. Jo, S. Morikawa, Y. Tabata, M. Takahashi and K. Murata: Development of a conjugated gadolinium and cisplatin-gelatin possessing properties as an intravascular contrast agent for MR imaging. *Eur J Radiol*. (in press)
- A. Seko, N. Nitta, A. Sonoda, S. Ohta, M. Takahashi, K. Murata and Y. Tabata: Vascular regeneration by repeated infusions of basic fibroblast growth factor in a rabbit model of hind limb ischemia. *American Journal of Roentgenology* (in press)
- N. Sasaki, T. Minami, K. Yamada, H. Yamada, Y. Inoue, M. Kobayashi and Y. Tabata: Effect of bFGF-containing gelatin hydrogel microspheres injected into the articular cavity on third metacarpal bone defect in an equine model. *American Journal of Veterinary Research* (in press)
- Y. Akagawa, T. Kubo, K. Koretake, K. Hayashi, K. Doi, A. Matsuura, K. Morita, R. Takeshita, Q. Yuan and Y. Tabata: Initial bone regeneration around fenestrated implants in Beagle dogs using basic FGF-gelatin hydrogel complex with varying biodegradation rates. *Journal of Prosthodontic Research* **53**(1): 41-47 (2009)
- T. Kikuchi, S. Kubota, K. Asaumi, H. Kawaki, T. Nishida, K. Kawata, S. Mitani, Y. Tabata, T. Ozaki and M. Takigawa: Promotion of Bone Regeneration by CCN2 Incorporated into Gelatin Hydrogel. *Tissue Eng Part A*. **14**(6): 1089-1098 (2008)
- K. Sasaki, R. Kuroda, K. Ishida, S. Kubo, T. Matsumoto, Y. Mifune, K. Kinoshita, K. Tei, T. Akisue, Y. Tabata and M. Kurosaka: Enhancement of tendon-bone osteointegration of anterior cruciate ligament graft using granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Sports Med*. **36**(8): 1519-1527 (2008)
- M. Tsubouchi, R. Morishita, Y. Tabata, S. Matsui and K. Kawakami: Critical issues for effective collaboration between academia and industry in the field of regenerative medicine in Japan. *Regen Med*. **3**(4): 497-504 (2008)
- T. Mimura, S. Amano, S. Yokoo, S. Uchida, S. Yamagami, T. Usui, Y. Kimura and Y. Tabata: Tissue engineering of

- corneal stroma with rabbit fibroblast precursors and gelatin hydrogels. *Molecular Vision* **14**: 1819-1828 (2008)
- S. Takemoto, N. Morimoto, Y. Kimura, T. Taira, T. Kitagawa, K. Tomihata, Y. Tabata and S. Suzuki: Preparation of collagen/gelatin sponge scaffold for sustained release of bFGF. *Tissue Eng Part A* **14(10)**: 1629-638 (2008)
- Y. Kimura, A. Hokugo, T. Takamoto, Y. Tabata and H. Kurosawa: Regeneration of anterior cruciate ligament by biodegradable scaffold combined with local controlled release of basic fibroblast growth factor and collagen wrapping. *Tissue Engineering Part C* **14(1)**: 47-57 (2008)
- M. Takigawa, T. Kikuchi, S. Kubota, K. Asami, H. Kawaki, T. Nishida, K. Kawata, S. Mitani, Y. Tabata and T. Ozaki: Promotion of Bone Regeneration by CCN2 incorporated into gelatin Hydrogel. *Tissue Engineering Part A* **14(6)**: 1089-0198 (2008)
- 高橋孝志, 田畑泰彦, 森下竜一, 杉本八郎: 座談会 ―日本を代表する大学発ベンチャーの三先生に聞く― 大学発ベンチャーの今と未来. *Medchem News* **18(4)**: 40-67 (2008)
- M. Ito, S. Saito, M. Yamada, S. Kozuka, H. Obata, K. Nishikawa and Y. Tabata: A novel bFGF-GH injection therapy for two patients with severe ischemic limb pain. *Journal of Anesthesia*. **22(4)**: 449-452 (2008)
- N. Takehara, Y. Tsutsumi, K. Tateishi, T. Ogata, H. Tanaka, T. Ueyama, T. Takahashi, T. Takamatsu, M. Fukushima, M. Komeda, M. Yamagishi, H. Yaku, Y. Tabata, H. Matsubara and H. Oh: Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. **52(23)**: 1858-1865
- T. Okasora, J. Jo and Y. Tabata: Augmented anti-tumor therapy through natural targetability of macrophages genetically engineered by NK4 plasmid DNA. *Gene Therapy* **15(7)**: 524-530
- K. Nagane, M. Kitada, S. Wakao, et al.: Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Engineering* (in press)
- T. Matsuno, Y. Hashimoto, S. Adachi, K. Omata, Y. Yoshitaka, Y. Ozeki, Y. Umezumi, Y. Tabata, M. Nakamura and T. Satoh: Preparation of injectable 3D-formed β -tricalcium phosphate bead/alginate composite for bone tissue engineering. *Dental Materials Journal* **27(6)**: 827-834 (2008)
- G. Matsumoto, Y. Omi, E. Kubota, S. Ozono, H. Tsuzuki, Y. Kinoshita, M. Yamamoto and Y. Tabata: Enhanced regeneration of critical bone defects using a biodegradable gelatin sponge and β -tricalcium phosphate with bone morphogenetic protein-2. *J. Biomater. Appl.* 2008 (in press)
- K. Hirose, A. Marui, Y. Arai, T. Kushibiki, Y. Kimura, H. Sakaguchi, H. Yuang, B. Chandra, T. Ikeda, S. Amano, Y. Tabata and M. Komeda: Novel approach with intratracheal administration of microgelatin hydrogel microspheres incorporating basic fibroblast growth factor for rescue of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **136(5)**: 1250-1256 (2008)
- A. Tomioka, M. Tanaka, M. A. De Velasco, S. Anai, S. Takada, T. Kushibiki, Y. Tabata, C. J. Rosser, H. Uemura and Y. Hirao: Delivery of PTEN via a novel gene microcapsule sensitizes prostate cancer cells to irradiation. *Molecular cancer therapeutics* **7(7)**: 1864-1870 (2008)
- K. Kaneko, K. Togami, S. Chono, T. Seki, Y. Tabata and K. Morimoto: Cationized polymers as absorption enhancers for nasal and pulmonary administration of peptide drugs. 第30回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (札幌). *薬学雑誌* **128 Suppl.2**: 131 (2008)
- A. Tomioka, M. Tanaka, M. A. De Velasco, S. Anai, S. Takada, T. Kushibiki, Y. Tabata, C. J. Rosser, H. Uemura and Y.

- Hirao: Delivery of PTEN via a novel gene microcapsule sensitizes prostate cancer cells to irradiation. *Mol Cancer Ther*, **7**(7), 1864–1870 (2008)
- X. Guo, H. Park, S. Young, J.D. Kretlow, J.J. van den Beucken, L.S. Baggett, Y. Tabata, K. Kasper, A.G. Mikos and J.A. Jansen: Repair of osteochondral defects with biodegradable hydrogel composites encapsulating marrow mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Journal of Orthopaedic Research* (in press)
- H. Park, X. Guo, J.S. Temenoff, Y. Tabata, A.I. Caplan, F.K. Kasper and A.G. Mikos: Effect of swelling ratio of injectable hydrogel composites on chondrogenic differentiation of encapsulated rabbit marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. *Biomacromolecules* (in press)
- A. Narita, M. Takahara, T. Ogino, S. Fukushima, Y. Kimura and Y. Tabata: Effect of gelatin hydrogel incorporating fibroblast growth factor 2 on human meniscal cells in an organ culture model. *The knee* (in press)
- X.H. Zhu, Y. Tabata, C-H. Wang and Y.W. Tong: Delivery of basic fibroblast growth factor from gelatin microsphere scaffold for the growth of human umbilical vein endothelial cells. *Tissue Eng, Part A* **14**(12): 1939–1947 (2008)
- K. Yingsukwattana, S. Agthong, R. Mongkonnarin, Y. Tabata and S. Kanokpanont: Development of a protein-filled conduit for peripheral nerve regeneration. *Adv Mater Res (Zuerich, Switz)*. **55–57**(Smart Materials): 701–704 (2008)
- Y. Yasuda, H. Koyama, Y. Tabata, Y. Fujihara, M. Oba, E. Uchinuma and T. Takato: Controlled Delivery of bFGF Remodeled Vascular Network in Muscle Flap and Increased Perfusion Capacity Via Minor Pedicle. *J Surg Res*. **147**(1): 132–137 (2008)
- H. Sakaguchi, A. Marui, K. Hirose, T. Nomura, Y. Arai, S.C. Bir, Y. Huang, J. Esaki, Y. Tabata, T. Ikeda and M. Komeda: Less-invasive and highly effective method for preventing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* graft infection by local sustained release of vancomycin. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **135**(1): 25–31 (2008)
- S. Nishijima, S-i. Takeda, F. Mishima, Y. Tabata, M. Yamamoto, J-i. Joh, H. Iseki, Y. Muragaki, A. Sasaki, K. Jun and N. Saho: A study of magnetic drug delivery system using bulk high temperature superconducting magnet. *IEEE Trans Appl Supercond*. **18**(2): 874–877 (2008)
- N. Mori, M. Gotoh, S.S. Chang, H. Igai, N. Misaki, Y. Yamamoto, Y. Tabata and H. Yokomise: Reconstruction of emphysematous lung tissue using slowly released basic fibroblast growth factor from gelatin microspheres. *ASAIO J*. **54**(6): 622–626 (2008)
- P-L. Lu, J-Y. Lai, Y. Tabata and G-H. Hsiue: A methodology based on the "anterior chamber of rabbit eyes" model for noninvasively determining the biocompatibility of biomaterials in an immune privileged site. *J Biomed Mater Res, Part A* **86A**(1): 108–116 (2008)
- M. Komura, H. Komura, Y. Kanamori, Y. Tanaka, K. Suzuki, M. Sugiyama, S. Nakahara, H. Kawashima, A. Hatanaka, K. Hoshi, Y. Ikada, Y. Tabata and T. Iwanaka: An animal model study for tissue-engineered trachea fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of tracheal stenosis. *J Pediatr Surg*. **43**(12): 2141–2146 (2008)
- Y. Huang, A. Marui, H. Sakaguchi, J. Esaki, Y. Arai, K. Hirose, C. Bir Shyamal, H. Horiuchi, T. Maruyama, T. Ikeda, Y. Tabata and M. Komeda: Sustained release of prostaglandin E1 potentiates the impaired therapeutic angiogenesis by basic fibroblast growth factor in diabetic murine hindlimb ischemia. *Circ J*. **72**(10): 1693–1699 (2008)

T. Fujiwara, N. Hato, T. Nakagawa, Y. Tabata, T. Yoshida, H. Komobuchi, S. Takeda, J. Hyodo, N. Hakuba and K. Gyo: Insulin-like growth factor 1 treatment via hydrogels rescues cochlear hair cells from ischemic injury. *NeuroReport* **19**(16): 1585-1588 (2008)

2) 著 書

山本雅哉, 田畑泰彦: 傾斜機能性足場材料. 「進みつづける細胞移植治療の実際 上巻 遺伝子医学 MOOK 別冊 ー再生医療の実際に向けた科学・技術と周辺要素の理解」(田畑泰彦編集, 株式会社メディカルドゥ, 大阪) 185-190 (2008)

木村 祐, 田畑泰彦: 血管新生技術. 「進みつづける細胞移植治療の実際ー再生医療の実現に向けた科学・技術と周辺要素の理解」(田畑泰彦編集, 株式会社メディカルドゥ, 大阪) 235-240 (2008)

城潤一郎, 田畑泰彦: 再生誘導治療(再生医療)の分子イメージング. 「ますます広がる分子イメージング技術 遺伝子医学 MOOK 9 生物医学研究から創薬, 先端医療までを支える分子イメージング技術・DDS との技術融合」(佐治英郎, 田畑泰彦編集, 株式会社メディカルドゥ, 大阪) 284-289 (2008)

城潤一郎, 田畑泰彦: 遺伝子導入法. 「進みつづける細胞移植治療の実際(上巻) 遺伝子医学 MOOK 別冊 ー再生医療の実現に向けた科学・技術と周辺要素の理解」(田畑泰彦編集, 株式会社メディカルドゥ, 大阪) 218-225 (2008)

城潤一郎, 山本雅哉, 田畑泰彦: 細胞研究と細胞移植治療のための細胞トレーシング技術. 「進みつづける細胞移植治療の実際(上巻) 遺伝子医学 MOOK 別冊 ー再生医療の実現に向けた科学・技術と周辺要素の理解」(田畑泰彦編集, 株式会社メディカルドゥ, 大阪) 251-257 (2008)

3) 総 説

Y. Tabata: Current status of regenerative medical therapy based on drug delivery technology. *Reproductive Bio Medicine Online* **16**(1): 70-80 (2008)

田畑泰彦: bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルを利用した治療的血管新生療法. *血管医学*. **9**(1): (2008)

田畑泰彦: 誘導治療のためのバイオマテリアル技術. *バイオマテリアルー生体材料*. **26**(3): (2008)

Y. Tabata: Regenerative medical therapy from the viewpoint of biomaterials. *Inflammation and regeneration*. **28**(2): 86-95 (2008)

田畑泰彦: アジアバイオマテリアル連盟の設立. *バイオマテリアル* **26**(5): (2008)

田畑泰彦: 先端医療を具現化するバイオマテリアル技術. *未来材料* **8**(8): 22-29 (2008)

田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲル. 環境調和型 新材料シリーズ 生体材料. (社)日本セラミックス協会 [編]. 日刊工業新聞社. 153-162 (2008)

田畑泰彦: バイオマテリアルからみた再生誘導治療の実際と展望. *バイオサイエンスとインダストリー* **66**(9): 542-548 (2008)

田畑泰彦: 再生医療を実現しつづけるバイオマテリアル技術. *ファルマシア* **44**(11): (2008)

田畑泰彦: ティッシュエンジニアリングが拓く再生誘導治療. *日本整形外科学会雑誌* **82**(11): 11-18 (2008)

Y. Tabata: Significant role of naturally occurring materials in drug delivery technology for tissue regeneration therapy. *ACS symposium series 992: New delivery systems for controlled drug release from naturally occurring materials*. Nicholas Parris, LinShu Liu, Cunxian Song and V. Prasad Shastri Ed. The American Chemical Society: 81-105 (2008)

M. Yamamoto and Y. Tabata: Tissue engineering of internal medicine for regeneration therapy of chronic fibrotic

- diseases. Topics in Tissue Engineering, **4**: Chapter 21-24 (2008)
- J. Jo and Y. Tabata: Non-viral gene transfection technologies for genetic engineering of stem cells. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **68**(1): 90-104 (2008)
- 城 潤一郎, 田畑泰彦: 再生誘導治療の観点からの DDS. 臨床血液. **49**(5): 302-10 (2008)
- J. Jo and Y. Tabata: Gene delivery system based on cationized polysaccharide carriers. Soft Nanomaterials (Chapter 10) in press
-

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- M. Yamamoto, N. Hayashi and Y. Tabata: Cell adhesion to the alginate sponge scaffolds with a spatial gradient of cell adhesion peptide. 8th World Biomaterial Congress. (2008.5.28-6.1. Amsterdam, Netherland)
- M. Yamamoto, A. Hokugo, Y. Takahashi and Y. Tabata: A novel functional scaffold combined with controlled release of bone morphogenetic protein enhances stem cell-based bone regeneration after radiation therapy: An experimental study in rabbits. 35th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society. (2008.7.12-16. New York)
- M. Yamamoto, N. Hayashi and Y. Tabata: A Spatial gradient of cell adhesion peptide in a three-dimensional scaffold directs osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. Toward synthesis of cells—Reconstruction and design of cellular functions—The 17th CDB Meeting. (2008.10.14-15. Kobe)
- 木村 祐, 林 直樹, 野一尚子, 宇山 浩, 田畑泰彦: ヒト脂肪前駆細胞の増殖および分化に対する基材の弾性率の影響. 第7回日本再生医療学会総会 (2008.3.13-14. 名古屋)
- 木村 祐, 村上裕子, 林 直樹, 宇山 浩, 田畑泰彦: 種々の弾性率をもつヒドロゲル上でのヒト脂肪前駆細胞の培養. 第57回高分子学会年次大会 (2008.5.28-30. 横浜)
- 木村 祐, 田畑泰彦: 間質細胞由来因子 (SDF)-1 徐放体の作製とその血管新生作用. 第28回日本炎症・再生医学会 (2008.7.8-10. 東京)
- 木村 祐, 田畑泰彦: 液性因子徐放体を組み込んだ足場材料への侵入細胞の解析. 第57回高分子討論会 (2008.9.24-26. 大阪)
- 城潤一郎, 林 雪, 米山 操, 柴田さやか, 青木伊知男, 田畑泰彦: 血管新生モニタリングのための磁気共鳴イメージング造影剤の作製. 第3回日本分子イメージング学会学術集会 (2008.5.22-23. 大宮)
- 城潤一郎, 林 雪, 青木伊知男, 田畑泰彦: 血管新生のための磁気共鳴イメージング造影剤の作製. 第57回高分子学会年次大会 (2008.5.28-30. 横浜)
- J. Jo, N. Nagaya, K. Kangawa and Y. Tabata: Genetic engineering of mesenchymal stem cells to enhance the therapeutic efficacy for acute myocardial infarction. 8th Biomaterials Congress. (2008.5.28-6.1. Amsterdam)
- 城 潤一郎, 吉田雅貴, 田畑泰彦: キレート残基導入ポリエチレングリコールを用いた簡便な薬物修飾法の開発. 第24回日本 DDS 学会 (2008.6.29-30. 東京)
- J. Jo, X. Lin, I. Aoki and Y. Tabata: Design of magnetic resonance imaging contrast agent for angiogenic therapy. 35th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2008.7.12-16. New York)
- 小川敏弘, 田畑泰彦: スタチン含有ポリ乳酸ナノファイバーの骨組織再生への有用性. 第7回日本再生医療学会総

会 (2008.3.13-14. 名古屋)

永根健太郎, 田畑泰彦: カチオン化多糖を用いた small interfering RNA による骨髄間葉系幹細胞の遺伝子発現抑制と脂肪分化促進. 第7回日本再生医療学会総会 (2008.3.13-14. 名古屋)

永根健太郎, 城 潤一郎, 田畑泰彦: カチオン化多糖を用いた small interfering RNA による骨髄間葉系幹細胞の遺伝子発現抑制. 第57回高分子学会年次大会 (2008.5.28-30. 横浜)

林 直樹, 山本雅哉, 田畑泰彦: 細胞接着ペプチドを3次元グラジエント固定化したアルギン酸足場材料の作製. 第7回日本再生医療学会総会 (2008.3.13-14. 名古屋)

林 直樹, 山本雅哉, 田畑泰彦: 細胞接着ペプチドを3次元グラジエント固定化したアルギン酸足場材料の作製. 第57回高分子年次大会 (2008.5.28-30. 横浜)

宮崎伸彦, 城潤一郎, 田畑泰彦: 乳酸オリゴマーグラフト化プルランによる難水溶性抗がん剤の水可溶化とその抗がん活性. 第57回高分子学会年次大会 (2008.5.28-30. 横浜)

吉田雅貴, 田畑泰彦: スペルミン導入デキストランを用いた樹状細胞への遺伝子導入と遺伝子-細胞ハイブリッド治療. 第7回日本再生医療学会総会 (2008.3.13-14. 名古屋)

吉田雅貴, 城 潤一郎, 田畑泰彦: 配位結合を利用したポリエチレングリコールによる薬物修飾とその体内動態の評価. 第57回高分子学会年次大会 (2008.5.28-30. 横浜)

林 雪, 小川敏弘, 江崎二郎, 丸井 晃, 池田 義, 田畑泰彦: Toward optimal therapeutic angiogenesis for mouse hindlimb ischemia: combination of two angiogenic growth factors with appropriate sustained-release duration. 第29回日本炎症・再生医学会 (2008.7.8-10. 東京)

林 雪, 小川敏弘, 江崎二郎, 丸井 晃, 池田 義, 田畑泰彦: 分解速度の異なるゼラチンハイドロゲル粒子からの複数の細胞増殖因子の徐放によるマウス下肢虚血の治療. 第7回日本再生医療学会総会 (2008.3.13-14. 名古屋)

折口智哉: 蛍光物質-酸化鉄ナノ粒子複合体による細胞イメージング. 第7回日本再生医療学会総会 (2008.3.13-14. 名古屋)

折口智哉: 障害細胞および炎症部位イメージングのためのアネキシンV誘導体の作製. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008 (2008.11.17-18. 東京)

高藤義正, 城 潤一郎, 田畑泰彦: 金属配位結合を用いた siRNA のポリエチレングリコール修飾. 日本バイオマテリアル学会 第3回関西若手研究発表会 (2008.8.7. 大阪)

高藤義正, 城 潤一郎, 田畑泰彦: 金属配位結合を利用した siRNA のポリエチレングリコール修飾. 第30回日本バイオマテリアル学会大会 (2008.11.17-18. 東京)

谷郷智美, 高岡良平, 田畑泰彦: 疎水性ゼラチン誘導体の作製とスタチンの水可溶化. 第24回日本 DDS 学会大会 (2008.6.29-30. 東京)

谷郷智美, 高岡良平, 田畑泰彦: スタチンのゼラチンハイドロゲルからの徐放と骨再生. 第35回骨カルシウム代謝研究会 (2008.9.5. 京都)

谷郷智美, 高岡良平, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲルからのスタチンの徐放と骨再生. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008 (2008.11.17-18. 東京)

土井規央, 城潤一郎, 田畑泰彦: ゼラチンを用いた粒子状非ウイルス性キャリアの作製. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008 (2008.11.17-18. 東京)

大野由尊, 山本雅哉, 田畑泰彦: アルギン酸-コラーゲン複合スポンジ内での間葉系幹細胞の骨分化培養. 日本バ

イオマテリアル学会シンポジウム2008 (2008.11.17-18. 東京)

木戸祐一郎, 永根健太郎, 城 潤一郎, 田畑泰彦: カチオン化多糖を用いた組織幹細胞への small interfering RNA 導入. 第54回高分子研究発表会 (神戸) (2008.7.18. 神戸)

木戸祐一郎, 永根健太郎, 城 潤一郎, 田畑泰彦: スペルミン導入プルランを用いた幹細胞への small interfering RNA 導入. 第29回日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008 (2008.11.17-18. 東京)

林 健太郎, 小川敏弘, 高藤義正, 田畑泰彦: 培養基材の修飾による細胞凝集体の作製. 第54回高分子研究発表会 (2008.7.18. 神戸)

林 健太郎, 山本雅哉, 田畑泰彦: 間葉系幹細胞と生体吸収性微粒子とからなる細胞凝集体の作製とその軟骨組織再生誘導への応用. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008 (2008.11.17-18. 東京)

村上裕子, 木村 祐, 田畑泰彦: 貯蔵弾性率の異なるハイドロゲル基材の作製とゲル上での細胞培養. 第54回高分子研究発表会 (2008.7.18. 神戸)

村上裕子, 木村 祐, 田畑泰彦: 種々のヒアルロン酸ハイドロゲルの作製とヒト脂肪前駆細胞の培養. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008 (2008.11.17-18. 東京)

H. Negoro, M. Imamura, A. Kanematsu, S. Yamamoto, I. Kanatani, Y. Tabata and O. Ogawa: Basic fibroblast growth factor causes urinary bladder overactivity through gap junction generation in the smooth muscle. 9th Asian Congress of Urology (2008.10.2-5. Delhi, India)

根来宏光, 今村正明, 兼松明弘, 金谷 勲, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川 修: bFGF による平滑筋 gap junction 発現を介した過活動膀胱発症機序の解明. 第5回泌尿器科再建再生研究会 (2008.6.28. 仙台)

根来宏光, 今村正明, 兼松明弘, 金谷 勲, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川 修: bFGF による平滑筋 gap junction 発現を介した過活動膀胱発症機序の解明. 第7回コネキシン研究会 (2008.12.19-20. 京都)

高岡良平, 田畑泰彦: PLLA 不織布内での細胞培養に与える播種細胞数と接着因子の影響. 第28回再生医療学会 (2008.3.13-14. 名古屋)

高岡良平, 田畑泰彦: 血管新生能力を持つヘルニア治療用テフロンメッシュの作製. 第27回日本 Biomaterial 学会 (2008.11.17-18. 東京)

K. Sawamura, T. Ikeda, M. Nagae, Y. Mikami, H. Hase, S. Okamoto, K. Ikoma, T. Yamada, M. Saito, K. Matsuda, Y. Tabata, M. Kawata and T. Kubo: A study of the effects of platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel on the degenerated intervertebral disc. World forum for spine research first Japanese meeting. (2008.1.23-26. Kyoto)

澤村和秀, 池田 巧, 長江将輝, 三上靖夫, 長谷 斉, 岡本慎一, 生駒和也, 山田哲也, 田畑泰彦, 河田光博, 久保俊一: 多血小板血漿含浸ゼラチンハイドロゲル粒子による椎間板変性抑制効果の検討. 第37回日本脊椎脊髄病学会 (2008.4.24-26. 東京)

澤村和秀, 池田 巧, 長江将輝, 三上靖夫, 長谷 斉, 岡本慎一, 生駒和也, 山田哲也, 田畑泰彦, 河田光博, 久保俊一: 多血小板血漿と生分解性ゼラチンハイドロゲル粒子の変性椎間板内投与による椎間板変性抑制機序の検討. 第29回日本炎症再生医学会 (2008.7.8-10. 東京)

澤村和秀, 池田 巧, 長江将輝, 三上靖夫, 長谷 斉, 岡本慎一, 生駒和也, 山田哲也, 田畑泰彦, 河田光博, 久保俊一: 多血小板血漿による椎間板変性抑制のメカニズム解析. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 (2008.10.23-24. 京都)

中野貴由, 石本卓也, 李 志旭, 田畑泰彦, 馬越佑吉: 骨微細構造の異方性を考慮した骨質評価と骨再建材料の設

計. 第7回日本再生医療学会総会 (2008.3.13-14. 愛知)

T. Ishimoto, T. Nakano, Y. Umakoshi and Y. Tabata: Changes in bone microstructure and toughness during healing process of long bone. International Congress on Advanced Structural and Functional Materials Design 2008. (2008.11.10-12. Osaka)

T. Ishimoto, T. Nakano, Y. Umakoshi, M. Yamamoto and Y. Tabata: Preferred alignment of biological apatite (BAP) is a promising predictor for mechanical function of bone tissue regenerated by controlled-released rBMP-2. 8th World Biomaterial Congress. (2008.5.28-6.1. Amsterdam)

JW. Lee, T. Nakano, S. Toyosawa and Y. Tabata: Analysis for preferential orientation of BAP c-axis using pathological model. The Material Research Society of Korea (2008.11.7, 8. Seoul)

JW. Lee, T. Nakano, S. Toyosawa, Y. Tabata and Y. Umakoshi: Orientation of biological apatite (BAP) c-axis and corresponding mechanical function in osteopetrotic model (op/op mouse). 8th World Biomaterial Congress. (2008.5.28-6.1. Amsterdam)

JW. Lee, T. Nakano, Y. Umakoshi, S. Toyosawa, and Y. Tabata.: Analysis of osteoarthritis (OA) by degree of preferential alignment of BAP. The Korea of Institute of Metals (2008.4.24, 25. Daejeon)

李 志旭, 中野貴由, 馬越佑吉, 豊澤 悟, 田畑泰彦: 硬組織疾患マウスの大腿骨骨幹中央部での BAP の配向性分布. 日本金属学会2008年春季大会 (2008.3.26-28. 東京)

N. Nitta, S. Ohta, T. Tanaka, R. Takazakura, T. Toyama, S. Kanasaki, Y. Nagatani, N. Kono, A. Furukawa, M. Takahashi, K. Murata, T. Sakamoto and Y. Tabata: Safety evaluation of gelatin microsphere (GMS) with changeable dissolution time as an embolic agent with regard to our experience of clinical use and the possible use of GMS as a drug delivery system. (DDS) European Congress of Radiology (2008.3.7-11. Vienna)

N. Nitta, S. Ohta, A. Sonoda, A. Seko, Y. Miyagawa, T. Tanaka, M. Takahashi, K. Murata, T. Sakamoto and Y. Tabata: Basic investigation to bind cisplatin with gelpart. ISIR & JSIR (2008.5.14-17. Nagano)

N. Nitta, S. Ohta, A. Sonoda, A. Seko, Y. Miyagawa, T. Tanaka, M. Takahashi, K. Murata, T. Sakamoto and Y. Tabata: Basic investigation to assess the embolic effects of gelpart and to bind cisplatin with gelpart. CIRSE (Cardiovascular and Interventional Radiological Society of Europe) (2008.9.13-17. Copenhagen)

瀬古安由美, 新田哲久, 木村 祐, 大田信一, 園田明永, 村田喜代史, 森川茂廣, 田畑泰彦: コラーゲンスポンジと徐放化 bFGF を用いたラット脂肪組織再生モデルの MRI 画像評価. 第7回日本再生医療学会総会 (2008.3.13-14. 名古屋)

瀬古安由美, 新田哲久, 大田信一, 園田明永, 村上陽子, 高橋雅士, 村田喜代史, 森川茂廣, 城 潤一郎, 田畑泰彦: 酸化鉄ナノ粒子を使用した組織特異性プローベの開発. 第67回日本医学放射線学会総会 (2008.4.4-6. 横浜)

A. Seko, N. Nitta, Y. Tabata, A. Sonoda, Y. Miyagawa, K. Tsuchiya, S. Takemura and K. Murata: Imaging of biodegradable tissue-engineered materials for tissue regeneration. Radiological Society of North America 94th Scientific Assembly and Annual Meeting (2008.11.30-12.5. Chicago)

園田明永, 新田哲久, 高松繁行, 瀬古安由美, 大田信一, 宮川善浩, 池畑芳雄, 田中豊彦, 城 潤一郎, 長野 勇, 田畑泰彦, 高橋雅士, 松井 修, 村田喜代史: 磁石によるリゾビストを用いたシスプラチン誘導の可能性. 第23回日本 IVR 学会関西地方会. (第44回関西 IVR 研究会). 第24回日本 IVR 学会中部地方会 (合同開催) (2008.2.15-16. 大阪)

- A. Sonoda, N. Nitta, Y. Ikehata, A. Seko, S. Ohta, Y. Miyagawa, S. Takamatu, T. Tanaka, J. Jo, I. Nagano, Y. Tabata, M. Takahashi, O. Matsui, K. Murata. : Basic investigation of a newly-developed anti-cancer drug with a function of thermal ablation instructed by magnets. 第37回日本 IVR 学会総会 (2008.5.14-17. 軽井沢)
- 園田明永, 新田哲久, 瀬古安由美, 大田信一, 高松繁行, 池畑芳雄, 田畑泰彦, 高橋雅士, 松井 修, 村田喜代史 : Dextran magnetite complex (DM) と cisplatin を用いた磁石誘導可能かつ温熱療法可能な抗癌剤の開発. 第44回日本放射線学会秋季臨床大会 (2008.10.22-24. 福島)
- A. Sonoda, N. Nitta, S. Ohta, A. Seko, K. Murata, S. Takamatu, Y. Miyagawa, M. Takahashi, Y. Tabata, I. Nagano and O. Matsui : Development of an anticancer compound allowing magnet-controlled delivery ; Experimental study using superparamagnetic iron oxide coated with carboxydextran (DM) and cisplatin. Radiological Society of North America 94th Scientific Assembly and Annual Meeting (2008.11.30-12.5. Chicago)
- 大田信一, 新田哲久, 園田明永, 瀬古安由美, 外山哲也, 田中豊彦, 高橋雅士, 坂本 力, 田畑泰彦, 村田喜代史 : ゼラチン製塞栓物質とシスプラチンとの結合 : 結合させる最適条件の検討. 第67回日本医学放射線学会総会 (2008.4.4-6. 横浜)
- 外山哲也, 新田哲久, 大田信一, 河野直明, 田中豊彦, 高櫻竜太郎, 古川 顕, 高橋雅士, 村田喜代史, 田畑泰彦 : シスプラチン含有ゼラチン粒子 (C-GMS) の肝細胞癌に対する使用経験. 第67回日本医学放射線学会総会 (2008.4.4-6. 横浜)
- 楠原廣久, 和田仁孝, 森 廣政, 磯貝典孝, 田畑泰彦 : 血管新生療法 (徐放化塩基性線維芽細胞増殖因子) を用いた指尖部切断再接着. 第51回日本手の外科学会 (2008.4.17-18. つくば)
- 田村悦代, 福田宏之, 田畑泰彦, 楠山敏行, 森 有子, 岡田信也, 渋谷正人, 飯田政弘 : 線維芽細胞増殖因子を用いた声帯内自家脂肪注入術の試み. 第60回日本気管食道科学会 (2008.11.6-7. 熊本)
- 高木 元, 宮本正章, 安武正弘, 高木郁代, 高野仁司, 加藤浩司, 太良修平, 大坪春美, 田畑泰彦, 水野杏一 : 徐放化 basic FGF 蛋白による血管再生治療—低侵襲, 安全かつ有効な再生治療の提案—. 第14回日本血管内治療学会総会 シンポジウム (2008.7.26. 東京)
- 渋谷弥生, 根岸 泉, 田畑泰彦, 石川 治 : プレオマイシン含有ポリ乳酸マイクロスフェアの単回注射による皮膚線維化モデルマウスの作製 厚生労働省「強皮症における病因解明と根治的治療法の開発」研究班・第11回強皮症研究会議合同会議 (2008.1.19. 東京)
- N. Sasaki, T. Minami, K. Yamada, H. Yamada, Y. Inoue, K. Kobayashi and Y. Tabata : Thee effects of Bfgf-containing gelatin hydrogel microsphere injected into the articular cavity on an equine third metacarpal bone defect model. ACVS2008 (2008.10.23. San Diego)
- 下野賢吾, 大島正充, 完山 学, 大野充昭, 縄稚久美子, 田畑泰彦, Walter Sebal, 洲鎌和茂, 窪木拓男 : 大腸菌由来・遺伝子組換え BMP-2 と塩基性ゼラチンを用いた骨補填材の効果. 第21回日本歯科医学会総会 (2008.11.14-16. 横浜)
- K. Morita, K. Hayashi, K. Doi, K. Koretake, T. Kubo, Y. Tabata and Y. Akagawa : Bone regeneration around fenestrated implants by different bFGF-Gelatin hydrogel complexes. 86th International Association for Dental Research. (2008. 7.2-5. Toronto)
- 石松宏隆, 諸富孝彦, 北村知昭, 田畑泰彦, 寺下正道 : ゼラチン粒子から徐放される FGF-2 濃度が象牙質/歯髄複合体再生に与える影響. 第128回日本歯科保存学会 (2008.6.5-6. 新潟)
- 石松宏隆, 北村知昭, 諸富孝彦, 田畑泰彦, 寺下正道 : FGF-2 濃度の違いが象牙質欠損部における硬組織誘導に

与える影響. 第129回日本歯科保存学会 (2008.11.6-7. 富山)

I. Asahina, H. Ikeda, M. Shibahara, T. Tobita, M. Ikeda, K. Yamada and Y. Tabata: Mnadible bone regeneration using basic fibroblast growth factor. 8th Asian Congress of Oral and Maxillofacial Surgeons. (2008.11.5 Bangkok)

戸部 賢, 小幡英章, 田畑泰彦, 齋藤 繁: リドカイン徐放薬の作成と疼痛治療への応用. 第55回日本麻酔科学会 (2008.6.12-14. 横浜)

夏本徹哉, 宇山 浩, 田畑泰彦: 生体内吸収性ファイバーシート上での上皮細胞の増殖. 第7回日本再生医療学会事務局 (2008.3.13-14. 名古屋)

美濃貴之, 松原千恵, 宇山 浩, 田畑泰彦: 電界紡糸による多糖類封入ファイバーの作製と応用. 第57回高分子学会年次大会 (2008.5.28-30. 横浜)

小川有佳子, 小川敏弘, Moon Young Sun, 宇山 浩, 田畑泰彦: 成長因子含有ゼラチン/ポリ乳酸ナノファイバー上における間葉系幹細胞の培養. 第57回高分子学会年次大会 (2008.5.28-30. 横浜)

北川偉之, 夏本徹哉, 宇山 浩, 田畑泰彦: モルフォロジーを制御した電界紡糸不織布の細胞足場材料への応用. 第57回高分子学会年次大会 (2008.5.28-30. 横浜)

大澤昌之, 高藤義正, 古川洋志, 田畑泰彦, 山本有平: ICG で標識可能なゼラチン導入ヒアルロン酸の開発: リンパ行性ドラッグデリバリーシステムの開発~第2報. 第17回日本形成外科学会基礎学術集会 (2008.10.2-3. 東京)

成田 淳, 高原政利, 古川孝志, 荻野利彦, 福島重宣, 木村 祐, 田畑泰彦: 線維芽細胞増殖因子とゼラチンハイドロゲルを用いた半月板修復—器官培養での検討—. 第7回日本再生医療学会総会 (2008.3.13-14. 名古屋)

成田 淳, 高原政利, 佐藤大祐, 荻野利彦, 福島重宣, 木村 祐, 田畑泰彦: 成長因子とドラッグデリバリーシステムを用いた半月板修復に関する研究. 第34回日本整形外科学会スポーツ医学会学術集会 (2008.7.4-5. 東京)

成田 淳, 高原政利, 伊藤和生, 佐藤大祐, 荻野利彦, 福島重宣, 木村 祐, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲルと線維芽細胞増殖因子を用いた家兎半月板修復. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 (2008.10.23-24. 京都)

羽藤直人, 菰渕勇人, 寺岡正人, 田畑泰彦: b-FGF の徐放投与による再生促進を目的とした顔面神経減荷手術. 第7回再生医療学会 (2008.3.14. 名古屋)

2) 講演・シンポジウム

Y. Tabata: Frontier of tissue engineering to realize regenerative medical therapy. Advances in Bioresorbable Biomaterials for Tissue Engineering (2008.1.5-6. Singapore)

田畑泰彦: 再生医療を実現させつづける医用材料技術. 医工連携ウェルネス人材育成セミナー (2008.1.15. 京都)

田畑泰彦: 再生医療の最近の進歩. 腎再生医療学術講演会 (2008.2.5. 長崎)

田畑泰彦: バイオマテリアルを活用した再生誘導治療の実際. 北野病院第13回研究セミナー—京都大学との連携先端医療臨床研究の推進に向けて— (2008.2.13. 大阪)

田畑泰彦: DDS 化細胞増殖因子を活用した再生誘導治療の臨床応用. 医工学フォーラム2007年度特別学術講演会 (2008.2.20. 京都)

Y. Tabata: Biomaterials-Based Tissue Engineering to Realize Tissue Regenerative Therapy. The Eleventh US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference on Tissue Engineering (2008.2.28. Washington)

Y. Tabata: DDS technology for tissue regeneration and siRNA. Roche special seminar (2008.2.29. Nutley)

田畑泰彦: 最近の再生医療のレビュー. 富士フイルム株式会社講演会 (2008.3.6. 神奈川)

田畑泰彦: DDS テクノロジーと再生医療. 第7回日本再生医療学会総会 (2008.3.13-14. 名古屋)

- 田畑泰彦：生体吸収性ハイドロゲルを利用した再生誘導治療．日本動物高度医療センター講演会（2008.3.25. 東京）
- Y. Tabata: Practical strategy of tissue engineering to realize regenerative therapy. Korea, University, Medical Center Guro Hospital Seminar (2008.3.27-28. Korea)
- 田畑泰彦：先端医療を具現化するバイオマテリアル・DDS 技術．日本化学会第88回春季大会 ATP フロンティア バイオ先端医療（2008.3.29. 東京）
- 田畑泰彦：再生誘導治療と幹細胞研究における tissue engineering の役割．第8回形成外科集学医療技術研究会（2008.4.5. 大阪）
- 田畑泰彦：バイオマテリアルから見た血管再生誘導治療の最前線．第20回岐阜心・血管研究会（2008.4.17. 岐阜）
- 田畑泰彦：バイオマテリアルと生体組織工学とを駆使した先端医療の最前線．第112回眼科学会総会（2008.4.19. 横浜）
- Y. Tabata: Tissue regeneration by biodegradable cell scaffolds. Chulalongkorn University special seminar (2008.5.8. Bangkok)
- 田畑泰彦：再生医工学の基本技術と再生誘導治療の最前線．第28回日本脳神経外科コンgres総会（2008.5.11. 横浜）
- 田畑泰彦：自然治癒力を高め病気を治す再生医療の最前線．日本薬剤学会第23年会 公開市民講座（2008.5.20-22. 札幌）
- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生誘導治療．関西バイオの未来を考える会セミナー（2008.5.26. 大阪）
- Y. Tabata: Biomaterials technology of growth factor release realize clinical angiogenic therapy. 8th World Biomaterials Congress (2008.5.28-6.1. Amsterdam)
- 田畑泰彦：再生誘導治療と基礎生物医学研究のためのバイオマテリアル技術．中部大学応用生物学部・生物機能開発研究所講演会（2008.6.3. 春日井）
- 田畑泰彦：生体組織工学を利用した再生医療．第1回生体機能化研究会（2008.6.4. 東京）
- 田畑泰彦：バイオマテリアルを利用した薬物治療・再生医療の最前線．和歌山県立医科大学医学部眼科学セミナー（2008.6.5. 和歌山）
- 田畑泰彦：先端医療を実現しつつけるバイオマテリアル技術の最前線と将来展望．社団法人発明協会京都支部記念講演会（2008.6.9. 京都）
- Y. Tabata: Tissue engineering technology to realize regenerative medical therapy. CIMTEC2008 (2008.6.8-13. Italy)
- 田畑泰彦：生物医学・医療のための高分子材料．第43回高分子の基礎と応用講座「わかりやすい高分子入門」（2008.6.20. 大阪）
- Y. Tabata: Evaluation of biomaterials-based tissue engineering technology for regeneration therapy. TERMIS-EU2008 (2008.6.22-26. Portugal)
- Y. Tabata: Tissue regeneration therapy based on drug delivery technology. Salon de grados, Facultad de Farmacia (2008.6.26. Spain)
- 田畑泰彦：生体吸収性ハイドロゲルからの siRNA の徐放化とその活性増強．第24回日本 DDS 学会学術集会（2008.6.29-30. 東京）
- 田畑泰彦：一日本を代表する大学発ベンチャーの三先生に聞く一大学発ベンチャーの今と未来．メドケミニュース

座談会 (2008.7.2. 京都)

Y. Tabata: Design of magnetic resonance imaging contrast agent for angiogenic therapy. 35th Controlled Release Society (2008.7.12-18. New York)

田畑泰彦: ここまで進んだ再生医療の実際と今後の方向性. 秋田大学泌尿器科同窓会「虎の会」と日本新薬(株)共催講演会 (2008.7.19. 秋田)

田畑泰彦: ここまで進んだからだをよみがえらせる材料. 京都大学再生医科学研究所第3回公開講演会 (2008.7.26. 京都)

Y. Tabata: Strategies for tissue regeneration and vascularization based on release technology of growth factor. 「Advances in Tissue Engineering」(2008.8.13-16. Teks)

Y. Tabata: Translational research in tissue engineering: Experiences and lessons learned from Japan. Gadjah Mada University Seminar (2008.8.27-30. Yogyakarta)

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. 神戸大学整形外科講義 (2008.9.4. 神戸)

田畑泰彦: 材料工学からみた先端医療. 技術サロン例会 (2008.9.9. 大阪)

田畑泰彦: 再生誘導治療のためのバイオマテリアル技術の最前線. 第72回日本皮膚科学会 東部支部学術大会 (2008.9.20-21. 秋田)

田畑泰彦: 材料科学からみた最先端医療と生物医学研究. 京都大学大学院教育コース「医工学連携コース」セミナー (2008.9.26. 京都)

田畑泰彦: 先端医療と生物医学研究を支えるバイオマテリアル技術. 日本レーザー歯学会 第20回記念大会 総会・学術大会 (2008.9.20-21. 大阪)

Y. Tabata: Tissue regeneration therapy based on drug delivery technology. Indian Institute of Technology Kanpur (2008.10.1. India)

田畑泰彦: バイオマテリアルから見た再生誘導治療の実際と歯科領域への応用. 特定非営利活動法人 口腔医科学会 平成20年度 第11回学術大会 再生医療の未来へのかけ橋 (2008.10.18. 東京)

田畑泰彦: 幹細胞・iPS細胞・再生医療のビジネスへの糸口～専門家との直接意見交換シンポジウム in KRP～. 京都リサーチパーク (2008.10.23. 京都)

Y. Tabata: Present status of tissue engineering-based regenerative medical therapy. 16th Alexandria International Dental Congress (2008.10.28-31. Alexandria)

Y. Tabata: Advanced medical therapy based on biomaterials of nano-order design (2008.11.6-8. Thailand)

Y. Tabata: Delivery technology of biosignaling molecules for tissue regeneration therapy. bone-tec 2008 (2008.11.7-9. Hannover)

Y. Tabata: Regeneration therapy based on drug Delivery technology of growth factor and gene. Uppsala University (2008.11.10. Sweden)

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. 東京大学大学院 医療ナノテクノロジー人材養成ユニット「ナノ医療工学」(2008.11.13. 東京)

田畑泰彦: 金属配位結合を利用した薬の高分子修飾. 第66回(財)日本化学繊維研究所講演会 (2008.11.14. 京都)

田畑泰彦: 再生誘導治療の最前線と獣医医療への展開. 第4回獣医再生医療研究会 (2008.11.15. 大阪)

田畑泰彦: ここまできた日本の再生医療. 芦屋川カレッジ第25期 必修コース (2008.11.19. 芦屋)

田畑泰彦: 再生医学 生体組織工学をベースとした再生医療. 京都府立医科大学眼科学講義 (2008.11.19. 京都)

- 田畑泰彦：先端医療と生物医学研究のための医工連携技術。平成20年度第3回ウエルネス研究科（2008.11.21. 京都）
- Y. Tabata: Biomaterial and drug delivery technologies toward the realization of tissue regeneration therapy. Zhejiang University Seminar (2008.11.26. China)
- 田畑泰彦：再生医療の今～生体材料から幹細胞まで。第8回次世代医療システム産業化フォーラム2008（2008.11.28. 京都）
- 田畑泰彦：再生医学の最近の進歩。第46回日本人工臓器学会（2008.11.27-29. 東京）
- 田畑泰彦：再生誘導治療を実現するバイオマテリアル技術。第10回記念循環器再生医療研究会（2008.11.27-29. 東京）
- 田畑泰彦：再生医療の全体像を見わたせるわかりやすい解説講座。京都リサーチパーク（2008.12.2. 京都）
- 田畑泰彦：DDSを用いた再生医療から分子イメージングまで。第5回岐阜脳科学研究会（2008.12.6. 岐阜）
- 田畑泰彦：再生医療の基礎と臨床応用を見すえた遺伝子デリバリー技術。学術セミナー 様々な機能を備えた遺伝子導入技術の最前線（2008.12.8. 神戸）
- 田畑泰彦：バイオマテリアル技術から見た再生誘導治療（再生医療）。平成18～20年度北海道重点領域特別研究 北海道再生医療・医用工学研究の公開拡大シンポジウム（2008.12.11. 札幌）
- M. Yamamoto and Y. Tabata: Importance of drug delivery systems in tissue engineering. Annual Seminar at NIDCR, National Institute of Health. (2008.2.23. Bethesda)

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。当研究分野では主に、高分子を中心とする有機材料、また、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で、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。

1. 材料—生体システム間相互作用

医用材料は、細胞や組織のような生きた生体システムと接触し、その界面で起こる分子間相互作用を通して機能を発揮します。そのため、タンパク質吸着や細胞接着のような材料—生体システム間相互作用を詳細に理解し、また、それらを厳密に制御することは重要な課題です。当研究分野では、表面プラズモン共鳴分析装置、全反射蛍光顕微鏡、走査型共焦点レーザー顕微鏡などの光学的手法を用いてこれらの課題に取り組んでいます。また、これらの基礎研究の結果をもとに高感度バイオセンシング装置の開発を行っています。

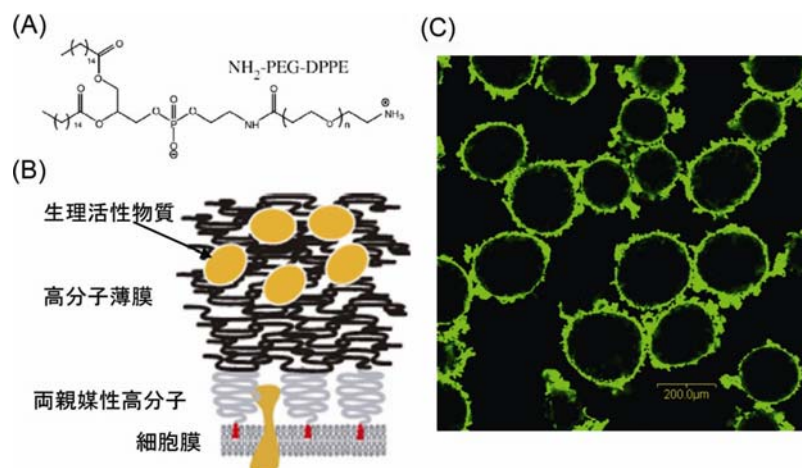


図1. (A) 末端にポリエチレングリコール鎖を有する脂質分子を設計した。この分子は細胞膜に親和性を持ち (B)、インスリン産生細胞からなる膵ランゲルハンス島の表面に高分子薄膜を形成させることが可能である (C)。

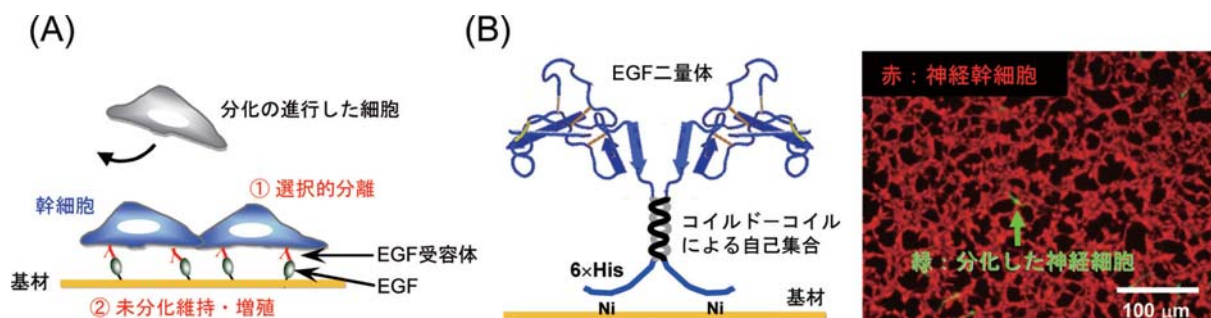


図2. 神経幹細胞を大量に調製するための培養基材の設計。(A) 神経幹細胞を選択的に増殖するための戦略。(B) 自己二量化型 EGF の配向固定した基材上での神経幹細胞の選択的増殖。

2. 組織工学用材料

細胞移植による臓器や中枢神経の再生医療に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免疫系からの攻撃に打ち勝たなければなりません。これには高分子ハイドロゲルによる細胞のカプセル化が有効です。当研究分野では、さらに優れた機能をもつカプセル化材料を生み出すため、材料化学的観点から研究を行っています (図1)。また、移植細胞による損傷組織の修復には、様々なシグナル分子を必要とします。そこで、細胞の機能を高度に制御できるタンパク質性材料の創出を目的として、遺伝子組換え技術を利用した組織修復材料の設計に取り組んでいます。

3. 移植細胞プロセッシング技術

再生医療の実現にとって、移植用の細胞をどのように調製するかという問題は、もっとも重要な課題の一つです。当研究分野では、ドーパミン作動性神経細胞、インスリン産生細胞、造血幹細胞、神経前駆細胞などを、安全かつ高効率に作り出すための細胞分化制御・増幅技術の開発に取り組んでいます。その一例を図2に示します。とくに、細胞外マトリックスや細胞増殖因子のような生体分子、あるいは、ストローマ細胞のような異種の細胞を利用して、細胞の分化・増殖に適した人工環境の創出を目指しています。

4. 細胞アレイ

多種類の生体分子の機能を迅速に分析するための細胞アレイの開発を行っています。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, あるいは, RNA, タンパク質, 生細胞などを配列固定し, 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。また, 細胞の形態や培養液の循環を厳密に制御する技術と組み合わせ, 新たなバイオアッセイ法へと展開する試みも行っています。細胞アレイ分析法は, 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されます。

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.

1. Surface chemistry of biomedical materials

Protein adsorption and complement activation 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 protein adsorption and complement activation by 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 the complement activation. 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.

2. Polymeric materials for cell transplantation therapy

Islets of Langerhans have been transplanted to treat insulin-dependent diabetes patients. Adult pancreatic b cells are known to have a poor growth capacity. Islets containing b 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 1,000 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.

3. 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.

4. 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

- H. Miyazaki, T. Maki, K. Kato and H. Iwata: Surface-displayed antibodies as a tool for simultaneously controlling the arrangement and morphology of multiple cell types with microscale precision. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, in press
- H. Miyazaki, K. Kato, Y. Teramura and H. Iwata: A collagen-binding mimetic of neural cell adhesion molecule. *Bioconjugate Chem.* **19**: 1119–1123 (2008)
- Y. Teramura, Y. Kaneda, T. Totani and H. Iwata: Behavior of synthetic polymers immobilized on cell membrane. *Biomaterials* **29**: 1345–1355 (2008)
- Y. Teramura and H. Iwata: Islets surface modification prevents blood-mediated inflammatory responses. *Bioconjugate Chem.* **19**: 1389–1395 (2008)
- T. Totani, Y. Teramura and H. Iwata: Immobilization of urokinase to islet surface by amphiphilic poly (vinyl alcohol) carrying alkyl side chains. *Biomaterials* **29**: 2878–2883 (2008)
- N. Miyano, Y. Inoue, Y. Teramura, K. Fujii, H. Iwata and H. Kotera: Gene transfer device with submicron-needle produced by a self-organization phenomenon in Fe-alloy. *Lab Chip* **8**: 1104–1109 (2008)
- C.A. Agudelo and H. Iwata: The development of alternative vitrification solutions for microencapsulated islets. *Biomaterials* **29**: 1167–1176 (2008)
- C.A. Agudelo, Y. Teramura and H. Iwata: Feasibility of cryopreserved agarose-encapsulated islets as a bioartificial pancreas. *Transplantation* in press
- S. Fujita, D. Ono, M. Oshima and H. Iwata: Supercritical CO₂-assisted embossing for studying cell behaviour on microtextured surfaces. *Biomaterials* **29**: 4494–4500 (2008)
- S. Fujita, Y. Morita and H. Iwata: High-throughput evaluation of quiescent hematopoietic progenitor cells using a micro-multiwell plate. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**: 2753–2758 (2008)
- S. Fujita, J. Toguchida, Y. Morita and H. Iwata: Clonal analysis of hematopoiesis-supporting activity of human mesenchymal stem cells in association with Jagged1 expression and osteogenic potential. *Cell Transplant.*, in press
- K. Kuraishi, H. Iwata, S. Nakano, S. Kubota, H. Tonami, M. Toda, N. Toma, S. Matsushima, K. Hamada, S. Ogawa and W. Taki: Development of nanofiber-covered stents using electrospinning: In vitro and acute phase in vivo experiments. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **88B**: 230–239 (2009)
- Y. Arima, M. Toda and H. Iwata: Complement activation on surfaces modified with ethylene glycol units. *Biomaterials* **29**: 551–560 (2008)

- M. Toda, T. Kitazawa, I. Hirata, Y. Hirano and H. Iwata : Complement activation on surfaces carrying amino groups. *Biomaterials* **29**: 407-417 (2008)
- T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato and H. Iwata : Essential role of structural integrity and firm attachment of surface-anchored epidermal growth factor in adherent culture of neural stem cells. *Biomaterials* **29**: 4403-4408 (2008)
- T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato and H. Iwata : Self-assembling chimeric protein for the construction of biodegradable hydrogels capable of interaction with integrins expressed on neural stem/progenitor cells. *Biomacromolecules* **9**: 1411-1416 (2008)
- T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato, Y. Arima and H. Iwata : Multifunctional chimeric proteins for the sequential regulation of neural stem cell differentiation. *Bioconjugate Chem.* **19**: 516-524 (2008)
- H. Fujimoto, K. Kato and H. Iwata : Use of microarrays in transfection of mammalian cells with dicer-digested small interfering RNAs. *Anal. Biochem.* **374**: 417-422 (2008)
- H. Fujimoto, K. Kato and H. Iwata : Prolonged durability of electroporation microarrays as a result of addition of saccharides to nucleic acids. *Anal. Bioanal. Chem.*, in press
- H. Fujimoto, K. Kato and H. Iwata : Electroporation microarray for parallel transfer of small interfering RNA into mammalian cells. *Anal. Bioanal. Chem.* **392**: 1309-1316 (2008)
- S. Koda, Y. Inoue and Iwata H. : Gene transfection into adherent cells using electroporation on a dendrimer-modified gold electrode. *Langmuir* **24**: 13525-13531 (2008)
- E. Njatawidjaja and H. Iwata : Gene delivery to cells on a miniaturized multiwell plate for high-throughput gene function analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **392**: 405-408 (2008)
- Y. Inoue Y, H. Fujimoto, T. Ogino and H. Iwata : Site-specific gene transfer with high efficiency onto a carbon nanotube-loaded electrode. *J. R. Soc. Interface* **5**: 909-918 (2008)

2) 著 書

- K. Kato, I-K. Ko, T. Ishimuro, M. Toda, Y. Arima, I. Hirata and H. Iwata : High-throughput cytometry using antibody arrays. *Biomaterials in Asia* (T. Tateishi, ed., World Scientific Publishing Co Pte Ltd., Singapore) 506-516 (2008)
- 加藤功一, 岩田博夫 : 細胞用抗体・マトリックスアレイ, マイクロアレイ・バイオチップの最新技術・応用編 (伊藤嘉浩 監修, CMC 出版, 東京) 285-294 (2007)
- Y. Arima, Y. Teramura, H. Takiguchi, K. Kawano, H. Kotera and H. Iwata : Surface plasmon resonance and surface plasmon field enhanced fluorescence spectroscopy for sensitive detection of tumor markers, "Methods in Molecular Biology, Vol. 503: Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols, Optical-based Detectors" (A. Rasooly, KE. Herold Eds., Humana Press, Totowa, USA) 3-20 (2008)

3) 総 説

- 岩田博夫, 有馬祐介 : 再生医療と幹細胞研究に関連した高分子材料. *高分子*, **57**: 917-922 (2008)
- 上田祐介, 寺村裕治, 岩田博夫 : 臍細胞—糖尿病の治療を目指して—. *バイオマテリアル*, **26**: 62-66 (2008)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 岩田博夫 : 見た目が9割—表面+細胞—, 第47回生体医工学会大会 (2008.5.8. 神戸)

- K. Kato, M. Hiraoka, T. Nakaji-Hirabayashi and H. Iwata: Collagen-binding chimeric proteins for the improved survival of neural progenitor cells entrapped in collagen scaffolds. 8th World Biomaterials Congress (2008.5.29-6.1. Amsterdam)
- Y. Teramura and H. Iwata: Surface modification of islets with urokinase for prevention of thrombosis formation. 8th World Biomaterials Congress (2008.5.29-6.1. Amsterdam)
- 寺村裕治, 乾 靖, 金田成弘, 岩田博夫: 両親媒性高分子を用いた移植用細胞の表面修飾剤の開発. 第57回高分子討論会 (2008.9.24. 大阪)
- 寺村裕治, 岩田博夫: ポリエチレングリコール結合脂質による膵島の表面修飾と生着率の評価. 第46回日本人工臓器学会 (2008.11.29. 東京)
- C.A. Agudelo, Y. Teramura and H. Iwata: *In vivo* study on the long-term function of agarose-encapsulated islets after cryopreservation. 8th World Biomaterials Congress (2008.5.29-6.1. Amsterdam)
- 乾 靖, 寺村裕治, 岩田博夫: 高分子材料と生体との相互作用—両親媒性高分子と生細胞—. 第37回医用高分子シンポジウム (2008.7.28-29. 東京)
- Y. Arima and H. Iwata: Effect of adsorbed fibronectin and albumin on cell adhesion to well-defined surface. 8th World Biomaterials Congress (2008.5.29-6.1. Amsterdam)
- 有馬祐介, 岩田博夫: フィブロネクチン/アルブミン競争吸着表面での細胞接着. 第57回高分子討論会 (2008.9.24-26. 大阪)
- 有馬祐介, 岩田博夫: 材料極表面の官能基が細胞接着に及ぼす影響. 第4回日本接着学会関西支部若手研究者の会 (2008.12.3. 大阪)
- 外波弘之, 滝 和郎, 濱田和秀, 倉石慶太, 中野恵之, 窪田真一郎, 戸田満秋, 岩田博夫: 脳血管内治療用カバードステントの開発—カバードステントの内皮化—. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008 (2008.11.17. 東京)
- M. Toda and H. Iwata: Activation of the complement system on NH_2/CH_3 and NH_2/COOH mixed self-assembled monolayers. 8th World Biomaterials Congress (2008.5.29-6.1. Amsterdam)
- 戸田満秋, 有馬祐介, 岩田博夫: 末端メトキシ化 PEG 担持表面の劣化による血清補体の活性化. 第57回高分子討論会 (2008.9.24-26. 大阪)
- T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato and H. Iwata: Epidermal growth factor signaling at cell-substrate interfaces. 8th World Biomaterials Congress (2008.5.29-6.1. Amsterdam)
- T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato and H. Iwata: Self-assembling chimeric proteins for constructing cell adhesive hydrogels. Taiwan-Japan Symposium on Nanotechnology and Nanomedicine (2008.10.30. Kyoto).
- 中路 正, 加藤功一, 岩田博夫: 二量体形成能を持つ増殖因子キメラ蛋白質の合成とその神経幹細胞培養基材への応用. 第37回医用高分子シンポジウム (2008.7.28-29. 東京)
- 中路 正, 加藤功一, 岩田博夫: 中枢神経再生に向けた神経栄養因子担持ヒアルロン酸ハイドロゲルの設計. 第57回高分子討論会 (2008.9.24-26. 大阪)
- 江田昇平, 井上祐貴, 岩田博夫: デンドリマー修飾電極を用いたエレクトロポレーション法による細胞への遺伝子導入—デンドリマーの世代の効果—. 第3回関西若手発表会 (バイオマテリアル学会) (2008.8.7. 大阪)
- 江田昇平, 井上祐貴, 岩田博夫: デンドリマー修飾電極を用いたエレクトロポレーション法による細胞への遺伝子導入. 第57回高分子討論会 (2008.9.24-26. 大阪)

川越雅子, 有馬祐介, 戸田満秋, 岩田博夫: デキストランによる補体活性化. 第3回関西若手発表会 (バイオマテリアル学会) (2008.8.7. 大阪)

川越雅子, 有馬祐介, 戸田満秋, 岩田博夫: 水酸基をもつ高分子による補体活性化. 第57回高分子討論会 (2008.9.24-26. 大阪)

上田祐介, 藤田 聡, 岩田博夫: 霊長類 ES 細胞の未分化維持のための各種培養液の検討. 第3回関西若手発表会 (バイオマテリアル学会) (2008.8.7. 大阪)

上田祐介, 藤田 聡, 岩田博夫: Feeder 細胞を排除した培養基材表面上での霊長類 ES 細胞の培養. 第57回高分子討論会 (2008.9.24-26. 大阪)

苗村祥太, 寺村裕治, 岩田博夫: 両親媒性高分子を用いた細胞の配列手法の研究. 第57回高分子討論会 (2008.9.24-26. 大阪)

2) 講演・シンポジウム

岩田博夫: バイオインターフェース—分析+デザイン+応用—. 東北大学グローバル COE プログラム「新世紀世界の成長焦点に築くナノ医工学拠点」第6回国際シンポジウム・REDEEM 第4回シンポジウム (2008.7.12. 東京)

岩田博夫: バイオインターフェース—分析+デザイン+応用—. 第28回表面科学学術講演会 (2008.11.13. 東京)

岩田博夫, 中路 正, 加藤功一: 神経疾患の細胞に用いるバイオマテリアルの研究. 日本化学繊維研究所講演会 (2008.11.14. 京都)

岩田博夫: 再生医学を支える高分子材料. 第17回ポリマー材料フォーラム (招待講演) (2008.11.27. 広島)

H. Iwata: Biointerface—Analysis + Design + Application—. The IUMRS International Conference in Asia 2008 (2008.12.9-13. Nagoya)

岩田博夫: , 再生医療を用いたhybrid Artificial Pancreas, 第46回日本人工臓器学会大会 (2008.12.27-29. 東京)

H. Tonami and H. Iwata: Enzymatic protein immobilization via tyrosine oxidation. 2008 Taiwan-Japan Symposium on Nanotechnology and Nanomedicine (2008.10.30. Kyoto)

生体物性学分野 (国内客員)

Department of Mechanical Properties

客員准教授 平井 洋平
Visiting Assoc. Prof. Yohei Hirai

【研究概要】

高等生物の諸器官の構築過程には、多種多様の細胞外シグナル分子群が参加しそれぞれが時間的・空間的な活性発現調節を受けて組織形態・機能分化の方向性を決めている。本研究分野では、シグナル分子群により誘導された組織の大まかな形態が、如何にして最終的な精密構造に仕上げられるのかの解析を本年10月より開始した。具体的には、常に間質の細胞内で t-SNARE 蛋白質として待機しているが必要に応じて即座に方向性を持って分泌され直近の上皮組織の形態変化を促すエピモルフィンに着目し、他のシグナル分子群の誘導機能を加味した上皮形体形成調節モデルを提案した (図1)。今後、本モデルの検証・修正を実験的に進め、組織の高次構造の制御技術を早期

組織の形態形成誘導

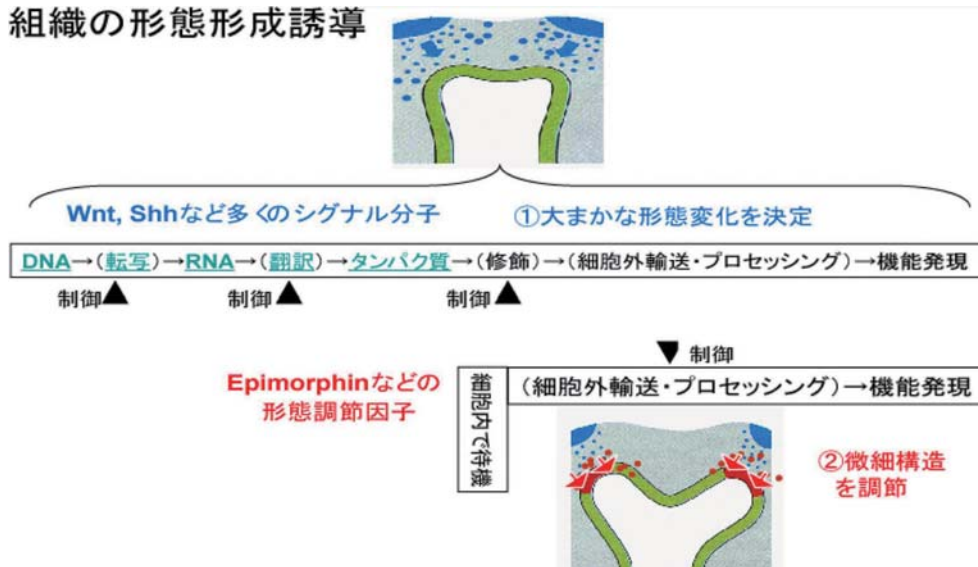


図1. 間質からのシグナル分子による上皮組織の形態形成モデル

Wnt, Shhなどの強力なシグナル分子は、必要に応じて上皮に働きかけその基本的な形態変化を促すが、これらの機能発現には転写・翻訳・修飾・分泌の過程を経るため時間を要し、また、ターゲットの上皮に到達するのまでに拡散してしまう。一方、上皮近傍の間質の上皮側細胞膜に蛋白質の形で待機しているエピモルフィン、必要に応じて即座に方向性を持って分泌されるため、シグナル分子群により誘導された基本的な形態をより精密でシャープな構造物へと仕上げていく。

に確立したい。

Organogenesis involves the concerted action of many signaling factors to orchestrate tissue remodeling and cell differentiation. This October, our laboratory has launched a project to establish the molecular mechanisms underlying roughly arranged tissue structures by major diffusible signaling factors are tuned up to well-shaped tissue architectures. We are now focusing on a stromal membrane protein epimorphin, which usually stays at the cytoplasmic side of the membrane as a t-SNARE protein but is promptly secreted extracellularly to elicit morphogenic programs in adjacent epithelia. We have proposed a hypothetical model for the molecular basis of the strict regulation of epithelial morphogenesis that involves the major signaling molecules and epimorphin (Fig.1). Investigations for the verification and expansion of this model are now underway.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

原著論文

- D. Radisky, M. Stallings-Mann, Y. Hirai and M. Bissell: Single proteins serve multiple functions in intracellular and extracellular environments. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. in press
- C. Chen, M. Nelson, D. Bennett, E. Radisky, Y. Hirai, M. Bissell and D. Radisky: Homology with vesicle fusion mediator syntaxin-1a predicts determinants of epimorphin/syntaxin-2 function in mammary epithelial morphogenesis. J. Biol. Chem. Epub Jan. 7 (2009)

◆ 学会等の発表 ◆

講演会・シンポジウム

平井洋平 シグナル分子の新しい機能発現機構と上皮組織の形態調節 関西学院大学産学連携シンポジウム in 東大『発生・再生調節と内・外環境』2008.11.3（東京）

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

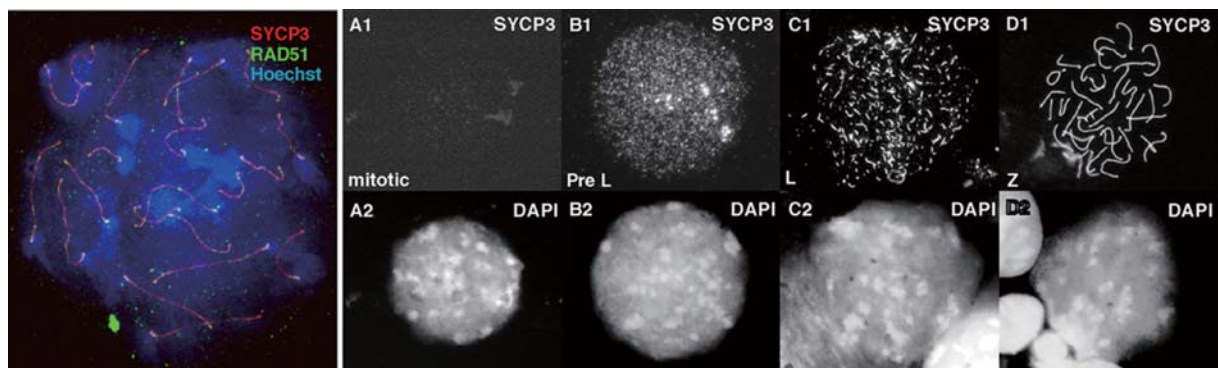
Prof. Norio Nakatsuji

【研究概要】

生殖細胞はゲノム情報を次世代に伝達し、個体発生の起点となる細胞系譜である。その発生分化プロセスでは個体発生能の維持形成、ゲノム再プログラム化、DNA 組換え等重要な生命現象が起こる。当研究グループでは、(1) 生殖細胞細胞質に特徴的に観察される生殖顆粒 ribonucleoprotein (RNP) 構造の構成分子同定と機能解析、(2) 減数分裂期相同遺伝子組換えの分子メカニズムの解明、(3) ショウジョウバエを用いた生殖幹細胞システムの研究、を進めている。

(1) Tudor ドメインの繰り返し構造を持つ TDRD1/MTR1, TDRD6, TDRD7/TRAP 蛋白質はいずれもマウス生殖顆粒に特異的に局在する。これら哺乳類 tudor 関連遺伝子群の遺伝学的、生化学的解析を進めている。これまでに Tdrdl, 6, 7 遺伝子改変マウスは何れも雄生殖細胞の分化過程に異常を示す雄性不妊で有る事を明らかにした。同遺伝子改変マウスは生殖顆粒構造 inter-mitochondrial cement や chromatoid body の形成不全が見られ、RNP リモデリングが起こる。一方、TDRD9/spindle-E は生殖顆粒の特異的構成分子ではないが、やはり生殖細胞特異的に発現する。同遺伝子改変マウスを作出したところ、雄生殖細胞の第一減数分裂期の染色体対合に異常を示し、レトロトランスポゾン mRNA の発現上昇およびゲノム DNA の CpG 脱メチル化が観察された事から、Tdrd9 が生殖細胞のトランスポゾン発現とエピジェネティクスを制御する極めて興味深い分子である事が明らかとなった。また併行して生殖顆粒の単離精製条件を検討し、蛋白質分画のショットガン質量分析同定、RNA 分画のマイクロアレイ解析等を行う事で、生殖細胞の RNP 機能コンパートメント化に注目して研究を進めている。

(2) 相同遺伝子組換えの制御機構は分子、細胞生物学の重要な課題であると共に、その解明はより効率の良い遺



マウス減数分裂前期核（精母細胞）組換え複合体と相同染色体対合（左）、雄生殖幹細胞の減数分裂移行（右、A～D）。
Meiotic recombination nodules and homologous chromosome synapses in a spermatocyte (left) and in vitro meiotic transition of germline stem cells (right A-D).

伝子改変技術を創出する基盤としても重要である。これまでに我々はマウス胎仔生殖細胞が培養下で自律的に減数分裂へ移行する事およびその減数分裂移行を抑制する分子を同定しているが、新たに精原細胞由来樹立株を用いて体細胞分裂から減数分裂を誘導する培養実験条件を作出した。この培養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、さらに分子から個体レベルでの詳細な研究を進めている。一方、相同遺伝子組換えへ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、生化学的機能解析を進めている。これらの研究により哺乳類相同遺伝子組換えの分子基盤を明らかにし、新たな遺伝子改変技術への応用を目指す。

(3) 幹細胞は生体内の様々な組織に存在しており、その未分化性維持には幹細胞自身に加えてニッチと呼ばれる周囲の微小環境が重要な役割を果たしている。しかし例えば哺乳類の生体幹細胞およびニッチの厳密な同定は必ずしも容易では無く、生体幹細胞の自己複製や分化制御機構の分子レベルでの研究を進める上で大きな律速段階となっている。我々は生殖幹細胞およびニッチの正確な同定と体系的な遺伝学的解析が可能であるショウジョウバエ精巣をモデルに用いて TGF-beta シグナル経路が幹細胞の未分化維持に直接関与している事を見い出しており、現在詳細な分子機構について現在研究を進めている。

The germline is the cell lineage that is fundamental for the ontogeny of individuals and transmission of genetic information. During the differentiation of the germline, intriguing and important biological processes, such as epigenetic reprogramming, establishment/maintenance of pluripotency and homologous recombination take place. Our current research projects focus on (1) molecular analyses of the germ-line specific cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) structure, germinal granules/nuage, (2) mechanisms and factors that regulate meiotic homologous recombination in mammals, and (3) molecular mechanisms governing stem cell regulation in *Drosophila*.

(1) TDRD1/MTR1, TDRD6 and TDRD7/TRAP contain multiple tudor domains and specifically localize to mouse germinal granules/nuage. We are carrying out genetic and biochemical studies on these mammalian tudor-related genes to reveal the functioning of germinal granule/nuage components. By using the TDRD proteins as specific molecular markers, we developed experimental conditions to isolate germinal granules/nuage and are currently analyzing protein and RNA composition of the structure. Protein profile was obtained by shotgun identification by mass-spectrometry, and microarray analysis was applied to RNA fractions. Recently, we identified and cloned a novel germ-line specific *Tdrd* gene, *Tdrd9/spindle-E*. *Tdrd9* gene-targeted mice showed incomplete pairing of homologous chromosomes during male meiosis. The mutant also exhibited elevated mRNA expression of a class of retrotransposon, LINE1, and CpG de-methylation of cognate genomic elements.

(2) Molecular mechanisms of homologous recombination are important research subjects in molecular and cell biology. We previously showed that primordial germ cells in mice autonomously enter into meiosis when cultured *in vitro* and identified a factor that suppresses the meiotic transition *in vitro*. Recently, we established another *in vitro* culture condition that induces meiotic transition of established germline stem cell line derived from spermatogonia. By using this culture method, we identified signaling pathways that promote/inhibit meiotic transition of mitotic germline stem cells. Biochemical and physiological characterization of these signaling

pathways is currently underway. Meanwhile, we carried out genome database screening for candidate genes that possibly participate in homologous recombination in mice. Genetic and molecular studies on such gene functions are in progress. Through the understanding of molecular basis underlying homologous recombination, we aim to develop a novel method for gene manipulation in mammalian cells.

(3) Stem cells are responsible for replacing damaged or dying cells in various adult tissues throughout a lifetime. Stem cell behavior has been shown to be controlled by specialized regulatory microenvironments or 'niche' in many systems. However, niche signals in many stem cell systems are still poorly defined. The *Drosophila* testis has become one of the premiere stem cell systems to study molecular mechanisms governing stem cell self-renewal, differentiation and proliferation. We previously showed that TGF-beta signaling from somatic cells is essential for maintaining germline stem cells (GSCs) in the *Drosophila* testis. Currently, we are addressing how TGF-beta signaling maintains GSCs in *Drosophila*.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- N. Tsuneyoshi, T. Sumi, H. Onda, H. Nojima, N. Nakatsuji and H. Suemori: PRDM14 suppresses expression of differentiation marker genes in human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **367**: 899-905 (2008)
- F. Ma, N. Kambe, D. Wang, G. Shinoda, H. Fujino, K. Umeda, A. Fujisawa, H. Suemori, N. Nakatsuji, Y. Miyachi, R. Torii, K. Tsuji, T. Heike and T. Nakahata: Direct development of functionally mature tryptase/chymase double positive connective tissue-type Mast cells from primate ES cells. *Stem Cells* **26**: 706-714 (2008)
- T. Otsuji, H. Matsumura, T. Suzuki, N. Nakatsuji, T. Tada and M. Tada: Rapid induction of large chromosomal deletions by a Cre/inverted loxP system in mouse ES cell hybrids. *J. Mol. Biol.* **378**: 328-336 (2008)
- N. Nakatsuji, F. Nakajima and K. Tokunaga: HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nature Biotechnol.* **26**: 739-740 (2008).
- T. Ishii, K. Fukumitsu, K. Yasuchika, K. Adachi, E. Kawase, H. Suemori, N. Nakatsuji, I. Ikai and S. Uemoto: Effects of extracellular matrixes and growth factors on the hepatic differentiation of human embryonic stem cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**: G313-G321 (2008)
- T. Sumi, N. Tsuneyoshi, N. Nakatsuji and H. Suemori: Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/b-catenin, Activin/Nodal, and BMP signaling. *Development* **135**: 2969-2979 (2008).
- T. Miyazaki, S. Futaki, K. Hasegawa, M. Kawasaki, N. Sanzen, M. Hayashi, E. Kawase, K. Sekiguchi, N. Nakatsuji and H. Suemori: Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **375**: 27-32 (2008)
- K. Suzuki, K. Mitsui, E. Aizawa, K. Hasegawa, E. Kawase, T. Yamagishi, Y. Shimizu, H. Suemori, N. Nakatsuji and K. Mitani: Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with

- helper-dependent adenoviral vectors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **105**: 13781-13786 (2008)
- M. Kanatsu-Shinohara, M. Takehashi, S. Takashima, J. Lee, H. Morimoto, S. Chuma, A. Raducanu, N. Nakatsuji, R. Fässler and T. Shinohara: Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on beta1-integrin. Cell Stem Cell **3**: 533-542 (2008)
- M. Kanatsu-Shinohara, M. Kato, M. Takehashi, H. Morimoto, S. Takashima, S. Chuma, N. Nakatsuji, M. Hirabayashi and T. Shinohara: Production of transgenic rats via lentiviral transduction and xenogeneic transplantation of spermatogonial stem cells. Biol. Reprod. **79**: 1121-1128 (2008)
- M. Kanatsu-Shinohara, T. Muneto, J. Lee, M. Takenaka, S. Chuma, N. Nakatsuji, T. Horiuchi and T. *Shinohara: Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. Biol Reprod **78**: 611-617 (2008)

2) 総説

- 中辻憲夫: ヒト多能性幹細胞研究における日本と世界の現状. 実験医学 **26**: 831-837 (2008)
- S. Chuma, M. Hosokawa, T. Tanaka and N. Nakatsuji: Ultrastructural characterization of spermatogenesis and its evolutionary conservation in the germline: germinal granules in mammals. Mol Cell Endocrinol (in press)
-

◆ 学会等の発表 ◆

1) 講演・シンポジウム

- 中辻憲夫: 幹細胞研究における日本の現状と展望. 第38回医学系大学倫理委員会連絡会議「国際シンポジウム」特別講演 (2008.1.25. 東京)
- N. Nakatsuji: Human and monkey ES cell Lines for biomedical research and drug discovery. First International Symposium on Human Embryonic Stem Cell Research (2008.1.31. Paris)
- 中辻憲夫: ヒト ES 細胞研究と医学および創薬への応用. Millipore Bio Forum Asia 2008 (2008.3.7. 東京)
- 中辻憲夫: ES 細胞株を用いた基礎研究と医学および創薬への応用. 科研費特定領域バイオ操作第5回公開シンポジウム・招待講演 (2008.3.7. 東京)
- 中辻憲夫: ES 細胞の驚異的能力と可能性?なぜ万能細胞と呼ばれるのか. 京都大学附置研究所・センターシンポジウム (2008.3.8. 横浜)
- 中辻憲夫: ヒト ES 細胞株の樹立と医学および創薬への応用. 第7回日本再生医療学会 (2008.3.13. 名古屋)
- 中辻憲夫: Pluripotent stem cell lines for biomedical research, drug discovery and regenerative medicine. 国際シンポジウム『iPS 細胞研究が切り拓く未来』 (2008.5.11. 京都)
- 中辻憲夫: 多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) はなぜ万能細胞と呼ばれるのか—研究の現状と医学応用の展望. 大阪府立高等学校生物教育研究会総会 記念講演 (2008.5.14. 大阪)
- 中辻憲夫: 万能細胞 (多能性幹細胞, ES/iPS 細胞) 研究と再生医療および新薬開発への応用. 未来エネルギー研究協会総会特別講演会 (2008.5.30. 京都)
- 中辻憲夫: ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞・iPS 細胞) の医学研究および創薬スクリーニングへの利用. 第15回 HAB 研究機構学術年会 (2008.5.16. 東京)
- 中辻憲夫: ヒト多能性幹細胞を用いた基礎研究と再生医療および創薬への応用. 第31回日本神経科学大会 (2008.7.11. 東京)
- N. Nakatsuji: Embryonic stem cells and other pluripotent stem cells as versatile tools for biology, cell therapy and

drug discovery. Controlled Release Society's 35th Annual Meeting and Exposition (2008.7.15. New York)

中辻憲夫：多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）の基礎研究および医学と創薬への応用. 日経 BP 社・インビトロジェン社共催 Gateway 開発記念10周年シンポジウム（2008.9.2. 東京）

N. Nakatsuji: Application of embryonic stem cell lines to basic research and production of model cells for drug discovery. National Health Research Institute Stem Cell Symposium (2008.9.22. Taipei)

中辻憲夫：万能細胞（ES/iPS 細胞などの多能性幹細胞）の素晴らしい能力と医学および新薬開発への応用. 西宮市第24回ライフサイエンスセミナー（2008.10.3. 西宮）

中辻憲夫：幹細胞医学の現状と未来：その応用の社会的インパクト. メディカルイノベーションフォーラム2008（2008.11.10. 浜松）

中辻憲夫：ヒト多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）を用いた基礎研究と医学および創薬への応用. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム. 2008（2008.11.17 東京）

中辻憲夫：万能細胞（ES/iPS 細胞）とは何か，その不思議な能力と素晴らしい可能性. 西宮市平成20年度湯川記念科学セミナー（2008.11.29. 西宮）

中馬新一郎：哺乳類 tudor 関連遺伝子群と生殖顆粒 RNP 構造. 特定領域研究シンポジウム「生殖細胞の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」（2008.11.24-27. 熊本）

2) 学会発表

S. Chuma: Ultrastructural characteristic of spermatogenesis and its evolutionary conservation in the germline. 15th European testis workshop with NAFA annual meeting (2008.5.2-6. Naantali, Finland)

S. Chuma: Protein and RNA assembly of germinal granules/nuage in the germline. World Congress on Reproductive Biology (2008.5.24-25. Hawaii, U.S.A.)

S. Chuma: Mammalian germ cells and germinal granules/nuage. Germ cell-soma interactions in gonadal development and germ cell tumors (workshops "current trends in biomedicine") (2008.10.20-22. Baeza, Spain)

M. Shoji, T. Tanaka, M. Hosokawa, K. Kitamura, Y. Kato, G. Kondoh, K. Okawa, T. Chujyo, T. Suzuki, K. Hata, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, H. Sasaki, S. Chuma and N. Nakatsuji: Role of TDRD9 in male meiosis and regulatory pathway of transposon RNA and DNA methylation. Germ Cells, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (2008.10.1-5. Cold spring harbor, USA)

小島加奈子, 宮川（倉持）さとみ, 中馬新一郎, 中辻憲夫, 仲野 徹：成体精巣内における MILI および MIWI の TDRD1/MTR-1 との相互作用. 第31回日本分子生物学会年会（2008.12.9-12. 神戸）



再生誘導研究分野 Department of Stem Cell Biology

分野主任 教授 山中 伸弥

Prof. Shinya Yamanaka

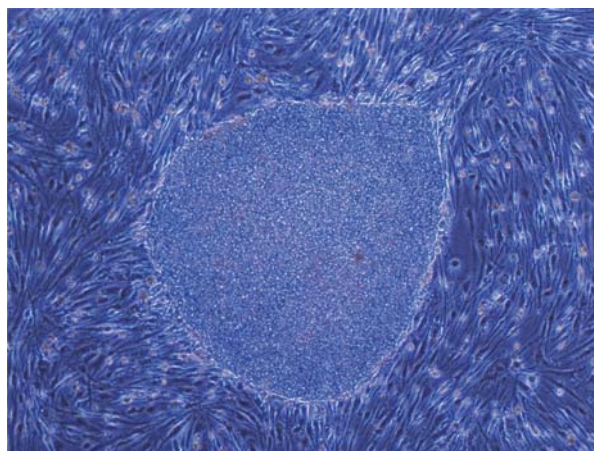
【研究概要】

既知因子による人工多能性幹細胞の樹立

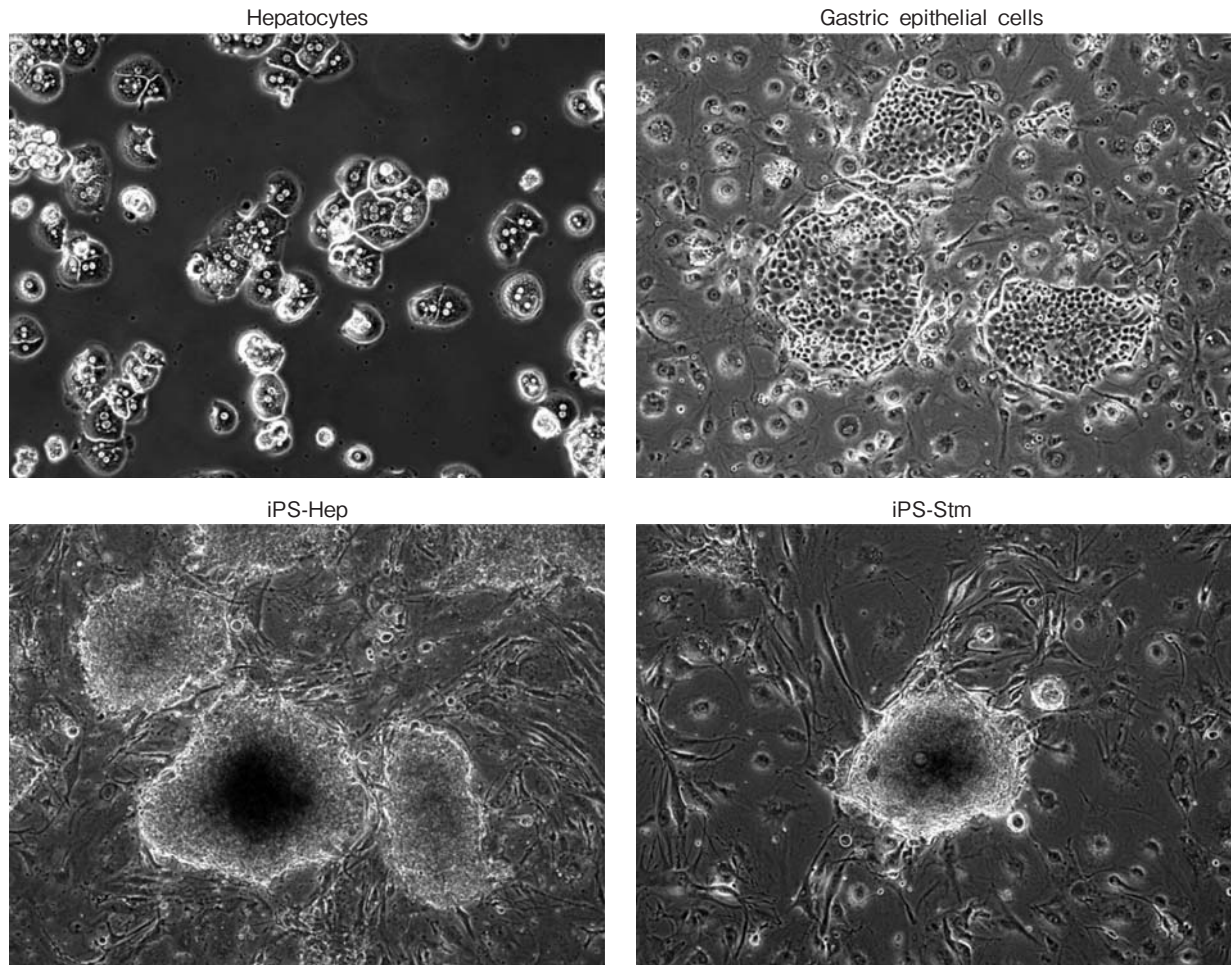
2006年、4つの転写因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4 および c-Myc) をレトロウイルスベクターで導入することにより、マウス線維芽細胞を多能性細胞へ変化させることに成功した。この人工多能性幹 (induced pluripotent; iPS) 細胞と名付けられた細胞は、遺伝子発現や試験管内での分化能のみならず、キメラマウスの生殖系列にも寄与し、胚性幹 (Embryonic stem; ES) 細胞と遜色ないことを示した。さらに成人皮膚由来の線維芽細胞からも同様の因子を用いて iPS 細胞を樹立することに成功した。しかし、臨床応用までにはまだいくつもの解決すべき課題が残されている。

iPS 細胞由来のキメラマウスおよびその仔において、約20%の確率で腫瘍の形成が確認された。そして、解析を行った全ての腫瘍において外來性 c-Myc の再活性化が見られた。そこで、この問題を解決するために、c-Myc を用いない iPS 細胞樹立法の確立を試みた。その結果、c-Myc を用いない場合、樹立効率は大きく低下するものの c-Myc を用いた場合と同様に分化多能性を有する iPS 細胞を樹立することができた。この c-Myc を用いずに作製した iPS 細胞は成体キメラマウスに寄与し、腫瘍の形成は1年以上の観察期間において見られなかった。

もうひとつの腫瘍形成リスクとして、レトロウイルスの染色体への挿入が挙げられる。我々は線維芽細胞に加えて、非間葉系の細胞である、肝細胞または胃粘膜上皮細胞から iPS 細胞を樹立し、その解析を行った。上皮細胞由来の iPS 細胞も線維芽細胞由来の iPS 細胞と同様に、分化多能性を含めて ES 細胞と高い類似性を示した。この上皮由来の iPS 細胞におけるレトロウイルスベクターの挿入部位を調べたところ、クローン間において共通する部位は認められなかった。また、上皮由来の iPS 細胞においては、線維芽細胞由来のものと比較してレトロウイルスの



A. c-Myc 遺伝子を用いずに作製したヒト iPS 細胞。
Human iPS cell clone without c-Myc.



B. マウス肝細胞, 胃粘膜上皮細胞 (上段) とそこから作製した iPS 細胞 (下段)。

Morphology of a primary culture of hepatocytes and gastric epithelial cells (upper panels) and iPS cells from hepatocytes (iPS-Hep) and gastric epithelial cells (iPS-Stm) (lower panels).



C. プラスミド DNA を用いて作製した iPS 細胞由来のキメラマウス。

Chimera mice derived from plasmid-derived iPS cells.

挿入数が優位に少ないことがわかった。これらの結果から、染色体の特定の部位にレトロウイルスが挿入されることが iPS 細胞の樹立にとって必要ではないことが示唆された。

そこで、我々はウイルスベクターを用いない iPS 細胞の作製を試みた。2 種類のプラスミド DNA (Oct3/4,

Sox2, Klf4 をコードするベクターと c-Myc をコードするベクター) を繰り返し導入する方法を選択した。結果として樹立できた iPS 細胞においては導入遺伝子の挿入は認められず、成体キメラマウスへ寄与した。この技術の開発により、臨床応用を視野に入れた安全性の向上に一步近づいたと考えられる。

Generation of induced Pluripotent Stem Cells by Defined Factors

In 2006, we firstly discovered that the retroviral transduction of four transcription factors, Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc, could change fibroblasts into pluripotent state. We named these reprogrammed cells induced pluripotent stem (iPS) cells. We also generated iPS cells from adult human dermal fibroblasts by using same set of reprogramming factors. Both mouse and human iPS cells showed the pluripotency identical with embryonic stem (ES) cells. Notably iPS cells contributed to adult chimera mice and also their offspring through the germ line. Patient, or disease-specific iPS cells will contribute to elucidation of pathogenesis, drug screening, toxicology study, and regenerative medicine. However, some critical issues for clinical application remained to be overcome.

We observed increased tumor incidence in more than 20% of the iPS-derived chimera mice and their offspring, and found reactivation of the c-Myc transgene in all the tumors we examined. To overcome the issue, then we generated mouse iPS cells from fibroblasts without c-Myc transgene, although the efficiency of iPS cell generation were markedly decreased. Mice derived from iPS cells without c-Myc did not develop tumors during the study period (more than one year). Furthermore, we generated human iPS cells without c-Myc. These data demonstrated that introduction of c-Myc transgene is dispensable for direct reprogramming. On the other hand, retroviral integrations of factors other than Myc into chromosomes should be avoided before clinical application.

However, the cellular origin and molecular mechanisms of iPS cells induction were unknown. In addition to fibroblasts, we also established iPS cells from non-mesenchymal cells, namely, adult mouse hepatocytes and gastric epithelial cells. These iPS cell clones appeared to be equivalent to embryonic stem cells in gene expression and were competent to generate germline-transmitted chimeras. Genetic lineage tracings showed that liver-derived iPS cells were derived from albumin-expressing cells. No common retroviral integration sites were found among multiple clones. And iPS cell clones derived from hepatocyte or gastric epithelial cell had smaller number of retroviral insertion than fibroblast-derived iPS cell clones. These data showed that iPS cells are generated by direct reprogramming of lineage-committed somatic cells and that retroviral integration into specific sites in the chromosomes are not required. These findings suggest that it might be possible to generate iPS cells with gene transfer methods free from an integration mechanism.

Therefore we tried to generate mouse iPS cells with non-viral vectors. Repeated transfection of two expression plasmids (one containing the cDNAs of Oct3/4, Sox2 and Klf4 linked by 2A sequences, and the other containing the c-Myc cDNA) into mouse embryonic fibroblasts resulted in iPS cells. The plasmid-derived iPS cells had no insertion of transgenes into chromosomes and they were similar to ES cells in morphology, proliferation and developmental potential as they could contribute to adult chimeras. This was a meaningful step to achieve a critical safety concern for potential use of iPS cells in regenerative medicine.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

K. Aiba, T. Nedorezov, Y. Piao, A. Nishiyama, R. Matoba, L.V. Sharova, A.A. Sharov, S. Yamanaka, H. Niwa and MS. Ko: Defining developmental potency and cell lineage trajectories by expression profiling of differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res.* **16**: 73-80 (2009)

K. Okita, M. Nakagawa, H. Hong, T. Ichisaka and S. Yamanaka: Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**: 949-953 (2008)

T. Aoi, K. Yae, M. Nakagawa, T. Ichisaka, K. Okita, K. Takahashi, T. Chiba and S. Yamanaka: Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* **321**: 699-702 (2008)

2) 総説

大貫茉莉, 山中伸弥: iPS 細胞の樹立. *実験医学 別冊 培養細胞実験ハンドブック*. 274-283 (2008)

K. Okita and S. Yamanaka: Recent advance in induced pluripotent stem cells. *Inflammation and Regeneration*. **28**: 510-515 (2008)

山中伸弥, 中川誠人: iPS 細胞研究の最前線: 再生医療の応用に向けて. *丸善 平成21年理科年表*. 898-899 (2008)

山中伸弥: ES 細胞研究の現状と展開. *日本脊椎関節炎研究会誌*. **1**: 13-18 (2008)

青井貴之, 八戸宏二郎, 山中伸弥: 成体マウス肝および胃細胞からの多能性幹細胞樹立. *分子消化器病*. **5**: 91-93 (2008)

石井哲也, 山中伸弥: 京都大学 iPS 細胞研究統合推進拠点. *再生医療*. **7**: 8-11 (2008)

中村友紀, 山中伸弥: 人工多能性幹細胞の樹立と展望. *科学と生物*. **46**: 531-538 (2008)

吉田善紀, 山中伸弥: iPS 細胞 (inducible pluripotent stem cell). *Vascular Medicine*. **4**: 68-71 (2008)

梶原正俊, 山中伸弥: iPS 細胞 (人工多能性幹細胞). *Medical Practice*. **25**: 1264-1266 (2008)

S. Yamanaka: Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **363**: 2079-2087 (2008)

吉田善紀, 山中伸弥: 臨床応用に向けた ES/iPS 細胞の研究. *Angiology Frontier*. **7**: 56-59 (2008)

沖田圭介, 山中伸弥: ヒト体細胞からのオーダーメイド多能性幹細胞の誘導法. *医学のあゆみ*. **225**: 191-192 (2008)

福原晶子, 青井貴之, 山中伸弥: iPS 細胞. *臨床研修プラクティス*. **5**: 94-96 (2008)

田邊剛士, 高橋和利, 山中伸弥: iPS 細胞樹立の軌跡と展望. *再生医療*. **7**: 83-89 (2008)

K. Okita, T. Ichisaka and S. Yamanaka: Establishment of mouse induced pluripotent stem cells selected for Nanog expression. *Inflammation and Regeneration*. **28**: 96-99 (2008)

山中伸弥: 幹細胞研究のパラダイムシフトおよび臨床応用への展望. *実験医学増刊*. **26**: 24-28 (2008)

高橋和利, 山中伸弥: 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞). *実験医学増刊*. **26**: 35-40 (2008)

高橋和利, 山中伸弥: ヒト人工多能性幹細胞の樹立. *細胞工学*. **27**: 252-253 (2008)

S. Yamanaka: Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Prolif.* **41**: 51-56 (2008)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

山中伸弥：iPS Cell, Perspective and Challenge. 世界トップレベル拠点プログラム第1回フォローアップ委員会 (2008.5.20. 東京)

山中伸弥：Reconstruction of Nuclear Reprogramming by Defined Factors. 上原記念生命科学財団 システムバイオロジー—複雑な生命システム理解への挑戦— (2008.7.1. 東京)

山中伸弥：Induction of Pluripotency by Defined Factors. 第23回内藤カンファレンス (2008.11.12. 神奈川)

玉置也剛, 高橋和利, 田中孝之, 國貞隆弘, 柴田敏之, 山中伸弥, 手塚建一：ヒト歯髄幹細胞からの人工多能性幹細胞の誘導. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.10. 神戸) ※口頭およびポスター発表

五香麻衣子, 佐藤千香子, 過足芳子, 中村直子, 松山さと子, 近藤 靖, 山中伸弥, 高橋和利, 佐伯久美子, 湯尾 明：霊長類胚性幹細胞およびヒト iPS 細胞に由来する血管内皮細胞でのストレス依存性老化の機序. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.10. 神戸) ※ポスター発表

山中伸弥：臨床応用に向けた, iPS 細胞の展望と課題. 独立行政法人科学技術振興機構「免役難病・感染症等の先進医療技術」第5回公開シンポジウム (2008.12.15. 東京)

M. Nakagawa, Y. Mochiduki, K. Takahashi, K. Okita, N. Takizawa, T. Ichisaka and S. Yamanaka: Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells by family genes of Sox, Oct, Klf and Myc transcription factors. 6th ISSCR Annual Meeting (2008.6.11. U.S.) ※ポスター発表

M. Nakagawa, Y. Mochiduki, K. Takahashi, K. Okita, N. Takizawa, T. Ichisaka and S. Yamanaka: Generation of induced pluripotent stem cells by family genes. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9. 神戸) ※ポスター発表

K. Takahashi and S. Yamanaka: Induction of human pluripotent stem cells by defined factors. 6th ISSCR Annual Meeting (2008.6.11. U.S.) ※ポスター発表

K. Takahashi, M. Yokura, A. Okada, T. Tanaka, T. Ichisaka and S. Yamanaka: Induction of Pluripotent Stem Cells from Japanese Skin. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9. 神戸) ※ポスター発表

沖田圭介, 一阪朋子, 山中伸弥：ウイルスを用いないマウス人工多能性幹 (iPS) 細胞の樹立. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9. 神戸) ※口頭およびポスター発表

沖田圭介, 中川誠人, ホン ヒョンジョン, 一阪朋子, 山中伸弥：ウイルスベクターを用いないマウス人工多能性幹 (iPS) 細胞の樹立. 独立行政法人科学技術振興機構「免役難病・感染症等の先進医療技術」第5回公開シンポジウム (2008.12.15. 東京) ※ポスター発表

青井貴之, 沖田圭介, 一阪朋子, 田邊剛士, 小柳三千代, 高橋和利, 中川誠人, 山中伸弥：iPS 細胞に由来するマウスの長期経過観察. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9. 神戸) ※ポスター発表

青井貴之, 沖田圭介, 一阪朋子, 田邊剛士, 小柳三千代, 高橋和利, 中川誠人, 山中伸弥：iPS 細胞に由来するマ

ウスの長期経過観察. 独立行政法人科学技術振興機構「免役難病・感染症等の先進医療技術」第5回公開シンポジウム (2008.12.15. 東京) ※ポスター発表

小柳三千代, 岡田亜紀, 一阪朋子, 熊崎 恵, 田邊剛士, 青井貴之, 沖田圭介, 高橋和利, 中川誠人, 山中伸弥: マウス・ヒト体細胞の iPS 細胞化に関わる microRNA の探索とその機能解析. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9. 神戸) ※ポスター発表

前川桃子, 渋谷 蘭, 関 ひとみ, 石井哲也, 段 孝, 山中伸弥: iPS 細胞誘導のための新規因子の網羅的探索. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9. 神戸) ※ポスター発表

八戸宏二郎, M. Schmidt, A. Nowrouzi, 高橋和利, C. Von Kalle, 山中伸弥: ヒト人工万能幹細胞誘導時における 4 因子の挿入部位解析. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9. 神戸) ※ポスター発表

今村公紀, 青井貴之, 野瀬敏明, 山中伸弥: マウス iPS 細胞の *in vitro* 生殖細胞分化. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9. 神戸) ※ポスター発表

坪岡則子, 一阪朋子, 成田 恵, 中川誠人, 山中伸弥: 多能性幹細胞で高発現する Zn フィンガータンパク質 Sall4 の機能解析. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9. 神戸) ※ポスター発表

K. Miura, O. Tsuji, Y. Okada, M. Nishino, E. Ikeda, K. Okita, K. Takahashi, Y. Matsuzaki, Y. Toyama, M. Nakamura, S. Yamanaka and H. Okano: Directed neural differentiation of induced pluripotent stem cells. 6th ISSCR Annual Meeting (2008.6.11. U.S.) ※ポスター発表

三浦恭子, 岡田洋平, 西野 誠, 富里周太, 小川大輔, 幸田和久, 池田栄二, 沖田圭介, 高橋和利, 松崎有未, 柚崎通介, 山中伸弥, 岡野栄之: 人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いた神経系細胞の誘導. 第31回日本神経科学大会 (2008.7.9. 東京)

K. Miura, O. Tsuji, Y. Okada, M. Nishino, S. Tomisato, K. Kohda, E. Ikeda, K. Okita, K. Takahashi, M. Koyanagi, K. Tanabe, M. Yuzaki, Y. Toyama, M. Nakamura, S. Yamanaka and Okano, H.: Neural differentiation and therapeutic effects of induced pluripotent stem cell. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9. 神戸) ※口頭およびポスター発表

三浦恭子, 辻 収彦, 岡田洋平, 西野 誠, 富里周太, 池田栄二, 幸田和久, 高橋和利, 沖田圭介, 一阪朋子, 小柳三千代, 田邊剛士, 大貫菜里, 柚崎通介, 戸山芳昭, 中村雅也, 山中伸弥, 岡野栄之: iPS (induced pluripotent stem) 細胞を用いた神経系細胞の誘導. 独立行政法人科学技術振興機構「免役難病・感染症等の先進医療技術」第5回公開シンポジウム (2008.12.15. 東京) ※ポスター発表

中村友紀, 中川誠人, 一阪朋子, 塩田有史, 山中伸弥: 未分化 ES 細胞に高発現する遺伝子 ECAT15-1, ECAT15-2 の機能解析. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9. 神戸) ※口頭およびポスター発表

田邊剛士, 大貫菜里, 高橋和利, 一阪朋子, 沖田圭介, 中川誠人, 山中伸弥: Lin28 の iPS 細胞誘導における効果. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) (2008.12.9. 神戸) ※口頭およびポスター発表

H. Hong, K. Okita, K. Takahashi, A. Okada, T. Ichisaka and M. Nakagawa: Increased efficiency of induced pluripotent stem cell induction by suppression of p53. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大

会 (BMB2008) (2008.12.9. 神戸) ※ポスター発表

2) 講演・シンポジウム

山中伸弥：人工多能性幹 (iPS) 細胞がつくる新しい医学「独立行政法人 工業所有権情報・研修館 技術研修」(2008.1.9. 東京)

山中伸弥：iPS 細胞の研究現状と今後の課題について「社団法人 日本外国特派員協会 報道昼食会」(2008.1.9. 東京)

S. Yamanaka: The discovery and future of induced pluripotent stem (iPS) Cells「The 1st GCOE International Symposium at Kumamoto University」(2008.1.16. 熊本)

S. Yamanaka: Regenerative Medicine: Reprogramming the cell「World Economic Forum Annual Meeting 2008」(2008.1.25. Switzerland)

S. Yamanaka: Induction of pluripotency by defined factors「4th Annual Stem Cell Conference "Stem Cell Regulation and Reprogramming"」(2008.2.8. U.S.)

S. Yamanaka: Induction of pluripotency by defined factors「京都大学 物質—細胞統合システム拠点開所記念式典 記念講演」(2008.2.19. 京都)

山中伸弥：人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の可能性「四天王寺病院 第25回学術講演会」(2008.2.23. 大阪)

山中伸弥：iPS 細胞研究の今後の展望と課題「自由民主党 科学技術創造立国推進調査会・ライフサイエンス推進議員連盟合同会議」(2008.2.26. 東京)

山中伸弥：ヒト iPS 細胞の解析「東京大学 医科学研究所 平成19年度特定領域研究幹細胞の可塑性と未分化性維持機構成果公開シンポジウム」(2008.2.27. 東京)

山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「財団法人神奈川科学技術アカデミー KAST フォーラム 3」(2008.3.8. 神奈川)

山中伸弥：人工多能性幹 (iPS) 細胞がつくる新しい医学「京都大学 附置研究所 センターシンポジウム」(2008.3.8. 神奈川)

山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「第一三共株式会社 北九州市学術講演会」(2008.3.11. 福岡)

山中伸弥：人工万能幹 (iPS) 細胞の可能性と課題「第7回日本再生医療学会」(2008.3.14. 愛知)

山中伸弥：iPS 細胞がつくる新しい医学「2007年度朝日賞受賞記念講演会」(2008.3.21. 東京)

S. Yamanaka: Generation of iPS cells from adult human fibroblasts「Keystone Symposia "Signaling Pathways in Cancer and Development"」(2008.3.25. U.S.)

山中伸弥：iPS 細胞研究で学んだこと「平成20年度神戸大学入学式」(2008.4.8. 神戸)

S. Yamanaka: Induction of pluripotency by defined factors「The 3rd International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest Under Stress」(2008.4.9. Okinawa)

山中伸弥：iPS 細胞の展望と課題「毎日新聞社 シンポジウム「iPS 細胞研究の展望と課題」」(2008.4.15. 東京)

山中伸弥：多能性幹細胞研究のインパクト—iPS 細胞研究の今後「大塚製薬株式会社 第26回川内カンファレンス」(2008.5.1. 徳島)

山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「第16回近畿臍帯血幹細胞移植研究会」(2008.5.10. 大阪)

山中伸弥：iPS cells—perspective and challenge「独立行政法人科学技術振興機構 国際シンポジウム「iPS 細胞研究が切り拓く未来」」(2008.5.11. 京都)

山中伸弥：Perspective of iPS cells「毛髪研究サテライトシンポジウム」(2008.5.13. 京都)

- 山中伸弥：人工多能性幹細胞の可能性と課題「大阪臨床整形外科医会研修会」(2008.5.17. 大阪)
- 山中伸弥：iPS 細胞の展望と課題「第51回日本糖尿病学会年次学術集会」(2008.5.23. 東京)
- 山中伸弥：NAIST での教育研究を振りかえって「日経産業新聞フォーラム2008「NAIST の戦略—先端科学技術と環境との調和, 共生, 融合」」(2008.6.5. 東京)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「奈良県立医科大学精神医学教室同門会・三山会学術講演会」(2008.6.7. 大阪)
- 山中伸弥：iPS 細胞がつくる新しい医学「毎日21世紀フォーラム第73回例会」(2008.6.10. 大阪)
- 山中伸弥：iPS 細胞がつくる新しい医学「広島ライオンズクラブ市民公開講座」(2008.6.24. 広島)
- 山中伸弥：iPS 細胞の展望と課題「神戸大学 神戸カンファレンス」(2008.6.27. 神戸)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「中日懇話会400回記念会」(2008.7.8. 東京)
- 山中伸弥：iPS 細胞がつくる新しい医学「SMBC トップセミナー」(2008.7.9. 東京)
- 山中伸弥：iPS 細胞がつくる新しい医学「SMBC トップセミナー」(2008.7.16. 大阪)
- 山中伸弥：iPS 細胞がつくる新しい医学「三重銀トップセミナー」(2008.7.22. 大阪)
- 山中伸弥：iPS 細胞がつくる新しい医学「慶應 MCC 定例講演会『夕学五十講』」(2008.7.22. 東京)
- S. Yamanaka: iPS cell「First Annual Stem Cell Symposium on the Bay」(2008.8.8 U.S.)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「清和政策研究会 夏季研究会」(2008.8.19. 神奈川)
- S. Yamanaka: iPS cells—perspective and challenge「European Forum Alpbach 2008 Technology Forum」(2008.8.21. オーストリア)
- S. Yamanaka: Induction of pluripotency by defined factors「Workshop on Cellular Reprogramming, Development and Stem Cells」(2008.9.8. Hong Kong)
- S. Yamanaka: iPS cell, perspective and challenge「The Shaw Prize Public Lectures」(2008.9.10. Hong Kong)
- S. Yamanaka: Induction of pluripotency by defined factors「Peking University College of Life Science」(2008.9.11. Peking)
- S. Yamanaka: iPS, perspective and challenge「2nd International SOX Meeting」(2008.9.16. Hyogo)
- 山中伸弥：iPS 細胞の展望と課題「第17回日本組織適合性学会大会 第44回日本移植学会総会」(2008.9.19. 大阪)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「万有製薬株式会社 第4回 Kansai Cardiovascular Consortium」(2008.9.20. 大阪)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「第13回アジア太平洋リウマチ会議」(2008.9.23. 横浜)
- S. Yamanaka: Induction of pluripotency by defined factors「The Biology of Stem Cells in Development and in Cancer, Karolinska Institutet」(2008.9.25. Sweden)
- 山中伸弥：iPS 細胞がつくる新しい医学「STS フォーラム公開シンポジウム」(2008.10.4. 京都)
- 山中伸弥：iPS 細胞がつくる新しい医学「男女共同参画学協会連絡会第6回シンポジウム」(2008.10.7. 京都)
- 山中伸弥：Induction of pluripotency by defined factors「第70回日本血液学会総会」(2008.10.10. 京都)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「バイオジャパン2008」(2008.10.17. 神奈川)
- 山中伸弥：iPS 細胞研究の展望と課題「第23回日本整形外科基礎学術集会」(2008.10.24. 京都)
- 山中伸弥：整形外科医が幹細胞研究者になった理由「日本学術会議 合同シンポジウム「私はなぜ生命科学研究者になったのか。」細胞生物学の魅力」(2008.10.28. 京都)

- 山中伸弥：幹細胞学と癌細胞学の接点「第67回日本癌学会学術総会」(2008.10.30 名古屋)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性「関西医科大学創立80周年記念講演会」(2008.11.1. 大阪)
- 山中伸弥：iPS 細胞がつくる新しい医学「ベンチャー関西2008「未来を拓く先端医療とグローバル経営」」(2008.11.5. 大阪)
- 山中伸弥：iPS 細胞で不老不死か？「エンジン01オープンカレッジ in なごや」(2008.11.8. 愛知)
- 山中伸弥：多能性幹細胞の維持と誘導「2008年度武田医学賞受賞記念講演」(2008.11.12. 東京)
- S. Yamanaka: Induction of pluripotency by defined factors「Massry Prize Lectures at USC」(2008.11.20. U.S.)
- S. Yamanaka: Induction of pluripotency by defined factors「2008 Massry Prize Mini-Symposium at UCLA」(2008.11.21. U.S.)
- S. Yamanaka: iPS cells, perspective and challenge「The Massry Prize」(2008.11.22. U.S.)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「第58回日本アレルギー学会秋季学術大会」(2008.11.27. 東京)
- 山中伸弥：iPS 細胞がつくる新しい医学「桜友会特別フォーラム」(2008.11.27. 東京)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「第38回日本免疫学会総会」(2008.12.3. 京都)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「彩都・医薬基盤研究所連携フォーラム」(2008.12.4. 大阪)
- S. Yamanaka: Induction of pluripotency by defined factors「International Symposium on Regenerative Medicine—Tenth Anniversary of Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University」(2008.12.4. Kyoto)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「慶応義塾大学・京都大学連携記念第1回シンポジウム」(2008.12.4. 京都)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「第29回日本臨床薬理学会年会」(2008.12.5. 東京)
- 山中伸弥：iPS 細胞の可能性と課題「第22回表皮細胞研究会」(2008.12.7. 東京)
- 山中伸弥：多能性総論「第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) シンポジウム “多能性幹細胞を規定する因子群—臨床応用を見据えて—”」(2008.12.9. 神戸)
- 中川誠人, 山中伸弥：iPS 細胞の展望と課題「日本実験動物科学技術2008」(2008.5.15. 宮城)
- 中川誠人, 山中伸弥：iPS 細胞がつくる新しい医学「山梨科学アカデミー平成20年度第1回交流会」(2008.5.26. 山梨)
- 中川誠人：iPS 細胞の研究の最新動向と今後の応用展開—再生医療への応用—「技術情報協会 技術セミナー」(2008.6.27)
- 中川誠人：iPS 細胞の現状と再生医療への応用「第9回日本分子脳神経外科学会」(2008.8.31. 京都)
- M. Nakagawa: Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells by Sox2, Oct4, Klf4, and c-Myc transcription factors and their family genes「The 11th Kyoto University International Symposium 2008」(2008.10.11. China)
- 中川誠人：再生医療への応用に向けた iPS 細胞研究の最前線「浜松医科大学脳神経外科教室講演会」(2008.10.17. 静岡)
- 高橋和利, 山中伸弥：iPS 細胞の展望と課題「日本組織培養学会第81回大会公開シンポジウム」(2008.5.20. 茨城)
- 高橋和利：iPS 細胞の樹立と再生医療への応用「JST シンポジウム CREST12—科学技術イノベーションを目指す CREST の挑戦—」(2008.5.27. 東京)
- K. Takahashi: Induction of pluripotency by defined factors「Royal College of Surgeons of Edinburgh "Programming pluripotent cell identity"」(2008.8.27. Scotland)
- 高橋和利：iPS 細胞の樹立とその展開「WalkAgain2008 シンポジウム「患者に語る：iPS 細胞」」(2008.10.5. 東

京)

高橋和利: Induction of pluripotency by defined factors「第21回日本動物細胞工学大会」(2008.11.25 福岡)

沖田圭介: 体細胞からの人工万能幹 (iPS) 細胞の樹立「愛知医科大学医学部先端医学・医療研究拠点 研究セミナー」(2008.3.11. 愛知)

沖田圭介: iPS 細胞の展望と課題「第6回幹細胞シンポジウム」(2008.5.16. 東京)

沖田圭介: 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の展望と課題「日本医師会生涯教育講座 (第1回)」(2008.7.19. 愛媛)

K. Okita: Stem cells, control of differentiation & regenerative medicine「EMBO Conference Series on Regeneration: The Molecular and Cellular Basis of Regeneration and Tissue Repair」(2008.10.8. Spain)

沖田圭介: iPS cell, perspective and challenge「The 17th CDB Meeting Towards Synthesis of Cells—Reconstruction and Design of Cellular Functions—」(2008.10.14. 兵庫)

沖田圭介: iPS 細胞研究に関する最新情報の紹介「幹細胞・iPS 細胞・再生医療のビジネスへの糸口—専門家との直接意見交換シンポジウム in KRP—意見交換会」(2008.10.23. 京都)

沖田圭介: iPS 細胞の展望と課題「第26回日本骨代謝学会学術集会」(2008.10.29. 大阪)

沖田圭介: 体細胞からの人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立と展望「第28回表面科学学術講演会」(2008.11.13. 東京)

青井貴之: iPS 細胞研究の現状と課題「長崎大学 第17回グローバル COE セミナー」(2008.9.24. 長崎)

青井貴之: iPS 細胞と再生医学の最前線「第67回日本脳神経外科学会総会」(2008.10.3. 岩手)

青井貴之: iPS 細胞による再生医療の展望「第4回日本移植再生医療看護学会」(2008.10.4. 京都)

青井貴之: iPS 細胞の現状と課題「聖マリアンナ医科大学難治研 大学院セミナー」(2008.11.4. 神奈川)

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】

我々の研究室は、哺乳類を中心に脊椎動物の形態形成機構、特に骨格筋や心臓などの器官形成の仕組みを研究している。器官形成には、様々の細胞間シグナル分子や接着因子が働いている。これらの機能は、遺伝子の転写レベルのみならず様々の転写後制御機構により時間的・空間的なチューニングを受けている。我々は、骨格筋や心臓形成を中心にそのような細胞間シグナリング・接着とその制御の解明を目指している。ADAM プロテアーゼは、膜型シグナル分子・レセプター・接着因子などの細胞外ドメイン切断を介して、それらの機能制御の鍵を握ると考えられていることから、我々はそのファミリーに属するメルトリン α (ADAM12)、メルトリン β (ADAM19) に関して発生・再生における役割や機能を探ってきた。今回は、末梢神経の再生および神経筋接合部形成におけるメルトリン β の働きに関する研究を紹介したい。

神経組織形成において、グリア細胞は神経と接触して存在し、神経突起からの維持刺激がなければ死んでしまう。このような神経において合成され、グリアの分化と維持に必要なグリア増殖因子は、その多くが膜貫通型タン

パク質として合成され、膜直上の位置で切断されて、可溶性分子として細胞外に放出される。我々はメルトリン β が上記膜型グリア増殖因子の切断活性を持つことを報告してきた。グリア増殖因子は、神経筋接合部におけるアセチルコリンレセプター遺伝子のシナプス特異的な転写に関わる分子でもある。もし、グリア増殖因子がメルトリン β の生理的基質なら、このプロテアーゼの欠損はグリアの増殖や分化、アセチルコリンレセプター誘導活性にどんな影響をもたらすと考えられる。そこで我々はそのような可能性を検証し、実証することができた。

1. 末梢神経のグリア（シュワン）細胞分化におけるメルトリン β の役割

メルトリン β は心臓形成において心臓神経堤細胞で必要とされ、この遺伝子が欠損したマウスはその殆どが生後まもなく死んでしまう (Komatsu K. et al., *Developmental Biol.* 2007)。本研究では、10~15%の割合で生き延びるノックアウトマウスを用いて、坐骨神経の軸索再生におけるメルトリン β の役割を調べた。その結果、メルトリン β ノックアウトマウスでは神経組織の再生が遅れること、Wallerian 変性や軸索伸長は正常に進行するが、ミエリン形成が遅れることを見出した。

そこで、神経堤細胞由来の Schwann 細胞の分化を、転写因子などのマーカー遺伝子の発現を指標に調べた。Schwann 細胞のプロミエリン段階からミエリン形成段階への細胞分化にはプロミエリン段階を維持する Oct6 の発現に引き続き、ミエリン形成に必須の Krox20 の活性化を必要とする。ノックアウトマウスでは、Krox20 の活性化と、それにとまう Oct6 の発現抑制、ミエリン蛋白である myelin basic protein (MBP) や Protein0 (P0) 遺伝子の活性化が遅れていた。またミエリン形成は、PI3K-AKT 経路の活性化を必要とするが、この活性化がノックアウトマウスでは抑えられていることがわかった。マウスの脊髄・後根神経節の膜分画を調製し、シュワン細胞の PI3K-AKT 経路を活性化する能力を調べたところ、メルトリン β ノックアウトマウスではその能力が低下していることがわかった。以上のように神経再生においてメルトリン β は、細胞膜依存的な PI3K-AKT 経路の活性化制御を介して、神経細胞接着に依存した Schwann 細胞分化を制御することが明らかになった (図1)。プロミエリン、ミエリンステージへの分化を制御するのは、どちらもニューレグリンであり、前者が切断によって可溶性分子を生ずる Type I、後者が膜分子でジャクスタクラインシグナル分子と考えられている Type III ニューレグリンであることが報告されている。メルトリン β の欠損によって神経のジャクスタクラインシグナル産生能が低下することから、メルトリン β がシナプスにおいて膜型ニューレグリンシグナルの産生に関与することが推察された (Wakatsuki et al., *J Biol. Chem.* in press)。

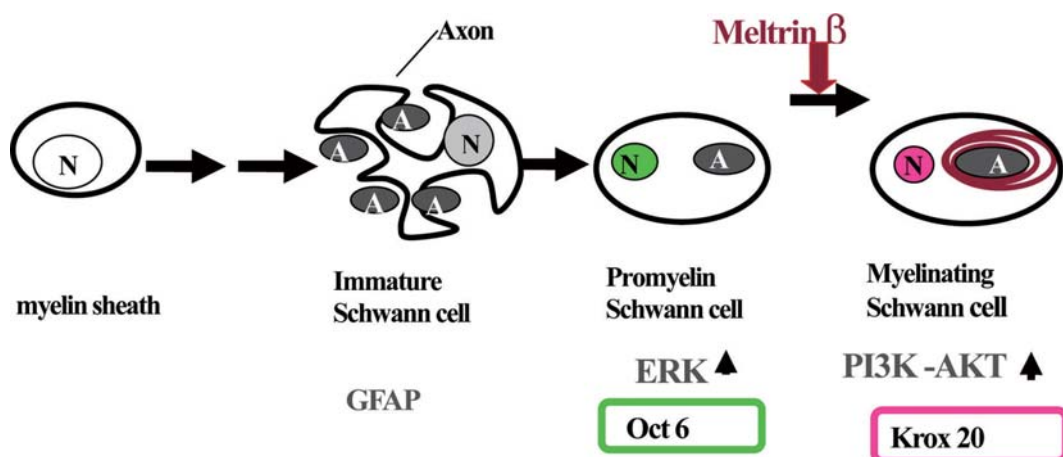


図1. 末梢神経系グリア Schwann 細胞分化におけるメルトリン β の役割

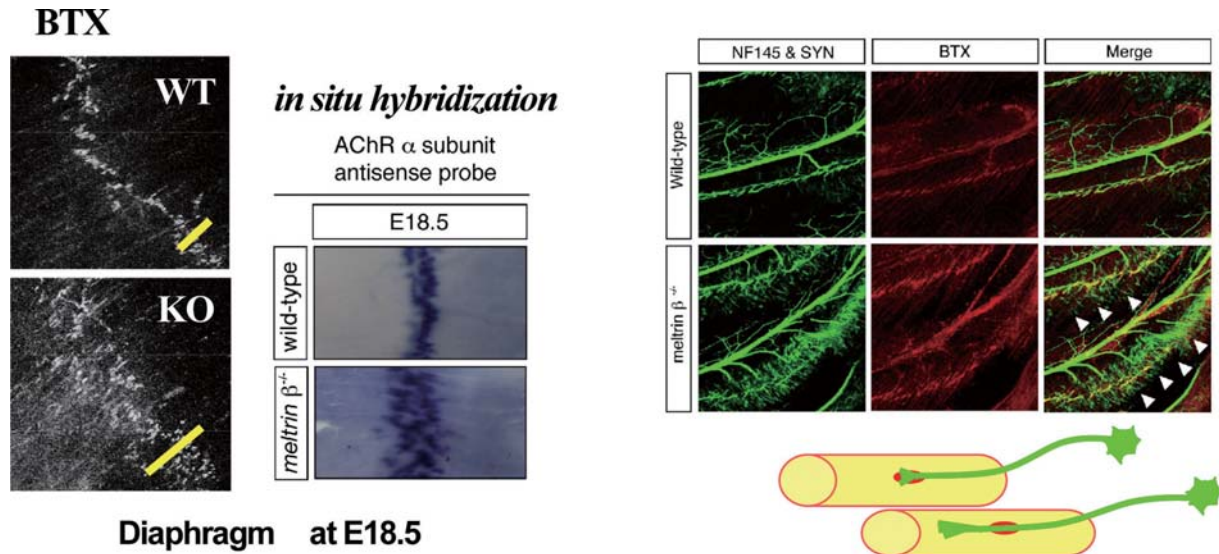


図2. 神経筋接合部形成におけるメルトリン β の役割。メルトリン β ノックアウトマウスでは、アセチルコリンレセプターの発現が、蛋白レベルでも（左）転写レベルでも筋肉の中央に局在しない（中）。さらに、軸索がシナプスを越えて伸長する（右）。

2. 神経筋接合部 (NMJ) 形成におけるメルトリン β の役割

一方、メルトリン β 欠損マウスの胎仔では、呼吸に關与する横隔膜や肋間筋神経筋接合部を構成する運動神経の接合部への投射に異常が認められ、アセチルコリンレセプターの集積も悪いことがわかった。アセチルコリンレセプターの集積の悪さは、ニューレグリン ARIA のシナプスでの活性制御の異常を示唆するものであった（図2）。一方、運動神経の接合部への投射に関する表現型は、ニューレグリンだけでは説明できないものであった。そこで、野生型マウス胎仔では NMJ に集積するのに対しメルトリン β 欠損マウスでは集積しない転写産物を microarray を用いて検索し、この異常に關与しそうな、いくつかの候補遺伝子を選択した。そして、そのうちのひとつが神経の軸索の pathfinding を制御する EphrinA5 であること、EphrinA5 欠損マウスでも、同様の NMJ 形成の異常が見られることを見出した。メルトリン β は、そのレセプター EphA4 と相互作用し、EphrinA5-EphA4 複合体のエンドサイトーシスを抑制した。その効果は、メルトリン β のプロテアーゼ活性に依存しないものであった。この研究は、シナプスの安定化におけるメルトリン β の役割を明らかにするとともに、プロテアーゼに依存しないメルトリン β の機能の存在を示したものである (Yumoto N. *et al.*, *PLoS One* 2008)。

Development and regeneration require various kinds of intercellular signaling and adhesion molecules. Our research has been focused on regulatory mechanisms of such cell-cell interactions. Numerous intercellular signaling molecules are generated as membrane-anchored proteins, and they are subjected to proteolytic processing to liberate their extracellular domains (ectodomain shedding). Evidence suggests that ADAM family proteases are involved in the ectodomain shedding of various membrane proteins. We are currently studying roles of ADAM proteases in development of nervous system.

1. Roles of Meltrin β /ADAM19 in Progression of Schwann Cell Differentiation and Myelination during Sciatic Nerve Regeneration

Remyelination is an important aspect of nerve regeneration after nerve injury, but the underlying mechanisms are not fully understood. Here, we show that Meltrin β (ADAM19), a member of the ADAM (a disintegrin and metalloprotease) family, plays crucial roles in nerve regeneration after a crush injury to the sciatic nerves. The expression of Meltrin β was up-regulated in neurons after the crush injury. Morphometrical analysis revealed a delay in remyelination in Meltrin β deficient nerves whereas no significant defects were observed in their axon elongation. The activation of Krox-20, an indispensable transcription factor for myelination, was delayed in Meltrin β deficient nerves and was accompanied by the retarded expression of myelin-related proteins. Expression of Krox-20 in Schwann cells were mediated by Akt. Phosphorylation of Akt but not that of Erks was reduced in regenerating nerves of Meltrin β deficient mice. The cell membrane fraction prepared from Meltrin β deficient nerves showed a defective activation of Akt in the membrane-loaded Schwann cells. Meltrin β deficient mice exhibited delayed sciatic functional recovery after the nerve crush. Altogether, these results reveal a role of Meltrin β in Schwann cell differentiation and re-myelination in nerve regeneration. Moreover, this study suggests that Meltrin β functions as a modulator of juxtacrine signaling from axons that activates Akt pathway and Krox-20 prerequisite for Schwann cell differentiation.

2. Meltrin β /ADAM19 interacting with EphA4 in developing neural cells participates in formation of the neuromuscular junction

Background

Development of the neuromuscular junction (NMJ) is initiated by the formation of postsynaptic specializations in the central zones of muscles, followed by the arrival of motor nerve terminals opposite the postsynaptic regions. The post- and presynaptic components are then stabilized and modified to form mature synapses. Roles of ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) family proteins in the formation of the NMJ have not been reported previously. Principal findings

We report here that Meltrin β , ADAM19, participates in the formation of the NMJ. The zone of EphA4 interacted with each other in developing motor neurons, and both of these proteins localized in the NMJ. Coexpression of Meltrin β and EphA4 strongly blocked vesicular internalization of ephrin-A5/EphA4 complexes without requiring the protease activity of Meltrin β , suggesting a regulatory role of Meltrin β in ephrin-A5-Eph signaling

Conclusion

Meltrin β plays a regulatory role in formation of the NMJ. The endocytosis of ephrin-Eph complexes is required for efficient contact-dependent repulsion between ephrin and Eph. We propose that Meltrin β stabilizes the interaction between ephrin-A5 and EphA4 by regulating endocytosis of the ephrinA5-EphA complex negatively, which would contribute to the fine-tuning of the NMJ during development

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- S. Wakatsuki, N. Yumoto, K. Komatsu, T. Araki and A. Sehara-Fujisawa: Roles of meltrin beta/ADAM19 in progression of Schwann cell differentiation and myelination during sciatic nerve regeneration. *J Biol Chem. in press*
- N. Yumoto, S. Wakatsuki, T. Kurisaki, Y. Hara, N. Osumi, J. Frisén and A. Sehara-Fujisawa: Meltrin beta/ADAM19 interacting with EphA4 in developing neural cells participates in formation of the neuromuscular junction. *PLoS ONE*, **3**(10): e3322 (2008)
- A. Harsha, O. Stojadinovic, H. Brem, A. Sehara-Fujisawa, U. Wewer, C. Loomis, C. Blobel, M. Tomic-Canic: ADAM12: a Potential Target for the Treatment of Chronic Wounds. *Journal of Molecular Medicine*, **86**(8): 961-969 (2008)
- A. Okada, S. Mochizuki, T. Yatabe, T. Kimura, T. Shiomi, Y. Fujita, H. Matsumoto, A. Sehara-Fujisawa, Y. Iwamoto and Y. Okada: ADAM-12 (meltrin alpha) is involved in chondrocyte proliferation via cleavage of insulin-like growth factor binding protein 5 in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* **58**(3): 778-789 (2008)

2) 総説

- 入江直樹, 小松紘司, 瀬原淳子: Image J を用いた組織切片画像の三次元データ化. 実験医学, 羊土社, Vol. 26 No. 4 (3月号) pp. 555-560 (2008)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Tomomi Sato: EphrinB2 Reverse Signaling in the Probability of Neurons Projecting from the Tectum to the Hindbrain in Zebrafish. CDB シンポジウム (2008.3.24. 兵庫)
- Koji Komatsu, Shuji Wakatsuki, Atsushi Iida and Atsuko Sehara-Fujisawa: Roles of Meltrin beta/ADAM19 Protease in Development of Cardiovascular System. Keystone Symposia (Molecular Mechanisms of Angiogenesis in Development and Disease). (2008.1.16. Vancouver, Canada)
- N. Yumoto, S. Wakatsuki, T. Kurisaki, Y. Hara, N. Osumi, J. Frisén and A. Sehara-Fujisawa: Meltrin beta/ADAM19 interacting with EphA4 in developing neural cells participates in formation of the neuromuscular junction, Frontiers in Developmental Biology Meeting (Joint meeting of the Societe Francaise de Biologie du Developpement/Japanese Society of Developmental Biologists) (2008.9.15. Giens, France)
- 飯田敦夫, 坂口和弥, 工藤寛明, 坂口泰子, 川原敦雄, 瀬原淳子: ゼブラフィッシュの形態形成における adam-8 プロテアーゼ因子の役割 (Roles of adam-8 (A disintegrin and metalloproteinase domain 8) in zebrafish development.), BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会) (2008.12.9. 兵庫)
- 栗崎知浩, 増田亜紀, 岸 義朗, 中桐志保, 瀬原淳子: 筋前駆細胞の融合活性を検出する抗体を用いた筋管形成の解析 (Analysis of myotube formation using monoclonal antibodies that recognize fusogenic myoblasts.), BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会) (2008.12.10. 兵庫)

2) 講演・シンポジウム

Atsuko Sehara: Peri-membranous Proteolysis and Regulatory Mechanisms. ミニシンポジウム「膜近傍におけるプロテオリシス (Proteolysis in the perimembrane region)」、第60回日本細胞生物学会大会 (2008.6.29. 神奈川)

瀬原淳子: 細胞たちの「生涯」を探る。第13回京都大学薬学部生涯教育講演会 (招待講演), (2008.7.26. 東京)

瀬原淳子: 神経提細胞分化・神経筋接合部形成におけるメルトリン β の役割。シンポジウム「膜結合性プロテアーゼとその制御」, 第13回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会学術集会 (2008.8.23. 大阪)

Atsuko Sehara: Roles of Meltrin beta (ADAM19) in development of the heart and the peripheral nervous system. セミナー Developmental Biology Institute of Marseille Luminy (2008.9.12. Marseille, France)

瀬原淳子: 形態形成における ADAM プロテアーゼの役割—循環器系を中心に, 第30回心筋生検研究会 (招待講演) (2008.11.28. 三重)

瀬原淳子: 発生と再生, そしてヘビ毒にみる生物の“エコライフ”, 生化学若い研究者の会創立50周年記念シンポジウム「生化学若手と生命科学」 (招待講演) (2008.12.10. 兵庫)

再生免疫学分野

Department of Immunology

准教授 喜納 辰夫

Assoc. Prof. Tatsuo Kina

【研究概要】

本研究分野では, (1) X線照射による胸腺リンパ腫発症機構および (2) アレルギー自然発症モデル BALB/c.CD45.1 マウスにおけるアレルギー発症の分子機構を主なテーマとして研究を行っている。

1. X線照射による胸腺リンパ腫発症機構の解析——頭のマウスに発生した胸腺リンパ腫から検出された複数の TCR β genotype

マウスに放射線を照射すると, 低線量でもその胸腺はいったん著しく萎縮する。その後骨髄から幹細胞が供給されるとともに, 残存した胸腺細胞の分化・増殖により, 胸腺は臓器として再生する。しかし照射マウスでは, 高い頻度で胸腺リンパ腫が生じる。そこでわれわれは胸腺リンパ腫の TCR β 鎖遺伝子座 (TCR β genotype) の構造を解析することで, 胸腺再生の過程でおきた異常を明らかにしようとしてきた。これまでに, 一部の胸腺リンパ腫においては TCR β genotype が一つではないことを示すデータが得られていた。今年度はこれら複数の genotype が共通の要素を含んでいることをつきとめた。

一つの胸腺リンパ腫に複数の genotype が存在する場合, 大部分の細胞はある一つの genotype を有し, さまざまな genotype は残りの細胞から検出される (図1)。興味深いことに, 前者の genotype における DJ construct と後者の genotype における VDJ construct の DJ 部分が完全に一致していた。このことはすなわち, 二つある対立遺伝子のうち一方で最初の TCR β 鎖遺伝子 V-DJ 再構成が成功した後, 少数の細胞では, もう一方の対立遺伝子で

も V-DJ 再構成がおこったことを示唆している。われわれが得たデータは、従来厳密であると考えられてきた "feedback inhibition" の概念に反するものである。今後まず、この現象が胸腺再生時に限定されるか否かを解明する。

2. BALB/c.CD45.1 コンジェニック・マウスにおける免疫異常とその分子機構

細胞膜タンパク質 CD45 は、その細胞質内ドメインにリン酸化チロシン特異的な脱リン酸化 (PTPase) 活性を有し、免疫反応の正・負の調節因子として重要である。最近ヒトにおいて、CD45 の細胞外ドメインの変異あるいは部分的欠失が免疫不全症や多発性硬化症、細菌感染などを引き起こす原因となっている例が報告され、CD45 がいろいろな病気の発症に関係していることが示唆されている。我々が樹立した BALB/c.CD45.1 マウスは、CD45 分子に関して、通常の BALB/c マウス (CD45.2) と比較して、CD45 分子の細胞外ドメインの 5 個のアミノ酸配列が変異しているが、生後半年以降に高頻度で頭や背中 of 皮膚炎、アレルギー性結膜炎や中耳炎を発症する。BALB/c.CD45.1 マウスにおけるこれらの免疫異常は、血中の Th2 サイトカインや IgE の上昇と時期を一致しており、細胞レベルでは、リンパ節における CD69 陽性 B 細胞数の増加とこれらの B 細胞における Jak3 および Stat6 のチロシンリン酸化の亢進が認められた。Jak3/Stat6 の信号伝達系は IgE 産生に重要であることが示されていることから、これらの結果は、CD45.1 マウスが持つ CD45 分子 (CD45.1) は CD45.2 分子と比較して、PTP 活性が低下している、もしくは低下しやすいことを示唆していると考えられた。この点について解析を行ったところ、CD45.1 マウスの B 細胞内の CD45 分子は、年齢とともに PTP 活性が CD45.2 マウスに較べて有意に低下していることが示された。また、マウスの B 細胞表面 CD45 分子を抗 CD45 抗体で架橋すると、CD45 の PTP 活性が顕

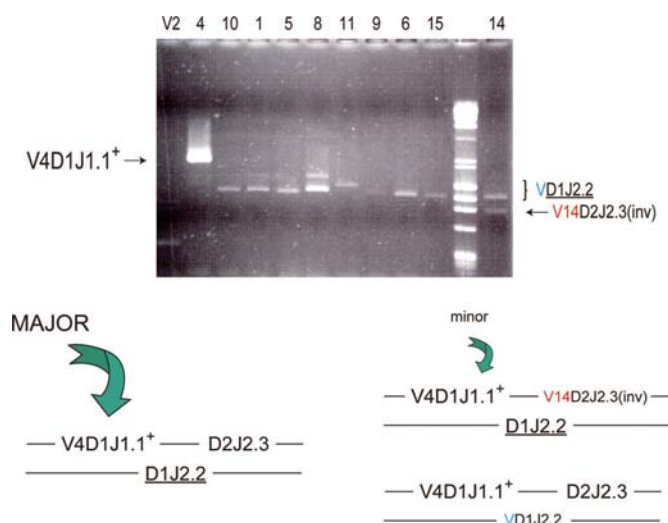


図 1. 一つの胸腺リンパ腫から検出された複数の genotype。この胸腺リンパ腫においては、すべての細胞が一方の対立遺伝子に TCR β 鎖分子をコードする VDJ construct (V4D1J1.1⁺) を持つ。少数の細胞はその上、もう一方の対立遺伝子においても V-DJ 再構成をおこなっていた。この VDJ construct 中の V は多種類であるのに、DJ 部分は一種類 (D1J2.2; 下線部) で、feedback inhibition によって V-DJ 再構成をしなかった DJ と同一であった。この胸腺リンパ腫ではさらに、V4D1J1.1⁺ の下流にある D2J2.3 と V14 セグメント間での再構成も検出された。

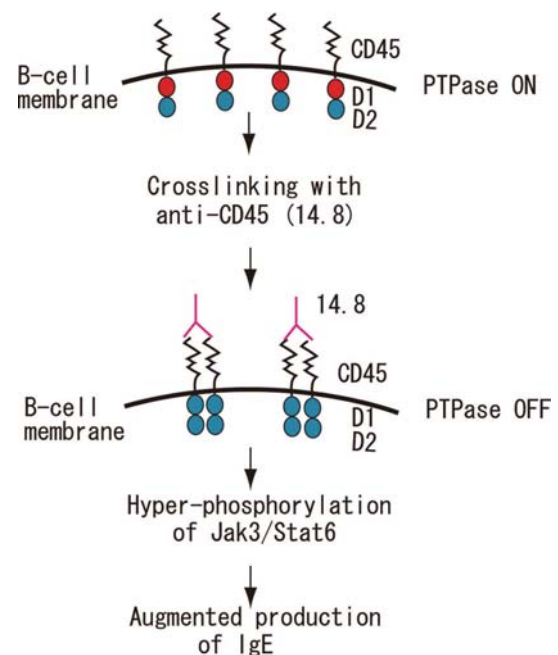


図 2. BALB/c.CD45.1 マウスにおける抗 CD45 抗体による IgE 産生の増強のメカニズム。抗原投与後、IgE 産生は通常、CD45 の PTPase 活性により産生がコントロールされるが、抗 CD45 抗体により B 細胞表面の CD45 分子が架橋され、PTPase 活性が OFF になると、その下流の Jak3/Stat6 のリン酸化が促進され、過剰の IgE が産生されるようになる。

著に低下することから、細胞表面 CD45 分子のダイマー形成が CD45 分子そのものの PTP 活性低下の原因になっている可能性が示された。この点を直接確かめるために、Ovalbumin (OVA) 抗原投与を行ったマウスに、B 細胞特異的な抗 CD45 抗体 (14.8) を注射して、OVA 特異的 IgE 産生における影響を調べたところ、OVA 特異的 IgE 抗体産生が増強されることから、生体内においても、CD45 分子の架橋が免疫異常の発症の原因となっていると考えられる (図 2)。今後、この現象の分子機構をさらに解明していくと共に、BALB/c.CD45.1 マウスを用いて、種々のアレルギーや炎症の治療モデルを開発したい。

Our research aim focuses on two major areas. (1) Molecular mechanism of X-ray-induced thymic lymphomagenesis in C57BL/6 mice and (2) Molecular and cellular mechanisms of inflammatory diseases in BALB/c.CD45.1 congenic mice.

1. TCR β genotypes detected from a murine thymic lymphoma

Irradiation to mice, even at low dose, causes atrophy of their thymi. Normally, immigrating stem cells from bone marrow and intensive proliferation and differentiation of survived thymocytes regenerate the thymus. Thymic lymphomas however are often induced in irradiated mice. In order to elucidate the anomaly in the thymic regeneration, we have analyzed TCR β chain gene loci in thymic lymphomas. Our previous data show that some thymic lymphomas contain several TCR β genotypes. This year, we have revealed that all the genotypes detected in a thymic lymphoma have a part in common.

In case a thymic lymphoma has several TCR β genotypes, a large portion of the cells have a genotype and the rest have various genotypes for each (Fig.1). Interestingly, the DJ construct in the former and all the DJ fragments in the VDJ constructs in the latter were identical. Therefore the identity strongly suggests that the minor cells undertook the second V to DJ recombination in the other allele even though the first V to DJ rearrangement had been productive. Our finding is against the feedback inhibition of TCR β V to DJ rearrangement. As a next stage, we are going to investigate whether this phenomena is restricted to the thymic regeneration.

2. Molecular and cellular mechanism of immune disorders in BLB/c.CD45.1 mice.

BALB/c.CD45.1 congenic mice spontaneously develop atopic dermatitis in skins as well as allergic inflammatory diseases in eyes and ears after 6 months of age. The concentration of Th2 cytokines and IgE in blood was elevated in these mice as compared with normal BALB/c mice. However, more profound effects are found in lymph node B-cell population. Higher number of activated (CD69⁺) B-cells were detected in axillary lymph nodes in these mice, and the expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and the germline IgE transcripts were highly elevated in these B-cells. Biochemical analysis revealed that tyrosine phosphorylation of Jak3/Stat6 in lymph node B-cells in aged BALB/c.CD45.1 mice was significantly higher than that in normal BALB/c mice. Because the activation of Jak3/Stat6 system is shown to be required for IgE production in B-cells and CD45 is involved in the regulation of Jak3/Stat6, these results suggest that PTPase activity of CD45 in aged BALB/c.CD45.1 lymph node B-cells is reduced as compared with normal BALB/c B-cells. Using the assay method to directly quantitate the PTP activity of CD45 molecules, we showed that PTPase activity of CD45 molecules in aged BALB/c.CD45.1 mice was significantly lower than that in normal mice. To investigate the role of CD45 molecules in higher production of IgE

in vivo, we injected B-cell specific anti-CD45 antibody (14.8) in ovalbumine (OVA)-immunized mice and OVA-specific IgE levels are compared. The results showed that OVA-specific IgE production was greatly enhanced by the injection of anti-CD45, suggesting that the cross-linking of B-cell surface CD45 molecules resulted in reduced PTPase activity of CD45 and elevated production of IgE. Similar mechanisms might be involved in the immune disorders developed in BALB/c.CD45.1 mice.

【業績目録】

◆ 学会等の発表 ◆

学会・研究会

藤本真慈, 柿沼志津子, 喜納辰夫, 島田義也: 一頭のマウスに発生した胸腺リンパ腫の TCRb genotype は必ずしも 1 種類ではない. Kyoto T Cell Conference 第18回学術集会 (2008.6.13-14. 京都)

Shinji Fujimoto, Shizuko Kakinuma, Tatsuo Kina and Yoshiya Shimada: Further V to DJ rearrangement of TCRb gene in the presence of an in-frame VDJ construct. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 (2008.12.1-3. 京都)

Shinji Fujimoto, Shizuko Kakinuma, Tatsuo Kina and Yoshiya Shimada: TCRb V to DJ rearrangement in the DP thymocytes in the presence of an in-frame VDJ construct. International Symposium on Regenerative Medicine (2008.12.4. Kyoto)

藤本真慈, 柿沼志津子, 喜納辰夫, 島田義也: 一頭のマウスに発生した胸腺リンパ腫の TCRb 鎖遺伝子再構成の解析によって明らかになった 1 個の前リンパ腫細胞からの増殖と分化. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (2008.12.9-12. 神戸)

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、ドーパミン産生神経の誘導、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、効果的な神経誘導、腫瘍形成抑制のための細胞選別、移植時における細胞死抑制、移植後の免疫抑制、長期の効果と安全性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。

細胞死抑制に関して、ROCK 阻害薬が細胞分散による細胞死（anoikis）を抑制することを明らかにし報告した。ROCK 阻害薬で処理することにより細胞移植24～48時間後の細胞死が有意に減少し、細胞移植の効率化に寄与するものと思われる。また Stromal cell-derived inducing activity（SDIA）の候補として胎生期髄膜細胞も ES 細胞からのドーパミン産生神経誘導能を有することを報告した（図1）。この中で PA6 細胞との比較から特に Wnt5a の働きが重要であることも明らかにした。この成果は動物由来因子を用いない神経分化誘導に寄与しうる。また、細胞移植後の宿主脳の炎症・免疫反応に注目し、これらの反応が移植神経幹細胞の神経分化を抑制していることを明らかにした。特に IL-6 の関与が示唆され、現在は宿主脳環境制御による移植細胞分化による影響を検討している。

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

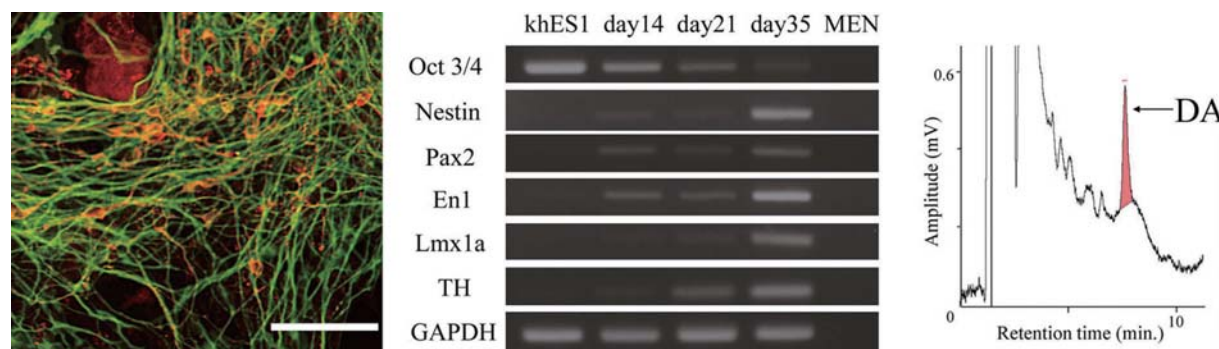


図1. 胎生期髄膜細胞上でのヒト ES 細胞からのドーパミン産生神経誘導（チロシン水酸化酵素陽性のドーパミン産生神経=赤, Tuj1 陽性のすべての神経細胞=緑）

Fig. 1. Induction of DA neurons from human ES cells on meningeal cells (TH+cells=red, Tuj1+cells=green)

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 effective method for clinical application of these cells.

We have reported that cell death after dissociation (anoikis) of ES cells or ES cell-derived neural precursor cells (NPCs) can be reduced by the treatment with ROCK inhibitor. Cell death immediately after injection into the brain was significantly reduced by ROCK inhibitor, so these results are useful for the efficient cell transplantation. We have also revealed that meningeal cells can be used as feeders to induce DA neurons from ES cells (Fig. 1), and Wnt5a plays an important role in the stromal cell-derived inducing activity (SDIA). We hope that further investigation of the molecular mechanism of SDIA will lead to chemically defined neuronal induction. In addition, we have demonstrated that host-derived leukocytes, including microglia, macrophages, and lymphocytes, accumulate around the grafts of mouse ES cell-derived NPCs in host mouse brains, and that they suppressed neuronal differentiation of the grafted NPCs. As it is suggested that IL-6 is involved in this suppression, we are investigating the effects of the host brain environment including pro-inflammatory cytokines on the differentiation of the grafted NPCs.

【業績目録】

◆ 誌 上 発 表 ◆

1) 原著論文

- T. Wataya, S. Ando, K. Muguruma, H. Ikeda, K. Watanabe, M. Eiraku, M. Kawada, J. Takahashi, N. Hashimoto and Y. Sasai: Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**(33): 11796–11801 (2008)
- M. Ideguchi, M. Shinoyama, M. Gomi, H. Hayashi, N. Hashimoto and J. Takahashi: Immune or inflammatory response by the host brain suppresses neuronal differentiation of transplanted ES cell-derived neural precursor cells. *J Neurosci Res* **86**(9): 1936–1943 (2008)
- H. Hayashi, A. Morizane, M. Koyanagi, Y. Ono, Y. Sasai, N. Hashimoto and J. Takahashi: Meningeal cells induce dopaminergic neurons from embryonic stem cells. *Eur J Neurosci* **27**: 261–268 (2008)
- M. Koyanagi, J. Takahashi, Y. Arakawa, D. Doi, H. Fukuda, H. Hayashi, S. Narumiya and N. Hashimoto: Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors. *J Neurosci Res* **86**(2): 270–280 (2008)

2) 総 説

- 高橋 淳: パーキンソン病に対するニューロモデュレーション. *臨床神経学* **48**(4): 233–241 (2008)
- 高橋 淳: ES 細胞移植による中枢神経機能の再生. 遺伝子医学 MOOK 別冊 進みつづける細胞移植治療の実際 (下巻): 117–121 (2008)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 高橋 淳, 林 英樹, 森実飛鳥: 髄膜細胞による ES 細胞からのドーパミン産生神経誘導. 神経組織の成長・再生・移植研究会第23回学術集会 (2008.5.17. 幕張)
- 高橋 淳, 林 英樹, 森実飛鳥: 髄膜細胞による ES 細胞からのドーパミン産生神経誘導. 第31回日本神経科学大会 (2008.7.9-11. 東京)
- 高橋 淳, 菊地哲広, 土井大輔: ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) からのドーパミン産生神経誘導. 第67回日本脳神経外科学会 (2008.10.1-3. 盛岡)
- Jun Takahashi: ES cell transplantation for Parkinson's disease—animal study. 57th Congresso Nazionale Societa Italiana di Neurochirurgia (2008.11.6-8. Udine, Italy)
- 森実飛鳥, 高橋 淳, Jia-Yi Li, Patrik Brundin: ヒト ES 細胞の継代培養数と脳内移植後の生着について. 第67回日本脳神経外科学会 (2008.10.1-3. 盛岡)
- 林 英樹, 土井大輔, 高橋 淳: Wnt シグナルを利用した ES 細胞からの神経誘導法の開発. 第67回日本脳神経外科学会 (2008.10.1-3. 盛岡)
- 土井大輔, 菊地哲広, 斎木英資, 尾上浩隆, 林 拓也, 林 英樹, 高橋 淳: 霊長類パーキンソン病モデルに対するヒト ES 細胞移植. 神経組織の成長・再生・移植研究会第23回学術集会 (2008.5.17. 幕張)
- D. Doi, T. Kikuchi, H. Saiki, H. Onoe, T. Hayashi, H. Hayashi, Y. Sasai and J. Takahashi: Analysis of the human ES cell-derived tumor in the primate model of Parkinson's disease. Annual meeting of the Society for Neuroscience 2008 (2008.11.15-19. Washington D.C.)
- 五味正憲, 篠山瑞也, 高橋 淳: Interleukin-6 の ES 細胞由来神経幹細胞の分化・遊走に対する影響. 第9回日本分子脳神経外科学会 (2008.8.30-31. 京都)
- 植村 真, Mohamed Refaat, 高橋 淳: Matrix を用いた細胞移植療法の開発. 神経組織の成長・再生・移植研究会第23回学術集会 (2008.5.17. 幕張)

2) 講演・シンポジウム

- 高橋 淳: ES 細胞を利用した神経再生医療. 再生医科学研究所医工学フォーラム (2008.2.20. 京都)
- 高橋 淳: パーキンソン病治療. 関西広域バイオメディカルクラスター 再生医療の実現化セミナー (2008.2.21. 東京)
- 高橋 淳: ES 細胞由来神経前駆細胞の脳内移植における腫瘍形成と炎症・免疫反応. 第7回日本再生医療学会総会 (2008.3.13-14. 横浜)
- 高橋 淳: ここまで進んだパーキンソン病の治療～ES 細胞を利用した治療方法～. 関西広域バイオメディカルクラスター成果発表会 (2008.3.20. 大阪)
- 高橋 淳: ES 細胞移植によるパーキンソン病治療法の開発. 第14回(財)田附興風会医学研究所セミナー (2008.4.9. 大阪)
- 高橋 淳: iPS 細胞を用いたパーキンソン病に対する移植治療の実現化. 再生医療の実現化プロジェクト 第1回夏のワークショップ (2008.8.28. 熱海)
- 高橋 淳: ES 細胞を用いたパーキンソン病治療の開発. 第34回神戸薬科大学卒後教育講座 (2008.9.7. 神戸)
- 高橋 淳: 多能性幹細胞からのドーパミン産生神経誘導と移植. 第29回神経組織培養研究会 (2008.9.20. 東京)

高橋 淳：PET 分子イメージングと再生医療，PET 科学アカデミーセミナー（2008.10.28，神戸）

高橋 淳：再生医療の臨床応用に向けて，神戸医療産業都市構想10周年記念事業（2008.10.31，神戸）

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し，その成果にもとづいて，間葉系組織の臨床病態に対する新規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およ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，増殖およ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り，低酸素環境での培養により，発現亢進が阻害できることを見出した。分化能に関しては，我々が樹立した不死化 MSC クローンをを用いたアプローチにより，CD106 発現と骨および脂肪分化能との相関，あるいは $TGF\beta$ に対する反応と軟骨分化能の相関等のクローナルな現象を見出した。これらの結果は，現在一括りに取り扱われている MSC が増殖・分化能において多様な細胞の集団であることを実証するものであり，詳細な解析への鍵となるものと考えている。

2. 間葉系幹細胞の癌化監視機構の開発

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。実際マウスのみならずヒト MSC も特に低密度培養法により，細胞増殖を刺激する方法で培養を行った場合，染色体異常が発生することが示されており，MSC を用いた間葉系組織の再生医療の遂行に当たって無視できない状況になっている。我々は培養過程における癌化の初期変化としての p16 遺伝子のメチル化に注目し，その変異を定量的に解析する方法を開発し，実際に p16 遺伝子のメチル化が培養過程で発生し，それにより細胞の増殖能が亢進する場合があることを報告した。他の遺伝子変異解析を含めて，MSC の癌化監視機構の確立が最終目標である。

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平成18

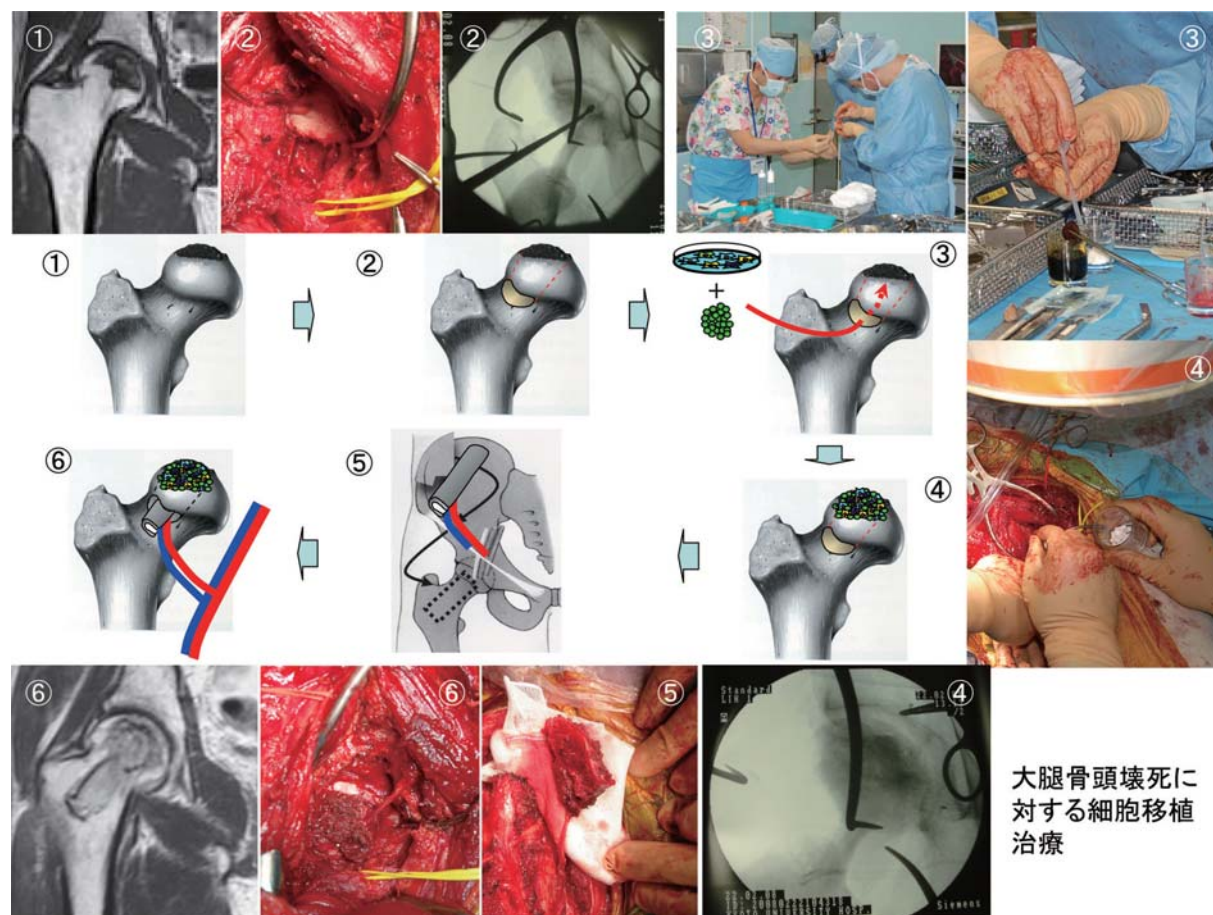


図 1. 大腿骨頭壊死に対する新規細胞移植治療法の概要

①術前の MRI 像。②病巣の搔爬のための開窓および X 線透視下の搔爬。③培養 MSC と人工骨の混合。④病巣部への移植。⑤血管柄付腸骨の採取および開窓部への移植。⑥術後 3 ヶ月の MRI 像。良好な骨再生像が得られている。

Fig. 1. Outlines of the new treatment with MSC for avascular necrosis of femoral head.

①Preoperative MRI finding. ②Fenestration and curettage under fluoroscopy. ③Mixture of cultured MSC and artificial bone. ④Transplantation into the curetted region. ⑤Vascularized iliac bone grafting. ⑥Postoperative MRI (3 months after operation.; good bone remodeling was found.).

年 9 月 1 日に施行された「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およ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12月5日に第一例の治療を開始し、平成20年12月末までに11例の治療を施行した（図1）。最終的に20例に対し施行し、2年間の経過観察後、治療成績を評価する予定である。

4. 関節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グランジン E2 (PGE2) に注目し、その関節軟骨病態への応用を検討してきた。マウスおよびヒト軟骨細胞を用いた *in vitro* 実験で、4種類の PGE2 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、この知見に基づき、家兎を用いた *in vivo* 治療実験を行った。その結果、EP2 アゴニストにより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。この成果は、EP2 アゴニストの治療剤としての臨床応用の可能性を強く示唆するものである。

5. iPS 細胞に関する研究

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20年1月22日に設立された京都大学 iPS 細胞研究センターの一員として、iPS 細胞に関する研究を行っている。現在のテーマは、iPS 細胞からの MSC の誘導法の樹立、樹立細胞源として骨髄間質細胞と皮膚線維芽細胞の異同、および骨軟骨関連難治性疾患患者からの iPS 細胞の樹立である。

(文責 戸口田淳也)

The major objects of our department are to understand the basic biology of growth and differentiation of mesenchymal tissues and to develop new therapeutic modalities for pathological conditions in mesenchymal tissues. 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. There are, however, still many fundamental features of MSC are unknown, 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. As for the differentiation potential, we used immortalized MSC clones that we have established and found that the CD106 expression correlated positively and negatively with the adipogenic and osteogenic differentiation potential, respectively. Also we found that the response to exogenous TGF β determined the chondrogenic potential of each clone. These findings indicated that MSC which have been analyzed as a whole are a group of heterogeneous cells which has different potential of growth and differentiation and provide a key to understand the basic biology of MSC.

2. Establishment of surveillance system for transformation of MSC

Cancer cells are now considered to be derived from tissue stem cells resided in each tissue and therefore MSCs are potentially progenitors of malignant tumors developed in the mesenchymal tissues, sarcomas. Several reports showed that the chromosomal aberrations may take place during the culture of mouse and also human MSC, especially when cells were seeded and cultured in low density condition to stimulate growth. This issue should be seriously considered to promote the regenerative medicine in mesenchymal tissues using MSC. As one of important initial mutations, we have focused on the methylation of the p16 gene and established the method to detect the methylation quantitatively. Using this method, we have found that the methylation of the p16 gene did take place during the in vitro culture of MSC elongating the in vitro life. With additional analyses of other type of mutations, our final goal is to establish the transformation surveillance system of MSC.

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) on September 1, 2006. 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 11 cases have been treated until the end of December 2008 (Fig. 1). Twenty cases will be treated during two years, followed for two years and evaluated by radiological and clinical examination.

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 prostaglandin E2, which is one of physiological active materials and investigated the application of PGE2 to the regeneration therapy of articular cartilage. We have reported that the agonist specific to EP2, which is one of four types of PGE2 receptor, 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 and found that in combination with appropriate DDS, EP2 agonist enhanced the cartilage regeneration *in vivo* and also contributed to reconstruct the osteo-chondral boundary, which is important factor to maintain normal structure of articular cartilage. These data strongly suggested that EP2 agonist is a promising candidate for clinical trial as therapeutic drug.

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

iPS cells are autologous pluripotent cells, which were established by Prof. Shinya Yamanaka on November 2007. We have been engaging the research related to iPS cells as the faculty member in the Center for iPS Research and Application, Kyoto University, which was established on January 22, 2008. Current theme are; the induction of MSC from iPS cells, the difference between bone marrow stromal cells and skin fibroblasts as the cell source for iPS cells and the establishment of iPS cells from patients suffering bone and cartilage diseases with no effective treatments.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

原著論文

1. T. Aoyama, T. Okamoto, Y. Kohno, K. Fukiage, S. Otsuka, M. Furu, K. Ito, Y. Jin, S. Nagayama, T. Nakayama, T. Nakamura and J. Toguchida: Cell-specific epigenetic regulation of ChM-I gene expression: crosstalk between DNA methylation and histone acetylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. **365**: 124-130 (2008)

2. K. Fukiage, T. Aoyama, K.R. Shibata, S. Otsuka, M. Furu, Y. Kohno, K. Ito, Y. Jin, S. Fujita, S. Fujibayashi, M. Neo, T. Nakayama, T. Nakamura and T. Toguchida: Expression of vascular cell adhesion molecule-1 indicates the differentiation potential of human bone marrow stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**: 406-412 (2008)
3. S. Osone, H. Hosoi, K. Tanaka, K. Tsuchiya, T. Iehara, A. Morimoto, T. Hashida, M. Yamashita, K. Kawabata, K. Nishijo, J. Toguchida, J.I. Hata and T. Sugimoto: A case of a Ewing sarcoma family tumor in the urinary bladder after treatment for acute lymphoblastic leukemia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **29**: 841-844 (2008)
4. S. Takenaka, T. Ueda, N. Naka, N. Araki, N. Hashimoto, A. Myoui, T. Ozaki, T. Nakayama, J. Toguchida, K. Tanaka, Y. Iwamoto, A. Matsumine, A. Uchida, M. Ieguchi, M. Kaya and T. Wada: Prognostic implication of SYT-SSX fusion type in synovial sarcoma: A multi-institutional retrospective analysis in Japan. *Oncology Report* **19**: 467-466 (2008)
5. C. Fukukawa, H. Hanaoka, S. Nagayama, T. Tsunoda, J. Toguchida, K. Endo, Y. Nakamura and T. Katagiri: Radioimmunotherapy of human synovial sarcoma using a monoclonal antibody against FZD10. *Cancer Sci.* **99**: 432-440 (2008)
6. T. Nakayama, T. Tsuboyama, J. Toguchida, T. Hosaka and T. Nakamura: Natural course of desmoid-type fibromatosis. *J. Orthop. Sci.* **13**: 51-55 (2008)
7. S. Hasegawa, T. Aoyama, R. Kakinoki, J. Toguchida and T. Nakamura: Bilateral phlegmasia dolens associated with Trousseau's syndrome: A case report. *Arch. Phys. Med. Rehab.* **89**: 1187-1190 (2008)
8. T. Ueda, N. Naka, N. Araki, T. Ishii, H. Tsuchiya, H. Yoshikawa, K. Mochizuki, T. Tsuboyama, J. Toguchida, T. Ozaki, H. Murata, I. Kudawara, K. Tanaka, Y. Iwamoto, Y. Yazawa, K. Kushida, T. Otsuka and K. Sato: Validation of radiographic response evaluation criteria of preoperative chemotherapy for bone and soft tissue sarcomas: Japanese Orthopaedic Association Committee on Musculoskeletal Tumors Cooperative Study. *J. Orthop. Sci.* **13**: 304-312 (2008)
9. M. Ikegawa, H. Han, A. Okamoto, R. Matsui, M. Tanaka, N. Omi, M. Miyamae, J. Toguchida and K. Tashiro: Syndactyly and preaxial synpolydactyly in the single Sfrp2 deleted mutant mice. *Dev. Dyn.* **237**: 2506-2517 (2008)
10. F. Chen, R. Miyahara, T. Bando, K. Okubo, K. Watanabe, T. Nakayama, J. Toguchida and H. Date: Prognostic factors of pulmonary metastasectomy for osteosarcomas of the extremities. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **34**: 1235-1239 (2008)
11. S. Otsuka, T. Aoyama, M. Furu, K. Ito, Y.A. Jin, K. Fukiage, Y. Kohno, T. Maruyama, T. Kanaji, A. Nishiura, H. Sugihara, S. Fujimura, T. Otsuka, T. Nakamura and J. Toguchida: PGE2 signal via EP2 receptors evoked by a selective agonist enhances regeneration of injured articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* (in press)
12. H. Matsubara, M. Watanabe, T. Imai, Y. Yui, Y. Mizushima, Y. Hiraumi, Y. Kamitsuji, K.I. Watanabe, K. Nishijo, J. Toguchida, T. Nakahata and S. Adachi: Involvement of ERK activation in human osteosarcoma cell resistance to the HDAC inhibitor FK228. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (in press)
13. S. Nagayama, E. Yamada, Y. Kohno, T. Aoyama, C. Fukukawa, H. Kubo, G. Watanabe, T. Katagiri, Y. Nakamura, Y. Sakai and J. Toguchida: Inverse correlation of the up-regulation of FZD10 expression and the activation of beta-catenin in synchronous colorectal tumors. *Cancer Sci.* (in press)

14. C. Fukukawa, S. Nagayama, T. Tsunoda, J. Toguchida, Y. Nakamura and T. Katagiri: Activation of the non-canonical Dvl-Rac1-JNK pathway by Frizzled homologue 10 in human synovial sarcoma. *Oncogene* (in press)
 15. 戸口田淳也, 青山朋樹, 柴田弘太郎, ロバーツ, 吹上謙一: 間葉系幹細胞の増殖と分化. *実験医学* **26**: 668-675 (2008)
 16. 青山朋樹, 大塚聖視, 戸口田淳也. 軟骨の再生療法. *リウマチ科* **39**: 506-512 (2008)
 17. 青山朋樹, 戸口田淳也: iPS 細胞—再生医療への展望と治療. *Diabetes Journal* **36**: 38 (2008)
-

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 中山富貴, 戸口田淳也, 坪山直生, 中村孝志: 脛骨粗面を温存して切除人工膝関節置換術を行った脛骨近位骨肉腫の1例. 第418回京阪神整形外科集談会 (2008.1.19. 大阪)
- 青山朋樹, 光野芳樹, 大塚聖視, 吹上謙一, 布留守敏, 伊藤錦哉, 長山 聡, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也: 内因性ヒストンテイル修飾因子によるコンドロモジュリン-1 遺伝子発現制御機構の解析. 第21回日本軟骨代謝学会 (2008.3.21. 京都)
- K. Ito, T. Aoyama, S. Otuska, K. Fukiage, J. Yomghio, A. Nasu, M. Ueda, Y. Kasai, E. Ashihara, S. Kimura, T. Otsuka, T. Nakamura and J. Toguchida: Development of a new device using the nonwoven fabrics for isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow. 6th ISSCR (2008.6.11. Philadelphia)
- T. Aoyama, S. Otuska, K. Fukiage, J. Yomghio, A. Nasu, T. Nakamura and J. Toguchida: Intrinsic epigenetic regulators determine the expression of lineage-specific gene in mesenchymal stem cells. 6th ISSCR (2008.6.13. Philadelphia)
- 戸口田淳也, 青山朋樹, 布留守敏: 肉腫と iPS 細胞—今後の展望—. 第30回近畿肉腫研究会 (2008.6.28. 大阪)
- 仲俣岳晴, 保坂泰介, 坪山直生, 戸口田淳也, 中山富貴, 中村孝志: 大腿骨遠位部骨腫瘍に対する非蝶番型人工膝関節の使用経験. 第41回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2008.7.17. 浜松)
- 布留守敏, 長山 聡, 梶田洋一郎, 青山朋樹, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也: 肉腫転移関連因子 C7059 の機能解析および治療標的としての可能性の探索. 第41回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2008.7.17. 浜松)
- 青山朋樹, 大塚聖視, 石部達也, 布留守敏, 吹上謙一, 光野芳樹, 伊藤錦哉, 金 永輝, 梶田洋一郎, 那須 輝, 長山 聡, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也: 分化誘導プロファイルを用いた肉腫起源細胞へのアプローチ. 第41回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2008.7.18. 浜松)
- 中山富貴, 坪山直生, 戸口田淳也, 仲俣岳晴, 中村孝志: 多発骨転移を生じた粘液型脂肪肉腫の3例. 第41回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2008.7.18. 浜松)
- 伊藤錦哉, 青山朋樹, 大塚聖視, 吹上謙一, 金 永輝, 那須 輝, 大塚隆信, 中村孝志, 戸口田淳也: 不織布を用いた骨髄間葉系幹細胞分離法の開発. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 (2008.10.24. 京都)
- 青山朋樹, 大塚聖視, 布留守敏, 伊藤錦哉, 金 永輝, 那須 輝, 丸山隆幸, 金治敏也, 大塚隆信, 中村孝志, 戸口田淳也: プロスタグランジン E2 受容体特異的作動薬を用いた関節軟骨欠損治療薬の開発. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 (2008.10.24. 京都)
- 布留守敏, 長山 聡, 梶田洋一郎, 青山朋樹, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也: 肉腫転移関連因子 C70059 の機

能解析. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 (2008.10.24. 京都)

金 永輝, 青山朋樹, 布留守敏, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也: 肉腫における ras 遺伝子の変異解析. 第67回日本癌学会総会 (2008.10.28. 名古屋)

長山 聡, 布留守敏, 青山朋樹, 久保 肇, 渡辺 剛, 片桐豊雅, 中村祐輔, 戸口田淳也, 坂井義治: 大腸癌にて高発現している新規遺伝子の免疫組織化学染色による発現解析. 第67回日本癌学会総会 (2008.10.28. 名古屋)

布留守敏, 長山 聡, 梶田洋一郎, 青山朋樹, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也: 肉腫における転移関連新規因子 C7059 の機能解析. 第67回日本癌学会総会 (2008.10.29. 名古屋)

戸口田淳也, 大塚聖視, 石部達也, 青山朋樹, 中山富貴, 大塚隆信, 中村孝志: 肉腫において組織幹細胞としての特質は癌幹細胞としての特質に関連するものか. 第67回日本癌学会総会 (2008.10.29. 名古屋)

中山富貴, 戸口田淳也, 坪山直生, 仲俣岳晴, 中村孝志: 体外処理骨を用いた悪性骨腫瘍切除後再建. 第17回小児固形腫瘍研究会 (2008.11.21. 京都)

2) 講演・シンポジウム

戸口田淳也: 癌幹細胞探索のための細胞イメージングの可能性. 第47回日本生体医工学会大会 (2008.5.8. 神戸)

戸口田淳也: 間葉系幹細胞に関する期待と疑問. 第1回京都大学「医学領域」産学連携推進機構・産学情報交流会 (2008.5.15. 京都)

戸口田淳也: 肉腫幹細胞と組織幹細胞の接点. 治療開発を目指した最前線セミナー2 Cancer Stem Cell ～がん幹細胞をターゲットとした治療の開発に向けて～ (2008.6.24. 東京)

戸口田淳也: 遺伝子発現プロファイルからみた骨・軟部腫瘍の起源・分類・診断. 第41回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2008.7.17. 浜松)

J. Toguchida: iPS Cell Research in Kyoto. Biobridge2008 (2008.9.22. Geneva)

戸口田淳也: 細胞が足場に望むもの. 第57回高分子討論会 (2008.9.24. 大阪)

J. Toguchida: Development of a new therapy for osteonecrosis utilizing bone marrow-derived mesenchymal stem cells 3rd Franco-Japanese TR Initiative (2008.10.27. Kyoto)

戸口田淳也: 網羅的解析からの骨軟部腫瘍へのアプローチ. 第2回東京医科歯科大学硬組織疾患ゲノムセンターシンポジウム (2008.11.25. 東京)



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、膵 Langerhans 島（膵島）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。重症糖尿病治療は主としてインスリン補充療法に依存してきたが、根本的治療をめざす膵臓や膵島の移植が我が国でもよ

うやく定着してきた。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たりがある。また、ここ数年、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も、実施施設間の成績のばらつきや、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。

膵島再生医療を実現するための道筋としては、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（胎生幹）細胞やiPS（人工多能生幹）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おり、これらの方法が一部でも応用可能となれば、ドナー不足の問題は相当程度解決される。しかし、患者自身に由来する細胞を使用するのでない限り拒絶反応の対象となり、また、治療対象疾患が自己免疫の関与する1型（インスリン依存性）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。このようなバイオ人工膵が臨床に応用できるようになれば、重症糖尿病に対する有力な治療法となり得る。

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、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マクロカプセル化など、各種のバイオ人工膵の研究開発を行ってきた。また、あらかじめ血管誘導処置を施した皮下組織を移植部位とすることで、このようなデバイスの皮下移植によって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。さらに近年では、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・解凍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。

本年は、このバイオ人工膵を用いてラットから重症糖尿病ラットへの同種同系および同種異系膵島移植実験を行って、デバイスの効果と問題点を明らかにした。その結果、単純な膵島移植では拒絶されるウイスター系からルイス系への移植であっても、次第に減弱はするものの最長24週間の高血糖是正効果が得られることを確認している。一方、ルイス系からルイス系への膵島移植は拒絶されることがなく長期にわたり機能するが、この系で膵島をマクロカプセル化した場合は、異系の場合と類似した経過で機能が廃絶することが示唆された。これを受けて、カプセル化膵島の機能維持等を目指したカプセル化法の基礎的検討を行い、PVA濃度や添加タンパク質の最適化に一定の成果を得た。また、PVAゲルの物質放出能を検討し、ブドウ糖・インスリンは10分程度で放出が完了するが、IgGはほとんど放出しない（透過しない）ことを確認した。

また、通常は*in vitro*では増殖しない膵島細胞が未分化細胞との細胞融合によるリプログラミングを通して増殖能を獲得する可能性について検討する目的で、電氣的細胞融合の実験を行い、基礎的な細胞融合技術をほぼ確立した。現在は、*in vitro*での増殖・インスリン分泌動態や、移植時の機能・増殖等について評価すべく、実験を継続中である。さらに、膵臓のマスタージーンであるPDX1陽性の未分化細胞が膵島分離後の膵外分泌組織から培養できることを見だし、糖尿病治療応用への可能性について検討を行っている。

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 world-wide. Although therapy for severe diabetes mellitus still depends mostly on insulin replacement therapy, a slowly growing number of patients are recently treated by pancreas organ transplantation or islet transplantation even in Japan. 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 and poor outcome in some facilities. Therefore, current transplantation therapies are still far from our dream.

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. If these cells are clinically usable, the problem of donor shortage will be solved. However, as long as nonself 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 and thereby protected from host immune responses.

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 bioartificial pancreas such as mesh-reinforced polyvinyl alcohol (PVA) tube and bag, rod-shaped device of agarose containing polystyrene sulfonate, anti-complement substance and so on 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.

Using this macro-device, we recently examined the effect in iso- and allogeneic situations in rats and found that hyperglycemia can be improved as long as 24 weeks, although the effect gradually weakened, in the allo-geneic situation in that transplanted free islets are promptly rejected (Wistar to Lewis). On the other hand, in iso-geneic situation (Lewis to Lewis) in which free islets shows life-time engraftment, the effect of the device attenuates in a similar manner as in the allo-geneic situation. Therefore, we have made some basic improvement for long-lasting function and also demonstrated that the device released (or more practically permeate) glucose and insulin in about 10 min but IgG hardly did.

Other related researches are as follows. We have established a method of cell fusion between islet cells and mesenchymal stem cells and currently studying its effect on islet function *in vitro* and *in vivo* after transplantation. In addition, we found that PDX1 (the master gene of the pancreas)-positive undifferentiated cells can be cultured from exocrine tissue residual after islet isolation and studying their possibility toward diabetes therapy.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- 漆 智, 角 昭一郎, 奇 梅日更, 坂田直昭, 山本ちづる, 柳井伍一, 日裏彰人, 井上一知: 凍結法によるポリビニルアルコール (PVA) マクロカプセル化膵島に関する検討. 胆膵の生理機能 **24**: 43-47 (2008)
- K-C. Yang, C-C. Wu, F-H. Lin, Z. Qi, T-F. Kuo, Y-H. Cheng, M-P. Chen and S. Sumi: Chitosan/gelatin hydrogel as immunoisulative matrix for injectable bioartificial pancreas. Xenotransplantation **15**: 407-416 (2008)

2) 著書・総説

- 角 昭一郎: 特集: 臓器・組織再生の最先端. 糖尿病に対する再生医療. 移植 (日本移植学会雑誌) **43**: 26-33 (2008)
- 角 昭一郎: バイオ人工膵. 「新時代の糖尿病学 (3) 一病因・診断・治療研究の進歩」 (日本臨床66巻 増刊号7. 日本臨床社, 東京) 477-481 (2008)
-

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 漆 智, 奇 梅日更, 坂田直昭, 山本ちづる, 柳井伍一, 池之上悦子, 絹川綾乃, 日裏彰人, 角 昭一郎: 凍結法による polyvinyl alcohol (PVA) マクロカプセル化膵島に関する検討. 第7回日本再生医療学会総会 (2008. 3.14. 名古屋)
- 角 昭一郎, 柳井伍一, 林 隆志, 島袋 隆, 漆 智, 池之上悦子, 呉 倩, 日裏彰人, 井上一知: 間葉系幹細胞と膵島細胞の電気的細胞融合に関する研究. 第108回日本外科学会 (2008.5.16. 長崎)
- 漆 智, 柳井伍一, 池之上悦子, 呉 倩, 日裏彰人, 井上一知, 角 昭一郎: Polyvinyl alcohol (PVA) マクロカプセル化膵島を用いたラット同種膵島移植に関する検討. 第25回胆膵生理機能研究会 (2008.6.21. 京都)
- 柳井伍一, 林 隆志, 島袋 隆, 漆 智, 池之上悦子, 呉 倩, 日裏彰人, 井上一知, 角 昭一郎: 間葉系幹細胞と膵島細胞の電気的細胞融合に関する研究. 第25回胆膵生理機能研究会 (2008.6.21. 京都)
- 漆 智, 柳井伍一, 池之上悦子, 呉 倩, 日裏彰人, 井上一知, 角 昭一郎: 膵島移植における PVA マクロカプセル化膵島の応用. 第44回日本移植学会 (2008.9.21. 大阪)
- Z. Qi, M. Qi, N. Sakata, C. Yamamoto, G. Yanai, E. Ikenoue, Q. Wu, A. Hiura and S. Sumi: Application of polyvinyl alcohol (PVA) macro-encapsulated islets in type 1 diabetes treatment. International Symposium on Regenerative Medicine—Tenth Anniversary of Institute for Frontier Medical Sciences— (2008.12.4. 京都)

2) 講演・シンポジウム

- 角 昭一郎: バイオ人工膵研究の展望. 「医工学フォーラム2007」 (2008.2.21. 京都)
- 角 昭一郎: 糖尿病の夢の治療法とは; 再生医療への期待. 第22回 NPO 再生医療推進センター講演会 (2008.3.29. 京都)
- 角 昭一郎: 糖尿病の再生医療. 第15回滋賀消化器分子生物学懇話会 (2008.11.27. 大津)
- 角 昭一郎: 膵再生医療の可能性. 第70回日本臨床外科学会総会 シンポジウム 消化器外科における再生医療の

未来 (2008.11.28, 東京)

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】

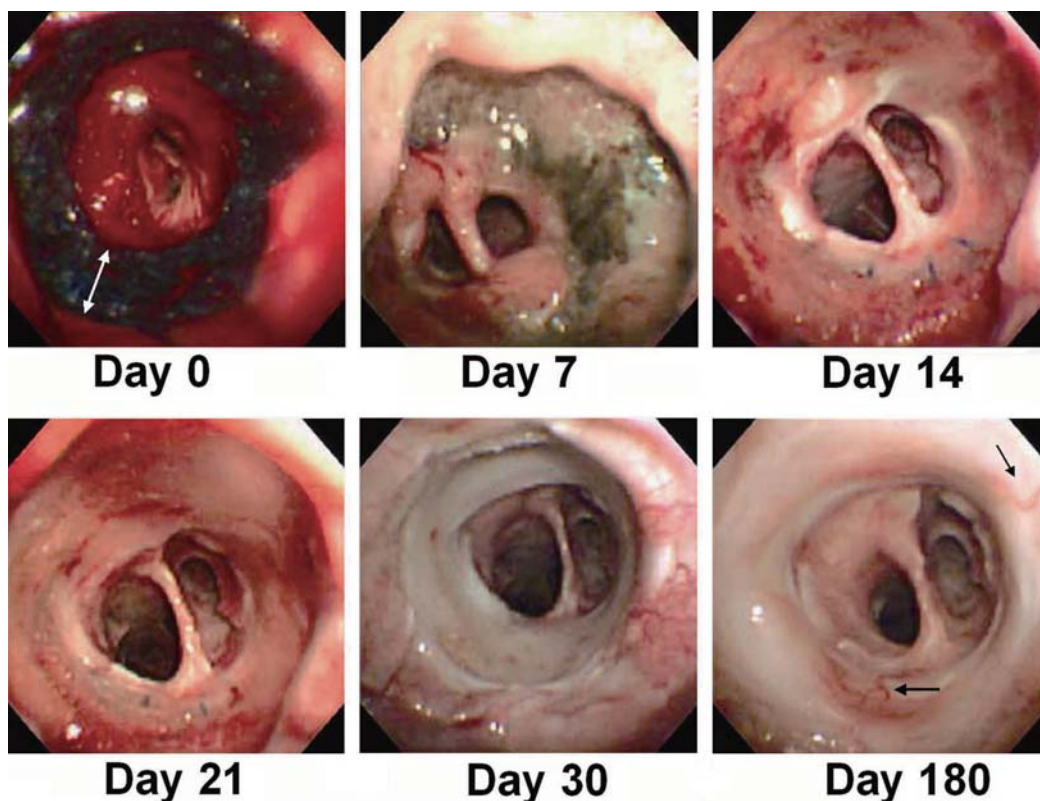
臓器再建応用分野では、“*in situ* Tissue Engineering” の概念に基づいて再生医学を推進し、人類の幸福に貢献することを研究の第一目標にしています。これによって、未だ治療法が見付かっていない症例、或いは移植ドナー不足のため治療が受けられない患者さんが救われることを目指しています。さらに、再生医療が普及すると高騰が続いている医療費が抑制されることが期待されるので、この面からも社会に貢献出来るものと考えています。

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。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“*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 Detergent で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マトリックス、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、幹細胞を分離・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内容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・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・手術方法の研究
- ⑪ バイオマテリアルの研究

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る“場”(環境)を人工的に体の



新しい人工気管の開発

臓器再建応用分野で開発された人工気管は頸部の気管切除後再建に臨床応用が開始され、現在までに8例が主として甲状腺癌術後の再建に使用されている。これは *in situ* Tissue Engineering に基づく再生医学の臨床応用であり、当研究分野ではさらに胸腔内での人工気管の開発に取り組んでいる。写真は、動物モデルでの生分解性プラスチックとコラーゲンの複合材料でできた目下開発中の人工気管で、移植後7日から14日で生分解性プラスチック（青色）は分解され、その後ほぼ自己組織に置き換わっていることが観察される。安全性と機能性の評価を行い、臨床へ研究成果を還元できるよう動物実験を続けている。

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 “*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. Furthermore, this new approach helps 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.

1. 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.

2. 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 should facilitate cell proliferation and cell redifferentiation, leading to regeneration of organs completely composed of cells derived from patients.

3. Cell+ECM Method

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.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

T. Nakamura, T. Sato, M. Araki, S. Ichihara, A. Nakada, M. Yoshitani, S. Itoi, M. Yamashita, S. Kanemaru, K. Omori, Y. Hori, K. Endo, K. Inada and K. Hayakawa: *In situ* Tissue Engineering for the tracheal reconstruction using a

- luminar-remodeling type of artificial trachea. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery (in press)
- 稲田有史, 中村達雄, 市原理司, 諸井慶七郎, 橋爪圭司, 古家 仁, 森本 茂: 末梢神経損傷に対する生体内再生治療. ペインクリニック **29**: 452-458 (2008)
- 稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 橋爪圭司, 古家 仁, 森本 茂: CRPS (complex regional pain syndrome) type II (causalgia) に対する生体内再生治療. 整形・災害外科 **51**: 639-645 (2008)
- 稲田有史, 中村達雄, 市原理司, 諸井慶七郎, 橋爪圭司, 古家 仁, 森本 茂: 末梢神経損傷に対する Polyglycolic acid-Collagen tube (PGA-C tube) を用いた生体内再生医療. 脳神経外科ジャーナル **17**: 506-510 (2008)
- M. Araki, H. Tao, T. Sato, N. Nakajima, T. Nagayasu and T. Nakamura: Development of a new tissue-engineered sheet for reconstruction of the stomach. Artif Organs (in press)
- S. Ichihara, Y. Inada and T. Nakamura: Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts. Injury, Int. J. Care Injured **39S4**: S29-S39 (2008)
- S. Ichihara, Y. Inada, A. Nakada, K. Endo, T. Azuma, R. Nakai, S. Tsutsumi, H. Kurosawa and T. Nakamura: Development of new nerve guide tube for repair of long nerve defects. Tissue Engineering (in press)
- 岩田敏男, 橋爪圭司, 諸井慶七郎, 稲田有史, 中村達雄: 末梢神経の再生促進による CRPS の治療. ペインクリニック **29**: 1171-1178 (2008)
- K. Omori, T. Nakamura, S. Kanemaru, A. Magruffov, M. Yamashita and Y. Shimizu: In situ Tissue Engineering of the cricoid and trachea in a canine model. Ann Otol Rhinol Laryngol. **117**: 609-613 (2008)
- K. Omori, Y. Tada, T. Suzuki, Y. Nomoto, T. Matsuzuka, K. Kobayashi, T. Nakamura, S. Kanemaru, M. Yamashita and R. Asato: Clinical application of in situ tissue engineering using a scaffolding technique for reconstruction of the larynx and trachea. Ann Otol Rhinol Laryngol. **117**: 673-678 (2008)
- T. Ohno, S. Hirano, S. Kanemaru, M. Yamashita, H. Umeda, A. Suehiro, T. Nakamura and J. Ito: Expression of extracellular matrix proteins in the vocal folds and bone marrow derived stromal cells of rats. Eur Arch Otorhinolaryngol. **265**: 669-674 (2008)
- S. Kin, A. Hagiwara, Y. Nakase, Y. Kuriu, S. Nakashima, T. Yoshikawa, C. Sakakura, E. Otsuji, T. Nakamura and H. Yamagishi: Regeneration of skeletal muscle using in situ tissue engineering on an acellular collagen sponge scaffold in a rabbit model. ASAIO J. **53**: 506-513 (2007)
- T. Suzuki, K. Kobayashi, Y. Tada, Y. Suzuki, I. Wada, T. Nakamura and K. Omori: Regeneration of the trachea using a bioengineered scaffold with adipose-derived stem cells. Ann Otol Rhinol Laryngol. **117**: 453-463 (2008)
- T. Sato, H. Tao, M. Araki, H. Ueda, K. Omori and T. Nakamura: Replacement of the left main bronchus with a Tissue-Engineered prosthesis in a canine model. Ann Thorac Surg **86**: 422-428 (2008)
- T. Sato and T. Nakamura: Tissue-engineered airway replacement. Lancet **372**: 2003-2004 (2008) No abstract available.
- K. Seo, Y. Inada, M. Terumitsu, T. Nakamura, K. Horiuchi, I. Inada and G. Someya: One year outcome of damaged lingual nerve repair using a PGA-collagen tube: A case report. J Oral Maxillofac Surg **66**: 1481-1484 (2008)
- Y. Tada, T. Suzuki, T. Takezawa, Y. Nomoto, K. Kobayashi, T. Nakamura and K. Omori: Regeneration of tracheal epithelium utilizing a novel bipotential collagen scaffold. Ann Otol Rhinol Laryngol. **117**: 359-365 (2008)
- Y. Nakase, T. Nakamura, S. Kin, S. Nakashima, T. Yoshikawa, Y. Kuriu, C. Sakakura, H. Yamagishi, J. Hamuro, Y. Ikada, E. Otsuji and A. Hagiwara: Intrathoracic esophageal replacement by in situ tissue-engineered esophagus.

Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery **136**: 850-859 (2008)

A. Nakada, S. Fukuda, S. Ichihara, T. Sato, S. Itoi, Y. Inada, K. Endo and T. Nakamura: Regeneration of central nerves using a collagen scaffold and adipose-derived stromal cells. Cells Tissues Organs (in press)

Y. Nomoto, K. Koayashi, Y. Tada, I. Wada, T. Nakamura and K. Omori: Effect of fibroblasts on epithelial regeneration on the surface of a bioengineered trachea. Ann Otol Rhinol Laryngol. **117**: 59-64 (2008)

市原理司, 中村達雄, 稲田有史, 黒澤 尚: 新しい人工神経の開発. 整形・災害外科 **52**: 118-119 (2009)

2) 著 書

稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 古家 仁, 橋爪圭司: 痛みに対する生体内再生医療. In-situ Tissue Engineering for the Treatment with Neuropathic Pain. 「痛みの概念が変わった 新キーワード100+α」(真興交易(株)医学出版部, 小川節郎/編著, 257頁) 246-247 (2008)

稲田有史, 中村達雄, 市原理司, 諸井慶七郎, 橋爪圭司, 古家 仁, 森本 茂: 慢性疼痛に対する生体内再生治療. 「慢性疼痛の理解と医療連携」(真興交易(株)医学出版部, 宮崎東洋・北出利勝/編, 331頁) 268-277 (2008)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

T. Nakamura, A. Nakada, T. Sato, M. Araki, S. Ichihara, K. Shigeno, Y. Inada and K. Endo: Application of *in situ* Tissue Engineering for artificial trachea. American Society for Artificial Internal Organs, 54th Annual Conference (2008.6.19-21. San Francisco)

中村達雄: Tissue Engineering による最先端医療. 平成20年度学術講演会 (2008.11.17. 福島)

荒木政人, 田尾裕之, 佐藤寿彦, 中島直喜, 須賀井一, 玄 丞休, 永安 武, 中村達雄: 肺瘻閉鎖用接着剤評価のための均一な胸膜肺実質損傷モデル作成方法の開発. 第108回日本外科学会定期学術集会 (2008.5.15-17. 長崎)

荒木政人, 中島直喜, 須賀井一, 玄 丞休, 永安 武, 中村達雄: 新しいパウダー噴霧式癒着防止剤の開発. 第63回日本消化器外科学会総会 (2008.7.16-18. 札幌)

荒木政人, 中島直喜, 須賀井一, 玄 丞休, 田川 努, 山崎直哉, 土屋智史, 永安 武, 中村達雄: 胸腔鏡下に塗布可能な新しいパウダー状生体内分解性接着剤の開発. 第61回日本胸部外科学会定期学術集会 (2008.10.12-15. 福岡)

荒木政人, 中村達雄, 中島直喜, 澤井照光, 福岡秀敏, 國崎真己, 七島篤志, 日高重和, 永安 武: 組織工学の手法を用いた消化管再生の現状と問題点. 第70回日本臨床外科学会 (2008.11.27-29. 東京)

稲田有史, 中村達雄, 市原理司, 諸井慶七郎, 古家 仁: 橈骨神経損傷後神経因性疼痛に対する生体内再生治療の治療成績. 第51回日本手の外科学会学術集会 (2008.4.17-18. つくば)

稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 橋爪圭司, 古家 仁, 森本 茂, 市原理司: 膝関節手術後伏在神経障害に引き続く難治性疼痛患者に対する外科的治療. 第81回日本整形外科学会 (2008.5.22-25. 北海道)

市原理司, 中村達雄, 稲田有史, 中田 顕, 遠藤克昭, 東 高志, 中井隆介, 堤 定美, 黒澤 尚: 長い欠損に対する新しい人工神経の開発. 第81回日本整形外科学会 (2008.5.22-25. 北海道)

S. Ichihara, T. Nakamura, Y. Inada, A. Nakada, K. Endo, T. Azuma, R. Nakai, S. Tsutsumi and H. Kurosawa: Development of new nerve guide tube for repair of peripheral nerve injury. American Society for Artificial

Internal Organs, 54th Annual Conference (2008.6.19-21. San Francisco)

市原理司, 稲田有史, 中田 顕, 東 高志, 中井隆介, 遠藤克昭, 島田英徳, 黒澤 尚, 中村達雄: Canine model
を用いた神経再生後の機能評価法の確立. 第23回日本整形外科学界基礎学術集会 (2008.10.23-24. 京都)

T. Sato, H. Sakai, H. Hamakawa, A. Takahashi, H. Date and T. Nakamura: New surgical approach for COPD:
Covering lung with an elastic net. American Thoracic Society International Conference (2008.5.16-21. Toronto,
Canada)

A. Nakada, S. Fukuda, S. Ichihara, S. Itoi, Y. Inada, K. Endo and T. Nakamura: Regeneration of central nervous tissue
using a collagen scaffold and adipose-derived stromal cells. American Society for Artificial Internal Organs,
54th Annual Conference (2008.6.19-21. San Francisco)

2) 講演・シンポジウム

中村達雄: *In situ* Tissue Engineering (生体内再生) の呼吸器領域への臨床応用. 第7回肺分子病態研究会 (特別
講演) (2008.1.12. 福岡)

中村達雄: 生体内再生の呼吸器領域への臨床応用. 第31回日本呼吸器内視鏡学会学術集会 (特別講演) (2008.6.
13-14. 大坂)

中村達雄: 神経チューブを用いた神経再生治療の大学病院をはじめ地域病院での展開. 第6回日本再生歯科医学会
学術大会・総会 (特別講演) (2008.9.12-13. 東京)

茂野啓示: インプラント修復治療の基本設計に関する考え方およびインプラント修復治療における再生医療の取り
組みを踏まえて. 北海道大学歯学部同窓会特別講演 (招待講演) (2008.1.17. 北海道)

茂野啓示: テクニカルコンテスト審査員「世界に発信! 日本の歯科技工—審美修復・インプラント治療そして教
育—」第4回国際歯科技工学術大会 第30回日本歯科技工学会学術大会 (招待講演) (2008.11.21-23. 大阪)

T. Sato, A. Nakada, N. Nakajima and T. Nakamura: Biodegradable polymer coating tissue-engineered airway
prosthesis. 京都大学再生医科学研究所設立10周年記念国際シンポジウム (2008.12.4. Kyoto)

A. Nakada, S. Fukuda, S. Ichihara, T. Sato, S. Itoi, Y. Inada, K. Endo and T. Nakamura: Regeneration of central nerves
using a collagen scaffold and adipose-derived stromal cells. 京都大学再生医科学研究所設立10周年記念国際シ
ンポジウム (2008.12.4. Kyoto)

附属再生実験動物施設 Laboratory of Animal Experiments for Regeneration

施設長・教授 坂口 志文

Acting Head, Prof. Shimon Sakaguchi

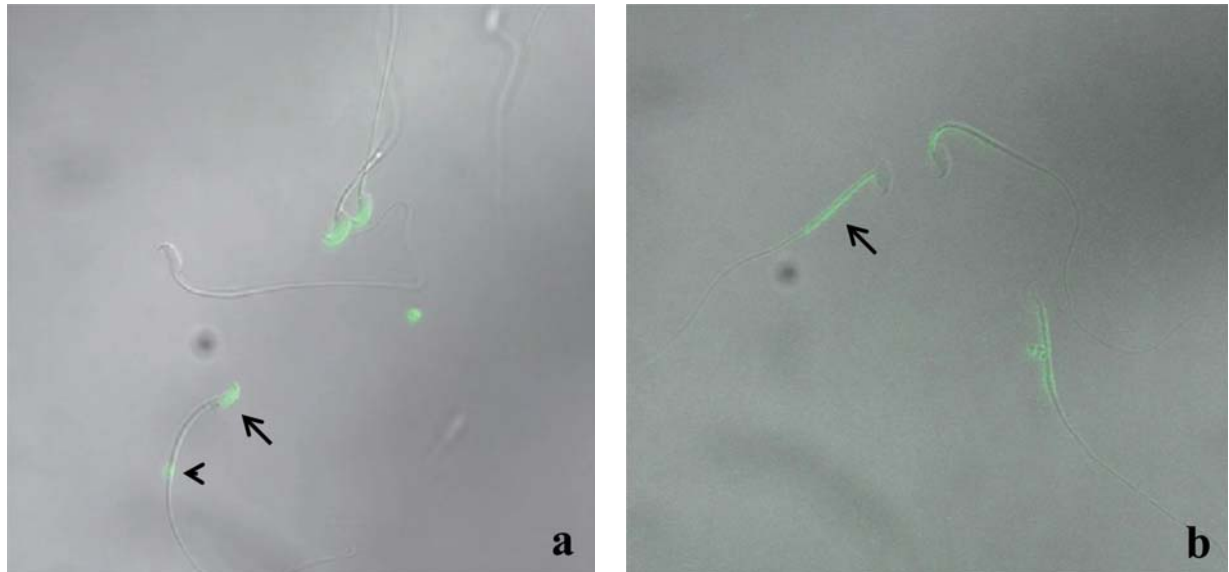
【再生実験動物施設の現状について】

附属再生実験動物施設では、平成19年度イヌ129頭、ネコ6匹、サル5頭、ウサギ52羽、チンチラ4匹、ラット80匹、マウス9,958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20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1名・非常勤職員19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・動物福祉に十分の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講習を受けなければならない。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 マウスおよ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、多数の人間が出入りする以上、いつ何時汚染事故が生じるかもしれない。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把握により、スムーズな登録と狂犬病予防注射が可能に



二種類の GPI アンカー型タンパク質レポーターマウス

精子における GPI アンカー型 GFP の局在

a. GPI アンカー型 EGFP トランスジェニックマウス：精子頭部（矢印）および細胞質小滴（矢頭）に局在。

b. Spam1-Venus ノックインマウス：中片部（矢印）に局在。

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、南部棟動物施設と同様の受益者負担システムのさらなる導入と将来の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 アンカー型蛋白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、膜結合蛋白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) アンカー型蛋白質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 アンカー型蛋白質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 (G. Kondoh 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 アンカー型蛋白質遊離因子の精製・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ギ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、アンギオテンシン 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 アンカー型蛋白質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 アンカー型蛋白質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 アンカー型蛋白質遊離活性 (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 (G. Kondoh et al., *Nat. Med.* 11, 160-166, 2005)。

そこで、我々は、ACE の受精における機能をさらに追究するためジペプチダーゼ不活性型 tACE (精巣型アイソフォーム) を導入したトランスジェニックマウス (Tg マウス) を作出した。その結果、作出した Tg マウス家系のいずれにおいても体外受精における受精率の低下および精子—卵透明帯結合の障害がみられた。また、同マウスの精巣、精巣上体内での GPIase 活性およびジペプチダーゼを測定したところ、精巣上体内でのジペプチダーゼ活性が特異的に低下していた。このことから、変異型 tACE は精巣上体でいわゆるドミナント-ネガティブ分子として作用していると考えられた。すなわち、tACE は、GPIase 活性により精子上で機能すると同時に精巣上体内においてジペプチダーゼとして機能し、二元的に受精に関与していることが示唆された (E. Deguchi et al., *Biol. Reprod.* 77, 794-802, 2007)。

また、本年度は tACE の酵素活性に対する糖鎖修飾の影響を検討した。tACE の N 末端側には、体細胞型 (sACE) にはない 36 アミノ酸残基からなる特異領域がある。この領域はセリン・スレオニンリッチで、O 型糖鎖修飾を受けることが報告されていたが、その生物学的意義は不明であった。そこで、我々は、この領域の O 型糖鎖が結合すると予想された 9 か所のスレオニン残基を全てアラニンに置換した変異体を作製した。この変異体では、O 型糖鎖の付加が検出限界以下であったが、いずれの活性も変異体と野生型とで有意差はなかった。一方、野生型 tACE を CHO 細胞で発現させて得た分子の両活性を、COS7 細胞由来分子と比較したところ、ジペプチダーゼ活性は同等であったが、GPIase 活性は CHO 由来分子のほうが有意に高かった。そこで、これらの分子の糖鎖プロファイリングを、レクチンアレイ (LecChipTM) を用いて解析した。その結果、両分子間で糖鎖プロファイリングの違いが認められた。これらのことから、O 型糖鎖の有無は tACE の両活性の基盤に影響は与えないものの、そのプロファイリングの違いは、GPIase 活性の高低を左右する可能性が示唆された (G. Kondoh et al., *J. Biochem.* 145, 115-121, 2009)。

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 (G. Kondoh et al., *J. Biochem. Biophys. Methods.* 39, 137-142, 1999)。これらの技術集約のもとに、過去 4 年間で 11 件の遺伝子改変マウス作出に参加した。

We have previously found that the angiotensin-converting enzyme (ACE) carries GPI-anchored protein releasing activity (GPIase) as well as dipeptidase activity. Testicular ACE (tACE), the male germinal specific isozyme, plays a crucial role in male fertilization. The amino-terminal region of this isozyme is different from that of somatic isozyme (sACE) and contains potential O-linked glycosylation sites. By multiple mutagenesis after an *in*

silico prediction, amino acid residues acquiring O-glycans were assigned. Both GPIase and dipeptidase activities were compared between O-glycan null mutant and wild-type molecules, but no differences were found. Furthermore, the wild-type tACE was produced in two different cells (COS7 and CHO) and its activities compared. The GPIase activity, but not dipeptidase, was apparently higher for CHO-derived molecule than COS7. Sensitivity to neuraminidase and O-glycosidase digestions and the profile of glycosylation were quite different between these two molecules. Moreover, serial digestions with neuraminidase and O-glycosidase have no influence on GPIase activity of both molecules, suggesting that the sialylation and the presence of O-glycan has no influence on tACE enzyme activities, while the set of glycans modulate GPIase activity.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

G. Kondoh, H. Watanabe, Y. Tashima, Y. Maeda and T. Kinoshita: Testicular angiotensin-converting enzyme with different glycan modification: Characterization on glycosylphosphatidylinositol-anchored protein releasing and dipeptidase activities. *J. Biochem.* **145**: 115-121 (2009)

2) 総説

近藤 玄: 受精担当分子としてのアンギオテンシン変換酵素: GPI アンカー型タンパク質遊離機能との相関. 医学のあゆみ「レニン・アンギオテンシン系のすべて」228巻5号, p. 513-516, 2009

◆ 学会等の発表 ◆

学会・研究会発表

1. 近藤 玄, 渡邊仁美, 田嶋優子, 前田裕輔, 木下タロウ: 精巣型アンギオテンシン変換酵素の糖鎖修飾と機能. 第55回日本実験動物学会総会 (2008.5.15-17. 仙台市)
2. 竹村浩昌, 東城博雅, 近藤 玄: 遺伝子変異マウスを用いたホスホリパーゼB/リパーゼの生理的機能の解析. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会 (2008.12.9-12. 神戸市)

(文責: 近藤 玄)

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

分野主任 准教授 末盛 博文
Assoc. Prof. Hirofumi Suemori

【研究概要】

1. 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および他の霊長類 ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究を行っている。我々が樹立したヒト ES 細胞株は2004年3月に分配を開始し、これまでに30件以上の研究計画に対して細胞株の分配を行った。さらに、2008年12月には新たに2株のヒト ES 細胞株を樹立し、分配に向けての準備を進めている。

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。現在、ES 細胞の比較解析などより高精度に行うために、培養条件の標準化に向けての作業が行われている。

2. Wnt シグナルは BMP シグナルと協調して ES 細胞の分化運命を制御する

Wnt/ β -catenin を介したシグナル伝達は動物の発生分化の様々な局面で重要な機能を果たしていることが知られ

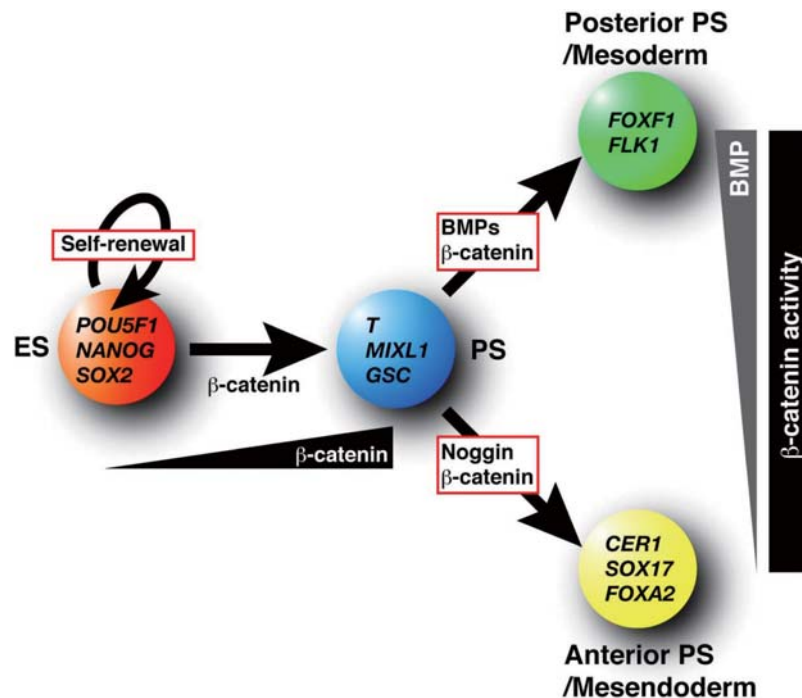


図1. ES 細胞において β -catenin が活性されると原条へと分化する。原条からは BMP の刺激により中胚葉がつくられ、BMP が抑制されると中内胚葉が形成される。

ている。マウス ES 細胞では、Wnt による β -catenin の活性化が ES 細胞の自己増殖に重要な機能を果たしていることが知られている。そこでヒト ES 細胞で、 β -catenin の活性化を誘導したところ未分化状態の維持ではなくむしろ細胞分化が誘導されることがわかった。遺伝子発現の解析結果などから、この細胞分化過程で ES 細胞はまず原条 (primitive streak) と呼ばれる将来中胚葉や内胚葉を形成する組織を作り、そこで自身が分泌する BMP の刺激により尾側の中胚葉組織に分化することが明らかにされた。さらにこのとき、BMP シグナルを抑制すると頭側中胚葉や内胚葉になる中内胚葉組織に分化することがわかった。

この研究により哺乳動物の初期発生に於いて最も重要な細胞分化現象の一つである原条形成から中胚葉・内胚葉組織への分化運命の決定を試験管内で再現することができ、ヒトの初期発生の研究に重要なシステムになると考えられる。

Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Stem Cell Research Center.

1. 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 three human ES cell lines. We have distributed these cell lines to over 30 laboratories.

In December 2008, we established two human ES cell lines, KhES-4 and KhES-5.

2. Wnt and BMP specify human ES cell fate.

The canonical Wnt/ β -catenin signaling has remarkably diverse roles in embryonic development, stem cell self-renewal, and cancer progression. Here we show that stabilized expression of β -catenin perturbed human embryonic stem (hES)-cell self-renewal, such that up to 80% of the hES cells developed into the primitive streak (PS)/mesoderm progenitors, reminiscent of early mammalian embryogenesis. The commitment of the PS/mesoderm progenitors essentially depended on the cooperative action of β -catenin together with Activin/Nodal and BMP signaling pathways. Intriguingly, blockade of BMP signaling completely abolished mesoderm generation, and induced a cell fate change toward the anterior PS population. The PI3-kinase/Akt, but not MAPK, signaling pathway had a crucial role in the anterior PS commitment, at least in part, by enhancing β -catenin stability. Our findings demonstrate that the orchestrated balance of canonical Wnt/ β -catenin and BMP signaling directs the cell fate of the nascent PS during hES cell differentiation. Further, the hES cell model system allows us to uncover the molecular networks involved in early lineage specification and to produce functional cells from hES cells for regenerative medicine and drug discovery.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- N. Tsuneyoshi, T. Sumi, H. Onda, H. Nojima, N. Nakatsuji and H. Suemori: PRDM14 suppresses expression of differentiation marker genes in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **367**: 899-905 (2008)
- T. Sumi, N. Tsuneyoshi, N. Nakatsuji and H. Suemori: Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/ β -catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development* **135**: 2969-2979 (2008)
- K. Suzuki, K. Mitsui, E. Aizawa, K. Hasegawa, E. Kawase, T. Yamagishi, Y. Shimizu, H. Suemori, N. Nakatsuji and K. Mitani: Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 13781-13786 (2008)
- T. Miyazaki, S. Futaki, K. Hasegawa, M. Kawasaki, N. Sanzen, M. Hayashi, E. Kawase, K. Sekiguchi, N. Nakatsuji and H. Suemori: Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **375**: 27-32 (2008)
- F. Ma, N. Kambe, D. Wang, G. Shinoda, H. Fujino, K. Umeda, A. Fujisawa, L. Ma, H. Suemori, N. Nakatsuji, Y. Miyachi, R. Torii, K. Tsuji, T. Heike and T. Nakahata: Direct development of functionally mature tryptase/chymase double-positive connective tissue-type mast cells from primate embryonic stem cells. *Stem Cells* **26**: 706-714 (2008)

2) 著書

- 山内香織・末盛博文:「ヒト ES 細胞の培養」培養細胞実験ハンドブック (羊土社: 監修 黒木登志夫, 編集 許南 浩, 中村幸夫) 267-273

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 恒吉法尋, 角 智行, 恩田弘明, 野島 博, 中辻憲夫, 末盛博文: 未分化ヒト ES 細胞特異的に発現している因子の解析. 第31回日本分子生物学会 (2008.12.9. 神戸)
- 石井隆道, 安近健太郎, 福光 剣, 末盛博文, 中辻憲夫, 猪飼伊和夫, 上本伸二: 胆管癌における癌幹細胞としての AFP 産生細胞. 第7回再生医療学会 (2008.3.13-14. 名古屋)
- T. Ishii, K. Yasuchika, K. Fukumitsu, H. Suemori, N. Nakatsuji, I. Ikai and S. Uemoto: Alpha-fetoprotein producing cells as a candidate for cancer STEM cells of cholangiocellular Carcinomas. 第43回ヨーロッパ肝臓学会 (EASL) (2008.4.23-27. Italy, Milan)
- 恒吉法尋, 角 智行, 恩田弘明, 野島 博, 中辻憲夫, 末盛博文: PRDM14 のヒト ES 細胞の未分化性維持における役割. 第7回再生医療学会 (2008.3.13-14. 名古屋)
- Tomoyuki Sumi, Norihiro Tsuneyoshi, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori: Canonical WNT/ β -catenin-

mediated early lineage specification in human Embryonic stem cells. 6th ISSCR Annual Meeting (2008.6.11-14. Cairns)

Emi Aizawa, Kaoru Mitsui, Keiichiro Suzuki, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji and Ko Mitani: Homologous recombination in cynomolgus monkey embryonic stem cells with an integrase-defective lentiviral vector. 日本遺伝子治療学会 (6.12-14. 札幌)

Ko Mitani, Keiichiro Suzuki, Emi Aizawa, Kaoru Mitsui, Haruka Shiiba, Kouichi Hasegawa, Esihachiro Kawase, Hirofumi Suemori and Norio Nakatsuji: Highly efficient gene transfer and genetic manipulation in human embryonic stem cells using viral vectors. 日本遺伝子治療学会 (6.12-14. 札幌)

Emi Aizawa, Kaoru Mitsui, Keiichiro Suzuki, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji and Ko Mitani: Optimazation of envelope and promoter for lintiviral gene transfer into human embryonic stem cells. 日本遺伝子治療学会 (6.12-14. 札幌)

2) 講演・シンポジウム

末盛博文:「多能性幹細胞を用いた細胞分化誘導系は発生分化過程におけるクロマチン機能解析のモデルになるか?」. 第31回日本分子生物学会 (2008.12.10. 神戸)

末盛博文:「ES・iPS 細胞の医療応用に向けて」『社会の要求に応える動物生命工学の実践教育』. 第2回学術シンポジウム「動物生命工学の新潮流」(2008.3.20. 大阪)

末盛博文:「ES 細胞医療の実現に向けて」. 第81回日本組織培養学会 (2008.5.19-20)

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

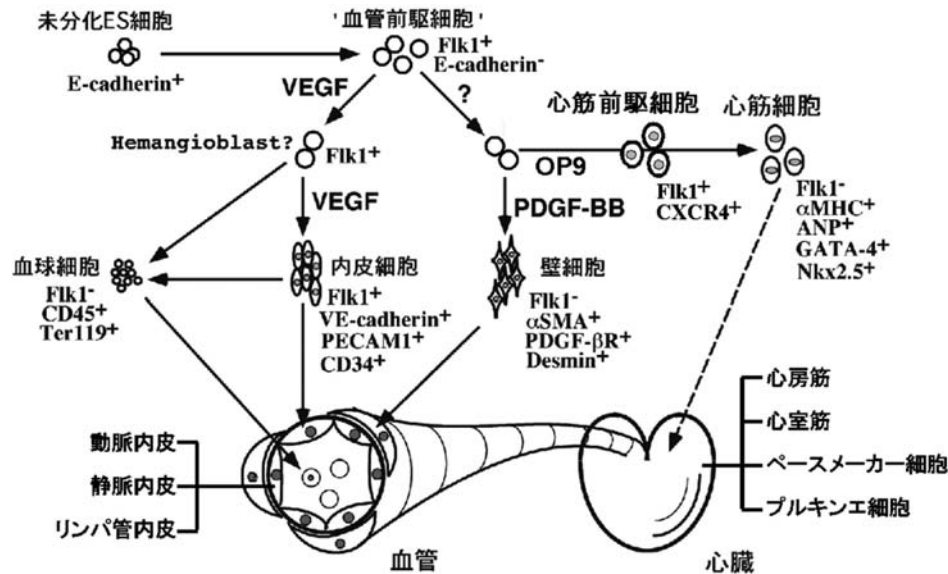
Assoc. Prof. Jun K. Yamashita

【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）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関連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)。また最近では、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)。

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)。

このように我々の ES 細胞を用いた *in vitro* 分化系は、心血管および血球という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。

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および予定している。

1. ES 細胞 *in vitro* 分化系を用いた血管細胞分化・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)
- 4) 物理的刺激的血管内皮分化多様化における意義 (Yamamoto, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005)

2. 誘導血管細胞の血管再生への応用

- 1) 移植におけるドナー細胞の最適な分化段階の決定 (Yurugi-Kobayashi, Blood, 2003)
- 2) 移植細胞の遺伝子修飾による組織への動員、生着効率の改善効果の検討

- 3) 人工生体材料を用いた新しいハイブリッド人工血管の開発 (Huang, J Artif Organ, 2005)

3. ES 細胞からの心筋細胞の分化誘導

- 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) サイクロスボリン 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)
- 5) 新しい心臓再生治療への応用 ―新しい心筋前駆細胞治療の開発―

4. 霊長類 ES 細胞からの心血管分化誘導

- 1) サル ES 細胞からの血管分化誘導
京都大学臨床病態医科学との共同研究により, サル ES 細胞からの血管分化誘導に成功した (Sone, Circulation, 2003)
- 2) 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)
- 3) 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 細胞を用いた心血管分化研究を開始している。

5. 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた心血管分化再生研究 (再生医科学研究所再生誘導研究分野との共同研究)

- 1) マウス iPS 細胞を用いた心血管分化系の構築 (Narazaki, Circulation, 2008)
- 2) ヒト iPS 細胞からの心血管細胞分化誘導法の開発
- 3) iPS 細胞分化システムのケミカルバイオロジーおよび創薬応用 (Nakao, Bioorg Med Chem Lett, 2008)

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 cells (and induced pluripotent stem 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

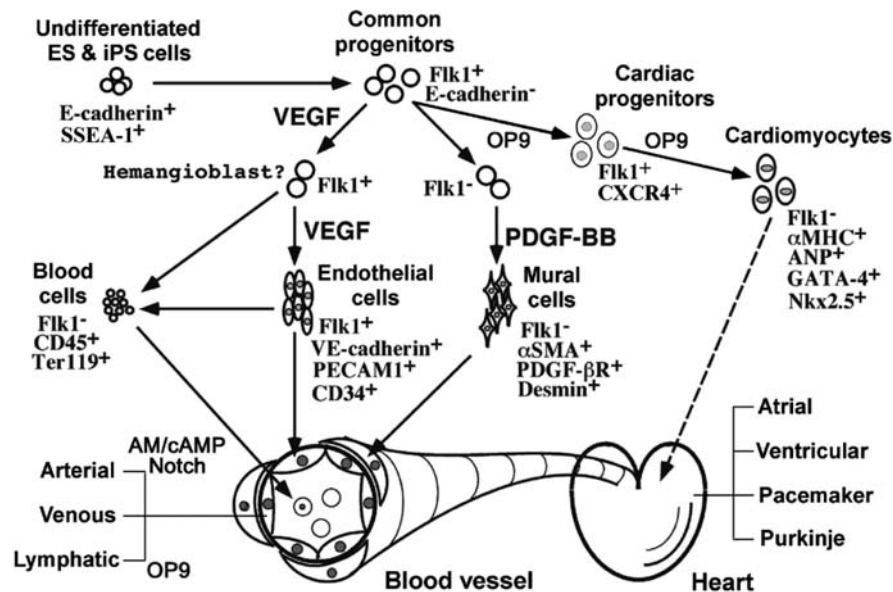


Fig. 1. Cardiovascular development in ES and iPS cell *in vitro* differentiation

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 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 iPS cells (Narazaki, Circulation, 2008). Research projects using human iPS cells for cardiovascular regeneration have been already launched.

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 vascular 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).

4) Significance of rheological force on endothelial differentiation and diversification (Yamamoto, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005).

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) Improvement of the efficacy of recruitment, contribution and survival of donor cells, by modifying gene expressions in donor cells.

3) Development of novel hybrid vessels with ES cells and artificial scaffolds (Huang, J Artif Organ, 2005).

3. Cardiomyocyte induction from ES cells

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).

5) Application to cardiac regeneration—Novel cardiac progenitor therapy

4. Cardiovascular differentiation using primates ES cells

1) Vascular cell differentiation from monkey ES cells (Sone, Circulation, 2003) (Collaboration with Department of Medicine and Clinical Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine).

2) 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)

3) 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).

5. Cardiovascular differentiation and regeneration using induced pluripotent stem (iPS) cells (Collaboration with Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University).

1) Establishment of cardiovascular cell differentiation system of mouse iPS cells (Narazaki, Circulation, 2008).

2) Cardiovascular cell differentiation and regeneration from human iPS cells.

3) Application of iPS cell differentiation system to chemical biology and drug screening (Nakao, Bioorg Med Chem Lett, 2008).

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

(* corresponding author)

1. P. Yan, A. Nagasawa, H. Uosaki, A. Sugimoto, K. Yamamizu, M. Teranishi, H. Matsuda, S. Matsuoka, T. Ikeda, M. Komeda, R. Sakata and J.K. Yamashita*: Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**: 115-120 (2009)
2. G. Narazaki, M. Uosaki, M. Teranishi, K. Okita, B. Kim, S. Matsuoka, S. Yamanaka and J.K. Yamashita*: Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* **118**: 498-506 (2008)
3. J.K. Yamashita: A linkage in the developmental pathway of vascular and hematopoietic cells. In K. Tanaka, E.W. Davie. *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008. Part 5*, p. 363-p. 373. Springer, Tokyo (2008)
4. Y. Nakao*, G. Narazaki, T. Hoshino, S. Maeda, M. Yoshida, H. Maejima and J.K. Yamashita*: Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**: 2982-2984 (2008)
5. K. Yamahara, M. Sone, H. Itoh, J.K. Yamashita, T. Yurugi-Kobayashi, K. Homma, T.H. Chao, K. Miyashita, K. Park, N. Oyamada, N. Sawada, D. Taura, N. Tamura and K. Nakao: Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS One* **3**: e1666 (2008)
6. M. Matsuda, Y. Kobayashi, S. Masuda, M. Adachi, T. Watanabe, J.K. Yamashita, E. Nishi, S. Tsukita and M. Furuse: Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization-based expression cloning. *Exp. Cell Res.* **314**: 939-949 (2008)
7. N. Shimizu, K. Yamamoto, S. Obi, S. Kumagaya, T. Masumura, Y. Shimano, K. Naruse, J.K. Yamashita, T. Igarashi and J. Ando: Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor β . *J. Appl. Physiol.* **104**: 766-772 (2008)

2) 和文総説

1. 山下 潤: 「iPS 細胞を用いた血管再生」. *CLINICIAN「再生医療を考える」* **56**: 61-74 (2008) エーザイ株式会社
2. 山下 潤: 「血管再生」. *総合臨床* **58**: 72-78 (2008) 永井書店
3. 山下 潤: 「ES 細胞による血管の分化再生」. *遺伝子医学 MOOK「進み続ける細胞移植治療の実際」* 下巻. 田畑泰彦編, p. 107-p. 111 (2008) メディカルドゥ社

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

1. 魚崎英毅, 榑崎元太, 柳 堅徳, 鷹野 誠, 山下 潤: ES 細胞を用いた生物学的ペースメーカー樹立の試み. 第7回再生医療学会 (2008.3.13-14. 名古屋)
2. 榑崎元太, 寺西瑞恵, 沖田圭介, 山中伸弥, 山下 潤: 誘導多能性幹 (iPS) 細胞からの心血管系細胞の誘導 (oral). 第7回日本再生医療学会総会 (2008.3.13-14. 名古屋)
3. P. Yan, T. Otsuji, A. Nagasawa, G. Narazaki, H. Uosaki, A. Sugimoto, M. Fujiwara, T. Ikeda, K. Nakao, S. Yamanaka, N. Nakatsuji, M. Komeda and J.K. Yamashita: Efficient and specific expansion of highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells by cyclosporin-A treatment. 第72回日本循環器学会留学生 YIA 審査講演 (2008.3.28-30. 福岡)
4. 榑崎元太, 山下 潤: マウス人工多能性幹 (iPS) 細胞からの系統的な心血管系細胞の誘導 (oral). 第6回幹細胞シンポジウム (2008.5.16-17. 東京)
5. K. Yamamizu and J.K. Yamashita: Phosphatidylinositol 3-kinase pathway and Notch signaling coordinately induce differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. The 15th International Vascular Biology Meeting (2008.6.1-5. Sydney, Australia)
6. G. Narazaki, M. Teranishi, H. Uosaki, K. Okita, B.J. Kim, S. Matsuoka, S. Yamanaka and J.K. Yamashita: Cardiovascular cell differentiation system using mouse induced pluripotent stem cells. 6th ISSCR Annual Meeting (2008.6.11-14. Philadelphia, U.S.A.)
7. 榑崎元太, 寺西瑞恵, 魚崎英毅, 沖田圭介, 金 鳳柱, 松岡 達, 山中伸弥, 山下 潤: 様々のマウス人工多能性幹 (iPS) 細胞からの心血管系細胞誘導 (oral). 第29回日本再生医療学会総会 (2008.7.8-14. 東京)
8. 山下 潤: iPS 細胞を用いた心血管分化機構の解明と創薬研究システムによる心血管再生治療法の開発. 「再生医療の実現化プロジェクト」第1回夏のワークショップ (2008.8.28-29. 熱海)
9. 魚崎英毅, 顔 培実, 藤原正隆, 山下 潤: ES 細胞および iPS 細胞からの心筋前駆細胞の効率的誘導法. 12th Molecular Cardiovascular Conference (2008.9.5-7. 小樽)
10. 榑崎元太, 山下 潤: Induction of Cardiovascular cells from induced pluripotent stem (iPS) cells (oral). 第12回 Molecular cardiovascular conference (2008.9.5-7. 北海道)
11. K. Yamamizu and J.K. Yamashita: Converged signaling of Notch and beta-catenin induces differentiation of arterial endothelial cells from VEGFR2+ vascular progenitors. American Heart Association Scientific Session 2008 (2008.11.8-14. New Orleans, U.S.A.)
12. G. Narazaki, J.K. Yamashita: Systematic and directed differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into cardiovascular cells. 第23回藤コンファレンス (2008.11.11-14. 神奈川)
13. 山水康平, 山下 潤: Notch と beta-catenin シグナルによる新しい動脈内皮細胞分化誘導機構. 第15回心血管内分泌代謝学会 YIA 審査講演 (2008.11.28-29. 熊本)
14. H. Uosaki, P. Yan and J.K. Yamashita: Efficient induction of cardiogenic progenitors and cardiomyocytes from embryonic and induced pluripotent stem cells. International symposium on regenerative medicine-10th anniversary of institute for frontier medical sciences (poster) (2008.12.4. Kyoto)
15. G. Narazaki and J.K. Yamashita: Systematic differentiation system of mouse induced pluripotent stem (iPS) cells

to cardiovascular cells (invited). The 6th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology And The 16th Annual Meeting of the Japan Vascular Biology and Medicine Organization Joint Meeting (2008.12.3-5. Kanazawa)

16. G. Narazaki, JK Yamashita: Systematic and directed differentiation of various mouse induced pluripotent stem cells into cardiovascular cells (poster). BMB 2118 (2008.12.9-12)

2) 講演・シンポジウム

1. 山下 潤: ES 細胞および iPS 細胞を用いた心血管分化再生研究. 山口免疫懇話会 (特別講演) (2008.3.5. 山口)
2. J.K. Yamashita: Cellular and molecular mechanisms for diversification of arterial, venous and lymphatic endothelial cells. The U.S.-Japan cooperative cancer research program workshop 2008 (invited) (2008.3.19-21. Kyoto)
3. J.K. Yamashita: Effective cardiac regeneration *in vivo* by ES cell-derived cardiac progenitors. Japan-Korea Cardiovascular Conference, 第72回日本循環器学会 (招請講演) (2008.3.28-30. 福岡)
4. 山下 潤: ES 細胞および iPS 細胞を用いた心血管分化再生研究. 心血管再生先端治療フォーラム (特別講演) (2008.7.5. 東京)
5. 山下 潤: ES 細胞および iPS 細胞を用いた心血管分化再生研究. 第1回臨床研究フォーラム (招請講演) (2008.8.8-9. 御殿場)
6. 山下 潤: ES 細胞および iPS 細胞を用いた心血管分化再生研究. 佐賀・生活習慣病フォーラム2008 (2008.8.2. 佐賀)
7. 山下 潤: 幹細胞と再生医学—心臓や血管は再生できるか—. 京都南ロータリークラブ講演会 (招請講演) (2008.10.16. 京都)
8. J.K. Yamashita: Specific Expansion of Cardiac Progenitors and Cardiomyocytes from ES and iPS Cells. The Second International Cell Therapy Conference (invited) (2008.11.20. Seoul, Korea)
9. J.K. Yamashita: Research for vascular development and regeneration using ES and iPS cells. The 24th Kumamoto Medical Bioscience Symposium "Frontiers of Vascular Medical Science and Innovative Therapy" (invited) (2008.11.27. Kumamoto)
10. J.K. Yamashita: Molecular mechanisms of arterial-venous specification. 第16回日本血管生物医学会・日韓合同血管生物シンポジウム (invited) (2008.12.3-5. 金沢)
11. 山下 潤: ES 細胞および iPS 細胞からの心血管分化. BMB2008 シンポジウム: 1S1 多能性幹細胞を規定する因子群—臨床応用を見据えて— (招請講演) (2008.12.9. 神戸)
12. 山下 潤: ES 細胞および iPS 細胞を用いた心血管分化再生研究. 熊本 Science Frontier 研究会 (特別講演) (2008.12.10. 熊本)
13. 山下 潤: ES 細胞および iPS 細胞を用いた心血管分化再生研究. 私学理科学研究会二学期例会 (2008.12.25. 京都)



幹細胞加工研究領域

Laboratory of Stem Cell Engineering

分野主任 准教授 多田 高

Assoc. Prof. Takashi Tada

【研究概要】

体細胞は機能的に特殊化した細胞である。ゲノム再プログラム化とは、体細胞の機能を規定するエピジェネティクスを消去し、未分化細胞のエピジェネティクスを新たに上書きする事により多能性を獲得する現象である。体細胞核移植という高度なテクニックを要求したゲノム再プログラム化も、胚性幹 (ES; Embryonic Stem) 細胞との細胞融合による体細胞の再プログラム化、ES 細胞から同定された再プログラム化因子の導入による iPS (induced pluripotent stem) 細胞の作製の成功により、容易な技術となってきた。これは、体細胞の再プログラム化技術が医学や薬学に広く応用される日が近い事を物語っている。近年の再生医学のトピックである再プログラム化に関して、我々は、1) ゲノム再プログラム化分子機構の解明、2) 幹細胞の未分化性維持機構の解明、3) ゲノム再プログラム化の応用技術の開発を目標に研究を行っている。

ゲノム再プログラム化の分子機構 ES 細胞との細胞融合による再プログラム化に伴い、体細胞ゲノムは特有の堅いクロマチンがゲノム全体で変化し、未分化細胞特有の緩いクロマチンに変化する。その過程は、体細胞エピジェネティクスの消去と未分化細胞エピジェネティクス確立の少なくとも2段階が必要と推測されている。我々は、同様の分子機構が体細胞の iPS 細胞化の過程でも同様の機構が働いているのではないかと推測している。この作業仮説を元に、iPS 細胞出現過程における分子ネットワークの解析を行う。

ゲノム再プログラム化鍵因子 *Nanog* の働き 細胞の未分化性維持に働く鍵因子として同定された *Nanog* 遺伝子は、ホメオドメインをもつ転写因子である。未分化細胞に特異的に発現する *Nanog* はゲノム再プログラム化に伴い、体細胞核から再活性化する。*Nanog* の発現は、初期胚のみならず生殖細胞での高発現が知られている。機能解明を目的に生殖細胞特異的な発現抑制実験系を用いて生殖細胞での遺伝子機能の解明を目指している (図1)。



図1. *Nanog* ノックダウンによるアルカリフォスファターゼ陽性生殖細胞数の激減

Nanog 遺伝子の初期胚と生殖細胞での機能的相違点を明らかにする。

ヒト融合細胞核からの染色体除去 ES 細胞との細胞融合により体細胞ゲノムは再プログラム化され、ES 細胞様に変化する。しかし、融合細胞は4倍体であるため2倍体化するための技術が望まれていた。我々は、マウス融合細胞から ES 細胞由来の望んだ染色体を選択的に取り除く技術を開発した。ES 細胞の取り除きたい染色体に組み換え DNA 配列（染色体除去カセット）を組み込む。この ES 細胞と体細胞を細胞融合した後に組み換え酵素で処理すると、DNA 複製後にあたる S 期後半や G2 期に姉妹染色分体間で組み換えが起こる。組み換え染色体は細胞分裂に好ましくない形に変化し核から排除される。結果として、染色体除去カセットで印された染色体のみが融合細胞核から除去される（図2）。ES 細胞由来の第6番染色体（*Nanog* 遺伝子を運ぶ）を取り除き、体細胞由来の第6番染色体のみにした融合細胞でも未分化性が維持された。再プログラム化により再活性化した体細胞由来の *Nanog* のみで融合細胞の未分化性を維持する事ができることを示した。マウスで開発された染色体除去技術をヒト ES 細胞に移植するための技術開発を進めている。

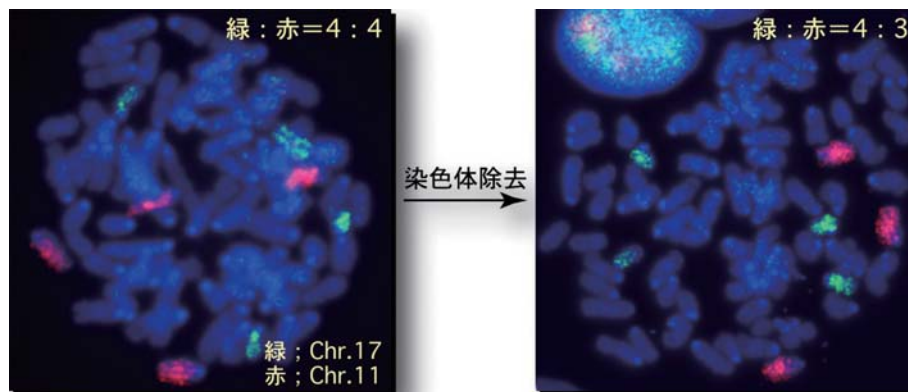


図2. 体細胞ゲノムの再プログラム化と ES 細胞染色体の選択的除去

Our body is built by an incredible variety of cell and tissue types, which develop from a single fertilized egg through embryogenesis. Those cells are basically classified into two types of cells; somatic cells and germ cells. Determination of 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. Recent development of a technology of embryo manipulations achieves epigenetic reprogramming by nuclear transplantation of a somatic cell to enucleated oocytes as seen by production of cloned animals in many mammalian species. 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. Several factors Oct4, Sox2, Klf4 and C-Myc isolated from ES cells are sufficient for triggering nuclear reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem (iPS) cells. Reprogrammed somatic genomes through cell fusion with ES cells function equivalent to the ES genomes in differentiated cells. We have demonstrated that the acquisition of pluripotential competence by a reprogrammed somatic genome is accompanied, independent of gene activity, by global de-condensation of the somatic cell-derived chromatin. Thus, we have proposed that two epigenetic events; erasure of somatic cell memory and establishment of pluripotential cell memory are required to complete the nuclear reprogramming. On the working hypothesis that similar molecular events will occur during the nuclear

reprogramming of somatic cells to iPS cells, molecular mechanisms involved in generation of iPS cells is analyzing.

Nanog is a homeodomain-bearing transcriptional factor identified as a pluripotential cell-specific gene. Our data clearly demonstrated that *Nanog* was essential for maintaining pluripotency of stem cells and inducing successful nuclear reprogramming of somatic nuclei through cell fusion and nuclear transplantation. *Nanog* is highly expressed also during early germ cell development in mice. *Nanog* RNA was conditionally knocked down *in vivo* by *Nanog*-specific shRNA. The *Nanog* shRNA transgenic (NRi-Tg) mice were generated by matings with germline transmittable chimeras with NRi-Tg embryonic stem cells. Crossing with the TNAP-Cre transgenic mice, in which PGC-specific Cre expression is initiated at E9.5, the number of PGCs drastically decreased in E12.5 double transgenic NRi-Tg/TNAP-Cre embryos as detected by alkaline-phosphatase and SSEA-1 staining (Fig. 1). Similar fatal effect of *Nanog* knockdown on PGC development was detected in E12.5 double transgenic mice of NRi-Tg and ER-Cre, in which Cre expression was induced by tamoxifen administration at E7.5. TUNEL-positive PGCs were detectable in tamoxifen-administered NRi-Tg/ER-Cre E10.5 embryos, indicating crucial function of *Nanog* in survival of migrating PGCs. These data suggest that *Nanog* plays a key role of proliferation and survival in migrating PGCs *Oct4*-independent manner.

Hybrid cells between ES cells (2n) and somatic cells (2n) are tetraploid (4n). To produce personalized diploid stem cells from the tetraploid hybrid cells, it is necessary to eliminate the ES cell-derived chromosomes once the somatic genome has been reprogrammed. We have developed a novel technology to eliminate ES-derived chromosomes from mouse hybrid nuclei with newly designed a chromosome elimination cassette (CEC) (Fig. 2). Cre-mediated sister-chromatid recombination in late S and G2 phases of the cell cycle should generate di-centric and nulli-centric chromosomes specific to CEC-tagged chromosomes. Such aberrant chromosomes are spontaneously deleted from cells during cell division. To apply the technology to human ES-somatic cell, we have optimized the techniques with human ES cells.

【業績目録】

◆ 誌 上 発 表 ◆

1) 原著論文

- T. Tada: Genetic modification-free reprogramming to induced pluripotent cells: fantasy or reality? *Cell Stem Cell* **3**: pp. 121-122 (2008)
- T. Otsuji, H. Matsumura, T. Suzuki, N. Nakatsuji, T. Tada and M. Tada: Rapid induction of large chromosomal deletions by a Cre/inverted loxP system in mouse ES Cell hybrids. *J. Mol. Biol.* **378**: pp. 328-336 (2008)
- N. Mise, T. Fuchikami, M. Sugimoto, S. Kobayakawa, F. Ike, T. Ogawa, T. Tada, S. Kanaya, T. Noce and K. Abe: Differences and similarities in the developmental status of embryo-derived stem cells and primordial germ cells revealed by global expression profiling. *Genes Cells* **13**: pp. 863-877 (2008)

2) 著 書

- 多田 高: 細胞融合と体細胞核の再プログラム化, 「培養細胞実験ハンドブック 改訂第2版」(許 南浩・中村幸夫 編集) pp. 284-290 (実験医学別冊, 羊土社, 2008)
- 多田 高: ES 細胞から iPS 細胞へ; 再プログラム化の応用. 「特集: iPS 細胞誕生後—新たな謎と基礎課題—」.

pp. 28-32 (現代化学 452巻, 東京化学同人, 2008)

山中伸弥・多田 高: 世界が注目! ヒトの皮膚から多能性幹細胞 再生医療だけではない, オーダーメイド医療にも貢献する「iPS 細胞」とは? pp. 150-155 (ニュートン別冊, ニュートン プレス社, 2008)

多田 高: 再プログラム化融合細胞の個人対応化技術. 「進みつづける細胞移植治療の実際」(田畑泰彦 編集) pp. 140-144 (遺伝医学 MOOK 別冊, メディカルドゥ社, 2008)

3) 総 説

H. Matsumura and T. Tada: Cell fusion-mediated nuclear reprogramming of somatic cells. *BRMOnline* **16**: pp. 51-56 (2008)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

山口新平, 佐々木裕之, 中辻憲夫, 多田 高: マウス生殖細胞における *Nanog* の抑制は移動期のアポトーシスを誘導する. 「第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学学会大会 合同大会」(2008.12.9-12. 神戸)

S. Yamaguchi, H. Sasaki, N. Nakatsuji and T. Tada: Molecular roles of *Nanog* in mouse germ cell development. 「The 23rd Naito Conference on Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells [III]」(2008.11.11-14. Kanagawa, Japan)

S. Yamaguchi, H. Sasaki, N. Natsuji and T. Tada: Molecular roles of *Nanog* in mouse germ cell development. *Frontiers in Developmental Biology* (2008.9.13-17. France)

2) 講演・シンポジウム

T. Tada: Nuclear reprogramming in vitro and *in vivo*. 「Seminar in Center for Stem Cell and Regenerative Medicine, USC」(2008.12.17. Los Angeles, U.S.A.)

T. Tada: Nuclear reprogramming; pluripotent stem cells by cell fusion and iPS induction. 「The 2008 Seoul International Symposium on Stem Cell Research」(2008.12.3. Seoul, Korea)

多田 高: 幹細胞因子 *Nanog* の生殖細胞における分子機能—生殖細胞における *in vivo* knockdown—. 「第5回細胞核ダイナミクス特定領域研究会班会議」(2008.10.27-28. 京都)

多田 高: ゲノム再プログラム化の仕組みと医療応用の可能性. 「第7回藤田保健衛生大学肺腫瘍治療研究会」(2008.10.7. 名古屋)

多田 高: 体細胞の多能性幹細胞への再プログラム化. 「生体機能と創薬シンポジウム2008—生命システムにおける情報ネットワークの重要性を解く—」(2008.9.5-6. 東京)

多田 高: 融合細胞と体細胞核の再プログラム化. 「幹細胞のシステム生物学」研究会 (2008.6.11-12. 山形)

多田 高: 細胞融合と細胞核の再プログラム化. 日本細胞培養学会第81回大会シンポジウム (2008.5.19-20. つくば)

多田 高: 体細胞の細胞融合再プログラム化と染色体除去. 「幹細胞の可塑性と未分化性維持機構; 幹細胞公開シンポジウム」(2008.2.27. 東京)

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

【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、2005年度に新設された部門である。ES 棟地下に細胞処理施設（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、その基盤技術の研究開発を行っている。CPC は空調管理、清浄度管理および作業管理を含む、医薬品 GMP ハードに準拠した施設としてある。また CPC には、細胞調製室、閉鎖系として独立して細胞調製、培養が可能な Cell-processing Isolator システム、細胞保存室がある。

2008年度は、昨年 CPC のヒト ES 細胞株の樹立研究施設としての政府による確認が行われたのに伴い、ヒト ES 細胞の樹立研究、培養試験を実施している。現時点では、霊長類幹細胞研究領域により樹立されたヒト ES 細胞株を、在来の培養手法を用いて培養試験を行っているが、順次、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すると共に、臨床応用に使用可能なレベルのヒト ES 細胞株の樹立と、将来のヒト ES 細胞バンク構築の可能性の探索を行う。

また、臨床応用に必要となる要件として、動物由来成分を用いない完全合成培地による培養の検討、ヒト由来フィーダー細胞の試験を行っている。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、2008年10月には、その第一段階として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が発行された。引き続き第二段階として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。

この他、ヒト ES 細胞株のより適切な品質管理体系の確立の為に、その凍結保存過程に着目し、温度制御ステージつき顕微鏡を用いたカニクイザル ES 細胞コロニーの凍結解凍過程の解析、および DSC（示差走査熱量計）を用いた熱力学的解析を通じた、細胞、コロニーレベルでの凍結解凍現象の理論化、凍結解凍条件の最適化の検討を試みている。

The Laboratory of Cell Processing was established in the fall of 2005 to develop basic technologies to produce and supply human embryonic stem cells (hES cells) with clinical grade. The cell processing center (CPC), located at underground level of the ES building in the Institute was built to establish hES cells for clinical use satisfying the standards of Pharmaceutical Good Manufacturing Practices (GMP) and the research necessary to achieve that. The CPC meets the hardware standard of GMP such as management of work, air conditioning, clean level of air, etc.

The CPC is composed of several rooms, one for cell processing, one for the Cell-Processing Isolator in which cells can be processed and cultured in a complete closed system, cell-storage, computer controlled observation room, cell storage, supply room etc.

Following the approval of the Government (MEXT) that the CPC can be used as a facility to establish hES cells, we have started research on the establishment and culture of hES in this facility.

The trial to establish clinical-grade hES cells has been done using the conditions developed to establish monkey ES cells, but it should be developed to make the hES cells possible for clinical use and to establish of hES cell banking system.

For the clinical application of hES cells, there are several issues remain to be solved, such as developing an effective complete defined culture medium without animal serum and/or human-tissue derived feeder cells. To verify these factors we should develop a standard that meets the international level. For this we have joined the Working Group for International Standards for ES cells and their banking organized by the ISCBI (International Stem Cell Banking Initiative). In October 2008, the ISCBI established "Consensus Guidance for Banking and Supply of Human Embryonic Stem Cell Lines for Research Purposes" as a first stage, and now working on that for Clinical Purposes.

One important aspects of our research is to develop an effective protocol for cryopreservation of hES cells that should significantly increase the recoveries of the cells that is quite low at present. In this study we utilize a cryo-microscope equipped with a temperature-controlling stage to observe the cells under freezing and thawing, and a differential scanning calorimeter to measure heat transfer in the cell and suspension medium during the process. First, we have refined our methods with single monkey ES cells and then colonies, and the techniques will be refined and validated on hES cells. We expect this strategy will allow us to find an optimal cryopreservation protocol for hES cells that will contribute to make these cells suitable for clinical use.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Miho K. Furue, Jie Na, Jamie P Jackson, Tetsuji Okamoto, Mark Jones, Duncan Baker, Ryu-Ichiro Hata, Harry D. Moore, J. Denry Sato, Peter W. Andrews: Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **9**; **105**(36): 13409-13414 (2008)

2) 和文総説

高田 圭: ヒト ES 細胞のバンキングに向けた試み, 再生医療 **4**(7): (2008)

林 洋平, 古江一楠田美保, 明石靖史, 岡本哲治, 浅島 誠: マウス ES 細胞の無血清培養法. Tiss. Cult. Res. Commun. **27**: (2008)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会, 研究会発表

Miho Kusuda Furue, Jie Na, Takamichi Miyazaki, Kei Takada, Hirofumi Suemori, Hiroshi Mizusawa, Norio Nakatsuji, Tetsuji Okamoto, Peter W. Andrews: Defined medium for monkey and human ES cell culture. The 23rd Naito Conference on Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells [III] (2008.11.11-14. 湘南国際村センター)

2) 講演会, シンポジウム

高田 圭: ヒト ES 細胞のバンキングに向けた試み. 第7回日本再生医療学会総会, シンポジウム「細胞ソースとバンキング」(2008.3.18. 名古屋国際会議場)

古江一楠田美保: ヒト胚性幹細胞培養の現状と国際標準化. 第81回日本組織培養学会, シンポジウム「先端医療を支える細胞培養技術の現状と将来への課題」(2008.5.19-20. つくば市研究交流センター)

古江一楠田美保: ES 細胞からの顎骨の再生. 平成20年度日本歯科大学歯学会総会, シンポジウム「歯の再生: 戦略, 現状, 予測」(2008.6.7. 日本歯科大学)

古江一楠田美保: JAACT 総会. 第19回動物細胞工学シンポジウム「マウス, ヒト ES 細胞の無血清培養」(2008.6.24. 首都大学東京)

古江一楠田美保: ヒト ES 細胞培養法 ―創薬開発ツールとしての利用を目指して―. 第15回組織工学・再生医学ワークショップ「企業化を目指す再生医療」(2008.9.6)

再プログラム化研究領域

Laboratory of Reprogramming Research

客員教授 鳥居 隆三

Visiting Prof. Ryuzo Torii

サル体細胞核移植クローン胚の作製 (Cloned blastocysts produced by nuclear transfer from somatic cells in cynomolgus monkey)

【研究概要】

昨年度報告した改良型体細胞核移植法(体細胞核移植後に卵子除核)を用いて, テーラーメード ES 細胞株の樹立を試みた。胚盤胞期胚への発生率は大幅に改良されたものの, 依然として体細胞核移植胚からの ES 細胞株の樹立には至らなかった。今回, ドナー細胞として胎子線維芽細胞とより効率が良いといわれている ES 細胞を用いて体細胞核移植を行ったが, テーラーメード ES 細胞株の樹立には至らなかった。テーラーメード再生医療を行うためには, 移植後の免疫拒絶反応を考えると, 今後は体細胞から直接未分化細胞を作り出す iPS 細胞作製の検討を行う必要があると考えられる。ただし iPS 細胞の多分化能等について ES 細胞との比較検討を十分行う必要がある。

1. カニクイザルの体細胞核移植胚からの ES 細胞樹立の検討

従来の核移植法は, 未受精卵子の核を取り除いた後にドナーとなる細胞核を注入し発生刺激を与える方法であ

表 体細胞核移植の成績

Donor cell	No. of oocyte	No. of injection	No. of enucleation	No. of activation	No. of 2-cell	No. of 4-cell	No. of 6-cell	No. of 8-cell	No. of morula	No. of blastocyst	No. of ES established
ES cell	47	43	37	37	31 (5) [83.8%]	25 (3)	19 (6)	9 (3)	5 (1)	2 [6.5%]	0
Monkey fetus fibroblast cell	57	47	29	29	21 [72.4%]	13	12	11	10	10 [47.6%]	0

() は、胚移植数を示す。

る。我々はこの核移植法に改良を加え、細胞核を注入後レシピエント卵子の核を取り除き、発生刺激を与えるという従来の方法と順序を入れ替えた方法により、クローン胚の作製効率率は従来法の13%から33%に大きく改善できたことを昨年度報告したが、この方法を用いて核移植を行った。ドナー細胞として、胎子由来線維芽細胞とより効率の良いといわれている ES 細胞を用いた。核移植法を改良したことにより、胚盤胞期胚へ高率に発生するようになった（胎子線維芽細胞47.6%，ES 細胞6.5%，初期胚での胚移植を含む）。しかし、胚盤胞期胚からのテラーメード ES 細胞株の樹立には至らなかった。以上のことから、カニクイザルでは、体細胞核移植胚からのテラーメード ES 細胞株の樹立は極めて困難であり、今後は iPS 細胞の作製を検討する必要があると考える。

2. 良質の体細胞核移植クローン胚作製のための未受精卵子の獲得方法

核移植法によって作製されたクローン胚からの ES 細胞樹立が極めて難しい原因の一つとして、卵巣刺激によって得られる成熟未受精卵子の品質を改良する試みを行った。従来は FSH 製剤を連日同量を筋肉内に投与してきた。その結果、個体間のバラツキが大きく、得られる MII 期（第二減数分裂中期）の卵子の数が少なくかつ品質が安定しなかった。これに対して、マイクロポンプを皮下に埋設し、連続して一定量を投与する方法、さらに途中から量を増加させる方法によって、MII 期の卵子数は増加しかつ安定したと共に、顕微授精による胚発生は大きく改善されてきた。今後この卵子を用いて、クローン胚作製と ES 細胞樹立を試み、さらに iPS 細胞との比較検討も行ってゆく予定である。

Research abstract :

We attempted to establish tailor-made ES cell lines using the modified somatic cell nuclear transfer method (oocyte enucleation after somatic cell nuclear injection) that was reported last year. The developmental rate of blastocyst was greatly improved, but establishment of ES cell lines from somatic cell nuclear transfer was not achieved. In this study, somatic cell nuclear transfer was performed using, for the donor, fetus fibroblast cells and ES cells that were said to be rather effective, but establishment of tailor-made ES cell lines was not achieved. For tailor-made regeneration therapy, when post-transplant immunological rejection is considered it is believed that in the future it will be necessary to study production of iPS (induced pluripotent stem) cells with undifferentiated cells directly produced from somatic cells. However, in regard to iPS cell differentiation ability, it is necessary to first do sufficient comparative studies with ES cells.

1. Study of the establishment of ES cells from cynomolgus monkey somatic cell nuclear transfer

Conventional nuclear transfer is a method in which cell nuclei from donor cells are injected after unfertilized matured oocyte are enucleated and then growth stimulation is carried out. Last year we reported that we made

improvements to this nuclear transfer method and using a method in which the conventional sequence (the recipient oocyte was enucleated after injection the nucleus and then activation was performed) was reversed, cloned embryos production efficiency was greatly increased from the conventional method's 13% to 33%. Here we performed the nuclear transfer using this method. For the donor, fetus fibroblast cells and ES cells that were said to be rather effective were used. As a result of the modified nuclear transfer method, the rate of embryo development to the blastocyst stage was high (fetus fibroblast cells 47.6%, ES cell 6.5%; includes embryo transfer of early stage embryos). However, establishment of tailor-made ES cell lines from the blastocyst stage was not achieved. Due to the above, establishment of tailor-made ES cell lines from somatic cell nuclear transfer embryos was extremely difficult in the cynomolgus monkey and it is believed that in the future it will be necessary to study iPS cell.

2. Method of retrieved MII oocyte for the manufacture of quality somatic cell nuclear transferred embryos

As one factor in the extreme difficulty of establishing ES cells from cloned embryos manufactured by the nuclear transfer method, an attempt was made to improve the quality of MII oocyte obtained through follicle stimulation. Conventionally FSH formulation has been administered intramuscularly at the same dosage for consecutive days. As a result, there is large variation between individuals and the number of MII stage oocyte obtained is few and quality is unstable. To counter this a micro-pump was implanted subcutaneously and by using a method in which a set amount was administered continuously and halfway through that amount was increased, the number of MII oocyte was increased and stabilized and embryo development due to ICSI (intracytoplasmic sperm injection) was also greatly improved. In the future an attempt to produce cloned embryos using these high quality oocytes and ES cell establishment and finally a comparison study with iPS cells, are planned.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

原著論文

- C. Iwatani, J. Okahara-Narita, J. Yamasaki, H. Tsuchiya and R. Torii: Clonal offspring derived from separated blastomeres in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Reproduction, Fertility and Development* **20**(1): 100 (2008)
- H. Tsuchiya, C. Iwatani, J. Okahara-Narita, J. Yamasaki and R. Torii: Influence of Hoechst staining for nuclear transfer on parthenogenetic embryos in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Reproduction, Fertility and Development* **20**(1): 111 (2008)
- J. Yamasaki, J. Okahara-Narita, C. Iwatani, H. Tsuchiya and R. Torii: Effect of epidermal growth factor on in vitro maturation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) oocytes. *Reproduction, Fertility and Development* **20**(1): 208 (2008)
- J. Okahara-Narita, J. Yamasaki, C. Iwatani, H. Tsuchiya and R. Torii: A cynomolgus monkey embryonic stem cell line derived from a single blastomere. *Fertility and Development* **20**(1): 224-225 (2008)
- J. Yamasaki, J. Okahara-Narita, C. Iwatani, H. Tsuchiya and R. Torii: Effective condition for maturation of

cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) oocytes *in vitro*. *Exp. Anim.* **57**(3): 272 (2008)

C. Iwatani, J. Okahara-Narita, J. Yamasaki, H. Tsuchiya and R. Torii: Success in deliveries of clonal offspring derived from separated blastomeres in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Exp. Anim.* **57**(3): 273 (2008)

J. Okahara-Narita, J. Yamasaki, C. Iwatani, H. Tsuchiya and R. Torii: ES cell line derived from a single blastomere in cynomolgus monkey. *Exp. Anim.* **57**(3): 273 (2008)

◆ 学会等の発表 ◆

C. Iwatani, J. Okahara-Narita, J. Yamasaki, H. Tsuchiya and R. Torii: Clonal offspring derived from separated blastomeres in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (2008.1.5-9. Denver, USA)

H. Tsuchiya, C. Iwatani, J. Okahara-Narita, J. Yamasaki and R. Torii: Influence of hoechst staining for nuclear transfer on parthenogenetic embryos in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (2008.1.5-9. Denver, USA)

J. Yamasaki, J. Okahara-Narita, C. Iwatani, H. Tsuchiya and R. Torii: Effect of epidermal growth factor on *in vitro* maturation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) oocytes. 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (2008.1.5-9. Denver, USA)

J. Okahara-Narita, J. Yamasaki, C. Iwatani, H. Tsuchiya and R. Torii: A cynomolgus monkey embryonic stem cell line derived from a single blastomere. 34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (2008.1.5-9. Denver, USA)

鳥居隆三：(招待講演) 医学研究とサルー繁殖，ES 細胞樹立，そして再生医療へー。済生会近畿ブロック会議 (2008.2.1. 滋賀)

山中昌哉，橋本 周，岡原純子，山崎樹里，岩谷千鶴，中村紳一郎，土屋英明，鳥居隆三，森本義晴：カンクイザル卵子の体外成熟培養後の微細構造。第133回日本生殖医学会関西支部集談会，第36回関西アンドロロジーカンファレンス (2008.3.8. 大阪)

岡原（成田）純子，岩谷千鶴，山崎樹里，土屋英明，鳥居隆三：カンクイザルにおける効率よい核移植法の検討。日本生殖再生医学会 第3回学術集会 (2008.3.30. 東京)

山崎樹里，岡原純子，岩谷千鶴，土屋英明，森本義晴，鳥居隆三：クライオトップを用いたカンクイザル顕微授精胚の凍結保存。日本生殖再生医学会 第3回学術集会 (2008.3.30. 東京)

岩谷千鶴，岡原純子，山崎樹里，土屋英明，鳥居隆三：カンクイザル分割胚によるクローン個体の作出。日本生殖再生医学会 第3回学術集会 (2008.3.30. 東京)

岩谷千鶴，岡原（成田）純子，山崎樹里，土屋英明，鳥居隆三：カンクイザル分割クローン個体の作出。日本実験動物科学技術2008（第55回日本実験動物学会総会）(2008.5.15-17. 仙台)

山崎樹里，岡原純子，岩谷千鶴，土屋英明，櫻川宣男，鳥居隆三：カンクイザル未成熟卵子の体外成熟培養における支持細胞および EGF 添加濃度の検討。日本実験動物科学技術2008（第55回日本実験動物学会総会）(2008.5.15-17. 仙台)

岡原（成田）純子，山崎樹里，岩谷千鶴，土屋英明，鳥居隆三：カンクイザルにおける単一割球からの ES 細胞の樹立。日本実験動物科学技術2008（第55回日本実験動物学会総会）(2008.5.15-17. 仙台)

鳥居隆三：再生医療研究とサル ES 細胞の樹立，そして iPS 細胞へ，(株)イナリサーチ，新研究棟竣工記念講演（2008.8.8）

鳥居隆三：（招待講演）再生医療に向けたサル ES 細胞と iPS 細胞研究の現況と展望．日本実験動物共同組合研修会（2008.9.27. 東京）

M. Yamanaka, S. Hashimoto, J. Okahara, J. Yamasaki, R. Torii and R. Morimoto: Abnormal distribution of cortical granules in monkey one-day old MII oocytes which were immature at oocyte retrieval after controlled ovarian hyperstimulation. American Society for Reproductive Medicine 64th Annual Meeting, San Francisco (2008.11.8-12.8. California, USA)

鳥居隆三：再生医療とサル ES 細胞，そして iPS 細胞，第 1 回滋賀医科大学サルシンポジウム（2008.11.28）

岩谷千鶴，山崎樹里，岡原純子，土屋英明，鳥居隆三：カニクイザル連続微量投与による卵巢刺激法の検討，関西実験動物研究会第100回記念大会（2008.12.4. 京都）

山崎樹里，岡原純子，岩谷千鶴，土屋英明，鳥居隆三：クライオトップを用いたカニクイザル顕微授精胚の凍結保存および凍結胚由来産子の獲得，関西実験動物研究会第100回記念大会（2008.12.4. 京都）

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行うことで、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）までをも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。

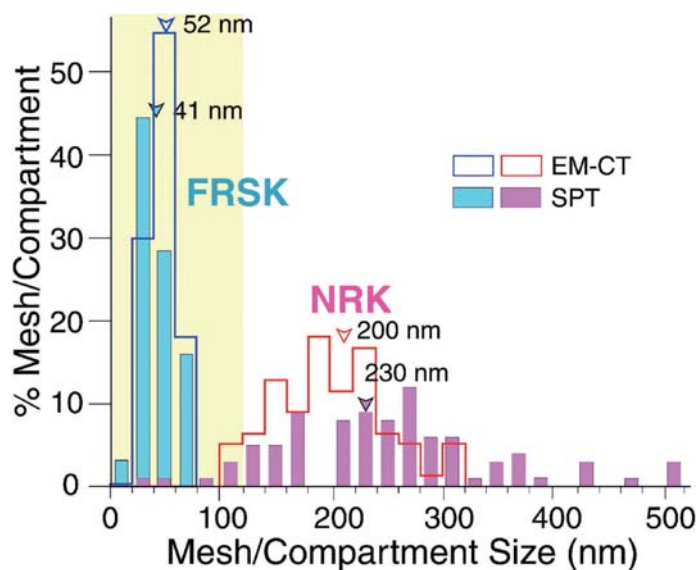


図1. 細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化し、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めた。網目の大きさの分布を、オープンバーで示す。赤がNRK細胞、青が、FRSK細胞。さらに、細胞膜中のリン脂質の拡散運動から求めたコンパートメントの大きさの分布を、クローズドバーで示す。両者は、各々の細胞でよく一致する。このように、網目やコンパートメントの大きさが大きく異なる2種の細胞で、それぞれ一致が見られたことは、膜骨格フェンスとそれに結合した膜貫通型タンパク質のビケットモデルを強く支持する。

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。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]

1. 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.

2. 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).

3. 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).

4. 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

- Y.M. Umemura, M. Vrljic, S.Y. Nishimura, T.K. Fujiwara, K.G. Suzuki and A. Kusumi: Both MHC class II and its GPI-anchored form undergo hop diffusion as observed by single-molecule tracking. *Biophys. J.* **95**: 435-450 (2008)
- N. Morone, C. Nakada, Y. Umemura, J. Usukura and A. Kusumi: Three-dimensional molecular architecture of the plasma-membrane-associated cytoskeleton as reconstructed by freeze-etch electron tomography. *Methods in Cell Biology* **88**: Introduction to Electron Microscopy for Biologists, T. Allen Ed. Chapter **12**: 207-236 (2008)
- A. Kusumi, Y. Umemura, N. Morone and T. Fujiwara: Paradigm shift of the molecular dynamics concept in the cell

membrane: high-speed single-molecule tracking revealed the partitioning of the cell membrane. Anomalous Transport: Foundations and Applications, R. Klages Ed. Chapter 19, Wiley Interscience: 545-574 (2008)

K.G.N. Suzuki and A. Kusumi: Mechanism for signal transduction in the induced-raft domains as revealed by single molecule tracking. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2008 (in press)

2) 和文解説

楠見明弘, 鈴木健一: デジタルシグナル変換場としてはたらく on-demand ラフトドメイン. 膜 (MEMBRANE) **33**(5): 194-200 (2008)

鈴木健一, 楠見明弘: デジタルシグナル変換場としてはたらく誘導ラフトドメイン. 生物物理 **6**(48): 320-324 (2008)

鈴木健一, 楠見明弘: 1 分子追跡でみえてきた細胞膜ラフトが働くしくみ. 実験医学増刊号「生命現象の動的理解を目指すライブイメージング」**12**: 96-103 (2008)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 国際学会・外国の学会

1A) 国外開催

A. Kusumi: Single-molecule tracking reveals dynamics of monomer-oligomer equilibrium of GPCRs. Meeting: two days with GPCRs in Montpellier (2008.6.12-13. Montpellier, France)

A. Kusumi: Signal transduction based on the plasma membrane meso-domains and the actin membrane skeleton: a single-molecule tracking study. New Frontiers in Neurophotonics: 1st Franco-Canadian Symposium (2008.10.20-23. Bordeaux, France)

A. Kusumi: Single-molecule tracking in the living cell plasma membrane: compartments, nanodomains and signaling. Principles of Cell and Tissue Organization (2008.11.10-12. Dresden, Germany)

A. Kusumi: Single-molecule tracking of transient signal transduction complexes. Medical Sciences Congress (2008.11.25-28. Queenstown, New Zealand)

T. Fujiwara and A. Kusumi: Compartmentalization of the plasma membrane by the membrane skeleton: high-speed single-molecule tracking study. The 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (2008.11.2-7. Jeju, Korea)

1B) 国内開催

K.G.N. Suzuki and A. Kusumi: Mechanism for raft-based signal transduction as studied by single-molecule tracking. The First iCeMS International Symposium/The 11th International Membrane Research Forum (2008.2.20-22. Kyoto, Japan)

A. Kusumi: Single-molecule imaging of raft-based signal transduction in living cells: a system of digital signal transduction? The 38th Seiriken/ Sokendai International Conference "Stock and flow of functional molecules in synapse" (2008.3.17-19. Okazaki, Japan)

A. Kusumi: Single-molecule tracking in the living cell membrane: signaling in a variety of membrane domains. Post IID 2008 Satellite International Meeting on "Autoimmune Bullous Diseases" (2008.5.17-19. Otsu, Japan)

A. Kusumi: Paradigm shift of the plasma membrane dynamics, structure and signal transduction by single-molecule tracking analysis. Kobe University Global COE Program: International Symposium on Integrative Membrane

Biology (2008.12.17-18. Kobe, Japan)

2) 国内での招待講演

鈴木健一, 楠見明弘: 信号伝達ラフトの1分子可視化解析. 特定領域「G蛋白質シグナル」&「膜輸送複合体」合同ワークショップ (2008.1.26-28. 箱根)

楠見明弘: 1分子毎に見る: 細胞膜分子の働く仕組み. 東京大学医学部 平成19年度基礎統合講義「見る」(2008. 2.5. 東京)

楠見明弘: 1分子追跡で見る細胞膜上のシグナル変換. 日本膜学会第30回年会 (2008.5.15-16. 東京)

楠見明弘: 細胞膜システムを見る. 奈良県立医科大学アドバンストコース講義 (2008.5.30. 奈良)

楠見明弘: Signal transduction based on the plasma membrane meso-domains and the actin membrane skeleton: a single-molecule tracking study. 第60回日本細胞生物学会大会 シンポジウム3 (S3)「細胞骨格と生体膜のダイナミクス」(2008.6.29-7.1. 横浜)

楠見明弘: 1分子追跡と電子線トモグラフィーの相関顕微技術で明らかになった細胞膜のナノ間仕切り構造. 再生医療・臓器再建コースミーティング (2008.7.4. 京都)

楠見明弘: ナノデバイスコース・先端計測学. 京都大学ナノメディシン融合教育ユニット講義 (2008.7.17. 京都)

楠見明弘: 1分子追跡法による細胞膜ドメインの動的構造と機能の研究. 第4回次世代バイオイメーjing技術開発研究会 (2008.7.18. 名古屋)

楠見明弘: 1分子追跡で見る細胞膜上のドメインとシグナル変換. 第48回 PB 夏の学校 八王子セミナーハウス (2008.7.20. 東京)

楠見明弘: 1分子追跡によって細胞膜上の足場がはたらく仕組みを解く. 文部省科学研究費補助金特定領域研究 生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能 平成20年度第1回班会議 (2008.9.24-26. 淡路)

鈴木健一, 楠見明弘: 1分子観察で初めて見えてくる細胞膜ラフトとシグナル伝達機構. 第30回北海道大学獣医学術基金群講演会 (2008.10.15. 北海道)

鈴木健一, 楠見明弘: 細胞膜上のラフトを介したシグナル伝達機構: 1分子追跡による研究. 日本顕微鏡学会第52回シンポジウム (2008.10.17-18. 千葉)

楠見明弘: 1分子追跡で見る細胞膜が働くしくみ. 日本バイオイメーjing学会第17回学術集会 (2008.10.30-11. 1. 千葉)

藤原敬宏: Super-speed single fluorescent-molecule tracking revealed hop diffusion of a phospholipid in the compartmentalized plasma membrane. 第46回日本生物物理学会年会 シンポジウム 2S2「細胞膜とアクチン骨格との相互作用: 生物物理のアプローチ」(2008.12.3-5. 福岡)

小山一本田郁子: 細胞膜内層信号分子と細胞膜外層ラフト分子の短寿命カップリング: 2色1分子同時追跡による検出. 生命・情報セミナー第6回「タンパク質2分子計測」ワークショップ (2008.12.9. 東京)

鈴木健一, 楠見明弘: Dynamics of raft-associated molecules for signal transduction as revealed by single-molecule tracking. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同年会 シンポジウムセッション 2S12「糖鎖による生体膜近傍の細胞機能制御機構」(2008.12.9-12. 神戸)

楠見明弘: ラフト仮説の新展開: 1分子追跡による研究. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会 シンポジウムセッション 2S21「膜ドメイン研究の新展開」(2008.12.9-12. 神戸)



シミュレーション医工学研究領域 Department of Medical Simulation Engineering

准教授 玄 丞休

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並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る。

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)。

睪島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、形成外科共同研究) (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。さらに、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助成金）。

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

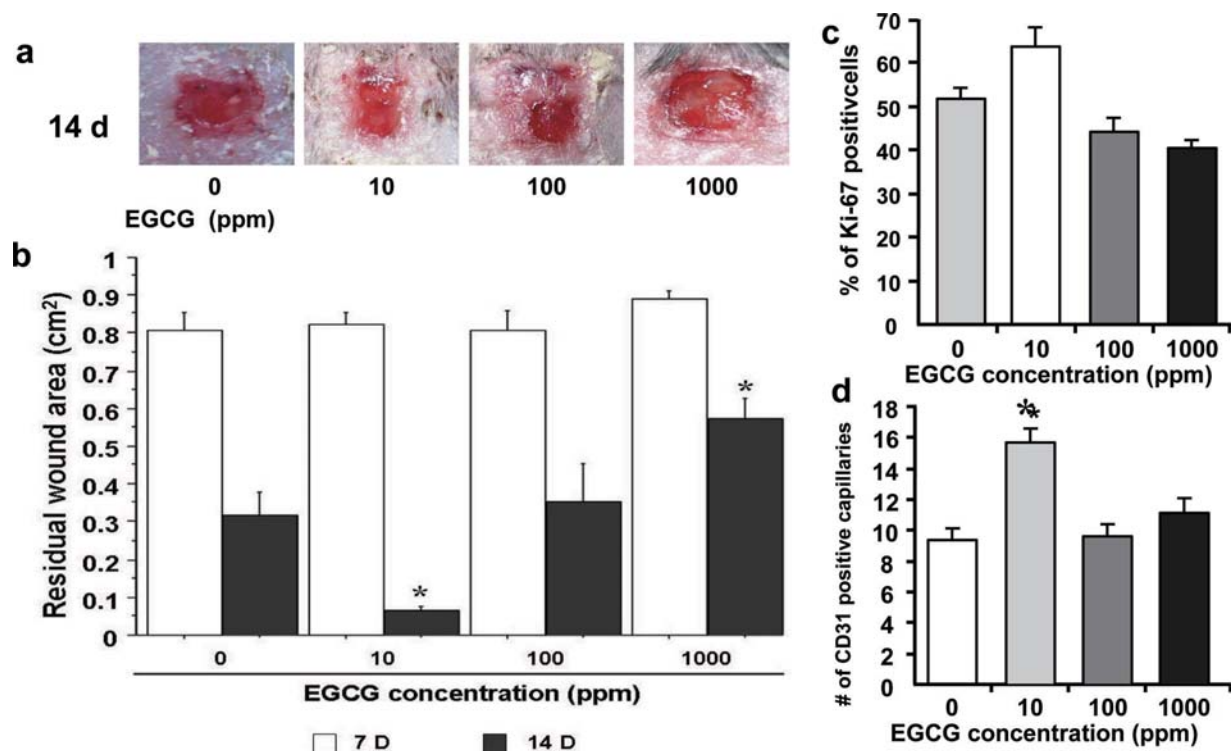
promising as artificial articular cartilage and intervertebral disk material (Supported by Japan Ministry of Health, Labour and Welfare).

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).



(a) Photographs of the wounds in diabetic mice after 14 days of treatment of collagen sponge (EGCG 0 ppm) or epigallocatechin gallate (EGCG)-incorporated collagen sponge. (b) Residual wound size of diabetic mice after 7 and 14 days of treatment was measured from unclosed wound area using a digital planimeter. (c) and Ki-67 positive cells at the basement membrane of epidermis. (d) were quantitatively analyzed with immunohistochemical staining sections.

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 aldehydized 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).

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

K. Matsumura, K. Kaihatsu, S. Mori, H-H. Cho, N. Kato and S-H. Hyon: Enhanced antitumor activities of (–)-epigallocatechin-3-*O*-gallate fatty acid monoester derivatives *in vitro* and *in vivo*. Biochemical and Biophysical Research Communications **377**: 1118-1122 (2008)

松村和明, 玄 丞然: EVA とチタンとの接着および人工歯根への応用. 第132回ポパール会記録 6-12 (2008)

K. Matsumura, T. Hayami, S-H. Hyon and S. Tsutsumi: Control of proliferation and differentiation of osteoblasts on apatite coated poly (vinyl alcohol) hydrogel as an artificial articular cartilage material. Journal of Biomedical Materials Research (in press)

K. Matsumura, H. Takayama, J-Y. Bae, M. Kurihara, S. Tsutsumi and S-H. Hyon: Preservation of platelets by adding epigallocatechin-3-*O*-gallate to platelet concentrates. Cell Transplantation (in press)

T. Azuma, J. Ito, M. Kutsuki, R. Nakai, S. Fujita and S. Tsutsumi: Analysis of the mandibular movement by

- simultaneous multi-section continuous ultrafast MRI. *Magnetic Resonance Imaging* Epub Sep 4 (2008)
- R. Nakai, T. Azuma, M. Sudo, S. Urayama, O. Takizawa and S. Tsutsumi: MRI analysis of structural changes in skeletal muscles and surrounding tissues following long-term walking exercise with training equipment. *J Appl Physiol.* **105**(3): 958-963 (2008)
- H-H. Cho, D-W. Han, K. Matsumura, S. Tsutsumi and S-H. Hyon: The behavior of vascular smooth muscle cells and platelets onto epigallocatechin gallate-releasing poly (L-lactide-co-ε-caprolactone) as stent-coating materials. *Biomaterials* **29**: 884-893 (2008)
- 曹 漢姫, 松村和明, 玄 丞然: Cisplatin 含有 DNA マイクロ粒子からの薬物送達システム. *食品と科学 別冊* 68-72 (2008)
- 時見高志, 堤 定美, 玄 丞然, 近田英一: 新しい熱可塑性アクリル樹脂を用いた義歯製作—特定保険. *医療材料『アクリショット』の化学的性質と操作方法—歯科技工* **36**(11): 1306-1315 (2008)
- T. Ino, R. Nakai, T. Azuma, K. Tokumoto, K. Usami and T. Kimura: An fMRI Study of word reading and colour recognition in different quadrant fields. *The Open Neuroimaging Journal* **2**: 56-64 (2008)
- S. Ichihara, Y. Inada, A. Nakada, K. Endo, T. Azuma, R. Nakai, S. Tsutsumi, H. Kurosawa and T. Nakamura: Development of new nerve guide tube for repair of long nerve defects. *Tissue Engineering* (in press)
- H-H. Kim, T. Kawazoe, S. Suzuki, S. Tsutsumi, K. Matsumura and S-H. Hyon: Enhanced wound healing by epigallocatechin gallate-incorporated collagen sponge in diabetic mice. *Wound Repair and Regeneration* **16**(5): 714-720 (2008)
- T. Kawazoe, H-H. Kim, Y. Tsuji, N. Morimoto, S-H. Hyon and S. Suzuki: Green tea polyphenols affect skin preservation in rats and improve the rate of skin grafts. *Cell Transplantation* **17**: 203-209 (2008)
- J-Y. Bae, J. Kanamune, D-W. Han, K. Matsumura and S-H. Hyon: Reversible regulation of cell cycle-related genes by epigallocatechin gallate for hibernation of neonatal human tarsal fibroblasts. *Cell Transplantation* (in press)
- J-Y. Bae, K. Matsumura, S. Wakitani, A. Kawaguchi, S. Tsutsumi and S-H. Hyon: Beneficial storage effects of epigallocatechin-3-o-gallate on the articular cartilage of rabbit osteochondral allografts. *Cell Transplantation* (in press)
- M. Takaoka, T. Nakamura, H. Sugai, A.J. Bentley, N. Nakajima, N.J. Fullwood, N. Yokoi, S-H. Hyon and S. Kinoshita: Sutureless amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction with a chemically defined bioadhesive. *Biomaterials* **29**: 2923-2931 (2008)
- M. Takaoka, T. Nakamura, H. Sugai, A.J. Bentley, N. Nakajima, N. Yokoi, N.J. Fullwood, S-H. Hyon and S. Kinoshita: Novel sutureless keratoplasty with a chemically defined bioadhesive. *Invest ophthalmol vis sci.* (in press)
- M. Araki, H. Tao, T. Sato, N. Nakajima, T. Nagayasu, T. Nakamura and S-H. Hyon: Development of a new tissue-engineered sheet for reconstruction of the stomach. *Artif Organs* (in press)
- M. Tanaka, H. Tanaka, M. Hojo, T. Adachi, S-H. Hyon and M. Konda: Evaluation of anisotropic deformation and fracture properties in extruded HAP/PLLA Composites. *Proceedings of the 13th European Conference on Composite Materials*: 1-8 (2008)
- A. Osterburg, J. Gardner, S-H. Hyon, A. Neely and G. Babcock: Highly antibiotic resistant *acinetobacter baumannii* clinical isolates are killed by the green tea polyphenol (–)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Clinical Microbiology and Infections* (in press)

D-W. Han, K. Matsumura, B-J. Kim and S-H. Hyon: Time-dependent intracellular trafficking of FITC-conjugated epigallocatechin-3-O-gallate in L-929 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **(16)**: 9652-9659 (2008)

A. Miskon, T. Yamaoka and S-H. Hyon: Preservation of porcine hepatocytes in 3d bioreactor at room temperature using epigallocatechin-3-gallate. *Tissue Engineering* (in press)

2) 著 書

玄 丞然: 医療用としての応用事例. 「バイオプラスチックの高機能化・再資源化技術」(エヌ・ティー・エス, 東京) 290-298 (2008)

3) 総 説

松村和明, 玄 丞然, 井汲憲治, 川植康史, 堤 定美: 歯根膜再生型人工歯根の開発. *THE NIPPON Dental Review* (日本歯科評論) **68**(3): 39-40 (2008)

玄 丞然: 再生医療を指向した機能性バイオマテリアルの設計と応用. *Journal of Japanese Society for Biomaterials* **26**(2): 111-121 (2008)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

S-H. Hyon, N. Nakajima and H. Sugai: Dextran based medical glue and its clinical application. The 8th World Biomaterials Congress (2008.5.28-6.1. Amsterdam)

S-H. Hyon and K. Matsumura: Anticancer activity and DDS application of green tea polyphenol derivatives. 35th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2008.7.12-16. New York)

玄 丞然, 金 学嬉, 松村和明, 西川武志: 緑茶ポリフェノール EGCG とさけ白子 DNA を用いた皮膚熱傷の治療効果. 核酸・核タンパク機能性研究会学術集会 (2008.9.12. 恵庭)

K. Matsumura, K. Kaihatsu, S. Mori and S-H. Hyon: Anticancer effects of novel tea polyphenol derivatives and their DDS application. The 8th World Biomaterials Congress (2008.5.28-6.1. Amsterdam)

松村和明, 開発邦宏, 森 修一, 玄 丞然: エピガロカテキンガレート新規誘導体の抗ガン活性および DDS 化. 第24回日本 DDS 学会学術集会 (2008.6.29-30. 東京)

松村和明, 中島直喜, 玄 丞然: 新規細胞凍結保存高分子の開発. 第57回高分子討論会 (2008.9.24-26. 大阪)

松村和明, 中島直喜, 玄 丞然: ジメチルスルホキシドに代わる細胞凍害防御剤の開発. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008 (2008.11.17-18. 東京)

松村和明, 裴 庭胤, 玄 丞然: ポリリジン誘導体による細胞凍結保存効果. 第35回日本臓器保存生物医学会 (2008.11.22-23. 東京)

中井隆介, 東 高志, 猪野正志, 吉田忠剛, 瀧澤 修, 福山秀直: fMRI および DT-MRI を使用した内包における皮質脊髄路の Somatotopy の解析. 第36回日本磁気共鳴医学会大会 (2008.9.11-13. 北海道)

H-H. Cho, K. Matsumura, D-W. Han and S-H. Hyon: Epigallocatechin-3-O-gallate Crosslinked Collagen Sponges with Enhanced Biostability and Biocompatibility for Tissue Engineering. The 8th World Biomaterials Congress (2008.5.28-6.1. Amsterdam)

H-H. Cho, D-W. Han, K. Matsumura and S-H. Hyon: *In vitro* studies of Epigallocatechin Gallate-Eluting Stent Coatings Based on Poly (L-Lactide-co-epsilon-Caprolactone). The 8th World Biomaterials Congress (2008.5.28-6.1.

Amsterdam)

- 曹 漢姫, 松村和明, 玄 丞然: 緑茶ポリフェノール含有の冠状動脈用薬剤溶出ステント. 第24回日本 DDS 学会学術集会 (2008.6.29-30. 東京)
- H-H. Kim, T. Kawazoe, K. Matsumura and S-H. Hyon: Healing effects of epigallocatechin-3-*o*-gallate (egcg) on burn wounds in mice. The 8th World Biomaterials Congress (2008.5.28-6.1. Amsterdam)
- J-Y. Bae, D-W. Han, K. Matsumura, S. Wakitani and S-H. Hyon: EGCG Application to the non-frozen preservation of articular cartilages through the regulation of cell cycle and NF- κ B expression. The 8th World Biomaterials Congress (2008.5.28-6.1. Amsterdam)
- 裴 庭胤, 松村和明, 脇谷滋之, 玄 丞然: 軟骨組織の保存と移植について—緑茶ポリフェノール (EGCG) 添加保存液の効果—. 第6回日本再生歯科医学会 (2008.9.12-13. 東京)
- 裴 庭胤, 韓 東旭, 松村和明, 脇谷滋之, 縄田昌司, 玄 丞然: ヒト軟骨組織の低温長期保存について—緑茶ポリフェノール (EGCG) 添加保存液の効果—. 第35回日本臓器保存生物医学会 (2008.11.22-23. 東京)
- 高岡真帆, 中村隆宏, 須賀井一, Adam J. Bentley, 中島直喜, Nigel J. Fullwood, 横井則彦, 玄 丞然, 木下茂: 新規生体接着剤を用いた無縫合羊膜移植術の開発. 第32回角膜カンファレンス・第24回日本角膜移植学会 (2008.2.28-3.1. 浦安)
- M. Takaoka, T. Nakamura, H. Sugai, Adam J. Bentley, N. Nakajima, Nigel J. Fullwood, N. Yokoi, S-H. Hyon and S. Kinoshita: A Novel Sutureless Amniotic Membrane Transplantation for Ocular Surface Reconstruction with Chemically Defined Bioadhesives. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2008 Annual Meeting (2008.4.27-5.1. Fort Lauderdale, Florida)
- 高岡真帆, 中村隆宏, 須賀井一, Adam J. Bentley, 中島直喜, Nigel J. Fullwood, 横井則彦, 玄 丞然, 木下茂: 新規生体接着剤を用いた眼表面再建術の開発. 第29回日本炎症・再生医学会 (2008.7.8-10. 東京)
- 荒木政人, 田尾裕之, 佐藤寿彦, 中島直喜, 須賀井一, 玄 丞然, 永安 武, 中村達雄: 肺瘻閉鎖用接着剤評価のための均一な胸膜肺実質損傷モデル作成方法の開発. 第108回日本外科学会定期学術集会 (2008.5.15-17. 長崎)
- 荒木政人, 中島直喜, 須賀井一, 玄 丞然, 永安 武, 中村達雄: 新しいパウダー噴霧式癒着防止剤の開発. 第63回日本消化器外科学会総会 (2008.7.16-18. 札幌)
- 荒木政人, 中島直喜, 須賀井一, 玄 丞然, 田川 努, 山崎直哉, 土屋智史, 永安武, 中村達雄: 胸腔鏡下に塗布可能な新しいパウダー状生体内分解性接着剤の開発. 第61回日本胸部外科学会定期学術集会 (2008.10.12-15. 福岡)
- 荒木政人, 中村達雄, 中島直喜, 澤井照光, 福岡秀敏, 國崎真己, 七島篤志, 日高重和, 永安 武: 組織工学の手法を用いた消化管再生の現状と問題点. 第70回日本臨床外科学会 (2008.11.27-29. 東京)
- 市原理司, 中村達雄, 稲田有史, 中田 顕, 遠藤克昭, 東 高志, 中井隆介, 堤 定美, 黒澤 尚: 長い欠損に対する新しい人工神経の開発. 第81回日本整形外科学会 (2008.5.22-25. 北海道)
- S. Ichihara, T. Nakamura, Y. Inada, A. Nakada, K. Endo, T. Azuma, S. Tsutsumi and H. Kurosawa: Development of new nerve guide tube for repair of peripheral nerve injury. American Society for Artificial International Organs, 54th Annual conference (2008.6.19-21. San Francisco)
- 市原理司, 稲田有史, 中田 顕, 東 高志, 中井隆介, 遠藤克昭, 島田英徳, 黒澤 尚, 中村達雄: Canine modelを用いた神経再生後の機能評価法の確立. 第23回日本整形外科学界基礎学術集会 (2008.10.23-24. 京都)

- 市原理司, 稲田有史, 中田 顕, 東 高志, 中井隆介, 遠藤克昭, 島田英徳, 黒澤 尚, 中村達雄: Canine model を用いた神経再生後の機能評価法の確立. 第23回日本整形外科学界基礎学術集会 (2008.10.23-24. 京都)
- 正木悠紀子, 天満 敬, 佐野紘平, 木村寛之, 東 高志, 中井隆介, 久下裕司, 小野正博, 佐治英郎: 立体構造制御に基づく on/off スwitching機構を導入した新規機能性 MRI プローブの開発. 第8回放射性医薬品・画像診断薬研究会 (2008.12.6. 京都)
- 中村淳一, 中島直喜, 松村和明, 玄 丞然: 葉酸吸着によるタキソール抗がん効果の向上. 第24回日本 DDS 学会 (2008.6.29-30. 東京)
- M. Tanaka, H. Tanaka, M. Hojo, T. Adachi, S.H. Hyon and M. Konda: Effect of Microstructural Anisotropy on Deformation and Fracture Properties in Extruded HAP/PLLA Composites. The 8th World Biomaterials Congress (2008.5.28-6.1. Amsterdam)
- M. Tanaka, H. Tanaka, M. Hojo, T. Adachi, S.H. Hyon and M. Konda: Evaluation of anisotropic deformation and fracture properties in extruded HAP/PLLA composites. 13th European Conference on Composite Materials (2008.6.2-5. Stockholm)
- D-W. Han, H-H. Cho and S.H. Hyon: Cytoprotective Effects of Laminin via Blocking Cellular Uptake of Epigallocatechin Gallate. The 8th World Biomaterials Congress (2008.5.28-6.1. Amsterdam)
- D-W. Han, H-H. Cho, K. Matsumura and S.H. Hyon: *In vitro* studies of epigallocatechin gallate-eluting stent coatings based on poly (l-lactide-co-epsilon-caprolactone). The 8th World Biomaterials Congress (2008.5.28-6.1. Amsterdam)
- M. Tanaka, H. Tanaka, M. Hojo, T. Adachi, S.H. Hyon and M. Konda: Effect of microstructural anisotropy on deformation and fracture properties in extruded hap/plla composites. The 8th World Biomaterials Congress (2008.5.28-6.1. Amsterdam)
- T. Yamamoto, S. Fujibayashi, N. Nakajima, H. Sugai, S.H. Hyon and T. Nakamura: A new biodegradable adhesive (LYDEX). The 8th World Biomaterials Congress (2008.5.28-6.1. Amsterdam)
- 山本展之, 田中秀和, 田中基嗣, 北條正樹, 安達泰治, 玄 丞然, 近田英一: 押出により微視構造の配向した HAp/PLLA 複合材料の変形・破壊特性. 第53回 FRP CON-EX 講演会 (2008.11.25-26. 京都)
- M-H. Lee, D-W. Han, S-H. Hyon and J-C. Park: Suppression of intimal layer formation as inhibiting migration and proliferation of smooth muscle cell by epigallocatechin-3-gallate (EGCG). The 8th World Biomaterials Congress (2008.5.28-6.1. Amsterdam)
- 内藤泰行, 河内明宏, 邵 仁哲, 沖原宏治, 水谷陽一, 三木恒治, 中島直喜, 須賀井 一, 玄 丞然: 腹腔鏡下腎部分切除術における新規医療用接着剤 (LYDEX) の有用性. 第21回日本内視鏡外科学会総会 (第11回世界内視鏡外科学会 共催) (ELSA 2008 同時開催) (2008.9.2-6. 横浜)

2) 講演

- 玄 丞然: 生分解性医療材料であるポリ乳酸の最近の研究. 「第67回人工関節機能高度化研究会」(依頼講演) (2008.1.12. 岡山)
- 玄 丞然: 緑茶ポリフェノール (EGCG) による細胞増殖制御と移植用生体組織の常温長期保存. 「大阪大学病院移植外科」(依頼講演) (2008.1.22. 大阪)
- 玄 丞然: 歯科・口腔外科に於ける生体材料. 「歯科人工知能研究会」(依頼講演) (2008.6.21 京都)
- Suong-Hyu Hyon: Biomedical application of PVA focusing in ophthalmic area. 「Kwangju Institute of Science and

Technology」(招待講演)(2008.6.24. Kwangju)

Suong-Hyu Hyon: Functional Medical Adhesives「BIO KOREA 2008」(招待講演)(2008.10.9. Osong)

Suong-Hyu Hyon: Biodegradable medical sealant or adhesive composed of dextran/polylysine. 「Korea Polymer Meeting」(招待講演)(2008.10.10. Seoul)

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

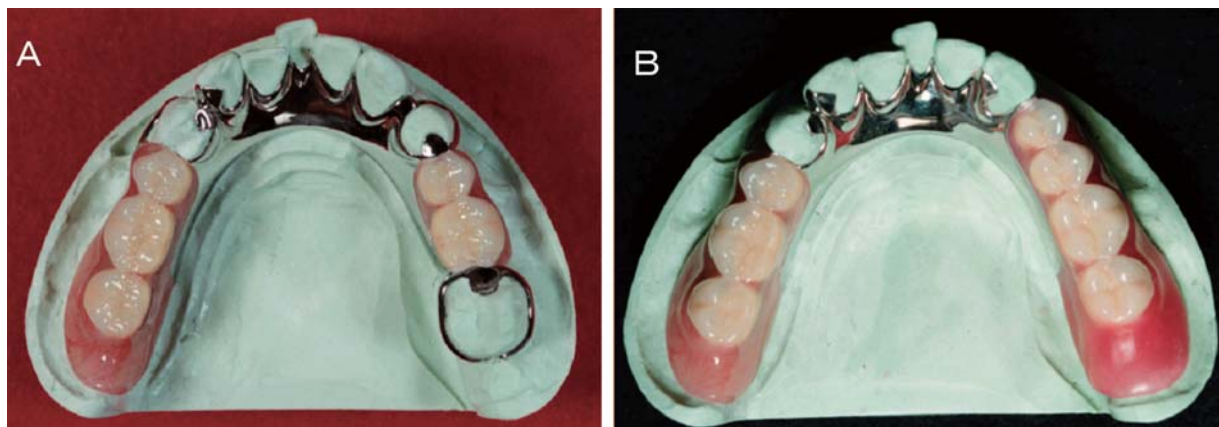
Assist. Prof. Toshihiro Togaya

【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



レーザー加工によってリフォームされた義歯。鉤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、患者の満足感も高い。

A：リフォーム前， B：リフォーム後

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.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

著 書

都賀谷紀宏：歯科技工・補綴パラダイムシフト「レーザー溶接入門」（単著，医歯薬出版，東京，2008）

◆ 学会等の発表 ◆

講演・シンポジウム

T. Togaya: Applications of laser welding in dental laboratory work. 4th International Congress on Dental Technology (Invited Lecture) (2008.11.22. Osaka)

再生医工学研究領域 Department of Medical Engineering

Visiting Prof. Tanguay, Robert Maurice

"Role of molecular chaperones in development and regeneration"

【Research Overview】

Many heat shock proteins (HSP) act as molecular chaperones and play key roles in the proper folding and/or disposal of denatured/misfolded proteins resulting from exposure to severe thermal or chemical stresses. In addition some HSPs are expressed in a developmental- and cell specific-regulated manner in the absence of stress suggesting that they also have some functions in these biological processes. This is particularly striking in the case of the small HSPs, a family of conserved Hsps ranging from 12 to 40 kDa, which have been shown to be expressed in specific cells during normal development and during aging in the *Drosophila* model system. In humans, there are 11 members in the small HSP family and these also show cell-specific expression. Interestingly overexpression of a small mitochondrial HSP in *Drosophila melanogaster* (DmHsp22) has been shown to extend lifespan and protect against oxidative stress (Morrow et al. *FASEB J* 18: 598, 2004; *J Biol Chem* 279: 43382, 2004). Aging is a complex process accompanied by a decreased capacity of cells to tolerate and respond to various forms of stresses leading to damages such as protein aggregation in various components of the cell. Chaperones are thus likely important players in the aging process by preventing damages resulting from protein denaturation and aggregation. Small

chaperones have been shown to be involved in the refolding or disposal of protein aggregates, a feature of many age-associated diseases. However the mechanisms by which these small chaperones protect against aging damages are unknown. Identifying the proteins that associate with the small HSPs may provide clues to better understand their mode of actions in the aging process and also in many age-associated neurodegenerative diseases thought to result from protein denaturation and aggregation.

We are particularly interested in small HSPs associated with mitochondria as this organelle is the main generating site of the damaging radical oxygen species (ROS) though to be responsible for damages to DNA, proteins and cellular membranes (Figure 1). We have thus started to identify the partners and substrates of two specific mitochondrial sHSPs using technology developed by members of Prof. Kazuhiro Nagata's laboratory in the Department of Molecular and Cellular Biology of the Institute of Frontier Medical Sciences. The two proteins, the matrix DmHsp22 and HspB2, a human sHSP associated with the mitochondrial outer membrane have been tagged and used in immunoprecipitation studies to identify their partners/substrates using mass spectrometry. We hope that the identification of protein/protein interactions between the sHSPs and cellular proteins will help in understanding the mechanisms of protection against oxidative stress conferred by these small chaperones (Figure 1). This may be particularly important in some human neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in which mitochondrial homeostasis seems to play an important role.

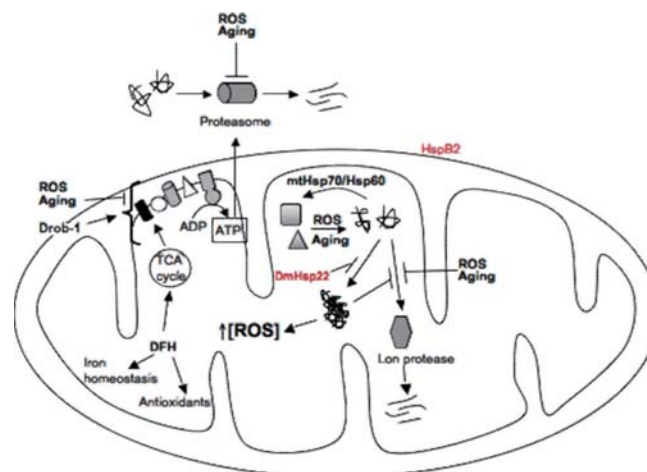


Fig. 1. Model of putative sites of action of small HSP chaperones in mitochondria. The matrix localized DmHsp22 may prevent the accumulation of toxic protein aggregates by chaperoning the refolding or elimination of denatured proteins. HspB2 may also participate in the mitochondrial protein quality control process through its association with the outer membranes by distinct mechanisms.

During my stay at the Institute, I discussed with the members of Prof Nagata's group at multiple occasions about their projects, progress and difficulties. I also gave a series of seminars for students and researchers of the Institute on "Drosophila melanogaster as a model system for the study of aging and protein folding diseases" and on "Small HSP chaperones, aging and resistance to oxidative stress in Drosophila". I also presented a seminar on "Hepatocellular carcinoma in hereditary tyrosinemia: activation of survival pathways and inhibition of mitochondria-mediated apoptosis", a severe genetic liver disorder involving ER signaling and resistance to apoptosis.

Finally in collaboration with a member of the group, Dr Hiroshi Kubota, and colleagues of the University of Groningen (Netherlands), we participated in the writing of a manuscript on "Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins" which will be published in 2008 in the journal *Cell Stress and Chaperones*.

寄附研究部門 Endowed Chairs

組織分化制御学研究部門 Department of Morphoregulation

特任准教授 平井 洋平
Assoc. Prof. Yohei Hirai

【研究概要】

上皮組織の構築プログラムは個体の発生・器官の再生過程において活発に進行するが、出来上がった組織が複雑な生命現象を効率よくこなせるように、その形態変化・機能分化は間質シグナルによって時間的、空間的に厳密にコントロールされている。当研究室では、必要に応じて細胞外に分泌され隣接する上皮の局所的な形態変化を促す間質細胞内蛋白質エピモルフィンとそのファミリー蛋白質（シンタクシン）に着目し、これら分子群の精密な上皮形態調節機構についての研究を行ってきた。プロジェクトの最終年である本年（9月まで）は、実際の皮膚におけるこれらの発現挙動と分泌状況を調べ、組織分化の精密な制御機構の1つのモデルを検証した。シンタクシン1～6のうち細胞膜に発現するのは、エピモルフィン（シンタクシン2）とシンタクシン3、4であるが、前者は真皮層の繊維芽細胞に存在し、刺激に応じて細胞外拡散性因子として表皮に向かって分泌されるが、後者は表皮層のケラチノサイトに存在し、細胞外に呈示されるものの分泌はされず、隣接した細胞にのみ働きかけることが分かった。さらに、これらの組み替え蛋白は、いずれも重層化するケラチノサイトに対して（EGFによる）角化シグナルを調節することが判明し、空間的な表皮分化におけるこれらの積極的な協調作用が示唆された（図1）。

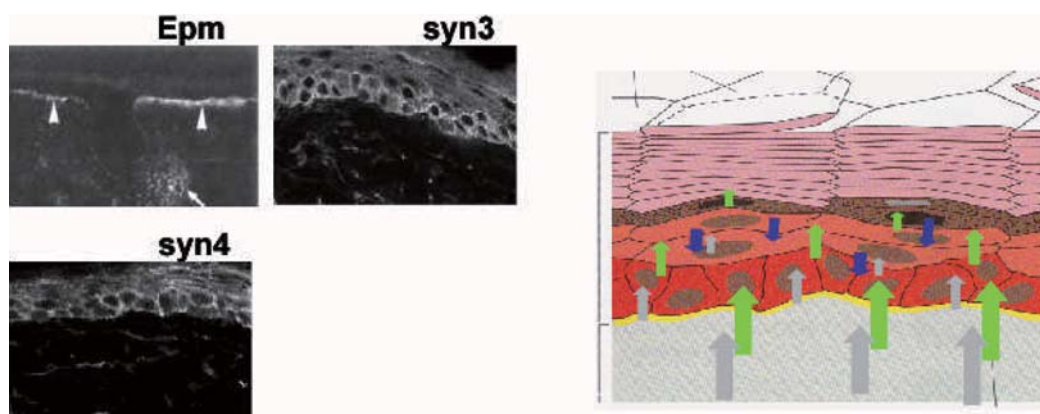


図1. エピモルフィン、シンタクシン3、4の皮膚での発現（左）と表皮分化制御における協調作用（右）

また、本プロジェクトと平行して、表皮付属物である毛包の周期変化に伴うケラチンフィラメントの動態調節を担う AHF（トリコヒアリン様蛋白質）の発現制御機構についての解析も行った。AHF は毛周期成長期にのみ発現し、ケラチンフィラメントを束ねることで周期的に変動する毛包細胞の形態・強度を調節する巨大蛋白質であるが、本研究から、BMP がその転写を促し核膜成分のラミンが間接的にプロテアソームによる分解から守ることも明らかになった（図2）。このことは、細胞外シグナル、細胞内蛋白分解システム、核膜成分が協調して表皮細胞

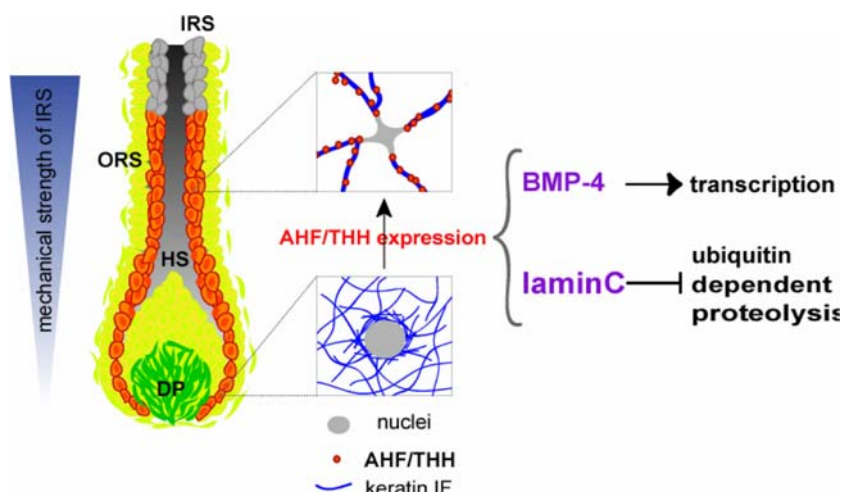


図2. ケラチン中間系フィラメントを束ねる AHF の発現制御
BMP が転写促進を，ラミンが蛋白の安定を促す。

の挙動調節していることを示すものである。

During the developmental and organ regenerative processes, epithelial tissues actively construct complex architectures, where their differentiation programs are spatio-temporally regulated by the surrounding stroma. We have analyzed functional expression of a stromal morphogenic protein epimorphin, which usually exists at the cytoplasmic surface of the stromal plasma membrane and functions as a t-SNARE molecule, while is temporally secreted extracellularly and elicits local morphogenetic responses in the adjacent epithelia. As the last year of the project, we have tried to establish functional relationship between epimorphin and its related members to provide new insight into strict regulation in the functional differentiation and morphogenesis of the skin epidermis. We found that epimorphin (syntaxin 2) is localized predominantly at the stromal fibroblasts whereas syntaxin 3 and 4 is localized at the cell membrane of stratified keratinocytes (Fig. 1). As has been shown for epimorphin, syntaxin 3 and 4 are projected extracellularly in response to some biological stimuli, however, they appeared not to be released from these cells and affect only to the neighboring keratinocytes. We found that the recombinant forms of epimorphin, syntaxin 3 and 4 are all active in regulation of EGF-dependent keratinocyte growth and differentiation, suggesting their spatial cooperation for the programmed stratification/cornification in the epidermal tissues (Fig. 1).

We also revealed a novel regulatory mechanism of functional expression of AHF/Trichohyalin which plays key roles in the cyclic morphogenesis of a skin appendix hair follicle via bundling the keratin intermediate filaments. We found that BMP4 up-regulates AHF transcription, and a nuclear envelope component lamin C indirectly affects AHF protein to confer proteolytic resistance. These findings underscore the orchestrated cooperation of extracellular signals, the cytoplasmic proteolytic elimination machinery and the nuclear membrane component.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

原著論文

Y. Okugawa and Y. Hirai: Overexpression of extracellular epimorphin leads to impaired epidermal differentiation in

- HaCaT keratinocytes. J. Invest. Dermatol. **128**: 1884-1893 (2008)
- S. Aono and Y. Hirai: Phosphorylation of claudin-4 is required for tight junction formation in a human keratinocyte cell line. Exp. Cell Res. **314**: 3326-3339 (2008)
- S. Yamamoto, K. Hirai, Y. Hasegawa-Oka and Y. Hirai: Molecular elements of the regulatory control of keratin filament modulator AHF/Trichohyalin in the hair follicle. Exp. Dermatol. [Epub] Jul 17 (2008)
- C. Chen, M. Neison, D. Khavy, S. Bennett, E. Radisky, Y. Hirai, M. Bissell and D. Radisky: Homology with rescle fusion mediator syntaxin-1a predicts determinants of epimorphin/syntaxin-2 function in mammary epithelial morphogenesis. J. Biol. Chem. Epub. Jan. 7 (2009)
- D. Radisky, M. Stallings-Mann, Y. Hirai and M. Bissell: Single proteins serve multiple functions in intracellular and extracellular environments. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (in press)
-

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Y. Okugawa and Y. Hirai: Overexpression of extracellular epimorphin leads to impaired epidermal differentiation in HaCaT keratinocytes. *11th IUBMB conference/33rd FEBS congress* (2008.6.28-7.3. Athen Greece)
- Y. Hirai and K. Yamazaki: The Non-classical Export of syntaxins and Their possible Extracellular Functions as Integrin Ligands. *11th IUBMB conference/33rd FEBS congress* 2008.6.28-7.3 (Athen Greece)

2) 講演会・シンポジウム

- Y. Hirai: Extracellular function of epimorphin/syntaxin 2 as a morphogenic protein. The 34th JSBBA symposium on Chemistry and Biology (2008.9.27. Nagoya, Japan)
- 平井洋平: 新しいタイプの形態形成因子 epimorphin による皮膚組織の分化制御. 関西学院大学・吉林大学生命科学院 連携記念シンポジウム 特別講演 (2008.7.28. 西宮)
- 平井洋平: シグナル分子の新しい機能発現機構と上皮組織の形態調節. 関西学院大学産学連携シンポジウム in 東大『発生・再生調節と内・外環境』(2008.11.3. 東京)

技 術 部 Division of Technical Support

【研究支援概要】

2002年10月17日の教授会において、再生医科学研究所における研究支援の一環として技術部を発足させ、再生医科学研究所各分野の病理組織標本作製を行うようになった。

2008年は1月より12月末までに12分野185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、分野によるクレオスタット（凍結切片作製装置）の共同利用や固定、包埋から染色までの組織作製や免疫染色などの技術指導も行ってきた。

新たに自動染色装置、ベアリング式ミクロトームが入れられ、自動包埋装置、研究用生物顕微鏡が更新されるなど機器の整備もなされた。

- 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等）

一方、自己研鑽として京都大学技術職員研修（専門、総合）、日本病理学会総会、実験病理組織技術研究会関西部会技術研修会に参加し、情報収集や技術交流を行ってきた。

また、衛生管理者として、労働衛生教育の実施の研修を受けてきた。

【業績目録】

◆ 学会，研究会発表 ◆

松下隆寿，小岸久美子：四酸化オスミウムを用いた骨髄の脂肪染色．第19年度京都大学技術職員研修（専門研修）

「プレ京都大学総合技術研究会」（2008.3.18-19）

小岸久美子，松下隆寿：Fast Green-Safranin O 染色の検討．第19年度京都大学技術職員研修（専門研修）「プレ京都大学総合技術研究会」（2008.3.18-19）

4. ナノメディシン融合教育ユニット Nano-Medicine Merger Education Unit

ナノメディシン融合教育ユニットは、ナノテクノロジーとライフサイエンス、並びに医学が融合して初めて実現できる「ナノメディシン」という新しい先端医工学領域において、将来、産学官で活躍できる人材を育成することを目的として開設された教育組織です。

このユニットは京都大学の部局を横断した組織として位置づけられ、医学研究科、工学研究科および再生医科学研究所が互いに連携しながら運営されます。教育においては既存の研究科・専攻という教育体系の枠組みを越えて、京都大学の豊富な教員スタッフと新たに採用された特任教員とが融合教育ユニットを形成してプログラムをコーディネートし、基礎知識、基礎技術の実習教育、研究指導に当たります。

既に産官で研究者、技術者として活躍されている社会人にナノメディシンに関する基礎知識を講義により提供するとともに、基礎実習および演習などの実技による再教育を行います。これにより、新領域において問題解決能力をもつ人材へと育成します。

また、神戸バイオテクノロジー研究・人材育成センターにおいては、再生医科学研究所より、機材の提供・スタッフの派遣を行います。ハード・ソフトの両面からのサポートを行うことにより、本ユニットの活動を通じて、神戸医療産業都市構想の推進に寄与するものでもあります。

We are proud of foundation of Nano-Medicine Merger Education Unit, which is an educational organization with the aim of nurturing talented experts who can drive translational research, display issue-solving ability, and create next-generation industry in terms of "nano-medicine" generated only by merger of nano-technology, life science, and medicine.

The unit is crossing over Graduate School of Medicine, Graduate School of Engineering, and Institute for Frontier Medical Sciences to make abundant human resources of Kyoto University and new designated researchers grow together, as the result of which we can provide coordinated and fundamental education programs efficiently.

It is an ultimate goal of this unit to contribute to nurturing talent with issue-solving ability in new fields by providing practice and basic lecture about nano-medicine for experts in engineering and research in a specific field.

The essential role of Institute for Frontier Medical Sciences concerned with the activity of this unit in Kobe Biotechnology Research and Human Resource Development Center is providing machinery, materials and staff, which means comprehensive support of hard- and software. It is a pleasure that we can contribute to the promotion of Kobe Medical Industry Development Project through the activity of this unit.

5. 学 術 集 会

5-1 京都大学再生医科学研究所設立10周年記念 国際シンポジウム

International Symposium on Regenerative Medicine —Tenth Anniversary of Institute for Frontier Medical Sciences—

日時：2008年12月4日（木）
会場：芝蘭会館 稲盛ホール

Opening address, Prof. Shimon Sakaguchi
(The Director of Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University)

Chairperson: Prof. Atsuko Sehara-Fujisawa
(Department of Growth Regulation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University)

Melanocyte stem cell and their niches

Prof. Emi Nishimura (Division of Stem Cell Medicine, Cancer Research Institute, Kanazawa University)

Aging from a stem cell perspective: niche-imposed signaling imbalance

Prof. Irina Conboy (Department of Bioengineering, University of California, Berkeley)

Niche regulation of Hematopoietic stem cells

Prof. Toshio Suda (Department of Cell Differentiation, Graduate School of Medicine, Keio University)

Lunch and Poster Session

Chairperson: Prof. Yasuhiko Tabata
(Department of Biomaterials, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University)

Single Molecule Nano-Science: Fluctuation and Function of Life

Prof. Toshio Yanagida (Graduate School of Frontier Bioscience and Graduate School of Medicine, Osaka University)

Quality control of newly synthesized proteins in the ER

Prof. Kazuhiro Nagata (Department of Molecular and Cellular Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University)

Matrix elasticity directs Stem Cell Differentiation & Cardiomyocyte De-differentiation

Prof. Dennis Discher (Biophysical Engineering Laboratory, University of Pennsylvania)

Coffee Break and Poster Session

Chairperson: Prof. Takashi Nagasawa
(Department of Immunobiology and Hematology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University)

Stem cells and neurogenesis in the adult central nervous system

Prof. Jonas Frisén (Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institute)

Induction of Pluripotency by Defined Factors

Prof. Shinya Yamanaka (Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University)

Closing remark, Prof. Norio Nakatsuji

(Department of Development and Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University)

Poster Session

POSTER 1

QUALITY CONTROL OF PROTEINS IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM.

Nobuko Hosokawa¹, Ikuo Wada², Yukiko Kamiya³, Koichi Kato^{3,4,5} and Kazuhiro Nagata¹

¹Department of Molecular and Cellular Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8397, Japan

²Department of Cell Sciences, Institute of Biomedical Sciences, Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima 932-0012, Japan

³Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences, Okazaki 444-8787, Japan

⁴Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagaya City University, Nagoya 467-8063, Japan

⁵The Glycoscience Institute, Ochanomizu University, Tokyo 112-8610, Japan

POSTER 2

THE NEW POSSIBILITY OF CHROMATIN REMODELING FACTOR IN THE TRANSCRIPTION REGULATION.

Ken I Hohmura and Kazunori Hirayoshi

Department of Ultrastructural Research studies, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

POSTER 3

CHARACTERIZATION OF TENDON AND LIGAMENT SPECIFIC ENHANCER OF THE MOUSE TENOMODULIN GENE

Yuriko Nishizaki, Yuki Sugimoto, Yuji Hiraki and Chisa Shukunami

Department of Cellular Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

POSTER 4

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY TO GENETICALLY ENGINEER STEM CELLS

Jun-ichiro Jo, Kentaro Nagane, Masaya Yamamoto and Yasuhiko Tabata

Department of Biomaterials, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

POSTER 5

BONE REGENERATION INDUCED BY BIOMOLECULES-FUNCTIONALIZED SCAFFOLDS

Masaya Yamamoto, Akishige Hokugo, Yu Kimura, Naoki Hayashi and Yasuhiko Tabata

Dept. Biomaterials, Inst. Frontier Med. Sci., Kyoto Univ., Kyoto, JAPAN

POSTER 6

BIOMATERIALS DESIGN WITH CHIMERIC PROTEINS

K. Kato, H. Sato, T. Nakaji-Hirabayashi, H. Miyazaki, M. Hiraoka and H. Iwata

Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

POSTER 7

BIOARTIFICIAL PANCREAS

Yuji Teramura and Hiroo Iwata

Department of Reporative Materials, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

POSTER 8

TCR β V TO DJ REARRANGEMENT IN THE DP THYMOCYTES IN THE PRESENCE OF AN IN-FRAME VDJ CONSTRUCT

Shinji Fujimoto

Department of Immunology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

POSTER 9

CLINICAL TRIAL OF THE NEW TREATMENT FOR OSTEONECROSIS USING AUTOLOGOUS BONE MARROW STROMAL CELLS

Tomoki Aoyama¹, Ryosuke Kakinoki², Ryosuke Ikeguchi², Koji Goto², Moritoshi Furu¹, Kinya Ito¹, Haruhito Mitsui¹, Michiko Ueda¹, Yasunari Kasai³, Eishi Ashihara³, Shinya Kimura³, Taira Maekawa³, Takashi Nakamura² and Junya Toguchida¹

¹Department of Tissue Regeneration, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

²Department of Orthopaedic Surgery, Kyoto University Hospital

³Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, Kyoto University Hospital

POSTER 10

APPLICATION OF POLYVINYL ALCOHOL (PVA) MACRO-ENCAPSULATED ISLETS IN TYPE 1 DIABETES TREATMENT

Zhi Qi, Meirigeng Qi, Naoaki Sakata, Chizuru Yamamoto, Goichi Yanai, Etsuko Ikenoue, Qian Wu, Akihito Hiura and Shoichiro Sumi

Department of Organ Reconstruction, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

POSTER 11

REGENERATION OF CENTRAL NERVES USING A COLLAGEN SCAFFOLD AND ADIPOSE-DERIVED STROMAL CELLS

Akira Nakada MD, Seijun Fukuda MD, Satoshi Ichihara MD, Toshihiko Sato MD, Shin-ichi Itoi MD, Yuji Inada MD, Katsuaki Endo MD and Tatsuo Nakamura MD

Department of Bioartificial Organs, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

POSTER 12

BIODEGRADABLE POLYMER COATING TISSUE-ENGINEERED AIRWAY PROSTHESIS

Toshihiko Sato MD¹, Akira Nakada MD¹, Naoki Nakajima, PhD² and Tatsuo Nakamura MD¹

¹Department of Bioartificial Organs, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

²Medical Simulation Engineering, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

POSTER 13

THE CULTURE OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS USING RECOMBINANT HUMAN LAMININ ISOFORMS

Takamichi Miyazaki¹, Sugiko Futaki², Kouichi Hasegawa³, Miwa Kawasaki², Noriko Sanzen², Maria Hayashi², Eihachiro Kawase³, Kiyotoshi Sekiguchi², Norio Nakatsuji^{3,4} and Hirofumi Suemori¹

¹Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University

²Institute for Protein Research, Osaka University

³Department of Development and Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

⁴Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University

POSTER 14

PRDM14 IS INVOLVED IN THE MAINTENANCE OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELL SELF-RENEWAL

Norihiro Tsuneyoshi^{1,2}, Tomoyuki Sumi¹, Hiroaki Onda³, Hiroshi Nojima³, Norio Nakatsuji^{2,4} and Hirofumi Suemori¹

¹Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

²Department of Development and Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

³Department of Molecular Genetics, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan

⁴Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

POSTER 15

EFFICIENT INDUCTION OF CARDIOGENIC PROGENITORS AND CARDIOMYOCYTES FROM EMBRYONIC AND INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

Hideki Uosaki¹, Peishi Yan^{1,2} and Jun K. Yamashita^{1,3}

¹Laboratory of Stem Cell Differentiation, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

²Department of Cardiovascular Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University

³Center for iPS Cell Research and Application, Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

POSTER 16

DIFFERENTIATION MECHANISMS OF THE ARTERIAL ENDOTHELIAL CELLS CONVERGING NOTCH AND BETA-CATENIN SIGNALING

Kohei Yamamizu¹ and Jun K. Yamashita^{1,2}

¹Laboratory of Stem Cell Differentiation, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

²Center for iPS Cell Research and Application, Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

POSTER 17

CRYOPRESERVATION OF STEM CELLS WITH NOVEL POLYAMPHOLYTES

Kazuaki Matsumura and Suong-Hyu Hyon

Department of Medical Simulation Engineering, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

POSTER 18

ENHANCEMENT OF ANTI-CANCER ACTIVITIES OF TAXOL BY FOLIC ACID ADSORPTION

Junichi Nakamura, Naoki Nakajima, Kazuaki Matsumura and Suong-Hyu Hyon

Department of Medical Simulation Engineering, Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University

POSTER 19

ESTABLISHMENT OF MOUSE INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS WITHOUT VIRAL VECTORS

Keisuke Okita¹, Masato Nakagawa^{1,2}, Hyenjong Hong², Tomoko Ichisaka^{1,3} and Shinya Yamanaka^{1~3}

¹Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University

²Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

³CREST and Yamanaka iPS Cell Project, Japan Science and Technology Agency

POSTER 20

INDUCTION OF PLURIPOTENT STEM CELLS FROM VARIOUS AGES

Kazutoshi Takahashi¹, Aki Okada¹, Midori Yokura¹, Tomoko Ichisaka^{1,3} and Shinya Yamanaka^{1~3}

¹Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University

²Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

³CREST and Yamanaka iPS Cell Project, Japan Science and Technology Agency

POSTER 21

ELEVATED, CIRCULATING TGF-BETA INHIBITS MUSCLE STEM CELL MEDIATED REGENERATION IN OLD MAMMALS

Michael J. Conboy^{1#}, Morgan E. Carlson^{1#}, Michael Hsu¹, Laurel Barchas¹, Jaemin Jeong¹, Anshu Agrawal⁴, Amanda J. Mikels³, Smita Agrawal², David V. Schaffer² and Irina M. Conboy^{1*}

¹Department of Bioengineering, University of California, Berkeley, Berkeley, California

²Department of Chemical Engineering and The Helen Wills Neuroscience Institute, University of California, Berkeley, CA

³Department of Developmental Biology, Stanford University, Stanford, CA

⁴Division of Basic and Clinical Immunology, University of California, Irvine, CA

Denotes equal first author contribution.

5-2 セミナー

開催日	講演者・所属	演 題	セミナー名	主催分野
2008. 1.15	林崎 良英 (独立行政法人 理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター 遺伝子構造・機能研究グループ)	ポストゲノムテクノロジーと FANTOM	第11回再生誘導セミナー	再生誘導研究分野
2008. 2.12	目加田 英輔 (大阪大学微生物病研究所)	遺伝子改変マウスから明らかに なってきた HB-EGF の多様な作用機構	第139回細胞生物学 セミナー	細胞機能調節学分野
2008. 2.21	小守 壽文 (長崎大学大学院医歯薬学総合 研究科)	骨細胞ネットワークによる骨量調節	生体分子設計学分野 セミナー	生体分子設計学分野
2008. 2.29	池川 志郎 (独立行政法人 理化学研究所 遺伝子多型研究センター)	骨・関節疾患のゲノム解析	生体分子設計学分野 セミナー	生体分子設計学分野
2008. 3.10	朝倉 淳 (University of Minnesota Medical School)	Muscle regeneration by muscle stem cells and vasculatures: Application of stem cell transplan- tation to muscular dystrophy	再生増殖制御学分野 セミナー	再生増殖制御学分野
2008. 3.11	野地 博行 (大阪大学産業科学研究所)	Single-molecule study of F1- ATPase and Intracellular ATP imaging	第140回細胞生物学 ジョイントセミナー	細胞機能調節学分野
2008. 3.11	平岡 泰 (大阪大学大学院生命機能研究 科・情報通信研究機構未来 ICT 研究センター)	Chromosome dynamics during meiosis in fission yeast	第140回細胞生物学 ジョイントセミナー	細胞機能調節学分野
2008. 3.14	鄭 雄一 (東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻)	骨軟骨再生のためのシグナル因子 とスカフォールド	生体分子設計学分野 セミナー	生体分子設計学分野
2008. 3.21	Rong Wang (Department of Surgery and Department of Anatomy, University of California, Sanfrancisco)	Cell-cell signaling of angiogenesis in development and disease	生体システム制御学 分野セミナー	生体システム制御学 分野
2008. 4. 1	Robert Tanguay (Department of Medicine, School of Medicine, Universite Laval)	Drosophila melanogaster as a model system for the study of aging and protein folding diseases	第141回細胞生物学 シリーズセミナー (1)	細胞機能調節学分野
2008. 4. 8	Robert Tanguay (Department of Medicine, School of Medicine, Universite Laval)	Small HSP chaperones, aging and resistance to oxidative stress in Drosophila	第141回細胞生物学 シリーズセミナー (2)	細胞機能調節学分野
2008. 4.15	Teruko Taketo (McGill University)	Regulation of meiotic divisions in the mouse oocyte	再生増殖制御学分野 セミナー	再生増殖制御学分野
2008. 4.22	Robert Tanguay (Department of Medicine, School of Medicine, Universite Laval)	Hepatocellular carcinoma in hereditary tyrosinemia: activa- tion of survival pathways and inhibition of mitochondria-medi- ated apoptosis	第141回細胞生物学 シリーズセミナー (3)	細胞機能調節学分野
2008. 5.13	Peter Bruckner (University Hospital of Muen- ster, Institute for Physiological Chemistry & Pathobiochemi- stry, Germany)	Chondrocytes sense extracellular matrix suprastructure: The never ending story of cartilage collagens	生体分子設計学分野 セミナー	生体分子設計学分野

開催日	講演者・所属	演 題	セミナー名	主催分野
2008. 7. 3	Tsvee Lapidot (Department of Immunology, Weizmann Institute, Rehovot, Israel)	Dynamic interactions between the nervous and immune systems with the microenvironment, regu- late hematopoietic stem cells	生体システム制御学 分野セミナー	生体システム制御学 分野
2008. 7.10	浜田 賢一 (徳島大学大学院ヘルスバイオ サイエンス研究部)	MRI アーチファクトフリー生体 用金合金の開発	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2008. 7.15	Bruce R. Conklin (Gladstone Institute of Cardio- vascular Disease, UCSF)	Hormone signaling in mice and stem cells: dissection, design and construction	第12回再生誘導セミ ナー	再生誘導研究分野
2008. 7.22	Phillip B. Messersmith (Biomedical Engineering Department, Northwestern University)	Mussel adhesive proteins: mechanochemistry and biologi- cally inspired polymers	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2008. 9.22	Gerd Scherer (Institute of Human Genetics and Anthropology, University of Freiburg, Freiburg, Germany)	SOX9 and campomelic dysplasia: a molecular and clinical overview	生体分子設計学分野 セミナー	生体分子設計学分野
2008. 9.22	安達 泰治 (京都大学大学院工学研究科・ 機械理工学専攻)	生体組織・細胞力学構造の機能的 適応ダイナミクス—システムバイ オメカニクス—	再生医学セミナー	組織修復材料学分野
2008.11. 6	鳥光 慶一 (NTT 物性科学基礎研究所・ 機能物質科学研究部)	受容体タンパク質のナノバイオ解 析と神経機能との融合—デバイス 創製に向けて—	再生医学セミナー	組織修復材料学分野
2008.11.17	Judith Frydman (Stanford University, USA)	Molecular origami: protein folding and misfolding in health and disease	第142回細胞生物学 セミナー	細胞機能調節学分野
2008.11.20	成瀬 恵治 (岡山大学大学院医歯薬学総合 研究科システム循環生理学)	メカニカルストレスの基礎と臨床 応用	再生医学セミナー	組織修復材料学分野
2008.11.28	KIM, YOUNG HA (Dept. of Materials Sci. & Eng., Gwangju Institute of Science and Technology)	Mechano-active tissue engi- neering	シミュレーション医 工学分野—組織修復 材料学分野合同セミ ナー	組織修復材料学分 野・シミュレーショ ン医工学分野
2008.12. 8	Ulrich Hartl (Max Planck Institute, Germany)	Protein folding by molecular chaperones	第143回細胞生物学 ジョイントセミナー	細胞機能調節学分野
2008.12. 8	Manajit Hayer-Hartl (Max Planck Institute, Germany)	Chaperone-assisted assembly: The Rubisco paradigm	第143回細胞生物学 ジョイントセミナー	細胞機能調節学分野

5-3 研究発表会

第4回再生医科学研究所 若手発表会プログラム（日時：2008年1月18日 場所：東館5階ルーフトラス）

発表者	所属	演題名
小原 洋志	生体システム制御学分野	ウイルスに対する自然免疫に重要な形質細胞様樹状細胞の発生とケモカイン CXCL12
島 友子	生体機能調節学分野	アロ抗原により誘導される制御性T細胞の動態解析
滝本 晶	生体分子設計学分野	VEGF-A による軟骨性骨原基への血管侵入制御
山水 康平	幹細胞分化制御研究領域	ES 細胞を用いた動脈分化機構の解析
田邊 剛士	再生誘導研究分野	選択レポーターを持たない成体由来細胞からの iPS 誘導
中村 友紀	再生誘導研究分野	未分化 ES 細胞に高発現する 2 因子, ECAT15-1 と ECAT15-2 の機能解析
入江 直樹	再生増殖制御学分野	発生秒時計モデルの検証～進化と胚発生の関係は？～
湯本法 弘	再生増殖制御学分野	神経筋接合部における meltrin beta/ADAM19 の Eph-ephrin シグナルを介した役割
林 英樹	生体修復応用分野	Meninges によるドーパミン産生神経の誘導—SDIA 法と Wnt の関わり
土井 大輔	生体修復応用分野	パーキンソン病に対する ES 細胞由来の細胞移植治療における細胞純化方法の検討
北村 朗	細胞機能調節学分野	生細胞内分光イメージング法を用いた変異 SOD1 タンパク質の凝集ならびに脱凝集過程の時空間的解析
根本 悠宇里	ナノバイオプロセス研究領域	細胞膜中コレステロールの短寿命共局在の 1 分子追跡と検出
金 永輝	組織再生応用分野	間葉系幹細胞培養条件検討の際の p16 の有用性
城 潤一郎	生体材料学分野	幹細胞への遺伝子導入技術の開発
木村 祐	生体材料学分野	生理活性物質の徐放化と足場材料による生体組織の再生誘導
山口 武志	シミュレーション医工学研究領域	SQUID（超伝導磁気センサ）による生体磁場測定
裴 庭胤	シミュレーション医工学研究領域	NF- κ B と細胞周期関連遺伝子の発現調節を通じた緑茶ポリフェノールによる軟骨組織の保存と移植
中路 正	組織修復材料学分野	キメラタンパク質を利用した神経幹細胞の増殖・分化制御材料の合理的設計

5-4 学術講演会・シンポジウム・研究会等

医工学フォーラム—2007年度特別学術講演会—

開催日：2008年2月20日（水）

会 場：京大会館

会 長：岩田 博夫

開会の挨拶

医工学フォーラム会長 岩田 博夫（組織修復材料学分野）

講 演

1. DDS 化細胞増殖因子を活用した再生誘導治療の臨床応用 田畑 泰彦（生体材料学分野）
2. 糖尿病の新たな治療を目指して—臍島細胞のナノカプセル化— 岩田 博夫（組織修復材料学分野）
3. ES 細胞を利用した神経再生医療 高橋 淳（生体修復応用分野）
4. 人工膝関節用ビタミン E (D,L- α -Tocopherol) 添加 UHMWPE の新たな展開
富田 直秀（工学研究科・バイオエンジニアリング講座医療工学分野）

特別講演 1

シミュレーション医工学と Regulatory Science

堤 定美（ナノ再生医工学研究センターシミュレーション医工学研究領域）

5. *in situ* Tissue Engineering の臨床応用と場の理論 中村 達雄（臓器再建応用分野）
6. バイオ人工膝研究の展望 角 昭一郎（器官形成応用分野）
7. 幹組織幹細胞と癌幹細胞（Part II）：治療への応用の可能性 戸口田淳也（組織再生応用分野）

特別講演 2

バイオチップと医療：現状と課題 堀池 靖浩（独立行政法人 物質・材料研究機構 フェロー）

第25回日本胆膵生理機能研究会

開催日：2008年6月21日（土）

会 場：メルパルク京都

会 長：角 昭一郎（京都大学再生医科学研究所 器官形成応用分野 准教授）

開会の辞

当番会長 角 昭一郎（京都大学再生医科学研究所器官形成応用分野）

1. 主題Ⅲ-1 その他の胆膵生理機能（外科系）

座 長 萱原 正都（金沢大学大学院医学系研究科がん局所制御学）

コメンテーター 安田 秀喜（帝京大学ちば総合医療センター）

2. 主題Ⅲ-2 その他の胆膵生理機能（内科系）

座 長 神澤 輝実（都立駒込病院内科）

コメンテーター 片岡 慶正（京都府立医科大学大学院消化器内科学）

特別講演

「自己免疫性膵炎における免疫・生理機能」

講 師 岡崎 和一（関西医科大学内科学第3講座）

司 会 角 昭一郎（京都大学再生医科学研究所 器官形成応用分野）

ランチョンセミナー

「膵癌治療—最近の話題—」

講 師 土井隆一郎（京都大学大学院医学研究科外科学講座 肝胆膵・移植外科学分野）

司 会 太田 哲生（金沢大学医学部附属病院 肝胆膵・移植外科）

3. 主題Ⅰ これからの ERCP

座 長 清水 京子（東京女子医科大学消化器内科）

コメンテーター 海野 倫明（東北大学大学院医学系研究科消化器外科学分野）

4. 主題Ⅲ-3 その他の胆膵生理機能（膵外分泌）

座 長 高折 恭一（京都大学医学研究科肝胆膵・移植外科）

コメンテーター 中村 光男（弘前大学医学部保健学科）

5. 主題Ⅲ-4 その他の胆膵生理機能（膵内分泌）

座 長 下田 貢（獨協医科大学第二外科）

コメンテーター 伊佐地秀司（三重大学大学院肝胆膵・乳腺外科）

6. 主題Ⅱ 胆・膵の再生医療

座 長 野口 洋文（名古屋大学医学部・大学院医学系研究科/ベイラー研究所）

コメンテーター 剣持 敬（国立病院機構千葉東病院外科）

閉会の辞

日本学術会議シンポジウム

「私はなぜ生命科学研究者になったのか—細胞生物学の魅力」

開催日：2008年10月28日（火）

会 場：京都大学医学部芝蘭会館稲盛ホール

世話人：永田 和宏（京都大学再生医科学研究所 教授，学術会議細胞生物学分科会）

塩田 浩平（京都大学 副学長，医学研究科 教授，学術会議形態・細胞生物医科学分科会）

演者・演題：

郷 通子（お茶の水女子大学 学長）

「気がつけば生命科学に：科学に境界はない」

竹市 雅俊（理化学研究所 発生再生センター長）

「限らない生物学の楽しみ」

吉田 賢右（東工大 資源化学研究所長）

「細胞エネルギーの源を探る」

成宮 周（京都大学医学研究科 教授）

「医学研究の楽しみと人生」

山中 伸弥（京都大学再生医科学研究所 教授/iPS 細胞研究センター長）

「整形外科医が幹細胞研究者になった理由（わけ）」

京都大学再生医科学研究所 第3回公開講演会

再生医学に必要なもの—からだの自然治癒力とともに—

開催日：2008年7月26日（土） 午後2時00分～午後4時10分

会 場：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

「からだを守る免疫の不思議」

再生医科学研究所 所長 坂口 志文 教授

「ここまで進んだからだをよみがえらせる材料」

再生医科学研究所 田畑 泰彦 教授

6. 共同研究

2008年度共同研究課題一覧

研 究 代 表 者	再生医科学研究所共同研究者	研 究 課 題
久保田広志 准教授 (秋田大学工学資源学部)	永田 和宏 教 授 (細胞機能調節学分野)	タンパク質品質管理機構の研究
中村 雅也 専任講師 (慶應義塾大学医学部)	田畑 泰彦 教 授 (生体材料学分野)	生体吸収性高分子バイオマテリアルを利用した末梢神経の再生修復
鄭 雄一 教 授 (東京大学大学院工学系研究科)	宿南 知佐 准教授 (生体分子設計学分野)	歯周組織における Tenomodulin 機能の解明
庭野 道夫 教 授 (東北大学電気通信研究所)	岩田 博夫 教 授 (組織修復材料学分野)	高感度分光法による細胞機能計測機器の開発
白吉 安昭 准教授 (鳥取大学大学院医学系研究科)	川瀬栄八郎 NEDO 講師 (発生分化研究分野)	ヒト心臓ペースメーカー細胞の樹立と心疾患研究
大森 孝一 教 授 (福島県立医科大学)	中村 達雄 准教授 (臓器再建応用分野)	<i>in situ</i> Tissue Engineering の臨床応用に関する研究
島田 義也 グループリーダー (放射線医学総合研究所)	藤本 真慈 助 教 (再生免疫学分野)	胸腺再生過程で高頻度に発生する胸腺リンパ腫と Notch1 遺伝子部分欠損の解析

7. 協議員・運営委員・教職員等名簿

(平成21年1月1日現在)

◆ 京都大学再生医科学研究所協議員（所外）◆

中 畑 龍 俊（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）
鍋 島 陽 一（京都大学大学院医学研究科教授）
伊 藤 紳三郎（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（東北大学大学院医学系研究科教授）

◆ 京都大学再生医科学研究所教職員等 ◆

所長（兼）：坂 口 志 文 副所長（兼）：戸口田 淳 也、開 祐 司

■ 生体機能学研究部門 ■

〈細胞機能調節学分野〉

教授：永田和宏 准教授：細川暢子 助教：寶関 淳

技能職員：島田道子 教務補佐員：石田玉美、金森和美

技能補佐員：中川澄江 技術補佐員：福田泰子

研究員（科学研究）：森戸大介 大学院生：石田義人、潮田 亮、平山尚志郎、新木和孝、石川善弘、杉浦仁美、萩原誠智、
真砂有作、川崎邦人、森本宣光、山谷 理、飯田恭崇、嶋崎雅広

〈生体微細構造学分野〉

講師：平芳一法 研修員：法邑賢一

〈生体機能調節学分野〉

教授：坂口志文 助教：山口智之 講師（非常勤）：坂口教子、小野昌弘、大倉永也

JST 研究補助員：森田博子 特任事務職員：高山みな 教務補佐員：柴田 茜 特任研究員：橋本 求

研究員（科学研究）：佐々木直人

大学院生：前田伸治、瓜生英尚、吉岡弓子、Paz Prieto Martin、瀬藤和也、野田裕美、大崎一直、藤森千尋

〈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：大澤 梓

研究員（研究機関）：小原洋志

大学院生：野田麻実子、梶原 茜（休学中）、藤本七恵（休学中）、長岡 真

〈生体再建学分野（国内客員）〉

准教授：池川志郎

■ 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 助教：近藤俊哉 講師（非常勤）：近藤 淳，鄭 雄一，小守壽文
 教務補佐員：滝本 晶 技術補佐員：杉山弘美
 大学院生：杉本由紀，毛利公美，佐野寛子，島村仁子 研究員（科学研究）：西崎有利子 教務補佐員：三浦重徳
 外国人共同研究者：韓 麗娜

〈生体材料学分野〉

教授：田畑泰彦 助教：山本雅哉 講師（非常勤）：原島秀吉，中村雅也，金田安史
 日本学術振興会特別研究員：柳原佳奈 事務補佐員：馬場恭子 技術補佐員：吉田久子 教務補佐員：森田美枝
 大学院生：木村 祐，劉 健，高本智紹，根来宏光，河井可奈江，高藤義正，谷郷智美，土井規央，炭多晃波，折口智哉，
 大野由尊，木戸祐一郎，林健太郎，村上裕子，岩本貴寛，川崎博之，白井智明，戸田裕之
 受託研究員：安部智之，堀内祥行，川上尚章，中村健太郎 研究員（NEDO）：城潤一郎 民間等共同研究員：園田 浩
 研究生：高岡良平 日本学術振興会外国人特別研究員：林 雪 特別研究学生：浅野一成

〈組織修復材料学分野〉

教授：岩田博夫 准教授：加藤功一 講師（非常勤）：宇山良公
 事務補佐員：鈴木義子
 大学院生：中路 正，陳 顥，Nguyen Minh Luan，上田祐介，江田昇平，川越雅子，苗村祥太，EGAWA Edgar Yuji，
 小長谷周平，西垣達矢，山本寿弘，山本英樹
 民間等共同研究員：戸田満秋 研究員（研究機関）：Njatawidjaja Ellyana

〈生体物性学分野（国内客員）〉

准教授：平井洋平

■ 再生統御学研究部門 ■

〈発生分化研究分野〉

教授：中辻憲夫 NEDO 講師：川瀬栄八郎 助教：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，*富山敦美 技術補佐員：田中ます子 事務補佐員：酒井睦美，廣富ひとみ，*仙石久弥子
 大学院生：田中 敬，熊谷英明 民間等共同研究員：多田政子

〈再生誘導研究分野〉

教授：山中伸弥 助教：中川誠人 特定拠点助教：*高橋和利，*沖田圭介
 JST 技術員：*一阪朋子，*成田 恵，関ひとみ 特定研究員（産官学連携）：*小柳三千代，*吉田善紀，*瀧澤奈々子
 特定研究員（WPI）：*與倉みどり 特任研究員：*八戸宏二郎，*前川桃子 教務補佐員：*岡田亜紀
 技能補佐員：*飯塚當近 事務補佐員：*井山諒子 派遣事務員：*西川絵里，*丸橋乃律代
 派遣技術員：*澁川 蘭，*小西 制，*松村泰子，*西川美里 外国人共同研究者：*Marc P.A. Lewitzky
 JST 研究補助員：*加藤里絵
 日本学術振興会特別研究員：青井貴之 大学院生：今村公紀，坪岡則子，三浦恭子，岩渕久美子，梶原正俊，田邊剛士，
 中村友紀，洪 炫禎，大貫茉莉，望月裕司，福原晶子，田中孝之

〈再生増殖制御学分野〉

教授：瀬原淳子 助教：栗崎知浩 講師（非常勤）：月田早智子 特定研究員（グローバル COE）：△飯田敦夫
 研究員（学術支援）：栗崎智美 日本学術振興会特別研究員：佐藤文規 事務補佐員：倉澤祥子
 技術補佐員：黒田信子 教務補佐員：高塚志保 特定研究員（WPI）：*桜井英俊
 大学院生：木村剛隆，坂口和弥，木村祐介，酒井大史，坂口泰子，佐藤洋旭

〈再生免疫学分野〉

准教授：喜納辰夫 助教：藤本真慈

■ 再生医学応用研究部門 ■

〈生体修復応用分野〉

准教授：高橋 淳 研究員（産官学連携）：森實飛鳥 事務補佐員：五味淵淑子 技術補佐員：窪田 慶，勝川美都子
大学院生：土井大輔，菊地哲広，五味正憲，鷺田和夫，北村彰浩，吉川達也，植村 真

〈組織再生応用分野〉

教授：戸口田淳也 助教：青山朋樹 民間等共同研究員：小林 明 研究員（学術支援）：加藤友久
事務補佐員：安田尚代，安藤嘉奈子 技術補佐員：上田路子，小林由紀子
大学院生：布留守敏，伊藤錦哉，金 永輝，梶田洋一郎，那須 輝，三井裕人，末吉達也，笠原 崇，早川和男
外国人共同研究者：Elalaf Hassan

〈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，小林直哉 研究員（学術研究奨励）：漆 智
事務補佐員：菊地裕子
大学院生：池之上悦子 研究生：星野順一，呉 倩 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，稻田有史，堀 義生，茂野啓示，萩原明於
技術補佐員：矢延聡枝，瀬尾華奈
大学院生：佐藤寿彦，小林丈士，島田英徳
研究生：井上勝也，町口敏彦，畑山敬秀，瀬川篤典
研修員：井上祐利，中田 顕 特別研究学生：塩谷伊毅，平崎憲範

〈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）：坂口志文 副施設長（兼）：戸口田淳也
准教授：近藤 玄 技術職員：出口央士
技能補佐員：古卿智英，人見博子，石丸英典，細田 勝，西山尚之，柴田 豊，森本幸子，田中正行，大川実穂，藤田 章，
竹明フサ
JST：谷 妙子（研究補助員） 技術補佐員：折橋 郁，渡邊仁美

■ 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 特定研究員（NEDO）：石井隆道 研究員（NEDO）：宮崎隆道
研究員（WPI）：*山内香織 教務補佐員：采女久実子，後藤律子 大学院生：福光 剣，恒吉法尋，武内大輝

〈幹細胞分化制御研究領域〉

准教授：山下 潤 大学院生：星野託広，栖崎元太，魚崎英毅，山水康平，藤原正隆，顔 培美，松永太一，寺西瑞恵
教務補佐員：村山千里，佐藤瑞穂 研究員（NEDO）：蟹江美奈

〈幹細胞加工研究領域〉

准教授：多田 高 教務補佐員：◇福地恵美
大学院生：山口新平，平野邦生，長田翔伍

〈細胞プロセッシング研究領域（客員）〉

教授：高橋恒夫 准教授：古江－楠田美保

研究員（特別教育研究）（CPC 主任）：高田 圭 技術補佐員：濱生麻里

〈再プログラム化研究領域（客員）〉

教授：鳥居隆三

■ 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

大学院生：石橋宗典，西村博仁，梅村康浩，廣澤幸一郎，根本悠宇里，柴田明裕，田中賢治，Sven Rasidi，後神秀考，杉田 守，瀧澤勇介

民間等共同研究員：※鈴木健一，※藤原敬宏，※岩沢こころ，※本田郁子，※笠井倫志，※吉村英哲，※中田千枝子，※Rahul Chadda，※渋谷周作

JST (ICORP) 技術員：坪井久恵，八原雅子，土方博子

教務補佐員：※金政宏治，※藤原順子，※富永正江，※入谷真由子 技術補佐員：※Ankita Chadda

〈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）：南部敏之，茂木伸夫，中島直喜 特任助教：松村和明

事務補佐員：小柴里美 教務補佐員：○金 学嬉，○裏 庭胤 研究員（研究機関）：曹 漢姫

大学院生：中井隆介，中村淳一，堀内 亮，加藤希理子，高山 了

研究員（産官学連携）：東 高志

研究生：城眞理子

民間等共同研究員：須賀井一

〈ナノバイオメカニズム研究領域〉

助教：都賀谷紀宏

〈再生医工学研究領域（外国人客員）〉

（欠員中）

■ 技 術 部 ■

技術専門員：松下隆壽 技術専門職員：小岸久美子

■ 事 務 部 ■

事務長：小山房男

専門職員（総務グループ長）：旗谷文一 主任：坂 令子 事務職員：木村 彩 事務補佐員：中瀬安子，戸倉理恵子，小山みさを 専門職員（共同利用グループ長）：神田俊明 派遣職員：藤田彩子

専門職員（経理グループ長）：重光一夫 専門職員：福島慎吉 主任：三原一晃

事務職員：勝 清香，西坂加奈，高橋江里 事務補佐員：上村幸代，戸嶋素子，緒方康子 派遣職員：鎌田亜希子

■ ナノメディシン融合教育ユニット ■

科学技術振興助教：外波弘之，有馬祐介

教務補佐員：井上加代子

※：物質－細胞統合システム拠点所属

◇：工学研究科所属

△：医学研究科所属

○：医学部附属病院所属

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences
Kyoto University 2008

京都大学再生医科学研究所年報2008

2009年 3 月18日 印刷 2009年 3 月25日 発行

発 行 京都大学再生医科学研究所
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53

印 刷 山代印刷株式会社
