

発生・分化・成育を規定する因子と医薬品等の影響評価に関する研究 (平成 18～20 年度)

世話人 山口 照 英

I. 事業目的

近年、再生医療や癌の分化誘導療法といった発生・分化・成育と言った生命の基本現象を意図的に制御することにより有用な医薬品を創生する試みが数多く行われる様になり、これまで有効な治療法の無かった疾病への適応も期待され、非常に活発な医薬品開発が進行している。一方、環境ホルモンに代表される様に逆に様々な化学物質が非常に低濃度でこのような発生・分化・成育現象を望ましくない方向に変えてしまうこと知られる様になり、新たな対応が必要となってきた。従って、発生・分化・成育の意図的な制御を目的とした医薬品の有用性や安全性確保においてその機作の分子レベルでの解明や評価法の開発が望まれる一方で、化学物質等の発生・分化・成育への望ましくない作用を適切に評価することや有用な評価法の開発が、毒性回避や望ましくない作用をできる限り低減化するために必要とされている。一方、発生・分化・成育の意図的な制御や化学物質等による望ましくない作用にせよ、その作用発現は転写制御やシグナル伝達、あるいは細胞外での情報伝達等を介する場合など様々な作用点から誘起されると考えられている。本研究においては、発生・分化・成育を制御することを目的とした、あるいはこれらを制御する作用を有する医薬品および化学物質等の評価法開発を目的として、その作用機序の解明も含めて総合的に研究を実施した。

II. 事業概要

発生・分化・成育を制御する医薬品や有用物質、あるいは望ましくない作用を有する化学物質等を取り上げ、その作用機序を分子レベルで明らかにすると共に、それぞれの医薬品や化学物質のターゲット分子の解明を目指した。本研究により、発生・分化・成育の影響を与える医薬品や化学物質の作用機作について分子レベルでの解明が進んだことにより、医薬品や化学物質のより適切な品質・安全性評価手法開発が進むとともに新規医薬品開発のシーズ提供にもつながったと考えられる。事業は所内12部（遺伝子細胞医薬部、医薬安全科学部、環境衛生化学部、機能生化学部、食品部、生物薬品部、代謝生化学部、毒性部、病理部、薬理部、有機化学部、療品部）が分担して遂行した。

なお、動物実験は、動物実験指針等を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに採取された試料を使用するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で研究を実施した。

III. 分担研究

(1) 心筋の肥大および線維化を規定する因子の解明

遺伝子細胞医薬部 佐藤陽治・鈴木和博

1-1 研究要旨：心不全の一因とされている心筋の病的線維化の発症に心筋細胞から放出されるヌクレオチド、心筋細胞のP2Y6受容体、およびG蛋白質アイソフォームGα12/13が関与することを、トランスジェニックマウス等を用いて明らかにした。

1-2 研究目的：圧付加心肥大に付随して発生する心筋線維化に、G蛋白質アイソフォームGα12/13が仲介する細胞情報伝達経路が関与するという仮説を検証すると同時に、情報伝達経路の詳細を解明する。

1-3 研究方法：Gα12/13阻害ペプチド (p115RGS) を過剰発現した培養ラット心筋細胞もしくはp115RGSを心筋細胞特異的に過剰発現したトランスジェニックマウス (p115-Tg) の心筋に機械的負荷を課し、心筋細胞肥大および心筋線維化を検討した。また、Gα12/13の関与する情報伝達経路の各種阻害剤を用い、肥大および線維化に寄与する因子を同定した。

1-4 研究成果：大動脈狭窄による圧負荷によりp115-Tgマウスは野性型と同程度の心肥大を示したものの、心筋線維化は抑制されていた。p115RGSを過剰発現した培養ラット心筋細胞に機械的進展を加えたところ、ATPおよびUDPの放出が確認され、ヘミチャネル阻害剤およびP2Y6受容体阻害剤によりRhoの活性化および線維化促進因子 (CTGF, Periostin, TGFβ) の発現が阻害された。進展刺激による細胞外へのヌクレオチド放出は、ヘミチャネルの一種パネキシンのRNAiにより抑制された。

1-5 考察：心筋への圧負荷においては、機械的進展刺激により心筋細胞からパネキシンを通じてヌクレオチド放出され、細胞外からP2Y6受容体に作用し、線維化促進因子の心筋細胞における発現を促進することにより、心

筋線維化が亢進することが示唆された。また、Ga12/13の阻害剤は心筋の異常なリモデリングの予防薬となりうると考えられた。

(2) 遺伝子発現を指標とする化学物質の安全性評価法に関する研究

医薬安全科学部 長谷川隆一・頭金正博・黒瀬光一

2-1 研究要旨：アフリカツメガエルの初期胚をモデルとして、ビスフェノールAを暴露した際の形態形成異常および遺伝子発現に及ぼす影響を調べたところ、神経胚後期から尾芽胚後期にかけて、脳やせき髄などの中枢神経系を形成する細胞で、多数のアポトーシス細胞が検出された。また、遺伝子発現をマイクロアレイで分析したところ、エストラジオール暴露とは異なった変動パターンが観察された。

2-2 研究目的：個体形成に重要な時期である発生初期における化学物質の影響を調べるため、アフリカツメガエルの初期胚をモデルとして、ビスフェノールAを暴露した際の形態形成異常および遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。

2-3 研究方法：アフリカツメガエルの桑実胚に種々の濃度のビスフェノールAを暴露し、形態形成を観察するとともに、マイクロアレイを用いて9,600種類の遺伝子の発現に対する影響を調べた。

2-4-1 研究成果①発生初期の形態形成に及ぼすビスフェノールAの影響：20 μMのビスフェノールAを暴露した初期胚では、神経胚後期から尾芽胚後期にかけて、脳やせき髄などの中枢神経系を形成する細胞で、多数のアポトーシス細胞が検出された(表1)。一方、類似の形態異常をおこす10 μMのエストラジオールを暴露した初期胚ではアポトーシスを起こした細胞は観察されなかった。

表1 各発生段階における非暴露胚とビスフェノールA暴露胚の生存比率

	胚の個数	神経胚まで	尾芽胚中期まで	尾芽胚後期まで
非暴露胚	274	92.3%	92.3%	91.6%
10 μM BPA	269	94.1%	94.1%	93.7%
20 μM BPA	268	92.5%	92.5%	89.6%

2-4-2 研究成果②発生初期の遺伝子発現に及ぼすビスフェノールAの影響：ビスフェノールAを暴露した尾芽胚中期の胚での9,600種類の遺伝子の発現を測定したところ、ビスフェノールA暴露胚と被暴露胚を比べて発現量に変化が見られた遺伝子は、10 μMで344種類、20 μMで281種類あり、形態異常を起こさなかった10 μMビスフェノールA暴露胚でも遺伝子レベルでは変化が見られた(表2)。一方、10 μMのエストラジオールを暴露した初期胚で発現量が変動した遺伝子群を、ビスフェノールA暴露群と比較すると、共通の遺伝子はあまり見られなかった。

表2(A) ビスフェノールA暴露で変動した遺伝子群(のう胚および尾芽胚由来遺伝子 3840 個)

シグナル強度 変動幅(倍数)	10 μM	20 μM
-3 以下	0	0
-3 ~ -2	5	9
2 ~ 3	31	19
3 以上	0	0

表2(B) ビスフェノールA暴露で変動した遺伝子群(母性由来遺伝子 5760 個)

シグナル強度 変動幅(倍数)	10 μM	20 μM
-3 以下	0	0
-3 ~ -2	49	49
2 ~ 3	251	182
3 以上	8	22

2-5 考察：ビスフェノールAはエストロゲン様作用を示す内分泌攪乱物質であると考えられているが、アフリカツメガエルをモデル動物とした初期胚への影響を、形態形成および遺伝子発現を指標として比較するとビスフェノールAとエストラジオールでは共通性は少なく、ビスフェノールAの作用機構はエストラジオールとは異なることが示唆された。また、遺伝子発現を指標にした場合、形態形成よりも低濃度で発生の異常を検出できることが明らかになった。

(3) 医薬品類の塩素処理生成物の健康影響評価

環境衛生化学部 西村哲司・清水久美子

3-1 研究要旨：環境水中から検出される頻度が比較的高い医薬品有効成分原体12種を選択し、塩素反応後の生成物を抽出し、心筋細胞分化に対する影響を検討した。

未分化ES細胞に対する細胞毒性発現EC20に相当する濃度で分化0日目～7日目まで曝露した結果、エリスロマイシン、フェノフィブレートおよびクロロテトラサイクリンの塩素処理生成物は分化誘導を遅延する可能性が、メフェナム酸は細胞毒性が低いにも拘らず分化誘導に影響を及ぼさないと考えられた。

3-2 研究目的：ほとんどの医薬品類は、疾患治療のために処方使用された後、生体を通り排泄されて環境水中に放出される。したがって、生理活性を有する原体も排泄されることが知られており、環境中に存在する調査結果が報告されている。また、環境水中では、光や温度などの物理化学的な要因による酸化、還元、加水分解、光分解の他、微生物による代謝などを受け、医薬品としての有効成分は原体とは異なった様々な反応生成物が生成していることが推測される。一方、環境水中に存在する医

薬品の有効成分原体は、下水処理や浄水処理工程で塩素処理を受けることがある。これらの医薬品有効成分原体の塩素反応における挙動や、生物に対する影響に関しては情報がほとんどない。本研究では、環境水中から検出される頻度が比較的高い医薬品有効成分原体12種を選択し、塩素反応後の生成物を抽出し、生物に対する影響を検討した。

3-3 研究方法：

3-3-1 試薬：①エリスロマイシン（和光純薬工業（株））、②メフェナム酸()、③ベザフィブラート（アルドリッチーシグマ社）、④フェノフィブラート（アルドリッチーシグマ社）、⑤パロキセチン（TRC社）、⑥テトラサイクリン（MP Biochemical社）、⑦トリクロサン（CALBIOCHEM社）、⑧ロキスロマイシン（和光純薬工業（株））、⑨ジクロフェナック（アルドリッチーシグマ社）、⑩クロロテトラサイクリン（関東化学（株））、⑪オキシテトラサイクリン（和光純薬工業（株））、⑫フルロキサミン（TOCRIS社）の、市販されている試薬純度の製品を使用した。

3-3-2 標準溶液：メチルアルコールで500μg/mL溶液を調整し、使用時まで-20℃に保存した。

塩素処理反応：10mMリン酸水溶液（pH7.0）500mLに対し、1000μLの500μg/mLのメチルアルコール標準溶液を添加し、室温で10分間攪拌した。さらに、初期遊離塩素濃度が1mg/Lになるように次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加し、室温で2時間間攪拌して、塩素反応させた。

3-3-3 塩素反応生成物の抽出：塩素反応終了後、10mg/mlのアスコルビン酸ナトリウム溶液を250μL添加し、残留塩素を除去した。20%硝酸水溶液を適量加え、pH値を2に調整した後、ジクロロメタン5mL、メチルアルコール5mLおよび精製水5mLを順次通した固相カートリッジ Oasis HLBに、10mL/分の流速で通水した。固相カートリッジは、精製水を20mL通水した後、空気を5分間およ

び窒素を5分間、順次通気して乾燥した。固相カートリッジにジクロロメタン5mLを通して、吸着成分を溶出した。溶出溶液は、減圧濃縮により乾固し、ジメチルスルホキシド（DMSO）で1mLに定容し、試験溶液とした。

3-3-4 培養細胞の準備：細胞は、マウス幹細胞(ES細胞)とヒト肝がん由来樹立細胞(HepG2細胞)を用いた。ES細胞では、0.1% Gelatinを予めコーティングした96well white plate 6枚にマウス線維芽細胞を1x10⁵ cells/ml、0.2ml/wellを植え、2時間後に線維芽細胞が接着したことを確認後、ES細胞を1x10⁵ cells/ml、0.2ml/wellを植え、24時間培養した。HepG2細胞では、96well white plate 6枚に1x10⁵ cells/ml、0.2ml/wellを植え、24時間培養した。

3-3-5 塩素反応生成物の細胞への曝露：12種の抽出されたDMSO溶液を100%として、DMSOで等倍段階希釈を行ない、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625%のDMSO溶液を調整した。24時間培養した細胞を0.5% FCS medium、0.2ml/wellで培地交換し、段階希釈したDMSO溶液をn=3で1μL/well添加し、37℃ CO₂インキュベータ内で24時間及び48時間曝露した。

3-4 研究成果：塩素反応生成物を曝露したマウスES未分化細胞について、CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega) およびLDH Cytotoxicity Detection Kit (TaKaRa)を用いて、添付されたプロトコールに従って細胞毒性に対する影響を調べた。現時点では、塩素反応生成物の分析用標準物質が入手できないため、定量的な評価はできないが、12種の塩素反応生成物は、細胞毒性が強く出る傾向が見られた。20～30%の細胞毒性が見られた濃度を、原体と塩素反応生成物の抽出効率がおおよそ同等と仮定して求めると、トリクロサン塩素処理抽出生成物の6.25ng/mL相当（以下）からメフェナム酸とジクロフェナックの12.5μg/mL相当（以下）であった（表3）。これらの医薬品成分の環境中実態濃度の測定結果では、1μg/L以上の濃度が検出されることはほ

表3 医薬品塩素処理生成物のマウス ES 細胞に対する毒性および心筋細胞分化誘導に及ぼす影響

Compounds	Roughly EC20-30 (g/mL)	Fluorescence Detection	
		7 days	11days
Erythromycin	0.25	—	±
Mefenamic acid	12.5	—	—
Bezafibrate	0.4	±	±
Fenofibrate	2.5	—	±
Paroxetine Hydrochloride	0.05	±	±
Tetracycline Free base	0.4	±	±
Triclosan	0.0625	±	±
Roxithromycin	1	±	±
Diclofenac sodium salt	12.5	±	±
Chlorotetracycline Hydrochloride	1.5	—	±
Oxytetracycline Hydrochloride	0.75	±	±
Fluvoxamine malate	0.0375	±	±

±: 蛍光タンパク質の限られた発現
 -: 蛍光タンパク質が発現認められない

とんど無いことから、20～30%の細胞毒性が見られた濃度の塩素反応生成物が環境水中に存在する可能性は低いと考えられた。また、ヒト肝がん由来HepG2細胞に対する細胞毒性を調べた結果、マウスES未分化細胞に比べ毒性が強く出る傾向が認められた。パロキセチン、トリクロサン、フルロキサミンは、両細胞に対し細胞毒性が強くでており、環境中の挙動に注意を払う必要があると考えられる。

ここで求められた濃度を用いて、我々が確立したマウスの心筋分化誘導評価系で分化過程に及ぼす影響を検討した。マウスの心筋分化誘導評価系は、蛍光タンパクを発現するベクター pZs Green 1-1に心筋分化特異的発現遺伝子であるGATA-4遺伝子のプロモーター領域を導入したプラスミドを構築し、そのプラスミドを形質導入したES細胞を心筋細胞に分化誘導させて誘導される蛍光タンパク質を指標として、曝露した化学物質の影響を評価するスクリーニング系である。各々の塩素反応生成抽出物を、細胞毒性発現EC20に相当する濃度で、分化0日目～7日目まで曝露して心筋系に分化させた。分化後、7日目と11日目の細胞のGATA-4の発現を顕微鏡にて観察した。溶媒対照では、7日目から蛍光タンパク質の誘導が認められたが、エリスロマイシン、メフェナム酸、フェノフィブレートおよびクロロテトラサイクリンを曝露した分化細胞では誘導が認められなかった。その他9物質では誘導が見られたが、GATA-4の発現が抑制される傾向にあった。11物質の暴露では11日後に誘導発現が見られたが、メフェナム酸は細胞毒性が低いにも拘らず、11日目においても認められなかった。

3-5 考察：本研究で検討した12医薬品成分の塩素反応生成物の中で、メフェナム酸は細胞毒性が低いにもかかわらず、心筋細胞分化指標遺伝子であるGATA-4の誘導が認められなかった。この結果は、メフェナム酸の塩素反応生成物は心筋分化に影響を及ぼす可能性を示唆している。しかし、本研究で用いた塩素反応生成物は固相抽出混合物であり、正確な定量ができていないことから、影響を及ぼす物質の同定および影響濃度等、さらに詳細な検討を行うことが必要である。

また、本研究で使用したマウスの心筋分化誘導評価系は、種々の化学物質が心筋へ分化誘導する過程に及ぼす影響を評価するために有効な手法であり、化学物質のスクリーニング法としての適用が期待される。

(4) 粘膜免疫および神経免疫系相互作用の機序解析

代謝生化学部 手島玲子・中村亮介

4-1 研究要旨：粘膜免疫に関係して腸管上皮細胞中 $\gamma\delta$ Tリンパ球の経口免疫寛容への影響を、 $\gamma\delta$ Tリンパ球の発現の抑えられているW/W^vマウスに野生型マウスの骨髄

細胞を移植する再構成実験より確認した。また、神経免疫系相互作用に関連して、神経細胞とマスト細胞の共存培養実験からマスト細胞から産生されるATPが神経の活性化に関与すること、ATP受容体拮抗薬により抑制されることを確認した。

4-2 研究目的：食物アレルギーの経口感作における寛容のメカニズムを知る目的で腸管上皮細胞中 $\gamma\delta$ Tリンパ球の役割の解析を行う。また、神経系と免疫系の相互作用に関与する制御因子の解析を神経系細胞とマスト細胞の共存培養系を用いて検討する。

4-3 研究方法：c-kit遺伝子に変異を持つために $\gamma\delta$ Tリンパ球の発現の抑えられているWBB6F1-W/W^v(W/W^v)マウスに野生型(C57BL/6)マウスの骨髄細胞を移植し、5ヶ月後に腸管上皮細胞中 $\gamma\delta$ Tリンパ球の再構成を確認し、卵白アルブミン経口感作実験を行い、再構成前のW/W^vマウスの感作能との比較を行った。また、頸上神経節(superior cervical ganglia (SCG))由来神経細胞とマスト細胞の共存培養系を用いて、相互作用へのATPの影響を検討した。

4-4 研究成果： $\gamma\delta$ Tリンパ球を再構成したW/W^vマウスにおいて卵白アルブミン経口感作によるIgG1抗体産生が抑えられ、経口免疫寛容が再構成前のW/W^vマウスに比べ大きく誘導されることから、 $\gamma\delta$ Tリンパ球が経口免疫寛容に重要な役割を担うこと、また、 $\gamma\delta$ Tリンパ球はc-kit陽性骨髄細胞のSCFによる分化により形成されることが示された。神経細胞とマスト細胞の共存培養実験からマスト細胞から産生されるATPが神経の活性化に関与すること、ATP受容体拮抗薬及びATP加水分解酵素により抑制されることを確認した。

4-5 考察：腸管上皮細胞中 $\gamma\delta$ Tリンパ球は、CD8陽性リンパ球であり、細胞から産生されるサイトカインを介して経口免疫寛容を成立させる役割を担っているものと考えられた。また、神経細胞とマスト細胞の共存培養実験からは、神経系細胞から産生されるサブスタンスP等の神経伝達物質ばかりでなくマスト細胞から産生されるATPも神経・マスト細胞の相互作用に関与していることが示された。

(5) 化学形に依存したヒ素の発生・分化に対する影響

食品部 長岡(浜野) 恵

5-1 研究要旨：化学形に依存したヒ素の発生・分化に対する影響を検討するために、水素化物変換ーコールドトラップー原子吸光法(HG-CT-AAS法)によるヒ素の化学形別定量法を確立した。

5-2 研究目的：ヒ素の代謝経路について含硫化合物との相互作用を含む系が報告されつつあり、近い将来、代謝マップが新しいものに塗り替えられる可能性がある。そ

ここでヒ素代謝をさらに明らかにするため、まずヒ素の形態別分析法の確立を検討した。

5-3 研究方法：ヒ素の分別定量には水素化物変換ーコールドトラップー原子吸光法（HG-CT-AAS法）を用いた。形態別ヒ素分離システム：島津ASA-2sp, 原子吸光分光光度計：サーモエレメンタルSOLAAR M5。

5-4 研究成果：無機ヒ素、モノメチルアルソン酸、ジメチルアルシン酸、トリメチルアルシンオキシドの4種のヒ素化合物の分別定量を、水素化物変換ーコールドトラップー原子吸光法（HG-CT-AAS法）を用いて行うための最適な分析条件を確立した。

5-5 考察：ヒ素代謝についてはこれまでメチル化機構の代謝経路が確立され、長年信じられてきたが、含硫化合物との相互作用を含む新しい代謝経路についての報告がなされつつある。含硫化合物との関連について、今後、HPLC/HR-ICP-MS法を用いた研究が必要と考えられた。

(6) AC133陽性細胞由来early EPCの分化に対するThrombopoietinの促進効果に関する研究

生物薬品部 豊田淑江・石井明子・山口照英

6-1 研究要旨：血管内皮前駆細胞（EPC: Endothelial Progenitor Cells）の中でも細胞・組織加工医薬品として有用性が高いと期待されるearly EPCに着目し、AC133陽性の幹細胞画分からearly EPCを効率よく誘導する方法の開発を試みた。Early EPCの分化に対するstatin類等の各種医薬品や生理活性物質の影響を評価したところ、Thrombopoietin（TPO）がearly EPCの分化促進活性を持つことを見出すことができ、TPOを用いてearly EPCの誘導効率を改善することができた。また、TPOのシグナル伝達が血管内皮細胞増殖因子VEGFとは異なること、TPOとVEGFが相乗的に作用することを明らかにした。

6-2 研究目的：現在、虚血性心疾患や下肢虚血疾患などの重症虚血性疾患患者に対して、血管内皮前駆細胞の起源細胞を含む骨髄あるいは末梢血由来単核球を虚血部位に移植するという血管再生療法が臨床研究や先進医療として実施されている。しかし、多様な細胞を含む単核球画分を投与することにより有害作用が生じる可能性も懸念されることから、有効成分である血管内皮前駆細胞のみをex vivoで調製し、一定の品質・有効性・安全性が確保された細胞・組織医薬品として提供することにより、血管再生療法の有効性・安全性を向上させることが望まれている。本研究では、血管新生に関わるサイトカイン類を放出することから細胞・組織加工医薬品として有用性が高いと期待されるearly EPCに着目し、early EPCの分化誘導を促進する方法の探索を行った。

6-3 研究方法：末梢血より分離したバフィーコートあるいは臍帯血を2mM EDTAを含むPBS(-)で2倍希釈し、

Lymphoprep tubeを用いた遠心法により単核球を分離した。分離した単核球を抗AC133抗体-マイクロビーズと4°Cで30分反応させ、Auto MACS (Milteny Biotec)を用いてAC133陽性細胞を分離した。AC133陽性細胞は20%ウシ胎児血清(FBS), 50 ng/ml VEGF, 50 ng/ml TPO, を含むEBM-2培地に浮遊させ培養した。なお、末梢血バフィーコートは埼玉赤十字血液センターより、臍帯血は東京赤十字血液センター臍帯血バンクより提供された。

6-4 研究成果：我々はこれまで、ヒト末梢血あるいは臍帯血から分画したAC133陽性細胞からearly EPCを分化誘導する系を確立し、AC133陽性細胞に由来するCD31強陽性細胞が高活性なearly EPCであることを報告してきた (Kanayasu-Toyoda et al. J. Cell. Physiol. 195, 19, 2003)。本研究において、*in vitro*でearly EPCを分化誘導する物質を探索した結果、TPOがAC133陽性細胞から分化するCD31強陽性early EPCを増加させることを見出すことができた。

1) AC133陽性細胞由来EPCの誘導系におけるTPOの効果

AC133陽性細胞にVEGFのみを添加、あるいは、VEGFとTPOの両者を添加してfibronectinプレート上で2週間培養したところ、VEGF単独群に比して、VEGF+TPO添加群でKDR陽性、eNOS陽性の接着した細胞が増加した。フローサイトメトリーによる解析で、TPOの添加によりCD31強陽性細胞が0.51%から2.80%に増加していたことから、TPOがAC133陽性細胞からearly EPCへの分化増殖を促進することが明らかとなった。

上記の検討では対照群にVEGFを添加し、VEGFにTPOを加えて比較したが、次にTPO単独の効果を検討した。AC133陽性細胞にVEGFを加えて一週間培養すると細胞総数 (Fig. 1a) は対照群と比べて増加しなかったが、CD31強陽性細胞の割合は約1.5倍とわずかではあるが上昇しており (Fig. 1b), CD31強陽性細胞数 (Fig. 1c) は

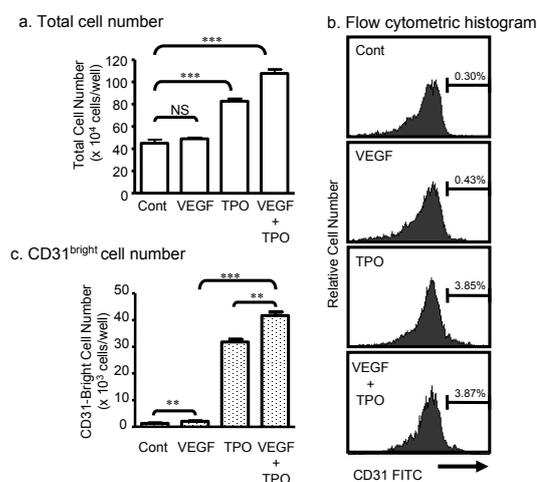


Fig. 1 Effects of TPO and VEGF on induction of CD31^{bright} early EPC.

対照群に比べて有意に増加していた。一方、TPOを加えて培養すると、細胞総数は約2倍増加 (Fig. 1a) し、CD31強陽性細胞の割合は約13倍近く上昇しており (Fig. 1b)、CD31強陽性細胞数 (Fig. 1c) は20倍以上の増加が観察された。また、VEGFとTPOを同時に添加すると細胞総数がさらに増加し、CD31強陽性細胞数は相乗的に増加していた (Fig. 1c)。

2) TPOの情報伝達経路

培養開始3日後の細胞を用い、AC133陽性細胞におけるTPOの情報伝達経路について検討した。Fig. 2に示すように、PI3K/Akt経路の活性化に重要なAktの473番目のセリンのリン酸化がTPO刺激後15分で観察された。次に、TPOあるいはVEGFで刺激15分後のPI3K/Akt経路とJAK/STAT経路の活性化を比較したところ、Aktの473番目のセリンのリン酸化はVEGFよりTPOの方が強く、両者を同時に刺激するとさらに強いリン酸化が検出された。Aktのセリンリン酸化に対して観察されたVEGFとTPOの相乗効果は、early EPC誘導において相乗効果が見られたことと一致した現象である。一方、STAT3の705番目のチロシンのリン酸化はTPOで刺激した時のみ観察された。PI3Kをその阻害剤であるワートマニンで抑制すると、early EPCの産生は有意に減少したが、その阻害が完全でなく部分的であったことから、EPC産生促進にはPI3K/Akt経路とJAK/STAT経路の両経路の活性化が重要と考えられた。また、TPOがVEGFより強いearly EPC産生促進作用をもつのはTPO単独で両経路の活性化ができることが一因であると考えられた。

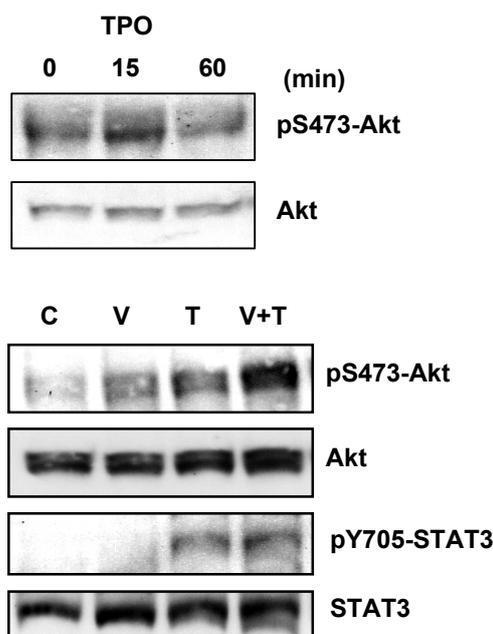


Fig. 2 TPO-induced signal transduction in AC133⁺ cells.

6-5 考察：血管内皮前駆細胞にはearly EPC とOutgrowth Endothelial Cells (OEC)という少なくとも2つのタイプがあることが知られている。early EPCは血管形成に関与するサイトカイン等を放出することにより、OECは自身が新生血管に取り込まれることにより、それぞれ血管形成に寄与すると考えられていることから、両者を併用することにより、より高い血管再生効果が期待できる。OECが増殖性の高い細胞であるのに対して、early EPCは増殖性が低く、実用化に向けては細胞調製法の確立が最大の課題である。本研究の成果は、early EPCの臨床応用に向けた有用な知見であると考えられる。

(7) 破骨細胞および脂肪細胞の分化と機能発現に関する研究

機能生化学部 安達玲子・鈴木和博・手島玲子・最上(西巻)知子

慶應義塾大学 櫻井智子・笠原忠

7-1 研究要旨：造血幹細胞より分化し骨代謝系において重要な役割を担う破骨細胞について、その分化及び機能発現において細胞骨格系の一つである中間径フィラメント（ビメンチンフィラメント）が重要な役割を果たすことを示した。また、脂肪前駆細胞を用い、 β 3アドレナリン受容体 (β 3-AdR) 発現影響評価の方法を検討した。

7-2 研究目的：①造血幹細胞より分化し骨代謝系において重要な役割を担う破骨細胞について、その分化及び機能発現における中間径フィラメント（ビメンチンフィラメント）の役割について解析する。②白色脂肪での β 3アドレナリン受容体 (β 3-AdR) 発現とその制御について、培養細胞を用いた解析方法を検討する。

7-3 研究方法：マウスマクロファージ系RAW264.7細胞に、破骨細胞の分化において重要なサイトカインであるReceptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) を添加して3日間培養し、破骨細胞に分化させた。ビメンチン及びアクチンの分布は蛍光標識抗体を用いて観察した。破骨細胞活性はOAASプレートを用いたPit formation assayにより測定した。3T3-L1脂肪前駆細胞を脂肪細胞へと分化誘導する際に薬物処理し、 β 3-AdR mRNA発現への影響を調べた。

7-4 研究成果：①RAW264.7細胞の破骨細胞への分化に伴い、中間径フィラメントを形成するビメンチンの発現が増大することを示した。また、siRNAによりビメンチン発現量を低下させた細胞では、分化後の破骨細胞において重要なアクチン細胞骨格の分布に異常が生じること、細胞が通常よりも大きく広がった形態をとること、骨吸収活性が低下することを示した。②3T3-L1細胞の分化と薬物処理のタイミングが β 3-AdR mRNA発現に及ぼす影響を解析し、 β 3-AdR mRNA発現は分化とともに上

昇することを見いだした。

7-5 考察：①中間径フィラメントであるビメンチンフィラメントは、破骨細胞分化の際、アクチン細胞骨格と相互作用しつつ、その形態維持、さらに機能発現において重要な役割を果たしているものと考えられる。②β3-AdR mRNA発現は3T3-L1細胞の分化と関連しており、分化効率に影響する薬物は、分化誘導時に処理すると評価が困難になることが判明した。

(8) 分子メカニズムに支えられた発生毒性評価系の開発

毒性部 菅野純・北嶋聡

8-1 研究要旨：3年間を通じ、遺伝子発現変動に立脚した高精度な発生毒性評価系の開発・確立を目的として、1) 無処置野生型マウス・全胚における遺伝子発現変動の経時データベースの作成[マウス胎生6.25-9.75日]、2) 催奇形性モデル物質を経胎盤投与した際のマウス胚における本手法の適用と解析、加えて3) *in vitro*の系を導入し、無処置野生型ES細胞を用いた胚様体(EB)形成における遺伝子発現変動の経時データベースの作成 [EB形成0-7日]の以上3点につき検討した。1)、3) の経時データベースは取得でき、2) については、分子標的物質が影響する想定外のシグナルカスケード、あるいは不明であった標的分子を見いだした可能性が示唆されるなど、化学物質の安全性評価上、意義深い知見が得られており、本解析手法の基本的な部分は確立されたものと考えられた。

8-2 研究目的：本研究の目的は、医薬品をはじめとする化学物質暴露時の安全性確保の観点から、遺伝子発現変動に立脚した高精度な発生毒性評価系を開発・確立することにある。げっ歯類という実験動物を用いた本研究の成果を通して、ヒトにおける発生毒性評価を、より正確に予測することができるものと期待される。

8-3 研究方法：マウスは、C57BL/6CrSlcを実験に用い、経時的にサンプリングした各ステージのマウス胚を1腹分ブールしたRNAサンプルを用い、マイクロアレイ [Affymetrix GeneChip MOE430v2] (約45,000プローブセット) を用いて、網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。胚性幹(ES)細胞はTT2を使用し、ES細胞の分化はLIF非存在下で2日間天井培養し(day2)、その後得られた胚様体(EB)を浮遊培養することによりおこなった。EBは、180個～60個(分化日数によって異なる)をブールして1サンプルとし、直接、1%の2-メルカプトエタノール含有RLTバッファーに変性・溶解させた。

催奇形性モデル物質はサイクロパミンとサリドマイドを選択した。化学物質の投与に際しては、投与経路は、妊娠マウスへの強制経口投与とし、投与容量は10 (ml/kg)、溶媒は0.5% メチルセルロースあるいはコーンオイルとし、懸濁にはメノウ鉢を使用した。用量設定実験結

果を基に投与用量を決定した。サイクロパミンは、ユリ科バイケイソウ属植物由来のアルカロイドで、妊娠羊から産まれた仔羊が単眼症を示し、*in vitro*実験にて、神経管発生等に関与するShhシグナル関連分子Smo分子を阻害することが報告された化学物質である。したがって、標的分子が一応明らかな催奇形性モデル物質である。サリドマイドは、げっ歯類で催奇形性を示さないがヒトで示し、標的分子が不明な化学物質である。

Whole mount ISHは、ジゴキシゲニンでラベルしたdNTPを用いて作製したRNAプローブを用いて、固定後プロテナーゼK処理したマウス胚とハイブリダイゼーションをおこない、検出は抗ジゴキシゲニン抗体、発色はBM purpleでおこなった。

8-4 研究成果：①無処置野生型マウス・全胚につき、胎生6.25日から9.75日まで(0.25日毎)、計12点のtime pointにつき、マウス胚1匹あたりのgenomic DNA量、total RNA量の算出、ならびにGeneChip1枚あたりに必要な胚数を算出の後、遺伝子発現変動の経時データを取得した。Shhシグナルカスケードに直接関係する各遺伝子の発現の経時変化を解析し、それぞれ同様な発現パターンを示すことが明らかとなった。②妊娠7.25日の妊娠動物にサイクロパミン(0, 30 mg/kg)を単回経口投与し、投与2, 8, 24時間後の胚RNAサンプルにつき、遺伝子発現変動解析を検討した。標的分子と考えられSmoならびにShhシグナル関連遺伝子につき検討したところ、対照群と投与群とで有意な変化が認められなかった。網羅的に遺伝子発現変動解析を検討した結果、コレステロール生合成に関わる遺伝子群の発現変動が見いだされた。妊娠7.25日の妊娠動物にサリドマイド(0, 1,000 mg/kg)を単回経口投与し、投与2, 8, 24時間後の胚RNAサンプルにつき網羅的遺伝子発現変動解析を検討し、その結果、当該分子の遺伝子欠失マウス胚のサリドマイド誘発奇形と同様な肢部での形成異常の報告がある遺伝子の発現減少が見いだされた。③無処置野生型ES細胞を用いた、EBにおける遺伝子発現変動の経時データベース [EB形成0-7日] (TIME POINT: 14点)を取得した。BrachyuryやCardiac actinなど、いくつかの分化マーカーについて、すでに取得済みのマウス無処置野生型胚のデータベースと比較し、両データベース間で同様な発現パターンを示すことが明らかとなった。

8-5 考察：①取得した、無処置野生型マウス・全胚の遺伝子発現変動の経時データは、化学物質暴露実験時の対照として有益となるだけでなく、非投与時でも、発生に関与する遺伝子群が激しく経時的に変化することから、特定のシグナルカスケードを描出できる可能性が示唆された。加えて、ある遺伝子の発現に関し、時間1点における観察だけでは、発現ピークの変化なのか位相のシフ

トなのか、あるいは両者複合なのか不明となり、化学物質影響下での比較のためには、用量依存性ととも経時変化を検討する必要があることが示唆された。②サイクロパミンあるいはサリドマイド投与の際の解析結果は、分子標的物質が影響する想定外のシグナルカスケード、あるいは不明であった標的分子を見いだした可能性を示唆しており、本解析手法が高精度な発生毒性評価系として有用であると同時に、化学物質の安全性評価上、意義深いものと考えられた。③ES分化系であるEBを用いる実験系は、*in vitro* 実験として有用であるだけでなく、より早期の胚の代替となり得ることからも有用となるものと考えられた。具体的には、マウス胚のサンプリングは、着床前後の胎生3.5日～5.5日まで困難であるが、マウス胎生3.5日の胚盤胞の内細胞塊由来のES細胞を分化させるEBは、この時期を補完できるためである。

以上のことから、本解析手法の基本的な部分は確立されたものと考えられた。

(9) ラット大腸発がん過程に出現する分化異常の発生機構と大腸発がん物質検出への応用

病理部 広瀬雅雄・西川秋佳・今井俊夫・吉田緑

9-1 研究要旨：ラット大腸中期発がんモデルにおいて出現する分化異常を呈するベータカテニン陽性の小腸上皮類似細胞は、大腸がんの前がん病変であると考えられた。またこのモデルを用いた結果、スルファサラジンは大腸発がん促進作用を有し、その機序に炎症の増強の関与が示唆された。

9-2 研究目的：ラット大腸発がん過程において小腸類似の分化異常を呈する細胞が出現するが、この分化異常と大腸発がんとの関連性を明らかにし、この分化異常が大腸発がん物質の短期検出のエンドポイントとなりうるかを検討する。

9-3 研究方法：ラットに大腸発がん物質であるジメチルヒドラジン処置後、大腸炎発生物質であるデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を投与するラット大腸中期発がんモデルを応用してスルファサラジンの発がん修飾作用を検索した。

9-4 研究成果：ラット大腸中期発がんモデルでは、パネート細胞を有する小腸上皮類似の上皮が出現し、ベータカテニン陽性であった。このモデルを応用した結果、スルファサラジンは発がん促進作用を示し、免疫組織化学、RT-PCR法の結果よりiNOS関連の遺伝子および蛋白が上昇した。

9-5 考察：ラット大腸中期発がんモデルで出現するパネート細胞を有する小腸上皮類似の上皮は、ベータカテニン陽性を示すことから前がん病変であると考えられた。また、このモデルを応用した結果、スルファサラジ

ンは大腸発がん促進作用を示し、その機序にはiNOS関連の遺伝子および蛋白の上昇が関与していると考えられた。

(10) ラット海馬アストロサイトにおけるfluoxetineのBDNF産生とadenosineの増強作用

薬理部 大久保聡子

10-1 研究要旨：ラット初代培養海馬アストロサイトの有するbrain-derived neurotrophic factor (BDNF)産生能に与える影響について、SSRI型抗うつ薬fluoxetine (FLX) 及びATPおよびその代謝物adenosineの作用を検討した。その結果、FLXはアストロサイトからのBDNF産生を促し、その作用はadenosine共存下さらに増強した。

10-2 研究目的：抗うつ薬の作用機序については「モノアミン仮説」を中心に進められてきたが、薬理作用と臨床効果発現の時間依存性の矛盾が指摘され、実際の抗うつ薬の作用機序は未解明のままである。近年、抗うつ薬はニューロンやグリア細胞の一種であるアストロサイトにおいて神経栄養因子であるBDNFを増加させることが知られており、抗うつ薬の新たな作用機序としてBDNFを介した神経新生が注目されている。一方、ATPは恒常的にアストロサイトから遊離される「グリア伝達物質」として、P2受容体を介し中枢神経系機能の制御を担う他、遊離後は速やかにadenosineまで分解され、adenosine受容体を介した機能制御を行う。アストロサイトはBDNFなど様々な神経栄養因子を放出してニューロンの機能を維持すると考えられているが、常にアストロサイトから放出され細胞周囲に存在すると考えられるATPまたはその代謝物adenosineの神経栄養因子放出に対する役割は未だ明らかでない。そこで本研究では、アストロサイトのBDNF産生に着目し、これに対する抗うつ薬FLXの効果とATP/adenosineの修飾作用について実験を行った。

10-3 研究方法：実験には生後1日目のラットより調製した海馬アストロサイト初代培養細胞を用いた。BDNF mRNA量は定量的real-time RT-PCR法、また海馬アストロサイトに発現するadenosine受容体の発現はRT-PCR法を用いて検討した。リン酸化CREB (cAMP response element-binding protein)の検出にはウエスタンブロット法を用いた。

10-4 研究成果：ATPおよびその代謝産物であるADP, AMP, adenosineの中で、adenosineが最も強くBDNF mRNA発現増強をもたらした。一方、抗うつ薬FLXによってもBDNF mRNA発現が観察された。さらにFLX存在下でadenosineの効果は相乗的に増大した。RT-PCR法及び受容体阻害薬を用いた検討により、adenosine刺激によるBDNF mRNA発現増加にはA_{2B}受容体の関与が示唆された。また、adenosine及びFLXによるBDNF mRNA発現上

昇にはMEK/ERK経路から転写因子CREBへの経路が関与することを見出した。

10-5 考察：アストロサイトはグリア伝達物質として常にATPを放出し、これは速やかにadenosineに代謝されることから、脳内には常に一定量のadenosineが存在していると考えられる。このことから、アストロサイトにおけるFLXのBDNF産生にはadenosineが常に相乗的な作用をもたらしていることが示唆され、脳内での神経新生を介する抗うつ作用発現を考える上でも有用な知見を得ることが出来た。

(11) 安全性を確保したビタミンDレセプターリガンドの創製

有機化学部 栗原正明・袴田航

11-1 研究要旨：核内レセプターのひとつであるビタミンDレセプター（VDR）は細胞の分化、骨代謝に深く関わり、創薬のターゲット分子として注目されている。しかし、血中カルシウム濃度の上昇という副作用もあり、安全性を十分確保した創薬が求められている。我々は、VDRの新規な非セコステロイド型リガンドの創製を行った。また、X線構造解析も行い、新規リガンドとVDRの結合様式も明らかにした。

11-2 研究目的：安全性を確保した新規VDRリガンドの創製を行うことを目的とする。

11-3 研究方法：コンピュータを用い、タンパク質の三次元構造に基づいた非セコステロイド型VDRリガンドの分子設計を行った。設計した分子を合成し、転写活性を評価した。

11-4 研究成果：セコステロイド骨格を持たない新規リガンドYR301の創製を行った。YR301は活性型ビタミンD₃に匹敵する転写活性を示した。また、このYR301とビタミンDレセプター（VDR）の複合体のX線構造解析に成功した。

11-5 考察：内在性のリガンドである活性型ビタミンD₃はビタミンDレセプター（VDR）の6つの残基（Tyr143, Ser237, Arg274, Ser278, His305, His397）と水素結合を形成しているが、YR301では6残基うち2残基（Tyr143, Ser278）とは水素結合を形成していなかった。にもかかわらず、YR301は活性型ビタミンD₃に匹敵する転写活性を示した。これは今後のリガンド設計に大きな情報を与える。

(12) 骨接合材料の高度安全性評価手法の開発

療品部 伊佐間和郎・土屋利江

12-1 研究要旨：直接接触法によるコロニー法を用いて、Ti-Ni合金等の細胞毒性を評価した。また、in vitroアパタイト形成能試験に用いる擬似体液として、カルシウム

及びマグネシウムイオンを含有するハンスク平衡塩溶液の有用性を確認した。さらに、Ti合金のアパタイト形成能を定量的に評価するために、フーリエ変換赤外光音響分光（FT-IR/PAS）分析の測定条件を最適化した。

12-2 研究目的：金属材料は化学組成の相違によって細胞毒性強度が異なる。そこで、金属材料の細胞毒性を高感度に検出する方法を検討する。また、擬似体液中でのアパタイト形成能は生体内での骨結合性をよく再現する。そこで、金属材料のアパタイト形成能を簡便に定量的に評価する方法を検討する。

12-3 研究方法：Ti-Ni合金等の細胞毒性を直接接触法によるコロニー法を用いて評価する。また、カルシウム及びマグネシウムイオンを含有するハンスク平衡塩溶液を用いて、Ti合金のアパタイト形成能試験を行う。さらに、FT-IR/PAS分析において、スキャンスピードを変化させた時のアパタイト由来の光音響強度の動向を解析する。

12-4 研究成果：直接接触法によるコロニー法において、Ti及びTi-Niは細胞毒性を示さなかったが、Niは細胞毒性を示した。また、ハンスク平衡塩溶液浸漬によって、Ti合金は材料表面にアパタイトを形成した。さらに、アパタイトのFT-IR/PAS分析において、スキャンスピードが2.0 mm/secの時に光音響強度が最も高くなった。

12-5 考察：アパタイトの分析にFT-IR/PASを用いることで、試料の表面形状に制限が無く、定量的なアパタイト形成能の評価が可能となった。金属材料の細胞毒性を高感度に検出し、アパタイト形成能を定量的に評価することは、安全性及び有効性のより高い骨接合材料の材料設計に有用である。

IV. 研究発表

(1) 論文発表

1. Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I, Mori Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:5400-5.
2. Nishida M, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T, Kurose H. P2Y6 receptor-Galpha12/13 signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. *EMBO J*. 2008;27:3104-15.
3. Nishida M, Onohara N, Sato Y, Suda R, Ogushi M, Tanabe S, Inoue R, Mori Y, Kurose H. Galpha12/13-mediated up-regulation of TRPC6 negatively regulates

- endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation. *J Biol Chem.* 2007;**282**:23117-28.
4. Onohara N, Nishida M, Inoue R, Kobayashi H, Sumimoto H, Sato Y, Mori Y, Nagao T, Kurose H. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J.* 2006;**25**:5305-16.
 5. Nagamatsu Y, Nishida M, Onohara N, Fukutomi M, Maruyama Y, Kobayashi H, Sato Y, Kurose H. Heterotrimeric G protein G alpha13-induced induction of cytokine mRNAs through two distinct pathways in cardiac fibroblasts. *J Pharmacol Sci.* 2006;**101**:144-50.
 6. Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y, Mori Y. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol.* 2006;**2**:596-607.
 7. Teshima R, Okunuki H, Sato Y, Akiyama H, Maitani T, Sawada J. Effect of oral administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/Wv mice. *Allergol Int.* 2006;**55**:43-8.
 8. Suzuki R, Furuno T, Okamoto K, Teshima R, Nakanishi M. ATP plays a role in neurite stimulation with activated mast cells. *J Neuroimmunol.* 2007;**192**:49-56.
 9. Nagaoka MH, Maitani T. Analysis of inorganic arsenic in foods by hydride generation-cold trap-atomic absorption spectrophotometry. *Metal Ions in Biology and Medicine.* 2006;**9**:75-7.
 10. Nagaoka MH, Hanaoka K, Usui M, Nishimura T, Maitani T. Nitric acid-based partial-digestion method for selective determination of inorganic arsenic in hijiki and application to soaked hijiki. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 2008;**49**:88-94.
 11. Nagaoka MH, Nishimura T, Matsuda R, Maitani T. Evaluation of a nitric acid-based partial-digestion method for selective determination of inorganic arsenic in rice. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 2008;**49**:95-9.
 12. Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, Yamaguchi T. A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133-positive cells. *J Biol Chem.* 2007;**282**:33507-14.
 13. Mukai N, Akahori T, Komaki M, Li Q, Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Kobayashi A, Yamaguchi T, Abe M, Amagasa T, Morita I. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res.* 2008;**314**:430-40.
 14. Sanosaka T, Namihira M, Asano H, Kohyama J, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J, Nakashima K. Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells. *Neuroscience.* 2008;**155**:780-8.
 15. Yasuhiko Y, Kitajima S, Takahashi Y, Oginuma M, Kagiwada H, Kanno J, Saga Y. Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm-specific enhancer of Mesp2. *Development.* 2008;**135**:3511-9.
 16. David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Müller-Höcker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R, Franz WM. MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling. *Nat Cell Biol.* 2008;**10**:338-45.
 17. Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, Saito M, Fukuda K, Nishiyama T, Kitajima S, Saga Y, Fukayama M, Sata M, Kudo A. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *J Exp Med.* 2008;**205**:295-303.
 18. Baniasadi S, Chairoungdua A, Iribe Y, Kanai Y, Endou H, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J. Gene expression profiles in T24 human bladder carcinoma cells by inhibiting an L-type amino acid transporter, LAT1. *Arch Pharm Res.* 2007;**30**:444-52.
 19. Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T. "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics.* 2006;**7**:64.
 20. Grün F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Cubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol.* 2006;**20**:2141-55.
 21. Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J, Saga Y. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;**103**:3651-6.
 22. Onose J, Imai T, Hasumura M, Cho YM, Hirose M. A new medium-term rat colon bioassay applying neoplastic lesions as endpoints for detection of carcinogenesis modifiers-validation with known modifiers. *Cancer Lett.* 2006;**232**:272-8.
 23. Imai T, Onose J, Hasumura M, Takizawa T, Hirose M. Indomethacin induces small intestinal damage and inhibits amitrole-associated thyroid carcinogenesis in

- rats initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Toxicol Lett.* 2006;**164**:71-80.
24. Imai T, Fukuta K, Hasumura M, Cho YM, Ota Y, Takami S, Nakagama H, Hirose M. Significance of inflammation-associated regenerative mucosa characterized by Paneth cell metaplasia and beta-catenin accumulation for the onset of colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis.* 2007;**28**:2199-206.
 25. Cho YM, Imai T, Ota Y, Hasumura M, Takami S, Hirose M, Nishikawa A. A new medium-term rat colorectal bioassay applying neoplastic lesions as end points for detection of carcinogenesis modifiers effects with weak or controversial modifiers. *Toxicol Pathol.* 2008;**36**:459-64.
 26. Hakamata W, Sato Y, Okuda H, Honzawa S, Saito N, Kishimoto S, Yamashita A, Sugiura T, Kittaka A, Kurihara M. (2S,2'R)-analogue of LG190178 is a major active isomer. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;**18**:120-3.
 27. Kakuda S, Okada K, Eguchi H, Takenouchi K, Hakamata W, Kurihara M, Takimoto-Kamimura M. Structure of the ligand-binding domain of rat VDR in complex with a nonsecosteroidal vitamin D3 analogue YR301. *Acta Crystallogr. F.* 2008;**64**:970-3.
 28. Honzawa S, Yamamoto Y, Yamashita A, Sugiura T, Kurihara M, Arai MA, Kato S, Kittaka A. The 2alpha-(3-hydroxypropyl) group as an active motif in vitamin D3 analogues as agonists of the mutant vitamin D receptor (Arg274Leu). *Bioorg Med Chem.* 2008;**16**:3002-24.
 29. Tamai M, Isama K, Nakaoka R, Tsuchiya T. Synthesis of a novel beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties. *J Artif Organs.* 2007;**10**:22-8.
 30. 西村哲治, 久保田領志. 環境中の医薬品由来の化学物質によるヒトに対するリスク評価. *環境技術.* 2008;**37**:865-70.
- (2) 学会発表
1. Nishida M, Sato Y, Nakaya M, Inoue R, Mori Y, Kurose H. Regulation of hypertrophic signaling pathway by functional interaction between G protein-coupled receptor and TRPC channels. 第82回日本薬理学会年会 (平成21年3月16-18日, 横浜)
 2. Uemura A, Nishida M, Sato Y, Narita Y, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Inoue K, Kurose H. Role of P2Y6 receptor-Galpha12/13 signaling in pressure overload-induced cardiac fibrosis. 第82回日本薬理学会年会 (平成21年3月16-18日, 横浜)
 3. Minamisawa S, Satoh Y, Cho MC. Regulation of Activity of Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase in the Failing Heart. 第72回日本循環器学会総会・学術集会 (平成20年3月28日, 福岡)
 4. Nishida M, Suda R, Sato Y, Onohara N, Tanabe S, Nakaya M, Kurose H. A small GTPase rac mediates pertussis toxin-induced up-regulation of angiotensin receptors. 第81回日本薬理学会年会 (平成20年3月17-19日, 横浜)
 5. Haghghi K, Sato Y, Fan G-C, He S, Kolokathis F, Paraskevidis I, Jones K, Dorn GW II, Kremastinos DT, Kranias EG. A Novel Human Phospholamban Promoter Polymorphism in Dilated Cardiomyopathy Alters Glucocorticoid Nuclear Receptor Mediated Transcription Regulation. The American Heart Association Scientific Sessions 2007, Orlando, USA (2007年11月)
 6. Nishida M, Onohara N, Inoue R, Sumimoto H, Sato Y, Mori Y, Nagao T, Kurose H. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. 第80回日本薬理学会年会, 名古屋 (2007年3月)
 7. Suda R, Onohara N, Sato Y, Nishida M, Kurose H. Inhibition of angiotensin II signaling by ATP-induced NFAT activation in cardiac fibroblasts. 第80回日本薬理学会年会, 名古屋 (2007年3月)
 8. Narita Y, Onohara N, Nishida M, Sato Y, Nagao T, Kurose H. Role of Galpha12/13 in angiotensin II-induced cardiac fibrosis in mice. 第80回日本薬理学会年会, 名古屋 (2007年3月)
 9. Kurose H, Suda R, Tanabe S, Onohara N, Mangmool S, Nagamatsu Y, Sato Y, Nagao T, Nishida M. Rac up-regulates angiotensin II type I receptors through ROS and NF-kappaB-dependent interleukin-1beta production in rat cardiac fibroblasts. The American Heart Association Scientific Sessions 2006, Chicago, USA (2006年11月)
 10. Teshima R., Okunuki H., Nakamura R., Sawada J.: The effect of plant oil on oral sensitization of mice with ovomucoid., 13th International congress of mucosal immunology (2007.7)
 11. 中村亮介, 酒井信夫, 松岡英樹, 秋山晴代, 佐藤雄嗣, 穂山浩, 手島玲子: 「c-kit欠損W/W^vマウスにお

- けるタンパク質の経口感作とその関連遺伝子」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)
12. Nagaoka M. H. Maitani T. : Speciation of arsenic in foods by hydride generation-cold trap-atomic absorption spectrophotometry. Ninth International Symposia on Metal Ions in Biology and Medicine (ISMIBM) (Lisbon) p.244 (2006.5)
 13. 長岡(浜野) 恵, 米谷民雄: 水素化物変換-コールドトラップ-原子吸光法およびHPLC/ICP-MS法を用いた食品中無機ヒ素の分別定量法に関する研究. 日本分析化学会第55年会(大阪) (2006.9)
 14. Nagaoka M. H. and Maitani T.: Analysis of inorganic arsenic in samples of seaweed, rice and infant foods by hydride generation-cold trap-atomic absorption spectrometry. 12th Symposium on Sample Handling for Environmental and Biological Analysis (Zaragoza) p.120 (2006.10)
 15. Nagaoka M. H. and Maitani T.: Efficient extraction and determination of inorganic arsenic in baby foods containing seaweed and fish, 3rd. International FSTEM (Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals) Symposium on Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology (Santiago, Spain) (2007. 5)
 16. 長岡(浜野)恵 米谷民雄: 水素化物変換-コールドトラップ-原子吸光法を用いたゲルマニウム含有試料中の無機ヒ素分別定量. (Speciation analysis by hydride generation-cold trap-atomic absorption spectrometry to measure the levels of inorganic arsenic in bottled waters containing inorganic germanium). 第17回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2007) (京都) (2007.6)
 17. 長岡(浜野)恵 米谷民雄: ヒジキを含有する乳幼児食中のヒ素の無機ヒ素の定量. (Efficient extraction and determination of inorganic arsenic in baby foods containing seaweed "hijiki"). 第18回 日本微量元素学会学術集会 (福井) (2007.7)
 18. Nagaoka M. H. and Maitani T.: Efficient extraction and selective determination of inorganic arsenic in rice. Tenth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers (HTC-10) & Tenth International Symposium on Advances in Extraction Techniques (ExTech (R) 2008)) (Bruges, Belgium) (2008.1-2)
 19. 豊田淑江, 押澤正, 石井明子, 鈴木孝昌, 山口照英: Thrombopoietin(TPO)によるAC133陽性細胞より分化する血管内皮前駆細胞(EPC)の分化促進作用 日本薬学会第127年会 2007年3月
 20. 豊田淑江, 石井明子, 鈴木孝昌, 押澤正, 山口照英: トロンボポエチン (TPO) によるin vitroでの血管内皮前駆細胞 (EPC) の増幅作用 第28回日本炎症・再生医学会 2007年8月
 21. 石井明子, 豊田淑江, 鈴木琢雄, 小林 哲, 山口照英: 細胞組織利用医薬品としての血管内皮前駆細胞の誘導法確立と特性解析 第51回日本薬学会関東支部大会 2007年10月
 22. 豊田 淑江, 石井 明子, 鈴木 孝昌, 押澤 正, 山口 照英: トロンボポエチン(TPO)による, in vitroでの血管内皮前駆細胞(EPC)の増幅作用 第80回日本生化学会大会 2007年12月
 23. 豊田淑江, 石井明子, 山口照英: トロンボポエチン(TPO)の血管内皮前駆細胞(EPC)増幅作用における新しい役割 第7回 日本再生医療学会総会 2008年3月
 24. 豊田淑江, 石井明子, 鈴木 浩子, 李勤, 田村悦臣, 森田育男, 山口照英: 血管内皮前駆細胞であるEarly EPCとOutgrowth Endothelial Cellの特性解析 第81回日本生化学会大会 2008年12月
 25. 安達玲子, 櫻井智子, 笠原忠, 鈴木和博, 手島玲子「破骨細胞における中間系フィラメントの役割について」 日本薬学会第128年会 平成20年3月27日
 26. 櫻井智子, 安達玲子, 笠原忠, 鈴木和博, 手島玲子「破骨細胞の形態維持・機能発現におけるビメンチンの役割について」 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 平成20年12月11日
 27. 菅野 純, Percellome遺伝子発現解析標準化及び解析手法, 第11回癌治療増感研究シンポジウム, 2009年2月
 28. 北嶋 聡, 菅野 純, トキシコゲノミクスによる毒性評価法の高精細化, 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008年6月
 29. 菅野 純, トキシコゲノミクス(Percellome Project)を基盤とした分子毒性学の展開の試み, 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008年6月
 30. 菅野 純, Chemosphere-Biosphere Interaction解析ツールとしてのPercellome Toxicogenomics, 第34回日本トキシコロジー学会学術年会 特別講演 2007年6月
 31. 北嶋 聡, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 中津 則之, 菅野 純, モデル催奇形性物質を用いた発生トキシコゲノミクス (Percellome手法) 解析, 第34回日本トキシコロジー学会学術年会, 2007年6月
 32. 北嶋 聡, トキシコゲノミクスを用いた毒性予測の

迅速・精細化研究

33. [日本実験動物医学会・教育シンポジウム-動物実験代替法における分子毒性学的アプローチ-(第54回日本実験動物学会関連集会として実施)]2007年5月
34. Kanno Jun, Aisaki Ken-ichi, Igarashi Katsuhide, Nakatsu Noriyuki, Kitajima Satoshi, Kodama Yukio, "PERCELLOME" TOXICOGENOMICS PROJECT FOR THE MECHANISM-BASED TOXICOLOGY, the SOT 46th Annual Meeting March 25-29, 2007
35. 菅野 純, トキシコゲノミクス (Percellome Project) を基盤とした分子毒性学の展開の試み, 第145回日本獣医学会学術集會 日本比較薬理学・毒性学会, 教育講演, 2008年3月
36. Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project for Predictive Toxicology, 8th International ISSX meeting (Oct.9-12, 2007)
37. Kitajima S, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N and Kanno J, Fetus (developmental) toxicogenomics for addressing the embryotoxicity induced by chemicals. Demonstration by a model teratogen cyclophamide. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the life Sciences, 2007年8月
38. 菅野 純, Percellome法による遺伝子発現解析研究(トキシコゲノミクス)とその基礎研究への適用性, 東京大学分子細胞生物学研究所・機能形成研究分野セミナー, 2007年3月
39. 菅野 純, Percellome Projectの概要と展望, 第33回日本トキシコロジー学会, 2006年7月
40. 北嶋 聡, 相崎 健一, 五十嵐 勝秀, 中津 則之, 相賀 裕美子, 菅野 純, Percellome手法を用いた遺伝子発現変動解析の発生毒性実験への適用, 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 2006年7月
41. 北嶋 聡, 発生毒性のPercellomeトキシコゲノミクス解析, 第1回毒性オミクスフォーラム(第33回日本トキシコロジー学会学術年会との共催), 2006年7月
42. 菅野 純, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 北嶋聡, 中津則之, 創薬とトキシコゲノミクス, 第10回がん分子標的治療研究会総会, 2006年6月
43. Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project, ASIA TOX IV, 18-23 June, 2006
44. 菅野 純, 基礎と応用のリンケージ・ツールとしてのPercellome System, 第95回日本病理学会総会, 2006年5月
45. 今井俊夫, 園田二郎, 前田博, 久田茂: リンパ節とパイエル板の病理検査 -医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン- その進め方と試験法 第13回日本免疫毒性学会学術大会(2006.9)
46. 今井俊夫, 福田勝洋, 蓮村麻衣, 曹永晩, 太田世志雄, 蓮村麻衣, 中釜斉, 広瀬雅雄: DMH-dextran sodium sulfateラット大腸発がんモデルにみられる再生粘膜における β -cateninの異常発現. 第65回日本癌学会学術総会(2006.9)
47. 曹永晩, 今井俊夫, 蓮村麻衣, 高見成昭, 広瀬雅雄: ラット中期大腸発がん試験法における酵素処理イソクエルシトリン及びヤマモモ抽出物の発がん修飾作用. 第65回日本癌学会学術総会(2006.9)
48. 今井俊夫, 蓮村麻衣, 高見成昭, 曹永晩, 広瀬雅雄: DMH-DSSラット大腸発がん過程にみられるパネート化生の意義. 第23回日本毒性病理学会(2007.1)
49. 曹永晩, 今井俊夫, 蓮村麻衣, 高見成昭, 広瀬雅雄: DMH-DSSラット大腸発がんに対する抗炎症剤スルファサラジンの作用. 第23回日本毒性病理学会(2007.1)
50. 今井俊夫: 炎症関連ラット大腸発がんモデルの初期病変 -再生粘膜におけるパネート化生と β -catenin蛋白蓄積の意義- 第145回日本獣医学会(2008.3)
51. 金子文也, 佐藤由紀子, 袴田 航, 奥田晴宏, 本澤 忍, 山下 純, 杉浦隆之, 橋高敦史, 加藤茂明, 栗原正明 ビタミンDレセプターノンセコ型リガンドの設計と合成 日本薬学会第128年会 (2008/03/26-28 横浜)
52. 金子文也, 佐藤由紀子, 岩井すみれ, 本澤 忍, 山下 純, 橋高敦史, 加藤茂明, 奥田晴宏, 栗原正明 VDR及び変異VDRに作用するノンセコ型リガンドの設計と合成 第27回メディシナルケミストリーシンポジウム (2008/10/26-28, 大阪)
53. 伊佐間和郎, 小園知, 小林郁夫, 石水敬大, 土屋利江: Ti-Zr-Nb合金の骨組織適合性評価, 第29回日本バイオマテリアル学会大会 (2007.11)
54. Isama K, Haishima Y, Tsuchiya T: Evaluation of proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on collagen scaffolds, 1st Asian Biomaterials Congress (2007.12)
55. Isama K, Tsuchiya T: Osteoblast compatibility of Ti-Zr-Nb alloys, Biomaterials Asia 2009 (2009.4)
56. 西村哲治, 清水久美子, 久保田領志, 田原麻衣子, 徳永裕司: マウスES細胞分化系を用いた環境汚染物質の評価系の確立, 第12回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会(2006.9)
57. Nishimura, T., Shimizu, K., Kubota, R., Tahara, M., Hirose, M., Tokunaga, H. : Load to aqueous environment in urban area by swage treatment water

on pharmaceuticals and personal care products. SETAC North America 28th Annual Meeting (2007.11)

58. Nishimura, T., Micropollutants Management for Drinking Water Safety in Japan. (2008) International Seminar on the World Water Day 2008 (Korea) Future Direction of Improvement in Drinking Water Safety, 55-89 (2008).
59. Nishimura, T., Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., and Tokunaga, H.:A occurrence of pharmaceuticals and personal care products in raw water for drinking water supply and load to aqueous environment by swage treatment water in Japan. 2008 IWA World Water Congress, (2008.9).
60. 西村哲治, 久保田領志 : 水道水中の医薬品類の影響評価, 日本リスク研究学会2008年度第21回年次大会発表予稿論文集, p407-412 (2008.11)
61. 須藤久美, 大久保聡子, 本田一男, 小泉修一 : ラット海馬アストロサイトにおけるフルオキセチンのBDNF産生に対するアデノシンの増強作用, 第80回日本薬理学会年会 (2007.3)

(3) その他の発表, 施策への貢献, ガイドライン, マニュアル等の作成

1. 山口照英, 石井明子 細胞・組織加工医薬品の品質と安全性確保への提言 PHARMASTAGE 7, 1-6, 2008 (生物薬品部)
2. 「医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン」(病理部)
3. Isama K, Tsuchiya T: Gamma-ray Irradiated Poly(L-lactide) for Bone Repair, Tetsuya Tateishi ed., Biomaterials in Asia, World Scientific Publishing Company, Singapore (2008), pp. 254-265 (療品部)