戦略的創造研究推進事業
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域「医療に向けた化学・生物系分子を利用した
バイオ素子・システムの創製」
研究課題「疾患モデル細胞の高効率創製と機能解析」

研究終了報告書

研究期間　平成14年11月～平成20年3月

研究代表者：松岡英明
（東京農工大学・大学院工学府生命工学専攻・教授）

1 研究実施の概要

背 景

病気の治療法や創薬の研究において、特定の標的遺伝子を欠失（Knockout ; KO）、その発現の抑制（Knock down; KD）あるいは逆に増強（Over expression; OE）させたモデル動物が自由に作製できれば、極めて有用である。しかし、そうした遺伝子改変動物の作製は容易ではない。元々長時間かかる上、最終的に出来ない場合も多い。したがって、幸いにもノックアウト動物が得られた場合は、大変貴重な生物材料として扱われる。それ以外は、偶々自然発症した動物をその症状に応じて「特定の疾患に対するモデル動物」として使われるが、その場合は、同一の疾患に対するモデル動物同士の間でも、遺伝子発現の状態や生理状態など、生物材料としての同等性が保証されているわけではない。

ポストゲノム科学の潮流の一つは、疾患の原因遺伝子に対する見方を一変させたことである。すなわち、特定の単一遺伝子の異状によってのみ疾患が生じるケースはむしろ希で、予想以上に多くの遺伝子が関連している場合が多い、という認識である。DNA アレイ解析はその一端を垣間見させてくれる。ただし DNA アレイは、疾患の「結果として発現強度が変化した」遺伝子を網羅的に示してくれるものの、その発現が確かに疾患の「原因になっている」ことを示すものではない。言うまでもなく疾患に対しては、この後者の「原因になっている」遺伝子の解析が重要である。この考え方に沿った遺伝学的解析法を逆遺伝学的解析と呼んでいる。したがって、逆遺伝学的解析に基づく解析を行うためには、種々の遺伝子について、それも複数の遺伝子を同時に改変したモデル動物が必要であり、実際その高効率作製が急務となっている。

基本戦略

上記の要請に応えるための技術的可能性を検討した結果、遺伝子改変 ES 細胞の作製と ES 細胞からの個体作製が各々可能であるとの報告があるので、これを組み合わせる方法が有望と考えられた。しかも、個体としてはクローン動物が作製できるとの報告により、一旦、遺伝子改変 ES 細胞が得られれば、遺伝子構造の均一なモデル動物が作製できるはずである、との期待がもたれた。ただ、この場合はいずれも「できた」ということであり、「何時でもできる」というわけではない。そこに技術的な大きな壁があると予想された。そこで、ES 細胞の品質、その遺伝子改変、遺伝子発現解析技術、などに関する研究の第一人者、及びマウスクローンを始め個体作製に関する研究の第一人者を加えた研究チームを構成することが不可欠と考えた。さらに、疾患として適当な多因子疾患を一つ選び、具体的な的を絞った研究計画にする必要がある。本研究では疾患として糖尿病を選ぶこととし、したがって糖尿病原因遺伝子に関する研究の第一人者の参画を要請することとした。さらに個々の技術を検証し、その高効率化を目指すことが重要となるはずであり、そのためには様々のエ

ンジニアリングの動員が必要になると予想された。とりわけ、遺伝子改変細胞の機能評価の基本となる、遺伝子発現動態解析は必須である。それを可能にするものは、遺伝子や薬剤を定量的に単一細胞へ導入し、それをリアルタイムで解析する技術である。言うまでも無く、原理的に可能なこの技術も、高効率化なくしては全く実用的に利用できない。そこで、本研究ではこの技術開発を目標の一つに掲げたが、これは低効率ながら長年この技術を磨き続けてきた第一人者が主導することが不可欠である。以上の考察に基づき、稲垣（糖尿病）、丹羽（ES 細胞）、小倉（個体作製）、松岡（単一細胞解析）の４グループ（G）からなる研究チームを編成し、研究課題と担当 G を次のように設定した。

A. 高効率マイクロインジェクション技術開発　【松岡 G】
B. 糖尿病モデル細胞としての指標遺伝子系の構築 【稲垣 G】
C. 遺伝子改変マウス ES 細胞の高効率作製　【丹羽 G、松岡 G、稲垣 G】
D. 遺伝子改変マウス ES 細胞から分化細胞の作製　【松岡 G】
E. 遺伝子改変マウス個体の作製　【小倉 G、松岡 G】
F. 遺伝子改変細胞･マウス個体の機能解析　【全 G】
G. 遺伝子改変 ES 細胞及びマウス個体のライブラリー維持管理システムの構築　【松岡 G】

成果の概要

A に関しては、培養ディッシュを、複数の顕微計測装置やインキュベーター間を移動させながら、ディッシュ中の任意の細胞を、定時間隔で顕微計測するために、細胞の座標を 2μm の精度で登録し、これを瞬時に呼び出せるシステムを開発した（スグワカルチャー（Suguwaculture）システム）。また、新規開発した高性能インジェクター、スグワカルチャーシステム、等の要素技術からなる単一細胞操作支援ロボット（Single-cell Manipulation Supporting Robot; SMSR）を開発した。これを利用することによって、ES 細胞内への遺伝子の直接導入で、フェムトグラムレベルでの迅速な定量的導入が可能になり、「フェムトインジェクション」の呼称を提案した。

B 及び C に関しては、RNAi 法により、糖尿病関連遺伝子（PDX-1、GK、IRS-1、IRS-2、Kir6.2、SHP、HNF-1α、HNF-1β）の各々の発現をノックダウンした ES 細胞を作製した。ただし、最大ノックダウン率は細胞によって異なる。また、PDX-1 と IRS-1、Kir6.2 と IRS-2、HNF-1αと HNF-1β の 2 遺伝子を各々ダブルノックダウンした ES 細胞を作製した。

D に関しては、PDX-1、IRS-1、IRS-2、Kir6.2、HNF-1α、HNF-1βの 6 遺伝子に関しては、各々のノックダウン ES 細胞をインスリン産生細胞まで分化させても、高々30%に KD された状態が保持されていることがわかった。さらに、3 組のダブル KD の作製にも成功した。

E の ES 細胞からのマウス個体作りに関しては、当初、予想していたよりもはるかに困難であった。

外来遺伝子が導入されること（第 1）と、ジャームラインに乗って子孫に伝わること（第 2）の、2 段階の壁があるが、その困難にもかかわらず、最終的には、遺伝子改変 ES 細胞からキメラマウス、核移植クローン、また受精卵に直接ベクターを導入して作るトランスジェニックマウス、が作製できた。

F の単一細胞での遺伝子発現トランジエントアッセイは、複数の遺伝子発現をリアルタイム、インビボでの解析を可能にするもので、ポストゲノム遺伝子機能解析における、有力な方法論となり得ると考えられた。

D、E、F の結果より、B で作製された一連の遺伝子改変 ES 細胞が、糖尿病に対する疾患モデル細胞ライブラリーとして利用できる見通しが得られた。

「疾患モデル細胞」のコンセプト

研究遂行の過程で、絶えず「疾患モデル細胞」のコンセプトに関する議論を重ねた。当初、自然発症の疾患モデル動物に対比されるモデル動物を「高効率」に作るための「素材」と位置づけていた。しかし、個体作製は予想以上に低効率で困難であることがわかった。特に遺伝子改変細胞では、一層状況が複雑であった。何故、個体が出来ないのか？ということは、それが発生に関わる疾患であることを意味しているのかもしれない。簡単には個体が出来ないところに、疾患というものの奥深さがあるようだ。そう考えると、逆遺伝学により、糖尿病に関連した遺伝子改変した細胞を得た、ということは、それらから遺伝子改変個体の作製を繰り返し行うことができるようになった、というところに本質があるように思われてきた。個体が出来なくても、その原因を解析することによって、出来た場合以上に重要な情報を与えてくれるはずである。このように考えて、最終的には、次のようなコンセプトを提示するに至った。

- **疾患関連遺伝子を改変（KO、KD、OEなど）した複数の細胞株をライブラリーとして得られること**
- **ライブラリーの個々の細胞株は均質な細胞集団として、繰り返し、供給できること**
- **遺伝子発現状態が詳しく解析されていること**
- **特定の組織への分化実験に利用できること**
- **個体発生実験に利用できること**
- **疾患関連遺伝子の発現動態の単一細胞解析ができること**

2 研究構想及び実施体制

(1)研究構想

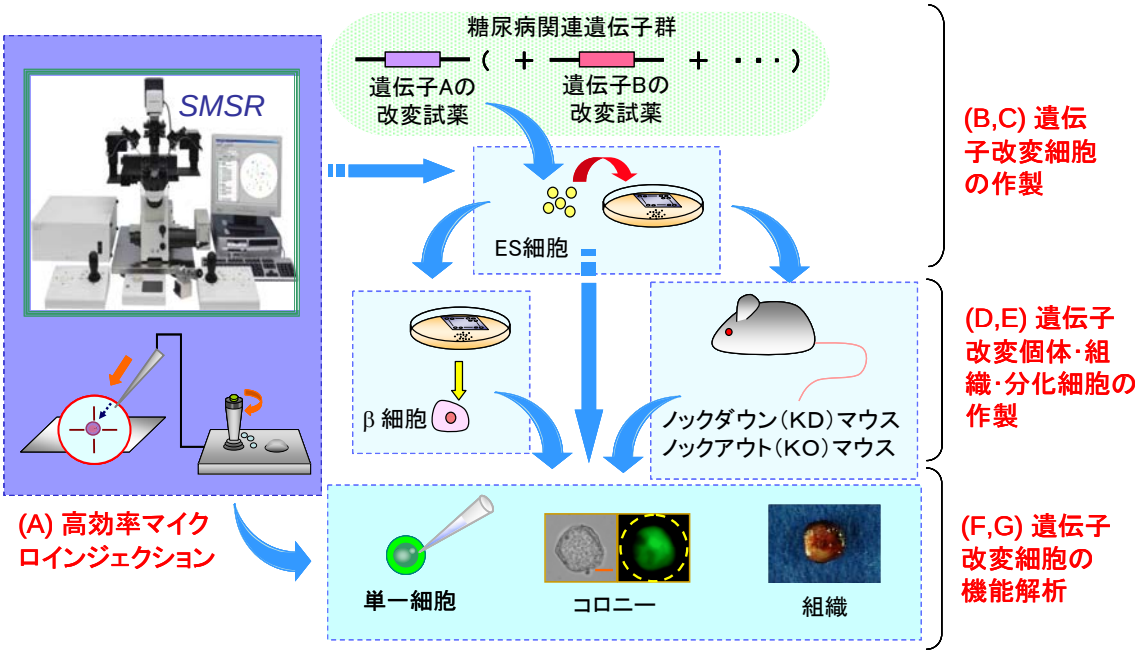


図2-1. 研 究 構 想

糖尿病、ES 細胞、マウス個体、そして単一細胞機能解析に関する、各々の世界的スペシャリストを研究分担者としてチーム編成し、次のような戦略で実施する計画を立てた。

①疾患を「糖尿病」と定め、標的遺伝子として「意味のある」遺伝子複数個を厳密に選定する。これは稲垣 G が担当した。検討の結果、PDX-1、GK、IRS-1、IRS-2、Kir6.2、SHP の 6 遺伝子を選定し、後に HNF-1α、HNF-1βの 2 遺伝子を追加した（図 2-2)。

②出発物質であるマウス ES 細胞の品質に関して、十分な注意を払う。これは丹羽 G が担当した。

③複数遺伝子を同時改変する方法として RNAi 法によるノックダウンが、最も現実的と考えられた。この方法により、初めに図 2-2 の各遺伝子を一個ずつ改変した ES 細胞、さらにその中の 2 個の遺伝子のダブルノックダウン ES 細胞を作製する。一連の作業によってライブラリー作製を目指す。この課題は松岡 G が担当した。

④マウス ES 細胞へ RNAi 法が適用できるのか？その利点と限界は？について理解を深めておくことは極めて重要である。そのためには、遺伝子ターゲティング法、あるいは遺伝子トラップ法など、異なる原理の方法によって単一遺伝子ノックアウトを達成し、その結果に基づく議論が不可欠である。この課題は丹羽 G が担当した。

⑤「遺伝子改変 ES 細胞からのマウス個体の作製」の可能性を、早い時期に、研究チームとして

確認しておけば、見通しがよくなると思われた。そこで、稲垣 G が、最も重要な遺伝子の一つ PDX-1 に着目し、これを遺伝子ターゲティング法でノックアウトした ES 細胞を作製し、小倉 G が、これを用いてマウス個体作製を試みた。

⑥ノックダウン細胞から、その性質を維持したままのノックダウン個体ができるか、という問題を検討するために、少なくとも in vitro でインスリン産生細胞まで分化させて、ノックダウン効果が維持されていることの確認が必要である。この課題は松岡 G が担当した。

⑦正常細胞からでも個体作製は難しい。まして、遺伝子改変した細胞からでは、出来なかった場合の原因解明も容易ではない。ノックダウン ES 細胞からの作製が難しい場合は、他のあらゆる可能な方法を検討する。この課題は小倉 G が担当した。

⑧例え単一の遺伝子のみを改変した細胞でも、その影響で他の多数の遺伝子の発現状態が変化する。その場合、改変の強弱によって、変動遺伝子の種類も、細胞全体の性質も大きく変わる可能性がある。このような複数遺伝子の発現状態を定量的に、かつ迅速に評価することは、全過

a. 症状と遺伝子

疾患	症状名	個体での症状	原因	選択した遺伝子
糖尿病原因・関連遺伝子	インスリン欠損	インスリンを与えれば正常なるになる	インスリン生成能の欠損	PDX−1, IRS−2
	耐糖能の減少、あるいはインスリン分泌不全	糖を与えると血糖値が正常値に戻らない	インスリン分泌調節能の欠損	GK, Kir6.2, PDX−1, HNF−1α, HNF−1β
	インスリン抵抗性	インスリンを注射しても血糖値が下がらない	インスリン受容体の欠損	IRS−1, IRS−2
糖尿病発症状態に影響を及ぼす遺伝子	肥満	肥満		SHP

約50種類の遺伝子が挙げられているが・・・

b. 遺伝子の本来の機能

遺伝子		本来の機能
PDX-1	(Pancreatic and duodenal homeobox gene-1)	膵発生に必須の転写因子
Kir6.2	(Inw ardly rectifying potassium (K) channel (MW:6.2kD))	内向きカリウムイオンチャネル
GK	(Glucokinase)	膵β細胞 に発現している解糖系の律速酵素
IRS-1	(Insulin receptor substrate-1)	脂肪細胞などに発現しているインスリン受容体の基質
IRS-2	(Insulin receptor substrate-2)	膵β細胞 に発現しているインスリン受容体の基質
SHP	(Small heterodimer partner)	核内受容体として転写の抑制に関与?
HNF-1α	(Hepatocyte nuclear factor-1a)	膵β細胞におけるグルコース代謝及び膵島構築に関わる遺伝子群の発現を制御する転写因子
HNF-1β	(Hepatocyte nuclear factor-1b)	

図2-2. 糖尿病原因・関連遺伝子

程で必要となる。この要請に応える単一細胞遺伝子解析法を確立する。この課題は松岡 G が担当した。具体的には ES 細胞程度の小さな細胞へも適用できる単一細胞操作支援ロボット（SMSR）の開発である。

⑨作製されるマウス個体だけでなく、遺伝子改変した ES 細胞、さらにそれを作製するために開発したベクターなどの新規バイオリソースを維持管理し、必要に応じて供給できるシステムを構築する必要がある。これは松岡 G が実施した。

⑩ES 細胞は論文情報（McKay, Miyazaki らの方法）に従ってインスリン産生細胞へ分化させる。しかし、分化に長時間を要するため、分化を促進させる活性物質の探索も同時に行う。すなわち、薬理活性物質が多数含まれていると考えられる生薬からの探索、及びインスリン産生細胞との共培養などを行う。この課題は松岡 G が担当した。

以上の研究内容は、研究の進展に伴って見直しを重ねつつ、最終的には図 2-3 にしたがって推移した。

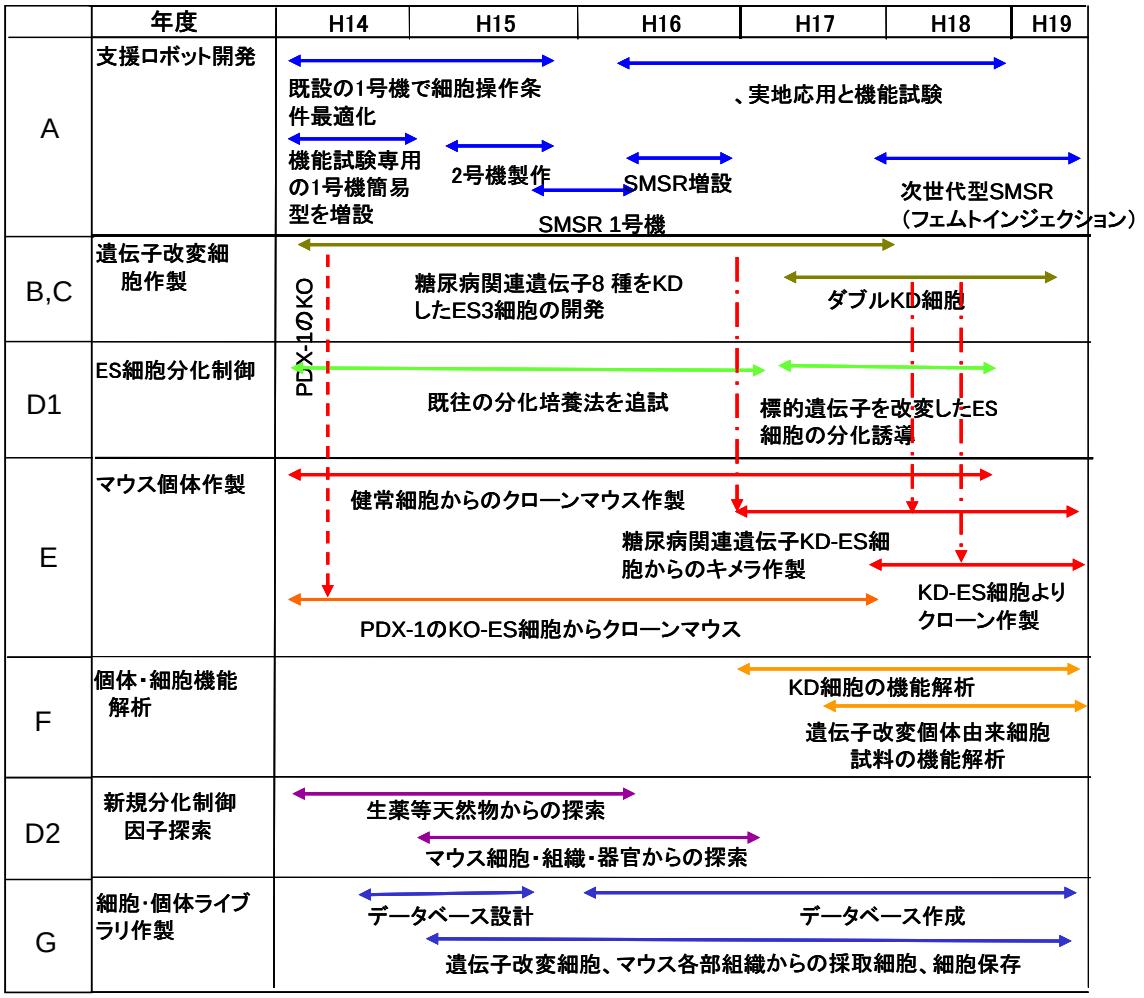


図2-3. 主要課題研究スケジュール

(2)実施体制

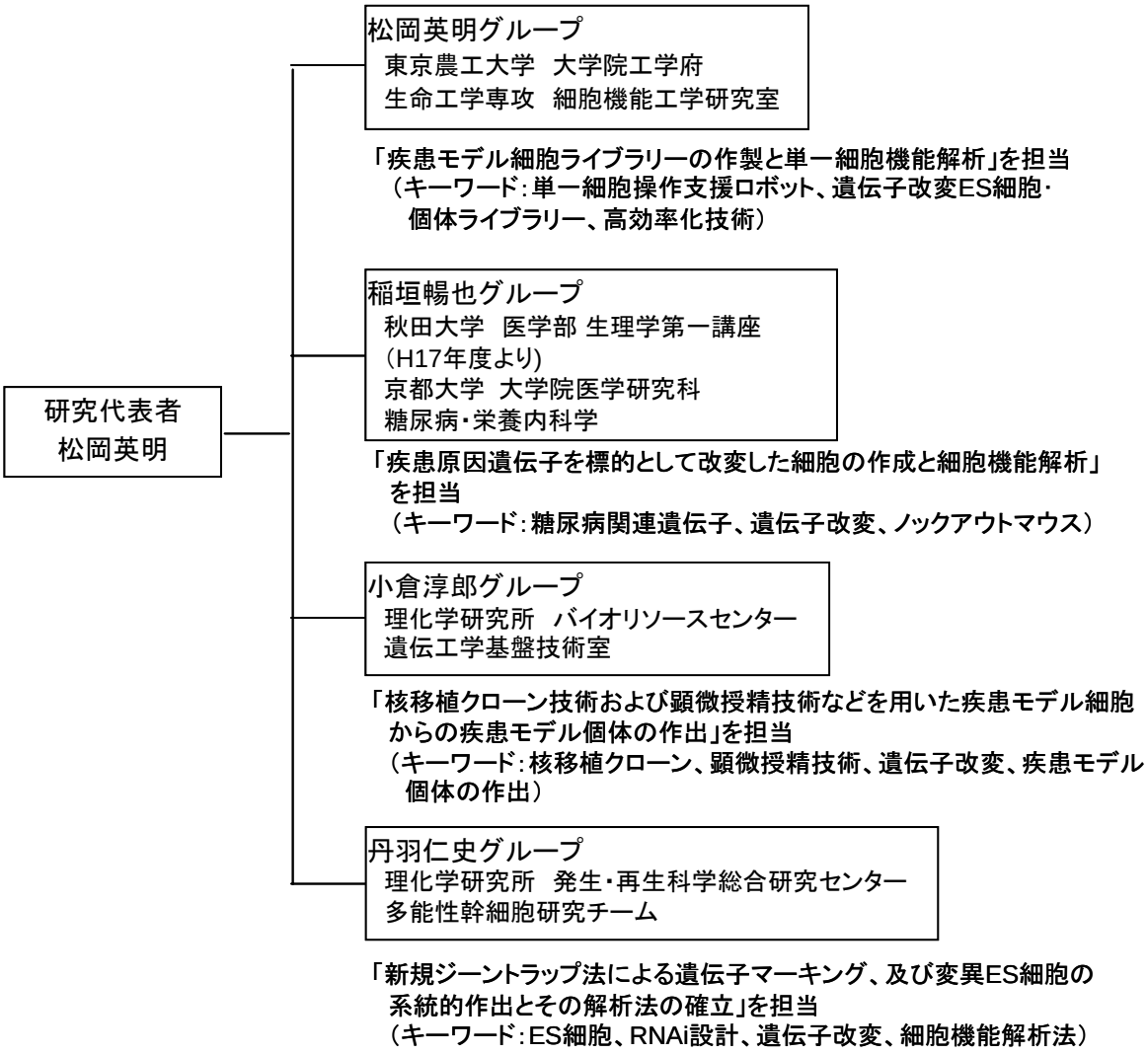


図2-4. 実施体制と各研究グループの担当課題

3 研究実施内容及び成果

3.1 松岡グループ:「疾患モデル細胞ライブラリーの作製と単一細胞機能解析」

「疾患モデル細胞ライブラリーの作製と単一細胞機能解析」として、上記の研究課題 A～G に対応して、設定された次の課題を実施した。

・フェムトインジェクション技術開発 (A)
・遺伝子改変細胞の単一細胞機能解析 (F, G)
・糖尿病関連遺伝子改変 ES 細胞の創製およびインスリン産生細胞への分化 (C1, D1)
・マウス ES 細胞分化制御因子の探索 (D2)
・遺伝子改変 ES 細胞からのトランスジェニックマウスの作製 (E1)

3.1.1 フェムトインジェクション技術開発 (A)

〔実施方法〕

遺伝子発現可視化ベクター、shRNA 生成用ベクター、あるいは、蛍光試薬、siRNA、タンパク質分子などの複数の試薬を、同時に、直接、細胞へ導入する方法としてマイクロインジェクションは最適である。しかし、その作業は煩雑で長時間を要する。しかも成功率は極めて低い。その難度は、細胞径が 50μm 以下になると極端に高くなる。そこで、この方法を簡便迅速にできる装置の開発を目指した。具体的には、従来は直径 30-50μm の細胞では、インジェクション速度 5-10 個/hr であったものを、ES 細胞（直径 15-20μm）に対して 100 個/hr に高速化することを目標とした。

当初、松岡 G による基本構想に基づき、実機製作を中央精機㈱および関連企業への依頼製作とした。試験機 1、2 号機、の製作を経て、2004 年 5 月には実用試験研究モデル 1 号機を製作、これを単一細胞操作支援ロボット（Single-cell Manipulation Supporting Robot; SMSR）と命名して、上市するに至った[II-55]。これを機に、同社を松岡 G のメンバーに組み入れ、以後の、実用試験研究モデルの機能試験、バージョンアップなどをより緊密に実施する協力体制を構築した。

〔成　果〕

<u>基準座標チップとスグワカルチャーシステム</u>

培養ディシュ中の個々の細胞の座標を一旦登録しておけば、培養しながら、随時、顕微鏡ステージに載せて観察、あるいはマイクロインジェクションなどを行う際に、瞬時にして任意の細胞を視野中心にもってくることができる。このシステムを、“すぐ (sugu)”、“分かる (wakaru)”、“培養しながら(during culture)”の言葉を繋げて“Suguwaculture”システムと命名した [Y. Yamada, et al., Instant cell recognition system using microfabricated coordinate standard chip useful for combinable cell observation with multiple microscopic apparatus. *Microsc. Microanal.* in press]。その仕様は以下のよう

になっている。

・国内外のメーカーの培養ディッシュの形状を調査し、共通して適応可能な座標基準チップ(CS Chip)をデザインし、実用化させた。（図 3-1-1）

・2μm 以下の高精度な座標基準線を描画させた座標基準チップを、溶融樹脂成型量産により、実用レベルのコストで供給可能にした。

・オリンパスの倒立顕微鏡、及びカールツァイスの共焦点顕微鏡に共通の自動ステージを設計し、

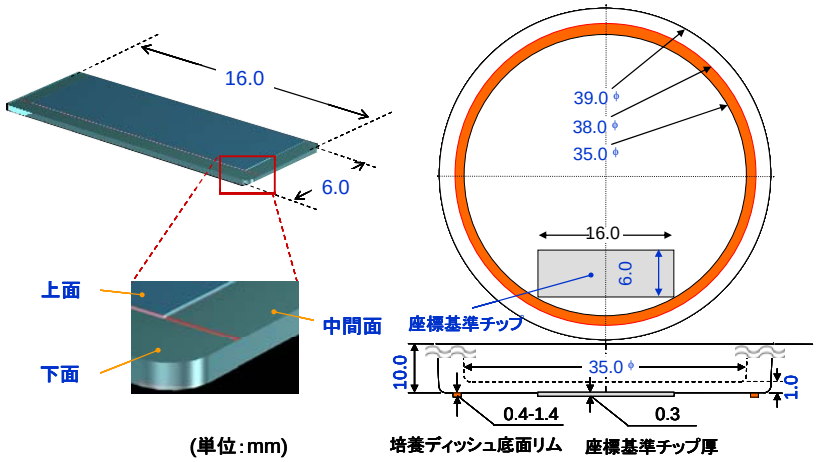


図3-1-1. 座標基準チップ

両機器を組み合わせた単一細胞実験を可能にした。

・マイクロインジェクション、細胞観察、高精度顕微画像解析、などの一連の作業を、異なる光学装置で行う場合でも、また培養器での培養を挟みながらでも、個々の細胞の座標情報、及び実験操作情報を保持できる(図 3-1-2)ので、全作業がハイスループットでできる。

・1 週間にわたって、単一の ES 細胞からクラスター形成に伴う経時的観察・評価を可能にした(図 3-1-3)。

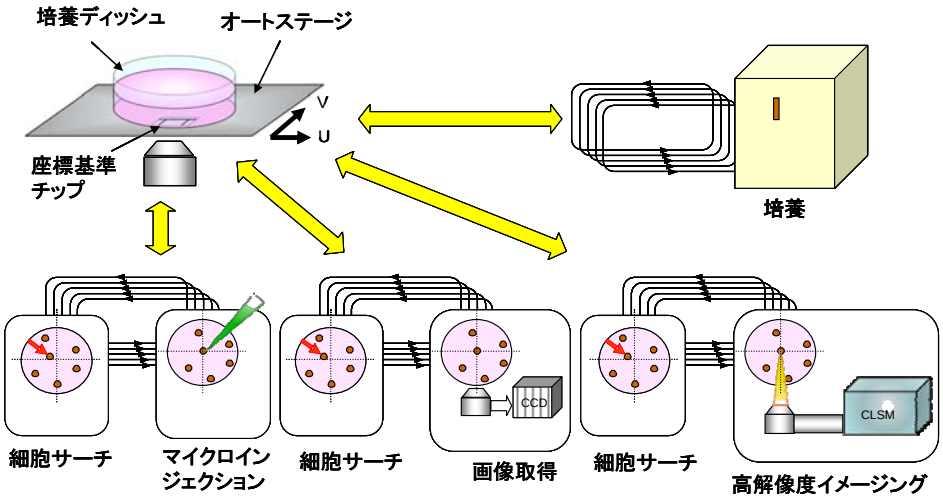
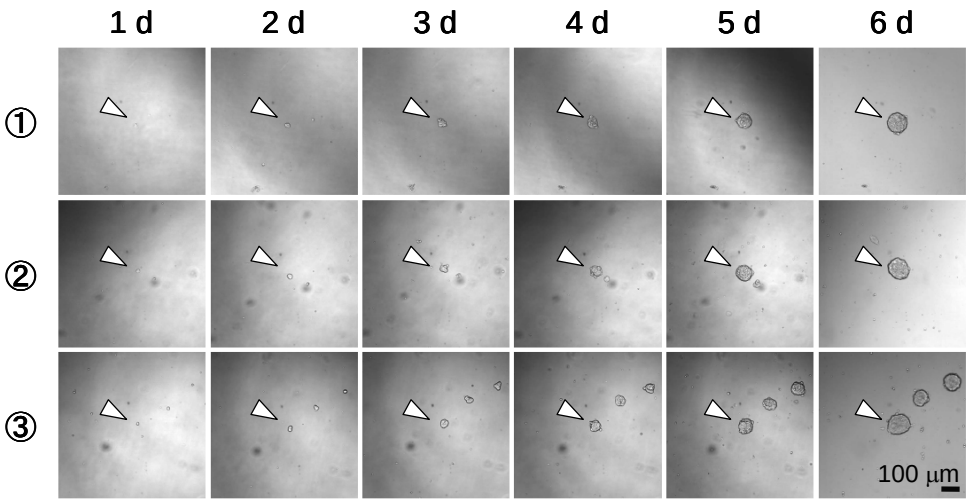


図3-1-2. 単一細胞連続顕微操作･培養･イメージングシステム



3個の培養ディッシュ①、②、③中の任意に定めたES細胞について、6日間、培養･顕微観察を繰り返した。毎回、顕微観察時に、ディッシュの座標登録後、各細胞は瞬時に視野中心に呼び出される。

図3-1-3. 複数ディッシュ中の単一標的ES細胞の長期間培養･顕微観察

<u>各種細胞への高効率遺伝子導入</u>

SMSR を用いる共同研究によって、マウス ES 細胞、イネプロトプラスト、タバコ培養細胞 BY-2 [II-56]、ニワトリ始原生殖細胞(PGC) などに対する遺伝子、siRNA、タンパク質、などのマイクロインジェクションが高効率にできることが示された（図 3-1-4)。最も困難と予想されたマウス ES 細胞への遺伝子導入に世界で初めて成功した [I-36] だけでなく、その成功率が、当初（2004 年)、わずかに 0.2%であったものが、その後の関連デバイスの改良や、オペレーターの技術の向上などによって、現在では恒常的に 5-10%の成功率が得られるようになっている。

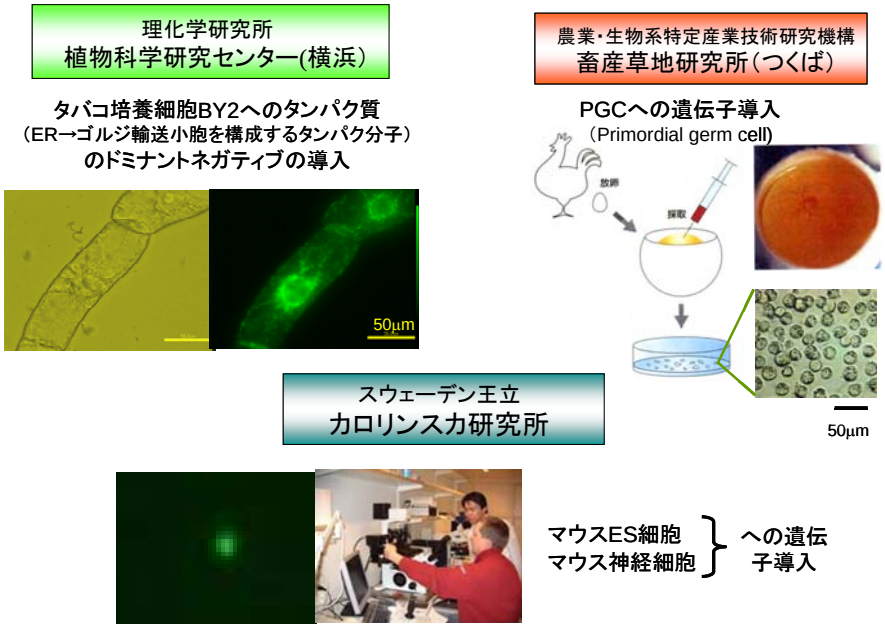


図3-1-4. SMSRを用いる共同研究

定量的マイクロインジェクション

従来、50 μm 以下の小さな細胞の場合、導入の成否を論ずる定性的議論にとどまっていたが、SMSR の利用によってマイクロインジェクションの精度が飛躍的向上し、定量性の議論も可能となった [I-79]。微小液滴への吐出実験によって検討した結果、例えば、キャピラリー先端径 0.6-0.8μm、加圧条件 0.70kg/cm^2×30ms で、キャピラリー内遺伝子濃度を 10-100ng/μl の範囲で変化させると、フェムトグラム(fg)のオーダーで半定量的（正の相関は得られたが、直線性の精度は十分とは言えず、半定量的と表現した）に吐出されることが示された。細胞内にインジェクションされた遺伝子量を直接定量することは難しいが、EGFP 遺伝子発現ベクターを導入して、その発現量（蛍光強度）を調べたところ、図 3-1-5 に示すように、キャピラリー内遺伝子濃度と発現量の間に半定量的関係が認められた。

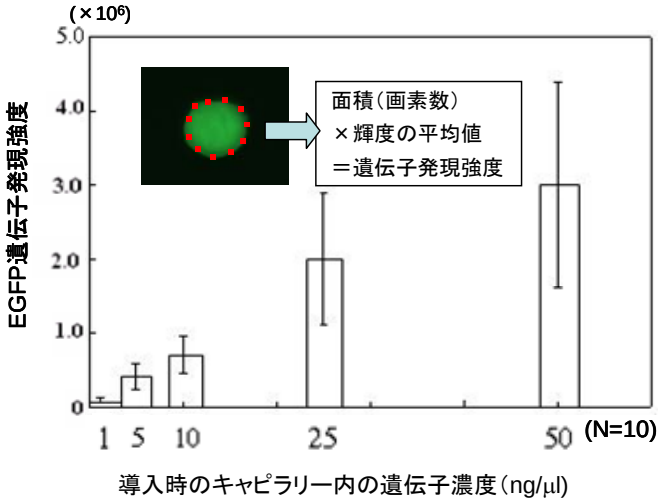
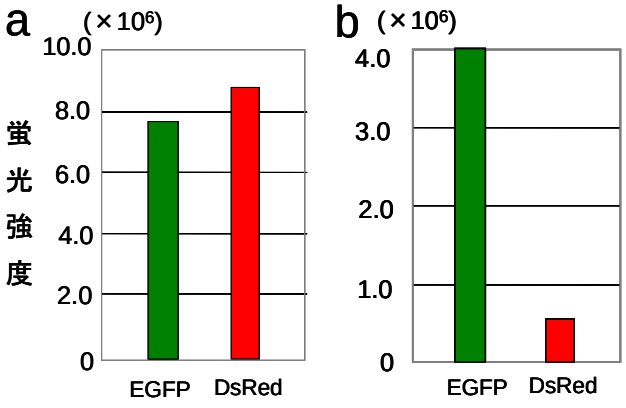


図3-1-5. 遺伝子導入量に応じた遺伝子発現強度

複数の遺伝子を同時に導入する場合の定量性についても検討した。EGFP と DsRed は何れも類似の蛍光タンパク分子であるが、DsRed は EGFP と異なり 4 分子会合して初めて蛍光を発する。しかし、その蛍光自体も 1 分子の EGFP よりも弱いようで、予備試験によれば、DsRed は EGFP の 1/10 程度の蛍光強度であった。そこで、それぞれの発現ベクター、pCAG-EGFP と pCAG-DsRed を 1:10 で同時導入したところ、図 3-1-6. a に示すように発現強度の比は 1:1.2 となった。一方、両ベクターを同一濃度で同時導入した場合は、発現強度の比は 1:0.14 であった。したがって、この場合も半定量的導入が可能であることが示された。



[pCAG-EGFP] / [pCAG-DsRed] = 1:10 (a) or 1:1 (b)

図3-1-6. EGFP及びDsRedの各発現ベクターの同時導入

遺伝子発現を KD する場合の定量性についても検討した。EGFP の場合で、EGFP に対する RNAi を導入した場合は、導入量に応じて EGFP 遺伝子発現量が低減した(図 3-1-7)。

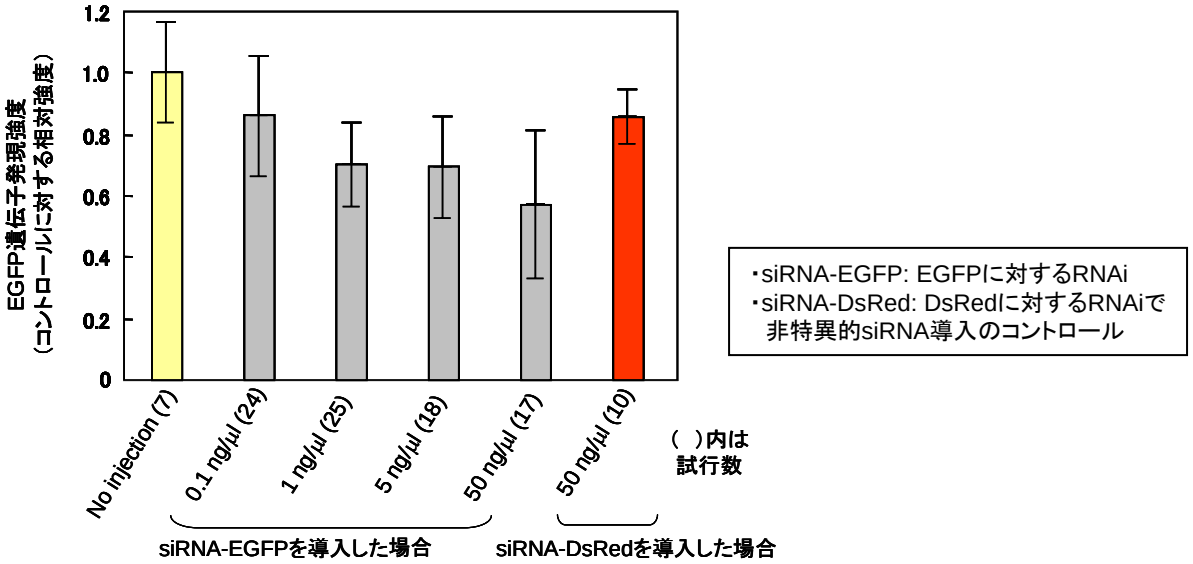
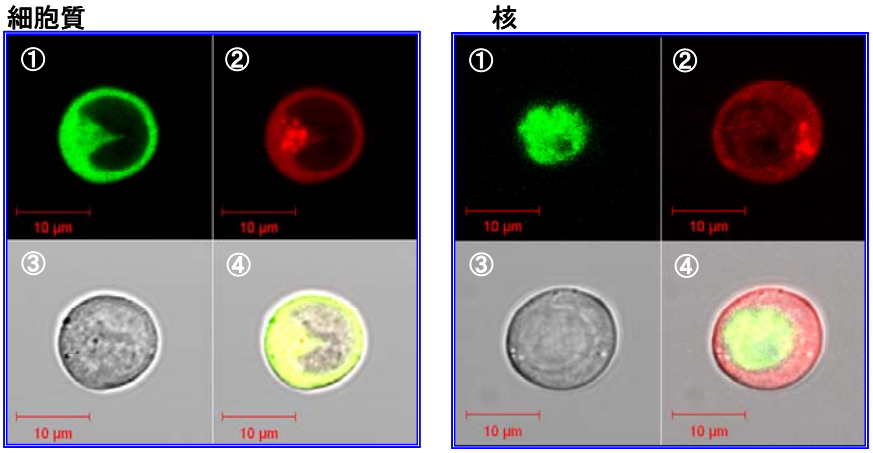


図3-1-7. EGFP恒常発現ES細胞に対するsiRNA定量導入の結果

細胞質と核への刺し分け技術

遺伝子は通常、細胞質へ導入される。その後、核まで拡散していくと考えられる。この拡散の過程で遺伝子の一部は分解ないし散逸してしまう可能性がある。この損失を減らすためには、遺伝子を核に直接導入することが有効と期待される。そこで、DsRed 恒常発現 ES 細胞を用いて、この点を調べた。この細胞は細胞質のみが DsRed の赤い蛍光を発している。これに蛍光色素 Dextran-Fluorescein （緑色蛍光、MW100,000 で核膜を透過できない）を導入すると、細胞質に導入した場合と核に導入した場合とで図 3-1-8 のように区別できる。そこで、Dextran-Fluorescein と pCMV-Venus（黄色蛍光）を同時に導入して、導入場所ごとの Venus の発現率を比較した。その結果、物理的に導入に成功したものは全体で 54%であり、遺伝子発現率は 22%であったが、その内訳



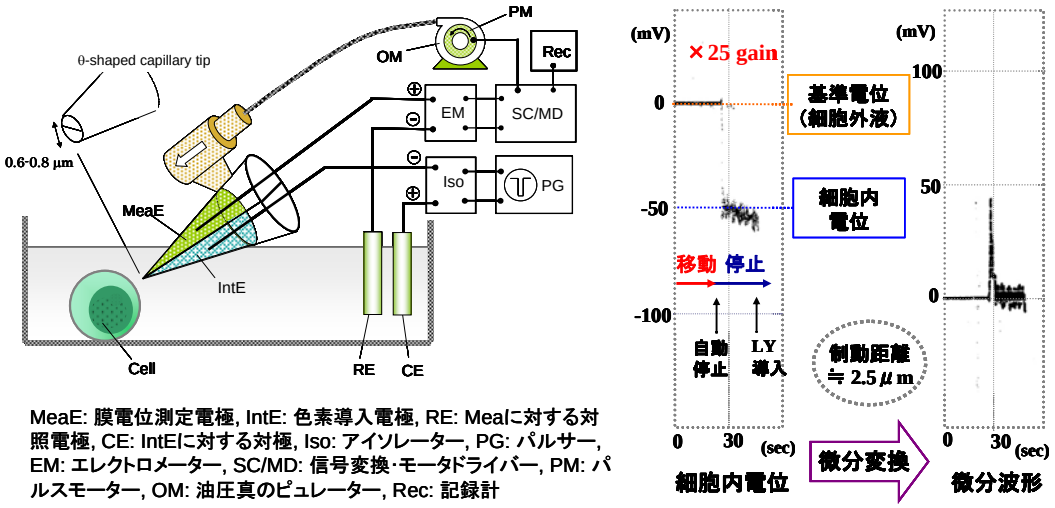
①:Dextran-Fluorescein蛍光画像 ②:DsRed蛍光画像 ③:明視野像 ④:Merge

図3-1-8. 核と細胞質への刺し分け

をみると、細胞質へ導入した場合は 30%、核へ直接導入した場合は 80%の発現効率であり、核への直接導入が有効であることが示された。

<u>細胞膜貫通シグナルの検出とマイクロインジェクター自動停止機構</u>

マイクロインジェクションを完全自動化する場合の最終的な課題は、キャピラリー先端が細胞膜を貫通した瞬間を捉え、インジェクターを速やかに停止させる機構の開発である。本研究では、マルチチャンネル型のキャピラリーを用いて、膜貫通シグナルとして膜電位を利用することとした（図 3-1-9）。ES 細胞内電位は細胞ごとに異なるので、その影響を無くすために微分信号を使うようにした。自動停止後に蛍光色素 Lucifer Yellow (LY) を導入し、その拡散パターンから自動停止位置を確認した。その結果、66% (71/108) の成功率で、ES 細胞内で自動停止した [I-58, I-84]]。他の細胞（イネプロトプラスト、タバコ培養細胞 BY2）でも同様に行った結果、自動停止成功率は、それぞれ 77% (23/30)、68% (52/77) であった。いずれの場合も 70－80%の成功率を示したものの、実用的にはさらに高い成功率が望まれる。



MeaE: 膜電位測定電極, IntE: 色素導入電極, RE: Mealに対する対照電極, CE: IntEに対する対極, Iso: アイソレーター, PG: パルサー, EM: エレクトロメーター, SC/MD: 信号変換･モータドライバー, PM: パルスモーター, OM: 油圧真のピュレーター, Rec: 記録計

図3-1-9. 細胞膜貫通シグナルによるインジェクター自動停止機構

〔類似研究動向と本成果の位置づけ〕

単一細胞エレクトロポレーション (Haas et al. *Neuron* **29**, 583-591 (2001); Olofsson et al. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 29-34 (2003))、単一細胞リポフェクションの報告はあるが、マイクロインジェクションに関しては、内外の精密位置決め装置メーカー及び研究機関 103 社・研究室、ディッシュメーカー15 社を調査した結果、ES 細胞に対して使えるものを供給している、あるいは開発を進めているところは皆無であった。今のところ、具体的な単一細胞実験を必要としているケースは、比較的特殊な場合に限られ、数も少ないようであるが、技術的に容易であれば、是非実施したいとの

声は大きい。特に、現在、ポストゲノムでは、DNA アレイ解析に続く実験科学方法論が要望されている。すなわちアレイ解析が「動いた遺伝子」を知る方法であるのに対して、「動かしている遺伝子」を見つける方法である。そのためには、多数の遺伝子を定量的に同時に導入して、指標遺伝子が動くかどうかを調べればよい。また、mRNA やタンパク質を直接導入することによっても同様の解析ができる。そして、これを可能にする方法が高効率フェムトインジェクションである。

3.1.2 遺伝子改変細胞の単一細胞機能解析 (F, G)

〔実施方法及び成果〕

図 3-1-10.a はマウス膵β細胞におけるグルコース応答からインスリン合成及び分泌に至る分子機構の概略である。この分子機構に基づき、PDX-1 を改変した細胞の機能評価をするアッセイ系の一例が図 3-1-10.b である。この例では、グルコースを入力とし、インスリン合成遺伝子 Ins1 の発現を出力（Venus で可視化）としている。インスリン産生細胞（MIN6）を用いてグルコース応答を調べた結果、1mM のグルコースを含む培地から、20mM のグルコースを含む培地に交換したことによって 34.7% (17/49) の細胞で Ins1 遺伝子発現が 2 倍以上に増強された。これに対して、コントロール（1mM のグルコースを含む新鮮な培地に交換）で増強が見られたのは 11.8% (4/34) の細胞のみであった。

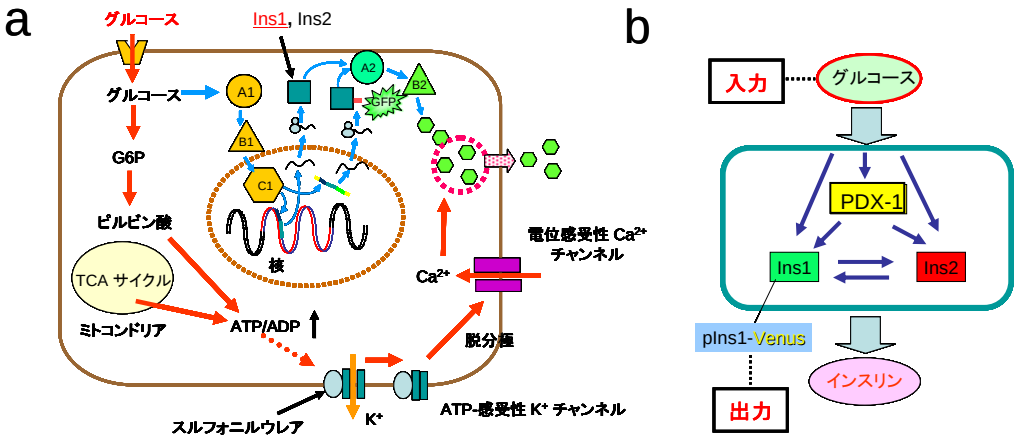
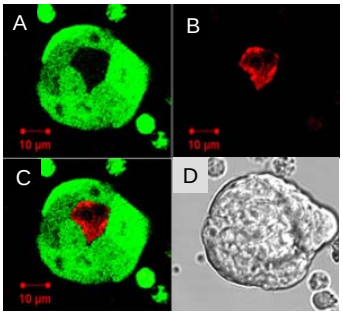


図3-1-10. グルコース応答性インスリン生成活性のアッセイモデル。(a)膵b細胞におけるインスリン生成の分子機構、(b)グルコース入力ーIns1出力のアッセイモデル

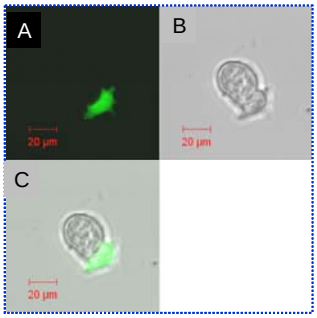
図 3-1-11 は、糖尿病関連遺伝子の一つ SHP を IRES を介して強制発現可視化（EGFP）させた ES 細胞クローンに、p-shSHP（SHP に対する shRNA を発現するベクター）を、DsRed 発現ベクターと一緒にインジェクションした結果の一例である。DsRed の発現は遺伝子導入が成功したことを示しており、その細胞では EGFP の蛍光が消え、SHP の発現が阻害されていることがわかる。図 3-1-12 は ES 細胞の分化･未分化維持機構に関連する遺伝子 Oct3/4 発現ベクター（EGFP で可視化）をインジェクションし、細胞形態変化を分化の指標として調べた結果の一例である。EGFP の蛍光

は遺伝子導入が成功したことを示している。そして、この導入が成功した細胞のみが、細胞形態変化を示していた。またベクターの導入濃度を変化させたところ、その濃度が大きいほど、蛍光強度が増大し、また細胞の形態変化も明確に認められ、半定量的な効果が認められた



A：EGFPの蛍光、B：DsRedの蛍光、
C：Merge、D：明視野像

図3-1-11 p-shSHPの導入による
SHP発現KD



A：EGFPの蛍光、B：明視野像
C：Merge

図3-1-12. Oct3/4発現ベクターの
導入に伴うES細胞の形態変化

〔類似研究動向と本成果の位置づけ〕

遺伝子改変細胞における遺伝子発現特性評価は、上流遺伝子の解析と下流遺伝子の解析に分けて考えることができる（図 3-1-13）。下流遺伝子の解析とは、標的遺伝子を改変した結果、どの遺伝子が影響を受けるか、という問題である。それを大規模に網羅的に行う方法は DNA アレイ解析である。その結果、コントロールに対して発現強度が、例えば 2 倍以上か、あるいは 1/2 以下になったりした遺伝子を全て検出する方法である。一方、関連遺伝子としての可能性の高い候補遺伝子を推定できるならば、それらに限っての網羅的解析が有効である。フェムトインジェクション法は、そのような場合に適用できる。

一方、上流遺伝子の解析とは、標的遺伝子の発現を誘導したり、逆に阻害したりする遺伝子を調

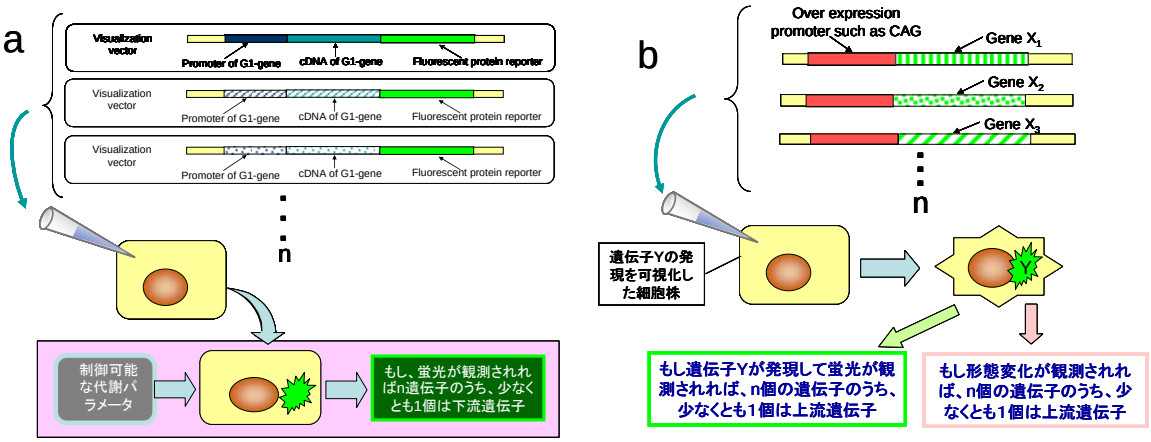


図3-1-13. フェムトインジェクションを利用した下流 (a) あるいは上流 (b) 遺伝子解析法

べることである。原理的には、標的遺伝子の発現を、例えば、EGFP で可視化した細胞株を作製しておき、これに候補となる遺伝子 n 種の発現ベクターを同時に導入する。もし、EGFP の発現が見られれば、n 種の中の少なくとも 1 種は上流遺伝子である。このような上流遺伝子解析は、当にフェムトインジェクション法なくしては難しい。

3.1.3 糖尿病関連遺伝子改変 ES 細胞の創製およびインスリン産生細胞への分化 (C1, D1)

〔実施方法〕

図 2-2 に示す 8 種の各遺伝子に対して、IRES を介して EGFP あるいは DsRed の遺伝子を結合したベクターを、エレクトロポレーションで ES 細胞(EB3 株)に導入した。恒常的に可視化された細胞クローンを取得し、これに対して、siRNA を遺伝子毎に数種類設計し、その効果をリポフェクション法で評価して最適な配列を決定した。次に、shRNA を生成するためのベクターを設計し、エレクトロポレーションで導入して、siRNA 恒常発現株を取得した。単一遺伝子について完了後、同様の方法で、2 種の遺伝子をダブルノックダウンした ES 細胞クローンを作製した。β細胞への分化に関しては、Miyazaki 法を追試した上で、その最適化に関する基礎データを得た。

〔成　果〕

8 種類の遺伝子に関して、その発現を可視化した ES 細胞クローン（強制発現株）が得られた（図 3-1-14）。これらの細胞に、各々3～5 種類の siRNA を設計して KD 活性を比較した。KD 率は強制発現レベルを基準にするか、野生株での発現レベルを基準にするかで値が異なる。図 3-1-15 に示した発現率（30%の KD 率ということは 70%の発現率を意味する。以下、混同を避けるため、発現率の

標的遺伝子			強制発現株（EGFP/DsRed可視化）	強制発現株KD株 (D1/C1)	強制発現株KD株 (Stage4での発現率) (D2/C2)	野生株KD株 (Stage4での発現率) (B2/A2)
シングルノックダウン	IRS-1		EGFP	20% (F)		28%(定量PCR)
	PDX-1		EGFP, DsRed	25% (F)	65%(定量PCR)	30%(定量PCR)
	Kir6.2		EGFP	5% (F)	20%(F)	64%(定量PCR), 30%(定量PCR)
	IRS-2		EGFP	22%(F)	20%(F)	30%(定量PCR)
	SHP		EGFP	75%(F)	-	-
	GK		EGFP	70%(F)	70% (F)	-
	HNF-1α		EGFP	18%(F)	80%(定量PCR)	10%(定量PCR)
	HNF-1β		EGFP	18%(F)	75%(定量PCR)	20%(定量PCR)
ダブルノックダウン	IRS-1/PDX-1	IRS-1	-	-	-	30%(定量PCR)
		PDX-1	-	-	-	32%(定量PCR)
	Kir6.2/IRS-2	Kir6.2	DsRed	5% (F)	20%(F)	-
		IRS-2	EGFP	20% (F)	20%(F)	-
	HNF-1α/HNF-1β	HNF-1α	-	-	-	10%(定量PCR)
		HNF-1β	-	-	-	20%(定量PCR)

(F): EGFPあるいはDsRedで可視化した遺伝子の発現強度を細胞あるいは細胞集団の相対的蛍光強度（蛍光強度×面積）から算出。
(定量PCR): 細胞集団から分離したRNA量をPCR解析によって算出。

図3-1-14. 糖尿病関連遺伝子ノックダウンES細胞ライブラリー

表記で統一する）はそれぞれ 50%以下の発現率に抑えることができる siRNA 配列が得られた。こうして得られた siRNA 配列を基に、shRNA 用ベクターを設計し細胞に導入した結果、SHP、GK を除く 6 種全てで、その恒常発現ノックダウン ES 細胞（強制発現株 KD 株）が得られた。さらにこれら 6 種の細胞をインスリン産生細胞（Stage4）まで分化させたところ、Kir6.2、IRS-2 では 20%以下の発現率が保持された。他の遺伝子については、KD 率が保持されなかった。以上は、可視化するために強制発現した細胞株であり、元々、発現レベルが野生株よりは高く設定されているので、その影響が無視できないと考えられた。そこで、野生株を KD させた株を作製し、これを Stage4 まで分化させて調べたところ、SHP、Gk を除く 6 種の遺伝子発現が高々30%に KD された状態が保持されていることがわかった。GK や SHP では何故かノックダウンされ難かった。

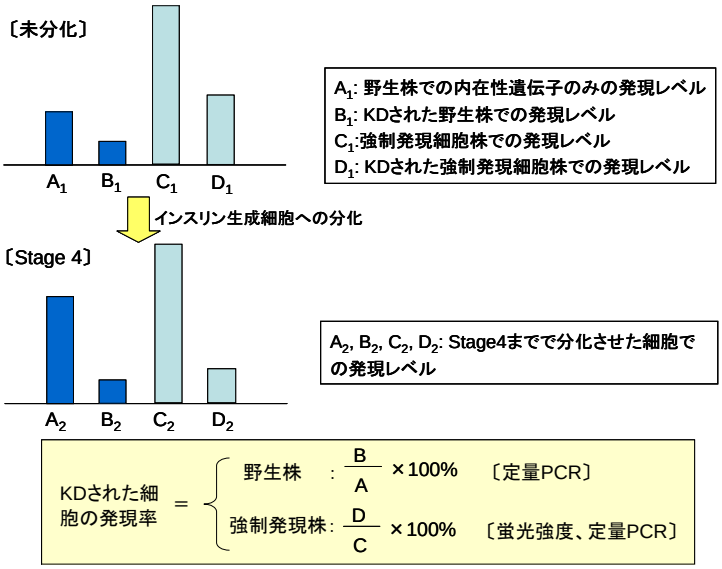


図3-1-15. KD効果の定量的表記

次に、PDX-1 と IRS-1、Kir6.2 と IRS-2、HNF-1αと HNF-1βの各組み合わせのダブルノックダウン ES 細胞の作製にも成功した。この場合も、強制発現させていない野生株 KD 株では Stage4 まで分化させても、高々30%に KD された状態が保持されていることが示された。以上により、糖尿病関連遺伝子 KD-ES 細胞ライブラリーの構築が軌道に乗ってきたと判断される。

〔類似研究動向と本成果の位置づけ〕

8 種の糖尿病関連遺伝子のいくつかについては、そのノックアウトマウスが既に作られているが、世界のわずか数ヶ所の研究グループが作った実績をもっているに過ぎない。それを基に、ダブルノックアウトマウスの作製も試みられているようであるが、今のところ、成功したとの報告は無いようである。こうした状況の下、本研究では RNAi 法による複数遺伝子 KD を目指した。しかし、KD であっても困難なことに変わりは無いと考えられたので、当初から十分に戦略を練って取り組んだ。その結果、糖尿病関連遺伝子 8 種の KD 細胞株が得られた。また、それらの中から、3 組のダブル KD 細胞株を作製した。これらの一連の細胞ライブラリーは世界に例を見ない。例えば、IRS-1 と PDX-1 のダブルノックダウンでは、両遺伝子とも発現率を 30%以下に保持することができた。こうした結果は世界で初めての報告になるはずであり、また、3 種類以上の複数遺伝子ノックダウンへ展開する道を開いた、と考えられる。そして、今後、益々重要になるであろう多因子疾患を考える上

で極めて先導的で有意義な成果であると評価される。

一方、KD は KO に比べると定量的議論が難しいとの指摘がある。すなわち、発生から分化、さらに個体に至る過程で KD 率が一定である保証はなく、したがって、実験に際して制御すべきパラメーターが余分に増えることになる。KD 法を実用化するためには、このような観点での KD 分子機構についてさらに詳しい解析が必要であろう。

3.1.4 マウス ES 細胞分化制御因子の探索 (D2)

〔実施方法〕

ES 細胞から作製した胚様体(EB 体)に、図 3-1-16 に示すように、12 日目に、スペルミンを 1 日間だけ作用させた。それに伴う形態変化、マーカー分子の発現を、免疫染色、及び遺伝子解析で調べた。

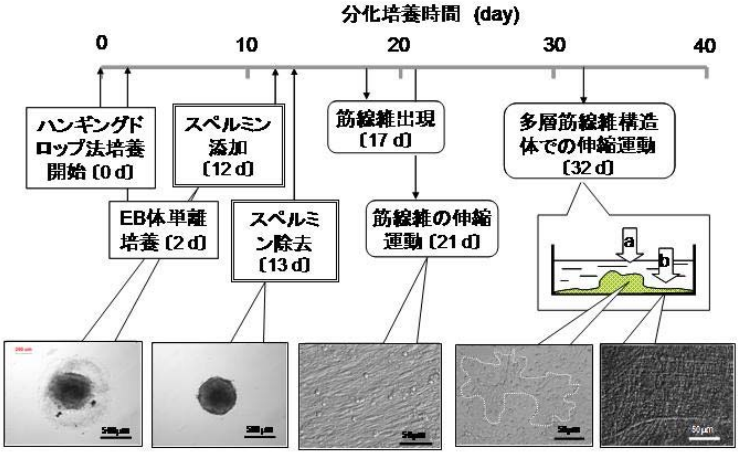


図3-1-16 多層化筋線維作製法

〔成　果〕

スペルミンを 0.5-1.0 mM で作用させると、高い確率で自立的に収縮運動をする多層化筋線維が出現することがわかった。この筋線維構造、及びギャップ結合の形成状態を免疫染色法で解析したところ、心筋特異的タンパクである Connexin 40 (Cx40)と atrium natriuretic peptide (ANP)で染色された（図 3-1-17）。また、骨格筋特異的タンパクである、MyoD でも染色され、そのパターンは成体マウスの 心筋及び骨格筋と類似していた。このことから、形成された多層化筋線維は、心筋及び骨格筋の両方の特徴を有していることが分かった。

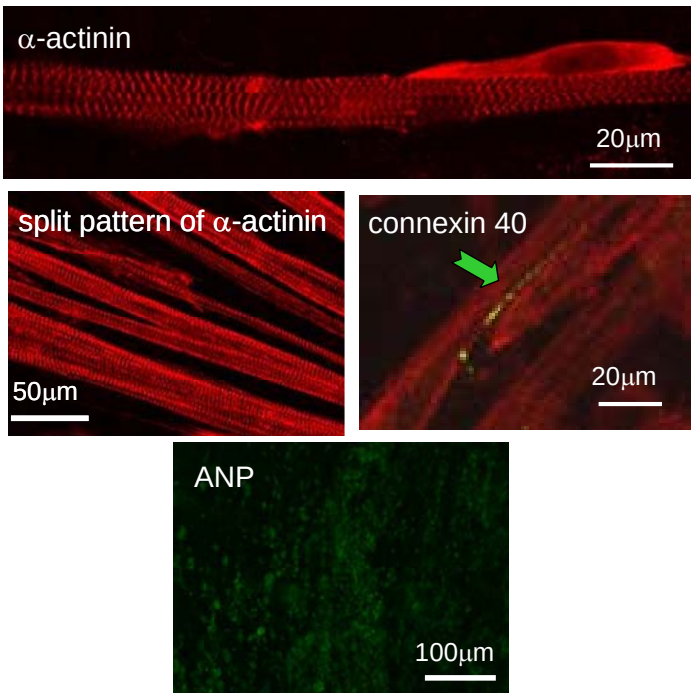


図3-1-17 多層筋繊維に観察された心筋特異的マーカーの分布

〔類似研究動向と本成果の位置づけ〕

松岡 G は十数年前より、単一細胞計測に基づく高感度抗真菌活性測定装置を開発し、それを利用して、世界に先駆けて、生薬中に多くの抗真菌活性成分が含まれていることを見出してきた。この経験に基づき、ES 細胞の分化に影響を及ぼす新規物質の探索源として、生薬に着目した。その結果、7 種類の生薬のうち人参抽出物中に拍動を活発にする成分、逆に阻害する成分が各々複数見出された。詳しい解析の結果、拍動を阻害する活性成分の一つ、スペルミンに多層化筋線維を形成する作用があることが見出された。従来は、心筋細胞は単層での培養しかできなかったが、本研究により、世界で初めて 3 次元構造を有する多層化筋線維の作製に成功した。このことは、新たな ES 細胞の分化関連因子の探索源として、生薬が極めて有望であることを示す結果であると考えられる。

3.1.5 遺伝子改変 ES 細胞からのトランスジェニックマウスの作製 (E1)

〔実施方法及び成果〕

マウス個体作製は松岡 G と後述の小倉 G が実施した。得られたマウス個体に関して、毛色からキメラの程度を判断した。また、毛色だけからでは判断が難しい場合もあるので、尾または血液からげゲノム DNA を抽出し、導入遺伝子に特異的な配列を標的にした PCR 解析によっても判断した。

松岡、小倉、両 G によって得られたキメラマウス、あるいは遺伝子導入個体は図 3-1-18 に示すように、50 に達している。

方 法	導入遺伝子	目的	遺伝子導入するホスト細胞の系統名	遺伝子導入細胞を導入するホスト胚盤胞の系統名	産仔数		キメラ個体または遺伝子導入個体数	担当
キメラ法	shPDX1	KD	129 (EB3)	B6J	♂	4	3	松岡G
					♀	4	2	
	Kir6.2-DsRed/ IRS2-EGFP	ダブル OE	129 (EB3)	BDF1×B6J	♂	1		
					♀	2	1	
	IRS2-EGFP	OE	129 (EB3)	BDF1×B6J	♂	5	5	
					♀	10	6	
	IRS2-EGFP	OE	129 (EB3)	B6J	♂	3		
					♀	1		
	shHNF1α	KD	129 (EB3)	BDF1×B6J	♂	2	1	
					♀	1	1	
	shHNF1β	KD	129 (EB3)	BDF1×B6J	♂	3	1	
					♀	2		
	GKターゲティングベクター	KO	129 (EB3)	B6J	♂	8	6*	
					♀	11	2*	
	GKターゲティングベクター	KO	129 (EB3)	BDF1×B6J	♀	2	1*	
	shEGFP	KD	B6J由来ES細胞 (B6G-2)			20	9	小倉G
核移植クローン法	shPDX1	KD	(B6J×129)F1由来繊維芽細胞			2	2	
	shIRS1	KD				0		
	―		(B6J×129)F1由来ES細胞			0		
受精卵導入法	shPDX1	KD	B6J		♂	16	9	
	shIRS1	KD	B6J			16	10	
個 体 総 数						81	50	

図3-1-18 遺伝子改変マウス個体作製状況

〔類似研究動向と本成果の位置づけ〕

遺伝子改変マウス個体の作製は、ドナーとなる ES 細胞の性質や改変した遺伝子の種類によって成功の可否が著しく影響を受けるようである。今回作製に成功した一連のマウス個体は、まだキメラマウスの段階であるとはいえ、その基になった遺伝子改変 ES 細胞が、十分、個体作製に利用できることを示している。糖尿病関連遺伝子 KDES 細胞ライブラリー作製が、世界で初めての成果であると同時に、その ES 細胞から作製されたマウス個体も世界で初めての成果である。これまで、キメラマウスさえなかなか出来なかったが、漸く、その壁は越えたようである。次は、トランスジェニック個体で、かつ、サイレンシングの起きない個体を目指す段階である。

3.2 稲垣グループ:「疾患原因遺伝子を標的として改変した細胞の作製と細胞機能解析」

「疾患原因遺伝子を標的として改変した細胞の作製と細胞機能解析」として、上記の研究課題 A～G に対応して、設定された次の課題を実施した。

・糖尿病モデル細胞としての指標遺伝子系の構築 (B)
・PDX-1 遺伝子改変細胞の作製と機能解析 (C1, F)
・脂質代謝関連タンパク AMPK の機能解析 (F)
・ABCA3 遺伝子改変細胞の作製と機能解析 (C1, F)

3.2.1 糖尿病モデル細胞としての指標遺伝子系の構築(B)

〔実施方法及び成果〕

糖尿病関連遺伝子は遺伝子名が明示されているものだけでも約 50 種類ある。その分類は必ずしも厳密ではないが、例えば、

(a)単一遺伝子病モデルにおける原因遺伝子として挙げられるのは 8 種類、
(b)ヒト糖尿病関連遺伝子として挙げられているものは約 20 種類、
(c)糖尿病との関連が示唆された遺伝子は約 20 種類、である。また、
(d)筋緊張性ジストロフィーなど、原因遺伝子が同定されている遺伝子疾患で糖尿病を併発する例がいくつか知られているが、これらの原因遺伝子も、見方によっては糖尿病関連、あるいは原因遺伝子とみなすべきかも知れない。
(e)肥満のように、それ自体が病気とは限らないが、糖尿病の発症状態に影響を及ぼすことが知られている場合、肥満の原因遺伝子は糖尿病関連遺伝子とみなすことができるかもしれない。さらに、
(f)複数の遺伝子が同時に異常になったときに発症するという多因子遺伝モデルに該当する遺伝子座も報告されている。当に、糖尿病が典型的な多因子疾患といわれる所以である。

以上のことを考慮して、医薬・医療の観点から「糖尿病に対する疾患モデル細胞」を提示するために、どのような遺伝子の組み合わせを考えるべきか、についての調査し、具体的な複数遺伝子を選定した。その視点とは

(i) 単一の遺伝子の改変で確実に糖尿病を発症する確率が高い遺伝子を選ぶこと、

(ii) 他の遺伝子との組み合わせによって糖尿病を発症させるような遺伝子を選ぶこと、

としたが、同時に、

(iii) 新規の関連遺伝子の発見や上流遺伝子の解析を進めること、

とした。その結果、(i)に該当する遺伝子として PDX-1, GK (いずれも(a)に属する)、(ii)に該当する遺伝子として IRS-1, Kir6.2 (いずれも(b)に属する), IRS-2 ((c)に属する), SHP ((e)に属する) を選んだ。

全体のスケジュールに鑑み、第一に PDX-1 を選んで、そのノックアウト ES 細胞を最初に作製し、小倉 G でのクローンマウス作製に供することとした。6 種類の遺伝子改変 ES 細胞の作製は、改変法の検討も含め、他 G が行うこととした。さらに、医薬・医療の観点から重要なのは、(iii)の視点である。元々、糖代謝異常の典型的な疾患とされてきた糖尿病ではあるが、脂質代謝異常も関係している可能性がある。実際、上記分類中、(a)、(b)の中にも脂質代謝関連遺伝子が含まれている。そこで、(iii)の視点として、この脂質代謝関連遺伝子、具体的には、ABC トランスポーター遺伝子に着目し、その遺伝子改変細胞の開発も平行して進めることとした。

3.2.2 PDX-1 遺伝子改変細胞の作製と機能解析 (C1, F)

〔実施方法〕

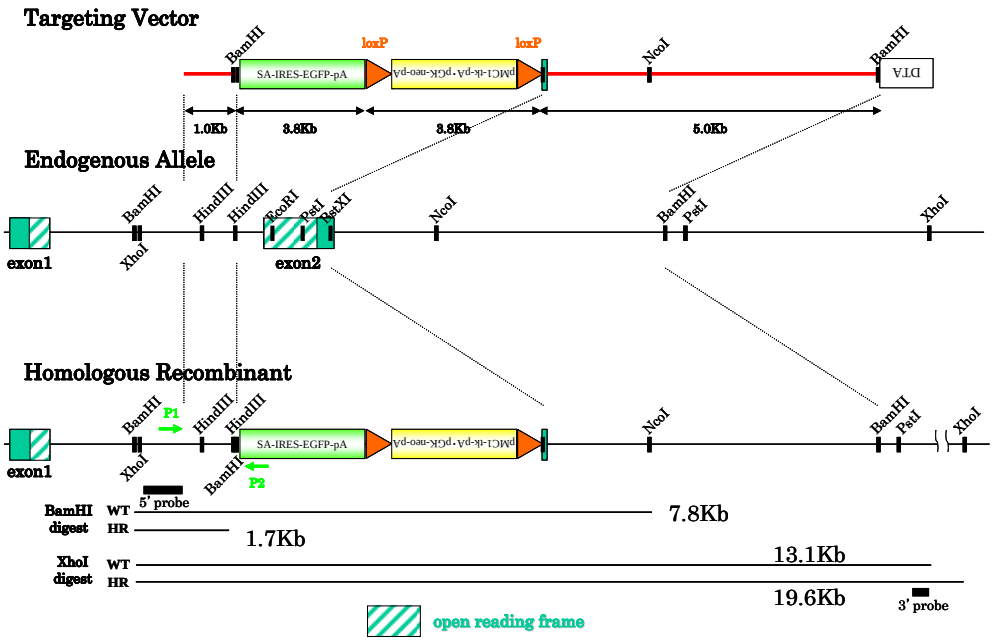


図3-2-1 PDX-1に対するターゲティングベクター

マウスゲノムファージライブラリーから PDX-1 遺伝子を含む領域をスクリーニングにより単離し、図 3-2-1 に示すターゲティングベクターを作製した。これをエレクトロポレーション法により ES 細胞（EB3）に導入し、G418 により薬剤選択して PDX-1 遺伝子座に EGFP 遺伝子をノックインした ES 細胞を得た。この ES 細胞を用いて、PDX-1 陽性細胞を可視化したノックインマウスの作製を試みた。さらに、この ES 細胞を用いて in vitro で膵島への分化誘導を試みた。

〔成　果〕

pdx-1 遺伝子座に EGFP 遺伝子を相同性組み換えによりノックインした ES 細胞を作製した。この ES 細胞を用いて、PDX- 1 陽性細胞を可視化したノックインマウスの作製を試みキメラマウスが生まれたが、F1 ヘテロマウスの樹立に成功しなかった。そこで、ES 細胞株を EB3 から E14 に変更し、再度、エレクトロポレーションにより相同性組み換えを行い、ノックイン ES 細胞を作製した。さらに高効率に F1 ヘテロマウスを作製するために、DsRed を恒常的に発現するノックイン細胞を作製した（図 3-2-2）。この細胞をマウス胚盤胞にインジェクションすることにより、寄与率の高いキメラマウスの作製に成功した。雄のキメラマウスが 3 週齢になった時点で精巣を摘出し、DsRed 陽性精子細胞を蛍光顕微鏡下で採取し、顕微受精を行うことにした。しかしながら（図 3-2-3）に示したように、精細管の間質細胞は RFP 陽性であったが、RFP 陽性精子細胞が非常に少なく、顕微受精を断念した。

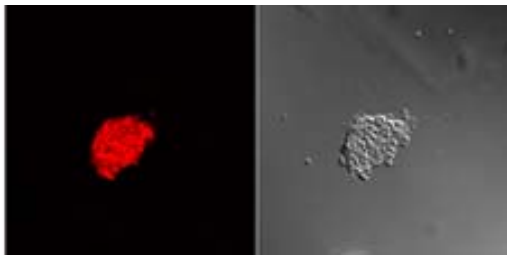


図3-2-2 マーカー遺伝子DsRedを発現させたE14細胞

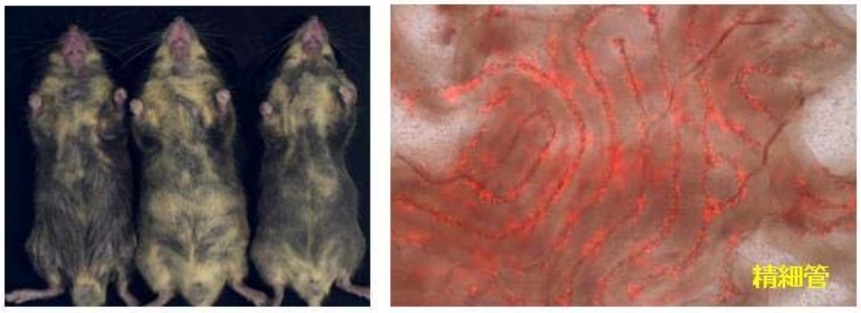


図3-2-3. DsRed恒常発現ES細胞株から作製したキメラマウス（3週齢）

3.2.3 脂質代謝関連タンパク AMPK の機能解析 (F)

〔実施方法〕

AMP-activated protein kinase（AMPK）は細胞内の AMP により活性化されるプロテインキナーゼであることから、細胞内の代謝センサーとして機能している可能性があり、また脂質代謝酵素の調

節因子でもあることから、生体における糖脂質代謝に深く関わっている可能性がある。そこで、インスリンプロモーター制御下に AMPK の酵素触媒領域を持つα1 サブユニットの constitutive active form（AMPK-CA）や dominant negative form（AMPK-DN）を組み入れたトランスジーンを作製し、マウス受精卵にインジェクションを行い仮親の卵管に戻すことで、膵β細胞でこれらの遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製した。これらのマウスを用いて、種々の条件下においてインスリン分泌に及ぼす AMPK の影響について検討した。

〔成　果〕

膵β細胞で AMPK の AMPK-CA または AMPK-DN を過剰発現させたトランスジェニックマウスの作製を試みた結果、AMPK-CA に関しては 4 ライン、AMPK-DN に関しては 7 ラインのそれぞれコピー数の異なるトランスジェニックマウスの作製に成功した。さらに AMPK-CA、AMPK-DN をアデノウイルスにより膵島に感染させる事で発現させ、グルコース応答性インスリン分泌における効果について、現在継続して解析している。

3.2.4 ABCA3 遺伝子改変細胞の作製と機能解析 (C1, F)

〔実施方法〕

糖尿病は単に糖代謝のみに関する疾患ではなく、脂質代謝疾患も密接に関わっている多因子疾患である。脂質代謝疾患の中で近年注目されているものの一つが脂質を始めとする多様な基質を輸送する ABC トランスポーターである。この中で、特に ABCA3 が肺サーファクタントの分泌に関与している可能性を、稲垣 G は世界に先駆けて提唱してきた。そして、実際、ABCA3 遺伝子異状によっ

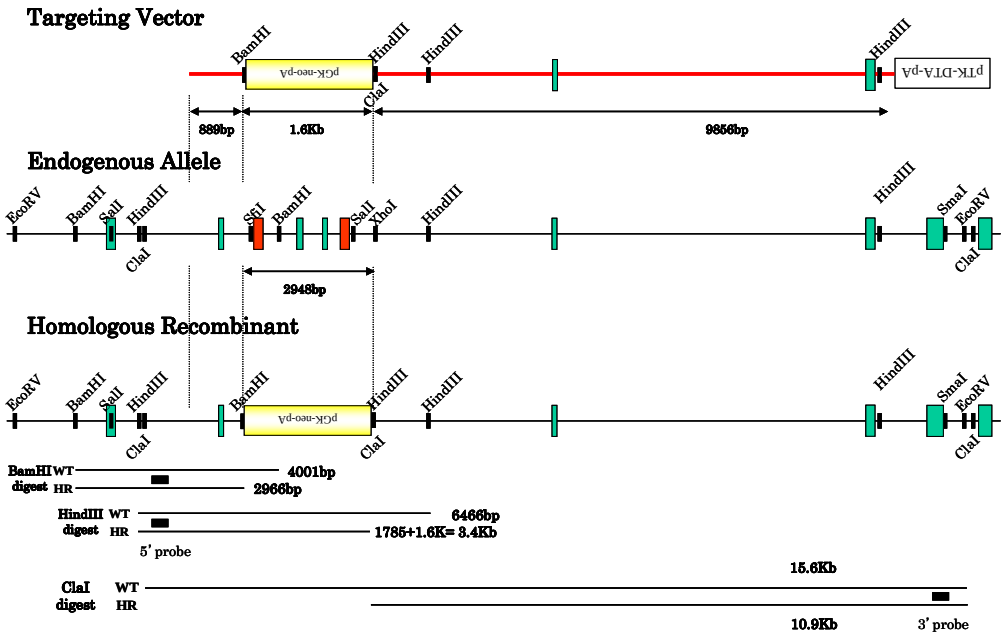


図3-2-4. *abca3* に対するターゲティングベクター

て先天性サーファクタント欠損症が引き起こされることが、他の研究グループにより、報告された。そこで、その報告にある遺伝子変異体を発現するベクターを mutagenesis により作製し、哺乳動物細胞（ヒト腎臓由来細胞 HEK293、肺上皮由来細胞 A549 など）に発現させることにより、細胞内局在、糖鎖修飾、ATP 加水分解能の変化について検討することとした。

マウスゲノムファージライブラリーから *abca3* 遺伝子を含む領域をスクリーニングにより単離し、図 3-2-4 に示すようなターゲティングベクターを作製した。これをエレクトロポレーション法により ES 細胞（E14）に導入し、G418 により薬剤選択して *abca3* 遺伝子座にネオマイシン耐性遺伝子を導入した ES 細胞を得た。この ES 細胞を用いて、ABCA3 遺伝子欠損マウスを作製し、生化学的・生理的機能解析を試みた。

一方、マウスゲノムファージライブラリー及びマウス精巣 cDNA ファージライブラリーを用いたスクリーニングにより、ABCA3 と非常に相同性の高い新規 ABC 蛋白 ABCA17 を単離した。またラットオルソログを 5'-RACE、3'-RACE 法により単離した。ABCA17 の発現分布は RNA ブロット法、リアルタイム PCR 法、*in situ* ハイブリダイゼーション法により検討した。さらに ABCA17 蛋白の C 末端に特異的な抗体を作製し、蛋白レベルでの局在を検討した。また哺乳動物細胞に ABCA17 蛋白を安定発現させた細胞株を作製した。さらに、ABCA17 遺伝子欠損マウスを作製、解析することにより ABCA17 の個体における機能や病態における役割の解明を試みた。

〔成　果〕

変異 ABCA3 タンパクを培養細胞で発現させて解析を行った。N568D, G1221S, L1580P 変異体タンパクは野生型と同様に大部分がラメラ体や多小胞体のマーカーである LAMP3 陽性の細胞内小胞に局在した。これに対し、L101P、L982P、L1553P、W1142X、Ins1518fs/ter1519 変異体タンパクは大部分が小胞体に局在し、また糖鎖修飾の異常が認められた。一方で、細胞内局在が正常であった N568D、G1221S、L1580P 変異体タンパクは、野生型と比べ ATP 加水分解能の著しい低下が認められた。これらの結果から、ABCA3 遺伝子変異は細胞内局在に異常が生じる I 型、ATP 加水分解能に異常が生じる II 型に二分することができると推定された。致死的サーファクタント欠損症患者は多くの場合 I 型変異をホモで持つか、あるいは I 型と重度の II 型変異をヘテロで有しており ABCA3 の著しい機能異常が致死的サーファクタント欠損を引き起こすと推測される。

X 線結晶構造解析の検討から既に 3 次元立体構造が明らかとなっているバクテリアのマルトーストランスポーターMal K との SWISS-MODEL を用いたホモロジーモデリング解析

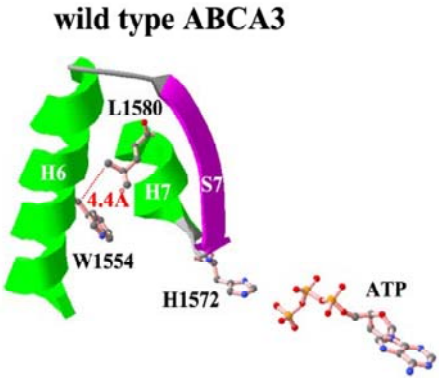


図3-2-5. SWISS-MODELを用いたホモロジーモデリング解析

を行った結果、さまざまなアミノ酸の変異によって ABCA3 の ATP 加水分解能が変わる原因が 3 次元的な立体構造のとり方にあることを明らかにした（図 3-2-5）。

HEK293 細胞に ABCA3 タンパクを安定発現させることによって、ラメラ体様の細胞内小器官ができること、また ABCA3 は脂質存在下で ATP 加水分解能が誘導されることを見出した。これらの結果は ABCA3 が ATP の加水分解を利用して脂質を輸送することを示唆した最初の報告である。

ABCA3 を介する脂質輸送機構をより詳細に明らかにするために、野生型 ABCA3 タンパクおよび II 型変異 (N568D) ABCA3 タンパクをそれぞれ A549 細胞に安定発現させて解析を行った。野生型発現株では、LAMP3 陽性の細胞内小胞が肥大し、ホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンなどのコリンリン脂質量が増加した。変異型発現株では LAMP3 陽性の細胞内小胞の肥大は認められず、コリンリン脂質量は A549 細胞と同レベルであった。一方、総コレステロール量は A549 細胞、野生型発現株、変異型発現株で同レベルであった。野生型発現株ではコリンリン脂質に富む比重の軽い細胞内小胞が増加し、細胞内小胞のラメラ構造形成の促進が認められた。これらの結果は、ABCA3 を介するコリンリン脂質の LAMP3 陽性小胞内部への輸送がラメラ体の成熟に重要な役割を果している可能性を示唆している。これらの結果から、ABCA3 は、細胞内において脂質トランスポーターとして機能し、ラメラ体形成に重要な役割を担っている可能性が明らかになった。

また、本邦の小児肺疾患患者から新規の W1148X/T1114A ヘテロ複合変異を見出すことに成功した。モデル細胞を用いた機能解析を行った結果、W1148X は細胞内局在異常を引き起こす I 型変異、T1114A は ATP 加水分解能の緩やかな低下を引き起こす II 型変異であり、比較的軽度の II 型変異が本症例の非致死性と関係していることが推測された。

ABCA3 の生理的な機能を明らかにするために、上述の方法で ABCA3 遺伝子欠損マウスを作製した。図 3-2-7 は Genotype をサザンプロットにて確認した結果である。ABCA3 遺伝子欠損マウスは生後一時間以内にチアノーゼを呈し、呼吸不全で死亡した。また、肺胞嚢の拡張が不十分で、正常なラメラ体が存在せず、ヒトサーファクタント欠損患者と同様に密な構造を有する異常なラメラ体様の細胞内小器官が認められた（図 3-2-7）。

一方、サーファクタントタンパクであるプロ SP-C は検出されたが、成熟 SP-C は認められなかっ

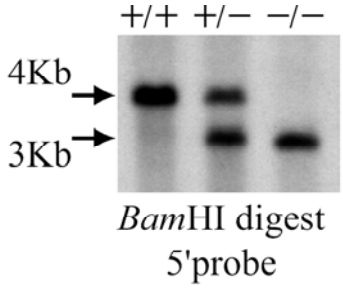


図3-2-6. 5’probeを用いたサザンブロットの結果解析

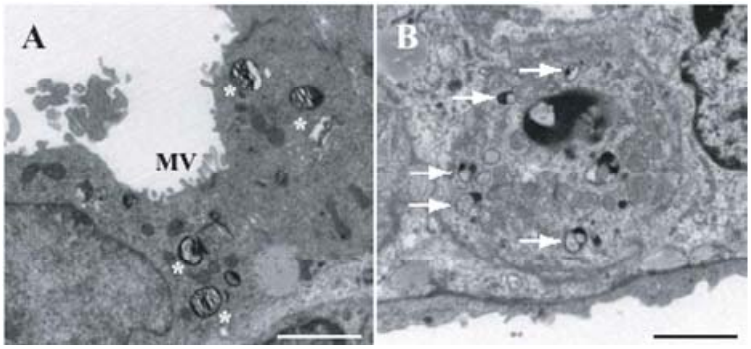


図3-2-7.マウス肺電顕像（A:WT, B:KO）

た。肺間質由来の脂質を二次元薄層クロマトグラフィーとエレクトロスプレーイオン化質量分析にて網羅的な脂質解析を行ったところ、側鎖にパルミチン酸を有するホスファチジルコリンやホスファチジルグリセロールが著しく減少していた（図 3-2-8）。これらの結果は、ABCA3 がこれらのリン脂質のトランスポーターとして機能し、サーファクタント代謝とラメラ体の形態形成に重要な役割を担っている可能性を強く示唆している。

さらにまた、ABCA3 と非常に相同性の高い、マウス及びラット ABCA17 について解析した。その結果、精子細胞及び精子の先体膜に局在していた。また哺乳動物細胞に ABCA17 蛋白を安定発現させた細胞株を作製したところ、細胞内コレステロールエステル・脂肪酸エステル・中性脂肪が有意に減少していた。精子の受精能獲得には先体膜上のコレステロール量の減少が必須であることから、雄性不妊という疾患の原因となることも考えられ、ABCA17 の精子における生理学的役割をさらに明らかにしていかなくてはならない。

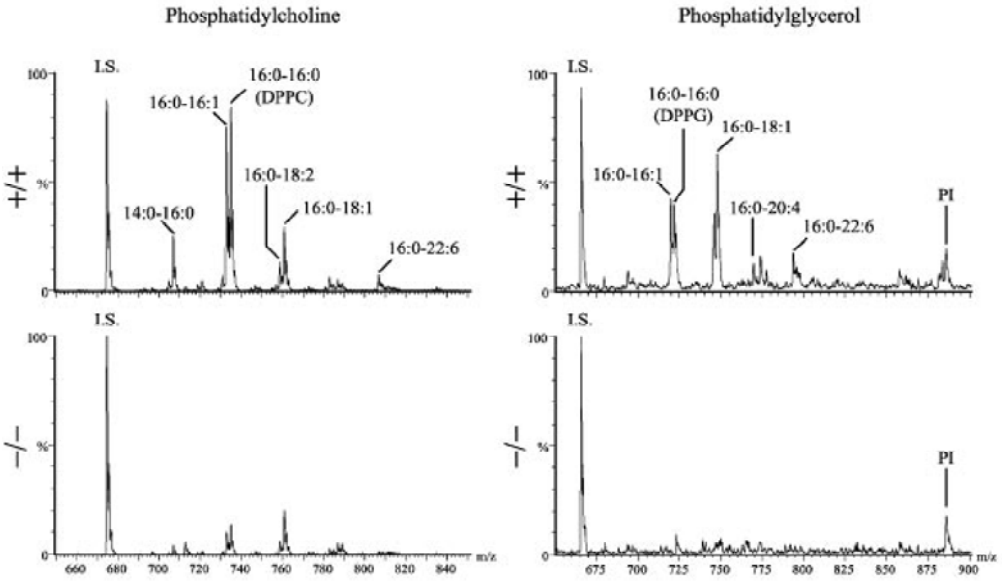


図3-2-8. LC-ESI/MSを用いた網羅的なメタボローム解析

〔類似研究動向と本成果の位置づけ〕

稲垣 G ではこれまでに、糖尿病の成因に関する分子生物学的研究を行い、特にインスリン分泌や脂質輸送にかかわる遺伝子の単離を行ってきた。また、その過程でカリウムチャネルやカルシウムチャネルのほか、多様な基質を輸送する ABC トランスポーターなど、さまざまな膜輸送蛋白をコードする遺伝子を単離してきた。

平成 14 年から糖尿病や肺サーファクタント欠損症をはじめとするさまざまな糖・脂質代謝疾患の原因遺伝子を単離・同定すると同時に、単一あるいは複数の疾患原因遺伝子を破壊あるいは改変することにより、疾患モデル細胞を作製した細胞の機能解析を行ってきた。平成 15～17 年には肺にお

ける脂質代謝に関与する ABC トランスポーターABCA3 遺伝子の単離・同定、さらに日本人の患者において初めて遺伝子異常を発見した。一方国外では、Shulenin らは先天性肺サーファクタント欠損患者において ABCA3 遺伝子の異常の存在を報告し、稲垣 G が提唱してきた ABCA3 が肺サーファクタントの分泌に関与しているという仮説が証明された(Shulenin et al. N. Engl. J. Med. 350: 1296-1301, 2004)。しかしながら、そのメカニズムに関しては全く不明であった。

平成 18 年には、ターゲティングベクターとの相同性組み換えにより ES 細胞の ABCA3 遺伝子を欠損させ、ノックアウトマウスの樹立に成功した。また同年には肺サーファクタント欠損患者において認められた ABCA3 変異タンパクを発現する疾患モデル細胞を作製し、局在・糖鎖修飾・ATP 水解活性を調べる事によって、重篤度をはじめとする臨床的なクラス分けを可能にした [I-62]。さらに ABCA3 ノックアウトマウスから精製した脂質の網羅的なメタボローム解析によって、パルミチン酸残基を持つホスファチジルコリンとホスファチジルグリセロールが ABCA3 タンパクの輸送基質であることを明らかにした [I-92]。

哺乳細胞を用いた網羅的な脂質メタボローム解析は、技術的にも難しく世界をリードする結果である。しかしながら、ABCA3 の変異の違いによってタンパクの細胞内局在や機能に異常が生じる原因、また重篤度の異なる肺疾患が発症するメカニズム、さらに病態の発症時期に違いが生じる理由など、未だ十分に解明されていない問題が多く存在する。また現在のところ、*ABCA3* 変異による肺疾患に対する有効な治療法は肺移植以外には存在しない。以上の一連の成果は、本研究課題である「疾患モデル細胞の高効率創製と機能解析」の推進が、変異の種類に応じた有効な治療法開発の糸口になる、ということを強く支持するものであると言えよう。

3.3 小倉グループ:「核移植クローン技術および顕微授精技術などを用いた疾患モデル細胞からの疾患モデル個体の作出」

「核移植クローン技術および顕微授精技術などを用いた疾患モデル細胞からの疾患モデル個体の作出」として、上記の研究課題 A～G に対応して、設定された次の課題を実施した。

- 核移植クローン技術の開発 (E, F)
- 疾患モデル動物作製用新規細胞株の作製 (E, F)
- キメラ法による疾患モデルマウスの作出 (E, F)
- 核移植クローン法による疾患モデルマウスの作出 (E, F)
- 受精卵導入法による疾患モデルマウスの作出 (E, F)

3.3.1 核移植クローン技術の開発 (E, F)

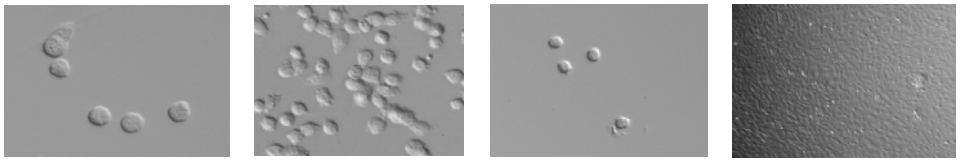
〔実施方法〕

核移植クローン作製に最適な ES 細胞・体細胞の樹立をめざし、常用されている 3 系統（C57BL/6、DBA/2、 および 129）のマウスを掛け合わせた第一世代の F1 マウスのクローン効率を検討した。

〔成　果〕

8 種類の細胞から産子を作出することに成功した（図 3-3-1）。そして再構築胚の発生結果の統計学的解析から、細胞種と遺伝子型を適切に組み合わせることにより、クローンの作出効率を改善できることが明らかになった（図 3-3-2）。特に(C57BL/6[B6] x 129)F1 系は、雄のクローンを作出する上で非常に良好な結果を示した。また、クローンの成功に必須であるドナーゲノムの再プログラム化の指標として、2 細胞期で発現する遺伝子マーカーを 4 種類特定できた（図 3-3-3；Dppa2、Dppa4、ERV-L、 eIF-1A）。この手法により、核移植クローン実験の効率を胚移植の結果を待たずに、核移植の翌日に予測できるようになった。また、造血系列細胞など一定の条件化で比較した限り、細胞の未分化度とクローンの効率には必ずしも関連は無かった。以上のように、適切な遺伝子型と細胞種のドナーを考慮し、かつ初期胚の遺伝子発現パターンを指標にすることより、今後核移植クローン技術改善が進展すると期待される。この結果をもとに核移植クローンに最適と予想される雄(B6 x 129)F1 系 ES 細胞および尾部由来線維芽細胞の樹立を試み、成功したので、核移植実験に移行した（下記 3.3.4）。

細胞	特徴	産子/移植
卵丘細胞	細胞の準備、注入が容易。産子を得やすい。	1%
未成熟セルトリ細胞	注入が容易。産子を得やすい。	4-10%
胎仔線維芽細胞	細胞周期の調節が必要。増殖が早い。	4%
尾部線維芽細胞	個体を生かしたまま細胞を採取できる。細胞膜が強固で、注入法に向かない。	4%
胎仔生殖細胞	ドナー採取胎齢により胚発生が異なる。	2%
神経幹細胞	注入が容易。産子を得やすい。	2%
リンパ球系細胞	DNA rearrangement を残したまま個体になる。	2%
造血幹細胞	G0 のため、2-cell 率は高い。	1%



卵丘細胞 (cumulus)　未成熟セルトリ細胞 (immature Sertoli)　造血幹細胞 (hematopoietic stem)　成体線維芽細胞 (adult fibroblast)

図3-3-1. クローン産子の作出を確認したドナー細胞種とその性質

(A) 二元分散分析

	2-cell	Morula/ blastocyst	Implantation	Pups
Cell type	< 0.05	NS	NS	< 5.0×10^{-7}
Genotype	NS	NS	NS	NS
Interaction	NS	NS	NS	<0.05

NS, no significant difference.

(B) 多重比較検定

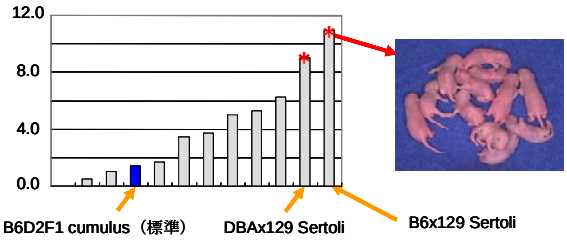
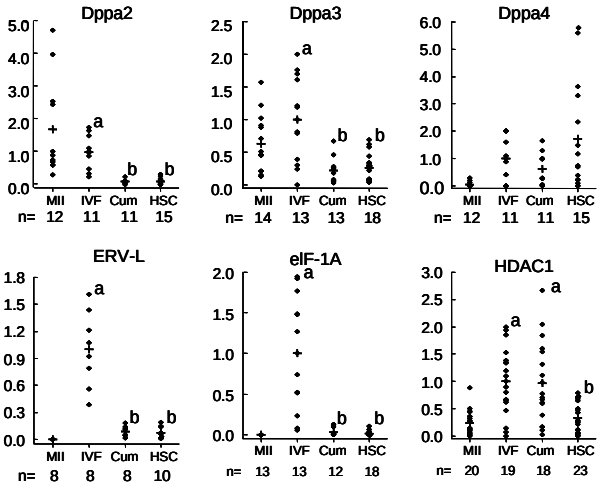


図3-3-2 細胞種と遺伝子型の組み合わせによるクローン産仔作出効率



Cum: cumulus cell clone; HSC: hematopoietic stem cell clone

図3-3-3 体細胞クローン２細胞期胚の遺伝子発現

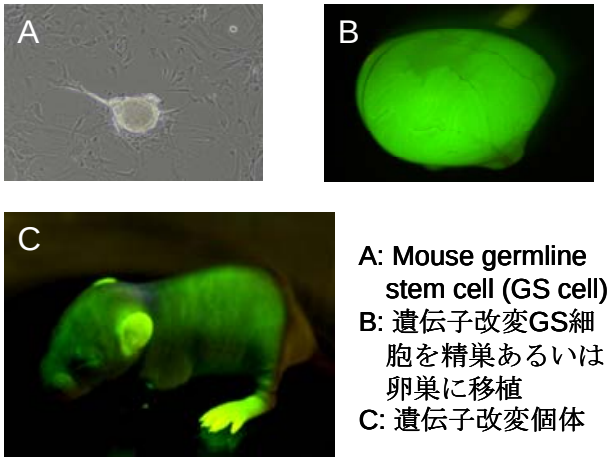
3.3.2 疾患モデル動物作製用新規細胞株の作製 (E, F)

〔実施方法〕

マウス以外の動物への応用展開の将来的要請も視野に入れ、唯一の齧歯類以外の一般小型実験動物であるウサギに着目し、マウスとともにウサギの ES 細胞および GS 細胞樹立を試みた。また、ES 細胞に代わる多分化能細胞として、生殖細胞(GS 細胞)に着目し、その樹立・応用も試みた。

〔成　果〕

マウス ES 細胞以外の多分化能幹細胞の樹立に関しては、雄の GS 細胞の樹立に成功している。この雄 GS 細胞は、ジーンターゲティングができることが明らかになった。このジーンターゲティング GS 細胞由来の精子を用いてジーンターゲッティングヘテロ個体の作出に成功した（図3-3-4）。雌雄ヘテロ個体が存在したので、両者の精子と卵子で顕微授精を行い、ホモ個体を早期に作出することに成功した。一方、雌においても GS 細胞の樹立を目指し、



A: Mouse germline stem cell (GS cell)
B: 遺伝子改変GS細胞を精巣あるいは卵巣に移植
C: 遺伝子改変個体

図3-3-4 GS 細胞の疾患モデル個体作出への応用

コロニーの形成には成功した。しかしながら、これらの細胞は、生殖細胞系列でなく、体細胞系列の荚膜幹細胞であることが明らかになった。この幹細胞は in vivo および in vitro で分化誘導が可能である。

ウサギの ES 細胞も安定したコロニー作出法に成功した。日本白色種ウサギの受精卵を採取し、in vitro で胚盤胞期胚まで発生させた後に、透明帯を物理的に切除し、マウスフィーダー細胞上で培養した。様々な試行錯誤の末に、ウサギ ES 様細胞を未分化なまま増殖させるには、フィーダー細胞の濃度が重要であることを突き止めた。樹立したウサギ ES 様細胞はヒト ES 細胞のように単層で増殖し、アルカリフォスファターゼ陽性であった。免疫染色では SSEA1、SSEA4、Oct4、および Nanog 陽性であることが明らかになった。ハンギングドロップ法で高密度培養を行うことで胚様体の形成も見られ、SCID マウスに移植することにより三胚葉性のテラトーマ形成も確認できた（図 3-3-5）。また、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入も可能であるため、現在は GFP を発現するウサギ ES 様細胞をウサギ胚盤胞期胚に注入して、キメラウサギ作製に取り組んでいる。

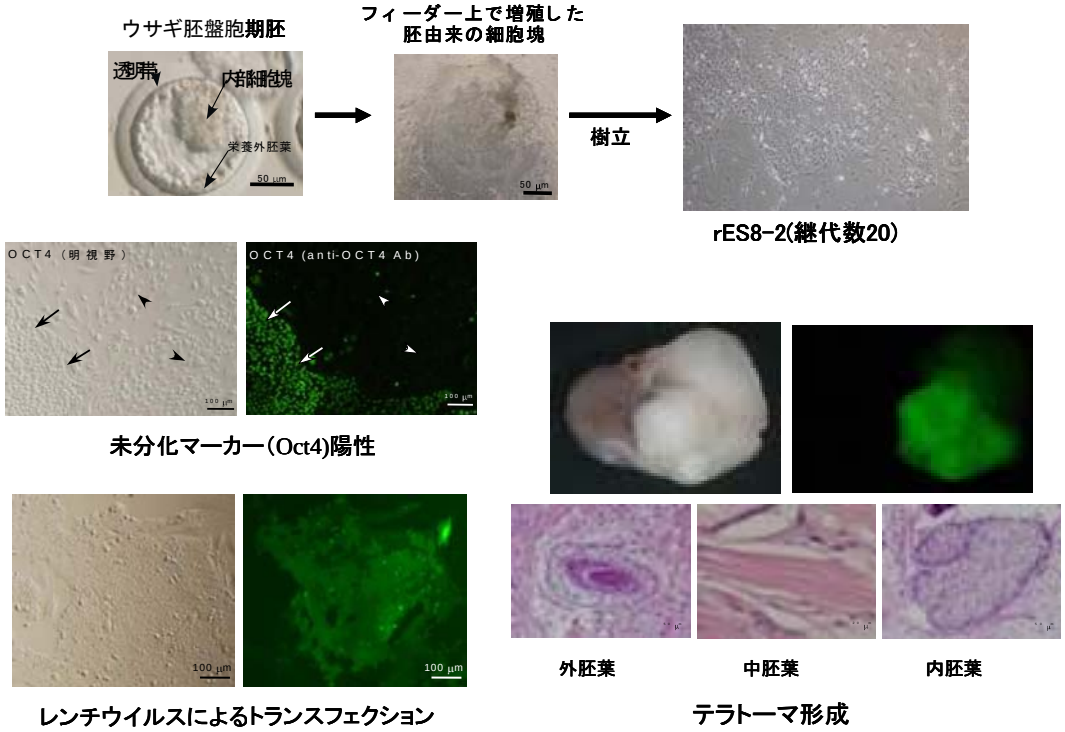


図3-3-5. ウサギES細胞株の樹立と解析

3.3.3 キメラ法による疾患モデルマウスの作出 (E, F)

〔実施方法〕

ES 細胞からのクローンマウス作製効率が低すぎる場合も想定して、顕微授精によるキメラ作製を行った。なお、本節と次の 2 節で実施する個体作出法を図 3-3-6 に示す。

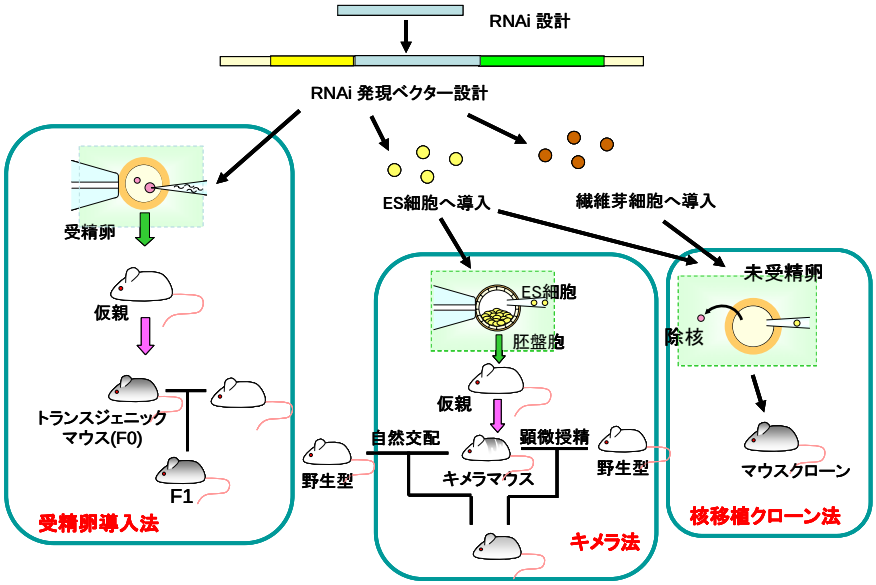


図3-3-6 遺伝子改変マウス個体作出法

〔成　果〕

3.3.1 の核移植クローン技術開発の間に、shRNA を組み込んだ ES 細胞 -> キメラマウス作製 -> 顕微授精からなる実験系を開発した。まずは既存の ES 細胞（E14 株）からの疾患モデル個体の作出も進めるために、疾患モデル ES 細胞（稲垣グループ作製 PDX-1 ノックイン ES 細胞）を胚盤胞へ注入した。この目的のためには、自然交配よりも顕微授精が早期に germline transmission を確認できるので、当該 ES 細胞にはさらに DsRed のマーカー遺伝子を導入して実施した。このノックイン＋DsRed ES 細胞由来キメラマウスを 39 匹作出できたので（図 3-2-4）（上記の稲垣 G に記載）、DsRed を指標に精巣から精細胞を回収しようとしたが、すべて体細胞系列のみに寄与しており（図 3-2-4）、顕微授精には至らなかった。

そこで、既存の ES 細胞として、まだ継代の少ない B6 由来 ES 細胞（B6G-2 株）へ shRNA を導入し、同様の実験を試みた。その結果、キメラ個体が作出でき、その精巣中のマーカー(EGFP)を元に顕微授精を実施したところ、生殖系列への寄与も確認できた（図 3-3-7）。最終的に目的のトランスジェニックマウスを 9 匹作出することに成功した（図 3-3-7）。しかしながら、樹立したマウス系統においては、組み込まれた shRNA が発現抑制を受けていた。そこで、さらに子孫の解析を行ったが、同様に発現抑制が生じていた。遺伝学的には、疾患モデルマウスとして確立しているので、現在、これらのサイレンシングの解除を試みている。

3.3.4 核移植クローン法による疾患モデルマウスの作出 (E, F)

〔実施方法〕

ES 細胞から直接クローンマウス作製が困難な場合も想定して、キメラ作製法で作製した個体の体細胞からのクローンマウス作製のための、クローンの効率の良い体細胞を選択した。また、既存 ES

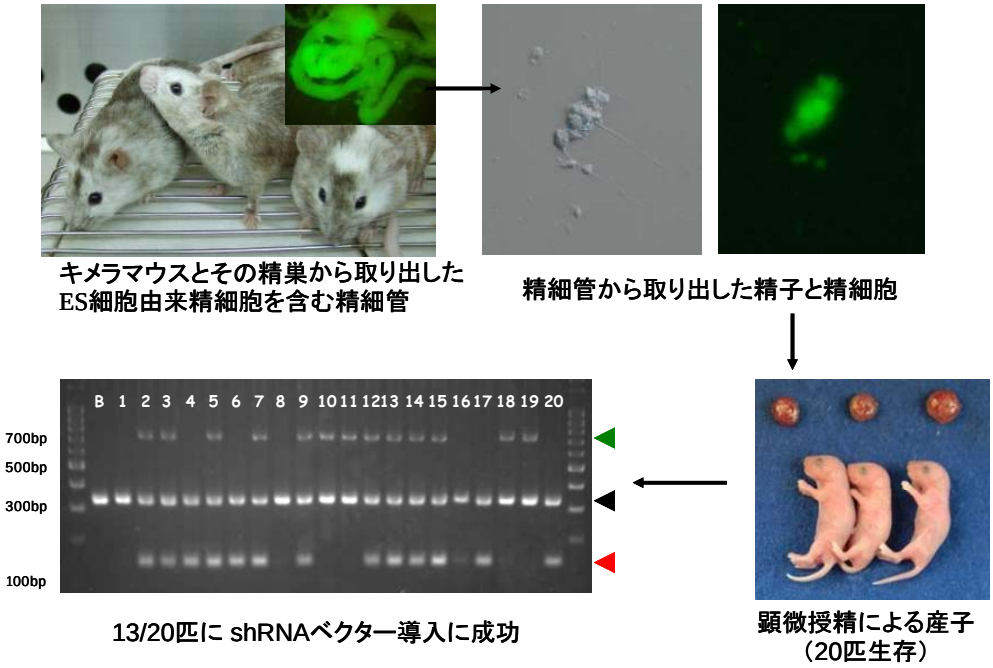


図3-3-7.顕微授精技術を用いた shRNA導入 ES細胞(B6G-2株) 由来
キメラマウスからの産子の作出

細胞からのクローン作製に関しては、稲垣 G によって EB3 から作製された PDX-1 ヘテロノックアウト ES 細胞（EGFP 遺伝子をノックインした細胞)、松岡 G によって EB3 から作製された遺伝子ノックダウン ES 細胞（PDX-1, SHP, Kir6.2, IRS-1, IRS-2, GK のうちの 1 種、あるいは複数同時にノックダウンした細胞）を用いた。

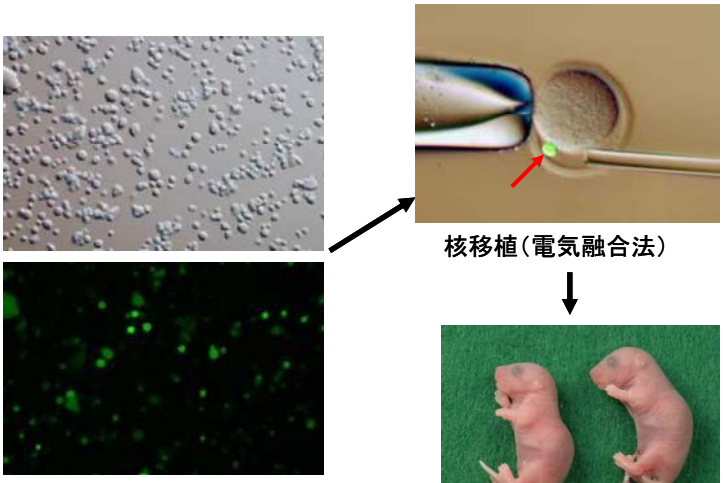
〔成　果〕

上記の稲垣グループの疾患モデル E14ES 細胞を用いて核移植クローンを実施した。核移植のために M 期あるいは G1 期に同期化し、また核移植方法として注入法、電気融合法、ウイルス膜融合法など全てを試み、699 個の再構築胚を作出した。胚移植後、胎仔までの発生は確認できたが、産子までは発生しなかった。着床数は正常であるので、着床後の胚発生に影響する刷込み遺伝子の変異の可能性がある。

そこで、上記で高い核移植クローン効率が明らかになった雄(B6x129)F1 遺伝子背景の ES 細胞を用いて、核移植クローンを実施した。２株のうち１株から、分娩期まで発生したクローン胚を得たが、胎盤のみの発生であった。

以上の実験から、細胞増殖能が極めて高い ES 細胞をクローンに用いるためには、細胞周期の同期化が重要であるが、現時点では M 期へ誘導することしかできず、この M 期では物理的に核移植がむずかしいというジレンマが生じることがわかった。そこで次に、容易に G1 期に同期化できる尾部線維芽細胞を(B6x129)F1 マウスから樹立し、遺伝子導入後、核移植クローンを試みた。ES 細胞で効果が確認された PDX-1 あるいは IRS-1 に対する shRNA に CMV(ユビキタスに発現)－EGFP

をカセットとして組み込んだコンストラクトを G1 期の線維芽細胞へレンチウイルスベクターにより導入した。EGFP 蛍光をマーカーに顕微操作によりポジティブの細胞を選択し、除核卵子の囲卵腔への導入により電気膜融合法で胚を再構築した（図 3-3-8）。PDX-1 群から 3 例、IRS-1 群から 1 例の分娩期胚を得たが、最終的に PDX-1 群の 2 匹が生き残った。当然の事ながら、これらのマウスはすべて遺伝的には導入遺伝子を有しているが、shRNA と EGFP の発現が見られないため、現在 F1 および F2 を作出し、これらの導入遺伝子の発現を誘導できないか試みている。



（*CS-H1-Pdx1-CG* と *CS-H1-Irs1-CG*の2ラインを作出）

図3-3-8. .核移植クローン技術を用いた shRNA導入体細胞
（線維芽細胞）からの産子の作出

3.3.5 受精卵導入法による疾患モデルマウスの作出 (E, F)

〔実施方法〕

ES 細胞においてその有効性が確認された RNAi コンストラクトを、レンチウイルスベクターを利用して受精卵へ導入し、トランスジェニック疾患モデルマウスの作出を試みた。

〔成　果〕

上記と同様の PDX-1 あるいは IRS-1 に対する shRNA に CMV(ユビキタスに発現)－EGFP をカセットとして組み込んだコンストラクトをレンチウイルスベクターにより受精卵へ導入し、トランスジェニック疾患モデルマウスの作出を試みた。生まれたマウスのうち、PDX-1 に対するトランスジェニックは 9/16 (56%)、IRS-1 に対しては 10/16 (63%) という極めて高率にトランスジェニックマウスの作出に成功した。しかしながら、これらの F0 ファウンダーマウスはすべてマーカーの EGFP の発現がネガティブであった。そこで、ランダムに選択した F0 雄マウスを ICR 雌マウスと交配し、

F1 を作出した。その結果、IRS-1 グループの雄１匹の子孫の一部が EGFP の蛍光を発していた。特に皮膚、筋肉、心筋（心房）、膵臓に強い蛍光が見られ、プロモーターである CAG の特徴を見せていた（図 3-3-9）。

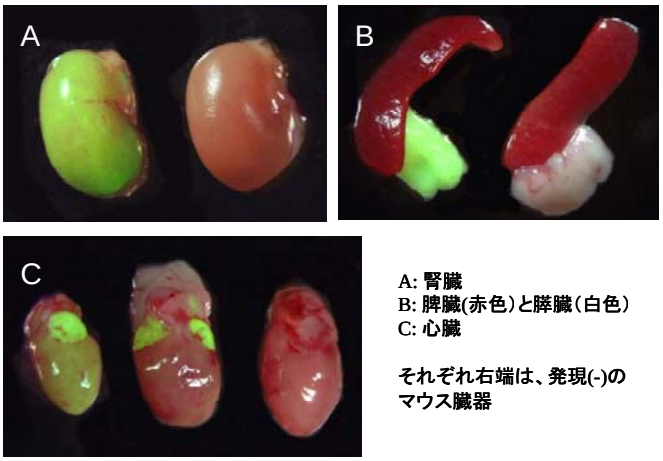


図3-3-9. 受精卵導入法による shRNA導入疾患モデル動物の作出。F0（トランスジェニックファウンダー）の次のF1世代で、shRNA発現のマーカー(EGFP)を確認。

〔類似研究動向と本成果の位置づけ〕

以上の通り、キメラ法、核移植クローン法、受精卵導入法のいずれにおいても、shRNA をゲノムに有する目的のマウスの作出に成功した。しかしながら、多くの動物は、導入したコンストラクトの発現が押さえられている可能性が高いことから、この発現抑制を解除する必要がある。

技術開発の一つの目標であったマウスの核移植クローン技術については、始原生殖細胞 [I-49]、NKT リンパ球 [I-40]、造血幹細胞 [I-68]、神経幹細胞のクローン [I-104] はいずれも初の成功である。これらはすでに多くの論文で引用されており、クローンの分野でインパクトを与えている。新規幹細胞としての GS 細胞の樹立については、特に雄性 GS 細胞において進展しており、ジーンターゲッティングも初の報告になった [I-66, 67, 68]。また、雌の GS 細胞探索中に発見された莢膜幹細胞も初の報告である [I-105]。ウサギの ES 細胞については、その樹立成績および長期にわたる安定した継代成績は、ES 細胞と呼ぶにふさわしいレベルに達しており、特に遺伝子導入が可能であることは、疾患モデル細胞を作製する上で非常に重要な特性である。

実際の疾患モデル動物の作製においては、発現させることが極めて困難であると言われている shRNA のトランスジェニックマウス (総説：Xia et al., Transgenic Research 15: 271-275, 2006)の作出に成功した。また、体細胞へ遺伝子を導入してクローンマウスを作出した初めての実験でもある。本研究で開発した技術および成果は、今後、疾患モデル動物の作出に幅広く応用されると期待される。

3.4　丹羽グループ:「新規ジーントラップ法による遺伝子マーキング、及び変異 ES 細胞の系統的作出とその解析法の確立」

遺伝子改変は、松岡 G では 6 種類の糖尿病関連遺伝子を RNAi 法で、稲垣 G は PDX-1 を遺伝子ターゲティング法で、同時に開始する。しかし、その場合の条件は、既往の知見に基づく標準的な

条件であり、最適条件とは言いがたい。丹羽 G は、この点を重視し、高効率に遺伝子改変細胞を得る方法を検討するために、「新規ジーントラップ法による遺伝子マーキング、及び変異 ES 細胞の系統的作出とその解析法の確立」として、上記の研究課題 A～G に対応して、設定された次の課題を実施した。

・puromycin/pac 選択系を利用する遺伝子ターゲティング (C, F)
・Rosa-tet 系を利用する遺伝子ターゲティング (C, F)
・ホモ変異細胞の機能レスキュー (C, F)
・RNAi 法のマウス ED 細胞への適用性の検討 (C, F)

3.4.1 puromycin/pac 選択系を利用する遺伝子ターゲティング (C, F)

〔実施方法〕

遺伝子ターゲティング法に関しては、ホモ変異体 ES 細胞の作出を可能とするジーントラップ法を確立し、これによって系統的な変異 ES 細胞の創製を可能にすることを目的とした。

マウス ES 細胞に標的遺伝子と相同な配列を含むターゲティングベクターを導入し、薬剤耐性遺伝子を用いて選択した遺伝子導入細胞の中から、目的の遺伝子にベクターが組み込まれた細胞を選別する。このようにして得られた ES 細胞においては、常染色体上の遺伝子の場合は一対ある染色体の一方の遺伝子が破壊された状態（ヘテロノックアウト）であり、完全機能欠失型変異マウスの作製には、このような ES 細胞から得られたキメラマウスを 2 世代交配することにより、変異遺伝子座をホモ化する必要がある。しかし、今日では ES 細胞は様々な分化誘導条件が確立され、種々の細胞にシャーレ内で分化させることが可能となっている。従って、もし ES 細胞の段階で、ある特定の遺伝子の機能を欠失させることができるならば、その遺伝子の特定の細胞種における機能を、容易に解析することが可能となる。

このような方法として、これまでに報告されていた技術としては、高濃度の薬剤を用いて、ES 細胞集団の中で培養中に自発的に起こる相同染色体間の遺伝子組み換えにより、導入された変異をホモに持つようになったクローンを濃縮する方法がある（図 3-4-1）。この方法でホモ変異 ES 細胞を樹立した報告は幾つかあるが、いずれの場合においても高濃度の薬剤により選択されたクローンの 1-5 %がホモ変異体であるにすぎず、我々の経験からはしばしばこの方法でホモ変異体が取得できないこともあった。一方、我々はこれまでに種々の薬剤耐性遺伝子を遺伝子導入マーカーとして用いてきたが、この過程で、使用する薬剤と耐性遺伝子の組み合わせにより、耐性遺伝子の発現量に対する薬剤選択圧の濃度依存性が著しく異なることに気付いた。これまでの全て報告においては、G418/neomycin phosphotransferase (neo)の系が用いられていたが、この系は薬剤選択圧の濃度依存性が低く、高濃度の薬剤を用いて耐性遺伝子の発現量の増加したクローンだけを選別することには適していないと考えられた。これに対して、puromycin/puromycin acethyltransferase (pac)の系は、

薬剤選択圧の濃度依存性が高く、高濃度選択により耐性遺伝子を高発現するクローンを容易に濃縮することが出来た。そこで、本計画においては、この系を用いて相同染色体間の遺伝子組み換えを起こした ES 細胞を高度に濃縮する方法の開発を試みることとした。この際、まず特定の遺伝子に薬剤耐性遺伝子を相同組み換えで導入したクローンを用いて方法論的検討を行うこととした。また、この方法を用いて系統的に種々の遺伝子について変異 ES 細胞を作出する方法として、遺伝子トラップ法を採用することとした。遺伝子トラップ法は、相同領域を持たない薬剤耐性遺伝子をゲノム中にランダムに挿入し、任意の遺伝子がベクターの挿入で破壊されたクローンを回収する方法である（図 3-4-2）。ES 細胞で発現している遺伝子ならば、プロモーターを持たない薬剤耐性遺伝子を導入し、これが挿入部位上流のプロモーターから発現するようになった、即ち任意の遺伝子内に挿入したクローンを、単純な薬剤選択で 100%濃縮することができる。これを上記の相同染色体間の遺伝子組み換えを起こした ES 細胞を高度に濃縮する方法と組み合わせれば、任意の遺伝子についてホモ異 ES 細胞を系統的に作出することが可能となると考えた。

作出した変異 ES 細胞の表現型を詳細に解析するためには、得られた表現型が遺伝子変異の結果であることを証明する必要がある。このためには、当該遺伝子の発現ないしは機能を外部から調節可能なシステムを構築することが望ましい。ES 細胞において外来遺伝子の発現を調節するシステムとして、我々は従来テトラサイクリンによる発現調節系を用いているが、理想的な発現誘導を得るには、数多くのクローンをスクリーニングする必要があった。そこで、これを簡便に行うための新たな方法論の開発を試みた。また、転写因子の機能は細胞核への移行を調節することによっても可能である。これについても、従来から用いられているステロイドホルモンリガンド結合領域との融合法について、改良を試みた。

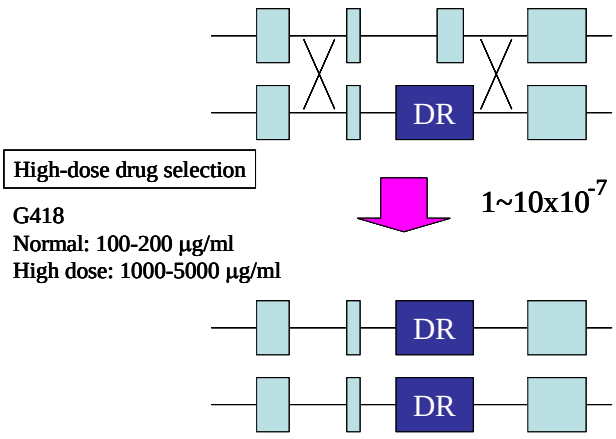


図3-4-1. ホモ変異ES細胞の作製原理

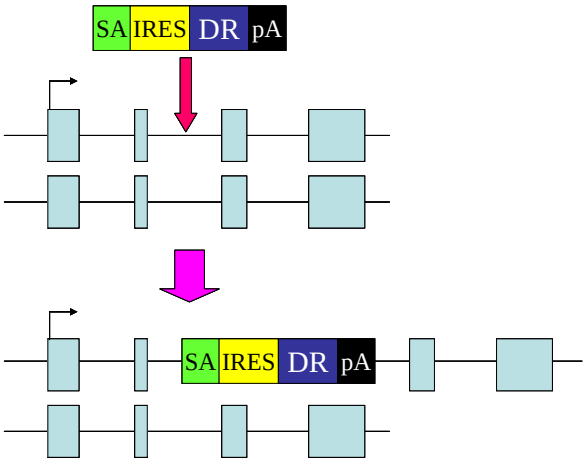


図3-4-2 遺伝子トラップ法

〔成　果〕

puromycin/pac 系を用いたホモ ES 細胞の濃縮効果を、我々が既に樹立していた Zfp42/Rex1 遺伝子座に IRES-pac-pA が挿入されたクローンを用いて検討した。このヘテロ変異体は、1.5 μg/ml puromycin によって選択された中から得られたものであるが、この細胞 50 万個を 9 μg/ml puromycin で選択したところ、2 個のクローンが得られ、これらは共にホモ変異体であった。これより、この系を用いることにより、極めて高度にホモ変異体 ES 細胞を濃縮できる可能性が示唆された（Masui, S. et al. 論文投稿中）。

次に、puromycin/pac 系を用いた選択が適用可能な遺伝子トラップベクターの構築を試みた。最も単純なデザインとして、pac をそのまま遺伝子トラップマーカーとして用いる方法を検討した。En-2 splice acceptor-IRES-pac-pA ベクターを ES 細胞に電気穿孔法で導入し、1.5 μg/ml puromycin を含む培養液で選択して、遺伝子トラップクローンを得た。次にこれらのクローン 12 種を 9 μg/ml puromycin で選択したところ、全ての場合において耐性クローンは得られなかった。これは耐性遺伝子の発現がこれらのトラップクローンでは低いためと予想されたので、濃度を下げて検討を行ったところ、クローン間で薬剤耐性度の差が極めて大きいことが判明した。このような状況では大規模スクリーニングは不可能と考えられたので、次に、遺伝子トラップマーカーとしては G418/neo を用い、ホモ ES 細胞の濃縮マーカーとしてのみ puromycin/pac を用いるデザインに変更した。En-2 splice acceptor-IRES-neo- pA:PGK-pac-pA ベクターを ES 細胞に電気穿孔法で導入し、1.5 μg/ml puromycin を含む培養液で選択して、遺伝子トラップクローンを得た。このベクターでは、neo の発現はトラップした遺伝子の発現量に応じて大きなばらつきを示すが、pac の発現は常に PGK promoter によって制御されているので安定すると考えられた。しかし、次にこれらのクローン 12 種を種々の濃度の puromycin で選択したところ、En-2 splice acceptor-IRES-pac-pA ベクターほどではないが、これらのクローンを 90%以上死滅させる puromycin の最小濃度は 3~9 μg/ml の間でばらつき、一定濃度における一律なホモ変異 ES 細胞の濃縮は困難であった。

そこで、puromycin/pac 以外に、本方法に適した薬剤選択システムが存在しないかどうかを、網羅的に検討した。発現ベクターpCAG-EGFP-IRES-DR(drug resistant)-pA の DR として、neomycin 耐性遺伝子、hygromycin 耐性遺伝子、puromycin 耐性遺伝子、blasticidinS 耐性遺伝子、zeocin 耐性遺伝子、histidiolD 耐性遺伝子を挿入し、これらのベクターを ES 細胞に電気穿孔法で導入して、低濃度（＝野生型ＥＳ細胞を死滅させる最低濃度の 2 倍）、中濃度（同 4 倍）、高濃度（同 8 倍）で選択し、生存したコロニーをプールして、それぞれにおける EGFP の発現量を FACS で解析した。この結果、puromycin 選択系において、最も良好な容量依存的高発現細胞の選択が確認された。一方で、neomycin 系はもっとも発現の微弱な耐性細胞集団を形成し得た。これは、この選択系が、もっとも微弱な耐性遺伝子発現を選択できることを証明するものである（論文投稿準備中）。

〔類似研究動向と本成果の位置づけ〕

2004 年に大阪大学の竹田らのグループが、ホモ変異 ES 細胞の系統的作出を可能とするようなジーントラップ法の開発を報告した（Yusa et al., Nature）。この方法は gene conversion を高率に誘導するために、Bloom's syndrome gene の機能をテトラサイクリンにより調節可能な ES 細胞を用いて、G418/neo 系でホモ ES 細胞の濃縮を行っている。このかわりに我々が見いだした puromycin/pac 系を用いれば更なる効率の改善が予想されるので、今後共同研究も検討したい。

3.4.2 Rosa-tet 系を利用する遺伝子ターゲティング (C, F)

〔実施方法及び成果〕

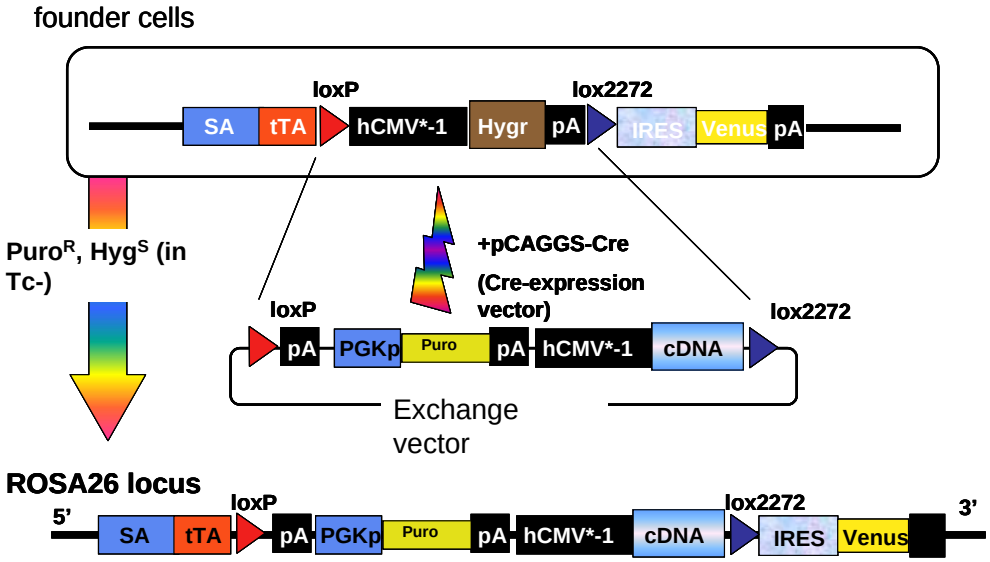


図3-4-3. Rosa-Tet systemの概要

テトラサイクリン発現調節系の簡便な適用法として、発現ユニット一式をゲノム上の安定な発現が保証されている遺伝子（Rosa26）内に一括して挿入した（図 3-4-3）。さらに、ここに目的遺伝子を挿入するために、Cre-loxP 組み換え系を用いた recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) 法を用いることとした。このようにして構築された Rosa-tet system においては、5 万個の細胞を簡便なリポフェクション法で処理することにより得られたクローンの 50%以上で、組み込まれた外来遺伝子の発現が理想的にテトラサイクリンで制御されることを確認した [I-53]。

3.4.3 ホモ変異細胞の機能レスキュー (C, F)

〔実施方法及び成果〕

ホモ変異細胞の機能をレスキューして解析する実例として、Cdx2 遺伝子変異 ES 細胞に Cdx2 を estrogen receptor ligand binding domain (ER)と融合した遺伝子を導入し、その機能を回復させるこ

とができるかどうか、検討した。この結果、Cdx2 欠損により失われていた trophoblast stem cells 化した後の自己複製能が、Cdx2ER の導入によりリガンド依存性に回復することを確認した [I-56]。

3.4.4 RNAi 法のマウス ED 細胞への適用性の検討 (C, F)

〔実施方法〕

RNAi 法は、近年、哺乳動物細胞においても報告され、その手法は一般化しつつあるが、本計画の着手時点では ES 細胞における適用例は報告されていなかった。また、ES 細胞では、導入した外来遺伝子の発現が不安定で、しばしば完全に抑制されることが知られていた。したがって、RNAi 法を採用するに際して、導入された二本鎖 RNA オリゴ(siRNA) あるいは Short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターの効果について詳しく調べることが重要であった。

〔成　果〕

RNAi 法については、これまでに以下の結果を得ている。

(1) 用いる配列の選択については、基本的には東京大学の程らが報告したルールに従えば、約 60%で有意なノックダウン効果（20%以下に減少）を ES 細胞で与えうることを確認した。
(2) 導入細胞の種類による RNAi の効果の差異を、ES 細胞と HeLa 細胞を用いて比較検討したところ、ES 細胞の方がより高い配列依存性を示すことを見いだした。
(3) 導入方法として、オリゴ RNA を用いる方法と、short-hairpin(sh) RNA を発現させる方法を比較したところ、shRNA でノックダウン効果を持続させても、得られるノックダウン効果の程度には有意な影響を与えないことを明らかにした。
(4) 上記方法を用いて、転写因子 Nanog のマウス ES 細胞における機能的閾値は 10%以下であることを確認した。

では、KD 法が ES 細胞に於ける遺伝子機能解析法として一般的に適用可能か、転写因子 Sox2 について KO の結果と比較検討を試みた。内在性 Sox2 遺伝子を標的遺伝子組み換えで破壊し、テトラサイクリンで発現制御可能な Sox2 で未分化性を維持した誘導型 KO-ES 細胞を作製した。また、配列予想プログラムに基づいて Sox2 siRNA を合成し、これを ES 細胞に導入してその効果を検討した。さらに、Sox2　3'-UTR を標的とする shRNA を発現し、テトラサイクリンで発現制御可能な Sox2(3'-UTR)で未分化性を維持した誘導型 KD-ES 細胞の譲渡を受け、これらの表現型の比較を行った。この結果、Sox2 knock-out はほぼ 100%栄養外胚葉への分化を誘導したが、Sox2 siRNA は作製した 6 つ全てに於いて、50%以上の KD 効率を達成出来ず、表現型の変化も誘導出来なかった。shRNA クローンは表現型にクローン間のばらつきが大きく、KO に近い効率で栄養外胚葉分化誘導を示すものもあれば、殆ど表現型に変化を示さないものもあった。これより、Sox2 のケースにおいては、KO の表現型を KD で模倣することの困難さが浮き彫りになった [I-110]

4 研究参加者

(1)松岡英明グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
松岡英明	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	教授	研究の総括・細胞機能解析システム開発	H14.11～H20.3
斉藤美佳子	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	准教授	遺伝子改変ES細胞・分化細胞・マウス個体創製	H14.11～H20.3
小曽根郁子	東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻	助手	細胞機能解析	H14.11～H17.12
天草由紀	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	特任助手	マウス個体作製	H18.4～
山口直俊	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	研究協力員	単一細胞操作支援ロボットの開発	H17.4～H20.3
西澤松彦	東北大学大学院工学研究科	教授	細胞機能解析法の開発	H16.6～H20.3
安部隆	東北大学大学院工学研究科	助教授	MEMSデバイス作製	H17.4～H20.3
三重正和	東京工業大学大学院生命理工学研究科	助手	インテグレーションの高効率化	H16.4～H18.3
山田洋平	東京農工大学大学院工学研究科生命工学専攻	D3年	単一細胞操作支援ロボットの機能試験及び関連装置の開発	H16.2～H16.3
佐賀彩子	東京農工大学大学院工学研究科生命工学専攻	D3年	マウス個体の作製	H15.2～H16.9
盛山優子	東京農工大学大学院工学研究科生命工学専攻	研究員	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H15.4～H16.3
駒﨑太夢	東京農工大学大学院工学研究科生命工学専攻	M2年	単一細胞操作支援ロボットの開発	H15.8～H16.3
佐々木俊也	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	D3年	細胞機能解析	H16.2～H20.3
落岩寛明	東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻	M2年	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H16.4～H18.3
佐藤伴	東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻	M2年	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H16.4～H18.3
澁澤明里	東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻	M2年	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H16.4～H18.3
下田聡一郎	東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻	M2年	単一細胞操作支援ロボットの開発	H16.4～H18.3
小河原明恵	東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻	M2年	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H17.4～H19.3
金子智恵	東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻	M2年	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H17.4～H19.3

白井雅人	東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻	D1 年	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H17.4～H20.3
白築和大	東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻	M2 年	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H17.4～H19.3
都築隆宏	東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻	M2 年	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H17.4～H19.3
早川　彩	東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻	M2 年	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H17.4～H19.3
平井理恵子	東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻	M2 年	単一細胞操作支援ロボットの開発	H16.6～H19.3
與田照美	東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻	M2 年	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H17.4～H19.3
尾崎正和	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2 年	単一細胞操作支援ロボットの開発	H18.4～H20.3
兼田亜沙子	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2 年	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H19.4～H20.3
水上　創	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2 年	単一細胞操作支援ロボットの開発	H18.4～H20.3
尹　貞順	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M2 年	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H19.4～H20.3
笠木夕子	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	M1 年	疾患関連遺伝子に関する機能発現解析	H19.4～H20.3
菱山美穂	東京農工大学大学院工学府生命工学専攻	事務員	研究チーム事務	H15.4～H20.3
松橋一男	中央精機㈱バイオ事業部	執行役員	単一細胞操作支援ロボットの開発	H16.6～H20.3
真柄憲治	中央精機㈱営業本部	営業本部長	単一細胞操作支援ロボットの開発	H16.6～H20.3
鹿島信行	中央精機㈱営業本部	営業本部長	単一細胞操作支援ロボットの開発	H16.6～H20.3
石津敏直	中央精機㈱営業本部・バイオ事業部	ｻﾌﾞﾏﾈｰｼﾞｬｰ	単一細胞操作支援ロボットの開発	H16.6～H20.3
松本宏理	中央精機㈱営業本部	技術調査員	単一細胞操作支援ロボットの開発	H16.6～H20.3
山田洋平	中央精機㈱バイオ事業部	技術開発員	単一細胞操作支援ロボットの開発	H16.6～H20.3
茶木昭彦	中央精機㈱技術センター技術部	ｻﾌﾞﾏﾈｰｼﾞｬｰ	単一細胞操作支援ロボットの開発	H16.6～H20.3

(2)稲垣暢也グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
稲垣暢也	京都大学大学院医学研究科内科系専攻内科学講座糖尿病栄養内科学	教授	研究の遂行・総括、疾患関連遺伝子の単離	H14.11～H20.3

山田勝也	弘前大学医学部生理学第一講座	准教授	疾患関連遺伝子の導入・破壊	H14.11～H20.3
坂　信広	秋田大学医学部機能制御医学講座細胞制御学分野	助手	疾患関連遺伝子改変細胞の機能解析	H14.11～H19.9
尾野恭一	秋田大学医学部機能制御医学講座細胞制御学分野	教授	疾患関連遺伝子改変細胞の機能解析	H19.9～H20.3

(3)小倉淳郎グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
小倉淳郎	理化学研究所ﾊﾞｲｵﾘｿｰｽｾﾝﾀｰ	室長	核移植クローン、研究とりまとめ	H14.11～H20.
井上貴美子	理化学研究所ﾊﾞｲｵﾘｿｰｽｾﾝﾀｰ	研究員	核移植クローン、クローン胚・胎児の遺伝子解析	H14.11～H20.3
越後貫成美	理化学研究所ﾊﾞｲｵﾘｿｰｽｾﾝﾀｰ	技師	核移植クローン、ドナー細胞の準備およびゲノム変異の解析	H14.11～H20.3
本多　新	理化学研究所ﾊﾞｲｵﾘｿｰｽｾﾝﾀｰ	理研基礎特別研究員	生殖幹細胞の樹立	H17.4～H20.3
大川美佳	理化学研究所ﾊﾞｲｵﾘｿｰｽｾﾝﾀｰ	訪問研究員	核移植クローン、クローン胚移植、クローン産子の表現型解析	H15.4～H18.3
三木洋美	理化学研究所ﾊﾞｲｵﾘｿｰｽｾﾝﾀｰ	学振研究員（PD）	核移植クローン、クローン産子の表現型解析	H14.11～H20.3
新免明恵	理化学研究所ﾊﾞｲｵﾘｿｰｽｾﾝﾀｰ（東京農業大学大学院）	M2 年	核移植クローン、クローン胚移植、顕微授精	H16.4～H17.3
遠藤圭介	理化学研究所ﾊﾞｲｵﾘｿｰｽｾﾝﾀｰ（麻布大学大学院）	M2 年	核移植クローン、クローン胚移植、顕微授精	H17.4～H19.3

(4)丹羽仁史グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
丹羽仁史	理化学研究所発生・再生科学総合研究センター多能性幹細胞研究チーム	ﾁｰﾑﾘｰﾀﾞｰ	研究全般・ホモ変異体 ES 細胞の作出を可能とするジーントラップ法の確立	H14.11～H20.3
升井伸治	理化学研究所発生・再生科学総合研究センター多能性幹細胞研究チーム	研究員	研究全般・単一細胞技術を用いた ES 細胞における表現型解析法の確立	H14.11～H18.10
杉村逸郎	理化学研究所発生・再生科学総合研究センター多能性幹細胞研究チーム	共同研究員	RNAi 技術の改良	H16.4～H19.3

５ 招聘した研究者等

該当者なし。

６ 成果発表等

（Ⅰ）原著論文発表（国内誌:0 件、国際誌:113 件）

(1) M. Saito, H. Matsuoka and K. Kasamo, “Isolation of H^+-translocating ATPase in tonoplast of *Tradescantia virginiana* L. leaf cells”, *J. Biotechnol.*, **100**, 221-229 (2003).

(2) M. Saito, S. Horikiri and H. Matsuoka, “Dielectrophoretic selection of viable single-cells of rice and tobacco”, *Electrochemistry*, **71**, 446-448 (2003).

(3) M. Saito, Y. Mukai, T. Komazaki, K.-B. Oh, Y. Nishizawa, M. Tomiyama, N. Shibuya and H. Matsuoka, “Expression of rice chitinase gene triggered by the direct injection of Ca^{2+}”, *J. Biotechnol.*, **105**, 41-49 (2003).

(4) H. Matsuoka, K. Oishi, M. Watanabe, I. Kozone, M. Saito and S. Igimi, “Viable cell detection by the combined use of fluorescent glucose and fluorescent glycine”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2459-2462 (2003).

(5) Y.-J. Zheng, T. Furukawa, K. Tajimi and N. Inagaki, “Cl^- channel blockers inhibit transition of quiescent (G_0) fibroblasts into the cell cycle”, *J. Cell Physiol.*, **194**, 376-383 (2003).

(6) Y. Tanaka, K. Yamada, C.-J. Zhou, N. Ban, S. Shioda and N. Inagaki, “Emporal and spatial profiles of ABCA2-expressing oligodendrocytes in the developing rat brain”, *J. Comp. Neurol.*, **455**, 353-367 (2003).

(7) M. Kanatsu-Shinohara, N. Ogonuki, K. Inoue, H. Miki, A. Ogura, S. Toyokuni and T. Shinohara, “Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells”, *Biol. Reprod.*, **69**, 612-616 (2003).

(8) M. Kanatsu-Shinohara, N. Ogonuki, K. Inoue, A. Ogura, K. Toyokuni, T. Kogishi, T. Honjo and T. Shinohara, “Allogeneic offspring produced by male germ line stem cell transplantation into infertile mouse testis”, *Biol. Reprod.*, **68**, 167-173 (2003).

(9) M. Kanatsu-Shinohara, N. Ogonuki, K. Inoue, A. Ogura, S. Toyokuni and T. Shinohara, “Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells”, *Hum. Reprod.*, **18**, 2660-2667 (2003).

(10) N. Ogonuki, K. Mochida, K. Inoue, J. Matsuda, Y. Yamamoto, K. Takano and A. Ogura, “Fertilization of oocytes and birth of normal pups following intracytoplasmic injection with spermatids in mastomys (Praomys coucha)”, *Biol. Reprod.*, **68**, 1821-1827 (2003).

(11) N. Ogonuki, H. Tsuchiya, Y. Hirose, H. Okada, A. Ogura and T. Sankai, “Pregnancy by the tubal

transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (Macaca fascicularis)", *Hum. Reprod.*, **18**, 1273-1280 (2003).

(12) A. Ogura, N. Ogonuki, K. Inoue and K. Mochida, "New microinsemination techniques for laboratory animals", *Theriogenology*, **59**, 87-94 (2003).

(13) K. Inoue, N. Ogonuki, K. Mochida, Y. Yamamoto, K. Takano, T. Kohda, F. Ishino and A. Ogura, "Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning", *Biol. Reprod.*, **69**, 1394-1400 (2003).

(14) S. Tateishi, H. Niwa, J.-I. Miyazaki, S. Fujimoto, H. Inoue and M. Yamaizumi, "Enhanced genomic instability and defective postreplication repair in RAD18-knockout mouse embryonic stem cells", *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 474-481 (2003).

(15) Y. Tokuzawa, E. Kaiho, M. Maruyama, K. Takahashi, K. Mitsui, M. Maeda, H. Niwa and S. Yamanaka, "Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for ES cell self-renewal and mouse development", *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 2699-2708 (2003).

(16) K. Shimozaki, K. Nakashima, H. Niwa and T. Taga, "Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures", *Development*, **130**, 2505-2512 (2003).

(17) C . Ishida, K. Ura, A. Hirao, H. Sasaki, A. Toyoda, Y. Sakaki, H. Niwa, E. Li and Y. Kaneda, "Genomic organization and promoter analysis of the Dnmt3b gene", *Gene*, **22**, 151-159 (2003).

(18) N. Hatano, Y. Mori, M. Oh-hora, A. Kosugi, T. Fujikawa, N. Nakai, H. Niwa, J. Miyazaki, T. Hamaoka and M. Ogata, "Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development", *Genes Cells.*, **8**, 847-56 (2003).

(19) K. Hashimoto, M. Saito, H. Matsuoka, K. Iida and H. Iida, "Functional analysis of a rice putative voltage-dependent Ca^{2+} channel, OsTPC1, expressed in yeast cells lacking its homologous gene *CCH1*", *Plant Cell Physiol.*, **45**, 496-500 (2004).

(20) T. Shinya, K. Hanai, M. Saito and H. Matsuoka, "Isolation of a novel isozyme of tobacco BY-2 chitinase induced by a fungal elicitor", *Plant Biotechnol.*, **21**, 155-158 (2004).

(21) T. Shinya, S. Gondo, H. Iijima, K. Hanai, H. Matsuoka and M. Saito, "Cell-lytic activity of tobacco BY-2 induced by a fungal elicitor from *Alternaria alternata* attributed to the expression of a class I ・-1,3-glucanase gene", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1265-1272 (2004).

(22) M. Saito, T. Shinya, K. Hanai, T. Katagi and H. Matsuoka, "A novel chitinase isozyme in tobacco BY-2 cells induced by the autoclaved *Alternaria alternata* culture medium", *Plant Sci.*, **167**, 811-817 (2004).

(23) M. Saito, A. Saga and H. Matsuoka, "Production of a cloned mouse by nuclear transfer from

a fetal fibroblast cell of a mouse closed colony strain", *Exp. Anim.*, **53**, 467-469 (2004).

(24) I. Yoshida, N. Ban and N. Inagaki, "Expression of ABCA3, a causative gene for fatal surfactant deficiency, is up-regulated by glucocorticoid in lung alveolar type II cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**, 547-555 (2004).

(25) K. Nagata, A. Yamamoto, N. Ban, A. R. Tanaka, M. Matsuo, N. Kioka, N. Inagaki and K. Ueda, "Human ABCA3, a product of a responsible gene for abca3 for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellr vesicles", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 262-268 (2004).

(26) K. Yoneda, T. Furukawa, Y.-J. Zheng, T. Momoi, I. Izawa, M. Inagaki, T. Manabe and N. Inagaki, "An autocrine/paracrine loop linking keratin 14 aggregates to TNF・-mediated cytotoxicity in a keratinocyte model of *epidermolysis bullosa simplex*", *J. Biol. Chem.*, **279**, 7296-7303 (2004).

(27) H. Yuan, K. Yamada and N. Inagaki, "Glucose sensitivity in mouse substantia nigra pars reticulata neurons *in vitro*", *Neurosci. Lett.*, **355**, 173-176 (2004).

(28) H. Yuan, K. Yamada and N. Inagaki, "Multiminute oscillations in mouse substantia nigra pars reticulata neurons *in vitro*", *Neurosci. Lett.*, **355**, 136-140 (2004).

(29) M. Kanatsu-Shinohara, K. Inoue, J. Lee, M. Yoshimoto, N. Ogonuki, H. Miki, S. Baba, T. Kato, Y. Kazuki, S. Toyokuni, M. Oshimura, T. Heike, T. Nakahata, F. Ishino, A. Ogura and T. Shinohara, "Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis", *Cell*, **119**, 1001-1012 (2004).

(30) H. Miki, K. Inoue, N. Ogonuki, K. Mochida, H. Nagashima, T. Baba and A. Ogura, "Cytoplasmic asters are required for progression past the first cell cycle in cloned mouse embryos", *Biol. Reprod.*, **71**, 2022-2028 (2004).

(31) H. Miki, J. Lee, K. Inoue, N. Ogonuki, Y. Noguchi, K. Mochida, T. Kohda, H. Nagashima, F. Ishino and A. Ogura, "Microinsemination with first-wave round spermatids from immature male mice", *J. Reprod. Dev.*, **50**, 131-137 (2004).

(32) K. Inoue, N. Ogonuki, Y. Yamamoto, K. Takano, H. Miki, K. Mochida and A. Ogura, "Tissue-specific distribution of donor mitochondrial DNA in cloned mice produced by somatic cell nuclear transfer", *Genesis*, **39**, 79-83 (2004).

(33) K. Ogawa, H. Matsui, S. Ohtsuka and H. Niwa, "A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells", *Genes Cells*, **9**, 471-477 (2004).

(34) S. Miyagi, T. Saito, K. Mizutani, N. Masuyama, Y. Gotoh, A. Iwama, H. Nakauchi, S. Masui, H. Niwa, M. Nishimoto, M. Muramatsu and A. Okuda, "The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells", *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 4207-4220

(2004).

(35) M. Hirose, H. Hashimoto, N. Shintani, M. Nakanishi, N. Arakawa, J. Iga, H. Niwa, J. Miyazaki and A. Baba, "Differential expression of mRNAs for PACAP and its receptors during neural differentiation of embryonic stem cells", *Regul. Pept.*, **126**, 109-113 (2004).

(36) H. Matsuoka, T. Komazaki, Y. Mukai, M. Shibusawa, H. Akane, A. Chaki, N. Uetake and M. Saito, "High throughput easy microinjection with a single-cell manipulation supporting robot", *J. Biotechnol.*, **116**, 185-194 (2005).

(37) K. Hashimoto, M. Saito, H. Iida and H. Matsuoka, "Evidence for the plasma membrane localization of a putative voltage-dependent Ca^{2+} channel, OsTPC1, in rice", *Plant Biotechnol.*, **22**, 235-239 (2005).

(38) N. Ban, M. Sasaki, H. Sakai, K. Ueda and N. Inagaki, "Cloning of ABCA17, a novel, rodent sperm-specific ATP-binding cassette (ABC) transporter that regulates intracellular lipid metabolism", *Biochem. J.*, **389**, 577-585 (2005).

(39) Y. Wang, K. Yamada, Y. Tanaka, K. Ishikawa and N. Inagaki, "Expression of ABCA2 protein in human vestibular schwannoma and peripheral nerve", *J. Neurol. Sci.*, **232**, 59-63 (2005).

(40) K. Inoue, H. Wakao, N. Ogonuki, H. Miki, K. Seino, R. Nambu-Wakao, S. Noda, H. Miyoshi, H. Koseki, M. Taniguchi and A. Ogura, "Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells", *Curr. Biol.*, **15**, 1114-1118 (2005).

(41) T. Kohda, K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, M. Naruse, T. Kaneko-Ishino, A. Ogura and F. Ishino, "Variation in gene expression and aberrantly regulated 1 chromosome regions in cloned mice", *Biol. Reprod.*, **73**, 1302-1311 (2005).

(42) M. Yamaguchi-Yamada, N. Manabe, M. Kiso, Y. Goto, T. Mori, C. Sakata, S. Anan, M. Nagao, Y. Yamamoto and A. Ogura, "Dysfunction of erythropoietin-producing interstitial cells in the kidneys of ICR-derived glomerulonephritis (ICGN) mice", *J. Vet. Med. Sci.*, **67**, 891-899 (2005).

(43) A. Ogura, N. Ogonuki, H. Miki and K. Inoue, "Microinsemination and nuclear transfer using male germ cells", *Int. Rev. Cytol.*, **246**, 189-229 (2005).

(44) M. Kanatsu-Shinohara, H. Miki, K. Inoue, N. Ogonuki, S. Toyokuni, A. Ogura and T. Shinohara, "Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum- or feeder-free conditions", *Biol. Reprod.*, **72**, 985-991 (2005).

(45) M. Kanatsu-Shinohara, H. Miki, K. Inoue, N. Ogonuki, S. Toyokuni, A. Ogura and T. Shinohara, "Germline niche transplantation restores fertility in infertile mice", *Hum. Reprod.*, **20**, 2376-2382 (2005).

(46) M. Kanatsu-Shinohara, N. Ogonuki, T. Iwano, J. Lee, Y. Kazuki, K. Inoue, H. Miki, M. Takehashi,

S. Toyokuni, Y. Shinkai, M. Oshimura, F. Ishino, A. Ogura and T. Shinohara, “Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture”, *Development*, **132**, 4155-4163 (2005).

(47) K. Mochida, M. Ohkawa, K. Inoue, D.M. ValdezJr, M. Kasai and A. Ogura, “Birth of mice after in vitro fertilization using C57BL/6 sperm transported within epididymides at refrigerated temperatures”, *Theriogenology*, **64**, 135-143 (2005).

(48) K. Mochida, T. Wakayama, K. Takano, Y. Noguchi, Y. Yamamoto, O. Suzuki, J. Matsuda and A. Ogura, “Birth of offspring after transfer of mongolian gerbil (Meriones unguiculatus) embryos cryopreserved by vitrification”, *Mol. Reprod. Dev.*, **70**, 464 - 470 (2005).

(49) H. Miki, K. Inoue, T. Kohda, A. Honda, N. Ogonuki, M. Yuzuriha, N. Mise, Y. Matsui, T. Baba, K. Abe, F. Ishino and A. Ogura, “Birth of mice produced by germ cell nuclear transfer”, *Genesis*, **41**, 81-86 (2005).

(50) S. Chuma, M. Kanatsu Shinohara, K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, S. Toyokuni, M. Hosokawa, N. Nakatsuji, A. Ogura and T. Shinohara, “Spermatogenesis from epiblast and primordial germ cells following transplantation into postnatal mouse testis”, *Development*, **132**, 117-122 (2005).

(51) N. Ogonuki, K. Inoue, H. Miki, K. Mochida, M. Hatori, H. Okada, S. Takeiri, N. Shimozawa, H. Nagashima, T. Sankai and A. Ogura, “Differential development of rabbit embryos following microinsemination with sperm and spermatids”, *Mol. Reprod. Dev.*, **72**, 411-417 (2005).

(52) S. Okumura-Nakanishi, M. Saito, H. Niwa and F. Ishikawa, “Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct3/4 gene in ES cells”, *J. Biol. Chem.*, **280**, 5307-5317 (2005).

(53) S. Masui, D. Shimosato, Y. Toyooka, R. Yagi, K. Takahashi and H. Niwa, “An efficient system to establish multiple embryonic stem cell lines carrying an inducible expression unit”, *Nucleic Acids Res.*, **33**, e43 (2005).

(54) T. Akagi, M. Usuda, T. Matsuda, M.S. Ko, H. Niwa, M. Asano, H. Koide and T. Yokota, “Identification of Zfp-57 as a downstream molecule of STAT3 and Oct-3/4 in embryonic stem cells”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**, 23-30 (2005).

(55) M. Nishimoto, S. Miyagi, T. Yamagishi, T. Sakaguchi, H. Niwa, M. Muramatsu and A. Okuda, “Oct-3/4 maintains the proliferative embryonic stem cell state via specific binding to a variant octamer sequence in the regulatory region of the UTF1 locus”, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 5084-5094 (2005).

(56) H. Niwa, Y. Toyooka, D. Shimosato, D. Strumpf, K. Takahashi, R. Yagi and J. Rossant, “Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation”, *Cell*, **123**, 917-929 (2005).

(57) T. Shimakita, Y. Tashiro, A. Katsuya, M. Saito and H. Matsuoka, ″Rapid separation and counting of viable microbial cells in food by nonculture method with bioplorer, a focusing-free microscopic apparatus with a novel cell separation unit″, *J. Food Prot.*, **69**, 170-176 (2006).

(58) H. Matsuoka, S. Shimoda, Y. Miwa and M. Saito, ″Automatic positioning of a microinjector in mouse ES cells and rice protoplasts″, *Bioelectrochemistry*, **69**, 187-192 (2006).

(59) T. Shinya, R. Ménard, I. Kozone, H. Matsuoka, N. Shibuya, S. Kauffmann, K. Matsuoka and M. Saito, ″Novel ・-1,3-, 1,6-oligoglucan elicitor from *Alternaria alternata* 102 for defense responses in tobacco″, *FEBS J.*, **273**, 2421-2431 (2006).

(60) K. Fujioka, I. Kozone, M. Saito and H. Matsuoka, ″Rapid evaluation of the efficacy of microbial cell removal from fabrics″, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 995-1002 (2006).

(61) S. Sato, K. Yamada and N. Inagaki, “System for simultaneously monitoring heart and breathing rate in mice using a piezoelectric transducer”, *Med. Biol. Eng. Comput.*, **44**, 353-362 (2006).

(62) Y. Matsumura, N. Ban, K. Ueda and N. Inagaki, “Characterization and classification of ATP-binding cassette transporter ABCA3 mutants in fatal surfactant deficiency”, *J. Biol. Chem.*, **281**, 34503-34514 (2006).

(63) C. Yamada, K. Nagashima, A. Takahashi, H. Ueno, Y. Kawasaki, Y. Yamada, Y. Seino and N. Inagaki, “Gatifloxacin acutely stimulates insulin secretion and chronically suppresses insulin biosynthesis”, *Eur. J. Pharmacol.*, **553**, 67-72 (2006).

(64) N. Ogonuki, K. Mochida, H. Miki, K. Inoue, M. Fray, T. Iwaki, K. Moriwaki, Y. Obata, K. Morozumi, R. Yanagimachi and A. Ogura, “Spermatozoa and spermatids retrieved from frozen reproductive organs or frozen whole bodies of male mice can produce normal offspring”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13098-13103 (2006).

(65) N. Wakisaka-Saito, T. Kohda, K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, T. Hikichi, E. Mizutani, T. Wakayama, T. Kaneko-Ishino, A. Ogura and F. Ishino, “Chorioallantoic placenta defects in cloned mice”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **349**, 106-114 (2006).

(66) M. Kanatsu-Shinohara, M. Ikawa, M. Takehashi, N. Ogonuki, H. Miki, K. Inoue, Y. Kazuki, J. Lee, S. Toyokuni, M. Oshimura, A. Ogura and T. Shinohara, “Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8018-8023 (2006).

(67) M. Kanatsu-Shinohara, K. Inoue, H. Miki, N. Ogonuki, M. Takehashi, T. Morimoto, A. Ogura and T. Shinohara, “Clonal origin of germ cell colonies after spermatogonial transplantation in mice”, *Biol. Reprod.*, **75**, 68-74 (2006).

(68) K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, M. Hirose, S. Noda, J.-M. Kim, F. Aoki, H. Miyoshi and A. Ogura, “Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear

transfer", *J. Cell Sci.*, **119**, 1985-1991 (2006).

(69) Y. Sekita, H. Wagatsuma, M. Irie, S. Kobayashi, T. Kohda, J. Matsuda, M. Yokoyama, A. Ogura, K. Schuster-Gossler, A. Gossler, F. Ishino and T. Kaneko-Ishino, "Aberrant regulation of imprinted gene expression in Gtl2lacz mice", *Cytogenet. Genome Res.*, **113**, 223-229 (2006).

(70) T. Okada, Y. Ishii, K. Masujin, N. Izawa, A. Yasoshima, K. Takano, J. Matsuda, A. Ogura, H. Nakayama, T. Kunieda and K. Doi, "The critical roles of serum/glucocorticoid regulated kinase 3 (SGK3) in the hair follicle morphogenesis and homeostasis: the allelic difference provides novel insights into hair follicle biology", *Am. J. Pathol.*, **168**, 1119-1133 (2006).

(71) H. Miki, N. Ogonuki, K. Inoue, T. Baba and A. Ogura, "Improvement of cumulus-free oocyte maturation in vitro and its application to microinsemination with primary spermatocytes in mice", *J. Reprod. Dev.*, **52**, 239-248 (2006).

(72) R. Ono, K. Nakamura, K. Inoue, M. Naruse, T. Usami, N. Wakisaka-Saito, T. Hino, R. Suzuki-Migishima, N. Ogonuki, H. Miki, T. Kohda, A. Ogura, M. Yokoyama, T. Kaneko-Ishino and F. Ishino, "Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality", *Nat. Genet.*, **38**, 101-106 (2006).

(73) M. Kanatsu-Shinohara, K. Inoue, J. Lee, H. Miki, N. Ogonuki, S. Toyokuni, A. Ogura and T. Shinohara, "Anchorage-independent growth of mouse male germline stem cells in vitro", *Biol. Reprod.*, **74**, 522-529 (2006).

(74) K. Ogawa, R. Nishinakamura, Y. Iwamatsu, D. Shimosato and H. Niwa, "Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 159-166 (2006).

(75) T. Aoto, N. Saitoh, T. Ichimura, H. Niwa and M. Nakao, "Nuclear and chromatin reorganization in the MHC-Oct3/4 locus at developmental phases of embryonic stem cell differentiation", *Dev. Biol.*, **298**, 354-367 (2006).

(76) Y. Nakatake, N. Fukui, Y. Iwamatsu, S. Masui, K. Takahashi, R. Yagi, K. Yagi, J.-I. Miyazaki, R. Matoba, M.S.H. Ko and H. Niwa, "Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells", *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 7772-7782 (2006).

(77) S. Tsuruzoe, K. Ishihara, Y. Uchimura, S. Watanabe, Y. Sekita, T. Aoto, H. Saitoh, Y. Yuasa, H. Niwa, M. Kawatsuji, H. Baba and M. Nakao, "Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 920-926 (2006).

(78) R. Matoba, H. Niwa, S. Masui, S. Ohtsuka, M.G. Garter, A.A. Sharov and M.S.H. Ko, "Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling", *PLoS One*, **1**, e26 (2006).

(79) H. Matsuoka, S. Shimoda, M. Ozaki, H. Mizukami, M. Shibusawa, Y. Yamada and M. Saito,

"Semi-quantitative expression and knockdown of a target gene in single-cell mouse embryonic stem cells by high performance microinjection", *Biotechnol. Lett.*, **29**, 341-350 (2007).

(80) T. Shinya, K. Hanai, I. Gális, K. Suzuki, K. Matsuoka, H. Matsuoka and M. Saito, "Characterization of *NtChitIV*, a class IV chitinase induced by ・-1,3-, 1,6-glucan elicitor from *Alternaria alternata* 102: Antagonistic effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the induction of *NtChitIV*", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353**, 311-317 (2007).

(81) K. Fujioka, I. Kozone, M. Saito and H. Matsuoka, "Automatic mapping of viable microbial cells distributed in the surface layer of cotton fabrics", *Biocont. Sci.*, **12**, 31-34 (2007).

(82) K. Yamada, M. Saito, H. Matsuoka and N. Inagaki, "A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells", *Nat. Prot.*, **2**, 753-762 (2007).

(83) T. Shimakita, H. Yamamoto, T. Naramura, A. Fujimori, T. Ide, Y. Tashiro, M. Saito and H. Matsuoka, "Rapid count of microbial cells in dialysate", *Ther. Apher. Dial.*, **11**, 363-369 (2007).

(84) H. Matsuoka, Y. Yamada, S. Horikiri, K. Hatta, T. Kubo, Y. Kushihashi, M. Saito and Y. Miwa, "Automatic stop of a microinjector distinctively in the cytosol or the vacuole of plant single-cells", *Electrochemistry*, **75**, 513-517 (2007).

(85) K. Fujioka, P. Geis, M. Saito and H. Matsuoka, "Visualization of yeast single-cells on fabric surface with a fluorescent glucose and their isolation for culture", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, in press.

(86) T. Shinya, I. Gális, T. Narisawa, M. Sasaki, H. Fukuda, H. Matsuoka, M. Saito and K. Matsuoka, "Comprehensive analysis of glucan elicitor-regulated gene expression in tobacco BY-2 cells reveals a novel MYB transcription factor involved in the regulation of phenylpropanoid metabolism", *Plant Cell Physiol.*, in press.

(87) H. Kodaka, S. Mizuochi, M. Saito and H. Matsuoka, "Evaluation of a new medium for the enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in Japanese surface waters", *J. Appl. Microbiol.*, in press.

(88) T. Abe and M. Matsumoto, "Improved wettability of a fluoropolymer from a simple combination of surface modifications using a plasma and surfactant", *Jap. J. Appl. Phys.*, **46**, 367-369 (2007).

(89) K. Yamada, M. Hoso kawa, S. Fujimoto, K. Nagashima, K. Fukuda, H. Fujiwara, E. Ogawa, Y. Fujita, N. Ueda, F. Matsuyama, Y. Yamada, Y. Seino and N. Inagaki, "The spontaneously diabetic Torii rat with gastroenteropathy", *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **75**, 127-134 (2007).

(90) A. Hamasaki, Y. Yamada, T. Kurose, N. Ban, K. Nagashima, A. Takahashi, S. Fujimoto, D. Shimono, M. Fujiwara, S. Toyokuni, Y. Seino and N. Inagaki, "Adult pancreatic islets require

differential pax6 gene dosage", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353**, 40-46 (2007).

(91) T. Saito, K. Yamada, Y. Wang, Y. Tanaka, K. Ohtomo, K. Ishikawa and N. Inagaki, "Expression of ABCA2 protein in both non-myelin-forming and myelin-forming Schwann cells in the rodent peripheral nerve", *Neurosci. Lett.*, **414**, 35-40 (2007).

(92) N. Ban, Y. Matsumura, H. Sakai, Y. Takanezawa, M. Sasaki, H. Arai and N. Inagaki, "ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis", *J. Biol. Chem.*, **282**, 9628-9634 (2007).

(93) K. Yamada, M. Saito, H. Matsuoka and N. Inagaki, "A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells", *Nat. Protocols*, **2**, 753-762 (2007).

(94) A. Takahashi, K. Nagashima, A. Hamasaki, N. Kuwamura, Y. Kawasaki, H. Ikeda, Y. Yamada, N. Inagaki and Y. Seino, "Sulfonylurea and glinide reduce insulin content, functional expression of K_{ATP} channels, and accelerate apoptotic beta-cell death in the chronic phase", *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **77**, 343-350 (2007).

(95) A. Miyake, K. Yamada, T. Kosaka, T. Miki, S. Seino and N. Inagaki, "Disruption of Kir6.2-containing ATP-sensitive potassium channels impairs maintenance of hypoxic gasping in mice" *Eur. J. Neurosi.*, **25**, 2349-2363 (2007).

(96) H. Sakai, Y. Tanaka, M. Tanaka, N. Ban, K. Yamada, Y. Matsumura, D. Watanabe, M. Sasaki, T. Kita and N. Inagaki, "ABCA2 deficiency results in abnormal sphingolipid metabolism in mouse brain", *J. Biol. Chem.*, **282**, 19692-19699 (2007).

(97) Y. Matsumura, H. Sakai, M. Sasaki, N. Ban and N. Inagaki, "ABCA3-mediated choline-phospholipids uptake into intracellular vesicles in A549 cells", *FEBS Lett.*, **581**, 139-3144 (2007).

(98) T. Yokota, Y. Matsumura, N. Ban, T. Matsubayashi and N. Inagaki, "Heterozygous ABCA3 mutation associated with non-fatal evolution of respiratory distress", *Eur. J. Pediatr.*, in press.

(99) B.-C. Chang, A. Takahashi, K. Nagashima, N. Kuwamura, Y. Kawasaki, H. Ikeda, Y. Yamada, Y. Seino and N. Inagaki, "Lipophilic statins inhibit insulin secretion by reducing ATP content and inhibiting insulin promoter activity and functional activity of voltage-dependent Ca^{2+} channels in pancreatic ・-cells", *Diabetes Res. Clin. Pract.*, in press.

(100) M. Kanatsu-Shinohara, K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, S. Yoshida, S. Toyokuni, J. Lee, A. Ogura and T. Shinohara, "Leukemia inhibitory factor enhances formation of germ cell colonies in neonatal mouse testis culture", *Biol. Reprod.*, **76**, 55-62 (2007).

(101) M. Takehashi, M. Kanatsu-Shinohara, K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, S. Toyokuni, A. Ogura and T. Shinohara, "Adenovirus-mediated gene delivery into mouse spermatogonial stem cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2596-2601 (2007).

(102) A. Shinmen, A. Honda, M. Ohkawa, M. Hirose, N. Ogonuki, M. Yuzuriha, H. Miki, K. Mochida, K. Inoue, K. Abe, M. Ito and A. Ogura, "Efficient production of intersubspecific hybrid mice and embryonic stem cells by intracytoplasmic sperm injection", *Mol. Reprod. Dev.*, **74**, 1081-1088 (2007).

(103) J. Lee, M. Kanatsu-Shinohara, K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, S. Toyokuni, T. Kimura, T. Nakano, A. Ogura and T. Shinohara, "Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells", *Development*, **134**, 1853-1859 (2007).

(104) K. Inoue, S. Noda, N. Ogonuki, H. Miki, S. Inoue, K. Katayama, K. Mekada, H. Miyoshi and A. Ogura, "Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells", *Stem Cells*, **25**, 1279-1285 (2007).

(105) A. Honda, M. Hirose, K. Hara, S. Matoba, K. Inoue, H. Miki, H. Hiura, M. Kanatsu-Shinohara, Y. Kanai, T. Kono, T. Shinohara and A. Ogura, "Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 12389-12394 (2007).

(106) K. Endoh, K. Mochida, N. Ogonuki, M. Ohkawa, A. Shinmen, M. Ito, N. Kashiwazaki and A. Ogura, "The developmental ability of vitrified oocytes from different mouse strains assessed by parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection", *J. Reprod. Dev.*, in press.

(107) K. Ogawa, A. Saito, H. Matui, H. Suzuki, S. Ohtsuka, D. Shimosato, Y. Morishita, T. Watabe, H. Niwa and K. Miyazono, "Activin/Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells", *J. Cell. Sci.*, **120**, 55-65 (2007).

(108) H. Niwa, "How is pluripotency determined and maintained?", *Development*, **134**, 635-646 (2007).

(109) K. Mishima, T. Watabe, A. Saito, Y. Yoshimatsu, N. Imaizumi, S. Masui, M. Hirashima, T. Morisada, Y. Oike, M. Araie, H. Niwa, H. Kubo, T. Suda and K. Miyazono, "Prox1 induces lymphatic endothelial differentiation via Integrin ・9 and other signaling cascades", *Mol. Biol. Cell.*, **18**, 1421-1429 (2007).

(110) S. Masui, Y. Nakatake, Y. Toyooka, D. Shimosato, R. Yagi, K. Takahashi, H. Okochi, A. Okuda, R. Matoba, A. Sharov, M.S.H. Ko and H. Niwa, "Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells", *Nat. Cell. Biol.*, **9**, 625-635 (2007).

(111) D. Shimosato, M. Shiki and H. Niwa, "Extra-embryonic endoderm cells derived from ES cells induced by GATA factors acquire the character of XEN cells", *BMC Dev. Biol.*, **7**, 80 (2007).

(112) H. Umehara, T. Kimura, S. Ohtsuka, T. Nakamura, K. Kitajima, M. Ikawa, M. Okabe, H. Niwa and T. Nakano, "Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase-3", *Stem Cells*, in press.

(113) H. Fujiwara, Y. Hayashi, N. Sanzen, R. Kobayashi, C.N. Weber, T. Emoto, S. Futaki, H. Niwa, P. Murray, D. Edgar and K. Sekiguchi, “Regulation of mesodermal differentiation of mouse embryonic stem cells by basement membranes”, *J. Biol. Chem.*, in press.

（Ⅱ）その他の著作物(総説、書籍など)

(1) 松岡英明, 斉藤美佳子, “単一細胞操作支援ロボットの基盤技術”, *日本再生医療学会誌*, **2**, 55-63 (2003).

(2) 斉藤美佳子, “単一細胞実験法の開発と再生医学への応用”, 今農工大が面白い (矢嶋弘義編集) 第２部 教育と研究, 超技術開発者集団, 110-115 (2003).

(3) 斉藤美佳子, 松岡英明, “単一細胞操作支援ロボット”, ナノバイオテクノロジーの最前線 (植田充美編集) 第５章 ナノバイオテクノロジーで広がるプロセスとデバイス ８節, シーエムシー出版, 225-234 (2003).

(4) 坂 信広, 稲垣暢也, “膵β細胞インスリン分泌調節装置の新展開”, *医学のあゆみ* 特集「糖尿病-予防から治療まで」, **207**, 585-590 (2003).

(5) 中谷晴昭, 三木隆司, 清野 進, 山田勝也, 稲垣暢也, 鈴木 将, 佐藤俊明, 山田充彦, 松下賢治, 倉智嘉久, 有田 眞, “各種臓器の ATP 感受性 K^+チャネルの構造と機能：薬物制御による QOL の向上をめざして”, *日本薬理学雑誌*, 122, 243-250 (2003).

(6) 井上貴美子, 小倉淳郎, 林純一: マイトマウス. 「マウスラボマニュアル改訂版 (東京都臨床医学総合研究所実験動物研究部門編) Springer-Verlag Tokyo, p328-332, (2003).

(7) 小倉淳郎: クローンマウス. 「マウスラボマニュアル改訂版 (東京都臨床医学総合研究所実験動物研究部門編) Springer-Verlag Tokyo, p311-316, (2003).

(8) 小倉淳郎.: 核移植実験室. 「これからの大学等研究施設「生命科学編」」 文教施設協会, 東京, p6_29-6_30, 2003).

(9) 小倉淳郎: 実験動物の顕微授精と核移植クローンーその比較から何が見えてくるか. 医学のあゆみ 204, 912-916 (2003).

(10) 小倉淳郎: 生殖細胞核と体細胞核は何が違うのか ー 核移植技術から見えてくること. 分子細胞治療 2, 659-663 (2003).

(11) 丹羽仁史：ES 細胞の多能性を維持する分子機構、実験医学 (増刊)「再生医療へと動き始めた幹細胞研究の最先端」、21, 990-996, 2003.

(12) 丹羽仁史：胚性幹細胞を用いた移植治療の展望、脳の科学、13, 13-17, 2003.

(13) 小川和也、丹羽仁史：ES 細胞の多能性を維持する分子機構、医学のあゆみ「生殖医療のすべて」、204, 938-942, 2003.

(14) 豊岡やよい、丹羽仁史：ES 細胞の未分化性の維持、Molecular Medicine (増刊)「再生医学」、40, 106-115, 2003.

(15) 杉村逸郎、丹羽仁史：Oct-3/4 による ES 細胞の多能性の制御、分子細胞治療、2, 280-285, 2003.
(16) 升井伸治、丹羽仁史:プラスミド構築の裏技① 制限酵素の便利な使い方、実ア医学、21, 1247-1250, 2003.
(17) 升井伸治、丹羽仁史:プラスミド構築の裏技② 不退転のプラスミド構築法、実験医学、21, 1349-1352, 2003.
(18) 升井伸治、丹羽仁史:プラスミド構築法応用編① 必殺・外来遺伝子導入法、実験医学、21, 1777-1782, 2003.
(19) 升井伸治、丹羽仁史：プラスミド構築法応用編② To Be the first to know:電撃的遺伝子ターゲティング、実験医学、21, 2127-2132, 2003.
(20) Ogura, A., Ogonuki, N., Inoue, K., and Mochida, K. New microinsemination techniques for laboratory animals. Theriogenology, 59: 87-94, 2003
(21) 松岡英明, 斉藤美佳子, “再生生物エンジニアリング ④単一細胞操作支援ロボット”, *Surgery Frontier*, **11**, 86-88 (2004).
(22) 稲垣暢也: インスリン分泌における K_{ATP} チャネルの役割. 別冊・医学のあゆみ 糖尿病・代謝症候群 -state of arts- (門脇 孝、小川佳宏、下村伊一郎 編)、医歯薬出版、東京、p95-97, 2004
(23) 稲垣暢也: ABC トランスポーターと代謝調節. *細胞* 468: 198-20, 2004
(24) 稲垣暢也: 組織特異的に発現する脂質輸送関連 ABC トランスポーター. *生化学* 76: 539-545, 2004
(25) 長嶋一昭、稲垣暢也: 新生児血糖異常の遺伝的背景. *内分泌・糖尿病科* 19, 645-650, 2004
(26) 小倉淳郎: 動物の核移植クローン技術の現状. Medical Science Digest 30:410-413,2004
(27) 井上貴美子, 小倉淳郎: 核移植技術. 「実験医学別冊 クロマチン・染色体実験プロトコール (押村光雄, 平岡 泰編)」羊土社, 東京, p213-223, 2004
(28) 小川和也、西中村隆一、丹羽仁史:幹細胞の自己複製に関与する Wnt シグナル、細胞工学、23, 647-650, 2004.
(29) 丹羽仁史、小川和也、北島裕幸:ヒト ES 細胞の自己複製を制御する分子機構、細胞工学、23, 1260-1263, 2004.
(30) 丹羽仁史：誘導的発現システム開発の現状、医学のあゆみ (別冊)「疾患モデル動物」、19-23, 2004.
(31) 大塚哲、丹羽仁史：ES 細胞における細胞周期制御の特殊性、発生における細胞増殖制御 (竹内隆、岸本健雄編)、139-148, 2004.
(32) J. Fulka Jr, N. Miyashita, T. Nagai, A. Ogura, “Do cloned mammals skip a reprogramming step? *Nat Biotechnol*, **22**, 25-26 (2004).
(33) H. Niwa, “Mechanisms of stem cell self-renewal” in *HANDBOOK OF STEM CELLS Volume 1. Embryonic Stem Cells*, Edited by Robert Lanza et al., pp45-52, Elsevier Academic Press, 2004.
(34) 斉藤美佳子, “単一細胞操作支援ロボットを用いた ES 細胞へのナノインジェクション”, 文部科学省ナノテクノロジー総合支援プロジェクト メールマガジン第 81 号 (2005 年 1 月 26 日), (2005).

(35) 松岡英明, 斉藤美佳子, “環境保全に貢献する微生物センシング技術・微生物試験法実用化の課題”, *電気化学*, **73**, 205-211 (2005).

(36) 長嶋一昭、稲垣暢也: ATP 感受性 K^+チャネル. *Diabetes Frontier* 16: 584-588, 2005.

(37) 長嶋一昭、稲垣暢也: Kir6.2. 糖尿病カレントライブラリー４　糖尿病と遺伝子（堀川幸男、安田和基編)、分光堂、東京、p57-60, 2005.

(38) 長嶋一昭、稲垣暢也: K_{ATP} チャネルによるインスリン分泌と糖尿病. イオンチャネル最前線 update 別冊・医学のあゆみ（倉智嘉久編)、医歯薬出版、東京、p302-307, 2005.

(39) 稲垣暢也: 代謝調節に関わる ABC 蛋白質. ABC 蛋白質（植田和光編)、学会出版センター、東京、p189-217. 2005.

(40) 井上貴美子, 小倉淳郎: 割球分断クローン, 受精卵クローン, および体細胞クローンの相違について 綜合臨床 54: 24-29,2005.

(41) 小川和也、丹羽仁史：無血清培養系を用いた ES 細胞自己複製の最適化、バイオテクノロジージャーナル、538-542, 2005.

(42) 下里大輔、丹羽仁史：ES 細胞の未来、検査と技術、33, 1533-1536, 2005.

(43) M. Saito, H. Ochiiwa, B. Sato, M. Shibusawa, A. Hayakawa, T. Yoda and H. Matsuoka, “Knockdown of diabetes related genes in mouse ES cells and their differentiation into insulin-producing cells”, *Transgenic Res.*, **14**(4), p.525, 111 (2005).

(44) K. Yamada K. and N. Inagaki, “Neuroprotection by K_{ATP} channels”, *J. Mol.Cell. Cardiol.* 38, 945-949, 2005.

(45) A. Ogura, K. Inoue K, N. Ogonuki and H. Miki, “The present status of somatic cell cloning”, In: *Genetically Engineered Mice*, Sundberg, J.P. and Ichiki, T. (eds), CRC Press, Boca Raton, U.S.A., p125-130, 2005.

(46) 片山 靖, 斉藤美佳子, “イオン液体および細胞内における微小電極の応用”, *電気化学*, **74**, 911-915 (2006).

(47) 山田勝也、稲垣暢也: オリゴデンドロサイトおよびシュワン細胞の細胞体に発現する ABCA2 蛋白. 生体の科学 57: 167-171, 2006

(48) 井上貴美子, 小倉淳郎: 核移植とリプログラミング. 「再生医療のための分子生物学（仲野徹編)」コロナ社, 東京, p66-79, 2006

(49) 小倉淳郎, 越後貫成美, 井上貴美子: 哺乳類の顕微授精. 「新編 精子学（毛利秀雄, 星元紀監修, 森沢正昭)」 東京大学出版会, 東京, p333-347, 2006

(50) 越後貫成美, 小倉淳郎：顕微授精法. 「細胞工学別冊　マウス表現型解析プロトコール （理化学研究所ゲノム機能情報研究グループ編)」秀潤社, p204-211, 2006

(51) 丹羽仁史：Cdx2 と Oct3/4 の相互作用による栄養外胚葉分化運命の決定、細胞工学、25, 172-173, 2006.

(52) 丹羽仁史：哺乳類初期発生運命決定における転写因子の相克、蛋白質核酸酵素、51, 216-228, 2006.

(53) 中武悠樹、丹羽仁史：胚性幹細胞における自己複製能と多分化能、最新医学、61, 1468-1473, 2006.

(54) 丹羽仁史：幹細胞生物学の基本的概念、蛋白質核酸酵素、51, 1610-1617, 2006.

(55) H. Matsuoka and M. Saito, "High throughput microinjection technology toward single-cell bioelectrochemistry", *Electrochemistry*, **74**, 12-18 (2006).

(56) H. Matsuoka, Y. Yamada, K. Matsuoka and M. Saito, "High throughput microinjection technology for the single-cell analysis of BY-2 in vivo", in *Tobacco BY-2 Cells: From Cellular Dynamics to Omics* (Eds.: T. Nagata, K. Matsuoka, D. Inzé), Springer-Verlng, 339-346 (2006).

(57) S. Kishigami, S. Wakayama, N.V. Thuan, H. Ohta, E. Mizutani, T. Hikichi, H.-T. Bui, S. Balbach, A. Ogura, M. Boiani and T. Wakayama, "Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer", *Nat Protocols*, 1:125-138, 2006.

(58) T. Kohda, F. Ishino and A. Ogura, " Expression of imprinted genes in cloned mice", *Methods Mol Biol*, 348: 237-246, 2006.

(59) H. Niwa, "Mechanisms of stem cell self-renewal", in *Essentials of STEM CELL BIOLOGY*, Edited by Robert Lanza et al., pp55-62, Elsevier Academic Press, 2006.

(60) 斉藤美佳子, "疾患モデル細胞の創製を目指して", *生命化学研究レター*, **23**, 4-9 (2007).

(61) 松岡英明, 斉藤美佳子, "高効率マイクロインジェクション技術の開発と ES 細胞工学への応用", 再生医療の基礎シリーズ－生医学と工学の接点－④ 再生医療のためのバイオエンジニアリング(赤池敏宏編集) 10 章, コロナ社, 190-203 (2007).

(62) 稲垣暢也 糖尿病のこれまでの治療とこれから. 最新医学 62: 838-843, 2007

(63) 長嶋一昭、稲垣暢也: 新生児糖尿病治療の新展開-スルホニル尿素薬の新展開-. 最新医学 62: 933-939, 2007

(64) 松村欣宏、坂　信広、稲垣暢也: 肺疾患と ABCA3 - サーファクタント欠損症 - *最新医学* 62, in press

(65) 井上貴美子, 小倉淳郎: ドナー細胞の特性から見た核移植クローン. 「蛋白質核酸酵素 増刊号 生殖細胞の発生・エピジェネティクスと再プログラム化 (小倉淳郎, 佐々木裕之, 仲野徹, 松居靖久, 中辻憲夫編)」共立出版, 東京, 印刷中

(66) 丹羽仁史:ヒトＥＳ細胞の効果的な維持培養を可能にするシグナル因子、医学のあゆみ、220、139-142、2007.

（Ⅲ）学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

①招待講演（国内会議：49 件、国際会議：27 件）

(1) 斉藤美佳子, 永野陽子, 下川泰弘, 佐々木俊也, 佐賀彩子, 小曽根郁子, 松岡英明, "生薬からの ES 細胞における分化制御因子の探索", 第５０回日本実験動物学会総会, 大宮 (2003 年 5 月 29 日)

(2) 小倉淳郎 ″実験動物の核移植クローンの現状について″, 京都大学再生医科学研究所学術講演会 , 京都 , 2 月 (2003).

(3) 小倉淳郎 ″クローンマウス作出の現状と今後″, 実験動物懇話会 , (日本実験動物技術者協会), 東京 , 2 月 (2003).

(4) 小倉淳郎 ″実験動物の体細胞核移植クローンの現状″, 動物への遺伝子導入とその応用の開発研究会 , 東京 , 2 月 (2003).

(5) 小倉淳郎 ″体細胞クローンマウスの正常と異常″, 文科省科研費補助金特定領域研究「生殖細胞系列の制御機構と発生工学」公開シンポジウム「生殖細胞の発生プロセス･再プログラム化とエピジェネティクス」 , 京都 , 2 月 (2003).

(6) 小倉淳郎 ″実験動物の顕微授精と核移植クローン技術：特にマウスとウサギについて″, 発生工学用マニピュレーション技術研究会 , (岡崎国立共同研究機構), 岡崎 , 4 月 (2003).

(7) 小倉淳郎 ″実験動物の体細胞核移植クローンの特殊性について″, 第 44 回日本哺乳動物卵子学会 , 東京 , 5 月 (2003).

(8) 小倉淳郎 ″核移植クローン動物の異常とその解釈について″, 日本発生生物学会第 36 回大会 , 札幌 , 6 月 (2003).

(9) 小倉淳郎 ″Recent advances in somatic cell cloning for laboratory animals″, 第 9 回日本遺伝子治療学会総会 , 東京 , 7 月 (2003).

(10) 小倉淳郎 ″核移植クローンから何が見えてくるか″, 寄附講座「発生・医療工学 (三共)」開設記念国際シンポジウム「発生と創生」 , (東京大学大学院医学系研究科), 東京 , 11 月 (2003).

(11) 小倉淳郎 ″核移植クローン動物はなぜ生まれにくいのか″, 千里ライフサイエンスセミナー「新しく登場した生物学とそれを支える手法」 , 豊中 , 11 月 (2003).

(12) 小倉淳郎 ″哺乳類の顕微授精″, 第 18 回日本生殖免疫学会総会･学術集会 , 山口 , 11 月 (2003).

(13) 丹羽 仁史：Transcriptional control of self-renewal and differentiation in pluripotent stem cells, 第７６回日本生化学会 シンポジウム 個体の生涯を転写を通して考える、 パシフィコ横浜、2003.10.15~18

(14) 稲垣暢也：スルホニル尿素受容体の機能と病態における役割 日本薬学会第 26 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム「トランスポーターの機能制御；疾患との関連を中心に」, 2004 年 11 月, 東京

(15) 稲垣暢也：ATP 感受性カリウムチャネルの構造と病態における役割. 第 129 回日本産科婦人科学会秋田地方部会学術講演会, 2004 年 4 月, 秋田 (特別講演)

(16) 稲垣暢也： ATP 感受性カリウムチャネルの構造、機能と病態における役割. 日本糖尿病学会第 42 回東北地方会, 2004 年 11 月, 仙台 (特別講演)

(17) 稲垣暢也：糖尿病の分子病態. 第 28 回日本臨床検査医学会東北支部例会, 2004 年 11 月, 秋田 (教育講演)

(18) 小倉淳郎 ″何が体細胞クローンの効率を決めるのか″, 文科省科研費補助金特定領域研究「生殖細

胞の発生プロセス・再プログラム化とエピジェネティクス」公開シンポジウム , 京都 , 2 月 (2004).

(19) 小倉淳郎 ″サル類の発生工学的研究に期待すること″, 第 51 回日本実験動物学会総会 , 長崎 , 5 月 (2004).

(20) 小倉淳郎 ″何が体細胞クローンの効率を決めるのか″, 第 47 回発生工学･疾患モデル研究会定例会 , 東京 , 9 月 (2004).

(21) H. Niwa, “Cell Fate Commitment of Embryonic Stem Cells”, 第１７回内藤カンファレンス Molecular basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells [1]、湘南国際村、2004.11.17~

(22) 丹羽仁史：ES 細胞における外来遺伝子発現技術とその応用、日本組織培養学会第７７回大会、愛知産業貿易会館、2004.5.27~

(23) 稲垣暢也: インスリン分泌調節機構. 第 39 回糖尿病学の進歩、2005 年 2 月、仙台（レクチャー）

(24) N. Inagaki, “Structure and pathophysiology of ABC proteins involved in lipid transport”, 第 82 回生理学会大会、2005 年 5 月、仙台

(25) 稲垣暢也、三宅あかり、中村靖彦、三木隆司、清野　進、山田勝也. ATP 感受性カリウムチャネル: 脳における代謝センサー.　第 28 回日本神経科学会、シンポジウム「バイオ分子センサー：脳神経機能研究の新潮流」、2005 年 7 月、横浜

(26) 坂　信広、稲垣暢也: ABC 蛋白遺伝子異常によるサーファクタント関連肺疾患. 第 41 回日本界面医学会、2005 年 11 月、横須賀（話題提供）

(27) 小倉淳郎 ″実験動物の顕微授精の発達と今後の可能性について″, 第 139 回日本獣医学会学術集会 , 和光 , 3 月 (2005).

(28) 小倉淳郎 ″生殖細胞と体細胞は何が違うのか--核移植クローンからわかること″, 国立遺伝学研究所研究会「生命現象のエピジェネティクス」 , 三島 , 3 月 (2005).

(29) 小倉淳郎 ″実験動物を用いたクローン動物の作出″, 日本実験動物協会教育セミナー「実験動物における遺伝子改変技術の現状と畜産分野への展開」 , 東京 , 3 月 (2005).

(30) 小倉淳郎 ″ICSI（顕微授精）による突然変異マウスの活用″, 理研ゲノム科学総合研究センター公開シンポジウム「ヒト生活習慣病モデル動物の樹立とその利用」 , 東京 , 3 月 (2005).

(31) 小倉淳郎 ″マウス核移植クローンから何がわかるか″, 第 2 回北海道実験動物研究会学術集会 , 札幌 , 7 月 (2005).

(32) 小倉淳郎 ″マウス体細胞クローンに見られる異常について″, 第 45 回日本先天異常学会学術集会 , 東京 , 7 月 (2005).

(33) 小倉淳郎 ″雄性生殖細胞の胚形成能に関する研究（受賞講演）″, 第 98 回日本繁殖生物学会 , 静岡 , 9 月 (2005).

(34) 小倉淳郎 ″小型実験動物における発生工学の展開について″, つくば新技術講座 , (つくば研究支援センター), つくば , 10 月 (2005).

(35) 斉藤美佳子, ″疾患モデル細胞の開発と再生医工学への応用″, 電気化学会第７３回大会, 東京（2006年4月1日）

(36) 斉藤美佳子, ″ナノインジェクション法のポストゲノムサイエンスへの展開″, 第６７回応用物理学会学術講演会, 草津（2006年8月29日）

(37) 稲垣暢也: ATP感受性カリウムチャネルを介するインスリン分泌機構. *第49回日本糖尿病学会年次学術集会*、2006年5月、東京（シンポジウム）

(38) 稲垣暢也: 膵β細胞障害の分子機構. 第41回糖尿病学*の進歩*、2006年9月、札幌（レクチャー）

(39) 小倉淳郎 ″マウスICSI技術の応用について″, 生殖工学研究会（SSRE）2006年シンポジウム , 東京 , 3月 (2006).

(40) 小倉淳郎 ″実験動物の核移植クローンの意義とその現状″, 第24回日本ヒト細胞学会 , 東京 , 7月 (2006).

(41) 小倉淳郎 ″哺乳類における生殖細胞の特殊性について″, 第 99 回大会日本繁殖生物学会 , 名古屋 , 9月 (2006).

(42) 小倉淳郎 ″実験動物のクローン研究の現状について″, 第25回未来医療セミナー ,(大阪大学医学部未来医療センター), 大阪 , 10月 (2006).

(43) 小倉淳郎 ″実験動物の核移植クローンから何がわかるか″, 近畿大学21世紀COEプログラム「食資源動物分子工学研究拠点」第7回国際シンポジウム , 泉佐野 , 12月 (2006).

(44) 小倉淳郎 ″実験動物の生殖工学技術の現状と今後の可能性″, 東京大学疾患生命工学センターセミナー , 東京 , 12月 (2006).

(45) 丹羽　仁史：幹細胞の多能性を規定する分子基盤、　第５３回日本実験動物学会総会　公開シンポジウム　「再生医学の現状と今後の展望」、神戸国際会議場、2006.5.11~13

(46) 稲垣暢也、松村欣宏、坂　信広: ABCA3の機能と病態における役割. (Function and Pathophysiology of ABCA3) 日本薬学会第127年会、2007年3月、富山（シンポジウム）

(47) 稲垣暢也: 栄養とインスリン分泌.　第61回日本栄養・食糧学会大会、2007年5月、京都（シンポジウム）

(48) 小倉淳郎 ″公開講演会　哺乳動物における顕微授精の誕生と展開″, 第 25 回日本受精着床学会 , 仙台 , 8月 (2007).

(49) 小倉淳郎 ″精細胞を用いた顕微授精の応用″, 第 143 回日本獣医学会学術集会 , つくば , 4 月 (2007).

(50) M. Saito, ″Microinjection technology focused on the simultaneous introduction of multiple genes into a target single-cell″, The 1st International Congress on Bio-Nanointerface, Tokyo (May 19-24, 2003).

(51) N. Inagaki, “Regulation of ATP-sensitive potassium channels by metabolic stress in brain” (Symposium) Japan-US Brain Research Cooperative Program. Information Exchange Seminar.

Neural Signalplexes and Ion Channel Regulation., Mar. 16-18, 2003, Okazaki, Japan

(52) N. Inagaki, “Cloning, tissue distribution, and function of ABCA transporters” XIIIth International Symposium on Atherosclerosis, Sept. 28-Oct. 2, 2003, Kyoto, Japan (Symposium)

(53) A. Ogura, ″Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse″ The 3rd Meeting on Pathology of Genetically Engineered Mice: Large Scale Phenotyping of Mutant Mice, Kumamoto, Japan, Oct. 2003.

(54) A. Ogura, ″Cloned mice″ Pre-Conference Symposium on Mechanisms Regulating Developmental Plasticity, Auckland, New Zealand, Jan. 2003.

(55) A. Ogura, ″New microinsemination techniques for labolatory animals″ 29th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Auckland, New Zealand, Jan. 2003.

(56) H. Niwa, “Cell fate commitment of mouse ES cells, Controlling the differentiation of pluripotent cells”, The Banbury Center, Cold Spring Harbor Laboratory, 2003.10.19-22

(57) H. Niwa, “Molecular dynamics of mouse ES cells”, First National Stem Cell Centre Scientific Conference ″Stem Cells and Tissue Repair″, Grand Hyatt Hotel, Melbourne, 2003.10.9~12

(58) H. Niwa, “Molecular mechanism to maintain self-renewal in mouse ES cells”, Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology Meeting, Seoul, 2003.5.15~16

(59) A. Ogura, ″ICSI in laboratory animals″ Satellite Symposium of the JSAR Annual Meeting on Current Status and Perspectives in Reproductive Biology and Biotechnology, Kyoto, Japan, Sep. 2004

(60) H. Niwa, “Quantitative effects of transcription factors governing cell fate determination of mouse ES cells”, The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, パシフィコ横浜、2004.4.16~

(61) H. Niwa, “From Pluripotent Stem Cells to Multipotent Stem Cells”, 33rd Annual Scientific Meeting of the International Society for Experimental Hematology, New Orleans, USA 2004.7.19~

(62) H. Niwa, “Essential role of Cdx-2 for self-renewal of trophoblast stem cells”, The 2004 Meeting on Mouse Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, USA, 2004.9.1~

(63) A. Ogura, ″Cloning mice from differentiated and undifferentiated cells″ International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells, Kyoto, Japan, Nov. 2005.

(64) A. Ogura, ″Nuclear transfer using germ cells″ Mammalian Oogenesis and Epigenetic Modification, Kisarazu, Japan, Oct. 2005.

(65) K. Inoue and A. Ogura, ″Cloning mice from differentiated and undifferentiated cells″, Biology and Practice of Mammalian Cloning: A Reassessment , (Cold Spring Harbor Laboratory), Cold

Spring Harbor, USA, Nov. 2005.

(66) H. Niwa, “Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation”, International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells, 京都大学, 2005.11.15~18

(67) M. Saito, ″Quantitative gene introduction into single-cells by nanoinjection system″, The 4th Sweden-Japan Workshop on Bio-Nanotechnology, Tsukuba (November 13-14, 2006).

(68) N. Inagaki, “Characterization of the function and pathophysiology of ABCA3 in the lung”, (Symposium) FEBS Special Meeting “ABC2006-ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases”, Mar. 2006, Innsbruck, Austria,

(69) N. Inagaki, “Metabolic sensor for glucose homeostasis - roles of ATP-sensitive potassium channels”, The 4th Catholic International Stem Cell Symposium and the 1st Korea-Japan Islet Club, July 14, 2006, Seoul, Korea

(70) A. Ogura, ″Differential cloning efficiency following NT using different donor cell types and genotypes in mice″ 3rd Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society, Hanoi Vietnam、Nov. 2006.

(71) A. Ogura, ″Microinsemination using male germ cells″ 10th International Symposium on Spermatology, Madrid, Spain, Sep. 2006.

(72) H. Niwa, “Molecular mechanism to generate placenta: Implications for the regeneration of nuclear-transfer ES cells” ,第５回日本再生医療学会総会；International Symposium on Regenerative Medicine-Prospection on Human ES cells-based Therapies-, 岡山コンベンションセンター, 2006.3.8~9

(73) H. Niwa, “Molecular mechanism to maintain cellular pluripotency” , 59th Annual Symposium on Cancer Research; Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine, JW Marriott Hotel, Houston, USA, 2006.10.27~29

(74) H. Niwa, “Transcription factors regulating self-renewal and differentiation of ES cells”, A celebration of 25 years of embryonic stem cell research in Cambridge, University of Cambridge, UK 2006.12.18~19

(75) H. Niwa, “How is pluripotency maintained in mouse ES cells?, CDB Symposium 2007 Germ Line versus Soma: Towards Generating Totipotency, RIKEN CDB、神戸, 2007.3.26~28

(76) H. Niwa, “What makes pluripotency pluripotency?, 5th International Society for Stem cell Research Annual MeetingCairns Convention Centre, Cairns, Australia, 2007.6.17~20

②口頭発表（国内会議：76 件、国際会議：6 件）

(1) 駒﨑太夢, 向井嘉子, 斉藤美佳子, 松岡英明, ″単一細胞遺伝子導入支援ロボット″, 第２回日本再

生医療学会大会，神戸（2003 年 3 月 11 日）

(2) 斉藤美佳子，下川泰弘，永野陽子，佐々木俊也，佐賀彩子，小曽根郁子，松岡英明，″ES 細胞における分化制御因子の探索″，日本化学会第８３春季年会，東京（2003 年 3 月 20 日）

(3) 向井嘉子，駒﨑太夢，松岡英明，斉藤美佳子，″単一細胞操作支援システムによる遺伝子発現制御″，日本化学会第８３春季年会，東京（2003 年 3 月 20 日）

(4) 佐賀彩子，斉藤美佳子，小曽根郁子，松岡英明，″誘電的性質に基づくマウス線維芽細胞評価″，電気化学会第７０回大会，東京（2003 年 4 月 1 日）

(5) 駒﨑太夢，向井嘉子，斉藤美佳子，松岡英明，″単一細胞支援ロボットの導入によるイネ単一細胞 Ca^{2+}の電気的刺激応答の顕微分光計測″，電気化学会第７０回大会，東京（2003 年 4 月 1 日）

(6) 斉藤美佳子，佐賀彩子，向井嘉子，駒﨑太夢，松岡英明，″単一細胞操作支援ロボットによる単一動物細胞への遺伝子インジェクション″，２００３年電気化学秋季大会，札幌（2003 年 9 月 11 日）

(7) 駒﨑太夢，向井嘉子，斉藤美佳子，松岡英明，″イネ単一細胞 Ca^{2+}の電気的刺激応答とキチナーゼ遺伝子発現の動的解析″，２００３年電気化学秋季大会，札幌（2003 年 9 月 12 日）

(8) 佐々木真弓、坂　信広、稲垣暢也：マウス精巣に特異的に発現する新規 ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターABCA14 の単離 第 26 回日本分子生物学会大会，2003 年 12 月，神戸

(9) 永田　紅、松尾道憲、木岡紀幸、坂　信広、稲垣暢也、植田和光：肺胞 II 型細胞に高発現する ABCA3 と ATP との相互作用の解析 第 26 回日本分子生物学会大会，2003 年 12 月，神戸

(10) 広瀬 良宏,岡田 浩典,井上 貴美子,越後貫 成美,三木 洋美,竹入 修二,長嶋 比呂志,小倉 淳郎,山海 直：″ウサギの受精卵および体細胞の核移植由来胚からのES細胞樹立の試み″，第一回フォーラム「医療に貢献する実験用ウサギの新しい展開」，(佐賀医科大学医学部)，佐賀，3月 (2003).

(11) 越後貫 成美,井上 貴美子,三木 洋美,広瀬 良宏,岡田 浩典,竹入 修二,山海 直,小倉 淳郎：″ウサギ精子および精子細胞の卵子活性化能についての再検討″，第 96 回日本繁殖生物学会大会，帯広，9 月 (2003).

(12) 丹羽　仁史：「マウス ES 細胞の未分化状態を維持する分子機構」，日本分子生物学会　第３回春季シンポジウム、　米子コンベンションセンター、2003.5.11~13

(13) 駒﨑太夢，向井嘉子，斉藤美佳子，松岡英明，″電気的シグナルによって誘起されるイネ単一細胞内カルシウム濃度の空間分布変化″，電気化学会第７１回大会，横浜（2004 年 3 月 24 日）

(14) 下田聡一郎，斉藤美佳子，小曽根郁子，松岡英明，″イネ培養細胞および ES 細胞に対する自動マイクロインジェクションシステム″，電気化学会第７１回大会，横浜（2004 年 3 月 26 日）

(15) 斉藤美佳子，稲垣暢也，小倉淳郎，丹羽仁史，松岡英明，″マウス ES 細胞における糖尿病関連遺伝子改変法の検討″，日本化学会第８４春季年会，西宮（2004 年 3 月 27 日）

(16) 駒﨑太夢，向井嘉子，斉藤美佳子，小曽根郁子，松岡英明，″ハイスループットマイクロインジェクションを目指す要素技術開発″，日本化学会第８４春季年会，西宮（2004 年 3 月 28 日）

(17) 佐々木俊也，斉藤美佳子，小曽根郁子，丹羽仁史，松岡英明，″マウス ES 細胞から心筋への分化に

及ぼす人参含有成分の効果″，日本化学会第８４春季年会，西宮（2004 年 3 月 28 日）

(18) 斉藤美佳子，稲垣暢也，小倉淳郎，丹羽仁史，松岡英明，″糖尿病関連遺伝子ノックダウン ES 細胞の開発″，第８回バイオテクノロジー部会シンポジウム，神戸（2004 年 11 月 6 日）

(19) 王　エン、山田勝也、石川和夫、稲垣暢也：ヒト末梢神経における ABC トランスポーターABCA2 の発現解析，第 81 回日本生理学会大会，2004 年６月，札幌

(20) 坂　信広、吉田一郎、佐々木真弓、稲垣暢也：マウス精子に特異的に発現する新規 ATP-binding cassette (ABC)トランスポーターABCA14 の単離，第 81 回日本生理学会大会，2004 年６月，札幌

(21) 中田正範,加計正文,稲垣暢也,矢田俊彦：Endosulfine/ARPP による K-ATP channels および membrane electrical activity の調節，第 81 回日本生理学会大会，2004 年６月，札幌

(22) 井上 貴美子,越後貫 成美,三木 洋美,本多 新,持田 慶司,信賀 順,古関 明彦,小倉 淳郎：″マウス体細胞クローン胚に観察される初期胎盤形成不全について″，第97回日本繁殖生物学会大会 ，東広島 ，9月 (2004).

(23) 三木 洋美,井上 貴美子,幸田 尚,本多 新,越後貫 成美,三瀬 名丹,松居 靖久,馬場 忠,阿部 訓也,石野 史敏,小倉 淳郎:″始原生殖細胞 (PGC) を用いた核移植による産仔の作出″，第 97 回日本繁殖生物学会大会 ，広島 ，9 月 (2004).

(24) 斉藤美佳子，稲垣暢也，小倉淳郎，丹羽仁史，松岡英明，″RNAi 法による ES 細胞の糖尿病関連遺伝子ノックダウン″，日本化学会第８５春季年会，神奈川（2005 年 3 月 26 日）

(25) 斉藤美佳子，稲垣暢也，小倉淳郎，丹羽仁史，松岡英明，″マウス ES 細胞からインスリン分泌細胞への分化条件の検討″，日本化学会第８５春季年会，神奈川（2005 年 3 月 26 日）

(26) 山田洋平，茶木昭彦，斉藤美佳子，松岡英明，″SMSR による種々の細胞へのハイスループットマイクロインジェクション″，日本化学会第８５春季年会，神奈川（2005 年 3 月 26 日）

(27) 佐々木俊也，斉藤美佳子，小曽根郁子，松岡英明，″マウス ES 細胞から心筋細胞への分化に及ぼす人参含有成分ビタミン B12 の効果″，日本化学会第８５春季年会，神奈川（2005 年 3 月 26 日）

(28) 下田聡一郎，斉藤美佳子，小曽根郁子，松岡英明，″マイクロインジェクションにおける DNA 導入の高精度化″，電気化学会第７２回大会，熊本（2005 年 4 月 3 日）

(29) 平井理恵子，斉藤美佳子，小曽根郁子，松岡英明，″イネプロトプラスト及び ES 細胞の細胞内 Ca^{2+} の空間分布解析″，電気化学会第７２回大会，熊本（2005 年 4 月 3 日）

(30) 下田聡一郎，澁澤明里，斉藤美佳子，松岡英明，″ES 細胞への DNA のマイクロ電気泳動導入″，２００５年電気化学秋季大会，千葉（2005 年 9 月 9 日）

(31) 尾崎正和，水上 創，下田聡一郎，澁澤明里，斉藤美佳子，松岡英明，″ES 細胞への最適遺伝子導入条件の検討″，２００５年電気化学秋季大会，千葉（2005 年 9 月 9 日）

(32) 水上 創，尾崎正和，下田聡一郎，澁澤明里，斉藤美佳子，松岡英明，″ES 細胞へ導入された分子の細胞内動的挙動″，２００５年電気化学秋季大会，千葉（2005 年 9 月 9 日）

(33) 山田耕太郎、細川雅也、藤本新平、長嶋一昭、福田一仁、藤田義人、小川栄一、上田直哉、山田祐

一郎、清野　裕、稲垣暢也: Spontaneously Diabetic Torii(SDT)ラットにおける糖尿病性胃腸症の検討. 第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会、2005 年 5 月、神戸

(34) 長嶋一昭、高橋輝、豊田健太郎、山田千積、桑村尚充、池田弘毅、濱崎暁洋、山田祐一郎、清野　裕、稲垣暢也: Kir6.2 結合薬剤による骨格筋糖取込み能への影響についての検討」　第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会、2005 年 5 月、神戸

(35) 桑村尚充、常宝成、長嶋一昭、濱崎暁洋、山田祐一郎、清野　裕、稲垣暢也: HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）による膵 β 細胞インスリン分泌への影響に関する検討. 第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会、2005 年 5 月、神戸

(36) 山田千積、長嶋一昭、山田祐一郎、清野　裕、稲垣暢也: ガチフロキサシン（GFLX）の低血糖および高血糖誘発機序の検討. 第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会、2005 年 5 月、神戸

(37) 長嶋一昭、Pascal Beguin、魏　范研、富澤一仁、山田祐一郎、稲垣暢也: 膵 β 細胞における電位依存性 Ca2+チャネル機能的発現調節機構の多様性について」　第 17 回分子糖尿病学シンポジウム（京都、2005 年 12 月 3 日）

(38) 越後貫 成美,持田 慶司,新免 明恵,大川 美佳,三木 洋美,井上 貴美子,Fray M．,森脇 和郎,小幡 裕一,小倉 淳郎:″簡便かつ安定したマウス精巣上体および精巣の総組織凍結保存・輸送技術の開発″, 第 98 回日本繁殖生物学会 , 静岡 , 9 月 (2005).

(39) 丹羽仁史：ES 細胞の分化運命を制御する分子機構, 第９４回日本病理学会総会　シンポジウム「再生医学と病理」、パシフィコ横浜、2005.4.14~16

(40) 丹羽仁史、高橋一恵、矢木利香、下里大輔、豊岡やよい：Oct3/4 と Cdx2 の相互作用による細胞分化運命の決定、日本発生生物学会第３８回大会　シンポジウム「幹細胞生物学の展開」、仙台国際センター、2005.6.1~4

(41) 斉藤美佳子, 稲垣暢也, 小倉淳郎, 丹羽仁史, 松岡英明, ″糖尿病関連遺伝子ノックダウン ES 細胞の開発とインスリン分泌細胞への分化誘導″, 日本化学会第８６春季年会, 千葉(2006 年 3 月 30 日)

(42) 山田洋平, 山口直俊, 松橋一男, 斉藤美佳子, 松岡英明, ″SMSR における細胞登録機能の改善″, 日本化学会第８６春季年会, 千葉（2006 年 3 月 30 日）

(43) 松岡英明, 下田聡一郎, 尾崎正和, 水上 創, 山田洋平, 斉藤美佳子, ″SMSR による ES 細胞への半定量マイクロインジェクション″, 日本化学会第８６春季年会, 千葉（2006 年 3 月 30 日）

(44) 佐々木俊也, 松岡英明, 斉藤美佳子, ″マウス ES 細胞から心筋細胞への分化に及ぼすスペルミンの効果″, 日本化学会第８６春季年会, 千葉（2006 年 3 月 30 日）

(45) 尾崎正和, 下田聡一郎, 斉藤美佳子, 松岡英明, ″マイクロインジェクター先端径の評価法の開発″, 電気化学会第７３回大会, 東京（2006 年 4 月 1 日）

(46) 水上 創, 下田聡一郎, 斉藤美佳子, 松岡英明, ″ES 細胞に対する遺伝子導入の定量性の検討″,電気化学会第７３回大会, 東京（2006 年 4 月 1 日）

(47) 尾崎正和, 金澤正浩, 斉藤美佳子, 松岡英明, ″マイクロインジェクションによる導入遺伝子の発

現パターンに及ぼす要因の検討″，２００６年電気化学秋季大会，京都（2006 年 9 月 15 日）

(48) 水上 創，金澤正浩，斉藤美佳子，松岡英明，″ES 細胞への遺伝子導入における定量性の検討″，２００６年電気化学秋季大会，京都（2006 年 9 月 15 日）

(49) 松本真寛，関根宗一郎，梶弘和，西澤松彦，安部隆（東北大学），界面活性剤とプラズマ表面処理法を用いたポリマー表面の細胞接着性の制御，平成１９年電気学会全国大会，３月，富山

(50) 松本真寛， 梶弘和， 安部隆， 西澤松彦，界面活性剤を用いる新規な低温接合技術の開発とポリマーマイクロチップへの応用，2006 年電気化学秋季大会，2006 年 9 月，京都

(51) 長嶋一昭、依藤亨、桑村尚充、細川雅也、山田祐一郎、稲垣暢也：Kir6.2 遺伝子異常による家族性糖尿病症例とｲﾝｽﾘﾝ分泌促進薬反応性についての検討．第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会、2006 年 5 月、東京

(52) 船越生吾、藤本新平、濱崎暁洋、藤原秀哉、藤田義人、細川雅也、山田祐一郎、清野　裕、稲垣暢也：2 型糖尿病における糖尿病曝露による進行性膵 β 細胞機能低下の検討．*第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会*、2006 年 5 月、東京

(53) 福島光夫、三井理瑛、猪塚倫代、鱸英彦、谷口中、中井義勝、河北俊子、村上雅義、稲垣暢也、清野　裕：日本人の耐糖能低下要因：亜分類の有用性．第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会、2006 年 5 月、東京

(54) 鱸英彦、福島光夫、豊田健太郎、猪塚倫代、西勇一、谷口中、中井義勝、河北俊子、稲垣暢也、清野　裕：空腹時血糖値上昇初期因子の検討」*第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会*、2006 年 5 月、東京

(55) 山田祐一郎、福田一仁、藤本新平、豊田健太郎、佐々真理子、松本慎一、清野　裕、稲垣暢也：膵島移植からｲﾝｽﾘﾝ分泌の新たな指標 SUIT の開発とその 2 型糖尿病への応用．第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会、2006 年 5 月、東京

(56) 豊田健太郎、山田祐一郎、福田一仁、興津輝、松本慎一、稲垣暢也：上腸間膜静脈領域への膵島移植の有用性について．第 49 回日本糖尿病*学会年次学術集会*、2006 年 5 月、東京

(57) 山田耕太郎、細川雅也、藤本新平、藤原秀哉、藤田義人、原田範雄、山田千積、西勇一、下田平眞生子、福田一仁、上田直哉、松山太、山田祐一郎、清野　裕、稲垣暢也：コロソリン酸及び肝糖新生抑制作用の検討．第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会、2006 年 5 月、東京

(58) 藤田義人、細川雅也、藤本新平、藤原秀哉、山田耕太郎、西勇一、小川栄一、下田平眞生子、福田一仁、長嶋一昭、山田祐一郎、清野　裕、稲垣暢也：マウス単離肝細胞におけるクルクミンのグリコーゲン分解に及ぼす影響．第 49 回日本糖尿病*学会年次学術集会*、2006 年 5 月、東京

(59) 原田範雄、山田祐一郎、山田千積、月山克史、清野　裕、稲垣暢也：肥満における Truncated GIP 受容体の細胞内 GIP シグナルへの影響．*第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会*、2006 年 5 月、東京

(60) 山田千積、山田祐一郎、月山克史、原田範雄、宮脇一真、清野　裕、稲垣暢也：消化管ﾎﾙﾓﾝ GIP は骨代謝をアナボリックに調節する．*第 49 回日本糖尿病学会年次学術集会*、2006 年 5 月、東京

(61) Y. Aramaki, N. Kume, H. Mitsuoka, E. Mukai, M. Toyohara, K. Nakajima, N. Inagaki and T. Kita, “Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) as a novel receptor for remnant-like lipoprotein particles (RLPs) in vascular smooth muscle cells”, 第38回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2006年7月、東京

(62) 原田範雄、 山田祐一郎、 月山克史、 山田千積、 中村靖彦、 清野裕 、稲垣暢也: 肥満におけるTruncated GIP受容体の膵 β 細胞内GIPシグナルへの影響. 第18回分子糖尿病学シンポジウム、2006年12月、松山

(63) 斉藤美佳子，佐々木俊也，山田洋平，松岡英明，″多層化筋線維形成におけるネットワークの動的解析″，日本化学会第８７春季年会，大阪（2007年3月26日）

(64) 斉藤美佳子，早川 彩，與田照美，松岡英明，″糖尿病関連遺伝子ダブルノックダウンES細胞の開発″，日本化学会第８７春季年会，大阪（2007年3月28日）

(65) 山田洋平，山口直俊，篠崎行啓，斉藤美佳子，松岡英明，″細胞迅速呼び出し機能を利用した高効率単一細胞実験″，日本化学会第８７春季年会，大阪（2007年3月28日）

(66) 松岡英明，高山幸大，小泉貴寛，荒木恵美子，斉藤美佳子，″食品中の生菌の迅速分画計数システムの開発″，日本化学会第８７春季年会，大阪（2007年3月28日）

(67) 佐々木俊也，松岡英明，斉藤美佳子，″マウスES細胞由来筋線維の形態学的特徴″，日本化学会第８７春季年会，大阪（2007年3月28日）

(68) 尾崎正和，山口直俊，山田洋平，斉藤美佳子，松岡英明，″フェムトインジェクションにおける空間的・時間的精度の改良″，電気化学会第７４回大会，野田（2007年3月29日）

(69) 白井雅人，尾崎正和，斉藤美佳子，松岡英明，″バイオインジェクトロードの開発″，電気化学会第７４回大会，野田（2007年3月30日）

(70) 水上 創，斉藤美佳子，松岡英明，″定量フェムトインジェクションの高精度化″，電気化学会第７４回大会，野田（2007年3月30日）

(71) 白井正人，斉藤美佳子，松岡英明，″サブミクロン Pt-キャピラリー電極の作製″，２００７年電気化学秋季大会，東京（2007年9月20日）

(72) 尾崎正和，山田洋平，斉藤美佳子，松岡英明，″フェムトインジェクションを用いたインスリン合成関連遺伝子の定量的導入″，２００７年電気化学秋季大会，東京（2007年9月20日）

(73) 水上 創，山田洋平，斉藤美佳子，松岡英明，″フェムトインジェクションを用いたOct3/4遺伝子の定量的導入″，２００７年電気化学秋季大会，東京（2007年9月20日）

(74) 船越生吾、藤本新平、濱崎暁洋、藤原秀哉、藤田義人、細川雅也、山田祐一郎、清野　裕、稲垣暢也: 2 型糖尿病における内因性インスリン分泌能評価によるインスリン治療患者の識別についての検討. 第50回日本糖尿病学会年次学術集会、2007年5月、仙台

(75) 小湊理恵子、藤本新平、向　英里、西　勇一、下田平眞生子、船越生吾、山田祐一郎、船越生吾、清野　裕、稲垣暢也: 膵島の活性酸素種による ATP 産生制御機構には、Src 活性化を介する

Na/K-ATPase のシグナル伝達機能が関与する. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、2007 年 5 月、仙台

(76) 越後貫 成美: ″さまざまな条件下の雄性生殖細胞を用いた顕微授精による産仔作出″, 第 38 回精子研究会 , 東京 , 1 月 (2007).

(77) H. Miki, K. Inoue, N. Ogonuki, K. Mochida, H. Nagashima, T. Baba and A. Ogura A, ″Cytoplasmic asters are required for progression of the first cell cycle in mouse cloned embryos″, 37th Annual Meeting Society of the Study of Reproduction , (University of British Columbia), Vancouver , Canada , Aug. (2004).

(78) Y. Aramaki, N. Kume, H. Mitsuoka, E. Mukai, M. Toyohara, N. Inagaki and T. Kita, “Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) as a novel receptor for remnant-like lipoprotein particles (RLPs) in・vascular smooth muscle cells (VSMCs)”. ACC(American College of Cardiology).06, 55th Annual Scientific Session, March.11, Atlanta, U.S.A. (2006)

(79) N. Ogonuki, K. Mochida, A. Shinmen, M. Ohkawa, H. Miki, K. Inoue, M. Fray, K. Moriwaki, Y. Obata and A. Ogura, ″Microinsemination using male germ cells from epididymides and testes stored in freezers without cryoprotectant″, 32nd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society , Orlando , USA , Jan. (2006).

(80) K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki and A. Ogura, ″Gene expression analysis of somatic and germ cell nuclear transfer cloned mouse embryos″, 3rd Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society: Environmental Sciences Workshop , Hanoi , Viet Nam , Nov.--Dec. (2006).

(81) N. Ogonuk, K. Mochida, H. Miki, K. Inoue, T. Iwaki, K. Morozumi, R. Yanagimachi and A. Ogura, ″ICSI using male germ cells retrieved from reproductive organs and whole bodies stored in freezers″, International Symposium on Cell Signaling in Gamete Activation: from Basic Research to ART , (Tokyo Women's Medical University), Tokyo , Nov. (2006).

(82) N. Ogonuki, K. Mochida, H. Miki, K. Inoue, T. Iwaki, K. Morozumi, R. Yanagimachi and A. Ogura A, ″Spermatozoa retrieved from male mice frozen for 15 years can produce normal offspring″, 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society , Kyoto , Jan. (2007).

③ポスター発表（国内会議：49 件、国際会議：27 件）

(1) 井上 貴美子,越後貫 成美,三木 洋美,山本 美江,高野 薫,小倉 淳郎: ″体細胞クローンマウスに観察されるミトコンドリアDNAヘテロプラズミー″, 第50回日本実験動物学会総会 , さいたま , 5月 (2003).

(2) 広瀬 良宏,岡田 宏典,井上 貴美子,越後貫 成美,三木 洋美,小倉 淳郎,山海 直: ″マウスおよびウサギの体細胞核移植由来胚からのES様細胞の樹立″, 第50回日本実験動物学会総会 , さいたま , 5

月 (2003).

(3) 越後貫 成美,持田 慶司,井上 貴美子,三木 洋美,吉木 淳,小幡 裕一,森脇 和郎,小倉 淳郎: ″繁殖困難な遺伝子改変マウス維持への顕微授精技術の利用″, 第 50 回日本実験動物学会総会 , さいたま , 5 月 (2003).

(4) 丹羽　仁史:「栄養外胚葉分化に関わる転写因子の機能解析」日本発生生物学会第３６回大会, 札幌コンベンションセンター、 2003.6.11~13

(5) 斉藤美佳子, 駒﨑太夢, 向井嘉子, 下田聡一郎, 松岡英明, ″単一細胞操作支援ロボットによる ES 細胞への遺伝子導入″, 第５１回日本実験動物学会総会, 長崎 (2004 年 5 月 21 日)

(6) 落岩寛明, 赤根弘敏, 丹羽仁史, 小曽根郁子, 松岡英明, 斉藤美佳子, ″Kir6.2 および IRS2 遺伝子の ES 細胞における発現系の開発およびその発現阻害条件の検討″, 第５１回日本実験動物学会総会, 長崎 (2004 年 5 月 21 日)

(7) 佐藤 伴, 角田真英, 内藤加奈, 丹羽仁史, 小曽根郁子, 松岡英明, 斉藤美佳子, ″PDX-1 および IRS-1 遺伝子の ES 細胞における発現系の開発およびその発現阻害条件の検討″, 第５１回日本実験動物学会総会, 長崎 (2004 年 5 月 21 日)

(8) 澁澤明里, 香取将太, 丹羽仁史, 小曽根郁子, 松岡英明, 斉藤美佳子, ″SHP およびグルコキナーゼ遺伝子の ES 細胞における発現系の開発およびその発現阻害条件の検討″, 第５１回日本実験動物学会総会, 長崎 (2004 年 5 月 21 日)

(9) 佐々木俊哉, 永野陽子, 下川泰弘, 小曽根郁子, 斉藤美佳子, 松岡英明, ″マウス ES 細胞から心筋細胞への分化に及ぼす人参含有成分の影響″, 第５１回日本実験動物学会総会, 長崎 (2004 年 5 月 22 日)

(10) 松村欣宏, 坂　信広, 吉田一郎, 稲垣暢也: 肺サーファクタント欠損に認められる ABC トランスポーターABCA3 変異体の細胞内局在の検討 第 27 回日本分子生物学会大会、2004 年 12 月、神戸

(11) 越後貫 成美,井上 貴美子,三木 洋美,広瀬 良広,岡田 浩典,竹入 修二,山海 直,持田 慶司,小倉 淳郎: ″ウサギ精子・精細胞顕微授精由来胚の発生能についての検討″, 第51回日本実験動物学会総会 , 長崎 , 5月 (2004).

(12) 井上 貴美子,越後貫 成美,三木 洋美,野田 慎一,金 慎文,青木 不学,三好 浩之,小倉 淳郎: ″造血幹細胞をドナーとしたクローン胚発生効率の検討″, 第 51 回日本実験動物学会総会 , 長崎 , 5 月 (2004).

(13) 丹羽仁史、高橋一恵、矢木利香、豊岡やよい：栄養外胚葉分化に関わる転写因子の機能解析２００４、日本発生生物学会第３７回大会、名古屋国際会議場、2004.6.5~

(14) 佐々木俊哉, 斉藤美佳子, 小曽根郁子, 松岡英明, ″マウス ES 細胞から心筋細胞への分化に及ぼす人参含有成分ビタミン B12 の影響″, 第５２回日本実験動物学会総会, 船堀 (2005 年 5 月 18, 19 日)

(15) 落岩寛明, 丹羽仁史, 松岡英明, 斉藤美佳子, ″糖尿病関連遺伝子 Kir6.2 及び IRS-2 を標的としたノックダウン ES 細胞の開発″, 第５２回日本実験動物学会総会, 船堀 (2005 年 5 月 18, 19 日)

(16) 澁澤明里，丹羽仁史，松岡英明，斉藤美佳子，″糖尿病関連遺伝子 SHP 及び GK を標的としたノックダウン ES 細胞の開発″，第５２回日本実験動物学会総会，船堀（2005 年 5 月 18，19 日）

(17) 都築隆宏，黄　若慧，丹羽仁史，松岡英明，斉藤美佳子，″HNF-1・及び HNF-1・遺伝子の ES 細胞における発現の可視化及びその発現阻害法の検討″，第５２回日本実験動物学会総会，船堀(2005 年 5 月 18，19 日）

(18) 早川 彩，與田照美，小河原明恵，石井聖二，稲垣暢也，松岡英明，斉藤美佳子，″マウス ES 細胞からインスリン産生細胞への分化誘導条件の検討″，第５２回日本実験動物学会総会，船堀(2005 年 5 月 18，19 日）

(19) 金子智恵，白築和大，鈴木嘉崇，丹羽仁史，松岡英明，斉藤美佳子，″EGFP 陽性 ES 細胞及び HeLa 細胞における RNAi 効果の影響″，第５２回日本実験動物学会総会，船堀（2005 年 5 月 18，19 日）

(20) 下田平眞生子、竹広美方子、藤本新平、向　英里、下野　大、奈部浩一郎、小湊理恵子、荒牧陽、西　勇一、船越生吾、山田祐一郎、清野　裕、稲垣暢也：D-hydroxybutrate(HB)慢性暴露によるインスリン分泌の低下には malate/aspartate(M/A)shuttle の抑制が関与する．第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会、2005 年 5 月、神戸

(21) 小湊理恵子、藤本新平、向　英里、竹広美方子、下野　大、奈部浩一郎、下田平眞生子、荒牧陽、西勇一、船越生吾、山田祐一郎、清野　裕、稲垣暢也：ﾀｸﾛﾘﾑｽはｸﾞﾙｺｷﾅｰｾﾞ活性低下によりインスリン分泌を抑制する．第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会、2005 年 5 月、神戸

(22) 奈部浩一郎、藤本新平、向　英里、下野　大、下田平眞生子、小湊理恵子、荒牧陽、西勇一、船越生吾、山田祐一郎、清野　裕、稲垣暢也：膵島における細胞質アルカリ化によるインスリン分泌抑制の機序についての検討．第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会、2005 年 5 月、神戸

(23) 藤原秀哉、細川雅也、藤田義人、西　勇一、下田平眞生子、山田耕太郎、福田一仁、藤本新平、山田祐一郎、清野　裕、稲垣暢也：齲歯類肝糖産生に対するクルクミンの作用の検討（第 3 報）．第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会、2005 年 5 月、神戸

(24) 原田範雄、山田祐一郎、山田千積、月山克史、清野　裕、稲垣暢也：選択的ｽﾌﾟﾗｲｼﾝｸﾞによる GIP 受容体シグナル伝達の抑制．第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会、2005 年 5 月、神戸

(25) 堺　弘道、坂　信広、佐々木　真弓、植田　和光、稲垣暢也：Sperm-specific ABC transporter ABCA17 regulates intracellular lipid metabolism. 第 82 回生理学会大会、2005 年 5 月、仙台

(26) A. Miyake, K. Yamada, T. Miki, S. Seino and N. Inagaki, “Involvement of ATP-sensitive potassium channels in central control of gasping”, 第 82 回生理学会大会、2005 年 5 月、仙台

(27) 井上 貴美子,若尾 宏,越後貫 成美,三木 洋美,清野 研一郎,若尾 りか,古関 明彦,谷口 克,小倉 淳郎：″Natural Killer T (NKT) 細胞をドナーとしたクローンマウスの作製″，第52回日本実験動物学会総会 ，(日本実験動物学会)，東京 ，5月 (2005).

(28) 越後貫 成美,持田 慶司,新免 明恵,大川 美佳,三木 洋美,井上 貴美子,Fray M ．,森脇 和郎,小幡

裕一,小倉 淳郎:″簡易凍結保存した精巣上体と精巣由来の精子・精子細胞を用いたマウス産子の作出″, 第52回日本実験動物学会総会 , 東京 , 5月 (2005).

(29) 斉藤美佳子, 落岩寛明, 佐藤 伴, 澁澤明里, 早川 彩, 與田照美, 松岡英明, ″糖尿病関連遺伝子ノックダウンマウスES細胞の開発とインスリン産生細胞への分化誘導″, 第５３回日本実験動物学会総会, 神戸 (2006年5月13日)

(30) 山田洋平, 下田聡一郎, 尾崎正和, 水上 創, 澁澤明里, 斉藤美佳子, 松岡英明, ″ES細胞への高効率マイクロインジェクションを可能にする要素技術″, 第５３回日本実験動物学会総会, 神戸(2006年5月13日)

(31) 佐々木俊哉, 松岡英明, 斉藤美佳子, ″マウスES細胞から筋線維への分化に及ぼすスペルミンの効果″, 第５３回日本実験動物学会総会, 神戸 (2006年5月13日)

(32) 佐々木俊哉, 松岡英明, 斉藤美佳子, ″マウスES細胞から筋線維への分化におけるスペルミンの効果″, 日本発生生物学会第３９回大会, 広島 (2006年6月1日)

(33) 斉藤美佳子, 落岩寛明, 佐藤 伴, 澁澤明里, 早川 彩, 與田照美, 松岡英明, ″Knockdown of diabetes related genes in mouse ES cells and their differentiation into insulin-producing cells″, 日本発生生物学会第３９回大会, 広島 (2006年6月2日)

(34) 松本真寛, 西澤松彦, 安部隆, Plasma surface modification with surfactant and its applications to microfluidic chip, 第二十三回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2006年10月, 香川

(35) 藤田義人、細川雅也、藤本新平、藤原秀哉、山田耕太郎、西勇一、小川栄一、下田平眞生子、福田一仁、長嶋一昭、山田祐一郎、清野　裕、稲垣暢也: マウス単離肝細胞におけるクルクミンのグリコーゲン分解に及ぼす影響. *第49回日本糖尿病学会年次学術集会* （平成18年5月26日、東京）

(36) 山田耕太郎、細川雅也、藤本新平、藤原秀哉、藤田義人、原田範雄、山田千積、西　勇一、下田平眞生子、福田一仁、上田直哉、松山　太、山田祐一郎、清野　裕、稲垣暢也: コロソリン酸及び肝糖新生抑制作用の検討. *第49回日本糖尿病学会年次学術集会*、2006年5月、東京

(37) 遠藤 圭介,大川 美佳,持田 慶司,三木 洋美,柏崎 直巳,小倉 淳郎: ″単為発生能の評価によるマウス卵子の安定したガラス化保存法の検討″, 第53回日本実験動物学会総会 , 神戸 , 5月 (2006).

(38) 丹羽　仁史:Pou5f1と胎盤の進化、日本発生生物学会第３９回大会、広島国際会議場、2006.5.31~6.3

(39) 佐々木俊哉, 斉藤美佳子, 松岡英明, ″マウスES細胞から筋線維誘導された筋線維の形態解析″, 第５４回日本実験動物学会総会, 船堀 (2007年5月23日)

(40) 早川 彩, 尹 貞順, 松岡英明, 斉藤美佳子, ″*PDX-1* および *IRS-1* ダブルノックダウンES細胞の開発とインスリン産生細胞への分化誘導″, 第５４回日本実験動物学会総会, 船堀(2007年5月23日)

(41) 都築隆宏, 兼田亜沙子, 松岡英明, 斉藤美佳子, ″HNF-1・遺伝子および HNF-1・遺伝子ノックダウン ES 細胞の開発とインスリン産生細胞への分化誘導″, 第５４回日本実験動物学会総会, 船堀 (2007年5月24日)

(42) 與田照美, 笠木夕子, 松岡英明, 斉藤美佳子, ″糖尿病関連遺伝子 Kir6.2 および IRS-2 ダブルノックダウン ES 細胞の開発″, 第５４回日本実験動物学会総会, 船堀 (2007 年 5 月 24 日)

(43) 佐々木俊哉, 松岡英明, 斉藤美佳子, ″マウス ES 細胞から分化誘導した筋線維の DNA アレイ解析 (DNA array analysis in embryonic stem cell-derived muscle cells)″, 日本発生生物学会第４０回大会, 福岡 (2007 年 5 月 30 日)

(44) 斉藤美佳子, 早川 彩, 與田照美, 都築隆宏, 松岡英明, ″糖尿病関連遺伝子ダブルノックダウン ES 細胞の作製とインスリン産生細胞への分化誘導(Double knockdown of diabetes related genes in mouse ES cells and their differentiation into insulin-producing cells)″, 日本発生生物学会第４０回大会, 福岡 (2007 年 5 月 30 日)

(45) 遠藤 圭介,持田 慶司,大川 美佳,三木 洋美,柏崎 直巳,小倉 淳郎: ″単為発生と顕微授精によるマウスおよびウサギガラス化未受精卵の発生能の評価″, 日本実験動物技術者協会 関東支部 平成18年度総会・第32回懇話会 , 東京 , 2月 (2007).

(46) 藤田 麻衣子,持田 慶司,宮崎 史恵,大川 美佳,小木曽 彩,高島 梨香,横山 ちひろ,平岩 典子,吉木 淳,小倉 淳郎: ″マウス体外受精における雄の週齢と受精率の関連性について″, 日本実験動物技術者協会 関東支部 平成18年度総会・第32回懇話会 , 東京 , 2月 (2007).

(47) 宮崎 史恵,持田 慶司,藤田 麻衣子,小木曽 彩,大川 美佳,小貫 克也,高島 梨香,藤本 裕子,平岩 典子,吉木 淳,小倉 淳郎: ″理研BRCにおける自然交配由来胚の利用について″, 日本実験動物技術者協会 関東支部 平成18年度総会・第32回懇話会 , 東京 , 2月 (2007).

(48) 遠藤 圭介,持田 慶司,大川 美佳,三木 洋美,羽鳥 真功,山海 直,柏崎 直巳,小倉 淳郎: ″マウスおよびウサギ未受精卵のガラス化保存法の検討″, 第54回日本実験動物学会総会 , 東京 , 5月 (2007).

(49) 井上 貴美子,越後貫 成美,三木 洋美,野田 慎一,井上 信一,形山 和史,目加田 和之,三好 浩之,小倉 淳郎: ″マウス交雑系 (C57BL6x129/Sv-ter) F1由来組織幹細胞クローンの発生効率の比較″, 第54回日本実験動物学会総会 , 東京 , 5月 (2007).

(50) M. Saito, Y. Nagano, Y. Shimokawa, T. Sasaki, A. Saga I. Kozone and H. Matsuoka, ″Screening of differentiation inducing factors for ES cells from herbal medicine″, Keystone Symposia on From Stem Cells to Therapy, Colorado (March 29- April 3, 2003).

(51) A. Saga, I. Kozone, M. Saito and H. Matsuoka, ″Evaluation of cell viability based on the dielectric property″, The 1st International Congress on Bio-Nanointerface, Tokyo (May 19-24, 2003).

(52) T. Komazaki, Y. Mukai, M. Saito and H. Matsuoka, ″Development of a single-cell manipulation supporting robot″, The 1st International Congress on Bio-Nanointerface, Tokyo (May 19-24, 2003).

(53) M. Saito, ″Supporting technology for the development of genetically modified disease model

cells", Sweden-Japan Biotechnology Workshop, Kyoto (November 9-11, 2003).

(54) M. Saito, T. Komazaki, Y. Mukai, M. Shibusawa, H. Akane, A. Chaki, N. Uetake and H. Matsuoka, "Microinjection into rice protoplasts and mouse ES cells with single-cell manipulation supporting robot", 2004 Joint International Meeting, 206th Meeting of The Electrochemical Society, Honolulu (October 3-8, 2004).

(55) S. Shimoda, M. Saito, I. Kozone and H. Matsuoka, "Automatic insertion of a multifunctional microelectrode aimed at automatic microinjection", 2004 Joint International Meeting, 206th Meeting of The Electrochemical Society, Honolulu (October 3-8, 2004).

(56) R. Hirai, T. Komazaki, Y. Mukai, M. Saito and H. Matsuoka, "Electric gene expression in plant single-cells via Ca^{2+} dependent or independent pathway", 2004 Joint International Meeting, 206th Meeting of The Electrochemical Society, Honolulu (October 3-8, 2004).

(57) H. Miki, K. Inoue, T. Kohda, A. Honda, N. Ogonuk, N. Mise, Y. Matsu, K. Abe, F. Ishino, and A. Ogura, "In vitro development of embryos cloned from primordial germ cells in mice", The First Workshop of the Asian Reproductive Biotechnology , Ho Chi Minh City , Vietnam , Apr. (2004).

(58) K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, S. Noda, J. Kim, F. Aoki, H. Miyoshi and A. Ogura A, "Development of embryos cloned from hematopoietic stem cells", 37th Annual Meeting Society of the Study of Reproduction , (University of British Columbia)), Vancouver , Canada , Aug. (2004).

(59) M. Saito, H. Ochiiwa, B. Sato, M. Shibusawa, A. Hayakawa, T. Yoda and H. Matsuoka, "Knockdown of diabetes related genes in mouse ES cells and their differentiation into insulin-producing cells", 6th Transgenic Technology Meeting, Barcelona (September 11-13, 2005).

(60) M. Saito, H. Ochiiwa, B. Sato, M. Shibusawa, A. Hayakawa, T. Yoda and H. Matsuoka, "Knockdown of diabetes related genes in mouse ES cells and differentiation into insulin-producing cells", International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells, Kyoto (November 15-18, 2005).

(61) N. Ogonuki, K. Inoue, H. Miki, K. Mochida, Y. Hirose, H. Okada, N. Shimozawa, S. Takeiri, H. Nagashima, T. Sankai and A. Ogura, "Differential development of rabbit embryos following microinsemination using sperm and spermatids", 31st Annual Conference of the International Embryo Transfer , Copenhagen , Denmark , Jan. (2005).

(62) H. Matsuoka, S. Shimoda, M. Ozaki, H. Mizukami, Y. Yamada and M. Saito, "High throughput microinjection focused on ES cell engineering", 4^{th} International Society of Stem Cell Research Annual Meeting, Toronto (June 29-July 1, 2006).

(63) M. Saito, H. Ochiiwa, B. Sato, M. Shibusawa, A. Hayakawa, T. Yoda and H. Matsuoka, "Knockdown of diabetes related genes in mouse ES cells and their differentiation into insulin-producing

cells″, 4th International Society of Stem Cell Research Annual Meeting, Toronto (June 29-July 1, 2006).

(64) M. Matsumoto, M. Nishizawa, T. Abe, “PLASMA SURFACE MODIFICATION WITH THE AID OF COLLOIDAL SURFACE MODIFICATION FOR POLYMER MICROCHIP”, The 10th international Conference on Miniaturised Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2006), Nov. 5-9, Tokyo, Japan.

(65) M. Sasaki, N. Ban, H. Sakai, K. Ueda and N. Inagaki, “Cloning of ABCA17, a novel, rodent sperm-specific ABC transporter that regulates intracellular lipid metabolism”, FEBS Special Meeting “ABC2006-ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases”, Mar. 4-10, 2006, Innsbruck, Austria

(66) N. Ban, Y. Matsumura, T. Yokota, T. Matsubayashi and N. Inagaki, “Surfactant treatment of pediatric lung disease associated with ABCA3 mutation”, FEBS Special Meeting “ABC2006-ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases”, Mar. 4-10, 2006, Innsbruck, Austria

(67) Y. Matsumura, N. Ban, K. Ueda and N. Inagaki, “Characterization and classification of ABCA3 mutants in fatal surfactant deficiency”, FEBS Special Meeting “ABC2006-ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases”, Mar. 4-10, 2006, Innsbruck, Austria

(68) S. Sato, A. Ishida, M. Kawamura, W. Nakajima, G. Takada and N. Inagaki, “A new PZT (Piezoelectric Transducer)-based heartbeat and breathing monitor system for newborn”, *Pediatric Academic Societies 2006 Annual meeting*, April 29-May 2, 2006, San Francisco, U.S.A.

(69) N. Harada, Y. Yamada, K. Tsukiyama, C. Yamada, K. Yamada, Y. Seino and N. Inagaki, “A novel splicing variant GIP receptor regulates GIP signaling of β cells in obesity”, The 66th Scientific Sessions of the American Diabetes Association, June 9-13, 2006, Washinton D.C., USA

(70) C. Yamada, Y. Yamada, K. Tsukiyama, N. Harada, K. Yamada, K. Tanaka, N. Inagaki and Y. Seino, “GIP regulates bone remodeling as an endogeneous osteogenic factor”, The 66th Scientific Sessions of the American Diabetes Association, June 9-13, 2006, Washinton D.C., USA

(71) R. Kominato, S. Fujimoto, E. Mukai, Y. Nakamura, M. Hosokawa, Y. Yamada, Y. Seino and N. Inagaki, “Involvement of Src in signal-transducing function of Na^+/K^+ ATPase to decrease ATP production by generating reactive oxygen in pancreatic islets”, The 42nd Annual Meeting of the European Assocciation for the Study of Diabetes (EASD), September 14-17, 2006, Copenhagen, Denmark

(72) E. Ogawa, M. Hosokawa, K. Fukuda, K. Tsukiyama, K. Yamada, Y. Fujita, Y. Yamada, Y. Seino and N. Inagaki, “The effect of GIP on glucose absorption in small intestine”, The 42nd Annual

Meeting of the European Assocciation for the Study of Diabetes (EASD), September 14-17, 2006, Copenhagen, Denmark

(73) Y. Fujita, M. Hosokawa, K. Fukuda, K. Nagashima, S. Fujimoto, Y. Yamada, Y. Seino and N. Inagaki, “Acute exposure to palmitic acid damages autonomic enteric nerve in rat: preventive effects of protein kinase C inhibitor”, The 42nd Annual Meeting of the European Assocciation for the Study of Diabetes (EASD), September 14-17, 2006, Copenhagen, Denmark

(74) M. Saito, A. Hayakawa, T. Yoda, T. Tsuzuki and H. Matsuoka, ″Double knockdown of diabetes related genes in mouse ES cells and their differentiation into insulin-producing cells″, 5th International Society of Stem Cell Research Annual Meeting, Cairns (June 17-20, 2007).

(75) M. Saito and T. Sasaki, ″Application of single-cell technology to intercellular network analysis in multilayer muscle fiber formation″, The 2nd International Workshop on Apprroaches to Single Cell Analysis, Tokyo (September 6-7, 2007).

(76) K. Inoue, N. Ogonuki, H. Mik, S. Noda, S. Inoue, K. Katayama, K. Mekada, H. Miyoshi and A. Ogura, ″Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells″, 33rd Annual Conference of International Embryo Transfer Society , Kyoto , Jan. (2007).

（Ⅳ）特許出願

①国内出願（4 件）

(1) 松岡英明, 斉藤美佳子, 石津敏直, 茶木昭彦, “細胞位置教示方法と単一細胞操作支援ロボットおよび単一細胞操作支援ロボット用ディッシュ”, （出願日：2004.5.17, 特許願：2004-146203, 公開日：2005.11.24, 特許開：2005-326341）

(2) 松岡英明, 斉藤美佳子, 佐々木俊也, “心筋移植片の作製方法及び心筋分化促進剤”, （出願日 2005.2.9, 特許願：2005-033368, 公開日：2006.8.24, 特許開：P2006-218035A）

(3) 山田洋平, 松橋一男, 斉藤美佳子, 松岡英明, “微小物質移送方式及び微小物質移送用ピペット”, （出願日 2005.12.22, 特許願：2005-370718）

(4) 松岡英明, 斉藤美佳子, 山田洋平, “マイクロインジェクション方法及びマイクロインジェクション装置”, （出願日：2007.4.26, 特許願：2007-117216）

②海外出願（3 件）

(1) 松岡英明, 斉藤美佳子, “単一細胞操作支援ロボット(Single-cell Operation Supporting Robot)”, （国際出願日：2002.8.8, 国際出願番号：PCT/JP2002/08139, 国際公開日：2004.2.19, 国際公開番号：WO2004/015055 A1）（米国、ドイツ、日本 国内移行申請 申請日 2005.2.4）
米国（出願日 2002.8.8, 出願番号：US Appl. No. 10/523637 (2005), 公開日：2005.11.17, 公開番号：Public No. 20050254046A）

ドイツ（出願日 2002.8.8，出願番号：DE Appl. No. 2758815.1 (2006)）

日本（特許願：2004-527303）

(2) 山田洋平，斉藤美佳子，松岡英明，“単一細胞操作支援ロボット用細胞培養器具(Cell incubator for single cell operation supporting robot)”，（国際出願日：2005.8.2，国際出願番号：PCT/JP2005/014080，国際公開日：2006.4.20，国際公開番号：WO2006/040870 A1）

日本（出願日：2004.10.12，特許願：2004-298133，特許開：2006-109714）

(3) 山田洋平，斉藤美佳子，松岡英明，“ウェルプレートおよび細胞培養器具(Well plate and device for cell culture)”，（国際出願日：2005.8.2，国際出願番号：PCT/JP2005/014082，国際公開日：2006.4.20，国際公開番号：WO2006/040871 A1）

日本（出願日：2004.10.12，特許願：2004-298134，特許開：2006-109715）

（Ｖ）受賞等

①受賞

2005 年　小倉淳郎：　日本繁殖生物学会学術賞「雄性生殖細胞の胚形成能に関する研究」

②新聞報道

2005 年 1 月 25 日　東京農工大：　日経産業新聞　「遺伝子注入効率 10 倍に」

2005 年 3 月 7 日　東京農工大など：　日経産業新聞「先端技術―細胞を操る　高度化する制御技術　生きたまま観察可能に」

2006 年 3 月 22 日　丹羽仁史：　読売新聞　「幹細胞のいま③　未分化-分化　複雑な仕組みでスイッチ」　2005 年 12 月に発表した Cell 誌掲載論文内容の紹介

2006 年　8 月 15 日　　小倉淳郎：　朝日新聞など２７紙　「１５年冷凍マウスの子誕生」など

2006 年 10 月 26 日　斉藤美佳子：　日経産業新聞　「21 世紀の気鋭　細胞への遺伝子注入技術　装置開発、病の原因追究」

2006 年 10 月 31 日　丹羽仁史：　日経産業新聞　「知の開拓者　万能細胞人脈⑥　ES 細胞、簡単に培養」

2007 年 1 月 30 日　東京農工大など：　日経産業新聞　「遺伝子、細胞に自動注入」

2007 年 4 月 17 日　弘大医学部助教授ら：　東奥日報　「蛍光ブドウ糖で細胞の活動判定」

2007 年 7 月 19-25 日　小倉淳郎：　毎日新聞など 5 紙　「卵巣幹細胞を体外培養」「卵子大量培養に応用」など

③その他

該当なし

7 研究期間中の主な活動（ワークショップ・シンポジウム等）

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H15.3.10	チームミーティング	東京農工大学工学府	11	H14 年度の実施内容と H15 年度の実施計画
H15.1.25-26	The 5th Conference on ABC Proteins and Ion Channels	京都（京大会館）	100	
H16.11.24	Workshop on SMSR	Karolinska Institute	10	SMSR を搬入してセミナーと実習
H16.11.26	日本薬学会第 26 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム	東京大学	100	「トランスポーターの機能制御；疾患との関連を中心に」
H17.6.17-20	第 82 回日本生理学会大会シンポジウム	仙台	100	「脂質とトランスポートと脂質トランスファー」
H17.8.30	チームミーティング	東京農工大学工学府	10	中間報告書に向けた実施内容の報告
H18.4.6	チームミーティング	東京農工大学工学府	10	H17 年度の実施内容と H18 年度の実施計画
H19.3.6	チームミーティング	東京農工大学工学府	10	H18 年度の実施内容と最終年度の実施計画、及び以下のジェネラルレビュー ・稲垣「糖尿病治療法の動向と、関連遺伝子研究の位置づけ」 ・丹羽「インテグレーションおよびサイレンシングの分子機構に関する研究動向」 ・小倉「遺伝子改変個体の作出法、及び作出された個体を利用する研究の動向」 ・松岡「疾患モデル細胞のコンセプトと利用法」

8 研究成果の展開

(1)他の研究事業への展開

本研究の課題は、SMSR 関連技術の開発と糖尿病モデル細胞ライブラリーの構築に大別される。

①SMSR 関連技術に関しては、平成 16 年 5 月、実用試験研究機として上市すると、短期間のうちに国内外の 20 ヶ所以上の研究機関から、使用希望が寄せられた。それぞれ異なる用途に合わせるような装置を複数台、生産する体制にはないため、可能な課題から、農工大に設置された SMSR を使用して、松岡 G との共同研究として要請に応えるようにした。具体的

には以下の内容である。

・理化学研究所　植物科学研究センター　「タバコ培養細胞 BY-2 における細胞内タンパク輸送の分子機構解析」

・農業・生物系特定産業技術研究機構　畜産草地研究所「鶏始原生殖細胞を利用した新規医薬品･食品生産技術に関するアセス調査―高効率マイクロインジェクションを可能にする細胞ナノテクノロジー領域」（社団法人農林水産技術情報協会『融合新領域研究戦略的アセス調査委託事業』として平成 16-17 年度に採択。

・広島県産業科学研究所「カイコ卵へのインジェクションシステム」

②糖尿病モデル細胞ライブラリーの構築に関しては、文部科学省　概算要求　特別教育研究経費【研究推進】に、東京農工大学の代表として申請した「次世代型バイオリソースの開発」が、平成 19-23 年度で採択された。本研究による基盤技術開発の実績を評価されての採択であった。

③文部科学省科学研究費　特定領域研究「ライフサーベイアー」の複数の研究者から研究協力の依頼があり、現在、その中の独立行政法人理化学研究所　中央研究所　伊藤ナノ医工学研究室、京都大学大学院　農学研究科　応用生命科学専攻、北陸先端科学技術大学院大学　マテリアルサイエンス研究科と、それぞれ共同研究を実施中である。

⑵実用化に向けた展開

平成 16 年度に初めて上市した SMSR の機種は、十分、実用試験研究に利用できるものであった。その時点で寄せられた多様な要望に応えるためには、例えば、構成部品の規格の異なるものを用意したり、特殊な操作法を別途考案したりする必要があった。しかし、SMSR の将来的な用途を考えれば、そのような適用技術開発よりも、性能向上に直結する技術開発がはるかに緊急かつ重要と考えられた。そこで、研究開発の勢力を全面的に性能向上へ向けるようにした。その結果、次のような技術的成果を得るに至った。

①ディスポーザブル型の座標基準チップの開発により、迅速細胞認識システム（スグワカルチャー　システム）が独立した汎用技術として完成。

②細胞刺入検出システムが試験研究段階で成功し、自動インジェクションシステム設計の見通しが得られた。

③細胞内への遺伝子導入量の定量性に関しては、徹底的な条件検討により、フェムトグラムレベルの精度（水溶液の体積としてもフェムトリットル）を保証できるようになった。現在、実用化されているインクジェットの吐出精度（ピコリットル）をはるかに凌駕している。敢えて、フェムトインジェクションと呼ぶことを提案する所以である。

④複数の遺伝子を同時にフェムトインジェクションし、その相対的濃度に応じて、遺伝子発現

の強度も相対的強度も相対的な値になる、というレベルに達した。この技術は世界のトップである。

⑤定量的フェムトインジェクション技術を基盤とすれば、新しい遺伝子解析法が提案できる。その一例が複数遺伝子の定量的トランジエントアッセイである。これは、ポストアレイ解析法としての可能性を秘めている。

以上のように、個別の要素技術がそれぞれ汎用技術として発展する可能性があるり、それぞれの用途開発へ向けた技術移転が期待されている。

９ 他チーム、他領域との活動とその効果

⑴領域内の活動とその効果

①「世界で誰も挑戦していない課題に挑戦」は、見方を変えると、誰も関心を持たない無意味な挑戦かも知れない。本研究遂行の過程で、しばしば、そのような思いにとらわれた。しかし、定期的に行われた領域ミーティングでは、アドバイザーの方々から絶えずポジティブな助言を頂いた。これが、研究推進の大きな力となった。

②フェムトインジェクションでは、高濃度の遺伝子を導入する場合、しばしばキャピラリー先端が詰まってしまう。そのため、適当な界面活性剤を添加するか、あるいはベシクルに封入した状態で導入するか、検討する必要があった。その問題を考えるに当たって、領域会議にて報告されたナノメディスンに関する技術情報は有用であった。

③研究の最終年度を迎えるに当たって、平成 19 年 3 月 6 日のチームミーティングで、各グループリーダーに主要テーマに関するレビュー講演を行っていただいた。「疾患モデル細胞」のコンセプトを確認すると共に、各研究課題の位置づけが改めて確認された。

⑵領域横断的活動とその効果

①フェムトインジェクションにおける未踏科学は、細胞に刺入するキャピラリー先端におけるサブミクロン・フルイディクス (Sub-micro fluidix)である。遺伝子は負電荷を持った高分子であるが、それの高濃度溶液をキャピラリー先端から定量的に吐出する際の溶液挙動は、不可解である。この問題を考察する上で、『ナノテクノロジー分野別　バーチャルラボ成果報告会』（2006 年 7 月 15 日）において、極小空間における水溶液の粘性を扱った「共振ずり測定法の開発とナノトライポロジーへの応用」（栗原和江ら、東北大学多元物質科学研究所）は大変参考になった。現在、キャピラリー内液の物性を定量的に評価する実験方法を検討中である。

②スグワカルチャーシステムでは非運動性の細胞が対象となるが、運動性の細胞に対しては適当な支持基盤が無かった。ところが、同上のバーチャルラボ成果報告会において、「自己組織化

ハニカムフィルムの作製と医用応用」（下村政嗣ら、北海道大学電子科学研究所）が提案する基板が、原理的に優れ、またマテリアルとしての品質も均一と判断されたので、これの導入を進めるに至っている。

③JST 独創的シーズ展開事業独創モデル化 平成 18 年度採択課題である「レーザー吸収剤の熱膨張圧を利用したオルガネラ用キャピラリーインジェクターの実用化研究」に着目し、フェムトインジェクション技術への導入を検討している。

10 研究成果の今後の貢献について

(1)科学技術の進歩が期待される成果

①ポストゲノム科学では各遺伝子の機能解析がメインテーマ。最も直接的な解析法は、当該の遺伝子を生きた細胞に直接導入して発現させ、その細胞応答を解析することであろう。ハイスループットフェムトインジェクションは、それを可能にするはずである。それによって、「網羅的インジェクション解析法」が DNA アレイ解析法と相補してゲノム科学を発展させると期待される。

②糖尿病関連遺伝子８種類をノックダウンあるいはノックアウトした一連の遺伝子改変 ES 細胞を創製した。また、糖尿病に密接に関連する脂質代謝に関して、その異状の原因遺伝子を発見した。これらの細胞や遺伝子を活用して、色々な病態の糖尿病を発現できれば、逆遺伝学的解析による糖尿病研究の発展の契機になるかもしれない。そして、それによって「疾患モデル細胞」の意義が明確になると思われる。

③ES 細胞において、転写因子の相互作用が分化運命を決定する機構を解明したことにより、転写因子による分化制御機構の一般的原理の解明に寄与出来たと考えている。

④体細胞クローン技術は、極めて不完全な技術であるが、これまで主に家畜で実施されていたために、その遺伝的背景の効果等の体系的な解析が実施されていなかった。本研究では、遺伝的に均質なマウスを用いることにより、クローン効率への遺伝的背景の支配を明らかにした。また多くの体細胞種を用いた実験を実施することにより、予想外に、NKT リンパ球など終末分化した細胞もクローンに適していることを明らかにした。これらの情報の集積は、安定したクローン技術に利用されると期待される。

(2)社会・経済の発展が期待される成果

①「疾患モデル動物」がなかなか得がたい状況を鑑みて、それに代わる「疾患モデル細胞」を高効率に作製することを提唱した。それが直ちに疾患モデル動物の高効率作製となるわけではないが、疾患の治療法や創薬の研究に際しては、逆遺伝学に基づく「疾患モデル細胞ライブ

ラリー」が極めて有用であることが理解されよう。それが、関連産業分野に及ぼす効果は極めて大きい。それによって治療法や創薬研究が発展すれば、直ちに社会の健康と経済の発展につながる。

②フェムトインジェクション技術の発展によって、逆遺伝学に基づく遺伝子発現の網羅的解析も夢ではなくなるかも知れない。それが、DNA アレイ解析と相補しあう可能性があるので、関連分析機器産業は、新たなブームを迎えることになるであろう。

③ES 細胞において、厳密に外来遺伝子ならびに内在性遺伝子の発現を調節するための重要な知見を提供することにより、今後の技術開発に貢献するものと考えている。

④本研究で成果を挙げたレンチウイルスベクターを用いた受精卵への遺伝子導入による RNAi トランスジェニックマウスの作出は、これまでの通常の注入法によるトランスジェニックマウス法よりもはるかに効率が高い。今後、安定した発現促進の方法が見つかれば、ノックダウンマウス作出法として最もすぐれた方法になり、医学生物学分野に大きく貢献すると期待される。

11 結び

本研究は糖尿病、ES 細胞、個体作製の各々に関する第一人者を研究分担者として研究組織を構成した。各々の課題で大きな困難が予想されたので、仮に期待した結果とならなかった時でも、やり方がまずかったからではなく、本質的な問題として議論できるように、との思いがあったからである。そして、実際、遺伝子改変個体の作製は予想をはるかに超えて難しかった。遺伝子改変個体が出来ない限り、疾患モデルにならないと考えれば、研究が成功したとはいい難い。しかし、個体ができないことも、また、できること以上に重要な情報である、と考えれば、研究は大きな成果を挙げたと結論できる。その結果、「疾患モデル細胞」のコンセプトを、研究当初のときに比べ、はるかに現実的な内容として提示できるに至った。遺伝子改変 ES 細胞を作ったことによって、それを材料として、遺伝子改変個体の作製を、繰り返し試みられることが重要で、その結果、個体が出来なかったとしても、それだけで意味が無いと結論する必要はなく、その素性のわかった細胞から個体が出来なかった原因を究明することによって、むしろ疾患の本質に迫れるかもしれない、という認識である。

プロジェクトの運営に際しては、話題性の高い「再生医療」に密接な内容だけに、国際的な競合状況に常に注意を払うようにした。そして、自らが直面した課題は世界的な競合状態の中にあっても、なお、最先端の課題であるということを確信しつつプロジェクトを推進した。糖尿病関連遺伝子の 8 種類について、ノックダウン ES 細胞ライブラリーを揃えているのは、世界で本研究グループのみである。この細胞ライブラリーから、あらゆる方法で個体作りに挑戦してきたが、その結果得られた個体も含めたバイオリソースを駆使すれば、糖尿病に関する様々の研究の可能性が広がる。

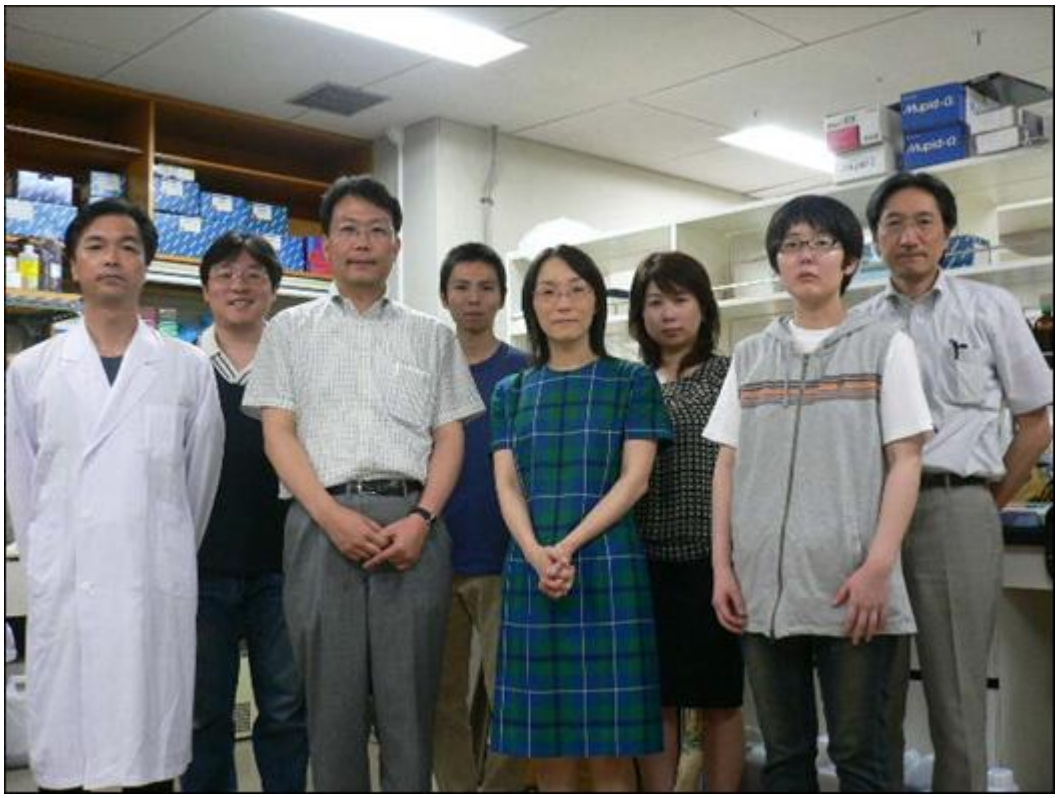
それが、単なる「遺伝改変細胞･個体」ではなく、「疾患モデル」たる所以である。しかも、遺伝子発現動態を解析する新技術によって、「素性の良く分かったバイオリソース」として提供できるところが重要である。

ここでいう、遺伝子発現解析の新技術は、言うまでも無く、高効率フェムトインジェクション技術が基になっている。こう考えてくると、本研究は生命の根源からロボット工学にまで及ぶ広範な科学技術分野を含みながらも、「疾患モデル細胞」という共通のコンセプトによってチームとしての求心力を保ってこられたのかもしれない。しかも、科学的にも技術的にも、また社会経済的にも発展性のある内容となっている。これらを総合して、十分満足のいく達成度であると自己評価している。

最後に、このような機会とご支援を与えていただいた、相澤益男研究総括はじめ、アドバイザーの先生方、そして科学技術振興機構に対しまして、深甚なる謝意を表します。

12 研究グループの写真

松岡英明グループ



稲垣暢也グループ

小倉淳郎グループ

丹羽仁史グループ