

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700562

研究課題名(和文) 完全なES/iPS細胞に由来する歯形成細胞誘導に関する研究

研究課題名(英文) Induction of tooth constitution cell derived from ES/iPS cells

研究代表者

赤坂 恵理 (Akasaka, Eri)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：20597562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：奇形腫から由来する細胞群から歯構成細胞を特異的に非侵襲的に検出するため、エナメル芽細胞特異的な遺伝子の下流に蛍光遺伝子と薬剤耐性遺伝子を繋げた構築体(pT-ARIP)をpiggyBacトランスポゾンによる遺伝子導入システムを用いて導入した。残念ながら、pT-ARIP導入iPS細胞からはそれ由来の奇形腫を得ることができなかった。そこで、遺伝子導入前のiPS細胞から得られた奇形腫を初代培養し、得られた培養細胞に対しRT-PCR解析と免疫組織学的解析を行ったところ、DSPPやAMELXの存在を確認した。以上より、in vitroでiPS細胞から歯形成に係わる細胞群を分化誘導できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In order to specifically and noninvasively detect a tooth constitution cell among teratoma cells, a construct (pT-ARIP), which connected the fluorescent gene and the drug resistance gene that were present downstream from the specific gene in the ameloblast, was introduced via a gene introduction system using the piggyBac transposon. A teratoma was not formed via the introduction of pT-ARIP into iPS cells. Hence, RT-PCR and immunohistological analyses of the primary cell culture of the teratoma derived from iPS cells was conducted before transgenesis. We confirmed the existence of DSPP and AMELX. As mentioned above, a possibility that the differentiation induction of the cell group concerning tooth formation could be carried out from an iPS cell in vitro was shown.

研究分野：医用生体工学

科研費の分科・細目：生体材料学

キーワード：ES細胞 iPS細胞 歯形成細胞 in vitro組織再構成

### 1. 研究開始当初の背景

近年の再生医療技術の進歩は目覚ましく、歯科領域でも智歯や乳歯に由来する幹細胞の性質を有する細胞群が単離され、これら体性幹細胞を用いた歯の再生が精力的に展開されている。マウス胎子の表皮細胞と間葉系細胞との共培養と、その集合体の *in vivo* 移植からほぼ完全な歯が形成されている。しかし歯幹細胞は歯組織内では数が少なく、その単離と *in vitro* での増殖およびその形質を維持したままの培養は難しいとされ、臨床応用まではまだ課題が山積している。

一方、2006年に開発された iPS 細胞作製技術は、自家移植が可能で、かつ *in vitro* でも増殖性が高く、その形質を維持したままの培養も確立しており、歯の体性幹細胞に代わる有力な再生用素材としても期待できる。しかしながら、iPS 細胞からの *in vitro* で効率的に歯形成細胞の分化誘導法の確立や、最終的な 3 次元構造を示す歯の形成については、まだ国内外とも萌芽的な段階である。加えて、分化誘導後の癌の再燃の可能性も大きな問題である。

このような状況下、東北大学大学院歯学研究科の福元敏教授らは、iPS 細胞由来の ameloblast を *in vitro* で誘導した。彼らは、ameloblastin を発現するラット歯胚由来 ameloblast とマウス iPS 細胞とを共培養し、iPS 細胞由来の分化細胞が ameloblast 特異的な ameloblastin mRNA の発現を確認している。この結果は、iPS 細胞は単独での分化誘導では歯形成は進行しにくい、歯形成細胞との共培養では、歯形成へ分化の方向が誘導されることを示唆し、このことは歯の発生が複雑な細胞間の相互作用で進行するという概念に合致する。

### 2. 研究の目的

申請者はブタ細胞の iPS 化に関する研究に従事してきたが、その過程で既に樹立されたマウス ES 細胞をヌードマウスの精巢内に移植する機会を得た。精巢に移植された ES 細胞は、予想通り様々な分化細胞・組織から成る奇形腫を形成した。奇形腫の中に様々な組織が混在するという事は、特定の分化組織は、発生学的に個々の初期の器官(組織)原基から発達することを示唆する。また、奇形腫の中には当然様々な段階の細胞が存在するため、歯形成に係わる前駆細胞もわずかではあるが含まれると考えられる。このことは、*in vitro* で ES 細胞からの歯への分化誘導条件を考慮しなくても、ES 細胞をヌードマウスに移植し、奇形腫を作製すれば、奇形腫から当該細胞由来の歯組織を得ることが可能であることを意味する。また、発生生物学の分野では既に常識として定着している器官/組織の解離、再集合、組織再構築の現象が、下等生物から哺乳類まで共通の原理として存在することから、この原理を iPS/ES 細胞か

らの歯形成細胞への分化誘導に適用しようと考えた。

本研究の目的は、1) ES 細胞の *in vivo* 移植、奇形腫からの *in vitro* 組織再構成を通じて、最終的に多種類の歯形成細胞の細胞分化を誘導すること、2) *in vitro* で再構成された集合体をヌードマウスに移植した時、歯髄・象牙芽細胞・デンチン・エナメル・エナメル芽細胞から成る 3 次元構造を示す歯形成を行うこと、3) 親株の ES 細胞の特性である奇形腫形成(癌の再燃)が生じないことを確認すること、4) 同様の操作がヒト iPS 細胞にも適用できるかを検討する。期間内には、1) - 3) 項の達成に全力を挙げ、さらに可能であれば、既に樹立されたヒト iPS 細胞に試料を変更し、同様の方法を用い歯の形成を行うことである。

### 3. 研究の方法

歯形成細胞特異的に蛍光タンパク遺伝子を発現するプラスミドを作製し、これらをマウス ES 細胞株に遺伝子導入し、組換え ES 細胞を作製する。この細胞に歯形成誘導のための処理を施し、細胞集合体をヌードマウス精巢内に移植し、奇形腫を作製する。奇形腫を初代培養系に移し、*in vitro* で ES 細胞由来の歯組織を含む組織再構成体を得る。歯組織再構成体をヌードマウス上顎骨と精巢内に移植し、3次元構造を持つ歯が形成されるかどうか、癌の再燃があるかどうかを検討する。詳細は以下の通りである。

1) ameloblast と odontoblast 特異的蛍光遺伝子の発現プラスミドの作製

ameloblast と odontoblast の歯形成細胞に特異的に蛍光タンパクを発現するプラスミドを構築する。pARP プラスミドは AM promoter + HcRed1 cDNA (赤蛍光タンパクをコード) + poly(A)付加部位 + puromycin 耐性遺伝子発現ユニット (Puro) を持つ。pDCH プラスミドは Dspp promoter + cyan cDNA (青蛍光タンパクをコード) + poly(A) 付加部位 + Hygromycin B 耐性遺伝子発現ユニット (Hyg) を持つ。

2) マウス ES 細胞へのプラスミドの遺伝子導入と組換え ES 細胞の単離

pOEIN と新規作成 2 種のプラスミドをマウス ES 細胞 E14 株に nucleofection システム (Lonza) を用いて遺伝子導入し、G418/Hygromycin B/puromycin の 3 重選別により、最終的に pARP, pDCH, pOEIN の 3 種を内蔵する組換え ES 細胞を得る。

3) 組換え ES 細胞の *in vivo* 移植による奇形腫形成とその解析

研究計画 2) で得られた組換え ES 細胞を、ヌードマウス精巢内(皮下よりも精巢内のほうが効率的に奇形腫が出来ることが経験的に判っているため)へ移植し、奇形腫を作製

する。細胞群を移植する場合、その分散を防ぐため、細胞をコラーゲンスポンジゲル支持体にくみ移植する。

移植 1-1.5 ヶ月後に 10-15 mm に成長した奇形腫を摘出する。奇形腫内には未分化細胞と分化細胞とが混在していることから、奇形腫のスライスを作製し、UV 下で観察した場合、ameloblast を示す赤蛍光細胞群、odontoblast を示す青蛍光細胞群、ES 細胞あるいは生殖系細胞を示す緑蛍光細胞群を検出できると考えられる。一方、歯特異的タンパクおよび mRNA の検出のための抗体を用いた免疫組織学的解析/RT-PCR 解析、歯特異的遺伝子の mRNA 発現を検出するための in situ hybridization 解析、H-E 染色による通常の組織学的解析などを行い、奇形腫内の歯組織の分化状態を調べる。

#### 4) 固形腫瘍の細片化と in vitro 組織再構成

研究計画 3) で歯形成が確認された奇形腫を、ハサミでバラバラにほぐし、更に細胞分散剤で処理する。塊を 1-3 mm 程の大きさにし、コニカルチューブ内で 1 週間巡回培養する。この過程で、軟骨、腸、歯組織といった特定の組織が 3-5 mm の円形の集合体として発達する。歯組織を含む再構成体は、蛍光実体顕微鏡下で蛍光タンパク発現を指標にマイクロピペットで拾い上げることができる。選別された再構成体は、研究計画 3) と同様に解析し、歯組織形成の程度を観察する。

#### 5) 組織再構成体の in vivo 移植による機能解析

組織再構成体が、3 次元構造を示す成熟した歯へと分化誘導するために、ヌードマウスの臼歯の抜歯後に生じた移植窩に再構成体を移植する。これにより、成熟した歯が形成されるかを確認する。一方、当該集合体をヌードマウス精巣内に移植し、奇形腫が形成されるか(癌の再燃)も同時に検討する。

#### 4. 研究成果

マウス ES 細胞株を扱う前に、当研究室ではヒト乳歯歯髄細胞から iPS 細胞を樹立することができたため、上記実験の最終目標であった iPS 細胞を用いて実験を進めることにした。

まず初めに、ameloblast と odontoblast の歯形成細胞に特異的に蛍光タンパクを発現する 2 種のプラスミドを構築した。前者の場合、amelogenin (AM) 遺伝子プロモーターを、後者の場合、dentin sialophosphoprotein (Dspp) プロモーターを用いた。

次に nucleofection システム (Lonza) を用いた遺伝子導入法で、iPS 細胞に上記プラスミドの遺伝子導入を試みた。しかしながら、導入効率が極端に低いせいか、2 種の薬剤による選別後、薬剤耐性コロニーは得られな

かった。そこで、哺乳類細胞での遺伝子導入の効率が非常に高いとされるトランスポゾン的一种 PiggyBac (PB) の系を適用することとした。PB transposase が認識し、特異的に結合する PB acceptor の間に上記プラスミド内の発現ユニットを挿入した、いわゆる PB ベクターを作成した。この 2 つの PB ベクターと PB transposase 発現ベクターとを iPS 細胞に co-transfection させた。その結果、幾つかの薬剤耐性コロニーを得た。なお、PB による iPS 細胞への効率的遺伝子導入については論文作成中である。

残念ながら、pT-ARIP 導入 iPS 細胞からはそれ由来の奇形腫を得ることができなかった。おそらく遺伝子導入過程で細胞の分化ポテンシャルが低下していた可能性がある。そこで、遺伝子導入前の iPS 細胞から得られた奇形腫を初代培養し、得られた培養細胞に対し RT-PCR 解析と免疫組織学的解析を行ったところ、DSPP や AMELX の存在を確認した。以上より、in vitro で iPS 細胞から歯形成に係わる細胞群を分化誘導できる可能性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 35 件中、一部抜粋)

1. Watanabe S, Haraguchi S, Nakamura S, Sakurai T, Mugikura S, Kajiura K, Minoiri K, Sato M: Novel cancer vaccination system based on human endo- $\beta$ -N-Acetyl glucosaminidase gene delivery. Journal of Glycobiology, 2014, 3:1  
DOI:http://dx.doi.org/10.4172/2168-958X

.1000106 (査読有)

2. Miura H, Inoko H, Inoue I, Okada Y, Tanaka M, Sato M, Ohtsuka M: piggyBac-mediated generation of stable transfectants with surface HLA expression from a small number of cells. Analytical Biochemistry 437, 29-31, 2013  
DOI:10.1016/j.ab.2013.02.003. (査読有)

DOI:10.1016/j.ab.2013.02.003. (査読有)

3. Sato M, Maeda S, Inada E, Saitoh I, Kubota N: Mosaic expression of pluripotency-related proteins oct-3/4 and alkaline phosphatase in human pancreatic carcinoma cell PANC-1. Advanced Studies in Biology 5, 157-172, 2013

http://www.doaj.org/doaj?func=issueTOC&isId=150538&uiLanguage=en (査読有)

4. Sato M, Kubota N, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: HeLa cells consist of two cell types,

as evidenced by cytochemical staining for alkaline phosphatase activity: A possible model for cancer stem cell study. *Advances in Stem Cells* Article ID 208514, 15 pages, 2013 DOI:10.5171/2013.208514 ( 査読有 )

5. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: Targeted toxin-based selectable drug-free enrichment of mammalian cells with high transgene expression. *Biology* 2, 341-355, 2013 DOI:10.3390/biology2010341 ( 査読有 )

6. Nakamura S, Maehara T, Watanabe S, Ishihara M, Sato M: Improvement of hydrodynamics-based gene transfer of nonviral DNA targeted to murine hepatocytes. *BioMed Research International* Article ID 928790, 9 pages, 2013 DOI:10.1155/2013/928790 ( 査読有 )

7. Ohtsuka M, Miura H, Hayashi H, Nakaoka H, Kimura M, Sato M, Gurumurthy CB, Inoko H: Improvement of pronuclear injection-based targeted transgenesis (PITT) by iCre mRNA-mediated site-specific recombination. *Transgenic Research* 22, 873-875, 2013 DOI:10.1007/s11248-013-9703-x ( 査読有 )

8. Sato M, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: Site-targeted non-viral gene delivery by direct DNA injection into the pancreatic parenchyma and subsequent *in vivo* electroporation in mice. *Biotechnology Journal* 8, 1355-1361, 2013 DOI:10.1002/biot.201300169 ( 査読有 )

9. Murakami T, Saitoh I, Inada E, Kurosawa M, Iwase Y, Noguchi H, Terao Y, Yamasaki Y, Hayasaki H, Sato M: STO feeder cells are useful for propagation of primarily cultured human deciduous dental pulp cells *in vitro* of elimination of contaminated bacteria and promotion of cellular outgrowth. *Cell Medicine* 6, 75-81, 2013 DOI:http://dx.doi.org/10.3727/215517913X674234 ( 査読有 )

10. Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y: Microbial and enzyme technology: an efficient and convenient method for MiniPrep analysis of recombinant plasmids. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 7, 105-107, 2013 DOI:10.4236/jbise.2014.73013

11. Nakamura S, Maehara T, Ishihara M, Sato M: Liver lobe- and strain-difference in gene expression after hydrodynamics-based gene delivery in mice. *Animal Biotechnology* (in press) ( 査読有 )

12. Sato M, Miyoshi K, Nagao Y, Nishi Y, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: The combinational use of CRISPR/Cas9-based gene editing and targeted toxin technology enables efficient biallelic knockout of the  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase gene in porcine embryonic fibroblasts. *Xenotransplantation* Article first published online: 21 FEB 2014 DOI:10.1111/xen.12089 ( 査読有 )

13. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Watanabe S: Development of a technique for efficient gene transfer to antral follicular cells in the mouse ovary. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58, 136-141, 2012 DOI: 10.3109/19396368.2012.656796. ( 査読有 )

14. Ohtsuka M, Miura H, Nakaoka H, Kimura M, Sato M, Inoko H: Targeted transgenesis through pronuclear injection of improved vectors into *in vitro* fertilized eggs. *Transgenic Research*, 21, 225-226, 2012 DOI:10.1007/s11248-011-9505-y. ( 査読有 )

15. Chi H, Sato M, Yoshida M, Miyoshi K: Expression analysis of a  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase, an enzyme that creates xenotransplantation-related  $\alpha$ -Gal epitope, in pig preimplantation embryos. *Animal Science Journal*, 83, 88-93, 2012 DOI:10.1111/j.1740-0929.2011.00964.x ( 査読有 )

16. Chi H., Shinohara M., Yokomine T., Sato M, Takao S., Yoshida M., Miyoshi K: Successful suppression of endogenous  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase expression by RNA interference in pig embryos generated *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, 58, 69-76, 2012 DOI:http://dx.doi.org/10.1262/jrd.10-165M ( 査読有 )

17. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Watanabe S: *In vivo* gene transfer in mouse preimplantation embryos after intraoviductal injection of plasmid DNA and subsequent *in vivo* electroporation.

Systems Biology in Reproductive Medicine, Posted online on, 58, 275-287, 2012

DOI:10.3109/19396368.2012.688088. ( 査読有 )

18. Sato M, Ohtsuka M, Miura H, Miyoshi K, Watanabe S: Determination of the optimal concentration of several selective drugs useful for generating multi-transgenic porcine embryonic fibroblasts. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 759-765, 2012

DOI:10.1111/j.1439-0531.2011.01964.x ( 査読有 )

19. Abe K, Araki K, Tanigawa M, Semba K, Ando T, Sato M, Sakai D, Hiyama A, Mochida J, Yamamura K-I: A Cre knock-in mouse line on the Sickletail locus induces recombination in the notochord and intervertebral disks. *Genesis*, Article first published online, 50, 758-765, 2012

DOI:10.1002/dvg.22035 ( 査読有 )

20. Ohnami N, Nakamura A, Miyado M, Sato M, Kawano N, Yoshida K, Harada Y, Takezawa Y, Kanai S, Ono C, Takahashi Y, Kimura K, Shida T, Miyado K, Umezawa A: CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biology Open*, Advance Online Publication, 1, 640-647, 2012

DOI:10.1242/bio.20121420 ( 査読有 )

21. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: A simplified protocol for the semi-large scale recovery of plasmids from *Escherichia coli* grown on agar plates. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 5, 406-408, 2012.

DOI:org/10.4236/jbise.2012.57051. ( 査読有 )

22. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Watanabe S: Development of a technique for efficient gene transfer to antral follicular cells in the mouse ovary. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58, 136-141, 2012

DOI:10.3109/19396368.2012.656796. ( 査読有 )

23. Saitoh I, Sato M, Iwase Y, Akasaka E, Yamasaki Y, Noguchi H: Generation of a set of mouse STO feeder cell lines that confer resistance to several types of selective drugs. *Cell Medicine*, 3, 97-102, 2012.

DOI:http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639414 ( 査読有 )

24. Ohtsuka M, Miura H, Sato M, Kimura M, Inoko H, Gurumurthy CB: PITT : Pronuclear injection-based targeted transgenesis, a reliable transgene expression method in mice, *Experimental animals* 61, 489-502, 2012 DOI: 10.1538/expanim.61.489 ( 査読有 )

25. Ohtsuka M, Miura H, Gurumurthy CB, Kimura M, Inoko H, Yoshimura S, Sato M: Fluorescent transgenic mice suitable for multi-color aggregation chimera studies. *Cell and Tissue Research*, 350, 251-260, 2012 DOI: 10.1007/s00441-012-1470-0. ( 査読有 )

26. Nakamura N, Ishihara M, Takikawa M, Kishimoto S, Isoda S, Fujita M, Sato M, Maehara T: Attenuation of limb loss in an experimentally induced hindlimb ischemic model by FGF-2/ F/P MPs as a delivery system. *Tissue Engineering Part A*, 18, 2239-2247, 2012

DOI:10.1089/ten.TEA.2011.0741. ( 査読有 )

27. Nakamura S, Takikawa M, Ishihara M, Nakayama T, Kishimoto S, Isoda S, Ozeki Y, Sato M, Maehara T: Delivery system for autologous growth factors fabricated with low-molecular-weight heparin and protamine to attenuate ischemic hindlimb loss. *Journal of Artificial Organs*, 15, 375-385, 2012

DOI:10.1007/s10047-012-0658-0. ( 査読有 )

28. Akasaka E, Ozawa A, Mori H, Mizobe Y, Yoshida M, Miyoshi K, Sato M: Whole-genome amplification-based GenomiPhi for multiple genomic analysis of individual early porcine embryos. *Theriogenology*, 75, 1543-1549, 2011

DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.12.018. ( 査読有 )

8. ( 査読有 )

[学会発表](計25件中、一部抜粋)

1. Murakami T, Saitoh I, Iwase Y, Inada E, Mastuyama J, Ohshima H, Hayasaki H, Sato M, Multipotency of juvenile human buccal epithelial cells. AADR, 2014年3月(North Carolina).

2. 渡部 聡、梶原景正、麥倉真一郎、桜井敬之、中村伸吾、木村穰、佐藤正宏 : gcr2 タンパクは糖鎖を介して I 型 BMP 受容体と結合しシグナル伝達制御に関与する、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月(神戸)

3. 佐藤正宏、三好和睦、長尾洋三、西洋平、大塚正人、中村伸吾、桜井敬之、渡部聡 : RISPR/Cas9 による遺伝子編集と標的毒素法

との組み合わせは、 $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase 遺伝子を完全に KO したブタ胎仔性線維芽細胞の効率的な作製に有効である、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 (神戸)

4. 中村伸吾、前原正明、渡部聡、石原雅之、佐藤正宏：ハイドロダイナミクスに基づく生体内遺伝子導入における外来遺伝子発現のマウス系統差および肝臓ローブ間の差、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 (神戸)

5. Tada N, Kanai F, Nakamura E, Lu H, Saito M, Sato M: Syngenic grafting of a whole male juvenile gonadal tissue into the adult testes confers successful spermatogenesis in mice. The 3rd World Congress of the International Society for Fertility Preservation, Malia Valencia Hotel, Valencia, Spain, 7-9 November, 2013

6. 郡山美優、稲田絵美、齋藤一誠、三浦浩美、大塚正人、中村伸吾、桜井敬之、渡部聡、三好和睦、佐藤正宏、トランスポゾン PiggyBac システムによる複数遺伝子のブタ細胞への同時導入、第 106 回日本繁殖生物学会、2013 年 9 月 (東京)。

7. 村上智哉、齋藤一誠、稲田絵美、岩瀬陽子、長谷川大子、窪田直子、松本祐子、大島邦子、岡 暁子、山崎要一、早崎治明、ヒト乳歯歯髓由来 iPS 細胞樹立におけるフィーダー細胞選択の重要性、第 51 回日本小児歯科学会、2013 年 5 月 (岐阜)。

8. 大塚正人、三浦浩美、佐藤正宏、木村穰：受精卵への iCre mRNA 注入によるターゲットトランスジェニック法 (PITT 法) の効率改善、第 60 回日本実験動物学会総会 2013 年 5 月 (茨城)

9. Sato M, Akasaka E, Saito I, Ohtsuka M, Watanabe S, Attempts to produce transgenic mice by a novel in vivo method, as an alternative to the pre-existing pronuclear microinjection-based transgenesis., 11th Transgenic Technology Meeting, Feb. 25 to 27, 2013 (Guangzhou City, P.R. China), 2013 年 2 月 (中国)。

10. 佐藤正宏、赤坂恵理、齋藤一誠、大塚正人、渡部聡：マウス成熟卵胞細胞への生体内遺伝子導入法の開発、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 (福岡)

11. 中村伸吾、前原正明、渡部聡、石原雅之、佐藤正宏：マウス肝臓を標的とした plasmid DNA の効率的な遺伝子導入法の開発、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 (福岡)

12. 渡部聡、原口清輝、中村伸吾、桜井敬之、梶原景正、麦倉信一郎、佐藤正宏：ヒト Endo-N-acetylglucosaminidase 遺伝子を用いた新たな Cancer vaccination 法の開発、2012 年 12 月 (福岡)

13. 三浦浩美、佐藤正宏、大塚正人、PITT 法を利用して作製したノックダウンマウスにおけるノックダウン効果の比較解析、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 (福岡)

14. Sato M, Akasaka E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: ENDOGALC/TARGETED TOXIN-BASED SELECTION SYSTEM AS A USEFUL TOOL FOR ENRICHMENT OF TRANSGENE-HIGH-EXPRESSING MAMMALIAN CELLS. "9th Asian Reproductive Biotechnology Society (ARBS) conference" Oct. 23 to 28, 2012 (Edsa Shangri-La Hotel, Mandaluyong City, Manila, Phillipine )

15. 佐藤正宏、赤坂恵理、齋藤一誠、大塚正人、渡部聡、プラスミド DNA の卵管内注入、続く電気穿孔法によるマウス着床前胚への遺伝子導入法の開発、第 59 回日本実験動物学会総会、2012 年 5 月 (大分)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

赤坂 恵理 (AKASAKA, Eri)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：20597562

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

佐藤 正宏 (SATO, Masahiro)  
鹿児島大学・医用ミニブタ先端開発研究センター・教授  
研究者番号：30287099

齋藤 一誠 (Saitoh, Issei)  
新潟大学・医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号：90404540