

組換えフィブロネクチンフラグメントの遺伝子治療への応用 ——造血幹細胞への遺伝子導入——

加藤郁之進

造血幹細胞は VLA-4 と VLA-5 の 2 種類のインテグリンを発現しており、それぞれが組換えフィブロネクチン (rFN) の CS1 部位と細胞結合ドメインに特異的な相互作用を示す。一方、レトロウイルスベクターは rFN のヘパリン結合ドメインと反応する。したがって、この 3 種類の結合リガンドを同時にもち rFN (CH-296) は、造血幹細胞のような標的細胞とレトロウイルスベクターに対して、近接した相互作用を可能にする“反応の場”を提供する。その結果、従来不可能であった高い遺伝子導入効率を得られるようになった。

Key words 【遺伝子治療】【造血幹細胞】【遺伝子導入】
【組換えフィブロネクチン】

はじめに 遺伝子治療は、細胞のもつ“遺伝子情報の誤り”に起因する遺伝子病やがんなどの難病を、“正しい遺伝子情報”の付加によってその細胞の機能を修正したり、細胞が本来もっていなかった新しい“保護遺伝子”を付加したりして病気の治療または予防をしようとする新しい治療法である。

がん治療でいえば、前者は *p53* のような必須の遺伝子の誤りを“正しい遺伝子”の付加で治療する場合であり¹⁾、後者は、がん治療によって用いられる抗がん剤の副作用から正常血液細胞を保護するために、その抗がん剤を分解除去して無害にする能力をもった“保護遺伝子”を導入する場合である²⁾。また、ウイルスの細胞内増殖を抑制する能力のある抗体遺伝子を導入して、エイズのような感染症を防ごうという試みも後者に属する³⁾。

病気の種類によって、前述のようにいろいろな遺伝子治療の戦略が考えられているが、現実にはまだまだ未解決の技術的問題が山積みされており、多くの研究

を必要としている。技術的問題の中心は、依然として標的細胞に応じた特異的な遺伝子導入法の開発と遺伝子導入の効率化という基本的な問題である。

筆者らのグループは、たまたま最も困難とされていた造血幹細胞への遺伝子導入効率が、細胞外マトリックスの代表であるフィブロネクチンのフラグメントを利用することによって著しく増大することを、インディアナ大学医学部との共同研究で見いだした⁴⁾。以下、この方法の解説とその周辺の問題点などについて述べてみたい。

I. 遺伝子導入の技術的問題点

遺伝子導入方法は、ウイルスをベクターとして使う“ウイルスベクター法”と、リボソームを利用する“リポフェクション法”の 2 つに大別される。

多種類の標的細胞に高効率で遺伝子導入を行なえる“アデノウイルスベクター法 (AV 法)”は導入効率とい

Ikunoshin Kato, 宝造造(株)バイオ研究所 (〒520-21 滋賀県大津市瀬田 3-4-1) [Biotechnology Research Laboratories, Takara Shuzo Co., Ltd., Seta, Otsu, Shiga 520-21, Japan]

Recombinant Fibronectin Fragments in Stem-cell Gene Therapy

う観点からはたいへん優れている。しかし、目的遺伝子を細胞のゲノムに組み込む能力がないため、標的細胞に遺伝子導入しても、細胞の増殖分裂につれて導入遺伝子が薄められ、その治療効果は一過性である。一方、“レトロウイルスベクター法 (RV 法)” は、増殖中の細胞にしか遺伝子導入できず、しかも遺伝子導入効率は非常に低い。しかし標的細胞のゲノムに目的遺伝子を組み込むことができるため、導入された遺伝子は標的細胞

群に恒久的に保持され、持続的な治療効果が期待できる。とくに、リンパ球を対象にしたアデノシンデアミナーゼ欠損症 (ADA 欠損症) の遺伝子治療の場合、たえずリンパ球をつくり出している造血幹細胞に正しい ADA 遺伝子を RV 法で遺伝子導入する方法が理想的な戦略となる。

“リポフェクション法” はウイルスを使わないので安全だという観点から、多くの研究が積み重ねられているが、この方法も目的遺伝子をゲノムに組み込むことはできない。しかも遺伝子導入効率も非常に低い。しかし、筋肉細胞にこの方法で抗原蛋白質の遺伝子を導入すると、筋肉細胞が長寿であるため、その間に微量の目的抗原が発現される。これを利用した“DNA ワクチン”の研究開発が行なわれている⁵⁾。

以上の諸点を考慮すると、正しい遺伝子を持続的に保持発現させることによって治療しようという観点からは、RV 法による治療が最も望ましいという結論に到達する。また、RV 法は米国における多数の臨床試験でもその安全性がほぼ確立されており、残る問題は RV 法の遺伝子導入効率をいかにして上げるかという点に絞られてくる。

II. 標的細胞としての造血幹細胞

遺伝子治療の実際の治療手順には、目的遺伝子を生体に直接注入する“体内法 (*in vivo* 法)”と生体外へいったん取り出した標的細胞を体外で培養して目的遺

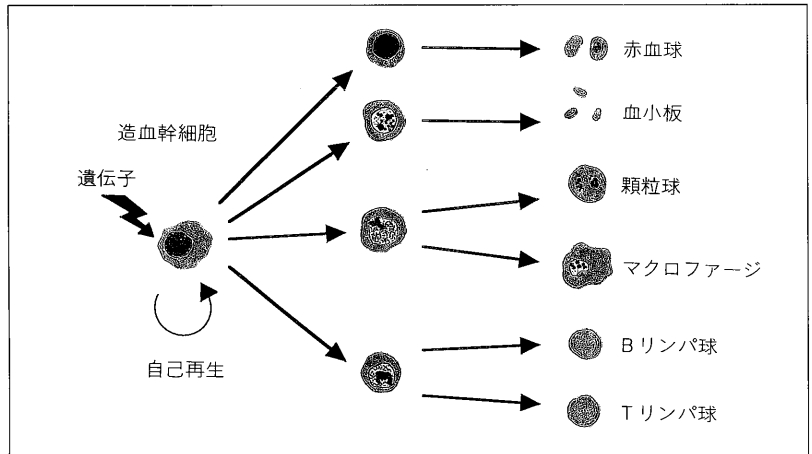


図 1 血球の分化

伝子を導入し、導入が確認された細胞のみを培養増殖させたのちに生体内に戻す“体外法 (*ex vivo* 法)”の 2 つの方法がある。

体内法を用いる場合、現在開発されているウイルスベクターには、標的器官または組織を特異的に狙う能力がないので、がんの発生部位に局所的に投与する以外には方法がない。一方、体外法では当然のことながら標的以外の細胞には遺伝子導入が起こらず、また標的細胞の環境を自由に変えることができるため、遺伝子導入効率の上昇を狙っているいろいろな操作が可能である。

以上の諸点を考慮すると、現在のところ遺伝子治療を最も応用しやすい領域は、血液細胞由来の遺伝子病を RV と体外法を組み合わせで行なう治療法といえる。事実、世界最初の遺伝子治療例は白血球の ADA 欠損症の治療であり、標的細胞として選ばれたのはリンパ球であった⁶⁾。しかしリンパ球の寿命は約 2 カ月と短いため、“正しい ADA 遺伝子”が発現されても、遺伝子導入操作を何度もくり返さなければならなかった。

すべての血液細胞は、多能性をもった造血幹細胞から分化誘導される。しかも、造血幹細胞それ自身も自己再生を一生くり返す。もしも、このような能力をもった造血幹細胞に RV で目的遺伝子を組み込んだ場合、赤血球、マクロファージ、T 細胞など、ヒトの血液の遺伝子病にかかわるほとんどすべての細胞に一生にわたって治療遺伝子を保持させることができ、最も理想的な治療法になるはずである (図 1)。

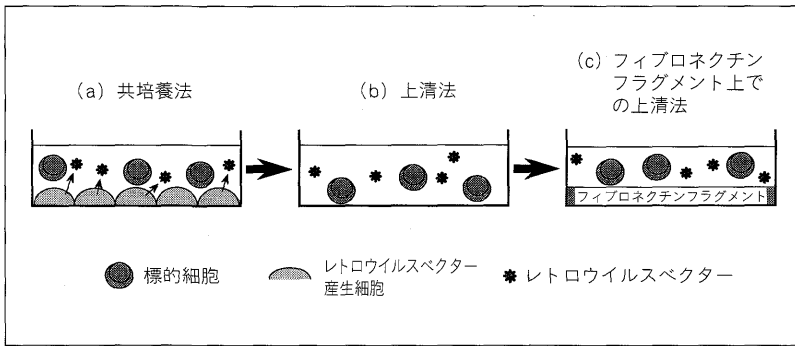


図 2 レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法

III. 遺伝子導入効率をどのようにして上げるか

造血幹細胞のような標的細胞とウイルスベクター産生細胞と一緒に“共培養”してやると、50%レベルの高効率で遺伝子導入が起こることはすでに知られていた(図2a)⁷⁾。ベクター産生細胞だけでなく、骨髄のストローマ細胞(間隙細胞)と共培養しても導入効率は増大する。しかし、この方法を用いて実際に遺伝子治療を行なうことは不可能である。なぜなら、遺伝子導入された標的細胞とウイルス産生細胞の完全な分離が非常に困難だからである。実際、米国食品医薬品局(FDA)も、この類のプロトコールを認可していない。

結局、ウイルスベクター産生細胞から生産されたベクターを含む上清と標的細胞を培養して遺伝子導入す

る方法を用いなければならない。これを上清法とよんでいる(図2b)。この方法では、治療上の危険性はなくなるが、どんなにウイルスのタイターを上げて、遺伝子導入効率はせいぜい数%という低い効率しか望めないのが現状であった⁸⁻¹⁰⁾。

細胞と“共培養”してやると標的細胞への遺伝子導入効率が上がるという現象は、その

細胞表面が標的細胞とウイルスとの反応の“場”を提供している可能性を示唆している。また造血幹細胞の骨髄における“微小環境”を調べてみると、ストローマ細胞上に細胞外マトリックスの1つ、フィブロネクチン(FN)分子が発現しており、造血幹細胞と相互作用していることがすでに知られていた¹¹⁻¹⁴⁾。

反応の“場”を提供するという観点から、いろいろなFN断片を培養皿にコートしたうえで、遺伝子導入実験が試みられた。その結果、FNのキモトリプシン分解断片をコートした場合、かなりの導入率の上昇が認められた(図2c)¹⁵⁾。

一方、筆者らのグループは、数年前からヒトFNのいろいろな組換えフラグメントを開発し、がん細胞の転移抑制実験を行なっていた¹⁶⁻²¹⁾。これらのFN組換えフラグメント(図3)は、偶然にもインディアナ大学

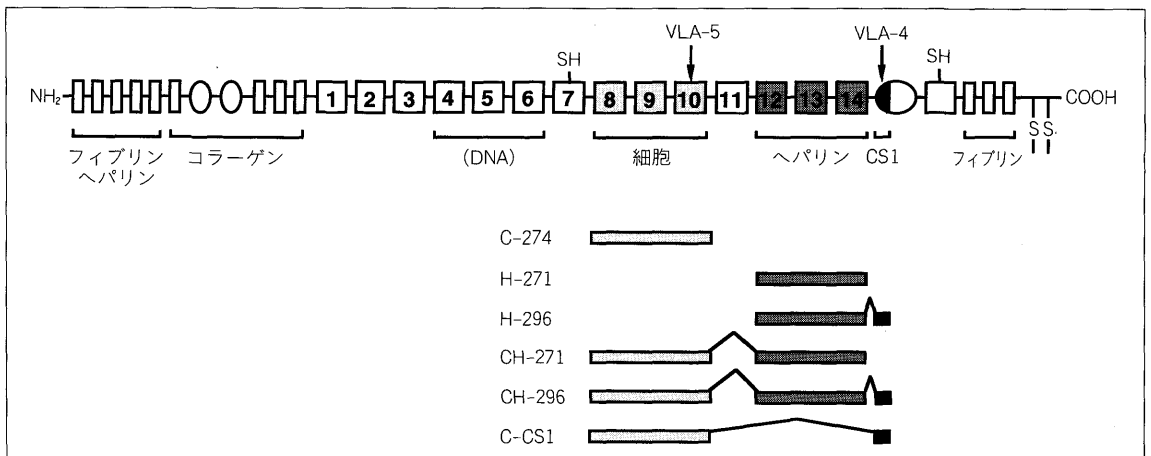


図 3 フィブロネクチンA鎖のドメイン構造と組換えフィブロネクチンフラグメント

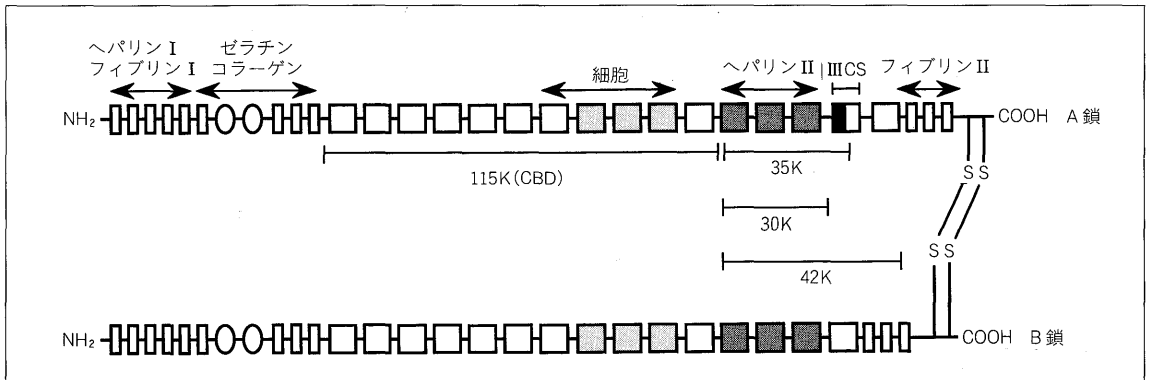


図 4 フィブロネクチン分子

グループの見いだした遺伝子導入効率増強効果をもつ FN のキモトリプシン分解物 (30 K, 35 K, 42 K) と一部オーバーラップしていることが明らかとなった(図 4)。臨床実験に使うヒト由来 FN は血液汚染防止の立場から、血液由来の FN よりも組換えフラグメントのほうが望ましいことはいうまでもない。こうして筆者らのグループとインディアナ大学グループとの共同研究が開始された。この結果、以下に述べるようなまっ

たく予期しなかった重要な発見につながっていった。

IV. 組換えヒト FN フラグメント

インディアナ大学グループの見いだした FN キモトリプシンフラグメント(図 4)は、ヘパリン結合ドメイン(ヘパリン II)と III 型接着セグメント(III CS)を含んでいる。筆者らのグループの組換え FN フラグメントは 6 種類あり、細胞結合ドメイン(Cell), ヘパリン結合ドメイン(ヘパリン II), III CS の一部 CS1 ドメインの 3 種類のドメインの組合せからつくられている(図 3)。

マウスの造血幹細胞を含む c-Kit 陽性の細胞群を IL-6 と SCF (stem cell factor) で活性化したのち、NEO

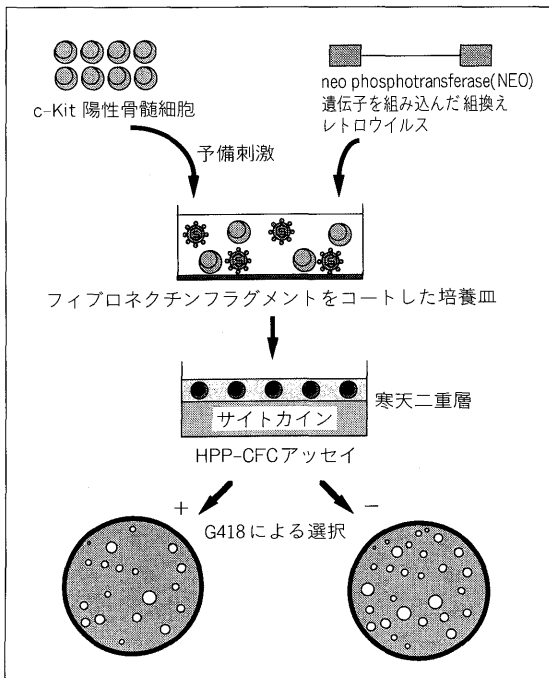
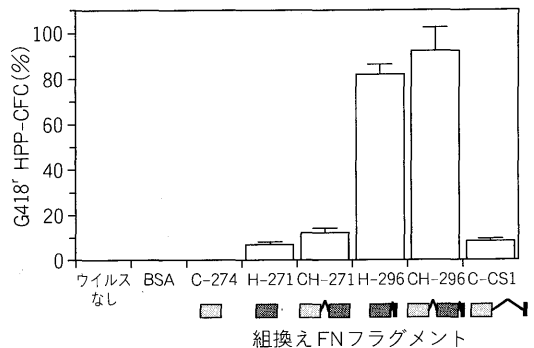


図 5 高増殖能コロニー形成細胞への遺伝子導入



c-Kit 陽性細胞 (8×10^3), レトロウイルス (2×10^6 CFU/ml)

図 6 フィブロネクチンフラグメントを用いた c-Kit 陽性骨髓細胞への遺伝子導入

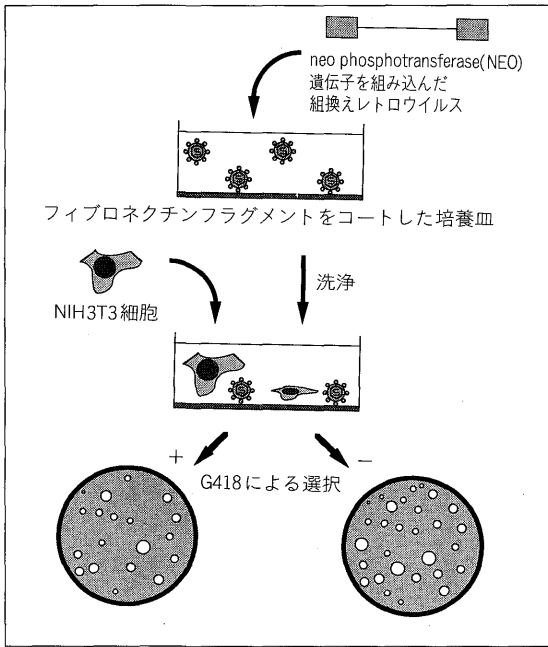


図 7 NIH 3T3 細胞への遺伝子導入

(neo phosphotransferase) 遺伝子をもったレトロウイルスベクターと前記の FN フラグメントをコートした培養皿で培養したのちに、寒天二重層でサイトカインとともに HPP-CFC (high proliferative potential colony forming cells) アッセイを行なった。NEO 遺伝子が導入された細胞は G418 抗生物質に耐性になるため、耐性になった細胞コロニー数を比較することによって NEO 遺伝子の導入効率を算定することができる(図 5)⁴⁾。この結果を示したのが図 6 である。

マウスの c-Kit 陽性細胞に 100% 近い遺伝子導入を起こしたのは、細胞結合ドメイン(Cドメイン)とヘパリン結合ドメイン(Hドメイン)と CS1 ドメインの3種のドメインが直列でつながった CH-296 分子であった。続いて、Hドメインと CS1 ドメインがつながった H-296 ドメインであった。Cドメイン、Hドメインがそれぞれ単独ではほとんど遺伝子導入は認められず、Cドメインが Hドメインとつながった CH-271 や Cドメインと CS1 ドメインがつながった C-CS1 フラグメントなどでも有意義な遺伝子導入は起こらなかった。

この結果は、マウスの造血幹細胞への効果的な遺伝子導入には、Hドメインと CS1 ドメインが必要であることを示唆している。この FN フラグメントの作用機

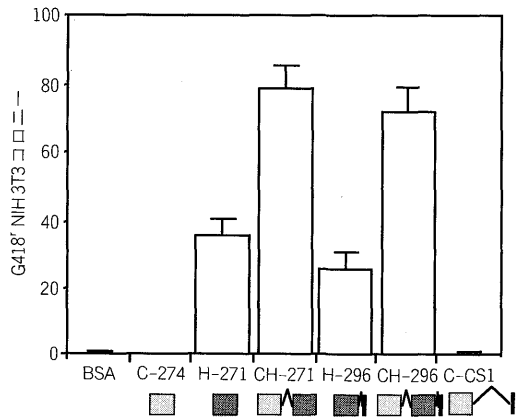


図 8 フィブロネクチンフラグメントとレトロウイルスの結合

作を明らかにするために、NIH 3T3 を標的細胞にして同様の実験を行なった。実験のプロトコールは図 7 のとおりで、重要な点は FN フラグメントをコートした培養皿にウイルスベクターを加えたのちよく洗浄して結合していないベクターを除去している点である。したがって、コートされた FN フラグメントにウイルスベクターが接着しない場合は、続けて標的細胞を添加して培養しても遺伝子導入が起こらないことに留意されたい。この実験結果を図 8 に示す。

NIH 3T3 細胞を標的にした場合、すぐ気づくのは Hドメインを含まない FN フラグメントではほとんど遺伝子導入は起こっていないことである。しかも Hドメインを含んでいて、さらに Cドメインも含んだ FN フラグメントのほうが遺伝子導入効率が格段に高い。用いた実験プロトコールをもとに考察すると、Hドメインがないとウイルスベクターが FN フラグメントに結合しないことを示唆している。そこで、導入効率が最も高かった CH-271 の Hドメインをヘパリンと反応させてブロックしたのち、遺伝子導入効率を調べた。予想どおり、ヘパリンの濃度が上がるにつれて遺伝子導入効率が低下し、ウイルスベクターは Hドメインに結合していることを強く示している。

V. 細胞レセプターと FN リガンドとの相互作用

FN フラグメントの Cドメインは、細胞表面に発現されている VLA-5 (very late antigen-5) レセプター

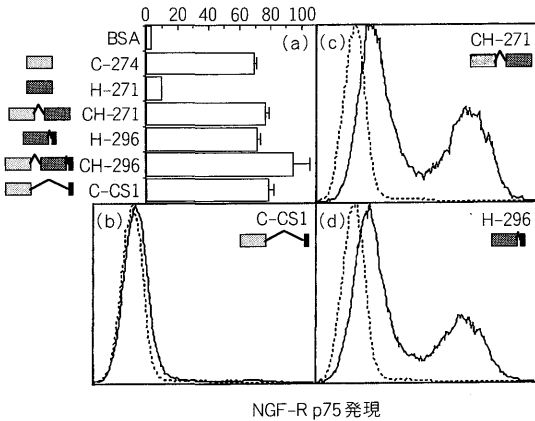


図 9 HEL 細胞への遺伝子導入

(b)~(d) の実線は各フラグメントを入れたときの結果、点線は対照を示す。

に対するリガンドであるモチーフ RGDS をもっている²²⁾。一方、CS1 ドメインは細胞の VLA-4 レセプターに対するリガンドであるモチーフ EILDVPST をもっている²³⁾。FN フラグメントを用いた遺伝子導入実験 (図 8) を、細胞レセプター VLA-5, VLA-4 と FN フラグメントの対応するそれぞれのリガンドとの相互作用という観点からみると、以下に述べるようなメカニズムで説明できる。まず両実験で、H ドメインが存在しない場合には肝心のレトロウイルスベクターが結合できないので、遺伝子導入が起こらない。NIH 3T3 細胞はレセプター VLA-5 を発現しているので、CH-271 と CH-296 がコートされていると著しい遺伝子導入効率の上昇が認められる (図 8)。造血幹細胞を含む c-Kit 陽性細胞は、VLA-5 と VLA-4 の両方を発現しているので、両レセプターに対するリガンドをもった CH-296 がコートされているときに最も効率よく遺伝子導入が起こる。

このメカニズムをさらに確かめるために、VLA-5 と VLA-4 の両レセプターを発現している HEL 細胞への NGF レセプター (NGF-R) p75 の遺伝子導入実験を行なった (図 9)。図 9a は、HEL 細胞と各 FN フラグメントとの接着

反応を示している。両レセプターに対するリガンドをそれぞれもっている C ドメインと CS1 ドメインは、それぞれ単独か複合かを問わず、HEL 細胞と接着している。当然、両リガンドをもたない、BSA と H-271 は接着しない。ところが、FACS を用いて導入遺伝子の発現を調べてみると (図 9b~d)、H ドメインをもたない C-CS1 以外、どちらか一方のリガンドしかもたないにもかかわらず、CH-271 と H-296 のそれぞれが NGF-R p75 の有意な発現を示している。

以上の結果をまとめると、図 10 に示したようなメカニズムで、高効率な遺伝子導入が説明できる。FN のヘパリン結合ドメインに結合したレトロウイルスベクターをはさんで VLA-5 と VLA-4 のリガンドとが、標的細胞をはさみ込んだ状態をつくり出すことによって高効率な遺伝子導入を起していると考えられる。筆者らは、これをウイルスベクターと標的細胞が FN フラグメント分子上で“共配置”するという意味で、“co-localization” (“共配置”) 仮説とよんでいる⁴⁾。

この仮説にも最も適した FN フラグメント CH-296 は、あらゆる標的細胞に対して最も高い遺伝子導入効率を示している。このフラグメントをコートしてヒトの骨髄由来 CD34 陽性細胞とヒトの臍帯血由来の CD34 陽性細胞にそれぞれ遺伝子導入を行なった結果を図 11 に示した。両者とも 70%前後の導入効率を示しており⁴⁾、驚異的な遺伝子導入効率といえる。

ここで、CH-296 という FN フラグメントの代わりになぜネイティブな FN を使わないのかという疑問がわいてくるはずである。すでに述べたように FN の細胞結合ドメイン内に存在する RGD というモチーフは広く分布している $\alpha_5\beta_1$ インテグリンなどによって認識され

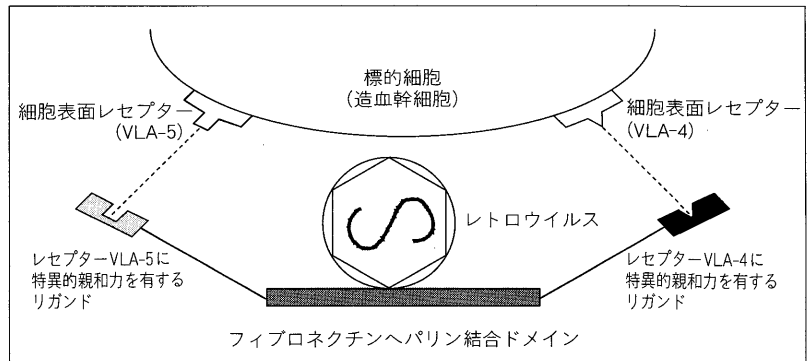


図 10 フィブロネクチンによる遺伝子導入促進のメカニズム (仮説)

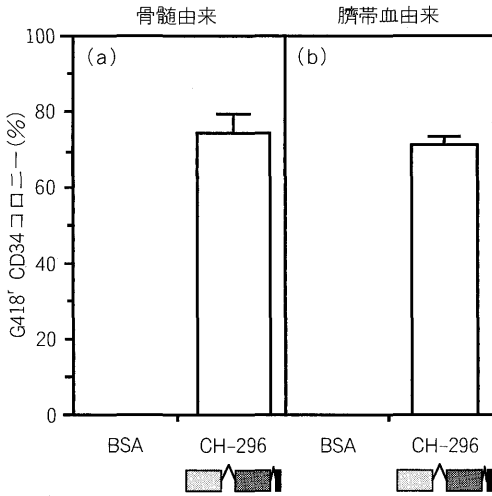


図 11 CD34 陽性細胞への遺伝子導入

る²²⁾。しかし、この RGD モチーフは FN のとるコンフォメーションによっては表に露出されることが多い。もうひとつ FN 分子に存在する重要な接着領域は、ヘパリン II (本稿での H ドメイン) の C 末端側の約 120 アミノ酸配列の部分に含まれる、いわゆる III CS セグメント (III 型接続セグメント) である²⁴⁾。このセグメントは、mRNA がスプライスアウトされる際に生成するもので、FN の A 鎖 (図 4) にしか存在しない。この III CS セグメントに、インテグリン $\alpha_4\beta_1$ と接着する CS1 アミノ酸配列が存在している (図 3)。CS1 部位は、 $\alpha_4\beta_1$ インテグリンを発現している B 細胞、T 細胞などのリンパ球なども接着する^{25,26)}。しかしながら、 $\alpha_4\beta_1$ インテグリンを発現している細胞は実際には可溶性のプラズマ FN とほとんど反応しない²⁷⁾。さらに、可溶性の FN は CS1 を含むペプチド断片と反応する B 細胞や T 細胞の接着を阻害できない²⁸⁾。これらの事実は CS1 領域がネイティブ FN のコンフォメーションによって支配されていることを示唆している。

Ugarova らはいいないな実験を行ない、ネイティブ FN の CS1 部位 (III CS 領域のアミノ酸残基 1~25) は非常に疎水性

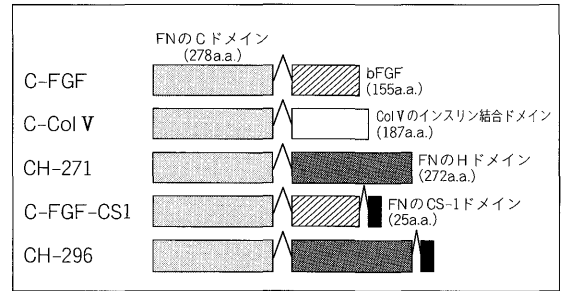


図 12 FGF, Col V (インスリン結合ドメイン) との組換えフラグメント

が強く、水和表面にほとんど露出していないことを証明した²⁹⁾。プラスチックなどの表面にネイティブ FN をコートしたときでもほんのわずかに露出されるとどまっていた。ところが、カテプシン D や B のプロテアーゼでネイティブ FN を分解すると、CS1 部位はほぼ完全に露出された。以上のように、最も細胞との接着に大切な III CS 領域は、ネイティブ FN では細胞接着には役立っていないことが明らかになった。筆者らのグループの結果でも、ネイティブ FN をコートした場合、対照の BSA (ウシ血清アルブミン) と同程度の遺伝子導入効率で、組換え CH-296 の 1/5 以下であった。

VI. ウイルスペクター結合ドメインの多様性

前述のように、レトロウイルススペクターは組換え FN の H ドメインに結合する。この相互作用のメカニズムを理解するために、H ドメインの代わりに FGF^{30,31)} や V 型コラーゲンのインスリン結合ドメイン³²⁾ の組換え

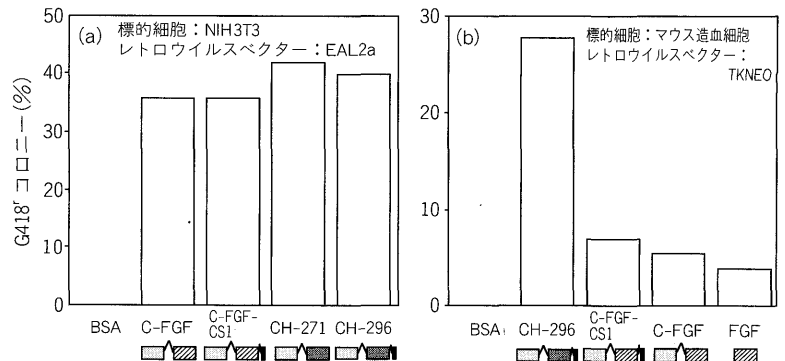


図 13 組換えフラグメントを用いた遺伝子導入

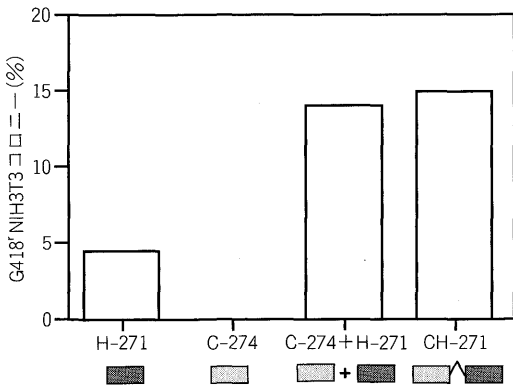


図 14 細胞結合ドメインとヘパリン結合ドメインを用いた遺伝子導入

フラグメント (図 12) を用いて遺伝子導入実験を行なった。

NIH 3T3 細胞を標的細胞に選んだ場合、H ドメインと FGF ドメインの導入効率に大きな差はない (図 13 a)。一方、マウスの造血幹細胞を標的とした場合 CH-296 と C-FGF-CS1 に大きな差が認められ、マウスの幹細胞は FN の H ドメインとも何らかの相互作用をしている可能性を示唆している (図 13 b)。V 型コラーゲンのインスリン結合ドメインを用いた場合もほぼ同様の結果が得られている。いずれにしても、NIH 3T3 細胞の結果は、レトロウイルスベクターは FGF や V 型コラーゲン ColIV のインスリン結合ドメインと結合することを示しており、今後いろいろなキメラ型のフラグメントの開発が可能である。

VII. 遺伝子導入を増強するポリペプチドの多様性

以上の実験から、標的細胞表面のレセプターと反応する 1 つまたは複数のリガンドと、ウイルスベクターと反応するリガンドによる“標的細胞とベクターの共配置効果”によって、遺伝子導入効率を上げられることが明らかとなった。

次の疑問は、これらのリガ

ンドが CH-296 や CH-271 のように互いに共有結合で連結されていないのかどうかという点である。つまり、各々のリガンドを含むペプチドフラグメントをカクテルのように混合したのちにコートしても遺伝子導入効率を上げられるかどうかを確かめるために次のような実験を行なった。

実験を簡単にするために、VLA-5 だけを発現している NIH 3T3 細胞を標的に選んだ。図 14 に示したように、VLA-5 に対するリガンドを含む C-274 フラグメントとウイルスに結合する H-271 フラグメントの混合物を培養皿にコートした場合と、両フラグメントが直列に共有結合した CH-271 をコートした場合を比較すると、両者ともほとんど同様のレベルの遺伝子導入効率を得られた。つまり、両リガンド間の共有結合は不要という結論に達する。筆者らは、この方法を“カクテル導入法”とよんでいる³³⁾。

カクテル導入法の意味するところはたいへん大きいと考えられる。ウイルスベクターと結合するフラグメントをベースにして、標的細胞表面の特異的な受容体と特異的に反応する抗体や糖鎖などをカクテルにすることによって、あらゆる種類の標的細胞に対する遺伝子導入効率を上げられる可能性を示している。以上の概念をまとめたのが図 15 である。

おわりに 組換え FN、とくに 3 つのドメインを含む

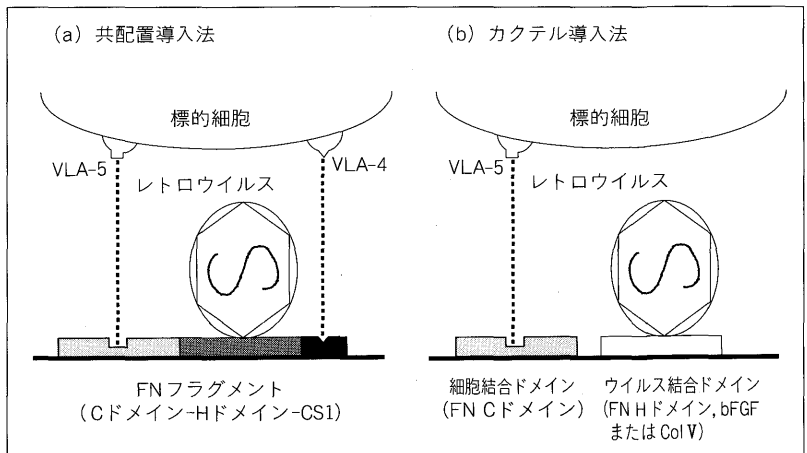


図 15 フィブロネクチンフラグメントによる遺伝子導入法

CH-296 を用いたレトロウイルスベクターによる遺伝子治療プロトコルの有用性が認められ、米国インディアナ大学病院の3グループに対して米国食品医薬品局は、FN を用いたがん患者に対する遺伝子治療の臨床試験を許可した。宝酒造がこれらのグループに対してGMP対応のCH-296フラグメントを供給している。

筆者らのグループが数年前から“がんの転移抑制研究”のために開発してきた組換えFNが実際の遺伝子治療に応用されることになったのは、望外の喜びであり、これらの臨床試験が成功することを祈っている。現在、宝酒造には世界中の遺伝子治療研究グループ(約100グループ)からCH-296フラグメント供与の要請が来ており、今後の発展が大いに期待できる。

本稿に述べた研究は、宝酒造(株)バイオ研究所の遺伝子治療グループの浅田起代蔵博士をはじめとする、延べ25人の諸氏の努力のたまものである。

文 献

- Roth, J. A., Nguyen, D., Lawrence, D. D., Kemp, B. L., Carraseo, C. H., Ferson, D. Z., Hong, W. K., Komaki, R., Lee, J. J., Nesbitt, J. C., Pisters, K. M. W., Putnam, J. B., Schea, R., Shin, D. M., Walsh, G. L., Dolormente, M. M., Han, C.-I., Martin, F. D., Yen, N., Xu, K., Stephens, L. C., McDonnell, T. J., Mukhopadhyay, T., Cai, D. : *Nature Med.*, **2**, 985-991 (1996)
- Pastan, I., Gottesman, M. M., Ueda, K., Lovelace, E., Rotherford, A. V., Willingham, M. C. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4486-4490 (1988)
- Maciejewski, J. P., Weichold, F. F., Young, N. S., Cara, A., Zella, D., Reitz, M. S. Jr., Gallo, R. C. : *Nature Med.*, **1**, 667-673 (1995)
- Hanenber, H., Xiao, X. L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I., Williams, D. A. : *Nature Med.*, **2**, 876-882 (1996)
- Hsu, C.-H., Chua, K.-Y., Tao, M.-H., Lai, Y.-L., Wu, H.-D., Huang, S.-K., Hsieh, K.-H. : *Nature Med.*, **2**, 540-544 (1996)
- Anderson, W. F. : *Science*, **256**, 808-813 (1992)
- Bordignon, C., Notarangelo, L. D., Nobili, N., Ferrari, G., Casorati, G., Panina, P., Mazzolari, E., Maggioni, D., Rossi, C., Servida, P., Ugazio, A. G., Mavilio, F. : *Science*, **270**, 470-475 (1995)
- Brenner, M. K., Rill, D. R., Holladay, M. S., Heslop, H. E., Moen, R. C., Buschle, M., Krance, R. A., Santana, V. M., Anderson, W. F., Ihle, J. N. : *Lancet*, **342**, 1134-1137 (1993)
- Dunbar, C. E., Cottler-Fox, M., O'Shaughnessy, J., Doren, S., Carter, C., Berenson, R., Brown, S., Moen, R. C., Greenblatt, J., Stewart, F. M., Leitman, S. F., Wilson, W. H., Cowan, K., Young, N. S. : *Blood*, **85**, 3048-3057 (1995)
- Kohn, D. B., Weinberg, K. I., Nolta, J. A., Heiss, L. N., Lenarsky, C., Crooks, G. M., Hanley, M. E., Annett, G., Brooks, J. S., El-Khourey, A., Lawrence, K., Wells, S., Moen, R. C., Bastian, J., Williams-Herman, D. E., Elder, M., Wara, D., Bowen, T., Hershfield, M. S., Mullen, C. A., Blaese, R. M., Parkman, R. : *Nature Med.*, **1**, 1017-1023 (1995)
- Yonder, M. C., Williams, D. A. : *Exp. Hematol.*, **23**, 961-967 (1995)
- Williams, D. A., Rios, M., Stephens, C., Patel, V. P. : *Nature*, **352**, 438-441 (1991)
- Verfaillie, C. M., McCarthy, J. B., McGlave, P. B. : *J. Exp. Med.*, **174**, 693-703 (1991)
- Verfaillie, C. M., Benis, A., Iida, J., McGlave, P. B., McCarthy, J. B. : *Blood*, **84**, 1802-1811 (1994)
- Moritz, T., Patel, V. P., Williams, D. A. : *J. Clin. Invest.*, **93**, 1451-1457 (1994)
- Yoneda, J., Saiki, I., Igarashi, Y., Kobayashi, H., Fujii, H., Ishizaki, Y., Kimizuka, F., Kato, I., Azuma, I. : *Exp. Cell Res.*, **217**, 169-179 (1995)
- Saiki, I., Yoneda, J., Kobayashi, H., Igarashi, Y., Komazawa, H., Ishizaki, Y., Kato, I., Azuma, I. : *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 326-335 (1993)
- Matsumoto, Y., Saiki, I., Makabe, T., Yoneda, J., Murata, J., Kimizuka, F., Ishizaki, Y., Kato, I., Azuma, I. : *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1130-1138 (1991)
- Saiki, I., Makabe, T., Yoneda, J., Murata, J., Ishizaki, Y., Kimizuka, F., Kato, I., Azuma, I. : *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1112-1119 (1991)
- Kimizuka, F., Taguchi, Y., Ohdate, Y., Kawase, Y., Shimojo, T., Hashino, K., Kato, I., Sekiguchi, K., Titani, K. : *J. Biochem.*, **110**, 284-291 (1991)
- Saiki, I., Matsumoto, Y., Murata, J., Makabe, T., Yoneda, J., Okuyama, H., Kimizuka, F., Ishizaki, Y., Kato, I., Azuma, I. : *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1120-1129 (1991)
- Ruoslahti, E. : *J. Clin. Invest.*, **87**, 1-5 (1991)
- Komoriya, A., Green, L. J., Mervic, M., Yamada, S. S., Yamada, K. M., Humphries, M. J. : *J. Biol. Chem.*, **266**, 15075-15079 (1991)
- Kimizuka, F., Ohdate, Y., Kawase, Y., Shimojo, T., Taguchi, Y., Hashino, K., Goto, S., Hashi, H., Kato, I., Sekiguchi, K., Titani, K. : *J. Biol. Chem.*, **266**, 3045-3051 (1991)
- Gismondi, A., Morrone, S., Humphries, M. J.,

- Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A. : *J. Immunol.*, **146**, 384-392 (1991)
- 26) Wayner, E. A., Garcia-Pardo, A., Humphries, M. J., McDonald, J. A., Carter, W. G. : *J. Cell Biol.*, **109**, 1321-1330 (1989)
- 27) Molnar, J., Hoekstra, S., Ku, C. S.-L., Alten, P. : *J. Cell Physiol.*, **131**, 374-383 (1987)
- 28) Ferreira, O. C. Jr., Garcia-Pardo, A., Bianco, C. : *J. Exp. Med.*, **171**, 351-356 (1990)
- 29) Ugarova, T. P., Ljubimov, A. V., Deng, L., Plow, E. F. : *Biochemistry*, **35**, 10913-10921 (1996)
- 30) Dilber, M. S., Bjökstrand, B., Li, K. J., Smith, E., Xanthopoulos, K. G., Gahrton, G. : *Exp. Hematol.*, **22**, 1129-1133 (1994)
- 31) Faham, S., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Linhardt, R. J., Rees, D. C. : *Science*, **271**, 1116-1120 (1996)
- 32) Yaoi, Y., Hashimoto, K., Koitabashi, H., Takahara, K., Ito, M., Kato, I. : *Biochem. Biophys. Acta*, **1035**, 139-145 (1990)
- 33) Asada, K., Uemori, T., Ueno, T., Hashino, K., Kato, I. : The Second Annual Meeting, The Japan Society of Gene Therapy, p. 106 (1996)

お知らせ

1997年度生理学研究所
生命科学実験技術トレーニング・コース

日 時：講演 平成9年7月28日～29日／実習（講義，実習）平成9年7月29日～
場 所：生理学研究所（〒444 岡崎市明大寺町西郷中38）

講 演：生体機能の解明に向けて——分子・細胞レベルからシステムレベルまで（受入人数 約60名）

◆7月28日（月）13：00～18：00

「海馬・嗅球の細胞構成」 小坂俊夫（九大医）
「運動の制御と中枢神経系；歩行運動制御システムの解析を中心として」 森 茂美（生理研）
「ヒト高次脳機能の非侵襲的研究法の現況」 柴崎 浩（京大院医学研）

◆7月29日（火）9：00～12：00

「細胞膜の膜蛋白質とリン脂質の分布と動態を電子顕微鏡で見る」 藤本 和（京大院医学研）
「細胞内物質輸送の分子機構；新しいモーター分子群 KIFs の分子細胞生物学」 廣川信隆（東大院医学研）

実 習：講義7月29日（火）14：00～17：00（受入人数 約60名）／実習7月30日（水）より

「Ca²⁺ 画像解析とコンフォーカルマイクロスコープ」 (10名：3日間)

「パッチクランプ」 (23名：3日間)
「アフリカツメガエル卵母細胞を用いたイオンチャネルの発現と測定」 (5名：2日間)

「培養細胞の *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫同時

染色」 (3名：3日間)

「ノックアウトマウスの作製と解析（概要）」 (4名：3日間)

「超高圧電子顕微鏡操作実習」 (3名：2.5日間)

「スライスパッチクランプ法」 (1名：3日間)

「視覚心理物理と皮質ニューロン活動記録」 (3名：2日間)

「脳磁図を用いたヒト脳機能の研究」 (5名：3日間)

「霊長類の運動制御神経機構の解析」 (2名：3日間)

対 象：学部学生，大学院生（修士・博士），若手研究者（Postdoctoral fellow を含む）。

申込方法：FAX，E-mailまたは葉書で名前，所属，身分，学会名，参加希望項目（実習は第2希望まで記入可），Tel.，FAX，住所，E-mailを記して下記連絡先へお申込みください。なお，宿泊は個室ロッジ（一泊1,600円以下）35名まで利用可能です。

申込締切：平成9年6月15日（日）

連絡先：〒444 岡崎市明大寺町西郷中38

生理学研究所生体システム部門 森 茂美

FAX 0564-52-7913 Tel. 0564-55-7860

E-mail : training@nips.ac.jp