

## 組織機能保持細胞株を用いた生体機能解析研究

帯 刀 益 夫

ヒトの全ゲノム情報の解読を始めとして、遺伝子研究にかかわる方法論の発展は生命科学に飛躍的な発展をもたらし、思考実験を遺伝子のレベルで容易に具体化できるようになった。しかし、それぞれの遺伝子の生体内での働きは、生物体である細胞や個体で解析しなければならない。生体組織は200種に及ぶ分化した機能細胞の集まりであり、この多様な組織細胞をその機能を残したまま不死化し、遺伝子ライブラリーと同様に保存、増幅することができれば、生体機能の研究に大きな発展が期待できる。本稿では、この目的でわれわれが行った不死化遺伝子を導入したマウスからの組織機能細胞の不死化の技術開発と、これによって樹立された細胞株を用いた生体組織機能の再構成研究、ならびに今後の医薬品開発などへの利用についてまとめたものである。

### 1. はじめに

われわれヒトの身体はおよそ60兆個の細胞でできている。また、脳、肝臓、腎臓というように、いろいろな組織を構成している細胞は、それぞれ機能や形態が異なり、このような分化した組織細胞の種類は200を越えるといわれている。このように多様で膨大な細胞でできているヒトの個体が、一つの細胞である受精卵からどのようにして間違いなく形成されるかは驚異的なことであるといえよう。ヒトでこの初期発生過程から体ができるまで、一つの細胞が分裂を繰り返し、分化しつつ組織を形成し個体を形成してゆく過程を細胞の系図として記述するのは不可能であるが、個体が約千個の細胞で1個体を形成している線虫という実験動物を観察すればその様子が分かる。この細胞分裂過程では、神経、表皮、腸管、生殖器など固有の分化した組織が形成されてゆく間に、細胞分裂、細胞分化、そして細胞死が整然と起きていることが分かり、この過程は細胞の系譜と呼ばれている。この細胞系譜の理解は、分化した細胞がいかにして生まれるかを明確に示すと共に、細

胞系譜の制御を変化させてしまう遺伝子変異を得るという遺伝学的研究により、細胞の系列分化がどのような遺伝子によって支配されているかも解明することが可能になった。1個体が約千個の生物と、約60兆個の細胞で構成されるヒトとは比較できないが、ヒトにおいては途方もなく膨大な細胞系譜となったとしても、原理的には同じように細胞系譜を描くことが概念的に可能であるといえる。

個体発生は遺伝的なプログラムによって正しく遂行された結果であり、そのメカニズムはヒトをはじめとする多様な生物種で共通性があり、ゲノム情報の解読や、分子遺伝学や発生生物学、細胞生物学などの研究の発展により詳しく解き明かされてきた。多様な細胞を生み出す過程としての発生過程では、1個の細胞は分裂して2個になるとき、全く同等の細胞となるか、元とは異なる細胞になるかの運命転換が必要であり、いったん運命転換の決定が起きると、分化特異的な機能を発揮するための遺伝子発現プログラムが作動し、その結果として多様な組織細胞が生み出される。この細胞の変換の過程は細胞分化と呼ばれる。また、いったん身体ができあがってしまっても、これを恒常的に維持しつつ、幾つかの組織では細胞の交代が起きており、とくに細胞の交代の激しい血液細胞、小腸、皮膚などでは大量の細胞が生まれ、死んでいる。ヒトでは、毎日およそ $10^{10}$ 個の細胞が死んで新しい細胞と交代しているといわれており、このような個体形成、維持において、細胞がどのようにしてその運命を変換し、組織の機能的特異性を

東北大学名誉教授(〒206-0025 東京都多摩市永山5-30-3-1)

The immortalized cell lines with differentiation potentials: their establishment and possible application

Masuo Obinata (Professor Emeritus of Tohoku University, Nagayama 5-30-3-1, Tama City, Tokyo 206-0025, Japan)

発揮するようになるかの細胞分化過程を理解し、また細胞死や細胞老化、これと関係する細胞のがん化がおきるのかなどを理解するためには、200種を超えるといわれる分化した細胞の特性を知ることが必要となってくる。

## 2. 組織機能細胞の不死化の必要性

遺伝子クローニング法の発展により、染色体の遺伝子はクローニング（選別）、増幅、ストックが可能になり、ヒトの全ゲノム情報の解読を始めとして、遺伝子情報はcDNAライブラリーやゲノムライブラリーとして個別の遺伝子をストックし、そこから遺伝子産物であるタンパク質も望みの量を増やすことができるだけでなく、遺伝子配列情報を元としてPCR法を用いれば希望の遺伝子を合成することができるなど、思考実験を遺伝子のレベルで容易に具体化できるようになった。ただ、こうした遺伝子とその情報、その産物であるタンパク質は個々の物理化学的特性の解析には利用できるが、それぞれの生体内での機能は生物体である細胞や個体での追跡をしなければならない。そのために細胞へ遺伝子を導入してその機能を追跡するか、受精卵での遺伝子導入または遺伝子破壊実験によりその機能を追跡することになる。

生命科学研究手法の目覚ましい発展をもたらした遺伝子クローニング法と同様に、生体組織の分化した細胞を選別し、ストックし、その生体機能の解析などに利用することは可能であろうか。生体組織の異なる種類の細胞をすべて、その生体機能を残した形で不死化することができれば、これをクローニングすることにより細胞株としてストックすることができるので、原理的には同じことが可能となる。本稿は、このような生体組織の細胞の不死化の技術開発とこれによって樹立された細胞株の特性と、これらを用いた研究と今後の医薬品開発などへの利用についてまとめたものである。

## 3. 細胞の不死化技術

動物組織から取り出した細胞は、一定の条件下の培養で増殖する（初代培養）が、多くの場合、ある程度継代すると増殖を停止し、死滅する。この現象はクライシスと呼ばれている。げっ歯類などの組織の細胞の場合、ある程度の頻度で不死化した細胞が現れ、培養を続けることができる。これは、培養中に細胞の遺伝子の変異により不死化が起きたものと考えられている。ヒトの細胞の場合はこのような不死化が起きる頻度は非常に低く、不死化は起きにくいとされている。Hayflickは、ヒト繊維芽細胞の培養系で若いヒトから取った細胞は長く継代でき、高年齢のヒトの細胞は継代可能な時間が短いことから、ヒト細胞は細胞寿命を持っていると提唱し、最近ではこの細胞寿命の一因として細胞分裂を繰り返すことによるテロメアの短縮が想定

されている<sup>1)</sup>。

一般に、がん細胞は永久に増殖する細胞と考えられ、がん化を起こす要因であり、細胞増殖を正と負に制御する遺伝子であるがん遺伝子やがん抑制遺伝子が不死化に関係していると考えられる。ただ、がん組織から取り出したがん細胞のほとんどは初代培養系で永久に増殖するわけではなく、細胞のがん化と不死化は必ずしも同じ事象ではない。また、がんの多段階説にあるように、細胞のがん化には単一のがん遺伝子だけでなく、がん遺伝子とがん抑制遺伝子の変異が重なることが必要であるとされている。実際、多くのがんで遺伝子増幅や染色体転座により過剰発現し、がん化の大きな要因となっている *c-myc* 遺伝子などを細胞へ遺伝子導入し、過剰発現させても細胞をがん化させることも不死化させることもできない。

このような中であって、DNA型がんウイルスであるSV40やヒトパピローマウイルスのがん遺伝子（T抗原遺伝子）は、単独でげっ歯類の細胞に導入すると細胞を不死化させることができる<sup>2)</sup>。これらのがん遺伝子産物は、宿主細胞のがん抑制遺伝子産物であるRBとp53に結合し、その機能（細胞増殖の抑制機能）を抑制することにより細胞を増殖に導き、不死化させていると考えられる。とくに、SV40 T抗原はげっ歯類の初代培養系に導入することで頻度よく細胞を不死化させることができる。ヒト細胞も不死化させるとの報告もあるが、その頻度は低く再現性のある結果は得られていなかった。最近になってヒト細胞もSV40ウイルスやヒトパピローマウイルスのT抗原とともに、テロメラーゼ遺伝子を導入すると細胞の不死化が起きることが分かった<sup>3)</sup>。この場合も不死化した細胞はがん化しておらず、新たに *ras* などのがん遺伝子を導入して初めてがん化することが分かった<sup>4)</sup>。

さて、生体組織の細胞のほとんどは分化した細胞であり、G<sub>0</sub>期に入って増殖を停止している細胞である。一般に、細胞分化の過程では、未分化な細胞は増殖しつつ分化決定が起きると、分化特異的な遺伝子発現が誘導されるとともに、細胞周期はG<sub>0</sub>に移行し、増殖を停止して組織機能を発揮する細胞として維持される。この分化の決定過程は細胞の増殖と分化の方向性の転換点ともいえる。われわれは、培養系でDMSOなどの分化誘導剤を添加するだけで、未分化な白血病細胞の状態から赤血球へと分化し、増殖も停止するマウス赤白血病細胞では、分化誘導とともにがん遺伝子である *c-myc* 遺伝子の一過的な発現に引き続いて発現の減少が起き、この発現減少が分化誘導に必須であることを示した。そして、*c-myc* 遺伝子を細胞へ遺伝子導入し条件的に発現を制御すると、分化誘導される細胞の頻度を制御できること、つまり、*c-myc* がん遺伝子を制御すれば増殖と分化をスイッチすることが可能であることを明らかにした<sup>5)</sup>。

このことは、生体組織の細胞も増殖と分化の転換ができれば不死化が可能であり、しかも分化誘導も可能ではないかと考えさせる。そこで、*c-myc* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作出し<sup>6)</sup>、組織を取り出し、初代培養を行ったが良い結果は得られなかった。同様の考えで、SV40 T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作出したが、その際、温度感受性変異株 (ts-T 抗原) を初代培養に導入すると許容温度 (33-36°C) では増殖し、非許容温度 (39°C) では増殖停止が起きるとの報告<sup>7)</sup>があったので、温度感受性変異株を用いることとした<sup>8)</sup>。

#### 4. トランスジェニックマウスからの 組織機能細胞株の樹立

この ts-T 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウス (以下 T 抗原マウスと略称) の成体組織から細胞株を樹立できるかについて、まず肝臓と腎臓から初代培養を行い、樹立を試みた。その結果、肝実質細胞<sup>9)</sup>、腎臓尿管細胞<sup>9)</sup>の株化に成功した。肝細胞では、アルブミンの発現やシトクロム p450 遺伝子の誘導などが認められたし、腎臓尿管細胞ではドーム形成が起きることなどが分かり、一定の組織機能を反映した細胞株であることが分かった。肝細胞の増殖は、33°C で最も高く、37°C でも良好であるが、39°C に移すと増殖を停止し、33°C に戻すと増殖が回復することから、細胞の増殖は温度依存性の T 抗原の性質を反映していることが分かった。腎臓尿管細胞株では同様の温度感受性の増殖を示すものの、39°C ではアポトーシスを起こして死滅することが分かった。その後に樹立された多様な細胞株のほとんどは、許容温度では T 抗原依存 (温度依存) 性の増殖を示すが、非許容温度では増殖を停止するもの、増殖を停止したまま分化形質が増強するもの、アポトーシスにより死滅するものが認められた。このような増殖分化の表現型の違いの理由はまだ不明であるが、細胞株ごとに、Rb や p53 の発現量が異なっていたり、T 抗原との結合量に違いがあること、さらにはこれらタンパク質の標的遺伝子の組織特異性などが総合的に反映されている可能性がある。われわれは、非許容温度でアポトーシスを起こす腎臓尿管細胞株を用いて細胞増殖に対する T 抗原の作用機序について解析したが、この細胞株では、許容温度では、抗 T 抗原抗体を用いても抗 p53 抗体を用いても、ともに両者の結合物を共沈させることから、T 抗原は p53 タンパク質と結合していることが分かった。非許容温度に移すと、T 抗原が分解し、解離した p53 タンパク質は一過的に濃度が高まることがわかり、これがアポトーシスが起きる理由であると推定した<sup>10)</sup>。また、T 抗原マウスから樹立された細胞株は、T 抗原が発現しているががん細胞としての性格は持たず、移植しても腫瘍性増殖は起きないことも確認されている。先のヒト細胞の不死化について

述べたように、T 抗原マウスから樹立された細胞株は不死化だけが起きており、がん化するためにはさらに遺伝子変異が必要であるといえる。

組織の機能を調べる目的で、組織の初代培養が用いられる。初代培養では、げっ歯類などの細胞は不死化しない場合でも、ある程度の期間、増殖を維持するので、生化学的、薬理的解析などが可能である。ただ、組織そのものをばらしただけの培養系では、いろいろな細胞が混在している。したがって、目的とする機能細胞のみを培養したい場合は、あらかじめ目的の細胞を分離して行うか、培養したのちに選別することにより、目的の機能細胞の解析に用いている場合が多い。この際、組織の初代培養では、組織中の繊維芽細胞が旺盛な増殖能を持っており (あるいは組織培養の培養液が繊維芽細胞の増殖に有利なため)、一方、多くの分化した組織細胞が遅い増殖能であるため、培養皿を繊維芽細胞が覆ってしまうことが多い。T 抗原マウスからの組織の初代培養では、組織の分化した細胞が比較的早い増殖性を示すため、繊維芽細胞から分離し、早めにクローニングすることが可能であり、結果として目的とする組織細胞を不死化することが可能になったと思われる。その後の T 抗原マウスからの多様な細胞株樹立の結果から、微小な組織の細胞、組織中の微量な細胞種でも、あらかじめ目的とする細胞種を分離しなくても不死化が可能であることが分かった。

このように T 抗原マウスからの多様な細胞株の樹立が可能になったので、実験動物として繁用されるラットについても、同様の温度感受性 T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットを作出した<sup>11)</sup>。そして、ラットからも多様な機能細胞株の樹立に成功している。これまでに、50 種を超える細胞株が樹立できており、その性状や利用についてすでに総説<sup>12-14)</sup>を書いているので、興味のある方はそちらも参照されたい。

樹立された細胞株中には、生体組織の形態や分化マーカーの発現などから明確に同定できる細胞とともに、これまでその性状が明確でなかった細胞も含まれている。また、組織機能の主役ともいべき分化した細胞に加えて組織中には、主役の細胞を支持し、組織の安定化に側面から働いている細胞もあると思われる。こうした細胞は組織の中での特徴が明確でなく未同定の細胞もあると思われ、われわれの手法で樹立した細胞株の中には、このような細胞株も多いと思われた。組織機能を培養系で再現させ、株化した細胞を用いて組織の再構築を目指す場合には、主役の細胞と脇役の細胞が混在した培養系の構築が必要となる。とくに、最近、組織の幹細胞の制御に組織微小環境 (あるいはニッチとよばれる) の重要性が指摘されてきた。われわれはこれまで骨髓の造血組織微小環境に着目して研究を進めてきたので、造血組織微小環境を構成している骨髓の

細胞株の樹立と、これを用いた造血組織微小環境の培養形での再構築について、以下に概説する。

## 5. 骨髓細胞株を用いた造血微小環境の研究

### (1) 骨髓細胞株を用いた血液細胞培養系の構築

骨髓は、血液幹細胞が局在し、造血組織として知られている。組織化学的観察や、骨髓中の培養皿に付着性の細胞と共培養すると血液細胞を長期に培養することができるという報告などから、骨髓組織の間質の細胞は、血液細胞、血液幹細胞を支持する機能を持つと考えられていた。そこで、T抗原マウスの骨髓から間質細胞の樹立を行い、繊維芽細胞様、血管内皮様、脂肪細胞様など、多様な形態を示す付着性の間質細胞株を樹立することができた<sup>15)</sup>。これらの細胞株をフィーダー細胞として培養し、この付着細胞の上に血液前駆細胞や血液幹細胞を載せて培養すると、血液細胞の増殖が著しく促進された。30種以上の骨髓間質細胞と血液前駆細胞を共培養すると、面白いことに細胞株によって赤血球、骨髓球などの増殖分化の促進機能に差が認められた。このような選択的な造血支持機能の差は、間質細胞の形態の特長とは関係がなかったが、骨髓間質の細胞が個々に異なる造血支持機能を持つことが予想された。たとえば、赤血球前駆細胞の分化増殖作用を示す間質細胞との共培養では、CFU-E (colony forming unit-erythroid) の分化段階にある前駆細胞は、エリスロポエチンの共存下で千個に及ぶ分化した細胞の巨大コロニーを形成した。このことは、エリスロポエチン単独のセミソリッドアッセイではせいぜい十数個の細胞のコロニーしか形成できないので、間質細胞はエリスロポエチンの増殖シグナルを補強する形で促進効果を発揮していると考えられた<sup>16~18)</sup>。また、間質細胞の多くは、G-CSF、M-CSF、GM-CSFなどのサイトカインを産生しており、ミエロイド系の前駆細胞から顆粒球、単球、マクロファージなどへの分化を促進するが、共培養するとサイトカイン単独のときと比べて巨大なコロニーを形成することから、ミエロイド系の前駆細胞でも、間質細胞依存の段階があることを示すものと考えられる<sup>19)</sup>。前駆細胞と同様に、骨髓中の血液幹細胞をセルソーターを用いて Lin<sup>-</sup>/c-Kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>/ という表面マーカーで選別分取し、幹細胞1個1個を間質細胞株フィーダー上に播いた後、培養し、間質細胞株ごとの幹細胞の増殖分化への効果を観察した<sup>20)</sup>。その結果、間質細胞株は、まったく効果を示さないものから強い促進効果を示すものまで、細胞株ごとに大きな差異が認められた。促進の効果がある間質細胞株上では、幹細胞はフィーダー細胞層の下にもぐりこむ形で敷石状のコロニーを形成し、ミエロイド系のコロニーとリンパ球系のコロニーが観察された。このような間質細胞株ごとの機能的差異が、骨髓中の個々の間質細胞の個々の機能的差異に由来するのか、不死化の途中で細胞に

変異が起き、本来の性質を部分的に失った結果かは不明であるが、骨髓の間質細胞が形成している造血微小環境の特性の一部を、細胞株として培養系で再現させることができたと考えられる。

最近、いろいろな組織で、組織幹細胞がその組織特有の微小環境によって維持されていることが明らかとなり、組織環境の細胞学的特性も明らかになりつつある。骨髓の造血微小環境は、概念としては早くから提唱されてきていたが、組織の観察が難しいなどの理由から、造血微小環境の細胞化学的追跡は遅れていた。最近になって、造血幹細胞は骨髓の特徴的な骨芽細胞 (=SNO細胞 = spindle-shaped N-cadherin<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> osteoblastic (SNO) cells) に接着していることが報告された<sup>21)</sup>。このような生体内の組織化学的観察とわれわれが樹立した間質細胞株がどのような対応関係にあるのかは今後の課題である。

### (2) 間質細胞の造血促進効果を示す因子の同定

間質細胞株をフィーダーとして血液細胞を培養すると血液細胞の増殖分化への促進効果を示すことがわかったので、間質細胞の造血促進因子の同定が可能となった。まず、間質細胞依存の血液細胞の増殖と分化の制御において、この制御が細胞間の直接の接着によるものかどうかを調べた。細胞接着に影響を与えると思われるインテグリンについて、その阻害抗体を共培養系に添加すると、造血前駆細胞からの赤血球造血、リンパ球造血、さらにソーティングした血液幹細胞のコロニー形成のいずれの場合も、抗VLA4抗体が強い阻害をすることがわかった<sup>22~24)</sup>。さらに、抗c-Kit抗体を添加すると、赤血球造血、ソーティングした血液幹細胞のコロニー形成の場合は強い阻害が認められ、間質細胞が産生するSCF (stem cell factor) が重要であることが示されたが、リンパ球造血ではあまり阻害効果は見出せず、むしろIL-7による増殖促進効果の増強が認められた。また、種々のサイトカインと間質細胞は血液細胞の増殖分化に相乗的效果を示すことが多い。

間質細胞側の血液細胞支持因子を探索するため、支持する間質細胞と支持しない細胞で発現の異なる遺伝子のスクリーニングを行った。赤血球造血を支持する細胞で高く発現している遺伝子群をマイクロアレイ法で同定したところ、いくつかの遺伝子が候補として挙げられたが、その中でテネイシンCに着目して解析した<sup>25)</sup>。血球造血を支持する間質細胞の産生する細胞外基質であるテネイシンCの発現をsiRNAで阻害すると、赤血球造血促進機能は著しく低下した。一方、非支持細胞株にテネイシンCの遺伝子を導入し発現させると、有意に赤血球造血の促進が認められた。テネイシンCは細胞外基質としてレクチンやEGF受容体と部分的に弱く結合することが報告されている。その作用の分子メカニズムはまだ不明であるが、細胞外基質

からのシグナルが赤血球前駆細胞の分化増殖を促進するシグナルとして働いていることが考えられる。また、ソーティングした血液幹細胞と間質細胞の培養系で、支持能と対応して発現変動する遺伝子を mRNA ディスプレイ法で選別し、*MysPDZ* と名付けた遺伝子を同定した<sup>26)</sup>。この遺伝子は、タンパク質の会合に働く PDZ ドメインを持つ新規のミオシン遺伝子であり、*Myo18A* と命名された<sup>27)</sup>。*MysPDZ* は間質細胞で発現している  $\alpha$  型、血液細胞で発現している  $\beta$  型、筋肉で発現している  $\gamma$  型など、スプライスバリエントが認められた。*MysPDZ* は N 末端でアクチンと結合する新規のドメインを持っており<sup>28)</sup>、細胞内輸送に関与していることが分かったが<sup>29)</sup>、このタンパク質が間質細胞の血液幹細胞への支持機能とどのような対応を示しているかは分かっていない。

### (3) 間質細胞依存の血液細胞株の樹立と、造血制御因子の同定

間質細胞をフィーダー細胞として血液細胞の培養系が開発されたので、つぎにわれわれは、間質細胞依存性に増殖分化できる血液細胞の不死化を試みた。その結果、間質細胞依存性に増殖が維持される細胞株として、通常のマウス骨髄由来からリンパ球系前駆細胞株 (B31-1, DFC-28)<sup>30,31)</sup>、T 抗原マウス骨髄由来の血液幹細胞様細胞株 (THS119)<sup>32)</sup>、骨髄球系細胞株<sup>33,34)</sup>などが得られた。

THS119 細胞は、非許容温度では増殖せずアポトーシスを起こすし、間質細胞を除くと同様にアポトーシスを起こす<sup>32)</sup>。その細胞表面マーカーは  $\text{Lin}^-/\text{c-Kit}^+/\text{Sca1}^+$  であり、血液幹細胞と同様であるし、転写因子などの遺伝子発現のパターンも未分化血液細胞と類似であった。この細胞株から分化した血液細胞への誘導を起こす条件を見出すことはできなかったが、この細胞株を間質細胞との共培養下で、IL-3 あるいは IL-7 を添加しつつ培養を長期的に続けると、IL-3 あるいは IL-7 に依存性で間質細胞非依存性の血液細胞株が得られ、これらの遺伝子発現のパターンは親株とは異なっていることが分かった。さらに、これら細胞株の比較から、間質細胞上で培養した血液細胞は、*Bcl-2* の誘導によりアポトーシスを防いでいると考えられた<sup>35)</sup>。さらに、間質細胞は未分化性の維持に働いていると思われるが、この過程に間質細胞が産生しているインターフェロン  $\beta$  が働いていることが示された。

これら間質細胞依存性の細胞株が樹立されたことにより、間質細胞の造血支持機能についての解析が可能となった。血液幹細胞様細胞である THS119 細胞の間質細胞依存性は、抗 *c-Kit* 抗体、抗 *VLA4* 抗体で阻害される<sup>32)</sup>。また、この細胞は、ソーティングした血液幹細胞と同様に、フィーダー細胞の下層に潜り込んで敷石状のコロニーを形成する。この細胞の潜り込みに関わる因子の同定を進めた

ところ、血清中の脂質が必要であり、中でもリゾホスファチジン酸 (LPA) が特に活性が強いことが分かった<sup>36)</sup>。LPA は、血液細胞の受容体から Rho の活性化を経て細胞運動能に寄与しており、阻害剤の実験などからも、これを支持する結果が得られた。この結果は、造血組織の微小環境で、血液幹細胞などが、間質細胞との接着、脱離、移動等を行う際に LPA などの脂質が重要な制御因子として働いている可能性を示唆するものである。

DFC-a 細胞株は、間質細胞依存に増殖し、 $\text{c-Kit}^{(+)} \text{Gr-1}^{(-)} \text{Mac-1}^{(-)}$  の未分化な細胞から、顆粒球 ( $\text{c-Kit}^{(+)} \text{Gr-1}^{(+)} \text{Mac-1}^{(+)}$ ) とマクロファージ ( $\text{c-Kit}^{(\text{low}/+)} \text{Gr-1}^{(-)} \text{Mac-1}^{(\text{high})}$ ) へと分化が起き、間質細胞依存の培養系ではこれらが混在して増殖する。 $\text{c-Kit}^{(+)} \text{Gr-1}^{(-)} \text{Mac-1}^{(-)}$  の未分化な細胞をソーティングして間質細胞をフィーダー細胞として培養すると顆粒球とマクロファージが生産されることから、間質細胞依存で、二つの分化した血液細胞になる能力をもつ前駆細胞であると推定された<sup>31)</sup>。

DFC-28 細胞株はフィーダー細胞とする間質細胞株を変えると、その細胞分化の状態が変換することを見出した<sup>37)</sup>。この細胞株は、脾臓から樹立した間質細胞 (MSS32) と共培養すると  $\text{c-Kit}^+/\text{Sca-1}^+/\text{CD19}^-/\text{Pax-5}^-$  の未分化な血液細胞の表現型を示す。この細胞株を骨髄間質細胞株 (TBR31-1) 上で培養すると、 $\text{c-Kit}^+/\text{Sca-1}^+/\text{CD19}^+/\text{Pax-5}^+/\text{BP-1}^+/\text{Rag-1}^+/\text{Rag-2}^+/\text{TdT}^+$  の表現型を示す幼弱な B リンパ球へと分化していたことがわかる。大変興味深いことに、DFC-28 細胞を TBR31-1 細胞上で培養し、幼弱な B リンパ球へと分化した細胞を、もう一度 MSS32 細胞上に戻して培養すると、DFC-28 細胞は短期間の間に、再び  $\text{c-Kit}^+/\text{Sca-1}^+/\text{CD19}^-/\text{Pax-5}^-$  の未分化な血液細胞の表現型を示すようになる。この細胞の表現型の転換は、細胞集団の一部の未分化な細胞集団が増殖した結果ではなく、大半の細胞集団が細胞分裂を経過せずに、表現型を転換している結果であることが分かった。つまり、この幼弱な血液細胞株は、未分化状態と分化した状態を不可逆的にスイッチのオン-オフができることを示すものである。しかも、この可逆的な分化転換は、血液細胞と間質細胞の直接の接着を介して起きていることも明らかであった。一般に、細胞の分化は不可逆過程であり、分化した細胞から未分化な細胞へと逆戻りすることはないと考えられてきた。われわれの結果は、培養細胞系の特殊な条件においてもたらされた可能性もあるが、最近、*Pax-5* の発現のスイッチのオン-オフにより、未分化な B リンパ球系が分化転換を起こすことが報告された<sup>38)</sup>。われわれの結果でも、間質細胞からのシグナルにより *Pax-5* の発現のスイッチのオン-オフが起きることが証明されているので、造血組織の微小環境の中で、未分化な血液細胞は間質細胞からのシグナルにより、可逆的な分化転換を起こす可能性があると思われる。

このような間質細胞との接着による血液細胞の分化転換がどのようなシグナルに依存して起きるかは興味深い。われわれの解析から、DFC-28細胞においては、エフリンB2の発現がMSS32細胞上では認められ、TBR31-1細胞上では認められず、両間質細胞ではEphB4などの受容体ファミリーの発現に違いがあることが分かった。DFC-28細胞だけでなく、骨髄由来の血液細胞をMSS32細胞と共培養してもエフリンB2の発現が細胞接着依存性に誘導されることが分かった<sup>39)</sup>。また、エフリンB2を強制発現させた血液細胞株はMSS32細胞への接着性が増し、細胞移動能が低下していた。これらの結果から、間質細胞は未分化な血液細胞のエフリンB2を誘導することにより、移動能を低下させ、接着依存の何らかのシグナルを与えることで血液細胞の未分化性を保つことが推定された。エフリンファミリーとそのEph受容体ファミリーは、エフリンからEph受容体へ、またその逆方向へのシグナルを与えることが報告されており、間質細胞と血液細胞では相互に影響を与えあっている可能性が高い。また、オンコスタチンMなどのサイトカインは、血液細胞でIL-3等により誘導されるが、われわれはオンコスタチンMが、間質細胞の分化能とともに、造血支持機能を変動させることを見出している<sup>40)</sup>。この結果と対応して、最近、オンコスタチンM遺伝子欠損マウスでは骨髄の造血微小環境の造血支持機能が低下することが報告されている<sup>41)</sup>。生殖幹細胞のニッチでは、ニッチが幹細胞を制御するとともに、幹細胞もニッチを制御するという双方向の制御機構があることが分かってきているが、これらの結果は、造血微小環境でも同様の制御機構があることを示すものである。

#### (4) 骨髄間質細胞の間葉系分化

骨髄から樹立された多数の細胞株は、これまで述べたように造血支持機能を示すが、それとともに、それ自体が多様な間葉系細胞へと分化する多能性幹細胞を含んでいることが分かった。株化された細胞はそれぞれ異なる形態を示し、また分化マーカーの発現など違いが認められているが、培養条件に応じて血管内皮細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、血管平滑筋細胞、脂肪細胞、心筋細胞などの分化形質を発現した細胞へと誘導されることが分かった<sup>42)</sup>。中に

は、血管内皮細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞など多種類の細胞へと分化する間葉系幹細胞と思われる細胞株もある<sup>43)</sup>、拍動する心筋細胞へと分化する細胞株や<sup>44)</sup>、平滑筋細胞<sup>45)</sup>へと分化する細胞株もある。近年、骨髄細胞がこのような多様な分化誘導能を示すことから、細胞移植による再生医学的な利用に注目が集まっているが、われわれが不死化した骨髄由来の間葉系幹細胞は、組織幹細胞の分化誘導の研究に利用できる材料として期待されている。

## 6. その他の細胞株の情報について

これまで述べてきた以外の細胞株については表1にまとめて示すが、それぞれ組織特異的な細胞株であり、培養細胞である限界もあるものの、それぞれの機能について興味ある結果が示されている。紙面の都合と、すでに総説で示しているものも多いのでここでは詳細を省くが、興味ある方はそれぞれの論文を参照していただきたい。なお、このようなT抗原トランスジェニックマウスを用いた細胞株の樹立については、Jatらが、インターフェロンで誘導されるH-2KbプロモーターにT抗原遺伝子をつないだ形でトランスジェニックマウスを作出して行っている<sup>46)</sup>。

## 7. おわりに—組織機能細胞株の利用—

表2は、組織機能保持細胞株の今後の可能性について示したものである。これからの医薬品の開発については、遺伝子情報などに基づいて特定の遺伝子やタンパク質を標的とする医薬品のスクリーニングが進められると思われるが、そのためには、特定の遺伝子やタンパク質が本来働いている特定の細胞での生理機能を指標とすることが求められている。同時に、組織の機能や細胞特異性を指標にした医薬品の開発も必要であり、分子を標的とするのではなく、組織機能を直接指標とするスクリーニングも必要である。組織機能を保持した細胞株は、こうした開発研究に好適な材料である。また、多様な機能細胞を用いて、同時にハイスループットスクリーニングを可能にする細胞ベースのスクリーニング系の確立にも役立つものと思われる。さらに、昨今批判を浴びている膨大な数の実験動物を必要とする毒性試験や薬物動態の研究などを代替できる細胞レベルでのアッセイ系の確立も必要となっているので、この目

表1 T抗原マウス、ラットから樹立された細胞株 (参考文献)

免疫関係細胞 (樹状細胞, マスト細胞, ナチュラルキラー細胞) (44-46)
血管平滑筋, 血管内皮細胞, リンパ管由来内皮細胞 (47-48)
軟骨細胞, 腱由来細胞, 靭帯由来細胞, 歯肉由来上皮細胞 (49-53)
消化管由来細胞 (胃粘膜細胞, 胃上皮細胞, 結腸上皮細胞, 小腸上皮細胞) (54-58)
腎臓由来細胞 (近位尿細管細胞, 遠位尿細管細胞, 尿細管領域特異的細胞, マクラデンサ細胞) (59-63)
組織—血管バリアー由来細胞 (脳由来周皮細胞, 脳脈絡膜上皮細胞, 脳毛細管内皮細胞, 網膜由来周皮細胞, 網膜由来毛細管内皮細胞, 網膜由来ミューラー細胞) (64-71)
生殖器由来細胞 (ライディッヒ細胞, セルトリ細胞, 副睾丸上皮細胞) (72-76)
脳視交叉上核由来細胞 (神経細胞, オリゴデンドロサイト) (77-79)

表2 組織機能保持細胞株の創薬科学への利用

## 細胞特性に注目した医薬品の開発

- (1) 組織再生
  - 多能性幹細胞の分化制御
  - 組織微少環境の構築
  - 生理活性分子, 分化制御因子の探索
- (2) 遺伝子機能, 発現制御因子の探索
- (3) ハイスループットスクリーニング系の開発
- (4) 毒性試験等, 実験動物代替法の開発
- (5) 遺伝子治療, 細胞治療の研究

的で利用することも考えられる。これまでに述べてきた細胞株は、マウス、ラットいずれも遺伝形質を同一にする細胞株であり、各細胞株の遺伝子発現プロファイルの解析を統合的に進めつつ、バイオインフォーマティクスの助けを借りて、医薬品の多様な動きを追跡し、新たな作用効果を見つけたし、また、副作用の軽減を図るための情報を総合的に得ることなども可能となると思われる。

## 謝辞

この研究の端緒については本誌にミニレビュー (生化学 67, 1391-1396, 1995) を書く機会を与えていただいた。本稿で示した研究成果は、多数の共同研究者との共同研究の成果であり、心から感謝を申し上げる。

## 文 献

- 1) Hayflick, L. (2002) *Science*, 296, 1611-1612.
- 2) Jat, P.S. & Sharp, P.A. (1986) *J. Virol.*, 59, 746-750.
- 3) Counter, C.M., Hahn, W.C., Wei, W., Caddle, S.D., Beijersbergen, R.L., Lansdorp, P.M., Sedivy, J.M., & Weinberg, R.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14723-14728.
- 4) Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., & Weinberg, R.A. (1999) *Nature*, 400, 464-468.
- 5) Kume, T.-U., Takada, S., & Obinata, M. (1988) *J. Mol. Biol.*, 202, 779-786.
- 6) Jat, P.S. & Sharp, P.A. (1986) *J. Virol.*, 59, 746-750.
- 7) Suzuki, M., Yoshinaga, K., Obinata, M., Furusawa, M., & Abe, K. (1996) *Genes Cells*, 1, 1077-1086.
- 8) Yanai, Y., Suzuki, M., & Obinata, M. (1991) *Exp. Cell Res.*, 197, 50-56.
- 9) Yanai, Y., Satoh, T., Kyo, S., Abe, K., Suzuki, M., & Obinata, M. (1991) *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 1344-1348.
- 10) Yanai, Y. & Obinata, M. (1994) *Exp. Cell Res.*, 211, 296-300.
- 11) Takahashi, R., Hirabayashi, M., Yanai, N., Obinata, M., & Ueda, M. (1999) *Exp. Anim.*, 48, 255-261.
- 12) Obinata, M. (1997) *Genes Cells*, 2, 235-244.
- 13) Obinata, M. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286, 667-672.
- 14) Obinata, M. (2007) *Cancer Sci.*, 98, 275-283.
- 15) Kameoka, J.-I., Yanai, N., & Obinata, M. (1995) *J. Cell Physiol.*, 164, 55-64.
- 16) Yanai, N., Matsuya, Y., & Obinata, M. (1989) *Blood*, 74, 2391-2397.
- 17) Ohneda, O., Yanai, N., & Obinata, M. (1990) *Development*, 110, 379-384.
- 18) Yanai, N., Satoh, T., & Obinata, M. (1991) *Cell Struct. Funct.*, 16, 87-93.
- 19) Ohneda, O., Yanai, Y., & Obinata, M. (1992) *Development*, 114, 245-252.
- 20) Okuyama, R., Koguma, M., Yanai, N., & Obinata, M. (1995) *Blood*, 86, 2590-2597.
- 21) Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., Harris, S., Wiedemann, L.M., Mishina, Y., & Li, L. (2003) *Nature*, 425, 836-841.
- 22) Koguma, M., Matsuda, K.-I., Okuyama, R., Yanai, N., & Obinata, M. (1998) *Exp. Hematol.*, 26, 280-287.
- 23) Yanai, Y., Sekine, C., Yagita, H., & Obinata, M. (1994) *Blood*, 83, 2844-2850.
- 24) Yanai, N., Shimizu, A., Koguma, M., & Obinata, M. (1996) *Exp. Hematol.*, 24, 883-887.
- 25) Seki, M., Kameoka, J., Takahashi, S., Harigae, H., Yanai, N., Obinata, M., & Sasaki, T. (2006) *Exp. Hematol.*, 34, 519-527.
- 26) Furusawa, T., Ikawa, S., Yanai, N., & Obinata, M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 67-75.
- 27) Sellers, J.R. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, 1496, 3-22.
- 28) Mori, K., Furusawa, T., Okubo, T., Inoue, T., Ikawa, S., Yanai, N., Mori, K.J., & Obinata, M. (2003) *J. Biochem.*, 133, 405-413.
- 29) Mori, K., Matsuda, K., Furusawa, T., Kawata, M., Inoue, T., & Obinata, M. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 326, 491-498.
- 30) Matsuda, K., Koguma, M., Okuyama, R., Nakazawa, T., Matsuzaki, Y., Nakauchi, H., Yanai, N., & Obinata, M. (1999) *J. Biochem.*, 125, 602-612.
- 31) Okubo, T., Yanai, N., & Obinata, M. (2000) *Exp. Hematol.*, 28, 651-659.
- 32) Yanai, N., Matsui, N., Matsuda, K.-I., Furusawa, T., Okubo, T., Nakazawa, T., Ishibashi, K., Nawa, K., & Obinata, M. (1999) *Exp. Hematol.*, 27, 1087-1096.
- 33) Okubo, T., Yanai, N., Watanabe, S., Arai, K.-I., & Obinata, M. (2000) *J. Biochem.*, 127, 591-596.
- 34) Okubo, T., Matsui, N., Yanai, N., & Obinata, M. (2000) *Cell Struct. Funct.*, 25, 133-139.
- 35) Sato, K.A., Yanai, N., Okubo, T., Mori, K.J., & Obinata, M. (2001) *Cell Struct. Funct.*, 26, 95-101.
- 36) Yanai, N., Matsui, N., Furusawa, T., Okubo, T., & Obinata, M. (2000) *Blood*, 96, 139-144.
- 37) Okubo, T., Yanai, N., Ikawa, S., & Obinata, M. (2002) *Exp. Hematol.*, 30, 1193-1201.
- 38) Cobaleda, C., Jochum, W., & Busslinger, M. (2007) *Nature*, 449, 473-477.
- 39) Okubo, T., Yanai, N., & Obinata, M., (2006) *Exp. Hematol.*, 34, 330-338.
- 40) Yanai, N. & Obinata, M. (2001) *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 37, 698-704.
- 41) Minehata, K., Takeuchi, M., Hirabayashi, Y., Inoue, T., Donovan, P.J., Tanaka, M., & Miyajima, A. (2006) *Int. J. Hematol.*, 84, 319-327.
- 42) Okuyama, R., Yanai, N., & Obinata, M. (1995) *Exp. Cell Res.*, 218, 424-429.
- 43) Negishi, Y., Kudo, A., Obinata, A., Kawashima, K., Hirano, H., Yanai, N., Obinata, M., & Endo, H. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268, 450-455.
- 44) Karibe, A., Okubo, T., Yagi, T., Ito, K., Ong, B., Kagaya, Y., Watanabe, J., Obinata, M., & Shirato, K. (2002) *Circulation*,

- 106, 1015 Suppl.
- 45) Arakawa, E., Hasegawa, K., Yanai, N., Obinata, M., & Matsuda, Y. (2000) *FEBS Lett.*, 481, 193–196.
  - 46) Jat, P.S., Noble, M.D., Ataliotis, P., Tanaka, Y., Yannoutsos, N., Larsen, L., & Kioussis, D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5096–5100.
  - 47) Ebihara, S., Endo, S., Ito, K., Ito, Y., Akiyama, K., Obinata, M., & Takai, T. (2004) *J. Biochem.*, 136, 321–328.
  - 48) Kanehira, M., Kaifu, T., Maya, K., Kaji, M., Nakamura, A., Obinata, M., & Takai, T. (2006) *J. Biochem.*, 140, 21
  - 49) Iizuka, S., Kaifu, T., Nakamura, A., Obinata, M., & Takai, T. (2006) *J. Biochem.*, 140, 255–265.
  - 50) Hasegawa, K., Arakawa, E., Oda, S., Yanai, N., Obinata, M., & Matsuda, Y. (1997) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 29, 2177–2186.
  - 51) Matsuo, M., Koizumi, K., Yamada, S., Tomi, M., Takahashi, R., Ueda, M., Terasaki, T., Obinata, M., Hosoya, K., Ohtani, O., & Saiki, I. (2006) *Cell Tissue Res.*, 326, 749–758.
  - 52) Mataga, N., Tamura, M., Yanai, N., Shinomura, T., Kimata, K., Obinata, M., & Noda, M. (1996) *J. Bone Miner. Res.*, 11, 1646–1654.
  - 53) Kitaoka, E., Satomura, K., Hayashi, E., Yamanouchi, K., Tobiume, S., Kume, K., Obinata, M., & Nagayama, M. (2001) *J. Cell. Biochem.*, 81, 571–582.
  - 54) Salincarnboriboon, R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Obinata, M., Amagasa, T., Nifuji, A., & Noda, M. (2003) *Exp. Cell Res.*, 287, 289–300.
  - 55) Saito, Y., Yoshizawa, T., Takizawa, F., Ikegame, M., Ishibashi, O., Okuda, K., Hara, K., Ishibashi, K., Obinata, M., & Kawashima, H. (2002) *J. Cell Sci.*, 115, 4191–4200.
  - 56) Hatakeyama, S., Ohara-Nemoto, Y., Yanai, N., Obinata, M., Hayashi, S., & Satoh, M. (2001) *J. Oral Pathol. Med.*, 30, 296–304.
  - 57) Sugiyama, N., Tabuchi, Y., Horiuchi, T., Obinata, M., & Furusawa, M. (1993) *Exp. Cell Res.*, 209, 382–387.
  - 58) Tabuchi, Y., Arai, Y., Shioya, H., Kuribayashi, R., Ishibashi, K., Sugiyama, N., Obinata, M., Takeguchi, N., & Asano, S. (2003) *Digestion*, 67, 71–81.
  - 59) Tabuchi, Y., Arai, Y., Ohta, S., Shioya, H., Takahashi, R., Ueda, M., Takeguchi, N., Asano, S., & Obinata, M. (2002) *Cell Struct. Funct.*, 27, 71–79.
  - 60) Tabuchi, Y., Ohta, S., Arai, Y., Kawahara, M., Ishibashi, K., Sugiyama, N., Horiuchi, T., Furusawa, M., Obinata, M., Fuse, H., Takeguchi, N., & Asano, S. (2000) *Cell Struct. Funct.*, 25, 297–307.
  - 61) Hosoya, K., Tomi, M., Takayama, M., Komokata, Y., Nakai, D., Tokui, T., Nishimura, K., Ueda, M., Obinata, M., Hori, S., Ohtsuki, S., Amidon, G.L., & Terasaki, T. (2004) *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 19, 264–269.
  - 62) Takeuchi, K., Yanai, N., Takahashi, N., Abe, T., Tsutsumi, E., Obinata, M., & Abe, K. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202, 680–687.
  - 63) Sekine, T., Hosoyamada, M., Haga-Mizuno, A., Takeda, M., Suzuki, M., Obinata, M., & Endou, H. (1994) *Contrib. Nephrol.*, 110, 98–102.
  - 64) Takeda, M., Hosoyamada, M., Shirato, I., Obinata, M., Suzuki, M., & Endou, H. (1995) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 37, 507–515.
  - 65) Hosoyamada, M., Obinata, M., & Endou, H. (1996) *Arch. Toxicol.*, 70, 284–292.
  - 66) Yasuoka, Y., Kawada, H., Suzuki, Y., Sato, M., Endou, H., Obinata, M., & Kawahara, K. (2005) *Jpn. J. Physiol.*, 55, 365–372.
  - 67) Ohta, S., Tabuchi, Y., Yanai, N., Asano, S., Fuse, H., & Obinata, M. (2002) *Arch. Androl.*, 348, 43–51.
  - 68) Tabuchi, Y., Ohta, S., Kondo, T., Yanai, N., Obinata, M., Fuse, H., & Asano, S. (2002) *J. Urol.*, 167, 1538–1545.
  - 69) Tabuchi, Y., Takahashi, R., Ueda, M., & Obinata, M. (2003) *Cell Struct. Funct.*, 28, 87–95.
  - 70) Kuwahara, S., Ikei, A., Taguchi, Y., Tabuchi, Y., Fujimoto, N., Obinata, M., Uesugi, S., & Kurihara, Y. (2006) *Biol. Reprod.*, 75, 352–359.
  - 71) Araki, Y., Suzuki, K., Matusik, R.J., Obinata, M., & Orgebin-Crist, M.C. (2002) *J. Androl.*, 23, 854–869.
  - 72) Hosoya, K., Tetsuka, K., Nagase, K., Tomi, M., Saeki, S., Ohtsuki, S., Takanaga, H., Yanai, N., Obinata, M., Kikuchi, A., Okano, T., & Terasaki, T. (2000) *AAPS PharmSci.*, E27.
  - 73) Hosoya, K.I., Takashima, T., Tetsuka, K., Nagura, T., Ohtsuki, S., Takanaga, H., Ueda, M., Yanai, N., Obinata, M., & Terasaki, T. (2000) *J. Drug Target.*, 8, 357–370.
  - 74) Asashima, T., Iizasa, H., Terasaki, T., Hosoya, K., Tetsuka, K., Ueda, M., Obinata, M., & Nakashima, E. (2002) *Eur. J. Cell Biol.*, 81, 145–152.
  - 75) Kitazawa, T., Hosoya, K., Watanabe, M., Takashima, T., Ohtsuki, S., Takanaga, H., Ueda, M., Yanai, N., Obinata, M., & Terasaki, T. (2001) *Pharm. Res.*, 18, 16–22.
  - 76) Hosoya, K., Tomi, M., Ohtsuki, S., Takanaga, H., Ueda, M., Yanai, N., Obinata, M., & Terasaki, T. (2001) *Exp. Eye Res.*, 72, 163–172.
  - 77) Kondo, T., Hosoya, K., Hori, S., Tomi, M., Ohtsuki, S., Takanaga, H., Nakashima, E., Iizasa, H., Asashima, T., Ueda, M., Obinata, M., & Terasaki, T. (2003) *Cell Struct. Funct.*, 28, 145–153.
  - 78) Tomi, M., Funaki, T., Abukawa, H., Katayama, K., Kondo, T., Ohtsuki, S., Ueda, M., Obinata, M., Terasaki, T., & Hosoya, K. (2003) *Glia*, 43, 208–217.
  - 79) Kitano, T., Iizasa, H., Terasaki, T., Asashima, T., Matsunaga, N., Utoguchi, N., Watanabe, Y., Obinata, M., Ueda, M., & Nakashima, E. (2002) *J. Cell Physiol.*, 193, 208–218.
  - 80) Matsushita, T., Amagai, Y., Terai, K., Kojima, T., Obinata, M., & Hashimoto, S. (2006) *Neuroscience*, 140, 849–856.
  - 81) Matsushita, T., Amagai, Y., Soga, T., Terai, K., Obinata, M., & Hashimoto, S. (2005) *Neuroscience*, 136, 115–121.
  - 82) Kawaguchi, S., Shinozaki, A., Obinata, M., Saigo, K., Sakaki, Y., & Tei, H. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355, 555–561.