

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		NAGAMUNE TERUYUKI					
①研究代表者氏名		長棟 輝行			②所属研究機関・部局・職		東京大学・大学院工学系研究科・教授
③研究課題名	和文	プロテインチップ用抗体 Fv 迅速選択・生産技術の開発					
	英文	Development of rapid screening and production technique of antibody Fv for protein chip					
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計	
	36,800	26,900	9,000	9,000	9,100	90,800	
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
長棟 輝行	東京大学・大学院工学系研究科・教授	生物工学	研究の総括				
上田 宏	東京大学・大学院工学系研究科・助教授	抗体工学	ライブラリー作製とポジティブ選択法の確立				
新海 政重	東京大学大学院工学系研究科・講師	生体工学	抗体可変領域の分泌生産系の構築				
河原 正浩	東京大学・大学院工学系研究科・助手	細胞工学	抗原結合活性と増殖活性とが相関するような新規キメラ受容体発現系の構築				
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>本研究の目的は、新規な動物細胞膜提示型抗体可変領域 Fv-受容体キメラのライブラリーを作製し、目的蛋白質と結合する Fv-受容体キメラを膜に提示している細胞だけが細胞内に増殖シグナルを伝達して増殖できるが、それ以外の細胞は死滅するような系を構築し、目的蛋白質に対する抗体 Fv を膜提示している細胞だけを短時間にポジティブスクリーニングできる系を開発することである。このような系を構築することができれば、各種の Fv-受容体キメラのライブラリーを膜に提示している細胞群に目的蛋白質を添加して培養し、そこで増殖してくる細胞を選択するだけで目的蛋白質に対して特異的に結合する抗体 Fv を発現する細胞を取得することができ、数多くの蛋白質に対して特異的に結合する抗体 Fv をハイスループットに作製する技術を確立することが可能となる。このような抗体 Fv の高速スクリーニング技術は、ヒト由来の蛋白質のみならず、農薬や環境ホルモンなどの小分子単価抗原や多価抗原など種々の抗原に対する抗体を培養細胞系で取得することができる極めて汎用性の高い技術であるため、従来の動物を免疫する伝統的な抗体作製方法に代わる、迅速簡便な作製方法となることが期待される。</p>							

⑦研究成果の概要（研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。）

まず、抗体/受容体キメラの分子構築とその発現・選択系の構築を行った。エリスロポエチン受容体のリガンド認識部位を抗ニワトリ卵白リゾチーム(HEL)抗体HyHEL-10の可変領域V_H、V_Lで置換したキメラ受容体HE、LEと、その細胞内ドメインをIL-6受容体のシグナル伝達サブユニットであるgp130で置換したキメラ受容体Hg、Lgを作製した。これらのキメラ受容体の組み合わせを発現レトロウイルスベクターを作製し、IL-3依存性pro-B細胞株Ba/F3細胞に導入し、IL-3を除いてHELを添加して直接選択した結果、キメラ受容体発現細胞を選択的に増幅することに成功した。また、HgのV_H部分を抗フルオレセイン(FI)一本鎖抗体31IJ3で置換したキメラ受容体も作製し、FI標識BSA(BSA-FI)またはFIダイマーに応答して導入細胞を選択することに成功した。以上のことから、V_H/V_L型およびScFv型2つのキメラ受容体が、それぞれ抗原との結合により細胞膜上で複合体を形成し、その結果細胞内ドメインが近接して増殖シグナルが伝達され、キメラ受容体発現細胞が増殖するという選択系の構築に成功した。

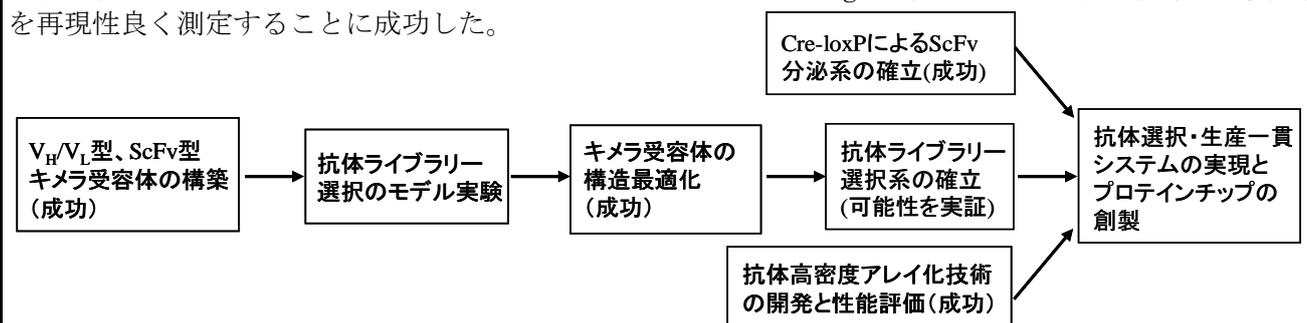
そこで、キメラ受容体の組み合わせとしては最もクリアなHEL依存性が見られたHg+LEの組み合わせをベースとして用い、抗体選択システムとしての有効性を検証した。まず、Hgの発現ベクターpMX-Hgをもとに、V_Hの抗原認識部分の4アミノ酸(Y53, S54, S56, Y58)をランダムに他のアミノ酸に置換した発現ベクター(pMX-mHg)を作製し、LEをあらかじめBa/F3細胞に導入し発現させた細胞(Ba/LE)へ導入した(Ba/LE+mHg)。この細胞を選択した結果、得られたクローンを解析したところ、HEL依存的に増殖シグナルが抑制されるクローンが得られ、そのクローンからゲノムPCRで回収した変異V_Hは野生型V_Hとほぼ同等のHELへの結合活性を示した。以上より、抗原結合活性が増殖抑制活性に相関する形となったが、キメラ受容体を用いて抗体ライブラリーから抗原結合性の抗体断片を得る系の構築に成功した。

しかし、実際にライブラリー選択を行う際には、抗原がキメラ受容体へ結合したときのみ増殖シグナルが伝達されることが望ましい。このようなキメラ受容体を作製するために、FI応答性キメラ受容体をベースとして、EpoR細胞外ドメインの追加・除去やコンフォメーションを変化させる変異を導入した結果、gp130の細胞外ドメインを直接抗FI抗体ScFvで置換したキメラ受容体(ScFv-gp130)が、抗原であるBSA-FIの有無によって増殖シグナルのON/OFFが最も明確となることが分かった。

そこでこの厳格な抗原依存性を示したキメラ受容体のScFv部分をライブラリー化し、目的抗原結合性抗体断片のスクリーニング系の構築を試みた。具体的には抗原として家族性の筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子であるSOD(superoxide dismutase)を選び、マウスに免疫して脾臓細胞ライブラリーを得て、PCR法を用いてV_H部分を増幅してファージミドに組み込み、数回のパニング操作を行った後、キメラ受容体発現ベクターのScFv部分を置換する形で組み込んだ(V_H-gp130 library)。このライブラリーをBa/F3細胞に導入し、抗原であるSODを加えて選択培養を続けたところ、増殖したクローンが得られた。これらを回収して増殖アッセイを行った結果、SOD濃度に応答して増殖が促進もしくは抑制されるような細胞が存在した。このことから、これらのキメラ受容体のV_H部分は抗原SODに結合していることが示唆され、ライブラリーから目的抗原結合性抗体断片がスクリーニングできる可能性が示唆された。

また、キメラ受容体の受容体部分の前後にloxP配列を組み込み、抗原選択後にCreを発現させることで、選択された目的抗原結合性抗体をもつキメラ受容体発現細胞を抗体分泌細胞に変換する系の構築にも成功した。この系では抗体にC末端にSer/Thrを含むloxP由来配列を持たせ、糖鎖修飾によると思われる分子量の顕著な増大が観察されたことから、動物細胞を用いた糖鎖修飾抗体断片の迅速な作製法として有用であると考えられる。

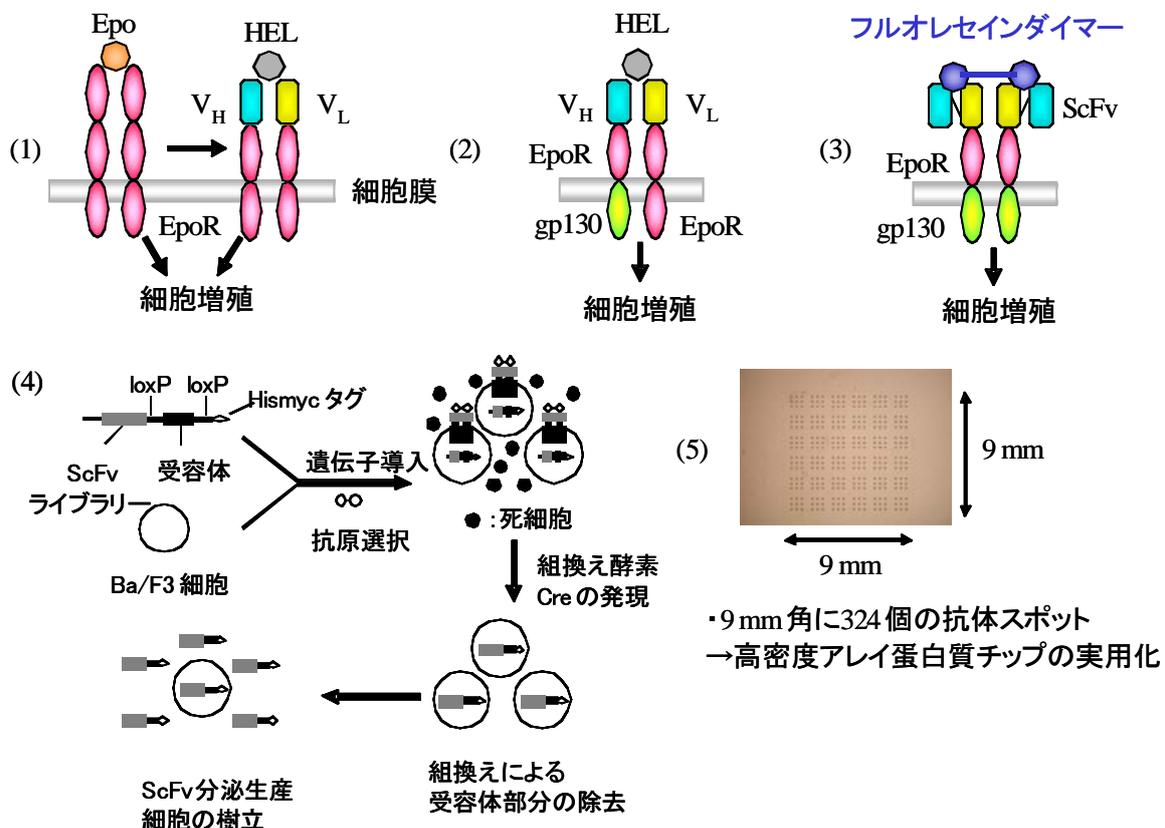
さらに、上記のScFv選択技術を利用して、将来的にはこれらのScFvを基板上に高密度に固定化し、蛋白質の発現プロファイルを免疫測定法によりハイスループットに検出するシステムを構築する予定である。このようなシステムを構築するための予備的検討として、エレクトロスプレー法によってガラス基板上の9mm角の範囲に直径150μm程度の抗体の均一なスポットを324個作製する技術を開発した。このような抗体チップを用いたサンドイッチELISA法により0.1~1ng/ml以上の測定感度で抗原蛋白質濃度を再現性良く測定することに成功した。



⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

サイトカイン受容体のリガンド認識部位を抗体可変領域で置換した例は世界でも類がなく、抗原の添加によってサイトカインと同様なシグナル伝達を行わせたのは本研究が世界で初めてである(下図1)。さらに、天然には存在しないと考えられているEpoRとgp130細胞内ドメインのヘテロダイマー化が効率の良いシグナル伝達を生じることを世界で初めて示した(下図2)。この成果は、サイトカイン受容体のシグナル伝達のクロストークやシグナル伝達機構に新たな知見を与え、学術的にも大変興味深いものといえる。さらに、V_H/V_L型キメラ受容体に続き、ScFv型キメラ受容体の開発にも成功し、リガンドとして大きな抗原であるHELだけではなく、*in vivo*に投与しても免疫原性のない小分子ハプテンであるフルオレセインダイマーも用いることが可能となり、*in vivo*での遺伝子導入細胞の選択システムとして医学的な応用への可能性を広げることができた(下図3)。また、抗HEL抗体V_H/V_L、および抗SOD抗体V_Hをライブラリーからスクリーニングできることを示したことから、抗体断片の選択法としての利用可能性を実証した。ここで、抗体断片の選択法として、動物細胞の増殖活性を指標とした選択を行った例は世界でも類はなく、極めて独創的であり、本プロジェクトにとっても大きな進展である。また、抗原が結合したときのみ増殖シグナルが伝達されるキメラ受容体の構築を目指して研究を行った結果、受容体のコンフォメーションが増殖活性に大きな影響を与えることが示唆され、受容体のシグナル伝達機構の解明にも一石を投じたと言える。また、選択後にCre-loxPシステムを用いて抗体分泌細胞に変換する技術は極めて独創的であり、動物細胞を用いた糖鎖修飾抗体断片の選択・生産一貫システムとして本法は新規性・有用性ともに高い。(下図4)。

また、エレクトロスプレー法によって抗体のスポットを抗原結合能を維持したまま、基板に高密度(9mm角に324個)に集積し、ELISA法により高感度に抗原濃度を測定することに成功した。この成果は、現在世界的に激しい開発競争が繰り広げられている蛋白質チップの実用化に先鞭をつけたものと言える(下図5)。



⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

【学術論文】

1. Yamada, H., Kunisato, A., Kawahara, M., Tahimic, C.G.T., Ren, X., Ueda, H., Nagamune, T., Katoh, M., Inoue, T., Nishikawa, M. and Oshimura, M. "Exogenous gene expression and growth regulation of hematopoietic cells via a novel human artificial chromosome" *J. Hum. Genet.* **51**, 147-150, 2006.
2. 上田宏, 河原正浩, 長棟輝行. "細胞表面受容体工学の最近の進歩" *バイオインダストリー* **64(2)**, 18-23, 2006.
3. Kawahara, M., Ogo, Y., Ueda, H., and Nagamune, T. "Improved growth response of antibody/receptor chimera attained by the engineering of transmembrane domain." *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 715-719, 2004.
4. Pihkala, P., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. "An antigen-mediated selection system for mammalian cells that produce glycosylated single-chain Fv." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 1165-1172, 2004.
5. Kawahara, M., Ishii, S., Tsumoto, K., Kumagai, I., Ueda, H., and Nagamune, T. "Reversal of antigen-dependent signaling by two mutations in antibody/receptor chimera: implication of inverse agonism in cytokine receptor superfamily." *Biochem. Pharmacol.* **68**, 539-548, 2004.
6. Kawahara, M., Kimura, H., Ueda, H., and Nagamune, T. "Selection of genetically modified cell population using hapten-specific antibody/receptor chimera." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 132-138, 2004.
7. Kawahara, M., Ueda, H., Tsumoto, K., Kumagai, I., and Nagamune, T. "AMEGA: antigen-mediated genetically modified cell amplification." *J. Immunol. Methods* **284**, 187-194, 2004.
8. Kimura, H., Kawahara, M., Tomlinson, I.M., Ueda, H., and Nagamune, T. "Cell proliferation switch responsive to fluorescein dimer." *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (Yagasaki, K., Ed.), 13., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 335-339, 2004.
9. Kaneko, E., Kawahara, M., Tsumoto, K., Kumagai, I., Ueda, H., and Nagamune, T. "Antigen-mediated genetically modified cell amplification (AMEGA) with single vector transduction." *J. Chem. Eng. Jpn.* **37**, 1259-1264, 2004.
10. 河原正浩, 上田宏, 長棟輝行. "抗体-受容体キメラによる遺伝子導入細胞のポジティブ選択法" *実験医学* **22**, 871-875, 2004.
11. 河原正浩, 上田宏, 長棟輝行. "キメラ受容体を用いた抗体産生細胞の安価な増殖促進" *バイオインダストリー* **21(11)**, 63-68, 2004.
12. Kawahara, M., Ueda, H., Morita, S., Tsumoto, K., Kumagai, I. and Nagamune, T. "Bypassing antibiotic selection: positive screening of genetically modified cells with an antigen-dependent proliferation switch." *Nucleic Acids Res.* **31**, e32, 2003.
13. 河原正浩, 上田宏, 長棟輝行. "抗体を用いた受容体のエンジニアリング-効果的な細胞医療を目指して-" *バイオインダストリー*, **20(7)**, 23-33, 2003.
14. Lee, B., Kim, J., Ishimoto, K., Yamagata, Y., Tanioka, A. and Nagamune, T. "Fabrication of protein microarrays for immunoassay using the electrospray deposition (ESD) method." *J. Chem. Eng. Jpn.*, **36**, 1370-1375, 2003.
15. Kawahara, M., Ueda, H., Tsumoto, K., Kumagai, I., Mahoney, W. and Nagamune, T. "Selection of highly productive mammalian cells based on an inducible growth advantage using an antibody/receptor chimera." *J. Biosci. Bioeng.* **93**, 399-404, 2002.
16. Kawahara, M., Ueda, H., Tsumoto, K., Kumagai, I., Mahoney, W. and Nagamune, T. "Antigen-mediated genetically modified cell amplification" *ACS SYMPOSIUM SERIES 830 (Biological System Engineering)*, 140-152, 2002.
17. Kawahara, M., Ueda, H., Tsumoto, K., Kumagai, I., Mahoney, W., and Nagamune, T. "A growth signal with an artificially induced erythropoietin receptor-gp130 cytoplasmic domain heterodimer" *J. Biochem.* **130**, 305-312, 2001.
18. Kawahara, M., Natsume, A., Terada, S., Kato, K., Tsumoto, K., Kumagai, I., Miki, M., Mahoney, W., Ueda, H., and Nagamune, T. "Replacing factor dependency with that for lysozyme: Affordable culture of IL-6 dependent hybridoma by transfecting artificial cell surface receptor." *Biotechnol. Bioeng.* **74**, 416-423, 2001.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

19. 河原正浩、上田 宏、長棟輝行 "無血清・低血清培地で増殖する動物細胞の創出" バイオサイエンスとインダストリー, **59**, 35-36, 2001.

【国際会議】

1. Masahiro Kawahara, Akito Natsume, Yuko Ogo, Kouhei Tsumoto, Izumi Kumagai, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune "Design of Antibody/cytokine Receptor Chimera for Affordable Culture of Mammalian Cells.", APBioChEC2005, Jeju Island (Korea), May 15-19, 2005.
2. Takahiro Sogo, Masahiro Kawahara, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune "Selective expansion of genetically modified T cells using a chimeric IL-2 receptor.", APBioChEC2005, Jeju Island (Korea), May 15-19, 2005.
3. Wenhai Liu, Masahiro Kawahara, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune "Construction of a fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency", China/USA/Japan Joint Chemical Engineering Conference, Beijing (China), Oct 11-13, 2005.
4. Masahiro Kawahara, Päivi Pihkala, Hiroshi Ueda, and Teruyuki Nagamune "Direct antibody selection and secretion system in mammalian cells using chimeric receptors.", YABEC 2004, Osaka (Japan), Sep 23-25, 2004.
5. Masahiro Kawahara, Hiroko Kimura, Kouhei Tsumoto, Izumi Kumagai, Hiroshi Ueda, and Teruyuki Nagamune "Positive screening of genetically modified cells with an antigen-dependent proliferation switch" 12th International Congress of Immunology, Montreal (Canada), July 18-23, 2004.
6. Masahiro Kawahara, Shinya Ishii, Kouhei Tsumoto, Izumi Kumagai, Hiroshi Ueda, and Teruyuki Nagamune "Screening of antibody library based on growth activity of mammalian cells.", YABEC 2003, Jeju Island (Korea), Nov 13-15, 2003.
7. Masahiro Kawahara, Hiroko Kimura, Ian M. Tomlinson, Hiroshi Ueda, and Teruyuki Nagamune "A fluorescein dimer-dependent proliferation switch for genetically modified cell amplification.", Biochemical Engineering (XIII) 2003, Boulder (USA), Jul 19-23, 2003.
8. Masahiro Kawahara, Hiroko Kimura, Ian M. Tomlinson, Hiroshi Ueda, and Teruyuki Nagamune "Controlling cell growth with a fluorescein dimer.", YABEC2002, Taipei (Taiwan), Nov 10-12, 2002.
9. Masahiro Kawahara, Hiroshi Ueda, Kouhei Tsumoto, Izumi Kumagai, Walt Mahoney, and Teruyuki Nagamune "Mimicry of cytokine receptor activation with antigen-induced enforcement of VH-VL interaction.", IBC's 12th Annual International Conference (Antibody Engineering), San Diego (USA), Dec 2-6, 2001.
10. Masahiro Kawahara, Akito Natsume, Satoshi Terada, Kouhei Tsumoto, Izumi Kumagai, Masao Miki, Walt Mahoney, Hiroshi Ueda, and Teruyuki Nagamune "A lysozyme-dependent proliferation switch for affordable culture of mammalian cells.", 10th European Congress on Biotechnology, Madrid (Spain), Jul 8-11, 2001.

【国内学会】

1. Masahiro Kawahara, Takahiro Sogo, Kouhei Tsumoto, Izumi Kumagai, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune "AMEGA for T cells: Antigen-mediated genetically modified T cell amplification" 78th Annual Meeting of The Japanese Biochemical Society, Kobe, 2005年10月
2. Wenhai Liu, Masahiro Kawahara, Hiroshi Ueda Teruyuki Nagamune "A fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency", 78th Annual Meeting of The Japanese Biochemical Society, Kobe, 2005年10月
3. Kento Tanaka, Masahiro Kawahara, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune "Development of new chimeric antibody/receptor tyrosine kinases for AMEGA", 78th Annual Meeting of The Japanese Biochemical Society, Kobe, 2005年10月
4. 河原正浩、Päivi Pihkala、上田 宏、長棟輝行 "動物細胞でのScFv選択・生産一貫システム", 第70回日本化学工学会年会、名古屋大学、2005年3月。

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

5. 河原正浩、Päivi Pihkala、上田 宏、長棟輝行 “Selection and subsequent production of antibodies in the same mammalian cells”, 第 77 回日本生化学会年会, パシフィコ横浜, 2004 年 10 月.
6. 河原正浩、上田 宏、長棟輝行 “抗体/サイトカイン受容体キメラによる抗原依存的シグナル伝達”, 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡国際会議場、2003 年 12 月.
7. 十河孝浩、河原正浩、上田 宏、長棟輝行 “キメラIL-2Rを用いた遺伝子導入CTLの選択的増幅法” 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡国際会議場、2003 年 12 月.
8. 木村寛子、河原正浩、上田 宏、長棟輝行 “Fluorescein応答性受容体の創製と機能解析” 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡国際会議場、2003 年 12 月.
9. 金子悦士、河原正浩、上田 宏、長棟輝行 “遺伝子導入樹状前駆細胞の選択的増幅” 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡国際会議場、2003 年 12 月.
10. 河原正浩、木村寛子、金子悦士、上田 宏、長棟輝行 “Genetically modified cell amplification system using cell growth switch responsive to fluorescein dimer”, 第 76 回日本生化学会年会, パシフィコ横浜, 2003 年 10 月.
11. 河原正浩、小郷裕子、津本浩平、熊谷 泉、上田 宏、長棟輝行 “膜貫通部位への変異導入による抗体/受容体キメラの改良”, 第 55 回生物工学会大会、熊本大学、2003 年 9 月.
12. 金子悦士、河原正浩、上田 宏、長棟輝行 “抗体/c-kitキメラによる細胞増殖制御”, 第 55 回生物工学会大会、熊本大学、2003 年 9 月.
13. 河原正浩、石井慎也、津本浩平、熊谷 泉、上田 宏、長棟輝行 “抗体/受容体キメラの創製とその活性化機構”, 第 68 回日本化学工学会年会, 東京大学, 2003 年 3 月.
14. 金子悦士、河原正浩、上田 宏、長棟輝行 “抗体/c-kitキメラによる遺伝子導入細胞の選択的増幅” 第 68 回日本化学工学会年会, 東京大学, 2003 年 3 月.
15. 木村寛子、河原正浩、Ian Tomlinson、上田 宏、長棟輝行 “フルオレセイン応答性キメラ受容体の開発” 第 68 回日本化学工学会年会, 東京大学, 2003 年 3 月.
16. 河原正浩、木村寛子、上田 宏、長棟輝行 “抗体-受容体ハイブリッド分子を用いた遺伝子導入細胞の選択的増幅システム”, 第 2 回日本再生医療学会総会, ポートピア神戸, 2003 年 3 月.
17. 河原正浩、木村寛子、津本浩平、熊谷 泉、上田 宏、長棟輝行 “抗原添加による遺伝子導入細胞の選択的増幅法(AMEGA)”, 第 5 回生命化学研究会シンポジウム, 宇治, 2003 年 1 月.
18. 河原正浩、上田 宏、津本浩平、熊谷 泉、Walt Mahoney、長棟輝行 “遺伝子導入細胞に増殖優位性を与える新規選択法の開発”, 第 75 回日本生化学会年会, 京都国際会館, 2002 年 10 月.
19. 木村寛子、河原正浩、Ian Tomlinson、上田 宏、長棟輝行 “フルオレセイン応答性増殖スイッチの創製”, 第 54 回日本生物工学会年会, 大阪, 2002 年 10 月.
20. 河原正浩、上田 宏、津本浩平、熊谷 泉、Walt Mahoney、長棟輝行 “抗体/受容体キメラを用いた目的遺伝子導入細胞の選択的増幅法.”, 第 67 回化学工学会年会, 福岡工業大学, 2002 年 3 月.
21. 石井慎也、河原正浩、津本浩平、熊谷泉、上田宏、長棟輝行 “キメラ受容体を用いた抗体可変領域のライブラリー選択”, 第 67 回化学工学会年会, 福岡工業大学, 2002 年 3 月.
22. Päivi Pihkala, Masahiro Kawahara, Kouhei Tsumoto, Izumi Kumagai, Walt Mahoney, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune “High-affinity VH selection and production system using antibody/receptor chimera”, 第 67 回化学工学会年会, 福岡工業大学, 2002 年 3 月.
23. 河原正浩、上田 宏、津本浩平、熊谷 泉、Walt Mahoney、長棟輝行 “リゾチーム応答性増殖スイッチを用いた遺伝子導入細胞の選択的増幅法.”, 第 66 回化学工学会年会, 広島大学, 2001 年 4 月.

【特許】

・発明者：長棟輝行、河原正浩、上田 宏、新海政重、出願人：長棟輝行 “キメラ受容体を有する動物細胞とその利用”, 公開日：平成 16 年 4 月 15 日, 出願番号：特開 2004-113062