

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発に関する研究

平成14年度～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 沖田 極

平成17(2005)年3月

目 次

I. 総合研究報告

自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の基礎と臨床 _____ 1

沖田 極

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ 10

III. 研究成果の刊行物・別刷 _____ 13

研究要旨 我々はより多くの肝不全患者を救命するために、生体肝移植前に行うブリッジ的な治療法として『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の臨床開発を進めたいと考え研究を行ってきた。（自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法）の臨床応用を進める基盤モデルとして骨髄細胞から肝細胞への分化評価モデル(GFP/CC14 モデル)の開発をし、骨髄細胞が持続的肝障害の肝硬変時に肝臓に遊走され肝細胞へ分化・増殖することを明らかにした (JB 2003、特公 2003-70377)。さらにこのモデルの解析を通じ、骨髄細胞移植により生存率の回復、また肝線維化の改善を発見した (Hepatology 2004、この発見はWiley社よりHepatology News Alert記事として世界に発信された)。さらに骨髄細胞を用いた再生療法をより効果的に行うための骨髄細胞の肝細胞への分子制御機構をMicro array-Self Organization Map (SOM)解析法にて解析した (FEBS letters 2004、生データは<http://liver-project.med.yamaguchi-u.ac.jp/research>のサイトでホームページにて公開している。)。また胎児肝特異的なモノクローナル抗体の作製とスクリーニングにより、肝芽細胞を特異的に認識するLiv2抗体を得ることに成功した。また肝臓再生療法開発のための基盤研究として、肝発生の肝幹細胞である肝芽細胞の同定法の開発と、肝芽細胞の生存維持および分化誘導機構の解明を行ってきた。Liv2抗体をツールとして、我々が作出した肝形成不全となるストレスキナーゼSEK1およびMKK7ノックアウトマウスを解析し、“肝芽細胞の生死の制御は、増殖シグナルであるSAPK/JNK系と生存シグナルであるNFκB系、細胞死誘導シグナルであるカスパーゼ系の3者のバランスによって制御される”という概念を提示した。さらに肝臓の発生や肝臓の機能に関わる遺伝子を明らかにする目的で、メダカを用いた大規模スクリーニングを行なった。その結果、肝形成および肝機能に異常のある興味深い変異メダカ13種類を得ることに成功した。これらの中にはヒト疾患モデルとして利用可能なものも存在した。これら得られた発生の肝幹細胞の特性の解明は、既に進行中の成体に存在する骨髄細胞の肝再生への応用の理論的根拠に貢献している。また我々の開発したLiv8抗体は骨髄中の肝再生に有効な分画の分離に有効であることが明らかになった (BBRC 2004)。今後は抗原同定を進め抗体を作ることで、効果的な再生療法の臨床開発が期待できることが明らかになった。

これらの基礎研究成果を基盤に約2年の月日をかけ臨床研究の準備を進め平成15年11月14日に国内初の（自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法）のPhase I 臨床研究を開始した。臨床研究の対象は（75歳以下、非代償性肝硬変症、ビリルビンの値は3mg/dl以下、血小板5万以上、肝臓はコントロールされていること、また心肺機能正常）が基本的な適応である。実際のプロトコールは、全身麻酔下にて、自己骨髄細胞を400ml分離し末梢静脈より投与する。採取した骨髄液は濃縮器セルプロセッサ-Cytomateを使用し骨髄細胞を濃縮・洗浄し、患者の静脈より投与し、その後血液検査、画像検査等により肝臓機能の改善について評価する。この臨床研究の開始はNHK等の報道機関にて報道され、多くの肝不全患者から期待されている。現在までに8例の患者に施行し副作用の発生はない。また肝臓機能について長期に経過観察した6症例についての解析をしたところ、（術前、1ヶ月、6ヶ月のEnd Pointでの評価では、平均値で血清アルブミン値は15.2%（1ヶ月後）、および8.7%（6ヶ月後）上昇、血小板値は19.8%、および18.9%上昇、また肝線維化の評価として血清プロコラーゲンIII型ペプチド値は9%および12.3%減少と肝線維化の改善傾向を確認した。また骨髄細胞投与1ヶ月後の肝生検組織において肝再生マーカー蛋白の発現により肝再生も誘導されたと考えられた。この結果は、肝移植以外に有効な治療法がない肝不全患者に対し、自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の有効性を示し、また安全性が確認された。これらのトランスレーショナル研究をさらに基盤とし、さらに効果のある次世代の肝臓再生療法を確立していきたいと考えている。

分担研究者氏名・所属機関および所属機関における職名
 坂井田 功（山口大学医学部消化器病態内科学助教授）
 山崎 隆弘（山口大学医学部附属病院第一内科助手）
 寺井 崇二（山口大学医学部消化器病態内科学助手）
 仁科 博史（東京医科歯科大学難治疾患研究所 発生再生生物学分野・教授）

細胞から肝細胞への分化転換について評価した。またトランスレーショナル研究の一環として、基礎研究を基盤にし、臨床研究『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』のPhase I 臨床研究を行うべく準備を行い実際の臨床研究を開始した。さらに将来の効果的な再生療法の開発のため胎児期に存在する増殖能と分化能を有する肝幹細胞である肝芽細胞の生死を制御する細胞内シグナル伝達系の解明と肝臓の発生や再生に関わる分子の同定を目的とし研究を行った。

A. 研究目的

C型肝炎の蔓延とともに近年肝疾患が増加している。それとともに肝不全（肝硬変、肝癌、劇症肝炎）患者が増加している。現在肝不全患者に対しては日本においては生体肝移植が行われているが、手術侵襲の問題、ドナーの問題などまだまだ障害が多い。また今後高齢者を対象とした医療を行うには、より侵襲の少ない移植にかわる次世代の再生医療技術の開発が急務である。最近になり、人剖検例にて骨髄中に存在する細胞が肝細胞へ分化転換したことが報告された。また肝臓は胎児期において2次造血の場であるなど、その骨髄細胞から肝細胞への分化の可塑性は存在すると考えられる。我々はその機序を解明し、さらに実際に人の治療に応用するために、新たに骨髄細胞から肝細胞への分化転換についてその分化転換の機序を解明するために、GFP/CC14 modelを開発し骨髄

B. 研究方法

基礎研究
 ※GFP/CC14モデル（骨髄細胞の肝細胞への分化評価モデル）を開発しこのモデルを用いて基礎的検討を行った。
 肝硬変マウスに対する骨髄細胞投与による肝機能の回復、肝線維化の改善、生存率の改善効果について検討した。
 ※骨髄細胞の肝細胞への分化に関与する遺伝子群の解析
 GFP/CC14モデルの解析を通じて、骨髄由来細胞の肝細胞への分化過程に関与する遺伝子群を、Micro array-Self Organization Map (SOM)解析を用い骨髄細胞の投与により誘導された遺伝子群の抽出を目指した。
 ※骨髄細胞の肝細胞への分化に関与する細胞外マトリックスの解析と肝線維化改善効果に対する解析

骨髄細胞の投与により、肝線維化の改善が認められたことより、この機序についてさらに解析した。実際にMMP9等のコラゲナーゼの発現が増加していたことより In situ zymography を行いMMP9の活性を評価し、肝線維化改善のメカニズムについて評価した。

※胎児肝特異抗体、また骨髄中の肝幹細胞分画を精製する抗体の開発

胎生期11.5日のマウス肝を抗原にして複数のモノクローナル抗体を作製した。既に作製済みの10種類以上の胎児肝を認識するモノクローナル抗体のうち、肝芽細胞を特異的に認識する抗Liv2抗体と血液幹細胞を含む細胞を認識する抗Liv8抗体を開発した。特にLiv8抗体については、細胞表面蛋白を認識する抗体で、細胞の sorting に使えることより骨髄中の肝幹細胞の同定に使用できる抗体になりえるかを評価した。

※マウス肝芽細胞特異抗体の作製を行ない、肝形成不全ノックアウトマウスの解析を行なった。また、ヒト疾患モデル生物として期待されているメダカを用いて、肝形成および肝機能不全メダカを単離した。

臨床研究

臨床研究の対象は(75歳以下、非代償性肝硬変症、ビリルビンの値は3mg/dl以下、肝臓はコントロールされていること、また心肺機能正常)が基本的な適応である。実際のプロトコールは、全身麻酔下にて、自己骨髄細胞を400ml分離し末梢静脈より投与する。採取した骨髄液は濃縮器セルプロセッサーCytomateを使用し骨髄細胞を濃縮・洗浄し、患者の静脈より投与する。その後、経時的に血液検査を施行し、肝再生についてモニターしていく。また画像的にも腹部エコー、CT検査等にて、肝再生の促進の有無について評価する。First Endpointは1ヶ月後、Second Endpointは6ヶ月後の肝機能に対する改善について評価した。腹水の状況次第であるが、可能であれば、患者の同意の上、エコー下肝生検を行い肝臓の状態について、組織学的検討をしていく。その際にAFP、c-kit、HNF4、CD34、CD45、HIM抗体を用い免疫染色を行い、実際に骨髄細胞投与により肝再生が誘導されるかを評価する。肝線維化の改善の有無については、血清ヒアルロン酸、4型コラーゲン、3型プロコラーゲンペプチドを測定し評価した。

(倫理面への配慮)

山口大学動物委員会の承認の下、実験動物取り扱いプロトコールに従い実験は行われた。また分担者の仁科の研究については東京医科歯科大学および東京大学動物委員会の承認の下、実験動物取り扱いプロトコールに従い実験は行われた。また実際の自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法は、ドナー細胞として自己骨髄細胞を使用する。また分離した骨髄細胞には分離後遺伝子操作、サイトカイン等は加えない。このため自己血輸血とほぼ同様の安全性で行えると考える。すでに我々は自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の臨床研究について、山口大学医学部生命倫理委員会にプロトコールを申請し臨床研究の承認を受け、また臨床研究に参加希望の患者さんに対しては、基本的にはPhaseIの安全性試験であるということ十分に本人、患者家族に説明の上インフォームドコンセントを取得のちに行なった。

C. 研究結果

I: 基礎研究の結果

自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の臨床応用を進める基盤モデルとして骨髄細胞から肝細胞への分化評価モデル(GFP/CC14モデル)を開発し、骨髄細胞が持続的肝障害の肝硬変時に肝臓に遊走され肝細胞へ分化・増殖することを明

らかにした(JB 2003、特公2003-70377)。さらにこのモデルの解析を通じ、骨髄細胞移植により生存率の回復、また肝線維化の改善を発見した(Hepatology 2004、この発見はWiley社よりHepatology News Alert記事として世界に発信された)。さらに骨髄細胞を用いた再生療法をより効率的に行うための骨髄細胞の肝細胞への分子制御機構をMicro array-Self Organization Map(SOM)解析法にて解析した(FEBS letters 2004、生データーは<http://liver-project.med.yamaguchi-u.ac.jp/research>のサイトでホームページにて公開している)。その結果、骨髄細胞の肝細胞への分化は初期には形態形成に関与するHOX、HLH型転写制御分子が関与し、後期においては肝細胞の代謝に関与する分子が誘導されていた。また我々の開発したLiv8抗体は骨髄中の肝再生に有効な分画の分離に有効であることが明らかになった(BBRC 2004)。Liv8抗体については、今後は抗原同定を進め人抗体を作ることで、効率的な再生療法の臨床開発が期待できる。また肝芽細胞の増殖には、ストレス応答性SAPK/JNKシグナル伝達系が必須の役割を果たしていることが明らかになり、“肝芽細胞の生死の制御は、増殖シグナルであるSAPK/JNK系と生存シグナルであるNFκB系、細胞死誘導シグナルであるカスパーゼ系の3者のバランスによって制御される”という概念を提示した。また、メダカを用いた大規模スクリーニングを行ない、興味深い変異メダカ(内胚葉形成に影響のある遺伝子変異4種類、肝形成不全7種類、肝機能不全6種類)の発生を国際誌Mechanisms of Developmentのメダカ特集号に報告した。この中には脂肪肝の表現型を呈する変異メダカも存在し、ヒト疾患モデルとして、また薬剤のスクリーニングの対象としての活用が期待されている。これらの成果から、肝臓の発生や再生を考える重要な分子レベルの知見が得られると考えられる。

II: 臨床研究の結果

平成15年11月14日に国内初の(自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法)のPhaseI臨床研究を開始した。臨床研究の対象は(75歳以下、非代償性肝硬変症、ビリルビンの値は3mg/dl以下、肝臓はコントロールされていること、また心肺機能正常)が基本的な適応である。実際のプロトコールは、全身麻酔下にて、自己骨髄細胞を400ml分離し末梢静脈より投与する。採取した骨髄液は濃縮器セルプロセッサーCytomateを使用し骨髄細胞を濃縮・洗浄し(この方法については2年の歳月をかけた開発した)、患者の静脈より投与する。この研究の開始はNIK等の報道機関にて報道され、多くの肝不全患者から期待されている。現在までに8例の患者に施行し、副作用の発生はない。また肝機能について長期間に経過観察した6症例についての解析をしたところ、(術前、1ヶ月、6ヶ月のEnd Pointでの評価では、平均値で血清アルブミン値は15.2%(1ヶ月後)、および8.7%(6ヶ月後)上昇、血小板値は19.8%、および18.9%上昇、また肝線維化の評価として血清プロコラーゲンIII型ペプチド値は9%および12.3%減少と肝線維化の改善傾向を確認した。また骨髄細胞投与1ヶ月後の肝生検組織において肝再生マーカー蛋白の発現の増加より肝再生も誘導されたと考えられた。

D. 考察

1) 達成度について

当初の目的は概ね達成されたと考えられる。実際に基礎研究成果を基盤にし、本助成の目的である、基礎研究成果の臨床応用推進事業として、世界初の臨床研究：自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法研究が開始することができた。また過去の経験では肝硬変患者から十分量の骨髄細胞がとれるかどうか

も不明であったが、400ml の骨髄液から約 $8.5 \pm 1. \times 10^8$ 個の有核細胞がとれることが新たに明らかになった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について再生医療の理論的根拠は発生や再生の基盤研究に基づいている。GFP/CC14 モデルを通じた基礎研究については、アメリカ肝臓病学会誌に2回ほど我々の発表論文について特別企画として紹介された (Hepatology 39, 4:1143-1146, 2004, Hepatology 41, 1:16-18, 2005, Elsewhere, Editorial、特に骨髄細胞投与により肝線維化改善については Wiley 社より Hepatology News Alert 記事とし世界に発信された)。また論文発表以前の発表としてアメリカ肝臓病学会年会においても Plenary session, Presidential Plenary として口頭発表を行い、この分野に対して国際的にも、大きな影響を与えたと考える。また基礎研究として、発生期の肝幹細胞である肝芽細胞の生死に関わるシグナル機構の解明でき、この情報は再生時の肝細胞のシグナルの理解に繋がると考えられる。また、単離された変異メダカは肝臓の形成や病態に関わる分子の解明につながることから国内外の肝臓研究者から注目を集めており、再生医療への基盤的知見を通して社会的にも意義あると考えられる。臨床研究については、その開始が NIK 等の報道機関で取り上げられ非常に大きな期待の中で臨床研究が開始された。また現在も全国各地から臨床研究参加依頼が山口大学病院にきており、肝不全患者に対する本治療法の開発は今後ますます社会的な意義は大きくなると考える。

3) 今後の展望について

本グラントで開始した臨床研究より、肝移植以外に有効な治療法がない肝不全患者に対し、自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の有効性が示唆され、また安全性が確認された。本治療法は移植とは違い自己細胞を使うため倫理的問題がほとんどない。今後は我々は本治療法の臨床における有効性のエビデンスを明確にし、増加している肝不全患者を救命するため山口大学で施行したプロトコル、技術を多施設で検討する必要があると考えている。また治療法の開発普及のためには、今までの Phase I 臨床研究により開発した基盤技術 (実際のプロトコル) を、他の施設においても施行可能にするようにすることが、全国の肝不全患者によりよい治療法を提供するために不可欠と考えており、旭川医科大学、山形大学、東京医科歯科大学、山口大学と、日本のほぼ全域を網羅するように拠点を選定し多施設にて臨床研究ができる体制を整った。このグループの名は Liver Regeneration with Cell Transplantation (LRCT) Study Group とする。この LRCT にて、『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』の Phase II の臨床研究を開始したいと考えている。この Phase II 臨床研究は多施設研究であり、まず初年度は山口大学で開発したプロトコルを各施設で行えるように技術移転を行い各施設ごとに3症例の施行を目標に臨床研究を進める。一方で、我々が行ってきた基礎研究において、骨髄細胞の間歇投与を行うことがより生存率をあげる結果がでた。このため、山口大学では計画1年目において間歇投与の臨床研究の準備を行い、計画の2年目以降は、山口大学で適応症例をランダム化し、現在のプロトコル通り骨髄細胞を採取し1回投与する群と、頻回投与群 (6ヶ月間で2ヶ月ごとの3回投与群) とに割付け有効性の比較研究を行う。この臨床研究により本治療法の臨床上的エビデンスが明確になり、肝移植前に行う次世代のスタンダードな治療法の開発につながると考える。また骨髄細胞による肝臓再生療法は、山口大学での実際の費用は平均一人あたり約200万の治療費で入院期間も約1ヶ月であり、生体肝移植がドナー、レシピエントを入れ2000万円程度かかるのに比べ低額で侵襲も少ない。また自己骨髄細胞を使うため拒絶の問題がなく安全に施行でき、増加する肝不全患者を、低額でより多く患者を救命する方法の開発につながる。また

我々が開発した骨髄中の肝幹細胞の分離に使える胎児肝モノクローナル抗体 Liv8 抗体の抗原同定を推進し人用抗体の開発ができればより効率的な治療法の開発につながる。また基礎研究として行ってきた肝再生時のシグナル系の解明と肝疾患に関わる分子の同定が行なわれ、現在展開中の自己骨髄を用いた再生療法の改良が期待される。

E. 結論

肝再生療法の開発を念頭においた本基盤研究は着実に進展し、肝発生や肝疾患に関わる分子機構が明らかにされつつある。また実際に、我々は基礎研究を基盤とし、Phase I 臨床研究『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法』を推進してきた。現在までに特に問題となる adverse effect の発生はなく、この治療法は将来、次世代の生体肝移植までブリッジ的に使用可能な治療法になる可能性がある。

F. 研究発表

論文発表

Terai S., Thorgeirsson SS

Human homologue of maid: A dominant inhibitory helix-loop-helix protein associated with liver-specific gene expression. Hepatology;32(2):357-66, 2000

Terai S, Sakaida I, Okita K et al. Development of new regenerative model: transplanted GFP positive bone marrow cell migrated into damaged area and differentiated into hepatocyte. Hepatology 34:4:235A, 2001

Terai S., Yamamoto N., Omori K., Sakaida I., Kiwamu Okita New cell therapy using bone marrow cell to repair damaged liver. J Gastroenterology 37(Suppl XIV), 162-163 (2002).

Shirahashi H, Sakaida I, Terai S, Hironaka K, Kusano N, Okita K. Ubiquitin is a possible new predictive marker for the recurrence of human hepatocellular carcinoma. Liver 2002 Oct;22(5):413-8

Omori K, Terai S, Yamamoto N, Sakaida I, Nishina H, Okita K. Gene expression profile which regulates the differentiation of bone marrow cell into hepatocyte in GFP/CC14 model. Hepatology 36, 199A, 2002

Terai S., Yamamoto N., Omori K., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Sakaida I., Ohata S., Watanabe T., Nishina H., Snorri S. Thorgeirsson, Okita K. The strategy for development of cell therapy using bone marrow cell to repair damaged liver. Hepatology 36, 200A, 2002

Yamamoto N., Terai S., Omori K., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Sakaida I., Ohata S., Watanabe T., Nishina H., Snorri S. Thorgeirsson, Okita K. Liv8 mAb: A new murine monoclonal antibody separate hepatic stem cell population in bone marrow. Hepatology 36, 200A, 2002

Sakaida I., Terai S., Yamamoto N., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Okita K. Transplantation of bone marrow cells reverse

CCl4-induced liver fibrosis. *Hepatology* 36, 295A, 2002

Sakaida I., Terai S., Yamamoto, N., Omori K., Kawaguchi K., Tsuchiya M., Uchida K., Okita K. Herbal medicine Inchin-ko-to (TJ-135) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesion in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid defined diet. *Hepatology* 36, 252 A, 2002

Tsuchiya M., Sakaida I., Omori K., Kawaguchi K., Yamamoto N., Okamoto M., Uchida K., Terai S., Okita K. Regulation of collagen and matrix metalloproteinase expression by MAP kinase signal pathway in stellate cell. *Hepatology* 36, 262 A, 2002

Kitagawa, D. et al. Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase by Ultraviolet Is Mediated Through Src-dependent Epidermal Growth Factor Receptor Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* (2002) 277, 366-371

Yamamoto, A. et al. Possible Involvement of I · B Kinase 2 and MKK7 in Osteoclastogenesis Induced by Receptor Activator of Nuclear factor · B Ligand. *J. Bone Miner. Res.* (2002) 17, 612-621

Watanabe, T. et al. SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- · B-induced anti-apoptosis. *Dev. Biol.* (2002) 250, 332-347

Takayanagi, H. et al. Induction and Activation of the Transcription Factor NFATc1 (NFAT2) Integrate RANKL Signaling. *Dev. Cell* (2002) 3, 889-901

Sakaida I., Tsuchiya M., Kawaguchi K., Kimura T., Terai S., Okita k. Herbal medicine Inchin-ko-to (TJ-135) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *J. Hepatol* 2003;38(6) 762-769

Sakaida I., Hironaka K., Terai S., Okita K Gadolinium chloride reverses dimethylnitrosamine (DMN)-induced rat liver fibrosis with increased matrix metalloproteinases (MMPs) of Kupffer cells. *Life Sci.* 2003;72:943-959.

Yamasaki T., Kurokawa F., Takami T., Omori K., Kawaguchi K., Tsuchiya M., Yamamoto N., Okamoto M., Hironaka K., Kimura T., Terai S., Sakaida I., Okita K. Arterial infusion chemotherapy using cisplatin, 5-fluorouracil, and isovorin for patients with advanced hepatocellular carcinoma, pilot study: Is a high dose of the biochemical modulator effective? *Hepatol Res.* 2003 Sep;27(1):36-44.

Sakaida I., Jinhua S., Uchida K., Terai S., Okita K. Leptin receptor-deficient Zucker (fa/fa) rat retards the development of pig serum-induced liver fibrosis

with Kupffer cell dysfunction. *Life Sci.* 2003 Sep 26;73(19):2491-501.

Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, Miyamoto K, Shinoda K, Nishina H, Okita K
An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes *Journal of Biochemistry* 2003, 134;551-558

Okamoto M, Sakaida I, Tsuchiya M, Suzuki C, Okita K. Effect of a late evening snack on the blood glucose level and energy metabolism in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res Hepatol Res.* 2003 ; 27 : 45-50 ·

Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Okita K Strategy for the development of cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. *Growth/Differentiation and hepatocyte/HCC* (Springer Verlag) 51-56, 2003

Saibil, S.D., et al. (2003) Weak agonist self-peptides promote selection and tuning of virus-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* 33, 685-696

Kishimoto, H., et al. (2003) Different Properties of SEK1 and MKK7 in Dual Phosphorylation of Stress-induced Activated Protein Kinase SAPK/JNK in Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 16595-16601

Okamura-Oho, Y., et al (2003) Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) protein is phosphorylated by c-Jun NH2-Terminal Kinase. *Human Mol. Genetics*, 12, 1535-1542

Momose, H., et al (2003) Dual Phosphorylation of Phosphoinositide 3-Kinase Adaptor Grb2-Associated Binder 2 Is Responsible for Superoxide Formation Synergistically Stimulated by Fc · and Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine Receptors in Differentiated THP-1 Cells. *J. Immunol.*, 171, 4227-4234.

Terai, S., et al (2003) An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J. Biochem.*, 134, 551-558.

Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada, Sakaida I, Nishina H, Okita K A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *BBRC* 313:1110-1118, 2004

Nishina H, Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, Asaka S, Katada T SAPK/JNK Signaling Participates in Embryonic Hepatoblast Proliferation via a Pathway Different from NF- · B-Induced Anti-Apoptosis. *Growth/Differentiation and hepatocyte/HCC* (Springer Verlag) 51-56, 2003

Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada, Sakaida I, Nishina H, Okita K A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *BBRC* 313:1110-1118 2004

Sakaida I, Hironaka K, Kimura T, Terai S, Yamasaki T, Okita K. Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) increases expression matrix metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in rat stellate cell. *Life Sci.* 2004 Mar 19;74(18):2251-63

Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Toda T, Terai S, Sakaida I, Oka M, Nakamura K, Okita K. Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. *Proteomics* 2004 Jul;4(7):2111-6.

Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology.* 2004 Dec;40(6):1304-11.

Omori K, Terai S, Ishikawa T, Aoyama K, Sakaida I, Nishina H, Shinoda K, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K. Molecular signature associated with plasticity of bone marrow cell under persistent liver damage by self-organizing-map-based gene expression. *FEBS Lett.* 2004 Dec 3;578(1-2):10-20.

Takami T, Terai S, Yokoyama Y, Tanimoto H, Tajima K, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I, Nishina H, Thorgeirsson SS, Okita K Human homologue of Maid (HM) is a useful marker protein in hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2005 in press

和文論文

仁科博史、渡辺智美、大畑慎也、浅香聡、堅田利明：初期肝形成時のシグナル伝達機構、胆肝臓 46 巻 3 号：295-302 (2003)

山崎 隆弘、木村 輝昭、浦田 洋平、丸本 芳雄、青山 浩司、石川 剛、田島 邦彦、横山 雄一郎、大森 薫、川口 浩太郎、高見 太郎、土屋 昌子、山口 裕樹、寺井 崇二、黒川 典枝、坂井田 功、沖田 極
肝細胞癌に対する新バルーンマイクロカテーテルを用いたリポドール併用肝動脈バルーン閉塞下ラジオ波凝固療法
肝臓 45—9：505—506, 2004

寺井 崇二、大森 薫、石川 剛、青山 浩司、高見 太郎、横山 雄一郎、田島 邦彦、坂井田 功、沖田 極
自己骨髄細胞に対する肝硬変症に対する肝臓再生療法 治療学 Vol 38-10, 1158-1159, 2004

寺井 崇二、石川 剛、大森 薫、青山 浩司、坂井田 功、沖田 極
骨髄細胞から肝細胞への分化制御機構の解析とその臨床応用 *GI Resaerch* 12:117-125, 2004

寺井 崇二、坂井田 功、沖田 極
肝硬変治療の新たなストラテジー
—自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法—
炎症と免疫 Vol 12-6 :718-725, 2004

沖田 極、寺井 崇二、坂井田 功
医学と医療の最前線 骨髄幹細胞移植による肝疾患の治療 日本内科学会誌 2005 in press

学会発表

寺井崇二、山本直樹、大森薫、坂井田功、仁科博史、沖田極「GFP/CC14 モデル：骨髄細胞から肝細胞への分化評価モデルの開発」日本再生医療学会（京都、4月18.19日、2002年）＜口頭発表＞

山本直樹、寺井崇二、大森薫、坂井田功、仁科博史、沖田極「骨髄細胞から肝細胞への分化過程における Liv 抗体陽性細胞の解析」日本再生医療学会（京都、4月18.19日、2002年）＜口頭発表＞

大森薫、寺井崇二、山本直樹、坂井田功、仁科博史、沖田極「骨髄細胞から肝細胞への分化制御に関する遺伝子群の検索」日本再生医療学会（京都、4月18.19日、2002年）＜口頭発表＞

寺井崇二、山本直樹、沖田極「骨髄細胞を用いた肝臓再生療法開発の基礎的検討」第88回日本消化器病学会総会 workshop：消化器の再生医療の現状（旭川、4月26日、2002年）

大森薫、木村輝昭、川口浩太郎、高見太郎、岡本真理子、寺井崇二、坂井田功、山口大学肝移植研究会、沖田極
「生体部分肝移植で救命し得た B 型劇症肝炎急性型の成人例」第86回 日本内科学会中国地方会（2002年6月8日）

高見太郎、寺井崇二、山崎隆弘、坂井田功、沖田極「肝発癌に関与する転写制御分子 HM の機能解析」第38回日本肝臓学会総会（2002.6 大阪）＜口頭発表＞

大森薫、寺井崇二、山崎隆弘、坂井田功、沖田極「骨髄細胞から肝細胞への分化制御に関する遺伝子群の解析」第38回日本肝臓学会総会（2002.6 大阪）＜口頭発表＞

山本直樹、寺井崇二、大森薫、坂井田功、仁科博史、沖田極「新規マウスモノクローナル抗体 Liv 抗体群および Maid 抗体を用いた肝幹細胞同定への試み」第38回日本肝臓学会総会（2002.6 大阪）＜口頭発表＞

高見太郎、寺井崇二、大森 薫、山本直樹、山崎隆弘、坂井田功、沖田極「肝幹細胞の発生分化と肝発癌に関与する HLH 型転写制御分子 Human Homologue of Maid (HM)」第61回日本癌学会総会（2002.10 東京）＜口頭発表＞

大森薫、木村輝昭、川口浩太郎、高見太郎、土屋昌子、山本直樹、岡本真理子、寺井崇二、坂井田功、山口大学肝移植研究会、沖田極「山口大学医学部付属病院における生体肝移植の現状」第19回 中・四国肝臓病研究会（2002年9月21日）

寺井崇二、山本直樹、大森薫、坂井田功、渡辺智美、大畑慎也、堅田利明、仁科博史、沖田極「骨髄細胞を用い

た肝臓再生療法の開発を目指して-GFP/CC14 モデルの開発と解析および骨髄細胞中の幹細胞の同定法」第61回日本癌学会総会(東京国際フォーラム、2002年10月1日から3日)再生医療ポスター

寺井崇二「骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発」シンポジウム:抗体細胞療法の新展開 第18回日本Drug Delivery System学会(札幌、6月21,22日、2002年)

寺井崇二、山本直樹、大森薫、内田耕一、坂井田功、大畑慎也、渡辺智美、仁科博史、沖田極「骨髄由来幹細胞を用いた肝再生医学」workshop:肝再生医学に最適な細胞源を考える 第9回肝細胞研究会(秋田、7月12,13日、2002年)

Shuji Terai, Naoki Yamamoto, Kaoru Omori, Koji Miyamoto, Isao Sakaida, Tomomi Watanabe, Shinya Ohata, Hiroshi Nishina, Toshiaki Katada, Snorri S. Thorgeirsson, Kiwamu Okita
GFP/CC14 model: An new in vivo model for monitoring the differentiation of bone marrow cell into hepatocytes.
2002 FASEB Summer Research Conference "Mechanism of liver growth, differentiation and molecular pathogenesis of hepatic disease. (July 27-August 1, 2002, Snowmass, Colorado, USA). <Invited Speaker.>

Tarou Takami, Shuji Terai, Kotarou Kawaguchi, Haruko Tanimoto, Masako Tsuchiya, Kaoru Omori, Kouichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Fumie Kurokawa, Isao Sakaida, Hiroshi Nishina, Snorri S. Thorgeirsson, Kiwamu Okita
HHM: A dominant inhibitory HLH protein which regulates hepatic stem cell activation and liver carcinogenesis.
2002 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES (2002.8 Colorado, USA) <示説発表>

Kaoru Omori, Shuji Terai, Naoki Yamamoto, Koji Miyamoto, Isao Sakaida, Tomomi Watanabe, Shinya Ohata, Hiroshi Nishina, Toshiaki Katada, Snorri S. Thorgeirsson, Kiwamu Okita
Gene expression profiles during the differentiation of bone marrow cell into hepatocyte in GFP/CC14 model.
2002 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES (2002.8 Colorado, USA) <示説発表>

Naoki Yamamoto, Shuji Terai, Kaoru Omori, Koji Miyamoto, Isao Sakaida, Tomomi Watanabe, Shinya Ohata, Hiroshi Nishina, Toshiaki Katada, Snorri S. Thorgeirsson, Kiwamu Okita
Characterization of bone marrow cells using new monoclonal antibody, Liv8.
2002 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES (2002.8 Colorado, USA) <示説発表>

高見太郎、寺井崇二、川口浩太郎、大森薫、山本直樹、瀬川誠、内田耕一、萱野幸三、坂井田功、沖田極「肝臓の発生分化と肝発癌に関する HLH 型転写制御分子、Human Homologue of Maid (HHM)」第5回肝発癌とその制御研究会(2002.8 東京) <一般演題>

高見太郎、寺井崇二、横山雄一郎、田島邦彦、谷本浩子、山本直樹、内田耕一、木村輝昭、山崎隆弘、黒川典枝、坂井田功、沖田極「肝幹細胞の発生分化と肝発癌に関する HLH 型転写制御分子 Human Homologue of Maid (HHM)」第66回オンコロジーセミナー(2002.12 宇部) <一般演題>

寺井崇二「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発への戦略」第2回GIリサーチフォーラム(講演)(仙台、2002年9月6日)

寺井崇二、山本直樹、沖田極「骨髄細胞を用いた肝臓再生療法開発のためのストラテジー」第6回日本肝臓学会大会、肝再生医学の現状と展望(横浜、2002年10月25日)

寺井崇二、坂井田功、沖田極「自己骨髄細胞を用いた再生療法の開発を目指して」シンポジウム11. 消化器領域における再生医療の現状と展望(横浜、2002年10月25日)

坂井田功、寺井崇二、沖田極「骨髄移植による肝線維化治療の試み」シンポジウム5. 肝線維化治療のストラテジー(横浜、2002年10月25日)

大森薫、寺井崇二、坂井田功、沖田極「骨髄細胞から肝細胞への分化制御に関する遺伝子群の検索」DDW-Japan 合同プレナリー(横浜、2002年10月25日)

Sakaida I., Terai S., Yamamoto N., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Okita K. Transplantation of bone marrow cells reverse CC14-induced liver fibrosis. Presidential Plenary AASLD (Nov, 2002, Boston, USA).

Omori K., Terai S., Yamamoto N., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Sakaida I., Ohata S., Watanabe T., Nishina H., Snorri S. Thorgeirsson, Okita K. Gene expression profile which regulate the differentiation of bone marrow cell into hepatocyte in GFP/CC14 model.
AASLD, Poster Presentation, Experimental Transplantation (Nov, 2002, Boston, USA)

Terai S., Yamamoto N., Omori K., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Sakaida I., Ohata S., Watanabe T., Nishina H., Snorri S. Thorgeirsson, Okita K. The strategy for development of cell therapy using bone marrow cell to repair damaged liver. AASLD, Poster Presentation, Experimental Transplantation (Nov, 2002, Boston, USA)

Yamamoto N., Terai S., Omori K., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Sakaida I., Ohata S., Watanabe T., Nishina H., Snorri S. Thorgeirsson, Okita K. Liv8 mAb: A new murine monoclonal antibody separate hepatic stem cell population in bone marrow. AASLD, Poster Presentation, Experimental Transplantation (Nov, 2002, Boston, USA)

Sakaida I., Terai S., Yamamoto N., Omori K., Kawaguchi K., Tsuchiya M., Uchida K., Okita K. Herbal

medicine Inchin-ko-to(TJ-135) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesion in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid defined diet. AASLD, Poster Presentation, (Nov, 2002, Boston, USA)

Tsuchiya M., Sakaida I., Omori K., Kawaguchi K., Yamamoto N., Okamoto M., Uchida K., Terai S., Okita K. Regulation of collagen and matrix metalloproteinase expression by MAP kinase signal pathway in stellate cell. AASLD, Poster Presentation, (Nov, 2002, Boston, USA)

Shuji Terai. The strategy for the development of cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. Guest Speaker. LEC seminar (NIH, Nov. 5th, 2002, USA)

Terai, S., Sakaida I., Nishina H., Okita K. The strategy for the development of cell therapy using bone marrow cell to repair damaged liver. Growth/Differentiation of hepatocyte/HCC. 14th Yamaguchi Symposium on liver disease. (Yamaguchi, Dem 7-8, 2002)

Terai S., Yamamoto N., Omori K., Kawaguchi K., Takami T., Tsuchiya M., Miyamoto K., Uchida K., Sakaida I., Ohata S., Watanabe T., Nishina H., Snorri S. Thorgeirsson, Okita K. The strategy for development of cell therapy using bone marrow cell to repair damaged liver. AASLD, Poster Presentation, Experimental Transplantation (Nov, 2002, Boston, USA)

Shuji Terai. The strategy for the development of cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. Guest Speaker. LEC seminar (NIH, Nov. 5th, 2002, USA)

寺井崇二、山本直樹、大森薫、坂井田功、渡辺智美、大畑慎也、堅田利明、仁科博史、沖田極「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法開発のための戦略」workshop：肝形成の分子メカニズムと医学への応用（横浜、2002年12月13日）

大森薫、寺井崇二、坂井田功、沖田極「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発のための基礎的検討」第15回肝再生研究会（2002年12月13日）

大森薫、寺井崇二、青山浩司、石川剛、山本直樹、坂井田功、仁科博史、沖田極「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の臨床応用のための基礎的解析」1 国際科学振興財団フォーラム・第10回浜名湖シンポジウム（2002年12月22, 23日）

寺井崇二、坂井田功、仁科博史、沖田極「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発への戦略」シンポジウム幹細胞の可塑性を問う 第2回日本再生医療学会総会（神戸、2003年3月11, 12日）

寺井崇二、山本直樹、大森薫、石川剛、坂井田功、渡辺智美、大畑慎也、仁科博史、沖田極「骨髄由来幹細胞を用いた肝臓再生療法の開発のための基礎的検討」第2回日本再生医療学会総会（神戸、2003年3月11, 12日）

workshop：組織幹細胞を用いた消化腺上皮への分化転換と再生医療への展開

H. Nishina, H. Kishimoto, K. Nakagawa, & T. Katada: Different regulation of stress-induced activated protein kinase SAPK/JNK by SEK1 and MKK7 in murine embryonic stem cells. Cell Signaling, Transcription and Translation as Therapeutic Targets, ルクセンブルグ、Luxembourg（2002年1月）

T. Watanabe, H. Nishina, T. Katada SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK Signaling Participates in Embryonic Hepatoblast Proliferation via a Pathway Different from NF- κ B-induced Anti-apoptosis. 2002 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES, 米国、コロラド（2002年7月）

仁科博史、中川健太郎、西林元、北川大樹、渡辺智美、堅田利明；SEK1とMKK7による協調的なSAPK/JNKの活性化機構とその生理的意義（口頭発表）[第25回日本分子生物学会大会シンポジウム；2002年12月／横浜]

渡辺智美、大畑慎也、浅香聡、仁科博史、堅田利明；マウス胎児肝細胞特異的モノクローナル抗体の作製とその利用（口頭発表）[第25回日本分子生物学会大会シンポジウム；2002年12月／横浜]

Apoptosis, カナダ国、バンフ（2003年2月）H. Nishina, K. Nakagawa, D. Kitagawa, G. Nishitai, and T. Katada: Cooperative SAPK/JNK Activation by SEK1/MKK4 and MKK7: SAPK/JNK Activation Is Not Linked to Stress-induced Apoptosis in Embryonic Stem Cells. 2003 Keystone Symposia, Molecular Mechanism of Apoptosis.

石川剛、寺井崇二、青山浩司、大森薫、山本直樹、坂井田功、仁科博史、沖田極「骨髄細胞の肝臓への分化・増殖メカニズムと増殖因子の関連性」第2回日本再生医療学会総会（神戸、3月）＜一般演題・口演＞

寺井崇二、坂井田功、沖田極「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の臨床開発のために基礎的検討」第89回日本消化器病学会総会（埼玉、4月）＜シンポジウム：消化器疾患における再生医療の展望＞

弘中孝治、山崎隆弘、沖田極「進行肝細胞癌に対する low dose FP(5-FU+CDDP)の Biochemical modulator (leucovorin, isovorin)併用による動注化学療法の有効性」第89回日本消化器病学会総会（埼玉、4月）＜パネルディスカッション：肝細胞癌の治療：EBMに基づいた体系の確立＞

山崎隆弘、黒川典枝、沖田極「肝細胞癌に対する経皮的ラジオ波凝固療法の際における工夫」第65回日本消化器内視鏡学会総会（福岡、5月）＜パネルディスカッション：肝細胞癌局所治療：腹腔鏡か、経皮的か＞

寺井崇二、坂井田功、仁科博史、沖田極 骨髄由来、胆管由来の肝幹細胞の発生分化に関する検討 第39回日本肝臓学会総会（福岡、5月）＜シンポジウム：肝幹細胞研究のアップデート＞

高見太郎、寺井崇二、横山雄一郎、田島邦彦、山本直樹、内田耕一、木村輝昭、山崎隆弘、黒川典枝、坂井田功、沖田極「HIMは肝発癌の初期に誘導され増殖を促進する」第39回日本肝臓学会総会(福岡、5月)〈口頭発表〉

石川剛、寺井崇二、青山浩司、大森薫、山本直樹、坂井田功、沖田極「FGFは骨髄細胞の肝細胞への分化・増殖を促進する。」第39回日本肝臓学会総会(福岡、5月)〈一般演題・口演〉

大森薫、寺井崇二、松本しのぶ、石川剛、青山浩司、山本直樹、坂井田功、仁科博史、沖田極「骨髄細胞から肝細胞への分化に関する遺伝子群についての解析」第39回日本肝臓学会総会(福岡、5月)〈一般演題・口演〉

青山浩司、坂井田功、石川剛、田島邦彦、横山雄一郎、大森薫、川口浩太郎、高見太郎、土屋昌子、山本直樹、寺井崇二、沖田極「骨髄細胞移植による肝繊維化治療の検討」第39回日本肝臓学会総会(福岡、5月)〈一般演題・口演〉

大森薫、寺井崇二、松本しのぶ、石川剛、青山浩司、坂井田功、仁科博史、沖田極「骨髄細胞から肝細胞への分化に関する遺伝子群についての解析」肝細胞研究会(7月)

Taro Takami, Shuji Terai, Yuichiro Yokoyama, Kunihiro Tajima, Katunori Harada, Kotaro Kawaguchi, Masako Tsuchiya, Kaoru Omori, Kouichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Fumie Kurokawa, Isao Sakaida, Snorri S. Thorgeirsson and Kiwamu Okita「HIM; A dominant inhibitory HLH protein, which regulates hepatic stem cell activation and hepatocarcinogenesis.」94th AACR, American Association for Cancer Research, Annual Meeting 2003(Washington D.C. July)〈Poster presentation〉

Tsuyoshi Ishikawa, Shuji Terai, Kouji Aoyama, Kaoru Omori, Isao Sakaida, Hiroshi Nishina, Kiwamu Okita「Fibroblast growth factors enhance the trans-differentiation and proliferation of bone marrow cells into hepatocytes.」54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2003.10 Boston)〈Parallel session, Oral presentation〉

Sakaida I, Uchida K, Terai S, Okita K.「Leptin receptor-deficient zucker (FA/FA) rat retards the development of pig-serum induced liver fibrosis with kupffer cell dysfunction.」54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2003.10 Boston)〈Parallel session, Oral presentation〉

Sakaida I, Aoyama K, Yamamoto N, Ishikawa T, Omori K, Terai S, Nishina H, Okita K, Transplantation of「Liv8-negative fraction of bone marrow cell reverse OC14-induced liver fibrosis.」54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2003.10 Boston)〈Parallel session, Oral presentation〉

Sakaida I, Kimura T, Omori K, Terai S, Okita K.「Cytochrome-c is the possible new marker for the patient with acute liver failure.」54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2003.10 Boston)〈Poster presentation〉

寺井崇二、高見太郎、山崎隆弘、黒川典枝、坂井田功、沖田極「HIMは肝発癌初期に発現が誘導される」第39回日本肝臓学会(金沢、6月)〈シンポジウム:肝結節性病変の診断と治療〉

山崎隆弘、木村輝昭、高見太郎、大森薫、川口浩太郎、土屋昌子、山本直樹、寺井崇二、黒川典枝、坂井田功、沖田極「肝細胞癌に対する肝動脈バルーン閉塞下ラジオ波凝固療法」第39回日本肝臓学会(金沢、6月)〈一般演題・ポスター〉

高見太郎、寺井崇二、横山雄一郎、田島邦彦、内田耕一、木村輝昭、黒川典枝、坂井田功、沖田極「HIM(Human Homologue of Maid)は肝発癌を initiate する HIM, Human Homologue of Maid, initiates liver carcinogenesis.」第62回日本癌学会総会(名古屋、9月)〈口頭発表〉

寺井崇二、坂井田功、沖田極「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法開発のための戦略「肝疾患における再生医療—基礎から臨床へ—」DDW-Japan 2003 (大阪、10月)〈workshop14〉

石川剛、寺井崇二、青山浩司、大森薫、坂井田功、仁科博史、沖田極「FGFは骨髄細胞から肝細胞への分化・増殖を促進する。」第10回肝細胞研究会(東京、7月)〈一般演題・口演〉

Naoki Yamamoto, Hitoshi Shirahashi, Andreea Catana, Jian Wu, Mark A Zern, and Kiwamu Okita「Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Along a Hepatocyte Lineage」2nd Annual Gene Therapy Symposium in Sonoma 2003 November 21, Sonoma CA 〈Poster presentation〉

山崎隆弘、黒川典枝、沖田極「教室における進行肝細胞癌に対する動注化学療法の現状と展望」第7回日本肝臓学会大会(大阪、2003.10月)〈ワークショップ:進行肝細胞癌の予後改善をめざして〉

Taro Takami, Shuji Terai, Isao Sakaida, Snorri S. Thorgeirsson, Kiwamu Okita「HIM, Human Homologue of Maid, regulates cell proliferation and differentiation in hepatocarcinogenesis.」Thirteenth international symposium of the Hiroshima cancer seminar (2003.10 Hiroshima, Japan)〈Poster presentation〉

寺井崇二、坂井田功、仁科博史、沖田極「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発への基礎的検討—持続的障害下の骨髄細胞の肝細胞への分化制御機構の解析—」第24回日本炎症・再生医学会(京都、2003.11月)

大森薫、寺井崇二、石川剛、青山浩司、坂井田功、仁科博史、沖田極「骨髄細胞から肝細胞への分化に関する遺伝子群についての解析」類洞壁細胞研究会(2003.12月)

Hiroshi Nishina, Kentaro Nakagawa, Daiju Kitagawa, Gen Nishitai, and Toshiaki Katada [Poster]: Cooperative SAPK/JNK Activation by SEK1/MKK4 and MKK7: SAPK/JNK Activation Is Not Linked to Stress-induced Apoptosis in Embryonic Stem Cells. 2003 Keystone Symposia, カナダ国, バンフ, 2003年1月

Kentaro Nakagawa, Daiju Kitagawa, Tomomi Watanabe, Hiroshi Nishina, and Toshiaki Katada [Poster]: SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF- κ B-induced anti-apoptosis. 2003 Keystone Symposia, カナダ国, バンフ, 2003年1月

Daiju Kitagawa, Kentaro Nakagawa, Hiroshi Nishina, and Toshiaki Katada [Poster]: Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase by Ultraviolet Is Mediated through Src-dependent Epidermal Growth Factor Receptor Phosphorylation: ITS IMPLICATION IN AN ANTI-APOPTOTIC FUNCTION
2003 Keystone Symposia, カナダ国, バンフ, 2003年1月

Watanabe T., Nishina H., Katada T., Sasado T., Morinaga C., Suwa H., Niwa K., Hirose Y., Yasuoka A., Yoda H., Deguchi T., Iwanami N., Osakada M, Henrich T., Kondoh H., and Furutani-Seiki [Poster]: Screening for mutations affecting liver organogenesis in Medaka. 3rd European Meeting on Zebrafish and Medaka Development and Genetics, フランス国, パリ, 2003年6月

仁科博史; 肝形成の分子メカニズムと医学への応用: 再生医学と組織工学の連携強化のためのシンポジウム (口頭発表) [東京大学医学部; 2003年1月/東京]

仁科博史、渡辺智美、大畑慎也、浅香聡、斉藤亮太、堅田利明; 初期肝形成のシグナル伝達機構: 第10回肝細胞研究会 (シンポジウム口頭発表) [東京大学医学部; 2003年7月/東京]

寺井 崇二、坂井田 功、沖田 極
「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の臨床応用研究 (Phase I)」第90回日本消化器病学会総会シンポジウム7: 消化器疾患における再生医療応用の現状, 2004

寺井 崇二 シンポジウム「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の基礎的検討と臨床への展開」第7回移植遺伝子工学会 第40回日本移植学会, 2004

Sakaida I, Shen J, Uchida K, Aoyama K, Ishikawa T, Terai S, Okita K. Leptin enhanced TNF- α production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. Hepatology 40-4, 196A, 2004 (AASLD 2004)

Ishikawa T, Terai S, Urata Y, Marumoto Y, Aoyama K, Omori K, Sakaida I, Nishina H, Okita K. Fibroblast growth factors enhance the repopulation and differentiation of bone marrow cells into hepatocyte.

Hepatology 40-4, 380A, 2004 (AASLD 2004)

Yokoyama Y, Terai S, Omori K, Aoyama K, Ishikawa T, Takami T, Sakaida I, Nishina H, Okita K. Proteomic analysis of serum protein in carbon tetrachloride treated mice transplanted bone marrow cells. Hepatology 40-4, 382A, 2004 (AASLD 2004)

Sakaida I, Tsuchiya M, Okamoto M, Terai S, Okita K. The effect of late evening snack in patients with liver cirrhosis. Hepatology 40-4, 632A, 2004 (AASLD 2004)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

坂井田功、沖田極
特許出願 2002-377803: 肝癌発生、進展抑制剤

寺井崇二、沖田極
骨髄細胞の遊走・分化・増殖評価モデル動物およびその利用法 特許出願 特願 2001-271240 号
特公 2003-70377

寺井 崇二、高見 太郎、坂井田 功、沖田 極
特許出願 2004-267065 新規肝細胞癌の腫瘍マーカー抗 HMIgG の発見

寺井 崇二、三浦 泉、坂井田 功、沖田 極
特許出願 2005- 79248 生体液中のイオン濃度の測定方法

2. 実用新案登録 特になし

3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Terai S. , Thorgeirsson SS., Okita K.	HIM: a dominant inhibitory Helix Loop Helix protein which associated with liver stem cell and liver development.	Okita K.	Frontier in Hepatology (Growth, Proliferation and Apoptosis in Hepatocyte)	Springer Verlag	Tokyo	2001	1-9
高見太郎、寺井崇二、山崎隆弘、坂井田功、沖田極	肝細胞癌の病態と診断	戸田 剛太郎	消化器 Annual Review	中外医学社	東京	2003	285-288
高見太郎、寺井崇二、山崎隆弘、坂井田功、沖田極	肝細胞癌の病態と診断	戸田 剛太郎	消化器 Annual Review	中外医学社	東京	2004	303-307
Nishina H, Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, Asaka S, Katada T	SAPK/JNK Signaling Participates in Embryonic Hepatoblast Proliferation via a Pathway Different from NF- κ B-Induced Anti-Apoptosis	Okita K.	Frontier in Hepatology (Growth/Differentiation and hepatocyte/HCC)	Springer Verlag	Tokyo	2003	1-14
Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Okita K	Strategy for the development of cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver.	Okita K.	Frontier in Hepatology (Growth/Differentiation and hepatocyte/HCC)	Springer Verlag	Tokyo	2003	51-56

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版社名
寺井崇二、坂井田功、高見太郎、内田耕一、白橋斉、山本直樹、大森薫、川口浩太郎、宮本康嗣、沖田極	肝発癌に関する転写制御分子 HIM	第4肝発癌とその制御研究会—湯沢シンポジウム—医学と薬学	47(Sup pl.) , 2002	4-7	自然科学社
山本直樹、寺井崇二、大森薫、高見太郎、坂井田功、沖田極	骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の開発を目指して 再生・増殖・分化と消化器病	第9回浜名湖シンポジウム	2002	22-27	アークメディア
寺井崇二、山本直樹、大森薫、坂井田功、沖田極	骨髄由来幹細胞を用いた肝臓再生療法	肝胆膵	46(3), 2003	365-369	アークメディア
高見太郎、坂井田功、沖田極	癌細胞のアミノ酸代謝—ことに肝細胞癌を中心に	肝胆膵	47(1), 2003	101-106	アークメディア
高見太郎、寺井崇二、大森薫、山本直樹、内田耕一、木村輝昭、山崎隆弘、黒川典枝、坂井田功、沖田極	肝臓の発生分化と肝発癌に関する Helix-Loop-helix (HLH) 型転写制御分子 Human Homologue of Maid (HIM) の機能解析	医学と薬学	49(sup), 2003	64-68	自然科学社
仁科博史、渡辺智美、大畑真也、浅香聡、堅田利明	初期肝形成時のシグナル伝達機構	肝胆膵	46(3), 2003	295-302	アークメディア
寺井崇二、山本直樹、大森薫、坂井田功	骨髄由来幹細胞を用いた肝臓再生療法	肝胆膵	46(3), 2003	365-369	アークメディア

寺井崇二、沖田極	消化器領域の再生医療の展望	Frontiers in Gastroenterology	8(3), 2003	234-240	メディカルレビュー社
寺井崇二、沖田極	肝臓の再生医療—高齢者社会に対応する次世代に肝臓再生療法開発を目指して—	老年消化器病	15(1), 2003	17-20	医学図書出版
寺井崇二、坂井田功、沖田極	肝幹細胞を用いた再生医療	最新医学	58(9), 2003	75-81	最新医学社
沖田極	わが国の肝細胞癌—疫学、発生・病理から予防まで—	外科治療	89(2), 2003	125-131	永井書店
坂井田功、沖田極	NASHの成因と病態(4)レプチンとNASH	臨床消化器内科	18(9), 2003	1275-1280	日本メディカルセンター
Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada, Sakaida I, Nishina H, Okita K.	A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver.	BBRC	313, 2004	1110-1118	ELSEVIER
Sakaida I, Hironaka K, Kimura T, Terai S, Yamasaki T, Okita K.	Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) increases expression matrix metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in rat stellate cell.	Life Sci	Mar19; 74(18) 2004	2251-2263	ELSEVIER
Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Toda T, Terai S, Sakaida I, Oka M, Nakamura K, Okita K.	Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus.	Proteomics	Jul;4(7) 2004	2111-2116	WILEY
Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K.	Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice.	Hepatology	Dec;40(6) 2004	1304-1311	WILEY
Omori K, Terai S, Ishikawa T, Aoyama K, Sakaida I, Nishina H, Shinoda K, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K.	Molecular signature associated with plasticity of bone marrow cell under persistent liver damage by self-organizing-map-based gene expression.	FERS Lett	Dec 3;578(1-2) 2004	10-20	ELSEVIER
山崎隆弘、木村輝昭、浦田洋平、丸本芳雄、青山浩司、石川 剛、田島邦彦、横山雄一郎、大森薫、川口浩太郎、高見太郎、土屋昌子、山口裕樹、寺井崇二、黒川典枝、坂井田功、沖田 極	肝細胞癌に対する新バルーンマイクロカテーテルを用いたリポオドール併用肝動脈バルーン閉塞下ラジオ波凝固療法	肝臓	45(9) 2004	505-506	日本肝臓学会
寺井 崇二、大森 薫、石川 剛、青山 浩司、高見 太郎、横山 雄一郎、田島 邦彦、坂井田 功、沖田 極	自己骨髄細胞に対する肝硬変症に対する肝臓再生療法	治療学	38(10) 2004	1158-1159	ライフサイエンス
寺井 崇二、石川 剛、大森 薫、青山 浩司、坂井田 功、沖田 極	骨髄細胞から肝細胞への分化制御機構の解析とその臨床応用	GI Resaerch	12, 2004	117-125	先端医学社
寺井 崇二、坂井田 功、沖田 極	肝硬変治療の新たなストラテジ—自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法—	炎症と免疫	12(6) 2004	718-725	先端医学社

Teiji Wada, Nicholas Joza, Hai-ying M. Cheng, Takehiko Sasaki, Ivona Kozieradzki, Kurt Bachmaier, Toshiaki Katada, Martin, Schreiber, Erwin F. Wagner, Hiroshi Nishina, and Josef M.	Penninger MKK7 couples stress signaling to G2/M cell cycle progression and cellular senescence.	Nat. Cell Biol.	6, 2004	215-226	Nature
Nishitai G, Shimizu N, Negishi T, Kishimoto H, Nakagawa K, Kitagawa D, Watanabe T, Momose H, Ohata S, Tanemura S, Asaka S, Kubota J, Saito R, Yoshida H, Mak TW, Wada T, Penninger JM, Azuma N, Nishina H, Katada T.	Stress induces mitochondria-mediated apoptosis independent of SAPK/JNK activation in embryonic stem cells.	J Biol Chem	Jan 16;279 (3) 2004	1621-1626	ASBMB Group
Tomomi Watanabe, Satoshi Asaka, Daiju Kitagawa, Kota Saito, Ryumei Kurashige, Takao Sasado, Chikako Morinaga, Hiroshi Suwa, Katsutoshi Niwa, Thorsten Henrich, Yukihito Hirose, Akihito Yasuoka, Hiroki Yoda, Tomonori Deguchi, Norihisa Iwanami, Sanae Kunimatsu, Masakazu Osakada, Felix Loosli, Rebecca Quiring, Matthias Carl, Clemens Grabher, Sylke Winkler, Filippo Del Bene, Jochen Wittbrodt, Keiko Abe, Yosuke Takahama, Katsuhito Takahashi, Toshiaki Katada, Hiroshi Nishina, Hisato Kondoh, and Makoto Furutani-Seiki	Mutations affecting liver development and function in Medaka, <i>Oryzias latipes</i> , screened by multiple criteria.	Mech Dev	Dev. 121, 2004	791-802	ELSEVIER
Matsuoka M, Igisu H, Nakagawa K, Katada T, Nishina H.	Requirement of MKK4 and MKK7 for CdCl ₂ - or HgCl ₂ -induced activation of c-Jun NH ₂ -terminal kinase in mouse embryonic stem cells.	Toxicol Lett	152, 2004	175-181	ELSEVIER
Kitagawa D, Watanabe T, Saito K, Asaka S, Sasado T, Morinaga C, Suwa H, Niwa K, Yasuoka A, Deguchi T, Yoda H, Hirose Y, Henrich T, Iwanami N, Kunimatsu S, Osakada M, Winkler C, Elmasri H, Wittbrodt J, Loosli F, Quiring R, Carl M, Grabher C, Winkler S, Del Bene F, Momoi A, Katada T, Nishina H, Kondoh H, Furutani-Seiki M.	Genetic dissection of the formation of the forebrain in Medaka, <i>Oryzias latipes</i> .	Mech Dev	Dev. 121, 2004	673-685	ELSEVIER
Nishina H, Wada T, Katada T.	Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway.	J Biochem	136 2004	123-126	Oxford Journal

K. Okita (Ed.)

Growth, Proliferation, and Apoptosis in Hepatocytes

With 53 Figures



Springer

HHM: A Dominant Inhibitory Helix-Loop-Helix Protein Associated with Liver-Specific Gene Expression and Liver Stem Cells

SHUJI TERAI^{1,2}, SNORRI S. THORGEIRSSON³, and KIWAMU OKITA²

Summary. The helix-loop-helix (HLH) family of transcriptional regulatory proteins are key regulators in numerous organ development. We had identified a novel HLH factor, human homologue of Maid (HHM), from a human fetal liver cDNA library. HHM is composed of 360 amino acids (aa). The HHM has an HLH region (150–184 aa) with a leucine zipper motif (240–260 aa) lacking the basic region. The homology of the HLH region for HHM shared 82% identity with that for maternal Id-likemolecule (Maid), but showed low homology with other dominant inhibitory HLH proteins such as Ids. HHM is expressed at a high level in fetal liver as well as in brain, placenta, bone marrow, and lung and is transiently high during liver stem cell activation in the 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy (AAF/PH) model. HHM also inhibited luciferase gene activation induced by the hepatic nuclear factor 4 (HNF-4) promoter. These results suggest that HHM is a novel type of dominant inhibitory HLH protein that might be associated with liver-specific gene expression and liver stem cells.

Key words. HLH transcription factor, Liver stem cell, Liver-specific gene expression, Liver development

Introduction

The helix-loop-helix (HLH) family of transcriptional regulatory proteins are key regulators of various processes of organ development [1,2]. HLH proteins are classified into seven groups on the basis of tissue distribution, dimerization capability, and DNA binding [2]. Class I HLH proteins, such as E12 and E47, are also called E proteins. These class I HLH proteins are ubiquitously expressed in many tissues and form either homo- or heterodimers [1,2]. The specific DNA-binding site of class I proteins is known as E-box, having the consensus sequence (CANNTG) [3]. Class II HLH proteins, such as MyoD, myogenin, Atonal, and NeuroD/BETA2, show a tissue-specific

¹ Department of Molecular Science & Applied Medicine, Bioregulation, ² Department of Molecular Science & Applied Medicine, Gastroenterology & Hepatology, Yamaguchi University School of Medicine, 1-1-1 Minami-Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

³ Laboratory of Experimental Carcinogenesis, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

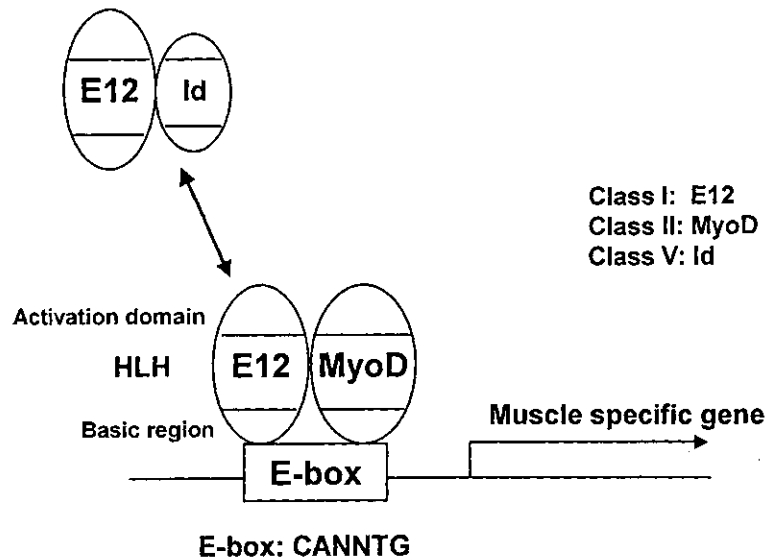


Fig. 1. Regulation of muscle cell differentiation by E12/MyoD and Id. The E12/MyoD heterodimer binds to E-box and regulates muscle cell differentiation. The dominant inhibitory helix-loop-helix (HLH) protein Id binds to E12 and inhibits the binding of the E12/MyoD heterodimer to E-box. As a result, Id acts as an inhibitor of differentiation

expression pattern [2]. The heterodimers of class I and II HLH proteins bind to the E-boxes that are found in a number of cell type-specific promoters and enhancers and regulate different developmental pathways, such as myogenesis (Fig. 1) [1-3]. Class III HLH proteins include the Myc family of transcription factors, TFE-3, SREBP-1, and the microphthalmia-associated transcription factor Mi [2,4,5]. Proteins of this class contain a leucine zipper (LZ) adjacent to the HLH motif [2]. Class IV HLH proteins include Mad, Max, and Mxi, which are capable of dimerizing with the Myc proteins or with one another [6,7].

Class V HLH proteins lack the basic domain and consequently do not bind to DNA; these include Id and emc, and are negative regulators of class I and class II HLH proteins [8,9]. Class VI HLH proteins have a specific feature, a proline in their basic region. *Drosophila* proteins Hairy and Enhancer of split are included in this class [10,11]. The class VII HLH proteins, characterized by the presence of the bHLH-PAS domain, include aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and the AHR nuclear translocator (Arnt) [12].

The Id family is a dominant inhibitory HLH protein [8,9]. Id proteins, inhibitors of DNA binding and differentiation, are negative regulators of bHLH [2,8,9]. All Id proteins contain the HLH domain and heterodimerize with bHLH factors but lack the basic region; as a result, the heterodimers lose the DNA-binding activity. This disruption of DNA binding is closely associated with the inhibition of differentiation [2,8,9]. The four Id proteins, Id1-4, that have been identified are highly homologous in the HLH regions and show similar affinities for various kinds of E protein [2,9]. An Id-like molecule, Maid, has been previously identified and shown to be a potentially dominant inhibitory HLH protein as exemplified by inhibition of E12/MyoD dimerization, but the precise function has not been evaluated [13]. Similar to the Id pro-

teins, Maid also lacks the basic region, but differs from the Id proteins in harboring an LZ motif.

Little information exists on the potential impact of HLH proteins on early liver development or on activation and differentiation of liver stem cells. In contrast, in pancreatic development a number of pancreas-specific genes have been shown to contain E-box elements that regulate their tissue-specific expression [14–16]. We have found E-box sequences in promoters/enhancers of a number of genes that both regulate and characterize liver-specific gene expression; these include hepatic nuclear factor (HNF)-1 α , HNF-3 α and 3 β , HNF-4, HNF-6, and alpha-fetoprotein (AFP) as well as the intergenic enhancer between albumin and AFP genes [17–21]. From these results, we tried to identify partners for E12 that might act as potential regulators of liver-specific gene expression. A yeast two-hybrid screen using an interaction trap system with the HLH region of E12 protein fused to DNA-binding protein LexA (termed LexA-E12) as bait was performed. As a result, we identified the novel HLH factor, HHM, from a human fetal liver cDNA library [22].

Structure of HHM

The HHM protein is composed of 360 amino acids and has a predicted molecular mass of 40.8 kDa (Fig. 2). The HHM protein contains a region of 35 amino acids (positions 150–184 aa) with a similarity of HLH domain and 22 amino acids of putative LZ motif (240–261 aa) (Fig. 2). Similar to the mouse Maid protein, HHM lacks the basic DNA-binding domain, suggesting that HHM might be a dominant inhibitory HLH protein. In comparison to HHM, the Id family is smaller and lacks the LZ motif. The HLH domains for HHM shared 82% identity with that for Maid but had low homology with those for Ids, suggesting that HHM might be a distant member of the Id family and belong to class V [2,13,22].

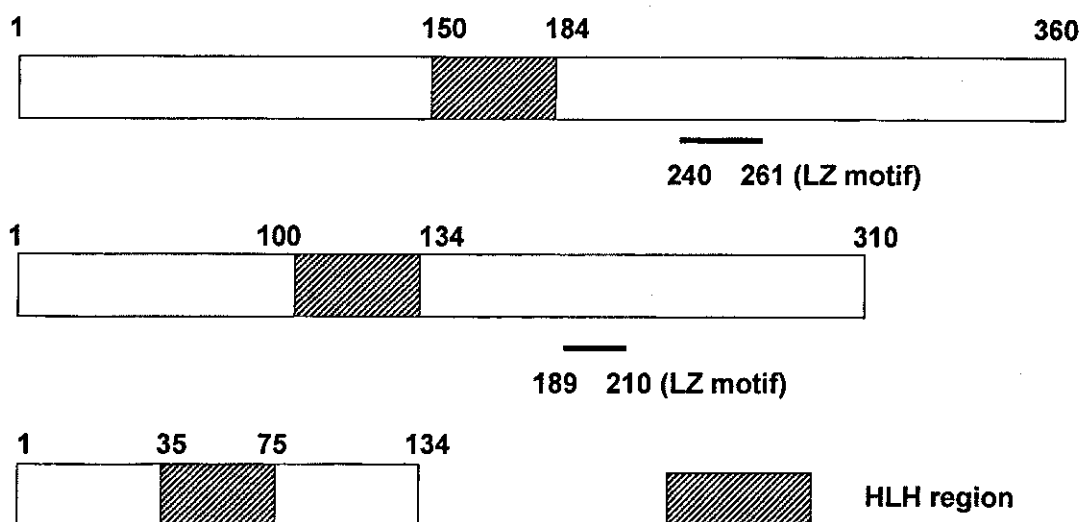


Fig. 2. Structure of the human homologue of Maid (HHM) protein. Schematic illustration of HHM, Maid, and Id2. The HHM protein is composed of 360 amino acids. HHM and Maid proteins are longer than Id2; HHM and Maid proteins have the leucine zipper (LZ) motif

Expression Profile of HHM

The level of HHM transcripts in adult mouse tissues was reported to be high in ovary, intestine, muscle, and brain, whereas low hybridization was observed in testis, heart, kidney, and spleen. Also, a low level of hybridization was observed with lung and liver RNA after long exposure of the blot [13]. We had analyzed the expression profile of HHM using the Multiple Tissue Expression Array (obtained from Clontech, CA, USA). Abundant expression of HHM mRNA was observed in bone marrow, brain, pituitary gland, adrenal gland, thyroid gland, spleen, lung, heart, and placenta. Interestingly, abundant HHM mRNA transcripts were also observed in fetal but not in adult liver [22].

Expression of HHM mRNA During Liver Regeneration

It was of interest that abundant HHM mRNA expression was specifically observed in fetal but not in adult liver [22]. This observation suggested that HHM might be involved in regulating both growth and differentiation in the liver. Our initial approach to addressing this issue was to analyze the HHM gene expression during liver regeneration by utilizing two different rat models, the classical partial hepatectomy (PH) model in which 70% of the liver mass is surgically removed and the restoration of the liver takes place from the remaining hepatocytes, and the combination of PH and treatment with 2-acetylaminofluorene (the AAF/PH model) representing stem cell-supported liver regeneration [23]. In the PH model, the peak level of HHM mRNA was observed during maximum DNA synthesis at 24–36 h after the operation, whereas the highest HHM mRNA expression was observed between 13 and 16 days in the AAF/PH model (Fig. 3). In the AAF/PH model, the time period of maximum HHM expression coincided with the period at which foci of newly generated basophilic hepatocytes were abundant [22]. Furthermore, *in situ* hybridization analysis revealed that HHM mRNA was preferentially expressed in the basophilic foci in the AAF/PH model [22].

HHM Inhibits Transcriptional Activity Induced by the HNF-4 Promoter

We analyzed the inhibitory function of HHM in HepG2 cells by introduction of the plasmid pGL3-HNF4 E-box carrying the luciferase reporter gene fused to HNF-4 promoter and effector plasmids expressing HHM, Δ HHM (1–149), Id2, and pcDNA-FLAG as a control. The 5'-region of HNF-4 promoter from –363 to +48 bp is sufficient to drive liver-specific expression of the luciferase gene in HepG2 cells [24]. We found that two E-boxes exist in these regions (from –179 to –174 bp, CAGTTG; from –161 to –156 bp, CAGGTG). The introduction of HHM efficiently suppressed HNF-4 promoter-induced luciferase gene activation. However, Δ HHM (1–149) and Id2 did not suppress luciferase gene activation [22].

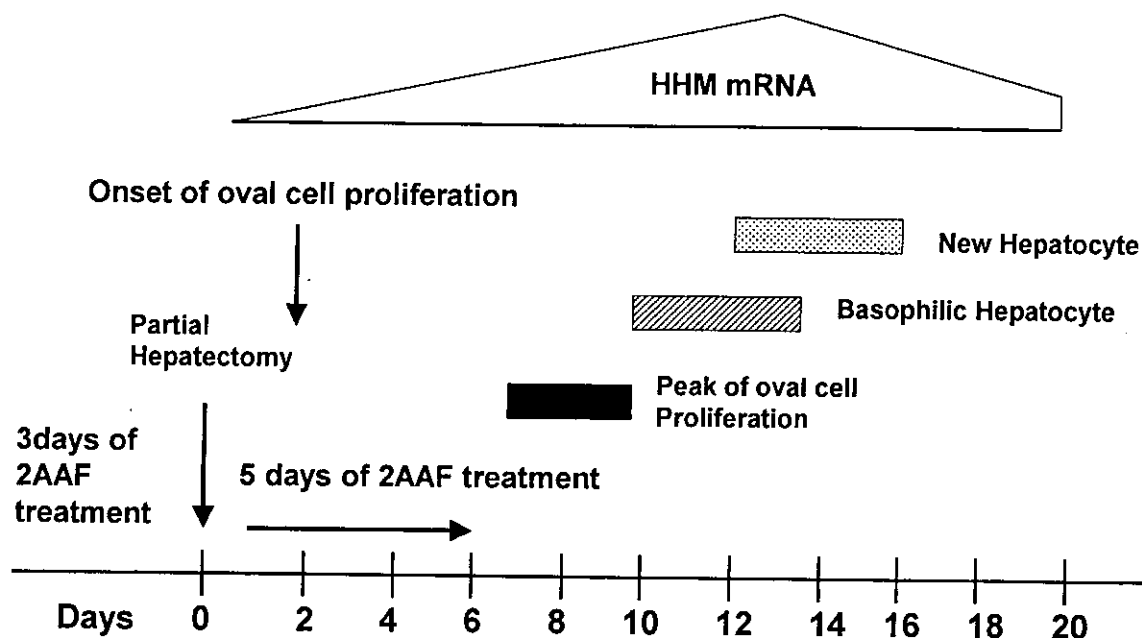


Fig. 3. HHM mRNA expression in the 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy (AAF/PH) model. In this model can be seen the generation of the oval cell and sequential differentiation into the basophilic hepatocyte and hepatocyte. HHM mRNA is elevated from the period when the proliferation of the oval cell starts. The peak value *HHM mRNA* was seen at the time of the appearance of the basophilic hepatocytes. The HHM mRNA transcript was specifically seen in the foci of basophilic hepatocytes by in situ hybridization

Discussion

We have identified a novel inhibitory HLH factor that interacts with E12, displays extensive homology with Maid, and has consequently been named human homologue of Maid [22]. Maid was previously shown to be an inhibitory HLH protein that impeded the dimerization of E12/MyoD, but the precise function of Maid had not been identified [13]. Physical interaction of HHM with bHLH protein, E12, was demonstrated by coprecipitation assay and a glutathione S-transferase-pulldown experiment [22]. Both HHM and Maid contain an LZ region in addition to the HLH motif, and this feature provides a distinct structural difference from the Id proteins (Figure 2). However, based on a recent review by Massari and Murre [2], HHM and Maid may be included with the Id family in class V. HHM is able to heterodimerize with E12 through the HLH region, but these heterodimeric complexes are functionally inactive. By titrating out E12 and MyoD, HHM, similar to Id2, inhibits DNA binding of the E12-MyoD heterodimer; however, inhibition by HHM was less than that by Id2. It was noteworthy that the HLH domain of HHM is quite different from that of the Id family [22].

Although little is known about the role of HLH proteins in the regulation of liver-specific gene expression, a number of hepatic transcription factors and liver-specific genes including HNF-1 α , HNF-3 α and - β , HNF-4, HNF-6, and AFP contain E-boxes in their promoters and enhancers [17–21]. It is, however, known that a number of genes