

200629011A

厚生労働科学研究研究費補助金

エイズ対策研究事業

ヒト人工染色体ベクターを用いた血友病の新遺伝子治療法の開発

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 押村 光雄

平成19(2007)年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
ヒト人工染色体ベクターを用いた血友病の新遺伝子治療法の開発.....	1
押村 光雄	
II. 分担研究報告書	
1. Factor VIII 遺伝子を多コピー搭載する血友病治療用人工染色体ベクターの 構築とその機能評価	4
押村 光雄、香月 康宏、井上 敏昭、加藤 基伸、武谷 浩之	
2. 染色体ベクターレシピエント細胞としての間葉系幹細胞利用の安全性の検討..	6
落谷 孝広	
3. クラニアルウインドウ法を用いた人工染色体保持細胞の安全性確認	9
谷口 英樹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	12

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

ヒト人工染色体ベクターを用いた血友病の新遺伝子治療法の開発

主任研究者 押村 光雄 鳥取大学大学院・医学系研究科・教授

研究要旨

HAC は細胞中で単一コピーの自律的な極小染色体として振る舞うベクターであり、染色体であるが故遺伝子導入サイズに制限がなく、ホストゲノムを破壊せず、Cre-LoxP 反応を利用しカセット方式で巨大遺伝子を容易に搭載できる。またベクターと名のつくとおりにあらゆる細胞に移入可能である。このような HAC ベクターの利点を生かし、持続的改善と患者の経済的肉体的負担の大幅軽減をもたらす血友病治療法をマウスで検証する。それは Factor VIII 発現ユニット多コピーを HAC に搭載し、自己間葉系幹細胞及び皮膚線維芽細胞に導入、皮下移植するという最少自己移植細胞による補充療法である。具体的には Factor VIII の cDNA を多数タンデムに HAC ベクター上に搭載し、ヒト間葉系幹細胞及び皮膚由来線維芽細胞に導入し高効率発現システムを構築する。まずモデル系としてこれをマウス皮下に移植し、発現を定量化し、最少数の移植細胞による長期補充療法を検証する。さらにクラニアルウインドウ法にてリアルタイムで細胞生着のプロセス、細胞動態、Factor VIII の分泌動態を長期にわたり解析し、安全性・機能性を評価する。遺伝子導入した幹細胞を臓器に定着させる上での問題は、前処置として健常組織を切除・除去する必要があることである。我々が提案する方法は自己細胞（間葉系幹細胞及び皮膚由来線維芽細胞）皮下移植であり、高効率発現系であるため、最少数の細胞を移植するだけで十分かつ持続的な補充効果が期待でき、健常組織を傷つけることを回避できる。我々の提案は患者にとって極めて非侵襲的かつ安全であり、経済的肉体的負担を大幅に軽減できる新しい遺伝子治療法の確立を目指したモデル系である。

研究組織

主任研究者

押村光雄 鳥取大学大学院 医学系研究科
機能再生医科学専攻 生体機能医工学
講座 遺伝子機能工学部門 教授

分担研究者

谷口 英樹 横浜市立大学大学院 医学研究科 教授
落谷 孝広 国立がんセンター研究所 がん転移研究
室 室長

香月 康宏 鳥取大学大学院 医学系研究科 機能再
生医科学専攻 生体機能医工学講座
遺伝子機能工学部門 助手

井上 敏昭 鳥取大学 医学部 生命科学科 分子細胞
生物学講座 ゲノム医工学分野 助
教授

加藤 基伸 鳥取大学 医学部 生命科学科 分子細胞
生物学講座 ゲノム医工学分野 助手

武谷 浩之 鳥取大学 医学部 生命科学科 生体情報
機能学講座 病態生化学分野 助教授

A. 研究目的

血友病では組換え製剤の長期投与による苦痛や経済的負担の軽減のために遺伝子治療の有用性が指摘されてきた。そのためにウイルスベクターが Factor VIII, IX 遺伝子の導入に用いられてきたが、これらの因子は遺伝子サイズが大きく、全長 cDNA の搭載が困難であること、ホストゲノムへの挿入が避けられずがん化の懸念が払拭できないこと、投与の繰り返しによる中和抗体出現の問題があった。本研究では遺伝子導入サイズに上限がなく、ホストゲノムを破壊せず（がん化の懸念がない）安定に長期間保持される HAC ベクターの利点を生かし、Factor VIII の発現ユニットを多数搭載した HAC を構築し、安定で安全な高効率発現系を作ること、従来ベクターが抱える問題を克服する。遺伝子導入する細胞として、従来は自己血液幹細胞や肝幹細胞が主に用いられてきた。これらは万一副作用が発生した際に簡単には除去できないという欠点がある。一番大きな問題として導入幹細胞を生着させるためには、前処置として患者の健常細胞／組織を除去、切除することが必要となる。本研究では調製が容易な間葉系幹細胞、皮膚線維芽細胞に構築した HAC を導入し、さらにこれを皮下移植し定着させることで健常組織を損なうことを回避する。さらに HAC を使うこと

で細胞当たりの産生の飛躍的向上が実現でき、ごく少数の移植細胞で因子を補充できること、不要の際には外科的に除去することができることも利点として挙げられる。本研究が目指す「HAC を搭載した極少数の自己細胞の移植による補充療法」は、肉体的にも経済的にも患者への負担が少ない治療法の確立という社会的要請にも十分応えることができると考えられる。

B. 研究方法

1. Factor VIII を高発現する機能性 HAC の構築と発現解析 (押村、加藤、井上、香月、武谷)

Factor VIII 発現ユニットを効率よく産生できるようにタンデムに4コピーつないだ HAC を構築した。プロモーターとしては間葉系幹細胞と肝細胞とで実績のある CAG プロモーターを用い、それぞれのユニットの発現を確保するためユニット間にインスレーター配列を置いた。これらを CHO 細胞で構築したが、取得したクローンではコピー数依存的な発現、そしてクローン間の違いに寄らない均一なレベルでの発現が確認できた。今後このコピー数を BAC 操作で16コピーにまで増やした HAC を CHO 細胞内で構築する。

2. 機能性 HAC のヒト間葉系幹細胞、皮膚線維芽細胞への移入 (落谷、谷口、武谷)

CHO 細胞から微小核融合法でヒト間葉系幹細胞、皮膚線維芽細胞に構築 HAC を移入し HAC 保持細胞を取得する。FISH 解析で HAC が一コピーの独立した極小染色体として保持されていることを確認する。培養上清と細胞抽出物を持ちいて、Western Blot と ELISA にて CHO 細胞内で Factor VIII, IX の発現されていること確認する。合わせて EGFP 融合 Factor VIII, IX の発現を蛍光顕微鏡で確認する。ヒト間葉系幹細胞、皮膚線維芽細胞はともに得やすく HAC 移入が容易な細胞であり、HAC を用いた遺伝子発現の実績を我々は得ている。HAC 導入後に皮下移植に用いる自己細胞として、若年では非侵襲的に採取でき旺盛な分裂能を持つ皮膚線維芽細胞、老年では間葉系幹細胞が細胞数の確保の点から適切であると想定されるが、実際に採取年齢の異なる細胞を用いて HAC 移入を行い、以降の実験に供し、用いる細胞の適正を明らかにする。同じ目的で *in vitro* での継代数、凍結保存日数を変えたものも用い、移植細胞としての HAC 導入細胞の品質管理法の検討を行う。間葉系幹細胞についてはその分化能、表面抗原マーカーも良い指標となるので、*in vitro* での分化能、各種マーカーの発現を HAC 導入、非導入細胞で比較する。

3. 間葉系幹細胞に移入、皮下移植し発現の確認、治療効果の確認を行う

移植した細胞数と発現量の関連を明らかにし、

目標値として設定している正常値の2-4% (日常生活で出血のリスクを激減できるとされる値) を産生するために必要な条件を明らかにする。

4. クラニアルウインドウ (透明窓) 法での安全性評価実験 (谷口)

移植した細胞の動態をリアルタイムで長期観察し、定着プロセス (がん化しないことも含む)、Factor VIII の産生・分泌について蛍光を利用し確認する。

5. ノードマウスを用いての HAC 移入細胞の Tumorigenicity アッセイ (落谷)

HAC 移入細胞の安全性をノードマウスを用いて検証する。

6. ガンシクロビル投与による HAC 導入細胞排除の確認 (谷口、落谷)

HAC には自殺遺伝子 HSV-TK を搭載しており、万一排除する必要が生じた際にはガンシクロビル投与で選択的に死滅させられることを確認する。

7. Factor IX ゲノム搭載 HAC による機能補正 (押村、加藤、井上、香月、武谷)

幹細胞操作技術と HAC 操作技術の融合を目指し、長期的視点に立った新たな試みとして Factor IX ゲノムを搭載した HAC を Factor IX ^{-/-} マウス ES 細胞に導入し、Factor IX ^{-/-} ES 細胞とのキメラマウスを作成し、発現量の検討および個体レベルでの表現型の改善を確認する。

(倫理面への配慮)

本研究は、将来的にヒト遺伝子治療に利用可能な基盤技術をマウス個体レベルで確立することを目指とする。したがって患者個体への適用を含むものではない。ヒト間葉系幹細胞、ヒト皮膚線維芽細胞はそれぞれ CAMBREX 社、KURABO 社から研究用として販売されているものを購入、利用する。既に広く一般に流布しているヒト培養細胞株から分離した染色体断片をマウス細胞に導入するものであり、一般的なトランスジェニックマウス作成と同等の組換え DNA 実験 (P2 レベル) の範疇に入る。本研究の実施にあたっては同指針および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守する。実験動物の愛護については、安楽死の方法を含めて十分に配慮して研究を遂行した。

C. 研究結果

本年度は Factor VIII cDNA を1-4コピー搭載した人工染色体の構築を CHO 細胞内で行った。染色体解析の結果、これら HAC は独立したミニ染色体として安定に保持されていた。これらの細胞クローンは Factor VIII のコピー数依存的な発現、そしてクローンに寄らない均一な発現を確認できた。これらの細胞は今後間葉系幹細胞、線維芽細胞へ微

小核融合法で HAC 移入するためのドナーとして利用できる。

安全性評価のための系であるクラニアルウインドウ（透明窓）法についてはヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）とマウス間葉系前駆細胞株（C3H10T1/2）をコラーゲンゲル中で共培養した後、NOD/scid マウス頭部のクラニアルウインドウへ移植することにより、レシピエント側血流を伴った血管ネットワーク構造の再構成が可能であることを確認した。また自殺遺伝子 HSV-TK および GFP 蛍光タンパク発現ユニットを搭載した HAC、及びこれらを導入した間葉系幹細胞を取得し、クラニアルウインドウ法の確立と相まって実際の移植細胞である HAC 搭載間葉系幹細胞のクラニアルウインドウでの追跡、ガンシクロビルにより細胞排除の追跡が可能になった。

D. 考察

多コピーの発現ユニットを搭載でき、ミニ染色体として安定に保持され、安定した発現を保障するという HAC の特性が十分に生かされたと言え、予想通りの結果が得られていると言える。血友病の新規治療法としての HAC の将来的な利用に目処がついたと言える。

E. 結論

HAC を用いる血友病の新遺伝子治療法の開発は概ね予定通り進んでいると言える。Factor VIII 搭載 HAC のミニ染色体としての挙動、安定で均一な発現、コピー数依存的な発現が確認できた。またクラニアルウインドウ法についても技術開発は順調に進み、次年度の研究（構築した HAC の間葉系幹細胞への移入、皮下移植、効果と安全性の検証）に向けての準備が整った。

今後、本研究でめざす新規血友病治療法を完成させ、HAC を用いた遺伝子治療において我が国が世界的リーダーとなるよう長期的な展望に立ち研究を進めたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表：

Ren X, Tahimic CG, Katoh M, Kurimasa A, Inoue T, Oshimura M. Human artificial chromosome vectors meet stem cells: new prospects for gene delivery. *Stem Cell Rev.* 2006;2(1):43-50.

黒崎 創、押村光雄：「遺伝子・再生医療をめざしたヒト人工染色体」*医学のあゆみ* 219, 227-8

(2006)。

任 鮮英、押村光雄：「遺伝子導入のためのヒト人工染色体ベクター」*分子細胞医療* 5, 39-46 (2006)。

平塚正治、押村光雄：「遺伝子・再生医療のためのヒト人工染色体 (HAC) ベクター」*再生医療* 5, 528-33 (2006)。

2. 学会発表：

Mitsuo Oshimura, Yasuhiro Kazuki, Motonobu Katoh, Masaharu Hiratsuka, Hiroyuki Kugoh, Toshiaki Inoue, Akihiro Kurimasa Chromosome engineering for gene function and gene delivery (2nd Congress of the International Cytogenetics and Genome Society, UK Canterbury 25th-29th June 2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

・ 特許取得

<申請中>

特願 2006-127372：内在遺伝子を含まないヒト人工染色体ベクター

[出願人]：国立大学法人鳥取大学、有限会社 chromocenter

[発明者]：押村 光雄、香月 康宏、松岡 隆之

[出願日] 2006年5月1日

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

Factor VIII 遺伝子を多コピー搭載する血友病治療用人工染色体ベクターの構築とその機能評価

主任研究者 押村 光雄 鳥取大学大学院・医学系研究科・教授

研究要旨

1-4 コピーの Factor VIII cDNA を搭載した人工染色体の構築を CHO 細胞内で行った。染色体解析の結果、これら HAC は独立したミニ染色体として安定に保持されていた。これらの細胞クローンでは Factor VIII のコピー数依存的な発現、そしてクローンに寄らない均一な発現を確認できた。これらの細胞は今後間葉系幹細胞、線維芽細胞へ微小核融合法で HAC 移入するためのドナーとして利用できる。

分担研究者

香月 康宏	鳥取大学大学院	医学系研究科	機能再生医科学専攻	生体機能医工学講座	遺伝子機能工学部門 助手
井上 敏昭	鳥取大学	医学部	生命科学科	分子細胞生物学講座	ゲノム医工学分野 助教授
加藤 基伸	鳥取大学	医学部	生命科学科	分子細胞生物学講座	ゲノム医工学分野 助手
武谷 浩之	鳥取大学	医学部	生命科学科	生体情報機能学講座	病態生化学分野 助教授

A. 研究目的

Factor VIII に着目した血友病遺伝子治療は、すでに臨床実験が行われているが、残念ながら十分な成果を上げているとはいえない。例えば患者由来の線維芽細胞にプラスミドで Factor VIII を導入した場合、発現が一過性で消失する。レトロウイルスを静脈内投与する方法も行われつつあるが、リスクが伴う。非病原性レンチウイルスを用いた場合、クッパー細胞でのベクターの貪食をいかに防ぐかが問題となっている。そもそもウイルスベクターでは搭載遺伝子サイズの問題があるため、ミニジーンが用いられている。

HAC を用いることで、安全性の問題が克服できるだけでなく、導入サイズに制限がないことは大きな利点となる。タンデムに多コピーつなぐことによる Factor VIII の高効率産生系の確立も HAC を用いてはじめて可能になる。すでに我々はインスレーター配列の利用により、プロモーターの活性を長期的にわたって安定に維持できること、実際に発現ユニットのコピー数に応じて発現量が変化することを確認しており、本研究で目指す Factor VIII の高発現については、実現の可能性が非常に高い。

本研究ではこのような Factor VIII 遺伝子を多コピー搭載する血友病治療用人工染色体ベクターの構築を目指しその機能評価、とくに発現レベルについての検討を行った。

B. 研究方法

Factor VIII 発現ユニットを効率よく産生できるようにタンデムに多コピーつないだ HAC をまず BAC (Bacterial artificial chromosome) で構築する。プロモーターとしては間葉系幹細胞と肝細胞とで実績のある CAG プロモーターを用い、それぞれのユニットの発現を確保するためユニット間にインスレーター配列を置く。これを Cre-LoxP 反応を用いて CHO 細胞内に保持した空 HAC ベクターに搭載する。最終的に構築される Factor VIII 発現人工染色体ベクターは線維芽細胞や間葉系幹細胞に導入し、さらにはマウス皮下移植を行い、効果・安全性検証を進めていくことになるが、まず機能評価のため CHO 細胞内での Factor VIII 発現レベルを RT-PCR と培養上清を用いた ELISA で検討した。

HAC に搭載するための BAC でのコンストラクションとさらにその元となるプラスミドレベルでのコンストラクションはそれぞれ井上と加藤が進めた。BAC から HAC への搭載と RT-PCR での発現解析は香月が行い、Factor VIII の ELISA 系の開発と定量は武谷が行った。染色体解析は押村が直接行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、将来的にヒト遺伝子治療に利用可能な基盤技術をマウス個体レベルで確立することを目指とする。したがって患者個体への適用を含むものではない。ヒト間葉系幹細胞、ヒト皮膚線維芽細胞はそれぞれ CAMBREX 社、KURABO 社から研究用として販売されているものを購入、利用する。既に広

く一般に流布しているヒト培養細胞株から分離した染色体断片をマウス細胞に導入するものであり、一般的なトランスジェニックマウス作成と同等の組換え DNA 実験 (P2 レベル) の範疇に入る。本研究の実施にあたっては同指針および「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」を遵守する。実験動物の愛護については、安楽死の方法を含めて十分に配慮して研究を遂行した。

C. 研究結果

初年度においては Factor VIII 発現ユニットを 4 コピーまで搭載した人工染色体の構築を行った。これを保持する CHO 細胞を用いて RT-PCR および培養上清を用いた ELISA ではコピー数依存的かつ細胞クローンに寄らない均一な発現を確認した。これらについてはヒト Cot1-DNA をプローブとした FISH 解析を行い、独立したミニ染色体として保持されていることを確認した。さらにこれらの細胞はコルセミド処理により微小核を良く形成することから、構築した人工染色体ベクターを繊維芽細胞や間葉系幹細胞に導入するためのよいドナー細胞となることが分かった。

D. 考察

今後、コピー数をさらに増やした Factor VIII cDNA 搭載 HAC の構築を優先する。順次この HAC の間葉系細胞への移入、マウス皮下移植行い、効果・安全性検証を予定通り進める。

長期的な視点に立脚した場合、幹細胞操作技術を併用する HAC でのゲノム補正が可能であることを血友病で示すことも重要であると考えている。そのため Factor IX ゲノムを搭載した HAC を Factor IX ^{-/-}マウス ES 細胞に導入し、Factor IX ^{-/-}ES 細胞とのキメラマウスを作出し、個体レベルでの表現型の改善を確認する。

相互補完的なこれらに方向の研究により HAC を用いる血友病の新遺伝子治療法の道筋が付き、臨床応用へのステップになると考えている。

E. 結論

本研究では期待通り多コピーの発現ユニットを搭載でき、ミニ染色体として安定に保持され、安定

した発現を保障するという HAC の特性が十分に生かされたと言え、予想通りの結果が得られていると言える。血友病の新規治療法としての HAC の将来的な利用に目処がついたと言える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表:

Ren X, Tahimic CG, Katoh M, Kurimasa A, Inoue T, Oshimura M. Human artificial chromosome vectors meet stem cells: new prospects for gene delivery. *Stem Cell Rev.* 2006;2(1):43-50.

黒崎 創、押村光雄:「遺伝子・再生医療をめざしたヒト人工染色体」*医学のあゆみ* 219, 227-8 (2006)。

任 鮮英、押村光雄:「遺伝子導入のためのヒト人工染色体ベクター」*分子細胞医療* 5, 39-46 (2006)。

平塚正治、押村光雄:「遺伝子・再生医療のためのヒト人工染色体 (HAC) ベクター」*再生医療* 5, 528-33 (2006)。

2. 学会発表:

Mitsuo Oshimura, Yasuhiro Kazuki, Motonobu Katoh, Masaharu Hiratsuka, Hiroyuki Kugoh, Toshiaki Inoue, Akihiro Kurimasa Chromosome engineering for gene function and gene delivery (2nd Congress of the International Cytogenetics and Genome Society, UK Canterbury 25th-29th June 2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

・特許取得

<申請中>

特願 2006-127372:

内在遺伝子を含まないヒト人工染色体ベクター
[出願人]: 国立大学法人鳥取大学、有限会社 chromocenter

[発明者]: 押村 光雄、香月 康宏、松岡 隆之

[出願日] 2006年5月1日

染色体ベクターレシピエント細胞としての間葉系幹細胞利用の安全性の検討

分担研究者 落谷孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室 室長

研究要旨

ヒト間葉系幹細胞は、可塑性を有するステム細胞であり、*in vitro* の分化により、例えば肝臓の機能を持つ細胞へと変化する。これらの細胞に、Factor VIII, IX 発現ユニットを搭載する HAC ベクターを組み込み、その細胞の治療応用を図る上で、間葉系幹細胞や分化した細胞の安全性を検討した。本年度は先ず、ヒト間葉系幹細胞の培養レベルでの安全性を、継代ごとの染色体の安定性について検討した結果、無血清の特殊培地で培養した場合、継代数 7-8 代までは染色体数は安定に保たれることが判明した。ただし、継代数が増すにつれ、細胞の形態は扁平に変化する傾向が現れ、また倍加速度も低下した。またこれらの未分化の細胞をヌードマウスの皮下に移植した結果、現在のところ腫瘍形成等の変化は認められなかった。以上の結果より、未分化の継代数の若い細胞であれば、腫瘍形成や染色体不安定化を招くこと無く、安全であることが示唆された。

A. 研究目的

ヒト人工染色体を組み込んだヒト間葉系幹細胞を患者自身の組織から作製し、それを移植することで新しい細胞移植治療の開発を行う。そのためには、間葉系幹細胞を患者の成体から安全採取、分離、培養する方法の検討や、得られた細胞の安全性を動物個体レベルで検証しておく必要がある。

B. 研究方法

初年度は既に販売されているヒト間葉系幹細胞を培養し、それらは無血清特殊培地で培養し、継代ごとに細胞形態、細胞倍加時間、染色体数の観察を行い、継代による細胞の安定性を確認する。さらに免疫不全動物へ細胞を未分化の状態に移植し、造腫瘍性の有無を検討する。

(倫理面への配慮)

実験動物の愛護については、安楽死の方法を含めて十分に配慮して研究を遂行した。

C. 研究結果

ヒト間葉系幹細胞の培養レベルでの安全性を、継代ごとの染色体の安定性について検討した結果、無血清の特殊培地で培養した場合、継代数 7-8 代までは染色体数は安定に保たれることが判明した。ただし、継代数が増すに連れ、細胞の形態は扁平に変化する傾向が現れ、脂肪細胞への分化等も観察された。また倍加速度も低下した。またこれらの未分化の細胞をヌードマウスの皮下に移植した結果、継代数 5 の細胞を移植し 8 ヶ月を経過した 6 匹のマウスに腫瘍形成等の変化は認められなかった。以上の結果よ

り、未分化の継代数の若い細胞であれば、腫瘍形成や染色体不安定化を招くこと無く、安全であることが示唆された。

D. 考察

ヒト間葉系幹細胞の可塑性は確かめられてきたが、その培養状態の安定性や、長期間にわたる継代における染色体の変化等に付いては詳細な検討がなされていなかった。初年度の研究成果で、継代数の若い（5 世代）の細胞であれば、培養による細胞形態の変化や染色体の不安定化を招く心配はないと考えられ、

また腫瘍形成も今のところ観察されないことから、初期の目的である安全性に関する目標は十分達成した。

E. 結論

ヒト人工染色体を組み込んだ幹細胞を患者自身の組織から作製し、それを移植する新しい細胞移植治療の開発を行う上で、間葉系幹細胞は安定に培養することが可能であり、研究目的に適した細胞であることが判明した。

F. 健康危険情報

本研究では健康を害するようなウイルスや、薬物の使用は無いことから、健康危惧に関する問題は生じないと考える。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya

- T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, in press.
2. Morita S, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, Hatada I. One Argonaute family member, eIF2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics*, in press
3. Watanabe H, Ochiya T, Ueda S, Kominami Y, Gon R, Nishiki M, Hayashi M, Sasaki A, Shiraishi M, Kashimoto N, Myojin Y, Kamiya K. Differentiation of a hepatic phenotype after heterotropic transplantation of heart, kidney, brain, and skin tissues into liver in F344 rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 354: 841-845, 2007.
4. Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. "Stem cells into liver"--basic research and potential clinical applications. *Adv Exp Med Biol*. 585: 3-17, 2006.
5. Takeshita F, Kodama M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Ueda S, Teratani T, Yamamoto Y, Tamatani T, Kanegasaki S, Ochiya T, Quinn G. Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells. *Diabetologia*. 49: 2948-2958, 2006.
6. Kosaka N, Kodama M, Sasaki H, Yamamoto Y, Takeshita F, Takahama Y, Sakamoto H, Kato T, Terada M, Ochiya T. FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *FASEB J*. 20: 1484-1485, 2006.
7. Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev*. 20:1321-1330, 2006.
8. Fukaya M, Isohata N, Ohta H, Aoyagi K, Ochiya T, Nakanishi Y, Taniguchi H, Sakamoto H, Shimoda T, Nimura Y, Yoshida T, Sasaki H. Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse type gastric cancer. *Gastroenterology*, 131: 14-29, 2006.
9. Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Atelocollagen-mediated Drug Discovery Technology. *Expert Opin. Drug Discov*. 2: 159-167, 2007.
10. Hanai K, takeshita F, Honma K, nagahara S, maeda M, Minakuchi Y, Sano A, Ochiya T. Atelocollagen-mediated systemic DDS for nucleic acid medicines. *Ann NY Acad Sci*. 1082: 9-17, 2006.
11. Kurokawa Y, Honma K, Takemasa I, Nakamori S, Kita-Matsuo H, Motoori M, Nagano H, Dono K, Ochiya T, Monden M, Kato K. Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers. *Int J Oncol*, 28: 383-391, 2006.
12. Fujii T, Saito M, Iwasaki E, Ochiya T, Takei Y, Hayashi S, Ono A, Hirao N, Nakamura M, Kubushiro K, Tsukazaki K, Aoki D. Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. *Int J Oncol*. 29: 541-548, 2006.
13. Yanagihara K, Takigahira M, Takeshita F, Komatsu T, Nishio K, Hasegawa F, Ochiya, T. A new photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer Res*. 66: 7532-7539, 2006.
14. Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci*. 97: 689-696, 2006.
15. Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, Ochiya T, Hatada I. Genomic imprinting in Dicer1-hypomorphic mice. *Cytogenet Genome Res*. 113: 138-143, 2006.
16. Ueda S, Fukamachi K, Matsuoka Y, Takasuka N, Takeshita F, Naito A, Iigo M, Alexander DB, Moore MA, Saito I, Ochiya T, Tsuda H. Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas. *Carcinogenesis*. 27: 2497-2510, 2006.
2. 学会等発表
(国内発表)
- 1) イメージング技術によるがん細胞の可視化と RNAi 治療評価系への応用、落谷孝広、第1回医療バイオワークショップ (2006.4.24 東京工業大学) 招待講演
- 2) ヒト幹細胞から分化した肝細胞、落谷孝広、第13回 HAB 研究機構学術年会 シンポジウム (2006.5.19 東京) 招待講演
- 3) Functional screening of the genes correlated with drug resistance in breast cancer using Atelocollagen-mediated siRNA delivery in vitro and in vivo. Kimi Honma, Kyoko Iwao-Koizumi, Fumitaka Takeshita, Kazuki Nemoto, Jun Onodera, Yu Aso, Hiroshi Itoh, Kikuya Kato, Takahiro Ochiya 第20回国際生化学・分子生物学学会議 (2006.6.22 京都)
- 4) ステム細胞の肝細胞分化制御、落谷孝広、(シンポジウム) 第13回肝細胞研究会 (2006.7.1 旭川) 招待講演
- 5) アテロコラーゲン DDS による siRNA のがん治療モデル、落谷孝広、(シンポジウム) 第65回日本癌学会学術総会 (2006.9.30 横浜)
- 6) 転移性ヒト乳がん細胞に対する RNAi による治療効果の検討、竹下文隆、アグネスバナス、落谷孝広、第65回日本癌学会学術総会 (2006.9.30 横浜)
- 7) アテロコラーゲン siRNA 導入技術による薬剤耐

性関連遺伝子の機能解析、本間紀美、小泉恭子、竹下文隆、西尾和人、加藤菊也、落谷孝広、第65回日本癌学会学術総会(2006.9.30 横浜)

8) アテロコラーゲン DDS で siRNA のがん治療は可能なのか、落谷孝広、バイオテクノロジージャパンセミナー(2006.11.13 東京) 招待講演

9) がん転移モデルの in vivo イメージング、落谷孝広(シンポジウム) 第23回日本疾患モデル学会総会(2006.11.30 群馬) 招待講演

10) アテロコラーゲン DDS による RNAi 創薬、落谷孝広(セミナー) 第27回ヒューマンサイエンス総合セミナー(2007.1.23 東京) 招待講演

11) siRNA によるがん治療モデル: RNA 干渉による抗がん剤増感の試み、落谷孝広(シンポジウム) 第9回癌治療増感研究シンポジウム(2007.2.11 奈良) 招待講演

(海外発表)

1) FASEB Liver Conference on Liver Growth, Development & Disease, (July 22-27 2006, Colorado, USA) Ochiya T. Title: Generation of hepatocytes from ES cells. 招待講演

2) The 5th Sino-Japan Joint Conference, (October 5-8 2006, Shanghai, China) Ochiya T. Title: Therapeutic potential of atelocollagen-mediated delivery of siRNA against cancer. 招待講演

3) Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society, (Oct 19-21, 2006, NY, USA) Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Title: Atelocollagen-mediated delivery of siRNA against cancer.

4) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan, June 18-23, 2006 Yamamoto Y, Teratani T, Murata S, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. Transcriptome profiling of hepatic differentiation from mesenchymal stem cell.

5) Gordon Research Conference-Molecular cell biology July 2-7, 2006, USA, Yamamoto Y, Teratani T, Murata S, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. Transcriptome Analysis to Define the Hepatic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cell.

6) 9th International Conference Drug and Gene-based Therapeutics, Agia Pelagia, island of Crete, Greece, September 2-8, 2006. Takeshita F, Ochiya T.: Efficient Small Interfering RNA delivery to metastatic tumors. 招待講演

7) International Genomic Imprinting Workshop 2006, Morita S, Fukasawa M, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, Hatada I. Genomic imprinting in dicer 1-hypomorphic mice and EIF2C2 - deficient mice.

(poster)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願中:「ヒト肝細胞様細胞及びその利用」特許出願番号 2005-042364

EPC 出願準備中

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

クラニアルウインドウ法を用いた人工染色体保持細胞の安全性確認

分担研究者 谷口 英樹 横浜市立大学大学院・医学系研究科・教授

研究要旨

HAC ベクターは、ヒト培養細胞において安定に保持されることが確認されている。本研究は、HAC ベクター導入細胞の生体内における組織再構築能や安全性を確認すること、および HAC ベクターにより導入した遺伝子の生体内における長期発現を確認することを目的として、Factor VIII 遺伝子導入標的候補細胞である間葉系幹細胞を用いた血管組織構造の再構成系の確立を試みた。その結果、クラニアルウインドウ法を用いて間葉系幹細胞と血管内皮細胞を細胞外マトリックスと共に移植することにより、生体内において長期間（150 日以上）にわたり維持され得る血流を伴った血管網構造を再構成することの可能な *in vivo* 実験系を確立した。

A. 研究目的

Factor VIII 遺伝子を用いた血友病に対する遺伝子治療は、既に臨床試験が実施されているものの、十分な成果を挙げるには至っていない。すなわち、導入した Factor VIII 遺伝子の発現が一過性で消失してしまうことから、継続的な治療効果を得るには至っていない。

これらの問題点は、鳥取大学大学院医学研究科生体機能工医学講座（押村光雄教授）において開発中の HAC を用いることで、ウイルスベクターに起因する搭載遺伝子サイズの問題や安全性の問題を克服できる可能性がある。また、タンデムに多コピーつなぐことにより、Factor VIII の高効率産生系を確立することも HAC を用いてはじめて可能になる。押村らは、既にインスレーター配列の利用により、プロモーターの活性を長期にわたって安定に維持できること、実際に発現ユニットのコピー数に応じて発現量が変化することなどを確認しており、本研究で目指す Factor VIII 高発現系の構築についても実現可能性が非常に高いといえる。

本研究では、このような Factor VIII 遺伝子を多コピー搭載する血友病治療用人工染色体ベクターが確立された際に問題となる、HAC 導入細胞の機能解析、特に生体内へ移植した後の組織再構築能と長期的な安全性についてクラニアルウインドウ法を用いて検討した。

B. 研究方法

血管ネットワーク再構築の基本的な手技は、小池らの方法に従った（Koike. *Nat. Nature* 2004, supplemental data）。ヒト血管内皮細胞（Human Umbilical Vascular Endothelial Cells: HUVEC）（Cambrex, U.S.A.）の培養は EGM2 付属添加因子キット（Cambrex）を添加した

EGM-2 培地を用いて、保障継代回数（5 回）以内の継代数で培養した。マウス間葉系前駆細胞株（C3H10T1/2）（Riken Bioresource Center Cell Bank, Tsukuba, Japan）は、Basal Medium Eagle（GIBCO, U.S.A）にウシ胎児血清 FBS（JRH bioscience）を最終濃度 10% で加え Penicilin/Streptomycin（GIBCO）を 1% 添加したものをを用いて培養した。それぞれ 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で培養した。各々の細胞は標準的な方法でトリプシン処理を施し、細胞数を計測後、HUVEC は 0.8×10⁶ 個、C3H10T1/2 は 0.2×10⁶ 個の細胞を用いて Rat Tail Collagen, Type I Gel（BD Biosciences, U.S.A）へ包埋した。包埋に用いたゲルは、コラーゲン最終濃度が 1.5 mg/ml になるように 25 mM HEPES buffered EGM-2 で希釈した後、Human Plasma Fibronectin（Sigma）を 90 μg/ml で添加し、pH7.4 へ調整したものを 1 ml 用いた。ゲルが固化したのち、EGM-2 培地を 1ml 上層添加し一昼夜インキュベーター内で培養した。包埋 24 時間後、あらかじめ作成しておいたクラニアルウインドウへ移植した。

クラニアルウインドウ作製は主に Yuan らの方法に従った。すなわち、NOD/scid マウス頭部皮膚を切開し、頭蓋骨表面の骨膜を除去した後、歯科用マイクロドリル（Fine Science Tools, U.S.A.）で円形を描きながら頭蓋骨を徐々に薄削した。硬膜を除去し出血が見られないことを確認した後、生理食塩水（Otsuka Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan）で脳表面を満たし、特注円形スライドガラス（MATSUNAMI, Osaka, Japan）を表面に乗せ、接着剤により強固に封入し、クラニアルウインドウ作成マウスとした。

移植後のライブ観察は、マウスを仰臥位固定し、

倒立蛍光顕微鏡を用いて観察した。PBS で10mg/ml に調整した FITC-Dextran (Molecular probes, U.S.A.) 及び Rhodamin-Dextran (Molecular probes) を尾静脈から注射し、血流を緑色および赤色に可視化することにより観察を行った。組織学的解析は、クラニアルウインドウ内的大脑組織と移植ゲルを共に摘出し、パラフィンおよび凍結包埋を作成し薄切した後、Hematoxylin & Eosin (HE) 染色ならびに各種免疫染色を行い実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は、将来的にヒト遺伝子治療に利用可能な基盤技術をマウス個体レベルで確立することを目標とする。したがって患者個体への適用を含むものではない。ヒト血管内皮細胞は CAMBREX 社から研究用として販売されているものを購入、利用した。本研究の実施にあたっては、動物実験委員会の承認を受けた後に実施し、実験動物の愛護については安楽死の方法を含めて十分に配慮して研究を遂行した。

C. 研究結果

初年度においては、小池らによりすでに報告されている生体内血管網再構築実験(Koike.Netal. 2004)の再現性を確認した。移植したゲルの存在領域、すなわち脳表面と封入したカバーガラス間へ焦点を設定し観察を行った結果、移植後16日目以降においてHUVECと10T1/2により再構成された血流を伴う血管組織構造が観察された。これらは移植後37日目、さらには移植後136日目以降においても長期間安定して存在し続けることが確認された。また、HE染色による組織学的解析を行った結果、移植後28日目及び移植後150日目の移植ゲル内において、管腔構造を形成する血管構造が確認された。

再構築された血管組織構造の免疫染色法による解析では、再構成血管は血管内皮細胞が管腔構造を形成し、その周囲を血管壁細胞(平滑筋細胞やペリサイト)が取り巻く適正な構造を有していることが判明した。すなわち、血管内皮細胞マーカーであるPlatelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1(PECAM-1)陽性の血管内皮細胞と、その周囲に存在する平滑筋マーカーである α -Smooth Muscle Actin (α -SMA)を発現した細胞により血管組織構造が再構成されていることが確認された。

D. 考察

Factor VIII タンパク質の生体内供給を目的とした血友病治療用人工染色体ベクターが確立された場合には、それらを用いた遺伝子導入の標的細胞として血管組織構成細胞が第1候補となると考えら

れる。すなわち、Factor VIII タンパク質が産生され、それらが効率良く血流中に放出され全組織へ供給されていくためには、血管組織を構成する細胞への遺伝子導入に優位性があると考えられる。

血管は、主として血管内皮細胞と血管平滑筋細胞や周皮細胞などの間葉系細胞から構成されており、血管内皮細胞は血管内皮前駆細胞(EPC)から分化派生し、血管平滑筋細胞や周皮細胞などは間葉系幹細胞から分化派生する。生体内(患者内)において長期的にFactor VIII タンパク質が供給され続け、臨床的に有効な治療効果を得るためには、遺伝子導入した標的細胞から多くの遺伝子搭載細胞が増殖し、かつ、それらが長期的に維持される必要がある。これらの条件を満たすためには、高い増殖能・自己複製能・組織再構築能を兼ね備えた体性幹細胞の標的細胞としての利用が望ましいと考えられる。

このような観点から、本年度の研究において、ヒト血管内皮細胞とマウス間葉系前駆細胞を用いた血管組織構造の再構築系を確立した。150日以上長期間にわたり、血流を伴った血管組織(血管網)構造が維持され続けたことから、HAC導入血管系幹/前駆細胞を用いた実験系へと発展させることが可能であることが確認されたといえる。

今後、ヒト血管内皮細胞とヒト間葉系幹細胞を用いた完全なヒト型血管組織の再構築系を確立するとともに、HAC導入ヒト間葉系幹細胞を用いたヒト型血管組織の再構成へと進める予定である。これらの研究により、HACを用いる血友病に対する新規遺伝子治療に関する基盤技術が開発され、臨床応用への重要なステップになると考えている。

E. 結論

本研究では、期待通り血管内皮細胞と間葉系前駆細胞を用いた血管組織(血管網)構造の再構築系が確立された。HAC導入ヒト間葉系幹細胞の有効性や安全性を詳細に確認することができる生体内評価系に目処がついたことから、血友病の新規治療法としてのHACの将来的な利用に向けた研究が加速されると期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表:

谷口英樹:肝臓における組織幹細胞と癌幹細胞 病理と臨床 2007;25(4)331-336

谷口英樹:肝臓における癌幹細胞(cancer stem cell)の

同定 *Surgery Frontier* 2007:14(1)95-97

谷口英樹、大島祐二:膵臓における組織幹細胞の分離・同定 *最新医学* 2006:61(7)28-34

谷口英樹:腸管上皮におけるインスリン産生細胞の異所性誘導 *Diabetes Frontier* 2006:17(3)324-329

谷口英樹、鈴木淳史、千葉哲博:肝臓における幹細胞研究の動向 *医学のあゆみ* 2006:217(5)429-433

谷口英樹、千葉哲博:固定臓器における組織幹細胞研究の重要性—幹細胞と癌の接点— *学術月報* 2006:59(4)

谷口英樹、千葉哲博、大島祐二:肝臓・胆管・膵臓の発生的な関連性 *肝胆膵* 2006:52(2)167-172

中村英志、谷口英樹:ヒト由来幹細胞の創薬プロセスへの応用 <新連載>最先端の医療とそれを支える基礎研究の現状と展望 *HAB NEWSLETTER* 2006:12(2)14-16

2. 学会発表:

Zheng YW, Ohkohchi N, Taniguchi H: Hepatocellular transplantation contributes stable hepatic replacement included the reconstitution of bile ductules 日本分子生物学会2006フォーラム「分子生物学の未来」. 名古屋. Dec.6-8, 2006

谷口英樹:外科領域への幹細胞生物学のインパクト 第33回日本臓器保存生物医学学会総会 シンポジウム Nov.23-24,2006 東京

千葉哲博、岩間厚志、谷口英樹:肝幹/前駆細胞における自己複製メカニズムの解明 第10回日本肝臓学会大会 シンポジウム Oct.11-12,2006 札幌

千葉哲博、喜多かおる、鄭允文、横須賀 収、岩間厚志、谷口英樹:肝幹/前駆細胞の自己複製機構と癌化過程の関連性の検証 第65回日本癌学会学術総会 Sep.28-30,2006 横浜

大島祐二、石川桃太郎、鈴木淳史、大河内信弘、谷口英樹:膵管上皮特異的マーカーを用いた膵前駆細胞の

分離とインスリン産生細胞への分化誘導 日本消化器外科学会定期学術総会 July 13-15,2006 横浜

谷口英樹:肝幹細胞を対象とした腫瘍化プロセスの再構成 第13回肝細胞研究会 シンポジウム June30-July1,2006 旭川

千葉哲博、喜多かおる、鄭允文、横須賀収、税所宏光、岩間厚志、谷口英樹:ポリコム遺伝子 Bmi-1 は幹細胞を制御する 第42回日本肝臓学会総会 ワークショップ May 25-26,2006 京都

谷口英樹:組織幹細胞を用いた眼科プロセスの再構成 第95回日本病理学会総会 シンポジウム Apr.30-May 2,2006 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願準備中

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ren X, Tahimic CG, Katoh M, Kurimasa A, Inoue T, Oshimura M.	Human artificial chromosome vectors meet stem cells: new prospects for gene delivery.	Stem Cell Rev.	2	43-50	2006
黒崎 創、押村光雄	遺伝子・再生医療をめざしたヒト人 工染色体	医学のあゆみ	219	227-228	2006
任 鮮英、押村光雄	遺伝子導入のためのヒト人工染色体 ベクター	分子細胞医療	5	39-46	2006
平塚正治、押村光雄	遺伝子・再生医療のためのヒト人工 染色体 (HAC) ベクター	再生医療	5	528-533	2006

Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T.	Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes.	Hepatology	in press	in press	2007
Morita S, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, Hatada I.	One Argonaute family member, eIF2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation.	Genomics	in press	in press	2007
Watanabe H, Ochiya T, Ueda S, Kominami Y, Gon R, Nishiki M, Hayashi M, Sasaki A, Shiraishi M, Kashimoto N, Myojin Y, Kamiya K.	Differentiation of a hepatic phenotype after heterotropic transplantation of heart, kidney, brain, and skin tissues into liver in F344 rats.	Biochem Biophys Res Commun.	354	841-845	2007
Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T.	Stem cells into liver"--basic research and potential clinical applications	Adv Exp Med Biol.	585	3-17	2006
Takeshita F, Kodama M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Ueda S, Teratani T, Yamamoto Y, Tamatani T, Kanegasaki S, Ochiya T, Quinn G	Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells.	Diabetologia	49	2948-2958	2006
Kosaka N, Kodama M, Sasaki H, Yamamoto Y, Takeshita F, Takahama Y, Sakamoto H, Kato T, Terada M, Ochiya T.	FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation	FASEB J	20	1484-1485	2006

Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I.	MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cell.	Genes Dev	20	1321-1330	2006
Fukaya M, Isohata N, Ohta H, Aoyagi K, Ochiya T, Nakanishi Y, Taniguchi H, Sakamoto H, Shimoda T, Nimura Y, Yoshida T, Sasaki H.	Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse type gastric cancer	Gastroenterology	131	14-29	2006
Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S.	Atelocollagen-mediated Drug Discovery Technology	Expert Opin. Drug Discov.	2	159-167	2007
Hanai K, takeshita F, Honma K, nagahara S, maeda M, Minakuchi Y, Sano A, Ochiya T.	Atelocollagen-mediated systemic DDS for nucleic acid medicines.	Ann N Y Acad Sci.	1082	9-17	2006
Kurokawa Y, Honma K, Takemasa I, Nakamori S, Kita-Matsuo H, Motoori M, Nagano H, Dono K, Ochiya T, Monden M, Kato K.	Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers	Int J Oncol	28	383-391	2006
Fujii T, Saito M, Iwasaki E, Ochiya T, Takei Y, Hayashi S, Ono A, Hirao N, Nakamura M, Kubushiro K, Tsukazaki K, Aoki D.	Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer.	Int J Oncol	29	541-548	2006
Yanagihara K, Takigahira M, Takeshita F, Komatsu T, Nishio K, Hasegawa F, Ochiya, T.	A new photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination	Cancer Res.	66	7532-7539	2006
Takeshita F, Ochiya T.	Therapeutic potential of RNA interference against cancer	Cancer Sci.	97	689-696	2006
Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, Ochiya T, Hatada I,	Genomic imprinting in Dicer1-hypomorphic mice.	Cytogenet Genome Res.	113	138-143	2006
Ueda S, Fukamachi K, Matsuoka Y, Takasuka N, Takeshita F, Naito A, Iigo M, Alexander DB, Moore MA, Saito I, Ochiya T, Tsuda H.	Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas.	Carcinogenesis	27	2497-2510	2006

上野康晴、 <u>谷口英樹</u>	胆管上皮細胞と肝細胞の分化転換	肝胆膵	53(6)	1053-1057	2006
<u>谷口英樹</u>	再生医療とGLP-1	内分泌・糖尿病科	23(3)	267-275	2006
<u>谷口英樹</u> 、大島祐二	膵臓における組織幹細胞の分離・同定	最新医学	61(7)	28-34	2006
<u>谷口英樹</u>	腸管上皮におけるインスリン産生細胞の異所性誘導	Diabetes Frontier	17(3)	324-329	2006
<u>谷口英樹</u> 、鈴木淳史、千葉哲博	肝臓における幹細胞研究の動向	医学のあゆみ	217(5)	429-433	2006
<u>谷口英樹</u> 、千葉哲博	固定臓器における組織幹細胞研究の重要性—幹細胞と癌の接点—	学術月報	59(4)		2006
<u>谷口英樹</u> 、千葉哲博、大島祐二	肝臓・胆管・膵臓の発生学的な関連性特集「肝胆膵での粘液生産腫瘍と嚢胞性腫瘍」	肝胆膵	52(2)	167-172	2006
中村英志、 <u>谷口英樹</u>	ヒト由来幹細胞の創薬プロセスへの応用 <新連載>最先端の医療とそれを支える基礎研究の現状と展望	HAB NEWSLETTER	12(2)	14-16	2006