

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

シアロムチン PCLP1 による脈管内皮幹細胞の分離とその培養系を用いた
血管／リンパ管再生医療の基盤技術の確立に関する研究

平成 17 年度～19 年度 総括研究報告書

主任研究者 宮島 篤

平成 20 (2008) 年 4 月

目 次

I	総括研究報告	
	シアロムチン PCLP1 による脈管内皮幹細胞の分離とその培養系を用いた血管／リンパ管再生医療の基盤技術の確立に関する研究	
	宮島 篤	1
II	研究成果の刊行に関する一覧表	32
III	研究成果の刊行物・印刷	38

I 総括研究報告

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）
総合研究報告書

研究課題：シアロムチン PCLP1 による脈管内皮幹細胞の分離とその培養を用いた血管/リンパ管の再生医療の基盤技術の確立に関する研究

主任研究者：東京大学分子細胞生物学研究所・教授 宮島 篤

研究要旨

生体内に存在する脈管内皮前駆細胞は、各種血管およびリンパ管内皮細胞への分化能を有している。本研究では、(1)脈管内皮前駆細胞の性状を明らかにするとともに、その培養技術を確立し、各種血管およびリンパ管の再生医療における移植細胞源としての可能性を検討した。また、(2)生体内で多種多様な脈管内皮細胞が形成される分子基盤を明らかにすることで、幹細胞から目的とする組織特異的内皮細胞を選択的に分化誘導するシステムを開発し、脈管内皮前駆細胞の効果的な利用法の確立を目指した。

マウス胎児肝臓に存在するPodocalyxin-like protein1 (PCLP1)強陽性細胞は、ストローマ細胞非存在下においてstem cell factor、oncostatin M、basic FGF 依存的に増殖し敷石状のコロニーを形成した。増殖した細胞はalphaSMA やMesothelinなど間葉系細胞のマーカーを発現する一方で、CD31(PECAM1)やLyve-1などの脈管内皮細胞のマーカーはほとんど発現していなかった。サイトカイン依存的に増殖した細胞を新生児肝臓に移植したところ肝臓門脈周囲の間葉系組織に生着が認められ、一部の細胞はCD31やLyve-1を発現していた。PCLP1強陽性細胞は、生体内では肝臓ローブ表層に存在しており、胎生14日目以降ではMesothelinを共発現することから中皮前駆細胞であると考えられた。脈管の内皮細胞や壁細胞の一部は発生過程において中皮組織より生じること、移植実験の結果よりPCLP1強陽性細胞は脈管に生着することから、脈管系再生のための細胞源として有用である可能性が示唆された。

ES細胞から内皮細胞を誘導する系において、VEGFに加えTGFシグナルの阻害剤を添加することにより、胎児型未成熟肝類洞内皮細胞が分化誘導されることが明らかとなった。成熟内皮細胞の細胞移植療法により疾患モデルマウスの症状が改善するとの報告もあることから、本研究で樹立したES細胞からの組織特異的内皮細胞の分化誘導系は、あらかじめ試験管内で内皮細胞を分化させて細胞移植を行う治療戦略に利用可能であると考えられた。

本報告書では第一部において脈管系前駆細胞の性状解析、および培養技術の確立について、第二部において脈管内皮細胞が多様性を獲得する分子機構の解明について報告する。

第一部 脈管系前駆細胞の性状解析および培養技術の確立

1- A. 研究目的

高等動物の循環器系を構築する心筋、血管、リンパ管および血液細胞はいずれも中胚葉由来であり、特に血管内皮細胞と血液細胞には、それらに共通の前駆細胞（ヘマンジオブラスト）が側板中胚葉に存在することが古くから想定されていた。分子生物学的手法を用いてこのヘマンジオブラストの存在が我々を含む複数の研究グループにより証明されている (Kyunghheeら、1998; 原ら、1999; Huberら、2004)。我々は、成体型造血幹細胞が生じる組織として知られる胎生 11.5 日目のマウス大動脈-生殖腺隆起 - 中腎 (aorta-gonad-mesonephros; AGM) 領域に存在する CD34 ファミリーのシアロムチンである PCLP1 を発現する細胞が *in vitro* および *in vivo* で血球と血管内皮細胞の双方に分化することを見出し、PCLP1 を AGM 領域のヘマンジオブラストマーカーとして報告した(原ら、1999; 田村ら、2002)。AGM 領域で生じた成体型造血幹細胞は、その後胎児肝臓へと移行し、出生直前まで肝臓は胎児期の主要な造血器官として機能する。同時に胎児肝臓は、代謝器官としての機能を獲得しつつその容積を急速に増していくことから、脈管系を構成する細胞も急速に増幅する必要があり、増殖性の高い脈管前駆細胞が存在すると考えられる。

我々は、胎児期造血の最盛期に相当する胎生 14.5 日目の肝臓に PCLP1 を強く発現する細胞集団が少数存在することを見出し、これを PCLP1 強陽性細胞と命名した。PCLP1 強陽性細胞は、OP9 ストローマ細胞との共培養において高い増殖活性を示し、血管内皮細胞の増殖/分化を促進する増殖因子存在下でリンパ管マーカーを含む複数の脈管内皮マーカーを発現したことから、既知の血管内皮前駆細胞とは異なる新規の脈管幹細胞を含むと考えられた。本プロジェクトの最終目標は血管/リンパ管等の再生医療に利用可能な脈管内皮前駆細胞の *in vitro* 増幅法および分化誘導法の構築である。我々の見出したマウス胎児肝臓 PCLP1 強陽性細胞は、この目的を実現するために有用な細胞を含むと考え、この細胞集団の性状解析を行った。

1- B. 研究方法

胎児肝臓細胞のフローサイトメトリー解析およびセルソーティング

胎生 12.5 日肝臓はトリプシン処理により、胎生 14.5-16.5 日肝臓はコラゲナーゼ/ディスパーゼ処理により細胞を分散し、細胞懸濁液を調製した。細胞はラット抗マウス Fc 受容体モノクローナル抗体にて Fc 受容体ブロッキング処理を行った後に各種蛍光標識モノクローナル抗体 (ラット抗マウス PCLP1、Flk-1、PECAM1、CD34、CD45、TER119) またはビ

オチン化ラット抗マウス Mesothelin モノクローナル抗体を反応させた。ビオチン化抗体についてはストレプトアビジン-APC を反応させ、FACS Calibur (Becton Dickinson 社) または EPICS ALTRA (BECKMANCOULTER 社) にて解析した。セルソーティングには EPICS ALTRA を使用した。

OP9 共培養系を用いた PCLP1 強陽性細胞の性状解析

PCLP1 強陽性細胞は GFP トランスジェニックマウスの胎児肝臓よりセルソーターで分離し、サブコンフルエントの OP9 上に播種した。培養後は GFP 陽性細胞を PCLP1 強陽性細胞由来細胞としてセルソーターにて OP9 から分離し、RT-PCR 解析および新生児肝移植に用いた。

PCLP1 強陽性細胞の新生児肝移植法による *in vivo* 機能解析 (1)

胎生 14.5 日 GFP トランスジェニックマウスの胎児肝臓よりセルソーターで分離した PCLP1 強陽性細胞をテスト細胞とし、これを直接あるいは OP9 共培養増幅後に野生型の新生児肝臓に移植した。OP9 共培養増幅後の細胞はセルソーターにて GFP 陽性細胞を OP9 細胞と分離し、GFP 陽性細胞のみを移植した。新生児肝移植法は他文献 (Yoder ら、1997) に準じた。

ストローマ細胞非依存的な胎児肝臓PCLP1強

陽性細胞培養系の確立

ストローマ細胞を使用しない *in vitro* 増幅系の確立を目的に、培養ディッシュのコーティング、培地、血清、増殖因子の添加など、様々な培養条件を網羅的に検討した。

免疫組織染色

胎児、新生児および成体肝臓の凍結切片を作製し、ラット抗マウスPCLP1モノクローナル抗体、ヤギ抗マウスPCLP1ポリクローナル抗体、ラット抗マウスMesothelinモノクローナル抗体および蛍光標識ウサギ抗GFPポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行った。未標識抗体の検出には二次抗体として蛍光標識抗ラットIgGまたは蛍光標識抗ヤギIgGを用いた。移植個体の免疫組織化学染色には、ウサギ抗GFPポリクローナル抗体、ラット抗マウスPECAM1モノクローナル抗体およびラット抗マウスLyve-1モノクローナル抗体を用いた。必要に応じて核をDAPIで共染色した。染色後の切片は直ちに蛍光顕微鏡で観察/撮影した。

PCLP1強陽性細胞の新生児肝移植法による *in vivo* 機能解析 (2)

胎生 12.5 日 GFP トランスジェニックマウスの胎児肝臓より PCLP1 強陽性細胞をセルソーターで分離し、ストローマ細胞非依存的培養系で増幅した。これをテスト細胞として野生型新生児肝臓に移植した。移植 3-5 週後に

肝臓を摘出し、ゲノミック PCR および免疫組織染色を行った。

1-C. 結果

胎生 14.5 日胎児肝臓細胞のフローサイトメトリー解析

溶血処理後の胎生 14.5 日胎児肝臓細胞は、フローサイトメトリー法により PCLP1 の発現強度と細胞の大きさから 4 つの異なる分画に分けられ、我々はこれらの細胞集団を PCLP1 強陽性 (0.2-0.5%)、PCLP1 中等度陽性 (約 40%)、PCLP1 弱陽性 (約 40%) および PCLP1 陰性 (約 10%) とした (図 1)。血球マーカーおよび内皮細胞マーカーとの多重染色により、PCLP1 中等度陽性細胞集団は主に未分化な赤芽球と成熟内皮細胞を含み、PCLP1 弱陽性細胞集団は成熟赤血球、PCLP1 陰性細胞は白血球をそれぞれ含むことが明らかとなった。PCLP1 強陽性細胞は血球、内皮マーカーのいずれも陰性であった。

OP9 共培養系における PCLP1 強陽性細胞の性状解析

セルソーターを用いて胎生 14.5 日胎児肝臓細胞から分離した PCLP1 強陽性細胞は、単独では培養が成立しなかったが、OP9 細胞株との共培養で内皮細胞様のシート状のコロニーを形成し、数十倍に増殖した (図 2A)。さらに RT-PCR による遺伝子発現解析の結果、培養液に血管内皮増殖因子 (VEGF) を添加した場合にのみ内皮細胞特異的遺伝子の発現が

誘導された (図 2B)。さらに複数の脈管内皮マーカーの発現を検討した結果、リンパ管マーカーは培養前後で発現が認められ、動脈、静脈マーカー遺伝子は培養後に発現誘導されていた (図 2C)。

PCLP1 強陽性細胞の *in vivo* 機能解析 (1)

セルソーターを用いて胎生 14.5 日 GFP トランスジェニックマウス胎児肝臓細胞から分離した PCLP1 強陽性細胞を直接あるいは OP9 共培養後に新生児肝臓に移植し、8-20 週後に臓器を摘出し、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学染色にて移植細胞の生着を検討した。その結果、培養前と培養後のいずれの細胞を移植した場合でも、肝臓、小腸、腎臓、心臓など複数の臓器において GFP 陽性細胞を認め、一部は血管壁に寄与していた (図 3)。

ストローマ細胞非依存的な培養系の確立

OP9 細胞株は血球/血管内皮細胞への分化誘導活性を有する事が知られ、ES 細胞および胎児組織から血球/血管内皮細胞への分化誘導に汎用されているが、ストローマ細胞としての活性が不安定であり、実験毎の増幅効率が安定しないという問題があった。さらに、我々の見出した PCLP1 強陽性細胞を細胞移植療法のための材料とするためには、ウイルス感染や免疫反応の原因となりうる異種生物由来物質の混入を極力避ける必要があり、マウス由来である OP9 細胞株の利用は好ましくない。

これらの理由から、ストローマ細胞に依存しない培養系を確立することを目的として、培養ディッシュのコート、培地、血清、増殖因子の添加など、さまざまな培養条件を網羅的に検討した。その結果、IV型コラーゲンコート、alpha-MEM培地、血清有り(10%)、増殖因子無しの条件において10-20倍に増殖可能であった。しかしながら、この条件下では主として繊維芽細胞様の細胞が生じ、OP9との共培養系で認められた高い増殖活性と脈管内皮マーカ分子の発現を示す敷石状のコロニーはほとんど形成されなかった。そこで、OP9非存在下で高い増殖活性と敷石状のコロニー形成を誘導するためには、血清以外にも何らかの増殖因子、サイトカインが必要であると考え検討を行った。

その結果、マウス胎生11.5日目のAGM領域より分離したヘマンジオブラストの培養系で用いられるstem cell factor(SCF)、oncostatinM(OSM)、basic fibroblast growth factor(bFGF)の同時添加(SOF)により、高い増殖能をもった敷石状のコロニーが形成された(図4A)。OSM非存在下では主に繊維芽細胞様の細胞が増殖し、敷石状のコロニーはOSMとbFGFの両方が存在する場合に最も高頻度に出現し、かつ増殖能も高かった。SOFの存在下では、この細胞は40代以上もの継代培養が可能であった。培地中からサイトカインを除去すると増殖は速やかに停止した。フローサイトメトリー解析の結果、SOF存在下で増幅したこ

これらの細胞は、初代培養では約30%が、継代30回目の細胞では約90%が内皮細胞マーカであるFlk-1を発現していることが確認された(図4B)。しかしながら、成熟血管内皮細胞マーカであるPECAM1はほぼ陰性であった。そこで、増殖してコロニーを形成した細胞の性状を明らかにするために、発生の系譜上、内皮細胞と近縁の関係にある間葉系細胞、すなわち平滑筋細胞、繊維芽細胞、中皮細胞などのマーカ遺伝子の発現を検討した。その結果、WT1、Mesothelin、vimentin、alpha SMAなど平滑筋細胞や中皮細胞で発現するマーカの発現が認められた(図4B、C)。以上の結果から、ストローマ細胞非存在下で増殖してコロニーを形成する細胞は、間葉系/中皮系細胞であると考えられた。

免疫組織染色およびフローサイトメトリー法によるPCLP1強陽性細胞の肝臓内での存在部位の検討

PCLP1強陽性細胞集団の胎児肝臓内における組織学的情報を得るために、肝臓の免疫組織染色を行った。PCLP1強陽性細胞が真に脈管内皮前駆細胞であるのならば、脈管周囲の微小環境あるいは脈管そのものの特殊な部位に局在している可能性がある。そこで、まずはフローサイトメトリーに使用しているラット抗マウスPCLP1モノクローナル抗体で免疫組織染色を試みた。しかしながら、ラット抗マウスPCLP1モノクローナル抗体の染色性が

悪く、PCLP1 強陽性細胞の胎児肝臓での組織学的位置情報に関する手がかりは得られなかった。そこで、免疫組織染色に有用とされるポリクローナル抗体（ヤギ抗マウス PCLP1 ポリクローナル抗体）の使用を試みたところ、PCLP1 強陽性細胞を組織切片上で明確に検出することに成功した。胎生 12.5 日は、肝臓のローブが形成されて間もない時期であるが、各ローブ表面の 1 層の細胞層がローブを取り囲むように PCLP1 で強く染色された(図 5A)。この領域は将来中皮組織が形成される部位であることから、胎児肝臓に低頻度に存在する PCLP1 強陽性細胞集団は肝臓の表面を覆う中皮細胞である可能性が示唆された。胎生 14.5 日および 16.5 日に至ってもなお、胎児肝臓の表面に PCLP1 強陽性細胞が検出された(図 5A)。胎生 16.5 日の肝臓中皮を顕微鏡下で剥離し、中皮と中皮以外の細胞を別々に蛍光標識抗 PCLP1 抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、PCLP1 強陽性細胞は中皮組織を含むサンプルからのみ検出され、非中皮領域（実質領域）のサンプルからは検出されなかった(図 5B)。従って、免疫組織染色およびフローサイトメトリー法の双方で検出される PCLP1 強陽性細胞は同一の細胞集団であることが明らかとなり、さらにこの細胞集団は各ローブを覆う肝臓中皮細胞である可能性が示された。

次に肝臓の中皮細胞が一般的な中皮マーカーを発現しているのかどうかを検討するため、

抗マウス Mesothelin モノクローナル抗体を用いて胎児 (E14.5, E16.5) および成体マウス肝臓の免疫組織染色を試みた。胎生 16.5 日および成体肝臓では、ローブ表面の扁平な 1 層の細胞層が Mesothelin 陽性細胞層として検出された(図 6)。胎生 14.5 日以前の胎児肝臓の免疫組織染色では Mesothelin 陽性細胞は検出されなかった。一方、成体肝臓中皮の PCLP1 については、フローサイトメトリー法と免疫組織染色法のいずれにおいても陽性細胞はほとんど検出されなかった。

ストローマ非依存的培養系にて増幅した細胞の *in vivo* 機能解析

ストローマ非依存的培養系で増幅した細胞を新生児肝臓に移植し、3-5 週後に肝臓を摘出し、ゲノミック PCR による GFP トランスジーンを検出を試みた。その結果、移植個体の肝臓組織片からは GFP ゲノムが検出された(図 7A)。次に抗 GFP 抗体を用いた免疫組織染色法にて移植細胞を検出した結果、門脈壁そのもの、またはその周辺の胆管壁に近接して GFP 陽性細胞がクラスター状に局在している様子が複数の個体で認められた(図 7B)。これらの GFP 陽性細胞の一部は内皮マーカー PECAM1 あるいはリンパ管マーカー Lyve-1 を発現していた(図 7B)。GFP 陽性細胞は中心静脈周囲とローブ表面の中皮領域には認められなかった。

1-D. 考察

我々はこれまでに、成体型造血幹細胞が生じるとされる胎生 11.5 日マウス胚の AGM 領域に存在する血球／血管内皮共通前駆細胞（ヘマンジオブラスト）が PCLP1 を発現していることを報告している（原ら、1999）。また、胎児肝臓は動脈、静脈、類洞およびリンパ管など複数の脈管系を構築する器官であると同時に、発生にともない臓器の容積を急激に増すことから増殖性の高い脈管前駆細胞が存在する臓器であると考えられる。

我々が胎児肝臓より見出した PCLP1 強陽性細胞は、OP9 ストローマ細胞との共培養において敷石状のコロニーを形成し、リンパ管内皮マーカを含む複数の脈管特異的マーカー分子を発現する。本プロジェクト初年度は、これまでの観察結果を再現することに加え、移植実験によって PCLP1 強陽性細胞が生体内に生着／機能しうることを確認した。次年度には、問題点を有する OP9 の使用を回避すべく OP9 非依存的培養系の構築を試みた。我々が採用した OP9 非依存的培養系では、未分化な内皮前駆細胞から内皮細胞までの一貫した内皮細胞マーカーである Flk1 の発現が強く誘導されており、同時にこの培養系は OP9 共培養系に比して極めて安定であり、本プロジェクトの目的に適していると考えられた。しかしながら、OP9 共培養系に比して成熟内皮細胞マーカーやリンパ管内皮マーカ発現が弱かったことから、内皮細胞に至る以前の未

分化な前駆細胞を増幅していると考えられ、継続してこの培養系を基盤に成熟内皮細胞を分化誘導するサイトカイン添加条件の検討を進めた。その結果、我々の確立したストローマ細胞非依存的培養系においては、Mesothelin を含む複数の中皮および間葉系マーカーの発現が誘導され維持されていることが明らかとなった。従って、本培養系では、主に中皮／間葉系細胞への分化が誘導されている可能性が示された。

一方、この培養系を用いて増幅した細胞を移植した複数個体の肝臓から、GFP 陽性細胞が検出されたことから、我々の確立したストローマ細胞非依存的培養系では、生体に生着しうる機能的な細胞が増幅されていると考えられる。さらに生着した GFP 陽性細胞の一部は内皮マーカー、リンパ管マーカーあるいは間葉系マーカーを発現し、門脈壁そのものまたは胆管周囲に局在していたことから、移植した細胞は脈管内皮のみならず繊維芽細胞や平滑筋細胞など脈管壁を構成する複数の間葉系細胞への分化能力を有していると考えられる。ストローマ非依存的 *in vitro* 培養系では主に中皮マーカ発現が誘導され、成熟内皮細胞への分化はほとんど認められなかったが、これらの細胞は *in vivo* での脈管壁細胞への分化能を保持している可能性が示された。移植した個体で中皮領域への寄与が認められなかった理由としては、増幅したテスト細胞はすでに *in vivo* で中皮へ分化する能力を失ってい

るか、あるいは新生児肝臓の内部へテスト細胞を注入する本法では細胞が中皮領域へ到達できないか、いずれかの可能性が考えられる。

成体の中皮組織は、組織学的には外胚葉性の体壁と内胚葉性の消化管の間に位置し、脈管内皮細胞と同じく側板中胚葉に由来する。しかし組織の形態は単層扁平上皮であり、肝臓を含めて体腔に面するあらゆる臓器の表面と体腔面を覆う。これらの中皮組織は動く臓器の表面の摩擦を防ぐと同時に互いに癒着するのを防いでいる。さらに中皮は臓器の保護にとどまらず、体腔液の調節、溶質の輸送、免疫的監視、細胞外マトリックス、各種プロテアーゼ、サイトカインの産生／分泌など、その機能は多岐にわたる (Mutsaers ら、2002、2003、2004)。従って、中皮組織は臓器や個体の恒常性維持に必須の役割を担っていると言えるが、中皮細胞の分化、増殖やその制御機構に関してはこれまでほとんど研究されていない。我々が本プロジェクトにより確立した培養系は、中皮細胞の性状解析には有用な手段となり得ると考えられる。

染色性の優れたポリクローナル抗体の使用により、最終年度には胎児肝臓切片上での PLCPI 強陽性細胞の組織学的存在部位を明らかにした。ローブ形成後間もない早期にすでにローブ表面を覆う一層の細胞層が PCLPI 強陽性細胞であり、この領域は後に肝臓中皮細胞となる領域である。OP9 共培養系を用いた場合は PCLPI 強陽性細胞から複数の脈管内皮

マーカーの発現が誘導されたことも、脈管内皮細胞と中皮細胞の発生学的起源はいずれも側板中胚葉であり、細胞系譜的に非常に近縁の細胞に由来することから説明できると考えられる。実際に、発生途上のトリ胚を用いた移植実験により、肝臓中皮細胞の一部が肝実質領域に侵入し、血管内皮細胞および壁細胞 (星細胞) の双方に分化することが示されている (Pererz-Pomarres ら、2004)。ほ乳類においても同様に、小腸や心臓形成において、脈管内皮細胞は主にこれらの組織をとりまく中皮組織に由来することが近年報告されており (Munoz-Chapuli ら、2002; Perez-Pomares ら、2002; Wilms ら、2005)、胚発生期に臓器の周囲をとりまく中皮細胞が実質領域に侵入し、脈管内皮の構築に寄与するという現象は体腔に面する複数の臓器に広く共通したメカニズムであり、さらに種を超えて保存された現象であるという認識が広まりつつある。これを支持する知見として、成熟した中皮細胞は脈管内皮細胞と共通する複数のマーカー分子を発現しており、LDL の取り込み能など機能面でも類似した活性を有していることが知られる。細胞の形態がリンパ管内皮細胞や血管内皮細胞と酷似しているとの報告もある。従って、脈管内皮細胞と中皮細胞の双方に分化可能な共通前駆細胞が存在する可能性も考えられる。OP9 は ES 細胞や胎児組織の未分化な前駆細胞から血球／血管内皮およびリンパ管内皮細胞の分化誘導に汎用されているストロ

一マ細胞であることから、脈管内皮細胞への潜在的な分化能を有する未分化な細胞に対し、脈管内皮への分化誘導を強く促進するものと推察される。

我々の確立したストローマ非依存的培養系では、未分化な前駆細胞を増幅しつつ、同時に脈管内皮細胞ではなく中皮細胞への分化誘導が起こっていると考えられる。しかしながら、この培養系で増幅した細胞は *in vivo* においてはリンパ管を含む脈管壁細胞への分化能を有している可能性が示された。従って、発生学的に近縁な脈管内皮細胞と中皮細胞の分化運命決定機構を明らかにすることができれば、我々が見出した知見と *in vitro* 増復系を基に脈管内皮細胞への効率的な分化誘導を行うことが可能になるかもしれない。

1-E. 結論

胎児肝臓PCLP1強陽性細胞は肝臓表面の中皮領域に存在することを見出し、この細胞を *in vitro* で無限に増幅可能なストローマ細胞非依存的培養系を確立した。この培養系では成熟リンパ管内皮細胞の分化誘導には至っておらず、脈管内皮細胞と発生学的／細胞系譜的に近縁な中皮細胞の分化が主におこっていた。しかし、この培養系では未分化細胞の無限増幅が可能であり、移植した場合は脈管壁への分化能を保持している可能性が示されことから、脈管内皮細胞への選択的かつ効率的な分化誘導法の探索により、移植医療応用への可

能性が開けるものと期待される。

参考文献

- Chapman et al., *Tissue and Cell* 39, 343-351 (2007)
- Pererz-Pomarres et al., *Dev. Dyn.* 229, 465-474 (2004)
- Munoz-Chapuli et al., *Tex Heart Inst J*, 29, 243-9 (2002)
- Perez-Pomares et al., *Int. J. Dev. Biol.* 46, 1005-1013 (2002)
- Wilms et al., *Development* 132, 5317-5328 (2005)

第二部 脈管内皮細胞が多様性を獲得する分子機構の解明

2- A. 研究目的

研究の背景

血管の内腔を覆う血管内皮細胞は、その存在部位によって多様な形態、特徴を有することが知られている。近年、このような血管内皮細胞の多様性が分子レベルで明らかになるにつれ、各種内皮細胞の分化・増殖の分子メカニズムについても明らかになりつつある。しかしながら、動静脈、リンパ管内皮細胞の解析が進展する一方で、組織特異的な毛細血管については、分子レベルでの解析は十分なされていない。

肝臓の脈管系には少なくとも門脈、肝静脈、肝動脈、類洞、リンパ管の5種類が存在する。肝類洞は肝臓特異的な毛細血管網であり、血管と組織間との物質交換を用意するための構造的な特徴がある。例えば、内皮細胞間の接着は緩く、基底膜は十分に発達していない。さらに、肝類洞を構成する肝類洞内皮細胞にはfenestraeと呼ばれる小孔が存在し、不溶性の脂質コロイドも透過することが可能である。その他、肝類洞内皮細胞には、異物取り込み能が高く、免疫抑制活性を有し、肝細胞の分化や増殖を制御するなどの活性が報告されている。

このように組織特異的血管内皮細胞は、解剖学的知見から、形態的特徴を有すること、各組織の働きを補うための特殊な機能を保持

することが知られている。しかし、内皮細胞の多様性がどのように形成されるのかについてはほとんど解析されていない。本研究では、

(1) 組織特異的な血管内皮細胞を分離・識別する手法を確立し、(2) これに基づき内皮細胞が多様性を獲得する分子機構を明らかにすることで、(3) 多様な内皮細胞の分化を人為的に制御可能とし、ひいては(4) 内皮細胞を用いた細胞移植療法、脈管再生医療の実現を目指すことを究極的な目標とした。

2- B. 研究方法

組織特異的内皮細胞を分離・識別可能なマーカー遺伝子の探索

肝類洞内皮細胞のマーカー遺伝子の探索は、網羅的遺伝子発現解析と、抗体ライブラリーのスクリーニングの二つの手法により行った。

(1) 遺伝子発現解析によるマーカー遺伝子の探索

遺伝子発現解析は、マウス成体肝臓の非実質細胞より既知のマーカーの組み合わせ(CD45陰性FcyR陽性)により肝類洞内皮細胞を含む細胞集団を分離した後、serial analysis of gene expression (SAGE)ライブラリーを作製し行った。得られた肝類洞内皮細胞集団の遺伝子発現プロファイルを、公共のデータベースに登録されている様々なマウス臓器、細胞株由来の遺伝子発現プロファイルと比較し、肝類洞内皮細胞集団で特異的に発現している遺伝子の抽出を行った。

遺伝子発現解析により同定された stabilin-2(Stab2)に対する抗体作製では、まず、マウスStab2の細胞外領域を恒常的に発現する細胞株を樹立し、免疫原として用いた。免疫したラットより回収したリンパ節細胞は、骨髓腫細胞株と細胞融合させハイブリドーマを作成した。マウスStab2抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングしたのち、限界希釈法によりクローン化し、ヌードマウスへ移植、腹水よりモノクローナル抗体を精製した。

(2) モノクローナル抗体スクリーニング法によるマーカー遺伝子の探索

モノクローナル抗体スクリーニング法では、まず、マウス胎児肝臓細胞（未成熟肝細胞、非実質細胞を含む、血液細胞を除く）をラットに免疫し、胎児肝臓細胞の膜抗原に対する抗体ライブラリーの作製を行った。その後、マウス胎児肝臓、成体肝臓の免疫組織化学により脈管系を特異的に染色する抗体のスクリーニングを行った。抗体の認識する抗原の同定は、レトロウイルスを用いたcDNA発現クローニング法によった。

肝類洞内皮細胞、リンパ管内皮細胞、それ以外の内皮細胞の分離・識別

免疫組織化学染色

マウス成体肝臓は凍結切片作製後、4%PFAで固定し抗体染色を行った。マウス胎児は4%PFAで固定した後、凍結し切片を作製した。必要に応じて、蛍光二重染色を行った。

フローサイトメトリー解析

マウス成体肝臓をコラゲナーゼ灌流法により分散した後、低速遠心操作により肝細胞と非実質細胞とに分離した。成体肝臓のフローサイトメトリー解析は、肝細胞がなく解析が容易な非実質細胞を用いて行った。成体肺、胎児肝臓、胎児全身は、コラゲナーゼで分散し解析に用いた。

RT-PCR解析

各種内皮細胞におけるmRNAの発現解析は、RT-PCR法のより行った。細胞の分離はセルソーターを用いて行った。

異物取り込み解析

セルソーターを用いて分離した細胞を、マトリックスコートした培養ディッシュに播種した後、蛍光標識アセチル化LDLを添加し、3-4時間後に取り込まれたアセチル化LDLを蛍光顕微鏡下で観察した。

組織特異的内皮細胞の分化制御因子の探索

(1) 遺伝子発現解析

胎生14日目のマウス胎児より肝類洞内皮細胞、Stab2陰性内皮細胞を、セルソーターを用いて分離し、RNAを精製、マイクロアレイ解析のサンプルとした。マイクロアレイ解析はAffymetrix社製GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Arrayを用いた。得られたデータはGeneSpringを用いて解析を行った。転写因子の抽出はGene Ontologyのタームにおいて'transcription', 'DNA binding'を含むものを選んだ。

(2) in vitro分化誘導系

マウスCCE ES細胞はゼラチンコートディッシュ上、LIFを添加し維持した。Flk1陽性の脈管前駆細胞の誘導は、LIF非存在下、IV型コラーゲンコートのディッシュ上で4日間培養することで行った (Yamashitaら、2000)。Flk1陽性脈管前駆細胞は磁気ビーズを用いて分離したのち、さらに3-6日間、VEGFを加えて培養し内皮細胞へと分化させた。阻害剤Xは培養4-6日目で加えた。内皮細胞の分化の評価は、フローサイトメトリー法、RT-PCR法、異物取り込み解析などで行った。

2- C. 研究結果

組織特異的内皮細胞を分離・識別可能なマーカー遺伝子の探索

組織特異的な血管内皮細胞を詳細に解析するためには、目的とする内皮細胞を分離・識別する手法を確立する必要がある。これまで、肝類洞内皮細胞の分離・識別には形態や細胞の比重などが指標とされてきたが、これらは電子顕微鏡や特殊な遠心装置が必要であり汎用性という点で難があった。また、マーカー遺伝子としてFcγRs、第8因子 (F8) などの報告があるが、特異性は低く分離・識別に用いるには適していなかった。本研究では、汎用性、特異性を兼ね備えたマーカー遺伝子の同定を目的とし、特異性の高い細胞表面抗原マーカーの探索を行った。細胞表面抗原マーカーは、それに対する抗体を用いることで生

細胞の分離も可能となり、実用性が高い。

(1) ヒアルロン酸受容体、stabilin-2の同定

肝類洞内皮細胞を含む細胞集団で多く発現している遺伝子の抽出を行った結果、23個の遺伝子が同定された (表2-1)。そのうち11個については既に肝類洞内皮細胞を含む内皮細胞で多く発現していることが知られている遺伝子であった。残りのうち4個については十分な解析がされておらず、新規の肝類洞内皮細胞マーカーである可能性が考えられた。既知の遺伝子の中には、ヒアルロン酸の取り込みに関する膜タンパク質、stabilin-2 (Stab2)が存在した。血中ヒアルロン酸の取り込みは、肝類洞内皮細胞を含む一部の組織特異的内皮細胞 (肝臓以外では脾臓や骨髄の類洞内皮細胞) に特徴的であることから、Stab2を機能的な肝類洞内皮細胞マーカーとして注目し以降の実験に用いた。

Stab2の発現を指標に (肝類洞) 内皮細胞を分離・識別することを目的に、マウスStab2に対するモノクローナル抗体を作製した。得られた4クローンのうち一つ34- 2は、フローサイトメトリー、免疫組織化学染色、ウェスタンブロットに使用可能であった (図2-1)。

(2) ヒアルロン酸受容体、Lyve-1の同定

免疫組織化学染色による抗体ライブラリーのスクリーニングの結果、胎児肝臓の類洞および成体肝臓のリンパ管を認識する抗体、14- 4を得た。14- 4抗体の抗原同定はレトロウィルスライブラリーを用いた発現クローニン

グ法により行った。その結果、ヒアルロン酸受容体Lyve-1が同定された（図2-2）。Lyve-1は、リンパ管内皮細胞マーカーとして広く用いられているが、肝類洞内皮細胞での発現も報告があることから、本研究では、リンパ管内皮細胞・肝類洞内皮細胞と、それ以外の内皮細胞とを識別するマーカーとして以降の実験に用いた。なお、我々が作製した抗マウスLyve-1抗体は、免疫組織化学染色では成体肝類洞内皮細胞を認識しないが、フローサイトメトリーでは認識することがわかった。これは、免疫組織化学染色では組織を固定するため、抗体が認識するエピトープが変性することによると考えられる。

肝類洞内皮細胞とリンパ管内皮細胞、それ以外の内皮細胞をいかに識別するか？

本研究で新たに導入したマーカー遺伝子Stab2、Lyve-1と、既存の内皮細胞マーカーを組み合わせることにより、肝類洞内皮細胞、リンパ管内皮細胞、それ以外の内皮細胞（動脈内皮細胞などを含む）をいかに分離・識別できるかについて、免疫組織化学染色、フローサイトメトリー法、RT-PCR法、培養細胞を用いた機能的アッセイにより検討した。

(1) 成体期

マウス成体肝臓を抗Stab2抗体により染色したところ、類洞においてシグナルが検出された。一方で、門脈、肝動脈、中心静脈の内皮細胞はStab2陰性であった（図2-3）。したがっ

てStab2は、肝臓内に存在する血管内皮細胞のなかでも、肝類洞内皮細胞を特異的に認識するマーカーであることが確認された。

マウス成体肝臓より分離した非実質細胞（肝類洞内皮細胞、それ以外の内皮細胞、星細胞、クッパー細胞、血液細胞などを含む細胞集団）をフローサイトメトリー法により解析したところ、Stab2の発現は血液細胞マーカーであるCD45が陰性で、内皮細胞マーカーであるCD31が陽性の内皮細胞集団において認められた。また、CD45陰性／CD31陽性細胞はLyve-1陽性、FcγRs陽性、CD34陰性、podoplanin陰性であった（図2-3）。以上の結果から、肝類洞内皮細胞はリンパ管内皮細胞と同様、Lyve-1陽性である一方で、podoplanin陰性であることが明らかとなった。

リンパ管内皮細胞やそれ以外の内皮細胞におけるマーカー遺伝子の発現を検討するために、マウス成体肺を用いて解析を行った。マウス成体肺のCD45陰性CD31陽性細胞には、podoplanin陽性細胞が存在するものの、FcγRs陽性細胞、Stab2陽性細胞は認められなかった（図2-3）。

更に、詳細な解析をRT-PCR法によって行った。肝類洞内皮細胞、肺由来リンパ管内皮細胞（podoplanin陽性）、肺由来内皮細胞（podoplanin陰性）におけるマーカー遺伝子の発現を検討した結果、肝類洞内皮細胞では第8因子（factor VIII, F8）が発現する一方で、ケモカインCcl21は発現しないこと。リンパ管

内皮細胞では逆にF8の発現が認められず、Ccl21の発現が認められることが明らかとなった(図2-4)。

以上の結果から、肝類洞内皮細胞とリンパ管内皮細胞、それ以外の内皮細胞を分離・識別するには、Stab2、FcγRs、F8、podoplanin、Ccl21の発現が良い指標となることが明らかとなった。

(2) 胎児期

マウス胎生14日目の肝類洞内皮細胞、リンパ管内皮細胞、それ以外の内皮細胞におけるマーカー遺伝子の発現を検討したところ、胎児肝類洞内皮細胞は成体と同様、Stab2陽性Lyve-1陽性である一方、成体とは異なり、CD34陽性FcγRs陰性であることが明らかとなった(図2-3)。また、胎児肝類洞内皮細胞においても、成体と同様、podoplaninやCcl21の発現は認められなかった(図2-3、2-4)。

内皮細胞は胎生14日目において既に異なる遺伝子発現プロファイルを有していたが、機能的にも異なるか否かについて検討を行った。アセチル化LDLを取り込む性質は、内皮細胞であることを示す指標の一つである。このアセチル化LDLの取り込み能について定量的な解析を行った結果、胎児肝類洞内皮細胞は、それ以外の内皮細胞と比較し取り込み能力が高いことが明らかとなった(図2-4)。

最後に、マウス発生過程において、肝類洞内皮細胞はどの時期より、他の内皮細胞と識

別可能となるのかについて、免疫組織化学染色によって検討を行った。その結果、Stab2の発現は胎生9日目の肝芽において既に認められることが明らかとなった(図2-5)。肝臓原基は胎生8日目に形成されるが、内皮細胞の組織特異性は肝臓原基の誘導から1日後において既に認められることが明らかとなった。

組織特異的内皮細胞の分化制御因子の探索

これまでの研究結果から、肝類洞内皮細胞、リンパ管内皮細胞、それ以外の内皮細胞はマーカー遺伝子の発現と機能的な差異より分離・識別可能であることが明らかとなった。そこで次に、どのような分子機構によってこのような違いが生じるかについての検討を行った。

(1) 遺伝子発現解析

肝類洞内皮細胞、リンパ管内皮細胞、それ以外の内皮細胞の分化制御がどのような因子によって制御されているのかを明らかにすることを目的にマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。マウス胎生14日目より分離したStab2陽性の肝類洞内皮細胞と、Stab2陰性内皮細胞を用いて遺伝子発現解析を行い、発現量に差が認められた遺伝子を抽出した。本研究では特に、分化制御のマスター遺伝子の同定を目的とし転写調節に関する因子に注目した。その結果、肝類洞内皮細胞で多く発現する遺伝子が、30個程度同定された。それらの中から11遺伝子を選び、RT-PCRによる発現

解析を行ったところ、5遺伝子についてはマイクロアレイの結果と同様に顕著な発現量の差を認めた。

(2) in vitro分化誘導系

肝類洞内皮細胞、リンパ管内皮細胞などの分化をin vitroで再現することを目的として、既に確立されているES細胞からの内皮細胞分化誘導系を導入した。マウスES細胞をLIF非存在下、IV型コラーゲンでコートしたディッシュ上で培養すると4日目には、内皮細胞と壁細胞への分化能を有した、Flk1陽性の脈管前駆細胞が出現する。Flk1陽性細胞は更に3～6日間、VEGF存在下で培養するとCD31陽性CD34陽性の内皮細胞へと分化する(図2-6)。

我々は、この系においてStab2やLyve-1の発現を誘導する因子の探索を行った。その結果、VEGFに加えTGFシグナルの阻害剤を添加することにより、CD31陽性CD34陽性細胞において、Lyve-1およびStab2の発現が誘導されることが明らかとなった。フローサイトメトリー法による解析から、阻害剤存在下で誘導された内皮細胞はpodoplanin陰性であること、RT-PCR法による解析から、同内皮細胞はCcl21陰性であることが明らかとなった。機能的な差異については、異物取り込み能の検討を行った結果、阻害剤で誘導した内皮細胞は対照の内皮細胞と比較しアセチル化LDLの取り込み能が高く、更にヒアルロン酸の取り込み能も有していることが明らかとなった。細胞の形態について走査型電子顕微鏡を用いて観察

を行った結果、成熟肝類洞内皮細胞の特徴であるfenestraeは阻害剤で誘導した内皮細胞においても認められなかった(図2-7)。

以上の結果から、TGF阻害剤によって誘導された内皮細胞は、胎児期の肝類洞内皮細胞の遺伝子発現プロファイル、機能、形態を有することが示された。

2-D. 考察

ヒアルロン酸受容体

本研究において新たに導入した血管内皮細胞の分化マーカーStab2、Lyve-1は共にヒアルロン酸のエンドサイトーシスに関する受容体として報告されている。血中ヒアルロン酸の取り込みは主に肝類洞内皮細胞で行われていることから、これらマーカーは組織特異的内皮細胞の機能と密接に関わる遺伝子であると言える。Stab2の発現は、肝類洞内皮細胞以外では脾臓、骨髄、リンパ節などの洞様毛細血管内皮細胞に限局しており、またLyve-1の発現はリンパ管内皮細胞と肝類洞内皮細胞とに特異的である。したがって、Stab2、Lyve-1はともに特異性の高い、機能的マーカー分子であると言える。

肝類洞内皮細胞、リンパ管内皮細胞の識別

肝類洞内皮細胞とリンパ管内皮細胞は、形態的にも、マーカー遺伝子の発現においても類似していることが知られている。例えば、どちらも細胞間の接着はゆるやかで、発達し

た基底膜をもたない。また、マーカー遺伝子の発現では、Lyve-1を発現する一方、CD34は発現しないなどの共通の特徴がある。本研究では、これら内皮細胞の相違点を明確に示した。すなわち肝類洞内皮細胞はpodoplaninやCcl21などリンパ管内皮細胞マーカーを発現しないこと、一方、リンパ管内皮細胞はF8やFcγRsなどの肝類洞内皮細胞マーカーを欠くことを明らかにした。これは、内皮細胞の多様性を議論する上で非常に有用な情報である。

肝類洞内皮細胞の誘導

本研究では、試験管内で未分化ES細胞より肝類洞内皮細胞を誘導することが可能であることを示した。しかし、TGFの阻害剤で誘導した肝類洞内皮細胞は、成熟肝類洞内皮細胞で認められるfenestraeを持たず、またCD34陽性FcγRs陰性の胎児型肝類洞内皮細胞であった。胎児型肝類洞内皮細胞を分化・成熟させるためには、阻害剤に加えて、未知の因子が必要であると思われる。

最近、野生型の肝類洞内皮細胞をF8欠損マウスに移植することにより、F8欠損による血友病の症状を改善することができるとの研究成果が報告された (Follenziら、2008)。我々は未分化細胞より試験管内で誘導した肝類洞内皮細胞が、このような細胞移植療法へ応用できるものと期待している。

2-E. 結論

肝臓特異的血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、それ以外の内皮細胞は分子マーカーを用いて分離・識別可能であり、また、これら内皮細胞は機能的にも異なることが明らかとなった。肝臓特異的血管内皮細胞はES細胞から誘導可能であることが明らかとなった。ES細胞からの分化誘導系は、細胞の大量調製が可能であり、生体では困難な発生初期の内皮細胞分化についての解析が可能となる。また同様の理由から、細胞移植療法の可能性についての検討も今後進展することが期待される。

胞、それ以外の内皮細胞は分子マーカーを用いて分離・識別可能であり、また、これら内皮細胞は機能的にも異なることが明らかとなった。肝臓特異的血管内皮細胞はES細胞から誘導可能であることが明らかとなった。ES細胞からの分化誘導系は、細胞の大量調製が可能であり、生体では困難な発生初期の内皮細胞分化についての解析が可能となる。また同様の理由から、細胞移植療法の可能性についての検討も今後進展することが期待される。

参考文献

Yamashita J et al., Nature 408, 92-96 (2000)

Follenzi A et al., J Clin Invest 118, 935-945 (2008)

G. 研究発表

論文発表

Iwatsuki K., Tanaka K., Kaneko T., Kazama R., Okamoto S., Nakayama Y., Ito Y., Satake M., Takahashi S., Miyajima A., Watanabe T., and Hara T. Runx1 promotes angiogenesis by down-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3. *Oncogene* 23, 1129-1137, 2005.

Bando T., Sekine K., Kobayashi S., Watanabe A., Rump A., Tanaka M., Suda Y., Kato S., Manabe T., and Miyajima A. Neuronal leucine-rich repeat protein 4 is required for hippocampus-dependent long-lasting memory. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4166-4175, 2005.

Okaya A., Kitanaka J., Kitanaka N., Satake M., Kim Y., Terada K., Sugiyama T., Takemura M., Fujimoto J., Terada N., Miyajima A., and Tsujimura T. Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am. J. Pathology* 166, 709-719, 2005.

- Kato Y., Iwama A., Tadokoro Y., Shimoda K., Minoguchi M., Akira S., Tanaka M., Miyajima A., Kitamura T., and Nakauchi H. Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J. Exp. Med.* 202, 169-179, 2005.
- Doyonnas R., Nielsen J.S., Chelliah S., Drew E., Hara T., Miyajima A., and McNagny K.M. Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood* 105, 4170-4178, 2005.
- Inukai T., Inaba T., Dang J., Kuribara R., Ozawa K., Miyajima A., Wu W., Look A.T., Arinobu Y., Iwasaki H., Akashi K., Kagami K., Goi K., Sugita K., and Nakazawa S. TEF, an antiapoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by down-regulating expression of the common chain of cytokine receptors. *Blood* 105, 4437-4444, 2005.
- Kojima N., Shiojiri N., Sakai Y., and Miyajima A. Expression of neuritin during liver maturation and regeneration. *FEBS Letters* 579, 4562-4566, 2005.
- Noguchi T., Fujimoto H., Sano H., Miyajima A., Miyachi H., and Hashimoto Y. Angiogenesis inhibitors derived from Thalidomide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 5509-13, 2005.
- Takeuchi M. and Miyajima A. Hematopoiesis in Fetal Liver. *Pluripotent Hematopoietic Stem Cells* (Ed. J. Keller) ISBN: 1-58706-182-1, 2005.
- 鬼塚和泉、竹内眞樹、宮島篤
哺乳類の胚発生における造血と成体型造血幹細胞の起源
別冊・医学の歩み 血液疾患 -State of arts
Ver.3, 6-8, 2005.
- 竹内眞樹、宮島篤
肝臓における造血ニッチー 胎生期造血ー
分子細胞治療 Vol.5 no.2, 11-17, 2006.
- Minehata K., Takeuchi M., Hirabayashi Y., Inoue T., Donovan P.J., Tanaka M., and Miyajima A. Oncostatin M maintains the hematopoietic microenvironment and retains hematopoietic progenitors in the bone marrow. *Int J Hematol.* 84(4), 319-27, 2006.
- Ito T., Arimitsu N., Takeuchi M., Kawamura N., Nagata M., Saso K., Akimitsu N., Hamamoto H., Natori S., Miyajima A. and Sekimizu K. Transcription elongation factor S-II is required for definitive hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* 26 (8): 3194-3203, 2006.
- Sano H., Noguchi T., Miyajima A., Hashimoto Y., and Miyachi H. Anti-angiogenic activity of basic-type, selective cyclooxygenase (COX)-1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 16 (11):3068-72, 2006.
- Watanabe N., Tanaka M., Suzuki K., Kumanogoh A., Kikutani H., and Miyajima A. Tim2 is expressed in mouse fetal hepatocytes and regulates their differentiation. *Hepatology* 45(5):1240-49, 2007.
- Tanimizu N., Miyajima A. and Mostov KE. Liver Progenitor Cells Develop Cholangiocyte-type Epithelial Polarity in Three Dimensional Culture. *Mol Biol Cell.* 18(4):1472-9. 2007.
- Nonaka H., Tanaka M., Suzuki K. and Miyajima A. Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors. *Dev Dyn.* 236(8):2258-67, 2007.
- Tanimizu N. and Miyajima A. Molecular mechanism of liver development and regeneration. *Int Rev Cytol.* 259:1-48, 2007.
- Sugano Y., Takeuchi M., Hirata A., Matsushita H., Kitamura T., Tanaka M. and Miyajima A. Junctional adhesion molecule-A, JAM-A, is a novel cell surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* 111, 1167-72, 2008.
- Suzuki K., Tanaka M., Watanabe N., Saito S., Nonaka N. and Miyajima A. P75 neurotrophin receptor is a marker for precursors of stellate cells and portal fibroblasts in mouse fetal liver. *In press*
- Nonaka H., Watabe T., Saito S., Miyazono K. and Miyajima A. Generation of liver-specific