

200 706016A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療等研究事業

間葉系幹細胞に由来する

ヒト肝細胞の移植に関する基盤開発研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 落谷 孝広

平成20（2008）年4月

目 次

I. 総括研究報告		
間葉系幹細胞に由来するヒト肝細胞の移植に関する基盤開発研究		
落谷 孝広	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 肝細胞の遺伝子発現解析		
畑田 出穂	-----	8
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	11

間葉系幹細胞に由来するヒト肝細胞の移植に関する基盤開発研究

主任研究者 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 本研究の最重要課題である、移植細胞としての適合性の問題に関して、まず SCID マウスへの細胞移植により、この細胞は宿主の肝臓組織へ問題なく組み込まれることが判明し、移植細胞として有用であることが推測でき、また移植されたマウスは重篤な副作用の発症や移植細胞による腫瘍化は観察されず、その安全性も証明した。またゲノム DNA メチル化の網羅的解析法である MIAMI 法の改良をはかり、これまでの 10 倍量のメチル化の変化を検出できるようにした結果、上皮-間葉転換を制御する TWIST などの遺伝子がメチル化されており、上皮-間葉転換が間葉系幹細胞からの肝細胞分化の原因となっていることが示唆された。これより、間葉系幹細胞が通常分化経路を経ず分化転換により肝細胞に分化する可能性が考えられた。

分担研究者

畑田 出穂 群馬大学生体調整研究所
准教授

閉鎖症などに対する画期的な新規治療法の確立への道が開けるものと期待される。さらに新規薬物の毒性試験や安全性試験にも本研究によって得られるヒト肝細胞は有用であり、従来の動物などに代わる信頼性の高いヒト肝細胞の利用が可能になればその経済的効果は大である。

A. 研究目的

末期の肝不全に陥った患者を救う唯一の方法は肝移植であるが、慢性のドナー不足や高いコストなどの問題から、肝移植に代わる新たな治療法の開発が急務である。本研究の目的は、間葉系幹細胞から分化誘導したヒト肝細胞の再生医療への応用を目指して、この細胞の肝細胞としての能力と安全性を *in vitro* での培養実験や、実験動物モデルにおける安全性などの観点から徹底的に検討することに重点を置く。本研究によって間葉系幹細胞並びにそれに由来するヒト肝細胞様細胞の機能と安全性が証明されれば、この細胞を実際の移植用細胞として利用するための臨床応用研究の基礎を確立することが出来る。これによって、成人では肝炎ウイルスなどによる重篤な肝不全や、小児の場合の胆道

B. 研究方法

平成 19 年度（最終年度）は安全性に関して、未分化および分化誘導したヒト肝細胞の正常マウス肝臓への移植や皮下への移植をすでに行ったマウス群に関して、長期観察による（1-2 年）造腫瘍性の有無を検討した。各群 20 匹のマウスは、移植後すでに 2 年以上を経過しており、造腫瘍性や長期の毒性の出現を、組織レベル、血液の生化学的レベル、動物の行動等の観点から、その安全性に関する判定を行う。さらに分化した肝細胞の網羅的遺伝子発現解析やメチル化解析を評価し、解析を実施する。

（倫理面への配慮）

本報告に関わるヒト骨髄組織由来間葉系幹細胞

は、米国内の倫理審査を得て採取され、販売されているものである。ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞はインフォームドコンセントを得て患者から得られたサンプルであり、分化実験は、国立がんセンター生命倫理委員会に提出し、承認を得た実験計画に従っている。

C. 研究結果

皮下脂肪組織に由来する間葉系幹細胞は、FGF1, FGF4, HGF それに OsM, デキサメサゾン の段階的添加による *in vitro* の分化誘導 (図 1) で、肝臓の機能を持つ細胞へと変化した。未分化の間葉系幹細胞, あるいはこれらの肝細胞様細胞を, SCID マウスやヌードマウスに移植し, その安全性を確認する実験を行った。ヒト間葉系幹細胞から分化した肝細胞様細胞の染色体は正常であった他、これらの細胞を尾静脈から肝臓に移植した群のマウス (20匹) では、移植した細胞はマウスの肝臓内に生着している像が確認された (図 1)。また移植マウスは全観察期間にわたって全て健康であり、血液検査による GOT, GPT などの生化学的数値も正常値であった。また皮下に移植した群 (20匹) とともに、およそ 2 年経過した時点での解剖学的所見から、全く腫瘍の形成等は得られなかった。未分化の間葉系幹細胞を移植した群のマウス全 20 匹を移植後 1 年 6 ヶ月で解剖して検討したところ、肝臓をはじめ、全身での腫瘍化等の所見は認められなかった。

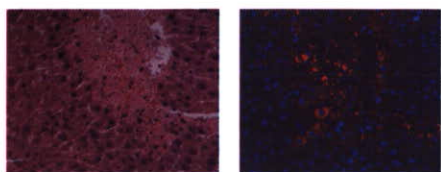


図 1 肝臓内に生着したヒト間葉系幹細胞由来の肝細胞様細胞：左は組織像；右はヒト特異的アルブミン抗体によって染色された移植細胞（ローダミン陽性、赤色）を示す。

移植した肝細胞様細胞は、網羅的な遺伝子発現解析やパスウェイ解析を施行することにより、その肝臓特異的な遺伝子発現の全貌や、活性化されているパスウェイが明らかになった。その結果を表 1 に示す。

表 1 パスウェイ解析 (ConPath 解析法) により抽出された肝臓関連の遺伝子シグナル

シグナルパスウェイ	間葉系幹細胞由来肝細胞	正常肝臓	ConPath に含まれる遺伝子数
Blood Clotting Cascade	14	15	20
Complement Activation, Classical Pathway	12	16	17
Eicosanoid Synthesis	14	12	19
Fatty Acid Omega Oxidation	6	11	15
Glucocorticoid & Mineralocorticoid Metabolism	4	6	9
Glutathione metabolism	11	9	20
Glycogen Metabolism	7	12	36
Steroid Biosynthesis	4	6	9
Synthesis and Degradation of Ketone Bodies	3	4	5
Urea cycle and metabolism of amino groups	8	9	20

これからわかるように、脂肪組織の間葉系幹細胞に由来する肝細胞様細胞では、複数の肝特異的な代謝経路や合成経路が働いており、特に血液凝固のパスウェイにおいては全 20 遺伝子中、間葉系幹細胞由来肝細胞では 14 遺伝子、正常肝臓では 15 遺伝子の発現量が上昇していることが見て取れる (表 1)。さらに、補体の活性についてのシグナルパスウェイは未分化の間葉系幹細胞とは明らかに異なり、間葉系幹細胞由来肝細胞と正常肝臓の遺伝子の発現パターンが非常に近いことが確認できた。同様に脂肪酸の酸化、ステロイドの合成のパスウェイも顕著に活性化されていた。

さらに、肝障害を惹起させたマウスに、未分化なヒト間葉系幹細胞及び肝細胞様に分化誘導した細胞を、それぞれ 5×10^6 細胞個移植した結果、図 3 に示すように、アンモニアを解毒し、移植 24 時間後には正常値に戻す作用があることを確認することが出来た。また、予備的な結果であるが、四塩化炭素等予後、8 日以内に全例が死亡する致死的な肝障害を与えたマウスにおいても、これらのヒト間葉系幹細胞 (AT-MS-C)、および肝細胞様細胞 (AT-MS-C-Hepa) の移植は、

明らかな延命効果をもたらすことも判明した。分担研究者らは細胞の分化において重要な役割をはたすエピジェネティックな情報の検討をおこなうため自ら開発したマイクロアレイを用いたメチル化の網羅的解析法の改良をはかり、その感度の高上と解析の自動化に成功した。そしてこれを用いて誘導分化された肝細胞のメチル化の検討をおこなった結果、上皮-間葉転換

(EMT:epithelial-mesenchymal transition)を制御する TWIST などの遺伝子がメチル化されており、上皮-間葉転換が間葉系幹細胞からの肝細胞分化の原因となっていることが示唆された。

以上の結果から、ヒト間葉系幹細胞、あるいはそれから分化誘導した肝細胞様の細胞は、動物個体レベルの移植実験において、その安全性と、肝障害を克服する有効性の一部が示された。

D. 考察

ヒト間葉系幹細胞から *in vitro* にて分化した肝細胞様細胞の機能解析や動物個体レベルでの移植による安全性の検討は順調に進行し、肝臓や骨髄に置ける急性の毒性や長期観察での造腫瘍性は認められず、本研究の目的を完全に達成した。分化した肝細胞のヒト正常肝細胞と比較した遺伝子発現や遺伝子のメチル化の状態を網羅的に把握し、遺伝子のエピジェネティックな変化や、遺伝子発現の変化等にも注目した検討も加えることで、将来の移植用細胞としての安全性に関する総合評価を行う材料が揃った。間葉系幹細胞から分化させた肝細胞が実際の成人の肝細胞の表現型の多くを示すこと、また間葉系幹細胞が通常分化経路を経ず分化転換により肝細胞に分化していることが明らかとなった。

ヒト脂肪組織中に肝細胞様に分化する間葉系幹細胞が存在することを十分な科学的根拠を持って示したことは、体性幹細胞の可塑性を研究する上で大きな基礎情報を与えることに貢献した。この業績は、肝臓の国際雑誌 HEPATOLOGY

に発表し、また脂肪間葉系幹細胞の国際学会である IFAT2007 で講演し、学会賞を受賞した。さらに、動物個体への移植実験で、その有効性と安全性を確認出来た成果は、将来の再生医療の細胞ソースとして、脂肪組織中の間葉系幹細胞が有用な候補であることを示す貴重なデータである。

E. 結論

本研究では間葉系幹細胞を数週間で成熟したヒト肝細胞へと分化誘導することが可能なため、ヒトへの移植応用に適した系である。本研究の最重要課題である、移植細胞としての適合性の問題に関して、まず SCID マウスへの細胞移植により、この細胞は宿主の肝臓組織へ問題なく組み込まれることが判明し、移植細胞として有用であることが推測でき、また移植されたマウスは重篤な副作用の発症や移植細胞による腫瘍化は観察されず、その安全性も証明した。またゲノム DNA メチル化の網羅的解析法である MIAMI 法の改良をはかり、これまでの 10 倍量のメチル化の変化を検出できるようにした結果、上皮-間葉転換を制御する TWIST などの遺伝子がメチル化されており、上皮-間葉転換が間葉系幹細胞からの肝細胞分化の原因となっていることが示唆された。これより、間葉系幹細胞が通常分化経路を経ず分化転換により肝細胞に分化する可能性が考えられた。

さらに、将来の肝疾患に対する再生医療実現に向けて、本研究の成果は有用であり、分化誘導した肝細胞はもちろん、ヒト間葉系幹細胞そのものに肝疾患治癒能力を見いだした点は、今後の応用研究に重要な知見である。

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) Takeuchi T, Ochiya T, Takezawa T. Tissue array substratum composed of histological sections: a new platform for orienting differentiation of embryonic stem cells towards hepatic lineage. *Tissue Eng.* 14(2): 267-274, 2008
- 2) Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, Hatada I., Matsubara K, Kato T, Ochiya T. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J.*, 275(6): 1260-1273, 2008
- 3) Takezawa T, Takeuchi T, Yanagihara K, Nakazawa Y, Nitani A, Terada S, Ochiya T, Ueno K. Advantages of culture models utilizing substrata made of TOSHI (tissue/organ sections for histopathology) or collagen vitrigel membrane and their application concept for drug development researches. *Yakugaku Zasshi*, 128(1): 51-60, 2008
- 4) 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
- 5) 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*, 89(6): 687-696, 2007
- 6) Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, 46(1): 219-228, 2007
- 7) Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn.*, 236: 3228-3241, 2007
- 8) Yamamoto Y, Banas, A, Kato T, Ochiya T. Plasticity of adult stem cells into liver. *Curr. Res. in Hepatol.*, 1: 1-18, 2007
- 9) Obata Y, Maeda Y, Hatada I., Kono T. Long-term effects of in vitro growth of mouse oocytes on their maturation and development. *J Reprod Dev.*, 53: 1183-1190, 2007
- 10) Horii T, Kimura M, Morita S, Nagao Y, Hatada I.. Loss of genomic imprinting in mouse parthenogenetic embryonic stem cells., *Stem Cells.*, 26: 79-88, 2008
- 11) Hatada I., Morita S, Kimura M, Horii T, Yamashita R, Nakai K. Genome-wide demethylation during neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells., *J Hum Genet.*, 53: 185-191, 2008
- 12) Nomura T, Kimura M, Horii T, Morita S, Soejima H, Kudo S, Hatada I. . MeCP2-dependent repression of an imprinted miR-184 released by depolarization. *Hum Mol Genet.* 2008. in press

2. 学会等発表

(国内発表)

- 1) 光イメージングによるがんのRNAi治療法の開発、落谷孝広(シンポジウム)、第66回日本癌学会学術総会(2007.10.3-5 横浜)

- 2) がんの分子標的治療モデルにおける分子イメージングの実際、落谷孝広、第2回日本分子イメージング学会学術大会 (2007. 6. 28-29 福井)
- 3) Efficacy of RNAi-based molecular target therapy against metastatic human breast cancer cells. Fumitaka Takeshita, Agnieszka Banas, Naomi Hokaiwado, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会 (2007. 10. 3-5 横浜)
- 4) MicroRNA therapy against bone metastasis of prostate cancer. Naomi Hokaiwado, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会 (2007. 10. 3-5 横浜)
- 5) MicroRNA involvement in liver development and hepatocarcinoma. Yusuke Yamamoto, Fumiaki Koizumi, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会 (2007. 10. 3-5 横浜)
- 6) Genome-wide DNA methylation analysis of cancers. Izuho Hatada, Akira Sakurada, Masami Sato, Takashi Kondo, Akira Horii, Yusuke Yamamoto, Takahiro Ochiya, Riu Yamashita, Kenta Nakai, Katsumi Nakanishi, Ryo Matoba, Kenichi Matsubara 第66回日本癌学会学術総会 (2007. 10. 3-5 横浜)
- 7) RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. Kimi Honma, Kyoko Iwao-Koizumi, Fumitaka Takeshita, Yusuke Yamamoto, Teruhiko Yoshida, Kasuto Nishio, Shunji Nagahara, Kikuya Kato, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会 (2007. 10. 3-5 横浜)
- 8) Presence of multiple mechanisms in lymph node metastasis of esophageal cancers. Masayuki Sano, Fumitaka Takeshita, Kazuhiko Aoyagi, Yukihiro Nakanishi, Takahiro Ochiya, Yuji Nimura, Teruhiko Yoshida, Hiroki Sasaki 第66回日本癌学会学術総会 (2007. 10. 3-5 横浜)
- 9) Establishment and Maintenance of Rat Embryonic Stem Cell. Shinobu Ueda, Takumi Teratani, Hiroyuki Tsuda, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会 (2007. 10. 3-5 横浜)
- 10) Cancer Patients' Own Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells as a source for stem cell-based therapy for the liver cancer. Agnieszka Banas, Yusuke Yamamoto, Makoto Tokuhara, Takumi Teratani, Takahiro Ochiya 第66回日本癌学会学術総会 (2007. 10. 3-5 横浜)
- 11) A novel culture technology utilizing TOSHI (tissue/organ sections for histopathology)-substrata useful for regulating cell behavior. Toshiaki Takezawa, Tomoyo Takeuchi, Kana Yanagihara, Satoshi Terada, Takahiro Ochiya 第6回国際動物実験代替法会議 (2007. 8. 21-25 東京)
- 12) RNA 干渉による発がんの分子標的の同定と治療への応用、落谷孝広 (シンポジウム)、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12. 11-15 横浜)
- 13) 合成 microRNA 導入によるヒト転移性前立腺がん細胞における機能解析、竹下文隆、外岩戸尚美、本間紀美、落谷孝広、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12. 11-15 横浜)
- 14) 薬剤抵抗性獲得に関与する microRNA の探索、外岩戸尚美、竹下文隆、山本雄介、箕浦加穂、田谷敏貴、本間紀美、落谷孝広 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12. 11-15 横浜)
- 15) マウス肝臓発生と肝がん形成に関わる

microRNA の同定、山本雄介、田中稔、宮島篤、小泉史明、金井弥栄、加藤尚志、落谷孝広 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (2007.12.11-15 横浜)

16) siRNAによる放射線感受性増強、落谷孝広 (シンポジウム)、第37回放射線による制癌シンポジウム (2007.7.20 つくば)

17) 画像イメージングと毒性病理学の接点、落谷孝広 (ワークショップ)、第24回日本毒性病理学会学術集会 (2007.2.6-7 名古屋)

18) RNAi創薬とがん治療、落谷孝広 (ワークショップ)、第145回日本獣医学会 (2008.3.30)

19) バイオフォトニクスと Non-coding small RNA の融合がもたらすがん研究の革新、落谷孝広、バイオフォトニクス技術研究会 (2007.12.7 神戸)

20) がん治療戦略における RNAi 創薬の意義、落谷孝広 (シンポジウム)、ゲノム創薬フォーラム第10回シンポジウム (2008.11.7 東京)

21) 再生肝由来の切片担体を利用して ES 細胞を肝細胞様細胞へ分化誘導する培養技術とその創薬研究への応用構想、竹内朋代、寺谷工、落谷孝広、竹澤俊明、日本薬学会第128年会 (2008.3.26-28 横浜)

22) 畑田出穂、Genome-wide DNA methylation analysis of cancers、第66回日本癌学会学術総会シンポジウム、横浜、2007.10.3-5 (海外発表)

1) Ochiya T, Hokaiwado N, Takeshita F, Nagahara S., Optical imaging of RNAi Therapy SPIE Photonics West 2008 Biomedical Optics Meeting. (Jan. 21-22, 2008 San Jose, CA, USA.) invited

2) Yamamoto Y, Kosaka N, Kato T, Ochiya T., MicroRNA expression profile to define

mouse liver development 2007 Keystone symposia-MicroRNA and Cancer. (Jun. 10, 2007 Colorado USA.)

3) Banas A, Yamamoto Y, Kato N, Yamada Y, Suzuki S, Enosawa S, Ochiya T., CYPs metabolizing activities in hepatocytes generated in vitro from human adipose tissue-derived stem cells The 8th International ISSX Meeting. (Oct. 9-12, 2007 Sendai, Japan)

4) Ochiya T., RNAi-based anti-cancer strategy 1st International Conference on Drug Design & Discovery. (Feb. 3-6, 2008 Dubai, UAE) invited

5) Ochiya T., RNAi-based therapeutics against cancer. 12th Annual Fall Symposium of Korean Cancer Association. (Nov. 9, 2007 Seoul, Korea) invited

6) Takeshita F, Ochiya T., MicroRNA therapy for inhibition of bone metastatic human prostate tumor cells. 2008 Keystone symposium. (Mar. 25-30, 2008 British Columbia, Canada) invited

7) Banas A, Yamamoto Y, Tokuhara M, Teratani T, Okochi H, Ochiya T., Adipose tissue-derived stem cells as a source of hepatocytes. Genetic and functional studies 7th International Federation of Adipose Therapeutics and Science. (Oct. 18-20, 2007 Indianapolis, USA.)

8) Hatada I., Microarray-based Genome-Wide Methylation Analysis. First JCA-AACR Special Joint Conference 2007 (Invited Speaker)

9) Hatada I., Genome-wide DNA methylation analysis by MIAMI. Epigenomics, Technology, Products, and Obstacles, Jun 14, 2007 Osaka

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

肝細胞の遺伝子発現解析

分担研究者 畑田 出穂 群馬大学生体調整研究所 准教授

研究要旨 臓器移植に頼らず欠損した臓器の機能を再生する方法を開発するため、主任研究者らはヒト間葉系幹細胞から形態的、機能的にヒトの成熟肝細胞と判断できる細胞を誘導することに成功した。分担研究者らは細胞の分化において重要な役割をはたすエピジェネティックな情報の検討をおこなうため自ら開発したメチル化の網羅的解析法で、誘導分化された肝細胞のメチル化の検討をおこなった。その結果、上皮-間葉転換 (EMT:epithelial-mesenchymal transition) を制御する遺伝子がメチル化されており、このことが間葉系幹細胞から成熟肝細胞への原因となっている示唆される。

A. 研究目的

臓器移植に頼らず欠損した臓器の機能を再生する方法を開発するため、主任研究者らはヒト間葉系幹細胞から形態的、機能的にヒトの成熟肝細胞と判断できる細胞を誘導することに成功した。一方近年、DNA のメチル化などのエピジェネティックな情報は細胞の分化において重要な役割をはたしていること知られている。そこで分担研究者らが開発したマイクロアレイを用いたメチル化の網羅的解析法で誘導分化された肝細胞のメチル化の検討をおこなう。

B. 研究方法

MIAMI (Microarray-based Integrated Analysis of DNA Methylation by Isoschizomers) 法は分担研究者らが独自に開発したマイクロアレイを用いたゲノム DNA メチル化の網羅的解析法である。この方法では、おのおのの遺伝子について 2 サンプル間でメチル化感受性の制限酵素である Hpa II で切れる DNA 量と、同じ認識部位を持つメチル化非感受性の制限酵素の Msp I で切れる DNA 量を比較する。そして Hpa II で差があるときに、Msp I で差

がなければメチル化の差があると判断する。また両方に差があるときはメチル化によらない多型などの差であるというように判断する。このように単にメチル化感受性の酵素による比較だけでなく、同じ認識部位をメチル化非感受性の酵素を用いることにより正確にメチル化を比較できるところが、他の方法と比べてこの方法の独創的などころである。この方法を用いて誘導分化された肝細胞のメチル化の検討をおこなう。
(倫理面への配慮)

本報告に関わるヒト骨髄組織由来間葉系幹細胞は、米国内の倫理審査を得て採取され、販売されているものである。

C. 研究結果

MIAMI 法を用いて間葉系幹細胞に由来する成熟肝細胞のエピジェネティックな情報の網羅的解析をおこなった。その結果 39 個の遺伝子がヒト間葉系幹細胞から誘導した肝細胞でメチル化されており 8 個の遺伝子が脱メチル化していることがわかった。これらの中でメチル化されていた TWIST1 は上皮-間葉転換 (EMT:epithelial-mesenchymal transition) を制御する遺伝子で

着目に値する。

D. 考察

上皮-間葉転換(EMT)は1980年代初めに Elizabeth Hay らが提唱した、上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、初期胚発生における原腸陥入、神経提細胞の運動や器官形成過程特に、心臓や腎臓また口蓋形成での重要性がこれまでに明らかとなっている。一方、EMTの獲得が運動性の亢進や細胞外基質の蓄積をもたらすことから、癌細胞の浸潤や線維症との関連も示唆されている。

これらのことから TWIST1 がメチル化で発現抑制されることにより EMT の逆の間葉-上皮転換(MET: mesenchymal - epithelial transition) が起こることが、ヒト間葉系幹細胞から肝細胞への分化の原因となっている示唆される。

E. 結論

ゲノム DNA メチル化の網羅的解析法である MIAMI 法を用いて間葉系幹細胞に由来する成熟肝細胞のエピジェネティックな情報の網羅的解析をおこなった。その結果、TWIST1 という上皮-間葉転換(EMT: epithelial-mesenchymal transition)を制御する遺伝子が誘導された肝細胞でメチル化されていることがわかり、上皮-間葉転換が肝細胞の分化に重要であることが示唆される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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*

2007. 89: 687-696.

2) Obata Y, Maeda Y, Hatada I, Kono T. Long-term effects of in vitro growth of mouse oocytes on their maturation and development. *J Reprod Dev.* 2007. 53: 1183-1190.

3) Horii T, Kimura M, Morita S, Nagao Y, Hatada I. Loss of genomic imprinting in mouse parthenogenetic embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2008. 26: 79-88.

4) Hatada I., Morita S, Kimura M, Horii T, Yamashita R, Nakai K. Genome-wide demethylation during neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *J Hum Genet.* 2008. 53: 185-191.

5) Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, Hatada I., Matsubara K, Kato T, Ochiya T., A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J.* 2008. 275: 1260-1273.

6) Nomura T, Kimura M, Horii T, Morita S, Soejima H, Kudo S, Hatada I. MeCP2-dependent repression of an imprinted miR-184 released by depolarization. *Hum Mol Genet.* 2008. in press

2. 学会発表

1) Hatada I. Microarray-based Genome-Wide Methylation Analysis. First JCA-AACR Special Joint Conference 2007 (Invited Speaker)

2) 畑田出穂、Genome-wide DNA methylation analysis of cancers、第66回日本癌学会学術総会シンポジウム、横浜、2007.10.3-5

3) Hatada I. Genome-wide DNA methylation analysis by MIAMI. *Epigenomics,*

Technology, Products, and Obstacles, Jun
14, 2007 Osaka

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研 究 成 果 の 刊 行 に 関 す る 一 覧 表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeuchi T, Ochiya T, Takezawa T.	Tissue array substratum composed of histological sections: a new platform for orienting differentiation of embryonic stem cells towards hepatic lineage.	Tissue Eng.	14(2)	267-274	2008
Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, Hatada I, Matsubara K, Kato T, Ochiya T.	A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells.	FEBS J.	275(6)	1260-1273	2008
Takezawa T, Takeuchi T, Yanagihara K, Nakazawa Y, Nitani A, Terada S, Ochiya T, Ueno K.	Advantages of culture models utilizing substrata made of TOSHI (tissue/organ sections for histopathology) or collagen vitrigel membrane and their application concept for drug development researches.	Yakugaku Zasshi	128(1)	51-60	2008
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
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	89(6)	687-696	2007
Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T.	Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes.	Hepatology	46(1)	219-228	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, <u>Ochiya T.</u>	Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies.	Dev Dyn.	236	3228-3241	2007
Yamamoto Y, Banas, A, Kato T, <u>Ochiya T.</u>	Plasticity of adult stem cells into liver.	Curr. Res. in Hepatol.	1	1-18	2007
Obata Y, Maeda Y, <u>Hatada I</u> , Kono T.	Long-term effects of in vitro growth of mouse oocytes on their maturation and development.	J Reprod Dev.	53	1183-1190	2007
Horii T, Kimura M, Morita S, Nagao Y, <u>Hatada I.</u>	Loss of genomic imprinting in mouse parthenogenetic embryonic stem cells.	Stem Cells.	26	79-88	2008
<u>Hatada I</u> , Morita S, Kimura M, Horii T, Yamashita R, Nakai K.	Genome-wide demethylation during neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells.	J Hum Genet.	53	185-191	2008
Nomura T, Kimura M, Horii T, Morita S, Soejima H, Kudo S, <u>Hatada I.</u>	MeCP2-dependent repression of an imprinted miR-184 released by depolarization.	Hum Mol Genet.			In press