

200706016B

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17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 落谷 孝広

平成20（2008）年4月

目 次

| | |
|-------------------------------|----------|
| I. 総合研究報告 | |
| 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. 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 主な研究成果は、以下の4項目である。1) 脂肪組織に由来するヒト間葉系幹細胞を、in vitro で肝細胞様細胞に分化誘導する系を確立した。2) 分化誘導した細胞は、遺伝子発現、パスウェイ解析、機能解析等により、肝細胞の性状を持つことを証明した。3) 間葉系幹細胞および肝細胞様の細胞を SCID マウスに移植した結果、短期、長期の毒性や腫瘍化は認められず、細胞移植における安全性が確認された。4) 肝障害モデルマウスへの移植では、間葉系幹細胞、並びに肝細胞様細胞の双方が顕著な機能改善効果を認めた。

分担研究者

畑田 出穂 群馬大学生体調整研究所
准教授

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、脂肪組織に由来するヒト間葉系幹細胞そのもの、あるいはそれから分化誘導したヒト肝細胞様細胞の再生医療への応用を目指して、この幹細胞の肝細胞としての能力と安全性を in vitro で培養実験や、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および分化誘導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

B. 研究方法

未分化な間葉系幹細胞や分化誘導したヒト肝細胞様細胞の正常 SCID マウス肝臓への移植や皮下への移植(5x10⁶ 細胞を移植)を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2年近くまで観察し、解剖所見を整え、造腫瘍性の有無の安全性に関する判定を行った。さらに分化誘導した肝細胞様細胞の網羅的遺伝子発現解析やメチル化解析を実施した。

(倫理面への配慮)

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により得られたサンプルであり、分化誘導実験は、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2)。

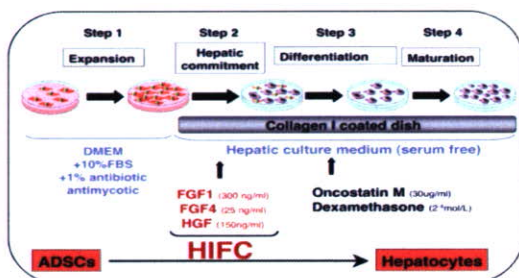


図1 間葉系幹細胞の肝細胞への分化誘導

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。
さらに移植した間葉系幹細胞は、もともと骨、
軟骨、脂肪細胞に分化する可塑性を有するため、
それらの細胞の増生が生じているかどうかを肝
臓を中心に検討したが、そのような事実は見い
だすことが出来なかった。従って、本間葉系幹
細胞、その分化細胞の移植による毒性、急性の
副作用等は観察出来なかった。

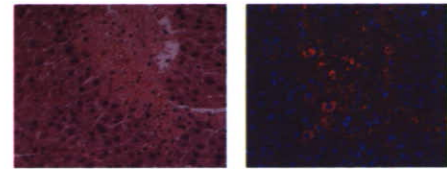


図2 肝臓内に生着したヒト間葉系幹細胞由来の
肝細胞様細胞: 左は組織像; 右はヒト特異的アル
ブミン抗体によって染色された移植細胞 (ローダ
ミン陽性、赤色) を示す。

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な間葉系
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。

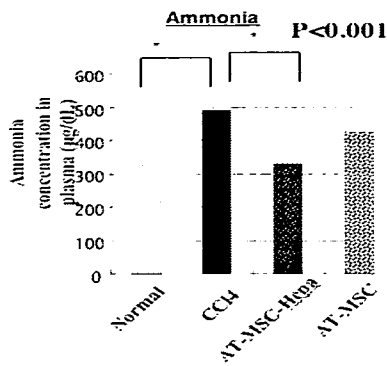


図3 肝障害モデルマウスへの細胞移植実験：障害によって上昇した血中のアンモニアレベルは、肝細胞様に分化した細胞の移植によって正常値にまで低下した。

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-MSC)、および肝細胞様細胞(AT-MSC-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の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。

ヒト間葉系幹細胞は、そのソースを脂肪組織に求めた場合、非常に豊富に得ることが可能であり(骨髄の間葉系幹細胞の100倍)、肝細胞へ分化する可塑性、あるいは、移植における安全性、さらには未分化な間葉系幹細胞そのものにも肝障害をレスキューする能力があることなどの複数のメリットが明らかになり、肝臓疾患を対象とした再生医療のためのステム細胞と

して、大変有望であることが示された。今後は、ヒト間葉系幹細胞の肝再生能力のメカニズムを trophic effect (サイトカインなどの産生) の面から明らかにするとともに、移植医療実現へ向けて、様々な肝疾患モデル動物での治療効果を検証する前臨床試験へと進む努力をする。

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の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療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. 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, Ochiya T., MeCP2-dependent repression of an imprinted miR-184 released by depolarization. *Hum Mol Genet.*, in press
- 13) Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Atelocollagen-mediated Drug Discovery Technology. *Expert Opin. Drug Discov.*, 2:159-167, 2007
- 14) Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cells into liver-basic research and potential clinical applications. *Adv. Exp. Biol. Med.*, 585:3-17, 2006
- 15) 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
- 16) Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, Ochiya T, & Hatada I. Genomic imprinting in Dicer1-hypomorphic mouse. *Cytogenetic & Genome Res.*, 131:138-143, 2006
- 17) Fukasawa M, Kimura K, Morita S, Matsubar K, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Horii A, Sasaki H, & Hatada I. Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers. *J. Hum. Genet.*, 51:368-374, 2006
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci.*, 97:689-696, 2006
- 26) 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
- 27) Hatada I. Emerging technologies for genome-wide DNA methylation profiling in cancer. *Critical Rev., Oncogenesis*, 12(3-4):205-223, 2006
- 28) Hatada I, Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamanaka S, Sakurada A, Sato M, Endo C, Kondo T, Horii A, Ushijima T, & Sasaki H. Genome-wide profiling of promoter methylation in human. *Oncogene*, 25(21):3059-3064, 2006
- 29) Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H, Asari A, Quinn G, Sasaki H, Terada M, Ochiya T. Direct hepatic fate specification from embryonic stem cells. *Hepatology*, 41:836-846, 2005
- 30) Yamamoto Y, Teratani T, Quinn G, Murata S, Ikeda R, Kinoshita K, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from embryonic stem cells. *Hepatology*, 42:558-567, 2005
- 31) Teratani T, Quinn G, Yamamoto Y, Sato T, Yamanokuchi H, Asari A, Ochiya T. Long-term maintenance of liver-specific functions in cultured ES cell-derived hepatocytes with hyaluronan sponge. *Cell Transplant.*, 14:629-635, 2005
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) 薬剤抵抗性獲得に關与する 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關わる 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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・分子生物学会議 (2006. 6. 22 京都)
- 26) 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
- 27) 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)
- 28) 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)
- 29) 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)
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) ゲノムワイドな DNA メチル化プロファイリングと脱メチル化のターゲットの解析 畑田出穂、木村美香、森田純代、波平昌一、中島欽一、山中澄隆、桜田晃、佐藤雅美、遠藤千頭、近藤丘、堀井明、日本分子生物学会 2006 フォーラム (口頭発表)
- 35) 寺谷 工、玉谷卓也、落谷孝広、ヒト間葉系幹細胞由来成熟肝細胞の肝疾患研究

- への応用. 第 64 回日本癌学会学術総会.
(札幌)、平成 17 年 9 月 14-16 日
- 36) Banas Agnieszka、寺谷 工、徳原 真、Quinn Gary、落谷孝広. ヒト肝細胞のソースとしての間葉系幹細胞の有用性. 第 64 回日本癌学会学術総会. (札幌)、平成 17 年 9 月 14-16 日
- 37) 寺谷 工、山本雄介、玉谷卓也、落谷孝広. ヒト骨髄細胞由来間葉系幹細胞の加齢に伴う肝細胞分化への影響. 第 28 回日本分子生物学会年会. (福岡)、平成 17 年 12 月 7-10 日
- 38) 山本雄介、寺谷 工、野川菜美、石田貴子、加藤尚志、落谷孝広. ES 細胞の肝細胞分化誘導系における肝幹細胞の探索. 第 18 回日本分子生物学会年会. (福岡)、平成 17 年 12 月 7-10 日
- 39) 寺谷 工、山本雄介、Quinn Gary、Banas Agnieszka、落谷孝広. 移植医療としての間葉系幹細胞由来ヒト肝細胞の評価. 第 5 回日本再生医療学会総会. (岡山)、平成 18 年 3 月 8-9 日
- 40) Banas Agnieszka、徳原 真、寺谷 工、Quinn Gary、山本雄介、大河内仁、落谷孝広. Human adipose stem cells as a source of functional hepatocytes. 第 5 回日本再生医療学会総会. (岡山)、平成 18 年 3 月 8-9 日
- 41) 落谷孝広 バイオ人工肝臓の細胞ソースとしてのステム細胞の評価 第 5 回日本再生医療学会総会(岡山)シンポジウム 平成 18 年 3 月 8 日
(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 8 th 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

10) 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

11) 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

12) 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.

13) 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.

14) 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.

15) 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

16) International Genomic Imprinting

Workshop 2006, Morita S, Fukasawa M, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, Hatada I., Genomic imprinting in dicer1-hypomorphic mice and EIF2C2 deficient mice. (poster)

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

18) Morita S, Fukasawa M, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T & Hatada I GENOMIC IMPRINTING IN DICER1-HYPOMORPHIC MICE AND EIF2C2 DEFICIENT MICE, International Genomic Imprinting Workshop 2006 (poster)

19) 山本雄介、寺谷 工、Quinn Gary、加藤尚志、落谷孝広. Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from mouse embryonic stem cells. Society for Developmental Biology 64th Annual Meeting. (U. S. A.)、平成 17 年 8 月

20) 落谷孝広 FGF4 plays a key role for induction of hepatocytes from stem cells GRC: FGFs and Disease. Ventula, CA, USA March 12-17, 2006.

G. 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

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, <u>Ochiya T</u> , 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, <u>Hatada I</u> , Matsubara K, Kato T, <u>Ochiya T</u> . | 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, <u>Ochiya T</u> , 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, <u>Ochiya T</u> , 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, <u>Ochiya T</u> , <u>Ochiya T</u> . | 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, <u>Ochiya T</u> . | 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>Ochiya T</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>Ochiya T.</u> | Loss of genomic imprinting in mouse parthenogenetic embryonic stem cells. | Stem Cells. | 26 | 79-88 | 2008 |
| <u>Ochiya T</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>Ochiya T.</u> | MeCP2-dependent repression of an imprinted miR-184 released by depolarization. | Hum Mol Genet. | | | In press |
| <u>Ochiya T</u> , Honma K, Takeshita F, Nagahara S. | Atelocollagen-mediated Drug Discovery Technology. Expert Opin. | Drug Discov. | 2 | 159-167 | 2007 |
| Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T, <u>Ochiya T.</u> | Stem cells into liver-basic research and potential clinical applications. | Adv. Exp. Biol. Med. | 585 | 3-17 | 2006 |
| Takeshita F, Kodama M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Ueda S, Teratani T, Yamamoto Y, Tamatani T, Kanegasaki S, <u>Ochiya T</u> , Quinn G. | Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells. | Diabetologi a | 49 | 2948-2958 | 2006 |
| Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, <u>Ochiya T</u> | Genomic imprinting in Dicer1-hypomorphic mouse. | Cytogenetic & Genome Res. | 131 | 138-143 | 2006 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|-------------------------|------|-----------|------|
| Fukasawa M, Kimura K, Morita S, Matsubar K, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Horii A, Sasaki H, & Ochiya T. | Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers. | J. Hum. Genet. | 51 | 368-374 | 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 cells. | 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. | Gastroenter ology | 131 | 14-29 | 2006 |
| 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 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|---------------------------|---------|-----------|------|
| Fujii T, Saito M, Iwasaki E, <u>Ochiya T</u> , 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, <u>Ochiya T</u> . | A new photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. | Cancer Res. | 66 | 7532-7539 | 2006 |
| Takeshita F, <u>Ochiya T</u> . | Therapeutic potential of RNA interference against cancer. | Cancer Sci. | 97 | 689-696 | 2006 |
| Ueda S, Fukamachi K, Matsuoka Y, Takasuka N, Takeshita F, Naito A, Iigo M, Alexander DB, Moore MA, Saito I, <u>Ochiya T</u> , 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 |
| <u>Ochiya T</u> . | Emerging technologies for genome-wide DNA methylation profiling in cancer. | Critical Rev. Oncogenesis | 12(3-4) | 205-223 | 2006 |
| <u>Ochiya T</u> , Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamanaka S, Sakurada A, Sato M, Endo C, Kondo T, Horii A, Ushijima T, & Sasaki H. | Genome-wide profiling of promoter methylation in human. | Oncogene | 25(21) | 3059-3064 | 2006 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|---------------------|----|---------|------|
| Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H, Asari A, Quinn G, Sasaki H, Terada M, <u>Ochiya</u> <u>T.</u> | Direct hepatic fate specification from embryonic stem cells. | Hepatology | 41 | 836-846 | 2005 |
| Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H, Asari A, Quinn G, Sasaki H, Terada M, <u>Ochiya</u> <u>T.</u> | Direct hepatic fate specification from embryonic stem cells. | Hepatology | 41 | 836-846 | 2005 |
| Yamamoto Y, Teratani T, Quinn G, Murata S, Ikeda R, Kinoshita K, Matsubara K, Kato T, <u>Ochiya T.</u> | Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from embryonic stem cells. | Hepatology | 42 | 558-567 | 2005 |
| Teratani T, Quinn G, Yamamoto Y, Sato T, Yamanokuchi H, Asari A, <u>Ochiya T.</u> | Long-term maintenance of liver-specific functions in cultured ES cell-derived hepatocytes with hyaluronan sponge. | Cell Transplant. | 14 | 629-635 | 2005 |