

14個存在した。興味深いことに、肝臓および腎臓でコレステロール代謝に関わる遺伝子の発現量が、BNラットと比べ約4倍上昇していた。そこで24週齢の血中脂質濃度を測定したところ、LEA/Sendaiラットでは血中コレステロールおよび遊離脂肪酸が有意に上昇していた。トリグリセリド濃度には、有意な差はなかった。さらに、血中脂質プロファイルを詳細に解析したところ、HDLおよびLDLコレステロールが、コントロール系統に比べ有意に増加していた（図23）。

## （2）臨床パネルの作成

本研究全体の成果を吟味して臨床へ還元するために、2型糖尿病の「成因」と「病期／ステージ」個体レベルの統合的な解析を可能にする臨床パネルの構築を行った。これまでも、ミレニアムプロジェクトやプロテオームファクトリー事業等で、臨床情報を整備したパネルを構築してきたが、糖尿病の病態を多角的に解析することが可能な臨床のリソースづくりを進めている（厚生労働省バイオリソースバンク構想）。

具体的には、糖尿病患者約900名、対照約600名について、ゲノムと血清のペアとともに、詳しい臨床情報や病歴を採取した。また、同一患者での治療入院前後での血清ペアを、約300

例収集した。さらに、眼科手術時に硝子体液を採取し、糖尿病網膜症30例、非糖尿病30例などを収集して局所の生理活性物質の解析に供している。

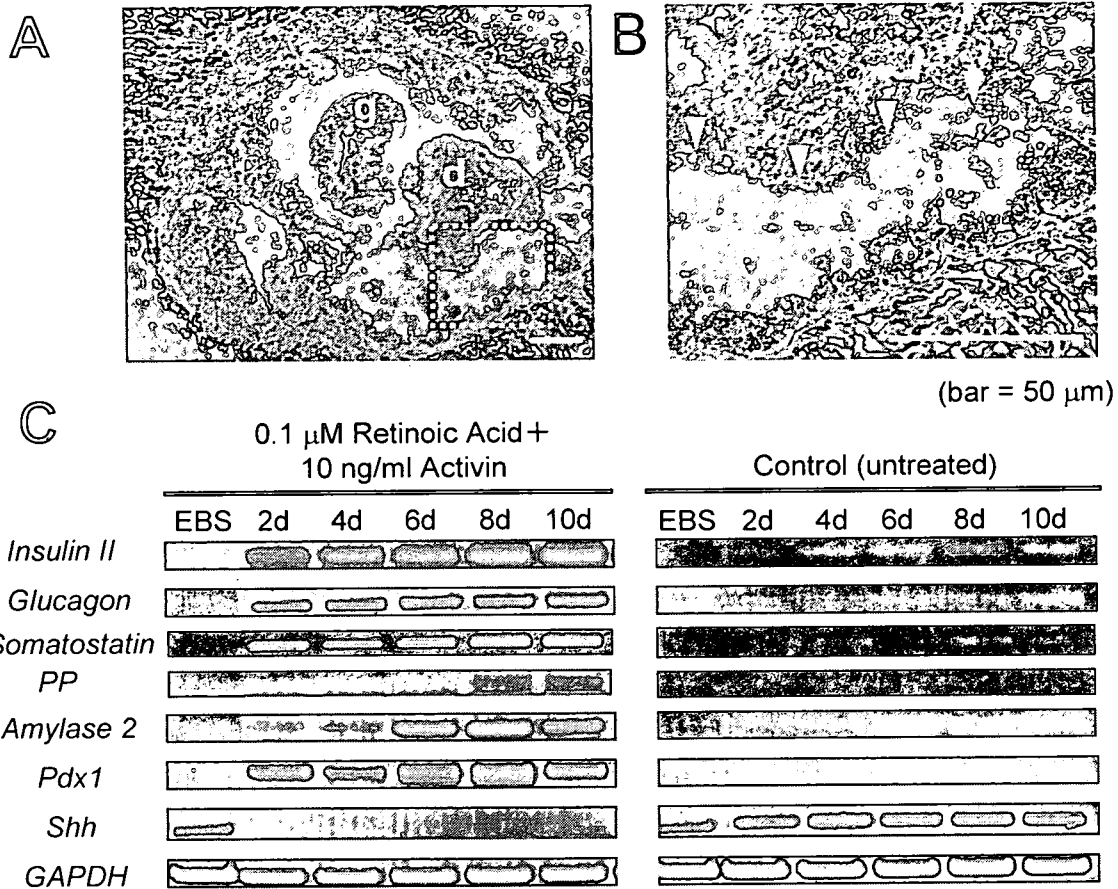


図 3. 0.1 mM レチノイン酸と 10 ng/ml アクチビンで共処理した誘導処理後 13 日の EBS (a,b). 黒い斑点状の部分 (矢印,b) が外分泌細胞でありアミラーゼの顆粒を含む. [Bar = 50  $\mu$ m (a and b)] (C) RT-PCR 法による, レチノイン酸・アクチビン処理した EBs, および無処理の EBs における膵臓マーカー遺伝子の発現. *Insulin II*, *glucagons*, *PDX-1* は 8 日後から, また *amylase 2* は, 12 日後から経時的に発現量が上昇してくる. 一方, *Sonic Hedgehog(Shh)* は処理後, 遺伝子発現が抑制

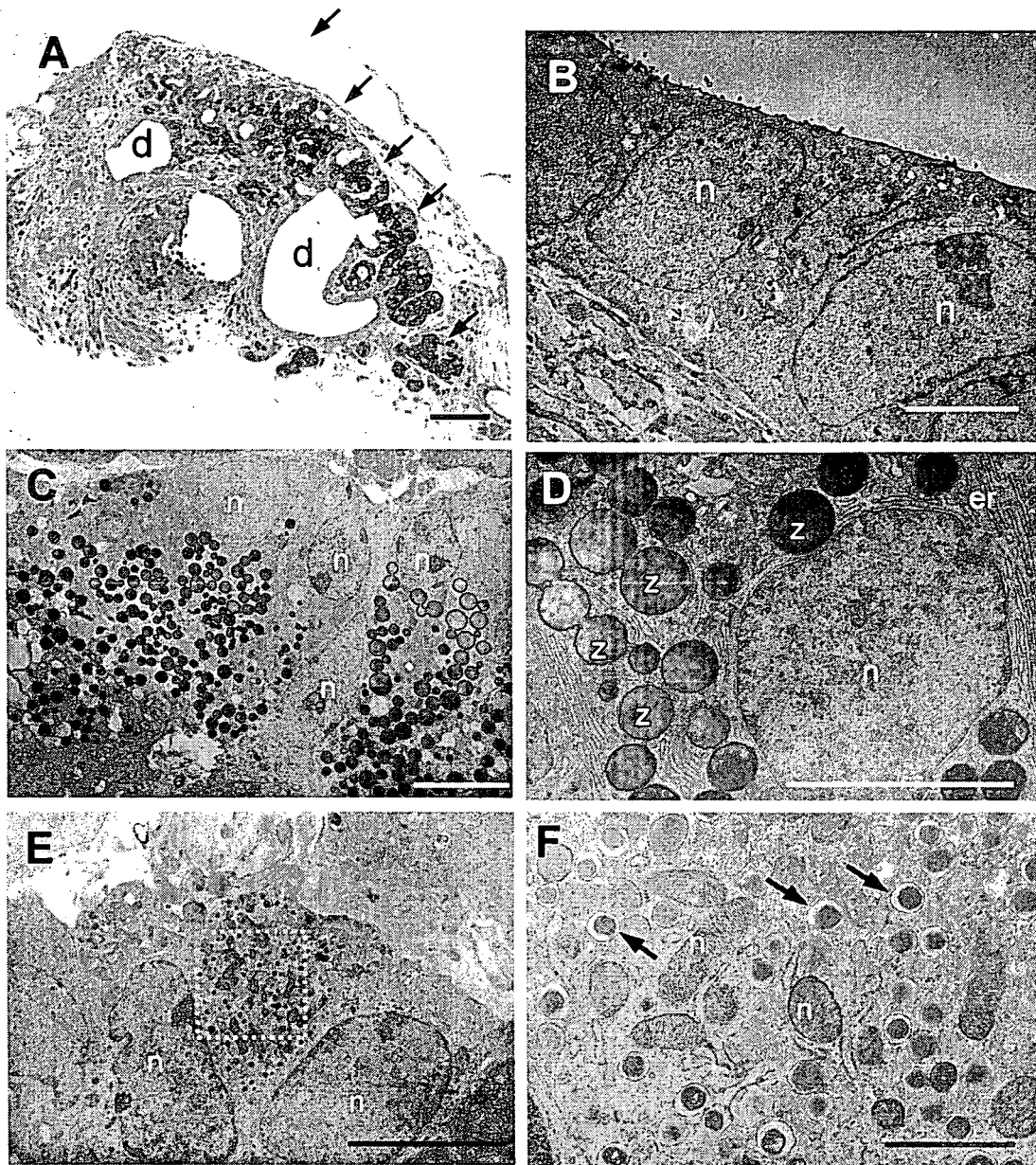


図4. 分化誘導した膵臓を含む EBs の光学および電子顕微鏡による解析

0.1  $\mu\text{M}$  レチノイン酸, 10 ng/ml アクチビンで処理した EB (誘導処理終了後 11 日後 (EB 形成後 17 日)). 管腔に隣接した部分にトルイジンブルーによって濃く染まる細胞をふくむ、房状の組織が観察された(A). また、それに隣接した導管用構造が認められた (A, B). 電子顕微鏡による観察から大量の分泌顆粒 (zymogen granules) を含む細胞 (C, D) が観察された。この細胞は発達した小胞体と、暗色で、均質な大量の分泌顆粒を含んでおり、これは膵臓の外分泌細胞 (腺房細胞) の特徴と一致している。低い円柱上皮に囲まれた膵臓の導管上皮細胞に類似した構造 (B) も観察された。

また、外分泌細胞とくらべて少数ではあるが、膵臓の内分泌細胞に類似した形態をもつ細胞 (E, F) も認められた。この細胞は外分泌細胞 (C, D) とは形態の異なる分泌顆粒を多数含んでいる (F)。暗く染まる中心部分と、外側の膜とのあいだに広い間隙があり、これは膵臓の $\beta$ 細胞の顆粒の特徴的な形態と一致している。[小胞体, ER; ミトコンドリア, M; 核, N; 分泌顆粒, Z] [Bar = 50  $\mu\text{m}$  (A); 5  $\mu\text{m}$  (C-E), 1  $\mu\text{m}$  (F).]

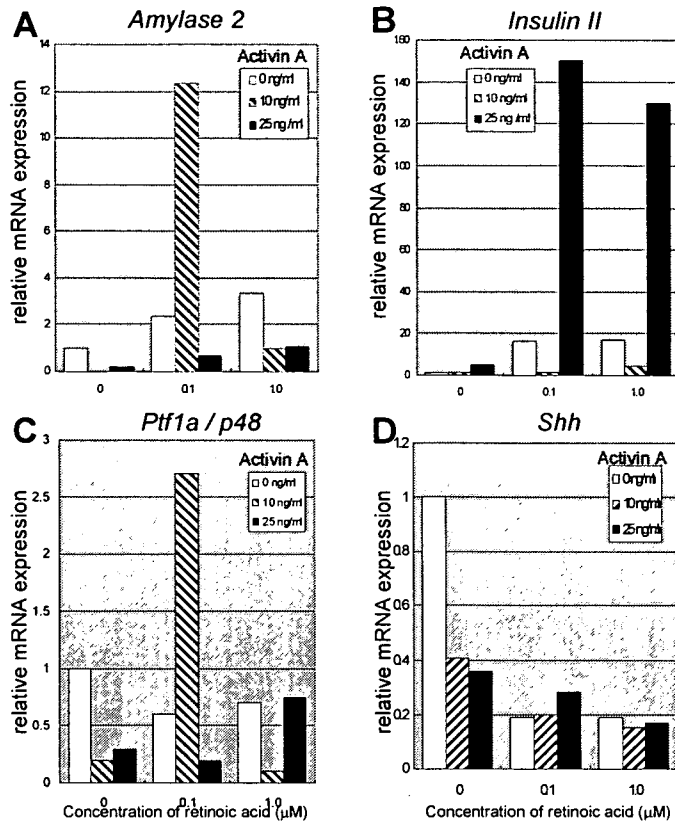


図5. 各濃度のレチノイン酸とアクチビンで共処理した EBs における膵臓マーカー遺伝子および shh の発現量の比較

レチノイン酸およびアクチビンで共処理した EBs から処理後 13 日に total RNA を抽出、Real-time PCR 法によって(A) amylase 2, (B) insulin II, (C) ptf1a/p48 および(D) shh の転写レベルにおける発現量を比較した。いずれも無処理の EBs における発現を 1 とした場合の相対値を示す。shh の発現量はレチノイン酸処理, アクチビン処理, レチノイン酸・アクチビン共処理いずれによっても減少した (D)。レチノイン酸の処理濃度を一定 (0.1 mM) としてアクチビンの処理濃度を変えた場合, 低濃度(10 ng/ml)のアクチビンと共処理した EBs では無処理の EBs と比較してアミラーゼの発現量が著しく増加する一方, インスリンの発現量はそれほど変化がなかったのに対し, より高い濃度(25 ng/ml)のアクチビンと共処理した EBs ではインスリンの発現量が著しく増加することが

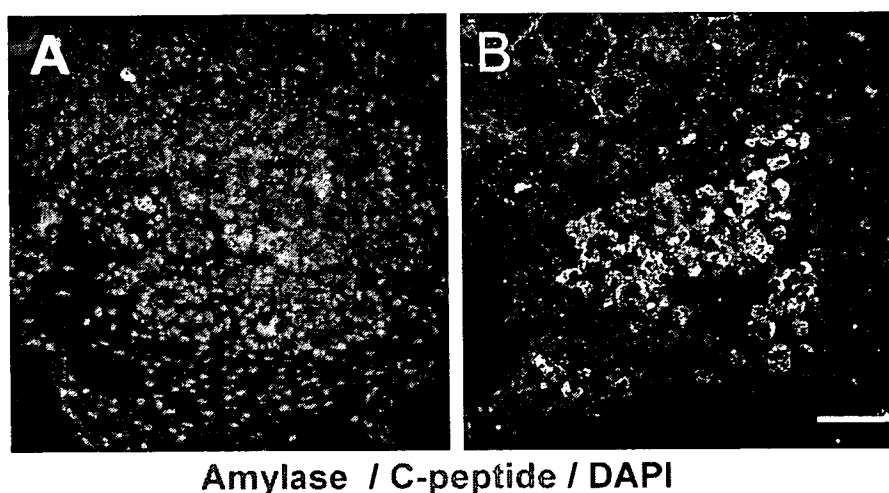


図6. 抗C-ペプチド抗体および抗アミラーゼ抗体による重染色  
 0.1 mM レチノイン酸と 10 ng/ml アクチビンで共処理した EBS(A), および 0.1 mM レチノイン酸と  
 25 ng/ml アクチビンで共処理した EBS(B). 0.1 mM レチノイン酸と 25 ng/ml アクチビンで共処理し  
 た EBs においてはインスリン陽性細胞の割合が著しく増加した(B). [Bar = 50 mm]

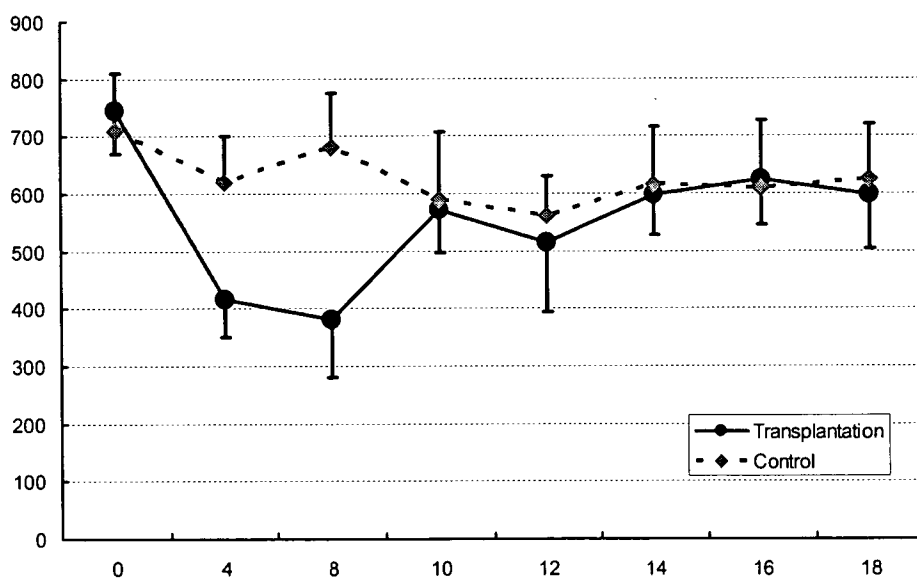
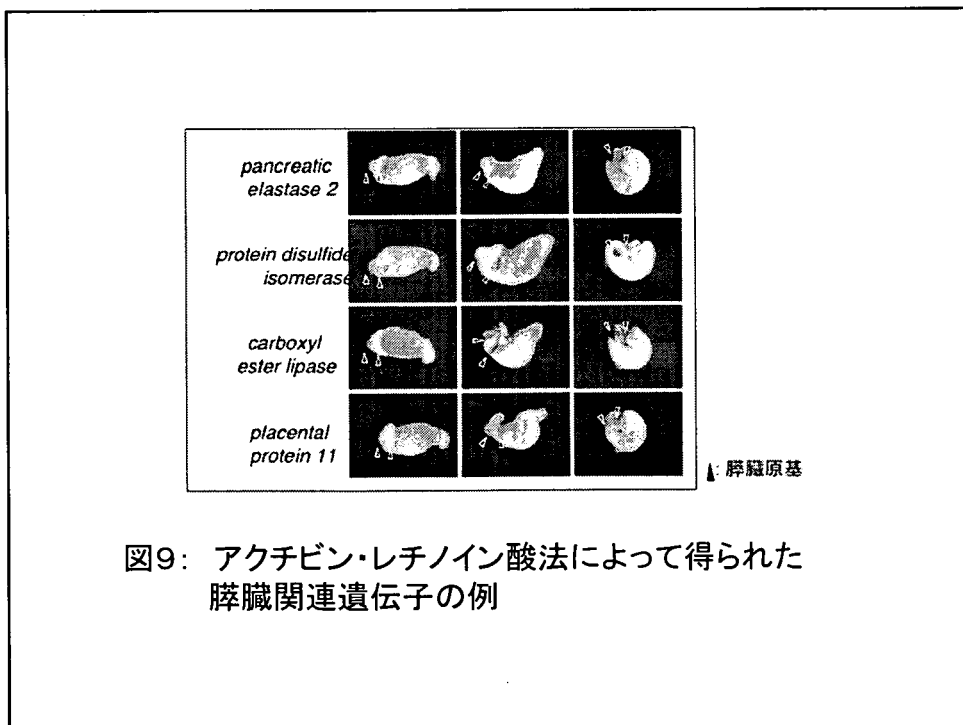
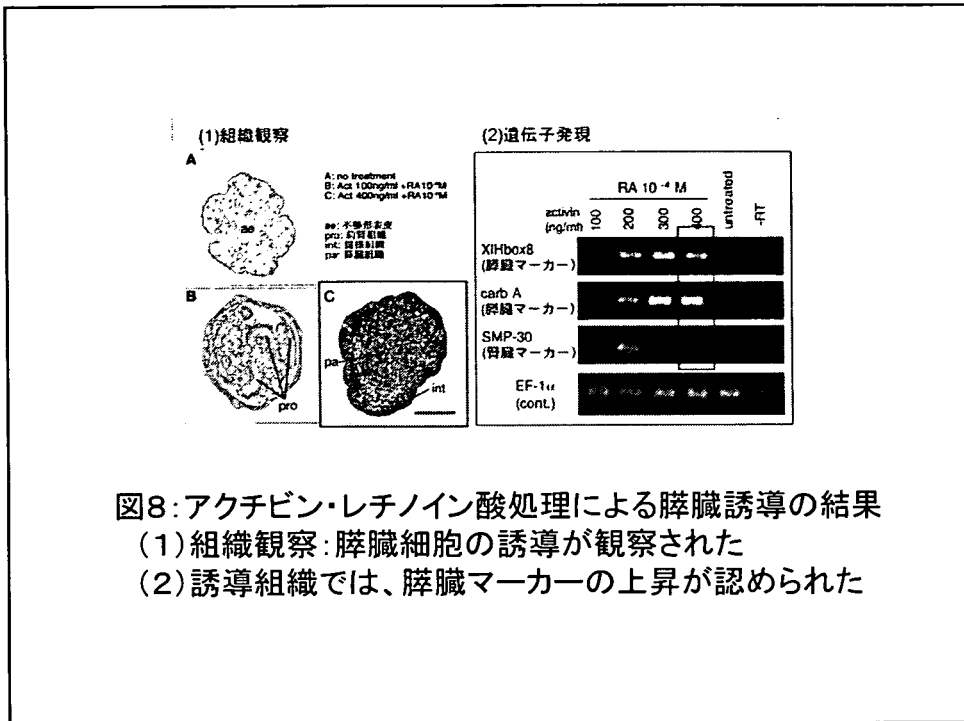


図7. 分化誘導した ES 細胞からの膵臓組織を 10 コロニー AKITA マウスに移植した結果、対  
 照群と比較して、4 日から 8 日の間、血糖値が下がっているのがわかる。しかし、その後上昇  
 し、対象群と変わらなくなっていた。(n=3)



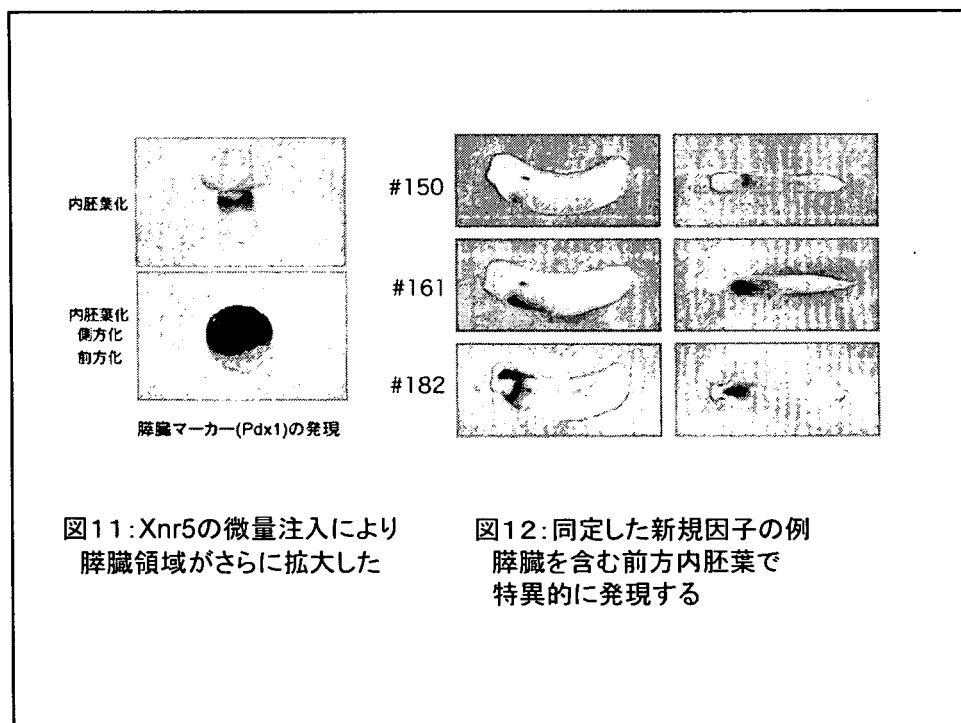
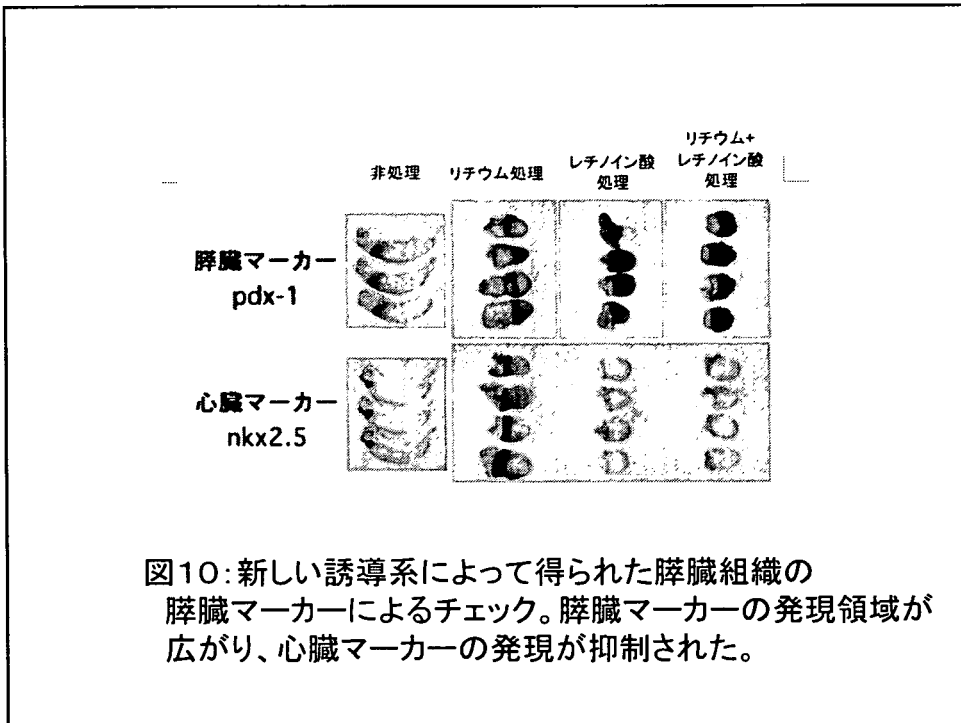
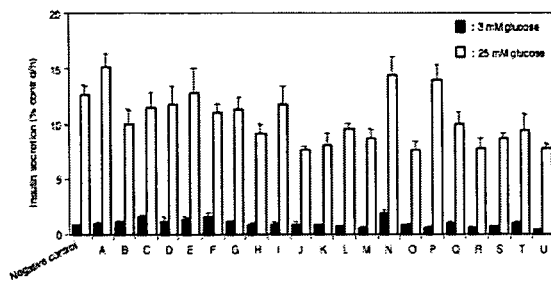
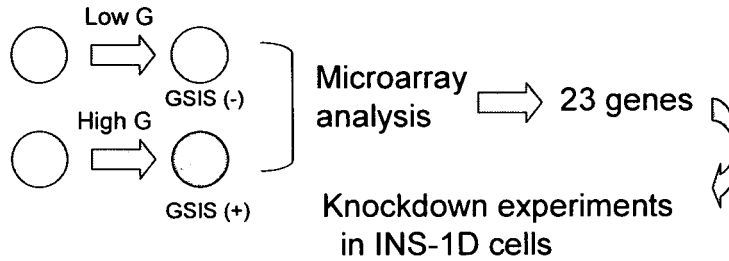
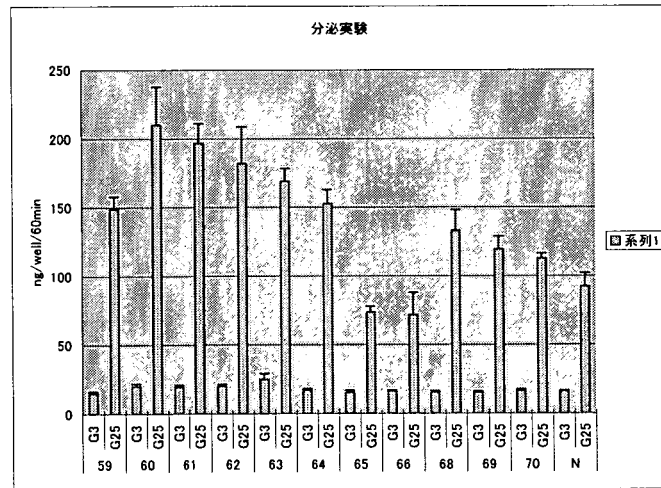


図13: 膵β細胞機能成熟に関する遺伝子の探索



siRNAによるノックダウンを行い、72時間後にグルコース反応性インスリン分泌に対する効果を検討した。Negative control siRNA処理細胞を対照とした(左端)。反応性が低下したもの(HJKLMOQRSTUなど)がかなり見られている。

図14: ncRNAのGSISへ及ぼす効果: siRNAによる検討



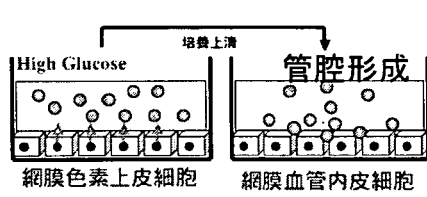
ncRNA-1 ncRNA-2 ncRNA-3 ncRNA-4

4つのncRNAに対して、各3種のsiRNAをデザインし、INS-1D細胞に導入して72時間後にグルコース反応性インスリン分泌(GSIS)を検討した。ネガティブコントロールsiRNA導入細胞を対照とした(N)。



図15: 糖尿病網膜症の新規の病態候補の発見

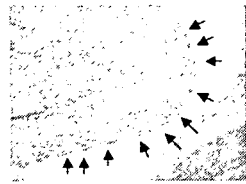
網膜血管新生in vitroモデル



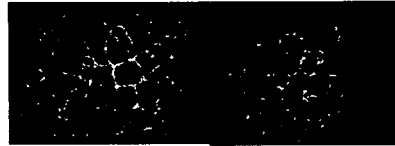
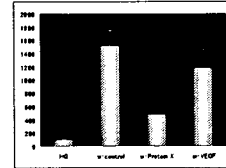
網羅的発現解析etc

高グルコースで発現が誘導される、新規の網膜血管新生促進因子ANGPTL4の同定

糖尿病網膜症モデルにおける局所発現



VEGFに匹敵する強いIn vitro網膜血管新生促進活性



ANGPTL4:代謝と血管新生をつなぐ物質

⇒ ヒト糖尿病網膜症への関与の検討へ

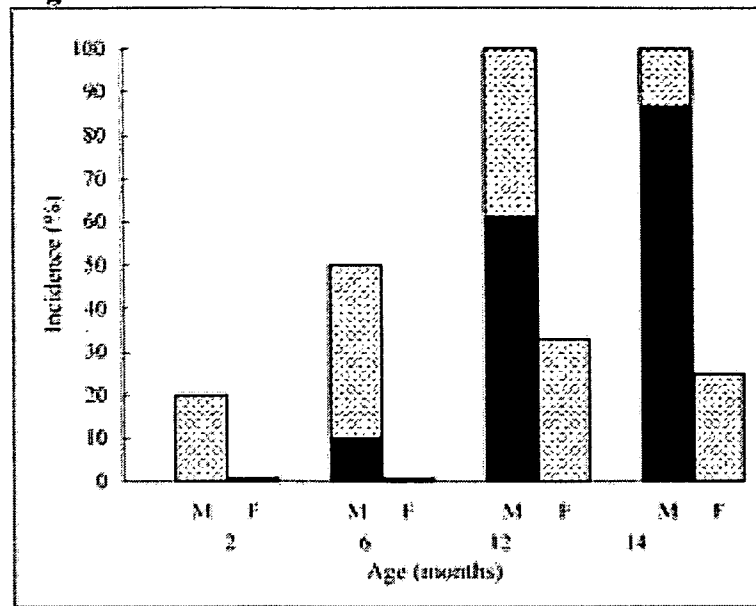


図16. LEA/Sendaiラットの糖尿病発症率。ドットおよびブラックバーは、それぞれ耐糖能異常 (IGT) および糖尿病発症率を示す。M:雄ラット、n=32、F:雌ラット、n=26

### Oral Glucose Tolerance Test (2g/Kg glucose)

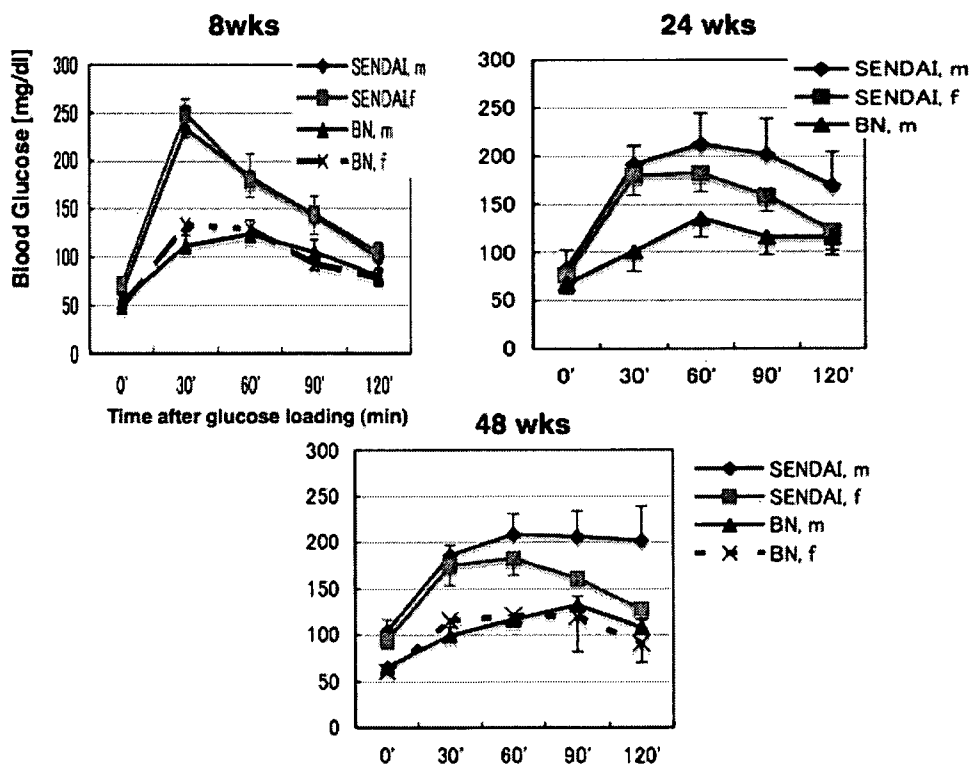
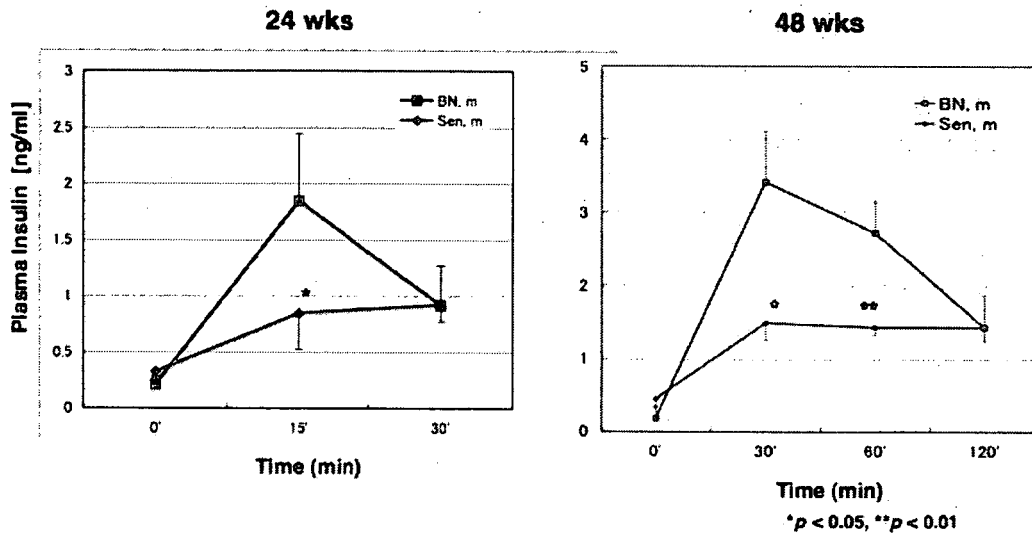


図17 各週齢における経口糖負荷試験

耐糖能は加齢と共に悪化し、雄のみOGTT後の血糖値が200-300mg/dlの軽症糖尿病を発症する。  
m: male, f: female

## Plasma Insulin levels in OGTT



雄ではインスリン分泌能も加齢と共に低下する。

図18 経口糖負荷後の血中インスリン濃度

## Pancreatic Islets in Male LEA/Sendai Rats

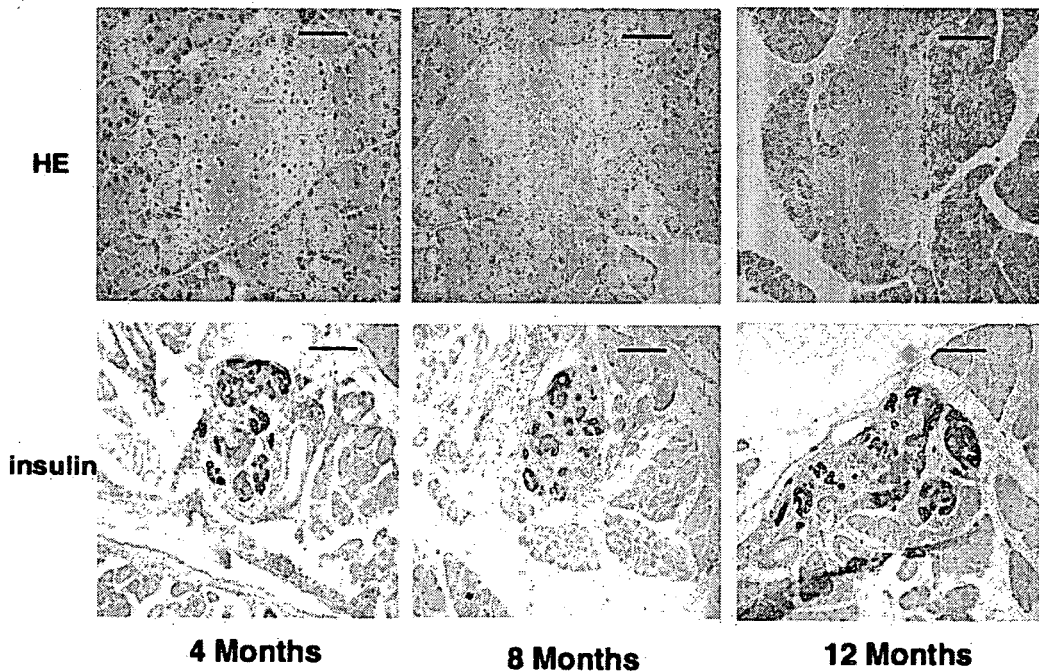


図19 LEA/Sendai雄ラットの膵島における加齢変化

加齢と共に膵島の線維化が進行する。線維化領域にはCD4, CD8陽性細胞は検出されず、マクロファージの浸潤が観察された。

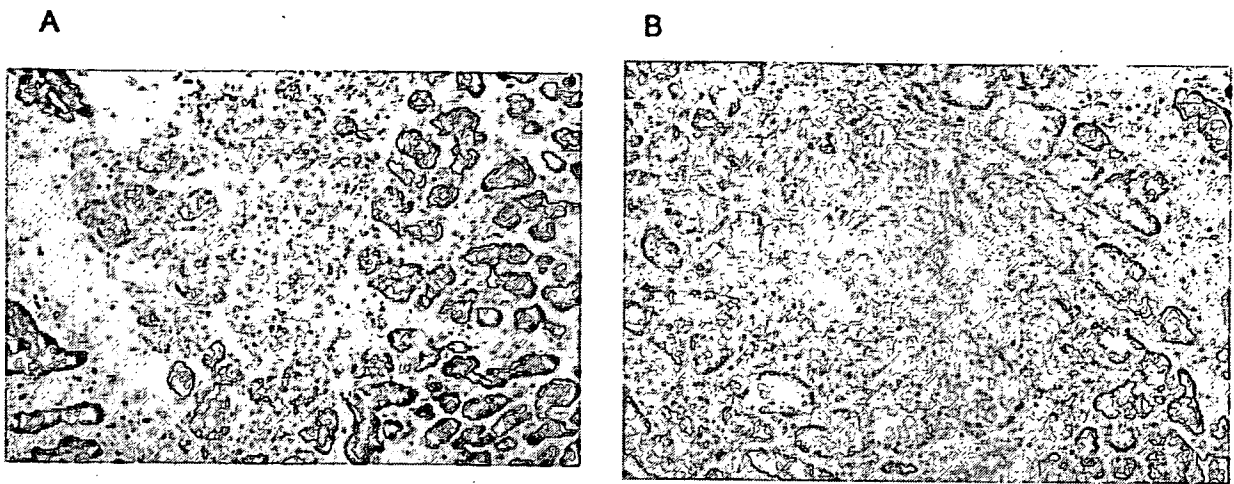


図20 雄LEA/Sendaiラット膵島における初期病変

10-12週齢では、一部の膵島周辺に炎症性細胞の浸潤が見られ（A）、中等度の炎症、浮腫および出血像が観察された。

### 8wks, male

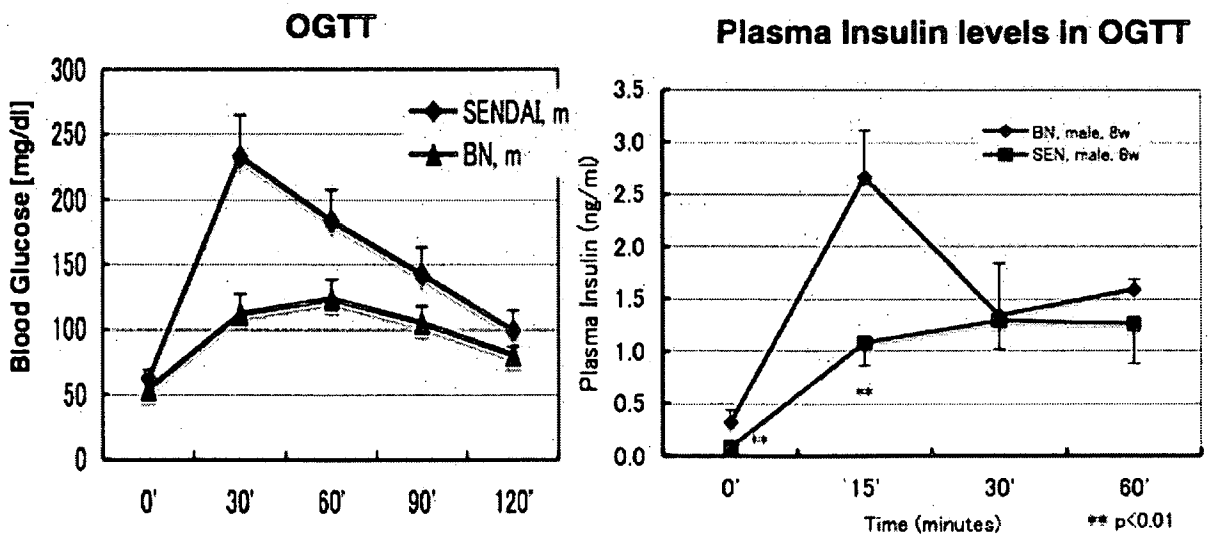


図21 8週齢雄ラットにおける経口糖負荷後血糖値および血中インスリン濃度の変化

LOD Score Plots for Blood Glucose

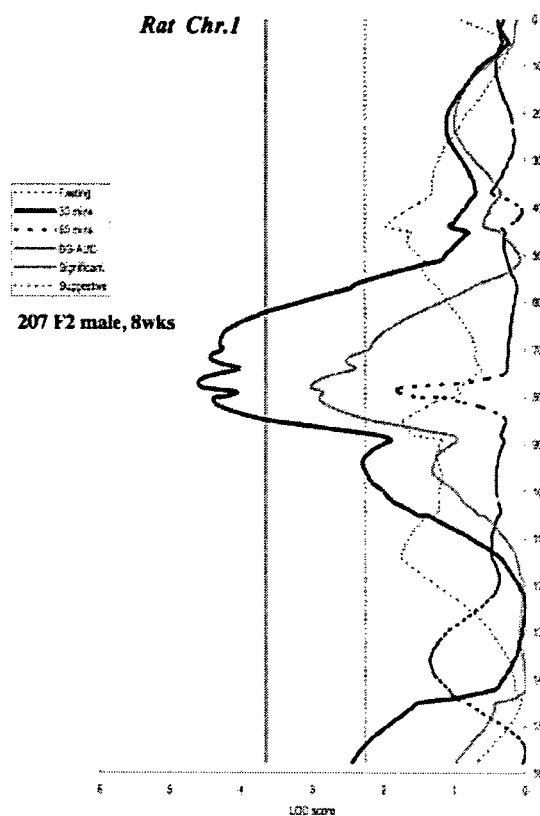


図22 207匹の8週齢F2ラットを用いたQTL解析  
 糖負荷0, 30、60分後血糖値およびAUCを量的形質とした。その結果、糖負荷後30分血糖値で significant を超えるQTLがマップされた。

Lipid Profile in LEA/Sendai Rat

24w	コレステロール [mg/dL]	中性脂質 [mg/dL]	FFA [mEq/l]
Sen, male	98.7 ± 8.3	56.7 ± 32.1	1.37 ± 0.15
BN, male	61.2 ± 3.4 **	60.9 ± 11.5	1.11 ± 0.04 *
F344, male	48.9 ± 8.9 **	72.6 ± 24.6	

Mean ± SD  
 \* < 0.05, \*\* < 0.001

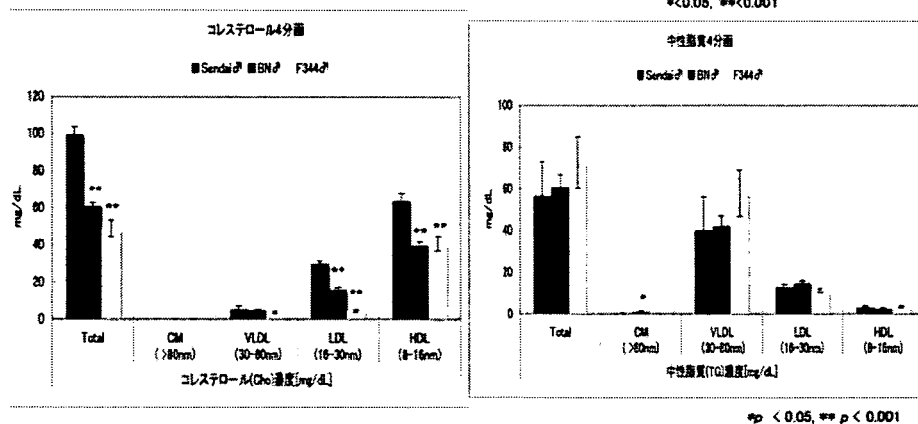


図23 24週齢の血中脂質プロファイル  
 血中コレステロール、FFA、さらにLDLコレステロールが、コントロール系統に比べ有意に高い。

#### D. 考察

本研究の最大の利点は、独自の解析系をいくつも有することである。具体的には、特に、「環境因子解析動物モデル」(江崎)、「マウス ES 細胞からの膵分化系」(浅島、浜崎)、「ツメガエルからの *in vitro* 膵分化系」(浅島)、「仔ブタ膵由来 SP (side population) 細胞」(安田、大河内)、「皮膚及び脂肪組織由来細胞の膵内分泌化」(大河内)、「膵内分泌細胞完全長 cDNA ライブラリー」(安田)、「霊長類 ES 細胞からの血管内皮分化系」(湯尾)、「網膜症関連物質スクリーニング系」(安田)「日本人 2 型糖尿病に酷似したモデル動物 (Sendai ラット)」(岡村) などである。これらはいずれも世界中で我々だけが保持するものであり、糖尿病研究において非常にユニークな解析ツールである。

本研究の 3 つの柱の成果についてみると、まず A. 「環境因子やインスリン抵抗性の分子解析」については、「運動」や「食事」など環境因子の効果を発生工学的に mimic する独自の系を用いて新規の知見を報告しており、環境因子の効果も従来の定説のように一通りではないことを明らかにしている。

たとえば運動の代謝への効果は、最近では AMP キナーゼ活性化を介する

という説が有力だが、同じく AMP キナーゼ活性化を生じるアディポネクチンやビッグアニド剤との異同もそれだけでは十分説明できない。本研究により、運動の効果には AMP キナーゼ活性化を介する効果 (体脂肪減少効果) とそれ以外の機序も関与する効果 (代謝改善作用) とがあり、交感神経 ( $\beta$  作用) は後者にも重要であることを示した。PPAR $\alpha$  活性化剤が筋 GLUT4 発現増加作用をもつという発見は、直接創薬に結びつく可能性も秘めている。

次に、本研究の 3 つの柱のうち、糖尿病の発症進展に最も重要で、最も分担研究者の多い B. 「膵  $\beta$  細胞の代償と破綻」については、膵  $\beta$  細胞の発生・分化という本質的な問題は避けて通れないし、糖尿病での障害部位としても、この全段階を視野にいれておくべきである。研究班がもっている「膵  $\beta$  細胞」解析系を整理すると、たとえば図 24 のようになる。

膵  $\beta$  細胞の『量的代償』という点では、発生・分化・増殖、及び細胞源が大きな課題である。発生学との関連では、 $\beta$  細胞のみをつくろうという試みが世界的にも多い中、「マウス ES 細胞」(浜崎)、「ツメガエル胚」(浅島)からは、膵という臓器全体の発生分化の流れのなかで  $\beta$  細胞の増殖・分化をとらえようとする系を構築して

いる。いずれも胎児期膵原基に発現が認められるアクチビンとレチノイン酸に着目している点で、生理的な新規のマスター遺伝子を得られる可能性が高い。また、ES 細胞の系では、アクチビン処理濃度を高めると外分泌系細胞の割合が減少し、内分泌系細胞が大きく増加するという、調節可能な分化誘導系を見いだしている。これを基盤として、更に効率良くインスリン産生細胞を誘導可能な系が開発できれば、膵代償機序と破綻の解明に重要であると考えられる。

自己の細胞からの膵β細胞の供給、という点で、まだ存在やそのアイデンティに議論が絶えない膵幹細胞、内分泌前駆細胞の同定は重要である。膵SP細胞は、当初目指した細胞とはやや違うようだが、一方で膵の細胞生理学においてまた新たな知見を加えることになった。

さらに治療目的も考えると、皮膚や脂肪組織等の採取可能な自己組織からのβ細胞作成は、実現すれば非常にインパクトが大きい。今回の糖尿病モデルへ移植する予備的 *in vivo* 実験でもその可能性がみえてきた。まだウイルスで *Pdx1* などのマスター遺伝子の導入をおこなっているが、コンディショナルに発現を調節できる系を試行中である。将来的にはウイルスによらずに分化誘導が可能になれば、現在話

題の *iPS* 細胞に比較してもより安全かつ簡便に臨床応用が期待できる。

膵β細胞の『質的代償』という点では、障害モデルはもちろんのこと、むしろ保たれるべき「高度に最終分化した膵β細胞」の分子基盤をさぐる、という視点から解析系を構築した。実際、ES 細胞からインスリン陽性細胞がなかなか作れない状況など、膵β細胞に特徴的な、非常に精密な遺伝子発現調節機構の存在が示唆され、膵β細胞の機能異常を示す糖尿病の伊本質的な障害部位である可能性もあり、その解明は、きわめて重要である。「膵内分泌細胞由来完全長 cDNA ライブラリー」は、この点に遺伝子調節機構の点で正面からアプローチするものであり、実際全く予想外の RNA world の存在を示しつつある。また、より生理的な成熟経路を見る系も確立したが、そこで発現が誘導された遺伝子の半数以上が、GSIS に関与することが、ノックダウン実験から示唆されるなど、きわめて有用な系であることが証明された。前記発生・分化からのアプローチと比較すると、膵β細胞分化をいわばはさみうちにするような、相補う戦略といえ、同時に、創薬のスクリーニング系としても期待される。

このように、当研究班が、この現在もっともチャレンジングな課題に対

して、ユニークな解析系を用いて全体をカバーしアプローチしていることが明らかである。

第3の C. 「合併症」については、血管病としての特徴に着目し、その血管内皮を直接の解析対象としてグルコースなどの効果をみようとしている。特に、霊長類 ES 細胞由来の血管内皮細胞分化系は、非常に高効率で世界的にも類を見ない。糖毒性の解析に適しているだけでなく、初代培養内皮細胞の量的問題もクリアできる安定した系であり、創薬スクリーニング系としても非常にすぐれている。

ES 細胞由来の分化系を、血管病としての合併症の共通部分の解析とすれば、一方で臓器ごとに内皮細胞の性質や合併症の進行が異なることも知られている。実際本研究でも、ヒト初代培養内皮細胞にて、高グルコースで産生される ROS の由来が、ミトコンドリアか細胞膜 NADPH オキシダーゼか、由来する臓器が異なると、違う結果がでてくる。その分子機序が明らかになれば、個々の合併症に対する、より特異的な診断・治療法が期待される。

特に網膜症においては、局所の血管新生活性が非常に重要である。今回見いだした分子にしても、網膜内皮細胞には VEGF に匹敵する活性を示すが、ほかの内皮を使った報告では血管新

生促進活性は議論がわかれている。また高グルコースによる発現増加も網膜色素上皮以外では報告がなく、糖尿病患者や摂食時には血中濃度がむしろ低下すると報告されているなど、やはり血管をとりまく各臓器の特異性を考慮する必要がある。さまざまな培養細胞と、ES 由来細胞とで比較することで、血管病としての共通部分と組織特異性部分とが浮き彫りになるであろう。

生物学の重要な現象を再現する系が一端手に入れば、その分子機構の解明は、現時点ではかなり標準化されたかつ体系的な方法によって可能である。網羅的な遺伝子発現解析ではマイクロアレイがあるし、特定の遺伝子機能の検討ならノックダウンや Morpholino などですぐ可能である。マイクロアレイの利点の一つは、一見異なる系同士の「分子的な比較」ができることである。当研究班でも研究代表者が横糸となってマイクロアレイ解析を行ってきた。

実際、本研究班により、糖代謝や臓器生理学に重要な、多くの新規分子が同定された。論文や特許申請の関係もあって、本報告書では具体名を示せないものも多いが、これらの病態における意義、診断マーカーや治療標的となりうるかどうか、など今後一つ一つ丁



寧に検証する必要がある。各分担研究は独自に深めつつも相互に特徴を補いあって全体テーマを深めるべく組織されており、基盤的な新規性、発展性は研究班としてもうまく機能しているといえよう。

反省としては、個別研究は非常に深いところまで解析をおこなったが、本研究で最も大切な点、すなわち個別の研究を、最終的に個体レベルへどのように統合し、臨床へどのように還元させるか、という点で、限られた研究期間で十分成果をあげきらなかったことである。研究の統合、という点では、たとえば、「マイクロアレイなどで得られた、様々な系に関与する遺伝子を一覽とし、 $\beta$ 細胞の発生分化成熟過程の『分子マップ』を作成して、それらと糖尿病の発症進展との関係を議論し、診療に役立てたい」、という計画をもっていたが、途半ばのまま最終年度が終了してしまった。

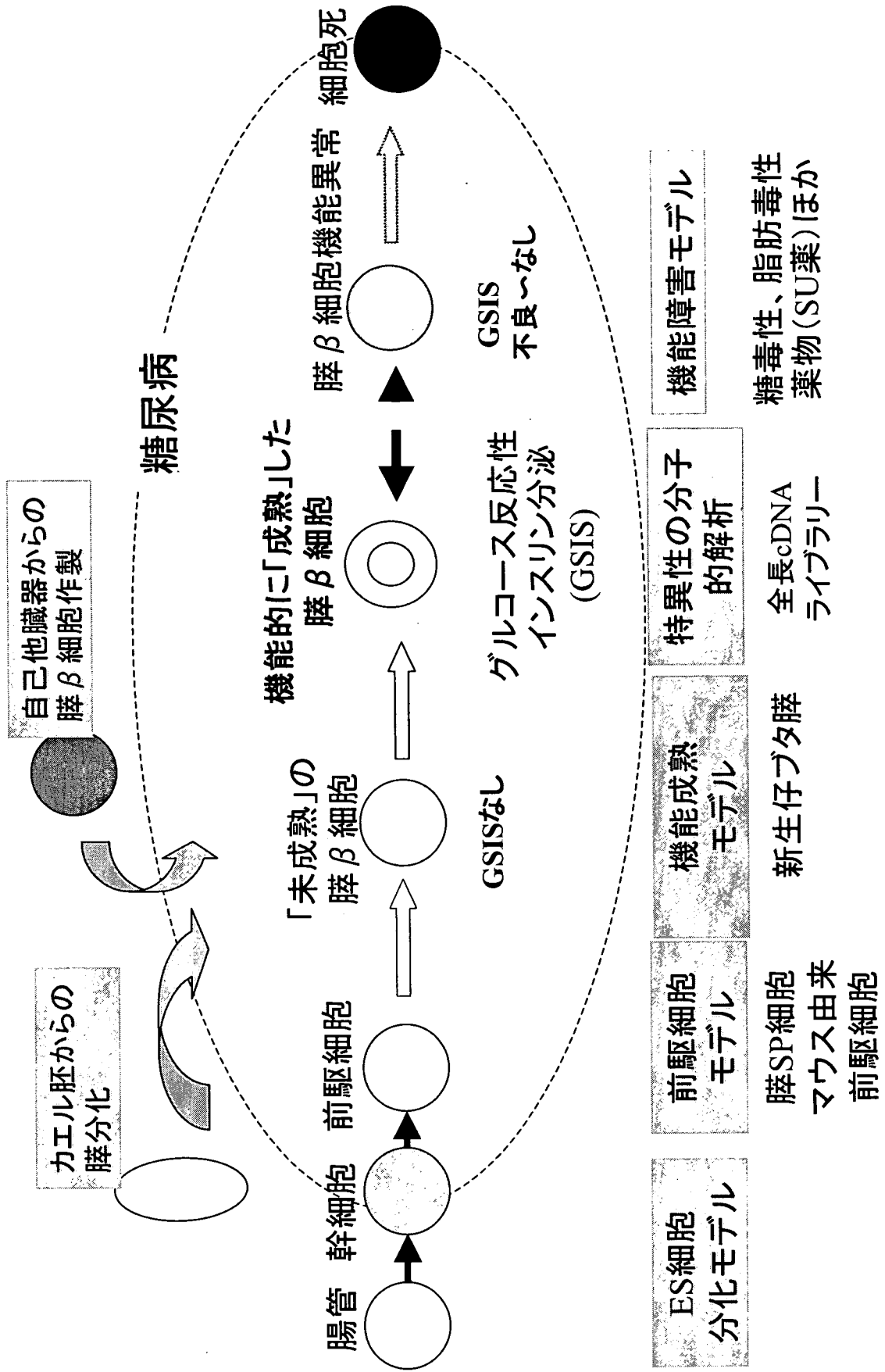
個体レベルへの統合、という点は、生活習慣病研究における永遠のテーマでもあるが、ヒトを使った研究には限界がある。この点、本研究班で解析した日本人糖尿病に酷似した非肥満インスリン分泌低下型の Sendai ラットは、経時的に臨床像や臓器変化が追えること、しかも比較的高齢まで高血糖が生じにくく、いわゆる糖毒性によ

る二次的変化の影響が少ないと考えられること、などから、ヒトでなし得ない「病期」の分子的検討については、現時点で最適のモデルの一つであろう。

また、ヒト検体については、大型プロジェクトなどで構築された基盤を活かして、糖尿病個体のゲノムや血清・個体の細かい臨床情報・フェノタイプ（フェノーム）、が多数収集されたので、今後重層的な解析が大いに期待される。

いずれにしても、今後本研究班で得られた成果が、診断や治療へ応用され、糖尿病の病態を、病因と病期という両面からとらえる、真の個別化医療が実現することを、期待するものである

図24: 本研究班の解析リソース: 膵β細胞の例



## E. 結論

本研究では、糖尿病の慢性の発症・進展の中でも、これまで特に解析が遅れていた「環境因子の分子メカニズム」、「膵代償機序とその破綻」「合併症」の3点に注目して、世界的にも独自の有用な系を確立して解析を進め、多数の新規重要分子を単離し、また創薬のスクリーニング系も構築した。個体レベルでの解析系として、動物モデル (Sendai ラット) を解析し、また重層的な解析を可能にするヒト臨床パネルを構築した。これらの成果は、今後病期に基づく糖尿病の新しい診断治療法の開発にきわめて有用と期待される。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamazaki T, Sasaki E, Kakinuma C, Yano T, Miura S, Ezaki O: Increased VLDL secretion and gonadal fat mass in mice over-expressing liver acyl CoA: Diacylglycerol transferase1. **J Biol Chem**: 280: 21506-21514, 2005
- 2) Ihara K, Miyako K, Ishimura M, Kuromaru R, Wang HY, Yasuda K, Hara T. A case of hyperinsulinism/hyperammonaemia syndrome with reduced carbamoyl-phosphate synthetase-1 activity in liver: A pitfall in enzymatic diagnosis for hyperammonaemia. **J Inherit Metab Dis** 28(5):681-7, 2005.
- 3) Yamashita R, Saito Y, Satoh S, Aoki K, Kaburagi Y, Sekihara H. Effects of dehydroepiandrosterone on gluconeogenic enzymes and glucose uptake in human hepatoma cell line, HepG2. **Endocrine J**. 52: 727-733,2005.
- 4) Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y, Yuo A: Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 289:E419-E428,2005.
- 5) Horiuchi A, Yasugi E, Yuo A: Structural requirement of dolichyl phosphate as an apoptosis inducer. **J Oleo Science** 54:341-346,2005.
- 6) Nakatsu M, Doshi M, Saeki K, Yuo A: Synergistic effects of dehydroepiandrosterone and retinoic acid on granulocytic differentiation of human promyelocytic NB4 cells. **Int J Hematol** 81:32-38,2005.
- 7) Yano S, Ito Y, Fujimoto M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H: Characterization and localization of side population cells in mouse skin. **Stem Cells**. 23:834-841, 2005
- 8) Yano S, Okochi H: Long-term culture of adult murine epidermal keratinocytes **Br J Dermatol** 153:1101-4.,2005
- 9) Inoue Y, Yanagi Y, Tamaki Y, Uchida S, Kawase Y, Araie M, Okochi H: Clonogenic analysis of ciliary epithelial derived retinal progenitor cells in rabbits. **Exp Eye Res**. 81:437-445,2005
- 10) Kagami S, Saeki H, Idezuki T, Yano S, Kawabata Y, Okochi H, Asahina A, Nakagawa K, Tamaki K: Epithelioid Sarcoma Associated with

- Lung Adenocarcinoma. **J Dermatol** 32:904-908, 2005
- 11) Furue M, Okamoto T, Hayashi Y, Okochi H, Fujimoto M, Myoishi Y, Abe T, Ohnuma K, Sato GH, Asashima M, Sato JD: LIF as an Anti-apoptotic Mitogen for Pluripotent Mouse ES Cells in a Serum-Free Medium without Feeder Cells, **In Vitro Cell Dev Biol Anim.** 41:19-28, 2005
- 12) Michiue T, Asashima M. Temporal and spatial manipulation of gene expression in *Xenopus* embryos by injection of heat shock promoter-containing plasmids. **Developmental Dynamics**, 232, 369-376, 2005
- 13) Goto, T., L. Davidson, M. Asashima, R. Keller Planar cell polarity genes regulate polarized extracellular matrix deposition during frog gastrulation. **Current Biology**, 15(8), 787-793, 2005
- 14) Qinghua Tao, Yokota, C., Helbert Puck, Matt Kofron, Bilge Birsoy, Dong Yan, Asashima, M., C. C. Wylie, Xinhua Lin, and Janet Heasman Maternal Wnt11 activates the canonical Wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. **Cell**, 120, 857-871, 2005
- 15) Abe, T., Furue, M., Kondow, A., Matsuzaki, K., Asashima, M. Notch signaling modulates the nuclear localization of carboxyl-terminal-phosphorylated smad2 and controls the competence of ectodermal cells for activin A. **Mechanisms of Development**, 122, 671-680, 2005
- 16) Li, Dong-hui, Chan, T., Satow, R., Komazaki, S., Hashizume, K. and Asashima, M. The role of XTRAP- $\gamma$  in *Xenopus* pronephros development. **Int. J. Dev. Biol.**, 49(4), 401-408, 2005
- 17) Honda, M., Hamazaki, S. T., Komazaki, S., Kagechika, H., Shudo, K. and Asashima, M. RXR agonist enhances the differentiation of cardiomyocytes derived from embryonic stem cells in serum-free conditions. **B. B. R. C.**, 333, 1334-1340, 2005
- 18) Kobayashi, H., Michiue, T., Yukita, A., Danno, H., Sakurai, K., Fukui, A., Kikuchi, A. and Asashima, M. Novel Daple-like protein positively regulates both the Wnt/b-catenin pathway and the Wnt/JNK pathway in *Xenopus*. **Mechanisms of Development**, 122(10), 1138-1153, 2005
- 23) Yoshida, S., Furue, M., Nagamine, K., Abe, T., Fukui, Y., Myoishi, Y., Fujii, T., 19) Yoshida, S., Furue, M., Nagamine, K., Abe, T., Fukui, Y., Myoishi, Y., Fujii, T., Okamoto, T., Taketani, Y. and Asashima, M. Modulation of activin a-induced differentiation in vitro by vascular endothelial growth factor in *Xenopus* presumptive ectodermal cells. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal**, 41(3), 104-110, 2005
- 20) Kitamoto, J., Fukui, A. and Asashima, M. Temporal regulation of global gene expression and cellular morphology in *Xenopus* kidney cells in response to clinorotation. **Advances in Space Research**, 35(9), 1654-1661, 2005
- 21) Nagamine, K., Furue, M., Fukui, A. and Asashima, M. Induction of cells expressing vascular endothelium markers from undifferentiated *Xenopus* presumptive ectoderm