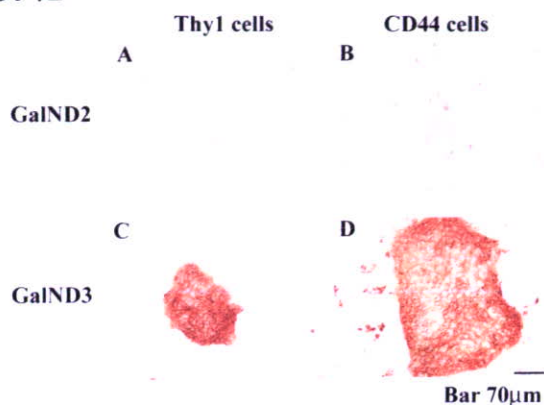


した Thy1 細胞は上皮細胞コロニーをほとんど形成しなかったが、3 日目から分離した Thy1 陽性細胞の中から数は少ないが CD44 陽性小型肝細胞コロニーが出現した (図46)。

図46 肝stem細胞から小型肝細胞への分化



分離した細胞を10日間培養した。

4 日目の細胞から出てきた小型肝細胞は、3 日目のものより明らかに大きなコロニーを形成したが、その大きさは 3 日目から分離した CD44 陽性細胞が作るものとはほぼ同じであった。2 日目から分離した CD44 陽性細胞はコロニーを作らず、4 日目から分離したものが、最も多くのまた大きなコロニーを形成した (Kon J 他、論文投稿中)。Thy1 陽性細胞が上皮様の形態をとりコロニーを形成して増殖するときは、すべての細胞に CD44 が発現していた。この結果は、Thy1 陽性細胞の一部に肝幹細胞としての能力を持つ細胞がいて、CD44 陽性小型肝細胞を介して肝細胞へ分化することを示している。

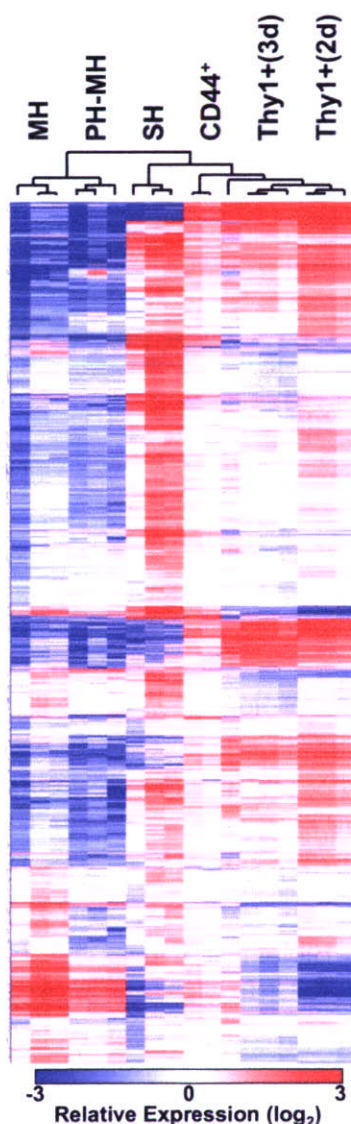
5. 小型肝細胞のマイクロアレイによる遺伝子発現解析

1) GeneChipによる遺伝子発現解析と階層クラスタリング

細胞から抽出した総 RNA を GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array を用いて解析を行った。解析は小型肝細胞、成熟肝細胞、2/3 部分肝切除後の成熟肝細胞、CD44 陽性細胞、Thy1 陽性細胞 (D-gal 投与後 2 日目と 3 日目) についてそれぞれ 3 例ずつ行い、

全体のデータを RMA 法にて標準化した。マイクロアレイ上には 31,099 probe が存在し、そのうち 22,006 probe はいずれかのサンプルにおいて発現が認められた。このうち 12,942 probe においては、いずれかのサンプル間での発現差が 2 倍以上であり、このデータを用いて階層クラスタリングを行った (図47)。今回解析を行ったサンプルは、成熟肝細胞のグループと CD44, Thy1 陽性細胞の 2 つのクラスターに大きく分かれ、小型肝細胞は CD44, Thy1 陽性細胞のクラスターに含まれた。

図47 階層クラスタリング解析



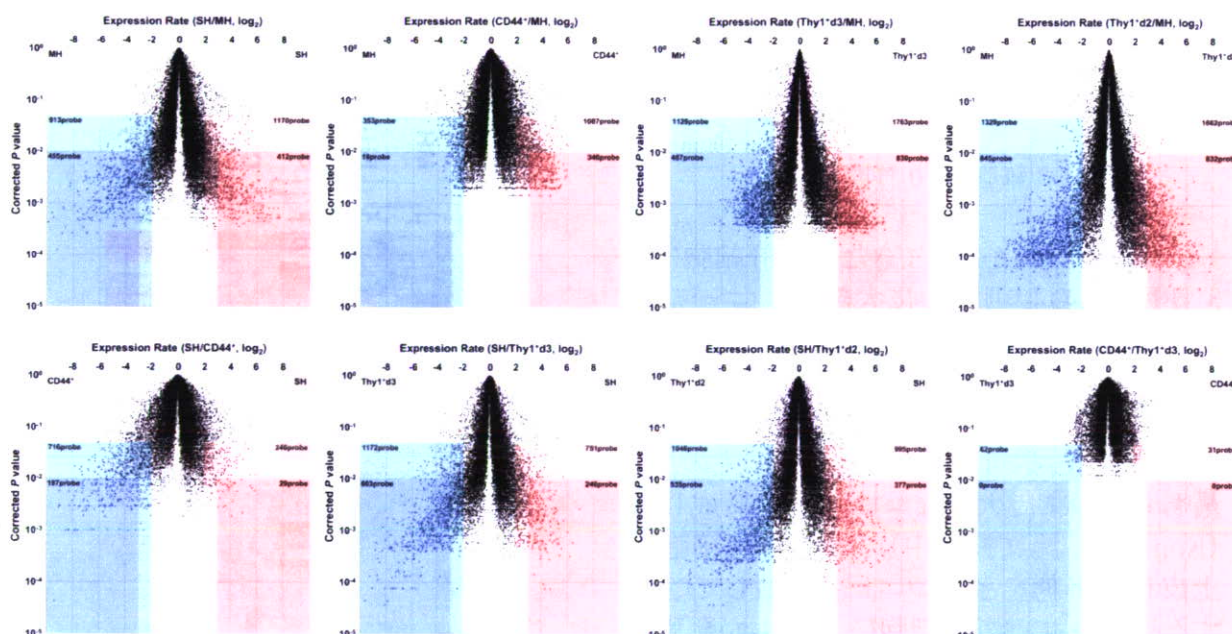
2) Volcano plot によるサンプル間遺伝子発現プロファイルの比較

発現が認められた probe について、発現比と p value を算出して Volcano plot を行い、各サンプル間における遺伝子発現の差を検討した(図48)。小型肝細胞、CD44 陽性細胞、及び Thy1 陽性細胞を成熟肝細胞と比較した結果、発現上昇を示した probe 数は発現低下した probe 数よりもいずれも多かった。

また成熟肝細胞と比較して発現に有意差

を示す probe 数は Thy1 陽性細胞(D-gal 投与後 2 日目)で多く、Thy1 陽性細胞(D-gal 投与後 3 日目)、小型肝細胞、CD44 陽性細胞の順で少なくなることがわかった。小型肝細胞と CD44 陽性細胞、Thy1 陽性細胞を比較した結果、小型肝細胞の発現プロファイルは CD44 陽性細胞と非常によく似ており、Thy1 陽性細胞とはかなり異なっていることが確認された。また CD44 陽性細胞と Thy1 陽性細胞は非常によく似た発現プロファイルを示すことも明らかになった。

図48 Volcano plot 解析

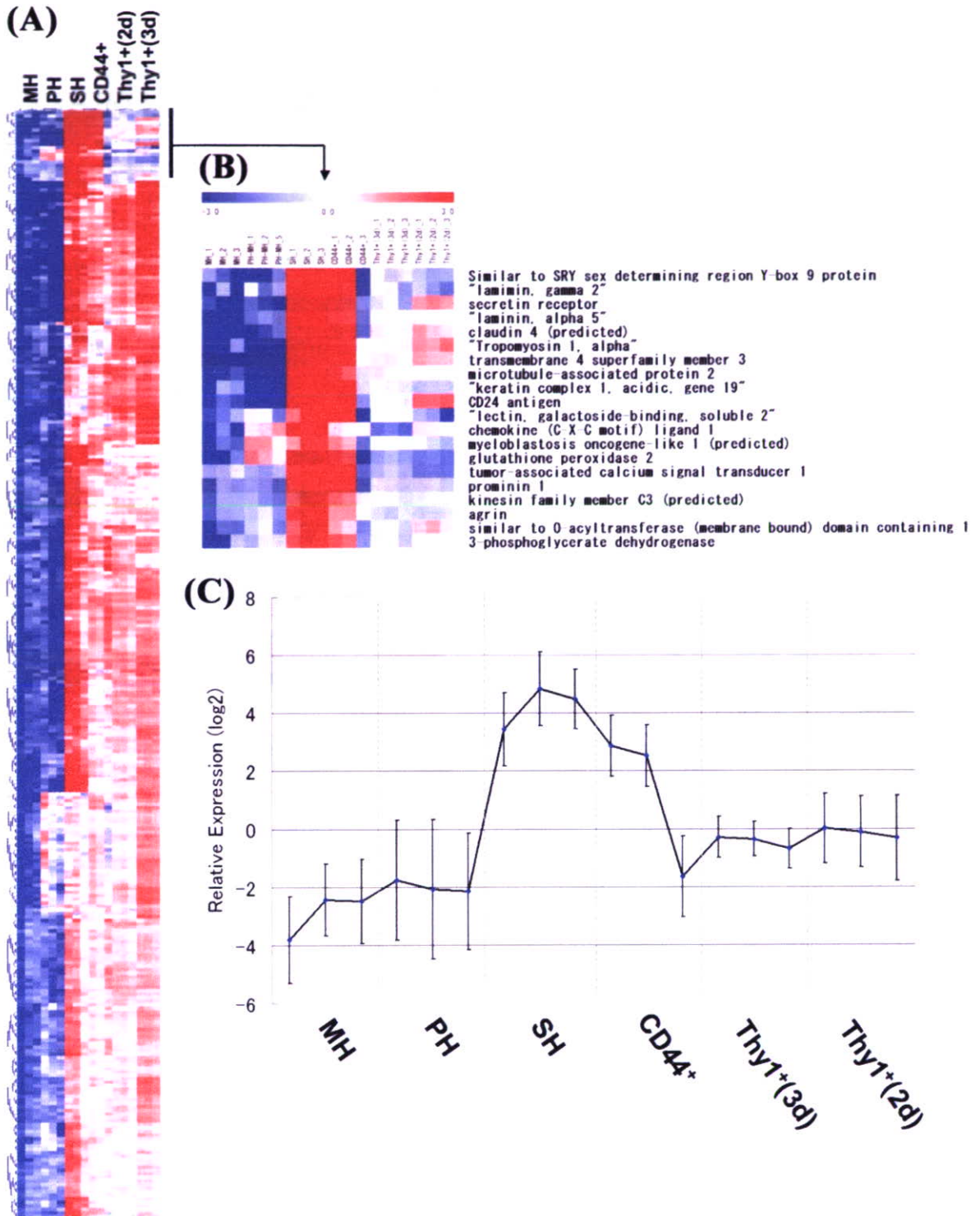


3. Gene Ontology に基づく発現変動遺伝子の機能解析

各サンプルにおいて、全サンプルの平均発現量と比較して 4 倍以上の発現を示した遺伝子を発現変動遺伝子とし、これらの遺伝子に多く含まれる遺伝子機能(GO term, Biological Process)をリストアップした(平成 18 年度総括研究報告書に記載)。成熟肝細胞において高い発現を示す遺

伝子には代謝に関与するものが多く含まれ、小型肝細胞では細胞成長や組織の発達に関与する遺伝子の多くが発現上昇していた。CD44, Thy1 陽性細胞では血球系で機能する遺伝子が発現上昇していたが、特に Thy1 陽性細胞では細胞運動に関与する遺伝子が強く発現していることが明らかになった。

図49 クラスタリング解析を用いた小型肝細胞/CD44 陽性細胞に特異的に発現している遺伝子の同定



4) 小型肝細胞、CD44 陽性細胞特異的遺伝子の抽出

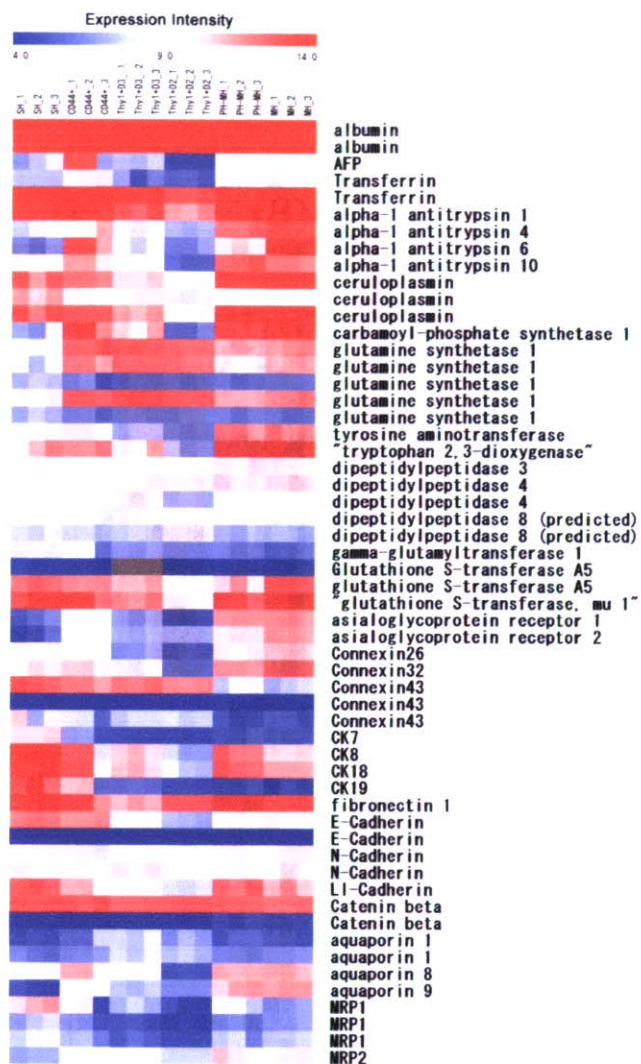
小型肝細胞、CD44 陽性細胞の両方において、平均発現量と比較して 4 倍以上の発現を示した probe を抽出し、クラスタリングを行い(図49A)、そこから Thy1 陽性細胞での発現が低い probe クラスタを抽出してリストアップした(図49B)。このクラスタは 20 遺伝子で構成されており、小型肝細胞特異的遺伝子として同定されている D6.1A や、laminin, EpCAM, claudin 等の細胞外マトリックスや細胞接着に関与する遺伝子が含まれていた。また、このクラスタの平均発現量は、成熟肝細胞と比較して約 32~64 倍、Thy1 陽性細胞と比較して約 8~16 倍であった(図49C)。

5) 特定の機能に関与する遺伝子発現データの抽出

GeneChip に配置されている遺伝子から、肝細胞機能に関与する遺伝子(56 probes)、チトクロム P450 (67 probes)、を選出し、各細胞における発現量の比較を行った。

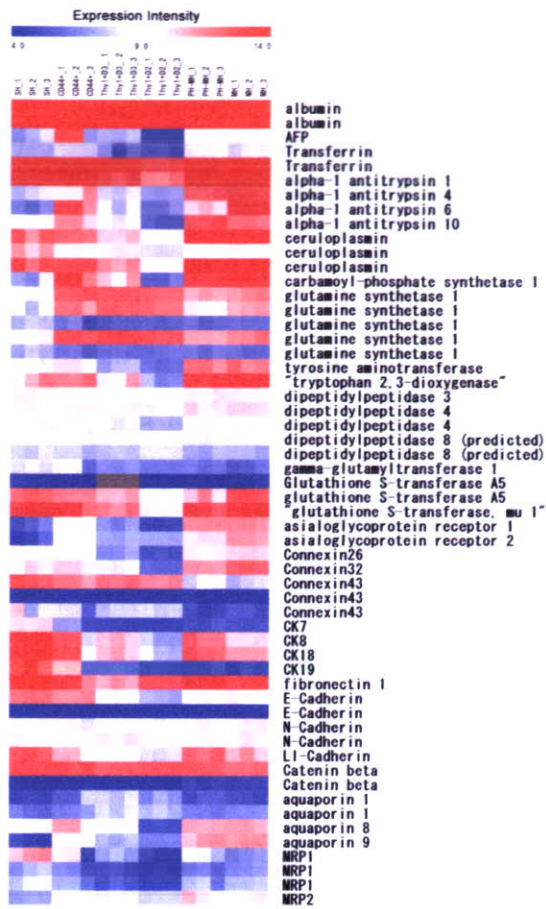
肝細胞分化機能に関与する遺伝子(図50)の多くは、小型肝細胞においても成熟肝細胞と同様の発現を示したが、いくつかの遺伝子に関しては発現が低下していた。また CD44 陽性細胞、Thy1 陽性細胞(D-gal 投与 3 日目)においても多くの肝細胞マーカーが発現していたが、Thy1 陽性細胞(D-gal 投与 2 日目)ではそれらのうちいくつかが発現していないことが明らかになった。

図50 肝細胞分化機能に関与する遺伝子の発現



チトクロム P450(図51)については、小型肝細胞においてはほとんど発現していないが、これは培養を行った結果と考えられる。CD44 陽性細胞、Thy1 陽性細胞(D-gal 投与 3 日目)では、成熟肝細胞と比較すると弱いですが、いくつかの CYP が発現していることがわかった。さらに、Thy1 陽性細胞(D-gal 投与 2 日目)では CYP はほとんど発現していないことも示された。

図51 肝細胞分化機能に関与する遺伝子の発現



D. 考察

(1) 毛細胆管へ分泌される代謝産物の同定方法の確立

ラット小型肝細胞を培養し、増殖させた後で基底膜成分の細胞外基質（商品名 Matrigel）を投与すると小型肝細胞の成熟化を急速に誘導することができる。成熟化した小型肝細胞コロニーには毛細胆管が良く発達する。胆汁酸やビリルビンの肝細胞内への取り込みや排泄には様々な有機アニオントランスポーターが関与している。それらのタンパク質は細胞膜に局限して発現し、胆汁酸塩やビリルビンを血中から取り込み、細胞内で代謝した後、代謝産物は毛細胆管面膜のトランスポーターを介して毛細胆管に排泄される。生体内の肝細胞は極性を持ち、それらの物質の移動・運搬が方向性を持って行われている。言い換えれば、取り込まれた物質の細胞内での代謝経路、胆汁中への排泄が特定の方向性を持つようになることと極性を持った成熟肝細胞であると云うことができる。成熟化した小型肝細胞も生体内と同様な極性を有しているか検討してきた。その結果、成熟化した小型肝細胞においても、生体内の肝細胞と同様に類洞膜面には、OATP, NTCP などの取り込みトランスポーターが発現し、毛細胆管膜面には MRP2, BSEP, MDR など排泄トランスポーターが局在するようになった。In Vitro の閉鎖系であるために発現してきたと考えられる MRP3 は、小型の形態をとっているときにはよく発現していたが、成熟化し組織化した細胞ではその発現がほぼ消失していた。これらの結果は、盛り上がり類肝組織を形作っている小型肝細胞は生体内の肝細胞と同様に成熟化していることを示唆している。RT-PCR の結果もその結果を反映しており、免疫染色できなかつた他のトランスポータータンパク質も生体内での発現様式と同様にこの類肝組織でも発現していると推測できる。一方、肝毛細胆管膜側存在する Mdr1b (multiple drug resistance 1b)、Bcrp (breast cancer resistance protein) は、mRNA レベルでは培養初期に成熟肝細胞

以上の発現を示すが、成熟化に伴い発現の低下傾向を認めた。これらのトランスポーターは、臓器を問わずに幹細胞と考えられている side-population (SP) 細胞に発現していることから、小型肝細胞も幹細胞の一種であることを示唆している所見かもしれない。

これらのトランスポーターの遺伝子・タンパク質発現を裏付けるようにビリルビンや蛍光物質で MRP2 を介して胆汁中に排出されることが知られている Fluorescein diacetate (FD) を培養液中に添加すると毛細胆管中に排泄され、嚢胞様構造内に蓄積されていくことを確認した。この結果も、先の結果と同様に成熟化した小型肝細胞は極性を持った胆汁排泄機能を有していることを示しており、培養皿内に小肝組織が形成されたことを証明するものである。その上で毛細胆管中に排出された代謝産物を同定するために、毛細胆管と嚢胞様構造から細胞を傷害することなく胆汁を回収する方法を検討した。キレート剤と低濃度のトリプシンの併用により、細胞を障害せずに毛細胆管中に蓄積した代謝産物を回収することに成功した。有機アニオントランスポーターを介して肝細胞中に取り込まれ、MRP2などを介して毛細胆管中に排泄されることが知られている放射線ラベルした Estron sulfate を培養液中に投与すると、Estron sulfate の取り込み量は類肝組織量に依存して増加した。つまり類肝組織の形成が十分ではないと取り込まれる Estron sulfate の総量は少なく、また取り込みにも時間がかかった。加えて正常では発現していない類洞側面の排泄トランスポーターの MRP3 が成熟化していない小型肝細胞によく発現しているため、毛細胆管内に排泄されるばかりではなく MRP3 を介して培養液中にも排泄される。そのため毛細胆管内から基質の回収を試みてもコントロールとの差がはっきりしなかつた。よく発達した類肝組織が多い培養では取り込みも早く、取り込み総量も多かった。そのことは培養経過と共に類肝組織が増加するに従い、Estron 取り込みが増えることから

わかる。

放射線ラベルした Estradiol 17 β -D-glucuronide のような特異性の高い基質を用いて毛細胆管中に分泌されたEstradiolの回収を試みると、類肝組織がよく発達するにつれ毛細胆管中に排泄され、嚢胞状形態をとる毛細胆管に蓄積するEstradiolが増えるため、Excretion buffer投与により毛細胆管内からEstradiolを回収することが可能になったと考えられる。

このような極性を持った肝細胞を培養皿上に作ろうという試みは世界中で行われている。初代培養ラット肝細胞をコラーゲンゲルにサンドイッチすることで極性を持った肝細胞を作ったと報告があるが、トランスポーター蛋白質の発現などの検討は十分に行われておらず、また毛細胆管内から排泄物を回収できると報告されているが、回収される量はきわめて少ない。またMDCK細胞株に遺伝子を導入することにより、トランスポーターを人為的に発現させ、細胞内移送の極性を作らせた細胞もあるが、特定のタンパク質を強制発現している実験系のため、生体内の代謝物のSorting機構を正しく反映しているかどうか疑問である。我々が開発した小型肝細胞の成熟化による類肝組織は、凍結保存した小型肝細胞からも作成することが可能であり、長期間(一ヶ月以上)その機能を維持できる。このようなAssay系は世界で類を見ない。薬剤が肝細胞内でどのように代謝されるか、この実験系を用いることで動物個体を使うことなく推測することができると考えられる。

(2) ホルモン異常状態における薬剤の代謝酵素遺伝子誘導発現の解析

小型肝細胞を用いて薬物代謝を検討する場合、成熟化誘導した小型肝細胞と成熟肝細胞の代謝酵素の発現の相違を十分に検討しておく必要がある。その検討過程において凍結保存をした小型肝細胞ではCYP2Bの活性が誘導されないことが判明し、その原因がCYP2B1遺伝子の発現を調節している核内受容体のCARの発現低下によることがわかった。

さらにこの現象は無血清で培養していると起こり、血清添加で回復すること、血清中に含まれる量の甲状腺ホルモンを培養液に加えることでCYP2B1遺伝子の発現が回復することがわかった。In Vitroの条件でのみ起こる人工的な現象ではなく、甲状腺ホルモンがCYP2B1の発現に生理的にも必須のホルモンであることを証明するための実験を行った。

甲状腺切除ラットに甲状腺ホルモン産生抑制作用のあるプロピルチオウラシル(6-propyl-2-thiouracil, PTU)を投与し低甲状腺ホルモン状態のラットを作成した。甲状腺切除ラットにPTUを投与すると2週間ほど全てのラットが衰弱死した。そのためPTU投与後1週間以内の比較的元気なラットで肝細胞のCAR及びCYP2B1の遺伝子・タンパク質の発現を検討すると、どちらの遺伝子もほとんど発現していなかった。血中の甲状腺ホルモン量は、検出限界以下になっていた。正常濃度の1/10程度の量でもCYP2B1、CAR遺伝子の発現を認めることから、生体内では極端にホルモン濃度が減少しない限りCYP2B1の発現には影響を与えないのかもしれない。これらの結果は論文にまとめ投稿中である。また、この結果はCYP2B1により代謝される薬剤等を甲状腺機能低下症の患者に使用すると血中濃度の上昇とその遷延などを引き起こす可能性があることを示している。

薬剤投与によるラット小型肝細胞の遺伝子発現をGeneChip(Affymetrix社)により解析するために、正常成熟肝細胞と小型肝細胞の遺伝子発現の差異を詳細に検討してきた。小型肝細胞は生体内の正常ラット肝臓では同定できず、培養することによって初めて小型肝細胞としての表現型を呈し同定可能になる。そのため生体内と培養という条件の違いによる遺伝子変化、また静止期の細胞と増殖期の細胞という条件の違いも考慮する必要があった。小型肝細胞は成熟肝細胞と比較して未熟な細胞であり、さらに無血清という限られた条件下で培養されるため、成熟肝細胞で発現するすべての薬剤代謝遺伝子を発現しているとは限らない。そのため、成熟

肝細胞と小型肝細胞、さらには Matrigel による成熟化を行った小型肝細胞について、その遺伝子発現の解析を行った。成熟肝細胞と小型肝細胞で発現が異なる遺伝子が多数同定され、成熟化小型肝細胞はその中間の遺伝子発現プロファイルを示した。各細胞間での発現差を元に詳細に probe 数をカウントした結果、成熟肝細胞と小型肝細胞で発現差を示した遺伝子のほぼ全てにおいて成熟化小型肝細胞ではその中間の発現を示した。成熟化により発現上昇する probe では、CYP を含む代謝に関与する遺伝子が大部分を占めた。また、成熟化により発現低下する遺伝子には、小型肝細胞特異的遺伝子として見つかっている Claudin 4 や Annexin, Cytokeratin 7,19 などが含まれており、加えて増殖に関係する遺伝子も多く含まれている。このことは、網羅的遺伝子解析の結果も成熟化誘導した小型肝細胞は、成熟肝細胞に近い遺伝子発現パターンを持つようになり、小型肝細胞の持つ未熟性や増殖能が減少・消失するようになることを示している。

また我々は、高エストロゲン状態(妊娠類似状態)を In Vitro で再現できるか検討している。成熟化誘導を行った小型肝細胞にエストロゲンを投与後、RNA を回収し GeneChip による網羅的遺伝子発現解析を現在行っているところである。

(3) ヒト小型肝細胞を効率よく分離培養する方法の確立

ヒト小型肝細胞は、(A)外科手術により摘出された正常部分肝組織からの分離、(B)中国上海市にある Research Institute for Liver Diseases (Shanghai), LTD (RILD 社)より提供されたヒト小型肝細胞分画、の2つの方法により得られた細胞を用いて検討してきた。

(A) 札幌医科大学病院にて、大腸癌の肝転移や胆管癌などによって肝臓の部分切除を行う必要があった患者のうち、ウイルス性肝炎などの背景疾患の無い患者に限定し、十分なインフォームドコンセントを実施した上で施行された肝切除術の摘出組織中の正常と思われる肝組織の一部から細胞を分離した

(札幌医科大学倫理委員会にて承認済み)。

ヒト小型肝細胞は、ヒアルロン酸をコートした培養皿と無血清培養液を併用すると選択的に増殖し、大きなコロニーを作ることがわかった。肝細胞培養において良く用いられるコラーゲンをコートした培養皿を使用するとこのような小型肝細胞の選択的な増加を認めないことから、ヒアルロン酸に対する特異的な受容体がヒト小型肝細胞に発現していることが考えられる。小型肝細胞に特異的に発現する CD44 はその受容体ではあるが播種時には発現していない。小型肝細胞以外の細胞の多くはヒアルロン酸コート培養皿に接着しなかった事実を考え合わせると、CD44 以外の受容体の発現か、他の接着因子により接着すると推測できる。小型肝細胞コロニーの頻度は、播種した細胞総数の約 0.04% であるがそのうちの 20%程が上皮細胞であるので、上皮細胞画分の 0.2%程度が小型肝細胞であると推測される。平均すると培養後 3 週間で約 100 倍に増えること、培養経過に伴いアルブミン分泌が上がることもわかった。RT-PCR 法を用いて肝細胞の分化機能に関係する遺伝子の発現を調べると、アルブミンやトランスフェリン、フィブリノーゲンなどの分泌タンパク質をはじめ、肝細胞のマーカーと考えられる CK8 や 18 も発現していた。本研究に最も重要でその発現が望まれる薬物代謝酵素のチトクロム P450 の各分子種及び、それらの肝分化機能発現に関係が深い転写因子の HNF3 α , HNF4 α , C/EBP α , C/EBP β の発現も見られた。またラットと同様に小型肝細胞に特異的と考えられる CD44 や BRI3, D6.1A を発現していた。これまで 16 例以上のヒト症例から分離培養を行ってきたが、その患者年齢はほとんどが 50 歳以上であり、中には 80 歳以上の症例もあったが、全例において小型肝細胞コロニー形成は認められた。しかしながらコロニーの出現頻度は症例により大きく異なった。ヒト小型肝細胞コロニーの出現頻度には、背景疾患や治療による肝臓の状態と手術時に肝血流を遮断してから組織を確保するまでの温阻血時間が大きな影響を与えることがわかってきた。

これらの研究成果は、論文にまとめ投稿中である。

(B) RILD 社より心臓死後に分離された小型肝細胞画分の細胞を入手し、ヒト小型肝細胞コロニーが出現するかどうか検討してきた。これまでに試みた方法は、凍結保存した成熟肝細胞と小型肝細胞画分の細胞、低温で空輸した細胞懸濁液、コラーゲンコートまたはヒアルロン酸コートしたプレートに播種しすぐに輸送した細胞及び中国において2日間培養後に空輸した細胞などについてコロニーの出現頻度を検討した。上海で分離してから札幌にある当教室まで輸送するのに少なくとも48時間かかった。これまでの検討結果から、中国において一旦培養した細胞は輸送を経ても生存していたが、ヒアルロン酸コートしたプレートに播種し培養した場合にのみ小型肝細胞コロニーが出現した。凍結保存した細胞を播種しても小型肝細胞コロニーの出現は認めず、一般的な方法で凍結保存しても小型肝細胞を回収できないことがわかった。

近年中国 RILD 社においてもヒト肝臓を全肝状態で入手することが困難になってきている。そのため我々が札幌医科大学で行っている外科手術材料の肝組織断片からヒト小型肝細胞を分離培養する手技を用いて現在上海においてもヒト小型肝細胞の分離を行っている。

今後は、RILD 社及び Fudan 大学との共同研究を積極的に進め、ヒト小型肝細胞の効率的な分離培養方法と大量培養方法を確立することにより、ヒト小型肝細胞の安定供給に道をつけたいと考えている。

(4) 小型肝細胞の増殖機序と肝stem細胞から小型肝細胞を誘導する方法の確立

(A) 小型肝細胞の増殖機序

小型肝細胞は、特異的遺伝子として CD44 を発現していることを我々は見出した (Kon J, et al. J. Hepatology, 2006)。CD44 のリガンドの一つにヒアルロン酸があり、ヒアルロン酸コートした培養皿には小型肝細胞が接着し、無血清培養液中で選択的に増殖することを見出し報告した (Chen Q, et al. Nature

Protocols, 2007)。この方法は、ヒト小型肝細胞の分離培養にも応用可能であることは、18年度総括報告書にも記載した。

増殖するラット小型肝細胞の遺伝子発現を GeneChip により解析することにより、小型肝細胞の増殖には Follistatin が重要な働きをしていることがわかった。成熟肝細胞は、自ら分泌する Activin A により増殖を抑制しているが、Follistatin は分泌された Activin A と結合することにより Activin A の活性を抑制することがわかっている。小型肝細胞は Follistatin の発現が高く、Activin A の発現が抑えられているために強い増殖活性を示すことがわかった (論文準備中)。

この研究成果は、ヒト小型肝細胞の増殖を促進させる培養方法の改善に寄与すると考えられる。

(B) 肝stem細胞から小型肝細胞を誘導する方法の確立

成体肝臓には、肝stem細胞として小型肝細胞の他に Oval 細胞が知られている。Oval 細胞は肝化学発癌過程において一時的に出現する細胞でヒトにおいても重篤な障害肝に出現することが知られている。Oval 細胞が肝細胞又は胆管上皮細胞に分化可能なことはわかっていたが、この細胞がどのような過程を経て肝細胞・胆管上皮細胞に分化するかは良くわかっていなかった。我々は、ラットの障害肝臓から Oval 細胞を分離・培養し肝細胞・胆管上皮細胞に分化させることに成功した。ガラクトサミン投与により誘導された Oval 細胞が肝細胞に分化するときには、一旦 CD44 陽性の小型肝細胞に分化した後、成熟肝細胞に分化することがわかった。

ヒト小型肝細胞を創薬のために用いるためには細胞数の確保が重要である。この研究成果は、病的肝臓から分離したより未熟なstem細胞からも小型肝細胞を誘導することが可能であることを示唆している。

薬剤投与によるラット小型肝細胞の遺伝子発現を GeneChip (Affymetrix 社) により解析するために、正常成熟肝細胞と小型肝細胞の遺伝子発現の差異を詳細に検討してきた。小型肝細胞は生体内の正常ラット肝臓では

同定できず、培養することによって初めて小型肝細胞としての表現型を呈し、同定できる。そのため生体内と培養という条件の違いによる遺伝子変化、また静止期の細胞と増殖期の細胞という条件の違いも考慮する必要があった。これまでに成熟肝細胞、2/3 部分肝切除術後の再生期の肝細胞、加えて、重度の肝障害を受けた肝臓では小型肝細胞特異的遺伝子である CD44 を発現している肝細胞が出現することから生体内における小型肝細胞としての CD44 陽性肝細胞、などの遺伝子発現を GeneChip により解析してきた。CD44 陽性細胞と培養小型肝細胞の遺伝子発現パターンは良く似ており、また再生肝細胞と成熟肝細胞では、増殖関連遺伝子以外の遺伝子発現パターンは似ていた。しかしながら、〈小型肝細胞／CD44 陽性細胞〉と〈成熟肝細胞／再生肝細胞〉でその遺伝子パターンを比較すると、その違いは大きく、小型肝細胞は成熟肝細胞とは明らかに別の細胞群であることが証明された。しかしながら、Matrigel などの細胞外基質で処理することにより、小型肝細胞は、成熟化し、生体内の成熟肝細胞に近い遺伝子の発現をするようになること、また小型肝細胞に特異的に発現していた遺伝子の発現が減少・消失することから、In Vitro で長期間成熟肝細胞を培養するシステムを確立できたと考えている。

E. 結論

ヒト小型肝細胞は比較的新鮮な正常ヒト肝組織が入手可能ならば、通常の肝細胞分離操作を行い、低速遠心により沈殿した成熟肝細胞を除いた上清画分の細胞をヒアルロン酸コート培養皿に播種することにより、選択的に増殖させることができる。接着した細胞の約 2% は小型肝細胞コロニーを形成し、3 週間で約 100 倍に増えることを考えると、得られた肝組織がある程度の大きさであれば相当数の小型肝細胞を回収できる。また、小型肝細胞は、Follistatin 投与により成熟化が抑えられ、増殖が促進することもわかっている。培養条件の改善によりさらに多くの小型肝細胞を確保することが期待できる。さらに肝ステ

ム細胞から小型肝細胞を誘導する方法の確立は、病的肝臓から分離したステム細胞からもヒト小型肝細胞を誘導することが可能であることを示唆しており、小型肝細胞の新たなソースとなりうると考えられる。中国 RILD 社との共同研究から、心臓死した患者肝臓から分離した細胞からも小型肝細胞を分離することが可能であることがわかった。現在、ドナー肝として使用できなかった肝臓は研究用として肝細胞などが分離され、世界中で分配又は市販されている。小型肝細胞は、成熟肝細胞を分離する際に破棄されていた画分にも存在することがわかっている。廃棄物から有用成分を回収することは経済効率を考えたとしても、また得られる小型肝細胞の絶対数を考えてもすぐにでも検討すべきことと考えている。

現在検討中ではあるが、ラット小型肝細胞では長期間の凍結保存が可能なのでヒト小型肝細胞も凍結保存できれば、試験研究用や細胞バンクに供給できると考えられる。

小型肝細胞は成熟化するとほぼ生体内の肝細胞と同様の代謝機能を発揮することができ、また形成された毛細胆管内に胆汁を分泌することができる。さらに形成させた毛細胆管から胆汁を回収することも可能になった。薬剤の多くが肝細胞内で代謝され、胆汁中にその代謝産物が排泄される。この In Vitro 解析システムを使えば、代謝経路などが不明な化学物質などを投与し、排泄された胆汁を回収し代謝産物の分析をすることで代謝経路を推測できるようになる。

つまり創薬研究に必須の ADME が動物個体を用いることなく、In Vitro で解析できるシステムが構築できたことを意味している。このことはまた、世界中に高まっている動物保護運動により使用が難しくなっている実験動物の数を激減させることに繋がると考えている。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

著書・総説

1. 吉川大和、三高俊広. 肝再生とラミニン $\alpha 1$ 鎖. *Surgery Frontier*, 13(2), 93-95 (2006)
2. 今 純子、三高俊広. 「小型肝細胞を用いた肝細胞移植」遺伝子医学 MOOK 別冊「進みつつける細胞移植治療の実際」印刷中、2008.
3. 三高俊広、今純子、大柴秀和、市戸義久. 肝再生過程における小型肝細胞の役割. *移植*, 43(1)、印刷中 (2008)

原著論文

* 太字: 本研究に深く関係する論文

1. Kikkawa Y, Mochizuki Y, Miner JH, Mitaka T. Transient expression of laminin a1 chain in regenerating murine liver: Restricted localization of laminin chains and nidogen-1. *Exp. Cell Res.*, 305(1), 99-109 (2005)
2. Sugimoto S, Harada K, Shiotani T, Ikeda S, Katsura N, Ikai I, Mizuguchi T, Hirata K, Yamaoka Y, Mitaka T. **Hepatic organoid formation in collagen sponge of cells isolated from human liver.** *Tissue Engineering*, 11(3-4), 626-633 (2005)
3. Miyamoto S, Hirata K, Sugimoto S, Harada K, Takeda H, Mitaka T. **Expression of cytochrome P450 enzymes in hepatic organoid reconstructed by rat small hepatocytes.** *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 20(6), 865-872 (2005)
4. Sudo R, Kohara H, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Coordination of Bile Canalicular Contraction in Hepatic Organoid Reconstructed by Rat Small Hepatocytes and Nonparenchymal Cells. *Annals of Biomedical Engineering (Ann Biomed Engineer)*, 33(5), 696-708 (2005)
5. Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. **Reconstruction of 3D stacked-up structures by rat small hepatocytes on**

microporous membranes. *FASEB J*, 19(12), 1695-1697 (2005).

6. Mizuguchi T, Oshima H, Imaizumi H, Kohara H, Kawamoto M, Nobuoka T, Kawasaki H, Harada K, Masuda Y, Kikkawa Y, Mitaka T, Asai Y, Hirata K. Hyperbaric oxygen stimulates cell proliferation and normalized MRP2 (anion transporter) protein localization in primary rat hepatocytes. *Wound Repair Regen*, 13(6), 551-557 (2005)
7. Mizuguchi T, Mitaka T, Katsuramaki T, Hirata K. **Hepatocyte transplantation for total liver repopulation.** *J Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, 12(5), 378-385 (2005)
8. Shibata C, Mizuguchi T, Kikkawa Y, Nobuoka T, Oshima H, Kawasaki H, Kawamoto M, Katsuramaki T, Mitaka T, Hirata K. **Liver repopulation and long-term function of rat small hepatocyte transplantation as an alternative cell source for hepatocyte transplantation.** *Liver Transplantation*, 12(1), 78-87 (2006)
9. Nagaya M, Kubota S, Suzuki N, Akashi K, Mitaka T. Thermoreversible gelation polymer induces the emergence of hepatic stem cells in a partially injured rat liver. *Hepatology*, 43(5), 1053-1062 (2006).
10. Kon J, Ooe H, Oshima H, Kikkawa Y, Mitaka T. **Expression of CD44 in rat hepatic progenitor cells.** *J. Hepatology*, 40(1), 90-98 (2006)
11. Manase K, Endo T, Chida M, Nagasawa K, Honnma H, Yamazaki K, Kitajima Y, Goto T, Kanaya M, Hayash T, Mitaka T, Saito T. Coordinate elevation of membrane type 1-matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 expression in rat uterus during postpartum involution. *Reprod Biol Endocrinol*, 4(1), 32-38 (2006)
12. Ooe H, Kon J, Miyamoto S, Oozono Y, Ninomiya S, Mitaka T. **Cytochrome P450 expressions of cultured rat small hepatocytes after long-term**

cryopreservation. Drug Metabolism and Disposition, 34(10), 1667-1671 (2006)

13. Nobuoka T, Mizuguchi T, Oshima H, Shibata T, Kimura Y, Mitaka T, Katsuramaki T, Hirata K. Portal blood flow regulates volume recovery of the rat liver after partial hepatectomy: Molecular evaluation. *Eur Surg Res*, 38(6), 522-532 (2006)
 14. **Chen Q, Kon J, Ooe H, Sasaki K, Mitaka T. Selective Proliferation of Rat Hepatocyte Progenitor Cells in Serum-free Culture. *Nature Protocols*, 2(5), 1197-1205 (2007)**
 15. Kikkawa Y, Sasaki T, Nguyen MT, Nomizu M, Mitaka T, Miner JH. The LG1-3 tandem of laminin a5 harbors the binding sites of Lutheran/B-CAM and a3b1/a6b1 integrins. *J Biol Chem*, 282(20), 14853-60 (2007)
 16. **Oshima H, Kon J, Ooe H, Hirata K, Mitaka T. Functional Expression of Organic Anion Transporters in Hepatic Organoids Reconstructed by Rat Small Hepatocytes. *J Cell Biochem*, in press (2008)**
 17. Hashimoto W, Sudo R, Fukasawa K, Ikeda M, Mitaka T, Tanishita K. Ductular network formation by rat biliary epithelial cells in the dynamical culture with collagen gel and dimethylsulfoxide stimulation. *Am J Pathol*, revision, (2008)
2. 学会発表
- 国内学会
1. 橋本渉、小原洋志、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫「ラット胆管上皮細胞による管構造の再形成」第44回日本生体医工学会大会、茨城、2005年4月25-27日、日本生体医工学会誌、43巻、suppl, p265.
 2. Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita. Reconstruction of 3D liver-like structures by stacking cell-layers cultured on microporous membranes. 6th Asian-Pacific Conference on Medical and Biological Engineering (APCMBE2005). April 24-27, 2005, Tsukuba, Japan
 3. 長屋昌樹、窪田倭、鈴木登、明石勝也、三高俊広. 「温度感受性ハイドロゲル(TGP)を充填した肝小欠損創における新しい再生のメカニズムと肝前駆細胞. 第105回日本外科学会定期学術集会、2005年5月11-13日、名古屋
 4. 川崎浩之、水口徹、大島秀紀、平田公一、三高俊広. 「アデノウイルスベクターを用いた PDX-1 遺伝子の肝細胞への導入とβ細胞化」第41回日本肝臓学会総会、大阪、2005年6月16日、肝臓、第46巻、Supplement(1)、A126. (口演)
 5. 大島秀紀、大柴秀和、今純子、川崎浩之、長屋昌樹、平田公一、三高俊広. 「小型肝細胞・類肝組織における有機アニオントランスポーター発現の検討」第41回日本肝臓学会総会、大阪、2005年6月17日、肝臓、第46巻、Supplement(1)、A180. (口演)
 6. 長屋昌樹、窪田倭、三高俊広. 「In Vitro での肝前駆様細胞誘導(HPC)とその分離及び解析」第41回日本肝臓学会総会、大阪、2005年6月17日、肝臓、第46巻、Supplement(1)、A285. (ポスター)
 7. 大柴秀和、今純子、三高俊広. 「ラット小型肝細胞における薬物代謝酵素の発現解析」第41回日本肝臓学会総会、大阪、2005年6月16日、肝臓、第46巻、Supplement(1)、A296 (ポスター)
 8. 橋本渉、小原洋志、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. 「ラット胆管上皮細胞のゲルサンドイッチ培養による管構造の形成」第12回肝細胞研究会、東京、2005年7月8日、(口演)プログラム抄録集、p45
 9. 今純子、大島秀紀、佐々木寿誉、吉川大和、三高俊広. 「ヒアルロン酸による小型肝細胞の増殖機構の解析」第12回肝細胞研究会、東京、2005年7月9日、(口演)
 10. 大島秀紀、大柴秀和、今純子、高松みのり、佐々木寿誉、三高俊広. 「小型肝

- 細胞・類肝組織を用いた *in vitro* における胆汁うっ滞病変の解析」第12回肝細胞研究会、東京、2005年7月8-9日、(ポスター)
11. 大柴秀和、今純子、三高俊広. 「凍結ラット小型肝細胞における薬物代謝酵素及びその核内受容体の発現解析」第12回肝細胞研究会、東京、2005年7月8-9日、(ポスター)
 12. 吉川大和、三高俊広. 「肝再生過程におけるラミニンの発現とその役割」第12回肝細胞研究会、東京、2005年7月8-9日、(ポスター賞)
 13. 橋本渉、小原洋志、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. 「ラット胆管上皮細胞による管構造の形成」第26回日本炎症・再生医学会、東京、2005年7月12-13日、日本炎症・再生医学会雑誌、25巻、No.4, p.375
 14. 大柴秀和、今純子、大島秀紀、三高俊広. 「凍結ラット小型肝細胞における薬物代謝酵素及び核内受容体の発現解析」第86回北海道癌談話会、札幌(北大)、2005年9月3日(口演)
 15. 今純子、佐々木寿誉、大島秀紀、三高俊広. 「CD44陽性小型肝細胞の肝障害モデルラットへの移植」第38回北海道病理談話会、札幌(北大医学部)、2005年9月10日、(口演)
 16. Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Reconstruction of 3D Liver-like Structures by Stacking up Layers of Rat Small Hepatocytes. The Second Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, Sep 15, 2005, Kyoto, Japan.
 17. 西陰亜紀、平田公一、三高俊広. 「ラット小型肝細胞を用いた3次元培養による肝組織形成:各種 scaffold との共培養」第43回日本人工臓器学会、東京、2005年12月1日、日本人工臓器学会、34(2)、PS133(2005) (ポスター)
 18. 須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. 「ラット初代培養肝細胞の3次元積層培養における細胞間接着の解析」第18回バイオエンジニアリング講演会、新潟、2006年1月13, 14日
 19. 高橋憲生、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. 「小型肝細胞コロニーの形態形成に対する多孔性膜の影響」第18回バイオエンジニアリング、新潟、2006年1月13, 14日、日本機会学会 (No.05-66) 第18回バイオエンジニアリング講演会講演論文集、pp133-134.
 20. 橋本渉、深沢一知、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. 「ラット胆管上皮細胞による管構造ネットワークの再形成」第18回バイオエンジニアリング講演会、新潟、2006年1月13, 14日、講演論文集 No. 05-66, p.137-138.
 21. 今純子、佐々木寿誉、大島秀紀、三高俊広. 「CD44陽性小型肝細胞の増殖及び分化の解析」第5回日本再生医療学会総会、岡山、2006年3月8日、日本再生医療学会雑誌、5巻 (Suppl)、p153, 2006年
 22. 長屋昌樹、窪田倭、鈴木登、磯貝晶子、渡辺泰治、明石勝也、三高俊広. 「ラット肝前駆様細胞の分離・培養と肝細胞への分化の検討」第5回日本再生医療学会総会、岡山、2006年3月8日、日本再生医療学会雑誌、5巻 (Suppl)、p189, 2006年
 23. 市戸義久、稲継泰之、中野貴由、藤谷渉、馬越佑吉、田畑泰彦、三高俊広. 「一軸配向性アパタイトセラミックスの *in vitro* 評価」第5回日本再生医療学会総会、岡山、2006年3月8日、日本再生医療学会雑誌、5巻 (Suppl)、p215, 2006年
 24. 深沢一知、橋本渉、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. 「初代培養ラット胆管上皮細胞の管腔ネットワーク形成」第45回日本生体医工学会大会、2006年、日本生体医工学会誌、44巻、suppl, .
 25. 今純子、大島秀紀、佐々木寿誉、三高俊広. 「ラット小型肝細胞を中心とした肝前駆細胞の分化・増殖の解析」第42回日本肝臓学会総会、京都、2006年5月

- 25日、肝臓、47巻 (Supplement 1)、A115、2006年
26. 大島秀紀、大栄秀和、今純子、佐々木寿誉、平田公一、三高俊広.「小型肝細胞・類肝組織による有機アニオン輸送モデルの検討」第42回日本肝臓学会総会、京都、2006年5月25日、肝臓、47巻 (Supplement 1)、A209、2006年
 27. 市戸義久、塩田博之、関康夫、久保木芳徳、田畑泰彦、三高俊広.「マイクロチタン繊維 Scaffold による bFGF 徐放と骨再生」「ナノキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会、2006年6月22、23日、札幌
 28. 今純子、大島秀紀、佐々木寿誉、三高俊広.「肝前駆細胞の増殖及び分化機構の解析」第13回肝細胞研究会、旭川、2006年6月30日、(ポスター賞)
 29. 佐々木寿誉、今純子、陳其潔、大栄秀和、大島秀紀、柴田稔人、水口徹、信岡隆幸、木村康利、桂巻正、平田公一、三高俊広.「成人ヒト肝組織から分離した小型肝細胞の分離と無血清培養」第13回肝細胞研究会、旭川、2006年6月30日、(口演)
 30. 大栄秀和、陳其潔、今純子、三高俊広.「ラット小型肝細胞の無血清培養と遺伝子発現解析」第13回肝細胞研究会、旭川、2006年6月30日、(ポスター)
 31. 大島秀紀、大栄秀和、今純子、佐々木寿誉、平田公一、三高俊広.「Eisai Hyperbilirubinemic Rat (EHBR) 由来小型肝細胞における有機アニオントランスポーターの発現と機能」第13回肝細胞研究会、旭川、2006年6月30日、(口演)
 32. 吉川大和、高橋直哉、今純子、水口徹、平田公一、三高俊広.「ヒト肝細胞癌におけるラミニン α 鎖の発現」第13回肝細胞研究会、旭川、2006年6月30日、(口演)
 33. 市戸義久、塩田博之、関康夫、久保木芳徳、田畑泰彦、三高俊広.「徐放化 bFGF の組み合わせによるチタン不織布の骨再生誘導の増強」第9回日本組織工学会、京都、2006年9月7、8日、(ポスター)
 34. 深澤一知、橋本渉、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫.「初代培養ラット胆管上皮細胞による Large Bile Duct 形成と機能解析」第9回日本組織工学会、京都、2006年9月7、8日(口演)
 35. 須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫.「ラット初代培養肝細胞の三次元積層培養による形態形成と機能維持」第9回日本組織工学会、京都、2006年9月7、8日(口演)
 36. 今純子、佐々木寿誉、大島秀紀、三高俊広.「ラット小型肝細胞の増殖及び分化機構の解析」第39回北海道病理談話会、札幌(ムトウビル)、2006年9月10日(口演)
 37. 大栄秀和、陳其潔、今純子、佐々木寿誉、三高俊広.「ラット小型肝細胞の網羅的遺伝子発現解析」第89回北海道癌談話会、札幌(札幌医大)、2006年9月17日(口演)
 38. 佐々木寿誉、今純子、陳其潔、大栄秀和、大島秀紀、水口徹、柴田稔人、信岡隆幸、木村康利、桂巻正、平田公一、三高俊広.「成人ヒト肝組織に存在する肝前駆細胞の分離と無血清培養法の確立」第89回北海道癌談話会、札幌(札幌医大)、2006年9月17日(口演)
 39. 吉川大和、今純子、平田公一、三高俊広.「ヒト肝細胞癌におけるラミニン α 鎖の発現とその役割」第65回日本癌学会学術総会、横浜、2006年9月28日(口演)
 40. 大栄秀和、今純子、大曾根義泰、二宮真一、三高俊広.「凍結ラット小型肝細胞における Cytochrome P450 及びその核内受容体の発現解析」第21回日本薬物動態学会年会、東京江戸川区総合区民ホール、2006年11月29日(口演)
 41. 深澤一知、橋本渉、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫.「初代培養ラッ

- ト胆管上皮細胞の管腔形成に伴う分化の進展」第46回日本生体医工学会大会、2007年
42. 三高俊広、佐々木寿誉、今純子、陳其潔、大栄秀和、柴田稔人、水口徹、平田公一。「ヒト肝前駆細胞の分離と無血清培養の確立」第6回日本再生医療学会総会雑誌、6巻 Suppl p192、2007年3月13・14日、横浜(口演・ポスター)
 43. 今純子、大栄秀和、陳其潔、佐々木寿誉、三高俊広。「肝障害モデルラットにおける完全くさい棒の分化機序の解析」第6回日本再生医療学会総会雑誌、6巻 Suppl p261、2007年3月14日、横浜(ポスター)
 44. 陳其潔、今純子、大栄秀和、佐々木寿誉、三高俊広。「小型肝細胞における follistatin と activinA の役割」第6回日本再生医療学会総会雑誌、6巻 Suppl p264、2007年3月14日、横浜(ポスター)
 45. Sasaki K, Kon J, Chen Q, Ooe H, Oshima H, Shibata T, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Proliferation of hepatic progenitor cells isolated from resected adult human liver specimens 2007 Asia Pacific Association for the Study of Liver (APASL) March 27-30, 2007, Kyoto.
 46. 今純子、佐々木寿誉、三高俊広。「ラット肝障害モデルにおける肝前駆細胞の分化・増殖の解析」第43回日本肝臓学会総会、肝臓48巻 Supplement(1)、A130、2007年5月30日、東京(口演)
 47. 三高俊広。肝前駆細胞の選択的培養方法の確立とヒト細胞への応用。第14回肝細胞研究会、2007年6月22-23日、鹿児島(口演)
 48. 大栄秀和、今純子、三高俊広。ラット小型肝細胞の CAR 及び CYP2B1 発現における甲状腺ホルモンの必要性。第14回肝細胞研究会、2007年6月22-23日、鹿児島(ポスター)
 49. 粕谷淳一、浅見裕之、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫。類洞内皮細胞と小型肝細胞を用いた共培養モデルの評価。第14回肝細胞研究会、2007年6月22-23日、鹿児島(口演)
 50. 深澤一知、橋本渉、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫。コラーゲンゲルサンドイッチ法を用いた初代培養ラット胆管上皮細胞の胆管様構造形成。第14回肝細胞研究会、2007年6月22-23日、鹿児島(ポスター)
 51. 田母神龍、須藤亮、池田満里子、三高俊広、谷下一夫。「小型肝細胞の3次元積層化のためのポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体を用いた生体吸収性微孔薄膜のデザイン」。第14回肝細胞研究会、2007年6月22-23日、鹿児島(ポスター)
 52. 今純子、大栄秀和、市戸義久、三高俊広。「肝障害モデルラットにおける肝前駆細胞の分化機構」日本病理学会カンファレンス2007旭川、2007年7月27日、旭川(ポスター)
 53. 大栄秀和、陳其潔、今純子、三高俊広。「ラット小型肝細胞の網羅的遺伝子発現解析」日本病理学会カンファレンス2007旭川、2007年7月27日、旭川(ポスター)
 54. Yamato Kikkawa, Toshihiro Mitaka, Motoyoshi Nomizu. Identification of B-CAM/Lutheran binding site on laminin alpha5 chain. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007, Yokohama (Poster)
 55. 市戸義久、今純子、大栄秀和、陳其潔、三高俊広。「肝前駆細胞の分化機構の解析」第7回日本再生医療学会総会、2008年3月13日、名古屋(口演)
 56. 大栄秀和、陳其潔、今純子、三高俊広。「網羅的遺伝子発現解析によるラット小型肝細胞の増殖能および成熟化能の検討」第7回日本再生医療学会総会、2008年3月13日、名古屋(口演)
 57. 大島秀紀、三高俊広、今純子、大栄秀和、水口徹、平田公一。「ラット肝前駆細

胞 small hepatocyte-like progenitor cell における分化、再生機序の検討」第7回日本再生医療学会総会、2008年3月13日、名古屋(口演)

シンポジウム・特別講演等

1. 陳其潔、今純子、大栄秀和、佐々木寿誉、三高俊広。シンポジウム1肝細胞の分化・増殖とシグナル伝達「Follistatin 産生によるラット小型肝細胞の増殖」第14回肝細胞研究会、2007年6月22日、鹿児島
2. 今純子、大栄秀和、陳其潔、市戸義久、三高俊広。シンポジウム2肝幹細胞研究の現況と展望「肝前駆細胞の分化機構の解析」第14回肝細胞研究会、2007年6月23日、鹿児島
3. 三高俊広、今純子。「肝再生過程における小型肝細胞の役割」シンポジウム2「再生医療の break through」第34回日本臓器保存生物医学会定期学術集会、2007年11月16日、札幌(北大学術交流会館)、Organ Biology, 14(3), 220(36), 2007
4. 今純子、大栄秀和、大島秀紀、三高俊広。ワークショップ4肝再生と再生医療「ラット小型肝細胞特異的遺伝子CD44の機能解析」第41回日本肝臓学会総会、大阪、2005年6月17日、肝臓、46巻(supplement1)、P. A53.
5. 三高俊広。教育講演「肝前駆細胞による肝再生」第23回日本肝移植研究会、札幌、2005年6月24日。
6. 三高俊広。「ラット肝臓における性差」第3回北海道性差医学・医療研究会、札幌、2005年7月1日。
7. 長屋昌樹、窪田倭、鈴木登、三高俊広。シンポジウム2 肝障害と再生「ラット胆管由来肝前駆様細胞の分離と培養」第12回肝細胞研究会、東京、2005年7月9日
8. 三高俊広。教育講演「幹細胞を用いた組織・臓器再生-肝から学ぶ-」第3回泌尿器科再建再生研究会、2006年6月3日、札幌

9. 三高俊広 シンポジウム3「消化器疾患の再生医療」「ヒト小型肝細胞の分離培養とその再生医療への応用」DDW-Japan 第10回日本肝臓学会、札幌、2006年10月11日
10. Mitaka T. Characteristics of small hepatocytes as hepatic progenitor cells and a reconstruction of hepatic organoids in vitro. The 2nd International Symposium on Developmental Biology and Tissue Engineering. March 24th, 2006, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan.
11. Mitaka T. In vitro hepatic tissue formation by hepatic stem/progenitor cells. 慶應義塾大学国際シンポジウム「細胞のマイクロナノバイオエンジニアリング」2008年3月12日、東京

国際学会

1. Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Bile canalicular formation in 3D stacked-up culture of rat small hepatocytes and nonparenchymal cells. 2005 Summer Bioengineering Conference, June 22-26, Vail, Colorado, U.S.A.
2. Hashimoto W, Kohara H, Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Reconstruction of ductular structure by rat biliary epithelial cells. 2005 Summer Bioengineering Conference, June 22-26, Vail, Colorado, U.S.A., Conference program p.17.
3. Nagaya M, Kubota S, Suzuki N, Akashi K, Mitaka T. Filled thermoreversible gelation polymer resulted in the complete recovery of focal defect in a rat. 40th Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), May 25-28, 2005, Konya, Turkey.
4. Nagaya M, Kubota S, Suzuki N, Isogai A, Watanabe T, Akashi K, Mitaka T. Thermoreversible gelation polymer induces the regeneration of partially injured rat liver accompanying the stem/progenitor cells derived from bile ducts. Hepatology 42(4, Suppl. 1), 279A, (2005), AASLD, November 11-15, San

- Francisco, USA, 2005.
5. Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Regulation of cellular configuration by cell-cell adhesion in the 3D stacked-up culture of rat primary hepatocytes. World Congress of Biomechanics, July 29-August 4, Munchen, Germany, 2006.
 6. Sasaki K, Kon J, Chen QJ, Ooe H, Oshima H, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Proliferation of Hepatic Progenitor Cells Isolated from Adult Human Livers. FASEB Summer Research Conferences, Snowmass, Colorado, U.S.A. 2006, July22-27.
 7. Kon J, Ooe H, Oshima H, Kikkawa Y, Mitaka T. CD44 expression in rat small hepatocytes. FASEB Summer Research Conferences, Snowmass, Colorado, U.S.A. 2006, July22-27.
 8. Kon J, Sasaki K, Oshima H, Mitaka T. Analysis of differentiation of hepatic progenitor cells derived from severely injured rat livers. The 58th Annual Meeting of the American Association of the Study of Liver Diseases, Nov 2-6, 2007, Boston, MA, USA, Vol.46, No.4(Suppl), 803A.
 9. Mitaka T, Sasaki K, Kon J, Chen Q, Ooe H, Oshima H, Mizuguchi T, Hirata K. Selective proliferation of human hepatocyte progenitor cells in combination with hyaluronic acid and serum-free medium. The 58th Annual Meeting of the American Association of the Study of Liver Diseases, Nov 2-6, 2007, Boston, MA, USA, Vol.46, No.4(Suppl), 802A.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許等

1. 今純子、三高俊広. 「ヒアルロン酸を用いた小型肝細胞の選択的培養法及び分離法」(PCT/JP2005/11915) 各国移行
2. 今純子、三高俊広. 「特異的抗体を用いる小型肝細胞の分離法」(PCT/JP2005/11914) 各国移行

資料

1. 平成 17 年度総括研究報告書

資料名	
別紙 1	表1・表2・表5・図10
別紙 2	遺伝子リスト
別紙 3	外国人研究者招へい等事業(萌芽的先端医療技術推進研究事業)研究実績報告書・外国人研究者によるレポート
別紙 4	第一回研究会議報告書

2. 平成 18 年度総括研究報告書

資料名	
別紙 1	抗体・Primer・組織リスト
別紙 2	札幌医科大学倫理委員会承認結果
別紙 3	札幌医科大学倫理委員会承認結果
別紙 4	委託業務報告書

3. 平成 19 年度総括研究報告書

資料名

- | | |
|------|--|
| 別紙 1 | 外国人研究者招へい等事業(創薬基盤推進研究事業:トキシコゲノミクス研究推進事業)研究実績報告書及び外国人研究者によるレポート |
| 別紙 2 | 流動研究員 陳 其潔 研究実績報告書 |
| 別紙 3 | 委託業務報告書 |
-

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	巻号	ページ	出版年
Sugimoto S, Harada K, Shiotani T, Ikeda S, Katsura N, Ikai I, Mizuguchi T, Hirata K, Yamaoka Y, <u>Mitaka T</u>	Hepatic organoid formation in collagen sponge of cells isolated from human liver	Tissue Engineering	11(3-4)	626-633	2005
Miyamoto S, Hirata K, Sugimoto S, Harada K, Takeda H, <u>Mitaka T</u>	Expression of cytochrome P450 enzymes in hepatic organoid reconstructed by rat small hepatocytes	Journal of Gastroenterology and Hepatology	20(6)	865-872	2005
Sudo R, Kohara H, <u>Mitaka T</u> , Ikeda M, Tanishita K	Coordination of Bile Canalicular Contraction in Hepatic Organoid Reconstructed by Rat Small Hepatocytes and Nonparenchymal Cells	Annals of Biomedical Engineering	33(5)	696-708	2005
Mizuguchi T, <u>Mitaka T</u> , Katsuramaki T, Hirata K	Hepatocyte transplantation for total liver repopulation (review)	Journal of Hepatobiliary Pancreatic Surgery	12(5)	78-87	2005
Shibata C, Mizuguchi T, Kikkawa Y, Nobuoka T, Oshima H, Kawasaki H, Kawamoto M, Katsuramaki T, <u>Mitaka T</u> , <u>Hirata K</u>	Liver repopulation and long-term function of rat small hepatocyte transplantation as an alternative cell source for hepatocyte transplantation	Liver Transplantation	12(1)	78-87	2006