

201030025A

差替え版

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

骨髄および脂肪由来細胞を用いた
次世代型肝臓再生・修復(抗線維化)療法の開発研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 坂井田 功

平成23(2011)年 7月

<正誤表>

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業「骨髄
および脂肪由来細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復（抗線維化）
療法の開発研究（研究代表者 坂井田 功）」

平成 22 年度 総括研究報告書

- ・目次ページ；<誤>総合研究報告、<正>総括研究報告
- ・ページ 1 の 2 行目；<誤>総合研究報告、<正>総括研究報告

以上

目 次

I. 総合研究報告	1
骨髄および脂肪由来細胞を用いた次世代型肝臓再生・ 修復（抗線維化）療法の開発研究 坂井田 功	
II. 分担研究報告	6
1. 肝再生・修復（抗線維化）のメカニズムの解明に関する研究 宮島 篤	
2. 肝疾患モデル動物の作出と質量顕微鏡を用いた分子マーカーの探索に関する研究 仁科 博史	
3. アルコール性肝硬変に対する ABMi療法の有用性に関する症例対照研究 河田 純男 齊藤 貴史	
4. 骨髄細胞における HBV HCV の動態の解明に関する研究 梅村 武司	
5. 皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞の肝硬変に対する効果の研究 大河内 仁志	
6. 脂肪組織由来間質細胞による慢性肝疾患に対する再生療法に関する研究 酒井 佳夫	
7. NASH モデルマウス解析に関する研究 小川 佳宏	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	34
III. 研究成果の刊行物・別刷	42

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総合研究報告書

骨髄および脂肪由来細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復（抗線維化）療法の開発に関する研究

研究代表者 坂井田 功

研究要旨：

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝炎が進んだ肝硬変症患者の救命ために早急に行う必要がある。そこで平成 15 年 11 月より、山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学、山口大学医学部附属病院再生細胞療法センターにて、適応基準を満たす非代償性肝硬変患者に対して、Phase I 臨床研究『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法〔自己骨髄細胞の投与療法、Autologous Bone Marrow Cell Infusion therapy(ABMi療法)〕』を推進してきた。この日本で開発された ABMi 療法をいち早く多くの肝硬変症患者に提供することは急務である。一方、肝臓は、肝細胞のみならず、胆管細胞、星細胞、血管内皮細胞や Kupffer 細胞から構成されている。そこで効率的に肝硬変症を再生・修復させるためには、患者に投与した自己骨髄ないし脂肪細胞との複雑な細胞間相互作用を解明する必要がある。この目的達成のために新たに All Japan の研究開発チームを組織し、基礎研究で明らかになった肝線維化改善(抗線維化)と肝再生・修復に有効な骨髄細胞・脂肪細胞分画の細胞を応用し、今までの基礎研究から臨床応用への実績を踏まえて、独自の骨髄および脂肪由来細胞の分離培養技術を基盤にした肝硬変症に対する有効分画細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復(抗線維化)療法を開発する。

(分担研究者・所属機関および所属期間における職名)

宮島 篤 (東京大学 分子細胞生物学研究所 機能形成分野 教授)

仁科 博史 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 発生再生生物学分野 教授)

寺井 崇二 (山口大学大学院医学系研究科 消化器病態内科 准教授)

河田 純男 (山形大学医学部 消化器病態制御内科 教授)

斉藤 貴史 (山形大学医学部 消化器病態制御内科 准教授)

梅村 武司 (信州大学医学部 消化器内科 助教)

大河内 仁志 (国立国際医療センター研究所 細胞組織再生医学研究部 部長)

酒井 佳夫 (金沢大学大学院医薬保健研究域 医学系 血液情報統御学 准教授)

小川 佳宏 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子代謝医学分野 教授)

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝炎が進んだ末期肝硬変症患者の救命のために早急に行う必要がある。山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学、山口大学医学部附属病院再生細胞療法センターにて、2003 年 11 月より、適応基準を満たす非代償性肝硬変患者に対して、Phase I 臨床研究『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法〔自己骨髄細胞の投与療法、Autologous Bone Marrow Cell infusion therapy(ABMi療法)〕』を推進してきた。平成 21 年 12 月までに山口大学では 19 症例施行したが、重篤な副作用の発生はなく、肝機能・肝線維化が改善する結果を得ている(StemCells 2006)。平成 17 年度からは多施設研究を実施し、山形大学でも 6 症例実施した。さらに平成 18 年 11 月には国際共同研究として韓国 Yonsei 大学で第 1 例目が実施され、現在までに 9 症例に施行され、その有効性が再現された。現在まで 34 症例に施行しているが、この日本で開発された ABMi 療法をいち早く肝硬変症患者に提供することは急務である。一方、肝臓は、肝細胞のみならず、胆管細胞、星細胞、内皮細胞やクッパー細胞から構成され、肝硬変症状態から肝

A.研究目的

線維化を改善し再生修復させるためには、患者に投与する自己骨髄由来ないしは脂肪由来細胞との複雑な細胞間相互作用を解明することが必要である。そこでこの目的達成のため、新たに他大学・他施設との研究開発チームを組織し基礎研究を開始した。今回の研究の目的は、我々独自の骨髄および脂肪由来細胞の分離培養技術を基盤として、肝硬変症に対する有効分画細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復(抗線維化)療法の開発とし、下記の項目を達成する。

1. 肝再生・修復(抗線維化)に有用な骨髄および脂肪由来細胞分画の分離培養法の開発

- 骨髄細胞および脂肪細胞中の肝再生・修復に有効な細胞分画の同定
- 有効な細胞分画の培養法の開発
ヒト応用のため GMP グレードに準拠した細胞培養培地による培養方法を開発する。
- 有効な細胞分画の安全性評価試験
有効な細胞分画を SCID マウスへ投与しその安全性を検証する。

2. 肝再生・修復(抗線維化)のメカニズム解明

- 分離肝臓構成細胞と骨髄および脂肪由来細胞との相互作用の解析
- 投与骨髄および脂肪由来細胞の抗肝線維化メカニズムの解明
細胞外マトリクスの産生・分解に関する酵素、その制御因子、細胞外シグナル分子とその受容体、転写因子を解析する。

3. ABMi 療法臨床研究の推進

ABMi 療法を推進し、さらに次世代治療開発のための臨床試験プロトコール作成準備を行う。
以上の目標を推進すれば、世界的もトップレベルの研究成果と臨床応用への展開が可能となる。

B. 研究方法

我々は低侵襲治療法を開発するために、骨髄および脂肪由来細胞の分離培養法、さらには脂肪幹細胞の培養法を開発してきた。それをさらに発展させ、再度検証す

ることで、Sorting や FACS 等の解析を駆使して、下記の解析・開発を行う。



- 肝再生・修復に有用な骨髄および脂肪由来細胞分画の分離培養法の開発
- 骨髄細胞および脂肪細胞中の肝再生・修復に有効な細胞分画の同定
- 有効な細胞分画の培養法の開発

これにより臨床応用のための GMP グレードに準拠した細胞培養培地による培養方法を開発する。
また有効な細胞分画の安全性評価試験のために SCID マウスへそれらの細胞を投与しその安全性を検証する。

一方、自己骨髄細胞を肝硬変症マウスに投与することによる肝硬変の肝線維化改善についても世界で初めて報告した(JB 2003, Hepatology 2004)。そこで、有効な細胞分画の骨髄および脂肪由来細胞を四塩化炭素障害にて誘導した肝硬変マウスに投与することにより、肝臓の線維化改善・修復メカニズムを解明する。また細胞外マトリクス関連酵素、その制御因子、細胞外シグナル分子と受容体や転写因子を解析する。既に肝臓構成細胞の細胞膜抗原に対する多数のモノクローナル抗体を我々は作製しており、細胞膜抗原の発現を指標に肝臓構成細胞を分離・精製する方法を開発している。本研究では、肝線維化の発症・進行過程における肝臓構成細胞をそれぞれ分離してその性状の変動および細胞相互間の作用を解析する。

C. 研究結果

- 肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(ABMi法)の先進医療への申請

申請後現在、Revise の段階で厚生労働省と協議中である。

- 山形大学医学部と ABMi 療法を共同臨床研究として実施
- 韓国延世大学と ABMi 療法を共同臨床研究として実施
ABMi 療法の HBV 関連肝硬変症に対する有効性を示す結果を論文として発表した
- ヒト骨髄由来肝再生・修復細胞の培養法の開発、四塩化炭素誘導肝硬変症に対する細胞機能評価の実施
ヒト骨髄由来培養細胞を免疫不全肝硬変マウスに投与しその肝線維化抑制効果をシリウスレッド染色で評価したところ、肝線維化は有意に抑制されていた。またその投与細胞を FACS 解析したところ、間葉系マーカー陽性細胞とマクロファージ系マーカー陽性細胞であった。
- マウス骨髄由来肝再生・修復細胞の培養法の開発、四塩化炭素誘導肝硬変症に対する細胞機能評価の実施
マウス骨髄由来細胞の培養において High density 法により無血清培地培養が可能となった。また、肝硬変マウス骨髄細胞投与実験により抗線維化作用を有することが明らかとなった。
- ヒト細胞用 GMP グレード無血清培地開発を開始
ヒト細胞用 GMP グレード無血清培地についてアメリカ Life Technologies 社(アメリカ Frederick)と共同研究推進を行っている。
- Image Mass spectrometer 肝再生に関与する脂質について Massspectrometer を用いて解析した。
- 非アルコール性脂肪肝炎モデルの作成
新たに MCR4KO マウスを用いてマウスの新しい NASH モデルを作成した。本モデルの確立により今後は NASH 病態に対する骨髄細胞投与の改善効果を検討する。
- 脂肪組織由来間質細胞の肝硬変への効果の検討
マウス皮下脂肪組織より間質細胞を分離、培養した、脂肪組織由来間質細胞を、C57Bl/6 マウスに経脾経門脈投与し、肝、肺、脾、腎組織における細胞の分布、生着日数を検討したところ、投与後 2 週間で肝臓に生着することが確認できた。

D. 考 察

肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法 (ABMi 法) の先進医療への申請も Revise 段階であり、山形大学・韓国延世大学でそれぞれ ABMi 療法の肝硬変症に対する有効性を示す論文を発表されたことで他施設での ABMi 療法の有効性を証明することができた。ABMi 療法については現在申請中である先進医療の認可を取得する。

基礎研究では High density 法による無血清培地培養を使用したマウス骨髄細胞の培養を成功させ、肝硬変マウス投与実験により抗線維化作用を示せたことで研究の最初の第一歩を踏み出し、さらにヒト骨髄由来培養細胞を免疫不全肝硬変マウス投与実験により肝線維化抑制効果を示せたことで骨髄細胞の抗線維化作用を再確認できた。今後 Life Technologies 社の完全無血清培地システムを使って、マウス・ヒト骨髄由来肝臓再生・修復細胞の無血清培養法を確立する。ABMi 療法について現在申請中である先進医療の認可を取得する。

E. 結 論

High density 法による無血清培地培養を使用してヒト骨髄由来培養細胞の培養を成功させ、免疫不全肝硬変マウス投与実験により抗線維化作用を確認できた。今後非アルコール性脂肪肝炎モデル等様々な場合での骨髄細胞の動態・治療効果を検討する。

研究発表

1. 論文発表

1: Miyamura N, Nakamura T, Goto-Inoue N, Zaima N, Hayasaka T, Yamasaki T, Terai S, Sakaida I, Setou M, Nishina H. Imaging mass spectrometry reveals characteristic changes in triglyceride and phospholipid species in regenerating mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 in press.

2: Oishi T, Terai S, Iwamoto T, Takami T, Yamamoto N, Sakaida I. Splenectomy reduces fibrosis and preneoplastic lesions with increased triglycerides and essential fatty acids in rat liver cirrhosis induced by a

choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Hepatol Res.* 2010 in press.

3: Saito T, Okumoto K, Haga H, Nishise Y, Ishii R, Sato C, Watanabe H, Okada A, Ikeda M, Togashi H, Ishikawa T, Terai S, Sakaida I, Kawata S. Potential Therapeutic Application of Intravenous Autologous Bone Marrow Infusion in Patients with Alcoholic Liver Cirrhosis. *Stem Cells Dev.* 2010 in press

4: Takami T, Sakaida I. Iron regulation by hepatocytes and free radicals. *J Clin Biochem Nutr.* 2010 in press.

5: Takami T, Terai S, Sakaida I. Novel Findings for the Development of Drug Therapy for Various Liver Diseases: Current State and Future Prospects for Our Liver Regeneration Therapy Using Autologous Bone Marrow Cells for Decompensated Liver Cirrhosis Patients. *J Pharmacol Sci.* 2010 in press.

6: Iizuka N, Oka M, Sakaida I, Moribe T, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Uchida K, Terai S, Yamashita S, Okita K, Sakata K, Karino Y, Toyota J, Ando E, Ide T, Sata M, Tsunedomi R, Tsutsui M, Iida M, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Tamesa T, Fujita Y, Hamamoto Y. Efficient detection of hepatocellular carcinoma by a hybrid blood test of epigenetic and classical protein markers. *Clin Chim Acta.* 2011 Jan
7: Kuwashiro S, Terai S, Oishi T, Fujisawa K, Matsumoto T, Nishina H, Sakaida I, Segawa M, Sakaida I. Telmisartan improves nonalcoholic steatohepatitis in medaka (*Oryzias latipes*) by reducing macrophage infiltration and fat accumulation. *Cell Tissue Res.* 2010 in press.

8: Yamasaki T, Hamabe S, Saeki I, Harima Y, Yamaguchi Y, Uchida K, Terai S, Sakaida I.
Tanaka Y, Sakaida I, Mizokami M, A novel transcatheter arterial infusion chemotherapy using iodized oil and degradable starch microspheres for hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial. *J Gastroenterol.* 2011 Mar;46(3):359-66.

9: Terai S, Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2011 Jan;18(1):23-5.

10: Harima Y, Yamasaki T, Hamabe S, Saeki I, Okita K, Terai S, Sakaida I. Effect of a late evening snack using branched-chain amino acid-enriched nutrients in patients undergoing hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2010 Jun;40(6):574-84.

11: Kim JK, Park YN, Kim JS, Park MS, Paik YH, Seok JY, Chung YE, Kim HO, Kim KS, Ahn SH, Kim do Y, Kim MJ, Lee KS, Chon CY, Kim SJ, Terai S, Sakaida I, Han KH. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant.* 2010;19(10):1237-46.

12: Okita K, Sakaida I, Okada M, Kaneko A, Chayama K, Kato M, Sata M, Yoshihara H, Ono N, Murawaki Y. A multicenter, open-label, dose-ranging study to exploratively evaluate the efficacy, safety, and dose-response of tolvaptan in patients with decompensated liver cirrhosis. *J Gastroenterol.* 2010 Sep;45(9):979-87.

13: Matsumoto T, Terai S, Oishi T, Kuwashiro S, Fujisawa K, Yamamoto N, Fujita Y, Hamamoto Y, Furutani-Seiki M, Nishina H, Sakaida I. Medaka as a model for human nonalcoholic steatohepatitis. *Dis Model Mech.* 2010 Jul-Aug;3(7-8):431-40.

14: Negishi T, Nagai Y, Asaoka Y, Ohno M, Namae M, Mitani H, Sasaki T, Shimizu N, Terai S, Sakaida I, Kondoh H, Katada T, Furutani-Seiki M, Nishina H. Retinoic acid signaling positively regulates liver specification by inducing wnt2bb gene expression in medaka. *Hepatology.* 2010 Mar;51(3):1037-45.

2.学会発表

(日本再生医療学会総会 平成22年3月18日 一般)
骨髄由来肝幹細胞の肝硬変修復時における様々な動態と微細構造解析

(日本再生医療学会総会 平成22年3月18日 一般)
無血清培地によるマウス骨髄由来ディッシュ接着細胞
ex vivo 培養法

(日本再生医療学会総会 平成22年3月18日 一般)
骨髄細胞投与による肝修復機構における TNF α シグナル
の検討

(日本肝臓学会総会 平成22年5月28日 シンポジウ
ム)骨髄由来 Liver Repair 細胞を用いた肝臓再生修復
療法の現状と今後の課題

(日本肝臓学会総会 平成22年5月29日 ワークショ
ップ)脾臓摘出術は、肝硬変症に対する自己骨髄細胞
投与療法の効果を増強する

(JDDW 平成22年10月14日 パネルディスカッション)
骨髄由来 Liver Repair (LR)細胞を用いた肝臓再生修復
療法の開発について

(AASLD 平成22年11月2日 ポスター)
Autologous bone marrow cell infusions suppress
tumor-initiation and do not promote tumor-proliferation
during N-nitrosodiethylamine-induced
hepatocarcinogenesis in carbon tetrachloride-treated
liver cirrhosis mice.

(AASLD 平成22年11月2日 ポスター)
Disruption of Maid accelerates liver fibrosis and cell
proliferation in CCl4 induced cirrhosis mice

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得
特記事項なし

2. 実用新案登録
特記事項なし

3. その他
特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

「肝再生・修復(抗線維化)のメカニズムの解明」に関する研究

研究分担者 宮島 篤

研究要旨:

【目的】 肝線維化あるいはその改善に関わる細胞種および因子の同定

【方法】 線維化あるいはその改善に関与することが期待される分子の機能を、前年度確立した HTVi 法により生体肝臓レベルで検討する。肝線維化のメカニズムの解析のために、種々の肝障害モデルマウスにおける線維化を比較し、従来の四塩化炭素投与による線維化モデルとは異なる機序により線維化が誘導されるマウスモデルを探索する。

【成績】 先行研究により選択した線維化への関与が期待される分子を HTVi 法によりマウス生体の肝細胞に発現させ、線維化に対する効果を検討した。MMP9 には線維化改善作用が認められたが、肝障害で発現が誘導される chinase3-like 1, Chitinase3-like 3, IGFBP3, EpCAM, renin-angiotensin system には線維化を促進および抑制する効果は認められなかった。Tak1 を肝細胞特異的に欠損するマウスでは生後4週で肝線維化が認められることから、今後の解析に有用である。

【考察】 HTVi 法は生体の肝細胞に遺伝子を導入し発現させる簡便な方法であり、肝障害時に発現が誘導される遺伝子の線維化に対する効果を評価する上で大変有用である。今後は、さらなる候補因子の肝線維化に対する効果を HTVi 法にて評価する。Tak1 を肝細胞で特異的に欠損したマウスは成長に伴い、4週で肝線維化が起こり、数ヶ月で肝癌が発症するので、線維化の改善因子を評価する上では従来の四塩化炭素投与モデルより優れている。

共同研究者

田中稔、伊藤暢、菊地暁子

A.研究目的

肝障害からの修復再生のメカニズムを明らかにするために、肝障害に応じて発現が誘導される遺伝子の解析を行ってきた。その中で、細胞膜タンパク質あるいは分泌タンパク質に注目し、肝線維化の促進あるいは改善に関与する分子の探索を行う。具体的には、候補分子の cDNA を Hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法により肝臓で発現させ、肝線維化に対する作用を検証する。

さらに、先行研究から肝線維化の促進あるいは改善に関与することが示唆されている分子についても同様に検討する。

従来、肝線維化のモデルとして四塩化炭素 (CCl₄) の連続投与が一般に用いられている。しかしながら、これはヒトの肝疾患を反映しているとは言いがたく、肝線維化からの修復・再生法の開発には、よりヒトの病態に近い肝線維化モデルが必要になる。そこで、いくつかの異なる肝障害モデルにて線維化への進行を評価する。

B.研究方法

Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法は、プラスミド DNA を含む大量の溶液(マウス体重の10%)を尾静脈からごく短時間で注入

することで肝細胞に特異的に遺伝子導入する方法であり、適当な発現ベクターを使うことで目的遺伝子の発現を数週間にわたり維持させることのできる方法である。本研究では肝細胞で高発現する pLIVE 発現ベクターを用いた。これにより各種の cDNA を CCl₄ の連続投与で線維化を誘導したマウス肝臓に導入し、肝線維化の程度をシリウスレッド染色あるいはコラーゲンの発現にて評価した。

肝障害モデルマウスの線維化の評価

Tak1 遺伝子の第2エクソンの両側に lox P 配列を挿入したマウス(大阪大学・審良教授から供与)と、Alfp enhancer/Alb promoter 制御下に Cre を発現するマウス(Alfp-Cre)の交配により、肝細胞特異的に Tak1 を欠損するマウスを作成した。その肝臓における線維の蓄積をシリウスレッド染色にて経時的に観察した。

C. 研究結果

HTVi 法による肝線維化関連因子の探索

マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)やマトロプロテアーゼ阻害因子(TIMP)など、肝線維化の促進あるいは改善に関与する可能性のある可溶性分子を正常マウスおよび肝線維化マウスの肝臓で発現させたところ、MMP9の発現により肝線維化の改善が認められた。一方、TIMP1 の発現による線維化の促進は認められなかった。

3, 5-Diethoxycarbonyl-1, 4-Dihydrocollidine (DDC) 投与による肝障害時に誘導された分泌タンパク質 chinase3-like 1, chinase3-like 3, nephronectin, IGFBP3 あるいは細胞膜タンパク質 EpCAM をそれぞれ HTVi 法により発現させて評価したところ、肝線維化に対しては促進、改善いずれの作用も認められなかった。

レニン-アンジオテンシン系 (Renin-Angiotensin System ; RAS) は血圧調節や電解質バランスの維持に重要なホルモン系である。肝臓で産生される Angiotensin (Ang) 前駆体タンパク質 (Angiotensinogen; Agt) が血中でレニンおよび Ang 変換酵素による酵素変換を受けて 8 残基のペプチド Ang II になり、これが主要な effector として血管や腎臓に作用する。Ang II の受容体 (Agtr) には、Agtr I a、Agtr I b、Agtr II の 3 種類が存在する。Agtr I a を介したシグナルは線維化に対して促進的に働くことが以前より良く知られている。一方で、Agtr I b や Agtr II が線維化に対して抑制的に働くことが、それぞれの分子の KO マウスを用いた研究から明らかにされた。さらに最近、Ang II の誘導体である Ang1-7 が MasR を介して線維化抑制作用を及ぼすということも明らかにされた。このように個別のリガンド/受容体の組み合わせについての線維化への作用が解析されてきたが、RAS というシステム全体の活性が及ぼす作用、すなわち、その活性化が線維化に対して促進的であるか、抑制的であるかは、依然として不明であった。そこで、全ての Ang 分子の前駆体である Agt を欠損する KO マウスに CCl₄ を連続投与して線維化を評価したところ、野生型との有意差が認められなかった。すなわち、RAS は線維化に対しては中立であるが、活性化される受容体のバランスが線維化を促進するか抑制するかを決めている可能性が示唆された。現在、この KO マウスに HTVi 法で各 Ang 分子を発現させるかペプチドを投与することで、この可能性を検証している。

肝障害モデルマウスの線維化

Tak1 は TNF α 受容体などからのシグナルを NF- κ B に伝える分子であり、これを肝細胞で欠損したマウスでは肝細胞の細胞死が起こり、出生後数週間で線維化が誘導され、さらに数ヶ月で肝癌へと移行することが報告されている。我々はこのシステムを今後の肝線維化の研究に使うことを念頭に評価した。Alfp-Cre で肝細胞特異的に Tak1 遺伝子を欠損させると、生後4週ですでに肝臓における線維の蓄積が認められ、生後8週までに顕著に進行した。したがって、このマウスは肝線維化を評価するよいモデルとなることが期待される。

DDC の投与により、投与開始後8週目までに線維化が誘導されたが、CCl₄ モデルや Tak1 欠損モデルに比べて線維化の程度は低く、進行も緩慢であった。また、胆管結紮による障害でも肝線維化の顕著な誘導が認められたが、術後3週目頃までに死に至るケースが多く、種々の遺伝子や細胞種の肝線維化に対する作用を経過的に観察する系としては制約が大きいと考えられた。

D. 考 察

HTVi 法は生体の肝臓に遺伝子を導入する大変簡便な優れた方法であり、これにより様々な分子の肝線維化に対する作用を評価可能であることが示された。MMP9 は、ウイルスベクターによる遺伝子導入系を用いた既報から線維化の改善効果が期待された分子であったが、予想に違わず、線維化を抑制した。一方、TIMP1 は MMP を抑制することから線維化を促進する可能性が考えられたが、この分子単独では線維化に対する作用は認められなかった。

RAS は、これまで一般的には肝線維化に対

して促進的な作用を及ぼすものと見なされ、これに関わる変換酵素や受容体に対する阻害剤が肝線維化に対する治療効果をもたらす可能性が考えられてきた。今回の結果は、肝線維化における RAS の役割と作用機序についての新たな局面を明らかにしたものであり、今後さらに詳細な解析を進めることで、より効果的な治療法の創出へとつながる可能性がある。

E. 結 論

HTVi 法は肝線維化の促進あるいは改善に関わる分子の生体内での機能を評価する簡便で優れた方法である。その“Proof-of-concept”として、MMP9 を肝細胞で発現させることで線維化の改善が認められた。また、肝細胞特異的な Tak1 欠損マウスは肝線維化の解析のモデルとなる。今後、これら機能評価系と肝線維化モデルとを組み合わせることで、肝再生・修復(抗線維化)メカニズムの解明に向けた研究が加速されることが期待できる。

研究発表

1.論文発表

Onitsuka I., Tanaka M., and Miyajima A. Characterization and functional analyses of hepatic mesothelial cells in mouse liver development. *Gastroenterology* 138, 1525-1536, 2010.

Yamauchi S., Ito H., and Miyajima A. I κ B β , a nuclear I κ B protein, positively regulates the NF- κ B-mediated expression of pro-inflammatory cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 11924-11929, 2010.

Yanai H., Nakura K., Hijioka S., Kamei A.,

Ikari T., Ishikawa, Y., Shinozaki E., Mizunuma N., Hatake K., and Miyajima A. Dlk-1, a cell surface antigen on hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency. *J. Biochem.* 148, 85-92, 2010.

Tanaka M., Itoh T., Tanimizu N. and Miyajima A. Liver stem/progenitor cells: Their characteristics and regulatory mechanisms. *J. Biochem.* in press.

2.学会発表

Hinako Takase, Tohru Itoh, Atsushi Miyajima
FGF7 induces stem/progenitor cell response in the adult mouse liver. 8th Stem Cell Research Symposium 第8回幹細胞シンポジウム (淡路夢舞台国際会議場 2010.5.13-15)

伊藤 暢, 高瀬比菜子, 宮島篤
成体肝幹/前駆細胞反応を制御する細胞間シグナルネットワーク. 第17回肝細胞研究会 (秋田アトリエ 2010.6.18-19)

宮岡 佑一郎, 宮島篤
肝再生における細胞系譜の追跡. 第17回肝細胞研究会 (秋田アトリエ 2010.6.18-19)

田中 稔, 宮島篤
肝臓の発生メカニズム解明へのアプロー

チ: マーカー分子を用いた肝臓構成細胞の分離・同定と性状解析. 第17回肝細胞研究会 (秋田アトリエ 2010.6.18-19)

千賀一徳, 谷水直樹, 三高俊広, 宮島篤.
胆管上皮細胞に特異的な転写因子 Grhl2 の機能解析. 第17回肝細胞研究会 (秋田アトリエ 2010.6.18-19)

稲垣冬樹, 田中稔, 寺井 崇二, 神谷淑子, 國土典宏, 坂井田 功, 宮島篤.
骨髄細胞移植による肝線維化改善に有効な細胞成分の検討. 第17回肝細胞研究会 (秋田アトリエ 2010.6.18-19)

高瀬比菜子, 伊藤暢, 宮島篤
FGF シグナルによるマウスオーバル細胞の制御. 第17回肝細胞研究会 (秋田アトリエ 2010.6.18-19)

Minoru Tanaka, Marika Motomura, Yoshiko Kamiya, and Atsushi Miyajima.
Identification of fetal liver cells contributing to hematopoiesis during mouse embryogenesis. 2010 FASEB Summer Research Conferences (Snowmass Village Conference Center 2010.8.15-20)

Tohru Itoh, Hinako Takase, and Atsushi Miyajima.
Searching for signaling molecules regulating adult liver progenitor cell response using the hydrodynamic tail vein injection-mediated *in vivo* gene transfer technique. 2010 FASEB Summer

Research Conferences "Liver Growth, Injury & Metabolism: Basic & Applied Biology" (Snowmass Village Conference Center 2010.8.15-20)

Hinako Takase, Tohru Itoh, Atsushi Miyajima.

FGF7 induces stem/progenitor cell response in the adult mouse liver. 2010 FASEB Summer Research Conferences "Liver Growth, Injury & Metabolism: Basic & Applied Biology" (Snowmass Village Conference Center 2010.8.15-20)

伊藤暢, 高瀬比菜子, 宮島 篤
マウス成体肝臓における幹/前駆細胞反応制御シグナルの解析. IN Cell User's Day 2010 (GEヘルスケア・ジャパン ライフサイエンス新宿本部 2010.8.27)

伊藤 暢
肝障害時に誘導される幹/前駆細胞反応および再生の FGF シグナルによる制御. 第31回幹細胞治療研究フォーラム (東京大学医科学研究所 2010.11.18)

宮岡 佑一郎、江波戸 一希、加藤 英徳、宮島 篤.
Liver Regeneration Consists of Coordinated Proliferation and Hypertrophy of Hepatocytes. 第16回武田科学振興財団生命科学シンポジウム (シェラトン都ホテル東京 2010.12.1)

Minoru Tanaka, Marika Motomura,

Yoshiko Kamiya, and Atsushi Miyajima.
Identification of fetal liver cells contributing to hematopoiesis during mouse embryogenesis. BMB2010/第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)

宮岡 佑一郎、齊藤 滋、今村 亨、宮島 篤

Fgf結合分子Cfr/Glg-1の細胞内局在制御機構. BMB2010/第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)

廣瀬 恵一、西條 (及川) 栄子、菅野 安喜、陳 彦榮、関根 圭輔、宮島 篤.

肝類洞内皮細胞に発現するStabilin-2は血中ヒアルロン酸の主要なクリアランス受容体である. BMB2010/第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)

Shumpei Yamauchi, Hiroaki Ito, Ai Omi, Atsushi Miyajima

Identification and characterization of a new IkappaB protein. BMB2010/第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)

千賀 一徳、谷水 直樹、三高 俊広、宮島 篤.

胆管上皮細胞に特異的な転写因子Grhl2の機能解析. BMB2010/第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大

会 (神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)

伊藤 暢、高瀬 比菜子、宮島 篤

Hydrodynamic tail vein injection法を用いた、マウス成体肝幹/前駆細胞反応の制御シグナルの探索. BMB2010/第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)

高瀬 比菜子、伊藤 暢、宮島 篤

FGF7 regulates stem/progenitor cell response in the adult mouse liver. BMB2010/第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (神戸ポートアイランド 2010.12.7-10)

Tohru Itoh, Hinako Takase, and Atsushi Miyajima.

FGF7 is critical for progenitor cell-mediated regeneration in the adult mouse liver. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Stem Cells in Development, Tissue Homeostasis and Disease" (Eldorado Hotel & Spa, Santa Fe, New Mexico, USA 2011.1.31)

宮岡 佑一郎、江波戸 一希、加藤 英徳、宮島 篤

肝再生における肝細胞増殖と肥大.第10回日本再生医療学会総会 (京王プラザホテル (東京都新宿区) 2011.3.1)

伊藤 暢、高瀬 比菜子、宮島 篤

マウス肝障害モデルにおける肝幹/前駆細胞

反応の FGF シグナルによる制御. 第10回日本再生医療学会総会 (京王プラザホテル (東京都新宿区) 2011.3.2)

齋藤弘樹、竹内真樹、宮島篤

iPS 細胞から機能的膵島を形成する培養法の開発. 第10回日本再生医療学会総会 (京王プラザホテル (東京都新宿区) 2011.3.2)

Yen-Rong Chen, Eiko Saijou, and Atsushi Miyajima.

Generation of Factor VIII producing cells from human iPS cells. 第10回日本再生医療学会総会 (京王プラザホテル (東京都新宿区) 2011.3.2)

宮島篤

幹細胞からの in vitro における組織構築. 第10回日本再生医療学会総会 (京王プラザホテル (東京都新宿区) 2011.3.1)

Minoru Tanaka, Tohru Itoh, Hinako Takase, Izumi Onitsuka, Yuko Tsukahara, Yoshikazu Hirose, Yoshiko Kamiya, and Atsushi Miyajima.

Liver stem/progenitor cells in normal and pathological conditions. 2010 FASEB Summer Research Conferences "Liver Growth, Injury & Metabolism: Basic & Applied Biology" (Snowmass Village Conference Center, 2010.8.15-20)

Minoru Tanaka, Tohru Itoh, Hinako Takase, Izumi Onitsuka, Atsushi

Miyajima.

Roles of non-parenchymal cells in liver development and regeneration. 15th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid (The Hilton Pasadena Hotel, Pasadena CA, 2010.8.29-9.1)

Atsushi Miyajima.

Liver stem/progenitor cells in development and regeneration. Tokyo iPS/Stem Cell Symposium 2010 (Yasuda Auditorium, University of Tokyo, 2010. 11.24)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

- 1.特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

肝疾患モデル動物の作出と質量顕微鏡を用いた分子マーカーの探索に関する研究

研究分担者 仁科 博史

研究要旨：【目的】

肝線維化改善（抗線維化）と肝再生・修復に有効な骨髄細胞・脂肪細胞分画の細胞を同定および評価可能な新規低分子マーカーの同定を目的とする。患者から採取可能な微量サンプルを用いた新たな方法の開発と分子マーカーの単離を目指す。

【方法】

モデル生物（マウスやメダカ）を用いて様々な状態の肝臓を作り出し、次世代の解析装置として期待されている質量顕微鏡を用い、網羅的かつ可視化可能な解析を行う。得られた分子は、肝疾患の患者からのサンプルを用いて解析し、病態と関連するか否かを検討する。

【成績】

次世代の分析ツールとして期待されている質量顕微鏡を世界で初めて、マウスの再生肝に適用し、脂質の動態を解析し、従来の分析方法である薄層クロマトグラフィーでは不明であった多種類のトリグリセリド(TG)やリン脂質(PC)の挙動を明らかにすることができた。また、肝臓障害が末梢の脂肪組織に影響を及ぼすことも観察され、肝臓-脂肪組織間のネットワークの存在が示唆された。

【考案】

質量顕微鏡は、低分子量の脂質を位置情報を保ちながら網羅的に解析できる有望なツールであることが判明した。また、肝臓には多種類のTGやPCが存在し、固有の挙動を示すことから、それぞれが固有の生理機能を有している可能性が示唆された。また、この特性から、様々な肝臓の状況に対応する分子マーカーの単離が期待された。

共同研究者

平山 順（東京医科歯科大学・准教授）
浅岡 洋一（東京医科歯科大学・助教）
宮村 憲央（東京医科歯科大学・大学院生）
瀬藤 光利（浜松医科大学・教授）
寺井 崇二（山口大学・准教授）
坂井田 功（山口大学・教授）

A.研究目的

肝線維化改善（抗線維化）と肝再生・修復に有効な骨髄細胞・脂肪細胞分画の細胞を同定および評価可能な新規低分子マーカーの同定を目的とする。患者から採取可能な微量サンプルを用いた新たな方法の開発と分子マーカーの単離を目指す。次世代の解析ツールとして期待されている質量顕微鏡（島津製作所）を用いて、マウスの再生肝における脂質の動態解析を行い、本ツールの有効性の検討を行うこと、また、再生肝特異的な脂質の同定を目的に実験を行った。

B.研究方法

70%部分肝切除をマウスに行い、薄層クロマトグラフィーでTGの蓄積が観察される24時間後の肝臓を解析した。網羅的な質量分析を行うとともに、切片の情報を取り入れた解析を行った。

研究結果

従来の分析方法である薄層クロマトグラフィーでは不明であった多種類のトリグリセリド(TG)やリン脂質(PC)の挙動を明らかにすることができた。また、肝臓障害が末梢の脂肪組織に影響を及ぼすことも観察され、肝臓-脂肪組織間のネットワークの存在が示唆された。さらに食餌によって誘導される脂肪肝との比較を行うことで、病態肝および再生肝特異的なPCの同定に成功した。
(論文投稿準備中)

考 察

質量顕微鏡は、低分子量の脂質を位置情報を保ちながら網羅的に解析できる有望なツールであることが判明した。また、肝臓には多種類の TG や PC が存在し、固有の挙動を示すことから、それぞれが固有の生理機能を有している可能性が示唆された。また、この特性から、様々な肝臓の状況に対応する分子マーカーの単離が期待された。

E. 結 論

質量顕微鏡は、低分子量の脂質を位置情報を保ちながら網羅的に解析できる有望なツールであることが判明した。また、肝臓には多種類の TG や PC が存在し、固有の挙動を示すことから、それぞれが固有の生理機能を有している可能性が示唆された。また、この特性から、様々な肝臓の状況に対応する分子マーカーの単離が期待された。今回同定された PC 分子種がヒトの病態と相関するかの検討が期待される。

研究発表

1. 論文発表

1. Takahiro Negishi, Yoko Nagai, Yoichi Asaoka, Mami Ohno, Misako Namae, Hiroshi Mitani, Takashi Sasaki, Nobuyoshi Shimizu, Shuji Terai, Isao Sakaida, Hisato Kondoh, Toshiaki Katada, Makoto Furutani-Seiki*, and Hiroshi Nishina* (2010) Retinoic acid signaling positively regulates liver specification by inducing wnt2bb gene expression in medaka. *Hepatology* 51, 1037-1045. (*Corresponding authors) Press release □□
2. Kentaro Nakagawa¹, Misato Sugahara¹, Tokiwa Yamasaki¹, Hiroaki Kajihō, Shinya Takahashi, Jun Hirayama, Yasuhiro Minami, Yasutaka Ohta, Toshio Watanabe, Yutaka Hata, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2010) Filamin Associates with Stress Signaling Kinases MKK7 and MKK4 and Regulates JNK Activation. *Biochem. J.* 427, 237-245. (1Contributed equally)□□
3. Jinzhan Wu¹, Junko Kubota¹, Jun Hirayama¹, Yoko Nagai, Sachiko Nishina, Tadashi Yokoi, Yoichi Asaoka, Jungwon Seo, Nao Shimizu, Hiroaki Kajihō, Takashi Watanabe, Noriyuki

Azuma, Toshiaki Katada, and Hiroshi Nishina (2010) p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Controls a Switch between Cardiomyocyte and Neuronal Commitment of Murine Embryonic Stem Cells by Activating Myocyte Enhancer Factor 2C-Dependent Bone Morphogenetic Protein 2 Transcription. *Stem Cells and Development* 19, 1723-1734.

4. Jungwon Seo¹, Yoichi Asaoka^{1*}, Yoko Nagai, Jun Hirayama, Tokiwa Yamasaki, Misako Namae, Shinya Ohata, Nao Shimizu, Takahiro Negishi, Daiju Kitagawa, Hisato Kondoh, Makoto Furutani-Seiki, Josef M. Penninger, Toshiaki Katada, and Hiroshi Nishina* (2010) Negative regulation of wnt11 by JNK signaling is required for convergent extension during vertebrate gastrulation. *J. Cell. Biochem.* 110, 1022-1037. □
5. Yoko Nagai¹, Yoichi Asaoka¹, Misako Namae, Kota Saito, Haruka Momose, Hiroshi Mitani, Makoto Furutani-Seiki, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2010) The LIM protein Ajuba is required for ciliogenesis and left-right axis determination in medaka. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 887-893. □□
6. G. Gregory Neely, Keiji Kuba, Anthony Cammarato, Kazuya Isobe, Sabine Amann, Liyong Zhang, Mitsushige Murata, Lisa Elmén, Vaijayanti Gupta, Suchir Arora, Rinku Sarangi, Debasis Dan, Susumu Fujisawa, Takako Usami, Cui-ping Xia, Alex C. Keene, Nakissa N. Alayari, Hiroyuki Yamakawa, Ulrich Elling, Christian Berger, Maria Novatchkova, Rubina Kogelgruber, Keiichi Fukuda, Hiroshi Nishina, Mitsuaki Isobe, J. Andrew Pospisilik, Yumiko Imai, Arne Pfeufer, Andrew A. Hicks, Peter P. Pramstaller, Sai Subramaniam, Akinori Kimura, Karen Ocorr, Rolf Bodmer, Josef M. Penninger (2010) A Global In Vivo Drosophila

- RNAi Screen Identifies NOT3 as a Conserved Regulator of Heart Function. *Cell* 141, 142-153. Cover of the issue□□
7. Shigeomi Shimizu, Akimitsu Konishi, Yuya Nishida, Takeshi Mizuta, Hiroshi Nishina, Akitsugu Yamamoto, and Yoshihide Tsujimoto (2010) Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene* 29, 2070-2082.□□
8. Ryuichi Mashima, Kazuho Honda, Yi Yang, Yohei Morita, Akane Inoue, Sumimasa Arimura, Hiroshi Nishina, Hideo Ema, Hiromitsu Nakauchi, Brian Seed, Hideaki Oda, and Yuji Yamanashi (2010) Mice lacking Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histiocytic sarcoma. *Laboratory Investigation* 90, 1357-1364. □□
9. Toshihiko Matsumoto, Shuji Terai, Toshiyuki Oishi, Shinya Kuwashiro, Koichi Fujisawa, Naoki Yamamoto, Yusuke Fujita, Yoshihiko Hamamoto, Makoto Furutani-Seiki, Hiroshi Nishina and Isao Sakaida (2010) Medaka as a Novel and Accurate Model for Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Disease Models & Mechanisms* 3, 431-440. Press release, Cover of the issue, Faculty of 1000 Medicine□□Masahiko
10. Tanaka, Hideyuki Hara, Hiroshi Nishina, Kentaro Hanada, Kenichi Hagiwara, Tomohiko Maehama (2010) An improved method for cell-to-cell transmission of infectious prion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 505-508.□
11. Yoichi Asaoka and Hiroshi Nishina (2010) [review] Diverse Physiological Functions of MKK4 and MKK7 during Early Embryogenesis. *J. Biochem.* 148: 393-401.□□
12. Yoshimi Uchida, Jun Hirayama, Hiroshi Nishina (2010) [review] A common origin: signaling similarities in the regulation of the circadian clock and DNA damage responses. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 535-544. Cover of the issue□□
13. Shuhei Tanemura, Tokiwa Yamasaki, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2010) [review] Utility and limitations of SP600125, an inhibitor of stress-responsive c-Jun N-terminal kinase. *Curr. Enzym. Inhib.* 6, 26-33.
14. 仁科博史：分子細胞生物学 第6版 (Lodish et al.) (翻訳分担) 東京化学同人 (2010)
15. 仁科博史：生物学事典、東京化学同人 (執筆分担) (2010)
16. 仁科博史：小型魚類メダカを用いた肝形成および肝疾患研究：肝細胞研究会ホームページ：研究交流 (http://hepato.umin.jp/kouryu/kouryu12.htm) (2010)
17. 平山順、内田好海、宮村憲央、沢登健治、仁科博史：概日リズムによる生理機能の制御機構；自律神経 47, 297-300 (2010)
18. 中村貴、早坂孝宏、井上菜穂子、仁科博史、瀬藤光利：「メタボロームの分布可視化法について」メタボロミクス：その解析技術と臨床・創薬応用研究の最前線、メディカルドゥ、遺伝子医学MOOK 16, 131-135 (2010)
- 2.学会発表
- 1.Yoichi Asaoka and Hiroshi Nishina; Negative Regulation of Wnt11 Expression by Jnk Signaling during Convergent Extension [9th International meeting on ZEBRAFISH DEVELOPMENT AND GENETICS, Wisconsin, USA, June, 2010]
- 2.Yoichi Asaoka and Hiroshi Nishina; Liver biology and disease: lessons from mutant fish [The Joint Symposium of the 5th International Symposium of Institute Network and the International Symposium Commemorating

- Inauguration of Kanazawa University Cancer Research Institute, Kanazawa, June, 2010]
3. Hiroshi Nishina; The LIM protein Ajuba is required for ciliogenesis and left-right axis determination in medaka [FASEB Summer Research Conferences 2010, Aspen, USA, August, 2010]
 4. Hiroshi Nishina; Regulation of ES cell differentiation [Lectures on Organogenesis and Regeneration in Fayoum University, Fayoum, Egypt, October, 2010]
 5. Hiroshi Nishina; Generation and Regeneration of liver [Fayoum University International Symposium on Stem Cells, Fayoum, Egypt, October, 2010]
- Yoko Nagai et al.; The LIM protein Ajuba is required for ciliogenesis and left-right axis determination in medaka [The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Tokyo, Japan, December, 2010]
6. Yoshimi Uchida et al.; The death domain-associated protein DAXX interacts with the core clock component BMAL1 and modulates circadian transcription [The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Tokyo, Japan, December, 2010]
 7. 仁科博史; 細胞死調節因子 Daxx による分子時計制御 [細胞死研究会; 2010 年 1 月/京都]
 8. 仁科博史; 私のキャリアパス [東大医科研 GCOE キャリアパス支援セミナー; 2010 年 2 月/東京]
 9. 仁科博史; 小型魚類を用いたトランスポートソーム下流シグナル伝達系の解析 [膜輸送公開シンポジウム; 2010 年 3 月/大阪]
 10. 宮村憲央他; 細胞死調節因子 Daxx による概日リズムの分子機構 [日本薬学会第 130 年会; 2010 年 3 月/岡山]
 11. 長井陽子他; LIM ファミリータンパク質 Ajuba は初期発生過程の繊毛形成に関与する [日本薬学会第 130 年会; 2010 年 3 月/岡山]
 12. 内田好海他; ストレス応答キナーゼ JNK による時計蛋白質 PER2 の安定性制御 [日本薬学会第 130 年会; 2010 年 3 月/岡山]
 13. 仁科博史; 肝細胞の増殖を制御するシグナル伝達の解析 [第 12 回日本肝臓医生物学研究会; 2010 年 4 月/静岡]
 14. 仁科博史; マウスやメダカを用いた MAP キナーゼシグナル伝達系の生理機能の解析 [東京女子医大セミナー; 2010 年 5 月/東京]
 15. 仁科博史; 小型魚類メダカを用いた肝臓研究 [第 7 回日本胎盤臨床研究会; 2010 年 5 月/東京]
 16. 仁科博史; 小型魚類メダカを用いた肝臓研究: 肝形成と肝疾患 [大学院生命情報教育部公開シンポジウム; 2010 年 6 月/東京]
 17. 内田好海他; JNK シグナル伝達系による分子時計制御機構の解明 [日本分子生物学会第 10 回春期シンポジウム; 2010 年 6 月/東京]
 18. 仁科博史; 小型魚類メダカを用いた肝臓左右性決定機構の解明 [第 17 回肝細胞研究会; 2010 年 6 月/秋田]
 19. 山崎世和、仁科博史; ストレス応答性キナーゼ MKK7 欠損マウスにおける脳形成異常 [第 9 回生命科学研究会; 2010 年 6 月/筑波]
 20. 平山順、仁科博史; 細胞死制御因子 DAXX による分子時計制御 [第 9 回生命科学研究会; 2010 年 6 月/筑波]
 21. 浅岡洋一、仁科博史; ストレス応答性 JNK シグナル伝達系のゼブラフィッシュ初期胚における役割 [第 16 回小型魚類研究会; 2010 年 9 月/埼玉]
 22. 長井陽子他; LIM ファミリータンパク質 Ajuba は初期発生過程の繊毛形成に関与する [第 16 回小型魚類研究会; 2010 年 9 月/埼玉]
 23. 宮村憲央、仁科博史; プロトオンコジーン YAP による肝細胞増殖誘導法の開発 [第 13 回日本肝臓医生物学研究会; 2010 年 10 月/札幌]
 24. 大谷智実他; ゼブラフィッシュ培養細胞を用いた概日リズムの光同調機構の解析 [第 9 回ファーマバイオフォーラム; 2010 年 10 月/京都]
 25. 尾崎友美他; DNA 損傷応答における概日リズムの役割 [第 9 回ファーマバイオフォーラム; 2010 年

10月／京都]

26. 下村忠範他; ストレス応答性 JNK シグナル経路による概日リズム制御因子 PER2 の機能制御 [第9回ファーマバイオフォーラム; 2010年10月／京都]
27. 仁科博史; マウスやメダカを用いた肝形成機構の解明 [北里大学セミナー; 2010年10月／東京]
28. 仁科博史; 小型魚類メダカを用いた肝形研究 [第22回分子糖尿病研究会; 2010年12月／東京]
29. 仁科博史／高橋良輔世話人ワークショップ; 小型魚類メダカやゼブラフィッシュを用いた疾患研究 [BMB2010; 2010年12月／神戸]
30. 山崎世和他; ストレス応答性キナーゼ MKK7 欠損マウスにおける脳形成異常 [BMB2010; 2010年12月／神戸]
31. 仁科博史; 小型魚類ゼブラフィッシュおよびメダカを用いた器官形成機構の解明 [徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部セミナー; 2010年12月／徳島]

3. その他

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

ナシ

2. 実用新案登録

ナシ