

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

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

研究分担者：河田純男 山形大学医学部消化器内科学 教授

研究分担者：齋藤貴史 山形大学医学部消化器内科学 准教授

研究要旨：

【目的】肝再生を目的として、肝硬変患者に対する自己骨髄細胞移植（Autologous Bone Marrow Cells Infusion: ABMi）療法の有用性が報告されている。本研究の目的は、アルコール性肝硬変患者に対する ABMi 療法の有効性を検討することである。

【方法】肝炎ウイルス慢性持続感染のないアルコール性肝硬変 6 例を対象とし、山口大学チームより技術サポートを得て、当大学医学部附属病院において、ABMi 療法を施行した。ABMi 療法施行後、禁酒が守られ 24 週間を経過した 5 症例について、肝機能改善効果、肝線維化マーカーの経過、等について、ABMi 療法施行前後の 24 週間（計 48 週間）について検討した。患者背景の合致したアルコール性肝硬変 5 症例を対照（コントロール）とした。

【成績】アルコール性肝硬変患者では、ABMi 療法後、24 週間の経過経過中、血清アルブミン値、総蛋白およびプロトロンビン活性の有意な改善が認められた。これらの肝機能検査値の有意な変動は、ABMi 療法前の禁酒期間、対照群では全観察期間を通じて、認められなかった。血清線維化マーカーとして用いた 4 型コラーゲン 7 S 値は、ABMi 療法を施行した 5 例中 4 例で、低下が認められた。

【考案】アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法が、肝機能改善効果（血清アルブミン、総蛋白、プロトロンビン活性）と肝線維化マーカー改善効果（4 型コラーゲン 7 S）を有することが、今回の症例対照研究により示された。

共同研究者

奥本和夫 山形大学医学部消化器内科学 助教

芳賀弘明 山形大学医学部消化器内科学 助教

A. 研究目的

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝硬変患者の生命予後の改善のために早急に行う必要がある。骨髄内には multipotent progenitor cell の存在が知られており、私たちは、これまでの *in vitro* における研究において、ラット骨髄細胞の肝様細胞への分化や増殖が可能であることを示してきた（J Hepatol 2005; 43: 110-116, J Gastroenterol 2006; 41: 62-69）。また、肝障害モデルでは、骨髄細胞移植による肝再生ならびに線維化改善効果が確認されている。近年、肝再生を目的とした肝硬変患者に対する自己骨髄細胞移植（Autologous Bone Marrow Cells Infusion: ABMi）療法が、主に C 型肝

炎ウイルスによる非代償性肝硬変患者に対して施行され、24 週間の術後経過において Child-Pugh スコアや血清アルブミン値などの肝機能検査値全般の改善が報告されている（Terai S et al. Stem Cell 2006）。

私たちは、肝炎ウイルス慢性持続感染のない、アルコール性肝硬変症では、本療法の肝機能改善効果がウイルス性肝疾患よりも期待出来るものと考え、アルコール性肝硬変患者に対する ABMi 療法を、山口大学チームとともに当大学医学部附属病院で施行してきた。今年度は、昨年度までの研究成果を踏まえ、ABMi 療法を施行された症例の 24 週間にわたる臨床データを集積し、アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法の有効性について検討を行った。また、アルコ

ール性肝障害には禁酒による臨床データの改善も見込まれるため、ABMi療法による臨床効果を正確に評価する目的で、患者背景の合致したアルコール性肝硬変患者を対照として、症例対照研究を行った。

B. 研究方法

1. アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法

対象は、アルコール性肝硬変患者とし、肝生検にて肝硬変 (F4) が確認され、かつ、総ビリルビン値 3.0 mg/dl 未満、血小板数 50,000/ μ l 以上、画像検査で肝細胞癌がなく、腹水や脳症がコントロールされ心肺機能良好で全身麻酔が可能な患者、とした。また、ABMi療法施行前に6か月間以上の禁酒を確認できた症例を適格とした。自己骨髄細胞は、全身麻酔下で 400ml の骨髄液を採取し、洗浄後に静脈内投与を行った。平成 22 年度までに 6 例 (男性) に施行した。ABMi療法施行後の 24 週間の経過観察中に飲酒により脱落した 1 例を除外し、5 例を解析対象とした。対照 (コントロール) として、年齢、性別、血清アルブミン値、プロトロンビン活性、服薬内容、等の合致するアルコール性肝硬変 5 症例を用いた。

本研究は、山形大学医学部倫理委員会で承認され、本治療法の施行に際し患者から文書で同意を得た。

C. 研究結果

1. アルコール性肝硬変に対する ABMi 療法

(1) 肝機能検査値に及ぼす効果

血清アルブミン値、総蛋白およびプロトロンビン活性について、検討を行った。ABMi療法施行群 (5 例) では、血清アルブミン値は、移植前 (3.3 ± 0.2 g/dl) に比し移植 24 週後 (3.8 ± 0.2 g/dl) ($P < 0.05$)、総蛋白は、移植前 (6.9 ± 0.2 g/dl) に比し移植 24 週後 (7.7 ± 0.1 g/dl) ($P < 0.05$)、プロトロンビン活性は、移植前 (76.6 ± 6.1 %) に比し移植 24 週後 (87.6 ± 6.0 %) ($P < 0.01$)、にそれぞれ有意な上昇が見られた。一方、対照群では、観察期間中に、これら検査値の有意な変動は認められなかった (図 1)。

(2) Child-Pugh スコアに及ぼす効果

Child-Pugh スコアは、移植前 (6.8 ± 1.3) に比し移

植 24 週後 (5.8 ± 0.8) に低下が認められた。特に、Child-Pugh スコアが 7 点以上のクラス B に分類された 3 例では全例でスコアの低下が認められた (図 2)。

(3) 血清肝線維化マーカーに及ぼす効果

4 型コラーゲン 7 S 値は、5 例中 4 例で低下した。その血清レベルは、移植前 (10.0 ± 3.9 ng/ml) に比し移植 24 週後 (8.1 ± 2.3 ng/ml) に低下が認められた (図 3)。

D. 考 察

アルコール性肝硬変症例を対象として、ABMi療法の効果についての検討を行った。本療法の有効性の検討に際しては、禁酒効果との比較も必要であるため、患者背景の合致する対照群を設定して、解析を行った。

アルコール性肝硬変患者に対する ABMi療法の短期的な有効性については既に報告してきたが、本研究により、ABMi後 24 週間にわたり、血清アルブミン値、総蛋白、プロトロンビン活性、等の肝機能改善効果が維持されることが示された。これらの改善は、禁酒のみでは見られないことから、ABMi療法はアルコール性肝硬変患者の肝機能改善に有用であると思われる。Child-Pugh スコアについて、ABMi療法を施行した 5 例において、前後のスコアを比較すると、2 例 (いずれもクラス A) が不変、3 例 (いずれもクラス B) が低下していたことから、ABMi療法は Child-Pugh スコアの改善にも有用であることが示された。肝臓線維化マーカーは、前後において、ABMi療法 5 例中 4 例に改善が認められた。

本研究により、ウイルス持続感染の影響がないアルコール性肝硬変において、ABMi療法は、禁酒が守られた場合には良好な肝機能の持続的改善が得られ、良い適応であることが示された。しかしながら、症例により、その効果の発現程度には差異が見られる。その一因として ABMi療法により投与された自己骨髄細胞が、側副血行路により有効に肝に到達できない可能性が推測される。また、症例間で、肝臓内における接着因子等の発現程度の相違、肝障害の程度

の差による増殖因子等の発現程度の相違、等が、ABMi療法の臨床効果に差異を生ずる原因となっている可能性もある。今後、自己骨髄細胞がアルコール性肝硬変患者の肝機能改善に関わる分子メカニズムについて、更に研究を進める必要があるものと思われた。

E. 結 論

症例対照研究により、ABMi療法には、禁酒のみでは得られない、良好な肝機能改善効果（血清アルブミン、総蛋白、プロトロンビン活性）と肝線維化マーカー改善効果（4型コラーゲン7S）があることが示された。ABMi療法の効率性の向上と手技の改善について、更なる検討を要する。

F. 研究発表

1.論文発表

- 1) Hattori E, Shu HJ, Saito T, Okumoto K, Haga H, Yokozawa J, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S: Expression of the RNA-binding protein Musashi1 in adult liver stem-like cells. *Hepatol Res* 2010; 40: 432-437
- 2) Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S: Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2010; 82: 1364-1370
- 3) Nishise Y, Saito T, Makino N, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Ikeda C, Kubota I, Daimon M, Kato T, Fukao A, Kawata S: Relationship between alcohol consumption and serum adiponectin levels: The Takahata Study - A cross-sectional study of a healthy Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 3828-3835

- 4) Nishise S, Takeda Y, Fujishima S, Orii T, Sato T, Sasaki Y, Nishise Y, Takeda H, Kawata S: Release of interleukin 1 receptor antagonist by combining a leukocyte adsorption carrier with ulinastatin. *Ther Apher Dial* 2010; 14: 386-391
- 5) Orii T, Takeda H, Kawata S, Maeda K, Yamakawa M: Differential immunophenotypic analysis of dendritic cell tumours. *J Clin Pathol.* 2010; 63:497-503

2.学会発表

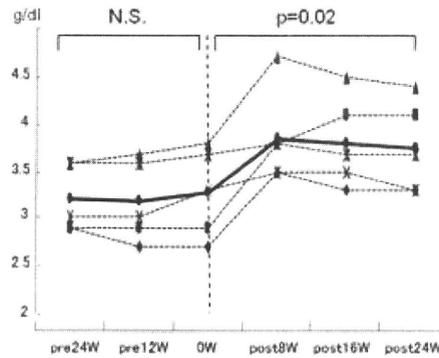
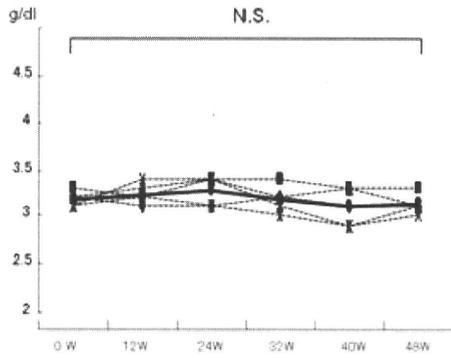
- 1) Okumoto K, Saito T, Haga H, Ishii R, Sanjo M, Ito JI, Nishise Y, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S: The serum level of b-FGF in hepatitis C patients and its prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. 18th United European Gastroenterology Week (UEGW2010), Barcelona, Spain; October 2010
- 2) 奥本和夫、斎藤貴史、芳賀弘明、河田純男、他：骨髄細胞由来肝様細胞の樹立と移植による肝再生療法についての検討。第9回日本再生医療学会総会，広島；2010年3月
- 3) 奥本和夫、斎藤貴史、芳賀弘明、河田純男、他：肝再生における Stem Cell Factor (SCF) の役割についての検討。第46回日本肝臓学会総会，山形；2010年5月
- 4) 斎藤貴史、奥本和夫、河田純男：アルコール性肝硬変症に対する自己骨髄移植療法の有用性（ワークショップ：肝再生医学—臨床応用を目指した研究の新展開）、第46回日本肝臓学会総会、山形、2010年5月
- 5) 芳賀弘明、斎藤貴史、奥本和夫、河田純男、他：FGF2の肝再生における役割についての検討。第46回日本肝臓学会総会，山形、2010年5月

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

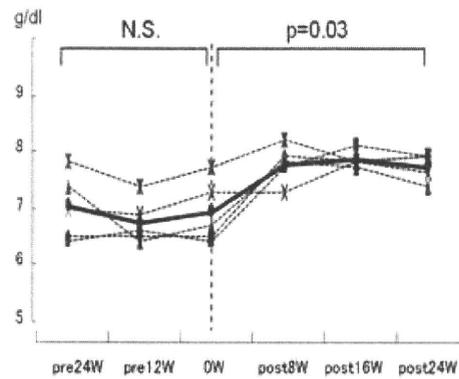
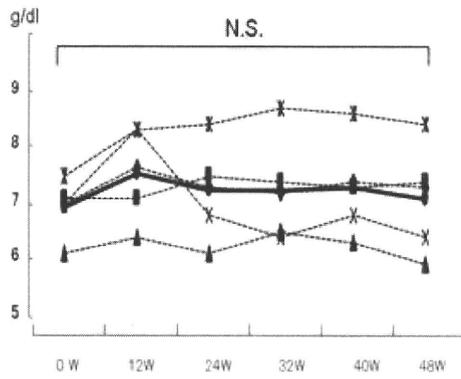
- 1.特許取得
 2. 実用新案登録
- なし。

図 1 肝機能検査値の変動

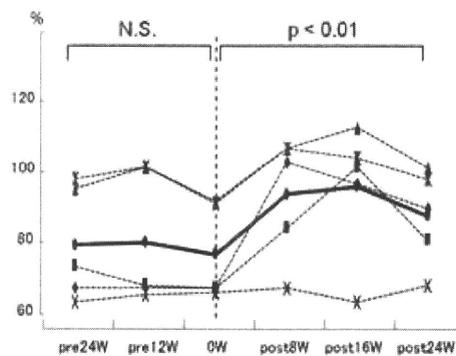
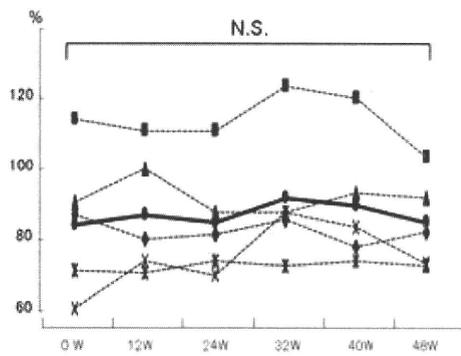
A Serum Albumin



B Total Protein



C Prothrombin Time



Controls

- ◆ control 1 ■ control 2 ▲ control 3
- × control 4 × control 5 ● average

ABMi cases

- ◆ case 1 ■ case 2 ▲ case 3
- × case 4 × case 5 ● average

図 2 Child-Pugh スコアの変化 (ABMi 症例)

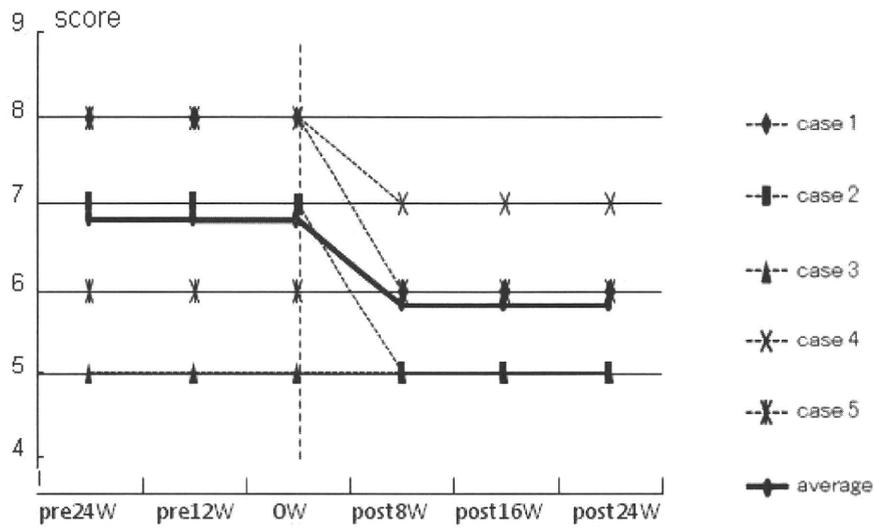
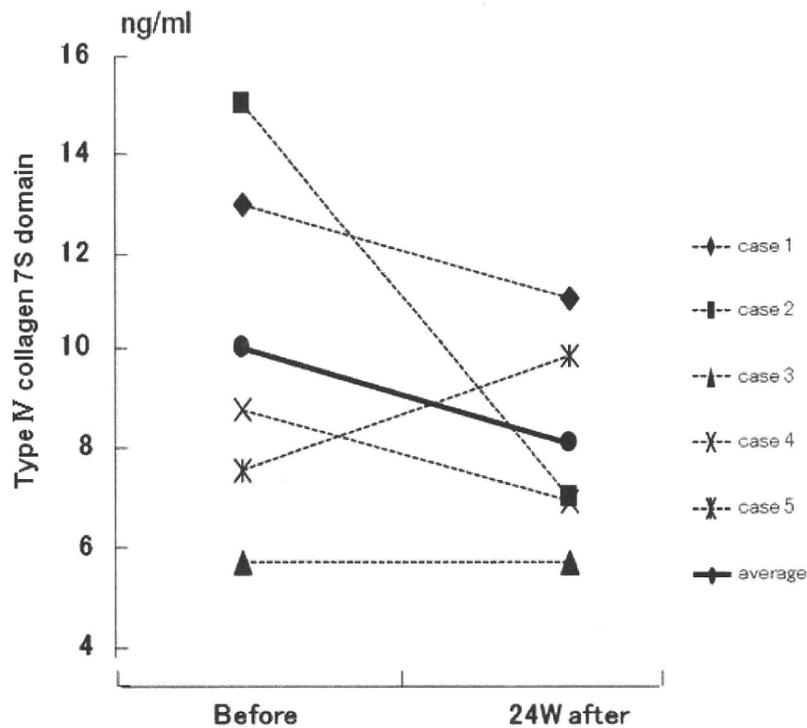


図 3 4型コラーゲン7Sの変化 (ABMi 症例)



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

骨髓細胞における HBV HCV の動態の解明に関する研究

研究分担者 梅村武司 信州大学医学部消化器内科 講師

研究要旨：【目的】

肝硬変症に対する自己骨髓細胞投与[Autologous Bone Marrow Cell Infusion (ABMI)]療法は患者本人の骨髓細胞を採取して注入する治療である。本邦における肝硬変患者の8割以上がB型肝炎ウイルス(HBV)もしくはC型肝炎ウイルス(HCV)が原因である。昨年度は末梢血単核球中 HCV RNA の定量系を確立した。本年度は末梢血単核球中の HBV DNA に加えて HBV RNA の測定を行い、骨髓細胞での HBV の動態を解析するための方法として確立することを目標とした。

【方法】

慢性 B 型肝炎患者の末梢血単核球から採取された DNA、RNA を用いてリアルタイム PCR、RT-PCR をそれぞれ施行して HBV-DNA と HBV-RNA を測定した。

【成績】

末梢血単核球中の HBV DNA、HBV RNA はそれぞれ 10^2 - 10^5 copies/ 10^6 PBMCs を定量する事が可能であった。

【考案】

末梢血単核球中の HBV DNA、HBV RNA の定量は可能であり、来年度は ABMI療法の際に採取される骨髓細胞中の HCV RNA、HBV DNA、HBV RNA の測定を行う予定である。

共同研究者

松本晶博 信州大学医学部内科学第二・講師

田中榮司 信州大学医学部内科学第二・教授

A. 研究目的

非代償性肝硬変症に対する自己骨髓細胞投与 [Autologous Bone Marrow Cell Infusion (ABMI)] 療法は、患者本人の骨髓液を採取して、これを濃縮洗浄後に末梢静脈より投与する治療であり、施行後に肝機能の改善が認められる。本邦における肝硬変患者の8割以上がウイルス肝炎であり、B型肝炎ウイルス(HBV)またはC型肝炎ウイルス(HCV)感染が原因である。このため、ABMI療法を行う上で、骨髓細胞におけるこれら肝炎ウイルスの増殖状態を知ることが重要である。昨年度は末梢血単核球(PBMCs)を用い、細胞中 HCV RNA の測定系を開発しており、本年度は HBV 核酸の測定系について検討を行った。ABMI療法が必要となる B 型肝硬変患者では通常 HBV の増殖を強力に抑える核酸アナログ薬が使用されて

おり、肝内での cccDNA は残存しているものの血中 HBV DNA は感度以下となることが多い。このため、核酸アナログ投与中においても肝細胞内の cccDNA 量を反映すると考えられる HBV-RNA 量の測定系を開発した。これらのウイルスマーカーを駆使し、骨髓細胞中での HBV 増殖の動態を解明することが目的である。

B. 研究方法

PBMCs は 6 例の B 型慢性肝炎患者から採取された検体を用い、QIAGEN AllPrep DNA/RNA Mini Kit にて総核酸を抽出した。

HBV DNA の測定は、プライマーを HBV 遺伝子の S 領域に設定しリアルタイム PCR 法にて定量的に測定した。HBV RNA の測定は、最初に DNase にて HBV DNA を処理後、RT にて HBV RNA から cDNA を作成してからリアルタイム PCR 法にて測定した。ポジティブコントロールとして genotype C の HBV DNA を pCU19 に組み込んだものを使用した。

C. 研究結果

今回開発した測定系を用いると、血清中の HBV DNA と HBV RNA はともに 10^2 - 10^{10} copies/mL の範囲で定量的測定が可能であった。一方、PBMCs 中の HBV DNA は 10^2 - 10^5 copies/ 10^6 PBMCs、HBV RNA は 10^2 - 10^5 copies/ 10^6 PBMCs で可能であった。

D. 考 察

自己骨髄細胞投与療法の対象となる非代償性 B 型肝炎患者では核酸アナログ薬がすでに投与されている可能性が高く、HBV 感染の病態を明らかにするには HBV DNA の測定のみでは不十分である。これは、核酸アナログ薬投与下では、HBV 複製の元となる細胞中の cccDNA 量を血清中 HBV DNA 量が反映しないためである。このため、今回の研究では、核酸アナログ薬投与下においても cccDNA 量を反映する HBV RNA 量測定法の開発を行った。これまでも HBV RNA の測定法は報告されているが、HBV DNA との同時測定であったり、感度と定量域が不十分であったりしていた。

リアルタイム PCR 法を用いた HBV DNA の測定法では 2 log copies/ml 程度の感度が限界であり、今回の測定系でもこの感度が担保された。HBV RNA の測定では DNase 処理や RT の課程が余分に存在するため、DNA よりも感度が低下することが心配されたが、今回の測定系では 2 log copies/ml の感度をほぼクリアすることができた。また、定量域も 10 log copies/ml と十分広い範囲で測定することが可能であった。

B 型肝炎患者の PBMCs 中の HBV DNA と HBV RNA の測定が可能であることが判明した。測定系の感度・特異度が安定しており骨髄球中のウイルス量の測定も可能と考えられる。

E. 結 論

今回開発した HBV RNA 測定系は感度、特異性、定量域の広さに優れ、自己骨髄細胞投与療法の対象とな

る非代償性 B 型肝炎患者のウイルス学的な病態解明に有用であると考えられる。

研究発表

1. 論文発表

1) Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, Kamiyo A, Joshita S, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Ota M, Tanaka E. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. J Infect Dis in press

2. 学会発表

1) Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, Kamiyo A, Joshita S, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Ota M, Tanaka E. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. The 7th APASL Single Topic Conference Makuhari, Japan, December 17, 2010

2) 梅村武司、米田傑、松本晶博 C 型肝炎の PEG-IFN/RBV 併用療法におけるサイトカイン・ケモカイン測定の意義 第 14 回日本肝臓学会大会 横浜 平成 22 年 10 月 14 日

3) 梅村武司、清澤研道、田中榮司 de novo B 型肝炎における HBV 遺伝子型および遺伝子変異と予後との関連 第 46 回日本肝臓学会総会 2009 年 5 月 27 日 山形

4) Umemura T, Kiyosawa K, Tanaka E, and the Japan de novo hepatitis group. Clinical and virological features of patients with fulminant hepatic failure due to hepatitis B virus reactivation from HBsAg-negative status. EASL 2010, Vienna, Austria, 2010. 4.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 今回の研究内容についてはなし。
2. 実用新案登録
3. その他

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

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

研究分担者 国立国際医療センター研究所 細胞組織再生医学研究部 大河内仁志

研究要旨：

【目的】

皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞の投与による肝硬変に対する効果の検討

【方法】

マウスに四塩化炭素を週2回8週間にわたって反復投与し、肝硬変モデルを作成した。薬剤投与開始4週間後にマウス皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞の投与し、その4週間後に採血ならびに肝臓組織を採取して、血液生化学検査と組織学的検査を行った。その際、移植細胞数、移植回数、移植経路等を検討した。SCIDマウスに肝硬変を作製して、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞を移植した。

【成績】

培養しない新鮮な細胞を肝硬変モデルマウスに移植した群では生化学検査においてビリルビン値以外に有意な改善は認められなかったが、組織学的に一部に線維化の軽減がみられた。培養した細胞を移植した場合には移植細胞数や移植回数を増やしても有意な差は認められなかった。SCIDマウスにヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞を培養した後、移植した群では有意にALPの低下がみられたが、静脈から細胞を投与した場合には多くの移植細胞が4週間後にも肺に認められた。脾臓経由で移植した場合には5日後に肝臓に移植細胞を検出した。

【考案】

肝硬変モデルマウスに対する細胞移植実験では組織学的に一部抗線維化作用がみられたが、培養細胞での抗線維化作用ははっきりしなかった。静脈内に細胞を投与すると長期間肺に存在する可能性が示唆されたので、留意すべき点であると思われる。

A.研究目的

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝硬変症患者の救命のために喫緊の課題である。肝硬変患者に対する自己骨髄細胞を用いた細胞移植療法の効果が報告されており、特に骨髄細胞の抗線維化作用が注目されている。骨髄には造血幹細胞以外に多能性をもつ間葉系幹細胞の存在が知られている。一方脂肪組織にも骨髄と同様に多分化能をもつ間葉系幹細胞が存在するので、肝硬変の治療に使えるのではないかと考えた。これまでに我々は脂肪由来の間葉系幹細胞はマウスの急性肝炎モデルに投与をすると効果があることを確認している。そこで今回はマウスの肝硬変モデルを作成して、脂肪由来の間葉

系幹細胞を移植した場合の効果を検討することを目的とした。

B.研究方法

脂肪組織由来の間葉系幹細胞の分離

マウス（C57BL/6Njcl, ♀ 10週齢）の鼠径部の脂肪塊を摘出して phosphate buffered saline (PBS) で洗浄して、control medium [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, low-glucose; GIBCO) + 10% fetal calf serum (FCS; GIBCO) + 1% penicillin-streptomycin (SIGMA)] の入った dish に移した後、メスで 2~3 mm まで細かく刻み、CO₂ incubator 内で 1 時間培養した。脂肪塊を遠心 (1,300 rpm, 6 min, room temperature) し、液体

を吸引し、0.12 % type1 collagenase (Wako) を加え、37 °Cで振盪 (30 min) し、細胞を解離した。解離した細胞に control medium を加え、遠心 (1300 rpm , 6 min , room temperature) し、上清及び沈まなかった細胞を吸引した。

ヒトの脂肪組織からも同様に細胞を分離したが、術前に書面による同意の得られた患者からの検体を用いた。

細胞培養

細胞を control medium で resuspend し、40 μ m filter を通した後、 1×10^6 / 10 cm dish に播種した。培地交換は 2 日に 1 回行い、1 週間後にトリプシン処理して再播種した。細胞を Passage 5 まで培養を続けた後、control medium + 10 % dimethyl sulphoxide (DMSO) (SIGMA) 内に移し液体窒素中で凍結保存するか、または実験に使用した。

肝硬変モデルマウスの作製と移植実験

C57/BL6 マウスに四塩化炭素を週 2 回 8 週間にわたって反復投与し、肝硬変モデルを作成した。薬剤投与開始 4 週間後に同系マウスより皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞を移植した。その 4 週間後に採血ならびに肝臓組織を採取して、血液生化学検査 (AST, ALT, Alb, T-Bil, LDH, ALP) と組織学的検査を行い、細胞移植をしなかった群と比較検討した。移植条件では以下の検討を行った。

- 1) 1 回の移植細胞数 : 100 万個、200 万個、300 万個
- 2) 移植回数 : 単回投与、毎週 1 回計 4 回
- 3) 移植経路 : 静注、脾臓内
- 4) 移植前に HGF などのサイトカイン処理をしてから移植

SCID マウスに肝硬変を作製して、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞を移植して、効果を検討した。

研究結果

培養しない細胞を肝硬変モデルマウスに移植

マウスの新鮮な脂肪由来の細胞を移植した群では総ビリルビン値は対照群 (PBS) に比べて有意に低下がみられたが、AST, ALT, Alb, LDH, ALP には有意差がみられなかった。移植細胞数は 100 万個と 300 万個でも大きな差は認められなかった。肝臓組織の組織染色標本を作製したが、対照群では肝硬変に特徴的な線維化像がみられた。シリウスレッドによる線維組織の染色面積を比較したが、新鮮な細胞移植群において一部線維化の改善を示す所見がえられた。投与回数による大きな違いは得られていない。

培養した細胞を肝硬変モデルマウスに移植

脂肪由来の間葉系幹細胞を培養して上記の肝硬変モデルに尾静脈から投与する実験を行った。培養細胞は細胞のサイズが大きくなるため、ヘパリンを同時投与することで 100-150 万個の培養した細胞を移植することができた。200 万個以上の投与は困難であった。移植後 4 週間の採血並びに組織の検討を行ったが、対照群と比較して有意な差は得られていない。移植経路を検討するために 100 万個の移植細胞を静注と脾臓内直接注入で比較した。移植後 5 日では静注の場合、圧倒的に肺に移植細胞が存在していたが、脾臓注入では肺には全く移植細胞が認められず、脾臓と肝臓に移植細胞が多く存在した。移植前に HGF などのサイトカイン処理をしてから移植してみたが、明らかな線維化改善を認めることはできなかった。

培養したヒト細胞を肝硬変モデルマウスに移植

SCID マウスに肝硬変を作成し、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞 (P5-10) を 150 万個、尾静脈より移植した群では有意に ALP の低下がみられた。AST, ALT, Alb, T-Bil, LDH には有意差がみられなかった。シリウスレッドによる線維組織の染色面積を比較したが、これまでのところ細胞移植群において有意な線維化の改善を示す所見は得られていない。細胞移植後 4 週間でも、組織学的に移植細胞が肝臓よりも肺に多く存在していた。

考 察

今回の細胞移植実験では、マウス肝硬変モデルを用いて種々の条件で細胞を投与した。昨年度の検討において血液生化学検査にて移植群に改善がみられたことから、移植細胞による何らかの効果がみられたと考え、今年度はより効果的な移植条件の検討を行った。骨髄細胞の移植実験においては移植細胞数が10倍から100倍も多いことを考慮すると、効果を上げるには投与細胞数を増やす必要があると思われた。移植細胞数を増やしたり、移植回数を複数回にしてみたが、血液生化学検査にて大幅な改善は認められなかった。手技的に骨髄細胞と同数の新鮮な細胞を脂肪から確保することは難しく、一方で培養すると、細胞はサイズが大きくなることにより、静脈から移植する場合には移植細胞数として150万個程度が限界のように思われた。新鮮な細胞を移植した場合に線維化組織の改善が一部で認められたが、血清の生化学データを改善するほどの効果をもってはならず、まだ十分とはいえない程度である。移植細胞の生着も検討したが、4週間後に肝臓で移植細胞の存在を検出できたが、肺により多くの細胞が存在していたことから、今後ヒトに応用する場合には留意しなければならない点になると思われた。移植細胞を肝臓へより多く到達させるためには静脈を経由するよりも脾臓に直接投与した方が有効である結果が得られた。マウスでは固有肝動脈から細胞を投与することが手技的に不可能なので、今回検討することはできなかったが、ヒトでは固有肝動脈からのカテーテルによって細胞投与も可能なので、一考の余地があると思われる。

E. 結 論

細胞移植実験では脂肪由来の細胞を移植した群において血液生化学的に一部改善が認められ、組織学的にわずかに抗線維化作用を認めたが、必ずしも満足できるレベルに達しているとはいえないので、今後さらなる検討が必要と思われる。

研究発表

1.論文発表

1. Konno M, Hamazaki TS, Fukuda S, Tokuhara M, Uchiyama H, Okazawa H, Asashima M, Okochi H. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. **Biochem Biophys Res Commun.** 400:461-5, 2010

2.学会発表

大河内仁志 教育講演12 皮膚の再生医療：現状と展望 皮膚の幹細胞と再生医療 第109回日本皮膚科学会総会、4月、大阪、2010

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

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

研究分担者

酒井 佳夫

研究要旨：

【目的】

脂肪組織由来間質細胞は、間葉系幹細胞を含む細胞群であり、骨髄細胞とともに、肝再生療法への細胞治療への応用が期待されている。今回、脂肪組織由来間質細胞の経脾経門脈による肝再生療法検討のための基礎的実験を行った。

【方法】GFPトランスジェニックマウス皮下脂肪組織より間質細胞を分離、培養し、脂肪組織由来間質細胞を獲得した。獲得した細胞を、C57Bl/6 マウスに経脾経門脈投与し、肝、肺、脾、腎組織における GFP 陽性細胞の分布、生着日数を免疫染色にて検討した。また、肝硬変モデルの確立のため、C57Bl/6 マウスに高脂肪動脈硬化食を投与し非アルコール性脂肪肝炎モデルを作成、アルブミン発現、 α -フェトプロテイン発現をリアルタイム定量 PCR にて検討した。

【成績】

C57Bl/6 マウスに経脾経門脈投与した GFP 発現脂肪組織由来間質細胞は、主に肝への分布集積を認め、一部肺への集積も認めた。経時的に肝における生着を評価したところ、14 日間生着が認められた。C57Bl/6 マウスに 24 週間高脂肪動脈硬化食を投与した場合、普通食投与マウスと比較して、肝実質細胞の AFP 発現に差は認めなかったが、アルブミンの発現低下を認めた。

【考案】マウス皮下脂肪組織由来間質細胞を経脾経門脈投与した場合、肝組織に 2 週間生着することを確認した。非アルコール性脂肪肝炎、肝硬変モデルでは、肝実質細胞のアルブミン発現量が低下していることを確認し、このモデルを用いて、今後脂肪組織由来間質細胞を用いた肝硬変に対する再生療法の検討を行う準備が整った。

A.研究目的

肝硬変患者においては、持続する慢性炎症のために肝不全へと進展し、その根治的治療法は肝移植が唯一である。しかしながら、ドナー不足のため、わが国では生体肝移植が主に行われているが、問題が多い。肝不全への進展を阻止するため、肝再生療法が期待されている。骨髄、脂肪組織は間葉系組織とよばれ、間質細胞には肝細胞への分化能を有する間葉系幹細胞が豊富に存在する。そのため、これらの間質細胞を用いた肝再生療法の可能性が注目されている。本研究では、肝へより直接細胞が到達する血管を経た脂肪組織由来間質細胞の肝再生療法の検討のための、基礎的検討を行った。

B.研究方法

GFP トランスジェニックマウスの皮下脂肪組織より間質細胞を分離、継代した。C57Bl/6 マウスに対して、Pentobarbital 麻酔下開腹のもと、 1×10^7 個あるいは 1×10^5 個の GFP 発現脂肪組織由来間質細胞を経脾経門脈投与し、肝、肺、脾、腎への分布、また、肝内生着

についての経時的評価を、免疫染色にて行った。マウスを用いた肝再生療法の基礎的検討のため、C57Bl/6 マウス(♀、6 週)に対して、高脂肪動脈硬化食を 24 週間投与し、肝硬変モデルの作成を試みた。投与 24 週間後におけるマウスの肝組織を採取、肝実質細胞を分離、RNA を抽出し、リアルタイム定量 PCR にて、 α -フェトプロテイン、アルブミンの産生を評価した。

C.研究結果

C57Bl/6 マウスへ 1×10^7 個の GFP 発現脂肪組織由来間質細胞を経脾経門脈投与し、30 分後に肺、肝、脾、腎を摘出し、免疫染色にて GFP 陽性細胞の分布を検討したところ、投与部位の脾の他は、肝に主に集積し、肺にも分布を認めた。腎への集積は認められなかった。 1×10^5 個の GFP 発現脂肪組織由来間質細胞を経脾経門脈投与し、3 日後(n=2)、7 日後(n=3)、14 日後(n=2)まで肝組織における GFP 陽性細胞の有無を検討したところ、14 日まで肝内に GFP 陽性細胞が確認された。24 週間高脂肪動脈硬化食を投与した C57Bl/6 マウスの肝実質細胞は、普通食を投与したマウスの肝実質細胞と比

較して、 α -フェトプロテインは同程度であったが、アルブミンの産生は、減弱していた。

D. 考 察

本検討によって、経脾経門脈投与したマウス脂肪組織由来間質細胞は、主に肝組織に集積し 14 日間生着することが確認された。高脂肪動脈硬化食を 24 週間与えたマウスの肝実質細胞のアルブミン産生能は減弱しており、肝再生療法を検討する慢性肝疾患、肝硬変のモデルとして用いることが可能と考えられた。

E. 結 論

マウス脂肪組織由来間質細胞を経脾経門脈投与した場合、肝に 14 日間良好に集積することを確認した。高脂肪動脈硬化食の投与による非アルコール性脂肪肝炎マウスモデルを作成し、慢性肝疾患に対する肝再生療法検討の、前臨床モデルとして用いることが可能と考えられた。

研究発表

1.論文発表

本年度、本研究課題に関する発表はございません。

2.学会発表

本年度、本研究課題に関する発表はございません。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

本年度、本研究課題に関する出願・登録はございません。

2. 実用新案登録

本年度、本研究課題に関する出願・登録はございません。

3. その他

特記事項ございません。

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

NASH モデルマウス解析

研究分担者 小川 佳宏

研究要旨：

【目的】

非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）はしばしばメタボリックシンドロームに合併し、高率に肝硬変・肝癌に進展する病態として注目されているが、ヒト NASH の臨床病態を再現できる動物モデルが存在しないことが問題となっている。我々は既に、メラノコルチン 4 型受容体（MC4R）欠損マウスに対する 20 週間の高脂肪食負荷により、肥満、糖脂質代謝異常、高レプチン血症に加え、ヒト NASH に特徴的な肝組織像（肝細胞風船様変性、肝細胞周囲性線維化）や肝星細胞の活性化が起きることを確認している。本研究では、MC4R 欠損マウスの NASH モデルとしての有用性を検討するとともに、NASH 病態形成におけるマクロファージの意義を検討した。

【方法・成績】

MC4R 欠損マウスに 1 年間の長期間高脂肪食負荷を行ったところ、肝線維化の進行とともに、検討をおこなった全個体（5/5）において AFP 陽性の肝細胞癌を発症することを見出した。さらに、クロドロネートリポソーム法を用いてマクロファージを選択的に消去し、肝臓における炎症・線維化に対する効果を検討した。野生型マウスと比較して MC4R 欠損マウスではマクロファージ消去効果が減弱しており、NASH の病態形成過程におけるマクロファージの機能変化が示唆された。

【考案】

MC4R 欠損マウスは 20 週間の高脂肪食負荷により肥満・糖脂質代謝異常とヒト NASH 様の肝病変を呈し、1 年間の負荷によって肝細胞癌への進展することが明らかとなった。また、NASH 発症過程においてマクロファージの機能に変化が起きている可能性が示唆された。

共同研究者 菅波 孝祥 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野
伊藤 美智子 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野

A. 研究目的

非アルコール性脂肪性肝炎（NASH: non-alcoholic steatohepatitis）はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と考えられ、ときに肝硬変や肝癌へ進展する病態として注目されている。NASH の発症機構として、インスリン抵抗性や肝脂肪蓄積などの代謝障害（1st hit）とサイトカインや酸化ストレス、エンドトキシンなどの炎症性変化（2nd hit）の 2 段階より構成される「2 hit 仮説」が提唱されているが、各々の要因と病態形成の因果関係には不明の点が多い。また、NASH には感度・特異度の高いバイオマーカーがなく、確定診断や治療効果の判定には肝生検が必要であることが臨床上重要な問題である。従来の NASH 動物モデルは肥満/インスリン抵抗性と

肝線維化のすべてを併せ持つものがなく、NASH 研究における大きな障壁であった。我々は、摂食調節に関わるメラノコルチン 4 型受容体（MC4R: melanocortin 4 receptor）欠損マウスに対し高脂肪食を 20 週間負荷することにより、肥満、インスリン抵抗性、脂肪肝、肝線維化を呈する新たな NASH 動物モデルを確立した（論文投稿中）。本研究では、MC4R 欠損マウスに対する長期間高脂肪食負荷により NASH 様病変からの進展を検討した。また、NASH の病態形成では実質細胞である肝細胞と炎症性細胞・血管内皮細胞・肝星細胞などの間質細胞との相互作用が重要であると考えられる。特に肝臓には多数の常在性マクロファージであるクッパー細胞が存在し、その活性化が病態形成に関与すると言われて

いるため、MC4R 欠損マウスの肝病変におけるマクロファージの意義を検討した。

B. 研究方法

1. MC4R 欠損マウスに対する長期間高脂肪食負荷

8 週齢雄性 MC4R 欠損マウスおよび野生型マウスに対して 1 年間の高脂肪食負荷を行い、ad lib 条件下にサンプリングした。組織学的解析 (HE 染色、Sirius red 染色、AFP (α -fetoprotein) 免疫染色と遺伝子発現解析 (リアルタイム PCR 法) を施行した。

2. マクロファージ消去実験

クロドロネートリポソームの作成：鶏卵由来ホスファチジルコリンとコレステロールを用いてガラスチューブに脂質フィルムを作成し、デシケーターにて一晩乾燥させる。脂質フィルムにクロドロネート溶液を加え、十分ボルテックスをした後に、Extruder (Avanti 社) を用いて 400 μ m のメッシュを通す。10000 x g, 4°C, 15min 遠心し、パスツールピペットでリポソームを回収し、PBS に懸濁する。

マウスへの投与：8 週間高脂肪食負荷を行った MC4R 欠損マウス、および通常食あるいは高脂肪食負荷にて飼育した野生型マウスに対し、クロドロネートリポソームを MC4R 欠損マウスは 0.2ml、野生型マウスは 0.1ml ずつ静脈内に投与した。初回投与後 4 日目に再度投与、7 日目にサンプリングし、肝臓の組織学的解析と遺伝子発現を検討した。

C. 研究結果

1. MC4R 欠損マウスに対する長期間高脂肪食負荷

(1) NASH 様病変：1 年間の高脂肪食負荷を行うと、野生型マウスの肝臓においても炎症性細胞浸潤、肝細胞風船様変性が散見され、軽度の線維化が認められた。MC4R 欠損マウスではさらに顕著な炎症性細胞浸潤、肝細胞風船様変性が認められ、線維化面積の増加とともに架橋形成に近い所見も認められた。

(2) 肝線維化からの腫瘍発症：MC4R 欠損マウスでは検討をおこなった全個体 ($n=5$) に腫瘍形成を認め、HE 染色にて圧排性の増殖と被膜形成を認めた (図 1)。腫瘍内部の細胞では核/細胞質比の増大、

核の大小不同、脂質蓄積を認め、これらの細胞が不規則な索状構造を取り、正常な脈管構造は消失していた。さらに、肝細胞癌マーカーである AFP が陽性であり、高分化型肝細胞癌に一致する所見であった (図 1)。一方、野生型マウスでは同様の変化は認められなかった。

2. クロドロネートリポソームによるマクロファージ消去実験

(1) 野生型マウスに対する効果：野生型マウスに対してクロドロネートリポソームを投与すると、通常食群・高脂肪食群いずれにおいてもマクロファージマーカーである F4/80 陽性細胞がほぼ消失し、F4/80 遺伝子発現も著明に減少した。高脂肪食群では炎症性マーカー (TNF α : tumor necrosis factor α) と線維化マーカー (TGF β 1: transforming growth factor β 1, COL1A1, collagen α 1(I)) の発現が低下した。肝障害マーカーである ALT (alanine aminotransferase) はクロドロネートリポソーム投与によって変化がなかった。

(2) MC4R 欠損マウスに対する効果：MC4R 欠損マウスに対する 8 週間の高脂肪食負荷では、線維化形成は認められないものの、著明な脂質蓄積および炎症性変化が誘導されることを以前から確認している。この段階でクロドロネートリポソームを投与すると野生型マウスと比較してマクロファージの消失効率が弱く、炎症・線維化マーカーの発現も抑制されなかった。また、ALT はクロドロネートリポソーム投与によって増加傾向となった。

D. 考察

従来、食餌性肥満モデルでは線維化発症までに 1 年近い負荷が必要であり、四塩化炭素やメチオニン・コリン欠乏食では肥満を伴わないことが問題であった。また、これらのマウスでは肝癌の発症はなく、肝線維化から癌を発症する肝特異的 PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10) 欠損マウスや MAT1A (methionine adenosyltransferase 1A) 欠損マウスには肥満が認められない。MC4R 欠損マウスはこれらのすべての問題

点を克服した NASH モデルであると考えられる (図 2)。また、MC4R は主に中心神経系に発現し、肝臓には発現が認められないため、肝臓における脂質代謝・炎症・線維化が中枢を介して調節されている可能性が示唆される。さらに、NASH の発症過程ではマクロファージ機能に変化が起こっている可能性が示唆され、クロドロネートリポソーム投与の時期・期間を検討することで NASH の病態形成におけるマクロファージの役割の解明が期待される。

E. 結 論

MC4R 欠損マウスは高脂肪食負荷によって脂肪肝から肝線維化を発症するだけでなく、肝癌への進展を連続的に観察できる有用な系であり、従来の問題点を克服した全く新しいモデルである。本モデルを用いた解析から、NASH 病態形成過程におけるマクロファージの機能変化が示唆された。今後、NASH の発症・進展におけるマクロファージの病態生理的意義、特に、肝細胞や他の間質細胞との相互作用の解明、さらに中枢・脂肪組織など多臓器間相互作用の解明につながると考えられる。

研究発表

1.論文発表

1. A. Sato, H. Kawano, T. Notsu, M. Ohta, M. Nakakuki, K. Mizuguchi, M. Itoh, T. Suganami, and Y. Ogawa. Anti-obesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. **Diabetes** 59: 2495-2504, 2010.
2. T. Suganami and Y. Ogawa. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **J. Leukoc. Biol.** 88: 33-39, 2010.
3. N. Satoh, A. Shimatsu, A. Himeno, Y. Sasaki, H. Yamakage, K. Yamada, T. Suganami, and Y. Ogawa. Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone. **Diabetes Care** 33: e7, 2010.
4. 伊藤美智子、菅波孝祥、小川佳宏:「NASH と慢性炎症」*The Lipid* 21(3)247-251, 2010.

2.学会発表

1. M. Itoh, T. Suganami, N. Nakagawa, M. Tanaka, Y. Yamamoto, Y. Kamei, Y. Ogawa: “Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis.” Keystone symposia: Type 2 diabetes, insulin resistance and metabolic dysfunction and obesity. Keystone, Colorado, USA 2011.1.12-17
2. 小川佳宏:「肥満と慢性炎症」:第 31 回日本肥満学会, 2010.10.1-2, 群馬
3. 伊藤美智子、菅波孝祥、中川信貴、田中都、亀井康富、小川佳宏:「新しい NASH モデルとしての MC4R 欠損マウス」:日本肥満学会、前橋、2010.10.1-2
4. 小川佳宏:「メタボリックシンドロームと慢性炎症」:第 93 回日本消化器病学会中国支部例会, 2010.6.12, 山口

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

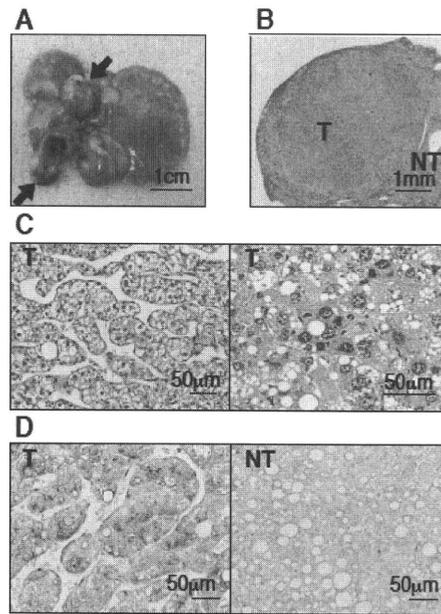
1.特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他



(図1) MC4R欠損マウスにおける肝癌発症
 A 肉眼所見 矢印: 腫瘍形成
 B, C HE染色 D α -fetoprotein染色
 T, tumor; NT, non-tumor

	負荷期間	体重増加	インスリン抵抗性	脂肪肝	肝線維化	発癌
肥満モデル						
<i>ob/ob</i>		+++	+++	++	-	-
<i>db/db</i>		+++	+++	++	-	-
食餌誘導性	> 1年	++	+	++	+	-
肝線維化モデル						
メチオニン・コリン欠乏食	8-12週	↓	-	+	++	-
四塩化炭素	4週	-	-	-	+++	-
肝特異的						
PTEN-KO		-	-	+	+	+
MAT1A-KO		-	-	+	+	+
MC4R-KO	20週	+++	++	+++	++	+

(図2) 既存のNASHモデルとの比較

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
伊藤美智子, 菅波孝祥, 小川佳宏	NASHと慢性炎症	坂井田功	The Lipid	メディカルレビュー社	東京都文京区湯島3-19-11	2010	247-251
仁科博史 翻訳分担			分子細胞生物学 第6版	東京化学同人	東京	2010	341-372, 763-810, 949-994
仁科博史 分担執筆			生物学事典	東京化学同人	東京	2010	

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
Miyamura N, Nakamura T, Goto-Inoue N, Zaima N, Haya saka 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.		In press	2010
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.		In press	2010
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.		In press	2011

Yamasaki T, Hamabe S, Saeki I, Harima Y, Yamaguchi Y, Uchida K, Terai S, Sakaida I	A novel transcatheter arterial infusion chemotherapy using iodized oil and degradable starch microspheres for hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial.	J Gastroenterol.	46(3)	359-366	2010
Terai S, Sakaida I	Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients.	J Hepatobiliary Pancreat Sci.	18(1)	23-25	2010
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.	Hepato Res..	40(6)	574-584	2010
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.	19(10)	1237-1246	2010
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.	45(9)	979-987	2010

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.	3(7-8)	431-440	2010
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.	51(3)	1037-1045	2010
Konno M, Hamazaki TS, Fukuda S, Tokuhara M, Uchiyama H, Okazawa H, Asashima M, Okochi H	Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture.	Biochem Biophys Res Commun	400	461-465	2010
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..	IkBh, a nuclear IkB protein, positively regulates the NF-kB-mediated expression of pro-inflammatory cytokines.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	107	11924-1192	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	2010
A. Sato, H. Kawano, T. Notsu, M. Ohta, M. Nakakuki, K. Mizuguchi, M. Itoh, T. Suganami, and Y. Ogawa.	Anti-obesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis.	Diabetes	59	2495-2504	2010
T. Suganami and Y. Ogawa	Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling.	J. Leukoc. Biol.	88	33-39	2010
N. Satoh, A. Shimatsu, A. Himeno, Y. Sasaki, H. Yamakage, K. Yamada, T. Suganami, and Y. Ogawa.	Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone.	Diabetes Care	33	e7	2010
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
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	遺伝子医学MOOK	16	131-135	2010
Uchida Y, Hirayama J, Nishina H	A Common Origin: Signaling Similarities in the Regulation of the Circadian Clock and DNA Damage Responses	Biological & Pharmaceutical Bulletin	33(4)	535—544	2010
Asaoka Y Nishina H	Diverse physiological functions of MKK4 and MKK7 during early embryogenesis	The Journal of Biochemistry	148(4)	393—401	2010