

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

研究課題
「肝臓における造血・免疫機構の解明と
肝疾患治療への応用」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者:宮島篤
(東京大学分子細胞生物学研究所、教授)

1 研究実施の概要

肝臓は生体における代謝の中心臓器であり生命活動の維持に必須の臓器である。ウイルス、アルコール、薬物、自己免疫など様々な原因による肝疾患は肝硬変や肝癌の発症につながる。一方、肝臓は胎生期においては最も主要な造血組織として機能し、造血幹細胞が生涯で最も活発に増殖する組織でもある。しかし、こうした肝機能の形成、維持、および恒常性破綻の分子基盤の理解は必ずしも十分ではなく、肝臓における分子細胞生物学的研究は血液・免疫学などに比べかなり遅れている。その要因として細胞の同定・分離が不十分であることがあげられる。そこで、本研究では、まず肝臓の構成細胞の厳密な同定・分離法を確立することによる肝臓細胞の分子レベルでの解析を可能とし、それにより肝臓の発生・分化・再生および胎児肝臓の造血機能の分子基盤を理解し、肝疾患治療法開発の基盤を作ること目指して研究を展開した。

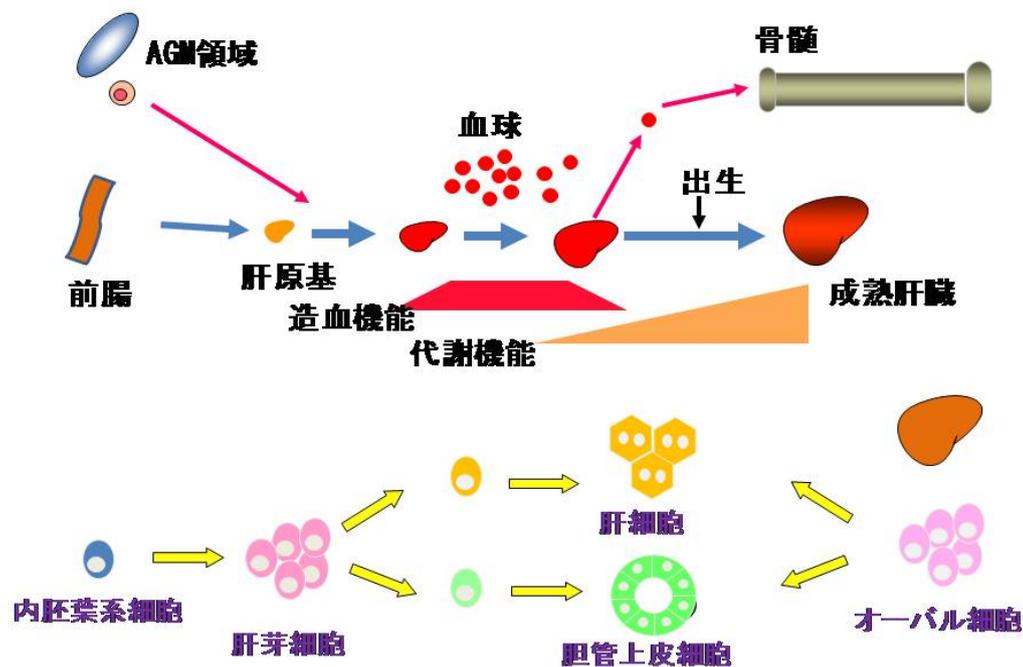
1.1 肝臓構成細胞の細胞膜タンパク質の発現に基づく同定と分離

肝臓を構成する細胞には、代謝機能を担う肝臓の実質細胞である肝細胞と胆汁の肝臓からの排出を行う胆管の上皮細胞、肝臓特有の血管系である類洞を構成する類洞内皮細胞、星細胞、肝マクロファージであるクッパー細胞などがある。また、肝細胞と胆管上皮細胞は腸管上皮に由来する肝芽細胞から分化する。しかし、肝臓研究においては、未だに実質細胞と非実質細胞という表現が頻繁に使われていることから明らかなように、肝臓構成細胞の研究は組織学的なものが中心であり、肝臓から厳密に細胞を同定・分離してその性状を分子レベルで調べるという研究はほとんどなく、これが肝臓の分子細胞生物学的研究における大きな欠陥であった。そこで、本研究では、まず各種肝臓構成細胞の細胞膜タンパク質の同定とそれらに対するモノクローナル抗体の作成を行い、細胞膜タンパク質の発現に基づく肝臓構成細胞の同定・分離を可能とした。さらに、分離した細胞の培養系を確立して、それらの機能および分化について検討を行った。こうして類洞内皮細胞がリンパ管内皮など他の内皮細胞とは明確に区別された。さらに、それがリンパ球活性化を負に制御する活性をもつことなどが明らかとなった。また、横中隔の間葉系細胞から星細胞が分化し類洞内皮細胞との相互作用をしつつ類洞を構成する様子が明らかとなった。

1.2 肝臓の発生・分化および障害

本研究では、肝臓の幹細胞と考えられる肝芽細胞の分化について特に詳細な検討を行った。肝臓は胎生中期に前腸上皮から発生する。発生直後の肝芽細胞は高い増殖能と肝細胞と胆管上皮細胞への分化能を備えた肝臓の幹細胞とみなされていたが、実態は不明であった。我々はこの肝芽細胞に発現する分子として *Dlk* と *EpCAM* を同定し、*EpCAM*⁺*Dlk*⁺⁺細胞が最も未熟な肝幹細胞であること、それが *Dlk*⁺の肝芽細胞を経て *Dlk*⁻の成熟肝細胞となること、一方 *EpCAM* 陽性の胆管上皮も肝芽細胞に由来し、肝芽細胞から肝細胞と胆管上皮への運命決定には *Notch* の活性化が重要であることなどを明らかにした。

肝芽細胞から分化した肝細胞はさらに何段階かの分化過程を経て成熟肝細胞となるが、このプロセスに関与する分子を同定した。A型肝炎ウイルスの受容体として知られている *Tim1* のマウスのカウンターパート *Tim2* は未分化肝細胞に発現しており肝分化を負に制御していることを示した。また、肝機能は出生前後で劇的に変化し、転写因子 *C/EBPα* がこの過程に必須であることが知られていたが、その活性を制御する因子として *Foxo1* を同定し、これが出生前後におけるインスリンの劇的な変化を感受し肝細胞の糖新生を制御している様子を明らかにした。



肝臓の発生・分化

前腸の上皮細胞から発生する肝芽細胞が肝臓の原基を形成し、そこに造血幹細胞が流入する。胎児期の肝臓は血球産生を行う最も主要な造血組織である。その後、造血機能は骨髄へ移行し、肝臓は代謝器官へと分化成熟する。肝芽細胞は幹細胞と胆管上皮細胞に分化する能力を持った胎児肝臓における幹細胞である。一方、肝障害により門脈域に出現するオーバル細胞は成体肝臓における幹細胞あるいは前駆細胞とみなされている。

成体肝臓はウイルス感染、アルコール、薬物、自己免疫などより肝炎を発症する。さらに、慢性肝炎は線維化・肝硬変を経てしばしば肝がんを発症する。肝細胞は強い再生能をもつものの、肝再生と障害の繰り返しは肝がん発症の誘因となる。肝再生には HGF や IL-6 などのサイトカインの関与が示されていたが、その分子基盤は十分に理解されてはいなかった。Oncostatin M(OSM)は LIF に類似した IL-6 ファミリーのサイトカインであるが、この遺伝子を欠損したマウスでは四塩化炭素投与による急性肝炎が野生型に比べて著しく悪化していた。逆に、OSM を投与したマウスでは四塩化炭素による肝炎が軽減されていた。この現象を解析した結果、クッパー細胞などが産生する OSM が、肝細胞に作用して細胞死を抑制するとともに、TIMP1 の発現を介してマトロプロテアーゼ MMP の活性を抑制して組織の破壊を抑制している様子が明らかとなった。

重篤な慢性肝炎では門脈周辺にしばしば偽胆管が形成され、オーバル細胞と呼ばれる増殖性の細胞が出現する。オーバル細胞は肝細胞と胆管上皮細胞へと分化する成体肝臓の幹細胞とみなされており、この増殖性細胞と発がんとの関連も指摘されている。しかし、その実態は不明であった。我々は、オーバル細胞に発現する細胞膜抗原として EpCAM を同定し、分離した細胞の性状解析を行った。一方、EpCAM は正常肝臓の胆管にも発現することから、正常肝臓および肝障害によりオーバル細胞を誘導した肝臓か

ら EpCAM⁺細胞集団を分離して *in vitro* の増殖・分化能を検討した結果、いずれの肝臓由来の EpCAM 細胞にも増殖性と胆管上皮細胞と肝細胞への分化能を備えた細胞が存在していたことから、オーバル細胞は正常肝臓の胆管に存在する EpCAM 陽性細胞集団に由来することが強く示唆された。

さらに、胎児肝臓の肝芽細胞に発現する Dlk がヒト肝がんの 20～30%において発現すること、とりわけ低分化型で悪性度の高い肝がんにおいて高頻度の発現が認められた。また、ラットオーバル細胞の一部にも Dlk が発現することが示された。これらの結果は、オーバル細胞など肝幹細胞が肝がんの前駆細胞となる可能性、あるいは分化した肝細胞が脱分化して幹細胞様の性質を獲得する可能性が示唆された。Dlk のように胎児肝臓に発現するが、成体組織ではほとんど発現せず、肝がんが発現する細胞膜分子は抗体を使った癌治療の標的となりうる。

1.3 胎児肝臓の造血機能

肝臓は、成体では代謝機能を担うが、胎児期には最も中心的な造血器官として機能する。成体では骨髄に少数存在する造血幹細胞 (HSC: Hematopoietic Stem Cell) が骨髄の骨芽細胞など様々な細胞が形成する造血環境の中で極めて緩やかな自己複製を行うとともに、多くの中間段階を経て成熟血球への分化を行い、個体の生涯に渡って造血を維持し続ける。HSC は、胎生初期に大動脈-生殖原基-中腎 (AGM: Aorta-Gonad-Mesonephros) 領域で発生し、胎生肝臓へ移行する。HSC は胎児肝臓の造血環境下で著しく増殖した後骨髄へと移行する。

白血病などの治療において、骨髄および臍帯血をソースとした造血幹細胞移植は近年重要性を増してきているが、移植するヒト骨髄及び臍帯血由来の HSC の不足が大きな問題点となっている。HSC が胎児肝臓で劇的に増幅することから、我々は胎生肝臓における HSC 増幅機構の理解が、*ex vivo* での HSC 増幅技術の開発につながることを期待し、胎児肝臓を *in vitro* で再現することを試みた。胎生 14 日目のマウス肝臓の初代培養系に AGM 由来の造血幹細胞分画を加えて共培養することで造血幹細胞が著しく増幅することを見出した。さらに、胎児肝臓から Dlk 陽性の肝芽細胞を分離しこれをフィーダーとしても造血が盛んに起こることから、肝芽細胞が胎児肝臓における造血ニッチであることが強く示唆された。

今後の課題と展望

本研究では、肝臓を構成する細胞の細胞膜タンパク質の同定と抗体の作製により肝臓の分子レベルでの研究を促進した。従来の肝臓研究における細胞の大きさや比重による細胞分離法に比べて細胞膜タンパク質の発現に基づく細胞分離法は扱う細胞の純度を格段に上げることができ、これにより肝臓構成細胞の性状解析、発生分化の機構、機能形成過程の分子レベルでの解析が可能となった。

前腸上皮細胞から発生した肝芽細胞は横中隔に存在する内皮細胞の支持により増殖すると考えられているが、今後は分離した肝芽細胞、内皮細胞、あるいは星細胞前駆細胞などを使って肝臓分化および肝臓障害における細胞同士の相互作用の様子が明らかにされるであろう。胎児肝臓の造血幹細胞支持機構が明らかになれば、造血幹細胞の増幅技術の開発につながることを期待される。

がん組織に組織幹細胞に発現する分子や胎児性抗原の発現が認められるのは肝臓に限らない。組織幹細胞の発生時期と部位は特定されており、胎児期の組織幹細胞の研究はそうした抗原の探索に有効である。それら抗原からがん治療抗体の標的が見出されることが期待される。

2 研究構想及び実施体制

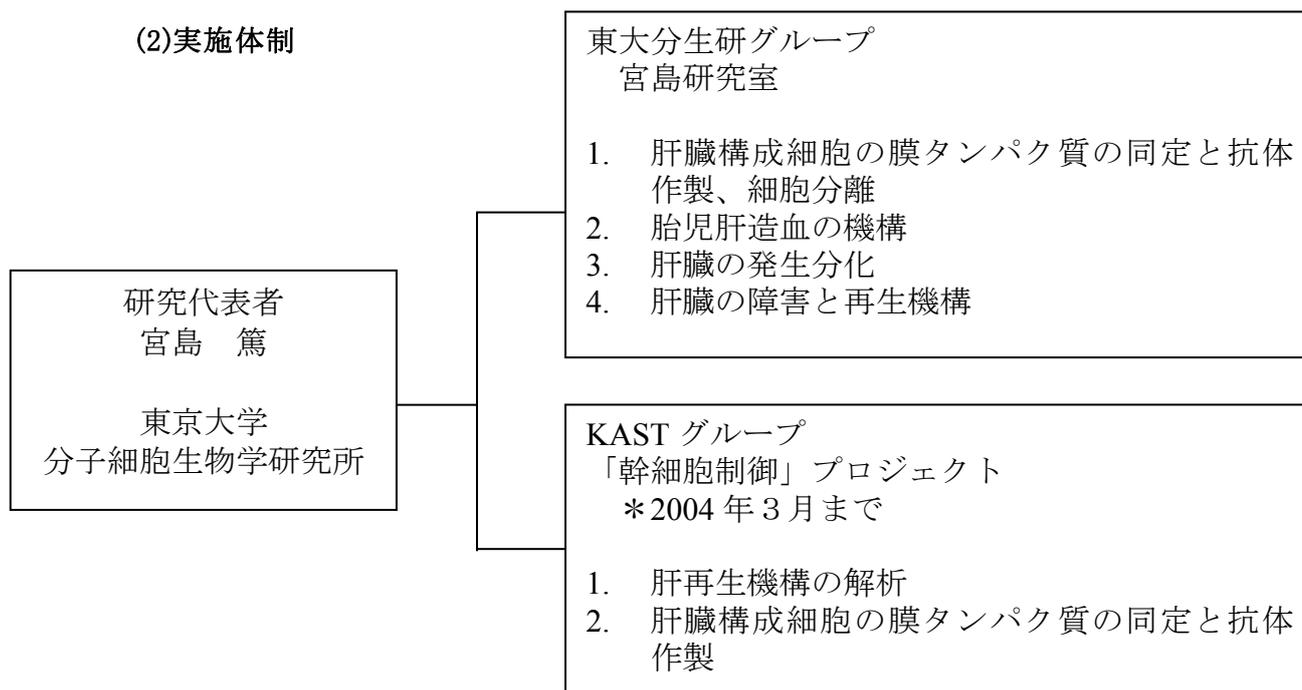
(1) 研究構想

肝臓は成体における代謝の中心器官であり生命活動の維持に必須の臓器であるが、一方で胎児肝臓は胎児期における最も主要な造血器官である。前腸から発生した肝芽細胞は間葉系細胞や内皮細胞などと細胞社会を形成しつつ分化・成熟するが、胎生中期には造血組織として血球産生を支持する。一方、成熟した肝細胞は通常ほとんど分裂しないが、肝障害により増殖を開始し肝臓を再生する。ウイルス感染、アルコール、薬物、自己免疫など原因は様々であるが、いずれの場合にも炎症性細胞の動員を伴った肝細胞の破壊が肝疾患の増悪因子となり、持続的な肝障害は肝硬変や肝癌を引き起こす。胎生期の肝臓の発生・分化、造血機能、あるいは成体肝臓の恒常性維持およびその破綻においても肝細胞を中心とした様々な肝構成細胞による細胞社会の理解が必須である。しかし、この基本的な問題は必ずしも十分に研究されていない。

本研究では、胎児期における肝臓の発生・分化機構と造血機構、さらに成体肝臓における肝障害と肝再生の機構の解明を目指した。胎児肝臓は造血幹細胞が生涯で最も活発に増殖する組織であり、このメカニズムの解明は再生医療にも大きく貢献することが期待された。また、肝臓の発生時に存在する肝芽細胞、および慢性的な肝障害時に門脈周辺に出現するオーバル細胞は肝幹細胞と考えられており、その同定・分離とその性状解析は再生医療においても注目を集めていた。さらに、肝障害に伴い出現する増殖性のオーバル細胞は肝がんの前駆細胞となる可能性も指摘されていた。したがって、こうした肝臓の幹細胞の発生・増殖・分化の機構を理解することは、肝臓の基礎生物学のみならず、医療面でも重要である。

本研究では、肝臓の細胞社会の形成と破綻の分子基盤を解析することとしたが、研究開始時においては、肝臓の構成細胞を厳密に分離する方法が十分に整備されておらず、肝臓細胞の分子細胞生物学的研究な解析が困難であった。そこで、我々はまず肝臓の構成細胞に発現する細胞膜タンパク質の同定とモノクローナル抗体の作成により細胞の同定・分離法の開発を行い、純化した細胞集団あるいはそれから分離した細胞株などを使って肝臓における細胞社会の形成と恒常性破綻の理解を目指した。なお、肝臓の障害からの再生におけるサイトカインの機能解析と肝臓細胞の抗原同定の一部は神奈川科学技術アカデミー「幹細胞制御」プロジェクトで行われたが、このプロジェクトは2004年3月に終了し、その後は東大分生研に引き継がれた。

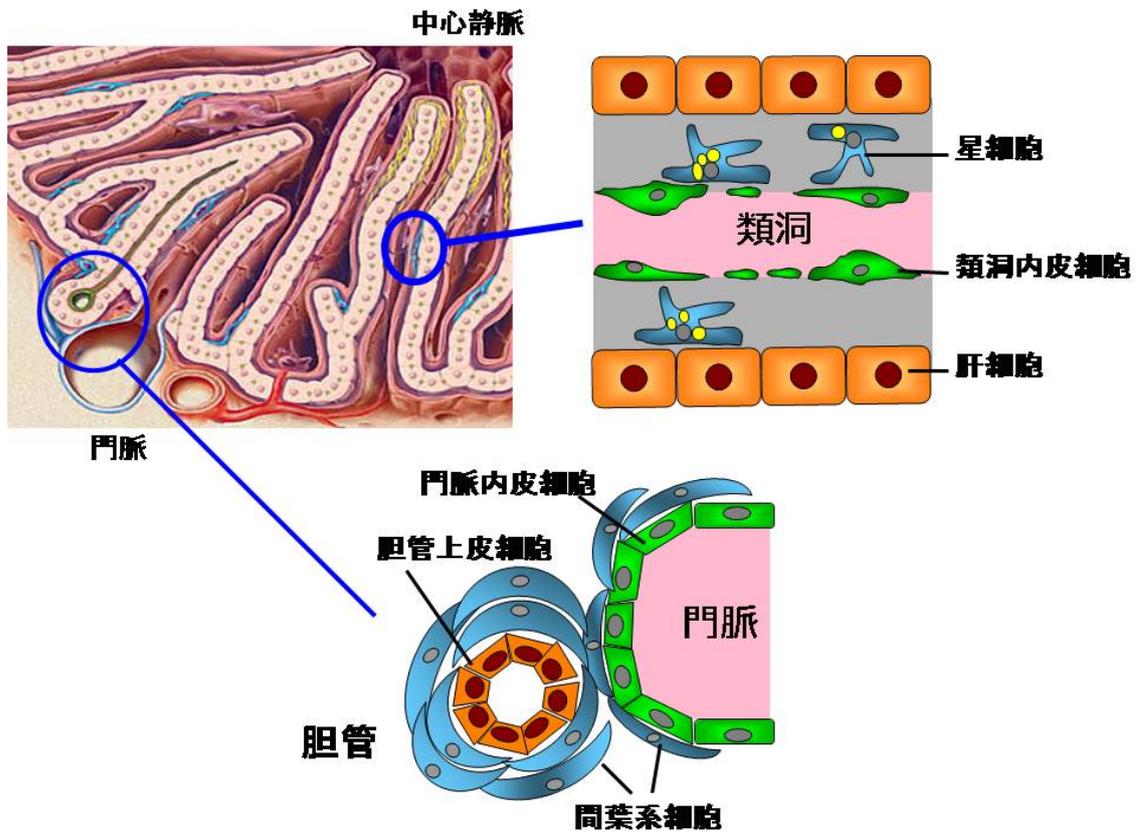
(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

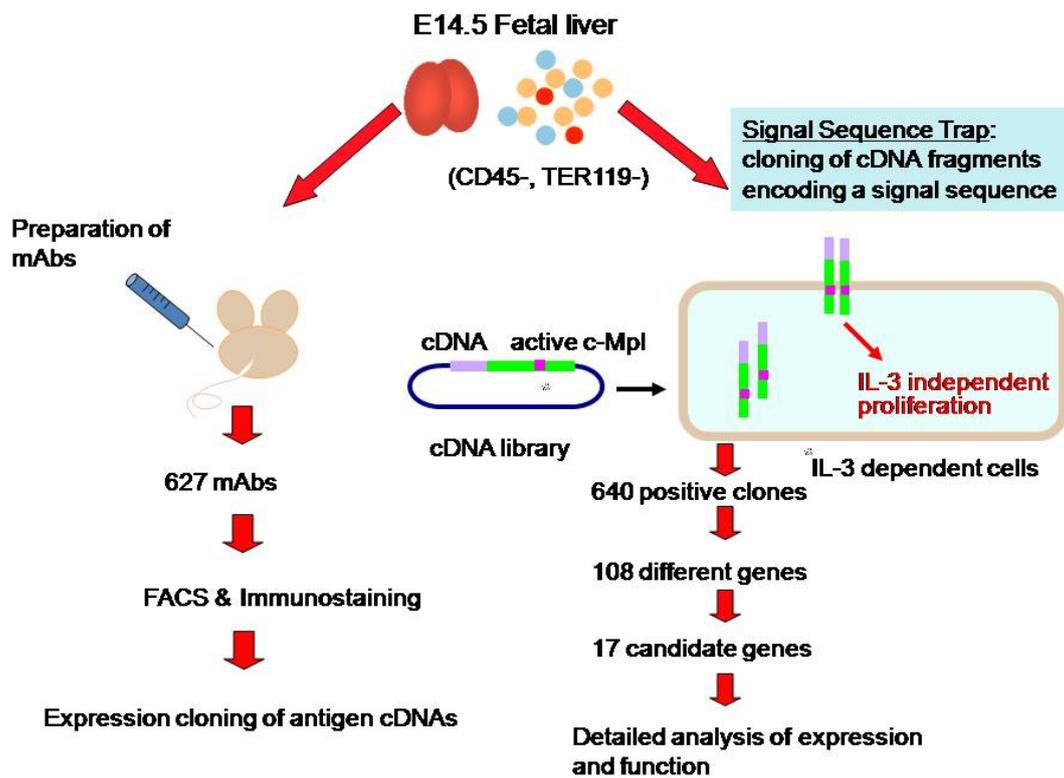
3.1 肝臓構成細胞の細胞膜タンパク質の発現に基づく同定と分離

肝臓を構成する細胞には、代謝機能や血清蛋白質の産生などを担う肝臓の実質細胞である肝細胞と胆汁の肝臓からの排出を行う胆管の上皮細胞、肝臓特有の血管系である類洞を構成する類洞内皮細胞、星細胞、肝マクロファージであるクッパー細胞などがある。また、肝細胞と胆管上皮細胞は腸管上皮に由来する肝芽細胞から分化すると考えられていた。しかし、肝臓研究においては、未だに実質細胞と非実質細胞という表現が頻繁に使われていることから明らかなように、肝臓構成細胞の研究は組織学的なものが中心であり、肝臓から厳密に特定の細胞を同定・分離してその性状を分子レベルで調べるという研究はほとんどなく、これが肝臓の分子細胞生物学的研究における決定的な欠陥であった。そこで、本研究では、まず各種肝臓構成細胞の細胞膜タンパク質の同定とそれらに対するモノクローナル抗体の作製を行い、細胞膜タンパク質の発現による肝臓構成細胞の同定・分離を可能とした。さらに、分離した細胞を使った培養系を確立して、それらの機能および分化について検討を行った。こうして類洞内皮細胞が他の内皮細胞と明確に区別された。分離した類洞内皮細胞の培養液中にはリンパ球の活性化を抑制する活性が見いだされ、この細胞が肝臓の免疫寛容に関与する可能性が示唆された。また、横中隔の間葉系細胞から星細胞が分化し類洞内皮細胞との相互作用をしつつ類洞壁を構成する様子が明らかとなった。



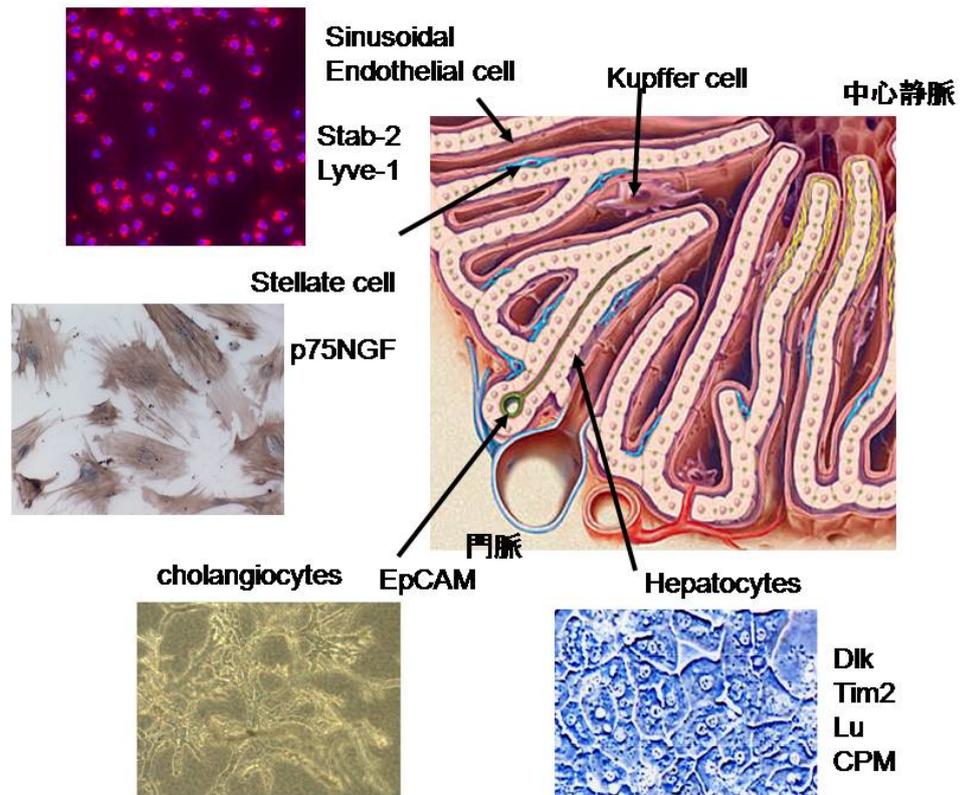
肝臓の構造

肝臓は多数の肝小葉という単位からなる。肝小葉の中心部には中心静脈があり、辺縁部には門脈、肝動脈、胆管が近接して存在する。肝機能を担う肝細胞は中心静脈から周囲に放射状に配列しており、ブロック塀の様に積み重なり、1層の板を形成している。その間を類洞という特殊な毛細血管が走っており、門脈と肝動脈の血液を受けて中心静脈に血液を送る。類洞壁は有窓構造をもち基底膜も持たない特殊な内皮細胞と星細胞とも呼ばれるビタミン A 貯蔵細胞からなり、血流から種々の物質は類洞壁を通して肝細胞に達する。肝細胞は、類洞から取り込んだ物質を代謝して、血流に送るとともに胆汁などを肝細胞同士の接着部位に形成される毛細胆管に排出する。胆汁は肝内胆管から肝外胆管を経て十二指腸に排出される。



細胞膜タンパク質の同定とモノクローナル抗体の作成方法

胎児肝臓から血球を除いた細胞を免疫源として多数のモノクローナル抗体を作製し、フローサイトメトリーおよび免疫染色に利用可能な抗体を選択し、発現クローニングにて cDNA を分離し抗原を決定した。また、シグナル配列をもつタンパク質をコードする cDNA を選択的に分離するシグナルシーケンストラップ法にて cDNA 断片を分離し、発現解析から肝構成細胞の同定に利用可能な分子を選択し、抗体を作製した。



肝臓構成細胞の分離と培養

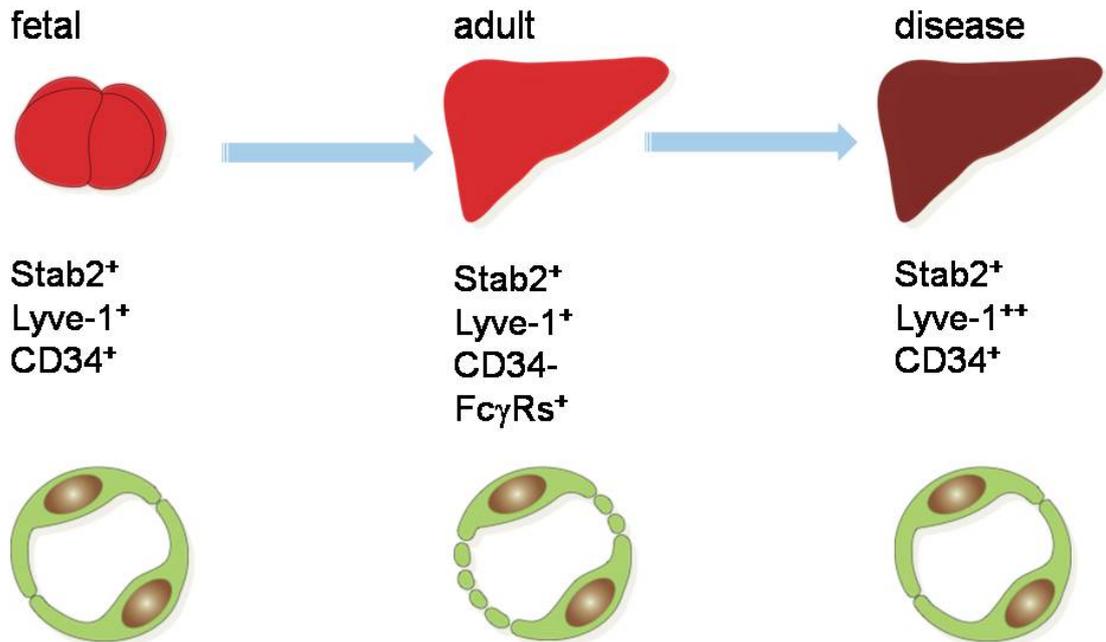
肝臓から抗体を使って肝細胞、胆管上皮細胞、星細胞、類洞内皮細胞を分離して培養した。

3.2 肝類洞内皮細胞の分化と機能

肝類洞内皮細胞は基底膜をもたず有窓構造 (fenestrae) を有するユニークな内皮細胞である。この細胞に発現する抗原としてヒアルロン酸受容体である Lyve-1 と Stabilin-2(Stab2)を同定した。Lyve-1はリンパ管内皮細胞のマーカーとして知られていたが、肝類洞内皮細胞にはPodoplanin, SLC, Prox1が発現しないこと、一方、リンパ管内皮細胞にはStab2, FcγR, F8が発現しないことから、両者は明確に区別された。肝類洞内皮細胞は、既知の内皮細胞マーカーであるCD31の発現を指標に分離することも可能ではあるが、Stab2の発現を指標に分離した方がより高純度であることも明らかとなった。

発生ステージを追ってマーカー遺伝子の発現を検討したところ、Stab2, Lyve-1 の発現は胎齢 (E) 9.5 日の肝芽で発現が認められ、その後一貫して、肝類洞で認められた。興味深いことに、これらの発現は、胎児期では肝類洞のみならず門脈や中心静脈などの「大きな」血管においても認められた。この「大きな」血管における Stab2, Lyve-1 の発現は、出生後に認められなかった。すなわち、肝類洞と肝内の「大きな」血管の内皮細胞は、胎児期においては共通のマーカー遺伝子を発現し、成体では異なるマーカー遺伝子を発現しており、肝類洞と「大きな」血管の内皮細胞が共通の前駆細胞より分化する可能性を示唆している。E14 の肝類洞内皮細胞は CD34 陽性 FcγR 陰性であったが、成体では CD34 陰性 FcγR 陽性であった。すなわち、肝発生の初期において、その他の内皮細胞と異なる性質を獲得した肝類洞内皮細胞は、発生ステージが進むにつれて、徐々に

類洞内皮細胞の分化



胎児期の類洞内皮細胞は有窓構造がなくStab2⁺Lyve1⁺CD34⁺であるが、成体になると有窓構造をもちStab2⁺Lyve1⁺CD34⁻FcγR⁺となる。さらに、肝障害により肝線維化が進むと再び有窓構造を失いStab2⁺Lyve1⁺CD34⁺となる。

成体の肝類洞内皮細胞の表現型を獲得していく様子が明らかにされた。また、類洞内皮細胞はリンパ管内皮細胞を含むその他の内皮細胞に比べて強いendocytosis活性を有することも明らかとなった。

一方、成体肝臓の類洞内皮細胞は線維化、肝硬変などの病変時においては基底膜が形成され、fenestraeを有しない連続的な毛細血管へと変化することが知られている。そこで、我々はマウス肝線維化モデルを用いて、マーカー遺伝子の発現がどのように変化するかを検討した。肝線維化はDMNの頻回投与により誘導した。その結果、DMNを投与した肝臓では、Stab2の発現量に変化は認められないものの、CD34およびLyve-1の発現は顕著に亢進することが明らかとなった。以上の結果から、肝類洞内皮細胞は発生ステージや病態下において、その表現型を大きく変化させていることが明らかとなった。我々の結果は、新たに同定したマーカーの発現を指標にすることで、時間軸に沿った組織特異的な内皮細胞の形質発現の詳細を明らかにした最初の知見である。

肝臓は免疫寛容の臓器として知られている。肝臓は腸管由来の異物に常に晒されており、過剰な免疫応答が惹起されないよう抑制されていると考えられる。腸管からの血流は門脈から類洞に流入するので、類洞には免疫系を抑制する機能がある可能性が考えられた。そこで、Stab2の発現を指標に分離した肝類洞内皮細胞の培養液を脾臓細胞に加えてLPSで刺激したところ、T細胞の活性化が顕著に抑制された。この抑制作用は既存

の抗炎症性サイトカインでは説明がつかず、類洞内皮細胞が未知の因子を産生して免疫系を抑制している可能性が示唆された。現在、この因子の同定を試みている。

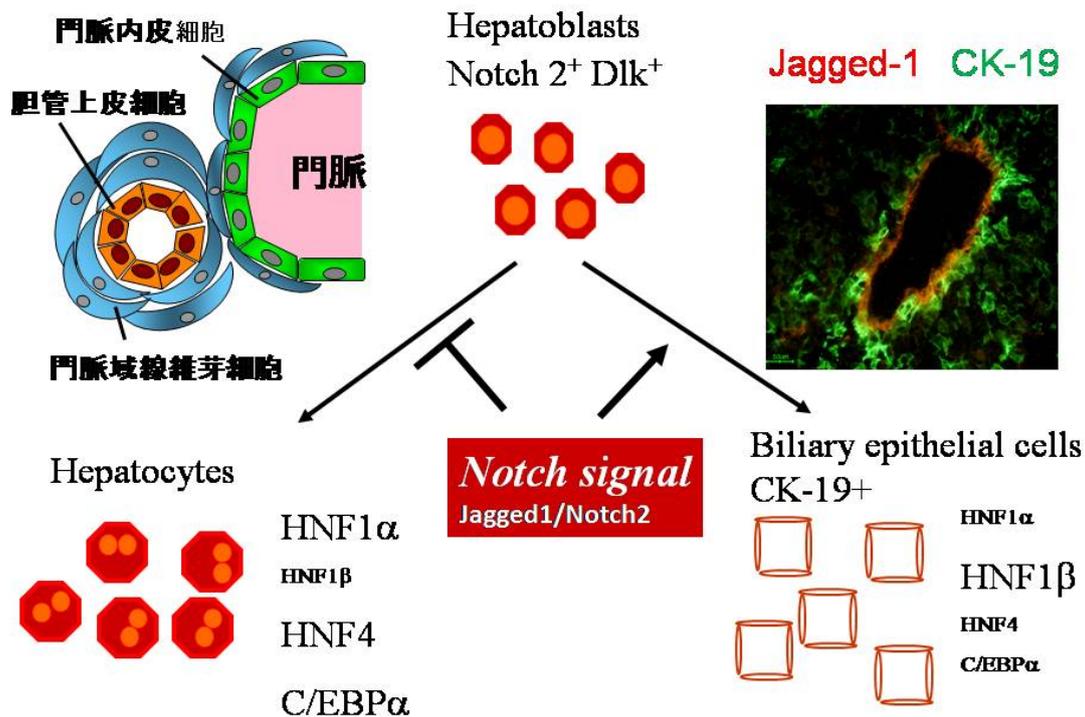
3.3. 肝星細胞および門脈域間葉系細胞の機能と分化

星細胞は類洞内皮細胞と肝細胞との間に存在する間葉系細胞であり、ビタミン A 貯蔵細胞としても知られている。肝臓の線維化とともに星細胞は形質転換して線維芽細胞様の形態を呈し、コラーゲンなど細胞外マトリクスの産生を行う。肝臓の線維化が進むと、本来基底膜を有しない類洞に基底膜様構造物が出現し、類洞の「毛細血管化 capillarization」が起こる。これにより肝細胞周囲の線維化が形成され、類洞の血流と肝細胞との間の物質交換が著しく障害される。類洞の血流を左右する星細胞は、肝臓の命運を握っている重要な細胞である。しかし、この細胞の起源や類洞内皮細胞とともに類洞を形成するプロセスに関する研究はほとんどない。成体肝臓の星細胞はビタミン A を多量に蓄積しており、比重による細胞分離が一般的に行われてきた。しかし、胎生期の星細胞あるいはその前駆細胞は比重で分離することはできず、したがって研究も進んでいなかった。

NGF の低親和性受容体である p75NTR が星細胞に発現しており、その抗体を使ってマウス胎児から星細胞の前駆細胞を同定分離することが可能となった。E14 肝臓から分離した p75NTR⁺細胞は vimentin や desmin などの間葉系細胞に特有の遺伝子を発現していた。また、そのうち 10%程度が油滴を溜めていること、さらに分離した細胞を培養すると成体肝臓の星細胞が発現する GFAP を発現するようになることから、p75NTR⁺細胞は星細胞の前駆細胞であることが強く示唆された。

さらに発生を追って肝臓での p75NTR の発現を検討したところ、E10 にすでに発現が認められ、E12 では肝臓全体に分布し、E14 では実質域と門脈域に発現していた。門脈周辺の線維芽細胞は細胞外マトリクス産生を行うことで肝線維化を引き起こしたり、胆管の障害からの再生を促進したりすると考えられている。この間葉系細胞も p75NTR を発現しており、星細胞と起源を同じにする可能性が示唆された。また、実質域の p75NTR⁺細胞は類洞内皮細胞と接しており、類洞形成が始まっていることが示された。一方、この時期は肝細胞と胆管上皮細胞の分化が起こる時期でもあることから、肝細胞、胆管、類洞の形成が同時に進行しており、相互に interaction がある可能性も示唆された。この点は以下の実験からも支持される。

肝内胆管の形成不全を伴う Alagille syndrome は Jagged-1 の変異であることが知られていた。我々は胎児肝臓における Notch とそのリガンドの発現を調べたところ、胎児肝臓の肝細胞に Notch2 が発現しており、胆管が形成される門脈周辺の p75NTR 陽性の間葉系細胞が Jagged-1 を強く発現していた。そこで、Notch のシグナルが肝芽細胞の胆管化に関与する可能性を検討した。Notch が活性化されるとその細胞内ドメインが遊離して核に移行し転写因子として機能する。後述のように肝芽細胞を胎児肝臓から Dlk 陽性細胞として分離してレトロウイルスにより Notch の細胞内ドメインを強制発現したところ、肝細胞への分化が抑制され、逆に胆管への分化が促進された。したがって、Notch-2 を発現する肝芽細胞が門脈周辺の Jagged-1 を発現する p75NTR⁺間葉系細胞に接触することで肝芽細胞の運命が決定されることが強く示唆された。

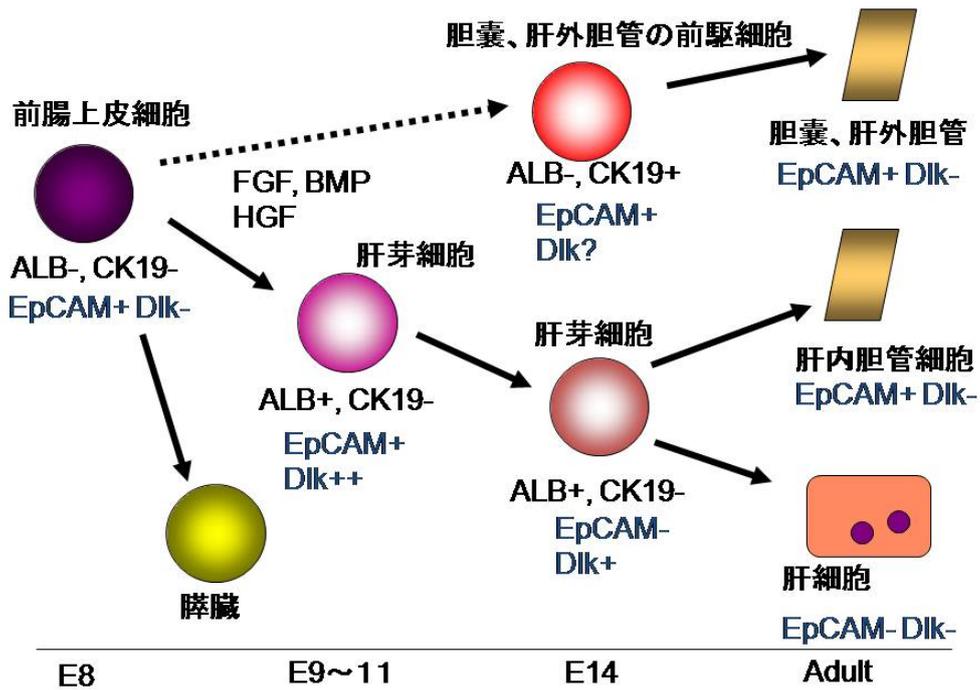


門脈での胆管形成モデル図

肝芽細胞からの胆管形成は門脈周辺でのみおこる。肝芽細胞は Notch2 を発現しており、門脈周辺の間葉系細胞が Jagged-1 を発現している。Dlk⁺の肝芽細胞で Notch を活性化すると肝細胞分化に必要な HNF1 α , HNF4, C/EBP α の発現が抑制される。一方、胆管上皮細胞に必須の HNF1 β の発現が増強され、胆管上皮への分化を促進する。

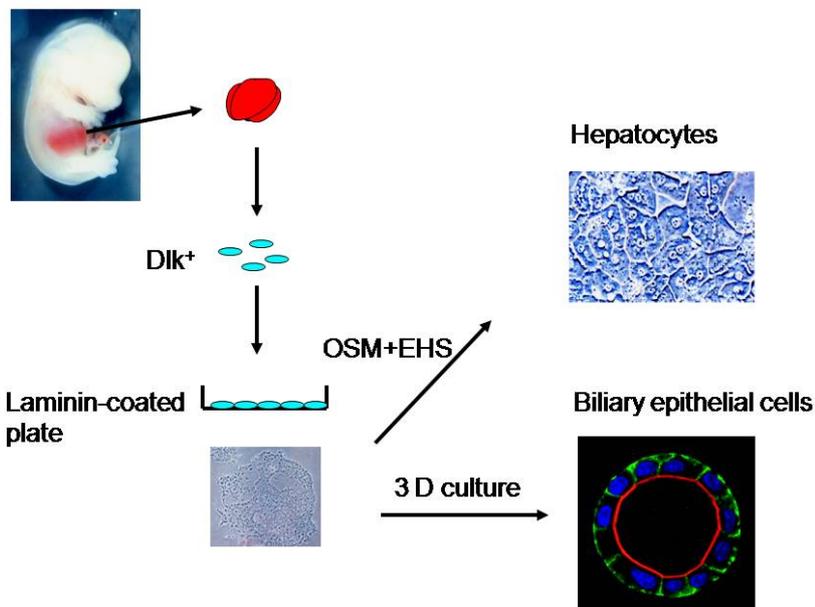
3.4 肝臓幹細胞の同定と分化

本研究では、肝臓の幹細胞と考えられる肝芽細胞の分化についてとりわけ詳細な検討を行った。肝臓は胎生中期に前腸上皮から発生する。発生直後の肝芽細胞は高い増殖能と肝細胞と胆管上皮細胞への分化能を備えた肝臓の幹細胞とみなされていたが、実態は不明であった。我々はこの肝芽細胞に発現する分子として Dlk と EpCAM を同定した。E10.5 のマウス胎児を EpCAM と Dlk に対する抗体で染色すると、腸管は EpCAM を強く発現し、肝臓では腸に近い部分も EpCAM を発現していた。一方、Dlk は肝芽全体に発現していた。さらに、E11.5 の肝臓を摘出してセルソーターにて細胞を分画すると、EpCAM⁺Dlk⁺細胞集団と EpCAM⁻の細胞集団に分離できた。これらの細胞を培養して増殖能を検討した結果、EpCAM⁺細胞に増殖能の高い細胞が含まれていた。また、E14.5 の肝臓から分離した Dlk⁺細胞は OSM と EHS ゲルの存在下に肝細胞へ分化し、コラーゲンゲルにより胆管上皮としての性質を示した。さらに、Dlk⁺細胞をラミニンでコートしたプレート上でクローナルな増殖をする細胞が存在しており、その細胞は継代培養可能であり、上記の培養法により肝細胞あるいは胆管上皮細胞へと分化したことから肝臓の幹細胞株であると考えられた。



肝臓上皮細胞の発生と分化のモデル

肝芽細胞は腸管から発生し、肝細胞と胆管上皮細胞に分化する。



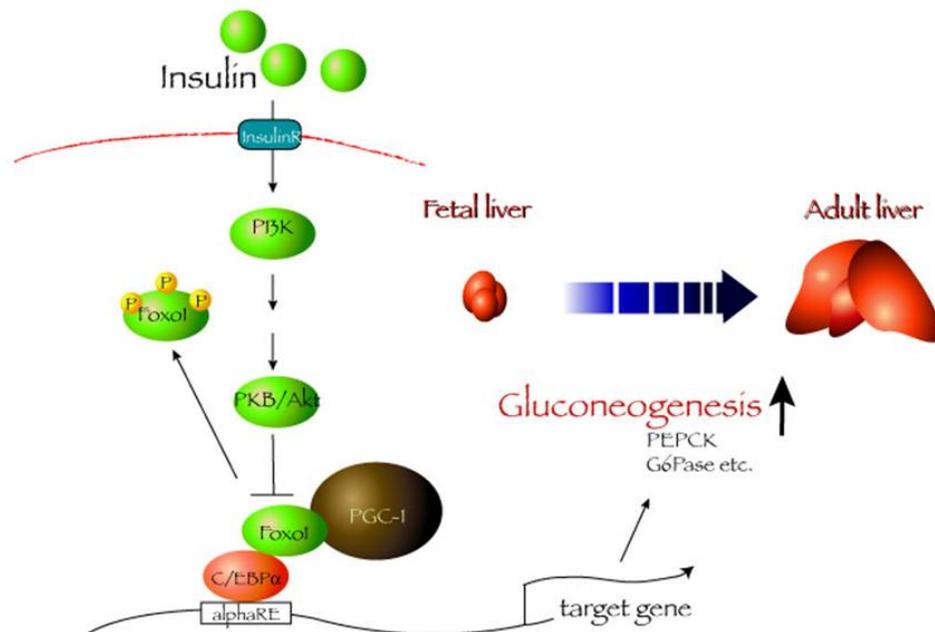
Dlk 陽性細胞の多分化能

胎生中期の肝臓から Dlk⁺細胞を分離して細胞をラミニンでコートしたプレートで培養するとクローナルに増殖する細胞が得られる。この細胞は培養条件により肝細胞あるいは胆管上皮細胞へと分化する。

肝芽細胞から分化した肝細胞はさらに何段階かの分化過程を経て成熟肝細胞となるが、このプロセスに関与する分子を同定した。A型肝炎ウイルス HAV の受容体として知られている Tim1 のマウスのカウンターパートである Tim2 は未分化肝細胞に発現しており、Tim2 の発現を siRNA により抑制すると、分化が促進されることから Tim2 は肝細胞分化の負の制御因子であることが明らかとなった。さらに、胎児肝細胞に発現する細胞膜タンパク質として Lutheran, CPM, JAM-A など多数の分子を同定しており、それらが肝細胞の増殖や分化に作用する可能性についての検討を継続している。

肝機能は出生前で劇的に変化し、転写因子 C/EBP α はこの過程に必須であることがノックアウトマウスの解析により知られていた。しかし、C/EBP α は胎児期から肝臓で発現しており、C/EBP α のみでは出生時における劇的な遺伝子発現の変化は説明できない。また、血中インスリンは出生後に減少し、糖新生が上昇することも知られていた。我々は C/EBP α の活性を制御する因子として Foxo1 を同定し、これが出生時に発現して C/EBP α とともに肝細胞の糖新生を制御している様子を明らかにした。さらに Foxo1 はインスリンのシグナルによりリン酸化されて核から細胞質に排出されることが知られており、出生前後でのインスリン濃度の劇的な変化を感受する因子として糖新生を制御することが明らかとなった。

Perinatal Liver

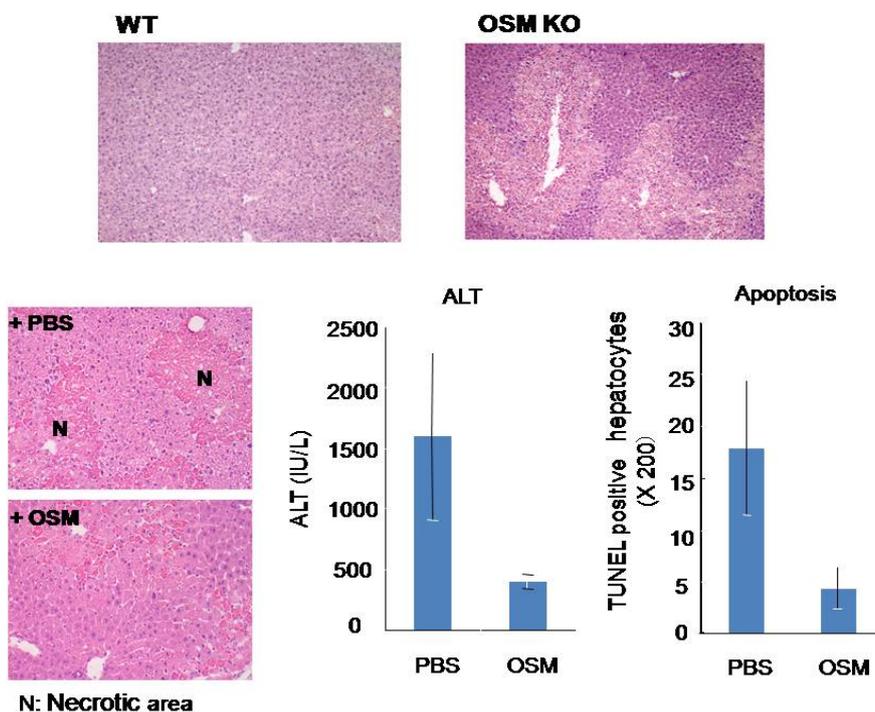


肝細胞の糖新生酵素の発現制御機構

糖新生酵素は出生後に誘導されるが、その発現には C/EBP α と Foxo 1 が必要である。C/EBP α は胎児期から発現しているが、Foxo1 の発現は出生直前に誘導される。また、Foxo1 はインスリンにより活性化された Akt によりリン酸化され核外に移行することが知られている。胎児血清中のインスリンは高く、出生後に減少する。したがって、Foxo1 はこのインスリンによる制御に関与する。

3.5 成体肝臓の障害と再生

成体肝臓はウイルス感染、アルコール、薬物、自己免疫などにより肝炎を発症する。さらに、慢性肝炎は線維化・肝硬変を経てしばしば肝がんを発症する。肝細胞は強い再生能をもつものの、肝再生と障害の繰り返しは肝がん発症の誘因となる。肝再生には HGF や IL-6 などのサイトカインの関与が示されていたが、その分子基盤は十分に理解されてはいなかった。Oncostatin M(OSM)は LIF に類似した IL-6 ファミリーのサイトカインであるが、この遺伝子を欠損したマウスでは四塩化炭素投与による急性肝炎が野生型に比べて著しく悪化していた。逆に、OSM を投与したマウスでは四塩化炭素による肝炎が軽減されていた。この現象を解析した結果、クッパー細胞などが産生する OSM が、肝細胞に作用して細胞死を抑制するとともに肝細胞の増殖を促進すること、さらに肝障害によりプロテアーゼ MMP が活性化されて組織を一時的に破壊し肝細胞の増殖を促すが、ほぼ同時にその阻害因子である TIMP1 の発現を誘導して MMP の活性を制御することで過剰な組織破壊を抑制していることが明らかとなった。OSM はこの TIMP1 の発現を誘導することで組織の過剰な破壊を抑制していることが明らかとなった。OSM はヒトとマウスでは作用に差がある。ヒト OSM は LIF 受容体にも作用するが、マウス OSM は LIF 受容体にほとんど作用しない。したがって、マウスにおいては OSM の効果のみを現わしており、マウス OSM 投与による肝障害抑制作用は、OSM 受容体を特異的に標的とした肝治療薬の開発の可能性を示すものである。



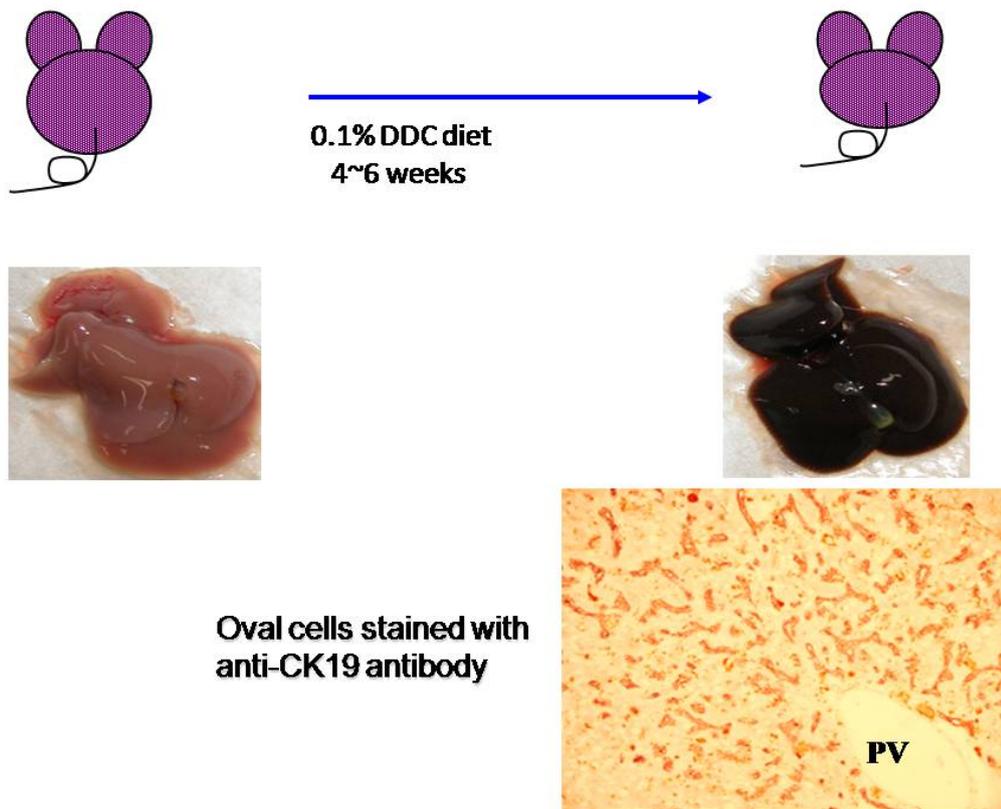
OSM による肝再生

上段。四塩化炭素投与 7 2 時間後の肝臓。WT では障害から回復しているが、OSM 欠損マウスの肝臓では障害部位が残る。

下段：野生型マウスに OSM を投与すると四塩化炭素投与による肝障害が緩和される。下段右：血中の ALT 濃度とアポトーシスを起こした肝細胞数。

一方、肝臓が重篤な慢性的障害を受けた場合に門脈周辺に偽胆管構造が形成される。このとき出現する細胞はげっ歯類ではオーバル細胞とも呼ばれている。この細胞は増殖性で肝細胞と胆管上皮細胞へと分化すると考えられており、成体肝臓の幹細胞あるいは前駆細胞とみなされていた。また、この細胞は増殖性であり、肝がんの元となる可能性も指摘されている。しかし、オーバル細胞については組織学的な研究が多く、その起源や実態は不明であった。

オーバル細胞を分離するために、我々は、まず細胞膜タンパク質の同定を行った。オーバル細胞の研究はラットを使った研究が主流であるが、ノックアウト技術が利用できるマウスでの研究も行われるようになってきた。オーバル細胞を誘導する様々なプロトコルがあるが、ラットで頻繁に用いられる誘導法がマウスでは無効であり、誘導される細胞も必ずしも同じとは限らない。そこで我々は、まずラットのオーバル細胞に発現する遺伝子を検索することとした。2-acetylaminofluoren(2AAF)を投与して肝細胞の増殖を抑制した状態で部分肝切除を施すとオーバル細胞の増殖が誘導されることが知られており、ラットにおけるオーバル細胞の一般的な誘導法である。これによりオーバル細胞を誘導した肝臓の非実質細胞からシグナルシーケンストラップ法により膜タンパク質および分泌タンパク質をコードする cDNA を多数分離した。次に、これらのマウスの相同遺伝子の発現をマウスのオーバル細胞を誘導した肝臓で検証した。マウスでは 2AAF/ 部分肝切除法ではオーバル細胞は誘導されない。そこで、3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidine (DDC)を投与する方法を用いた。DDC はヘム合成経路を阻害し、ヒトポルフィリン症のモデルとしても知られている。DDC 投与後 4 週程度で門脈域に CD19 陽性のオーバル細胞が多数出現する。正常肝臓、DDC 投与によりオーバル細胞を誘導した肝臓、さらに四塩化炭素投与による急性肝炎を誘導した肝臓の RNA を用いて、DDC 投与により特異的に発現する遺伝子を複数選択した。こうした遺伝子の中に EpCAM を見出した。



DDC によるオーバル細胞誘導

マウスに DDC を投与して数週間すると、肝臓には鉄が沈着し黒くなる。この状態で門脈周辺に CK-19 陽性のオーバル細胞が現れる。

EpCAM 抗体を使って DDC 投与マウスの肝臓から EpCAM⁺細胞を分離して電子顕微鏡で観察すると小型で核が卵型の形態をした細胞であり、すでにオーバル細胞のマーカーとして知られていた A6, CK-19 などを発現していた。さらに、分離した細胞は *in vitro* で増殖し、多数のクローンが得られた。これらのクローンは胎児肝芽細胞で発現する遺伝子を多数発現するとともに胆管上皮細胞で発現する遺伝子も複数発現していた。一方、肝細胞の遺伝子発現はほとんど認められなかった。このクローン増殖する細胞を OSM と EHS ゲルで培養すると、肝細胞の形態を呈し、TAT など肝細胞特有の遺伝子を発現し、グリコーゲンを蓄積することから、肝細胞への分化能を持つことが示された。一方、同じクローン増殖する細胞をコラーゲンゲルで胞埋培養すると、胆管上皮特有の遺伝子発現がみられ、細胞が集まって分枝構造を呈することから、胆管上皮細胞への分化能も有することが示された。すなわち、この DDC 投与にて誘導された EpCAM⁺細胞には肝臓幹細胞が含まれることが明らかとなった。

以上のように、オーバル細胞には EpCAM が発現し、オーバル細胞を誘導した肝臓から分離した EpCAM⁺細胞には幹細胞が含まれていたが、一方、EpCAM は正常肝臓の胆管にも発現する。そこで、正常肝臓および肝障害によりオーバル細胞を誘導した肝臓から EpCAM⁺細胞集団を分離して *in vitro* の増殖・分化能を検討した結果、いずれの肝臓由来の EpCAM⁺細胞にも増殖性で胆管上皮細胞と肝細胞への分化能を備えた細胞が存在していたことから、オーバル細胞は正常肝臓の胆管に存在する EpCAM 陽性細胞集団に由来することが強く示唆された。

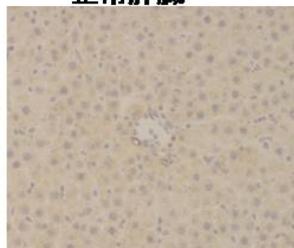
3.6 肝がん抗原

近年の研究から、がん組織においても極少数の自己複製能をもつ幹細胞が存在することが、白血病、乳がん、脳腫瘍などで次々と明らかにされてきた。がん幹細胞は正常な組織幹細胞の制御が利かなくなり増殖性となった可能性、あるいは前駆細胞が自己複製能を獲得した可能性など考えられる。さらに、完全に分化した細胞が変異により前駆細胞や幹細胞の性質を獲得した可能性も考えられる。肝臓がんにおいて、がん幹細胞が存在するかどうかは不明であるが、肝臓がんの起源が幹細胞あるいは前駆細胞である可能性は十分考えられる。肝障害により出現する増殖性のオーバル細胞は肝臓がんの前駆細胞である可能性も指摘されている。肝臓がんが幹細胞由来であるなら、幹細胞に発現する遺伝子を発現する可能性が考えられる。そこで、我々は胎児肝臓の幹細胞に発現するが、成体肝臓には全く発現が認められない Dlk が肝臓がんでは発現するかどうか検討した。その結果、ヒト肝臓の 20~30%において Dlk の発現が認められた。とりわけ低分化型で悪性度の高い肝臓がんにおいて高頻度で発現が認められた。また、ラットオーバル細胞の一部にも Dlk が発現することが示された。これらの結果は、オーバル細胞など肝幹細胞が肝臓がんの前駆細胞となる可能性あるいは分化した肝細胞が脱分化して幹細胞様の性質を獲得する可能性が示唆された。

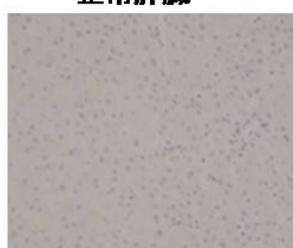
ラット肝臓

ヒト肝臓がんおよび正常肝臓におけるDlkの発現

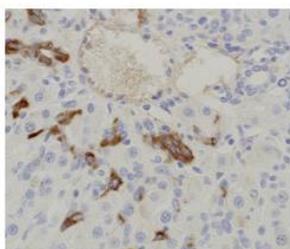
正常肝臓



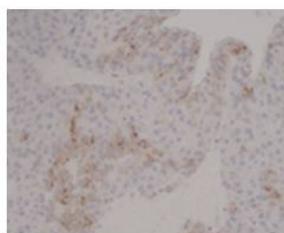
正常肝臓



2AAF/PHIによる肝障害



HCC 1



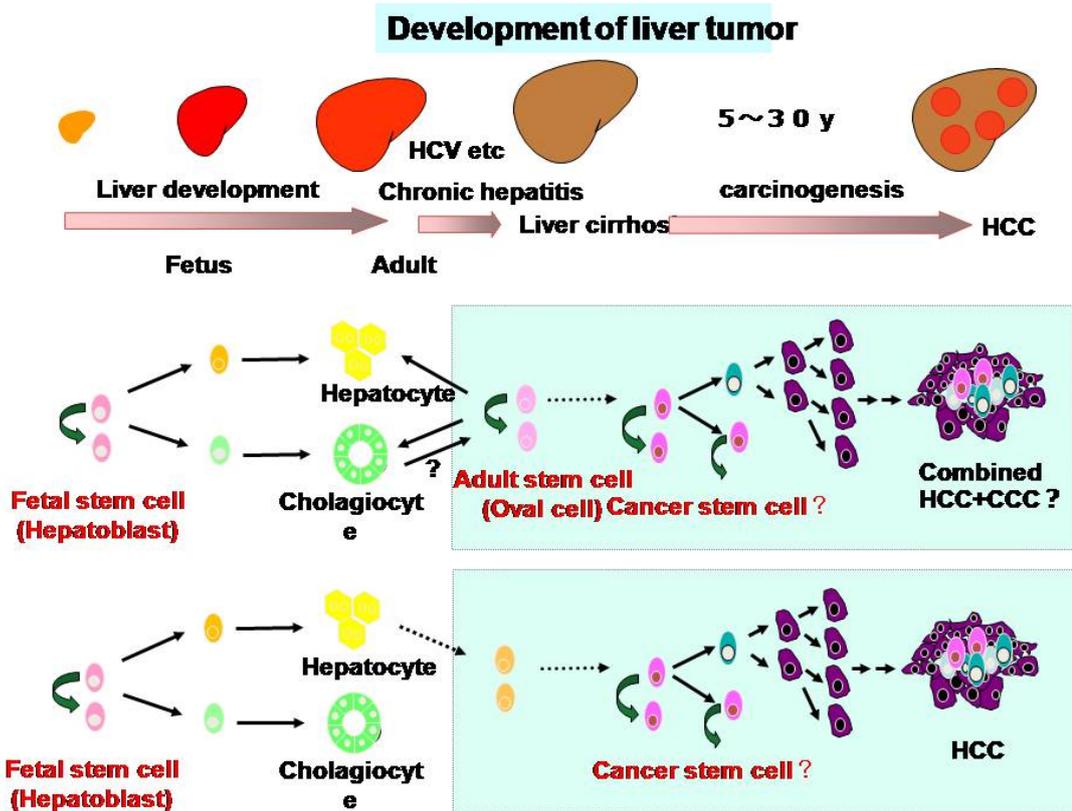
HCC 2



ヒト組織での Dlk の発現

正常なヒト肝臓には全く発現がみられず、マウスと同様に胎児肝臓には強く発現していた。さらに、多くの肝臓がんでの発現が認められた。

Dlk のように胎児肝臓に発現するが、成体組織ではほとんど発現せず、肝臓がんでは発現する分子は抗体を使った癌治療の標的となりうる。



肝癌発生のモデル

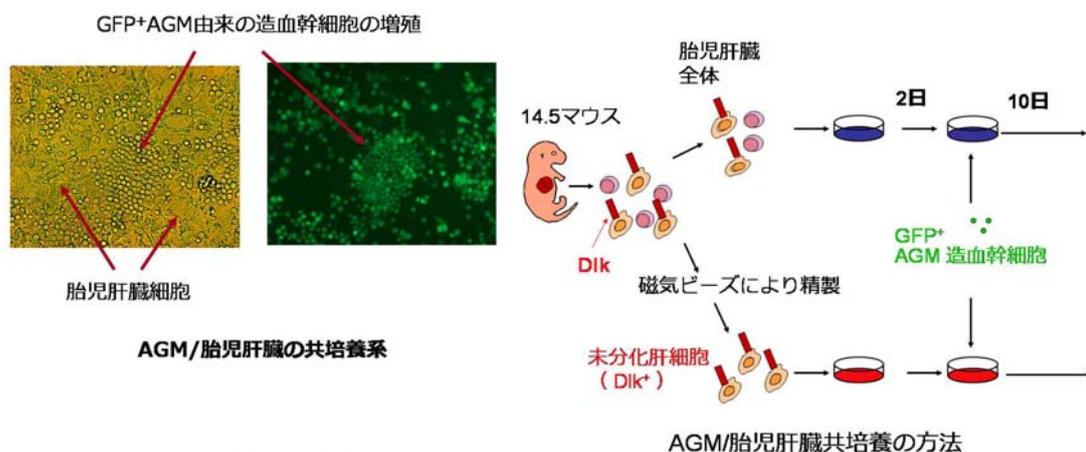
幹細胞に由来する肝癌として hepatocellular carcinoma と cholangiocarcinoma の混合型の癌がある。一方、多くの肝癌は分化した肝細胞に由来すると考えられている。この場合には分化した細胞が脱分化して幹細胞様の形質を発現する可能性が考えられる。

3.7 胎児肝の造血機能

成体では骨髄に少数存在する造血幹細胞 (HSC: Hematopoietic Stem Cell) が骨髄の骨芽細胞など様々な細胞が形成する造血環境の中で極めて緩やかな自己複製を行うとともに、多くの中間段階を経て成熟血球への分化を行い、個体の生涯に渡って造血を維持し続ける。HSC は、胎生初期に大動脈・生殖原基・中腎 (AGM: Aorta-Gonad-Mesonephros) 領域で発生し、胎生肝臓へ移行する。HSC を胎児肝臓の造血環境下で著しく増殖した後骨髄へと移行する。この胎生肝臓での特徴的な造血を細胞生物学的に解析していくために、胎生肝臓での造血を *in vitro* で再現する培養系を構築した。造血が最も盛んな胎生 14 日目の肝臓細胞を造血支持細胞として GFP を発現するトランスジェニックマウスの AGM から分離した HSC 細胞 (CD34⁺c-kit⁺) を 10 日間共培養し、GFP 陽性の総血液細胞数、コロニー形成ユニット、さらに移植による長期骨髄再構築能を検討した。その結果、これらはいずれも増幅していた。

この胎生肝臓細胞には造血細胞、未分化な肝細胞、血管内皮細胞など様々な細胞が含まれている。そこで、造血支持細胞を特定するために、胎児肝臓の主要な細胞集団である Dlk 陽性の未分化肝細胞をフローサイトメトリーあるいは磁気ビーズにより分離し、

それをフィーダーとして HSC の増幅を検討した。その結果、胎生肝細胞全体を支持細胞とした場合よりも Dlk^+ 肝芽細胞を用いた場合の方がより効率的に長期骨髄再建能をもつ HSC 活性を支持することが明らかになった。すなわち、胎生肝臓では骨髄とは全く異なる Dlk^+ 肝芽細胞が造血環境を形成することが示唆された。



in vitro の胎児肝造血

胎生 14 日のマウス肝臓細胞の培養系に GFP を発現するトランスジェニックマウスの AGM から分離した $c\text{-Kit}^+\text{CD}34^+$ 細胞を加えると、GFP⁺ の血球が増殖する。胎児肝臓細胞から Dlk 陽性の未分化肝細胞を分離してそれをフィーダーとして培養すると、血球産生はむしろ増加することから、造血支持能はこの未分化肝細胞にあると考えられる。

一方、胎児肝臓に発現する細胞膜タンパク質の探索から細胞間接着分子 junctional adhesion molecule A (JAM-A) を見出し、その発現を詳細に検討した。JAM-A は造血系では巨核球系での発現が知られていたが、我々の作成した抗 JAM-A 抗体で胎生期および成体の造血細胞での JAM-A の発現を検討したところ、HSC が濃縮されている $c\text{-Kit}^+\text{Sca}1^+\text{lineage}^-$ (KSL) 細胞集団が JAM-A⁺ 細胞と JAM-A⁻ 細胞に分けられた。JAM-A⁺KSL 細胞と JAM-A⁻KSL 細胞の造血前駆細胞活性をコロニー形成法で比較したところ、JAM-A⁺KSL 細胞により多くの多分化能をもった造血前駆細胞が含まれていた。KSL 細胞における JAM-A⁺ の発現は、胎生肝臓だけでなく成体骨髄でも認められ、JAM-A⁺ がこれらの HSC に共通の新たな抗原と考えられた。さらに興味深いことに、骨髄細胞を抗 JAM-A 抗体単独で分離した JAM-A⁺ 細胞には長期骨髄再構築能が濃縮されており、わずか 100 個の JAM-A⁺ 細胞で造血系を再構成することができた。従来造血幹細胞の分離には多数の抗体をつかった多色のフローサイトメトリーが一般的であるが、単一の JAM-A 抗体を使うことで効率よく造血幹細胞の濃縮が可能となった。

今後の課題と展望

本研究では、肝臓を構成する細胞の細胞膜タンパク質の同定と抗体の作製により肝臓の分子レベルでの研究に貢献をした。従来の肝臓研究における細胞の大きさや比重による細胞分離法に比べて細胞膜タンパク質の発現に基づく細胞分離法は扱う細胞の純度を格段に上げることができ、これにより肝臓構成細胞の性状解析、発生分化の機構、機能形成過程の分子レベルでの解析が可能となった。また、胎児肝臓造血環境の中心となる細胞が同定され、造血幹細胞を効率的に濃縮する抗体が得られた。胎児肝臓の造血機構の解析から造血幹細胞の増幅技術の開発が期待される。

肝臓の発生、機能的肝臓の形成過程、さらに成体肝臓の恒常性維持と破綻から生ずる様々な疾病の発生機構においても、細胞の分離と培養法は多大な貢献をすることが期待される。そもそも肝臓は肝細胞のみならず、従来非実質細胞と十把一絡げにして呼ばれていた内皮細胞、星細胞、胆管上皮細胞、線維芽細胞などにより細胞社会を形成しており、それらの肝臓構成細胞は相互作用しながら発生して機能する。したがって、肝臓の発生にせよ疾患にせよ、細胞社会を俯瞰する研究が必須である。本研究で開発した肝臓構成細胞の分離・培養法はこうした研究を大幅に加速し、肝臓の分子細胞生物学においても血液・免疫学のような詳細な解析が進むことが期待される。

4 研究参加者

【東大分生研グループ】

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
宮島 篤	東京大学・分生研	教授	統括	平成14年11月～平成20年3月
田中 稔	東京大学・分生研	助教	肝幹細胞の解析	平成14年11月～平成20年3月
関根 圭輔	東京大学・分生研	助手	モデルマウス作成	平成14年11月～平成18年8月
伊藤 暢	東京大学・分生研	助教	幹細胞分化	平成15年9月～平成20年3月
谷水 直樹	東京大学・分生研	助教	肝幹細胞分化の解析	平成19年4月～平成20年3月
竹内 眞樹	東京大学・分生研	研究員	造血幹細胞増殖	平成14年11月～平成18年11月
峯畑 健一	東京大学・分生研	研究員	造血支持機能の解析	平成14年11月～平成15年4月
松井 等	東京大学・分生研	研究員	肝細胞分化機構	平成14年11月～平成16年7月
内木 隆寛	東京大学・分生研	研究員	肝細胞の増殖機構	平成16年4月～平成17年8月
江指 永二	東京大学・分生研	研究員	リンパ球の解析	平成14年11月～平成16年12月
野中 秀紀	東京大学・分生研	研究員	類洞内皮細胞の解析	平成14年11月～平成20年3月
木戸 丈友	東京大学・分生研	研究員	類洞内壁細胞の解析	平成17年4月～平成19年2月
及川 栄子	東京大学・分生研	技術職員	モデルマウス作成	平成16年4月～平成20年3月
鈴木 香	東京大学・分生研	CREST 技術員	肝幹細胞の解析	平成14年11月～平成20年3月
神谷 淑子	東京大学・分生研	研究補助員	造血幹細胞の解析	平成15年6月～平成20年3月
平田 絢美	東京大学・分生研	研究補助員	細胞の分離	平成16年4月～平成18年3月
阿部 聡子	東京大学・分生研	研究補助員	事務全般	平成14年11月～平成20年3月
板東 高功	東京大学・分生研	大学院生	変異マウス作製	平成14年11月～平成17年3月
金 経雲	東京大学・分生研	大学院生	転写因子の解析	平成14年11月～平成17年3月
斉藤 弘樹	東京大学・分生研	研究員	肝芽細胞	平成14年11月～平成20年3月
須田 芳國	東京大学・分生研	大学院生	AGMでの造血発生	平成14年11月～平成16年3月
伊藤 寛明	東京大学・分生研	研究員	リンパ球の解析	平成15年4月～平成20年3月
笠原 大資	東京大学・分生研	大学院生	肝芽細胞の解析	平成15年4月～平成18年3月
菅野 安喜	東京大学・分生研	大学院生	造血幹細胞	平成15年4月～平成20年3月
岡部 繭子	東京大学・分生研	大学院生	オーバル細胞	平成15年4月～平成18年3月
陳 彦榮	東京大学・分生研	大学院生	肝細胞分化	平成15年4月～平成20年3月
渡辺 夏巳	東京大学・分生研	大学院生	肝細胞分化	平成16年4月～平成19年8月
鬼塚 和泉	東京大学・分生研	大学院生	肝造血の解析	平成17年4月～平成20年3月
宮岡 佑一郎	東京大学・分生研	大学院生	細胞分化機構の解析	平成17年4月～平成20年3月
岡崎 有羽子	東京大学・分生研	大学院生	肝細胞抗原の解析	平成17年4月～平成18年3月
河村 由布子	東京大学・分生研	大学院生	オーバル細胞の解析	平成17年4月～平成20年3月
山内 俊平	東京大学・分生研	大学院生	内皮細胞の解析	平成17年4月～平成20年3月

【KAST グループ】

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
中村 康司	KAST	研究員	OSMによる肝再生促進作用の解析	平成14年～平成16年3月
安西 弘子	KAST	研究員	肝細胞移植系	平成14年11月～平成16年3月
谷水 直樹	KAST	研究員	肝幹細胞の分離と遺伝子解析	平成14年11月～平成16年3月

5 招聘した研究者等

該当なし

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国際誌 37件)

* 著者、論文タイトル、掲載誌 巻、号、発行年の順番

1. Anzai H., Kamiya A., Shirato H., Takeuchi T. and Miyajima A. Impaired differentiation of fetal hepatocytes in homozygous *jumonji* mice. *Mechanisms of Development* 120(7), 791-800, 2003
2. Tanimizu N., Nishikawa M., Saito H., Tsujimura T. and Miyajima A. Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *Journal of Cell Science* 116, 1775-1786, 2003
3. Esashi E., Sekiguchi T., Koyasu S. and Miyajima A. A possible role for CD4+ thymic macrophages as professional scavengers of apoptotic thymocytes. *The Journal of Immunology, Cutting Edge* 171, 2773-2777, 2003
4. Tanaka M., Hirabayashi Y., Sekiguchi T., Inoue T., Katsuki M. and Miyajima A. Targeted disruption of Oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 102, 3154-3162, 2003
5. Rump A., Morikawa Y., Tanaka M., Minami S., Umesaki N., Takeuchi M. and Miyajima A. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 9190-9198, 2003
6. Nakamura K., Nonaka H., Saito H., Tanaka M. and Miyajima A. Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in Oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology* 39(3), 635-644, 2004
7. Morikawa Y., Tamura S., Minehata K., Donovan P.V., Miyajima A. and Senba E. Essential function of oncostatin M in nociceptive neurons of dorsal root ganglia. *J. Neuroscience* 24(8), 1941-1947, 2004
8. Esashi E., Ito, H. Suzuki H., Koyasu S. and Miyajima A. Development of CD4+ macrophages from intrathymic T cell progenitors is induced by thymic epithelial cells. *Journal of Immunology* 173, 4360-4367, 2004
9. Tanimizu N. and Miyajima A. Notch signalling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *Journal of Cell Science* 117, 3165-3174, 2004
10. Nonaka H., Sugano S. and Miyajima A. Serial analysis of gene expression in sinusoidal endothelial cells from normal and injured mouse liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324(1), 15-24, 2004
11. Tanimizu N., Saito H., Mostov K. and Miyajima A. Long-term culture of hepatic progenitors derived from mouse Dlk⁺ hepatoblasts. *Journal of Cell Science* 117, 6425-6434, 2004
12. Tanimizu N., Tsujimura T., Takahide K., Kodama T., Nakamura K. and Miyajima A. Expression of Dlk/Pref-1 defines a subpopulation in the rat oval cell compartment. *Mechanism of Development Gene Expression Pattern* 5(2), 209-218, 2004

13. Okaya A., Kitanaka J., Kitanaka N., Satake M., Kim Y., Terada K., Sugiyama T., Takemura M., Fujimoto J., Terada N., Miyajima A. and Tsujimura T. Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *American Journal of Pathology* 166, 709-719, 2005
14. Jiang J., Kojima N., Kinoshita T., Miyajima A., Yan W. and Sakai Y. Cultivation and induction of fetal liver cells in a poly-L-lactic acid scaffold. *Mat. Eng. C.* 24, 361-363, 2004
15. Shimizu A., Sasaki H., Aoya K., Yoshida M., Kato K., Heike Y., Ikarashi Y., Shirakawa K., Takaue Y., Miyajima A., Terada M., Nagai H. and Wakasugi H. The mouse natural killer T cell-associated antigen recognized by U5A2-13 monoclonal antibody is intercellular adhesion molecule-1. *Immunol. Letters* 92, 227-235, 2004
16. Matsunaga T, Inaba T, Matsui H, Okuya M, Miyajima A, Inukai T, Funabiki T, Endo M, Look A.T. and Kurosawa H. Regulation of annexin II by cytokine-initiated signaling pathways and E2A-HLF oncoprotein. *Blood.* 103(8), 3185-3191, 2004
17. Iwatsuki K., Tanaka K., Kaneko T., Kazama R., Okamoto S., Nakayama Y., Ito Y., Satake M., Takahashi S., Miyajima A., Watanabe T. and Hara T. Runx1 promotes angiogenesis by down-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3. *Oncogene* 23, 1129-1137, 2005
18. Bando T., Sekine K., Kobayashi S., Watabe A.M., Rump A., Tanaka M., Suda Y., Kato S., Morikawa Y., Manabe T. and Miyajima A. Neuronal leucine-rich repeat protein 4 is required for hippocampus-dependent long-lasting memory. *Molecular and Cellular Biology* 25(10), 4166-4175, 2005
19. Iwatsuki K., Tanaka K., Kaneko T., Kazama R., Okamoto S., Nakayama Y., Ito Y., Satake M., Takahashi S., Miyajima A., Watanabe T. and Hara T. Runx1 promotes angiogenesis by down-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3. *Oncogene* 23, 1129-1137, 2005
20. Okaya A., Kitanaka J., Kitanaka N., Satake M., Kim Y., Terada K., Sugiyama T., Takemura M., Fujimoto J., Terada N., Miyajima A. and Tsujimura T. Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am. J. Pathology* 166, 709-719, 2005
21. Kato Y., Iwama A., Tadokoro Y., Shimoda K., Minoguchi M., Akira S., Tanaka M., Miyajima A., Kitamura T. and Nakauchi H. Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J. Exp. Med.* 202, 169-179.2005
22. Doyonnas R., Nielsen J.S., Chelliah S., Drew E., Hara T., Miyajima A. and McNagny K.M. Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood* 105, 4170-4178, 2005
23. Inukai T., Inaba T., Dang J., Kuribara R., Ozawa K., Miyajima A., WuW., Look A.T., Arinobu Y., Iwasaki H., Akashi K., Kagami K., Goi K., SugitaK. and Nakazawa S. TEF, an antiapoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by down-regulating expression of the common chain of cytokine receptors. *Blood* 105, 4437-4444, 2005

24. Kojima N., Shiojiri N., Sakai Y. and Miyajima A. Expression of neuritin during liver maturation and regeneration. *FEBS Letters*. 579, 4562-4566, 2005
25. Noguchi T., Fujimoto H., Sano H., Miyajima A., Miyachi H. and Hashimoto Y. Inhibitors of angiogenesis derived from Thalidomide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15, 5509-5513, 2005
26. Ito T., Arimitsu N., Takeuchi M., Kawamura N., Nagata M., Saso K., Akimitsu N., Hashimoto H., Natori S., Miyajima A. and Sekimizu K. Transcription elongation factor SII is required for definitive hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* ,26 ,3194-3203, 2006
27. Ito H., Esashi E., Akiyama T., Inoue J. and Miyajima A. IL-18 produced by thymic epithelial cells induces development of dendritic cells with CD11b in the fetal thymus. *International Immunology* 18(8), p.1253-1263, 2006
28. Minehata K., Takeuchi M., Hirabayashi Y., Inoue T., Donovan P.J., Tanaka M. and Miyajima A. Oncostatin M maintains the hematopoietic microenvironment and retains hematopoietic progenitors in the bone marrow. *International Journal of Hematology* 84(4), p.319-327, 2006
29. Miyaoka Y., Tanaka M., Naiki T. and Miyajima A. Oncostatin M inhibits adipogenesis through the RAS/ERK and STAT5 signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 281(49), p.37913-37920, 2006
30. Tanimizu N., Miyajima A., and Mostov K.E. Liver progenitor cells develop cholangiocyte-type epithelial polarity in three-dimensional culture. *Mol Biol Cell*. 18,1472-1479, 2007
31. Watanabe N., Tanaka M., Suzuki K., Kumanogoh A., Kikutani H. and Miyajima A. Tim2 is expressed in mouse fetal hepatocytes and regulates their differentiation. *Hepatology* 45(5) ,1240-1249, 2007
32. Naiki T., Saijou E., Miyaoka Y., Sekine K. and Miyajima A. TRB2, a mouse Tribbles ortholog, suppresses adipocyte differentiation by inhibiting Akt and C/EBP β . *The Journal of Biological Chemistry* 282(33),24075-24082, 2007
33. Sekine K., Chen Y., Kojima N., Ogata K., Fukamizu A. and Miyajima A. Foxo1 links insulin signaling to C/EBP α and regulates gluconeogenesis during liver development. *The EMBO Journal* 26(15),3607-3615, 2007
34. Nonaka H., Tanaka M., Suzuki K. and Miyajima A. Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors. *Developmental Dynamics* 236 (8),2258-2267, 2007
35. Hamada T., Sato A., Hirano T., Yamamoto T., Son G., Onodera M., Torii I., Nishigami T., Tanaka M., Miyajima A., Nishiguchi S., Fujimori J. and Tsujimura T. Oncostatin M gene therapy attenuates liver damage induced by dimethylnitrosamine in rats. *The American Journal of Pathology* 171(3), 2007
36. Saijou E., Itoh T., Kim K., Iemura S., Natsume T. and Miyajima A. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the zinc finger protein EZI is mediated by importin-7-dependent nuclear import and CRM1-independent export mechanisms *JBC* 282(44), 32327-32337, 2007

37. Sugano Y., Takeuchi M., Hirata A., Matsushita H., Kitamura T., Tanaka M. and Miyajima A. Long-term repopulating hematopoietic stem cells in bone marrow are highly enriched in the population expressing junctional adhesion molecule-A, JAM-A. *Blood* 111, 1167-1172, 2008

(2)その他の著作物

【総説】

1. Tanaka M. and Miyajima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 149, 39-52, 2003
2. Nakamura K. and Miyajima A. Oncostatin M promotes differentiation of fetal hepatocytes in vitro and regulates liver regeneration in vivo. *Stem Cell and Liver Regeneration* (K. Okita Ed. Springer-Verlag), 26-35, 2004
3. 竹内眞樹, 宮島篤. 胎生期肝臓における造血. *臨床血液* 45 巻第 5 号 p.355-364 2004 年 5 月号
4. 宮島篤. サイトカインと受容体. *別冊医学のあゆみ サイトカイン—state of arts* (編 宮坂信之、宮島篤) 医歯薬出版株式会社 2004
5. Takeuchi M. and Miyajima A. Hematopoiesis in Fetal Liver. *Pluripotent Hematopoietic Stem Cells* (Ed. J. Keller), ISBN: 1-58706-182-1, 2005 (オンライン書籍)
6. 宮島篤. サイトカインの種類とその作用. (臨床免疫学 (上) 基礎研究の進歩と最新の臨床 基礎編IV サイトカインとその受容体) *日本臨床* 63 巻増刊号 4 2005
7. 鬼塚和泉, 竹内眞樹, 宮島篤. 哺乳類の胚発生における造血と成体型造血幹細胞の起源. *別冊・医学の歩み 血液疾患 state of arts Ver. 3*, p. 6-8, (編 坂田 洋一他) 医歯薬出版株式会社 2005
8. 宮島篤 編集. *実験医学* vol. 23 no. 20 (増刊) 「サイトカインの多彩な機能と臨床応用; 免疫・造血・代謝・発生・神経の調節機構と疾患治療への最新アプローチ」羊土社 2005
9. 田中稔, 宮島篤. オンコスタチン M による肝再生の制御. *実験医学* vol. 23 no. 20 (増刊) 「サイトカインの多彩な機能と臨床応用; 免疫・造血・代謝・発生・神経の調節機構と疾患治療への最新アプローチ」羊土社 2005
10. 宮島篤. サイトカインと受容体. *免疫実験法ハンドブック* (編 中島泉) p. 47-50 名古屋大学出版会 2005
11. 竹内眞樹, 宮島篤. 肝臓における造血ニッチ-胎生期造血. *分子細胞治療* Vol. 5 No. 2, p. 11-17 先端医学社 2006

12. Tanimizu N. and Miyajima A. Molecular mechanism of liver development and regeneration *International Review of Cytology* 259 , 1-48, 2007
13. 田中稔,宮島篤. Oncostatin M (OSM). *Surgery Frontier* vol.14 no.2,メディカルレビュー社 2007
14. 伊藤寛明,宮島篤.胎児期胸腺における IL-18 による CD11b⁺胸腺樹状細胞の分化誘導. *臨床免疫・アレルギー科* 「I/ 誘導される免疫応答の種類と樹状細胞」第 48 巻 第 3 号 科学評論社 2007
15. 宮岡佑一郎,宮島篤.脂肪細胞分化における Oncostatin M の役割. *The Lipid (ザ・リピッド)* 「脂肪細胞の新しい展開」第 19 巻 第 1 号 メディカルレビュー社 2008

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 27 件 (国内会議 17 件、国際会議 10 件)

1. Miyajima A. Development of hematopoiesis and liver. *5th IMBN Conference*(Shanghai, China 2002.11.3-5)
2. Miyajima A. Roles of Oncostatin M in hematopoiesis. *Annual Meeting of the French Society of Immunology* (Strasbourg, France 2002.11.27-29)
3. Miyajima A. Liver development and hematopoiesis. *Wilsede Meeting. XV* (Wilsede, Germany 2003.6.17)
4. 宮島篤. 肝細胞の発生・分化・再生の分子機構. *第 10 回肝細胞研究会* (東大医学部・鉄門記念講堂 2003.7.11-12)
5. Miyajima A., Tanimizu N., Matsui T., Tanaka M. and Nakamura K. Role of Cytokines for Development and Regeneration of Liver. *the American Society for Cell Biology Summer meeting "Signal Transduction Determining the Fate of Stem Cells"* (Bozeman, Montana U.S.A 2003.8.9-12)
6. 宮島篤. Fetal liver hematopoiesis: expansion of immature hematopoietic progenitors *in vitro*. *第 65 回日本血液学会総会* (大阪 2003.8.29)
7. 宮島篤, 中村康司, 谷水直樹, 安西弘子, 田中稔. 肝幹細胞と肝臓の発生・分化・再生. *第 7 回 Molecular Cardiovascular Conference* (北海道余市郡赤井川村 キロロホテルピアノ 2003.9.5-7)
8. 宮島篤. Molecular basis for liver development. *第 76 回日本生化学会大会* (パシフィコ横浜 2003.10.15-18)
9. 宮島篤. Liver development and regeneration. *奈良先端科学技術大学院大学 21 世紀 COE プログラム 第 2 回国際シンポジウム Molecular Network in Cellular Signal Transduction and Environment Responses* (奈良 2004.1.19-20)

10. 宮島篤. 肝臓の発生・分化・再生の分子機構. 第 35 回肝代謝コロキウム(大阪 2004.2.6)
11. 宮島篤, 江指永二, 伊藤寛明. Thymic CD4⁺/Mac1⁺ Cells Are Professional Scavengers and Are Derived From Immature Thymocytes through the Interaction with Thymic Epithelial Cells. 平成 15 年度国際ワークショップ「免疫システムの構築・作動の分子構造とその制御技術の開発」(学術総合センター 一橋記念講堂、東京 2004.2.16-17)
12. 宮島篤. Liver development and regeneration. 細胞周期ワークショップ (奈良 2004.4.16)
13. Miyajima A., Tanimizu N., Tanaka M. and Nakamura K. Liver development and regeneration. *The 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop* (奈良県新公会堂 2004.4.13-16)
14. Miyajima A. Hepatic progenitors in liver development and regeneration 2004 *Seoul Symposium on Stem Cell Research*(Seoul , Korea 2004.9.1-3)
15. 宮島篤. 造血幹細胞の発生分化と造血ニッシェ. 第 6 回九州血液腫瘍研究会(福岡 ファッションビル 2005.2.26)
16. 宮島篤. 幹細胞生物学と再生医療. 第 64 回日本癌学会学術総会 (ロイトン札幌 2005.9.14-16)
17. Miyajima A. Characteristics of hematopoietic stem cells and liver stem cells. 8th *A-IMBN (Asia-Pacific International Molecular Biology Network) Conference in HCMC* (Unification Palace、Ho Chi Minh City, Socialist Republic of Vietnam 2005.10.27-29)
18. Miyajima A. Characterization of membrane proteins in fetal hepatocytes. *2nd International Symposium on Developmental Biology and Tissue Engineering* (Tokyo Institute of Technology, Yokohama 2006.3.24)
19. 宮島篤. 造血幹細胞と肝臓幹細胞の発生・分化. 第 14 回奈良県造血細胞移植研究会 (奈良 2006.6.24)
20. 宮島篤. 総論-幹細胞の分離、培養とその医療応用. 第 5 回臨床応用を目指した産学連携セミナー「細胞医療の躍進を担う細胞分離・培養技術の最前線」(駒場エミナース 東京 2006.7.14)
21. 宮島篤. 肝細胞分化制御の異常とがん化. 金沢大学がん研究所附属がん幹細胞研究センターシンポジウム「がん研究の新しい潮流」(金沢大学医学部記念館 2006.11.24)
22. 宮島篤, 岡部繭子, 鈴木香, 田中稔. 肝幹細胞の分離と性状解析. 第 6 回日本再生医療学会総会 (パシフィコ横浜 2007.3.13-14)
23. 宮島篤. 肝幹細胞の発生と分化. 第 33 回日本急性肝不全研究会 (お台場グランパシフィックメリディアン 東京 2007.5.30)
24. 宮島篤. 肝臓の発生と分化の分子機構. 第 3 回広島肝臓プロジェクト研究センタ

ー シンポジウム (広島大学廣仁会館 2007.6.29)

25. 宮島篤. 肝幹細胞の発生と分化. 第4回日本病理学会カンファレンス 2007 旭川「肝疾患研究の最前線：現状と課題」(旭川グランドホテル 2007.7.27-28)
26. 宮島篤, 岡部繭子, 河村由布子, 鈴木香, 田中稔. 肝障害により出現する肝幹細胞の分離と性状解析. 第28回日本炎症・再生医学会 (京王プラザホテル新宿 2007.8.2-3)
27. 宮島篤. 肝癌の分子標的としての肝幹細胞膜タンパク質. 第45回日本癌治療学会総会 (国立京都国際会館 2007.10.24-26)

② 口頭発表 36件 (国内会議 30件、国際会議 6件)

1. 笠原大資, 竹内眞樹, 峯畑健一, 宮島篤. マウス胎仔肝臓における delta-like (Dlk) 発現細胞の造血支持能の解析. 第1回幹細胞シンポジウム (大阪 2003.5.28-29)
2. Tanimizu N., Saito H., Miyajima A. Dlk/Pref-1, a cell surface protein with EGF-like repeats, is a useful marker for the isolation of hepatoblasts from mouse fetal liver. *EMBO workshop on Liver Development, Gene Regulation and Disease* (Heraklion, Crete, Greece 2003.6.14-19)
3. Takeuchi M., Kasahara D., Sekiguchi T. and Miyajima A. Two distinct populations of fetal liver cells are required for expansion of immature hematopoietic progenitors in vitro. *32nd Annual Scientific Meeting, International Society for Experimental Hematology* (Paris, France 2003.7.5-8)
4. 中村康司, 野中秀紀, 宮島篤. 肝再生におけるオンコスタチンMとインターロイキン6の関係. 第10回肝細胞研究会 (東大医学部・鉄門記念講堂 2003.7.11-12)
5. 谷水直樹, 斉藤弘樹, 宮島篤. Dlkの発現を指標とした肝芽細胞の分画とその分化能の検討. 第10回肝細胞研究会 (東大医学部・鉄門記念講堂 2003.7.11-12)
6. 松井等, 宮島篤. 初代胎生肝細胞を用いた毛細胆管膜形成機構の解析. 第10回肝細胞研究会 (東大医学部・鉄門記念講堂 2003.7.11-12)
7. 田中稔. Analyses of Oncostatin M receptor (OSMR) deficient mice. 第4回若手研究者ワークショップ「総合がん」(長野県茅野市 2003.8.27-30)
8. 笠原大資, 関口貴志, 竹内眞樹, 峯畑健一, 宮島篤. マウス胎仔肝臓における delta-like (Dlk) 発現細胞の造血支持能の解析. 第65回日本血液学会総会 (大阪 2003.8.28)
9. 竹内眞樹, 関口貴志, 宮島篤. マウスにおける成体型造血幹細胞の初期発生. 第65回日本血液学会総会 (大阪 2003.8.30)
10. 安西弘子, 竹内隆, 宮島篤. 胎仔肝細胞の増殖・分化に及ぼす *jumonji* の機能解析. 神奈川県産学公交流研究発表会 (神奈川県海老名市、神奈川県産業技術総合研究

所 2003.10.16)

11. 宮島 篤, 野中秀紀, 田中稔, 中村康司. 肝再生過程におけるオンコスタチン M の役割. 第24回日本炎症・再生医学会 (国立京都国際会館、京都 2003.11.26-27)
12. Miyajima A., Minehata K., Takeuchi M, Sekiguchi T., Hirabayashi Y., Donovan P.J., Inoue T. and Hara T. Roles of Oncostatin M for homeostasis of bone marrow hematopoiesis. *American Society of Hematology 45th Annual Meeting* (San Diego CA, U.S.A. 2003.12.6-9)
13. 鈴木香, 田中稔, 渡辺夏巳, 岡部繭子, 宮島篤. 胎仔肝臓の細胞表面マーカーの検索. 第11回肝細胞研究会 (宇部市文化会館 2004.7.2-3)
14. 渡辺夏巳, 田中稔, 鈴木香, 熊ノ郷淳, 菊谷仁, 宮島篤. 膜タンパク質 Tim2 の発現解析と in vitro での胎生肝細胞分化における作用の検証. 第11回肝細胞研究会(宇部市文化会館 2004.7.2-3)
15. 野中秀紀, 関口貴志, 菅野純夫, 宮島篤. SAGE による肝類洞内皮細胞の遺伝子発現解析. 第25回日本炎症・再生医学会 (京王プラザホテル、東京 2004.7.13-14)
16. 谷水直樹, 宮島篤. 肝障害時に出現するオーバル細胞における肝芽細胞抗原 Dlk の発現. 第25回日本炎症・再生医学会 (京王プラザホテル、東京 2004.7.13-14)
17. Tanimizu N. and Miyajima A. Notch-2 controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *FASEB 2004 Summer Research Conferences; Mechanisms of Liver Growth, Development and Disease* (Snowmass Village, Colorado 2004.8.7-12)
18. 菅野安喜. 成体マウス骨髄細胞の造血幹細胞画分における JAM-1(junction adhesion molecule-1)の発現. 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (京都、国立京都国際会館 2004.9.17-19)
19. 笠原大資, 竹内眞樹, 平田絢美, 峯畑健一, 宮島篤. マウス胎仔肝臓の造血ニッチは胎仔未分化肝細胞で構成される. 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会 (京都、国立京都国際会館 2004.9.17-19)
20. 江指永二, 宮島篤. オンコスタチン M 遺伝子欠損マウスの解析. 第34回日本免疫学会総会 (札幌 2004.12.1-3)
21. 宮島篤, 峯畑健一, 竹内眞樹, 神谷淑子. オンコスタチン M による造血環境の制御. 第3回幹細胞シンポジウム (兵庫県立淡路夢舞台国際会議場、淡路島 2005.4.21-23)
22. Miyajima A., Tanimizu N., Nakamura K., Saito H. and Tanaka M. Characterization of fetal and adult hepatic progenitors. *ISSCR 3rd Annual meeting* (San Francisco 2005.6.23-25)
23. 田中稔, 鈴木香, 宮島篤. オンコスタチン M 受容体 KO マウスにおける肝障害. 第12回肝細胞研究会 (東大医学部・鉄門記念講堂 2005.7.8-9)

24. 野中秀紀, 菅野純夫, 宮島篤. ヒアルロン酸受容体 Stabilin-2 の発現を指標にした肝類洞内皮細胞の分離・識別. 第 12 回肝細胞研究会 (東大医学部・鉄門記念講堂 2005.7.8-9)
25. 岡部繭子, 田中稔, 宮島篤. 新たな胆管上皮細胞マーカーの同定. 第 12 回肝細胞研究会 (東大医学部・鉄門記念講堂 2005.7.8-9)
26. 鬼塚和泉, 岡部智也, 矢原一郎, 竹内眞樹, 宮島篤. Identification of stromal cell-dependent progenitors for hematopoietic or endothelial lineages in the fetal liver. 第 67 日本血液学会総会 (パシフィコ横浜 2005.9.17-19)
27. 江指永二, 伊藤寛明, 宮島篤. オンコスタチン M 遺伝子欠損マウスにおける Th1/Th2 バランスの異常. 第 35 回日本免疫学会総会 (パシフィコ横浜 2005.12.13-15)
28. 伊藤寛明, 江指永二, 秋山泰身, 井上純一郎, 宮島篤. 胸腺上皮細胞由来の IL-18 は胸腺樹状細胞の分化を誘導する. 第 35 回日本免疫学会総会 (パシフィコ横浜 2005.12.13-15)
29. 田中稔, 岡部繭子, 鈴木香, 宮島篤. 肝幹細胞の細胞表面タンパク質の同定と性状解析. 第 13 回肝細胞研究会 (旭川グランドホテル 2006.6.30-7.1)
30. 関根圭輔. 胎児肝細胞の分化成熟における C/EBP α による転写調節機構の解析. 第 13 回肝細胞研究会 (旭川グランドホテル 2006.6.30-7.1)
31. 渡辺夏巳, 田中稔, 鈴木香, 熊ノ郷淳, 菊谷仁, 宮島篤. マウス胎仔肝細胞分化における細胞膜表面タンパク質 Tim2 の機能解析. 第 13 回肝細胞研究会 (旭川グランドホテル 2006.6.30-7.1)
32. Watanabe N., Tanaka M. and Miyajima A. Tim2, a member of the immunoglobulin superfamily, is implicated in liver development. 2006 FASEB Summer Research Conferences; Liver Biology, Development and Disease (Snowmass Village, Colorado, U.S.A. 2006.7.22-27)
33. Yamauchi S., Ito H. and Miyajima A. Anti-inflammatory activity of endothelial cells in LPS-induced endotoxin shock. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪国際会議場 2006.12.11-13)
34. 谷水直樹, Mostov K., 宮島篤. 肝前駆細胞株の 3 次元培養を用いた胆管形態形成の分子メカニズムの研究. 第 10 回日本組織工学会 (大手町サンケイプラザ、2007.11.8-9)
35. 菅野安喜. Junctional adhesion molecule-A (JAM-A/JAM-1/F11R) は、長期骨髄再構築能を有する造血幹細胞を分離する有用なマーカーである. 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (パシフィコ横浜、2007.12.11-15)
36. 谷水直樹, Mostov K., 宮島篤. 肝前駆細胞の 3 次元培養を用いた胆管形態形成の分子メカニズムの解析. 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 合

同大会(パシフィコ横浜、2007.12.11-15)

③ ポスター発表 68 件 (国内会議 34 件、国際会議 34 件)

1. Tanaka M. Targeted disruption of Oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Challenges in the era of stem cell Plasticity* (Providence, USA 2003.4. 10)
2. Nonaka H., Sekiguchi T., Sugano S. and Miyajima A. Gene expression profiles of endothelial cells isolated from normal and injured mouse liver. *EMBO workshop on Liver Development, Gene Regulation and Disease*(Heraklion, Crete, Greece 2003.6.14-19)
3. Nakamura K., Nonaka H., Saito H., Tanaka M. and Miyajima A. Oncostatin M is a key regulator of liver regeneration. *EMBO workshop on Liver Development, Gene Regulation and Disease*(Heraklion, Crete, Greece 2003.6.14-19)
4. Kojima N., Chuang D., Shiojiri N. and Miyajima A. Regulation of C/EBP α Transcriptional activity by STAT3. *EMBO workshop on Liver Development, Gene Regulation and Disease* (Heraklion, Crete, Greece 2003.6.14-19)
5. 田中稔. 胎生肝芽細胞の細胞表面マーカーの探索. 第10回肝細胞研究会 (東大医学部・鉄門記念講堂 2003.7.11-12)
6. 野中秀紀, 関口貴志, 菅野純夫, 宮島篤. SAGE による肝類洞内皮細胞の遺伝子発現解析. 第10回肝細胞研究会 (東大医学部・鉄門記念講堂 2003.7.11-12)
7. Sekine K., Minehata K., Takeuchi M., Yokota T. and Miyajima A. STAT3 induces development of hematopoietic cells in the AGM region. *The 6th conference Asia-Pacific International Molecular Biology Network* (日本科学未来館、東京 2003.11.12-13)
8. Esashi E., Ito H., Koyasu S. and Miyajima A. CD4⁺ Macrophages Are Professional Scavengers of Apoptotic Thymocytes and Are Derived from Intrathymic Lymphoid Progenitors. *American Society of Hematology 45th Annual Meeting* (San Diego CA, U.S.A 2003.12.6-9)
9. 伊藤寛明, 江指永二, 宮島篤. 胸腺樹状細胞の機能と胸腺上皮細胞由来の分化誘導因子. 第33回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡国際会議場、福岡 2003.12.8)
10. 渡辺夏巳, 田中稔, 鈴木香, 熊ノ郷淳, 菊谷仁, 宮島篤. 膜タンパク質 Tim2 の発現解析と in vitro での胎生肝細胞分化における作用の検証. 第26回日本分子生物学会年会 (神戸国際展示場 2003.12.10~13)
11. 中村康司, 安西弘子, 柳内浩之, 宮島篤. II型膜タンパク質 ITM2A は、肝幹/肝前駆細胞のマーカーである. 第26回日本分子生物学会年会 (神戸国際展示場 2003.12.10~13)
12. 小島伸彦, 塩尻信義, 宮島篤. 肝成熟に伴う Neuritin の発現. 第26回日本分子生物学会年会 (神戸国際展示場 2003.12.10~13)

13. 谷水直樹, 宮島篤. Notch シグナルによる肝芽細胞の分化制御. 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸国際展示場 2003.12.10-13)
14. 陳彦榮, 関根圭輔, 深水昭吉, 宮島篤. マウスの胎仔肝臓における Cyclin D の制御機構の解析. 第 26 回 日本分子生物学会年会 (神戸国際展示場 2003.12.10-13)
15. 鈴木香, 田中稔, 渡辺夏巳, 岡部繭子, 宮島篤. 胎児肝芽細胞に対する細胞表面マーカーの検索. 第 26 回 日本分子生物学会年会 (神戸国際展示場 2003.12.10-13)
16. Tanaka M, Tanimizu N., Nakamura K. and Miyajima A. Identification and Characterization of Hepatic Stem Cell Marker Molecules. *International Society for Stem Cell Research* (Boston, USA 2004.6.12)
17. 野中秀紀, 関口貴志, 菅野純夫, 宮島篤. 肝類洞内皮細胞のマーカー遺伝子の同定とモノクローナル抗体の作製. 第 11 回肝細胞研究会(宇部市文化会館 2004.7.2-3)
18. 松井等, 宮島篤.肝細胞の毛細胆管膜機能に対するアミノペプチダーゼ N の役割. 第 11 回肝細胞研究会 (宇部市文化会館 2004.7.2-3)
19. 岡部繭子, 田中稔, 宮島篤. Oval 細胞の細胞表面抗原の探索. 第 11 回肝細胞研究会 (宇部市文化会館 2004.7.2-3)
20. Takeuchi M., Kamiya Y., Hirata A. and Miyajima A. Definitive hematopoietic stem cells alter their characteristics during development. *33rd Annual Scientific Meeting of the International Society for Experimental Hematology* (New Orleans, U.S.A. 2004.7.17-20)
21. Ito H., Esashi E. and Miyajima A. Thymic epithelial cells induce the development of dendritic cells from pro-T cells by soluble factors. *12th International Congress of Immunology* (Montreal, Canada 2004.7.18-23)
22. Esashi E., Ito H., Koyasu S. and Miyajima A. Thymic CD4⁺ macrophages are originated from intrathymic lymphoid progenitors by the interaction with thymic epithelial cells. *12th International Congress of Immunology* (Montreal, Canada 2004.7.18-23)
23. Nonaka H., Sekiguchi T., Sugano S. and Miyajima A. Gene expression profiles of endothelial cells isolated from normal and injured mouse liver. *FASEB 2004 Summer Research Conferences; Mechanisms of Liver Growth, Development and Disease* (Snowmass Village, Colorado 2004.8.7-12)
24. Watanabe N., Tanaka M., Suzuki K., Kumanogoh A., Kikutani H. and Miyajima A. Expression and function of Tim2 during liver development. *FASEB 2004 Summer Research Conferences; Mechanisms of Liver Growth, Development and Disease* (Snowmass Village, Colorado 2004.8.7-12)
25. Kim K., Nakayama K. and Miyajima A. A novel nuclear zinc finger protein EZI enhances nuclear retention and transactivation of STAT3. *韓国分子細胞生物学会* (ソウル, 韓国 2004.10.14-15)
26. Ito T., Arimitsu N., Takeuchi M., Kawamura N., Natori S., Miyajima A. and Sekmizu K.

Impaired fetal liver erythropoiesis in mice lacking transcription elongation factor S-II/TFIIS. *ASBMB- Symposia: Transcriptional Regulation by Chromatin and RNA Polymerase* (Granlibakken, Lake Tahoe CA U.S.A 2004.10.29-11.1)

27. 岡部繭子, 田中稔, 宮島篤. Oval 細胞の細胞表面マーカー分子の探索. 第27回日本分子生物学会年会 (神戸 2004.12.8-11)
28. 渡辺夏巳, 田中稔, 鈴木香, 熊ノ郷淳, 菊谷仁, 宮島篤. Expression and function of Tim2 during liver development. 第27回日本分子生物学会年会 (神戸 2004.12.8-11)
29. 鈴木香, 田中稔, 渡辺夏巳, 岡部繭子, 宮島篤. 胎仔肝臓の細胞表面マーカーの探索. 第27回日本分子生物学会年会 (神戸 2004.12.8-11)
30. 有光なぎさ, 伊藤貴浩, 竹内眞樹, 川村暢幸, 名取俊二, 宮島篤, 関水久. 転写伸長因子 S-II 遺伝子欠損マウスにおける赤血球産生異常. 第27回日本分子生物学会年会 (神戸 2004.12.8-11)
31. 鬼塚和泉, 岡部智也, 矢原一郎, 竹内眞樹, 宮島篤. PCLP 1 の発現レベルの違いによる血球/血管内皮前駆細胞の同定. 第3回幹細胞シンポジウム (日兵庫県立淡路夢舞台国際会議場、淡路島 2005.4.21-23)
32. Tanimizu N., Miyajima A. and Mostov K. Laminin confers the long-term proliferative capability on mouse Dlk⁺ hepatoblasts. *Cellular Niches Workshop* (Marriott Bethesda North Hotel and Conference Center, Bethesda, MD, U.S.A. 2005.5.16-17)
33. 内木隆寛, 宮島篤. TRB の肝細胞分化、増殖への関与. 第12回肝細胞研究会(東大医学部・鉄門記念講堂 2005.7.8-9)
34. 鈴木香, 田中稔, 渡辺夏巳, 岡部繭子, 宮島篤. 胎生および成体肝臓における p75^{NTR} 発現細胞の解析. 第12回肝細胞研究会 (東大医学部・鉄門記念講堂 2005.7.8-9)
35. Ito T., Arimitsu N., Takeuchi M., Kawamura N., Nagata M., Natori S., Miyajima A. and Sekimizu K. Transcription elongation factor S-II is required for fetal liver erythropoiesis. 第78回日本生化学会大会 (神戸国際会議場 2005.10.19-22)
36. 岡部繭子, 田中稔, 平田絢美, 宮島篤. マウス肝臓における EpCAM の発現解析. 第28回日本分子生物学会年会 (ヤフドーム、福岡 2005.12.7-10)
37. 宮岡佑一郎, 田中稔, 宮島篤. Oncostatin M (OSM)による脂肪細胞分化抑制機構の解析. 第28回日本分子生物学会年会 (ヤフドーム、福岡 2005.12.7-10)
38. 田中稔, 鈴木香, 宮島篤. 肝障害時におけるオンコスタチンM受容体 KO マウスの解析. 第28回日本分子生物学会年会 (ヤフドーム、福岡 2005.12.7-10)
39. 関根圭輔, 小島伸彦, 陳彦榮, 宮島篤. マウス胎児肝発生における C/EBP α による転写調節機構の解析. 第28回日本分子生物学会年会 (ヤフドーム、福岡 2005.12.7-10)
40. Tanimizu N., Miyajima A. and Mostov K. Hepatic Progenitor Cells Establish Epithelial

Polarity In The Three Dimensional Culture. *ASCB 45 th Annual Meeting* (Moscone Center San Francisco, CA U.S.A. 2005.12.10-14)

41. Onitsuka I, Takeuchi M., Okabe T., Kamiya Y., Hirata A., Yahara I. and Miyajima A. Two distinct precursors of hematopoietic stem cells and endothelial progenitors characterized by the PCLP1 expression. *American Society for Hematology 47th Annual Meeting* (Atlanta, U.S.A 2005.12.10-13)
42. Tanaka M., Okazaki Y., Suzuki K. and Miyajima A. Involvement of Lutheran blood group in the maturation of mouse fetal hepatocytes. *20thIUBMB and 11thFAOBMB Congress* (Kyoto JAPAN 2006.6.18-23)
43. Sekine K. Cooperation of C/EBP α ; and Foxo1 in the expression of liver enzymes during development. *20thIUBMB and 11thFAOBMB Congress* (Kyoto JAPAN 2006.6.18-23)
44. Nonaka H., Yamauchi S., Hirata A. and Miyajima A. Developmental stages of liver sinusoids and endothelial cells defined by the expression of cell surface antigens. *20thIUBMB and 11thFAOBMB Congress* (Kyoto JAPAN 2006.6.18-23)
45. Ito H., Esashi E., Akiyama T., Inoue J. and Miyajima A. IL-18 produced by thymic epithelial cells induces the development of dendritic cells with CD11b in the fetal thymus. *20thIUBMB and 11thFAOBMB Congress* (Kyoto JAPAN 2006.6.18-23)
46. Suzuki K., Tanaka M., Watanabe N. and Miyajima A. Isolation and characterization of p75^{NTR} positive cells from mouse fetal liver. *20thIUBMB and 11thFAOBMB Congress* (Kyoto JAPAN 2006.6.18-23)
47. Watanabe N., Tanaka M., Suzuki K., Kumanogoh A., Kikutani H. and Miyajima A. A role for Tim2 in hepatocyte differentiation. *20thIUBMB and 11thFAOBMB Congress* (Kyoto JAPAN 2006.6.18-23)
48. Miyaoka Y., Tanaka M. and Miyajima A. Inhibition of adipocyte differentiation by Oncostatin M (OSM). *20thIUBMB and 11thFAOBMB Congress* (Kyoto JAPAN 2006.6.18-23)
49. Kawamura Y., Okabe M., Kido T., Suzuki K., Tanaka M. and Miyajima A. Search for extracellular factors associated with the induction of hepatic oval cells. *20thIUBMB and 11th FAOBMB Congress* (Kyoto JAPAN 2006.6.18-23)
50. 岡崎有羽子, 木戸丈友, 鈴木香, 渡辺夏巳, 田中稔, 宮島篤. マウス肝芽細胞における Lutheran blood group glycoprotein の発現とその機能解析. *第13回肝細胞研究会* (旭川グランドホテル 2006.6.30-7.1)
51. Tanaka M., Okabe M., Suzuki K. and Miyajima A. Identification of a cell surface marker of oval cells and isolation of mouse hepatic oval cells. *2006 FASEB Summer Research Conferences; Liver Biology, Development and Disease* (Snowmass Village, Colorado, U.S.A. 2006.7.22-27)
52. Tanimizu N., Miyajima A. and Mostov K. Cholangiocyte differentiation of hepatic progenitor cells in culture. *2006 FASEB Summer Research Conferences; Liver Biology, Development and Disease* (Snowmass Village, Colorado, U.S.A. 2006.7.22-27)

53. 西條栄子, 伊藤暢, 宮島篤. マウス zinc-finger タンパク質 Ezi の核局在メカニズムの解析. *日本分子生物学会 2006 フォーラム* (名古屋国際会議場 2006.12.6-8)
54. Ito H. and Miyajima A. Role of Oncostatin M in dendritic cell function. *第36回日本免疫学会総会・学術集会* (大阪国際会議場 2006.12.11-13)
55. Ito H., Esashi E. and Miyajima A. Role of Oncostatin M in dendritic cell function. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology 2007 "Intracellular and Intercellular Signaling in Dendritic Cell Function" (J8)* (Keystone Restort, Colorado, U.S.A. 2007.2.25-3.1)
56. Itoh T., Okabe M., Tanaka M., Suzuki K. and Miyajima A. Identification and characterization of adult hepatic stem cells in the mouse DDC diet model. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology 2007 "Stem Cells and Cancer" (X2)* (Keystone Restort, Colorado, U.S.A. 2007.3.2-7)
57. Tanaka M., Okabe M., Suzuki K. and Miyajima A. EpCAM marks highly proliferative and bipotential hepatic stem/progenitor cells in mouse E11 fetal liver. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology 2007 "Stem Cells and Cancer" (X2)* (Keystone Restort, Colorado, U.S.A. 2007.3.2-7)
58. 山本雅大, 木戸丈友, 田中宏樹, 宮腰昌明, 玉川進, 吉江真澄, 柳沼裕二, 宮島篤, 小川勝洋. 肝前癌細胞における cytokeratin 19 の毛細胆管周囲への局在. *第96回日本病理学会総会* (大阪大学 2007.3.13-15)
59. Yanai H., Nakamura K., Hijioka S., Kamei A., Ikari T., Ishikawa Y., Shinozaki E., Mizunuma N., Hatake K. and Miyajima A. Dlk/Pref-1, a cell surface antigen of hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular carcinoma. *AACR Annual meeting 2007* (Los Angeles, CA, U.S.A. 2007.4.14-18)
60. Ito T., Arimitsu N., Takeuchi M., Mizuguchi A., Takeuchi K., Miyajima A. and Sekimizu K. Essential role of the transcription elongation factor S-II/TFIIS in definitive hematopoiesis. *5th ISSCR Annual Meeting* (Cairns Convention Centre, Cairns, Australia 2007.6.17-20)
61. Tanaka M., Okabe M., Suzuki K., Kawamura Y. and Miyajima A. Isolation and characterization of liver stem cells from fetal and adult mouse. *5th ISSCR Annual Meeting* (Cairns Convention Centre, Cairns, Australia 2007.6.17-20)
62. 谷水直樹, 宮島篤, Mostov K. 3次元培養中での肝前駆細胞の胆管上皮細胞への分化. *第14回肝細胞研究会* (城山観光ホテル、鹿児島 2007.6.22-23)
63. 鈴木香, 田中稔, 宮島篤. p75^{NTR} 抗体を用いたマウス肝形成における間葉系細胞の解析. *第14回肝細胞研究会* (城山観光ホテル 鹿児島 2007.6.22-23)
64. 河村由布子, 田中稔, 斉藤滋, 宮島篤. 成体の正常肝臓における肝幹細胞の分離. *第14回肝細胞研究会* (城山観光ホテル 鹿児島 2007.6.22-23)
65. Sugano Y. Junctional adhesion molecule-A (JAM-A/JAM-1/F11R) marks long-term

repopulating hematopoietic stem cells. The American Society of Hematology 49th Annual meeting and exposition(Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia December 8-11, 2007)

66. 田中稔,鈴木香,齊藤滋,宮島篤.抗 p75NTR 抗体を用いた胎生肝臓における間葉系前駆細胞の分離・同定.第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会(パシフィコ横浜、2007.12.11-15)
67. 伊藤暢,西條栄子,家村俊一郎,夏目徹,宮島篤. 核内輸送タンパク質 importin-7 の新規基質の同定.第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会(パシフィコ横浜、2007.12.11-15)
68. 河村由布子,齋藤滋,田中稔,宮島篤.マウス成体肝臓における肝幹細胞の同定.第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会(パシフィコ横浜、2007.12.11-15)

(4)特許出願

①国内出願 (7件)

1. 未分化造血細胞検出用マーカー. 宮島篤、竹内真樹、田中稔、松下浩和；出願人（科学技術振興事業団） 特願 2003-33008(出願日 2003.2.10)
2. 肝臓の検出方法および肝臓診断薬. 柳内浩之、中村康司、宮島篤；出願人（神奈川県科学技術アカデミー） 特願 2003-401585(出願日 2003.12.1) PCT/JP2004/017499 EP 04819413.8
3. 造血幹細胞または血管内皮前駆細胞の製造法. 宮島篤、竹内真樹、矢原一郎、岡部智也、鬼塚和泉；出願人（先端科学技術インキュベーションセンター、医学生物学研究所） 特願 2003-406527（出願日 2003.12.4）
4. 癌治療薬. 安西弘子、中村康司、柳内浩之、宮島篤；出願人（神奈川県科学技術アカデミー） 特願 2003-423237（出願日 2003.12.19）
5. 疼痛を処理するための薬学的組成物. 森川吉博、宮島篤；出願人（科学技術振興機構） 特願 2004-27405(出願日 2004.2.3)
6. 肝芽細胞から内胚葉系前駆細胞を得る方法. 谷水直樹、宮島篤；出願人（神奈川県科学技術アカデミー） 特願 2004-130250（出願日 2004.4.26）
7. STAT 機能阻害剤およびその応用. 宮島篤、金経雲、伊藤暢；出願人（東京大学） 特願 2005-153814 (出願日 2005.5.26)

②海外出願

該当なし

(5)受賞等

- ①受賞 該当なし
- ②新聞報道 該当なし

(6)その他特記事項

肝臓の幹細胞の研究方法を膵臓の発生にも応用し、膵臓幹細胞/前駆細胞をマウス胎児より分離する方法を開発し、in vitroにて膵島を形成することに成功した。この技術はシーズ事業に採択された。検討を継続している。

7 研究期間中の主な活動

【 学会、研究会 】

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2005.7.8-9	第12回肝細胞研究会	東大鉄門記念講堂	300名	肝臓細胞に関する研究発表
2007.4.28	第4回肝臓医生物学研究会	住友入船ビル	30名	肝臓細胞に関する研究発表

【 所内セミナー 】

年月日	名称	場所	参加人数	概要(演題)
2003.12.4	分生研セミナー (山中伸弥)	東大分生研 セミナー室	30名	ES細胞における分化全能性と類腫瘍性増殖の分化機構
2003.7.18	分生研セミナー (紙谷聡英)	東大農学部 2号館講義室	30名	Role of the hepatocyte nuclear factor 4 alpha in control of the xenobiotic responses during fetal liver development.
2004.1.15	分生研セミナー (大野茂男)	東大分生研 セミナー室	30名	細胞極性と PAR-Apcc 経路
2004.2.19	分生研セミナー (夏目徹)	東大分生研 セミナー室	30名	タンパク質相互作用大規模解析
2004.4.12	分生研セミナー (Hide Tsukamoto)	東大分生研 セミナー室	30名	Molecular dysregulation of hepatic stellate cells and macrophages in chronic liver disease.
2004.5.10	分生研セミナー (竹内隆)	東大分生研 セミナー室	30名	Jmj 遺伝子と心筋細胞の増殖・分化制御
2004.7.22	宮島研究室セミナー (仁科博史)	東大分生研 セミナー室	30名	ストレス応答性 SAPK/JNK シグナル伝達系の肝形成における役割
2004.7.28	宮島研究室セミナー (吉富秀幸)	東大分生研 セミナー室	30名	Critical roles of endothelial cells on liver and pancreas development.
2004.9.6	分生研セミナー (Yoh-suke Mukoyama)	東大分生研 セミナー室	30名	Nerve-blood vessel interactions: how nerves control vessel identity and branching pattern.
2004.10.20	分生研セミナー (Peter C. Heinrich)	東大分生研 セミナー室	30名	Interleukin-6, oncostatinM and interleukin-31 signaling and its regulation.

2006.3.23	分生研セミナー (Stephen A. Duncan)	東大分生研 セミナー室	30名	Hepatocyte nuclear factor 4 controls hepatogenesis by regulating expression of multiple genes encoding transcription factors and cell adhesion proteins.
2006.3.23	分生研セミナー (Frederic Lemaigre)	東大分生研 セミナー室	30名	Role of onecut transcription factors in hepatic cell differentiation.
2006.12.13	分生研セミナー (Snorri S. Thorgeirsson)	東大分生研 セミナー室	30名	Stem cells and cancer.
2007.1.12	分生研セミナー (George Yeoh)	東大分生研 セミナー室	30名	The differences between acute and chronic liver regeneration with regard to cytokine signaling.

8 結び

本研究では肝臓における造血免疫機構と肝疾患治療への応用というテーマで5年間 CREST の研究をさせていただいた。この研究を始めて痛感したことは、血液学・免疫学に比べて肝臓の分子生物学的研究が大変遅れているということであった。肝臓の分子生物学を真剣に展開するには細胞の厳密な分離同定法の開発が必須であると判断し、大変泥臭いアプローチではあるが、肝臓構成細胞に発現する細胞膜抗原の同定とモノクローナル抗体作製を集中的に行った。血液細胞には300を超える細胞膜抗原がすでに同定され、それらに対する抗体が用意されている。これにより血液細胞の研究が大幅に発展したが、これは1980年代より世界中の非常に多くの研究者の努力によるものである。しかし、肝臓においては、そうした努力は極めて限定的であった。我々は短期間に多数の抗原の同定と抗体作製を行うことでほぼ全ての肝臓細胞の分離を可能としたが、これは肝臓の分子生物学の発展に大きく貢献することができたと思っている。これにより、肝臓の細胞社会の形成と破綻の一端が明らかになったが、今後はさらにこれを発展させ、肝臓の分子細胞生物学の発展に貢献したいと願っている。

肝臓細胞の多数の細胞膜抗原を同定し抗体を作製するという大変地道な研究を遂行することは他の短期的な研究費では到底不可能であり、CREST による長期間の研究助成、研究統括およびアドバイザーの先生方からの適切なお指導、さらに研究費の執行に当たり柔軟に対応していただいた CREST 本部および「免疫難病・感染症等の先進医療技術」事務所の皆様方に深謝申し上げます。



東大分生研 研究チームメンバー (平成17年7月撮影)

