

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791927

研究課題名(和文)酸化ストレスを利用した新規脂肪由来幹細胞産生サイトカインによる分化誘導法の開発

研究課題名(英文)Development of efficient differentiation methods using cytokine produced by human adipose-derived mesenchymal stem cells

研究代表者

森山 博由 (MORIYAMA, Hiroyuki)

近畿大学・薬学総合研究所・准教授

研究者番号：90581124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：新規ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞に酸化ストレスを与えると、hADMPCの培養上清がPC12の神経伸張を促すことを見いだしたことから、その機序を調べるために本研究を行った。まず、hADMPCからグルタチオンを枯渇させると酸化ストレスが生じ、BMP2とFGF2の発現ならびに分泌が上昇することを見いだした。またこの発現・分泌は抗酸化剤であるN-アセチルシステインを添加すると抑制された。さらに、BMP2とFGF2の発現にはp38MAPキナーゼが関与していることが明らかとなった。本研究より、hADMPCを神経変性部位に移植した際、神経伸張を伴う治療効果が期待出来ると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the role of oxidative stress on human adipose-derived multilineage progenitor cells (hADMPCs) in neurite outgrowth in PC12.

We found that glutathione depletion, followed by accumulation of reactive oxygen species, stimulates the expression of BMP2 and FGF2 in hADMPCs. Addition of N-acetylcysteine, a precursor of the intracellular antioxidant glutathione, suppressed the BSO-mediated upregulation of BMP2 and FGF2. Moreover, BSO treatment caused phosphorylation of p38 MAPK in hADMPCs. Inhibition of p38 MAPK was sufficient to suppress BMP2 and FGF2 expression, while this expression was significantly upregulated by overexpression of a constitutively active form of MKK6, which is an upstream molecule from p38 MAPK.

Thus, transplantation of hADMPCs into neurodegenerative lesions such as stroke and Parkinson's disease, in which the transplanted hADMPCs are exposed to oxidative stress, can be the basis for simple and safe therapies.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：脂肪由来間葉系幹細胞 酸化ストレス 神経伸張 再生医療 細胞治療 p38 MAPキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

我々の研究室では、脂肪組織を原材料に新たな方法を用いて獲得したヒト脂肪由来多系統前駆細胞 (hADMPC : human Adipose tissue Derived Multilineage Progenitor Cell) を素材に幹細胞生物学・再生医療研究を進めている。この hADMPC は従来の脂肪由来幹細胞 (ADSC) と比べ、脂肪、骨、軟骨への分化能も高いことのみならず、心筋細胞 (Okura H, et. al. Tissue Eng Part C Methods. 2010)、肝細胞 (Okura H, Moriyama H, et. al. Tissue Eng Part C Methods. 2010)、神経細胞 (未発表) など幅広い分化能を持つ細胞集団である。また、HGF, FGF2, VEGFA をはじめとした各種サイトカインの発現量は従来の ADSC や骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) よりも高い (図 1、未発表データ)。さらに疾患モデル動物への移植の際には遊走性、生着性にもすぐれており、細胞治療の材料として最も有用性が高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

申請者は現在、この hADMPC をさまざまなストレス環境下で培養することにより、hADMPC にどのような影響が起こるのか、主に細胞増殖、分化能、サイトカイン分泌に与える影響について検討している。最近それらのストレスのうち、酸化ストレスを与えた hADMPC の培養上清が、PC12 細胞の神経伸長を著しく促進することを見出した。そこで、神経伸長に関連すると思われるサイトカインについて解析したところ、酸化ストレス暴露培養下における hADMPC では、BMP2 と FGF2 の発現量、分泌量ともに増加していることが明らかとなった。また、その発現は p38 MAPK を介して制御されているという知見も得ている。本研究では、hADMPC において酸化ストレスがどのようなメカニズムで BMP2 と FGF2 の発現量を増加させているのか、その作用機序を明らかにする。また、hADMPC を酸化ストレスに暴露することで、hADMPC 自身や他の未分化細胞の骨、脂肪、心筋、神経などへの分化誘導が改善されるかを確かめる。この研究により、特に脳虚血、心虚血など、病変部が酸化ストレスに暴露されやすい部位での hADMPC による細胞治療の有効性に可能性が見出されると期待される。上述したこれまでの研究成果と背景をもとに、酸化ストレスに暴露された hADMPC のサイトカイン産生メカニズムを解明し、標的細胞への分化誘導法を開発する。これにより hADMPC を細胞治療に適用するために必要な技術基盤を築く。そのため研究期間内には以下のことを明らかにすることを目的とした。酸化ストレスが BMP2、FGF2 の発現を上昇させるメカニズムを解明する。酸化ストレスを与えた hADMPC の培養上清が PC12 の神経伸長を誘起したメカニズムを解明する。

本研究で使用する新規 hADMPC は従来の ADSC や BMSC と比べ、増殖能、分化能いずれも高く、細胞治療の材料として最も有用な細胞の一つであると言える。また、患者本人の腹部皮下脂肪より比較的大量に分離出来るため、採取による患者への負担や、移植の際の拒絶反応に対する心配もほとんどないと考えられる。我々は、hADMPC を細胞治療として用いる際の生体内環境に着目し、hADMPC にさまざまなストレスを負荷している。最近、それらのストレスのうち、酸化ストレスを負荷した hADMPC では、少なくとも BMP2 と FGF2 の 2 つの成長因子の発現量・分泌量が上昇していることが判明した。BMP2 や FGF2 は神経、心筋をはじめ、さまざまな細胞への分化に関与することが報告されている。また、脳虚血や心虚血では、再灌流の際、酸化ストレスがかかることも分かっている。つまり、hADMPC はそのような病変部位で酸化ストレスを受け、内在性の幹細胞から神経や心筋への効率的な分化誘導を誘起する可能性がある。また、hADMPC 自身がそれらの細胞へと分化する可能性も十分高い。

このように本研究を通じて、hADMPC を用いた新たな細胞治療へとつながる基礎研究を十分おこない、臨床応用へ道が開けていくことが最終目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト皮下細胞検体

ヒト皮下脂肪は形成外科手術時の余剰廃棄皮膚から得た。研究プロトコルは近畿大学薬学総合研究所、公益財団法人先端医療振興財団、神戸大学医学部付属病院、大阪市立大学医学部の倫理委員会から承認を受けて行った。脂肪の提供においては全て、ドナーよりインフォームドコンセントに同意のサインを得ている。

### (2) 細胞培養

PC12 はヒューマンサイエンス研究資源バンク (大阪、日本) より購入した。培養は RPMI1640 に 10% 熱不活化ウマ血清、5% ウシ血清を加えたものを用い、Collagen Type 1 (新田ゼラチン、大阪、日本) をコートしたディッシュ上で行った。分化誘導は RPMI1640 に 1% ウマ血清、0.5% ウシ血清を加えた培地に、NGF (50 ng/mL)、BMP2 (40 ng/mL)、もしくは FGF2 (5 ng/mL) を加えた。BMP を阻害するための組換えマウス Noggin (PeproTech, NJ, USA) は 200 ng/mL となるように加えた。ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (human adipose-derived multilineage progenitor cells: hADMPC) は DMEM-低グルコース: MCDB-201 培地 (6:4) に 1×インスリン-トランスフェリン-セレニウム (ライフテクノロジーズ社, NY, USA)、1 nM デキサメタゾン、100 mM アスコルビン酸、10 ng/mL EGF (PeproTech)、5% ウシ血清を加えた培地を用

い、フィブロネクチンコーティングディッシュに播種した。培地は2日おきに交換した。

(3)hADMPCのコンディション培地の作成  
hADMPCを播種してから2日後にBSO(濃度は実験により異なる)を添加し、16時間処理した。PC12細胞用の新鮮培地に交換して2日間培養し、培養上清を回収、フィルトレーションしてコンディション培地として使用した。

(4) GSH/GSSG比の計測  
還元グルタチオン(GSH)と酸化グルタチオン(GSSG)はGSH/GSSG-Glo assay kit(プロメガ)はプロトコルに準拠して行った。

(5) 活性酸素種の測定  
細胞は $10\ \mu\text{M}$  CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ を添加して培養し、細胞内活性酸素種をフローサイトメーターで測定した。蛍光は488 nmのアルゴンレーザーで励起し、525/30 nmのバンドパスフィルターを用いて測定した。死細胞はLIVE/DEAD fixable far red dead cell stain kitで除外した。

(6)ウェスタンブロッティング  
細胞をリン酸緩衝液で洗浄し、M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent(Thermo Scientific, MA, USA)により溶解し、タンパク質の抽出を行った。抽出したタンパク質はSDSを含むポリアクリルアミドゲルで泳動、分離を行った。分離したタンパク質はPVDF膜(Immobilon-P, Millipore)に転写した。今回実験で用いた抗体は、1次抗体として、phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP™ウサギモノクローナル抗体(1000倍希釈)、p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5)ウサギモノクローナル抗体(2000倍希釈)、phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (3D7)ウサギモノクローナル抗体(1000倍希釈)、p38 MAPKウサギポリクローナル抗体(1000倍希釈)、phospho-Smad1 (Ser463/465) /Smad5 (Ser463/465) /Smad8 (Ser426/428)ウサギポリクローナル抗体(1000倍希釈)、phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP™ウサギモノクローナル抗体(2000倍希釈)、Akt (pan) (C67E7)ウサギモノクローナル抗体(1000倍希釈)(以上すべてCell Signaling Technology, MA, USA)、FLAG (Clone M2)マウスモノクローナル抗体(10000倍希釈)、Actin (Clone C4)マウスモノクローナル抗体(10000倍希釈)(以上すべてMillipore)、2次抗体として、HRP標識抗ウサギIgG抗体(5000倍希釈)、HRP標識抗マウスIgG抗体(5000倍希釈)(以上すべてCell Signaling Technology)を使用した。検出はイモビロン HRP 化学発光検出試薬(Millipore)を使用し、37 で5分間インキュベーションした後、ATTO社のEzCaptureで撮影した。

(7)定量的PCR  
QIAshredder および RNeasy Micro Kit (Qiagen)を使用し、Qiagen社のプロトコルに従ってトータルRNAを抽出した。cDNAは、トータルRNA  $1\ \mu\text{g}$  から、Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific)を使用して合成した。合成したcDNAは、MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)を使用して精製した。定量的PCRはSsoFast EvaGreen supermix (Bio-Rad)を使用して行った。最も確実な内部標準となる遺伝子は、8種類のハウスキーピング遺伝子の中からgeNormソフトウェアを使用して決定し、それぞれの遺伝子の相対的な発現量をCt法にて算出した。

(8) ELISA法  
ELISA(酵素免疫測定法)は、Quantikine BMP2 Immunoassay System, Human FGF basic Immunoassay System(ともにR&D Systems, MN, USA)を用い、R&D System社のプロトコルに従い行った。

(9)プラスミド構築とレンチウイルスの作製  
Flag-tagged MKK6(glu)は、Addgene (pcDNA3-Flag MKK6(glu); Addgene plasmid 13518)より分与された。まず、エンターベクターであるpENTR11-MKK6(glu)-IresGFPを作製するためにFlag-tagged MKK6(glu)をIresGFPと共にENTR11(Invitrogen)に導入した。このエンターベクターとCS-EF-RfA(理研、三好先生より供与された)をLRクローナーゼ酵素(Invitrogen)を用いてLR反応により組換えを行い、CS-EF-MKK6(glu)-IresGFPを作製した。レンチウイルスベクターを作成するため、合成したプラスミドをパッケージングプラスミド(pCAG-HIVg/p, pCMV-VSVG-RSV-Rev:理研、三好先生より供与された)とともに、293T細胞にトランスフェクションした。2日後、レンチウイルスベクターを含む上清を回収し、6000Gで15時間、4にて濃縮した。

#### 4. 研究成果

(1)酸化ストレスを負荷したヒト脂肪組織多系統前駆細胞の培養上清によりラット副腎髄質由来褐色細胞腫は神経へ分化する

L-Buthionine-sulfoximine (BSO)は、細胞内の抗酸化物質であるグルタチオンの濃度を低下させることによって、酸化ストレスを与える作用がある薬剤である。そこで、実際にBSOによって酸化ストレスが負荷されるのか確認を行った。ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)にBSO(1 mM)を添加し、GSH/GSSG Glo Assay Kitを用いて還元型グルタチオン(GSH)と酸化型グルタチオン(GSSG)の比を測定した。その結果、BSOを加えたものはコントロールに比べGSH/GSSG比が顕著に減少していた。また、hADMPCに活性酸素の一種である過酸化水素( $\text{H}_2\text{O}_2$ )と反応

し蛍光を発する CM-H<sub>2</sub>DCFDA (10 μM) を添加し、hADMPc 内の過酸化水素量を測定したところ、BSO を添加したものは細胞内の過酸化水素量が増加していた。次に、BSO により酸化ストレスを負荷した hADMPc から産生された分化誘導因子により、ラット副腎髄質由来褐色細胞腫である PC12 細胞が神経へ分化するのかが確認するために、hADMPc から回収した培養上清 (conditioned medium, 以下 CM) を使用して PC12 細胞の培養実験を行った。コントロールとして通常の PC12 細胞分化用培地、hADMPc から回収した CM、BSO を添加した hADMPc から回収した CM、神経分化のポジティブコントロールとして NGF (50 ng/mL) を添加した分化用培地を用いて、2 日間分化誘導を行った。hADMPc からは、NGF をはじめとした多種の成長因子やサイトカインが分泌されていることが知られている。実験の結果、hADMPc から回収した CM で培養した PC12 細胞では、コントロールの分化用培地を用いた PC12 細胞よりも多くの神経突起が確認できた (Figure 1C, D)。しかし興味深いことに、酸化ストレスを負荷した hADMPc から回収した CM では、さらに多くの神経突起が確認できた (Figure 1E)。このことから hADMPc から神経分化に関わる分化誘導因子が産生されており、その分化誘導因子の産生が BSO により促されることが示唆された。

#### (2) PC12 細胞は Erk1/2 と Smad1/5/8 を介して神経へ分化する

hADMPc から回収した CM による PC12 細胞の神経伸長がなぜ誘起されたのかを調べるために、主な神経伸長シグナル経路である Erk1/2 MAP キナーゼ (MAPK)、p38 MAPK、Smad1/5/8、Akt 経路で活性化される因子をウエスタンブロッティング法により確認した。サンプルは、PC12 細胞を 2 日間 37 °C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% の条件下で培養し、上記項目 で示した培地と同様の 4 種類の培地で 1 時間分化誘導した後、回収された。ウエスタンブロッティング法の結果、分化誘導した PC12 細胞において、Erk1/2 と Smad1/5/8 が hADMPc の CM で活性化していることが示された。さらに酸化ストレスを負荷した hADMPc の CM ではより活性化していた。このことから、hADMPc からは Erk1/2 と Smad1/5/8 を活性化するような因子が産生されていることが示唆された。

#### (3) hADMPc に酸化ストレスを負荷することで BMP2 と FGF2 が産生される

hADMPc から産生される分化誘導因子の同定を行うために、リアルタイム PCR 法と ELISA 法を用いた網羅的な定量解析を行った。hADMPc を播種してから 2 日後に BSO (0, 1, 2 mM) を添加し、その 2 日後に PC12 細胞分化用培地に置き換え、さらにその 2 日後にサンプルを回収した。回収したサンプルより mRNA を抽出し、網羅的にリアルタイム PCR 法を行った結果、酸化ストレスを負荷した hADMPc

では BSO の濃度依存的に骨形成促進因子 (bone morphogenetic protein 2; BMP2) と繊維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor 2; FGF2) の遺伝子発現量が顕著に増加していることを見出した。同様に ELISA 法にて定量解析を行った結果、BSO を添加した hADMPc の培養上清において、BMP2 と FGF2 の分泌量が顕著に増加していた。さらに、この発現量の増加が本当に酸化ストレスによる影響なのかを確認するために、抗酸化作用のある N-アセチルシス테인 (NAC) を最終濃度 5 mM で添加し、リアルタイム PCR 法にて確認した。その結果、NAC を添加したことによって、BSO による BMP2 と FGF2 の発現上昇がコントロールレベルにまで抑制されたことより、酸化ストレスの影響で BMP2 と FGF2 の発現量が増加したことが確認された。また、BMP2 と FGF2 の発現により神経分化を促すという報告があるが、実際に両者の精製タンパクを用いて PC12 細胞の神経分化を確認したところ、BMP2 だけを添加したものでは短い神経伸長が確認でき、FGF2 だけを添加したものでは、長い神経伸長が確認できた。さらに、BMP2 と FGF2 の両方を添加したものでは長い神経突起が多く確認できたため、PC12 細胞は BMP2 と FGF2 により神経分化したことが示唆された。

#### (4) hADMPc では p38 MAPK を介して BMP2 と FGF2 が産生される

hADMPc において、酸化ストレスが負荷されたときの BMP2 と FGF2 の産生上昇に関わる機序を調べるために、様々なストレスに対して活性化することが知られている p38 MAPK に着目した。ファイブロンクチンコート処理した 6 ウェルプレートに hADMPc を播種し、2 日後に p38 MAPK の阻害剤である SB203580 (10 μM) を添加した後、4 時間後に BSO (2 mM) を加え、1 日後に培地交換を行い BSO を取り除いた。その 2 日後にもう一度培地交換を行い、阻害剤も取り除いた。その 2 日後に PC12 細胞分化用培地に置き換え、さらにその 2 日後にサンプルを回収した。回収したサンプルに含まれる活性化 p38 MAPK をウエスタンブロッティング法により確認した。その結果、酸化ストレスを負荷することで p38 MAPK が活性化することがわかった。また、同じ MAPK 経路である Erk1/2 および SAPK/JNK MAPK の活性化も確認した。ファイブロンクチンコート処理した 6 ウェルプレートに hADMPc を播種してから 2 日後に Erk1/2 MAPK の阻害剤である U0126 (10 μM) と SAPK/JNK MAPK の阻害剤である JNK inhibitor (1 μM) をそれぞれ添加し、1 時間後に BSO (2 mM) を添加し、1 日後に培地交換を行い、その 1 日後にサンプルを回収し、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、酸化ストレスの負荷により Erk1/2 MAPK は活性化されるが SAPK/JNK MAPK の活性化には影響がないことがわかった。BMP2 と FGF2 の産生には p38 MAPK の活性と

Erk1/2 MAPK の活性化が必要なのかを確認するために p38 MAPK の阻害剤である SB203580 と Erk1/2 の阻害剤である U0126 をそれぞれ添加し、BMP2 と FGF2 の発現をリアルタイム PCR により定量した。その結果、p38 MAPK を阻害することで BMP2 と FGF2 の発現が抑制されたことから、hADMPc では p38 MAPK を介して BMP2 と FGF2 が産生されていることが示唆された。

(5) 恒常活性型 MKK3/6 により p38 MAPK が活性化し、BMP2 と FGF2 の発現が上昇する

p38 MAPK の活性化が BMP2 と FGF2 の産生に関わっていることが示唆されたが、そのことをさらに確かめるために、hADMPc に p38 MAPK シグナルの上流因子である MKK6 の恒常活性型 (MKK6 (glu)) をレンチウイルスベクターにて導入した。MKK6 (glu) の発現により、以前の報告どおり、p38 MAPK の活性化が確認され、それにともなった BMP2 と FGF2 の発現上昇が示された。以上の結果より、p38 MAPK の活性化により BMP2 と FGF2 の発現が上昇するといえた。

上述の結果から、hADMPc に酸化ストレスを負荷すると MKK3/6 を介して p38MAPK が活性化し、分化誘導因子である BMP2 と FGF2 が産生されることがわかった。そして、産生された BMP2 と FGF2 は PC12 細胞において Erk1/2 と Smad1/5/8 を介して神経伸長を促すことが示唆された。以上の結果をまとめたのが図 1 である。

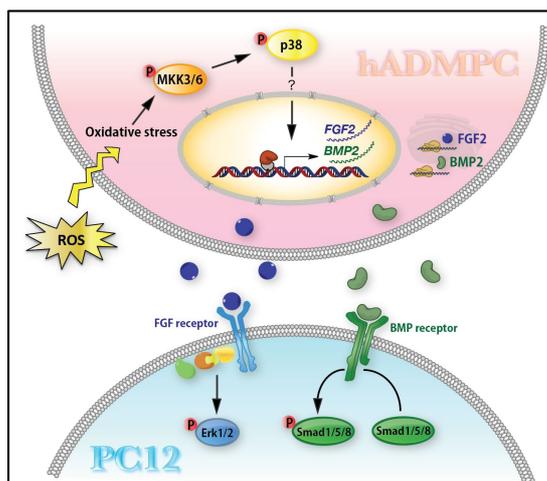


図 1 : 本研究から明らかとなったこと

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

(1)BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. Moriyama M, Moriyama H, Uda J, Matsuyama A, Osawa M,

Hayakawa T. *J Invest Dermatol*. 査読有, (2014) Jan 8. [Epub ahead of print] doi: 10.1038/jid.2014.11.

(2)Hypoxia increases Gefitinib-resistant lung cancer stem cells through the activation of insulin-like growth factor 1 receptor. Murakami A, Takahashi F, Nurwidya F, Kobayashi I, Minakata K, Hashimoto M, Nara T, Kato M, Kajima K, Shimada N, Iwakami S, Moriyama M, Moriyama H, Koizumi F, Takahashi K.

*PLOS ONE*. 査読有, 8(6):e66274 (2014)

(3)Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system. Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T.

*PLOS ONE*. 査読有, 8(6): e66274 (2013)

(4)Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling. Moriyama M, Moriyama H, Ueda A, Nishibata Y, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. *BMC Cell Biol*. 査読有, 13(1): 21. (2012) Highly accessed

(5)Hypoxia induces Gefitinib resistance in non-small cell lung cancer with both mutant and wild-type epidermal growth factor receptors. Minakata K, Takahashi F, Nara T, Hashimoto M, Tajima K, Murakami A, Nurwidya F, Yae S, Koizumi F, Moriyama H, Seyama K, Nishio K, Takahashi K. *Cancer Sci*. 査読有, 103(11): 1946-54 (2012)

〔学会発表〕(計 29 件)

(1)森山 麻里子、宇田 純輝、森山 博由、早川 堯夫：オートファジー制御関連分子 BNIP3 は表皮分化ならびに表皮形態維持に重要な働きをする (ポスター発表) 第 13 回日本再生医療学会総会 (京都)2014. 3. 4-6

(2)森山 博由、森山 麻里子、大倉 華雪、松山 晃文、早川 堯夫：低酸素暴露を介する脂肪由来間葉系幹細胞のドーパミン産生細胞分化誘導 (口頭発表) 第 13 回日本再生医療学会総会 (京都)2014. 3. 4-6

(3)北川 綾弓、森山 麻里子、宇田 純輝、野村 昇吾、早川 堯夫、森山 博由：Bcl-2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響 (ポスター発表) 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都)2013. 10. ポスター賞受賞

(4)森山 麻里子、宇田 純輝、北川 綾弓、野村 昇吾、早川 堯夫、森山 博由：Bcl-2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響 (口頭発表) 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都)2013. 10. 12

(5)石原 慎、森山 麻里子、大倉 華雪、松山 晃文、早川 堯夫、森山 博由：低酸素

培養における Notch シグナルを介した解糖系調節機能の解明 (ポスター発表) 第 4 回生命機能研究会 (滋賀) 2013. 9. 21-22 ベストポスター賞受賞

(6) Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Uda Junki, Matsuyama Akifumi, Osawa Masatake, Hayakawa Takao. INDISPENSABLE ROLES OF BNIP3, AN INDUCER OF AUTOPHAGY, IN BOTH DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. (Poster presentation) 11<sup>th</sup> ISSCR (BOSTON, USA) 2013. 6.12-15

(7)Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. ROLE OF NOTCH SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS. (Poster presentation) June 12 - 15, 2013, 11<sup>th</sup> ISSCR at BOSTON, U.S.A.

(8)Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Uda Junki, Matsuyama Akifumi, Osawa Masatake, Hayakawa Takao. INDISPENSABLE ROLES OF BNIP3, AN INDUCER OF AUTOPHAGY, IN BOTH DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. May 8 - 11, 2013, 2013 International Investigative Dermatology Meeting, Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, Scotland

(9)森山 博由, 森山 麻里子, 松山 晃文, 早川 堯夫: 低酸素暴露下における脂肪由来間葉系幹細胞の Notch シグナル亢進と解糖系調節機構の解明 (口頭発表) 第 12 回日本再生医療学会総会 (横浜) 2013. 3.21-23

(10)森山 博由, 森山 麻里子, 松山 晃文, 早川 堯夫: 脂肪組織由来体制幹細胞の製造方法 (口頭発表) 関西 8 私大新技術開発説明会 (東京) 2013. 3.1.

(11)森山 博由, 森山 麻里子, 松山 晃文, 早川 堯夫: 低酸素暴露下における脂肪由来間葉系幹細胞の Notch シグナル亢進と解糖系調節機構の解明 (口頭発表) 第 7 回 Notch meeting (三島) 2013. 2.14-15

(12)Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Ayaka Ueda, Ryouyuke Nishibata, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling. (Poster presentation) The 34<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. (Fukuoka, Japan) 2012. 12.11-14

(13)Haruki Isshi, Mariko Moriyama, Kei Sawaragi, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama. Role of Notch signaling in glycolysis regulation under hypoxic conditions. (Oral presentation) The 34<sup>th</sup>

annual meeting of the molecular biology society of Japan (Fukuoka, Japan) 2012. 12.11-14

(14)宇田 純輝, 森山 麻里子, 北川 綾弓, 野村 昇吾, 松山 晃文, 早川 堯夫, 森山 博由: Bcl2 ファミリー分子 BNIP3 が表皮構築に及ぼす影響. (ポスター発表) 第 6 2 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (兵庫) 2012. 10.20 (ポスター賞受賞)

(15)一志 春樹, 森山 麻里子, 榎木 佳, 大倉 華雪, 松山 晃文, 早川 堯夫, 森山 博由: 低酸素下における Notch シグナルによる解糖系調節機構の解明. (口頭発表) 第 6 2 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (兵庫) 2012. 10.20

(16)Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED MULTILINEAGE PROGENITOR CELLS EXPOSED TO OXIDATIVE STRESS INDUCE NEURITE OUTGROWTH IN PC12 CELLS THROUGH P38 MAPK SIGNALING. (Poster presentation) 10<sup>th</sup> ISSCR (Yokohama, Japan) 2012. 6.13-16

他 13 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)

名称: 脂肪組織由来体性幹細胞の製造方法  
発明者: 森山 博由, 森山 麻里子, 早川 堯夫, 松山 晃文  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2012-155584  
出願年月日: 平成 24 年 7 月 11 日  
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.phar.kindai.ac.jp/biomedical/Biomedical/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森山 博由 (MORIYAMA, Hiroyuki)  
近畿大学・薬学総合研究所・准教授  
研究者番号: 90581124