

欠損の雌ラットに DPPIV 陽性雄ラットの骨髄細胞を移植し、その後の骨髄細胞の運命が調べられた。その結果、肝障害後 11 日目に DPPIV 陽性の肝幹細胞が検出され、肝幹細胞が肝細胞に分化する 13 日目に DPPIV 陽性の肝細胞が検出された。最後に、L21-6 陽性 Lewis ラットの肝臓を MHC クラス II 抗原 L21-6 陰性の Brown-Norway ラットに移植した。その結果、肝障害後移植臓器の胆管は L21-6 陽性の細胞を含んでいたことから、胆管上皮の一部は循環骨髄細胞に由来していることが示された。

その後、骨髄細胞が肝細胞に分化することを示す様々な知見が以下のように得られている。移植された骨髄細胞のその後の運命を調べるため、マウスにおいて同様な性ミスマッチ骨髄移植のアプローチが Theise らにより行われた⁶⁵。その結果、少なくとも 6 箇月後までは雌の骨髄に由来する肝細胞が雄の正常肝の 1~2% 存在することが明らかになり、障害を受けていない正常時の肝再生においても骨髄の寄与が示唆された。ほぼ同時期に Alison ら⁶⁶ と Thise ら⁶⁷ はヒトにおいて骨髄由来の肝細胞の存在について以下に示す 2 つのアプローチを用いて証明した。まず、男性ドナーから骨髄移植を受けた女性の肝臓において、ドナー由来の細胞の存在を Y-染色体に特異的な DNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにより調べた。次に、男性患者に移植され、その後病気の再発により除去された女性患者の肝臓における Y-染色体陽性細胞を調べた。その結果、両方の場合で Y-染色体陽性肝細胞が検出された。

このような HSC のヒト肝臓への移植率は場合によって大きく異なり、肝障害の重症度が高いほど高い。例えば、肝臓移植後 C 型肝炎を再発したレシピエントの肝臓において肝細胞及び胆管上皮細胞は最大 40% を占める⁶⁷。G-CSF で動員させた CD34 陽性幹細胞を用いた研究では男性ドナーから骨髄移植を受けた女性の肝臓における Y-染色体陽性細胞は 4~7% の割合で肝細胞に分化する⁶⁸。チロシン同化経路において重要な酵素である Fumarylacetoacetate hydrolase 欠損 (FAH^{-/-}: 致死的なチロシン血症タイプ 1) マウスに致死量のアイソトープを照射後 FAH 野生型である 10^6 個の未分画骨髄細胞を移植すると FAH 疾患が治癒される⁶⁹。その際、造血能を維持するために必要である 2×10^5 個の FAH^{-/-}

骨髄細胞と共に移植する場合においては、わずか 50 個の精製 HSC (c-kit high, Thy low, Lin⁻, Sca-1⁺) だけで FAH 欠損を治癒できる。Bcl-2 トランスジェニックマウス由来の骨髄由来細胞を野生型のレシピエントに移植し肝障害及び増殖を誘導すると、移植した骨髄由来細胞が肝細胞に分化する⁷⁰。ラットにおいて骨髄由来肝幹細胞 “bone marrow-derived hepatocyte stem cell” (BDHSC) の分画が $\beta 2$ -ミクログロブリン陰性、Thy-1 陽性に基いて同定されているが、BDHSC と胆汁鬱滞性肝細胞を半透明膜で分離して共培養すると、BDHSC は肝細胞に分化し肝細胞と同様な効率でアンモニアを尿素に代謝する⁷¹。したがって、肝臓の障害は骨髄由来細胞において生着だけでなく、肝臓への分化にも必要と思われる。また、ラット肝実質障害のモデルの 1 つであるアリルアルコール誘導胆管障害において、胆管周囲の増殖性細胞は造血由来である可能性が高いことも明らかになっている⁷²。

以下のように骨髄から分離した各種細胞が肝細胞へ分化することを示す知見も得られている。Schwartz らは正常ヒト、マウス、ラットの生後未発達の骨髄から multipotent adult progenitor cell (MAPC) を分離し、マトリゲル上で HGF 及び FGF-4 を添加し培養すると、肝細胞に特徴的な表現系、形態及び機能を有する細胞に分化することを明らかにした⁷³。Lee らはヒト骨髄から分離した mesenchymal stem cell (MSC) を HGF, bFGF, ニコチンアミドを含む培地で培養後、オンコスタチン M, デキサメタゾン, インスリン, トランスフェリン, セレンを含む培地で培養すると、肝細胞に特徴的な表現系、形態及び機能を有する細胞に分化することを明らかにした⁷⁴。Sato らはヒト骨髄から分離した MSC をアリルアルコールにより障害された肝臓に直接移植すると、肝細胞に特徴的な表現系を有する細胞に分化することを明らかにした⁷⁵。

2.2 造血幹細胞と肝細胞の細胞融合

Terada ら⁷⁶ と Ying ら⁷⁷ は別々に細胞融合の存在を示し、Y 染色体マーカーなどドナー遺伝子の有無に基づいただけでは分化転換を証明したことにならないと指摘した。Terada らは green fluorescence protein (GFP) トランスジェニックマウスの骨髄細胞をインターロイキン含有培地で胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞) と混合培養すると、

GFP 陽性 ES 細胞が得られることを示した。この細胞は未分化な ES 細胞のマーカである Oct3/4, UTF-1 がともに陽性であったが、DNA ploidy を調べてみると 4 倍体 XXXY であり、ドナー側とレシピエント側の細胞が細胞融合を起こしていることが判明した。また、Ying らも同様な手法を用いてマウス CNS 細胞と ES 細胞における細胞融合を証明した。これら細胞融合に関する新知見から、次々に報告されてきた造血幹細胞の可塑性に疑問が投げかけられたのである。

その後、HSC から肝細胞の分化過程においても細胞融合の関与が報告された⁷⁸⁻⁸⁰。Wang ら⁷⁸と Vassilopoulos ら⁷⁹は雄の HSC を雌の肝臓に投与後増殖した肝細胞を FISH で解析すると、レシピエントの肝細胞の大部分が Y 染色体をもっていることを明らかにした。Alvarez-Dolado らは Cre-loxP システムを用いてレシピエントの肝細胞の大部分が Y 染色体をもっていることを明らかにした⁸⁰。なお、Cre-loxP システムとは loxP 配列を介してプロモーターと LacZ 遺伝子を導入した骨髓由来細胞を Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニック動物に移植すると、細胞融合により loxP 配列が Cre リコンビナーゼにより除去され LacZ が発

現するという手法である。しかしながら、これらの実験においては HSC の肝細胞への分化を過小評価している可能性もある。なお、HSC のうち肝細胞と融合する細胞は顆粒球-マクロファージ前駆細胞あるいは骨髓由来のマクロファージのような骨髓単核細胞であることも明らかになっている^{81,82}。したがって、移植した HSC のうち骨髓において骨髓単核細胞に分化した細胞が肝細胞と融合すると考えられる。本知見と対照的に、HSC は細胞融合することなく肝細胞へ分化するという報告もある^{75,83-85}。なお、細胞融合も含めた HSC が肝細胞に分化する機構を Fig. 2 において模式的に示す。

2.3 HSC の肝臓への生着に関与する因子

肝臓の障害は HSC が肝臓に生着するうえで刺激になると考えられるが、その促進因子については以下のような因子が候補として考えられている。マウスにおいては Clq 受容体のマウスホモログである AA4 分子が HSC の胎児肝へのホーミングに関与している⁸⁶。したがって、障害を受けた肝臓に対して生着する HSC にこの受容体たん白質が発現していると考えられる。胆管/間質細胞は幹細胞遊走因子 “stromal derived factor-1” (SDF-1) を発現し、HSC がその受容体 CXCR4 を発現する⁸⁷。CXCR4

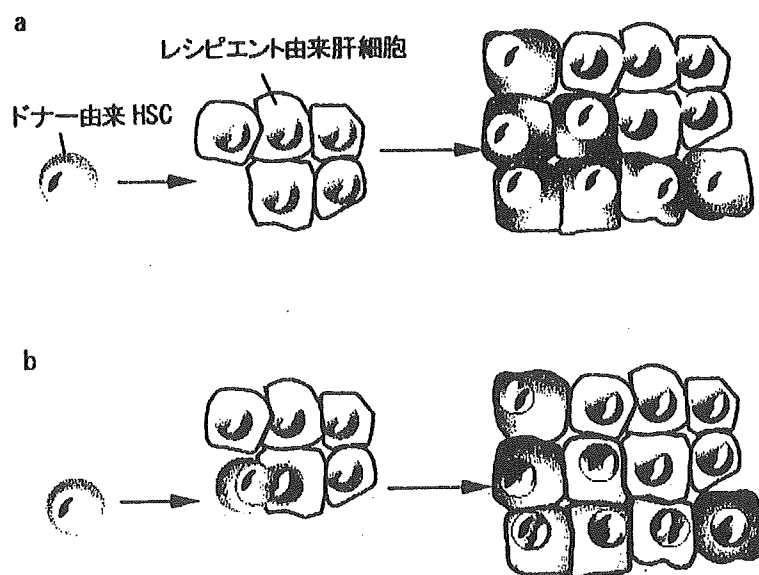


Fig. 2 HSC が肝細胞に分化する機構 a: ドナーの HSC がレシピエントの肝臓の微小環境で直接肝細胞に転換される。b: ドナーの HSC とレシピエントの肝細胞が融合する。(文献 145 を元に作製)

の抗体による中和あるいは SDF-1 の注入により、それぞれ HSC の肝臓へのホーミングが抑制あるいは促進される⁸⁸⁾。また、肝障害に伴い CXCR4 の発現が上昇し、SDF-1 を介した HSC の肝臓へのホーミングが促進される。したがって、SDF-1/CXCR4 システムは HSC の肝臓へのホーミングに重要な役割を果たしていると考えられる。この場合、HSC は CXCR4 を介して SDF-1 の走化性勾配に沿って移動し、肝臓の障害部位に運ばれるのかもしれない。

2.4 HSC の肝細胞への分化に関与する因子

HGF が *in vivo* 及び *in vitro* において HSC の肝細胞への分化を促進することが明らかになっている。ヒト臍帯血及び骨髄由来の精製した HSC を免疫不全マウスに移植後肝障害を起こすと、HSC の肝細胞への誘導が促進される⁸⁹⁾。その際、HGF を投与するとマウス肝臓におけるヒトアルブミン mRNA レベルがより顕著に増加する。ヒト臍帯血由来 HSC の培養において fibroblast growth factor/leukemia inhibitory factor/SCF/HGF の添加によりアルブミン mRNA は発現するが、それらの因子から HGF を除去すると顕著な発現低下がみられる⁹⁰⁾。HGF はラットの骨髄由来 HSC の培養系において肝細胞への誘導を促進する⁹¹⁻⁹⁴⁾。

3. その他の肝幹細胞

3.1 胚性幹細胞

マウス胚性幹 “embryonic stem” (ES) 細胞は *in vitro* において肝細胞へ分化する⁹⁵⁻⁹⁹⁾。また、ES 細胞を脾臓へ移植すると奇形種の形成を伴い肝細胞へ分化する¹⁰⁰⁾。更に、ES 細胞由来肝細胞を肝臓に移植すると、肝細胞分化表現型が維持される^{95,98)}。ヒト ES 細胞を胚様体 (embryoid body) で分化させると、胎児肝で特異的な各種遺伝子を発現する¹⁰¹⁾。更に、アルブミンのプロモーターに eGFP 遺伝子をつないだ発現ベクターをヒト ES 細胞にトランスフェクトして同様に分化させると、分離した eGFP 陽性細胞はアルブミンを発現し数週間にわたって増殖し続ける。

ヒト及びマウス ES 細胞を *in vitro* で効率よく分化させる工夫についても以下のような検討がなされている。Shirahashi らはヒト及びマウス ES 細胞をコラーゲンタイプ I でコートしたディッシュにプレーティングし、20%牛胎児血清、ヒトインスリン、

デキサメタゾンを含む培地で培養すると、肝細胞に特異的な表現系及び機能を有する細胞に効率よく分化することを明らかにした¹⁰²⁾。Hu らはあらかじめ形成されたマウス ES 細胞の胚様体を 0.1%ゼラチンでコートしたディッシュにプレーティングし、aFGF, TGF, AFP, HGF, オンコスタチン M, デキサメタゾン, インスリン, トランスフェリン, セレンを含む培地で培養した¹⁰³⁾。その結果、マウス ES 細胞は肝細胞に特異的な表現系及び機能を有する細胞に効率よく分化し、その比率は培養 21 日後で 33.4%に達する。Teratani らはマウス ES 細胞にアルブミンのプロモーターに eGFP 遺伝子をつないだ発現ベクターをトランスフェクトし、ゼラチンコートしたディッシュにプレーティング後、LIF, レチノイン酸を含む培地、続いて HGF, FGF-1, FGF-4 を含む培地で培養後、コラーゲンコートしたディッシュに移しオンコスタチン M を含む培地で培養すると、eGFP 陽性細胞数が増加することを明らかにした¹⁰⁴⁾。また、eGFP 陽性細胞は肝細胞に特異的な表現系、形態及び機能を有しており、ジニトロソアミンにより肝臓が障害されたマウスに静脈内投与すると、生存率及び肝機能の改善がみられる。Ishii らはマウス ES 細胞に AFP のプロモーターに eGFP 遺伝子をつないだ発現ベクターをトランスフェクトし、コラーゲンコートしたディッシュにプレーティング後、LIF, レチノイン酸を含む培地、続いて bFGF, 5 アミノ酸欠如 HGF を含む培地で培養すると、eGFP 陽性細胞が全体の 40% を占めることを明らかにした¹⁰⁵⁾。分離した eGFP 陽性細胞は AFP のような未成熟な肝細胞のマーカーしか発現しないが、Thy-1 陽性細胞を feeder layer として培養すると各種成熟肝細胞のマーカーを発現し、形態及び機能的にも肝細胞の特徴を有する細胞に分化する。Imamura らはマウス ES 細胞から形成された胚葉体をコラーゲンの scaffold に組み込み、オンコスタチン M, デキサメタゾン, インスリン, トランスフェリン, セレンを含む培地で三次元培養すると、肝細胞に特異的な表現系及び未成熟な肝細胞の形態を有する細胞に分化することを明らかにした¹⁰⁶⁾。scaffold に組み込まれた状態でその細胞を部分肝切除マウスの肝臓に移植すると、肝細胞に特異的な表現系を示す凝集化した細胞集団を形成する。

特に幹細胞としてヒト ES 細胞を一般的な細胞治療等に用いる場合、以下のような問題点が指摘されてきた。① ES 細胞そのものは移植により奇形腫を形成するが、分化誘導した細胞でも高いテロメラーゼ活性が保持されていれば腫瘍化の危険性がある。この点については以下のような知見もある。先に述べた Teratani らの報告¹⁰⁴⁾において、マウス ES 細胞から分化した eGFP 陽性細胞は、肝細胞に特異的な表現系、形態及び機能を有し、腫瘍化に関与する c-kit 及び E-ras の発現が消失していることが明らかになっている。eGFP 陽性細胞を更に精製後マウスに移植すると、肝臓に生着し奇形腫は形成されない。Kumashiro らは胚葉体で分化後部分的に解離させサブカルチャーしたマウス ES 細胞において肝細胞の表現系を有する細胞を確認した¹⁰⁷⁾。Percoll gradient, platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) 及び Mac-1 抗体を用いた磁気セルソーティングにより未分化 ES 細胞を含むその他の細胞を除くと、未分化 ES 細胞に発現し奇形腫形成の原因と考えられている Oct-3/4 が検出されず、マウスに移植後肝臓に生着し奇形腫を形成しない。②目的の細胞に分化する細胞のみを選択し、他の細胞に分化する細胞を除去する必要がある。選択した細胞が他の細胞に分化しないという安全性の保証も必要である。この点については前述の Kumashiro らにより報告された Percoll gradient 及び各種抗体を用いた磁気セルソーティング¹⁰⁷⁾が有用かもしれない。③分化した細胞が形態や一部の機能だけでなく、本来の細胞機能を発現するかどうか未知数である。この点に関しては以下のような知見もある。Fair らはマウス ES 細胞を FGF により分化後、第 IX 因子欠損のマウス肝臓に移植すると、レシピエントのマウスにおいて第 IX 因子が検出されることを明らかにした¹⁰⁸⁾。その際、コントロールのマウスは 7 日以内に死亡するのに対し、移植マウスは 38 から 115 日生存する。④自家移植を除き免疫学的に拒絶反応を制御する必要がある。この点に関しては、骨髄移植のように HLA 適合移植を行うか、対象者の体細胞核を移植した ES 細胞を樹立するなどの方法が理論的に可能である。

3.2 小型肝細胞

成熟ラットの肝細胞を分離し、無血清 DMEM を基本とした培地にビタミンの一種であるニコチンア

ミドを加え、EGF や HGF、TGF- α などの増殖因子を添加して培養すると、小型という以外形態的にはまわりの肝細胞と区別がつかない細胞のコロニーが検出されるようになる^{109,110)}。この細胞はアルブミン陽性、トランスフェリン陽性、AFP 陰性、CK8 陽性、CK18 陽性など、成熟肝細胞とほぼ同様の表現型をもち、超微細構造的にも肝細胞としての特徴をもっている。ヒト肝臓にも小型肝細胞の存在が示されている¹¹¹⁾。上記小型肝細胞との異同について明らかではないが、レトロルシン/PH の肝臓において小型肝細胞のコロニーが出現する¹¹²⁾。この小型肝細胞は肝細胞へと分化・増殖し、PH 後 30 日目には肝細胞の 90% を占めるようになる。

3.3 胎児肝臓由来肝幹細胞

In vitro におけるコロニー形成能を指標として、FACS で分離したマウス胎仔肝臓の様々な細胞画分において増殖能の解析が行われた。その結果、c-kit⁻, CD49f⁺, CD29⁺, CD45⁻, TER119⁻ の細胞画分において増殖能の高い細胞が高頻度に存在することが明らかになった¹¹³⁾。この細胞の多分化能について 1 個の同細胞から派生したコロニーを用いて分化マーカーの発現を検討した結果、肝細胞マーカーと胆管細胞マーカーを発現した細胞の存在が確認された¹¹⁴⁾。したがってこの細胞は肝細胞と胆管細胞に分化可能であることが明らかになった。また、マーカー遺伝子を導入したこの細胞を脾臓内に移植すると、肝臓組織や胆管を形成する¹¹⁴⁾。

3.4 非実質細胞由来肝幹細胞

成熟ラット肝臓より分離した非実質細胞を低張処理すると、凝集する細胞画分と凝集しない細胞画分に分かれる。凝集しない細胞画分の中に AFP、E-cadherin、アルブミンを発現するが、CK19、 α -平滑筋アクチン、VE-cadherin を発現しない細胞が存在する¹¹⁵⁾。更に、この細胞は培養すると形態的にも機能的にも肝細胞に分化する。

3.5 肝上皮細胞

正常及び発癌物質投与ラットから分離したほとんどの細胞は初代培養においてまもなく死亡し、LEC あるいは“rat liver epithelials” (RLE) 細胞と呼ばれる小型の非実質上皮細胞がコロニーとして急速に増殖し、培養細胞において優勢を占める¹¹⁶⁻¹¹⁹⁾。この細胞は胆管細胞と肝細胞の特徴を共有しており、活性化された齧歯類肝臓の oval cell から由来する

多くのセルラインとよく似ている。これらの細胞は肝臓に分化する。しかし、この細胞の由来や肝臓における存在場所などは不明である。

3.6 膵臓細胞

膵臓細胞が胎児肝に類似した表現型に分化するということが示されている。Krakowskiらはインスリンのプロモーターにより調節されるケラチノサイト増殖因子“keratinocyte growth factor” (KGF) トランスジェニックマウスにおいて機能を有する肝細胞がランゲルハンス島に多数出現することを示した¹²⁰⁾。また、膵外分泌細胞は *in vitro* においてデキサメタゾンとオンコスタチン M の組み合わせにより肝細胞に非常に効率良く分化する¹²¹⁾。

4. 肝幹細胞の臨床応用の可能性と将来の展望

今日まで人工肝臓や幹細胞移植に用いられた細胞はヒトからの高度に分化した肝細胞¹²²⁾、ヒト肝癌セルライン¹²³⁾、動物からの肝細胞¹²⁴⁾が主であった。しかし、成人肝細胞を得ることは事実上困難であると共に、たとえ得られたとしても大量調製ができず必要に応じて用時調製することは困難なため、その使用は限られたものであった。一方、胎児肝や小児肝は倫理上の問題があり、ヒト肝癌セルラインはウイルス感染や発癌のリスクがある。動物由来の肝細胞の場合、血漿及びアルブミンはヒトと動物では質的に異なるため、動物の肝細胞で産生させてもヒト

の代替はできない。また、種の間で酵素活性が異なり、ウイルス感染のリスクもある。異種組織の免疫拒絶に加えて異種性移植の倫理上の問題もある。したがって、これら3種類の細胞は上記目的を満たすものではない。

一方、ヒト幹細胞は *in vitro* で旺盛に増殖し、肝細胞に分化する。したがって、幹細胞を未分化な表現系のみで十分な量が得られるまで増殖させ、その後、成熟肝細胞の表現型を発現できるように操作することにより大量の肝細胞を得ることが可能である。このように、肝幹細胞は肝臓疾患の細胞治療、人工肝臓装置、遺伝子治療の担体として必要な肝細胞の無限大な供給源として期待されている¹²⁵⁾。Fig. 3に肝幹細胞の臨床応用について模式的に示す。

更に、肝幹細胞は成熟肝細胞に比べて以下のような利点がある。(1)肝幹細胞の提供者の範囲を広げることができる。(2)移植細胞の容量を少なくできる。(3)高い増殖能と凍結保存が可能なることから操作が容易である。(4)肝幹細胞移植は同所性肝移植という利点がある。(5)移植などにおいて問題となる免疫抑制に関しては患者自身の肝幹細胞を用いることにより回避できる。

4.2 肝幹細胞を用いた治療戦略

4.2.1 肝幹細胞移植

今後、肝幹細胞移植による肝疾患の治療の有用性を検討する上で、これまでの肝細胞移植による肝疾

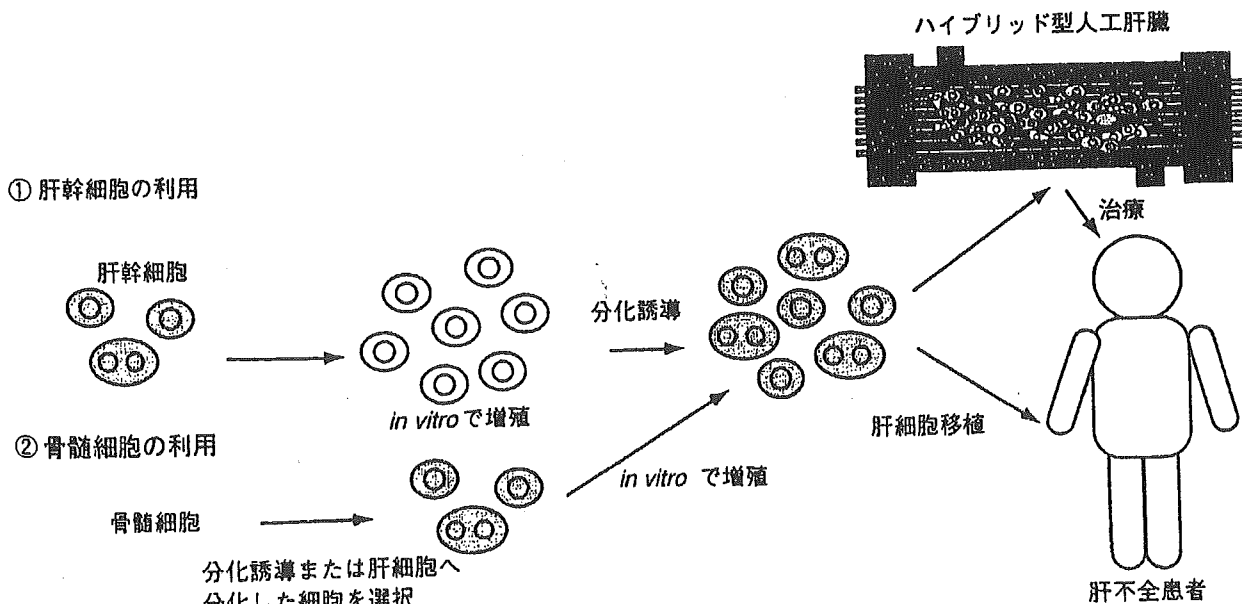


Fig. 3 肝幹細胞の臨床応用 (文献 146 より許可を得て一部改変し転載)

患の治療成績は参考となる。以下に肝細胞移植によるヒト肝疾患の治療例を示す。

劇症肝炎患者7人に胎児性肝細胞の腹腔内移植を行った結果、肝性昏睡からの覚醒がみられ、3例の生存が得られた¹²⁶⁾。急性肝不全患者に対し肝移植までのbridge-useとして脾動脈を介した肝細胞移植が試みられた。その結果、移植後に頭蓋内圧及び血清アンモニア値の低下が認められ、5例中3例において肝移植までのbridge-useに成功した¹²⁷⁾。Crigler Najjar 症候群の患者に対し門脈を介して肝実質の5%に相当する量の分離肝細胞を肝臓に注入すると、血清ビリルビンの減少及び胆汁に抱合したビリルビンの増加がみられた¹²⁸⁾。1型糖原病の患者に門脈を介して20億個の肝細胞を肝臓に注入するとその病態の特徴である空腹時における低血糖症が改善された¹²⁹⁾。後天性の肝臓病、特に肝臓毒あるいはウイルス障害による急性肝臓障害について胎児及び成人肝細胞を用いた臨床実験も限定的ではあるが行われている¹³⁰⁻¹³²⁾。更に、肝細胞移植による肝疾患の治療戦略についての検討も行われている^{131,133)}。なお、実験的急性肝不全動物に対する肝細胞移植の有用性については多数の報告があるが、本稿では割愛する。

このように、少なくとも上記ヒト肝疾患においては肝細胞移植により治療されることが示されたが、その治療成績は必ずしも満足のいくものではない。また、大量の肝細胞が必要とされることが主な原因により、その症例数も少ない。

肝幹細胞は先に述べたように様々な点で肝細胞に比べ優れた特徴を有することから、肝細胞を用いた肝疾患の治療における問題点をブレイクスルーするものと期待されている¹³⁴⁻¹³⁶⁾。肝幹細胞を用いた細胞治療として臨床的に有用と思われる疾患は原発性肝臓病、肝臓における異常な遺伝子発現あるいはたん白質産生の欠損による肝臓外の疾患である^{132,133)}。内在性の肝臓病としては α 1-アンチトリプシン欠損血症、高脂血症、ポルフィン症、1型チロシン血症、ウイルソン病(銅の蓄積)などの遺伝子異常があげられる。肝臓に起因する肝臓外の病気としては1型 Crigler-Najjar 症候群(ビリルビン抱合活性の欠如)のような代謝欠損、家族性高コレステロール症、家族性アミロイド性多発性神経障害(シュウ酸症)、第IX因子欠損(血友病A)のような凝固

欠損などがある。

4.2.2 人工肝臓装置

肝幹細胞は人工肝臓装置において有用かもしれない。多くの急性肝不全モデルにおいて異種肝細胞を人工肝臓装置として用いて治療に成功した例が多数報告されており¹²⁴⁾、人工肝臓装置は急性肝臓障害の患者の延命及び移植へのbridge-useを目的として臨床的に用いることが可能と考えられる。しかしながら、人工肝臓装置が代謝をはじめとする各種機能を十分に維持するためには大量の細胞が必要であり¹³⁷⁾、慢性肝臓病を有する患者において人工肝臓装置へ長期にわたり細胞を補充する必要もある。この場合、肝幹細胞は培養において高い増殖能を長期にわたって保持できることから、肝細胞の大量調製に有用と考えられる。また、人工装置に幹細胞を直接注入すると、患者の血液中に循環しているケモカイン及びサイトカインにより肝幹細胞が肝細胞へより効率よく分化誘導される可能性もある。

4.2.3 遺伝子治療

肝幹細胞は遺伝子治療の担体として用いることが可能かもしれない¹³⁶⁾。ここで述べる遺伝子治療とは遺伝的に改変を加えた肝幹細胞を直接患者に移植し、各種肝臓病を治癒することを指している。遺伝的な改変とは例えば遺伝的代謝異常のような遺伝子変異を正常に戻すことである。現在、遺伝子治療の問題の1つは、遺伝子改変を加えた成熟肝細胞は増殖及び継代培養が困難という点である。高い増殖能を持つ肝幹細胞は遺伝的改変を加えても継代培養が可能であり、遺伝子治療の大きな障壁を克服できる新しい戦略となりうる。例えば、遺伝的代謝異常において欠損酵素遺伝子を肝臓特異的なアルブミンのプロモーターについで肝幹細胞に遺伝子導入し、この遺伝子導入肝幹細胞を肝臓に移植すると、細胞は安定な集団として肝臓に生着し、欠損酵素を生理的なレベルで長期間産生することが可能である。以下に肝細胞ではあるが、その可能性を示唆した最初の例を示す。低密度リポたん白質“low-density lipoprotein”(LDL)受容体欠損が原因とされる家族性高脂血症患者に患者からの肝細胞にレトロウイルスを用いて正常なヒトLDL受容体遺伝子を導入後門脈内移植した¹³⁸⁾。その結果、肝生検組織で導入されたLDL受容体遺伝子が観察され、一時的ではあるがLDLコレステロールの有意な低下が認め

られた。

また、肝幹細胞は非遺伝病の治療にも用いることも可能である。例えば、肝硬変のラットモデルにおいて骨格筋に HGF 遺伝子を導入すると、肝硬変において顕著な病理的な特徴が軽減される¹³⁹⁾。一方、HGF は多くの細胞において増殖因子として作用することから、他の組織に対する影響も懸念される。しかしながら、HGF 遺伝子を導入した骨髄由来肝幹細胞は障害肝を標的として運ばれ、肝臓においてより高濃度の HGF を発現できることから、この懸念は解消される。以下に B 型肝炎の遺伝子治療への応用について述べる。現在、世界において 3 億 5 千万のヒトが慢性 B 型肝炎に感染しているが、このウイルスは除去できないため持続的な肝細胞破壊がおき、肝硬変及び肝癌を生じる。臨床的には持続的な B 型肝炎感染の治療にインターフェロンアルファ “interferon- α ” (IFN- α) が用いられており、30%の確率でウイルスが除去される。しかしながら、毒性が強いためその使用量が制限され、低用量でしか用いることができない。このような問題点を克服する試みとして、IFN- α を *ex vivo* で導入した肝幹細胞、特に骨髄由来肝幹細胞を肝臓に移植し、遺伝子導入された IFN- α が肝臓で局所的に産生されるならば、副作用を軽減した状態で病態を改善できる可能性が考えられる。

5. 今後の検討課題

肝幹細胞を臨床治療に用いるためには、以下のような検討課題が残されている。

(1) ヒト肝幹細胞の分離・精製法の確立：

肝幹細胞を臨床応用する際、その有効性及び安全性を確保する点から均一な集団として分離・精製することが必須である。現状では動物からの肝幹細胞はかなり高純度で分離・精製されているが、ヒト肝幹細胞を分離・精製する方法は確立していない。

(2) 肝幹細胞を効率よく分化・増殖させる条件の確立：

マウスの肝幹細胞と比較すると、ヒト肝幹細胞は培養において増殖が遅い一方で、短期間で容易に分化し、その後増殖能を消失する。したがって、ヒト肝幹細胞を肝細胞に誘導後移植する場合、あらかじめ幹細胞の表現系を維持した状態で充分量まで増殖させ、その後肝細胞に分化させる必要がある。前述

したように主に動物由来の肝幹細胞において様々な因子が分化・増殖を誘導することが明らかになっているが、ヒト肝幹細胞を臨床応用に用いるという観点に基づいた増殖・分化の検討は十分ではない。また、生体において肝幹細胞が肝細胞に分化するには重篤な肝障害を起こす必要があり、その場合においても例えば HSC が肝細胞に分化する割合は極めて低い¹⁴⁰⁾。

(3) 肝細胞セルラインの確立：

(2)で述べた理由から、ヒト肝幹細胞のセルラインを増殖させ確立することは現在困難である。しかしこの点に関し、以下のようなアプローチが試みられている。レトロウイルスにより SV40T 抗原遺伝子を導入すると肝幹細胞が不死化する。この細胞は無限大に *in vitro* で増殖し、アルブミン、CK7、CK19 及び内在性テロメラーゼを発現する¹⁴¹⁾。門脈を介してこの細胞を肝臓に移植すると、腫瘍を形成することなく肝実質に生着し肝細胞に分化する。p53 が発現しないと細胞は通常の限界を超えて細胞周期が進行し不死化することに着目し、p53 のノックアウトにより不死化された肝幹細胞セルラインが確立された¹⁴²⁾。しかしながら、このセルラインには癌原性の潜在的なリスクがある。肝幹細胞ではないがヒト胎児肝細胞においてテロメラーゼ活性を高発現させることにより肝細胞の表現系を消失することなく無限大に複製させることも可能となっている¹⁴³⁾。このように肝幹細胞セルラインの確立に向けて多くの努力がなされているが、安全でかつ十分な機能を有するものは得られていない。

おわりに

現在までに、動物及びヒトにおいて多様な種類の肝幹細胞の存在が確認され、その性状についても一部は明らかになってきた。また、様々な検討から肝幹細胞の細胞治療などへの臨床応用が肝疾患の治療において有用となる可能性が示唆されており、一部の動物モデル実験では肝幹細胞を移植することにより病態が改善されるとの報告もある。しかしながら、ヒトにおける肝幹細胞の研究は始まったばかりであり、単一集団として分離精製し、その後増殖・分化させるという基礎的段階まで達していないというのが現状である。今後、まずはヒト肝幹細胞における基礎的な知見の蓄積が必須であるが、将来的には肝

幹細胞を用いた肝疾患治療法の有効性及び安全性が確立され、ドナー不足から肝移植を受けられない患者がその恩恵を受ける日がやってくることを期待する。

謝 辞

本研究の一部は厚生科学研究費補助金医薬品医療機器リスク評価研究事業 (H 16-リスク-039) として実施されたものである。

文 献

- 1) Wilson, J. W., Leduc, E. H.: *J Pathol Bacteriol*, **76**(2), 441-9 (1958).
- 2) Fausto, N.: *Prog Clin Biol Res*, **331**, 325-34 (1990).
- 3) Kroese, E. D., Bannenberg, G., Dogterom, P., Noach, A. B., Nagelkerke, J. F., Meerman, J. H.: *Biochem Pharmacol*, **40**(8), 1885-92 (1990).
- 4) Mathis, G. A., Walls, S. A., D'Amico, P., Gengo, T. F., Sirica, A. E.: *Hepatology*, **9**(3), 477-85 (1989).
- 5) Ledda, G. M., Sells, M. A., Yokoyama, S., Lombardi, B.: *Int J Cancer*, **31**(2), 231-7 (1983).
- 6) Thorgeirsson, S. S., Evarts, R. P., Bisgaard, H. C., Fujio, K., Hu, Z.: *Proc Soc Exp Biol Med*, **204**(3), 253-60 (1993).
- 7) Evarts, R. P., Hu, Z., Fujio, K., Marsden, E. R., Thorgeirsson, S. S.: *Cell Growth Differ*, **4**(7), 555-61 (1993).
- 8) Anilkumar, T. V., Golding, M., Edwards, R. J., Lalani, E. N., Sarraf, C. E., Alison, M. R.: *Carcinogenesis*, **16**(4), 845-53 (1995).
- 9) Alpini, G., Aragona, E., Dabeva, M., Salvi, R., Shafritz, D. A., Tavoloni, N.: *Am J Pathol*, **141**(3), 623-32 (1993).
- 10) Sarraf, C., Lalani, E. N., Golding, M., Anilkumar, T. V., Poulson, R., Alison, M.: *Am J Pathol*, **145**(5), 1114-26 (1994).
- 11) Golding, M., Sarraf, C. E., Lalani, E. N., Anilkumar, T. V., Edwards, R. J., Nagy, P., Thorgeirsson, S. S., Alison, M. R.: *Hepatology*, **22**(4 Pt 1), 1243-53 (1995).
- 12) Alison, M. R., Golding, M., Sarraf, C. E.: *Int J Exp Pathol*, **78**(6), 365-81 (1997).
- 13) Petersen, B. E., Zajac, V. F., Michalopoulos, G. K.: *Am J Pathol*, **151**(4), 905-9 (1997).
- 14) Elmore, L. W., Sirica, A. E.: *Cancer Res*, **51**(20), 5752-9 (1991).
- 15) Sirica, A. E., Gaine, T. W., Mumaw, V. R.: *Am J Pathol*, **145**(2), 375-83 (1994).
- 16) Factor, V. M., Radaeva, S. A., Thorgeirsson, S. S.: *Am J Pathol*, **145**(2), 409-22 (1994).
- 17) Yin, L., Lynch, D., Ilic, Z., Sell, S.: *Histol Histopathol*, **17**(1), 65-81 (2002).
- 18) Thorgeirsson, S. S.: *Faseb J*, **10**(11), 1249-56 (1996).
- 19) Alison, M. R., Golding, M. H., Sarraf, C. E.: *Cell Prolif*, **29**(7), 373-402 (1996).
- 20) Alison, M. R., Poulson, R., Forbes, S. J.: *Liver*, **21**(6), 367-73 (2001).
- 21) De Vos, R., Desmet, V.: *Am J Pathol*, **140**(6), 1441-50 (1992).
- 22) Ruck, P., Xiao, J. C., Pietsch, T., Von Schweinitz, D., Kaiserling, E.: *Histopathology*, **31**(4), 324-9 (1997).
- 23) Hsia, C. C., Evarts, R. P., Nakatsukasa, H., Marsden, E. R., Thorgeirsson, S. S.: *Hepatology*, **16**(6), 1327-33 (1992).
- 24) Crosby, H. A., Hubscher, S., Fabris, L., Joplin, R., Sell, S., Kelly, D., Strain, A. J.: *Am J Pathol*, **152**(3), 771-9 (1998).
- 25) Crosby, H. A., Hubscher, S. G., Joplin, R. E., Kelly, D. A., Strain, A. J.: *Hepatology*, **28**(4), 980-5 (1998).
- 26) Baumann, U., Crosby, H. A., Ramani, P., Kelly, D. A., Strain, A. J.: *Hepatology*, **30**(1), 112-7 (1999).
- 27) Petersen, B. E., Goff, J. P., Greenberger, J. S., Michalopoulos, G. K.: *Hepatology*, **27**(2), 433-45 (1998).
- 28) Coleman, W. B., Wennerberg, A. E., Smith, G. J., Grisham, J. W.: *Am J Pathol*, **142**(5), 1373-82 (1993).
- 29) Grisham, J. W., Coleman, W. B., Smith, G. J.: *Proc Soc Exp Biol Med*, **204**(3), 270-9 (1993).
- 30) Yasui, O., Miura, N., Terada, K., Kawarada, Y., Koyama, K., Sugiyama, T.: *Hepatology*, **25**(2), 329-34 (1997).
- 31) Knight, B., Yeoh, G. C., Husk, K. L., Ly, T., Abraham, L. J., Yu, C., Rhim, J. A., Fausto, N.: *J Exp Med*, **192**(12), 1809-18 (2000).
- 32) Roskams, T., Campos, R. V., Drucker, D. J., Desmet, V. J.: *Histopathology*, **23**(1), 11-9 (1993).
- 33) Roskams, T., Willems, M., Campos, R. V.,

- Drucker, D. J., Yap, S. H., Desmet, V. J.: *Histopathology*, **23**(6), 519-25 (1993).
- 34) Roskams, T., Moshage, H., Depla, E., Willems, M., Desmet, V., Yap, P.: *J Hepatol*, **23**(2), 160-5 (1995).
- 35) Alison, M. R., Poulsom, R., Jeffery, R., Anilkumar, T. V., Jagoe, R., Sarraf, C. E.: *J Pathol*, **171**(4), 291-9 (1993).
- 36) Okano, J., Shiota, G., Matsumoto, K., Yasui, S., Kurimasa, A., Hisatome, I., Steinberg, P., Murawaki, Y.: *Biochem Biophys Res Commun*, **309**(2), 298-304 (2003).
- 37) Nagy, P., Bisgaard, H. C., Santoni-Rugiu, E., Thorgeirsson, S. S.: *Hepatology*, **23**(1), 71-9 (1996).
- 38) Shiota, G., Kunisada, T., Oyama, K., Udagawa, A., Nomi, T., Tanaka, K., Tsutsumi, A., Isono, M., Nakamura, T., Hamada, H., Sakatani, T., Sell, S., Sato, K., Ito, H., Kawasaki, H.: *FEBS Lett*, **470**(3), 325-30 (2000).
- 39) Fujio, K., Evarts, R. P., Hu, Z., Marsden, E. R., Thorgeirsson, S. S.: *Lab Invest*, **70**(4), 511-6 (1994).
- 40) Matsusaka, S., Tsujimura, T., Toyosaka, A., Nakasho, K., Sugihara, A., Okamoto, E., Uematsu, K., Terada, N.: *Hepatology*, **29**(3), 670-6 (1999).
- 41) Isfort, R. J., Cody, D. B., Stuard, S. B., Randall, C. J., Miller, C., Ridder, G. M., Doersen, C. J., Richards, W. G., Yoder, B. K., Wilkinson, J. E., Woychik, R. P.: *J Cell Sci*, **110**(Pt 24), 3117-29 (1997).
- 42) Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Stein, H., Surrenti, C.: *Am J Pathol*, **139**(6), 1221-9 (1991).
- 43) Nagy, P., Evarts, R. P., McMahon, J. B., Thorgeirsson, S. S.: *Mol Carcinog*, **2**(6), 345-54 (1989).
- 44) Evarts, R. P., Nakatsukasa, H., Marsden, E. R., Hsia, C. C., Dunsford, H. A., Thorgeirsson, S. S.: *Cancer Res*, **50**(11), 3439-44 (1990).
- 45) Evarts, R. P., Nakatsukasa, H., Marsden, E. R., Hu, Z., Thorgeirsson, S. S.: *Mol Carcinog*, **5**(1), 25-31 (1992).
- 46) Alison, M. R., Nasim, M. M., Anilkumar, T. V., Sarraf, C. E.: *Cell Prolif*, **26**(5), 449-60 (1993).
- 47) Hu, Z., Evarts, R. P., Fujio, K., Marsden, E. R., Thorgeirsson, S. S.: *Am J Pathol*, **142**(6), 1823-30 (1993).
- 48) Pagan, R., Llobera, M., Vilaro, S.: *Hepatology*, **21**(3), 820-31 (1995).
- 49) He, Z. P., Tan, W. Q., Tang, Y. F., Zhang, H. J., Feng, M. F.: *Cell Prolif*, **37**(2), 177-87 (2004).
- 50) Lazaro, C. A., Rhim, J. A., Yamada, Y., Fausto, N.: *Cancer Res*, **58**(23), 5514-22 (1998).
- 51) Okaya, A., Kitanaka, J., Kitanaka, N., Satake, M., Kim, Y., Terada, K., Sugiyama, T., Takemura, M., Fujimoto, J., Terada, N., Miyajima, A., Tsujimura, T.: *Am J Pathol*, **166**(3), 709-19 (2005).
- 52) Germain, L., Noel, M., Gourdeau, H., Marceau, N.: *Cancer Res*, **48**(2), 368-78 (1988).
- 53) Burt, A. D., MacSween, R. N.: *Histopathology*, **23**(6), 599-602 (1993).
- 54) Arthur, M. J., Iredale, J. P.: *J R Coll Physicians Lond*, **28**(3), 200-8 (1994).
- 55) Uetsuka, K., Suzuki, M., Nakayama, H., Doi, K.: *Histol Histopathol*, **12**(4), 937-43 (1997).
- 56) Braun, K. M., Thompson, A. W., Sandgren, E. P.: *Am J Pathol*, **162**(1), 195-202 (2003).
- 57) Terada, T., Nakanuma, Y.: *Lab Invest*, **68**(3), 261-9 (1993).
- 58) Omori, N., Omori, M., Evarts, R. P., Teramoto, T., Miller, M. J., Hoang, T. N., Thorgeirsson, S. S.: *Hepatology*, **26**(3), 720-7 (1997).
- 59) Omori, M., Omori, N., Evarts, R. P., Teramoto, T., Thorgeirsson, S. S.: *Am J Pathol*, **150**(4), 1179-87 (1997).
- 60) McKay, R.: *Nat Med*, **6**(7), 747-8 (2000).
- 61) Hirschi, K. K., Goodell, M. A.: *Gene Ther*, **9**(10), 648-52 (2002).
- 62) Forbes, S. J., Poulsom, R., Wright, N. A.: *Gene Ther*, **9**(10), 625-30 (2002).
- 63) Kopen, G. C., Prockop, D. J., Phinney, D. G.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(19), 10711-6 (1999).
- 64) Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S., Goff, J. P.: *Science*, **284**(5417), 1168-70 (1999).
- 65) Theise, N. D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J. M., Krause, D. S.: *Hepatology*, **31**(1), 235-40

- (2000).
- 66) Alison, M. R., Poulsom, R., Jeffery, R., Dhilon, A. P., Quaglia, A., Jacob, J., Novelli, M., Prentice, G., Williamson, J., Wright, N. A.: *Nature*, **406** (6793), 257 (2000).
- 67) Theise, N. D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P. B., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O., Krause, D. S.: *Hepatology*, **32** (1), 11-6 (2000).
- 68) Korbling, M., Katz, R. L., Khanna, A., Ruffrook, A. C., Rondon, G., Albitar, M., Champlin, R. E., Estrov, Z.: *N Engl J Med*, **346** (10), 738-46 (2002).
- 69) Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L., Grompe, M.: *Nat Med*, **6**(11), 1229-34 (2000).
- 70) Mallet, V. O., Mitchell, C., Mezey, E., Fabre, M., Guidotti, J. E., Renia, L., Coulombel, L., Kahn, A., Gilgenkrantz, H.: *Hepatology*, **35** (4), 799-804 (2002).
- 71) Avital, I., Inderbitzin, D., Aoki, T., Tyan, D. B., Cohen, A. H., Ferraresso, C., Rozga, J., Arnaut, W. S., Demetriou, A. A.: *Biochem Biophys Res Commun*, **288**(1), 156-64 (2001).
- 72) Sell, S.: *Hepatology*, **33**(3), 738-50 (2001).
- 73) Schwartz, R. E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W. S., Verfaillie, C. M.: *J Clin Invest*, **109**(10), 1291-302 (2002).
- 74) Lee, K. D., Kuo, T. K., Whang-Peng, J., Chung, Y. F., Lin, C. T., Chou, S. H., Chen, J. R., Chen, Y. P., Lee, O. K.: *Hepatology*, **40**(6), 1275-84 (2004).
- 75) Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., Sato, T., Miyayoshi, K., Takayama, T., Takahashi, M., Takimoto, R., Iyama, S., Matsunaga, T., Ohtani, S., Matsuura, A., Hamada, H., Niitsu, Y.: *Blood*, **106**(2), 756-63 (2005).
- 76) Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E., Scott, E. W.: *Nature*, **416**(6880), 542-5 (2002).
- 77) Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P., Smith, A. G.: *Nature*, **416**(6880), 545-8 (2002).
- 78) Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Oson, S., Grompe, M.: *Nature*, **422**(6934), 897-901 (2003).
- 79) Vassilopoulos, G., Wang, P. R., Russell, D. W.: *Nature*, **422**(6934), 901-4 (2003).
- 80) Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J. M., Fike, J. R., Lee, H. O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S. J., Alvarez-Buylla, A.: *Nature*, **425**(6961), 968-73 (2003).
- 81) Camargo, F. D., Finegold, M., Goodell, M. A.: *J Clin Invest*, **113**(9), 1266-70 (2004).
- 82) Willenbring, H., Bailey, A. S., Foster, M., Akkari, Y., Dorrell, C., Olson, S., Finegold, M., Fleming, W. H., Grompe, M.: *Nat Med*, **10**(7), 744-8 (2004).
- 83) Newsome, P. N., Johannessen, I., Boyle, S., Dalakas, E., McAulay, K. A., Samuel, K., Rae, F., Forrester, L., Turner, M. L., Hayes, P. C., Harrison, D. J., Bickmore, W. A., Plevris, J. N.: *Gastroenterology*, **124**(7), 1891-900 (2003).
- 84) Ishikawa, F., Drake, C. J., Yang, S., Fleming, P., Minamiguchi, H., Visconti, R. P., Crosby, C. V., Argraves, W. S., Harada, M., Key, L. L., Jr., Livingston, A. G., Wingard, J. R., Ogawa, M.: *Ann N Y Acad Sci*, **996**, 174-85 (2003).
- 85) Jang, Y. Y., Collector, M. I., Baylin, S. B., Diehl, A. M., Sharkis, S. J.: *Nat Cell Biol*, **6** (6), 532-9 (2004).
- 86) Petrenko, O., Beavis, A., Klaine, M., Kittappa, R., Godin, I., Lemischka, I. R.: *Immunity*, **10**(6), 691-700 (1999).
- 87) Whetton, A. D., Graham, G. J.: *Trends Cell Biol*, **9**(6), 233-8 (1999).
- 88) Kollet, O., Shivtiel, S., Chen, Y. Q., Suriawinata, J., Thung, S. N., Dabeva, M. D., Kahn, J., Spiegel, A., Dar, A., Samira, S., Goichberg, P., Kalinkovich, A., Arenzana-Seisdedos, F., Nagler, A., Hardan, I., Revel, M., Shafritz, D. A., Lapidot, T.: *J Clin Invest*, **112**(2), 160-9 (2003).
- 89) Wang, X., Ge, S., McNamara, G., Hao, Q. L., Crooks, G. M., Nolte, J. A.: *Blood*, **101**(10), 4201-8 (2003).
- 90) Kakinuma, S., Tanaka, Y., Chinzei, R., Watanabe, M., Shimizu-Saito, K., Hara, Y., Teramoto, K., Arai, S., Sato, C., Takase, K., Yasumizu, T., Teraoka, H.: *Stem Cells*, **21** (2), 217-27 (2003).
- 91) Oh, S. H., Miyazaki, M., Kouichi, H., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Tsuji, T., Shima, N.,

- Higashio, K., Namba, M.: *Biochem Biophys Res Commun*, **279**(2), 500-4 (2000).
- 92) Miyazaki, M., Akiyama, I., Sakaguchi, M., Nakashima, E., Okada, M., Kataoka, K., Huh, N. H.: *Biochem Biophys Res Commun*, **298**(1), 24-30 (2002).
- 93) Wang, P. P., Wang, J. H., Yan, Z. P., Hu, M. Y., Lau, G. K., Fan, S. T., Luk, J. M.: *Biochem Biophys Res Commun*, **320**(3), 712-6 (2004).
- 94) Miyazaki, M., Masaka, T., Akiyama, I., Nakashima, E., Sakaguchi, M., Huh, N. H.: *Cell Transplant*, **13**(4), 385-91 (2004).
- 95) Yamada, T., Yoshikawa, M., Kanda, S., Kato, Y., Nakajima, Y., Ishizaka, S., Tsunoda, Y.: *Stem Cells*, **20**(2), 146-54 (2002).
- 96) Jones, E. A., Tosh, D., Wilson, D. I., Lindsay, S., Forrester, L. M.: *Exp Cell Res*, **272**(1), 15-22 (2002).
- 97) Hamazaki, T., Iiboshi, Y., Oka, M., Papst, P. J., Meacham, A. M., Zon, L. I., Terada, N.: *FEBS Lett*, **497**(1), 15-9 (2001).
- 98) Chinzei, R., Tanaka, Y., Shimizu-Saito, K., Hara, Y., Kakinuma, S., Watanabe, M., Teramoto, K., Arii, S., Takase, K., Sato, C., Terada, N., Teraoka, H.: *Hepatology*, **36**(1), 22-9 (2002).
- 99) Miyashita, H., Suzuki, A., Fukao, K., Nakauchi, H., Taniguchi, H.: *Cell Transplant*, **11**(5), 429-34 (2002).
- 100) Choi, D., Oh, H. J., Chang, U. J., Koo, S. K., Jiang, J. X., Hwang, S. Y., Lee, J. D., Yeoh, G. C., Shin, H. S., Lee, J. S., Oh, B.: *Cell Transplant*, **11**(4), 359-68 (2002).
- 101) Lavon, N., Yanuka, O., Benvenisty, N.: *Differentiation*, **72**(5), 230-8 (2004).
- 102) Shirahashi, H., Wu, J., Yamamoto, N., Catana, A., Wege, H., Wager, B., Okita, K., Zern, M. A.: *Cell Transplant*, **13**(3), 197-211 (2004).
- 103) Hu, A. B., Cai, J. Y., Zheng, Q. C., He, X. Q., Shan, Y., Pan, Y. L., Zeng, G. C., Hong, A., Dai, Y., Li, L. S.: *Liver Int*, **24**(3), 237-45 (2004).
- 104) Teratani, T., Yamamoto, H., Aoyagi, K., Sasaki, H., Asari, A., Quinn, G., Terada, M., Ochiya, T.: *Hepatology*, **41**(4), 836-46 (2005).
- 105) Ishii, T., Yasuchika, K., Fujii, H., Hoppo, T., Baba, S., Naito, M., Machimoto, T., Kamo, N., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ikai, I.: *Exp Cell Res*, **309**(1), 68-77 (2005).
- 106) Imamura, T., Cui, L., Teng, R., Johkura, K., Okouchi, Y., Asanuma, K., Ogiwara, N., Sasaki, K.: *Tissue Eng*, **10**(11-12), 1716-24 (2004).
- 107) Kumashiro, Y., Asahina, K., Ozeki, R., Shimizu-Saito, K., Tanaka, Y., Kida, Y., Inoue, K., Kaneko, M., Sato, T., Teramoto, K., Arii, S., Teraoka, H.: *Transplantation*, **79**(5), 550-7 (2005).
- 108) Fair, J. H., Cairns, B. A., Lapaglia, M. A., Caballero, M., Pleasant, W. A., Hatada, S., Kim, H. S., Gui, T., Pevny, L., Meyer, A. A., Stafford, D. W., Smithies, O., Frelinger, J. A.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(8), 2958-63 (2005).
- 109) Mitaka, T., Norioka, K., Nakamura, T., Mochizuki, Y.: *J Cell Physiol*, **157**(3), 461-8 (1993).
- 110) Tateno, C., Yoshizato, K.: *Am J Pathol*, **148**(2), 383-92 (1996).
- 111) Hino, H., Tateno, C., Sato, H., Yamasaki, C., Katayama, S., Kohashi, T., Aratani, A., Asahara, T., Dohi, K., Yoshizato, K.: *Biochem Biophys Res Commun*, **256**(1), 184-91 (1999).
- 112) Gordon, G. J., Coleman, W. B., Hixson, D. C., Grisham, J. W.: *Am J Pathol*, **156**(2), 607-19 (2000).
- 113) Suzuki, A., Zheng, Y., Kondo, R., Kusakabe, M., Takada, Y., Fukao, K., Nakauchi, H., Taniguchi, H.: *Hepatology*, **32**(6), 1230-9 (2000).
- 114) Suzuki, A., Zheng Yw, Y. W., Kaneko, S., Onodera, M., Fukao, K., Nakauchi, H., Taniguchi, H.: *J Cell Biol*, **156**(1), 173-84 (2002).
- 115) Azuma, H., Hirose, T., Fujii, H., Oe, S., Yasuchika, K., Fujikawa, T., Yamaoka, Y.: *Hepatology*, **37**(6), 1385-94 (2003).
- 116) Tsao, M. S., Smith, J. D., Nelson, K. G., Grisham, J. W.: *Exp Cell Res*, **154**(1), 38-52 (1984).
- 117) Tsao, M. S., Grisham, J. W., Nelson, K. G., Smith, J. D.: *Am J Pathol*, **118**(2), 306-15 (1985).
- 118) Marceau, N., Germain, L., Goyette, R., Noel, M., Gourdeau, H.: *Biochem Cell Biol*, **64**(8), 788-802 (1986).
- 119) Blouin, R., Blouin, M. J., Royal, I., Grenier,

- A., Roop, D. R., Loranger, A., Marceau, N.: *Differentiation*, **52**(1), 45-54 (1992).
- 120) Krakowski, M. L., Kritzik, M. R., Jones, E. M., Krahl, T., Lee, J., Arnush, M., Gu, D., Sarvetnick, N.: *Am J Pathol*, **154**(3), 683-91 (1999).
- 121) Shen, C. N., Slack, J. M., Tosh, D.: *Nat Cell Biol*, **2**(12), 879-87 (2000).
- 122) Sussman, N. L., Chong, M. G., Koussayer, T., He, D. E., Shang, T. A., Whisennand, H. H., Kelly, J. H.: *Hepatology*, **16**(1), 60-5 (1992).
- 123) Nagamori, S., Hasumura, S., Matsuura, T., Aizaki, H., Kawada, M.: *J Gastroenterol*, **35**(7), 493-503 (2000).
- 124) Strain, A. J., Neuberger, J. M.: *Science*, **295**(5557), 1005-9 (2002).
- 125) Faris, R. A., Konkin, T., Halpert, G.: *Artif Organs*, **25**(7), 513-21 (2001).
- 126) Habibullah, C. M., Syed, I. H., Qamar, A., Taher-Uz, Z.: *Transplantation*, **58**(8), 951-2 (1994).
- 127) Strom, S. C., Fisher, R. A., Thompson, M. T., Sanyal, A. J., Cole, P. E., Ham, J. M., Posner, M. P.: *Transplantation*, **63**(4), 559-69 (1997).
- 128) Fox, I. J., Chowdhury, J. R., Kaufman, S. S., Goertzen, T. C., Chowdhury, N. R., Warkentin, P. I., Dorko, K., Sauter, B. V., Strom, S. C.: *N Engl J Med*, **338**(20), 1422-6 (1998).
- 129) Muraca, M., Gerunda, G., Neri, D., Vilei, M. T., Granato, A., Feltracco, P., Meroni, M., Giron, G., Burlina, A. B.: *Lancet*, **359**(9303), 317-8 (2002).
- 130) Strom, S. C., Chowdhury, J. R., Fox, I. J.: *Semin Liver Dis*, **19**(1), 39-48 (1999).
- 131) Ohashi, K., Park, F., Kay, M. A.: *J Mol Med*, **79**(11), 617-30 (2001).
- 132) Gupta, S., Chowdhury, J. R.: *Semin Cell Dev Biol*, **13**(6), 439-46 (2002).
- 133) Laconi, E., Laconi, S.: *Semin Cell Dev Biol*, **13**(6), 433-8 (2002).
- 134) Stanworth, S. J., Newland, A. C.: *Clin Med*, **1**(5), 378-82 (2001).
- 135) Susick, R., Moss, N., Kubota, H., Lecluyse, E., Hamilton, G., Luntz, T., Ludlow, J., Fair, J., Gerber, D., Bergstrand, K., White, J., Bruce, A., Drury, O., Gupta, S., Reid, L. M.: *Ann N Y Acad Sci*, **944**, 398-419 (2001).
- 136) Grompe, M.: *J Inherit Metab Dis*, **24**(2), 231-44 (2001).
- 137) Bilir, B. M., Guinette, D., Karrer, F., Kumpe, D. A., Krysl, J., Stephens, J., McGavran, L., Ostrowska, A., Durham, J.: *Liver Transpl*, **6**(1), 32-40 (2000).
- 138) Grossman, M., Raper, S. E., Kozarsky, K., Stein, E. A., Engelhardt, J. F., Muller, D., Lupien, P. J., Wilson, J. M.: *Nat Genet*, **6**(4), 335-41 (1994).
- 139) Ueki, T., Kaneda, Y., Tsutsui, H., Nakaniishi, K., Sawa, Y., Morishita, R., Matsumoto, K., Nakamura, T., Takahashi, H., Okamoto, E., Fujimoto, J.: *Nat Med*, **5**(2), 226-30 (1999).
- 140) Zheng, Y. W., Taniguchi, H.: *Semin Liver Dis*, **23**(4), 337-48 (2003).
- 141) Allain, J. E., Dagher, I., Mahieu-Caputo, D., Loux, N., Andreoletti, M., Westerman, K., Briand, P., Franco, D., Leboulch, P., Weber, A.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(6), 3639-44 (2002).
- 142) Dumble, M. L., Croager, E. J., Yeoh, G. C., Quail, E. A.: *Carcinogenesis*, **23**(3), 435-45 (2002).
- 143) Wege, H., Le, H. T., Chui, M. S., Liu, L., Wu, J., Giri, R., Malhi, H., Sappal, B. S., Kumaran, V., Gupta, S., Zern, M. A.: *Gastroenterology*, **124**(2), 432-44 (2003).
- 144) 立野知世, 吉里勝利: 蛋白質 核酸 酵素, **45**(13), 2085-2091 (2000).
- 145) Medvinsky, A., Smith, A.: *Nature*, **422**(6934), 823-825 (2003).
- 146) 立野知世, 吉里勝利: 実験医学, **23**(1), 193-197 (2005).

Suppression of Proliferation of Poliovirus and Porcine Parvovirus by Novel Phenoxazines, 2-Amino-4,4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one and 3-Amino-1,4 α -dihydro-4 α -8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one

Akiko IWATA,^a Teruhide YAMAGUCHI,^a Kouei SATO,^b Noriko YOSHITAKE,^c and Akio TOMODA^{*,d}

^a Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health, Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-0098, Japan; ^b The Institute of Saitama Red Cross Center; 8-3-41 Kamiochiai, Saitama, Saitama 338-0001, Japan; ^c Third Department of Internal Medicine, Tokyo Medical University; and ^d Department of Biochemistry and Intractable Immune System Disease Research Center, Tokyo Medical University; 6-1-1 Shinjuku, Tokyo 160-0022, Japan. Received October 7, 2004; accepted January 5, 2005

The present study aimed at investigating the antiviral effects of 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one (Phx-1) and 3-amino-1,4 α -dihydro-4 α -8-dimethyl-2H-phenoxazine-2-one (Phx-2) on 6 representative viruses: poliovirus, porcine parvovirus, simian virus 40 (SV-40), herpes simplex virus-1 (HSV-1), Sindbis virus, and vesicular stomatitis virus (VSV). Phx-1 and Phx-2 suppressed the proliferation of poliovirus in Vero cells and that of porcine parvovirus in ESK cells at concentrations between 0.25 μ g/ml and 2 μ g/ml, when the cells were treated with Phx-1 and Phx-2 for 1 h and then inoculated with these viruses. The proliferation of the other viruses, SV-40, HSV-1, Sindbis virus, and VSV, in the host cells was not influenced by Phx-1 or Phx-2 at concentrations less than 20 μ g/ml. The results suggest that Phx-1 and Phx-2 may be useful to prevent the proliferation of poliovirus and porcine parvovirus infection and may contribute to developing new antiviral drugs in future.

Key words phenoxazine; poliovirus; porcine parvovirus

The development of antiviral drugs has been undertaken in parallel with that of vaccines, so as to overcome viral infections. Vaccination has been adopted to prevent several viral infections due to poliovirus, poxvirus, influenza virus *etc.* However, the usefulness of the antiviral drugs discovered so far seems to be restricted by the adverse effects of the drugs and the appearance of drug-resistant viruses.^{1,2)}

On the other hand, Tomoda *et al.* found that relatively water-soluble phenoxazines were biosynthesized by the reaction of *o*-aminophenol and its derivatives with human and bovine hemoglobin.^{3–5)} Among these phenoxazines, 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one (Phx-1) has been demonstrated to have anticancer activity.^{6,7)} It was also shown that Phx-1 exerts an immunosuppressive effect on the activated lymphocytes such as B cells and T cells^{8,9)} and the activated mast cells.¹⁰⁾ Therefore, it seems of interest to investigate the effects of water-soluble phenoxazines on the proliferation of viruses in the host cells. We briefly reported that the proliferation of poliovirus inoculated to Vero cells was inhibited by Phx-1.¹¹⁾ This discovery prompted us to investigate the effects of water-soluble phenoxazines on various kinds of viruses, because there is a possibility that a new antiviral drug may be developed through such an investigation. The present manuscript deals with studies on the antiviral effects of Phx-1 and 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one (Phx-2) on 6 representative viruses: poliovirus, porcine parvovirus, simian virus (SV-40), herpes simplex virus-1 (HSV-1), Sindbis virus, and vesicular stomatitis virus (VSV).

MATERIALS AND METHODS

Phx-1, Phx-2, Cells and Viruses Phx-1 and Phx-2 were prepared by reaction of bovine hemoglobin with 2-amino-5-methylphenol and 2-amino-4-methylphenol, respectively, as previously described.^{4,5)} The chemical structures of Phx-1

and Phx-2 are shown in Fig. 1. Phx-1 or Phx-2 was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) before use to reach a concentration of 20 mM, and then was diluted with α -minimum essential medium (α -MEM).

African green monkey kidney cells (Vero cells), were generously supplied by the Japanese Cancer Research Resources Bank (Tokyo, Japan). The ESK cells (embryonic swine kidney cells line)¹²⁾ were kindly donated by Dr. J. Koga (JCR Co., Japan).

Cells were maintained in α -MEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Sigma Co., Ltd., St. Louis, MO, U.S.A.), and 30 mg/l kanamycin sulfate RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated FCS, at 37 °C under moisturized air containing 5% CO₂.

Poliovirus (strain Sabin 1) was also donated by Dr. Koga. Porcine parvovirus (strain 90HS), SV-40, Sindbis virus, and HSV-1 (strain F) were the generous donation of Dr. M. Kohase (National Institute of Infectious Diseases). VSV (strain NJ) was the gift of Dr. H. Kita (Suntory Center Institute, Japan).

The supernatants of Vero cells infected with poliovirus, HSV-1, Sindbis virus, and VSV were used as the virus samples. The supernatant of ESK cells infected with porcine parvovirus was used as the porcine parvovirus sample. CV-1 cells were infected with SV-40 virus, and then 5 d after infec-

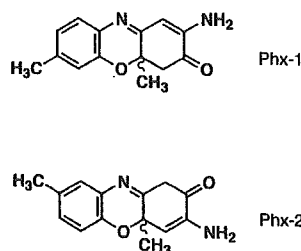


Fig. 1. Chemical Structures of Phx-1 and Phx-2

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: tomoda@tokyo-med.ac.jp

Table 1. Effects of Phx-1 or Phx-2 on the Proliferation of Poliovirus Inoculated to Vero Cells at Different Concentrations of Phx-1 and Phx-2, Estimated by TCID₅₀^{a)}

	Phx-1 ($\mu\text{g/ml}$)					Phx-2 ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	0.25	0.55	1	2	0	0.25	0.5	1	2
TCID ₅₀	62	32	32	16	17	63	63	63	63	14

a) TCID₅₀ was defined as dilution ratio of the virus to generate 50% disruption of the cells.

tion, the supernatant was saved as the SV-40 sample. To remove the cell debris from the collected virus suspension, each suspension was centrifuged at $450\times g$ for 10 min. After removing the debris, the resulting stock viruses were aliquoted and stored at -80°C until use.

Determination of Viral Infectivity The infectious titer of virus suspension was determined using indicator cells. Poliovirus and porcine parvovirus were introduced into Vero cells and ESK cells, respectively.¹³⁾ The cells were seeded in a 96-well microplate (Asahi Technoglass Co., Ltd., Tokyo) at a density of 2×10^5 to 3×10^5 cells per well in culture medium. They were then cultured at 37°C , for 2 d. Various concentrations of Phx-1 or Phx-2 solution [final concentration: 0 $\mu\text{g/ml}$ (DMSO alone), 0.25, 0.5, 1 and 2 $\mu\text{g/ml}$] were then added to the cells in each well, and these were subsequently incubated for 1 h. After 1 h, the supernatant was removed from the well by an aspirator. At this time, poliovirus or porcine parvovirus which had been serially diluted with α -MEM to obtain a 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀, defined as dilution ratio of the virus to generate 50% disruption of the cells), as performed conventionally,²⁾ was added to Vero cells or ESK cells, respectively, in each well. Cell cultures were incubated for 1 h at 37°C . Post infection TCID₅₀ cultures were then fed with α -MEM containing various concentrations of Phx-1 or Phx-2 [final concentration: 0 (DMSO alone), 0.25, 0.5, 1 and 2 $\mu\text{g/ml}$] and were incubated at 37°C for 2 or 3 d.

After that period, the disruption of Vero cells or ESK cells was examined by the method described by Satoh *et al.*,¹⁴⁾ and the infectivity of poliovirus or porcine parvovirus to these cells was estimated. The estimation of the viruses SV-40, HSV-1, Sindbis virus and VSV was essentially in agreement with the method described by Satoh *et al.*¹⁴⁾

Effects of Phx-1 and Phx-2 on Cell Viability We examined the effects of Phx-1 and Phx-2 on the viability of Vero cells, ESK cells, and CV-1 cells in the presence of various concentrations of these phenoxazines and without addition of viruses. There was no significant disruption of these cells at various concentrations of Phx-1 and Phx-2 up to 50 $\mu\text{g/ml}$, indicating that these phenoxazines do not affect the viability of the cells at the concentrations of used to examine the viruses.

RESULTS AND DISCUSSION

We initially studied the effects of Phx-1 and Phx-2 on the proliferation of poliovirus, a non-enveloped and single strand RNA virus, inoculated to Vero cells. Since TCID₅₀ is defined as the dilution ratio of the virus to generate 50% disruption of the cells, a lower value of TCID₅₀ means that the viral proliferation is being suppressed in the host cells. We found that

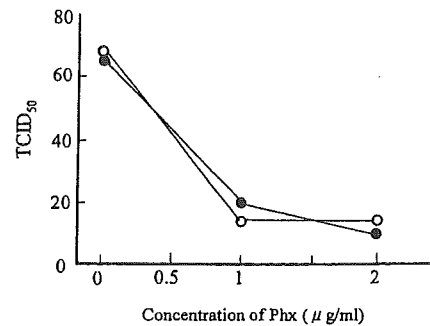


Fig. 2. Antiviral Effects of Phx-1 and Phx-2 on Porcine Parvovirus

The infectious titer of porcine parvovirus suspension was determined using ESK cells, as described in Materials and Methods. Antiviral effects of Phx-1 (●) or Phx-2 (○) were expressed by TCID₅₀ (defined as dilution ratio of the virus to generate 50% disruption of the cells) at different concentrations of these phenoxazines ($\mu\text{g/ml}$ of Phx-1 or Phx-2).

TCID₅₀ of poliovirus was decreased according to the increase in the concentrations of Phx-1 or Phx-2 (Table 1). Namely, Phx-1 suppressed the proliferation of poliovirus inoculated to Vero cells at all concentrations tested between 0.25 $\mu\text{g/ml}$ and 2 $\mu\text{g/ml}$, and reached maximal antiviral activity at 1 $\mu\text{g/ml}$. Phx-2 also inhibited the proliferation of poliovirus inoculated to Vero cells at 2 $\mu\text{g/ml}$ (Table 1). Such inhibition was observed when the cells were treated with Phx-1 or Phx-2 for 1 h and then inoculated with poliovirus. On the contrary, the proliferation of poliovirus was not suppressed by Phx-1 or Phx-2 when Vero cells were inoculated with the virus together with various concentrations of Phx-1 or Phx-2 (data not shown). These results may be explained by the facts that these phenoxazines do not exert virucidal activity against poliovirus directly, but some mechanisms preventing the attachment or the intracellular proliferation of poliovirus in the host cells, are apparently revoked during 1 h incubation of the host cells with Phx-1 or Phx-2. The detailed biochemical changes in the host cells are not yet clear.

Figure 2 shows the inhibitory effects of Phx-1 and Phx-2 against porcine parvovirus, a non-enveloped and single strand DNA virus, as determined by the changes in TCID₅₀. These phenoxazines showed antiviral effects on porcine parvovirus at 1 $\mu\text{g/ml}$ and 2 $\mu\text{g/ml}$. Such inhibition was observed when the cells were treated with Phx-1 or Phx-2 for 1 h and then inoculated with porcine parvovirus. However, Phx-1 or Phx-2 did not exert antiviral effects on porcine parvovirus when ESK cells were inoculated with the virus together with Phx-1 or Phx-2 (data not shown).

We studied the effects of Phx-1 and Phx-2 on various representative viruses such as SV-40 (non-enveloped, double strand DNA), HSV-1 (enveloped, double strand DNA), Sindbis virus (enveloped, single and plus strand RNA), and VSV (enveloped, single strand RNA). Table 2 summarizes the

Table 2. Antiviral Activity of Phx-1 and Phx-2 on Various Species of Viruses

Type of virus	Name of virus	Antiviral activity ^{a)}	
		Phx-1	Phx-2
sDNA, envelope (-)	Porcine parvovirus	+	+
dDNA, envelope (-)	Simian virus 40	-	-
dDNA, envelope (+)	Herpes simplex virus-1	-	-
sRNA, envelope (-) (plus strand)	Poliovirus	+	+
sRNA, envelope (+) (plus strand)	Sindbis virus	-	-
sRNA, envelope (+) (minus strand)	Vesicular stomatitis virus	-	-

a) TCID₅₀ was estimated as described in Materials and Methods. Then, the antiviral activity was expressed by + or -, where + shows "effective" at the concentration of Phx-1 or Phx-2 between 0.25 and 20 µg/ml, and - shows "not effective" at these concentrations.

inhibitory effects of Phx-1 and Phx-2 on these viruses, in comparison with poliovirus and porcine parvovirus. Although Phx-1 and Phx-2 showed antiviral activity against poliovirus and porcine parvovirus, these phenoxazines did not inhibit the proliferation of SV-40, HSV-1, Sindbis virus or VSV in the host cells. Therefore, it may be conceivable that non-enveloped and single strand RNA virus (coxackie virus, ECHO virus, hepatitis virus A, encephalomyocarditis virus *etc.*) or non-enveloped and single strand DNA virus (B19 virus, adeno-associated virus 2 *etc.*) may be inhibited by Phx-1 and Phx-2 as well. Increased amounts of interferon is not possible, because the inhibition of proliferation of viruses was restricted only to poliovirus and porcine parvovirus (Table 2). These views should be assessed by further examinations.

Tang *et al.*¹⁵⁾ reported that hypericin, a derivative of emodin exerts antiviral activity against enveloped viruses such as HSV-1, influenza virus A and Mo-Mul V, but not against the non-enveloped viruses poliovirus and adenovirus, at concentrations of 1.56 to 25 µg/ml. On the other hand, our results showed that Phx-1 and Phx-2 exerted antiviral activity only against poliovirus and porcine parvovirus (Table 1, Fig. 2). Concerning the chemical structure of emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylantraquinone) and Phx-1, emodin is analogous to Phx-1, because emodin and Phx-1 (Fig. 1) are

tricyclic chromophores with the methyl group at the same position, however, the former is a semiquinone type producing active oxygens,¹⁶⁾ while the latter is a non-semiquinone type. Such similarity and differences in the chemical structure of these compounds may be reflected to the differences in biological actions between hypericin and Phx-1 or Phx-2.

Acknowledgments The present research was supported by funds from the Ito Foundation and from High-Tech Research Project for Private Universities: matching fund subsidy from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (2002—2006).

REFERENCES

- Schaffer H. J., Beauchamp L., de Miranda P., Elion G. B., Bauer D. J., Collins P., *Nature* (London), **272**, 583—585 (1978).
- Schmidtke M., Schnittler U., Jahn B., Dahse H., Stelzner A., *J. Virol. Methods*, **95**, 133—143 (2001).
- Tomoda A., Yamaguchi J., Kojima H., Amemiya H., Yoneyama Y., *FEBS Lett.*, **196**, 44—48 (1986).
- Tomoda A., Hamashima H., Arisawa M., Kikuchi T., Tezuka Y., Koshimura S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1117**, 306—314 (1992).
- Tomoda A., Arisawa M., Koshimura S., *J. Biochem.* (Tokyo), **110**, 1004—1007 (1991).
- Mori H., Honda K., Ishida R., Nohira T., Tomoda A., *Anti-Cancer Drugs*, **11**, 653—657 (2000).
- Koshibu-Koizumi J., Akazawa M., Iwamoto T., Takasaki M., Mizuno F., Kobayashi R., Abe A., Tomoda A., Hamatake M., Ishida R., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **128**, 363—368 (2002).
- Akazawa M., Koshibu-Koizumi J., Iwamoto T., Takasaki M., Nakamura M., Tomoda A., *Tohoku J. Exp. Med.*, **196**, 185—192 (2002).
- Gao S., Takano T., Sada K., He J., Noda C., Hori-Tamura N., Tomoda A., Yamamura H., *Br. J. Pharmacol.*, **137**, 749—755 (2002).
- Enoki E., Sada K., Qu X., Kyo S., Shahjahan Miah S. M., Hatani T., Tomoda A., Yamamura H., *J. Pharm. Sci.*, **94**, 329—333 (2004).
- Iwata A., Yamaguchi A., Sato K., Izumi R., Tomoda A., *Tohoku J. Exp. Med.*, **200**, 161—165 (2003).
- Kawamura H., Fujita T., Imada T., *Nippon Juigaku Zasshi*, **50**, 803—808 (1988).
- Johnson K. L., Sarnow S. P., *J. Virol.*, **65**, 4341—4349 (1991).
- Satoh K., Iwata A., Murata M., Hikata M., Hayakawa T., Yamaguchi T., *J. Virol. Methods*, **114**, 111—119 (2003).
- Tang J., Colacino J. M., Larsen S. H., Spitzer W., *Antiviral Res.*, **13**, 313—326 (1990).
- Huang H. C., Chu S. H., Chao P. D. L., *Eur. J. Pharmacol.*, **198**, 211—213 (1991).



RNA interference of PPAR γ using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells

Tetsuji Hosono^a, Hiroyuki Mizuguchi^{b,*}, Kazufumi Katayama^c, Naoya Koizumi^{b,d}, Kenji Kawabata^b, Teruhide Yamaguchi^a, Shinsaku Nakagawa^c, Yoshiteru Watanabe^d, Tadanori Mayumi^e, Takao Hayakawa^f

^aDivision of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

^bProject III, National Institute of Health Sciences, Osaka Branch, Fundamental Research Laboratories for Development of Medicine, Asagi 7-6-8, Saito, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

^cDepartment of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

^dDepartment of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Showa Pharmaceutical University, Tokyo 194-8543, Japan

^eFaculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin University, Hyogo 651-2180, Japan

^fNational Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

Received 12 October 2004; received in revised form 14 December 2004; accepted 6 January 2005

Received by T. Sekiya

Abstract

The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ is regarded as a “master regulator” of adipocyte differentiation and is abundantly expressed in adipose. To understand the biological role of PPAR γ in adipose, RNA interference (RNAi) of PPAR γ should be a powerful tool. 3T3-L1 cell line serves an excellent model to investigate the mechanism of preadipocyte-to-adipocyte differentiation. However, this cell line is difficult to transfect by plasmid vectors and viral vectors. We optimized the transduction of both 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes by means of fiber-modified adenovirus (Ad) vectors. Among the various vectors tested, polylysine modification of the C-terminal of the fiber knob most markedly improved the transduction efficiency in both 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes. Then, we examined whether fiber-modified Ad vectors with polylysine peptides expressing the small interfering RNA (siRNA) for PPAR γ inhibit the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into adipocytes. Oil red O staining and measurement of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity indicated that the vectors effectively suppressed the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes. These results suggested that the combination of fiber-modified Ad vectors containing polylysine peptides and RNAi is an effective tool for the study of the biological and physiological mechanism of adipogenesis in adiposity and diabetes using 3T3-L1 models. Ad vector-mediated RNAi for PPAR γ should also be useful to clarify the biological role of the PPAR γ pathway in various tissues in addition to adipose and for therapeutic application to a variety of diseases, including adiposity and diabetes.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Adenovirus vector; PPAR γ ; RNA interference; Adipocyte

Abbreviations: CAR, coxsackievirus and adenovirus receptor; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GPDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; LacZ, β -galactosidase; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ ; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; shRNA, short hairpin RNA; siRNA, small interfering RNA.

* Corresponding author. Tel.: +81 72 641 9815; fax: +81 72 641 9816.

E-mail address: mizuguch@nihs.go.jp (H. Mizuguchi).

0378-1119/\$ - see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.gene.2005.01.005

1. Introduction

An understanding of the biological and physiological mechanism of adipogenesis is essential for an improved understanding of adiposity and diabetes. The expression of many transcription factors and adipocyte-specific genes, including CCAAT enhancer binding proteins (C/EBP) and

adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1 (ADD-1/SREBP-1), is programmatically regulated in the process of adipogenesis (Gregoire et al., 1998; Ntambi and Young-Cheul, 2000). Among them, the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ is regarded as a “master regulator” of adipocyte differentiation and is abundantly expressed in adipose (Tontonoz et al., 1994a,b; Vidal-Puig et al., 1997; Wu et al., 1998; Kubota et al., 1999; Berger and Moller, 2002). PPAR γ is a member of the nuclear receptor superfamily and induces transcriptional activation by heterodimerization with the retinoic acid-like receptor (RXR) (Tontonoz et al., 1994a; Berger and Moller, 2002).

Adipocytes are thought to be derived from mesenchymal stem cells, and cell culture models using preadipocyte 3T3-L1 cell lines are extensively used to study preadipocyte-to-adipocyte differentiation (Ntambi and Young-Cheul, 2000). Treatment of 3T3-L1 adipocytes with agonists for PPAR γ including thiazolidinediones (TZD), potent insulin sensitizing agents, induces preadipocyte-to-adipocyte differentiation. To understand the factors and mechanisms involved in the process of adipogenesis, studies of loss of function via knock-out/knock-down of target gene expression or gain of function via overexpression are among the most powerful methods. 3T3-L1 cells, however, are not efficiently transfectable. Viral vector-mediated transduction might improve their efficiency.

Among the viral vectors, adenovirus (Ad) vectors have been extensively used to deliver foreign genes to a variety of cell types and tissues both *in vitro* and *in vivo*. They can be easily grown to high titer and can efficiently transfer genes into both dividing and non-dividing cells. The efficiency of Ad vector-mediated transduction into 3T3-L1 cells, however, is quite low due to the scarcity of the primary receptor, the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) (Orlicky et al., 2001). To overcome CAR-dependent transduction, fiber-modified Ad vectors have been developed (Krasnykh et al., 1996; Wickham et al., 1997; Dmitriev et al., 1998; Shayakhmetov et al., 2000; Havenga et al., 2001; Mizuguchi et al., 2001; Mizuguchi and Hayakawa, 2002; Koizumi et al., 2003), containing RGD peptides in the HI loop of the fiber knob, polylysine peptides in the C-terminal end of the fiber knob, or fiber proteins derived from subgroup B Ads such as Ad type 3, -11, or -35. These vectors are infected via α v integrin, heparan sulfates, or CD46 (or CD80 or CD86) on the cellular surface, respectively (Wickham et al., 1997; Dmitriev et al., 1998; Mizuguchi et al., 2001; Gaggar et al., 2003; Segerman et al., 2003; Short et al., 2004).

For studies of loss of function via knockdown of target gene expression, RNA interference (RNAi) has been shown to have great promise for both basic research and therapeutic use. RNAi mediates the sequence-specific suppression of gene expression in a wide variety of eukaryotes by double-stranded RNA homologies to the target gene (McManus and Sharp, 2002). In mammalian cells, small interfering RNA (siRNA), a 19- to 29-nt RNA, leads to the inhibition of target gene expression in a sequence-specific manner

(Elbashir et al., 2001). Vector-based siRNA systems, including Ad vectors, have also been developed using RNA polymerase III promoters, such as the U6 promoter or the H1 promoter, to express siRNA (Brummelkamp et al., 2002; Miyagishi and Taira, 2002; Paul et al., 2002; Sui et al., 2002; Yu et al., 2002; Shen et al., 2003; Zhao et al., 2003; Hosono et al., 2004).

In the present study, we established an optimal fiber-modified Ad vector for transduction of 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes and demonstrated that the fiber-modified Ad vector expressing short hairpin RNA (shRNA) against PPAR γ efficiently suppressed the differentiation of preadipocytes into adipocytes in 3T3-L1 cells.

2. Materials and methods

2.1. Cells

293 cells and 3T3-L1 cells (clonal subline of the mouse 3T3 that accumulate large amounts of triglyceride fat when the cells are in the resting state; Human Science Research Resources Bank, Japan, JCRB9014) were cultured with Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). NIH3T3 cells were cultured with minimum essential medium supplemented with 10% FCS.

2.2. Construction of stable CAR-expressing NIH3T3 cells

Mouse liver total RNA was isolated using ISOGEN reagent (Nippon Gene, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. Mouse liver cDNA was obtained from reverse transcription (RT) product for mouse liver total RNA using a SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Mouse CAR cDNA was amplified from mouse liver cDNA using the following primers: 5'-accatggcgcctactgtgct-3' and 5'-tcagtagtccctcatattat-3'. The amplified polymerase chain reaction (PCR) product was inserted into the TA cloning vector pGEM-T Easy (Promega Corp., Madison, WI, USA) to generate pGEM-T-mCAR. CAR-expressing plasmid pCMV-mCAR was constructed by ligation of the *EcoRI* site of pcDNA3 (Invitrogen Life Technologies) with the *EcoRI* fragment of pGEM-T-mCAR, and was transfected into NIH3T3 cells by SuperFect transfection reagent (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). The stable CAR-expressing cells, NIH3T3-CAR, were obtained by geneticin (G418) selection.

2.3. Plasmid and virus

pHMCA-LacZ1 contains a β -actin promoter/CMV enhancer with a β -actin intron, which was kindly provided by Dr. J. Miyazaki (Osaka University, Osaka, Japan) (Niwa et al., 1991), an *Escherichia coli* β -galactosidase (LacZ)

gene derived from pCMV β (Clontech, Palo Alto, CA, USA), and a bovine growth hormone polyadenylation signal, flanked by *I-CeuI* and *PI-SceI* sites.

pHM5-H1-PPAR γ was constructed by insertion of the oligonucleotides (5'-gatccccgtctgctgatctgcgagccttcaagaggctcgcagatcagcagactttttggaat-3' and 5'-ctagatttccaaaaagtctgctgatctgcgagccttcttgaaggctcgcagatcagcagacggg-3') (Katayama et al., 2004) (loop sequences were underlined) into the *BglII* and *XbaI* sites of pHM5-H1 (Hosono et al., 2004), which is designed to express shRNA upon the insertion of an appropriate sequence into the *BglII/XbaI* site. pHM5-H1-Scramble was constructed by insertion of the oligonucleotides (5'-gatccccacgctgagtacttcgaaatttcaagagaatttcgaagtactcagcgtttttggaat-3' and 5'-ctagatttccaaaaacgctgagtacttcgaaattcttcttgaatttcgaagtactcagcgggg-3') (loop sequences were underlined) into the *BglII* and *XbaI* sites of pHM5-H1. The sequence was verified on a DNA sequencer (ABI PRISM 310, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Ad vectors expressing LacZ or siRNA were constructed by an improved in vitro ligation method (Mizuguchi and Kay, 1998; Mizuguchi and Kay, 1999). Briefly, pHMCA-LacZ1 was digested with *I-CeuI* and *PI-SceI*, and then ligated with *I-CeuI/PI-SceI*-digested pAdHM4 (Mizuguchi and Kay, 1998), pAdHM15-RGD (Mizuguchi et al., 2001), pAdHM41-K7(C) (Koizumi et al., 2003), or pAdHM34 (Mizuguchi and Hayakawa, 2002), resulting in pAdHM4-CALacZ1, pAdHM15-RGD-CALacZ1, pAdHM41-K7-CALacZ1, or pAdHM34-CALacZ1, respectively. pAdHM41-K7-H1, pAdHM41-K7-H1-PPAR γ , and pAdHM41-K7-Scramble were constructed by the ligation of *I-CeuI/PI-SceI*-digested pHM5-H1, pHM5-H1-PPAR γ , or pHM5-H1-Scramble, respectively, with *I-CeuI/PI-SceI*-digested pAdHM41-K7(C).

To generate the virus (Ad-CALacZ, AdRGD-CALacZ, AdF35-CALacZ, AdK7-CALacZ, AdK7-H1, AdK7-H1-PPAR γ , AdK7-H1-Scramble), *PacI*-digested Ad vector plasmids (pAdHM4-CALacZ1, pAdHM15-RGD-CALacZ1, pAdHM34-CALacZ1, pAdHM41-K7-CALacZ1, pAdHM41-K7-H1, pAdHM41-K7-H1-PPAR γ , and pAdHM41-K7-Scramble, respectively) were transfected into 293 cells plated in a 60-mm dish with SuperFect (Qiagen, Inc.) according to the manufacturer's instructions. Viruses were prepared as described previously (Mizuguchi and Kay, 1998). AdK7-Null contains no transgene in the E1 deletion region. The virus was purified by CsCl₂ gradient centrifugation, dialyzed with the solution containing 10 mM Tris (pH 7.5), 1 mM MgCl₂ and 10% glycerol, and stored in aliquots at -70 °C. The determination of virus particle titer was accomplished spectrophotometrically by the method of Maizel et al. (1968).

2.4. X-gal staining

In the case of 3T3-L1 preadipocytes, 3T3-L1 cells (1×10^5 cells) were seeded into a 12-well plates. On the

following day, they were transduced with Ad-CALacZ, AdRGD-CALacZ, AdF35-CALacZ, or AdK7-CALacZ (3000 or 10,000 vector particles (VP)/cell) for 1.5 h. Forty-eight hours later, LacZ production in the cells was determined by X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) staining.

In the case of 3T3-L1 adipocytes, 3T3-L1 cells were differentiated as described in the next section. After 6 days in culture with differentiation medium, the cells were transduced with each Ad vector (3000 or 10,000 vector particles (VP)/cell) for 1.5 h. Forty-eight hours later, LacZ production in the cells was determined by X-gal staining.

2.5. Adipocyte differentiation

Induction of adipocyte differentiation was performed as previously described (Tontonoz et al., 1994a). Two days after confluence (day 0), the medium was replaced with differentiation medium containing pioglitazone (CALBIOCHEM, San Diego, CA, USA) (3 μ M), insulin (Sigma, Saint Louis, MO, USA) (150 nM), dexamethasone (Sigma) (1 μ M) and 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma) (100 μ M), which was changed every 3 days thereafter until analysis.

Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes was monitored by measurement of intracellular lipid accumulation using Oil red O staining and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity on day 9. The cells were fixed for 2 h with 10% formaldehyde in isotonic phosphate buffer and then washed with distilled water. The cells were then stained with complete immersion in a

Table 1
Adenovirus vectors used in this study

Name	Fiber type	Gene of interest
Ad-CALacZ	type 5 fiber	CA promoter+LacZ
AdRGD-CALacZ	RGD peptide in the HI-loop of the fiber knob	CA promoter+LacZ
AdK7-CALacZ	polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob	CA promoter+LacZ
AdF35-CALacZ	chimeric type 5 fiber tail and type 35 fiber knob and shaft	CA promoter+LacZ
AdK7-H1	polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob	H1 promoter
AdK7-H1-PPAR γ	polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob	H1 promoter+shRNA for PPAR γ
AdK7-H1-Scramble	polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob	H1 promoter+shRNA for Scramble
AdK7-Null	polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob	none

CA promoter: β -actin promoter/CMV enhancer with β -actin intron.

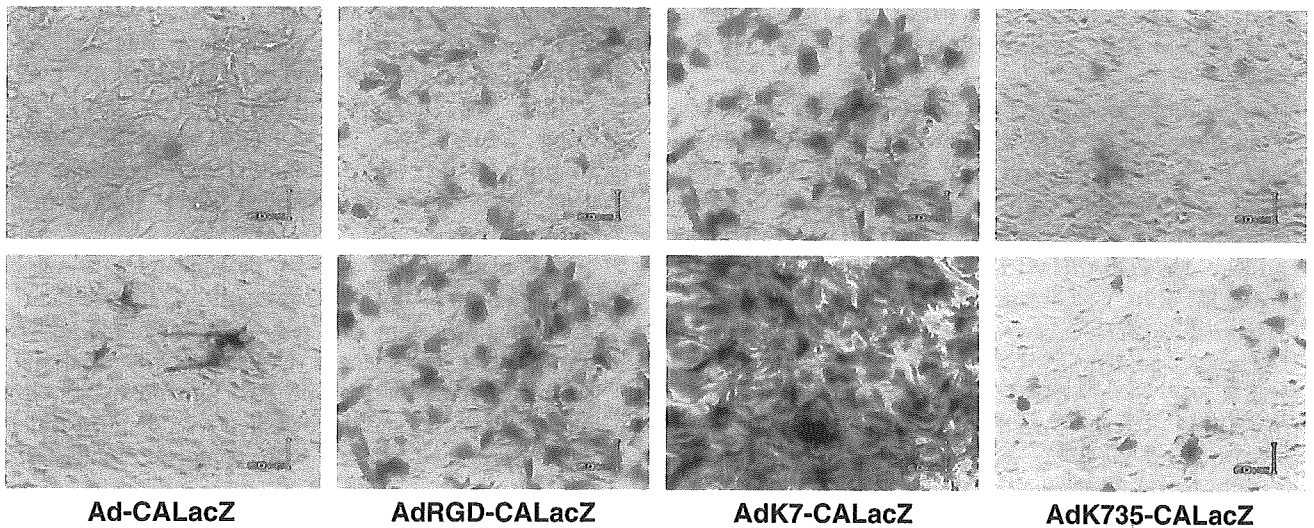
working solution (0.3%) of Oil red O for 4 h. Excess dye was removed by exhaustive washing with water. The GPDH activity was measured using a GPDH assay kit (Hokudo, Hokkaido, Japan).

2.6. Reverse transcription–polymerase chain reaction for CAR mRNAs

Total RNA was isolated using ISOGEN reagent according to the manufacturer's instructions. RT was carried out using a SuperScript First-Strand Synthesis System for reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) according to the manufacturer's instructions.

PCR amplification of the mouse CAR and GAPDH was performed in 50 μ l of a solution containing 1 μ l of RT products, 1 U TaKaRa Ex Taq HS and attached reagents (TaKaRa, Shiga, Japan). The sequences of the primer for PCR are as follows: CAR: forward, 5'-aattcctgctgaccgttctt-3'; reverse, 5'-tttctgccagccatggcgta-3'; GAPDH: forward, 5'-accacagtccatgccatcac-3'; reverse, 5'-tccaccaccctgtgtgta-3'. The following parameters were used: CAR: 20 s at 94 °C, 10 s at 60 °C, and 60 s at 72 °C for 35 cycles; GAPDH: 20 s at 94 °C, 10 s at 60 °C, and 60 s at 72 °C for 25 cycles. The PCR products were electrophoresed in 2.0% agarose gel. The sequence of the PCR products was confirmed by direct sequencing.

[A] Preadipocyte



[B] Adipocyte

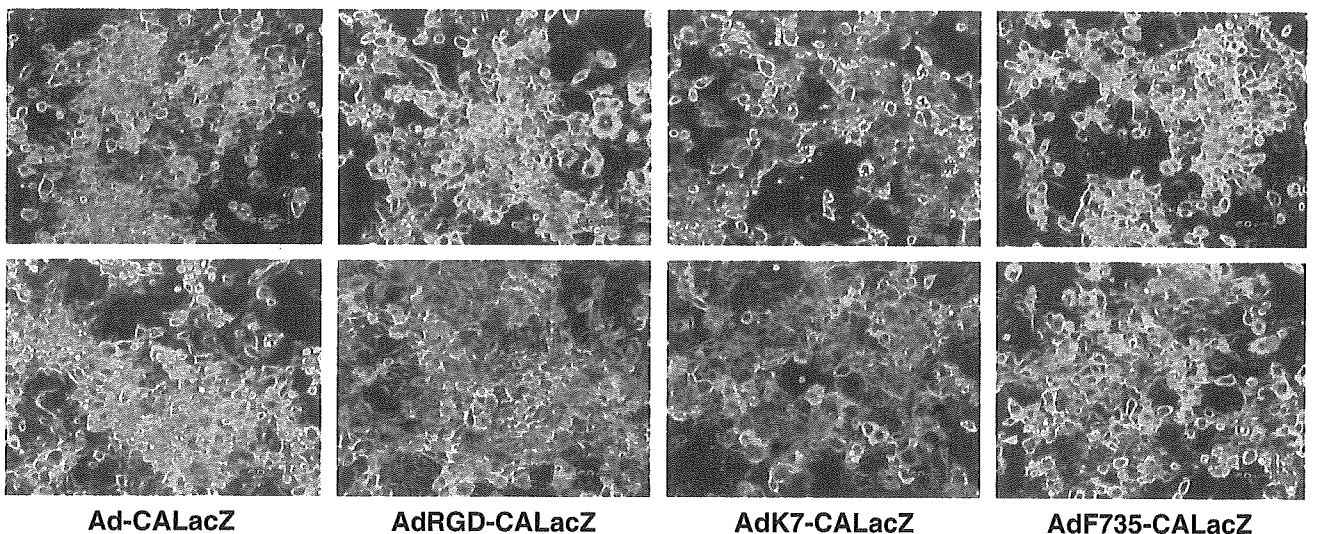


Fig. 1. Comparison of the transduction efficiency of various types of fiber-modified Ad vector into 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes. 3T3-L1 preadipocytes (A) and adipocytes (B), which were cultured in differentiation medium containing pioglitazone, insulin, dexamethasone and 3-isobutyl-1-methylxanthine for 6 days, were transduced with Ad-CALacZ, AdRGD-CALacZ, AdK7-CALacZ or AdF35-CALacZ (3000 or 10,000 VP/cells) for 1.5 h. After 48 h in culture, LacZ expression was determined by X-gal staining.

2.7. Western blotting for PPAR γ proteins

The cell extracts were prepared in lysis buffer (25 mM Tris [pH 7.5], 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl) containing a cocktail of protease inhibitors (Sigma). The protein content was measured with a Bio-Rad assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using bovine serum albumin as the standard. The protein samples (10 μ g) were electrophoresed on 12.5% SDS-polyacrylamide gels under reducing conditions, followed by electrotransfer to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). After blocking in Block Ace (Dainippon Pharmaceuticals, Osaka, Japan), the filters were incubated with antibodies against PPAR γ (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) and GAPDH (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA), followed by incubation in the presence of peroxidase-labeled horse anti-mouse IgG antibody (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA) or peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG antibody (Cell Signaling Technology, Inc.). The filters were developed using chemiluminescence (ECL Western blotting detection system; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). The signals were read using a LAS-3000 (FUJIFILM, Tokyo, Japan), and quantified by Image Gauge Software (FUJIFILM).

3. Results

3.1. Optimization of fiber-modified Ad vectors for the transduction of 3T3-L1 adipocytes and preadipocytes

The Ad vector is known to transduce 3T3-L1 preadipocytes with very low efficiency (Orlicky et al., 2001; Orlicky and Schaack, 2001; Ross et al., 2003). Therefore, we first optimized the transduction of 3T3-L1 adipocytes as well as preadipocytes by means of fiber-modified Ad vectors, which exhibit different tropism with the conventional Ad vector.

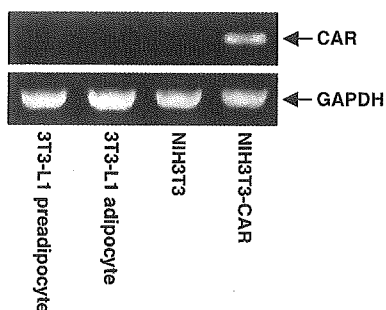


Fig. 2. RT-PCR analysis of CAR mRNA expression in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes. Total RNA was isolated from 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes differentiated for 6 days, and RT-PCR analysis was performed as described in Materials and methods. NIH3T3 and NIH3T3-CAR cells were also analyzed as a negative and positive control of CAR mRNA expression, respectively.

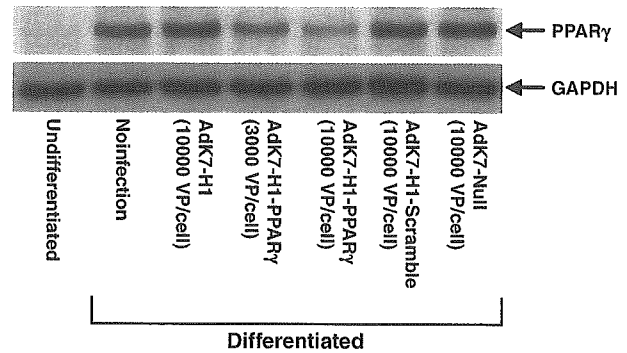


Fig. 3. Suppression of PPAR γ expression in 3T3-L1 cells transduced with AdK7-HI-PPAR γ . 3T3-L1 preadipocytes were transduced with each Ad vector for 1.5 h. On the following day, the cells reached confluence. From 3 days after Ad treatment, the cells were cultured with differentiation medium containing pioglitazone, insulin, dexamethasone and 3-isobutyl-1-methylxanthine for 4 days. Proteins were then extracted from the cells, and the levels of PPAR γ expression were examined by Western blotting. The GAPDH bands served as an internal control for equal total protein loading.

The 3T3-L1 preadipocytes were infected with LacZ-expressing Ad vectors containing modified fiber proteins (Ad-CALacZ, AdRGD-CALacZ, AdF35-CALacZ and AdK7-CALacZ) (Table 1 and Fig. 1A). Ad-CALacZ contains the wild-type fiber, AdRGD-CALacZ contains an RGD peptide motif in the HI-loop of the fiber knob, AdK7-CALacZ contains a polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob, and AdF35-CALacZ contains a fiber protein derived from Ad type 5 fiber tail and Ad type 35 fiber knob and shaft. As shown previously (Orlicky et al., 2001; Orlicky and Schaack, 2001; Ross et al., 2003), Ad-CALacZ was inefficient for transduction of 3T3-L1 preadipocytes. AdK7-CALacZ was the most effective in transducing the LacZ genes. Nearly 100% of 3T3-L1 preadipocytes were transduced by AdK7-CALacZ at 10,000 vector particles (VP)/cell. AdRGD-CALacZ mediated higher levels of LacZ expression than Ad-CALacZ but lower levels than AdK7-CALacZ, while AdF35-CALacZ was ineffective.

We then examined the transduction efficiency of 3T3-L1 adipocytes using various types of Ad vectors. 3T3-L1 preadipocytes differentiate into mature, lipid droplet-containing adipocytes when stimulated with an appropriate hormonal cocktail containing insulin, dexamethasone and 3-isobutyl-1-methylxanthine. Pioglitazone, the ligand of PPAR γ , enhances adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. 3T3-L1 preadipocytes were cultured with a differentiation medium containing pioglitazone for 6 days and then transduced with Ad vectors (Fig. 1B). Under the differentiated conditions, AdK7-CALacZ showed high transduction efficiency (67% LacZ-positive cells), although its efficiency was slightly lower than that in 3T3-L1 preadipocytes. AdRGD-CALacZ also showed high transduction efficiency (59% LacZ-positive cells). Ad-CALacZ and AdF35-CALacZ were ineffective. No cytotoxicity or other negative effects on cell function were observed in either 3T3-L1 preadipocytes or adipocytes.