

生存率を調べたところ約59%であった。方主任研究員とのディスカッションより、中国における施行方法と若干の違いがあったため、中国における方法に準じて行ったところ、生存率は約76%まで上昇した。

## 2. 凍結小型肝細胞の培養

1で融解した細胞を24穴培養プレートに $0.7 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度で播種した。培養液に通常我々がラット小型肝細胞の培養時に使用する培養液(10%FBS添加)及び無血清DMEM/F12を用いた。10%FBSを添加した細胞は、培養プレートへ接着を認めたが、小型肝細胞の増殖像は認められなかった。また無血清DMEM/F12を使用した細胞は培養プレートへの接着をほとんど認めなかった。

現在、凍結ヒト肝細胞中に含まれると考えられる小型肝細胞を増殖させる方法について検討中である。

## 3. 研究会議

平成17年12月5日に札幌医科大学において研究会議を開催した。RILD社のCEOであり、Futan大学薬学部教授であるZhuohan Hu教授の来日に合わせて開催したもので、RILD社で行っている培養ヒト肝細胞を用いた研究について発表していただいた。我々の持っている小型肝細胞研究と中国RILD社の持つヒト細胞分離・培養技術を合わせることで、ヒト小型肝細胞を効率よく分離培養する方法を共同で開発すること

を話し合った。〈別紙4〉

## 考察

### (1) 毛細胆管へ分泌される代謝産物の同定方法の確立

小型肝細胞によって形成された類肝組織においては、これまでの成熟肝細胞の初代培養では見られなかった肝細胞膜の極性形成を見ることができた。成熟化し盛り上がった細胞間には毛細胆管様構造が見られる。毛細胆管面に発現が限局されていることが知られているMrp2は、毛細胆管様構造に一致して発現しており、また類洞面に存在するOatp2は、細胞膜全体に限局して発現していた。加えて培養条件では閉鎖系という条件でもあるために発現してきたと考えられるMrp3の発現は、小型の形態をとっているときにはよく発現していたが、成熟化し組織化した細胞では消失していた。これらの結果は、盛り上がり類肝組織を形成している小型肝細胞は生体内の肝細胞と同程度に成熟化していることを示唆している。RT-PCRの結果もそれを反映しており、免疫染色できなかつた他のトランスポーター蛋白質も生体内で存在するようにこの類肝組織でも発現していることが推測できる。実際、有機アニオントランスポーターを介して肝細胞中に取り込まれ、BcrpやMrp2などを介して毛細胆管中に排出されることが知られているEstron sulfateを培養

液中に投与すると、Estron sulfateの取り込み量は類肝組織の量に依存していた。つまり類肝組織の形成が十分ではないと取り込まれるEstron sulfateの総量は少なく、また取り込みにも時間がかかった。加えて正常では発現していない類洞側面の排出トランスポーターのMrp3が成熟化していない小型肝細胞によく発現しているため、毛細胆管内に排泄されるばかりではなくMrp3を介して培養液中にもよく排泄される。そのため毛細胆管内から基質の回収を試みてもコントロールとの差がはっきりしなかったと考えられる。よく発達した類肝組織が多い培養では取り込みも早く、取り込み総量も多かった。そのことは培養経過と共に類肝組織が増加するに従い、Estron取り込みが増えることからわかる。 $[^3\text{H}]$ -Estradiol 17 $\beta$ -D- glucuronide のように特異性が高い基質を用いて毛細胆管中に分泌されたEstradiolの回収を試みると、類肝組織がよく発達するにつれ、毛細胆管中に排泄され、嚢胞状形態をとる毛細胆管に蓄積するEstradiolが増えるため、Excretion buffer投与により毛細胆管からEstradiolを回収することが可能になったと考えられる。

このような極性を持った肝細胞を培養皿上に作ろうという試みは世界中で行われている。初代培養ラット肝細胞をコラーゲンゲルにサンドイッチすることで極性を持った肝細胞を作ったと報告があるが、トランスポー

ター蛋白質の発現などの検討は行われていず、また毛細胆管内から排泄物を回収できると報告されているが、回収される量はきわめて少ない。またMDCK細胞株に遺伝子を導入することにより、トランスポーターを人為的に発現させ、細胞内移送の極性を作らせた細胞もあるが、特定の蛋白質を強制発現している実験系のため、生体内の代謝物のソウティング機構を正しく反映しているかどうか疑問である。我々が開発した小型肝細胞の成熟化による類肝組織は、凍結保存した小型肝細胞からも作成することが可能であり、長期間(一ヶ月以上)その機能を維持することができる。このようなアッセイ系は世界中で唯一である。薬剤が肝細胞内でどのように代謝されるか、この実験系を用いることで動物生体を使うことなく推測することができると考えられる。

肝毛細胆管膜側に存在する Mdr1b (multiple drug resistance 1b)、Bcrp (breast cancer resistance protein)は mRNA レベルで成熟肝細胞以上の発現を示すが、成熟化に伴い発現の低下傾向を認めた。これらのトランスポーターは、臓器を問わず、ステム細胞と考えられている side-population 細胞に見られることから、小型肝細胞の肝前駆細胞としての特徴の1つかもしれない。

**(2) 女性ホルモン異常状態(疑似妊娠状態)における薬剤の代謝酵素遺伝子誘導発現の解析**

小型肝細胞を成熟化させ、培養皿上に形成させた類肝組織を用いて薬剤など化学物質の毒性や代謝機構を、成体を用いることなく解析するシステムを確立しようというのが本研究プロジェクトの大きな目的である。そのためには成熟化させた小型肝細胞における遺伝子発現が生体内における肝細胞とほぼ同様に発現していることが求められる。本年度はまず生体内で肝細胞が機能している遺伝子と比較して小型肝細胞は何が違うのかを明らかにすることを旨とした。この違いを明らかにすることは、小型肝細胞を効率的に分離・培養する上でも重要である。また遺伝子の網羅的解析方法として用いたAffymetrix社のGeneChipは世界標準であるので結果の信頼性及び再現性が保証されると考えた。ラットとヒトそれぞれ平行して実験を行っているが、外科手術から得られるヒト肝組織は不定期なため、またヒト小型肝細胞の効率的な培養法の検討も同時に行っているため、十分なデータの蓄積が行われていないのが現状である。しかしながら、(3)で詳細については述べるが、ヒト小型肝細胞をほぼ純粋に培養する実験系ができたので、来年度以降その方法を用いてデータの蓄積ができるものと考えている。

ラット小型肝細胞の遺伝子解析は3例行い、ほぼ同様な遺伝子発現の結果が得られたところであり、t検定の結果選択された

遺伝子をGOにより機能別に分類した。結果は、小型肝細胞に発現の高い遺伝子群は予想通り増殖に関連したものが多く、代謝機能に関係する遺伝子は発現が低いことが明らかになった。来年度以降、得られた結果を利用して研究を進める考えである。また小型肝細胞を成熟化した肝細胞と生体内の肝細胞の機能差を明らかにして、薬剤の毒性や代謝機序の解析が容易にできるIn vitro実験系の確率を目指すつもりである。

### (3) ヒト小型肝細胞を効率よく分離培養する方法の確立

ヒト小型肝細胞の分離・培養方法を確立するためにはヒト肝組織をまず入手する必要がある。しかしながら、われわれが外科手術症例から肝組織片を得られる可能性は低い。肝臓疾患の多くが肝炎ウイルス感染によって引き起こされるため、外科手術対象になる患者数が多くても我々の実験に使える肝炎ウイルス感染陰性例は極めて少ない。その頻度は、1~2例/月程度である。また入手できる肝組織片の大きさも一般的に小さい。この方法を用いて研究を行うのは効率が悪いため、中国上海市にあるRILD社と共同研究することにより、心臓死直後に分離された新鮮な細胞の中から小型肝細胞を分離する研究も平行して行うこととした。札幌医科大学倫理委員会で承認された実験方法を用いて現在研究を開始したところ

である。実験結果は来年度以降の報告書に記載する予定である。

外科手術症例から得られた肝組織から分離した小型肝細胞をほぼ純粋に培養する方法の開発に成功した。表2で示すように提供された肝組織は平均年齢58歳(44-66歳)であった。現在の所、男性からのものがほとんどではあるが、全例で小型肝細胞のコロニー形成を認め、高齢患者の肝組織からも小型肝細胞を分離することが可能なことが示された。しかしながら、背景の疾患の影響か、また採取された組織片の大きさによる所為であるか不明であるが、その出現頻度は患者年齢には比例せず症例により大きな差があった。今後、実験数を増やすことによりその原因を解明できるものと考えている。

ヒト小型肝細胞は、これまで通常の培養で使われているコラーゲンをコートした培養皿上ではコロニーを形成することはなく、ヒアルロン酸をコートした培養皿又は何もコートしていない培養皿においてのみコロニー形成が見られた。ラット小型肝細胞に特異的に発現することがわかっているCD44はヒアルロン酸レセプターのひとつであり、実際ヒト小型肝細胞においてもCD44が発現していることが確かめられた。この結果は、ヒト小型肝細胞の出現と培養にヒアルロン酸が強く関係していることを示唆している。さらに、ヒト成熟肝細胞の増殖や分化機能維持に

必要だと考えられていたヒト血清がヒト小型肝細胞の出現・増殖には逆に抑制的に働くことがわかった。加えてヒト血清の添加は線維芽細胞の増殖を促進し、肝細胞の増殖維持にも抑制的に働くことがわかった。

ヒト小型肝細胞の無血清培養においては、これまでラット小型肝細胞の培養に使用してきた培養液ではコロニー形成が見られず、無血清培養用に調整されたDMEM/F12培養液が必要であった。現在どの成分がヒト小型肝細胞の増殖に必要であるか検討を行っている。

我々が開発した方法では、まだ3週間以上ヒト小型肝細胞を増殖させ続けることができない。それが培養方法に問題があるのか、元々の患者の年齢が高いため、強い増殖能を持った小型肝細胞が少ないためなのか今後の検討が必要である。

## 結論

我々は、培養皿上に形成させた類肝組織を用いて、培養液中に加え小型肝細胞に取り込ませた基質を毛細胆管内から回収する方法を確立したので、その方法を応用して実際に薬剤が肝細胞内で生体内の肝臓と同様の代謝が可能かどうか検討する予定である。GeneChip (Affymetrix)を用いてラット小型肝細胞に強く発現している遺伝子を網羅的に解析し、成熟肝細胞との違いを検討した。その結果を成熟化させた小型

肝細胞における遺伝子発現の解析結果に反映させ、小型肝細胞の増殖・成熟化機構の解明に利用しようと考えている。ラット小型肝細胞での検討結果はヒト小型肝細胞の培養方法の開発に重要なデータを提供すると考えている。ヒト小型肝細胞を用いて培養皿上で類肝組織を形成させることができれば、生体を用いることなく薬剤の毒性や代謝機序・相互作用を研究することが出来、創薬研究開発の時間の短縮・コスト削減につながり、ひいては医療費の削減に結びつくものと期待される。

## 健康危険情報

無し

## 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mizuguchi T, Mitaka T, Katsuramaki T, Hirata K. Hepatocyte transplantation for total liver repopulation. *J Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, 12(5), 378-385 (2005)
2. Kikkawa Y, Mochizuki Y, Miner JH, Mitaka T. Transient expression of laminin  $\alpha 1$  chain in regenerating murine liver: Restricted localization of laminin chains and nidogen-1. *Exp. Cell Res.*, 305(1), 99-109 (2005)
3. Sugimoto S, Harada K, Shiotani T, Ikeda S, Katsura N, Ikai I, Mizuguchi T, Hirata K, Yamaoka Y, Mitaka T. Hepatic organoid formation in collagen sponge of cells isolated from human liver. *Tissue Engineering*, 11(3-4), 626-633 (2005)
4. Miyamoto S, Hirata K, Sugimoto S, Harada K, Takeda H, Mitaka T. Expression of cytochrome P450 enzymes in hepatic organoid reconstructed by rat small hepatocytes. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 20(6), 865-872 (2005)
5. Sudo R, Kohara H, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Coordination of Bile Canalicular Contraction in Hepatic Organoid Reconstructed by Rat Small Hepatocytes and Nonparenchymal Cells. *Annals of Biomedical Engineering (Ann Biomed Eng)*, 33(5), 696-708 (2005)
6. Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Reconstruction of 3D stacked-up structures by rat small hepatocytes on microporous membranes. *FASEB J*, 19(12), 1695-1697 (2005).
7. Mizuguchi T, Oshima H, Imaizumi H, Kohara H, Kawamoto M, Nobuoka T, Kawasaki H, Harada K, Masuda Y, Kikkawa Y, Mitaka T, Asai Y, Hirata K. Hyperbaric oxygen stimulates cell proliferation and normalized MRP2 (anion transporter) protein localization in primary rat hepatocytes. *Wound Repair Regen*, 13(6), 551-557 (2005)
8. Shibata C, Mizuguchi T, Kikkawa Y,

- Nobuoka T, Oshima H, Kawasaki H, Kawamoto M, Katsuramaki, T, Mitaka T, Hirata K. Liver repopulation and long-term function of rat small hepatocyte transplantation as an alternative cell source for hepatocyte transplantation. *Liver Transplantation*, 12(1), 78-87 (2006)
9. Kon J, Ooe H, Oshima H, Kikkawa Y, Mitaka T. Expression of CD44 in rat hepatic progenitor cells. *J. Hepatology*, in press (2006).
  10. Nagaya M, Kubota S, Akashi K, Mitaka T. Thermoreversible gelation polymer induces the emergence of hepatic stem cells in a partially injured rat liver. *Hepatology*, in press (2006).
  11. 吉川大和、三高俊広. 肝再生とラミニン $\alpha$ 1鎖. *Surgery Frontier*, in press (2006)
- ## 2. 学会発表
1. 橋本渉、小原洋志、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫「ラット胆管上皮細胞による管構造の再形成」第44回日本生体医工学会大会、茨城、2005年4月25-27日、日本生体医工学会誌、43巻、suppl, p. 265
  2. Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita. Reconstruction of 3D liver-like structures by stacking cell-layers cultured on microporous membranes. 6<sup>th</sup> Asian-Pacific Conference on Medical and Biological Engineering (APCMBE2005). April 24-27, 2005, Tsukuba, Japan
  3. 長屋昌樹、窪田倭、鈴木登、明石勝也、三高俊広. 「温度感受性ハイドロゲル (TGP) を充填した肝小欠損創における新しい再生のメカニズムと肝前駆細胞. 第105回日本外科学会定期学術集会、2005年5月11-13日、名古屋
  4. Nagaya M, Kubota S, Suzuki N, Akashi K, Mitaka T. Filled thermoreversible gelation polymer resulted in the complete recovery of focal defect in a rat. 40<sup>th</sup> Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), May 25-28, 2005, Konya, Turkey.
  5. 川崎浩之、水口徹、大島秀紀、平田公一、三高俊広. 「アデノウイルスベクターを用いた PDX-1 遺伝子の肝細胞への導入と $\beta$ 細胞化」第41回日本肝臓学会総会、大阪、2005年6月16日、肝臓、第46巻、Supplement(1)、A126.
  6. 今純子、大栄秀和、大島秀紀、三高俊広. ワークショップ4肝再生と再生医療「ラット小型肝細胞特異的遺伝子CD44の機能解析」第41回日本肝臓学会総会、大阪、2005年6月17日、肝臓、46巻(supplement1)、P. A53.
  7. 大島秀紀、大栄秀和、今純子、川崎浩之、長屋昌樹、平田公一、三高俊広.

- 「小型肝細胞・類肝組織における有機アニオントランスポーター発現の検討」第41回日本肝臓学会総会、大阪、2005年6月17日、肝臓、第46巻、Supplement(1)、A180.
8. 長屋昌樹、窪田倭、三高俊広. 「In Vitro での肝前駆様細胞誘導(HPC)とその分離及び解析」第41回日本肝臓学会総会、大阪、2005年6月17日、肝臓、第46巻、Supplement(1)、A285.
  9. 大柴秀和、今純子、三高俊広. 「ラット小型肝細胞における薬物代謝酵素の発現解析」第41回日本肝臓学会総会、大阪、2005年6月16日、肝臓、第46巻、Supplement(1)、A296
  10. Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Bile canalicular formation in 3D stacked-up culture of rat small hepatocytes and nonparenchymal cells. 2005 Summer Bioengineering Conference, June 22-26, Vail, Colorado, U.S.A.
  11. Hashimoto W, Kohara H, Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Reconstruction of ductular structure by rat biliary epithelial cells. 2005 Summer Bioengineering Conference, June 22-26, Vail, Colorado, U.S.A.
  12. 三高俊広. 教育講演「肝前駆細胞による肝再生」第23回日本肝移植研究会、札幌、2005年6月24日.
  13. 三高俊広. 「ラット肝臓における性差」第3回北海道性差医学・医療研究会、札幌、2005年7月1日.
  14. 長屋昌樹、窪田倭、鈴木登、三高俊広. シンポジウム2 肝障害と再生 「ラット胆管由来肝前駆様細胞の分離と培養」第12回肝細胞研究会、東京、2005年7月9日
  15. 橋本渉、小原洋志、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. 「ラット胆管上皮細胞のゲルサンドイッチ培養による管構造の形成」第12回肝細胞研究会、東京、2005年7月8日プログラム抄録集、p. 45
  16. 今純子、大島秀紀、佐々木寿誉、吉川大和、三高俊広. 「ヒアルロン酸による小型肝細胞の増殖機構の解析」第12回肝細胞研究会、東京、2005年7月9日
  17. 大島秀紀、大柴秀和、今純子、高松みのり、佐々木寿誉、三高俊広. 「小型肝細胞・類肝組織を用いた in vitro における胆汁うっ滞病変の解析」第12回肝細胞研究会、東京、2005年7月8-9日
  18. 大柴秀和、今純子、三高俊広. 「凍結ラット小型肝細胞における薬物代謝酵素及びその核内受容体の発現解析」第12回肝細胞研究会、東京、2005年7月8-9日

19. 吉川大和、三高俊広.「肝再生過程におけるラミニンの発現とその役割」第12回肝細胞研究会、東京、2005年7月8-9日
20. 長屋昌樹、窪田倭、鈴木登、三高俊広. シンポジウム2 肝障害と再生「ラット胆管由来肝前駆様細胞の分離と培養」第12回肝細胞研究会、東京、2005年7月9日
21. 橋本渉、小原洋志、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫.「ラット胆管上皮細胞による管構造の形成」第26回日本炎症・再生医学会、東京、2005年7月12-13日、日本炎症・再生医学会雑誌、25巻、No.4, p.375
22. Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Reconstruction of 3D Liver-like Structures by Stacking up Layers of Rat Small Hepatocytes. The Second Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, Sep, 2005, Kyoto, Japan
23. Nagaya M, Kubota S, Suzuki N, Isogai A, Watanabe T, Akashi K, Mitaka T. Thermoreversible gelation polymer induces the regeneration of partially injured rat liver accompanying the stem/progenitor cells derived from bile ducts. *Hepatology* 42(4, Suppl. 1), 279A, (2005), AASLD, November 11-15, San Francisco, 2005
24. 西陰亜紀、平田公一、三高俊広.「ラット小型肝細胞を用いた3次元培養による肝組織形成:各種 scaffold との共培養」第43回日本人工臓器学会、東京、2005年12月1日、日本人工臓器学会、34(2)、PS133(2005)(ポスター)
25. 須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫.「ラット初代培養肝細胞の3次元積層培養における細胞間接着の解析」第18回バイオエンジニアリング講演会、新潟、2006年1月13, 14日
26. 高橋憲生、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫.「小型肝細胞コロニーの形態形成に対する多孔性膜の影響」第18回バイオエンジニアリング、新潟、2006年1月13, 14日、日本機会学会(No.05-66)第18回バイオエンジニアリング講演会講演論文集、pp. 133-134
27. 橋本渉、深沢一知、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫.「ラット胆管上皮細胞による管構造ネットワークの再形成」第18回バイオエンジニアリング講演会、新潟、2006年1月13, 14日、講演論文集 No. 05-66, p.137-138
28. 今純子、佐々木寿誉、大島秀紀、三高俊広.「CD44陽性小型肝細胞の増殖及び分化の解析」第5回日本再生医療学会総会、岡山、2006年3月8日、日本再生医療学会雑誌、5巻(Suppl)、p153, 2006年



- |  |   |
|--|---|
| <p>29. 長屋昌樹、窪田倭、鈴木登、磯貝晶子、渡辺泰治、明石勝也、三高俊広。「ラット肝前駆様細胞の分離・培養と肝細胞への分化の検討」第5回日本再生医療学会総会、岡山、2006年3月8日、日本再生医療学会雑誌、5巻(Suppl)、p189, 2006年</p> <p>30. 市戸義久、稲継泰之、中野貴由、藤谷渉、馬越佑吉、田畑泰彦、三高俊広。「一軸配向性アパタイトセラミックスの <i>in vitro</i> 評価」第5回日本再生医療学会総会、岡山、2006年3月8日、日本再生医療学会雑誌、5巻(Suppl)、p215, 2006年</p> <p>31. Mitaka T. Characteristics of small hepatocytes as hepatic progenitor cells and a reconstruction of hepatic organoids <i>in vitro</i>. The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Developmental Biology and Tissue Engineering. March 24<sup>th</sup>, 2006, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan.</p> | <p>分離法」(PCT/JP2005/11915)</p> <p>3. 大栄秀和、今純子、三高俊広。「妊娠状態における薬物代謝予測法」(特願 2005-109369)</p> <p>4. 大栄秀和、今純子、三高俊広。「小型肝細胞におけるCYP2Bの誘導法」(特願 2005-110259)</p> <p>5. 大栄秀和、今純子、三高俊広。「ラット肝細胞におけるリファンピシンによるCYP3A誘導法」(特願 2005-225708)</p> |
|--|---|

実用新案登録

無し

その他

無し

知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特許取得

1. 今純子、三高俊広。「特異的抗体を用いる小型肝細胞の分離法」(PCT/JP2005/11914)
2. 今純子、三高俊広。「ヒアルロン酸を用いた小型肝細胞の選択的培養法及び

<別紙1>

表1 実験に使用抗体一覧

	一次抗体/免疫動物	希釈倍率	二次抗体	希釈倍率
Oatp2	Santa Cruz sc18436/goat	X50	Alexa 488 gout anti-goat	X500
MRP2	Alexis 801-016-C250/mouse	X100	Alexa 488 gout anti-mouse	X500
MRP3	SIGMA M-0318/rabbit	X200	Alexa 488 gout anti-rabbit	X500
Albumin	Dako A0001/rabbit	x100	Alexa 488 gout anti-rabbit	x500
Transferrin	Dako A0061/rabbit	x100	Alexa 488 gout anti-rabbit	x500
Cytokeratin 8	Progen/mouse	x200	Alexa 488 gout anti-mouse	x500
Cytokeratin 19	Dako M0888/mouse	x200	Alexa 488 gout anti-mouse	x500
CD 44	CHEMICON MAB2137/rat	x200	FITC anti-rat	x100
BrdU	Dako M0744/mouse	x400	Biotinated anti-mouse	x200

表2 ヒト肝組織の由来

実験番号	Age	Sex	原疾患	手術方法	採取組織重量
HH1	64	M	肝門部胆管 Ca	拡大右葉切除	4g
HH2	50	M	大腸 Ca	肝部分切除	10.8g
			肝転移		
HH3	65	M	総胆管～胆嚢 Ca	拡大右葉切除	11g
HH4	44	F	卵巣 Ca	肝部分切除	20g
			肝・腹膜転移		
HH5	66	M	胆管細胞癌	左葉切除	6.2g
HH6	62	M	肝細胞癌	右葉切除	7g
HH7	56	M	直腸 Ca	左葉切除	5.6g
			肝転移		
HH8	65	M	大腸 Ca	右葉切除	20.3g
			肝転移		
HH9	50	M	大腸 Ca	左葉切除+	9.61g
			肝転移	肝部分切除	

図10

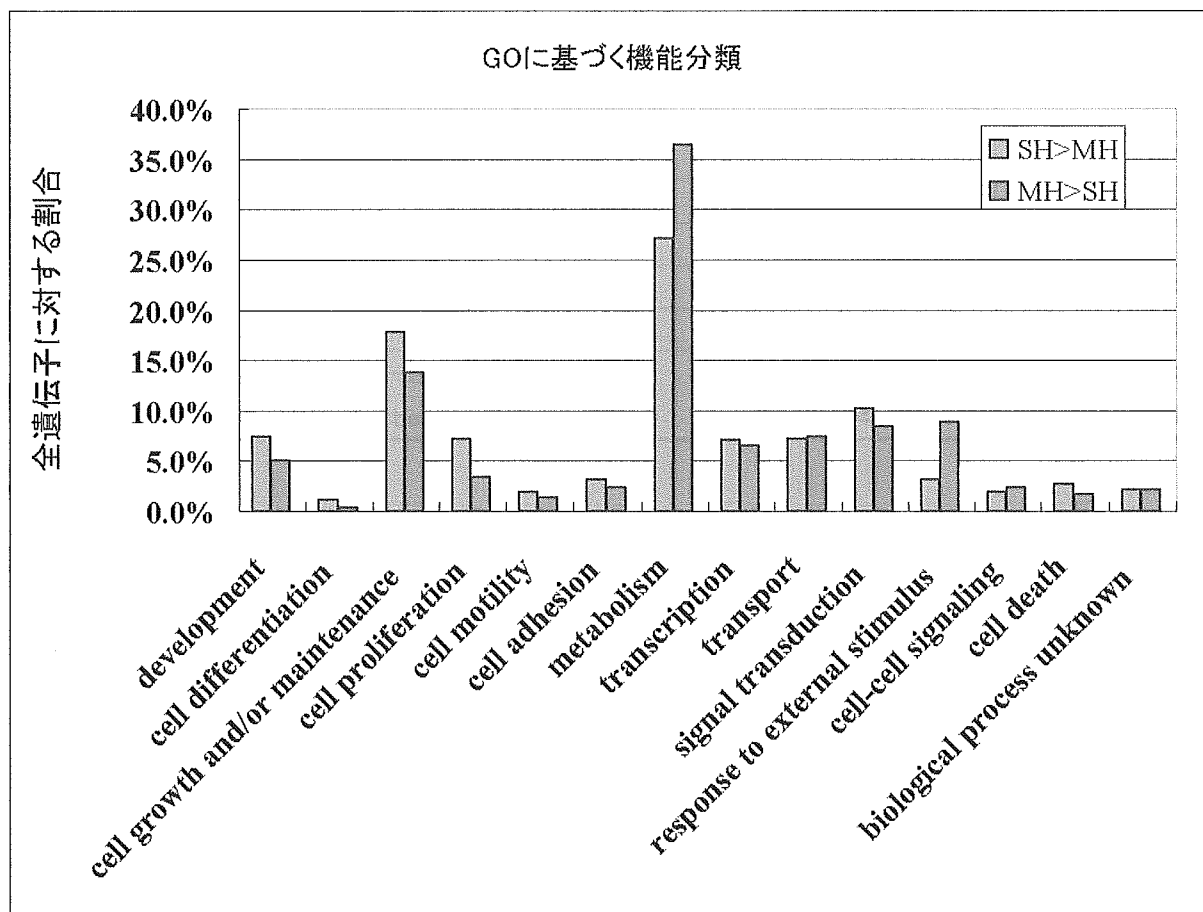


表5 Labeling Index (LI)

カウントした総コロニー数(個)	96
カウントした総細胞数(個)	3950
1コロニーあたりの平均細胞数(個)	41.58
総 BrdU 陽性細胞数(個)	734
1コロニーあたりの平均 BrdU 陽性細胞数(個)	7.65
全体の LI(%)	18.58
コロニーごとの LI 分布(%)	0~52.6

ラット小型肝細胞において、成熟肝細胞と  
比較して発現が抑制されている  
遺伝子のリスト

No.	Gene Title	P value
1	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase	0.0407
2	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	0.0195
3	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	0.0006
4	2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase	0.0011
5	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase	0.0031
6	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	0.0037
7	3-hydroxybutyrate dehydrogenase (heart, mitochondrial)	0.0001
8	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	0.0031
9	3-hydroxyisobutyryl-Coenzyme A hydrolase (predicted)	0.0070
10	4-aminobutyrate aminotransferase	0.0006
11	4-nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog 1 ( <i>C. elegans</i> ) (predicted)	0.0052
12	6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1)	0.0066
13	absent in melanoma 1-like (predicted)	0.0032
14	acetyl-CoA transporter	0.0123
15	Acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1	0.0022
16	acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1	0.0019
17	Acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	0.0074
18	acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	0.0299
19	ACN9 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ) (predicted)	0.0128
20	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	0.0344
21	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	0.0101
22	acyl-coenzyme A dehydrogenase, short chain	0.0007
23	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	0.0036
24	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	0.0002
25	acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl	0.0021
26	adenosine kinase	0.0108
27	adenylate kinase 2	0.0082
28	adenylate kinase 3-like 2	0.0186
29	adiponectin receptor 2 (predicted)	0.0145
30	ADP-ribosylation factor 5	0.0261
31	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (brefeldin A-inhibited)	0.0074
32	adrenergic receptor, alpha 1b	0.0001
33	afamin	0.0040
34	Alcohol dehydrogenase 1	0.0042
35	aldehyde dehydrogenase 2	0.0174

<別紙2>

36	aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1	0.0051
37	aldehyde reductase (aldose reductase) like 6	0.0265
38	aldo-keto reductase family 7, member A2 (aflatoxin aldehyde reductase)	0.0426
39	alpha-2-HS-glycoprotein	0.0105
40	alpha-2u globulin PGCL3 /// alpha-2u globulin PGCL5 /// alpha-2u globulin PGCL1 /// alpha-2u globulin PGCL4 /// major urinary protein 5 /// alpha-2u globulin PGCL2 /// similar to alpha-2u-globulin precursor (clone 36) - rat /// similar to alpha-2u-globulin precursor (clone 36) - rat /// alpha-2u-globulin (L type) /// major urinary protein 4 /// similar to alpha-2u-globulin /// alpha 2U globulin	0.0002
41	alpha-2u globulin PGCL4	0.0039
42	alpha-2u globulin PGCL5 /// major urinary protein 5	0.0007
43	aminoacylase 1	0.0022
44	aminolevulinic acid synthase 1	0.0075
45	amylase 1, salivary	0.0050
46	angiopoietin-like 6 (predicted)	0.0068
47	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	0.0013
48	ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 1 (predicted)	0.0263
49	apolipoprotein A-V	0.0002
50	apolipoprotein B	0.0127
51	apolipoprotein C-III	0.0493
52	apolipoprotein H (predicted)	0.0286
53	apolipoprotein L, 3 (predicted)	0.0009
54	argininosuccinate lyase	0.0026
55	argininosuccinate lyase /// heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	0.0045
56	arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase	0.0004
57	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	0.0152
58	asparaginase-like sperm autoantigen	0.0031
59	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 1	0.0105
60	ATPase, Cu <sup>++</sup> transporting, beta polypeptide	0.0123
61	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8a (predicted)	0.0019
62	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8b (predicted)	0.0044
63	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 9	0.0275
64	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 3 (predicted)	0.0464
65	attractin	0.0019
66	ATX1 (antioxidant protein 1) homolog 1 (yeast)	0.0396
67	AU RNA binding protein/enoyl-coenzyme A hydratase (predicted)	0.0009
68	autocrine motility factor receptor (predicted)	0.0130

69	baculoviral IAP repeat-containing 2	0.0087
70	BCS1-like	0.0076
71	betaine-homocysteine methyltransferase	0.0095
72	beta-spectrin 3	0.0194
73	bile acid CoA ligase	0.0003
74	bile acid-Coenzyme A: amino acid N-acyltransferase	0.0025
75	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH)) (predicted)	0.0017
76	blocked early in transport 1 homolog (S.cerevisiae)	0.0143
77	butyrylcholinesterase	0.0010
78	BWK-1	0.0090
79	cAMP responsive element binding protein 3-like 3 (predicted)	0.0345
80	cAMP responsive element modulator	0.0075
81	cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II	0.0015
82	carbonic anhydrase 3	0.0007
83	carbonic anhydrase-related XI protein	0.0097
84	carboxylesterase 1	0.0004
85	carnitine O-octanoyltransferase	0.0247
86	carnitine O-octanoyltransferase	0.0129
87	carnitine palmitoyltransferase 1, liver	0.0472
88	carnitine palmitoyltransferase 2	0.0062
89	catalase	0.0035
90	cathepsin C	0.0204
91	CCA2 protein	0.0094
92	CD1d1 antigen	0.0040
93	cd36 antigen	0.0393
94	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility class II antigen-associated)	0.0009
95	CD97 antigen (predicted)	0.0173
96	CEA-related cell adhesion molecule 1 /// CEA-related cell adhesion molecule 10	0.0102
97	cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector B (predicted)	0.0416
98	cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae)-like (predicted)	0.0250
99	cellular repressor of E1A-stimulated genes (predicted)	0.0114
100	CGI-58-like protein	0.0015
101	chemokine (C-C motif) ligand 6	0.0003
102	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	0.0265
103	chitobiase, di-N-acetyl-	0.0152
104	choline kinase alpha	0.0269
105	Chromodomain helicase DNA binding protein 3 (predicted)	0.0191

## &lt;別紙2&gt;

106	chromosome 6 open reading frame 108	0.0361
107	chromosome condensation 1-like	0.0019
108	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family) (predicted)	0.0174
109	coagulation factor X	0.0064
110	coenzyme Q3 homolog, methyltransferase (yeast)	0.0080
111	Colony stimulating factor 2 receptor, beta 1, low-affinity (granulocyte-macrophage)	0.0036
112	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide (predicted)	0.0005
113	complement component 3	0.0216
114	complement component 4 binding protein, alpha	0.0439
115	complement component 4a /// complement component 4, gene 2	0.0189
116	complement component 9	0.0023
117	complement component factor H	0.0105
118	copine VIII (predicted)	0.0158
119	copper chaperone for superoxide dismutase	0.0018
120	crystallin, zeta (predicted)	0.0064
121	Cytochrome b-245, beta polypeptide	0.0378
122	cytochrome b-5	0.0072
123	cytochrome P450 2c13	0.0050
124	cytochrome P450 monooxygenase CYP2T1	0.0031
125	cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	0.0071
126	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 23	0.0008
127	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 40	0.0006
128	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 13	0.0054
129	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 22	0.0144
130	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	0.0023
131	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 4	0.0029
132	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14	0.0053
133	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 2	0.0028
134	cytochrome P450, subfamily 51	0.0275
135	cytosolic acetyl-CoA hydrolase	0.0041
136	D4, zinc and double PHD fingers, family 3 (predicted)	0.0158
137	damage specific DNA binding protein 2 (predicted)	0.0146
138	D-dopachrome tautomerase	0.0112
139	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3 (predicted)	0.0406
140	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4	0.0472
141	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8	0.0007
142	dicarbonyl L-xylulose reductase	0.0022
143	DiGeorge syndrome critical region gene 6 (predicted)	0.0036



<別紙2>

144	dihydrofolate reductase	0.0036
145	Dihydrolipoamide branched chain transacylase E2	0.0152
146	dihydropyrimidine dehydrogenase	0.0010
147	Dipeptidylpeptidase 6	0.0307
148	DNA topoisomerase I, mitochondrial	0.0047
149	dual specificity phosphatase 19 (predicted)	0.0353
150	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 (predicted)	0.0256
151	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	0.0245
152	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	0.0061
153	EGF-like domain 7	0.0338
154	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1	0.0014
155	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (yeast)	0.0271
156	Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1	0.0001
157	Endothelin receptor type A	0.0256
158	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 1	0.0402
159	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	0.0041
160	ER transmembrane protein Dri 42	0.0009
161	ethylmalonic encephalopathy 1 (predicted)	0.0210
162	etoposide induced 2.4 mRNA (predicted)	0.0086
163	evectin-1	0.0226
164	evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway	0.0032
165	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1	0.0096
166	fatty acid amide hydrolase	0.0181
167	fatty acid desaturase 1	0.0106
168	F-box only protein 8 (predicted)	0.0171
169	f-box only protein 9 (predicted)	0.0019
170	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	0.0011
171	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2 (predicted)	0.0008
172	fibroblast growth factor 21	0.0045
173	flavin containing monooxygenase 1	0.0010
174	forkhead box O1A	0.0338
175	fractured callus expressed transcript 1	0.0144
176	fring	0.0449
177	fructose-1,6- biphosphatase 1	0.0007
178	FtsJ homolog 2 (E. coli) (predicted)	0.0139
179	Fucosyltransferase VII	0.0143
180	fumarate hydratase 1	0.0054

181	G elongation factor	0.0113
182	G kinase anchoring protein 1 (predicted)	0.0257
183	G protein-coupled receptor 105	0.0097
184	G protein-coupled receptor 48	0.0177
185	G0/G1 switch gene 2 (predicted)	0.0004
186	G1 to S phase transition 1	0.0306
187	G1 to S phase transition 1	0.0108
188	G1 to S phase transition 1	0.0066
189	GABA(A) receptor-associated protein like 2	0.0057
190	galactokinase 1 (predicted)	0.0191
191	gap junction membrane channel protein beta 1	0.0137
192	gephyrin	0.0033
193	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1	0.0024
194	glucokinase regulatory protein	0.0002
195	glucose-6-phosphatase, catalytic	0.0001
196	glutamate cysteine ligase, modifier subunit	0.0089
197	glutamate oxaloacetate transaminase 2	0.0056
198	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	0.0033
199	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	0.0077
200	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2 (predicted)	0.0265
201	glutamic pyruvic transaminase 1, soluble	0.0022
202	glutamine synthetase 1	0.0295
203	glutathione S-transferase theta 1	0.0055
204	glutathione S-transferase, alpha 4 (predicted)	0.0133
205	glutathione-S-transferase, alpha type2	0.0293
206	glycerol kinase	0.0009
207	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	0.0067
208	glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	0.0092
209	glycine cleavage system protein H (aminomethyl carrier)	0.0148
210	glycine dehydrogenase (decarboxylating; glycine decarboxylase, glycine cleavage system protein P) (predicted)	0.0061
211	group specific component	0.0029
212	group specific component	0.0117
213	growth factor, erv1 -like	0.0275
214	Growth hormone inducible transmembrane protein	0.0017
215	growth hormone receptor	0.0053
216	GTP cyclohydrolase 1	0.0023
217	GTP cyclohydrolase 1	0.0021
218	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10	0.0007
219	hairy and enhancer of split 6 (Drosophila) (predicted)	0.0027

## &lt;別紙2&gt;

220	haptoglobin	0.0154
221	heme binding protein 1 (predicted)	0.0117
222	hemopexin	0.0093
223	hepatocyte growth factor	0.0267
224	hepatocyte growth factor activator	0.0089
225	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	0.0288
226	hepsin	0.0031
227	histidine triad nucleotide binding protein 3	0.0107
228	histone 2, H2aa (predicted)	0.0105
229	histone deacetylase 5	0.0390
230	HIV-1 Rev binding protein-like (predicted)	0.0206
231	Hydroxyacid oxidase 1	0.0067
232	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10	0.0045
233	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	0.0031
234	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	0.0102
235	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 9	0.0060
236	hypothetical LOC287661	0.0117
237	hypothetical LOC293498 (predicted)	0.0297
238	hypothetical LOC297077 (predicted)	0.0036
239	hypothetical LOC298504 (predicted)	0.0149
240	hypothetical LOC300441	0.0135
241	hypothetical protein LK44	0.0104
242	hypoxia induced gene 1	0.0319
243	Inhibitor of DNA binding 4	0.0039
244	insulin receptor	0.0101
245	insulin receptor substrate 1	0.0141
246	insulin-like growth factor 1	0.0004
247	inter alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 4	0.0287
248	interferon gamma induced GTPase (predicted)	0.0401
249	interferon gamma inducing factor binding protein	0.0064
250	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K) (predicted)	0.0268
251	interleukin 1 alpha	0.0060
252	Interleukin 6 signal transducer	0.0114
253	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta	0.0015
254	kallikrein B, plasma 1	0.0003
255	Kelch-like ECH-associated protein 1	0.0368
256	ketoheksokinase	0.0019
257	kidney cell line derived transcript 1 (predicted)	0.0426
258	kidney-specific protein (KS)	0.0035

<別紙2>

259	kininogen 1	0.0072
260	Kruppel-like factor 15	0.0043
261	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	0.0013
262	lactate dehydrogenase A	0.0191
263	lactate dehydrogenase D (predicted)	0.0075
264	lecithin cholesterol acyltransferase	0.0032
265	lectin, galactose binding, soluble 5 /// lectin, galactose binding, soluble 9	0.0076
266	lectin, galactose binding, soluble 9	0.0023
267	Lectin, mannose-binding, 1	0.0047
268	leptin receptor	0.0243
269	leucine-rich PPR-motif containing (predicted)	0.0028
270	leucocyte specific transcript 1	0.0111
271	leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (predicted)	0.0374
272	L-gulonolactone oxidase	0.0068
273	L-gulonolactone oxidase	0.0024
274	lin-7 homolog a (C. elegans)	0.0003
275	lipase A, lysosomal acid	0.0028
276	liver glycogen phosphorylase	0.0016
277	LOC362671 (predicted)	0.0092
278	LOC363020 (predicted)	0.0205
279	low density lipoprotein receptor-related protein 11 (predicted)	0.0206
280	low density lipoprotein receptor-related protein 5 (predicted)	0.0273
281	LRP16 protein	0.0050
282	Lymphocyte antigen 68	0.0134
283	Lysosomal trafficking regulator	0.0032
284	macrophage expressed gene 1	0.0117
285	Macrophage expressed gene 1	0.0025
286	Macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	0.0024
287	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	0.0023
288	mannan-binding lectin serine peptidase 1	0.0001
289	mannan-binding lectin serine protease 2	0.0024
290	mannan-binding lectin serine protease 2	0.0033
291	MARVEL (membrane-associating) domain containing 1 (predicted)	0.0032
292	MAWD binding protein	0.0022
293	meningioma expressed antigen 6 (coiled-coil proline-rich) (predicted)	0.0074
294	metallophosphoesterase 1 (predicted)	0.0094
295	methionine sulfoxide reductase B (predicted)	0.0017
296	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha) (predicted)	0.0007
297	methylmalonyl CoA epimerase (predicted)	0.0026