

- Osborne, B. A., Ishida, I., Robl, J. M.: *Nat. Biotechnol.*, **20**(9), 889-894 (2002).
- 30) Robl, J. M., Kasinathan, P., Sullivan, E., Kuroiwa, Y., Tomizuka, K., Ishida, I.: *Therigenology*, **59**(1), 107-113 (2003).
- 31) Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., Shitara, K.: *J. Biol. Chem.*, **278**(5), 3466-3473 (2002).
- 32) Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H., Presta, L. G.: *J. Biol. Chem.*, **277**(30), 26733-26740 (2002).
- 33) Deisenhofer, J.: *Biochemistry*, **20**(9), 2361-2370 (1981).
- 34) Radaev, S., Motyka, S., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., Sun, P. D.: *J. Biol. Chem.*, **276**(19), 16469-16477 (2001).
- 35) Harris, L. J., Larson, S. B., Hasel, K. W., McPherson, A.: *Biochemistry*, **36**(7), 1581-1597 (1997).
- 36) Harris, L. J., Skaletsky, E., McPherson, A.: *J. Mol. Biol.*, **275**(5), 861-872 (1998).
- 37) Pollock, D. P., Kutzko, J. P., Birck-Wilson, E., Williams, J. L., Echelard, Y., Meade, H. M.: *J. Immunol. Methods*, **231**(1-2), 147-157 (1999).
- 38) Hiatt, A., Cafferkey, R., Bowdish, K.: *Nature*, **342**(6245), 76-78 (1989).
- 39) Mohammed, S. M., Morrison, S., Wims, L., Trinh, K. R., Wildeman, A. G., Bonselaar, J., Etches, R. J.: *Immunotechnology*, **4**(2), 115-125 (1998).
- 40) Tcheng, J. E., Kereiakes, D. J., Lincoff, A. M., George, B. S., Kleiman, N. S., Sane, D. C., Cines, D. B., Jordan, R. E., Mascelli, M. A., Langrall, M. A., Damaraju, L., Schantz, A., Efron, M. B., Braden, G. A.: *Circulation*, **104**(8), 870-875 (2001).
- 41) Remicade (infliximab). Prescribing Information. Physician's Desk Reference. (1999).
- 42) Stack, W. A., Mann, S. D., Roy, A. J., Heath, P., Sopwith, M., Freeman, J., Holmes, G., Long, R., Forbes, A., Kamm, M. A.: *Lancet*, **349**(9051), 521-524 (1997).
- 43) 尾崎修治, 柴田泰伸, 原 朋子, 小阪昌明: 分子細胞治療, **1**(3), 279-285 (2002).
- 44) Ritter, G., Cohen, L. S., Williams, C. Jr., Richards, E. C., Old, L. J., Welt, S.: *Cancer Res.*, **61**(18), 6851-6859 (2001).
- 45) Krebs, B., Rauchenberger, R., Reiffert, S., Rothe, C., Tesar, M., Thomassen, E., Cao, M., Dreier, T., Fischer, D., Hoss, A., Inge, L., Knappik, A., Marget, M., Pack, P., Meng, X. Q., Schier, R., Sohlmann, P., Winter, J., Wolle, J.: *J. Immunol. Methods*, **254**(1-2), 67-84 (2001).
- 46) Glover, R. D.: 12th Annual International Conference on Antibody Engineering. San Diego, (2001).
- 47) Kuroiwa, Y., Kasinathan, P., Matsushita, H., Sathiyaselan, J., Sullivan, E. J., Kakitani, M., Tomizuka, K., Ishida, I., Robl, J. M.: *Nat. Genet.*, **36**(7), 775-780 (2004).
- 48) Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., Watier, H.: *Blood*, **99**(3), 754-758 (2002).
- 49) Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., Ravetch, J. V.: *Nat. Med.*, **6**(4), 443-446 (2000).
- 50) Nakamura, K., Tanaka, Y., Fujino, I., Hirayama, N., Shitara, K., Hanai, N.: *Mol. Immunol.*, **37**(17), 1035-1046 (2000).
- 51) Nakamura, K., Tanaka, Y., Shitara, K., Hanai, N.: *Cancer Immunol. Immunother.*, **50**(5), 275-284 (2001).
- 52) Reff, M. E., Carner, K., Chambers, K. S., Chinn, P. C., Leonard, J. E., Raab, R., Newman, R. A., Hanna, N., Anderson, D. R.: *Blood*, **83**(2), 435-445 (1994).
- 53) Tedder, T. F., Engel, P.: *Immunol. Today*, **15**(9), 450-454 (1994).
- 54) Deans, J. P., Schieven, G. L., Shu, G. L., Valentine, M. A., Gilliland, L. A., Aruffo, A., Clark, E. A., Ledbetter, J. A.: *J. Immunol.*, **151**(9), 4494-4504 (1993).
- 55) Vose, J. M.: *Semin. Hematol.*, **36**(4 Suppl 6), 15-20 (1999).
- 56) 柴田徹一: あいみっく, **22**, 27 (2001).
- 57) Igarashi, T., Ohtsu, T., Fujii, H., Sasaki, Y., Morishima, Y., Ogura, M., Kagami, Y., Kinoshita, T., Kasai, M., Kiyama, Y., Kobayashi, Y., Tobinai, K.; IDEC-C28B Study Group.: *Int. J. Hematol.*, **73**(2), 213-221 (2001).
- 58) Czuczman, M. S., Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., Saleh, M., Gordon, L., LoBuglio, A. F., Jonas, C., Klippenstein, D., Dallaire, B., Varns, C.: *J. Clin. Oncol.*, **17**(1), 268-276

- (1999).
- 59) Vose, J M., Link, B K., Grossbard, M. L., Czuczman, M., Grillo-Lopez, A., Gilman, P., Lowe, A., Kunkel, L A., Fisher, R. I.: *J. Clin. Oncol.*, **19**(2), 389-397 (2001).
- 60) Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Van Den Neste, E., Salles, G., Gaulard, P., Reyes, F., Lederlin, P., Gisselbrecht, C.: *N. Engl. J. Med.*, **346**(4), 235-242 (2002).
- 61) Kaminski, M. S., Zasadny, K. R., Francis, I. R., Milik, A. W., Ross, C. W., Moon, S. D., Crawford, S. M., Burgess, J. M., Petry, N. A., Butchko, G. M. *et al.*: *N. Engl. J. Med.*, **329**(7), 459-465 (1993).
- 62) Knox, S. J., Goris, M. L., Trisler, K., Negrin, R., Davis, T., Liles, T. M., Grillo-Lopez, A., Chinn, P., Varns, C., Ning, S. C., Fowler, S., Deb, N., Becker, M., Marquez, C., Levy, R.: *Clin. Cancer Res.*, **2**(3), 457-470 (1996).
- 63) Witzig, T. E., White, C. A., Wiseman, G. A., Gordon, L. I., Emmanouilides, C., Raubitschek, A., Janakiraman, N., Gutheil, J., Schilder, R. J., Spies, S., Silverman, D. H., Parker, E., Grillo-Lopez, A. J.: *J. Clin. Oncol.*, **17**(12), 3793-3803 (1999).
- 64) Kaminski, M. S., Zasadny, K. R., Francis, I. R., Fenner, M. C., Ross, C. W., Milik, A. W., Estes, J., Tuck, M., Regan, D., Fisher, S., Glenn, S. D., Wahl, R. L.: *J. Clin. Oncol.*, **14**(7), 1974-1981 (1996).
- 65) Vose, J. M., Wahl, R. L., Saleh, M., Rohatiner, A. Z., Knox, S. J., Radford, J. A., Zelenetz, A. D., Tidmarsh, G. F., Stagg, R. J., Kaminski, M. S.: *J. Clin. Oncol.*, **18**(6), 1316-1323 (2000).
- 66) Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E., Shepard, H. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**(10), 4285-4289 (1992).
- 67) Shak, S.: *Semin. Oncol.*, **26**(4 Suppl 12), 71-77 (1999).
- 68) King, C. R., Kraus, M. H., Aaronson, S. A.: *Science*, **229**(4717), 974-976 (1985).
- 69) Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., McGuire, W. L.: *Science*, **235**(4785), 177-182 (1987).
- 70) Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., *et al.*: *Science*, **244**(4905), 707-712 (1989).
- 71) Tsuda, H., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Tanaka, Y., Hirota, T., Tsugane, S., Shirashi, M., Toyoshima, K., Yamamoto, T., Terada, M., *et al.*: *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**(4), 327-332 (1990).
- 72) Yarden, Y., Sliwkowski, M. X.: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2**(2), 127-137 (2001).
- 73) Sundaresan, S., Penuel, E., Sliwkowski, M. X., *Curr. Oncol. Rep.*, **1**(1), 16-22 (1999).
- 74) Brennan, P. J., Kumagai, T., Berezov, A., Murali, R., Greene, M. I., Kumogai, T.: *Oncogene*, **19**(53), 6093-6101 (2000).
- 75) Dankort, D., Maslikowski, B., Warner, N., Kanno, N., Wang, Z., Moran, M. F., Oshima, R.G., Cardiff, R. D., Muller, W. J.: *Mol. Cell. Biol.*, **21**(5), 1540-1551 (2001).
- 76) Cuello, M., Ettenberg, S. A., Clark, A. S., Keane, M. M., Posner, R. H., Nau, M. M., Dennis, P. A., Lipkowitz, S.: *Cancer Res.*, **61**(12), 4892-4900 (2001).
- 77) Keshmouni, V. G., Mattingly, R. R., Reddy, K. B.: *J. Biol. Chem.*, **277**(25), 22558-22565 (2002).
- 78) Yakes, F. M., Chinratanalab, W., Ritter, C. A., King, W., Seelig, S., Arteaga, C.L.: *Cancer Res.*, **62**(14), 4132-4141 (2002).
- 79) Baselga, J., Albanell, J.: *Ann. Oncol.*, **12**(Suppl 1) S35-41 (2001).
- 80) Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso E., Fukumura, D., Jain, R. K.: *Nature*, **416**(6878), 279-280 (2002).
- 81) 医薬品インタビューフォーム：抗 Her2 ヒト化モノクローナル抗体、抗悪性腫瘍剤ハーセプチン（注射用）150，トラスツツマブ（遺伝子組換え）製剤，2001年6月（日本ロシユ株式会社）p.13.
- 82) Slamon, D. J., Leyland-Johnes, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L.: *N. Engl. J. Med.*, **344**(11), 783-792 (2001).
- 83) Seidman, A. D., Fornier, M. N., Esteva, F. J., Tan, L., Kaptain, S., Bach, A., Panageas, K. S., Arroyo, C., Valero, V., Currie, V., Gilewski, T., Theodoulou, M., Moynahan, M. E., Moasser, M., Sklarin, N., Dickler, M., D'Andrea, G., Cristofanilli, M., Rivera, E., Hortobagyi, G. N., Norton, L., Hudis, C. A.:

- J. Clin. Oncol.*, **19**(10), 2587-2595 (2001).
- 84) Cobleigh, M.A., Vogel, C. L., Tripathy, D., Robert, N. J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J. M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G., Slamon, D. J.: *J. Clin. Oncol.*, **17**(9), 2639-2648 (1999).
- 85) Choy, E. H., Panayi, G. S.: *N. Eng. J. Med.*, **344**(12), 907-916 (2001).
- 86) Nakada, M. T., Tam, S. H., Woulfe, D. S., Casper, K. A., Swerlick, R. A., Ghrayeb, J.: *Cell Adhes. Commun.*, **5**(6), 491-503 (1998).
- 87) Scallon, B. J., Moore, M. A., Trinh, H., Knight, D. M., Ghrayeb, J.: *Cytokine*, **7**(3), 251-259 (1995).
- 88) Tragan, S. R., Hanauer, S. B., van Deventer, S. J., Mayer, L., Present, D. H., Braalman, T., DeWoody, L. L., Schaible, T. F., Rutgeerts, P. J.: *N. Engl. J. Med.*, **337**(15), 1029-1035 (1997).
- 89) Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Katsikis, P., Brennan, F. M., Walker, J., Bijl, H., Ghrayeb, J., et al.: *Arthritis. Rheum.*, **36**(12), 1681-1690 (1993).
- 90) Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Kalden, J. R., Antoni, C., Smolen, J. S., Leeb, B., Breedveld, F. C., Macfarlane, J. D., Bijl, H., et al.: *Lancet*, **344**(8930), 1105-1110 (1994).
- 91) Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., Woody, J. N.: *Lancet*, **344**(8930), 1125-1127 (1994).
- 92) Mani, R., St Clair, E. W., Breedveld, F., Furst D., Kalden, J., Weisman, M., Smolen, J., Emery, P., Harriman, G., Feldmann, M., Lipsky, P.: *Lancet*, **354**(9194), 1932-1939 (1999).
- 93) Lipsky, P. E., van der Heijde, D. M., St Clair, E. W., Furst, D. E., Breedveld, F. C., Kalden, J. R., Smolen, J. S., Weisman, M., Emery, P., Feldmann, M., Harriman, G. R., Maini, R. N.; Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group.: *N. Engl. J. Med.*, **343**(22), 1594-1602 (2000).
- 94) 第45回日本リウマチ学会特集. 日経メディカル別冊, **8**, 1 (2001).
- 95) Sandborn, W. J., Hanauer, S. B.: *Am. J. Gastroenterol.*, **97**(12), 2962-2972 (2002).
- 96) Keane, J., Gershon, S., Wise, R. P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W. D., Siegel, J. N., Braun, M. M.: *N. Eng. J. Med.*, **345**(15), 1098-1104 (2001).
- 97) Gardam, M. A., Keystone, E. C., Menzies, R., Manners, S., Skamene, E., Long, R., Vinh, D. C.: *Lancet Infect. Dis.*, **3**(3), 148-155 (2003).
- 98) Haba, T., Uchida, K., Katayama, A., Tomimaga, Y., Sato, T., Watanabe, I., Inagaki, H., Kimata, T., Goto, K., Morozumi, K., Takeda, A., Takahara, S., Takahashi, K., Oshima, S.: *Transplant. Proc.*, **33**(7-8), 3174-3175 (2001).
- 99) Nashan, B., Moore, R., Amlot, P., Schmidt, A. G., Abeywickrama, K., Soullillou, J. P.: *Lancet*, **350**(9086), 1193-1198 (1997).
- 100) Kahan, B. D., Rajagopalan, P. R., Hall, M.: *Transplantation*, **67**(2), 276-284 (1999).
- 101) Onrust, S. V., Wiseman, L. R.: *Drugs*, **57**(2), 207-213 (1999).
- 102) Ponticelli, C., Yussim, A., Cambi, V., Legendre, C., Rizzo, G., Salavadori, M., Kahn, D., Kashi, H., Salmela, K., Fricke, L., Heemann, U., Garcia-Martinez, J., Lechler, R., Prestele, H., Girault, D.; Simulect Phase IV Study Group.: *Transplantation*, **72**(7), 1261-1267 (2001).
- 103) Beeler, J. A., van Wyke Coelingh K.: *J. Virol.*, **63**(7), 2941-2950 (1989).
- 104) Press, E. M., Hogg, N. M.: *Biochem. J.*, **117**(4), 641-660 (1970).
- 105) Takahashi, N., Noma, T., Honjo, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**(16), 5194-5198 (1984).
- 106) Bently, D. L., Rabbits, T. H.: *Nature*, **288**(5792), 730-733 (1980).
- 107) Johnson, S., Oliver, C., Prince, G. A., Hemming, V. G., Pfarr, D. S., Wang, S. C., Domitzer, M., O'Grady, J., Koenig, S., Tamura, J. K., Woods, R., Bansal, G., Couchenour, D., Tsao, E., Hall, W. C., Young, J. F.: *J. Infect. Dis.*, **176**(5), 1215-1224 (1997).
- 108) The Impact-RSV Study Group.: *Pediatrics*, **102**, 531-537 (1998).
- 109) Kempeni, J.: *Ann. Rheum. Dis.*, **58**(Suppl 1), 170-172 (1999).
- 110) Barrera, P., Joosten, L. A., den Broeder, A. A., van de Putte, L. B., van Riel, P. L., van den Berg, W. B.: *Ann. Rheum. Dis.*, **60**(6), 660-669 (2001).
- 111) Weinblatt, M. E., Keystone, E. C., Furst, D.

- E., Moreland, L. W., Weisman, M. H., Barbara, C. A., Teoh, L. A., Fischkoff, S. A., Chartash, E. K.: *Arthritis Rheum.*, 48(1), 35-45 (2003).
- 112) den Broeder, A. A., Joosten, L. A., Saxne, T., Heinegard, D., Fenner, H., Miltenburg, A. M., Frasa, W. L., van Tits, L. J., Buurman, W. A., van Riel, P. L., van de Putte, L. B., Barrera, P.: *Ann. Rheum. Dis.*, 61(4), 311-318 (2002).
- 113) Freeman, S. D., Kelm, S., Barber E. K., Crocker, P. R.: *Blood*, 85(8), 2005-2012 (1995).
- 114) Wagner, J. E., Collins, D., Fuller, S., Schain, L. R., Berson, A. E., Almici, C., Hall, M. A., Chen, K. E., Okarma, T. B., Lebkowski, J. S.: *Blood*, 86(2), 512-523 (1995).
- 115) van der Jagt, R. H., Badger, C. C., Appelbaum, F. R., Press, O. W., Matthews, D. C., Eary, J. F., Krohn, K. A., Bernstein, I. D.: *Cancer Res.*, 52(1), 89-94 (1992).
- 116) Caron, P. C., Co, M. S., Bull, M. K., Avdalovic, N. M., Queen, C., Scheinberg, D. A.: *Cancer Res.*, 52(24), 6761-6767 (1992).
- 117) Sievers, E. L., Larson, R. A., Stadtmauer, E. A., Estey, E., Lowenberg, B., Dombret, H., Karanes, C., Theobald, M., Bennett, J. M., Sherman, M. L., Berger, M. S., Eten, C. B., Loken, M. R., van Dongen, J. J., Bernstein, I. D., Appelbaum, F. R.; Mylotarg Study Group.: *J. Clin. Oncol.*, 19(13), 3244-3254 (2001).
- 118) Penichet, M. L., Morrison, S. L.: *J. Immunol. Methods*, 248(1-2), 91-101 (2001).
- 119) Helguera, G., Morrison, S. L., Penichet, M. L.: *Clin. Immunol.*, 105(3), 233-246 (2002).
- 120) Rook, A. H., Mc Ginnis, K. S., Richardson, S. K., Budgin, J. B., Wysocka, M., Benoit, B. M., Hopkins, J. M., Vittorio, C. C.: *Dermatol. Ther.*, 16(4), 331-336 (2003).
- 121) Nissim, A., Gofur, Y., Vessillier, S., Adams, G., Chernajovsky, Y.: *Trends Mol. Med.*, 10(6), 269-274 (2004).
- 122) 花井陳夫：BIO ベンチャー, 2, 37-43 (2002).
- 123) 小崎丈太郎, 久保田 文：日経ビジネス, 05, 36-53 (2003).
- 124) 富塚一磨, 黒岩義巳, 石田 功：BIO INDUSTRY, 20, 43-51 (2003).
- 125) 伊東祐二, 田中孝一, 橋口周平, 杉村和久：BIO INDUSTRY, 20, 34-42 (2003).
- 126) 中島敏博：BIO ベンチャー, 2, 59-66 (2002).
- 127) 石田 功：バイオサイエンスとインダストリー, 60, 296-301 (2002).
- 128) 石田 功：日病薬誌, 38, 1121-1124 (2002).
- 129) 黒岩義巳, 富塚一磨, 石田 功：バイオサイエンスとインダストリー, 61, 39-40 (2003).
- 130) 土屋政幸：BIO ベンチャー, 2, 81-88 (2002).
- 131) 石田 功, 富塚一磨, 吉田 均：BIO ベンチャー, 2, 44-50 (2002).
- 132) 浅野竜太郎, 津本浩平, 熊谷 泉：BIO INDUSTRY, 20, 6-14 (2003).
- 133) 飛内賢正：最新医学, 56, 609-618 (2001).
- 134) 渡辺 亨, 勝俣範之, 藤原康弘, 向井博文, 松本光史, 安藤正志, 清水千佳子, 西條長宏：癌治療と宿主, 14, 2002-2007 (2002).
- 135) 吉崎和幸, 奥畑聡子, 中原英子, 荻原圭佑, 西本憲弘：BIO ベンチャー, 2, 67-74 (2002).
- 136) 湊健二郎：医薬ジャーナル, 40, 295-301 (2004).

## 肝幹細胞に関する研究の現状と肝疾患の細胞治療への応用の展望

新見 伸吾\*, 原島 瑞\*, 日向 昌司\*, 野間 誠司\*\*,  
川西 徹\*, 早川 堯夫\*\*\*

(受付:平成17年6月13日, 受理:平成17年9月30日)

State of Research about Hepatic Stem Cell and Perspective of  
its Application to Cell Therapy for Hepatic DiseaseShingo NIIMI\*, Mizuho HARASHIMA\*, Masashi HYUGA\*,  
Seiji NOMA\*\*, Toru KAWANISHI\*, Takao HAYAKAWA\*\*\*

## はじめに

対象疾患ごとに必要な治療用細胞を大量生産・再構築することにより, それらの細胞が有する機能を利用することによる再生医療が実現しようとしている。特に肝疾患においては死亡者が毎年4万人ともいわれ, そのうち60歳以下の肝移植適応患者は年間3,500~5,000人と見積もられている。しかし適応拡大による移植症例数の急激な増加はドナー肝の有効利用を目的とした分割肝移植や生体部分肝移植などの工夫にもかかわらず, 深刻なドナー不足をもたらしている。すなわち, 劇症肝炎の年間発症率は約2,500例と推定されるが, 重大な基礎疾患がなく肝移植の対象となる患者は年間100例程度と概算されており, 摘出されたドナー肝の約50%が何らかの理由で肝移植に用いられず棄却されている。そこで急性肝不全や代謝性肝疾患に対して肝細胞移植や人工肝を利用した治療が肝移植に代わる方法として

試されている。これらの方法に加え, より高度な肝機能を発揮させるため, 組織工学的手法を用いて正常肝に類似した組織を体内あるいは体外で構築し, これを利用することも考えられている。

肝細胞移植に関連して, 最近, 有効であるといわれているのは, 全肝移植までのbridge-use, 肝不全の際の代謝補助, ある代謝疾患のための全肝移植に置き換わる方法としての肝細胞移植である。また, 宿主の肝細胞死の割合が高い特別な状況においては, 移植肝細胞が増殖して置き換わることも期待される。しかし, 臓器移植同様, 肝細胞移植に用いるための肝細胞の不足は明らかであり, ヒト肝細胞の培養, 増殖, 凍結保存技術の開発は大きな課題である。

このような観点において最近注目されているのが肝幹細胞である。肝幹細胞は細胞治療において以下のような利点を有する。①分化の方向性や増殖能が既に決定されているので腫瘍化の危険性が低い。②増殖能が成熟肝細胞に比べ極めて高い。③正常細胞

\* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀1-18-1 (〒158-8501)  
Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1  
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

\*\* 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 東京都中央区日本橋小伝馬町13-4 共同ビル4階 (〒103-0001)  
The Japan Health Sciences Foundation, Kyodo Bldg. 4F, 13-4 Nihonbashi, Kodenma-cho, Chuo-ku,  
Tokyo 103-0001, Japan

\*\*\* 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞ヶ関3-3-2 新霞ヶ関ビル (〒100-0013)  
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Shinkasumigaseki Bldg. 3-3-2 Kasumigaseki,  
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan

と同等の機能発現が期待できる。④対象者自身の細胞の利用が可能である。

肝幹細胞の存在については半世紀にわたり論争が行われていた。Wilsonらは世界で最初に肝幹細胞を仮定した<sup>1)</sup>。彼らの仮説は、肝臓が肝臓毒により重篤な障害を受けた際に肝臓が再生できるという事実に基づいており、既存の細胞はそのような条件において分裂増殖できないため新しい肝細胞が肝幹細胞より派生するはずであるというものであった。この仮説を強く支持する知見が多岐にわたる肝臓の発癌研究から得られた。Faustoらは化学発癌物質を動物に投与すると、初期の段階において、細胞質が乏しく卵型の核を有する小型の肝細胞が増殖することを明らかにした<sup>2)</sup>。その後肝幹細胞に関する研究は大きく進展し、動物及びヒトにおいて肝幹細胞の存在が確認された。その中で代表的なものは oval cell と骨髄由来細胞である。本稿においては肝幹細胞に関する最近の知見、及び肝幹細胞を用いた細胞治療などの臨床応用における現状と今後の展望について概説する。

### 1. Oval cell

Oval cell は、エチオニン、2-アセチルアミノフルオレン “2-acetylaminofluorene” (2-AAF), 3'-メチル-4-ジメチルアミノアゾベンゼンなどを用いて肝化学発癌過程を研究中にグリソン鞘周囲に増殖する楕円形 (oval) の核をもつ小型の細胞として見出された。Oval cell の名前の由来はこの特徴的な形態による。Oval cell は肝細胞毒による肝障害及び広範囲な肝細胞壊死などにより成熟肝細胞の増殖の著しい阻害及び遅延などの病態が生じた場合において肝臓に出現し、小葉内胆管につながる肝細胞索及び胆管を形成する。また、ヒト肝臓の胆管においても肝細胞への分化がおきることから、重篤な障害の肝臓で再生する oval cell が新しい肝細胞の幹細胞として機能すると考えられるようになった。上記のように oval cell は肝細胞だけでなく胆管上皮細胞にも分化するが、本稿においては肝細胞への分化を中心に概説する。

#### 1.1 Oval cell から肝細胞への分化

Oval cell から肝細胞への分化を誘導する典型的なモデルは改変 Solt-Farber 法であり、ラットに 2-AAF を投与後 2/3 部分肝切除 “partial hepatect-

omy” (PH) するというものである。2-AAF は phase 1 代謝酵素により毒性及び増殖抑制作用を有する N-水酸化誘導体に代謝される<sup>3)</sup>。Oval cell は肝細胞と比べると phase 1 代謝酵素のレベルは低いが phase 2 代謝酵素のレベルは高いという特徴を有する<sup>4)</sup>。したがって、oval cell は発癌物質の毒性効果に抵抗性である<sup>5)</sup>。その結果、上記モデルにおいては肝細胞よりむしろ oval cell が 2/3 PH 後増殖する。詳細な検討によると、小葉内胆管が<sup>3</sup>Hチミジンにより PH 後 4 時間で標識され<sup>6)</sup>、増殖は 24 時間で起こる<sup>6-8)</sup>。その後、oval cell は小葉内胆管領域から放射状に出現して肝実質の中へ深く浸入し<sup>9,10)</sup>、小型肝細胞へ分化する<sup>11)</sup>。その際、小葉内胆管においてのみ腫瘍胎児糖たん白質 “ $\alpha$ -fetoprotein” (AFP) が発現し<sup>12)</sup>、メチレンジアニリンで小葉内胆管を障害すると oval cell の増殖が阻害される<sup>13)</sup>。

その他の oval cell から肝細胞への分化へのモデル系としてはフラン投与<sup>14,15)</sup>、ディピン投与<sup>16)</sup>、2-AAF 投与/四塩化炭素投与<sup>17)</sup>などが知られている。

なお、Table 1 に oval cell, 肝細胞, 胆管上皮細胞に特徴的なマーカーをまとめて示す。

#### 1.2 Oval cell の由来

先に述べた改変 Solt-Farber 法における知見並びに他のモデル系における同様な解析結果などから、oval cell の由来は Fig. 1 に示す肝臓断片のなかで門脈周囲の肝細胞と末端小葉内胆管の間に位置するヘリング管、門脈路、胆道系の枝分かれ部分であるとの可能性が現在においては主流を占めている<sup>18-20)</sup>。

#### 1.3 成人ヒト肝臓における oval cell

形態学的な解析により障害を受けたヒト肝臓にお

Table 1 Oval cell, 肝細胞, 胆管上皮細胞のマーカー

マーカー	Oval cell	肝細胞	胆管上皮細胞
CK7	+	-	+
CK19	+	-	+
Albumin	±	+	-
CYP1A <sub>2</sub>	-	+	-
AFP	+	-	-
CK8	+	+	+
CK18	+	+	+
OV-6	+	-	+

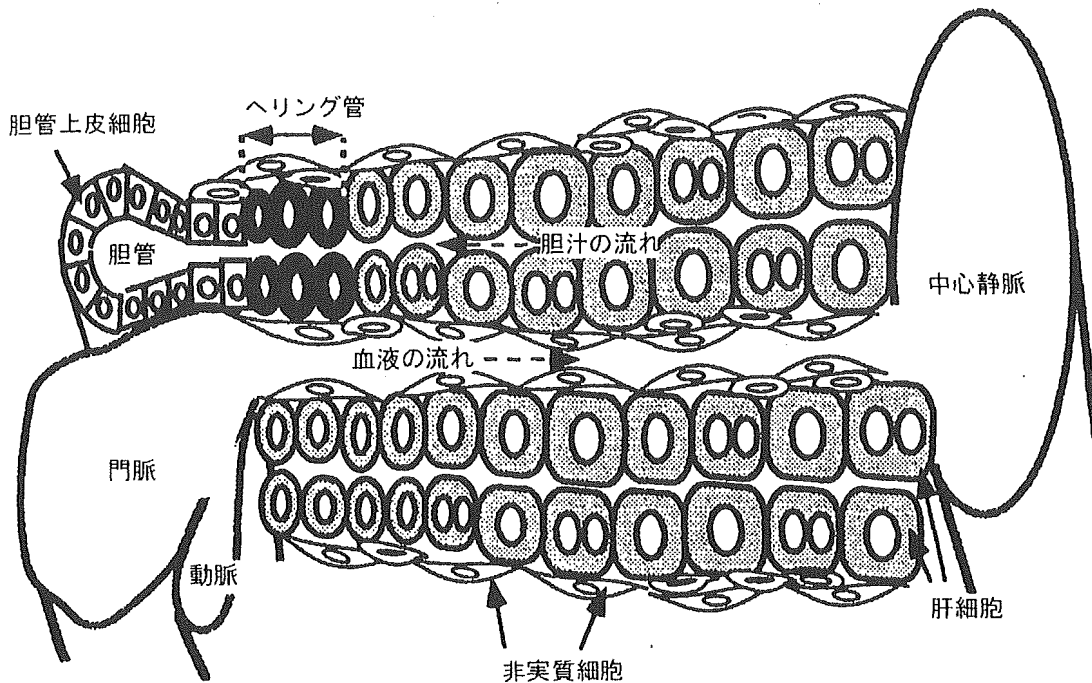


Fig. 1 ラット肝臓の模式図 (文献 144 より許可を得て転載)

いて小型肝細胞の存在が確認され<sup>21)</sup>、また、ラット oval cell に特異的な OV-6, c-kit, CD34 のようなマーカーを用いた解析により肝芽腫<sup>22)</sup>、肝細胞癌<sup>23)</sup>、肝硬変の肝臓<sup>24-26)</sup>において oval cell が同定された。更に、二重免疫染色法を用いた解析によりこれらの細胞において肝細胞と胆管の表現型を共発現するものも見つかっている<sup>24,26)</sup>。

#### 1.4 Oval cell の分離精製

Oval cell のマーカーとして Thy-1 に着目し、抗 Thy-1FITC 標識抗体とフローサイトメーターによるソーティング (FACS) を用いてラット肝臓から 95~97% という高純度で Thy-1 陽性 oval cell が得られている<sup>27)</sup>。この細胞には他の oval cell のマーカーである AFP, CK-19, GGT, OC2 及び OV-6 も発現する。

#### 1.5 移植した oval cell の肝臓における分化

Oval cell を皮下に移植すると強く凝集し未分化な腫瘍を形成するが、肝臓に移植すると悪性の表現系を消失し肝細胞に分化する<sup>28,29)</sup>。“Long-Evans Cinnamon” (LEC) ラットから分離した oval cell を LEC/Nagase アルブミン欠損ラットの肝臓に移植するとアルブミンを産生する肝細胞に分化する<sup>30)</sup>。

#### 1.6 Oval cell を含む肝幹細胞の分化及び増殖に影響を与える因子

通常肝再生に関与する増殖因子は oval cell の増殖・分化も調節する。その調節には、促進及び抑制に働く増殖因子の精巧でかつ協調的な発現、発現する時期及び場所が重要となる。また、Ito 細胞との接触、マトリックスメタロプロテアーゼによる肝実質細胞外マトリックス “extracellular matrix” (ECM) の分解も oval cell の増殖・分化に影響を及ぼす。

##### 1.6.1 ノックアウトマウスを用いた解析

Knight らは oval cell の増殖時において腫瘍壊死因子アルファ “tumor necrosis factor- $\alpha$ ” (TNF- $\alpha$ ) の産生が促進され、oval cell の増殖はタイプ 1 受容体のノックアウトマウスにおいて顕著に抑制されることを明らかにした<sup>31)</sup>。したがって、TNF- $\alpha$  タイプ 1 のシグナル伝達は oval cell の増殖において重要な役割を果たしていると考えられる。

##### 1.6.2 培養レベルにおける液性因子による調節

副甲状腺ホルモン関連ペプチド “parathyroid hormone related peptide” (PTHrP) は胆管癌<sup>32)</sup>だけでなく胆汁鬱滞並びに肝再生に伴い増殖する胆管<sup>33)</sup>において発現する。上皮増殖因子 “epidermal growth factor” (EGF) のような増殖因子は培養胆

管細胞において早期に PTHrP を誘導する<sup>34)</sup>。したがって、PTHrP はオートクラインの様式で oval cell の増殖を促進する可能性が考えられる。

肝細胞増殖因子 “hepatocyte growth factor” (HGF)、幹細胞因子 “stem cell factor” (SCF)、EGF も以下に示すように oval cell の増殖を促進する。HGF は oval cell の増殖時において産生が促進され<sup>35)</sup>、oval cell の増殖を *in vitro*<sup>36)</sup> 及び *in vivo*<sup>37,38)</sup> において促進する。SCF も oval cell の増殖時において発現し<sup>39)</sup>、oval cell の出現を促進する<sup>40)</sup>。EGF は *in vivo*<sup>37)</sup> 及び *in vitro*<sup>41)</sup> において、TGF- $\alpha$  は *in vitro*<sup>41)</sup> において oval cell の増殖を促進する。一方、トランスフォーミング増殖因子ベータ “transforming growth factor- $\beta$ ” (TGF- $\beta$ ) は増殖性胆管及び胆管周囲の Ito 細胞において発現し<sup>42-44)</sup>、*in vitro* において EGF 共存下で oval cell の遊走を促進させる<sup>41)</sup>。また、TGF- $\beta$  は rat liver epithelial cell の肝細胞への分化を促進する<sup>43)</sup>。Oval cell は HGF を除くこれらすべての増殖因子<sup>45,46)</sup> 及びその受容体<sup>6,39,47)</sup> を発現する。一方、oval cell と同等と考えられている胎児性の培養肝芽細胞は増殖因子のない状態で増殖及び移動できる<sup>48)</sup>。したがって、oval cell はこれらの因子が外から供給されない状態でもオートクラインにより増殖・分化できる可能性もある。

#### 1.6.3 feeder layer 及びコンディショニングメディウムによる調節

増殖因子存在下において線維芽細胞の feeder layer を用いることにより、oval cell は未分化の状態を高増殖能を 3 ヶ月以上維持される<sup>49)</sup>。三次元カラーゲルと線維芽細胞の feeder layer を用いることにより、oval cell を肝細胞に分化できる<sup>50)</sup>。オンコスタチン M 強発現 293T 細胞のコンディショニングメディウムで oval cell を培養すると増殖が抑制され、肝細胞への分化が促進される<sup>51)</sup>。

#### 1.6.4 薬剤による調節

ブチル酸ナトリウムは oval cell の DNA 合成を抑制し、分化を誘導する<sup>52)</sup>。線維芽細胞を feeder layer として用いた oval cell の培養系において、DMSO は線維芽細胞の過剰増殖を抑制し、oval cell を肝細胞に誘導する<sup>50)</sup>。DMSO により oval cell は肥大化し、細胞質に富む細胞となる。分化した細胞は集合後クラスターを形成し、肝臓プレート様構造

に組み込まれる。

#### 1.6.5 Ito 細胞による調節

ヒト肝臓において増殖性胆管は筋繊維芽細胞と類洞周囲の Ito 細胞から構成される活性化された間葉細胞に囲まれている<sup>53,54)</sup>。Ito 細胞は 2-AAF/PH モデルにおいて最初に増殖し<sup>6)</sup>、oval cell が肝実質に浸入する初期の段階においてその挙動を共にし両細胞は高密度な網様構造の中で重なりあって存在する<sup>44,55,56)</sup>。したがって、Ito 細胞は oval cell を肝実質微小環境から隔離することにより、oval cell の未熟な肝細胞への分化を阻止すると考えられる。

#### 1.6.6 マトリックスメタロプロテアーゼによる調節

Ito 細胞は ECM に特異的なマトリックスメタロプロテアーゼ “matrix metalloprotease” (MMP) を分泌し、障害を受けた肝実質 ECM の分解を亢進する。その結果、oval cell が肝実質に浸入しやすくなると考えられる。ヒトの肝再生時において胆管プレートから移動する未発達な胆管細胞が MMP を発現する<sup>57)</sup>。したがって、oval cell も MMP を発現し ECM を分解する可能性が考えられる。

## 2. 骨髄由来細胞

Oval cell の細胞表面マーカーを探索する過程で、そのマーカーは c-kit, CD34, Thy-1, flt-3 受容体など骨髄の血液幹細胞の表面抗原と共通であることが示された<sup>27,39,58,59)</sup>。その後の研究から、骨髄由来の細胞が肝細胞に分化することが以下のように示された。

### 2.1 骨髄由来細胞の肝細胞への分化

成熟造血幹細胞 “hematopoietic stem cell” (HSC) は同じ細胞系列にしか分化しないと従来考えられていたが、骨格筋<sup>60,61)</sup>、腎臓<sup>62)</sup>、脳<sup>63)</sup> を含む様々な組織の細胞に分化することが最近示された。更に、ラットにおいても循環骨髄細胞は肝細胞に分化することが Peterson らによる以下に示す実験から証明された<sup>64)</sup>。最初に、致死量の放射線を照射後 2-AAF 及び四塩化炭素により肝臓に障害を与えた雌ラットに雄骨髄細胞を移植し、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 9 日目に Y-染色体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 Y-染色体陽性の肝細胞が検出された。次に、dipeptidyl peptidase IV (DPPIV)



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<sup>65)</sup>。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<sup>66)</sup> と Thise ら<sup>67)</sup> 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<sup>67)</sup>。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<sup>68)</sup>。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<sup>-/-</sup>: 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<sup>69)</sup>。その際、造血能を維持するために必要である  $2 \times 10^5$  個の FAH<sup>-/-</sup>

骨髄細胞と共に移植する場合においては、わずかに 50 個の精製 HSC (c-kit high, Thy low, Lin-, Sca-1<sup>+</sup>) 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<sup>70)</sup>。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 陽性に基づ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<sup>71)</sup>。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<sup>72)</sup>。

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<sup>73)</sup>。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<sup>74)</sup>。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<sup>75)</sup>。

## 2.2 造血幹細胞と肝細胞の細胞融合

Terada ら<sup>76)</sup> と Ying ら<sup>77)</sup> 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 細胞のマーカーである 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<sup>78-80</sup>。Wang ら<sup>78</sup>と Vassilopoulos ら<sup>79</sup>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<sup>80</sup>。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髄由来細胞を 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髄由来のマクロファージのような骨髄単核細胞であることも明らかになっている<sup>81,82</sup>。したがって、移植した HSC のうち骨髄において骨髄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<sup>75,83-85</sup>。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<sup>86</sup>。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<sup>87</sup>。CXCR4

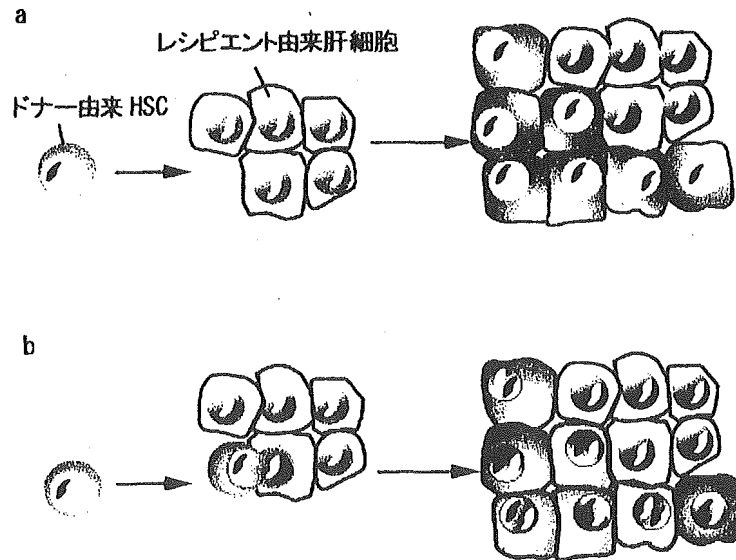


Fig. 2 HSC が肝細胞に分化する機構 a: ドナーの HSC がレシピエントの肝臓の微小環境で直接肝細胞に転換される。b: ドナーの HSC とレシピエントの肝細胞が融合する。(文献 145 を元に作製)

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<sup>88)</sup>。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<sup>89)</sup>。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<sup>90)</sup>。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<sup>91-94)</sup>。

### 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<sup>95-99)</sup>。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<sup>100)</sup>。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<sup>95,98)</sup>。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<sup>101)</sup>。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<sup>102)</sup>。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<sup>103)</sup>。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<sup>104)</sup>。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<sup>105)</sup>。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<sup>106)</sup>。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<sup>104)</sup>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<sup>107)</sup>。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<sup>107)</sup>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<sup>108)</sup>。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、骨髓移植のように 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- $\alpha$  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<sup>109,110)</sup>。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<sup>111)</sup>。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<sup>112)</sup>。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<sup>-</sup>, CD49<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, TER119<sup>-</sup> 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<sup>113)</sup>。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<sup>114)</sup>。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<sup>114)</sup>。

### 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,  $\alpha$ -平滑筋アクチン, VE-cadherin を発現しない細胞が存在する<sup>115)</sup>。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<sup>116~119)</sup>。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<sup>120)</sup>。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<sup>121)</sup>。

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<sup>122)</sup>、ヒト肝癌セルライン<sup>123)</sup>、動物からの肝細胞<sup>124)</sup>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<sup>125)</sup>。

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

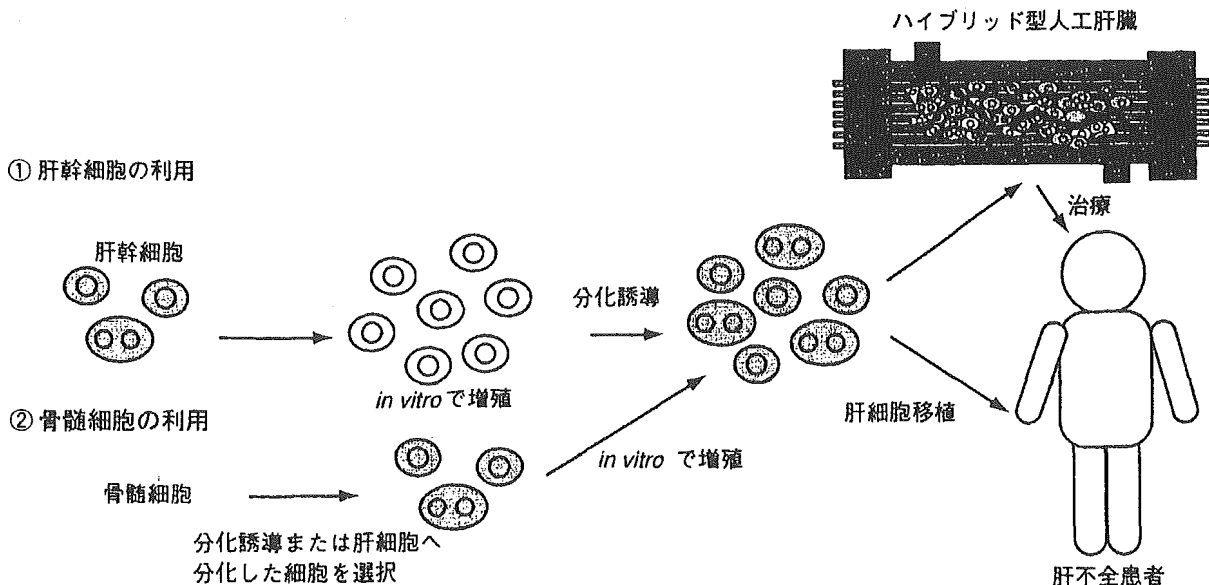


Fig. 3 肝幹細胞の臨床応用 (文献 146 より許可を得て一部改変し転載)

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<sup>126)</sup>。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<sup>127)</sup>。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<sup>128)</sup>。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<sup>129)</sup>。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<sup>130~132)</sup>。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<sup>131,133)</sup>。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<sup>134~136)</sup>。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<sup>132,133)</sup>。内在性の肝臓病としては $\alpha$ 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<sup>124)</sup>、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<sup>137)</sup>、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<sup>136)</sup>。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な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<sup>138)</sup>。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<sup>139)</sup>。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- $\alpha$ ” (IFN- $\alpha$ ) 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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<sup>140)</sup>。

### (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<sup>141)</sup>。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<sup>142)</sup>。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<sup>143)</sup>。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 (H16-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., Gainey, 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), 111-9 (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., Poulson, 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., Poulson, 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., Ruffro, 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., Miyaniishi, 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., Shvitiel, 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., Arii, S., Sato, C., Takase, K., Yasumizu, T., Teraoka, H.: *Stem Cells*, **21** (2), 217-27 (2003).
  - 91) Oh, S. H., Miyazaki, M., Kouchi, 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., Arai, 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., Arai, 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., War-kentin, 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., Nakani-shi, 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).