岡山医学会雑誌　第114巻
January 2003, pp. 243−251

特別依頼原稿

肝臓を標的とした細胞療法

小林　直哉[1,2)]，興津　　輝[1)]，都津川敏範[1)]，丸山　昌伸[1)]
小坂　芳和[1)]，荒田　尚司[1)]，小林　和也[1)]，野口　洋文[1)]
大橋　一郎[3)]，国枝　武美[4)]，柴田　憲邦[4)]，武居　道彦[4)]
尾下　瑞子[5)]，林　　伸幸[5)]，中路　修平[5)]，大元　謙二[4)]
倉林　　譲[6)]，山本晋一郎[4)]，田中　紀章[1)]

―― 岡山大学医学賞（結城賞）を受賞して ――

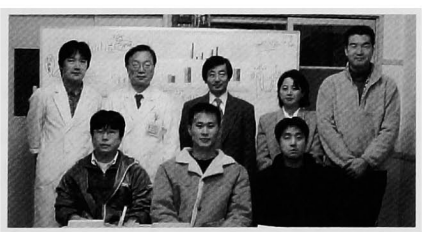
キーワード：バイオ人工肝臓，不死化肝臓細胞，Cre/loxP 部位特異的組換え反応，reversible immortalization

要　　旨

生きた肝細胞の合成能や代謝能を積極的に利用し肝疾患治療に応用しようとする細胞療法が注目され，肝細胞移植やバイオ人工肝臓（bioartificial liver，以下 BAL と略す）の誕生として近い将来，臨床の場への還元が大いに期待されている．こうした肝細胞療法を発展させる上で，どういった細胞が生物学的安全性の見地から，また，医療経済学的に普遍的であるか，各研究者間で盛んに議論，研究されている．生物学的安全性に立脚すれば，健常ヒト細胞が理想であるが，世界的なドナー肝の不足から万人が平等にその恩恵を受けることはできない．さらには，患者自身の細胞を利用できれば免疫学的な問題を回避できるため極めて望ましいといえる．現在，ES 細胞，肝幹細胞，骨髄細胞，異種動物の肝臓細胞などが注目されている．幹細胞や前駆細胞を利用するにあたり，こうした細胞の多分化能と活発な増殖能自体に由来する制御の困難さが本質的に内包されていることを十分考慮しておく必要がある．また，異種

1）岡山大学大学院医歯学総合研究科　消化器・腫瘍外科
2）ヒューマンサイエンス振興財団
3）麻酔蘇生学科
4）川崎医科大学消化器Ⅰ内科
5）クラレ・メディカル株式会社　メディカル商品開発部
6）岡山大学医学部付属動物実験施設
論文請求先：岡山大学大学院医歯学総合研究科　消化器腫瘍外科
小林直哉
電話：086-235-7257　FAX：086-221-8775
E-mail：immortal@md.okayama-u.ac.jp

● プロフィール ●



向って一番左上が著者

細胞療法の実用化を推進するために，Cre/loxP 部位特異的組換え反応を利用し，臨床使用前に導入した不死化遺伝子を切り出すことで，元の安全性の高い状態に復帰させるという reversible immortalization system（可逆性不死化システム）を提唱している．一対の loxP 配列間に simian virus 40 large T 抗原（SV40T）遺伝子やテロメラーゼ遺伝子（hTERT）をコードするレトロウイルスベクターを用いることで，可逆性不死化ヒト細胞株を各種樹立している．こうした取り扱いの容易な，安全性の高い細胞を利用して，肝臓・膵臓を標的とした細胞移植・バイオ人工臓器の開発に取り組んでいる．早期実用化を目指し，現在，クラレ・メディカル株式会社やティッシュエンジニアリング研究センターと産官学の共同研究体制をしいている．

（岡山大学医学部　昭和62年卒業）

動物細胞を使用することで生じる問題点としては人畜共通感染症などがある．ブタ細胞よりヒト細胞への内因性ブタ特異的レトロウイルス（porcine endogenous retrovirus；PERV）の感染が in vitro にて証明され，異種動物の細胞や組織を用いた治療が懸念されている．

こうした問題を回避するために，我々は，これまで肝細胞療法のソースとして取扱いの容易なヒト細胞株の樹立及び当該細胞の分化誘導療法の開発に努めてきた．本稿では，こうした我々のこれまでの一連の研究を概説すると共に世界の幹細胞を用いた細胞療法の現状と問題点を革新的かつ独創的に総説する．

緒　　言

近年，高齢化社会を迎えて重度の障害に陥った臓器に対する対策が緊急な医療上の課題となってきた．平成9年に本邦では臓器移植法が認められ脳死ドナーからの臓器提供が認可されたが，臓器提供者数は伸び悩んでいる．肝臓の旺盛な再生能力を鑑みると，とりわけ急性肝不全の患者では機能不全に陥った肝臓機能を一時的に補助することが可能なら肝臓移植なしに患者を救命することが可能である．このような治療法として肝細胞移植やバイオ人工肝臓(bioartificial liver，以下 BAL と略す）が臨床試験されている．しかしながら，いまだに肝臓移植に匹敵するほどの治療効果は得られていない．これには，1）肝細胞療法のソースとしての理想的な細胞が未だにない，2）細胞機能が十分に発揮できるような理想的な細胞外環境が創作されていないことが原因である．我々は，最終分化した健常ヒト肝臓細胞に遺伝子導入技術を駆使し安全性の高い不死化ヒト肝細胞を作成することで肝細胞療法の材料として利用することを考えている[1-4]．高密度細胞培養が細胞療法の実用化には必須であることから，細胞接着性の良好な培養担体の設計開発に取り組んできた．GRGDS（G：グリシン，R：アルギニン，D：アスパラギン酸，S：セリン）ペプチドを固定化した球状のセルロースマイクロビーズ(GRGDS-CMB)を開発し，良好な成績を得ている[5]．また，樹立細胞にサイクリン依存性キナーゼ(cyclin dependent kinase：Cdk)の活性阻害分子としてクローニングされた p21 Cip 1 を発現させることで細胞周期を調節し，分化形質の誘導が可能であることを見いだしてきた[6,7]．

1）肝細胞療法の実用化に向けた戦略

図1に肝臓を標的とした再生医療の戦略を示す．図1に示すごとく，全能性を有する ES 細胞(embryonic stem cell）やさらに分化した組織特異的な幹細胞を肝臓細胞へ分化誘導して肝再生療法に利用する stem cell therapies（幹細胞治療）と，我々が提唱する最終分化した肝臓細胞に遺伝子操作を行うことでその細胞の population を人為的にコントロールすることで細胞療法に応用する reversible immortalization（可逆性不死化システム）がある．こうした細胞治療の利点としては，1）臓器移植と比較して侵襲が低い，2）単一の donor から複数の recipient に投与できる，3）細胞は凍結保存できる，4）患者自身の細胞を生体外に取り出し機能矯正したのち再び戻すことができる(autologous setting)，5）臓器移植に比較して免疫原性が低いことである．肝細胞療法のソースを確保する手段として，1）高い増殖能と多分化能を有する幹細胞を肝細胞へと分化誘導して利用する，2）我々が提唱する最終分化した肝細胞を可逆的に増殖誘導することでその数を人為的にコントロールする，3）ヒトとの免疫学的な問題の回避を計ったトランスジェニックブタの作成がある．Table 1にこうした細胞群をリストした．1998年に Thomson JA らはヒト ES 細胞株を樹立し，免疫不全マウスへ移植することで腸上皮，軟骨，骨，平滑筋，骨格筋，神経上皮，重層扁平上皮などへ分化することを示めした[8]．当該 ES 細胞から肝細胞への分化誘導法を解明して肝再生医療へ向けたソースとしようと研究されている．とくに，Geron 社（米国カリフォルニア州）ではこうした研究に精力的に取り組み，sodium butyrate にて ES 細胞を効果的に肝様細胞（hES-derived hepatocyte-like cells）に分化誘導できることを報告している[9]．また，Catherine MV らは，ヒト成人骨髄中の多分化能を有す細胞集団 multipotent adult projenitor cells（MAPCs）を同定し，HGF と FGF-4 存在下に機能的な肝様細胞（functional hepatocyte-like cells)

が誘導できることを示している[10]．患者自身のMAPCsを肝細胞へと分化誘導して細胞治療に応用できれば免疫学的な問題を回避できるために理想的である．これまでブタ肝臓細胞がヒトに細胞移植された例はないが，ブタ肝臓細胞を用いたBALはすでに欧米で臨床試験されている．こうした臨床治験の中で，大規模なものはDemetriou AAらの171症例のphase II/III臨床試験である．当該治療患者では，一生涯にわたりPERVの検索が義務づけられているが，全例現在のところPERV陰性でありPERVの感染は証明されていない．ブタ細胞を用いる場合，PERV等の異種感染の可能性が問題となる．2000年の米国PHS（Public Health Service）の異種移植ガイドライン改定案では，人工臓器のような体外設置型治療も異種移植と同等の取り扱いとし，一生涯の検査体制と検体保存等が挙げられている．

2）ヒト肝細胞株

一般に肝不全患者を安定化させるためには全肝重量の10%程度（150 g）が必要とされており，約150億個の肝細胞が必要な計算となる．万人が平等にBAL治療を受けることが可能な安全性の高いヒト細胞株の開発は魅力的である．すなわち，取り扱いが容易で，分化能を有した無血清培地で増殖可能な細胞株の樹立である．これまで我々は各種ヒト肝細胞株の樹立に取り組んできたので以下に概説する．

2-1）ヒト不死化肝細胞（Immortalized human hepatocytes）

リポフェクション法にて胎児肝細胞にプラスミドpSV 3 neo（シミアンウイルスラージT抗原；simian virus 40 large T antigen（SV40T）遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子をコードしている）を形質導入しOUMS-29を樹立し，SV40Tにてヒト肝細胞が適度な分化機能と増殖能を有する事を報告した[2]．しかしながら，このような不死化遺伝子を形質導入した細胞を臨床応用する際にSV40Tが宿主に及ぼす影響，とりわけ免疫能が低下した肝不全患者の体内でのmalignant transformationの危険性は否定できない．不死化細胞株を臨床応用する際には，当該細胞に自殺遺伝を同時に導入しておく，あるいは将来的に導入した不死化遺伝子を切り出し可能な形で予め導入するなどの工夫が必要である．

2-2）安全弁を有するヒト不死化肝細胞（Tightly regulated immortalized human hepatocytes）

OUMS-29細胞に自殺遺伝子であるherpes simplex virus-thymidine kinase（HSV-TK）を導入す

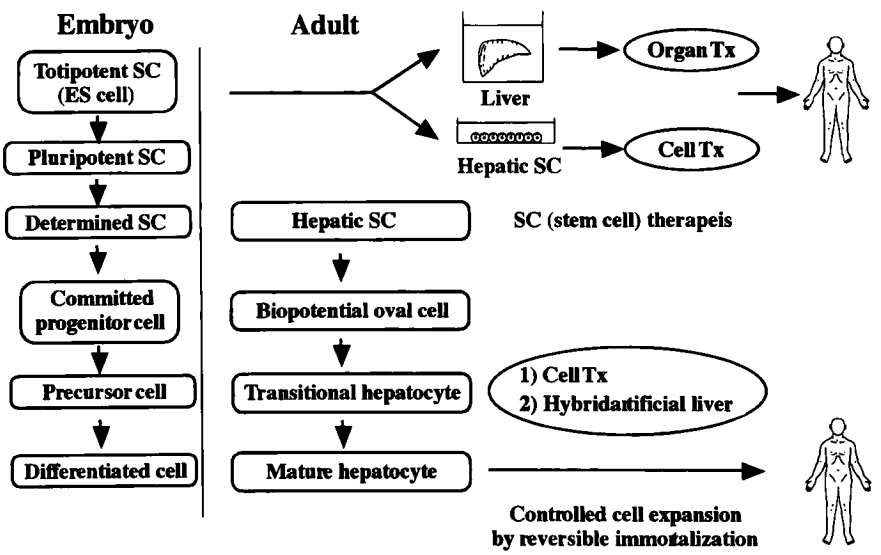


図1　肝臓を標的とした再生医療の戦略
全能性を有するES細胞やさらに分化した組織特異的な幹細胞を肝臓細胞へ分化誘導して肝再生療法に利用するstem cell therapiesと，我々が提唱する最終分化した肝臓細胞に遺伝子操作を行うことでその細胞のpopulationを人為的にコントロールすることで細胞療法に応用するreversible immortalizationがある．

ることで，抗ウイルス剤であるガンシクロビル(GCV)に対する感受性が100倍以上増強したOUMS-29/TKを樹立した[4]．該細胞は，5μMという微量のGCVを培養液中に添加することで著明に細胞増殖が抑制された．

2-3）ヒト肝臓細胞株の樹立

ヒト不死化肝細胞株を樹立するに当たり，臨床使用前に導入した不死化遺伝子を切り出せるようにCre/loxP部位特異的組換え反応を利用した．

図2に示すごとく，大腸菌のP1ファージ由来であるCre組換え酵素は，1）34塩基からなるloxP配列を認識し，2）その部位に結合してloxP配列間にコードされるDNAを切除する，という一連の反応を単独で行うことが出来る[11]．Cre組換え酵素の標的となるloxP配列間にSV 40T遺伝子と自殺遺伝子であるHSV-TKを同時にコードするレトロウイルスベクターSSR#69を使用した[12]．SSR#69形質導入細胞では，SV40TとHSV-TKが同時に発現するためGCVを投与することで，その増殖制御が可能であるように設計されているのである．こうした工夫がベクター開発時に極めて重要である．Cre/loxP反応にてSV40Tを取り除くために，遺伝子導入効率の良好なアデノウイルスベクターAxCANCreを利用した(図3)．SSR#69にてヒト肝細胞株NKNT-3を樹立した[1]．NKNT-3は，CS-C無血清培地下に安定増殖し，ラット急性肝障害モデルで脾内への細胞移植効果が認められた[1]．in vitroで大量培養したNKNT-3細胞にAxCANCreを形質導入することでSV40T遺伝子の除去とその後の肝機能遺伝子の増強が認められた[1]．次に，NKNT-3のガンシクロビル感受性を検討したところ5μMのGCVにて細胞は増殖を停止し2週間以内に死滅した．安定した異種移植でのキメリズム[13]やHLAミスマッチのアロ遺伝子型の偶然のグラフト生着[14]がヒトで報告されており，不死化細胞へ安全弁を付加しておくことは実用化を考える上で極めて重要である．現在，SV40Tのかわりにhuman telomerase reverse transcriptase (hTERT)[15]による不死化株の樹立に取り組んでいる．また，アデノウイルスベクターの細胞毒性を考慮し，ヒト免疫不全ウイルス（HIV）由来のTAT蛋白[16]にCre組み換え酵素をフュージョンさせて細胞へ効果的に組み換え酵素を送り込むprotein transduction therapyを検討中である．

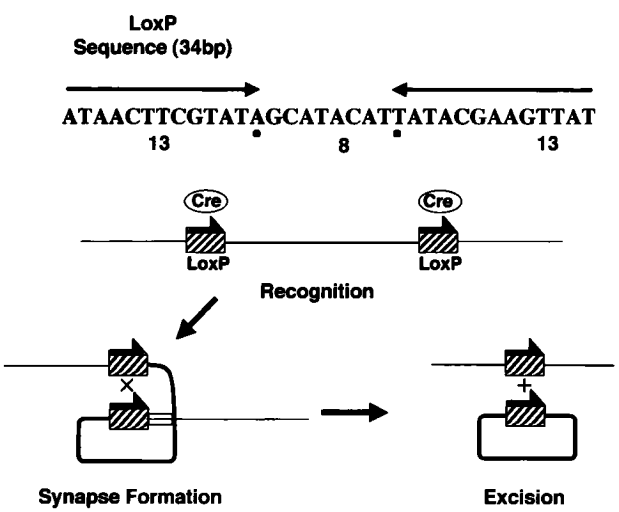


図2　Cre/loxPシステムの模式図
大腸菌のP1ファージ由来であるCre組換え酵素は，34塩基からなるloxP配列を認識し，単独でloxP配列間にコードされるDNAを切除できる．

2-4）不死化ヒト肝細胞のp21を用いた分化誘導療法

SV40Tはp53およびretinobrastoma（Rb）のリン酸化を抑制し，細胞周期を正の方向に向かわせ強制的に増殖の方向へと誘導させる．AxCANCre感染NKNT-3細胞では，SV40Tが発現しなくなるためにp53やRbが不活化された状態から回復し，細胞増殖にブレーキがかかり分化への方向に向かうことが容易に想像される．事実，復帰NKNT-3細胞ではp53及びp21が発現してくることがWestern blot法にて，また細胞周期解析では有意にG0/G1-arrestの状態になっていることが確認されている．そこで，p53の下流に位置し細胞周期を調節している遺伝子であるp21に注目した．p21は，1993年にはじめてp53により誘導されるWAF 1（wild type p53 activated factor）遺伝子として同定され，また同じ頃にサイクリン依存性キナーゼ（cyclin dependent kinase：Cdk）の活性を阻害するタンパク質としてp21 Cip 1がクローニングされた[17,18]．これらが同一分子であることから，p53のCdk阻害タンパク質p21 WAF 1/Cip 1を介した細胞周期の調節機構が明らかになった（図4）．また，p21は同時期にsenescent

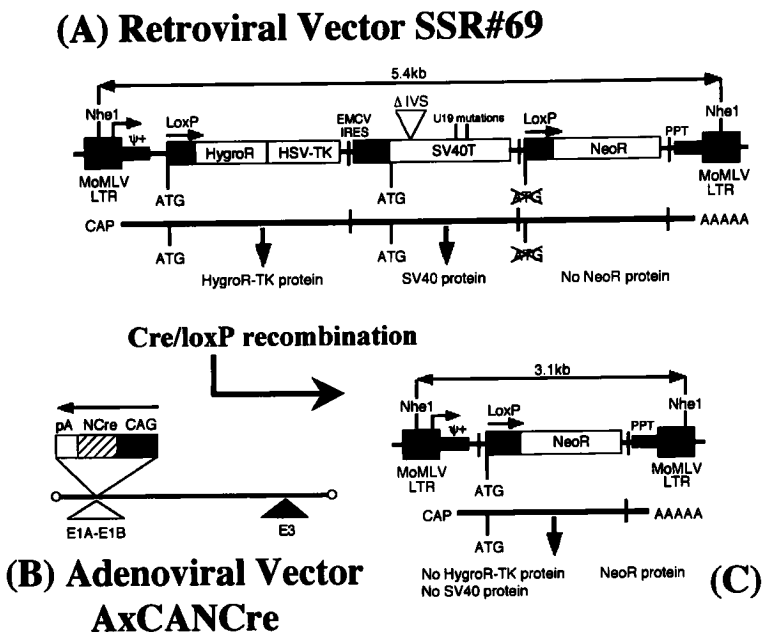


図3　ヒト肝細胞の可逆的不死化システム
Cre 組換え酵素の標的となる loxP 配列間に SV40T 遺伝子と自殺遺伝子である HSV-TK を同時にコードするレトロウイルスベクター SSR#69(A)を使用した. Cre/loxP 反応にて SV40T を取り除くためにアデノウイルスベクターAxCANCre を利用した(B). 組換え後では, SV40T の発現はなくなる(C).

cell-derived inhibitor 1（sdi 1）としても同定されており, 細胞の分化/老化にも関与していると推測される. こうした知見から, Cre 組換え酵素を NKNT-3 細胞に発現させて SV40T を取り除く代わりに強制的に p21を細胞に発現させることで細胞周期を G0/G1-arrest の状態にもってくることで分化形質の向上が可能か否か検討した. 予想した如く, 組替えアデノウイルスを用いて p21を NKNT-3 細胞に発現させることで細胞周期は G0/G1-arrest の状態になり, アルブミン, CYP の蛋白レベルでの発現の増強が認められた[6,7].

3）BAL の作成

さまざまな器官を構成する細胞はその発生学的起源から上皮系細胞と間葉系細胞からなる. 肝臓を例にとると, 肝機能の担い手である肝細胞や胆管細胞は上皮系, 肝マクロファージ, 肝星細胞, 肝類洞内皮細胞などが間葉系細胞である. 肝臓の障害に伴い hepatocyte growth factor（HGF）を産生, 分泌するのは間葉系細胞であり, HGF は上皮細胞を標的として再生因子としての活性を発揮する. そこで, 我々

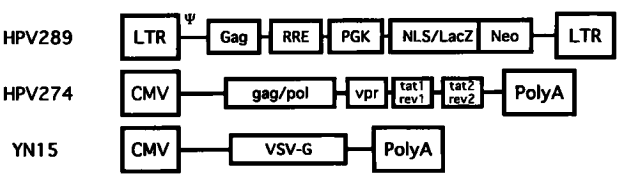


図5　スリープラスミドシステム
プロウイルスゲノムをベクタープラスミド, パッケージングプラスミド, エンベローププラスミドのつ3に分割する「スリープラスミドシステム」でレンチウイルスベクターを作製した.

は, 不死化肝細胞 NKNT-3 と非実質細胞の cell-cell intereaction を重要と考え, 非実質細胞での可逆性不死化システムの樹立に着手してきた[4]. すなわち, こうした細胞を共培養することで, 肝星細胞から細胞増殖の足場としてのコラーゲンが産生され, 肝類洞内皮細胞から HGF をはじめとした各種の調節因子が分泌されることで NKNT-3 細胞の分化機能を促進, 維持しようとするものである. このような in vitro で形成される肝臓細胞混合体, すなわち肝オルガノイドを BAL へとスケールアップするわけである. 第1段階として混合培養時の足場として

細胞接着性ペプチドGRGDSを固定化した粒子状担体のセルロースマイクロビーズ（CMB）を開発し良好な細胞接着性を観察している[5]．各種細胞成長因子とサイトカインのカクテル療法やドラッグデリバリーシステムを組み合わせることで，細胞に時間的・空間的情報を肝オルガノイドに与えることを計画中である．基底膜構造を伴う肺胞構造のin vitroでの作成に成功した持立らと共同して，彼らのマトリックス工学を取り入れて検討中である[19]．このようにしてin vitroで作成された肝オルガノドを人工モジュール内に高密度に充填し，スケールアップすることで高性能なBALを計画している．肝不全の治療だけでなく遺伝子操作による大腸菌やクローン動物などを利用することなくヒト肝臓細胞を用いた生理的活性物質（応用例として，ヒトアルブミン，各種の血液凝固因子等の製剤の産生）の大量生産，新たなる細胞性医薬品の開発へ応用できるBALの開発が可能である．さらに，ラット，イヌ，ブタなどが薬物代謝判定のモデルとして使用されているが，高性能なBALの誕生はヒト肝薬物代謝検定モデルとして利用できるため動物愛護の点からも好ましい．

4）肝細胞移植への応用

移植医療には移植に必要な臓器や組織の数が圧倒的に足らないというドナー不足と，移植を行っても拒絶反応が制御困難で患者にうまく定着しないという二つの乗りこえるべき課題がある．臨床使用前に導入した不死化遺伝子をCre/loxP部位特異的組換え反応を利用して切り出すことで，元の安全性の高い状態に復帰させる可逆性不死化（reversible immortalization）システムは，生検にて得られた患者自身の細胞に応用できる．樹立細胞に治療遺伝子を導入したあとで患者に戻すことで免疫抑制剤を使用することなく治療できる．患者から採取した肝細胞に治療遺伝子を導入後，その患者に戻すautologous hepatocyte transplantationは，こうした問題を回避できる魅力的なものである．事実，Grossman Mらによって，low density lipoprotein（LDL）-receptor機能異常を有する高コレステロール血症の患者でこうしたex-vivo gene therapyが自家肝細胞移植として施行されている[20]．臨床的に有効であったとされているが，その後の報告例はない．これには，1）遺伝子導入効率の優れたベクターを使用する必要がある（彼らが使用したのは，レトロウイルスベクターであり，導入効率が低かった），2）外科的肝外側区域切除にて肝細胞を入手しており手術侵襲が高いなどの問題を含んでいたと考えられる．こうした外科的切除術でなく，生検材料から肝細胞を分離し，不死化遺伝子と治療遺伝子の両者を導入することで細胞数を増幅することができればより魅力な治療法として普及させることができる[21-23]．遺伝子導入効率の良好なウイルスベクターを考慮する必要がある．

5）レンチウイルスベクターを用いた肝細胞への遺伝子導入

平成13年4月から，我々は非分裂細胞へも遺伝子導入効率が優れていると報告されているレンチウイルスベクターシステムの樹立に取り組んでいる．レンチウイルスベクターを用いた以下の動物実験および感染実験は，実験動物取扱い指針，岡山大学医学部付属動物実験施設P3感染実験室安全委員会規程に準じ施行した．

5-1）レンチウイルスベクターを構成する3種類のプラスミド

プロウイルスゲノムをベクタープラスミド，パッケージングプラスミド，エンベローププラスミドのつ3に分割する「スリープラスミドシステム」でレンチウイルスベクターを作製した（図5）．ベクタープラスミド（HPV289）はlong terminal repeat（LTR），パッケージングシグナル（Ψ）などを有し，核移行シグナル/β　ガラクトシダーゼ融合遺伝子（NLS/LacZ）とネオマイシン耐性遺伝子（Neo）を発現する．パッケージングプラスミド（HPV274）はgag，pol遺伝子の他，tat，revなどの制御遺伝子をコードしている．エンベローププラスミド（YN15）は水疱性口内炎ウイルスG糖蛋白質（vesicular stomatitis virus G glycoprotein；VSV-G）をコードし，いわゆるpseudotyped vectorとなっている．

5-2）ラットおよびブタ肝細胞への遺伝子導入

プラスミドをリン酸カルシウム法によって293T細胞へトランスフェクションし，レンチウイルスベク

ターを作製した．初代分離ラット肝細胞およびブタ肝細胞への遺伝子導入効率を検討した．培地をレンチウイルスベクター溶液2mlに置換し18時間37℃，5％CO_2下で培養，その後肝細胞培養液を2ml加え，さらに48時間培養した．X-gal染色にて遺伝子導入効率を計算した．ラット肝細胞の8％に核内にlacZ遺伝子の発現を認め（図6-左），ブタ肝細胞の5％にLacZ遺伝子の発現を認めた（図6-右）．予想された数値よりも低値であったが，レンチウイルスベクターを使用することで，確実に一回感染で遺伝子導入が困難である肝細胞に遺伝子導入が可能であることが判明した．今後は，レポーター遺伝子であるLacZの代わりに治療遺伝子や不死化遺伝子の導入を検討したい．

6）ブタモデルでの細胞治療の安全性と有効性の検討

このような遺伝子導入細胞の利用においても安全性の保証は解決しなければならない問題である．そこで，我々の樹立した各種ヒト肝臓細胞株の安全性と有効性を詳細に検討するために，実験動物取扱い指針に従い現在ブタを使用した細胞移植，バイオ人工臓器の実験を開始している．早期の実用化を目指すためには，こうした中～大動物での実験が不可欠となる．細胞移植治療への実用化を視野におき，現在薬剤誘導性（D-ガラクトサミン）ブタ肝不全モデルを作成して不死化肝細胞の移植実験を施行している．脾静脈から6Frの栄養チューブを挿入し，先端を門脈に留置後，肝臓内に1×10^9個レベルの細胞をリンゲル液100mlに希釈し約30分かけて移植を行った．血行動態を詳細に検討するため，外頸静脈からSwan-

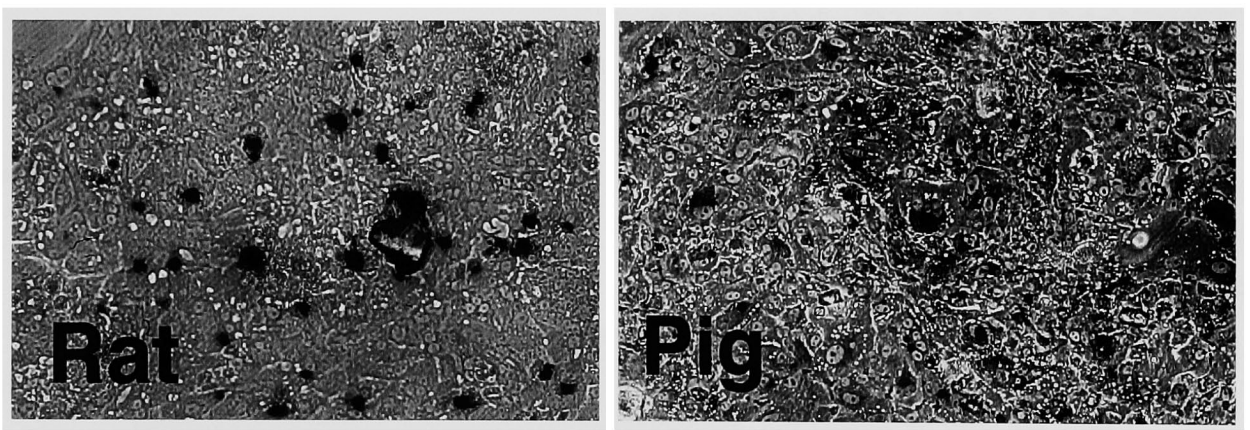


図6　レンチウイルスベクターを用いた肝細胞への遺伝子導入
初代分離ラット肝細胞の8％，ブタ肝細胞の5％にLacZ遺伝子の発現を認めた（位相差顕微鏡像，倍率×100）．

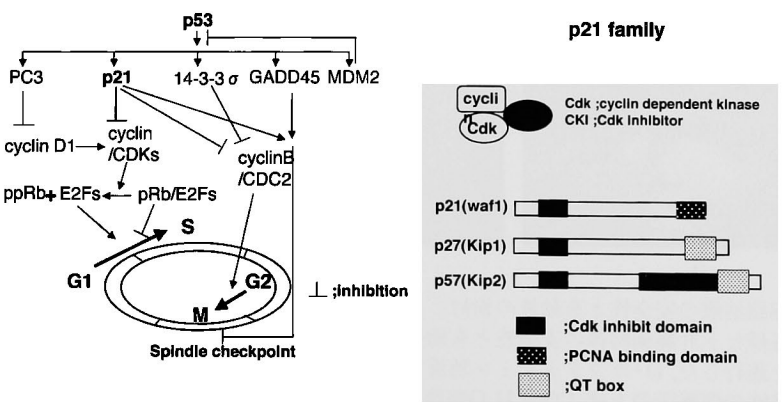


図4　p53を介した細胞周期の調節とp21ファミリー

Ganz カテーテルを挿入している．細胞移植中に一過性の門脈圧の上昇（25cm H_2O）を認める以外，全身血圧などへの悪影響を認めず安全に経門脈的な細胞移植が施行できている（図7-A）．肝不全ブタを救命するために必要な細胞数，移植細胞の肝臓内への engraftment などを今後検討する計画である．また，不織布とホローファイバーを組み合わせた次世代型のバイオ人工肝臓モジュールを作成し，ブタに装着したところ抗凝固療法下に24時間連続して安全に作動させることができた（図7-B）．ブタを使用した動物実験は始まったばかりであるが，ラットやマウスを用いた実験とは全く異なるものである．時間，費用，そして何よりも人手（ワークホース）が要求される．こうしたデータの集積が次世代型の新規医療の誕生には不可欠なのである．

ま　と　め

高齢化社会を迎え，医学，工学，生命科学の協力の下に組織あるいは臓器の代替品の開発を目的とした新しい学問分野である tissue engineering が期待されている．我々は，遺伝子導入工学と細胞培養技術とを駆使し，安全性の高いヒト肝臓細胞株（reversibly immortalized human liver cell lines）を樹立し，マトリックス工学を組み合わせることで高性能な BAL の開発に挑戦している．細胞を三次元培養し，組織を再現する tissue engineering は単に高度先端医療への貢献が期待されるだけではなく，これまでにない型の最先端技術として他の技術領域への反響効果も大きいものとなる．さらには，autologous cell transplantation の開発を目指してレンチウイルスベクターシステムを樹立に取り組んでいる．近い将来に，こうした我々の提唱する reversible immortalization による細胞療法が実用化されるように日々努力している．

謝　　辞

本研究内容の一部は，第100回岡山医学会にて結城賞受賞研究として発表した．本研究の一部は，平成13年度科学研究費補助金（基盤研究B，課題番号13470236），平成13年度新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）産業技術研究助成事業費助成金，及び平成14年度地域新生コンソーシアム研究開発事業助成金によるものである．

文　　献

1）Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, et al.：Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. Science (2000)

A　　B

図7　ブタモデルでの細胞治療の安全性と有効性の検討
我々の樹立した各種ヒト肝臓細胞株の安全性と有効性を詳細に検討するために，ブタを使用した細胞移植(A)，バイオ人工臓器の実験(B)を施行した．D-ガラクトサミン誘導ブタ肝不全モデルを作成して不死化肝細胞の移植を施行したところ，細胞移植中に一過性の門脈圧の上昇（25cm H_2O程度）を認める以外全身血圧などへの悪影響を認めず，安全に経門脈的な細胞移植が施行できた．バイオ人工肝臓モジュールをブタに装着し24時間連続して安全に作動させることができた(B)．

287, 1258.

2) Kobayashi N, et al.: Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure. Transplantation (2000) **69**, 202—207.

3) Kobayashi N, et al.: Construction of a differentiated human hepatocyte cell line expressing the herpes simplex virus-thymidine kinase gene. ASAIO J. (2001) **47**: 476—480.

4) Noguchi H, Kobayashi N, Westerman K.A, et al. Controlled expansion of human endothelial cell populations by Cre/loxP-based reversible immortalization. Hum. Gene Ther. (2002) **13**, 321.

5) Kobayashi N, et al.: Rapidly functional immobilization of immortalized human hepatocytes using cell adhesive GRGDS peptide-carrying cellulose microspheres. Cell Transplant. (2001) **10**, 387.

6) Kobayashi N, Sakaguchi M, Okitsu T, et al.: Improvement in the differentiated hepatic phenotype of immortalized human hepatocytes by adenovirus mediated p21 gene transfer. ASAIO J. (2002) **48**, 355—359.

7) Kunieda T, N. Kobayashi, et al.: Cell Transplant. (in press).

8) Thomson JA, Itukovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al.: Science (1998) **282**, 1145.

9) Lebkowski J, Gold J, Chiu, C-P, et al.: Human embryonic stem cells: differentiation into cell types for transplantation applications. Cell Transplant. (2001) **10**, 505.

10) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al.: Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. J. Clin. Invest. (2002) **109**, 1291—1302.

11) Sternberg N, Hamilton D.: Bacteriophage P 1 site-specific recombination I. Recombination between loxP sites. J Mol Biol (1981) **150**, 467.

12) Westerman KA, Leboulch P.: Reversible immortalization of mammalian cells mediated by retroviral transfer and site-specific recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. (1996) **93**, 8971.

13) Gartner HV, Seidl C, Luckenbach G et al.: Genetic analysis of a sarcoma accidentally transplanted from a patient to a surgeon. New Eng. J. Med. (1996) **335**, 1494.

14) Paradis K, Lamgford G, Long Z et al.: Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. Science (1999) **285**, 1236.

15) Bondar AG: Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science (1998) **279**, 349.

16) Daewoong Jo, Nashabi A, Doxsee C, et al.: Epigeneic regulation of gene structure and function with a cell-permeable Cre recombinase. Nat. Biotech. (2001) **19**, 929.

17) Harper JW, Adami GR, Wei N, et al.: The p21 Cdk-interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G 1 cyclin-dependent kinase. Cell (1993) **75**, 805—816.

18) El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al.: WAF 1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell (1993) **75**, 817—825.

19) Furuyama, A., Kimata, K., and Mochitate, K.: Assembly of basement membrane in vitro by cooperation between alveolar epithelial cells and pulmonary fibroblasts, Cell Struc. Func. (1997) **22**, 603—614.

20) Grossmann M, Rader DJ, Muller DWM, et al.: A pilot study of ex vivo gene therapy for homologous familial hypercholeserolemia. Nature Medicine (1995) **1**, 1148—1154.

21) Totsugawa T, Kobayashi N, Okitsu T, et al.: Lentiviral transfer of the lacZ gene into human endothelial cells and human bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Transplant. (in press).

22) 都津川敏範，小林直哉，丸山昌伸ら：レンチウイルスベクターによるヒト血管内皮細胞への効果的な遺伝子導入. Organ biology (2001) **8**, 277—285.

23) 丸山昌伸，小林直哉，都津川敏範ら：肝細胞へのレンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入に関する基礎的研究. Organ Biology (in press).