The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	遺伝子治療と細胞移植による新規肝疾患治療法に関する研究
Author(s)	磯田, 勝広
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/45673
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士論文

遺伝子治療と細胞移植による新規肝疾患治療法に関する研究

2005 年

大阪大学大学院 薬学研究科 分子薬科学専攻

磯田 勝広

博士論文

遺伝子治療と細胞移植による新規肝疾患治療法に関する研究

2005年

大阪大学大学院 薬学研究科 分子薬科学専攻

磯田 勝広

目次

序論 1

第１章　肝細胞と骨髄間質細胞による肝機能維持と細胞移植
　第１節　緒言 5
　第２節　実験方法 7
　第３節　結果と考察
　　第１項　骨髄間質細胞の肝細胞 viability への影響 11
　　第２項　肝細胞尿素合成能への影響 12
　　第３項　肝細胞アルブミン分泌能への影響 12
　　第４項　骨髄間質細胞から放出される IL-6 定量と肝細胞機能への影響 15
　　第５項　骨髄間質細胞の同定 16
　　第６項　骨髄間質細胞と肝細胞の共移植におけるアルブミン分泌能 17
　第４節　小括 18

第２章　C/EBP 遺伝子導入による肝傷害の抑制
　第１節　緒言 19
　第２節　実験方法 21
　第３節　結果と考察
　　第１項　肝細胞への C/EBP β遺伝子導入 26
　　第２項　C/EBP β遺伝子導入による肝細胞増殖に対する影響 27
　　第３項　C/EBP β遺伝子導入による肝細胞アポトーシスへの影響 27
　　第４項　初代培養肝細胞 viability 維持のメカニズム 29
　　第５項　C/EBP β遺伝子導入による肝傷害の抑制（*in vitro*） 30
　　第６項　C/EBP β遺伝子導入による肝傷害の抑制（*in vivo*） 31
　第４節　小括 33

第３章　TRX 遺伝子導入による肝傷害の抑制
　第１節　緒言 34
　第２節　実験方法 35
　第３節　結果と考察
　　第１項　肝細胞への TRX 遺伝子導入 38
　　第２項　TRX 遺伝子導入による肝傷害の抑制（*in vitro*） 38

第３項　生体内における TRXmRNA の発現分布　40
第４項　TRX 遺伝子導入による肝傷害の抑制（*in vivo*）　41
第５項　TRX 遺伝子導入による肝傷害抑制の組織像　43
第４節　小括　44

結論　45

総括　46

謝辞　48

参考文献　49

序論

現在，日本における死因の第一位である悪性腫瘍は，年間の死亡者数が増加傾向にあり，国民の健康をおびやかす大きな問題となっている [1]．悪性腫瘍の部位別死因において肝癌および肝内胆管癌は第 4 位であり，年間死亡者数は約 3 万人を上回り近年，急激な増加傾向にある．肝癌の多くは慢性肝炎や肝硬変を背景に起こることが多く，さらに肝疾患に罹患している人数は日本において 200 万人以上にのぼり，社会問題化している．そして，肝疾患は死因の第 9 位にあげられ，年間死亡者数は 1 万人を上回っている．これらのことより，我が国の国民の健康を守るためには肝疾患・肝癌の克服，予防が重要な課題である．

肝臓は人体の最大の臓器であり，その機能は物質代謝の中心的な役割を果たし，生体の恒常性を維持している．肝臓の重量は，成人の男性では約 1,500 g，女性では約 1,300 g あり，腹部の右上の最上部に位置し，横隔膜に接している．肝臓の構造は約 50 万個にもおよぶ肝小葉から構成されており，肝小葉は肝臓固有機能を担う肝細胞と，類洞壁を構成している諸細胞 [クッパー細胞，肝星細胞，類洞内皮細胞，ピット細胞] などの肝非実質細胞，毛細血管，胆管，動脈，リンパ管，グリソン鞘，神経から構成されている．肝細胞は，肝が生体の代謝臓器の中心であることを反映し，核と細胞質ともに大きく，全ての細胞小器官がよく発達し，極性を持つ特徴的な細胞である．肝臓の主な機能としては，糖代謝，蛋白代謝，脂質代謝，胆汁の生成・分泌，解毒作用，異物・微生物に対する防衛反応，循環調節作用がある．これら肝臓の主な機能を担うのが肝細胞である [2]．

生体の代謝機能の中心を担う肝臓が肝疾患で障害を受け，機能不全に陥ると，生体は致命的なダメージを受けることになる．この肝疾患の主な疾病は，ウイルスによるウイルス性肝炎，肝細胞が壊死し肝組織が線維化する肝硬変，慢性肝炎，肝硬変が進行し肝細胞が悪性腫瘍化する肝細胞癌がある．また，これまで肝疾患の徴候のない患者が突然，肝不全を起こし数日以内に死亡する劇症肝炎などがある [2]．我が国におけるこれら肝疾患・肝癌での年間死亡者数は 4 万人以上に達しており，特に肝癌や終末期肝硬変，劇症肝炎においては肝移植以外，有効な治療法が確立されていない．これらのことより，新たなる治療法の確立が求められて

いる．

肝移植において，脳死移植法が制定された現在でもドナー不足は深刻な問題である．そこで，肝移植に代わる新たな治療法として，人工肝臓の開発，肝細胞移植の開発，また近年，劇的に進歩した遺伝子工学による遺伝子治療が試みられてきた．

人工肝臓は，臓器移植のドナー不足を補うために肝機能を代行する目的で開発が試みられてきた．しかし，肝臓の多岐にわたる生体機能のために，純粋な人工材料のみでの開発は困難と考えられ，細胞と人工材料を組み合わせたバイオ人工肝臓（BAL：Bioartificial Liver）の開発が進められてきた．現在まで報告されている研究例を挙げると，Shatford らはホローファイバーモジュール内にラット肝細胞を充填した，BAL のモデルを構築した[3]．他にも様々なタイプの BAL の作製が試みられている．Cuevas らは平板型の透析器内に凍結保存しておいたブタ肝細胞を注入しモジュールを用いて BAL の作製を行った[4]．また，Fledrig らは，ホローファイバーとポリエステルの不織布を組み合わせて酸素の供給を装置内で行えるモジュールを用いて，肝不全動物を用い，アンモニアやビリルビン濃度の上昇抑制や生存率が改善することを報告している[5]．しかしながら，現在でも実際の臨床において人工肝臓は画期的な効果をもたらすまでには至っておらず，また大型装置を必要とするため煩雑な準備や，限定された条件下でしか装置を扱えないなど問題点がある．そこで肝不全に陥った患者に対して体外から肝細胞を移植し，肝機能を回復させる肝細胞移植が研究されている．

細胞移植の利点としては臓器移植と比較して以下の 3 点がある．臓器移植は，深刻なドナー不足の問題に加え，複雑な手術を伴うため患者への負担が大きい，臓器の凍結保存ができない，などの問題点がある．それに対し，細胞移植は，1）臓器移植より患者の負担が少ない，2）細胞は凍結保存が可能であり利便性が高い，3）患者自身の細胞を生体外に取り出したあと，欠損機能を補い生体内に戻すことができる（*ex vivo* gene therapy），などの利点がある．さらに肝細胞移植は，遺伝性代謝疾患，慢性または急性肝不全，肝癌補充療法などの肝疾患治療への応用が可能である．しかし，肝細胞移植の問題点としては，以下の 2 点がある．1）移植する肝細胞の供給源と移植するまでの肝細胞機能の低下，2）移植する方法，である．そこで，移植する肝細胞の供給源としては，生体中の組織幹細胞，または

造血幹細胞，骨髄間葉系幹細胞などが注目されている．いくつかの研究グループが，これらの幹細胞が成熟した肝細胞へと分化することを報告している[6-10]．このことより，近い未来，肝細胞移植の供給源となることが期待できる．しかし，培養した肝細胞は細胞機能が維持できず低下するという問題がある．2 点目の移植する方法は，これまでの基礎研究では，マウスの脾臓または門脈から肝臓に肝細胞を移植すると，2 週間肝細胞の機能が持続し，肝不全治療に有効である可能性が報告されている[11-13]．しかし，門脈および脾臓から肝細胞を移植すると門脈塞栓や虚血肝不全の危険性が生じるため移植する細胞数には限界がある．そこで，これまでに肝細胞を高密度に充填した 3 次元担体を腹腔内に移植した生体内異所性肝組織の構築が試みられてきた．Higashiyama らは，生体親和性があり，拒絶反応の少ない多孔性ヒドロキシアパタイトディスクを用い，肝細胞を充填し，アルブミン分泌をしない nagase ラットの腹腔内に移植したところ血中アルブミン濃度が上昇したと報告した[14]．そこで本研究では多孔性ヒドロキシアパタイトディスクを用いた肝細胞移植において，さらに肝細胞機能を高く維持させ肝疾患に対し有効な治療法として用いるために，肝細胞と他の細胞との混合培養法に着目した．肝細胞と肝非実質細胞との混合培養においては，肝細胞機能の良好な維持が報告されている[15]．しかし，肝臓由来の肝非実質細胞は，生体にわずかしかなく採取数に限界がある．そこで生体中に多数ある骨髄細胞に着目した．特に骨髄中にある骨髄間質細胞は，造血幹細胞が様々な血球系の細胞に分化・増殖するのを多種類の液性因子を放出することによって支持している．また，骨髄間質細胞はヒドロキシアパタイトへ壁着し，良好に伸展をする[16]．これらのことより，本研究の第 1 章では，骨髄間質細胞から放出される因子に着目し，*in vitro* において肝細胞と骨髄間質細胞の混合培養をおこない，肝細胞機能を高く維持することをを試みた．さらに多孔性ヒドロキシアパタイトディスクを用い，肝細胞と骨髄間質細胞を肝炎モデルマウスへ移植し，有効性の検討を行った．

一方，近年，遺伝子工学の劇的な進歩により，多くの遺伝子疾患の原因遺伝子が単離され，生物（細胞）内で特定の遺伝子を発現できるようになった．遺伝子治療は 1990 年にアメリカの国立衛生研究所でアデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症患者への本格的遺伝子治療が始まってから，1998 年までに 200 ケース以上の第 1 相臨床試験が行われた．我が国においても，1995 年に北海道大学付属病

院において ADA 欠損症患者に対して遺伝子治療が行われ，活発に臨床研究が行われている．

遺伝子治療は臓器移植と比較して，遺伝子をウイルスベクターなどを用いて体内へ遺伝子導入（*in vivo* gene therapy）を行うことができる．これによって，生体に対して低侵襲性の手術で体に負担が少ないという利点がある．そこで，ウイルスベクターなどを用いて生体内へ目的の遺伝子を導入し，肝細胞に必要な機能を付加することで，肝疾患に対しての効果が期待されている．

現在まで，肝疾患に対しての基礎的な遺伝子治療の研究は，腹水などを伴う重度肝硬変，肝炎を標的として，障害肝に目的遺伝子を導入することで，肝臓が本来持っている潜在的再生能力を促し臓器再生を試みる検討が行われている．特に肝細胞増殖因子（HGF）を用いた遺伝子治療の基礎研究においては，重度肝硬変モデル動物の肝線維化が寛解し，延命ができることが報告されている [17,18]．このように慢性肝炎や肝硬変に対して遺伝子治療は劇的に改善できる可能性がある．これに対して，急性の肝疾患に対しては，唯一，Hwang らが HGF 遺伝子をアデノウイルスベクターで導入し，チオアセトアミドを用いて誘導した急性肝疾患マウスに対して肝保護効果があることを報告しているだけである [19]．しかし，サイトカインの HGF は，生体で強発現すると腫瘍細胞が出現するとの報告 [20] がある．

そこで，本研究では，生体内へ導入する遺伝子として，肝細胞に有効に働き，かつ安全性の高い遺伝子に着目した．CCAAT/enhancer binding protein β（C/EBP β）は肝切除時に発現が誘導される転写因子であり，正常な肝細胞の増殖には必須と考えられている [21, 22]．また，Thioredoxin（TRX）は細胞内 Redox 制御に関与し，抗アポトーシス作用を持ち，Tsutsui らによってラット初代培養肝細胞のアポトーシスとネクローシスを抑制することが報告されている [23, 24]．これらのことより，本研究の第 2 章と 3 章において，これらの 2 つの遺伝子を用いた急性肝傷害に対する遺伝子治療の有効性の検討を行った結果を記述した．

第１章　肝細胞と骨髄間質細胞の混合培養による肝機能維持と細胞移植

第１節　緒言

肝細胞は生体内において肝臓の主な機能である，糖代謝，蛋白代謝，脂質代謝，胆汁の生成・分泌，解毒作用などを担っており，肝臓内で中心的役割を果たす細胞である[2)]．

肝細胞は *in vivo* においては旺盛な増殖能を有するにもかかわらず，*in vitro* においては，ほとんど増殖せず，一般的培養法では，数日間の内にその細胞機能を消失してしまう．このために，バイオ人工肝臓の開発，また肝細胞移植を実際に臨床応用するためには *in vitro* において肝細胞の機能維持が必要となる．そこで，この問題を解決するために，多くの肝細胞培養方法が検討されてきた．培養ディッシュを用いた単層培養を基本とし，培地へ種々のホルモン，成長因子などを添加し，*in vitro* で肝細胞の機能発現と長期間の維持が試みられたが，人工肝臓や肝細胞移植に臨床応用されるまでには至っていない．また，物理的に肝臓の構造を *in vitro* で模倣し，肝細胞の機能発現を維持するために，ホローファイバー，マイクロキャリアーを用いた工学的な培養方法がある[3-5, 25, 26)]．工学的培養方法は，培養ディッシュを用いた単層培養と比較し，肝細胞機能を長期間維持できたが，日数が経つと肝細胞機能は低下し，実際に臨床で成果は上がらなかった．そこで，さらに生体内においての肝臓の微少環境を模倣するために，肝細胞と肝非実質細胞との混合培養が試みられた[15)]．肝細胞と肝非実質細胞の混合培養の結果，肝細胞単独培養と比較し肝細胞機能の良好な維持が報告されている．この機能維持は，肝非実質細胞から放出される様々な因子が関係していると考えられる．しかし，肝臓由来の肝非実質細胞は，生体にわずかしかなく採取数に限界があるため，実際に臨床治療において，この混合培養法の応用は困難であると考えられる．

最近，骨髄細胞から肝細胞に胚葉を超えて分化することが *in vitro*，*in vivo* にお

いて報告された[8, 9,10]．さらに，Okumoto らは骨髄細胞と肝細胞を細胞間接触をさせないために小孔径の分離膜を用い，培養することで骨髄細胞が肝細胞に分化したと報告した[27]．このように骨髄細胞と肝細胞との相互作用によって放出される液性因子は，細胞機能に重要な働きをすると考えられる．骨髄細胞中には，造血幹細胞が含まれており，造血幹細胞を様々な血球系細胞に分化させるための液性因子を放出する骨髄間質細胞が含まれている．この骨髄間質細胞は，*in vitro* においても増殖し，肝非実質細胞が採取数に限界があるのに対し，細胞の採取数には限界がない．そこで，本研究は，肝細胞を細胞移植に用いるため機能発現を高くし，細胞機能を長期に維持するために骨髄間質細胞から放出される因子に着目した．最初の *in vitro* においての検討では，肝細胞と骨髄間質細胞の混合培養を行い，肝細胞機能が高く機能を長期に維持することを試みた．さらに，多孔性ヒドロキシアパタイトディスクを用い，骨髄間質細胞と肝細胞を肝炎モデルマウスへ共移植することを試みた．これらの検討から，肝細胞移植における骨髄間質細胞の有用性を検討した．

第 2 節　実験方法

第 1 項　ラット肝実質細胞の単離及び調製

Sprague Dawley 系雄性ラット（体重，150～250g）を用い，Seglen のコラゲナーゼ灌流法を基本とし，肝実質細胞を単離した [28]．50×*g*，1 分間の遠心分離を 3 回繰り返し，得られた沈殿を肝細胞画分とし血球計算盤を用いて細胞数を算出した．トリパンブルー色素排除法により細胞生存率を測定し，生存率 90%以上の細胞を実験に使用した．ウイリアムス E 培地（ICN）に 100 IU/mL ペニシリン，100μg/mL ストレプトマイシン，2.5μg/mL アムホテリシン B 液を添加した基本培地（HFSF）へ 10%牛胎児血清（FBS），10^{-9} M デキサメタゾン，10^{-9} M インシュリンを添加した培地（IDSA）を使用し，37℃，5%CO_2 下で培養を開始した．

第 2 項　骨髄間質細胞の単離及び調製

Sprague Dawley 系雄性ラット（体重，150～250g）の大腿骨より，22G シリンジを用い，骨髄細胞を採取した．孔径 100μm ナイロンメッシュを用い，細胞を濾過したあと，α-MEM 培地（Sigma）に 100 IU/mL ペニシリン，100μg/mL ストレプトマイシンを添加した培地を基本培地とし，10%牛胎児血清（FBS）を添加し，37℃，5%CO_2 下で培養を開始した．培養開始 24 時間後に培地交換を行い，その後は 2 日毎に培地交換をコンフルエントになるまで行った．

第 3 項　細胞の培養方法

骨髄間質細胞は，細胞培養用プレートに骨髄細胞を 2×10^5 cells/cm^2 の密度で播種し，培養液を交換して血球系の細胞を取り除き，培養を継続した．そして，骨髄間質細胞がコンフルエントの際に，その上から単離直後のラット肝細胞を 1×10^5 cells/cm^2 の密度で播種し，細胞間接触している混合培養とした．次ぎに孔径 1.0

μm のメンブレンであるカルチャーインサート（FALCON）上に骨髄細胞を 2×10^5 cells/cm^2 の密度で播種し培養して，骨髄間質細胞がコンフルエントの際に，細胞培養用プレートに 1×10^5 cells/cm^2 の密度で播種した肝細胞と細胞間接触を伴わないものを共培養とした．単離した肝細胞を細胞培養用プレート（FALCON）に 1×10^5cells/cm^2 の密度で播種し control とした．各培養では，培養開始 6 時間目までは IDSA で培養を行い、その後は HFSF＋10%FBS（HFSA）で培養を行った。そして，肝細胞播種 24 時間後に培地交換を行い，その後は 48 時間毎に培地交換を行った．

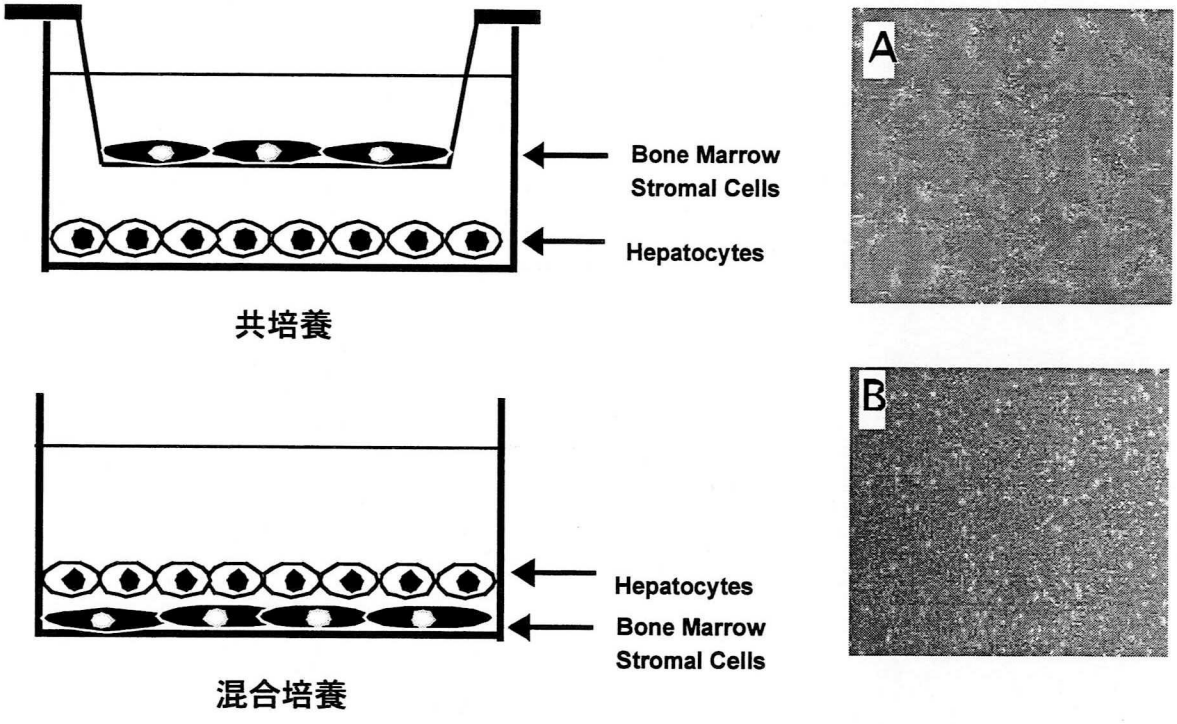


Fig.1 共培養と混合培養方法

カルチャーインサートを用いて細胞間接触のない培養を共培養（上）細胞間接触のある直接の培養を混合培養（下）とした．細胞間接触のない肝細胞の位相差顕微鏡像：A，細胞間接触のない骨髄間質細胞の位相差顕微鏡像：B（×100）

第 4 項　肝細胞尿素合成能測定

培養している細胞の上清を採取し，ジアセチルモノオキシム法[29]にて測定した．

第 5 項　肝細胞アルブミン分泌能測定

肝細胞の培養上清と rat albumin standard （1，0.5，0.25，0.125，0.0625，0 μg/mL）を ELISA 用 96 穴プレートに 50μL ずつ添加し，4℃で一晩放置してアルブミンをプレートの底に吸着させた．次に溶液を捨て，1% ゼラチンを含む PBS を加えて室温で 2 時間放置してブロッキングを行った．0.05% Tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄した後，peroxidase 標識付き抗ラットアルブミン抗体を 100μL ずつ添加し，室温で 2 時間静置し，アルブミンと結合させた．その後，0.05% Tween 20 を含む PBS で 5 回洗浄した．調製した発色液を 200μL ずつ添加して直ちに遮光し，そのまま約 10 分間静置した．10 分後，反応液がおおよそ橙色に発色しているのを確認し，そこで 6N HCl を 50μL ずつ添加して反応を停止させた．プレートリーダーで，吸光度 492.0 nm を測定した．

第 6 項　骨髄間質細胞 conditioned medium（BCM）の作製

骨髄間質細胞は細胞培養用プレート上でコンフルエントになったものを用いた．BCM の調製方法は，培養液を α-MEM 培地から HFSA 培地に交換して，この培養上清を用いた．BCM の調製時間は，共培養などの培養を始める肝細胞播種と同時に開始した．その後は，肝細胞培養と平行して BCM を調製した．

第 7 項　Interleukin-6 (IL-6) 中和抗体を用いた細胞培養と IL-6 定量

骨髄間質細胞から作製した conditioned medium を用い，IL-6 中和抗体（rabbit

anti-rat : Pepro Tec)500 ng/ml を加え，肝細胞を培養した．BCM 中の IL-6 は ELISA kit (TECHNE Corporation)を用いて定量を行った．

第 8 項　骨髄間質細胞の Flow cytometry (FACS) 解析

5×10^5 個の細胞を 10μl のマウス抗ラット CD44 抗体（R. Phycoerythrin 標識）を含む FACS バッファーで 4℃，1 時間反応させた．FACS バッファーで数回洗浄後，FACSCalibur (Becton-Dickinson) を用いて細胞の蛍光強度を測定した．また，データの解析には，付属のソフト Cell Quest を用いた．

第 9 項　肝炎マウスへの骨髄間質細胞と肝細胞の共移植

肝炎マウスの作製方法は，Balb/c マウス（♂，6 週齢）を用い，CCl_4 をオリーブオイル（WAKO）に溶解し，腹腔へ投与した．CCl_4 の投与量は 1.0 ml/kg，週 2 回投与を行った．また，飲み水にフェノバルビタール（SIGMA）を溶解させ，継続的に与えた．フェノバルビタールの投与量は 0.25 g/L であった．

連通管構造を持つ多孔性ヒドロキシアパタイトディスク（Interpore）をオートクレーブ滅菌し，細胞培養用プレート上で骨髄細胞を 2×10^6cells 播種し，約 2 週間培養を行った後，このアパタイトディスクに肝実質細胞を遠心法（4℃，50×*g*，1 分間）にて高密度充填を行った．充填後 6 時間 IDSA で培養を行ったあとに CCl_4 とフェノバルビタールを 4 週間投与した肝炎マウスの腹部にアパタイトディスクを 1 個移植した．移植後 2 週目に採血を行い，遠心分離（550×*g*，5 分間）により血清を得た．アルブミン量は ELISA 法を用いて測定を行った．

第 10 項 統計解析方法

各 Fig のデータの有意差は，2 標本差は t 検定，多重比較は Dunnett 検定を行った．標準偏差は mean±S.D.である．

第 3 節　結果と考察

第 1 項　骨髄間質細胞の肝細胞 viability への影響

肝細胞と骨髄間質細胞の共培養における肝細胞数を培養 2，4，6 日目に測定を行った．肝細胞と骨髄間質細胞の混合培養の肝細胞数は，肝細胞と骨髄間質細胞の見分けができないために測定を行わなかった．Fig. 2 に肝細胞数の測定結果を示した．Control として肝細胞単独での単層培養，肝細胞と骨髄間質細胞の共培養，また，BCM を用いた肝単層培養における肝細胞数を示した．培養 2 日目から 6 日目において，共培養における肝細胞数，及び BCM を用いた肝細胞単独培養における肝細胞数は，control と比較しほぼ同程度であった．このことより，骨髄間質細胞から放出される因子は，肝細胞の viability には影響がないことが示された．

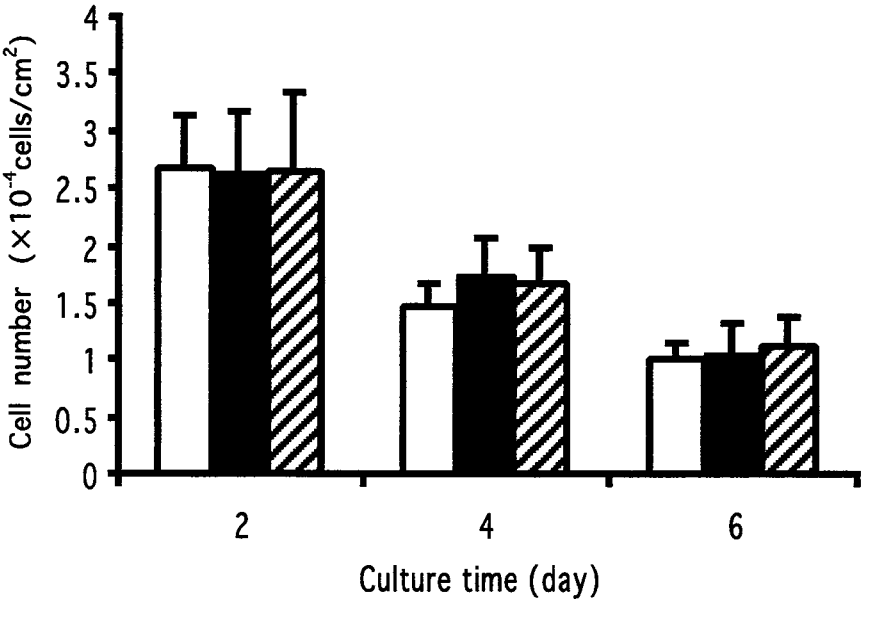


Fig.2. 骨髄間質細胞の肝細胞 viability に対する影響

□: 肝細胞単独の培養，■: 肝細胞と骨髄間質細胞の共培養，▨ : 骨髄細胞から調製した Condtioned medium を用いた肝細胞単独培養．肝細胞播種後 2，4，6 日目にトリパンブルー色素排除法を用い血球計算盤にて測定した．n = 3

第 2 項　肝細胞尿素合成能への影響

肝細胞と骨髄間質細胞の混合培養と共培養，及び BCM を用いた肝細胞単独培養における尿素合成能を培養 2，4，6 日目に測定を行った．肝臓の特異的な機能のひとつとして，生体内において有害な物質であるアンモニアを除去する解毒能の指標となっている尿素合成能がある．そこで肝細胞にアンモニアを付加した際に合成される尿素を測定し，肝細胞機能の評価を行った．

Fig.3 に尿素合成能測定の結果を示した．培養期間中の単位面積あたりの肝細胞尿素合成能は，肝細胞数減少のために減少した．共培養における肝細胞尿素合成能は培養期間中，control と比較し高い値を示し，肝細胞 10^6 個あたりの尿素合成能は培養 6 日目においては 2 倍以上の高い値となった．さらに，BCM を用いた肝細胞単独培養における尿素合成能は培養 4，6 日目に control と比較し高い値を示した．これらのことより，骨髄間質細胞が放出する因子は，肝細胞の解毒機能を高めることが示された．

第 3 項　肝細胞アルブミン分泌能への影響

肝細胞と骨髄間質細胞の混合培養と共培養，及び BCM を用いた肝細胞単独培養におけるアルブミン分泌能を培養 2，4，6 日目に測定を行った．アルブミンは肝臓でのみ合成されるタンパク質であり，肝特異的機能の指標の一つである．

Fig.4 にアルブミン分泌能測定結果を示した．培養期間中の単位面積あたりの肝細胞アルブミン分泌能は，肝細胞数減少のために減少した．単位面積あたりにおいて，混合培養と BCM を用いた肝細胞単独培養のアルブミン分泌能は，培養 4，6 日目に control と比較し高い値を示した．また，共培養と BCM を用いた肝細胞単独培養の肝細胞 10^6 個あたりのアルブミン分泌能は，培養 6 日目において control の 2 倍以上となった．これらのことより，骨髄間質細胞から放出される因子は，肝細胞のアルブミン分泌能を高めることが示された．

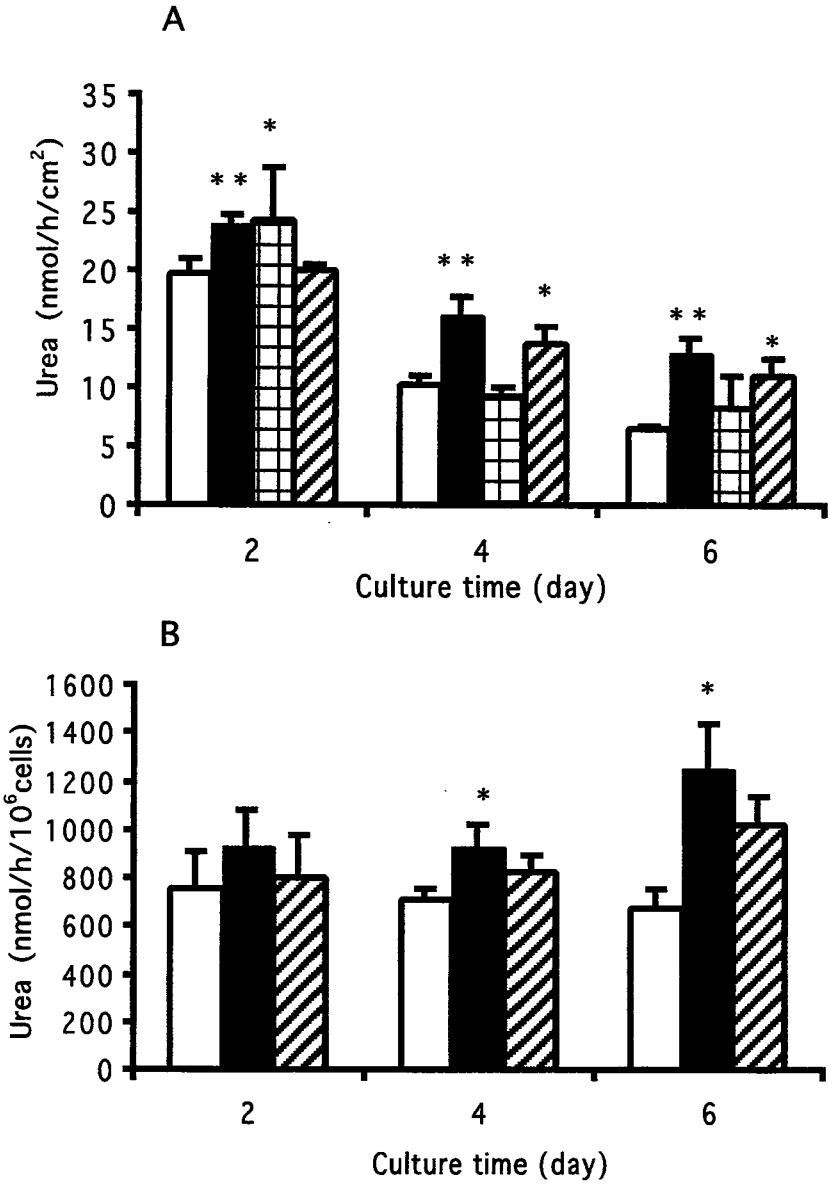


Fig.3. 肝細胞尿素合成能に対する骨髄間質細胞の影響

□: 肝細胞単独での単層培養, ■: 肝細胞と骨髄間質細胞の共培養, ⊞: 肝細胞と骨髄間質細胞の混合培養, ▨: 骨髄細胞から調製した conditioned medium を用いた肝細胞単層培養. A: 単位面積あたりの尿素合成能, B: 肝細胞 10^6 個あたりの尿素合成能. n = 3. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ vs 肝細胞単独培養 (Control)

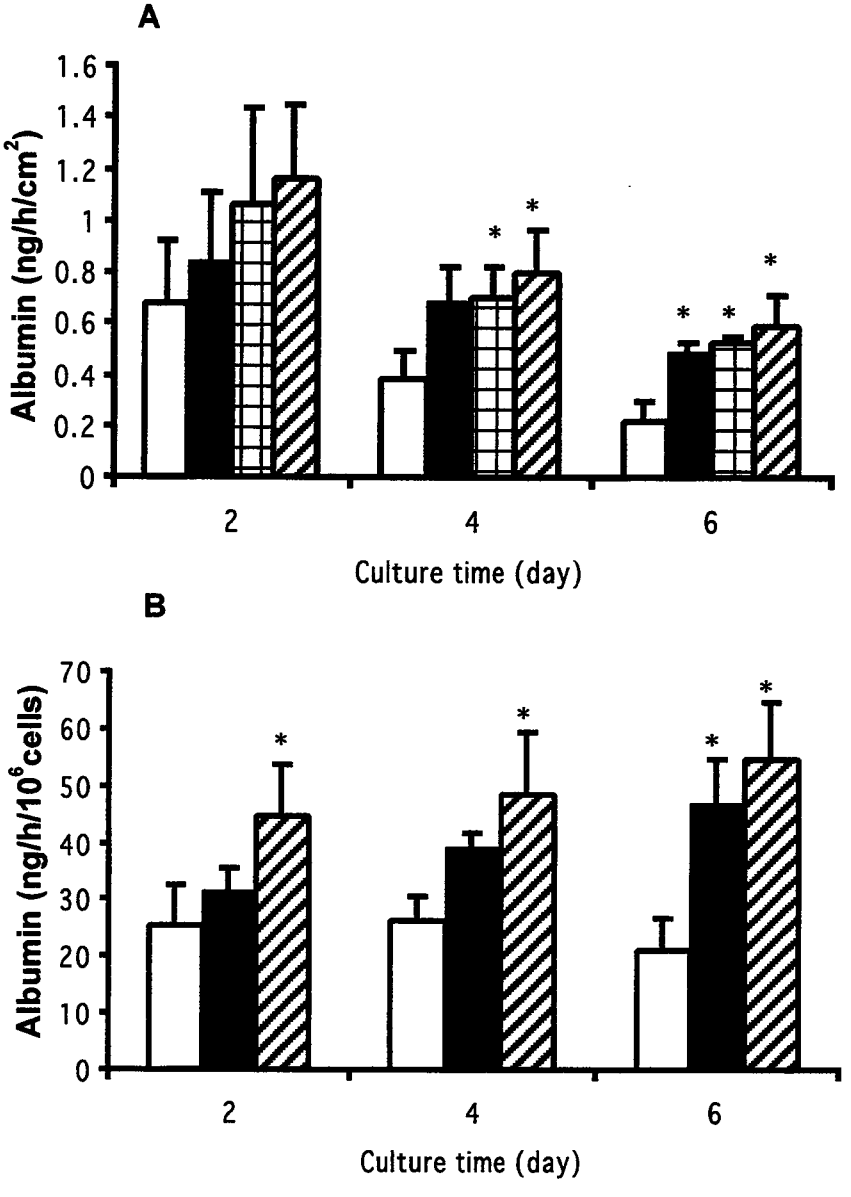


Fig.4. 肝細胞アルブミン分泌能に対する骨髄間質細胞の影響

□: 肝細胞単独での単層培養，■: 肝細胞と骨髄間質細胞の共培養，▥ : 肝細胞と骨髄間質細胞の混合培養，▨: 骨髄細胞から調製した conditioned medium を用いた肝細胞単層培養．A : 単位面積あたりのアルブミン分泌能，B : 肝細胞 10^6 個あたりのアルブミン分泌能．n = 3．＊$p < 0.05$，＊＊$p < 0.01$ vs 肝細胞単独培養（Control）

第 4 項　骨髄間質細胞から放出される IL-6 の定量と肝細胞機能への影響

IL-6 は骨髄間質細胞から放出され，マウスにおいて骨髄細胞中にある造血幹細胞を G1 期に導入し，増殖させることが知られている [30]．さらに IL-6 は肝細胞に作用し，CRP（ C-reactive protein ）などの急性期タンパク質の誘導をする．この IL-6 の働きに注目し，BCM 中にあるに IL-6 を定量し，そして肝細胞機能に及ぼす影響を IL-6 中和抗体を用い検討した．

Fig.5 は BCM 中の IL-6 の定量を行った結果を示した．BCM 中の IL-6 の量は，肝細胞単独培養の上清と比較し，圧倒的に多量であった．

BCM 中にある IL-6 が肝細胞機能に及ぼす影響を IL-6 中和抗体を添加し，肝細胞の尿素合成能を測定した結果を Fig.6 に示した．IL-6 中和抗体を添加した BCM を用いた肝細胞単層培養では，尿素合成能が通常の BCM と比較し減少した．これらのことより，骨髄間質細胞から放出される IL-6 は肝細胞の尿素合成能を高めることに関与していることが示唆された．

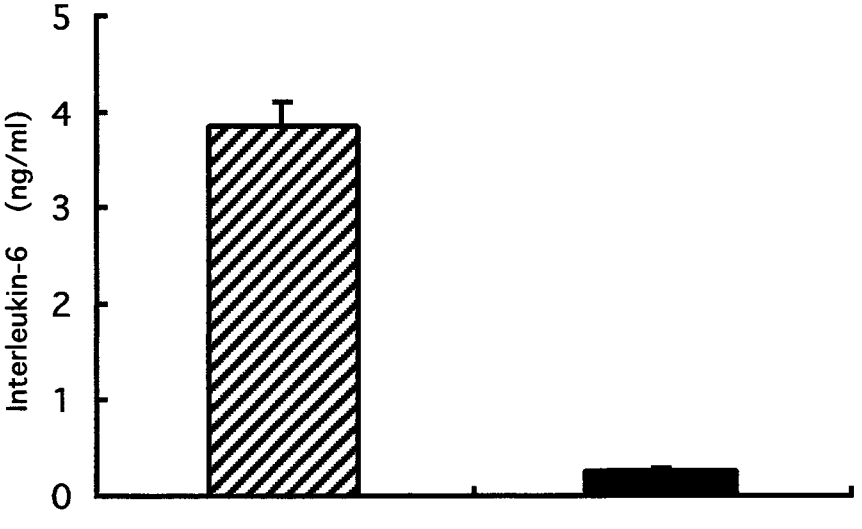


Fig.5.骨髄間質細胞から調製した Condtioned Medium 中の IL-6 量

▨ ：BCM 中にある IL-6，■ ：肝細胞単独培養の上清中にある IL-6．n = 3.

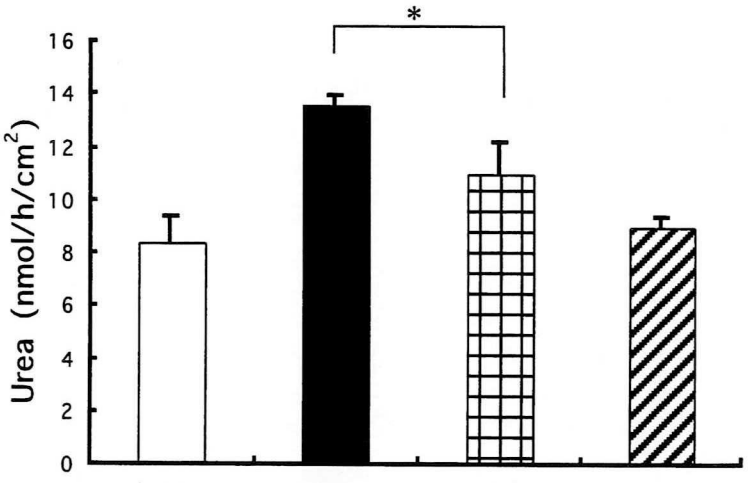


Fig.6. 骨髄間質細胞の肝細胞尿素合成能における IL-6 の関与

□: HFSA を用いた肝細胞単独培養, ■ : BCM を用いた肝細胞単独培養, ▦ : IL-6 中和抗体と BCM を用いた肝細胞単独培養, ▨ : IL-6 中和抗体と HFSA を用いた肝細胞単独培養. n = 3. ＊p< 0.05.

第 5 項　骨髄間質細胞の同定

骨髄細胞には血球系細胞と壁着する間質系細胞が存在している．骨髄細胞から培養し，調製した骨髄間質細胞中に血球系細胞又は造血幹細胞が存在していないことを骨髄間質細胞の抗原マーカーである CD44 を用い確認した. Fig.7 には FACS 解析結果を示した．培養した骨髄間質細胞の 90%以上の細胞が CD44-positive であり，CD44-negative な細胞は 4%以下と低かった．このことより，骨髄間質細胞以外の細胞が肝細胞に影響を与えていないと考えられる.

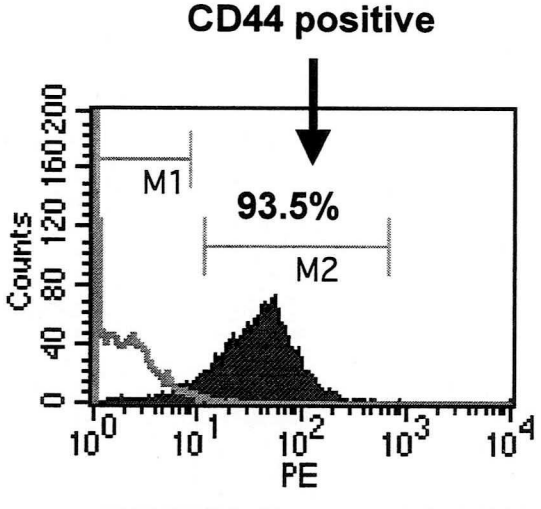


Fig.7.骨髄間質細胞の FACS 解析結果

第 6 項　骨髄間質細胞と肝細胞の共移植におけるアルブミン分泌能

肝細胞と骨髄間質細胞を混合培養した多孔性ヒドロキシアパタイトディスクを CCl_4 とフェノバルビタールを 4 週間投与した肝炎マウスへ移植し，血中のアルブミン濃度を測定した．Fig.8 にアルブミン濃度の測定結果を示した．移植後 2 週目において混合培養ディスクを共移植したマウスの血中アルブミン濃度は，肝細胞単独のディスクを移植したマウスと比較し，有意に高くなっていた．このことより，骨髄間質細胞は *in vivo* において肝細胞機能を高める，肝細胞移植において有用な細胞であることが示された．

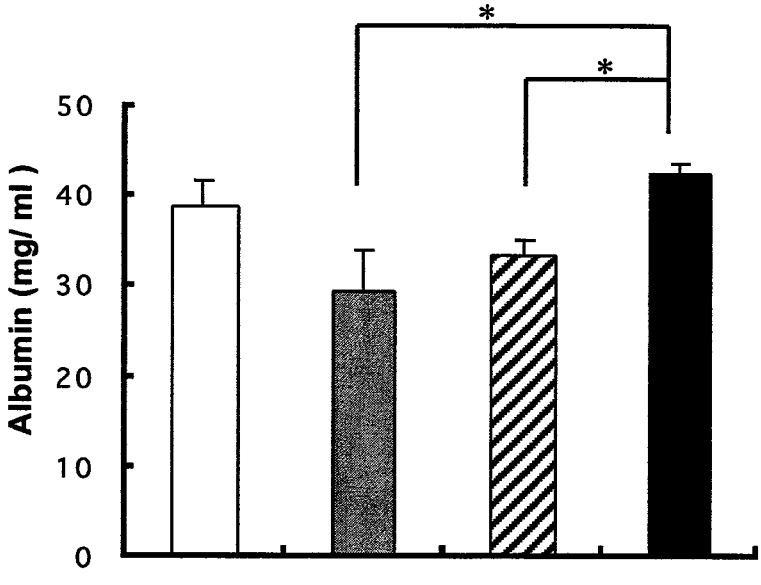


Fig.8. 肝炎マウスへの肝細胞と骨髄細胞の共移植

□：通常のマウス，▩：肝炎マウス（無処置），▨：肝細胞単独移植した肝炎マウス，■：肝・骨髄細胞を移植した肝炎マウス．血中アルブミン量を測定した．n = 3.　$*p < 0.01$

第4節　小括

骨髄細胞を採取して培養した骨髄間質細胞は，肝細胞との孔径 1.0μm のメンブレンを用いた細胞間接触を伴わない共培養において，肝細胞機能を長期に維持することができた．これは，骨髄間質細胞から放出される因子の影響である．IL-6 の中和抗体を BCM に添加し，肝細胞単層培養を行ったところ，肝細胞の尿素合成能は抑制された．Minges らは，骨髄間質細胞から放出される IL-6 が血球系細胞を維持する役割があることを報告している[31]．骨髄間質細胞から放出される IL-6 は肝細胞の尿素合成能を高め，維持することができると考えられる．肝細胞のアルブミン分泌能は，IL-6 中和抗体の影響を受けていなかった（data not shown）．このことより，肝細胞の代謝機能は，IL-6 以外の因子の影響を受けており，これは骨髄間質細胞から放出される様々なサイトカインのネットワークが関与していると考えられる．

アパタイトディスクに肝細胞と骨髄間質細胞を混合培養し，肝炎モデルマウスに移植したところ，移植後 2 週目に血中のアルブミン分泌能が，肝細胞単独ディスク移植群と比較し，有意に高くなっていた．*In vivo* において骨髄間質細胞が，肝細胞の代謝機能を高めたと考えられる．筆者らは，*in vitro* においても，アルブミン分泌能は混合培養することによって，機能維持できることを示している．さらにアパタイトディスクは，生体内に移植すると血管新生が起こることが確認されている[14]．*In vivo* において血管新生によって骨髄間質細胞は，自らの機能を維持し，さらに，骨髄間質細胞から放出される因子によって肝細胞機能が高められた考えられる．

骨髄間質細胞は，重篤な肝疾患に対しての肝細胞移植において，肝細胞機能を維持して高めることが示された．このことより，骨髄間質細胞は肝疾患治療をする際に患者自身の細胞を用いることで免疫反応のない理想的な移植用細胞になることが期待できる．

第 2 章　C/EBP β 遺伝子導入による肝傷害の抑制

第 1 節　緒言

肝臓は生体内において代謝，解毒など多様な機能を担う重要な臓器であり，肝細胞は，その機能発現をするために高度に分化をした細胞である．この肝細胞が機能発現をするために肝臓特異的遺伝子発現機構に作用する転写因子があると考えられるが，現在，発見されていない．いくつかクローニングされた転写因子の研究から，肝臓で豊富に存在する因子（Liver-enriched transcription factor ）が肝臓特異的機能発現と分化の鍵を握っていると考えられる．

Liver-enriched transcription factor において，代表的な転写因子に HNF(hepatocyte nuclear factor)ファミリーと C/EBP (CCAAT / enhancer-binding protein)ファミリーがある．HNF ファミリーは HNF-1，HNF-3，HNF-4，HNF-6 などから構成されている．HNF-1 はホメオドメインを持ったタンパク質であり，2 種類の異なった遺伝子にコードされたアイソフォームがある．HNF-1 は肝癌細胞の増殖に関与していることが報告されている [32]．HNF-3 はフォークヘッド，もしくはウイングヘリックス構造を持つタンパク質であり，3 種類のアイソフォームが存在する．HNF-3 は培養肝細胞において強発現させることにより，肝特異的機能を維持することが報告されている [33]．また，HNF-4 はステロイドホルモン受容体ファミリーに属する転写因子であり，肝特異的機能発現に最も重要な転写因子であると考えられている [34]．

一方，C/EBP ファミリーは，多様な組織で，細胞機能・分化に関与する遺伝子の発現を制御する転写因子群である．C/EBP は C 末端側に塩基性アミノ酸に富んだロイシンジッパー領域を持った bZIP 蛋白であり，6 種類同定されている．C/EBP α は脂肪細胞の分化に関与しており，増殖もしくは分化へのスイッチの役割をすることが報告されている [35]．C/EBPγ は，NK 細胞の機能に必須の転写因子であることが報告されている [36]．

本研究で用いる C/EBPβ は IL-1 刺激に応答する IL-6 プロモーター領域に結合

する転写因子としてクローニングされた[37]．C/EBPβ欠損マウスを用いた研究において C/EBPβは抗腫瘍活性と炎症反応に重要な役割を果たすことが報告されている[22]．さらに，C/EBPβは急性期反応の刺激で誘導されることが知られており，肝切除後の肝再生過程において C/EBPαが抑制されるのに対し，C/EBPβの発現は亢進する[22]．このことより C/EBPβは，正常な肝細胞増殖に必須であると考えられている．C/EBPβmRNA には複数の翻訳開始点が存在し，full length の LAP*（38kD)，LAP（35kD)，LIP（20kD）の 3 種類のアイソフォームが形成されている．LIP は転写活性化ドメインを持っていないために C/EBP の阻害蛋白として働く．LAP*と LAP は転写活性化ドメインを持ち，LAP は高い転写活性化効率持つことが報告されている[38]．本研究において C/EBPβの転写活性化ドメインを有する LAP に着目し，アデノウイルスと Cre-loxP システムを用い，C/EBPβ組換えアデノウイルスを作製し，肝傷害における有用性について検討を行った．

第 2 節　実験方法

第 1 項　C/EBPβ遺伝子組換えアデノウイルスの調製

アデノウイルスベクターは，浮遊細胞及び壁着細胞に対して導入効率が高い優れたベクターであり，基礎研究から遺伝子治療にも及ぶ応用研究まで広範に利用されている．アデノウイルスは，36kb の 2 本鎖直線状 DNA をゲノムとして持ち，12 個のペントンベースとファイバーを有する正 20 面体構造をしている．遺伝子導入に用いるアデノウイルスは通常，複製に必要な E1a，E1b，E3 領域を欠損させ，その領域に目的遺伝子を挿入する．

組換えアデノウイルスは，E1a 及び E1b 領域を恒常的に発現している 293 細胞でしか増殖することができず，そのほかの細胞では増殖しない．このため本研究においても 293 細胞において C/EBPβ組換えアデノウイルス（C/EBPβ-AdV）を増殖させた．また，組換えアデノウイルス作製法は，COS-TPC 法 [39] が一般的に用いられてきたが，この方法をさらに改良し操作が簡便でかつ組換え効率の向上した Cre-*loxP* システム [40] を用いた．Cre-*loxP* システムは，発現目的遺伝子を pALC コスミドベクター *Swa I* サイトに発現単位（expression cassette）を導入し，後に 293 細胞内で組換えをするときに，あらかじめ組込まれている 2 つの *loxP* 配列が Cre 酵素により除去される仕組みである．Fig.9 に pALC コスミドベクターと expression cassette の構造を示した．なお本研究においては，あらかじめ作製されていた C/EBPβ-AdV を 293 細胞を用いて増幅し，力価測定を行い研究に用いた．組換えアデノウイルスの力価は C/EBPβ-AdV が 5×10^9 pfu/ml，lacZ 組換えアデノウイルス（lacZ-AdV）が 9×10^9 pfu/ml であった．

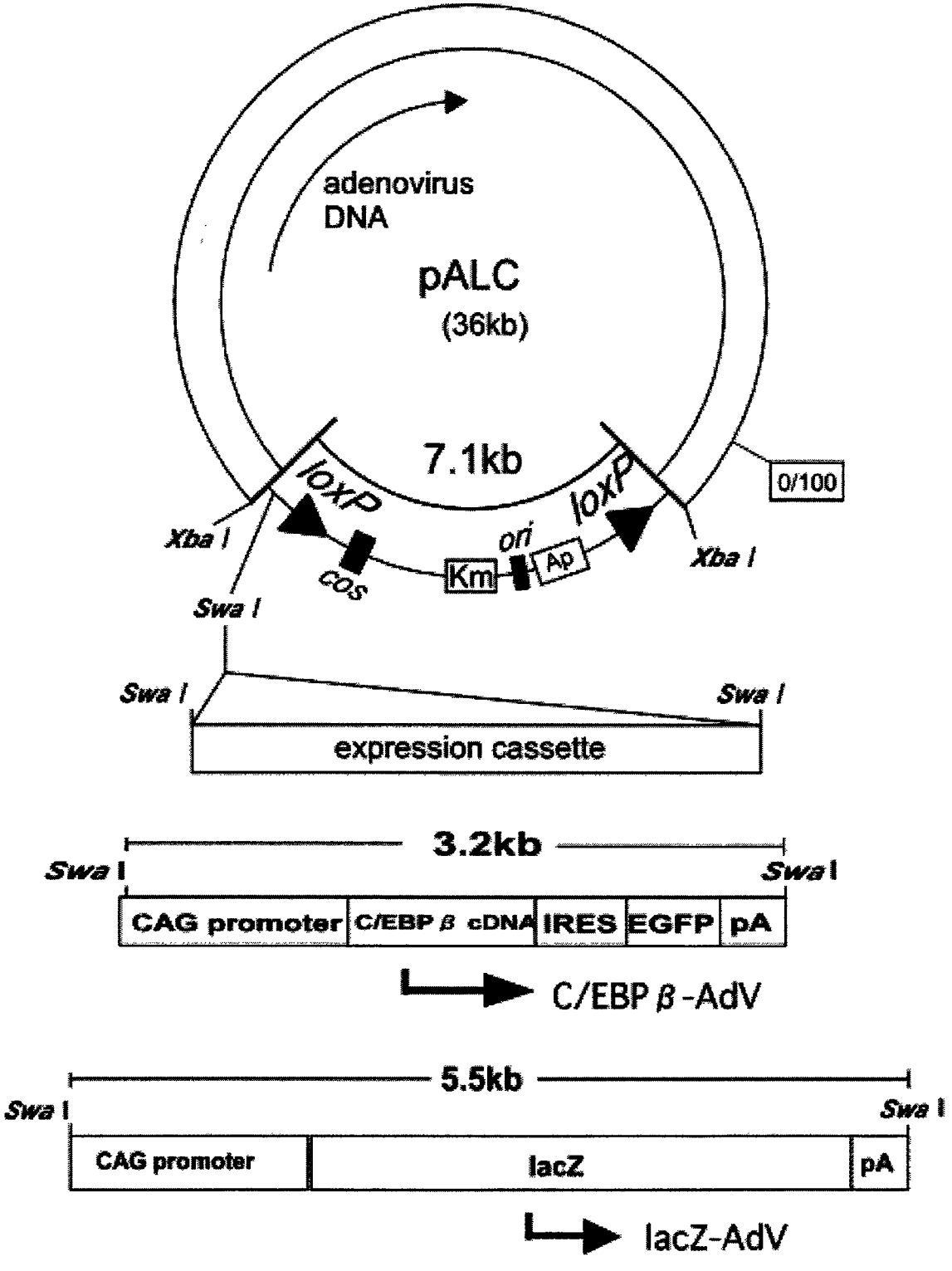


Fig.9 C/EBP β 組換えアデノウイルスの構造

第 2 項　ラット初代培養肝細胞への C/EBPβ遺伝子の導入

Sprague Dawley 系雄性ラットより肝細胞を採取し，細胞培養用プレート（FALCON）に 1×10^5 cells/cm^{2}の密度で播種した．細胞播種と同時に C/EBPβ-AdV または lacZ-AdV を 1×10^8 pfu（moi100）で感染させた．培養液は，ウイリアムス E 培地（ICN）に 100 IU/mL ペニシリン，100μg/mL ストレプトマイシン，2.5μg/mL アムホテリシン B 液を添加した基本培地（HFSF）へ 10%牛胎児血清（FBS），10^{-9} M デキサメタゾン，10^{-9} M インシュリンを添加した培地（IDSA）を使用し，37℃，5%CO_2下で培養を開始した．培養開始 24 時間後に HFSF＋10%FBS（HFSA）に交換し，培養を継続した．

第 3 項　Bromodeoxyuridine（BrdU）による DNA 合成能の検出

BrdU を培養 6 日目の C/EBPβ-AdV または lacZ-AdV を 1×10^8 pfu（moi100）で感染させた肝細胞，また非感染肝細胞に終濃度 40μM となるように添加した．24 時間後に BrdU を取り除き，PBS で洗浄を行った後にエタノールを用いて細胞を固定した．次ぎに 2 規定以上の塩酸を用いて DNA の 2 重鎖を解離させ，過酸化水素を用いて内因性ペルオキシターゼをブロックした．そして 1 次抗体（抗 BrdU 抗体）を加えて反応させたあと，2 次抗体（ABCkit blue label）を加え，最後に発色液を加えて反応させた．発色反応は冷水にて反応を停止させた．顕微鏡下で茶褐色に染色した BrdU 陽性細胞を測定し，全細胞数に対する BrdU 陽性細胞を係数化して，その割合を BrdU Labeling Index (BrdU L.I.)とした．

第 4 項　アポトーシス細胞の検出

第 2 章 1 節 2 項に従い初代培養肝細胞に C/EBPβ-AdV を 1×10^8 pfu（moi100）で感染させた．ホスファチジルセリンは健常時には細胞膜の内側に局在している

が，アポトーシスシグナルを受け取ると局在が崩れ細胞外側に突出する性質がある．そこで，フォスファチジルセリンと親和性のある Annexin V を用いてアポトーシス細胞を検出した．培養 4 日目に Annexin V - Cy3 Apoptosis Detection Kit (MBL)と共焦点レーザー顕微鏡（MRC1024ES:BIO-RAD）を用いアポトーシスを起こしている細胞を検出した．

第 5 項 COX-2mRNA の検出と COX-2 阻害剤を用いた細胞培養

誘導型シクロオキシゲナーゼ（COX-2）は，部分肝切除後の残存肝において C/EBPβと共に発現が誘導されることが報告されている[41]．また，COX-2 のプロモーター領域には C/EBP 結合サイトが存在し，C/EBPβホモダイマー結合により，COX-2 が誘導される[41]．第 2 章 1 節 2 項に従い初代培養肝細胞に C/EBPβ組換えアデノウイルスを 1×10^8 pfu（moi100）で感染させた後に COX-2 の発現を RT-PCR により観察をした．セパゾール RNA I（ナカライテスク）を用い，Total RNA を抽出し，Takara RNA PCR Kit（タカラバイオ）を用い，逆転写反応と PCR を行った．逆転写反応のサイクル数は 1，各ステップ温度は，30℃10 分間，50℃50 分間，95℃2 分間にて行った．PCR のサイクル数は 30，各ステップ温度は 94℃30 秒間，（55～58）℃30 秒間，72℃2 分間にて行った．Table1 に各プライマーの配列を示した．アニーリング温度はβ-actin 及び C/EBPβが 55℃，COX-2 は 58℃で行った．さらに，C/EBPβ-AdV 感染初代培養肝細胞において COX-2 の影響を検討するために，培養液中に COX-2 選択的阻害薬 NS398（CALBIOCHEM）を 50 μM 添加し，生肝細胞数を測定した．

Table 1 RT-PCR に用いたプライマーの配列

Transcript	Sense primer	Anti-sense primer	Size of product
C/EBPβ	AAGGCCAAGGCCAAGAAGGC	TGAACAAGTTCCGCAGCGTG	210bp
COX-2	TGATGACTGCCCAACTCCCATG	AATGTTGAAGGTGTCCGGCAGC	702bp
β-actin	CATCCCCCAAAGTTCTAC	CCAAAGCCTTCATACATC	347bp

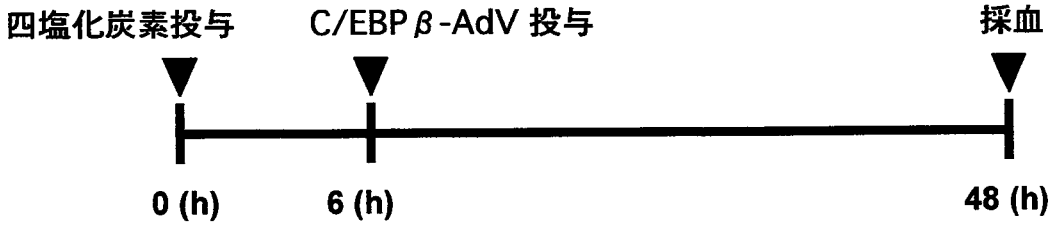
第 6 項　肝細胞傷害モデルの作製（*in vitro*）

培養している初代培養肝細胞へ四塩化炭素（CCl_4）を 1，5，10，50 mM 及び，溶媒のジメチルスルホキシド（DMSO）を HFSF に添加し，4 時間インキューベト後に生肝細胞数を測定した．

また，アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）とアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）は，広く臓器に分布しており，肝細胞が障害を受けると血清中の値が高くなることが知られている．そこで，培養上清より ALT, AST の活性を測定し，CCl_4の毒性の最適用量を決定した．C/EBP β-AdV 感染肝細胞の *in vitro* 肝細胞傷害実験は上記と同様のプロトコールで行い，肝細胞 viability, ALT, AST の活性を測定した．

第 7 項　急性肝傷害マウスへの C/EBP 遺伝子導入による効果

オリーブオイルに溶解した 1.0ml/kg CCl_4 を BALB/c マウス（♂，6w）の腹腔へ投与した．CCl_4投与 6 時間後，腹腔に C/EBP β-AdV1.0×10^9 pfu を投与した．マウス肝臓にある肝細胞を 1.0×10^8 個と仮定し，moi10 相当の組換えアデノウイルスを投与した．CCl_4 投与 48 時間後に採血を行い，血清を採取した．採取した血清中より，ALT と AST の活性をイアトロザイム TA-Lq（三菱化学ヤトロン）を用いて測定した．



第 8 項 統計解析方法

第 1 章 2 節 10 項に準じて行った．

第 3 節　結果と考察

第 1 項　肝細胞への C/EBP β 遺伝子導入

採取したラット肝細胞へ C/EBP β -AdV を moi100 で感染させた．C/EBP β -AdV には GFP 遺伝子が組み込まれており，共焦点レーザー顕微鏡を用いた肝細胞の蛍光像より，感染 24 時間後に GFP の発現が観察された．C/EBP β -AdV 導入肝細胞の培養 12 日間の肝細胞 viability を Fig.10 に示した．非感染肝細胞群，lacZ 組換えアデノウイルス導入肝細胞群と比較して，C/EBP β -AdV 導入肝細胞の viability は培養 12 日間ほぼ維持されていた．肝細胞は *in vitro* において通常，viability を維持することはできない．Fig.10 の結果より，C/EBP β を肝細胞内で強発現することによって，肝細胞 viability を維持することが示された．

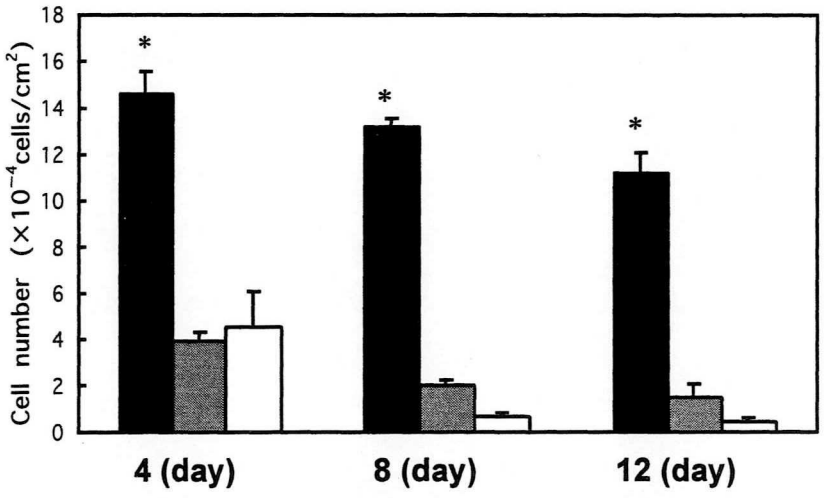


Fig.10. C/EBP β 導入肝細胞の viability 維持

■: C/EBP β 遺伝子導入肝細胞，■: lacZ 遺伝子導入肝細胞，□ : 非感染肝細胞．肝細胞播種後 4，8，12 日目にトリパンブルー色素排除法を用い血球計算盤にて測定した．n = 3．＊p<0.01 vs 非感染肝細胞

第 2 項　C/EBPβ遺伝子導入による肝細胞増殖に対する影響

Fig.11 に BrdU L.I.の測定結果を示した．C/EBPβ-AdV 導入肝細胞群は，非感染肝細胞群，lacZ-AdV 導入肝細胞群と比較して，有意に高い BrdU L.I.を示した．これにより，C/EBPβを発現することによって，肝細胞の増殖能は高まることが示唆された．

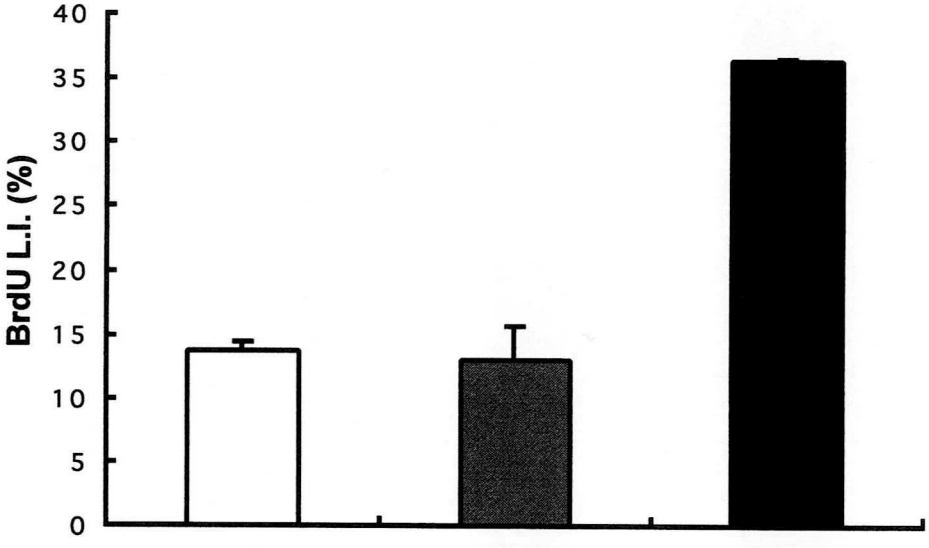


Fig.11.C/EBPβ遺伝子の肝細胞増殖能に対する影響

□：非感染肝細胞，■：lacZ 遺伝子導入肝細胞，■：C/EBPβ遺伝子導入肝細．n = 3.

第 3 項　C/EBPβ遺伝子導入による肝細胞アポトーシスへの影響

非感染肝細胞，C/EBPβ-AdV 導入肝細胞，及び lacZ-AdV 導入肝細胞の培養 6 日目におけるアポトーシス細胞を Annexin V-Cy3 と共焦点レーザー顕微鏡を用いて検出した．Fig.12 に結果を示した．非感染肝細胞と lacZ-AdV 導入肝細胞はほぼ全ての細胞がアポトーシスを起こしていたのに対し，GFP を発現している C/EBPβ-AdV 導入肝細胞は，ほとんどアポトーシスを起こしていなかった．このことより，肝細胞内で C/EBPβを強発現することにより，肝細胞アポトーシスが抑制され，肝細胞の viability が維持されていることが示唆された

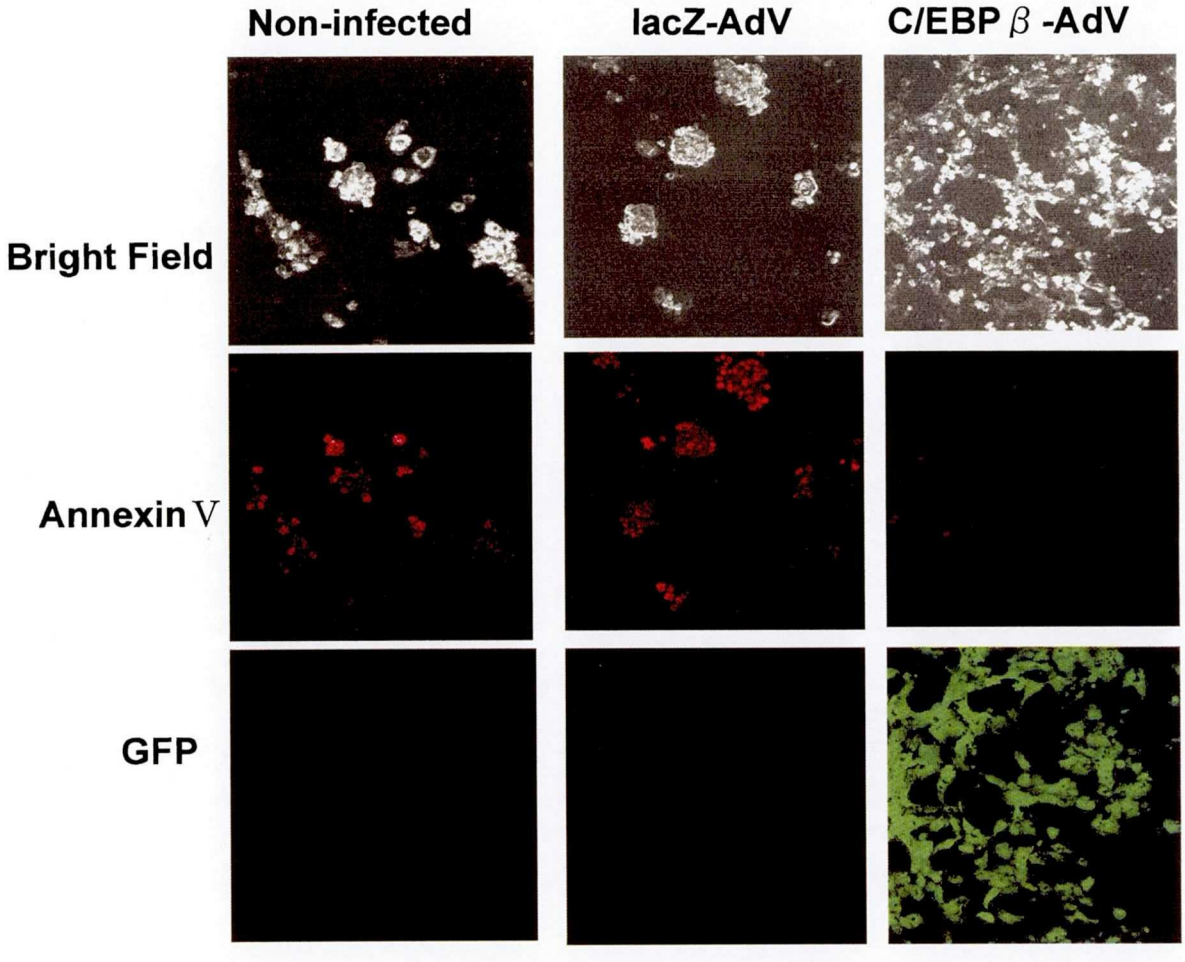


Fig.12. C/EBPβ遺伝子導入による肝細胞のアポトーシス抑制

AnnexinV-Cy3（赤）とGFP（緑）を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した.

第 4 項　初代培養肝細胞 viability 維持のメカニズム

C/EBPβ-AdV 導入肝細胞の viability 維持のメカニズムを検討するために，COX-2 に着目をした．C/EBPβ-AdV 導入肝細胞の培養 6 日目における RT-PCR による COX-2 遺伝子発現結果を Fig.13A に示した．C/EBPβ-AdV 導入肝細胞において COX-2 遺伝子の発現が観察された．このことより，C/EBPβを肝細胞内で強発現することによって，COX-2 が誘導されることが示された．さらに COX-2 の選択的阻害剤である NS398 を用い，C/EBPβ-AdV 導入肝細胞の viability 維持における関与を検討した．Fig.13B は NS398 を用いた C/EBPβ-AdV 導入肝細胞の培養 6 日目における viability を示した．NS398 を用いることで C/EBPβ-AdV 導入肝細胞の viability は大きく減少した．これらのことより，COX-2 が肝細胞の viability 維持に深く関与していることが示唆された．

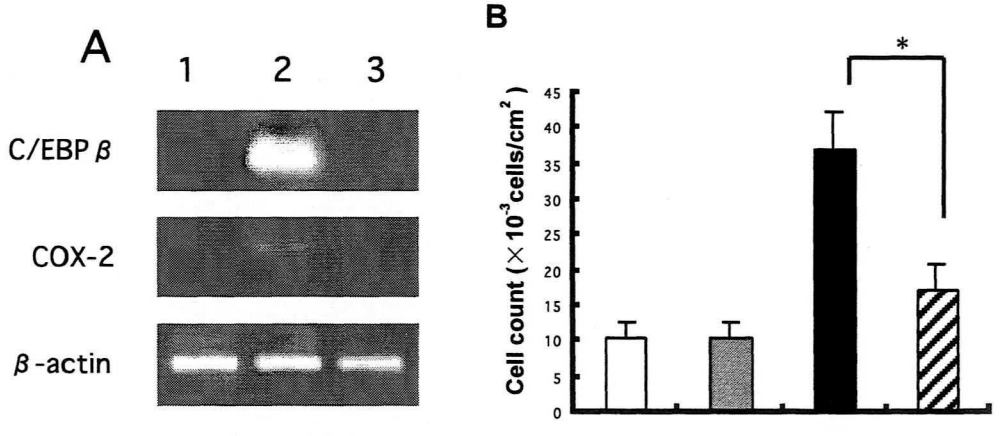


Fig.13. COX-2 遺伝子発現と C/EBPβ遺伝子導入肝細胞の viability に及ぼす影響

A：COX-2 遺伝子の RT-PCR 解析．lane1：非感染肝細胞，lane2：C/EBPβ遺伝子導入肝細胞，lane3：lacZ 遺伝子導入肝細胞，**B：NS398 を用い培養を行った肝細胞の viability．**□：非感染肝細胞（NS398 非添加），▩：非感染肝細胞（NS398 添加），■：C/EBPβ遺伝子導入肝細胞（NS398 非添加），▨：C/EBPβ遺伝子導入肝細胞（NS398 添加），肝細胞播種後 6 日目にトリパンブルー色素排除法を用い血球計算盤にて測定した．n=3．＊$p < 0.05$

第 5 項　C/EBPβ遺伝子導入による肝傷害の抑制（*in vitro*）

1）肝細胞傷害モデルの作製（ *in vitro* ）

採取したラット肝細胞を用い，培養 48 時間後に 1，5，10，50 mM の CCl_4 及び，溶媒のジメチルスルホキシド（DMSO）を HFSF に添加し，4 時間インキューベトし，肝細胞数，ALT，AST の活性を測定した．結果を Table2 に示した．この結果より，50 mM CCl_4ではほとんどの肝細胞が死滅し，5 mM CCl_4では肝細胞に対しての毒性がほとんど観察されなかった．このため 10 mM CCl_4 がもっとも肝細胞傷害モデルとして適当だと考えられた．また，DMSO の肝細胞に対しての毒性は見られなかった．

Table 2 肝細胞傷害モデル作製の結果（*in vitro*）

	無処置	1mM CCl_4	5mM CCl_4	10mM CCl_4	50mM CCl_4	DMSO
Cell counts($\times 10^5$cells/cm^2)	4.3	3.8	3.8	1.9	0.17	3.7
ALT(KU/ml)	181.9	96.7	161.2	325.3	1478.1	163.3
AST(KU/ml)	782.2	502.2	1072.1	2312.6	8572.3	1045.3

2）C/EBPβ遺伝子導入による肝細胞傷害の抑制（ *in vitro* ）

採取したラット肝細胞に C/EBPβ-AdV を導入し，感染 48 時間後に 10 mM CCl_4 で 4 時間インキューベトし，生肝細胞数，ALT，AST の活性を測定した．結果を Fig.14 に示した．C/EBPβ-AdV 導入肝細胞は，非感染肝細胞が CCl_4 添加の影響で肝細胞 viability が激減したのに対し，ほぼ肝細胞 viability を維持していた．また，C/EBPβ-AdV 導入肝細胞の培養上清中の ALT，AST の活性は，非感染肝細胞と比較し，有意に減少していた．このことより，肝細胞内で C/EBPβ遺伝子を強発現することにより CCl_4の肝傷害を抑制することが示された．

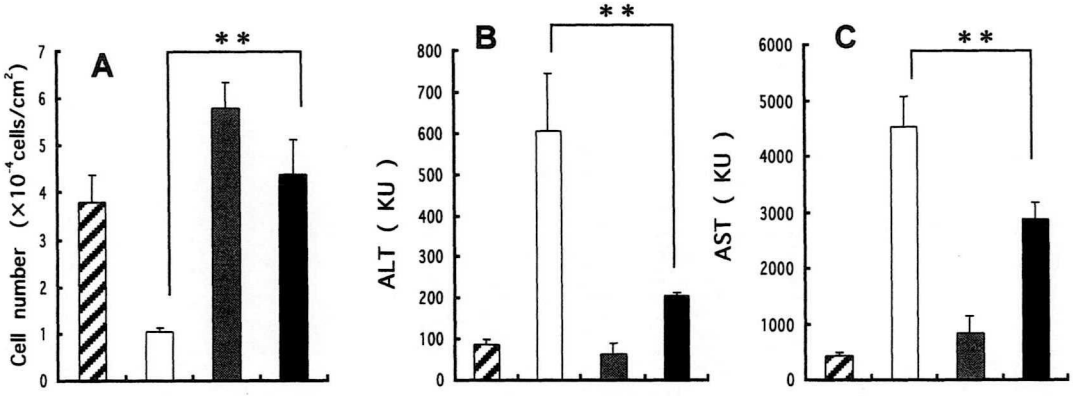


Fig.14. C/EBPβ遺伝子導入による肝傷害の抑制（*in vitro*）

A：肝細胞数測定結果，B：ALT 活性の測定結果，C：AST 活性の測定結果．▨：非感染肝細胞（CCl_4 非添加），□：非感染肝細胞（CCl_4 添加），■：C/EBPβ遺伝子導入肝細胞（CCl_4 非添加），■：C/EBPβ遺伝子導入肝細胞（CCl_4 添加），肝細胞数はトリパンブルー色素排除法を用い血球計算盤にて測定した．ALT,AST 活性は培養上清より測定した．n = 3．＊＊$p<0.01$

第 6 項　C/EBPβ遺伝子導入による肝傷害の抑制（*in vivo*）

BALB/c マウス（6w / ♂）へ C/EBPβ-AdV1×10^9 pfu を腹腔に投与し 48 時間後に肝細胞を採取して GFP の発現を共焦点レーザー顕微鏡で観察した．結果は Fig.15 に示した．GFP を発現している肝細胞が存在し，このことより C/EBPβ遺伝子が肝臓中の肝細胞で発現することが示された．

さらに，BALB/c マウスへ CCl_4 1ml/kg を投与した急性肝炎モデルマウスを用いて C/EBPβの *in vivo* での効果の検討をした．CCl_4 は，消化剤として使われてきたが，毒性があり，用量依存的に急性肝炎や肝障害の原因となることが知られている．CCl_4 を高用量で生体に投与すると，大量の肝細胞壊死と劇症肝疾患を誘導する．それはヒトにおいて病理学と生理学的に劇症肝疾患と似ている [43-45]．CCl_4 投与 6 時間後に C/EBPβ-AdV1×10^9 pfu を腹腔に投与し，CCl_4 投与 48 時間後に採血を行い，血清中より ALT，AST の活性を測定した．Fig.16 に測定結果を示した．C/EBPβ-AdV 投与マウス群の ALT，AST の活性は，非投与マウス群及び lacZ-AdV 投与マウス群と比較し，顕著に低値を示した．C/EBPβ-AdV がマウス肝臓で発現し，CCl_4 による肝傷害から治癒を促進したことが示された．

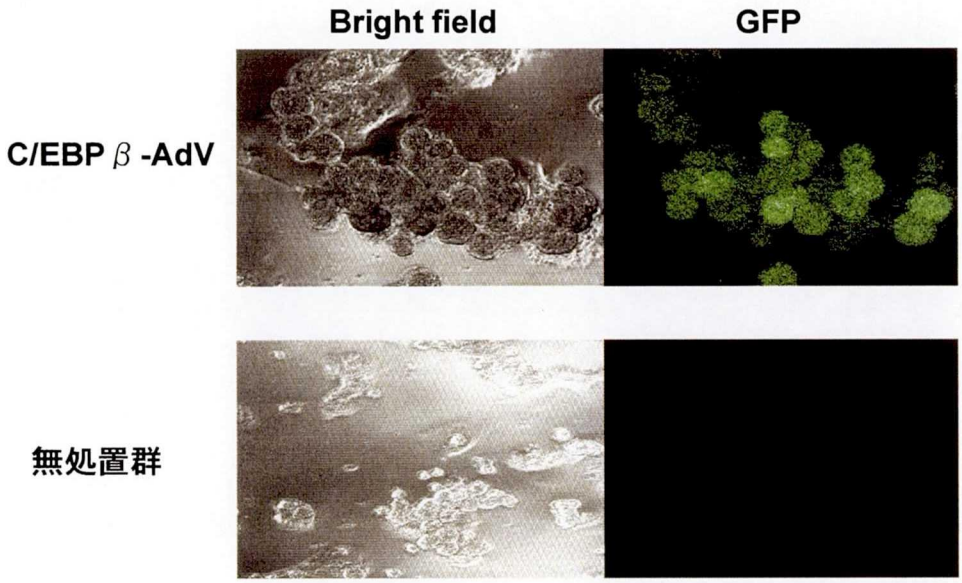


Fig.15. C/EBP β 遺伝子の発現（*in vivo*）

C/EBP β -AdV をマウス腹腔へ投与し，48 時間後にマウスより肝細胞を採取し GFP（緑）を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した.

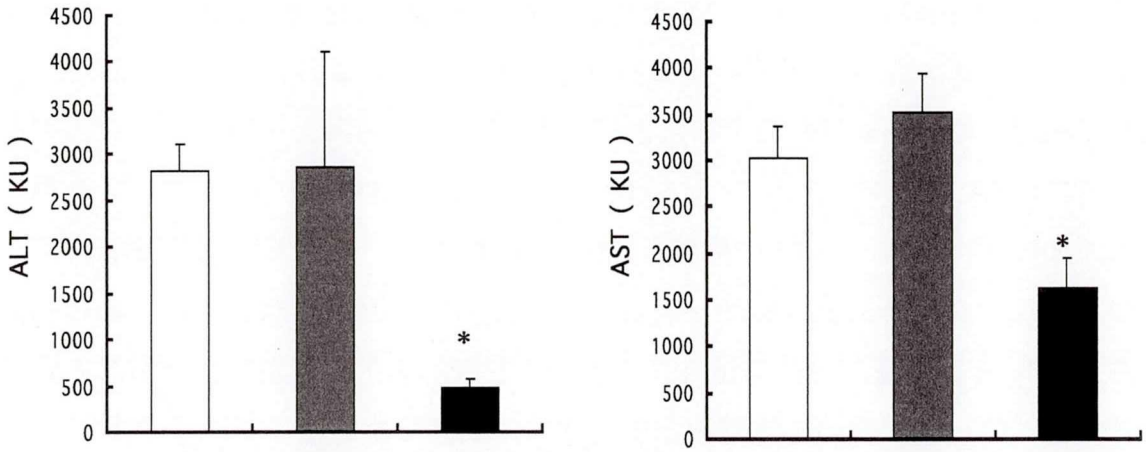


Fig.16. C/EBP β 遺伝子導入による肝傷害の抑制（*in vivo*）

□：無処置マウス，■:lacZ 遺伝子導入マウス，■:C/EBP β 遺伝子導入マウス. 血清中より ALT,AST を測定した. n = 3. ＊ $p<0.05$ vs 無処置マウス

第 4 節　小括

C/EBPβ-AdV を初代培養肝細胞へ導入し，C/EBPβを強発現させることによって，肝細胞 viability は維持され，増殖能が高まり，アポトーシスが抑制された．さらに COX-2 の発現が誘導され，肝細胞の viability 維持に深く関与していることが示唆された．

COX-2 は生体内においてアラキドン酸経路によりプロスタグランジン類（PG）の産生に関与している酵素である．PG はラット初代培養肝細胞の DNA 合成を促進し，細胞増殖作用を示すことが報告されている [46]．このことより，肝細胞に C/EBPβ遺伝子を導入することで，COX-2 を介して PG の産生によって肝細胞の増殖能が促進されたと考えられる．*In vivo* において C/EBPβ-AdV を投与することで CCl_4 肝傷害は抑制された．腹腔へ投与した C/EBPβ-AdV は肝臓に感染していることが確認された．これはアデノウイルスが肝臓に集積しやすい性質があるためだと考えられる [47]．

COX-2 と PG は生体内において炎症反応や癌細胞の増殖に関与していることが報告されている [48, 49]．本研究においては，アデノウイルスベクターを用い C/EBPβ遺伝子を導入し，肝細胞で C/EBPβを強発現させた．アデノウイルスは一般的に細胞内の細胞質画分に遺伝子を導入するために，導入された遺伝子が発現するのは 2 週間程度である．また，本研究において C/EBPβ遺伝子を導入された肝細胞は細胞機能を維持していた．これらのことより，C/EBPβが強発現し COX-2 が誘導されたが，肝細胞の癌化などは起こらない，生体に対して安全性は高いと考えられる．

C/EBPβを発現するアデノウイルスは，*in vitro*, *in vivo* において CCl_4 による肝傷害を抑制した．以上のことより，アデノウイルスベクターを用いた C/EBPβ遺伝子の導入は，肝疾患に対し，肝細胞の増殖，及び肝臓の再生を促進する，安全性の高い遺伝子治療になることが期待できる．

第 3 章 TRX 遺伝子導入による肝傷害の抑制

第 1 節　緒言

TRX は，分子量約 12,000 の原核生物，植物，ヒトまで存在する低分子蛋白である．TRX の立体構造は，3 つの α-ヘリックスと 4 つの β-ストランドからなり，Cys-Gly-Pro-Cys という特徴的な活性部位を持っている．この活性部位の 2 つのシステイン残基において，S-S 結合をつくる酸化型と，結合が切れ SH 基をつくる還元型が存在する．還元型 TRX はチオレドキシンリダクターゼ，フラボ蛋白などの基質タンパク質のジスルフィド結合を還元し自らは酸化型となる．酸化型 TRX は NADPH と TRX 還元酵素による還元反応によって還元型 TRX となる [50]．このように細胞内の Redox 制御に関与する TRX は，様々な作用を持つことが知られている．細胞が TNF-α 等の刺激を受けると，細胞内で活性酸素種（ROS）が産生するが，TRX は ROS のスカベンジャーとして働く [51]，またアポトーシスシグナル伝達に関与する apoptosis signal-regulating kinase-1（ASK-1）に TRX は結合することでアポトーシスシグナル伝達を抑制する [52, 53]．

リコンビナント TRX 蛋白投与は虚血肺障害の回復を促進する効果があり [54]，さらに TRX トランスジェニックマウスにおいて虚血脳障害を弱めることが報告されている [55]．TRX を生体内において強発現することで，種々の疾患を治療できる可能性が指摘されている [56]．

Tsutsui らは，Cre-*loxP* システムを用い，ヒト TRX 組換えアデノウイルスを作製し，ラット初代培養肝細胞に導入したところ，抗アポトーシスと抗ネクローシスの効果があることを報告した [24]．本研究においては，ヒト TRX 遺伝子を挿入した組換えアデノウイルス導入によってヒト TRX を強発現することで，CCl_4 を用いた肝傷害における有用性を検討した．

第 2 節　実験方法

第 1 項　ヒト TRX 組換えアデノウイルスの調製

293 細胞にヒト TRX 組換えアデノウイルス（TRX-AdV）を感染させた．アデノウイルスベクター作製方法は第 2 章 2 節 1 項に準じて行った（Fig.17）．TRX-AdV の力価は 1.52×10^{9} pfu / ml であった．

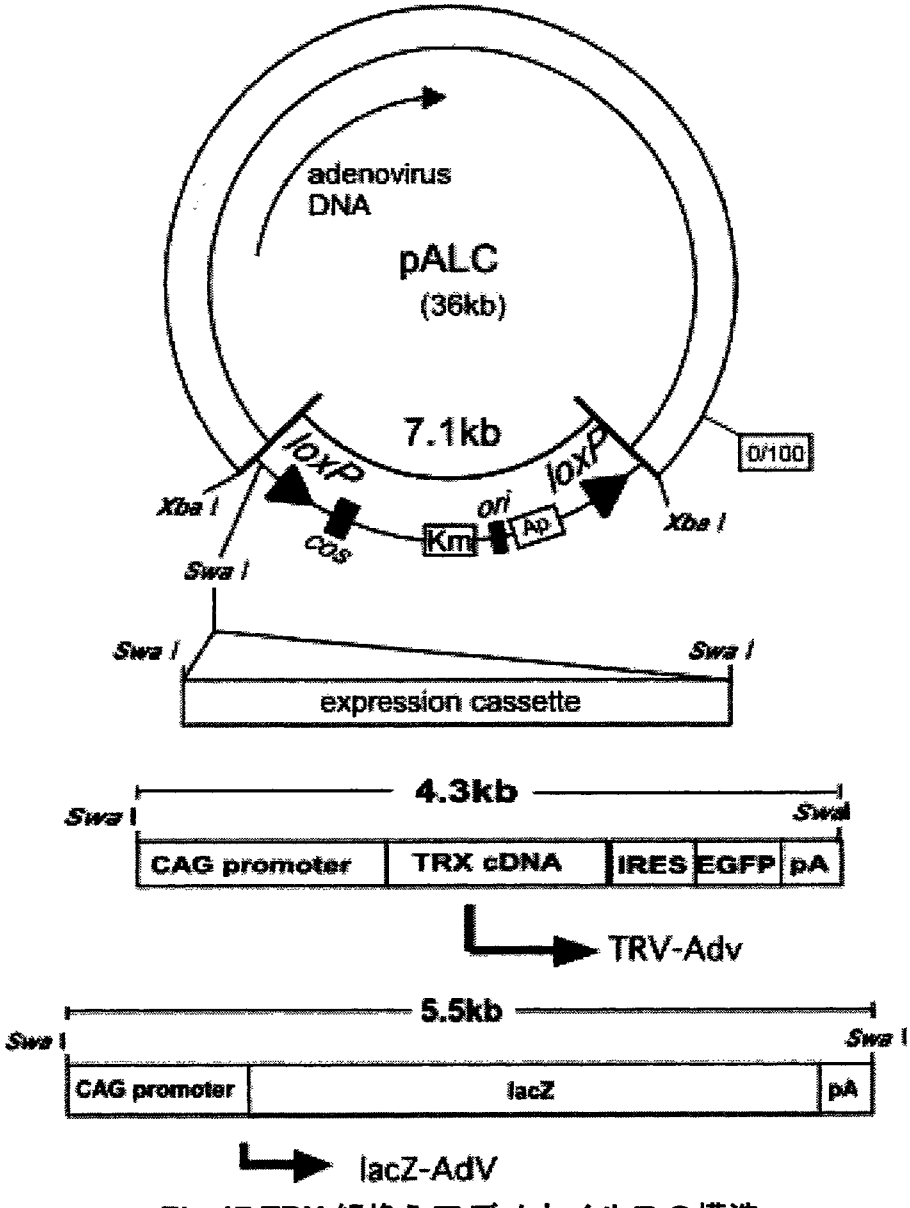


Fig.17 TRX 組換えアデノウイルスの構造

第 2 項　肝細胞傷害モデルの作製（*in vitro*）

第 2 章 2 節 6 項に準じて行った.

第 3 項　TRX-AdV の投与方法

TRX-AdV1.0×10^8 pfu を BALB/c マウス（♂，6w）の腹腔へ投与した．マウス肝臓にある肝細胞を 1.0×10^8 個と仮定し moi1 相当の組換えアデノウイルスを投与した．TRX-AdV 投与 48 時間後に CCl_4 を 1.0 ml/kg を腹腔へ投与した．CCl_4 投与 24 時間後，採血を行い，血清を採取した.

第 4 項　血清中アンモニア濃度測定

血清中のアンモニア濃度は，インドフェノール法を用いて測定した [57].

第 5 項　血清中 ALT，AST 活性の測定

第 2 章 2 節 7 項に準じて行った.

第 6 項　TRX 遺伝子発現の測定

各臓器よりセパゾールを用い total-RNA を抽出した．total-RNA 鋳型としてサーマルサイクラーを用いて RT-PCR を行った．RT-PCR は第 2 章 2 節 5 項に準じて行った．各プライマーの配列は Table 3 に示す．各プライマーのアニーリング温度は 56℃，サイクル数は 30 で行った．

Table 3 RT-PCR に用いたプライマーの配列

Transcript	Sense primer	Anti-sense primer	Size of product
TRX	TCTGACTGACCGCGTTACTC	TCATCCACATCTACTTCAAGGA	210bp
β-actin	CATCCCCCAAAGTTCTAC	CCAAAGCCTTCATACATC	347bp

第 7 項　肝組織像の観察

BALB/c マウスへ TRX-AdV を腹腔より 1×10^8 pfu 投与した．TRX-AdV 感染 48 時間後に 1.0 ml/kg を腹腔へ投与した．CCl_4 投与 24 時間後に脱血と組織固定を行い，肝臓を採取した．採取した肝臓は適当な大きさに切り，Compound (SAKURA) を用い，液体窒素によって凍結させた．凍結肝臓切片は凍結ミクロトーム（Leica）を用いて組織切片（20 μm）を作製し，スライドガラスに移した．スライドガスの組織切片は，真空乾燥後に hematoxylin/eosin（HE）染色を行い，位相差顕微鏡（IMT2-RFC:OLYPUS）を用いて観察を行った．次ぎに，撮影した画像より，photoshop（adobe）と Scion Image（Scion Corporation）を用いて肝臓が障害を受けている割合を算出した．

第 8 項 統計解析方法

第 1 章 2 節 10 項に準じて行った．

第 3 節　結果と考察

第 1 項　肝細胞への TRX 遺伝子導入

採取したラット肝細胞へ TRX-AdV を moi1 で感染させた．TRX-AdV には GFP 遺伝子が組み込まれており，Fig.18 には共焦点レーザー顕微鏡を用いた肝細胞の蛍光像より，感染 24 時間後に GFP の発現が観察された．これによって，TRX は感染 24 時間後に肝細胞で発現することが示唆された．

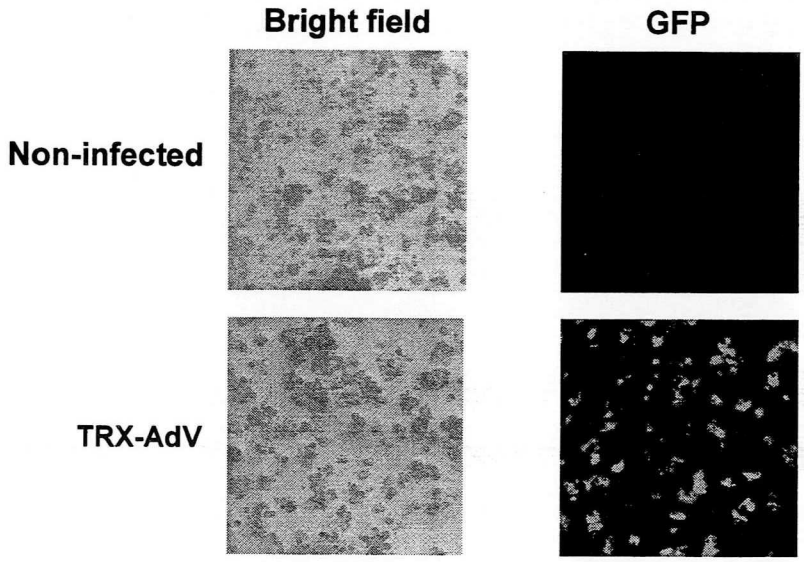


Fig.18. *in vitro* における GFP の発現

TRX-AdV をラット肝細胞に感染させ，24 時間後に GFP を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した．

第 2 項　TRX 遺伝子導入による肝傷害の抑制（*in vitro*）

1）肝細胞 viability への影響

採取したラット肝細胞に TRX-AdV を感染させ，48 時間後に 10 mM CCl_4 を添加した培地と交換した．培地交換 4 時間後に生肝細胞数の測定を行った．Fig.19 に肝細胞数測定の結果を示した．TRX-AdV 感染肝細胞群の肝細胞数は，非感染肝

細胞群と比較し，約 2 倍であった．また，TRX-AdV 感染肝細胞群の肝細胞数は，CCl_4 で障害をしていない TRX-AdV 感染肝細胞群の肝細胞数と，ほぼ同程度であった．このことより，*in vitro* において TRX 遺伝子導入した肝細胞は，CCl_4 による傷害から保護されることが示された．

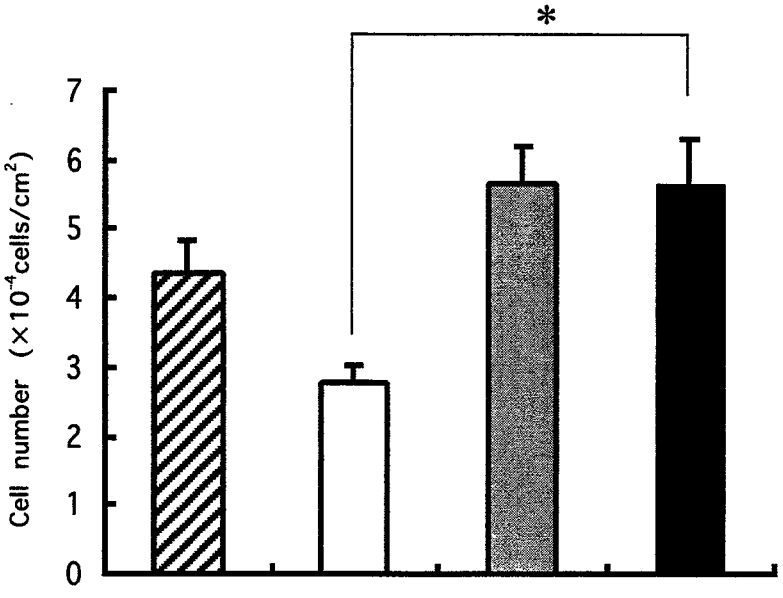


Fig.19. TRX 遺伝子導入によるの肝細胞死に対する抑制効果（*in vitro*）

▨: 感染をしていない通常の肝細胞（CCl_4 非添加），□ ：感染をしていない通常の肝細胞（CCl_4 添加），■ ：TRX 遺伝子導入肝細胞（CCl_4 非添加），■ ：TRX 遺伝子導入肝細胞（CCl_4 添加），肝細胞数はトリパンブルー色素排除法を用い血球計算盤にて測定した．n = 3．＊$p<0.05$

2）肝細胞傷害への効果

上記の CCl_4 による肝細胞傷害時に漏出する培養上清の ALT，AST 活性を測定した．Fig.20 に測定結果を示した．TRX-AdV 感染肝細胞群の ALT，AST は，非感染肝細胞群と比較し，1/2 以下に低下していた．この ALT，AST 活性は傷害を与えていない通常の肝細胞とほぼ同じ活性であった．このことより，TRX は肝細胞内において強発現することにより CCl_4 による傷害を抑制することが示された．

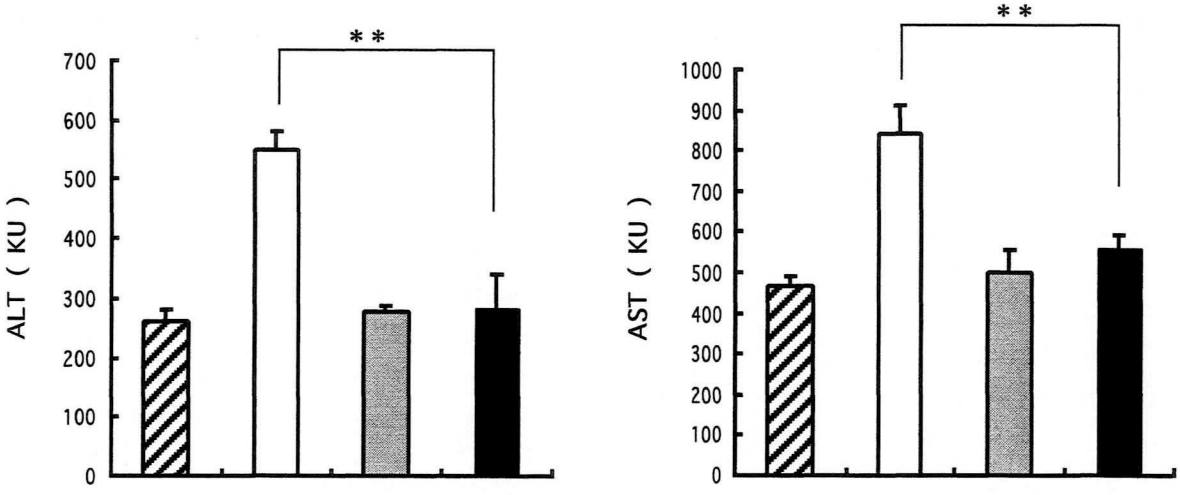


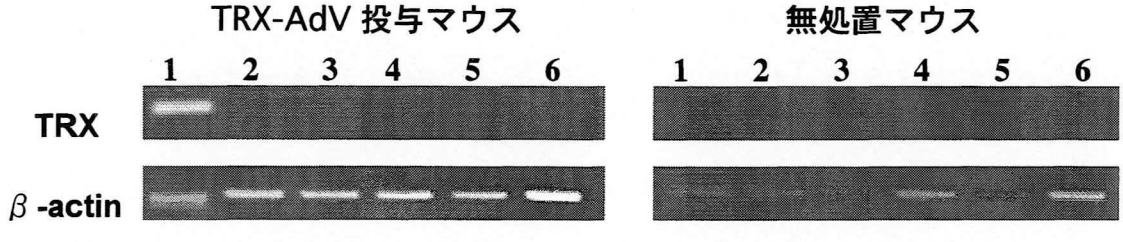
Fig.20. TRX 遺伝子導入によるの肝傷害の抑制（*in vitro*）

TRX 遺伝子導入 48 時間後に $CCl_4$10mM で 4 時間インキュベートし，肝傷害を誘導した．

▨：感染をしていない通常の肝細胞（CCl_4 非添加），□：感染をしていない通常の肝細胞（CCl_4 添加），■：TRX 遺伝子導入肝細胞（CCl_4 非添加），■：TRX 遺伝子導入肝細胞（CCl_4 添加），ALT,AST の活性は培養上清より測定した．n = 3.　＊＊ $p<0.01$

第 3 項　生体内における TRXmRNA の発現分布

TRX-AdV 1×10^8 pfu を BALB/c マウスの腹腔に投与し 48 時間後に，肝臓，心臓，肺，胃，腎臓，小腸を採取した．各臓器から抽出した TotalRNA から RT-PCR を行い TRX の発現を観察した．Fig.21 に結果を示した．肝臓でのみ TRX の発現が観察され，他の臓器では発現していなかった．



1.肝臓，2.小腸，3.心臓，4.腎臓，5.胃 6.肺

Fig.21. 生体内における TRXmRNA の発現

TRX-AdV をマウスへ投与し 48 時間後に mRNA を各臓器より抽出し，RT-PCR を用いて遺伝子発現を観察した．左：TRX-AdV 投与マウス，右：無処置マウス

第 4 項　TRX 遺伝子導入による肝傷害の抑制（*in vivo*）

1）肝傷害への影響

BALB/c マウス（6w / ♂）へ 1 ml/kg CCl_4 を投与した急性肝炎モデルマウスを用いて TRX の *in vivo* での効果の検討をした．TRX-AdV 1×10^8 pfu をマウスの腹腔に投与し 48 時間後に CCl_4 を投与した．CCl_4 投与 24 時間後に採血を行い，血清中より ALT，AST 活性の測定を行った．Fig.22 に測定結果を示した．TRX 投与マウス群の ALT，AST 活性は，非投与マウス群及び LacZ-AdV 投与マウス群と比較し，半分以下に抑制された．TRX がマウス肝臓で発現し，CCl_4 による肝傷害を抑制したことが示された．

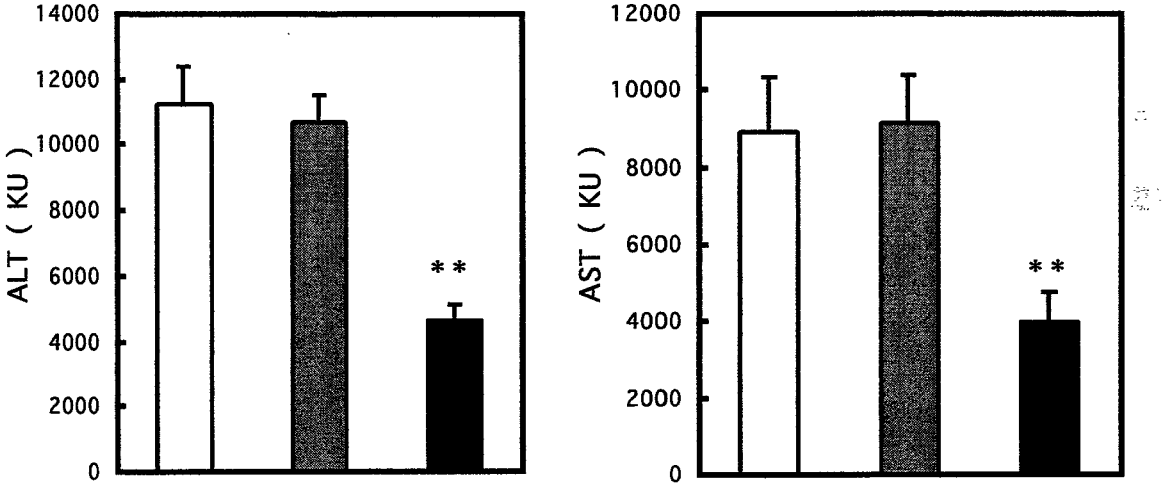


Fig.22. TRX 遺伝子導入による肝傷害の抑制（*in vivo*）

□: 無処置マウス，▒: lacZ 遺伝子導入マウス，■ : TRX 遺伝子導入マウス．TRX-AdV 投与 48 時間後，CCl_4 を投与し，24 時間後に採血をし，血清中より ALT,AST の活性を測定した．n = 4.

＊＊p< 0.01 vs 無処置マウス

2）肝機能への影響

生体の肝機能が傷害されると血液中のアンモニア濃度が上昇し，肝性脳症となり意識不明になる障害を及ぼす [58]．血液中にあるアンモニアや，有毒物質を除去することは劇症肝炎の治療において最も重要であり，現在は血液透析の手法を応用して行われている．そこで TRX が *in vivo* において肝機能に及ぼす影響を検討した．Fig.23 に測定結果を示した．TRX-AdV 投与マウス群のアンモニア濃度は，非投与マウス群及び lacZ-AdV 投与マウス群と比較し，半分以下の値であった．このことより，TRX は CCl_4 による肝傷害の際に肝機能低下を抑制することが示された．

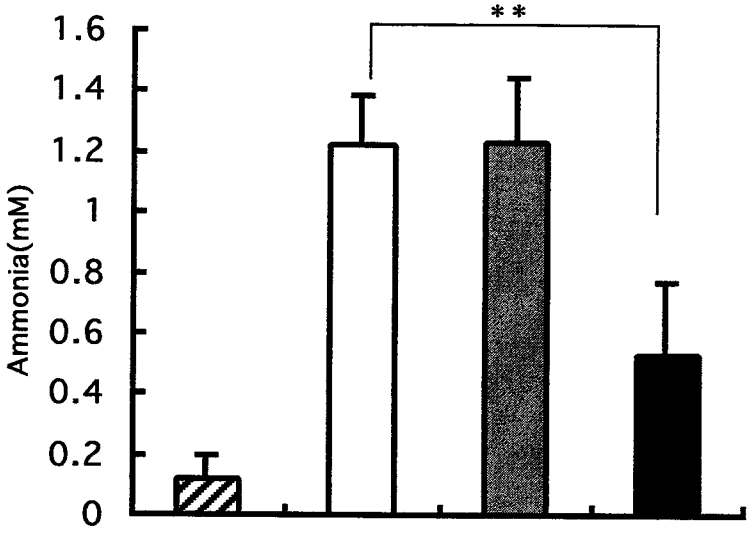


Fig.23. TRX 遺伝子導入による肝機能低下の抑制（*in vivo*）

▨：健常マウス，□：無処置マウス，▩：lacZ 遺伝子導入マウス，■：TRX 遺伝子導入マウス．TRX-AdV 投与 48 時間後，CCl_4 を投与し，CCl_4 投与 24 時間後に採血をし，血清中よりアンモニア濃度をインドフェノール法を用いて測定した．n = 4．＊＊p< 0.01

第 5 項　TRX 遺伝子導入による肝傷害抑制の組織像

無処置マウス群，1.0ml/kg CCl_4 単独投与群，TRX-AdV+CCl_4 投与群からの肝組織像を Fig.24（A～C）に示した．CCl_4 で傷害を与えたマウスは，血管の周りを中心として肝細胞が壊死を起こしていた．TRX-AdV を投与し，CCl_4 で傷害を与えたマウスでは，傷害を受けている像と，傷害を受けていない像が観察された．各組織の切片画像より photoshop と Scion Image を用いて，肝臓が傷害を受けている割合を算出した結果を Fig.24（D）に示した．これより，肝臓は TRX-AdV 投与によって CCl_4 による肝傷害を受ける割合が減少することが示された．

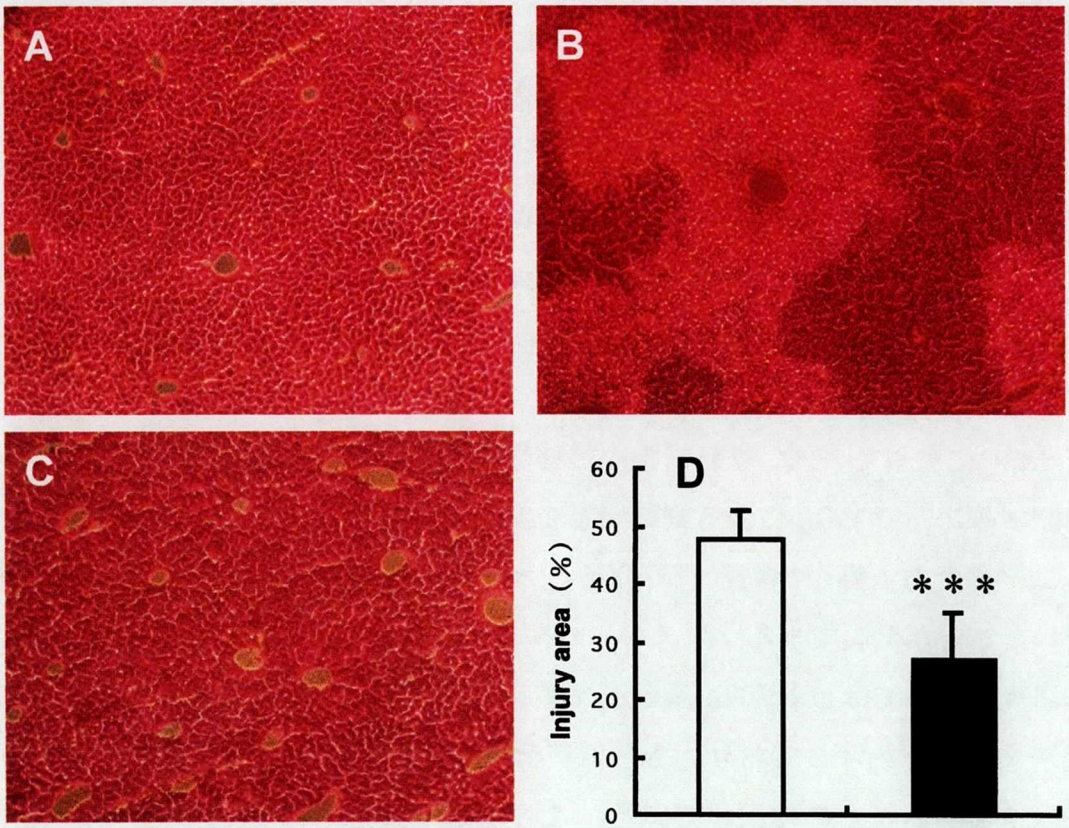


Fig.24. TRX 遺伝子導入による肝傷害抑制の組織像

A：健常マウスの HE 像，**B**：CCl_4 単独投与した無処置マウスの HE 像，**C**：TRX-AdV 投与マウスの HE 像，**D**：肝傷害の割合，□：CCl_4 単独投与群，■：TRX-AdV 投与群 n=3．＊＊＊p<0.005

第4節　小括

本研究は，ヒト TRX をアデノウイルスベクターを用いて肝細胞内で強発現することで，CCl_4 による細胞傷害を抑制することを示した．TRX は，ヒートショック，UV，過酸化水素など様々な刺激やストレスによる細胞死から保護することが報告されている [59]．また，肺虚血傷害などからの回復を促進する効果が報告されている [54]．しかしこれらは，内在性の TRX の効果である．本研究は，アデノウイルスベクターを用いてヒト TRX 遺伝子を形質導入し，TRX を強発現させることで肝傷害を抑制した．TRX と酸化ストレスの関係が最近研究され，TRX に抗酸化作用があり，細胞アポトーシスを抑制する細胞保護効果あることが報告されている [60, 61, 62]．さらに CCl_4 による肝細胞傷害は，活性酸素 reactive oxygen speces（ROS）による細胞アポトーシス誘導と TNF-α によって肝クッパー細胞の活性化であることが報告されている [63, 64, 65]．また，TRX は ASK-1 へ結合することでアポトーシスシグナル伝達を抑制し，ROS のスカベンジャーとして働くことが報告されている [66]．Okuyama らは，TRX トランスジェニックマウスを用いて TRX を強発現すると，アポトーシスシグナルである Caspase の活性を抑制することでチオアセトアミドとリポ多糖体の肝傷害が抑制されたと報告している [67]．これらのことより，TRX-AdV によって TRX を肝細胞内で強発現させることによって，アポトーシスを抑制することで CCl_4 による細胞障害を抑制したと考えられる．さらに，血中アンモニア濃度の上昇が抑制されていることから，生存した肝細胞が肝機能を維持していたことが示唆できる．

本研究においてはヒト TRX 遺伝子がアデノウイルスベクターにより肝臓でのみ強発現することを示しており，さらにアデノウイルスは発現を持続する期間が 2 週間程度であることを確認している．このため，アデノウイルスベクターを用いて TRX を強発現することは，生体に対して障害を及ぼさないために，安全性が高いと考えられる．TRX 遺伝子を用いた遺伝子治療は肝傷害を抑制し，肝臓を保護する効果があることを示した．今後，TRX を用いた遺伝子治療は肝炎進行の際に肝機能低下を抑制する肝庇護療法として有効な遺伝子治療となることが期待できる．

結論

1）骨髄間質細胞は放出する液性因子により肝細胞尿素合成能と肝細胞アルブミン分泌能を高く維持した．これらの骨髄間質細胞による肝細胞機能の維持には，骨髄間質細胞から放出される IL-6 の関与が示唆された．

2）多孔性ヒドロキシアパタイトディスクを用いた，肝細胞と骨髄間質細胞の共移植は，血中のアルブミン濃度を高めた．

3）C/EBP β 遺伝子をアデノウイルスベクターを用い，初代肝細胞に導入することで肝細胞 viability を長期間維持し，肝細胞の増殖能を高め，アポトーシスを抑制した．C/EBP β 遺伝子導入による肝細胞 viability 維持には，COX-2 の関与が示唆された．

4）C/EBP β 遺伝子導入により，CCl_4 による肝細胞傷害が *in vitro*，*in vivo* において抑制された．

5）TRX 遺伝子導入により，CCl_4 による肝細胞傷害が *in vitro*，*in vivo* において抑制された．

6）TRX 遺伝子導入により，CCl_4 による肝機能低下が抑制された．

総括

骨髄細胞中にあり造血幹細胞の分化・増殖を支持する細胞である骨髄間質細胞とラット初代培養肝細胞を多孔性の分離膜を用いて細胞間接触のない共培養をすることで肝細胞尿素合成能と肝細胞アルブミン分泌能を高く維持することができた．さらに，細胞間接触のある混合培養においては肝細胞アルブミン分泌能を高めた．そして，この作用には骨髄間質細胞から放出されるサイトカインである IL-6 が関与していることで示唆できた．また，肝細胞アルブミン分泌能の維持には，IL-6 以外の因子が関わっており，骨髄間質細胞から放出される様々なサイトカインネットワークによって肝細胞機能が維持できることが示唆された．さらに多孔性ヒドロキシアパタイトディスクを足場材料に用い骨髄間質細胞と肝細胞を混合培養し，肝炎マウスへ共移植したところ，共移植したマウスのアルブミン分泌能は肝細胞単独移植と比較して有意に高くなった．これらのことより骨髄間質細胞は肝細胞機能を高める，肝細胞移植において有用な細胞であるこが示された．

肝臓において豊富に存在する転写因子である C/EBPβは，ラット初代培養肝細胞のアポトーシスを抑制し，viability を長期にわたって維持した．肝細胞の viability 維持には，肝切除後に発現が誘導される COX-2 の関与が示唆された．また，C/EBPβ導入ラット初代培養肝細胞は，CCl_4による細胞傷害を抑制することが示された．さらに，CCl_4 によって急性肝傷害を誘導した急性肝傷害マウスへ C/EBPβ-AdV を投与することで，血中の ALT 及び AST の活性は低下した．このことより，C/EBPβ-AdV は障害を受けた肝臓の回復を促進することが示された．これらのことより，転写因子である C/EBPβの遺伝子導入は，肝傷害の際に有効な治療効果があり，急性の肝疾患に対する有効な遺伝子治療になることが期待できる．

細胞内 redox 制御に関与している低分子蛋白である TRX は，初代培養肝細胞のネクローシスとアポトーシスを抑制し，肝細胞 viability を維持する．さらに，TRX はラット初代培養肝細胞において CCl_4による細胞傷害を抑制した．また，TRX-AdV をマウスへ投与したあとに CCl_4 による傷害を与えた急性肝傷害マウスにおいて血中の ALT，AST 活性の抑制，さら血中のアンモニア濃度の上昇が抑制され，HE 染色した肝組織像より肝傷害を抑制することが示された．TRX 遺伝子は *in vivo*

において肝傷害を抑制し，肝細胞機能を維持する肝保護効果があることが示された．これらのことより，TRX 遺伝子は，肝炎進行の際に肝細胞機能低下を抑制する肝庇護療法として有効な遺伝子治療となることが期待できる．

HGF を肝臓で強発現させることによって肝炎・肝硬変モデル動物の病態を寛解し，延命できることが示されている[17,18]．本研究においては，転写因子である C/EBP β遺伝子は急性肝傷害の際に有効な治癒効果のある遺伝子治療として，低分子蛋白である TRX 遺伝子は急性肝傷害の際に肝炎進行と肝機能低下を抑制する肝庇護療法として有効な遺伝子治療であることを示した．従来の研究においては，HGF は悪性腫瘍が発生する可能性が大きいことが指摘されているが，本研究で用いた遺伝子は，悪性腫瘍などを起こす可能性はないと考えられる．C/EBP β遺伝子と TRX 遺伝子は，肝疾患に対して，安全で，かつ有効な遺伝子治療となることが期待できる．

謝辞

本稿を終えるにあたり，終始適切なる御指導，ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科分子薬科学専攻，八木清仁教授に深く感謝いたします.

研究遂行にあたり御助言，御指導を賜りました大阪大学大学院薬学研究科分子薬科学専攻，川瀬雅也助教授，梅田房子技官に厚く御礼申し上げます.

研究遂行にあたり，御助言と実験材料を御供与下さいました，大阪大学大学院医学系研究科，宮崎純一教授，倭英司助教授，田代文助手，大阪大学大学院薬学研究科，中川晋作助教授，大和友子さん，産業総合技術研究所ティシュエンジニアリングセンター，大串始博士に厚く御礼申し上げます.

本論文を審査していただきました，大阪大学大学院薬学研究科，前田正知教授，松田敏夫教授，土井健史教授に深く感謝いたします.

本研究を遂行するにあたり多大なるご協力を頂いた，小島翠学士，一角昌広学士，有田英里学士をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科生体機能分子化学分野の皆様に深く感謝いたします.

参考文献

(1) “国民衛生の動向”，p.53，厚生統計協会編，2001

(2) 織田敏次，肝臓の生物学，東京大学出版会，東京，1990

(3) Shatford RA.et al. J. Surg. Res. 53: 549-557. (1992)

(4) Cuevas C.V.et al. Tranplantation 69 : 337-344 (2000)

(5) Flendrig L.M.et al. Int. J. Artif. Organs. 22 : 701-709. (1999)

(6) Tateno C.et al. Am. J. Pathol. 149 : 1593-1605 (1996)

(7) Yasui O.et al. Hepatology 25 : 329-334 (1997)

(8) Gussoni E.et al. Nature 401 : 390-394 (1999)

(9) Lagasse E.et al. Nature Med. 6 : 1229-1234 (2000)

(10) Jiang Y.et al. Nature 418 : 41-49 (2002)

(11) Gupta S.et al. Hum. Gene Ther. 5 : 959-967 (1994)

(12) Ponder K.P.et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 : 1217-1221 (1991)

(13) Gupta S.et al. Am. J. Physiol. 276 : G629-G638 (1999)

(14) Higashiyama S.et al. J. Biosci. Bioeng. 96 : 83-85 (2003)

(15) Yagi K.et al. J. Ferment. Bioeng. 80 : 575-579 (1995)

(16) Ozawa S.et al. Biomaterials 17 : 23-29 (1996)

(17) Ueki T.et al. Nature Med. 5 : 226-230 (1999)

(18) Matsuno Y.et al. Gene Ther. 10 : 1559-1566 (2003)

(19) Hwang T. E.et al. Life Sci. 72 : 851-861 (2003)

(20) Takayama H.et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 94 : 701-706 (1997)

(21) Descombes P.et al. Gene Dev. 4 : 1541-1551 (1990)

(22) Tanaka T.et al. Cell 80 : 353-361 (1995)

(23) Arner E.S.et al. Eur. J. Biochem. 267 : 6102-6109 (2000)

(24) Tsustui T.et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 307 : 765-770 (2003)

(25) Landry J.et al. J. Cell Biol. 101 : 914-923 (1985)

(26) Funatsu K.et al. Artif. Organs 25 : 194-200 (2001)

(27) Okumoto K. Biochem. Biophys. Res. Commun. 304 : 691-695 (2003)

(28) Seglen PO.et al. Methods Cell Biol. 13 : 29-83 (1976)
(29) Ormsby A.A.et al. J. Biol. Chem. 213 : 595-597 (1942)
(30) Ikebuchi K.et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84 : 9035-9039 (1987)
(31) Minges W.et al. J. Immunol. 169(8) : 4213-4221 (2002)
(32) Xu L.et al. Cancer Res. 61 : 3176-3181 (2001)
(33) Nakamura T.et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 253 : 352-357 (1998)
(34) Li J.et al. Gene Dev. 14 : 464-474 (2000)
(35) Umek RM.et al. Science 251 : 288-292 (1991)
(36) Kaisho T.et al. J. Exp. Med. 190 : 1573-1581 (1999)
(37) Akira S.et al. EMBO. J. 9 : 1897-1906 (1990)
(38) Descombes P.et al. Cell 67 : 569-579 (1991)
(39) Miyake S. et al. Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 91 : 8802-8806 (1994)
(40) Tashiro F.et al. Hum. Gene Ther. 10 : 1845-1852 (1999)
(41) Casado M.et al. FASEB J. 15 : 2016-2018 (2001)
(42) Wadleigh DJ.et al. J. Biol. Chem. 275 : (2000)
(43) Mourelle M.et al. J. Hepatol. 6 : 337-342 (1988)
(44) Mizuoka H.et al. J. Hepatol. 31 : 825-833 (1999)
(45) Mizuguchi H.et al. Throm. Res. 106 : 257-261 (2002)
(46) Skouteris GG.et al. J. Cell Physiol. 135 : 516-520 (1988)
(47) Alemany R.et al. J. Gen. Virol. 81 : 2605-2609 (2000)
(48) Karamouzis MV.et al. Expert Opin. Inv. Drug. 13 : 359-372 (2004)
(49) Martey CA.et al. Am. J. Physiol. Cell Mol. Physiol. 287 : L981-L991 (2004)
(50) Holmgren A.et al. J. Biol. Chem. 264 : 13963-13966 (1989)
(51) Kumuda C.D.et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 277 : 443-447 (2000)
(52) Hatai T.et al. J. Biol. Chem. 275 : 26576-26581 (2000)
(53) Saitoh M.et al. EMBO. J. 17 : 2596-2606 (1998)
(54) Yokomise H.et al. Respiration 61 : 99-104 (1994)
(55) Takagi Y.et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 : 4131-4136 (1999)
(56) Ford S. R.et al. Arch. Biochem. Biophys. 314 : 261-267 (1994)
(57) Hayner NT.et al. J. Tissue. Cult. Methods. 7 : 77-80 (1982)

(58) Haussinger D.et al. Adv. Enzyme. Regul. 25 : 159-180 (1986)
(59) Takagi Y.et al. Ann. Rev. Immunol. 15 : 351-369 (1997)
(60) Andoh T.et al. J. Biol. Chem. 277 : 9655-9660 (2002)
(61) Tobiume K.et al. J. Cell Physiol. 191 : 95-104 (2002)
(62) Tanaka T.et al. EMBO J. 21 : 1695-1703 (2002)
(63) Edwards MJ.et al. Toxicol. Appl. Pharmacology. 119 : 275-279 (1993)
(64) Schumann J.et al. Toxicology 138 : 103-126 (1999)
(65) Taniguchi M.et al. Life Sci. 75 : 1539-1549 (2004)
(66) Zhang R.et al. Circ. Res. 11 : 1483-1491 (2004)
(67) Okuyama H.et al. Hepatology 37 : 1015-1025 (2003)