慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	コラーゲンゲルサンドイッチ法が初代培養肝細胞の機能・分化機構に及ぼす影響
Sub Title	Effects of collagen gel sandwich on functions and differentiation mechanisms in primary cultured hepatocytes
Author	井口, 清香(Inoguchi, Sayaka)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.1 (2004. 3) ,p.49- 60
JaLC DOI	
Abstract	Bioartificial liver is one of the prolnising approaches to expedite recovery of liver failure. In an effort to reconstruct the hepatocyte function and cellular polarity normally found in the liver, adult rat hepatocytes were sandwiched between two layers of hydrated collagen matrix. Functionally, sandwiched hepatocytes maintained the secretion of albumin, the expression of liver specific proteins and the distribution of actin filaments, whereas the cells cultured on single layer of collagen gel decreased the albumin secretion, the liver specific proteins and showed abnormal formation of actin stress fibers and cell spreading. Overlaying asecond layer of collagen gels on the hepatocytes that had been cultured on a single gel reversed the cell spreading, reduced actin stress fibers and recovered the liver specific protein expressions. Bone marrow cells could differentiate into hepatocytes when they co-cultured with primary cultured hepatocytes in collagen gel sandwich indicating that hepatocytes cultured in collagen gel sandwich was functionally good enough to induce differentiation of bone marrow cell into hepatocytes. This evidence clearly suggests that supplying bone marrow cells into biohybrid artificial liver will be able to extend the lifespan of thisdevice.
Notes	原著
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040300-0049

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・81(1)：49～60，2004

原　著

コラーゲンゲルサンドイッチ法が初代培養肝細胞の機能・分化機構に及ぼす影響

慶應義塾大学医学部内科学教室
（指導：石井裕正教授）
井口清香（いのくちさやか）

（平成15年12月4日受付）

ABSTRACT

Effects of collagen gel sandwich on functions and differentiation mechanisms in primary cultured hepatocytes

Sayaka Inokuchi
Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University

Bioartificial liver is one of the promising approaches to expedite recovery of liver failure. In an effort to reconstruct the hepatocyte function and cellular polarity normally found in the liver, adult rat hepatocytes were sandwiched between two layers of hydrated collagen matrix. Functionally, sandwiched hepatocytes maintained the secretion of albumin, the expression of liver specific proteins and the distribution of actin filaments, whereas the cells cultured on single layer of collagen gel decreased the albumin secretion, the liver specific proteins and showed abnormal formation of actin stress fibers and cell spreading. Overlaying a second layer of collagen gels on the hepatocytes that had been cultured on a single gel reversed the cell spreading, reduced actin stress fibers and recovered the liver specific protein expressions. Bone marrow cells could differentiate into hepatocytes when they co-cultured with primary cultured hepatocytes in collagen gel sandwich indicating that hepatocytes cultured in collagen gel sandwich was functionally good enough to induce differentiation of bone marrow cell into hepatocytes. This evidence clearly suggests that supplying bone marrow cells into biohybrid artificial liver will be able to extend the lifespan of this device.

Key Word：collagen gel sandwich configuration, primary cultured hepatocyte, biohybrid artificial liver, hepatic differentiation.

現在わが国において肝硬変患者は約30万人いると推定される．また慢性C型肝炎患者が約200万人存在し，将来的な肝不全予備軍とみなされる．肝硬変はひとたび肝不全に陥ると機能の回復は非常に難しく，根本的な治療法がないのが現状である．現在，末期肝硬変患者の唯一の救命手段は肝移植であるが，C型肝硬変患者は，現在のわが国の深刻なドナー不足の状況から見て，そのほとんどが移植を受けられないと考えられる．そしてこのドナー不足は，今後解消される見込みが極めて低いと言わざるをえない．したがって，多くのC型肝硬変患者は有効な根本的治療を受けることなく，生活の質（quality of life）の低下に苦しんでいる．

肝臓は，肝硬変に陥ると，肝再生がおこらず非可逆的に徐々に肝不全に向かう．再生医学の開発はこの現状を打開する革新的治療法の可能性を持つものとして注目されている．我々は，肝臓を標的とした肝再生医療の実現

と人工肝臓の開発をリンクし，肝不全治療への応用を目指す新たな試みを行った．

一般に人工肝臓と言えば，バイオハイブリッド型人工肝臓（biohybrid artificial liver： BAL）を指し，肝細胞の機能を持つ何らかの細胞を利用するものを言う．この開発において重要な点は，①どのような組織・細胞を肝細胞の機能を代用するものとして用いるか？（細胞ソース）②治療に用いうるだけいかに持続的に長期間機能を維持させられるか？（機能維持）である[1]．細胞ソースとしては，すでに肝細胞としての機能を有している細胞を用いる方法が実用化に向けて先行している[2]．Demetriou A.A らは，ブタ肝細胞を用いた BAL を171名の患者に対し用い，良好な結果を得ている[3]．その他に，ヒト肝芽腫由来 C3A 株を使用したもの[4]，不死化肝細胞を用いたもの[5]，ヒト胎児肝細胞を利用したもの[6]などが検討されている．ブタ肝細胞を用いる方法は，すでに成熟した機能を持つ肝細胞を用いる点，多くの細胞を一度に大量に供給することが可能な点で優れている．しかし，人畜共通感染に関しては大きな問題であることが一般に認知され[7]，今後この問題を解決することが重要になってくると思われる．

肝臓の組織特異的幹細胞は，肝細胞に分化する増殖能の高い細胞である．肝小葉門脈周囲の肝細胞索と小葉間胆管との組織学的な境界である Herring 管やその周辺領域に，卵円形の核を持つという形態学的な特徴から oval cell と名づけられた細胞が存在する[8]．Oval cell は，重篤な肝障害を加えたときに門脈周囲に出現し，可塑性をもつことから注目され，すでに肝細胞[9,10]，胆管細胞[11]，小腸細胞[12]，膵臓細胞[13,14]，神経細胞[15]に分化することが報告されている．また Mitaka らは，初代培養肝細胞の培養中に，通常の成熟肝細胞とは増殖能力の異なる細胞群の存在を見出し，これを小型肝細胞と名づけた[16]．この細胞は増殖能が高く，超微構造的にも機能的にも成熟肝細胞に非常によく似ている．しかし，これら oval cell と小型肝細胞を効率よく大量に採取し，BAL や細胞移植に応用するためには，なんらかのマーカーが必要となるが，今のところ効率よく分離する方法はない．

未分化な細胞を大量に増殖させ，これを肝細胞に分化させて利用する方法がある．これはヒト由来の細胞を利用できる可能性が広がる点で優れている．もともと ES 細胞は，受精卵が分裂して胚盤胞となった際に形成される内部細胞集塊に由来し，この分化全能性を保ったまま樹立された細胞株である[17]．この細胞は，マウスでは LIF（leukemia inhibitory factor）の存在下で，未分化な状態のまま半永久的に増殖し[18]，移植により三胚葉性の分化能が維持されていることを確認できる．現在までに，様々な臓器・組織に特異的に分化誘導する試みが報告されてきた[19,20]．すでにヒト ES 細胞株（human embryonic stem cell）が樹立され[21]応用が始まっており，DMSO（dimethylsulfoxide）[22]や HGF（hepatocyte growth factor）[23]，beta-NGF（beta-nerve growth factor）[24]を培養液に添加することにより，肝細胞へ分化誘導させることができることも報告された．ES 細胞を用いた場合の利点としては ①ES 細胞の操作方法が確立されており多くの研究室で比較的簡単に扱えること ②遺伝子操作を行う技術がマウスで確立されていること ③遺伝子操作により肝細胞への分化を誘導する遺伝子の検索が可能であること などが挙げられる．しかしこのように，ES 細胞には高い可能性があるものの，倫理的問題点は本邦のみならず世界的に大きな問題となっている．さらに，①テラトーマの発生 ②ヒト ES 細胞にはマウス ES 細胞と異なる技術が必要となる可能性 があり，安定した培養法の開発が今後の課題とみなされている．一方，ES 細胞の倫理的問題点を避けるため，骨髄細胞が細胞ソースとして注目されている．最近まで，組織特異的幹細胞が唯一その組織に分化することが出来ると考えられていたが，骨髄細胞が他の臓器の細胞に分化する可能性が発表された[25~28]．骨髄間葉系細胞由来の多能性成体前駆細胞（MAPC：multi-potent adult progenitor cells）は80回程度分裂増殖することが可能であり，採取した後増殖させることにより十分量を得ることが可能で，生体内に移植すると血液細胞，肝臓，肺，腸管上皮細胞に分化することが報告されている[29]．FGF-4（fibroblast growth factor）と HGF（hepatocyte growth factor）の存在下で培養することにより，肝細胞へ分化させることが可能であることも示された[30]．ただし，ES 細胞，骨髄細胞とも，特に *in vitro* では，未分化細胞から肝細胞への分化誘導は可能ではあるが100%ではない．したがって肝細胞にならなかった細胞をどのように処理するか検討する必要がある．

このような観点から，我々は肝臓組織内に近い環境を *in vitro* で作り，肝細胞の機能を長期的に維持させること，未分化細胞を肝細胞へ分化誘導することを考えた．このことは，BAL 開発において重要な点である．肝細胞の機能維持には細胞外マトリックスを利用することが重要である[31]．現在，スフェロイド形成[32]や，マイクロマニピュレーション法による混合培養法[32,33]などが開発されているがいずれも高度の技術が必要であり，一般の研究室での応用は困難である．しかも，これらの方法を

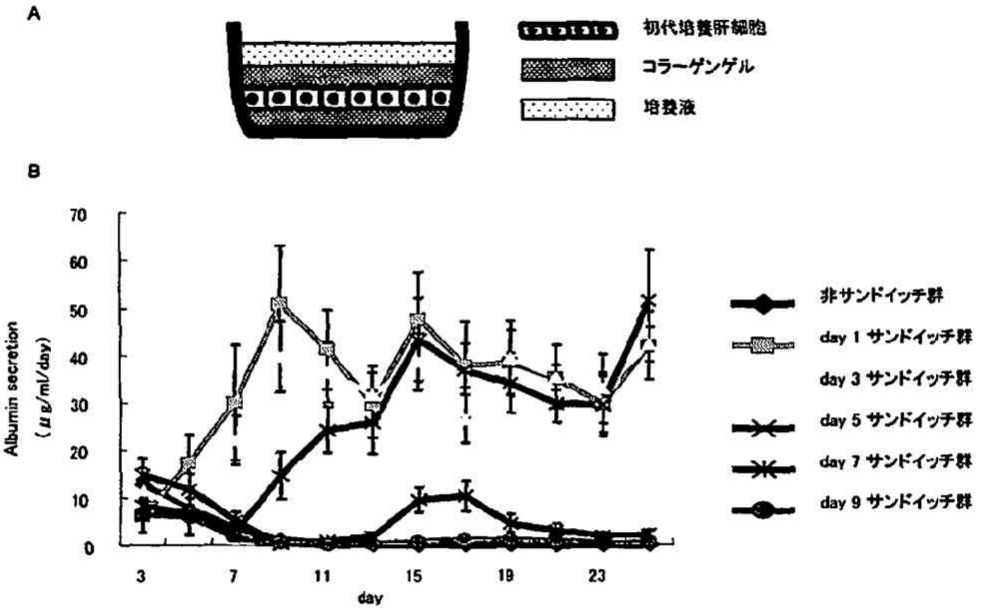
用いても，初代培養肝細胞を維持することが可能なのは1.5ヶ月ほどである．そこで我々は，コラーゲンゲルによるサンドイッチ法を応用した．この方法はYarmushらにより1989年に報告された[34]．コラーゲンは低温状況下，アルカリ性に保つと液体として保存可能であるが，これを初代培養肝細胞培養環境である，37℃の中性にするとゲル化する．この性質を応用することにより，簡便に初代培養肝細胞を1ヶ月間機能保持したまま培養を継続できる．この方法は非常に簡単であり，かつ細胞を通常型顕微鏡で経時的に観察できる利点がある．また，骨髄細胞を，傷害した肝臓に移植した場合，ほぼ2週間で肝細胞にtransdifferentiateしていることから，1ヶ月間肝細胞としての機能を維持して培養出来ることは重要な利点である．初代培養肝細胞が通常の培養環境では機能を継続的に喪失していくことは報告されているが，そのメカニズムについての検討は未だない．肝細胞の機能維持においては，細胞の3次元的構造の理解が重要である[35,36]．肝細胞間の接着にはE-カドヘリンやラディキシンなどの蛋白質が正常に分布し，毛細胆管やその周囲を取り巻く収縮蛋白（アクチン線維）などの構造が保たれることが重要である[37]．そのためには，細胞と基質の接着を担うインテグリンが細胞の上下に正しく分布する必要がある．しかし一般の細胞培養では細胞と基質の接着が下面のみに限局されてしまうため，インテグリンが下面のみに集中してしまい，その結果として細胞全体が平坦化してしまう[38]．そのため肝細胞間接着分子であるE-カドヘリンやラディキシンなどの蛋白質が正常に分布することができず，毛細胆管やその周囲を取り巻く収縮蛋白（アクチン線維）などの構造が形成されなくなり，細胞機能が失われていくと考えられる．この時細胞の上にコラーゲンゲルを重層するとインテグリンの分布が細胞の上面にも分布するため，細胞の立体構造が回復していく可能性が考えられる．

はたして機能を失った肝細胞はコラーゲンを重層することにより再び機能を回復することが出来るのか．また骨髄細胞を肝細胞へ分化誘導する環境を形成することが出来るのか．このことは肝臓としての機能を代用するBALが，肝臓にいかに機能上近づくことが出来るかを測る指標として重要であると考えられる．本研究ではこれらのことを念頭に，コラーゲンゲルサンドイッチ法を用い，肝細胞の分化機構における細胞外マトリックスと肝細胞分化機構との関係を解明し，さらには骨髄細胞から肝細胞への *in vitro* でのtransdifferentiationが可能か否かを明らかにする．

材料と方法

1. 初代培養肝細胞の作成と培養

体重100～120 gのWistar系雄性ラットから，two-step perfusion method（二段階コラゲナーゼ灌流法[39]）を改変した方法で分離した後，Percollを用いた低速遠心法[40]で精製した．すなわち麻酔下にラット門脈に18Gサーフロー針を挿入・留置し，0.2 mM EGTA（ethylene glycol bis（β-aminoethylether 9-N,N,N',N'-tetraacetic acid）（Sigma, St. Louis, USA）を含むHank's balanced salt solution（HBSS）（Sigma, St. Louis, USA）で5 ml/minで4分間灌流し脱血した．次に，酸素化した0.05% コラゲナーゼ（Type I）（Sigma, St. Louis, USA）を含む後灌流液を5 ml/minで20分間灌流した．肝臓を摘出し，HBSS中でハサミとピンセットを用いて細切し，肝細胞を分散した．滅菌したガーゼを4重に重ね濾過後，50 gで3分間遠心した．ペレットをHBSSに分散して24 mlとし，Percoll原液（Amersham Biosciences, Piscataway, USA）21.6 ml，10倍濃度のHBSS 2.4 mlを加えてよく混和し，50 gで15分間遠心した．得たペレットをHBSSで1回洗浄した．トリパンブルー排斥試験にて生存率を確認後，肝細胞培養液（Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）（Sigma, St. Louis, USA）＋10% fetal bovine serum（Invitrogen, Carlsbad, USA）＋7 ng/ml Glucagon G Novo（Novo Nordisk, Bagsvard, Denmark）＋0.5 U/ml Novolin R 100（Novo Nordisk, Bagsvard, Denmark）＋20 ng/ml Natural murine EGF（epidermal growth factor）（Invitrogen, Carlsbad, USA）＋7.5 μg/ml hydrocortisone（Banyu Pharmaceutical, Tokyo, Japan）＋10 mM HEPES（Sigma, St. Louis, USA）＋1% penicillin-streptomycin（Invitrogen, Carlsbad, USA））に懸濁した．培養には，コラーゲンゲル混合液（Cellmatrix Type I-A（Nitta gelatin, Osaka, Japan），7.5% sodium bicarbonate solution（Invitrogen, Carlsbad, USA），10倍濃度のDMEMを8：1：1の割合で混合）を60 mm培養皿に500 μlずつ分注し，37℃で20分間インキュベートして作成したコラーゲンゲルディッシュを用いた．分離・精製した細胞を3×10^5個ずつ撒いて，37℃の5% CO^2気相下にて培養した．培養開始1，3，5，7，9日後に，培養細胞の上に上記と同様にして作成したコラーゲンゲルを重層した（第1-A図）．培養液は培養皿あたり2 mlとし，毎日交換した．



第1図　A：コラーゲンゲルサンドイッチ法．60 mm コラーゲンゲルディッシュに，ラット肝臓から分離・精製した肝細胞を撒いた．しかるべき期間培養後，コラーゲンゲルを重層した．培養液は培養皿あたり 2 ml 用い，毎日交換した．B：コラーゲンゲルサンドイッチ法で培養した初代培養肝細胞のアルブミン産生能．培養液中のアルブミン濃度を ELISA 法で測定した．培養開始5日目までにコラーゲンゲルを重層した場合，重層するまでは減少していたアルブミン濃度が，重層後1週間で培養開始1日目に重層した場合と同程度に達し，その後も維持された．重層しなかった場合は，減少し続け，検出感度以下となった．

2. アルブミン測定

隔日に培養上清を採取し，上清中のアルブミン濃度を ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）法（Nephrat II（Exocell, Philadelphia, USA））を用いて測定した．ELISA プレートに，細胞培養上清 100 μl を加え，続いて HRP（horse radish peroxidase）標識抗ラットアルブミン抗体 100 μl を加えよく混和し，室温で 30 分間反応させた．洗浄バッファーあるいは水道水でプレートを 6 回洗浄後，0.2 mg/ml tetramethyl benzidine（TMB）溶液を 100 μl 加えて 5 分間室温で反応させ，反応停止液（1 M 硫酸）100 μl を加え，ただちに 450 nm の吸光度を測定した．

3. mRNA 測定

培養液を吸引後，0.5% コラゲナーゼ（Type I）1 ml をディッシュに加え，10 分間 37℃で加温しゲルを溶解後，細胞を 50 g で 5 分遠心して，上清を捨て細胞沈渣に Isogen（Nippon gene, Tokyo, Japan）1 ml を加え RNA 抽出液を得た．Isogen RNA 抽出キット（Nippon gene, Tokyo, Japan）のプロトコールに従い，全 RNA を得た．First-strand cDNA の合成には random hexamers, multiscribe reverse transcriptase（Perkin-Elmer, Wellesley, USA）を用いて 25℃ 10 分プライマーと親和させ，次に 48℃ 30 分逆転写反応をさせ，95℃ 5 分処理することにより multiscribe reverse transcriptase を不活性化した．TaqMan PCR 法は TaqMan universal PCR master mix（Applied Biosystems, Foster City, USA）を用いて，5′端に 6-carboxy fluorescein（FAM）ならびに 3′端に 6-carboxy-tetramethyl rhodamine（TAMRA）を標識した TaqMan Probe（250 nM），さらにプライマーペア（900 nM）とともに，ABI PRISM 7700 Sequence Detection System（Applied Biosystems, Foster City, USA）で増幅し測定した．プライマーシークエンスは第1表にまとめて示した．測定値の定量化には rat 18S ribosomal RNA（Applied Biosystems, Foster City, USA）を内部コントロールとして用い（comparative CT method）ABI PRISM 7700 Sequence Detection System の添付文書に基づき TaqMan software（Applied Biosystems, Foster City, USA）を用いて各々

第1表　リアルタイム PCR に用いた TaqMan プローブとプライマーペアー

	TaqMan Probe	Forward primer / Reverse primer	PCR product (bp)
Albumin	TTCCAAAACGCCGTTCTGGTTCGATA	AAGGCACCCCGATTACTCCG	648
		TGCGAAGTCACCCATCACCG	
Bsep	TGGCCCAGCCAGGCATACTTATTATT	TGCTTATGGGAGGCGTAT	564
		GGGCTGACAGCAAGAATC	
TAT	TGCCTCTCCCACCCATTTCCTCG	TACTCAGTTCTGCTGGAGCC	511
		GCAAAGTCTCTAGAGAGGCC	
CYP2E1	TGTTCACACTGCACCTTGGCTCAAGG	AAGCGCTTCGGGCCA	60
		CATGCAGGACCACGATGC	
HNF-4	CAATGACTACATCGTCCCTCGGCACTG	AGGTCCATGGTGTTCAAGGATG	106
		TCGAGGATGCGAATGGACA	
Activin A	CCCAAGGCGGCGCTTCTCAAC	CCCGATGTCACCCAGCC	67
		TTACCCACATGAAGCTTTCTGATC	
β-actin	CTGTGCTGCTCACCGAGGCCC	TGGCCCCTGAGGAGCA	69
		ATCTTTTCACGGTTGGCCTTAG	
Integrin α1	ATCCTCCTGAGCGCCTTCGCG	CAGAGTGCCGCTGTGGGT	73
		GAGCCAATATAAGGAGCATTAGCAG	

の反応における Ct 値を得，18S ribosomal RNA を用いた内部コントロールの Ct 値をサブトラクト（Ct target-Ct 18S ribosomal RNA = Ct.）することにより結果を解析した．

4. ストレスファイバー（Stress fiber：SF）の観察

培養液を吸引した後，氷冷した phosphate buffered saline（PBS）で1回洗浄し，4% パラホルムアルデヒド（Sigma, St. Louis, USA）を加え，5分間固定した．PBS で3回洗浄後，1 μg/ml の FITC 標識 phalloidin（Sigma, St. Louis, USA）溶液を加え，室温で1時間反応後，PBS で3回洗浄し，90% グリセロール/PBS を重層したものを倒立型蛍光顕微鏡（ECLIPSE TE 300）（Nikon, Tokyo, Japan）で観察した．

5. 骨髄細胞の共培養

雌性 EGFP（enhanced green fluorescent protein）トランスジェニックラット（Nippon SLC, Hamamatsu, Japan）の大腿骨・脛骨の両端を切断し，18G の針を差し込み HBSS で押し出した細胞液を 40 μm のセルストレイナー（40 μm Nylon）（BD Bioscineces, San Jose, USA）で濾過し，等量の Ficoll-Paque Plus（Amersham Biosciences, Piscataway, USA）に重層し，18℃ 360 g で 20 分間遠心した．中間層を採取し，HBSS で2回洗浄した．コラーゲンゲル上に初代培養肝細胞を1日間培養した 60 mm ディッシュに，1×10^5 個ずつ撒き，コラーゲンゲルを重層した．培養液は，肝細胞培養液に 20 ng/ml recombinant human FGF-4（fibroblast growth factor-4）（R&D Systems, Minneapolis, USA）と 50 ng/ml recombinant human HGF（hepatocyte growth factor）（R&D Systems, Minneapolis, USA）を加えたものを用い，毎日交換した．

6. 免疫染色

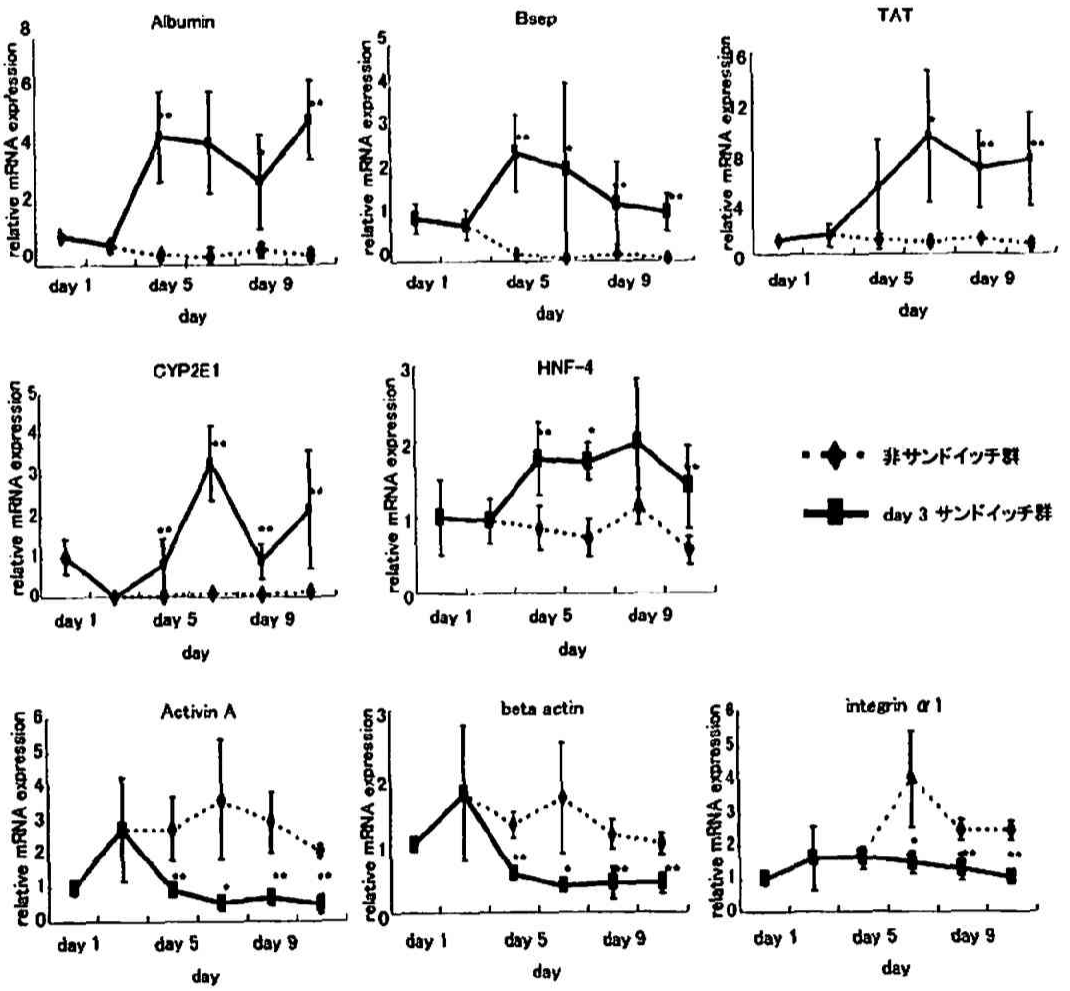
初代培養肝細胞をディッシュで培養後，冷 PBS で3回洗浄し，冷 4% パラホルムアルデヒド（Sigma, St. Louis, USA）で 20 分間固定した．0.2% Triton X-100（Sigma, St. Louis, USA）/PBS に 10 分間浸漬後，3% ウシアルブミン（Sigma, St. Louis, USA）/PBS で室温 30 分間ブロッキングした．100 倍希釈した一次抗体（ウサギ抗ラットアルブミン抗体（ICN biomedicals, Irvine, USA），ニワトリ抗 GFP（green fluorescent

protein）抗体（Chemicon International, Temecula, USA））で室温1時間反応させ，PBSで10分間3回洗浄した．100倍希釈した二次抗体（Cy3標識ヒツジ抗ウサギIgG抗体（Sigma, St. Louis, USA），FITC標識ラビット抗ニワトリIgG抗体（Sigma, St. Louis, USA））で室温1時間反応させ，PBSで10分間3回洗浄し，90%グリセロール/PBSを重層したものを倒立型蛍光顕微鏡（ECLIPSE TE 300）（Nikon, Tokyo, Japan）および共焦点レーザー顕微鏡（LSM510 Ver. 2.02）（Carl Zeiss, Oberkochen, Germany）で観察した

結　果

1. コラーゲンゲルサンドイッチ法

培養条件はこれまでコラーゲンゲルサンドイッチ法による初代培養肝細胞の報告と同じ条件を用いた．肝細胞に特異的な機能解析は，分泌蛋白として，アルブミンの培養上清への分泌量を培養開始後25日間まで測定し，

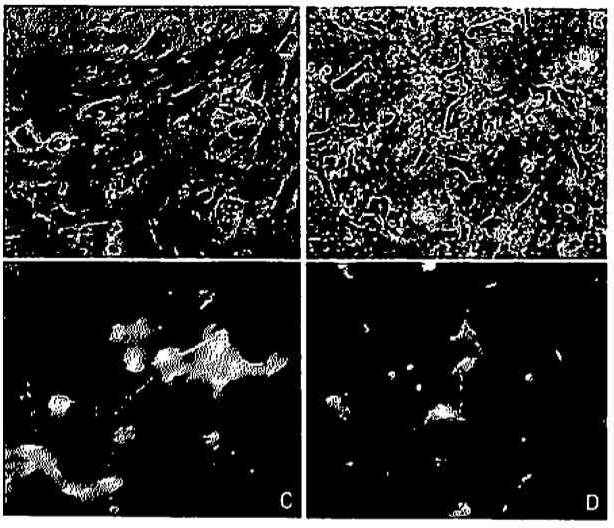


第2図　コラーゲンゲルサンドイッチ法で培養した初代培養肝細胞の肝特異的マーカー等のmRNA量の比較．培養細胞のmRNA発現量をリアルタイムRT-PCRで測定した．各mRNA量は，内部コントロールにラット18S ribosomal RNAを用いて補正し，培養開始1日目の各マーカーのmRNA量に対する比で表した．コラーゲンゲルサンドイッチ群として培養開始3日目にコラーゲンゲルを重層した検体を用い，非コラーゲンサンドイッチ群と比較した．アルブミン，Bile salt export pump（Bsep），TAT（tyrosine aminotransferase），CYP2E1（cytochrome P450IIE1），HNF-4（hepatocyte nuclear factor-4）のmRNAは，コラーゲンゲルサンドイッチ群で発現量が増加，非サンドイッチ群で減少し，明らかな差を認めた．Activin A，β-actin，のmRNA発現量は，非サンドイッチ群で増加，あるいは不変であったのに対し，サンドイッチ群ではどちらも減少した．Integrin α1はサンドイッチ群で減少傾向であったが，非サンドイッチ群では増加した．*<0.05，**<0.01 vs. 非サンドイッチ群（Wilcoxon順位和検定）

その他の重要な肝特異的タンパク質の発現についてはmRNA量をRT-PCR法を用いて測定した．

アルブミンの分泌量は，初代培養肝細胞を単層のコラーゲンゲル上で培養し，コラーゲンゲルを培養開始後3，5，7，9日目に重層した群，重層しない群に分けて，24時間で培養液中に分泌されるアルブミン量を，ELISAで測定した培養液中のアルブミン濃度で比較した．単層のコラーゲンゲル上に培養し続けた群では持続的にアルブミン分泌は低下した．培養開始5日目までにコラーゲンゲルを重層した群では，重層するまでは持続性に減少していたアルブミン分泌がコラーゲンゲルを重層した直後から急速に上昇した．コラーゲンゲルを重層した肝細胞からのアルブミン分泌は，重層後4日目から有意差をもって，単層のコラーゲンゲル上に培養し続けた群より高くなった．コラーゲンゲルを培養開始5日までに重層した場合，重層後7日目に最大分泌量に達しその後も維持され，最大量は培養開始1日目に重層した群と同程度となり維持された．培養開始後7日目に重層した群では，重層後数日して検出レベル以下まで低下していたアルブミン濃度が上昇してくるものの，その最高分泌量は，1日目に重層した場合の1/4程度に留まり再び減少しはじめた．9日目以降に重層した場合，アルブミン産生は回復しなかった（第1-B図）．

アルブミンは肝特異的タンパク質として重要な指標であるが，人工肝臓を目指す上でその他の肝臓機能が保たれているかの検討も重要である．そこでリアルタイムRT-PCRの手法を用い，コラーゲンゲルを培養開始3日目に重層した場合と，重層しなかった場合で，肝特異的マーカーを始めとしたいくつかのmRNA発現量を比較した．内部コントロールとしてラット18S mRNA量を測定して，これとの比として各mRNA量を比較検討した．アルブミンは，重層しなかった検体では，アルブミンのmRNA量は持続的に減少した．一方，3日目に重層した検体では，重層した直後からmRNA発現量の著しい増加が認められ，コラーゲンゲルを重層しなかった肝細胞に比し14.5倍以上の発現量となった．肝細胞分化における後期マーカーと言われるtyrosine aminotransferase（TAT）は，コラーゲンゲルを重層した肝細胞ではコラーゲンゲル重層後4日目には培養開始時の9.3倍の発現量となり，そのレベルが維持された．同様に肝特異的転写調節因子HNF-4（hepatocyte nuclear factor-4）は1.7倍，代謝機能マーカーとしてCYP2E1（cytochrome P450IIE1）は3.3倍，胆汁分泌機構胆汁酸輸送分子であるbile salt export pump（Bsep）は2.1倍であった．一方肝細胞の増殖を抑制し

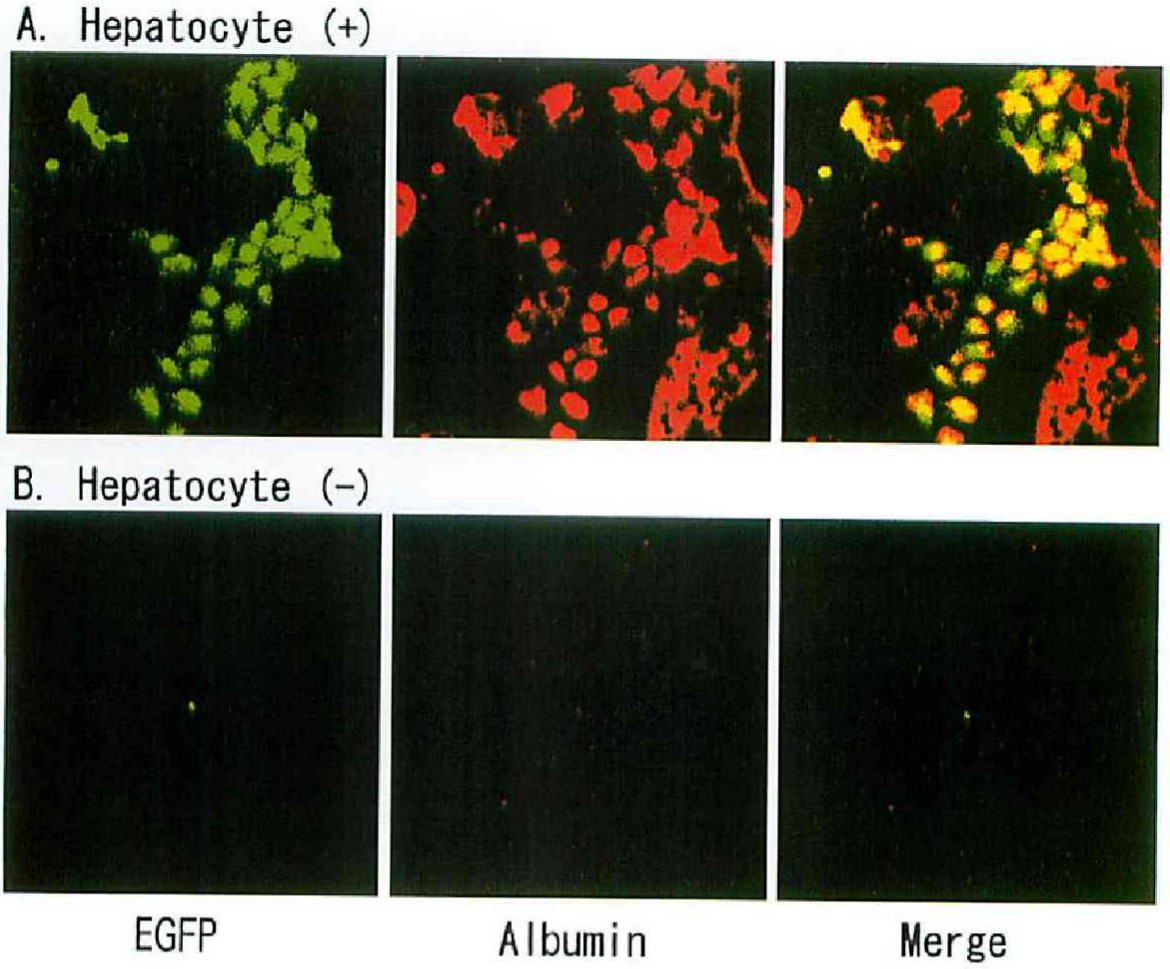


第3図　コラーゲンゲルサンドイッチ法で培養した初代培養肝細胞のアクチン線維分布の比較．培養開始6日目の位相差顕微鏡像（A，B）とFITC-Phalloidin染色後の蛍光顕微鏡像（C，D）．培養開始3日目にコラーゲンゲルサンドイッチした場合（B，D）は，アクチン線維で裏打ちされた毛細胆管（BC）が観察されたが，サンドイッチしなかった場合（A，C）は，細胞は線維芽細胞様になり，細胞内に充満したアクチン線維（ストレスファイバー：SF）が観察された．対物レンズ40倍．

肝線維化を促進する作用が確認されているactivin Aは逆にコラーゲンゲル重層後その発現が減少し重層後4日目には0.5倍に減少した．同様に肝細胞内のβ-actinの発現量も重層後速やかに減少に転じ4日目には0.4倍となった．activin Aおよびβ-actinはいずれも培養開始後いずれもコラーゲンゲル重層するまでの間その発現が増加した．β-actin線維が接着する細胞接着装置において重要な役割を持つintegrin α1ではコラーゲンゲルを重層することにより，発現がやや減少するのに対し，重層しない肝細胞では発現が持続的に増加する（第2図）．形態学的にも初代培養肝細胞は，コラーゲンゲルを重層せずに長期培養すると，線維芽細胞様になり，いわゆるストレスファイバー（stress fiber：SF）とよばれるアクチン線維が細胞内に充満するようになったが，コラーゲンゲルで重層することにより，この形態的変化が抑制された（第3図）．

2．初代培養肝細胞と骨髄細胞の共培養

未分化な細胞は生体肝臓内に移植することで肝細胞へ分化誘導されるので，コラーゲンゲルサンドイッチ法で培養した初代培養肝細胞が，未分化な細胞を肝細胞へ分化誘導できるか否かを検討した．骨髄細胞に含まれる多



第4図　コラーゲンゲルサンドイッチ法を用いた初代培養肝細胞と骨髄細胞の共培養．ラット初代培養肝細胞と，EGFPラット骨髄細胞をコラーゲンゲルサンドイッチ法を用いて2週間培養し，アルブミン染色を行った．GFP陽性細胞のコロニーが多数観察された．骨髄細胞由来のEGFP陽性細胞にアルブミン陽性細胞が観察された（A）．骨髄細胞単独でコラーゲンゲルサンドイッチ法を用いて培養すると，骨髄細胞はほとんど死滅し，残存した細胞にアルブミン発現は認められなかった（B）．対物レンズ40倍．緑：GFP陽性細胞，赤：アルブミン陽性細胞，黄：EGFP・アルブミン陽性細胞．

能性幹細胞から肝細胞へ，*in vitro*で分化を誘導する方法として，HGFを添加する方法，肝細胞と共培養する方法が用いられているが，いずれも肝細胞への分化の確認はRT-PCR法を用いており，その陽性率は比較的低いことが推測される．我々はコラーゲンゲルサンドイッチ法を用いて培養した初代培養肝細胞と骨髄細胞を共培養することにより，どの程度の細胞が肝特異蛋白質であるアルブミンを発現するようになるのかを検討した．

コラーゲンゲルでサンドイッチした初代培養肝細胞とEGFPを発現するトランスジェニックラットから採取した骨髄細胞を共培養すると，2週間GFP陽性の細胞の中に，増殖しコロニーを形成する集団が現れた．また，2週間経過したあとでアルブミンに対する免疫組織化学法を施行したところ，コラーゲンゲルサンドイッチ内で初代培養肝細胞と共培養した骨髄細胞では48.3%が陽性となった．一方，初代培養肝細胞を入れなかったコラーゲンゲルでサンドイッチした骨髄細胞は次第に死滅していき，ほぼ2週間でいくつかの孤立したGFP陽性細胞を認めるのみとなった．このいずれもアルブミン染色で陰性であった．したがって，骨髄細胞は初代培養肝細胞と2週間，共培養することで，肝細胞特異的蛋白質アルブミンを産生するように分化した．また，コラーゲンゲルサンドイッチ法による初代培養肝細胞は骨髄細胞を肝細胞様に分化させる機能を備えていることが確認された（第4図）．

考　案

肝臓は，薬物などの代謝，ビリルビンなどの胆汁中への輸送・排泄，タンパク質の合成といった生命活動にとり，きわめて重要な機能を担っている．そのため肝不全となると，生命活動が維持できず致死的となることが多い．この状態から救うために，血漿交換や生体肝移植が行われているが，高コスト，感染，ドナー不足をはじめとする多くの問題があり，今後これらの方法に頼ることが難しい状況にある．肝臓は旺盛な再生能力を有するという優れた特徴があるが，一度生体外に取り出すと肝細胞としての機能・特徴を急速に失い再生能力も喪失する．この点が成熟肝細胞を再生医療に用いる場合に障害となっている．そこで肝前駆細胞を再生医療に用いる可能性が検討された．現在まで，肝臓内における再生能力の検討から肝臓内には小型肝細胞，oval cell などの増殖性の高い肝前駆細胞が報告された．しかしこれらの単離方法は未確立である．胎児肝から肝前駆細胞を単離する方法が検討され，single cell から肝細胞と胆管上皮細胞の2方向へ分化できることが確認されている[41]．しかし胎児肝の利用は倫理的問題があり実用化は難しいと考えられる．

臨床応用可能な肝臓を生体外で再構成させるためには，肝細胞の増殖と機能維持をいかに長期間可能とするかが最も重要な課題である[42]．この課題の解決に向けた第一歩は，肝細胞やその前駆細胞の培養条件の検討である[43]．肝細胞は生体外に取り出すと比較的早期から線維芽細胞様に形態が変化し機能上も肝細胞としての特質を失う．この変化を防ぐため様々な検討がなされてきた．液性因子の検討から，dexamethazone[44]，EGF（epidermal growth factor）[45]，insulin[38]などが肝細胞の機能維持に重要であることがわかった．また，コラーゲンなどの細胞外マトリックスも細胞の接着性の向上のみならず機能維持の点からも重要であることが確認された[38]．さらに細胞の足場としての構造をより生体に近い環境にする検討がなされた．多くの水を含み柔軟な材質，かつ細胞外マトリックスとしての機能の点からコラーゲンゲルが比較的早くから検討されてきた．コラーゲンゲルを培養基質として再生医療に応用した例もある．線維芽細胞をコラーゲンゲル内で培養するとゲル自体が収縮する．この過程は真皮のモデルとしてバイオ人工皮膚に応用されている[46]．肝細胞培養においては　コラーゲンゲルの硬度を調節することにより機能の維持が変化することが示された．すなわち，ゲルが硬いと細胞はゲル上に張り付き培養皿上での培養と同じに機能が失われるが，柔らかいゲルに細胞を撒くと細胞はゲル内に埋没し肝細胞の機能を維持すると報告された[47]．この過程において，細胞内のアクチン線維の束であるストレスファイバーが硬いゲル上では発達し細胞が扁平化するが，柔らかいゲル内では細胞は凝集し伸展しない．さらには細胞が基質と接着する足場の構造である接着斑が硬い基質では多く見られるようになる．このことは細胞内のシグナル伝達系にも，大きな影響があると考えられる．一方コラーゲンゲル内に埋没した場合この接着斑は大きく変化しない．我々の検討でもインテグリンはコラーゲンゲル上に肝細胞を培養した場合には増加するが，コラーゲンゲルを重層することにより逆に減少することが確認された．

我々は肝臓を生体外に取り出すことにより肝細胞が失った機能が，適当な環境下で培養することにより再び取り戻すことが出来るのか否かという問題について検討した．バイオ人工肝臓：BAL の開発において，Demetriou[3]や Sussman[48]の装置が開発されているが，いずれも薬物代謝能が低く，胆汁酸の排泄機能がなく，長期間の培養により機能が低下していくことが問題であった．また，肝細胞は培養の過程で形態が線維芽細胞化していく．線維芽細胞は一般に間葉系細胞でやや未分化な細胞と考えられている．従って適当な条件におけば肝細胞に分化する可能性がある．もし分化することが出来るならば，それは肝細胞の分化機構の検討にも有用となると考えられる．本研究では，単層のコラーゲンゲル上で肝細胞を培養して肝細胞の機能を失わせてからコラーゲンゲルで重層し機能の変化を観察した．その結果，培養開始から5日目までは肝細胞として機能を回復するがその時期を過ぎたものはコラーゲンゲルの重層のみでは肝細胞の機能を回復することができなかった．また，代謝，蛋白質合成，胆汁酸排泄といった肝細胞の非常に重要な機能はいずれもコラーゲンゲルの単層培養では速やかに失われ，重層することでこれも速やかに回復した．その逆に，細胞骨格特にアクチン線維とこれに結合する接着装置はいずれもコラーゲンゲル単層上での培養では増加し，重層することにより減少した．この事実は細胞外マトリックスとそれを足場にするインテグリンからの情報伝達機構が細胞の形態と機能をリンクさせてコントロールしていることを示唆した．肝細胞骨格と肝細胞機能の関係は肝細胞の特徴的な形態である，毛細胆管の収縮機構の検討において報告されている．M. J. Philips らは毛細胆管周囲のアクチン線維の束を見いだした[49]．これが肝細胞の胆汁分泌機構において重要な役割を果たすこと，このアクチン線維の傷害が胆汁分泌機構のみならず細胞全体の

傷害を引き起こすこと，細胞が障害されること自体が毛細胆管周囲のアクチン線維の傷害を引き起こすことを示した．このことは細胞の機能と細胞骨格が密接につながっていることを示す．以上のことから以下の3点が示唆された．①肝細胞機能は細胞外マトリックスによる情報が非常に重要な役割を果たしている．②肝細胞の形態において細胞内アクチン線維の分布とそれにつながる細胞接着斑の分布が重要でこれが細胞外マトリックスにより調節されている．③肝細胞は細胞外マトリックスが適当でないと脱分化し，しかも非可逆的な変化を来す可能性がある．以上の点から，培養開始5日目以降におこる非可逆的変化において重要な因子の同定ができれば肝細胞の機能維持に重要な因子が解明される可能性があると考えられる．

再生医療に応用する場合，分化した肝細胞を利用することと併行して未分化細胞を利用する方法がある．未分化細胞を移植細胞として応用する検討はすでに心筋の再生においては積極的に行われている[50]．しかし未分化な細胞を一定の方向に分化させる人工的に統合された方法はないのが現状である．いわゆる局所的レベルでの分化誘導は成功例の報告が見られるが，未分化細胞を分化誘導する手法の主流は幹細胞，あるいは前駆細胞を直接標的臓器に注入して周囲の環境にさらすことにより自然に分化誘導する方法である．肝臓の再生においても ES 細胞，骨髄細胞などが応用されて肝細胞への分化が確認されている．しかし臓器への移植することによる分化誘導は未知の力にゆだねる手法で，その機序の解明は難しい．そこで *in vitro* で分化させる方法の確立が求められる．我々は未知の力を *in vitro* で利用することで未分化細胞を分化誘導する方策として，長期の初代培養系を利用した．初代培養系の問題点は長期永続的に培養を続けることが困難である点である．本研究ではコラーゲンゲルで長期に初代培養肝細胞を維持することにより，これと共培養した未分化細胞が肝細胞へ分化することを示した．この事実は，この初代培養系が少なくとも生体内の肝臓に近い機能を有し，未分化細胞を分化誘導する未知の力を持っていることを示している．また，この系が有効に利用されれば，未分化細胞を一定の間隔で補充することにより，永久的に利用できるバイオ人工肝臓が可能になると考えられる．以上の点は人工肝臓構築を目指す上で画期的である．今後，初代培養肝細胞を共培養した未分化細胞がどの程度の肝機能を有しどの程度の期間培養が可能でどの程度増殖する能力を有するかについての検討が必要と思われる．

総　括

コラーゲンゲルサンドイッチ法を用いた初代培養肝細胞の機能，分化誘導能についての検討を行い以下の結果を得た．

1. 単層のコラーゲンゲル上で肝細胞を培養すると，肝細胞は肝特異的機能を失った．

2. 培養開始後一定期間単層コラーゲンゲルで培養した後，コラーゲンゲルで重層し機能の変化を観察すると，培養開始から5日目までは肝細胞として再び機能を回復したが，その時期を過ぎたものはコラーゲンゲルの重層のみでは肝細胞の機能は回復しなかった．

3. 代謝，蛋白質合成，胆汁酸排泄といった肝細胞の非常に重要な機能はいずれもコラーゲンゲルの単層培養では速やかに失なわれ，重層することでこれも速やかに回復した．逆に，細胞骨格特にアクチン線維とこれに結びつく接着装置はいずれもコラーゲンゲル単層上での培養では増加し，重層することにより減少した．

4. コラーゲンゲルサンドイッチ法を応用した肝細胞初代培養系が，少なくとも生体内の肝臓に近い機能を有し，骨髄内未分化細胞を，肝細胞様機能を有した細胞に分化誘導する能力を持っていた．

5. バイオ人工肝臓：BAL に未分化細胞を応用する可能性が示唆された．

以上の結果は肝不全治療法の開発において重要な発見であり，今後も臨床応用において有用である．

本稿を終えるにあたり，ご指導とご校閲を賜った慶應義塾大学医学部内科学教室石井裕正教授に深く感謝いたします．また，本研究に際し，直接ご指導いただいた慶應義塾大学医学部内科学教室東俊文講師，ご協力いただいた研究室員各位に心から感謝いたします．

文　献

1) Strain AJ, Neuberger JM：A bioartificial liver--state of the art. Science 295：1005-1009, 2002
2) Allen JW, Hassanein T, Bhatia SN：Advances in bioartificial liver devices. Hepatology 34：447-455, 2001
3) Hui T, Rozga J, Demetriou AA：Bioartificial liver support. J Hepatobiliary Pancreat Surg 8：1-15, 2001
4) Krasteva N, Harms U, Albrecht W, Seifert B, Hopp M, Altankov G, et al.：Membranes for biohybrid liver

support systems--investigations on hepatocyte attachment, morphology and growth. Biomaterials 23 : 2467-2478, 2002

5) Kobayashi N, Miyazaki M, Fukaya K, Inoue Y, Sakaguchi M, Uemura T, et al. : Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure. Transplantation 69 : 202-207, 2000

6) Uchida N, Fujisaki T, Eaves AC, Eaves CJ : Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34(+) side population (SP)phenotype. J Clin Invest 108 : 1071-1077, 2001

7) Weiss RA : The Leeuwenhoek Lecture 2001. Animal origins of human infectious disease. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 356 : 957-977, 2001

8) Farber E : Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylamino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res 16 : 142-148, 1956

9) Evarts RP, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson SS : *In vivo* differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. Cancer Res 49 : 1541-1547, 1989

10) Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS : A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. Carcinogenesis 8 : 1737-1740, 1987

11) Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK : Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. Hepatology 27 : 433-445, 1998

12) Tatematsu M, Kaku T, Medline A, Farber E : Intestinal metaplasia as a common option of oval cells in relation to cholangiofibrosis in liver of rats exposed to 2-acetylaminofluorene. Lab Invest 52 : 354-362, 1985

13) Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, et al. : In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 8078-8083, 2002

14) Rao MS, Reddy JK : Hepatic transdifferentiation in the pancreas. Semin Cell Biol 6 : 151-156, 1995

15) Deng J, Steindler DA, Laywell ED, Petersen BE : Neural trans-differentiation potential of hepatic oval cells in the neonatal mouse brain. Exp Neurol 182 : 373-382, 2003

16) Mitaka T, Kojima T, Mizuguchi T, Mochizuki Y : Growth and maturation of small hepatocytes isolated from adult rat liver. Biochem Biophys Res Commun 214 : 310-317, 1995

17) Evans MJ, Kaufman MH : Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292 : 154-156, 1981

18) Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, et al. : Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature 336 : 688-690, 1988

19) Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R : The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines : formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol 87 : 27-45, 1985

20) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282 : 1145-1147, 1998

21) Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. : Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc Natl Acad Sci USA 95 : 13726-13731, 1998

22) Draper JS, Pigott C, Thomson JA, Andrews PW : Surface antigens of human embryonic stem cells : changes upon differentiation in culture. J Anat 200 : 249-258, 2002

23) Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, et al. : Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*. FEBS Lett 497 : 15-19, 2001

24) Kuai XL, Cong XQ, Li XL, Xiao SD : Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. Liver Transpl 9 : 1094-1099, 2003

25) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 410 : 701-705, 2001

26) Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM : From marrow to brain : expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science 290 : 1775-1779, 2000

27) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. : Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 284 : 1168-1170, 1999

28) Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. : Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell 105 : 369-377, 2001

29) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418 : 41-49, 2002

30) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. : Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. J Clin Invest 109 : 1291-1302, 2002

31) Nagaki M, Shidoji Y, Yamada Y, Sugiyama A, Tanaka M, Akaike T, et al. : Regulation of hepatic genes and liver transcription factors in rat hepatocytes by extracellular matrix. Biochem Biophys Res Commun 210 : 38-43, 1995

32) Bhatia SN, Toner M, Tompkins RG, Yarmush ML : Selective adhesion of hepatocytes on patterned surfaces. Ann N Y Acad Sci 745 : 187-209, 1994
33) Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M : Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype : cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. Faseb J 13 : 1883-1900, 1999
34) Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG, Tompkins RG : Hepatocyte function and extracellular matrix geom etry : long-term culture in a sandwich configuration. Faseb J 3 : 174-177, 1989
35) Arterburn LM, Zurlo J, Yager JD, Overton RM, Heifetz AH : A morphological study of differentiated hepatocytes *in vitro*. Hepatology 22 : 175-187, 1995
36) Knop E, Bader A, Boker K, Pichlmayr R, Sewing KF : Ultrastructural and functional differentiation of hepatocytes under long-term culture conditions. Anat Rec 242 : 337-349, 1995
37) Tsukita S : Isolation of cell-to-cell adherens junctions from rat liver. J Cell Biol 108 : 31-41, 1989
38) Spence JT, Haars L, Edwards A, Bosch A, Pitot HC : Regulation of gene expression in primary cultures of adult rat hepatocytes on collagen gels. Ann N Y Acad Sci 349 : 99-110, 1980
39) Seglen PO : Preparation of isolated rat liver cells. Methods Cell Biol 13 : 29-83, 1976
40) Kreamer BL, Staecker JL, Sawada N, Sattler GL, Hsia MT, Pitot HC : Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations. In Vitro Cell Dev Biol 22 : 201-211, 1986
41) Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, Kusakabe M, Takada Y, Fukao K, et al. : Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. Hepatology 32 : 1230-1239, 2000
42) Allen JW, Bhatia SN : Improving the next generation of bioartificial liver devices. Semin Cell Dev Biol 13 : 447-454, 2002
43) Flendrig LM, Sommeijer D, Ladiges NC, Te Velde AA, Maas MA, Jorning GG, et al. : Commercially available media for flushing extracorporeal bioartificial liver systems prior to connection to the patient's circulation : an *in vitro* comparative study in two and three dimensional porcine hepatocyte cultures. Int J Artif Organs 21 : 467-472, 1998
44) Schulz WA, Gebhardt R, Mecke D : Dexamethasone restores hormonal inducibility of ornithine decarboxylase in primary cultures of rat hepatocytes. Eur J Biochem 146 : 549-553, 1985
45) Fausto N, Webber EM : Control of liver growth. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 3 : 117-135, 1993
46) Nanchahal J, Otto WR, Dover R, Dhital SK : Cultured composite skin grafts : biological skin equivalents permitting massive expansion. Lancet 2 : 191-193, 1989
47) Semler EJ, Ranucci CS, Moghe PV : Mechanochemical manipulation of hepatocyte aggregation can selectively induce or repress liver-specific function. Biotechnol Bioeng 69 : 359-369, 2000
48) Sussman NL, Gislason GT, Kelly JH : Extracorporeal liver support. Application to fulminant hepatic failure. J Clin Gastroenterol 18 : 320-324, 1994
49) Oshio C, Phillips MJ : Contractility of bile canaliculi : implications for liver function. Science 212 : 1041-1042, 1981
50) Leinwand LA : Hope for a broken heart? Cell 114 : 658-659, 2003