

肝臓幹細胞の多分化能

杉山俊博

秋田大学医学部生化学第一講座

The Multipotential Hepatic Stem Cells

Toshihiro Sugiyama

First Department of Biochemistry,

Akita University School of Medicine, Akita 010-8543, Japan

要旨: 成人の生体には、分化度の異なる状態の幹細胞が存在しており、それらは分化系列子孫を生み出すために非常に異なる分化能を持つ多数の幹細胞が存在している。自己維持のための能力は、全ての幹細胞の基本的で共通の特徴である。大規模な自己維持能力を持つ細胞集団が、全ての幹細胞に適用される唯一の定義である。肝臓システムは、1方向性分化能を持つ肝細胞システムと多分化能を持つ非実質上皮性細胞（胆管）システムという2つの幹細胞システムで組み立てられると考えられる。肝臓腫瘍の発生過程でも、これらの両方のシステムが肝臓内で腫瘍形成過程で先祖細胞を提供していると思われる。本総説では、まず肝臓における幹細胞の起源およびその機能について概説し、次いで最近、我々が分離した幹細胞と非常によく似た卵形細胞についてその特徴を解説する。

Key words: liver, hepatic stem cell, oval cell, hepatic development, hepatocarcinogenesis, hepatic regeneration

I. はじめに

肝臓に幹細胞が存在するかという問題は、古くから論争的になっていた。肝臓の上皮性細胞である主な2つのタイプの細胞、肝実質細胞と胆管上皮細胞、には増殖能があり、少なくとも健康な肝臓において、これら2つの分化した細胞集団から細胞の損傷を補填することができる。成人の肝実質細胞と胆管上皮細胞が増殖するもっとも良い例は、ラットやマウスにおける部分肝切除後に観察されるものである。そこでは、残っている肝小葉中のこれらの細胞が代償性に過形成をおこし、肝臓のかさを元に戻す（図1B）。臨床において多数の肝臓移植が実施されて、それらの成功により、人間の肝臓の再生能力は動物のそれと差がないことが分かった。しかし、成人の肝臓に幹細胞が存在するかどうか未だははっきりしない。肝臓幹細胞については、これまで多数の優れた総説^{1,2)}があり、本稿ではそれらをもとに概説し、最後に我々の最近の研究の一端を紹介する。

自己維持に対する能力は、全ての「幹細胞（stem cell）」の基本的でそして共通の特徴である。「幹細胞」とは、広範な自己維持する能力を所有する細胞集団と定義される³⁾。トランスジェニックマウスを用いた肝細胞移植実験で、肝実質細胞の莫大な増殖能を明らかにした⁴⁾。成熟肝臓は肝実質細胞数を一生涯維持する偉大な能力があるので、「肝実質細胞はまさに幹細胞である。」といえる。

早期に出現する胎児の肝芽細胞が成熟した肝実質細胞と胆管上皮細胞の先祖であるという事実は、肝芽細胞は少なく2方向への分化能力を持った前駆細胞として存在することを示唆する（図2）。そこで、肝芽細胞から由来した細胞系譜、「肝細胞系譜」と「胆管上皮細胞系譜」、のうち一方あるいは両方もが、前駆細胞としての「2方向性分化能」を保持しているかどうかという疑問が生じる。現在のところ成熟肝臓は「1方向性分化能」を有する幹細胞系が複数存在することを示す証拠はない。肝細胞系譜に対して、胆管上皮細胞系譜では、胆管上皮が胆管上皮、肝実質細胞、腸管上皮やおそらく膵臓外分泌腺を含むいくつかの系列に分化することができる（図3）⁵⁻⁸⁾。

A. 肝発生過程 B. 肝部分切除後再生過程 C. 肝傷害後再生過程

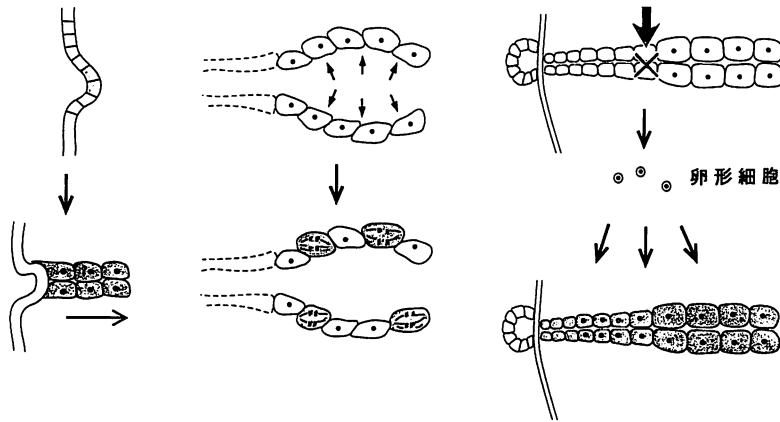


図1. 肝臓の発生・再生過程における肝細胞の起源

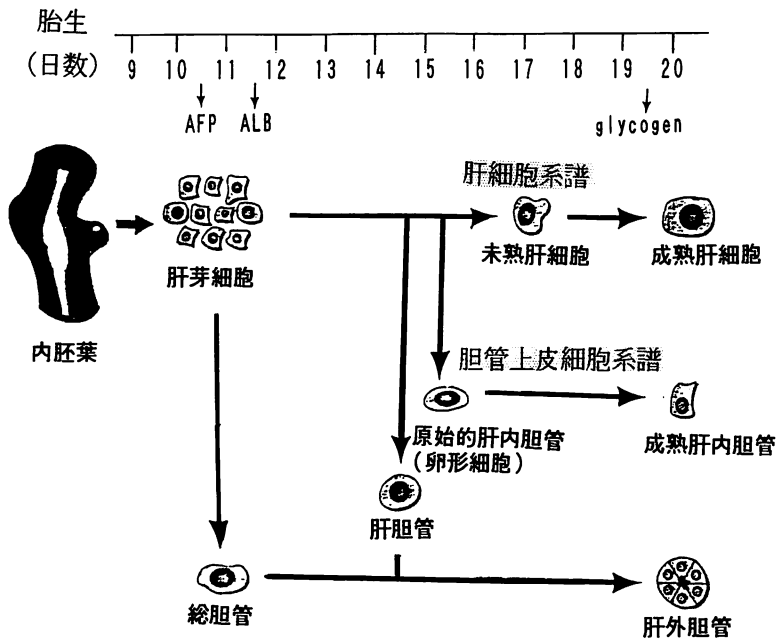


図2. 肝臓の発生過程における細胞系譜

以上のことから、肝臓の幹細胞システムは、1方向性分化能を有する「肝細胞系譜」と多分化能を有する「胆管上皮細胞系譜」から成りたっていると考えられる。

II. 肝臓発生：肝原基，肝細胞と肝内胆管の起源

肝臓は、前腸腹側床の憩室から発生する⁹⁾。内胚葉性細胞から、肝細胞と非実質上皮細胞が発生するが、一

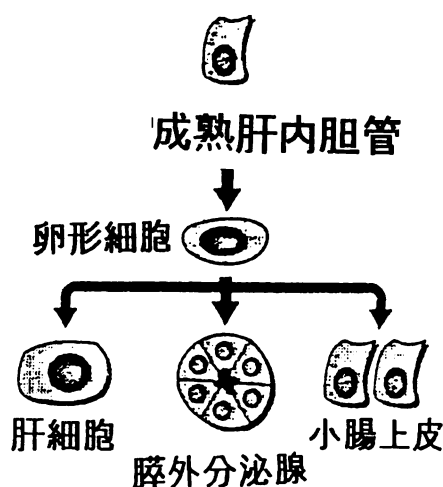


図3. 成熟肝臓における胆管上皮細胞系譜

方、間葉（また、体腔中皮の細胞を含む）から類洞に配列している細胞が発生する¹⁰⁾。前腸憩室からの肝臓の発生は、内胚葉性の細胞とその周囲の中胚葉との相互作用に依存する。発生後期（20 体節）において、すでに肝芽細胞へコミットした肝臓の内胚葉性の細胞の分化は、肝臓の中胚葉と相互作用するかどうかによって依存する^{11,12)}。鳥類の胎児において、肝臓の先祖になるこれらの細胞のコミットメントは、5 体節期に心臓の中胚葉の誘導を必要とする。

図2は、ラット肝臓の発生過程における細胞系譜を示している。発生の10.5日（10～14 体節期）のラットで、肝臓原基は、だいたい100個の細胞からなる腹側前腸の肥厚として認められる。10～17日目のラット肝臓発生において肝細胞索を形成する肝実質細胞は、一般に肝芽細胞と呼ばれる。これらの細胞は、発生18日の肝実質細胞（未熟肝細胞）より幅広い分化能を持っており、成熟肝細胞との共通性はほとんどない。肝芽細胞は、肝臓発生過程で3つの異なる運命をたどる (i) 肝細胞への分化、(ii) 肝内胆管への分化、そして、(iii) 肝外胆管の1部分の形成である。

Shiojiri ら^{13,14)}は、マウス胎児の肝臓原基における α -フェトプロテイン (AFP) とアルブミンの発現について多くの研究を行い、肝内と肝外の胆管形成を解析した。彼らは、免疫蛍光法を用いて、発生9～9.5日にAFPを、10.5～11.5日にAFPとアルブミンを同定した。マウスでは最も初期の肝臓細胞は、AFP陽性、アルブミン陰性であり、コード形成の時点でAFP陽性

アルブミン陽性になる。ラットの発生15.5～18日目にAFP陽性アルブミン陽性肝細胞から形成された原始的な肝内胆管は発生学上卵形細胞に相当することを示唆した¹³⁻¹⁵⁾。

III. 肝臓幹細胞コンパートメント

in vivo 系

肝臓の幹細胞コンパートメントを研究するために最もよく用いられた3つのモデル系は、(1) 0.1%のエチオニン添加あるいは無添加のコリン欠乏食 (CDE) の食餌¹⁶⁾；(2) 2-acetylaminofluorene (AAF) 処理と部分肝切除の併用¹⁷⁾；そして(3) 肝毒性を起こすD-galactosamineの投与¹⁸⁾である。これらすべての実験システムに共通するのは、肝臓実質の大規模な破壊や再生の抑制が起こり、残っている肝実質細胞の代償機能の低下と肝臓容量の減少が引き起こされることである (図1C)。肝臓実質の再生に寄与する幹細胞コンパートメントが十分に活性化されるまでの間、一次的な増殖コンパートメントが肝細胞の再生を代償していることから、Grisham¹⁹⁾はこれを条件的 (facultative) 幹細胞コンパートメントと呼ぶように提案した。これは、上で指摘されるように健康な肝実質細胞は、再生のための膨大な能力を持っており1方向性分化能を有する幹細胞システムとみなされるので、特に重要な概念である。

前述したラットの実験系で共通な細胞応答は、卵形細胞 (oval cell) と呼ばれる、細胞質の乏しい卵形の核を持った胆管周囲の小型細胞の増殖である²⁰⁻²²⁾。人の肝臓においても類似した細胞の存在が報告されている^{23,24)}。これらの卵形細胞が、肝臓の幹細胞コンパートメントの代表的な子孫であると考えられており、またいくつかの例では肝癌の前駆細胞であると考えられている^{7,8,25)}。

正常の肝臓において肝臓の幹細胞コンパートメントの明確な組織学的な場所は今もなおはっきりしないが、現在あるデータから、細胆管とHering管を接続している末端の胆管細胞と、胆管周囲の細胞集団の両方か、あるいはいずれか一方が肝臓の幹細胞を構成しているらしい^{7,8,15,26,27)}。ラット肝臓の研究によれば、卵形細胞が、胆管上皮に加えて、*in vivo* で肝実質細胞^{18,21)}と腸管型上皮¹⁷⁾の少なくとも2つの系列に分化することができることが示された。さらに、培養系で卵形細胞は、肝実質細胞様細胞や胆管型細胞に分化誘導さ

れる^{28,29)}。卵形細胞は肝臓発生の初期に出現する肝芽細胞に似た細胞系譜である事を支持する。このように、卵形細胞は、2つの肝実質細胞系列の「2方向性分化能を有する前駆細胞」とみなすことができる。更に、それらは特に肝臓の微小環境が徹底的に破壊された時にこの系列に分化する能力を発揮する³⁰⁾。

in vitro 系

上で述べた *in vivo* データに加えて、肝細胞培養の研究で得られた結果は肝臓の幹細胞が存在することに対し重要な支持を与えた。いくつかの研究グループは、胎児や成熟ラット肝臓の酵素灌流法と、分化した肝細胞のみを除去できる条件を用いることによって、形態学的にも機能的にも単一な小型の上皮細胞を分離して、長期間の培養を確立することができた³¹⁻³⁴⁾。これらのラット肝臓由来の上皮性 (RLE) 細胞は、胆管上皮細胞と肝細胞の両方の性質を併せ持っているが、形質的には卵形細胞の性質により似ている^{28,35,36)}。

卵形細胞が肝臓の幹細胞からの子孫であるという概念は、また、RLE細胞が卵形細胞に形質が類似していることから、RLE細胞もそのような幹細胞コンパートメントからの子孫であることを示唆する。この推測は、化学発癌物質とがん遺伝子による膨大なRLE細胞を用いた *in vitro* 形質変換の研究データから支持されている。最も重大なことは、形質変換したRLE細胞が、同系のラットかヌードマウスに移植されると、混合型上皮-間葉性腫瘍と同様に、非常に分化した肝細胞癌、肝芽細胞、胆管癌を含む腫瘍が出現する³⁷⁾。これは、RLE細胞は胚芽の性質を保持していることを示唆し、肝細胞と胆管の両方の系列に分化する能力を有していることを示す。しかし、*in vitro* ではRLE細胞は肝細胞や胆管上皮細胞のいずれにも分化できない。

RLE細胞の性質や肝臓幹細胞の分化能力の役割については、Colemanら³⁸⁾によって明かにされた。彼らは、大腸菌β-ガラクトシダーゼ・リポーター遺伝子を組み込んだRLE細胞を肝臓内部に移植し経過を追って観察したところ、RLE細胞は、肝臓のプレートに集積して、成熟した肝細胞と同じ大きさや核構造を持っていた。これらの研究は、卵形細胞とRLE細胞が肝臓の幹細胞コンパートメントからの子孫であるという概念を強く支持する。

IV. 肝臓幹細胞と肝発癌

Farber³⁹⁾は、3種類の化学発癌物質に起因する肝発癌過程で、早期の組織学的変化について詳細に記述して、肝発癌では肝臓非実質上皮細胞が関与している事を明かにした。Farberによって用いられた発癌物質、ethionine, 2-acetylaminofluorene (AAF) や 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (Me-DAB) は、構造的に非常に異なるにもかかわらず同様の組織学的変化を引き起こす。その共通の特徴は、(1) 門脈領域から徐々に肝小葉の大部分の領域に広がる、卵形細胞の増殖、(2) 増殖している卵形細胞に隣接した肝細胞の逆行性過形成の変化、そして (3) 小結節性に再生する肝臓細胞の過形成の3つである。

卵形細胞やRLE細胞が肝細胞癌へ進行できる最も直接的な証拠は、*in vitro* 系でのこれらの細胞の形質転換により得られた。RLEや卵形細胞の自然形質転換により、化学発癌物質やドミナントがん遺伝子による形質転換と同様に高分化肝細胞癌、胆管腫、肝芽〔細胞〕腫や低分化あるいは異形成の腫瘍など様々な表現型を示す腫瘍が発生した^{15,37,40)}。

肝細胞癌の先祖が卵形細胞か胆管細胞かのどちらであることの証拠は、齧歯動物の肝化学発癌の実験的モデルに限らない。末期肝硬変とB型肝炎感染から発生した腫瘍の患者の肝臓には胆管と肝細胞の性質を有する胆管系の「卵形」型細胞が存在することを免疫組織的方法によって証明した^{24,41)}。

V. 正常肝臓の幹細胞

肝臓発生の解析と肝発癌過程での細胞コンパートメントの研究は、正常な成熟肝臓に存在すると思われる肝臓幹細胞の局在やそれらのマーカーのタイプを予測するための基礎的なデータを提供した。発癌過程での卵形細胞コンパートメントの増殖パターンと、発生過程での原始的な肝内胆管の組織形成がもし同じ様式であるとすれば、幹細胞は、肝実質に最も近い胆管セグメントに局在していると予想される。これらのセグメントがHering管で、肝細胞と胆管細胞が一行に並ぶ構造をとり、肝実質細胞と肝外胆管の間を結合する制限プレートを貫通して伸びている⁴²⁾。

正常肝臓の胆管幹細胞は、CK-7, -19のような典型的な胆管細胞マーカーと同様にAFPを発現する。しかし、マーカーの分化と発現の程度は小胆管の間で異

なり、それらの発生学上の起源の時間を反映する。ラットの肝臓発生過程で肝内胆管形成が、15.5日に始まって、生後2週まで続く(図2)^{1,13-15}。

VI. 肝臓ストリーミング説

これまで論議されてきた肝臓幹細胞の概念は、肝臓の発生過程で作用し、発癌過程や激しい肝細胞傷害で活性化される「条件的なコンパートメント」であるという仮定に基づいている。さらに、この同じコンパートメントが正常の肝臓の中で連続的に子孫を産生する可能性がある。肝臓の幹細胞が不可欠に機能しているならば、幹細胞が非増殖性コンパートメントへ分化して最後に死ぬ経過をとる移行細胞を複製し、産生しているような、小腸、皮膚などと同じような器官に分類される。これらのステップの全てが肝小葉で起こるが、再生ステップより非常に速度が遅い。Zajicekら⁴³⁻⁴⁵は、肝細胞は門脈域に隣接する増殖コンパートメントの中で発生し、細胞外マトリックスと非実質細胞とともに次第に小葉の静脈辺縁末端へ移動するという説を提案した(「肝臓ストリーミング説」)(図4)。組織再生と同様に、肝臓小葉が増殖コンパートメントと分化(「機能上の」)コンパートメントに分かれていて、それらのコンパートメントの境界は増殖能力の大きい細胞から構成されていると仮定した。それらが移行細胞になり、完全に分化するために幹細胞コンパートメントから移動し、最後に、中心静脈周辺で年をとるので、肝細胞は段階的に成熟と分化がなければならないことになる⁴³。

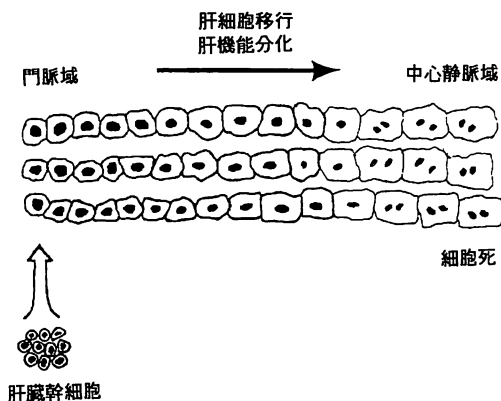


図4. 肝臓ストリーミング説

門脈域に近い所に存在する肝細胞は中心静脈周辺の細胞より高い増殖能力を持つ⁴⁶。さらに、正常の成熟肝臓では中心静脈周辺の領域に向かって肝臓索がゆっくり移動しているように見える⁴³。しかし、これらのことが増殖性コンパートメントと非増殖性のコンパートメントが肝小葉にあることや、門脈周辺から中心静脈周辺に分化の勾配が存在することを意味しない。これらの概念について以下のような問題点がある。(i) 幹細胞組織の存在を否定するものとして、肝小葉の中ではっきり区別された増殖、非増殖性のコンパートメントは、1つも同定できなかった。肝細胞の増殖能力は、位置によってちがうかもしれないが、小葉の細胞全部が増殖できるし、ある種類の傷害では門脈周辺の肝細胞は静止期にあり、中心静脈周辺に近い領域の細胞が複製している⁴⁶⁻⁴⁹。殆ど増殖のない中心静脈周辺に最も近い細胞も、in vivoでも、in vitroでも複製できる⁴⁷。(ii) 肝臓中の増殖コンパートメントと「機能上の」コンパートメントの間の分化能の境界ははっきり区別できない。小葉中の帯状構造は、門脈周辺から中心静脈周辺の領域にわたる一種の代謝の専門化であって、小葉中の機能上の局在性は、細胞が未熟か成熟かのちがいによって生じるのではない。(iii) 細胞ストリーミング説は部分肝切除後の肝臓の再生を説明できない。この肝再生において、実際的には小葉の全細胞が異なるG1間隔で増殖する(図1B)。さらに細胞ストリーミング説では中心静脈周辺の領域の中で細胞消失を必要とする。少なくとも、部分肝切除後の肝再生において、このような特別な増殖性コンパートメントは発見できない。

VII. 非発癌性傷害における卵形細胞増殖

卵形細胞の増殖は、肝細胞が成長刺激に対応できない激しい肝細胞の傷害によって引き起こされると思われる(図1C)。もしそうであれば、この種の傷害は、誘導剤の発癌能力に関係なく、卵形細胞コンパートメントの活性化が起こらなければならない。AFPを発現し、肝発癌の初期に観察される卵形細胞によく似ている胆管細胞が非発癌性の毒作用による傷害で増殖することが明らかにされた^{18,50}。特に、ガラクトサミン投与後出現し、胎児型のAFP mRNAを発現する胆管細胞がその薬剤の注射後3~5日目の肝臓に存在する小型肝細胞の前駆細胞となりうる。

Siricaほか⁵¹)は、彼ら自身の研究と文献的データに

基づいて、過形成の肝内胆管細胞の形質的な特性と卵形細胞コンパートメントの比較をした。彼らは、過形成の胆管が一般に移行性の細胞を含まないことや、非常に激しい傷害が存在する場合だけ、いくらかの肝細胞特性を発現するかもしれないことを示した。Alpiniらによる詳細な研究⁵²⁾は、エチオニン含有コリン欠乏食で飼育したラット肝臓中の非実質上皮細胞にAFPとアルブミンの発現をみた(異型の増殖パターン)が、しかし、胆管結紮した動物や、あるいは、 α -naphthylisothiocyanate を投与されたラットでは発現がない(典型的な胆管炎症)ことを証明した。Lemireら¹⁸⁾は、これらの発見をさらに発展して、ガラクトサミン注射後3~5日目に形態学的に典型的な肝細胞と全く同一の多数の小型肝細胞が実質にあることを明らかにした。ガラクトサミン傷害肝臓のもう一つのめづらしい特徴は、肝細胞と移行細胞とが一列に並んだ小胆管の出現であった。ガラクトサミン傷害で増殖した非実質胆管細胞は、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP)活性と、サイトケラチン(CK)-7, -8, -18と-19で染色された。これらの細胞のサブセットが、68~70 kDa タンパク質と同様に胎児型AFP mRNAを発現した。このように、これらの細胞での両系統マーカーの分布は、肝臓発生過程での原始的な肝内胆管や、発癌過程での卵形細胞コンパートメントで見つけられたそれと全く同一であった。

VIII. LEC ラットからの卵形細胞の分離と *in vivo* での肝細胞への形質転換

Long-Evans Cinnamon (LEC) ラット⁵³⁾は、ウィルソン病疾患遺伝子(ATP7B 遺伝子)⁵⁴⁾を欠損しているので肝臓中に銅を蓄積する。それらは4ヵ月齢の前後で急性肝炎を発症し、そして、生存したラットは自然発生的に慢性肝炎を引き起こし、ほぼ1年後には高い発生率で肝細胞癌と胆管癌を発症する。LEC ラットにおける卵形細胞の出現と特性は、肝発癌物質を与えられたラットで見られる組織像に似ている(図5)。このラットは、ウィルソン病のモデルとしてだけでなく肝発癌のモデルでもある。最近、我々はLECラットから卵形細胞を分離し、それらの特徴を明らかにし、そして長瀬無アルブミン血症ラット/LECラット(NAR/LEC)の肝臓にそれらを移植した。我々の樹立した卵形細胞が *in vivo* で肝細胞に形質転換されて、

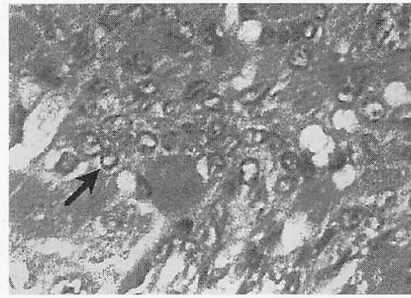


図5. LECラット肝臓のHE染色像。26週齢肝臓には矢印に示した卵形細胞が多数存在する($\times 400$)。

肝臓特異的なタンパク質(アルブミン)を産生することが判明した⁵⁵⁾。

LEC ラットからの卵形細胞の分離

最初にプロテアーゼEで肝細胞を破壊して、Percoll勾配による等密度遠心分離法によって卵形細胞を分離した(図6)。一つのラット肝臓から $3.0 \pm 0.5 \times 10^4$ の細胞を得た。細胞の直径は10-15 μm 、肝細胞の半分以下のサイズであった。分離された大部分の細胞は、 γ -GTP活性を示したが、ペルオキシダーゼ活性は見られ

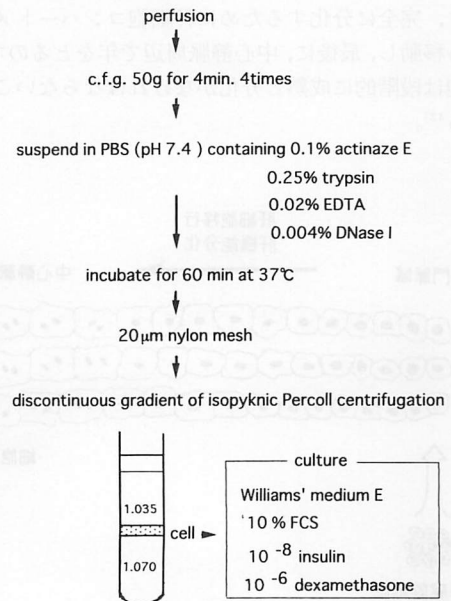


図6. 卵形細胞の分離法

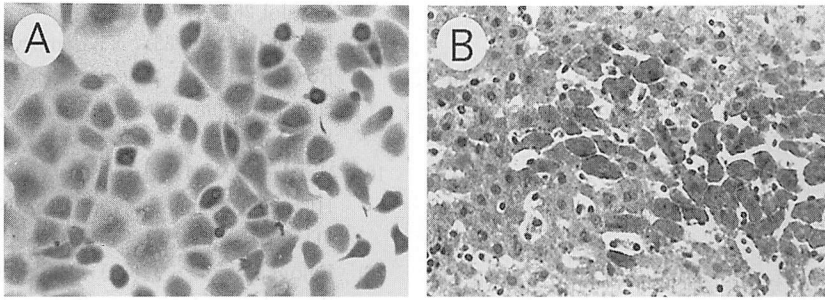


図7. 卵形細胞の培養系での形態と肝臓への細胞移植。A. 培養14日目の卵形細胞の抗サイトケラチン19抗体による染色像(×200)。B. NAR/LEACラット肝臓に卵形細胞を移植した後、14日目の肝臓の抗アルブミン抗体による免疫組織像(×400)。卵形細胞から由来した細胞は、周囲の肝細胞と形態学的には区別が出来ず、しかも抗アルブミン抗体で染色された。

なかった。したがって、これらが卵形細胞であると結論した。培養系で1年以上安定に増殖したが、 γ -GTP活性は、徐々に減少した。

卵形細胞の特性

細胞播種後14日目には、卵形細胞は増殖し玉石状の形態を示した(図7A)。次に、卵形細胞に発現するマーカーを調べた。CK-18は肝細胞と胆管上皮の両方に発現した。CK-19は胆管上皮のマーカーであり、AFPとアルブミンは肝細胞のマーカーである。14日目の卵形細胞はAFP、CK-18、CK-19の抗体で染色されたが(図7A)、アルブミンは染色されなかった。この卵形細胞にアルブミンの発現が欠如していることは、ウェスタンブロットティングとノーザンブロットティングによって確かめられた。

肝臓への卵形細胞の移植

卵形細胞が肝細胞と胆管上皮細胞の両方の特性を持っていたので、それらが肝細胞か胆管に形質転換できるかどうかを検討した。移植された卵形細胞の存在を評価するために、重複突然変異体ラット(NAR/LECラット)を用いた。NAR/LECラットでは、LECラットに由来する移植された細胞は免疫反応による排除がより遅れることが期待できる。また、NAR/LECラットに由来する肝細胞はアルブミン遺伝子欠陥のためにアルブミンを生産できない。そこで、NAR/LECラットの肝臓へ β -ガラクトシダーゼ遺伝子を導入した卵形細胞を移植して、外来性の β -ガラクトシダーゼとアルブミンの産生を調べた。移植されたNAR/LECラットのX-galで染色された肝臓切片を調べて、それらを

抗アルブミン抗体で免疫組織化学染色した。いくつかの領域は抗アルブミン抗体で非常に強く染色された。そして、常にX-galで染色された細胞はアルブミンに陽性であった(図7B)。一連の切片を調べてみても、X-galで染色された胆管は見当たらなかった。これらの結果は、移植された卵形細胞が成熟した肝細胞としてアルブミンを産生することを示した。

我々は卵形細胞をLECラットから分離して、それらを特徴づけた。それらは、形態学的に発癌物質を投与されたラットから分離した卵形細胞のそれとよく似た肝細胞と胆管上皮細胞の両方の特性を持っていた。しかし、我々の卵形細胞はアルブミンを培養初期から産生しなかった。そして、HNF-3 β mRNAだけはin vitroで発現していた。

「卵形細胞」は、肝細胞と胆管に分化できる2方向性の細胞であるとみなされている¹⁵⁾。しかし、我々の卵形細胞株がラットの肝臓にin vivoで移植されたとき、それは肝細胞に形質転換されたが、胆管には形質転換されなかった。我々の卵形細胞株はプロテアーゼE処理で獲得したものであるので、我々の樹立した細胞株が「卵形細胞」の1つの集団である可能性がある。しかし、我々の結果は、以前の研究のそれと同じものである。Colemanらは培養ラット上皮性の幹様細胞(WB-F344)が肝細胞に分化することを報告した³⁸⁾。それらの細胞は、正常肝臓の非肝細胞に由来する。我々の卵形細胞株は肝臓の環境下では肝細胞に分化するようにコミットされていると思われる。

IX. ま と め

これまで述べてきたように、齧歯動物と人の成熟肝臓には、肝細胞と最も小さい胆管セグメントの接合部に局在する幹細胞が存在することはほとんど疑いない。条件的な幹細胞コンパートメントを活性化するメカニズムや前駆細胞から肝細胞への分化を制御するメカニズムを解明することが、より緊急の問題である。これらの研究には初代培養肝細胞や肝細胞の遺伝子操作は高度な技術を必要とする。そして、まだ肝細胞の長期的な培養は不可能である。肝細胞に対して、我々の樹立した卵形細胞は長い間培養することができ、永遠に液体窒素下で保存することができ、しかも肝細胞としていつでも *in vivo* に移植することができる。培養系の肝細胞源として、肝細胞より卵形細胞の方が将来より多く使用されることが期待される。

文 献

- 1) Fausto N. (1994) Liver stem cell. In: The liver biology and pathology. Third ed. Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA (eds.) Raven Press Ltd., New York, pp 1501-1518
- 2) Thorgeirsson SS (1995) Stem cell and hepatocarcinogenesis. In: Liver regeneration and carcinogenesis. Molecular and cellular mechanism. Jirtle RL (ed.) Academic Press, New York, pp 99-112
- 3) Lajtha LG (1979) Stem cell concepts. *Nouv Rev Fr Hematol* **21**: 59-65
- 4) Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL (1994) Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* **263**: 1149-1152
- 5) Thorgeirsson SS (1993) Hepatic stem cells. *Am J Pathol* **142**: 1331-1333
- 6) Fausto N (1990) Oval cells and liver carcinogenesis: An analysis of cell lineages in hepatic tumors using oncogene transfection techniques. *Prog Clin Biol Res* **331**: 325-334
- 7) Sell S (1990) Is there a liver stem cell? *Cancer Res* **50**: 3811-3815
- 8) Sigal SH, Brill S, Reid LM (1992) The liver as a stem cell and lineage system. *Am J Physiol* **263**: G139-G148
- 9) DuBois AM (1963) The embryonic liver. In: Rouiller C (ed.) The liver, morphology, biochemistry, physiology. Academic Press, New York, pp 1-39
- 10) Wilson JW, Groat CS, Leduc EH. (1963) Histogenesis of the liver. *Ann N Y Acad Sci* **111**: 8-24
- 11) Fukuda-Taira S (1981) Hepatic induction in the avian embryo: specificity of reactive endoderm and inductive mesoderm. *J Embryol Exp Morphol* **63**: 111-125
- 12) Gualdi R, Bossard P, Zheng M, Hamada Y, Coleman JR, Zaret KS. (1996) Hepatic specification of the gut endoderm *in vitro*: cell signaling and transcriptional control. *Gene Dev* **10**: 1670-1682
- 13) Shiojiri N (1981) Enzyme- and immunocytochemical analyses of the differentiation of liver cells in the prenatal mouse. *J Embryol Exp Morphol* **62**: 139-152
- 14) Fausto N, Lemire JM, Shiojiri N (1992) Oval cells in liver carcinogenesis: cell lineages in hepatic development and the identification of stem cells in normal liver. In: The role of cell types in hepatocarcinogenesis. Sirica AE (ed.) CRC Press, Boca Raton, pp 89-108
- 15) Fausto N (1990) Hepatocyte differentiation and liver progenitor cells. *Curr Opin Cell Biol* **2**: 1036-1042
- 16) Shinozuka H, Lombardi B, Sell S, Iammarino RM (1978) Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline-deficient diet. *Cancer Res* **38**: 1092-1098
- 17) Tatematsu M, Kaku T, Medline A, Farber E (1985) Intestinal metaplasia as a common option of oval cells in relation to cholangiofibrosis in the livers of rats exposed to 2-acetyl-amino-fluorene. *Lab Invest* **52**: 354-362
- 18) Lemire JM, Shiojiri N, Fausto N (1991) Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* **139**: 535-552
- 19) Grisham JW (1980) Cell types in long-term

- propagable cultures of rat liver. *Ann N Y Acad Sci* **349**: 128-137
- 20) Farber E (1990) Clonal adaptation during carcinogenesis. *Biochem Pharmacol* **39**: 1837-1846
- 21) Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS (1987) A precursor relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* **8**: 1737-1740
- 22) Marceau N (1990) Biology of disease. Cell lineage and differentiation programs in epidermal, urothelial and hepatic tissues and their neoplasms. *Lab Invest* **63**: 4-20
- 23) Gerber MA, Thung SN, Shen SL, Stromeyer FW, Ishak KG (1983) Phenotypic characterization of hepatic proliferation: Antigenic expression of proliferating epithelial cells in fetal liver, massive hepatic necrosis, and nodular transformation of the liver. *Am J Pathol* **110**: 70-74
- 24) Hsia CC, Evarts RP, Nakatsukasa N, Marsden ER, Thorgeirsson SS (1992) Occurrence of oval-type cells in hepatitis B virus-associated human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **16**: 1327-1333
- 25) Hixson DC, Faris RA, Thompson NL (1990) An antigenic portrait of the liver during carcinogenesis. *Pathobiology* **58**: 65-77
- 26) Factor VM, Radaeva SA, Thorgeirsson SS (1994) Origin and fate of oval cells in Dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am J Pathol* **145**: 409-422
- 27) Wilson JW, Leduc EH (1958) Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol* **76**: 441-449
- 28) Hayner NT, Braun L, Yaswen P, Brooks M, Fausto N (1984) Isozyme profiles of oval cells, parenchymal cells, and biliary cells isolated by centrifugal elutriation from normal and preneoplastic livers. *Cancer Res* **44**: 332-338
- 29) Germain L, Noel H, Gourdeau H, Marceau N (1988) Promotion of growth and differentiation of rat ductular oval cells in primary culture. *Cancer Res*: 368-378
- 30) Thorgeirsson SS, Evarts RP (1992) Growth and differentiation of stem cells in adult liver. In: *The Role of Cell Types of Hepatocarcinogenesis*. Sirica AE (ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 100-120
- 31) Grisham JW, Thal SB, Nagel A (1974) Cellular derivation of continuously cultured epithelial cells from normal rat liver. In: *Gene Expression and Carcinogenesis in Cultured Liver*. Gerschenson LE, E. B. Thompson EB (eds.), Academic Press, New York, pp. 1-23
- 32) Furukawa K, Shimada T, England, Mochizuki Y, Williams GM (1987) Enrichment and characterization of clonogenic epithelial cells from adult rat liver and initiation of epithelial cell strains. *In Vitro Cell Dev Biol* **23**: 339-348
- 33) Marceau N, Goyette R, Deschenes J, Valet J-P (1980) Morphological differences between epithelial and fibroblast cells in rat liver cultures and the roles of cell surface fibronectin and cytoskeletal element organization in cell shape. *Ann N Y Acad Sci* **349**: 138-152
- 34) Schaeffer WI (1980) The long term culture of a diploid rat hepatocyte cell strain. *Ann N Y Acad Sci* **349**: 165-182
- 35) Tsao M-S, Smith JD, Nelson KG, Grisham JW (1984) A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of oval cells. *Exp Cell Res* **154**: 38-52
- 36) Marceau N, Germain L, Goyette R, Noel M, Gourdeau H (1986) Cell of origin of distinct cultured rat liver epithelial cells, as typed by cytokeratin and surface component selective expression. *Biochem Cell Biol* **64**: 788-802
- 37) Tsao M-S, Grisham JW (1987) Hepatocarcinomas, cholangiocarcinomas, and hepatoblastomas produced by chemically transformed cultured rat liver epithelial cells. A light- and electron-microscopic analysis. *Am J Pathol* **127**: 168-181
- 38) Coleman WB, Wennerberg AE, Smith GT, Grisham JW (1993) Regulation of the differentiation of diploid and some aneuploid rat liver epithelial (stem like) cells by the hepatic microenvironment. *Am J Pathol* **142**: 1373-1382

- 39) Farber E (1956) Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* **16**: 142-148
- 40) Garfield S, Huber BE, Nagy P, Cordingley MG, Thorgeirsson SS (1988) Neoplastic transformation and lineage switching of rat liver epithelial cells by retrovirus-associated oncogenes. *Mol Carcinog* **1**: 189-195
- 41) Vandersteenhoven AM, Burchette J, Michalopoulos G (1990) Characterization of ductular hepatocytes in end-stage cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med* **114**: 403-406
- 42) Fishback FC (1929) A morphologic study of regeneration of the liver after partial removal. *Arch Pathol* **7**: 955-977
- 43) Zajicek G, Oren R, Weinreb MJ, (1985) The streaming liver. *Liver* **5**: 293-300
- 44) Arber N, Zajicek G, Ariel I (1988) The streaming liver II. Hepatocyte life story. *Liver* **8**: 80-87
- 45) Zajicek G, Ariel I, Arber N (1988) The streaming liver III. Littoral cells accompany the streaming hepatocyte. *Liver* **8**: 213-218
- 46) Rabes H (1976) Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver. *Prog Liver Dis* **5**: 83-99
- 47) Gebhardt R (1992) Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* **53**: 275-354
- 48) Gebhardt R, Jonitza D (1991) Different proliferative responses of periportal and perivenous hepatocytes to EGF. *Biochem Biophys Res Commun* **181**: 1201-1207
- 49) Nostrant TT, Miller DL, Appleman HD, Gumucio JJ (1978) Acinar distribution of liver cell regeneration after selective zonal injury in the rat. *Gastroenterology* **75**: 181-186
- 50) Tournier I, Legres L, Schoevaert D, Feldmann G, Bernuau D (1990) Cellular analysis of α -fetoprotein gene activation during carbon tetrachloride and D-galactosamine-induced acute liver injury in rats. *Lab Invest* **59**: 657-665
- 51) Sirica AE, Mathis GA, Sano N, Elmore LW (1990) Isolation, culture, and transplantation of intrahepatic biliary epithelial cells and oval cells. *Pathobiology* **58**: 44-64
- 52) Alpini G, Aragona E, Dabeva M, Salvi R, Shafritz DA, Tavoloni N (1992) Distribution of albumin and alpha-fetoprotein mRNAs in normal, hyperplastic, and preneoplastic rat liver. *Am J Pathol* **141**: 623-632
- 53) Yoshida MC, Sasaki M, Masuda R (1991) Origin of the LEC strain with a new mutation causing hereditary hepatitis. In: *The LEC rat, a new model for hepatitis and liver cancer*. Mori M, Yoshida MC, Takeichi N, Taniguchi N (eds.) Springer-Verlag, Tokyo, pp 3-10
- 54) Wu J, Forbes JR, Chen HS, Cox DW (1994) The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nat Genet* **7**: 541-545
- 55) Yasui O, Miura N, Terada K, Kawarada Y, Koyama K Sugiyama T (1997) Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes *in vivo* in the rat liver. *Hepatology* **25**: 329-334