説 明

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 75, No. 12, pp. 1267~1274, 2001]

培養肝細胞の機能維持に関する細胞生物学的・分子栄養学的研究[†]

(2001 年度農芸化学奨励賞受賞)

小 田 裕 昭

(名古屋大学大学院生命農学研究科)

Key words: hepatocyte; cell shape; extracellular matrix; HNF-4; molecular nutrition

はじめに

肝臓は代謝の中心的な臓器として、栄養素の代謝、生体に必要な物質の生産、代謝最終産物の処理、有害物質の解毒などを行っている。肝機能として、これらすべてが十分に機能している状態を肝臓が分化表現型を維持している状態であるとみなされる。肝臓の総細胞数の70%を占める肝実質細胞(肝細胞)は、これらの化学反応を短時間に処理する能力をもち、その集合体の肝臓はまさに「生体化学コンビナート」である。肝細胞は高度に分化した臓器であると同時に、あまりにも多くの化学反応を行うため最も専門化していない細胞であるとも言われる。高度に分化しつつ最も専門化していないという一見矛盾した肝細胞の特徴は、肝再生にも見ることがでる。肝細胞を70%切り取り(部分肝切除)、肝細胞が減り急速な増殖が起こっている間でも肝機能を維持し、むしろいつも以上にその機能を高めているような、興味深い臓器でもある。しかしながら肝機能を維持した培養が困難であるため、肝細胞の分化維持機構の詳細な解明やその多機能性を利用するには至っていない。

1. 肝細胞の設計図1(肝臓特異的転写因子)

肝臓に特異的に存在する転写因子を求めていくつかの転写因子がクローニングされたが、現在のところ肝臓にのみ存在する肝臓特異的な転写因子は見つかっていない。クローニングされた転写因子は肝臓以外でも発現が見られることより、正確には肝臓で豊富に存在

する転写因子(liver-enriched transcription factor)であるが、ここでは便宜的に肝臓特異的転写因子と呼ぶ^(1~7)。肝臓特異的転写因子の制御下にある遺伝子は膨大な数にのぼり、肝機能の発現にとって必須な因子であることが示されてきている。肝臓特異的に発現する遺伝子の制御には、複数の肝臓特異的転写因子が複

図1 肝臓特異的転写因子の構造

[†] Molecular Mechanism of Maintenance of Differentiation Functions in Cultured Hepatocytes and Application of the Hepatocytes to Molecular Nutritional Study

Hiroaki ODA (Laboratory of Nutritional Biochemistry, Nagoya University)

表 1 肝臓特異的転写因子

発現臓器		ノックアウトマウスの表現型
HNF-1	肝臓, 小腸, 腎臓 肝臓, 腎臓	HNF-1 α : 肝機能不全, フェニルケトン尿症, ファンconi症候群, 膵インスリン分泌不全 HNF-1 β : 胎生致死
HNF-3	肝臓, 肺 肝臓, 肺 肝臓, 睪丸	HNF-3 α : 低血糖, 生後 2 週間で死亡, 膵グルカゴン低下 HNF-3 β : 胎生致死, 肝臓でのコンディショナルノックアウトマウスは正常 HNF-3 γ : 肝臓特異的遺伝子発現の低下
HNF-4	肝臓, 小腸, 腎臓	胎生致死, 肝臓でのコンディショナルノックアウトマウスにおいて脂質代謝異常
HNF-6	肝臓, 脳, 脾臓	膵内分泌細胞の異常
C/EBP	肝臓, 脂肪組織	C/EBP α : 生後数時間で死亡, 低血糖, 肝臓での脂質・グリコーゲン蓄積の低下, 脂肪組織での脂質蓄積の低下, 高アンモニア血症 C/EBP β : 半数で低血糖, マクロファージの異常
DBP	肝臓	日リズムに関連した行動の変化

図 2 肝臓特異的転写因子ネットワーク (A) とマウス肝臓形成の段階的進行と肝臓特異的転写因子の発現 (B)

合的に作用して肝臓特異性の発現に貢献していると考えられている。肝臓特異的転写因子は大きく 6 つに分類され, その簡単な構造とノックアウトマウスの表現型について簡単にまとめた (図 1, 表 1)。肝臓特異的転写因子ではあるが, 他の組織で発現が見られるため (表 1), また発生のある段階で必須な転写因子の場合もあるため, まだ必ずしも肝臓における特異的な役割が十分理解されたわけではない。どの転写因子も重要であるが, 後述するように私たちは成熟肝細胞において分化表現型を決定する最も重要な転写因子の一つが HNF-4 であることを示してきた。特に脂質代謝の制御において HNF-4 は重要であり, 糖代謝の制御において重要な転写因子は C/EBP α であると考えられる^(8,9)。最近になり, HNF-3 β や HNF-4 α など, その欠損により胎生致死となる遺伝子のコンディショナルノ

ックアウトマウスが作製されたが (肝臓でのみの欠損マウス), HNF-3 β の欠損マウスではほとんど異常は観察されず, 成熟肝細胞における肝機能制御における役割ははっきりとしなくなった⁽¹⁰⁾。一方, HNF-4 α では脂質代謝をはじめとする多くの肝機能に異常が現れ, 成熟肝細胞の肝機能維持に重要な因子であることがわかった⁽⁸⁾。以上のことより肝臓特異的転写因子の中には, 肝形成に重要な因子と肝機能維持に必要な因子あることがわかった。

肝臓特異的転写因子が, お互いに調節しあっている様子を図 2A にまとめてみた。図の矢印の実験的背景はさまざまであるが, 少なくともこれまでクローニングされた肝臓特異的転写因子の中に, カスケードの最上流にいるマスター因子と呼べるほどの因子は見られない。成熟肝細胞における肝機能維持に最も重要であ

る HNF-4 遺伝子のプロモーター解析から、HNF-6 が HNF-4 を制御する因子であることを示した^(11, 12)。さらに、HNF-4 遺伝子発現が C/EBP や STAT, AP-1 などによって制御されることも示してきた。マウスの初期発生の肝臓形成において、肝臓特異的転写因子の遺伝子発現が段階的に始まり、肝臓（もしくは肝臓になる内胚葉）のみを見ると、HNF-3 β →HNF-3 α →HNF-1 β , HNF-3 γ , HNF-4 α , HNF-6→HNF-1 α →C/EBP α →DBP の順序で発現が始まる（図 2B）。実際に肝臓原基ができるときに、HNF-1 β , HNF-3 γ , HNF-4 α , HNF-6 の遺伝子発現スイッチが一斉に入る。

2. 肝細胞の設計図 2（「肝臓特異的オーファン核内受容体」）

肝臓特異的転写因子以外の転写因子も肝機能維持に重要な働きをしており、ステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する甲状腺ホルモン受容体や RXR などが、通常の肝細胞培養では急速に低下してしまい、甲状腺ホルモンに応答しなくなる現象が見られる。後述するように EHS-gel（EHS 肉腫由来再構成基底膜ゲル）上で肝細胞を培養することにより甲状腺ホルモン受容体遺伝子発現ならびに甲状腺ホルモンに対する応答性が回復する⁽¹³⁾。

最近になり、ステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属し、リガンドがはっきりしなかったオーファン核内受容体のリガンドが見つけれられるようになってきた。そして、それらのオーファン核内受容体が肝臓分化表現型にたいへん重要な働きをしていることが明らかとなってきた^(14, 15)。オキシステロールをリガンドとする LXR, 胆汁酸をリガンドとする FXR, ささまざまな薬剤や胆汁酸もリガンドとする PXR/SXR/ PAR などである。また、フェノバルビタールによって誘導される薬物代謝酵素（CYP2B など）の誘導に CAR が重要であることが明らかとなった。胆汁酸合成の律速酵素である CYP7A1 は、コレステロールの過剰により活性化された LXR により誘導される。その産物である胆汁酸が増えると FXR が活性化されて、別のオーファン受容体 SHP-1 を増加させることにより CYP7A1 の転写を抑え、胆汁酸の生成を抑制していることが明らかとなった。PXR や CAR が薬物代謝酵素の誘導において中心的な役割を果たすことがわかってきた。

これらのオーファン核内受容体が、肝臓に豊富に存

在する転写因子であり、「肝臓特異的オーファン核内受容体 (liver-enriched orphan nuclear receptor)」と呼んで良いと思われるほどに肝機能に重要な転写因子である。先に肝臓特異的転写因子が、厳密には特異的ではなく肝臓に豊富な転写因子であると書いたが、この基準からすればこれらのオーファン核内受容体は肝臓特異的 (liver-enriched) といって差し支えない。これらのオーファン核内受容体のノックアウトマウスでは、薬物代謝酵素の誘導や胆汁酸による胆汁酸合成のフィードバック抑制など特定の肝機能のみが失われることから、「肝臓特異的オーファン核内受容体」は、肝臓特異性を決める因子というよりは、むしろ肝臓表現型のファインチューニングを行う転写因子でないかと考えられる。

3. 肝機能を制御するその他の因子

肝臓以外にも広く分布する遍在性因子もまた肝機能に影響を与えることは良く知られている。糖代謝、特に糖新生に重要な因子である cAMP 依存的タンパク質キナーゼの調節サブユニット I α (PKA-RI α) は、肝臓機能を消す因子 (Tse-1) として、遺伝学的手法によって見いだされた⁽¹⁶⁾。同様に糖代謝に重要なグルココルチコイドホルモン受容体を欠損させたマウスでは、肝臓での糖新生系酵素の遺伝子発現の低下が認められている⁽¹⁷⁾。肝形成において肝細胞のアポトーシスを回避させる因子として、NF- κ B や c-Jun が知られるようになり、それぞれを活性化する IKK β (IKK 2) や SEK1/MKK4/JNKK も発生時の肝形成に重要な因子であることがわかってきた⁽⁵⁾。このほかにも多くのタンパク質が肝機能や肝形成に影響を及ぼすことがわかってきているのでそれを表 2 にまとめた。

4. 肝機能を調節する環境因子

肝臓は肝細胞、内皮細胞、星細胞、クッパー細胞、線維芽細胞、ピット細胞により構成され、肝臓としての機能の多くは肝細胞が行っている。形態的に肝臓は肝小葉から成り立ち、門脈から中心静脈に血液が流れている。肝細胞は多面体の立体的な形をしており、また細胞極性を維持しているため細胞膜はベースル・サーフェス、ラテラル・サーフェス、アピカル・サーフェスの三つに分けられる。ベースルサーフェスはディッセ腔の基底膜に近い組成の細胞外マトリクス成分と接し、肝細胞同士はラテラル・サーフェスで接触している。アピカル・サーフェスからは胆汁成分が分泌さ

表2 肝機能・肝形成を制御する因子

転写因子
GR
NF- κ B
c-Jun
Ah 受容体
XBT/HTF
Hex
細胞内情報伝達因子
Tse-1/PKA-R1 α
IKK β /IKK2, NEMO/IKK γ
SEK1/MKK4/JNKK
GSK3
PI-3K p85 α
c-met (HGF 受容体)
EGF 受容体
TNF α 受容体
Fas
液性因子
HGF
Hlx に制御される因子
FGF1,2,8
IL-6
グルココルチコイド
オンコスタチン M
TGF β
その他
mdr2
シスタチオニン- β -シンターゼ
HMG1

れる。つまり、肝細胞は細胞極性を維持して、立体的な形態をもち、肝細胞同士が密に接触し、基底膜成分に近い細胞外マトリクスと接触している。肝臓から取り出した肝細胞は、急速に肝細胞分化表現型を失い、その寿命も極端に短くなることから、肝細胞を取り巻くこれらの微細環境因子が、肝細胞の機能に大きな影響を及ぼしていることは明らかである。

5. 高分化能を維持した肝細胞培養法の改良

肝機能を研究する目的で、多くの肝細胞株が樹立されてきている。樹立肝細胞は、増殖能をもち遺伝子導入の容易さなど多くの利点をもつ反面、多くの肝機能を失っている。また、最も肝臓に近いと考えられている初代培養肝細胞においてすら通常の単層培養法では培養に伴い急速に肝機能を失うなどの問題がある。

これまで、培地や細胞外マトリクスなど初代培養法の改良が行われ、最近では肝細胞を細胞塊で培養する

というスフェロイド培養法（細胞塊として浮遊培養させる培養法）などが開発され成功を収めてきている。私たちは、細胞外マトリクスとして EHS-gel を用いて、無血清・無ホルモン培地で肝細胞を「球形」で培養する方法を採用した。この改良培養法は、無血清にもかかわらず肝細胞の接着がたいへんよく、無血清・無ホルモン培地を用いても 1 週間ほどの培養を行うことができるなど、簡便な操作により高い再現性が得られるなどの利点をもっている。特に、多くの肝機能を高く維持できる点が最も大きな利点として挙げられる。本培養法により培養した肝細胞での肝臓特異的遺伝子発現の維持をまとめると（表 3）^(6, 13, 18~24),

- 1) 糖新生系の酵素は、単層培養では基礎的発現がほとんど見られなくなるのに対し、本培養条件下では高いレベルで維持されていた。
- 2) 血清タンパク質の遺伝子発現は、本培養条件下ではほぼ分離前のレベルを維持した。
- 3) 胆汁酸合成系は、本培養条件下で胆汁酸による負の制御も見られるようになった。
- 4) 単層培養でかなり低下するインスリンや甲状腺ホルモン、成長ホルモンに対する応答性が本培養によって肝臓レベルまで維持された。
- 5) 薬物による薬物代謝酵素系の誘導が高く維持されていた。
- 6) 薬物による脂質代謝の変動も本培養条件下では見ることができた。
- 7) これまで初代培養肝細胞では検出されないと考えられてきた遺伝子発現の一部が、培地に含まれていたホルモンによって抑制されていたためであることが明らかとなった。

本培養法は簡便に高分化肝細胞を培養できる方法であり、以下に述べるように、人為的に分化状態を変化させて肝細胞分化の分子メカニズムを検討したり、栄養素による肝臓での代謝変動の分子機構を解明するに最も実用的な培養法であると考えられる。

6. 肝細胞の機能維持にかかわる分子細胞生物学的検討

本培養法によって維持される肝機能がどのように制御されているのかについて検討を行った。これまで常識であった一培養肝細胞は扁平で敷石状であることが正常である一と異なり本研究で確立した改良培養法では、肝細胞は球状を保ち高い肝機能を維持していた。

表3 肝臓特異的遺伝子発現の比較

	肝臓	I型コラーゲン上の単層肝細胞	EHS-gel上の球状肝細胞
基礎的発現			
Albumin	++++	+	+++
Apo A-I	++++	+	+++++
Apo B	++++	+	+++++
Apo C-III	++++	+	++++
PEPCK	++++	-	+
TAT	++++	+	++
CYP7A1	++++	-	++
Transthyretin	++++	-	++
CDO	++++	-	++
OTC	++++	-	
誘導的発現			
CYP2B1/2B2	++++	-	+++
CYP1A1	++++	+++	+++++
CYP1A2	++++	-	+++
HMG-CoA reductase	++++	-	+++
Malic enzyme	++++	-	+++
転写因子の基礎的発現			
HNF-1 α	++++	++++	++++
HNF-1 β	++++	-	
HNF-3 α	++++	+++++	++++
HNF-3 β	++++	+++++	
HNF-3 γ	++++	++	
HNF-4 α	++++	+	++++
C/EBP α	++++	+	++
C/EBP β	++++	+	++
DBP	++++	+++	+++++
Thyroid hormone receptor β	++++	+	++++

相対的な mRNA 量を表した。++++: 肝臓でのレベルを示す。-: わずかにあるかほとんどないことを示す。

この培養条件のどの因子が重要であるかを検討するため、細胞外マトリクスに焦点をあてさまざまな培養法を用い、肝機能に与える影響の比較検討を行った。EHS-gel上で培養した球状の肝細胞は、肝臓には戻らないまでも肝機能をかなり維持する(表3)。このとき、肝臓特異的転写因子の遺伝子発現を見ると、HNF-4 α 、C/EBP α 、C/EBP β 遺伝子発現が EHS-gel上の肝細胞で高く維持されており、HNF-4 α mRNA量は分離前のレベルを維持していた(表3)⁽¹⁹⁾。これらの転写因子の支配下にある遺伝子は膨大な数にのぼり、これらの肝臓特異的転写因子の維持により肝臓特異的遺伝子発現が高く維持されていることを示した。特に HNF-4 α の mRNA 量や DNA 結合能は肝臓のレベルを維持しており、調べた肝臓特異的転写因子の中で最も重要であることが明らかとなった。そして、

HNF-4が高ければ肝機能が高いという現象を利用して、数多くの遺伝子発現を調べなくても、HNF-4を肝機能マーカーとして用いることができることを示した。一方、HNF-3 α mRNA量は、単層肝細胞で増加し、EHS-gel上の肝細胞では分離前のレベルを維持していた。

さらに細胞外マトリクスについて詳細に検討する目的で、I型コラーゲン、I型コラーゲングル、EHS-gelの主要構成成分であるラミニン、IV型コラーゲンの影響を検討した。これまで、細胞外マトリクスが直接肝機能を制御するという報告は少なく、アルブミン遺伝子発現やチトクローム P-450 のひとつの分子種である CYP2B1/2B2 のフェノバルビタールによる誘導、樹立肝細胞株(H2.35細胞、HepG2細胞)における HNF-3 α 遺伝子発現が報告されている⁽²⁵⁾。しかし、

図 3 肝細胞の形態による肝細胞分化表現型の制御

樹立肝細胞株で見られた I 型コラーゲングルによる HNF-3 α 遺伝子発現の亢進は、初代培養肝細胞で得られた、脱分化に伴い増加する結果と矛盾するものであり、アルブミンについては私たちの実験では変化が見られなかった。

細胞外マトリクスを変化させたとき、肝細胞に起こる最も明らかな変化として細胞形態の変化がある。I 型コラーゲン上で培養した肝細胞は、扁平な単層になり、EHS-gel 上で培養した肝細胞は分離直後の丸い形態を示す。Ingber のグループは最初に形態と肝機能について報告し、細胞接着面積（つまり広ければ単層になり、狭ければ立体的になる）と肝機能が逆相関の関係にあることを報告した⁽²⁶⁾。私たちも、細胞外マトリクスを変化させることにより、肝細胞にさまざまな細胞形態をとらせ肝機能を調べたところ、立体的な丸い細胞ほど機能が低いことを見いだした⁽⁶⁾。このときに肝細胞の形態と HNF-4 α 遺伝子発現にははっきりとした関係が見られ、細胞が球形になれば HNF-4 α 遺伝子発現が亢進されていた。インテグリンを介さない細胞外基質である PVLA により肝細胞を球形にした場合でも肝機能は高く、HNF-4 α 遺伝子発現は高く保たれていた。特定の細胞外マトリクスを用いない場合でも、またスフェロイドの場合でも、肝細胞は立体的になり、肝機能や HNF-4 α mRNA は高く維持されていた⁽⁶⁾。さらに、細胞外マトリクスを変えず細胞形態を変えた実験でも、肝機能や HNF-4 α は立体的な肝細胞で高く、私たちは肝細胞の形態そのものが HNF-4 α 遺伝子発現を介し肝臓分化表現型を調節していることを明らかにした。つまり、「肝細胞の形態が肝細胞の分化を制御する」という、細胞生物学的に新しい概念を実験的に示してこれを提唱することに成功した（図 3）。肝細胞の形態による HNF-4 α 遺伝子発現調節機構の分子メカニズムはまだ十分わかっていないが、微小管を介して細胞形態の情報が HNF-4 α 遺伝子に伝

図 4 肝細胞の形態から HNF-4 α 遺伝子までの細胞内情報伝達機構

わることがわかった。また、微小管を介する情報伝達には新たなタンパク合成を必要としないことが明らかとなり、既存の調節因子の活性化が核内に伝えられることが推測された（図 4）。

7. 栄養学研究・代謝研究への応用

本研究で改良した簡便で高肝機能を維持した培養肝細胞を、栄養学研究や代謝研究への応用を試みた。本培養法によって初めて十分な発現と正常な制御が見られるようになった肝臓特異的遺伝子をパラメーターとして用いて、栄養素や食品などの食環境因子を培養肝細胞でスクリーニングしてから、その結果を個体に還元する、これまでとは逆方向の「逆栄養学」ともいえる、新しい栄養学的方法を試みた。1) グリシンにより、胆汁酸合成の律速酵素であるコレステロール 7 α 水酸化酵素 (CYP7A1) の遺伝子発現が誘導されることが認められ、ラットにおいても CYP7A1 遺伝子発現の誘導作用や血漿コレステロール濃度低下作用があることが確認された。2) 薬物代謝酵素を誘導するフェノバルビタールが、糖新生の律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 遺伝子発現を抑制することを明らかにして、糖尿病ラットにおいても PEPCK 遺伝子発現の抑制と血糖値低下作用を示すことを明らかにした。3) 高密度リポタンパク質の主要アポリポタンパク質であるアポリポタンパク質 A-I の遺伝子発現が、cAMP で抑制されることを認め、ラット個体においても cAMP が増加する食餌条件下で抑制されることを示した⁽²⁷⁾。

8. ヒト肝細胞研究への応用

ここで改良された培養法によって得られた高機能を有する肝細胞は、カラムに詰めて肝細胞の多機能性を利用できるようになることが期待される。その候補として、ハイブリッド型のバイオ人工肝臓が挙げられる。ヒト肝細胞株を実験材料として利用した研究は膨大な数にのぼるものの、細胞外マトリクスの影響の検討や、3次元培養法をヒト肝細胞に用い、臨床応用を目指した基礎研究はほとんどない。永森のグループは、ヒトヘパトーマ FLC-4 細胞、FLC-7 細胞を使った3次元培養により、肝機能を亢進させたことを報告している^(28, 29)。このときリアクターとしてラジアルフロー型バイオリアクターを用い、立体化させた肝細胞をコンパクトにリアクターに詰め込み、肝機能の亢進に成功している。そこで、私たちは細胞の立体化にตอบสนองして肝機能を亢進する細胞株を捜す目的で、FLC-4, 5, 7 細胞を含むいくつかの肝細胞株の検討を行った。ヒト肝芽細胞株である HepG2 細胞をはじめヒトヘパトーマ HuH-7 細胞、ヒトヘパトーマ FLC-5、ラットヘパトーマ H4IIE 細胞は細胞外マトリクスによる細胞形態の変化にตอบสนองして HNF-4 などの肝機能を亢進することはなかった。FLC-4 細胞、FLC-7 細胞は細胞の立体化にตอบสนองして、HNF-4 遺伝子発現が亢進し、他の肝機能も強く増強されていた。つまり、樹立細胞株には、細胞の立体化（球状化）にตอบสนองする能力を保持した細胞とそうでない細胞があり、応用研究には細胞形態にตอบสนองする細胞を利用することが効果的であることが示された。

おわりに

最近になり、肝細胞の幹細胞様細胞が同定されつつあり、また骨髓細胞から肝細胞が分化誘導されることも明らかとなり、肝細胞を利用した応用研究を取り巻く状況は大きく変化してきている。肝臓由来幹細胞や骨髓細胞、ES 細胞から成熟肝細胞まで分化させることは近い将来可能になると十分考えられる。どのような由来の肝細胞であれ、それを利用しようとした場合に機能を最大限引き出す培養条件（例えば3次元培養）がなければ、十分な肝機能は期待できない。したがって、さらなる培養法の改良ならびに、その応用研究の発展が必要である。

以上本研究では、簡便で高い再現性が得られる初代培養肝細胞の改良培養法の開発ならびに、「細胞形態

が肝細胞の分化を制御する」という新しい概念の提出を行い、本改良培養法を分子栄養学へ導入してきた。今後、細胞形態による肝細胞分化制御の詳細な分子メカニズムと、本培養法を用いた栄養素・食品の新たな機能性のスクリーニングを行っていきさらなる分子栄養学の発展に寄与したいと考えている。さらに、ヒト肝細胞の応用も視野に入れた応用研究を目指したい。

本研究は、一貫して名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻応用生命化学講座栄養生化学研究室（旧農芸化学科栄養生化学講座）において行われたものであり、研究の機会を与えていただき、終始ご指導いただきました吉田 昭先生（現名古屋文理短期大学学長）ならびに垣沼淳司先生（現名古屋女子大学教授）に心より感謝申し上げます。本研究の肝細胞培養と栄養素のかかわりの研究は吉田 昭教授のもとで始まり、それ以降の大部分を占める肝細胞分化維持機構の分子細胞生物学的研究は垣沼淳司教授のもとで行われました。この間、貴重なご助言や暖かい激励をいただきました青山頼孝先生（現北海道大学教授）、横越英彦先生（現静岡県立大学教授）、堀尾文彦先生、岡田統子先生、米国ケース・ウェスタン・リザーブ大学 R. W. Hanson 先生に深く感謝いたします。また、本研究にご協力いただいた栄養生化学研究室内の職員、卒業生、在校生の皆様に深く感謝いたします。さらに、多くの共同研究者の先生方や実験試料を快く提供していただいた先生方に感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞に推薦していただきました農芸化学会中部支部長および諸先生方に厚く御礼申し上げます。

- (1) C. Noda and A. Ichihara: *Cell Struct. Funct.*, **18**, 189-194 (1993).
- (2) S. Cereghini: *FASEB J.*, **10**, 267-282 (1996).
- (3) H. Oda: *Connect. Tissue*, **30**, 225-232 (1998).
- (4) "Liver Gene Expression," ed. by F. Tronche and M. Yaniv, R. G. Landes Company, Austin, 1994.
- (5) 小田裕昭: 組織培養研究, **18**, 203-219 (1999).
- (6) 小田裕昭: "細胞の分化, 再生, 形態形成", 自然科学社, 1999, pp. 37-51.
- (7) 小田裕昭: 細胞, **33**, 402-405 (2001).
- (8) G. P. Hayhurst, Y.-H. Lee, G. Lambert, J. M. Ward, and F. J. Gonzalez: *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 1393-1403 (2001).
- (9) N. Wang, M. J. Finegold, A. Bradley, C. N. Ou, S. V. Abdelsayed, M. D. Wilde, L. R. Taylor, D. R. Wilson, and G. J. Darlington: *Science*, **269**, 1108-1112 (1995).

- (10) N. J. Sund, S.-L. Ang, S. D. Sackett, W. Shen, N. Daigle, M. A. Magnuson, and K. H. Kaestner: *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 5175-5183 (2000).
- (11) C. Landry, R. Clotman, T. Hioki, H. Oda, J. J. Picard, F. P. Lemaigre, and G. G. Rousseau: *Dev. Biol.*, **192**, 247-257 (1997).
- (12) 小田裕昭: 生化学, **70**, 434-436 (1998).
- (13) H. Oda, K. Nozawa, F. Miyachi, A. Shimizu, Y. Iwasaki, and A. Kakinuma: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1590-1592 (1997).
- (14) I. Zelko and M. Negishi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **277**, 1-6 (2000).
- (15) T. T. Lu, J. J. Repa, and D. J. Mangelsdorf: *J. Biol. Chem.*, in press.
- (16) M. Boshart, F. Weih, M. Nichols, and G. Schutz: *Cell*, **66**, 849-859 (1991).
- (17) T. J. Cole, J. A. Blendy, A. P. Monaghan, K. Kriegstein, W. Schmid, A. Aguzzi, G. Fantuzzi, E. Hummler, K. Unsicker, and G. Schutz: *Genes Dev.*, **9**, 1608-1621 (1995).
- (18) N. Matsushita, H. Oda, K. Kobayashi, T. Akaike, and A. Yoshida: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1514-1516 (1994).
- (19) H. Oda, K. Nozawa, Y. Hitomi, and A. Kakinuma: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 800-805 (1995).
- (20) Y. Yoshida, N. Kimura, H. Oda, and A. Kakinuma: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **229**, 182-188 (1996).
- (21) 小田裕昭: 組織培養工学, **23**, 229-231 (1997).
- (22) T. Mizuguchi, T. Mitaka, K. Hirata, H. Oda, and Y. Mochizuki: *J. Cell Physiol.*, **174**, 273-284 (1998).
- (23) H. Oda, Y. Suzuki, T. Shibata, and A. Yoshida: *J. Nutr. Biochem.*, **10**, 644-653 (1999).
- (24) A. Kawamura, Y. Yoshida, N. Kimura, H. Oda, and A. Kakinuma: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **264**, 530-536 (1999).
- (25) C. M. DiPersio, D. A. Jackson, and K. S. Zaret: *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 4405-4414 (1991).
- (26) R. Singhvi, A. Kumar, G. P. Lopez, G. N. Stephanopoulos, D. I. C. Wang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber: *Science*, **264**, 696-698 (1994).
- (27) 小田裕昭: バイオサイエンスとインダストリー, **55**, 198-201 (1997).
- (28) S. Hasumura, T. Matsuura, H. Aizaki, M. Kawada, H. Shimizu, S. Mizutani, and S. Nagamori: *Artificial Blood*, **5**, 141-145 (1997).
- (29) M. Kawada, S. Nagamori, H. Aizaki, K. Fukaya, M. Niiya, T. Matsuura, H. Sujino, S. Hasumura, H. Yashida, S. Mizutani, and H. Ikenaga: *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **34**, 109-115 (1998).