

ヒト肝細胞キメラマウス—肝臓肥大のメカニズムに関して—

立野 知世

我々は、ヒト肝細胞を持つキメラマウスを開発した。キメラマウス肝臓は、ヒト肝細胞とマウス非実質細胞で構築されている。キメラマウス肝臓のヒト肝細胞はヒト肝臓におけるヒト肝細胞に近い遺伝子発現、タンパク質発現、活性を示し、組織学的にもほぼ正常な肝臓組織構築を呈している。しかしながら、ヒト肝細胞キメラマウスでは、正常なヒトやマウスとは異なる性質も示す。その一つとして、肝臓の肥大が挙げられる。本稿では、ヒト肝細胞キメラマウスとラット肝細胞キメラマウスでの肝細胞の増殖、遺伝子、タンパク質発現を比較することにより、肝臓肥大のメカニズムに関して考察する。

1. はじめに

肝臓は、成体の肝臓を2/3切除しても残余肝が増殖し、げっ歯類では1週間で元の重量に戻ることから、成体になってもなお高い増殖能力を持つ臓器として知られている。しかしながら、肝細胞をコラゲナーゼ灌流法で分離し *in vitro* で培養すると、その高い増殖能を再現させることは現在のところ不可能である。また、肝細胞を2次元培養することにより、多くの遺伝子やタンパク質の発現が低下する。このことから、特にヒト肝細胞の *in vivo* での増殖・分化に関する性質は不明な点が多い。

Heckel らは生まれながら肝細胞の増殖に障害のあるトランスジェニックマウスを作製した。アルブミンエンハンサー/プロモーター下にウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (urokinase-type plasminogen activator, uPA) のゲノム遺伝子が約5個連結された形でベクターが導入されているトランスジェニックマウス (Alb-uPA マウス) である¹⁾。Rhim らは生後5~11日目の Alb-uPA マウスの脾臓から正常なマウス肝細胞を移植すると、移植したマウス肝細胞が宿主である Alb-uPA マウスの肝臓に生着・増殖

し完全に置換することを示した²⁾。彼らはさらに Alb-uPA マウスとヌードマウスを掛け合わせるにより、Alb-uPA/ヌードマウスを作製し、ラット肝細胞で置換された肝臓を持つキメラマウスを作製した³⁾。その後、筆者らも含めいくつかのグループにより、Alb-uPA/SCID マウス^{4,5)} や Alb-uPA/Rag2 ノックアウト⁶⁾ マウスなどが作製され、ヒト肝細胞によるマウス肝臓の置換の試みが行われた。

筆者らは他のグループに先立ち、マウス肝臓のほとんどがヒト肝細胞で置換されたキメラマウス (ヒト肝細胞キメラマウス) を安定的に生産することに成功した⁴⁾。このマウスは、ヒト型の薬物代謝能を持つことや^{4,7,8)}、B型肝炎ウイルス (HBV) やC型肝炎ウイルス (HCV) に感染可能であることから^{5,6)}、新薬開発のための薬物代謝試験や抗HBV薬や抗HCV薬の薬効試験に使われている。

筆者らは、このヒト肝細胞キメラマウスは、*in vivo* におけるヒト肝細胞の増殖・分化能に関する研究に有用と考えている。また、ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では、肝細胞はヒト由来であるが、非実質細胞はマウス由来である。ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト肝細胞が通常とは異なる環境におかれることにより生じる異常現象を解明することにより、肝細胞と非実質細胞、肝細胞と他組織との新たな相互作用を知りえるのではないかと考えている。本稿では、ヒト肝細胞キメラマウスで観察される異常な性質の一つである、肝重量体重比の増加について取り上げ、肝重量体重比調節メカニズムに関して考察する。

株式会社フェニックスバイオ (〒739-0046 広島県東広島市鏡山3-4-1)

Chimeric mice with humanized liver—Mechanism of hepatic hyperplasia induction—

Chise Tateno (PhoenixBio Co., Ltd., 3-4-1 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan)

2. ヒト肝細胞キメラマウスの作製とその利用

筆者らは Alb-uPA マウス¹⁾と重度免疫不全の SCID マウスを掛け合わせた Alb-uPA/SCID マウスを作製し⁴⁾, 現在クローズドコロニーとして株式会社フェニックスバイオにおいて系統を維持している. 約3週齢の Alb-uPA/SCID マウスに脾臓経由で米国から購入した子供のドナー由来の凍結保存ヒト肝細胞を融解後 $2.5 \sim 10 \times 10^5$ 個注入すると, 約2ヶ月でマウス肝臓の70%以上がヒト肝細胞で置換されたキメラマウスが作出できる (図1). ヒト肝細胞を移植後, 経時的にマウス血液を採取しマウス血中ヒトアルブミン濃度のモニタリングを行っている. 移植後7週目 (10週齢) 頃まで対数的にヒトアルブミン濃度は増加するがその後安定する (図1). マウス肝臓の7葉の組織切片を作製し, ヒト特異的サイトケラチン8/18抗体を用いて免疫染色を行い, マウス肝臓のヒト肝細胞による置換率を求めている (図2). 屠殺時のマウス血中ヒトアルブミン濃度と置換率はよく相関していることから, ヒトアルブミン濃度からマウスの置換率を推定することができる (図1).

ヒト肝細胞キメラマウス肝臓はヒト肝臓と同等の薬物代謝酵素やトランスポーターを発現していることから^{4,7,8)}, 新薬におけるヒト薬物代謝予測に利用されている. これまで *in vivo* での HBV や HCV の新薬の薬効試験にはチンパンジーが使われていたが, 最近では動物愛護の問題からその使用が難しくなってきた. ヒト肝細胞キメラマウスは HBV や HCV に容易に感染することができるため^{5,6)}, 現在唯一の HBV, HCV 感染小動物モデル系として利用されている.

現在, 株式会社フェニックスバイオでは, 移植したマウスの約8割が置換率70%以上の高置換のキメラマウスを

ヒトサイトケラチン8/18抗体による免疫染色

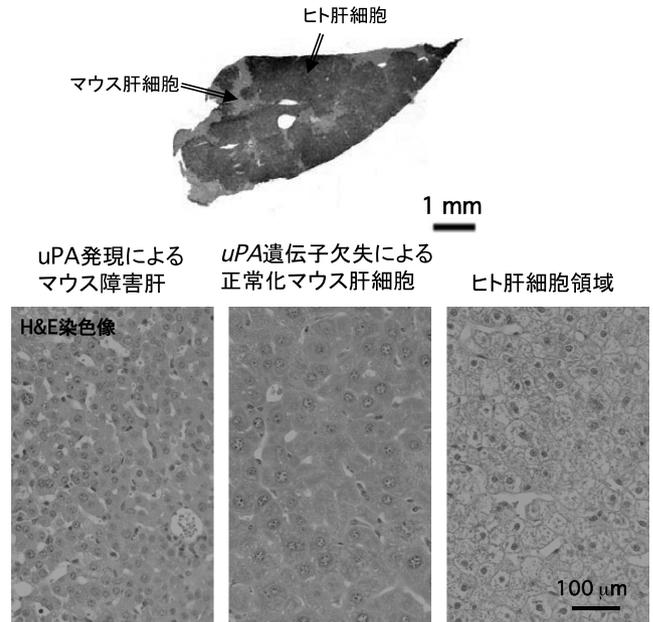


図2 ヒト肝細胞キメラマウスの組織像

大量生産することが可能である. 年間約3,000匹のヒト肝細胞キメラマウスを生産し, これらのマウスは学術研究機関や製薬会社との共同研究や受託試験に使われている.

3. ヒト肝細胞キメラマウスの特徴

ヒト肝細胞キメラマウス肝臓は, ヒト肝細胞とマウス由来の類洞内皮細胞, クッパー細胞, 星細胞などの非実質細胞で構成されている. キメラマウス肝臓切片をヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色すると, 3種類の肝細胞が観察できる (図2). 1) uPAの発現による障害マウス肝細胞

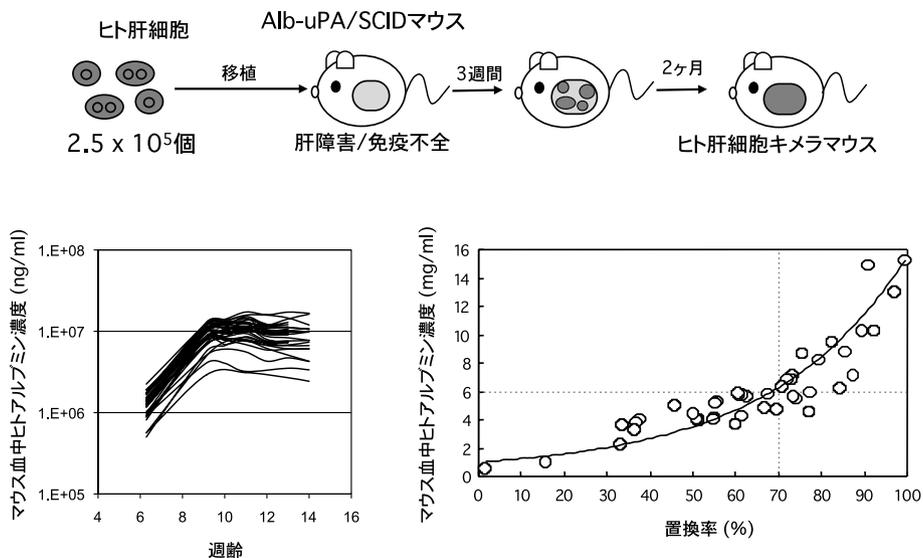


図1 ヒト肝細胞キメラマウスの作製

であり、萎縮している。細胞質に多くの小さな脂肪滴を持つ。2) 肝細胞の細胞分裂の際に、導入された *uPA* 遺伝子が相同組換えにより欠失することにより正常化したマウス肝細胞である。細胞質がエオシンに好染し正常マウス肝細胞の形態を示す。3) マウス肝臓を置換したヒト肝細胞である。マウス正常肝細胞に比べて核の大きさが均一で小型であり、細胞質が淡明である。細胞質が過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色陽性であることから、ヒト肝細胞にグリコーゲンが多く存在しているためと考えられる。これら3種の細胞の特徴は透過型電子顕微鏡でも確認できる。電子顕微鏡観察により、ヒト肝細胞領域においても、正常な類洞構造が形成されており、肝細胞と類洞内皮細胞間にはディッセ腔が存在することが確認できる。また、肝細胞間には胆汁が分泌される毛細胆管が形成されている。後に詳細に述べるが、正常なげっ歯類やヒト肝臓では、肝細胞が類洞に沿って1列に並んでいるが、ヒト肝細胞キメラマウスでは、2列に並んでいる⁹⁾。

これらのことから、ヒト肝細胞とマウス非実質細胞はほぼ正常に構築されていると考えている。また、遺伝子発現の観点から観察すると、ヒト肝臓由来の肝細胞とヒト肝細胞由来の肝細胞の遺伝子発現をマイクロアレイで比較することにより、80~85%の遺伝子が2倍の範囲内で同等の発現をしていることを確認している。

ヒト肝細胞キメラマウスの持つ正常なヒトやマウスと異なる性質もいくつか明らかになっている。ヒト肝細胞キメラマウスは肝重量体重比が正常のマウスに比べて1.5~2.0倍高い⁹⁾(図3)。通常、体重に対する臓器重量は動物種により決まっており、部分肝切除後も元の重量に戻る^{10~12)}。肝重量体重比は、マウスでは約5~6%⁹⁾、ラットでは約3.5~4.5%¹¹⁾、ヒトでは約2~3%¹²⁾ということが知られている。また、ヒト肝細胞キメラマウスでは血清中の

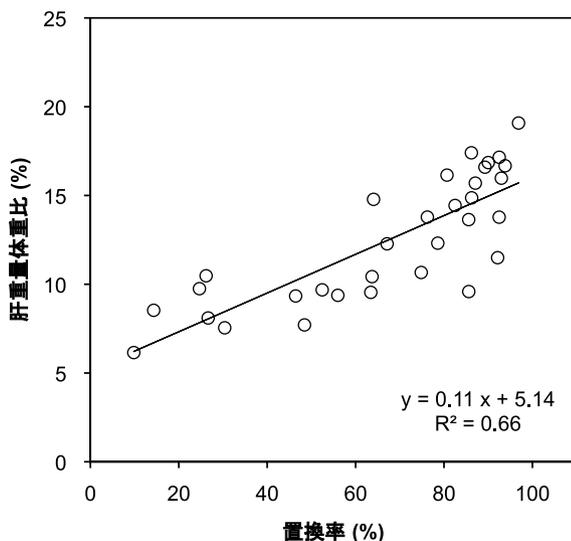


図3 ヒト肝細胞キメラマウス肝臓の肥大化

胆汁酸濃度が正常マウスに比べて高いという特徴も持つ。

4. マウス肝細胞およびラット肝細胞キメラマウスを用いたG1からS期への移行メカニズムの探索

Weglarzらは、主要尿タンパク (major urinary protein, MUP) のプロモーターを用いた *uPA* トランスジェニックマウスを作製した¹³⁾。MUPプロモーターは生後発現するという以外は、これまでの *uPA* マウスと同様な特徴を持つ。このMUP-*uPA* マウスとヌードマウスを掛け合わせ、MUP-*uPA*/ヌードマウスを作製した¹⁴⁾。

2/3部分肝切除後のDNA合成が亢進した肝細胞の動態は、ラットとマウスで異なることが知られている。ラットでは、術後24時間と36時間に二つのピークがある。一方、マウスでは、40時間後に一つのピークがあることが知られている¹⁴⁾。ラット肝細胞はマウスの体内に存在すると、どちらの動態を示すのだろうか。この疑問に答えるために、彼らは、MUP-*uPA*/ヌードマウスにラット肝細胞とマウス肝細胞を移植し、キメラマウスを作製した¹⁴⁾。作製したラット肝細胞キメラマウスとマウス肝細胞キメラマウスに2/3肝部分切除術を施し、その後の肝細胞におけるDNA合成能をプロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込みにより調べた。その結果、ラット肝細胞キメラマウスは、24時間と36時間、二つのピークを示し、コントロールのマウス肝細胞キメラマウスでは、マウスと同様40時間にピークを示した¹⁴⁾。このことから、G1からS期への移行は、サイトカインや増殖因子による外因的な刺激よりも、内因的な性質によることが証明された。

5. ヒトおよびラット肝細胞キメラマウスの作製

筆者らは、ヒト肝細胞キメラマウスにおける肝臓の肥大メカニズムを調べるために、Alb-*uPA*/SCIDマウスに 7.5×10^5 個のヒト肝細胞と 5.0×10^5 個のラット肝細胞を移植し、ヒト肝細胞キメラマウスとラット肝細胞キメラマウスを作製した。移植後1週目よりマウスを安楽死させ、肝臓のサンプリングを行い肝重量体重比および置換率を求めた。さらに肝臓におけるBrdUの取り込みとタンパク質発現を免疫染色により、また、遺伝子発現を定量性リアルタイムRT-PCR法により測定した。

6. ヒトおよびラット肝細胞キメラマウスの肝重量体重比

肝重量体重比を調べると、ラット肝細胞キメラマウスは5.4%とほぼ正常マウスと同じであったが、ヒト肝細胞キメラマウスは、マウス肝臓におけるヒト肝細胞の置換率が上昇するとともに肝重量体重比が増加し、置換率約80%以上では約13%の肝重量体重比であった(図3)。また、肝臓の肥大が個々の肝細胞の肥大によるものか、肝細胞数の増加によるものを調べるために、一定面積あたりの肝

細胞数を計測した。その結果、肝細胞自身の肥大は観察されなかったことから、ヒト肝細胞キメラマウス肝臓の肥大は肝細胞数の増加であると結論した⁹⁾。

7. ヒトおよびラット肝細胞キメラマウス肝細胞増殖の動態

ラット肝細胞キメラマウスとヒト肝細胞キメラマウスの血中ラットおよびヒトアルブミン濃度と肝臓におけるBrdUの取り込みを調べた。ラット肝細胞キメラマウスは移植後1週目で約15%であったがその後急速に低下し4週で正常マウスレベルに達し、置換率は100%となった。一方、ヒト肝細胞キメラマウスではBrdUの取り込みは移植後1週目で約10%であったが、その後ゆるやかに減少し11週で正常マウスレベルに達し、置換率は平均で約60%であった⁹⁾(図4)。

これらのことから、ラットに比べてヒトでは肝細胞の増殖速度が遅いと考えられた。系統発生的にラットとマウスは近縁であり、ヒトとマウスは遠縁であるため、サイトカインなどのアミノ酸配列に関しては、前者に比べて後者は相同性が低いと考えられる。このことから、ラットとヒト肝細胞の増殖能として同列に比較することはできないが、これまでの肝部分切除後の再生速度の報告からは、ラットでは約7日で元の重量まで再生するのに対し、ヒトでは約1ヶ月かかると言われていることから、ヒトにおける増殖速度の遅さがある程度反映しているものと考えている。

8. 肝部分切除における増殖の停止機構

肝臓再生における増殖の停止のメカニズムにはトランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) やアクチビンが関わっていることが知られている^{15,16)}。TGF- β はまずTGF- β 受容体2 (TGFB2) の二量体に結合しTGFB2をリン酸化する。さらにTGF- β 受容体1 (TGFB1) が結合することにより、TGFB1がリン酸化される。Smad2/3がその後リン酸化され、Smad4と複合体を形成し核内移行する。核内で転写因子とともにDNAドメインに結合することにより、DNA合成が低下し、アポトーシスが誘導され、肝細胞の増殖は停止すると言われている。肝部分切除では、切除後すみやかに肝細胞のTGFBの発現が低下し、非実質細胞のTGF- β の発現は増加する。切除後120時間後には肝細胞のTGFBの発現は上昇し元に戻る言われている¹⁷⁾。

9. ヒトおよびラット肝細胞キメラマウス肝細胞のTGFBファミリーの発現

ヒト肝細胞キメラマウスでは正常な増殖停止機構が働いているのかどうかを調べるために、TGFBファミリーのラットおよびヒト肝細胞キメラマウス肝臓におけるmRNA発現量を経時的に計測した。ラット肝細胞キメラマウスでは、移植後2週目において、ラット (r)TGFB1, rTGFB2, ラットアクチビン受容体2A (rACTR2A) の発

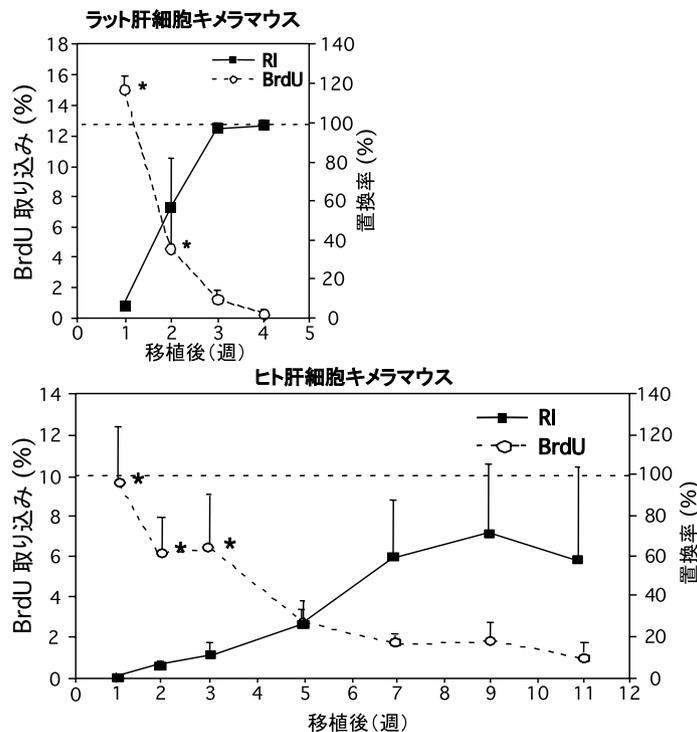


図4 移植肝細胞のBrdUの取り込みおよび肝細胞による置換率 (文献9を改変)

現は約半分に低下しており、増殖の停止時点である3週目より正常値に戻っていた(図5)。一方、ヒト肝細胞キメラマウスでは、移植後3週目において、ヒト(h)TGFBFR1, hTGFBFR2, hACTR2Aの発現は0.1~0.4倍に低下していた。hTGFBFR1は移植後11週目において正常値に戻ったが、hTGFBFR2, hACTR2Aは低値のままであった⁹⁾(図5)。

次にTGFBFR2, Smad2, Smad3のタンパク質発現を免疫染色により調べた。その結果、増殖停止時期である移植後3週目のラット肝細胞キメラマウス肝臓では、TGFBFR2の細胞質における発現が見られ(図6)、同時期にSmad2, Smad3の核内移行が観察された(図7)。一方、ヒト肝細胞キメラマウスでは、増殖の停止期である移植後11週目

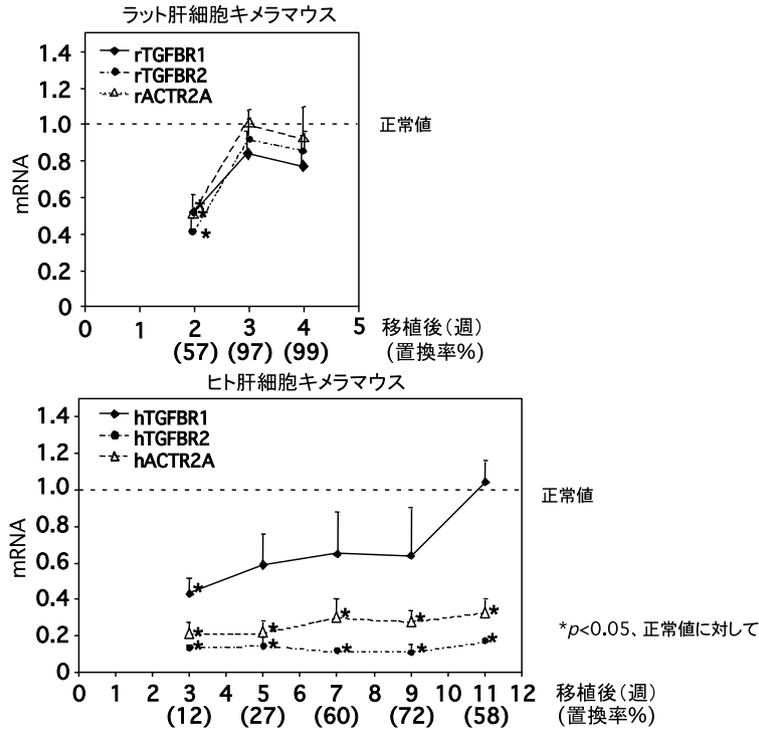


図5 肝細胞移植後のTGFBFR, ACTRのmRNA量の変化(文献9を改変)

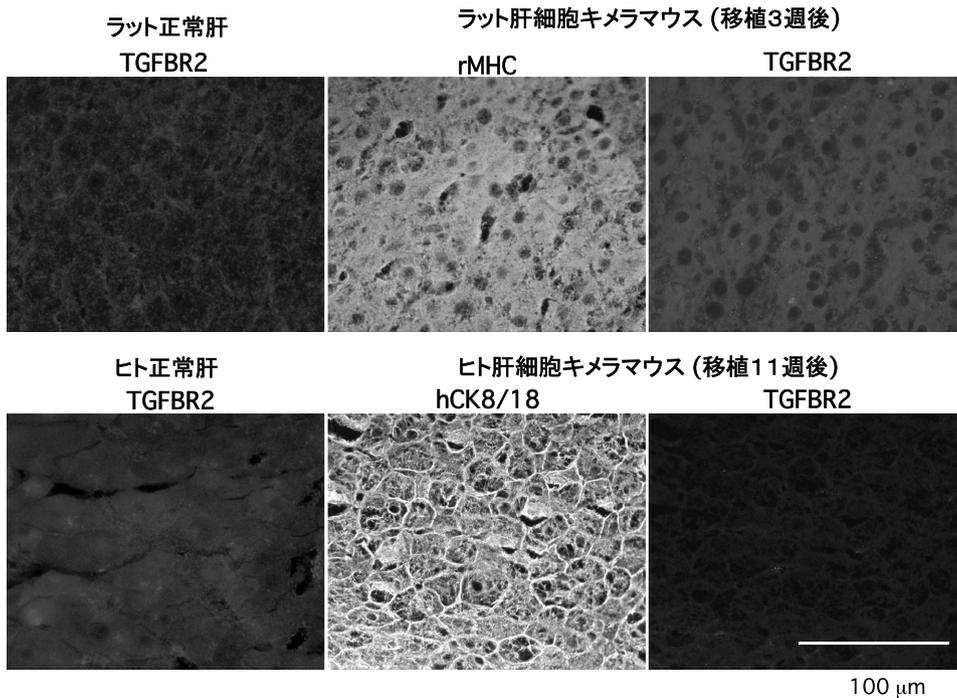


図6 TGFBFR2の免疫染色(文献9を改変)

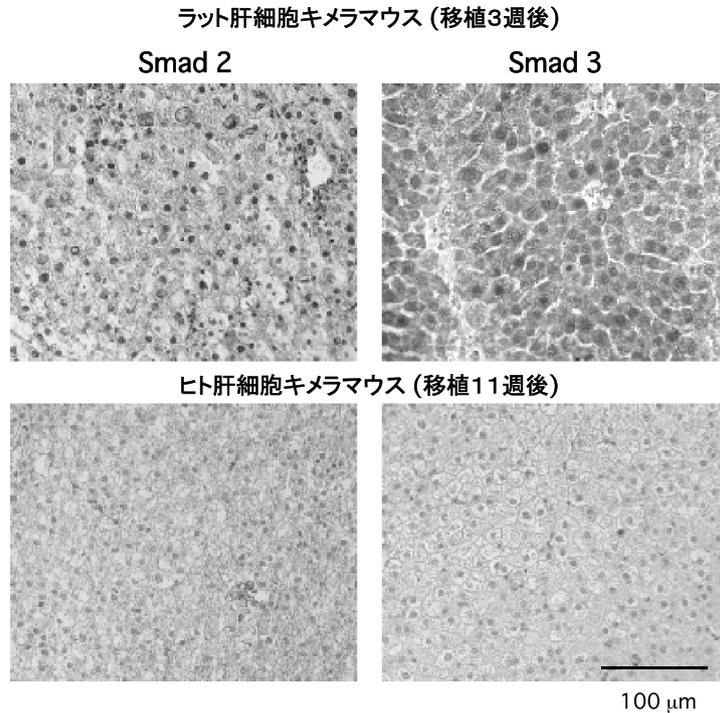


図7 Smad2, 3の免疫染色 (文献9を改変)

において, TGFBR2の細胞質における発現は低く(図6), Smad2, Smad3の核内移行も観察されなかった(図7). また, E-カドヘリンと $\beta 1$ -インテグリンはSmad2/3を介したTGF- β シグナルのターゲット遺伝子であることが知られている¹⁸⁾. ヒト肝細胞キメラマウス肝臓においては, E-カドヘリンのタンパク質発現が正常ヒト肝臓に比べて低いことが示され, TGF- β シグナルが働いていないと考えられた⁹⁾.

10. ヒトおよびラット肝細胞キメラマウスの肝細胞索構造

IV型コラーゲンの抗体で正常マウス, ラット, ヒト肝臓を染色すると, 肝細胞は1列の索状構造を形成しているのが観察される(図8). 移植2週目のヒトおよびラット肝細胞キメラマウス肝臓を, 同様に染色すると, どちらも肝細胞索を形成しておらず, コロニー状に存在していた. ラット肝細胞キメラマウス肝臓では, 増殖の停止した移植後5週目では, IV型コラーゲン染色により, 正常肝と同様な1列の肝細胞索が観察された. ところが, ヒト肝細胞キメラマウスでは, 増殖の停止した移植後14週でも肝細胞索は2~3列となっていた⁹⁾(図8). 再生肝では肝細胞索が2列であることが知られていることから¹⁹⁾, ヒト肝細胞キメラマウスでは, DNA合成は停止しているものの, 再生肝の特徴を維持していると考えられた.

11. 宿主マウス星細胞におけるTGF- β の発現

部分肝切除後約120時間後には, 星細胞がTGF- β を産

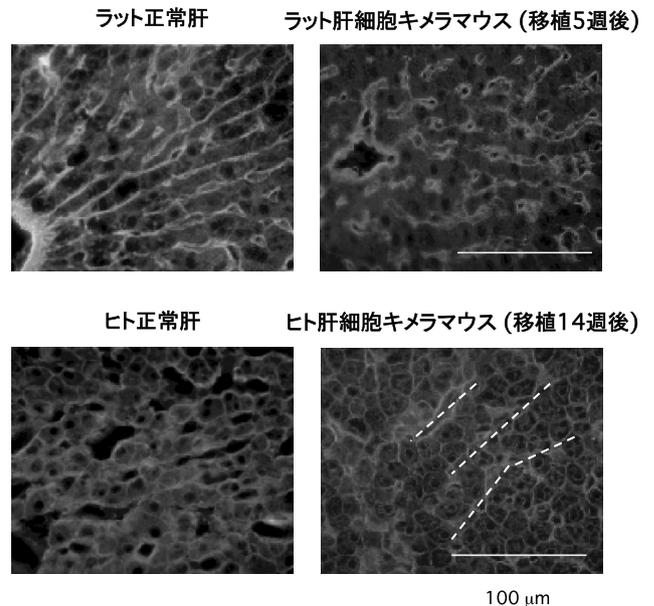


図8 IV型コラーゲンの免疫染色 (文献9を改変)

生し, 再生の停止に寄与していると考えられている¹⁶⁾. また, 正常肝では, TGF- β の発現はほとんど見られない. ラット肝細胞キメラマウスの星細胞におけるTGF- β の発現を免疫染色により調べた. その結果, 移植後2週目ではデスミン陽性星細胞でのTGF- β の発現はみられなかったが, 3週目においては, デスミン陽性星細胞でのTGF- β の発現が観察された. 一方, ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では, 移植後5週でも11週目においても, デスミン陽性

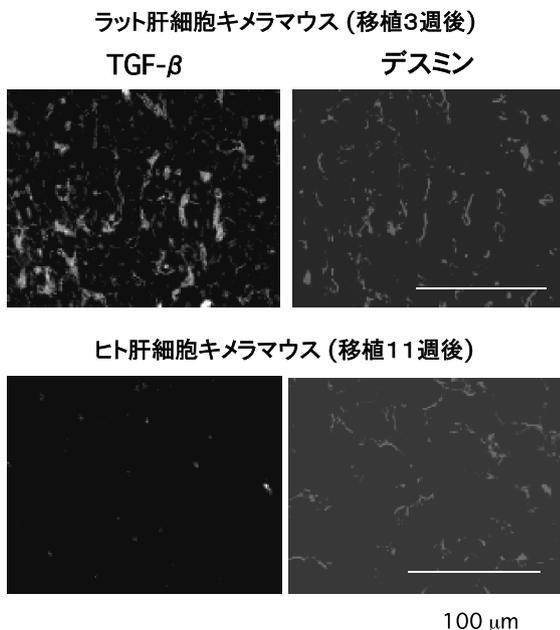


図9 TGF- β /デスミンの免疫染色 (文献9を改変)

星細胞での TGF- β の発現は見られなかった⁹⁾(図9)。このことから、ヒト肝細胞キメラマウス肝臓では、ヒト肝細胞における TGFBR2, ACTR2 の発現のみでなく、星細胞における TGF- β も発現していないことが明らかとなった。

12. 胆汁酸による肝重量体重比への影響

肝重量体重比の調節因子の一つとして、胆汁酸が挙げられる。マウスに胆汁酸 (0.2%) を餌に混ぜて与えると、肝細胞への BrdU の取り込みが増加し、肝重量体重比が 30% 上昇する。この反応には肝細胞の核内受容体であるファルネソイド X 受容体 (FXR) が関与している。胆汁酸は FXR を介して FoxM1B 転写因子を誘導し、肝細胞の増殖を促進する。一方、FXR は核内受容体であるショートヘテロダイマーパートナー (SHP) を誘導し、胆汁酸合成酵素である Cyp7a1 の発現を抑え、胆汁酸合成を低下させる。肝部分切除後、血中の胆汁酸がやや増加し、それに伴い、SHP の増加、Cyp7a1 の低下が見られ、部分肝切除 7 日目には正常に戻る²⁰⁾。これらのことから、胆汁酸は肝重量体重比の調節に関わっているのではないかと考えられる。ヒト肝細胞キメラマウス血清中では、胆汁酸濃度が正常マウスに比べて高く、また、CYP7A1 の発現も高い。このことから、ヒト肝細胞キメラマウスでは何らかの原因で胆汁酸産生調節に不具合が生じており、マウス血中胆汁酸が低下しないことが肝重量体重比の増加に関わっているのかもしれない。

13. おわりに

肝細胞の増殖に関わる増殖因子、サイトカイン、ホルモ

ンに対する受容体が肝細胞表面に存在する場合、ヒト肝細胞キメラマウスでは、アミノ酸配列のホモロジーの種差により通常起きている反応が起こらないという可能性がある。その一つの例として、成長ホルモンが挙げられる。

ヒト成長ホルモン (hGH) は、マウスの成長ホルモン受容体 (mGHR) に結合しないことが知られている²¹⁾。肝臓の再生には、GH による肝細胞の増殖促進作用が関わっていることが、GH ノックアウトマウスなどを用いた実験により明らかになっている。ヒト肝細胞キメラマウスでは、マウスの下垂体から放出される mGH は存在するが、hGH は存在しない²²⁾。hGH が存在しないことにより、ヒト肝細胞キメラマウスではヒト肝細胞に脂肪肝が生じる。キメラマウスに hGH を投与することにより脂肪肝や hGH 欠損による遺伝子発現の異常が正常化する²³⁾。

ヒト肝細胞キメラマウスにおける肝臓肥大に関しても、このような種差による何らかの原因があり、それを是正することにより、より正常に近いヒト肝臓を持つキメラマウスを作製できるのではないかと考えている。

謝辞

本研究に主に携わられた現東京女子医科大学の鶴頭理恵先生、御指導くださいました現株式会社フェニックスバイオ吉里勝利先生に深く感謝致します。また、本研究は知的クラスター創成事業と株式会社フェニックスバイオにおいて実施された。

文 献

- 1) Heckel, J.L., Sandgren, E.P., Degen, J.L., Palmiter, R.D., & Brinster, R.L. (1990) *Cell*, 62, 447-456.
- 2) Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Degen, J.L., Palmiter, R.D., & Brinster, R.L. (1994) *Science*, 263, 1149-1152.
- 3) Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Palmiter, R.D., & Brinster, R.L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4942-4946.
- 4) Tateno, C., Yoshizane, Y., Saito, N., Kataoka, M., Utoh, R., Yamasaki, C., Tachibana, A., Soeno, Y., Asahina, K., Hino, H., Asahara, T., Yokoi, T., Furukawa, T., & Yoshizato, K. (2004) *Am. J. Pathol.*, 165, 901-912.
- 5) Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R.T., Tyrrell, D.L.J., & Kneteman, N.M. (2001) *Nat. Med.*, 7, 927-933.
- 6) Dandri, M., Burda, M.R., Török, E., Pollok, J.M., Iwanska, A., Sommer, G., Rogiers, X., Rogler, C.E., Gupta, S., Will, H., Greten, H., & Petersen, J. (2001) *Hepatology*, 33, 981-988.
- 7) Katoh, M., Matsui, T., Okamura, H., Nakajima, M., Nishimura, M., Naito, S., Tateno, C., Yoshizato, K., & Yokoi, Y. (2005) *Drug Metab. Dispos.*, 33, 1333-1340.
- 8) Nishimura, M., Yoshitsugu, H., Yokoi, T., Tateno, C., Kataoka, M., Horie, T., Yoshizato, K., & Naito, S. (2005) *Xenobiotica*, 35, 877-890.
- 9) Utoh, R., Tateno, C., Kataoka, M., Tachibana, A., Masumoto, N., Yamasaki, C., Shimada, T., Itamoto, T., Asahara, T., &

- Yoshizato, K. (2010) *Am. J. Pathol.*, **177**, 654–665.
- 10) Kam, I., Lynch, S., Svanas, G., Todo, S., Polimeno, L., Francavilla, A., Penkrot, R.J., Takaya, S., Ericzon, B.G., Starzl, T. E., & Van Thiel, D.H. (1987) *Hepatology*, **7**, 362–366.
- 11) Francavilla, A., Zeng, Q., Polimeno, L., Carr, B.I., Sun, D., Porter, K.A., Van Thiel, D.H., & Starzl, T.E. (1994) *Hepatology*, **19**, 210–216.
- 12) Van Thiel, D.H., Gavaler, J.S., Kam, I., Francavilla, A., Polimeno, L., Schade, R.R., Smith, J., Diven, W., Penkrot, R.J., & Starzl, T.E. (1987) *Gastroenterology*, **93**, 1414–1419.
- 13) Weglarz, T.C., Degen, J.L., & Sandgren, E.P. (2000) *Am. J. Pathol.*, **157**, 1963–1974.
- 14) Weglarz, T.C. & Sandgren, E.P. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12595–12600.
- 15) Hu, P.P., Datto, M.B., & Wang, X.F. (1998) *Endocr. Rev.*, **19**, 349–363.
- 16) Braun, L., Mead, J.E., Panzica, M., Mikumo, R., Bell, G.I., & Fausto, N. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1539–1543.
- 17) Chari, R.S., Price, D.T., Sue, S.R., Meyers, W.C., & Jirtle, R. L. (1995) *Am. J. Surg.*, **169**, 126–132.
- 18) Weinstein, M., Monga, S.P., Liu, Y., Brodie, S.G., Tang, Y., Li, C., Mishra, L., & Deng, C.X. (2001) *Mol. Cell Biol.*, **21**, 5122–5131.
- 19) Wack, K.E., Ross, M.A., Zegarra, V., Sysko, L.R., Watkins, S. C., & Stolz, D.B. (2001) *Hepatology*, **33**, 363–378.
- 20) Huang, W., Ma, K., Zhang, J., Qatanani, M., Cuvillier, J., Liu, J., Dong, B., Huang, X., & Moore, D.D. (2006) *Science*, **312**, 233–236.
- 21) Souza, S.C., Frick, G.P., Wang, X., Kopchick, J.J., Lobo, R.B., & Goodman, H.M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **92**, 959–963.
- 22) Masumoto, N., Tateno, C., Tachibana, A., Utoh, R., Morikawa, Y., Shimada, T., Momisako, H., Itamoto, T., Asahara, T., & Yoshizato, K. (2007) *J. Endocrinol.*, **194**, 529–539.
- 23) Tateno, C., Kataoka, M., Utoh, R., Tachibana, A., Itamoto, T., Asahara, T., Miya, F., Tsunoda, T., & Yoshizato, K. (2011) *Endocrinology*, **152**, 1479–1491.
-