岡山医学会雑誌　第124巻　December 2012, pp. 231-238

総　説

高分化型ヒト肝癌由来細胞株“HuH-7”

中 林 秀 和[a*]・武 田 和 久[b,c]

[a]北海道情報大学　医療情報学科，[b]介護老人保健施設　仁和の里，[c]岡山大学名誉教授

キーワード：肝細胞癌，培養細胞，α–フェトプロテイン，HuH-7

HuH-7 cell line established from a highly differentiated human hepatocellular carcinoma

Hidekazu Nakabayashi[a*], Kazuhisa Taketa[b,c]

[a]Department of Medical Management & Informatics, Hokkaido Information University, [b]Geriatric Health Service Facility, Niwanosato Home, [c]Professor Emeritus, Okayama University

要　　旨

高分化型ヒト肝癌由来細胞株“HuH-7”は，1982年にCancer Researchにその樹立を報告した．HuH-7は，当時の岡山大学医学部附属癌源研究施設病理部門（故佐藤二郎教授）の下で樹立し，これまで多くの研究分野で利用され，世界的に有名な肝癌細胞株となっている．本稿では，有用性の高い分化機能を有するヒト肝癌細胞株HuH-7について，肝細胞癌の腫瘍マーカーであるα-fetoprotein（AFP）を中心に，この細胞株を用いた研究分野に関する詳細を紹介する．

はじめに

1980年前後，肝特異機能を有する多数のヒト肝癌細胞株が樹立され，多くの分野の研究に供与されて来た．表1に示す様に，2012年3月現在でPubMedに掲載されたヒト肝癌細胞株としてAdenらによって樹立されたHepG2，Hep3B両細胞株[1)]は多くの研究に利用されている．次いで我々が樹立したHuH-7（Huh7を含む）[2)]は，2,400件を超える論文が発表されている．本株樹立に際し，故佐藤二郎教授（岡山大学医学部・癌研病理）の広く皆に使って欲しいと言う御意志で特許を申請しなかったことも関係しているかも知れない．この細胞株は無血清，無タンパクで培養でき，遺伝子導入が容易であることから，多くの研究に用いられている．近年ウイルス研究，特に1987年のB型肝炎ウイルス（HBV）の複製の成功や，1999年に確立されたC型肝炎ウイルス（HCV）のレプリコンシステムがHCVの複製機構の解析に広く使われている．HBV・HCVの感染者は全世界で数億人に達し，培養細胞を用いた抗ウイルス剤の開発に有効なことから広く研究に用いられ，特にHCVレプリコンシステムは，HuH-7細胞でのみ可能であることから急速に引用件数が増加している．ここでは，我々が樹立したHuH-7細胞の特徴とこれ迄に用いられた研究を紹介し，今後更に多くの分野の研究に幅広く貢献する為に，これまでの研究成果を解説したい．

平成24年5月1日受理
*〒069-8585　北海道江別市西野幌59-2
電話：011-385-4411　FAX：011-384-0134
E-mail：hnakabay@do-johodai.ac.jp

HuH-7株の樹立

HuH-7株は，57歳男性患者の手術材料（分化型肝細胞癌）から培養された．肝癌部位をメスにて小切片に切断し，一部切片をプラスチックシャーレに張り付け培地を加えて培養する切片培養法を，残りをトリプシンで消化分散した細胞分散法を用いて初代培養を行なった．細胞分散法では，一部に上皮様細胞が認められたが，短期間のうちに線維芽細胞に覆われ上皮様細胞を分離するのは困難であった．一方切片培養法でも線維芽細胞に覆われたが，切片を取り除いた後に上皮様細胞の集団が認められたため，キャピラリーにてこの細胞集団を分離して，上皮様細胞のみを得る事ができた．培地は，当時一般的だったEagle's MEMに20％牛血清（BS）＋0.4％ラクトアルブミン加水分解物（LAH）

表1　ヒト肝癌由来細胞株のPubMed検索結果

細胞株	樹立者	発表年	PubMed引用数
HepG2 or Hep-G2	Aden[1)]	1979	15,320
HuH-7 or Huh7	Nakabayashi[2)]	1982	2,425
Hep3B or Hep-3B	Aden[1)]	1979	1,677
HLE or HLF	Doi[3)]	1975	1,188
PLC/PRF/5	Alexander[4)]	1976	615

に抗生物質を加えて培養を行った[2].

肝癌細胞の無血清培養

上記の方法で得られた上皮様細胞は，固まりを作り非常にゆっくりと増殖を始めたが，細胞継代は容易ではなかった．数回の継代後，充分な細胞数が得られたが，細胞間の結合が強く細胞を分散して単離細胞に分ける事ができなかった．これは，肝癌細胞の一つの特徴と思われるが，細胞を分散し易くして増殖率の改善や，取扱い易い細胞株として研究に使用できる様にする為に培養条件の改良を試みた．当時の培地は，血清やタンパクなどの天然成分を添加して培養するのが一般的であったが，組織培養技術の中で無血清，無タンパクの培地で培養する事は極めて重要であった．そこで無血清培養の可能性を探るため上記培地より BS を除いたところ，充分な分裂細胞が認められ安定に増殖を開始したばかりか，分散し易く取扱が容易になり無血清培地での継代培養が可能になった．当時の無血清培養は，徐々に血清濃度を下げ，無血清の条件に適応した細胞のみを選択するもので，この方法では由来した組織の性質と異なった突然変異株を選択するものであった．しかし HuH-7の場合，培地から血清を除去する事により増殖率が改善された上，オリジナルの肝癌細胞の性質がそのまま維持されていた[2]．次に，LAH 中の有効成分を検討し種々の必須微量元素を調べたところ，セレニウム（3×10^{-8} M Na_2SeO_3）の添加が有効で, LAH を加えた培地の80％程度の増殖率が得られた．更に検討を進め，モリブデン，鉄，マンガン，バナジウムが増殖率を改善した．他の成分として必須脂肪酸リノール酸とオレイン酸，膜の構成に必要なエタノールアミンを加え，ISE-RPMI として現在も使用している（表２）．HuH-7株は，この完全に無血清の状態で長期間増殖し，肝特異機能も安定に維持されている[5]．このことから，細胞の増殖に必要な増殖因子，細胞接着因子等を自律的に産生しているものと思われる．特筆すべきことは，ISE-RPMI を用いると肝分化機能を有する他の肝癌細胞[6-9]やヨークサック腫瘍細胞[10]などでは，そのまま無血清で培養できること，他の培養細胞では増殖しないものの生存し続けることから，細胞の生存に必要な成分を十分に含んでいると思われる．また HuH-7を培養した培地は，血清の代わりに他の培養細胞の増殖を誘導できる．HuH-7細胞の分泌する増殖因子として，hepatoma-derived growth factor（HDGF）の存在が報告されている[11,12]．また Lee ら（2003年）により，HuH-7がセレニウム添加により酸化ストレスの減少とアポトーシスを抑える事から，無血清培地で生存できるメカニズムが示された[13].

表２　Composition of Chemically Defined Medium, ISE-RPMI, for the Growth of Human Hepatoma Cells (HuH-7)

Components	Concentrations	
	mg/liter	M
RPMI-1640 (GIBCO)	10400.0	
HEPES	1190.0	5.0×10^{-3}
Na_2SeO_3	0.00387	3.0×10^{-8}
$(NH_4)_6Mo_7O_2$·$4H_2O$	0.00371	3.0×10^{-9}
$FeSO_4$·$7H_2O$	0.0278	1.0×10^{-7}
$MnCl_2$·$4H_2O$	0.000059	3.0×10^{-10}
NH_4Vo_3	0.00117	1.0×10^{-8}
linoleic acid	0.00084	3.0×10^{-9}
oleic acid	0.0005	3.0×10^{-9}
ethanolamine	1.8324	3.0×10^{-5}
$NaHCO_3$	2000.0	2.4×10^{-2}

HuH-7細胞株の肝特異的機能

HuH-7は，多くの肝特異的機能を安定に保持しており，HuH-7の各種酵素活性は，患者の正常部位より癌部の酵素レベルに近く，癌細胞の特徴を保持している[5]．また HuH-7細胞は多くの肝特異的血清タンパクを分泌している[2]．殊に世界で最初に発見された腫瘍マーカーである α-フェトプロテイン（AFP）が，胎児期の主要な血清成分で出生と共に急速に減少するのに対し，成人期の主要な血清成分であるアルブミンはその後増加する．これら両タンパク質の分泌量を比較すると，HuH-7では AFP の分泌量がアルブミンより高く[14]，逆に huH-1[15]では，アルブミンは大量に分泌されているにも関わらず, AFP の分泌量は少なく成人型の性質が強い. 上記の無血清培地 ISE-RPMI は, HuH-7ばかりでなく他の肝癌細胞株も培養できることから，血清の影響を受けずに，各種ホルモンによる AFP 分泌に及ぼす影響を調べる材料として最適であった．特にグルココルチコイドは総ての肝癌細胞株で AFP の産生を高め，それまで報告されていたラット・マウスとは逆の結果を示した[14].

AFP 糖鎖の研究

肝細胞癌の腫瘍マーカーとして広く使われてきた

AFP は，慢性肝炎や肝硬変などの慢性肝疾患でも上昇する．AFP 糖鎖の core フコースは，AFP-L3分画として肝細胞癌に特異的な診断マーカーとなっている[16,17]．AFP-L3は２分岐鎖で，core の GlcNAc がフコシル化されている．AFP-L3の検出は，core フコースを認識するレクチン LCA（lens *culinaris* agglutinin）を用いたレクチン親和性電気泳動によって行われる．この方法は，共著者である武田によって開発された．HuH-7が産生する AFP 糖鎖のレクチン分画を表３に示した[18,19]．肝細胞癌に特異的な AFP-L3が，約80％を占めており，Yasuda らもほぼ同様の値を報告している[21]．また２分岐鎖の Gal 末端には，肝細胞癌に特異的な Manα1-3鎖側のみシアル酸が結合した AFP-P4が殆んど見られず，Manα1-6鎖側にもシアル酸の結合した腺癌で増加が見られる AFP-P5[22]が約半分を占める．また，AFP receptor（RECAF）[23]の HuH-7細胞による産生が認められている（Tomono *et al*. in press）[24]．

AFP 遺伝子の発現調整

1970年代後半には，肝臓細胞に特異的な遺伝子のクローニングが活発に行われ，特に腫瘍マーカーとして AFP のクローニングがマウス，ラットを含めて競われていた．その中で，AFP を大量に分泌する HuH-7は最適な細胞で，cDNA クローニングに利用され，カナダ・カルガリー大学の玉置大器教授の下で成功を収め，ヒトのアルブミン，AFP のゲノム DNA が得られた[25]．AFP 遺伝子はアルブミンの下流14kb に存在し，夫々15のエクソンと14のイントロンを持つことが示された[26]．この劇的に変化する癌胎児性遺伝子，AFP の発現制御機構を解析する材料として，HuH-7は大変有用であった．Watanabe ら（1980年）によりレポーター解析法を用いて，AFP 遺伝子の上流5.1kbに非常に強いエンハンサー領域が発見された[27]．この部位は典型的なエンハンサーの特徴を有しており，位置，方向，また異なった遺伝子のプロモーター活性を上昇させる．1900年に Cortese らのグループにより肝特異的転写因子として LFB1（後に HNF-1）が発見され，多くの肝特異的遺伝子のプロモーター領域にコンセンサス配列の存在が明らかになった[28]．その後，北海道大学医学部第一生化学講座（西信三教授）の下で，ヒト AFP 遺伝子のプロモーター領域にも２ヵ所の HNF-1結合部位が有り[29]，エンハンサー領域にも２ヵ所存在する事を示した[30]．また，アルブミン遺伝子のプロモーター部位に２ヵ所，－1.7kb と－6.0kb 上流に存在するエンハンサー領域にそれぞれ１ヵ所の HNF-1結合部位が存在する[30]．他に肝特異的転写因子は HNF-3，HNF-4，HNF-6，及び C/EBP などの結合配列が次々に同定された[31]．ヒト AFP エンハンサー，プロモーター領域の結合部位を図１に示す．これら転写因子は，必ずしも肝組織のみに発現しているのではなく，特に内胚葉系の組織で発現が認められることから，後に liver-enriched transcription factor と命名され，いずれもネットワークを形成し各種臓器の分化に重要な役割を果たしている．

AFP 遺伝子の発現制御に関与する因子

マウス・ラットの AFP 遺伝子発現を研究していた Belanger ら[32]や Papaconstantinou ら[33]のグループは，グルココルチコイド処理により AFP 遺伝子の発現が抑制され，出生後 AFP の発現が抑制される原因であると考えていた．ヒト肝癌細胞では，グルココルチコイド処理により AFP 発現は逆に上昇するが，これを癌化による異常発現と断定していた．我々はグルココルチコイド反応領域（GRE）がヒト AFP 遺伝子のプロモーター領域－178～－162bp に存在する事を報告し，マウス・ラットの AFP プロモーターの同一部位

表３　HuH-7および HepG2の培養液上清中 AFP のレクチン反応性（Tomono Y, *et al* 未発表，2012）

Cultured cell	Lectin reactivity（％）							
	AFP-L1	AFP-L2	AFP-L3	AFP-P1	AFP-P2	AFP-P3	AFP-P4	AFP-P5
HuH-7	19.5	＋	80.5	7.0	34.9	5.3	0	52.8
HepG2	13.0	＋	87.0	16.6	38.1	20.8	9.0	15.6
Reference	71.3	0	28.7	5.4	34.8	18.2	41.9	0

＋：not well-separated from AFP-L3
Analyzed by Wako Pure Chemical Co.

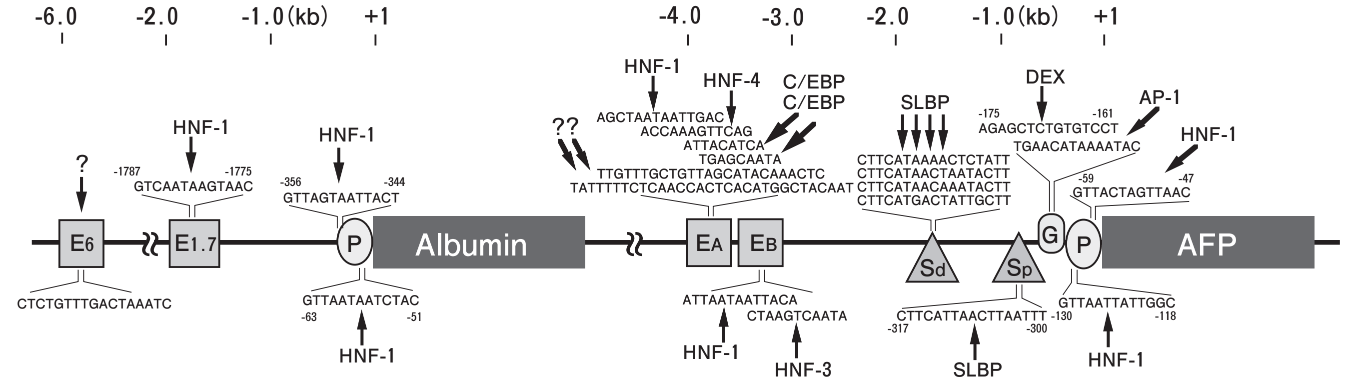

図１　アルブミンと AFP 遺伝子の発現制御領域と転写因子の結合する塩基配列
アルブミンと AFP のプロモーター領域には，２ヵ所の HNF-1結合部位が存在する．AFPエンハンサー（E_A と E_B）は，強力で多くの転写因子が結合し肝臓に特異的に発現する．AFP エンハンサーとプロモーターの間には２ヵ所のサイレンサー領域が存在し，位置特異的にエンハンサー活性を抑制する．

にも GRE のコンセンサス配列が存在する事を示した[34]．ヒトを含めゴリラ，チンパンジーなど霊長類の GRE 部位は良く保存され，デキサメサゾン処理により発現が増強される．一方，マウス・ラットなどげっ歯類では，GRE 配列に HNF-4結合配列が重複して存在し，グルココルチコイド処理により HNF-4の結合と拮抗しプロモーター活性を抑制している事を明らかにした[29]．

AFP 遺伝子の発現抑制機構

AFP 遺伝子の活性を増強するエレメントやファクターが，明らかにされてきたが，抑制機構は未だ謎のままであった．先に述べた様に，AFP 遺伝子の発現調節機構を調べた実験では，AFP を大量に産生する胎児型の HuH-7では，－5.1kb までの５'-上流領域によってレポーター活性が増強される．一方，アルブミンを多く発現し，AFP の産生の少ない成人型の huH-1[15]では，AFP 5'-上流領域の長さにかかわらず活性は殆ど認められない．しかし，エンハンサーとプロモーター領域の中間部位の一部を除去すると活性が増強する事を見いだした．詳細に検討した処，－1790～－1760bp に強いサイレンサー活性が認められ，さらに－402～－174bp 部位にも同様の活性が認められた．このサイレンサーの特徴は，エンハンサーとプロモーターの中間に位置した時のみ，エンハンサーのプロモーターへの活性を位置特異的に抑制する[35]．エンハンサーそのものの活性は抑制されないため，上流に存在するアルブミンのプロモーターに作用し，アルブミン活性を増強する[36]．図２に胎児期および成人期での AFP およびアルブミンの制御機構を示した．EGF と TPA 処理により AFP のエンハンサー活性を抑制すると，AFP ばかりかアルブミンの発現も強く抑制される．このことから，AFP エンハンサーはアルブミン遺伝子の発現を活性化しており，出生後サイレンサーが作用すると，アルブミンのプロモーターを活性化するものと思われる．これらの遺伝子発現の発現制御機構は，日本臨床54巻（1996年）にて解説している[37]．

AFP 遺伝子の発現に関与する因子の研究は他にも活発に行われており，癌遺伝子 c-H-ras[38]および c-jun, c-fos[39]による発現抑制や，癌抑制遺伝子 ING1[40]，p53[41]による発現抑制効果が報告されている．またHNF-1結合配列（AT-motif）に結合する別の転写因子ATBF1は，AFP 遺伝子発現を抑制する[42,43]．肝組織の癌化による AFP の上昇機序に関して，小島ら(2011年)により miRNA122の発現を抑制すると肝癌の悪性度が上がり，AFP の発現抑制が外れて AFP が上昇する機序が報告されている[44]．

AFP 5'-上流領域を用いた肝癌の遺伝子療法

AFP 遺伝子の制御機構が明らかになった事から，AFP 5'-上流の制御領域を用いた肝癌の遺伝子療法の可能性が示唆され，この可能性を第３回 Human Gene Therapy Conference にて発表した[45]．AFP 産生性肝細胞癌に対して，特異的に自殺遺伝子を発現させ，AFP を産生する肝癌細胞のみを特異的に殺す多数の試みが現在も積極的に行われている[46–53]．

HBV 研究

Ｂ型肝炎の原因ウイルスであるＢ型肝炎ウイルス

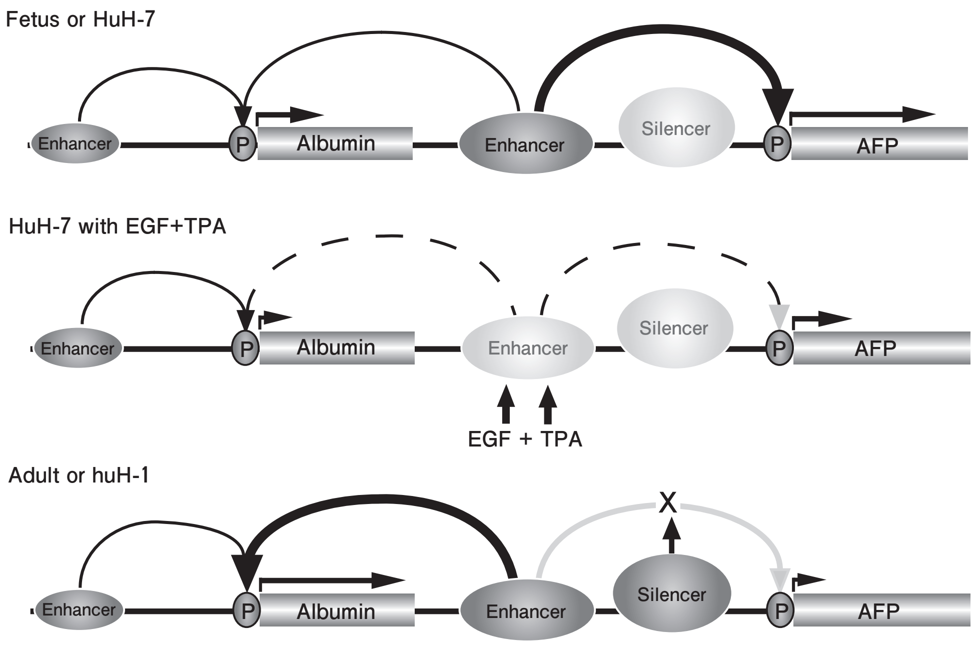

図２　アルブミンと AFP 遺伝子の制御機構
HuH-7細胞に EGF と TPA を同時に処理すると，AFP ばかりかアルブミンの転写も抑制される．この現象は AFP エンハンサーが，アルブミンのプロモーターをも活性化している事を示している．胎児期肝組織では，サイレンサーが働かず AFP 遺伝子が強く活性化される．成熟肝組織では，サイレンサーの作用で AFP 遺伝子の発現が抑制され，アルブミン遺伝子の活性が増強される[36,37]．

（HBV）は，DNA 型の肝炎ウイルスで，ヘパドナウイルス科に分類される．直径約42nmの球状ウイルスで，外被（エンベロープ）とコアの二重構造を有している．表面を被うエンベロープ蛋白が HBs 抗原，その内側のコア蛋白が HBc 抗原と呼ばれる．肝癌細胞株では，HepG2[1]，huH-1[15]，JHH-7[54]が HBs 抗原を産生している．1986年に環状 HBV　DNA を HepG2 に導入し，Dane 様粒子の産生が確認され[55]，1987年に HuH-7[56-58]で大量のウイルス粒子の産生が報告された．

HCV 研究

1989年，カイロン社の Choo ら[59]により長く不明であった非Ａ非Ｂ型ウイルス性肝炎の原因ウイルスとしてＣ型肝炎ウイルス（HCV）が同定され，フラビウイルス科に属する一本鎖 RNA ゲノムを持つ RNA ウイルスであることが判明した．1999年に Lohmann ら[60]により HCV のレプリコンシステムが報告され，HCV の構造領域と非構造領域の一部を取り除き，ネオマイシン耐性遺伝子を挿入したレプリコンプラスミドが構築された．このプラスミド DNA を鋳型として合成した RNA を HuH-7細胞内に導入し，ネオマイシンで選択培養を行い，レプリコンが複製している高効率な持続的複製システムが確立された．このシステムは当初 HuH-7細胞でのみ唯一可能であり，ウイルスの複製に関与するウイルス側，ホスト側因子の同定に大きな力を発揮した．なぜ HuH-7でしか増殖を再現できないのか不明であるが，HuH-7において，HCV の複製に関連する宿主因子として miRNA122が重要であると報告されている[61]．この頃より特に HCV レプリコンシステムでは“Huh7”の表記が増え，異なった細胞株との印象を与えているが間違いなく HuH-7細胞である．レプリコンシステムの普及により，HCV に対する治療法を確立するため，薬剤感受性や抗ウイルス薬の研究に広く用いられてきたが，このレプリコンシステムには HCV ゲノムの構造領域が一部含まれていない．その後，全長 HCV RNA 複製システムが2002年に相次いで報告された．2005年には，脇田らのグループから遺伝子型２a の JFH-1株を用いて感染性ウイルス粒子産生系が開発されている[62]．HCV の複製機構は，腫瘍ウイルス学分野 加藤宣之教授の総説Ｃ型肝炎ウイルスゲノムの複製[63]を参照していただきたい．

その他のウイルス研究

Ｄ型肝炎ウイルス（HDV：hepatitis delta virus）は一本鎖 RNA を持つデルタウイルスで単独で増殖することができない欠損ウイルスで，HBV をヘルパーウイルスとして増殖する特異な肝炎ウイルスである．1991年，台湾のグループから相次いで HuH-7に HBV 表面抗原を発現するプラスミド DNA との co-transfection により HDV 粒子の産生に成功した[64]．最近では，HEV，HAV の遺伝子発現，薬剤感受性，siRNA によるウイルス産生の抑制など広くウイルス研究に用いら

れている．

おわりに

1979年から培養を開始し，HuH-7細胞株の樹立に成功してから30年余が経過し，当初考えていた以上に多方面の研究に利用されていることは，光栄の至りであります．HuH-7は無血清で培養できること，トランスフェクション効率が高く遺伝子導入が容易であることから広い分野の研究に有用な材料を提供している．我々自身もこの細胞を用いて肝細胞癌の形質発現を分子レベルで研究する事ができた事は幸いで有りました．細胞培養の有用性は，本誌第122巻（2010年）の総説で，岡山医学振興会理事長の難波正義名誉教授が「細胞培養のノーベル賞への貢献」と題して，細胞培養について高次の立場から広く全容を紹介されています[65]．

稿を終えるに当たり，当初御指導を戴いた故佐藤二郎教授，岡山大学癌研病理の技術補佐員の方々，カナダ・カルガリー大学で御指導を賜った玉置大器教授に深謝致します．故佐藤二郎教授の後を引き継がれ，HuH-7細胞の保管，分与に御尽力下さっている難波正義名誉教授並びに許　南浩教授に深謝致します．

文　　献

1）Aden DP，Fogel A，Plotkin S，Damjanov I，Knowles BB：Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line．Nature（1979）282，615-616.

2）Nakabayashi H，Taketa K，Miyano K，Yamane T，Sato J：Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium．Cancer Res（1982）42，3858-3863.

3）Doi I，Namba M，Sato J：Establishment and some biological characteristics of human hepatoma cell lines．Gann（1975）66，385-392.

4）Alexander JJ，Bey EM，Geddes EW，Lecatsas G：Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver．S Afr Med J（1976）50，2124-2128.

5）Nakabayashi H，Taketa K，Yamane T，Miyazaki M，Miyano K，Sato J：Phenotypical stability of a human hepatoma cell line，HuH-7，in long-term culture with chemically defined medium．Gann（1984）75，151-158.

6）Bagnarelli P，Brugia M，Clementi M：A serum-free growth of a human hepatoma cell line as a tool for hepatocarcinogenesis and virus gene expression．Dev Biol Stand（1985）60，45-53.

7）Wu JC，Merlino G，Cveklova K，Mosinger B Jr，Fausto N：Autonomous growth in serum-free medium and production of hepatocellular carcinomas by differentiated hepatocyte lines that overexpress transforming growth factor alpha 1．Cancer Res（1994）54，5964-5973.

8）Kambe H，Kishima Y，Kuroda T，Enomoto H，Ogawa H，Nakmaura H：Protein kinase C inhibitor，H-7 suppresses the growth activity of hepatoma-derived growth factor．Hepatogastroenterology（2000）47，1645-1648.

9）Abe K，Ikeda M，Ariumi Y，Dansako H，Kato N：Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus（strain O of genotype 1b）replication．Virus Res（2007）125，162-168.

10）Ohkawa K，Hatano T，Takizawa N，Shinmoto K，Yamada K，Matsuda M，Takada K，Tsukada Y：Growth of a human yolk sac tumor cell line with yolk sac-derived functions in selenium-supplemented chemically defined synthetic medium．In Vitro Cell Dev Biol（1992）28A，449-454.

11）Everett AD，Bushweller J：Hepatoma derived growth factor is a nuclear targeted mitogen．Curr Drug Targets（2003）4，367-371.

12）Enomoto H，Yoshida K，Kishima Y，Okuda Y，Nakamura H：Participation of hepatoma-derived growth factor in the regulation of fetal hepatocyte proliferation．J Gastroenterol（2002）37，S158-161.

13）Lee YC，Tang YC，Chen YH，Wong CM，Tsou AP：Selenite-induced survival of HuH7 hepatoma cells involves activation of focal adhesion kinase-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway and Rac1．J Biol Chem（2003）278，39615-39624.

14）Nakabayashi H，Taketa K，Yamane T，Oda M，Sato J：Hormonal control of alpha-fetoprotein secretion in human hepatoma cell lines proliferating in chemically defined medium．Cancer Res（1985）45，6379-6383.

15）Huh N，Nemoto N，Utakoji T：Metabolic activation of benzo[a]pyrene，aflatoxin B1，and dimethylnitrosamine by a human hepatoma cell line．Mutat Res（1982）94，339-348.

16）Taketa K，Izumi M，Nakabayashi H，Sato J：Production and identification of different molecular species of human α-fetoprotein by double affinity electrophoresis with concanavalin A and Lens culinaris hemagglutinin A；in Electrophoresis '83，Hirai H（ed），Walter de Gruyter & Co，Berlin-New York（1984）pp611-618.

17）Taketa T，Ichikawa H，Nakabayashi H，Sato J，Kato K，Akai S，Ohkawa R，Taga H，Hirai H：Further resolution of human α-fetoprotein by affinity electrophoresis with erythroagglutinating phytohemagglutinin of Phaseolus valgaris lectin．Tumor Biology（1985）6，519-531.

18）Suzuki Y，Aoyagi Y，Muramatsu M，Igarashi K，Saito A，Oguro M，Isemura M，Asakura H：A lectin-based monoclonal enzyme immunoassay to distinguish

fucosylated and non-fucosylated alpha-fetoprotein molecular variants. Ann Clin Biochem (1990) 27, 121-128.
19) Taketa K, Endo Y, Sekiya C, Tanikawa K, Koji T, Taga H, Satomura S, Matsuura S, Kawai T, Hirai H：A collaboration study for the evaluation of lectin-reactive alpha-fetoproteins in early detection of hepatocellular carcinoma. Cancer Res (1993) 53, 5419-5423.
20) Yasuda I, Shiratori Y, Adachi S, Obora A, Takemura M, Okuno M, Shidoji Y, Seishima M, Muto Y, Moriwaki H：Acyclic retinoid induces partial differentiation, down-regulates telomerase reverse transcriptase mRNA expression and telomerase activity, and induces apoptosis in human hepatoma-derived cell lines. J Hepatol (2002) 36, 660-671.
21) Taketa K, Fujii Y, Taga H：Characterization of E-PHA-reactive alpha-fetoprotein isoforms by two-dimensional lectin affinity electrophoresis. Electrophoresis (1993) 14, 1333-1337.
22) Taketa K, Endo Y, Sekiya C, Tanikawa K, Koji T, Taga H, Satomura S, Matsuura S, Kawai T, Hirai H：A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive alpha-fetoproteins in early detection of hepatocellular carcinoma. Cancer Res (1993) 53, 5419-5423.
23) Moro R, Gulyaeva-Tcherkassova J, Stieber P：Increased α-fetoprotein receptor in the serum of patients with early-stage breast cancer. Curr Oncol (2012) 19, 1-8.
24) Tomono Y, Ando K, Taketa K：Analysis of sugar chains of alpha-fetoprotein (AFP) secreted by HuH-7 cell line. 重井医年報 (in press).
25) Sakai M, Morinaga T, Urano Y, Watanabe K, Wegmann TG, Tamaoki T：The human alpha-fetoprotein gene. Sequence organization and the 5' flanking region. J Biol Chem (1985) 260, 5055-5060.
26) Urano Y, Sakai M, Watanabe K, Tamaoki T：Tandem arrangement of the albumin and alpha-fetoprotein genes in the human genome. Gene (1984) 32, 255-261.
27) Watanabe K, Saito A, Tamaoki T：Cell-specific enhancer activity in a far upstream region of the human alpha-fetoprotein gene. J Biol Chem (1987) 262, 4812-4818.
28) Nicosia A, Monaci P, Tomei L, De Francesco R, Nuzzo M, Stunnenberg H, Cortese R：A myosin-like dimerization helix and an extra-large homeodomain are essential elements of the tripartite DNA binding structure of LFB1. Cell (1990) 61, 1225-1236.
29) Nakabayashi H, Koyama Y, Sakai M, Li HM, Wong NC, Nishi S：Glucocorticoid stimulates primate but inhibits rodent alpha-fetoprotein gene promoter. Biochem Biophys Res Commun (2001) 287, 160-172.
30) Hayashi Y, Chan J, Nakabayashi H, Hashimoto T, Tamaoki T：Identification and characterization of two enhancers of the human albumin gene. J Biol Chem (1992) 267, 14580-14585.
31) Nakabayashi H, Koyama Y, Suzuki H, Li HM, Sakai M, Miura Y, Wong NC, Nishi S：Functional mapping of tissue-specific elements of the human alpha-fetoprotein gene enhancer. Biochem Biophys Res Commun (2004) 318, 773-785.
32) Turcotte B, Guertin M, Chevrette M, Bélanger L：Rat α_1-fetoprotein messenger RNA：5'-end sequence and glucocorticoid-suppressed liver transcription in an improved nuclear run-off assay. Nucleic Acids Res (1985) 13, 2387-2398.
33) Rabek JP, Zhang DE, Torres-Ramos CA, Papaconstantinou J：Analysis of the mechanism of glucocorticoid-mediated down regulation of the mouse alpha-fetoprotein gene. Biochim Biophys Acta (1994) 1218, 136-144.
34) Nakabayashi H, Watanabe K, Saito A, Otsuru A, Sawadaishi K, Tamaoki T：Transcriptional regulation of alpha-fetoprotein expression by dexamethasone in human hepatoma cells. J Biol Chem (1989) 264, 266-271.
35) Nakabayashi H, Hashimoto T, Miyao Y, Tjong KK, Chan J, Tamaoki T：A position-dependent silencer plays a major role in repressing alpha-fetoprotein expression in human hepatoma. Mol Cell Biol (1991) 11, 5885-5893.
36) Nakata K, Motomura M, Nakabayashi H, Ido A, Tamaoki T：A possible mechanism of inverse developmental regulation of alpha-fetoprotein and albumin genes. Studies with epidermal growth factor and phorbol ester. J Biol Chem (1992) 267, 1331-1334.
37) 酒井正春，中林秀和：特集 腫瘍マーカー 腫瘍マーカー遺伝子の発現制御．日本臨床 (1996) 54, 94-101.
38) Nakao K, Lawless D, Ohe Y, Miyao Y, Nakabayashi H, Kamiya H, Miura K, Ohtsuka E, Tamaoki T：c-Ha-ras down regulates the α-fetoprotein gene but not the albumin gene in human hepatoma cells. Mol Cell Biol (1990) 10, 1461-1469.
39) Saegusa M, Ido A, Nakabayashi H, Tamaoki T：Down-regulation of human α-fetoprotein gene by c-jun and c-fos. J Tumor Marker Oncol (1994) 9, 29-34.
40) Kataoka H, Bonnefin P, Vieyra D, Feng X, Hara Y, Miura Y, Joh T, Nakabayashi H, Vaziri H, Harris CC, Riabowol K：ING1 represses transcription by direct DNA binding and through effects on p53. Cancer Res (2003) 63, 5785-5792.
41) Lee KC, Crowe AJ, Barton MC：p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression by specific DNA binding. Mol Cell Biol (1999) 19, 1279-1288.
42) Ninomiya T, Mihara K, Fushimi K, Hayashi Y, Hashimoto-Tamaoki T, Tamaoki T：Regulation of the α-fetoprotein gene by the isoforms of ATBF1 transcription factor in human hepatoma. Hepatology (2002) 35, 82-87.
43) Yasuda H, Mizuno A, Tamaoki T, Morinaga T：ATBF1, a multiple-homeodomain zinc finger protein, selectively

down-regulates AT-rich elements of the human alpha-fetoprotein gene．Mol Cell Biol（1994）14，1395-1401.
44）Kojima K，Takata A，Vadnais C，Otsuka M，Yoshikawa T，Akanuma M，Kondo Y，Kang YJ，Kishikawa T，Kato N，Xie Z，Zhang WJ，et al．：MicroRNA122 is a key regulator of α-fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma．Nat Commun（2011）2，338-348.
45）Nakabayashi H，Shiozawa C，Suzuki H，Tamaoki T：Selective expression of a toxin gene under the direction of human α-fetoprotein gene regulatory sequences in the human hepatoma cells - An approach to hepatocellular carcinoma gene therapy．Human gene therapy（1992）3，614.
46）Kaneko S，Hallenbeck P，Kotani T，Nakabayashi H，McGarrity G，Tamaoki T，Anderson WF，Chiang YL：Adenovirus-mediated gene therapy of hepatocellular carcinoma using cancer-specific gene expression．Cancer Res（1995）55，5283-5287.
47）Kanai F，Shiratori Y，Yoshida Y，Wakimoto H，Hamada H，Kanegae Y，Saito I，Nakabayashi H，Tamaoki T，Tanaka T，Lan KH，Kato N，et al．：Gene therapy for alpha-fetoprotein-producing human hepatoma cells by adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene．Hepatology（1996）23，1359-1368.
48）Kanai F，Lan KH，Shiratori Y，Tanaka T，Ohashi M，Okudaira T，Yoshida Y，Wakimoto H，Hamada H，Nakabayashi H，Tamaoki T，Omata M：In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene．Cancer Res（1997）57，461-465.
49）Sato Y，Tanaka K，Lee G，Kanegae Y，Sakai Y，Kaneko S，Nakabayashi H，Tamaoki T，Saito I：Enhanced and specific gene expression via tissue-specific production of Cre recombinase using adenovirus vector．Biochem Biophys Res Commun（1998）244，455-462.
50）Ishikawa H，Nakata K，Mawatari F，Ueki T，Tsuruta S，Ido A，Nakao K，Kato Y，Ishii N，Eguchi K：Utilization of variant-type of human alpha-fetoprotein promoter in gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma．Gene Ther（1999）6，465-470.
51）Xu HN，Huang WD，Cai Y，Ding M，Gu JF，Wei N，Sun LY，Cao X，Li HG，Zhang KJ，Liu XR，Liu XY：HCCS1-armed，quadruple-regulated oncolytic adenovirus specific for liver cancer as a cancer targeting gene-viro-therapy strategy．Mol Cancer（2011）1，133-147.
52）Liu X，Cao X，Wei R，Cai Y，Li H，Gui J，Zhong D，Liu XY，Huang K：Gene-viro-therapy targeting liver cancer by a dual-regulated oncolytic adenoviral vector harboring IL-24 and TRAIL．Cancer Gene Ther（2012）19，49-57.
53）Zhang KJ，Qian J，Wang SB，Yang Y：Targeting Gene-Viro-Therapy with AFP driving Apoptin gene shows potent antitumor effect in hepatocarcinoma．J Biomed Sci（2012）19，20-34.
54）Fujise K，Nagamori S，Hasumura S，Homma S，Fujita K，Sujino H，Matsuura T，Shimizu K，Niiya M，Ohno T，Kameda H：Analysis for the integrated hepatitis B virus genome in cells of established human hepatocellular carcinoma cell line JHH-7．日消外会誌（1990）87，1851-1855.
55）Sureau C，Romet-Lemonne JL，Mullins JI，Essex M：Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA．Cell（1986）47，37-47.
56）Chang CM，Jeng KS，Hu CP，Lo SJ，Su TS，Ting LP，Chou CK，Han SH，Pfaff E，Tsurimoto T，Fujiyama A，Matsubara K：Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA．Proc Natl Acad Sci U S A（1987）84，444-448.
57）Chang CM，Jeng KS，Hu CP，Lo SJ，Su TS，Ting LP，Chou CK，Han SH，Pfaff E，Salfeld J，Schaller H：Production of hepatitis B virus in vitro by transient expression of cloned HBV DNA in a hepatoma cell line．EMBO J（1987）6，675-680.
58）Yaginuma K，Shirakata Y，Kobayashi M，Koike K：Hepatitis B virus（HBV）particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA．Proc Natl Acad Sci U S A（1987）84，2678-2682.
59）Choo QL，Kuo G，Weiner AJ，Overby LR，Bradley DW，Houghton M：Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A，non-B viral hepatitis genome．Science（1989）244，359-362.
60）Lohmann V，Körner F，Koch J，Herian U，Theilmann L，Bartenschlager R：Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line．Science（1999）285，110-113.
61）Jopling CL，Yi M，Lancaster AM，Lemon SM，Sarnow P：Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA．Science（2005）309，1577-1581.
62）Wakita T，Pietschmann T，Kato T，Date T，Miyamoto M，Zhao Z，Murthy K，Habermann A，Kräusslich HG，Mizokami M，Bartenschlager R，Liang TJ：Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome．Nat Med（2005）11，791-796.
63）加藤宣之：C型肝炎ウイルスゲノムの複製，ウイルス（2008）58，191-198.
64）Wu JC，Chen PJ，Kuo MY，Lee SD，Chen DS，Ting LP：Production of hepatitis delta virus and suppression of helper hepatitis B virus in a human hepatoma cell line．J Virol（1991）65，1099-1104.
65）難波正義：細胞培養のノーベル賞への貢献，岡山医会誌（2010）122，33-38.