

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字	TODO SATORU					
①研究代表者氏名	藤堂 省			②所属研究機関・部局・職	北海道大学・大学院医学研究科・教授	
③研究課題名	和文	臓器移植における遺伝子治療による免疫抑制・免疫寛容誘導法の開発				
	英文	Tolerance induction by gene therapy in organ transplantation				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	37,600	11,500	14,400	14,400	16,600	94,500
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
藤堂 省	北海道大学・大学院医学研究科・教授	肝臓移植	研究の総括及び大動物実験の遂行とデータ解析			
上出 利光	北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授	免疫病態学	ウイルスベクター開発と免疫学的作用機序の解明			
藤田 博美	北海道大学・大学院医学研究科・教授	環境医学・生化学	ウイルスベクターの開発と作用機序の解明			
松下 通明	北海道大学医学部・教授	肝臓外科	小動物移植実験の遂行とデータ解析			
古川 博之	北海道大学・大学院医学研究科・寄附講座教員	肝臓移植	大動物実験の遂行とデータ解析			
嶋村 剛	北海道大学・北海道大学病院・助教授	肝臓移植	大動物実験の遂行とデータ解析			
山下 健一郎	北海道大学・北海道大学病院・医員	肝臓移植	小動物移植実験の遂行とデータ解析			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>臓器移植における拒絶反応の制御は、カルシニューリン阻害剤や核酸代謝阻害剤等の薬剤を用いた免疫抑制療法により行われてきた。これら薬剤は近年改良されているものの拒絶反応は未だ完全には制御されず、またそれによる免疫抑制も抗原非特異的である。我々は本研究計画に基づいた前年度まで（平成13-17年度）の研究より、T細胞の副刺激経路を遮断する種々の分子を組み込んだアデノウイルスベクターのドナーもしくはレシピエントへの全身投与による遺伝子治療で長期グラフト生着しないドナー抗原特異的な免疫寛容誘導が得られる事を見いだした。アデノウイルスベクターを用いる遺伝子導入法は導入効率の点で優れているが、米国における臨床試験でベクター経門脈投与による全身性炎症反応での死亡例が報告されその使用が問題となった。一方、非ウイルスベクターによる新たな遺伝子治療法も考案されているが遺伝子導入効率が比較的安く現時点における実用性は乏しい。これらの現状および本研究中間報告結果で指摘された点を加味し、本年度は副刺激経路遮断による免疫抑制法の臨床応用化にむけて遺伝子治療のみならず現在開発中であるヒト抗CD40抗体の効果をサル腎移植モデルにおいて検討した。また、より実際的で安全かつ有効な免疫抑制法の確立するため、副刺激経路遮断による免疫抑制法とタクロリムスやシクロスポリンなど現在臨床で用いられている主な免疫抑制剤との併用効果を検討した。更に、副刺激経路遮断療法では免れない拒絶反応を克服するための併用剤となり得る新しい薬剤を検討した。</p> <ol style="list-style-type: none"> 副刺激経路遮断療法における免疫抑制作用機序の解明 副刺激経路遮断療法と既存免疫抑制剤の併用による免疫寛容誘導・慢性拒絶反応抑制効果の検討 新しいNF-κB阻害剤であるDHMEQの免疫抑制効果の検討 サル移植モデルにおけるヒト抗CD40抗体による副刺激経路遮断療法の免疫抑制効果の検討（前臨床実験） 						

⑦ 研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

1. CD40Ig 遺伝子組込みアデノウイルスベクターを用いた CD40-CD154 シグナル遮断による免疫抑制作用機序の解明

ラットの T 細胞および ACI-LEW ラット心移植モデルを用いた実験で、CD40Ig 遺伝子組込みアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療によって生体内で産生される CD40Ig は免疫反応に係る 2 種類の細胞に作用、即ち、CD4⁺ T 細胞に直接作用し IL-2 産生を亢進させることおよび抗原提示細胞(Dendritic cell)に作用し CD4⁺CD25⁺ T 細胞を誘導することで、最終的に細胞障害性 T 細胞を制御する抗原特異的な機能的 regulatory T 細胞が誘導され、移植片の長期性着が得られることが判明した。

2. CD40-CD154 シグナル遮断療法におけるカルシニューリン阻害剤併用の影響

i) ACI-LEW ラット心移植および肝移植モデルを用い CD40Ig 遺伝子組込みアデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療におけるカルシニューリン阻害剤 (タクロリムスおよびシクロスポリン、14 または 30 日間投与) 併用の影響を検討した。肝移植モデルでは CD40-CD154 副刺激経路遮断治療にカルシニューリン阻害剤を併用してもグラフトの長期生着は阻害されず、ドナー抗原特異的な免疫寛容誘導効果も失わなかった。心移植モデルでも CD40-CD154 副刺激経路遮断治療によるグラフトの長期生着効果はカルシニューリン阻害剤併用により阻害されることは無かったが、併用群ではグラフトへの細胞浸潤が若干増加する傾向にあり、また慢性血管病変もごくわずかながら増強傾向を示した。

ii) ラット心移植モデルでの結果を検証すべく CD40、CD154 遺伝子欠損マウスを用い CD40-CD154 経路遮断にカルシニューリン阻害剤が及ぼす影響を BALB/c-B6 マウス心移植モデルで検討した。CD40 欠損および CD154 欠損いずれの場合においてもカルシニューリン阻害剤 (タクロリムス) との併用でグラフトの生着が阻害されることはなかった。しかし、CD40 欠損、CD154 欠損いずれの場合においてもカルシニューリン阻害剤を遅いタイミング(移植一ヶ月後から 2 週間)で投与すると、グラフトへの細胞浸潤の増加と血管病変の増加を認めた。

3. 副刺激シグナル遮断療法に併用可能な新しい免疫抑制法の探求(新規NF-κB阻害剤の免疫抑制効果)

新規 NF-κB 阻害剤である Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) の免疫抑制効果を検討した。

i) DHMEQ は用量依存性に抗 CD3+CD28 抗体刺激による T 細胞の増殖および MLR を抑制した。本剤は T 細胞において NF-κB の核内移行を特異的に抑制(NFAT は抑制せず)することで CD69、CD25 の発現および IL-2、IFN-γ の産生を抑制し、細胞増殖を阻止することが解った。更に DHMEQ はマウス DC の成熟化・活性化も抑制することが示された。

ii) 急性拒絶反応を惹起する BALB/c-B6 マウス心移植モデルでは DHMEQ 投与によりグラフト生着期間が延長し、この免疫抑制効果は特にカルシニューリン阻害剤であるタクロリムスとの併用で相乗作用を認めグラフトの長期生着が得られた。

iii) 慢性拒絶反応を惹起する Bm12-B6 マウス心移植モデルでは DHMEQ 投与によりグラフト冠動脈の内膜肥厚を抑制し、これは NF-κB 活性抑制によるドナー抗原特異的 memory T 細胞の増殖抑制によることが判明した。

iv) マウスラ氏島移植モデルでは DHMEQ 投与により移植直後の非特異的免疫反応に起因する移入ラ氏島の細胞死(アポトーシス)を抑制し、より少ないラ氏島数での移植の可能性が示唆された。

4. カニクイザル腎移植モデルにおける完全ヒト抗CD40抗体、4D11の免疫抑制効果(前臨床試験)

カニクイザル腎移植モデルを用いて新しい完全ヒト抗 CD40 抗体である 4D11 の効果と安全性を検討した。

i) 4D11 の免疫抑制効果と安全性：

ABO 血液型適合で MLR index が 3 以上のカニクイザルの組み合わせで腎移植を行い、4D11 を 10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg の投与量で 10 週間 (移植後 2 週間までは計 9 回、3-6 週間は週 1 回、8 および 10 週目に各 1 回、以後は無治療) 投与した所、すべての治療群において 100 日以上長期生存 (最長 375 日) が得られた。4D11 の有効血中濃度は術後 14 日以内で 500~1000 μg/ml であった。全動物の B 細胞は移植 4 週間後に術前値の 3 分の 1 に減少した。観察期間中、抗ドナー抗体および 4D11 に対する抗体を血液中に認めなかった。血栓症、血小板減少を含む副作用は血液・生化学検査および病理所見上認めなかった。

ii) 4D11 導入(induction)療法と維持(maintenance)療法の免疫抑制効果：

同一のサル腎移植モデルで、4D11 (10 mg/kg、20 mg/kg) の導入療法 (術後 2 週間のみ 6 回の投与) および維持療法 (導入療法に引き続き 1/2 量を週一回投与、10 週目以降は無治療) 施行した所、induction 治療では 5 頭中 3 頭は 100 日前後で拒絶されたが、維持療法では現在全例 100 日以上長期生存中である。本実験は現在も進行中である。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

1. CD40-CD154シグナル制御における免疫抑制の作用機序

CD40-CD154シグナルはT細胞の活性化および増殖に重要な役割を果たしており、抗CD154抗体は本カスケードを遮断することでその免疫抑制作用を発揮すると考えられていたが、最近、この抗体投与によりシグナル遮断のみならず補体依存性に活性化T細胞の細胞死を誘導する事が報告されている。本研究では遺伝子導入により産生されたCD40Igが1) CD4⁺T細胞に直接作用しIL-2産生を亢進させる、2) 抗原提示細胞(Dendritic cell; DC)に作用しCD4⁺CD25⁺T細胞を誘導する、3) CD4⁺CD25⁺T細胞はIL-2が作用することで機能的regulatory T細胞となる事を見いだした。将来的にこの作用機序の詳細が明らかになれば、ヒトにおいてもin vivoで有効な免疫寛容誘導法の確立やex vivoで効率的にregulatory T細胞を誘導しこれを生体内に戻すことで免疫寛容を誘導し得る方法が確立できる可能性がある。

2. CD40-CD154シグナル制御におけるカルシニューリン阻害剤併用の可否

臓器移植におけるCD40-CD154副刺激経路遮断治療の有効性は多くの実験モデルで示されている。しかし、サル移植モデルでは本治療法単独による効果は十分とは言えず、現行免疫抑制剤との併用の検討が必要である。マウス移植モデルでは、抗CD154抗体治療にカルシニューリン阻害剤を併用すると活性T細胞の細胞死(AICD)が阻害されグラフトが拒絶される。一方、十分量の抗CD154抗体を投与すればカルシニューリン阻害剤を併用してもグラフトは長期生着するとの報告もあり、併用の可否については未だcontroversialである。本研究では、肝移植ではカルシニューリン阻害剤を併用してもCD40-CD154刺激遮断治療で得られる抗原特異的免疫寛容誘導作用は失われないことが判った。これは新しい知見である。心移植でもラットを用いた研究ではカルシニューリン阻害剤を併用してもグラフトの長期生着は阻害されなかったが、CD40やCD154遺伝子欠損マウスを用いたモデルではカルシニューリン阻害剤を移植後期に併用すると慢性拒絶が促進されたことから、心移植ではその併用には注意を要することが示唆された。しかし、これらの知見は小動物実験で得られた結果であるため、必ずしもヒトにおいて同様の結果となり得るかは不明であり、サルを用いた前臨床モデルでの評価が必須であると考ええる。

3. 新規NF-κB阻害剤、Dehydroxymethylepoxyquinomicinの免疫抑制剤としての有用性・可能性

本研究では新しいNF-κB阻害剤であるDehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ)の免疫抑制効果をin vitro およびin vivo で検討した。DHMEQは慶応義塾大学応用化学・梅澤教授らによって見いだされたepoxydone化合物であり、我々は世界に先駆けて本剤の急性拒絶反応および慢性拒絶反応に対する効果を示した。本剤はマウスT細胞においてその活性化の際にNF-κBが核内へtranslocationする時点で作用することやNFATなどの他の転写因子の核内以降を阻害せず非常にNF-κB特異性が高いことも判明した。即ち、本剤はNF-κB特異性が高く、実際に活性化シグナルが入り増殖・分化する細胞を主な標的と出来ることが特徴的である。また、小動物を用いた今までの実験では明らかな毒性が認められていない事などからも臨床応用の可能性が示唆される。NF-κBは様々な細胞の活性化・分化・増殖に関与しており、ラ氏島細胞移植への応用や移植以外の疾患治療薬としての応用の可能性を秘めているものと考ええる。今後、臨床応用化に向けた研究が望まれる。

4. CD40L-CD40シグナル制御における新しい完全ヒトCD40抗体、4D11の優位性・臨床応用の可能性

CD40L-CD40シグナルの制御において1990年代はCD154ブロックのための方法論が数多く開発された。特に抗CD154モノクローナル抗体を用いたサルにおける腎移植実験では、その成果が極めて将来性に富むと考えられていたが、数年前に行われた臨床試験では血栓症合併のために以後の開発を断念せざるを得なくなった。他方、CD40を標的分子とする我々の方法論は世界に先駆けて開発したものであり、その免疫抑制/免疫誘導効果はこれまでに報告されたCD154を標的分子とするものと遜色がない。血栓症の発生機序としてCD154抗体そのものの関与が示唆されており、逆に我々の知見はCD40に対するモノクローナル抗体を開発し臨床に応用する可能性を示していると考えられる。今後は既存免疫抑制剤との併用効果や肝移植などでの免疫抑制効果の検討が必要であり、これらは現在進行中である。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

関連論文

藤堂 省 :

1. Echizenya H, Yamashita K, Takehara M, Konishi K, Nomura M, Yanagida N, Kitagawa N, Kobayashi T, Furukawa H, Inobe M, Uede T, Todo S: Adenovirus-mediated CTLA4IgG gene therapy in orthotopic small intestinal transplantation in rats. *Transplantation Proc* 33(1-2): 183-184, 2001.
2. Nomura M, Yamashita K, Murakami M, Takehara M, Konishi M, Echizenya H, Yanagida N, Sunahara M, Kitagawa N, Furukawa H, Uede T, Todo S: Novel CD40-IgG adenovirus-mediated gene therapy as a potent immunosuppressive treatment for liver transplantation in rats. *Transplantation Proc* 33(1-2): 189, 2001.
3. Yanagida N, Nomura M, Yamashita K, Takehara M, Murakami M, Echizenya H, Konishi K, Kitagawa N, Furukawa H, Uede T, Todo S: Tolerance induction by a single donor pretreatment with the adenovirus vector encoding CTLA4Ig gene in rat orthotopic liver transplantation. *Transplantation Proc* 33(1-2): 573-574, 2001.
4. Takehara M, Murakami M, Inobe M, Tanaka K, Chikuma S, Saito I, Kanegae Y, Yasunami Y, Nakano M, Yamashita K, Todo S, Uede T: Long-term acceptance of allografted organs by in vivo gene transfer of regulatable adenovirus vector containing CTLA4IgG and Lox P. *Human Gene Ther* 12: 415-426, 2001 Mar.
5. Nomura M, Yamashita K, Murakami M, Takehara M, Echizenya H, Sunahara M, Kitagawa N, Fujita M, Furukawa H, Uede T, Todo S: Induction of donor-specific tolerance by adenovirus mediated CD40Ig gene therapy in rat liver transplantation. *Transplantation* 73(9): 1403-1410, 2002
6. Jin MB, Nakayama M, Ogata T, Fujita M, Mino K, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, Furukawa H, Todo S: A Novel lefunomide derivative, FK778, for immunosuppression after kidney transplantation in dogs. *Surgery* 132(1): 72-79, 2002
7. Konishi K, Inobe M, Yamada A, Murakami M, Todo S: Combination Treatment With FTY720 and CTLA4IgG Preserves the Respiratory Epithelium and Prevents Obliterative Disease in a Murine Airway Model. *J Heart Lung Transplant* 21(6):692-700, 2002
8. Nakamura Y, Yasunami Y, Satoh M, Hirakawa E, Katsuta H, Ono J, Kamada M, Todo S, Nakayama T, Taniguchi M, Ikeda S: Acceptance of islet allografts in the liver of mice by blockade of an inducible costimulator, *Transplantation* 75(8): 1115-1118, 2003
9. Yamashita K, Masunaga T, Yanagida N, Takehara M, Hashimoto T, Kobayashi T, Echizenya H, Hua N, Fujita M, Murakami M, Furukawa H, Uede T, Todo S: Long-term acceptance of rat cardiac allografts on the basis of adenovirus mediated CD40Ig plus CTLA4Ig gene therapies, *Transplantation* 76(7): 1089-1096, 2003.
10. Hua N, Yamashita K, Hashimoto T, Masunaga T, Fujita M, Furukawa H, Uede T, Todo S: GeneTherapy-Mediated CD40L and CD28 Co-stimulatory Signaling Blockade plus Transient Anti-xenograft Antibody Suppression Induces Long-Term Acceptance of Cardiac Xenografts, *Transplantation* 78(10): 1463-1470, 2004
11. Nabeyama, K., Y. Yasunami, A. Toyofuku, M. Nakano, M. Satoh, N. Matsuoka, J. Ono, M. Kamada, T. Uede, S. Todo, S. Ikeda. Beneficial effects of costimulatory blockade with anti-inducible costimulator antibody in conjunction with CTLA4Ig on prevention of islet xenograft rejection from rat to mouse. *Transplantation* 78:1590-1596, 2004.
12. Hirakawa, E., Y. Yasunami, M. Nakano, M. et.al (3), S. Todo, J. Ono, S. Ikeda. Amelioration of hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice with fetal pancreatic allografts: prevention of rejection by donor specific transfusion in conjunction with CTLA4Ig. *Pancreas* 28:146-152, 2004
13. Sakihama H, Masunaga T, Yamashita K, Hashimoto T, Inobe M, Todo S, Uede T: Stromal Cell-Derived Factor-1 and CXCR4 Interaction is Critical for Development of Transplant Arteriosclerosis. *Circulation* 110:2924-2930, 2004
14. Masunaga T, Yamashita K, Sakihama H, Hashimoto T, Hua N, Imai, A, Inobe M, Miyazaki T, Todo S, Uede T: Dimeric but not Monomeric Soluble CD40 Prolongs Allograft Survival and Generates Regulatory T Cells that Inhibit CTL Function. *Transplantation* 80(11) 1614-1622, 2005

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

上出 利光：

1. T Takahashi, T Tagami, S Yamazaki, T Uede, J Shimizu, N Sakaguchi, TW Mak and S Sakaguchi : Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen *J Exp Med* 192:303-310, 2000
2. K Ijima, M Murakami, H Okamoto, M Inobe, S Chikuma, I Saito, Y Kanegae, Y Kawaguchi, A Kitabatake and T Uede : Successful gene therapy via intraarticular injection of adenovirus vector containing CTLA4IgG in murine model of type II collagen induced arthritis. *Human Gene Ther* 12:1063-1077, 2001
3. N Iwasaki, T Gohda, C Yoshioka, M Murakami, M Inobe, A Minami and T Uede : Feasibility of immunosuppression in composite tissue allografts by systemic administration of CTLA4Ig. *Transplantation* 73: 334-340, 2002.
4. AD Salama, X Yuan, A Nayer, A Chandraker, M Inobe, T Uede, MH Sayegh : Interaction between ICOS-B7RP1 and B7-CD28 costimulatory pathways in alloimmune responses in vivo. *Am J Transplant* 3:390-395, 2003
5. K Kanaya, Y Tsuchida, M Inobe, M Murakami, T Hirose, S Kon, S Kawaguchi, T Wada, T Yamashita, S Ishii, T Uede : Combined gene therapy with adenovirus vectors containing CTLA4Ig and CD40Ig prolongs survival of composite tissue allografts in rat model. *Transplantation* 15:275-281, 2003
6. Y Matsui, H Okamoto, M Inobe, N Jia, T Shimizu, M Akino, T Sugawara, K Tezuka, Y Nakayama, J Morimoto, C Kimura, S Kon, T Miyazaki, A Kitabatake and T Uede : Adenovirus-mediated Gene Transfer of ICOSIg Fusion Protein Ameliorates Ongoing Experimental Autoimmune Myocarditis. *Human Gene Ther*
7. Matsui Y, Rittling SR, Okamoto H, Inobe M, Jia N, Shimizu T, Akino M, Sugawara T, Morimoto J, Kimura C, Kon S, Denhardt D, Kitabatake A, Uede T. Osteopontin deficiency attenuates atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(6):1029-34, 2003
8. Tsuji H, Kawaguchi S, Wada T, Nagoya S, Inobe M, Yagita H, Okumura K, Yamashita T, Uede T. Concurrent induction of T-cell activation and apoptosis of osteosarcoma cells by adenovirus-mediated B7-1/Fas chimeric gene transfer. *Cancer Gene Ther*. 10(9):717-25, 2003
9. Watanabe T, Miyatake T, Kumamoto H, Mafune N, Kubota S, Okamoto H, Murashita T, Uede T, Yasuda K. Adenovirus-mediated CTLA4 immunoglobulin G gene therapy in cardiac xenotransplantation. *Transplant Proc*. 36(8):2478-9, 2004

藤田 博美：

1. K Ogawa, K Igarashi, C Nishitani, S Shibahara & H Fujita: Heme-regulated transcription factor Bach1. *J Health Sic*, 48: 1-6, 2002. (invited review)
2. H Fujita, C Nishitani & K Ogawa: Lead, Chemical Porphyria, and Heme as a Biological Mediator. *Tohoku J Exp Med*, 196: 53-64, 2002. (invited review).
3. T Kitamuro, K Takahashi, K Ogawa, R.F Udono, K Takeda, K Furuyama, M Nakayama, J Sun, H Fujita, W Hida, T Hattori, K Shirato, K Igarashi & S Shibahara: Bach 1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. *J Biol Chem*, 278 : 9125-9133, 2003.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

古川 博之：

1. Suzuki T, Jin MB, Shimamura T, Yamashita K, Taniguchi M, Nomura M, Yokota R, Fukai M, Magata S, Horiuchi H, Fujita M, Nagashima K, Furukawa H, Todo S: A new immunosuppressant, FTY720, in canine kidney transplantation: effect of single-drug, induction and combination treatments. *Transpl Int* 17: 574-584, 2004
2. Furukawa, H, and S. Todo. Evolution of immunosuppression in liver transplantation: contribution of cyclosporine. *Transplant Proc* 36:274S-284S, 2004
3. Wakayama, K., M.B. Jin, H. Furukawa, S. Todo, T. Shimamura, T. Suzuki, M. Hattori, R. Yokoyama, S. Iwasaki, M. Sato, T. Nakagawa, N. Kurauchi, H. Kamachi, T. Kamiyama, M. Matsushita. Cadaveric domino liver transplantation: the first case in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 11:445-448, 2004

松下 通明：

1. Okubo H, Matsushita M, Kamachi H, Kawai T, Nishikawa K, Fujimoto T, Saito T, Todo S. Maintenance of morphology and function of mixed liver cell spheroids under collagen gel environment. *J Artif Organs* 4: 331-335, 2001
2. Okubo H, Matsushita M, Kamachi H, Kawai T, Takahashi M, Fujimoto T, Nishikawa K, Todo S. A Novel Method for Faster Formation of Rat Liver Cell Spheroids. *Artificial Organs* 26(6): 497-505, 2002 August
3. Kamachi H, Matsushita M, Okubo H, Kawai T, Nishikawa K, Fujimoto T, Todo S. Rat small hepatocytes for liver support: growth and metabolic activities in culture. *J Artif Organs* 5: 24-29, 2002