

臨床研究としての肝細胞移植プロトコール作成に向けて

絵野沢 伸

国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部
東京医科大学外科学第三講座

Designing clinical study of hepatocyte transplantation

Enosawa Shin

Department of Innovative Surgery, National Research Institute for Child Health and Development
Third Department of Surgery, Tokyo Medical University

Clinical interest for hepatocyte transplantation is becoming stronger along with the progress in the research of regenerative medicine and donor shortage. Comparing to liver transplantation, hepatocyte transplantation is not an accepted conventional treatment yet, because the therapeutic potential still remains to be elucidated. However, hepatocyte transplantation is thought to have numerous advantages to liver transplantation ; 1) less invasive, 2) partial or temporal liver support is feasible for congenital metabolic disorders or fulminant hepatic failure, 3) efficient use of marginal donor, because cryopreservation of hepatocytes is less difficult than that of a whole organ or tissue, 4) ready to use as a cellular medicine when frozen. To establish hepatocyte transplantation as an evidence-based medical treatment, clinical study should be achieved. Unfortunately, hepatocyte transplantation so far has been performed by individual hospitals without systemic study design. Here, the points of consideration, such as purpose, indication, dose, route, character of hepatocytes (auto or allogeneic, fresh or cryoperserved) , end points, etc, for clinical study are reviewed.

1. 緒言

再生医療研究の進展と移植用臓器の不足にともない、臨床現場で肝細胞移植への期待が再び高まっている。報告として残る最初の臨床肝細胞移植は1967年のコロラド大学、Eiseman教授によるという¹⁾。その後、わが国でも水戸らのグループが精力的に検討した²⁾。しかしながら、肝臓移植の効果がめざましかった一方で、肝細胞移植には期

待していたほどの効果がなかったことから、さほど臨床例は増えなかった。肝細胞移植の医療上の意義を確立するためには、臨床研究として取り組み、結果を出さなくてはならない。臨床細胞移植は、骨髄移植が広く行われている。しかし、肝細胞は血球系細胞といくつかの点で異なる。まず大ききで、血球系の10 μ m前後に対して3倍程度の径を有する。また、採取に当たり実質臓器から酵素的に分離しなくてはならないこと³⁾、接着性細

別刷請求先：絵野沢伸 〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1 国立成育医療センター研究所
E-mail : senosawa@nch.go.jp

胞であること、凍結保存が難しいこと、がある。従って、骨髄移植のプロトコルをそのまま当てはめることはできない。そこで本稿では、今までの報告を参考にして、肝細胞移植の臨床研究プロトコル作成の要点を整理してみたい。基本資料は、Fisher, Stromの2006年報告とした⁴⁾。また、適宜、原著論文にさかのぼって調べた。

2. 肝細胞移植において考慮されるべき手技上の条件・因子

肝臓移植の手技上の分類は、全肝移植、部分肝移植、脳死ドナー肝移植、生体ドナー肝移植、同所性移植、異所性移植で事足りると思うが、肝細胞移植ではさらにいろいろな因子を考慮しなくてはならない。列挙すると、移植の場（肝内、脾内、腹腔内、大網内など）、移植細胞の種類（肝実質細胞、全肝細胞、間葉系幹細胞など）、移植細胞数、移植細胞密度、輸注速度、細胞採取源（自己、他己）、保存状態（新鮮・凍結の別）がある。また、凍結肝細胞を使用する場合は、保存臍帯血移植、保存自己幹細胞移植のように解凍後保存液ごと輸注するか、遠心洗浄の後に輸液に懸濁して輸注するかも考慮すべきである。その他、組織適合性や免疫抑制については肝臓移植と同様でよいと思いがちであるが、臨床研究プロトコル作成時には、何らかの根拠・方針を示す必要がある。

Fisher, Stromの総説⁴⁾では、ヒト肝細胞移植78症例を文献（学会発表を含む）と私信に基づいて分析している。彼らの分類は病型によって、先天代謝異常症、慢性（硬変性）肝不全、急性肝不全の3種に大別している。先天代謝異常症に対する移植症例は、家族性高コレステロール血症（この治療は肝細胞移植というより遺伝子治療として有名である⁵⁾）、 α 1-アンチトリプシン欠損症、クリグラー・ナジャール症候群、第7因子欠損症、糖原病、レフサム病（パーオキシゾーム病）、進行性家族性肝内胆汁鬱滞症、尿素サイクル異常の21名である。慢性肝不全症例はウイルス性肝炎などの原疾患に起因する肝硬変患者20名である。急性肝不全症例は、薬剤性、ウイルス性、特発性な

ど37名である。

まず、これらから考慮すべき手技上の条件・因子について抽出してみる。移植の場は、先天代謝異常ではすべて門脈経由（アクセスに臍帯静脈、上腸管膜静脈、中結腸静脈使用のことあり）であるが、慢性肝不全、急性肝不全では半数程度が脾内に移植されている。急性肝不全の1例では腹腔内投与もなされている。おそらくこれらの症例では出血傾向や全身状態の悪化により門脈へのカニューレーションに危険を伴うことや、極度に肝硬変が進み移植細胞の生着が見込めなかったといった理由があるものと思う。

移植細胞は専ら肝実質細胞である。彼らの総説には含まれていないが、1980年代に造血幹細胞移植の目的で、胎児肝細胞が移植されたことがある⁶⁾。しかしながら肝疾患の治療を目的として移植された細胞は、今までのところ肝実質細胞のみと考えられる。移植細胞数は、病型、患者の年齢によって異なるが、1回投与量の最少が 4×10^7 細胞（薬剤性急性肝不全、門脈内投与）、最多が 3.9×10^{10} 細胞（薬剤性急性肝不全、脾内投与）である。肝実質細胞は、肝組織体積 1 cm^3 当たり約 2×10^8 細胞存在し、精製すると湿体積 1 cm^3 当たり約 10^8 細胞含まれる。この違いは、生理的状況下では肝実質細胞が極めて高密度に維持されているが、一旦分離されると個々の細胞が分散し、つながりがルーズになるためと考えられる。先の投与細胞数を体積に換算すると、 4×10^7 細胞は肝組織 0.2 cm^3 相当、移植細胞湿体積 0.4 cm^3 、 3.9×10^{10} 細胞は肝組織 200 cm^3 相当、移植細胞湿体積 400 cm^3 となる。実際に投与された懸濁液全量の体積は、門脈内投与と脾内投与で異なるだろうが、おそらく移植細胞湿体積の3～5倍と思われる。

先天代謝異常症21症例では移植細胞数は概して多く、 $1 \sim 7.5 \times 10^9$ 細胞を2時間から24時間、あるいは分割して投与している。先と同じく換算すると、肝組織 $5 \sim 40 \text{ g}$ 相当、移植細胞湿体積 $10 \sim 80 \text{ cm}^3$ である。これらの中で、実施手順をかなり詳細に報告しているのが韓国ソウル大学三星メディカルセンターのLeeらによる糖原病患者への肝

細胞移植である⁷⁾ (Fisher, Stromの総説中では私信として紹介され、論文は2007年に出版されている)。患者は18歳男性、体重35kg、身長145cm。1回目の移植肝細胞は、脳死の48歳男性の肝臓で、線維化が進み臓器移植に不適と判断されたものから得た。ABO血液型は適合。分離肝細胞の生細胞率は75%。局所麻酔下で5 French径の経皮経肝カテーテルを透視により門脈に留置。移植細胞は 2×10^7 細胞/mLの濃度でHanks Balanced Salt Solutionに懸濁し、5分間におよそ20mLの速度で総計 2×10^9 細胞を輸注した。かれらの換算では、患者肝の2%相当を移植したことになるという。輸注時に門脈圧、血圧、心拍数、酸素飽和度、肝血流(ドプラーエコーによる)をモニターし、門脈圧が過度に上昇したときは安全なレベルに下がるまで輸注を控えた(限度圧の数値記載はなし)。つまり、全量100mLの細胞懸濁液を5回に分け、少なくとも30分以上かけて輸注したと思われる。この細胞濃度(2×10^7 /mL)は血球系細胞の移植に比べると非常に薄い印象を与えると思うが、サイズが大きい肝細胞を門脈に投与する場合には妥当な数値である。1週間後に行われた2回目の肝細胞移植は、1回目の分離肝細胞の残余を凍結保存したものを 1×10^9 細胞移植した。凍結保存には15%ジメチルスルフォキシド、85%UW液を用い、解凍直後の生細胞率は75%だった。彼らは凍結保護剤のジメチルスルフォキシドを遠心によって洗い落とし、懸濁用緩衝液に置き換えて輸注している。さらに1ヶ月後に3回目の肝細胞移植が行われた。肝細胞は30歳、女性ドナー、ABO血液型一致からの移植不適合肝から得、生細胞率は82%であった。

細胞輸注時に患者は覚醒しており、特に異常を訴えることはなく、モニター数値も門脈圧以外は著変はなかった。1回目の移植時、門脈圧は初期値が7 mmHgで輸注終了時に24mmHgになった。しかしながら終了5分後に15mmHgに低下し、カテーテルを抜いた。移植2回目の門脈圧初期値は11mmHg、終了時値は19mmHg、その5分後は14mmHgに低下した。移植3回目では、門脈圧初

期値は11mmHgと、2回目と変わらなかったものの、終了時値が33mmHgにまで上昇した。10分後に20mmHgに低下した。しかし、ドプラーエコーによれば肝内に塞栓は起きていなかった。免疫抑制は肝臓移植時と同様に行った。肝細胞移植により、患者はコーンスターチ食なしの通常食でも低血糖症状を示さなくなり、その他、好中球数の増加、下痢と鼻出血の頻度減少、身長増加、二次性徴の発現など、症状の改善が見られた。これらの結果に患者、患者家族ともに満足しているという。

2009年10月にベルリンで開催された第10回 International Society of Organ Donation and Procurementで、バルセロナのグループが尿素サイクル異常症の乳幼児への肝細胞移植4例の成績を発表した⁸⁾。予め分離され、凍結保存されたヒト肝細胞を、術前に解凍して中結腸静脈や臍帯静脈から門脈にカニューレーションし輸注している。輸注は2回から6回で、1回に 4×10^8 細胞程度が投与された。4人の患児はそれぞれ、生後6時間、10週、9日、3歳の時に初回の肝細胞移植を受けている。結果は、1例が死亡、1例は軽快、2例は後日肝臓移植がなされた。75%で治療効果があったということになる。肝細胞ドナーは9日齢の新生児だった。すべての症例でこのドナー由来の細胞が使用された。移植時(解凍時)の生細胞率は64~77%という。

韓国の例では新鮮肝細胞を用いていたが、バルセロナの例では凍結肝細胞のみを用いた。凍結肝細胞の方が、いつでも使用することが出来、また凍結している間に細菌汚染などの品質チェックができるので、いろいろな利点がある。しかしながら、肝実質細胞は凍結解凍操作で障害を受けやすく、また死細胞を密度遠心によって除去すると生細胞の回収率が著しく落ちるといった手技上の課題がある。ただ、今後、肝細胞移植臨床研究を行う場合は凍結肝細胞を用いる方がプロトコル組み立て上も、将来の一般化をめざす意味でも意義があると思う。

3. プロトコルの作成

1) 研究目的, 適応およびエンドポイントの設定

臨床研究プロトコル作成で特に重要なのは、研究目的, 適応, エンドポイントの設定である。研究目的には、治療効果を調べることと安全性の確認の2つの面がある。ここでは、患者あるいは患者家族の視点で考えることが重要である。つまり、新しい治療法は今までの医療技術の限界を越え得る可能性があり、この臨床研究になら協力してもよいと考えられるようではならぬ。肝細胞移植の場合、細胞移植という術式を主眼に据えるのではなく、あくまでもある病気を課題に挙げ、従来の治療よりもよい結果をもたらす可能性がある新しい治療を行う信念を持って計画を立てるべきである。従って、種々の病態を対象とするのではなく、1病態1プロトコルとすることが望ましい。もちろん、類似の病態、例えば尿素サイクル異常といった括りを行うことはかまわない。適応は、臨床研究が必要であることを第三者が見ても納得できるように、具体的な検査値の上下限などを記して示す必要がある。

エンドポイントは臨床研究の評価を行う上で非常に重要である。単なる観察による事後評価ではなく、予め評価項目を定めておくことが必須である。肝細胞移植の最終エンドポイントは、治癒あるいは肝臓移植までのつながりができれば成功と判断することが多い。治癒の場合は、術後何日をもって治癒と判断するかを決めておく必要がある。その他の評価項目としては、パフォーマンス・ステータスや、それぞれの病態に特有の検査値（慢性肝不全であれば血中アルブミン値や血液凝固検査値、尿素サイクル異常であれば血中アンモニア値、尿素窒素値など）を定めておく。パフォーマンス・ステータスはPSと略称されるもので、グレード0；無症状で社会活動ができ、制限を受けることなく、発病前と同等にふるまえる、から、グレード4；身の回りのこともできず、常に介助がいり、終日就床を必要としているまでの5段階評価である。一方、有害事象の判断基準も必要で

あるが、これはJCOG（Japan Clinical Oncology Group, 日本臨床腫瘍研究グループ）の有害事象判定基準が参考になる⁹⁾。

2) その他の留意点

臨床研究プロトコルでは、移植する細胞の採取・調製方法、品質管理、投与方法（投与中のモニター項目を含む）、免疫抑制療法を含む患者管理、除外基準、中止判定基準、個人情報保護や第三者審査委員会（適応、中止、評価など）といった管理体制、研究協力の同意取得方法、などが必要である。このうち症例数は、治験と異なり統計的な結果判定は必須ではないので、現実的な数、すなわち当該医療機関で巡り会う可能性のある数を挙げればよい。また対照群は設定しなくてもよい。臨床研究は、治験よりは自由度が高く、開始後にプロトコルから外れる運用も実施者の裁量（と必要に応じて第三者審査）で臨機に行うことができる。

なお、それぞれの加療の安全性と有効性について、動物実験による裏付けと、当該研究チームがそれを行うに足る技量を十分に有することを示す必要がある。これらの項目を網羅した基本プロトコルが、次項に述べる各指針に従って、科学的、倫理的妥当性を審査される。

4. 肝細胞移植の形態および指針との関係

表1に肝細胞移植臨床研究の対象となりうる枠組みを挙げた。動物実験ではこの他にES細胞移植¹⁰⁾なども行われているが、ここでは現状で臨床的に実施可能との観点によった。また、薬事法のもとで行われる治験は除外した。

先天代謝異常症の治療は、他者の肝細胞を移植して欠失機能を補助するものである。期待される効果は症状の緩和、先の韓国の例に見られるようなQOL向上である。尿素サイクル異常の場合は、高アンモニア血症による不可逆的中枢障害を未然に防ぐという重要な役割もある。先天代謝異常に対しては肝臓移植が根治療法とされるが、低体重

表1 肝細胞移植の分類。

*注：関連指針は臨床研究プロトコールを作成する上で遵守が必要と考えられるもの。臨床研究；臨床研究に関する倫理指針、幹細胞；ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針。ただし、治験であれば、厚生省医薬安全局長、細胞・組織を利用した医療用具又は医薬品の品質及び安全性の確保について（医薬発第906号、平成11年7月30日）の「細胞・組織利用医療用具等」になると考えられるので、（独）医薬品医療機器総合機構へ確認申請が必要となる。

対象疾患／ねらい	移植細胞・由来	治療目的	関連指針*注
先天代謝異常症／機能補助	肝実質細胞・他己	症状緩和、QOL向上、成長促進、肝臓移植へのつなぎ	臨床研究
慢性肝不全／機能補助	肝実質細胞、間葉系幹細胞・他己、自己	症状緩和、肝臓移植へのつなぎ	臨床研究 or 幹細胞
急性肝不全／機能補助、急性期の沈静化	肝実質細胞、間葉系幹細胞・他己	症状緩和、治癒、肝臓移植へのつなぎ	臨床研究 or 幹細胞
移植肝／自己化	肝実質細胞、間葉系幹細胞・自己	移植肝内での自己細胞再生	幹細胞

児には技術的に困難であり、また、ドナーがいな
い場合は施行できない。そこで、肝臓移植が行え
るようになるまでのつなぎ治療という目的も非常
に重要である。こういった治療は臍島移植と同じ
く組織移植の枠組みで行えるものと考えられる。
ヒト幹細胞臨床研究指針¹¹⁾はヒト幹細胞を「組織
幹細胞およびそれを豊富に含む細胞集団」と定義
している。従って、肝実質細胞は対象外となり、
上記の疾患に対する細胞移植臨床研究の場合、遵
守すべき指針は臨床研究指針¹²⁾となる。

慢性肝不全、すなわち肝硬変に対する肝細胞移
植にはいくつかの形態があると思われる。今まで
の臨床例でも、他者の肝細胞の移植のみならず自
己肝細胞の移植もある。水戸らは後者を脾臓内
に行い、自己肝細胞の異所性再構築をねらった²⁾。
さらに、最近の再生医療実験モデルでは間葉系幹
細胞が肝の線維化を改善するとの報告も多い^{13,14)}。
遵守すべき指針は、移植細胞の性格から、肝実質
細胞であれば臨床研究指針、間葉系幹細胞であ
ればヒト幹細胞臨床研究指針となる。ただし、自
己肝細胞移植が、肝組織幹細胞移植と判断され
ればヒト幹細胞臨床研究指針の適用を受けるか
もしれない。

急性肝不全においても肝実質細胞、間葉系幹
細胞の両者が移植対象として考えうる。ただし、
慢性肝不全と異なり自己由来細胞の移植は考えに
く

い。この病態におけるねらいは、肝機能補助の他
に免疫系沈静化が挙げられると思う。間葉系幹
細胞は骨髄移植後の難治性の移植片対宿主病
(GVHD)を抑える効果が認められ¹⁵⁾、治験に
まで進んでいる^{16,17)}。この場合、間葉系幹細胞に
期待する効果は免疫系の調整で、組織再生とはい
えないが、ヒト幹細胞臨床研究指針の文言によ
れば、組織幹細胞を移植する場合はこの指針に
従って行うことになる。なお、現在、GVHD治
療での効果検討はわが国で治験として行われて
いる¹⁷⁾。

最後に挙げた移植肝への肝細胞移植は次のよ
うな想定である。非ウイルス性の肝硬変組織で
移植のために摘出されたもの、例えば小児領域
では胆道閉鎖症による肝硬変などの組織から肝
細胞を分離し、移植された肝臓に移入し生着を
試みるというものである。最終的な目標は、移
植肝の肝細胞をもとの自己肝細胞に置換するこ
とにある。つまり慢性拒絶反応による移植肝機
能低下の抑止をねらう。これは前3者と異なり、
長期的なメリットを見込むものなので、技術
的には現状でも十分可能であるが、倫理審査
は慎重にならざるを得ないと思われる。マウ
ス実験では移植肝細胞による組織再構築がな
されている¹⁸⁾が、臨床への橋渡しにはさら
に大きな動物を用いて、効果および有害事
象の検証が必要であろう。この臨床研究スキ
ームは肝組織幹細胞の移植ということでヒト
幹細胞臨

床研究指針の遵守が適切と考えられる。

5. おわりに

肝臓移植は肝不全に対して極めて有効な治療法である。しかしながらドナー不足は深刻で、現状では解決の糸口は見いだせない。脳死ドナーの不足を緊急回避的に生体ドナーで補っているが、生体ドナーの増加はかえって臓器移植にまつわる問題を複雑化、深刻化している。一方、わが国でも臓器移植法が改正され、脳死の幼小児からの臓器提供が行われる可能性が出てきた。改正議論は、特に幼小児の心臓提供を中心に行われてきたが、仮に全臓器提供の意思が表示された場合、移植法改正を推進してきた側としては、それらをできるだけ医療に役立てる義務があると思う。肝臓の場合、バルセロナグループの例に見られるように分離肝細胞として凍結保存し、種々の肝細胞移植を行うことができる。ただし、これらの肝細胞移植は場当たり的に行えるものではない。今から臨床研究として計画を十分に練り上げ、その時に備える必要がある。

謝辞

種々の貴重な情報を提供いただいた松野直徒先生、笠原群生先生に感謝いたします。

参考文献

- 1) Mito M, Sawa M. Historical review of hepatocyte transplantation : the road from whole liver transplantation to hepatocyte transplantation. In *Hepatocyte transplantation*, ed by Mito M, Sawa M. pp.1-11, Karger Landes Systems, Basel, 1997
- 2) Mito M, Kusano M. Hepatocyte transplantation in man. *Cell Transplant* 2 ; 65-74, 1993
- 3) 絵野沢伸. ヒト肝組織からの肝細胞分離. *Organ Biology* 16 ; 361-370, 2009
- 4) Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation : worldwide results. *Transplantation* 82 ; 441-449, 2006
- 5) Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6 ; 335-341, 1994
- 6) 平尾敬男, 太田邦明, 河盛重造, 三宅 健, 瀬戸嗣郎. 重症複合免疫不全症における胎児肝細胞移植生着例. *免疫病理* 2 ; 535-540, 1984
- 7) Lee KW, Lee JH, Shin SW, Kim SJ, Joh JW, Lee DH, Kim JW, Park HY, Lee SY, Lee HH, Park JW, Kim SY, Yoon HH, Jung DH, Choe YH, Lee SK. Hepatocyte transplantation for glycogen storage disease type Ib. *Cell Transplant* 16 ; 629-637, 2007
- 8) Gomez M, Manyalich M, Meyburg J, Ruedinger W. Hepatocyte isolation from livers not suitable for whole organ transplantation and first clinical series of hepatocyte transplantation. 10th International Society for Organ Donation and Procurement, Berlin, 4-7 Oct, 2009
- 9) JCOG (日本臨床腫瘍研究グループ). 有害事象共通用語規準 v4.0日本語訳JCOG版. [http : //www.jcog.jp/doctor/tool/ctcaev4.html](http://www.jcog.jp/doctor/tool/ctcaev4.html)
- 10) Yamamoto H, Quinn G, Asari A, Yamanokuchi H, Teratani T, Terada M, Ochiya T. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes : biological functions and therapeutic application. *Hepatology* 37 ; 983-993, 2003
- 11) 厚生労働省. ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針. 平成18年7月3日 [http : //www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/iryousai-sei01/pdf/01.pdf](http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/iryousai-sei01/pdf/01.pdf)
- 12) 厚生労働省. 臨床研究に関する倫理指針. 平成15年7月30日, 平成20年7月31日全部改正 [http : //www.mhlw.go.jp/general/seido/kou-sei/i-kenkyu/rinsyo/dl/shishin.pdf](http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kou-sei/i-kenkyu/rinsyo/dl/shishin.pdf)
- 13) Ishikawa T, Banas A, Hagiwara K, Iwaguro

- H, Ochiya T. Stem cells for hepatic regeneration : the role of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* Nov 26, 2009 [Epub ahead of print]
- 14) Jung KH, Shin HP, Lee S, Lim YJ, Hwang SH, Han H, Park HK, Chung JH, Yim SV. Effect of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in a cirrhotic rat model. *Liver Int* 29 ; 898-909, 2009
- 15) Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81 ; 1390-1397, 2006
- 16) Osiris Therapeutics. FDA Fast-Track clearance expedites stem cell therapy. [http : //www.osiristx.com/clinical.php](http://www.osiristx.com/clinical.php)
- 17) 日本ケミカルリサーチ. IR情報. 2 /細胞治療. [http : //www.jcrpharm.co.jp/irinfo5.html](http://www.jcrpharm.co.jp/irinfo5.html)
- 18) 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. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 165 ; 901-912, 2004