

氏名	やす ちか けん たろう 安 近 健 太 郎
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	論 医 博 第 1803 号
学位授与の日付	平 成 15 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Establishment of a highly efficient gene transfer system for mouse fetal hepatic progenitor cells に関する研究 (マウス胎仔肝前駆細胞への高効率遺伝子導入法の確立に関する研究) 安近健太郎, 廣瀬哲朗, 藤井英明, 大江正士郎, 長谷川光一, 藤川貴久, 東久弥, 山岡義生
論文調査委員	(主 査) 教 授 田 中 紘 一 教 授 中 辻 憲 夫 教 授 山 岡 義 生

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 背景

肝移植におけるドナー不足の現状を鑑み、肝細胞移植は全肝移植までの“bridge therapy”あるいはその代替治療として期待されている。すでにいくつかの疾患で成体肝細胞移植が有効であることが示されているが、さらに臨床現場に定着させるには、移植ドナー以外からの細胞源入手が必要となることから、増殖力と分化能を併せ持つ肝前駆細胞に着目した。本研究では、マウスをモデルとして胎仔肝前駆細胞の新しい分離精製・培養法を確立するとともに、その細胞遺伝子治療への利用の可能性を検証すべく、胎仔肝前駆細胞への遺伝子導入法を検討し、さらに移植された胎仔肝前駆細胞内での遺伝子発現を検討した。

#### 方法

胎生 13.5日 Balb/c マウスの胎仔肝臓を酵素処理後、浮遊培養中の細胞接着性の差異に基づき細胞分画を分離し、RT-PCR, 免疫染色により胎仔肝前駆細胞の特性を検証した。また、培地に添加する因子 (FCS, dHGF, インスリン) の差による胎仔肝前駆細胞の増殖活性の違いを  $^3\text{H}$ -thymidineuptake により比較検討することで至適培養条件を確認し、さらに蛍光蛋白遺伝子 (DsRed 遺伝子) をリポフェクションにより導入する至適条件 (培地, 導入時期) を決定した。DsRed 遺伝子のゲノムへのインテグレーションはサザンブロットにて評価し, *in vitro* にて DsRed 遺伝子を導入した肝前駆細胞を, 70%肝切除後の同系マウスに細胞移植し, 移植細胞の生着をアルブミンに対する免疫染色により評価すると共に, DsRed の発現を蛍光顕微鏡下に観察した。

#### 結果

浮遊培養中にスフェロイドを構成した細胞分画にはアルファフェトプロテイン, アルブミン, サイトケラチン19の発現を認めしたが, 血管内皮や血球系マーカーは発現せず, この分画に肝前駆細胞が精製された。増殖活性および遺伝子導入効率は前記各因子をすべて添加した培地において有意に高く, 遺伝子導入効率は分離直後の導入が分離 6 時間後に比べ有意に高かった ( $45.6 \pm 12.3\%$ )。ゲノムへのインテグレーションも確認された。また, 細胞移植後10日目の観察では, *in vitro* で遺伝子導入された肝前駆細胞が肝臓内に生着し, そこでの外来遺伝子発現およびアルブミン産生が確認された。

#### 考察と結論

成体肝細胞の分離に関しては, 低速遠心法や密度勾配遠心法などが既に確立されているが, 胎仔肝前駆細胞はその大きさが他の肝構成細胞と類似であるため, 同様の方法では他細胞の混入が多くなる。また, 近年蛍光励起セルソーターを用いて高純度で肝前駆細胞を分取できることが報告されているが, ソーティングでは細胞障害が加わることから, さらに細胞障害を伴う細胞への遺伝子導入を効率的に行うべく, 肝前駆細胞に高く発現する E-カドヘリン依存性の細胞集塊を浮遊培養中に形成させることで, 簡便にその分画のみを分離可能とした。同方法の開発及び至適培養条件の確立で, 肝前駆細胞への高効率遺伝子導入法を検討でき, 同方法でのゲノムへのインテグレーションも確認された。また, 細胞移植後も遺伝子導入肝

前駆細胞での遺伝子発現が確認できたことから、外来遺伝子を恒常発現する肝前駆細胞のみを *in vitro* にて選別の上で増殖させ、移植できる可能性が示唆され、肝前駆細胞は細胞遺伝子治療の有効な細胞源として利用できる可能性があると考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究では、マウス胎仔肝前駆細胞の新規分離法および高効率遺伝子導入が確立された。本申請者は、肝内胚葉系細胞特異的接着分子による浮遊培養中の細胞間接着を利用し、胎生13.5日マウス肝から肝前駆細胞を細胞集塊として分離できることを、肝内胚葉マーカーであるアルファフェトプロテイン、アルブミン、サイトケラチン19に対する RT-PCR、免疫染色により検定し、分離法を確立した。その上で、体外非ウイルス的遺伝子導入に適した培養液組成およびタイミングを検討した。HGF、インスリンを添加した RPMI 培地中で分離直後に導入したものでは、肝前駆細胞へ高効率 ( $45.6 \pm 12.3\%$ ) に遺伝子導入されることが確認されただけでなく、サザンブロット解析でゲノムインテグレーションも確認された。また、この条件下に蛍光蛋白遺伝子を導入した肝前駆細胞を70%肝切除施行した同系マウスに移植すると、移植後10日目における細胞生着と *in vivo* での導入遺伝子発現維持が確認できたことから、治療遺伝子をゲノムに取りこみ、かつ腫瘍形成の危険を伴う染色体異常のない肝前駆細胞を選別の上、試験管内で増殖させて移植に利用できる可能性が示唆された。以上の研究は、肝移植の補助療法や代替治療となり得る細胞遺伝子治療において、肝前駆細胞が有用な細胞源となる可能性を示したものであり、消化器外科学の発展に寄与するものと思われる。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成14年12月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。