

氏名	か も なお こ 加 茂 直 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3066 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate the <i>in vitro</i> maturation of hepatic progenitor cells (2種類のThy1陽性間葉系細胞による肝前駆細胞の試験管内成熟化制御)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 辻 憲 夫 教 授 千 葉 勉 教 授 戸 口 田 淳 也

### 論 文 内 容 の 要 旨

〔背景・目的〕 難治性肝疾患に対して、細胞移植医療の実現が期待されている。既に肝細胞移植の有効性を示すいくつかの報告がある一方で、成熟肝細胞よりも高い増殖活性を持つ肝前駆細胞が移植細胞源として注目されている。疾患によっては、治療効率の向上の為に機能的に未熟な肝前駆細胞を移植前に *in vitro* において成熟化させることが必要となる可能性がある。既に胎仔肝由来 Thy1陽性間葉系細胞が CD49f 陽性胎仔肝前駆細胞を *in vitro* において成熟化させることを報告した。この Thy1 陽性間葉系細胞は形態学的に立方形および紡錘形の2つの細胞集団により構成される。今回、この2種類の胎仔肝由来間葉系細胞を mucin-type transmembrane glycoprotein 38 (gp38) を指標として分離採取し、肝前駆細胞の肝細胞への成熟化メカニズムについての特性解析を行った。

〔方法〕 既に確立した方法に準じて採取した E13.5 胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞を、フローサイトメトリー (FACS) を用いて CD49f±Thy1+gp38+CD45- (gp38陽性) 立方形細胞と CD49f±Thy1+gp38-CD45- (gp38陰性) 紡錘形細胞に分離した。各細胞の特異的マーカー発現および肝前駆細胞成熟化への効果を RT-PCR, 免疫染色, PAS 染色, 電子顕微鏡により検討した。

〔結果と考察〕 マウス胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞は FACS によって gp38 陽性立方形細胞と gp38 陰性紡錘形細胞に分離可能であった。gp38 陽性、陰性細胞はそれぞれ E13.5 胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞の約16%, 84%を占め、両細胞共に aSMA, desmin, vimentin の発現を認めたが、血管内皮細胞, 星細胞, クッパー細胞のマーカー発現を認めず、幼若な間葉系細胞と考えられた。gp38 陽性細胞と7日間共培養した肝前駆細胞は多核細胞の出現が認められ、PAS 染色陽性となった。RT-PCR では成熟肝細胞マーカー (G6P, TAT, TO) が有意に発現上昇し、電子顕微鏡では成熟肝細胞に類似の超微細構造を呈した。また、肝前駆細胞の成熟化には gp38 陽性細胞との接触培養が必要であった。一方、gp38 陰性細胞との共培養では上記結果を認めず、gp38 陰性細胞の培養上清中では gp38 陽性細胞と共培養した肝前駆細胞の PAS 陽性率が低下した。従って、gp38 陰性細胞は、gp38 陽性細胞が肝前駆細胞に及ぼす成熟化促進作用に対して抑制的に働く液性因子を分泌していると考えられた。更に、gp38 陰性細胞との共培養では、gp38 陽性細胞との共培養や肝前駆細胞単独培養と比較して、肝前駆細胞における BrdU 染色の陽性率や、アルブミンと CK19 の二重免疫陽性率が有意に高く (P < 0.05), gp38 陰性細胞が肝前駆細胞の未分化状態維持に働いていることが示唆された。

〔結語〕 E13.5 胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞は gp38 陽性細胞と gp38 陰性細胞から構成され、前者は接触共培養により肝前駆細胞の成熟化を促進し、後者は抑制すると共に未分化を維持することが示唆された。これら2つの間葉系細胞は肝前駆細胞の成熟化制御メカニズムの解明において重要な手がかりになると考えられる。また、これら2種類の間葉系細胞により肝前駆細胞を *in vitro* において増殖させた上で機能的に成熟化させ、細胞移植治療に利用する可能性が考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

難治性肝疾患に対する細胞移植医療実現のため、高い増殖活性を持ち機能的に幼若な肝前駆細胞の *in vitro* 成熟化が必要となる可能性がある。既に胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞が CD49f 陽性胎仔肝前駆細胞を *in vitro* において成熟化させることが報告された。この Thy1 陽性間葉系細胞は形態学的に立方形および紡錘形集団により構成される。本研究では、この2種類の E13.5 胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞を mucin-type transmembrane glycoprotein 38 (gp38) を指標として分離採取し、特性解析を行った。マウス胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞は FACS によって CD49f<sup>+</sup>Thy1<sup>+</sup>gp38<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> (gp38 陽性) 立方形細胞と CD49f<sup>+</sup>Thy1<sup>+</sup>gp38<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> (gp38 陰性) 紡錘形細胞に分離可能であった。gp38 陽性細胞と接触共培養した肝前駆細胞は成熟肝細胞のマーカー発現や特徴を認めたが、gp38 陰性細胞との共培養では認めなかった。gp38 陰性細胞の培養上清中では gp38 陽性細胞と共培養した肝前駆細胞の PAS 陽性率が低下した。更に gp38 陰性細胞との共培養では、肝前駆細胞における増殖能や二分化能が有意に高く、gp38 陰性細胞が肝前駆細胞の未分化状態維持に働いていることが示唆された。よって、E13.5 胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞は gp38 陽性細胞と陰性細胞から構成され、前者は接触共培養により肝前駆細胞の成熟化を促進し、後者は抑制すると共に未分化を維持することが示唆された。

以上の研究は肝前駆細胞の肝細胞への成熟化制御メカニズムの解明に貢献し、2種類の間葉系細胞による肝前駆細胞の *in vitro* における増殖、機能的成熟化を実現化し、将来的な細胞移植治療等の臨床応用に寄与するところが多い。

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19年1月22日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格とみとめられたものである。