

氏 名	すぎもと しんいち 杉 本 真 一
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2567 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 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	Morphological changes induced by extracellular matrix are correlated with maturation of rat small hepatocytes に関する研究 (細胞外基質により誘導されるラット小型肝細胞の形態変化は成熟化に関連している)
論文調査委員	(主 査) 教授 田中 紘一 教授 千葉 勉 教授 山岡 義生

### 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】成熟ラット肝臓から分離される小型肝細胞は旺盛な増殖能と成熟肝細胞とはほぼ同様の表現型を持ち、“肝細胞への分化が方向づけられた committed progenitor cell”と考えられている。しかし、小型肝細胞から成熟肝細胞への分化の機序については未だ明らかとなっていない。本研究においては、小型肝細胞の成熟化における細胞外基質の重要性について形態と機能から検討した。

【実験 1】(方法) 第10週齢ラット肝臓より小型肝細胞を分離し、非実質細胞との共培養にて小型肝細胞20~30個からなる単層コロニーを形成させた。小型肝細胞のコロニーを Replating し、細胞数が約150から200個/コロニーに増殖した時点で、mouse sarcoma 由来のゲル状を呈する再構成基底膜 (Matrigel™) を重層し、小型肝細胞の形態学的・機能的変化を無処置群と比較検討した。形態学的評価は位相差顕微鏡・電子顕微鏡にて、また機能的評価は血清蛋白 (albumin, transferrin,  $\alpha_1$ -antitrypsin, fibrinogen) の細胞内発現、培養液中への分泌、成熟肝細胞にのみ発現するアミノ酸代謝酵素 (tryptophan dioxygenase, serine dehydratase) および肝特異的転写因子 (HNF4 $\alpha$ , HNF6, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ ) の発現をウエスタンブロット法, ELIZA 法およびノーザンブロット法にて検討した。

(結果) 無処置群では小型肝細胞は形態変化することなく単層のまま増殖を続けた。一方, Matrigel の重層により小型肝細胞は大型化し、コロニーは形態的に盛り上がり、索状・嚢胞様構造が形成された。大型化した細胞は超微細構造的にはペルオキシダーゼ、ミトコンドリアなどの細胞内小器官やグリコーゲン顆粒に富み、細胞間には毛細胆管が認められた。形態変化をおこした細胞は血清蛋白質、アミノ酸代謝酵素および肝特異的転写因子は無処置群に比べ強い発現誘導を認め、小型肝細胞は成熟化したと考えられた。

【実験 2】(方法) Matrigel による小型肝細胞の成熟化の機序を調べるために、小型肝細胞のコロニーに Matrigel と同様のゲル状を呈する Type I Collagen gel を重層, Matrigel の主成分である基底膜成分 (Laminine, Type IV collagen), Matrigel に含まれる液性増殖因子 (TGF $\beta$ , PDGF, FGF, NGF) を各々培養液に添加し、形態変化・機能的変化を Matrigel 重層群と比較検討した。

(結果), Type I Collagen gel, 基底膜成分 (Laminine, Type IV collagen) および液性増殖因子 (TGF $\beta$ , PDGF, FGF, NGF) で処置し培養した各々の小型肝細胞は形態変化を認めず, tryptophan dioxygenase の発現は Matrigel を重層した小型肝細胞に比較し軽度であり, 成熟肝細胞には至っていないと考えられた。

【考察】小型肝細胞は mouse sarcoma 由来のゲル状を呈する再構成基底膜により形態的・機能的成熟化が誘導された。その成熟化にはゲル状の細胞外基質あるいは個々の基底膜構成成分のみでは不十分であり, 三次元構造をもつ基底膜様構造が重要な働きをしている可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、肝組織幹細胞とされる小型肝細胞の成熟化における細胞外基質の重要性について形態と機能から検討したものである。

申請者はラット小型肝細胞の単層コロニーに再構成基底膜（マトリゲル）を重層すると小型肝細胞は大型化し、コロニーは索状・嚢胞様構造を形成することを示した。大型化した細胞は微細構造的に細胞内小器官やグリコーゲン顆粒を豊富に認め、小型肝細胞が形態的に成熟化したことを明らかにした。また、アルブミン分泌量は無処置群に比べ10日間で約5倍に増加、さらには、アミノ酸代謝酵素および肝特異的転写因子の強い発現誘導を認め小型肝細胞が機能的にも成熟化したことを明らかにした。一方、小型肝細胞の単層コロニーにマトリゲルと同様のゲル状を呈するコラーゲンゲルを重層あるいはマトリゲルの構成成分である基底膜成分や液性増殖因子を培養液に添加しても小型肝細胞の形態的・機能的成熟化が誘導されないことを示した。

以上より、小型肝細胞はマトリゲルにより形態的・機能的成熟化が誘導され、その成熟化にはゲル状の細胞外基質あるいは個々の基底膜構成成分のみでは不十分であり、三次元構造をもつ基底膜様構造が重要な働きをしていることを明らかにした。

以上の研究は、肝組織幹細胞とされる小型肝細胞の成熟化およびその機序の解明に貢献し、肝臓分野における再生医療の発展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15年1月15日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。