

氏 名	ふじ 藤 井 英 明
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2506 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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	Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. (マウス部分肝切除後肝再生への骨髄由来細胞の寄与に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 田 中 紘 一 教 授 西 川 伸 一 教 授 山 岡 義 生

論 文 内 容 の 要 旨

研究の背景：近年の幹細胞研究の進歩により、骨髄細胞が血球系以外の種々の細胞へも分化できることが明らかになりつつある。一方、肝臓についてはそれが胎生期の造血器官であり、成体でも状況によってはその組織中で造血を認めるにも関わらず、一部劇症肝障害時に観察される肝幹様細胞や肝細胞が骨髄由来であるとの報告の他には骨髄との関係が未だ明らかでなく、臨床で日常的に遭遇する肝切除術後肝再生についてもこれまでは肝内の成熟細胞の増殖に依存するとされていた。そこで今回、肝切除術後肝再生時における骨髄細胞の寄与を、緑色蛍光を呈する Green Fluorescent Protein (GFP) トランスジェニックマウス由来の骨髄細胞を利用することで直接的、定量的に検証した。

研究の方法：C57BL/6J 系 GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を致死量放射線照射後の同系マウスに移植し、骨髄 GFP 陽性マウスを作成した。4 週後に 70% 部分肝切除術施行群と単開腹術施行コントロール群（各 $n=4$ ）を作成し、さらにその 4 週後に非生着細胞を灌流により排除後、肝内 GFP 陽性細胞の生着数比較、及び免疫組織染色（アルブミン、CD31）による分化検討を行った。細胞分化は DiI 標識アセチル化低比重リポ蛋白とラテックスビーズの取り込み能、フローサイトメトリーでの表面抗原解析からも確認した。また骨髄細胞肝生着の機序検討のため、再生肝組織中の血管内皮増殖因子（VEGF）濃度を ELISA 法にて、肝・骨髄・末梢血中の内皮前駆細胞数をフローサイトメトリーにて解析した。

研究の結果：肝切除術後の肝組織には GFP 陽性細胞が血管壁や肝類洞壁に数多く確認された一方、コントロール群では極少数のみが確認された。免疫組織染色では GFP 陽性細胞は内皮細胞・クッパー細胞マーカーの CD31 陽性である一方、肝実質細胞マーカーのアルブミンは陰性であった。肝酵素処理にて単離後の GFP 陽性細胞のうち、内皮細胞である DiI 標識アセチル化低比重リポ蛋白陽性・ラテックスビーズ陰性細胞は $69.5 \pm 3.5\%$ 、クッパー細胞である DiI 標識アセチル化低比重リポ蛋白・ラテックスビーズ共陽性細胞は $28.3 \pm 2.6\%$ であった。また両方とも陰性の細胞群も $5.5 \pm 0.9\%$ 存在した。フローサイトメトリー解析でも再生肝中 GFP 陽性細胞はコントロール群と比べ有意に増加し、内皮細胞・クッパー細胞等から成る非実質細胞群の $11.9 \pm 2.3\%$ を占めていた。さらに上記の結果を裏付ける様に、再生肝ではコントロール群に比べ CD31 陽性細胞 (185.5 ± 32.9 vs. 986.5 ± 129.7 個/ 1×10^4 細胞)、クッパー細胞マーカー CD16/CD32 陽性細胞 (222.5 ± 17.8 vs. 326.8 ± 35.1 個/ 1×10^4 細胞) とも有意に増加していた。骨髄細胞の内皮細胞やクッパー細胞への分化が確認されたため、骨髄・末梢血・肝臓内の内皮前駆細胞数をそのマーカーである CD34、VEGF レセプター-2 から検討すると、肝切除術後には陽性細胞が有意に増加していた。さらに内皮前駆細胞の増殖・遊走因子の一つである VEGF の肝組織中濃度も肝切除術後に有意な上昇を示すことから、骨髄細胞のなかでも特に内皮前駆細胞の再生肝への遊走が示唆された。

研究の結論：マウス 70% 部分肝切除後肝再生時には、骨髄細胞が肝非実質細胞へと分化する事で組織再生に寄与することが直接的に示され、それへの内皮前駆細胞の関与が示唆された。この結果は、肝切除後肝再生が残存肝のみならず骨髄をも含む全身の細胞反応であることを初めて示しただけでなく、骨髄細胞を用いた肝疾患治療の可能性をも示唆するものであることから、消化器外科学の発展に寄与すると思われる。

論文審査の結果の要旨

従来肝内成熟細胞の増殖に依存するとされていた肝切除術後肝再生への骨髄細胞の寄与を、直接的・定量的に検証した。マーキングとして用いた GFP トランスジェニックマウス由来骨髄細胞を同系マウスへ移植した 4 週後に 70% 部分肝切除術施行群と単開腹術施行コントロール群を作成した。肝切除術後 4 週では免疫組織学的に CD31 陽性、アルブミン陰性の GFP 陽性細胞を血管壁や肝類洞壁に数多く認めたが、コントロール群では極少数のみであった。単離後の GFP 陽性細胞中、内皮細胞である DiI 標識アセチル化低比重リボ蛋白陽性・ラテックスビーズ陰性細胞は $69.5 \pm 3.5\%$ 、クッパー細胞である DiI 標識アセチル化低比重リボ蛋白・ラテックスビーズ共陽性細胞は $28.3 \pm 2.6\%$ 、両方とも陰性の細胞群は $5.5 \pm 0.9\%$ であった。フローサイトメトリー解析でも、再生肝中 GFP 陽性細胞は非実質細胞群の $11.9 \pm 2.3\%$ を占めており、コントロール群に比べ CD31 陽性細胞、クッパー細胞マーカー CD16/CD32 陽性細胞とも有意に増加していた。さらに骨髄・末梢血・肝臓内の内皮前駆細胞 CD34、VEGF レセプター-2 陽性内皮前駆細胞数増加とその増殖・遊走因子の一つである肝組織中 VEGF 濃度の上昇から、骨髄に存在する内皮前駆細胞の再生肝への遊走が示唆された。

以上の研究は、肝切除後肝再生が残存肝のみならず骨髄をも含む全身の細胞反応であることを解明し、消化器外科学の発展に寄与すると思われる。

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3月5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。