

氏 名	いし い たか みち 石 井 隆 道
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3083 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	In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes (マウス胚性幹細胞から肝細胞への試験管内分化誘導及び成熟化法)
論文調査委員	(主 査) 教 授 山 中 伸 弥 教 授 瀬 原 淳 子 教 授 長 澤 丘 司

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕Embryonic stem (ES) 細胞が肝細胞を含む内胚葉細胞へと分化することが示されているが、*in vitro* で分化させると、その多能性故に内胚葉以外の様々な細胞種が混在する。さらに ES 細胞を完全に *in vitro* で成熟肝細胞へ分化させることは困難であった。以前に我々はマウス胎仔肝臓由来の Thy1 陽性間葉系細胞が肝前駆細胞を成熟化させることを報告した。この成熟化能は接触共培養したときのみに認められ、conditioned medium や separate culture を行うと肝前駆細胞の成熟化は認められなかった。今回この結果をふまえ、ES 細胞から内胚葉細胞を分化・分離し、Thy1 陽性細胞と共培養することにより成熟肝細胞へと分化するかを検討した。

〔方法〕内胚葉のマーカーである alpha-fetoprotein (AFP) のプロモーター下に enhanced green fluorescence protein (EGFP) を発現するマウス ES 細胞をコラーゲン I コートディッシュ上にて血清不添加の培地で培養し、増殖因子刺激(basic fibroblast growth factor, hepatocyte growth factor 等)により EGFP 発現細胞を分化誘導した。フローサイトメトリーで分離した EGFP 陽性細胞を免疫染色及び RT-PCR で特性解析した。また EGFP 陽性細胞単独培養群と Thy1 陽性細胞との共培養群とに分け、免疫染色、RT-PCR、PAS 染色(グリコーゲンの産生・蓄積)、アンモニア除去能、及び電子顕微鏡を用いて、成熟肝細胞への分化を検討した。

〔結果〕EGFP を発現する細胞は 7～8 日目でプラトーに達し、誘導効率は $41.6 \pm 12.2\%$ (mean $\pm$ SD) であった。7 日目にフローサイトメトリーで分離した EGFP 陽性細胞に初期内胚葉マーカーである AFP、Foxa2 およびアルブミンの蛋白発現を認めたが、この細胞単独では肝発生の後期マーカーである tyrosine amino transferase や tryptophan 2,3-dioxygenase, glucose-6-phosphatase の mRNA は認めなかった。一方で Thy1 陽性細胞と共培養すると成熟肝細胞のマーカーの発現を認め、さらに共培養群では PAS 染色陽性となり、アンモニア除去能が上昇した。電子顕微鏡でも共培養群は、細胞内小器官として発達したミトコンドリアや粗面小胞体、グリコーゲン顆粒を有し、成熟肝細胞に類似した特徴を示した。この Thy1 陽性細胞の持つ肝細胞成熟化能は、接触共培養したときにのみ認められ、Thy1 陽性細胞の培養上清を用いた培養では RT-PCR 及び PAS 染色で成熟化傾向を認めなかった。

〔結論〕マウス ES 細胞から AFP 産生細胞を分離し、マウス胎仔肝臓由来 Thy1 陽性細胞を支持細胞として共培養することにより肝細胞様細胞へと分化することが可能となった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

これまでもマウス ES 細胞を肝細胞系へ分化させる報告はあったが未分化な内胚葉細胞に留まっており、機能的・形態的に成熟肝細胞へ試験管内で分化・成熟させることは困難であった。本学位申請者は、マウス ES 細胞を成熟肝細胞へと分化させるためにマウス胎仔肝由来間葉系細胞と共培養した。まず AFP プロモーター下に GFP を発現する ES 細胞を作製し、これを血清及び支持細胞の非存在下に増殖因子刺激により AFP-GFP 陽性細胞へと分化誘導した。培養条件を至適化

して GFP 発現細胞の誘導効率が7日目まで約40%まで達することを示し、GFP 陽性細胞をフローサイトメーターで分離した。この GFP 陽性細胞を単独培養群およびマウス胎仔肝由来 Thy1 陽性間葉系細胞との共培養群とに分け、肝細胞成熟化を評価した。GFP 陽性細胞単独培養では肝発生後期マーカーは認めなかったが、共培養群ではこれらの発現を認めた。共培養群のみ PAS 染色陽性となりグリコーゲンを産生・蓄積していた。さらに単独培養群と比べて共培養群細胞は約2倍のアンモニア代謝能を有していた。また電子顕微鏡にて共培養群の細胞のみ成熟肝細胞に類似した形態を示した。以上の研究は、共培養法によって ES 細胞から機能的・形態的に成熟肝細胞に類似した細胞が試験管内で得られることを初めて示したもので、ES 細胞由来肝細胞を用いた細胞移植等の再生医療の発展に寄与する所が多い。

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2月6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。