

|           |                                                                                               |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | ば ば しん じ<br>馬 場 慎 司                                                                           |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (医 学)                                                                                     |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2825 号                                                                                  |
| 学位授与の日付   | 平 成 17 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    | Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse<br>(マウスにおいて骨髄細胞が肝星細胞に分化する) |

論文調査委員 (主 査)  
教 授 中 畑 龍 俊      教 授 生 田 宏 一      教 授 千 葉 勉

### 論 文 内 容 の 要 旨

【背景及び目的】肝臓の非実質細胞の一つである肝星細胞は正常肝では細胞内脂肪滴を有する静止期の状態で存在するが、肝障害刺激が加わると活性型となり増殖し、細胞外マトリックスを産生して障害肝の修復に重要な役割を果たす。近年、幹細胞研究の発展に伴い肝再生時における種々の肝構成細胞の由来が研究され前駆細胞の役割や重要性が次第に明らかになりつつある。しかし、肝星細胞においては未だその由来は解明されていない。本研究においては骨髄由来肝星細胞の存在の有無について検討した。

【方法】致死量の全身放射線照射を施した8週齢のC57BL/6Jマウスにgreen fluorescent protein (GFP) トランスジェニックマウスから採取した骨髄細胞を移植した。骨髄移植後2ヶ月目に肝臓をコラゲナーゼ灌流後、ナイコデントを用いた濃度勾配遠心法にて選択的に肝非実質細胞を分離して培養を行った。培養2日目にRT-PCRにて肝星細胞の活性型のマーカーである $\alpha$ -平滑筋アクチン、静止期・活性型の両期に発現するデスミンならびに骨髄由来を示すGFP、肝細胞・血管内皮細胞・Kupffer細胞および胆管細胞のマーカーであるアルブミン・Flk-1・CD16・CK19の発現から分離効率を検討した。また、培養2日目および7日目に蛍光免疫染色を行い、静止期の肝星細胞マーカーであるglial fibrillary acidic protein (GFAP)・ $\alpha$ -平滑筋アクチン・デスミンの発現パターンの変化ならびにGFPとの局在について検討した。また、骨髄移植後2ヶ月目の肝組織においてGFP陽性細胞における肝星細胞マーカーの発現を蛍光免疫染色にて観察した。さらに、移植後2ヶ月目から3日ごとに四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)を皮下に5回投与した肝障害モデルを作成し骨髄由来細胞の形態および機能変化を蛍光免疫染色およびアザン染色・HE染色にて検討した。

【結果及び考察】培養2日目に分離した細胞の94.4 $\pm$ 1.1%は肝星細胞の特徴の一つである細胞内脂肪滴を有しており、その中で骨髄由来細胞を示すGFP陽性細胞は33.4 $\pm$ 2.3%であった。分離した細胞のRT-PCRではデスミン・ $\alpha$ -平滑筋アクチンとGFPの発現を認めた。一方、アルブミンやFlk-1・CD16の発現がわずかに認められ少数の肝細胞・血管内皮細胞およびKupffer細胞の混入と考えられたが、CK19の発現はなく胆管細胞の混入は認めなかった。培養2日目の蛍光免疫染色においても肝細胞・血管内皮細胞・Kupffer細胞の混入を各々0.13%・0.29%・0.25%認めたが、98.6 $\pm$ 0.5%の細胞がGFAP陽性であり、98.2 $\pm$ 1.1%がデスミン陽性細胞であった。更に、GFP陽性細胞の99.1 $\pm$ 0.6%がGFAP陽性、98.1 $\pm$ 0.1%がデスミン陽性であった。培養7日目になるとGFP陽性細胞は蛍光免疫染色において $\alpha$ -平滑筋アクチンが陽性となり、形態的には細胞内脂肪滴が消失し筋線維芽細胞様となった。以上から分離した細胞の大部分は肝星細胞であり、少なくとも約3割は骨髄由来であると考えられた。骨髄移植後2ヶ月目の肝組織では肝細胞周囲に骨髄由来GFP陽性細胞を認めた。この細胞は形態学的に肝星細胞の特徴の一つである肝細胞周囲に伸びる樹状突起を有しており、免疫組織学的にはデスミンとGFAPを共発現していたが $\alpha$ -平滑筋アクチンの発現は認めなかった。CCl<sub>4</sub>投与により肝内のGFP陽性細胞は増加し、免疫組織学的にはデスミン・ $\alpha$ -平滑筋アクチンを共発現する活性型となった。さらに、コラーゲンを伴った繊維化がこれらの細胞周囲に認められ、細胞外マトリックス産生による肝障害時の肝再生機能に関与していることが示唆さ

れた。

【結論】正常肝組織内に静止期の肝星細胞の特徴を有する骨髄由来の肝非実質細胞が存在することが確認され、肝障害刺激によりこれらの細胞が増殖し細胞外マトリックスを産生することが示唆された。肝星細胞の由来を明らかにした本研究は今後の肝硬変形成機構の解明に有用であると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

肝臓の構成細胞の由来を明らかにすることは、肝不全、肝障害に対する将来の再生医療の確立に重要である。本研究は、マウスモデルにおける骨髄由来肝星細胞の存在の有無を検討したものである。

本申請者は、骨髄細胞の肝臓構成細胞への分化に関し、これまで成体における由来が不明であった肝星細胞に着目した。今回、green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックマウスの骨髄を同系マウスに移植することにより骨髄マーキングしたマウスを作製した。このマウスの肝臓より肝星細胞分画を分取し、RT-PCR および蛍光免疫染色にて特性解析を行った。分取した肝星細胞の約3分の1が骨髄由来を示すGFP陽性細胞であり、培養直後の静止期の状態から7日間の培養にて活性型となった。また、肝組織内の肝星細胞の解析を、骨髄移植マウス並びに骨髄移植マウスに四塩化炭素を投与した肝障害マウスを用い、蛍光免疫染色、アザン染色にて検討した。骨髄移植マウスの肝組織内には骨髄由来肝星細胞を認め、肝障害を加えることにより、骨髄由来星細胞は本来肝内に存在する肝星細胞と同様に活性化され、機能的にも周囲にコラーゲン産生能を有することを示した。これらの結果から、骨髄が成体における肝星細胞の細胞源の一つである可能性を示した。

以上の研究は、骨髄由来肝星細胞の存在を *in vitro*, *in vivo* の両面から示したものであり、再生医療に向けた消化器外科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のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年1月18日実施の論文内容とそれに関した試問を受け、合格を認められたものである。