

京都大学	博士（ 医 学）	氏 名	上村 良
論文題目	Comparative study of transplantation of hepatocytes at various differentiation stages into mice with lethal liver damage （致死性肝障害モデルマウスに対する分化段階の異なる肝細胞移植の比較検討）		
（論文内容の要旨）			
致死性の肝疾患に対する治療として近年肝移植が確立されてきたが、深刻なドナー不足が問題となっており、代替する治療として、induced pluripotent stem cells (iPS 細胞)や embryonic stem cells (ES 細胞)などから肝細胞へ誘導した細胞を用いた肝細胞移植が期待されている。当研究室においても、ES 細胞から内胚葉系細胞へと誘導した細胞および胎仔肝細胞を細胞移植することで、致死性急性肝障害モデルマウスの生存率を改善させることを示してきた。しかしながら、どの分化段階の細胞が最も肝細胞移植に適しているかは、はっきりしていなかった。とりわけ、高度な肝細胞機能を持つ成熟肝細胞がより適切であるのか、または増殖能旺盛な幼若肝前駆細胞がより適切であるのかは、議論のあるところであった。以上をふまえて、肝細胞移植においてどの分化段階の細胞が最も効果的であるのかを比較検討することを、本研究の目的とした。以下に実験方法を述べる。初めに、急性肝障害モデルとして、albumin enhancer/promoter 下にマウスの細胞には本来存在しないジフテリア毒素受容体の特異的に発現するトランスジェニックマウスを用いた。このマウスにジフテリア毒素の腹腔内投与を行うことでレシピエントの肝細胞特異的に細胞障害を惹起し、致死性急性肝障害を誘発させた。このモデルマウスに対して、分化段階の異なる3種の細胞、すなわち ES 細胞由来内胚葉細胞、胎仔肝細胞及び成熟肝細胞を経脾臓的にそれぞれ細胞移植し、各移植群の生存率を比較検討した。さらに、細胞移植に用いた胎仔肝細胞と成熟肝細胞間で、細胞間の接着及び細胞の組織への浸潤に関与すると考えられているカドヘリン群および matrix metalloproteinase (MMPs)の mRNA の発現を real time PCR にて比較検討した。以下に結果を述べる。細胞移植 35 日目の時点で、成熟肝細胞移植群（8/20, 40%）においてのみ、偽手術群(2/25, 8%)や胎仔肝細胞移植群(1/20, 5%)及び ES 由来内胚葉細胞移植群(0/21, 0%)に比較して有意に生存率が改善された。移植後 35 日目の成熟肝細胞移植群の生存マウスの肝臓では、多くの肝実質が移植細胞に置換されていた。免疫染色にて、移植細胞は全てアルブミン陽性であり、また CK19 および CD45 が陰性であることから、肝細胞として生着していることが示された。また、real time PCR を用いた検索にて、成熟肝細胞は胎仔肝細胞と比較して、有意に E-cadherin の mRNA の発現が亢進していることが示された。一方、成熟肝細胞と抗 E-cadherin 抗体を懸濁して細胞移植を行ったところ、細胞の生着が低下する傾向が見られた。以上より、急性肝障害に対する細胞移植においては、成熟肝細胞が有意に他の未熟な細胞よりもその生存率を改善させることが明らかとなった。急性肝障害に対する ES 細胞や iPS 細胞を用いた肝細胞移植においては、移植細胞を可能な限り成熟化したほうがより効果的であることが示唆された。また、胎仔肝細胞と比較して成熟肝細胞における E-cadherin の発現が亢進していることから、E-cadherin が移植細胞の肝生着に必要である可能性が示唆された。これらの実験結果は、将来臨床的に肝細胞移植を実用化していく上で、重要な示唆を与えるものと考えられる。			

（論文審査の結果の要旨）
致死性の肝疾患の治療における肝移植の代替治療として、 embryonic stem cells(ES細胞) や induced pluripotent stem cells(iPS細胞) から肝細胞へ誘導した細胞を用いた肝細胞移植が期待されている。しかしながらどの分化段階の細胞が最も肝細胞移植に適しているかは明らかでないので、申請者はこの解明を目的として、致死性急性肝障害モデルマウスに対し分化段階の異なる ES細胞 由来内胚葉細胞、胎仔肝細胞及び成体肝細胞を細胞移植し、各移植群の生存率を比較した。この結果、成体肝細胞移植群においてのみ有意に生存率が改善された。さらに成体肝細胞の治療効果が高いメカニズムを探るため、胎仔肝細胞と成体肝細胞間で細胞間接着因子等の発現を比較したところ、成体肝細胞で E-cadherin の発現亢進を認め、さらに成体肝細胞と抗 E-cadherin 抗体を懸濁して細胞移植を行うと、細胞の生着が低下する傾向を認めた。以上の結果より、急性肝障害に対する ES/iPS細胞 を用いた肝細胞移植においては、移植細胞を可能な限り成熟化したほうがより効果的であることが示唆された。また、 E-cadherin の移植細胞の肝生着への重要性も示唆された。以上の研究は、肝細胞移植における移植細胞の分化段階の違いによる治療効果の違いの解明に貢献し、臨床的な肝細胞移植の実用化に寄与するものと考えられる。
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 24 年 2 月 1 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。
要旨公開可能日： 年 月 日 以降