

氏 名	ふじ 藤 かわ 川 たか 貴 ひさ 久
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3013 号
学位授与の日付	平 成 18 年 7 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	Purification of Adult Hepatic Progenitor Cells Using Green Fluorescent Protein (GFP) - Transgenic Mice and Fluorescence - activated Cell Sorting (蛍光励起セルソーティングを用いた緑色蛍光蛋白トランスジェニックマウスからの成体肝前駆細胞の分離精製に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 上 本 伸 二 教 授 長 澤 丘 司 教 授 山 中 伸 弥

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】幹細胞研究の進歩により肝前駆・幹細胞が肝の発生や再生において重要な役割を果たすことが明らかになり、臓器不足が深刻な肝移植にかわる代替治療としての細胞移植や臓器再生の細胞源として期待されている。しかしながら、肝幹細胞の特異的のマーカが同定されていないため、成体肝からの幹細胞分離は従来行われていなかった。そこで green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックマウスを利用して、マウス成体肝より肝前駆細胞の分離を試みた。

【方法と結果】GFP トランスジェニックマウスの肝を摘出後に肝酵素処理により細胞分離し、GFP 発現を利用して以下の実験を行った。

- 1) 利用した GFP トランスジェニックマウスにおける GFP 発現プロファイルを検討したところ、成熟肝細胞では GFP の強発現を認めたが、非実質細胞（星細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞）では GFP の発現は検出感度以下であった。この系統のマウスを用いて蛍光励起セルソーティングにより細胞の精製分離を行うこととした。
- 2) 血球マーカーを用いて可及的血球細胞を除去した後、分布する細胞をそれぞれ、血球系細胞、非実質細胞、成熟肝細胞に分画化したところ、血球系細胞分画では大部分が GFP 陰性、成熟肝細胞分画ではほぼ全て GFP 強陽性、非実質細胞分画では GFP 陰性と GFP 陽性の2つの細胞群で構成された。成体肝由来未分化内胚葉細胞が比較的小型で細胞内顆粒が少ないことから非実質細胞分画内の GFP 陽性群にくと考え、この分画をセルソーティングしたところ、限外希釈後の培養下で1つの細胞より分裂増殖しコロニーを形成した。このコロニー細胞は免疫染色にて未分化肝細胞のマーカである α -fetoprotein (AFP) が陽性であった。
- 3) 分離精製度を検討したところ、AFP 陽性細胞コロニー形成数は、他の分画に比べ、ソーティングした細胞で有意に多かった。RT-PCR では、ソーティング後1週間培養した細胞ではアルブミンや AFP、胆管上皮マーカーである CK19 の陽性は維持され、一方血球や非実質細胞のマーカはいずれも陰転化し、細胞が十分に精製されていることが示された。
- 4) クローナル解析及び電子顕微鏡を用いて、得られた細胞の二分化能を検証した。ソーティング細胞は単独培養では成熟肝細胞への成熟化や胆管上皮細胞の出現は認めなかった。一方 GFP 陰性の非実質細胞との共培養を行うと約3週間で成熟化しアルブミン/CK19 の共陽性細胞や CK19 単独陽性細胞が出現した。電子顕微鏡を用いた解析でも、共培養後に成熟肝細胞や胆管上皮細胞が出現することを確認した。このことからソーティング細胞が肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能を有することが示唆された。
- 5) ソーティング細胞の表面抗原を解析したところ、胎仔肝幹細胞のマーカとして報告のある CD29 や CD49f についてはいずれも陽性であったが、障害肝由来肝幹細胞のマーカである c-Kit や Thy1.1 についてはいずれも陰性であった。

【結論】内胚葉系細胞に GFP を強発現する GFP トランスジェニックマウスと蛍光励起セルソーティングを用いることで、マウス成体肝より AFP 陽性で高い増殖能及び肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能を有する肝前駆細胞が分離精製できた。以上の研究は肝幹・前駆細胞を用いた細胞治療や臓器再生の細胞源確立に貢献し、肝臓外科手術領域の臨床応用に寄与するところ大きい。

論文審査の結果の要旨

本研究は、CAG プロモーター下で緑色蛍光蛋白（GFP）を発現させた、トランスジェニックマウスのうち、偶発的に肝内では内胚葉系細胞で GFP を強発現することが示された一系統を利用して、マウス成体肝からの肝前駆細胞の精製分離を検討したものである。

肝酵素処理により細胞分離し血球系マーカーや低速遠沈を用いて可及的血球系細胞や成熟肝細胞を除去した細胞群に対し、非実質細胞分画内の GFP 陽性細胞群をセルソーティングした（精製の純度は 0.1-0.3%）。ソーティングした細胞のうちの培養皿に接着した細胞の大部分（>90%）が、1つの細胞から分裂増殖して細胞コロニーを形成し、さらに電子顕微鏡の観察により非実質細胞との約3週間の共培養にて成熟肝細胞と胆管上皮細胞へと分化することを確認した。この細胞群は胎仔肝前駆細胞のマーカーである CD29 や CD49f が陽性であった。以上から、高い増殖能及び肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能を有する肝前駆細胞を精製分離し得たことが示された。

以上の研究は肝前駆細胞を用いた細胞治療や臓器再生の細胞源確立に貢献し、肝臓外科手術領域の臨床応用に寄与するところ大きい。

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18年6月16日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格したものと認められたものである。