京都大学	博士（医学）	氏　名	小西　小百合
論文題目	A transmembrane glycoprotein,gp38,is a novel marker for immature hepatic progenitor cells in fetal mouse livers （糖蛋白 gp38 は胎仔肝細胞における未分化肝前駆細胞の新規マーカーである）		

背景・目的

肝疾患領域の再生医療実現に向け注目される肝幹細胞候補はいくつか報告があるものの、その単離法は未確立である。先行研究にて胎仔肝組織から肝幹細胞を含むと考えられる肝前駆細胞集団を濃縮・分離する方法を確立したが、その中にもまたさまざまな分化段階の細胞が含まれている。肝前駆細胞集団と成熟肝細胞集団との間で DNA subtraction を行い同定した肝幹細胞表面抗原候補うち、glycoprotein 38: gp38 を用いて肝幹細胞候補の単離および特性解析を行った。

方法

胎生 13.5 日の C57BL/6J マウス胎仔肝臓細胞を flow cytometer を用いて gp38 陽性細胞(CD49f+ CD45- Thy1- gp38+)と gp38 陰性細胞(CD49f+ CD45- Thy1- gp38-)に分画した。分離した各細胞集団に対して、アルファフェトプロテイン（AFP）、アルブミン（Alb）、サイトケラチン 19(CK19)に対する免疫染色および各種マーカー遺伝子に対する RT-PCR を行い発現遺伝子解析を行うと共に、免疫染色により蛋白発現を同定した。Brd-U 取り込み試験により各細胞集団の増殖活性を定性的に解析した。さらにマイクロアレイを用いて各細胞分画における発現遺伝子の網羅的解析を行ったうえで、Wnt3A 刺激下および非刺激下における各細胞分画の発現遺伝子変化を定量的 RT-PCR により解析すると共に、MTT assay により増殖活性の定量解析を行った。

結果

gp38 陽性細胞は胎生 13.5 日マウス肝前駆細胞集団中 1.75%を占める細胞集団であり、AFP 発現を認めたが、Alb と CK19 発現は認めなかった。一方、gp38 陰性細胞 には AFP、Alb、CK19 の発現を認めた。一方、gp38 陽性細胞は陰性細胞と比べて有意に高い Brd-U の取り込みを認めた。また、gp38 陽性細胞には Wnt シグナル伝達系にかかわる遺伝子発現が有意に高かったが、gp38 陰性細胞には Wnt 関連遺伝子は発現しておらず、発生後期内胚葉マーカーである FoxA2 や c-Met が有意に発現していた。Wnt3a 刺激下においては発現遺伝子には有意な差を認めなかったが、gp38 陽性細胞の分裂速度が gp38 陰性細胞よりも有意に短縮していた。

考察と結語

マウスでは、胎生 8.5 日頃に腹側前腸内胚葉の一部が liver bud を形成し、その構成細胞には AFP が発現し、組織学的に肝芽細胞と呼ばれる細胞になる。胎生 9.5 日頃には、Alb および CK19 が発現し、肝細胞へ運命決定された細胞には Alb 発現が、胆管上皮細胞へ運命決定した細胞には CK19 の発現が上昇していく。その後、AFP 発現が低下してゆき、成熟肝細胞、および成熟胆管上皮細胞へと分化すると考えられている。

一方、近年の幹細胞生物学発展に伴い特性解析が期待される肝幹細胞については上記の胎仔肝臓組織を構成する肝前駆細胞集団中に含まれると考えられるが、セルソーターによる単離に必要な肝幹細胞特異的表面抗原は未確定である。本研究により同定されたマウス胎仔肝前駆細胞中 gp38 陽性細胞は AFP のみ発現し、高い増殖活性を持つことから、肝発生初期のより未分化な内胚葉細胞であると考えられる。また、Wnt シグナルにより未分化を維持できる可能性があると考えられる。本研究結果は将来肝組織内に存在する肝幹細胞を単離・増殖させたうえでさらに詳細な特性解析を可能にすることのみならず、胚性幹細胞（ES 細胞）や誘導多能性幹細胞（iPS 細胞）由来の肝細胞を分化誘導する際に重要な知見になるものと考えられる。

（論文審査の結果の要旨）

肝疾患領域の再生医療実現に向け注目されている肝幹細胞候補はいくつか報告があるものの、未だにその単離法は確立していない。本申請者は胎生 13.5 日のマウス胎仔肝組織を構成する肝前駆細胞集団をセルソーターにより gp38 陽性細胞と陰性細胞に分画し、各種マーカー遺伝子の発現を RT-PCR および免疫染色にて比較した。gp38 陽性細胞は胎仔肝前駆細胞中 1.7%を占める希少な細胞集団であり、アルブミン、CK19 の発現は認めず、最も初期に発現するアルファフェトプロテインを発現していた。また、BrdU の取り込み試験により高い増殖活性を示した。一方、マイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的解析の結果、gp38 陽性細胞には Wnt シグナル伝達系関連遺伝子群が高発現しており、gp38 陽性細胞に対して Wnt3A が増殖刺激活性を有する一方、分化傾向には影響を与えないことを確認した。従って、マウス胎仔肝前駆細胞中の gp38 陽性細胞はより未分化な肝内胚葉細胞であると考えられ、Wnt シグナルにより分化させることなく増殖させうる可能性が示唆された。本研究は将来 gp38 発現を指標に肝組織内に存在する肝幹細胞を単離・増殖させることを可能にする一方、ES 細胞や iPS 細胞由来の肝細胞を分化誘導する際の重要な知見となり、肝臓領域の幹細胞生物学の発展に寄与すると考えられる。従って、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 23 年 3 月　7 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