

氏 名	ほっ ほう とし たか 北 方 敏 敬
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2803 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	Thy1-positive mesenchymal cells promote the maturation of CD49f-positive hepatic progenitor cells in the mouse fetal liver (マウス胎仔肝臓において Thy1 陽性の間葉系細胞は CD49f 陽性肝前駆細胞の成熟化を促進する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 千 葉 勉 教 授 中 畑 龍 俊 教 授 生 田 宏 一

論 文 内 容 の 要 旨

【背景】末期の肝疾患に対して肝移植が標準的な治療となりつつあるが、ドナー不足が世界的に深刻な問題となっている。ドナー不足を解消する治療法の一つとして細胞移植療法が注目されており、細胞移植における移植細胞源の確保が重要な課題である。【目的】移植細胞源の一つとして、増殖力が旺盛で、低酸素状態に強く、凍結保存が可能な胎仔肝前駆細胞に着目し、これまでにマウス胎仔肝より細胞凝集塊を形成し効率よく肝前駆細胞を濃縮採取する方法を確立した。今回、この細胞凝集塊に含まれる細胞集団の表面抗原解析・特性解析を行い、それぞれの集団間における相互作用について検討した。【方法】フローサイトメーターを用いて細胞凝集塊を構成する細胞集団の表面抗原解析を行い、それぞれの集団を分離採取し免疫染色や RT-PCR にて特性解析を行った。更にこれらの細胞集団の接触共培養、非接触培養、単独培養を行い、形態学的変化、定量的 RT-PCR、電子顕微鏡にて細胞集団間の相互作用について検討した。【結果と考察】表面抗原解析により、細胞凝集塊中に CD49f(+)Thy1(-)CD45(-)細胞（以下、CD49f 陽性細胞）、CD49f(±)Thy1(+)CD45(-)細胞（以下、Thy1 陽性細胞）、CD49f(+ (low and high))Thy1(-)CD45(+)細胞（以下、CD45 陽性細胞）の3集団が含まれることが明らかとなった。CD45 陽性細胞は血球系細胞の混入と考えられ、CD49f 陽性細胞と Thy1 陽性細胞の特性解析を行った。CD49f 陽性細胞は、形態的には上皮系細胞であり、免疫染色にて未分化内胚葉系マーカーである α -フェトプロテイン (AFP) が一様に陽性で、肝細胞マーカーであるアルブミン (ALB) と胆管細胞マーカーであるサイトケラチン19 (CK19) が共に陽性の細胞を認め、肝前駆細胞と考えられた。一方、Thy1陽性細胞は紡錘状の不均一な細胞集団であり、免疫染色と RT-PCR では間葉系細胞マーカーである α -SMA、デスミン、ビメンチンが陽性であったが、内胚葉系マーカー (ALB, CK19, AFP) や血管内皮・クッパー細胞マーカー (VE-cadherin, PECAM, Flk-1, CD16) は陰性であった。以上より、Thy1 陽性細胞は間葉系細胞と考えられた。次に2つの細胞集団を接触共培養したところ、CD49f 陽性細胞のコロニーは形態的に成熟化が示唆され、PAS 染色にて著名なグリコーゲン貯留を認めた。更に、定量的 RT-PCR にて成熟肝細胞マーカーである tyrosine amino transferase や tryptophan oxygenase の mRNA 発現が著名に増加した。電子顕微鏡では共培養した細胞中に成熟肝細胞に特徴的な微細構造を認めた。一方、CD49f 陽性細胞単独培養及び2つの細胞集団を非接触培養した場合には、成熟化を示す形態変化は起こらず、定量的 RT-PCR にても成熟肝細胞マーカーの増加は認めなかった。以上より、CD49f 陽性細胞は成熟肝細胞へと分化しうる内胚葉系未分化細胞であり、Thy1 陽性間葉系細胞との細胞間接触が CD49f 陽性細胞の成熟化に重要であることが示唆された。【結論】細胞凝集塊形成法とフローサイトメーターを用いることにより、未分化内胚葉系細胞と Thy1 陽性間葉系細胞を精製分離することができた。また、未分化内胚葉系細胞と Thy1 陽性間葉系細胞との接触共培養は、*in vitro* maturation system として有用であると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、表面抗原発現に基づきマウス胎仔肝から肝前駆細胞と間葉系細胞を分離採取し、その特性解析および相互作用

について検討したものである。

本申請者は、肝不全に対する細胞移植療法の移植細胞源の一つとして、低酸素抵抗性があり凍結保存が可能な肝前駆細胞に着目した。これまでにマウス胎仔肝より細胞凝集塊を形成させることによって、肝前駆細胞を効率よく濃縮採取する方法を確立した。今回、この細胞凝集塊を構成する細胞集団の表面抗原解析を行い、CD49f 陽性細胞と Thy1 陽性細胞をフローサイトメーターにて分離採取し、免疫染色と RT-PCR にて特性解析を行った。CD49f 陽性細胞は α -フェトプロテイン、アルブミン、サイトケラチン19を発現した肝前駆細胞であり、Thy1 陽性細胞は α -SMA、デスミンを発現した間葉系細胞であった。この二つの細胞集団を接触共培養した場合には CD49f 陽性細胞が成熟肝細胞への分化が促進されることを定量的 RT-PCR、PAS 染色と透過型電子顕微鏡を用いて示した。これらの結果から、CD49f 陽性細胞は成熟肝細胞へと分化する内胚葉系未分化細胞であり、Thy1 陽性間葉系細胞との細胞接触が CD49f 陽性細胞の成熟化に重要であり、*in vitro* maturation system として有用であると考えられる。

以上の研究は、マウス胎仔肝からの肝前駆細胞の分離とその成熟化促進について明らかにしたものであり、細胞移植治療に向けた消化器外科学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あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成16年11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。