

氏 名	あずま 東 ひさ や
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2712 号
学位授与の日付	平 成 16 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	Enrichment of hepatic progenitor cells from adult mouse liver (成体マウス肝からの肝前駆細胞の濃縮に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 前 川 平 教 授 千 葉 勉 教 授 田 中 紘 一

論 文 内 容 の 要 旨

〔背景〕 肝細胞移植の細胞源として分裂増殖能と成熟肝細胞への分化能を有する肝前駆細胞が有望視されている。肝前駆細胞は全肝構成細胞の0.1～1%で肝障害時に肝組織内に多数出現するが、正常肝からの分離培養は困難であり、その特性は未だ解明されていない。これまでの我々の胎仔肝細胞の研究から肝前駆細胞は成熟肝細胞に比較し小型で、低酸素耐性を有すると考えられる。これまでの研究成果を基礎とし、本研究においては正常肝組織から肝前駆細胞を分離・濃縮する方法を確立することを目的とした。

〔対象と方法〕 生後8週齢以降の成体C57BL/6マウスの肝組織を2-step-collagenase perfusion法に準じて処理した後、50×Gの低速遠沈で成熟肝細胞を除き、一般的に肝非実質細胞分画と考えられている上清を回収した。この上清をナイロンメッシュで濾過し単独細胞にまで遊離した細胞浮遊液を作成した。これを遠沈管に封入して酸素分圧10mmHg以下の低酸素条件下で2時間の振盪培養することにより細胞凝集体を形成させ、20分の自然沈降によって分離した。10%血清加DMEMにHGF、インスリン、ニコチンアミドを加えて接着培養し、さらにデキサメサゾンとジメチルスルフォキシドを加えて1カ月間培養し分化を誘導した。

形成された細胞凝集体を、免疫染色および定量的RT-PCRによりアルブミン (ALB; 肝細胞系)、AFP (未分化肝細胞)、サイトケラチン19 (CK19; 胆管細胞)、 α 平滑筋アクチン (星細胞)、E-カドヘリン (上皮系細胞)、VE-カドヘリン (血管内皮細胞)、トリプトファンジゲナーゼ (TO; 成熟肝細胞) の発現を検討した。増殖能は位相差顕微鏡下で経時的に観察することにより評価し、成熟肝細胞への分化能はTOとAFPの発現量を定量的RT-PCRにより評価した。さらに透過電子顕微鏡によって形態学的特徴を評価した。

〔結果〕 マウス一頭につき非実質細胞分画から $1.5\sim 2.0\times 10^7$ 個の細胞が得られ、2時間浮遊培養させることで10～50個の細胞からなる細胞凝集体が $0.6\sim 1.0\times 10^5$ 個回収された。浮遊培養時に培養液からカルシウムを除くと細胞凝集体が形成されないことから、細胞の凝集にはカドヘリン依存性の機序が推測された。回収された細胞凝集体は定量的RT-PCRではTOの発現が認められず成熟肝細胞はほぼ完全に除去されており、またE-カドヘリン、VE-カドヘリン、AFPの発現を認めた。免疫染色では回収した細胞凝集体の約95%はVE-カドヘリンを発現する血管内皮細胞であり、残りの約5%はAFP、ALB、E-カドヘリンを発現する小型の上皮細胞により構成されていることが示された。前者は培養10日以内にほぼ死滅するが、後者の細胞凝集体は接着培養ののち1週間で4～5回分裂してコロニーを形成した。さらに同細胞の約半数のコロニーで培養1カ月後には培養初期に陰性であった成熟肝細胞マーカーであるTOが発現し、電子顕微鏡像においても形態学的にも成熟肝細胞に類似する像を示した。従って、同細胞は分裂増殖能と成熟肝細胞への分化能を有する肝前駆細胞であると考えられた。

〔結語〕 本研究により、成体マウス肝にはおよそ $5\sim 20\times 10^4$ 個の肝前駆細胞が存在し、細胞凝集体を形成させることにより同細胞を濃縮することが可能であることが確立された。本方法を用いることにより効率的に成体肝由来の肝前駆細胞を

分離することができ、今後、肝前駆細胞の特性解析するために有用な方法になると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、成体マウス正常肝から肝前駆細胞を分離する方法論を確立したものである。

本申請者は、肝前駆細胞が成熟肝細胞に比較し小型で低酸素抵抗性であることに着目した。成体マウス肝をコラゲナーゼ灌流して得られた細胞浮遊液から成熟肝細胞よりも小型である非実質細胞を分離し、これを低酸素条件下で浮遊培養して細胞凝集塊を形成させた。形成された細胞凝集塊のうち約95%は血管内皮細胞が凝集したものであるが、約5%は上皮系未分化細胞により構成されたものであることを明らかにした。また後者の細胞が旺盛な増殖能力を有し、免疫染色および定量的RT-PCRにおいて、 α フェトプロテイン、アルブミン、E-カドヘリンを発現する肝細胞系の未分化細胞であることを示した。さらに定量的RT-PCRと透過型電子顕微鏡を用いてこの未分化細胞は長期培養することにより成熟肝細胞に分化することを示した。これらの結果は細胞凝集塊を形成させることにより増殖能と分化能を有する成体肝由来の肝前駆細胞を効率よく分取できることを示している。

以上の研究は、正常な肝組織から細胞移植治療に用いる肝前駆細胞を分取できる可能性を示したものであり、消化器外科学の発展に寄与するところが多い。

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16年2月5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。