京都大学	博士（　医　学）	氏　名	福　光　剣
論文題目	Establishment of a cell line derived from a mouse fetal liver that has the characteristic to promote the hepatic maturation of mouse embryonic stem cells by a co-culture method （マウスＥＳ細胞を共培養により肝細胞へ成熟化させる能力を有するマウス胎仔肝由来細胞株の樹立）		

（論文内容の要旨）

ES 細胞由来の成熟肝細胞は再生医療や創薬にとって有用なツールと考えられるが、成熟肝細胞への効率よい分化誘導は未だ困難である。そこでマウス ES 細胞および肝前駆細胞を共培養することで成熟肝細胞へと分化させる能力を持つ細胞株を樹立した事を報告する。以前 E13.5 胎仔肝臓より Thy1 陽性 gp38 陽性間葉系細胞が肝前駆細胞の成熟化を促進させることを示したが、今回この間葉系細胞に SV40 Large T antigen を導入することにより細胞株を樹立し、樹立された 35 クローンから 3 段階の選別にて最も成熟化能の高いものを選んだ。まずマウス ES 細胞由来 AFP 産生細胞をクローン化する前の細胞株と共培養したところ、PAS 染色陽性を示し G6P, TAT, TO などの肝成熟化マーカーの発現を認めたため、これらの細胞株が成熟化能を有することを確認した。次に、より成熟化能の高い細胞株を得るため限界希釈にて 35 クローンを得た。第 1 段階として、マウス ES 細胞由来 AFP 産生細胞を各クローンと共培養し、Thy1 陽性 gp38 陽性間葉系細胞の初代培養細胞と共培養した場合と形態が似ているもの、且つ PAS 染色陽性を示すものを選択し、21 クローンを選んだ。第二段階として、細胞株自身が成熟肝細胞のマーカーを発現してはいないかを確認したところ、約 8 割のクローンに TAT の発現を認めたためこれらを除外し、残った 5 クローンを次の解析に進めた。最後にマウス ES 細胞由来 AFP 産生細胞を各クローンと共培養し、成熟肝細胞のマーカーである G6P, TO, TTR、および未分化マーカーである AFP の発現を定量的 PCR にて比較することで、最も成熟化能の高い株を選択し、これを MLSgt-20 と命名した。この MLSgt-20 は、Thy1 陽性 gp38 陽性間葉系細胞の初代培養細胞と似た多角形の細胞で、RT-PCR にて初代培養細胞と似た遺伝子発現を認めた。しかし、FACS の解析にて gp38 の発現は認めるものの Thy1 の発現は消失していた。これら ES 細胞由来成熟肝細胞様細胞は未分化マーカーである AFP の発現は弱く、TAT, TO, CYP3a11 などの肝細胞特異的マーカーを発現し、アンモニア除去能、アルブミン分泌能を有することが示された。また cytochrome P450 活性の測定にて、Cyp1a1、Cyp1b1、Cyp1a2 の活性を弱いながらも認める事ができた。電子顕微鏡写真にて biliary canaliculi やタイトジャンクション、グリコーゲン顆粒など肝細胞に特徴的な形態を示していた。MLSgt-20 のコンディショントメディウムでの培養や、グルタアルデヒドにて固定したものでは成熟化能を有しなかった事により、これら間葉系細胞が生きた状態での接触共培養が必要と考えられた。成熟肝細胞を大量に培養できることで、肝細胞移植、体外式人工肝臓だけでなく、薬剤のスクリーニングや肝細胞の成熟化にかかわる因子の検討にも有用となる可能性がある。

（論文審査の結果の要旨）

ES 細胞由来の成熟肝細胞は再生医療や創薬にとって有用なツールと考えられるが、成熟肝細胞への効率よい分化誘導は未だ困難である。本研究は、マウス ES 細胞および肝前駆細胞を共培養することで成熟肝細胞へと分化させる能力を持つ細胞株を樹立し、肝細胞成熟化の分化誘導系を確立する事を目的としたものである。以前、当研究室より胎仔肝臓の Thy1 陽性 gp38 陽性間葉系細胞が肝前駆細胞の成熟化を促進させることが示されたが、今回この間葉系細胞に不死化遺伝子を導入する事により細胞株を樹立し、更にその中で最も成熟化能の高いクローンを選択した。まずマウス ES 細胞由来 AFP 産生細胞をクローン化する前の細胞株と共培養すると、この細胞株が肝細胞成熟化能を有することを確認できた。次に、より成熟化能の高い細胞株を得るため限界希釈にてまず 35 クローンを得た。初めに形態が初代培養間葉系細胞に類似しているクローンを選択し、更に肝細胞成熟化マーカーを発現していたクローンを除外した。最後に共培養において成熟肝細胞のマーカーの発現を定量的 PCR にて比較する事で最も成熟化能の高い株を選択した。共培養にて得られた成熟肝細胞様細胞は、肝細胞特異的な遺伝子発現・機能を有し、またチトクローム P450 活性も認める事ができた。電子顕微鏡写真にても肝細胞に特徴的な形態を示していた。また肝細胞成熟化に間葉系細胞の接触共培養が必要である事を示唆した。

以上の研究は ES 細胞から肝細胞への分化誘導系の確率ならびにそのメカニズムの解明に貢献し、肝細胞移植、体外式人工肝臓や創薬スクリーニング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のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 2 月 8 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