

氏 名	ふじのひさのり 藤 野 寿 典
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3159 号
学位授与の日付	平 成 19 年 11 月 26 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 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Human cord blood CD34 ⁺ cells develop into hepatocytes in the livers of NOD/SCID/ γ_c^{null} mice through cell fusion (ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞は細胞融合を介し NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスの肝臓内で肝細胞へと発育する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 生 田 宏 一 教 授 上 本 伸 二 教 授 前 川 平

論 文 内 容 の 要 旨

近年造血幹細胞を移植したマウスにおいて、移植造血幹細胞に由来する肝細胞が再生されることが明らかとなった。ドナー・レシピエントの条件を様々に設定したマウス-マウス同種移植モデルを用いることで、マウス血液細胞が肝再生に寄与するメカニズムが複数提唱されてきている。

一方ヒトにおいても、造血幹細胞移植後のレシピエント肝臓内にドナー由来の肝細胞を認める、また肝移植後のドナー肝臓内にレシピエント由来の肝細胞を認めるとの報告が散見されるようになった。これらヒト血液細胞が肝再生に寄与するメカニズム解明に当たって、これまでヒトの血液細胞をマウスに移植し解析するヒト-マウス異種移植モデルが使われてきた。しかし従来のマウスモデルはヒト肝細胞を生み出す効率が非常に悪く、ヒト血液細胞がどのようなメカニズムを介して肝再生に寄与するかについての知見は乏しい。

これらの非効率性を克服するため今回、その高度免疫不全性によりヒト血液細胞を始め異種細胞の生着を非常によく許容する NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスモデルを用い、ヒト造血幹細胞・前駆細胞の肝細胞への分化経路を検討した。

ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスの静脈に移植した結果、免疫染色にて多数のヒトアルブミン陽性細胞及びヒト $\alpha 1$ アンチトリプシン陽性細胞・ヒト胆管細胞及びヒトクッパー細胞を NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスの肝臓内に証明した。これらの現象は、肝傷害の有無に関わらず観察された。またマウス末梢血中にヒト型アルブミンを検出し、NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスの肝臓内のこれらの細胞が機能的に成熟していることを証明した。マウス末梢血中のヒト型アルブミンの値は血球キメリズム (ヒト CD45 陽性細胞及びヒト CD3 陽性細胞) と正の相関を認めた。更にレシピエント肝臓を単一細胞に懸濁しフローサイトメトリーで解析する方法、及びヒト及びマウス特異的プロンプを用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いることにより、これらの細胞がヒト・マウス双方のゲノムを保有し、双方の MHC を発現していることを証明した。更に定性・定量 RT-PCR 法を用いレシピエント肝臓中にヒト肝臓、胆管、血管内皮特異的な多種類の mRNA の発現を確認した。以上の免疫染色陽性細胞、ヒト型アルブミンの値及び mRNA 量は全て移植後の時間経過に従い上昇傾向を認めた。

これらの現象は CD34 陰性細胞移植群では認めなかったことより、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞のみが NOD/SCID/ γ_c^{null} マウスの肝臓と細胞融合を起こし、ヒト肝特異的な遺伝子の転写を開始し、極めて生理的なヒト肝細胞を生み出す能力を持つことを証明した。以上よりこれまで明らかにされていなかったヒト造血幹細胞・前駆細胞の肝臓系統への分化経路を証明した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年血液細胞が肝細胞に分化転換する現象が世界的に注目されている。このメカニズム解明に当たり、既存のヒト-マウス異種移植モデルの非効率性を克服するため、申請者はその高度免疫不全性によりヒト血液細胞を始め異種細胞の生着を非

常によく許容する NOD/SCID/ γ_c^{null} (NOG) マウスモデルを用い、ヒト造血幹細胞・前駆細胞の肝細胞への分化経路を検討した。

ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を NOG マウスに移植した結果、マウス肝臓内に免疫染色にて多数のヒト肝細胞・胆管細胞を証明した。またマウス末梢血中にヒト型アルブミンを検出し、肝臓内のこれらの細胞が機能的に成熟していることを証明した。これらの細胞がヒト・マウス双方のゲノムを保有し、双方の MHC を発現していることを証明した。更にレシピエント肝臓中にヒト肝臓、胆管、血管内皮特異的な多種類の mRNA の発現を確認した。これらの現象は肝傷害の有無に関わらず観察され、かつ大量の CD34 陰性細胞移植群では認めなかった。以上よりヒト臍帯血 CD34 陽性細胞のみが NOG マウスの肝臓と細胞融合を起こし、ヒト肝特異的な遺伝子の転写を開始し、極めて生理的なヒト肝細胞を生み出す能力を持つと考えられた。

本研究はこれまで明らかにされていなかった新たなヒト造血幹細胞・前駆細胞の肝臓系統への分化経路の解明に貢献し、将来的にはヒト造血幹細胞移植の臨床応用の拡大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 19 年 10 月 31 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。