

氏名(国籍)	てい 鄭	いん 允	ぶん 文	(中国)
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第3207号			
学位授与年月日	平成15年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	医学研究科			
学位論文題目	Liver Repopulation Capability of Hepatic Stem/Progenitor Cells Isolated by Flow Cytometric Cell Sorting (フローサイトメトリーを用いて分離した肝幹細胞/前駆細胞の組織再構築能)			
主査	筑波大学教授	医学博士	田中直見	
副査	筑波大学併任助教授	農学博士	寺尾恵治	(国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター センター長)
副査	筑波大学講師	医学博士	今川重彦	
副査	筑波大学講師	医学博士	村田秀行	

## 論文の内容の要旨

### (目的)

最近の研究から、肝幹細胞/前駆細胞が様々な肝疾患の治療に応用しうる可能性が示されている。これまでフローサイトメトリーを用いて胎児肝臓から肝幹細胞を回収する方法は確立されているものの、*in vivo*における機能解析は充分に行われていない。そこで、フローサイトメトリーを用いて肝幹細胞を分離し、その組織再構築能を解析することを試みた。

### (方法)

細胞移植モデル：レトロリン投与後に70%部分肝切除を行ったDipeptidyl Peptidase IV (DPP IV) 欠損ラットにDPP IV+ラット由来の肝細胞を移植し、免疫・酵素組織学的検討を行った。フローサイトメトリーを用いた両分化と回収：胎仔肝細胞をICAM-1, MHC class I, c-Met, CD45, ラット赤芽球特異抗原 (EC) の各抗体で標識し、フローサイトメトリーを用いた画分化と回収を行った。回収した細胞の*in vitro*, *in vivo*における機能解析;*(in vivo)* フローサイトメトリーにより分離・回収された細胞を低密度(200cells/cm<sup>2</sup>)で培養し、コロニー形成能及び多分化能について評価した。*(in vivo)* フローサイトメトリーで回収された細胞をレシピエントに移植し、3か月後に移植された細胞の生着を定量的に評価した。細胞周期の解析：propidium iodideを用いて各画分の細胞核染色を行い、細胞周期および核型分析を行った。

### (結果)

妊娠145日目の胎仔肝臓を用いてフローサイトメトリーによる解析を行ったところ、全体の約2.7%に主画分とは明らかに異なるICAM-1<sup>+</sup>RT1A<sup>-low</sup>CD45<sup>-</sup>EC<sup>-</sup>の細胞からなる画分が認められた。コロニー形成能と多分化能を*in vitro*で解析した結果、ICAM-1<sup>+</sup>RT1A<sup>-low</sup>CD45<sup>-</sup>EC<sup>-</sup>細胞はその他の細胞画分由来の細胞と比較して有意に多くのH-CFU-C (Hepatic Colony-Forming-Unit on Culture) を形成した。さらに回収された単一のICAM-1<sup>+</sup>RT1A<sup>-low</sup>CD45<sup>-</sup>EC<sup>-</sup>細胞が形成したコロニーを免疫組織学的に検討したところ、肝細胞マーカーであるアルブミンと胆管上皮細

胞のマーカーであるサイトケラチン 19 の発現が認められた。ICAM-1<sup>+</sup>RT1A<sup>-low</sup>CD45<sup>-</sup>EC<sup>-</sup>細胞を移植した場合、非画分化細胞と比較して200-500倍の高い肝組織再構築能を示した。同様に肝臓内におけるコロニー形成能については50-120倍の違いが認められた。このICAM-1<sup>+</sup>RT1A<sup>-low</sup>CD45<sup>-</sup>EC<sup>-</sup>細胞は、レシピエント肝臓内で機能的にも成熟肝細胞の特徴を持った正常の肝細胞に分化していることが確認された。細胞周期と核型分析の結果、ICAM-1<sup>+</sup>RT1A<sup>-low</sup>CD45<sup>-</sup>EC<sup>-</sup>細胞画分には4Nの核型を持つ細胞は存在せず、64%がG0/G1期にあり、33%がS期にあった。これに対し、非画分化肝細胞の72%はS期にあり、G0/G1期にあるのは26%のみであった。

#### (結論)

フローサイトメトリーによりラット胎仔肝臓から単離されたICAM-1<sup>+</sup>RT1A<sup>-low</sup>CD45<sup>-</sup>EC<sup>-</sup>の細胞画分はコロニー形成能と多分化能を有し、肝幹細胞と考えられる特徴を有することが示唆された。この細胞画分はレトロロシン/PHを用いた移植モデルにおいて、in vivoでも同様の性格を有したことから、この画分が肝幹細胞であることがほぼ決定的となった。またin vivoにおける解析の結果、胎仔肝由来細胞移植において、フローサイトメトリーにより得られた特定の細胞画分を使用することで200倍以上の効率で細胞の生着が認められ、幹細胞移植の有効性が示された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、ラット胎仔肝臓における肝幹細胞/前駆細胞を制度の高い細胞分離法であるフローサイトメトリーを用いて回収し、培養系に増殖能・多分化能、細胞周期、細胞移植系における組織再構築能を解析したものである。本研究は、著者の所属研究室において世界で初めて同定されたマウス肝幹細胞に関する研究手法を基盤として行われたものであるが、特に幹細胞の機能として最も重要な組織再構築能を指標としてin vivoにおける機能解析を行ったものである。その結果、マウス肝幹細胞とほぼ同様の幹細胞がラット胎仔肝臓中にも存在することを明確に示し、肝幹細胞が種を越えて間違いなく存在することを明らかにするとともに、それらの特徴づける細胞表面マーカーとしてICAM-1, MHC Class I, c-Met分子の発現が重要であることを初めて報告したものであり、独創性・新規性の高い研究であるといえる。また、肝幹細胞の細胞周期解析を世界で初めて行った点にも大いにオリジナリティーがある。

今後、成体肝臓ならびにヒト肝臓における幹細胞の同定を進めるとともに、肝疾患に対する細胞療法の確立に向けた実用化研究を行うことが、本研究の成果を臨床医学の領域において一層価値あるものにすると考えられる。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。