

氏名(本籍)	かのじゅんこ 加野准子(岐阜県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第2691号		
学位授与年月日	平成13年3月23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	The in vitro differentiating capacity of nonparenchymal epithelial cells derived from adult porcine livers (成熟ブタ肝臓由来非実質上皮性細胞の in vitro における分化能)		
主査	筑波大学教授	医学博士	田中直見
副査	筑波大学教授	工学博士	大島宣雄
副査	筑波大学教授	医学博士	中内啓光
副査	筑波大学教授	医学博士	松井陽

## 論文の内容の要旨

### (目的)

げっ歯類の研究により、胎児肝臓には増殖能を有し、肝実質細胞または胆管上皮細胞に分化できる hepatoblast が含まれていることが知られている。その数は出生後急速に減少し、成体には存在しないと考えられてきた。一方、マウスとラットの成体から分離された肝非実質上皮性細胞には、肝前駆細胞様の性質を示す細胞が存在することが証明されている。また、発ガン物質投与などによって誘導される oval cell も hepatoblast 様の性質を持つことが明らかになっている。しかし、これらの細胞は生理的条件下では形態的な胆管上皮細胞への分化が観察されないことも一因となり、成体の肝組織に hepatoblast 様の前駆細胞が存在するかどうかはまだ結論づけられていない。著者らはこれまでに、成熟ブタの肝組織に肝実質細胞または胆管上皮細胞に分化すると示唆される非実質上皮性細胞を見出したことを報告したが、本報告ではこの前駆細胞としての性質と起源を明らかにすることを目的として、その生育過程で特徴的に観察される、細胞群の分散とその後の環状様構造構築との関連を検討するとともに、in vitro 培養系での分化を、蛋白発現と超微形態観察によって研究した。

### (対象と方法)

正常な成熟ブタの肝臓から分離した非実質細胞画分中に含まれる上皮性細胞を対象とした。dispase と collagenase を用いた簡易還流法により還組織から細胞を分離し、60xg、1-2分間の遠心操作により、実質細胞と非実質細胞を分画した。非実質細胞画分を Type I collagen をコートした培養皿と、独自に調整した National Institute for Advanced Interdisciplinary Research (NAIR) - 1 培地を用いた系で培養した。標的とする上皮性細胞の成育を位相差顕微鏡で観察するとともに、免疫細胞学もしくは細胞化学的にその分化発現形質の変化を調べた。また、細胞の分化に伴う超微形態を透過型電子顕微鏡によって観察した。

### (結果)

成熟ブタ肝組織の非実質細胞画分中には、上記培養系において特徴的な発達を示す上皮性細胞の集団が存在した。この細胞集団は培養1日目には3-10個前後の細胞群として見出され、培養3-4日目に分散形態をとった

後、急速に増殖してコロニー様に発達した。さらに培養8-9日目にはコロニー中心部に環状様構造を構築した。分散形態を示す細胞群の96%は環状様構造を構築するコロニーに発達することが明らかになり、分散形態を示すことは環状様構造構築の指標となることを確認した。両段階における種々のマーカー蛋白の発現に関しては、分散段階では集団の全細胞が、比較的未熟な肝実質細胞のマーカーと、一部の oval cell マーカーを均質に発現していたが、胆管上皮細胞としての特徴は cytokeratin 7 の発現以外には認められなかった。一方、環状様構造を構築した段階では、環状様構造を構築している細胞群は胆管上皮細胞に発現しているマーカーのみを発現していた。またコロニー辺縁部と環状様構造の内部に存在する細胞群は、分散段階で発現していた肝実質細胞マーカーの他に、成熟した肝実質細胞に発現すると考えられている  $\alpha$ -1-antitrypsin を発現していた。さらに超微形態観察により、環状様構造を構築している細胞群が細胆管様の特徴を持つこと、一方、環状様構造の内部に存在する細胞群は肝実質細胞様の特徴を持つことが明らかになった。

#### (考察)

本研究で対象となった特徴的な非実質上皮性細胞が培養初期に分散形態をとることは、その後に環状様構造を構築することと密接な関連があり、一連の分化過程であることが示唆された。分散段階の発現蛋白の研究から、この細胞が hepatoblast や oval cell と類似した性質を持つことが考えられた。また環状様構造構築段階では形態変化に相応して肝実質細胞と胆管上皮細胞マーカーの発現が局在しており、この細胞群が肝実質細胞または胆管上皮細胞に分化できる前駆細胞様の細胞であることが示唆された。この事実は超微形態観察の結果からも明らかとなり、本培養系では分散細胞の二方向への分化が形態的にも実現されると考えられた。そのため、一連の成育過程は *in vivo* での hepatoblast の発達過程を *in vivo* で擬似していると思われる。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

成体における肝幹細胞の、存在の証明を含めた分化機構の解明は、近年の医療・細胞工学の分野で成果が待たれる課題の一つである。そこで著者らは、ヒトへのフィードバックを考慮して遺伝的にヒトに近いブタの成体肝臓を材料に用い、独自の培養系を開発することによって肝前駆細胞様細胞と認められる非実質上皮性細胞の存在を明らかにした。また、この培養系においては見出した肝前駆細胞様細胞の分化が、機械的のみならず形態的にも実現されることが超微形態観察から証明されたことに加え、その分化過程を *in vitro* で段階的にとらえることが可能であり、肝幹細胞の分化機構を解明するための画期的なモデルを提供している。現実的な細胞移植・遺伝子治療・人工肝臓など臨床応用までの道りは遠いと考えられるが、このモデルは分化に対するサイトカインの影響や発現遺伝子の解析などのアプローチを可能にしているので、今後の大いなる成果が期待される。

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。