

氏 名 (本 籍)	鈴木 敦 史 (群 馬 県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 3221 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	Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver (胎仔肝臓中に存在する自己複製能を有した多能性幹細胞の同定とその特性解析)
主 査	筑波大学教授 医学博士 高 橋 智
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 田 中 直 見
副 査	筑波大学教授 医学博士 山 本 雅 之

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

再生医療という新しい治療コンセプトが提唱され、造血系や神経系などではその基礎研究が急速に進みつつある。しかし、同じく再生治療の標的となり得る、高い再生能を持つ肝臓においては、その研究が格段に遅れているのが現状である。造血系や神経系の理解が深まった一つの大きな原因は、それらの組織における幹細胞が同定され、その機能解析が進んだことによる。一方、肝臓においても幹細胞システムの存在が示唆されているが、その同定や機能解析は全く進んでいない。そこで、本研究では、調製した肝臓細胞集団の中から、ごく少数しか存在せず、形態によって区別することが困難な肝幹細胞を、造血幹細胞の純化に大きく貢献したFACS (fluorescence activated cell sorting) を用いて分離・回収し、その同定と機能解析を行うことを目的とした。

### (対象と方法)

著者はこれまでに、マウス胎仔肝臓から細胞を単離し、血球特異的細胞表面抗原であるCD45 (白血球特異的抗原) とTER119 (赤血球特異的抗原)、およびc-Kit (幹細胞因子受容体)、CD49f (インテグリン  $\alpha 6$ )、CD29 (インテグリン  $\beta 1$ ) に対するモノクローナル抗体を用いて、マウス胎仔肝臓中の約3%を占めるc-Kit<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>TER119<sup>+</sup>細胞画分中に、高い増殖能と、肝細胞と胆管上皮細胞へ分化可能な多分化能を有する細胞が高頻度に含まれることを報告している (Suzuki et al. *Hepatology* 32:1230-1239; 2000)。しかしながら、引き続き肝幹細胞をより詳細に解析するためには、*in vitro* および *in vivo* において、より精度の高いクローナルな解析系が必要であった。そこで、本研究では、培養ディッシュ上でたった1つの細胞から培養を開始する手法である単細胞培養系 (single cell culture system) を確立し、純化した肝幹細胞の多分化能、自己複製能、生体内組織再構築能、分化可塑性を完全にクローナルなレベルで解析した。また、肝幹細胞をさらに効率良く分離・回収すべく、複数の細胞表面抗原をスクリーニングした結果、HGF (肝細胞成長因子) の受容体であるc-Metに注目し、上記の各種抗体に加え、抗c-Met抗体も併用して解析した。

## (結果)

抗c-Met抗体を加えて解析を進めた結果、c-Met<sup>+</sup>CD49f<sup>+/low</sup>c-Kit<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>細胞画分中に増殖性の高い細胞が極めて限定して、かつ高頻度に存在することを突き止め、肝幹細胞の単細胞培養がはじめて可能になった。また、免疫染色とRT-PCRの解析の結果、コロニー形成能を有する細胞のほぼすべてが、肝細胞と胆管上皮細胞に分化可能な多分化能を有することが確認され、厳密にクローナルな解析系によって肝幹細胞の多分化能が明らかにされた。

次に、幹細胞の重要な特徴の一つである自己複製能を解析したところ、c-Met<sup>+</sup>CD49f<sup>+/low</sup>c-Kit<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>細胞は、*in vitro*で6ヶ月以上の長期にわたり細胞分裂を続け、自らと全く同じ性質を持った細胞を生み出す（自己複製）と共に、肝細胞と胆管上皮細胞の両者を継続して産生できる（多分化能）ことが明らかとなった。こうして、c-Met<sup>+</sup>CD49f<sup>+/low</sup>c-Kit<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>細胞は、高い増殖能と多分化能に加え、自己複製能を有することが判明し、その培養下での維持と凍結保存に成功した。

続いて、*in vitro*でクローナルに分裂維持されている肝幹細胞を、GFP発現レトロウイルスベクターを用いてマーキングし、それらをドナー細胞として*in vivo*における細胞移植実験を行った。移植1ヶ月後と6ヶ月後に被移植組織を解析した結果、ドナー細胞の一部はアルブミン陽性の成熟肝細胞へ、また一部は胆管類似構造を形成し、ケラチン陽性で粘液産生可能な成熟胆管上皮細胞へと分化していた。これらの実験の結果、マウス肝幹細胞は*in vivo*においても肝細胞と胆管上皮細胞へ分化可能であることが確認された。

肝幹細胞の分化能をさらに詳しく解析すべく、GFP（緑色蛍光タンパク質）トランスジェニックマウスから肝幹細胞を分離・回収した。それらをドナー細胞として、肝臓をはじめ膵臓や十二指腸といった複数の消化器系臓器・組織へ移植した。移植2～6ヶ月後に被移植組織を解析した結果、移植した肝幹細胞は、肝臓内で肝細胞と胆管上皮細胞に分化することに加え、膵臓や十二指腸を構成する機能細胞へも分化し、それらの組織を再構築していた。

## (考察)

純化した1個の肝幹細胞から肝臓や膵臓、腸を構成する機能細胞が分化・増殖し、生体内でそれらの組織を再構築したことは、肝幹細胞の幅広い分化可塑性を表すものであるか、もしくは、肝幹細胞と呼ばれている細胞が、より未分化な細胞である内胚葉性幹細胞そのものである可能性を示唆している。非常に幅広い分化能を有するこれらマウス肝幹細胞をFACSにより効率よく回収し、培養下で自己複製的な分裂維持を可能にできたことは、同様の手法によるヒト肝幹細胞の同定とその分離・回収へ向けた基盤技術を提供し、肝幹細胞を用いた消化器疾患全般に対する細胞療法や遺伝子治療などの再生医療へと発展していくことが期待される。

## (結論)

本研究では、c-Met<sup>+</sup>CD49f<sup>+/low</sup>c-Kit<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>といった細胞表現型を有し、高い増殖能、多分化能、自己複製能、生体内肝組織再構築能、分化可塑性の全てを兼ね備えた多能性肝幹細胞が明確に同定され、FACSを用いてその特異的分離・回収が可能となった。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

著者提出の論文は、多能性肝幹細胞を同定し、その細胞生物学的な性状を明らかにしたものである。多能性肝幹細胞同定のために、まず、試験管内で培養法を確立し肝幹細胞測定法を確立した。ついで、FACSと様々な細胞表面抗原を用い、どのような細胞表面抗原を有している細胞群が増殖活性と多分化能を有しているかを測定し、c-Met<sup>+</sup>CD49f<sup>+/low</sup>c-Kit<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>といった細胞表面抗原を有する細胞が多能性肝幹細胞であることを明らか

にした。これらの研究は、肝幹細胞を世界で初めて同定した業績として高く評価されるとともに、今後の再生医学応用への基盤を築いたものとして重要である。

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。