

氏 名（本籍）	おおしま ゆうじ（広島県） 大 島 祐 二		
学 位 の 種 類	博 士（医 学）		
学 位 記 番 号	博 甲 第 4400 号		
学位授与年月日	平成 19 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	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting (CD133, C-Met 抗原を指標としたマウス膵管からのフローサイトメトリーによる前駆細胞の分離)		
主 査	筑波大学教授	博士（医学）	大根田 修
副 査	筑波大学教授	獣医学博士	八 神 健 一
副 査	筑波大学教授	医学博士	榊 原 謙
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	小野寺 雅 史

論 文 の 内 容 の 要 旨

（目的）

近年，糖尿病に対する治療として膵島移植が注目を浴びる中，ドナー不足を解消するため幹・前駆細胞を用いた膵島の再生が試みられている。膵臓における前駆細胞の存在を証明し膵島を再生することで，膵島移植への臨床応用を図ることを目的として本実験を行った。

（対象と方法）

前駆細胞の存在部位とされている膵管上皮細胞を，マウス膵から FACS により高純度に分離・培養することで，前駆細胞の同定と機能解析を試みた。

（結果）

膵管上皮特異的な表面抗原を同定するためにマウス膵の免疫組織染色を行った。結果，CD133 抗原がすべてのレベルにおける膵管上皮に特異的に発現していた。

この CD133 に加えて，血管内皮マーカー（CD34），血球マーカー（CD45，Ter119）を用いて，新生仔膵からの膵管上皮細胞の分離を FACS により試みた。CD133⁺CD34⁻CD45⁻Ter119⁻ 画分の細胞は分離直後の免疫染色の結果から，ほぼ 100%が膵管上皮由来であると判明し，さらに低密度培養によってクローナルな上皮様コロニーを形成した。これらのコロニーにおける RT-PCR による解析では，培養後 3 日目では膵管上皮マーカーしか確認されなかったが，14 日目では内分泌・外分泌細胞のマーカーも併せて確認され，さらに同一のクローナルなコロニーで複数の系統のマーカーが確認された。免疫細胞染色においても同様の所見が得られた。

成体マウスからも同じ分画から上皮様コロニーが特異的に得られたが，14 日間の培養後も膵管上皮以外のマーカーは確認されなかった。

次に、肝細胞増殖因子の受容体である c-Met の発現から、新生仔臍における前駆細胞の分離を行った。CD133⁺CD34⁻CD45⁻Ter119⁻ 細胞を c-Met 陽性画分と陰性画分に分けて培養した。c-Met 陽性画分において、c-Met 陰性画分と比較してインスリン mRNA の発現が顕著に高いことが、定量的 RT-PCR で確認された。

(考察・結論)

新生仔マウスでは、前駆細胞の性質を備えた細胞が臍管上皮に存在した。また、発生時期における臍管上皮と同じく、前駆細胞は c-Met を発現していることが示唆され、インスリンへの高い分化能を持つと考えられた。タンパクレベルの発現はまだ低いが、この純度の高い培養系を用いることで、臍島再生への培養系のスクリーニングが可能になると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、臍管上皮細胞からの臍臓前駆細胞の単離を行った。CD133 陽性 CD34 陰性 CD45 陰性 Ter119 陰性の分画をさらに c-Met の発現を指標にして陽性画分を単離することに成功した。この分画において、インスリン mRNA の発現が、c-Met 陰性画分より高いことを見出した。今後の研究の進展に際して、同分画に含まれる細胞は本研究で用いた培養系では、増幅および長期間培養することはできなかったが、今後、さらにそれら臍臓前駆細胞を含む分画の生体外培養方法の研究開発が望まれる。

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。