

氏名(本籍)	みな かわ かず のり 皆 川 和 則 (大 阪 府)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 5094 号		
学位授与年月日	平成 21 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	人間総合科学研究科		
学位論文題目	胎仔肝臓細胞の三次元培養における線維芽細胞増殖因子および非実質細胞との共培養の効果		
主査	筑波大学教授	博士(医学)	山 縣 邦 弘
副査	筑波大学教授	医学博士	筒 井 達 夫
副査	筑波大学講師	博士(医学)	加 野 准 子
副査	筑波大学助教授	博士(医学)	村 田 聡一郎

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### 目的：

重篤な肝不全患者の肝機能が回復するまでの長期間にわたって患者の肝機能を代行することができるようなバイオ人工肝臓の開発を目的として、生体外でも増殖能を示す胎仔肝臓細胞の培養環境についての検討を行った。多孔質の樹脂を担体とする三次元培養と通常の単層培養において、oncostatin M (OSM) の存在下、あるいは非存在下で fibroblast growth factor (FGF) が胎仔肝臓細胞の増殖や機能に及ぼす影響について調べた。さらに、細胞の機能を向上させることを目的として胎児期の組織に由来する細胞株を用いて胎仔肝臓細胞との三次元共培養実験を行った。

### 対象と方法：

培養にはマウス胎仔肝臓細胞を用い、コラーゲンコートディッシュを用いた単層培養と polyvinyl formal (PVF) 樹脂を用いた三次元培養を行った。三次元培養では、立方体状に細切した PVF 樹脂 (1 辺 2mm, 平均孔径 100 $\mu$ m) に胎仔肝臓細胞を播種したのち、ディッシュに移して培養を行った。培養には基本培地として Williams' medium E を用い、FGF の効果を調べるために、FGF (-1, -2, あるいは -4) や OSM を適宜培地に添加した。共培養実験では、PVF 樹脂にマウス胎仔背側大動脈血管内皮に由来する細胞株である DAS104-8, あるいはマウス胎仔皮膚由来の細胞株である NIH/3T3 を播種して 3 日間培養したのち、一部の実験ではアルデヒドで細胞株を固定、もしくは増殖抑制処理を行い、マウス胎仔肝臓細胞を再播種した。この実験では、OSM とともに epidermal growth factor (EGF) を基本培地に添加した培地を用いた。いずれの実験でも 3 週間培養を行い、培養期間中の細胞数や肝特異的機能の指標となるアルブミン分泌能の経時的変化を確認した。さらに培養終了時に担体内に固定されていた細胞や extracellular matrix (ECM) を、電子顕微鏡を用いて観察をした。

### 結果：

#### 1) マウス胎仔肝臓細胞の三次元培養に及ぼす FGF の効果

1. 胎仔肝臓細胞の三次元培養系において、FGF-1 や FGF-4 と FGF-2 では、細胞の増殖やアルブミン分泌活

性に及ぼす効果は異なっていた。なお、FGF を単独で用いた場合には、いずれの FGF も胎仔肝臓細胞のアルブミン分泌活性を抑制した。

2. 三次元培養系において、OSM 存在下に FGF-1 や FGF-4 を添加することによって、これらの FGF は胎仔肝臓細胞のアルブミン分泌能を亢進した。

一方、FGF-2 は細胞の増殖を促進したものの、アルブミン分泌量は抑制した。

3. 胎仔肝臓細胞が分泌する ECM の密度は添加した FGF の分子種によって異なっていた。

## 2) 胎仔期の細胞に由来する細胞株との三次元共培養

1. 未処理や増殖抑制処理した DAS104-8、あるいはこの細胞の conditioned medium (CM) は胎仔肝臓細胞の増殖や機能を抑制した。

2. 固定処理を施した DAS104-8 を胎仔肝臓細胞との共培養に用いることで、胎仔肝臓細胞の増殖や機能が向上した。一方、固定処理した NIH/3T3 についてはこのような効果は認められなかった。

### 考察：

胎仔肝臓細胞の培養に FGF-1 や FGF-4 を OSM と同時に用いることで胎仔肝臓細胞のアルブミン分泌能が向上した。このとき、胎仔肝臓細胞が分泌する ECM が低密度であることが観察されており、胎仔肝臓細胞の機能と ECM には密接な関係があると考えられた。一方、FGF-2 を OSM と同時に添加した場合には胎仔肝臓細胞は顕著に増殖したものの、アルブミン分泌能は低かったため、肝非実質細胞が増加したことが強く示唆された。

未処理や増殖抑制処理を行った DAS104-8、さらに DAS104-8 に由来する CM を用いることで胎仔肝臓細胞の機能は抑制されたことから、DAS104-8 が分泌する液性因子が胎仔肝臓細胞の機能を抑制している可能性が示唆された。一方で、固定処理を施した DAS104-8 は胎仔肝臓細胞の機能を向上させたことから、DAS104-8 の細胞表面分子が胎仔肝臓細胞の機能向上に効果的であると考えられた。

### 結論：

成長因子や固定処理を施した細胞株を胎仔肝臓細胞の三次元培養に用いることによって、胎仔肝臓細胞の機能を向上させることができた。

## 審査の結果の要旨

バイオ人工肝臓の開発を目的に、胎仔肝臓において、肝実質細胞としての機能と増殖能を維持した状況での培養条件を三次元培養法にて、FGF1, 2, 4 ならびに OSM 添加さらには固定処理後の大動脈血管内皮細胞との共培養において検討したものである。今回の検討で明らかとなった OSM 使用下での FGF1, 4 の添加あるいは、グルタルアルデヒド処理 DAS104-8 細胞との共培養、ないしはその両者併用のいずれが最も効果的なのか示す必要がある。また肝機能の指標としてアルブミン合成量を使用しているが、アンモニア分解能やその他の肝機能指標での検討が望まれる。さらに将来の臨床応用を見据え、今後実際に使用可能な異種動物あるいは ES 細胞での、本実験と同様な結論が得られるのか更なる検討が望まれる。

学位論文審査委員会において審査委員全員出席の下に最終試験を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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