

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	有 倉 潤
学 位 論 文 題 目 Colonization of hepatocytes differentiating from F344 rat bone marrow cells in regenerating livers in congenic Nagase's analbuminemic rats (無アルブミンラットの再生肝内での F344 ラット 骨髓細胞由来肝細胞のコロニー形成) 共著者名 稲垣 光裕、向 慧玲、小野寺 一彦、小川 勝洋、葛西 眞一 未公表 研 究 目 的 劇症肝炎や重症肝疾患、先天性肝代謝疾患に対する根本的な治療として肝移植が施行されているが、ドナー不足が深刻な問題となっており、肝移植に代わる治療法として肝細胞移植や人工肝など細胞療法による治療の開発がすすめられている。1999 年 Petersen らが、肝障害を与えたマウス宿主肝内に移植した骨髓細胞が肝細胞へ分化することを報告して以来、骨髓細胞から肝細胞への分化に関する研究が進められ、骨髓細胞は細胞療法の細胞源として期待されている。最近の報告では、移植された骨髓細胞が肝障害を有する宿主肝内で、肝細胞の前駆細胞とされる oval cell に形質転換して、さらに肝細胞に分化する能力を有することが報告されている。しかし、肝切除後再生肝においては、骨髓細胞が肝細胞へ分化するか否かについては解っていない。 Nagase 無アルブミンラット (F344alb) はアルブミン遺伝子の HI イントロンに 7bp の欠損があり、先天的			

にアルブミン合成が障害されるため、移植細胞のアルブミン産生能を指標として、生着・分化及び機能発現の解析が容易である。

われわれは、部分肝切除した F344alb の再生肝内に移植した F344 ラット (F344) 骨髓細胞が肝細胞に分化するか否かについて検討した。

材 料 ・ 方 法

骨髓細胞分離

F344 (6 週令、雄) からエーテル麻酔下にて両大腿骨より骨髓細胞を採取した。Histopaque-1077 非連続密度勾配法により、1,800 rpm 30 分で遠心して全単核球分画の細胞浮遊液(BMCs)を作成して移植に用いた。

骨髓細胞移植

F344alb (6 週令、雄) を 4 群に分け、group 1 を未処置群(n=5)、group 2 を 70% 部分肝切除(PH)のみを施行した群 (n=5)、group 3 を PH せず BMCs を移植した群(n=5)、group 4 を PH 直後に BMCs を移植した群(n=10)とした。Group 3 と 4 については 2×10^7 個/匹の BMCs を盲腸静脈から経門脈的に移植した。group 1-3 は 4 週目に犠牲死させ、group 4 については、移植後 2 週目(n=5)と 4 週目(n=5)にそれぞれ犠牲死させた。また、*in situ* hybridization 法を用いた検討のために、雌 F344alb(n=5)に対して PH 直後に雄 F344 の BMCs を同様に移植し、4 週目に犠牲死させた。

組織及び免疫染色

門脈から phosphate buffered saline (PBS)を灌流後、periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP)液で灌流固定した。各 lobe の最大径が得られるよう組織を切り出して、さらに同固定液で固定し、パラフィン包埋後に $3 \mu\text{m}$ の組織切片を作成した。抗ラットアルブミン抗体を用いた免疫染色を施行した。ラット当り平均 $2.81 \pm 0.10 \text{ cm}^2$ の肝組織についてアルブミン陽性細胞数とアルブミン陽性細胞集塊 (クラスター) 数を光学顕微鏡下で測定し、単位面積あたりのクラスターの出現頻度を検討した。さらに、連続切片を作成してアルブミン陽性クラスターにおける glutathione s-transferase placental form (GST-P)の発現を免疫染色で検討した。

RT-PCR 及び Southern blotting

PBS で灌流後、新鮮肝組織を採取して液体窒素にて凍結し、 -80°C で保存した。これらより total RNA を抽出し、正常アルブミン mRNA の発現の有無を RT-PCR 法で検討した。さらに PCR 産物を 1.0%アガロースゲル電気泳動後ナイロン膜に転写し、F344alb mRNA でスキッピングしている exon H に対する probe を用いて hybridization し、シグナルを検出した。

Microdissection 及び PCR

$5 \mu\text{m}$ の組織切片を脱パラフィン後アルブミン染色し、実体顕微鏡下にアルブミン陽性細胞クラスターを確認し、同部を採取して DNA を抽出した。これらを用いて F344alb では欠損している 7 bp を含む領域を PCR

法で増幅して正常アルブミン遺伝子の有無を検討した。

In situ hybridization

雄 F344 BMCs を移植した雌 F344alb の肝組織を PLP 液で灌流固定後パラフィンで包埋し、3 μ m の厚さで連続切片を作成した。FITC でラベルした Y 染色体遺伝子 (Sry3) に対する probe を用い、組織切片を熱変性させた後 hybridization し、抗 FITC-AP 抗体を反応させたのち発色した。

Western blotting

犠牲死前に採血して血清を分離し、 -80°C で保存した。SDS sample buffer 中で熱変性した 50 μ g の血清蛋白を 13% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写して抗ラットアルブミン抗体を反応させたのち、ECL detection reagents で検出した。

統計学的解析

アルブミン陽性細胞数・クラスター数を、one-way ANOVA で分散分析し、Bonferroni test で検定した。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

成 績

骨髓細胞移植後のアルブミン陽性クラスターの増加

10 週令の未処置 F344alb(group 1)ではアルブミン陽性細胞は 1 個又は 2 個で存在し、3 個以上からなるクラスターは認められず、また、部分肝切除後 4 週目(group 2)でも、group 1 と同様であった。それに対して、BMCs 移植を施行した group 3、4 では、3 個以上からなるクラスターの形成を認め、特に group 4 ではクラスターの数・大きさともに増加しており、60 個を越す細胞からなるクラスターも認められた。

クラスターを大きさで 5 クラスに分類したところ、1 個又は 2 個のアルブミン陽性細胞数は各 group 間に有意差を認めなかったが、6 個以上のアルブミン陽性細胞からなるクラスターは group 4 にのみ認められた。group 4(4 週目)でのクラスター数は、3-5 個のクラスで $2.9 \pm 0.9 / \text{cm}^2$ 、6-10 個のクラスで $1.1 \pm 0.6 / \text{cm}^2$ 、11 個以上のクラスでは、 $1.2 \pm 0.6 / \text{cm}^2$ となり、group 1-3 との間に有意差を認めた。また、アルブミン陽性クラスターでは GST-P の発現は認めなかった。

アルブミン陽性クラスターのドナー由来

BMCs 移植宿主肝組織から分離した RNA を用いて exon H を含む正常アルブミン mRNA 発現を、RT-PCR 法にて検討したところ、エチディウムブロマイド染色では、正常アルブミン mRNA の発現を確認できなかったが、検出感度を上げるために PCR 産物の Southern blotting を行ったところ、group 1、2 では非常にわずかな発現を認めたのに対し、group 4 では、移植後 2 週目、4 週目とも強い発現を認め、また、4 週目の発現の方が 2 週目より強かった。microdissection によりアルブミン陽性クラスターから抽出した DNA を用いた PCR

法でも、ドナーF344 由来の正常アルブミン遺伝子が検出された。*In situ hybridization* でもアルブミン陽性クラスターに一致して *Sry3* のシグナルが検出された。

血清アルブミン値の上昇

Western blotting による血清アルブミン値の検討では、group 1、2 ではごく微量のアルブミン発現を認めたが、group 4 の血中アルブミン値は group 1、2 より上昇しており、また、4 週目では2 週目より上昇していた。

考 察

本研究において、われわれは、経門脈的に F344alb 肝内に移植した F344 BMCs が肝細胞に分化してコロニーを形成することを、1) アルブミン陽性細胞数の増加、2) 正常アルブミン mRNA の増加、3) アルブミン陽性細胞群における正常アルブミン遺伝子の同定、4) 雄 BMCs を移植した雌宿主肝内でのアルブミン陽性細胞群における Y 染色体の同定、そして、5) 血清アルブミン値の上昇により示した。これまで肝切除後再生肝において、機能的に正常な肝細胞へ分化したことについては報告がなかったが、われわれはこれを証明した。

未処置の F344alb (group 1) では、アルブミン mRNA 合成過程のスプライシングの異常によりアルブミン合成が障害されるが、1%以下の割合でアルブミン合成が生じる可能性が指摘されている。したがって未処置 F344alb でみられた 1 個又は 2 個のアルブミン陽性細胞はこのような細胞と考えられる。一方、70%肝切除後 (group 2) においても、1 個又は 2 個のアルブミン陽性細胞のみ存在し、同週令の未処置 F344alb の単位面積あたりのアルブミン陽性細胞数と有意差を認めなかったため、肝再生時でのアルブミン陽性細胞は優位に分裂・増殖するとは考えられず、正常肝細胞と同様に 1 度ないし 2 度程度と考えられる。一方、アルブミン陽性クラスターが F344 骨髄細胞由来であることは、1) 宿主肝内のみで認められたこと、2) クラスター内アルブミン陽性細胞での正常アルブミン遺伝子が証明されたこと、3) 雌の宿主肝内でアルブミン陽性細胞に Y 染色体遺伝子の存在が確認されたことにより明らかになった。組織切片におけるアルブミン陽性クラスターは、最小 3 個のアルブミン陽性細胞から、最大は 60 個を越す細胞から構成されており、1 クラスターあたり 10 から 500 個の細胞から形成されていると推定される。1 つのクラスターが 1 個の骨髄細胞由来とするならば、コロニーを形成する細胞は 3 から 9 回の分裂が生じていると推察され、成熟肝細胞に比べてはるかに分裂・増殖能力が高いと推察される。しかし、腫瘍性肝細胞のマーカーである GST-P 染色では陰性であり腫瘍性の性格を持たず、正常肝細胞への分化と考えられた。

最近の green fluorescence protein マウスの骨髄細胞を用いた骨髄細胞移植では、肝切除後再生肝において骨髄細胞から類洞内皮細胞や Kupffer 細胞への分化が報告されているが、肝細胞への分化を確認できていない。われわれはアルブミンを指標に、主に肝細胞への分化を確認したが、雌宿主肝内の血管内皮細胞にも Y 染色体遺伝子のシグナルを認め、肝再生時に BMCs が血管内皮細胞へ分化する可能性も示唆された。

結 論

われわれは、70%部分肝切除後の肝再生時において、移植骨髓細胞が肝細胞へ分化することを正常ラット BMCs を無アルブミンラットに移植することにより証明した。骨髓細胞中の肝細胞へ分化する細胞の数はきわめて少ないが、宿主肝に生着後は、残存宿主肝細胞に比べて高いコロニー形成能を有することが確認された。

引 用 文 献

1. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170.
2. Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, et al. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2002; 36: 653-659.
3. Ogawa K, Ohta T, Inagaki M, Nagase S. Identification of F344 rat hepatocytes transplanted within the liver of congenic analbuminemic rats by the polymerase chain reaction. *Transplantation* 1993; 56: 9-15.

参 考 文 献

1. Arikura J, Kobayashi N, Okitsu T, Noguchi H, Totsugawa T, Watanabe T, et al. UW solution: a promising tool for cryopreservation of primarily isolated rat hepatocytes. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9: 742-749.

学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学 位 の 種 類	博 士 (医学)	氏 名	有 倉 潤
<u>審査委員長 郷 一 知 ㊞</u> <u>審査委員 葛 西 眞 一 ㊞</u> <u>審査委員 小 川 勝 洋 ㊞</u>			
学 位 論 文 題 目			
Colonization of hepatocytes differentiating from F344 rat bone marrow cells in regenerating livers in congenic Nagase's analbuminemic rats (無アルブミンラットの再生肝内での F344 ラット骨髄細胞由来肝細胞のコロニー形成)			
ドナー不足が深刻な問題となっている肝移植に代わる治療法として、肝細胞移植や人工肝などの細胞療法による治療の開発がすすめられている。その細胞源としていろいろな細胞が検討されているが、多分化能・自己複製能を有する骨髄細胞の研究もそのひとつである。これまで骨髄由来細胞から肝細胞への分化については肝障害モデルにおいて報告されているが、肝切除後の再生肝における骨髄由来細胞が肝細胞へ分化については解明されていない。 本研究では先天的にアルブミン産生能を欠損している Nagase 無アルブミンラット (F344alb) を用いて、アルブミン産生能を指標に骨髄由来細胞から肝細胞への分化を解析した。70%部分肝切除後に経門脈的に移植されたアルブミン産生能力のある同系ラットから採取した骨髄細胞が、無アルブミンラットの宿主肝内に生着した後、肝細胞に分化しコロニー (クラスター) を形成することを、以下の実験により検討した。1) 宿主肝組織切片での免疫染色によるアルブミン陽性細胞数の増加、2) RT-PCR/Southern blotting 法による宿主肝内での正常アルブミン mRNA の増加、3) Microdissection/PCR 法によるアルブミン陽性細胞群における正常アルブミン遺伝子の同定、4) <i>in situ</i> hybridization 法による、雄の骨髄細胞を移植した雌宿主肝内でのアルブミン陽性細胞群における Y 染色体の同定、そして 5) Western blotting 法による血清アルブミン値の上昇などにより示し、肝切除後再生肝において骨髄由来細胞から肝細胞への分化をはじめて証明した。 臨床応用には更に検討を要するが、肝再生時において肝細胞へ分化する骨髄細胞分画が存在することは、自己骨髄細胞や HLA の適合した骨髄細胞の利用も考えられ、本研究の成果は細胞療法を含めた再生医療の発展に向けて期待されるものである。			

論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。以上の結果から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位に値すると判定した。