

論文内容要旨

論文題目

骨髄由来肝様細胞の性質についての基礎的検討

(骨髄細胞を用いた肝再生療法の可能性について)

責任講座：消化器病態制御内科学講座

氏名：奥本和夫

【内容要旨】

(背景) 近年骨髄内に多分化能を有する幹細胞が存在することが知られている。肝細胞への分化に関しても様々な報告があるが分化でなく細胞融合であるとの報告もあり、肝再生療法への利用に関しては未だなお困難が多い。(目的) 本研究における目的は骨髄細胞の肝再生療法への応用を目指してその性質および分化、増殖の機序を明らかにすることである。(方法) (1) ラット骨髄細胞を採取し細胞除去用磁気分離システムを用いて幹細胞豊富な細胞群を分離して肝細胞との共培養を行ない肝特異的遺伝子、Notch シグナル遺伝子の発現をみた。(2) Green Fluorescence Protein - Transgenic (GFP-Tg)ラットから同様の方法で細胞を分離し、2-acetylaminofluorene(2-AAF)モデルと四塩化炭素(CCl₄)モデルの脾臓内へ移植しその生着と性質を検討した。(3) 細胞外基質を豊富に含有する培養基盤(マトリゲル)を用いて同細胞を培養しその性質を調べた。(結果) (1) 肝細胞と共培養した骨髄細胞は7日目には RT-PCR でアルブミン、alpha-fetoprotein (AFP)などの肝細胞マーカーを発現していた。(2) 2-AAF モデルラットには GFP 陽性骨髄細胞は存在しなかったが、CCl₄ モデルには肝門脈域に GFP 陽性細胞が存在していた。定量 PCR で肝細胞増殖因子 (HGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF) レベルは CCl₄ モデルの方において高値であった。生着 GFP 細胞には AFP、サイトケラチン 19 共陽性細胞が存在した。(3) マトリゲル培養にて7日目には紡錘形の小型の増殖性をもつ細胞が出現し 21 日目には肝細胞索に類似した構造を形成した。同細胞は RT-PCR、蛍光免疫染色にて肝特異的マーカーを発現していた。同細胞を CCl₄ 肝障害ラット脾臓に移植したところ、14、28 日目の脾臓内、肝門脈域に GFP 陽性細胞が存在した。(考察) これまでの実験では *in vivo* においては骨髄を直接移植して、生着した細胞の分化を検討しているものであり、分化か、細胞融合かは現時点では議論の最中である。我々は *in vitro* で骨髄細胞が肝臓細胞マーカーを発現する細胞へと分化することを確認し、その分化の過程において Notch シグナルを発現することを示した。さらにこれまで骨髄細胞の分化には多くの時間と増殖因子が必要とされてきたが、マトリゲルを用いることで効率良く分化誘導が可能であることを示した。骨髄細胞を *in vitro* で分化、増殖させ移植に用いれば効率よい再生療法となる可能性がある。(結論) 本研究に於いては (1) 骨髄内に肝特異的遺伝子をもつ細胞へ分化する細胞が存在し、その分化には Notch シグナルが関係する (2) *in vivo* において骨髄細胞は肝障害の強い時に限り生着し、生着した細胞の分化には Notch シグナルが関与している (3) マトリゲルを用いることで効率良い分化誘導が可能であることを示した。同細胞を用いることで有効な肝再生療法となる可能性があり今後さらなる研究が必要である。

平成 17 年 1 月 21 日


山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書


申請者氏名： 奥本 和夫

論文題目： 骨髄由来肝様細胞の性質についての基礎的検討
(骨髄細胞を用いた肝再生療法の可能性について)


審査委員：主審査委員

貞弘 光章 

副審査委員

近藤 憲夫 

副審査委員

本郷 誠治 

審査終了日：平成 17 年 1 月 21 日

【 論文審査結果要旨 】

本論文は自家骨髄細胞の肝再生療法への応用を目差した一連の研究の中で、その可能性と分化増殖の機序を実験的に検討したものである。

(1) ラット骨髄細胞を採取し細胞除去用磁気分離システムを用いて幹細胞豊富な細胞群を分離、肝細胞との共培養で7日目に骨髄細胞はアルブミン、 α -fetoprotein の肝細胞マーカーを発現していることを RT-PCR 法で確認した。(2) Green Fluorescence Protein-Transgenic (GFP-Tg) ラットから上記の方法で細胞を分離、これを肝細胞増殖因子(HGF)や線維芽細胞増殖因子(FGF)レベルを高値誘導した四塩化炭素投与肝障害レシピエントラットに移植した結果、肝門領域に GFP 陽性細胞を認め、その生着細胞には AFP、サイトケラチン P 共陽性細胞が存在していた。(3) 細胞外基質を豊富に含有する培養基盤(マトリゲル)を考案し、これに GFP-Tg ラット骨髄細胞を培養した。7日目に紡錘形の小型増殖性細胞が出現、21日には肝細胞策類似構造を形成、それぞれが RT-PCR、蛍光免疫染色で肝特異的マーカーを発現していた。さらに、この培養細胞を四塩化炭素ラット脾臓に移植すると、14、28日目の脾臓および肝臓内に GFP 陽性細胞の存在を認めた。

以上の検討結果から、骨髄内に肝特異的遺伝子を持つ細胞へ分化する細胞が存在し、マトリゲルを用いることで効率良く分化誘導され、肝障害モデルレシピエント動物に移植されても生着可能であることが示され、有望な肝再生療法への方向性が示唆された。

本論文に対して審査委員会は研究方法も適切であり独創性が高く、将来への臨床応用の可能性を期待させる優れた論文であると評価し、博士論文に相応であると認定した。

(1, 200字以内)