

氏名	いちばみほ 市場美帆
学位の種類	博士(再生医科学)
学位記番号	甲第5号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Dual effects of adenovirus-mediated thrombopoietin gene transfer on hepatic oval cell proliferation and platelet counts (肝オーバル細胞増殖と血小板数へ及ぼすアデノウイルストロンボポエチン遺伝子導入の二重効果)
学位論文審査委員	(主査) 佐藤健三 (副査) 岡崎敏朗 汐田剛史

## 学位論文の内容の要旨

トロンボポエチン(TPO)は骨髄巨核球と血小板の増殖因子であり、又、造血幹細胞増殖の強力な促進因子として作用しており、他の幹細胞でも増殖促進効果が期待されている。肝オーバル細胞は、成熟肝細胞増殖が強く阻害された状態のいわゆる肝再生不全時、肝細胞と胆管上皮細胞に分化・増殖して肝再生を担っている。肝オーバル細胞増殖に TPO 遺伝子発現が及ぼす影響を、肝再生不全モデルの Solt-Farber モデルを用いて検討した。

### 方法

8週齢フィッシャーラットに、2-アセチルフルオレンペレットを皮下導入し、7日後に70%肝臓部分切除を行った。CAGプロモーター制御下にTPOcDNAを挿入し、アデノウイルスベクターに搭載としたpAxCATPO  $1 \times 10^9$ pfuを投与するI群と、同量のpAxCALacZを投与するII群に分け、70%肝臓部分切除直後にそれぞれ尾静脈より投与し、投与前、2日、4日、7日、9日、13日後に犠死させ検討した。検討項目は、RT-PCR法により肝組織中のTPOmRNA量とc-mplmRNA量、末梢血血小板数、肝組織中の肝オーバル細胞数、肝臓組織の免疫染色(TPO、c-mpl、CK-19、OV-6、PCNA、SCF、c-kit、CD34、AFP、アルブミン)、及びウエスタンブロット法にてSCFとc-kitの発現を検討した。

### 結果

TPOmRNAは2日後より増加し、7日後まで発現が維持された。血小板数はII群と比較しI群で4日後より有意に増加し、その後経時的に増加して9日後にII群の約5倍に増加した(各々

P<0.01)。免疫染色で肝オーバル細胞は、c-mpl、CK-19、OV-6、PCNA、SCF、c-kit、CD34、AFP が陽性であった。13 日後には肝オーバル細胞中にアルブミン陽性細胞が出現した。PCNA 陽性肝オーバル細胞数は、I 群で 7 日、9 日後に有意に増加し(各々P<0.05)、総肝オーバル細胞数は 9 日、13 日後に有意に増加した(各々P<0.05)。ウエスタンブロット法にて、I 群で SCF は 4 日、7 日、9 日後に、c-kit は 4 日、7 日後に増加を認めた。

## 考 察

成熟肝細胞増殖が強く阻害された状態である肝再生不全の際、肝オーバル細胞は肝細胞と胆管上皮細胞に分化・増殖し、肝再生における重要な役割を果たすことが知られている。肝オーバル細胞は、門脈域周辺から肝小葉へ増殖進展し、やがて肝細胞と胆管上皮細胞に分化する。今回の研究でも、免疫染色で OV-6、CD34、AFP 陽性の肝オーバル細胞の中に 13 日後にはアルブミン陽性細胞が発現したことにより、肝オーバル細胞から肝細胞への分化が示唆された。最近、重症肝疾患においてトロンボポエチンの産生減少が血小板数減少の一要因となり、又、トロンボポエチンが、骨髄又は臍帯血の幹細胞の増殖因子であることが報告されている。つまり、肝臓へのトロンボポエチン遺伝子導入は、血小板数増加や肝再生促進の治療法となりうると考えられる。SCF や c-kit の発現は、肝オーバル細胞の活性化の増殖マーカーであることが示唆されており、今回、SCF、及び c-kit が、トロンボポエチン遺伝子導入後より強く発現したことにより、トロンボポエチンは肝オーバル細胞の増殖促進因子であると推定された。又、血小板数においても、トロンボポエチン遺伝子導入後に著しい増加を認め、トロンボポエチンは血小板と肝オーバル細胞の両者の増殖に影響を及ぼすことが示された。

## 結 論

肝オーバル細胞増殖に対しトロンボポエチン遺伝子発現が及ぼす影響を、肝再生不全モデルの Solt-Farber モデルを用いて検討した。今回の検討により、トロンボポエチンは造血幹細胞のみならず肝オーバル細胞の増殖因子であると推定された。そして、アデノウイルスベクターによるトロンボポエチン遺伝子導入は、肝再生不全の状態において肝オーバル細胞増殖と血小板数増加の二重効果をもたらしうることが明らかとなった。以上より、劇症肝炎などの肝再生不全に対し、トロンボポエチン遺伝子治療が有用な治療法となりうることが示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は肝再生不全モデルの Solt-Farber モデルを用いて、肝オーバル細胞増殖にトロンボポエチン遺伝子発現が及ぼす影響を検討したものである。その結果、トロンボポエチンは、血小板の増殖因子であるのみでなく、肝オーバル細胞の増殖因子であることが示唆された。アデノウイルスベクターによるトロンボポエチン遺伝子導入は、肝再生不全の状態において肝オーバル細胞増殖と血小板数増加の二重効果をもたらしうることが明らかとなった。この結果は、

劇症肝炎などの肝再生不全に対し、トロンボポエチン遺伝子治療が有用な治療法となりうる  
ことが示唆され、明らかに学術水準を高めたものと認める。