

平成20年12月

# 平田みつひ 学位論文審査要旨

主査 汐田剛史  
副主査 林 眞一  
同 佐藤建三

## 主論文

Establishment and characterization of hepatic stem-like cell lines from normal adult rat liver

(成獣ラット正常肝からの肝幹様細胞株の樹立と特性)

(著者：平田みつひ、天野久美子、宮下肖美、安永茉由、中西友子、佐藤建三)

平成20年 The Journal of Biochemistry 掲載予定

# 学 位 論 文 要 旨

## Establishment and characterization of hepatic stem-like cell lines from normal adult rat liver

### (成獣ラット正常肝からの肝幹様細胞株の樹立と特性)

肝臓は再生能力の高い臓器である。部分肝切除後の肝細胞の増殖による肝再生のほか、重度の肝障害により肝細胞が増殖できない場合、oval細胞を含む肝幹細胞が肝再生に寄与すると考えられている。しかしながら肝再生の詳細なメカニズムについて不明な点が多い。本研究では試験管内で肝再生メカニズムを研究するため、成獣ラット正常肝から、新たな方法により、通常の培養条件においても長期間、増殖能と未分化能を維持する肝幹細胞の分離・株化を試みた。その結果、肝幹様細胞株HY細胞を樹立した。さらに、この細胞株の分化誘導にかかる培養条件を検討し、サイトカインの段階的な刺激により肝細胞様細胞への分化が誘導されることを解析した。

## 方 法

8週齢雄性ラット正常肝からコラゲナーゼ灌流法と遠心分離法を用いて、高い増殖能とコロニー形成能を有する肝幹様細胞を分離し、HY細胞と名付けた。HY細胞における肝細胞分化に関与する遺伝子発現をRT-PCR法により解析した。さらにoval細胞マーカーであるcytokeratin-19 (CK-19)の発現を免疫染色により検出した。また増殖能を解析した。次に、HY細胞の肝細胞への分化能を検討するため、肝再生に関与することが知られるサイトカインであるhepatocyte growth factor (HGF)、epidermal growth factor (EGF)、heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)、basic fibroblast growth factor (b-FGF)、transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)、oncostatin M (OSM)をHY細胞に各々作用させ、肝細胞分化に関与する遺伝子発現をRT-PCR法により解析した、また同様の実験を通常の培養器のほか、I型コラーゲンコート培養器内で行い、遺伝子発現変化の時間的経過をRT-PCR法により解析した。

## 結 果

成獣ラット正常肝から肝幹様細胞株HY細胞を樹立した。HY細胞はoval細胞と類似した表現型を示すが部分的には異なる形質を示した。HY細胞の肝細胞への分化能を検討するため、肝再生に関与するサイトカインであるHGF、EGF、HB-EGF、b-FGF、TGF- $\beta$ 1をHY細胞に各々48時間作用させたところ、通常の培養器内では遺伝子発現変化は見られなかった。しかし、同様の実験をI型コラーゲンコート培養器内で行ったところ、未熟な肝細胞のマーカである $\alpha$ -フェトプロテインの発現を認め、さらにTGF- $\beta$ 1の作用によりアルブミンの発現上昇とCK-19の発現減少が認められた。TGF- $\beta$ 1による遺伝子発現変化の時間経過を解析したところ、I型コラーゲンコート培養器内では、TGF- $\beta$ 1処理後48時間後までにアルブミンの発現が上昇し、72時間後にはチロシンアミノトランスフェラーゼのわずかな発現を誘導した。CK-19の発現は24時間後に減少し、48時間後には消失していた。さらにI型コラーゲンコート培養器内においてTGF- $\beta$ 1で72時間処理後、HGF、OSMを作用させたところ、アルブミン、チロシンアミノトランスフェラーゼ、 $\alpha$ 1-アンチトリプシンの高い発現誘導を認めた。同様の実験を通常の培養器内で行ったところ、遺伝子発現変化を認めなかった。

## 考 察

本研究では、試験管内において肝再生モデル系を確立するため、成獣ラット正常肝から肝幹様細胞株HY細胞を樹立した。HY細胞はoval細胞に類似した表現型を示した。Oval細胞は障害肝から分離されるため、正常肝由来のHY細胞はoval細胞の前駆細胞ではないかと考えられる。さらに肝幹細胞の由来が骨髄であるとも報告されているが、HY細胞分離の際、血球系細胞は除かれる。そのため、HY細胞は肝臓内のヘリング管由来の細胞と考えられる。またHY細胞の肝細胞への分化能力を検討したところ、I型コラーゲン、TGF- $\beta$ 1、HGFあるいはOSMの協同的な作用により肝分化マーカーの発現が誘導されることが示された。これまでoval細胞の増殖に伴うI型コラーゲン、TGF- $\beta$ 1、HGFの増加、またこれらの因子を分泌する肝星細胞のoval細胞近傍への出現、さらにクッパー細胞から分泌されるOSMの肝細胞成熟化への関与、などが報告されている。以上のことから、肝星細胞とクッパー細胞はHY細胞の肝細胞への分化に関与することが示唆され、本研究における肝再生モデル系は生体内肝再生環境を試験管内で模倣している可能性が示唆された。

## 結 論

成獣ラット正常肝から肝幹様細胞株HY細胞を樹立した。HY細胞はその特性から試験管内での肝再生研究において優れた肝幹細胞モデルになりうることを示唆された。