

論文審査の結果の要旨

氏名 野中 秀紀

本論文は7章からなる。第一章の緒言に続き、第二章から第五章までは研究結果が、第六章では結言、第七章では材料と方法が記述されている。

第二章では、肝臓構成細胞を分離することにより、肝再生過程におけるoncostatin M (OSM)の作用機序について明らかにしている。OSMは肝再生過程に重要なサイトカインであり、その受容体 (OSMR) 欠損マウスは肝再生に異常を示す。OSMR欠損マウスでは、肝障害後の肝細胞の増殖活性が野生型と比べ低く、アポトーシスが亢進しており障害が持続する。しかし、OSMの産生細胞や作用点については明らかにされておらず、その作用機序は不明であった。本研究では、肝臓構成細胞を分離しOSMおよびOSMRの発現について検討することで、まずOSMの発現がCD45陽性非実質細胞で認められること、OSMRの発現は肝細胞、CD45陽性、陰性非実質細胞と肝臓を構成する様々な細胞種で認められることを明らかにした。また、初代培養系を用いOSMが非実質細胞に作用しtissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1の発現を誘導することを明らかにした。OSMR欠損マウスを用いた解析から、生体内においてもOSMはTIMP-1の発現を誘導していることが示唆された。また、OSMは肝類洞内皮細胞にも作用することを明らかにした。以上の結果から、肝障害時にはCD45陽性非実質細胞がOSMを産生し肝細胞の生存・増殖を促進すること、それは肝細胞に直接作用するだけでなく、非実質細胞に作用し、炎症反応やマトリックス産生を調節することにより行なわれていることが示唆された。

第三章では、OSMが作用する細胞の一つであり、肝形成時に重要な役割をもつことが知られている肝臓特異的な内皮細胞、肝類洞内皮細胞に着目し行った解析について述べている。申請者は、肝類洞内皮細胞の肝再生過程における動態や機能を遺伝子レベルで明らかにすることを目的として、Serial analysis of gene expression (SAGE)法による遺伝子発現解析を行った。既に、肝臓の病態などを解析する目的でマイクロアレイなどによる遺伝子発現解析が行われているが、それらは肝臓全体のサンプルを用いたものであった。本研究では、肝類洞内皮細胞における遺伝子発現やその変動を正確に捉えるために、細胞集団を分離し遺伝子発現解析を行っている。その結果、正常肝・障害肝類洞内皮細胞における約6,000遺伝子の発現プロファイルが明らかにし、肝臓全体のサンプルを用いた場合では検出が困難であると思われる遺伝子も多数同定した。本研究の成果は公共のデータベース (SAGEmap

/Gene Expression Omnibus database, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/linking>)に公開されており、利用・閲覧が可能となっている。

第四章では、肝類洞内皮細胞の分離・識別のためのマーカー遺伝子の同定、モノクローナル抗体の作製と、抗体を利用した肝類洞内皮細胞の分離について述べられている。肝類洞内皮細胞の動態や機能についての解析が十分に進展していない原因には、細胞を分離・識別するための良いマーカー遺伝子とその抗体が存在しないことが挙げられる。そこで、申請者は先のSAGEの結果と、公開されているSAGEデータベースを利用し、肝類洞内皮細胞のマーカー遺伝子を同定した。それらの中で、Stabilin-2 (Stab2)に着目し、マウスStab2に対するモノクローナル抗体を作製した。この抗体による肝類洞内皮細胞の分離は、既存の抗体と比較し純度が高いことが明らかになった。本抗体を用いることで、肝類洞内皮細胞の動態や機能についての解析が進展することが期待される。

第五章では、Stab2の発現を指標に肝類洞および肝類洞内皮細胞の発生について解析した結果について述べられている。肝類洞内皮細胞は、マウスでは胎齢15日目頃から有窓構造やマーカー遺伝子の発現が認められることが知られていた。またラットの解析から「肝類洞内皮細胞は、門脈や中心静脈とは別個に発生する」というモデルが提唱されていた。本研究では、Stab2の発現が胎齢10日目の肝臓で既に認められること、胎児期の肝臓では成体での門脈や中心静脈に相当する「大きな」血管においてもStab2の発現が認められるが、出生後の門脈や中心静脈ではその発現が消失すること、胎児期のStab2陽性細胞はCD45陰性/PECAM-1陽性でアセチル化LDLを取込むことが可能な内皮細胞であることを明らかにしている。また、肝臓以外の組織では、臍帯静脈や卵黄囊の血管でStab2の発現が認められることから「卵黄静脈・臍帯静脈由来の門脈・中心静脈より肝類洞内皮細胞が発生する」というモデルを提唱している。内皮細胞は臓器ごとに特殊化されていることが知られているが、臓器形成のごく初期からその特殊化が認められるとの報告はなかった。本研究の成果は、内皮細胞の分化についての新たな知見を得たという点で意義深い。

なお、本論文第二章は中村康司、斉藤弘樹、田中稔、宮島篤との共同研究、第三章、第四章は菅野純夫、宮島篤との共同研究、第五章は宮島篤との共同研究であるが、申請者が主体となって実験および考察を行ったもので、申請者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。