

論文内容の要旨

論文題目 マウスオーバル細胞の分離とその性状解析
(Isolation and characterization of mouse oval cells)

氏名 岡 部 繭 子

序論

肝臓は体内最大の臓器であり代謝や解毒を司る。これらの機能を担う肝実質細胞である肝細胞は肝全体の体積の8割を占めている。さらに、胆管壁を形成する胆管上皮細胞、種々の血管壁を形成する内皮細胞、細胞外基質構成タンパク質を産生する星細胞、肝マクロファージであるクッパー細胞などの非実質細胞群が肝臓の恒常性維持のために機能している。

肝臓には肝細胞と胆管上皮細胞の2種類の上皮細胞がある。肝細胞は、血清タンパク質の合成、胆汁分泌、有害物質や中間代謝産物の解毒など多くの代謝機能を営んでいる。胆管は、肝細胞で産生された胆汁を十二指腸まで運ぶための導管であり、胆管壁は胆管上皮細胞により形成されている(図1)。

これら2種類の上皮細胞は、肝臓の発生過程で共通の前駆細胞である肝芽細胞から分化する。胎仔肝臓において、肝芽細胞はさかんに増殖するとともに、肝細胞に特徴的なアルブミン(ALB)やアルファフェトプロテイン(AFP)と、胆管上皮細胞に特徴的なサイトケラチン19(CK19)を共に発現している。そ

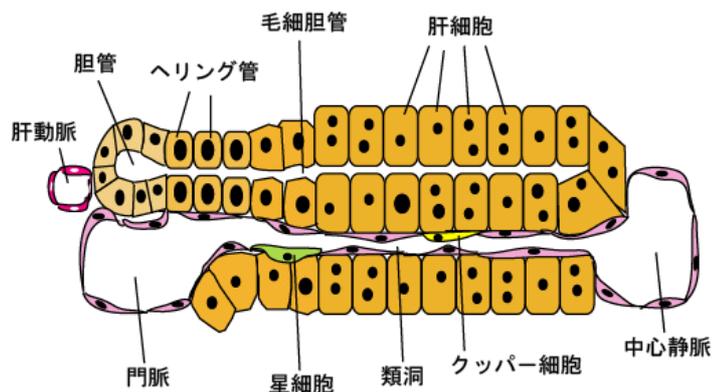


図1. 肝臓の構造

の後、マウスでは胎齢14日前後に門脈周囲の間充織に存在する一部の肝芽細胞は胆管上皮細胞へ分化し、残りの肝芽細胞は肝細胞へ分化する。このように肝芽細胞は、高い増殖能とともに、肝細胞および胆管上皮細胞への二分化能を有することから、胎生期の肝幹細胞と考えられている。

肝臓は他の臓器とは異なり、高い再生能力を有している。外科的な切除や、薬剤やウイ

ルス感染による炎症等の一般的な肝障害時には、残存肝細胞が細胞分裂することにより肝臓は再生する。しかし、2-AAF や DEN などの特定の発癌剤により肝細胞分裂が阻害された条件下で肝障害が起こると、オーバル細胞と呼ばれる細胞群が増殖し肝再生に寄与することが知られている。このようにオーバル細胞は、高い増殖能と、肝細胞および胆管上皮細胞への二分能を有することから、成体肝臓における幹細胞と考えられている。オーバル細胞は ALB や CK19 などの肝細胞と胆管上皮細胞の両マーカー分子を発現している。これらのオーバル細胞の特徴は、胎生期の肝芽細胞と共通しており、オーバル細胞の起源や増殖・分化機構を考察する上で興味深い。

しかしオーバル細胞に関する詳細な研究はあまり進んでいない。オーバル細胞の様々な特徴が報告されているが、これまでのところ複数の種類の細胞を含む細胞集団としてしか同定されておらず、オーバル細胞を均一な細胞種として純化し分離できないことから、分子生物学的な研究をしにくい状況にある。オーバル細胞で発現が知られている AFP や CK19 は細胞内タンパク質であるため、それらに対する抗体はセルソーターを用いた細胞分離には適さない。そこで本研究では、成体肝幹細胞と考えられるオーバル細胞の性状解析を目標として、オーバル細胞の表面抗原を同定し、そのモノクローナル抗体によるオーバル細胞の同定、およびセルソーターによる細胞純化法の確立を第一の目的とした。さらに、オーバル細胞抗原の発現を指標とした、肝芽細胞の性状解析を第二の目的とした。

結果と考察

オーバル細胞の細胞表面抗原の同定

オーバル細胞を同定するとともに、セルソーターによる純化にも使用可能なマーカー分子の同定を目的として、シグナルシークエンストラップ(SST)法によるマーカー遺伝子の探索を行った。SST 法は、cDNA ライブラリーからシグナルシークエンスをもつ遺伝子をスクリーニングする方法であり、膜・分泌タンパク質遺伝子を効率的に抽出できる。

薬剤によりオーバル細胞を誘導した肝臓の、オーバル細胞を含む非実質細胞画分から mRNA を調製し、cDNA ライブラリーを構築した。SST 法によるスクリーニングおよびデータベース検索の結果、83 の膜タンパク質、28 の分泌タンパク質遺伝子を同定した。

得られた遺伝子のうち 15 個の遺伝子は、正常肝臓と比較してオーバル細胞を誘導した肝臓で発現量が増加した。それらのうち I 型膜タンパク質である Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)に着目した。EpCAM はこれまでに多くの上皮癌抗原として同定されており、ほぼ全ての上皮細胞に発現することが報告されている。しかし、肝臓においては、二種類の上皮細胞のうち胆管上皮細胞では発現するが肝細胞では発現しない。これまでの免疫組織化学的研究から、オーバル細胞は、正常肝臓では肝細胞と胆管の接合部であるヘリング管に存在していること、薬剤で誘導されたオーバル細胞は偽胆管様構造を形成しながら増殖すること、既知のオーバル細胞マーカーである CK19 や A6 は正常肝臓では胆管上皮細胞のマーカーとなることが知られている。これらのことから、オーバル細胞

は胆管上皮細胞と似た性質を有することが推察されていた。これらの知見を踏まえ、胆管上皮細胞のマーカーである EpCAM がオーバル細胞のマーカーとなるのではないかと推測し、抗マウス EpCAM モノクローナル抗体を作製した。

抗マウス EpCAM モノクローナル抗体の作製

マウス EpCAM を恒常的に発現する細胞株を免疫原としてラットを免疫し、4つのクローンを得た。作製した抗体が、成体組織の EpCAM を認識するかどうかを確認するために、正常肝臓の免疫組織化学を行った。その結果、作製した抗体は、小葉間胆管のみならず、肝外胆管や胆嚢の胆管上皮細胞を認識した。さらに、この抗体を用いてセルソーターにより正常肝臓から分離した EpCAM 陽性細胞は、胆管上皮細胞マーカー遺伝子を発現しており、作製した抗 EpCAM 抗体を用いて、胆管上皮細胞を分離できることが確認された。

胎生期の胎仔肝臓に対しても、免疫組織化学により作製した抗体の働きを確認した。胎齢 14.5 日目の肝臓では、作製した抗体は肝外胆管を認識した。その後発生段階が進むにつれて、門脈周囲に出現した胆管上皮細胞から、管腔構造を形成した胆管まで全ての発生段階の胆管上皮細胞を認識した。このように作製した抗 EpCAM モノクローナル抗体は、発生段階の初期から胆管上皮細胞を認識し、セルソーターを用いた細胞分離にも用いることができることが確認された。

抗 EpCAM 抗体によるオーバル細胞の分離

作製した抗 EpCAM 抗体を用いて、オーバル細胞における EpCAM の発現を検討した。オーバル細胞を誘導した肝臓に対する免疫組織化学において、抗 EpCAM 抗体はオーバル細胞を染色し、既知のオーバル細胞マーカーである CK19 に対する抗体と同様の染色像を示した。以上により、EpCAM がオーバル細胞に発現していることが確認された。さらに、抗 EpCAM 抗体を用いてセルソーターにより分離した EpCAM 陽性細胞は、オーバル細胞のマーカー遺伝子を発現していることが確認された。このことから、抗 EpCAM 抗体によって、オーバル細胞を分離できることが強く示唆された。

EpCAM 陽性細胞の *in vitro* 培養

オーバル細胞を誘導した肝臓から分離した EpCAM 陽性細胞の性状を解析するために、*in vitro* 培養系の条件検討を行った。その結果、タイプ I コラーゲンをコートした培養皿上で培養した場合に、EpCAM 陽性細胞は高い増殖能を維持しており、継代培養も可能であった。

継代培養した EpCAM 陽性細胞からクローン化した細胞の遺伝子発現を解析したところ、ALB、AFP、CK19 など、オーバル細胞での発現が知られている遺伝子の発現が確認された。さらに、培養した EpCAM 陽性細胞を分化誘導することにより、*in vitro* で肝細胞、胆管上皮細胞の両方向へ分化させることができた。以上のことから、EpCAM 陽性細胞がオーバル細胞であることが示された。

肝芽での EpCAM の発現

胎仔肝臓は、マウスでは胎齢 8 日目に前腸内胚葉より生じた肝芽が、周囲の横中隔間充織に移入することにより発生する。胎齢 9.5 日目の胎仔における EpCAM の発現を解析したところ、前腸に強い発現が見られ、肝芽においても発現が確認された。しかし、その発現量は発生が進むにつれて減少していき、胆管上皮細胞への分化が始まる胎齢 14 日目前後から再び増加した。

当研究室では、肝芽細胞マーカーとして Delta-like protein (Dlk) を同定している。そこで、胎齢 11.5 日目の肝臓における EpCAM および Dlk の発現を解析した。その結果、胎齢 11.5 日目の肝臓では、Dlk 陽性細胞が EpCAM の発現により 2 つに集団に分けられた。Dlk⁺EpCAM⁺細胞画分と、EpCAM⁻Dlk⁺細胞画分のマーカー遺伝子の発現量や *in vitro* での増殖能を比較した結果、Dlk⁺EpCAM⁺細胞がより未分化な性質を維持する集団であることが示唆された。

結論

本研究では、オーバル細胞のマーカー分子として EpCAM を同定した。さらに、抗 EpCAM 抗体を用いて、セルソーターによりオーバル細胞を分離できることを明らかにした。本研究で同定した EpCAM を含め、CK19 や A6 など既知のオーバル細胞マーカーは全て胆管上皮細胞のマーカーでもある。このことは、オーバル細胞と胆管上皮細胞の性質が非常に類似していることを示唆する。肝芽細胞から初期の胆管が形成される場所は、成体肝臓のヘリング管や胆管末端にあたり、幹細胞のニッチと考えられている。多くの細胞が胆管上皮細胞へと分化する中で、オーバル細胞は幹細胞の性質を維持しつづけ、成体肝臓に障害が与えられた場合にのみ増殖して肝細胞へと分化すると考えられる (図 2)。

さらに、胎仔肝臓における EpCAM の発現を解析し、EpCAM は高い増殖能と肝実質細胞および胆管上皮細胞への二分化能という共通の性質をもつ、オーバル細胞と肝芽細胞に共通のマーカー分子であることを示した。

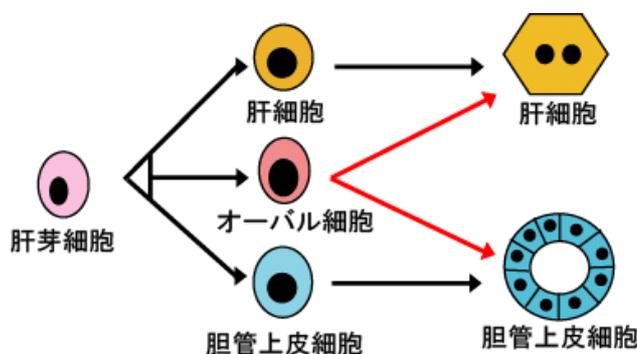


図 2. 肝臓における細胞系列