

論文審査の結果の要旨

氏名 岡 部 繭 子

本論文は8章からなる。第1章は序論であり、これまでの肝臓研究で得られた知見や問題点があげられている。第2章は材料と方法について述べられている。第3章から第7章は研究結果について述べられており、第8章は結論と今後の展望が記述されている。

肝臓は旺盛な再生能力をもつ臓器として知られており、外科的切除などの肝障害の場合には、残存細胞が分裂することにより再生する。しかし、肝細胞の増殖が制限された病的条件下では、オーバル細胞と呼ばれる細胞が増殖し、肝臓の再生に寄与することが報告されていた。オーバル細胞は高い増殖能と、肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能を有するために、成体の肝臓に存在する肝幹細胞と考えられ、細胞移植などの再生医療への応用が期待されている細胞である。しかし、オーバル細胞における研究は、免疫組織化学や、遠心法により分離したオーバル細胞を用いた研究が中心であり、純化した細胞を用いた解析はなされておらず、その由来や性状は明らかにされていなかった。血液学の分野では、細胞表面抗原の発現を指標として、セルソーターを用いて細胞を分離することにより研究が発展してきた。一方、肝臓学の分野ではセルソーターを用いた細胞分画が行われなかったために、分子細胞生物学的な研究が遅れていた。

そこで、本論文ではオーバル細胞の性状解析を行うために、オーバル細胞の細胞表面抗原の同定、およびその抗原に対する抗体とセルソーターを用いたオーバル細胞の分離を目的としている。また、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化能という、胎生期の肝幹細胞である肝芽細胞と共通の性質を有しているため、同定したオーバル細胞表面抗原の肝芽細胞での発現も解析している。肝臓学分野における従来の研究手法とは異なり、細胞表面抗原の発現を指標として均一な細胞集団を分離することを試みており、肝臓学分野に新たな研究手法を導入する点が新しく意義がある。

第3～6章では、シグナルシーケンストラップ(SST)法を用いたオーバル細胞表面抗原の同定について述べている。SST法はシグナルシーケンスを含む膜・分泌タンパク質遺伝子を効率的に抽出する方法であり、成体肝臓とオーバル細胞を誘導した肝臓での発現量の差を検討するのみでなく、膜タンパク質遺伝子を対象を絞ったスクリーニングを行っている点が工夫されている。スクリーニングによって多くの遺伝子が同定された中で、オーバル細胞と胆管上皮

細胞の類似点に注目し Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)に焦点を当てている。EpCAM がオーバル細胞で発現することを免疫組織学およびフローサイトメーターを用いた解析により明らかにしている。これまでのオーバル細胞の研究では、遠心法などにより分離したオーバル細胞でのマーカー遺伝子の発現を、免疫染色法や遺伝子発現解析により確認したのみで、オーバル細胞を分離できたとしていた。本研究ではセルソーターで分離した EpCAM 陽性細胞を、免疫染色や遺伝子解析によりオーバル細胞マーカー遺伝子の発現を確認するのみならず、*in vitro* での増殖能、および肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能を評価している。さらに、培養した細胞をクローン化することにより、単一の細胞から増殖した細胞が肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能を持つことを証明したところが非常に意義深い。

第7章では、オーバル細胞表面抗原として同定した EpCAM の、胎仔肝臓での発現を解析している。免疫組織化学により、EpCAM は肝臓の発生初期段階にある胎齢 9.5 日目の胎仔肝臓に既に発現していることを明らかにした。胎齢 11.5 日目の胎仔肝臓における EpCAM 陽性細胞は、*in vitro* の培養系において高い増殖能を示した。また、肝細胞マーカーであるアルブミンと、胆管上皮細胞マーカーであるサイトケラチン 19 を共発現する細胞や、アルブミンを発現する肝細胞クラスターは、EpCAM 陽性細胞のみから出現した。これらの結果から、胎齢 11.5 日目の胎仔肝臓において、肝芽細胞集団は EpCAM 陽性細胞に含まれることが明らかとなった。これまで肝芽細胞の分離には数種類の抗体が必要であったが、本研究では、抗 EpCAM 抗体のみを用いて肝芽細胞を分離できることを明らかにした。

本研究では、EpCAM をオーバル細胞マーカーとして同定し、さらに、胎仔肝臓における EpCAM 陽性細胞の性状解析を行うことにより、EpCAM が増殖能と肝細胞及び胆管上皮細胞への二分化能を持った細胞の共通マーカーであることを示した。本研究により開発された肝臓幹細胞の分離法とその性状解析は、肝臓の分子細胞生物学に大きく貢献するものと考えられる。また、本論文は、田中稔・宮島篤との共同研究であるが、申請者が主体となって解析及び検証を行ったもので、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。