

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名                      齊藤 弘樹

成体の肝臓と膵臓は共に一つの臓器が外分泌と内分泌機能を担うという特徴を備えている。また、発生においては、腸管の一部が隆起して肝芽及び膵芽が形成される。このように肝臓と膵臓は、生体機能及び発生過程における多くの類似点がみとめられる。従来の肝臓や膵臓の発生研究は、正常あるいは遺伝子改変動物の組織学的解析が中心であった。しかし、詳細な発生分化機構の解析には、発生過程を再現する細胞培養系が必要である。本研究は、肝臓と膵臓の発生時の共通性を念頭に、両者の肝芽および膵芽細胞の発生分化機構を分子細胞生物学的に解明することを目的としたものである。論文は四章より成る。

第一章は序論として、肝臓と膵臓の発生に関する研究の現状と問題点を述べている。これまでに、胎児肝臓細胞の表面抗原として Dlk (delta-like) が同定されている。胎生 (E) 14.5 日のマウス Dlk<sup>+</sup>肝臓細胞は培養系で肝芽細胞としての性質を有する点に注目し、本研究の目的を明確にした。

第二章では、肝臓の前駆細胞の分離・同定と機能について解析した。まず、肝再生過程における移植実験により、マウス E14.5 Dlk<sup>+</sup>肝芽細胞の *in vivo* 分化能を検討した。抗 Fas 抗体 Jo2 の投与により、選択的に肝細胞のアポトーシスを誘導し、脾臓に E14.5 Dlk<sup>+</sup>肝芽細胞を移植した。ドナー由来細胞はレシピエントの肝臓で肝細胞や胆管上皮細胞に分化することを明らかにした。

次に、培養した Dlk<sup>+</sup>胎児肝芽細胞の膵臓への分化能について検討した。E14.5 Dlk<sup>+</sup>肝芽細胞は、肝芽細胞としての分化能を維持したまま、継代培養が可能であった。その細胞を肝細胞増殖因子 HGF とレチノイン酸の存在下で培養すると、膵臓の外分泌及び内分泌細胞に特異的な遺伝子の発現が誘導された。これらの実験結果から、肝芽細胞としての性質を持つ培養細胞が、膵実質細胞への分化能を併せ持つことを示した。

第三章では、膵臓の前駆細胞の分離・同定と機能について解析した。Dlk の他に細胞分画に利用できる膜タンパク質 PCLP1 (podocalyxin-like protein 1) に着目し、マウス胎児膵臓から実質前駆細胞の分離を目指した。マウスでは E18.5 で初めて膵島構造がみとめられる。膵島構造が形成される前の E16.5 膵臓細胞を、PCLP1 と Dlk の発現を指標に分離し、その性状を検討した。この PCLP1<sup>+</sup>Dlk<sup>+</sup>細胞は、*in vitro* で極めて高い増殖能を示し、転写因子の発現パターンや胎児膵臓での局在から、幹/前駆細胞の性質をもつことを示した。

次に、胎児膵臓細胞の成体膵臓細胞への分化誘導能を調べた。まず、成体膵臓に類似した 3 次元細胞構造を誘導できる新しい培養法を確立した。E16.5 胎児膵臓から

PCLP1+Dlk+細胞を分離し、培養で分化誘導したところ、膵島や膵管に類似した構造を形成した。しかし、その他の細胞画分ではこのような構造を形成しなかった。胎児膵臓 PCLP1+Dlk+細胞は、培養系で膵実質細胞に分化可能な前駆細胞の性質を持つことを明らかにした。

生体内における分化能を解析するため、胎児膵臓細胞を糖尿病モデルマウスの腎皮膜下に移植した。PCLP1+Dlk+細胞は高血糖を一時的に改善し、*in vivo* で機能する膵島細胞に分化することを示した。さらに、培養によって形成した膵島を移植すると、長期間有意に高血糖を改善した。正常マウスへの移植では、血糖を下げ過ぎなかった。これらは、培養膵島のインスリン分泌が血糖によって調節されることを示唆している。また、移植部位には膵島の3次元構造が多数保持され、異所性膵島が機能することを示した。

第四章では、本研究の結果をまとめ、肝芽および膵芽細胞の発生分化機構について総合的に考察した。

以上、本研究は肝臓と膵臓の実質細胞の胎生期前駆細胞を、PCLP1 や Dlk を発現する細胞として分離し、成体細胞へ分化誘導できることを明らかにした。従来の研究では困難であった肝臓と膵臓の分化機構の解析に新たな基盤を提供するものであり、学術的さらに応用的に貢献できる。よって審査委員一同は、本研究が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。