

マウス肝芽腫は、ある系統に実験的に誘発することが可能であるが、ヒトのそれと異なり亜型に欠け、組織学的、免疫組織学的に非常に未分化な性質を示すため、その由来については未だ特定されていない。本研究では、diethylnitrosamine (DEN) および sodium phenobarbital (PB) の投与によりマウスに肝芽腫を誘発し、その生物学的特性を検索することで、マウス肝芽腫の由来について解明することを試みた。

6週齢の B6C3F1 マウスに DEN を単回投与した後、PB を 50 週間混餌投与した。肝臓腫瘍は、PB 投与群のみに認められ、肝芽腫の発生頻度は 62%であった。また、肝芽腫の約半数は、組織標本上で肝細胞腺腫あるいは肝細胞癌に隣接していた。肝芽腫は、成書の記述通りの組織学的特徴を示し、肝芽腫の TGF- $\alpha$ 陽性率および PCNA 陽性率は、肝細胞癌と比較して有意に高かった。また、肝芽腫ではすべて核に TGF- $\alpha$ 陽性像がみられた。

一方、肝芽腫は cytokeratin (CK) に対して免疫組織学的に陰性であったが、*in situ* hybridization 法では、CK18 陽性、CK19 陰性という結果を得た。また、albumin (ALB)、 $\alpha$ -fetoprotein (AFP)、vimentin は陰性であったが、一部の細胞が S-100 タンパクに陽性を示した。一方、肝芽腫は、免疫組織学的に c-kit、thy-1 陽性であったのに対し、CD34 は陰性であった。

病理組織学的に約半数の肝芽腫が肝細胞由来腫瘍に併発している点、肝細胞由来腫瘍と同じく PB のプロモーション作用を受けている点から、マウス肝芽腫が肝細胞系細胞に由来する可能性が考えられた。一方、肝芽腫が幹細胞マーカーである c-kit および thy-1 に陽性を示した点、一部で間葉系細胞マーカーである S-100 タンパクに陽性を示した点より、マウス肝芽腫が多分化能を有する幹細胞から発生した可能性が示唆された。

腫瘍の生物学的特性についてより詳細な検索を進めるためには、株化細胞を用いた *in vitro* 実験系が有用である。第二章では、上記肝芽腫より細胞株を樹立し、分化に関わる遺伝子発現を主体とした生物学的特性を検索した。

株化細胞 (MHB-2) は紡錘形あるいは多角形の単層細胞で、dispase 処理により結節より単離後、形成されたコロニーを数回継代することにより樹立した。MHB-2 は HGF 添加により増殖が有意に亢進し、その受容体である c-met mRNA を発現していた。しかし、MHB-2 は免疫不全マウスに対して、造腫瘍性を示さなかった。また、MHB-2 は keratin、ALB、AFP に対して免疫組織学的に陰性であった。

RT-PCR 法により MHB-2 細胞における mRNA の発現を検索したところ、本細胞は、c-kit、CD34、thy-1、ALB、CK18 および 19 を発現していたが、AFP ならびに成熟肝細胞マーカーである glucose-6-phosphatase および tyrosine aminotransferase の発現は認められなかった。幼若肝細胞マーカーである AFP mRNA を発現せず、一方でわずかに ALB mRNA を発現する本腫瘍は、脱分化した肝細胞というよりもむしろ肝前駆細胞様の未分化細胞の特徴を示すものと考えられた。一方、MHB-2 が CK18、19 をともに発現していることは、胆管系の特徴を有するものであると考えられた。

本考察に対するさらなる傍証を得るために、MHB-2 細胞について、肝臓の分化形成に関わると報告されている liver enriched transcription factors (LETFs) の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、C/EBP $\alpha$ 、FoxA2、HNF1 $\alpha$ 、HNF4 $\alpha$  および HNF6 mRNA の発現量は、正常肝細胞に比べて著しく少なかったのに対し、HNF-1 $\beta$  mRNA の発現量は正常肝細胞の約 8 倍を示した。また、分化促進条件下で MHB-2 細胞を 1 日間培養すると、HNF1 $\beta$

および HNF6 mRNA の発現量がそれぞれ約 2 倍、約 17 倍に増加した。胆管の分化・形成には、HNF6→HNF1 $\beta$ カスケードが関与しているとの報告があることから、通常条件下での HNF-1 $\beta$  の顕著な発現ならびに分化促進条件下での HNF-1 $\beta$ 、HNF6 の発現量増加は、MHB-2 細胞が胆管系への分化能を有することを示唆するものであると考えられた。

マウス肝芽腫は、肝細胞由来腫瘍に併発して認められ、PB のプロモーション作用に対して感受性を有することは、本腫瘍が肝細胞に由来することを示唆するものであるが、本研究の結果は、マウス肝芽腫が肝前駆細胞あるいは胆管系の特徴を有することを示した。したがって、マウス肝芽腫は肝細胞と胆管上皮細胞のどちらへも分化可能な肝前駆細胞に由来する可能性が高いと結論づけられた。本研究の成果は、肝芽腫の病態発現機序を考える上での基礎的知見として極めて重要である。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位を授与するに値するものと認めた。