

論文審査の結果の要旨

氏名 岡田 健

本論文は肝発生初期（マウス胎生 9.5 日目及び 10.5 日目）の肝臓細胞を *in vitro* において増殖・分化誘導可能な培養系を構築することで、肝発生初期における肝臓の幹・前駆細胞（hepatoblast）の性状を明らかにした。

本論文は緒言、結果及び考察により構成される。緒言においては、幹細胞の定義や、肝臓の発生、そして胎生期の hepatoblast について概説が行われている。肝発生中期の hepatoblast については培養系及びマーカーが明らかにされているためにその性状解析が進んでいるが、肝発生初期の hepatoblast については適切な培養系がないために単一細胞レベルでの解析が進んでいなかったことが述べられている。

研究結果の報告ではまず E9.5 から E13.5 の各発生段階の胎児肝臓から得られた肝臓細胞における CD13 及び Dlk の発現の解析がなされた。CD13 及び Dlk は肝発生中期の hepatoblast マーカーである。CD13・Dlk 共陽性細胞の機能解析のために、タイプ I コラーゲン上での H-CFU-C コロニーアッセイ系での培養を行なった結果、肝発生中期由来の細胞と異なり、肝発生初期由来の胎児肝臓細胞はほとんどコロニー形成能を認めなかった。

間葉系細胞との相互作用が hepatoblast の増殖に重要である可能性が過去の報告により示唆されている。そこで、本論文ではこの相互作用を模倣するため、mouse embryonic fibroblast (MEF) を feeder 細胞として CD13・Dlk 陽性細胞との共培養を行う系の構築を行った。この結果、肝発生初期(E9.5)の単一の CD13・Dlk 共陽性細胞に由来するコロニーが形成され、肝細胞様の細胞及び胆管上皮細胞様の細胞の両者から構成されていた。つまり、肝発生初期においても CD13・Dlk 共陽性細胞が hepatoblast の性質を有すると示された。

次に各発生段階の CD13・Dlk 共陽性細胞における遺伝子発現の解析が行われている。この結果、CD13・Dlk 共陽性細胞は E9.5 から E13.5 にかけて肝細胞特異的遺伝子の発現が有意に上昇していた。一方、内胚葉系前駆細胞のマーカーの発現は E9.5 で最も強く、その後急激に減少していたことから、E9.5 の CD13・Dlk 共陽性細胞は前腸内胚葉前駆細胞としての性質を保持していると考えられる。

更に本論文では肝発生初期における hepatoblast の生存／増殖を制御するシグナル経路を解析するため、様々なシグナル経路阻害剤を培地に加えて培養を行った。この結果、Rock または Rock 下流の Myosin II 分子の活性を阻害することで E9.5 および E10.5 の CD13・Dlk 共陽性細胞由来のコロニー数が有意に増大した。なお、Rock 阻害剤によるコロニー形成率の改善効果は、E13.5 の CD13・Dlk 共陽性細胞では認められず、肝発生初期の細胞に特異的であった。Rock 阻害剤によるコロニー形成効率向上の分子機序を明らかにするため、Rock 阻害剤存在下あるいは非存在下における hepatoblast の動態の解析が行われた。この結果、Rock 阻害剤存在下では肝発生初期の hepatoblast の多くが培養面上に広がって吸着したのに対し、非存在下では hepatoblast の多くが吸着しなかった。また、Rock 阻害剤の非存在下では、多くの hepatoblast において blebbing 現象が観察されたが、この現象は Rock 阻害剤の存在下では観察されなかった。

最後に本論文では考察として、肝発生初期及び肝発生中期の hepatoblast が生体内でおかれている環境との比較から、本培養系における MEF の果たす役割について論じている。また、発現遺伝子のプロファイルより、CD13・Dlk 共陽性細胞は E9.5 の時期においては E13.5 の時期とは異なり、原腸内胚葉細胞としての性質を一部有している点が議論された。さらに、単一細胞に分散した肝発生初期の hepatoblast において観察された blebbing が Rock の活性依存的に生じる原因について、上皮系組織である原腸内胚葉から hepatoblast が分化誘導される点を考慮した考察がなされた。

以上の内容により構成された本論文は、これまで解析が困難であった肝発生初期の hepatoblast について、フィーダー細胞との共培養系の構築を通じて単一細胞レベルでの解析を可能にし、肝発生中期の hepatoblast とは異なる形質を有することを明らかにしたことから、本学博士論文として十分な内容であると判断される。また、論文提出者は審査会において審査委員の質問に対して適切に答えることができた。