

イヌ脂肪組織由来間質細胞 ADSCs から
肝細胞様細胞への分化誘導と機能解析

麻布大学大学院獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程 獣医内科学

DV0901 藤本あゆみ

イヌ脂肪組織由来間質細胞 ADSCs から
肝細胞様細胞への分化誘導と機能解析

麻布大学大学院獣医学研究科
獣医学専攻 博士課程 獣医内科学
DV0901 藤本 あゆみ

目次

略語一覧 4

緒論 6

第1章 イヌ脂肪組織由来間質細胞 ADSCs から
 肝細胞様細胞 HLCs への分化誘導方法の検討 11

はじめに 11

材料と方法 12

結果 16

考察 17

小括 19

第2章 イヌの肝細胞癌株化細胞, 正常肝細胞, ADSCs および HLCs の性状解析 . . 20

はじめに 20

材料と方法 22

結果 29

考察 32

小括 38

第3章 イヌ HLCs の機能解析 39

はじめに 39

材料と方法 40

結果 41

考察	42
小括	45
総括	46
謝辞	49
参考文献	50
図表	60

略語一覽

bFGF: Basic fibroblast growth factor

cHCC: Canine hepatocellular carcinoma

CK7: Cytokeratin 7

CK18: Cytokeratin 18

CK19: Cytokeratin 19

CYP: Cytochrome P-450

dADSCs: Differentiated adipose tissue derived stromal cells

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimethyl sulfoxide

Dlk-1: Delta-like 1 homolog

Dil-Ac-LDL: 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate

EGF: Epithelial growth factor

EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule

ES cell: Embryonic stem cell

FBS: Fetal bovine serum

HGF: Hepatocyte growth factor

HGM: Hepatocyte growth medium

HPCs: Hepatocyte progenitor cells

HSCs: Hepatocyte stem cells

ILDL: Intermediate-sized low density lipoprotein

iPS cell: Induced pluripotent stem cell

LDL: Low-density lipoprotein

nADSCs: Naïve adipose tissue derived stromal cells

OSM: Oncostatin M

PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxykinase

PFA: Paraformaldehyde

VLDL: Very low-density lipoprotein

緒論

イヌでは肝炎、肝線維症、胆管炎、胆石症およびそれに続発する胆管閉塞、門脈シヤントといった疾患に起因する、難治性の慢性肝疾患が多く認められる (Allen *et al.*, 1999; Rutgers *et al.*, 1993; Watson 2004)。現在、小動物臨床においては、これら疾患に対して肝保護剤、利胆剤、ステロイドホルモン剤、肝線維化抑制剤投与といった対症的療法や、胆管および門脈系異常に対する外科的処置が行われている。上記の治療法は、病態発生の初期には非常に有効な場合もあるが、病態が慢性化し肝機能が著しく低下した状態では治療不応性であることが多い。そのため、代替治療法の開発が急務となっている。

ヒトの医療においては、肝疾患の終末期である肝硬変に対する根治的治療として、生体肝移植や脳死肝移植といった臓器移植が選択肢の一つとしてあげられる。しかしながら、獣医療よりはるかに進歩したヒト医学領域においても、臓器移植に関しては、移植臓器とレシピエントとの組織適合性の不一致による拒絶反応や、拒絶反応防止を目的とした長期の免疫抑制療法を必要とするなど、重大な医学的問題が存在する。さらに、本邦では臓器提供者不足という社会的問題や、それに起因する不適切な臓器移植治療や臓器売買といった倫理的問題もはらんでいる。獣医療に至っては、ドナーの確保という倫理的問題のみならず、移植医療に必須の白血球抗原の解析すら十分に行なわれていないため、肝細胞移植をはじめとする移植医療を安全に遂行するのは不可能に近い状態であることから、移植医療は積極的には行われていない。

再生医療は、機能障害および機能不全に陥った臓器や組織を、自己細胞または同種細胞や異種細胞を用いて、失われた臓器・組織の持つ機能を補完するものである。特に自己細胞を利用した再生医療は、組織適合性や拒絶反応等の医学的な障害が少なく、ドナーを必要としないため倫理的問題も回避可能な、理想的な代替療法として期待さ

れている。

近年、障害臓器の再生を目標として、幹細胞を用いた再生医療の研究が進められている。幹細胞の定義は、第10回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会の報告内容によると、自己複製能（自分と同じ能力を持った細胞を複製する能力）と多分化能（異なる系列の細胞に分化する能力）を持った細胞、としており、体性幹細胞、胚性幹細胞（embryonic stem cells : ES 細胞）及び人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells : iPS 細胞）が含まれる。体性幹細胞は身体の中に存在する幹細胞で、限定した分化能を保持している。体性幹細胞は様々な臓器に存在し、肝臓、皮膚、骨髄、脂肪、臍帯血、胎盤そして末梢血液中にも含まれる。一方、ES 細胞は受精卵を培養して得られる胚盤胞の内部細胞塊から樹立された細胞で、未分化な状態でほぼ無限に自己複製する能力と生殖細胞を含む全ての組織・細胞に分化しうる能力をもつ。iPS 細胞は人工的に多能性を誘導された幹細胞であり、ES 細胞とほぼ同様の能力を持つ細胞である。

体性幹細胞は、ES 細胞のようにヒトの胚を破壊すること無く入手可能で、iPS 細胞のように移植時の腫瘍形成の可能性が低いだけでなく、拒絶反応の問題、さらに倫理的問題も小さいと考えられ、幹細胞としての性質も維持し易い。難治性慢性肝疾患の治療に用いる細胞源として最も有効であると考えられる成熟肝細胞は、現状では *in vitro* における初代培養が非常に難しく、治療に必要な細胞数を確保することが不可能である。これは、臓器細胞を生体外で単層状態培養した場合、成体内で形成されるような細胞-細胞間ネットワークが再現されていないために高い細胞機能を維持することができないためと推測される。さらに、肝細胞と胆管細胞へと分化する肝臓幹/前駆細胞は、小葉間胆管の起始部であるヘリング管に沿って存在すると考えられ、機能的肝細胞として終末分化しうる事が十分期待できるが、その数はごく少量で、同定方法も確立されていないため、分離が非常に困難である。そのため、体性幹細胞源の中

でも、組織として入手しやすい骨髄や脂肪組織は、小動物臨床において非常に利便性があると考えられる。

申請者が所属する麻布大学内科学第二研究室では、これまでにイヌの骨髄由来細胞を Epidermal growth factor (EGF) および高濃度の Hepatocyte growth factor (HGF) 存在下またはヒト胎盤抽出液（商品名ラエンネック®）存在下で培養することにより、肝細胞の性状と機能を有する細胞に分化することを報告してきた (Neo *et al.*, 2009)。しかし、一回に採取可能な骨髄細胞の数は限られており、臨床応用可能な数を確保し難く、継続的な肝細胞の確保も困難であると考えられる。また、分化誘導に用いる試薬についても考慮すべき点がいくつか存在する。EGF は比較的安価で入手しやすい試薬であるが、猫リコンビナント HGF は非常に高価で、Neo らの方法だと、肝細胞分化誘導時に用いる培地へ HGF を 1000ng/ml と高濃度で添加しなければならず、莫大な費用がかかり、臨床に応用するには現実的でない。また、この分化誘導方法では FBS 添加培地を使用している。FBS を培地に添加することにより、細胞移植時にレシピエント体内へ BSE などの病原体となりうる異種異常タンパクが混入する可能性もある。ラエンネックは、含有する成長因子やラエンネックの種類が解明されていないだけでなく、複数のヒト胎盤を用いて 1 ロットとして作成されるため、組成がロット毎に異なる。そのため、ロットの違いにより骨髄細胞から肝細胞への分化誘導できないことがあり、分化誘導成功率が約半分と低い結果が得られている。さらに、ラエンネック自体が生物製剤であるため、FBS と同様の異種異常タンパクや病原体混入も考えられる。以上の諸問題から、他の幹細胞源の利用や、無血清培地での分化誘導法の確立が重要な課題であった。

一方、脂肪組織は、血管構成細胞、脂肪細胞、細胞外基質、そして間質細胞 (Adipose tissue-derived stromal cells: ADSCs) から構成されており、幹細胞は ADSCs 中に含まれていると考えられている。ADSCs は骨髄由来間葉系細胞とほぼ同等の多分化能を

持ち、採取細胞 100 個中 1 個の頻度で幹細胞を含有し、その数は骨髄の 100 から 1,000 倍多い (D' Ippolito *et al.*, 1999; Gronthos *et al.*, 2001; DeUgarte *et al.*, 2003)。さらに、ADSCs は脂肪組織採取時の侵襲性が比較的低いため分離しやすく、培養増幅や凍結保存が可能であることから、骨髄よりも臨床応用に有利であると考えられる。ヒトやラットでは ADSCs からの肝細胞分化が証明されている (Stock *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2008; Talens-Visconti *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2005; Sgodda *et al.*, 2007; Banas *et al.*, 2007) もの、イヌでは未だ証明されていない。そこで、本研究では骨髄に代わる組織幹細胞源として、イヌの ADSCs から肝細胞へと分化誘導することとした。

現在、ヒトやげっ歯類では肝臓の発生機序解明の研究が進んでおり、多能性を有する肝幹細胞 (Hepatocyte stem cells; HSCs) から肝前駆細胞 (Hepatocyte progenitor cells; HPCs)、さらに成熟肝細胞および胆管上皮細胞へと分化する際の細胞表面抗原解析が実施されてきた (Cogliati *et al.*, 2010)。特に、肝臓由来幹/前駆細胞の同定は肝細胞の分化成熟過程を調べるためにも必須であるばかりでなく、HSCs および HPCs の研究は、腫瘍化の機序の解明、早期診断ツールの確立と、治療方法の開発を行う上で重要である。人では免疫組織化学染色およびフローサイトメトリーによる解析結果から、HPCs 抗原の候補として Cytokeratin (CK) 7 や CK19、CD29、CD133、CD44、Dlk-1、Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) などが挙げられている (Liu *et al.*, 2011)。しかしながら、イヌにおいて正常肝細胞および腫瘍細胞や組織における HSCs および HPCs の表面抗原解析はほとんど実施されていない。そのため、骨髄由来細胞や脂肪組織由来間質細胞などの多能性幹細胞から分化誘導して得た肝細胞様細胞が、実際にどの段階まで分化誘導できているのか、解析できない状況であった。

以上の背景を踏まえて、本研究では以下の内容について検討を行った。

まず、第 1 章では、健常ビーグル犬から皮下脂肪組織を採取し、間質細胞を分離培養後、肝細胞分化誘導培地で 28 日間培養し、間質細胞が肝細胞様細胞へと分化誘導可能か否かを検討した。評価方法として、形態観察と、Albumin の mRNA 発現と蛋白発現の解析を行った。

第 2 章では、まず、犬の HSCs および HPCs に発現するマーカーを探索するため、イヌの HSCs および HPCs と同様の性状を示すと考えられるイヌ HCC (cHCC) 細胞株を用いて、細胞表面抗原である Dlk-1、CD29、CD34、CD44、CD90、CD133 の発現をフローサイトメトリーにより解析した。次に、分化誘導前のイヌ ADSCs が多能性を有する間葉系細胞集団であることを確かめるために、イヌ ADSCs 6 サンプルにおける細胞表面抗原 CD11b、CD14、CD29、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105、CD133、Dlk-1、CK18 の発現をフローサイトメトリーにて解析した。最後に、本研究の分化誘導方法で得られた肝細胞様細胞の性状を解析するため、細胞表面抗原 Dlk-1、CD29、CD34 の発現をフローサイトメトリーにより解析し、さらに定性的 RT-PCR により、肝細胞マーカーの Albumin と CK18、糖新生マーカーの PEPCK、薬物代謝酵素の CYP1A1 と CYP3A12、造血幹細胞および多能性幹細胞マーカーの CD34、上皮系および HPCs マーカーの CD90、そして HPCs および胆管上皮マーカーの CK7 および CK19 の mRNA 発現を解析した。

第 3 章では、分化誘導して得た肝細胞様細胞の機能を解析した。分化誘導を行ったイヌ ADSCs 2 サンプルを、Dil-Ac-LDL または Pentoxeresorufin を添加した分化誘導培地にて 4 時間インキュベートし、細胞中の赤色蛍光色素の有無を調べ、脂質代謝能または薬物代謝能の有無を評価した。

第 1 章 イヌ脂肪組織由来間質細胞 ADSCs から 肝細胞様細胞 HLCs への分化誘導方法の検討

はじめに

本章では、イヌ ADSCs を肝細胞へと分化誘導可能な培養方法を検討するため、健康犬から採取した鼠径部皮下脂肪組織から ADSCs を分離し、培養を開始した。2 代目継代後 8 割 confluent 時の ADSCs を分化誘導 0 日目とし、Hepatocyte growth factor (HGF)、basic fibroblast growth factor (FGF)、Epithelial growth factor (EGF)、Oncostatin M (OSM) および Dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加した無血清の肝細胞分化誘導培地を用いて 28 日間培養し、肝細胞へと分化誘導可能か検討した。評価のため、細胞形態の観察を倒立顕微鏡下で行い、Albumin mRNA の発現検出を定量的 RT-PCR にて試み、Albumin 蛋白の検出を免疫染色にて試みた。

材料と方法

イヌ脂肪組織由来間質細胞の分離と培養

脂肪組織の採取から肝細胞への分化誘導までの方法を Figure 1 に示した。臨床的に健康な 1 から 6 歳齢のビーグル犬 4 頭を供試した。前投与薬のアトロピン、麻酔導入薬のメドミジンそして麻酔維持薬のペントバルビタールを、それぞれ 0.025 mL/kg、0.06 mg/kg、10 mg/kg 使用して、麻酔下で鼠径部皮下脂肪組織を採取した。動物実験は麻布大学の動物実験指針に沿って適切に人道的に取り扱われた。採取した脂肪組織をハサミで細切した後、0.12% Collagenase 添加・リン酸緩衝液 (PBS) を用いて 37°C 30 分間インキュベートした。その後酵素活性をコントロール培地である Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (10% 牛胎仔血清 (FBS)、Penicillin 5000 units/L、Streptomycin 50 mg/L、L - glutamine 2 mmol/L 添加) (Table 1) で中和し 270×g で 5 分間遠心した。混入赤血球を除去するために、溶血剤 (10 mM KHCO₃ と 1 mM Na₂EDTA を含む 155 mM NH₄Cl (pH 7.0)) で細胞塊を再浮遊させ、室温で 5 分間静置した後、270×g で 5 分間遠心した。細胞塊を再度コントロール培地に浮遊させ、100 μm ナイロンメッシュで濾過し、不溶性線維物質を除去した。濾過後に得られた細胞集団をコントロール培地で再浮遊させ、25 cm² コラーゲン I 型コーティングフラスコ (IWAKI) に播種し、5% CO₂、37°C で培養開始した。培地を 3 日毎に交換した。

イヌ脂肪組織由来間質細胞から肝細胞への分化誘導

以後、分化誘導実験を行った ADSCs については、培養初期である 0 代目 8 割コンフルエント時の幼若 ADSCs を naïve-ADSCs (nADSCs)、分化誘導開始から 0、7、

14、21、および28日目の分化誘導ADSCsをdifferentiated-ADSCs (dADSCs) と記すことにする。2代目継代時、nADSCsを $3-5 \times 10^3/\text{cm}^2$ の細胞濃度で25 cm² コラーゲン I 型コーティングフラスコに播種し、60%-70%コンフルエントになったnADSCsを用いて肝細胞への分化誘導を開始した。分化誘導用の培地として、リコンビナントネコ肝細胞増殖因子 recombinant feline Hepatocyte growth factor (rfHGF; Nippon Zenyaku Kogyo Co. Ltd., Koriyama, Japan) (Miyake *et al.*, 2004) (最終濃度100 ng/mL)、リコンビナントヒト上皮成長因子 recombinant human Epithelial growth factor (rhEGF; Sigma, St. Louis, MO, USA) (最終濃度20 ng/mL)、リコンビナントヒト塩基性線維芽細胞成長因子 recombinant human basic Fibroblast growth factor (rh-bFGF; Corefront corporation, Tokyo, Japan) (最終濃度10 ng/mL)、リコンビナントヒトオンコスタチンM recombinant human Oncostatin M (rhOSM; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) (10 ng/mL)、そして Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (最終濃度0.1%) を添加した無血清のHepatocyte growth medium (HGM; Miyazaki *et al.*, 2002) (Table 2) を用いて、5% CO₂、37°C で28日間培養した。培地交換は週に3回行った。細胞の性状と機能を調べるために、nADSCsと分化誘導開始から0、7、14、21、および28日目のdADSCsを用いて、細胞形態の観察とAlbuminのmRNA発現および蛋白発現を解析した (Figure 1)。

イヌ成熟肝細胞

Albumin mRNA発現の定量的RT-PCR解析の陽性コントロールとしてイヌの成熟肝細胞の培養を行った。臨床上健康な2歳齢の実験ビーグル犬3頭から、麻酔下で肝臓組織を採取した。前投与薬のアトロピン0.05 mg/kg SC、麻酔導入薬のプロポフォール8 mg/kg IV、そして麻酔維持薬のイソフルランを使用した。なお、動物実験は全

て麻布大学実験動物委員会の指針に準拠して実施した。門脈から Ca^{2+} と Mg^{2+} フリーの Hanks 溶液を還流した後、コラゲナーゼ溶液を 37°C 条件下で 20 分間還流した。消化された組織を血清無添加の Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で溶解し、 $50\times g$ で 3 分間遠心して肝細胞を回収した。再度 10%FBS 添加 DMEM で細胞浮遊液を作成し、 25 cm^2 コラーゲン I 型コーティングフラスコ (IWAKI) に播種して、 $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C で培養開始した。

細胞形態の観察

臨床健康なビーグル犬 4 頭から分離した ADSCs を用いて分化誘導を行い、その細胞形態を観察した。観察は分化誘導開始から 0、7、14、21、および 28 日目の dADSCs にて実施し、評価日にインキュベーターから取り出し、倒立顕微鏡下にて観察した。

Total RNA の抽出と cDNA 合成

60-70%コンフルエントになった培養初期 (0 代目継代時) の nADSCs と、分化誘導開始 0、7、14、21 そして 28 日目の dADSCs の、mRNA 発現の解析を行った。陽性コントロールには、培養 24 時間後のイヌ成熟肝細胞を用いた。サンプルを TRI Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で溶解し、total RNA を RiboPure™ Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で抽出した。混入 DNA を TURBO DNA-free™ Kit (Applied Biosystems) で除去し、DU 730 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) で total RNA の $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ratio を測定することで品質を調べ、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写し、100 ng の RNA から cDNA を合成した。cDNA は -80°C で冷凍保存した。

定量的 reverse-transcription PCR (RT-PCR)

Albumin mRNA 発現の定量は、ABI7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて行った。内因性コントロールとして 18S リボソーム RNA を用いた。プライマーとプローブには TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) の eukaryotic 18S rRNA (Hs99999901_s1) と Alb (Cf02622284_m1) を使用した。データは Mann-Whitney test (Microsoft Excel 2010) を使って統計学的に解析し、 p 値 <0.05 を有意差ありとした。

免疫細胞化学染色による Albumin 蛋白発現の解析

分化誘導を実施したイヌ ADSCs のうち 2 サンプルを用いて、免疫細胞化学染色による Albumin 蛋白発現の解析を行った。評価は、コラーゲン I 型コーティングの 35mm ディッシュで培養した培養初期 (継代 0 代目) の nADSCs と、分化誘導開始 0、7、14、21 そして 28 日目の dADSCs にて実施した。まず、4% Paraformaldehyde (PFA) 添加 PBS で 4°C 30 分間固定処理を行い、その後 0.1% Triton X-100 添加 PBS で室温 4 分間賦活化処理を行った。内在性ペルオキシダーゼ活性除去のため、固定した細胞を 3%過酸化水素添加メタノール溶液で室温 15 分間静置した。そして 10%スキムミルク添加 PBS で室温 1 時間静置し、ブロッキング処理を行った。その後、ヤギ抗イヌ Albumin ポリクローナル抗体 (Bethyl Laboratory Inc., Montgomery, TX, U.S.A.) (Schaefer *et al.*, 2011) を 200 倍希釈した抗体溶液 (Dako, Glostrup, Denmark) を用いて、一次抗体反応を 4°C overnight 行った。アルデヒド基除去のため 0.2M グリシン添加 PBS で室温 30 分間インキュベートし、二次抗体としてシンプルステイン MAX PO (G) (Histofine; Nichirei, Tokyo, Japan) を室温 30 分間反応させた。全工程間で細胞を 3 回 PBS 洗浄した。最後に 3-3'-diaminobenzidine (DAB; Nichirei) を用いて発色し、Dako REAL™ Hematoxylin (Dako, Glostrup, Denmark) で核染色を行った。

結果

細胞形態

nADSCs と分化誘導 0 日目の dADSCs は紡錘形の線維芽細胞様の形態を維持していた。分化誘導を開始すると形態が変化し始め、7, 14, 21 および 28 日目の dADSCs で、多角の形態と明瞭な円形核を有する肝細胞様細胞 (HLCs) が認められた (Figure 2)。これは 10 サンプルの ADSCs の全てにおいて、同じ結果となった。

Albumin mRNA の発現

Albumin mRNA は nADSCs 時にもすでに発現しており、分化誘導することにより、発現が増強した。しかし、Mann-Whitney test で相関を調べたところ、全て $P > 0.12$ となり、統計学的な有意差は認められなかった (Figure 3)。

Albumin 蛋白の発現

免疫染色で Albumin 蛋白の発現を解析した結果、Albumin 蛋白は nADSCs で陰性、0 日目の dADSCs で陰性または弱陽性だった。分化誘導後徐々に発現が増強し、28 日目の HLCs では陽性細胞の割合が最多となった (Figure 4)。

考察

本研究の分化誘導方法で培養した結果、イヌ ADSCs は線維芽細胞様の形態から、多角形で明瞭な円形核を有する細胞へと変化した。さらに、Albumin の mRNA 発現と蛋白発現は、どちらも分化誘導することで経時的に増強した。

初代培養肝細胞は、分離時に球状を呈し、培養器に接着後、徐々に扁平化し、核が明瞭に観察されるようになる。播種後 6 から 7 時間で進展が完了し、その後細胞間細胞間接着が強固となり、培養 1 日目には敷石状に伸展した単層の細胞膜を形成する。この状態が最も肝細胞に特徴的で、細胞の中央に円形の核を 1 個以上有し、多角の形態が認められる。培養初期は小型の細胞として認められるが、長期間培養すると細胞を広く周囲に進展させた大型の細胞となる。また、細胞外基質の種類によっても細胞形態は異なってくるということが知られている (DiPersio *et al.*, 1991; Hamilton *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003)。

本研究で得られた HLCs は、以前 Banas らや Taléns-Visconti らがヒト ADSCs から分化誘導した肝細胞様細胞の形態と非常に類似していた。Banas らはヒト ADSCs 中の CD105⁺細胞をソーティングして分離培養し、分化誘導に用いた (Banas *et al.*, 2007)。Taléns-Visconti らは、ソーティングはせず本研究と同様にヘテロな細胞集団である脂肪組織由来間質細胞を分化誘導に用いた (Taléns-Visconti *et al.*, 2006)。両者は異なるプロトコルで分化誘導したが、どちらも幼若肝細胞の形態とよく似た細胞へと形態が変化した。

肝細胞特異的マーカーである Albumin の mRNA と蛋白の発現は、分化誘導を開始すると、イヌ成熟肝細胞と比較し Albumin mRNA の発現量は非常に低いですが、分化誘導開始から 28 日目まで継続的に増加する傾向が認められた。さらに、分化誘導培地に

よる培養により Albumin 蛋白の発現も増強し、分化誘導 28 日目で陽性細胞率が最多となったことから、本研究で用いた分化誘導方法が、Albumin を産生する HLCs へと分化誘導出来た可能性が示された。

さらに、nADSCs でも Albumin がすでに発現していたことから、*in vitro* での培養早期から肝細胞の機能を持つ様になっていると推測された。他の報告でも、肝細胞への分化誘導前に、ADSCs において低いレベルの Albumin mRNA 発現が確認されている (Taléns-Visconti *et al.*, 2006; Sgodda *et al.*, 2007)。CCl₄ 誘導肝障害モデルマウスにヒトの nADSCs を投与した研究ではマウスの肝機能が回復した。これは nADSCs がもともと肝細胞の機能を有することを示唆している (Banas *et al.*, 2008)。

本研究で得た HLCs は、陽性コントロールの培養 1 日目のイヌ成熟肝細胞と比較して、Albumin mRNA 発現が非常に少なく、明瞭な細胞間接着が倒立顕微鏡下の観察で認められなかったことから、成熟肝細胞まで分化誘導されておらず、未熟な段階の肝細胞系統の前駆細胞の状態であると考えられた。

小括

分化誘導を行うことで、イヌ ADSCs が、7 日目には多角の形態と明瞭な円形核を持つ HLCs へと変化した。Albumin mRNA 発現は有意差が認められなかったものの経時的に増加し、Albumin 蛋白も発現が増強した。以上の結果から、本研究の分化誘導方法で、イヌ ADSCs から肝細胞系細胞へと分化誘導できる可能性が示唆された。

第 2 章

イヌの肝細胞癌株化細胞, 成熟肝細胞, ADSCs および HLCs の性状解析

はじめに

第 1 章にて、イヌ ADSCs から肝細胞様細胞を分化誘導することにできた。この細胞は、形態学的に肝細胞に類似するばかりでなく、肝特異的なマーカーである Albumin の発現も認められた。しかしながら、ADSCs 由来 HLCs は分化誘導前にすでに Albumin の m-RNA の発現が認められていたこともあり、本マーカーの発現を以て肝細胞への分化誘導へ成功したとは言い難い。そこで、得られた HLCs が、体性肝臓幹細胞から成熟肝細胞へと分化する過程の中で、どの分化段階の細胞と類似しているかを調べるため、細胞表面抗原の発現を解析し、さらに肝細胞発生に関連する mRNA 発現を定性的 RT-PCR にて解析することにした。

まず、イヌの肝細胞の分化成熟過程で発現する細胞表面マーカーを探索するため、HSCs や HPCs と似た性状を示す cHCC 細胞株を用いて CD29、CD34、CD44、CD90、CD133 そして Dlk-1 の抗原発現の有無をフローサイトメトリーにより解析した。コントロールにはイヌ成熟肝細胞を用いた。

次に、分化誘導前のイヌ ADSCs における細胞表面抗原 CD11b、CD14、CD29、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105、CD133、Dlk-1 そして CK18 の発現をフローサイトメトリー解析にて調べた。

最後に、本研究の分化誘導方法で得られた HLCs の性状を調べるため、分化誘導を実施した 0 から 28 日目の dADSCs について、上記マーカーの中で Dlk-1、CD29、CD34 の三つの抗原発現をフローサイトメトリー解析し、さらに肝細胞マーカーの

Albumin と CK18、糖新生マーカーの PEPCK、薬物代謝酵素の CYP1A1 と CYP3A12、造血幹細胞および多能性幹細胞マーカーの CD34、上皮系および HPCs マーカーの CD90、そして HPCs および胆管上皮マーカーの CK7 および CK19 の mRNA 発現を定性的 RT-PCR で解析した。

材料と方法

1. cHCC 細胞株とイヌ成熟肝細胞の細胞表面抗原解析

1-1. cHCC 細胞株

930-599A、95-0112、95-1044 そして CHKS-rL の合計 4 株を解析に用いた。930-599A、95-0112 そして 95-1044 の 3 株は、麻布大学生命環境科学部臨床検査技術学科病理学研究室講師の荻原喜久美博士から提供された。CHKS-rL は麻布大学小動物臨床研究室助教の川原井晋平博士から提供された (Kawarai *et al.*, 2006)。凍結保存された cHCC 株化細胞を 60°C 急速解凍により再融解し、10% FBS (Gibco Brl, Tokyo, Japan)、ペニシリン 5000 units/L、ストレプトマイシン 50 mg/L (Gibco Brl)、そして L-グルタミン 2 mmol/L を添加した Isocove's Modified Dulbecco's Medium (IMEM) (Gibco Brl) で細胞浮遊液を作成し、100mm ノンコーティングプラスチックディッシュを用いて、37°C、5% CO₂ の条件下で培養を開始した。3 日ごとに培地を交換し、3-5 代目の継代細胞をフローサイトメトリー解析に用いた。

1-2. イヌ成熟肝細胞

第 2 章の材料と方法にて採取したイヌ成熟肝細胞 3 サンプルを、分離直後培養を行わず解析に用いた。消化された組織を血清無添加の Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で溶解し、50×g で 3 分間遠心して肝細胞を回収した後、再度 DMEM で細胞浮遊液を作成し、これをフローサイトメトリー解析に用いた。

1-3. cHCC 細胞株またはイヌ成熟肝細胞のフローサイトメトリー解析

解析する細胞を $1 \times 10^7/\text{ml}$ になるよう濃度を調整し、 $100 \mu\text{l}$ ずつ 1.5 ml チューブに分注し、各抗原に対するモノクローナル抗体を $2 \mu\text{l}$ 入れて 50 倍希釈溶液を作成し、 4°C 下で 30 分間インキュベートした。抗体は、Dlk-1 (FITC 標識 rat anti mouse- Dlk-1, IgG₁, D187-4, MBL, Nagoya, Japan) 、 CD29 (PE 標識 mouse anti-human CD29, IgG₁, κ , 303004, BioLegend, San Diego, CA) (Takemitsu *et al.*, 2012) 、 CD34 (R-PE 標識 mouse anti-canine CD34, IgG₁, κ , 559369, BD Biosciences, San Diego, CA) (Hägglund *et al.*, 2000) 、 CD44 (PE 標識 rat anti-mouse/human CD44, IgG_{2b}, κ , 103008, BioLegend) (Blacking *et al.*, 2011) 、 CD90 (Thy-1) (PE conjugated rat anti-canine CD90, IgG_{2b}, κ , 12-5900, eBioscience) (Kang *et al.*, 2008) 、そして CD133 (PE 標識 rat anti-mouse CD133, IgG₁, κ , 12-1331, eBioscience, San Diego, CA) (Lamerato-Kozicki *et al.*, 2006) を使用した。アイソタイプコントロールは抗 Dlk-1 抗体に対し FITC 標識 rat IgG₁ (M080-4, MBL) を、抗 CD29 抗体と抗 CD34 抗体に対し PE 標識 mouse IgG₁, κ (550617, BD Biosciences) を、抗 CD44 抗体と抗 CD90 抗体に対し PE 標識 rat IgG_{2b}, κ (556925, BD Biosciences) を、抗 CD133 抗体に対し PE 標識 rat IgG₁, κ (12-4301, eBioscience) を使用した。解析時に PBS で $200 \mu\text{l}$ にアップし、 $0.5 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度でフローサイトメトリー解析を行った。解析機器には EC800 cell analyzer (SONY, Tokyo, Japan) 、Flowjo7.6.3 software (TreeStar, Ashland, OR, U.S.A.) を使用した。アイソタイプコントロールの陽性率が約 5% になるように陰性と陽性の境界を設定した。得られた結果の陽性率を、 $10\% \leq$ 陽性、 $10\% \leq$ 低発現 $< 40\%$ 、 $40\% \leq$ 中等度発現 $< 70\%$ 、 $70\% \leq$ 高発現と定義し評価した。全ての検体で 3 回測定を行い、平均値を Table 5 に示した。成熟肝細胞については、統計解析を EXCEL (Microsoft) の EXCEL 統計 (Social Survey Research Information) にて算出し、細胞表面抗原の発現率を平均 \pm 標準偏差 (SD) で記した。

2. イヌ ADSCs のフローサイトメトリー解析

2-1. イヌ ADSCs の採取および培養

供試動物として、臨床上健康な 1 歳のビーグル犬 6 頭から鼠径部の皮下脂肪組織を採取した。なお、動物実験はすべて麻布大学実験動物委員会の指針に順拠して実施した。脂肪組織の採取と ADSCs の分離培養は、第 2 章の材料と方法の記載と同様に行った。1 代目継代後の 8 割コンフルエント時に、細胞保存用凍結液セルバンカー-1 を用いて、ADSCs を -80°C で凍結保存した。その後、フローサイトメトリー解析を行うため、 60°C で急速解凍し、10%FBS 添加 DMEM で培養を開始した。再融解から 1~2 代目継代後の 8 割コンフルエント時の ADSCs を、フローサイトメトリー解析に用いた。

2-2. イヌ ADSCs のフローサイトメトリー解析

解析する細胞を $1 \times 10^7/\text{ml}$ になるよう濃度を調整し、 $100 \mu\text{l}$ ずつ 1.5 ml チューブに分注し、各抗原に対するモノクローナル抗体を $2 \mu\text{l}$ 入れて 50 倍希釈溶液を作成し、 4°C で 30 分インキュベートした。抗体は以下のものを使用した。

CD11b (未標識 mouse anti-dog CD11b, IgG1, MCA1777S, AbD serotec, Oxford, UK) (Lamerato-Kozicki *et al.*, 2006)、CD14 (Alexa Fluor 700 標識 mouse anti-human CD14, IgG2a, MCA1568A700, AbD serotec, Oxford, UK) (Lamerato-Kozicki *et al.*, 2006)、CD29 (PE 標識 mouse anti-human CD29, IgG₁, κ , 303004, BioLegend, San Diego, CA) (Takemitsu *et al.*, 2012)、CD34 (R-PE 標識 mouse anti-canine CD34, IgG₁, κ , 559369, BD Biosciences, San Diego, CA) (Hägglund *et al.*, 2000)、CD44 (PE 標識 rat anti-mouse/human CD44, IgG_{2b}, κ , 103008, BioLegend) (Blacking *et al.*, 2011)、CD45 (FITC 標識 rat anti-dog CD45,

IgG2b, MCA1042F, AbD serotec, Oxford, UK) (Lamerato-Kozicki *et al.*, 2006)、CD73 (PE 標識 rabbit anti CD73, polyclonal, bs-0372R-PE, Bioss, MA, USA) (Takemitsu *et al.*, 2012)、CD90 (Thy-1) (PE conjugated rat anti-canine CD90, IgG_{2b}, κ, 12-5900, eBioscience) (Kang *et al.*, 2008) 、CD105 (FITC 標識 rabbit anti CD105, polyclonal, bs-6323R-FITC, Bioss, MA, USA) (Takemitsu *et al.*, 2012) 、 CD133 (PE 標識 rat anti-mouse CD133, IgG₁, κ, 12-1331, eBioscience, San Diego, CA) (Lamerato-Kozicki *et al.*, 2006)、Dlk-1 (FITC 標識 rat anti mouse- Dlk-1, IgG₁, D187-4, MBL, Nagoya, Japan) 、 CK18 (未標識 mouse anti-cytokeratin 18, MAB3224, Millipore, MA, USA) (Kato *et al.*, 2007) 。アイソタイプコントロールは、抗 CD11b 抗体と抗 CK18 抗体に対し未標識 mouse IgG₁, κ (554121, BD Bioscience) を、抗 Dlk-1 抗体に対し FITC 標識 rat IgG₁ (M080-4, MBL) を、抗 CD29 抗体と抗 CD34 抗体に対し PE 標識 mouse IgG₁, κ(550617, BD Biosciences) を、抗 CD14 抗体に対し未標識 mouse IgG_{2b}, κ (56-4732, eBioscience) を、抗 CD45 抗体に対し FITC 標識 rat IgG_{2b}, κ (556923, BD Bioscience) を、抗 CD73 抗体と抗 CD105 抗体に対し未標識 normal rabbit IgG (NI01 Calbiochem, MA, USA) 、抗 CD44 抗体と抗 CD90 抗体に対し PE 標識 rat IgG_{2b}, κ (556925, BD Biosciences) を、そして抗 CD133 抗体に対し PE 標識 rat IgG₁, κ (12-4301, eBioscience) を使用した。CD11b と CK18 の一次抗体に対する二次抗体として PE 標識 goat anti-mouse IgG (H+L) (731850, BECKMAN COULTER) を、CD73 と CD105 の一次抗体に対する二次抗体として FITC 標識 goat polyclonal secondary antibody to rabbit IgG-H&L (abcam, MA, USA) を使用した。

解析時に PBS で 200μl にアップし、 0.5×10^7 /ml の濃度でフローサイト解析を行った。解析機器には EC800 cell analyzer (SONY, Tokyo, Japan) 、Flowjo7.6.3 software (TreeStar, Ashland, OR, USA) を使用した。アイソタイプコントロールの陽性率が約

5%になるように陰性と陽性の境界を設定した。得られた結果の陽性率を、 $10\% \leq$ 陽性、 $10\% \leq$ 低発現 $< 40\%$ 、 $40\% \leq$ 中等度発現 $< 70\%$ 、 $70\% \leq$ 高発現と定義し評価した。統計解析を EXCEL (Microsoft)の EXCEL 統計 (Social Survey Research Information)にて算出し、細胞表面抗原の発現率を平均 \pm 標準偏差 (SD) で記した。

3. 分化誘導 0 から 28 日目のイヌ dADSCs の細胞表面抗原解析

3-1. イヌ dADSCs の採取および培養

供試動物として、臨床上健康な 6 歳のビーグル犬 2 頭から鼠径部の皮下脂肪組織を採取した。なお、動物実験はすべて麻布大学実験動物委員会の指針に順拠して実施した。脂肪組織の採取、ADSCs の分離培養、肝細胞への分化誘導は、第 2 章の材料と方法の記載と同様に行った。細胞表面抗原解析には、分化誘導開始 0、7、14、21 および 28 日目の dADSCs を用いた。評価日に培養細胞を 0.2%トリプシン・エディタで剥離し、DMEM で細胞浮遊液を作成し、これをフローサイトメトリー解析に用いた。

3-2. イヌ dADSCs のフローサイトメトリー解析

培養 0、7、21 および 28 日目の各細胞を、 $1 \times 10^6/\text{ml}$ になるよう濃度を調整し、 $100\mu\text{l}$ ずつ 1.5ml チューブに分注した。Dlk-1、CD29 および CD34 の各抗体を $2\mu\text{l}$ 入れて 50 倍希釈溶液を作成し、 4°C 下で 30 分間静置して反応させた。抗体は Dlk-1 (FITC 標識 rat anti mouse Dlk-1, IgG₁, D187-4, MBL, Nagoya, Japan)、CD29 (rabbit anti-human CD29 ポリクローナル, AB1952, CHEMICON)、そして CD34 (R-PE 標識 mouse anti-canine CD34, IgG₁, κ , 559369, BD Biosciences, San Diego, CA) (Hägglund *et al.*, 2000) を使用した。蛍光色素が標識されていない抗 CD29 抗体に対

して、一次抗体反応後遠心洗浄後に再度 100 μ l の PBS で細胞浮遊液を作成して、二次抗体(PE 標識 goat anti-mouse IgG, 731850, BECKMAN COULTER) を 2 μ l 入れて 50 倍希釈溶液を作成し、4°C 下で 30 分静置して反応させた。アイソタイプコントロールは FITC 標識 rat IgG₁ (M080-4, MBL) と PE 標識 mouse IgG_{1, κ} (550617, BD Biosciences) を使用した。解析機器には EC800 cell analyzer (SONY) 、Flowjo7.6.3 software (BD Biosciences) を、そして統計処理は Microsoft Excel 2010 を使用した。アイソタイプコントロールの陽性率が約 5%になるように陰性と陽性の境界を設定した。

4. イヌ nADSCs と 0 から 28 日目のイヌ dADSCs の定性的 RT-PCR 解析

4-1. 解析した遺伝子

肝細胞マーカーの Albumin と CK18、糖新生マーカーの PEPCK、薬物代謝酵素の CYP1A1 と CYP3A12、造血幹細胞および多能性幹細胞マーカーの CD34、上皮系および HPCs マーカーの CD90、そして HPCs および胆管上皮マーカーの CK7 と CK19 を解析した。内在性コントロールとして β アクチンを用いた。

4-2. Total RNA の抽出と cDNA 合成

80%コンフルエントになった培養初期 (0 代目継代時) の nADSCs と、分化誘導開始 0、7、14、21 そして 28 日目の dADSCs の、mRNA 発現の解析を行った。解析方法は第 1 章の材料と方法と同様に行った。

4-3. 定性的 RT-PCR

TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa, Kyoto, Japan) で定性的 RT-PCR を行い、各種 mRNA 発現を解析した。イヌ cDNA 配列を参考にして作成したプライマーの配列と PCR 条件を Table 3 に記載した。Ethidium bromide 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加 3% (w/v) アガロースゲルを使って PCR 産物を泳動し、バンドの有無を確認した。

結果

1. cHCC 株化細胞とイヌ成熟肝細胞の細胞表面抗原解析

cHCC 細胞株の細胞形態

930-599A は、紡錘形で、細胞同士が緩く接着していた。95-0112 は、他の 3 株よりサイズが大きく、多角形・扁平で、数個の細胞突起を有し、細胞間接着が認められなかった。95-1044 は、930-599A と似た紡錘形ではあったものの、細胞同士または細胞外基質との接着が強固で、敷石状となった。CHKS-rL は、多角形で、95-1044 と同様に細胞間接着が強く、敷石状となった (Figure 6)。

cHCC 細胞株とイヌ成熟肝細胞の細胞表面抗原発現

結果を Table 4 に示した。CD44、Dlk-1 そして CD133 が 4 株の cHCC 全てで発現していた。CD44 は 930-599A、95-0112 そして CHKS-rL で顕著に発現していたが (98.87%、78.90%、86.63%)、95-1044 では低発現であった (29.07%)。Dlk-1 は 930-599A で高発現で (86.50%)、他の 95-0112、95-1044 そして CHKS-rL の 3 株は低発現であった (20.90%、26.43%、21.17%)。CD133 は 930-599A で中等度発現していたが (57.53%)、残り 3 株の 95-1044、95-0112 そして CHKS-rL は低発現であった (34.67%、20.97%、19.70%)。CD29 の発現が 930-599A、95-1044 と CHKS-rL の 3 株で認められたが (99.30%、84.43%、94.30%)、95-0112 は未発現であった (1.88%)。CD90 は唯一 930-599A で高発現していた (98.57%)。CD34 は 4 株全てで未発現だった (発現範囲: 0.13% から 5.04%)。コントロールの肝細胞は 3 検体全て同様の結果が得られ、全抗原未発現であった (n=3, 発現範囲: 2.16±0.0174 % から

7.75±0.0926 %)。Dlk-1 抗体のイヌに対する交差性を調べるため、ウェスタンブロット法を用いてバンドの検出を試みた結果、確認は不可能だった (データなし)。

2. イヌ nADSCs のフローサイトメトリー解析

結果を Table 5 に示した。6 検体のイヌ nADSCs を用いて、フローサイトメトリー解析を行った結果、CD29、CD44、CD90、Dlk-1 は高発現していた (それぞれ 98.05±0.0297%、99.97±0.0005%、93.30±0.0533%、74.28±0.2581%)。一方、CD11b、CD14、CD34、CD45、CD73、CD105、CD133 そして CK18 は発現が認められなかった (それぞれ 7.25±0.025224%、4.87±0.0240%、6.62±0.0118%、4.26±0.0070%、0.26±0.0029%、2.16±0.0167%、3.86±0.0130%、9.24±0.0541%)。

3. 0 から 28 日目のイヌ dADSCs の細胞表面抗原解析

分化誘導開始 0、7、21 および 28 日目のイヌ ADSCs を用いてフローサイトメトリー解析を行った結果、Dlk-1 は培養 0 日目には発現が認められたが、7、21 および 28 日目では未発現となった。CD29 は培養 0 日目と比較し、7、21 および 28 日目で高い陽性率で推移した。CD34 に関しては、培養 0 日目から 28 日目まで絶えず未発現であった (Table 6)。本項目の実験で用いた抗 CD29 ポリクローナル抗体のイヌに対する交差性を調べるため、ウェスタンブロット法を用いてバンドの検出を試みた結果、目的とする部位にバンドが認められた (データなし)。

4. nADSCs と 0 から 28 日目の dADSCs の Albumin mRNA 以外の遺伝子発現解析

肝細胞マーカーの Albumin と CK18、糖新生マーカーの PEPCK、薬物代謝酵素の CYP1A1, CYP3A12 は、nADSCs から 28 日目の dADSCs まで絶えず発現していた。特に nADSCs で発現が非常に微弱だった CYP3A12 は、分化誘導 7 から 28 日目にかけて増強した。造血幹細胞および多能性幹細胞マーカーの CD34 は、nADSCs で発現が最も強かったが、分化誘導後減弱し、28 日目の dADSCs では未発現となった。上皮系および HPCs マーカーの CD90 は、nADSCs から 28 日目の dADSCs まで絶えず発現していた。HPCs および胆管上皮マーカーの CK7 は nADSCs と 0 日目 dADSCs で強い発現が認められたが、分化誘導後減少した。CK7 と同じ HPCs および胆管上皮マーカーの CK19 は、nADSCs から 28 日目の dADSCs まで絶えず未発現だった (Figure 5)。

考察

cHCC はイヌの全腫瘍のうち 1%以下の頻度で認められるが、肝臓原発腫瘍の中では約 50%を占める (Patnaik *et al.*, 1981)。獣医学領域では、Cogliati B らが cHCC 症例で CK19、CD44、CD133 の発現を報告したが、これらマーカーの有用性は裏付けられておらず、他の HCC 特異的マーカーと成りうる癌幹細胞 (CSCs) や 肝幹細胞 (HSCs) そして肝前駆細胞 (HPCs) の抗原も調べられていない (Cogliati *et al.*, 2010)。

一方、ヒトの医療分野では容易に HPCs を同定可能で、免疫組織または細胞化学染色で検出可能なマーカーとして、CD13、CD44、CD90、CD133、EpCAM、そして OV6 などが挙げられる (Liu *et al.*, 2011)。さらに、ヒトの HPCs に相当するラットのオーバル細胞では、従来造血幹とマーカー考えられている CD34、c-kit、flt-3、そして CD90 等が発現していると報告されている (Alison, M. R. 2005)。

本章では、まず、HSCs マーカーとなりうる細胞表面抗原を想定するために、cHCC 株化細胞および健常犬由来肝細胞を用いて、フローサイトメトリーで解析を行った結果、CD133、Dlk-1、そして CD44 が 4 株の cHCC 細胞株全てで発現していた。

CD133 は元々造血幹細胞の細胞表面抗原として同定された。ヒトでは、この抗原は造血幹細胞、HSCs および HPCs のマーカーとしてだけでなく、CSCs マーカーとしても一般的に認識されている。さらに、Suetsugu らや Yin らは、CD133 陽性細胞が *in vivo* と *in vitro* どちらにおいても高い腫瘍形成能を有することを明らかにした (Suetsugu *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2007)。その一方で、Cogliati B らは CD133 発現をいくつかの HCC 症例で調べた結果、たった 2 症例 (15.8%) でのみ CD133 が発現していたと報告している (Cogliati *et al.*, 2010)。彼らは CD133 発現を免疫組織化学染色で検出しているため、抗原に対する交差性の感度はフローサイトメトリーよりも低

い可能性が考えられる。

ヒトでは、Dlk-1 は EGF 様蛋白を分泌する膜蛋白で、最近 HSCs および HPCs のマーカーとして新しく認識されるようになった (Nishina *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012; Tanimizu *et al.*, 2003)。本研究では、Dlk-1 は全細胞株で発現していた。この抗原は、胎児 HSCs および HPCs に発現しており、新生胎児や成体の齧歯類の成熟肝細胞には発現していない。さらに、Yanai らは、免疫組織化学染色で肝細胞癌 386 症例を調べた結果、Dlk-1 が 79 症例 (20.5%) で発現していたと報告している (Yanai *et al.*, 2010)。これらの結果から、Dlk-1 は HSCs および HPCs、そして cHCC 中の癌細胞のマーカーとして有用であることが示唆された。

膜輸送蛋白の多糖蛋白である CD44 は、cHCC 4 株全てで発現していた。この結果はイヌの HCC を調べた結果と一致していることから、CD44 陽性細胞は HSCs および HPCs でも発現している可能性がある。CD44 は小型で幼若な肝細胞である成人肝臓内の HPCs に特異的に発現する。しかし、CD44 は発現量の程度は違うが他の細胞でも広く発現しているため、CD44 のみで HSCs および HPCs を同定するのは困難である。Zheng らが HCC 中の CD133⁺CD44⁺細胞集団中に高い割合で CSCs または癌前駆細胞 (CPCs) が含まれていたと報告しているように、複数の抗原発現の組み合わせにより HSCs および HPCs を同定する方法が良いと考えられる (Zheng *et al.*, 2010)。

CD29 は β インテグリンとも呼ばれ、細胞表面接着受容体であり、細胞と細胞外基質または細胞同士を接着する。CD29 は細胞外の環境からの生化学的シグナルを伝達し、特に成長、分化、侵襲、さらに悪性腫瘍細胞の転移に関与している。Suzuki らは、マウス胎児の肝臓で、CD49f と CD29 が発現している細胞集団がコロニーを形成する細胞へと分化し、肝細胞と胆管細胞になった、と報告している (Suzuki *et al.*, 2000)。このことは、これらのマーカーが HSCs マーカーである可能性を示唆している。本研

究では、4株中3株でCD29が発現していたことから、肝臓癌の細胞表面マーカーであると推測された。実際に、肝臓摘出で得た組織を用いて免疫染色にてCD29発現を調べた結果、再生中の肝臓組織中でCD29が発現していたことを確認している（データなし）。

CD90は、1株でのみ発現がみられ、CD34はすべての株で発現が認められなかった。これら2つのマーカーはこれまでヒトの肝癌細胞にて発現が認められたとしているが（Yamashita *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2008; Varma *et al.*, 2004; Saad *et al.*, 2004）、イヌの肝細胞株での発現は比較的弱いもしくは非発現である可能性が考えられた。以上の結果から、HSCs/HPCsマーカーの候補としてCD133、Dlk-1、CD44およびCD29が有力であると考えられ、CD90およびCD34は未発現および弱い発現である可能性が示唆された。しかし、CD90については健常イヌから分化誘導した肝細胞様コロニーにて発現が認められたとする報告もあり、今後慎重な検討が必要であるものと思われた（Arends *et al.*, 2009）。

以上の結果から、CD29、CD44、CD133そしてDlk-1の4つの抗原が、イヌHSCsおよびHPCsの特異的マーカーである可能性が示唆された。

次に、分化誘導前のイヌADSCsの細胞表面抗原解析を行った結果、本研究で用いたイヌADSCsは、CD29、CD44、CD90、Dlk-1が強発現し、CD11b、CD14、CD34、CD45、CD73、CD105、CD133、CK18、CK19が未発現の細胞集団であることが示された。

ヒトの脂肪組織由来間質細胞は、多能性を有する幹細胞を含有し、その発現抗原として、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD133が陽性で、CD11b、CD14、CD34、CD45などが陰性の細胞集団であるとの報告が多くなされている。しかし、抗原の発現は動物種によって異なり、さらに脂肪組織から分離後 *in vitro* にて培養する

ことによっても、発現抗原が変化する可能性が示唆されている。

本研究の解析結果では、イヌ ADSCs は、ヒト ADSCs の発現パターンとは異なり、陽性とされる CD34、CD73、CD105 が陰性であった。この結果はこれまで報告されているイヌ ADSCs の発現抗原解析結果と一致していた (Kang *et al.* 2008; Oh *et al.* 2011; Takemitsu *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2013.)。

しかし、今回研究に用いたイヌ ADSCs は、一回凍結保存して再融解し、2~3 代目にフローサイトメトリー解析したため、細胞表面抗原の発現が変化した可能性も除外できない。Yoshimura らは、ヒト脂肪組織由来細胞の大半が CD34⁺細胞で、その多くは CD34⁺、CD45⁻、CD90⁺、CD105⁻であり、接着培養すると新鮮時には発現がなかった CD105 の発現が新たに見られるようになり、その一方で培養を続けると CD34 の発現は徐々に減少し、DMEM で培養していると約 2 週間で CD34 の発現がなくなる、と報告している (Yoshimura *et al.*, 2006)。また、ADSCs は培養方法によりその表現型を大きく変えることもわかっている (Cao *et al.*, 2005)。

Dlk-1 抗体のイヌに対する交差性を調べるため、ウェスタンブロット法を用いて、目的とする分子量におけるバンドの検出を試みた結果、確認は不可能だった。抗体には、一次構造を認識するものと立体構造を認識するものがあり、立体構造を認識するモノクローナル抗体の場合、変性剤 (尿素や塩酸グアニジンなど) や還元剤 (DTT や 2-ME など) の存在下で抗原の立体構造が変化すると、抗原を認識できなくなることがある。このことから、本研究で使用した Dlk-1 抗体がフローサイト用のモノクローナル抗体であったため、ウェスタンブロットを行う際の処理により立体構造が破壊され、抗原を認識できず、バンドが検出されなかった、と推測された。ちなみに、製造会社に問い合わせたところ、本抗体のロットを用いたウェスタンブロットの報告は確認できなかった。また、Dlk-1 は脂肪幹細胞にも発現しており (Mitterberger *et al.*, 2012)、同じ Dlk-1 抗体を用いて脂肪幹細胞を含む間質細胞集団をフローサイトで解析した結

果、発現が認められたことから、この抗体の交差性は問題ないと思われた。

分化誘導細胞における表面抗原解析では、Dlk-1、CD29 および CD34 に対する抗体を用いて実施した。Dlk-1 は、前述したように、HSCs および HPCs のみならず脂肪組織にも発現していることが知られており、分化誘導に従い発現が減弱したものと想定された。さらに CD29 については、その発現が増加した。我々は、以前肝切除を行った犬において CD29 の発現が増加することを確認しており、肝細胞系への分化誘導が行われたことが確認された。脂肪由来の間質細胞に発現していた CD34 は、分化に伴いその発現が次第に減弱した。

分化誘導を実施したイヌ ADSCs を用いて定性的 RT-PCR 解析を行った結果、肝細胞マーカーの Albumin と CK18、糖新生マーカーの PEPCK、薬物代謝酵素の CYP1A1、CYP3A12 が、nADSCs から 28 日目の dADSCs まで絶えず発現しており、特に nADSCs で発現が非常に微弱だった CYP3A12 は、分化誘導 7 から 28 日目にかけて増強していた。CK18 は、通常 CK8 と同時に発現し、ほとんど単層腺上皮に存在し、成熟肝細胞マーカーとしてだけでなく、HSCs にも発現していると考えられている。さらに PEPCK (ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ) は糖新生に必須の酵素で、肝細胞の細胞質ゾルで、オキサロ酢酸をホスホエノールピルビン酸 (PEP) に変換する。イヌの薬物代謝酵素はいくつか解析されているが、本研究では CYP1A1 と CYP3A12 の遺伝子発現を解析した。造血幹細胞および多能性幹細胞マーカーの CD34 は、nADSCs で発現が最も強かったが、分化誘導後減弱し 28 日目の dADSCs では未発現となった。このことから、多能性を有する細胞から肝細胞系細胞へと変化したと推測された。上皮系および HPCs マーカーの CD90 は、nADSCs から dADSCs および HLCs まで絶えず発現していた。以上の結果から、未分化な多分化能を有する nADSCs が肝細胞の機能を有する細胞へと変化したことが示唆された。HPCs および胆管上皮マーカーの CK7 は nADSCs と 0 日目 dADSCs で強い発現が認められたが、分化誘導後減

少しした。Boomkens らは、初めて樹立したイヌ HCC 株化細胞の性状解析を行い、ヒトの HCC と非常によく似た性状を有していることを確認し、さらに免疫染色により細胞質内に CD7 蛋白の発現が認められたと報告している (Boomkens *et al.*, 2004)。このことは、イヌ cHCC と似た性状を有すると考えられる HSCs や HPCs でも、CD7 蛋白が発現していると推測することができる。つまり、イヌ ADSCs で CD7 mRNA が発現していたことから、イヌ ADSCs がもともと HSCs や HPCs に近い性状を有している可能性が考えられた。

CK7 と同じ HPCs および胆管上皮マーカーの CK19 は、nADSCs から 28 日目の dADSCs まで絶えず未発現だった。CK7 も CK19 も同じ胆管細胞マーカーではあるが、肝細胞の分化誘導段階で全く同様の動態を示すわけではなく、各分化誘導段階で発現が変化すると考えられる。また、CK19 の発現は動物種によって違いがあるため、イヌでは、HSCs から肝細胞への分化誘導時に必ずしも発現しているとは言えない。さらに、培養初期の nADSCs でも、Albumin 以外の肝細胞または肝芽細胞/肝前駆細胞マーカーの CD90、HGF、PEPCK、CK7、CK18、CYP1A1 および CYP3A12 が発現していたことから、イヌ ADSCs が培養開始後、非常に早い時期に肝細胞様の機能を獲得することも示唆された。この結果を裏付けるように、Zemel らは、幼若なヒト ADSCs でもすでに分化誘導前の段階で、肝葉系細胞マーカーのみならず肝臓発生初期に発現する α -fetoprotein や CK18、CK19、HNF4 の mRNA の発現や、主に成人肝臓中で発現している Albumin、G-6-P、AAT、 α -1-antitrypsin などの肝細胞の基本的な機能を有していたと報告している (Zemel *et al.*, 2009)。

以上の結果から、分化誘導されたイヌ HLCs が形質転換したことが示唆された。分化誘導細胞を臨床応用する際には前駆細胞を作製し、その細胞集団を輸注することが最も有効な手段の一つと考えられている。したがって、本研究で作成された細胞は今後肝臓の自家移植療法において活用できるかもしれない。

小括

4つの cHCC 細胞株と成熟肝細胞における細胞表面抗原の発現解析をフローサイトメトリーで行った結果、CD29、CD44、CD133 そして Dlk-1 の発現が認められ、これら抗原がイヌの HSCs または HPCs のマーカーである可能性が示唆された。

さらに、イヌ ADSCs を本研究の方法で分化誘導したところ、Dlk-1 蛋白は分化誘導初期において強陽性であったが、次第に発現が減弱した。さらに、定性的 RT-PCR 解析の結果、Albumin、CK18、PEPCK、CYP1A1、CYP3A12、CD90 は、nADSCs から 28 日目の dADSCs まで絶えず発現していた。特に CYP3A12 は、分化誘導 7 から 28 日目の dADSCs にかけて発現増強した。CK7 と CD34 は、分化誘導後から 28 日目にかけて減少した。CK19 は nADSCs から 28 日目の dADSCs まで絶えず未発現であった。

以上の結果から、イヌ ADSCs が形質転換したことが示唆された。

第3章 イヌ HLCs の機能解析

はじめに

肝臓は生体内で、様々な物質の同化および異化に関して中心的に働いており、主に肝細胞がその機能を担っている。特に重要な機能としては、蛋白の合成、糖質の代謝、脂質の代謝、尿素の生成、薬物および毒物の代謝が挙げられる。本研究では、これまで ADSCs から HLCs を分化誘導したが、これを肝臓への自家移植療法に活用できるか否か、その可能性を判断するためには、HLCs が肝臓に特異的な機能を有するか評価する必要がある。本章では、肝細胞の主要な機能のうち、脂質代謝能と薬物代謝能について検討し、分化誘導して得た HLCs の肝細胞への分化度を推測した。

材料と方法

低比重リポタンパク質 (LDL) の代謝能

臨床上健常なビーグル犬 2 頭から得た ADSCs を用いて分化誘導を行い、0、7、14、21 および 28 日目の dADSCs を解析に用いた。古い培地を除去し、1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI-Ac-LDL; Biochemical Technologies Inc., Stoughton, MA, U.S.A.) を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加した HGM に交換して、37°C で 4 時間インキュベートした。その後 PBS で 3 回洗浄し、4% PFA 添加 PBS で 4°C 30 分間固定後、再度 PBS で 3 回洗浄した。核を DAPI 染色し (Invitrogen, Grand Island, NY, U.S.A.)、細胞内に取り込まれた DiI-Ac-LDL が代謝されることで生じる蛍光赤色色素 DiI の有無を蛍光顕微鏡下にて評価した。

チトクローム P450 (CYP450) 活性

薬物代謝酵素であるチトクローム P450 (CYP450) の活性を 7-pentoxoresorufin O-dealkylation (PROD) assay で評価した。臨床上健常なビーグル犬 2 頭から得た ADSCs を用いて分化誘導を行い、0、7、14、21 および 28 日目の dADSCs を解析に用いた。古い培地を除去し、Pentoxoresorufin (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) を 20 μM になるように添加した HGM に交換して、37°C で 4 時間インキュベートした。その後 PBS で 3 回洗浄し、4% PFA 添加 PBS で 4°C 30 分間固定後、再度 PBS で 3 回洗浄した。核を DAPI 染色し (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)、細胞内に取り込まれた Pentoxoresorufin が CYP450 によって代謝され生じる蛍光赤色色素 Resorufin の有無を蛍光顕微鏡下にて評価した。

結果

低比重リポタンパク質 (LDL) の代謝能

分化誘導開始 0 日目の dADSCs では細胞内に蛍光赤色色素は認められなかった。しかし、7 日目にすでに肝細胞様となった dADSCs では、細胞内に蛍光赤色色素が認められ、その後分化誘導 14、21 および 28 日目の dADSCs でも同様に蛍光赤色色素が認められた (Figure 7)。また、陽性対象である健常犬新鮮肝細胞でも蛍光赤色色素が観察された (データなし)。なお、いずれも DiI-ac-LDL を加えなかった場合には、赤色蛍光色素は認められなかった (データなし)。

チトクローム P450 (CYP450) 活性

分化誘導開始時の 0 日目 ADSCs では細胞内に蛍光赤色色素は認められなかったが、分化誘導開始から 7 日目には認められるようになり、その後、14、21、28 日でも同様に認められた (Figure 8)。また、陽性対象である健常犬新鮮肝細胞でも蛍光赤色色素が観察された (データなし)。なお、いずれも Pentoxifyresorufin を加えなかった場合、蛍光赤色色素は認められなかった (データなし)。

考察

本研究では、イヌ ADSCs から肝細胞分化誘導培地により分化誘導した HLCs における脂質代謝能と薬物代謝能の有無を *in vitro* で検討した。

まず、脂質代謝能の検討のため、低比重リポタンパク質 (LDL) 代謝能を解析した。

リポタンパク質の一種である LDL は、肝細胞に取り込まれて異化されることが知られている (Mahley *et al.*, 1999)。食物から摂取される脂肪は大部分がトリアシルグリセロールである。トリアシルグリセロールは小腸内腔で胆汁酸の働きによりミセルを形成し、小腸上皮細胞に吸収される。吸収されたトリアシルグリセロールはタンパク質等と共にカイロミクロンを形成し、リンパ管に入り循環血液中に移行して、肝臓へ運搬される。カイロミクロンは肝臓で代謝を受け、超低比重リポタンパク質 (VLDL) として放出される。VLDL は末梢組織、特に筋肉等にトリアシルグリセロールを供給するため、トリアシルグリセロールを徐々に喪失する。これにより VLDL は中間比重リポタンパク質 (IDL) となり、さらにトリアシルグリセロールを喪失すると LDL となる。LDL はコレステロールを多く含むリポタンパク質で、LDL 受容体を介してエンドサイトーシスで肝細胞および末梢組織に取り込まれ、リソソーム内で破壊される。酸化された LDL は LDL 受容体への結合能を失うが、これは主にマクロファージに貪食されて異化される。

DiI-Ac-LDL は、1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate を標識したアセチル化した LDL であり、肝細胞の膜上にある LDL 受容体を介して細胞内に取り込まれる。DiI-Ac-LDL がリソソーム内の酵素によって代謝を受けると、蛍光赤色色素である DiI が遊離され、細胞内膜に蓄積される。DiI-Ac-LDL を添加し、短時間培養を行った細胞が蛍光を示すことは、すなわち LDL を取り込み、

代謝する能力があることを示す。

本研究では、ADSCs 由来 HLCs は、培養 7 日目にすでに LDL の取り込みが常に認められ、28 日目まで維持し続けることを確認した。この結果から、ADSCs から分化誘導した HLCs は LDL 代謝能を有していることが示唆された。同様の方法を用いて、マカク属のサルの卵胞顆粒層細胞や、マウス及びヒトの多能性幹細胞、ヒトの骨髄由来間葉系幹細胞、ヒトの臍帯血由来間葉系幹細胞、ヒトの脂肪組織中の間葉系幹細胞などから誘導された HLCs が、LDL を取り込み代謝する能力があることが証明されている (Brannian *et al.*, 1992; Hong *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004; Schwartz *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2005)。

次に、Pentoxeresorufin 代謝能の解析を行い、イヌ HLCs の薬物代謝能獲得の有無を評価した。

チトクローム P450 は小胞体中の電子伝達系の末端の酸化酵素であり、エポキシ化、過酸化、脱硫黄化、脱アルキル化、脱アミノ化、脱ハロゲン化などの幅広い反応に関与している。チトクローム P450 の反応は特に肝臓のミクロソーム分画で活性が高く、複数の分子種として存在している。ビーグル犬は CYP1A、CYP2B、CYP2E、CYP3A を有することが報告されている (Graham *et al.*, 2002)。イヌの CYP2B11 はラットの CYP2B1 と類似しており、肝ミクロソームに含まれている (Graham *et al.*, 2002)。CYP2B の分析には PROD (7-pentoxeresorufin-O-dealkylation) 活性が利用されている。O-脱アルキル化は薬物代謝の型のうち、酸化に分類される。O-アルキル化合物は肝ミクロソームで NADPH および酸素によりアルキル基が切れて、フェノールとなる。非蛍光性化合物 Pentoxeresorufin は CYP により O-脱アルキル化され、蛍光性化合物 Resorufin に変化し蛍光を発する。この蛍光強度は PROD 活性の程度で変化する。

本研究の結果、イヌ ADSCs より分化誘導した HLCs は、*in vitro* において Pentoxeresorufin 代謝能を有している可能性が示唆された。分化誘導 0 日目には蛍光

赤色色素が認められなかったが、7日目から28日目まで絶えず細胞に赤色色素が認められた。

Pentoxiresorufin の O-脱アルキル化の触媒は、マウスでは CYP2B9, CYP2B10, CYP2B13, ラットでは CYP2B1/2, ヒトでは CYP2B6 というチトクローム P450 の分子種によることが確認されている (Schwartz *et al*, 2002)。しかしながら、イヌにおける Pentoxiresorufin 代謝がどのチトクローム P450 の分子種によるものかは不明のままである。詳細を調べるには、他の薬物代謝酵素活性化物質を添加したり、遺伝子発現を検討する必要があるものと考えられた。

以上より、本分化誘導方法で培養されたイヌ ADSCs は、培養 28 日目には肝細胞としての機能を有する可能性が強く示唆された。しかしながら、イヌ ADSCs の性状は未だ完全に解明されていない。今後、ADSCs および HLCs において、肝細胞が果たす多様な機能に関する解析を検討することによって、性状を明らかにする必要がある。また、将来 ADSCs から分化誘導して得た HLCs を用いた細胞治療が、イヌの慢性肝疾患の新たな治療法として確立されるためには、*in vivo* における有効期間、投与時の最適細胞濃度、投与経路、副作用などについて、詳細に検討される必要がある。

小括

本研究の分化誘導方法で培養したイヌ ADSCs が、肝細胞の有する機能を獲得しているかどうかを調べるため、*in vitro* で脂質代謝能と薬物代謝能の有無を解析した。

その結果、分化誘導開始 0 日目の dADSCs では、LDL 代謝能と Pentoxiresorufin 代謝能は共に認められなかったが、分化誘導開始 7 日目には認められるようになり、その後、14、21、28 日目とも持続的に認められた。また、陽性対象である健常犬新鮮肝細胞でも LDL 代謝能と Pentoxiresorufin 代謝能が観察された。

以上の結果から、本研究の分化誘導方法で得たイヌ HLCs が、肝細胞の機能の一部を獲得したことが示された。

総括

イヌの慢性難治性肝疾患に対する新しい治療方法として、多能性を持つ自己の脂肪組織由来間質細胞を用いた肝再生医療の確立を目的とし、一連の研究を行った。

第1章では、ADSCs から肝細胞様細胞へと分化させるための培養方法の検討を行った。HGF、EGF、bFGF、OSM そして DMSO を添加した HGM でイヌ ADSCs を培養することにより、*in vitro* で HLCs へと分化誘導可能であることが示唆された。HLCs は多角の形態と明瞭な円形核を有していた。さらに肝細胞特異的マーカーである Albumin の mRNA 発現は、有意差は認められなかったものの時系列に増加し、Albumin 蛋白も発現増強していた。以上の結果から、本研究の分化誘導方法で、イヌ ADSCs から HLCs へ分化誘導可能であることが示唆された。

第2章では、まず、肝細胞分化を理解する上で必要な肝臓幹細胞の性状を明らかにするため、cHCC から樹立された4つの株化細胞を用いて、フローサイトメトリーで細胞表面抗原解析を行った。その結果、CD44、Dlk-1、CD133 が4株全てで発現しており、CD29 が3株で発現していた。このことから、CD44、Dlk-1、CD133、CD29 がイヌの癌幹細胞マーカーであるだけでなく、HSCs および HPCs のマーカーである可能性が示唆された。

次に、分化誘導前のイヌ ADSCs が多能性を有する間葉系細胞集団であることを確かめるため、発現抗原をフローサイトメトリー解析した。その結果、イヌ ADSCs は、CD29、CD44、CD90、そして Dlk-1 が陽性で、CD11b、CD14、CD34、CD45、CD73、CD105、CD133、そして CK18 が未発現の細胞集団であることが示された。これらの結果は、今まで報告されているイヌ ADSCs の性状解析結果と一致したことから、イヌ ADSCs が間葉系細胞集団であることが示された。

最後に、分化誘導を実施したイヌ ADSCs を用いて、細胞表面抗原解析と定性的

RT-PCR 解析を行った。フローサイトメトリー解析の結果、イヌ HSCs および HPCs のマーカーであると推測される Dlk-1 蛋白の発現量は分化につれて減少し、造血幹細胞および多能性幹細胞マーカーである CD34 の発現は減少した。また、定性的 RT-PCR 解析を行った結果、CYP3A12 の mRNA 発現が分化誘導することにより増加した。一方、多能性幹細胞マーカーである CD34 の mRNA は発現が減弱した。

以上の結果から、イヌ ADSCs が間葉系細胞の性質を喪失し別の系譜の細胞へ形質転換したことが考えられた。さらに、培養初期の nADSCs で、Albumin 以外の肝細胞または肝芽細胞/肝前駆細胞マーカーの CD90, PEPCK, CK7, CK18, CYP1A1, CYP3A12 が発現していたことから、イヌ ADSCs が培養開始後、非常に早い時期に肝細胞様機能を獲得することも示唆された。

第 3 章では、ADSCs 由来 HLCs が肝細胞特異的な機能を有するか調べるために、脂質代謝能と薬物代謝能の評価を行った。その結果、分化誘導開始 0 日目の ADSCs では脂質代謝能と薬物代謝能のどちらも認められなかったが、7 日目には認められるようになり、その機能を 28 日まで維持していた。このことから、本研究の分化誘導方法で培養することで、ADSCs が成熟肝細胞と同じ機能を少なくとも 2 つ保持する細胞集団へと分化誘導できていることが示された。

本研究により、脂肪組織由来間質細胞が、*in vitro* において肝細胞の機能を有する細胞へと分化誘導可能であることが示唆された。

ADSCs または ADSCs 由来 HLCs を用いた治療方法が、実際にイヌの難治性慢性肝疾患の新たな治療法として確立されるには、肝臓の持つ様々な機構の保持状況を調べるとともに、肝障害モデル動物に移植し、*in vivo* において長期にわたる治療の有効性や有効期間、副作用や移植細胞の腫瘍化の有無について詳細な評価が望まれる。また、イヌの ADSCs 自体の詳細な性状と機能の解析と、肝細胞の発生機序解明も重要な課題である。最終的には、自然発生例の肝線維症症例における移植治療効果についても

検討する必要がある。

本研究で得られた成果は、イヌの発生学に新しい知見をもたらし、獣医療の肝臓再生医療の確立に貢献するものと考えられた。

謝辞

本研究は、麻布大学獣医学部獣医学科内科学第二研究室教授 土屋亮博士、同研究室准教授 久末正晴博士、同研究室助教 根尾櫻子博士、同大学附属動物病院小動物臨床研究室助教 川原井晋平博士、同大学生命・環境科学部臨床検査技術学科病理学研究室講師 荻原喜久美博士にご指導を仰ぎ、ならびに内科学第二研究室大学院生学部生諸氏の助力のもと遂行することができた。

また、同大学獣医学部獣医学科第一外科学研究室准教授 藤井洋子博士、同研究室助教 青木卓磨博士、同研究室大学院生 砂原央氏のご厚意により、肝臓組織の供与を賜った。また同大学附属動物病院より画像診断機器の貸与を賜った。さらに日本全薬(株)にリコンビナントネコ HGF の供与を賜った。

本稿は同大学獣医学部獣医学科内科学第二研究室教授 土屋亮博士、同研究室准教授 久末正晴博士、同学部動物応用科学科動物工学研究室教授 滝沢達也博士に懇切な論文校閲を賜った。

稿を終えるにあたり、諸先生方、大学院生ならびに学生諸氏さらに貴重な検体を提供してくれたイヌ達に深く感謝致します。

参考文献

Alison, M. R. 2005. Liver stem cells: implications for hepatocarcinogenesis. *Stem. Cell. Rev.* 1: 253-60.

Allen, L., Stobie, D., Mauldin, G.N. and Baer, K.E. 1999. Clinicopathologic features of dogs with hepatic microvascular dysplasia with and without portosystemic shunts. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214: 218-20.

Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Quinn, G., Okochi, H. and Ochiya, T. 2007. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 46: 219-28.

Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Osaki, M., Kawamata, M., Kato, T., Okochi, H. and Ochiya, T. 2008. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells* 26: 2705-12.

Blacking, T. M., Waterfall, M. and Argyle, D. J. 2011. CD44 is associated with proliferation, rather than a specific cancer stem cell population, in cultured canine cancer cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 141: 46-57. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.02.004. Epub 2011 Feb 12.

Boomkens, S.Y., Spee, B., Ijzer, J., Kisjes, R., Egberink, H. F., van den Ingh, T. S.,

Rothuizen, J. and Penning, L. C. 2004. The establishment and characterization of the first canine hepatocellular carcinoma cell line, which resembles human oncogenic expression patterns. *Comp. Hepatol.* 26: 3(1): 9.

Brannian, J. D., Shiigi, S. M. and Stouffer, R. L. 1992. Gonadotropin surge increases fluorescent-tagged low-density lipoprotein uptake by macaque granulosa cells from preovulatory follicles. *Biol. Reprod.* 47: 355-60.

Cao, Y., Sun, Z., Liao, L., Meng, Y., Han, Q. and Zhao, R.C. 2005. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332: 370-9.

Cogliati, B., Aloia, T. P., Bosch, R. V., Alves, V. A., Hernandez-Blazquez, F. J. and Dagli, M.L. 2010. Identification of hepatic stem/progenitor cells in canine hepatocellular and cholangiocellular carcinoma. *Vet. Comp. Oncol.* 8: 112-21.

DiPersio, C. M., Jackson, D. A. and Zaret, K. S. 1991. The extracellular matrix coordinately modulates liver transcription factors and hepatocyte morphology. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4405.

DeUgarte, D.A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Zhu, M., Dragoo, J.L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J. and Hedrick, M.H. 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone

marrow. *Cells, Tissues, Organs* 174: 101-9.

D'Ippolito, G., Schiller, P.C., Ricordi, C., Roos, B.A. and Howard, G.A. 1999. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J. Bone. Miner. Res.* 14: 1115-22.

Graham, R. A., Downey, A., Mudra, D., Krueger, L., Carroll, K., Chengelis, C., Madan, A. and Parkinson, A. 2002. In vivo and in vitro induction of cytochrome P450 enzymes in beagle dogs. *Drug. Merab. Dispos.* 30: 1206-1213.

Gronthos, S., Franklin, D.M., Leddy, H.A., Robey, P.G., Storms, R.W. and Gimble, J.M., 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 189: 54-63.

Hägglund, H. G., McSweeney, P. A., Mathioudakis, G., Bruno, B., Georges, G. E., Gass, M. J., Moore, P., Sale, G. E., Storb, R. and Nash, R. A. 2000. Ex vivo expansion of canine dendritic cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *Transplantation.* 70: 1437-42.

Hamilton, G. A., Jolley, S. L., Gilbert, D., Coon, D. J., Barros, S. and LeCluyse, E. L. 2001. Regulation of cell morphology and cytochrome P450 expression in human hepatocytes by extracellular matrix and cell-cell interactions. *Cell. Tissue. Res.* 306: 85-99.

Hong, S.H., Gang, E. J., Jeong, J. A., Ahn, C., Hwang, S. H., Yang, I. H., Park, H. K., Han, H. and Kim, H. 2005. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 1153-61.

Kang, J. W., Kang, K. S., Koo, H. C., Park, J. R., Choi, E. W. and Park, Y. H. 2008. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 17: 681-93.

Kato, K., Uchida, K., Nibe, K. and Tateyama, S. 2007. Immunohistochemical studies on cytokeratin 8 and 18 expressions in canine cutaneous adnexus and their tumors. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 233-9.

Kawarai, S., Hashizaki, K., Kitao, S., Nagano, S., Madarame, H., Neo, S., Ishikawa, T., Furuichi, M., Hisasue, M., Tsuchiya, R., Tsujimoto, H. and Yamada, T. 2006. Establishment and characterization of primary canine hepatocellular carcinoma cell lines producing alpha-fetoprotein. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113: 30-6.

Kim, S. H., Kim, J. H. and Akaike, T. 2003. Regulation of cell adhesion signaling by synthetic glycopolymer matrix in primary cultured hepatocyte. *FEBS. Lett.* 553: 433-9.

Lamerato-Kozicki, A. R., Helm, K. M., Jubala, C. M., Cutter, G. C. and Modiano, J. F. 2006. Canine hemangiosarcoma originates from hematopoietic precursors with

potential for endothelial differentiation. *Exp. Hematol.* 34: 870-8.

Lee, K. D., Kuo, T. K., Whang-Peng, J., Chung, Y. F., Lin, C. T., Chou, S. H., Chen, J. R., Chen, Y.P. and Lee, O. K. 2004. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 40: 1275-84.

Liu, L. L., Fu, D., Ma, Y. and Shen, X. Z. 2011. The power and the promise of liver cancer stem cell makers. *Stem. Cells. Dev.* 20: 2023-30.

Mahley, R.W. and Ji, Z.S. 1999. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Lipid. Res.* 40: 1-16.

Mitterberger, M. C., Lechner, S., Mattesich, M., Kaiser, A., Probst, D., Wenger, N., Pierer, G. and Zwerschke, W. 2012. DLK1(PREF1) is a negative regulator of adipogenesis in CD105⁺/CD90⁺/CD34⁺/CD31⁻/FABP4⁻ adipose-derived stromal cells from subcutaneous abdominal fat pads of adult women. *Stem Cell Res.* 9: 35-48. doi: 10.1016/j.scr.2012.04.001.

Miyake, M., Yaguchi, T., Saze, K., Wang, J., Ogawa, T., Endo, Y., Suzuta, Y., Okazaki, M., Haga, Y., Waki, T., Takahashi, S, Y., Yamamoto, Y. and Iwabuchi, S. 2004. Isolation and expression of five-amino-acid-deleted variant of feline hepatocyte growth factor (HGF) cDNA. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 9-14.

Miyazaki, M., Akiyama, I., Sakaguchi, M., Nakashima, E., Okada, M., Kataoka, K. and Huh, N.H. 2002. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298: 24-30.

Neo, S., Ishikawa, T., Ogiwara, K., Kansaku, N., Nakamura, M., Watanabe, M., Hisasue, M., Tsuchiya, R. and Yamada, T. 2009. Canine bone marrow cells differentiate into hepatocyte-like cells and placental hydrolysate is a potential inducer. *Res. Vet. Sci.* 87: 1-6.

Nishina, H. 2012. hDlk-1: a cell surface marker common to normal hepatic stem/progenitor cells and carcinomas. *J. Biochem.* 152: 121-3.

Oh, H. J., Park, J. E., Kim, M. J., Hong, S. G., Ra, J. C., Jo, J. Y., Kang, S. K., Jang, G. and Lee, B. C. 2010. Recloned dogs derived from adipose stem cells of a transgenic cloned beagle. *Theriogenology* 75: 1221-31. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.035.

Patnaik, A. K., Hurvitz, A. I., Lieberman, P. H. and Johnson, G.F. 1981. Canine hepatocellular carcinoma. *Vet. Pathol.* 18: 427-38.

Rutgers, H.C., Haywood, S. and Kelly, D.F. 1993. Idiopathic hepatic fibrosis in 15 dogs. *Vet. Rec.* 133: 115-8.

Saad, R. S., Luckasevic, T. M., Noga, C. M., Johnson, D. R., Silverman, J. F. and

Liu, Y. L. 2004. Diagnostic value of HepPar1, pCEA, CD10, and CD34 expression in separating hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma in fine-needle aspiration cytology. *Diagn. Cytopathol.* 30: 1-6.

Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.S. and Verfaillie, C.M. 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* 109: 1291-302.

Seo, M.J., Suh, S.Y., Bae, Y.C., and Jung, J.S, 2005. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328: 258-64.

Sgodda, M., Auricha, H., Kleista, S., Auricha, I., König, S., Dollinger, M.M., Fleiga, W.E. and Christ, B. 2007. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Exp. Cell. Res.* 313: 2875-86.

Stock, P., Staeger, M.S., Müller, L.P., Sgodda, M., Völker, A., Volkmer, I., Lützkendorf, J. and Christ, B. 2008. Hepatocytes derived from adult stem cells. *Transplant. Proc.* 40: 620-3.

Suetsugu, A., Osawa, Y., Nagaki, M., Moriwaki, H., Saji, S., Bouvet, M. and Hoffman, R. M. 2010. Simultaneous color-coded imaging to distinguish cancer

"stem-like" and non-stem cells in the same tumor. *J. Cell. Biochem.* 111: 1035-41.

Suzuki, A., Zheng, Y., Kondo, R., Kusakabe, M., Takada, Y., Fukao, K., Nakauchi, H. and Taniguchi H. 2000. Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 32: 1230-9.

Takemitsu, H., Zhao, D., Yamamoto, I., Harada, Y., Michishita, M. and Arai, T. 2012. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC. Vet. Res.* 8:150. doi: 10.1186/1746-6148-8-150.

Taléns-Visconti, R., Bonora, A., Jover, R., Mirabet, V., Carbonell, F., Castell, J.V. and Gómez-Lechón, M.J. 2006. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World. J. Gastroenterol.* 12: 5834-45.

Tanimizu, N., Nishikawa, M., Saito, H., Tsujimura, T. and Miyajima A. 2003. Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J. Cell. Sci.* 116: 1775-86.

Varma, V. and Cohen, C. 2004. Immunohistochemical and molecular markers in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Adv. Anat. Pathol.* 11: 239-49.

Watson, P.J. 2004. Chronic hepatitis in dogs: a review of current understanding of the aetiology, progression, and treatment. *Vet. J.* 167: 228-41.

Xu, X., Liu, R. F., Zhang, X., Huang, L. Y., Chen, F., Fei, Q. L. and Han, Z. G. 2012. DLK1 as a Potential Target against Cancer Stem/Progenitor Cells of Hepatocellular Carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* 11: 629-38.

Yamamoto, Y., Banas, A., Murata, S., Ishikawa, M., Lim, C.R., Teratani, T., Hatada, I., Matsubara, K., Kato, T. and Ochiya, T. 2008. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS. J.* 275: 1260-73.

Yamashita, T., Honda, M., Nakamoto, Y., Baba, M., Nio, K., Hara, Y., Zeng, S. S., Kondo, T. H., Takatori, H., Yamashita, T., Mizukoshi, E., Ikeda, H., Zen, Y., Takamura, H., Wang, X. W. and Kaneko, S. 2012. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 23. doi 10.

Yanai, H., Nakamura, K., Hijioka, S., Kamei, A., Ikari, T., Ishikawa, Y., Shinozaki, E., Mizunuma, N., Hatake, K. and Miyajima, A. 2010. Dlk-1, a cell surface antigen on foetal hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency. *J. Biochem.* 148: 85-92.

Yang, Z. F., Ho, D. W., Ng, M. N., Lau, C. K., Yu, W. C., Ngai, P., Chu, P. W., Lam, C. T., Poon, R. T. and Fan, S. T. 2008. Significance of CD90+ Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. *Cancer Cell* 13: 153-66.

Yin, S., Li, J., Hu, C., Chen, X., Yao, M., Yan, M., Jiang, G., Ge, C., Xie, H., Wan, D., Yang, S., Zheng, S. and Gu, J. 2007. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int. J. Cancer*. 120: 1444-50.

Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., Sato, K., Inoue, K., Nagase, T., Koshima, I. and Gonda, K. 2006. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell. Physiol.* 208: 64-76.

Zemel, R., Bachmetov, L., Ad-El, D., Abraham, A. and Tur-Kaspa, R. 2009. Expression of liver-specific markers in naive adipose-derived mesenchymal stem cells. *Liver. Int.* 29: 1326-37.

Zhang, N., Dietrich, M. A. and Lopez, M. J. 2013. Canine Intra-Articular Multipotent Stromal Cells (MSC) From Adipose Tissue Have the Highest In Vitro Expansion Rates, Multipotentiality, and MSC Immunophenotypes. *Vet. Surg.* 42: 137-46. doi: 10.1111/j.1532-950X.2013.01091.x.

Zhu, Z., Hao, X., Yan, M., Yao, M., Ge, C., Gu, J. and Li, J. 2010. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer*. 126: 2067-78.

図表

Table 1	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	ADSCs 増殖培地の組成表
Table 2	・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	HGM の組成表
Table 3	・・・・・・・・・・・・・・・・	mRNA 発現の定性解析に用いた各プライマーの配列、 PCR 産物のサイズ、PCR 条件
Table 4	・・・・・・・・・・・・・・・・	cHCC 細胞株とイヌ成熟肝細胞の細胞表面抗原発現
Table 5	・・・・・・・・・・・・・・・・	イヌ ADSCs における細胞表面抗原発現
Table 6	・・・・・・・・	分化誘導を行ったイヌ dADSCs における細胞表面抗原解析
Fig. 1	・・・・・・・・・・・・・・・・	イヌ ADSCs から肝細胞への分化誘導方法
Fig. 2	・・・・・・・・・・・・・・・・	イヌの ADSCs および HLCs の細胞形態
Fig. 3	・・・・・・・・・・・・・・・・	イヌの ADSCs および HLCs の Albumin mRNA 発現
Fig. 4	・・・・・・・・・・・・・・・・	イヌの ADSCs および HLCs の Albumin 蛋白発現

Fig. 5 分化誘導を行ったイヌ ADSCs の Albumin 以外の mRNA 発現

Fig. 6 cHCC 株化細胞 4 株の細胞形態

Fig. 7 分化誘導を行ったイヌ ADSCs の LDL 代謝能

Fig. 8 分化誘導を行ったイヌ ADSCs の Pentoxeresorufin 代謝能

Table 1. ADSCs 増殖培地の組成表 (pH7.0)

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)-low glucose	10g/l	Gibco Brl, Tokyo, Japan
NaHCO ₃	3.7g/l	※
Penicillin Streptomycin(P/S)	5000U (?), 50mg(S)/l	※
L-glutamin	2mmol/l	ICN Biochemicals INC, OH, USA
fetal bovine serum	100ml/l	NICHIREI BIOSCIENCES INC

※は Gibco Brl, Tokyo, Japan を示す。

Table 2. HGM の組成表 (pH7.2)

Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose	10g/l	Gibco Brl, Tokyo, Japan; 31600
bovine serum albumin(BSA)	2g/l	Sigma Aldrich Co, MO, USA
Glucose	1g/l 追加 (最終濃度; 2g/l)	※
Galactose	2.0g/l	※
Ornithine	0.1g/l	※
Proline	0.030g/l	※
Glutamine	0.730g/l 追加(最終濃度; 5.0mM)	※
Nicotinamide	0.610g/l	※
ZnCl ₂	0.544mg/l	※
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.750mg/l	※
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.20mg/l	※
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.0327mg/l	※
ITS	10mM/l	Gibco Brl, Tokyo, Japan
< insulin >	1.0g/l	*
< sodium selenite >	0.67mg/l	*
< transferrin >	0.55g/l	*
< sodium pyruvate >	11.0g/l	*
Dexamethazone	0.1μM	※
NaHCO ₃	3.7g/l	※
Hepes	10mM	Nakarai Tesque, INC, Kyoto, Japan
Penicillin Streptomycin(P/S)	5000U(P), 50mg(S)/l	※
L-glutamin	2mmol/l	*

※は Sigma Aldrich Co, MO, USA を示し、*は Gibco Brl, Tokyo, Japan を示す。

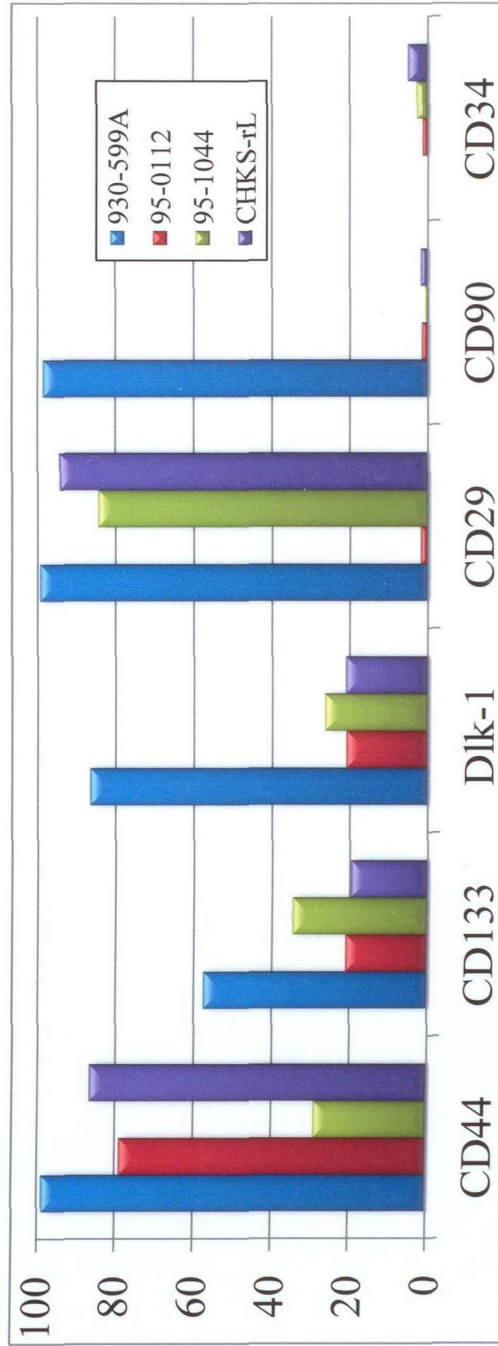
Table 3. mRNA発現の定性解析に用いた各プライマーの配列、PCR産物のサイズ、PCR条件

Gene	Accession number	Sequence 5'→3'	product size	Amplification conditions of qualitativePCR
Albumin	NM_001003026	F: gtt cct ggg cac gtt ttt gta tga	278bp	4min at 95°C, followed by 40cycles at 95°C for 1min,
		R: ctt ggg gfg ctt tet tgg tgt aac		60°C for 1min, 72°C for 10min at 72°C.
PEPCK	AY115495	F: tgc cat ggc cgc tgt gta cc	473bp	4min at 95°C, followed by 35cycles at 94°C for 1min,
		R: tgg ttc ggc cca gca tgc ag		63°C for 1min, 72°C for 1min and 10min at 72°C.
CD34	DQ202370	F: tga gac ctc cag ctg tga	550bp	4min at 95°C, followed by 36cycles at 94°C for 1min,
		R: cag gtg ttg tct tgc tga atg g		60°C for 1min, 72°C for 90sec and 10min at 72°C.
CD90	XM_546483	F: cag cat gac ccg gga gaa aaa g	134bp	4min at 95°C, followed by 35cycles at 94°C for 1min,
		R: tgg tgg tga agc cgg ata agt aga		63°C for 1min, 72°C for 1min and 10min at 72°C.
CK7	XM_534795	F: gcg tgg gag ccg tga aca tc	109bp	5min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 20sec,
		R: ccg ccg ccg ctg gag aa		55°C for 30sec and 30sec at 60°C.
CK18	XM_534794	F: ttg ct acct acc gtc gcc tgt tgg	109bp	5min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 20sec,
		R: atc ttg cgg gfg gtc ttc tgg		63.5°C for 30sec and 30sec at 60°C.
CK19	EU107521	F: gcc cag ctg agc gat gfg c	89bp	5min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 20sec,
		R: tgc tcc agc cgt gac ttg atg t		63.8°C for 30sec and 30sec at 60°C.
CYP1A1	AACN010067442	F: ccc tct ggc aca cta aat tcc a	90bp	5min at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 15sec,
		R: gaa gfg cat cgg tga gac cat		60°C for 1min.
CYP3A12	X54915	F: gga ctt cct ttt gtt ctt caa gaa a	84bp	5min at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 15sec,
		R: cct aca tga gfg aaa cca cat aat caa		60°C for 1min.
β-actin	AF021873	F: ttc gcc atg gat gac gat atc g	143bp	4min at 94°C, followed by 36cycles at 94°C for 30sec,
		R: ccc acc atc acg ccc tgg		62°C for 30sec, 72°C for 1min and 1min at 72°C.

Table 4. cHCC 細胞株とイヌ成熟肝細胞の細胞表面抗原発現

	930-599A	95-0112	95-1044	CHKS-rL	肝細胞
Dlk-1	86.50	20.90	26.43	21.17	3.01±0.021
CD29	99.30	1.88	84.43	94.30	2.46±0.0249
CD34	0.13	1.36	2.81	5.04	2.66±0.0196
CD44	98.87	78.90	29.07	86.63	7.75±0.0926
CD90	98.57	1.62	0.67	1.79	2.16±0.0174
CD133	57.53	20.97	34.67	19.70	4.00±0.0388

陽性率 (%)



肝細胞は解析を3回行い、平均±SD(%)で示した。

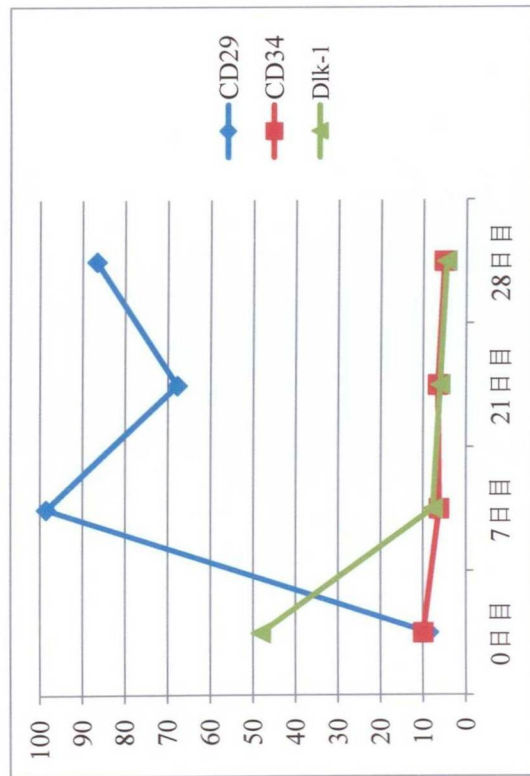
Table 5. イヌ ADSCs における細胞表面抗原発現

抗原	陽性細胞率 (%)
CD11b	7.25±0.0252
CD14	4.87±0.0240
CD29	98.05±0.0297
CD34	6.62±0.0118
CD44	99.97±0.0005
CD45	4.26±0.0070
CD73	0.26±0.0029
CD90	93.30±0.0533
CD105	2.16±0.0167
CD133	3.86±0.0130
Dlk-1	74.28±0.2581
CK18	9.24±0.0541

平均±標準偏差 (SD) (n=6)を示した。

Table 6. 分化誘導を行ったイヌ dADSCs における細胞表面抗原解析

1 検体目	陽性率 (%)			
	CD29	CD34	Dlk-1	
0 日目	8.62	9.96	48.2	
7 日目	98.6	6.29	7.74	
21 日目	67.8	6.59	6.09	
28 日目	86.7	5.16	4.66	



2 検体目	陽性率 (%)			
	CD29	CD34	Dlk-1	
0 日目	75.1	7.24	31.4	
7 日目	98.6	6.28	8.56	
21 日目	96	3.33	3.9	
28 日目	83.7	5.6	6.86	

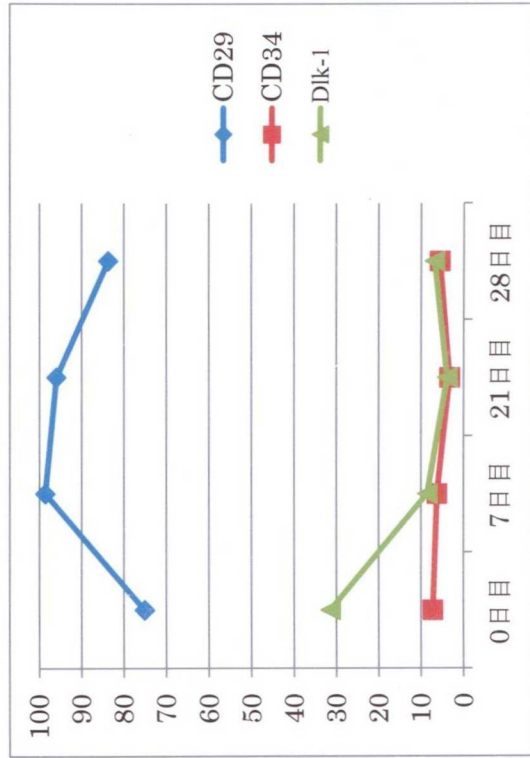


Figure 1. イヌADSCsから肝細胞への分化誘導方法

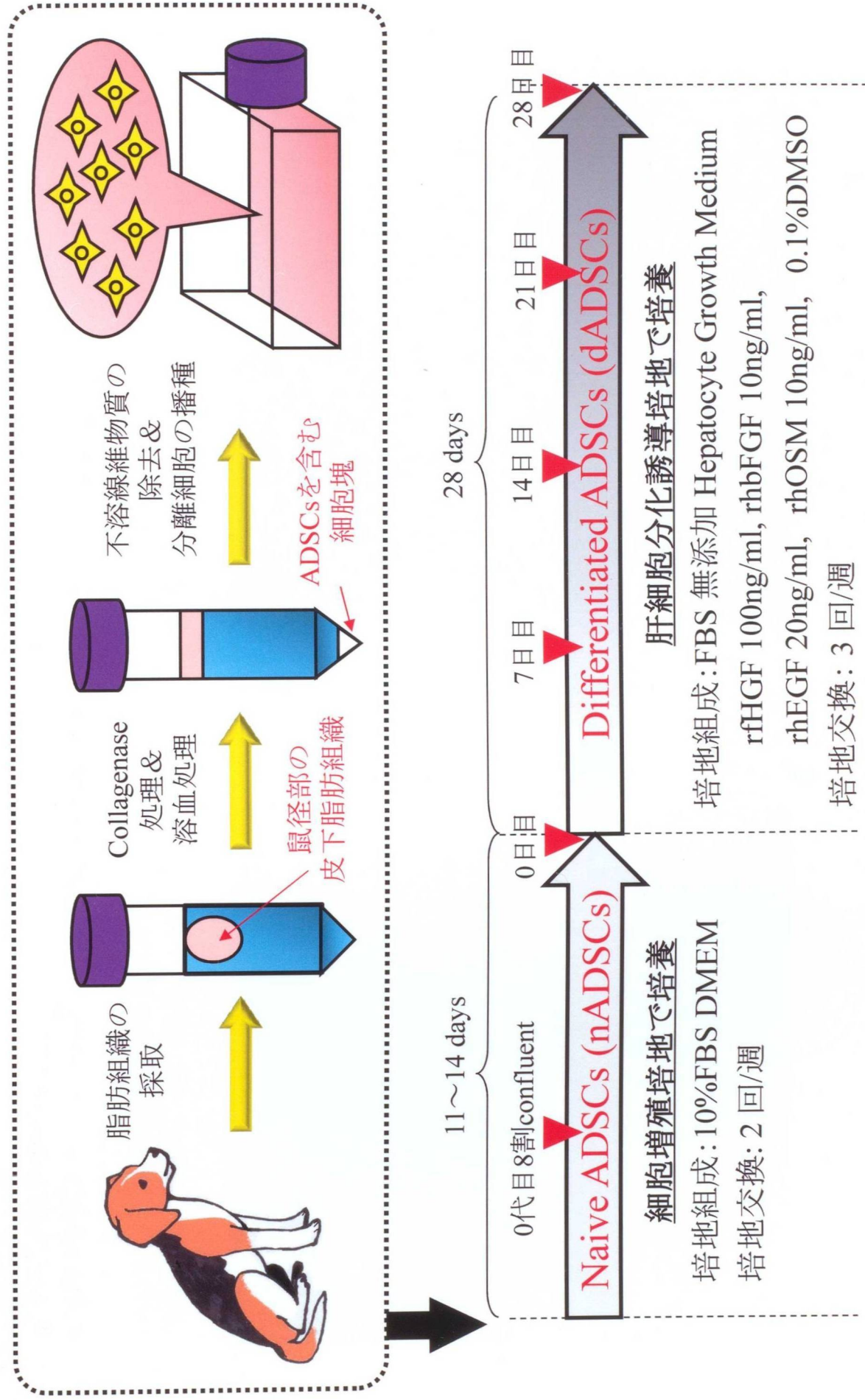


Figure 2. イヌのADSCsおよびHLCsの細胞形態

a. 細胞増殖培地で培養したnADSCs

b. 分化誘導開始0日目目のdADSCs

c. 分化誘導28日目目のdADSCs

nADSCsおよび分化誘導0日目目のdADSCsは線維芽細胞様であった。
分化誘導開始後7、14、21および28日目目のdADSCsは肝細胞様細胞 (HLCs) として認められた。

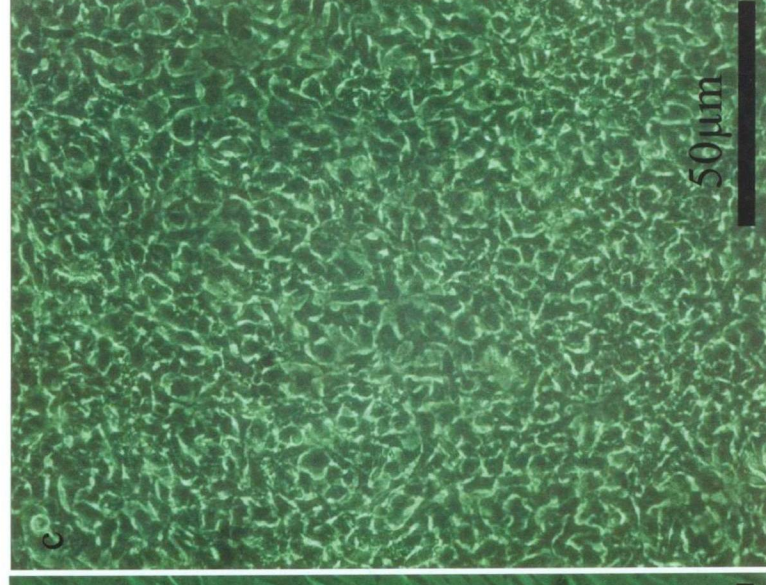
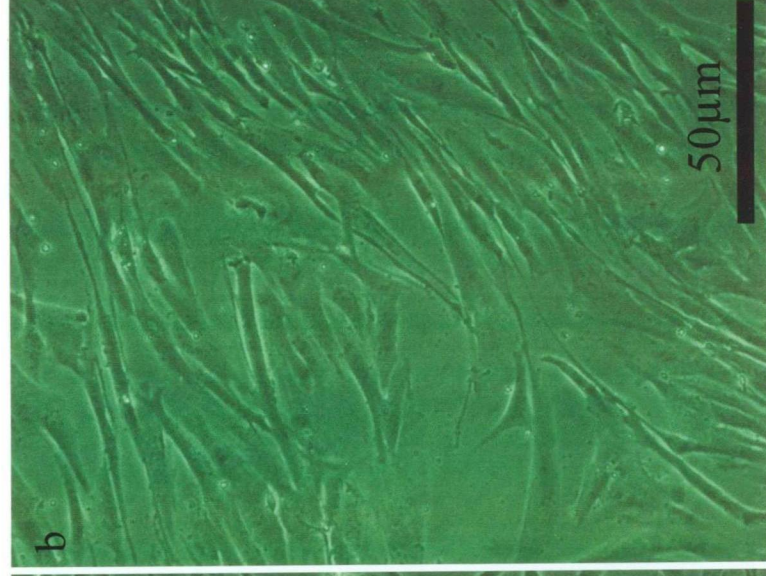
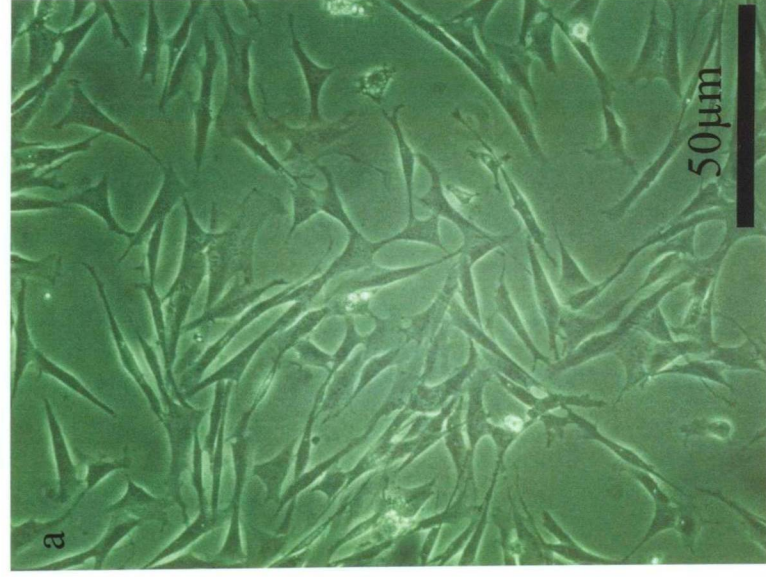


Figure 3. イヌのADSCsおよびHLCsのAlbumin mRNA発現

各評価日の平均±SE (n=4)を示した。Albumin mRNA発現はnADSCsでも認められ、分化誘導後経時的に増加した。しかしMann-Whitney testで統計解析を行った結果、有意差は認められなかった(全て $P>0.12$)。

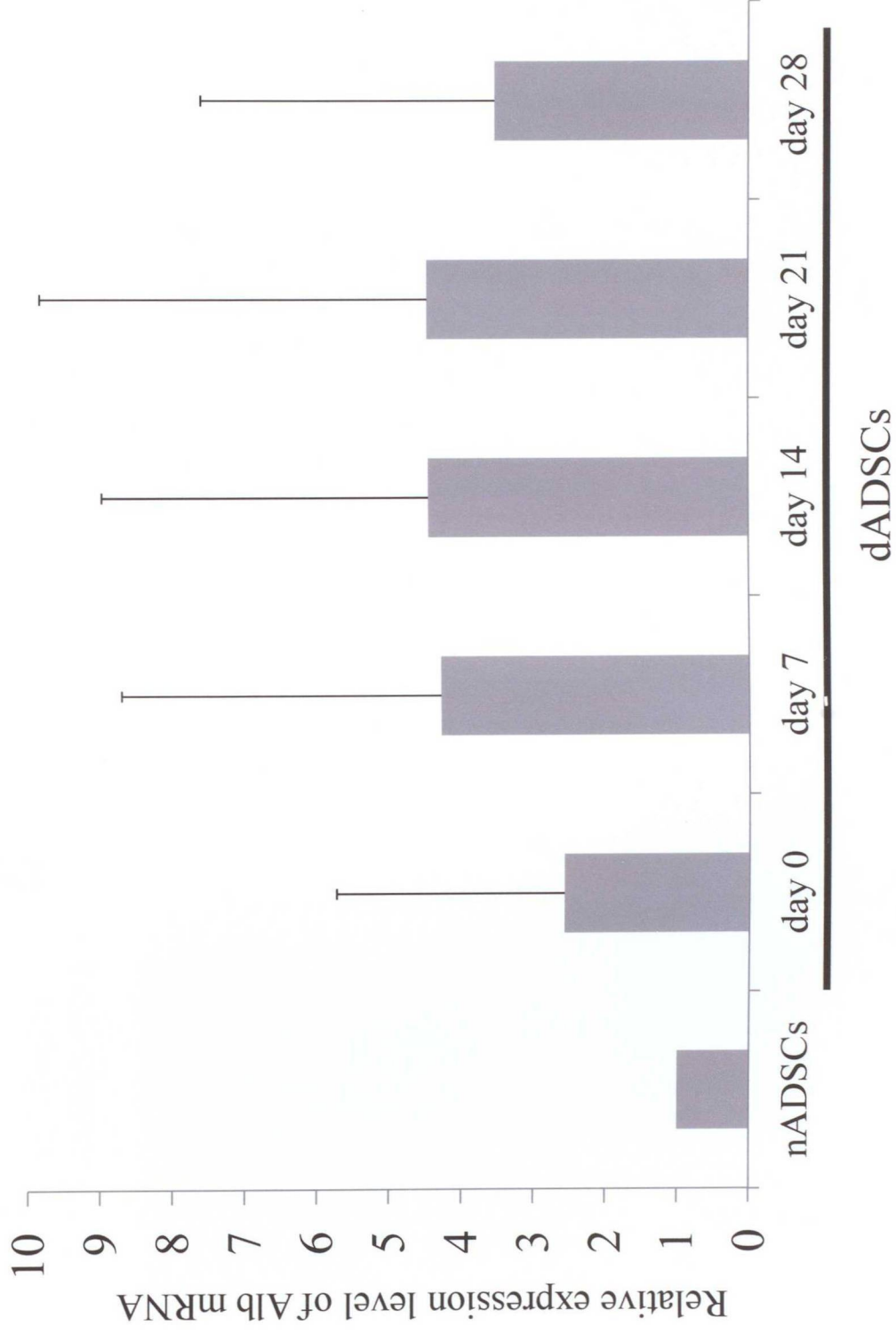


Figure 4. イヌのADSCsおよびHLCsのAlbumin蛋白発現

a. 細胞増殖培地で培養したnADSCs

b. 分化誘導開始0日目のdADSCs

c. 分化誘導28日目のdADSCs

Albumin蛋白はnADSCsでは陰性、0日目のdADSCsで陰性から弱陽性だった。
28日目のdADSCsでは陽性細胞の割合が最多となった。

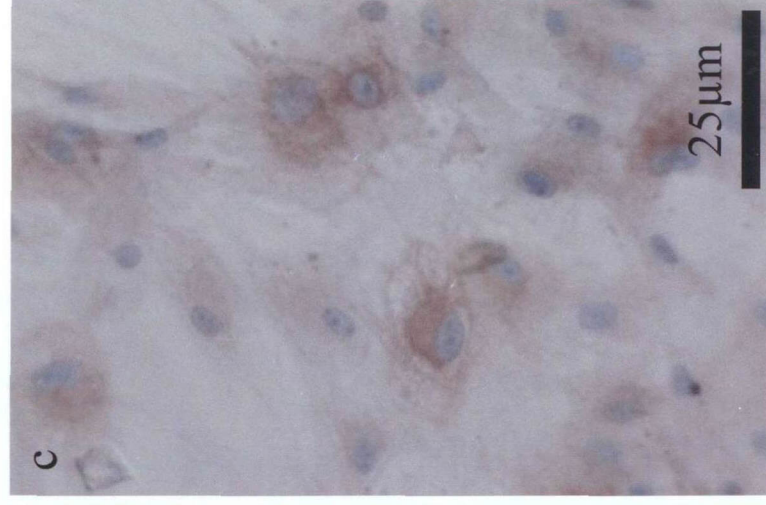
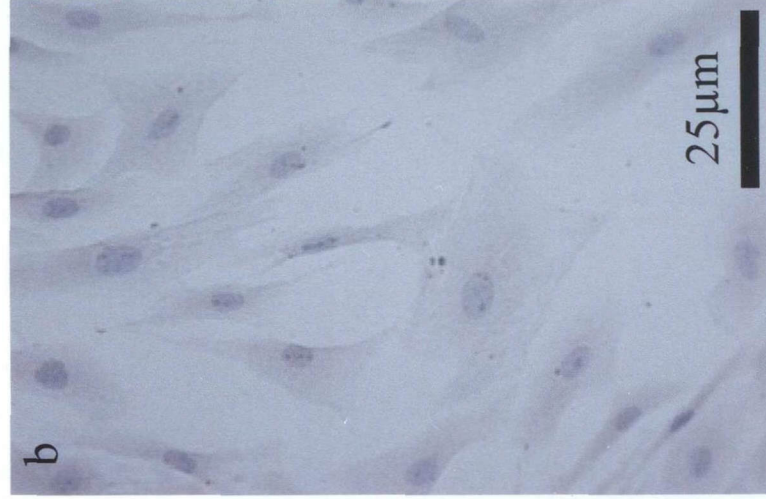
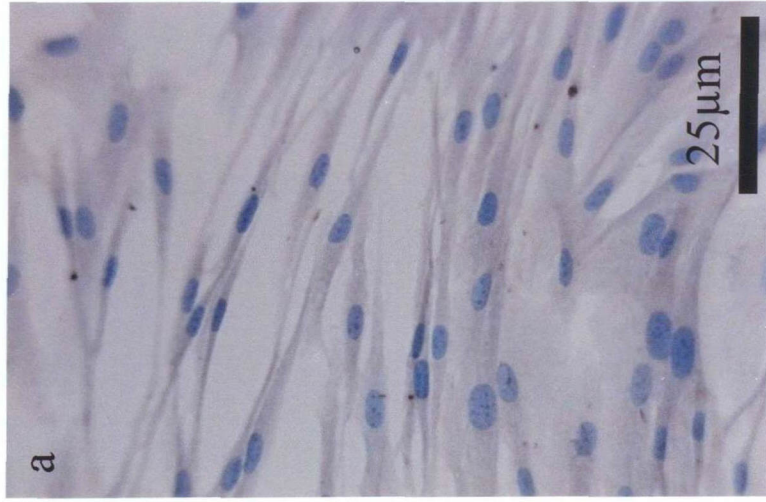


Figure 6. cHCC株化細胞4株の細胞形態
a. 930-599A b. 95-0112 c. 95-1044

d. CHKS-rL

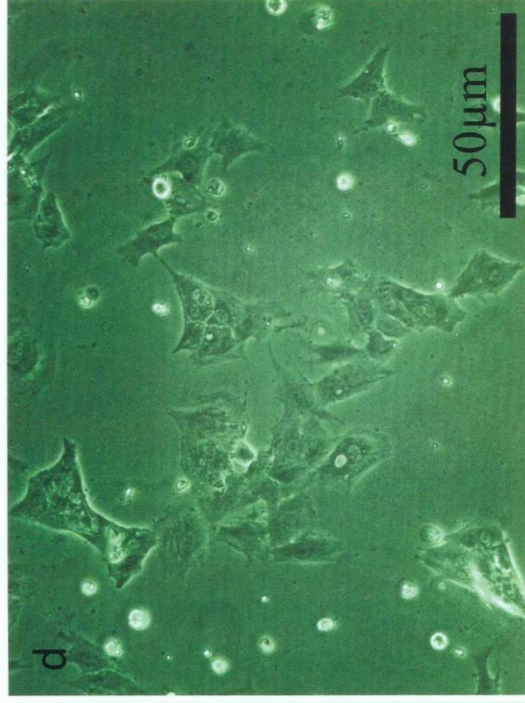
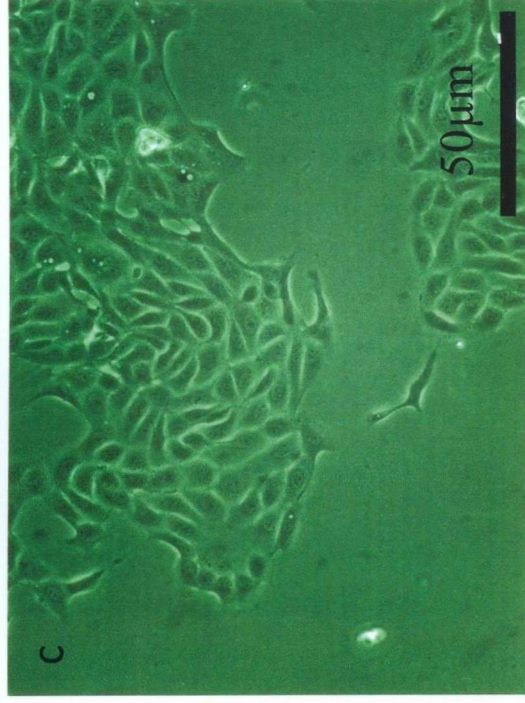
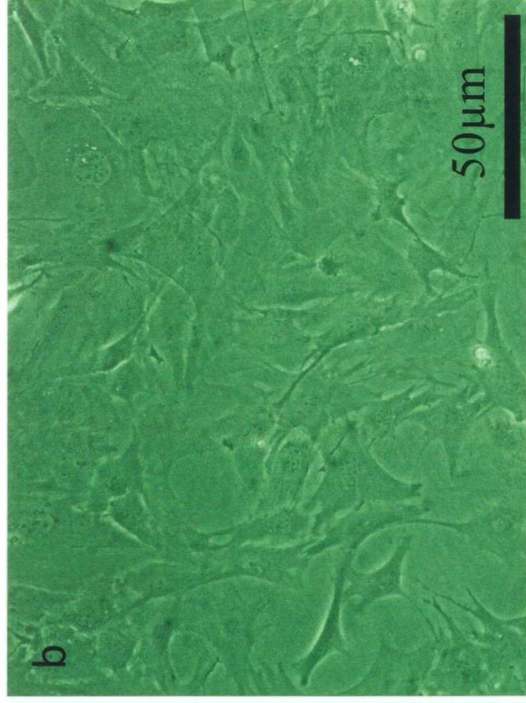
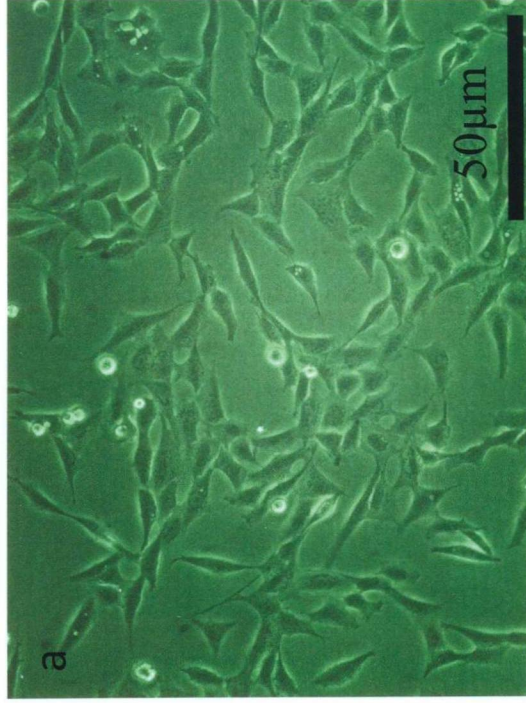


Figure 7. 分化誘導を行ったイヌdADSCsのLDL代謝能

a. 分化誘導開始0日目のdADSCs

b. 分化誘導28日目のdADSCs

本研究の方法により分化誘導を実施した結果、分化誘導開始0日目には認められなかった蛍光赤色素が、分化誘導開始7日目には細胞中に認められるようになり、28日まで同様に認められた。

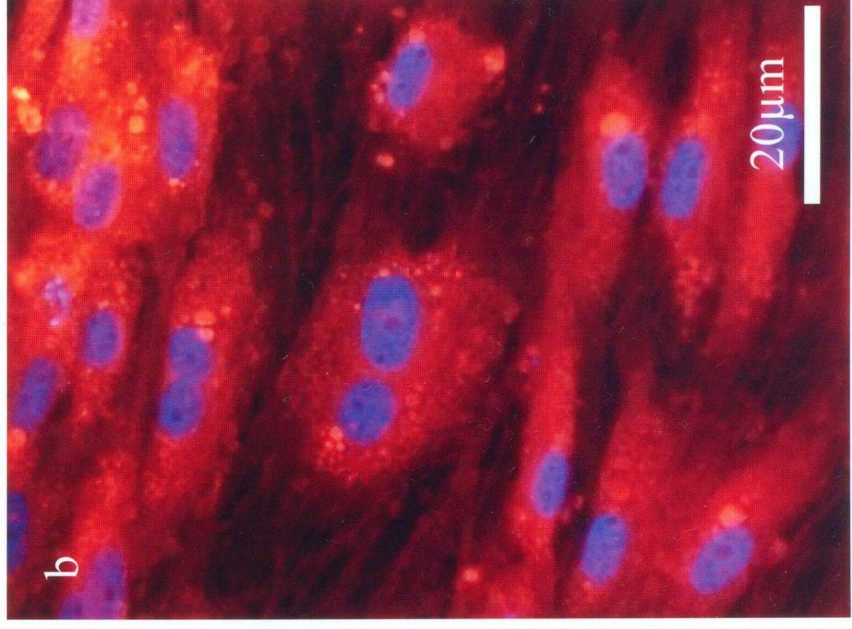
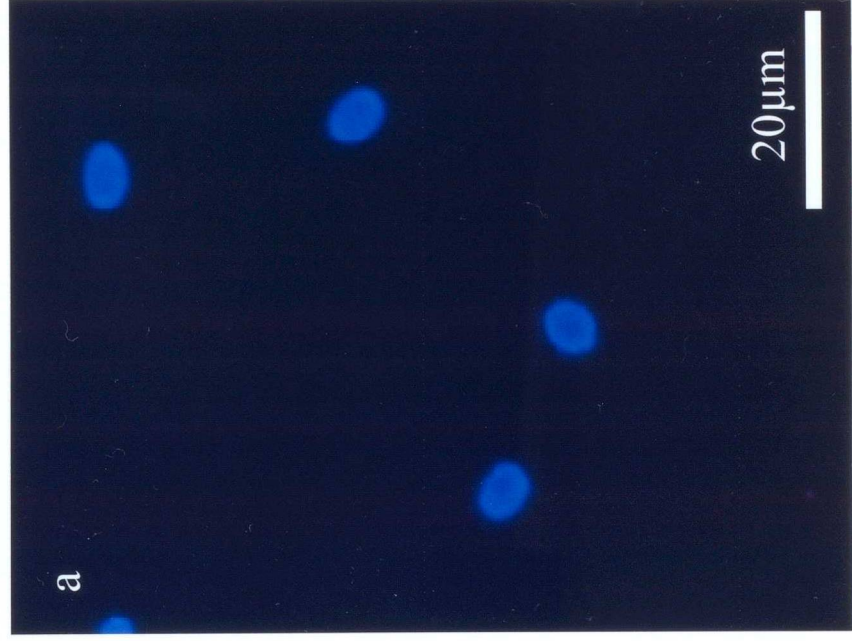


Figure 8. 分化誘導を行ったイヌdADSCsのPentoxylresorufin代謝能

a. 分化誘導開始0日目のdADSCs

b. 分化誘導28日目のdADSCs

本研究の方法により分化誘導を実施した結果、分化誘導開始0日目には細胞内に蛍光赤色素素は認められなかった。分化誘導を開始し、培養7日目には蛍光赤色素素が認められるようになり、28日まで同様に認められた。

