

氏名(本籍)	藤本 あゆみ(福岡県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第132号
学位授与年月日	平成25年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 土屋 亮 (副査) 滝沢 達也 久末 正晴

論文内容の要旨

イヌでは肝炎、肝線維症、胆管炎などに起因する難治性の慢性肝疾患が多く認められる。現在小動物臨床においては、これら疾患に対し内科的治療や外科的処置が行われているが、病態が慢性化し肝機能が低下した状態では治療不応性であることが多く、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、肝硬変に対する根治的治療として臓器移植が挙げられるが、移植臓器とレシピエントとの拒絶反応や、長期の免疫抑制療法が必要であること、臓器提供者不足といった問題をはらんでいる。獣医療に至っては、ドナーの確保のみならず、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、移植医療は積極的には行われていない。

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。幹細胞は、自己複製能と多分化能を持ち、体性幹細胞、人工多能性幹細胞(iPS細胞)及び胚性幹細胞(ES細胞)が含まれる。体性幹細胞は、iPS細胞やES細胞とは異なり、腫瘍形成や拒絶反応だけでなく、倫理的問題も回避可能であり、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。そのため、入手しやすい骨髄や脂肪は小動物臨床において有用な幹細胞源であると考えられる。

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したことを報告した。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、継続的な細胞の確保も困難であると考えられる。また、牛胎仔血清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常異種蛋白が混入する可能性があった。さらに、ラエンネックは組成がロット毎に異なるため、分化誘導成功率が約半分と低い結果が得られている。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100~1,000倍多い。さらに、ADSCsは脂肪組織採取時の侵襲性が比較的低い分分離しやすく、培養増幅や凍結保存が可能であることから、骨髄細胞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ものの、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ADSCsを用い、肝細胞の機能を有する細胞へと分化誘導することとした。

第一章では、ADSCsから肝細胞へと分化誘導する培養方法を検討した。臨床的に健康なビーグル犬4頭から、麻酔下で鼠径部皮下脂肪組織を採取し、ADSCsを分離培養した後、HGF、EGF、Oncostatin MおよびDimethyl sulfoxideを添加した無血清の肝細胞分化誘導培地で28日間培養を行った。肝細胞へ分化誘導したことを証明するために、0代目8割confluent時の培養初期のnaïve ADSCs (nADSCs) と分化誘導開始から0, 7, 14, 21および28日目の分化誘導ADSCs (dADSCs) を用いて、定量的RT-PCRによるAlbumin mRNAの発現解析と、免疫染色によるAlbumin蛋白の検出を試みた。その結果、nADSCsと分化誘導0日目のdADSCsはどちらも線維芽細胞様であったが、7~28日目では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。Albumin mRNAはnADSCs時にも発現しており、分化誘導後発現が増強した。しかしnADSCsと0~28日目のdADSCsで有意差は認められなかった。Albumin蛋白はnADSCsで陰性、0日目のdADSCsで陰性または弱陽性であったが、分化誘導後徐々に発現が増強し、28日目には陽性細胞の割合が最多となった。

第二章では、得られたHLCsがどの発生段階の肝細胞と類似しているか調べるため、性状解析を行った。

まず、肝幹細胞 (HSCs) または前駆細胞 (HPCs) と同様の性状を示すと考えられるイヌ肝細胞癌 (cHCC) 株化細胞を用いて、イヌのHSCsおよびHPCsの特異的マーカーの探索を試みた。イヌ肝細胞癌 (cHCC) 細胞株4株 (930-599A, 95-0112, 95-1044, CHKS-rL) と、健常犬3頭から採取した成熟肝細胞を用いて、ヒトHSCsおよびHPCsのマーカーである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。その結果、CD44, Dlk-1そしてCD133が4株のcHCC細胞全てで発現していた。CD29は95-0112以外の3株で発現が認められ、CD90は930-599Aの1株でのみ高発現し、CD34は4株全てで未発現だった。コントロールの肝細胞は全抗原未発現であった。以上の結果から、CD29, CD44, CD133およびDlk-1がイヌHSCsまたはHPCsのマーカーであると推測された。

次に、イヌADSCsが間葉系細胞集団であることを確かめるため、ADSCsの細胞表面抗原発現をフローサイトメトリーにて解析した。イヌADSCs 6検体を用いて、CD11b、CD14、CD29、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105、CD133、Dlk-1、CK18の発現解析を行ったところ、CD29、CD44、CD90、Dlk-1が高発現していたのに対し、CD11b、CD14、CD34、CD45、CD73、CD105、CD133そしてCK18が未発現であった。以上の結果から、イヌADSCsが間葉系細胞集団であることが示された。

最後に、分化誘導を行ったイヌdADSCsの性状を調べるため、フローサイトメトリー解析と定性的RT-PCR解析を行った。フローサイトメトリーによりDlk-1、CD29、CD34の発現を解析した結果、Dlk-1は分化誘導0日目には発現が認められたが、7、21および28日目にかけて未発現であった。CD29は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は0日目から28日目まで絶えず未発現であった。さらに、定性的RT-PCR解析の結果、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とCYP3A12、上皮系およびHPCsマーカーのCD90、胆管上皮およびHPCsマーカーのCK7とCK19、造血幹細胞および多能性幹細胞マーカーのCD34のmRNA発現を定性的RT-PCRで解析した結果、Albumin、CK18、PEPCK、CYP1A1、CYP3A12、CD90、CK7がnADSCsから28日目のdADSCsまで絶えず発現していた。特に、nADSCsで非常に微弱だったCYP3A12発現は分化誘導後増加し、28日目で最大となった。CD34はnADSCsで発現が最も強かったが、分化誘導後減弱し28日目で未発現となった。CK19はnADSCsから28日目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。

第三章では、イヌHLCsの機能を調べるため、脂質代謝能と薬物代謝能を解析した。まず、脂質代謝能を調べるため、0、7、14、21そして28日目のdADSCsをDil標識アセチルLDL (Dil-Ac-LDL) 添加分化誘導培地でインキュベートした後、細胞中に取り込まれた赤色蛍光色素の有無を評価した。その結果、赤色蛍光色素は0日目のdADSCsでは認められなかったが、分化誘導7～28日目のdADSCsでは常に認められた。次に、薬物代謝能を調べるため、0、7、14、21そして28日目のdADSCsを、Pentoxifyresorufinを添加した分化誘導培地でインキュベートした後、細胞中の赤色蛍光色素の有無を評価した。その結果、赤色蛍光色素は0日目のdADSCsでは認められなかったが、分化誘導7～28日目のdADSCsでは認められた。

本研究において、イヌADSCsが、無血清の肝細胞分化誘導により、多角の形態と明瞭な円形核を有するHLCsへと変化した。さらにAlbuminのmRNA発現と蛋白発現の増強傾向が認められ、CYP3A12のmRNA発現も増加した。一方、イヌHSCsまたはHPCsマーカーと推測されるDlk-1蛋白の発現が減少した。また、分化誘導前の間葉系細胞では認められなかった一部のLDL代謝能と薬物代謝能が、分化誘導後7～28日目のdADSCsで認められた。以上の結果から、イヌADSCsが肝細胞の性状と機能を有するHLCsへと分化誘導された可能性が示唆された。

より成熟した肝細胞へと分化誘導するためには、細胞外基質や培地条件を検討し、最適な分化誘導方法へと改良する必要がある。今後、*in vitro*でADSCsから成熟肝細胞の機能を持つHLCsへと分化誘導できれば、自家肝細胞による細胞移植治療や臓器再生によって難治性慢性肝疾患が治療可能となるだろう。

論文審査の結果の要旨

本研究は、イヌの難治性慢性肝疾患の新しい治療法として、再生療法の可能性に着目したものである。肝再生療法の実現には数多くの課題があるが、最も基本的なこととして肝細胞の入手があげられる。本研究ではその手段として、幹細胞から肝細胞への分化誘導を試みた。再生療法に用いる幹細胞としては、体性幹細胞、胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞が考えられる。このうち胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞には倫理上の問題あるいは腫瘍原性の危険性が指摘されているが、体性幹細胞はこれらの問題が少ない点で、再生療法への応用上有望と思われる。体性幹細胞の細胞源組織としては、骨髄や脂肪組織があげられる。このうち脂肪組織は、採取による侵襲性が比較的低く、しかも培養増幅や凍結保存が可能である。脂肪組織を構成する各種細胞のうち、間質細胞 (Adipose tissue-derived stromal cells ; ADSCs) には、幹細胞が豊富に存在する。

以上のことから本研究では、脂肪組織を肝細胞に分化させる幹細胞源とした。さらに、分化誘導された細胞が肝細胞としての特性を持つか否かを、形態、細胞表面抗原あるいは機能的特性などから検討した。

第一章では、ADSCsから肝細胞へと分化誘導する培養方法を検討した。

健康なビーグル犬から、全身麻酔下で鼠径部皮下脂肪組織を採取し、ADSCsを分離培養した後、肝細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子、Oncostatin M及びDimethyl sulfoxideを添加した無血清の肝細胞分化誘導培地で培養を28日間行った。そして、肝細胞へ分化誘導したか否かを判断するために、0日目8割confluent時の培養初期のnaïve ADSCs (nADSCs)と分化誘導開始から0, 7, 14, 21及び28日目の分化誘導ADSCs (dADSCs)を用いて、定量的RT-PCRによるAlbumin mRNAの発現確認と、免疫染色によるAlbumin蛋白の検出を試みた。

その結果、nADSCsと0日目のdADSCsの細胞形態はどちらも線維芽細胞様であったが、7日目には多角形の細胞質と明瞭な円形核を有する肝細胞に類似した形態が認められ、28日目もその形態を維持していた。定量的RT-PCR解析では、Albumin mRNAはnADSCs時から発現し、その後も増加傾向にあった。しかしながら、nADSCsとdADSCs間で統計的な有意差は認められなかった。免疫染色により検索したAlbumin蛋白は、nADSCsでは陰性であったが、分化誘導後徐々に発現が増強し、28日目には陽性細胞の割合が最多となった。

以上の結果から、上述のADSCsから分化誘導された細胞を、肝細胞様細胞 (HLCs) とした。

第二章では、第一章で得られたHLCsの性状が、生体におけるどの発生段階の肝細胞と類似するかを検討した。

まず前段階として、分化初期段階における肝細胞の特性を調べるために、4株のイヌ肝細胞癌 (cHCC) 細胞 (930-599A、95-0112、95-1044、CHKS-rL) を用い、細胞表面抗原の発現をフローサイトメトリーにより解析した。解析対象抗原には、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) までのマーカー6種類 (Dlk-1、CD29、CD34、CD44、CD90、CD133) を用いた。その結果、CD44、CD133及びDlk-1はcHCC細胞4株全において、またCD29は3株において発現していた。一方、コントロールとして同様の解析を行った健康成犬由来成熟肝細胞3検体では、6種類の抗原全てが発現していなかった。以上の結果から、CD29、CD44、CD133及びDlk-1が、肝細胞系の分化初期段階におけるマーカーとして使用できる可能性が示唆された。

次に、分化誘導前のイヌADSCsが間葉系細胞であることを確かめるため、間葉系細胞の表面抗原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。その結果、CD29、CD44、CD90、Dlk-1が高度に発現しており、イヌADSCsが間葉系細胞集団であることが示唆された。

最後に、本研究の分化誘導方法で得られたHLCsの細胞表現抗原をフローサイトメトリーにて解析した。上述のCD29、CD34、及びDlk-1について解析した結果、CD29は培養0日目と比較し、7、21及び28日目で高い陽性率で推移した。逆にCD34は、培養0日目を最高値として、その後陽性率が低下した。同様に、Dlk-1も培養0日目以降、7、21及び28日目にかけて低値を示した。さらに、肝細胞への分化誘導の程度を調べるため、肝細胞マーカーのCK18、糖新生マーカーのPEPCK、薬物代謝酵素のCYP1A1とCYP3A12、上皮系及びHPCsマーカーのCD90、胆管上皮及びHPCsマーカーのCK7とCK19、脂肪組織幹細胞及び造血幹細胞マーカーのCD34のmRNA発現を定性的RT-PCRで解析した。その結果、これらのマーカー中6種類 (CK18、PEPCK、CYP1A1、CYP3A12、CD90、CK7) が、nADSCsから28日目のdADSCsまで絶えず発現していた。特にnADSCsで非常に微弱だったCYP3A12発現は分化誘導後増加し、28日目で最大となった。CD34はnADSCsで発現が最も強かったが、分化誘導後に減弱し、28日目で未発現となった。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HLCsが肝細胞系統の細胞に分化誘導されたものと推測された。

第三章では、HLCsについて、肝細胞が持つ脂質代謝能と薬物代謝能を評価した。まず、脂質代謝能を調べるため、分化誘導前のADSCsまたはHLCsをDiI標識アセチルLDL添加分化誘導培地でインキュベートした後、細胞中に取り込まれた赤色蛍光発色の有無を蛍光顕微鏡観察により評価した。その結果、LDL取り込み能は0日目のdADSCsでは認められなかったが、分化誘導7～28日目のdADSCsでは常に認められた。次に、薬物代謝能を調べるため、分化誘導前のADSCsまたはHLCsを、

Pentoxylresorufinを添加した分化誘導培地でインキュベートした後、細胞中の赤色蛍光発色の有無を評価した。その結果、薬物代謝能は0日目の dADSCsでは認められなかったが、分化誘導7～28日目の dADSCsでは認められた。

本研究により、in vitroでイヌADSCsからHLCsが分化誘導された。このHLCsは成熟肝細胞までは分化していないが、HSCsまたはHPCsレベルの肝細胞系統の細胞へと分化誘導されていると推測された。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6種類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。

脂肪組織から肝細胞様細胞に分化誘導できたことは、今後、イヌの肝再生療法の研究推進に大きく貢献するものと期待される。また、難治性慢性肝疾患の自然発症例が多いイヌにおいてこの分野の研究が発展することは、獣医学領域のみならず、将来、医学領域の肝再生療法の研究にも貢献する可能性がある。

以上のことから本研究は、博士（獣医学）の学位を授与するのにふさわしい業績と判断した。