

論文審査の結果の要旨

氏名 伊藤 慶一

本論文は、成体の恒常性維持において必須の臓器である肝臓の発生に着目し、胎仔肝幹・前駆細胞の増殖・分化機構の解明を目的としたものである。肝幹・前駆細胞は、高い増殖能および成熟肝細胞と胆管細胞への分化能を併せ持つ細胞である。胎生期の前腸内胚葉の一部が心臓原基や横中隔膜からのシグナルを受けて肝幹・前駆細胞へと誘導され、胎児肝組織のなかで増殖しつつ肝細胞および胆管上皮細胞へと成熟・分化する。このような、肝組織中の肝幹・前駆細胞を試験管内で効率的に増幅し、必要に応じて成熟肝細胞等へ誘導することで、再生医療や創薬に資する機能的肝細胞を大量に得ることが可能になると考えられる。しかし、現在では肝幹・前駆細胞の自己複製制御機構等が未解明であり、未分化性や高増殖能を長期間にわたり培養系で維持することは困難であった。

肝幹・前駆細胞の *in vivo* での増殖・分化制御には様々な周辺環境との相互作用が重要なことがノックアウトマウス等を用いた解析から示唆されている。そこで、本研究ではマウス胎仔肝臓中の間葉系細胞に注目し研究を行った。Dlk1 および PDGFR α の特異的抗体およびフローサイトメーターを用いて、胎仔肝臓中の間葉系細胞の純化系を構築した。Dlk1 弱陽性 PDGFR α 陽性細胞は高い増殖能と軟骨・脂肪・骨細胞系への多分化能をもつ間葉系前駆細胞であり、*in vitro*における共培養実験から分泌因子を介して肝幹・前駆細胞の増殖を亢進させる一方で、細胞間相互作用により機能的肝細胞への分化を誘導することが確認された。間葉系細胞による肝芽細胞の増殖・分化制御がどのようなシグナルを介して行われているかは複数の液性因子の関与が指摘されるものの詳細は不明であり、増殖と分化が異なるメカニズムで制御される複雑な機構であることが本研究によって示唆された。今後は他の支持細胞と比較解析を行うことで、肝幹・前駆細胞の増殖・分化に重要な分子メカニズムの同定が期待できる。

また、肝幹・前駆細胞の長期増殖能の制御機構を解明する目的で、肝幹・前駆細胞に高発現する核内分子を候補として、細胞の長期増殖を制御する内因性因子の網羅的探索を試みた。肝幹・前駆細胞に高発現する核内因子群を未分化性・高増殖性を制御する候補遺伝子としてレトロウイルスベクターにクローニングし、肝幹・前駆細胞に強制発現させた。純化した肝幹・前駆細胞をフィーダー細胞 (MEF) 上に低密度で播種し、レトロウイルス感染による遺伝子導入を行った。培養7日後に増殖した1次コロニーを継代し、2次コロニーの形成を観察することで、肝幹・前駆細胞の長期増殖能を解析した。複数の遺伝子を導入しその効果をみたところ、Chromobox8 (Cbx8)の強制発現により肝幹・前駆細胞の長期増殖能が亢進した。Cbx8はCbx familyに属する遺伝子であり、polycomb複合体の構成因子である。Cbx8による肝幹・前駆細胞の長期増殖能維持機構がCbxファミリーに共通したものであるかを検討するために、同ファミリー分子であるCbx2, 4, 6, 7, 8をそれぞれ導入し、肝幹・前駆細胞の長期増殖能における効果を比較した。その結果、Cbx7, 8を強制発現することで肝芽細胞の長期増殖を有為に誘導できた。さらに遺伝子発現解析からCbx7, 8の強制発現によって、細胞周期を抑制するサイクリンインヒビターCdkn2aの発現が低下することを確認した。Cbx7, 8の強制発現時における肝幹・前駆細胞の長期増殖能がCdkn2aの抑制に依存しているかを検討するため、Cdkn2a遺伝子欠損マウス由来の肝幹・前駆細胞へCbx familyの

遺伝子導入を行い、長期増殖能への影響を検討した。その結果、 $Cdkn2a^{+/-}$ マウス由来の肝幹・前駆細胞ではCbx7,8を強制発現した際にのみ長期増殖能が誘導されたのに対し、 $Cdkn2a^{-/-}$ マウス由来の肝幹・前駆細胞ではCbx7,8非依存的に長期増殖が可能であった。これまでに $Cdkn2a$ は異常な癌遺伝子の発現時や、細胞外ストレスの存在下において発現が誘導されることが報告されており、今後生体内および培養系におけるポリコム複合体や細胞周期関連因子と肝幹・前駆細胞の機能についての更なる解析が期待される。

以上より、論文提出者が主体となり、肝幹・前駆細胞の増殖・分化を制御する機構を異なる二つのアプローチから解析した。その結果、胎仔肝臓由来間葉系細胞との相互作用による肝芽細胞の増殖・分化制御機構や、試験管内での肝幹・前駆細胞の増殖抑制機構の一端を明らかにした。これらは多能性幹細胞からの肝幹・前駆細胞の分化誘導にも適用可能であり、医療・創薬への応用されることが期待され、博士 (生命科学) の学位を授与できると認められる。

以上 1985 字