

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 柳田 絢加

本研究は肝細胞移植に変わるソースとして注目されている肝幹・前駆細胞の増殖、分化制御機構を明らかにするため、ヒト多能性幹細胞から肝幹前駆細胞への分化誘導及び *in vitro* 長期培養系の構築および細胞周期抑制遺伝子 $p57^{Kip2}$ 欠損マウスの解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト induced pluripotent stem (iPS) 細胞への連続的なサイトカイン投与によって肝細胞系へと分化誘導した後に、 $CD13^{high}CD133^{+}$ 細胞分画を単離することで、肝細胞マーカー陽性の大型のコロニーを形成する能力のある前駆細胞様細胞が純化可能であることを明らかにした。
2. $CD13^{high}CD133^{+}$ 細胞は、マウス線維芽細胞上で ROCK 阻害剤(Y-27632)、MEK 阻害剤(PD98059)、HGF、EGF を添加し培養することで、1 か月以上継代可能であることを明らかにした。また、これらの細胞は長期継代培養後でも肝細胞マーカーHNF4 α および AFP 陽性、また胆管上皮細胞マーカーCK7 陽性の大型コロニー形成能を維持していることが明らかになった。
3. $CD13^{high}CD133^{+}$ 由来の細胞は長期培養後も分化誘導により成熟肝細胞マーカーAlbumin や肝機能遺伝子の発現上昇がみられ肝細胞への分化能を保持していることが示された。さらに、細胞外マトリクスゲル中での包埋培養を行うことで胆管上皮マーカーCK7 陽性の極性を持った上皮管腔様 Cyst を形成できることから、胆管系への分化能も保持していることが明らかになった。
4. 肝前駆細胞から肝細胞への分化過程で細胞増殖活性が変化することに注目し、成熟過程における細胞周期関連遺伝子の発現を調べた。その結果、細胞周期抑制遺伝子 $p57^{Kip2}$ が肝前駆細胞で高発現し、肝細胞では発現が劇的に低下することを明らかにした。また、胎仔肝臓では $p57^{Kip2}$ は肝前駆細胞および、PDGFR α および PCLP1 陽性の間葉系細胞で発現していることを明らかにした。
5. $p57^{Kip2}$ 欠損マウスの解析から、 $p57^{Kip2}$ 欠損肝前駆細胞は *in vivo*, *in vitro* でやや増殖が亢進していることを明らかにした。さらに、胎生 19 日齢の $p57^{Kip2}$

欠損マウスでは肝成熟の遅滞が見られることが明らかになった。

6. 肝前駆細胞の分化は肝前駆細胞自身の内的因子、および肝臓を構成する様々な細胞からの外的因子の両方により制御されている。肝前駆細胞あるいは間葉系細胞での $p57^{Kip2}$ の発現が肝成熟に関与しているか明らかにするため、 $p57^{Kip2}$ 欠損細胞と野生型のキメラマウスを作製した。 $p57^{Kip2}$ 欠損マウスは出生直後に死亡するため、成体での解析が困難であったが、キメラ個体は成体まで生存した。また、キメラ肝臓内で $p57^{Kip2}$ 欠損肝細胞は野生型と同等の肝機能遺伝子の発現をすることが明らかになった。以上の結果から間葉系細胞における $p57^{Kip2}$ の欠損が肝成熟遅延の原因である可能性が示唆された。

以上、本論文はヒト iPS 細胞由来の肝前駆様細胞を純化可能な表面抗原の特定、*in vitro* で機能を維持したまま長期に増殖・培養可能な系の構築を行った。また、肝成熟過程における $p57^{Kip2}$ の機能解析から、間葉系細胞における $p57^{Kip2}$ 欠損が肝成熟を制御している可能性を明らかにした。本研究はこれまでに未知に等しかった、ヒト肝前駆細胞の増殖制御機構、および肝前駆細胞の分化制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。