

氏名(本籍) 束田 宏明(滋賀県)

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 博士第523号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与年月日 平成18年3月24日

学位論文題目 Acidic fibroblast growth factor promotes hepatic differentiation of  
monkey embryonic stem cells

(サルES細胞の肝細胞への分化におけるaFGFの効果)

審査委員

主査 教授 小笠原 一誠

副査 教授 山本 学

副査 教授 佐藤 浩

論文内容要旨

*整理番号	528	(ふりがな) 氏名	つかだ ひろあき 東田 宏明
学位論文題目	Acidic fibroblast growth factor promotes hepatic differentiation of monkey embryonic stem cells. (サル ES 細胞の肝細胞への分化における aFGF の効果)		
<p>(研究の目的) 肝臓移植は、致死的な肝臓疾患に対する唯一の治療方法である。しかしながら、ほとんどの患者がドナーの数が足りないためにこの治療を受けることができない。この臓器移植に替わる治療法として幹細胞を利用した細胞移植医療の有用性が報告されており、骨髄細胞、臍帯血細胞、などがその材料として使われている。その中でも embryonic stem (ES) 細胞は、多分化能と無限増殖能を有するために、非常に有用な材料と考えられる。マウス ES 細胞においては、様々な研究がなされ、多くの機能細胞に分化できることが報告されてきた。しかし最近、ヒト ES 細胞が樹立され、培養条件、形態、表面抗原の発現などがマウス ES 細胞と異なることが明らかになってきた。一方、同じ霊長類に属するサル ES 細胞は、これらの特性が、ヒト ES 細胞と類似しているため、ヒト ES 細胞の非常に良いモデルになると考えられる。そこで、我々は、滋賀医科大学動物生命科学研究センターで樹立されたカニクイザル ES 細胞株 (CMK6) を用い、肝細胞への分化に有効とされている growth factor の中の acidic fibroblast growth factor (aFGF) に注目し、サル ES 細胞の肝細胞への分化における効果を検討した。</p> <p>(方法) サル ES 細胞(CMK6)を、未分化状態を保ちながら継代し増殖させた。十分な細胞数に増殖させた後、hanging drop 法を用いて embryoid body (EB) を作製し、分化を誘導した。次に、コラーゲン処理した dish へ移し、aFGF を添加した培養液を用いて 4 週間培養した。経時的 (1, 2, 3, 4 週) に RNA を抽出し、reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により、肝細胞特異的遺伝子の発現を調べた。また、免疫細胞化学染色法を用いてアルブミン蛋白の発現を確認した。さらに、細胞移植医療への応用を考え、in vivo 移植実験を行った。すなわち分化させたサル ES 細胞を、50% 肝切除を行い肝再生を促した BALB/Ca マウスの脾臓に移植した。4 週間後、固定した肝臓を摘出し、移植細胞の生着およびアルブミン蛋白の発現を調べた。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. \*印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

(結果) 未分化状態のサル ES 細胞は、明確な核小体と大きな核を持つ ES 細胞特有の形態を示したが、マウス ES 細胞と異なり平坦なコロニーを形成した。分化させると aFGF の存在にかかわらず 2 週間目より初期肝細胞マーカーである hepatocyte nuclear factor 3 $\beta$  (HNF-3 $\beta$ ), alpha-1 antitrypsin (AAT) の mRNA の発現がみられた。aFGF の存在下で分化を行うと 3 週間目に、初期肝細胞マーカーである alpha-fetoprotein (AFP)、transthyretin (TTR), albumin (ALB) の mRNA の発現がみられた。成熟肝細胞マーカーである tyrosine aminotransferase (TAT) の mRNA の発現はみられなかったが、免疫細胞化学染色法にて ALB 蛋白の発現が確認できた。一方、aFGF の非存在下で分化させた細胞では、AFP, TTR, ALB の mRNA の発現は見られなかった。また、マウスへの細胞移植実験の結果、aFGF の存在下で分化させた細胞は、移植したマウスの肝臓内に生着し、サル ES 細胞由来の ALB 蛋白の発現が確認できた。

(考察) 本研究を進めるにあたって、サル ES 細胞はマウス ES 細胞に比べ未分化状態を維持することが難しく、しかも増殖に約 3 倍の期間を要し、継代は single cell ではなく colony で行う必要があり、かつ培養液を頻回に (1 日 2 回以上) 交換するなど、サル ES 細胞特有の維持方法を確立した。さらに常に安定した ES 細胞を確保するために凍結・融解方法も確立し、安定したサル ES 細胞を確保した。これらのサル ES 細胞を用いて、EB から aFGF を用いて分化誘導を行ったところ、肝細胞特異的遺伝子の発現がみられたことから、サル ES 細胞 (CMK6) の肝細胞への分化誘導において aFGF が有効であることを示唆した。本研究においてサル ES 細胞の肝細胞への分化にはマウス ES 細胞の 2 倍以上の期間を必要としたこと、また正常な発生過程において成熟肝細胞は妊娠後期に現れてくることから、マウスに比べ妊娠期間の長い (約 160 日) サルにおいては、ES 細胞の成熟肝細胞への分化は長期培養が必要となる可能性があると考えられた。さらに in vitro で分化させた細胞のマウスへの移植実験の結果、移植細胞はマウスの肝臓に生着し、サル細胞由来のアルブミンの発現がみられたことより、サル ES 細胞の細胞移植医療モデルとしての可能性を見出すことができた。

(結論) カニクイザル ES 細胞 (CMK6) は、aFGF を用い初期肝細胞へ分化誘導できることが確認できた。また、マウスへの移植実験により、サル ES 細胞の in vivo での機能発現も確認できたことから、サル ES 細胞は細胞移植医療の実用化のため、有用な前臨床試験モデルになる可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	528	氏名	東田 宏明
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>肝臓移植治療はドナー不足といった問題がある。これに替わる治療としてES細胞の利用は、有用と考えられ、サルES細胞はヒトES細胞と類似しているため、ヒトES細胞治療の良いモデルになると考えられる。サルES細胞は未分化状態を維持することが比較的難しいため、本研究では最初にサルES細胞特有の維持保存方法を確立した。次に、肝細胞への分化因子とされるaFGFを用いて分化誘導を行ったところ、初期肝細胞マーカーの発現がみられ、肝細胞への分化誘導においてaFGFは有効であると考えられた。分化させた細胞はマウスへの移植実験の結果、マウスの肝臓に生着しサル由来のアルブミンの発現がみられたことより、サルES細胞の細胞移植医療モデルとしての可能性を見出すことができた。</p> <p>本研究は、サルES細胞が細胞移植医療の実用化のため有用な前臨床試験モデルになる可能性を示したもので、博士(医学)の学位論文として価値のあるものと認められる。</p>			
(平成18年2月7日)			