

学位論文
Doctor's Thesis

導管結紮唾液腺に出現する前駆細胞の肝臓及び膵臓細胞への分化

(Salivary gland-derived progenitor cells induced by duct ligation
differentiate into hepatic and pancreatic lineages)

奥村 健治
Kenji Okumura

指導教官
遠藤文夫 教授
熊本大学大学院医学研究科 小児科学分野

2004年3月

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名：導管結紮唾液腺に出現する前駆細胞の肝臓及び膵臓細胞への分化
(Salivary gland-derived progenitor cells induced by duct ligation
differentiate into hepatic and pancreatic lineages)

著者名 : 奥村 健治
Kenji Okumura

指導教官名 : 小児科学担当教授 遠藤 文夫

審査委員名 : パターン形成分野学担当教授 横内 裕二
消化器内科学分野担当教授 佐々木 裕
顎口腔病態学分野担当教授 篠原 正徳
幹細胞制御分野担当教授 桑 昭苑

2004年3月

目次

(1) 要旨

(2) 学位論文の骨格となる発表論文、及び過去の発表論文リスト

(3) 謝辞

(4) 略語一覧

(5) 研究の背景と目的

5-(1) 肝臓の体性幹細胞

5-(2) 膵臓の体性幹細胞

5-(3) 唾液腺の発生、及び組織障害モデル

(6) 実験方法

6-(1) 実験動物と顎下腺の主排泄導管結紮術

6-(2) 唾液腺由来細胞の分離及び培養

6-(3) 唾液腺由来細胞の免疫染色

6-(4) 唾液腺由来細胞のフローサイトメトリー検索

6-(5) 組織の免疫組織化学及び *in situ* ハイブリダイゼーション

6-(6) ラット 2-AAF/PHx と細胞移植

6-(7) 培養細胞の GFP ラベル

6-(8) 培養細胞の RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 解析

(7) 実験結果

- 7-(1) 主排泄導管結紮による唾液腺組織の組織学的変化
- 7-(2) 結紮唾液腺組織内に出現する細胞の移植
- 7-(3) 唾液腺由来前駆細胞の分離と培養
- 7-(4) *in vitro* に於けるラット SGP 細胞の分化能
- 7-(5) 未分化 SGP-1 細胞のマーカー検索
- 7-(6) SGP-1 細胞は肝卵形細胞、胆管上皮細胞、肝細胞へと分化する

(8) 考察

(9) 結語

(10) 参考文献

(11) 図表及び図表の説明

Figure 1. チロシン代謝経路

Figure 2. 肝細胞内に於ける銅の輸送経路

Figure 3. 成体ラットの頸部解剖図譜（正面像）

Figure 4. 顎下腺の主排泄導管結紮術

Figure 5. 導管結紮と細胞移植のプロトコール

Figure 6. 唾液腺の組織病理学的変化と、分離された細胞

Figure 7. 導管結紮唾液腺より分離された新鮮細胞の移植

Figure 8. 1型コラーゲン上に於ける、SGP-1細胞の増殖と細胞塊形成

Figure 9. SGP-1細胞の免疫蛍光染色と、内胚葉細胞への分化

(Figure 9. supplement)

SGP-1細胞のインテグリン $\alpha 6\beta 1$ 、ラミニン二重染色

Figure 10. SGP-1細胞の Reverse Transcription-PCR 解析

Figure 11. SGP-1 細胞のフローサイトメトリー解析

Figure 12. SGP-1 細胞の移植

Figure 13. 胎生 15 日ラットの唾液腺原基、及びラミニン陽性細胞の分布

Table 1. ラット肝卵形細胞(hepatic oval cell)の誘導法

(1) 要旨

〔目的〕 成体に存在する組織幹細胞の代表的なものとしては、造血幹細胞や神経幹細胞などが挙げられる。これらの組織幹細胞には、自己複製能及び多分化能が備わっている事が、今までの研究より明らかにされている。私は肝臓、膵臓に代表される内胚葉由来の腹部臓器の再生を目指し、同じく内胚葉に由来する唾液腺から組織幹細胞の分離を目指した。

〔方法〕 成体雄ラットの唾液腺（両側顎下腺）の主排泄導管を二重結紮した。この結紮術により、6～7日後に顎下腺は萎縮性変化を来す。得られた萎縮顎下腺を分散し、これより細胞浮遊液を作成した。まず2-アセチルアミノフルオレン／部分肝切除 (2-AAF/PH) ラットをレシピエントとして、調整した細胞液を用いて細胞移植を行った。また導管結紮唾液腺より作成した細胞分散液を用いて、唾液腺細胞の初代培養を開始した。この初代培養に於いて出現した、均一な小型の上皮様細胞のコロニーを分離し、これより多分化能を有する細胞を確立した。この唾液腺に由来する rat-SGP (rat-salivary gland-derived progenitor) 細胞を用いて、*in vitro* での分化誘導実験を行った。また肝臓障害(2-AAF/PH)ラットに、SGP-1 細胞の移植を行った。

〔結果〕 6～7日間の導管結紮により、唾液腺組織には腺房細胞の脱落と導管上皮細胞の増殖が見られる。この萎縮唾液腺を消化して得られた細胞分散液を移植したレシピエントラットの肝臓内には、ドナー由来細胞が確認された。初代培養より上皮様細胞 SGP-1 を分離した。ラット SGP-1 細胞は1型コラーゲン上にて維持継代培養が可能であった。ラット SGP-1 細胞の表面マーカーのパターンは CD44^{std}(+)、インテグリン $\alpha 6\beta 1$ (CD29/CD49f)(+)、CD34(-)、CD45(-)であった。一部の SGP-1 細胞は CD90(Thy-1)(+)、CD117(c-kit)(+)を示した。また免疫蛍光染色により、サイトケラチン-19 陰性、nestin 陰性、細胞内ラミニン陽性であった。Rat-SGP 細胞は1型コラーゲン上で培養した場合、over-confluent の状態になると細胞塊を形成した。この細胞塊には、アルブミン、 α -fetoprotein、インスリン、グルカゴン陽性細胞が存在していた。*In vitro* に於いて増殖させた rat-SGP 細胞は、細胞移植を行ったレシピエントラット肝臓内で肝細胞及び胆管上皮細胞に分化していた。

【考察】 導管結紮唾液腺から分離された rat-SGP 細胞は、その特徴としてインテグリン $\alpha 6\beta 1$ 、及び細胞内ラミニンが共に陽性であった。SGP-1 細胞内に於けるラミニン蓄積は、器官形成期の唾液腺の terminal cluster 形成上皮細胞における知見と共通している。またラット SGP-1 細胞は、1 型コラーゲン上で肝臓細胞及び膵臓内分泌細胞へのランダムな分化能を有していた。これはラット SGP-1 細胞が内胚葉系の組織に共通する前駆細胞である事を示唆していると考えられた。

【結論】 成体組織内には、組織障害に反応して多分化能を持つ前駆細胞が出現する。唾液腺由来前駆細胞は、肝臓及び膵臓の再生医療に有用であると考えられる。

(2) 学位論文の骨格となる発表論文、及び過去の発表論文リスト

1. Okumura, K., Nakamura, K., Hisatomi, Y., Nagano, K., Tanaka, Y., Tarada, K., Sugiyama, T., Umeyama, K., Matsumoto, K., Yamamoto, T., **Suhrie, E.** gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages.

Hepatology 38: 104-113. 2003.

2. 奥村健治、中村公俊、久富雄一郎、永野幸治、遠藤文夫

「特集 体性幹細胞の臨床応用：進歩する再生医療、体性幹細胞による
膵臓再生」

細胞工学、秀潤社（東京）22: 534-538. 2003.

(3) 謝辞

本研究を行うにあたり全面的に御支援を頂きました、熊本大学大学院医学研究科 小児科学分野 遠藤文夫教授に深く感謝致します。

実験手法の御教授を頂きました熊本大学医学部生体機能病態学講座、山本哲郎教授、秋田大学医学部生化学第一講座、杉山俊博教授、寺田邦彦助教授に慎んで御礼申し上げます。

本研究に使用致しました LEA ラットの供給につきまして御協力頂きました徳島大学医学部附属動物実験施設、松本耕三先生に深謝致します。

(4) 略語一覽

2-AAF, 2-acetylaminofluorene

AFP, α -fetoprotein

D-MEM/F-12, Dulbecco's modified Eagle's medium/Fisher-12

EGF, epidermal growth factor

EGFP, enhanced green fluorescent protein

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GFAP, glial fibrillary acidic protein

H-CFU-C, hepatic colony-forming units in culture

HRP, horse radish peroxidase

LEA, Long-Evans agouti

LEC, Long-Evans cinnamon

PHx, partial hepatectomy

SCID, severe combined immunodeficient

SGP, salivary gland derived-progenitor

(5) 研究の背景と目的

5-(1) 肝臓の体性幹細胞

人類に火を与えたプロメテウスの逸話にも見られる様に、肝臓が再生する事は古くギリシャ神話の時代より既に知られていた。この記載より始まる肝臓再生の研究もまた、同様に長い歴史を持っている(Michalopoulos et al. 1997; Ponder et al. 1996; Fausto et al. 1995; Thorgeirsson et al. 1996; Kren et al. 1996; Taub et al. 1996; Diehl et al. 1996; Steer et al. 1995; Martinez-Hernandez et al. 1995; Pistoï et al. 1996)。特にラットに於ける部分肝切除 (partial hepatectomy: PHx)モデルは、肝再生のメカニズムを明らかにする上で大きな役割を果たして来た。その一方で、成体に存在する肝幹細胞の探索はあまり容易ではなかった(Thorgeirsson et al. 1996)。組織再生の過程は幹細胞/前駆細胞増殖の観点から考察した場合には、前駆細胞依存型(progenitor dependent regeneration)と前駆細胞非依存型(progenitor independent regeneration)の組織再生とに大別される(Grompe et al. 2001)。しかし正常な肝臓の場合には、肝細胞が有している大きな再生能からも明らかのように、肝臓再生は幹細胞/前駆細胞増殖に強く依存していない為である。

その一方で、ラット肝臓の化学発癌モデルの一つである、2-アセチルアミノフルオレン (2-acetylaminofluorene: 2-AAF) による薬剤性肝障害+2/3 肝切除モデル (2-AAF/PHx) に於いて、特殊な細胞が増殖する事が報告された(Teebor et al. 1971)。ラットに於いて肝卵形細胞の増殖を誘導する肝臓障害モデルの概要を示す(Table.1)。2-アセチルアミノフルオレンはDNA分子間に架橋を形成するDNAアルキル化剤の一つである。成熟肝細胞の様に2-アセチルアミノフルオレンに感受性を示す細胞は、細胞分裂刺激下に置かれても細胞分裂が出来ない状態(mitotic arrest)に置かれる。つまり2-アセチルアミノフルオレン持続投与ラットでは、部分肝切除により細胞分裂刺激を与えても、肝実質細胞による肝再生は殆ど見られない。そのような特殊な環境下に於いて増殖するのが、肝卵形細胞(hepatic oval cell)である(Golding et al.1995)。

N/C 比が高く、小型の細胞 (径 10 μ m) であり、門脈周囲領域より肝葉内に迷入しつつ旺盛に増殖するこの細胞は、細胞核の形態的特徴 (oval-shaped nucleus) より肝卵形細胞 (hepatic oval cell)と命名された(Shinozuka et al. 1978)。肝卵形細胞は偽胆管を形成しつつ増殖する (atypical tubular proliferation) という特徴を示し、 γ -glutamyl transpeptidase(GGT)、サイトケラチン-19 や胆管上皮

特異的抗原を発現しているが、同時にアルブミン、 α -fetoprotein のように肝細胞 (hepatocyte) もしくは肝芽細胞 (hepatoblast) のマーカーも発現している。その為に、肝卵形細胞は肝細胞と胆管上皮細胞の両方の特徴を兼ね備えていると考えられた。肝卵形細胞の肝臓内移植実験からは、肝卵形細胞が肝細胞と胆管上皮細胞の両方への分化能を有する事が明らかになった (Yasui et al. 1997)。従来へリング管近傍に肝幹細胞の存在が考えられていたが、肝卵形細胞がへリング管内 (Fausto et al. 1993) もしくは胆管近傍の blast-様の細胞より増殖するという報告 (Petersen et al. 1998b) は、これが肝幹細胞である事を支持しており、以上の検索より肝卵形細胞は bipotent な肝幹細胞の一つであると考えられた。

しかし近年の幹細胞と分化転換の研究は、この卵形細胞についても新たな知見と解釈を加えている。肝卵形細胞のマーカーとして従来からいわれているアルブミン、 α -fetoprotein、サイトケラチン-19 の他にも肝卵形細胞の特異的マーカーとして OV1、OV6 (Hixson et al. 1997; Dunsford et al. 1989)がある。これらのマーカーは同時に胆管上皮細胞も認識する。しかし肝卵形細胞の一部には、造血幹細胞マーカーとして用いられている CD34、CD90 (Thy-1)、CD117 (c-kit) が発現している事が明らかになった (Petersen et al. 1998a)。

CD90(Thy-1)は神経系 (Avalos et al. 2003)と造血系 (Craig et al. 1993)に発現している膜蛋白である。ヒト、マウス、ラットと異なった動物種間で高度に保存されており、胸腺細胞 (Page et al. 1997)や骨髓細胞の一部の他に、胎児肝臓の幹細胞 (Lazaro et al. 2003)、臍帯血 (Hao et al. 2001)、骨髓細胞の一部に発現が見られているが、機能の全貌は未だ不明のままである。特に 2-AAF/CCI₄ 処理したラット肝臓の非実質細胞 (NPC: non-parenchymal cell) 分画を、抗 Thy-1 抗体にて標識して分離すると、Thy-1 陽性細胞の 95%以上が従来の肝卵形細胞マーカー陽性を示していた。その為 Thy-1 は肝卵形細胞の特異的なマーカーとして提示された (Petersen et al. 1998a)。引き続き、2-AAF/PHx 処理したラットに骨髓移植を行うと、肝卵形細胞の増殖領域に骨髓細胞が存在する事が示された (Petersen et al. 1999)。同時に骨髓細胞から肝細胞への分化転換も確認され、これは肝卵形細胞の少なくとも一部は骨髓由来であろうという新たな解釈をもたらした。更に最近の報告によると Thy-1(anti-rat Thy1.1)強陽性分画をソートして得られた肝卵形細胞は、高濃度グルコース(23mM)及び血清存在下にて平板上培養すると、膵内分泌細胞と同じくインスリン、グルカゴン、及び膵ポリペプチド陽性

細胞を含む細胞塊への分化誘導可能であった(Yang et al. 2002)。これらの知見より、肝卵形細胞は肝臓、膵臓に共通の幹細胞であると考えられるようになっていく。

古典的な肝幹細胞である肝卵形細胞の概念が拡大してゆく一方で、1999年の Petersen らによる報告を更に追求し、純化された造血幹細胞の移植により肝臓の置換実験が報告された(Lagasse et al. 2000)。彼らは細胞移植に於ける肝細胞の置き換え実験に有用な動物モデルとして以前より、FAH-欠損マウス(FAH-deficient mice)を使用している(Grompe et al.1995)。FAH-欠損マウスでは、チロシン代謝障害に起因する1型高チロシン血症を来す(Fig.1)。1型高チロシン血症では肝障害と腎障害を来し、進行する肝機能障害がその死因である。この肝機能障害の本態は、持続的な肝細胞のアポトーシスである(Kubo et al. 1998)。このFAH-欠損マウスの肝細胞アポトーシスは、NTBCの投与により抑制が可能である。Lagasse らは致死線量の放射線照射を行ったFAH-欠損マウスに、ドナーマウスの骨髄より分離した $c\text{-kit}^{\text{hi}}/\text{Thy-1}^{\text{low}}/\text{Lin}^{\text{neg}}/\text{Sca-1}^{\text{+}}$ のパターンを示す造血幹細胞(KTLS)を移植した。その結果、細胞移植を受けたFAH-欠損マウスに於いては、骨髄の再建と同時に、肝細胞の一部が移植された造血幹細胞に由来する細胞に置換していた(Lagasse et al. 2000)。この結果は当初、造血幹細胞の持つ肝細胞への分化転換能を明確にしたものと受け止められた。しかし最近になって同じ研究グループより、移植された造血幹細胞はレシピエントの肝細胞と細胞融合を起こしていた事が報告されている(Wang et al. 2003)。

5-(2) 膵臓の体性幹細胞

肝臓と同じく内胚葉に由来する腹部臓器である膵臓についても、組織幹細胞の存在が以前より予測されていた。肝臓と膵臓の発生は密接に関係している。肝臓、膵臓の臓器発生は、前腸(foregut)の上皮細胞が transverse 及び splanchnic mesoderm へ迷入する事により開始する。ラットに於いては肝芽(liver bud)は胎生10日(E10)から形成され、引き続いて膵芽(pancreatic bud)がE11に形成される。

膵臓の代表的な組織障害モデルには、成体ラットの銅欠乏食モデル(Cu-depletion/repletion model)がある。ラットの食餌を銅欠乏食に変更すると、90%

以上に及ぶ進行性の腺房細胞の脱落と消失が見られ、8週間後には膵臓の腺房細胞の殆どが消失する(Smith et al. 1982)。同時にサイトケラチン-19陽性を示し、管様構造を取る腺管上皮細胞が間質に於いて増殖する。膵臓内に出現するこれらの小型上皮細胞には、初期の肝芽細胞に於いて発現する α -fetoprotein、アルブミンに加え、更に後期の胎児肝臓に於いて発現の見られる glucose-6-phosphatase、 α 1-antitrypsin の発現が見られる。しかしながら、出生後の肝臓に発現する *mdr-1b*、*serine dehydratase*、*tyrosine aminotransferase* 等の遺伝子は発現していない。又、肝臓の転写因子群については HNF-3 α は発現しておらず、HNF-1 α 及び HNF-4 の発現は微弱である(Dabeva et al. 1995)。これら小型上皮細胞の出現後に、銅を含有する正常の食餌に戻すと、直後から肝細胞様の細胞の出現が膵臓間質内に於いて観察される。この細胞は肝細胞仮生 (pancreatic hepatocyte) と呼称されており、膵臓に於ける肝幹細胞の存在を示唆していると考えられた(Rao et al. 1989, 1991)。更にはこれら pancreatic hepatocyte に分化転換する前のサイトケラチン-19陽性上皮細胞を回収してラット肝臓内に移植すると、それらの細胞が肝細胞索に取り込まれ肝細胞に分化転換する事が明らかにされた(Dabeva et al. 1997)。以上の知見より、銅欠乏時に出現する pancreatic epithelial progenitor cell は肝臓、膵臓に共通の前駆細胞であると考えられた(Dabeva et al. 1997)。

他にも、成体マウス膵臓細胞の移植で、肝細胞の置換が可能である事が示された(Wang et al. 2001)。更にラット及びヒト膵島より、肝細胞及び膵内分泌細胞に分化可能な幹細胞の分離が報告されている(Zulewski et al. 2001)。加えて、膵外分泌細胞由来細胞株 (AR42J) が、デキサメタゾンの存在下でアルブミン陽性細胞へ分化誘導が可能である報告(Shen et al. 2000; Tosh et al 2002)は、肝臓細胞と膵臓細胞への分化の密接な関係と、組織幹細胞の共通性を示唆していると考えられる。膵臓と肝臓が発生的からも極めて近縁にある事は、幹細胞の共通性を一層支持するものであろう(Bisgaard et al. 1991; Deutsch et al 2001)。

5-(3) 唾液腺の発生、及び組織障害モデル

膵臓と同じく内胚葉にも由来しており(Larson et al. 1997)、アミラーゼ産生細胞を含む臓器として唾液腺がある。解剖学的には大唾液腺と小唾液腺に分類され、大唾液腺は顎下腺、耳下腺、舌下腺 (Fig.3)に分類される。膵臓からインス

リン等が分泌される様に、唾液腺からは表皮成長因子 (EGF: epidermal growth factor)、神経成長因子 (NGF: nerve growth factor)等が分泌されており、これらの臓器は共に内分泌にも密接に関与している。

他の臓器と同様に唾液腺に於いても、組織幹細胞の存在が提唱されている。膵臓の組織障害系として膵管閉塞モデル(Abe et al. 1995)があるが、唾液腺の再生実験としても、膵臓と同様に主排泄導管の閉塞により腺細胞を消失させる系がある(Walker et al. 1987a, 1987b)。導管閉塞により殆どの腺房細胞はアポトーシスに陥るが、それに並行して腺管細胞の増殖が見られる。増殖した腺管細胞は、導管が再開通すると5～6日程度で腺房細胞へと分化する(Takahashi et al. 1998)。以上より、導管閉塞時に出現する腺管上皮細胞は腺房細胞の前駆細胞であると考えられている(Man et al. 2001)。

肝臓、膵臓、唾液腺などの腺組織は、障害を受けた場合には、肝臓の atypical ductular proliferation に代表される様に腺管増殖 (ductal proliferation) という共通の反応を示す。障害時に増殖する腺管上皮細胞は、障害後の組織再生の為の材料であり、そこには組織内の各種細胞に分化できる前駆細胞が含まれる事が予想される。しかし ductal proliferation は、単に腺組織の障害時に於いてのみ観察される現象ではない。腺組織はその器官発生の段階で腺管構造の伸長、分岐を繰り返し、最後に腺管の終末部が分泌細胞へ分化するという共通のパターンを踏襲している。つまり分泌細胞への分化を伴わずに、腺管上皮のみが増殖する環境下では、その臓器の器官形成期に見られたような未熟な細胞が出現している事が期待される。特に膵臓と機能的に類似点の多い唾液腺には、膵臓と同様に肝細胞に分化する前駆細胞の存在が期待される。

再生医療に応用する為には、自己複製能と多分化能を有する幹細胞が、胚組織からではなく成体（本人）から分離される事が好ましい。更にその幹細胞分離の材料となる組織に容易にアプローチ出来る事が望まれる。今回私は唾液腺組織から肝臓及び膵臓内分泌細胞のフェノタイプへと分化する前駆細胞を分離した。またこの前駆細胞の移植により、肝細胞への分化を *in vivo* にて確認したので報告する。

(6) 実験方法

6-(1) 実験動物と顎下腺主排泄導管結紮術

Inbred Crj:CD (SD) (Sprague-Dawley) ラットと Crj:LEC (Long-Evans cinnamon) ラット(Nagano et al. 1998; Nakamura et al. 1995)は、チャールズリバー・ジャパン (大阪) より購入した。LEA (Long-Evans agouti) ラットは松本耕三先生 (徳島大学医学部附属動物実験施設: Institute for Animal Experimentation, University of Tokushima School of Medicine)の御好意により供与頂いた。全ての動物実験は、熊本大学医学部附属動物実験施設 (Center for Animal Resources and Development, Kumamoto University and animals) の実験動物ガイドライン (Guide for Care and Use of Laboratory Animals) に沿って行った。

8週齢の雄 LEAラット はジエチルエーテル吸入及びペントバルビタール (ナカライテスク、京都) 30 mg/kg を腹腔内投与した後、仰臥位にて頸部を伸展させて固定した。術野は剃毛後に手術用イソジン及び70%エタノールにて消毒した。頸部の正中部皮膚を縦切開した後に反転させると、両側の顎下腺が正面に露出される(Fig.1)。両側の顎下腺は、周囲の結合織から剥離させ、血管及び排泄導管の通る茎部のみを残して遊離させた(Fig.4)。両側の顎下腺をそれぞれ外側に翻転させ、茎部を走行する動静脈は保存して排泄導管のみを5号絹糸にて二重結紮した(Fig.2)。導管結紮後は顎下腺を元の位置に戻し、頸部皮膚を縫合した。

6-(2) 唾液腺由来細胞の分離、及び培養

導管結紮後6日にて両側の顎下腺を摘出した。導管結紮顎下腺は、正常対象ラットの顎下腺に比べて萎縮している。顎下腺は1 mm片程度に細切し、30mlのEGTA buffer にて37℃で20分間インキュベーションした後、室温で100xg、5分間遠心した。ペレットは60mlのdigestion buffer に懸濁し、37℃で40分間インキュベーションした。Digestion buffer の組成は以下に示す通りである。

(D-MEM/F12 1:1(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), 1.67 mg/ml コラゲナーゼ (Invitrogen), 1.33 mg/ml ヒアルロニダーゼ (ナカライ))

部分的に消化された組織は、更に Dispersion buffer にて37℃で60分間消化した。Dispersion buffer の組成は以下に示す通りである。(D-MEM/F12, 1.67

mg/ml dispase (Invitrogen))

以上のステップにて作成された細胞分散液は、細胞濾過器（セルストレイナー）を通した後、4℃で100xg、5分間遠心した。細胞ペレットは10mlのD-MEM/F12培地に懸濁した後、10%ウシ胎児血清 (Invitrogen) を含むウイリアムズE培地 (Invitrogen)で3回洗浄した。分離された細胞は、 5×10^4 cells/100 mm dishの細胞密度で1型コラーゲンコート（旭テクノグラス、岩城、東京）に播き込みを行った。10%ウシ胎児血清、20ng/mlラット表皮成長因子（ヒゲタ醤油、東京）、 10^{-8} mol/Lインスリン (Invitrogen)、 10^{-6} mol/Lデキサメタゾン (Sigma Chemical, St. Louis, MO)、100U/mlペニシリンG and 100mg/mlストレプトマイシン (Invitrogen)を含むウイリアムズE培地を培地として用いた。出現してきたコロニーは、コロニーピックアップリング（旭テクノグラス）を用いて、ピックアップを行った。また、マトリゲル (BD Biosciences Falcon, San Diego, California) 上での培養は、細胞をウイリアムズE培地にて1:3に希釈したマトリゲル上に播き込んで行った。

6-(3) 唾液腺由来細胞の免疫染色

免疫染色の手技は、ダコジャパンの免疫染色ガイドラインに従った。概要は以下に示す通りである。培養細胞はガラスベースディッシュ（旭テクノグラス）に播き込み、細胞培養を行った。リン酸緩衝液 (phosphate buffered-saline: PBS)にて3回洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド/PBS（ナカライ）にて4℃で20分間固定した。固定後にリン酸緩衝液で洗浄し、浸透化処理を行った。浸透化処理は0.2% polyoxyethylene 20 sorbitan mono-laurate (Tween 20) (和光ケミカル、大阪)を含むリン酸緩衝液にて、室温で10分間インキュベーションして行った。非特異的染色のブロッキングは二次抗体の動物の非特異血清、もしくはnon-specific staining blocking reagent (DAKO A/S Glostrup, Denmark)を用いて行った。今回の検索に用いた一次抗体は以下に示す通りである。抗ラミニン抗体 (DAKO)、抗1型コラーゲン抗体 (LSL co., Ltd., Japan)、抗インテグリン $\alpha 6\beta 1$ 抗体 (Chemicon International, Inc. USA)、fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated 抗ラットアルブミン抗体 (Inter-Cell Technologies, Inc. Hopewell, New Jersey)、抗アルファフェトプロテイン抗体 (DAKO)、抗インスリン抗体 (Biogenesis Ltd., Poole, UK)、抗グルカゴン抗体 (DAKO)、抗ラットネスチン抗

体(BD Biosciences PharMingen. San Diego, California)、抗 anti- β III チューブリン抗体 (Research Diagnostics, Inc., Flanders, New Jersey)、抗GFAP 抗体(DAKO)、抗アミラーゼ抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California)、抗サイトケラチン19抗体 (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK)。今回の検索に用いた二次抗体は、アレクサ488ラベル抗マウス IgG 及び アレクサ594ラベル抗ウサギ IgG (Molecular Probes, Inc. Eugene, Oregon)である。細胞標本の観察は、共焦点レーザー顕微鏡FV500 (オリンパス光学、東京)で行った。

6-(4) 唾液腺由来細胞のフローサイトメトリー検索

細胞の染色とフローサイトメトリー検索は、ベクトンデッキンソン社のガイドラインに沿って行った。概要は以下の通りである。培養細胞は trypsin-EDTA処理にて培養用ディッシュより回収した後、staining buffer にて3回洗浄した。検体細胞は以下の一次抗体とインキュベーションを行った。FITC-conjugated 抗CD34 モノクローナル抗体 (SantaCruz)、phycoerythrin-conjugated 抗CD44s モノクローナル抗体 (Immunotech, Marseille, France)、ビオチン化抗Thy-1 モノクローナル抗体(BD PharMingen)、抗インテグリン α 6 β 1モノクローナル抗体 (Chemicon)、抗 c-kit ポリクローナル抗体 (SantaCruz)。二次抗体 (secondary reagents) は、細胞のラベルに用いた一次抗体に応じて、フィコエリスリン-ストレプトアビジン複合体、アレクサ488ラベル抗マウスIgG、アレクサ633ラベル抗ウサギIgGを使用した。抗体にてラベルを行った細胞は、staining bufferにて3回洗浄を行った。死細胞の判別の為、VIA-probe(BD Biosciences Pharmingen)を用いた。細胞はFACS caliber (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey)を用いて解析を行った。

6-(5) 組織の免疫組織化学及び*in situ* ハイブリダイゼーション

切り出しを行ったラット肝臓と唾液腺組織は、室温にて10%ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋を行った。ミクロトームにて4 μ m厚に作成した切片は、脱パラフィンのステップの後に、内因性ペルオキシダーゼ阻害の為に0.3% 過酸化水素含メタノールにて30分間インキュベーションした。リン酸緩衝液にて洗浄後、抗体の非特異的結合のブロッキングの為に、10%正常ヤ

ギ血清もしくは正常ヒツジ血清を用いて室温にて30分間インキュベーションを行った。組織切片は、1次抗体を乗せてインキュベーションを行った。今回の検索に用いた1次抗体は抗ラットアルブミン抗体 (Inter-Cell Technologies)、抗サイトケラチン-19モノクローナル抗体 (Novocastra Laboratories)、抗ラミニンポリクローナル抗体 (DAKO)、抗 α -fetoprotein ポリクローナル抗体 (DAKO)。サイトケラチン-19染色には抗原賦活が必要である。抗原賦活法として、組織切片を0.05% トリプシン (Sigma)、0.1 mol/L トリス塩酸、0.1%塩化カルシウム (pH 7.8) で 37°C、5分間消化した。

細胞移植を施したレシピエントラットより作成した肝臓の切片は、ドナー(雄)由来の細胞の検出の為に、*sry* 遺伝子をプローブとして *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。*sry* プローブはPCR DIG Labeling Mix (Roche, Basel, Switzerland)を用いて作成した。DIGラベルを行ったPCR産物は、GeneAmp PCR 9700 (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT)を用いて増幅を行った。*sry* 遺伝子(401-bp):のプライマーセットは以下に示す通りである(An et al. 1997)。forward 5'-GTGTTTCAGCCCTACAGCCTGA-3' and reverse 5'-TTGTTGTCCCATTGCAGCAG-3'。*in situ* ハイブリダイゼーションには、GenPoint kits (DAKO) を使用した。染色手技はキットのプロトコールに従った。

6-(6) 2-AAF/PHx と細胞移植

9週齢の雌 LEC ラットをレシピエントラットとして使用した。LEC (Long-Evans Cinnamon) ラットは、4ヵ月齢頃に重篤な黄疸を伴った自然発症の劇症肝炎を来す変異モデル動物として確立されたラットである。ウィルソン病の原因遺伝子として ATP7B 遺伝子が同定されているが、LEC ラットに於いても、同様にラット *atp7b* 遺伝子の一部が欠損していることが知られている。ウィルソン病では、セルロプラスミンを介した肝臓から血中への銅分泌と、胆汁中への銅排泄が低下している。その為肝臓内に銅が過剰に蓄積し、肝炎あるいは肝硬変などの重篤な肝障害が引き起こされる(Hayashi M et al. 2000)。ATP7B 遺伝子の最終産物である Cu-binding P type ATPase の欠失は、銅代謝の異常を来し肝臓内への銅の蓄積を引き起こす(Fatemi N et al.2002)。銅欠乏食が LEC ラットに於ける肝炎の発症を予防する事より、細胞内銅輸送の障害による銅の蓄積が肝障害の原因であると考えられている。ウィルソン病あるいは LEC ラットで

は、機能を保持した ATP7B 蛋白が肝臓内に発現していない為に、正常な細胞内銅輸送が傷害されて、肝臓に銅が蓄積する(Fig.2)。

2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) ペレット(time release pellet 2mg/day; Innovative Research of America, Sarasota, FL) は、2/3 部分肝切除術の7日前にレシピエントラット背部の皮下に埋め込んだ(Fig.5)。2-AAF/PHx 法については Petersen の記載に従った(Petersen et al. 1998a)。レシピエントラットは麻酔下に Higgins—Anderson 法(Higgins et al. 1931)に従って肝部分切除術を施行した。この術式によりラット肝臓の left lateral lobe と median lobe を切除した。

ドナーラット (雄) より分離された唾液腺細胞(8×10^6 cells/ラット) もしくは培養細胞 (1×10^6 cells/ラット)は、200 μ L のウイリアムズ E 培地に懸濁し、レシピエントラットの脾臓下極に 29 ゲージ針を用いて注入した。

6-(7) 培養細胞の GFP ラベル

Enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現しているリコンビナントレトロウイルスベクターは、pLEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech, San Diego, California) を用いてクロンテック社のガイドに従って調整した。SGP-1 細胞にレトロウイルスを感染させ、minimal dilution 法によりEGFP陽性細胞を選択した。EGFP を発現する単一細胞に由来するコロニーを選択し、これを SGP-1/H2と呼称した。SGP-1/H2は、以降の細胞移植実験に使用した。

6-(8) 培養細胞のreverse transcription -PCR解析

Reverse transcription-PCR 法による遺伝子の発現解析を行った。全 RNA を SGP-1 細胞の単層部位及びクラスター形成部位から各々抽出した。RNA の抽出には ISOGEN kits (Nippon Gene, 東京)を使用した。Complementary DNAs は、抽出した全 RNA 1mg をテンプレートとして、Superscript II (インビトロジェン) 及び oligo-dT プライマー(インビトロジェン)を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応については、インビトロジェンのプロトコールに従った。逆転写反応により得られた cDNA は、サーマルサイクラーGeneAmp PCR 9700 (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT) を用いて、以下のプライマーセットで発現遺伝子の増幅を行った(Oh et al. 2000; Zhou et al.1999)。

アルブミン (436-bp), forward 5'-ATACACCCAGAAAGCACCTC-3' and reverse 5'-CACGAATTGTGCGAATGTCAC-3';

a-fetoprotein (686-bp), forward 5'-AACAGCAGAGTGCTGCAAAC-3' and reverse 5'-AGGTTTCGTCCCTCAGAAAG-3';

インスリン (187-bp), forward 5'-TGCCCAGGCTTTTGTCAAACAGCACCTT-3' and reverse 5'-CTCCAGTGCCAAGGTCTGAA-3';

グルカゴン (236-bp), forward 5'-GTGGCTGGATTGTTTGTAATGCTG-3' and reverse 5'-CGGTTCCCTCTTGGTGTTTCATCAAC-3';

GAPDH (580-bp), forward 5'-ATCACTGCCACTCAGAAGAC-3' and reverse 5'-TGAGGGAGATGCTCAGTGTT-3';

Pdx-1 (305 bp), forward 5'-CGGCCACACAGCTCTACAAGG-3', and reverse 5'-TTCCAGGCCCCAGTCTCGG-3';

Pax-4 (214 bp), forward 5'-TGGCTTTCTGTCCTTCTGTGAGG-3' and reverse 5'-TCCAAGACTCCTGTGCGGTAGTAG-3';

Pax-6 (545 bp), forward 5'-AAGAGTGGCGACTCCAGAAGTTG-3' and reverse 5'-ACCACACCTGTATCCTTGCTTCAGG-3';

Nkx2.2 (188 bp), forward 5'-CACGCAGGTCAAGATCTG-3' and reverse 5'-TGCCCGCCTGGAAGGTGGCG-3.

得られた PCR 産物は 4% NuSieve GTG アガロースゲル(FMC Bioproducts, Rockland, ME)にて電気泳動を行った。アガロースゲルは、エチジウムブロマイド(ナカライテスク) 染色にて観察を行った。

(7) 実験結果

7-(1) 主排泄導管結紮による唾液腺組織の組織学的変化

顎下腺に於いて腺管増殖 (ductal proliferation) を起こす為に、3～4週齢の雄SDラットの両側顎下腺の主排泄導管を二重結紮した(Fig.4)。結紮後5～6日目に導管結紮顎下腺は、正常対象ラット顎下腺と比較して、臓器重量は70%程度に減少していた。

唾液腺の腺房細胞はPAS染色陽性を示す(Fig.6A)。しかし結紮後6日目には、PAS陽性細胞は殆どが消失していた。つまり導管結紮により、腺房細胞が脱落、消失した事が観察される(Fig.6B, C)。また正常の顎下腺組織では α -fetoprotein陽性を示す腺管上皮細胞が見られる(Fig.6D)。しかし導管結紮後には、この α -fetoprotein陽性の腺管上皮細胞も同様に消失していた(Fig.6E)。一方、間質に於いては炎症細胞浸潤が見られた。更に結合組織で被包され、管腔構造を形成する背の低い小型腺管上皮細胞の増殖が観察された(Fig.6C)。これら小型の腺管上皮細胞は α -fetoprotein陰性を示していた(Fig.6E)。

導管結紮唾液腺組織のラミニン染色を示す(Fig.6F)。正常顎下腺組織に於いては、ラミニン陽性細胞は観察されない。しかしながら導管結紮後には、細胞集塊を形成しているラミニン陽性細胞の出現が観察された(Fig.6F)。腺管構造を取りつつ増殖している小型の腺管上皮細胞は、ラミニン染色にて陰性を示していた。

7-(2) 結紮唾液腺組織内に出現する細胞の移植

導管結紮により唾液腺内に出現する前駆細胞の、肝臓細胞への分化転換能を確認する為にラットへの移植実験を行った。2AAF/PHプロトコールに従って処理された雌ラットに、雄ラット顎下腺を消化して作成した細胞を移植し、レシピエント肝臓に於けるドナー由来細胞の検出はY染色体sry遺伝子のDNAプローブにて行った。このcross-sex移植は雄SDラットから雌SDラットと、雄LEAラットから雌LECラットとの2つのモデルについて行った。

その結果、移植後2週目に管腔様構造を形成し、卵形の核を持つ細胞集団の増殖 (atypical ductular proliferation) が門脈三角領域周辺に於いて見られた。これらの細胞はサイトケラチン-19陽性(Fig.7A)であり、肝卵形細胞 (hepatic oval

cell) の増殖巣だと考えられた。また同部位の sry 遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションにて一部の細胞に sry シグナルが見られた。これら sry シグナル陽性細胞はドナー由来細胞（唾液腺由来細胞）だと考えられた。他に胆管上皮細胞に、またごく少数の肝細胞にも sry シグナル陽性を認めた(Fig.7B,C)。

移植後4週の肝組織では、殆ど肝卵形細胞は消失していた。この時期に於いても sry 陽性細胞は、胆管上皮細胞及び肝細胞の一部に於いて認められた(Fig.7D)。

7-(3) 唾液腺由来前駆細胞の分離と培養

前項 7-(2)に示した導管結紮唾液腺の細胞移植実験の結果より、hepatic phenotype への分化転換能を有する細胞の出現と存在が予想された。その為、導管結紮唾液腺の細胞分散液より、前駆細胞の分離を試みた。5～6週齢の雄 LEA ラットの主排泄導管を結紮し、コラゲナーゼ/ヒアルロニダーゼ消化にて得られた細胞分散液を、1型コラーゲンコートデイッシュ上にて、10% ウシ胎児血清 及び 20ng/ml ラット EGF 添加ウイリアムズ E 培地にて初代培養を開始した。唾液腺細胞の一部は1型コラーゲンデイッシュ上に展開して接着した。これらの細胞は肝卵形細胞と同様の敷石状の外観を呈しており(Fig.6G, H)、増殖した後に単層を形成した。これら初代培養コロニーはピックアップし増殖させた後に分散し、再度播き込みを行った。そして再び初回と同様の上皮様細胞コロニーの形成された部位をピックアップし、salivary gland-derived progenitor-1(SGP-1)から SGP-4 の4つのサブクローンを得た。

得られた SGP 細胞は 2×10^5 /100mm dish の濃度で巻き込みを行うと(Fig.6A)、3日後には単層に増殖してコンフルエントの状態 (1.0×10^6 cells/100mm dish)になった(Fig.8B)。コンフルエント後(5日目)より徐々に単層細胞の各所にて rat-SGP 細胞が pile up し、小型の細胞塊(small cell cluster) が形成された(Fig.6H, Fig.8C)。この後、単層部の細胞は次第にデイッシュ面より脱落した。細胞塊は暫く残りそのサイズを大型化するが、こちらも培養が15日以上に及ぶと徐々に脱落が始まり(Fig.8D)、30日以降には完全にデイッシュ面から剥離した。全ての細胞クラスターの脱落后は、少数の細胞のみがデイッシュ面に残された。これらの細胞は更に培養を継続すると、再び増殖してコロニーを形成し単層を形成した。その後も細胞クラスターの形成が初回の播き込み時と同様に観

察された。

7-(4) *in vitro* に於ける SGP 細胞の分化能

継代数 15 までの SGP-1 細胞について免疫蛍光染色を行った。SGP-1 細胞は 1 型コラーゲンコートディッシュ上に播き込みを行った。上述の通り、1 型コラーゲン上で培養すると SGP-1 細胞は 30~100 個の細胞から形成される細胞塊 (cell cluster) を形成する。これらの細胞塊は肝臓及び膵臓内分泌細胞のフェノタイプを有する細胞を含んでいた。細胞塊は肝細胞様細胞を含む hepatic cluster と、膵臓内分泌細胞様細胞を含む pancreatic cluster とに大別された。Hepatic cluster には、アルブミン及び α -fetoprotein 陽性細胞が観察された (Fig.9C)。しかしながらサイトケラチン-19 陽性細胞は殆ど見られなかった。

Pancreatic cluster には、膵内分泌細胞マーカーであるインスリン及びグルカゴン陽性細胞が確認された (Fig.9G, H)。インスリンとグルカゴンの二重染色では、各々の陽性細胞が互いに接着して存在している事が観察された (Fig.9I)。一部には、インスリン及びグルカゴンの二重陽性細胞も観察された (Fig.9I)。これらの肝臓、及び膵臓の分化マーカー陽性を示す細胞は、全て細胞塊の部位に限定されており、単層部の細胞にはマーカー陽性細胞は全く存在していなかった。唾液腺 (及び膵臓) 外分泌腺細胞マーカーであるアミラーゼ陽性細胞については、殆ど観察されなかった。

SGP-1 細胞は 1 型コラーゲン上で細胞塊を形成し、クラスター内の細胞は stochastic に肝臓細胞もしくは膵臓内分泌細胞に分化する。しかしながら細胞外マトリクスの一つであるラミニン上では、1 型コラーゲンと同様に細胞塊を形成するが、これらの細胞塊は殆どが肝臓細胞のフェノタイプを示していた (Fig.9E, F)。膵臓内分泌細胞のフェノタイプを有する細胞からなる細胞塊は見られなかった。

分化に伴う遺伝子発現変化の検討の為に SGP-1 細胞の単層部及びクラスター形成部の細胞より全 RNA を回収し、RT-PCR を行った。単層部の細胞に於いては、肝臓細胞の分化マーカーである α -fetoprotein、アルブミンは発現していなかった。また膵臓内分泌細胞の分化マーカーであるインスリン、グルカゴン、pdx-1、Pax-4、Pax-6、Nkx2.2 のいずれも発現は見られなかった。しかしながら細胞塊部に於いては以上の分化マーカーの発現が全て認められた

(Fig.10)。

7-(5) 未分化 SGP-1 細胞のマーカー検索

SGP-1 細胞の characterization の為、成体に存在する肝幹細胞である肝卵形細胞、及び胎生期の肝臓前駆細胞にて報告されている表面抗原について、免疫蛍光染色及び、フローサイトメトリー分析を行った。

低密度状態で培養されている SGP-1 細胞 に於いて、胎生期肝臓前駆細胞にて報告されているインテグリン $\alpha 6\beta 1$ の発現が確認された(Fig.9C)。インテグリン $\alpha 6\beta 1$ のリガンドであるラミニンも陽性を示した(Fig.9A-C)。Tween20 にて浸透化処理を行った SGP-1 細胞ではラミニン陽性(Fig.9B)であったが、浸透化処理を行っていない SGP-1 細胞ではラミニン陰性(Fig.9A)であった。これらの染色所見は、SGP-1 細胞の細胞質内にラミニンが存在し蓄積している事を示している。SGP-1 細胞の x-z 像からも、ラミニンの細胞質内蓄積が確認される(Fig.9 supplement C, D)。

造血幹細胞、及び肝卵形細胞にて報告されている表面抗原についてフローサイトメトリー検索を行った。サイトメトリー法に於いても、殆どの SGP-1 細胞はインテグリン $\alpha 6\beta 1$ 陽性を示した(Fig.11D)。同時に CD44s が弱陽性を示した(Fig.11D)。Thy-1 陽性細胞が 2.5%、c-kit 陽性細胞は 5%程度であった(Fig.11B,C)。CD34(Fig.11B)、CD45 は陰性であった。

7-(6) SGP-1 細胞は肝卵形細胞、胆管上皮細胞、肝細胞へと分化する

長期に渡って継代培養された SGP-1 細胞が *in vivo* に於いて、結紮唾液腺の新鮮分離細胞と同様に肝臓細胞への分化を示すかを検討する為に、SGP-1 細胞の移植実験を行った。移植プロトコールと移植細胞の検出法は新鮮分離細胞移植の場合に従った。

その結果、新鮮分離細胞移植の場合と同じく肝卵形細胞、胆管上皮細胞(Fig.12B)、そして肝細胞(Fig.12A)への分化が確認された。また移植後 5 週目までの検討では、レシピエント肝臓内に結節形成や、核異形を示す細胞などの出現は、マクロ及びミクロの病理学的検索(Fig.12A-F)にて見られなかった。sry 遺伝子による *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学の二重染色法に

より、抗ラットアルブミン陽性細胞の一部に *sry* シグナル陽性を確認した (Fig.12C)。これらの所見より、SGP-1 細胞はアルブミン産生能を有する機能的な肝細胞への分化能を維持していると考えられた。

また EGFP ラベルされた SGP (SGP/H-2) 細胞を移植した場合には、レシピエント肝臓内に於いて、GFP 陽性細胞が巣状に増殖しているのが確認された (Fig.12D, E)。SGP-1 細胞の増殖巣は大形のものも散見された (Fig.12D)。これら GFP 陽性細胞は、同時にラットアルブミン陽性を示していた (Fig.12F)。

7-(7) 胎生期の唾液腺原基に於けるラミニン陽性細胞

胎生 15 日ラットの顎下腺原基に於いては terminal cluster と呼称される球状のクラスター構造が観察される (Fig.13A)。Terminal cluster は、未分化細胞の集塊であり、器官形成に従って枝別れを繰り返して、高度に分枝した腺房構造を形成してゆく。胎生 15~17 日の terminal cluster に於いては、基底膜の主成分であるラミニンが terminal cluster を形成している細胞の細胞内顆粒にも出現する (Kadoya et al. 1989, 1995; Lazowski et al. 1994)。Fig.13B、C に示すように、terminal cluster 形成細胞はラミニン陽性を示していた。

(8) 考察

私は肝臓及び膵臓内分泌細胞の前駆細胞として、上皮様細胞であるSGP-1細胞を移植実験により同定した。未分化なSGP-1細胞は、その特徴としてインテグリン $\alpha 6\beta 1$ と、そのリガンドであるラミニンを発現している。唾液腺の腺管上皮細胞は α -fetoproteinを発現している事が示されているが(Tsuji et al. 1993)、今回同定されたSGP-1細胞は α -fetoprotein陰性であった。ラットに於いては肝臓の幹細胞である肝卵形細胞は α -fetoprotein、アルブミン、サイトケラチン-19が陽性である。これは胎児期の肝芽細胞の遺伝子発現と類似したパターンである(Shinozuka et al. 1978)。更に肝卵形細胞は造血幹細胞マーカーであるThy-1、CD34、c-kitを発現している。一方でSGP-1細胞は α -fetoprotein、アルブミン、サイトケラチン-19、CD34を発現していなかった。これらの知見はSGP-1細胞が、肝卵形細胞とは異なる細胞である事を示していると考えられる。H-CFU-C (hepatic-colony forming unit of culture) は胎仔マウス肝臓から得られた肝臓細胞の前駆細胞である(Suzuki et al. 2000, 2002)。報告されているH-CFU-Cの表面マーカーのプロファイルはc-kit(-)、CD45(-)、 α -fetoprotein(+)、c-met(+)、CD49f(low)である(Suzuki et al. 2000)。SGP-1細胞はCD49f(hi)であり、H-CFU-Cとはこの点で異なっている。加えてH-CFU-Cをラミニンコート上で培養した場合には、サイトケラチン-19陽性細胞が出現するが、SGP-1細胞はラミニン上、もしくは1型コラーゲン上で培養した場合でも、サイトケラチン-19陽性細胞の出現は稀である。RT-PCR法による解析からも、未分化状態のSGP-1細胞は分化した肝臓細胞もしくは膵臓内分泌細胞に発現の見られる α -fetoprotein、アルブミン、グルカゴン、インスリン、Pdx-1、Pax-4、Pax-6、Nkx2.2等の messenger RNAを発現していない。これらの知見は、SGP-1細胞が既に報告されている肝臓(Golding et al. 1995; Petersen et al. 1998a,b Suzuki et al. 2000, 2002)、及び膵臓(Zulewski et al. 2001; Jian et al. 1999)の体性幹細胞とは異なる事を示していると考えられる。

SGP-1細胞は1型コラーゲン上で少なくとも3ヵ月間は、複数の細胞への多分化能を維持したままで維持培養が可能であった。この細胞は放射線照射による細胞分裂阻止への感受性を有し、またSCIDマウスの背部皮下に移植した場合にも、奇形腫等の腫瘍組織形成は見られない。SGP-1細胞の単一細胞培養からは、反復して多様な種類の細胞への分化能を有する多能性前駆細胞が獲得可能であった。しかしながら、一度分化してしまったSGP-1細胞から多能性前駆細

胞を得る事は出来なかった。これらの実験結果は、多分化能を有するSGP-1 細胞の継続的な更新が、1型コラーゲン上の培養で起っている事を示唆している。

SGP-1 細胞は経門脈的に細胞移植を行った場合には、レシピエント肝臓内で肝臓細胞へと分化する。私は、雄ドナーラットの導管結紮唾液腺から分離されたばかりの唾液腺細胞、及び維持培養しているSGP-1細胞をラットに移植した。まず第一の方法として、*in situ* ハイブリダイゼーション法にてドナー由来細胞を検出した。この検出方法は、分離されたばかりの新鮮唾液腺細胞の細胞移植に於いて用いた。その結果、少数のドナー由来の移植細胞が、レシピエント肝臓の肝卵形細胞の増殖領域に存在しているのが確認された。同様に、培養されたSGP-1 細胞も、細胞移植後に肝卵形細胞の増殖領域に存在しているのが確認された。これらの移植細胞は、sry シグナル陰性であるレシピエント由来の周囲の肝卵形細胞と区別がつかなかった。これは、導管結紮唾液腺組織に出現する幹細胞/前駆細胞の一部が、肝臓に存在する肝幹細胞の増殖分化のプロセスに倣って分化しているものだと考えられるが、この可能性を明らかにするには、更なる検証が必要であろう。

SGP-1 細胞は、肝臓に移植した場合には、肝細胞のフェノタイプを有する細胞に分化する能力を有していると考えられる。また一方で、EGFPによりラベルされた細胞を用いて行った移植実験からは、移植されたSGP-1細胞が巣状に増殖している事が明らかとなった。これはSGP-1細胞がレシピエント肝臓内で分裂、増殖が出来る事を示唆している。同時にこの結果は、SGP-1細胞が肝臓細胞の前駆細胞としての能力を有している事を示唆している。また、SGP-1細胞のレトロウイルスのトランスダクション効率が培養繊維芽細胞と同程度に高い事は、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療の対象としても、SGP-1 細胞が適している事を示していると考えられる。

1型コラーゲンコートディッシュ、もしくはラミニンコートディッシュでSGP-1 細胞を培養すると、SGP-1 細胞は肝臓細胞のフェノタイプを有する細胞へと分化する。1型コラーゲンコートディッシュ上で細胞塊の形成が起こると、SGP-1 細胞は α -fetoprotein、アルブミン、グルカゴン、インスリン、Pdx-1、Pax-4、Pax-6、Nkx2.2を発現する。Pdx-1は膵臓の発生に於いて早期に発現する遺伝子の一つである。またPax-4 とPax-6 は ホメオボックス遺伝子であり、その発現は膵島の成熟に必須とされている。細胞塊を形成したSGP-1細胞に見られる

遺伝子発現の結果は、インスリン及びグルカゴン遺伝子の発現が、膵島の発生に
関与している遺伝子群の活性化の結果として起きた可能性を示唆している。
分化プロセスの詳細な同定が、SGP-1細胞からの肝臓細胞、膵臓内分泌細胞の
産生に関与するステップを明らかにする上で重要である。またSGP-1細胞は、
哺乳類の肝臓の早期発生に関与している遺伝子の検索に有用であると思われる。

細胞塊の形成は培養系に於けるSGP-1細胞の分化に必須である。肝卵形細胞
を10% ウシ胎児血清と高濃度グルコース(23mM)を含む培地で培養した場合、
細胞塊の形成は膵臓内分泌細胞への分化を引き起こす(Yang et al. 2002)。細胞間
相互作用が幹細胞/前駆細胞の分化プロセスに重要な役割を担っていると考
えられる。私の実験データは、細胞外マトリクスであるラミニンの存在がSGP-1
細胞を肝臓細胞のフェノタイプを有する細胞へと分化させている事を示唆して
いる。インテグリン $\alpha 6\beta 1$ がSGP-1細胞で発現されている事からも分かるように、
ラミニンはSGP-1細胞の分化に影響する重要なタンパク質の一つであろう。ま
た一方で、肝細胞成長因子(HGF)の存在下に於けるマトリゲル上培養では、SGP-1
細胞はサイトケラチン-19陽性細胞とアミラーゼ陽性細胞へと分化する。これら
の実験結果は、組織幹細胞の分化の運命付けが細胞外マトリクスに極めて依存
している事を示唆している(Brill et al. 2002)。

SGP-1細胞は細胞質内にラミニンを発現している。ラットの導管結紮唾液腺
組織内には、少数のラミニン陽性細胞が細胞集団を形成して出現していた。こ
れらの導管結紮時に見られるラミニン陽性細胞は、正常の成体唾液腺組織内
では見られない。唾液腺組織内に於いてラミニン陽性細胞が見られるのは、
胎生期に於いてである。官形成期の唾液腺には、terminal cluster と呼称される
上皮細胞塊が出現する。その terminal clusterを形成している上皮細胞は、
ラミニン陽性を示している(Kadoya et al. 1989, 1995; Lazowski et al. 1994)。もう一つの
SGP-1細胞の特徴は、CD44s弱陽性を示している事である。CD44sは唾液腺の
器官形成期(胎生16日から出生まで)に発現している(Weber et al. 1996)。
CD44sの発現は発生期の膵臓に於いても見られる。しかしながら、肝臓に於
いてはCD44sの発現は見られない(Weber et al. 1996)。CD44sはヒアルロン酸
の受容体であり、フィブロネクチン、グルコサミノグリカンに対する結合ド
メインを有しており、細胞間接着の役割を果たしている。これらのマーカー
の知見は、SGP-1細胞が胎生期の未熟な唾液腺細胞と同様の特性を有して
いる事を示唆してい

る。

骨髄由来の幹細胞は全身を循環し、各臓器組織に分布して組織再生に貢献していると考えられている(Krause et al. 2001)。SGP-1細胞も骨髄に由来している可能性が考えられる為、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を持つROSA26マウスをドナーとして、B6マウスに骨髄移植を行った後に、レシピエントマウスの唾液腺導管を結紮した。骨髄移植を受けた後に唾液腺導管を結紮したレシピエントマウスの唾液腺内にて増殖している腺管上皮細胞は、ドナー由来細胞で再構築されている骨髄細胞由来ではなかった。この知見より、SGP-1細胞は唾液腺に由来する細胞であると考えられる。

成体組織に存在する幹細胞／前駆細胞の臨床応用は、大変期待される所であろう。アクセスの容易な臓器組織からの組織幹細胞の分離と、特定の組織細胞への効率的な分化誘導は、細胞移植療法の臨床応用には不可欠である。今回、ラミニン上に於いて SGP-1 細胞を培養する事で、 α -fetoprotein もしくはアルブミンを産生する肝臓細胞のフェノタイプを有する細胞へ効率的に分化誘導出来る事を示しており、これらの唾液腺に由来する前駆細胞は、肝臓への細胞移植に適していると考えられる。

(9) 結語

導管結紮唾液腺から分離された rat-SGP 細胞は、その特徴としてインテグリン $\alpha 6\beta 1$ 及び細胞内ラミニンが共に陽性であった。SGP-1 細胞内に於けるラミニン蓄積は、器官形成期の唾液腺の terminal cluster 形成上皮細胞における所見と共通している。またラット SGP-1 細胞は、1 型コラーゲン上で肝臓細胞及び膵臓内分泌細胞へのランダムな分化能を有していた。また肝臓障害モデルラットへの細胞移植により、*in vivo*にて肝臓細胞への分化能を有している事が確認された。これらの知見より、SGP-1 細胞が内胚葉系の組織に共通する前駆細胞である事を示唆していると考えられた。

成体組織内には、組織障害に反応して多分化能を持つ前駆細胞が出現すると予想される。唾液腺の導管結紮により誘導した前駆細胞は、肝臓及び膵臓の再生医療に有用であると考えられる。

(10) 参考文献

Abe K, Watanabe S. 1995. Apoptosis of mouse pancreatic acinar cells after duct ligation. *Arch Histol Cytol* ;58:221-229.

An J, Beauchemin N, Albanese J, Abney TO, Sullivan AK. 1997. Use of a rat cDNA probe specific for the Y chromosome to detect male-derived cells. *J. Androl* ;18:289-293.

Avalos AM, Labra CV, Quest AF, Leyton L. 2002. Signaling triggered by Thy-1 interaction with beta 3 integrin on astrocytes is an essential step towards unraveling neuronal Thy-1 function. *Biol Res*:35:231-238.

Bisgaard HC, Thorgeirsson SS. 1991. Evidence for a common cell of origin for primitive epithelial cells isolated from rat liver and pancreas. *J Cell Physiol* ;147:333-343.

Brill S, Zvibel I, Halpern Z, Oren R. 2002. The role of fetal and adult hepatocyte extracellular matrix in the regulation of tissue-specific gene expression in fetal and adult hepatocytes. *Eur J Cell Biol* :81:43-50.

Craig W, Kay R, Cutler RL. 1993. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J.Exp.Med*;177:1331-1342

Dabeva, MD., Hurston, E. & Shafritz, DA. 1995. Transcription factor and liver-specific mRNA expression in facultative epithelial progenitor cells of liver and pancreas. *Am. J. Pathol.* 147, 1633-1648.

Dabeva MD, Hwang SG, Vasa SR, Hurston E, Novikoff PM, Hixson DC, Gupta S. 1997. Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* ;94:7356-7361.

Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J, Zaret KS. 2001. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development*:128:871-881.

Diehl AM, Rai RM. 1996. (Liver Regeneration 3. serial review) Regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J*:10:215-227.

Dunsford HA, Sell S. 1989. Production of monoclonal antibodies to preneoplastic liver cell populations induced by chemical carcinogens in rats and to transplantable Morris hepatomas. *Cancer Res*.49:4887-4893.

Fatemi N, Sarker B. 2002 Molecular mechanism of copper transport in Wilson disease. *Environ. Health Perspect*.110:695-698.

Fausto N, Laird AD, Webber EM. 1995. (Liver Regeneration 2. serial review) Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J*:9:1527-1536.

Fausto N, Lemire JM, Shiojiri N. 1993. Cell lineages in hepatic development and the identification of progenitor cells in normal and injured liver. *Proc.Soc. Exp. Biol. Med*. 204:237-241.

Golding M, Sarraf CE, Lalani EN, Anilkumar TV, Edwards RJ, Nagy P, Thorgeirsson SS, Alison MR. 1995. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. *Hepatology* :22:1243-1253.

Grompe M, Lindstedt S, Al-Dhalimy M, Kennaway NG, Papaconstantinou J, Torres-Ramos CA, Ou CN, Finegold M. Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinemia type I. 1995. *Nat Med*:10:453-460.

Grompe M, Finegold MJ. 2001. Liver stem cells. In: Marshak DR, Gardner RL, Gottlieb D, eds. *Stem cell biology*. New York: Cold spring harbor laboratory press;471-472

Hao QL, Zhu J, Price MA, Payne KJ, Barsky LW, Crooks GM. 2001. Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood*:97:3683-3690.

Hayashi M, Kuge T, Endoh D, Nakayama K, Arikawa J, Takazawa A, Okui T. 2000. Hepatic copper accumulation induced DNA strand breaks in the liver cells of long-evans cinnamon strain rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276:174-178.

Higgins GM, Anderson RM. 1931. Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following surgical removal. *Arch Pathol* ;12:186-202.

Jiang FX, Cram DS, DeAizpurua HJ, Harrison LC. 1999. Laminin-1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* ;48:722-730.

Kadoya Y, Yamashina S. 1989. Intracellular accumulation of basement membrane components during morphogenesis of rat submandibular gland. *J Histochem Cytochem* ;37:1387-1392.

Kadoya Y, Kadoya K, Durbeej M, Holmval K, Sorokin L, Ekblom P. 1995. Antibodies against domain E3 of laminin-1 and integrin alpha 6 subunit perturb branching epithelial morphogenesis of submandibular gland, but by different modes *J. Cell Biol* :129: 521-534.

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. 2001. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*:105:369-377.

Kren BT, Steer CJ. 1996. (Liver Regeneration 5. serial review) Posttranscriptional regulation of gene expression in liver regeneration: role of mRNA stability. *FASEB J*:10:559-573.

Kubo S, Sun M, Miyahara M, Umeiyama K, Urakami K, Yamamoto T, Jakobs C, Matsuda I, Endo F. 1998. Hepatocyte injury in tyrosinemia type I is induced by fumarylacetoacetate and is inhibited by caspase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*:95:9552-9557.

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Grompe M. 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocyte in vivo. *Nat*

Med:6:1229-1234.

Larson W. 1997. Human Embryology 2nd ed., Churchill Livingstone.

Lazaro CA, Croager EJ, Mitchell C, Campbell JS, Yu C, Foraker J, Rhim JA, Yeoh GC, Fausto N. 2003. Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes. *Hepatology*;38:1095-1106.

Lazowski KW, Mertz PM, Redman RS, Kousvelari E. 1994. Temporal and spatial expression of laminin, collagen types IV and I and alpha 6/beta 1 integrin receptor in the developing rat parotid gland. *Differentiation* ;56:75-82.

Man YG, Ball WD, Marchetti L, Hand AR. 2001. Contributions of intercalated duct cells to the normal parenchyma of submandibular glands of adult rats. *Anat Rec* ;263:202-214.

Martinez-Hernandez A, Amenta PS. 1995.(Liver Regeneration 1. serial review) The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J*;9:1401-1410.

Michalopoulos GK, DeFrances MC. 1997. Liver regeneration. *Science* :276:60-66

Nagano K, Nakamura K, Urakami KI, Umeyama K, Uchiyama H, Koiwai K, Hattori S. 1998. Intracellular distribution of the Wilson's disease gene product (ATPase7B) after in vitro and in vivo exogenous expression in hepatocytes from the LEC rat, an animal model of Wilson's disease. *Hepatology* :27:799-807.

Nakamura K, Endo F, Ueno T, Awata H, Tanoue A, Matsuda I. 1995. Excess copper and ceruloplasmin biosynthesis in long-term cultured hepatocytes from Long-Evans Cinnamon (LEC) rats, a model of Wilson disease. *J Biol Chem* :270:7656-7660.

Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N. 2000. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* :279:500-504.

Rao MS, Dwivedi RS, Yeldandi AV, Subbarao V, Tan XD, Usman MI, Thangada S. 1989. Role of periductal and ductular epithelial cells of the adult rat pancreas in pancreatic hepatocyte lineage. A change in the differentiation commitment. *Am J Pathol* ;134:1069-1086.

Rao MS, Subbarao V, Sato K, Reddy JK. 1991. Alterations of pancreatic hepatocytes in rats exposed to carcinogens. *Am J Pathol* ;139:1111-1117.

Steer CJ. 1995. Liver regeneration (serial review). *FASEB J*;9:1396-1400.

Page DM, Tokugawa Y, Silver J, Stewart CL. 1997. Role of Thy-1 in T cell development. *J Immunol*;159:5285-5292.

Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. 1998a. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology*;27:433-445.

Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. 1998b. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology*;27:1030-1038.

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*;284:1168-1170.

Pistoi S, Morello D. 1996.(Liver Regeneration 7. **serial review**) Prometheus' myth revisited: transgenic mice as a powerful tool to study liver regeneration. *FASEB J*:10:819-828.

Ponder KP. 1996. (Liver Regeneration 6. **serial review**) Analysis of liver development, regeneration, and carcinogenesis by genetic marking studies. *FASEB J*:10:673-684.

Shen CN, Slack JM, Tosh D. 2000. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol* ;2:879-887.

Shinozuka H, Lombardi B, Sell S, Iammarino R.M. 1978. Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline-deficient diet. *Cancer Res.* 38: 1092-1098.

Smith PA, Sunter JP, Case RM. 1982. Progressive atrophy of pancreatic acinar tissue in rats fed a copper-deficient diet supplemented with D-penicillamine or triethylene tetramine: morphological and physiological studies. *Digestion*:23:16-30.

Suzuki A, Zheng YW, Kondo R, Kusakabe M, Takeda Y, Fukao K, Nakauchi H. 2000. Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* ;32:1230-1239.

Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, Onodera M, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. 2002. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* :156:173-184.

Taub R. 1996. (Liver Regeneration 4. serial review) Transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J*:10:413-427.

Takahashi S, Schoch E, Walker NI. 1998. Origin of acinar cell regeneration after atrophy of the rat parotid induced by duct obstruction. *Int J Exp Pathol* :79:293-301.

Teebor GW, and Becker FF. 1971. Regeneration and persistence of hyperplastic hepatic nodules induced by N-2-fluorenylacetylamide and their relationship to hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*31: 1-3.

Thorgeirsson SS. 1996. (Liver Regeneration 9. serial review) Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J*:10:1249-1256.

Tosh D, Shen CN, Slack JM. 2002. Differentiated properties of hepatocytes induced from pancreatic cells. *Hepatology* ;36:534-543.

Tsuji T, Nagai N. 1993. Production of alpha-fetoprotein by human submandibular gland. *Int J Dev Biol* : 37: 497-498.

Walker NI, Gobe GC. 1987a. Cell death and cell proliferation during atrophy of the rat parotid gland induced by duct obstruction. *J Pathol* :153:333-344.

Walker NI. 1987b. Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. I. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am J Pathol*:126:439-451.

Wang X, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. 2001. Liver repopulation and correction of metabolic liver disease by transplanted adult mouse pancreatic cells. *Am J Pathol* :158:571-579.

Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. 2003. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 2003 ;422:897-901.

Weber B, Rosel M, Arch R, Moller P, Zoller M. 1996. Transient expression of CD44 variant isoforms in the ontogeny of the rat: Ectoderm-, endoderm- and mesoderm-derived cells express different exon combinations. *Differentiation* ;60:17-29.

Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. 2002 In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8078-8083.

Yasui O, Miura N, Terada K, Kawarada Y, Koyama K, Sugiyama T. 1997. Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes in vivo in the rat liver. *Hepatology* :25:329-334.

Zhou J, Wang X, Pineyro MA, Egan JM. 1999. Glucagon-like peptide 1 and exendin-4

convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells. *Diabetes* :48:2358-2366.

Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M. 2001. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*:50:521-533.

(11) 図表及び図表の説明

Figure 1. チロシン代謝経路

Figure 2. 肝細胞内に於ける銅の輸送経路

Figure 3. 成体ラットの頸部解剖図譜（正面像）

Figure 4. 顎下腺の主排泄導管結紮術

Figure 5. 導管結紮と細胞移植のプロトコール

Figure 6. 唾液腺の組織病理学的変化と、分離された細胞

Figure 7. 導管結紮唾液腺より分離された新鮮細胞の移植

Figure 8. 1型コラーゲン上に於ける、SGP-1細胞の増殖と細胞塊形成

Figure 9. SGP-1細胞の免疫蛍光染色と、内胚葉細胞への分化

(Figure 9. supplement)

SGP-1細胞のインテグリン $\alpha 6\beta 1$ 、ラミニン二重染色

Figure 10. SGP-1細胞の Reverse Transcription-PCR 解析

Figure 11. SGP-1細胞のフローサイトメトリー解析

Figure 12. SGP-1細胞の移植

Figure 13. 胎生 15 日ラットの唾液腺原基、及びラミニン陽性細胞の分布

Table 1. ラット肝卵形細胞(hepatic oval cell)の誘導法

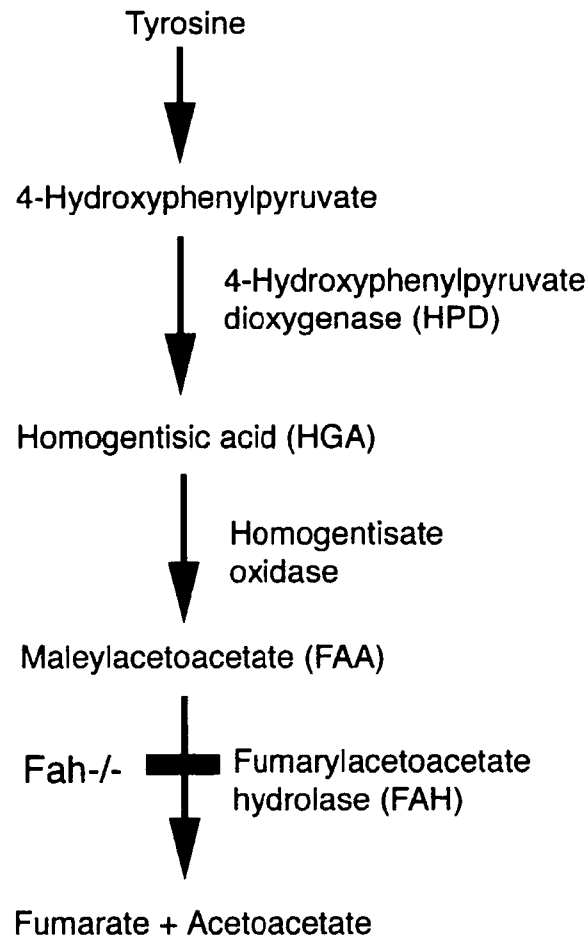


Figure 1.

チロシン代謝経路

チロシンの代謝経路を示す。5種類の連続的な酵素反応により、チロシンはフマル酸(Fumarate)とアセト酢酸(Acetoacetate)に変換される。チロシン異化の代謝異常症の一つにチロシン血症タイプ1 (tyrosinemia type 1)がある。チロシン血症タイプ1では、フマリルアセト酢酸ヒドロラーゼ(FAH;fumarylacetoacetate hydrolase)が障害を受けている。

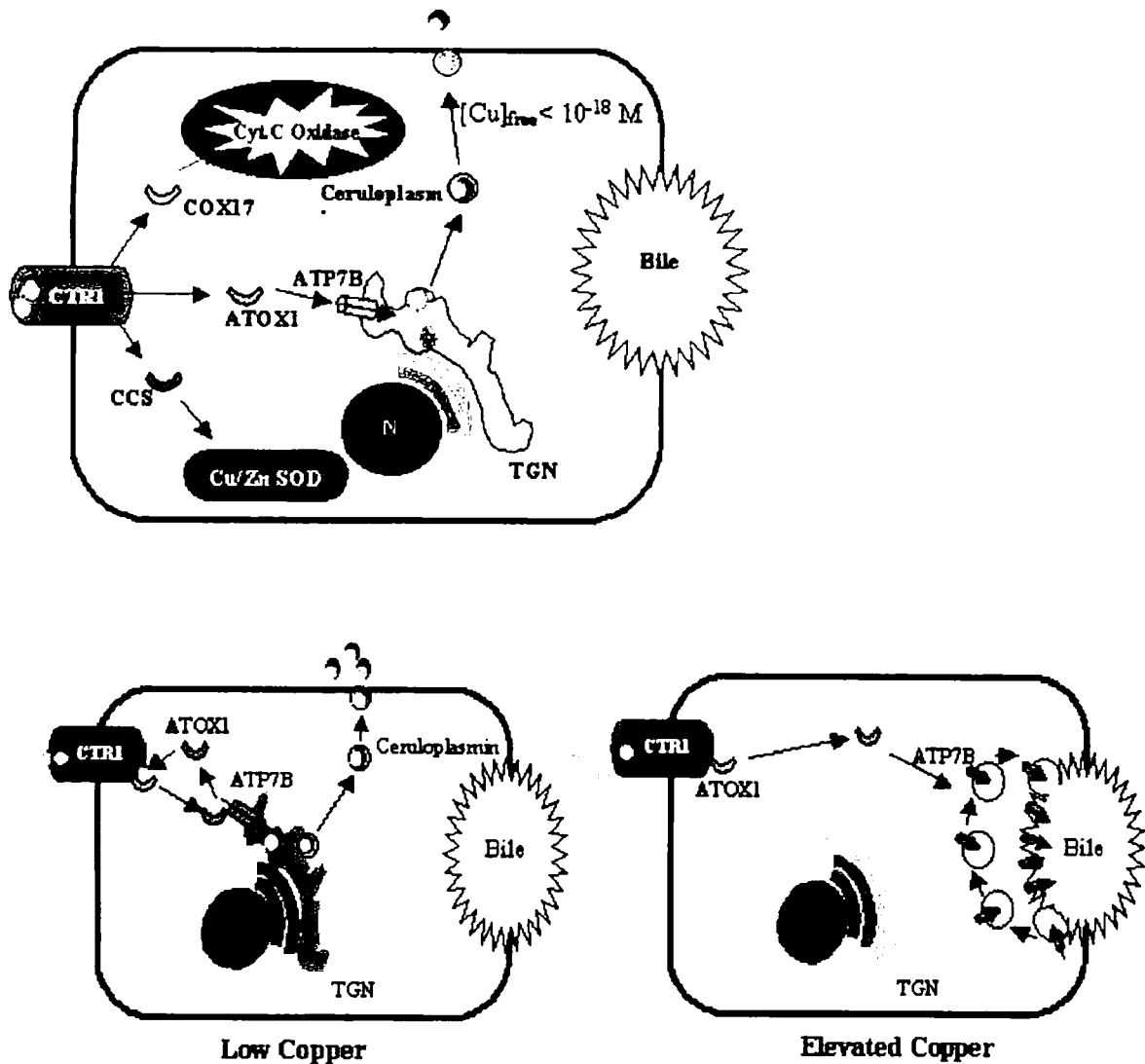


Figure 2.

肝細胞内に於ける銅の輸送経路

銅は copper transporter CTR1を介して細胞内に入り、特異的なシャペロン蛋白 (Atox1, Cox17, CCS) に細胞内に分布する。細胞外銅濃度が低い場合には、銅トランスポーターの ATP7B はTGNに局在している。TGNでは、ATP7Bは銅をアポセルロプラスミンに組み込み、それからホロセルロプラスミンとして血中に排泄する。その為、細胞内銅濃度は殆ど0である。また、銅濃度が上昇した場合には、ATP7Bは直接apical 側より胆汁中へ銅を排泄する。

LEC (Long-Evans Cinnamon) ラットでは、ラット *atp7b* 遺伝子の一部が欠損していることが知られている。その為 ATP7B 蛋白が肝臓内に発現せず、正常な細胞内銅輸送が傷害され、肝臓に銅が蓄積する。



Fig.104. Superficial glands of neck reflected to show relation to underlying structures

LN-lymph node	MAT - multilocular adipose tissue
Par- parotid gland	SD - salivary duct
MS- major sublingual gland	EJ - external jugular vein
SM- submaxillary gland	
SLN- submaxillary lymph node	

Figure 3.

成体ラットの頸部解剖図譜（正面像）

頸部の筋肉系、血管系、リンパ管系、及び大唾液腺（顎下腺、舌下腺、耳下腺）の位置を示す。

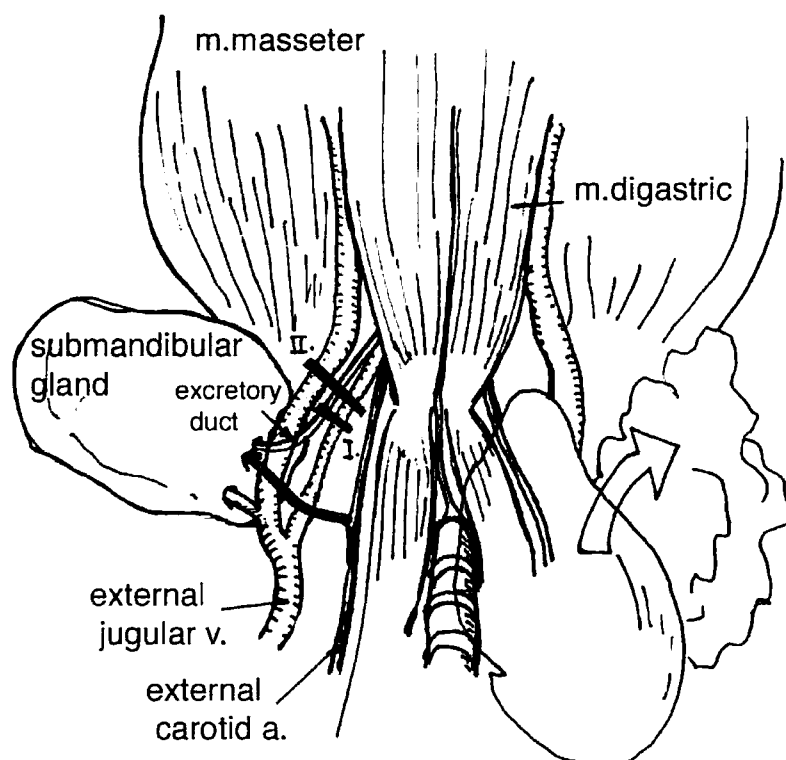


Figure 4.

顎下腺の主排泄導管結紮術

ラット頸部の解剖を更に模式的に示す。

導管結紮に際しては、反転させた顎下腺の頸部より顎二腹筋前枝腱附着部にかけて走行している排泄導管を損傷しないように注意する。またexternal jugular veinの分枝、internal carotid arteryの分枝が導管に並走しているので、これらを導管と同時に結紮しないように注意する。

本図譜中のI.及びII.の様に、血管を同時に結紮した場合には、期待する様な病理学的変化が見られない。また唾液腺組織が著明に萎縮する。

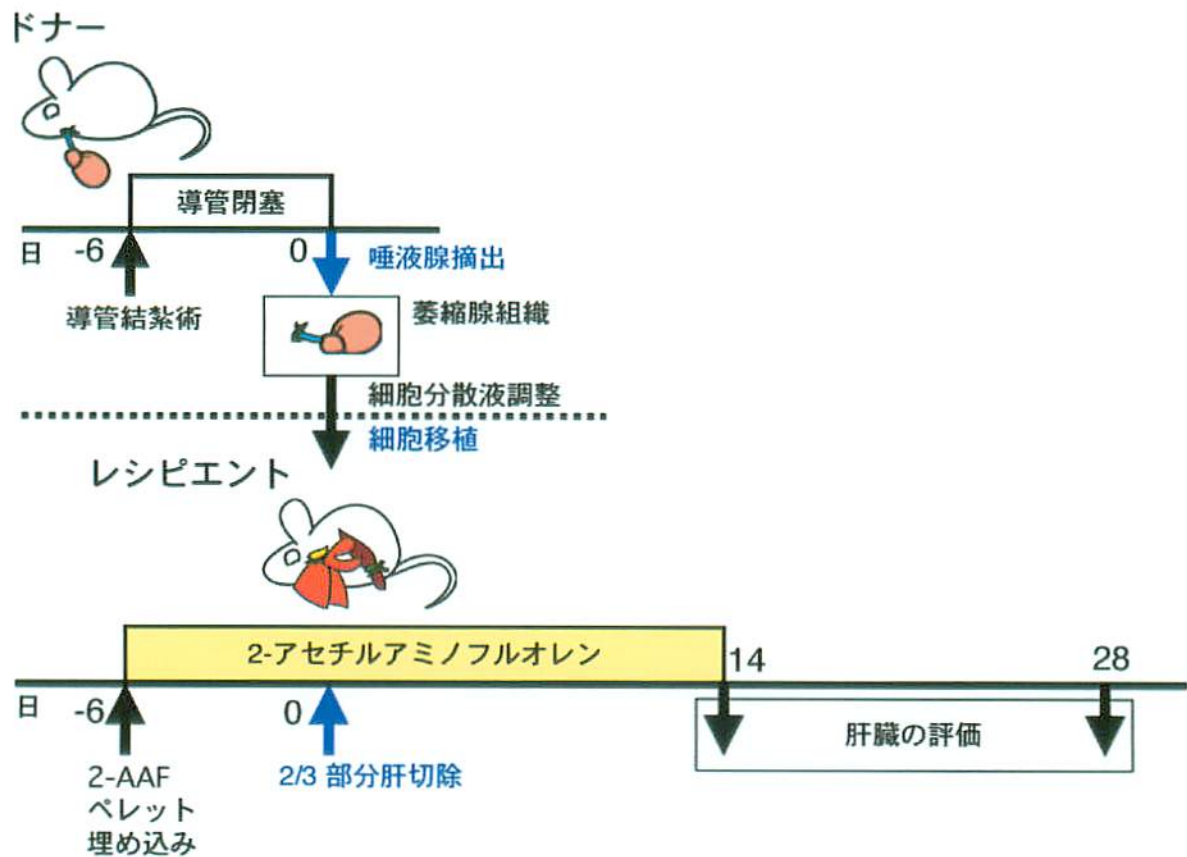


Figure 5.

導管結紮と細胞移植のプロトコール

ドナーラット（雄）の処置

day -6 に両側の顎下腺導管結紮術を行い、day 0 の段階で両側の萎縮唾液腺を摘出する。この萎縮唾液腺を分散して、細胞浮遊液を作成する。

レシピエントラット（雌）の処置

day -6 に 2-アセチルアミノフルオレンの徐放製剤を背部皮下に埋め込む。この徐放製剤は 50mg を 21days かけて放出する。

day 0 に 2/3 部分肝切除術を行い、同時にドナーラット唾液腺より調整した細胞を移植する。細胞移植後 14日、28日 にて肝臓を摘出し、評価する。

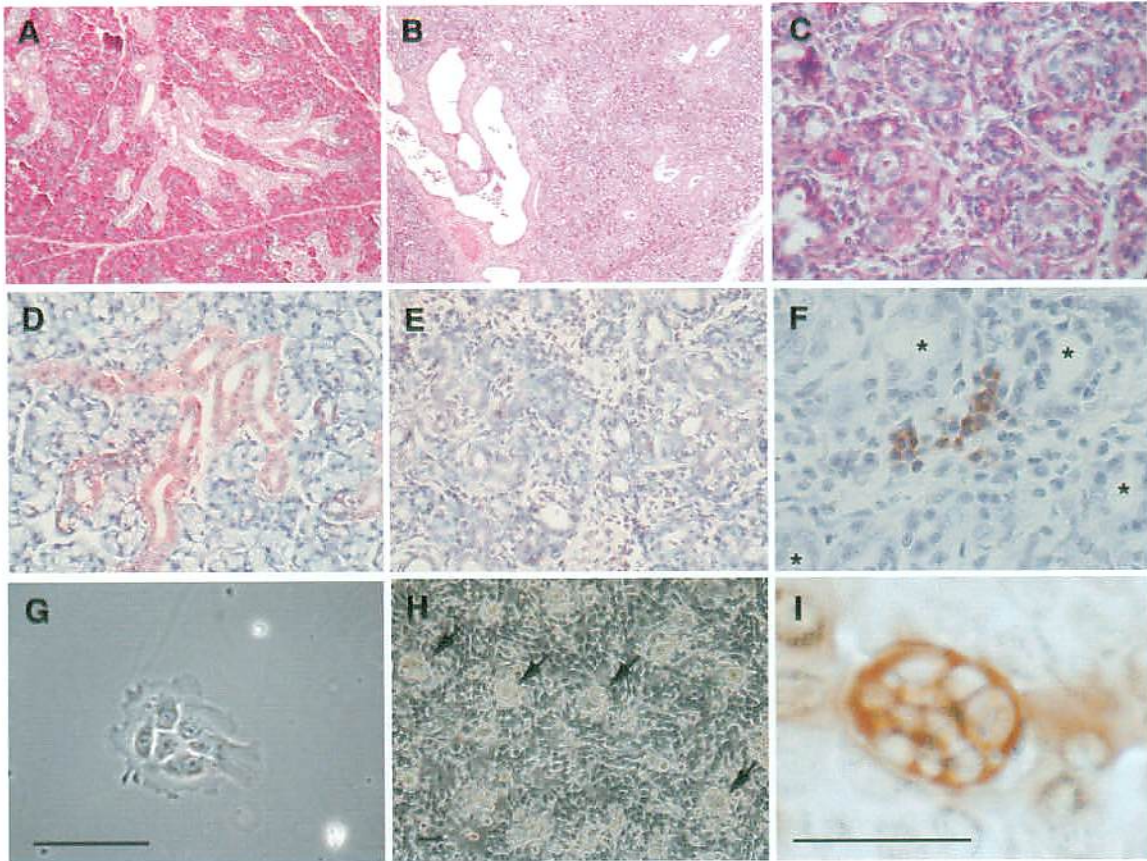


Figure 6.

唾液腺の組織病理学的変化と、分離された細胞。

ラット顎下腺の結紮前(A)と結紮6日目(B,C)の PAS 染色像を示す。ductal proliferation と PAS-陽性の腺房細胞の消失が見られる(B,C)。 α -fetoprotein 染色を示す(D,E)。正常顎下腺の腺管上皮細胞は、 α -fetoprotein 弱陽性を示している(D)。一方、導管結紮を行った顎下腺では、増殖している腺管細胞に α -fetoprotein は見られない(E)。導管結紮唾液腺のラミニン染色像(F)。増殖している小管腔構造の lumen は asterisks で示した。増殖している管腔周囲にラミニン陽性を示す細胞集塊が観察される。分離された上皮様細胞の、1型コラーゲン上に於ける小型コロニー(G)。1型コラーゲン上に於ける唾液腺由来上皮細胞の小細胞塊 (small cell cluster)(H)。1型コラーゲン上に形成された細胞塊のラミニン染色(I)。細胞塊を取り囲む細胞外マトリクスはラミニン陽性である。

(G-I) スケールバーは50 μ mを示す。

original magnification :A and B, X40; C and F, X200; D and E, X100.)

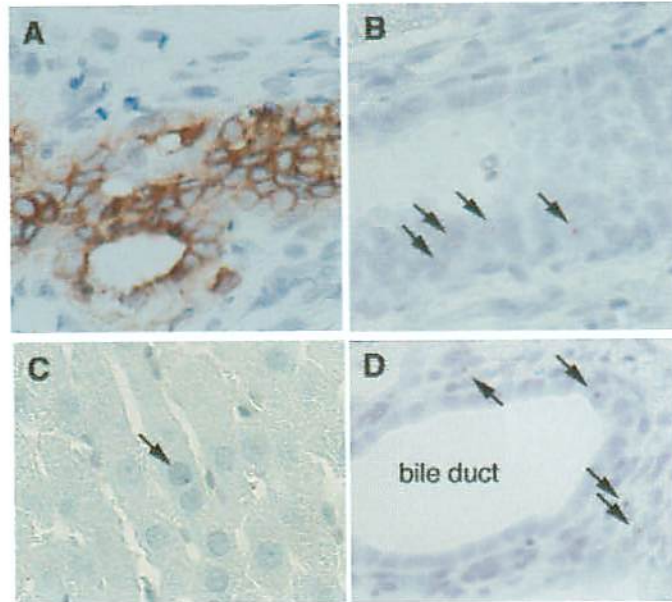


Figure 7.

導管結紮唾液腺より分離された新鮮細胞の移植。

肝臓は細胞移植後14日目(A, B)及び28日目(C, D)にてレシピエントラットより回収した。レシピエントラットはプロトコールに従って、2AAF/PH 処理を行っている。レシピエントの雌ラットに細胞移植を行った後、肝臓内に於ける移植細胞は *sry* 遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーション法により検出した。増殖している肝卵形細胞は、抗サイトケラチン-19抗体染色にて陽性を示した(A)。 *in situ* ハイブリダイゼーション法により、唾液腺由来細胞が肝卵形細胞増殖領域に検出された(B)。矢印は *sry* 陽性の細胞核を示している (B-D)。day 28では、極く少数の肝細胞様細胞 (矢印; C)及び胆管上皮様細胞 (矢印; D)が *sry* の *in situ* ハイブリダイゼーションにて陽性のシグナルを示した。

(original magnification X400,

切片はヘマトキシリンにて対比染色を行っている。)

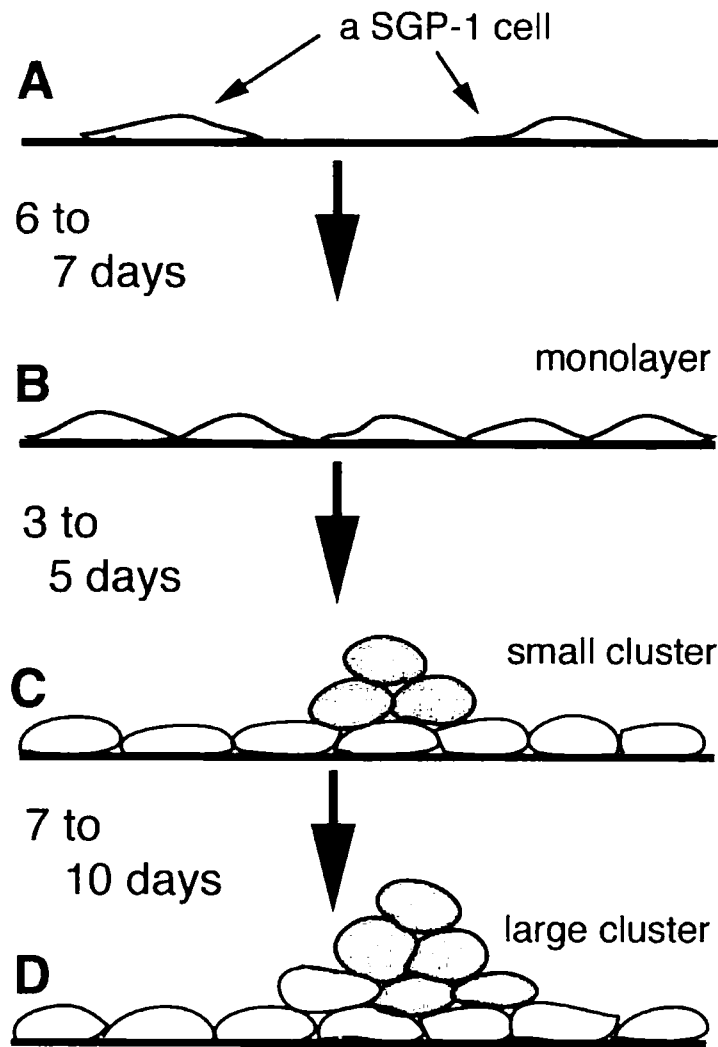


Figure 8.

1型コラーゲン上に於ける、SGP-1細胞の増殖と細胞塊形成

低密度状態(A)。SGP-1細胞を1型コラーゲンコートディッシュに低密度状態 (4×10^5 cells/100mm dish)で播き込みを行った場合には、SGP-1細胞は細胞内ラミニン陽性を示す。

高密度状態(B)。播き込みから6～7日後には、細胞密度は $3.0 \sim 3.5 \times 10^6$ cells/100mm dish に達する。この時期に於いては、細胞塊はあまり観察されない。

小細胞塊形成期(C)。1型コラーゲン上で高細胞密度状態が続くと、SGP-1細胞は小細胞塊 (small cell cluster) を形成する。100mm-dish 当たり $1.0 \sim 3.0 \times 10^4$ clusters が存在しており、細胞塊の細胞の一部は分化を開始する。

大細胞塊形成期(D)。SGP-1細胞は増殖を継続し、細胞塊のサイズも大きくなる。分化した細胞は、細胞塊にのみ存在している。

panel C、Dの dark cell は、分化した細胞を示す。

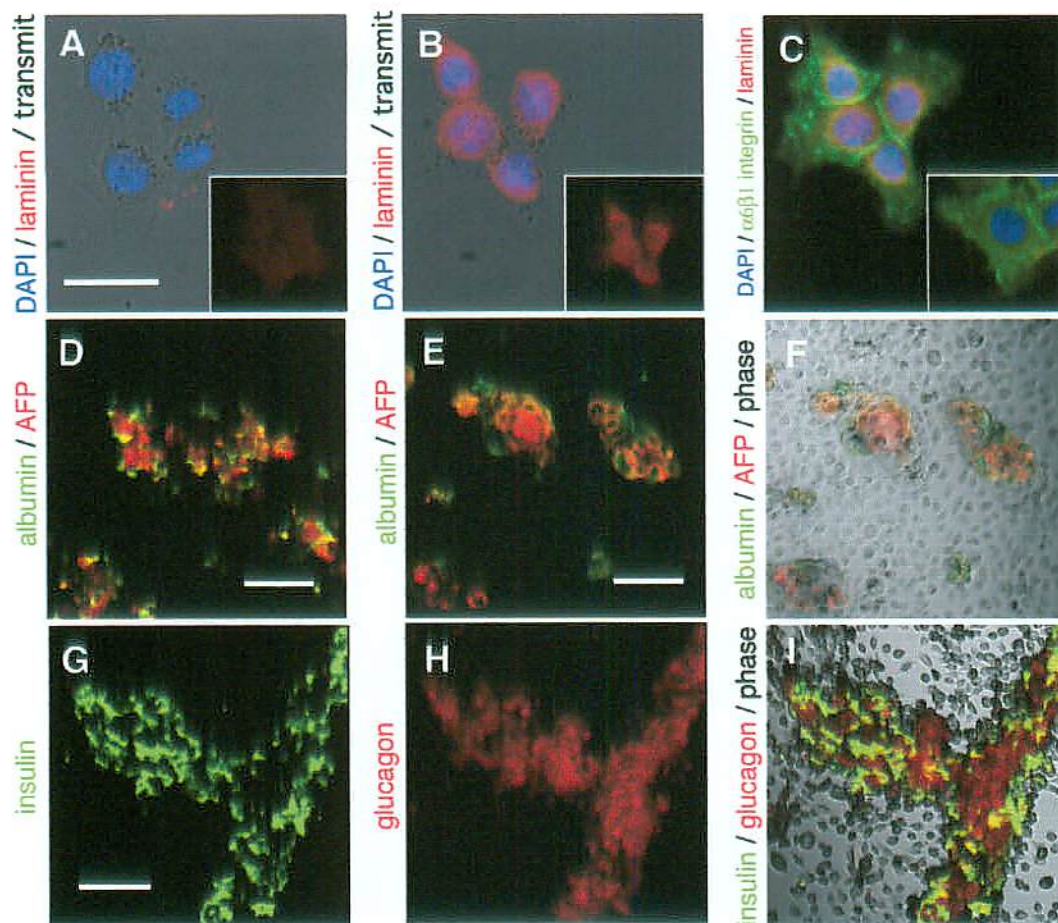


Figure 9.

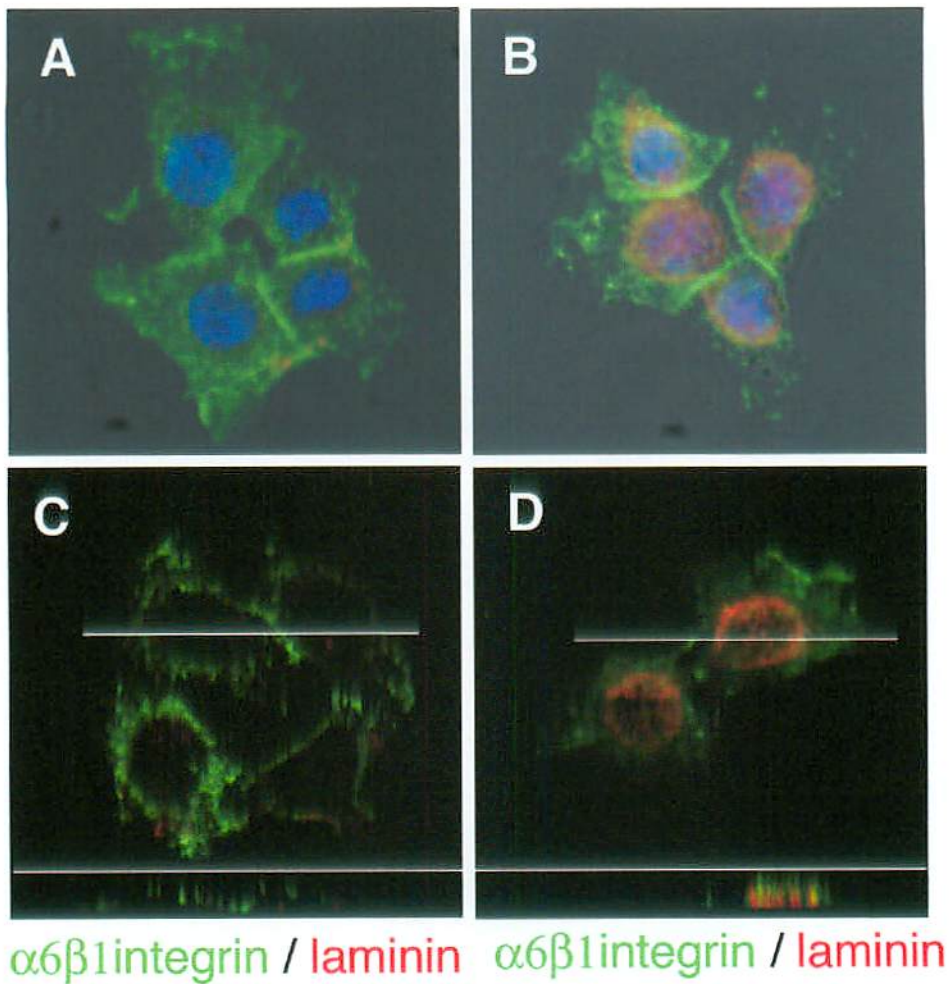
SGP-1細胞の免疫蛍光染色と、内胚葉系細胞への分化

ラミニン染色を tween20 による浸透化処理をしないサンプル(A)と、浸透化処理をしたサンプル(B)の双方について行った。核染色は、DAPIにて行った。panel AとB の inset は、panel A、Bのラミニン染色のみを示している。浸透化処理を行ったSGP-1細胞の インテグリン $\alpha6\beta1$ 、ラミニン染色を示す(C)。panel C の inset は、浸透化処理をしていない細胞の染色像。

1型コラーゲン上での培養にて、SGP-1細胞により形成された肝細胞様細胞からなる細胞塊(D)。アルブミン陽性細胞及び、 α -fetoprotein 陽性細胞が細胞クラスター内に存在する。ラミニン上での培養に於けるSGP-1細胞クラスター(E,F)。ラミニン上での培養では、全てのクラスターが肝臓系の分化マーカーであるアルブミン、 α -fetoprotein 陽性細胞を含む。

1型コラーゲン上での培養にて、SGP-1細胞により形成された膵臓内分泌細胞様細胞からなる細胞塊(G-I)。インスリン陽性細胞、もしくはグルカゴン陽性細胞が存在している。

(スケールバー A-C, 20 μ m; D-I, 100 μ m.)



(Figure 9. supplement)

SGP-1細胞のインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ 、ラミニン二重染色

Panel A, C は tween 20 による浸透化処理を行っていないサンプル、panel B, D は浸透化処理を行ったサンプルである。

Panel C, D の inset は、共焦点レーザー顕微鏡で Z 軸方向に画像を取得し、画像の白線の部分の断面像 (X-Z 方向) の画像を再構成したものである。ラミニンが細胞内に分布しているのが観察される。

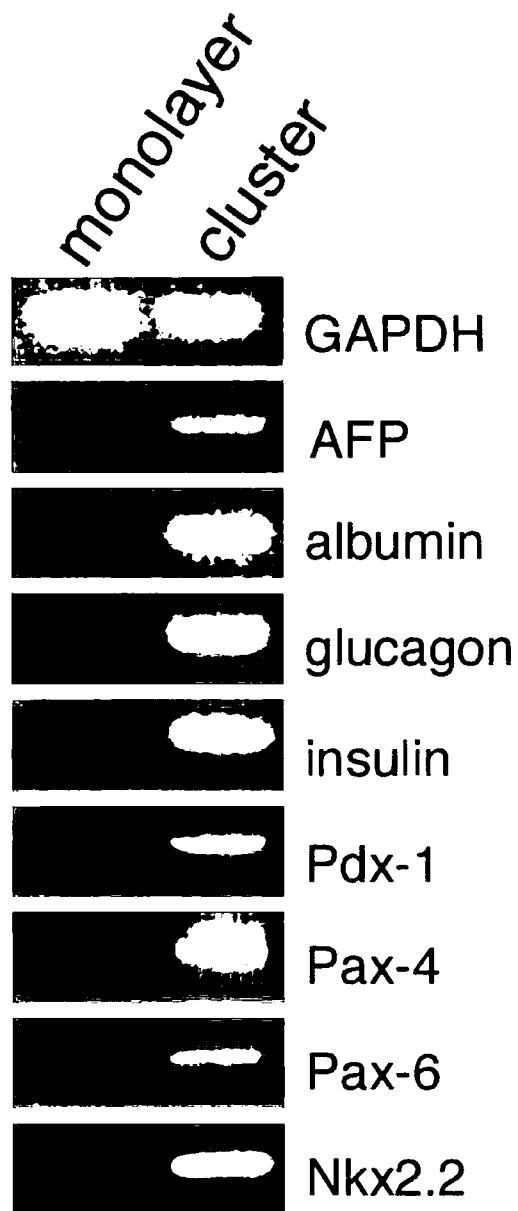


Figure 10.

SGP-1細胞の Reverse Transcription-PCR 解析

SGP-1細胞より回収したメッセンジャーRNAの RT-PCR 解析結果を示す。total RNA をSGP-1細胞の単層培養、及びSGP-1細胞の形成した細胞塊から分離した。GAPDH、 α -fetoprotein (AFP)、アルブミン、グルカゴン、インスリン、Pdx-1、Pax-4、Pax-6、Nkx2.2のプライマーを用いて、これらの遺伝子発現を検討した。

単層培養の状態ではSGP-1細胞には肝臓、膵臓の分化マーカー遺伝子は発現していないが、形成された細胞塊内にはマーカー陽性の細胞が含まれている。

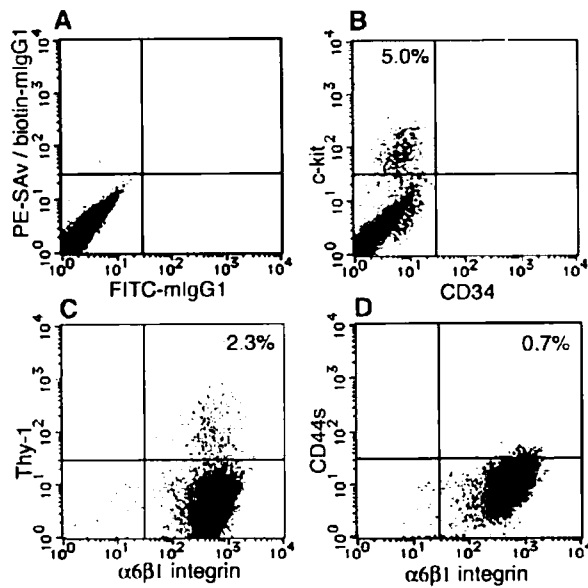


Figure 11.

SGP-1細胞のフローサイトメトリー解析

1型コラーゲン上で単層培養されているSGP-1細胞のフローサイトメトリー解析を示す。SGP-1細胞懸濁液は、以下の抗体で染色を行った。アイソタイプコントロール抗体(A)、FITC-conjugated 抗CD34抗体、及び phycoerythrin-conjugated 抗c-kit抗体(B)。抗インテグリン $\alpha6\beta1$ 抗体、及び phycoerythrin-conjugated 抗Thy-1抗体(C)。抗インテグリン $\alpha6\beta1$ 抗体、及び phycoerythrin-conjugated 抗CD44s抗体(D)。死細胞の判別には、7-aminoactinomycin D を使用した。

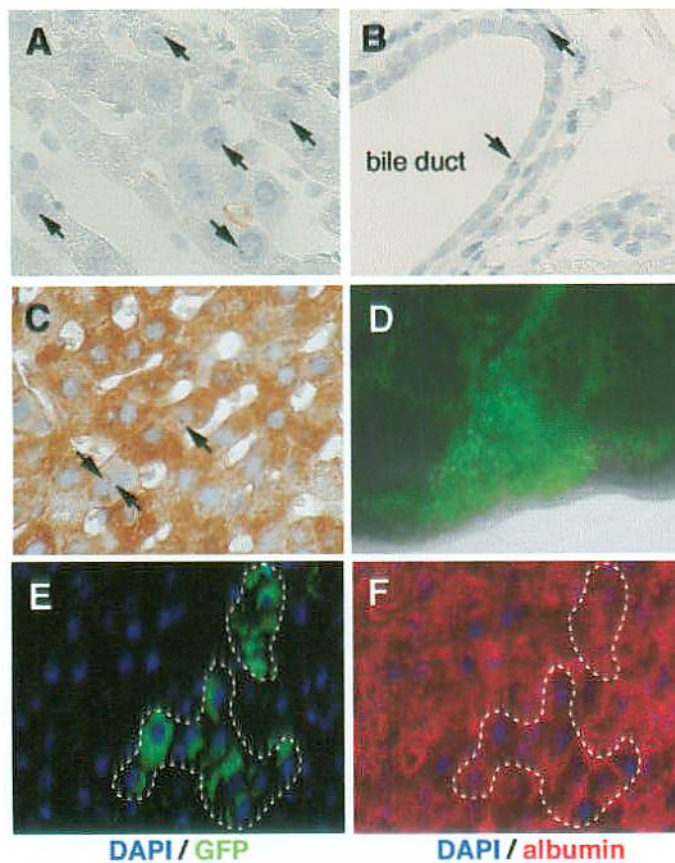


Figure 12.

SGP-1細胞の移植

細胞移植のプロトコールは、Figure 4.に示したタイムテーブルに準じて行った。2-AAF/PH 処理を行ったレシピエントラットは、細胞移植から14日後の肝臓を評価した。

移植したSGP-1細胞は、sry プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにて検出した。矢印はsry-陽性細胞核を示す(A, B)。SGP-1由来細胞は、肝細胞様細胞(A)、もしくは胆管上皮細胞様細胞(B)に認められる。細胞移植実験には15匹のラットを用いた。sry陽性の肝細胞様細胞は $5.7 \pm 3.2\%$ 、胆管上皮細胞様細胞は $1.5 \pm 2.0\%$ 存在していた。SGP-1細胞由来の肝細胞様細胞は、アルブミン抗体染色にて陽性を示していた(C)。

EGFPラベルしたSGP-1細胞(SGP-1/H2)を移植し、14日後に肝臓を評価した。GFP陽性細胞は肝臓切片に於いて、細胞増殖巣を形成していた。5~10箇所的大型の増殖巣(D)と、多数の小型の増殖巣(E)が存在していた。5~10%の肝細胞がGFP陽性を示していた。GFP陽性細胞は、アルブミン染色で陽性であった(F)。

切片はヘマトキシリン(A-C)、もしくはDAPI(E, F)にて核染色を行った。

(original magnification: A-C, E, F, X400.)

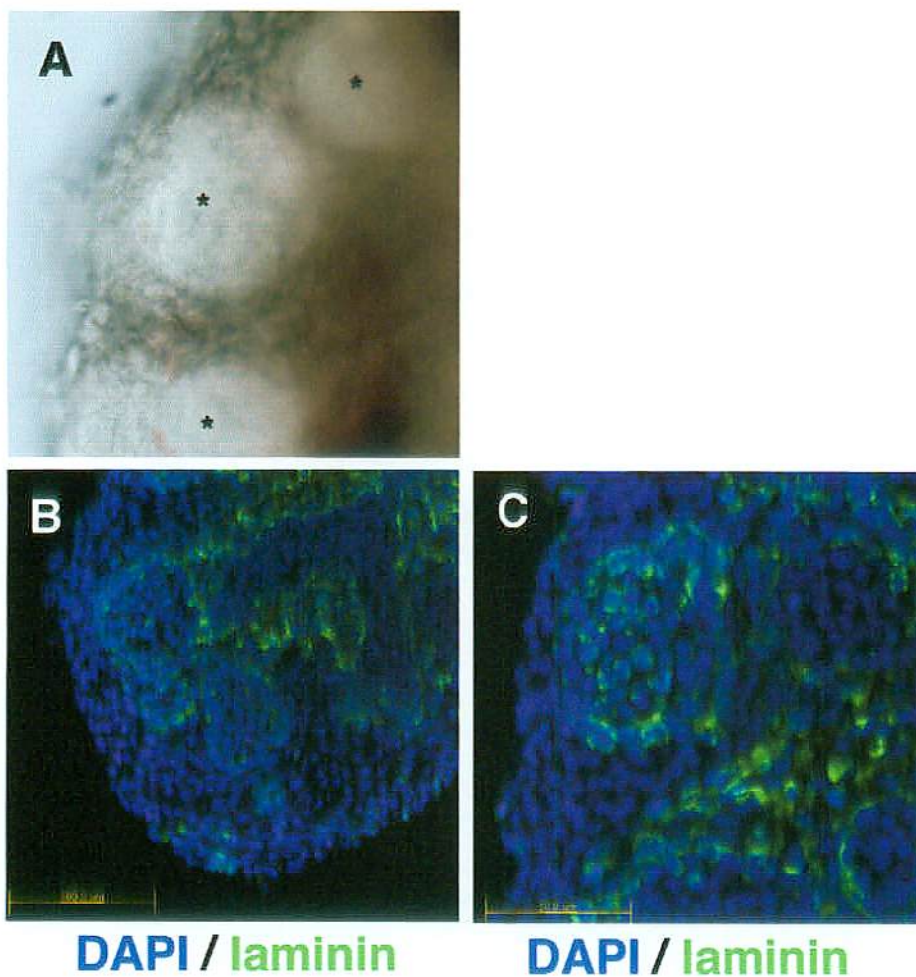


Figure 13.

胎生15日ラットの唾液腺原基、及びラミニン陽性細胞の分布

Panel A (*) に示すのが、terminal cluster である。この球状のクラスター構造に一致して、ラミニン陽性細胞が分布している (B, C)。胎生15日ラットの顎下腺原基は、終末端に terminal cluster と呼ばれる未分化細胞の塊を形成する。Terminal cluster は枝別れを繰り返して、高度に分枝した腺房構造を形成してゆく。Kadoya らの報告によると、胎生15~17日に於いては、基底膜の主成分であるラミニンが terminal cluster 形成細胞の細胞内顆粒にも出現する。この一時的なラミニン合成の亢進は、急激な形態形成に伴う基底膜増大を代償する為だと考えられている。同時にラミニンの主要なレセプターであるインテグリン $\alpha 6\beta 1$ の発現も認められており、これらインテグリン分子を介する細胞外マトリクスとの相互作用が、上皮の分化や形態形成に重要であると考えられる。

Table 1.

ラット肝卵形細胞(hepatic oval cell)の誘導法

Chemical / Manipulation	Reference
2-acetylaminofluorene (2-AAF)	Teebor et al. 1971
Diethylnitrosamine (DEN)	Schwarze et al. 1984
Solt-Farber model (DEN+AAF+PH)	Solt et al. 1977
Modified Solt-Farber model (AAF+PH)	Evarts et al. 1990
Choline-deficient diet+DL-ethionine	Shinozuka et al. 1978
D-Galactosamine+PH	Lemire et al. 1991
Retrorsine+PH	Gordon et al.2000

PH: partial hepatectomy