

北里大学大学院獣医学系研究科

博士課程学位論文審査の結果と最終試験の成績

2021年2月19日

学位論文題目

ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) における小型肝細胞の形態学的研究

氏名 深沢 英恵 所属 獣医学専攻 獣医解剖学

審査委員 主査 北里大学 教授 進藤 順治



副査 北里大学 教授 金井 一享



副査 北里大学 准教授 朴 天鎬



副査 酪農学園大学 准教授 渡邊 敬文







審査の結果

合格

最終試験の成績

優

論文審査の要旨および担当者

学位申請者	深沢 英恵 (DV17008 獣医解剖学)
学位論文題目	ニワトリ (<i>Gallus gallus domesticus</i>) における小型肝細胞の形態学的研究
担当者	主査 北里大学 教授 進藤 順治  副査 北里大学 教授 金井 一享  副査 北里大学 准教授 朴 天鎬  副査 酪農学園大学 准教授 渡邊 敬文 

論文審査の要旨

肝臓は食物の消化に関わる機能を有する以外に、代謝、合成、解毒、貯蔵といった様々な機能を有し、又細胞の損傷に対しても高い再生機能を有する器官である。そのため肝疾患は、ヒトや動物において重要な器官であり、診断や治療に関する研究が数多く行われている。また、肝再生に関する研究には *in vitro* や *in vivo* で様々な実験モデル、実験動物が用いられ、実験的肝障害モデルの一つの胆管結紮では、閉鎖性胆汁鬱滞による線維化や胆管増生などのリモデリングや肝細胞の増殖が示されている。

実験動物では肝再生の研究に、マウスやラットの哺乳動物と魚類としてゼブラフィッシュが用いられている。これらを用いた肝再生機構には、肝細胞が肥大増殖する場合と肝細胞以外の前駆細胞等が肝細胞へ変化する場合があります。この前駆細胞の 1 種に注目すべき小型肝細胞がある。小型肝細胞は、肝細胞と前駆細胞の性質を持ち、肝細胞増殖因子により増殖するこ

とがラットの肝臓を用いた *in vitro* で報告されている。

著者は、肝再生における実験が哺乳動物と魚類が中心に行われ、鳥類の報告例が少ないことから、ニワトリを実験対象動物として用い、胆管結紮による実験的な肝障害モデルを作り、第 1 章では、ニワトリにおける小型肝細胞の組織学的な特徴を観察し、第 2 章では、さらに小型肝細胞について透過型電子顕微鏡による細胞レベルでの観察を行い、第 3 章では小型肝細胞の出現性に関する要因を組織学的に検討した。さらに、第 4 章では肝障害により出現する小型肝細胞がヒアルロン酸受容体である CD44 を有していることから、ヒアルロン酸の投与による小型肝細胞の増生への影響について検討した。このように組織学的な手法を用いニワトリにおける肝細胞板内に出現する小型細胞について検討した。

第 1 章では胆管結紮を施したニワトリの肝臓内に出現し、集簇が認められた細胞の特徴について、組織学的な観察と小型肝細胞のマーカーである CD44、細胞増殖を示す PCNA、細胞接着分子の E-cadherin および肝細胞マーカーの Albumin を用い免疫組織化学的に検討した。

肝臓内に出現した細胞は、肝細胞より小さく、ヘテロクロマチンを多く含み核が濃染し、細胞の集簇は、肝細胞板と連続し存在していた。また、PAS 染色により細胞集簇の一部に赤紫色に染まるグリコーゲン顆粒が確認された。さらに、CD44、PCNA、Albumin のマーカーはそれぞれ陽性を示し、E-cadherin は陰性を示した。以上の組織学的ならびに免疫組織化学的特徴から、胆管結紮を施したニワトリでは、肝臓内に哺乳動物でも確認されている小型肝細胞と類似した細胞が出現することが推測された。

第 2 章では第 1 章で明らかになった哺乳動物の小型肝細胞と類似した細胞について、この細胞が肝細胞への分化する過程、細胞内の構造を詳細に明らかにするため、電子顕微鏡を用いた観察を行った。透過型電子顕微鏡によ

る観察で、小型肝細胞は核と細胞質の電子密度が高く、グリコーゲン顆粒を欠き、細胞小器官が乏しい細胞であり、未分化の細胞に類似した微細構造を呈していた。また、CD44 に対する免疫電顕法では、幼若な形態の細胞ほど細胞膜で広く陽性を示した。CD44 陽性細胞には円形と多角形の 2 種類が存在し、多角形細胞では、CD44 の発現は限局されていた。以上よりニワトリの胆管結紮により出現する小型肝細胞は、微細構造から未分化な細胞の特徴を持ち、哺乳動物の小型肝細胞と類似していた。また、多様な形態や CD44 の発現領域の特徴は何らかの分化過程を示していることが示された。

第 3 章では、第 1 章、2 章で施した胆管結紮による小型肝細胞の出現が他の動物で報告がないことから、ニワトリ特有の出現であるのか明らかにするため、哺乳動物であるラットとマウスを用い小型肝細胞の出現に関する組織学的及び生化学解析による比較検討を行った。胆管結紮により 3 種すべてに胆管増生と線維化がみられたが、ニワトリの肝病変が最も重度であった。CD44 陽性を示す小型肝細胞の出現はニワトリのみで見られた。また、生化学的な解析では、胆管結紮により肝細胞増殖因子 HGF がニワトリの肝臓で増加が確認され、ラット、マウスでは IL-6 の遺伝子発現量が増加し種による違いがみられた。

ニワトリの肝臓には肝細胞増殖因子を発現する類洞周囲脂肪細胞の存在と胆管結紮による遺伝子発現量の増加が小型肝細胞の出現に影響していると推測された。

第 4 章では小型肝細胞に出現する CD44 がヒアルロン酸の受容体でもあることから、胆管結紮を施したニワトリにヒアルロン酸がどのように影響するのかを、ヒアルロン酸投与により検討した。胆管結紮を施したニワトリにヒアルロン酸を投与の有無による組織病変について比較したところ、いずれの病変も大きな違いは見られなかった。また、ヒアルロン酸の血中濃度は胆管

結紮のみと結紮しヒアルロン酸投与した場合、ともにヒアルロン酸の上昇がみられたが、4週目にはヒアルロン酸投与の血中濃度は非投与より低値になっていた。さらに、ヒアルロン酸分解酵素の遺伝子発現では、結紮により Hyal1 と Hyal 2 がともに増加しているが、ヒアルロン酸投与では著しい増加の割合がみられない。

これらのことから、ヒアルロン酸の投与によりヒアルロン酸分解酵素の発現が増加し、ヒアルロン酸が低下したため病変に影響を及ぼさない結果となったと推測された。

以上、本研究は、ニワトリの胆管結紮により出現する小型肝細胞を組織形態学的に明らかにするため、1章では、胆管結紮を施したニワトリの小型肝細胞を組織学的な観察を行い、第2章では、小型肝細胞の微細構造について透過型電子顕微鏡を用い細胞の特徴を示した。第3章では小型肝細胞の哺乳動物との出現性について組織学的に比較検討し、第4章では小型肝細胞の増殖にヒアルロン酸の投与による影響を検討した。これらの組織学的な観察により、ニワトリの胆管結紮により出現する小型肝細胞は、哺乳類で確認されている小型肝細胞と同等の形質であり、哺乳類以外で明らかになった。

著者の研究は、肝細胞と同等の機能と高い増殖能を兼ね備えて、自己細胞移植による肝疾患の治療へ期待がかかる小型肝細胞を、ニワトリの胆管結紮により出現を明らかにし、その成果を学術論文雑誌に2報公表している。これらの知見は、ニワトリの新たな実験的肝障害のモデル動物としての可能性を示し、肝再生機能や肝疾患の解析の学術または技術的な発展に大いに寄与するものと考えられ、高く評価される。よって、審査員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認め合格と判定した。