

学位論文要旨

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

Morphological studies of small hepatocytes in chicken (*Gallus gallus domesticus*)

北里大学大学院獣医学系研究科

獣医学専攻 博士課程

深沢 英恵

Hanae FUKASAWA

指導教授 吉岡 一機

肝臓は多様な機能と高い再生能を持つ器官である。肝疾患は、ヒトや動物において重要であり、肝再生に関する研究には様々な実験モデル、実験動物が用いられてきた。実験的肝障害モデルの一つである胆管結紮では、閉塞性胆汁鬱滞による線維化や胆管増生等のリモデリング、肝細胞の増殖が生じる。また、肝再生の研究に用いられる実験動物には、マウスやラット、近年ではゼブラフィッシュが挙げられる。肝再生機構には、肝細胞自身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、後者の前駆細胞の一種に小型肝細胞がある。小型肝細胞は、肝細胞と前駆細胞の性質を持ち、肝細胞増殖因子などの添加により増殖することが、ラットを用いた *in vitro* の実験で報告されている。

鳥類の中でもニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) は、古くから研究に用いられている実験動物である。近年ではゲノム解析が完了し、脊椎動物間で遺伝子の三分の一が共通することが報告されている。しかし、従来の肝再生の研究において、哺乳類動物と魚類の間といえる鳥類での報告は少ない。したがって、本研究では組織学的解析を中心に、胆管結紮を行ったニワトリに特有な肝再生機構について、*in vivo* で肝臓内に出現する細胞に着目し、検討を行った。

第一章 ニワトリにおける小型肝細胞の組織学的特徴

肝臓の前駆細胞の一種である小型肝細胞は、高い増殖能と肝細胞の性状を持つ細胞である。また、成熟肝細胞と異なり、ヒアルロン酸受容体である CD44 を発現する。第一章では、胆管結紮を施したニワトリの肝臓内で認められる、集簇を形成する細胞の同定を試みた。この細胞は、肝細胞より小さく、ヘテロクロマチンに富む核を

持ち、細胞集簇は肝細胞板と連続して存在していた。さらに、小型肝細胞マーカーでもある CD44、細胞増殖を示す PCNA および肝細胞マーカーの Albumin に対して陽性を示した。肝細胞と同様に、PAS 染色により赤紫色に染まるグリコーゲン顆粒を持つ細胞も認められた。以上の組織学的特徴より、胆管結紮を行ったニワトリで出現した細胞は、哺乳類動物の小型肝細胞と同質であると推察された。

第二章 ニワトリ小型肝細胞の電子顕微鏡学的研究

哺乳類動物の小型肝細胞は、肝細胞へ分化すると考えられている。胆管結紮を行ったニワトリで出現した細胞集簇の中には、組織学的に染色性が異なる小型肝細胞が認められ、分化の程度の違いによるものと考えられた。そこで、ニワトリにおける小型肝細胞の分化について、透過型電子顕微鏡、グリコーゲン顆粒に対する電顕組織化学、CD44 に対する免疫電顕 (Pre-embedding) 法を用いて検討した。その結果、ニワトリ小型肝細胞は未分化な細胞と類似する超微細構造的特徴を有していることが明らかとなった。また、細胞が幼弱な形態の特徴を有しているほど CD44 陽性を示す細胞膜の範囲は広く、肝細胞と類似する細胞では CD44 を発現する範囲は限局されていた。以上より、CD44 の発現領域の違いがニワトリ小型肝細胞の様々な分化過程を示していると考えられた。

第三章 小型肝細胞の出現性に関する組織学的特徴

胆管結紮単独処置で小型肝細胞が出現する報告は無い。そこで、胆管結紮を行ったニワトリの肝臓の特徴を明らかにする為、ラットとマウスにも胆管結紮を施し、比較検討を行った。その結果、胆管

結紮を施した3つの動物種において、ニワトリで唯一、小型肝細胞の出現が認められた。また、ニワトリでは胆管結紮の有無に関わらず、小型肝細胞の増殖因子の一つとして知られる肝細胞増殖因子を発現する類洞周囲脂質細胞が存在した。一方で、3つの動物種間で共通的に、炎症、線維化、胆管増生が認められたが、いずれの変化でもニワトリが最も重度であった。以上より、ニワトリは哺乳類動物と異なり、胆管結紮単独処置で小型肝細胞が出現することが明らかとなり、このことは、肝細胞増殖因子を発現する類洞周囲脂質細胞が胆管結紮に関わらず常に存在することや、胆管結紮による重度の肝障害などが関連していると解された。

第四章 胆管結紮を施したニワトリに対するヒアルロン酸の影響

小型肝細胞の選択培養にはヒアルロン酸が用いられる。また、ヒトの肝線維症では血中ヒアルロン酸濃度が上昇する。しかし、*in vivo*での小型肝細胞へのヒアルロン酸の影響についての報告は無い。そこで、胆管結紮を施したニワトリに対するヒアルロン酸投与による影響を検討した。胆管結紮を行ったニワトリへのヒアルロン酸の投与は、小型肝細胞の出現を含めた肝臓の組織学的変化を誘起しなかった。血中ヒアルロン酸濃度は、偽手術群と比較して胆管結紮単独処置群で有意に高値を示した。しかし、胆管結紮に加えてヒアルロン酸の投与を行った群では、胆管結紮単独処置群より血中ヒアルロン酸濃度は低値を示す傾向にあった。また、ヒアルロン酸分解酵素である Hyaluronidase 1 の肝臓内での遺伝子発現量は、胆管結紮に加えてヒアルロン酸を投与することで増加する傾向を示した。ヒトの肝線維症では、ヒアルロン酸分解能が低下するといわれている。

る。しかし、ニワトリでは、胆管結紮により肝線維化が生じているにも関わらず、ヒアルロン酸の投与でヒアルロン酸分解酵素が活性化し、その結果として肝臓の組織学的変化が生じないことが考えられた。

本研究では、ニワトリの小型肝細胞の存在を、胆管結紮モデルを用いて初めて報告し、その組織学的特徴は哺乳類動物の小型肝細胞と同質であり、肝細胞に分化することを明らかにした。また、胆管結紮単独処置による小型肝細胞の出現は、ラットやマウスには認められないニワトリ特有の現象であった。さらに、胆管結紮を施したニワトリは、ヒアルロン酸の投与により、肝臓内のヒアルロン酸分解酵素が活性化し、小型肝細胞を含めた肝臓組織に対して影響を示さないことが示唆された。小型肝細胞は、肝細胞の機能と高い増殖能を持つことから、自己の細胞移植による肝疾患の治療への貢献が期待されている。ニワトリは、胆管結紮単独で小型肝細胞が出現する為、簡便かつ新たな実験的肝障害のモデル動物として有用であり、肝再生機構や肝疾患の解析への貢献が期待できると考える。