

## O4-04

## 胎仔ラット初代培養肝細胞における毛細胆管様構造の形成に関わる Cx32 と細胞増殖の関係

深澤 祥子<sup>1,2</sup>, 千田 耕輔<sup>2</sup>, 竹内 昭博<sup>1</sup>, 池田 憲昭<sup>1</sup>, 鶴田 陽和<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北里大学大学院医療系研究科医科学専攻医療工学群医療情報学研究室, <sup>2</sup>北里大学医療衛生学部基礎医学系解剖学研究室

【目的】肝細胞の分化・極性化のメカニズムの解析は、肝疾患の治療法開発のために重要である。私達はこれまで胎仔ラット肝細胞の初代培養系において、分化を促進させると、毛細胆管様構造が形成され、アルカリフォスファターゼ (ALP) が毛細胆管様構造を取り巻く細胞膜に局在し、細胞間にギャップ結合 (GJ) の構成蛋白質のコネキシン 32 (Cx32) が発現することを明らかにした。そこで、今回の研究では肝細胞の分化と増殖を制御することによって Cx32 の発現量、毛細胆管様構造の形成、及び細胞の増殖率がどのように変化するかを免疫蛍光法、プロモデオキシウリジン (BrdU) 法、画像解析ソフト (ImageJ) を使用して調査した。

【方法】妊娠 17 日目のラットから無菌的に胎仔の肝臓を摘出・細切し、コラゲナーゼ液で 10 分間、その後カルシウム入りのコラゲナーゼ溶液で 20 分間、スターラーで撹拌した。ガーゼで濾過後、低速遠心で 2 回洗浄し、コラーゲン被覆したカバーガラスに播き、24 時間培養を行った。翌日、培地交換を行い、デキサメサゾン (DEX) 添加培地で 3 日間培養後、上皮成長因子 (EGF) または DEX 添加培地に置き換え、更に 3～4 日間培養し、固定・免疫蛍光染色および BrdU 法を施した。

【データ処理】得られた細胞画像から ImageJ を使用して、Cx32 の発現量、毛細胆管様構造の長短および BrdU 陽性率を求めた。

【結果・考察】DEX 添加培地で培養を行い肝細胞の分化を促すと、Cx32 発現量は有意に増加し、毛細胆管様構造は伸長し、BrdU 陽性率は低値となった。EGF 添加培地で培養を行い肝細胞の増殖を促すと、Cx32 発現量は有意に減少し、毛細胆管様構造は委縮し、BrdU 陽性率は高値となった。これより、肝細胞の分化と増殖の制御により、Cx32 の発現量と毛細胆管様構造の形成は BrdU 陽性率と相反する変化をすることが分かった。

## O4-05

## 不死化羊膜間葉系細胞投与による脊髄損傷治療効果

吉田 淑子<sup>1</sup>, 岡部 素典<sup>1</sup>, 小池 千加<sup>1</sup>, 周 凱旋<sup>1</sup>, 京 哲<sup>2</sup>, 清野 透<sup>3</sup>, 二階堂 敏雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>富山大学大学院医学薬学研究部再生医学, <sup>2</sup>金沢大学医薬保健研究域医学系, <sup>3</sup>国立がんセンター研究所ウイルス部門

近年、再生医療における移植治療の効果が、欠損組織の再生のみならず、細胞の修復作用の増強効果にあることが示唆されている。我々は、これまでヒト羊膜間葉系細胞 (HAM) が、間葉系細胞としての特性を示すだけでなく、軟骨・骨・脂肪組織や神経系細胞やインシュリン分泌細胞への分化能力を有する細胞であることを報告してきた。

今回、ラット脊髄損傷モデルを用い、ヒト不死化羊膜間葉系細胞 (immortalized human amnion mesenchymal cell: iHAM) が脊髄損傷の細胞治療材料として有効であることを報告する。

【材料と方法】Sprague Dawley ラット (雌) の第 9 から 10 胸椎を椎弓切除し、MASCIS (Rutgers university, USA) を用いて脊髄損傷モデルを作成した。モデル作成後、7 日目に、ヒアルロン酸 (HA)、不死化ヒト羊膜間葉系細胞 (iHAM)、HA 添加 iHAM を接種し経時的に BBB (Basso-Beeattie-Bresnaha) test を行い、3 日目、21 日目、42 日目、56 日目に材料を採取し、組織細胞化学法 (H-E 染色、NB 染色)、免疫組織化学法 (anti-GFP, Map2, Neuronal Class III  $\beta$ -tubulin, GFAP, NF, Myelin Basic Protein など) にて効果を検討した。

【結果および考察】モデル作成後 7 日目に iHAM を投与した群では、損傷後 1 週間を経過してから細胞を移植したにも関わらず BBB test の数値が高く、運動能が回復する傾向が見られたが、HA 投与群では差が認められなかった。細胞移植後 56 日目において、損傷部位では、生食投与群では、未だに泡沫状の細胞浸潤、空胞化が著しく組織の損傷が著しいが、iHAM 投与群では空胞化が少なく、軸索の再形成が観察された。このことから、iHAM 細胞は、脊髄損傷の細胞治療材料として有効であることが示唆された。