

Title	肉眼的上皮細胞コロニー法による小腸上皮多分化能幹細胞の研究
Author(s)	井上, 雅智
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36695">https://hdl.handle.net/11094/36695</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	いの 井	うえ 上	まさ 雅	とし 智
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8321	号	
学位授与の日付	昭和63年8月9日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	肉眼的上皮細胞コロニー法による小腸上皮多分化能幹細胞の研究			
論文審査委員	(主査)			
	教授	森	武貞	
	(副査)			
	教授	藤田	尚男	教授 北村 幸彦

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

消化管の陰窩には幹細胞が存在し、常に増殖と分化を行うことにより粘膜を定常状態に保っている。幹細胞の研究は血液の場合が最も進歩しているが、その理由は1個の幹細胞由来のコロニーをつくらることができるためである。消化管についても、小腸の一部にX線照射し、上皮細胞の再生巣を作る方法が古くから知られている。しかしこの小腸上皮細胞コロニーが1個の幹細胞より由来したクローンであることが明確に示されていなかったため、小腸上皮細胞コロニーのクローン性を示すとともにその形態学的検索を行った。

#### 〔方法〕

クローン性の検証方法：phosphoglycerate kinase-1 (PGK-1) の遺伝子はX染色体上にあり、マウスでは電気泳動度の大きいA型PGK-1と、小さいB型PGK-1の2種類のアロザイムが知られている。Pgk-1<sup>b</sup>とPgk-1<sup>a</sup>の遺伝子を各々1個ずつ持つ雌マウスでは、胎生期に2本のX染色体の一方がアトランダムに不活性化されるため、成長した個体ではPgk-1<sup>b</sup>のみが活動している細胞とPgk-1<sup>a</sup>のみが活動している細胞とがモザイク状になっている。そこで検索する組織単位が、1個の細胞より生ずるクローンである場合、電気泳動を行うA又はBの1本のバンドになるが、2個以上の細胞より由来する多クローン性の場合には大部分がAB型の電気泳動パターンを呈する。我々は雌のC57BL/6-Pgk-1<sup>b</sup>/Pgk-1<sup>b</sup>マウスと雄DS-Pgk-1<sup>a</sup>/Yを交配し、雌のF<sub>1</sub>-Pgk-1<sup>b</sup>/Pgk-1<sup>a</sup>マウスを得、実験に用いた。

小腸のX線照射：マウスをネブタール麻酔下に開腹し約5cmの空腸を引き出した。マウス本体は鉛

板で遮蔽し、引き出した空腸の中心部に1700rad、両端に2500radのX線照射を行った。両端に2500radの照射を行うのはその部分の幹細胞を完全に殺すためである。照射後13日までの種々の日にマウスを殺し、照射した空腸を摘出した。

上皮細胞結節、正常絨毛及び正常陰窩の分離：X線照射後13日目のマウスより摘出した小腸の照射部位に発生した再生結節を $\frac{1}{2}$ に分け半分を組織学的検索に用い、残りをEDTA処理し上皮成分のみを採取した。

無処置のPgk-1<sup>b</sup>/Pgk-1<sup>a</sup>マウスを殺し空腸を摘出切開した。EDTA処理後毛細管ピペットを用いて絨毛を1本ずつ採取した。さらに残った粘膜をピペッティングすることにより陰窩を1本ずつ採取した。

上皮細胞結節、正常絨毛および正常陰窩の細胞数：採取した上皮細胞結節をコラゲナーゼ処理して細胞浮遊液とし、細胞数を算定した。

正常絨毛と陰窩はスライドガラス上で風乾後ヘマトキリン染色して細胞数を調べた。

PGK-1の電気泳動：上皮細胞結節のPGK-1パターンを調べる際には澱粉ゲルを、1本の絨毛及び陰窩を調べる際にはセルロースアセテート膜を支持体として用いた。

形態学的検索：上皮細胞結節及び正常小腸のパラフィン連続切片を作製し、HE染色、PAS-アルシンプルー染色及びグリメリウス染色を行った。S期にある細胞を同定するためにはプロモデオキシウリジン (BrdUrd) をマウスを殺す1時間前に注射した。S期細胞により取り込まれたBrdUrdは抗BrdUrdモノクロナール抗体を用いて染色した。また走査電顕及び透過電顕を用いて上皮細胞結節を観察した。

#### 〔成績〕

X線照射後5日目には上皮細胞は完全に消失する。9日目になると光顕的にやっと認められる程度の陰窩様再生巣が出現し、10日目からは肉眼的にも確認できる上皮細胞結節が出現する。13日目にマウスを殺すと、X線照射部位に平均25.3個の上皮細胞結節がみられた。

はっきりと孤立した上皮細胞結節120個のPGK-1の電気泳動パターンは、すべてA型かB型でありAB型のものは存在しなかった。正常空腸の陰窩57個についてもすべてA型あるいはB型を示した。一方、絨毛では55本中52本がAB型を示した。

小腸上皮細胞結節、絨毛及び陰窩の各々の平均細胞数は、上皮細胞結節が95,000個、絨毛が2,200個、陰窩が310個であった。上皮細胞結節のうち大型のものは約30万個の細胞を含むが、このように大型の上皮細胞結節では中央部に絨毛様構造が形成されることが光顕的にも電顕的にも認められた。またこのような大型の上皮細胞結節においてBrdUrdを取り込むS期の細胞は陰窩様部分に限極しており絨毛様部分には殆ど存在しなかった。

上皮細胞結節、絨毛及び陰窩のすべてに吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞が存在するが、パネート細胞は陰窩にのみ存在した。

#### 〔総括〕

空腸にX線を照射した後にみられる上皮細胞結節は1個の幹細胞より由来するクローンであることが

わかった。この様な幹細胞は吸収上皮細胞, 杯細胞, 内分泌細胞に分化し得るという意味で多分化能を持ち, さらに絨毛のような高次な形態を形成する能力も持っていると考えられる。

### 論文の審査結果の要旨

本研究は小腸上皮幹細胞が多分化能を持ち, さらに絨毛のような高次な形態を形成する能力を持っていることを明らかにしたものである。

マウス小腸のX線照射後に発生するコロニーが, 一個の幹細胞より由来したものであり, 異った分化の細胞を有し, さらに, 陰窩及び絨毛を形成することを初めて証明した。小腸上皮の幹細胞の研究に寄与するところ大であって, 学位に値する。