

Title	Epithelial Cell Nodules Developing in the Cecum of Irradiated Mice Some Comparisons with Jejunal Nodules
Author(s)	福島, 幸男
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38500
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"〉 大阪大学の博士論文について〈/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	ふくしま ゆきお 福 島 幸 男
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 8 5 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 5 年 6 月 2 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Epithelial Cell Nodules Developing in the Cecum of Irradiated Mice Some Comparisons with Jejunal Nodules (上皮細胞コロニー法による大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 高 井 新 一 郎 教 授 北 村 幸 彦

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

大腸上皮性腫瘍の発生において発癌物質の標的は陰窩低部の幹細胞と考えられているが、この幹細胞の性質はあまり明らかにされていない。以前我々は、小腸上皮の多分化能をもつ幹細胞の特性を調べ報告しているが、この方法を大腸に応用し、1個の幹細胞に由来する上皮細胞コロニーを作製することにより大腸上皮幹細胞の多分化能、増殖力、粘膜再生等について検討した。

〔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^b と Pgk-1^a 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^b のみが活動している細胞と Pgk-1^a 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、電気泳動を行うと 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^b/Pgk-1^b マウスと雄 DS-Pgk-1^a/Y を交配し、雌の F₁-Pgk-1^b/Pgk-1^a マウスを得、実験に用いた。

上皮性コロニー作製：マウスをネブタール麻酔下に開腹し盲腸を引き出し、マウス本体は鉛板で遮蔽した上で所定量の X 線を照射した後盲腸を還納し閉腹する。一定期間飼育した後に屠殺し盲腸を摘出した。X 線照射により正常粘膜は壊死に陥り脱落し潰瘍を形成するが、生き残った、幹細胞の増殖により粘膜は再構築されてゆく。適切な X 線量と飼育期間を選択すると、潰瘍面に肉眼的に観察し得る、独立した類円形の上皮性再生巣（上皮細胞コロニー）を作ることができる。以下の実験には、23-Gy 照射後 10 日間飼育した Day10 コロニーと 26-Gy 照射後 17 日間飼育した Day17 コロニーを用いた。

上皮性コロニー及び正常陰窩の分離：摘出した盲腸を切開し EDTA 処理することにより、上皮成分のみを粘膜

下結合織より分離し採取した。

上皮性コロニー及び正常陰窩の細胞数：採取した上皮性コロニーを更にコラゲナーゼ処理を加え、細胞浮遊液とし細胞数を算定した。正常陰窩はスライドガラス上で風乾後ヘマトキシリンで核染色し算定した。

PGK-1の電気泳動：Day17コロニーのPGK-1パターンを調べる際には澱粉ゲルを、Day10コロニー及び正常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：上皮細胞コロニー及び正常大腸のパラフィン連続切片を作製し、HE染色、PAS-アルシアンブ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モノクローナル抗体を用いて染色した。又走査電顕を用いて上皮細胞コロニーを観察した。

〔結果〕

大腸上皮幹細胞の放射線感受性（ $Do=1.15$ -Gy）は既に報告されている小腸上皮幹細胞のそれ（ $Do=1.07$ -Gy）と同様の値である。Day10コロニーは2300、Day17コロニーは約20万の細胞よりなり、正常陰窩（細胞数約200）とくらべるとはるかに巨大な組織単位であるが、PGKパターンは単クローン性であることから、正常陰窩と同様1個の幹細胞の分裂、増殖に由来する組織であることがわかり、幹細胞は旺盛な増殖力をもつことを示している。また組織学的に調べると、上皮性コロニー中には、吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞の3種の細胞が確認されることから、幹細胞は多分化能をもつこと示唆された。またDay10コロニーの走査電顕像からもうかがわれるように、1個の幹細胞は立体的な正常粘膜構造を再構築する能力をもつことがわかる。しかし、小腸の上皮性コロニーには絨毛様構造と陰窩様構造が認められたのに対し、大腸上皮性コロニーには、陰窩様構造しか認められなかった。BrdUrdを取り込むS期細胞の分布を見ると、早期（10日目）では上皮表層まで散在するが、17日目になると深部に限局され正常陰窩の増殖帯に近似してくることがわかる。

〔総括〕

大腸上皮幹細胞は吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞に分化する多分化能をもち、更に立体的な陰窩様構造を形成する能力もあると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、大腸上皮幹細胞が単クローン性の上皮コロニーを形成し、吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞に分化する多分化能を持つことをPGK-1^{+/+}-1⁺モザイクマウスを用いて実証したものである。小腸上皮幹細胞とはコロニー形成性、多分化能という点ではよく似ているが、形態学的にvilliを作らないという大きな違いがあることも示された。大腸上皮幹細胞は発癌物質の標的と考えられ、大腸癌の発生機構の解明のためには幹細胞の研究は重要な位置を占める。

この実験系は今後の研究に資するところ大きく、学位に値する業績と考える。