

氏 名	おく むら とも ゆき 奥 村 知 之
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2760 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Neurotrophin receptor p75NTR characterizes human esophageal keratinocyte stem cells in vitro に関する研究 (神経成長因子受容体 p75NTR 発現を用いたヒト食道正常上皮幹細胞の同定 に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 千 葉 勉 教 授 野 田 亮 教 授 今 村 正 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (緒言)

上皮組織幹細胞は、創傷治癒や発癌と深い関係を有すると推察されており、その分化と増殖制御機構の解明はさまざまな病態の解明に繋がるものと考えられる。これまでに重層扁平上皮幹細胞候補として上皮基底層中にあり活発に増殖する  $\beta 1$  インテグリン強陽性細胞、基底層中に存在し細胞周期が静止期にある  $\alpha 6 \beta 4$  インテグリン陽性/増殖関連マーカー 10G7 陰性細胞および低親和性神経成長因子受容体 (p75NTR) 陽性細胞が報告されている。ヒト食道上皮では p75NTR が基底層の一部で発現しており、申請者はヒト正常食道上皮培養細胞の幹細胞とその分化過程について検討した。

#### (材料・方法と結果)

ヒト正常食道上皮培養細胞より p75NTR 発現細胞を同定分離して、その幹細胞形質を検討した。FACS の結果 p75NTR 陽性細胞は NEK の 5~10% であった。次に抗 p75NTR 抗体および磁気ビーズを用いて p75NTR 陽性細胞を分離し ( $N^+$  細胞)、さらに陰性細胞を Type 4 コラーゲンに対する親和性の違いから  $\beta 1$  インテグリン強発現細胞 ( $N^-/\beta 1^{++}$  細胞) および  $\beta 1$  インテグリン弱発現細胞 ( $N^-/\beta 1^+$  細胞) とに分離した。 $N^+$  細胞は小さく均一であり  $N^-/\beta 1^{++}$  細胞は中等度の大きさで卵円形、 $N^-/\beta 1^+$  細胞は大きく不整形であった。ウエスタンブロットの結果、角化上皮分化マーカーであるサイトケラチン 13 は  $N^+$  細胞で弱発現、 $N^-/\beta 1^{++}$  細胞で中等度発現、 $N^-/\beta 1^+$  細胞で強発現しており、インボルクリンは  $N^-/\beta 1^+$  細胞のみで発現していた。FACS による細胞周期解析の結果、休止細胞の割合は  $N^+$  細胞、 $N^-/\beta 1^{++}$ 、 $N^-/\beta 1^+$  細胞でそれぞれ 71%、31%、34% であった。培養後の細胞増殖速度は  $N^+$  細胞、 $N^-/\beta 1^{++}$ 、 $N^-/\beta 1^+$  細胞の順に速く、それぞれ 6 継代、5 継代、2 継代まで増殖した。各細胞サブセットが増殖した後に p75NTR、 $\beta 1$  インテグリンおよび  $\beta 4$  インテグリンの発現を FACS で検出したところ、 $N^+$  細胞からのみ分離前と同様の発現パターンが再現された。 $N^+$  細胞を蛍光色素標識した上で培養したところ、蛍光保持細胞は全て p75NTR 陽性細胞であった。また培養後の p75NTR 陽性細胞は細胞総数に関わらず 5~10% と一定であり、このとき p75NTR 陽性細胞の絶対数は最大 15 倍に増加した。

#### (結論)

p75NTR 陽性細胞は最も分化度が低い、slow-cycling な少数サブセットとして存在し、自己複製しつつ分化細胞を産生することが示され食道上皮組織幹細胞であることが示唆された。さらに幹細胞である  $N^+$  細胞から  $N^-/\beta 1^{++}$  細胞を経て  $N^-/\beta 1^+$  細胞に至る分化過程が示唆された。本研究結果に基づいた幹細胞制御機構の詳細な検討は食道発癌機序の解明に有用であると考えられる。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

上皮組織幹細胞をその分化機序の研究は、発癌機序の解明に貢献すると考えられる。食道上皮幹細胞マーカーとして、低親和性神経成長因子受容体 (p75NTR) と  $\beta 1$  インテグリンが報告されている。申請者はヒト正常食道上皮培養細胞より抗

体および磁気ビーズを用いて p75<sup>NTR</sup>陽性細胞 (N<sup>+</sup>細胞) を分離し、陰性細胞を Type4 コラーゲンに対する親和性の違いにより  $\beta 1$  インテグリン強発現細胞 (N<sup>-</sup>/ $\beta 1$ <sup>++</sup>細胞) と弱発現細胞 (N<sup>-</sup>/ $\beta 1$ <sup>+</sup>細胞) に分離して、食道上皮の分化過程を検討した。N<sup>+</sup>細胞は最も小さく、サイトケラチン13とインボルクリンの発現が低く、全細胞の5%と少なかった。分離時の細胞周期解析で休止期細胞の細胞数はN<sup>+</sup>細胞、N<sup>-</sup>/ $\beta 1$ <sup>++</sup>、N<sup>-</sup>/ $\beta 1$ <sup>+</sup>細胞の順に多かった。また培養後の細胞増殖能はN<sup>+</sup>細胞、N<sup>-</sup>/ $\beta 1$ <sup>++</sup>、N<sup>-</sup>/ $\beta 1$ <sup>+</sup>細胞の順に高かった。各々の細胞サブセットを培養した後に細胞表面マーカー発現を検討すると、N<sup>+</sup>細胞でのみ分離前と同じ発現パターンが再現され、N<sup>+</sup>細胞を蛍光色素標識して培養したところ、蛍光保持細胞は全て p75<sup>NTR</sup>陽性細胞であった。これらより p75<sup>NTR</sup>陽性細胞は食道上皮組織細胞である可能性が高く N<sup>+</sup>細胞から N<sup>-</sup>/ $\beta 1$ <sup>++</sup>細胞を経て N<sup>-</sup>/ $\beta 1$ <sup>+</sup>細胞に至る分化過程が示唆された。

以上の研究は、食道上皮における幹細胞とその分化過程の解明に貢献し、幹細胞制御機構の解明と食道発癌機序の解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成16年2月20日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。