

氏 名	トラチャン シッダルタ シン Tulachan Sidhartha Singh
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2669 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	All-Trans Retinoic Acid Induces Differentiation of Ducts and Endocrine Cells by Mesenchymal/Epithelial Interactions in Embryonic Pancreas に関する研究 (胎児膵における間質上皮間相互作用を介したレチノイン酸の膵管細胞および内分泌細胞への分化誘導作用に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 清 野 裕 教授 鍋 島 陽 一 教授 今 村 正 之

論 文 内 容 の 要 旨

間葉上皮間相互作用は膵発生にとって重要である。レチノイドは種々の臓器の間葉上皮間相互作用におけるシグナル分子として広く認められている。成体膵においてレチノイドはインスリンを増加させるように働くが膵発生におけるその役割はほとんど解明されていない。本研究では膵発生初期におけるレチノイド関連分子の発現を検討し、また三次元培養系を用いて、生理活性が最も強いレチノイン酸である、All-trans Retinoic Acid (atRA) の膵発生時の細胞分化における役割を検討した。

胎生11.5日の未分化膵原基では、レチノイン酸合成酵素 (RALDH2) は間葉のみに発現していることが、RT-PCRと免疫染色により示された。一方レチノイン酸受容体は間葉と上皮の双方に発現していた (RT-PCR)。レチノイン酸結合蛋白 (CRABP II) およびレチノイン酸受容体阻害物質 (COUP-TF II) は主に間葉に発現していた (RT-PCR)。

胎生11.5日の未分化膵原基を外因性atRAを加えたコラーゲングル中で7日間三次元培養し、免疫染色にて組織中の各構成細胞の解析を行った。インシュリン陽性細胞はatRAの濃度依存性に増加し、しかも二重染色によりすべてのインシュリン陽性細胞がPDX-1陽性であることが示された。管腔を形成する細胞もatRAの濃度依存性に増加した。この管腔形成細胞は免疫染色にてサイトケラチンおよびCA-Ⅱ陽性で、電子顕微鏡にても膵管細胞の特徴を有し、膵管細胞であると考えられた。一部には管腔細胞からインシュリン陽性細胞の発芽も観察された。一方アミラーゼ陽性細胞はatRAの濃度依存性に減少した。

PDX-1は膵内分泌細胞分化に重要であり、またその持続的な過剰発現は腺房細胞にアポトーシスを誘導する。atRAによる膵の分化誘導へのPDX-1とアポトーシス関連分子の関与を検討するために、胎生11.5日の未分化膵原基をコラーゲングル中で三次元培養した。膵の細胞分化がすでに完了している6日目にatRAを添加し、7日目にPDX-1とアポトーシス関連分子の増減を免疫染色にて検討した。PDX-1の発現は膵内分泌細胞と腺房細胞の双方において増強していた。腺房細胞においてはBaXとssDNAの発現が増加していた。またatRAの添加により組織中における腺房細胞の構成が崩れ (dysmorphogenesis)、一方ではアミラーゼ陽性でありながら管腔を形成する細胞も認められた (transdifferentiation)。

(結論) 膵発生においてatRAは膵内分泌細胞と膵管細胞の分化維持を促進させ、その機序にPDX-1の発現増強が関与すると考えられた。一方腺房細胞においてはPDX-1の発現増強によりアポトーシスをきたすことが示された。以上よりatRAは間葉上皮間相互作用を介して、膵内分泌・外分泌細胞数の調節および臓器形成に化関わる貴重なシグナル分子であると結論された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者は膵発生初期におけるレチノイド関連分子の発現を検討し、また三次元培養系を用いて、生理活性が最も強いレチ

ノイン酸である、All-trans Retinoic Acid (atRA) の膵発生時の細胞分化における役割を検討した。

胎生11.5日の未分化膵原基では、レチノイン酸合成酵素 (RALDH2) は間葉のみに発現していることが、RT-PCRと免疫染色により示された。一方レチノイン酸受容体は間葉と上皮の双方に発現していた (RT-PCR)。レチノイン酸結合蛋白 (CRABP II) およびレチノイン酸受容体阻害物質 (COUP-TF II) は主に間葉に発現していた (RT-PCR)。

胎生11.5日の未分化膵原基を外因性 atRA を加えたコラーゲンゲル中で7日間三次元培養し、免疫染色にて組織中の各構成細胞の解析を行った。インシュリン陽性細胞は atRA の濃度依存性に増加し、しかも二重染色によりすべてのインシュリン陽性細胞が PDX-1 陽性であることが示された。管腔を形成する細胞も atRA の濃度依存性に増加した。この管腔形成細胞は免疫染色にてサイトケラチンおよび CA- II 陽性で、電子顕微鏡にても膵管細胞の特徴を有し、膵管細胞であると考えられた。一部には管腔細胞からインシュリン陽性細胞の発芽も観察された。一方アミラーゼ陽性細胞は atRA の濃度依存性に減少した。

PDX-1 は膵内分泌細胞分化に重要であり、またその持続的な過剰発現は腺房細胞にアポトーシスを誘導する。atRA による膵の分化誘導への、PDX-1 とアポトーシス関連分子の関与を検討するために、胎生11.5日の未分化膵原基をコラーゲンゲル中で三次元培養した。膵の細胞分化がすでに完了している6日目に atRA を添加し、7日目に PDX-1 とアポトーシス関連分子の増減を免疫染色にて検討した。PDX-1 の発現は膵内分泌細胞と腺房細胞の双方において増強していた。腺房細胞においては Bad と ssDNA の発現が増加していた。また atRA の添加により組織中における腺房細胞の構成が崩れ、一方ではアミラーゼ陽性でありながら管腔を形成する細胞も認められた。膵発生において atRA は膵内分泌細胞と膵管細胞の分化維持を促進させ、その機序に PDX-1 の発現増強が関与すると考えられた。一方腺房細胞においては PDX-1 の発現増強によりアポトーシスをきたすことが示された。以上より申請者は、atRA は間葉上皮間相互作用を介して、膵内分泌・外分泌細胞数の調節および臓器形成に関わる重要なシグナル分子であることを示唆した。

以上の研究は膵発生におけるレチノイドの役割の解明に貢献し膵臓の発生と分化の研究の発展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15年12月1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。