

氏 名	かや 萱 原 はら たか 隆 ひさ 久
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2634 号
学位授与の日付	平 成 15 年 5 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 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine (幹細胞及び早期前駆細胞マーカー候補蛋白, Musashi-1 と Hes1 はマウス小腸の陰窩底部円柱上皮細胞に発現する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 瀬 原 淳 子 教 授 中 畑 龍 俊 教 授 千 葉 勉

論 文 内 容 の 要 旨

緒言 小腸上皮の細胞は主に吸収上皮細胞, 杯細胞, 内分泌細胞, パネート細胞の4種類によって構成されている。これらの細胞はすべて陰窩底部に存在する多能性幹細胞から生ずると考えられている。中枢神経系を始めとする一部の組織では幹細胞が同定されつつあるが, 小腸上皮における幹細胞は未だ特定されていない。

RNA 結合蛋白である Musashi-1 はショウジョウバエの神経感覚前駆細胞の非対称性細胞分裂に必要な蛋白の哺乳類同体として分離され, 中枢神経系において幹細胞を含む前駆細胞に発現し, 幹細胞の維持や細胞の分化に重要な働きをしていると考えられている。

一方 Notch シグナルによって制御される転写因子として知られる Hes1 は神経幹細胞の自己複製と分化の抑制に必要な因子とされている。これらの分子はいずれもマウスの小腸にも発現していることが知られており, Musashi-1 が Hes1 のプロモーター活性を有することから小腸上皮幹細胞の維持, 再生, 分化における Musashi-1, Hes1 の役割について検討した。

方法 小腸の培養細胞である IEC6, Intestine407, および ICR マウスを用いて実験した。ICR マウスを生後 1, 7, 14, 21 日, 及び 8 週令にて屠殺し小腸, 大腸, 肝, 大腸, 胃を採取した。採取した臓器は RNA 採取と免疫組織染色に使用した。免疫組織染色は 4% パラホルムアルデヒドにて固定後 O.C.T コンパウンドまたはパラフィンにて包埋し, 抗 Musashi-1 抗体, 抗 Hes1 抗体, 抗 Ki-67 抗体を用いて行った。また培養細胞及びマウス小腸から採取した Total RNA を用いて RT-PCR を行った。

成績 RT-PCR では Musashi-1 はマウスの小腸, 大腸, 肝, 大腸, 胃, IEC6 に発現が認められたが, Intestine407 には認められなかった。一方 Hes1 はこれらの臓器, 細胞下部すべてに発現が認められた。成熟マウスの小腸粘膜上皮において, Musashi-1 陽性細胞は幹細胞が位置すると推測されているパネート細胞直上部に認められている。Hes1 はパネート細胞を除く陰窩底部から中部にかけての細胞に発現していたが, 縦網の細胞には発現していなかった。更に Musashi-1 と Hes1 はパネート細胞の間に存在する陰窩底部円柱上皮にも発現し, これらの細胞には Ki-67 の発現も認められた。

生後 1 日のマウスでは Musashi-1, Hes1 とともに絨毛間の細胞に発現し, 生後 7, 14 ではパネート細胞の周囲に染色性を有する細胞を認めた。生後 21 日になり, 陰窩の構造が完成されてくるとパネート細胞の間に陰窩底部円柱上皮細胞の存在が明らかとなる。Musashi-1, Hes1 はいわゆる幹細胞領域と陰窩底部円柱上皮細胞に陽性となり, この発育過程においてパネート細胞, 杯細胞, 絨毛吸収上皮細胞は染色性を認めなかった。以上の結果から神経系単細胞マーカーである Musashi-1 と Hes1 は, 小腸粘膜上皮における幹細胞を含んだ未分化な細胞に発現していることが考えられたが, Musashi-1 の方がより未分化な細胞に発現していることがわかった。従来小腸上皮細胞から上皮への分化は, 絨毛に向かって上方に移動するものと下方の陰窩に移動するものがあると考えられていた。しかし Musashi-1, Hes1 が陰窩底部円柱上皮にも発現していたことから, これらの細胞は極めて未分化で, パネート細胞の前駆細胞もしくは幹細胞の一部として存在していることが示唆

された。

論文審査の結果の要旨

従来、小腸の上皮細胞はPaneth細胞直上部に局在する幹細胞から種々の細胞に分化すると考えられていたが、小腸上皮における幹細胞の詳細は未だ明らかではない。中枢神経系の幹細胞マーカーとしてはMusashi-1 (Msi-1), Hes1が挙げられており、いずれも幹細胞の分化を抑制し未分化な状態を維持するとともに、ニューロンへの分化を抑制していると考えられているが、これらは小腸にも発現することが報告されている。

本研究で申請者はICRマウスを用いてMsi-1, Hes1の発現をRT-PCR, 免疫組織学的に解析することにより、Msi-1, Hes1の小腸における局在とその役割について検討し、小腸幹細胞の局在についても検討した。RT-PCRでは、小腸、脳のみならず、肝、大腸、胃においてもMsi-1, Hes1の発現が認められた。免疫組織染色では、adultマウスではMsi-1は幹細胞が存在すると推測されているPaneth細胞直上部の細胞に染色がみられ、さらに興味深いことにPaneth細胞の間に存在する陰窩底部円柱上皮細胞にも強くその発現が認められた。Hes1陽性細胞はMsi-1陽性細胞より広範囲に存在し、Paneth細胞直上部から陰窩中央部付近にまで分布し、Paneth細胞の間にある陰窩底部円柱上皮細胞においてもその発現が認められた。Msi-1, Hes1陽性細胞はKi-67陽性であり、活発な増殖活性を有していると思われた。また生後マウスの発育過程においても、陰窩構造が見られない時期に幹細胞が存在するとされている絨毛間領域にMsi-1, Hes1の発現が認められた。

以上の結果よりMsi-1はHes1に比し、より幹細胞に近い細胞に対するマーカーと考えられた。またPaneth細胞の間に存在する陰窩底部円柱上皮細胞は、Paneth細胞の前駆細胞、または小腸上皮における幹細胞もしくは類似の細胞の一部であることが考えられた。

以上の研究は、小腸上皮細胞における幹細胞の局在と分化制御機構の解明に貢献し、消化器病学の進展に寄与するところが多い。従って、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5月1日実施の論文内容とそれに関する試問を受け、合格と認められたものである。