



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	冬眠シリアンハムスターにおける腸粘膜上皮の細胞更新遅滞 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	浅野, 真未
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11837号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59026
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Mami_Asano_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 浅 野 真 未

学 位 論 文 題 名

冬眠シリアンハムスターにおける腸粘膜上皮の細胞更新遅滞

一般的に動物の冬眠現象は、体温、心拍数、呼吸数および代謝速度の著しい低下ならびに不動化によって特徴づけられる。シリアンハムスターの場合、4～5日間の持続的冬眠と12～24時間の中途覚醒を繰り返し、中途覚醒時には急激な代謝活性上昇がみられるとともに、摂食と排泄が行われる。すなわち、冬眠中のシリアンハムスターは4～5日間の絶食と再摂食を繰り返すが、このときの消化管生理については不明な点が多い。

小腸粘膜は一層の上皮細胞で覆われ、腸管内腔に突出した絨毛と陥没した陰窩の二つの区画に分けられる。陰窩底部には幹細胞が存在し、陰窩で分裂・増殖した上皮細胞は絨毛方向へ移動し、絨毛基部で分裂を停止する。その後は上昇しながら分化・成熟が進行し、絨毛先端に到達した細胞は細胞死を生じて脱落する。小腸上皮におけるこのような細胞更新は、3～5日間で行われる。冬眠動物において代謝活性が著しく低下しているという事実からは、それにとまって小腸陰窩における細胞増殖および陰窩-絨毛軸に沿った細胞移動も抑制されていることが予想されるが、詳細な研究は報告されていない。そこで本研究では、冬眠シリアンハムスターにおける小腸粘膜上皮の細胞更新の変化とそれにとまとう上皮の構造および機能の変化について明らかにすることを目的とした。

従来、陰窩-絨毛軸に沿った小腸上皮細胞の移動速度は、DNA合成を行っている細胞をチミジンアナログによってパルス標識し、それを組織学的に追跡することにより推定されていた。しかしながらこの方法では、標識後の異なる時間において組織を採取するために多くの個体が必要になり、それが困難な冬眠動物でこの方法を適用することは現実的ではなかった。そこで本研究では、二種類の異なるチミジンアナログをそれぞれ異なる方法で検出する二重標識法を用い、同一個体で腸上皮細胞の移動速度を推定する方法を確立した。すなわち、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) および 5-ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU) を時間差で投与し、前者を免疫組織染色により、後者をクリックケミストリーにより検出した。この方法の妥当性についてラットを用いて検証した結果、同一の組織切片において BrdU および EdU が検出可能であること、両者が交差反応しないこと、および両者が同様に DNA 合成細胞に取り込まれることを確認した。さらに、BrdU と EdU の投与間隔と投与順は移動速度の推定に影響しないことも確認した。以上のように、BrdU と EdU の二重標識によって、同一個体で腸上皮細胞の移動速度を推定する方法を確立した。

本研究で確立した腸上皮細胞の移動速度推定法を用い、シリアンハムスターの小腸粘膜上皮の細胞移動速度を推定したところ、活動個体で $5.9 \mu\text{m/h}$ であるのに対し、冬眠個体で $0.9 \mu\text{m/h}$ と著明に低下しており、活動個体の7倍以上も細胞更新が遅滞していることが明らかになった。さまざまな生理・病理条件が小腸粘膜上皮の細胞移動速度に影響をおよぼすことが知られているが、本研究で観察されたような著しい遅滞は過去に報告されていない。

小腸粘膜上皮について組織学的に検索した結果、成熟上皮細胞の指標として知られるアルカリフォスファターゼ（ALP）活性陽性細胞の割合が冬眠個体において増加しており、また ALP mRNA レベルも増加していることを RT-qPCR により確認した。粘液の主成分であるムチンを産生する杯細胞について組織学的に検索したところ、成熟杯細胞の指標であるスルフォムチンを産生する杯細胞の割合が冬眠個体において増加していた。さらに、細胞老化関連 β -ガラクトシダーゼ活性が冬眠個体の絨毛先端の上皮細胞において認められた。これらの結果は、冬眠ハムスターの小腸において細胞更新が遅滞した結果、細胞寿命の延伸にともなって細胞の分化と成熟が進行し、絨毛先端部では細胞老化状態に陥っていることを示唆している。また、電子顕微鏡による観察の結果、上皮細胞表面の微絨毛は、活動個体では長さが均一で整然としていたのに対し、冬眠個体では長さが不均一で粗雑であり、微絨毛を覆う糖衣が冬眠個体では明確に認められなかったため、冬眠による細胞更新の遅滞は上皮細胞の微細構造にも影響をおよぼすことが明らかになった。このような微細構造の変化は上皮のバリア機能に影響をおよぼす可能性が考えられたため、摘出した腸管を用いてタンパク透過性を比較したところ、活動個体と冬眠個体との間に差はみられなかった。したがって、冬眠個体における小腸上皮細胞の微細構造の変化は、少なくともタンパク透過性には影響しないと考えられた。BrdU パルス実験により冬眠個体の小腸陰窩において細胞増殖が低下していることが示されたので、絶食時の細胞増殖低下に関与することが知られている Wnt/ β -カテニンシグナル経路を免疫組織化学により調べた結果、このシグナル経路に関与するタンパク質である β -カテニンと E-カドヘリンの発現分布は冬眠個体において変化は認められなかった。一方、陰窩-絨毛軸に沿った細胞移動に関与すると考えられているタンパク質のうち、indian hedgehog (Ihh) および Cdc42 の遺伝子発現について RT-qPCR により検討したところ、これらが冬眠個体における細胞移動速度の低下に関与することを示す証拠は得られなかった。つまり、冬眠ハムスターにおける小腸粘膜上皮の細胞更新の遅滞に関わる分子機序を解明するためには、さらなる研究が必要である。

以上のように本研究では、新規に確立した小腸上皮細胞の移動速度推定法を用いて、冬眠ハムスターにおける小腸上皮の細胞更新が著しく遅滞していることを証明し、細胞寿命の延長にともなって上皮の成熟亢進と細胞老化が生じることを明らかにした。

