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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11837
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60425
Type	doctoral thesis
File Information	Mami_Asano.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

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

浅　野　　真　未

北海道大学大学院生命科学院

2015 年 3 月

目次 1

略語一覧 3

第 1 章　序論 5

第 2 章　5-Bromo-2'-deoxyuridine（BrdU）と 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine（EdU）の 2 重標識を用いた新しい細胞移動速度推定方法の確立

2－1　背景と目的 11

2－2　方法 12

2－3　結果 16

2－4　考察 21

第 3 章　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

3－1　背景と目的 23

3－2　方法 25

3－3　結果 31

3－4　考察 42

第 4 章　冬眠シリアンハムスターにおける小腸の機能変化

4－1　背景と目的 47

4－2　方法 48

4－3　結果 52

4－4　考察 55

第 5 章　冬眠シリアンハムスターにおける腸上皮細胞更新遅延のメカニズム

5－1　背景と目的 58

5－2　方法 59

5－3　結果 61

5－4　考察 63

第 6 章　総括 65

引用文献 67

謝辞 81

略語一覧

本論文において用いた略語を以下に示す。

AB	alcian blue pH 2.5
ANOVA	analysis of variance
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
CBC	crypt base columnar cells
cDNA	complementary DNA
CldU	5-chloro-2'-deoxyuridine
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GalNAc	*N*-acetylgalactosamine
HE	hematoxylin and eosin
HID	high iron diamine
HRP	horseradish peroxidase
IdU	5-iode-2'-deoxyuridine
Ihh	indian hedgehog
PAS	periodic acid-Schiff
PBS	phosphate-buffered saline
PCP	planar cell polarity
rRNA	ribosomal RNA
RT-qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
SE	stamdard error
SEM	scanning electron microscope
TA cells	transit amplifying cells

TEM	transmission electron microscope
TMB	tetramethylbenzidine
TPN	total parenteral nutrition
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated 2'-deoxyuridine triphosphate nick-end labeling
WAT	white adipose tissue
X-Gal	5'-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside
ZO-1	zunula occludens-1

第 1 章　序論

冬季の環境温度の低下と食物不足への適応として、動物たちは様々な生活史を選択してきた。冬季の悪化した環境を避けて暖かい地域へ移動して過ごすものもいれば、その場にとどまるものもいる。前者は鳥類や、海獣、コウモリ類にみられる。一方、その場にとどまって冬季を過ごす動物には、活動を続けるものと、活動を停止して冬眠に入るものがある。狭義の冬眠は、恒温動物の哺乳類と鳥類の一部が、活動を停止し、体温を低下させて冬期間を過ごすことをさす（Kawamichi *et al.* 2000）。しかし、変温動物である魚類、両生類、爬虫類、節足動物や陸生貝などが冬季に不活発な状態で過ごす冬越しにも冬眠の用語が使われる。

哺乳類の典型的な冬眠は持続的冬眠（bout）に特徴づけられ、この期間は 2 日から 5 週間までと種によって大きく異なる（Kawamichi *et al.* 2000）。例えば、冬眠中のシリアンハムスター（*Mesocricetus auratus*）は 4～5 日間の持続的冬眠と 12～24 時間の中途覚醒（interbout arousal）を繰り返して冬眠を行う（Fig. 1-1）。また、持続的冬眠を行っ

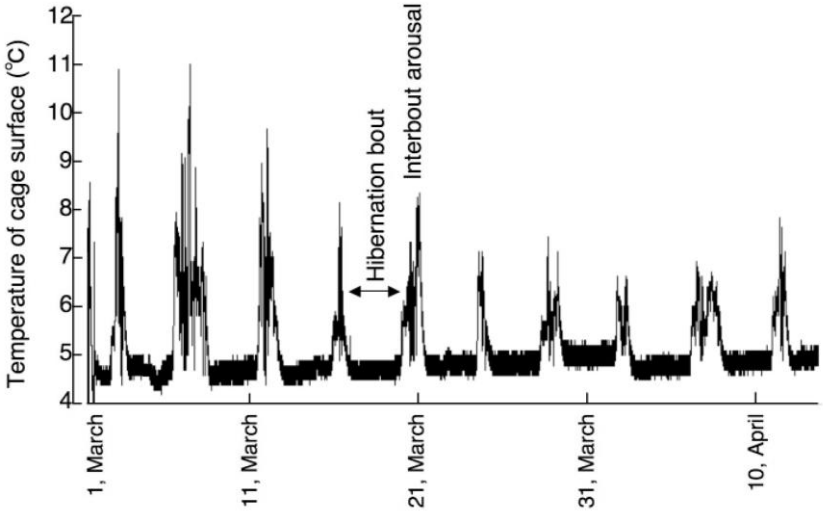


Figure 1-1 A representative presentation of housing time-course change in temperature time course in hibernating Syrian hamsters. A temperature sensor coupled with data logger was attached to each cage to monitor the hibernation cycle.

ている哺乳類においては、代謝が著しく低下している。例えば、キンイロジリス（*Spermophilus lateralis*）において、持続的冬眠中は、基礎代謝率が通常の 2〜4%まで減少し、体温は環境温度の 2〜3℃上で維持されている（Carey *et al.* 2003）。持続的冬眠は急激な代謝活性上昇の時期である中途覚醒により中断される。キンイロジリスの中途覚醒は、体温が正常値近くの 36℃に上昇し、持続的冬眠に再度入るまでの 12〜24 時間維持される。また、キバラマーモット（*Marmota flaviventris*）は、持続的冬眠中に心拍数が通常の 1 分間 200〜300 拍から 3〜5 拍まで減少し（Zatzman 1984）、呼吸数は 1 分間 100〜200 回から 4〜6 回まで低下する（McArthur & Milsom 1991）。そして、腎臓機能は大きく減少しているか、または完全に停止している（Zatzman 1984）。これらの生理的指標が中途覚醒時には急速に正常値近くまで回復する。

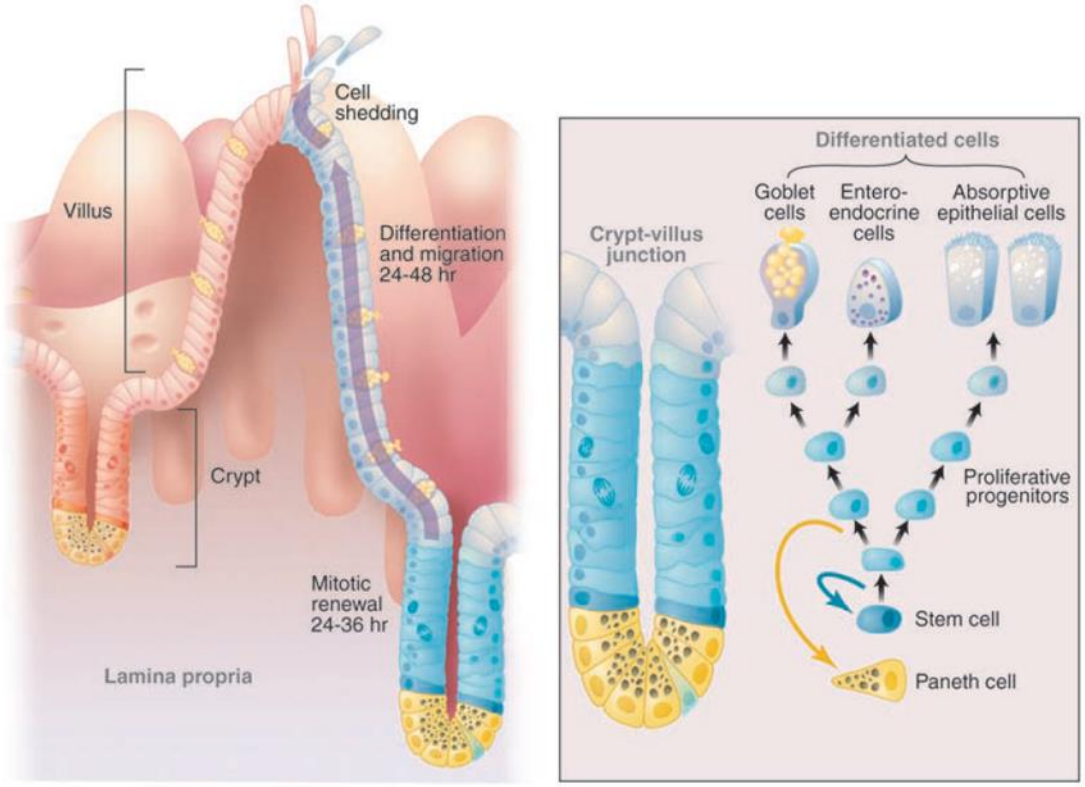
冬眠中のエネルギー源として、冬眠前に体内の白色脂肪組織（white adipose tissue、WAT）に蓄積した脂肪を用いる脂肪貯蓄型と、冬眠巣中に貯蔵した食物を利用する貯食型がある（Folk 1980）。前者は冬眠中に食餌摂取をせず、その代りに第一栄養源として WAT から得られた脂肪の加水分解に頼っている。脂肪貯蓄型にはクマやコウモリなどがいる。それに対して、シマリスやハムスターのような貯食型は、貯蓄した食物を中途覚醒時に摂取し代謝する（Humphries *et al.* 2003）。脂肪貯蓄型は WAT を季節性に増加させ、春から秋までに体重が 2 倍近くにまでなる。しかし、もし活動期と同様の代謝のままならば、この貯蓄した脂肪の代謝のみでは、5〜8 か月の冬眠期間を生き残れない。したがって、冬眠時期の代謝低下は、エネルギー消費を抑えるという点で有意義であり、冬眠において重要である（Carey *et al.* 2003）。

一方、シマリスやハムスターのような貯食型においても、持続的冬眠中は食餌摂取をしない。非冬眠動物において経口的な栄養摂取を数日間行わないと、腸管に形態的かつ機能的変化が生じることが知られている（Yang *et al.* 2009）。例えば、ラットにおいて中心静脈栄養（total parenteral nutrition、TPN）を施行すると、施行後 3 日目で絨毛の萎縮が起き（Ney 1999）、刷子縁膜酵素の活性が低下することが報告され

ている（Miura *et al.* 1992）。一方、冬眠動物における冬眠中の小腸の形態的かつ機能的変化についてはこれまでに以下のような研究がされてきた。例えば、ヨーロピアンハムスター（*Cricetus cricetus*）は冬眠中 10～12 日間の持続的冬眠と、48 時間の中途覚醒を繰り返す（Michel *et al.* 1988）。この冬眠動物において、小腸粘膜におけるスクラーゼおよびイソマルターゼの活性は、持続的冬眠中は変動せず、中途覚醒時に上昇する。また、ラクターゼおよびアミノペプチターゼ活性は持続的冬眠中に上昇する。加えて、冬眠中の腸粘膜湿重量は減少するが、粘膜から単離した刷子縁膜中のタンパク質量は変化しない（Michel *et al.* 1988）。これは、冬眠中に腸粘膜は萎縮するが、膜消化酵素や栄養素吸収担体などのタンパク量は変化しないことを意味している。一方、もっともよく研究がすすんでいるのは、アメリカ合衆国とカナダに生息するジュウサンセンジリス（*Spermophilus tridecemlineatus*）である。この種は 10 月に冬眠に入り、12 週間持続性冬眠を維持する（Carey 1990）。冬眠中は腸粘膜湿重量とタンパク量、絨毛の長さ、粘膜表面面積が減少する。これらは春期に回復し、夏期に最大となり、秋期に減少する。空腸の刷子縁膜におけるスクラーゼ、イソマルターゼおよびアルカリホスファターゼの活性ならびに mRNA 発現レベルは、冬眠期と活動期とで同様である。以上のように、ヨーロピアンハムスターとジュウサンセンジリスの冬眠中の小腸粘膜は、持続性冬眠中の絶食に伴って萎縮するものの、中途覚醒時の摂食に備えて、持続性冬眠中でも遺伝子レベルで消化機能を維持していることが示されてきた。

DNA 合成と細胞分裂は大きなエネルギーを要求する過程である。よって、細胞増殖は持続的冬眠でかなり抑制されており、遺伝子の転写と翻訳も減少している（Carey & Sandra 1996）。これまでの冬眠中の細胞分裂についての研究は、増殖速度が速い腸管組織において行われてきた。腸管上皮は動物生体において、外界との接触面積が最も広い組織である。これは栄養素や水分の吸収機能を最大限に発揮するためであると考えられる。同時に、腸管上皮は細菌やウイルスに対する防御の最前線となっており、

粘液分泌や抗菌物質の産生を介して外敵の侵入を阻止している。また、口側の内容物を効率良く消化し、肛側に運搬するために、神経・内分泌機構による腸管の消化液分泌および腸管運動調節が行われている。これらの腸管機能は主に４種類の分化細胞である、吸収上皮細胞（消化吸収機能）、杯細胞（粘液産生）、内分泌細胞（消化管ホルモン分泌）、パネート細胞（抗菌ペプチド分泌）により担われている（van der Flier & Clevers 2009）。腸管上皮は絨毛と呼ばれる腸管内腔に突出した分化細胞からなる組織構造と、主に未分化細胞からなる陰窩の二つの区画に分けられる（Fig. 1-2）。



Clevers H & Radtke F (2005) *Science* 25:1905

Figure 1-2 The anatomy of the small intestinal epithelium. The epithelium is shaped into crypt and villi (left). The lineage scheme (right) depicts the stem cell, the transit-amplifying cells, and the two differentiated branches. The right branch constitutes the enterocyte lineage; the left is the secretory lineage. Relative positions along the crypt-villus axis correspond to the schematic graph of the crypt in the center.

分化細胞のうち、パネート細胞のみが陰窩底部に局在し、その他は分化とともに陰窩から絨毛に移動していく。多彩な機能を持つ腸管上皮細胞であるが、これら全ての腸管上皮細胞は腸管上皮幹細胞から生み出されている。腸管上皮幹細胞は一生を通じて自己複製し続けるとともに、全ての腸管上皮細胞への分化能を持つ細胞と定義されており、陰窩底部に存在すると考えられている。腸上皮の陰窩底部には crypt base columnar cells（CBC）と呼ばれる細長い形態をした細胞が存在しているが、その機能についてはながらく不明であった。近年、Clevers らの研究グループは、Wnt シグナル標的遺伝子のなかで CBC が強く発現する Lgr5 遺伝子に注目し、その子孫細胞群を追跡可能なマウスを作成し、すべての分化細胞が Lgr5 陽性細胞に由来すること、長期にわたって Lgr5 陽性細胞が陰窩底部に維持されることを示し、これらの特徴から CBC は腸上皮幹細胞であると考えられるようになった（Barker *et al.* 2007）。以後、現在まで Lrig1（Wong *et al.* 2012）、EphB2（Jung *et al.* 2011）、Bmi1（Sangiorgi & Capecchi 2008）、CD133（Snippert *et al.* 2009）、Asc12（van der Flier *et al.* 2009a）、OLFM4（van der Flier *et al.* 2009b）などの分子が幹細胞マーカーとして報告されている。腸管上皮幹細胞は分裂して一過性増殖細胞（transit amplifying cells、TA cells）になる。TA cells は陰窩において活発に分裂しており、4〜5 回分裂を繰り返したのち、分化型上皮細胞へと分化し、絨毛の長軸方向に沿って移動していく。分化型上皮細胞は絨毛先端へ達したあと、最終的には細胞死により脱落する。このような小腸絨毛の細胞更新に費やされる時間は、約 3〜5 日間である。

オナガホッキョクジリス（*citellus undulatus*）において、冬眠中の小腸上皮細胞の DNA 合成は活動期の約 4%まで低下するものの、冬眠中でも継続されている（Kruman *et al.* 1988）。しかしながら、持続的冬眠中の細胞の有糸分裂は停止しており、腸上皮細胞の細胞周期の G_1 期から S 期の過程は進行しているが、G_2 期または S 期後半は停止している（Adelstein *et al.* 1967）。このような細胞周期の停止は、低温によって受動的に生じる現象なのか、あるいは低温または変動が大きい温度条件下で細胞増殖にエラーが生じる

のを最小限にする積極的な適応なのか、未だはっきりしていない（Kruman 1992）。細胞の有糸分裂と細胞増殖は中途覚醒時に再開する（Carey & Sandra 1996）。中途覚醒時の細胞増殖速度は、ほとんどの冬眠動物で活動期のそれと同等か、または上回る（Dubinin *et al.* 1995）。加えて、中途覚醒時に細胞増殖が高速になると同時に、体中のタンパク合成も短時間で増加する（Zhegunov *et al.* 1988）。冬眠動物における持続的冬眠と中途覚醒のサイクルにおいて、小腸上皮細胞が増殖停止と再開を繰り返すという事実からは、それにともなって陰窩－絨毛軸に沿った細胞移動もまた停止および再開を繰り返していることが予想される。しかし、冬眠中の腸上皮細胞の更新にともなう移動については、移動速度の推定などの詳細な研究は報告されていない。

これまで使用されてきた腸上皮細胞の移動速度を計測する主な方法は、5-bromo-2’-deoxyuridin（BrdU）のパルスチェイス実験である。この方法は、異なる個体に異なる時間において BrdU を投与することにより細胞を標識し、検出される細胞位置を比較することにより速度を計測する方法である。しかし、この方法では多くの個体が必要になるため、多くの個体を入手することが困難な冬眠動物では、この方法を適用することは現実的ではない。そこで本研究では、1 個体で測定することが可能である新しい細胞の移動速度の推定方法を確立した（第２章）。そしてこの方法を用いて、冬眠シリアンハムスターの腸上皮細胞の移動速度を推定した（第３章）。加えて、細胞更新速度の変化に伴う形態的および機能的変化を解析した（第４章）。さらに、冬眠シリアンハムスターにおける細胞更新の速度変化を調節するメカニズムについての情報を収集した（第５章）。

第 2 章　5-Bromo-2'-deoxyuridine（BrdU）と 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine（EdU）の 2 重標識を用いた新しい細胞移動速度推定方法の確立

2－1　背景と目的

これまでの *in vivo* における陰窩－絨毛軸に沿った腸上皮細胞移動速度の推定は、5-bromo-2'-deoxyuridine（BrdU）のパルスチェイス実験によるものがほとんどであった。BrdU はチミジンのアナログで、DNA 合成期に DNA に取り込まれる。半減期が約 1 時間と短く、投与時から 1～2 時間以内に DNA 合成を行った細胞、つまり増殖細胞を抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織染色などで検出することができる。また、投与後異なる時間で組織を採取し、検出することで、DNA 合成を行った細胞がどのように移動したかを観察することができる。すなわち、投与後の異なる時間で採取した組織における BrdU 陽性細胞の陰窩－絨毛軸に沿った距離を時間で除すことにより、細胞の移動速度を推定することが可能である。例えば、Melendez *et al.*（2013）は、野生型マウスと Cdc42 遺伝子欠損マウスに BrdU を投与後、2、4、12、24、36 時間で検体を採取し、腸上皮細胞の移動速度を推測した。その結果、Cdc42 遺伝子欠損マウスの十二指腸で細胞移動速度が増加していることを確認した。しかしこの方法では、1 回の移動速度の推定に 1 群 5 頭の個体が必要であり、数多くの個体の入手が困難な冬眠ハムスターの細胞移動速度を計測することは現実的ではない。そこで、本研究では 2 種類のチミジンアナログ BrdU と 5-ethynyl-2'-deoxyuridine（EdU）を時間差で投与し、2 重染色を行うことで細胞移動速度を推定する方法を新しく考案した。EdU も BrdU と同様にチミジンアナログであり、近年 BrdU の代替として使用されている（Buck *et al.* 2008、Cappella *et al.* 2008、Salic & Mitchison 2008）。BrdU の検出は抗 BrdU 抗体を用いた免疫化学的方法によるが、EdU の検出はクリックケミストリーによる化学的方法で行うことができる。ここで用いるクリックケミストリーは、蛍光色素が有するアジドと EdU に存在するアルキン間の銅触媒共有結合による反応である（Hsu *et al.* 2007、Sawa

et al. 2006、Tornøe *et al.* 2002)。本研究では、この方法の妥当性をラットによる実験で検証した。すなわち、時間差で投与した BrdU と EdU を絨毛部分で同時に検出できるか否か、交差反応が生じるか否か、投与の時間間隔および順序が細胞移動速度の推定に影響するか否かについて検証した。また、腸上皮細胞には吸収上皮細胞、杯細胞、腸内分泌細胞、パネート細胞、タフト細胞、M 細胞の 6 つの分化細胞が存在する。これらの 6 つの分化細胞に特異的なマーカーを使用した染色と、BrdU と EdU の 2 重染色を組み合わせることで、それぞれの分化細胞における移動速度を推定することが可能かもしれない。本研究ではその端緒として、杯細胞を PAS 染色で、腸内分泌細胞を抗クロモグラニン A 抗体で検出し、さらに BrdU との 2 重染色を行った。

2－2　方法

実験動物および飼料

6 週齢の雄性 Wistar 系ラット（日本エスエルシー）を室温 23±2℃、午後 8 時から午前 8 時までを暗期として飼育した。飼料は AIN-93G（Reeves *et al.* 1993）に準じて作成した精製飼料を自由摂取させ、水道水を自由摂取させた。2 週間飼育後、以下の 2 つの実験を行った。

実験 1

9 匹のラット（グループ A）に BrdU（Sigma-Aldrch、50 mg/kg 体重、Ito *et al.* 2009）を腹腔内投与し（午後 5 時）、17 時間後に EdU（Invitorogen、5 mg/kg 体重、Cappella *et al.* 2008）を腹腔内投与した（午前 10 時）。

また、別の 6 匹のラット（グループ B）に EdU を腹腔内投与し（午後 5 時）、17 時間後に BrdU を腹腔内投与した（午前 10 時）。EdU と BrdU の投与量は前述と同量にした。

さらに別の 6 匹のラット（グループ C）には BrdU を腹腔内投与（午後 10 時）して

から 12 時間後に EdU を腹腔内投与した（午前 10 時）。EdU と BrdU の投与量は前述と同量にした。

実験２

ラット 3 匹に BrdU と EdU の混合物を腹腔内投与した（午後 10 時）。EdU と BrdU の投与量はそれぞれ 50 mg/kg 体重とした。

すべての実験において、BrdU あるいは EdU 投与の 22 時間後にケタミン塩酸塩（70 mg/kg 体重）およびキシラジン塩酸塩（8 mg/kg 体重）の混合物の腹腔内投与による麻酔下で開腹し、腹部大動脈より放血死させ、小腸を採取した。採取した小腸は、氷冷したリン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline、PBS）で管腔内を洗浄してから、トライツ靭帯より 2 cm 遠位側の空腸断片 1 cm と、回腸末端から近位側の回腸断片 1 cm を採取した。採取した組織は固定液（ユフィックス；サクラファインテックジャパン）を用いて室温下で 3 時間浸漬後、パラフィン包埋し、ミクロトーム（REM-710；大和光機工業株式会社）で厚さ 4 μm の薄切片を切り出し、スライドグラスに貼り付け、乾燥のため 37℃で一晩インキュベートした。

BrdU と EdU の 2 重標識による細胞移動速度の測定

作成した組織薄切片を、脱パラフィンのためキシレンに 5 分間 3 回浸漬したのち、水和のためエタノール系列に浸漬した。その後、抗原賦活化のため、10 mM クエン酸バッファー（pH 6.0）中で 98℃、40 分間加熱した。次に DNA を変性するため、2 N 塩酸に 30 分間浸漬し、中和のために 0.1 M 四ほう酸ナトリウムに 10 分間浸漬した。ブロッキングのため、1%BSA／PBS で 1 時間インキュベートした後、100 倍希釈した抗 BrdU 抗体（anti-BrdU mouse IgG；clone OS94.6；Calbiochem）と 4℃で一晩インキュベートした。PBS で洗浄後、1000 倍希釈した 2 次抗体（anti-mouse IgG conjugated

with HyLyte Fluor 555 ; Anaspec）と遮光下の室温で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、膜透過処理のため 0.5% Triton X - 100／PBS に 20 分間浸漬した。その後、EdU 検出のため、Alexa Fluor 488 含有 Click-iT reaction cocktail（Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit；Life Technologies）を用いて室温遮光下で 30 分間インキュベートした。PBS 洗浄後、ProLong Gold antifade reagent with DAPI（Life Technologies）で封入し、蛍光顕微鏡（BX40、オリンパス）で観察、写真撮影した。細胞移動速度は以下のように算出した。

細胞移動速度（μm/h）＝最初に投与したチミジンアナログの陽性シグナルの中央値と次に投与したチミジンアナログの陽性シグナルの中央値との距離（μm）／2 つのチミジンアナログの投与間隔（h）

細胞移動速度は、距離だけではなく、最初に投与したチミジンアナログの陽性シグナルの中央値と次に投与したチミジンアナログの陽性シグナルの中央値との間の細胞数を用いることによっても、以下のように算出した。

細胞移動速度（cells/h）＝最初に投与したチミジンアナログの陽性シグナルの中央値と次に投与したチミジンアナログの陽性シグナルの中央値との間にある細胞数／2 つのチミジンアナログの投与間隔（h）

細胞移動速度は、ラット 1 個体につき 10 箇所で算出し、平均値を求めた。距離は Image J（http://imagej.nih.gov/ij/）を用いて計測した。

加えて、他の組織切片を用いて標準的な方法でヘマトキシリン／エオシン（HE）染色を行い、上記ソフトウェアで絨毛の長さを計測した。絨毛の長さは絨毛基部から絨毛先端までの長さとした。

腸内分泌細胞および杯細胞の検出

腸内分泌細胞の検出には、マーカーとして抗クロモグラニン A 抗体を使用して行った（Lloyd & Wilson 1983）。前述のとおり、脱パラフィンおよび抗原賦活化後の切片を用いて、DNA 変性、中和、およびブロッキングを行ったのち、100 倍希釈の抗 BrdU 抗体と 250 倍希釈の抗クロモグラニン抗体（ab45179；Abcam）の混合液を用いて 4℃で一晩インキュベートした。PBS 洗浄後、2 次抗体は 500 倍希釈の anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 488（Life Technologies）と 500 倍希釈の anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor 568（Life Technologies）の混合液を用い、室温遮光下で 2 時間インキュベートした。PBS 洗浄後、ProLong Gold antifade reagent with DAPI で封入し、蛍光顕微鏡で観察、写真撮影を行った。

杯細胞の検出には PAS 染色を行った。前述のとおり、抗 BrdU 抗体でインキュベートしたのち、MACH 2 Universal HRP Polymer Detection（Mouse and Rabbit Polymer HRP Secondary Antibody Polymer Detection Kit; Biocare medical）で室温 30 分間インキュベートした。PBS 洗浄後、2.3 mM 3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩（同仁化学）と 48.8 μM 過酸化水素を含む 0.6 M トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）で 10 分間インキュベートした。流水で洗浄後、0.5%過ヨウ素酸液（和光純薬）およびシッフ試薬（和光純薬）を用いて常法により PAS 染色を行い、ヘマトキシリンで対比染色を施した。エタノール系列で脱水後キシレンにより透徹し、カナダバルサムで封入後、光学顕微鏡により観察、写真撮影をおこなった。

統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差で表した。2 群間の平均値の比較には Student の *t*-検定を行った。多群間の平均値の比較には一元配置分散分析の後、有意差があったものには Tukey-Kramer テストを行った。解析には Stat view を用い、*P* 値が 0.05 未満の場合に統計的に有意と認めた。

2－3　結果

実験１

グループ A および C のラットにおいて、小腸組織の BrdU と EdU の 2 重染色により、絨毛部の上部で BrdU 陽性細胞（赤）、下部で EdU 陽性細胞（緑）が検出された（Fig. 2-1）。これらのラットにおいては、BrdU に次いで EdU を投与しているので、本実験結果は腸上皮細胞が絨毛基部から先端方向に移動していることを示唆する。また、グループ B のラットにおいては、グループ A および C のラットとは逆に、絨毛部の上方に EdU 陽性細胞が、下部に BrdU 陽性細胞が検出された。

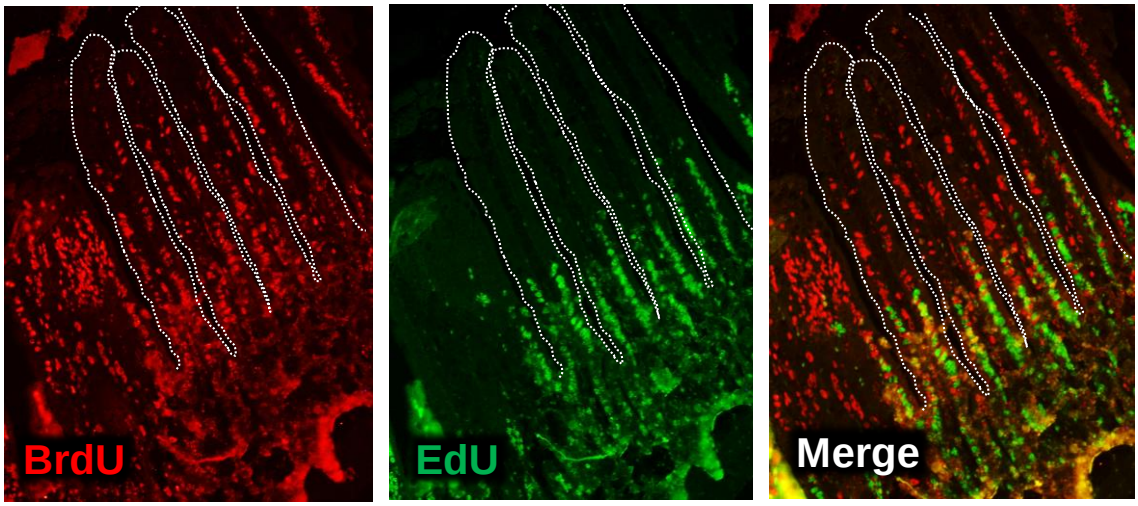


Figure 2-1 A representative fluorescence micrograph of jejunal sections of rats having received a single i.p. injection of BrdU and EdU within a time interval. EdU injection was done 17 h after BrdU injection, and tissues were excised 22 h after EdU injection. Signals of BrdU and EdU were detected by immunohistochemistry with anti-BrdU antibody and the click reaction, respectively. The white thin line represents the outline of villi. Bars represent 200 μm.

細胞移動速度は Fig. 2-2 のように算出した。Fig. 2-2 は実験 1 におけるグループ A の例である。赤色に検出された BrdU 陽性細胞の分布の中央値に位置する細胞と、緑色に検出された EdU 陽性細胞の分布の中央値に位置する細胞との間の距離を測定したところ、148 μm であった。この距離を BrdU と EdU の投与間隔である 17 時間で除したところ、細胞移動速度は 8.7 μm/h と算出された。同様の方法で、グループ A、B および C のラットにおいて細胞移動速度を算出したところ、各グループ間で有意な差はみられなかった（Table 2-1）。絨毛の長さはいずれのグループでも回腸より空腸で有意に長く、各グループ間での差はみられなかった。

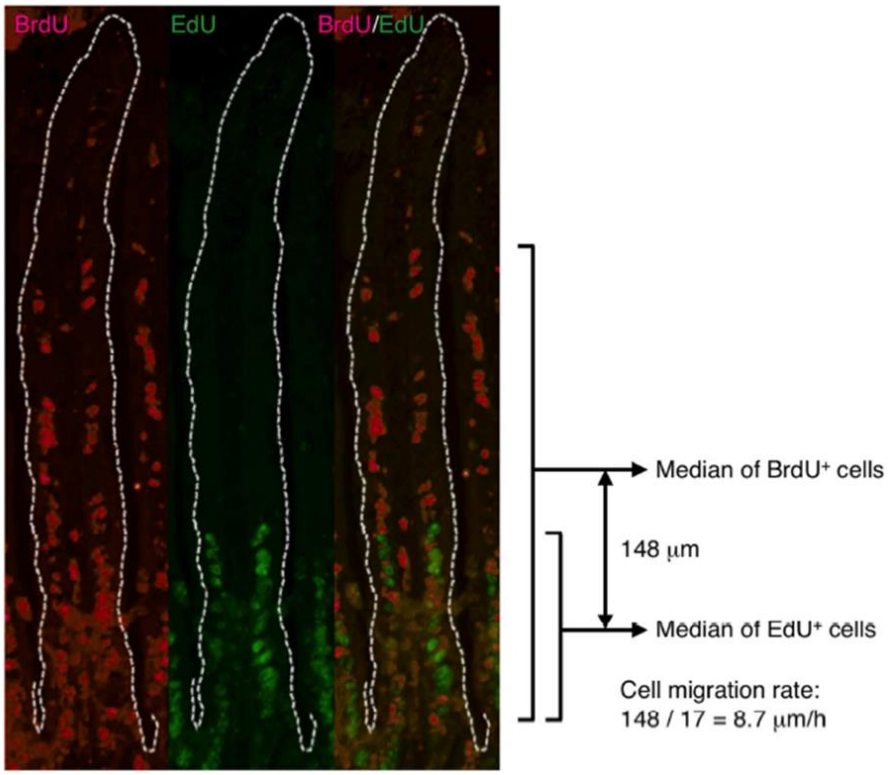


Figure 2-2 A representative estimation of the cell migration rate on a single villus of the jejunum. The white thin line represents the outline of villus. Dual-labeling experiments were performed as described in **Fig. 2-1**.

Table 2-1 Estimation of epithelial cell migration rate by dual labeling with BrdU and EdU under different experimental conditions in rat small intestine

	1st set	2nd set	3rd set	
Interval time	17 h	17 h	12 h	
Injection order	BrdU-EdU	EdU-BrdU	BrdU-EdU	
	(n = 9)	(n = 6)	(n = 6)	ANOVA*p*
Villus height (μm)				
Jejunum	498 ± 13	501 ± 25	511 ± 11	0.71
Ileum	234 ± 8*	227 ± 17*	238 ± 13*	0.83
Cell migration rate (μm/h)				
Jejunum	8.7 ± 0.5	8.3 ± 0.5	8.9 ± 0.4	0.72
Ileum	4.5 ± 0.3*	5.5 ± 0.6*	5.8 ± 0.8*	0.20
Cell migration rate (cells/h)				
Jejunum	1.37 ± 0.07	1.41 ± 0.12	1.23 ± 0.05	0.34
Ileum	0.80 ± 0.02*	0.84 ± 0.02*	0.78 ± 0.01*	0.13

Values are expressed as means ± SE. *P* values of one-way analysis of variance (ANOVA) are shown for the comparison of mean values estimated under different different conditions. * Mean value is significantly different from jejunum ($p<0.05$) as estimated by Student's *t*-test.

実験２

BrdU と EdU を同時投与したラットの小腸組織では、赤色に検出された BrdU 陽性細胞と緑色に検出された EdU 陽性細胞はほぼ同じ位置に観察された。BrdU 陽性細胞および EdU 陽性細胞を検出した組織画像を重ね合わせた結果、ほぼすべての陽性細胞が黄色に示されたことから、BrdU と EdU の陽性細胞の位置はほぼ完全に一致していると考えられた（Fig. 2-3）。

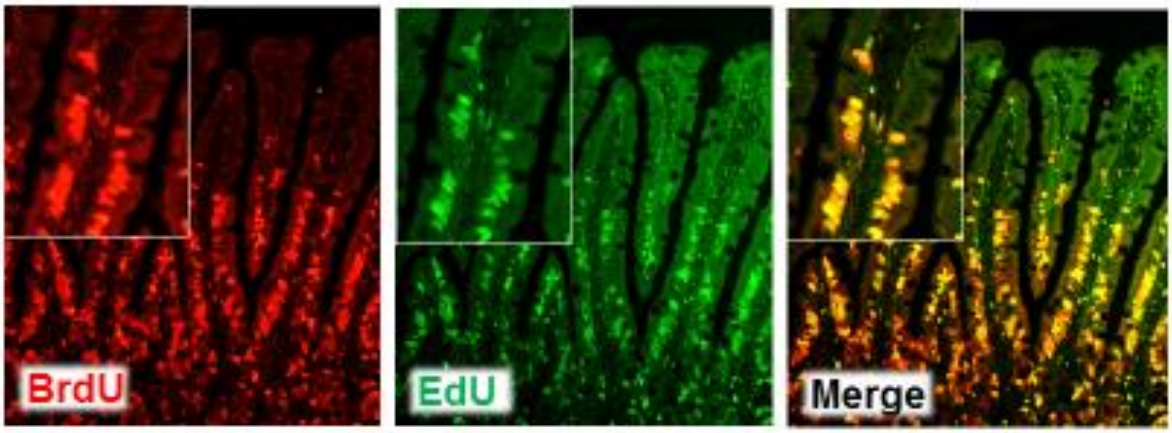


Figure 2-3 A representative fluorescence micrograph of jejunal sections of rats having received a simultaneous i.p. injection of BrdU and EdU. Tissues were excised 22 h after injection of a mixture of BrdU and EdU. Signals of BrdU and EdU were detected by immunohistochemistry with anti-BrdU antibody and the click reaction, respectively. Insets illustrate the higher magnification.

腸内分泌細胞および杯細胞の検出

Fig. 2-4のAの写真は抗BrdU抗体と抗クロモグラニンA抗体により2重免疫染色を行い、BrdU陽性細胞を緑色で、腸内分泌細胞であるクロモグラニンA陽性細胞をピンク色で検出したものである。白色の矢印はBrdU陽性細胞の最も上部、つまり移動速度が最も速い細胞を指しているが、いずれも緑色に検出されているため、腸内分泌細胞ではないと考えられた。写真Bは抗BrdU抗体による免疫染色とPAS染色を同時に行い、BrdU陽性細胞は茶色で、杯細胞は紫色で検出したものである（Fig. 2-4 B）。黒色の矢印は移動速度が最も速い細胞を指しているが、杯細胞を検出した紫色との重複は認められなかった。



Figure 2-4 Detection of BrdU-labeled cells, chromogranin A-expressing enteroendocrine cells and mucin-producing goblet cells in the jejunum. Rats received a single intraperioneal injection of BrdU, and tissues were excised 39 h after BrdU injection. *A.* Double immunofluorescent staining using anti-BrdU (green) and anti-chromogranin A (magenta) antibodies. The white thin line represents the outline of villus. *B.* Double staining using anti-BrdU antibody (brown) and PAS reaction (magenta). Arrows illustrate the furthest BrdU-positive cell on the each side of villus.

2－4　考察

Figure 2-1 より、BrdU と EdU の 2 重染色によって、先に投与した BrdU を絨毛上部に、後に投与した EdU を絨毛下部に確認することができた。予備実験において、BrdU のみを投与したラットと、EdU のみを投与したラットの小腸組織を用いて 2 重染色を行ったところ、前者では BrdU 陽性細胞のみが、後者では EdU 陽性細胞のみが検出された（データ省略）。これらの結果は、抗 BrdU 抗体が EdU と交差反応しないこと、および EdU 検出時のクリック反応が BrdU と交差反応しないことを示している。加えて、BrdU と EdU の同時投与により、それぞれの陽性細胞がほぼ完全に一致したことから（Fig. 2-3）、BrdU と EdU は同様に DNA に取り込まれ、半減期も一致し、同じ細胞を標識すると考えられた。これは、Zeng *et al.*（2010）らによって中枢神経系でも同様の結果が確認されている。したがって、BrdU と EdU は互換性があると考えられた。

増殖細胞の 2 重標識法には、5-chloro-2′-deoxyuridine（CldU）および 5-iodo-2’-deoxyuridine（IdU）などのハロゲン化デオキシウリジンで標識し、それぞれに親和性の異なる抗 BrdU 抗体を使用してこれらを染め分ける方法が報告されている（Tuttle *et al.* 2010）。しかし、この方法にはわずかに CldU と IdU の間に交差反応が起きてしまうという欠点が存在する（Tuttle *et al.* 2010）。この方法と比べると、BrdU と EdU の 2 重標識法は、免疫組織化学とクリック反応によりそれぞれを検出するため、交差反応が生じないという利点がある。

実験 1 において、ラットを BrdU と EdU を用いて異なる投与間隔と投与順によって標識し、細胞移動速度を算出した（Table 2-1）。空腸と回腸ともに各グループの間で推定した細胞移動速度に有意差は認められなかった。よって、投与間隔と投与順は移動速度の推定に影響しないと考えられた。しかしこの移動速度の推定に使用した陽性細胞間の距離は、*in vivo* における距離と同一であること、また組織からパラフィン切片を作成する際の手技で変動していないことを前提としている。そこで陽性細胞間の距離ではなく、陽性細胞間の細胞数により移動速度を算出した（Table 2-1）。細胞数により算出

した移動速度においても、空腸と回腸ともに各グループの間で有意差はみられなかった。以上の結果より、手技による絨毛の長さの変動は移動速度に影響しない程度であると考えられた。

小腸上皮細胞は分化する際に、吸収上皮細胞、杯細胞、腸内分泌細胞、パネート細胞、タフト細胞、M 細胞の 6 つの分化細胞に分化する（van der Flier & Clevers 2009）。しかし、それぞれの分化細胞に固有の移動速度は明らかになっていない。BrdU 投与ラットの小腸組織で腸内分泌細胞と杯細胞を検出したところ、絨毛部において最も絨毛先端に近い部位に位置する BrdU 陽性細胞、つまり最も移動速度が速い細胞は、腸内分泌細胞と杯細胞のどちらでもないと考えられた（Fig. 2-4）。

以上の結果より、BrdU と EdU の 2 重標識を用いることで、同一個体で腸上皮細胞の移動速度を推定することができると考えられた。

第 3 章　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

3－1　背景と目的

本研究では、冬眠モデルとしてシリアンハムスターを用いた。シリアンハムスターは実験動物として生産されているため、入手が容易であること、夏季でも環境を制御することにより実験室内で冬眠を誘発することができることから採用した。シリアンハムスターは環境温度が 5℃、24 時間暗期の環境条件下で飼育することにより、約 1 か月で冬眠を開始する。約 4 日の持続的冬眠と 0.5～1 日の中途覚醒を繰り返して、約 5 か月間冬眠する（Fig. 1-1）。冬眠時は curly shape と呼ばれる丸まった姿勢をとる特徴がある（Fig. 3-1）。体温が 5℃付近であるため、手で触ると冷たく、呼吸と心拍は直ちに確認できないが、鼻先と足蹠部の皮膚にチアノーゼ様の色変がないことから、生存していることが確認できる。

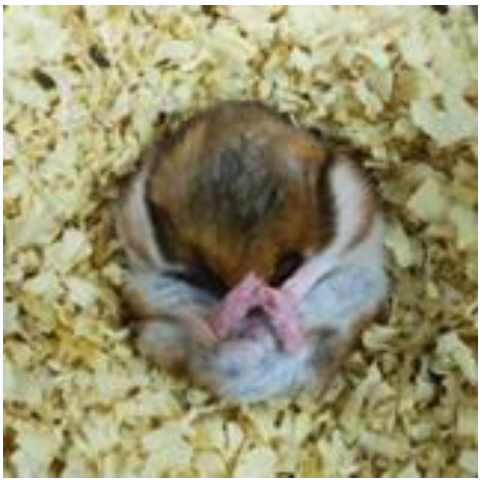


Figure 3-1 A hibernating Syrian hamster. The hibernating hamster assumes a curved up posture like a ball. The body temperature falls to eventually approximate the ambient temperature. The heart and respiratory rates decrease to 5-10 times/min and below 1 time/min, respectively. The basal metabolism is also extremely suppressed.

本章では、前章で確立した細胞移動速度の推定方法を用いて、冬眠シリアンハムスターにおける腸上皮細胞の移動速度を推定した。

陰窩で増殖した腸上皮細胞は分裂しながら絨毛の先端方向へ上昇し、絨毛基部で分裂を停止する。その後は上昇しながら分化が進行し、吸収上皮細胞、杯細胞、腸内分泌細胞などの分化型上皮細胞へと分化し、絨毛先端部に到達した寿命を終えた細胞は、細胞死により脱落する（van der Flier & Clevers 2009）。本研究では、冬眠ハムスターの小腸上皮における分化・成熟を解析することを目的とした。小腸粘膜が過形成のラットにおいて、絨毛頂部に存在する成熟が進行した上皮細胞は、アルカリホスファターゼを高く発現していることが報告されている（Hodin *et al.* 1995）。そこで本研究では、冬眠ハムスターにおける腸上皮の成熟度を、組織切片を用いたアルカリホスファターゼの活性染色により評価した。

また、PAS 染色により検出される杯細胞を指標に用いて腸上皮の成熟を評価した。PAS 染色は、過ヨウ素酸（periodic acid）を用いて糖鎖を特異的に酸化し、糖鎖構造の存在を証明する染色法である。過ヨウ素酸は糖鎖の保有する隣接ジオール基を酸化および解離して、アルデヒド基に変換する。このアルデヒド構造をシッフ（Schiff）反応で染めだすと、グリコーゲン、粘液、基底膜などが赤色を呈するため、小腸組織においては粘液を産生する杯細胞が赤色に染められる（Nettleton & Carpenter 1977）。

杯細胞が産生する粘液は、ムチンと呼ばれる糖タンパク質が主成分であり、酸性度の違いから中性ムチンと酸性ムチンに分けられる。小腸の粘液はすべて酸性ムチンであり、この酸性ムチンはさらにその糖鎖にシアル酸を含むシアロムチンと硫酸基を含むスルホムチンの２つに分けられる。High iron diamine（HID）染色は特に硫酸基に高い特異性を示すのに対して、pH 2.5 の溶液中のアルシアン青（AB）は硫酸基だけでなくシアル酸のカルボキシル基にも結合する。したがって、まず HID 染色を行い、ついで AB 染色を行うと、アルシアン青はカルボキシル基にのみ結合する。その結

果、上皮性粘液中ではスルホムチンが黒紫色に、シアロムチンが青色に染色される（Spicer 1965）。本研究では HID-AB 染色によるスルホムチンとシアロムチンの染め分けを利用して、冬眠ハムスターにおけるムチン糖鎖分子種の変化を解析した。

陰窩で増殖し、絨毛部で分化しながら絨毛先端部まで到達した腸上皮細胞は、寿命を終えて細胞死し、絨毛先端部から脱落する。したがって、絨毛長は上皮細胞の増殖と細胞死のバランスに依存する。手術や TPN 施行時などに経口摂取を一定期間行わないと、細胞増殖の減少から起因する腸粘膜の萎縮がおき、腸管の機能が低下することが知られている（Goodlad & Wright 1984）。例えばラットにおいて、4 日間の絶食で絨毛が萎縮したという例がある（Goodlad *et al.* 1988）。冬眠中のハムスターは、約 4 日間の持続的冬眠と 0.5～1 日の中途覚醒を繰り返している（Fig. 1-1）。持続的冬眠中は食物を全く摂取せず、中途覚醒時に摂食する。このような冬眠パターンを繰り返している冬眠ハムスターの腸粘膜は萎縮している可能性がある。本研究では、HE 染色により絨毛の長さを測定し、BrdU パルス実験により陰窩における増殖細胞を計測することで、冬眠ハムスターにおける粘膜構造および上皮細胞増殖の変化を確認した。加えて、電子顕微鏡を用いて吸収上皮細胞表面の刷子縁膜構造の変化についても観察した。

さらに、時間的寿命が長い上皮細胞においては、細胞老化が起こっている可能性が考えられた。終末分化を終えた細胞は細胞死を起こすか、細胞老化を起こすことで、過剰な増殖を防ぎ、がん化を予防していると言われている（Going *et al.* 2002）。老化細胞では酸性条件下でβ-ガラクトシダーゼ活性が検出されることが報告されている（Dimri *et al.* 1995）。そこで、細胞老化関連β-ガラクトシダーゼ活性染色により、冬眠ハムスターの腸上皮において細胞老化が生じているか否かを調べた。

3－2　方法

実験動物および飼料

10 週齢のシリアンハムスター（初期体重 120 g 前後、日本エスエルシー）12 匹を、室温 23±2℃、午後 8 時から午前 8 時までを暗期として飼育した。飼料は市販固形飼料ラボ H スタンダード （日本農産工業）を用い、水道水と共に自由摂取させた。12 週齢まで飼育したのち、12 匹を 1 群 6 匹の 2 群に分け、それぞれ冬眠群、活動群とした。活動群は引き続き上記と同条件で飼育し、冬眠群は、24 時間暗期、室温 4℃の環境下で飼育した。冬眠周期を確認するために、各ケージの底面にデータロガー（RTR-52A、ティアンドデイ）を接続した温度センサーを設置した。冬眠群のうち 4 匹は、冬眠開始から 1 ヶ月後の中途覚醒時に EdU を腹腔内投与し、その次の中途覚醒時に BrdU を投与した。活動群 6 匹は解剖の 50 時間前に EdU を、18 時間前に BrdU を投与した。投与量は 2－2 の実験 1 と同様にした。冬眠群は BrdU 投与後の持続的冬眠 4 日目に開腹し、下大静脈より放血死させ、空腸および回腸を摘出した。摘出した空腸と回腸は、氷冷 PBS で管腔内を洗浄してから 2 cm の断片を 5 個作成し、1 つは縦に切り開いてスライドガラスにより粘膜を掻きとり、凍結保存した。また、2 つ目の断片は包埋剤（OCT compound、Tissue-tek、Sakura Finetechnical）で凍結包埋して組織染色標本の作製に供した。3 つ目の断片は、2－2 と同様の方法によってパラフィン包埋し、薄切片を作成した。4 つ目と 5 つ目の断片は、固定のため 2.5%グルタルアルデヒド／0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）に浸漬し、電子顕微鏡用標本の作製に供した。活動群は、ジエチルエーテルによる麻酔下で開腹し、腹大動脈より放血死させ、冬眠群と同様に試料を回収した。

<u>BrdU と EdU の 2 重染色による細胞移動速度の測定</u>

2－2 と同様の方法で行った。

<u>小腸粘膜におけるアルカリホスファターゼ活性の測定</u>

採取した粘膜を秤量し、氷冷しながら 50 mM マンニトールを含む 2 mM トリス -

塩酸緩衝液 10 ml（pH 7.1）を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。基質 15 mM パラニトロフェニルリン酸二ナトリウム 6 水和物を含むアッセイ溶液（1 M ジエタノールアミン緩衝液 pH 9.8）200 µl に前述した組織ホモジネートを 2 µl 加えた後 1 分間の 405 nm の吸光度の変化をマイクロプレートリーダーにて測定し、Walter & Schütt（1974）の方法に従って、1 分につき 1 µmol のパラニトロフェノールを生成する酵素活性を 1 U とした。

小腸組織切片におけるアルカリホスファターゼ活性染色

スライドグラスは 2%の 3-アミノプロピルトリエトキシシラン／アセトン（信越化学工業）によりコーティングしたものを用いた。新鮮凍結組織から、クリオスタットで厚さ 5 µm の薄切片を切り出し、スライドグラスに貼り付け、室温で乾燥させた。10% ホルマリン／0.1 M リン酸緩衝液中で 10 分間固定した後、脱塩水で洗浄した。組織切片を反応液（ナフトール AS-MX リン酸 0.1 mg/ml、Fast-blue BB salt 0.6 mg/ml、*N,N*-ジメチルホルムアミド 5 µl/ml、2 mM 塩化マグネシウム、0.1 M トリス - 塩酸緩衝液 pH 8.8）中で 37℃、10 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、Nuclear fast red で対比染色した（Kirihata *et al.* 2008）。エタノール系列で脱水、キシレンにより透徹し、カナダバルサムで封入した後、光学顕微鏡により検鏡および写真撮影を行った。一絨毛あたりの活性部位の割合を、一個体あたり 5 ヶ所の絨毛で計数し、その平均値を一個体の活性部位の割合とした。

リアルタイム PCR によるアルカリホスファターゼ遺伝子の発現解析

空腸および回腸の粘膜より Trizol（Invitrogen）を用いてプロトコールに従い全 RNA を抽出した。得られた全 RNA に含まれるゲノム DNA を RQ1 RNase- free DNase（Promega）によって除去した後、Oligo（dT）primer 0.5 µg（北海道システムサイエンス）、10 mM dithiothreitol（Invitrogen）、0.5 mM deoxynucleotide

triphosphate （Takara）、20 U RNase inhibitor（Wako）、200 U Moloney murine leukemia virus RTase（Invitrogen）を含む 20 μl の 1st-strand buffer 中で 42℃、50 分間インキュベートすることにより 1st-strand cDNA を得た。その後、RNase H（Invitrogen）により RNA を除去した。得られた 1st-strand cDNA を、Thermal Cycler Dice TP800（Takara）を使用して、リアルタイム定量 PCR（quantitative real-time polymerase chain reaction、RT-qPCR）に供した。各プライマーの塩基配列と増幅サイズは Table 3-1 のとおりである。反応は 95℃10 秒の後、95℃5 秒、60℃30 秒を 40 サイクル行った。その後、95℃15 秒、60℃30 秒、95℃15 秒で解離させた。アルカリホスファターゼの発現は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）に対する発現の比により、両群の遺伝子発現の比較を行った。

Table 3-1 Oligonucleotide primers used for RT-qPCR

Target Template	PCR Primers	Product Size, bp
ALP		
Sense	5'-GGTCAAGGCCAACTACCAGA	198
Antisense	5'-CAATTACGGTTGACCGTGTG	
GAPDH		
Sense	5'-TCACCACCATGGAGAAGGC	169
Antisense	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC	

GAPDH primer sequences were in accordance with Giulietti *et al.* (2001)

Periodic acid-Schiff（PAS）染色

2－2 と同様の方法で薄切片を作成し、定法により PAS 染色と、ヘマトキシリンによる対比染色を行い、光学顕微鏡にて検鏡、写真撮影を行った。陽性細胞の数と絨毛の長さを測定し、絨毛 1 mm あたりの陽性細胞数を計算した。これを一個体あたり 5

つの絨毛で行い、その平均値を一個体の陽性細胞数とした。

High iron diamine-アルシアン青 pH 2.5（HID-AB）染色

2－2 と同様の方法で薄切片を作成し、*N, N*-ジメチル-*m*-フェニレンジアミン二塩酸塩（Sigma-Aldrich）120 mg、*N, N*-ジメチル-*p*-フェニレンジアミン塩酸塩（和光純薬）20 mg／脱塩水 50 ml と 40%塩化第二鉄溶液（和光純薬）1.6 ml を混合して作成した HID 溶液中で 23℃18 時間インキュベートした。流水で 3 分洗浄後、3%酢酸水に 5 分浸漬し、対比染色のためアルシアン青溶液 pH 2.5（和光純薬）で 30 分間インキュベートした。その後、3%酢酸水で洗浄したのち、流水で洗浄した。脱水のためエタノール系列に供した後、キシレン透徹し、カナダバルサムで封入後、光学顕微鏡により検鏡、写真撮影を行った。細胞位置は絨毛全長あたりの絨毛基部からの距離の割合で測定し、陽性細胞の数は一個体あたり 5 つの絨毛で数え、その平均値を一個体の陽性細胞数とした。

Hematoxylin and eosin（HE）染色

2－2 と同様の方法で薄切片を作成し、脱パラフィン、水和後、定法で HE 染色をおこなった。エタノール系列で脱水後キシレンにより透徹し、カナダバルサムで封入後、光学顕微鏡により検鏡、写真撮影を行った。絨毛の長さの測定を一個体あたり 5 つの絨毛で行い、その平均値を一個体の絨毛の長さとした。

増殖細胞数の計測

2－2 と同様の方法で冬眠群と活動群に解剖前 2 時間で BrdU を腹腔内投与し､解剖、パラフィン切片作成、BrdU 検出を行った。陽性細胞数を一個体 10 箇所の陰窩で算出し、その平均値を一個体の増殖細胞数とした。

電子顕微鏡による刷子縁膜の観察

摘出した組織を固定のため 2.5%グルタルアルデヒド／0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）に 2.5 時間浸漬後、エタノール系列で脱水し、完全に乾燥させた。その後、イオンスパッタ（MSP-1S、真空デバイス）を用いて金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡（scanning electron microscope、SEM ; VE-7800 ; キーエンス）により観察および写真撮影を行った。

別の組織は、SEM と同様に固定した後、1%酢酸ウラニル水溶液でブロック染色を施し、エタノール系列で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。定法により超薄切片の作成および酢酸ウラニルによる電子染色を行い、透過型電子顕微鏡（transmission electron microscope、TEM ; H-800 ; 日立）により観察および写真撮影を行った。

β-ガラクトシダーゼ活性染色

アルカリホスファターゼ活性染色と同様の方法で新鮮凍結組織から薄切片を作成し、PBS で洗浄後、固定のため 10% ホルマリン／0.1 M リン酸緩衝液中で 10 分浸漬し、再び PBS で洗浄した。β-ガラクトシダーゼ染色溶液により 37℃12～16 時間インキュベート後、エオシンで対比染色した。β-ガラクトシダーゼ染色溶液の組成は、5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside（X-Gal）1 mg/ml、40 mM クエン酸／リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）、5 mM フェリシアン化カリウム、5 mM フェロシアン化カリウム、150 mM 塩化ナトリウム、2 mM 塩化マグネシウムである（Going *et al.* 2002）。最後にエタノール系列で脱水後キシレンにより透徹し、カナダバルサムで封入後、光学顕微鏡により検鏡、写真撮影を行った。

統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差で表した。2 群間の平均値の比較には Student の *t*-検定を行った。解析には Stat view を用い、*P* 値が 0.05 未満の場合に統計的に有意と

した。

3－3　結果

小腸上皮細胞の移動速度

腸上皮細胞の平均移動速度は活動群で 5.9 μm/h、冬眠群で 0.9 μm/h であり、冬眠群で有意に低値を示した（Fig. 3-2）。この結果より、絨毛基部から絨毛先端まで移動するのに必要な日数を算出したところ、活動群で約 3 日であったのに対し、冬眠群で 23 日以上であり、冬眠群で活動群の 7 倍以上も細胞更新が遅滞していた。

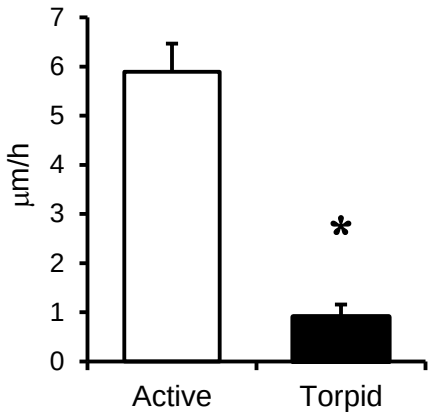


Figure 3-2 Comparison of migration rate in ileum of hamsters. Hamsters received a single intraperitioneal injection of BrdU and EdU within a time interval. In active group, BrdU injection was done 22 h after EdU injection, and tissue was excised 19 h after injection. In torpid group, BrdU injection was done 222 h after EdU injection, and tissue was excised 85 h after injection. Values are expressed as means±SE. Comparison of mean values were done by Student's *t*-test. * $P<0.05$ vs. active. Active; n=6, torpid; n=4

小腸粘膜におけるアルカリホスファターゼ活性

腸管断片 2 cm の粘膜ホモジネートにおけるアルカリホスファターゼ活性を比較したところ、空腸において、冬眠群で活動群よりも有意に高い活性が見られた。回腸においては、2 群間に有意な差はみられなかったが、空腸とほぼ同様の傾向を示した（Fig. 3-3）。

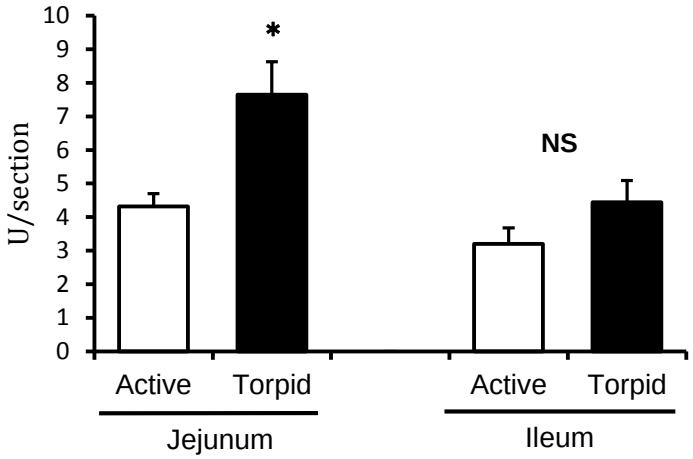
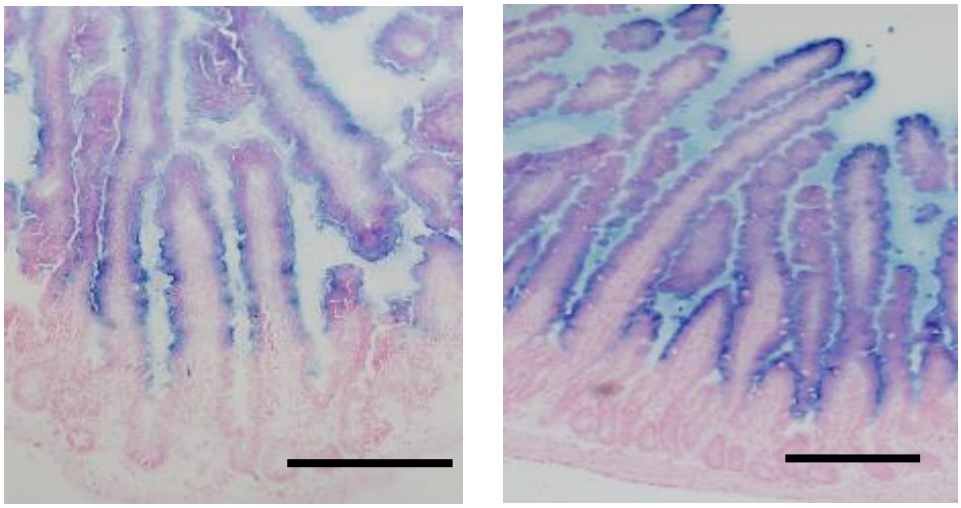


Figure 3-3 Alkaline phosphatase activity in jejunum and ileum of active and torpid Syrian hamsters. The activities are shown as units per 2 cm section. Values are expressed as means±SE. Comparison of mean values were done by Student's *t*-test. ∗ $P<0.05$ vs. active (n=6) NS: not significant

小腸組織切片におけるアルカリホスファターゼ活性

Fig. 3-4 に示した組織において、青色がアルカリホスファターゼの活性を示す部分である。アルカリホスファターゼの活性を示す上皮細胞は、両群共に絨毛にみられ、陰窩には認められなかった（Fig. 3-4 A）。絨毛上皮全体に対する活性を示す上皮の割合を算出したところ、空腸と回腸ともに冬眠群で活動群より有意に高値を示した（Fig. 3-4 B）。

A



B

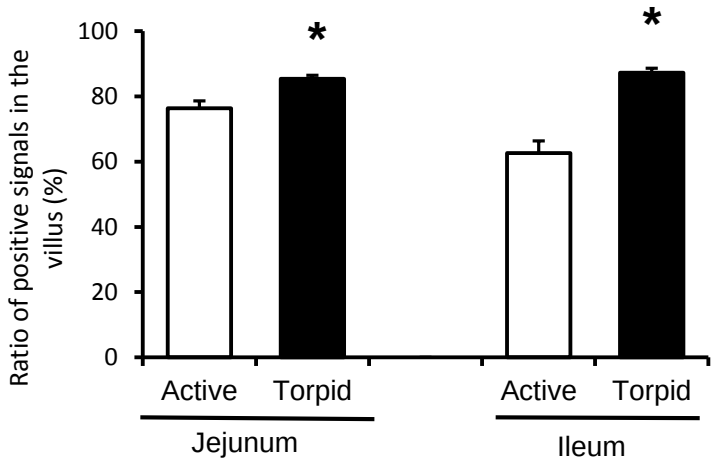


Figure 3-4 A representative micrograph of alkaline phosphatase activity staining in the jejunum of active and torpid Syrian hamsters (A). Bars represent 200 μm. The ratio of cells with positive signals in the villus in the jejunum and ileum is shown in panel B. Values are means±SE (n=6). Comparison of mean values were done by Student's *t*-test. ∗ $P<0.05$ vs. active.

アルカリホスファターゼ遺伝子の発現

アルカリホスファターゼ遺伝子の発現は、両群間で有意な差はなかったが、空腸において冬眠群で高い傾向にあった（Fig. 3-5）。

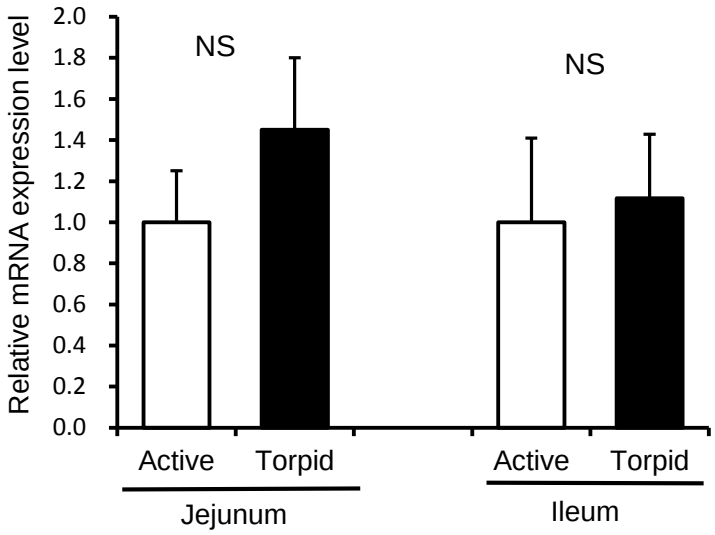
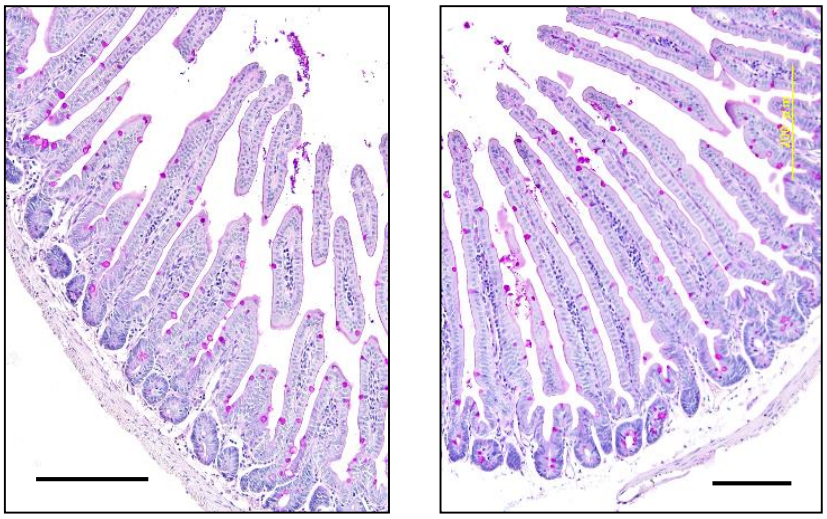


Figure 3-5 Jejunal and ileal mRNA expression of alkaline phosphatase. The mRNA expression level was normalized to the mRNA expression level of the *GAPDH*. The mRNA expression level in active group was set at 1. Values are expressed as means±SE (n=6) Comparisons of mean values were done by Student's *t*-test. NS: not significant

小腸上皮における杯細胞

空腸および回腸において、両群で赤紫色の陽性細胞が陰窩から絨毛全体にかけて散在性にみられた（Fig. 3-6 A）。絨毛 1 cm あたりの陽性細胞の数は、空腸および回腸において両群間で有意差はなかったものの、活動群より冬眠群で多い傾向にあった（Fig. 3-6 B）。

A



B

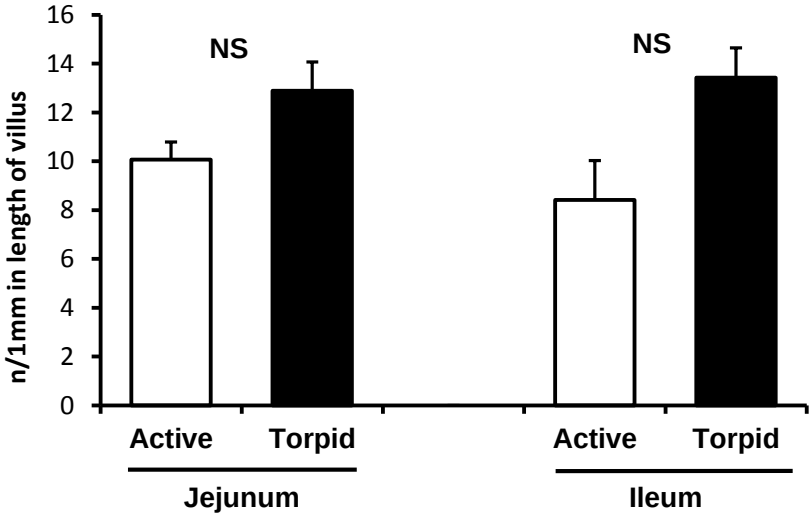
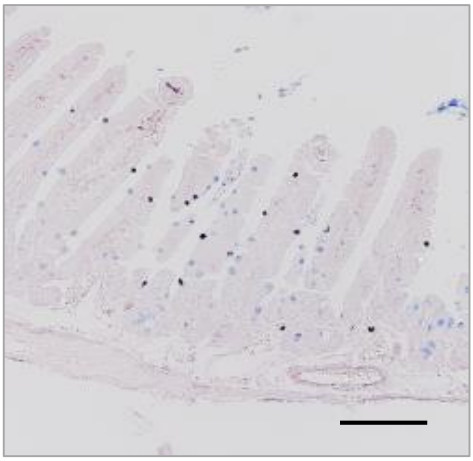


Figure 3-6 PAS staining in jejunul sections of active and torpid Syrian hamsters (*A*). Bars represent 200 μm. Red stains reflect goblet cells. The number of cells with positive staining per 1 mm in length of villus in the jejunum and ileum is shown in panel *B*. Values are means±SE (n=6). Comparisons of mean values were done by Student's *t*-test. NS: not significant

陰窩－絨毛軸に沿ったスルホムチンおよびシアロムチン産生杯細胞の分布

活動群において、黒色のスルホムチン産生杯細胞は絨毛全体に散在していたが、青色のシアロムチン産生杯細胞は陰窩付近にのみ見られた（Fig. 3-7A）。絨毛上皮における絨毛基部から先端にかけての細胞位置ごとのスルホムチンおよびシアロムチン産生杯細胞の数を Fig. 3-7B に示した。スルホムチン産生杯細胞は絨毛基部から先端部にかけて分布するのに対し、シアロムチン産生杯細胞は基部の約 30%の位置において分布していた。また、冬眠群においても、活動群と同様にスルホムチン産生杯細胞は絨毛全体に散在性に見られ、シアロムチン産生杯細胞は陰窩付近に見られたが、活動群よりシアロムチン杯細胞が少なく、スルホムチン産生杯細胞が多く見られた（Fig. 3-8A）。そこで、両群間でそれぞれの杯細胞の数を比較したところ、空腸および回腸の両方において、活動群と比較して冬眠群でスルホムチン産生杯細胞の数が有意に多く、シアロムチン産生杯細胞の数は有意に少なかった　（Fig. 3-8B）。

A



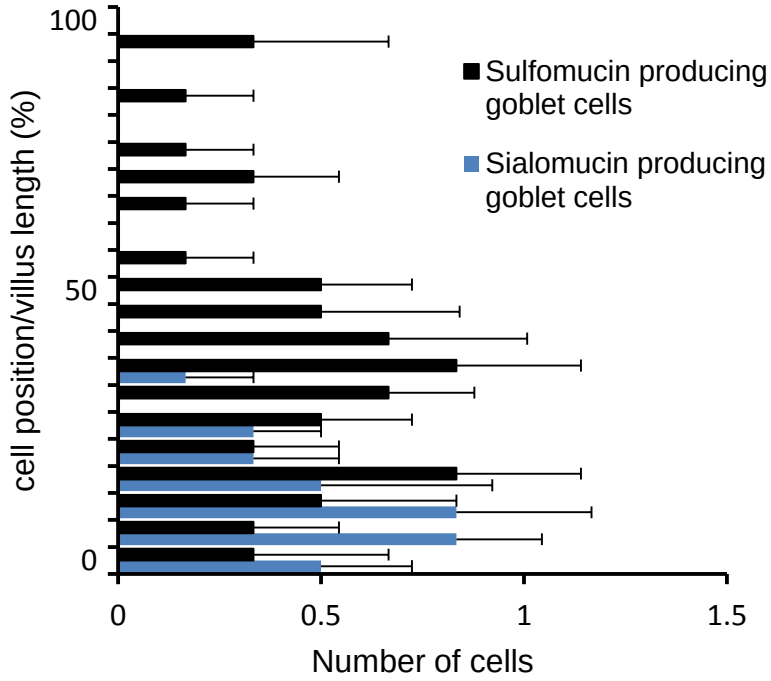
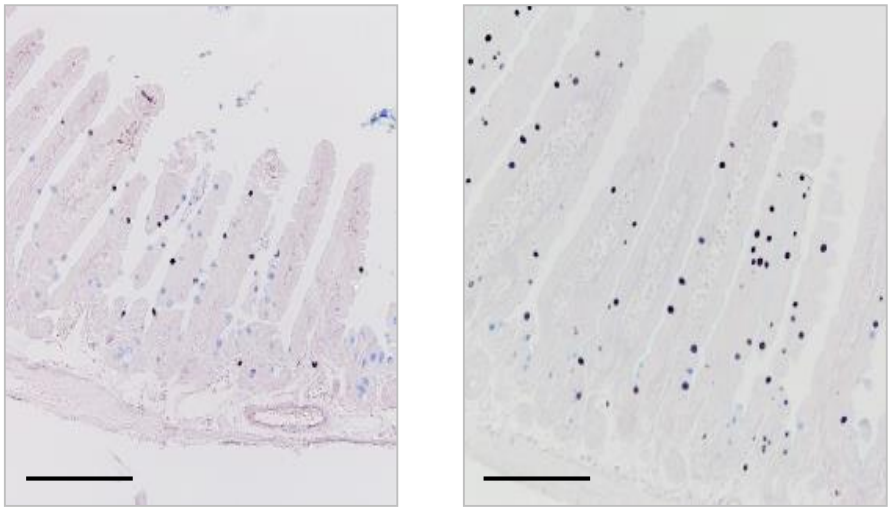


Figure 3-7 *A.* HID-AB staining in the jejunum of Active group. Black staining reflects sulfomucin-producing goblet cells, and blue staining reflects sialomucin- producing goblet cells. Bar represents 200 μm. *B.* The number of sulfomucin- and sialomucin- producing cells on each cell position along villus base-tip axis is shown, in which 0% represents the bottom of the villus, and 100% represents the top of the villus. Values are means±SE (n=6).

A



B

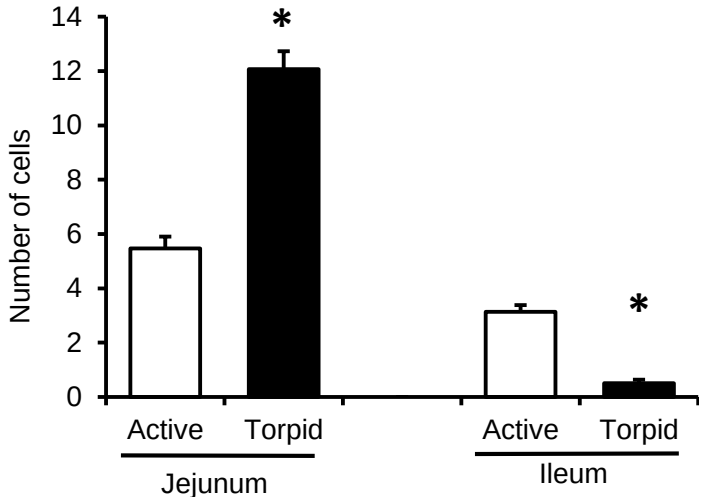
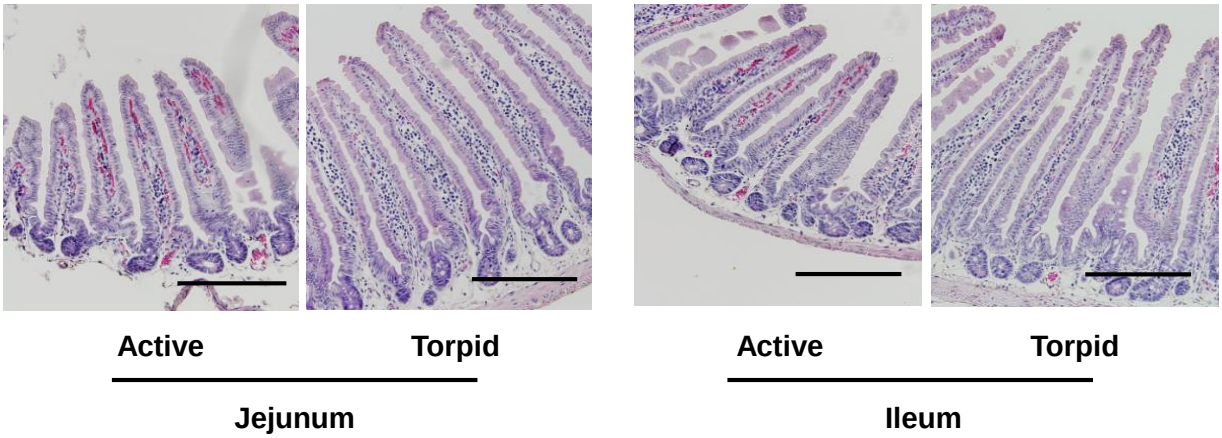


Figure 3-8 HID-AB staining in the jejunum of active and torpid Syrian hamsters (*A*) Black staining reflects sulfomucin-producing goblet cells, and blue staining reflects sialomucin-producing goblet cells. Bars represent 200 μm. *B.* The number of sulfomucin- and sialomucin-producing goblet cells in the ileum per villus. Values are means±SE (n=6). Comparison of mean values were done by Student's *t*-test. * $P<0.05$ vs. active.

絨毛長の比較

Fig.3-9 A は両群の空腸と回腸の粘膜組織を HE 染色したものである。絨毛基部から絨毛先端までの長さを計測したところ、空腸と回腸ともに群間で有意差は認められなかったものの、冬眠群で活動群に比較して絨毛の長さが増加している傾向にあった（Fig. 3-9B)。

A



B

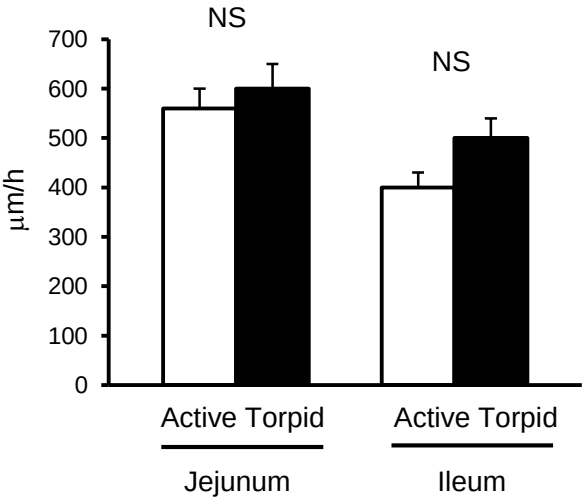


Figure 3-9 Comparison of villus height between active and torpid Syrian hamsters. *A.* HE staining of tissue sections in jejunum and ileum of hamsters. *B.* Comparison of villus height in the jejunum and ileum. Bars in *A* represent 200 μm. Values in *B* are expressed as means±SE (n=6). Comparison of mean values were done by Student's *t*-test. NS: not significant

増殖細胞数

小腸陰窩における BrdU 陽性細胞の割合を計測したところ、冬眠群において活動群に比較して有意に低下していた（Fig. 3-10）。BrdU 陽性細胞は投与時に DNA 合成を行っていた細胞であるため、この結果は陰窩における増殖細胞の割合の変化を反映するものである。

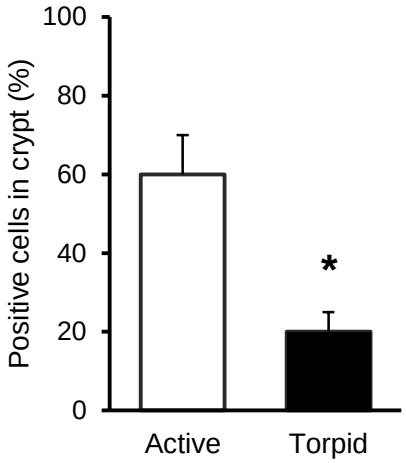


Figure 3-10 The ratio of BrdU positive cells in crypt of small intestine in active and torpid hamsters. Values are expressed as means±SE (n=6). Comparison of mean values were done by Student's *t*-test. * $P<0.05$ vs. active.

小腸上皮細胞の微細構造

Fig. 3-11A は、SEM により絨毛表面を撮影したものである。活動群の絨毛表面は平滑であるのに比較して、冬眠群の絨毛表面は粗雑な印象であった。Fig. 3-11B は、TEM により上皮細胞の管腔側表面の微絨毛を撮影したものである。活動群の微絨毛は長さが均一で整然としており、微絨毛の表面に糖衣が見られたのに対し、冬眠群の微絨毛は長さが不均一で配列は粗であり、糖衣が見られなかった。

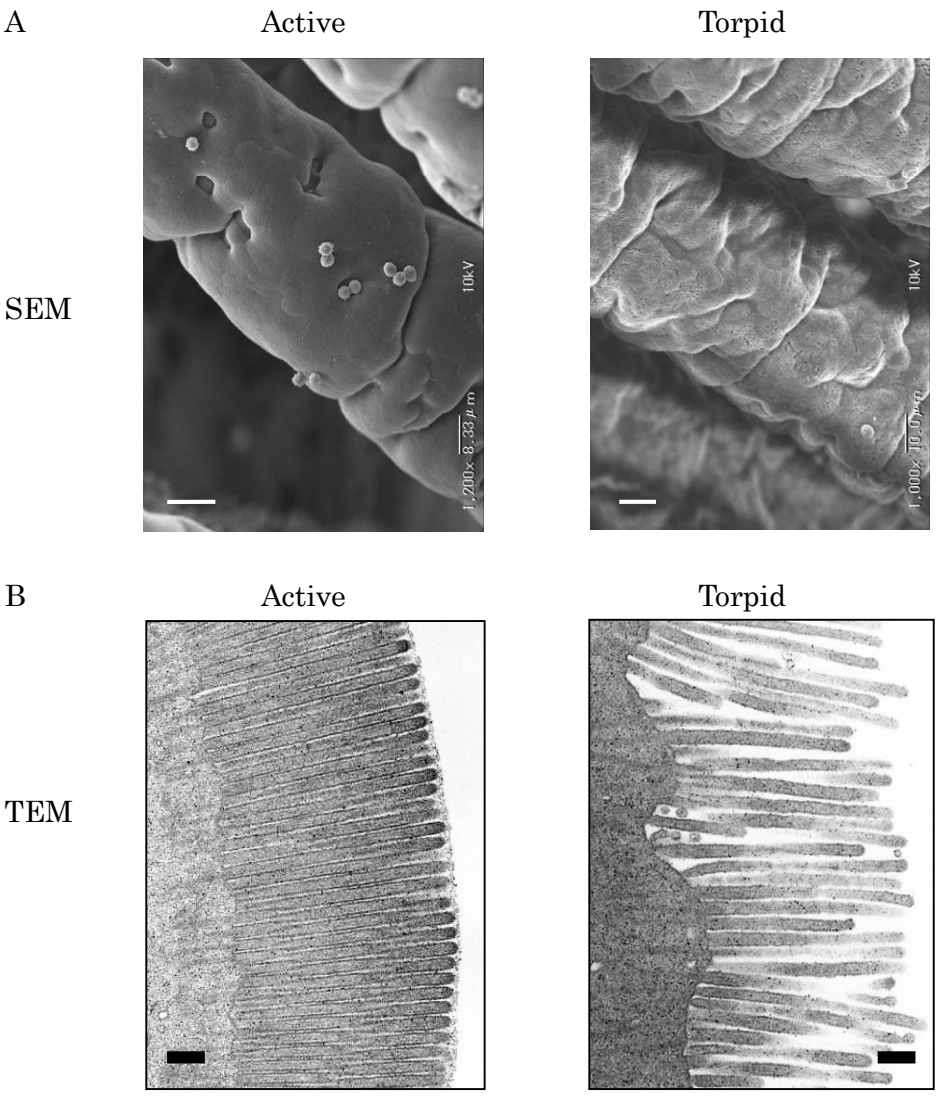


Figure 3-11 A representative electron microscopy of ileum of hamsters. *A.* A representative scanning electron micrographs of villi surface. *B.* A representative transmission electron micrographs of enterocyte microvilli. Bars in *A* represent 10 μm, and in *B* represent 500 nm.

細胞老化関連β-ガラクトシダーゼ活性

Fig. 3-12 において、青色が細胞老化関連β-ガラクトシダーゼ活性を示す部分である。活動群において、活性を示す上皮細胞は見られなかった。一方、冬眠群では、β-ガラクトシダーゼ活性細胞が絨毛先端にのみ観察され、陰窩と絨毛基部には観察されなかった。

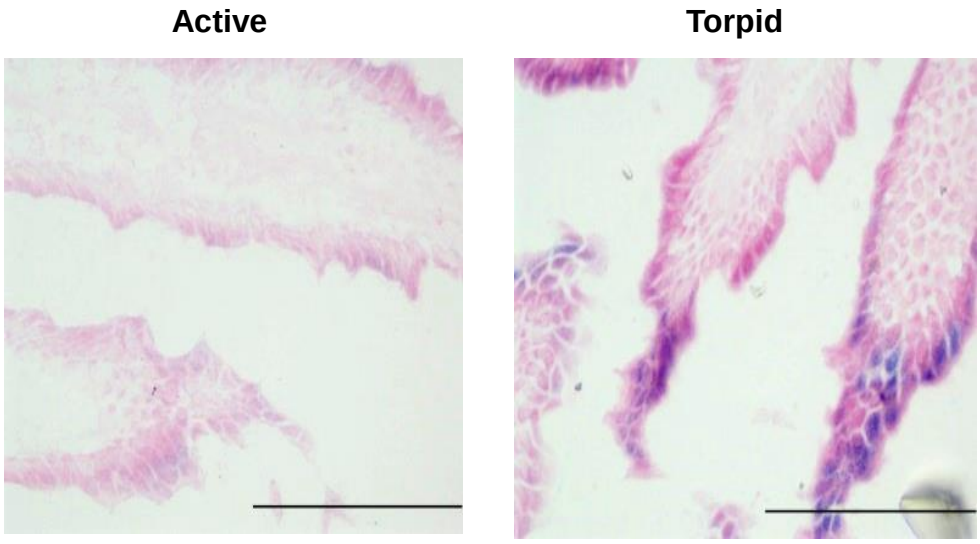


Figure 3-12 Senescence-associated β-galactosidase activity staining in the ileum of active and torpid Syrian hamsters. Blue staining reflects β-galactosidase activity. Bars represent 200 μm.

3－4　考察

冬眠ハムスターにおいて BrdU と EdU の 2 重標識により上皮細胞移動速度を測定したところ、活動期のハムスターに比較して、著しく移動速度が低下していた。細胞移動速度より細胞更新に必要な日数を算出したところ、活動群で約 3 日、冬眠群で 23 日以上であり、冬眠群で活動期より 7 倍以上細胞更新が遅滞していた。これまでに、いくつかの遺伝子がマウスにおける腸上皮細胞移動に関与していることが明らかになっている。例えば、がん抑制タンパク質をコードしている *Apc* 遺伝子の欠損は、腸上皮の細胞移動を遅滞させることが示されている（Andreu *et al.* 2005、Mahmoud *et al.* 1997、Sansom *et al.* 2004）。一方、Rho GTPase をコードする *Cdc42* の欠損は腸上皮細胞の移動を加速させる（Melendez *et al.* 2013）。加えて、肥満細胞の欠損は腸上皮細胞の移動速度を低下させる（Groschwitz *et al.* 2009）。さらに、小腸部分切除術後の残存小腸や（McDermott & Roudnew 1977）、線虫が感染した小腸において（Hoste & Mariana 1989）、腸上皮細胞の移動が加速する。しかし、陰窩－絨毛軸に沿った腸上皮細胞の移動を司る分子的メカニズムは未だはっきりしていない。また、本研究で観察された冬眠シリアンハムスターのように、細胞移動速度の 7 倍以上の変化が観察された例は、これ

までに報告がない。

冬眠個体で腸上皮細胞の更新が著しく遅滞していたことから、絨毛部分の上皮細胞の分化と成熟が過度に進行していることが予想されたため、これを確かめた。冬眠群の小腸の長さ当たりのアルカリホスファターゼ活性は、空腸で活動群に比較して有意に高い値であり、アルカリホスファターゼ活性染色によって、冬眠群では活性部位の割合が高いことが示された。これらの結果は、冬眠群において小腸の長さ当たりのアルカリホスファターゼの活性が高いのは一細胞あたりの活性が高いためではなく、アルカリホスファターゼを発現している細胞の割合が多いことによることを示唆している。また、アルカリホスファターゼの mRNA 発現レベルも冬眠群で高い傾向にあったことから、タンパク質レベルだけではなく、遺伝子レベルでもアルカリホスファターゼの発現が増加していることが示された。Hodin *et al.*（1995）により、成熟した腸上皮細胞はアルカリホスファターゼを発現していることが報告されていることより、冬眠群の小腸粘膜絨毛では成熟した上皮細胞の割合が増加していると考えられた。アルカリホスファターゼを発現するのは吸収上皮細胞であるため、冬眠群において成熟した吸収上皮細胞の割合が増加しているものと推察される。

小腸組織の PAS 染色を行ったところ、冬眠群において杯細胞の数が多い傾向にあった。これも、成熟した吸収上皮細胞の増加と同様に、上皮細胞が更新遅延した結果、分化および成熟した上皮細胞が増加し、分化した上皮細胞の一種である杯細胞の増加につながったものと考えられる。

活動個体における HID-AB 染色では、スルホムチン産生杯細胞は絨毛全体に見られたが、シアロムチン産生杯細胞は陰窩付近にのみ見られた。小腸の上皮細胞は成熟するに従って絨毛基部から絨毛先端に移動するため、本研究の結果は、杯細胞が成熟するにつれて分泌するムチン糖鎖をシアロムチンからスルホムチンに変化させることを示唆している。この結果を考慮すると、冬眠群でスルホムチン産生杯細胞が増加し、シアロムチン産生杯細胞が減少したことは、冬眠群における成熟杯細胞の増加を意味

する。以上のことから、冬眠群の小腸粘膜では杯細胞や吸収上皮細胞を含めた成熟した上皮細胞が増加しており、これは冬眠ハムスターにおける上皮細胞更新の遅延に起因するものと推察された。

一方、HE 染色により小腸組織の構造を観察したところ、冬眠個体で腸粘膜絨毛の長さが増加している傾向にあった。経口摂取が一定期間行われないと、細胞増殖が減少し、腸粘膜が萎縮するということが知られている。しかし、冬眠個体において増殖細胞数は減少していたにも関わらず、粘膜は萎縮しておらず、逆に肥厚傾向にあった。絨毛の長さは、陰窩における細胞増殖と、絨毛における細胞死とのバランスに依存する。冬眠個体で、細胞増殖が減少していたのにも関わらず、絨毛が長くなっていたのは、絨毛における細胞死が減少しているためと考えられる。しかし、元来少ない細胞死が、さらに減少していることを証明するのは困難である。また、冬眠シリアンハムスターにおいて小腸粘膜が萎縮していないのは、冬眠ヨーロピアンハムスターと冬眠ジュウサンセンジリスの小腸粘膜が萎縮していたのとは一致しない（Michel *et al.* 1988、Carey & Sandra 1996）。これは持続的冬眠の時間がヨーロピアンハムスターは 12 日間、ジュウサンセンジリスは 12 週間と、シリアンハムスターの 4 日間より長いことが関係する可能性がある。すなわち、中途覚醒時に細胞増殖が一過性に増加することが報告されているが（Dubinin *et al.*1995）、シリアンハムスターではこの細胞増殖の増加の頻度が、ヨーロピアンハムスターとジュウサンセンジリスより多く、かつ細胞死が少ないため、粘膜の萎縮が生じないのかもしれない。

さらに、電子顕微鏡により、絨毛表面と吸収上皮細胞の腸管内腔に面した細胞膜（頂端側）に存在する微絨毛を観察したところ、活動個体では絨毛の表面が滑らかであったのに対し、冬眠個体では粗雑であった。さらに微絨毛を観察すると、活動個体では微絨毛の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った。SEM によって冬眠個体の絨毛表面が粗雑に見えたのは、絨毛表面を覆っている微絨毛の長さが不均一であるためと考えられた。前述したように、吸収上皮細

胞の過成熟が生じていることが、微絨毛の構造変化を来しているのかもしれない。微絨毛には，ムチン様構造を持つ細胞膜貫通糖タンパク質が存在し，厚さ数百 nm の糖衣と呼ばれる層を形成して細胞表面を密に覆っている（Moran *et al.* 2011）。この糖衣が冬眠個体では明確に観察されなかった。糖衣の糖タンパク質は負の電荷を持ち、膵臓から分泌された消化酵素が付着している（Moran *et al.* 2011）。また、吸収上皮細胞の微絨毛には，膜貫通型消化酵素も発現している。したがって、糖衣は栄養素の終末消化が起こる場であり、分解産物であるアミノ酸や単糖は素早く吸収上皮細胞膜から各々の吸収担体を介して吸収される（Moran *et al.* 2011）。一方、抗原となり得る高分子やウイルス、細菌が拡散・透過により糖衣をくぐり抜けて細胞膜に到達することは容易ではないため、糖衣は吸収上皮の物理的バリアとしての役割を果たしていると考えられる（Janneke *et al.* 2013）。この糖衣が冬眠個体で消失している可能性があることから、冬眠個体の腸管においてバリア機能が低下している可能性が考えられた。

哺乳動物の正常な組織から体細胞を取り出し、培養容器の中で培養すると、最初のうちはよく増殖するが、ある一定の回数増殖すると分裂限界を迎え、不可逆的に増殖を停止する。この現象を細胞老化と呼び（Hayflick & Moorhead 1961）、テロメアの短縮や種々のストレス、がん遺伝子の発現などにより誘導され、正常細胞が必要以上に細胞分裂を繰り返してがん細胞へと形質転換することを防ぐ機構として働いていると考えられている（Bringold & Serrano 2000）。Dimri *et al.*（1995）によって、培養細胞を pH 6 の条件下で、X-Gal を基質として β-ガラクトシダーゼを染色すると、細胞老化を起こした細胞のみが青く染まることが報告された。これは通常は至適 pH が 4 であるβ-ガラクトシダーゼが老化に伴って変化した結果、至適 pH が 6 にシフトするためと言われている。このように細胞老化関連β-ガラクトシダーゼ活性は *in vitro* における細胞老化のマーカーとして発見されたが、*in vivo* における細胞老化のマーカーになるかどうかは未だはっきりせず、報告数も少ない。Going *et al.*（2002）は、*in vivo* において様々な腸管組織を用いて細胞老化関連β-ガラクトシダーゼ活性を観察

し、細胞老化のマーカーになるかどうかを検討している。その結果、分化成熟が進んだ化生状態の腸管組織において活性が増加すること、ならびにがん化した腸管組織では活性が減少することを観察した。つまり、腸管において分化成熟が進んだ細胞では活性が増加し、がん細胞のように未分化で増殖が活発な細胞では活性が減少することを示唆している。本研究において、活動個体の小腸ではβ-ガラクトシダーゼ活性は検出されず、冬眠個体においてのみ絨毛の先端に認められた。この理由として、冬眠中の腸粘膜絨毛では上皮細胞の更新が遅延しているために絨毛の同じ場所に留まり続け、その結果、細胞寿命が延長するとともに分化が進み、最も寿命の長い絨毛先端の細胞が細胞老化状態になっているためと考えられた。また、通常は上皮細胞が寿命を終えると細胞死などにより絨毛部からその細胞は脱落するために、老化状態にまで至らない。一方、冬眠個体で細胞の老化状態が見られたということは、冬眠個体で細胞死などによる細胞の絨毛部からの脱落が減少していることを意味しているのかもしれない。

第 4 章　冬眠シリアンハムスターにおける小腸の機能変化

4－1 背景と目的

小腸には、食物の消化吸収機能と、異物やバクテリアなどの侵入を防ぐバリア機能の主に２つの機能がある。本研究において、冬眠ハムスターの小腸粘膜上皮は細胞更新が遅滞しており、その結果、成熟した腸上皮細胞が増加し、刷子縁膜の構造が変化していることが示されたことから、小腸粘膜上皮細胞の機能も変化している可能性が考えられた。加えて、絶食により腸管の粘膜バリアが低下することが知られている。例えば、ラットにおいて 3 日間 TPN を施行すると、腸管粘膜の萎縮がおき、刷子縁膜酵素の活性が低下するだけでなく、腸粘膜透過性の亢進やタイトジャンクションの崩壊により腸のバリア機能も低下し、バクテリアルトランスロケーションが引き起こされる可能性が高まる（Yang *et al.* 2009）。このような腸粘膜バリアの低下は、炎症性サイトカインによる腸上皮細胞のアポトーシスの誘導が原因と考えられている（Bojarski *et al.* 2000）。例えば、7 日間 TPN を施行したマウスにおいて、タイトジャンクションに関連するタンパク質の発現低下と IFN-γの増加がみられており、IFN-γがバリア機能の低下を導く要因のひとつであることが示唆された（Yang *et al.* 2003）。冬眠ハムスターも持続的冬眠状態においては食物を摂取しないため、活動期の絶食時と同様に粘膜バリアが低下している可能性がある。また、前章において確認された腸上皮細胞の成熟と老化、刷子縁膜の構造変化からも、粘膜バリア低下を引き起こしている可能性が考えられる。そこで本研究では、冬眠中の小腸の機能について以下のように調べた。消化吸収機能としては、消化酵素であるマルターゼの活性を測定することで評価した。バリア機能については粘液量と horseradish peroxidase（HRP）の腸管透過性、タイトジャンクション関連タンパク質の発現により評価した。腸管粘膜を覆っている粘液は杯細胞が産生するムチンが主成分であり、腸管粘膜を保護する物理的バリアとして機能する。本研究では、小腸における分泌型ムチンをコードする *Muc2* の mRNA 発現レベルと、盲腸内容物中のムチ

ン量を測定することで、冬眠中の粘液バリアを評価した。腸管透過性については、分子量４万のタンパク質である HRP の *ex vivo* 反転腸管法による透過量を測定することにより検討した。また、タイトジャンクションは、隣接する上皮細胞を強固に接着するバリア構造のひとつであり、クローディンやオクルディン、ZO-1 などのタンパク質から構成されている。腸管上皮においてタイトジャンクション構造は上皮細胞頂端部の側底膜に濃縮して存在し、細胞間隙の物質の透過を厳密に制限することから、消化管のバリア機能に大きく寄与している（Tsukita *et al.* 2001）。本研究では、タイトジャンクションを構成するタンパク質のうちクローディン-1 と ZO-1 の mRNA 発現レベルと、クローディン-1 の免疫組織染色による観察を行った。

4－2 方法

実験動物および材料

3－2 で作成した小腸粘膜由来 1st strand cDNA と、3－2 で作成したパラフィン切片を使用した。また、3－2 と同じ個体より、盲腸内容物を 200 ㎎以上採取し、凍結保存した。HRP の透過量測定は 3－2 と同様に飼育した冬眠群 6 匹と活動群 6 匹より、回腸末端より 4cm を切り出し、測定に使用した。

マルターゼ活性測定

3－2 で採取し作成した粘膜のホモジネートを用いた。基質として 55.5 mM マルトースを含む 0.1 M マレイン酸緩衝液 30 μl にホモジネート 30 μl を加え、37℃で 30 分間インキュベートしたのち、5 分間煮沸し急冷後、グルコース CⅡ-テストワコー（和光純薬）を用いて遊離したグルコース量を測定した（Dahlqvist 1984）。1 分につき 1 μmol のグルコースを生成する酵素活性を 1 U とした。

リアルタイム PCR によるムチンコアタンパク遺伝子の発現解析

3－2 で得られた 1st strand cDNA を、Thermal Cycler Dice TP800 を使用して、RT-qPCR に供した。各プライマーの塩基配列と増幅サイズは Table 4-1 のとおりである。反応は、95℃10 秒の後、95℃5 秒、60℃30 秒を 40 サイクル行った。その後、95℃15 秒、60℃30 秒、95℃15 秒で解離させた。*Muc2* は 18S ribosomal RNA（rRNA）に対する発現の比により、両群の遺伝子発現の比較を行った。

Table 4-1 Oligonucleotide primers used for RT-qPCR

Target Template	**PCR Primers**	**Product Size, bp**
Muc2		
Sense	5'-GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG	113
Antisense	5'-GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC	
18S rRNA		
Sense	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA	187
Antisense	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT	

These primer sequences were in accordance with the following.
Muc2：Hoebler *et al.* (2006)
18S rRNA：Hewitt *et al.* (2004)

盲腸内容物中のムチン濃度

盲腸内容物よりムチン画分を Lien *et al.*（1987）の手法に基づいて分離し、*O*-結合性糖鎖当量としてムチン量を測定した。-80℃で凍結保存した盲腸内容物を、凍結乾燥機（FDU-540、Eyela）を用いて凍結乾燥し、PBS1 ml を加えてハンドホモジナイザーを用いて懸濁し、遠心分離した（10,000×g、30 分間、4℃）。上清に冷エタノールを加えて-28℃で一晩静置した。その後、遠心分離し（1,400×g、10 分間、4℃）、上清を除去した後に 0.15 M 塩化ナトリウム溶液を 900 μl 加えて沈殿を溶解させた後、冷エタノー

ルを 2.7 ml 加えて-28℃で一晩静置した。その後、遠心分離し（1,400×g、10 分間、4℃）、上清を除いて蒸留水を 900 μl 加えて沈殿を溶解させ、凍結乾燥した。その後、蒸留水 900 μl を加えて溶解し、*O*-結合型糖鎖の定量に供した。小腸内容物中 *O*-結合型糖鎖の定量は、Crowthe & Wetmore（1987）の手法に基づいて行った。蒸留水で 5 倍希釈したムチン画分 100 μl に対し、アルカリシアノアセタミド溶液（0.2 M 2-シアノアセタミド：0.15 M 水酸化ナトリウム＝1:5）を 120 μl 加えて 30 分間、100℃でインキュベートした。0.6 M ホウ酸緩衝液（pH 8.0）を 1 ml 加え、マイクロプレートリーダーを用いて 336 nm の励起波長および 383 nm の蛍光波長の蛍光強度を測定した。検量線は蒸留水で希釈した *N*-acetylgalactosamine（GalNAc）を用いて作成した。

ex vivo 反転腸管法による HRP の透過量

Enomoto *et al.*（1999）の手法に基づいて行った。ハムスターから摘出した回腸を氷冷 PBS で洗浄した後、回腸遠位から 4 cm の断片を切り出して反転した。反転した回腸をトリス塩酸緩衝液（pH 7.5）で満たして、両端を絹糸で結紮し、反転サックを作成した。サックを 40 μg/ml の HRP を含むトリス塩酸緩衝液（pH 7.5）に浸し、30 分間、37℃で保持した。その後、サックの内液を回収して 5 倍に希釈し、内液 10 μl にテトラメチルベンジジン（TMB）基質溶液（0.2 M クエン酸、0.2M クエン酸三ナトリウム、0.82 mM TMB、1.8 mM 過酸化水素）を 100 μl 加えて室温、遮光下で 5 分間インキュベートした。2 N 硫酸を 50 μl 加えた後、マイクロプレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定した。検量線はトリス塩酸緩衝液（pH 7.5）で希釈した HRP を用いて作成した。

リアルタイム PCR によるタイトジャンクション関連タンパク遺伝子の発現解析

3－2 で得られた 1st strand cDNA を、Thermal Cycler Dice TP800 を使用して、RT-qPCR に供した。各プライマーの塩基配列と増幅サイズは Table 4-2 のとおりであ

る。反応は、95℃10 分の後、95℃30 秒、60℃1 分を 45 サイクル行った。その後、95℃15 秒、60℃30 秒、95℃15 秒で解離させた。*GAPDH*（プライマーは Table 3-1 と同じ）に対する発現の比により、両群の遺伝子発現の比較を行った。

Table 4-2 Oligonucleotide primers used for RT-qPCR

Target Template	PCR Primers	Product Size, bp
Claudin-1		
Sense	5'-CGGTCTGGCGATTTTAGTAG	202
Antisense	5'-TGGTGTTGGGTAAGAGGTTG	
ZO-1		
Sense	5′-CCACCGGAGTCTGCCATTACACG	268
Antisense	5′-GGGTGGGCTCCTCCAGGCTGACATTAG	

These primer sequences were in accordance with the following.
ZO-1: Sun *et al.* 2008

クローディン-1 の免疫組織化学

3－2 で作成したパラフィン切片を、脱パラフィンおよび水和後、内因性ペルオキシダーゼの失活処理のため 3%H_2O_2 で室温 5 分間インキュベートした。2－2 と同様に抗原賦活化、ブロッキングした後、1 次抗体は 500 倍希釈の抗クローディン-1 抗体（Rabbit anti-claudin1 polyclonal antibody; Bioss）を用い、4℃で一晩インキュベートした。PBS で洗浄後、MACH2 Universal HRP polymer で室温 30 分間インキュベートした。PBS 洗浄後、DAB で発色し、ヘマトキシリンで対比染色、カナダバルサムで封入し、光学顕微鏡で検鏡、写真撮影した。

統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差で表した。2 群間の平均値の比較には Student の *t*-検定を行った。解析には Stat view を用い、*P*値が 0.05 未満の場合に統計的に有意とした。

4－3 結果

マルターゼ活性

空腸および回腸ともに 2 センチの腸管断片における活性を計測したところ、両群間で有意な差は見られなかった（Fig. 4-1）。

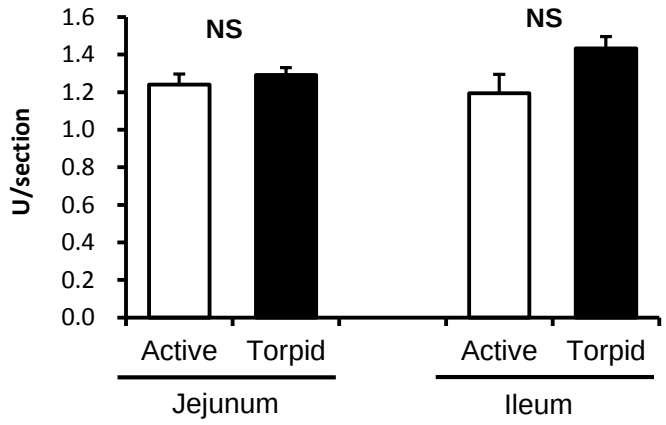


Figure 4-1 Maltase activity in the jejunum and ileum of active and torpid Syrian hamsters. The activities are shown as units per 2 cm section. Values are means±SE (n=6). Comparison of mean values were done by Student's *t*-test. NS: not significant

腸管バリアの評価

空腸における分泌型ムチンをコードする遺伝子である *Muc2* の発現は、活動群よりも冬眠群で有意に低値であった（Fig. 4-2 A）。一方、盲腸内容物乾燥重量 1 g あたりの *O*-結合型糖鎖当量として測定したムチン量は、両群間で有意な差はなかったが、冬眠群で低い傾向を示した（Fig. 4-2 B）。回腸末端の反転腸管サックを用いた HRP 透過量に両群間で有意な差はみられなかったが、冬眠群で高い傾向にあった（Fig. 4-2 C）。

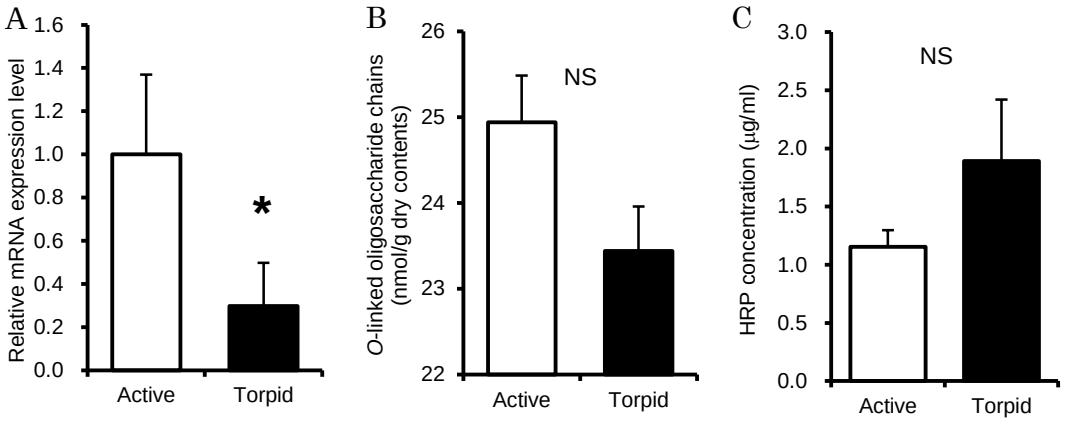


Figure 4-2 Evaluation of intestinal mucosal barrier. *A.* Jejunal mRNA expression of *Muc2*. The mRNA expression level of *Muc2* was normalized to the mRNA expression level of the *18S rRNA*. The mRNA expression level in active group was set at 1. *B.*Measure of *O*-linked oligosaccharide chains as mucin amount per 1 g of dry cecal content. *C.*HRP permeation of distal ileum in active and torpid Syrian hamsters *ex vivo*. Values are expressed means±SE (n=6). Comparison of mean values were done by Student's *t*-test. * $P<0.05$ vs. active. NS: not significant

タイトジャンクション関連タンパク遺伝子の発現

回腸におけるクローディン-1 および ZO-1 の mRNA の発現は、両群間で有意な差はみられなかった（Fig. 4-3）。

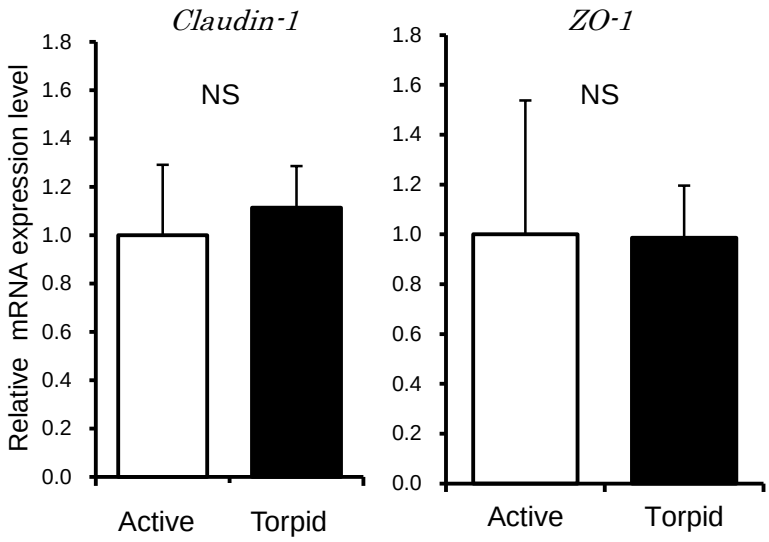


Figure 4-3 Ileal mRNA expression of *Claudin-1* and *ZO-1*. The mRNA expression level was normalized to the mRNA expression level of the *GAPDH*. The mRNA expression level in active group was set at 1. Values are expressed as means±SE (n=6). Comparisons of mean values were done by Student's *t*-test. NS: not significant

クローディン-1 の発現

Fig. 4-4 において、茶色の部分がクローディン-1 陽性を示している。活動群では上皮細胞間におけるクローディン-1 陽性シグナルが確認でき、細胞質部分では陽性シグナルはみられなかった。冬眠群では活動群に比べて、細胞間の陽性シグナルは弱く、細胞質にびまん性に陽性シグナルが確認された。

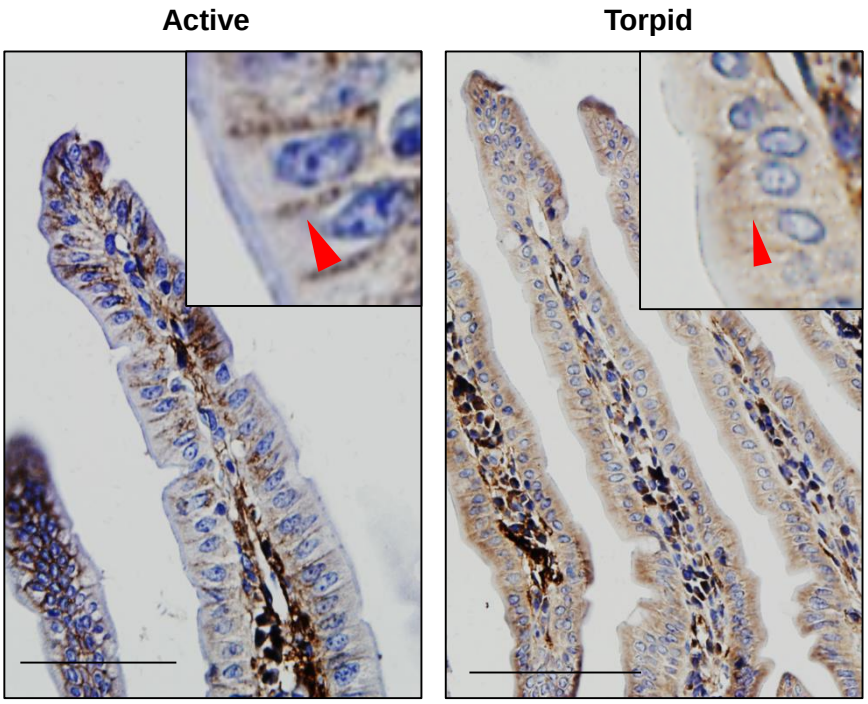


Figure 4-4 A representative immunohistochemistry for claudin-1 (brown) in the ileum of active and torpid hamsters. Insets illustrate the higher magnification and red arrows indicate cell membrane among cells. Bars represent 200 μm.

4－4 考察

冬眠群でマルターゼの活性は活動群と差が見られなかったことから、冬眠中も消化酵素の活性は低下しておらず、消化機能については冬眠中でも維持されていると考えられた。これまでに、冬眠中のヨーロピアンハムスターとジュウサンセンジリスにおいて、消化酵素の活性は低下せず、これらの遺伝子発現も低下しないという報告がある（Michel *et al.* 1988、Carey & Martin 1996）。冬眠シリアンハムスターにおける消化酵素の活性についても、ヨーロピアンハムスターとジュウサンセンジリス同様に持続的冬眠中でも遺伝子レベルで発現が維持されている可能性が高く、合目的的に考えるならば、中途覚醒時の摂食活動に備えて消化機能を維持していると推察された。

バリア機能のうち粘液については、小腸の分泌型ムチンをコードする *Muc2* の mRNA 発現レベルが冬眠個体で低下していたにも関わらず、盲腸内容物中のムチン量は低下し

ていなかった。持続的冬眠中は *Muc2* の発現は低下しているが、中途覚醒時に一過性に発現が上昇し、その後の持続的冬眠における低温条件下で腸内細菌による分解を免れて蓄積され、冬眠中の腸管内の粘液量は維持されていると考えられた。持続的冬眠中の *Muc2* の発現低下は、先ほどの持続的冬眠中でも遺伝子レベルで発現が維持されていた消化酵素とは異なる結果であった。冬眠中はエネルギー節約のため必要最低限な機能の発現のみを維持しているのかもしれない。

タイトジャンクションに関連するタンパク質のうち、クローディン-1 の mRNA 発現レベルについては冬眠個体において変化はなかったものの、クローディン-1 タンパクの発現分布において変化がみられた。活動個体では細胞間に発現していたクローディン-1 が、冬眠個体では細胞間におけるシグナルが減弱していた。クローディンは、タイトジャンクションを構成するタンパク質のうち、その機能を左右する重要なタンパク質である。オクルディンなどのクローディン以外のタイトジャンクション関連タンパク質を欠損させたマウスではタイトジャンクションの機能は低下しないが、クローディン欠損マウスはそれが低下することが知られている（Furuse *et al.* 2002）。冬眠個体においてクローディン-1 の発現分布に変化がみられたことより、冬眠中はタイトジャンクションの機能が変化している可能性が考えられた。

一方、*ex vivo* の反転腸管法による HRP の腸管透過量には活動個体と冬眠個体との間に差はみられなかった。HRP は分子量 4 万のポリペプチドであり、トランスサイトーシスにより腸管を透過する。トランスサイトーシスとは、輸送小胞内に物質を取り込んで細胞内を輸送するシステムであり、タンパク質などの高分子物質の輸送に関わるとされている（Barreau & Hugot 2014）。一方、タイトジャンクション部分に形成される小孔は物質輸送経路になっており、水溶性低分子物質はこれを介して受動拡散すると考えられている（Tsukita *et al.* 2001）。したがって、冬眠個体において HRP の透過量に変化がなかったことは、上皮細胞の微細構造の変化（微絨毛の構造の変化など）が認められるにも関わらず、トランスサイトーシスによる透過の変化が起きていないことを意

味する。また、タイトジャンクション関連タンパク質の発現の変化は、HRP のような高分子物質の透過に影響する程度の変化ではないと考えられた。

第 5 章　冬眠シリアンハムスターにおける腸上皮細胞更新遅延のメカニズム

5－1　背景と目的

Goodlad & Wright（1984）らは、マウスにおいて細胞増殖に対する絶食と再摂食の影響を検証した。絶食中のマウスに再摂食させると、直ちに絨毛における上皮細胞数が増加したが、陰窩における細胞数は増加しなかった。絨毛における細胞数増加が再摂食後直ちに起きたのは、陰窩から絨毛へ細胞が移動したためであり、これは再摂食時の栄養吸収に迅速に対応するためと推測された。したがって、陰窩－絨毛軸に沿った上皮細胞の移動は、積極的に調節された過程であり、陰窩における細胞増殖の結果によるものではないと彼らは結論した。冬眠ハムスターにおける上皮細胞の移動速度の低下も、陰窩における細胞増殖の低下による結果ではなく、なんらかの因子により調節されている可能性がある。多細胞生物の発生過程や恒常性の維持は，細胞の増殖、分化、死、運動、接着等の細胞応答が複雑に相互作用することにより調節されている。これらの多彩な細胞応答は、BMP および TGF、Notch、Hedgehog、Wnt 等の細胞外分泌タンパク質により制御されている（Logan & Nusse 2004）。中でも Wnt は細胞増殖と分化を制御するタンパク質であり、Wnt が細胞膜上の受容体に結合した後に活性化される細胞内のシグナル伝達機構には，β-カテニン経路、平面細胞極性（PCP）経路および Ca^{2+}経路の 3 種類が存在する（Kikuchi 1999）。β-カテニン経路では、Wnt が細胞に作用すると細胞質のβ-カテニンが安定化し、細胞質内に蓄積する。細胞内に蓄積したβ-カテニンは核内に移行した後，転写因子 Tcf と複合体を形成し，種々の標的遺伝子の発現を促進して，その結果、細胞の増殖や分化を制御する。つまり、陰窩における増殖細胞のような Wnt シグナルが活性化している細胞においては、β-カテニンが細胞膜から核へ移行している。一方、増殖を停止した細胞においては、β-カテニンは細胞膜に局在し、E-カドヘリンと結合している（van der Flier & Clevers 2009）。そこで本研究では、β-カテニンと E-カドヘリンの免疫組織染色を行い、それぞれのタンパク質の発現場所を見ることで、冬眠

ハムスターにおける Wnt シグナルの変化の有無を検討した。

また、hedgehog シグナル経路が腸管の恒常性維持に関与していることが知られており、マウスにおいてこの経路が阻害されるとアポトーシスが増加し、上皮細胞の移動速度が亢進することが報告されている（Tang *et al.* 2009）。したがって、腸管の hedgehog シグナル経路に関与するタンパク質である Indian hedgehog（Ihh）の、冬眠ハムスターの小腸粘膜おける mRNA 発現レベルを解析し、冬眠ハムスターの腸上皮細胞の移動速度の低下に hedgehog シグナル経路が関与しているか否かを検証した。

一方、ショウジョウバエの遺伝学的解析から、Wnt は平面内細胞極（PCP）経路において低分子量 G 蛋白質である Rho や Rac を活性化し、その結果、Rho キナーゼと Jun キナーゼを活性化することや、Ca^{2+}経路において C キナーゼやカルモデュリンキナーゼを活性化することが明らかになってきた（Kikuchi & Yamamoto 2008）。PCP 経路とCa^{2+}経路はあわせてβ-カテニン非依存性経路と呼ばれているが、これらの経路を介して Wnt は細胞骨格を制御し、その結果、細胞運動を促進すると共に細胞極性を決定すると考えられている（Kikuchi & Yamamoto 2008）。加えて、Rho ファミリーG タンパク質である Cdc42 のノックアウトマウスの小腸において、陰窩の細胞増殖が増加し、上皮細胞の移動速度が増加したという報告がある（Melendez *et al.* 2013）。これらのことから、Cdc42 が冬眠ハムスターにおける細胞増殖低下と細胞移動の遅滞に関与している可能性が考えられたため、冬眠ハムスターの小腸粘膜における Cdc42 の mRNA 発現を解析することで、Cdc42 の関与の有無を検証した。

5－1　方法

実験動物および材料

3－2 で作成した小腸粘膜由来 1st strand cDNA と、3－2 で作成したパラフィン切片を使用した。

β-カテニンおよび E-カドヘリンの免疫組織化学

3－2 で作成したパラフィン切片をキシレン系列で脱パラフィンし、アルコール系列で水和後、2－2 と同様の方法で抗原賦活化およびブロッキングを行った。その後、1 次抗体は 200 倍希釈の抗β-カテニン抗体（14/Beta-Catenin; BD Biosciences）、または抗 E-カドヘリン抗体（clone 36/E-cadherin; BD Biosciences）を用い、4℃で一晩インキュベートした。PBS で洗浄後、2 次抗体は 1000 倍希釈の anti-mouse IgG conjugated with HyLyte Fluor 555（Anaspec）を用い、遮光下にて 2 時間室温でインキュベートした。PBS 洗浄後、ProLong Gold antifade reagent with DAPI で封入し、蛍光顕微鏡で検鏡、写真撮影した。

リアルタイム PCR による細胞移動関連タンパク遺伝子の発現解析

3－2 で得られた 1st strand cDNA を、Thermal Cycler Dice TP800 を使用して、RT-qPCR に供した。各プライマーの塩基配列と増幅サイズは Table 5-1 のとおりである。反応は 95℃10 分の後、95℃30 秒、60℃1 分を 45 サイクル行った。その後、95℃15 秒、60℃30 秒、95℃15 秒で解離させた。*GAPDH*（プライマーは Table 3-1 と同じ）に対する発現の比により、2 群の遺伝子発現の比較を行った。

Table 5-1 Oligonucleotide primers used for RT-qPCR

Target Template	PCR Primers	Product Size, bp
Ihh		
Sense	5'-CCACCTTCAGTGATGTGCTCATTTT	68
Antisense	5'-GCATGACCTGGAAAGCTCTCA	
Cdc42		
Sense	5′-TTGTTGGTGATGGTGCTGTGTT	168
Antisense	5′-AATCCTCTTGCCCTGCAGTA	

These primer sequences were in accordance with the following.
Ihh: Tang *et al.* 2006
Cdc42: Melendez *et al.* 2013

統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差で表した。2 群間の平均値の比較には Student の *t* 検定を行った。解析には Stat view を用い、*P* 値が 0.05 未満の場合に統計的に有意とした。

5－2　結果

β-カテニンおよび E-カドヘリンの発現

β-カテニンについては、活動群において絨毛部の上皮細胞の細胞膜部分に赤色の陽性シグナルの局在が認められ、陰窩底部では細胞核部分における陽性シグナルが認められた（Fig. 5-1A）。冬眠群においても活動群と同様に、絨毛部の細胞膜部分の陽性シグナルと、陰窩底部の細胞核部分の陽性シグナルが認められ、活動群と冬眠群では発現パターンが同様であった。

E-カドヘリンについては、活動群において絨毛部の上皮細胞の細胞膜部分に赤色の陽性シグナルの局在が認められた（Fig. 5-1B）。冬眠群においても活動群と同様に、絨毛部の上皮細胞の細胞膜部分に陽性シグナルが認められ、活動群と冬眠群では発現パターンが同様であった。

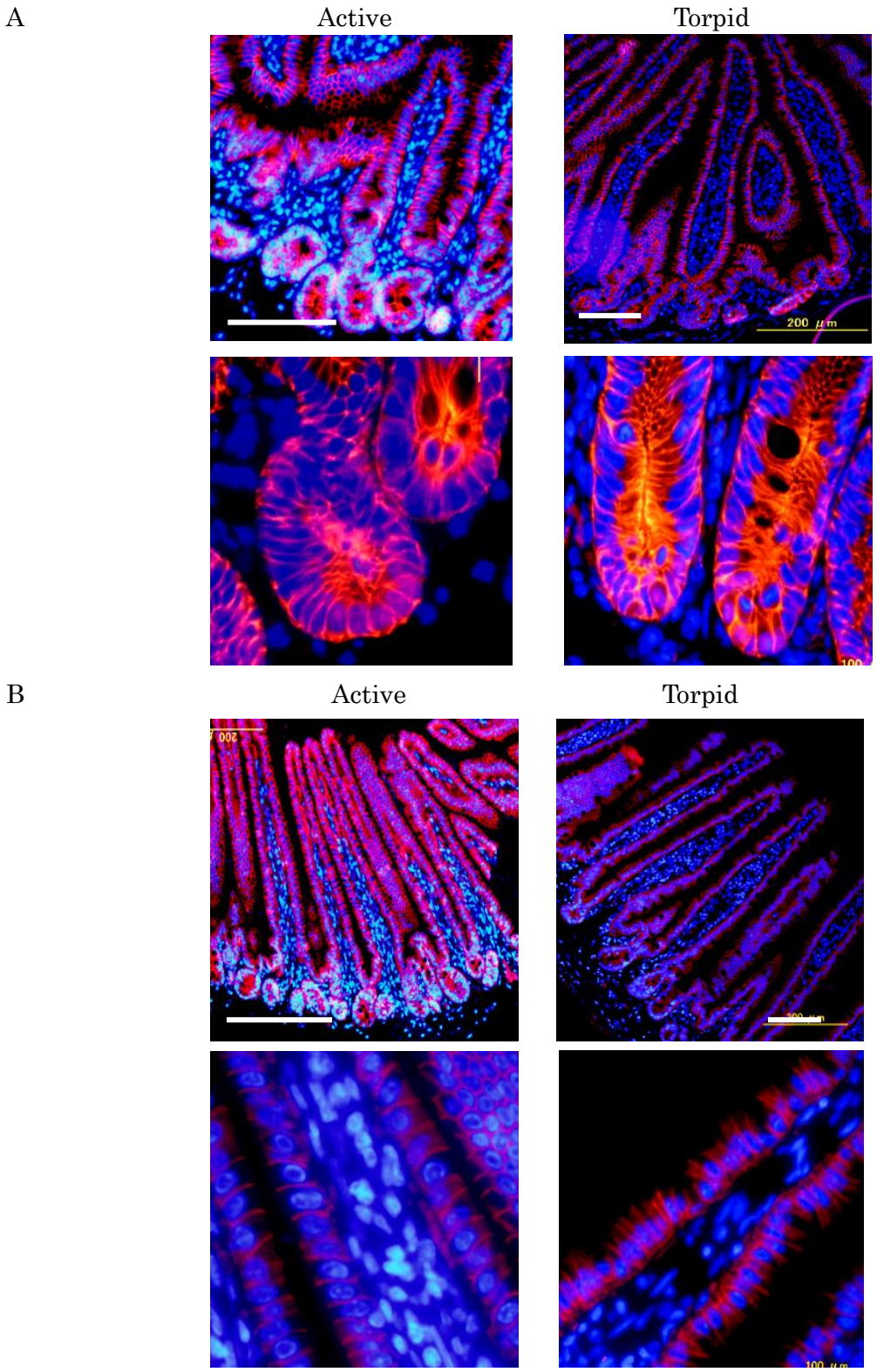


Figure 5-1 A representative immunofluorescence staining for β-catenin and E-cadherin in the jejunum of hamsters. *A.* Expression and distribution of β-catenin (red). Lower panels are at higher magnification in the crypt region. *B.* Expression and distribution of E-cadherin (red). Lower panels are at higher magnification in the villus region. White bars in charts A and B represent 200μm.

細胞移動関連タンパク遺伝子の発現解析

Ihh の発現は冬眠群で活動群より有意に低い値であった（Fig. 5-2A）。*Cdc42* の発現は両群間で有意な差はなかった（Fig. 5-2B）。

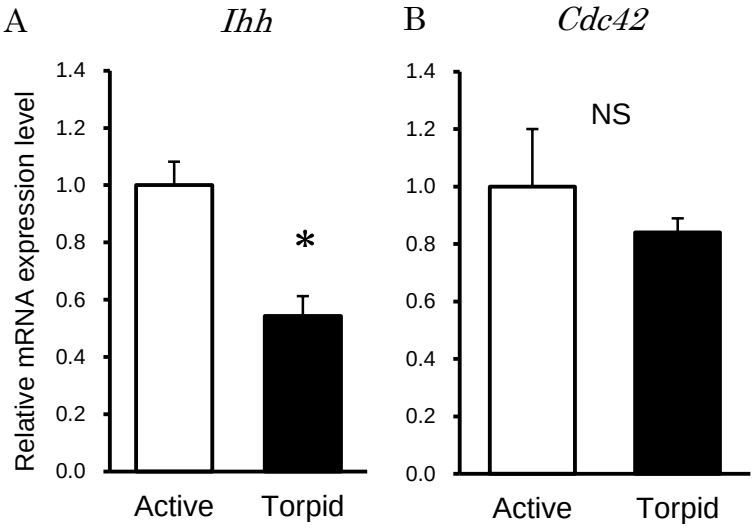


Figure5-2 Ileal mRNA expression of *Ihh* (*A*) and *Cdc42* (*B*). The mRNA expression level was normalized to the mRNA expression level of the *GAPDH*. The mRNA expression level in active group was set at 1. Values are expressed as means±SE (n=6). Comparison of mean values were done by Student's *t*-test. * $P<0.05$ vs. active. NS: not significant

5－3　考察

冬眠ハムスターにおいて、β-カテニンが陰窩底部における増殖細胞の細胞核に認められ、E-カドヘリンが絨毛部の上皮細胞の細胞膜に局在していた。マウスの小腸において、7 日間の TPN による細胞増殖低下に伴って、β-カテニンと E-カドヘリンの mRNA とタンパク質の発現レベルが低下し、陰窩底部におけるβ-カテニンの核への局在も低下したという報告がある（Feng *et al.* 2009）。これは、TPN により E-カドヘリンの発現が低下したため、通常 E-カドヘリンと結合して安定していたβ-カテニンが遊離して不安定になり、ユビキチン化されるためと考えられている。このように、経口的摂取を行わないと、Wnt/β-カテニンシグナル経路の遮断による細胞増殖の低下につながる（Feng *et al.* 2009）。しかし、冬眠中は持続的冬眠中に絶食しているのにも関わらず、E-カドヘリンの発現変化は認められなかった。したがって、冬眠個体の細胞増殖低下は Wnt/β-

カテニンシグナル経路の変化によるものではないと考えられた。

また、冬眠個体においてIhhのmRNAの発現が低下していた。この結果は、マウスにおけるhedgehogシグナル経路の阻害が上皮細胞の移動速度増加につながったという報告と一致しない結果であった（Tang *et al.* 2006）。加えて、Cdc42のmRNAの発現レベルについては冬眠個体で有意な変化は見られなかった。しかし、これらの結果はいずれもmRNAレベルでの結果であり、これらのタンパク質が冬眠ハムスターにおける腸上皮細胞の移動速度の低下に関与しているかどうかは不明である。

第 6 章　総括

本研究において、BrdU と EdU の 2 重標識を用いた小腸上皮の新しい細胞移動速度推定法を確立した。この方法には、1 個体で移動速度を推定することができるという利点があるため、冬眠個体のように多くの個体の入手が困難な動物の腸上皮細胞の移動速度を測定することが可能になった。この方法により、冬眠中の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 μm/h であるのに対し、冬眠個体で 0.9 μm/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。生理的条件下において、これほどまでに細胞更新が遅滞する現象は他に報告されていない。また、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なっていることが明らかになった。加えて、細胞の成熟進行と細胞老化状態に起因すると考えられる粗雑な微絨毛の配列と糖衣の消失、およびタイトジャンクション関連タンパク質であるクローディン-1 の発現パターンの変化が認められ、粘膜バリア機能とタイトジャンクション機能に変化が生じている可能性が考えられた。そこで、*ex vivo* の反転腸管法により、冬眠個体の回腸末端における HRP の透過量を測定したところ、透過量は活動個体と比較して有意に変化していなかった。よって、冬眠個体における粘膜バリア構造の変化は、HRP のような高分子物質の透過には影響しないと考えられた。冬眠中の粘膜バリアについては、さらに低分子物質の透過量を測定することにより、タイトジャンクション機能の変化についても検証する必要があると考える。また、冬眠個体の小腸陰窩において細胞増殖が低下していたが、この低下には Wnt/β-カテニンシグナル経路は関与しておらず、冬眠時の細胞増殖の低下は、絶食時の細胞増殖の低下とは異なるメカニズムによるものと考えられた。加えて、冬眠ハムスターの小腸粘膜は肥厚しており、これは絨毛部における細胞死と細胞の脱落が減少しているためと推測された。本研究では、冬眠中の細胞死と細胞の脱落の減少について確認することができておらず、今後の課題である。さらに、冬眠ハムスターにおける細胞更新遅滞の

メカニズムを解明するために、細胞移動に関与すると考えられるタンパク質のうち、Ihh と Cdc42 の発現について検討を行ったが、mRNA レベルでの結果のみであり、解明には至らなかった。これらのタンパク質においては、ウエスタンブロット法による定量や、免疫組織化学による発現部位の検出などによるタンパク質レベルでの解析も必要であると考える。

本研究において確立した、BrdU と EdU の 2 重標識を用いた細胞移動速度の推定法を用いることにより、必要な実験動物の数を従来法よりも減らすことができた。本法と小腸上皮の分化細胞特異的な検出法を組み合わせることにより、分化細胞固有の移動速度を測定することも可能である。また、投与間隔を短くし、異なる時間に解剖することにより、移動速度の推移をみることも可能である。さらに、他組織や *in vitro* における細胞移動の解析にも応用することができると考える。

本研究において、冬眠中のシリアンハムスターの小腸粘膜上皮の細胞亢進が著しく低下していることが明らかになったが、このメカニズムが解明できれば、細胞更新速度をコントロールすることできるようになる可能性がある。放射線照射や化学療法により小腸における腸上皮幹細胞が損傷を受けると、小腸上皮細胞の更新期間である約３－５日間で上皮細胞が失われ、小腸粘膜の萎縮と機能障害が起きる。したがって、このような場合に小腸上皮の細胞更新速度を低下させることができれば、粘膜萎縮の発生が遅延し、消化器症状の緩和または予防につながるかもしれない。また、TPN や手術時の絶食による小腸粘膜の萎縮と機能障害についても、同様に予防できるかもしれない。

引用文献

Adelstein SJ, Lyman CP, O'Brien RC (1967) Cell proliferation kinetics in the tongue and intestinal epithelia of hibernating dormice (*Glis glis*). *Mammalian Hibernation III*, edited by Fisher KC, Dawe AR, Lyman CP, Schonbaum E, South FE: 398-408

Andreu P, Colnot S, Godard C, Gad S, Chafey P, Niwa-Kawakita M, Laurent-Puig P, Kahn A, Robine S, Perret C, Romagnolo B (2005) Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development* 132: 1443-1451

Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449: 1003-1007

Barreau F, Hugot JP (2014) Intestinal barrier dysfunction triggered by invasive bacteria. *Curr Opin Microbiol* 17: 91-98

Bojarski C, Bendfeldt K, Gitter AH, Mankertz J, Fromm M, Wagner S, Riecken EO, Schulzke JD (2000) Apoptosis and intestinal barrier function. *Ann NY Acad Sci* 915: 270-274

Bringold F, Serrano M (2000) Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 35: 317-329

Brockhausen I (2003) Sulphotransferases acting on mucin-type oligosaccharides. *Biochem Soc Trans* 31: 318-325

Buck SB, Bradford J, Gee KR, Agnew BJ, Clarke ST, Salic A (2008) Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques* 44: 927-929

Cappella P, Gasparri F, Pulici M, Moll J (2008) A novel method based on click chemistry, which overcomes limitations of cell cycle analysis by classical determination of BrdU incorporation, allowing multiplex antibody staining. *Cytometry A* 73**:** 626-636

Carey HV (1990) Seasonal changes in mucosal structure and function in ground squirrel intestine. *Am J Physiol* 259: R385-R392

Carey HV, Martin SL (1996) Preservation of intestinal gene expression during hibernation. *Am J Physiol* 271: G804-G813

Carey HV, MT Andrews, SL Martin (2003) Mammalian hibernation : cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev* 83: 1153-1181

Carey HV, Sandra LM (1996) Preservation of intestinal gene expression during hibernation. *Am J Physiol* 271: G805-G813

Chang SK, Dohrman AF, Basbaum CB, Ho SB, Tsuda T, Toribara NW, Gum JR, Kim YS (1994) Localization of mucin (*MUC2* and *MUC3*) messanger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer. *Gastroenterology* 107: 28-36

Crowther RS, Wetmore RF (1987) Fluorometric assay of *O*-linked glycoproteins by reaction with 2-cyanoacetamide. *Anal Biochem* 163: 170-174

Dahlqvist A (1984) Assay of intestinal disaccharidases. *Secand J Clin Lab Invest* 44: 169-172

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9363-9367

Dubinin EV, Sukhova TV, Shmid VD, and Vinogradova MS (1995) Seasonal patterns of epithelium mitotic activity in the duodenum of two representatives of the Sciuridae with different eceological specialization. *Bull Exp Biol Med* 119: 619-621

Fleck CC, Carey HV (2005) Modulation of apoptotic pathways in intestinal mucosa during hibernation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R586-R595

Folk GE Jr (1980) Protein and fat metabolism during mammalian hypophagia and hibernation. *Fed Proc* 39: 2953-2954

Enomoto N, Yamashita S, Schemmer P, Rivera CA, Bradford BU, Enomoto A, Brenner DA, Thurman RG (1999) Estriol sensitizes rat Kupffer cells via gut-derived endotoxin. *Am J Physiol* 277: G671-G677

Feizi T (1985) Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* 314: 53-57

Feng Y, Sun X, Yang H, Teitelbaum DH (2009) Dissociation of E-cadherin and beta-catenin in a mouse model of total parenteral nutrition: a mechanism for the liss of epithelial cell proliferation and villus atrophy. *J Physiol* 587: 641-654

Forstner JF, Forstner GG (1994) Gastrointestinal mucus. In: Johnson LR, editor. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 1255-1283

Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156: 1099-1111

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25: 386-401

Going JJ, Stuart RC, Downie M, Fletcher-Monaghan AJ, Keith WN (2002) 'Senescence-associated' β−galactosidase activity in the upper gastrointestinal tract. *J Pathol* 196: 394-400

Goodlad RA, Plumb JA, Wright NA (1988) Epithelial cell proliferation and intestinal absorptive function during starvation and refeeding in the rat. *Clin Sci* 74: 301-306

Goodlad RA, Wright NA (1984) The effects of starvation and refeeding on intestinal cell proliferation in the mouse. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 45:63-73

Groschwitz KR, Ahrens R, Osterfeld H, Gurish MF, Han X, Abrink M, Finkelman FD, Pejler G, Hogan SP (2009) Mast cells regulate homeostatic intestinal epithelial migration and barrier function by a chymase/Mcpt4-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 22381-22386

Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621

Hewitt KN, Pratis K, Jones ME, Simpson ER (2004) Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology* 145: 1842-1848

Hoebler C, Gaudier E, Coppet DP, Rival M, Cherbut C (2006) *MUC* genes are differently expressed during onset and maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice. *Dig Dis Sci* 51: 381-389

Hodin RA, Chamberlain SM, Meng S (1995) Pattern of rat intestinal brush-border enzyme gene expression changes with epithelial growth state. *Am J Physiol* 269: G385-G391

Hoste H, Mariana JC (1989) *Trichostrongylus colubriformis*: epithelial cell migration in the proximal and distal small intestine of infected rabbits. *Exp Parasitol* 68: 347-353

Humphries MM, Thomas DW, Kramer DL (2003) The role of energy availability in mammalian hibernation: a cost-benefit approach. *Physiol Biochem Zool* 76: 165–179

Hsu TL, Hanson SR, Kishikawa K, Wang SK, Sawa M, Wong CH (2007) Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2614-2619

Ito H, Satsukawa M, Arai E, Sugiyama K, Sonoyama K, Kiriyama S, Morita T (2009) Soluble fiber viscosity affects both goblet cell number and small intestine mucin secretion in rats. *J Nutr* 139: 1640-1647

Ouwerkerk JP, de Vos WM, Belzer C (2013) Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27: 25-38

Jung P, Sato T, Merlos-Suárez A, Barriga FM, Iglesias M, Rossell D, Auer H, Gallardo M, Blasco MA, Sancho E, Clevers H, Batlle E (2011) Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med* 17:1225-1227

Kawamichi T, Kondo N, Morita T (2000) 冬眠する哺乳類　東京大学出版会: 3-23

Kikuchi A (1999) Roles of axin in the Wnt signaling pathway. *Cell Signal* 11:777-788

Kikuchi A, Yamamoto H (2008) Tumor formation due to abnormalities in the β-catenin-independent pathway of Wnt signaling. *Cancer Sci* 99: 202-208

Kirihata Y, Kawarabayashi T, Imanishi S, Sugimoto M, Kume S (2008) Coumestrol decreases intestinal alkaline phosphatase activity in post-delivery mice but does not affect vitamin D receptor and calcium channels in post-delivery and neonatal mice. *J Reprod Dev* 54:35-41

Kruman II (1992) Comparative analysis of cell replacement in hibernators. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 101: 11–18

Kruman II, Ilyasova EN, Rudchenko SA, Khurkhulu ZS (1988) The intestinal epithelial cells of ground squirrel (*Citellus undulatus*) accumulate at G_2 phase of the cell cycle throughout a bout of hibernation. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 90: 233-236

Lloyd RV, Wilson BS (1983) Specific endocrine tissue marker defined by a monoclonal antibody. *Science* 222: 628-630

Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810

Mahmoud NN, Boolbol SK, Bilinski RT, Martucci C, Chadburn A, Bertagnolli MM (1997) *Apc* gene mutation is associated with a dominant-negative effect upon intestinal cell migration. *Cancer Res* 57: 5045-5050

Melendez J, Liu M, Sampson L, Akunuru S, Han X, Vallance J, Witte D, Shroyer N, Zheng Y (2013) Cdc42 coodinates proliferation, polarity, migration, and differentiation of small intestinal epithelial cells in mice. *Gastroenterology* 145: 808-819

McArthur MD, Milsom WK (1991) Changes in ventilation and respiratory sensitivity associated with hibernation in Columbian (*Spermophilus columbianus*) and golden-mantled (*Spermophilis lateralis*) ground squirrels. *Physiol Zool* 64: 940-959

McDermott FT, Roudnew B (1977) Ileal epithelial cell migration after 40% small-bowel resection. Autoradiographic studies in the rat. *Am J Dig Dis* 22: 637-640

Michel G, Francis R, Bernard C (1988) Adaptation of intestinal enzymes to seasonal and dietary changes in a hibernator: the European hamster (*Cricetus cricetus*). *J Comp Physiol B* 158:143-149

Miura S, Tanaka S, Yoshioka M, Tashiro H, Shiozaki H, Imaeda H, Tsuchiya M (1992) Changes in intestinal absorption of nutrients and brush border glycoproteins after total parenteral nutrition in rats. *Gut* 33: 484-489

Moran AP, Gupta A, Joshi L (2011)Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut* 60:1412-1425

Nettleton GS, Carpenter AM (1977) Studies of the mechanism of the periodic acid-Schiff histochemical reaction for glycogen using infrared spectoroscopy and model chemical compounds. *Stain Technol* 52: 63-71

Ney DM (1999) Effects of insulin-like growth factor-I and growth hormone in models of parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 23: 184-189

Salic A, Mitchison TJ (2008) A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis *in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2415-2420.

Sangiorgi E, Capecchi MR (2008) *Bmil* is expressed *in vivo* in intestinal stem cells. *Nat Genet* 40: 915-920

Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, Batlle E, Simon-Assmann P, Clevers H, Nathke IS, Clarke AR, Winton DJ (2004) Loss of Apc *in vivo* immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 18: 1385-1390

Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villous structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459: 262-265

Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, van den Brink S, van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H (2011) Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141:1762-1772

Sawa M, Hsu TL, Itoh T, Sugiyama M, Hanson SR, Vogt PK, Wong CH (2006) Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12371-12376

Snippert HJ, van Es JH, van den Born M, Begthel H, Stange DE, Barker N, Clevers H (2009) Prominin-1/CD133 marks stem cells and early progenitors in mouse small intestine. *Gastroenterology* 136:2187-2194

Soga K, Yamauchi J, Kawai Y, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Mitsufuj S, Yoshikawa T, Arizono N (2008) Alteration of the expression profiles of acidic mucin, sialytransferase, and sulfotransferases in the intestinal epithelium of rats infected with the nematode. *Parasitol Res* 103: 1427-1434

Soria-Milla MA (1986) Structure of the mucosa of the small intestinal proximal portion in the hibernating garden dormouse (*Eliomys quercinus*). *Cryo Lett* 7:184-193

Spicer SS (1965) Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. *J Histochem Cytochem* 13: 211-234

Sun X, Yang H, Nose K, Nose S, Haxhija EQ, Koga H, Feng Y, Teitelbaum DH (2008) Decline in intestinal mucosal IL-10 expression and decreased intestinal barrier function in a mouse model of totalparenteral nutrition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G139-G147

Tang Y, Swietlicki EA, Jiang S, Buhman KK, Davidson NO, Burkly LC, Levin MS, Rubin DC. (2006) Increased apoptosis and accelerated epithelial migration following inhibition of hedgehog signaling in adaptive small bowel postresection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G1280-G1288

Tornøe CW, Christensen C, Meldal M (2002) Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem* 67: 3057-3064

Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 285-293

Tuttle AH, Rankin MM, Teta M, Sartori DJ, Stein GM, Kim GJ, Virgilio C, Granger A, Zhou D, Long SH, Schiffman AB, Kushner JA (2010) Immunofluorescent detection of two thymidine analogues (CldU and IdU) in primary tissue. *J Vis Exp* 46: e2166

Osborne PG, Gao B, Hashimoto M (2004) Determination *in vivo* of newly synthesized gene expression in hamsters during phases of the hibernation cycle. *Jpn J Physiol* 54: 295-305

Peterson CA, Ney DM, Hinton PS, Carey HV (1996) Beneficial effects of insulin-like growth

factor I on epithelial structure and function in parenterally fed rat jejunum. *Gastroenterology* 111: 1501-1508

Pinto D, Clevers H (2005) Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol Cell* 97: 185-196

Potten CS (1998) Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 821-830

Potten CS, Loeffler M (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110: 1001-1020

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951

van der Flier LG, Clevers H (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 71: 241-260.

van der Flier LG, van Gijn ME, Hatzis P, Kujala P, Haegebarth A, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Guryev V, Oving I, van Es JH, Barker N, Peters PJ, van de Wetering M, Clevers H (2009a) Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell* 136:903-912

van der Flier LG, Haegebarth A, Stange DE, van de Wetering M, Clevers H (2009b) OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 137: 15-17

Walter K, Schütt C (1974) In Methods of Enzymatic Analysis, 2nd ed, Volume II: 860-864

Wong VW, Stange DE, Page ME, Buczacki S, Wabik A, Itami S, van de Wetering M, Poulsom R, Wright NA, Trotter MW, Watt FM, Winton DJ, Clevers H, Jensen KB (2012) Lrigl controls intestinal stem cell homeostasis by negative regulation of ErbB signaling. *Nat Cell Biol* 14: 401-408

Yang H, Fan Y, Teitelbaum DH (2003) Intraepithelial lymphocyte-derived interferon-γ evokes enterocyte apoptosis with parenteral nutrition in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G629 –G637

Yang H, Feng Y, Sun X, Teitelbaum DH (2009) Enteral versus parenteral nutrition: effect on intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci*. 1165: 338-346.

Young K, Samuel B (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 12: 319-330

Zatzman ML (1984) Renal and cardiovascular effects of hibernation and hypothermia. *Cryobiology* 21: 593-614

Zhegunov GF, Mikulinsky YE, Kudokotseva EV (1988) Hyperactivation of protein synthesis in tissues of hibernating animals on arousal. *Cryo Lett* 9: 236-245

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切なご指導を賜りました北海道大学大学院農学研究院　川端　潤教授、園山　慶准教授、加藤　英介助教、鶴田　剛司特任助教に深甚の謝意を表します。

本論文を作成するにあたり、御校閲を賜りました北海道大学大学院農学研究院　内藤　哲教授、有賀　早苗教授、北海道大学大学院先端生命科学研究院　綾部　時芳教授に深謝いたします。

本研究の全般に亘り、終始御懇切なご指導を賜りました北海道大学大学院農学研究院　園山　慶准教授に重ねて厚く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、走査型電子顕微鏡による撮影につきましては、理化学研究所　長谷　耕二博士（現　慶應義塾大学薬学部教授）、透過型電子顕微鏡による撮影につきましては、北海道大学大学院農学研究院生物組織構造解析センター　伊藤　利章氏、免疫組織化学の実験につきましては、名寄市立大学保健福祉学部　西村　直道教授、山本　達朗講師、HID-AB 染色の実施につきましては、静岡大学農学部　森田　達也教授に多くのご指導を賜りましたことを深謝したします。

研究を進めるうえで技術援助およびご助言を賜りました食品機能化学研究室の石原利乃さん、水野　祐希さん、角田　妃菜子さん、三輪　明穂さん、濱田　晃弘さんをはじめとする同研究室の皆様、同研究室卒業生の Worrawalan Phoonsawat さんをはじめとする皆様に感謝いたします。

最後に、勉学の機会を与えてくれ、学生生活を送れるよう心身共に支えてくれた夫と両親、不平不満を言わずに保育園で待ってくれた娘に心から感謝いたします。本当にありがとうございました。