

氏名(本籍)	柴原健 (茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第1,164号
学位授与年月日	平成8年2月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	The Fate of Effete Enterocytes at the Villus Tips of the Human Small Intestine, with Special Reference to Their Exfoliating Process and Apoptosis (ヒト小腸絨毛先端部における老齢上皮細胞の運命, 特に上皮細胞の脱落過程と アポトーシスに注目して)
主査	筑波大学教授 医学博士 小山哲夫
副査	筑波大学教授 医学博士 中山凱夫
副査	筑波大学教授 医学博士 深尾立
副査	筑波大学教授 医学博士 武藤弘
副査	筑波大学教授 医学博士 渡邊照男

## 論文の要旨

### (目的)

一般に哺乳類の消化管上皮細胞は、陰窩に位置する幹細胞から分裂し、分化しながら絨毛の先端へと移動して、最終的には管腔内へ脱落するとされている。その過程で、他の細胞の turnover と同様に、上皮細胞は apoptosis を起こすことが推測されている。

現在の主な apoptosis の指標は、核を中心とした特徴的な形態変化(細胞の縮小、核クロマチンの凝縮とそれに続く細胞の断片化、周囲の食細胞による貪食)、および生化学的にはゲノム DNA のヌクレオソーム単位での断片化であるとされている。

Gavrieli らは、TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL reaction) 法を用いて、ラット・マウスの小腸、ヒトの大腸の絨毛先端部には DNA の断片化が認められることを報告している。しかし現在まで、絨毛先端部に核クロマチン凝縮などの典型的な apoptosis の像を呈した上皮細胞の存在を指摘した報告はない。

一方、絨毛先端部において老齢化した細胞は、そのまま個々の細胞が脱落していくと考えられてきた。しかし Iwanaga らは、モルモットの小腸絨毛先端部では粘膜固有層内のマクロファージが突起を延ばして老齢上皮細胞を貪食し、上皮細胞の管腔側の核を含まない一部分だけは貪食されずに残り、最終的にその上皮細胞の断片だけが消化管腔に脱落していくことを報告した。

現在まで、ヒト老齢上皮細胞の脱落過程は詳細な検討がなされていないため、本研究はヒト小腸を用いて、上皮細胞の絨毛先端部での老齢化、脱落、死の過程を形態学的、および生化学的に検討した。

### (方法)

上部消化管内視鏡にて採取したヒトの十二指腸液、および手術標本にて合併切除されたヒト空腸を用い、走査電顕法、透過電顕法、TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling 法、DNA agarose gel 電気泳動法、免疫組織化学法を用いて上皮細胞の絨毛先端部での老齢化、脱落、死の過程を検討した。

#### (結果及び考察)

1) ヒト十二指腸液中には多数の脱落した上皮細胞が存在した。上皮細胞はすべて核を持ったまま存在しており、モルモットで報告されたような細胞断片は認めなかった。また上皮細胞は胞体の縮小、核クロマチンの凝縮を呈しており、TUNEL reaction, DNA agarose gel 電気泳動法ではそれらの細胞の DNA のヌクレオソーム単位での断片化を認めた。したがって、ヒト上皮細胞はマクロファージに貪食されずにそのまま脱落し、脱落后の上皮細胞は典型的な apoptosis を呈していることが明らかとなった。

2) ヒト小腸絨毛先端部の走査電顕所見では、突出した上皮細胞が認められた。それらの細胞は、固定前に洗浄することで容易に脱落したため、非常に剥がれやすい状態にあることが示唆された。透過電顕所見では、モルモットで指摘されたマクロファージによる貪食像を認めなかった。また上皮細胞絨毛先端部の上皮細胞には、基底膜からの遊離、胞体の縮小、細胞間隙の拡大、内部に膜や細胞内小器官を取り込んだ小胞の出現を認め、さらに突出した脱落しなかった上皮細胞には、apoptosis に典型的な核クロマチンの凝縮を認めた。

3) ヒト小腸絨毛の TUNEL reaction では、DNA の断片化を認める細胞は突出した細胞だけでなく、絨毛先端部周囲にも認められた。連続切片を用いた観察では、各絨毛あたり DNA の断片化を呈した細胞は平均 $28.9 \pm 14.3$ 個であったが、形態的に apoptosis を呈していると考えられる絨毛から突出した細胞数は、各絨毛あたり平均 $6.8 \pm 4.5$ 個であった。この結果から、DNA の断片化は核の形態的变化に先行するものと考えられた。

4) 絨毛先端部の上皮細胞には、内部に膜や細胞内小器官を取り込んだ小胞が増加していた。その現象が、老齢上皮細胞における autophagy の亢進であるか否かを明らかにするため lysosome の代表的 cystein proteinase である cathepsin B に対する抗体を用いて免疫組織化学的に検討をおこなった。光顕および透過電顕での観察で、それらの小胞に cathepsin B が局在していることが明らかになった。したがって、それらの小胞は autophagolysosome であり、絨毛先端部の老齢化した上皮細胞には autophagy が亢進していることが示唆された。

#### (結論)

1) ヒトではモルモットで報告されたようなマクロファージによる上皮細胞の貪食は認められなかった。

2) ヒトの小腸上皮細胞の脱落過程には apoptosis が関与していることを形態学的に初めて確認した。

3) 上皮細胞が絨毛の先端部に到達すると、基底膜からの遊離、胞体の縮小、細胞間隙の拡大、autophagy の亢進、DNA の断片化などが生じた。

4) 上皮細胞は絨毛から突出し脱落する直前になって初めて形態的に典型的な apoptosis 像を呈した。

### 審 査 の 要 旨

近年、個体や細胞の発生、分化、成熟の過程に apoptosis が深く関与していることが明らかになっている。ヒト小腸絨毛上皮細胞の脱落・新生機序においても apoptosis の関与が想定されているが、その詳細は不明である。本研究では apoptosis を電子顕微鏡を用いた形態学的方法、DNA nick end labeling 法、DNA ラダー検出法などを用いて多方面から検討した。その結果、ヒト老齢小腸絨毛上皮細胞は形態学的変化を来す前に、DNA の断片化が生じ、autolysosome と考えられる空胞を形成し、cytoplasm の基底部分を縮小させることにより basal lamina との接触を絶ち、典型的な apoptosis の像を呈しながら、細胞全体として管腔へ脱落することを明らかにした。本研究はヒトの小腸上皮細胞の脱落過程には apoptosis が関与していることを形態学的に初めて確認した研究であり、高く評価される。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。