

マウス胃成熟アトラスの作成

平良 祐樹

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス領域

幹細胞工学研究室

(栗崎 晃 教授)

提出 R3 年 1 月 29 日

目次

1. 序論	p.4
1.1.胃の構造	
1.2.胃の発生	
1.3.腸の発生	
1.4.本研究の目的	
2. 材料・方法	p.10
2.1.実験材料	
2.2.発生・成熟中の胃及び成体の胃における上皮細胞マーカーの免疫蛍光染色	
2.3.発生・成熟中の胃及び成体の胃における上皮細胞マーカーの遺伝子発現解析	
3. 結果	p.15
3.1 EPCAM と SMA の発現パターンの解析	
3.2 SOX9 と SOX2 の発現パターンの解析	
3.3 Ki67 と SOX9 の発現パターンの解析	

3.4 ATP4B の発現パターンの解析解析	
3.5 PGC の発現解析	
3.6 GKN2 の発現解析	
3.7 SST (Somatostatin)の発現パターンの解析	
3.8 GAST(Gastrin)の発現解析	
4. 考察	p.42
4.1 内分泌細胞の分化開始時期と、多様な上皮細胞分化における役割	
4.2. 発生後期過程における上皮細胞の分化	
4.3. 胃の機能性上皮細胞の分化	
5. 謝辞	p.45
6.参考文献	p.46

1. 序論

1.1. 胃の構造

胃は酸性環境を作り出すことで、食物の殺菌と消化を行う重要な消化器官である。胃壁は大きく分けて内側から粘膜層、筋層、漿膜の3層で構成されている。マウスの胃には、前胃、胃体部、幽門部の3つの領域が存在し、それぞれの領域は異なる構造と性質を有する(図 1.1)。前胃の粘膜層は重層扁平上皮細胞で構成され、食物の貯蔵と機械的消化の機能を担う。一方、胃体部と幽門部の粘膜層は円柱上皮細胞で構成された胃腺構造を有し、粘液の分泌や消化酵素の分泌など消化における主要な機能を担う。以下に、胃体部と幽門部の胃腺構造の違いについて詳細に説明する。

1.1.1. 胃体部の胃腺

胃体部の胃腺には粘液を分泌する粘液分泌細胞、胃酸を分泌する壁細胞、消化酵素源(ペプシノーゲン)を分泌する主細胞、粘液を分泌するとともに主細胞の前駆細胞である粘液頸部細胞、ホルモンを分泌する内分泌細胞が存在する(図 1.1 B) 【1】。これらの上皮細胞は生涯にわたって細胞死と新生を繰り返しており、表層粘液細胞は約3日、壁細胞は約2ヶ月、主細胞は約6ヶ月で新しい細胞と入れ替わる【2】。この活発なターンオーバーは、胃腺の峽部に存在する幹細胞(峽部幹細胞)が絶えず分裂し、新しい上皮細胞へと分化することで支えられている。図に示すように、胃体部の峽部幹細胞は胃腺の中央上部に存在しており、表層部へと移動しながら表層粘液細胞へと分化し【3】、底部に移動する過程で壁細胞、副細胞、内分泌細胞へと分化する【4】。さらに副細胞は、粘液分泌細胞として機能するとともに、主細胞の前駆細胞として機能を有しており、分化転換によって主細胞へと分化することが示唆されている。【5】

1.1.2. 幽門部の胃腺

幽門部の胃腺には、粘液を分泌する粘液分泌細胞・底部粘液細胞、ホルモンを分泌する内分泌細胞【1】とこれらの機能性上皮細胞を供給する峽部幹細胞が存在する(図 1.1 B)。胃体部胃腺と異なり、壁細胞と主細胞は存在しないため、幽門部の胃腺は胃体部と比較して短い。また幽門部の胃腺には、峽部幹細胞に加えて LGR5 陽性幹細胞が存在する。LGR5 陽性幹細胞は、峽部幹細胞とは異なり分裂細胞ではないが、胃腺を構成する機能性上皮細胞へ分化する能力を持つこ

とが報告されている。また、LGR5 陽性幹細胞は WNT シグナルによって未分化性が維持されることが知られている【6】。

1.1.3. 胃で発現する主要なタンパク質

Gkn2(Gastrokine2)は粘液を分泌する表層粘液細胞のマーカーである。Gkn2は表層粘液細胞で発現する TFF(Trefoil factor family)ペプチドとヘテロ 2 量体を形成して分泌され、粘液層の主要成分として働くことで、胃を外界から防御する役割を持つ。

Atp4b(ATPase H⁺/K⁺ Transporting Subunit Beta)は胃体部に存在する胃酸を分泌する壁細胞のマーカーである。壁細胞で発現するプロトンポンプ H⁺, K⁺-ATPase は、細胞内/外にプロトン/K⁺を放出する。さらに、Cl⁻チャンネルが Cl⁻を細胞外へ輸送することにより、胃の内腔は pH1 の強酸性に保たれる

【7,8,9,10】。H⁺, K⁺-ATPase は触媒サブユニットの α 鎖と非触媒サブユニットの β 鎖で構成される。この非触媒サブユニットの β 鎖が Atp4b である。

Pgc(Pepsinogen)は、胃体部に存在する主細胞で分泌される消化酵素である。分泌されたペプシノーゲンは、胃酸によって活性化され、タンパク質分解酵素であるペプシンとして合成される【11】。合成されたペプシンは、食物のタンパク質鎖を切断し、体内に吸収しやすい形へ変化させる。

Gastrin は幽門部に存在する内分泌(G)細胞から分泌されるホルモンである。G 細胞は、食物の流入による機械的刺激や迷走神経からの刺激を受容してガストリンを分泌する。分泌されたガストリンは壁細胞や主細胞が持つガストリン受容体によって受容され、壁細胞では胃酸の分泌や SHH や HB-EGF などの細胞増殖・分化因子の分泌を促進し、主細胞では消化酵素ペプシノーゲンの分泌を促進する【12】。また、ガストリンは胃腸上皮細胞の分裂を促進する機能を持つ。

Somatostatin は内分泌(D)細胞から分泌されるホルモンである。ソマトスタチンは、G 細胞からのガストリン分泌や、内分泌(ECL)細胞からのヒスタミン分泌を抑制することで、胃酸の分泌を抑制する働きを持つ【12】。

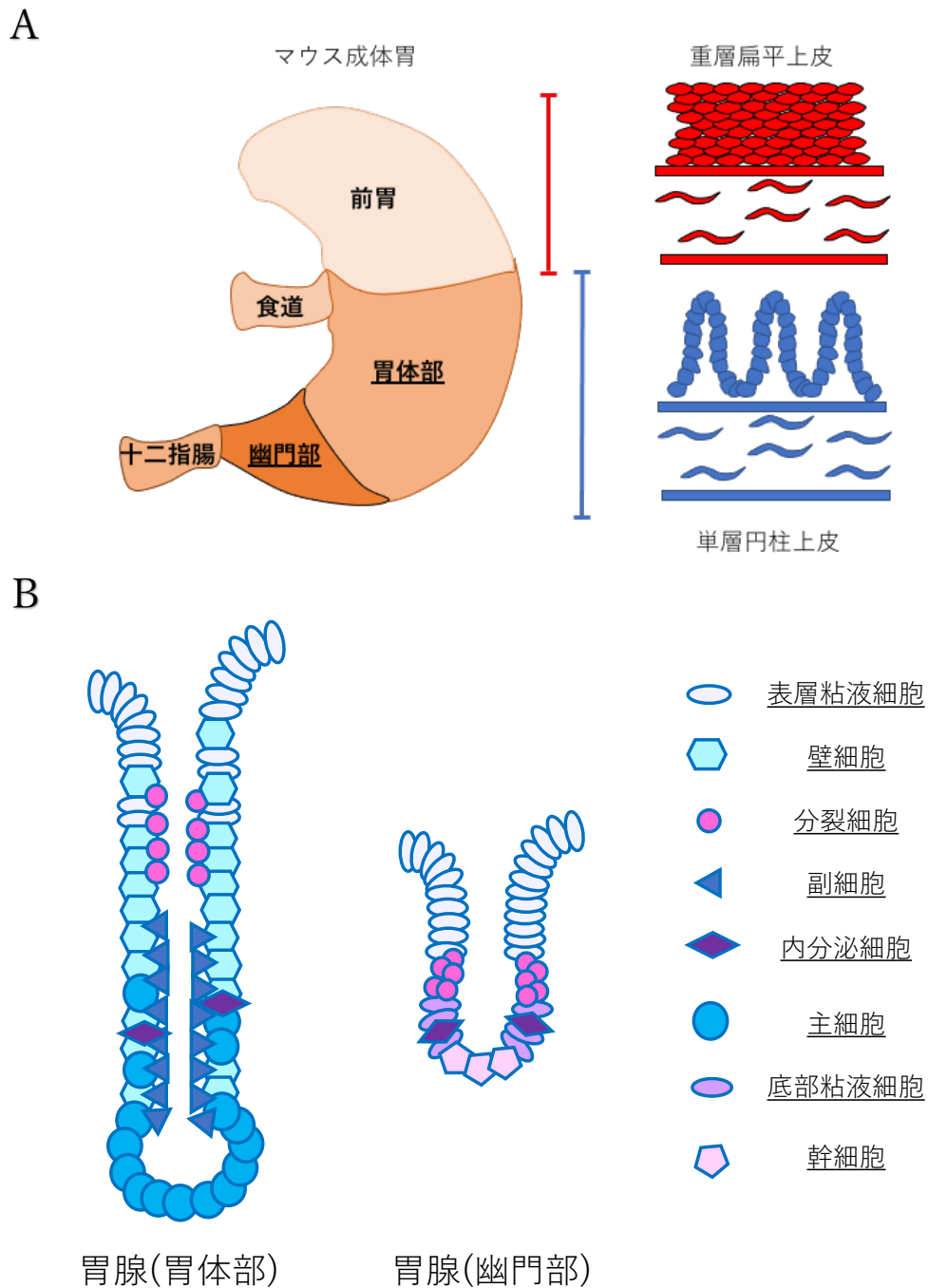


図 1.1 成体マウス胃および胃腺の構造

- A. 胃の構造を表す。マウスの胃はヒトの胃には存在しない前胃と胃体部、幽門部と呼ばれる3つの領域で構成されている。前胃は重層扁平上皮構造を取り、胃体部・幽門部は単層円柱上皮構造を取る。
- B. 胃体部と幽門部における胃腺構造。表層粘液細胞(淡い紫)、壁細胞(水色)、分裂細胞(濃い桃色)、副細胞(濃い青)、内分泌細胞(濃い紫)、主細胞(青)、底部粘液細胞(紫)、幹細胞(桃色)の細胞が存在する。

1.2. 胃の発生と成熟過程

発生過程において胃は内胚葉から派生する組織である。原腸陥入後、原始腸管は前後軸に沿った領域化を開始し、前腸では Sox2、中腸・後腸では Cdx2 と Cdx1 が発現する。胃は Sox2 を発現する後方の前腸領域から分化する組織であり、Sox2 と Cdx2 の発現領域の境界が将来の胃と腸の境界となる【13,14】。この時期、Wnt シグナルは後方化の促進因子として働き【15】、中腸と後腸における Cdx の発現誘導に寄与することが知られている【16】。一方、将来の胃となる領域では、間葉組織で Wnt の阻害因子である sFRPs が発現し、Wnt シグナルを減弱させることで後方化を抑制している【17】。

胃となる領域が特定されたのち、さらに胃は前後軸に沿った領域化を開始する。前胃となる領域では Sox2 が強く発現し、胃体部となる領域では Sox2 がやや弱く発現すると共に Gata4 が発現し【18】、幽門部となる領域には Sox2、Gata4、Pdx1 が発現することによって、胃組織内の前後軸に沿った領域が決定される。前後軸に沿った領域化には BMP シグナルが関与することが報告されている。前胃では BMP のアンタゴニストである NOGGIN が発現しており、NOGGIN 発現抑制もしくは BMP 過剰発現は前胃への分化を抑制することから、BMP シグナルの抑制が前胃の分化に必要であることが示された【19】。また近年、WNT シグナルも前後軸の領域化に関与することが報告されている【20】。WNT シグナル下流の因子である β -catenin をノックアウトすると、胃体部領域が幽門部領域に転換することから、胃体部の領域化には WNT シグナルが必要であることが示された。

このように発生後期過程において領域化が進行する一方、胃の上皮細胞層はその形態を大きく変化させる。E12.5 の胃では上皮細胞はシート状でありまだ胃腺構造が認められないが、E14.5 以降から上皮細胞が陥入を開始し、未熟な胃腺構造を形成する【21】。その後、発生後期から生後数週間にかけて、胃腺内で多様な胃の機能性上皮細胞が分化し、成熟した胃腺が構築されることが知られている。しかしながら、発生後期から開始する胃腺の成熟過程において、それぞれの胃の機能性上皮細胞がどのようなメカニズムで分化するのか、その詳細な解析はほとんどなされていない。

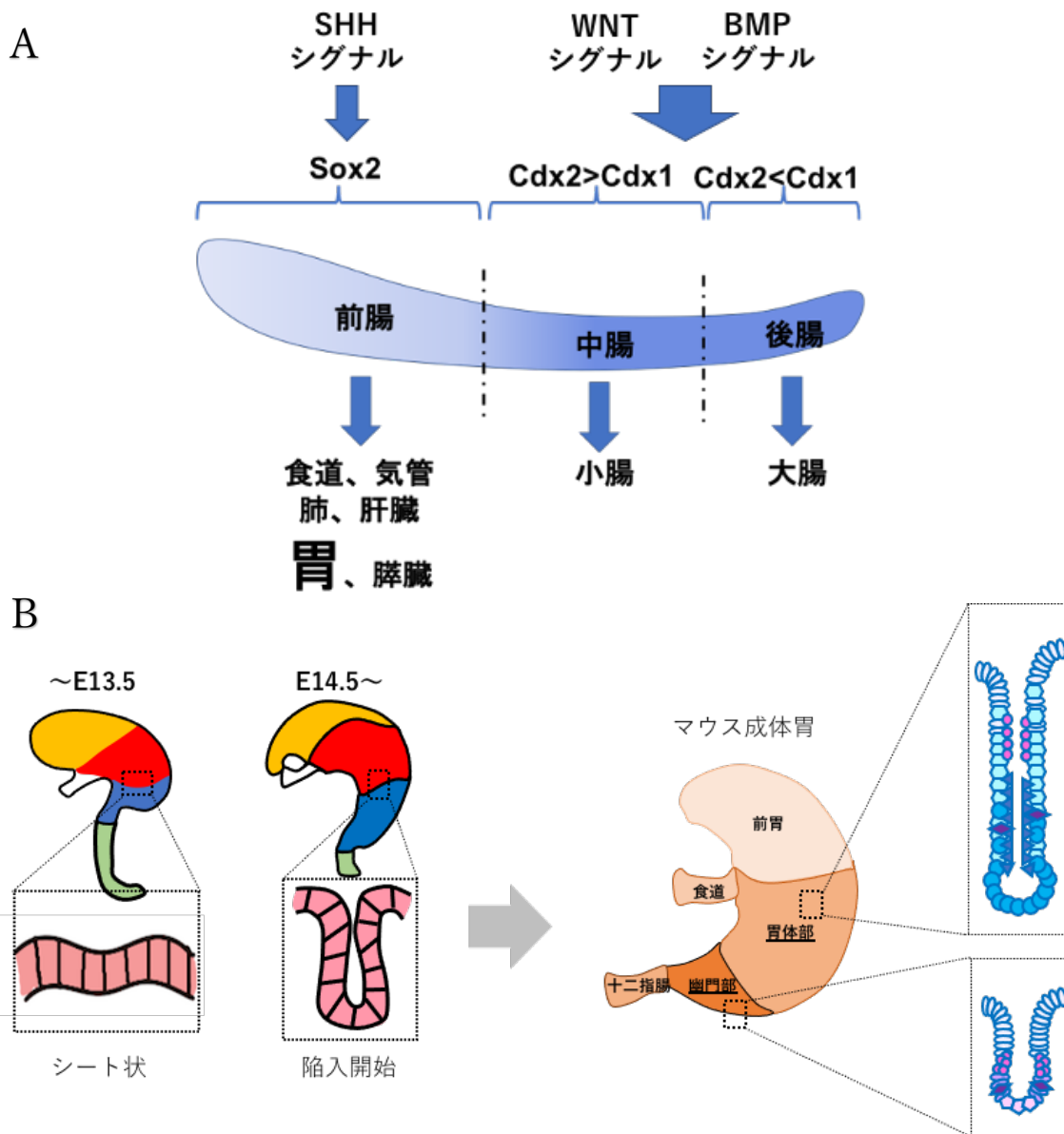


図 1.2 マウス胃の発生と成熟過程

- A. 胃は、前腸から派生する組織である。胚体内胚葉から SHH シグナルが発現誘導する SOX2 が発現した領域が前腸、WNT シグナルおよび BMP シグナルが発現誘導する CDX2 が発現した領域が中腸・後腸となる。
- B. 胃腺の形成は E14.5 から開始される。E13.5 の胃では上皮細胞はシート状でありまだ胃腺構造が認められないが、E14.5 以降から上皮細胞が陥入を開始し、未熟な胃腺構造を形成する。その後、発生後期から生後数週間にかけて、胃腺内で多様な胃の機能性上皮細胞が分化し、成熟した胃腺が構築される。

1.3. 小腸の発生と成熟過程

発生過程において小腸は胃と同様に内胚葉から派生する組織であり【22】、CDX2を発現する中腸領域から分化する。小腸上皮は胃と異なる形態を有しており、管腔内に突出した絨毛と、陥入した陰窩と呼ばれる構造を持つ。E9.5からE13.5までは上皮細胞は平坦な偽重層構造を示す。E14.5以降、シート状であった上皮細胞の下部に間葉系細胞が一定の間隔で凝集し、凝集した間葉系細胞の上部にある上皮が突出を開始することで、絨毛構造が形成される【23】。このとき上皮細胞から分泌されるソニックヘッジホッグ(shh)が間葉系細胞の凝集に必要であることが知られているが、上皮細胞の突出を制御するシグナルについては未だ解明されていない。絨毛構造が形成された後、小腸上皮細胞は分化を開始し、吸収上皮細胞や粘液を分泌する杯細胞、ホルモンを分泌する内分泌細胞へ分化し、離乳前に腸上皮の成熟は完了する。このとき、NOTCHシグナルは吸収上皮細胞への分化を促進し、杯細胞への分化を抑制することが知られている【24】。また、転写抑制因子BLIMP1は機能性上皮細胞への分化を制御することが知られており、BLIMP1をノックアウトするとパネート細胞や杯細胞への分化開始時期が早まることが示されている【25】。このように、小腸の成熟機構については胃よりも比較的解析が進んでいるが、成熟を制御するシグナルについては不明な点が残されている。

1.4. 本研究の目的

上述の通り、発生期における原始腸管の領域化や、胃組織内の領域化に関しては様々な研究がなされており、制御シグナルについても理解が進んでいる。しかしながら、平坦な上皮細胞層がどのようなメカニズムで陥入するのか、また均一な上皮細胞集団がどのように多様な胃の機能性上皮細胞へと分化するのかについては、ほとんど解析がなされていない。そこで本研究は、このような胃成熟過程を解明するために必要な最初のステップとして、発生後期から成体にかけて胃上皮細胞のマーカー遺伝子の発現パターンを詳細に解析し、それぞれの胃上皮細胞が成熟過程のどの時期から出現するのか、胃腺のどの位置から分化を開始するのかを明らかにし、胃組織成熟アトラスを作成することを目的としている。

2. 材料・方法

2.1. 実験材料

・マウスの解剖

ICR マウスは、日本 SLC と日本クレアから購入し、動物実験委員会の規定に基づいて実験を行った。まず、ICR マウスを頸椎脱臼(新生児は断頭)により安楽死させ、キムタオルの上に仰向けに乗せた。70%エタノールをマウスの腹部に吹きかけ、解剖用ハサミとピンセットを用いて腹部を切開し、胃を摘出した。

2.1.1. 胃組織の固定

ICR マウスから胃と腸を採取し、氷上で冷やした 1xPBS 中に回収した。実体顕微鏡下で、胃に付着した余分な肝臓組織や脂肪組織を取り除き、氷冷した 1xPBS で洗浄した。次に、洗浄した胃を、4%パラホルムアルデヒド/PBS が 10mL 入ったチューブに移し、シェーカー(3D Gyrotory Rocker)で攪拌しながら、4°Cで一晩固定した。翌日、4%パラホルムアルデヒド/PBS を取り除き、10mL の 1xPBS を加えて攪拌しながら 4°Cで 5 分間、3 回洗浄を行った。

2.2. 発生・成熟中の胃及び成体の胃における上皮細胞マーカーの免疫蛍光染色

2.2.1. 凍結ブロックの作成

固定した胃を冷えた 15%スクロース/PBS が 10ml 入った 15ml チューブに移し、4°Cの冷蔵庫のシーソー台上に 120 分放置した。冷えた 30%スクロース/PBS が 10ml 入った 15ml チューブに胃を移し、4°Cの冷蔵庫のシーソー台上に一晩放置した。30%スクロースを除いて、O.C.T compound(凍結組織切片作製用包埋剤)/30%スクロース/PBS(O.C.T Compound ; 30%スクロース/PBS=2 ; 1)が入ったプラスチック包埋用容器に胃を移した。胃が入ったトレーを液体窒素で凍結して蓋付きのポリ袋に移し、-80°Cの冷凍庫で保存した。

2.2.2. 凍結切片の作成

-80°Cの冷凍庫で保存した凍結ブロックをクライオスタットマイクロトーム内に移し、庫内の温度が-20°Cに設定された状態で 30 分放置した。以下の操作は全てクライオスタットマイクロトーム内で行う。プラスチック包埋用容器から凍結ブロックを取り出し、急速凍結ステーションに置いた試料チャック用トランスファーブロックの上に O.C.T. Compound を垂らして凍結ブロックを試料チャック用トランスファーブロック上に固定した。凍結切片作製用ブロックを試料チャックに取り付け、凍結ブロックを片刃のカミソリを用いてトリミングした。ナイフホルダーにマイクロトーム刃を取り付け、5um の厚みで切片を作成した。作成した切片はスライドガラスに貼り付け、60 分乾燥させた。

2.2.3. 免疫蛍光染色

スライドガラス上に貼り付いた凍結切片の周りを PAP ペン囲い、湿潤箱に移した。1xPBS を滴下して洗浄した。1xPBS をアスピレーターで除き、10mM のクエン酸(pH6.0)が入った黄色の染色バットに移して 96°Cで 15 分間熱処理を行った。(賦活化が不必要なときは行わない)オートクレーブ内の温度が 80 度以下であることを確認し、染色バットを取り出して室温になるまで放置した。染色バットから 10mM のクエン酸を除き、1xPBS で洗浄した。染色バットからスライドガラスを湿潤箱上に移し、4%スキムミルク/5% FBS/0.5% Tritonx-100/PBS を滴下して 60 分室温で静置した。4%スキムミルク/5% FBS/0.5% Tritonx-100/PBS をアスピレーターで除き、作成した 1 次抗体希釈液を滴下して一晩 4°Cで静置した。1 次抗体の希釈は 4%スキムミルク/5% FBS/0.5% Tritonx-100/PBS を用いて、以下の表の通り行った。1 次抗体希釈液をアスピレーターで除き、1xPBS を滴下して 5 回洗浄した。作成した 2 次抗体希釈液を滴下して 60 分室温で暗所に静置した。2 次抗体と DAPI の希釈は 4%スキムミルク/5% FBS/0.5% Tritonx-100/PBS を用いて、以下の表の通り行った。2 次抗体希釈液をアスピレーターで除き、1xPBS を滴下して 5 回洗浄した。Home made の封入剤を滴下し、カバーガラスをかけて固まるまで室温で暗所に放置した。作成したサンプルは蛍光顕微鏡(BZ-X-710 ; KEYENCE)を用いて観察した。

表 2.2 免疫染色で用いた抗体

1次抗体	特異的細胞	動物種	賦活化(オートクレーブ)	メーカー	型番	終濃度
Atp4b	壁細胞	ウサギ	必要	ATLAS	HPA045400	1/400
EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule)	上皮細胞	ラット	不必要	Santa Cruz	sc-53532	1/250
Gastrin	G細胞	ウサギ	どちらも可	Proteintech	18143-1-AP	1/1000
Gkn2	粘液分泌細胞	ウサギ	必要	abcam	ab188866	1/800
p63	扁平上皮細胞	マウス	必要	abcam	ab735	1/500
Somatostatin	D細胞	ヤギ	どちらも可	Santa Cruz	sc-7819	1/800
SMA (Smooth muscle actin)	平滑筋細胞	ウサギ	不必要	Novus	NB600-531	1/400
Sox2	主細胞	ラット	必要	Invitrogen	14-9811-82	1/400
Sox9	副細胞	ウサギ	必要	abcam	ab185230	1/400
Ki67	分裂細胞	ウサギ	必要	abcam	ab15580	1/500
		ラット		Invitrogen	14-5698-82	1/500
Pepsinogen II	主細胞	ヒツジ	必要	abcam	ab9013	1/2000
		ウサギ		abcam	ab255826	1/2000

2次抗体	メーカー	型番	終濃度
Donkey anti-Goat IgG AF488	Jackson	705-545-003	1/1000
Donkey anti-Goat IgG AF488	Life technologies	A11055	1/1000
Donkey anti-Goat IgG AF594	Life technologies	A11058	1/1000
Donkey anti-Mouse IgG AF 488	Life technologies	A21202	1/1000
Donkey anti-Mouse IgG AF555	Invitrogen	A31570	1/1000
Donkey anti-Mouse IgG AF 594	Life technologies	A21203	1/1000
Donkey anti-Mouse IgG AF647	Invitrogen	A31571	1/1000
Donkey anti-Rabbit IgG AF488	Life technologies	A21206	1/1000
Donkey anti-Rabbit IgG AF555	Invitrogen	A31572	1/1000
Donkey anti-Rabbit IgG AF594	Life technologies	A21207	1/1000
Donkey anti-Rabbit IgG AF647	Invitrogen	A31573	1/1000
Donkey anti-Rat IgG AF488	Invitrogen	A21208	1/1000
Donkey anti-Rat IgG AF594	Invitrogen	A21209	1/1000
Donkey anti-Sheep IgG AF594	Invitrogen	A11016	1/1000
Donkey anti-Sheep IgG AF488	Invitrogen	A11015	1/1000
DAPI	SIGMA	D9542	1/1000

2.3. 発生・成熟中の胃及び成体の胃における上皮細胞マーカーの遺伝子発現解析

2.3.1. RNA 調製用の組織の保管

ICR マウスから摘出した胃を 10cm ディッシュに移し、氷冷した 1xPBS を加えた。次に、実体顕微鏡下で胃に付いた余分な肝臓と脂肪組織を取り除き、氷冷した 1xPBS で洗浄した。胃を切り開いて内容物を除き、冷えた 1x PBS を加えて洗浄した。胃をチューブに移し、液体窒素で凍結して -80°C の冷凍庫で保管した。

2.3.2. RNA の調製

凍結した胃が入ったチューブに 1mL の ISOGEN(Home made)を加えてホモジナイザー(マイクロテックニチオン)によって組織を粉碎し、室温で 5 分静置した。これに $200\mu\text{L}$ のクロロホルムを加え、ボルテックスによって 15 秒間激しく攪拌して室温で 5 分静置した。その後、 $12,000\text{G}$ 、 4°C で 15 分間遠心した。 $500\mu\text{L}$ の上清をチューブに移し、 $500\mu\text{L}$ のイソプロパノールを加えてボルテックスによって 15 秒間激しく攪拌し、室温で 5 分静置した。その後、 $12,000\text{G}$ 、 4°C で 10 分間遠心した。上清を取り除き、1 mL の 70%エタノールを加え、ボルテックスによって 5 秒間激しく攪拌して室温で 5 分静置した。これを 7600G 、 4°C で 5 分間遠心し、上清を完全に取除いて 1 分間風乾した。その後、 $10\mu\text{L}$ を MilliQ 水加え、Nano Drop One を用いて RNA 濃度を測定した。

2.3.3. cDNA 合成

抽出した RNA の濃度をもとに RNA 濃度が 500ng、全体量が $6\mu\text{L}$ なるように RNA 溶液の調製を行い、 65°C で 5 分間インキュベートした。次に、10x DNase buffer $1\mu\text{L}$ 、MRI $1\mu\text{L}$ 、DNase $1\mu\text{L}$ を加え、 37°C で 15 分間インキュベートした。これにさらに RT $1\mu\text{L}$ 、RT buffer $9\mu\text{L}$ 加えて、 25°C 10分、 42°C 45分、 70°C 15分の順でインキュベートした。

2.3.4. qRT-PCR

調整した cDNA を用いた反応組成を表に示す。また、プライマーは表に示したものを使用した。qRT-PCR の反応は表の条件で行い、 β -actin の発現を基準に各機能的上皮細胞特異的なマーカーの発現量を解析した。

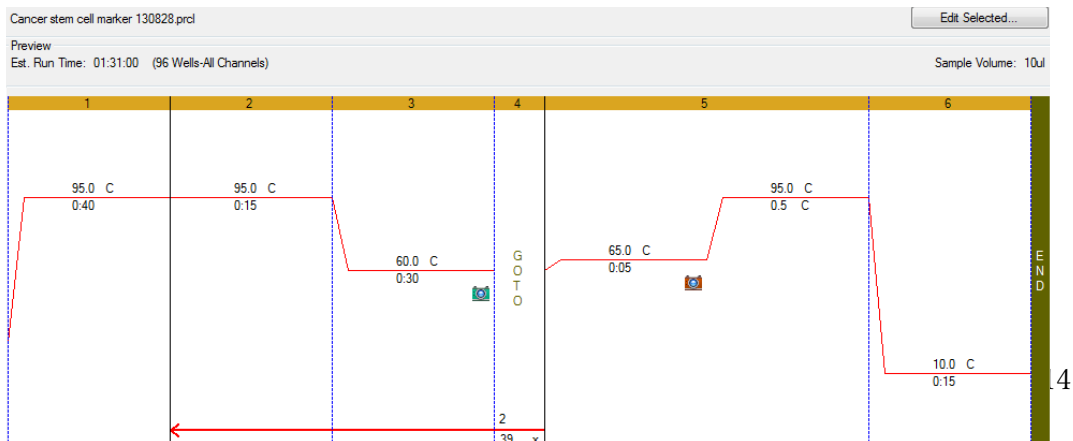
表 2.3.1 qRT-PCR で用いたプライマー

遺伝子	特異的細胞	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
<i>Sox2</i>	主細胞	GCGGAGTGGAAACTTTTGTCC	CGGGAAGCGTGTACTTATCCTT
<i>Somatostatin</i>	D細胞	ACCGGGAAACAGGAACTGG	TTGCTGGGTTCGAGTTGGC
<i>Gkn2</i>	粘液分泌細胞	ATGAAACCCCTCGTGGCATTT	TGTCTCCTGGATATTGCCTCC
<i>Pgc</i>	主細胞	CCACCTACTACACTCAAGGGC	AACTCCTGGTTAGGGACCTGG
<i>Apt4b</i>	壁細胞	TTCCGGCACTACTGTTGGAAC	TGACCACATAGAAACCTGCGTA
<i>Gastrin</i>	G細胞	CGCTCCCAGCTACAGGATG	GGTCTGCTATGAAGTGTGAGG
<i>Ki67</i>	分裂細胞	ATCATTGACCGCTCCTTTAGGT	GCTCGCCTTGATGGTTCCT
<i>Sox9</i>	副細胞	AGTACCCGCATCTGCACAAC	CCAAGCATTTAGACGCCAGTTT
<i>EpCAM</i>	副細胞	CCCAGACATCAGGGAGTAATGG	TCTATCGGATACTTCAGCGTCA
<i>SMA</i>	副細胞	AGTACCCGCATCTGCACAAC	ACGAAGGGTCTCTTCTCGCT

表 2.3.2. qRT-PCR 反応組成

試薬	液量
2x SYBR qPCR mix	5 μ L
2mM dNTPs	1 μ L
Taq	0.3 μ L
10 μ M Forward primer	0.3 μ L
10 μ M Reverse primer	0.3 μ L
MillQ	2.1 μ L
cDNA	1 μ L

表 2.3.3. qRT-PCR 反応サイクル条件



3. 結果

本研究では、E12.5 から成体にかけての発生後期過程および成熟過程において、多様な胃上皮細胞のマーカー因子の発現がどのように変化するかを解析するため、それぞれのマーカー因子について定量的 PCR による遺伝子発現解析と、胃組織切片の抗体染色解析を行った。定量的 PCR は胃の臓器全体から RNA を抽出して解析を行っており、抗体染色解析は胃体部と幽門部に分けて解析している。以下、それぞれのマーカー因子について順に結果を記載する。

3.1 EPCAM と SMA の発現パターンの解析

胃は、上皮細胞で構成された胃腺の周囲を間葉細胞が取り囲む構造を持つ。まず、上皮細胞と間葉細胞の分化過程を解析するため、上皮細胞の細胞表面に発現するタンパク質である EPCAM と、平滑筋細胞のマーカーである SMA (Smooth Muscle Actin) の発現を解析した。

3.1.1 定量的 PCR による *Epcam* と *Sma* の発現変化の解析

Epcam は、全てのステージで発現が認められるが、E14.5 で一過的に発現減少することが示された。また、E16.5 で *Epcam* の発現が上昇する傾向が見られたが、それ以降は大きな発現変動はみられなかった。

Sma は、E12.5 から E17.5 にかけて発現が上昇する傾向にあり、それ以降は大きな発現変動は見られなかった。

3.1.2 胃体部における EPCAM と SMA の抗体染色結果

胃体部において EPCAM は、E12.5 から P7 まで全ての上皮細胞で強く発現しているが、P21 以降では胃腺の底部にのみ弱く発現することが明らかになった。また、EPCAM の発現パターンから、E12.5 から E13.5 までの上皮細胞は重層上皮構造をとるが、E14.5 以降に陥入を開始していることが明らかとなった。

SMA は、E12.5 において上皮下に見られる間葉組織の中心から発現を開始し、E16.5 にかけて中心部のみで発現する。E17.5 以降、中心部での発現が引き続きみられるとともに、上皮細胞直下の間葉組織でも発現が開始する。また、P2 以降から、上皮細胞を裏打ちする間葉組織で発現開始することが示された。

3.1.3 幽門部における EPCAM と SMA の抗体染色結果

幽門部において EPCAM は E12.5 から全ての上皮細胞で発現しており、それ以降の成熟過程から成体にいたるまで全ての上皮細胞で発現し続けることが示された。また、EPCAM の発現パターンから、E14.5 から陥入を開始することが明らかになった。

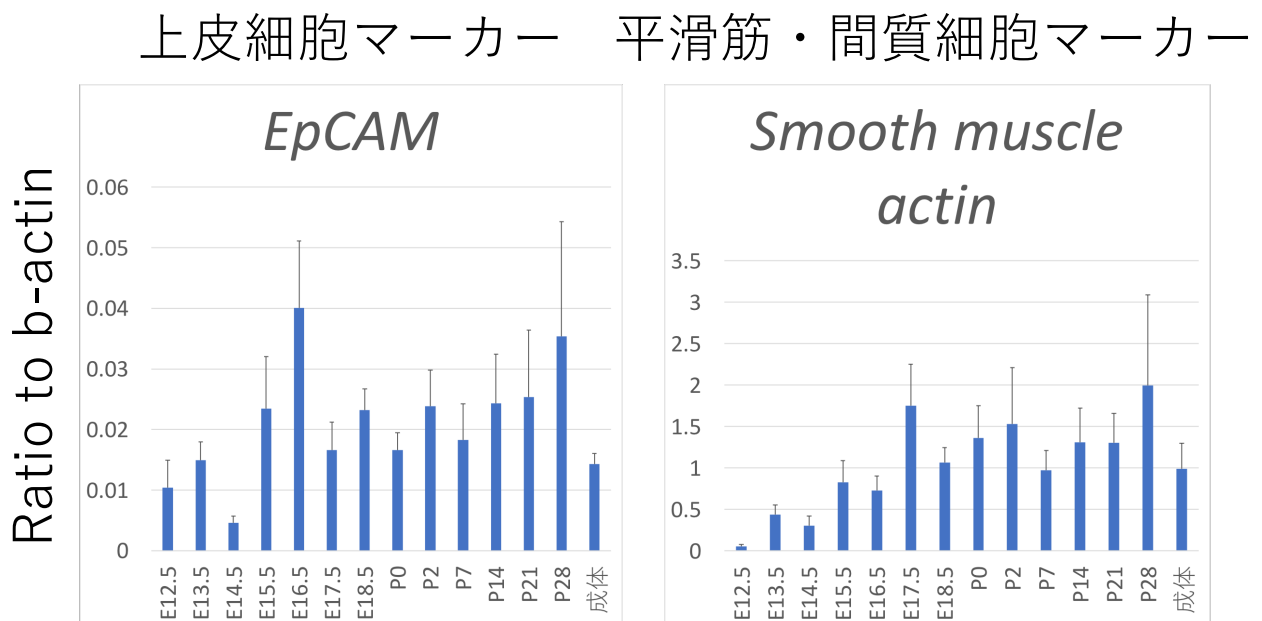
SMA は胃体部と同様に、E12.5 で間葉組織の中心部から発現を開始し、E17.5 以降に上皮細胞直下の間葉組織でも発現が開始する。また、P7 から胃腺を裏打ちする間質での発現が認められた。

3.1.4 結果のまとめ

定量的 PCR 解析から EPCAM は E14.5 で一過的に発現が減少する可能性が示された。また抗体染色の結果から、E14.5 は胃腺の陥入が開始する時期であることが示されており、EPCAM の発現減少と胃腺の陥入に何らかの関連がある可能性がある。

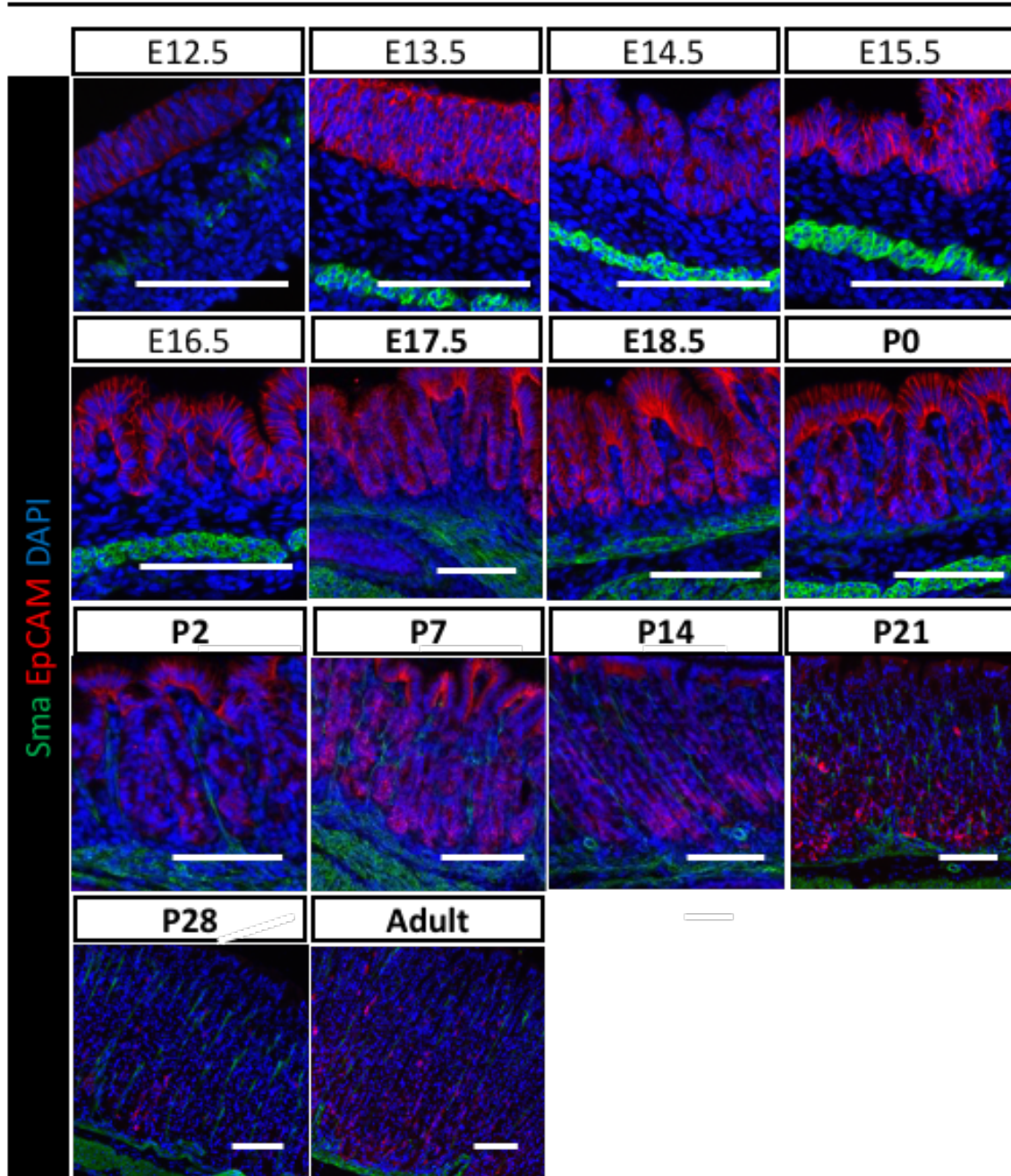
A

胃全体における発現



B

Corpus



Antrum

C

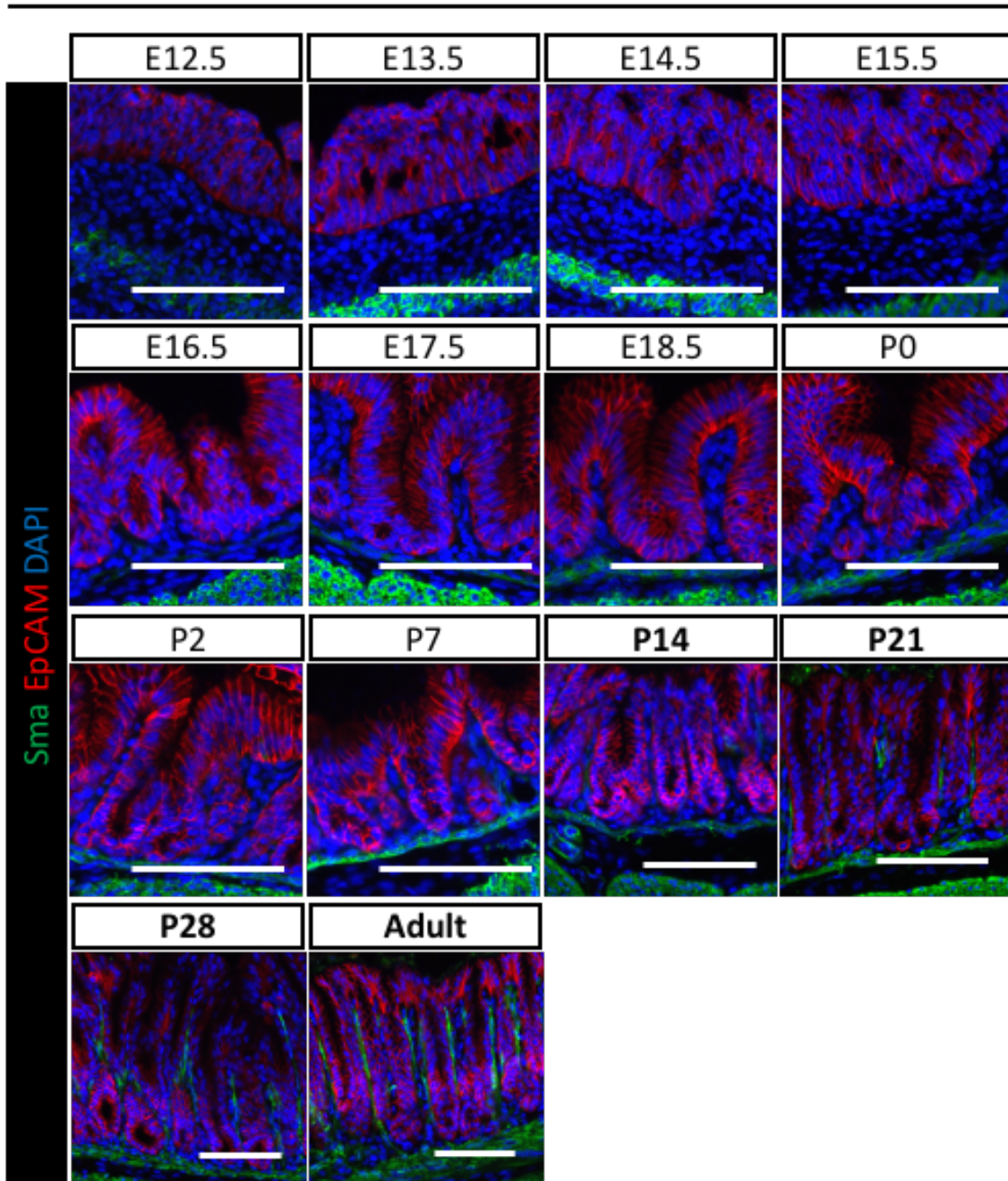


図 3.1. EPCAM と SMA の発現パターンの解析

- A. qRT-PCR による E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃組織全体における EPCAM と SMA の遺伝子発現変化 (n=3、mean±SD、*P<0.05、**P<0.01、***P=0.001)。
- B. E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃体部における EPCAM と SMA の免疫蛍光染色(スケールバー ; 100 μm)
- C. E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の幽門部における EPCAM と SMA の免疫蛍光染色(スケールバー ; 100 μm)

3.2 SOX9 と SOX2 の発現パターンの解析

SOX2 は原始腸管の領域化が開始する発生初期から胃となる領域の上皮細胞で発現する転写因子であり、成体の胃体部では主細胞で、成体の幽門部では峽部幹細胞で発現することが知られる。SOX9 は発生期の胃上皮細胞で発現する転写因子であり、成体の胃体部では副細胞で、幽門部では底部粘液細胞で発現する。

3.2.1 定量的 PCR による *Sox9* と *Sox2* の発現変化の解析

Sox9 は E16.5 で一過的に発現が上昇することが示された。また、P7 から P28 で発現が上昇する傾向があることが示された。

Sox2 の発現は E14.5 から E17.5 にかけて上昇する傾向があるが、その後 E18.5 で急激に発現が減少していることが明らかとなった。また E18.5 から P7 にかけて発現が上昇する傾向にあるが、P7 から P21 にかけて SOX2 の発現は減少し、P21 以降は上昇していた。

3.2.2. 胃体部における SOX9 と SOX2 の抗体染色結果

胃体部における SOX2 は、E12.5 から E18.5 で上皮の全体で発現していたが、E15.5 から E18.5 にかけて、胃腺の表層部で強く、底部で発現が弱いことが示された。P0 以降は胃腺の表層部での発現が消失し、P14 から成体で胃腺の中央上部から底部に発現していた。

SOX9 は E12.5 から E17.5 で上皮の全体で発現するが、E18.5 では胃腺の表層部での発現が消失する。このため、E18.5 では胃腺の表層部で強く SOX2 が発現し、底部では SOX9 が特異的に発現するといった、SOX2 と SOX9 の発現が相反する様子が観察された。E18.5 以降 P21 までは胃腺の中央から底部で発現するが、P28 以降から成体では底部での発現が消失し、胃腺の中央から中央下部に発現している様子が見られた。

3.2.3. 幽門部における SOX9 と SOX2 の抗体染色結果

幽門部において SOX9 は E12.5 では上皮の全体で発現するが、E13.5 になると上皮の中底部で強く発現し、表層部で発現が消失する。胃腺の陥入が開始する E14.5 から E18.5 では胃腺の中央から底部に限局して発現し、P0 から成体では胃腺の底部で発現する様子が観察された。SOX2 は E12.5 から E18.5 にかけて

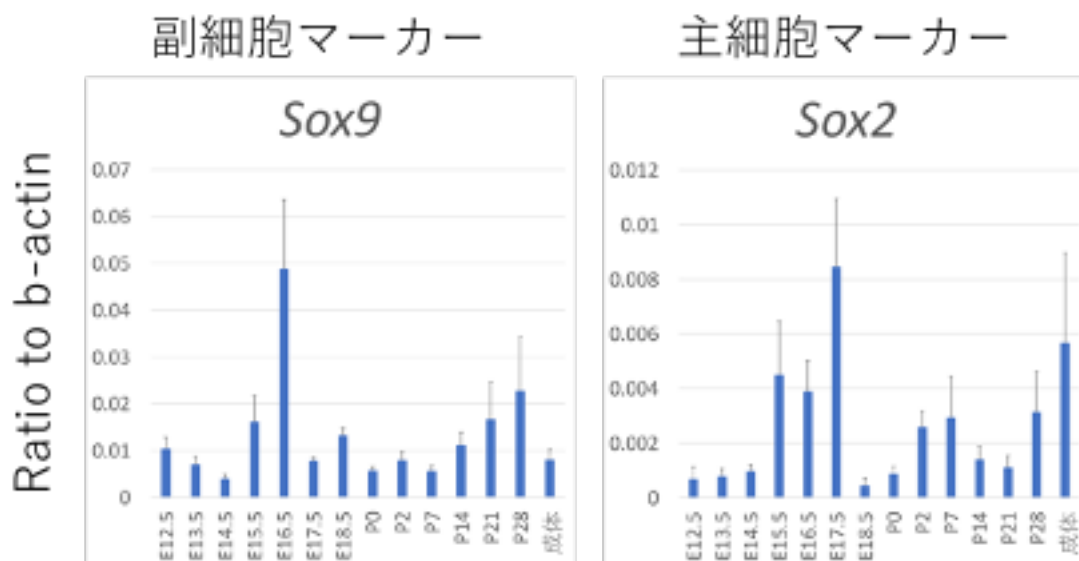
上皮の全体で発現していたが、胃腺の表層部で発現が強く、底部では弱く発現する。このため、E13.5 から E18.5 にかけて胃腺の表層部で SOX2 の発現が強く、底部では SOX9 が特異的に発現するといった、SOX2 と SOX9 の発現が相反する様子が観察された。その後 SOX2 は、P7 と P14 で発現が減弱するが、P21 以降は胃腺の中央上部から底部に発現する。

3.2.4. 結果のまとめ

抗体染色の解析から、発生後期において SOX9 と SOX2 は胃腺の上下で相反する発現パターンを示すことが明らかになった。幽門部では E13.5 から表層部での SOX9 の発現が消失し SOX2 との相反する発現パターンが明確になるが、胃体部では E18.5 で SOX9 の発現が表層部で消失しており、幽門部と胃体部で細胞分化の進行速度に違いがある可能性が示唆された。

胃全体における発現

A

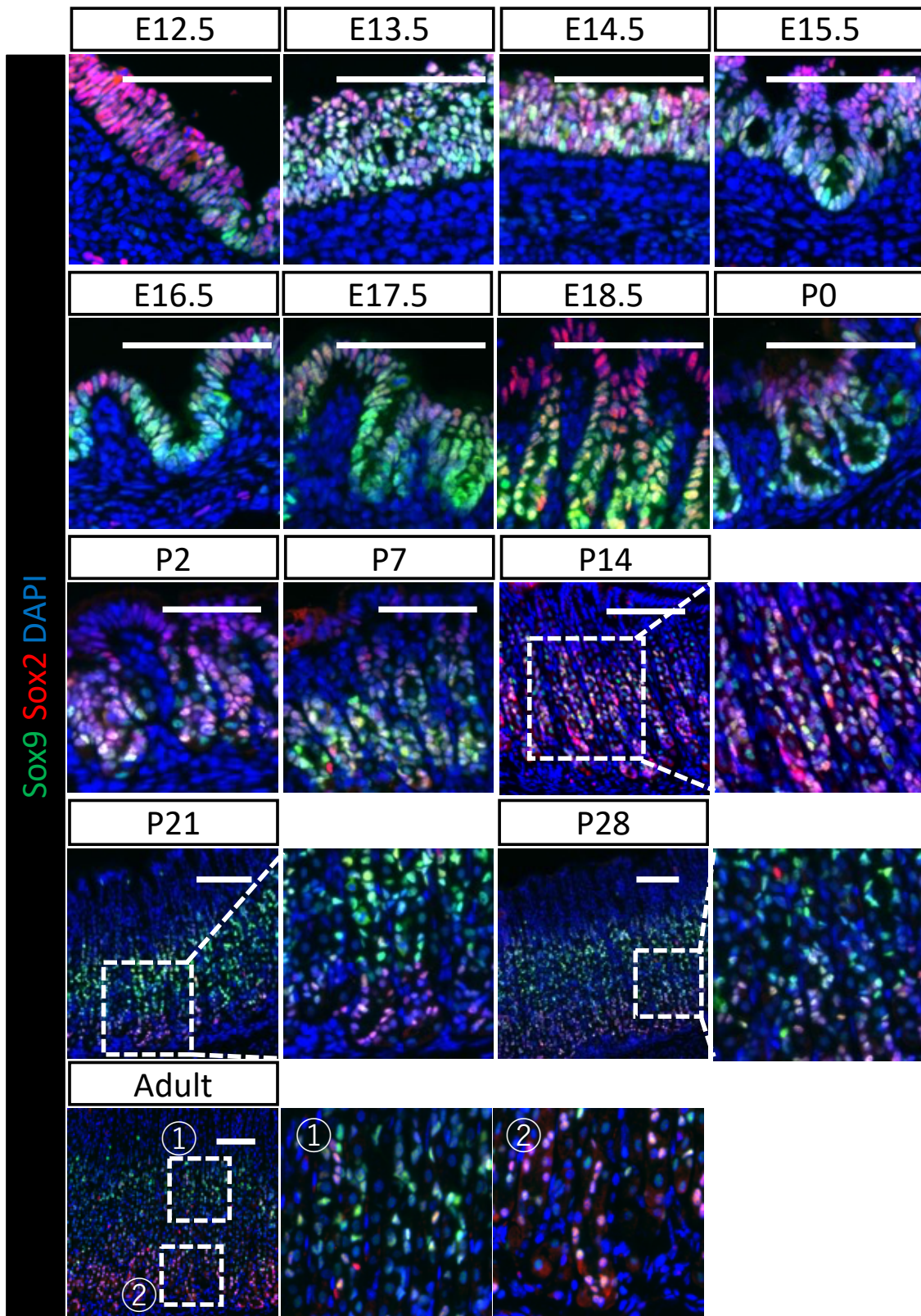


Sox9有意差		
*	**	***
P21-E16.5	E16.5-Adult	E16.5-E14.5
	E16.5-E12.5	P0-E16.5
	E16.5-E13.5	P7-E16.5
	E17.5-E16.5	
	E18.5-E16.5	
	P14-E16.5	
	P2-E16.5	

Sox2有意差
*
E17.5-E14.5
E18.5-E17.5
P0-E17.5
P21-E17.5

B

Corpus



Antrum

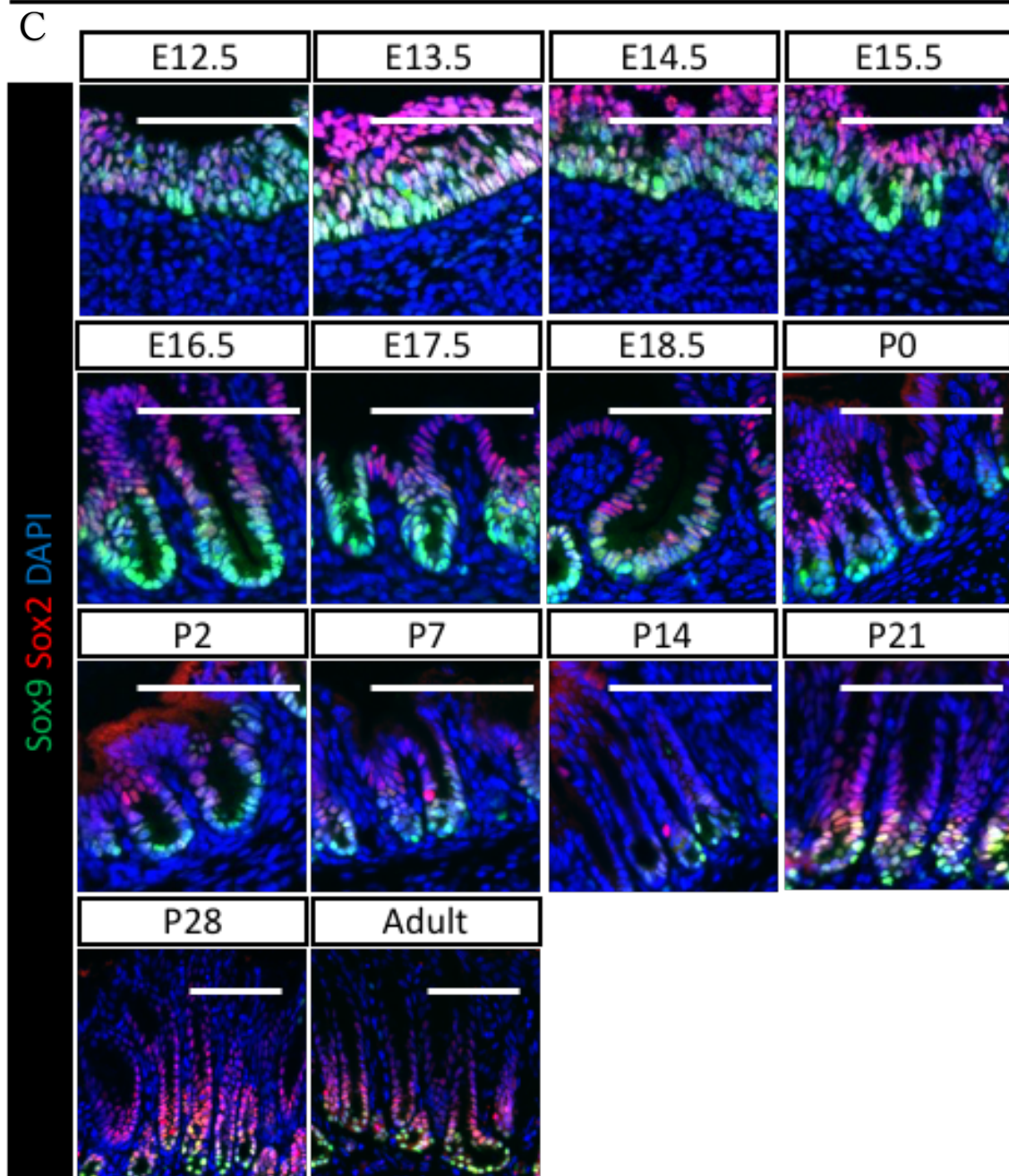


図 3.2. SOX9 と SOX2 の発現パターンの解析

- A. qRT-PCR による E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃組織全体における SOX9 と SOX2 の遺伝子発現変化 (n=3、mean±SD、*P<0.05、**P<0.01、***P=0.001)。
- B. E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃体部における SOX9 と SOX2 の免疫蛍光染色(スケールバー ; 100 μm)
- C. E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の幽門部における SOX9 と SOX2 の免疫蛍光染色(スケールバー ; 100 μm)

3.3 Ki67 と SOX9 の発現パターンの解析

Ki67 は分裂細胞のマーカーであり、発生期の未分化な細胞で広く発現する。成体では峽部幹細胞に限局して発現する。

3.3.1 定量的 PCR による *Ki67* の発現変化の解析

Ki67 は、E12.5 から E15.5 まではほとんど発現量が変化しないが、それ以降成体にかけて発現が減少する傾向があることが示された。

3.3.2 胃体部における Ki67 と SOX9 抗体染色結果

胃体部において Ki67 は E12.5 から E17.5 で上皮の全体で発現していたが、E18.5 以降では胃腺の表層部での発現は消失する。SOX9 との共染色の結果から、E12.5 から E18.5 における Ki67 の発現は SOX9 の発現パターンと相似することが示された。E18.5 以降 P14 までは胃腺の中央上部から中央下部に散在して発現するが、P21 以降は胃腺の中央上部に限局した発現が見られた。

3.3.3 幽門部における Ki67 と SOX9 の抗体染色結果

幽門部において Ki67 は、E12.5 では上皮の全体で発現するが、E13.5 から E15.5 にかけて胃腺の表層部での発現が減弱する。E16.5 から E18.5 では胃腺の表層部での発現が消失し、胃腺の中央から底部に限局して発現する様子が見られた。P0 から P7 では引き続き胃腺の底部に発現するが、P14 から胃腺の中央下部(峽部)での発現が強くなり、P21 以降は胃腺の中央下部(峽部)に限局して発現することが明らかになった。

3.3.4 結果のまとめ

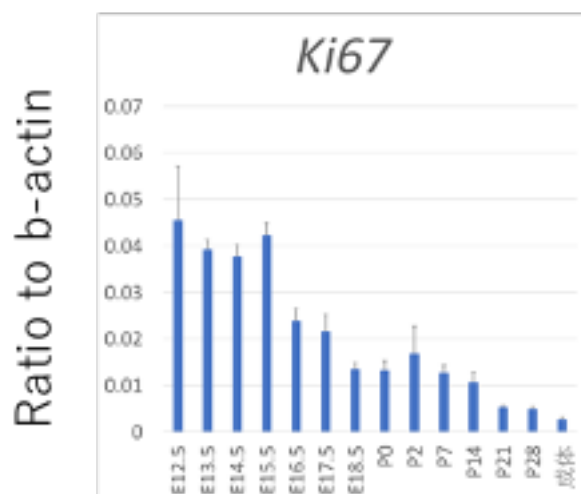
胃体部・幽門部ともに、E12.5 で上皮細胞全体に発現していた Ki67 の発現が、発生が進むにつれて胃腺の下部に限局する様子が見られた。この時期の Ki67 の発現は SOX9 の発現と相似しており、SOX9 が未分化性の維持を制御する可能性が示唆された。また、胃体部では E18.5 から、幽門部では E13.5 から胃腺の表層部で Ki67 の発現が消失することから、胃腺の表層部の細胞は発生後期から分化を開始する可能性が示された。また、生後から P14 までは胃腺の下部で散

在した発現を示すが、P28 では峽部に限局することから、P28 までに成熟を終える可能性が示唆された。

胃全体における発現

A

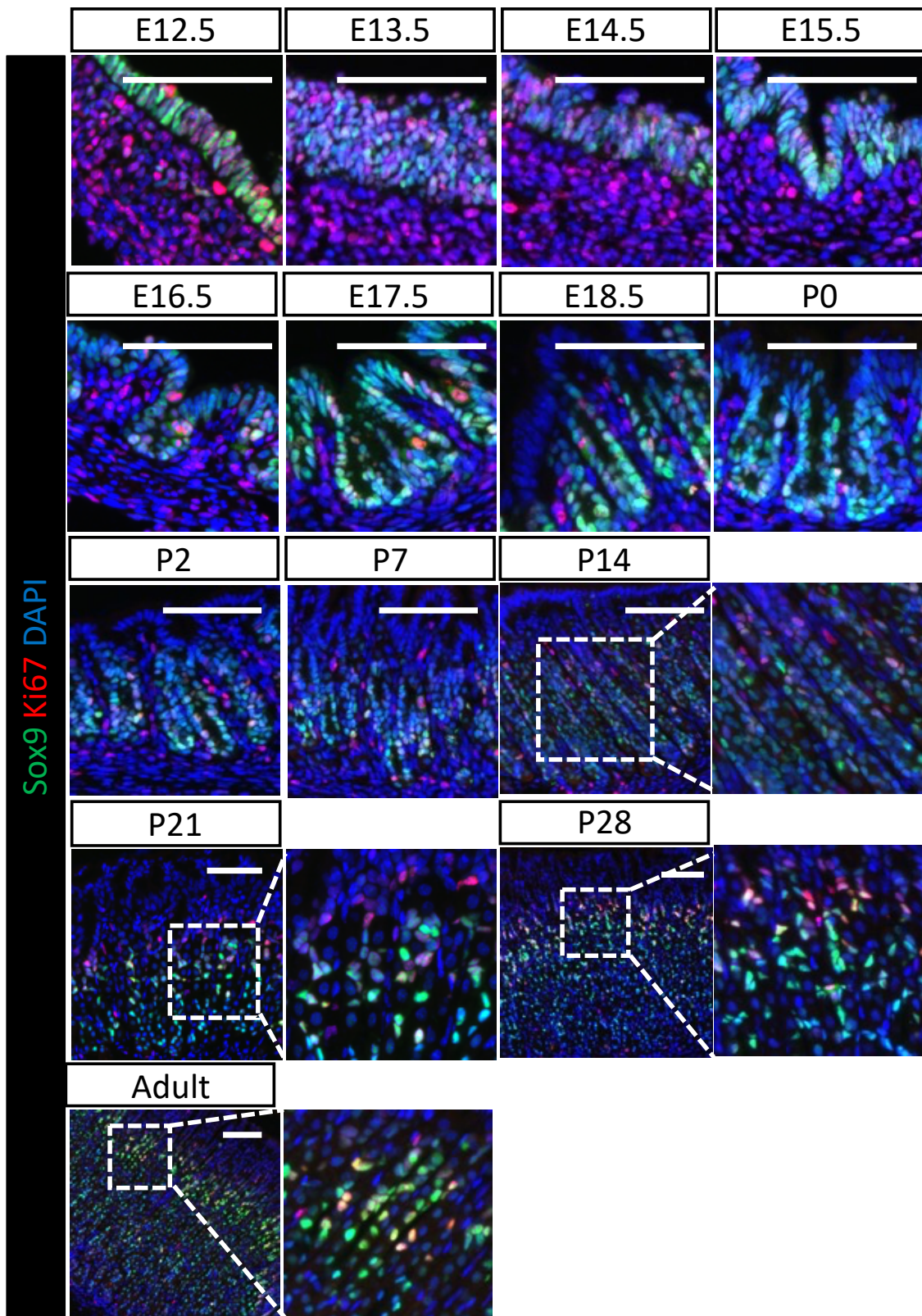
分裂細胞マーカー



Ki67有意差			
*	**	***	
E16.5-Adult	P2-E12.5	E12.5-Adult	P28-E12.5
E16.5-E12.5	E18.5-E13.5	E13.5-Adult	P7-E12.5
E17.5-E12.5	P0-E13.5	E14.5-Adult	P21-E13.5
P2-E13.5	P14-E13.5	E15.5-Adult	P28-E13.5
E18.5-E14.5	P7-E13.5	E18.5-E12.5	P21-E14.5
P2-E14.5	P0-E14.5	P0-E12.5	P28-E14.5
E17.5-E15.5	P14-E14.5	P14-E12.5	P14-E15.5
	P7-E14.5	P21-E12.5	P21-E15.5
	E18.5-E15.5		P28-E15.5
	P0-E15.5		P7-E15.5
	P2-E15.5		

B

Corpus



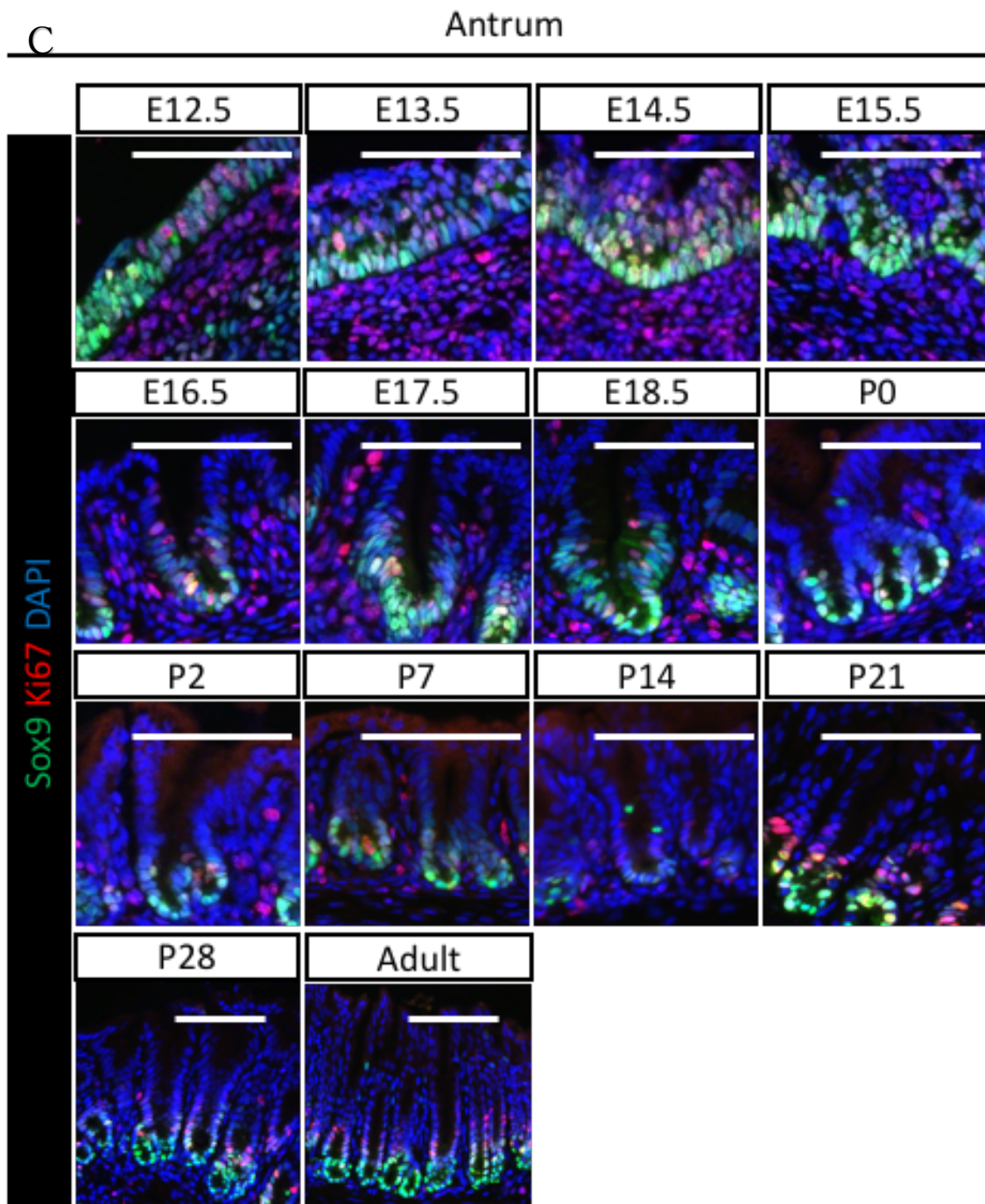


図 3.3. SOX9 と Ki67 の発現パターンの解析

- A. qRT-PCR による E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃組織全体における SOX9 と Ki67 の遺伝子発現変化 (n=3、mean ± SD、*P<0.05、**P<0.01、***P=0.001)。
- B. E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃体部における SOX9 と Ki67 の免疫蛍光染色(スケールバー ; 100 μ m)
- C. E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28 成体の幽門部における SOX9 と Ki67 の免疫蛍光染色(スケールバー ; 100 μ m)

3.4 ATP4B の発現パターンの解析解析

ATP4B はプロトンポンプを構成するタンパク質であり、胃酸を分泌する壁細胞のマーカー因子である。(ATP4B の機能についての詳細は、序論に記載した。)

3.4.1 定量的 PCR による *Atp4b* の発現変化の解析

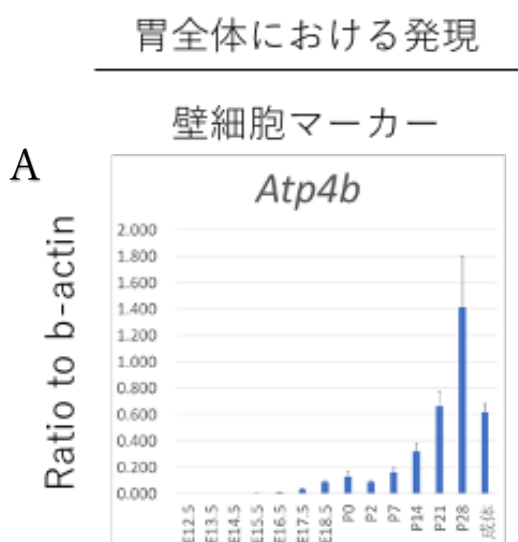
Atp4b は E17.5 から発現を開始し、その後 P28 にかけて発現が上昇する傾向にあることが示された。P28 から成体にかけて発現は減少していた。

3.4.2 胃体部における ATP4B と Ki67 の抗体染色結果

胃体部において ATP4B は E17.5 から胃腺の表層部を除く領域で発現を開始していた。E17.5 から P7 まで ATP4B を発現する細胞は胃腺の中央上部から底部に点在していたが、しだいにその数を増やし、P28 では胃腺の表層部を除く領域全体に整列している様子が見られた。また、Ki67 との共染色の結果から、E17.5 以降の ATP4B 発現細胞では Ki67 の発現は見られないことが示された。

3.4.3 結果のまとめ

以上の結果より壁細胞は E17.5 で胃腺の表層部を除く領域で分化を開始している可能性が示唆された。また、胃腺の特定の領域で分化が開始するわけではなく、胃腺の中央部から底部にかけて点在して分化が開始することが示された。また、ATP4B を発現する細胞は Ki67 の発現と一致していなかったことから前駆細胞ではないことが明らかとなった。ATP4B を発現する壁細胞が、常に未分化な細胞から分化してその数を増やすのか、それとも壁細胞の前駆細胞が形成され、それが分裂することで数を増やすのかについては、さらに他の壁細胞マーカーと Ki67 の共染色を行う必要があると考えられる。



Atp4b有意差		
*	**	***
E12.5-Adult	P28-Adult	P28-E12.5
E13.5-Adult		P28-E13.5
E14.5-Adult		P28-E18.5
E15.5-Adult		P28-P0
E16.5-Adult		P28-P14
E17.5-Adult		P28-P2
P21-E12.5		P28-P21
P21-E13.5		P7-P28

B

Corpus

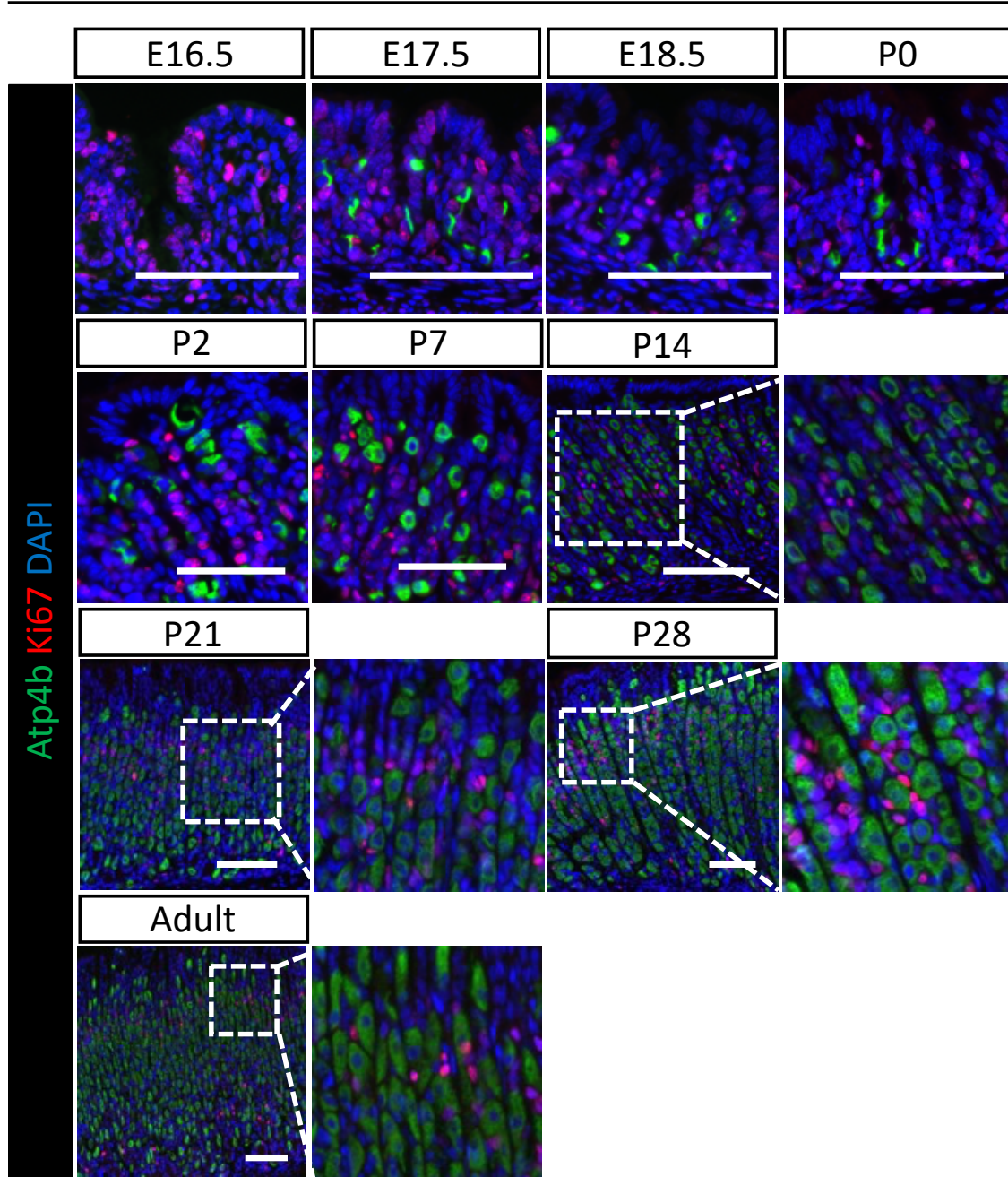


図 3.4. Atp4b と Ki67 の発現パターンの解析

- A. qRT-PCR による E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃組織全体における Atp4b と Ki67 の遺伝子発現変化 (n=3、mean ± SD、*P<0.05、**P<0.01、***P=0.001)。
- B. E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃体部における Atp4b と Ki67 の免疫蛍光染色(スケールバー ; 100 μm)

3.5 PGC の発現解析

PGC(Pepsinogen)はタンパク質分解酵素ペプシンの前駆体であり、胃体部に存在する主細胞のマーカー因子である。

3.5.1. 定量的 PCR による *Pgc* の発現変化の解析

Pgc の発現は P14 から発現を開始し、P21 で発現が劇的に上昇することが示された。

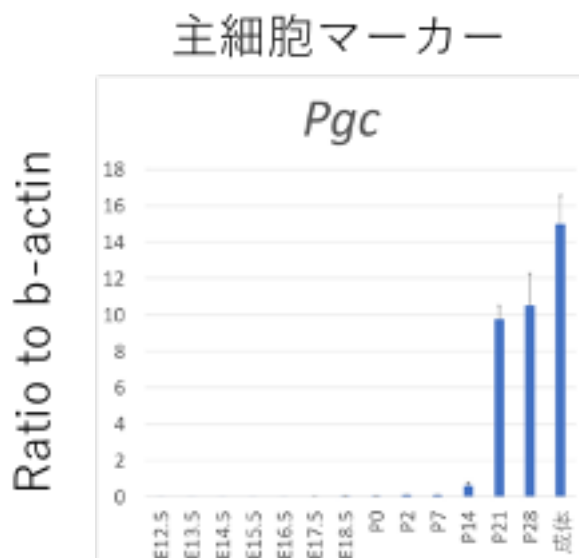
3.5.2. 胃体部における PGC と Ki67 の抗体染色結果

胃体部において PGC は P7 では発現していないが、P14 から胃腺の中央で発現を開始していた。P21 以降は胃腺の底部でも発現を開始し、中央部から底部にかけて広く発現していた。

3.5.3. 結果のまとめ

以上の結果より主細胞は P14 で胃腺の中央部から分化を開始し、P21 以降で胃腺の底部でも分化を開始する可能性が示唆された。主細胞は離乳の時期に劇的に分化が進行すると考えられる。

A 胃全体における発現



Pgc有意差	
**	***
P28-Adult	P21-Adult

B

Corpus

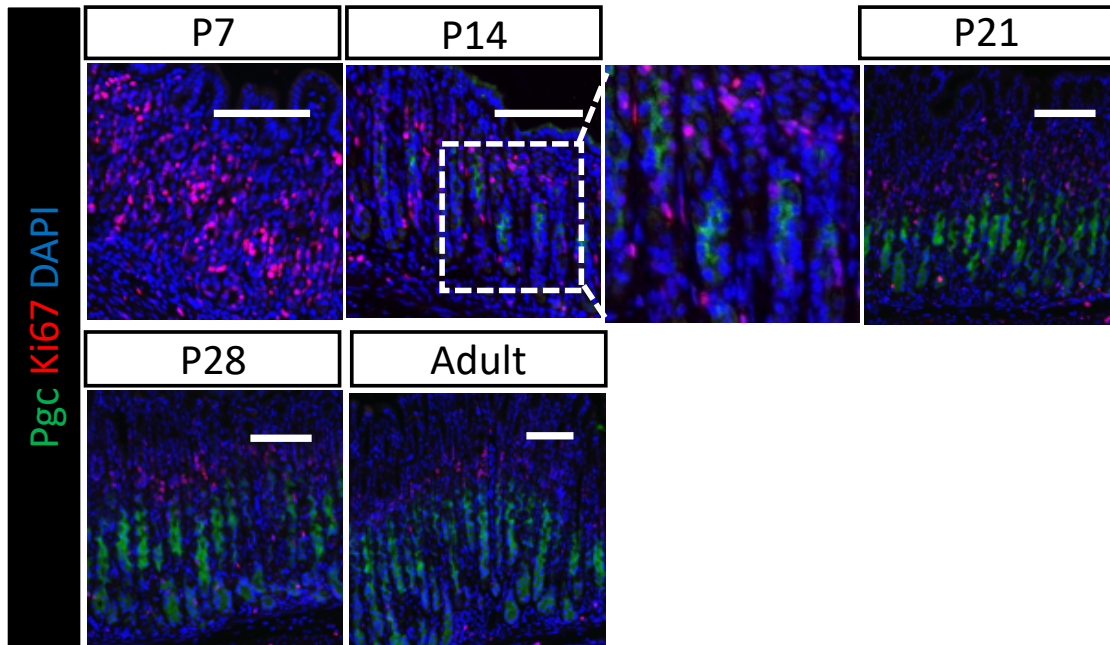


図 3.5. Pgc と Ki67 の発現パターンの解析

- A. qRT-PCR による E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃組織全体における Pgc と Ki67 の遺伝子発現変化 (n=3、mean±SD、*P<0.05、**P<0.01、***P=0.001)。
- B. P7、P14、P21、P28、成体の胃体部における Pgc と Ki67 の免疫蛍光染色(スケールバー；100 μm)

3.6 GKN2 の発現解析

GKN2 は表層粘液の構成タンパク質であり、表層粘液細胞のマーカーである。

3.6.1 定量的 PCR による *Gkn2* の発現変化の解析

Gkn2 は E18.5 から発現を開始しする。P21 で急激に発現上昇するが、その後は発現が減少する傾向が示された。

3.6.2 胃体部における GKN2 と Ki67 の抗体染色結果

胃体部において GKN2 は P0 から発現を開始する。P0 から P14 では胃腺の表層部のみで発現しており、GKN2 を発現する細胞の数はそれほど増加していない。P21 以降は胃腺の表層部だけでなく中央上部にかけて発現する。Ki67 との共染色より、P14 までは Ki67 発現細胞と GKN2 発現細胞が離れて存在するが、P21 以降から両細胞が近接することが示された。

3.6.3 幽門部における GKN2 と Ki67 の抗体染色結果

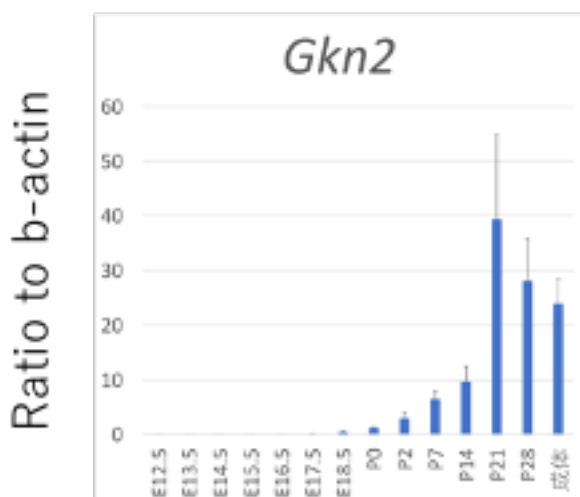
幽門部における GKN2 は P0 から P7 では胃腺の表層部のみに発現する。P14 以降、胃腺の中央上部でも発現を開始し、成体にかけて胃腺の表層部から中央に発現する様子が見られた。また、Ki67 との共染色により、P21 以降で Ki67 発現細胞と GKN2 発現細胞が近接することが示された。

3.6.4 結果のまとめ

以上の結果より、表層粘液細胞は胃体部、幽門部ともに P0 で分化を開始している可能性が示唆された。また、P21 以降で GKN2 を発現する細胞が急激に増加することから、離乳のタイミングで表層粘液細胞への分化が促進することが示唆された。

A 胃全体における発現

表層粘液細胞マーカー



Gkn2有意差		
*	**	***
P28-E12.5	P7-P21	P21-E12.5
P28-E13.5		P21-E13.5
P28-E14.5		P21-E14.5
P28-E15.5		P21-E15.5
P28-E16.5		P21-E16.5
P28-E17.5		P21-E17.5
P28-E18.5		P21-E18.5
P28-P0		P21-P0
P21-P14		P21-P2

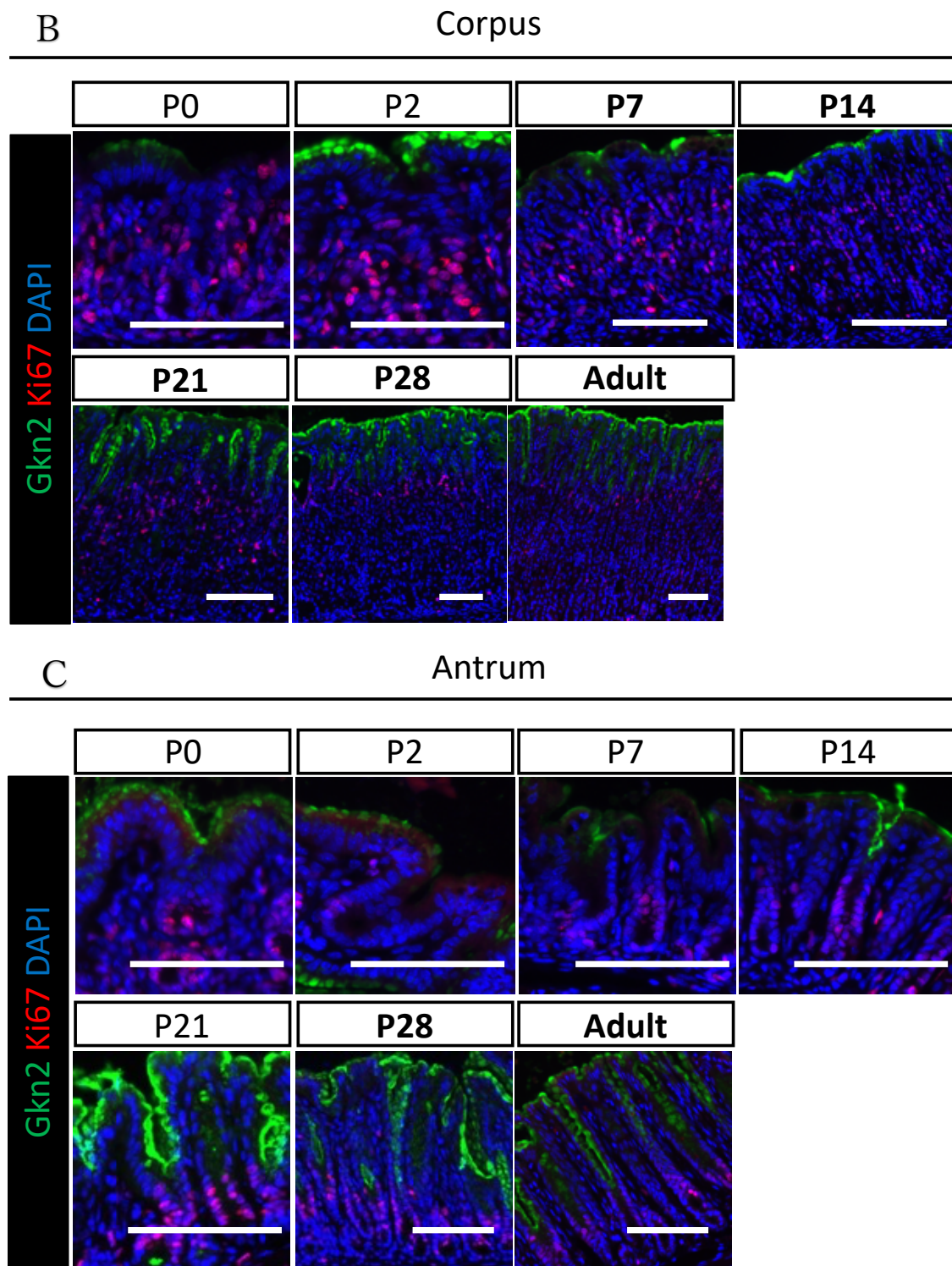


図 3.6. Gkn2 と Ki67 の発現パターンの解析

- A. qRT-PCR による E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃組織全体における Gkn2 と Ki67 の遺伝子発現変化 (n=3、mean±SD、*P<0.05、**P<0.01、***P=0.001)。
- B. P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃体部における Gkn2 と Ki67 の免疫蛍光染色(スケールバー ; 100 μ m)
- C. P0、P2、P7、P14、P21、P28 成体の幽門部における Gkn2 と Ki67 の免疫蛍光染色(スケールバー ; 100 μ m)

3.7 SST (Somatostatin)の発現パターンの解析

3.7.1 定量的PCRによる *Sst* の発現変化の解析

Sst は、E17.5 から発現を開始していた。その後、P21 にかけて SST の発現は上昇する傾向にあるが、P21 から P28 にかけて減少していることが示された。

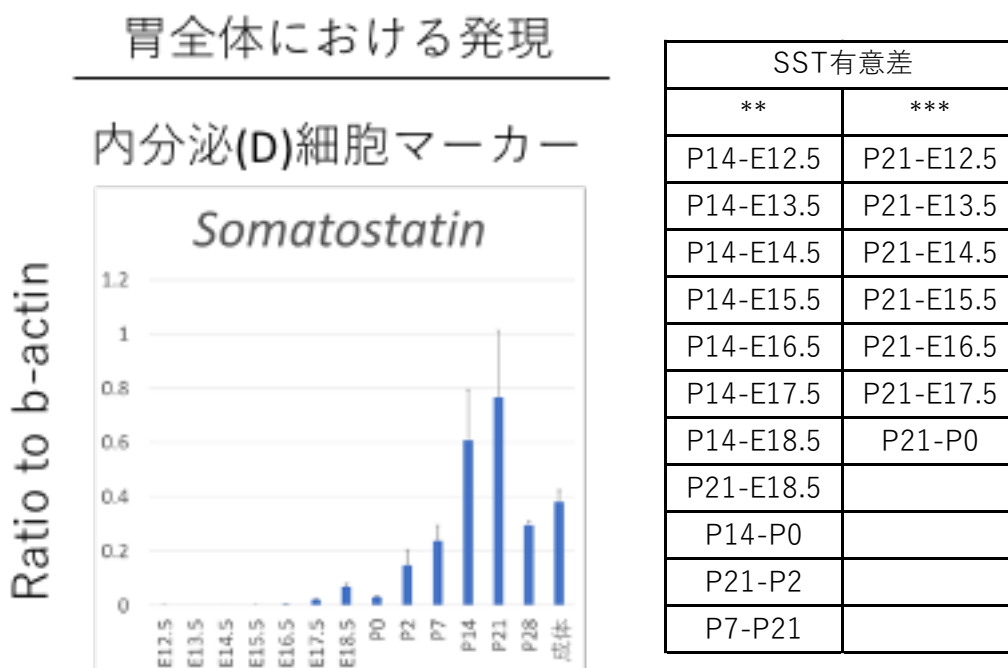
3.7.2 胃体部における SST と Ki67 の抗体染色結果

SST は胃体部において E17.5 の胃腺の底部で発現を開始していた。発生後期から生後の成熟過程にかけて、一つの胃腺あたりの SST 発現細胞の数はほとんど変化しないことが示された。

3.7.3 結果のまとめ

以上の結果より、内分泌(D)細胞は E17.5 で分化を開始している可能性が示唆された。また、SST を発現する細胞は Ki67 の発現と一致していなかったことから、これらの細胞は前駆細胞として機能するわけではないことが示唆された。

A



B

Corpus

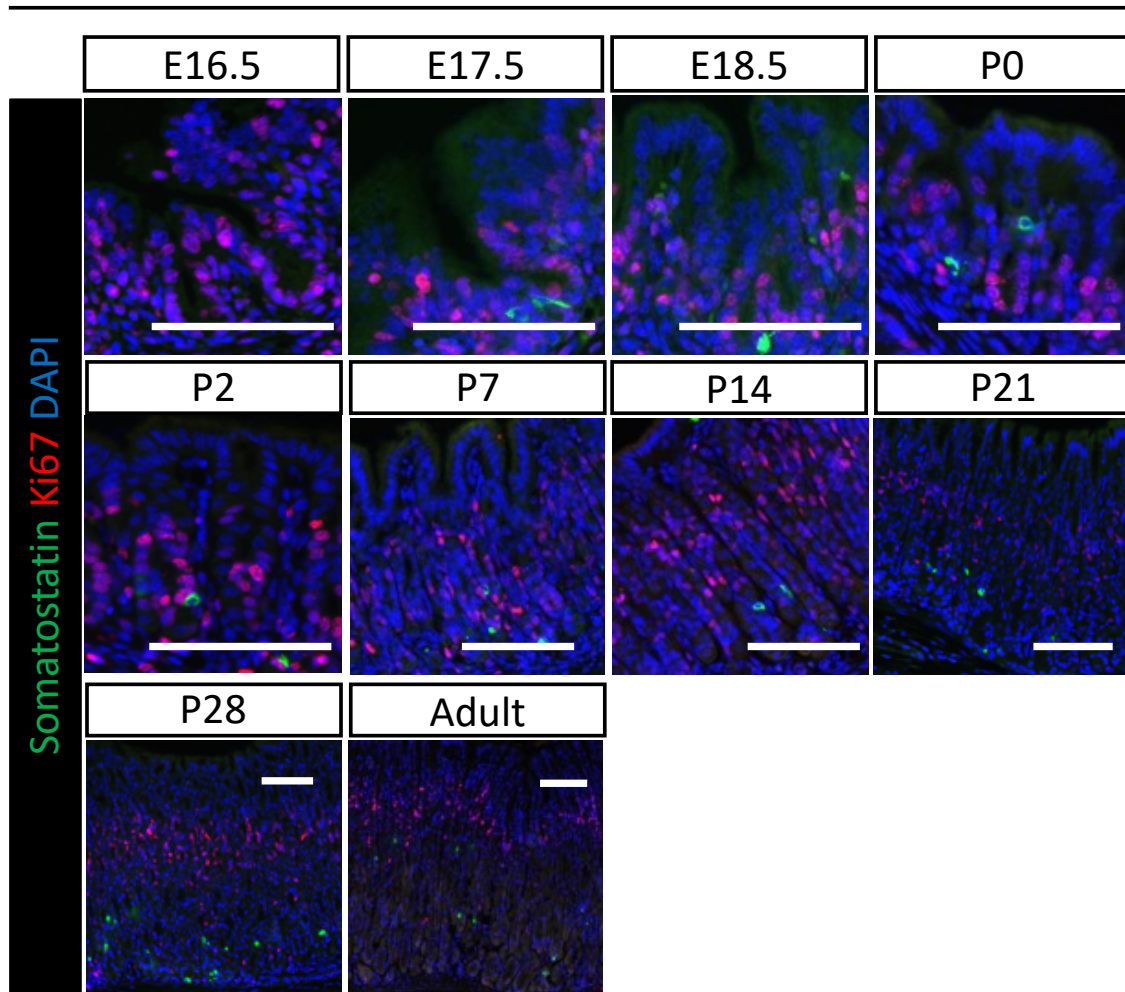


図 3.7. Somatostatin と Ki67 の発現パターンの解析

- A. qRT-PCR による E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃組織全体における Somatostatin と Ki67 の遺伝子発現変化 (n=3、mean ± SD、*P<0.05、**P<0.01、***P=0.001)。
- B. E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃体部における Somatostatin と Ki67 の免疫蛍光染色(スケールバー ; 100 μm)

3.8 GAST(Gastrin)の発現解析

3.8.1 定量的PCRによる *Gast* の発現変化の解析

胃組織全体における *Gast* の遺伝子発現は E15.5 か検出された。P2 と P14 で発現が大きく上昇し、それ以降の発現はほとんど一定であった。

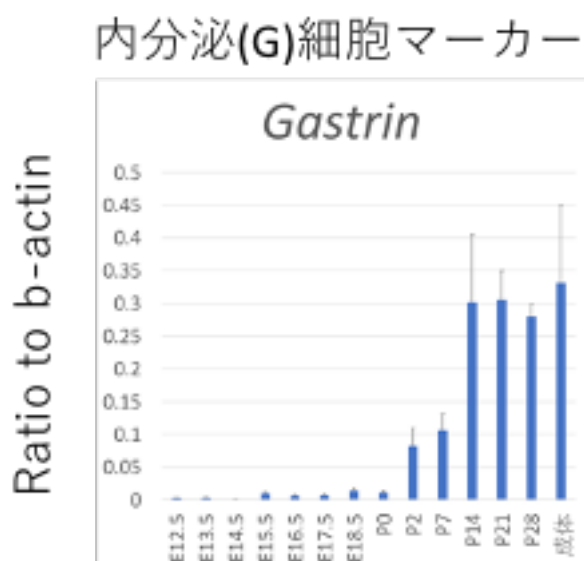
3.8.2 幽門部における GAST と Ki67 の抗体染色結果

幽門部において GAST は E13.5 から発現を開始していた。E13.5 から E14.5 で Gastrin は上皮の底部でのみ発現しているが、E15.5 から P2 では胃腺に点在して発現する。さらに P7 以降は胃腺の底部でのみ発現している様子が見られた。

3.8.3 結果のまとめ

以上の結果より、内分泌(G)細胞は E13.5 で分化を開始している可能性が示唆された。3.7 章に記載したように内分泌(D)細胞は E17.5 から分化を開始しており、G 細胞と D 細胞は分化開始時期が異なることが示された。また、Gastrin を発現する細胞は Ki67 の発現と一致していなかったことから前駆細胞ではないことが明らかとなった。

A 胃全体における発現



Gastrin有意差		
*	**	
P2-Adult	E12.5-Adult	P21-E13.5
P28-E12.5	E13.5-Adult	P14-E14.5
P28-E13.5	E14.5-Adult	P21-E14.5
P28-E15.5	E15.5-Adult	P28-E14.5
P28-E16.5	E16.5-Adult	P21-E15.5
P28-E17.5	E17.5-Adult	P14-E15.5
P28-E18.5	E18.5-Adult	P0-E16.5
P28-P0	P0-Adult	P21-E16.5
	P14-E12.5	P14-E17.5
	P21-E12.5	P21-E17.5
	P14-E13.5	P14-E18.5
	P14-P0	P21-E18.5
	P21-P0	

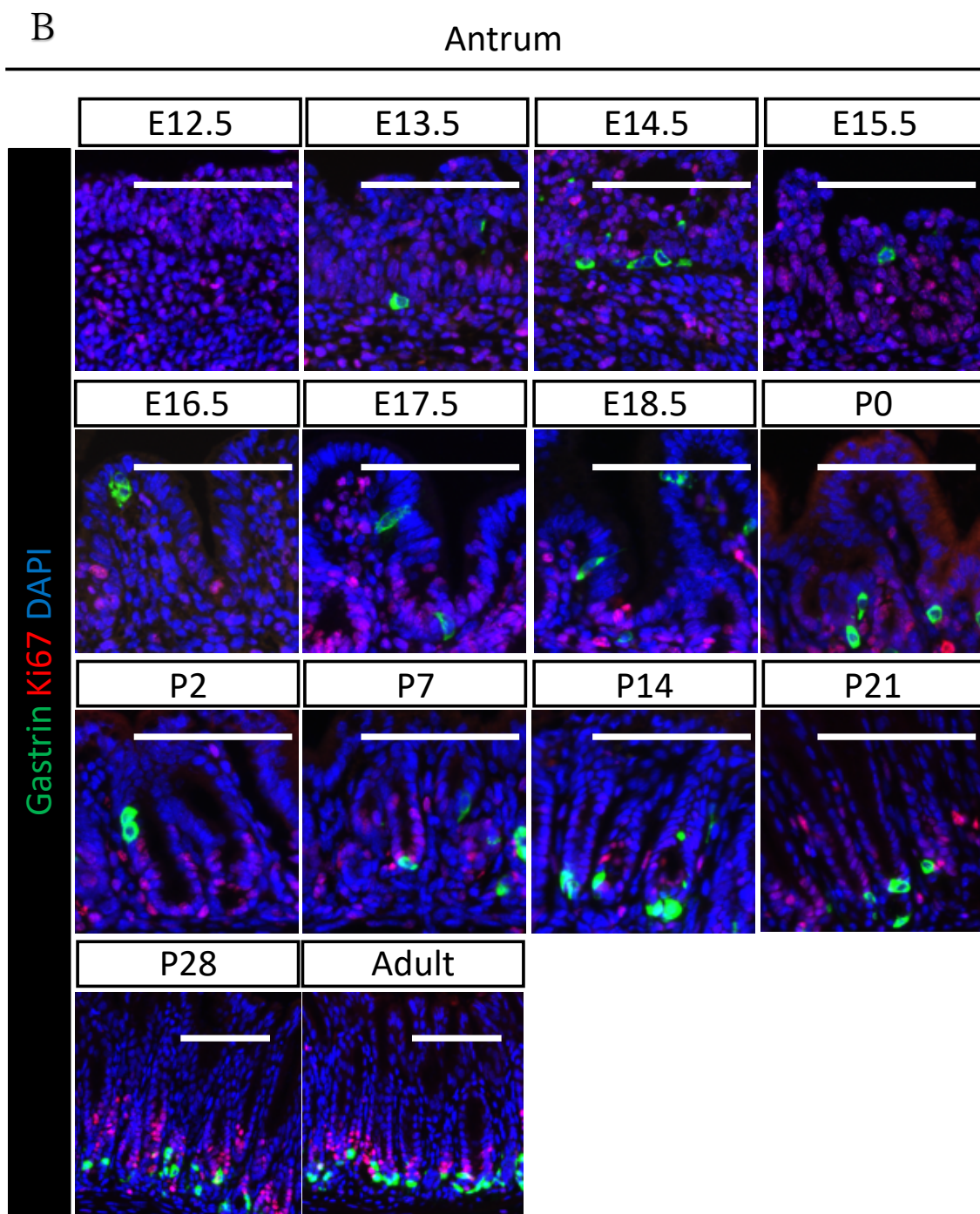
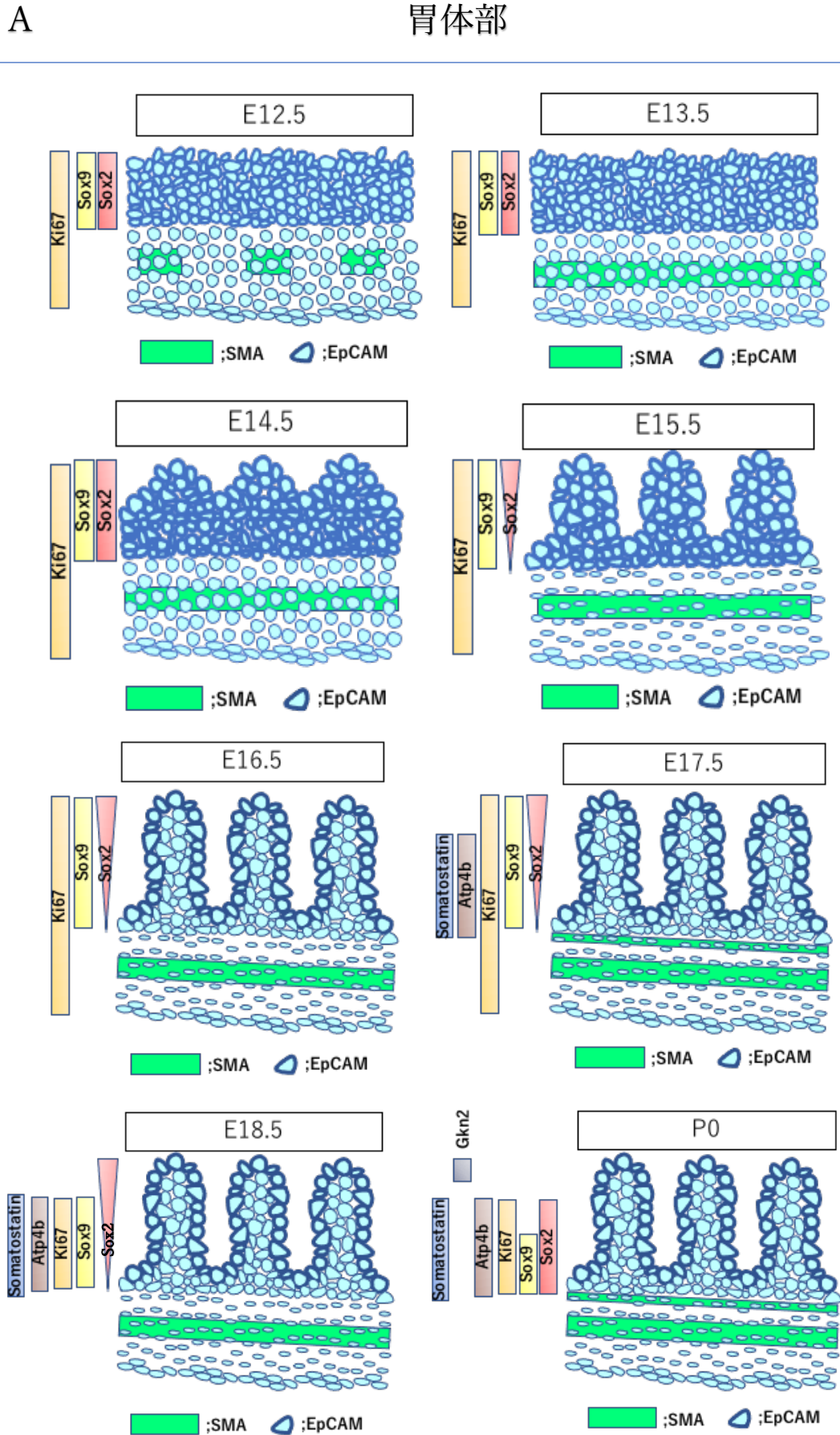
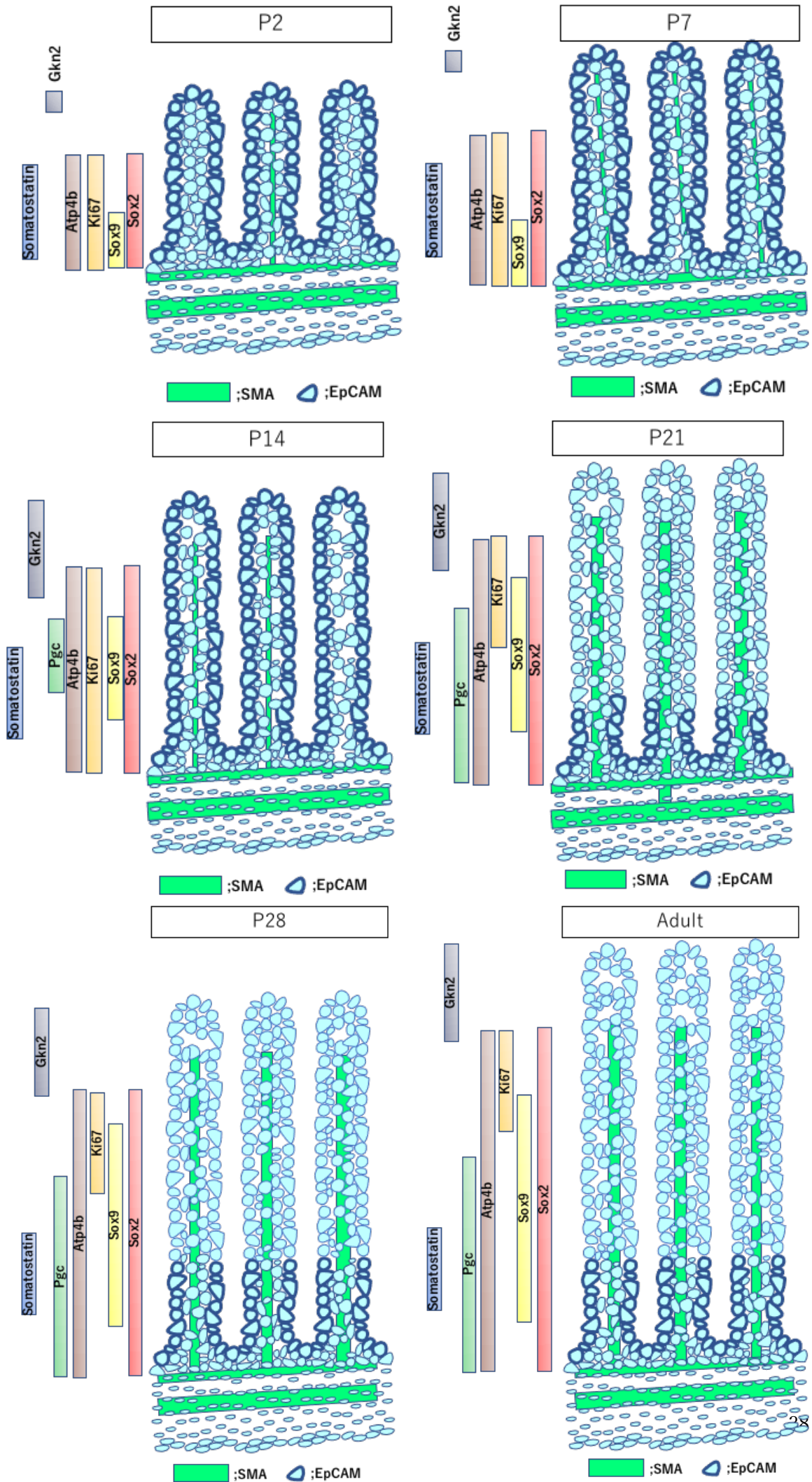


図 3.8. Gastrin と Ki67 の発現パターンの解析

- A. qRT-PCR による E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃組織全体における Gastrin と Ki67 の遺伝子発現変化 (n=3、mean±SD、*P<0.05、**P<0.01、***P=0.001)。
- B. E12.5、E13.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、P0、P2、P7、P14、P21、P28、成体の胃体部における Gastrin と Ki67 の免疫蛍光染色(スケールバー ; 100 μm)

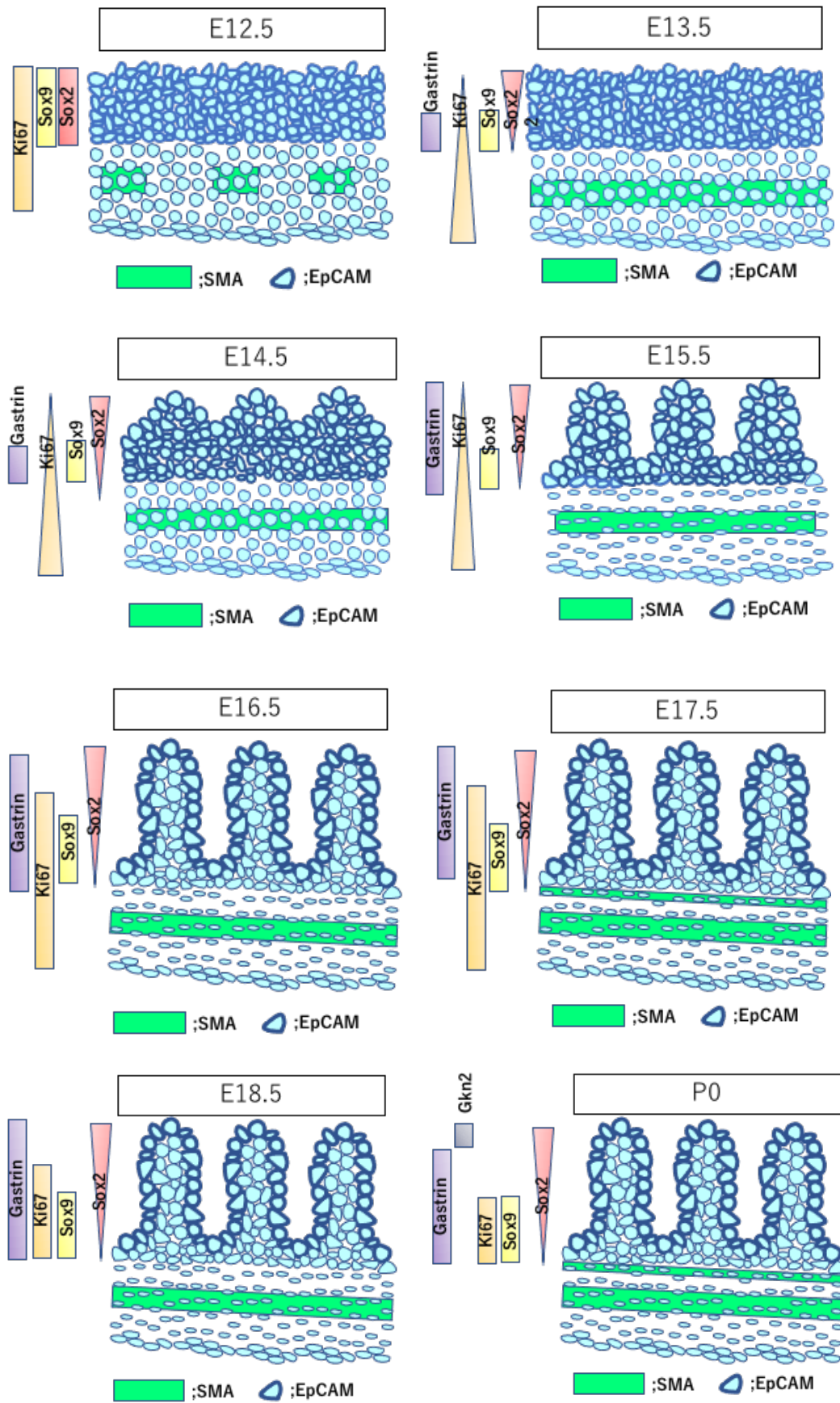
図 3.9 全体の結果のまとめ





B

幽門部



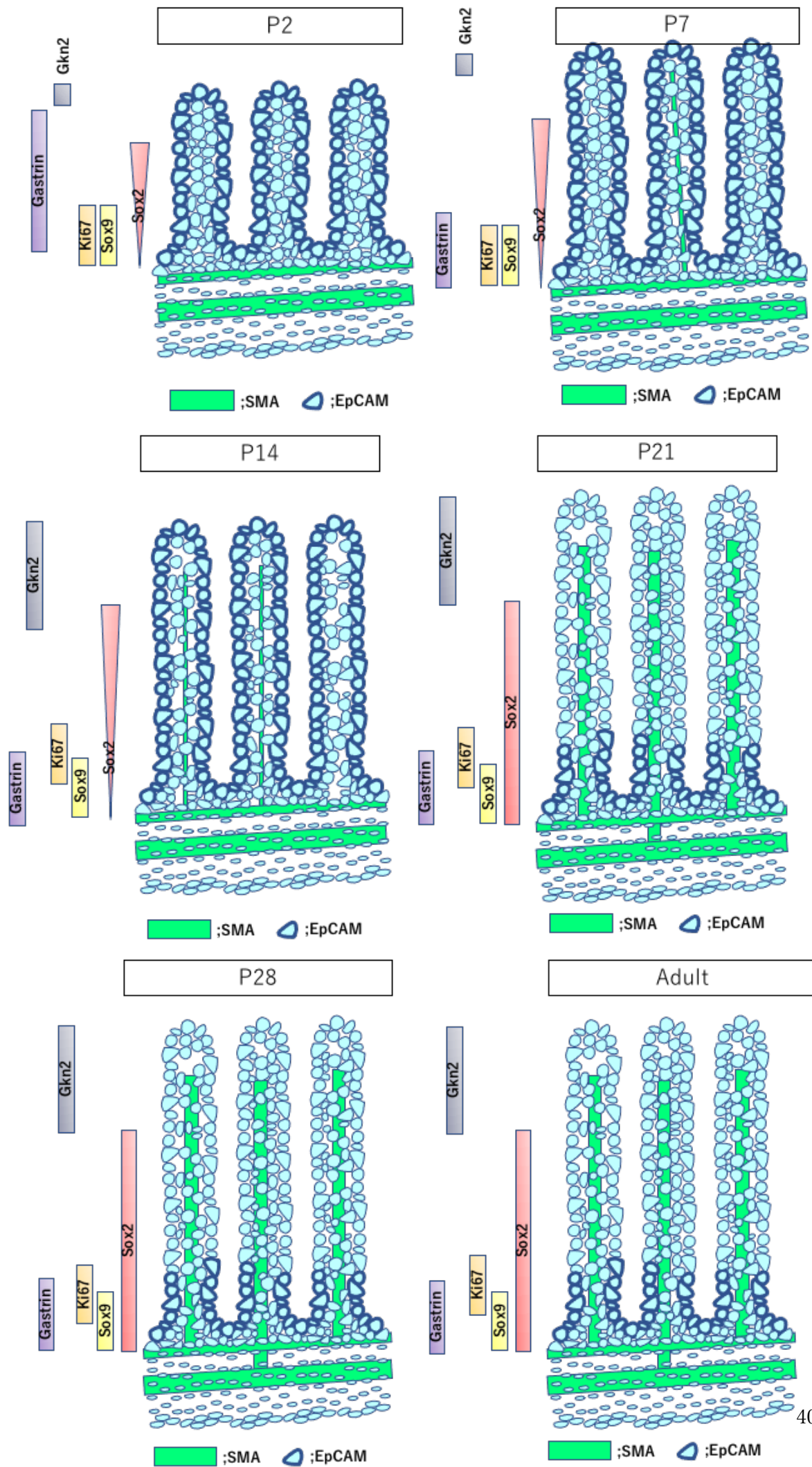


図 3.9. 結果のまとめ

A, 胃体部の成熟。E12.5 の胃体部において E12.5 から E17.5 にかけて Sox2 と Sox9、Ki67 は上皮の全体で発現し、E17.5 で壁細胞のマーカである Atp4b と内分泌(D)細胞のマーカである Somatostatin が胃腺の中央上部から底部にかけて点在していた。E18.5 では表層部から Sox2 と Sox9、Ki67 の発現が消失し、P0 で粘液分泌細胞のマーカである Gkn2 が表層部で発現を開始していた。P14 では、主細胞のマーカである Pgc の発現が胃腺の中央から開始され、Ki67 の発現は胃腺の中央上部から底部にかけて発現していたが、P21 では Ki67 は胃腺の中央上部に局限した発現が見られ、Pgc は胃腺の中央から底部にかけて発現していることが明らかとなった。このとき、機能性上皮細胞マーカは成熟した胃腺と同じ位置で発現していた。

B, 幽門部の成熟。幽門部において SOX9 は E12.5 では上皮の全体で発現するが、E13.5 になると上皮の中底部で強く発現し、表層部で発現が消失していた。E13.5 では、上皮の底部に内分泌(G)細胞のマーカである Gastrin が発現を開始し、E14.5 から E18.5 では胃腺の表層部から底部にかけて発現している様子が見られた。P0 になると表層部に粘液分泌細胞マーカである Gkn2 が発現を開始し、それと同時にガストリンは表層部においての発現が消失していた。P7 ではガストリンを発現する細胞は胃腺の底部に局限しており、Ki67 の発現もまた底部で発現していた。P14 から P21 にかけて Ki67 は胃腺の中央下部で発現している様子が見られた。このとき、機能性上皮細胞マーカは成熟した胃腺と同じ位置で発現していた。

4. 考察

4.1. 内分泌細胞の分化開始時期と、多様な上皮細胞分化における役割

成体の胃腺には、Gastrin を分泌する G 細胞、Somatostatin を分泌する D 細胞、Ghrelin を分泌する X/A 細胞、Histamine を分泌する ECL 細胞、Serotonin を分泌する EC 細胞の 5 種類の内分泌細胞が存在する。これら内分泌細胞は ASCL1 を発現する共通の前駆細胞から分化することが知られており、前駆細胞から G 細胞への分化には NKX6-3、PDX1、ARX、D 細胞への分化には PAX4 が必要である。私の解析結果から G 細胞のマーカーである Gastrin は幽門部において E13.5 から発現を開始し、D 細胞のマーカーである Somatostatin は胃体部において E17.5 から発現を開始することが明らかとなった。これらの結果は共通の前駆細胞を持つ内分泌細胞がそれぞれ異なる時期に出現することを示唆している。また、壁細胞のマーカーである ATP4B は胃体部において E17.5 から発現を開始する。成体の胃では、G 細胞から分泌される Gastrin によって、壁細胞からの SHH や HB-EGF などの細胞増殖・分化因子の分泌が促進されることが知られている。これらの結果から、E17.5 から発現開始する Gastrin が、壁細胞から分泌される細胞増殖・分化因子の分泌を促進し、胃腺におけるその他の上皮細胞への分化に関与している可能性が考えられる。過去の文献から、Gastrin ノックアウトマウスの成体胃組織において、壁細胞と ECL 細胞の細胞数が減少し、副細胞の数が増加することが報告されているが、成熟過程における変化については解析されていない。今後、Gastrin ノックアウトマウスを用いて胃腺の成熟過程を解析することで、壁細胞、内分泌細胞などの機能性上皮細胞が出現時期に変化がおこるかどうかが確かめる必要がある。

4.2. 発生後期過程における上皮細胞の分化

私の抗体染色の解析結果から、E12.5 から E18.5 までの発生後期過程における SOX9 と SOX2 の発現はダイナミックに変化することが明らかとなった。幽門部では、E12.5 で SOX9 と SOX2 はともに胃の上皮全体で発現していたが、E13.5 で上皮の表層部における SOX9 の発現は消失し、SOX2 を強く発現する表層部と SOX9 を強く発現する底部の 2 層にわかれていた(図 3.2)。胃腺構造が形成され始めた E14.5 以降は、引き続き SOX9 は胃腺の中央から底部に局限した発現

を示し、SOX2 は胃腺の中央から表層部に発現していた。一方胃体部では、E12.5 から E17.5 にかけて SOX9 は上皮全体で発現し、SOX2 は表層部でやや強く発現している様子が見られたが、E18.5 になると胃体部の表層部における SOX9 の発現が消失し、SOX2 を発現する表層部と SOX9 を発現する底部の 2 層構造が明確になった。また、Ki67 と SOX9 の共染色結果から、Ki67 と SOX9 の発現は相似することが示された(図 3.3)。このことから、発生後期過程において SOX2 陽性細胞は分化を開始しており、SOX9 陽性細胞は未分化な分裂細胞であることが示唆された。また、幽門部では E13.5 から、胃体部では E18.5 からこのような 2 層構造が明確になることから、幽門部と胃体部では分化を開始する時期に違いがある可能性が示唆された。さらに SOX9 の発現が消失した位置には、胃体部・幽門部において P0 で粘液分泌細胞マーカーである GKN2 が発現していた。以上のことから表層部で SOX2 を発現していた細胞は、粘液分泌細胞の前駆体へと分化していた可能性が示唆された。また、胃体部では SOX9 を発現する領域から ATP4B を発現する壁細胞が分化を開始しており、SOX9 は分裂促進だけでなく、細胞分化を制御する可能性もある。今後、発生後期の胃における SOX9 の役割を明らかにするためには、胃組織特異的な SOX9 ノックアウトマウスを作製したり、SOX9 を発現する細胞がどのように分化するのか追跡する必要がある。

過去の文献から、発生後期の肺上皮細胞において SOX9 をノックアウトすると細胞の分裂抑制や細胞移動の異常を示すことが明らかとなっている。また、SOX9 の過剰発現は分裂抑制や扁平上皮への分化を阻害することが知られている【26】。一方、発生後期の小腸では、SOX9 が分裂細胞に発現することが知られている。小腸では SOX9 発現細胞が WNT シグナルで制御されているが、肺では WNT シグナルの制御を受けないことが示されており、胃の SOX9 発現細胞がどのようなシグナルの制御を受けるかについてはさらに解析する必要がある。

4.3. 胃の機能性上皮細胞の分化

発生後期から成体までの胃組織のプロテオーム解析を行った過去の文献から、E12.5 から E16.5 はスプライソソーム、RNA 輸送、DNA 複製、細胞周期、ピリミジン代謝などの経路に豊富なタンパク質が多く発現していることから細胞分裂が盛んな期間であり、E17.5 から 2 週齢にかけて胃のサイズと質量が増加する期間である可能性が示唆されている。また、3 週齢から成体にかけて胃が代謝機能を獲得している可能性が示唆されている【27】。このように、胃組織成熟過程における、おおまかなタンパク質発現変化の解析は行われていたが、胃組織切

片を用いて、いつ・どの領域から機能性上皮細胞の分化が開始するのか、その詳細な解析はなされていなかった。私の抗体染色の解析結果から、E13.5 で内分泌(G)細胞のマーカである Gastrin が発現を開始し、E17.5 で壁細胞マーカである ATP4B と内分泌(D)細胞マーカである Somatostatin が発現を開始し、P0 で表層粘液細胞マーカである GKN2 が発現を開始し、P14 で主細胞マーカである PGC の発現が開始することが示された。これらの結果から、機能性細胞の分化開始時期は、種類ごとに大きく異なることが示された。P14 から主細胞が分化を開始し、P21 で主細胞、表層粘液細胞、壁細胞の数が大きく増加することから、離乳の段階で食物を受け入れる準備として胃腺を構成する機能性上皮細胞への分化が一気に促進される可能性が示唆された。近年、成体の表層粘液細胞において発現する SIDT1 を介して胃で食物由来のマイクロ RNA が吸収されることが示されている【28】。摂取した食物が胃の細胞分化を制御するかどうか興味深い点である。

4.4. 謝辞

本研究の執筆にあたり、多くの方々にご支援をいただきました。中間審査では、栗崎晃教授、別所康全教授、高田仁美助教、印東厚助教より貴重なご指導とご助言を賜りました。感謝申し上げます。

主 指導教員である栗崎晃教授には、研究の着想から、調査、修士論文の執筆まで多くのご指導をいただきました。深く御礼申し上げます。

また、研究を円滑に進める上で、1つ1つの実験に対する的確な助言と、丁寧なご指導をいただきました高田仁美助教に深く御礼申し上げます。

最後に、幹細胞工学研究室の皆さまには多くのご支援をいただきました。感謝申し上げます。ありがとうございました。

6. 参考文献

1. Jason, C. M. & Ramesh, A. S. Gastric epithelial stem cells. *Gastroenterology* 140, 412-24(2011)
2. Tamura, S. & Fujita, H. Fine Structural Aspects on the Renewal and Development of Surface Mucous Cells and Glandular Cells of the Gastric Body of the Adult Golden Hamster. *Arch Histol Jap* 46, 501–521 (1983).
3. Sherif, M. K., Timothy S., Wail, M. H. & Charles, P. L. Defining Epithelial Cell Progenitors in the Human Oxyntic Mucosa. *stem cells* 21, 322-336 (2003)
4. Matthew, B. & Hazel, C. Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, 767– 777 (2002).
5. Andrew, J. B. et al. The gastric epithelial progenitor cell niche and differentiation of the zymogenic (chief) cell lineage. *Dev. Biol* 325, 211–224 (2009)
6. Elise, S. D. et al. Notch signaling regulates gastric antral LGR5 stem cell function. *EMBO J* 34, 2522-2536(2015)
7. Sachs, G. et al. A nonelectrogenic H⁺ pump in plasma membranes of hog stomach. *J Biol Chem* 251, 7690–7698 (1976).
8. Castro, L. F. et al. Recurrent gene loss correlates with the evolution of stomach phenotypes in gnathostome history. *Proc Biol Sci* 281, 20132669 (2014).
9. Spicer, Z. et al. Stomachs of mice lacking the gastric H, K - ATPase alpha - subunit have achlorhydria, abnormal parietal cells, and ciliated metaplasia. *J Biol Chem* 275, 21555–21565 (2000).
10. Edith, L. et al. Luminescent immunoprecipitation system (LIPS) for detection of autoantibodies against ATP4A and ATP4B subunits of gastric proton pump H⁺, K⁺ - ATPase in atrophic body gastritis patients. *Clin Transl Gastroenterol* 8, e215 (2017).
11. Kageyama, T. & Takahashi, K. Pepsinogens and pepsins from gastric mucosa of japanese monkey purification and characterization. *J Biochem* 79, 455–468 (1976).
12. Amy, C. E., Izumi Kaji, & James R. G. The Physiology of the Gastric Parietal Cell. *Physiol Rev* 100, 573–602(2020).
13. Grainger, S., Savory, J. G. & Lohnes, D. Cdx2 regulates patterning of the intestinal epithelium. *Dev Biol* 339, 155–165 (2010).

14. Kim, T. H. & Shivdasani, R. A. Stomach development, stem cells and disease. *Development* 143, 554–565 (2016).
15. Takada, S. et al. Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev.* 8, 174-189(1994).
16. Junhui, Y. CDX2 inhibits the proliferation and tumor formation of colon cancer cells by suppressing Wnt / β -catenin signaling via transactivation of GSK-3 β and Axin2 expression. *Cell Death Dis* 10, 26(2019).
17. R, Scott. Heller. et al. Expression patterns of Wnts, Frizzleds, sFRPs, and misexpression in transgenic mice suggesting a role for Wnts in pancreas and foregut pattern formation. *Dev Dyn* 225, 260-270(2002).
18. Jacobsen, C. M. et al. GATA-4:FOG interactions regulate gastric epithelial development in the mouse. *Dev Dyn.* 234, 355–362 (2005).
19. Rodriguez, P. et al. BMP signaling in the development of the mouse esophagus and forestomach. *Development* 137, 4171–4176 (2010).
20. Kyle W. M. et al. Wnt / β -catenin promotes gastric fundus specification in mice and humans, *Nature* 541, 182-187(2017)
21. Ann, D. et al. GATA4 regulates epithelial morphogenesis in the developing mouse stomach to promote establishment of a glandular columnar epithelium(2020).
22. Aaron, M. & James, M. W. Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu Rev Cell Dev Bio* 25, 221–251(2009).
23. Katherine, D. W. Hedgehog-responsive mesenchymal clusters direct patterning and emergence of intestinal villi. *PNAS* 109, 15817-15822(2012).
24. Taeko, K. N. & Noah, F. S. Notch in the intestine: regulation of homeostasis and pathogenesis. *Annu Rev Physiol* 75, 263-288(2013).
25. James, H. et al. The transcriptional repressor Blimp1 / Prdm1 regulates postnatal reprogramming of intestinal enterocytes. *Proc Natl Acad Sci* 108, 10585-10590(2011).
26. Briana E. R. et al. Sox9 plays multiple roles in the lung epithelium during branching morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 4456-4464(2013).
27. Xianju, L. et al. A time-resolved multi-omic atlas of the developing mouse stomach. *Nature Communication* 4910(2018)
28. Qun, C. et al. SIDT1-dependent absorption in the stomach mediates host uptake of dietary and orally administered microRNAs. *Cell Research* 31, 247-258(2021).