

氏名(本籍) 龍田 健(兵庫県)

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 博士第492号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与年月日 平成17年3月25日

学位論文題目 Expression of Cdx2 in early GRCL of Barrett's esophagus induced in rats by duodenal reflux

(ラット十二指腸液逆流モデルに発生するバレット食道発生初期のGRCL(腸管再生細胞系)におけるCdx2発現)

審査委員 主査教授 岡部 英俊

副査教授 佐藤 浩

副査教授 柏木 厚典

## 論文内容要旨

*整理番号	496	(ふりがな) 氏名	たつた たけし 龍田 健
学位論文題目	Expression of Cdx2 in early GRCL of Barrett's esophagus induced in rats by duodenal reflux (ラット十二指腸液逆流モデルに発生するバレット食道発生初期の GRCL (腸管再生細胞系) における Cdx2 発現)		
<p>【目的】</p> <p>Barrett 食道の発生には、十二指腸液を含む胃液の逆流が重要であると報告されている。我々は、ラットを用いて、胃の生理機能を温存し、胃酸と十二指腸液の両方を食道へ逆流させるモデルを開発した。最近、このモデルに、Barrett 食道の Specialized columnar epithelium(SCE)やそれに続く食道腺癌が発生すること、また、この実験的 Barrett 上皮発生の最も初期の変化は、重層扁平上皮基底層における幽門腺型細胞の出現と、それに続く胃腺窩上皮型細胞の出現であり、さらに続いて腸型形質をもつ杯細胞が出現してくることを報告してきた。この一連の形態的变化は、他の消化管の修復過程においても認められる。つまり、持続的な慢性炎症などにより粘膜上皮が障害されると修復機構が働き、まず、幽門腺様腺管が出現し、それと同時期か、もしくは続いて腺窩上皮型細胞が形成される(幽門腺—腺窩上皮化生)。続いて腸型形質をもつ杯細胞が出現してくるのである。これは、全消化管共通の修復過程で、この過程で出現してくる細胞群を gut regenerative cell lineage(GRCL)として提唱してきた。今回、GRCL 進展の分子的なメカニズムを探るために、腸特異的ホメオボックス転写因子 Cdx2 に注目した。ラット十二指腸液逆流モデルの食道粘膜における Cdx2 の発現と粘液形質を調べ、Barrett 食道発生初期にみられる GRCL における Cdx2 の役割を検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>8週齢の Wistar 系ラットを用い、ジエチルエーテル吸入麻酔下に開腹し、胃食道接合部を 1.5 センチ縦切開し、挙上した空腸と側々吻合し、胃液と十二指腸液の両方が食道へ逆流する手術を行った。術後、10 週ごとに 50 週まで定期的に犠牲死させ、食道を摘出、パラフィン標本を作成した。HE 染色及び胃腺窩上皮型粘液である Galactose oxidase-Schiff(GOS)、幽門腺型粘液である ConcanavalinA(ConA)、腸杯細胞型粘液の High-iron diamine-alcian blue(HID-AB)の粘液染色を行った。Cdx2 の免疫染色は anti-Cdx2 monoclonal antibody(CDX2-88,BioGenex,USA)を用い、</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

streptavidin-biotin-peroxidase(SAB)法にて行った。また、手術後 20 週のラットから食道を摘出し、凍結切片を作成。Laser capture microdissection を用いて Barrett 食道の SCE、隣接する扁平上皮を分離し、total RNA を抽出後、RT-PCR を行った。

#### 【結果】

術後 10 週より食道粘膜に炎症がみられ、20 週目より Barrett 食道の SCE が観察された。40 週になると 75%(6/8)に SCE の発生がみられ、術後 50 週になると 37%(3/8)に腺癌が観察された。Cdx 2 の RT-PCR では、胃、食道扁平上皮、SCE 近傍の炎症のある扁平上皮で発現を認めず、SCE で発現を認めた。Cdx2 の免疫染色では、SCE, dysplasia, 腺癌の核が陽性となった。Barrett 食道発生初期病変での検討で、扁平上皮基底層に出現した円柱上皮に、幽門腺型粘液 ConA 陽性細胞、胃腺窩上皮型粘液 GOS 陽性細胞を認め、この GOS 陽性細胞の一部に Cdx2 陽性細胞を認めた。また、ConA 陽性細胞のなかには腸杯細胞の形態を認めないが、HID-AB が一部わずかに陽性の細胞があり、この細胞は Cdx2 が陽性であった。

#### 【考察】

Barrett 上皮の発生については、大きく分けて 2 つの説がある。一つは食道一胃接合部の腺管、小腸吻合部の腺管、もしくは食道腺が延長し、重層扁平上皮が円柱上皮に置き換わるという creeping 説。もう一つは食道重層扁平上皮の幹細胞が円柱上皮に変わるとする化生性説である。今回の実験では、Barrett 上皮が常に連続しているわけではなく散在性にみられたこと、食道中部にまでみられたこと、ラットに食道腺が存在しないことなどから、creeping 説は否定的で、化生性説が強く示唆された。Cdx2 は腸の発生、分化、腸型形質の維持に重要であると報告されている。今回の実験では、Barrett 上皮発生初期にみられる幽門腺型細胞、胃腺窩上皮型細胞に、腸杯細胞の形態を示す以前に Cdx2 が発現していた。このことは、食道扁平上皮基底層に発生した幽門腺一腺窩上皮化生細胞が、すでに腸へ分化するポテンシャルを持っており、これらの細胞に胃型、腸型への 2 方向の分化発現が起こっていると言える。この不安定な分化発現が癌化につながっていると考えられる。幽門腺一腺窩上皮化生とそれに続く腸杯細胞の出現は、全消化管にみられる修復過程で、GRCL として提唱しており、GRCL を介する癌化の経路が存在することが示唆された。

#### 【結論】

Cdx2 は、Barrett 上皮の SCE だけでなく、幽門腺一腺窩上皮化生にも認められた。Cdx2 は SCE への分化の早期に働き、腸型への分化に関与していると考えられた。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	496	氏名	龍田 健
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>慢性炎症により消化管粘膜が障害されると修復機構が働き、まず幽門腺様腺管、腺窩上皮型細胞が形成され、続いて腸型の杯細胞が出現する。この一連の変化は、全消化管共通の修復過程で、この過程で出現してくる細胞群を gut regenerative cell lineage (GRCL) と提唱している。本研究では、ラット十二指腸液逆流モデルを用い、食道粘膜における Cdx2 の発現と粘液形質を調べ、Barrett 食道の SCE 発生初期にみられる GRCL における Cdx2 の役割を検討した。結果、重層扁平上皮基底層に出現した円柱上皮に、幽門腺型粘液 ConA 陽性細胞、胃腺窩上皮型粘液 GOS 陽性細胞を認め、その一部は腸杯細胞の形態を示す以前に Cdx2 が発現していた。以上より、Barrett 食道が GRCL を介して発生し、Cdx2 が腸型への化生性変化に重要であると考えられた。</p> <p>本研究は、Barrett 食道の SCE の発生に Cdx2 が重要な働きをしていることを指摘したもので、博士 (医学) の学位を授与するに値すると評価された。</p>			
(平成 17 年 2 月 8 日)			