



TITLE:

An analysis of intestinal morphology and incretin-producing cells using tissue optical clearing and 3-D imaging(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Hatoko, Tomonobu

CITATION:

Hatoko, Tomonobu. An analysis of intestinal morphology and incretin-producing cells using tissue optical clearing and 3-D imaging. 京都大学, 2023, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2023-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k24517>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏名	波床 朋信
論文題目	An analysis of intestinal morphology and incretin-producing cells using tissue optical clearing and 3-D imaging (組織透明化と3次元イメージングを用いた腸管形態およびインクレチン産生細胞の解析)		
(論文内容の要旨) 【背景と目的】 腸管は栄養素の消化、吸収に加えて消化管ホルモンを介した代謝制御に関連する。glucagon-like peptide-1 (GLP-1) と glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) はインスリン分泌を促進する消化管ホルモン (インクレチン) であり、各々腸管内分泌 L 細胞と K 細胞から分泌される。腸管の評価に広く使用される組織学的解析では腸管の絨毛、陰窩の立体構造や正確な腸管構成細胞の数や局在の評価は困難である。CUBIC 法は組織を透明化して臓器を3次元で評価できる方法で、腸管解析への応用が可能と考えられる。本研究では、CUBIC 法を用いて腸管上皮 (IE) 細胞およびインクレチン産生細胞可視化マウス腸管の組織透明化を行い、腸管形態と IE 細胞、L・K 細胞を評価した。 【方法】 IE 細胞を tdTomato で標識した villin1-tdTomato マウスを作製し、管腔構造と IE 細胞の評価に用いた。小腸を均等な腸管間隔で5部位 (口側から S1-S5) 採取し、大腸を同様に3部位 (口側から C1-C3) 採取した。小腸5部位と大腸3部位の組織透明化を行い、DAPI での核染色を行った。得られた3次元腸管画像を自動解析し、各部位での絨毛・陰窩構造と IE 細胞数を評価した。また、リポポリサッカライド (LPS) 投与下のマウス絨毛・陰窩構造を組織学的解析 (2次元) と組織透明化解析 (3次元) で評価した。加えて、villin1-tdTomato マウスとインクレチン産生細胞の可視化マウスである GIP-GFP knock-in (KI) マウスまたは glucagon-GFP KI マウスを交配したマウスの腸管を用いて、L・K 細胞数と局在を評価した。 【結果】 tdTomato は絨毛、陰窩の腸管上皮のみで発現した。絨毛長は S1 で最長で、下部小腸に向けて短縮し S5 で最短であった。上部小腸の絨毛水平断面は紡錘形を呈し、下部小腸に向けて徐々に円形を呈した。絨毛水平断面の長軸長は S1 で最大で S2 で半減し、S5 で最小であったが、短軸長は有意差を認めなかった。小腸1絨毛あたりの IE 細胞数 (IE 細胞数/絨毛) は S1 で最大で S2 で半減し、S5 で最小であった。IE 細胞数と絨毛長、絨毛長軸長・短軸長での単回帰分析では、絨毛長軸長が最も強い相関を示した。大腸陰窩長、陰窩長軸・短軸長、IE 細胞数/陰窩は大腸部位間で有意差を認めなかった。LPS 投与下の3次元での絨毛長と陰窩長の結果は2次元での結果と同様であった。加えて、3次元解析では絨毛長軸長が小腸全体で短く、短軸長は下部小腸で短くなった。また、小腸長軸・短軸長は下部小腸で長く、大腸長軸・短軸長は大腸全体で長くなった。次に、K 細胞は小腸でのみ発現した。K 細胞数/絨毛は S1 で最大で S2 で半減し、S4-S5 で減少した。一方で1絨毛内の K 細胞/IE 細胞の比率は S1-S5 で有意差を認めなかった。K 細胞は主に小腸絨毛の上部と小腸陰窩の下部に局在した。L 細胞は小腸と大腸で発現した。L 細胞数/絨毛は S1 で極端に少なく、S2-S5 で有意差を認めなかったが、絨毛での L 細胞/IE 細胞は S1 で最小で S5 ま			

で漸増し S5 で最大であった。L 細胞数/陰窩と陰窩での L 細胞/IE 細胞は S1-S5、C1-C3 で有意差を認めなかった。L 細胞は主に小腸下部で絨毛下部に、小腸上部で陰窩上部に、大腸で陰窩下部に局在した。

【結語】
 組織透明化を用いた3次元腸管の解析から、腸管形態、IE 細胞、L・K 細胞の正確な個数や局在の解析が可能となった。

(論文審査の結果の要旨)
 腸管は栄養素の吸収や消化管ホルモンを介した代謝制御に関連する。GIP と GLP-1 はインスリン分泌を促進する消化管ホルモン (インクレチン) であり、各々腸管内分泌 K 細胞と L 細胞から分泌される。腸管の詳細な解析を目的に、腸管上皮 (IE) 細胞およびインクレチン産生細胞可視化マウス腸管の組織透明化を行い、3次元画像での腸管形態と IE 細胞、L・K 細胞を評価した。
 絨毛長、IE 細胞数/絨毛、絨毛断面長径は上部小腸で大きく、下部小腸で小さかった。小腸・大腸陰窩長、IE 細胞数/陰窩、絨毛断面短径、陰窩断面長径・短径に有意差はなかった。K 細胞は主に小腸の絨毛上部と陰窩下部に局在し、K 細胞数/絨毛は上部小腸で最大、下部小腸で最小であったが、K 細胞数/IE 細胞数に有意差はなかった。L 細胞は主に下部小腸で絨毛下部に、上部小腸で陰窩上部に、大腸で陰窩下部に局在した。L 細胞数/絨毛は上部小腸以外では有意差はないが、L 細胞数/IE 細胞数は上部小腸で最小、下部小腸で最大であった。L 細胞数/陰窩、L 細胞数/IE 細胞数は小腸・大腸陰窩で有意差はなかった。以上から、組織透明化法と3次元画像を用いることで、腸管構造や IE 細胞、インクレチン産生細胞の詳細な解析が可能となった。
 以上の研究は、腸管形態およびインクレチン産生細胞の局在の解明に貢献し、糖尿病学の発展に寄与するところが多い。
 したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。
 なお、本学位授与申請者は、令和5年2月22日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降