

速 報

DNA nick end labeling を用いた ヒト絨毛細胞におけるアポトーシスの検討

北海道大学医学部産婦人科

*北海道大学医学部病理学第 1 講座

櫻木 範明 石倉 浩* 晴山 仁志 武田 直毅
平島 功二 大河内俊洋 羅 明亮 津村 宣彦
牧野田 知 藤本征一郎

Apoptosis in Human Trophoblastic Cells Identified by in Situ Nick End Labeling of Fragmented DNA

Noriaki SAKURAGI, Hiroshi ISHIKURA, Hitoshi HAREYAMA,
Naoki TAKEDA, Kouji HIRAHATAKE, Toshihiro OHKOUCHI,
Min-Lian LUO, Norihiko TSUMURA, Satoru MAKINODA
and Seiichiro FUJIMOTO

*Department of Obstetrics and Gynecology, and *The First Department of Pathology,
Hokkaido University School of Medicine, Sapporo*

Key words: Apoptosis • Trophoblastic Cells • DNA nick end labeling

緒 言

アポトーシス (apoptosis, 以下 APO) は細胞死の一形態であり壊死とは基本的に異なるものである。壊死は物理的, 化学的な外的要因による細胞膜および細胞内小器官の不可逆的損傷による細胞の崩壊であるのに対して APO は細胞内にプログラムされた生理的細胞死 (programmed cell death) の過程であり, mRNA やタンパクの合成を伴う能動的細胞死である。細胞増殖の認められる臓器において細胞分裂と APO がバランスをとっていることが示されている。

胎盤を構成する絨毛細胞の増殖調節メカニズムに APO が関与していることが推察されるがいまだ絨毛細胞における APO を系統的に検討した報告はない。今回我々は DNA nick end labeling を用い正常胎盤において APO に陥った細胞の存在を検討したので報告する。

材料および方法

1. 材料

妊娠初期 (妊娠 5, 7 週) および末期 (妊娠 40, 42 週) の正常胎盤絨毛組織を材料として用いた。絨毛組織の使用にあたっては日本産科婦人科学会倫理規定に従った。

2. In situ fragmented DNA nick end labeling

DNA nick end labeling は Gavrieli et al.¹⁾の方法に基づいて行った。概要は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を脱パラフィン後 proteinase K 処理し, terminal deoxynucleotidyl transferase によって DNA 断片 3'-末端に biotin でラベルした dUTP を付加した。その後ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させ DAB にて発色させた。核染色は hematoxylin にて行った。絨毛細胞核を 5,000 個以上 (強拡大 20~30 視野) 数え 1,000 個あたりの陽性核数を算出した。

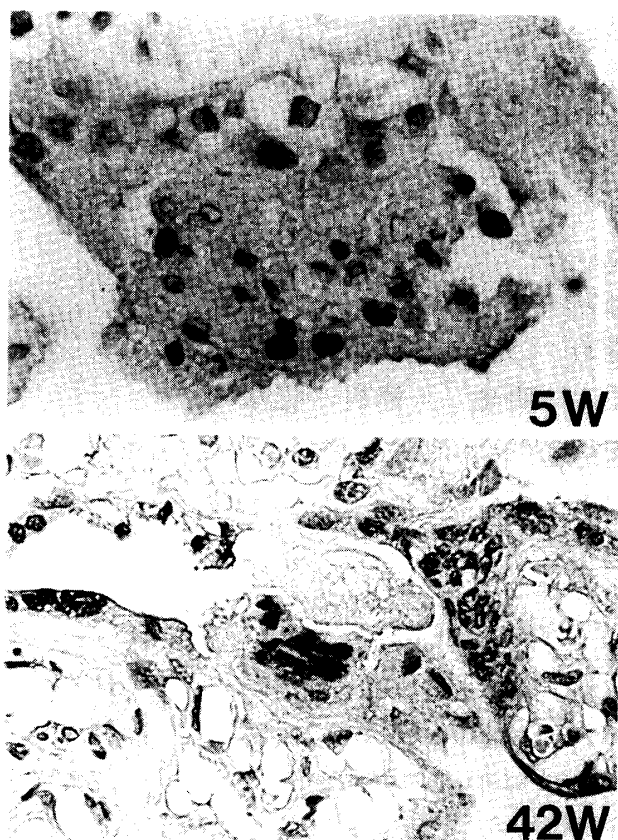


写真1 DNA nick end labeling によって認められたヒト正常妊娠5週および42週絨毛組織におけるアポトーシス細胞の核。

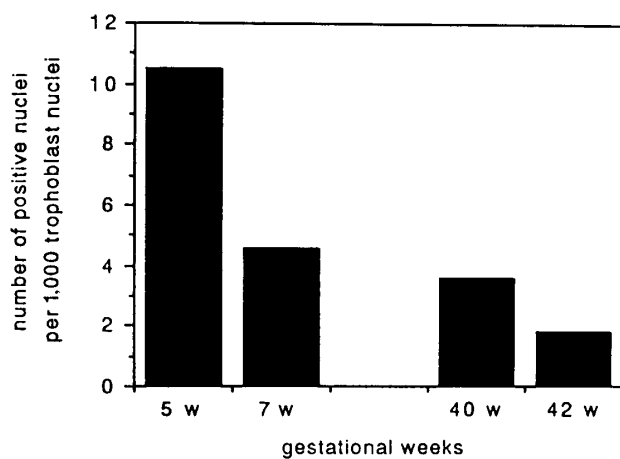


図1 ヒト正常妊娠初期および末期絨毛組織におけるアポトーシスの出現。絨毛細胞核に対するアポトーシス細胞の核の千分率で表示。

成績

APO細胞の存在

本法により確認されたAPO細胞の核（以下APO-N）はほとんどが合胞細胞（ST）に多くは集団として認められた（写真1）。ラングハンス型絨毛細胞（CT）、中間型絨毛細胞（IT）をも含んだ絨毛細胞の核数あたりのAPO-N数は妊娠5週で10.5/1,000、妊娠7週で4.6/1,000であった。妊娠40週では3.6/1,000、妊娠42週では1.8/1,000であった（図1）。

考察

APOの存在は内因性 endonuclease の活性化によるDNAの180～200塩基対の整数倍への断片化（DNA fragmentation）により確認される。これは agarose ゲル上でDNA ladderとして観察される。Gavrieli et al.¹⁾が報告したDNA nick end lablingは組織切片上でDNAの断片化を観察する方法で今後APOの研究にとって欠かせない手段となるものと考えられる。

種々の臓器の発育は細胞の増殖と細胞死との調節のうえに成り立っているものと考えられる。前者はmitosisで認められる分裂細胞や、Ki-67、PCNA染色などにより同定される分裂サイクルにある細胞により認識される。後者はAPOである。絨毛細胞においてはPCNA陽性細胞は分裂能を有しているCTに認められ、CTが分化・融合して形成されるSTは終末分化した細胞であり、もはや分裂することはない。今回観察されたAPO細胞はほとんどがSTに認められ、STがある条件下でAPOによる細胞死を迎えることが示唆された。胎盤における細胞増殖、分化とAPOとの関連は興味深い問題である。今後APOを誘導するメカニズムについて研究が進むことが期待される。

文献

1. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992; 119: 493-501

(No. 7485 平6・3・11受付)