

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	今田 慎也
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Role of Src Family Kinases in Regulation of Intestinal Epithelial Homeostasis (腸上皮組織の恒常性制御における Src ファミリーキナーゼの役割)			
論文審査担当者			
主査	教授	今泉 和則	印
審査委員	教授	浅野 知一郎	
審査委員	准教授	大上 直秀	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>最終分化した成熟細胞はそれぞれ固有の細胞寿命を持っているが、腸上皮細胞（IECs: Intestinal Epithelial Cells）、中でも吸収上皮細胞の細胞寿命は 3～5 日と非常に短い。小腸クリプト底部に存在する腸管幹細胞（ISCs: Intestinal Stem Cells）からできた前駆細胞（TA cells: Transient Amplifying cells）は、分裂を繰り返しながら吸収上皮細胞、ゴブレット細胞、パネート細胞などに分化していく。これらの分化した大部分の腸上皮細胞は絨毛先端に向かって移動し、細胞死を起こすかあるいは腸管内腔に放出されてその寿命を終える。このように腸上皮のターンオーバーは厳密に制御されているが、これらを制御する分子機構については十分に解明されていない。</p> <p>c-Src、Fyn、c-Yes などを含む Src ファミリーキナーゼ（SFKs: Src family kinases）は、非受容体型のチロシンキナーゼであり、同じくチロシンキナーゼである COOH-terminal Src kinase（Csk）によってその活性が負に制御される。SFKs は細胞の増殖や移動、および分化において重要な役割を果たすことが報告されているが、定常状態の腸上皮のターンオーバーおよび恒常性における SFKs の役割については不明確である。</p> <p>今回、著者等は Cre-loxp システムを用いて腸上皮細胞特異的 Csk 遺伝子破壊マウス（Csk CKO: Csk^{fl/fl};villin-cre）を作製し、腸上皮で SFKs を恒常的に活性化させることで、SFKs の腸上皮における役割およびその作用機構を調べた。ウエスタンブロットによる解析から Csk CKO マウスの小腸および大腸上皮では、Csk タンパクの著明な減少および SFKs の活性化を認めた。Csk CKO マウスはコントロールマウス（Csk^{fl/fl} マウス）と比較して発育異常は見られなかったが、40 週齢の Csk CKO マウスでは小腸および大腸において上皮の過形成変化を認めた。SFKs は細胞の増殖や移動に重要であることから、8 週齢マウスを用いてこれらの評価を行ったところ、Csk CKO マウスではコントロールマウスと比較してクリプトにおける細胞増殖の亢進と腸上皮細胞の絨毛先端への移動の促進、さらには腸上皮細胞のターンオーバーの亢進が見られた。一方で Csk CKO マウスでは ISCs の数が減少しており、Csk CKO マウスのクリプトで見られる細胞増殖の亢進は TA cells の</p>			

増殖と考えられた。腸上皮構成細胞の分化については、Csk CKO マウスでは小腸と大腸におけるゴブレット細胞の増加、小腸クリプトにおけるパネート細胞の減少およびその局在異常が認められた。

そこでオルガノイド培養を用いて、腸上皮における SFKs の役割についてさらなる解析を行った。小腸オルガノイド培養では、ISCs を含むクリプトを増殖因子とともに培養することでクリプトと絨毛を含む組織構造体が形成されていく。Csk CKO マウス由来のオルガノイドでは、*in vivo* の結果と同様に細胞増殖の亢進、ゴブレット細胞の増加、パネート細胞の減少、および ISCs マーカー遺伝子の発現の減少が見られた。また、培養 5 日目の Csk CKO マウス由来のオルガノイドは、コントロールマウスと比較して表面積が小さく、クリプトに相当する Budding の数が少なかった。

続いて、Csk CKO マウスの増殖、分化に関連する SFKs の下流の分子機構について解析を行った。組織免疫染色の結果から、Csk CKO マウスではコントロールマウスと比較して、小腸クリプト内腔面におけるチロシンリン酸化の亢進を認め、ウェスタンブロットの解析からも小腸上皮において分子量 50~65kDa 付近と 100~120kDa 付近のタンパク質のチロシンリン酸化の亢進が見られた。そして、チロシンリン酸化の亢進が認められた低分子量のタンパク質については SFKs である c-Src、Fyn、および c-Yes、高分子量側については FAK が含まれることが明らかとなった。さらに、c-Src による FAK の活性化は Rac などの Rho ファミリー低分子 G タンパク質を活性化することが知られているが、実際に Csk CKO マウスのクリプトではコントロールマウスと比較して Rac の活性化を認めた。そこで、オルガノイド培養を用いて Rac の活性化と Csk CKO マウスの表現型との関連性を調べた結果、Csk CKO マウス由来のオルガノイドにおける細胞増殖の亢進や分化異常、ISCs マーカー遺伝子発現の減少、およびオルガノイドの形成不良は Rac の活性化に起因することが強く示唆された。

さらに、活性化した SFKs や Rac と関連する他の分子について検討したところ、細胞増殖や分化に関連する YAP タンパクの発現が Csk CKO マウスのクリプトでは亢進しており、これに一致して YAP の標的遺伝子の 1 つである amphiregulin の遺伝子発現の増加が見られた。Csk CKO オルガノイドでもコントロールオルガノイドと比較して YAP タンパクの増加を認め、一方で Rac 活性阻害剤処理により YAP タンパクの減少が見られたことから、Csk CKO マウスでは活性化した Rac により YAP の発現が亢進していることが示唆された。また、オルガノイドを用いた解析から Csk CKO マウスにおける細胞増殖の亢進および分化異常が活性化した YAP に起因することが示唆された。

以上の結果から、本論文は定常状態の腸上皮において SFKs は Rac および YAP を介して腸上皮細胞の増殖や分化を制御し、腸上皮の恒常性に寄与することを証明した。

よって審査委員会委員全員は、本論文が今田慎也に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。