

論文内容要旨

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)

Molecular and Cellular Biology, 36(22):2811-2823,2016

主指導教員：大段 秀樹教授

(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

副指導教員：茶山 一彰教授

(応用生命科学部門 消化器・代謝内科学)

副指導教員：田邊 和照准教授

(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

今田 慎也

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】

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、細胞死あるいは腸管内腔に放出されその寿命を終える。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。

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。

【方法】

今回、私は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。

【結果】

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、ISCsの維持に必要なWntシグナルは抑制されており、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、ウエ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。さらに、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。ところで、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おり、確かに 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。

【結論】

以上の結果から、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が見出された。