

Title	Roles of Dlg5, a Crohn's disease associated protein, as a regulator of TGF- signals and epithelial-to-mesenchymal transition(Abstract_要旨)
Author(s)	Sezaki, Takuhito
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2012-11-26
URL	http://hdl.handle.net/2433/165040
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	瀬崎 拓人
論文題目	Roles of Dlg5, a Crohn's disease associated protein, as a regulator of TGF- β signals and epithelial-to-mesenchymal transition (クローン病関連因子Dlg5によるTGF- β シグナル経路と上皮間葉転換の調節)		
(論文内容の要旨)			
<p>炎症性腸疾患の一つであるクローン病は、口腔から大腸に至る消化管で慢性的な炎症を起こす病気である。この炎症のために下痢や腹痛、それに伴う体重減少などの症状が現れる。現在までクローン病の発症メカニズムは分かっておらず、根治するための治療法も確立されていない。そのため、食事制限や抗炎症薬を用いた対処療法によって炎症を抑えることしかできない。また、一度クローン病を発症すると炎症が抑えられたとしても、繰り返し再発することから、新しい治療法や予防法の開発が期待されている。クローン病の原因は食生活の問題や、不規則な生活習慣などの環境的な要因と、遺伝的な要因が考えられている。近年、網羅的なゲノム解析が行われ、多くのクローン病関連遺伝子が同定されている。クローン病関連遺伝子の多くは炎症と関連するものであるが、中には炎症との関連が示されていない遺伝子も含まれており、その一つが、上皮細胞の細胞-細胞間接着領域に局在するタンパク質Dlg5である。</p> <p>Dlg5はmembrane associated guanylate kinase (MAGUK) ファミリータンパク質に属するアダプター型のタンパク質である。Dlg5は、細胞-細胞間接着装置の一部として働いていると考えられているが、その生理機能についてはほとんど分かっていない。Dlg5の機能を明らかにすることは、クローン病の発症メカニズムの解明や新たな治療法の開発に繋がると考え、本研究ではDlg5の生理機能についての解析を行った。本論文の主な内容は以下のとおりである。</p> <p>Dlg5と同じくMAGUKファミリータンパク質に属するDlg1やZO1は、上皮細胞が間葉細胞へと形質転換する現象である“上皮間葉転換”の調節に関わっていることが報告されている。そこでDlg5も同様に上皮間葉転換の調節に関わる可能性が考えられた。</p> <p>第1章では、Dlg5と上皮間葉転換についての解析を行った。Dlg5を高発現しているブタ近位尿細管由来の上皮細胞であるLLc-PK1細胞を、上皮間葉転換を誘導するサイトカインであるTGF-β (transforming growth factor-β)で処理したところ、細胞の形態が伸長し、間葉細胞様の形態へと変化した。また、上皮細胞マーカーであるE-カドヘリンの発現量が減少し、間葉細胞マーカーであるフィブロネクチンとα平滑筋アクチンの発現量が増加し、上皮間葉転換が誘導された。このとき、Dlg5の発現が低下していることがわかった。逆に、LLc-PK1細胞におけるDlg5の発現をRNA干渉法によって抑制すると、TGF-β刺激をした場合と同様に細胞の形態が間葉細胞様に変化するとともに、E-カドヘリンの発現減少とフィブロネクチン、α平滑筋アクチンの発現増加が見られた。このことからDlg5の発現抑制によって上皮間葉転換が誘導されることが明らかになった。</p>			

次に、Dlg5が関わる上皮間葉転換を調節するシグナル経路について検討した。その結果、Dlg5の発現抑制が、TGF- β 受容体の下流で働くJNK(c-Jun N-terminal kinase)とp38(p38 mitogen-activated protein kinase)を活性化することを見いだした。さらに、TGF- β 受容体の活性を抑制すると、Dlg5の発現抑制によって誘導されるフィブロネクチンと α 平滑筋アクチンの発現増加が大きく低下することを見いだした。これらの結果は、Dlg5がTGF- β 受容体に依存したシグナル経路を抑制することで、上皮間葉転換を抑えることを示している。

第2章では、Dlg5がTGF- β 受容体依存シグナル経路を抑制するメカニズムを解析した。TGF- β シグナルの主要な抑制メカニズムとして、Smad7による調節が知られている。Smad7は、ホモ2量体のI型受容体 (T β RI) とホモ2量体のII型受容体 (T β RII) からなるヘテロ4量体のTGF- β 受容体と結合し、TGF- β 受容体の分解を促進することでTGF- β シグナルを抑制する。そこで、Dlg5がSmad7と同様のメカニズムでTGF- β シグナルを抑制する可能性があると考え、Dlg5とTGF- β 受容体との結合と分解について検討した。293T細胞を用いたDlg5とT β RIおよびT β RIIの共免疫沈降実験の結果から、Dlg5とT β RIまたはT β RIIが結合しうることがわかった。また、免疫染色による解析は、Dlg5とT β RIが293T細胞の細胞膜上で共局在することを示した。これらの結果から、Dlg5とTGF- β 受容体は複合体を形成することを明らかにした。Smad7とTGF- β 受容体との結合は、T β RIの活性化によって調節される。しかし、Dlg5はT β RIの活性に非依存的にT β RIと結合した。次にT β RIの分解に与えるDlg5の効果について検討した。その結果、Dlg5を細胞に強制発現させると、T β RIの分解が促進されることがわかった。Dlg5の強制発現によるT β RIの分解はプロテアソームとリソソームの両方の経路に依存していた。以上のことから、Dlg5はTGF- β 受容体と複合体を形成し、TGF- β 受容体の分解を促進することで、TGF- β シグナルを抑制すると考えられる。

本研究では、Dlg5がTGF- β 受容体と複合体を形成しTGF- β 受容体の分解を促進することを初めて明らかにした。また、Dlg5はTGF- β シグナルを抑制することで上皮間葉転換を抑えることを示した。TGF- β シグナルは炎症の制御と直接関わっており、これまでにTGF- β シグナルの異常がクローン病の発症のしやすさと関連があることが報告されている。また、クローン病患者では腸管でのバリア機能が低下していることも報告されている。本研究での発見を合わせて考えると、Dlg5の機能異常がクローン病の発症を引き起こすメカニズムとして、1) TGF- β シグナルの異常が炎症を直接引き起こす機構と、2) 上皮間葉転換の誘導によって腸管上皮細胞の細胞-細胞間接着が弱くなり、バクテリアなどの抗原が体内に侵入しやすくなり炎症を起こす機構の2つの可能性が考えられる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

炎症性腸疾患の一つであるクローン病は、これまで発症のメカニズムなど詳しいことがわかっておらず、根治するための治療法も存在しない。細胞-細胞間接着領域に局在するDlg5は、クローン病の発症との関連が示唆されるタンパク質の一つであるが、その生理機能はほとんど解明されていない。Dlg5の生理機能を明らかにすることは、クローン病の発症メカニズムの解明や新たな治療法の開発に繋がると期待される。本論文はDlg5の生理機能について解析したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. Dlg5が、上皮細胞から間葉細胞へと形質転換する現象である上皮間葉転換を抑制することを明らかにした。
2. Dlg5による上皮間葉転換の抑制には、MAPキナーゼであるp38 (p38 mitogen-activated protein) とJNK (c-JNK N-terminal kinase) の活性化の抑制が関与していることを明らかにした。
3. Dlg5による上皮間葉転換の抑制は、TGF- β 受容体に依存したシグナルであることを明らかにした。
4. Dlg5はTGF- β 受容体と結合することを明らかにした。
5. Dlg5はプロテアソームとリソソームに依存したTGF- β 受容体の分解を促進することを明らかにした。

以上のとおり、本論文はクローン病の発症との関連が示唆されるタンパク質であるDlg5の新たな生理機能を明らかにしたものであり、分子細胞生物学、細胞生化学、基礎生理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成24年9月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降