京都大学	博士（医学）	氏名	山本修司
論文題目	<p>Heparan sulfate on intestinal epithelial cells plays a critical role in intestinal crypt homeostasis via Wnt/β-catenin signaling (腸管上皮表面のヘパラン硫酸は Wnt/β カテニン経路を介して腸陰窩の恒常性維持に重要な役割を果たす)</p>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>ヘパラン硫酸 (Heparan sulfate, 以下 HS) はグルクロン酸またはイズロン酸とグルコサミンで構成される二糖単位が数十回繰り返した直鎖状の糖鎖である。生体内ではコア蛋白と結合し、HS プロテオグリカン (HS proteoglycan, 以下 HSPG) として存在することが多く、ほとんどすべての細胞の表面に存在する。HSPG は様々なサイトカイン、ケモカイン、細胞増殖因子などと結合し、これら分子の活性化・不活性化、化学的・物理的刺激からの保護、細胞表面での濃度調節などに重要な働きを示す。その結果、HSPG は細胞接着、移動、増殖、分化、形態形成といった細胞活動の制御に関与する。しかしながら、腸上皮における HSPG の働きを検討した研究はほとんどない。このため、HS ポリメラーゼである <i>Ext1</i> の exon1 を loxP で修飾した <i>Ext1</i> 遺伝子改変マウス (以下 <i>Ext1^{F/F}</i> マウス) に <i>villin</i> プロモータを持つ Cre トランスジェニックマウスを交配させることで、腸管上皮特異的に HS を欠失したマウス (以下 <i>Ext1^{Δ/Δ}</i> マウス) を作成した。このマウスを用いることにより、腸陰窩の恒常性維持における HS の役割を検討した。定常状態では、<i>Ext1^{F/F}</i> マウスと <i>Ext1^{Δ/Δ}</i> マウスの表現型に差は認められなかった。次に、全身放射線照射による小腸上皮障害モデルを用いて、腸管上皮再生に対する HS の関与について検討した。放射線照射後の生存率は、<i>Ext1^{F/F}</i> マウスと比較して <i>Ext1^{Δ/Δ}</i> マウスで有意に低率であった。全身放射線照射 4 日後の <i>Ext1^{Δ/Δ}</i> マウスの小腸陰窩数は <i>Ext1^{F/F}</i> マウスと比較して有意に減少していた。以上の結果から、HS の欠失は放射線照射後の小腸上皮再生に影響を及ぼすことが示唆された。引き続き、HS による小腸上皮再生調節の機序を検討した。<i>Ext1^{Δ/Δ}</i> マウスでは <i>Ext1^{F/F}</i> マウスと比較して、全身放射線照射 4 日後の小腸上皮における細胞内の β カテニン量および β カテニンの核局在は有意に減少し、Wnt 標的遺伝子の発現も低下していた。従って、放射線照射後の回復期に HS は小腸上皮において Wnt/β カテニン経路の活性化を増強することにより上皮再生を促すことが示唆された。最後に、マウスより小腸上皮細胞を単離し、HS の Wnt/β カテニン経路促進に関する検討をおこなった。小腸上皮の Wnt3a に対する結合性の測定では、<i>Ext1^{F/F}</i> マウスの小腸上皮と比較し <i>Ext1^{Δ/Δ}</i> マウスの小腸上皮で Wnt3a 結合性の有意な低下を認めた。さらに単離小腸上皮に対して Wnt3a もしくは塩化リチウムによる生体外刺激を行った。Wnt3a による刺激では、Wnt 共受容体である LRP6 のリン酸化、細胞内 β カテニン量および Wnt 標的遺伝子である <i>Axin2</i> の発現は、<i>Ext1^{F/F}</i> マウスの小腸上皮と比較し <i>Ext1^{Δ/Δ}</i> マウスの小腸上皮で有意に低下していた。一方、塩化リチウムを用いた GSK3 β 阻害による Wnt 受容体を介さない Wnt/β カテニン経路の活性化では、β カテニンの安定性や <i>Axin2</i> の発現に差はなかった。以上より、小腸上皮の HS は上皮細胞の Wnt 結合性を増強することにより、Wnt/β カテニン経路の活性化を促進して小腸上皮の再生に重要な役割を果たす可能性が示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

ヘパラン硫酸 (HS) は様々なサイトカイン、ケモカイン、細胞増殖因子などと結合し、多様な細胞活動の制御に関与するが、腸上皮における HS の役割を検討した研究はほとんどない。このため、申請者らは腸管上皮特異的に HS が欠失したマウスを作成し、放射線照射による腸管上皮障害後の上皮再生における HS の役割を検討した。

腸管上皮特異的 HS 欠失マウスでは、全身放射線照射後の小腸上皮再生が障害され、Wnt/ β カテニン経路の活性化が低下していた。さらに、HS 欠失により小腸上皮の Wnt3a 結合性が減弱した。単離小腸上皮に対する Wnt3a による生体外刺激でも、腸管上皮特異的 HS 欠失マウスで Wnt/ β カテニン経路の活性化が低下した。一方、塩化リチウムを用いた Wnt 受容体を介さない Wnt/ β カテニン経路の活性化は、腸管上皮細胞の HS の有無により Wnt/ β カテニン経路の活性化に差は認めなかった。以上より、小腸上皮の HS は上皮細胞の Wnt 結合性を増強することにより、Wnt 受容体を介して Wnt/ β カテニン経路の活性化を促進し、小腸上皮の再生に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

以上の研究は、腸管上皮の再生過程における HS の役割の解明に貢献し、腸管上皮における恒常性維持機構の研究の進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、平成 25 年 12 月 27 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