

京都大学	博士（医学）	氏名	平松 由紀子
論文題目	Arid1a is essential for intestinal stem cells through Sox9 regulation (Arid1aはSox9の制御を介して腸幹細胞に必須である)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>近年、SWI/SNFクロマチンリモデリング複合体が発癌、組織の恒常性に関わることを示す報告がなされている。最近、クロマチン制御因子Arid1aがマウスの大腸癌、肝組織再生に重要な役割を果たすことが報告された。しかし、Arid1aの腸の幹細胞・恒常性における役割は依然不明である。そこで、本研究では、Arid1aがマウス腸の幹細胞・恒常性に果たす役割を明らかにすることを目的とした。</p> <p>本研究では、腸上皮特異的にArid1aを欠失させたマウス(Villin-Cre; Arid1a^{fl/fl}マウス)を作成・解析した。その結果、Villin-Cre; Arid1a^{fl/fl}マウスではコントロールマウスと比較して、生存率の低下、成長障害を認めた。そこで、マウス小腸の免疫染色解析、RT-PCRを用いた遺伝子発現解析を行ったところ、Villin-Cre; Arid1a^{fl/fl}マウスでは腸上皮crypt-villi構造の異常、パネート細胞の減少、アポトーシスの増加を認めた。小腸幹細胞維持におけるArid1aの必要性を検討するために、Lgr5-GFP; Villin-Cre; Arid1a^{fl/fl}マウスを作成した結果、Lgr5-GFP; Villin-Cre; Arid1a^{fl/fl}マウスではLgr5陽性腸幹細胞の著明な減少が認められた。</p> <p>さらに、腸上皮から単離した腸陰窩細胞を用いて腸オルガノイドの作成を試みたところ、Villin-Cre; Arid1a^{fl/fl}マウスでは腸オルガノイドの形成能(=幹細胞能)が損なわれることを見出した。Lgr5陽性腸幹細胞維持におけるArid1aの役割を解析するために、Lgr5-CreERT2; Rosa-lacZ; Arid1a^{fl/fl}マウスを用いて細胞系譜解析(Lineage tracing)を行い、Lgr5陽性の腸幹細胞特異的にArid1aをノックアウトした結果、Lgr5陽性腸幹細胞の子孫細胞供給能が損なわれることを見出した。</p> <p>そこで、Micro array、RT-PCRを用いて遺伝子発現の比較解析を行った結果、Villin-Cre; Arid1a^{fl/fl}マウスの腸ではSox9を含めたWntシグナル関連遺伝子の発現の減少、アポトーシス関連遺伝子の発現上昇を認めた。</p> <p>以上の結果から、Arid1aはマウス小腸の幹細胞、恒常性に必須であることが示唆された。一方、腸特異的にSox9を欠失させたマウスでは、Arid1a-cKOマウス同様に腸幹細胞の減少、Crypt構造の異常を認めることから、「Arid1aがSox9の発現制御を介して腸の幹細胞、恒常性維持に必須な働きをしているのではないか」という仮説を立てた。</p> <p>この仮説を検証するために、ChIP assay実験を行い、Arid1aがSox9のプロモーター領域・エンハンサー領域に直接結合するかを検証した。WTマウスの腸幹細胞(crypt部分)、腸分化細胞(villi部分)それぞれから単離した細胞を用いてChIP-PCRを行ったところ、crypt部分ではArid1aがSox9のプロモーター領域・エンハンサー領域に直接結合する一方、villi部分では結合しないことを見出した。加えて、ChIP-Seq解析を行い、Arid1aのエピジェネティックな遺伝子発現制御を網羅的に解析したところ、Arid1aはアポトーシス、細胞周</p>			

期、腸上皮分化、Wntシグナル関連遺伝子制御に関わる遺伝子の発現制御に関わっていることが示唆された。

Villin-Cre; Arid1a^{fl/fl}マウスで認められた異常がSox9の発現抑制によるものかどうかを検証するため、Arid1a欠失下にSox9を過剰発現したマウスモデル(Villin-Cre; Arid1a^{fl/fl}; Sox9OEマウス)を作成解析した結果、Villin-Cre; Arid1a^{fl/fl}マウスで認められた幹細胞の減少、小腸Crypt-Villi構造の異常、アポトーシスの増加がレスキューされた。加えて、3D-cell culture実験では、Villin-Cre; Arid1a^{fl/fl}; Sox9OEマウス腸上皮から単離した腸陰窩細胞を用いて腸オルガノイドの作成を試みたところ、腸オルガノイドの形成能(=幹細胞能)が回復していることを見出した。

さらに検証するために、Arid1a欠失下Sox9過剰発現マウス(Lgr5-CreERT2; Rosa-lacZ; Arid1a(flox/flox); SOX9OEマウス)においてLineage tracing実験を行ったところ、幹細胞の子孫細胞供給能がレスキューされることを見出した。これらの結果から、Arid1aがSox9の発現制御を介して腸幹細胞維持に必須であることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

近年、SWI/SNFクロマチンリモデリング複合体が発癌、組織の恒常性に関わることを示す報告がなされている。最近、クロマチン制御因子Arid1aがマウスの大腸癌、肝組織再生に重要な役割を果たすことが報告された。しかし、Arid1aの腸の幹細胞・恒常性における役割は依然不明である。そこで、申請者らは遺伝子組み換えマウスを用いて、マウス腸の幹細胞・恒常性維持におけるArid1aの機能的役割について検討した。

その結果、第1にArid1aはマウス腸において幹細胞・恒常性維持に必須であることが明らかとなった。第2にArid1aはSox9を含めたWntシグナル因子の発現を制御していることが明らかとなった。第3にArid1aはSox9の発現を直接制御することにより、腸の幹細胞・恒常性維持に必須であることが明らかとなった。

以上の研究は、クロマチン制御因子Arid1aによる腸の幹細胞・恒常性維持における分子制御機構を明らかにし、今後、腸上皮再生医療への応用に寄与する可能性がある。

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31年5月14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