

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	平康 博章
論文題目	Studies on the role of a lymphocyte protease granzyme A in the intestinal epithelial-cell turnover （腸管上皮細胞の代謝回転におけるリンパ球プロテアーゼグランザイムAの役割に関する研究）		
（論文内容の要旨）			
小腸において、消化吸収を担う上皮細胞は絨毛の根元部分で幹細胞から分化し、絨毛先端に向かって移動したのち、細胞外マトリックスで構成される基底膜への接着性を失いアポトーシスを起こして剥落する。細胞の移動や剥落には、細胞外マトリックスタンパク質の分解が必須であると考えられるが、それを調節する因子は明らかでない。腸管上皮層には、上皮細胞の数個に1個という密度で上皮細胞間リンパ球と呼ばれる免疫細胞が散在しており、細胞中にセリンプロテアーゼの一種、グランザイムAを常時発現している。本酵素は細胞傷害性リンパ球が異常細胞を攻撃する際に使われることが知られているが、正常な腸管上皮層に常時発現していることの意義は不明である。本論文は、腸管上皮層グランザイムAの、上皮細胞の代謝回転、特に移動や剥落における意義を明らかにすることを目的としたもので、3つの章から構成されている。 第1章では、グランザイムAが腸管上皮細胞に及ぼす影響について、ラット腸管上皮由来培養細胞IEC-6株を用いた研究成果が述べられている。培養腸管上皮細胞IEC-6をマイクロプレート上に単層培養し、組み換え酵母を用いて作製したグランザイムAで細胞を刺激したところ、細胞の変形や培養容器からの剥落がみられた。グランザイムA刺激の際、グランザイムAに特異的なプロテアーゼインヒビターを同時添加することによって細胞の剥落が抑制された。また、細胞を培養容器に接着させる際に単独の細胞外マトリックスタンパク質を用いて接着させた場合、グランザイムAの基質になり得ると報告されているタンパク質を用いた場合は剥落が起こり、そうでないタンパク質では起こらなかった。これらのことから、グランザイムAは上皮細胞の足場となる細胞外マトリックスタンパク質を分解することで細胞の変形や剥落を引き起こしたことが示唆された。グランザイムA刺激によって剥落した細胞にアポトーシスは認められず、またグランザイムAが細胞の移動を促進するという結果は得られなかった。以上の結果から、グランザイムAは小腸上皮細胞の代謝回転において細胞の剥落に一部寄与していることを示した。 第2章においては、生体における腸管上皮細胞の剥落に対するグランザイムAの関与について、潰瘍性大腸炎モデルラットを用いて検討した成果が述べられている。潰瘍性大腸炎においては免疫関連細胞の異常な活性化が起こり、上皮細胞の剥落や細胞のアポトーシスが増加することが知られている。研究に先立って、大腸粘膜中でグランザイムAの活性を定量するために新規のグランザイムA活性測定法の構築が行われ			

た。この方法を用いて、デキストラン硫酸ナトリウム投与による潰瘍性大腸炎モデルラットの大腸粘膜中グランザイムA活性を経日的に測定した。その結果、グランザイムA活性はアポトーシスマーカーの増加に先立って上昇することが明らかになった。すなわち、生体組織においてもグランザイムAが腸管上皮細胞の接着性を低下させ、腸管上皮細胞の剥落に関与することを支持する証拠を得た。

第3章では、コンドロイチン硫酸やカラギーナン等、食品中に含まれる硫酸多糖類が、組み替え酵母を用いて作成したグランザイムAによる培養細胞の剥落を抑制することを明らかにしている。硫酸多糖類がグランザイムAの細胞剥落作用を抑制する現象について、グランザイムAが細胞外マトリックス中のタンパク質を分解する際にヘパラン硫酸プロテオグリカンへの結合が必要であることを示した。これに基づいて、可溶性の硫酸多糖類がグランザイムAの周囲に存在すると、グランザイムAとプロテオグリカンとの結合が阻害されて、細胞外マトリックスタンパク質の分解や細胞の剥落が抑制されるという機構を呈示した。食品由来の硫酸多糖類には一部が分解されずに腸管で吸収されるものがあることが報告されている。このような硫酸多糖類は吸収されて腸管の基底膜付近に到達した場合、グランザイムAに対する効果によって腸管上皮細胞の代謝回転に影響を及ぼし得ることが示された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

小腸上皮細胞は絨毛の根元部分で幹細胞から分化し、絨毛先端に向かって移動したのち、アポトーシスを起こして剥落する。細胞の移動・剥落には細胞外マトリックスタンパク質の分解が必須であるが、それを調節する因子は明らかでない。本論文は、腸管上皮層に高い密度で存在する上皮細胞間リンパ球に含まれるセリプロテアーゼであるグランザイムAの、上皮細胞の代謝回転、特に移動や剥落への関与を明らかにすることを目的としたものである。本論文の研究成果の中で、特に評価すべき点は以下の通りである。

(1) グランザイムAが腸管上皮細胞に及ぼす影響について、ラット腸管上皮由来培養細胞IEC-6株を用いた研究を行い、グランザイムAは上皮細胞の足場となる細胞外マトリックスタンパク質を分解することで細胞の変形や剥落を引き起こすことを示した。グランザイムAは小腸上皮細胞の代謝回転において細胞の剥落に一部寄与していることを示す成果である。

(2) 生体における腸管上皮細胞の剥落に対するグランザイムAの関与について、潰瘍性大腸炎モデルラットを用いて検討した。大腸粘膜中グランザイムAの活性を定量するための新規のグランザイムA活性測定法を構築し、グランザイムA活性はアポトーシスマーカーの増加に先立って上昇することを明らかにした。すなわち、生体組織においても、グランザイムAは腸管上皮細胞の接着性を低下させ、腸管上皮細胞の剥落に関与することを支持する重要な証拠である。

(3) コンドロイチン硫酸やカラギーナン等、食品中に含まれる硫酸多糖類がグランザイムAの細胞剥離作用を抑制する現象を見出した。このような硫酸多糖類はグランザイムAを介して腸管上皮細胞の代謝回転に影響を及ぼすことを示した。

以上のように、本論文は、上皮細胞間リンパ球に含まれる酵素であるグランザイムAが細胞外マトリックスタンパク質を分解することによって、腸管細胞の代謝回転、特に成熟した細胞の剥落に寄与していることを培養細胞ならびに潰瘍性大腸炎のモデル動物を用いて明らかにしたものであり、栄養化学、酵素化学、および食品科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22年10月12日、論文なら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