

学 位 論 文 題 名

Expression and function of activin A
in intestinal epithelial cells

(小腸上皮細胞におけるアクチビン A の発現と機能に関する研究)

学位論文内容の要旨

アクチビンは TGF- β スーパーファミリーに属するペプチド性増殖因子であり、広範な組織分布を示すとともに、細胞増殖抑制、細胞分化誘導、アポトーシス誘発などの多彩な生理作用を有している。アクチビンは 2 種類の β -サブユニット (βA 、 βB) のホモあるいはヘテロ二量体として合成され、それぞれアクチビン A ($\beta A\beta A$)、アクチビン B ($\beta B\beta B$)、及びアクチビン AB ($\beta A\beta B$) と呼ばれる。更に最近では βC -、 βD -、及び βE -サブユニットもクローニングされている。また、 βA -及び βB -サブユニットは α -サブユニットともヘテロ二量体を形成し、それぞれインヒビン A ($\alpha\beta A$) 及びインヒビン B ($\alpha\beta B$) と呼ばれる。アクチビンとインヒビンはいろいろな細胞系において互いに拮抗的に作用する。アクチビン受容体は細胞膜受容体であり、細胞質領域に存在するセリン・スレオニンキナーゼによってシグナルが伝達される。更に、フォリスタチンと呼ばれるアクチビン結合タンパクが存在し、このものはアクチビンと特異的に結合することによってアクチビンの生理活性を中和する。つまり、アクチビンの生理機能は、アクチビン受容体、アンタゴニスト（インヒビン）、及び中和タンパク（フォリスタチン）と協調して発揮される。

アクチビンの発現と機能についてはこれまでに様々な組織において研究されてきているが、腸においてはほとんど明らかにされていない。腸粘膜上皮細胞は栄養素の消化吸収を行うと同時に細菌や毒素に対する障壁にもなっている。そのような重要な生理機能を発揮・維持するために、腸粘膜上皮は迅速にリニューアルされており、結果として生体内で最もダイナミックに細胞のターンオーバーを行う組織のひとつとなっている。このリニューアルプロセス（増殖-分化-細胞死）は解剖学的には陰窩-絨毛軸に沿って進行する。すなわち、陰窩底部付近に存在する幹細胞から分裂した未成熟な細胞は陰窩で盛んに増殖し、絨毛との境界に移動すると増殖を停止して成熟を開始し、絨毛先端まで移動して終末分化した細胞はアポトーシスを起こして管腔内に脱落するか近傍のマクロファージに貪食されることによって除去される。このリニューアルプロセスは幹細胞システムにおいて遂行されており、予めプログラムされた組織特異的な遺伝子発現、細胞外マトリックス、及び増殖因子や栄養素などの外的因子により厳密に統御されている。そうした統御機構について

は、細胞生物学的な興味に加えて、その破綻がガンと関連することから、精力的に研究されてきているが、今なお不明な点が多い。前述したように、アクチビンが様々な細胞系において増殖・分化・アポトーシスなどの基本的な細胞機能の調節に関与していることを考慮すれば、腸粘膜上皮のリニューアルプロセスにおいても何らかの役割を果たしている可能性は十分に予想される。そこで本研究では、腸上皮細胞におけるアクチビンの発現と機能に関する知見を得ることを目的とし、主として培養細胞系を用いて検討した。その概要を示すと、以下の通りである。

(1) ラット小腸粘膜の陰窩-絨毛軸に沿って上皮細胞を段階的に単離して、アクチビン A (β A サブユニット) mRNA の発現パターンを半定量的 RT-PCR により解析した結果、 β A-サブユニット mRNA レベルは絨毛上部において高く、陰窩で低くなっていた。また、アクチビン A タンパクも絨毛上部の上皮細胞において多く存在することが免疫組織染色によって観察された。これらのことは、アクチビン A の発現は分化成熟した上皮細胞で高く、増殖している未成熟細胞では低いことを示唆している。

(2) アクチビン A と腸上皮細胞の増殖・分化の関連について、培養細胞株を用いて検討した。コンフルエントに達すると小腸吸収上皮細胞様に分化するヒト結腸ガン細胞株 Caco-2 において、 β A サブユニット mRNA は分化にともなって増加した。またラット小腸上皮細胞株 IEC-6 を細胞外マトリクスである Matrigel 上で培養して分化させると、やはり β A サブユニット mRNA レベルは増加した。更に、IEC-6 細胞をアクチビン A 添加培地で培養すると、DNA 合成が抑制され、分化マーカーの発現が増加した。これらの結果は、アクチビン A が腸上皮細胞の増殖を抑制し、分化を促進するオートクライン/パラクライン因子であることを示唆している。

(3) ラット小腸粘膜上皮ならびに Caco-2 細胞の分化モデルにおいて、 β B ならびに β C サブユニット mRNA の発現パターンを解析したところ、 β A サブユニットのような変化は観察されなかったので、腸上皮におけるアクチビンのアイソフォームの機能は異なるものと予想された。

(4) 単層培養した IEC-6 細胞の一部をかき取ると、その後かき取った部位への細胞移動が観察される。これを上皮損傷後の修復モデルとして用いてアクチビン A の発現と機能を解析した。 β A サブユニット mRNA レベルは、細胞かき取り後の移動細胞において一過性に増加した。また、細胞かき取り後にアクチビン A を培地に添加すると細胞移動が促進され、アクチビン A の中和タンパクであるフォリスタチンを添加すると逆に抑制された。つまり、アクチビン A は腸上皮細胞の損傷修復を促進する役割を果たすオートクライン/パラクライン因子であることが示唆された。

以上のように、アクチビン A 遺伝子の発現パターンと腸上皮細胞の増殖、分化、及び損傷修復との関連性を動物ならびに培養細胞を用いて明らかにした。また、実際にこれらの細胞機能が、外因性に添加したアクチビン A ならびにその中和タンパクであるフォリスタチンによって影響を受けることも示した。したがって、本研究により、腸上皮の増殖、分化、及び損傷修復の調節においてアクチビン A が重要な役割を担っていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 青 山 頼 孝

副 査 教 授 葛 西 隆 則

副 査 助 教 授 原 博

学 位 論 文 題 名

Expression and function of activin A in intestinal epithelial cells

(小腸上皮細胞におけるアクチビン A の発現と機能に関する研究)

本論文は総頁数 107 の英文論文で、図 28、表 5、引用文献 91 を含み、7 章で構成されている。別に参考論文 1 編が添えられている。

アクチビンは TGF- β スーパーファミリーに属するペプチド性増殖因子であり、広範な組織分布を示すとともに、細胞増殖抑制、細胞分化誘導、アポトーシス誘発などの多彩な生理作用を有している。アクチビンの発現と機能についてはこれまでに様々な組織において研究されてきているが、腸においてはほとんど明らかにされていない。腸粘膜上皮細胞は栄養素の消化吸収を行うと同時に細菌や毒素に対する障壁にもなっている。そのような重要な生理機能を発揮・維持するために、腸粘膜上皮は迅速にリニューアルされており、結果として生体内で最もダイナミックに細胞のターンオーバーを行う組織のひとつとなっている。このリニューアルプロセスは幹細胞システムにおいて遂行されており、予めプログラムされた組織特異的な遺伝子発現、細胞外マトリックス、及び増殖因子や栄養素などの外的因子により厳密に統御されている。そうした統御機構については、細胞生物学的な興味に加えて、その破綻がガンと関連することから、精力的に研究されてきているが、今なお不明な点が多い。本研究は、アクチビンが腸粘膜上皮のリニューアルプロセスにおいて何らかの役割を果たしているとの仮説を立て、ラットならびに培養細胞を用いた実験的検討により、アクチビン A 遺伝子の発現パターンと腸上皮細胞の増殖、分化、及び損傷修復との関連性を明らかにし、また、これらの細胞機能が、外因性に添加したアクチビン A ならびにその中和タンパクであるフォリスタチンによって影響を受けることも示している。第一章では本研究の歴史的背景、現時点での研究意義、問題点、目的等について論じている。第二章から第六章までは筆者自身による動物ならびに培養細胞を用いた実験に

基づく研究内容が記載され、本論文の中心をなすものである。第七章では、本研究を要約している。

主な内容は以下の如く要約される。

(1) ラット小腸粘膜の陰窩-絨毛軸に沿って上皮細胞を段階的に単離して、アクチビン A (β A サブユニット) mRNA の発現パターンを半定量的 RT-PCR により解析した結果、 β A-サブユニット mRNA レベルは絨毛上部において高く、陰窩で低くなっていた。また、アクチビン A タンパクも絨毛上部の上皮細胞において多く存在することを免疫組織染色によって観察している。これらの結果から、アクチビン A の発現は分化成熟した上皮細胞で高く、増殖している未成熟細胞では低いことを示唆した。

(2) アクチビン A と腸上皮細胞の増殖・分化の関連について、培養細胞株を用いて検討した。コンフルエントに達すると小腸吸収上皮細胞様に分化するヒト結腸ガン細胞株 Caco-2 において、 β A サブユニット mRNA は分化にともなって増加した。またラット小腸上皮細胞株 IEC-6 を細胞外マトリクスである Matrigel 上で培養して分化させると、やはり β A サブユニット mRNA レベルは増加した。更に、IEC-6 細胞をアクチビン A 添加培地で培養すると、DNA 合成が抑制され、分化マーカーの発現が増加した。これらの結果から、アクチビン A が腸上皮細胞の増殖を抑制し、分化を促進するオートクライン/パラクライン因子であることを示唆した。

(3) ラット小腸粘膜上皮ならびに Caco-2 細胞の分化モデルにおいて、 β B ならびに β C サブユニット mRNA の発現パターンを解析したところ、 β A サブユニットのような変化は観察されなかったので、腸上皮におけるアクチビンのアイソフォームの機能は異なるものと予想した。

(4) 単層培養した IEC-6 細胞の一部をかき取ると、その後かき取った部位への細胞移動が観察される。これを上皮損傷後の修復モデルとして用いてアクチビン A の発現と機能を解析した。 β A サブユニット mRNA レベルは、細胞かき取り後の移動細胞において一過性に増加した。また、細胞かき取り後にアクチビン A を培地に添加すると細胞移動が促進され、アクチビン A の中和タンパクであるフォリスタチンを添加すると逆に抑制された。これらの結果から、アクチビン A は腸上皮細胞の損傷修復を促進する役割を果たすオートクライン/パラクライン因子であることを示唆した。

以上のように、本研究は、アクチビン A 遺伝子の発現パターンと腸上皮細胞の増殖、

分化、及び損傷修復との関連性を動物ならびに培養細胞を用いて明らかにし、実際これらの細胞機能が、外因性に添加したアクチビン A ならびにその中和タンパクであるフォリスタチンによって影響を受けることをも示すなど、アクチビンの生理機能ならびに腸上皮の恒常性維持機構に新しい知見を加えた点で、国内外で高い評価を得ている。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 スリヤー・ルタティーブは博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。