

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 武石明佳

生体がストレスに曝された際に、ダメージを受けた細胞が巧みに反応して生体の恒常性を維持し、生体を健全な状態に保つ。全身性のストレス応答反応の一つとして、自然免疫経路を介した体液性の生体防御機構が挙げられる。自己免疫疾患や創傷治癒のマウスモデルを用いた研究から、このような生体防御機構の活性化は、外来性の病原体によってだけでなく、自己の組織や細胞の損傷によって放出された自己由来の生理活性物質によっても誘導され、体内の恒常性維持に寄与することが示唆された。しかしながら、体液性の生体防御反応を介した生体ストレス応答の組織・個体レベルでの解析は未だ少なく、特に自己由来の生理活性物質に応答する組織・細胞や、活性化されるシグナルメカニズムの多くは明らかでない。

そこで、生体ストレス応答を個体レベルで解析するため、遺伝学的研究に優れたショウジョウバエを用いて研究を行った。細胞死実行のキーマediatorであるカスパーゼは、様々な細胞ストレスに応じて活性化することが知られている。カスパーゼ活性化因子 *dpf-1/dark/HAC-1* の変異体 (*dpf-1* 変異体) は、初期胚発生過程で誘導されるカスパーゼ活性が全身で低下していることが報告されているが、成虫まで発生可能であり、成虫の体重、体長や繁殖能などについては野生型と比較して差が認められない。一方で、*dpf-1* 変異体成虫は表皮への局所的な損傷刺激に脆弱であったことから、カスパーゼ経路が損傷時に誘導される生体ストレス応答に関与していると考えられた。そこで本研究では、カスパーゼ活性が低下した *dpf-1* 変異体の損傷後致死性を生体ストレス応答破綻のモデルとしてとらえ、遺伝学的手法を用いてこの表現型を解析することにより、カスパーゼを介した正常なストレス応答における責任組織の同定とそのメカニズムの解明を目指した。

そこで本研究では、マイクロインジェクション用針でショウジョウバエ腹部表皮に損傷を与える実験を行い、*dpf-1* 変異体が損傷に脆弱であることを明らかにした。また、損傷後の *dpf-1* 変異体の体液に致死誘導性があることを見出し、カスパーゼ経路が損傷後、体液性の防御反応に関与することを示した。

次に、組織特異的にカスパーゼ阻害因子 *p35* を発現するショウジョウバエを用いて、損傷後の生存率を解析した。その結果、腸で *p35* を発現させた個体において、*dpf-1* 変異体と同様に損傷後の生存率の低下が観察された。さらに、*dpf-1* 変異体の腸で *dpf-1* を強制発現させた個体において損傷後の生存率の低下が緩和されたことから、損傷後の個体の生存には、腸におけるカスパーゼの活性化が必要であることが示唆された。

ショウジョウバエ中腸は主に腸細胞 (enterocyte : EC)、腸内分泌細胞 (enteroendocrine cell : EE)、腸芽細胞 (enteroblast : EB)、腸幹細胞 (intestinal stem cell : ISC) から構成されている。カスパーゼ活性化細胞の検出には、カスパーゼ活性化プローブ CD8::PARP::Venus を用いた。このプローブでは、カスパーゼ切断配列を含む PARP が過剰発現されるため、PARP の切断端を認識する抗体で染色することで、カスパーゼ活性化細胞を高感度に検出可能である。ショウジョウバエ中腸において、各細胞のマーカーと抗切断型 PARP 抗体の免疫染色を行った結果、損傷後のカスパーゼ活性化は EE、ISC、EB ではみられず EC のみで観察された。EC における抗切断型 PARP 抗体陽性細胞は、損傷後 30 分以内に認められ、損傷後 6 時間、24 時間の中腸においても観察された。損傷後 6 時間と損傷後 24 時間に観察された抗切断型 PARP 抗体陽性 EC を比較したところ、損傷後 24 時間の中腸において腸細胞層から脱落して腸管内腔側に位置する EC の割合が増加し、核 Hoechst の染色がみられない EC の割合も増加していた。一方、*dpf-1* 変異体の中腸では、損傷後においても抗切断型 PARP 抗体陽性細胞はみられなかった。以上の結果は、局所的な表皮の損傷がシステミックに中腸 EC に伝搬されてカスパーゼを活性化し、アポトーシスを誘導することを示唆している。

ショウジョウバエ中腸では、アポトーシスや細胞増殖によって恒常的に細胞が入れ替わっている。*dpf-1* 変異体の中腸ではカスパーゼ活性化細胞が観察されないことから、腸細胞のアポトーシスが抑制され、恒常的な入れ替わりが抑制されている可能性が考えられた。そこでまず、細胞増殖について調べるために BrdU 取り込み実験を行った結果、損傷の有無にかかわらず、*dpf-1* 変異体においては野生型と比較して ISC の分裂頻度が顕著に低下していることが明らかとなった。さらに、EC の入れ替わりを検証するため、EC に GFP を一過的に発現させ、GFP 保有細胞の数の変化を観察した。GFP を一過的に発現させたコントロール個体では、6 日後の中腸の EC 全体における抗 GFP 抗体陽性 EC の割合が 60% まで低下したことから、EC の入れ替わりが生じていることが認められた。一方、

*dpf-1* 変異体においては抗 GFP 抗体陽性 EC の割合は GFP を発現させてから 6 日後も 90%以上を保持していたことから、中腸細胞の恒常的な入れ替わりが阻害されていることが示唆された。そこで、中腸細胞の恒常的な入れ替わりが損傷後の生存に影響するかどうかを検討するため、がん抑制因子 PTEN を ISC に発現するショウジョウバエを用いた。BrdU 取り込み実験の結果、PTEN の発現が中腸の ISC の増殖を抑制することを確認した。さらに、この系統に損傷刺激を加えて生存率を検証したところ、*dpf-1* 変異体や腸でカスパーゼを抑制した系統と同様に、損傷後に生存率の低下が確認された。以上の結果から、EC でカスパーゼが活性化することにより引き起こされる腸細胞の入れ替わりが、損傷後の個体の生存に必須であることが示唆された。

本研究によって、表皮に損傷を受けたショウジョウバエ個体の生存には、カスパーゼの活性化を介した中腸 EC の入れ替わりが必要であることが明らかになった。ストレス応答時に、ダメージを受けた細胞や免疫系が活性化した細胞をカスパーゼの活性化を介して迅速に除去し、生体防御応答を適切に制御・収束することにより体内の恒常性を維持することが予想される。個体で局所的に生じた組織傷害を、物理的に離れた組織である腸が素早く感知、応答するという全身性の生体防御機構は、今回組織傷害のモデルとして用いた表皮の損傷にとどまらず、様々なストレスに対しても誘導されると考えられる。本研究は、個体レベルで解析を行うことにより、組織間の相互作用を介した組織傷害応答が存在することを強く示唆する研究成果である。以上より本研究は博士（薬学）の学位に値すると判定した。