

審査の結果の要旨

氏名 早稲田 真澄

本研究は、造血系及び免疫系の細胞において重要な役割を担うことが知られているアダプター分子である Downstream of tyrosine kinases 1 (Dok-1) 及び Dok-2 の腸管の恒常性維持における役割を明らかにするため、Dextran sodium sulfate (DSS) 誘導性大腸炎モデルを用いて、当該遺伝子欠損マウスの病態解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. DSS 非投与である対照群において、Dok-1 knockout (KO) マウス及び Dok-2 KO マウスは野生型 (wild type, WT) マウスと同様に体重減少および病態スコアの上昇を示さなかった。これらのマウスに DSS を飲水投与したところ、Dok-1 KO マウスは WT マウスと同程度の体重減少および病態スコアの上昇を示した。一方、Dok-2 KO マウスは Dok-1 KO マウスと異なり WT マウスよりも有意な体重減少を示した。

2. 対照群において、Dok-1/-2 double knockout (DKO) マウスは WT マウスと同様に体重減少および病態スコアの上昇を示さなかった。一方、これらのマウスに DSS を飲水投与したところ、Dok-1/-2 DKO マウスは WT マウスと比較して顕著な体重減少および病態スコアの上昇を示した。さらに、Dok-1 KO マウス及び Dok-2 KO マウスと比較しても、DSS を投与した Dok-1/-2 DKO マウスの病態スコアは有意に悪化していた。

3. マウスより摘出した大腸からホルマリン固定パラフィン切片を作製し観察したところ、対照群の WT マウスと Dok-1/-2 DKO マウスとの間に組織学的な差は認められず、また炎症の兆候や組織の損傷も認められなかった。一方、DSS 群の Dok-1/-2 DKO マウスにおいて、WT マウスと同様に大腸陰窩の消失や炎症性細胞の浸潤が認められた。さらに DSS 群の Dok-1/-2 DKO マウスは、WT マウスに比べてより広範囲に潰瘍を形成した。

4. 細胞増殖マーカーである Ki-67 に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、大腸陰窩中の Ki-67 陽性細胞数を測定したところ、対照群の WT マウスと Dok-1/-2 DKO マウスとの間で、陰窩中の Ki-67 陽性細胞数に明らかな差は認められなかった。一方、DSS 群の Dok-1/-2 DKO マウスでは、WT マウスと比較し潰瘍近傍部の陰窩にて Ki-67 陽性細胞数が顕著に減少していた。

5. マウスの大腸から RNA を抽出し、逆転写反応により合成した cDNA を用いて大腸組織中の細菌由来 16S rRNA 量を解析したところ、遺伝子型に関わらず対照群と比較して DSS 群において 16S rRNA 量の増加が認められた。さらに、DSS 群の Dok-1/-2 DKO マウスは WT マウスよりも有意に高い 16S rRNA 量を示した。しかしながら、対照群だけでなく DSS 群においても、WT マウスと Dok-1/-2 DKO マウスとの間で、炎症性サイトカインであ

る IL-6 及び TNF- $\alpha$  の発現量に有意な差は認められなかった。一方、DSS 群の Dok-1/-2 DKO マウスは、WT マウスに比べ抗炎症性サイトカインの有意な発現上昇を示した。

6. IL-23 特異的サブユニット p19 (IL-23p19) 及び Th17 サイトカインである IL-17A と IL-22 について上記と同様に遺伝子発現解析を実施したところ、DSS 投与の有無に関わらず WT マウスと Dok-1/-2 DKO マウスとの間で IL-23p19 の発現量に有意な差は認められなかった。一方、DSS 群の Dok-1/-2 DKO マウスにおいて、IL-17A 及び IL-22 の発現量は WT マウスよりも有意に低下していた。さらに大腸から免疫細胞を単離してフローサイトメーターを用いて解析したところ、Dok-1/-2 DKO マウスにおける IL-17A 陽性細胞および IL-22 陽性細胞の個体あたりの割合及び数は、WT マウスと比較していずれも顕著に減少していた。

以上、本論文は DSS 誘導性大腸炎モデルを用いた遺伝子欠損マウスの病態解析から、Dok-1 と Dok-2 が腸炎を協調的に抑制すること、及びこれら Dok アダプター分子が Th17 サイトカインである IL-17A と IL-22 の発現制御に関与し得ることを明らかにした。本研究はこれまでほとんど解析されていなかった Dok-1 及び Dok-2 と腸管の組織恒常性との関連を明らかにしており、Dok ファミリー分子による腸管の恒常性維持機構および Th17 サイトカインの大腸炎における役割の更なる解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。