



Title	Roles of Csk in mouse corneal development
Author(s)	高塚, 敦子
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48785">https://hdl.handle.net/11094/48785</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	高塚敦子
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第21767号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Roles of Csk in mouse corneal development (マウス角膜形成におけるCskの機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 雅人 (副査) 教授 吉川 和明 教授 三木 裕明

#### 論文内容の要旨

非受容体型チロシンキナーゼ Src family tyrosine kinases (SFK) は、細胞の運動、接着などの制御に重要な役割を担う分子であり、その活性は Csk (C-terminal Src kinase) によって負に制御される。本研究では神経堤細胞の発生、分化過程に焦点をあて、Csk の機能を解析することを目的として、神経堤由来細胞特異的な P0 (Protein zero) プロモーターを利用して Cre-loxP 系により Csk をコンディショナルに欠損したマウスを作製し、表現型を解析した。

KO マウスは顔面の形態異常と眼球角膜の強い混濁を示した。角膜内皮および角膜実質は頭部神経堤細胞由来といわれ、この部位における Csk の欠損を確認した。KO マウスでは角膜中央部における角膜内皮細胞の欠損および角膜実質コラーゲン繊維の構築異常が認められた。さらに角膜実質由来線維芽細胞を不死化して詳細な解析を行った。得られた Csk KO 細胞は、Csk を発現させたコントロール細胞に比べ運動能の低下、細胞極性の喪失およびアクチン骨格の異常が観察された。これらの結果から、KO マウスでは角膜の周辺部から中央部へ前駆細胞が移動して角膜内皮を形成する発生過程で細胞が正常に接着、移動できず、中央部で内皮細胞が欠損すると推測される。

KO 細胞では Csk の欠損によって、SFK 自身および FAK、p130Cas などが活性化されるとともに分解が亢進し、タンパク質の減少も観察された。特に Cas は顕著に活性化され分解されることから、内在性 Cas の活性を抑制したところ細胞極性を示し、アクチン骨格異常および運動性の低下も回復がみとめられた。さらに SFK および Cas の下流で活性化され、細胞骨格や細胞運動の制御に関わる small GTPases の細胞内における時空間的活性化を観察するため、FRET プローブによるイメージングを行った。Csk KO 細胞ではコントロール細胞のような細胞の進行方向での局所的な Rac 1、Cdc42、RhoA の活性化がみられなかった。Cas の活性化を抑制すると、局所的な活性化がみられるようになることから、KO 細胞の示す細胞の形態異常、運動性の低下に Cas の活性化が関与することが示唆された。これら *in vitro* の実験から、KO マウスにおける角膜形成異常の原因の一つとして Cas の活性化が関与する可能性が示唆された。

さらに KO 細胞では Procollagen 1a1、MMP2、MT1-MMP など、角膜実質と基底膜構築に関与する分子の発現量が増加していた。このことから Csk を欠損した角膜実質細胞ではコラーゲンの産生と分解のバランスが崩れ、角膜実

質の構築異常を引き起こすと考えられる。また MMP2 分泌の増加が角膜基底膜の異常に関与している可能性が示唆される。このように Csk および SFK は角膜実質や基底膜を構成するコラーゲンなどの細胞外マトリックスの構築および維持にも重要な役割を果たしており、Csk による SFK の正常な活性制御が、角膜発生およびその機能において必須の役割を果たしていることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

Src family tyrosine kinases (SFK) は細胞の運動、接着の制御に重要なシグナル分子であり、その活性は Csk (C-terminal Src kinase) によって負に制御される。本研究では、神経堤細胞の発生、分化過程に焦点をあて、SFK/Csk のマウス生体内における機能解析を目的として、神経堤由来細胞特異的に Csk を欠損した変異マウスを作製し、その表現型の詳細な解析を行なった。変異マウスでは顕著な混濁や血管新生などの表現型が認められるが、角膜中央部で先天的な角膜内皮細胞の欠損があることを見いだし、発生段階における神経堤由来細胞の不完全な移動が角膜形成異常の主たる要因であることを示した。次いで、マウス角膜から培養した Csk 欠損細胞を用いた解析から、Csk 欠損による SFK とその基質の活性化および分解促進にともなって、運動能の低下、アクチン骨格の形成異常、細胞極性の喪失が誘導されることを見いだした。さらに、SFK による p130Cas のリン酸化亢進がこれらの異常に直接関与することを示すことによって、角膜発生時の細胞移動に SFK および Cas の適切な活性制御が重要な役割を果たすことを明らかにしている。以上の成果は、SFK および Csk の生理機能とそのメカニズムにおいてきわめて重要な新たな情報を提供するものであり、よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。