

Title	The P2Y2 receptor promotes Wnt3a and EGF-induced epithelial tubular formation of IEC6 cells by binding to integrins
Author(s)	井深, 奏司
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/53899
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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 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

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	井深 奏司
論文題名 Title	The P2Y₂ receptor promotes Wnt3a and EGF-induced epithelial tubular formation of IEC6 cells by binding to integrins (P2Y₂受容体はインテグリンとの結合を介して、IEC6細胞によるWnt3a/EGF誘導性の上皮管腔形成を促進する)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 上皮管腔形成は、様々な臓器の発生において必須の形態形成パターンである。近年、肺や気管支を含め、腎臓や唾液腺などの上皮管腔組織における管腔形成の分子機構が、Wntシグナルの関与を含め、明らかになりつつある。しかし、細胞が集団としてどのように組織や臓器を協調的に形成するのか、その機能の詳細は未だ明らかになっていない。私共はこれまでにWnt3aとEGFが同時に作用することで細胞外基質中において、上皮細胞に対して上皮分岐管腔形成を誘導することを見出している。本研究ではWnt3aとEGFシグナルによる上皮組織の管腔形成制御機構を明らかにすることを目的とした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 1) 細胞外基質タンパクのマトリゲルを用いた三次元基質培養環境下で、Wnt3aとEGF (Wnt3a/EGF) の同時刺激は正常ラット腸管上皮細胞 (IEC6細胞) の管腔形成を誘導することを発見した。IEC6細胞においてWnt3a/EGF依存的に発現する標的遺伝子の1つとして細胞外ヌクレオチド (ATP/UTP) 受容体であるP2Y₂ receptor (P2Y₂R) を同定した。 2) IEC6細胞においてsiRNAを用いてP2Y₂Rを発現抑制するとWnt3a/EGF依存的な管腔形成が抑制された。またP2Y₂Rの安定発現細胞株 (IEC6/P2Y₂R-HA) を樹立したところ、発現抑制の表現型を回復させた。さらに、IEC6/P2Y₂R-HA細胞においてEGF単独存在下で管腔形成が誘導された。 3) リガンド (ATPとUTP) 不応性変異体 (P2Y₂R^{R264L}) を作製した。IEC6/P2Y₂R^{R264L}細胞は、IEC6/P2Y₂R-HA細胞と同様にP2Y₂Rの発現抑制の表現型を回復した。この結果から、IEC6細胞における上皮管腔形成にはP2Y₂Rのリガンド応答性は必要ではなかった。 4) 一方、P2Y₂Rは細胞外領域にRGD (ラットではQGD) 配列を有しており、インテグリンと相互作用することが知られていることから、インテグリン非結合変異体 (P2Y₂R^{D97E}) を作製した。IEC6/P2Y₂R^{D97E}細胞は、P2Y₂Rの発現抑制の表現型を回復できなかった。さらに、IEC6/P2Y₂R^{D97E}細胞においてはEGF単独存在下で管腔形成が誘導されなかった。これらの結果から、IEC6細胞において上皮管腔形成の誘導にはインテグリンとの結合が必要であることが明らかになった。 5) Proximity ligation assay (PLA) および免疫沈降法を用いた生化学的解析によりP2Y₂Rは、インテグリンとRGD配列を有する細胞外基質であるフィブロネクチンとの相互作用を抑制することを見出した。RGDペプチドを用いたインテグリン依存性細胞接着の抑制は、P2Y₂Rの発現と同様に管腔形成を誘導したことから、P2Y₂RはRGD依存性細胞接着を適切に抑制することで管腔形成を誘導すると考えられた。 6) IEC6細胞においてP2Y₂Rの発現、またはRGDペプチドを用いたインテグリン依存性細胞接着の阻害はIEC6細胞の伸長形態変化を誘導した。免疫染色法にて、伸長形態変化した細胞において細胞増殖活性化因子であるYAP/TAZが細胞質から核内へと移行し、管腔形成にともなう細胞増殖が誘導されることが明らかになった。 〔総括(Conclusion)〕 本研究によって、IEC6細胞における、P2Y₂Rによるインテグリンとフィブロネクチンの結合抑制を介したWnt3a/EGF誘導性上皮管腔形成の新規制御機構を明らかにした。本研究成果は、種々の管腔臓器における発生と再生の仕組みの解明につながることを期待される。また、WntとEGFシグナルの異常活性化にもとづく上皮管腔構造の破綻は種々のヒトがんににおいて認められることから、P2Y₂Rの発現が発がんに関連する可能性があり、本研究成果はがんの病態理解につながることを期待される。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

井 深 奏 司		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授 南 池 章
	副 査	大阪大学教授 原 田 彰 宏
	副 査	大阪大学教授 月 田 早 智 子

論文審査の結果の要旨

本論文では、ラット腸管上皮細胞由来であるIEC6細胞の3次元培養法を用いた実験系において、Wnt3aとEGFにより発現する細胞外ヌクレオチド（ATP/UTP）受容体のP2Y₂受容体（P2Y₂R）が、上皮管腔構造形成に関与することを明らかにした。P2Y₂Rは細胞外ヌクレオチド受容体としてCa²⁺動員やRhoの活性化に関与することが、これまでに報告されていた。本論文により、上皮管腔構造形成においてP2Y₂Rはインテグリンに結合してフィブロネクチンと競合する結果、細胞を伸長して増殖させることが明らかとなった。したがって、本研究成果は、P2Y₂R発現による新たな細胞-基質間接着制御とその上皮管腔構造形成における重要性を示唆して、今後種々の管腔臓器における発生と再生の仕組みの解明の端緒となる可能性が高い。さらに、WntシグナルとEGFシグナルの異常活性化にもとづく上皮管腔構造の破綻がヒトがんにおいて認められることから、P2Y₂Rの発現が発がんに関連する可能性があり、がんの病態理解へ貢献することが期待される。

よって、本論文は博士（医学）の学位授与に値すると判定した。