



Title	The ATP-hydrolyzing ectoenzyme E-NTPD8 attenuates colitis through modulation of P2X4 receptor-dependent metabolism in myeloid cells
Author(s)	谷, 春佳
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/92030">https://hdl.handle.net/11094/92030</a>
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</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

# 論文内容の要旨

## Synopsis of Thesis

氏名 Name	谷 春佳
論文題名 Title	The ATP-hydrolyzing ectoenzyme E-NTPD8 attenuates colitis through modulation of P2X4 receptor-dependent metabolism in myeloid cells (膜型ATP分解酵素E-NTPD8はP2X4受容体依存的なミエロイド細胞の代謝制御により腸炎を抑制する)
論文内容の要旨	
〔目的〕	
<p>活性化した免疫細胞や死細胞および細菌から産生される細胞外ATPは、P2X/P2Y受容体を介して多様な細胞を活性化することで生体防御に機能する。一方、過剰な細胞外ATPは組織破壊につながる病的な炎症を惹起する。そのため、組織や細胞では、膜型ATP分解酵素を発現することにより細胞外ATP濃度は厳密に制御されている。小腸上皮細胞に発現する膜型ATP分解酵素E-NTPD7とE-NPP3は、小腸管腔内ATPを分解し、Th17の増加や形質細胞用様樹状細胞のアポトーシスを抑制することで組織恒常性に寄与することが報告されている。しかし、大腸における管腔内ATP制御機構については不明であった。そこで、大腸における細胞外ATPの制御機構の解明を通して、大腸構成異常維持機構の一端を明らかにすることを目的とした。</p>	
〔方法ならびに成績〕	
<p>大腸において細胞外ATP代謝を担っている分子を明らかにするため、RNA-seq解析を行い大腸上皮細胞におけるATP分解酵素の発現パターン調べたところ、<i>Entpd8</i>が高発現していることが示された。また、潰瘍性大腸炎非炎症部の上皮細胞では、正常大腸上皮細胞に比べ<i>ENTPD8</i>の発現が低下していた。<i>Entpd8</i>欠損マウスを作製し、糞便中のATP濃度を解析したところ、野生型マウスに比べ、極めて高いATP濃度を示した。また、抗生剤投与により腸内細菌を死滅させると、<i>Entpd8</i>欠損マウスの便中ATP濃度は顕著に低下した。これにより、E-NTPD8は大腸管腔の細胞外ATP代謝調節を担っていることが明らかになった。次に、E-NTPD8の腸管炎症制御における役割を明らかにするため、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導性大腸炎に対する感受性を解析した。その結果、病態重症度および病理組織学的は重症度のいずれも野生型に比べ<i>Entpd8</i>欠損マウスで増悪していた。また、DSS投与7日目の<i>Entpd8</i>欠損マウス大腸では、野生型マウスに比べ、Ly6G陽性好中球とLy6C陽性樹状細胞の数が増加していた。さらに、免疫化学染色の結果から<i>Entpd8</i>欠損マウスでは好中球のアポトーシスが抑制されていることが示された。そこで、抗Gr-1抗体による好中球除去を行ったところ、<i>Entpd8</i>欠損マウスにおける大腸炎の増悪は起こらなかった。また、ATP受容体である<i>P2rx4</i>の欠損は、<i>Entpd8</i>欠損マウスにおける腸炎の重症化を防いだ。これにより、E-NTPD8による管腔内ATPの分解はP2X4受容体を介した好中球依存的な大腸炎の増悪を防ぐことが明らかとなった。次に、好中球が細胞外ATP刺激により増加するメカニズムについて解析を行った。マウス大腸好中球を分解しないATPであるATP<math>\gamma</math>Sで刺激するとP2X4受容体依存的にAnnexin-V陽性アポトーシス細胞が減少することが示された。そこで、大腸好中球を用いてRNA-seq解析を行ったところ、ATP刺激により細胞内代謝経路の一つである解糖系にかかわる分子をコードする遺伝子群の発現が亢進していることが示された。そこで、解糖系活性指標である細胞外酸性化速度の測定を行ったところ、野生型マウス大腸好中球ではATP<math>\gamma</math>S刺激により細胞外酸性化速度が顕著に上昇したが、<i>P2rx4</i>欠損マウス由来の細胞ではATP<math>\gamma</math>S依存的な解糖系の亢進は示されなかった。また、解糖系阻害剤2-DG処理を行った大腸好中球ではATP<math>\gamma</math>S刺激依存的なアポトーシス抑制は起こらなかった。これらの結果から、細胞外ATP-P2X4受容体シグナルは、解糖系を亢進させさせることで好中球のアポトーシスを抑制していることが明らかとなった。</p>	
〔総括〕	
<p>以上の結果から、大腸上皮細胞に発現する膜型ATP分解酵素E-NTPD8は、腸内細菌依存的な管腔内ATPを分解することにより、解糖系亢進に伴う好中球の増加を原因とする大腸炎の増悪を防ぐことが明らかとなった。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 谷 春佳			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	竹田 環
	副 査	大阪大学教授	山本雅裕
	副 査	大阪大学教授	我呂和世

**論文審査の結果の要旨**

細胞外ATPは活性化した免疫細胞や腸内細菌などから産生され、免疫細胞を活性化することで宿主防御に働く一方、過剰な細胞外ATPは炎症を惹起する。小腸においては宿主に様々な免疫反応を誘導する事が知られているが、大腸における制御機構については未知であった。そこで、大腸における細胞外ATPの制御による腸管恒常性維持機構の解明を目的とした。

大腸上皮細胞において最も発現が高いATP分解酵素E-NTPD8に着目し、当遺伝子欠損マウスのDSS（デキストラン硫酸ナトリウム）腸炎に対する感受性を検討したところ、欠損マウスでは野生型に比べ好中球が増加し炎症が増悪した。更に腸炎の増悪・好中球の増加は、腸管好中球に高発現するATP受容体P2RX4依存的であり、P2X4受容体を介した細胞内カルシウム濃度の上昇により、解糖系の亢進を伴う好中球の細胞死抑制を誘導することを示した。E-NTPD8による管腔内ATP濃度の制御機構を主体的に解明し、潰瘍性大腸炎に対する新規治療法および診断法の開発への足掛かりになることが期待されることから、学位に値するものと認める。