

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：84408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861669

研究課題名(和文) Wntシグナルによる肺、気管支の管腔形成制御機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of control mechanism in lung and bronchial by Wnt signaling

研究代表者

井深 奏司 (IBUKA, SOUJI)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・その他部局等・小児外科・診療主任

研究者番号：50625027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNAマイクロアレイ解析からIEC6細胞においてWnt3a/EGFにより協調的に発現誘導される標的遺伝子P2Y2Rを同定した。IEC6細胞で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。P2Y2Rは細胞外領域にインテグリン結合RGD配列を有しており、P2Y2Rのインテグリン非結合変異体の発現は管腔形成を誘導しなかった。また、 $\alpha$ 3インテグリンの特異的阻害剤であるRGDFVによる接着阻害は、IEC6細胞に対してP2Y2Rの発現と同様の管腔形成を誘導した。したがって、P2Y2Rはインテグリンと結合することによりIEC6細胞の管腔構造形成に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We used rat intestinal epithelial IEC6 cells to investigate tubulogenesis and we found that tubular formation was induced by a combination of Wnt3a and EGF signaling during 3D culture. Wnt3a and EGF induced the expression of the P2Y2 receptor, and knockdown of P2Y2R suppressed tubular formation. The Arg-Gly-Asp (RGD) sequence of P2Y2R has been shown to interact with integrins, and a P2Y2R mutant lacking integrin-binding activity was unable to induce tubular formation. P2Y2R expression inhibited the interaction between integrins and fibronectin. Inhibition of integrin and fibronectin binding by treatment with the cyclic RGD peptide and fibronectin knockdown induced tubular formation in the presence of EGF alone, but a fibronectin coat suppressed Wnt3a- and EGF-induced tubular formation. These results suggest that Wnt3a- and EGF-induced P2Y2R expression causes tubular formation by preventing the binding of integrins and fibronectin rather than by mediating nucleotide responses.

研究分野：小児外科

キーワード：P2Y2R 上皮管腔形成 インテグリン フィブロネクチン Wnt EGF

### 1. 研究開始当初の背景

小児外科領域では、嚢胞性肺疾患や肺低形成など、上皮管腔組織の形成異常が原因である先天性疾患が少なくない。これらの疾患の発生機序を理解し、治療に応用するためには、上皮管腔組織形成制御の分子機構の解明が欠かせない。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。私共はこれまでに Wnt3a が細胞外基質中において、上皮細胞に対して分枝上皮管腔形成を誘導することを見出している。本研究では Wnt シグナルと細胞外基質蛋白質の相互作用に焦点をあて、Wnt 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し、その異常による気管無形成や肺低形成、分化異常による嚢胞性肺疾患などの原因および治療の開発を最終的な研究の目的としている。

### 2. 研究の目的

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。

### 3. 研究の方法

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 P2Y<sub>2</sub> receptor (P2Y<sub>2</sub>R) を同定した。

2) IEC6 細胞において siRNA を用いて P2Y<sub>2</sub>R 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 P2Y<sub>2</sub>R の安定発現細胞株 (IEC6/P2Y<sub>2</sub>R-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/P2Y<sub>2</sub>R-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 (P2Y<sub>2</sub>R<sup>R264L</sup>) を作製した。IEC6/P2Y<sub>2</sub>R<sup>R264L</sup> 細胞は、IEC6/P2Y<sub>2</sub>R-HA 細胞と同様に P2Y<sub>2</sub>R 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 P2Y<sub>2</sub>R のリガンド応答性は必要ではなかった。

4) 一方、P2Y<sub>2</sub>R 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 (P2Y<sub>2</sub>R<sup>D97E</sup>) を作製した。IEC6/P2Y<sub>2</sub>R<sup>D97E</sup> 細胞は、P2Y<sub>2</sub>R の発現抑制の表現型を回復できなかった。さらに、IEC6/P2Y<sub>2</sub>R<sup>D97E</sup> 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 P2Y<sub>2</sub>R 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、P2Y<sub>2</sub>R の発現と同様に管腔形成を誘導したことから、P2Y<sub>2</sub>R 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 P2Y<sub>2</sub>R 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。

#### 4 . 研究成果

本研究によって、IEC6 細胞における、P2Y<sub>2</sub>R 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おいて認められることから、P2Y<sub>2</sub>R 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。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

The P2Y<sub>2</sub> receptor promotes Wnt3a- and EGF-induced epithelial tubular formation by IEC6 cells by binding to integrins  
Souji Ibuka, Shinji Matsumoto, Shinsuke Fujii, Akira Kikuchi  
J Cell Sci 2015 128: 2156-2168;  
doi: 10.1242/jcs.169060

A combination of Wnt and growth factor signaling induces Arl4c expression to form epithelial tubular structures.

Matsumoto S, Fujii S, Sato A, Ibuka S, Kagawa Y, Ishii M, Kikuchi A.  
EMBO J. 2014 Apr 1;33(7):702-18.

doi: 10.1002/embj.201386942.

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計4件)

EUPSA2015, 16<sup>th</sup> European Paediatric Surgeons Association's Annual Congress Slovenia, Ljubljana:

The P2Y<sub>2</sub> receptor promotes Wnt3a and EGF-induced tubular formation of IEC6 cells by inhibition of integrin-mediated cell adhesion

Souji Ibuka, Shinji Matsumoto, Shinsuke Fujii, Akira Kikuchi, Hiroomi Okuyama

第52回日本小児外科学会学術集会 神戸:  
Wnt3a と EGF シグナルによって発現する P2Y<sub>2</sub>R は上皮管腔形成を促進する

井深 奏司, 松本 真司, 藤井 慎介, 菊池 章, 奥山 宏臣

第87回日本生化学会大会 京都:

Wnt/EGF シグナルにより発現する P2Y<sub>2</sub> は上皮管腔形態形成を制御する

井深 奏司, 松本 真司, 菊池 章

第36回日本分子生物学会年会 神戸:

Wnt/EGF シグナルによる P2Y<sub>2</sub> の発現は上皮管腔形態形成を制御する

井深 奏司, 松本 真司, 菊池 章

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

P2Y<sub>2</sub>受容体の発現を介する上皮管腔組織  
形成

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/research04.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井深 奏司 (IBUKA, Souji)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府  
立母子保健総合医療センター(研究所)・小  
児外科・診療主任

研究者番号：50625027