Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Wnt5a signaling promotes apical and basolateral polarization of single epithelial cells

Gon, Hidetoshi

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2014-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6038号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006038

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

学位論文の内容要旨

Wnt5a signaling promotes apical and basolateral polarization of single epithelial cells

Wnt5a シグナルは単一上皮細胞レベルでの頂底極性形成を促進する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
肝胆膵外科学
(指導教員：具　英成　教授)

権　英寿

(目的)

上皮細胞は頂底極性を形成しており、その極性の形成、維持には細胞間接着や基底膜からのシグナルが重要であることが知られている。一方、Wnt シグナルにおいて、β カテニン非依存性経路が平面内細胞極性や神経細胞極性などの極性を制御することが知られているが、頂底極性形成に対する役割は依然として明らかではない。これまでに私共は、Wnt シグナルが基底膜シグナル誘導性の細胞運動極性の制御に関与することを報告している。そこで頂底極性の制御においても、Wnt シグナルが基底膜シグナルと協調してその極性を制御する可能性を考え、その点を明らかにすべく研究を行った。

(方法及び結果)

基底膜シグナルによる頂底極性形成に対する Wnt シグナルの影響を検討するために、以下に示すユニークな実験系を用いたアプローチを行った。なお、今回の実験では基底膜のモデルとしてマトリゲルを使用した。ラット正常腸管上皮細胞由来の細胞株である IEC6 細胞を、単一細胞レベルにて厚みをもったマトリゲル上で培養すると、細胞とマトリゲルの接着面と対側に F-actin が集積した特徴的な極性化形態を認め (actin cap)、この actin cap にリン酸化 Ezrin (頂端部マーカー) が共局在した。また、その周囲を囲むように ZO-1 (tight junction マーカー) が局在し、Par1b (基底部マーカー) は actin cap 以外の細胞膜に分布した。さらに走査型、透過型電子顕微鏡にて actin cap の部分に微絨毛様の構造が集積していることも確認した。以上より、IEC6 細胞は単一細胞レベルで頂底極性を形成していると考えられた。本実験系は、細胞間接着の影響なしに、基底膜シグナルによる頂底極性形成をシンプルに評価できる系であると考え、この系を用いて Wnt シグナルの頂底極性形成への影響を検討することとした。

なお、IEC6 細胞を浮遊培養した場合には極性化は見られなかったことから、マトリゲルとの接着が極性化に重要な因子であると考えられた。

Wnt シグナルは遺伝子発現を介して細胞の増殖、分化を制御するβカテニン依存経路と、細胞運動や骨格、極性の制御を行うβカテニン非依存経路の 2 つに大別される。まず Wnt シグナルがマトリゲルとの接着により誘導される単一細胞レベルでの頂底極性形成に関与しているかどうかについて検討するために、これら両経路を阻害する薬剤である Wnt 分泌阻害剤 IWP2 の処理を行い、上皮細胞極性化への影響を検討した。その結果、極性化の抑制効果が見られたことから、内在性 Wnt リガンドの極性化への関与が示唆された。これに対して、βカテニン依存経路の選択的阻害剤である IWR1 処理を行った場合には極性化に対する抑制効果は見られなかったことから、マトリゲル誘導性の頂底極性形成には、Wnt シグナルのβカテニン非依存経路が関与していることが示唆された。今回用いた IEC6 細胞において、内在性レベルでβカテニン非依存経路の代表的リガンドである Wnt5a の発現を認めたため、そのノックダウン (KD) を行ったところ、極性化の抑制効果を認め、さらに Wnt5a 受容体 Ror やその下流の Dvl の KD でも同様に極性化は抑制されたことから、Wnt5a シグナルがこの極性化の制御に関与することが示唆された。

βカテニン非依存経路の下流において、Dvl が細胞骨格制御因子である Rac1、RhoA の活性を制御することが知られている。そこで単一細胞レベルでの頂底極性形成に Rac1、RhoA 活性の極性化分布が重要ではないかと考え、これらの空間的活性分布を fluorescence resonance energy transfer (FRET) を用いて検討した。その結果、Rac1 の活性は actin cap (頂端部に相当) よりもむしろ actin cap 以外の細胞膜 (基底部に相当) により強く見られたのに対して、RhoA の活性は相対的に actin cap 側により強く認められた。同時に Wnt5a、Dvl を KD した条件で Rac1、RhoA 活性を pull down assay にて評価したところ、Rac1 の活性は KD で抑制されるのに対して、RhoA の活性は上昇することがわかった。これらの結果から、Wnt5a シグナルは単一細胞レベルで極性化した IEC6 細胞において、actin cap 以外の細胞膜部分での Rac1 活性を positive に制御すると同時に、RhoA 活性を同部分で negative に制御している可能性が考えられた。

次に Dvl による Rac1 活性の制御因子について、Dvl の結合因子である Tiam1 (RacGEF) に注目した。Tiam1 を KD すると、極性化、Rac1 活性ともに抑制され、この抑制効果は Dvl を安定発現した IEC6 細胞においても同様に見られたが、Tiam1 を安定発現した IEC6 細胞においては Dvl の KD による極性化及び Rac1 活性の抑制効果が部分的にレスキューされた。これらの結果から、Dvl の下流で Tiam1 が Rac1 活性の制御を行っている可能性が考えられた。さらに Dvl による RhoA 活性の制御因子についても検討した。IEC6 細胞の単一細胞レベルでの極性化にはマトリゲルへの接着が重要な起点となる。そこで細胞接着において、RhoA 活性を negative に制御する因子である p190RhoGAP-A (RhoGAP) に注目した。P190RhoGAP-A の KD により、極性化は抑制され、RhoA 活性の上昇が見られた。P190RhoGAP-A の GAP 活性はそのチロシン燐酸化により制御されるが、Wnt5a、Dvl を KD した条件ではこのチロシン燐酸化は抑制され、Wnt5a、Dvl を KD した際に RhoA 活性が上昇するという上述の結果と一致するものであった。

また、極性化した IEC6 細胞における Dvl、p190RhoGAP-A の局在について検討したところ、両者ともに actin cap 以外の細胞膜部分、つまりマトリゲルと接着している部位に優位に局在することがわかった。この結果は、Wnt5a シグナルが actin cap 以外の細胞膜部分の Rac1、RhoA 活性の制御を行うという考えに矛盾しないものであった。同時に Tiam1 の局在についても検討したが、これに関しては上皮細胞全体に分布するという結果であった。そのため、Rac1 の活性分

布が見られる理由としては、Dvl がより優位に極性化した細胞の actin cap 以外の細胞膜部分に分布することや、RacGAP のような因子が actin cap 側に優位に局在する可能性、といったことが考えられた。

さらに Wnt5a シグナルによる極性制御のメカニズムの詳細について検討した。まず IEC6 細胞において、Dvl は細胞接着における key factor である Focal adhesion kinase (FAK) と、Wnt5a シグナル依存的に、内在性のレベルで結合した。さらに p190RhoGAP-A が Dvl の C 末端側で結合すること (DEP domain より C 端側で結合)、さらにその結合部分は Tiam1 の結合領域(PDZ domain と DEP domain の間で結合) とは異なり、Dvl 上で Tiam1 及び p190RhoGAP-A が 3 者複合体を形成しうることがわかった。加えて、この複合体に FAK も同時に結合することも確認された。また、P190RhoGAP-A との結合に必要な Dvl の C 末端側を deletion した Dvl の mutant を安定発現した IEC6 細胞では、Dvl の KD による極性化のレスキュー効果がほとんど見られなかったことから、Dvl と p190RhoGAP-A の結合が今回の頂底極性形成に重要であることが確認された。

最後に、Wnt5a シグナルは単一細胞レベルの頂底極性のみでなく、上皮細胞シスト、つまり多細胞レベルでの極性化においても、Rac1、RhoA 活性制御を介してその極性制御に関与していることも確認した。

(結論)

マトリゲル誘導性の単一細胞レベルでの頂底極性形成には、Wnt5a シグナルが FAK を介する細胞接着シグナルと協調して、Tiam1、p190RhoGAP-A を介して Rac1、RhoA 活性の制御を同時に行うことが重要であることが示された。本研究は頂底極性形成において、Wnt シグナルが基底膜シグナルと協調してその極性を制御する可能性を示唆するものであると考えられた。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2382 号	氏　名	権　英寿
論文題目 Title of Dissertation	Wnt5a signaling promotes apical and basolateral polarization of single epithelial cells Wnt5a シグナルは単一上皮細胞レベルでの頂底極性形成を促進する		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	匂坂 敏朗 錦織千佳子 中村俊一	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

（目的）

上皮細胞は頂底極性を有しており、その極性の形成、維持には細胞と基底膜の接着を起点とするシグナル伝達が重要な役割を担っている。Wnt シグナルは平面内細胞極性や神経細胞の極性形成に関与することが知られているが、頂底極性形成における役割は不明である。本研究では、基底膜シグナル誘導性の頂底極性形成における Wnt シグナルの役割を検討した。

（方法）

・Single cell culture

基底膜シグナルによる頂底極性形成への影響を評価するために、分離したラット正常腸管上皮細胞由来の細胞株 IEC6 細胞を単一細胞レベルでゲル化させたマトリゲル上に播種した。Actin cap を形成した状態を極性化と判定した。

・Rac1 及び RhoA の活性評価

Rac1 及び RhoA 活性は、glutathione-*S*-transferase-Cdc42/Rac Interactive Binding 及び Rho-binding domain を用いた免疫沈降法により生化学的に評価した。また、細胞内における両者の活性の空間的分布は Raichu-Rac1、Raichu-RhoA を安定発現した IEC6 細胞を用いて、Fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis により解析した。

（結果）

上記条件下において、単一の IEC6 細胞は、マトリゲルの接着面と対側に F-actin の集積(actin cap)した特徴的な極性化構造を形成した。この actin cap には頂端部マーカーEzrin が局在し、それ以外の細胞膜領域には側底部マーカーPar1b が分布した。以上より、IEC6 細胞は単一細胞レベルで頂底極性を形成していることが示された。

次に、Wnt シグナルの IEC6 細胞頂底極性形成への関与について検討した。IEC6 細胞において、内在性レベルで発現を認めた Wnt5a のノックダウン(KD)を行ったところ、極性化が抑制された。さらに Wnt5a 受容体 Ror やその下流の Dvl の KD でも同様に極性化は抑制されたことから、Wnt5a シグナルが頂底極性形成に関与することが明らかになった。

Wnt シグナルは、Dvl を介して細胞骨格制御因子 Rac1、RhoA の活性に関与することが知られている。IEC6 細胞において Wnt5a、Dvl を KD したところ、Rac1 の活性は減少したが、RhoA の活性は逆に上昇した。また、Rac1/RhoA の空間的活性分布を FRET により解析した結果、RhoA 活性は actin cap 側(頂端部)に、Rac1 活性は actin cap 以外の細胞膜領域(側底部)に強く見られた。以上より、Wnt5a シグナルは側底部において Rac1 活性化する一方、頂端部では RhoA 活性を抑制することが考えられた。

本系における Rac1 及び RhoA 活性制御機構として、Dvl との結合因子である Tiam1(RacGEF)及び p190RhoGAP-A(RhoGAP)に注目し、KD したところ、上皮細胞の極性化は抑制された。また、接着シグナルによる Rac/Rho 活性を仲介する Focal adhesion kinase (FAK)が Dvl、Tiam1、p190RhoGAP-A と複合体を形成した。

（結論）

Wnt5a シグナルは細胞接着シグナルと協調して、FAK、Tiam1、p190RhoGAP-A を介して Rac1 と RhoA の活性を空間的に制御して、頂底極性形成に関わることが明らかとなった。

本研究は、ラット正常腸管上皮細胞由来の細胞株 IEC6 細胞を用いて、単一細胞レベルの頂底極性形成における Wnt5a シグナルの役割について解析したものである。その結果、Wnt5a が Rac1 の活性化、RhoA の不活性化を介して、単一上皮細胞の頂底極性形成を促進することを証明した点において、価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。