

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21410

研究課題名(和文) 唾液腺における分泌型IgAの分泌における低分子量Gタンパク質Cdc42の役割

研究課題名(英文) Role of Cdc42 in the secretion of secretory IgA in salivary glands

研究代表者

岡林 堅 (OKABAYASHI, Ken)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：20409072

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)：顎下腺における唾液成分の輸送とCdc42の関連性を検討するために、Cdc42遺伝子変異ラット顎下腺由来培養(SMIE)細胞を用いて、IgAの細胞内輸送および傍細胞経路による物質輸送について検討した。その結果、Cdc42とIgAの細胞内輸送に関連性は見いだせなかったが、傍細胞経路輸送についてはCdc42の関与が示唆された。また、ラット顎下腺遊離細胞を用いて自律神経系によるIgA分泌について検討した結果、受容体を介したシグナル伝達により、分泌調節されていることが示唆された。以上のことから、顎下腺におけるCdc42の機能およびIgA分泌の調節機構の一部について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To clarify the relationship of Cdc42 and transport of salivary component, the intracellular trafficking of IgA and paracellular transport were investigated using SMIE cells transfected with Cdc42. It was suggested that Cdc42 enhanced paracellular transport, though we could not find out the contribution of Cdc42 to intracellular trafficking. In addition, the regulation of IgA secretion by autonomic nervous system was investigated using submandibular gland cells. In submandibular gland, IgA secretion was suggested to be regulated via beta receptor. We clarified partially that the role of Cdc42 in paracellular transport, and the regulation of IgA secretion with autonomic nervous system in submandibular gland.

研究分野：農学

キーワード：唾液腺 分泌型IgA Cdc42 自律神経

1. 研究開始当初の背景

粘膜組織は、細菌やウイルスなど様々な病原体に感染するリスクが大きく、特有の免疫機構が存在している。特に口腔は、病原体だけでなく食物性タンパク質をはじめとする多くの外来抗原と生体が直接接する免疫の最前線であり、唾液中 IgA による粘膜免疫機構が重要な役割を果たしている。また、唾液中 IgA 濃度とストレスなど交感神経興奮の関連性が示唆されている。唾液中の IgA は、血清中の IgA とは異なり、上皮細胞内に取り込まれてから分泌される分泌型 IgA (sIgA) が主体となり、上皮細胞間を運搬される単量体 IgA が一部を担っている。口腔では、これら IgA を中心とした粘膜免疫機構が、全身の免疫系と緊密な関係を保ちながら機能していると考えられている。しかし、唾液中への IgA 分泌については不明な点が多く、分泌メカニズムや分泌調節の解明が期待されている。

上皮細胞における sIgA の分泌機構は、二量体 IgA が上皮細胞の基底側に存在する polymeric Ig receptor (pIgR) に結合し、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、pIgR が secretory component (SC) に変化し、最終的に sIgA が形成され分泌されると考えられている。低分子量 G タンパク質の Rho ファミリーの 1 つである Cdc42 は、様々な細胞の形態形成、極性形成および細胞骨格系の制御に関わることが知られており、細胞骨格系は細胞内輸送および傍細胞経路輸送に関与することが示唆されていることから、sIgA の分泌および単量体 IgA 輸送に、Cdc42 が強く関与すると考えられる。

また、唾液中の IgA 濃度と交感神経興奮に関連性があることから、唾液腺における IgA 分泌は自律神経系によっても調節されていることが示唆されている。

2. 研究の目的

唾液腺における sIgA 分泌、および単量体 IgA をはじめとする物質の唾液中への輸送における低分子量タンパク質 Cdc42 の役割を明らかにするために、ラット顎下腺由来培養細胞 (SMIE 細胞) を用いて Cdc42 遺伝子変異細胞を作製し、IgA の細胞内輸送および傍細胞経路における物質輸送との関連性について検討した。またラット顎下腺遊離細胞を作製し、自律神経作動薬や遮断薬を投与することで、IgA 分泌における自律神経系による調節機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) pEYFP-C1 ベクターに Cdc42 を組み込んだプラスミドを調製し、リポフェクション法を用いて Cdc42 遺伝子過剰発現 SMIE 細胞を作製した。また Cdc42 に対する siRNA を用いて、Cdc42 遺伝子ノックダウン SMIE 細胞を作製した。得られた Cdc42 遺伝子変異発現 SMIE 細胞を解析し、IgA 分泌に関与する pIgR の発現量変化や細胞内局在の変化について検討し

た。また、Cdc42 遺伝子変異 SMIE 細胞を Transwell 上に培養し、基底側培地に FITC-デキストランを添加し、一定時間後に腺腔側培地における FITC-デキストランを測定することで、傍細胞経路による物質輸送について検討した。

(2) 6 週齢の雄性 SD ラットから摘出した顎下腺をコラゲナーゼおよびヒアルロニダーゼ処理し、ラット顎下腺遊離細胞を作製した。作製したラット顎下腺遊離細胞に自律神経作動薬を投与し、分泌された IgA 量を ELISA 法にて分析し、IgA 分泌に関与する受容体を検索した。さらに強く関与が示唆された受容体に対する遮断薬を投与することによって、作動薬の効果を打ち消すことができるか調べ、IgA 分泌に関与する受容体を同定した。

4. 研究成果

(1) Cdc42 遺伝子変異 SMIE 細胞において、Cdc42 遺伝子の発現量が変化することを確認した。pIgR 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果から、細胞内 pIgR 発現量および細胞膜における pIgR 発現量において、対照との間に有意な差は認められなかったことから、本研究では顎下腺細胞における IgA の細胞内輸送および sIgA 分泌と、Cdc42 の関連性は見いだせなかった。しかし、Transwell 上に培養した Cdc42 遺伝子変異 SMIE 細胞を用いた Cdc42 と傍細胞経路による物質輸送の関連性の実験では、Cdc42 を過剰発現させた SMIE 細胞では、GFP を発現させた対照と比較し、FITC-デキストランの透過量が有意に増加した(図 1)。

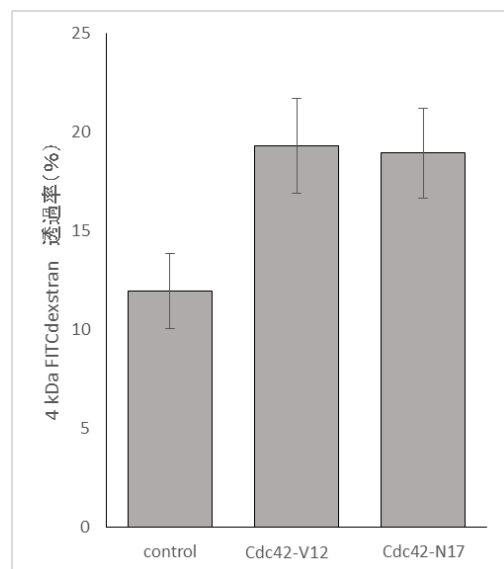


図 1. Cdc42 遺伝子過剰発現 SMIE 細胞における FITC-デキストランの透過量の変化

また、Cdc42 siRNA を用いてノックダウンした SMIE 細胞では、scrambled siRNA をトランスフェクションした対照と比較し、FITC-デキストランの透過量が減少した(図 2)。

これらの結果から、Cdc42 がラット顎下腺における唾液成分の傍細胞経路による物質輸送に参与していることが示唆された。

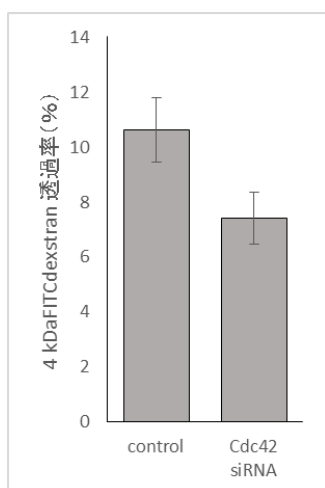


図 2. Cdc42 遺伝子ノックダウン SMIE 細胞における FITC-デキストランの透過率の変化

(2) ラット顎下腺遊離細胞に自律神経の作動薬であるフェニレフリン (Pheny)、クロニジン (Clo)、イソプロテレノール (IPR)、カルバコール (Carb) をそれぞれ 1 μM 添加し、30 分間の IgA 分泌について分析したところ、IPR > Pheny = Carb > Clo の順で分泌が認められた(図 3)。対照と比べ、どの作動薬も効果が認められたことから、IgA 分泌は単一の受容体を介して調節されるのではなく、複合的な作用によって調節されることが示唆された。最も効果の認められた作動薬が IPR であったことから IgA 分泌は、受容体を介した調節系が強く関与することが示唆された。

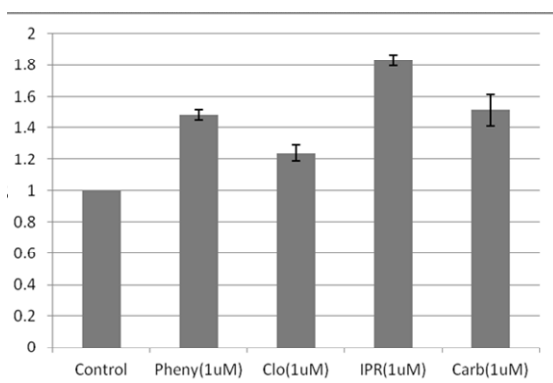


図 3. 自律神経作動薬と IgA 分泌について

さらに、遮断薬であるプロプラノロール (Pro) を添加し、IPR による IgA 分泌亢進への影響について調査したところ、Pro によって IPR の IgA 分泌亢進の効果が打ち消された(図 4)。このことから、ラット顎下腺において、IgA 分泌の自律神経系による調節は、受容体を介した細胞内情報伝達を介して調節されていることが確認された。

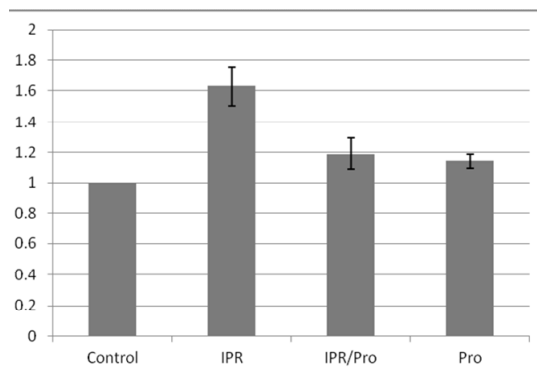


図 4. 遮断薬による 作動薬による IgA 分泌の効果を打消し

(1) の結果からラット顎下腺において Cdc42 は傍細胞経路による物質輸送に参与すること、および(2)の結果から IgA 分泌の自律神経系による調節機構は 受容体を介した細胞内情報伝達系によることが明らかになった。本研究の成果から、口腔における粘膜免疫機構の一部が明らかになり、また唾液中の IgA 濃度と交感神経興奮の関連性について有用な情報を提供することができた。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

塩野 まき、神原 萌、成田 貴則、岡林 堅；ラット耳下腺腺房細胞のアミラーゼ分泌に対するウリジン三リン酸 (UTP) の効果，第 55 回日本大学獣医学会，日本大学生物資源科学部，2017 年 6 月 24 日

灘岡 佐和子、高城 早希、成田 貴則、伊藤 大介、北川 勝人、岡林 堅；イヌ脳腫瘍の発現解析に用いる内部標準遺伝子の検討，第 55 回日本大学獣医学会，日本大学生物資源科学部，2017 年 6 月 24 日

高城早希，灘岡佐和子，岡林堅，成田貴則，伊藤大介，北川勝人；イヌ髄膜腫 15 症例における腫瘍関連遺伝子の発現解析，第 13 回日本獣医内科学アカデミー学術大会 パシフィコ横浜，2017 年 2 月 17-19 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡林 堅 (OKABAYASHI, Ken)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号：20409072

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし