

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10051

研究課題名(和文) 耳下腺および膵アミラーゼの開口分泌に寄与する脂質ラフト上のMARCKSの役割

研究課題名(英文) Role of MARCKS on lipid rafts in exocytotic amylase release in parotid and pancreas

研究代表者

佐藤 慶太郎 (Sato, Keitaro)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：10549041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究から以下の成果を得た。

1) 耳下腺や膵外分泌腺におけるアミラーゼ分泌刺激によるカルシウムを主体とする細胞内シグナルは、共通してMARCKSタンパク質のリン酸化を引き起こすことが考えられた。2) MARCKSタンパク質の脂質ラフトからの離脱は、脂質ラフト自体の機能を変えることなく、何らかの機能分子を調節していることが示唆された。3) 耳下腺では脂肪酸輸送体の一つのCD36が発現し、細胞内に脂肪酸を取り込んで、脂質ラフトの形成等の役割を担っている可能性が考えられた。4) 耳下腺において、MARCKSタンパク質の発現と調節を担う脂質ラフトは、腺房部と導管部で異なる構成成分であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MARCKSタンパク質については、これまで主に気道上皮の培養細胞を用いたムチン分泌研究で成果が挙がっている。一方、実験動物などを用いた生体に近いレベルの研究はあまり進んでいない。一方、代表者らは耳下腺および膵臓のMARCKSタンパク質のリン酸化がアミラーゼ分泌に関与することを示した。本研究では、これら二つの外分泌腺の解析を並行して進め、両臓器のアミラーゼ分泌メカニズムの共通性を検出することができた。外分泌という生命現象を二つの臓器間で俯瞰する多面的な本研究の成果は、外分泌障害を呈する難病(例えばIgG4関連疾患)の克服の可能性を高めるものになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The following results were obtained from this study.

1) Intracellular Ca²⁺ signaling induced by secretory stimulation in parotid and pancreatic exocrine glands commonly induce MARCKS phosphorylation. 2) The release of MARCKS from lipid rafts does not alter the function of the lipid rafts themselves but regulates some functional molecules present in the same rafts. 3) In the parotid gland, the fatty acid transporter CD36 is expressed and may play a role in the cellular uptake of fatty acids and the formation of lipid rafts. 4) In the parotid gland, the lipid rafts responsible for the expression and regulation of the MARCKS protein have different components in between the acini and the duct.

研究分野：生理学

キーワード：アミラーゼ 脂質ラフト 耳下腺 膵外分泌腺 腺房細胞 開口放出 脂肪酸輸送体 CD36

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

唾液および膵液分泌障害は著しいQOLの低下を招く。例えば、指定難病のIgG4関連疾患は膵臓や唾液腺などに顕著な炎症や腫脹を認める。このような臓器を跨いだ多発性の疾患に対する新規治療法の開発には、各臓器間における開口分泌などの細胞機能制御機構に関して共通する分子基盤の知見が不可欠である。

これまでに代表者らは、ラットの耳下腺および膵臓を用いてアミラーゼ開口分泌における細胞内シグナル伝達の研究を行ってきた。実際に耳下腺腺房細胞において、cAMP系細胞内シグナルの下流でmyristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) タンパク質のリン酸化がアミラーゼ分泌に関与することを明らかにした (Sato et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009)。一方、膵外分泌腺腺房細胞においては、MARCKSリン酸化がアミラーゼ分泌に関与することをCa²⁺系細胞内シグナル (Sato et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016) とcAMP系細胞内シグナル (Sato et al., J Physiol Sci, 2019) の両方で明らかにした。

以上より、耳下腺と膵外分泌腺においてcAMP系とCa²⁺系に細胞内シグナルが異なるにも関わらず共通してMARCKSのリン酸化が起こることから、『唾液分泌と膵液分泌との間にMARCKSリン酸化を共通とした開口分泌制御機構がある』ことを予想した。

2. 研究の目的

MARCKSはプロテインキナーゼC (PKC) の基質であり、非リン酸化の状態では細胞膜に局在し、リン酸化すると細胞膜から離れる性質を持つ。こうした細胞膜周辺で起こる現象に脂質ラフトによる調節が示唆されている。そこで代表者らは、『脂質ラフトを介するMARCKSの役割が耳下腺と膵外分泌腺のアミラーゼ開口分泌に共通する』という仮説を立てた。本研究は、この仮説を解き明かすための基盤となる知見を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 耳下腺および膵外分泌腺の腺房細胞の分離

実験動物 (ラットおよびマウス) より耳下腺および膵臓を摘出し、トリプシンおよびコラゲナーゼによる酵素処理により腺房細胞を分離・調整した。分離した耳下腺腺房細胞にアゴニストのイソプロテレノール (IPR)、ムスカリンアゴニストのカルバコール (CCh) およびPKC活性化剤のPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を、膵外分泌腺腺房細胞に消化管ホルモンのコレシストキニン (CCK) およびインクレチンホルモンのグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) をそれぞれ作用させた。なお、分離した腺房細胞のバイアビリティは、アミラーゼ分泌能が維持されているか否かをBernfeldのアミラーゼ測定法 (Bernfeld, Methods Enzymol, 1955) で随時チェックした。

(2) MARCKS、リン酸化 MARCKS の発現と局在

MARCKS およびリン酸化 MARCKS は、IPR、CCh、PMA、CCK および GLP-1 を作用させた外分泌腺の腺房細胞のライセート画分を用いて、ウェスタンブロットング法で検討した。また、これらタンパク細胞内局在を各外分泌腺の免疫染色にて検討した。

(3) 脂肪酸輸送体の発現と局在

脂肪酸輸送体の発現は、耳下腺のライセート画分を用いて、抗CD36抗体、抗SLC27A2抗体および抗L-FABP抗体を用いて、ウェスタンブロットング法で検討した。また、CD36タンパク質の組織内局在を耳下腺の免疫染色にて検討した。

(4) MARCKS と相互作用する可能性のある分泌関連タンパク質の検索

界面活性剤不溶画分のショ糖密度勾配法により分離したフラクションを摘出した外分泌腺の腺房細胞から得て、脂質ラフトのマーカーであるGM1aとMARCKSが同じ画分に回収されるか、リン酸化の影響があるか、ウェスタンブロットング法にて検討した。

4. 研究成果

(1) 耳下腺のCa²⁺系細胞内シグナルにおけるMARCKSリン酸化

耳下腺腺房細胞において、Ca²⁺系細胞内シグナルにより主に水やイオン分泌を誘発するCCh刺激下でMARCKSのリン酸化を検討した。その結果、cAMP系細胞内シグナル (Sato et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009) と似た傾向のリン酸化を認めた。また、PMA刺激でも同様の結果を得た。さらに、これらのリン酸化はnovel PKC阻害剤の存在下で抑えられた。以上より、耳下腺や膵外分泌腺における分泌刺激によるCa²⁺系細胞内シグナルは、共通してMARCKSリン酸化を引き起こすことが考えられた。さらに、開口分泌に関与する機能タンパク質 (例えばSNARE (Soluble NSF Attachment protein [SNAP] Receptors; 可溶性NSF結合タンパ

ク質受容体))の局在する脂質ラフトが、MARCKS リン酸化により制御を受けている可能性が考えられた。

(2) 耳下腺および膵外分泌腺腺房細胞の脂質ラフトと MARCKS の挙動

MARCKS が局在する脂質ラフトは分泌刺激によりどのような挙動を示すのか、検討した。ラフト耳下腺腺房細胞にアミラーゼ分泌刺激である IPR を作用させたところ、MARCKS の一部が脂質ラフトから離脱する様子を検出した。一方、脂質ラフトマーカーである GM1a 自体に大きな変動は観察されなかった。膵外分泌腺腺房細胞にアミラーゼ分泌刺激である CCK を作用させたところ、耳下腺と同様に MARCKS の一部が脂質ラフトから離脱する様子を検出した。一方、脂質ラフトマーカーである GM1a 自体はやはり大きな変動は観察されなかった。耳下腺における cAMP 系、膵外分泌腺における Ca²⁺系、両細胞内シグナルにおいて同傾向の結果が得られた。さらに膵外分泌腺において cAMP 系の細胞内シグナルからアミラーゼを分泌する GLP-1 刺激を行ったところ、同様の結果を得た。以上より、MARCKS の脂質ラフトからの離脱は脂質ラフト自体の機能を変えず、同じ脂質ラフトに存在する何らかの機能分子を調節していることが示唆された。

(3) 脂質ラフト構成成分である脂肪酸供給機構（脂肪酸輸送体）の検索

脂質ラフトの構成成分の一つに脂肪酸がある。脂肪酸は血中から脂肪酸輸送体を介して細胞に取り込まれる。そこで、脂質ラフトの構成成分から耳下腺と膵外分泌腺の共通性を見出すべく、まず耳下腺の脂肪酸輸送体の発現を検討した。その結果、マウス耳下腺ライセートにおいて 75kDa 相当と 52kDa 相当に抗 CD36 抗体に反応を示すバンドを検出した（図 1）。ヒト CD36 は糖鎖修飾により 88kDa に分子量が変化している報告がある（Collot-Teixeira et al., Cardiovasc Res, 2007）。一方、UniProt のデータベース(<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q08857/entry>)から、マウス CD36 は糖鎖修飾により分子量が約 52kDa から約 72kDa に変化することが想定された。そこで、ヒト CD36 のリコンビナントタンパク質を用いて脱グリコシル化実験を行ったところ、脱グリコシル化によりヒト CD36 は約 80kDa 相当から約 52kDa 相当へ分子量が変化することを確認した（図 1）。これらのことから、マウス耳下腺ライセートで検出した 75kDa 相当のバンドが生理機能を有しているグリコシル化した CD36 と考えられた。一方、L-FABP および SLC27A2 の発現は検出しなかった。このことから、耳下腺では脂肪酸輸送体 CD36 が発現し、細胞内に脂肪酸を取り込み、脂質ラフトの形成等の役割を担っている可能性が考えられた。

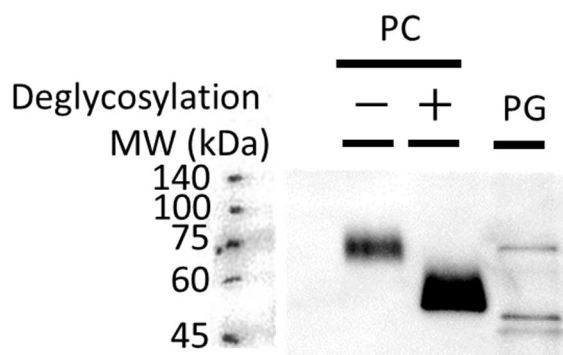


図1. 抗CD36抗体によるウェスタンブロットティング. PC、ポジティブコントロール(ヒトCD36のリコンビナントタンパク質). PG、マウス耳下腺ライセート。

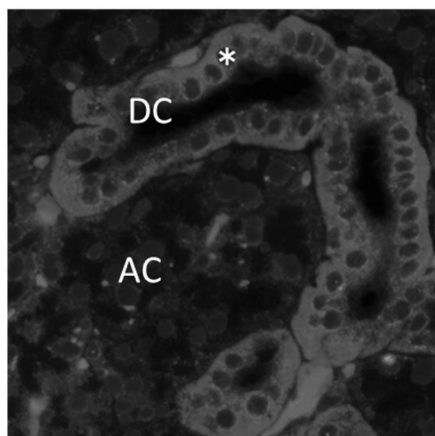


図2. マウス耳下腺の抗CD36抗体による免疫蛍光染色像。
*、核. AC、腺房細胞. DC、導管細胞. スケールバー、20μm.

(4) 耳下腺における脂肪酸輸送体 CD36 と MARCKS の発現

耳下腺における CD36 の組織内局在を免疫組織染色で検討した。その結果、抗 CD36 抗体に対する免疫反応は腺房部ではなく導管部に検出した。さらに細胞内局在を免疫蛍光染色で検討すると、導管細胞の細胞膜から細胞質にかけて免疫反応を検出した（図 2）。一方、MARCKS タンパク質は酵素処理により分離した腺房細胞にも導管細胞にも発現することを確認している。このことから、耳下腺において MARCKS タンパク質の発現と調節を担う脂質ラフトは、腺房部と導管部で異なる構成成分であることが示唆された。

5. 今後の展開

耳下腺において脂肪酸輸送体の CD36 は導管に多く腺房に少ない結果を得た。アミラーゼ分泌は耳下腺でも膵外分泌腺でも腺房部で生じる。したがって、少なくとも耳下腺の CD36 により取り込まれた脂肪酸、そしてその脂肪酸によって構成される脂質ラフトはアミラーゼ開口分泌に關与する可能性が低い。一方、膵外分泌腺においては CD36 がアミラーゼ分泌に關与する可能性

を残している。今後、外分泌機能と脂質ラフト、および脂肪酸輸送体へ視野を広げ、耳下腺と膵外分泌腺の分泌機構の共通性に関する研究をさらに展開する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 MORITA ASUKA, OUCHI MOTOSHI, SATOH KEITARO, KOBAYASHI SHUNSUKE, TERADA MISAO, WAKASHIN HIDEFUMI, KON HIROE, HAYASHI KEITARO, ANZAI NAOHICO, SHIMIZU AKIRA, SUGIHARA HITOSHI, OBA KENZO, FUJITA TOMOE | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 The Effects of Trypsin Inhibitor on Insulin Secretion Using Rat Pancreas in an Organ Bath | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 In Vivo | 6. 最初と最後の頁 2551 ~ 2558 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12537 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ohno Yuta, Satoh Keitaro, Shitara Akiko, Into Takeshi, Kashimata Masanori | 4. 巻 598 |
| 2. 論文標題 Arginase 1 is involved in lacrimal hyosecretion in male NOD mice, a model of Sj?gren's syndrome, regardless of dacryoadenitis status | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Physiology | 6. 最初と最後の頁 4907 ~ 4925 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP280090 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Satoh Keitaro | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 Regulatory factor for salivary secretion; parotid amylase release and MARCKS protein | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 New Food Industry | 6. 最初と最後の頁 35 ~ 40 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Morita Asuka, Ouchi Motoshi, Satoh Keitaro, Terada Misao, Kon Hiroe, Wakashin Hidefumi, Hayashi Keitaro, Anzai Naohiko, Oba Kenzo, Shimizu Akira, Fujita Tomoe | 4. 巻 69 |
| 2. 論文標題 Development of an organ bath technique for isolated rat pancreas preparations to assess the effect of 1,5-AG on insulin secretion | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Animals | 6. 最初と最後の頁 127 ~ 134 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.19-0059 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Ohno Yuta, Satoh Keitaro, Kashimata Masanori | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Review of genes potentially related to hyposalivation in male non-obese diabetic (NOD) mice, a Sjögren's syndrome model | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2023.05.001 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Ouchi Motoshi, Morita Asuka, Satoh Keitaro, Kobayashi Shunsuke, Terada Misao, Kon Hiroe, Hayashi Keitaro, Suzuki Tatsuya, Oba Kenzo, Sugihara Hitoshi, Yasutake Masahiro, Anzai Naohiko, Fujita Tomoe | 4. 巻 149 |
| 2. 論文標題 Effects of 1,5-anhydro-D-glucitol on insulin secretion both in <i>in vitro</i> and <i>ex vivo</i> pancreatic preparations | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences | 6. 最初と最後の頁 66 ~ 72 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2022.03.005 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤 慶太郎、大野 雄太、長瀬 春奈、柏俣 正典、安達 一典 |
| 2. 発表標題 老化促進マウスの耳下腺における脂肪酸輸送体CD36発現変化と唾液分泌への影響 |
| 3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森田 亜州華、大内 基司、佐藤 慶太郎、藤田 朋恵 |
| 2. 発表標題 ラット摘出膵臓の内外分泌能におけるトリプシン活性阻害の影響 |
| 3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大内 基司、森田 亜州華、佐藤 慶太郎、小林 俊介、清水 章、安西 尚彦、杉原 仁、大庭 建三、藤田 朋恵 |
| 2. 発表標題 ラット膵インスリン分泌評価におけるEx vivo実験系の応用 1,5-AGの効果を検証する先行研究 |
| 3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森田 亜州華、大内 基司、佐藤 慶太郎、小林 俊介、安西 尚彦、大庭 建三、杉原 仁、清水 章、藤田 朋恵 |
| 2. 発表標題 ラット摘出膵を用いた簡易インスリン分泌評価実験系の有効性検討と至適化 |
| 3. 学会等名 第63回糖尿病学会年次学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大野 雄太、佐藤 慶太郎、柏俣 正典 |
| 2. 発表標題 涙腺炎発症後の雄性NODマウスにおけるAQP5およびYAPの発現の検討 |
| 3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大野 雄太、佐藤 慶太郎、柏俣 正典 |
| 2. 発表標題 雄性NODマウスにおける涙腺炎発症と涙液分泌低下の関連性 |
| 3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森田 亜州華、大内 基司、佐藤 慶太郎、藤田 朋恵 |
| 2. 発表標題 オルガンパス実験系を用いたラット膵の内外分泌の同時評価 |
| 3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大内 基司、森田 亜州華、佐藤 慶太郎、若新 英史、寺田 節、大庭 建三、安西 尚彦、藤田 朋恵 |
| 2. 発表標題 糖類似体によるインスリン分泌能解析の初期検討 |
| 3. 学会等名 第50回日本消化吸収学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森田 亜州華、大内 基司、佐藤 慶太郎、若新 英史、今 弘枝、安西 尚彦、清水 章、藤田 朋恵 |
| 2. 発表標題 膵分泌実験系としてのex vivoモデルの至適化 |
| 3. 学会等名 第50回日本消化吸収学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|--|---------------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 大内 基司 (Ouchi Motoshi) (20409155) | 獨協医科大学・医学部・准教授 (32203) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|-------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 設楽 彰子 (Shitara Akiko) (30508718) | 朝日大学・歯学部・准教授 (33703) | |
| 研究分担者 | 大野 雄太 (Ohno Yuta) (30796644) | 朝日大学・歯学部・講師 (33703) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |