

令和 2 年 9 月 10 日現在

機関番号：33703

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2019

課題番号：17H07212・19K20764

研究課題名(和文) Cdc42依存性唾液腺腺房細胞形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of Cdc42-dependent salivary gland acinar cell formation

研究代表者

設楽 彰子(Shitara, Akiko)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：30508718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺の発生過程におけるCdc42の役割を明らかにするため、Cdc42ノックアウトマウスの腺房細胞の発生過程を蛍光顕微鏡を用いて解析した。その結果、腺房細胞の成長過程においてCdc42は、エンドサイトーシスを抑制的に制御することにより腺腔側膜の形成を調節することが示唆された。

さらに我々はCdc42をノックアウト細胞の微細構造を解析するため、透過電子顕微鏡による解析を行った。その結果Cdc42のノックアウトにより、分泌顆粒が小型化し、数が2倍程度増加することが明らかになった。このことからCdc42は分泌顆粒の生合成または成熟にも分泌顆粒の生合成や成熟にも関与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では唾液腺発生の後期に始まる腺房細胞発生機構に着目し、低分子量Gタンパク質であるCdc42が細胞内輸送の制御を介して腺房細胞の腺腔側膜の形成に重要な役割を果たすことを示した。これまで障害を受けた唾液腺を再生する技術を開発するために、唾液腺の発生機構の解析が行われてきた。本研究成果は発生前期の分枝形態形成期の唾液腺を用いた従来の多くの研究と、成熟した唾液腺組織の間のギャップを埋めるものであり、この研究から唾液腺の再生療法の確立に大きく前進する「Cdc42依存性の腺房細胞の発生機構」という新規の重要なトピックが提供された。

研究成果の概要(英文)： To define the role of Cdc42 during development of salivary acinar cell, we analyzed the morphological change of acinar cell in Cdc42-depleted mouse. Depletion of Cdc42 at late embryonic stages resulted in a complete inhibition of apical membrane their post-natal formation. In addition, intravital subcellular microscopy revealed that reduced levels of Cdc42 affected membrane trafficking from and towards the plasma membrane, highlighting a novel role for Cdc42 in membrane remodeling through the negative regulation of selected endocytic pathways.

We further showed that Cdc42 depletion alters the ultrastructure of large secretory granules analyzed by transmission electron microscopy. We found that lack of Cdc42 increases the number of granules per cell and alters their structure. Specifically, granules are smaller, less circular and exhibit heterogenous electron densities in their lumen. Our findings suggest a novel role for Cdc42 in controlling granule biogenesis and/or maturation.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：唾液腺 唾液腺 細胞内輸送 Cdc42 細胞極性 in vivoイメージング アクチン細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

唾液腺は唾液を産生・分泌する腺房と、それを口腔内まで輸送する導管からなる。腺房細胞は導管細胞より外来ストレスに対する感受性が高く、口腔癌治療時の放射線照射、シェーグレン症候群に伴う炎症などにより容易に障害を受け唾液分泌量低下による口腔乾燥症を惹起し、QOLの低下を招く。近年、障害を受けた唾液腺を再生する技術を開発するために唾液腺の発生機構を調べる研究が活発に行われている。これまで多くの研究グループが唾液腺の器官培養法を用いて、発生初期の唾液腺上皮組織の分枝形態形成を解析しており、詳細なシグナル経路が明らかにされつつある (Dev Biol.412,278,2016; Curr Top Dev Biol.115:111, 2015)。その一方で発生後期の唾液腺を器官培養する手法は確立されておらず、唾液分泌の主となる腺房細胞が形成される仕組みは未だ不明である。

2. 研究の目的

これまでの研究で私は、Rho GTPase の一種であり上皮細胞極性形成の中心として働く Cdc42 のコンディショナルノックアウトマウスを用いて、Cdc42 が唾液腺において、発生段階では腺房細胞の形態形成を制御し、Adult では腺房細胞の形態維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。そこで本研究では、Cdc42 依存性の腺房細胞の発生機構の理解を通して、腺房細胞自身が持つ再生のメカニズムが明らかにするという最終目標を掲げ、以下の3つの目的のもと研究を行う。まず、野生型マウスと Cdc42 ノックアウトマウスの発生過程における腺房細胞の形態変化を蛍光顕微鏡・電子顕微鏡を用いて解析し、どの時期に Cdc42 依存性の著明な形態変化がみられるかを明らかにする (目的1)。次に野生型のマウスを用いて、Cdc42 依存性の形態変化が著明な時期に発現量が変化するシグナル分子を明らかにする (目的2)。最後にこれまでの実験により明らかになった Cdc42 依存性のシグナル経路の阻害剤・活性化剤で処理することにより、腺房細胞の形態形成時に Cdc42 の下流で働くシグナル経路を薬理的アプローチにより確認する (目的3)。

3. 研究の方法

本研究ではまず、野生型マウスと Cdc42 ノックアウトマウスの腺房細胞の発生過程における形態変化を蛍光顕微鏡・電子顕微鏡を用いて解析し、どの時期に Cdc42 依存性の著明な形態変化がみられるかを明らかにする。次に野生型マウスを用いて、Cdc42 依存性の形態変化が著明な時期に発現量が変化するシグナル分子をリアルタイム PCR 法、または免疫組織化学的解析により明らかにする。さらに明らかになったシグナル分子の腺房細胞の形態形成に伴う発現量の変化を、野生型マウスと Cdc42 ノックアウトマウスで比較し、Cdc42 の下流で腺房細胞の形態形成を制御するシグナル経路を明らかにする。最後に器官培養下の唾液腺を、上記の実験により明らかになった Cdc42 依存性のシグナル経路の阻害剤・活性化剤で処理することにより、腺房細胞の形態形成時に Cdc42 の下流で働くシグナル経路を薬理的アプローチにより確認する。

4. 研究成果

(1) Cdc42 による腺腔側膜の形成機構

唾液腺の発生過程における Cdc42 の役割を明らかにするため、我々はまず Cdc42 ノックアウトマウスの腺房細胞の発生過程を蛍光顕微鏡を用いて解析した。その結果 Cdc42 のノックアウトにより、顎下腺腺房細胞の腺腔側膜の形成が抑制されること、その抑制は出生後5日より著名になることが明らかになった (Shitara et al., Mol Biol Cell, 2019; 図1、左)。また予想外のこと、Cre のマーカータンパク質として組み込まれている、細胞膜局在化シグナルを持つ GFP(membrane GFP: mGFP) が、細胞膜上だけでなく細胞内の小胞上においても認められた (図1、右)。このことから、Cdc42 のノックアウトにより細胞内輸送が変化することが示唆された。そこで次に、どの輸送経路が変化しているのかを、細胞内輸送に関わるオルガネラに対する抗体を用いた免疫組織学的解析により調べた。その結果、GFPの一部は初期エンドソームのマーカータンパク質 (EEA1) と共局在することが明らかになった。その一方で初期エンドソーム自体の大きさや数には変化がなかった。このことから Cdc42 のノックアウトにより、細胞膜に局在する GFP のエンドサイトーシスが促進することが示唆された。これらの結果から、腺房細胞の成長過程において Cdc42 は、エンドサイトーシスを抑制的に制御することにより、腺腔側膜の形成を調節している可能性が示唆された。

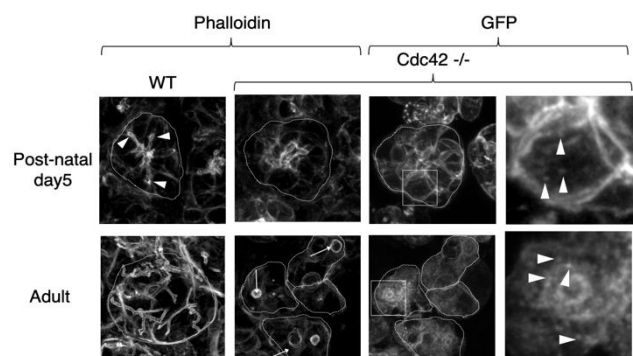


図1 Cdc42 のノックアウト(KO)は腺腔形成を抑制する
出生5日後(上段)、大人(下段)の野生型、Cdc42 KO マウス腺房の腺腔 (Phalloidin)、細胞膜局在化 GFP

従来の培養細胞を用いた研究では、Cdc42はエンドサイトーシスを促進的に制御することが示されている。本研究で我々は、動物の外分泌腺組織においてCdc42は促進的に腺腔側膜における輸送を制御するだけでなく、脂質やタンパク質の一部などの輸送シグナルを持たない分子の内在化抑制的に制御することを初めて示した。

(2) Cdc42による唾液腺分泌顆粒形成の制御

共焦点顕微鏡の解像度は細胞内小器官の詳細な構造を観察するには不十分であり、その見え方も蛍光プローブの発現量に依存して変わる。そこで我々は透過電子顕微鏡を用いて、Cdc42をノックアウト腺房細胞の内部構造のより詳細な解析を行った。

Cdc42ノックアウトマウスと野生型マウスの顎下腺腺房細胞の微細構造を比較した結果、Cdc42のノックアウトにより分泌顆粒の数が2倍程度増加し、かつ個々の分泌顆粒の大きさが減少することがわかった(Shitara et al., Commun. Integr. Biol., 2020; 図2、グラフ左・中)。さらに円形度が優位に減少したことから、分泌顆粒の形態が不規則になることが示された(図2、グラフ右)。またCdc42のノックアウト腺房細胞の分泌顆粒にのみ、内腔に電子密度の高い領域が観察された(図2、透過電子顕微鏡像下段・矢印)。さらに我々は分泌顆粒の細胞質における貯留は開口分泌の抑制により起こるのではないかと考え、*in vivo*イメージングを行い開口分泌機能を解析した。その結果、Cdc42をノックアウトしても分泌機能は維持されることが明らかになり、分泌顆粒数増加は開口分泌以前の過程で惹起されることが示された。

これまでの研究で、神経系内分泌細胞においてCdc42をノックアウトすると、分泌顆粒の数は減少することが示されている(Sato et al., Biochem Biophys Res Commun. 2012)。このことは本研究結果とは逆であり、Cdc42による分泌顆粒の制御は組織によって異なると考えられる。腺房細胞でのCdc42による分泌顆粒の制御の仕組みとしては2つの可能性が考えられる。第一の可能性はトランスゴルジネットワークにおける分泌顆粒の生合成の制御である。Cdc42の消失によりトランスゴルジネットワークにおいて分泌顆粒の出芽が促進され、積荷タンパク質の分配過程に影響を与えた結果、小型で細胞膜の成分などが誤輸送された分泌顆粒が作られたのかもしれない。第二の可能性は分泌顆粒の成熟過程における制御である。分泌顆粒はトランスゴルジネットワークで作られた後、小型の未成熟顆粒同士の融合、顆粒内部の酸性化、積荷タンパク質の濃縮、余剰膜・タンパク質の除去などの様々なステップを経て成熟する。Cdc42の消失により小型の未成熟顆粒同士の融合が抑制される、もしくは余剰膜の除去が抑制されることにより、分泌顆粒が小型化し、数が増加する可能性が考えられる。

(3) まとめ

本研究で我々は唾液腺腺房細胞の発生過程においてCdc42がエンドサイトーシスを抑制するという未知の機能を持つことを明らかにし、腺腔側膜の形成、分泌顆粒の合成または成熟を制御することを示した。今回明らかになったCdc42の新しい働きがこれ以外にどのような生理機能の制御に関与するのか、Cdc42による腺腔側膜の形成、分泌顆粒の合成または成熟過程の分子メカニズムはなんなのか、今後更なる研究が必要だと考えられる。

参考文献

1. Shitara A, Malec L, Ebrahim S, Chen D, Bleck C, Hoffman M, and Weigert R, Cdc42 negatively regulates endocytosis during apical membrane maintenance in live animals. *Molecular biology of the cell*, 30(3), 324-332, 2019.
2. Shitara A, Bleck C k, and Weigert R, Cdc42 controls secretory granules morphology in rodent salivary glands *in vivo*. *Communicative & Integrative Biology*, 13(1), 22-26, 2020.
3. Sato M, Kitaguchi T, Numano R, Ikematsu K, Kakeyama M, Murata M, et al. The small GTPase Cdc42 modulates the number of exocytosis-competent dense-core vesicles in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*.420,417-421,2012.

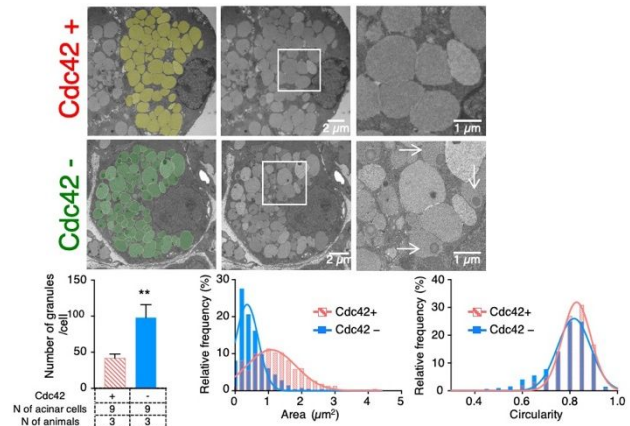


図2 Cdc42+(上)とCdc42-(下)マウスの顎下腺腺房細胞の透過電子顕微鏡像。グラフは定量化した分泌顆粒の数(左)、大きさ(中)、円形度(右)を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shitara Akiko, Malec Lenka, Ebrahim Seham, Chen Desu, Bleck Christopher, Hoffman Matthew P., Weigert Roberto	4. 巻 30
2. 論文標題 Cdc42 negatively regulates endocytosis during apical membrane maintenance in live animals	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 324 ~ 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.e18-10-0615	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 該当する

1. 著者名 Shitara Akiko, Malec Lenka, Ebrahim Seham, Chen Desu, Bleck Christopher, Hoffman Matthew P., Weigert Roberto	4. 巻 -
2. 論文標題 Cdc42 controls secretory granules morphology in rodent salivary glands in vivo.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/402677	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Shitara Akiko, Bleck Christopher K. E., Weigert Roberto	4. 巻 13
2. 論文標題 Cdc42 controls secretory granules morphology in rodent salivary glands in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communicative & Integrative Biology	6. 最初と最後の頁 22 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19420889.2020.1724605	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akiko Shitara, Christopher Bleck, Matthew Hoffman, Roberto Weigert
2. 発表標題 Cdc42 Negatively Regulates Endocytosis During Apical Membrane Maintenance in Live Animals
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Salivary Glands and Exocrine Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 設楽彰子
2. 発表標題 管状臓器の管腔維持、形成におけるCdc42の役割
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 設楽彰子、柏俣正典
2. 発表標題 Cdc42はin vivoでマウス唾液腺の分泌顆粒の形態を制御する
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 設楽彰子、柏俣正典
2. 発表標題 Cdc 4 2 はエンドサイトーシス を負に制御することにより管腔を維持する
3. 学会等名 第64回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Shitara, CKE Bleck, R. Weigert
2. 発表標題 Cdc42 negatively regulates endocytosis during lumen maintenance in live mice.
3. 学会等名 2019 ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ConBio2017における発表報告
<http://scw.asahi-u.ac.jp/~pharmaco/report/index.html#20171209>

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
研究協力者	ウェイガート ロベルト (Weigart Roberto)	National Institutes of Health・Principal Investigator	