

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08287

研究課題名(和文)慢性肝疾患の進展における細胞内輸送の解析

研究課題名(英文) Intracellular transport in the progress of chronic liver disease

研究代表者

阪森 亮太郎 (Sakamori, Ryotaro)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：10644685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化には、外部刺激が必要である。Small GTPaseであるRab8が制御する輸送ネットワークが間葉系組織の分化に与える影響については解明されていない。本研究では、Rab8欠損マウス胎児線維芽細胞(MEF)において脂肪細胞への分化が阻害されることを示した。Rab8aおよびRab8bを欠損したMEFの検討から、Rab8は分化MEFのWntシグナルを減衰させ、またRab8a^{-/-}、Rab8b KD MEFでは脂質滴の形成が阻害され、繊毛の形態異常を認めた。これらより、細胞内輸送が、間葉系細胞においてWnt受容体を介して、脂肪形成の誘導を制御す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

非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)/非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、慢性肝疾患の原因の一つであり、NASHは肝硬変や肝細胞癌に進展しうる。我が国におけるNAFLDの有病率は9～30%、NASHにおいては3～5%と推定され、ともに増加傾向と推測されている。NAFLD/NASHは内臓脂肪と関連し、脂肪細胞の発生についての理解が脂肪肝に対する加療において不可欠である。我々は細胞内輸送の観点から、脂肪細胞の分化誘導について検討を行った。本研究成果は脂肪肝成立メカニズムを理解する上で意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes requires external stimuli, and it is not known how the transport network regulated by Rab8, a Small GTPase, affects mesenchymal tissue differentiation. In this study, we show that Rab8-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs) are inhibited in their differentiation into adipocytes; examination of MEFs lacking Rab8a and Rab8b revealed that Rab8 attenuates Wnt signaling in differentiating MEFs and inhibits lipid droplet formation in Rab8a^{-/-} and/or Rab8b KD MEFs, suggesting that Rab8 is involved in the differentiation of cilia. formation and abnormal cilia morphology were observed in Rab8a^{-/-} and Rab8b KD MEFs. These results suggest that intracellular trafficking regulates the induction of adipogenesis via Wnt receptors in mesenchymal cells.

研究分野：消化器内科

キーワード：脂肪生成

1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患は肝線維化の進展に伴い、肝硬変・肝癌へと進行する不可逆的な病態と考えられている。近年、慢性肝疾患の原因の多くを占めるウイルス性肝炎において抗ウイルス療法の進歩により肝炎ウイルスの抑制・排除が得られるようになり、治療標的は進行した肝線維化の改善にシフトしているが肝線維化に対する有効な治療法は存在しない。一方、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) / 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、慢性肝疾患の原因の一つであり、NASH は肝硬変や肝細胞癌に進展しうる。我が国における NAFLD の有病率は 9~30%、NASH においては 3~5% と推定され、NAFLD については近年増加しており、NASH についても増加傾向と推測されている。NASH は肝細胞に中性脂肪が沈着し、炎症細胞浸潤や風船様肝細胞腫大を伴う病態であるが、その進展メカニズムについては明らかでない点が多い。栄養として体内に取り込まれた脂肪が肝細胞内に取り込まれ、細胞内代謝あるいは細胞外へ排出される細胞内輸送の破綻が細胞内脂肪蓄積の病態に関与している可能性があるが、肝細胞内輸送に焦点を当てた検討はほとんどなされていない。

申請者は、small GTPase である Cdc42 の腸管特異的ノックアウト (KO) マウスを用い、腸管上皮幹細胞の極性維持や発生・分化に Cdc42 が不可欠であること、Cdc42 が大腸癌進展に関与することを明らかにした。また Cdc42 と同じ Rab タンパク質である Rab8a が細胞内輸送とともに Wnt シグナルを制御すること、さらに Rab11 KO マウスを用いて、Rab11a が TLR9、NF- κ B の経路に関与して炎症性サイトカインの産生を制御することや炎症性の腫瘍形成を制御することを見出してきた。また Rab11a の全身 KO マウスは胎生致死に至ることも明らかにしている。このように申請者は様々な KO マウスを用いて消化器臓器の遺伝子学的探索に取り組んできた。同様の手法を用いることで、肝細胞における細胞内輸送の役割を明らかにし、NASH や肝癌の病態解明や、肝線維化に対する治療戦略の構築を目指したい。

2. 研究の目的

我々は細胞内輸送を制御するキープレーヤーと考えられる Rab11a に着目した。Rab11a は細胞内への取り込みや細胞外への排出を選択的に行うリサイクリングエンドソームに重要な small GTPase の一つである。特に低密度リポタンパク質 (LDL) やコレステロールの取り込み受容体ガリサイクリングエンドソームを介した細胞内輸送で制御されることが報告されている。またリサイクリングエンドソームを通過するタンパク質として、鉄やグルコースの取り込みに重要なトランスフェリン受容体や Glut4 などが知られており、Rab11a により制御されていることが報告されている。肝内の鉄過剰が肝発癌を誘導すること、糖尿病が肝発癌のリスク因子であることから、リサイクリングエンドソームを含む細胞内物質輸送が肝発癌を含む病態に関与していることが考えられる。また近年、肝星細胞においても Rab11 が TGF β 受容体 2 を介して肝星細胞を活性化し、細胞外マトリックスのリモデリング、血管新生、免疫抑制に関与することが報告されている。しかしいずれの報告も培養細胞での検討であり、遺伝子改変動物を用いた Rab11a の報告はない。

そこで本研究では、肝細胞特異的 Rab11a KO マウスを用いて脂肪の肝細胞内輸送ならびに脂肪蓄積による肝障害を明らかにし、NAFLD/NASH における病態メカニズムを解明することで、NAFLD/NASH に対する治療ターゲットを明らかにすることを目的とする。また肝星細胞特異的 Rab11a KO マウスを作製し、細胞内輸送の肝線維化や肝癌への関与について解析することも目的とする。

3. 研究の方法

マウス胎児線維芽細胞 (MEF) の分離、培養

Rab8a^{+/-} マウスを交配に用いた。E12.5 日目に、妊娠した雌を犠牲にし、胚を解剖した。胎盤、卵黄嚢、子宮を除去した後、頭部と内臓 (心臓、肝臓、脾臓、腸) を摘出した。尾はジェノタイプピングのために保存した。残りの組織は、トリプシン-EDTA の入った 1.5ml のエッペンドルフチューブに入れた。滅菌ハサミで、組織をできるだけ細かく裁断し、37 $^{\circ}$ C の加温器で 10 分間インキュベートした。懸濁後、細胞をペレット化し、ピルビン酸ナトリウム、10% ウシ胎児血清 (FBS)、1.0mg/ml ペンストレップ、0.05mg/ml ゲンタマイシンを含む DMEM 中にプレーティングした。実験開始前に細胞を 3 回継代して線維芽細胞を単離した。

Rab8b のクローニングとレンチウイルス ノックダウン化

マウス Rab8b の 3'UTR を標的とする Rab8b 特異的レンチウイルス shRNA 構築物は、アニールした相補的オリゴヌクレオチド (5'-) を挿入することにより構築した。CCGGGCCAAGAAGCTAAGAAGCTTTCCATGGAAGTTCTGTTAGTCTTTGGCTTTG-3' と 5'-AATTCAAAAAGCCAAGAAGCTAAGAAGCTTTCCATGGAAGTTCTGTTAGTCTTTGGC-3' を pLK0.1 lentiviral vector (Addgene) の AgeI サイトと EcoRI サイトの間に挿入した。ウイルスパッケージングのために、pVSV-G とともにこのレンチウイルスベクターを、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて GP2-293 細胞 (Clontech) にトランスフェクションした。48 時間後、上清を回収し、超遠心分離

(15,000g、2時間)に供してウイルスを濃縮した。ウイルスペレットを200 μ lのDMEMで再懸濁し、後で使用するためにアリコートした。Rab8b KDのために、MEFを希釈したレンチウイルスストック(1:50,000)でポリブレン(8 μ g/ml)存在下のDMEM中で5時間感染させ、さらに10%FBSを含むDMEMで24時間培養し、培養液にPuromycin(3 μ g/ml)を追加した。KD効率およびKDの維持は、ウェスタンブロッティングにより確認した。

細胞培養と脂肪細胞誘導

細胞は5%CO₂、37 $^{\circ}$ Cの加湿室で連続的に維持された。MEF細胞は、ピルビン酸ナトリウム、10%FBS、1.0 mg/ml Pen-Strep、および0.05 mg/ml ゲンタマイシンを含むDMEM中で70%コンフルエントに維持した。MEF細胞の脂肪形成は、以前に公開されたプロトコル(59-61)に従って実施した。脂肪形成を誘導するために、細胞を100%コンフルエントまで増殖させ、その後48時間過密プレートとして維持し、ピルビン酸ナトリウム、10%FBS、1.0mg/ml Pen-Strep、0.05mg/ml ゲンタマイシン、1.0- μ M デキサメタゾンを含むDMEMでインキュベートした。5-mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン、5.0mg/ml インスリン、1.0 μ M ロシグリタゾンを含むDMEMで48時間培養した後、ピルビン酸ナトリウム、10%FBS、1.0mg/ml Pen-Strep、0.05mg/ml Gentamicin、5.0mg/ml Insulinで8日培養を行った。完全な分化は、誘導から12日以内に達成された。脂肪細胞の脂質滴はBODIPY 493/503で染色し、ImageJで定量化した。染色実験のために、細胞は6ウェルプレートの0.1%ゼラチンコートされたカバースリップ上にプレーティングおよび/または分化させた。細胞溶解液については、細胞を10cm²の培養プレートで12日間培養し、分化させてから採取した。

ルシフェラーゼアッセイ

MEF細胞を24ウェルプレートにプレーティングし、Lipofectamine 3000(Invitrogen)を用いて250ng TopFlash、10ng Renilla、および200ng β -catenin Nを二重にトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、100%コンフルエントの細胞を8時間血清静置し、PBSに溶解した50 ng/ml Wnt3a(315-20; PeproTech)または20- μ M CHIR99021(Stemgent)で16時間処理した。カテニン N群では、100%コンフルエントの細胞を24時間血清静置した。その後、細胞を溶解し、Dual-Luciferase Reporter Assay Kit(Promega)およびGloMax-Multi Detection System(Promega)を用いて、製造者の指示に従いルシフェラーゼアッセイを行った。

ウェスタンブロット

WTおよびRab8a^{-/-} MEFs細胞を16~24時間飢餓状態にした後、ビヒクルまたはWnt3a(100 ng/ml)で処理し、0、2、4時間で回収した。MEF細胞を氷冷したPBSで洗い、溶解バッファ(50 mM Tris, pH 7.5, 150-mM NaCl, 10-mM EDTA, 0.02% NaN₃, 50-mM NaF, 1-mM Na₃VO₄, 1.0% NP-40, 0.1% SDS, 1-mM PMSF, 0.5-mM DTT, protease inhibitors)中で4 $^{\circ}$ Cで溶解し、溶解液を氷上に15分間インキュベートし4 $^{\circ}$ C、17000g、15分スピンドアウンの上、上清を回収し、タンパク質濃度を分析した。ドデシル硫酸リチウムおよび50-mM DTTを加えた後、サンプルを70 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした。サンプルをSDS-PAGEゲルにロードし、ポリビニリデンジフルオリド膜に転写し、0.1% Tween 20を含むトリス緩衝生理食塩水中の5%スキムミルクで1時間ブロッキングした(室温)。この膜を一次抗体とインキュベートした: LRP6(3395, Cell Signaling Technology) λ p-LRP6(S1490) λ 2568, Cell Signaling Technology) λ Axin1(2087, Cell Signaling Technology) λ Dvl2 λ 3224, Cell Signaling Technology) λ Dvl3 λ 3218, Cell Signaling Technology) λ β -catenin(#610154, BD Transduction Laboratories) λ p- β -catenin(9561, Cell Signaling Technology) λ GSK3 α (#9315, Cell Signaling Technology) λ p-GSK3 α (9323, Cell Signaling Technology) λ α -アクチン(sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) λ TCF-1(2203, Cell Signaling Technology) λ Caveolin-1(3267, Cell Signaling Technology) λ Rab5(3547, Cell Signaling Technology) λ Rab7(9367, Cell Signaling Technology) λ Rab9(5118, Cell Signaling Technology) λ Rab8(#610844, BD Transduction Laboratories) λ Rab11a(#R0009/YL8, US Biological) λ Fzd2(52565, Abcam) λ Fabp4(13979, Abcam) λ Glut4(2213, Cell Signaling Technology) λ Erk1/2(9102, Cell Signaling Technology) 及びpErk1/2(9106, Cell Signaling Technology)の希釈で4 $^{\circ}$ Cで一晩。0.1% Tween 20を含む1x トリス緩衝生理食塩水で洗浄後、膜を二次抗体(1:2000; ECL, GE Amersham ECL)で1~2時間インキュベートし(室温) ECL検出試薬(RPN2209とRPN2232, GE Amersham)で発光した。

スクロースグラジエントセディメンテーション

16~24時間の飢餓状態の後、WT Rab8a^{-/-}およびRab8bkd MEF細胞を収穫前に4時間Wnt3a(100 ng/ml)で処理した。細胞を氷上のHank's Balanced Salt Buffer中で収穫し、ペレット化し、30-mM Tris(pH 7.4), 140-mM sodium chloride, 1% Triton X-100, 25-mM sodium fluoride, 3-mM sodium orthovanadate, 2-mM PMSFおよびprotease inhibitor cocktail tablet(Roche)を含む抽出バッファで20分間溶解させた。溶解液を遠心分離し、上清を15~40%ショ糖勾配30-mM Tris(pH7.4) 140-mM 塩化ナトリウム、0.02% Triton X-100、25-mM フッ化ナトリウム、3-mM オルトパナジン酸ナトリウム、プロテアーゼ阻害剤の上に重層した。超遠心分離は、ベックマンSW55Tiローターで45,200rpm、4 $^{\circ}$ Cで4時間行った。遠心分離後、ペリスタルティックボ

ンブでチューブ底部から画分を集め、SDS-PAGE および免疫プロットで分析した。

免疫蛍光法

BODIPY 493/503 染色は濃度 1mg/ml とした。暗所で、カバースリップ上にプレATINGした分化細胞を 4%PFA で 10 分間固定し、1xPBS で 2 回洗浄し、0.1%Triton X-100 で 10 分間インキュベートした(室温)。次に、細胞を BODIPY 493/503 (1xPBS 中のストックの 1:1000) で 30 分間インキュベートし、TO-PRO-3 (1xPBS 中の 1:500) で 15 分間カウンターステインした(室温)。カバースリップを乾燥させ、ProLong Anti-fade reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてスライドにマウントし、透明なマニキュアで密封した。画像処理は、Zeiss LSM 510 Confocal Microscope を使用して実施した。繊毛形成については、カバースリップを含む 6 ウェルプレートに細胞をプレATINGした。すべての細胞を 48 時間オーバーコンフルエンスで増殖・維持し、無血清培地でそれぞれ 0、2、24、48 時間インキュベートした。染色当日、細胞をメタノールで -20℃、5 分間固定した。透過性化は、PBS 中の 0.1% Triton X-100 中で 10 分間行った(室温)。細胞を PBS 中の 10% ヤギ血清で 30 分間ブロックし(室温)。次いで一次抗体: アセチル化-チューブリン(1:800; T7451, Sigma-Aldrich)、 α -チューブリン(1:800; 84355, Abcam)、PBS 中の 10% ヤギ血清とともに 4℃で一晩インキュベートした。PBS で洗浄した 2 日目に、細胞を蛍光結合二次抗体(1:1000; Thermo Fisher Scientific) と暗所で 1 時間インキュベートした(室温)。PBS で洗浄後、細胞を PBS 中の TOPRO-3 (1:500; T3605, Thermo Fisher Scientific) で 15 分間カウンターステインした(室温)。カバースリップを乾燥させ、ProLong Anti-fade reagent (P36930, Thermo Fisher Scientific) でスライドにマウントし、透明なマニキュアで密封した。画像処理は、Zeiss LSM 510 共焦点顕微鏡を使用して行った。免疫染色は、細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、2% ウシ血清アルブミン、2% ヤギ血清、0.1% Triton X-100 ブロッキングバッファーで 1 時間ブロックし、一次抗体、アセチル化-チューブリン(1:500; T7451, Sigma-Aldrich) および α -チューブリン(1:500; #ab84355, Abcam) と、ブロッキングバッファー中で 4℃で一晩インキュベートした。翌日、PBS で洗浄した後、切片をブロッキングバッファー中の蛍光結合二次抗体(1:1000; Thermo Fisher Scientific) で 1 時間インキュベートした(室温)。切片を PBS 中の TO-PRO-3 (1:500; T3605, Thermo Fisher Scientific) で核のカウンターステインを RT で 15 分間行い、その後洗浄し、ProLong Gold Anti-fade mounting media (P36930, Thermo Fisher Scientific) を用いてマウントした。画像は、Zeiss LSM 510 共焦点顕微鏡を用いて撮影した。LPR6 免疫蛍光検出のために、細胞を pCS2+LRP6 GFP で一過性トランスフェクトした(83)。100%コンフルエントになったところで、細胞を 24 時間血清飢餓状態にし、その後 Wnt3a (100ng/ml, DMEM で希釈) またはベークルのみで処理した。処理の 15 分後、細胞を 4%PFA で固定し、その後、GFP (1:100; 8334, Santa Cruz Biotechnology) について前述したように、4℃で一晩間免疫蛍光ストレインングを実施した。画像は、Zeiss LSM 510 共焦点顕微鏡を使用して撮影した。LRP6 パンクタ、または周辺パンクタの数は、6~8 個の異なるフィールドの個々の細胞から手動でカウントした。

RNA 抽出と qPCR 解析

未誘導の MEF を 90%コンフルエントで回収した。誘導された MEF は、誘導開始から 48 時間後に回収した。RNA 抽出は、RNeasy キット(QIAGEN)を用いた。プライマー配列を以下に示す: Glut4、5'-CAGATCGGCTCTGACGATG-3' および 5'-ACTGAAGGGAGCCAAGCAC-3'、Fabp4、5'-CGCAGACGACAGGAAGGT-3' および 5'-CAGCTTGTCCACATCTCGTT-3' ; PPAR- α 、5'-AGCCTGTGAGACCAACAGC-3' および 5'-TGGTTCACCGCTCTTTCA-3'、 α -アクトニン、5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAG-3' および 5'-CACCGATCCACAGAGTA-3'。

定量化および統計

すべての結果は 3 つ以上の独立した実験から得られた。ウェスタンプロット、脂肪滴の大きさ、繊毛の長さは ImageJ (NIH, version 1.49) で測定した。各細胞株について、6 枚の低倍率共焦点画像から、全細胞に対して繊毛を手動でカウントした。脂質滴下数およびサイズは、ImageJ の粒子解析を用いて定量化した。データは、独立した実験からの平均値 \pm SEM を表した。統計解析は、Student's t test、one-way ANOVA、または way ANOVA によって行われた。有意性は $p < 0.05$ で認められた。計算とグラフは、GraphPad Prism (7.04) を用いて作成した。

4. 研究成果

MEF は、脂肪生成誘導剤に反応して脂肪細胞に成熟し、Canonical Wnt シグナルがその脂肪生成を阻害する。Wnt シグナルが、脂肪細胞の分化能に変化を及ぼすのかについて検討を行うため、Rab8a 欠損 MEF を用いて Wnt/ β -catenin シグナルにおける Rab8 の役割を検討した。Rab8a 欠損 MEF は Wnt3a 刺激に対する感受性が増加していた。野生型 MEF は 4.9 倍の Wnt3a 誘導 TopFlash 活性を示したのに対し、Rab8a 欠損 MEF は 30 倍の活性誘導を示した。次に、Wnt3a 刺激後の血清飢餓細胞における pLRP6 の一時的な誘導に Rab8a が影響を与えるかどうかを検討した。未処理(血清飢餓)の Rab8a 欠損 MEF において、総 LRP6 に対する pLRP6 量は、野生型 MEF の約 14 倍であった。これらから、胎児線維芽細胞における Rab8a 欠損により、細胞内シグナル伝達応答の

増強を伴う Lrp6 シグナロソーム活性が上昇することが示唆された。次に GSK3 を介したシグナル伝達阻害を評価するため GSK3 阻害剤である CHIR99021 を使用した。Rab8a 欠損 MEF は、野生型 MEF と比較して CHIR99021 に応答して TopFlash 活性の 9 倍の増加を示した。次に、-catenin (-cat- N) 恒常的活性化コンストラクトを過剰発現させたところ、TopFlash 活性は野生型・Rab8a 欠損 MEF において同等であった。以上より Rab8a 欠損 MEF において増強した Wnt シグナル伝達は、-カテニンの上流で関与していることが示唆された。

Rab8 が Lrp6 小胞を制御し、Wnt リガンドに応答する MEF のシグナルを制御しているかどうかを評価するため、Rab8b を KD した MEF と Rab8a および Rab8b の両方を欠損した MEF を作成した。まず GFP-Lrp6 を一過性に発現させ、野生型および Rab8 欠損 MEF の Lrp6 の細胞内局在を検討した。血清飢餓状態の野生型 MEF では、小胞型の Lrp6 はまれであり、細胞あたり平均約 2 個の Lrp6 陽性 puncta であった。Wnt3a の 15 分間添加により、小胞体 Lrp6 は約 9 倍増加した。一方、Rab8aKO、Rab8bKD、Rab8aKO;Rab8bKD の MEF は、野生型に比較し小胞体 Lrp6 が著しく増加した。Rab8 欠損 MEF では、Lrp6 のコンパートメントが変化していることが示唆された。Lrp6 の細胞内分布を評価するため、Wnt3a 刺激 4 時間後の MEF を用いてスクロース勾配沈降を行った。野生型 MEF では Lrp6 は主に 8-10 の分画に存在し、pLRP6 はどの分画においてもほとんど検出されなかった。Wnt3a 刺激を受けた野生型 MEF では Lrp6 は 6-11 の分画で検出され、pLrp6 は GSK3 、エンドサイトーシスマーカーとしてカベオリン 1 が共沈している 8-11 の分画で検出できるようになった。Rab8a KO MEF では、Dvl2、Rab7、Rab9、カベオリン 1 が共存する 9-11 分画で pLrp6 が顕著に増加した。Wnt 刺激により Rab8a KO MEF では pLrp6 の存在量と細胞内ドメインが増加した。また Rab8a KO MEF では Wnt 刺激による Axin1、Rab7、カベオリン 1 の沈降が野生型 MEF に比し変化しており、Rab8a 小胞欠損が Wnt リガンド刺激に対する膜輸送ネットワークに影響を与えていることが示唆された。Rab8b KD MEF では Rab8a KO MEF と同様に pLrp6 への影響がみられたが、より弱い影響であった。これらの結果より Wnt リガンドに対する MEF の感作に關与する可能性のある小胞体 Lrp6 の変化があると考えられた。

Planar cell polarity effectors は、Rab8 小胞への Dishevelled の Fuzzy リクルートメントに依存するメカニズムを介して、一次繊毛の基部に輸送される。Planar cell polarity 活性は、Wnt シグナルと直接交差している。Rab8 欠損 MEF では Wnt シグナロソーム活性が亢進していたことから、繊毛誘導した WT および Rab8 欠損 MEF で Wnt 受容体である Fzd2 を免疫蛍光染色した。55%の WT MEF では、血清飢餓前(0時間)に、Fzd2 は一次繊毛の基部にある大きな膜「パッチ」に局在していた。24 時間の血清飢餓後、一次繊毛の基部にある Fzd2 のパッチは、WT 細胞の 88.7%で検出され、多数の小さな Fzd2 の斑点を認めた。Rab8a KO MEF では約 50%が一次繊毛に局在する Fzd2 膜パッチを示し、24 時間の血清飢餓後に 80%に増加した。Rab8a KO MEF は血清飢餓前でも多くの蛍光 Fzd2 斑点を認め、これらは血清飢餓 24 時間後に増加した。Rab8a KO MEF と Rab8b KD MEF は繊毛の基部にほぼ同数の Fzd2 パッチを有していたが、Rab8b KD MEF では繊毛に関連したパッチは比較的小さく、Rab8b KD 細胞は飢餓前後ともに Fzd2 斑点を欠いた。Rab8a KO; Rab8b KD MEF は、飢餓前には繊毛関連 Fzd2 斑点が少なく、24 時間の血清飢餓後に顕著となった。Rab8a KO; Rab8b KD 細胞において Fzd2 の斑点形成は損なわれなかった。Kif3a KO MEF は、一次繊毛を欠くものの、Fzd2 膜パッチと Fzd2 斑点を含んでいた。これらより、Rab8 は Wnt シグナル成分の膜位置の制御と、脂肪生成シグナルに応答した適切な MEF 分化に重要な役割を果たすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Stypulkowski Ewa, Feng Qiang, Joseph Ivor, Farrell Victoria, Flores Juan, Yu Shiyun, Sakamori Ryotaro, Sun Jiabin, Bandyopadhyay Sheila, Das Soumyashree, Dobrowolski Radek, Bonder Edward M., Chen Miao-Hsueh, Gao Nan	4. 巻 296
2. 論文標題 Rab8 attenuates Wnt signaling and is required for mesenchymal differentiation into adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100488 ~ 100488
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100488	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0件

〔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	巽 智秀 (Tatsumi Tomohide) (20397699)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	疋田 隼人 (Hikita Hayato) (20623044)	大阪大学・大学院医学系研究科・講師 (14401)	

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
---------	---------