

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：34536

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460269

研究課題名(和文)細胞極性の異常が消化管ホルモン分泌に与える影響

研究課題名(英文)Disruption of cell polarity influences the secretion of gastrointestinal hormones

研究代表者

原田 玲子 (HARADA, Reiko)

宝塚医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：40230718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量GTP結合タンパク質Rab8aノックアウトマウスの小腸上皮細胞では、SGLTなど頂端側に輸送される蛋白の局在異常が認められた。GLP-1発現の増加や、GLP-1とChromogranin Aとの共発現も認められたが、GLP-1の細胞内局在に大きな変化は認められなかった。

インクレチン分泌の機構を解明するためには、側底側への蛋白の輸送異常を示すマウスを解析するのが望ましい。そこで申請者らは様々なノックアウトマウスを解析したが、側底側に輸送される蛋白の分布に明らかな異常は認められなかった。一方SNAP23欠損マウスではホルモン分泌異常が認められ、この結果を投稿中である。

研究成果の概要(英文)：Using mice deficient in the small GTP-binding protein Rab8a, we demonstrated that rab8a is responsible for the localization of apical proteins such as SGLT in intestinal epithelial cells. Rab8a knockout mice showed increased GLP-1 expression and co-expression of GLP-1 and Chromogranin A, but the subcellular localization of GLP-1 was not affected.

We therefore tried to generate knockout mice in which the localization of basolateral proteins is disrupted. However in all the knockout mice we analyzed, there were no obvious missorting of basolateral proteins. On the other hand, mice deficient in SNAP23 showed difference in hormone secretion, and this result is now under submission.

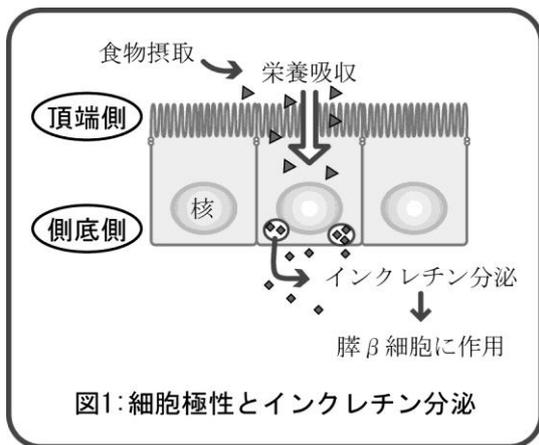
研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞極性 消化管ホルモン ノックアウトマウス インクレチン rab8

1. 研究開始当初の背景

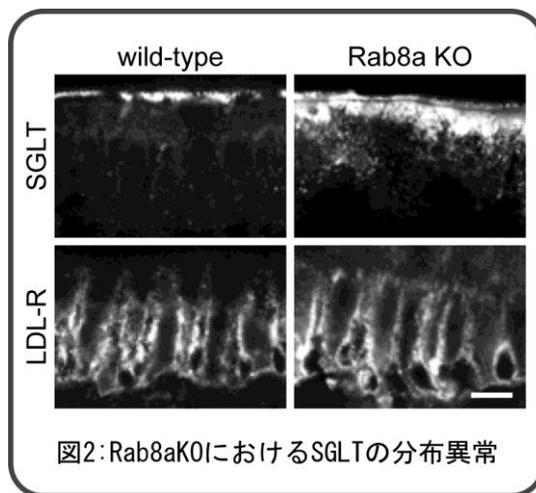
インクレチンは、食事摂取に応答して腸管から分泌され、膵β細胞に作用してインスリン分泌を促進する消化管ホルモンで、糖尿病の新たな治療標的として脚光を浴びている(参考文献①)。インクレチンの薬理作用に関する研究は盛んであるが、インクレチン分泌細胞の細胞生物学的研究は未だ少ない。

インクレチンには GLP-1 (glucagon-like peptide 1) と GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) があり、食事摂取に伴い GLP-1 は小腸下部の L 細胞、GIP は小腸上部の K 細胞から分泌されることが知られている(参考文献②)。インクレチンを産生するこれらの小腸上皮細胞は、頂端側(管腔に面する側)と側底側(血管などに面する側)という極性を有する。図1に示すように、小腸上皮細胞が頂端側において栄養素(主として糖質)を感受すると、インクレチンは側底側(つまり反対側)から血中に分泌され、血流を介して膵β細胞に作用する。糖質を感知する受容体としてはナトリウム依存性グルコース輸送体 SGLT が候補として知られているが、SGLT は小腸上皮細胞において頂端側の細胞膜上に局在している(参考文献③)。このためインクレチンが正常に作用するには、小腸上皮細胞における頂端側と側底側との連携が非常に重要と考えられるが、その機構は未だ解明されていない。



2. 研究の目的

申請者の所属する研究グループでは以前、低分子量GTP結合タンパク質Rab8aのノックアウトマウス(KOマウス)を作成・解析し、このマウスの小腸上皮細胞では頂端側への蛋白の輸送が選択的に障害されることをNature誌に発表した(参考文献④)。図2に示すように、Rab8aノックアウトマウス小腸上皮細胞においては、側底側に輸送されるLDL受容体(LDL-R)の分布は正常であるのに対し、頂端側に輸送されるSGLTは微絨毛まで運ばれずに細胞内に留まる。これらの背景から申請者は、Rab8aノックアウトマウスがインクレチン分泌機構の細胞生物学的解明に役立つであろうという着想に至った。



また、消化管ホルモンは、セクレチンやコレシストキニン・パンクレオザイミン(CCK)など三十種類以上が存在しており、複雑な働きを持つ胃腸や膵臓、肝臓、胆道といった臓器をコントロールしている。これら消化管ホルモンの多くは、摂取した食物の刺激を受けて、腸管上皮に存在する内分泌細胞から血中に分泌される。

例えばセクレチンは胃から送られて来る酸性糜汁の刺激を受けて、十二指腸のS細胞から分泌される。またCCKは、十二指腸の栄養素(ペプチド・アミノ酸・脂肪酸)を感受してI細胞から分泌される。これらS細胞やI細胞においても、インクレチン分泌細胞と同様に「頂端側での感受」から「側底側での分泌」という連携が重要な役割を担っている。

当研究において消化管ホルモンにおける細胞極性の影響を研究することは、ひいては一般に消化管ホルモン分泌の機構解明に役立つと考えられる。

3. 研究の方法

(1) Rab8a KOマウスのインクレチン解析

本研究で使用しているRab8a KOマウスは、我々の研究グループがrevertible knockout法を用いて作成したものである(参考文献④)。動物実験においては、大阪大学の実験動物指針を遵守した。また実験は大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て行われた。Rab8a KOマウスとしてはRab8a^{-/-}マウスおよびRab8a^{geo/geo}マウスを用い、wild-typeマウスとしては同腹のRab8^{+/+}マウスを用いた。Rab8a KOマウスは生後約4週齢で死亡するため、本研究では全て3週齢のマウスを解析した。

免疫染色実験では、マウスを麻酔下にて固定液(3% Paraformaldehyde/0.1M リン酸buffer)で経心灌流固定し、小腸を取り出した。小腸上部としては十二指腸を用い、小腸下部としては大腸境界部付近を用いた。さらに後固定とクライオプロテクションの後、組織片を凍結し、クライオスタットを用いて薄切した。

免疫染色の一次抗体としては以下の抗体を用いた：goat anti-SGLT-1 (M-19) (Santa Cruz sc-20582), goat anti-GLP1 (C-17) (Santa Cruz sc-7782), Rabbit anti Chromogranin A (94-130) (矢内原研究所 Y291)。二次抗体としては以下の抗体を用いた：Alexa 488-labeled donkey anti-rabbit IgG, Alexa 568-labeled donkey anti-goat IgG (Invitrogen)。免疫染色後さらに DAPI を用いて核染色を行った。コンフォーカル写真は共焦点レーザー顕微鏡オリンパス FV1000D を用いて撮影した。

(2) 様々な極性関連蛋白の KO マウスにおけるホルモン分泌異常の解析

申請者の所属する研究グループでは、様々な極性関連蛋白 KO マウスの作成・解析を行っている (参考文献⑤)。これらの KO マウス (PKD1 KO マウス、PKD2 KO マウス、PKD1 と PKD2 のダブル KO マウス、Rab8b KO マウス、Rab8ab ダブル KO マウス、Rab11 KO マウス、EHBP1L1 KO マウス) を用いて分泌の異常を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) Rab8a KO マウスにおける GLP-1 の異常

GLP-1 は、SGLT が小腸上皮細胞頂端側で糖質を感知したのを受けて、小腸下部の L 細胞から分泌される。Rab8a KO マウスにおいて SGLT が局在異常を示すことから、GLP-1 の産生にも異常が生じることが予想される。そこで本研究では小腸における GLP-1 の局在を解析した。

図 3 に示すように、Rab8a KO マウスでは小腸下部において、GLP-1 陽性細胞の数の増加が認められた。また、wild-type マウスでは小腸上部では GLP-1 陽性細胞はほとんど存在しないのに対し、Rab8a KO マウスでは小腸上部においても GLP-1 陽性細胞が点在していた。このことから Rab8a KO マウスの小腸全体において、GLP-1 産生細胞が増えていると考えられる。

倍率を上げて観察すると、GLP-1 陽性細胞において、GLP-1 陽性顆粒の局在や、一細胞当たりの顆粒の数には明らかな差は認められないことが解った (図 4)。GLP-1 陽性顆粒は wild-type と Rab8a KO マウスの双方において、核の周辺や細胞の側底側に分布し、調節性分泌経路に典型的な大型分泌顆粒であった。

Chromogranin A は腸クロム親和性細胞 (ECL 細胞) などの神経内分泌細胞に局在し、調節性分泌経路において分泌顆粒形成に重要な役割を担うと報告されている (参考文献⑥)。そこで小腸上皮細胞を抗 GLP1 抗体および抗 Chromogranin A 抗体で二重染色したところ、wild-type マウスでは GLP-1 陽性細胞は Chromogranin A 抗体で染まらないのに対し、Rab8a KO マウスでは GLP-1 と Chromogranin A との共発現が認められた。

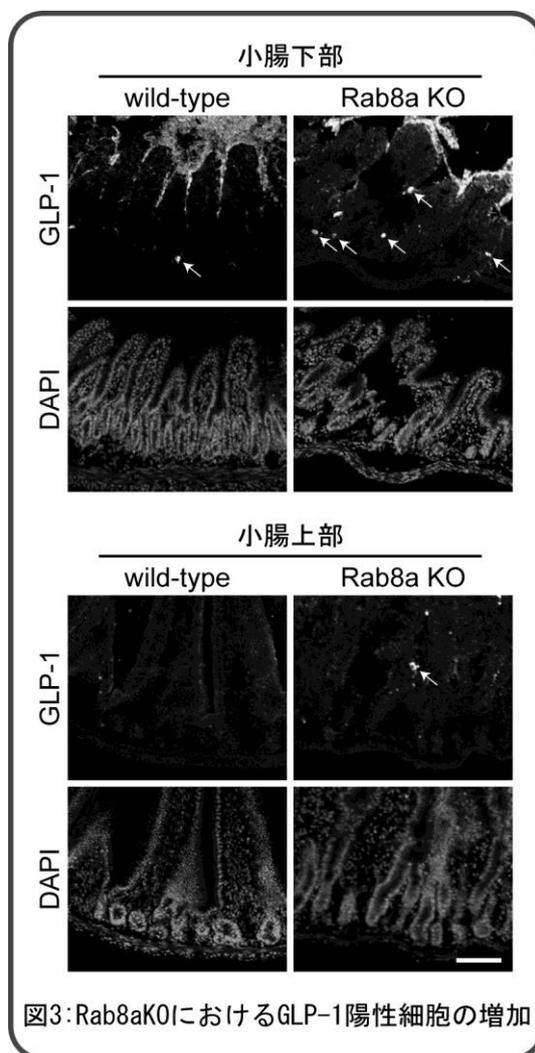


図3: Rab8aKOにおけるGLP-1陽性細胞の増加

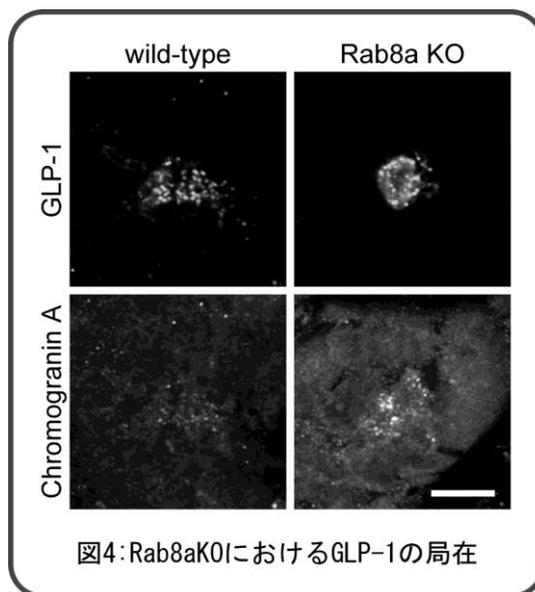


図4: Rab8aKOにおけるGLP-1の局在

申請者らの研究により、Rab8aKO マウスの小腸上皮細胞において、糖質を感知する受容体である SGLT が頂端側の細胞膜上に局在せず、細胞内に異常蓄積することが認められた。また本研究により、小腸全体において、GLP-1 産生細胞の増加が認められた。GLP-1 は SGLT からの情報を得て分泌されるため、

SGLTが機能しないことによりGLP-1の産生は抑えられると予想されたが、GLP-1産生細胞の増加は、このシステムがより複雑なものであることを示唆するものである。今後は血中GLP-1濃度の測定を行い、GLP-1の分泌がRab8aKOマウスにおいて阻害されていないか調べる必要がある。

さらに本研究では、Rab8aKOマウスにおいてGLP-1とChromogranin Aとの共発現が認められた。この結果に対しては以下の二つの仮説が考えられる：① ECL細胞など、L細胞以外の内分泌細胞がGLP-1を産生するようになった、または② L細胞において調節性分泌経路が活性化されてChromogranin Aの発現量が上昇した。これらの可能性をさらに探究するには、今後の経時的、定量的な解析が必要である。

本研究で観察されたGLP-1産生細胞の増加は非常に興味深い現象である。さらなる研究によって、この増加の機構が解明されて、GLP-1産生細胞の数を増やすことが可能になれば、それは糖尿病の新薬の開発につながることも期待される。

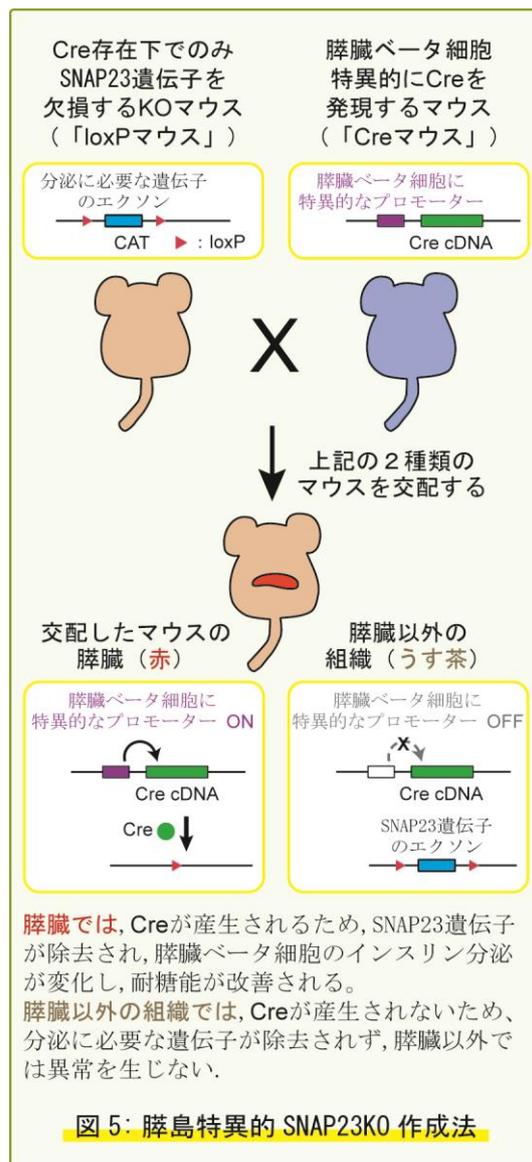
(2) 様々な極性関連蛋白のKOマウスの解析

Rab8aKOマウスにおいてはGLP-1発現の増加や、GLP-1とChromogranin Aとの共発現が認められたが、GLP-1の細胞内の局在に大きな変化は認められなかった。インクレチンは小腸上皮細胞の側底側から分泌されるため、インクレチン分泌のメカニズムを解明するためには、側底側に輸送される蛋白の分布が異常を示すKOマウスを解析することが望ましい。

そこで申請者らは、様々なノックアウトマウスにおいて、側底側に輸送される蛋白の分布を調べた。PKD (Mammalian protein kinase D) 1 KOマウス、PKD2 KOマウス、PKD1とPKD2のダブルノックアウトマウスにおいて、小腸上皮細胞の細胞極性に大きな異常は認められなかった。また、Rab8bノックアウトマウス、Rab8abダブルノックアウトマウス、Rab11 KOマウス、さらにはRab8aに結合するEHBP1L1ノックアウトマウスでは、Rab8aのノックアウトマウス同様に、頂端側に輸送される種々の蛋白では局在の異常が認められたが、側底側に輸送される蛋白の分布には明らかな異常が認められなかった(主な発表論文等参照)。そのため、現在は小腸上皮細胞の側底側への輸送が障害されることが予想されるモデルマウスを作成中であり、その様なモデルマウスを解析することによって、インクレチンの分泌機構が解明されることが期待される。

一方、SNAP23欠損マウスでは内分泌系および外分泌系に非常に興味深い異常が認められた(図5)。現在その結果を投稿中であり、既に査読者より好意的な評価が得られている。膵島ベータ細胞特異的SNAP23 KOマウスでは耐糖能が改善することから、この研究は

糖尿病の新たな治療法の開発につながる可能性がある。



<引用文献>

- ① Campbell JE, Drucker DJ : Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action, Cell Metabolism, 2013, 17:819-837
- ② Habib AM et al : Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry, Endocrinology, 2012, 153:3054-3065
- ③ Reimann F et al : Glucose sensing in L cells: a primary cell study, Cell Metabolism, 2008, 8: 532-539
- ④ Sato T, Mushiake S, Kato Y, Sato K, Sato M, Takeda N, Ozono K, Miki K, Kubo Y, Tsuji A, Harada R, Harada A : The Rab8 GTPase regulates apical protein

localization in intestinal cells,
Nature, 2007, 448:366-369

- ⑤ 原田彰宏:細胞内極性輸送に関わる分子の機能解明, 生化学, 2008, 80: 830-833
- ⑥ 渡部 剛, 他:内分泌細胞における分泌顆粒形成機構, 顕微鏡, 2008, 43: 29-34

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Nakajo A, Yoshimura SI, Togawa H, Kunii M, Iwano T, Izumi A, Noguchi Y, Watanabe A, Goto A, Sato T, Harada A : EHBP1L1 coordinates Rab8 and Binl to regulate apical-directed transport in polarized epithelial cells, The Journal of Cell Biology, 2016, 212:297-306, 査読有
DOI: 10.1083/jcb.201508086
- ② Avriyanti E, Atik N, Kunii M, Furumoto N, Iwano T, Yoshimura S, Harada R, Harada A : Functional redundancy of protein kinase D1 and protein kinase D2 in neuronal polarity, Neuroscience Research, 2015, 95:12-20, 査読有
DOI: 10.1016/j.neures.2015.01.007
- ③ Das S, Harada A, et al : Rab8a vesicles regulate Wnt ligand delivery and Paneth cell maturation at the intestinal stem cell niche, Development, 2015, 142:2147-2162, 査読有
DOI: 10.1242/dev.121046
- ④ Sato T, Iwano T, Kunii M, Matsuda S, Mizuguchi R, Jung Y, Hagiwara H, Yoshihara Y, Yuzaki M, Harada R, Harada A : Rab8a and Rab8b are essential for several apical transport pathways but insufficient for ciliogenesis, Journal of Cell Science, 2014, 127: 422-431, 査読有
DOI: 10.1242/jcs.136903
- ⑤ Atik N, Kunii M, Avriyanti E, Furumoto N, Inami K, Yoshimura S, Harada R, Harada A : The role of PKD in cell polarity, biosynthetic pathways, and organelle/F-actin distribution, Cell Structure and Function, 2014, 39: 61-77, 査読有
DOI: 10.1247/csf.13020
- ⑥ Tanaka T, Harada A, et al : CLAC-P/collagen type XXV is required for the intramuscular innervation of motoneurons during neuromuscular development, The Journal of Neuroscience, 2014, 34:1370-9, 査読有
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2440-13.2014
- ⑦ Sasaki T, Harada A, et al : Hypothalamic SIRT1 prevents age-associated weight gain by improving leptin sensitivity in mice, Diabetologia, 2014, 57:819-831, 査読有
DOI: 10.1007/s00125-013-3140-5
- ⑧ Vacca B, Harada A, et al : Drebrin E depletion in human intestinal epithelial cells mimics Rab8a loss of function, Human Molecular Genetics, 2014, 23:2834-2846, 査読有
DOI: 10.1093/hmg/ddt670
- ⑨ Akiyama M, Harada A, et al : Trans-regulation of oligodendrocyte myelination by neurons through small GTPase Arf6-regulated secretion of fibroblast growth factor-2, Nature Communications, 2014, 5:4744, 査読有
DOI: 10.1038/ncomms5744
- ⑩ Saegusa K, Harada A, et al : Caenorhabditis elegans chaperonin CCT/TRiC is required for actin and tubulin biogenesis and microvillus formation in intestinal epithelial cells, Molecular Biology of the Cell, 2014, 25:3095-3104, 査読有
DOI: 10.1091/mbc.E13-09-0530
- ⑪ Sobajima T, Yoshimura S, Iwano T, Kunii M, Watanabe M, Atik N, Mushiake S, Morii E, Koyama Y, Miyoshi E, Harada A : Rab11a is required for apical protein localisation in the intestine, Biology Open, 2014, 4:86-94, 査読有
DOI: 10.1242/bio.20148532
- ⑫ D'Angelo G, Harada A, et al : Vesicular and non-vesicular transport feed distinct glycosylation pathways in the Golgi, Nature, 2013, 501: 116-120, 査読有
DOI: 10.1038/nature12423
- ⑬ Aoki H, Harada A, et al : Proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on dendritic cells is required for airway responses in a murine asthma model, PLoS One, 2013, 8:e79985, 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0079985

[学会発表] (計 17 件)

- ① 佐藤隆史, 國井政孝, 原田玲子, 原田彰宏, 他, 細胞内極性輸送と繊毛形成における

- Rab8a, b の協調的機能の解明, 第 121 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2016/3/29, ビッグパレット福島 (福島県・郡山市)
- ② 國井政孝, 原田彰宏, 大脳皮質における SNARE 分子の機能の解析, 第 121 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2016/3/29, ビッグパレット福島 (福島県・郡山市)
- ③ Akihiro Harada, In vivo functions of genes involved in polarized transport, 2015 American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting, 2015/12/15, San Diego (USA)
- ④ 原田彰宏, 細胞内極性輸送を司る遺伝子の in vivo における機能, BMB2015, 2015/12/2, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- ⑤ Akihiro Harada, Functions of genes involved in polarized transport in neuronal polarity, 第 38 回日本神経科学大会, 2015/7/29, 神戸コンベンションセンター (兵庫県・神戸市)
- ⑥ 傍嶋智明, 國井政孝, 原田彰宏, 他, Rab11a は小腸において apical 腸タンパク質の局在を制御する, 第 67 回細胞生物学会大会, 2015/7/1, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)
- ⑦ 青柳共太, 原田彰宏, 他, VAMP7 はオートファジーによるミトコンドリア恒常性維持機構を介して膵β細胞からの第 2 相インスリン分泌を制御する, 第 67 回細胞生物学会大会, 2015/6/30, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)
- ⑧ Masataka Kunii, Akihiro Harada, 他, Function of a t-SNARE protein SNAP23 in exocrine and endocrine pancreas, 第 120 回日本解剖学会全国学術集会/第 92 回日本生理学会大会合同大会, 2015/3/21, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ⑨ Akihiro Harada, Analyses of neuronal and epithelial cell polarity of mice lacking genes involved in polarized transport, 第 37 回日本神経科学大会, 2014/9/13, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑩ 國井政孝, 原田彰宏, 他, 膵外分泌、内分泌における膜融合関連分子 SNAP23 の機能の解明, 第 66 回日本細胞生物学会大会, 2014/6/12, 奈良県新公会堂 (奈良県・奈良市)
- ⑪ 石田竜一, 原田彰宏, 他, Rab1 の GM130 結合とその生理的意義, 第 66 回日本細胞生物学会大会, 2014/6/12, 奈良県新公会堂 (奈良県・奈良市)
- ⑫ 國井政孝, 岩野智彦, 原田彰宏, 大脳皮質の形成における細胞内膜融合関連分子 SNAP23 の機能の解析, 第 119 回日本解剖学会全国学術集会, 2014/3/29, 自治医科大学キャンパス (栃木県・下野市)
- ⑬ 吉村信一郎, 原田彰宏, 他, シンポジウム: 新規 Rab8 結合タンパク質の上皮極性輸送における役割, 第 119 回日本解剖学会全国

学術集会, 2014/3/27, 自治医科大学キャンパス (栃木県・下野市)

- ⑭ Masataka Kunii, Takashi Sato, Tomohiko Iwano, Reiko Harada, and Akihiro Harada, Rab8a and Rab8b are essential for multiple apical transport pathway but insufficient for ciliogenesis, 2013 American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting, 2013/12/15, New Orleans (USA)
- ⑮ 原田彰宏, シンポジウム: 組織において、細胞内極性輸送を司る分子は細胞の極性や分泌などにどのように関わるか?, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013/12/3, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- ⑯ 原田彰宏, 表現型を復帰することが可能なレトロウイルスベクターを用いた神経細胞の形態形成に必要な遺伝子の同定, Neuro2013, 2013/6/21, 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑰ 原田彰宏, 表現型を正常に戻すことが可能なレトロウイルスベクターを用いた、形態によるスクリーニングによる神経細胞の形態形成に必要な遺伝子の同定, 第 65 回日本細胞生物学会大会, 2013/6/20, ウィンクあいち (愛知県・名古屋市)

[図書] (計 3 件)

- ① 鈴木郁子, 内田さえ, 鍵谷方子, 原田玲子: 中外医学社, やさしい自律神経生理学—命を支える仕組み, 2015, 248
- ② 原田玲子 他: 医歯薬出版, 人体の構造と機能 第 4 版, 2015, 426
- ③ 内田さえ・原田玲子 他: 医歯薬出版, 東洋療法学校協会編教科書 生理学 第 3 版, 2014, 334

[その他]

ホームページ等
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/acb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 玲子 (HARADA, Reiko)
 宝塚医療大学・保健医療学部・教授
 研究者番号: 40230718

(2) 研究分担者

國井 政孝 (KUNII, Masataka)
 大阪大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号: 80614768

(3) 連携研究者

原田 彰宏 (HARADA, Akihiro)
 大阪大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号: 40251441