

令和元年5月27日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08739

研究課題名(和文)酸化ストレス応答による細胞極性の異常を起点とした病態発生の分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of pathogenesis from disturbance of cell polarity caused by oxidative stress response

研究代表者

堀越 洋輔 (HORIKOSHI, Yosuke)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：60448678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患では、炎症反応による酸化ストレスを伴い極性化した上皮細胞から成る管腔組織構造の破綻が確認される。しかし、酸化ストレスの細胞極性に及ぼす作用の詳細は不明であった。本研究では、「炎症性腸疾患で起こる管腔構造の破綻が、炎症反応を介した酸化ストレスによる aPKC の過剰な活性化を経た aPKC-PAR 複合体の形成阻害によって誘導される事を証明する」を目的とした。本研究課題により、炎症応答による酸化ストレスは、脂溶性情報伝達物である PS (フォスファチジルセリン) の過酸化体を発生させ、aPKC の過剰活性化を引き起こし上皮組織の形態異常(極性異常)を引き起こす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性病態では、酸化ストレスに暴露されており、抗酸化作用を持つ薬剤の投与で細胞障害を抑制できると想定されるが十分な効果は得られていない。その理由として酸化ストレスによる脂溶性情報伝達物質の過酸化体の生成と、その生理活性の変化が抗酸化による防御機構を上回るためと考えられる。本研究課題により、「脂溶性情報伝達物である PS (フォスファチジルセリン) の過酸化体」を同定し、aPKC の過剰活性化を介することをはじめて明らかとした。この成果は、炎症性腸疾患や癌などの酸化ストレスを伴う病態発症および重篤化をまねく共通の分子基盤と考えられ、炎症性腸疾患や癌などの新たな治療法確立のための分子基盤として有用である。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel diseases processes disrupts the barrier function, inducing epithelial cell polarity. Increased permeability leads to oxidative stress-mediated chronic of inflammation. However, the effect of oxidative stress on epithelial polarity or epithelial morphology is unknown. We have also revealed that carbon tetrachloride (CCl₄)-induced oxidative stress resulted in disassembly of TJs through aberrant activation of aPKC. In this study, we found that oxidative stress-mediated oxidized phosphatidylserine (OxPS) induced provokes a disturbance of epithelial cell polarity through aberrant activation of aPKC.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞極性 酸化ストレス 炎症 aPKC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症反応などによる酸化ストレスは、細胞・組織の傷害に関与する可能性が示唆されている。これまでこのような傷害は、細胞自体に致命的なダメージを与える点に着目されてきた。一方、申請者らは、急性的な酸化ストレス傷害時において、細胞死が起きていない状態において、肝細胞の接着構造が傷害され、細胞極性の異常が生じることを報告してきた (Am J Pathol.2015;185:958-68)。一方、酸化ストレス刺激による上皮細胞の極性異常が生じる過程で、aPKC の異常な活性化が誘導されることを見出した。さらに、予備的な実験ではあるが、上皮細胞の極性異常が観察される炎症性腸疾患モデル動物を用いた解析から、傷害組織において aPKC の局在異常および活性異常が観察された。これらの結果から、炎症性腸疾患で惹起される炎症の具体的な作用点として aPKC の過剰な活性化による極性破綻 (上皮組織構造の破綻) によって腸の機能障害が誘導されると考えられた。最近、炎症応答により脂溶性情報伝達物質の過酸化体が生じることを突き止めた。重要な事に、この過酸化体は aPKC の活性化にも関与する脂質が含まれる可能性が出ていた。しかし、実際に脂溶性情報伝達物質の過酸化体により aPKC の異常な活性化が誘導され上皮細胞の極性異常が誘導されるかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では「aPKC の過剰活性化が酸化ストレスを伴う炎症性腸疾患の発生・重篤化に関するか明らかとする」ことを目的とし、炎症性病態の共通分子基盤として aPKC の関与を解明する。具体的には、炎症反応を介した酸化ストレスにより、aPKC 活性化作用を有する PS の過酸化体が生成され、aPKC の過剰な活性化を引き起こし組織傷害過程で細胞極性の破綻を進行させるという可能性について精査する。

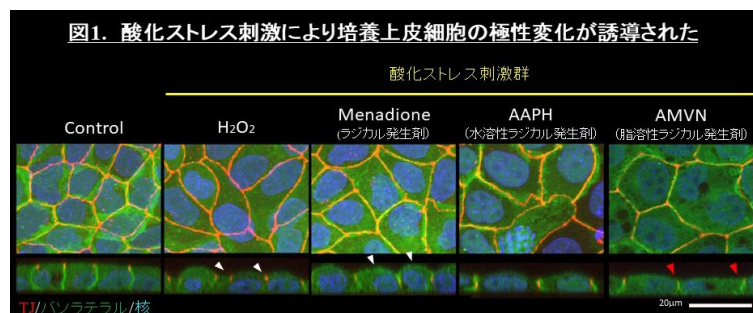
3. 研究の方法

本研究課題においては以下の点について解析を行った。

- (1). 酸化ストレス刺激を加えた上皮細胞において、細胞極性の異常および、aPKC の活性化と aPKC-PAR 複合体形成に対する作用の検討。
培養上皮細胞である MDCK 細胞に種々の酸化ストレス刺激 (H₂O₂, 水溶性ラジカル発生剤:AAPH, 脂溶性ラジカル発生剤:AMVN, ラジカル発生剤;Menadione) を加えたタイトジャンクション (TJ) マーカーである ZO-1、ゴルジマーカーである GM130、を用いて蛍光免疫染色にてそれらの構造および局在について検討した。
と同様に酸化ストレス刺激を加えた細胞を用いて抗 Par-3 抗体により免疫沈降実験を行い aPKC-PAR 複合体形成について検討した。
- (2). IBD モデルマウスの腸組織の形態変化 (傷害) が誘導される初期の段階において、aPKC の活性化が誘導されるか検討した。
IBD モデルマウスは DSS (Dextran Sodium Sulfate) を経口投与し作成し、病変組織の極性に与える作用について免疫組織化学的手法を用いて抗 aPKC 抗体、抗 Par-3 抗体を用いて、それらの細胞内局在と TJ 構造について検討する。
病変部位における aPKC の活性化について抗 aPKC リン酸化抗体を用いて影響を検討する。
- (3). フォスファチジルセリン (PS) の過酸化体の生成物を作成し上皮細胞に対する作用と aPKC 活性化作用について検討した。また、PS 過酸化体の生成標品を用いて IBD モデルマウスおよび CCl₄ による肝障害モデルマウスの傷害組織において PS 過酸化体が生じているか検討した。

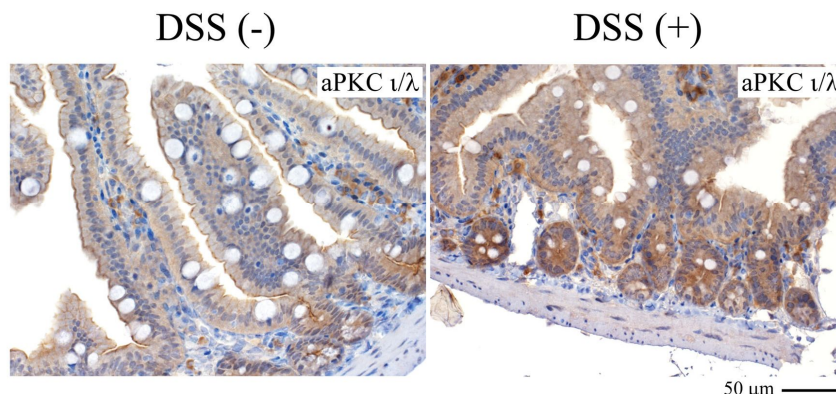
4. 研究成果

- (1). 酸化ストレス刺激を加えた上皮細胞において、細胞極性の異常および、aPKC の活性化と aPKC-PAR 複合体形成に対する作用の検討
酸化ストレス刺激を MDCK 細胞に与えたところ、TJ の消失、膜ドメインの異常やゴルジ体の局在変化が誘導された (細胞極性の異常が観察された。図 1.)
酸化ストレス刺激を加えた MDCK 細胞では、aPKC 活性化の指標となるリン酸化が上昇していることが明らかとなった。また、aPKC-PAR 複合体形成が抑制されることが分かった。



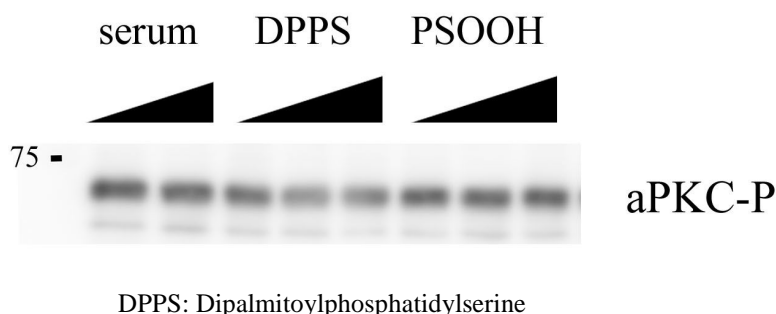
- (2). IBD モデルマウスの腸組織の形態変化(傷害)が誘導される初期の段階において、aPKC の活性変化が誘導されるか検討した。
 IBD モデルマウスの消化管上皮細胞において aPKC および Par-3 のタイトジャンクションの局在化が失われた(図.2)。
 aPKC 活性化の指標となるリン酸化抗体を用いて免疫組織化学的手法によりその局在を検討した。その結果、炎症傷害部位において aPKC のリン酸化が上昇していること、また、aPKC のリン酸化体は、細胞質に多く局在していることが明らかとなった。

図.2 IBD モデルマウス病変部位では aPKC の TJ への局在化が失われた。



- (3). フォスファチジルセリン(PS)の過酸化体の生成物を作成し上皮細胞に対する作用と aPKC 活性作用について検討した。また、PS 過酸化体の生成標品を用いて IBD モデルマウスおよび CCl4 による肝障害モデルマウスの傷害組織において PS 過酸化体が生じているか検討した。
 フォスファチジルセリン(PS)の精製標品より自動酸化させた後、HPLC により精製を行い PS の過酸化物の精製標品を作成することができた。
 PS の過酸化物の上皮極性に対する作用を検討した。その結果、上皮細胞の接着構造の変化を確認した。また、過酸化 PS を処理した細胞においては、aPKC の活性化に關与するリン酸化が上昇していることがわかった(図.3)。

図.3 過酸化 PS(PSOOH)を処理した上皮細胞では、aPKC のリン酸化が上昇した。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Horikoshi Y, Kamizaki K, Hanaki T, Morimoto M, Kitagawa Y, Nakaso K, Kusumoto C, Matura T. α -Tocopherol promotes HaCaT keratinocyte wound repair through the regulation of polarity proteins leading to the polarized cell migration. *Biofactors*. 査読あり、2018 Mar;44(2):180-191. doi: 10.1002/biof.1414.

Ohta Y, Yashiro K, Ohashi K, Horikoshi Y, Kusumoto C, Matura T. Compound 48/80, a mast cell degranulator, causes oxidative damage by enhancing vitamin C synthesis via reduced glutathione depletion and lipid peroxidation through neutrophil infiltration in rat livers. *J Clin Biochem Nutr*. 査読あり、2017 May;60(3):187-198. doi: 10.3164/jcbs.16-89.

Nakasone M, Nakaso K, Horikoshi Y, Hanaki T, Kitagawa Y, Takahashi T, Inagaki Y, Matura T. Preconditioning by Low Dose LPS Prevents Subsequent LPS-Induced Severe Liver Injury

via Nrf2 Activation in Mice. *Yonago Acta Med.* 査読あり、2016 Sep 12;59(3):223-231. eCollection 2016 Sep.

Takahashi T, Nakaso K, Horikoshi Y, Hanaki T, Yamakawa M, Nakasone M, Kitagawa Y, Koike T, Matura T. Rice Bran Dietary Supplementation Improves Neurological Symptoms and Loss of Purkinje Cells in Vitamin E-Deficient Mice. *Yonago Acta Med.* 査読あり、2016 Sep 12;59(3):188-195. eCollection 2016 Sep.

Hanaki T, Horikoshi Y, Nakaso K, Nakasone M, Kitagawa Y, Amisaki M, Arai Y, Tokuyasu N, Sakamoto T, Honjo S, Saito H, Ikeguchi M, Yamashita K, Ohno S, Matura T. Nicotine enhances the malignant potential of human pancreatic cancer cells via activation of atypical protein kinase C. *Biochim Biophys Acta.* 査読あり、2016 Nov;1860(11 Pt A):2404-2415. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.07.008.

Nakaso K, Horikoshi Y, Takahashi T, Hanaki T, Nakasone M, Kitagawa Y, Koike T, Matura T. Estrogen receptor-mediated effect of δ -tocotrienol prevents neurotoxicity and motor deficit in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 査読あり、2016 Jan 1;610:117-22. doi: 10.1016/j.neulet.2015.10.062.

堀越洋輔, 倉敷達之, 松浦達也、コエンザイム Q10 による脂肪組織の代謝制御を介した抗肥満・抗糖尿病効果、査読なし、*Vitamins* 92(8), 381-385, 2018-08

〔学会発表〕(計 6 件)

堀越洋輔, 中曽一裕, 花木武彦, 仲宗根正人, 北川良憲, 持田晋輔, 松浦達也、創傷治癒促進効果に関わるトコトリエノールの分子構造の検討、第 14 回 CoQ10 研究会、2017
堀越洋輔, 中曽一裕, 北川良憲, 持田晋輔, 松浦達也、創傷治癒促進に関与するトコトリエノールの分子構造とシグナル経路の検討、第 28 回ビタミン E 研究会、2017

Yosuke Horikoshi, Masaki Morimoto, Yoshinori Kitagawa, Kazuhiro Nakaso, Chiaki Kusumoto and Tatsuya Matura, C Coenzyme Q10 promotes epithelial cell polarization via PI3K/aPKC signaling cascade、第 9 回 Joint meeting of society for free radical research Australasia and Japan with international symposium on Coenzyme Q10、2018

堀越洋輔, 森本昌樹, 北川良憲, 中曽一裕, 楠本智章, 松浦達也、 α -トコフェロールは細胞極性を制御し上皮創傷治癒を促進する、第 70 回ビタミン学会、2018

野村聡子, 堀越洋輔, 森本昌樹, 倉敷達之, 北川良憲, 中曽一裕, 松浦達也、 α -トコフェロールは細胞極性を制御し上皮創傷治癒を促進する、第 26 回日本過酸化脂質・抗酸化物質学会、2018

Yosuke HORIKOSHI, Kazuhiro NAKASO, Tatsuya MATSURA, Molecular mechanisms underlying the promotion of wound repair by vitamin E、3rd ISRGH (International symposium on rice science in global health)、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.tottori-u.ac.jp/introduction/medicine/about/3318/3328/23776.html>

<https://tottoritougoubunshi.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大野 茂男

ローマ字氏名：Ohno Shigeo

研究協力者氏名：廣瀬 智威

ローマ字氏名：Hirose Tomonori

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。