

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07505

研究課題名（和文）新規炎症応答シグナル経路による細胞極性制御を介した細胞傷害抑制機構の解明

研究課題名（英文）Cell damage suppression mechanism via cell polarity control by a novel inflammatory response signal pathway

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、上皮バリア機能の破綻を細胞極性制御因子aPKCの活性制御により抑制されるか明らかとする事を目的とした。培養上皮細胞を用いた解析から、ラジカル発生剤やLPSの前処理によるaPKCの活性化は、カルシウム除去による細胞間接着構造の消失を抑制した。この効果は、インフラマソームの活性化阻害剤のカスパーゼ-1阻害剤の処理により阻害された。一方、肝障害、肺障害モデルマウスを用いた解析から、低濃度LPSの前処理によりそれら組織の細胞間接着構造の保護作用が確認された。以上の結果から、細胞障害前のaPKC活性化は、インフラマソームの活性化を介し細胞間接着構造の保護効果を発揮する事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
インフラマソームの過剰な活性化は、様々な炎症性疾患の発症に関わっている。本申請は、従来とは異なる新規炎症応答シグナル経路によって上皮バリア機能が強化され、過剰な炎症（急性炎症）による細胞・組織傷害を抑制（保護）する事が明らかとなった。上皮バリア機能の異常を伴う炎症性腸疾患、癌などに対して本研究課題で得られた結果は、それら病態の治療法や予防法の確立の新たな分子基盤として提示できその波及効果は大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify whether the disruption of epithelial barrier function is suppressed by a regulation of cell polarity regulator, aPKC activity. In cultured epithelial cell, radical generators or LPS induced aPKC activation revealed that suppression of the loss of intercellular adhesion structures remove to calcium in culture medium. This effect was inhibited by inflammasome inhibitor, caspase-1. On the other hand, analysis using mouse models of liver and lung injury confirmed that pretreatment with low concentrations of LPS protected disturbance of intercellular adhesion structures in those tissues. These results suggest that activation of aPKC prior to cell injury exerts a protective effect on intercellular adhesion structures through activation of inflammasomes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮バリア 細胞極性 aPKC 炎症 タイトジャンクション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、予備的な実験ではあるが、炎症・酸化ストレス刺激による aPKC の活性化は、カルシウム除去により誘導される培養上皮細胞のタイトジャンクション (TJ) の消失を抑制する可能性を明らかとした。この効果は、炎症応答によって引き起こされるインフラマソーム活性を阻害することで抑制される可能性が浮上してきた。しかし、上皮バリア機能強化の分子機構や新規炎症応答経路の存在は不明である。本研究では「新規炎症応答シグナルと細胞極性制御シグナルとのクロストークの存在を明らかとし、それらシグナル経路の活性化によって急性肝傷害で惹起される上皮バリア機能の破綻を抑制できるか明らかとする」ことを目的とする。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、「上皮バリア機能の破綻を伴う急性障害が、新規炎症応答を介した細胞極性制御因子 aPKC の活性により抑制されるのか」、明らかとすることを目的とした。

そこで、以下の (1) ~ (3) について検討する。

- (1) 弱い酸化ストレス刺激による aPKC の活性化は、培養液中のカルシウム除去による上皮細胞の TJ の消失を抑制するか明らかとする。また、上皮細胞の TJ 形成に対する作用についても検討する。
- (2) aPKC 活性化による TJ 消失の抑制効果は、炎症シグナルであるインフラマソーム活性化の阻害による TJ 消失にたいする作用を検討する。
- (3) 高濃度の LPS 刺激により誘導される多臓器障害 (肝障害、肺障害) は、あらかじめ低濃度 LPS 処理により、それら臓器障害が抑制されるか検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規炎症応答による上皮細胞の TJ 消失に対する保護効果の検討

低濃度 LPS・AMVN (脂溶性ラジカル発生剤) の前処理は、培養上皮細胞への酸化ストレス刺激による TJ の異常 (消失) を抑制するか、TJ マーカー (ZO-1、クローディン、Par-3) の発現・局在と上皮バリア機能について検討する。また、インフラマソームの活性化が生じているか NLRP3, ASC, Aim2, MyD88, Trif, Caspase-1 の発現とその下流で発現制御されている IL-1 $\beta$  の発現、Caspase-1 活性化、さらに、Caspase-1 の阻害剤処理の効果を検証する。

#### (2) 新規炎症経路と細胞極性制御とのクロストークの検討

新規炎症経路において、極性制御分子の aPKC 活性、発現、局在変化および、阻害剤処理による効果について検討する。NLRP3, ASC はリン酸化による制御を受ける。aPKC によるリン酸化を受けるか *in vitro* リン酸化実験を行う。また、精製過酸化脂質 (PC, PS の過酸化物) によるインフラマソーム活性化に対する作用を検討する。

#### (3) 新規炎症応答による急性障害保護効果の検討

LPS による急性肝障害前 (24 時間から 4 8 時間前) に低容量 LPS (傷害誘導量の 1/10 から 1/20 量) を投与しインフラマソームの活性化と障害組織 (肝臓および肺) における TJ 消失抑制効果について検討する。

### 4. 研究成果

本研究課題では、「上皮バリア機能の破綻を伴う急性障害が、新規炎症応答を介した細胞極性制御因子 aPKC の活性により抑制されるのか」、明らかとすることを目的とした。

以下の(1)~(3)についてその成果を報告する。

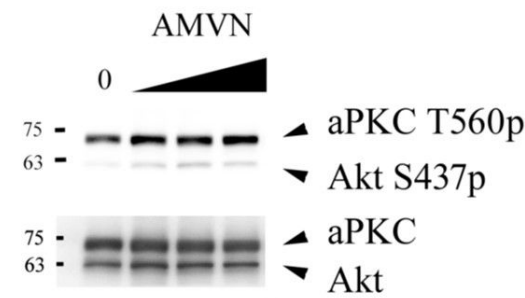
**(1) 新規炎症応答による上皮細胞の TJ 消失に対する保護効果の検討 (図1., 図2.)**

脂溶性ラジカル発生剤である AMVN や、LPS は、aPKC の活性化を誘導した。

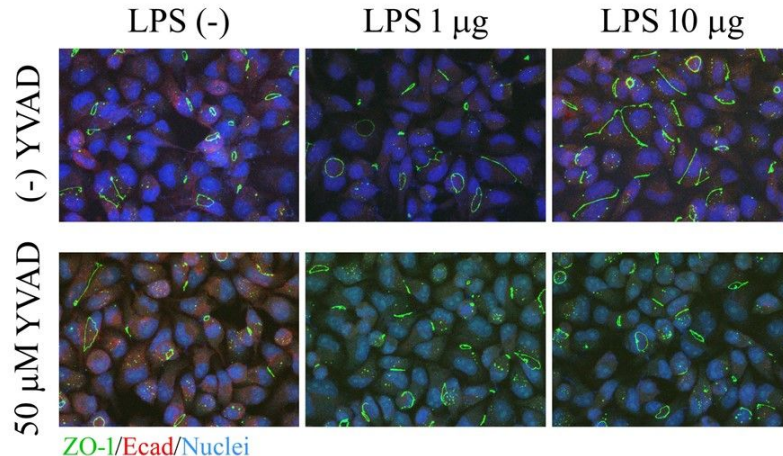
培養上皮細胞の培地中カルシウム除去によりタイトジャンクション (TJ) は消失 (破壊) する。この TJ の消失は、低容量 LPS や低容量 AMVN の前処理 (24 時間) により抑制された。

上皮細胞の TJ 形成に対する作用についても検討した結果、同様に TJ 形成を促進した。

**図1. AMVN 刺激は傷修復過程において aPKC / PI3Kシグナルの活性化とaPKC-Par複合体形成を促進した。**



**図2. LPS 刺激はカルシウム除去によるタイトジャンクションの消失を抑制した。**



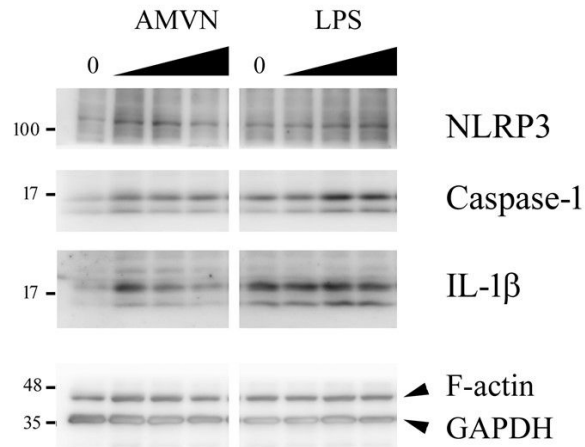
YVAD: インフラマソーム活性化の阻害 (カスパーゼ1 阻害剤)

**(2) 新規炎症経路と細胞極性制御とのクロストークの検討 (図2., 図3.)**

低容量 LPS や低容量 AMVN の前処理 (24 時間) は、NLRP3、カスパーゼ 1、IL-1 の発現上昇を誘導した。

低容量 LPS や低容量 AMVN の前処理)の処理によって抑制されるカルシウム除去依存的な TJ 消失の抑制は、インフラマソーム活性化阻害剤であるカスパーゼ 1 阻害剤処理によりキャンセルされた。

**図3. LPS・AMVN 刺激はインフラマソームの活性化を促進した。**



### **(3) 新規炎症応答による急性障害保護効果の検討**

高濃度の LPS 刺激により誘導されるマウス肝障害および肺障害は、あらかじめ低濃度 LPS を処理により、それら臓器障害が抑制された。また、それら組織の細胞間接着構造の変化も抑えられた。

以上の結果より、弱い酸化ストレス刺激や低容量 LPS 刺激による aPKC の活性化は、上皮細胞の TJ の消失（破壊）を抑制し上皮バリア機能の強化あるいは安定化を引き起こすと考えられた。また、上皮バリア機能の安定化だけではなく、TJ の形成を促進したことから、上皮バリア機能の維持や再形成（修復）においても働くことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morimoto Masaki, Horikoshi Yosuke, Nakaso Kazuhiro, Kurashiki Tatsuyuki, Kitagawa Yoshinori, Hanaki Takehiko, Sakamoto Teruhisa, Honjo Soichiro, Umekita Yoshihisa, Fujiwara Yoshiyuki, Matsura Tatsuya	4. 巻 470
2. 論文標題 Oncogenic role of TYR03 receptor tyrosine kinase in the progression of pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 149 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.11.028	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 Morimoto Masaki, Horikoshi Yosuke, Nakaso Kazuhiro, Kurashiki Tatsuyuki, Kitagawa Yoshinori, Hanaki Takehiko, Sakamoto Teruhisa, Honjo Soichiro, Umekita Yoshihisa, Fujiwara Yoshiyuki, Matsura Tatsuya	4. 巻 470
2. 論文標題 Oncogenic role of TYR03 receptor tyrosine kinase in the progression of pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 149 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.11.028	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 Kitagawa Yoshinori, Nakaso Kazuhiro, Horikoshi Yosuke, Morimoto Masaki, Omotani Takuma, Otsuki Akihiro, Inagaki Yoshimi, Sato Hideyo, Matsura Tatsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 System xc- in microglia is a novel therapeutic target for post-septic neurological and psychiatric illness	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44006-8	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 Kurashiki Tatsuyuki, Horikoshi Yosuke, Kamizaki Koki, Sunaguchi Teppei, Hara Kazushi, Morimoto Masaki, Kitagawa Yoshinori, Nakaso Kazuhiro, Otsuki Akihiro, Matsura Tatsuya	4. 巻 70
2. 論文標題 Molecular mechanisms underlying the promotion of wound repair by coenzyme Q10: PI3K/Akt signal activation via alterations to cell membrane domains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 222 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.21-141	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野中智生, 堀越洋輔, 森本昌樹, 倉敷達之, 中曽一裕, 松浦達也
2. 発表標題 コエンザイムQ10の上皮細胞極性形成に対する作用
3. 学会等名 特定非営利活動法人 日本コエンザイムQ 協会 第17回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀越洋輔, 野中智生, 倉敷達之, 中曽一裕, 松浦達也
2. 発表標題 上皮細胞極性形成に対するコエンザイムQ10の作用の検討
3. 学会等名 日本ビタミン学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀越洋輔, 松浦達也
2. 発表標題 コエンザイムQ10の上皮細胞接着および膜ドメインに対する作用
3. 学会等名 第365回脂溶性ビタミン総合研究委員会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀越洋輔, 市原克則, 酒井知恵子, 中曽一裕, 水田栄之助, 今村武史, 松浦達也
2. 発表標題 肥満マウス味細胞における細胞極性制御分子に対する影響の検討
3. 学会等名 第61回日本組織細胞化学総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀越洋輔, 野村聡子, 新藤有夏, 松井亮仁, 森本昌樹, 倉敷達之, 北川良憲, 中曾一裕, 松浦達也
2. 発表標題 新規インフラマソーム経路は上皮細胞の極性形成を介し傷修復を促進する
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀越洋輔, 野村聡子, 新藤有夏, 松井亮仁, 森本昌樹, 倉敷達之, 北川良憲, 中曾一裕, 松浦達也
2. 発表標題 酸化ストレス刺激/炎症刺激によるaPKCの機能制御を介した修復促進効果の検討
3. 学会等名 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会 第27回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀越洋輔, 酒井知恵子, 市原克則, 水田栄之助
2. 発表標題 肥満モデルマウスにおける味細胞の形態変化と細胞極性制御分子に対する影響
3. 学会等名 日本味と匂学会第53回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本昌樹, 堀越洋輔, 倉敷達之, 北川良憲, 中曾一裕, 本城総一郎, 藤原義之, 松浦達也
2. 発表標題 受容体型チロシンキナーゼTAMIは膵癌の増悪化に関する
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野中智生, 堀越洋輔, 森本昌樹, 倉敷達之, 中曾一裕, 松浦達也
2. 発表標題 コエンザイムQ10の上皮細胞極性形成に対する作用
3. 学会等名 第17回・コエンザイムQ10研究会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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