

機関番号：32644

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790307

研究課題名（和文） 上皮細胞のアピカル膜ドメインの異常を伴う病態に関わる
新規シグナル伝達経路の解析研究課題名（英文） The mechanism of epithelial apical membrane domain development and
diseases.

研究代表者

堀越 洋輔（HORIKOSHI YOSUKE）

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：60448678

研究成果の概要（和文）：癌や炎症性腸疾患の病変部位の上皮組織では、アピカル膜ドメインの異常が観察されているが、その異常と病態との関係については不明であった。本研究では、酸化ストレス傷害モデルラット肝臓を用いて、酸化ストレスの aPKC-PARR 複合体に形成と細胞極性に与える作用を検討した。その結果、酸化ストレスにより PI3 キナーゼシグナルを介した aPKC の異常活性化が起こり aPKC-PAR 複合体の形成が阻害され細胞極性の異常が誘導される事が明らかとなった。本研究により酸化ストレスによる細胞傷害の新たな分子機構の一端が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： Excessive productions of free radicals and oxidative stress are implicated in the pathogenesis of cancer and inflammatory bowel diseases. These diseases disturb the apical membrane domains and tissue architectures. However, the molecular mechanisms of oxidative stress-induced cell injuries and the effect of cell polarity remain to be clarified. The treatment of carbon tetrachloride (CCl4), which strongly promotes oxidative stress in rat liver, resulted in the disassembly of cell-cell junctions and also changes the localization of Par3 and aPKC from it to cytosol. Importantly, the Par3-aPKC interaction was inhibited by oxidative stress. Furthermore, phosphorylation level of aPKC Thr410/403 increased and its regulating kinase, PI3-kinase signaling is activated. These results suggested that oxidative stress inhibit the interaction between Par3 and aPKC and consequently the hepatocyte polarity is disrupted.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：細胞極性、アピカルドメイン、aPKC-PAR 複合体

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞のアピカル膜ドメインは、極性化した上皮細胞が持つ構造であり、上皮細胞の機能を決定する因子である。癌や炎症性腸疾患の病変部位の上皮組織では、アピカル膜ドメインの異常が観察されているが、アピカル膜ドメインの制御機構（形成・維持）や、その異常と病態との関係については不明である。

2. 研究の目的

イノシトールリン脂質シグナル伝達の異常を伴う細胞傷害や疾患に、aPKC-PAR 複合体を介した細胞極性の制御の異常が関わるか解明する事を最終目的とする。本研究課題の目的は「イノシトールリン脂質による aPKC-PAR 複合体の機能制御が、哺乳類上皮細胞のアピカル膜ドメインの形成・制御に関与するか明らかとすること」である。

3. 研究の方法

以下の2点に焦点を絞り解析を行う。

(1) aPKC-PAR 複合体とイノシトールリン脂質との相互作用が上皮細胞のアピカル膜ドメインの制御に関与するか明らかとする (2) 酸化ストレス傷害により aPKC-PAR 複合体を介した上皮細胞の極性制御に影響を与えるか明らかとする。(1)については、aPKC-PAR 複合体とイノシトールリン脂質が結合するか精製蛋白質を用いた結合実験により検討する。次に(2)については、培養細胞に酸化ストレス刺激を加え細胞極性に与える作用を免疫組織化学的手法により検討する。また、酸化ストレスの組織極性への作用をラット

酸化ストレス肝障害モデルにて検討する。

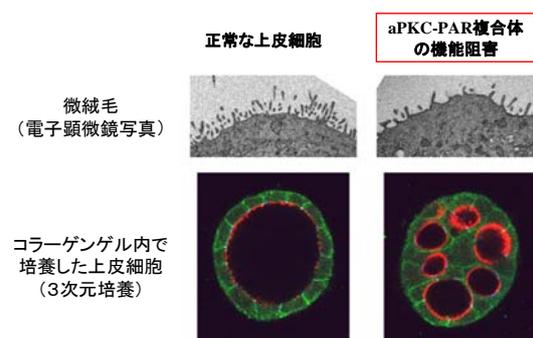
4. 研究成果

本研究課題の目的は「イノシトールリン脂質 (PIPs) シグナル伝達による aPKC-PAR 複合体の機能制御が、哺乳類上皮細胞のアピカル膜ドメインの形成・制御に関与するか明らかとすること」である。

(1) aPKC-PAR 複合体の機能阻害により上皮細胞のアピカル膜ドメインが異常になる。

極性制御分子である aPKC, PAR-3, PAR-6 からなる3者複合体 (aPKC-PAR 複合体) の機能阻害により、正常な上皮細胞のアピカル膜ドメインの形成が阻害される事を明らかとした (図. 1)。

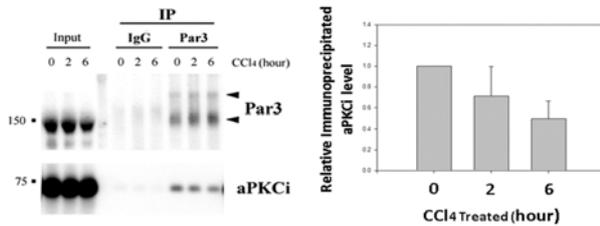
図.1 aPKC-PAR複合体の形成・機能阻害は正常な上皮細胞のアピカル膜ドメインの形成を阻害する



(2) 酸化ストレスにより aPKC-PAR 複合体形成が阻害される。

酸化ストレス傷害モデルラット肝組織を用いた解析から、aPKC-PAR 複合体形成および細胞間接着部位への局在化が阻害される事が明らかとなった。また、PIPs 代謝に関わる PI3 キナーゼシグナルが活性化し aPKC の異常活性化が確認された (図. 2)。

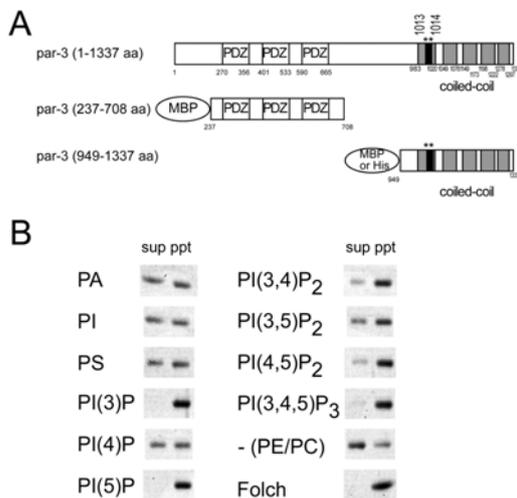
図.2 酸化ストレスによりaPKC-PAR複合体の形成が阻害される



(3) PAR-3 とイノシトールリン脂質と結合は PAR-3 の上皮細胞の細胞間接着構造の安定化にひつようである。

PAR-3 精製蛋白質を用いてイノシトールリン脂質との結合を In Vitro にて検討した。その結果、PAR-3 は、その C 末領域の K1013/1014 依存的にイノシトールリン脂質である PI(3, 4, 5)P₃、PI(4, 5)P₂ と結合する事が明らかとなった。また、これらの結合は、PAR-3 の細胞間接着への安定的な局在に必要な事が明らかとなった (図. 3)。

図.3 aPKC-PAR複合体の構成分子である PAR-3 はイノシトールリン脂質と結合する

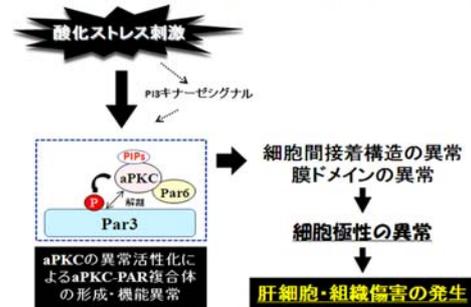


これらの解析結果から、「酸化ストレス→PI3キナーゼシグナルの活性化→aPKC の異常活性化→aPKC-PAR 複合体の形成阻害→細胞極性の異常→細胞傷害」というシグナルカスケードの存在が強く示唆された。これまで酸化

ストレスによる細胞傷害は、化学的な反応性による遺伝子への傷害によって誘導されていると考えられていたが、本研究により酸化ストレスによる細胞傷害の新たな分子機構の一端が明らかとなった。今後、酸化ストレスが関与する癌、炎症性疾患や動脈硬化などの病態で aPKC-PAR 複合体に機能変化が生じているか検討し、それら病態に果たす細胞極性の役割とその分子機構を解明する。これにより、それら病態の治療法の分子基盤の確立を目指す (図. 4)。

図.4 まとめ

aPKC-Par複合体の形成・機能異常による細胞傷害の分子機構モデル



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 堀越洋輔、鈴木厚、山中智行、佐々木和教、水野恵子、沢田元、米村重信、大野茂男

Journal Cell Science、122、1595-1606、2009

- ② 赤坂江美子、竹腰進、堀越洋輔、鳥海健太郎、生駒憲広、馬淵智生、田宮紫穂、松山孝、小澤明

Tokai Journal of Experimental Clinical Medicine、35、152-164、2010

- ③ 吉濱陽平、佐々木和教、堀越洋輔、鈴木厚、高橋貴、伯野史彦、高橋一郎、大野茂男、千田和広

Current Biology、21、705-711、2011

- ④ 堀越洋輔、濱田明香、大野茂男、末次志郎

Cell Structure and Function、36、97-102、2011

[学会発表] (計5件)

- ① 堀越洋輔、PAR-3 と aPKC-PAR-6 との相互作用は上皮細胞のアピカルドメインの形成に必要である、第 61 回日本細胞生物学大会、2009 年 6 月 3 日、愛知県

- ② 堀越洋輔、PAR-3 と aPKC-PAR-6 との相互作用は上皮細胞のアピカルドメインの形成に必要である、第 35 回レーザー顕微鏡研究会講演会、2009 年 7 月 14 日、埼玉県

- ③ 堀越洋輔、Interaction between PAR-3 and the aPKC/PAR-6 complex is indispensable for apical development of epithelial cells、The American Society for Cell Biology/Japan Society for Cell Biology/RIKEN center for Developmental Biology Meeting、2009 年 9 月 23 日、京都府

- ④ 堀越洋輔、組織形態に与える酸化ストレスの作用とその分子機構の解析、2010 年 6 月 24 日、第 63 回日本酸化ストレス学会学術総会、2010 年 6 月 24 日、神奈川県

- ⑤ 堀越洋輔、組織形態に与える酸化ストレスの作用とその分子機構の解析、第 51 回日本組織細胞化学会総会、2010 年 9 月 24 日、東京都

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀越 洋輔 (HORIKOSHI YOSUKE)

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：60448678

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし