

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790379

研究課題名(和文)極性制御因子の機能変化を基盤とした病態発生の分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of disease based on the functional aberration of aPKC-PAR complex

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、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)： 癌や肝硬変、炎症性腸疾患では炎症反応による酸化ストレスに暴露されている。また、細胞極性の異常も確認されるが、酸化ストレスの細胞極性に対する具体的な作用は不明であった。

本研究課題から、酸化ストレスによって極性制御因子であるaPKCの異常活性化がPar3, aPKC, Par6からなる三者複合体(aPKC-PAR複合体)形成を阻害し細胞極性の異常を惹起する要因となることを突き止めた。これら成果は、酸化ストレスが関与する病態に共通する分子基盤と考えられ新たな治療法の確立に貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)： Excessive productions of free radicals and oxidative stress are implicated in the pathogenesis of cancer, cirrhosis and inflammatory bowel diseases. However, the effect of oxidative stress on cell polarity or tissue morphology is still unknown.

Here we demonstrated that carbon tetrachloride (CCl4)-induced oxidative stress resulted in the loss of cell polarity in rat liver. Furthermore, the polarity regulating protein complex, aPKC-PAR complex (Par-3-aPKC-Par-6 ternary complex) formation was inhibited by aberrant activation of aPKC through CCl4 treatment. Our findings would contribute to understanding of molecular basis of oxidative stress-induced disease and to the innovation of diagnostic techniques.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：細胞極性 aPKC-PAR アピカル膜ドメイン 酸化ストレス 管腔構造

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・組織の傷害や癌の浸潤・転移に關与する可能性が示唆されている。申請者は、これまでにラット肝傷害モデル動物において肝細胞・肝組織の極性異常が誘導される可能性を見出してきた。また、極性制御に働く aPKC-PAR 複合体の形成が阻害されることも明らかとした。しかし、酸化ストレスを伴った細胞・組織傷害の過程で aPKC-PAR 複合体の機能変化の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、「酸化ストレスにより極性制御因子 Par3, aPKC, Par6 からなる三者複合体 (aPKC-PAR 複合体) の機能変化が生じることで炎症性病態を誘導するか明らかとする」ことを目的とした。

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) 培養上皮細胞の極性に対する酸化ストレス刺激の作用の検討。

培養上皮細胞である MDCK 細胞に各種酸化ストレス発生剤 (H_2O_2 , AMVN, AAPH, Menadione) を処理し細胞極性に対する作用をタイトジャンクションマーカーである抗 ZO-1 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い評価した。

酸化ストレス刺激を処理した細胞を使い抗 Par-3 抗体にて免疫沈降を行い供沈降してくる aPKC 量を元に aPKC-PAR 複合体形成に対する作用を評価、検討した。

(2) 酸化ストレス傷害モデル動物において細胞極性の異常および aPKC-PAR 複合体の機能変化が誘導されるか検討した。

酸化ストレス傷害モデル動物は、ウイスター系ラットオスに四塩化炭素 (CCl_4) を投与し作成した。そして、ラット肝臓を採取・固定した後、免疫組織化学により ZO-1, Par-3, aPKC に対するそれぞれの抗体を用いて肝組織および肝細胞の極性に対する作用を検討した。さらに、電子顕微鏡を用いた超微細構造の観察を行った。

上記ラット肝組織から抗 Par-3 抗体を使い免疫沈降を行い供沈降してくる aPKC 量の変化をコントロールラット肝と比較、検討した。また、抗酸化能を有するビタミン E 投与により CCl_4 による肝組織の極性異常に対する抑制効果について検討を加えた。

さらに、上記のラット肝臓を使い抗 aPKC 抗体により内在性 aPKC を精製し in vitro リン酸化実験を行い aPKC 活性変化について検討した。

aPKC の活性化に關わるシグナル伝達の検討を行った。aPKC は PI3-キナーゼシグナルの下流で活性化されることが知られている。そこで、PI3-キナーゼシグナルの活性化について Akt の Ser473 と Thr308 のそれぞれ

のリン酸化について抗リン酸化抗体を用いて検討を行った。

4. 研究成果

(1) 培養上皮細胞の極性に対する酸化ストレス刺激の作用の検討。

MDCK 細胞に酸化ストレス刺激を与えたところ、 H_2O_2 , AMVN, AAPH, Menadione のいずれの刺激においても刺激においても TJs の異常が観察された。また、Par-3, aPKC の局在変化が H_2O_2 刺激で確認された。

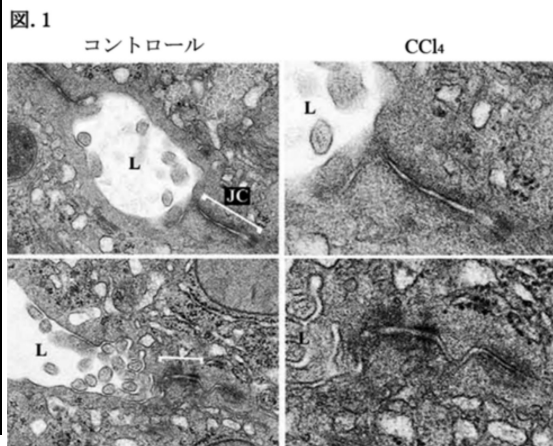
細胞極性に対する作用を更に検討するため、ゴルジ体マーカーである GM135 抗体を用いて免疫蛍光染色を行いその局在に対する作用を検討した。その結果、 H_2O_2 処理によりコントロール群で観察される細胞核と管腔面との局在が失われ細胞質全体へと局在することが明らかとなった。(学会発表 9, 13)

Par-3-aPKC 複合体形成に対する酸化ストレス刺激 (H_2O_2) の作用を検討した。その結果、Par-3 と共沈降される aPKC の量がコントロールと比較し減少することがわかった。(学会発表 9, 13)

以上の結果から酸化ストレス刺激によって培養上皮細胞の極性異常が誘導されることが明らかとなった。この時、極性制御分子である aPKC-PAR 複合体量の減少が確認された。酸化ストレスによる細胞傷害 (形態異常) の起点にそれら複合体の機能破綻が關与することが示唆された。

(2) 酸化ストレス傷害モデル動物において細胞極性の異常および aPKC-PAR 複合体の機能変化が誘導されるか検討した。

CCl_4 による肝傷害組織を使い TJs, Par-3, aPKC の細胞内局在について検討した。その結果、ZO-1 で観察される TJs 構造の部分的消失が確認された。また、Par-3, aPKC の細胞内局在もコントロール肝組織と比較して TJs への局在が失われ細胞質へと局在が変化することが明らかとなった。さらに、 CCl_4 による肝傷害組織を電子顕微鏡による超微細構造観察を行った結果、TJs の密着点の異常と胆細管の拡張が確認された

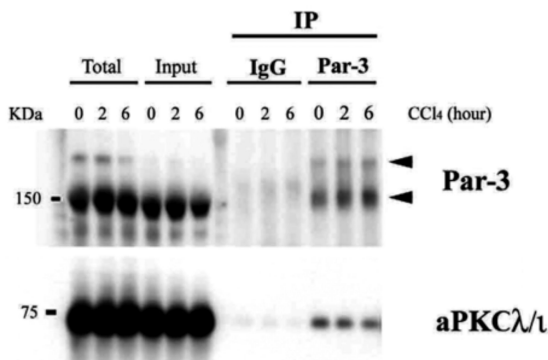


L: 胆細管, Jc: 接着複合体

(図.1)。(学会発表 3-5)

細胞極性の制御に関わる Par-3-aPKC 複合体の形成について抗 Par-3 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、CCl₄により Par-3 と共沈降してくる aPKC の量が減少することが判明した (図.2)。

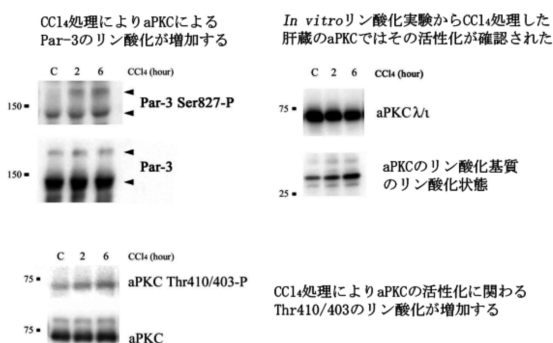
図.2



また、CCl₄による肝組織の極性異常をビタミン E の投与により抑制できるか検討した結果、TJs の異常および aPKC-PAR 複合体量の減少を抑制できることが明らかとなった。CCl₄による肝傷害において aPKC-PAR 複合体量の減少が肝組織の極性異常に関与することが示唆された。(雑誌論文 4, 学会発表 9, 13)

Par-3 は aPKC によるリン酸化により両者の結合が弱くなることが報告されている。そこで aPKC による Par-3 Ser827 の特異的リン酸化の変化について検討した。その結果、そのリン酸化が CCl₄ 処理により増加していることがわかった (図.3)。

図.3



さらに aPKC のキナーゼ活性化に働く aPKC Thr410/403 のリン酸化を識別する特異抗体を用いて aPKC 活性化について検討を加えた。その結果、aPKC Thr410/403 のリン酸化が CCl₄ 処理したラット肝臓で増加していることが明らかとなった。また、それら組織から抗 aPKC 抗体を使い精製・in vitro リン酸化実験を行ったところ、その活性がコントロール肝臓と比較し増大していた (図.3)。

今回の解析から、酸化ストレスによる肝傷害モデル動物において、初めて極性分子である aPKC-PAR 複合体の機能異常が確認された。また、この傷害モデルにおいて TJs および胆細管構造の拡張が観察された。aPKC-PAR 複合体は TJs や管腔構造の形成や維持に必須であることが報告されていることを考え合わせると、炎症性腸疾患などの TJs や管腔構造の異常を伴った病態においても aPKC-PAR 複合体の異常が確認されると予想される。現在、炎症反応による酸化ストレスが亢進していることが予想される炎症性腸疾患モデル動物を作成し、aPKC-PAR 複合体の機能変化が誘導されているか検討を進めている。酸化ストレスによる aPKC-PAR 複合体の異常が炎症性腸疾患の発生に関与することが明らかとなれば、クローン病や潰瘍性大腸炎など未だ治療が困難な疾患の新たな治療法の確立に繋がることが期待される。

CCl₄による肝傷害肝臓を使い、PI3-キナーゼシグナルの活性変化について抗 Akt Thr473 と Thr308 に対する抗リン酸化抗体を用いて評価した。その結果、いずれのリン酸化も、CCl₄ したラット肝臓で上昇することか明らかとなった。酸化ストレスによる肝傷害の過程で「PI3 キナーゼシグナルの活性化 aPKC の異常活性化 aPKC-PAR 複合体の減少 極性異常 肝臓組織形態の傷害」というシグナルカスケードの存在が示唆された。(雑誌論文 6) 今後、これら分子の機能変化がヒトの肝炎、肝硬変、胆汁うっ滞型肝硬変などにおいて確認されれば、新たな治療法の確立に繋がる可能性も示唆している。

(3) 今後の検討課題

これら CCl₄ による肝組織の極性異常によって誘導される胆細管の拡張 (異常) が Par-3-aPKC 複合体の減少あるいは aPKC の異常活性化が関与しているか検討をさらに加えた。α-naphthyl isothiocyanate (ANIT) は胆汁うっ滞を誘導することが知られており、この方法を利用して肝組織の胆管の変化が Par-3-aPKC 複合体の機能変化によって誘導されるか検討した。その結果、ZO-1, Par-3, aPKC の TJs への局在が阻害されていた。(学会発表 14) 今後、本モデルにおいて Par-3-aPKC 複合体の形成および aPKC 活性に対する作用を検討する予定である。また、消化管の管腔構造の異常が観察されるクローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患モデル動物を作成し細胞極性および Par-3-aPKC 複合体の機能変化が誘導されるか検討する。さらに、Par-3, aPKC の部位特異的ノックアウトマウスを入手しそれら傷害に対する Par-3, aPKC の役割を追求する。今後の検討により、炎症反応による酸化ストレスを伴った病態の普遍的分子基盤の解明

が期待される。

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6件)

- (1) Nakaso K, Tajima N, Horikoshi Y, Nakasone M, Hanaki T, Kamizaki K, Matsura T. The estrogen receptor -PI3K/Akt pathway mediates the cytoprotective effects of tocotrienol in a cellular Parkinson's disease model. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Apr 24. pii: S0925-4439(14)00095-7. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.04.008. 査読有
- (2) Imamura N, Horikoshi Y, Matsuzaki T, Toriumi K, Kitatani K, Ogura G, Masuda R, Nakamura N, Takekoshi S, Iwazaki M. Localization of aPKC lambda/iota and its interacting protein, Lgl2, is significantly associated with lung adenocarcinoma progression. *Tokai J Exp Clin Med*. 2013 Dec 20;38(4):146-58. 査読有
- (3) Nakaso K, Tajima N, Ito S, Teraoka M, Yamashita A, Horikoshi Y, Kikuchi D, Mochida S, Nakashima K, Matsura T. Dopamine-mediated oxidation of methionine 127 in -synuclein causes cytotoxicity and oligomerization of -synuclein. *PLoS One*. 2013;8(2):e55068. doi: 10.1371/journal.pone.0055068. 査読有
- (4) Toriumi K, Horikoshi Y, Yoshiyuki Osamura R, Yamamoto Y, Nakamura N, Takekoshi S. Carbon tetrachloride-induced hepatic injury through formation of oxidized diacylglycerol and activation of the PKC/NF- B pathway. *Lab Invest*. 2013 Feb;93(2):218-29. doi: 10.1038/labinvest.2012.145. Epub 2012 Dec 3. 査読有
- (5) Yoshihama Y, Sasaki K, Horikoshi Y, Suzuki A, Ohtsuka T, Hakuno F, Takahashi S, Ohno S, Chida K. KIBRA suppresses apical exocytosis through inhibition of aPKC kinase activity in epithelial cells. *Curr Biol*. 2011 Apr 26;21(8):705-11. doi: 10.1016/j.cub.2011.03.029. 査読有
- (6) Horikoshi Y, Hamada S, Ohno S, Suetsugu S. Phosphoinositide binding by par-3 involved in par-3 localization. *Cell Struct Funct*. 2011;36(1):97-102. 査読有

[学会発表](計25件)

- (1) Horikoshi Y, Toriumi K, Nakamura N, Ohno S and Takekoshi S. Oxidative stress controls the aPKC/Par-3 interaction

and maintenance of cell polarity through aPKC activity by phosphatidylinositol 3-kinase. The 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia, 2011年8月31日～8月4日、Kagoshima/Japan

- (2) Horikoshi Y, Hamada S, Ohno S, Suetsugu S. Phosphoinositide binding by Par-3 involved in Par-3 localization. The 10th China-Japan joint meeting of The Histochemistry and Cytochemistry, 2011年10月22日～23日、Beijing/China
- (3) 堀越洋輔, 鳥海健太郎, 中村直哉, 竹腰進、極性制御因子の機能変化を基盤とした酸化ストレス細胞傷害の分子機構の解明、第52回日本組織細胞化学学会、2011年9月25日、金沢
- (4) Horikoshi Y, Toriumi K, Nakamura N, Matsura T, Ohno S and Takekoshi S. Inhibition of aPKC and Par3 interaction disturbs the maintenance of cell polarity through aPKC activation by carbon tetrachloride-mediated oxidative stress. The Histochemical society 2012 annual meeting, 2012年3月17日-19日、Massachusetts, USA
- (5) Horikoshi Y, Toriumi K, Nakamura N, Matsura T, Ohno S and Takekoshi S. Aberrant activation of aPKC induces a disturbance of cell polarity by CCl4-mediated oxidative stress. 14th international congress of histochemistry and cytochemistry, 2012年8月29日、Kyoto/Japan
- (6) 鳥海健太郎, 堀越洋輔, 高木達也, 山本順寛, 中村直哉, 竹腰進、ビタミンEによる過酸化ジアシルグリセロール産生低下は四塩化炭素誘起肝傷害を抑制する、第65回日本酸化ストレス学会学術集会、2012年6月7日、徳島、
- (7) 堀越洋輔, 鳥海健太郎, 松浦達也, 中村直哉, 竹腰進、極性制御因子の機能変化を基盤とした酸化ストレス細胞傷害の分子機構の解析、第65回日本酸化ストレス学会学術集会、2012年6月7日、徳島、
- (8) 高木達也, 堀越洋輔, 鳥海健太郎, 中村直哉, 竹腰進、PKC スプライシングバリエーションによる酸化ストレス誘導性細胞傷害の抑制機構の解明、第65回日本酸化ストレス学会学術集会、2012年6月7日、徳島、
- (9) 堀越洋輔, 鳥海健太郎, 中村直哉, 竹腰進, 松浦達也、酸化ストレスによる細胞傷害: 極性制御分子の機能変化の関与、第20回年会日本過酸化脂質・抗酸化物質学会、2012年8月25日、仙台
- (10) 中曾一裕, 田島奈緒子, 菊池大介, 山下敦, 堀越洋輔, 小池泰介, 松浦達也、トコトリエノールの抗パーキンソン病効果

- ～細胞モデルから動物モデルへ～、第9回日本トコトリエノール研究会、2012年11月12日、東京
- (11) 鳥海健太郎, 高木達也, 堀越洋輔, 長村義之, 山本順寛, 中村直哉, 竹腰進, ジアシルグリセロールの酸化物は四塩化炭素による肝傷害を促進させる、第85回日本生化学大会、2012年12月16日、福岡
- (12) 田島奈緒子, 中曾一裕, 堀越洋輔, 山下敦, 菊池大介, メラトニンはパーキンソン病モデル細胞においてPI3K/Akt経路活性化を介して細胞死を抑制する、第85回日本生化学大会、2012年12月15日、福岡
- (13) 堀越洋輔, 鳥海健太郎, 竹腰進, 松浦達也, 細胞極性に対する酸化ストレスの作用とビタミンEによる細胞極性保護効果、第24回ビタミンE研究会、2013年1月11日-12日、東京
- (14) 堀越洋輔, 菊池大介, 山下敦, 田島奈緒子, 中曾一裕, 持田晋輔, 竹腰進, 松浦達也, 細胞極性に対するCoQ10の作用の検討、第10回日本コエンザイムQ協会研究会、2013年2月1日、東京
- (15) 中曾一裕, 田島奈緒子, 堀越洋輔, 仲宗根正人, 小池泰介, 松浦達也, トコトリエノールの抗パーキンソン病効果 - モデル細胞、モデル動物を用いた検討 -, 日本ビタミン学会65回大会、2013年5月18日、東京
- (16) 中曾一裕, 田島奈緒子, 堀越洋輔, 松浦達也, パーキンソン病関連分子 シヌクレインのメチオン酸化修飾と細胞毒性、第66回日本酸化ストレス学会学術集会、2013年6月14日、名古屋
- (17) 堀越洋輔, 菊池大介, 山下敦, 田島奈緒子, 中曾一裕, 持田晋輔, 竹腰進, 松浦達也, 細胞極性に対するビタミンEの作用の検討、日本ビタミン学会2013年度合同広島大会、2013年9月6日、広島
- (18) 松浦達也, 田島奈緒子, 堀越洋輔, 中曾一裕, トコトリエノールのシグナル伝達を介した抗パーキンソン病効果、第340回脂溶性ビタミン総合研究委員会、2013年9月27日、東京
- (19) 紙崎孝基, 堀越洋輔, 中曾一裕, 田島奈緒子, 仲宗根正人, 持田晋輔, 松浦達也, ビタミンEの上皮細胞創傷治癒に対する作用の検討、第25回ビタミンE研究会、2014年1月25日、米子
- (20) 大塚裕真, 妻鹿倫征, 森川さくら, 平井真理子, 大津匡弘, 羽賀大貴, 堀越洋輔, 中曾一裕, 松浦達也, 神話「因幡の白兔」とビタミンE、第25回ビタミンE研究会、2014年1月25日、米子
- (21) 北谷佳那恵, 鳥海健太郎, 堀越洋輔, 竹腰進, ビタミンE投与による四塩化炭素誘導性幹細胞傷害抑制作用の解析、第25回ビタミンE研究会、2014年、米子
- (22) 中曾一裕, 田島奈緒子, 紙崎孝基, 堀

- 越洋輔, 小池泰介, 松浦達也, パーキンソン病モデルマウスに対するトコトリエノールの効果、第25回ビタミンE研究会、2014年1月25日、米子
- (23) 田島奈緒子, 中曾一裕, 堀越洋輔, 紙崎孝基, 松浦達也, 記憶障害に対するブドウ種子抽出物の効果、第25回ビタミンE研究会、2014年1月24日、米子
- (24) 紙崎孝基, 堀越洋輔, 花木武彦, 田島奈緒子, 中曾一裕, 仲宗根正人, 持田晋輔, 池口正英, 松浦達也, CoQ10によるプロテインキナーゼCの機能制御を介した創傷治癒促進効果、第11回日本コエンザイムQ協会研究会、2014年1月28日、東京
- (25) 堀越洋輔, 紙崎孝基, 花木武彦, 田島奈緒子, 中曾一裕, 仲宗根正人, 持田晋輔, 池口正英, 松浦達也, ビタミンEはプロテインキナーゼC/Par-3複合体の機能制御を介し創傷治癒過程を促進する、第21回年会日本過酸化脂質・抗酸化物質学会、2014年3月15日、仙台

〔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〕
所属研究室ホームページにて研究内容を紹介している。
<http://www.med.tottori-u.ac.jp/medbioch/6000.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし