

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21101

研究課題名(和文) 静水圧による上皮細胞機能調節メカニズムの解明と癌治療への応用

研究課題名(英文) Mechanism of the regulation of epithelial function by hydrostatic pressure and the application for cancer treatment

研究代表者

徳田 深作 (Tokuda, Shinsaku)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：00433277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では上皮細胞が静水圧や浸透圧などの細胞外環境の変化に応じて様々な細胞機能の調節を行うメカニズムの解明を試みた。

MDCK細胞において、タイトジャンクション構成タンパク質のクローディン-2が、管腔側と基底側の浸透圧差の感知して経上皮イオン輸送や細胞骨格・細胞形状を調節するメカニズムに関与することが明らかとなった。さらに、クローディン-2とクローディン-4をダブルノックアウトした細胞の樹立にも成功し、その生理学的機能を明らかにした。

これらの研究結果は細胞外環境変化の感知と細胞機能調節のメカニズムの解明に寄与するとともに、今後の癌治療などへの臨床応用にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I attempted to elucidate the mechanism of the regulation of epithelial functions by the extracellular environment.

In MDCK cells, I revealed that claudin-2, transmembrane proteins in tight junctions, act as the sensor of the osmotic gradient between apical and basal sides to regulate several cell functions including transepithelial transport and cytoskeleton. Furthermore, I succeeded in establishing claudin-2 and claudin-4 double knockout cells and revealed the physiological role of claudin-4.

This study elucidates the mechanism in the epithelial cells to sense extracellular environment and regulate cell functions. This study also contributes to set a foundation for the clinical application for the cancer therapy in the future.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：タイトジャンクション 浸透圧 アクチン クローディン

### 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞の細胞外環境は絶えず変化しており、上皮細胞は細胞外の浸透圧・静水圧などの変化に応じて細胞機能の調節を行うと考えられる。一方、慢性炎症が生じるとアラキドン酸代謝産物やサイトカインなどによって毛細血管の透過性が亢進し、間質の静水圧が上昇する。慢性炎症が癌の危険因子となることは多くの組織で知られているが、静水圧と癌の関係については未だによく分かっていない。本研究代表者は、基底側の静水圧の上昇が上皮の重層化・極性異常・増殖亢進などの癌化と共通する変化を引き起こすことを報告している。しかし、上皮細胞が静水圧などの細胞外環境の変化をどのようにして感知して様々な上皮機能の調節を行うのか、その詳細なメカニズムについては未だによく分かっていない

### 2. 研究の目的

上皮細胞が浸透圧・静水圧などの細胞外環境の変化を感知して上皮機能を調節するメカニズムを明らかにする。本研究代表者はこれまでに上皮の管腔側と基底側の浸透圧や静水圧の差が上皮機能に大きな影響を及ぼすことを報告している。これらの浸透圧・静水圧の差は、上皮細胞のタイトジャンクションで勾配が形成されるため、タイトジャンクションが浸透圧・静水圧の差の感知に関わる可能性があると考えられる。そこで、本研究では特にタイトジャンクションに注目して、上皮細胞による細胞外環境の感知メカニズムについて検討を行った。

### 3. 研究の方法

培養上皮細胞を用いて、浸透圧などの細胞外環境の変化が上皮細胞に及ぼす影響を検討した。さらに、TALEN法を用いてタイトジャンクション構成タンパク質を遺伝子ノックアウトした細胞を樹立して、タイトジャンクションの細胞外環境感知における役割について検討を行った。

### 4. 研究成果

イヌ腎上皮のモデル細胞であるMDCK細胞を用いて管腔側・基底側の浸透圧の変化が上皮機能に及ぼす影響について検討を行った。その結果、管腔側を基底側と比較して低浸透圧としたときに、タイトジャンクションの陽イオン選択性が低下するとともに、細胞骨格・細胞形状の変化が認められた。

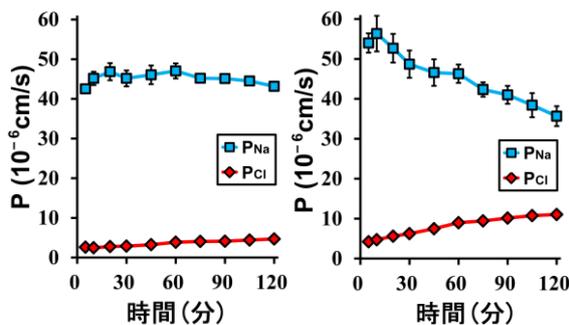


図1: 浸透圧によるタイトジャンクション透過性の変化

管腔側の低浸透圧によってタイトジャンクションの陽イオン透過性の低下が認められた。

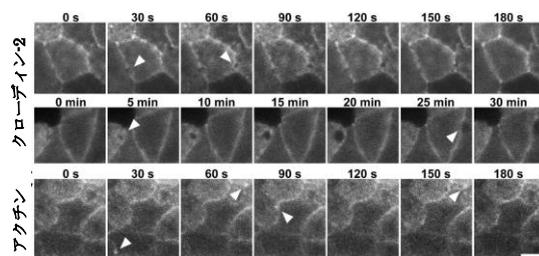


図2: 浸透圧による細胞形状の変化

管腔側の低浸透圧によって、細胞間接着部位における秒単位の bleb 構造の出現・消失が認められ、アクチン・ミオシンの細胞骨格にも変化が認められた。

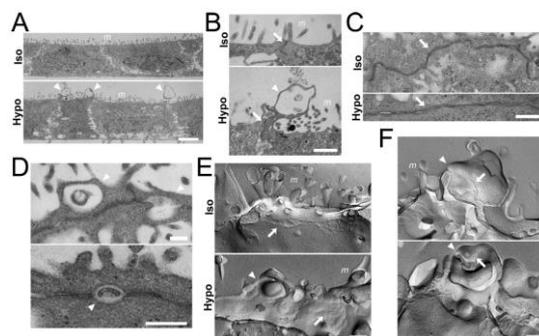


図3: 管腔側の低浸透圧時のタイトジャンクション部分の bleb 形成

透過型電子顕微鏡像・凍結割断レプリカ像。管腔側を低浸透圧とした時にタイトジャンクション近傍で特徴的な bleb 構造の形成が認められた。

さらに、タイトジャンクション構成タンパク質であるクロロディン-2 をノックアウトした細胞を用いて同様に細胞外の浸透圧変化が与える影響を検討した。その結果、クロロディン-2 をノックアウトした細胞では、管腔側を低浸透圧とした時にもタイトジャンク

シヨンの陽イオン選択性に顕著な変化は認められなくなるとともに、細胞骨格や細胞形状の変化も認められなくなった。

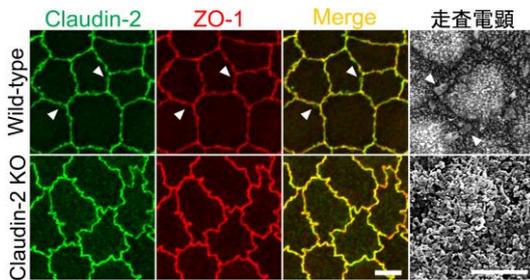


図 4：浸透圧による上皮形状の変化におけるクローディン-2 の役割

claudin-2 ノックアウト細胞では管腔側の低浸透圧による bleb 形成が認められなくなった。Bar, 5 $\mu$ m

これらの結果から、MDCK 細胞においてクローディン-2 が浸透圧を感知するセンサーとして機能しており、タイトジャンクションの透過性だけでなく細胞骨格や細胞形状の調節にも関わることが示唆された。

タイトジャンクションが細胞外環境を感知するメカニズムについてさらに検討するため、TALEN 法を用いて他のクローディンをノックアウトした細胞の樹立を試みた。その結果、クローディン-4 をノックアウトした細胞の樹立に成功した。次にクローディン-4 ノックアウトが MDCK 細胞のタイトジャンクションの機能に及ぼす影響を検討したところ、野生株細胞と比較してタイトジャンクションの透過性に明らかな変化は認められなかった。この結果は本研究代表者がクローディン-2 ノックアウト細胞を検討して報告した、クローディン-2 が単独で MDCK 細胞の透過性を決定している、という結果を支持すると考えられた。

クローディン-4 の機能を調べるため、さらにクローディン-2 とクローディン-4 をダブルノックアウトした細胞を樹立してタイトジャンクションの透過性への影響を検討した。その結果、クローディン-2 ノックアウト細胞を長期培養した際にタイトジャンクションの透過性が陰イオン選択的に上昇することが見いだされた。さらに、クローディン-4 のノックアウトは培養 6 日目ごろの経上皮電気抵抗の上昇や、長期培養時の陰イオン透過性の増加のいずれにも著明な影響を及ぼさないことが確認された。

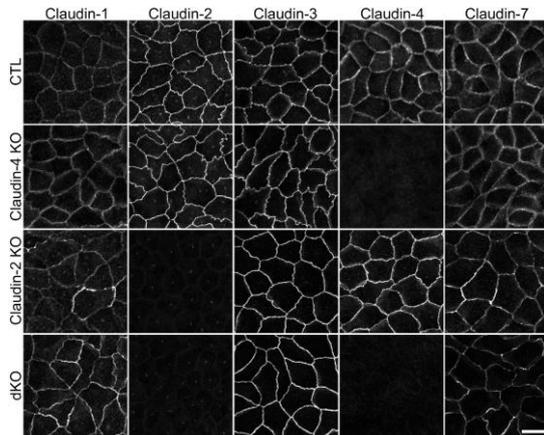


図 5：クローディンノックアウト細胞の樹立

TALEN 法を用いて、クローディン-4 ノックアウト細胞、クローディン-2・-4 ダブルノックアウト細胞を樹立した。Bar, 10 $\mu$ m

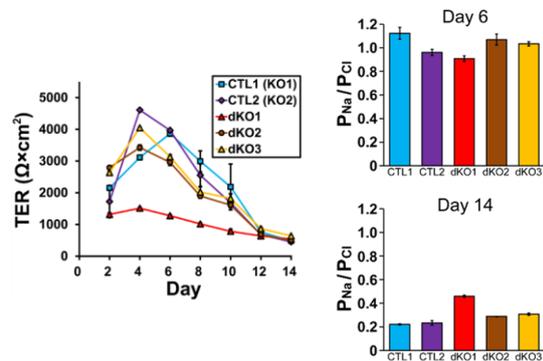


図 6：クローディン-2 ノックアウト細胞、クローディン-2・-4 ダブルノックアウト細胞の経上皮輸送特性

claudin-2 ノックアウト細胞では一旦経上皮電気抵抗が著明に上昇したのちに徐々に低下する変化が認められた。経上皮電気抵抗低下に合わせて陰イオン透過性の上昇が認められた。クローディン-4 のノックアウトはこれらの変化に明らかな影響を及ぼさなかった。

本研究で得られた結果は上皮細胞が浸透圧などの細胞外環境に応答して様々な上皮機能を調節することを示しており、タイトジャンクション構成タンパク質のクローディンがこの調節メカニズムに関与することを示唆している。本研究代表者は静水圧が上皮細胞の重層化・極性異常・増殖亢進などの癌化と共通する特性に影響を及ぼすことを見出しており、本研究結果は静水圧によるこれらの上皮機能の調節メカニズムにもタイトジャンクションが関与する可能性を示唆す

ると考えられる。さらに、本研究では2種類のクローディングをノックアウトしたダブルノックアウト細胞の樹立にも成功しており、これらの細胞やノックアウト細胞樹立技術は今後の研究で上皮細胞が細胞外環境を感知するメカニズムの解明を進めるために重要な土台となると考えられる。

今後、本研究をさらに進めて上皮細胞が細胞外環境を感知するメカニズムを明らかにすることは、癌発生についてこれまでの視点とは異なった知見を与えるとともに、新たな治療戦略の開拓にも寄与すると考えられる。

## 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2件)

1. Tokuda S, Hirai T, Furuse M. “Claudin-4 knockout by TALEN-mediated gene targeting in MDCK cells: claudin-4 is dispensable for the permeability properties of tight junctions in wild-type MDCK cells” *PLoS One*. 12: e01182521 (査読有)
2. Tokuda S, Hira T, Furuse M. “Effects of osmolality on paracellular transport in MDCK II cells” *PLoS One*. 11: e0166904. 2016 (査読有)

[学会発表] (計1件)

1. Tokuda S, Hirai T, Furuse M. “Effects of claudin-2 and claudin-4 knockouts in MDCK II cells” *International conference "Tight junctions and their proteins"*. Berlin, Germany. September, 2016 (口頭発表。査読有)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳田 深作 (TOKUDA, Shinsaku)

京都大学・医学研究科・医員

( )

研究者番号 : 00433277