

平成22年 6月21日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17014044

研究課題名（和文） がん細胞の細胞間接着異常の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of cell-cell adhesion in cancer cells

研究代表者

古瀬 幹夫 (FURUSE MIKIO)

神戸大学・大学院医学学研究所・教授

研究者番号：90281089

研究成果の概要（和文）：多くのがんが由来する上皮細胞を特徴づける構造の一つで、細胞同士の隙間をシールして細胞シートの漏れを防ぐバリアとしてはたらく細胞間接着装置タイトジャンクションの構造とはたらく分子生物学的手法で研究した。タイトジャンクションのバリア機能の異常によって、小腸上皮細胞の増殖が異常に亢進して腸管が肥大することを見出した。さらに、3つの上皮細胞の隙間を塞ぐ構造の分子構築を世界に先駆けて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The tight junction is one of the characteristic structures in epithelial cells, from which cancer is derived, and works as a barrier to restrict the free diffusion of solutes through the intercellular space. In this study, we investigated the molecular structure and function of tight junctions. We found that the artificial modification of the barrier property of tight junctions accelerates growth of intestinal epithelial cells and results in enlargement of the intestine. We also clarified for the first time the molecular constituents of tricellular contacts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	72,000,000	0	72,000,000
2006年度	79,000,000	0	79,000,000
2007年度	79,000,000	0	79,000,000
2008年度	35,000,000	0	35,000,000
2009年度	35,000,000	0	35,000,000
総計	300,000,000	0	300,000,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：上皮細胞、細胞接着、タイトジャンクション、クローデイン

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の大半は上皮細胞由来である。したがって、上皮細胞特有の分化・増殖制御機構を明らかにしていくことは、がん化や浸潤・転移機構の理解のために不可欠である。単層上皮細胞を特徴づけている構造の一つ

に、細胞間接着装置アドヘレンスジャンクションやタイトジャンクションがある。本研究グループでは、タイトジャンクション (TJ) の構造と機能を分子レベルで解明することが細胞のがん化・浸潤転移機能の理解に繋がると考えて研究を進め、TJの接着分子として

世界に先駆けてクロードインファミリーの同定に成功し、上皮細胞生物学に新しい分野を開いてきた。一方、細胞間接着装置の細胞質側には多くの細胞骨格が結合している。本研究グループでは、アクチンフィラメントと細胞膜の結合に重要な役割を果たすERMタンパク質ファミリーを同定して解析してきた。この分子群と似たタンパク質メルリンが重要ながん抑制遺伝子産物として同定され、がん抑制機構における細胞骨格・細胞膜相互作用の重要性が示唆されていた。

2. 研究の目的

「クロードインとその裏打ちタンパク質」を中心としたTJの解析、および「ERMタンパク質とメルリン」の解析を進めることにより、上皮細胞特有の増殖・運動・分化の制御機構を明らかにする。さらに、新しい上皮間葉転換の分子機構を独自の方法で解析することにより、上皮細胞に特有のタンパク質の同定を試みる。これらの上皮細胞解析を通して、細胞のがん化機構、浸潤転移機構に新しい視点を与えることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) タイトジャンクション (TJ) の解析 :

①小腸上皮などに発現しているクロードイン遺伝子のノックアウトマウスを作製して、TJが担う上皮バリア機能が細胞増殖制御に果たす役割を解明する。

②TJの膜裏打ちタンパク質であるZO-1, ZO-2, ZO-3の遺伝子ノックアウトマウスやこれら遺伝子の発現を抑制させた上皮培養細胞株を作製し、上皮バリア機能、および上皮細胞の増殖や分化に与える影響を解析する。

③特定のクロードインによるTJ形成を阻害するCPEをマウス初期胚に投与して、TJの機能阻害が発生時の形態形成や細胞分化に与える影響を解析する。

④クロードインに結合する新規分子を同定し、TJ形成、上皮細胞の増殖における役割を解析する。

(2) ERMタンパク質とメルリンの解析 :

①ERMタンパク質遺伝子ノックアウトマウスを解析し、細胞増殖との関係を解析する。②メルリンの結合タンパク質を同定し、その機能解析から細胞増殖との関連を解析する。

(3) 上皮間葉転換の系を用いた上皮特異的タンパク質の同定 : 転写因子Snailを培養上皮細胞に発現させることにより間葉細胞に転換させる系を用いて、この過程で発現が大きく減少する遺伝子を同定し、上皮細胞機能、細胞増殖における役割を解析する。

4. 研究成果

(1) TJの裏打ちタンパク質であるZO-1, ZO-2, ZO-3を発現しない上皮細胞株を作製することに成功した。この細胞の詳細な解析か

ら、上皮細胞においてはこれら裏打ちタンパク質がクロードインによるTJ形成に必要であること、細胞膜直下におけるZO-1の二量体化がTJ形成を引き起こすことを明らかにした。さらに、ZO-1が、細胞間接着形成過程において、TJ形成のみならず、Rac1の活性化とアクチン線維束形成を介して、ベルト状のアドヘレンスジャンクションの形成にも必要であることを見出した。さらに、ZO-1ノックアウトマウスが卵黄嚢の血管形成異常を伴い、胎生致死となることを見出した。

(3) 腸管に発現するクロードイン15遺伝子欠失マウスを作製、解析して、このマウスの小腸において、細胞間隙のイオン透過性の異常とともに上皮細胞の増殖が亢進して腸管が肥大化することを見出し、TJの異常が細胞増殖に関与することを初めて示した。また、腸管に発現する別のクロードインであるクロードイン7遺伝子を欠失したマウスを作出し、このマウスが生後1週間で致死となることを確認した。さらに、小腸の絨毛先端部およびパイエル板付近の上皮細胞に発現するクロードイン4の遺伝子欠失マウスの作製を試み、ヘテロマウス作製に成功している。

(4) 腸管のクリプトおよび腎臓の近位尿細管に発現するクロードイン2遺伝子を欠失するマウスにおいて、近位尿細管の傍細胞経路の陽イオン選択的性質が陰イオン選択的に逆転するとともに上皮のイオンと水の透過性が低下することを見出し、クロードイン2が個体レベルで陽イオン選択的チャネルの性質をもつことを明らかにした。

(5) マウス胚盤胞の栄養外胚葉に発現するクロードインを同定し、これらのクロードインによるTJ形成をCPEによって阻害することにより、胚盤胞の形態異常、および内部細胞塊の分化の異常が起こることを見出した。タイトジャンクションのバリア機能が発生過程の形態形成と正常な細胞分化に重要であることを示した。

(6) クロードインのC末側細胞質領域に結合する分子を探索し、E3ユビキチンリガーゼであるLNX1を同定した。LNX1をMDCK細胞に強制発現させることにより、クロードインがユビキチン化され、その細胞内取り込みが亢進してTJが減少することを見出した。クロードインのユビキチン化がTJを負に制御することを提唱した。

(7) 試験管内で上皮間葉転換を引き起こす転写因子Snailにより発現が抑制される遺伝子のスクリーニングから、3つの上皮細胞の隙間を閉じるためのTJの特殊な構造であるトリセルラーTJの構成分子トリセルリンを同定した。トリセルリンが、正常なトリセルラーTJと上皮バリア機能に必要であることを明らかにした。さらに、トリセルリンがクロードインと相互作用して、TJ構造の複雑化

に關与すること、TJの膜タンパク質オクルデインがトリセルリンを2細胞間のTJから排除して3細胞接着部位に押し込む役割を担うことを解明した。

(8)細胞内局在を指標としたスクリーニングから、トリセルラーTJに局在する新規膜タンパク質としてLSRを同定し、LSRがトリセルリンと相互作用することにより、トリセルラーTJにリクルートする活性をもつこと、すなわち、トリセルラーTJ形成においてLSRがトリセルリンの上流に存在することを明らかにした。

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20件)

- ①Nelson KS, Furuse M, and Beitel GJ. The Drosophila Claudin Kune-kune is Required for Septate Junction Organization and Tracheal Tube Size Control. *Genetics*. in press
- ②Muto S, Hata M, Taniguchi J, Tsuruoka S, Moriwaki K, Saitou M, Furuse K, Sasaki H, Fujimura A, Imai M, Kusano E, Tsukita S, and Furuse M. Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 8011-8016, 2010
- ③Higashi T, Ikeda T, Murakami T, Shirakawa R, Kawato M, Okawa K, Furuse M, Kimura T, Kita T, and Horiuchi H. Flightless-I (Fli-I) regulates the actin assembly activity of diaphanous-related formins (DRFs) Daaml and mDial in cooperation with active Rho GTPase. *J Biol Chem* 285: 16231-16238, 2010
- ④Adachi M, Hamazaki Y, Kobayashi Y, Itoh M, Tsukita S, Furuse M, and Tsukita S. Similar and distinct properties of MUPP1 and PaTJ, two homologous PDZ domain-containing tight-junction proteins. *Mol Cell Biol* 29: 2372-2389, 2009.
- ⑤Furuse M. Knockout animals and natural mutations as experimental and diagnostic tool for studying tight junction functions in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1788: 813-819, 2009.
- ⑥Furuse M, and Moriwaki K. The role of claudin-based tight junctions in morphogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1165: 58-61, 2009.
- ⑦Miyamoto T, Momoi A, Kato K, Kondoh H, Tsukita S, Furuse M, and Furutani-Seiki M.

Generation of transgenic medaka expressing claudin7-EGFP for imaging of tight junctions in living medaka embryos. *Cell Tissue Res* 335: 465-471, 2009.

⑧Takahashi S, Iwamoto N, Sasaki H, Ohashi M, Oda Y, Tsukita S, and Furuse M. The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. *J Cell Sci* 122: 985-994, 2009.

⑨Tamura A, Kitano Y, Hata M, Katsuno T, Moriwaki K, Sasaki H, Hayashi H, Suzuki Y, Noda T, Furuse M, Tsukita S, and Tsukita S. Megaintestine in claudin-15-deficient mice. *Gastroenterology* 134: 523-534, 2008

⑩Matsuda M, Kobayashi Y, Masuda S, Adachi M, Watanabe T, Yamashita JK, Nishi E, Tsukita S, and Furuse M. Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization-based expression cloning. *Exp Cell Res* 314: 939-949, 2008.

⑪Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, and Tsukita S. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 19: 4687-4693, 2008.

⑫Moriwaki K, Tsukita S, and Furuse M. Tight junctions containing claudin 4 and 6 are essential for blastocyst formation in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 312: 509-522, 2007.

⑬Sugihara-Mizuno Y, Adachi M, Kobayashi Y, Hamazaki Y, Nishimura M, Imai T, Furuse M, and Tsukita S. Molecular characterization of angiomin/JEAP family proteins: interaction with MUPP1/PaTJ and their endogenous properties. *Genes Cells* 12: 473-486, 2007.

⑭Fukumoto K, Kikuchi S, Itoh N, Tamura A, Hata M, Yamagishi H, Tsukita S, and Tsukita S. Effects of genetic backgrounds on hyperbilirubinemia in radixin-deficient mice due to different expression levels of Mrp3. *Biochim Biophys Acta* 1772: 298-306, 2007.

⑮Ikenouchi J, Umeda K, Tsukita S, Furuse M, and Tsukita S. Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J Cell Biol* 176: 779-786, 2007.

⑯Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, and Tsukita S. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*

126: 741-754, 2006.

⑰Adachi M, Inoko A, Hata M, Furuse K, Umeda K, Itoh M, and Tsukita S. Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein. *Mol Cell Biol* 26: 9003-9015, 2006.

⑱Furuse M, and Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol* 16: 181-188, 2006.

⑲Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, and Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171: 939-945, 2005.

⑳Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, Nakayama K, Okamura Y, Sasaki H, Miyachi Y, Furuse M, and Tsukita S. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol* 169: 527-538, 2005.

[学会発表] (計 35 件)

①東智仁、明石昌也、古瀬幹夫. PDZ-RhoGEF は細胞間接着部位に局在しアピカル面張力を制御する. 第 62 回日本細胞生物学会大会. 2010. 5. 19-21 (大阪)

②明石昌也、古瀬幹夫. 新規血管内皮 Cell-cell junction 関連分子はCdc42 を介してアクチンフィラメントを調節する. 第 62 回日本細胞生物学会大会. 2010. 5. 19-21 (大阪)

③古瀬幹夫. 血管内皮細胞におけるタイトジャンクションの分子構築. 第 32 回日本分子生物学会 2009. 12. 9-12 (横浜)

④東智仁、明石昌也、古瀬幹夫. ArfGEF11 は上皮細胞の細胞間接着部位に局在しアクチン細胞骨格の構成を制御する. 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009. 12. 9-12 (横浜)

⑤小田裕香子、池ノ内順一、古瀬幹夫. Tricellulin regulates actin-myosin organization at tricellular contacts. 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009. 12. 9-12. (横浜)

⑥明石昌也、古瀬幹夫. 血管内皮の cell-cell junction 新規構成分子の同定と機能解析. 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009. 12. 9-12. (横浜)

⑦Furuse M. Formation of tricellular tight junctions: How the extracellular space is plugged where three epithelial cells meet. ASCB/JSCB/RIKEN CDB Meeting. 2009. 9. 22 (京都)

⑧Furuse M. Molecular basis for the barrier function of tight junctions. *The*

7th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology 2009. 8. 20-21 (Seoul, Korea)

⑨Furuse M. Identification of a novel molecular component localizing at tricellular tight junctions. Gordon research conference "Cell Contact & Adhesion" 2009. 6. 30 (Watervalley Village, USA)

⑩増田小百合、佐々木博之、池ノ内順一、西英一郎、古瀬幹夫. 3細胞結合領域に局在する新規膜内在性タンパク質の同定と解析. 第 61 回日本細胞生物学会大会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 2009. 6. 2-4. (名古屋)

⑪吉原賢、池ノ内順一、月田承一郎、古瀬幹夫. Scribbleのリン酸化修飾は、そのアドヘレンスジャンクションへの局在およびE-カドヘリン-カテニン複合体との結合を制御する. 第 61 回日本細胞生物学会大会. 2009. 6. 2-4. (名古屋)

⑫古瀬幹夫. タイトジャンクション: 細胞間をシールする分子機構. 日本薬学会第 129 回年会 2009. 3. 26 (京都)

⑬Takahashi S, Iwamoto N, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M. The E3 ubiquitin ligase LNX-1 downregulates claudins from tight junctions. 48th The American Society for Cell Biology Annual Meeting. 2008. 12. 13-17. (San Francisco, USA)

⑭岩本典子、高橋千絵、佐々木博之、月田承一郎、古瀬幹夫. The E3 ubiquitin ligase LNX-1 downregulates claudins from tight junctions. 第 31 回日本分子生物学会年会. 2008. 12. 9-12. (神戸)

⑮Furuse M. Internalization and degradation of claudins during the remodeling of tight junctions. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Blood/Brain Barrier Physiology: Neural Boundary and the Molecular Mechanisms of CNS Protection 2008. 12. 1-4 (Cold Spring Harbor, USA)

⑯古瀬幹夫. タイトジャンクション: 細胞間隙をシールする分子機構. 第 56 回ウイルス学会学術集会. 2008. 10. 26-28 (岡山)

⑰松田美穂、山下潤、月田承一郎、古瀬幹夫. アドヘンスジャンクションに局在する新規アクチン結合タンパク質abLIM3 の同定と機能解析. 第 60 回日本細胞生物学会大会. 2008. 6. 29-7. 1 (横浜)

⑱高橋千絵、岩本典子、佐々木博之、月田承一郎、古瀬幹夫. E3 ユビキチンリガーゼLNX 1 によるクローディンのタイトジャンクションからの消失. 第 60 回日本細胞生物学会大会. 2008. 6. 29-7. 1 (横浜)

⑲Iwamoto N, Takahashi S, Sasaki H,

Tsukita S, Furuse M. The E3 ubiquitin ligase LNX-1 downregulates claudins from tight junctions. Gordon Research Conference: SIGNALING BY ADHESION RECEPTORS. 2008. 6. 29-7. 4 (South Hadley, USA)

⑩ Furuse M. The role of tight junctions in epithelial barrier function. Post IID 2008 Satellite international Meeting on Autoimmune Diseases 2008. 5. 17-19 (大津)

21. Furuse M. Internalization of claudins from tight junctions. International conference Berlin 2008 "Molecular structure and Function of the tight junction" 2008. 4. 24-27 (Berlin, Germany)

22. 古瀬幹夫. タイトジャンクションの分子構築と機能発現のメカニズム. 第32回角膜カンファレンス、第24回日本角膜移植学会 2008. 3. 1 (千葉)

23. 勝野達也、梅田一彰、山崎裕自、三宅由華、和田真実、松井毅、田村淳、池ノ内順一、古瀬幹夫、月田承一郎、月田早智子. 細胞間接着における細胞膜-細胞骨格インターフェイスとしてのZO-1. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会. 2007. 12. 11-15 (横浜)

24. 田村淳、北野由佳、秦正樹、勝野達也、森脇一将、佐々木博之、野田哲生、古瀬幹夫、月田承一郎、月田早智子. クローデイン15ノックアウトマウスにおける小腸肥大化の解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会. 2007. 12. 11-15 (横浜)

25. 足立誠、浜崎洋子、小林由佳、月田早智子、古瀬幹夫、月田承一郎. タイトジャンクションに局在する2つの類似したPDZドメイン含有分子MUPP1とPatjの解析. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会. 2007. 12. 11-15 (横浜)

26. 古瀬幹夫. タイトジャンクションとバリア障害. 第71回日本皮膚科学会東部支部学術大会 2007. 9. 23 (札幌)

27. Furuse M. Identification of novel components localizing at epithelial cell-cell junction. 10th Symposium on "Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers" 2007. 9. 13-17 (Potsdam, Germany)

28. Furuse M. Epithelial and endothelial tight junctions. 4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery. 2007. 6. 20-22 (金沢)

29. 古瀬幹夫. タイトジャンクションと皮膚のバリア機能. 第32回日本化粧品学会. 2007. 6. 7-8 (東京)

30. 小林由佳、松田美穂、増田小百合、足立誠、月田承一郎、古瀬幹夫. Fluorescence localization-based expression cloning (FL-REX) 法によるアドヘレンスジャンクション局在GTPase activating proteinの同定. 第40回日本発生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会. 2007. 5. 28-30 (福岡)

31. 池ノ内順一、梅田一彰、月田早智子、古瀬幹夫、月田承一郎. 上皮細胞の細胞接着過程におけるZO-1の役割. 第40回日本発生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会 2007. 5. 28-30 (福岡)

32. Furuse M, Ikenouchi J, and Tsukita S. Molecular dissection of tight junctions. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. 2006. 6. 18-23 (京都)

33. Moriwaki K, Tsukita S, Furuse M. Tight junction is required for blastocyst formation in mouse early development. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. 2006. 6. 18-23 (京都)

34. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita Sa, Tsukita Sh. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. 2006. 6. 18-23 (京都)

35. Adachi, M, Hamazaki Y, Kobayashi Y, Itoh M, Sasaki H, Takai Y, Furuse M, Tsukita S. Overlapping and distinct functions of two homologous, PDZ domain-containing tight junction proteins, MUPP-1 and Patj. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. 2006. 6. 18-23 (京都)

[図書] (計2件)

① Furuse M. Introduction: Claudins, Tight Junctions, and the Paracellular Barrier. *Current Topics in Membranes, Vol. 65 "Claudins"*. (Yu A, ed.) Elsevier, Inc. in press.

② Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *A Cold Spring Harbor Perspective in Biology Collection "Cell-Cell Junctions"*. p35-48 (Fuchs E and Nelson WJ, ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: タイトジャンクション調節因子
発明者: 古瀬幹夫、増田小百合

権利者：神戸大学
種類：特許
番号：特願 2009-096976
出願年月日：2009/4/13
国内外の別：国内

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/cellb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

月田 承一郎 (TSUKITA SHOICHO)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：50155347
(2005)

古瀬 幹夫 (FURUSE MIKIO)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90281089
(2005-2009)

(2) 研究分担者

月田 早智子 (SACHIKO TSUKITA)
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号：00188517
(2005-2007)

足立 誠 (ADACHI MAKOTO)
京都大学・大学院医学研究科・助手
研究者番号：30335244
(2005-2006)

久保 亮治 (KUBO AKIHARU)
京都大学・大学院医学研究科・助手
研究者番号：70335256
(2005-2006)

田村 淳 (SACHIKO TSUKITA)
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任助教
研究者番号：00362525
(2007)

小田 裕香子 (ODA YUKAKO)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70452498
(2007-2009)

佐々木 博之 (SASAKI HIROYUKI)
東京慈恵医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60170693
(2006-2009)

中尾 和貴
独立行政法人理化学研究所・研究員
研究者番号：20217657
(2006-2009)