

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14696

研究課題名(和文)タイトジャンクションによるPTENを介したガン化抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文)The Elucidation of tumorigenesis mechanisms through signal transduction starting from tight junction.

研究代表者

矢野 智樹 (Yano, Tomoki)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20546121

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)：本研究は、上皮細胞接着装置であるタイトジャンクションを起点としたがん化メカニズムの解明を目的として研究を行った。その結果、がんの悪性化に関与していると考えられているAMPKがTJタンパク質であるcingulinが結合する細胞骨格を制御し、TJの性質を制御していることを明らかにし、また、がんの浸潤に関与していると言われる接着班と細胞間接着に局在するタンパク質であるvinculinがTJの安定化に寄与していることを明らかにした。これらの結果から、TJとがん化のメカニズムが密接に関与していることが考えられ、今後その詳細を明らかにすることで癌研究に新たな知見を加えられることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今日まで上皮細胞接着とがん化のメカニズムの知見の多くはアドヘレンスジャンクションの研究が多くを占めており、タイトジャンクションとがん化のメカニズムについての知見はほとんどなかった。本研究においてタイトジャンクションとがん化のメカニズムが密接に関与していることが示唆されたことは、今後のがん研究に新たな知見を加えることが期待できるだけでなく、細胞間接着の研究分野の発展にも貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Multicellular organism is surrounded by the epithelial cell sheets. Epithelial cells are adhered each other by using cell-cell adhesion complexes such as adherence junctions and tight junctions (TJ). Carcinogenesis mostly arises from epithelial cells, however, it is remained unclear how TJ involved in epithelial carcinogenesis. Here we showed that AMPK, which participates in the malignancy of tumor, regulates the barrier function of TJ by which AMPK phosphorylates cingulin and changes the cingulin's binding cytoskeleton. Moreover, we showed that vinculin, localized at the focal adhesion which participates in the invasion of carcinoma and at the cell-cell contact regulates TJ robustness to create appropriate homeostasis for epithelial cells. These results suggest that TJ involved in epithelial carcinogenesis.

研究分野：上皮細胞生物学

キーワード：タイトジャンクション 細胞間接着 上皮細胞 細胞骨格 細胞外ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は細胞接着装置により隣り合う細胞と接着する事で上皮細胞シートを形成している。この上皮細胞シートが私たちの体を覆うように存在し、外界と体内を隔てる事により私たちの体は恒常性を維持している。この外界と体内を隔てるという重要な機能を上皮細胞にもたらしめているものこそ、細胞接着装置の一つであるタイトジャンクション (TJ) である。TJ とアクチンとの結合が上皮細胞のバリア機能を創出するのに必要であることは広く知られていたが、TJ と他の細胞骨格の結合は報告されていなかった。そんな中、申請者は超解像顕微鏡に代表される先端技術を用い、TJ と微小管との結合を明らかにし、論文として報告した。この報告の後、上皮細胞のアピカル面直下にアクチン繊維、微小管、中間径繊維それぞれのネットワークの存在が明らかにされ、その構造体をアピカル3層構造と定義されている。さらに最近では、申請者は TJ とアピカル3層構造は TJ に局在する TJ-MAPs と呼ばれるタンパク質を介して相互作用していることを突き止め、現在その詳細を明らかにしようと試みている。そのような状況の中、私たちの予備実験では cingulin は TJ とアピカル3層構造を繋ぎ止めているだけでなくがん抑制遺伝子 PTEN と結合することを見出した。また、cingulin は AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) によりリン酸化されることにより微小管に結合することを示していたが、AMPK はがんの悪性度に関与していることが知られている。さらに、がんの浸潤に関与することが知られている細胞-細胞外接着班に局在する vinculin は細胞-細胞接着であるアドヘレンスジャンクション (AJ) にも局在し、細胞外からのストレスに応答している。このように TJ とがん化制御は密接に関係していると考えられ、今日までは細胞間接着とがん化制御との関係については主に AJ について数多く研究が進んできた中で、TJ とがん化制御との関係について研究を進めることはがん研究において新たな知見を加えることができる可能性がある。

2. 研究の目的

上皮細胞シートの細胞間バリア機能を担うタイトジャンクション (TJ) とアピカル膜直下に存在する細胞骨格構造との連関を研究する中で、TJ に局在するタンパク質 cingulin がアピカル微小管ネットワーク構造と TJ を繋げていることを示した。cingulin はがんの悪性化に関与していることが知られている AMPK によりリン酸化されることにより微小管に結合することを示したが、cingulin は他の細胞骨格であるアクチン繊維にも結合するため、cingulin は同時に微小管とアクチン繊維に結合するのかなど、その詳細なメカニズムは不明のままである。さらに cingulin について解析を進めると cingulin はがん抑制遺伝子 PTEN と結合し、cingulin を欠損させた細胞においては PTEN シグナルの下流である Akt のリン酸化が亢進している予備実験を得ている。これらの結果から cingulin とがん化抑制メカニズムに重要な役割を果たしていることが示唆されるため、本研究において TJ を起点とした上皮細胞のがん化抑制メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。また、AJ に局在する vinculin はがんの浸潤に関与している細胞-細胞外基質接着班にも局在しており、細胞外ストレスに応答するタンパク質群の一つとして知られている。細胞外ストレスとがん化のメカニズムは近年その関係性が明らかになってきていることから vinculin を介して細胞外ストレスが TJ に及ぼす影響を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

- (1) Cingulin の細胞骨格結合に及ぼす AMPK の影響を調べるために、以下の方法を用いた。
Cingulin は N 末側の head ドメインによってアクチン繊維や微小管に結合することが知ら

れている。また、この head ドメインは AMPK によりリン酸化される 132 番目のセリンと 150 番目のセリンを含んだドメインである。これまでの研究により cingulin 全長よりも cingulin の head ドメインのみのミュータントの方が微小管により強く結合することが明らかになっていることから、cingulin の分子内構造変化が示唆されていた。これらのことから、AMPK による cingulin のリン酸化が及ぼす微小管やアクチン繊維への結合の影響を検討するために免疫沈降法を用いて検討した。また、低角度回転蒸着法を用いて生成した cingulin タンパク質分子を電子顕微鏡下で観察した。さらに、cingulin が結合する細胞骨格により TJ のバリア機能への影響を観察するために、AMPK 阻害剤である Compound C や AMPK 活性促進剤である AICAR を用いて実験を行った。

- (2) Vinculin を介して細胞外ストレスが TJ に及ぼす影響を調べるために以下の方法を用いた。TJ を蛍光ラベルした vinculin ノックアウト (KO) 細胞を作成し、超解像顕微鏡を用いてライブイメージングし、ワイルドタイプ (WT) 細胞と TJ 形成メカニズムを比較した。細胞外ストレスの一つである細胞外力学ストレスに応答するためにはアクチンミオシンを収縮させることで対応していることから、ミオシンの ATPase 活性を阻害する blebbistatin を Vinculin KO 細胞と WT 細胞に添加することによりその応答をライブイメージングにて観察する。さらに vinculin KO 細胞と WT 細胞の細胞間隙の透過性を様々な大きさの分子について検討し、blebbistatin を加えた際も同様に細胞間隙の透過性を検討した。

4 . 研究成果

- (1) まず、はじめに cingulin と微小管の結合様式を観察するために全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF) を用いて精製した GFP-cingulin タンパク質分子と ATTO647 でラベルした微小管を混合したものを観察した。その結果、cingulin は微小管が 2 本異常交差する点に存在していることから、cingulin は微小管をクロスリンクさせるように結合することが明らかになった。次に、cingulin の分子内結合の検討と、AMPK リン酸化を模した cingulin リン酸化ミュータントと非リン酸化ミュータントを作成し微小管への結合の影響を cingulin 全長及び、cingulin の head ドメインのみのミュータントについて免疫沈降法を用いて検討した。その結果、cingulin は N 末側の head ドメインと C 末側のドメインで結合することが明らかになり、また、head ドメインが AMPK によりリン酸化させることにより C 末側のドメインに結合しなくなることを示した。また、AMPK によってリン酸化された cingulin 分子の全長は微小管への結合が強くなるのに対し、cingulin の head ドメインだけのミュータントでは AMPK によるリン酸化の影響が観察されなかった。これらのことから、AMPK による cingulin のリン酸化が微小管への結合に及ぼす影響として、リン酸化した cingulin は head ドメインが微小管に結合することができるように分子内の構造を変化させることが示唆された。続いて、その示唆を検討するために低角度回転蒸着法を用いて生成した cingulin タンパク質分子の電子顕微鏡下での観察を行った。その結果、AMPK によるリン酸化を模した cingulin ミュータント分子の多くは直鎖状の分子形態を示していたのに対し、AMPK によるリン酸化を受けない非リン酸化 cingulin ミュータント分子の多くは球状の分子形態を示していた。また、AMPK と cingulin を混合し、cingulin をリン酸化させたサンプルにおいてもその分子形態が直鎖状の分子形態を示していた。これらの結果から、cingulin は AMPK によりリン酸化されると分子形態が球状から直鎖状に変化させることが明らかになった。次に cingulin がアクチン結合タンパク質と知られているため、AMPK に

よるリン酸化がアクチン繊維との結合に及ぼす影響を免疫沈降法により検討した。その結果、cingulin の非リン酸化ミュータントが AMPK によるリン酸化を模した cingulin ミュータントよりもアクチンに結合することが示された。さらに、cingulin の head ドメインミュータントを用いた実験では全長を用いた結果と同様に非リン酸化ミュータントが AMPK によるリン酸化を模した cingulin ミュータントよりもアクチンに結合することが示された。これらの結果から、cingulin のアクチンへの結合は AMPK によりリン酸化されることによって阻害されることが示された。Cingulin の微小管への結合は AMPK による分子形態により制御されていることが明らかになった一方で、cingulin のアクチン繊維への結合が cingulin の head ドメインのリン酸化そのものが結合を制御していることが明らかになった。最後に、AMPK が TJ のバリア機能に及ぼす影響を調べるために、AMPK 阻害剤である Compound C と AMPK 活性促進剤である AICAR を用いて実験を行った。その結果、阻害剤 Compound C を培養細胞に添加すると TJ のバリア機能の上昇が見られ、活性促進剤である AICAR を用いると TJ のバリア機能が低下し、細胞間隙を通過するナトリウムイオンが増加していることが明らかになった。以上のことから、AMPK は cingulin を介して TJ と細胞骨格の相互作用を変化させることで生体に必要なホメオスタシスの維持を行っていることが示された。これらの結果をまとめて Scientific Reports に報告した。また、AMPK が及ぼす細胞間接着への影響をまとめた総説が International journal of Molecular Sciences に採用された。

- (2) Vinculin KO 細胞を CRISPR/Cas9 システムを用いて作成し、4kDa や 20kDa の蛍光ビーズの細胞間隙の透過性を測定すると、vinculin KO 細胞と WT 細胞では大きな差が見られなかった。しかし、細胞間隙を通過するイオンは vinculin KO 細胞では WT 細胞に比較して非常に多くなっていることが明らかになった。この時免疫染色法を用いて TJ を観察すると、vinculin KO 細胞では TJ や AJ が断裂している箇所が見られた。Vinculin KO 細胞に TJ マーカーである occludin に venus タグを融合したタンパク質を発現させ超解像顕微鏡を用いてライブイメージングを行うと、vinculin KO 細胞では多くの場所で TJ が断裂したり、融合したりを繰り返している様子が観察された。免疫電子顕微鏡法により vinculin を観察すると、vinculin は主に AJ に局在するが、一部は TJ に局在する様子が観察された。また、免疫沈降法により ZO-1 と vinculin は相互作用していることが示され、vinculin の D2-D4 ドメインで ZO-1 と相互作用していることが示された。次に、ライブイメージングで得られた画像を用いて WT 細胞と vinculin KO 細胞のどちらがより動態が激しくなっているかを検討したところ、vinculin KO 細胞の方が WT 細胞に比べると細胞の動態が激しくなっていることが示された。この時、細胞にかかる力学エネルギーが vinculin KO 細胞において大きくなっていることが明らかになった。これらの結果より、vinculin KO 細胞の動態が激しくなることで、TJ にかかる細胞外力学エネルギーが大きくなっていることが示唆された。この示唆を検証するために細胞外力学エネルギーに応答するアクチンミオシンの阻害を試みた。ミオシンの ATPase 活性阻害剤である blebbistatin を用いてライブイメージングを行った結果、blebbistatin を加えた vinculin KO 細胞では TJ の断裂が観察されず、WT 細胞と同様の TJ の形成が行われることが明らかになった。また、この時 TJ のバリア機能を測定すると、vinculin KO 細胞では blebbistatin を加えると TJ のバリア機能が回復し、blebbistatin を取り除くと TJ のバリア機能が再び低下していくことが観察された。最後に、vinculin のアクチン結合領域である D5 ドメインをアクチン結合ドメインを取り

除いた α -catenin のミュータントタンパク質に融合させることにより、vinculin のアクチン結合領域だけを細胞間接着に発現させることにより、TJ の機能が回復したことから、vinculin は vinculin 分子内のアクチン結合ドメインを介して TJ のバリア機能を制御していることが明らかになった。以上のことから細胞間接着である AJ と TJ は vinculin を介して AJ が TJ のバリア機能を制御していることが示された。これらの結果をまとめて Life Science Alliance に報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Satoshi Konishi, Tomoki Yano, Hiroo Tanaka, Tomoaki Mizuno, Mizuho Kanoh, Kazuto Tsukita, Toshinori Namba, Atsushi Tamura, Shigenobu Yonemura, Shimpei Gotoh, Hisako Matsumoto, Toyohiro Hirai, and Sachiko Tsukita	4. 巻 2
2. 論文標題 Vinculin is critical for the robustness of the epithelial cell sheet paracellular barrier for ions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.26508/lsa.201900414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuto Tsukita, Tomoki Yano, Atsushi Tamura, and Sachiko Tsukita	4. 巻 20
2. 論文標題 Reciprocal Association between the Apical Junctional Complex and AMPK: A Promising Therapeutic Target for Epithelial/Endothelial Barrier Function?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/ijms20236012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomoki Yano, Takayuki Torisawa, Kazuhiro Oiwa & Sachiko Tsukita	4. 巻 8
2. 論文標題 AMPK-dependent phosphorylation of cingulin reversibly regulates its binding to actin filaments and microtubules	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-018-33418-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----