

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2014

課題番号：21227005

研究課題名(和文)細胞接着とシグナル伝達による細胞の形態形成機構

研究課題名(英文)Roles of Cell Adhesion and Signaling in Cell Morphogenesis

研究代表者

高井 義美 (TAKAI, YOSHIMI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60093514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 164,100,000円

研究成果の概要(和文)：個体を構成する細胞は、様々な細胞形態をとって固有の機能を発揮する。また、その形態の変化は環境に適応して個体が生存するために重要である。本研究では、研究代表者らが研究してきたネクチン-アフアディン系と、ネクチン様分子およびその下流のシグナル伝達分子を軸として、上皮細胞の細胞間接着装置の位置や細胞丈の決定機構、上皮間葉転換と間葉上皮転換における形態変化の分子機構、神経細胞のシナプスの形成とリモデリング機構、および軸索と樹状突起の形成に関わる細胞接着分子を解明した。さらに、得られたデータを深く掘り下げ、感覚上皮、中枢神経組織、および腸管上皮の組織形成や細胞の配置に細胞接着分子が果たす役割を解明した。

研究成果の概要(英文)：Each cell in the body has a variety of morphologies and exerts its own function. The change of cell morphology is important for a body to survive by adapting to its environment. In this research, based on the achievements we have made in the research of the nectin-afadin system, nectin-like molecules, and their downstream signaling molecules, we revealed the molecular mechanisms that regulate the localization of the adhesion apparatuses and the heights of the cells; those of the cell morphogenesis during epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions; those involved in the synaptic formation and remodeling of the neural cells; and the cell adhesion molecules involved in the formation of axon and dendrites. Furthermore, by analyzing these results more deeply, we revealed the roles of the cell adhesion molecules in the tissue formation and cell arrangements in the sensory epithelium, central nervous tissues, and the intestinal epithelium.

研究分野：生化学

キーワード：アドヘレンスジャンクション タイトジャンクション 異種細胞間接着 ネクチン ネクチン様分子
アフアディン

1. 研究開始当初の背景

一個の受精卵から出発して個体が形成される際、細胞は分裂・増殖を繰り返して分化し、様々な細胞形態をとる。個々の細胞が特異的な細胞形態をとることは、発生過程における臓器・組織形成において必要不可欠である。また、細胞形態の変化は、個体が環境に適応して生存していくために必須であり、細胞形態の不可逆的破壊は臓器機能の低下、さらには、生命の危機につながり得る。このような観点から、細胞の形態形成機構を解析することは生物学的にも医学的にも極めて重要である。研究代表者らは、30年以上前にCキナーゼを発見し、これが細胞膜イノシトールリン脂質由来のジアシルグリセロールによって、セリンリン脂質とカルシウムイオンに依存して活性化され、種々の細胞機能を遂行しているという全く新しい細胞内シグナル伝達機構を提唱した。その後、アクチン細胞骨格の構築に関わるRhoファミリーや細胞内輸送を制御するRabファミリーなどの低分子量Gタンパク質の研究を通じて、Rhoファミリーに属するCdc42とRacの活性化が、細胞接着分子ネクチンとその細胞内アダプタータンパク質アファディンにより構成される新規の細胞接着装置を介して上皮細胞の細胞間接着装置アドヘレンスジャンクション(AJ)の形成を促進していることを見出した。細胞形態を規定する分子機構についての研究は国内外の多数の研究室で行われてきたが、これまでの研究は主に構造学的な観点や細胞骨格を形成する分子を中心に進められている。しかし、多細胞生物の生体内においては、細胞同士の様々な相互作用が働いている。したがって、細胞形態の形成機構の全容を解明する上では、これまでの細胞の“形”に関する先行研究に加えて、細胞外シグナル分子、細胞間接着、細胞-基質間接着が細胞形態に及ぼす作用を統合的に検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らがこれまでに研究してきたネクチン-アファディン系と、ネクチン様分子(Nec1)およびその下流のシグナル伝達分子を軸に、以下の3点に焦点を絞って問題の解明に取り組んだ。さらに得られたデータを深く掘り下げることで、感覚器や中枢神経組織の組織形成や細胞の配置に細胞接着分子が果たす役割を解明した。

(1) 上皮細胞におけるAJとタイトジャンクション(TJ)の位置決定機構と細胞丈の決定機構

上皮細胞では、細胞間接着形成が完成した後に細胞間接着部位で側基底側領域と頭頂側領域が分離し、TJがAJの頭頂側に形成される。本研究では、AJとTJを構成する種々の接着分子や極性因子に着目し上皮細胞様の接着構造と頭頂-基底軸極性の形成および細胞丈の制御に関わる分子機構を明らかにする。

(2) 上皮間葉転換(EMT)と間葉上皮転換(MET)における形態変化の分子機構

EMT初期過程に対応する細胞の遊走開始時の運動先導端の形成過程におけるRap1やRac、Rhoなどのシグナル分子やNec1-5、アファディンの関与を明らかにする。さらに、上皮細胞に特徴的に発現しているNec1-2やNec1-2と結合するErbB3を介したシグナル伝達系と細胞の形態変化や細胞運動との関連を明らかにする。METにおける形態変化の分子機構を細胞接着分子の相互作用と発現制御に着目して明らかにする。

(3) 神経細胞におけるシナプスの形成・リモデリング機構と軸索の選択的形成機構

神経細胞の特徴的な形態の形成機構は、線維芽細胞の運動時に見られる形態や上皮細胞の接着構造とも多くの点で類似する。例えば、軸索が別の神経細胞の樹状突起と接着してシナプスを形成する際に形成されるPuncta adherentia junction (PAJ)はAJと構造上類似している。また、シナプスは神経活動に依存してリモデリングすることで、記憶や学習と密接に関連していると考えられている。そこで、ネクチン、アファディン、ZOタンパク質や低分子量Gタンパク質の解析を通じて、神経細胞のシナプス形成やリモデリング機構におけるネクチン-アファディン系の役割と作用機序を明らかにする。また、本研究ではネクチン-アファディン系をはじめとした細胞接着分子が軸索と樹状突起の形成に関わる分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 上皮細胞におけるAJとTJの位置決定機構と細胞丈の決定機構

研究代表者らはすでに、AJとTJを欠損している線維芽細胞に、ネクチン、カドヘリン、JAM、クローディンを発現させてAJ構造とTJ構造を再構築することに成功している。本研究では、これらの知見をもとにAJとTJの種々の接着分子や極性因子をさまざまな組み合わせで発現させる再構築実験を行った。これらの4種類の接着分子以外にも種々の因子をさらに発現させる、あるいは減少させることで、これらの構造をベルト様に細胞の周囲を連続して取り

巻くように転換させる機構や、頭頂-基底軸極性を上皮細胞様に転換させる機構を解析した。

(2) EMTとMETにおける形態変化の分子機構

EMT初期過程に対応する細胞の遊走開始時の運動先導端の形成過程におけるRap1やRac、Rhoなどのシグナル分子やNec1-5、アフアディンおよびその結合タンパク質の関与を、免疫染色、免疫沈降、細胞運動能の評価などを通じて解析した。また、上皮細胞に特徴的に発現しているNec1-2に着目し、増殖因子刺激下でのNec1-2の発現やErbB2/ErbB3シグナル伝達系の働きについて解析した。さらに、METにおける形態変化の分子機構を、AJ形成に関わる細胞接着分子の相互作用と発現制御に着目して解析した。

(3) 神経細胞におけるシナプスの形成・リモデリング機構と軸索の選択的形成機構

アフアディンのコンディショナルノックアウトマウスの神経組織、あるいはそれらの培養神経細胞を用いて、免疫染色や電子顕微鏡による観察などを行い、神経におけるこれらのシグナル分子の役割を解析した。さらに、神経細胞のリモデリングや、軸索や樹状突起形成におけるネクチン-アフアディン系やそれらの関連分子の役割と作用機序を、神経組織やそれらの培養細胞を用いて、免疫染色や電子顕微鏡による観察、神経生理学的解析などを行い検討した。

4. 研究成果

(1) 上皮細胞におけるAJとTJの位置決定機構と細胞丈の決定機構

① 線維芽細胞を用いたAJとTJの再構築

種々の細胞間接着分子や極性因子をさまざまな組み合わせで発現させ、AJとTJを欠損している線維芽細胞から上皮細胞様細胞への再構築に必要な因子を解析した。従来はTJがAJの頭頂側に形成されるには、カドヘリンが必須であると信じられていたが、今回の検討によりカドヘリンは必須ではなく、ネクチンが必須であることを解明した (Yamada et al. Genes Cells 2013)。また、PLEKHA7の強制発現により、のこぎりの歯のようになっている線維芽細胞のAJ構造が、上皮細胞様のAJのベルト様構造を示したことから、PLEKHA7がAJのベルト様構造の形成に重要であることが明らかになった (Kurita et al. J. Biol. Chem. 2013)。さらに、線維芽細胞には内在性に発現していない極性因子Par-3、aPKC、Par-6、Crb3、Pals1、Patjの強制発現により、TJがAJの頭頂側に形成された (Yamada et al. Genes

Cells 2013)。さらに、ネクチンはアフアディンと、JAM はZO-1とそれぞれ結合するとともに、アフアディンとZO-1が結合することがTJとAJの形成および配置に必須であった (Ooshio et al. J. Biol. Chem. 2010)。細胞丈の決定に関わる因子として、微小管の細胞内での頭頂-基底方向での配向が重要である。本研究では、LL5 α とインテグリンが微小管を細胞の基底面に配向する因子として必須であることを解明した (Hotta et al. J. Cell Biol. 2010)。

② アフアディンを介した腸管細胞配置制御の分子機構

アフアディンが細胞接着形成に重要であることを踏まえ、消化管特異的なアフアディンノックアウトマウスを解析した。アフアディンは腸管のパネート細胞の細胞接着の形成、細胞形態の維持、および配置に必須の働きをすることを組織レベルで解明した (Tanaka-Okamoto et al. PLoS One 2014)。

③ 異種細胞間接着を介した組織形成機構

細胞間接着分子ネクチンや Nec1 の機能解析の結果を踏まえ、各種ネクチンノックアウトマウスの表現型を詳細に解析して、ネクチンが異種細胞間の接着による細胞の形態と配列の形成に極めて重要な役割を果たすことを明らかにした。内耳蝸牛管の感覚上皮では有毛細胞と支持細胞が市松模様様に配列し、この異種細胞の配列が聴覚に必須である。有毛細胞と支持細胞にはネクチン-1と-3がそれぞれ選択的に発現していた。また、ネクチン-3ノックアウトマウスの聴覚上皮では、有毛細胞同士の異常な接着により聴覚上皮の細胞配列が著しく乱れていた。したがって、有毛細胞と支持細胞による市松模様様の細胞配列には、それぞれの細胞に発現しているネクチン-1と-3の結合が必須であることが示された (Togashi et al. Science 2011)。さらに、これらのネクチンの結合は有毛細胞の形態やその表面の毛の形態と配向 (平面内細胞極性) にも重要であった (Fukuda et al. Development 2014)。これらの結果から、ネクチンを介する細胞間接着は、臓器・組織の形成レベルでも、細胞接着の確立のみならず、平面内細胞極性の制御を介した細胞形態の形成にも重要であることが示された。

(2) EMTとMETにおける形態変化の分子機構

① 運動先導端の形成に関与する分子機構

EMTの初期過程では、細胞は遊走を開始するが、その時の運動先導端では、PDGF受容体、

インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 、Nec1-5 が複合体を形成して、血小板由来増殖因子 (PDGF) による細胞内シグナルの活性化を調節し、方向性を持った細胞運動を制御している。本研究では、運動先端端において、ネクチンに結合していないアフアディンが、活性型 Rap1 に結合して SHP-2 をリクルートし、運動先端端の形成を促進していること (Miyata et al. J. Cell Sci. 2009)、アフアディンが運動先端端における Rap1、Rac1、Rho の周期的な活性化・不活性化を制御して、PDGF を介した運動先端端の形成を制御していること (Miyata et al. J. Biol. Chem. 2009)、アフアディンとその結合タンパク質 ADIP との結合により Src と Vav2 を介して Rac を活性化し、運動先端端の形成と細胞運動を促進していること (Fukumoto et al. J. Biol. Chem. 2011) を解明した。

② Nec1-2 を介した形態変化の分子機構

上皮細胞では、インテグリン $\alpha_6\beta_4$ が発現しヘミデスモソームを形成することで、細胞外基質との結合を強固にしている。一方、EMT を介して細胞が遊走する過程では、ヘミデスモソームによる結合を弱めることが必要である。本研究では、Nec1-2 がインテグリン $\alpha_6\beta_4$ と結合し、ヘミデスモソーム構造の崩壊を抑えることで、EMT の制御に関わることを明らかにした (Mizutani et al. J. Biol. Chem. 2011)。また、がん抑制遺伝子として知られる Nec1-2 は、ErbB3 と結合し、リガンドを介した ErbB2 の活性化による ErbB3 のリン酸化を抑制し、Akt や Rac の活性化を抑制することでがん細胞の運動や生存を抑制した。したがって、Nec1-2 は、浸潤・転移などのがんの進展にも重要な働きをもつことが明らかになった (Kawano et al. J. Bio. Chem. 2009)。さらにマイクロ RNA を介した Nec1-2 の発現制御機構を解明した。マイクロ RNA の一種である miR-214 は Nec1-2 を標的としてその発現を直接抑制した。一方、miR-199a は、糖鎖修飾酵素 ST6GAL1 の発現抑制を介して間接的に Nec1-2 の発現を抑制した (Minami et al. J. Biol. Chem. 2013; Momose et al. Genes Cells 2013)。miR-214 と miR-199a はともに、Nec1-2 の発現抑制を介して ErbB2/ErbB3 シグナル伝達系を活性化した。また、Nec1 ファミリーに属する Nec1-4 も Nec1-2 と同様にヘミデスモソームの形成や、ErbB2/ErbB3 シグナル伝達系の活性化、および細胞の運動と増殖の接触阻害に働くことを解明した (Yamana et al. PLoS One 2015; Sugiyama et al. Genes Cells 2013)。さらに、Nec1-2 を過剰発現するマウスでは

、通常の皮膚の恒常性維持は保たれているものの、皮膚の傷の修復過程において先端端の細胞増殖を抑制し、傷の修復が遅れることを解明した (Giangreco et al. Development 2009)。したがって、生体内においても Nec1-2 は EMT を介した細胞運動の制御に関わることを示された。

③ Nec1-5 を介した形態変化の分子機構

Nec1-5 の過剰発現は肺腺がん患者において独立した予後不良因子であること (Nakai et al. Cancer Sci. 2010)、血管内皮では、Nec1-5 は VEGF 受容体とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の結合を促進して、下流の Rap1-Akt 経路の活性化を促進して、VEGF による血管新生を制御していること (Kinugasa et al. Circ. Res. 2012)、Nec1-5 は微小管の+端を運動先端端の近傍に誘導することで、細胞運動を制御していること (Minami et al. Genes Cells, 2010) を解明した。

④ MET における形態変化の分子機構

MET の過程では、運動する細胞同士が接触した後に、細胞間接着構造を形成していく。運動する細胞の運動先端端には Nec1-5 が存在し、ネクチン-3 と結合することで細胞間接着構造を形成する。この際 Nec1-5 とネクチン-3 の結合は、ネクチンとアフアディンの結合を促進し、これがさらに細胞間のネクチン同士の結合を促進することで、ポジティブ・フィードバック機構により細胞間接着装置の形成が促進されることを解明した (Kurita et al. J. Biol. Chem. 2011)。また、マイクロ RNA miR-199a が、EMT に関わる転写因子 SNAI1 の抑制と N-カドヘリンの発現の抑制を介して、EMT に抑制的に働く分子機構を解明した (Suzuki et al. Genes Cells 2014)。

(3) 神経細胞におけるシナプスの形成・リモデリング機構と軸索の選択的形成機構

① 神経細胞におけるシナプスの形成機構

本研究では、海馬由来の神経細胞を解析して、アフアディンがシナプスの接着構造である PAJ の形成、ネクチンなどの他のスパイン局在タンパク質との相互作用、および前シナプスの機能分化に重要な働きをしていることを解明した (Toyoshima et al. PLoS One 2014)。チロシンキナーゼレセプター EphA4 の細胞内ドメイン (EICD) は、家族性アルツハイマー病で変異がみられる γ -セクレターゼによる EphA4 の切断によって生成される。アルツハイマー病患者の死後脳においては、EICD の発現と膜結合型 Rac、シナプスタンパク質 PSD-95 の発現が減少していた (Matsui et al. Brain

Pathol. 2012)。また、神経突起の伸長には、ホスファチジル酸の結合により活性化されたRA-RhoGAPとRap1が関与することを解明した (Kurooka et al. J. Biol. Chem. 2011)。さらに、神経細胞においてNecl-2がErbB4の活性制御を通じて、興奮性シナプスの形成を制御することを解明した (Yamada et al. Mol. Cell. Neurosci. 2013)。

② 神経細胞におけるリモデリング機構

神経特異的なアフアディンノックアウトマウスでは、記憶や学習と密接に関連している海馬CA3領域におけるPAJの形成が阻害されており、シナプス結合も不安定であった。また、ノックアウトマウスの解析からアフアディンが、ラディアルグリア細胞のAJ形成に必須であること、およびアフアディンのノックアウトにより発生過程でのラディアルグリア細胞を足場とした神経細胞の移動が障害されて大脳組織の形成異常を起こすことを解明した (Yamamoto et al. Brain Res. 2015)。また、アフアディンが海馬におけるシナプス結合のリモデリングにも関連していることを解明した (Majima et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009)。

③ 軸索と樹状突起の形成機構

神経細胞が分化して成熟する過程で、細胞体から出る多くの神経突起は1本の軸索と複数の樹状突起となる。本研究では、細胞接着分子ZO-1を過剰発現およびノックダウンした初代培養神経細胞では、軸索および樹状突起のスパイン形成および伸長に影響がみられることを解明した (Komaki et al. PLoS One 2013)。さらに細胞接着分子の働きを嗅球の神経組織を用いて組織レベルで解析し、嗅球の僧帽細胞の樹状突起同士の接着には「ネクチン-1 スポット」とよばれる新規の接着装置があることを解明した (Inoue et al. J. Comp. Neurol. 2015)。この新規の接着構造は、神経細胞のネットワークを形成するうえで重要な働きをしていると考えられる。

④ アフアディンによるAJの維持機構を介した中脳組織の維持機構

神経特異的なアフアディンノックアウトマウスでは神経上衣細胞やグリア細胞のAJ構造維持機構が障害され、水頭症をおこすことを解明した (Yamamoto et al. PLoS One 2013)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 71 件)

- ① Inoue T, Fujiwara T, Rikitake Y, Maruo T, Mandai K, Kimura K, Kayahara T, Wang S, Itoh Y, Sai K, Mori M, Mori K,

Mizoguchi A, Takai Y. Nectin-1 spots as a novel adhesion apparatus that tethers mitral cell lateral dendrites in a dendritic meshwork structure of the developing mouse olfactory bulb. J. Comp. Neurol., 査読有, 2015, in press. doi:10.1002/cne.23762.

- ② Fukuda T, Kominami K, Wang S, Togashi H, Hirata K, Mizoguchi A, Rikitake Y, Takai Y. Aberrant cochlear hair cell attachments caused by Nectin-3 deficiency result in hair bundle abnormalities. Development., 査読有, vol. 2, 2014, pp. 399-409, doi:10.1242/dev.094995.
- ③ Togashi H, Kominami K, Waseda M, Komura H, Miyoshi J, Takeichi M, Takai Y. Nectins establish a checkerboard-like cellular pattern in the auditory epithelium. Science, 査読有, vol. 333, 2011, pp. 1144-1147, doi:10.1126/science.1208467.
- ④ Mizutani K, Kawano S, Minami A, Waseda M, Ikeda W, Takai Y. Interaction of nectin-like molecule 2 with integrin $\alpha_6\beta_4$ and inhibition of disassembly of integrin $\alpha_6\beta_4$ from hemidesmosomes. J. Biol. Chem. 査読有, vol. 286, 2011, pp. 36667-36676, doi:10.1074/jbc.M110.200535.
- ⑤ Miyata M, Rikitake Y, Takahashi M, Nagamatsu Y, Yamauchi Y, Ogita H, Hirata K, Takai Y. Regulation by afadin of cyclical activation and inactivation of Rap1, Rac1, and RhoA small G proteins at leading edges of moving NIH3T3 cells. J. Biol. Chem., 査読有, vol. 284, 2009, pp. 24595-24609, doi:10.1074/jbc.M109.016436.
- ⑥ Kawano S, Ikeda W, Kishimoto M, Ogita H, Takai Y. Silencing of ErbB3/ErbB2 signaling by immunoglobulin-like Necl-2. J. Biol. Chem., 査読有, vol. 284, 2009, pp. 23793-23805, doi:10.1074/jbc.M109.025155.

[学会発表] (計 27 件)

- ① Yoshimi Takai, Nectin and afadin in cell adhesion and signaling. Symposium on Membrane Biology, University of Washington and Kobe University, 2014. 3.27~3.28, Seattle, WA, USA

- ② 高井義美、シグナル伝達と細胞接着-研究の歴史と展望-、第100回日本消化器病学会総会、2014.4.26、東京国際フォーラム
- ③ 富樫英、Role of mode of action of nectins in the mosaic cellular patterning in sensory organs, 第45回日本発生生物学会(JSDB) / 第64回日本細胞生物学会(JSCB)合同大会、2012.5.28~31、神戸国際会議場
- ④ 扇田久和、新しいがん浸潤・転移のメカニズム、第69回日本癌学会学術総会、2010.9.23、大阪国際会議場
- ⑤ Yoshimi Takai, Regulatory mechanism of active zone formation by nectin-afadin adhesion system, "Current Trends in Biomedicine" workshop "Active Zones as organizers of neuronal communication", 2009.10.24、UNIA、Spain

[図書] (計2件)

- ① Takai Y. et al., Springer-Verlag New York, Cell Adhesion Molecules, 2013, 91-116
- ② Takai Y. et al., Springer-Verlag New York, The Sticky Synapse: Cell Adhesion Molecules and Their Role in Synapse Formation and Maintenance, 2009, 185-206

[その他]

報道:

- ① 読売新聞、朝日新聞、毎日新聞、神戸新聞、2014年度武田医学賞 神戸大・高井氏ら受賞、平成26年9月30日
- ② 朝日新聞、「内耳」形作る遺伝子特定、平成23年8月11日
- ③ 神戸新聞、耳の最奥部 細胞接着の構造解明、平成23年7月29日

ホームページ:

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/ps/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 義美 (TAKAI, Yoshimi)
神戸大学・大学院医学研究科・特命教授
研究者番号: 60093514

(2) 研究分担者

下野 洋平 (SHIMONO, Yohei)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 90594630

水谷 清人 (MIZUTANI, Kiyohito)
神戸大学・大学院医学研究科・特命講師
研究者番号: 50559177

富樫 英 (TOGASHI, Hideru)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 90415240

扇田 久和 (OGITA, Hisakazu)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50379236

栗田 宗一 (KURITA, Souichi)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30595484

溝口 明 (MIZOGUCHI, Akira)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 90181916

岡本 三紀 (OKAMOTO, Miki)
大阪府立成人病センター研究所
・分子生物学部門・研究員
研究者番号: 20332455

(H21 から H22 年度まで研究分担者として参画)

(3) 連携研究者

力武 良行 (RIKITAKE, Yoshiyuki)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 50419488

池田 わたる (IKEDA, Wataru)
カン研究所・主幹研究員
研究者番号: 90362699

岡本 三紀 (OKAMOTO, Miki)
大阪府立成人病センター研究所
・分子生物学部門・研究員

研究者番号: 20332455

(H23 年度から連携研究者として参画)