

令和 6 年 9 月 15 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06156

研究課題名(和文) プロテアーゼによる密着結合の恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of tight junction maintenance by proteases

研究代表者

東 智仁 (Higashi, Tomohito)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70515072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞間の密着結合は、細胞間の物質透過性を制御することによってバリア機能を担っています。細胞の動きや張力変化によって密着結合はつねに微細な破綻を生じていますが、それを修復してバリア機能を維持している仕組みは不明でした。本研究で、膜タンパク質EpCAMが密着結合の材料であるクロロディン7と結合してバソラテラル膜上にプルしていること、破綻部位ではMASPセリンプロテアーゼファミリーがEpCAMを切断してクロロディン7を供給し密着結合を修復していることが明らかになり、上皮組織のバリア機能を維持する仕組みの一端が解明できました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞間接着装置の一つである密着結合は、体の中の異なる区画の間の液性成分の移動を制限・制御することによって上皮組織が正常な生理機能を果たせるようにしています。本研究は密着結合が、生じてしまった小さなキズを常に修復しているという新しい概念に基づき密着結合の維持機構の一端を解明しました。本研究成果は、密着結合関連疾患の病態解明につながるるとともに、この維持機構を一過的に阻害することにより、鼻腔や消化管などの密着結合を一時的にゆるめて効率的に薬剤を送達する手法の開発などにつながる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Epithelial tight junctions (TJs) regulate the paracellular permeability of substances and maintain barrier function. Although TJs are challenged by cell movements and tension changes and undergo small breaks, the mechanisms that repair and maintain TJs have not been clarified. In this study, I discovered that a transmembrane protein EpCAM is complexed with claudin-7, a building block of TJs, and that EpCAM-claudin 7 complex is maintained on the basolateral membranes. Upon TJ break, membrane-anchored serine proteinase family proteinases cleave EpCAM and release the complexed claudin-7, which participates in the repair process of TJ breaks. This study uncovered a novel mechanism of epithelial barrier maintenance.

研究分野：細胞生物学

キーワード：密着結合(タイトジャンクション)

1. 研究開始当初の背景

密着結合 (タイトジャンクション) は上皮細胞のバリア機能を司る細胞間接着です (図1)。これまで、密着結合を主体的に構成するクローディン分子が上皮細胞の管腔側だけで重合する仕組みや、細胞周囲の力学的な環境変化によって生じる微細な密着結合の損傷が迅速に感知され修復される仕組みは明らかになっていませんでした (図2)。古典的な実験でプロテアーゼが新規の密着結合形成を惹起することが示唆されていましたが、その具体的な仕組みは不明でした。

2. 研究の目的

本研究では、「ラテラル膜領域のクローディンは何らかの未知の仕組みで未重合に保たれ、バリア機能が破綻した時に迅速に重合して密着結合を修復するためのプールとして保持されている」という作業仮説を立て、これを検証することによって**密着結合の恒常性維持の分子機構の解明**を目指しました。

3. 研究の方法

(1) EpCAM ノックアウト細胞株の樹立と解析

クローディンをラテラル膜領域に保持する分子の候補として膜タンパク質 EpCAM を考え、ゲノム編集によって EpCAM をノックアウトした MDCK II 細胞株を樹立しました。この細胞についてクローディンの局在やバリア機能を評価しました。

(2) EpCAM を切断するプロテアーゼの検証

密着結合形成を惹起する活性を持つ膜繫留型セリンプロテアーゼのうち、MDCK II 細胞に発現している4種類全てをノックアウトした細胞株を樹立し、EpCAM の切断状態やバリア機能について評価しました。また、膜繫留型セリンプロテアーゼを阻害剤カモスタットで阻害した場合の表現型についても解析しました。

(3) 生体内の上皮において密着結合の損傷修復が起きているのかを検証する。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 法を用いて EpCAM ノックアウト細胞株を樹立しました。EpCAM ノックアウト細胞は、バリア機能の成熟が少し遅れるものの、成熟した上皮シートを形成した時のバリア機能は野生型と遜色ないことが分かりました (data not shown)。しかし、さまざまなクローディンの局在を調べると、もともとラテラル膜上に広く局在していたクローディン7が密着結合に限局して局在するように変化することが分かりました (図3)。また、EpCAM-FLAG 発現細胞から FLAG 抗体を用いて EpCAM-FLAG を免疫沈降すると、クローディン7が共沈降

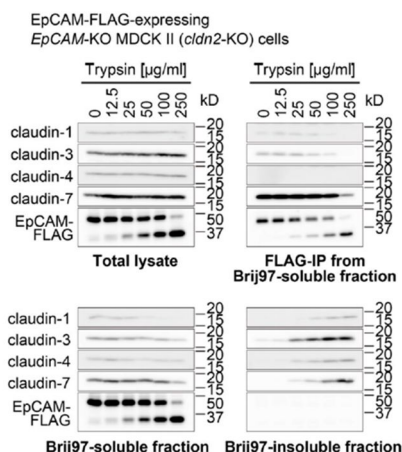


図4 プロテアーゼ処理によってクローディン7は EpCAM から解離して重合し界面活性剤不溶となる

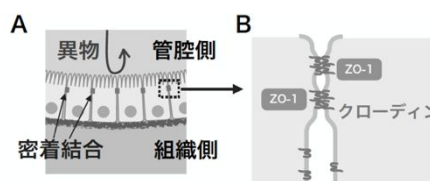


図1 密着結合とクローディン

A. 密着結合は上皮細胞のバリア機能を担う。
B. 密着結合の主要成分であるクローディンは互いに重合し膜どうしを密着させている。

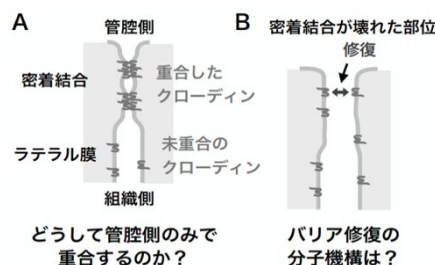


図2 密着結合形成に関する未解決の疑問点

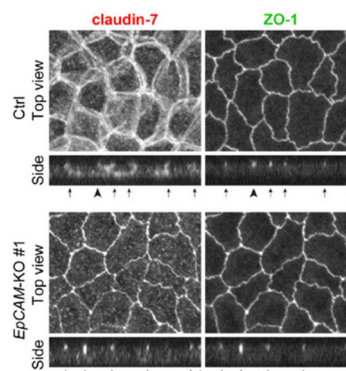


図3 EpCAM-KO細胞ではクローディン7の局在がラテラル膜から密着結合に限局するように変化する

両者が複合体を形成してラテラル膜上に局在していることが示唆されました。この複合体に対するプロテアーゼの影響を調べるため、細胞をトリプシン処理して免疫沈降を行いました (図4)。すると、EpCAM は濃度依存的に分解を受けますが、分解された EpCAM はクローディン7と結合できなくなることが分かりました。EpCAM から解離したクローディン7は界面活性剤 (Brij97) 不溶分画に移行しました。一般に、細胞間接着分子は細胞間接着に組み込まれると界面活性剤に溶けなくなることが知られており、トリプシンで処理した MDCK II 細胞でクローディン7が重合した染色像を示す (次ページの図5) ことと一致した結果が得られました。

(2) 生体内や MDCK II 細胞の EpCAM は常に一部が切断されていることから、EpCAM の切断（とクローディン7の解放・重合）が密着結合の構造や機能に何らかの役割を果たしている可能性があると考え、切断を行っている責任プロテアーゼの同定を行いました。阻害剤スクリーニングにより、膜繫留型セリンプロテアーゼ（MASP）の阻害剤カモスタットが EpCAM の切断を効率的に阻害することが分かりました（図6）さらに、MDCK II 細胞にカモスタットを6時間作用させるとバリア機能が有意に低下しました（図7）、この低下は、EpCAM-KO細胞では見られないこと（data not shown）から、膜繫留型セリンプロテアーゼが EpCAM を切断することが、バリア機能の維持に必要であることが示唆されました。次に、20種類のMASPのうち、MDCK II細胞に発現している4種類のMASPをすべてノックアウトしたMASP-qKO細胞を樹立しました（図8）。MASP-qKOのバリア機能を経上皮抵抗値で評価したところ、野生型より著しく低下していることが分かりました（図9）また、MASP-qKO細胞を低濃度のトリプシンで処理するとバリア機能が向上する（図10）ことから、バリア低下の原因はノックアウトによりプロテアーゼ活性が失われたことにあると考えられます。次に、バリア機能が低下した部位を蛍光によって鋭敏にリアルタイムで可視化できるZnUMBAアッセイ（Stephenson RE et al., Dev Cell, 2019, Higashi T et al., JCS, 2023）を用いてMASP-qKOと野生型細胞を混合培養し、バリア機能の時間変化を観察しました（図11）。すると、qKO細胞領域の方が有意に高い頻度で、長時間の漏れ（バリア機能の破綻）が生じていることが分かりました。

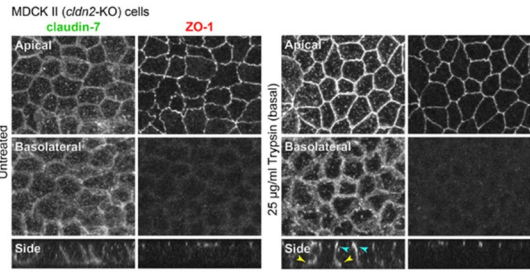


図5 バソラテラル面からのプロテアーゼ処理によりクローディン7は重合した染色像を示す

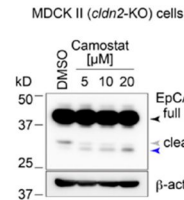


図6 膜繫留型セリンプロテアーゼ阻害剤カモスタットは濃度依存的にEpCAMの切断を阻害する

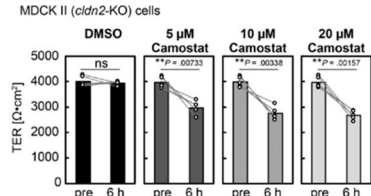


図7 MASP阻害剤カモスタットは上皮細胞の経上皮抵抗値（バリア機能）を低下させる

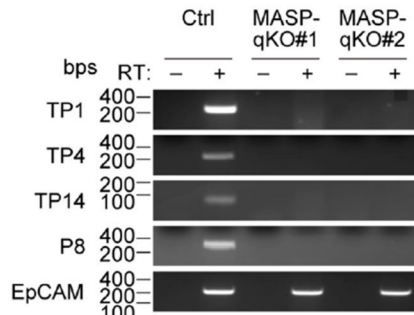


図8 MDCK II細胞に発現している4種類のMASPを全てノックアウトした細胞（MASP-qKO細胞）を作成した

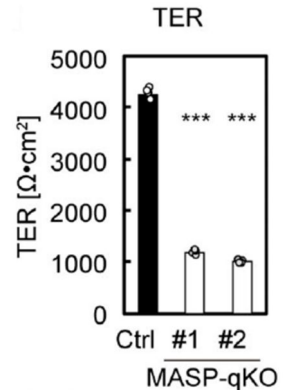


図9 MASP-qKO細胞のバリア機能は低下していた

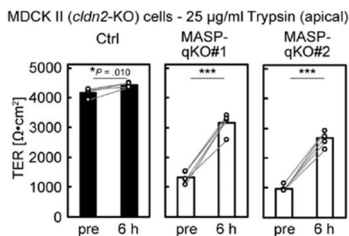


図10 MASP-qKO細胞のバリア機能はアピカル側からのトリプシン処理によって向上する

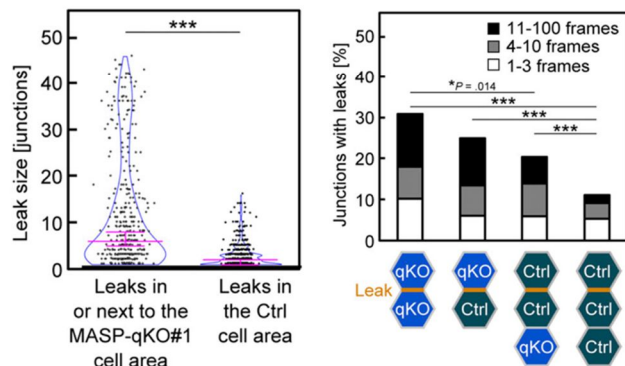
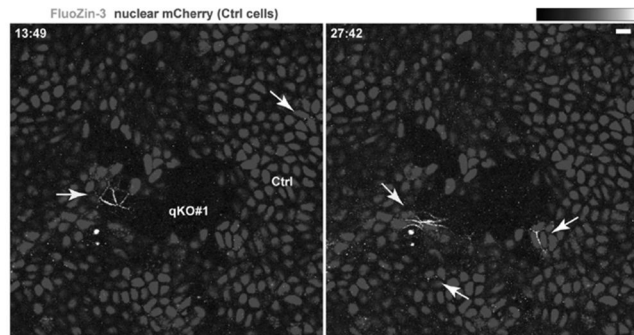


図11 ZnUMBA法によるバリア機能イメージング 野生型細胞とMASP-qKO細胞を混合培養すると、MASP-qKO領域でバリア機能の低下が頻発する

ZnUMBA 法で見られる短時間で修復される密着結合の破綻をビオチン化試薬で標識し、その破綻部位周囲のクローディン7の重合状態を調べると、野生型細胞ではちょうどビオチンラベルが侵入した部分を包むようにクローディン7が重合していることが分かりました(図12上)しかし、MASP-qKO細胞では増加した破綻部位のどこにもクローディン7の重合は見られず(図12下) MASPによるEpCAMの切断によってクローディン7が解放されることが密着結合の破綻部位の修復に寄与していることが強く示唆されました。また、この実験において、三細胞間接着部位では密着結合の破綻とは関係なくクローディン7の重合が見られたため、三細胞間接着部位においてはMASPに依存しないバリア維持修復機構が存在する可能性が示唆されたため、今後の課題として追求していきたいと考えています。

(3)最後に、ここまで培養細胞を用いて分かってきた仕組みが生体内でも機能しているかを検証するため、マウスの小腸と大腸の切片を界面活性剤で処理し、クローディン7の重合状態を調べました。界面活性剤なしの条件(図13上)ではクローディン7はラテラル膜全体に分布し、脱落細胞(矢印)周辺は少し濃くなっているものの大きな差が見られませんでした。界面活性剤処理によって未重合クローディン7を取り除き重合成分だけを可視化(図13下)すると、脱落細胞の膜上に強いシグナルが認められました。脱落細胞は上皮シートから離脱する間、継続してバリア機能を維持するために周囲の細胞との間に密着結合を発達させる(Madara JL, JCB, 1990)ことが知られており、その部位で特異的にクローディン7の重合が見られることから、プロテアーゼ-EpCAM-クローディン7の仕組みが生体内においてもバリア機能の維持に働いている可能性が示唆されました。

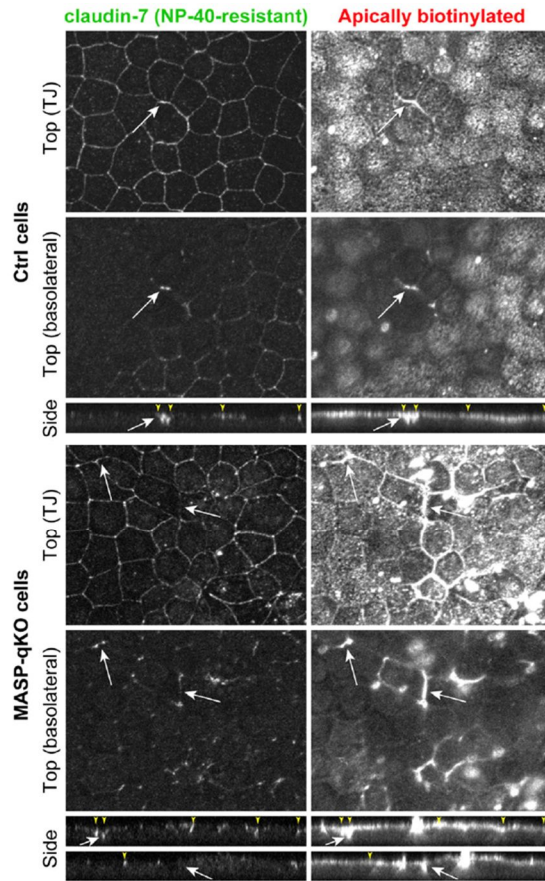


図12 クローディン7は密着結合の漏れの周辺で重合するが、MASP-qKO細胞ではクローディン7の重合が見られない

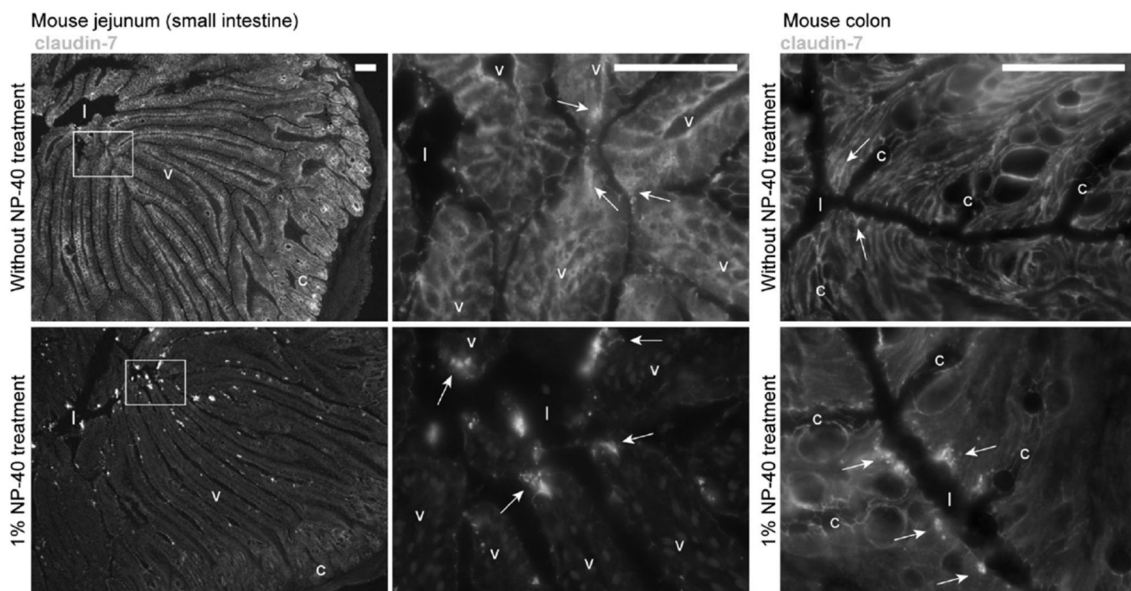


図13 マウス上皮組織(左:小腸、右:大腸)では、脱落する上皮細胞の周囲でクローディン7の重合が見られる

以上の結果をもとに、図14に示すモデルを提唱しました。定常状態（左）ではEpCAMとクローディング7が複合体を作ってラテラル膜に維持されており、密着結合が局所的に破綻する（右）とMASPによってEpCAMが切断を受けてクローディング7をリリースし、破綻部位に供給してバリア機能が修復されます。

以上の結果は、JCB誌に掲載されました（Higashi T et al., JCB, 2023）。

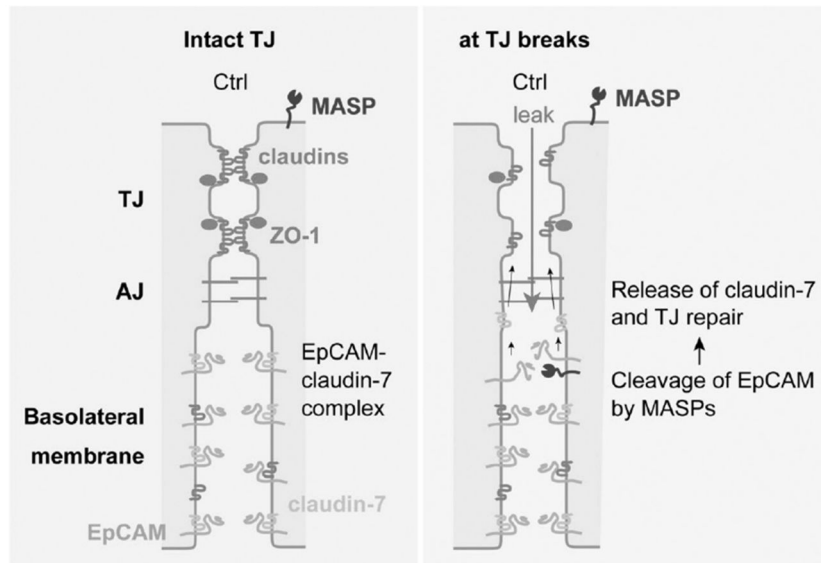


図14 上皮細胞が密着結合の破綻を瞬時に修復してバリア機能を維持する仕組みのモデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Higashi Tomohito, Saito Akira C., Fukazawa Yugo, Furuse Mikio, Higashi Atsuko Y., Ono Masahiro, Chiba Hideki	4. 巻 222
2. 論文標題 EpCAM proteolysis and release of complexed claudin-7 repair and maintain the tight junction barrier	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202204079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202204079	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 Higashi Tomohito, Saito Akira C., Chiba Hideki	4. 巻 103
2. 論文標題 Damage control of epithelial barrier function in dynamic environments	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 European Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 151410 ~ 151410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejcb.2024.151410	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 Higashi Tomohito, Stephenson Rachel E., Schwayer Cornelia, Huljev Karla, Higashi Atsuko Y., Heisenberg Carl-Philipp, Chiba Hideki, Miller Ann L.	4. 巻 136
2. 論文標題 ZnUMBA - a live imaging method to detect local barrier breaches	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs260668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.260668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Saito Akira C., Endo Chisato, Fukazawa Yugo, Higashi Tomohito, Chiba Hideki	4. 巻 1517
2. 論文標題 Effects of TAMP family on the tight junction strand network and barrier function in epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of the New York Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 234 ~ 250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nyas.14889	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東智仁、齋藤明、深澤有吾、古瀬幹夫、東淳子、小野将寛、千葉英樹
2. 発表標題 プロテアーゼによる密着結合の破綻の検知・修復の仕組み
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔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
研究協力者	古瀬 幹夫 (Furuse Mikio)		
研究協力者	深澤 有吾 (Fukazawa Yugo)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	ミシガン大学		
オーストリア	オーストリア科学技術研究所		