

平成21年 4月8日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590398

研究課題名（和文） 生体バリアと細胞極性形成の制御機構

研究課題名（英文） Regulation of biological barrier and cell polarity formation

研究代表者

千葉 英樹 (CHIBA HIDEKI)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00295346

研究成果の概要：ビタミン D 受容体ノックアウト (VDRKO)マウスの腸組織とビタミン D<sub>3</sub> 依存性ヒト腸上皮細胞株を用いて、活性型ビタミン D<sub>3</sub> が VDR を介して、腸上皮におけるタイト結合分子 claudin-2 及び claudin-12 の発現を誘導することを見出した。また、これらの claudins が腸上皮細胞間でカルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>)の細胞間隙チャネルを形成し、Ca<sup>2+</sup>の通過を制御することを突き止めた。本研究は、カルシウム代謝に新規の知見を加え、骨粗鬆症やカルシウム代謝異常に対する新たな予防・治療戦略になることが期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：病理学、細胞・組織、核内受容体、細胞極性、細胞間接着装置

## 1. 研究開始当初の背景

(1) カルシウムイオンは腸上皮細胞から吸収され、その経路には細胞内を通る transcellular pathway と細胞間隙を通る paracellular pathway が知られている。また活性型ビタミン D<sub>3</sub> は、transcellular pathway による Ca<sup>2+</sup>吸収を亢進させる最も重要なホルモンの一つである。しかし、paracellular pathway を介した Ca<sup>2+</sup>吸収に関わる分子や、そのビタミン D<sub>3</sub> 依存性は明らかではない。

(2)タイト結合膜貫通分子 claudin (Cldn)は、細胞間隙における分子やイオンの通過すなわちタイト結合のバリア機能に必須の蛋白で、第一細胞外ドメインの荷電アミノ酸の種類、位置や数によって異なるイオン選択性を有することが明らかになってきた。また Cldn は、24 種類からなる遺伝子ファミリーを構成し、組織や細胞によって異なる種類の Cldn が発現していることが

知られている。我々は先の研究で、Cldn1, 2, 3, 4, 5に加えてCldn7, 8, 12, 13, 15が腸上皮に発現し、特異的発現パターンと細胞内局在を示すことを報告した。

## 2. 研究の目的

1で述べた課題申請時の背景から、「腸上皮に発現し且つ第一細胞外ドメインに負電荷アミノ酸を多く有する Cldns、すなわち Cldn 2, 7, 12, 15 のいずれかが、Ca<sup>2+</sup>の paracellular channel として働き、Ca<sup>2+</sup>の細胞間隙通過を制御する」、「これらの Cldns の発現はビタミン D<sub>3</sub>によって誘導される」という仮説を立てて研究を行なった。

## 3. 研究の方法

- (1) 正常マウス(C57BL/6)とビタミン D 受容体ノックアウト(以下 VDRKO)マウスの十二指腸、空腸、回腸、結腸における Cldn2, 7, 12, 15 の発現を RT-PCR 法とウエスタンブロット法、免疫染色法で解析した。
- (2) 小腸上皮の形質を有するヒト Caco-2 細胞を活性型ビタミン D<sub>3</sub>で処置して、Cldn2, 7, 12, 15 の発現を RT-PCR 法とウエスタンブロット法、免疫染色法で検討した。
- (3) Caco-2 細胞において、活性型ビタミン D<sub>3</sub>によって誘導される Cldn2 または 12 の発現を RNAi 法で抑制し、電気抵抗値と Ca<sup>2+</sup>の透過性を解析した。
- (4) Cldn2, 7, 12, 15 を強制発現させた Caco-2 細胞株を樹立し、その電気抵抗値と Ca<sup>2+</sup>の透過性を解析した。

## 4. 研究成果

(1) Cldn2 と Cldn12 の mRNA 及び蛋白の発現は VDRKO マウスの十二指腸、空腸、回腸、結腸において著明に減弱していた。一方 Cldn7 と Cldn15 の発現は、正常マウスと VDRKO マウスの腸管で違いはみられなかった。

(2) 各々 crypt、villi から crypt の上皮タイト結合領域に局在する Cldn2 及び Cldn12 の陽性シグナルが、VDRKO マウスにおいて著明に減弱あるいは消失していた。一方 Cldn7 と Cldn15 の細胞内局在は、正常マウスと VDRKO マウスの腸管で変化がみられなかった。

(3) マウスの腸上皮と同様に、ヒト Caco-2 細胞においても、Cldn2 及び Cldn12 の mRNA とタンパクの発現がビタミン D シグナルによって誘導された。

(4) ビタミン D<sub>3</sub>による Caco-2 細胞における電気抵抗値低下と Ca<sup>2+</sup>透過性亢進は、Cldn2 または Cldn12 のノックダウンで抑制された。この結果から、Cldn2 と Cldn12 は腸上皮細胞間隙におけるビタミン D<sub>3</sub>依存性の Ca<sup>2+</sup>吸収に必要であると考えられた。

(5) Cldn2 過剰発現株 2 株と Cldn12 過剰発現株 2 株では、親株に比べて電気抵抗値が有意に低下し、カルシウム透過性が有意に上昇した。一方、Cldn7 強制発現株と Cldn15 強制発現株におけるカルシウム透過性は親株とほぼ同等の値であった。

(6) 活性型ビタミン D<sub>3</sub>が VDR を介して、腸上皮におけるタイト結合膜貫通分子 Cldn2 と Cldn12 の発現を誘導することを見出した。また、Cldn2 と Cldn12 からなるタイト結合が腸上皮細胞間で Ca<sup>2+</sup>の paracellular channels を形成し、Ca<sup>2+</sup>の細胞間隙通過を制御することを突き止めた

(図 1)。

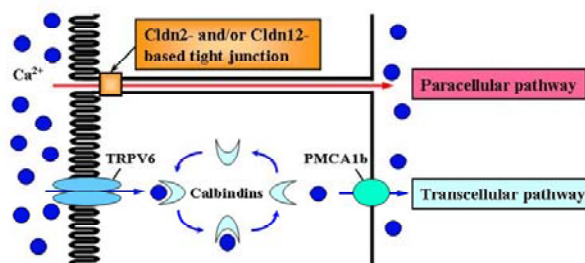


図 1. Cldn2 と Cldn12 による腸上皮細胞間隙における Ca<sup>2+</sup>通過の制御機構

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 25 件)

1. Kojima T, Murata M, Yamamoto T, Lan M, Imamura M, Son S, Takano K-i, Yamaguchi H, Ito T, Tanaka S, Chiba H, Hirata K, Sawada N. Tight junction proteins and signal transduction pathways in hepatocytes. *Histol Histopathol*, in press. 査読有.
2. Son S, Kojima T, Decaens C, Yamaguchi H, Ito T, Imamura M, Murata M, Tanaka S, Chiba H, Hirata K, Sawada N. Knockdown of tight junction protein claudin-2 prevents bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Histochem Cell Biol*, 131: 411-424, 2009. 査読有.
3. Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions. *BBA-Biomembranes*, 1778: 588-600, 2008. 査読有.
4. Kojima T, Takano K, Yamamoto T, Imamura M, Murata M, Son S, Yamaguchi H, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N. Transforming growth factor- $\beta$  induces epithelial to mesenchymal transition by down-regulation of claudin-1 expression and the fence function in adult rat hepatocytes. *Liver Int*, 28: 534-545, 2008. 査読有.
5. Satake S, Semba S, Matsuda Y, Usami Y, Chiba H, Sawada N, Kasuga M, Yokozaki H. Cdx2 transcription factor regulates claudin-3 and claudin-4 expression during intestinal differentiation of gastric carcinoma. *Pathol Int*, 58: 156-163, 2008. 査読有.
6. Nakayama F, Semba S, Usami Y, Chiba H, Sawada N, Yokozaki H. Hypermethylation-modulated downregulation of claudin-7 expression promotes the progression of colorectal carcinoma. *Pathobiology*, 75: 177-185, 2008. 査読有.
7. Takano K, Kojima T, Ogasawara N, Go M, Kikuchi S, Ninomiya T, Kurose M, Koizumi J, Kamekura R, Murata M, Tanaka S, Chiba H, Himi T, Sawada N. Expression of tight junction proteins in epithelium including Ck20-positive M-like cells of human adenoids in vivo and in vitro. *J Mol Histol*, 39: 265-273, 2008. 査読有.
8. Eijken M, Meijer IM, Westbroek I, Koedam M, Chiba H, Uitterlinden AG, Pols HA, van Leeuwen JP. Wnt signaling acts and is regulated in a human osteoblast differentiation dependent manner. *J Cell Biochem*, 104: 568-579, 2008. 査読有.
9. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H. Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent  $Ca^{2+}$  absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell*, 19: 1912-1921, 2008. 査読有.
10. Koizumi J, Kojima T, Ogasawara N, Kamekura R, Kurose M, Go M, Harimaya A, Murata M, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N. Protein kinase C enhances tight junction barrier function of human nasal epithelial cells in primary culture by transcriptional regulation. *Mol Pharmacol*, 74: 432-442, 2008. 査読有.
11. Nishikiori N, Osanai M, Chiba H, Kojima T, Inatomi S, Ohguro H, Sawada N. Experimental effect of retinoic acids on apoptosis during the development of diabetic retinopathy. *Clinical Ophthalmology*, 2: 233-235, 2008. 査読有.
12. Bruedigam C, Koedam M, Chiba H, Eijken M, van Leeuwen JP. Evidence for multiple peroxisome proliferator-activated receptor

- gamma transcripts in bone: Fine-tuning by hormonal regulation and mRNA stability. FEBS Lett, 582: 1618-1624, 2008. 査読有.
13. Hatakeyama N, Kojima T, Iba K, Murata M, Thi MM, Spray DC, Osanai M, Chiba H, Ishii S, Yamashita T, Sawada N. IGF-I regulates tight-junction protein claudin-1 during differentiation of osteoblast-like MC3T3-E1 cells via a MAP-kinase pathway. Cell Tissue Res, 334: 243-254, 2008. 査読有.
  14. Osanai M, Nishikiori N, Murata M, Chiba H, Kojima T, Sawada N. Cellular retinoic acid bioavailability determines epithelial integrity: role of retinoic acid receptor alpha agonists in colitis. Mol Pharmacol, 71: 250-258, 2007. 査読有.
  15. Sakai N, Chiba H, Fujita H, Akashi Y, Osanai M, Kojima T, Sawada N. Expression patterns of claudin family of tight-junction proteins in the mouse prostate. Histochem Cell Biol, 127: 457-462, 2007. 査読有.
  16. Ueda J, Semba S, Chiba H, Sawada N, Seo Y, Kasuga M, Yokozaki H. Heterogeneous expression of claudin-4 in human colorectal cancer: decreased claudin-4 expression at the invasive front correlates cancer invasion and metastasis. Pathobiology, 74: 32-41, 2007. 査読有.
  17. Nishikiori N, Osanai M, Chiba H, Kojima T, Ohguro H, Sawada N. Inhibitory effects of retinoic acid receptor alpha stimulants on murine cataractogenesis through suppression of deregulated calpains. Invest Ophthalmol Vis Sci, 48: 2224-2229, 2007. 査読有.
  18. Nishikiori N, Osanai M, Chiba H, Kojima T, Mitamura Y, Ohguro H, Sawada N. Glial cell-derived cytokines attenuate the breakdown of vascular integrity in diabetic retinopathy. Diabetes, 56: 1333-1340, 2007. 査読有.
  19. Tokunaga Y, Kojima T, Osanai M, Murata M, Chiba H, Tobioka H, Sawada N. A novel monoclonal antibody against second extracellular loop of occludin disrupts epithelial cell polarity. J Histochem Cytochem, 55: 735-744, 2007. 査読有.
  20. Imamura M, Kojima T, Lan M, Son S, Murata M, Osanai M, Chiba H, Hirata K, Sawada N. Oncostatin M induces upregulation of claudin-2 in rodent hepatocytes coinciding with changes in morphology and function of tight junctions. Exp Cell Res, 313: 1951-1962, 2007. 査読有.
  21. Matsuda Y, Semba S, Ueda J, Fuku T, Hasuo T, Chiba H, Sawada N, Kuroda Y, Yokozaki H. Gastric and intestinal claudins expression at the invasive front of gastric carcinoma. Cancer Sci, 98: 1014-1019, 2007. 査読有.
  22. Osanai M, Murata M, Nishikiori N, Chiba H, Kojima T, Sawada N. Occludin-mediated premature senescence is a fail-safe mechanism against tumorigenesis in breast carcinoma cells. Cancer Sci, 98: 1027-1034, 2007. 査読有.
  23. Osanai M, Murata M, Chiba H, Kojima T, Sawada N. Epigenetic silencing of claudin-6 promotes anchorage-independent growth of breast carcinoma cells. Cancer Sci, 98: 1557-1562, 2007. 査読有.
  24. Koizumi J, Kojima T, Kamekura R, Kurose M, Harimaya A, Murata M, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N. Changes of gap and tight junctions during differentiation of human nasal epithelial cells using primary human nasal epithelial cells and primary human nasal fibroblast cells in a noncontact coculture system. J Membr Biol, 218: 1-7, 2007. 査読有.
  25. Kurose M, Kojima T, Koizumi J, Kamekura

R, Ninomiya T, Murata M, Ichimiya S,  
Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N.  
Induction of claudins in passaged  
hTERT-transfected human nasal epithelial  
cells with an extended life span. Cell Tissue  
Res, 330: 63-74, 2007. 査読有.

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 千葉英樹. 細胞間接着と極性形成の制御機構. 第 53 回日本病理学会秋期特別総会, 2007 年 12 月 6 日, 東京.
2. Chiba H. A novel mechanism underlying vitamin D-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  absorption between enterocytes. In: 4th meeting Bone Biology Forum, 2007 Aug 24-25, Shizuoka.
3. 千葉英樹, 村田雅樹, 小山内誠, 二宮孝文, 小島隆, 澤田典均. 核内受容体 hepatocyte nuclear factor 4alpha は微絨毛と細胞接着の形成を誘導するモルフォゲンとして働く. ワークショップ「細胞接着・細胞外基質・細胞間相互作用」第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会大会, 2007 年 5 月 28-30 日, 福岡.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

千葉 英樹 (CHIBA HIDEKI)  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00295346

### (2) 研究分担者

澤田 典均 (SAWADA NORIMASA)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30154149

稲富 周一郎 (INATOMI SYUICHIRO)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：10437999

### (3) 連携研究者

なし