

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390470

研究課題名（和文） コネキシン 43 を介した組織の高次機能恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文） Mechanism for maintenance of homeostasis of several functions by connexin 43

研究代表者

森田 育男（MORITA IKUO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60100129

研究成果の概要（和文）：

Connexin 43 (Cx43)の生体内役割を解明するため、二細胞のみが隣接・接着しうる基板の作製、Cx43 タンパクの改変、Cx43 インテグレートリポソームなどを作成した。これらを用いて、細胞内にギャップ結合プラークが取り込まれる機序には、Cx43 の C325~C342 のアミノ酸配列が重要であること、Caveolin-1 が関与することが明らかとなった。今回の知見は、細胞間情報伝達の新たな調節機序を明らかとし、今後、細胞間情報伝達に伴う組織の高次機能恒常性維持への寄与が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

To clarify a role of connexin 43 (Cx43) in vivo, we produced the substrate in which only two cells are able to be adjacent, the mutated Cx43 proteins, and Cx43 integrated liposomes. By using these techniques, it is demonstrated that the amino-acid sequence between C325 and C342 in Cx43 protein and Caveolin-1 are involved in the incorporation of Cx43-plaques. These findings show a novel mechanism for cell-cell interaction and takes part in the maintenance of homeostasis in several functions.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2008 年度 | 8,200,000 | 2,460,000 | 10,660,000 |
| 2009 年度 | 4,300,000 | 1,290,000 | 5,590,000 |
| 2010 年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,600,000 | 4,380,000 | 18,980,000 |

研究分野：医歯薬学系

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：コネキシン、ギャップ結合、薬物導入法、annular gap、細胞分化、リポソーム

1. 研究開始当初の背景

生体のあらゆる組織、臓器はその組織としての恒常性を維持するため、隣接する細胞間にさまざまな形態の結合を有している。その中でもコネキシンタンパクで構成されるコネクソンを用いたギャップ結合は、細胞-細胞間でイオンや低分子物質を相互に伝達することにより、高次機能を維持していると考えられている。現在までヒトでは 21 のコネキシンが同定されているが、Cx43 は骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞、血管内皮細胞、神経細胞など骨を構成する細胞に発現しており、その欠損は神経細胞の異常、骨成長遅延、頭蓋冠の異常など骨発生、再生の異常を引き起こすことが知られている。一方、骨肉腫などでは Cx43 の発現低下およびギャップ結合の異常が認められること、さらに Cx43 の過剰発現はガンの増殖抑制、分化促進を引き起こすことより、Cx43 の発現はガン化、進展、転移などにも関与することが知られている。このように生体の恒常性維持に重要な役割を持っているコネキシンであるが、恒常性維持への関与、ガン化抑制機序に関する研究は遅れている。申請者は長年、Cx43 の生理的役割とその発現調節機序、作用機序に関し研究を行ってきたが、世界に先駆け、Cx43 がギャップ結合非依存的にガン細胞の増殖を抑制すること、その機序は、Cx43 発現に伴い、p27 のユビキチンリガーゼである skp-2 量が低下し、p27 の増加が起こり、Rb のリン酸化が抑制され細胞周期が停止することを明らかにした。さらに、その後の研究で、Cx43 のギャップ結合非依存的な反応にも Cx43 の細胞膜への局在が必須な機序が存在することを明らかとした。これらギャップ結合非依存性の反応には Cx43 の細胞質内部分すなわち C 末端ペプチドが関与していることを明らかにした。このことは、コネキシン研究の新たな展開、すなわち C 末端ペプチドが単に ZO-1, -catenin, debrin, tublin, caveolin-1 など細胞骨格関連タンパクと結合し、ギャップ結合の安定化、開閉に関与するだけでなく、リン酸化酵素等のタンパクとの結合により、生理・病理作用を引き起こすという最近のコネキシン研究の発端となった。また、最近の研究で、Cx43 が心筋細胞のミトコンドリア内にも存在し、虚血に伴うアポトーシスに関与するとする報告がなされたことより、Cx43 の作用機序の解明はさらに複雑になっている。さらに、ガンにおけるコネキシンの発現調節機序に関する研究において、その異常が転写レベル、post-transcriptional レベル、タンパクの局在と多くのプロセスにわたることが明らかとなりつつある。

2. 研究の目的

申請者が開発した細胞パターンニングシステムを基盤として、2 細胞のみが隣接して接着する基板を作成し、異なった蛍光ラベルをした細胞、mutatedCx43 遺伝子を入れた細胞など異種の細胞間の結合領域にのみ高密度にギャップ結合を作ることにより、ギャップ結合プラーク領域における Cx43 の挙動、細胞内局在、細胞内輸送などを高感度顕微鏡で観察する。さらに、ナノテクノロジーを駆使して作成した Cx43-リボソーム内に、種々のイオン、生理活性物質を含有させ、骨芽細胞機能に影響を与える因子を探索する。このことにより、Cx43 を介した骨芽細胞・骨細胞間・細胞内情報伝達機序を解明する。

さらに、本方法を用いて、Cx43 タンパクの細胞内の移動、局在、ギャップ結合の安定性、イオン等の物質の動きを調べることを目的とする。

3. 研究の方法

光学的観察システムを用いて、骨代謝関連細胞内の移動、局在、ギャップ結合の安定性、イオン等の物質の動きを調べる。Cx43 の C 末端ペプチドに結合するタンパクの網羅的解析を行う。

(1) 2 細胞のみが隣接して接着する基板の作成

PEG 基板を用い光リソグラフィー法で親水性部分（細胞接着部位）を $5\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ にし、一つのラインに一個の骨（芽）細胞のみが培養できるようにする。

(2) Annular gap のオリエンテーションの解明

GFP-融合 Cx43 タンパクを発現する細胞と DsRed-融合 Cx43 タンパクを発現する細胞隣接させる。その結果、このギャップ結合プラークでは異なる 2 つの蛍光を発する Cx43 によるギャップ結合が観察される。このギャップ結合はどちらかの細胞にコネクソンごと endocytosis され、annular gap が形成される。本方法では異なる 2 つの蛍光ラベルされた Cx43 が annular gap として観察されることより、どちらの細胞に endocytosis されるかが可視化できる。一つの細胞に各種処理をしたときに、その annular gap がどちらの細胞に形成されるかを調べる。

(3) Cx43 含有リボソームの作製

Cx43 含有リボソームはすでに作成しているが、本方法では、Cx43 の膜内での方向性が規定されなかった。そこで、本研究においては、新たな方法を用いて Cx43 含有リボソームを作製し、ギャップ結合による細胞間情報伝達の人為的調節の可能性を探索する。

4. 研究成果

1 ラインに 2 つの細胞を隣接してマニピュレートし、その隣接面のギャップ結合の動きを詳細に検討する方法を検討した結果、7.5~10 μm の幅を持ったポリエチレングリコールを塗布した基板に光リソグラフィーにより親水性のラインを作成することに成功した。現在、この刑を用いて、神経細胞における高次機能の維持における Cx43 の役割の解明を行っている。

また、ギャップ結合依存細胞間情報伝達系に関し、これまではプラークの安定性、Cx43 タンパクのリン酸化が検討されてきた。本研究においては、Cx43 プラークの細胞内取り込みに焦点を当てて研究を行った。方法としては、Cx43 野生型に GFP タンパクを Cx43 の C 末端欠損変異体には Ds-red タンパクを融合させ、これら細胞間における annular gap の移動を観察した (図 1)。その結果、興味深いことにアミノ酸の数を 325 以下に切断した

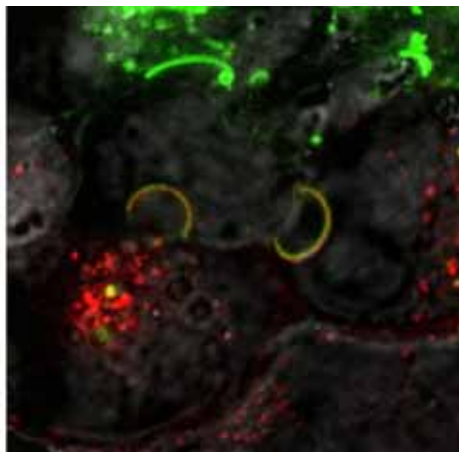


図 1 . Bi-directional annular gap 形成

変異細胞側には annular gap が認められず、すべての annular gap が野生型発現細胞のみに認められた。一方、342 までの変異体は変異体と野生型に 50% ずつ annular gap が認められた。このことは、325~342 のアミノ酸配列部位が annular gap を規定しており、この部分のアミノ酸のリン酸化、もしくは他のタンパクとの結合が重要な役割を有することが明らかとなった (図 2)。次に、Cx43 タンパクの発現調節機序に関する研究を行った。その結果、Cx43 mRNA の安定化が Cx43 タンパクの発現を調節していること、またその調節機序には PI3 キナーゼ-AKT が関与することが明らかとなった。以上の結果は Cx43 による細胞間の情報伝達が従来言われていた PKC やチロシンキナーゼだけでなく、annular gap の安定性や mRNA の安定性で調節されている可能性を示唆している。また、Annular gap には C 末端タンパク鎖が大事であること、Annular gap 形成には膜タンパクの細胞内移

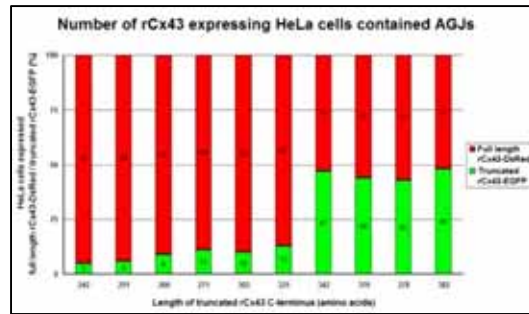


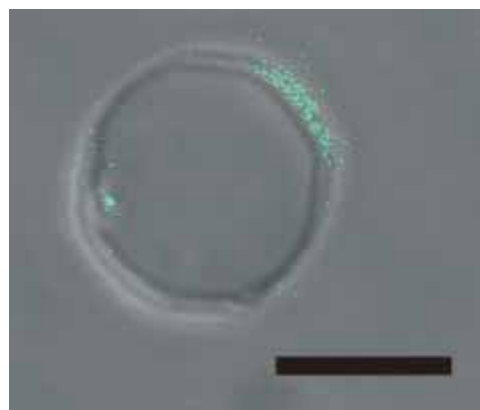
図 2 . Cx43 の C 末端の欠損と Annular gap の方向性

行に重要な役割を持つ Caveolin-1 が重要な役割を演じていることが明らかとなった。そこで、現在、Pull-down 法を用いて、この Cx43 の C 末端タンパクに結合して Annular gap を調節しているタンパクの同定を行っている。

さらに、申請者らは Cx43 を組み込んだリポソームは作成していたが、より安定に Cx43 タンパクを組み入れられる系として baculovirus を用いた系を開発した。このリポソームでは、すべてのコネクシンタンパクが一方方向性に並ぶことより、薬物導入法としては至適のものであった。一方、完全な In vitro 構築系として、すべてのコネクシンタンパクが逆向きであるものも作製し、細胞科学の研究を現在行っている (図 3)。

図 3 . Cx43-GFP 含有リポソームにおける蛍光像

一方、Cx43 含有リポソームの薬物導入法としての有用性を調べる目的で、Calcein をリポソーム内に入れ込み、ヒト骨肉腫細胞 U2OS に添加した。その結果、Cx43 遺伝子導入していない U2OS においては、蛍光の移行が認め



られなかったは、Cx43 遺伝子を導入した U2OS においては、細胞内への蛍光の移行が認められた。この結果は、Cx43 含有リポソームは細胞膜に存在する Cx43 プラークと結合し、薬物導入法として、非常に有用性が高いことが明らかとなった (図 4)。

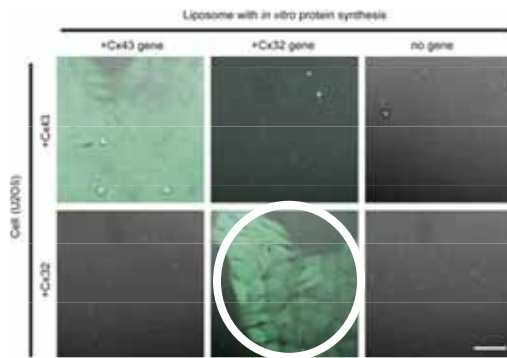


図4 .Cx43含有リポソームから細胞への蛍光物質の移動(丸印がCx43含有リポソームとCx43遺伝子導入U20Sの組み合わせ)

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計29件)すべて査読あり

1. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Sampath Narayanan A, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. **J Cell Physiol.** *in press*
2. Moriyama M, Ohno-Matsui K, Hayashi K, Shimada N, Yoshida T, Tokoro T, Morita I. Topographic Analyses of Shape of Eyes with Pathologic Myopia by High-Resolution Three-Dimensional Magnetic Resonance Imaging. **Ophthalmology** *in press*
3. Wang J, Ohno-Matsui K, Nakahama KI, Okamoto A, Yoshida T, Shimada N, Mochizuki M, Morita I. Amyloid β Enhances Migration of Endothelial Progenitor Cells by Upregulating CX3CR1 in Response to Fractalkine, Which May Be Associated With Development of Choroidal Neovascularization. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** *in press*
4. Tsugawa J, Komaki M, Yoshida T, Nakahama K, Amagasa T, Morita I. Cell-printing and transfer technology applications for bone defects in mice. **J Tissue Eng Regen Med** *n press*
5. Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, Ehata E, Shibata T, Morita I, Miyazono K, Saitoh M. TGF- β regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. **EMBO J** 30(4):783-789, 2011
6. Kamiya K, Tsumoto K, Arakawa S, Shimizu S, Morita I, Yoshimura T, Akiyoshi K. Preparation of connexin43-integrated giant liposomes by a baculovirus expression-liposome fusion method. **Biotechnology and Bioengineering** 107(5):836-843, 2010
7. Moritani, Y, Nomura S, Morita I, Akiyoshi K. Direct integration of cell-free synthesized connexin-43 into liposomes and hemichannel formation. **FEBS Journal.** 277(16): 3343-3352, 2010
8. Yoshida T, Komaki M, Hattori H, Negishi J, Kishida A, Morita I, Abe M. Therapeutic Angiogenesis by Implantation of a Capillary Structure Constituted of Human Adipose Tissue Microvascular Endothelial Cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 30(7):1300-1306, 2010
9. Yoshida T, Sato Y, Morita I, Abe M. Pigpen, a nuclear coiled body component protein, is involved in angiogenesis. **Cancer Sci.** 101(5):1170-1176, 2010
10. Safronova O, Morita I. Transcriptome Remodeling in Hypoxic Inflammation. **J Dent Res. (Review)** 89(5):430-444, 2010
11. Shimada N, Ohno-Matsui K, Iseki S, Koike M, Uchiyama Y, Wang J, Yoshida T, Sato T, Peters C, Mochizuki M, Morita I. Cathepsin L in bone marrow-derived cells is required for retinal and choroidal neovascularization. **Amer. J Pathol.** 176(5):2571-2580, 2010
12. Yuana J, Akiyama M, Nakahama K, Sato T, Uematsu H, Morita I. The effects of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on osteoclastogenesis in vitro. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators** 92, 85-90, 2010
13. Nakalekha C, Yokoyama C, Miura Y, Alles N, Aoki K, Ohya K, Morita I. Increased Bone Mass in Adult Prostacyclin Deficient Mice. **J. Endocrinology**, 204(2):125-133, 2010
14. Akahori T, Kobayashi A, Komaki M, Hattori H, Kahahama K, Ichinose S, Abe M, Takeda S, Morita I. Implantation of capillary structure engineered by optical lithography improves hindlimb ischemia in mice, **Tissue Engineering, Part A.** 16(3):953-959, 2010
15. Obitsu S, Hironori NA, Hasegawa A, Nakahama K, Morita I, Nishigaki N, Hayashi, Masuda T, Kannagi M. Potential enhancement of osteoclastogenesis by severe acute 3 respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 protein **Arch Virol** 154(9):1457-1464. 2009
16. Safronova O, Ikuo Morita. Transcriptional Pathways in Hypoxic Inflammation (Review) **Recent Advances and Research Updates.** 10, 145-149, 2009
17. Safronova O, Pluemsampant S, Nakahama K, Morita I Regulation of chemokine gene expression by hypoxia via cooperative

- activation of NF κ B and histone deacetylase. **Int J Biochem Cell Biology** 41(11): 2270-2280., 2009
18. Kaneda M, Nomura, MS, Ichinose S, Kondo S, Nakahama K, Akiyoshi K, Morita I. Direct formation of proteo-liposomes by in vitro synthesis and cellular cytosolic delivery with connexin-expressing liposomes., **Biomaterials** 30(23-24): 3971-3977, 2009
 19. Wang J, Ohno-Matsui K, Yoshida T, Shimada N, Ichinose S, Sato T, Mochizuki M, Morita I. Amyloid- β up-regulates complement factor B in retinal pigment epithelial cells through cytokines released from recruited macrophages/microglia; Another mechanism of complement activation in age-related macular degeneration **J Cell Physiol** 220(1): 119-128, 2009
 20. Bhattacharjee R, Kaneda M, Nakahama K, Morita I. The steady-state expression of connexin43 is maintained by the PI3K/Akt in osteoblasts. **Biochem Biophys Res Commun.** 382(2): 440-444, 2009.
 21. Tsuchiya T, Nakahama K, Asakawa Y, Maemura T, Tanaka M, Takeda S, Morita M, Morita I. The reduction in pigment epithelium-derived factor is a sign of malignancy in ovarian cancer expressing low-level of vascular endothelial growth factor. **Gynecol Endocrinol** 25(2) 104-109, 2009
 22. Hayashi H, Nakahama K, Sato T, Tsuchiya T, Asakawa Y, Maemura T, Tanaka M, Morita I. The role of Mac-1 (CD11b/CD18) in osteoclast differentiation induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand., **FEBS Letters**, 82(21-22): 3243-3248, 2008
 23. Fujimori H, Asahina K, Shimizu-Saito K, Ikeda R, Tanaka Y, Teramoto K, Morita I, Teraoka H. Vascular endothelial growth factor promotes proliferation and function of hepatocyte-like cells in embryoid bodies formed from mouse embryonic stem cells. **J. Hepatol.** 48(6):962-973, 2008
 24. Wang J, Ohno-Matsui K, Yoshida T, Kojima A, Shimada N, Nakahama K, Safranova O, Iwata N, Saido TC, Mochizuki M, Morita I. Altered function of factor I caused by amyloid beta: implication for pathogenesis of age-related macular degeneration from Drusen. **J Immunol.** 181(1):712-720, 2008
 25. Kaneda M, Zhang D, Bhattacharjee R, Nakahama K, Arai S, Morita I. Vitamin K(2) suppresses malignancy of HuH7 hepatoma cells via inhibition of connexin 43. **Cancer Lett**, 263(1): 53-60, 2008.
 26. Mukai N, Akahori T, Komaki M, Li Q, Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Kobayashi A, Yamaguchi T, Abe M, Amagasa T, Morita I. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. **Exp Cell Res**, 314(3): 430-440, 2008.
 27. Kojima A, Nakahama K, Ohno-Matsui K, Shimada N, Mori K, Iseki S, Sato T, Mochizuki M, Morita I. Connexin 43 contributes to differentiation of retinal pigment epithelial cells via cyclic AMP signaling. **Biochem Biophys Res Commun**, 366(2): 532-538, 2008.
 28. Huang, C, Wang J, Kikkawa U, Mukai H, Shen M, Morita I, Chen B, Chang WC. Calcineurin-mediated dephosphorylation of c-Jun Ser-243 is required for c-Jun protein stability and cell transformation. **Oncogene**, 27(17):2422-2429, 2008
 29. Pluemsampant S, Safranova O, Nakahama K, Morita I. Protein kinase CK2 is a key activator of histone deacetylase in hypoxia-associated tumors. **Int J Cancer**, 122(2): 333-341, 2008
- 〔学会発表〕(計 7 件)
1. 中浜健一、小沢 仁、鈴木岳史、森田育男 ギャップジャンクションを介した破骨細胞分化抑制作用の検討 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 7-10 日 神戸
 2. 森田育男 ギャップ結合の調節機序と DDS への応用 創剤フォーラム第 15 回 シンポジウム 2009.10.23 東京
 3. Bhattacharjee R, Kaneda M, Nakahama K and Morita I. The steady-state expression level of connexin43 is maintained by the PI3K/Act pathway 10th International Symposium on Mechanism of Vasodilatation 2009.6.1 宮城(松島)
 4. Nakahama K, Hayashi H, Sato T, Morita I. The role of Mac-1 (CD11/CD18) in osteoclast differentiation induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL). 48th The American Society for Cell Biology Annual Meeting December 13-17, 2008 San Francisco, USA,
 5. Bhattacharjee R, Kaneda M, Nakahama K, Morita I. Phosphatidylinositol 3- kinase akt regulates connexin43 expression through mRNA stability osteoblasts. 48th The American Society for Cell Biology Annual

Meeting December 13-17,2008 San Francisco, USA,

6. Chalida N, Yokoyama C, Miura H, Alles NR, Aoki K, Ohya k, Morita I Roles of prostacyclin on bone metabolism. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月9~12日神戸
7. Kato K, Morita I Analysis of accelerated osteoclast formation by metabolic acidosis. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月9~12日 神戸

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/dent/cell/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

森田 育男 (MORITA IKUO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60100129

(2)研究分担者

中浜 健一 (NAKAHAMA KENICHI)

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科・准教授研究者番号：60281515

秋吉 一成 (AKIYOSHI KAZUNARI)

京都大学 工学系研究科 教授研究者番号：90201285

市野瀬 志津子

東京医科歯科大学 医歯科学究支援センター 助教研究者番号：60014156

小野寺 光江

東京医科歯科大学 歯学部 講師研究者番号：50376703