

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26251013

研究課題名(和文) 異種細胞間接着におけるネクチンの機能と作用機構

研究課題名(英文) Roles and modes of action of nectins in heterotypic cell-cell adhesions

研究代表者

高井 義美 (Takai, Yoshimi)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：60093514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,400,000円

研究成果の概要(和文)：異種細胞間接着におけるネクチンとその関連分子の機能と作用機構を解析した。その結果、乳腺の管腔上皮細胞に発現するネクチン-4と、筋上皮細胞に発現するネクチン-1が異種細胞間接着装置を形成し、この装置がプロラクチン受容体の活性化のプラットフォームとして機能していることを解明した。また、ネクチン-2とネクチン-3がそれぞれ嗅上皮の嗅細胞と支持細胞に発現してトランスに相互作用し、カドヘリンと協調してこれらの細胞の異種細胞間接着とモザイク配列を形成することを解明した。さらに、ネクチン-2が、脳血管の基底膜に接するアストロサイトのエンドフットに局在し、脳の形態の維持に機能していることを解明した。

研究成果の概要(英文)：The roles and modes of action of nectins in heterotypic cell-cell adhesions were investigated. We identified a novel cell adhesion apparatus formed by the heterophilic trans-interaction between nectin-4 and nectin-1, which were expressed in the luminal and basal cells in the mammary gland, respectively. Nectin-4 in this apparatus enhanced the prolactin receptor signaling. Moreover, we showed that nectin-2 and nectin-3 expressed in olfactory and supporting cells, respectively, interacted in trans and recruited cadherin to the heterotypic cell junctions, resulting in the formation of the mosaic pattern in the olfactory epithelium. Further, we showed that nectin-2 was localized on the plasma membranes of astrocytic perivascular endfoot processes facing the basement membrane of blood vessels in the brain. Genetic ablation of nectin-2 caused degeneration of the astrocytic perivascular endfoot processes and neurons, indicating that nectin-2 is required to maintain the brain structures.

研究分野：生化学

キーワード：細胞接着・運動 細胞シグナル伝達機構 異種細胞間接着 細胞膜受容体 ネクチン アファディン

## 1. 研究開始当初の背景

生体内では隣り合う同種あるいは異種の細胞が接着して組織と臓器を形成し、維持する。同種の細胞間にはカドヘリンによって接着するが、異種の細胞間の接着機構は充分には理解されていない。研究代表者らは約 30 年前に低分子量 G タンパク質を見出し、Rac が細胞間接着装置であるアドヘレンスジャンクション(AJ)の形成を制御することを解明した。その後、Rac の作用機構を解析する過程で、細胞間接着分子ネクチンとこれをアクチン細胞骨格に連結するアフアディンとからなる新しい細胞間接着装置を発見した。同種細胞間での AJ は、カドヘリンによって形成されることが解明されていたが、研究代表者らは、ネクチン同士がまず結合して弱い細胞接着を引き起こし、その部位にカドヘリンをリクルートして AJ を完成させることを解明した。一方、典型的な異種細胞間接着は、精巣での精子細胞とセルトリ細胞との間や、感覚器官での感覚細胞と支持細胞の間で認められるが、精子細胞とセルトリ細胞の接着にはカドヘリンは関与しておらず、その接着機構は不明であった。研究代表者らは、ネクチン-3 とネクチン-2 が精子細胞とセルトリ細胞にそれぞれ選択的に発現し、これらが結合してこの二種類の細胞を接着させ、精子細胞の分化を制御することを解明した。精子細胞の分化に伴う形態変化には、ネクチンの弱い細胞間接着力が適していると考えられた。また、内耳コルチ器の感覚上皮では有毛細胞と支持細胞が市松様に配列するが、カドヘリンはこの配列には関与しておらず、ネクチン-1 とネクチン-3 が有毛細胞と支持細胞にそれぞれ選択的に発現し、これらが結合してこの二種類の細胞を接着させることによって市松様配列の形成を制御することも解明した。これらの結果から、ネクチンは、カドヘリンとは異なり、「異種細胞間接着活性」を有していることが解明された。しかし、生体内の多くの組織や臓器では精巣や内耳とは異なったタイプや、より複雑な異種細胞間接着が存在しており、異種細胞間接着におけるネクチンの機能と作用機構を解明することは生物学的にも医学的にも極めて重要である。

## 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-アフアディン系とその下流のシグナル伝達分子を軸に、組織や臓器の形成や細胞の配置に細胞間接着分子が果たす役割と作用機構を解明することを目的として研究に取り組んだ。以下の 3 つの組織における異種細胞間接着に焦点を絞って解析した。

### (1) 外分泌腺組織における異種細胞間接着の機構と機能

乳腺や唾液腺などの外分泌組織では、一層の管腔上皮細胞が腺腔を形成し、その周囲を筋

上皮細胞が覆っており、管腔上皮細胞の基底側は筋上皮細胞の頭頂側と接着している。この管腔上皮細胞と筋上皮細胞との異種細胞間接着の機構と機能を解析した。

### (2) 嗅上皮における異種細胞間接着の機構と機能

鼻腔に存在する嗅上皮では、嗅細胞と支持細胞が特徴的なモザイク配列を形成しているが、この配列の詳細な形成機構はわかっていない。細胞間接着分子のカドヘリンは同じカドヘリン同士で結合して細胞接着に機能するが、異なるカドヘリンは結合せず、細胞は分離して混ざり合わない。別種の細胞間接着分子のネクチンは、4 つの分子からなるファミリーを形成しているが(ネクチン-1、-2、-3、-4)、ネクチンの特徴として、同じネクチン間の結合と比較し、異なるネクチン間の結合がより強い。このような特徴は、異種細胞間接着、例えば内耳における有毛細胞と支持細胞の市松様配列の形成に寄与していることが明らかにされている。一方、ネクチンとカドヘリンはお互いに協調して細胞接着を形成するが、両者による制御機構は未だ不明な点が多く、これまでに知られている機能だけでは説明がつかない現象が存在する。そこで、嗅細胞と支持細胞がモザイク配列を形成しているマウス嗅上皮においてネクチンとカドヘリンによる細胞接着形成における協調的な制御機構を解析した。

### (3) 神経組織における異種細胞間接着の機構と機能

アストロサイトは、突起(エンドフット)を伸ばして神経細胞と脳血管基底膜に接触し、両者と相互作用して脳内の恒常性維持に重要な役割を果たしている。具体的には、神経細胞の支持・保護や神経細胞への栄養供給、細胞外液の恒常性維持、血液脳関門の形成、神経伝達や脳血流量の制御などの機能が知られている。アストロサイトの神経細胞と脳血管基底膜との接着機構は不明であり、この機構を解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) 外分泌腺組織における異種細胞間接着の機構と機能

乳腺の管腔上皮細胞と筋上皮細胞間の異種細胞間接着に関わる分子を同定するため、ネクチンとその関連分子の免疫組織化学染色を行った。さらに、管腔上皮細胞と筋上皮細胞のそれぞれに発現しているネクチンを同定するため、セルソーターでそれぞれの細胞を単離し、RT-PCR でその遺伝子発現を解析した。また、同定されたネクチンが異種細胞間接着の構成分子であることを、ネクチン遺伝子欠損マウスを用いた免疫組織化学染色によって検討した。これらの分子の作用機構とその下流シグナル伝達機構を解析するため、培養細胞を用いた細胞生物学実験と生化学実験を行った。

### (2) 嗅上皮における異種細胞間接着の機

## 構と機能

嗅上皮の嗅細胞と支持細胞に発現するネクチンを同定するため、免疫組織化学染色や *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。発現が認められた分子については、それらの分子の遺伝子欠損マウスを用いて、嗅上皮のモザイク配列の形成を解析した。観察された結果に基づいて数理モデルを構築し、培養細胞を用いた再構成系実験により、嗅上皮のモザイク配列の形成の再現を試みた。

### (3) 神経組織における異種細胞間接着の機構と機能

アストロサイトと神経細胞に発現するネクチンとその関連分子を同定するため、初代培養細胞を用いたウエスタンブロットを行った。発現が認められた分子については、培養細胞や野生型マウスの脳切片を用いた免疫組織化学染色や免疫電子顕微鏡法によってその局在を解析した。さらに、アストロサイトと脳血管基底膜との接着部位に見出されたネクチンの遺伝子欠損マウスを用い、脳の形態形成と維持におけるこのネクチンの機能を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 外分泌腺組織における異種細胞間接着の機構と機能

#### ① 乳腺における異種細胞間接着の機構と機能

外分泌腺組織として、主に乳腺の異種細胞間接着の解析を行った。乳腺は、胎児期には管状の構造として存在しているが、思春期になると卵巣から産生されるエストロゲンが乳腺上皮細胞に作用して乳管の延長と分岐を引き起こす。妊娠すると、その初期では卵巣から分泌されるプロゲステロンがプロラクチン受容体の発現を促進し、脳下垂体から産生されるプロラクチンと協働して乳管の枝分かれと乳葉の発達が促進され、乳汁を分泌する乳腺葉を形成する構造に成熟する。乳管と乳葉は管腔上皮細胞とその周囲を取り囲む筋上皮細胞の二層からできているが、このような二層上皮組織の形成と維持の機構、乳腺の発達過程における細胞間接着装置の機能や増殖因子との相互作用は不明であった。

乳腺の管腔上皮細胞と筋上皮細胞間の異種細胞間接着に関わる分子を免疫組織化学染色によって検討したところ、ネクチン-1とネクチン-4の共局在が観察された。セルソーターでそれぞれの細胞を単離し、RT-PCRでその遺伝子発現を解析した結果、ネクチン-1とネクチン-4が管腔上皮細胞に、ネクチン-1が筋上皮細胞にそれぞれ選択的に発現して、新規の異種細胞間接着装置を形成していることを発見した。ネクチン-1とネクチン-4の結合の方がネクチン-1同士よりも強いことから、この接着装置は主として管腔上皮細胞のネクチン-4と筋上皮細胞のネクチン-1との結合で形成されていると考えられた。また、この接着装置にはアフアディン

やアクチン細胞骨格が濃縮していなかった。この点は、研究代表者らが以前に見出していた、ネクチン-1スポットと呼ばれる脳の嗅球の僧帽細胞の樹状突起間で形成される同種細胞間接着装置と類似していた (Inoue et al., *J. Comp. Neurol.*, 2015)。

ネクチン-1欠損マウスでは、妊娠による乳腺葉の発達が障害され、乳管の管腔上皮細胞が薄くなり、乳管が拡張していた。ネクチン-1遺伝子欠損マウスの免疫組織化学染色では、ネクチン-1のシグナルが消失するとともに、その接着装置におけるネクチン-4のシグナルも消失していた。したがって、ネクチン-1とネクチン-4が新規異種細胞間接着装置を構成しており、この新規異種細胞間接着装置が、妊娠による乳腺の発達を制御していることが明らかになった。この妊娠による乳腺の発達にはプロラクチン受容体が関与していることが知られていたため、管腔上皮細胞に発現しているネクチン-4とこの受容体との相互作用を検討したところ、これらの分子が結合することによってプロラクチン受容体の下流の JAK2、STAT5 を介したシグナル伝達を増強していることを明らかにした (Kitayama et al., *J. Biol. Chem.*, 2016)。

#### ② ネクチンによる新規異種細胞間接着装置によるプロラクチンシグナルの制御

ネクチン-4とプロラクチン受容体の結合部位を検討したところ、両者の結合には細胞外領域と膜貫通領域の両方が必須であったが、ネクチン-4によるプロラクチン受容体の活性化にはネクチン-4の細胞内領域が必要であった。そこで、プロラクチンシグナルを負に制御する因子のうち、サイトカインシグナルを抑制的に制御している分子群の SOCS ファミリー分子に着目して解析を進めると、ネクチン-4の細胞内領域が SOCS1 と結合することが明らかとなった。さらに、作用機序の検討を行ったところ、ネクチン-4は、プロラクチンシグナルを負に制御する SOCS1 を捕捉することによって SOCS1 の機能を抑制し、結果としてプロラクチンシグナルを活性化させるという新しい制御機構を明らかにした (Maruoka et al., *J. Biol. Chem.*, 2017)。

今後は、乳腺同様に管腔上皮細胞とそれを取り囲む筋上皮の二層の上皮で形成される唾液腺などの外分泌腺組織において、ネクチンによる異種細胞間接着装置が普遍的に機能しているかを解析する。

### (2) 嗅上皮における異種細胞間接着の機構と機能

#### ① 嗅細胞と支持細胞のモザイク配列の形成機構

嗅上皮における嗅細胞と支持細胞によるモザイク配列の形成機構を解明するため、カドヘリンとネクチンの協調作用に着目した。発生の過程における嗅細胞と支持細胞のモザイク配列の形成過程を観察したところ、これらの細胞の細胞接着の再構成が起きること

によってモザイク配列が形成されていることがわかった。次にこれらの細胞におけるネクチンとカドヘリンの発現を解析したところ、嗅細胞はネクチン-2、N-カドヘリンと $\alpha$ N-カテニン、支持細胞はネクチン-2、ネクチン-3、E-カドヘリンとN-カドヘリンを発現していた。そこで、ネクチン-2、ネクチン-3、および $\alpha$ N-カテニンの遺伝子欠損マウスの嗅上皮を解析したところ、いずれの変異マウスにおいても嗅細胞と支持細胞のモザイク配列の形成が障害されていた。したがって、嗅細胞と支持細胞のモザイク配列の形成にはネクチン-2、ネクチン-3、および $\alpha$ N-カテニンが不可欠であることが明らかとなった (Katsunuma et al., J. Cell Biol., 2016)。

### ② 嗅細胞と支持細胞のモザイク配列形成機構のモデル

数理モデルを用いた解析から、ネクチン-2とネクチン-3がカテニンを介してカドヘリン-カテニン複合体をリクルートするが、そのリクルートされたカドヘリンの分子数の違いによって接着力に差が生まれることによってモザイク配列が形成されることが示唆された。さらに、培養細胞を用いた再構成実験により、嗅上皮のモザイク配列の形成を再現できた。

このような実験結果から嗅細胞と支持細胞のモザイク配列形成について次のような機構を明らかにした：①発生初期（胎生 14 日）では支持細胞どうしの結合がより強く、嗅細胞と支持細胞の結合は弱い。②発生後期（胎生 16-18 日）ではこれらの結合の強さは同程度になる。③生後は再び支持細胞どうしの結合が強くなる。その結果、モザイク配列が形成される。これらの制御はネクチン-2とネクチン-3、カドヘリンの協調作用に依存している (Katsunuma et al., J. Cell Biol., 2016)。

今後は、生体内の他の上皮組織においても嗅上皮と同様の異種細胞間接着機構が関与しているかを明らかにする。

### (3) 神経組織における異種細胞間接着の機構と機能

#### ① 脳におけるネクチン-2の発現部位の解析

培養マウス神経細胞とアストロサイトにおいて、ネクチン-1、ネクチン-2のバリエーションのネクチン-2 $\alpha$ とネクチン-2 $\delta$ 、およびネクチン-3の発現を検討したところ、ネクチン-1とネクチン-2 $\alpha$ は神経細胞とアストロサイト、ネクチン-2 $\delta$ はアストロサイトにのみ発現していた。一方、ネクチン-3は神経細胞にのみ発現していた。脳におけるネクチン-2の機能は不明であったため、ネクチン-2について解析を進めたところ、培養アストロサイトにおいてはネクチン-2 $\alpha$ とネクチン-2 $\delta$ はアストロサイト間の同種細胞間の接着部位に局在した。マウス脳の海馬や大脳皮質においては、ネクチン-2 $\delta$ は

血管の基底膜に接するアストロサイトのエンドフット先端に存在した (Miyata et al., Brain Res., 2016)。

#### ② 脳の形態維持におけるネクチン-2の機能

ネクチン-2ノックアウトマウスの表現型を解析したところ、出生直後の脳には解剖学的に明らかな異常は認められなかったが、生後4週齢頃からアストロサイトーシスを認め、その後の成長と加齢に伴い、大脳皮質・扁桃体の神経細胞の減少、苔状線維シナプスの減少、脳室の拡大などの多彩な表現型が観察された。また、血管の基底膜に接するアストロサイトのエンドフットは変性していた。アルツハイマー型認知症では海馬や大脳皮質の萎縮、脳室の拡大が認められるため、ネクチン-2が本疾患の病態の進展に重要な役割を果たしているかと推測された (Miyata et al., Brain Res., 2016)。

アルツハイマー型認知症患者およびそのモデルマウスでは、アストロサイトの傍血管エンドフットの変性が認められる。しかし、その詳しい分子メカニズムはわかっていない。今後は、ネクチン-2によるアストロサイトの傍血管エンドフットの形成と維持の機構を解明してアルツハイマー型認知症の治療法開発の基盤の確立を目指す。また、アストロサイトの神経細胞との異種細胞間の接着機構は依然として不明であり、現在も解析を継続している。

### 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 Maruoka M, Kedashiro S, Ueda Y, Mizutani K, Takai Y. Nectin-4 co-stimulates the prolactin receptor by interacting with SOCS1 and inhibiting its activity on the JAK2-STAT5a signaling pathway. J. Biol. Chem., 査読あり, vol. 292, 2017, pp. 6895-6909, DOI:10.1074/jbc.M116.769091.
- ② Mizutani K, Takai Y. Nectin spot: a novel type of nectin-mediated cell adhesion apparatus. Biochem. J., 査読あり, vol. 473, 2016, pp. 2691-2715, DOI:10.1042/BCJ20160235.
- ③ Miyata M, Mandai K, Maruo T, Sato J, Shiotani H, Kaito A, Itoh Y, Wang S, Fujiwara T, Mizoguchi A, Takai Y, Rikitake Y. Localization of nectin-2 $\delta$  at perivascular astrocytic endfoot processes and degeneration of astrocytes and neurons in nectin-2 knockout mouse brain. Brain res., 査読あり, vol. 1649, 2016, pp. 90-101, DOI:10.1016/j.brainres.2016.08.023.
- ④ Kitayama M, Mizutani K, Maruoka M,

- Mandai K, Sakakibara S, Ueda Y, Komori T, Shimono Y, Takai Y. A novel nectin-mediated cell adhesion apparatus that is implicated in prolactin receptor signaling for mammary gland development. *J. Biol. Chem.*, 査読あり, vol.291, 2016, pp.5817-5831, DOI:10.1074/jbc.M115.685917.
- ⑤ Katsunuma S, Honda H, Shinoda T, Ishimoto Y, Miyata T, Kiyonari H, Abe T, Nibu K, Takai Y, Togashi H. Synergistic action of nectins and cadherins generates the mosaic cellular pattern of the olfactory epithelium. *J. Cell Biol.*, 査読あり, vol.212, 2016, pp.561-575, DOI:10.1083/jcb.201509020.
- ⑥ Yamamoto H, Mandai K, Konno D, Maruo T, Matsuzaki F, Takai Y. Impairment of radial glial scaffold-dependent neuronal migration and formation of double cortex by genetic ablation of afadin. *Brain res.*, 査読あり, vol.1620, 2015, pp.139-152, DOI:10.1016/j.brainres.2015.05.012.
- ⑦ Mandai K, Rikitake Y, Mori M, Takai Y. Nectins and nectin-like molecules in development and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 査読あり, vol.112, 2015, pp.197-231, DOI:10.1016/bs.ctdb.2014.11.019.
- ⑧ 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.*, 査読あり, vol.523, 2015, pp.1824-1839, DOI:10.1002/cne.23762.
- ⑨ Fujiwara T, Inoue T, Maruo T, Rikitake Y, Ieki N, Mandai K, Kimura K, Kayahara T, Wang S, Itoh Y, Sai K, Mori M, Mori K, Takai Y, Mizoguchi A. Nectin-1 spots regulate the branching of olfactory mitral cell dendrites. *Mol. Cell. Neurosci.*, 査読あり, vol.68, 2015, pp.143-150, DOI:10.1016/j.mcn.2015.07.003.

〔学会発表〕(計12件)

- ① 高井義美、細胞の接着とシグナル伝達、第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会(BMB2015)、2015.12.2、神戸ポートアイランド(兵庫県)
- 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(東京都)

〔図書〕(計2件)

- ① Fujiwara T. et al., Springer Japan, *The Cadherin Superfamily: Key Regulators of Animal Development and Physiology*, 2016, 115-156
- ② Mori M. et al., Springer-Verlag New York, *Cell Adhesion Molecules: Implications in Neurological Diseases*, 2014, 91-116

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: ErbB3 活性化に伴うシグナルの伝達抑制物質及びそのスクリーニング方法  
 発明者: 高井義美、水谷清人、慶田城迅  
 権利者: 国立大学法人神戸大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願2016-96427  
 出願年月日: 2016年5月12日  
 国内外の別: 国内

〔その他〕

報道:  
 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

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

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

宮田 宗明 (MIYATA, Muneaki)  
 神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員  
 研究者番号: 90582007

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

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