

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K08158

研究課題名(和文) 上皮組織構築における細胞接着 - 細胞骨格インターフェースの機能解析

研究課題名(英文) The analysis of interface connecting cell adhesion and cytoskeleton on epithelial tissue architecture

研究代表者

伊藤 雅彦 (Itoh, Masahiko)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70270486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌が転移性となる際の細胞間接着喪失と細胞骨格再編成に、ARHGEF11のスプライシング変化が関与することを見いだした。転移性癌細胞ではexon38を含む分子が発現し、ZO-1への結合が失われていた。転移性癌細胞での発現をなくしたところ浸潤能低下と形態変化が起き、腫瘍形成能も抑制されたことから、悪性化との関連が予想される。

一方、ZO-1の類似分子ZO-2を腎系球体上皮で欠損するマウスを作製した結果、ZO-1欠損のような異常は生じなかった。しかし、両分子を同時に欠損させた場合ZO-1欠損よりも系球体上皮の変性や蛋白尿・生存率が悪化した。したがって、ZO-2は補助的役割を果たしていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞接着・細胞骨格が変化する場合の分子機構については、構成分子の発現を調べることで論じられることが多かった。しかし、インターフェース分子のsplicing変化が上皮細胞の表現系転換に関与するという本研究の知見は、発現レベルのみならずsplicing解析も重要であることを示している。また、splicing patternが癌の進行度合いを予測する診断マーカーとなりうる可能性も提示するものである。

一方、従来ZO-1とZO-2は相補的とされ、疾患解析等においてはZO-1のみを分析する事例が多かった。本研究は、これら分子の働きは臓器によって異なりZO-2についても解析を行う必要性あることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In the current research, we found that ARHGEF11 isoform containing exon38, which does not exhibit binding ability to ZO-1, is expressed in metastatic breast cancer cells, while the isoform without exon38 is expressed in non-metastatic cells. When ARHGEF11 isoform is inactivated in metastatic breast cancer cells, invasion ability of the cells is reduced and fibroblastic morphology changes. Furthermore, tumor formation in vivo is suppressed. These data indicate that the splicing shift of ARHGEF11 is implicated in the metastatic progression of breast cancer.

As a separate project, we established mice deficient for ZO-2 in podocytes. Our previous study demonstrated that the loss of ZO-1 leads to proteinuria, however, ZO-2 deficient mouse does not exhibit similar abnormalities. On the other hand, when both molecules are inactivated, degeneration of podocytes and proteinuria is deteriorated than ZO-1 deficiency. Therefore, ZO-2 is considered to play supportive role for ZO-1 in podocytes.

研究分野：分子組織細胞情報学

キーワード：細胞接着 細胞骨格 癌転移 系球体上皮 ZO-1 ZO-2 ARHGEF11

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

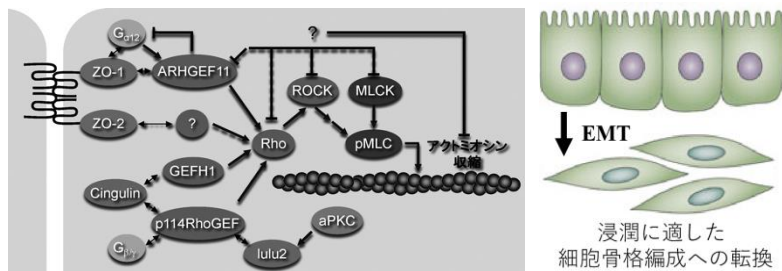
1. 研究開始当初の背景

個体を構成する多くの器官の基盤となる上皮組織は、極性を持つ上皮細胞が相互に強く接着したシート状構造をとっている。シート状構造の形成にはタイト結合・アドヘレンス結合からなる細胞間接着 Apical Junctional Complex と環状に配向したアクトミオシン細胞骨格との相互作用が深く関与している。Apical Junctional Complex に結合した環状アクトミオシンの収縮によって生じる張力が、上皮シートの陥入や管腔形成を伴う組織・器官の構築に重要な役割を果たし、逆にその異常は癌の浸潤転移など組織構築の破綻を伴う疾患に結びつくと考えられる。

これまでの研究で、数多くある Apical Junctional Complex の構成因子のうち、ZO-1、ZO-2 が接着分子とアクトミオシン細胞骨格をつなぐインターフェースとして働くことを明らかにしてきた。さらに、アクチン調節分子 Rho の活性化因子 ARHGEF11 が ZO-1 と結合して Apical Junctional Complex および環状アクトミオシンの形成促進に寄与することを見いだした(PNAS 2012)。一方で、癌の上皮間葉転換 (EMT) のような上皮の特性を失う現象において ZO-1・ARHGEF11 複合体がどのような変化を示すかについては不明である。

また先行研究において、腎糸球体上皮特異的に ZO-1 を欠損するマウス個体の作製と解析を行った結果、特殊な細胞接着構造である糸球体濾過スリットを形成する膜タンパク質の集積が

阻害され、スリットが構造的・機能的に破綻して重度の蛋白尿と成長障害を呈することを見いだした(PLOS One 2014)。一方で、ZO-2 を組織特異的に欠損させた際にどのような影響が及ぶのか明らかになっておらず、生体内におけるインターフェースの機能解析の一環として検討課題の一つとなっている。



2. 研究の目的

本研究は、上皮細胞間接着と細胞骨格をつなぐインターフェースとして機能する分子に着目し、上皮組織の形成・維持と破綻に関与するメカニズムについて解明を進めることを目的とする。近年、様々な組織の細胞を誘導する技術が進歩し再生医療への応用が期待されているが、3次元的な組織や臓器の構築までも再現することはいまだ困難な状況にある。細胞接着や細胞骨格は物理的作用を通じて正常組織の構築に寄与するのみならず、分化や増殖の調節に直接的に作用し、臓器の形やサイズ決定を制御する可能性が示唆されている。逆にその異常は、様々な疾患につながる事が予想される。また、上皮癌が浸潤能を獲得する際に、細胞骨格の配向が上皮構造を維持するための細胞間接着に適した状態から浸潤運動に適したファイバー状に変化するが、この現象にインターフェースがどのように関与するか明らかにしたい。

本研究では、細胞接着・細胞骨格インターフェースについて分子・細胞・組織・個体レベルの階層縦断的解析に取り組み、得られる知見を集約して、組織・臓器の形成メカニズムの解明と疾患治療の応用に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 転移性乳ガン細胞と非転移性乳ガン細胞を用いて、ZO-1 および ARHGEF11 の発現や性質について、以下の如く解析する。

- ・ウエスタンブロットおよび qPCR により発現レベルを比較する。
- ・免疫沈降により、ZO-1 と ARHGEF11 の結合状態を解析する。
- ・ノックアウト細胞を作製し、生じる変化を細胞生物学的に解析する。
- ・細胞をマウスに移植し、腫瘍形成を解析する。

(2) 糸球体上皮細胞特異的に ZO-2 を欠損するマウス、および ZO-1・ZO-2 両分子を欠損するマウスを作製し、生化学的・組織学的・細胞生物学的な手法による解析を行う。具体的には、以下の内容について実施する。

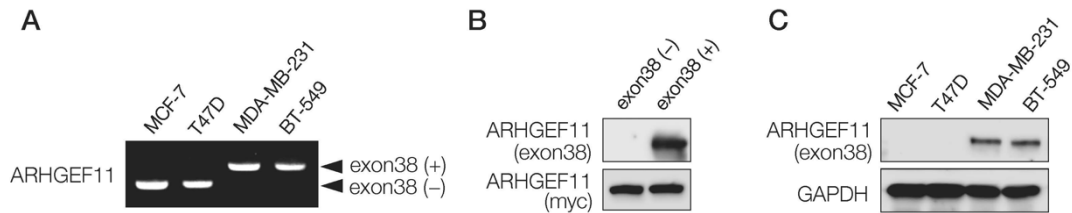
- ・floxed ZO-1 マウス、floxed ZO-2 マウス、および floxed ZO-1・ZO-2 マウスを、糸球体上皮細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス *Nephrin-Cre^{tg}* と交配することによって、遺伝子欠損を誘導する。
- ・遺伝子欠損を起こしたマウスの尿中タンパクを解析し、糸球体機能への影響を明らかにする。
- ・体重および生存率を解析し、個体の成長・全身症状への影響を明らかにする。
- ・組織構造を解析し、遺伝子欠損が個々の細胞ならびに組織構築に及ぼす影響を明らかにする。
- ・糸球体上皮細胞における ZO-1 と ZO-2 の役割の違いについて、細胞生物学的に解析する。

4. 研究成果

(1) 非転移性乳ガン細胞(MCF-7, T47)と転移性乳ガン細胞(MDA-MB-231, BT-549)を用いて、ZO-1 と ARHGEF11 の発現量がそれらの間で変化がないか解析を行ったところ、転移性細胞で

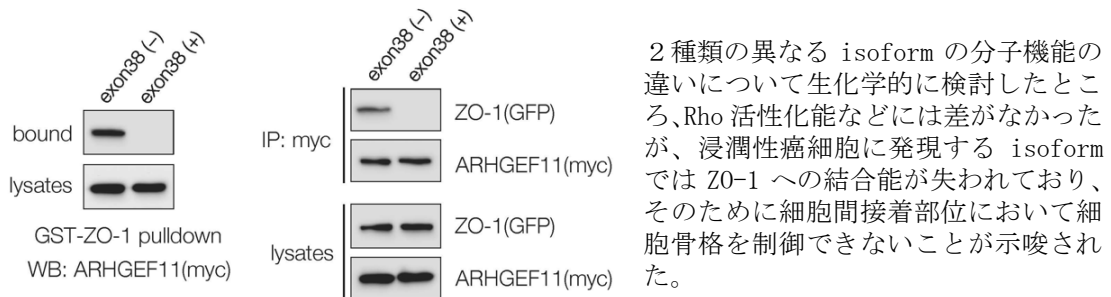
も発現量自体に大きな変化はなかった。一方で、興味深いことに ARHGEF11 については非転移性乳ガン細胞と転移性乳ガン細胞の間で発現する分子のアイソフォームが異なっていることが明らかになった。

- ・浸潤性乳癌と非浸潤性乳癌では、発現する ARHGEF11 のアイソフォームが異なる

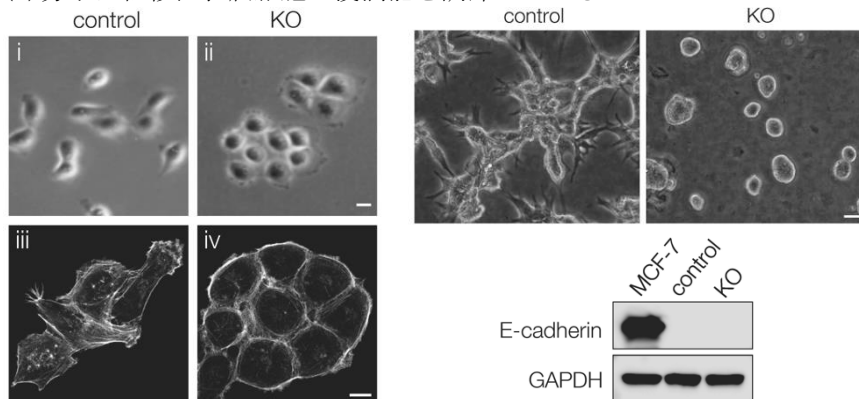


乳癌サンプルの網羅的 RNA-seq データベースの解析から、乳癌に発現する ARHGEF11 には 2 つの isoform が存在することを見いだした。PCR 解析および自ら作製した isoform 特異的抗体を用いた解析により、浸潤性乳癌細胞には 38 番目のエクソンを含む isoform A11exon38 (+) が発現し、非浸潤性乳癌細胞では当該エクソンを含まない A11exon38 (-) が発現することが明らかになった。

- ・浸潤性乳癌に発現する A11exon38 (+) 分子では ZO-1 との相互作用能が失われている

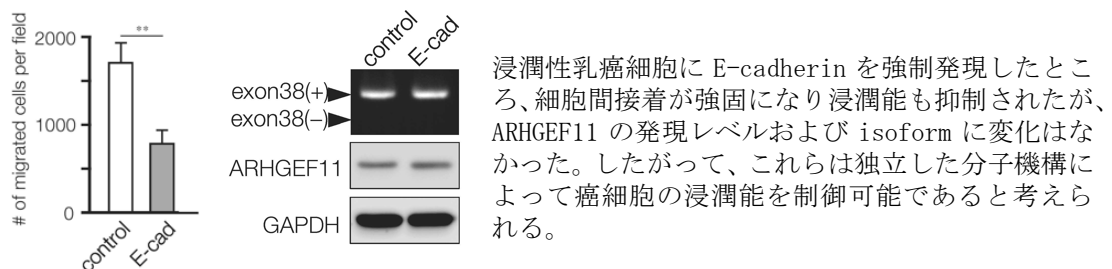


- ・A11exon38 (+) 分子は転移性乳癌細胞の浸潤能を調節している

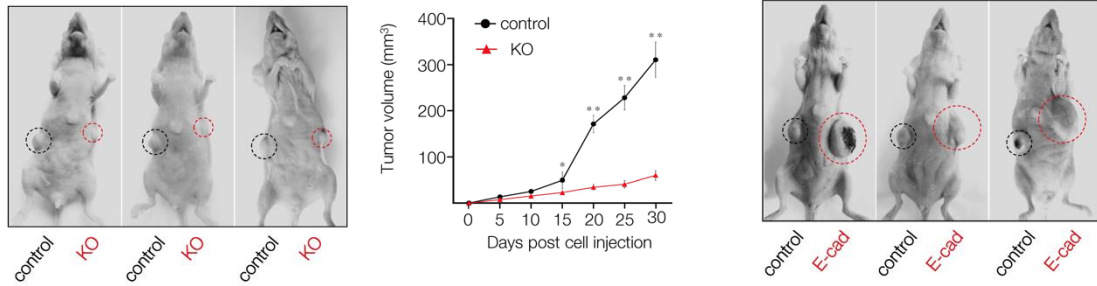


浸潤性乳癌細胞に発現する isoform を、ゲノム編集技術を用いて欠損させたところ、アクチン細胞骨格の状態が変化して細胞突起の形成が抑制され、線維芽細胞様の形態も上皮様に変化し、浸潤能の低下を認めた。その一方で E-cadherin の発現上昇は起きていないことから、分化状態の大きな変化を伴わず、細胞骨格の再編成によって浸潤能が抑制されていることが示唆された。

- ・E-cadherin の発現変化と ARHGEF11 のアイソフォーム変化は独立に浸潤能を調節する



・ All1exon38(+)分子は、浸潤能のみならず増殖能・生存能を増進している

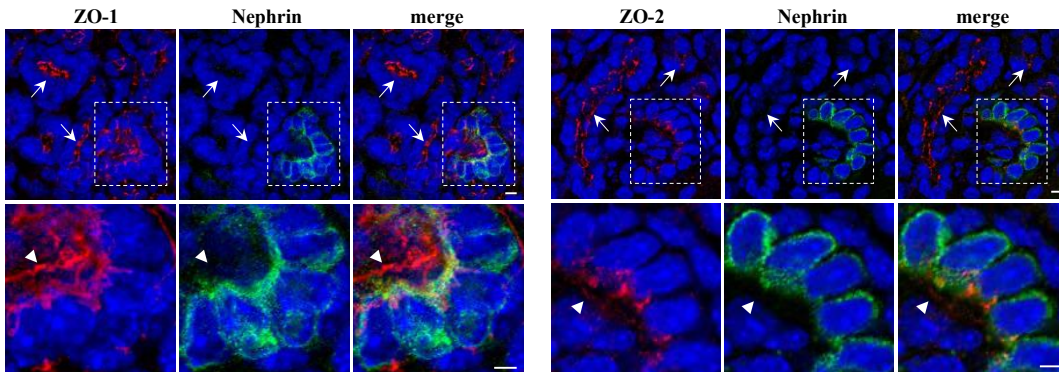


All1exon38(+)分子を欠損させた浸潤性乳癌細胞と、E-cadherin を強制発現させた浸潤性乳癌細胞を、ヌードマウス皮下に移植したところ、All1exon38(+)欠損により *in vivo*における癌細胞の生存増殖能が抑制され、E-cadherin 発現では逆に上昇することが明らかとなった。最近、転移先臓器に生着し増殖する癌はE-cadherin 陽性となっており、その発現が必ずしも良性であることを意味しないことが示唆されているが、得られた結果はこうした知見とも一致するものであった。

以上の結果から本解析の成果は、癌細胞の浸潤化に伴う分子変化として、上皮接着に関わる細胞骨格調節因子の isoform switch が機能的に関与する可能性を見いだした点にある。今後さらなる解析を進め、多様な形質変化を示す癌の診断マーカーや治療標的となる可能性について探索していきたい。

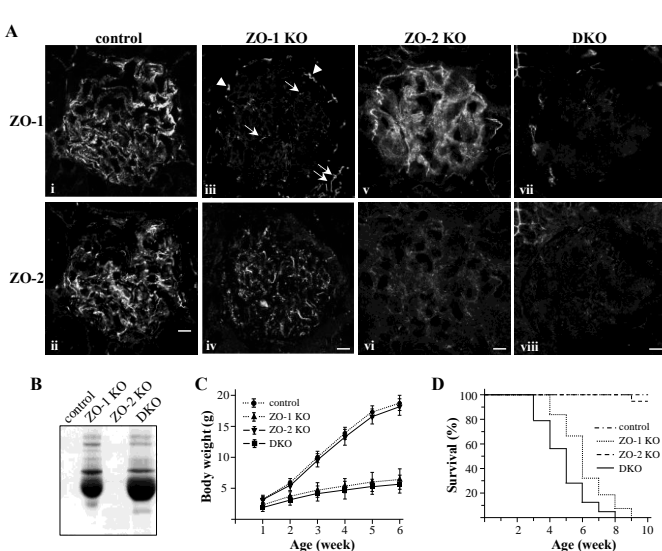
(2) 類似機能を果たすと予想される2種類のインターフェース分子 ZO-1, ZO-2 について、糸球体上皮細胞特異的に ZO-2 を欠損するマウス、および両分子を欠損するマウス作製し、先行研究で樹立した ZO-1 欠損マウスと共に、糸球体の構造と機能について解析した。

・ ZO-1 および ZO-2 はどちらも発生初期の糸球体上皮細胞に発現する



糸球体上皮の分化に伴い発現する分子 Nephrin と ZO-1, ZO-2 の発現を組織免疫染色により比較したところ、ZO-1 と ZO-2 は分化初期の糸球体上皮において共に限局した発現を示すことが明らかになった。

・ ZO-2 は糸球体濾過機能や個体の成長・生存に必須ではないが、ZO-1 の機能をサポートする



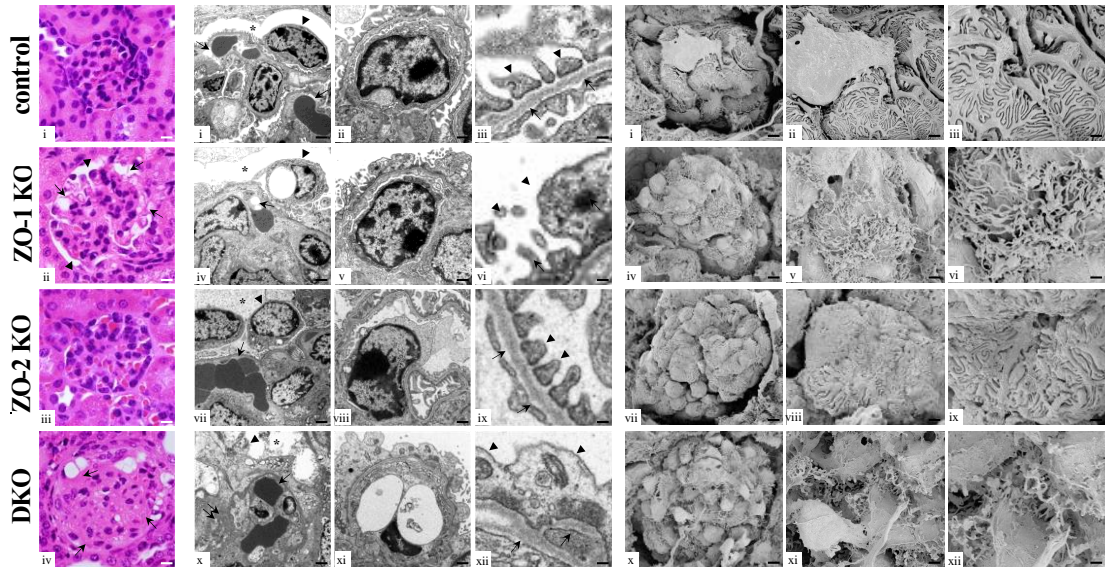
A. 免疫染色を行なったところ、糸球体上皮細胞のみで ZO-1, ZO-2 もしくは両分子の欠損 (ZO-1KO, ZO-2KO, DKO) を起こすことに成功していた。

B. 各マウスの尿を採取し、電気泳動にて尿中タンパク質の有無を解析したところ、ZO-1KO ではタンパクの漏出が起きているのに対し、ZO-2KO では起きなかった。一方、ZO-1 に加えて ZO-2 も欠損させると尿中タンパク量が増加傾向にあることが分かった。

C. 体重変化を解析したところ、ZO-2KO は control と大差なく、ZO-1KO および DKO は成長が著しく障害されていた。

D. 50%生存率が ZO-1KO では約 6 週、DKO では約 5 週となっていた。

・ZO-1 欠損による足突起および基底膜の変性はZO-2 欠損により重篤化する



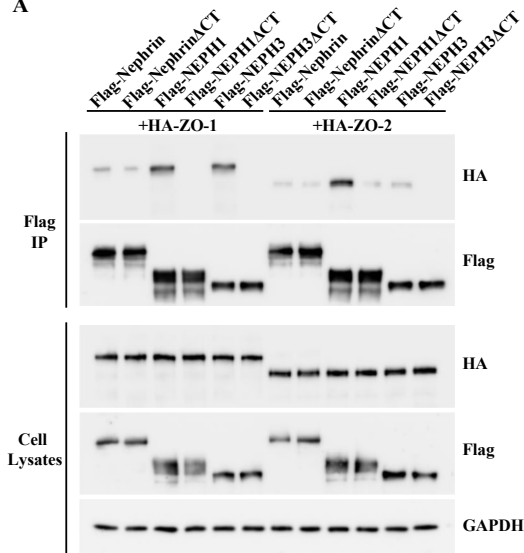
2 週齢マウスから腎臓を摘出して組織解析を行なったところ、ZO-2KO の糸球体構造はほぼ正常であった。一方で、ZO-1KO の糸球体はボウマン腔の拡張など比較的軽微な組織変化を示したのに対し、DKO では細胞外基質の集積など糸球体硬化症に近い変化が既に生じていた。

微細構造について透過型電子顕微鏡で解析した結果、糸球体上皮から ZO-2 が欠損しても足突起や濾過スリット構造は正常に形成されていた。しかし、ZO-1KO では足突起同士が接着して濾過スリットの形成不全が起きていた。さらにDKO では、スリットの形成不全のみならず、足突起が扁平に広がるように変性し、かつ細胞外基質が過剰に集積した状態をとるなど、ZO-1KO よりも重篤な変化を示した。

また、走査型電子顕微鏡により糸球体の表面構造を解析したところ、ZO-2KO では control と同様に足突起同士が噛み合う様子が確認されたが、ZO-1KO では噛み合いが失われ、DKO では足突起がよりランダムに存在していた。

・ZO-1 と ZO-2 は濾過スリット膜タンパク質 NEPH3 への結合能に違いがある

A



糸球体上皮細胞における ZO-1 欠損と ZO-2 欠損が及ぼす影響の違いが、どのような分子の性質により生じるのか、細胞生物学的に解析した。

ZO-1 と ZO-2 は共に膜タンパク質と細胞骨格をリンクさせる働きを担っていることから、糸球体上皮の濾過スリット構造に局在する膜タンパク質 Nephrin, NEPH1, NEPH3 と ZO-1, ZO-2 の結合を検討した。

その結果、Nephrin, NEPH1 に対しては ZO-1 と ZO-2 が同程度の affinity で結合したが、ZO-1 が NEPH3 にも結合能を示したのに対して ZO-2 はわずかな affinity しか示さなかった。

したがって、NEPH3 への結合能の違いが ZO-1 欠損と ZO-2 欠損の影響の違いに反映されている可能性が考えられる。

以上の結果から、類似した分子構造と発現様式を示す細胞接着-細胞骨格インターフェース ZO-1 と ZO-2 は、生体内の特定組織において必ずしも相補的に機能せず、腎臓糸球体上皮の濾過スリットの構造と機能において ZO-1 が必須な存在であるのに対し、ZO-2 は補助的な役割を担っていることが明らかになった。

いくつかの腎疾患において糸球体 ZO-1 の発現低下が観察されていることと合わせると、ヒトにおいても ZO-1 の発現は糸球体機能にとって重要であると予想される。今後、ZO-1 の発現を回復させる薬剤や処理などを同定することにより、腎疾患の治療に役立つ方法を模索したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Itoh M, Nakadate K, Matsusaka T, Hunziker W, Sugimoto H	4. 巻 23
2. 論文標題 Effects of the differential expression of ZO-1 and ZO-2 on podocyte structure and function.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 546-556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12598	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 該当する
1. 著者名 Itoh Masahiko, Radisky Derek C., Hashiguchi Masaaki, Sugimoto Hiroyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 The exon 38-containing ARHGEF11 splice isoform is differentially expressed and is required for migration and growth in invasive breast cancer cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 92157-92170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.20985.	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 該当する
1. 著者名 Horibata Y, Ando H, Satou M, Shimizu H, Mitsuhashi S, Shimizu Y, Itoh M, Sugimoto H	4. 巻 7(1)
2. 論文標題 Identification of the N-terminal transmembrane domain of StarD7 and its importance for mitochondrial outer membrane localization and phosphatidylcholine transfer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-09205-1.	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 Horibata Y, Ando H, Zhang P, Vergnes L, Aoyama C, Itoh M, Reue K, Sugimoto H	4. 巻 291(48)
2. 論文標題 StarD7 Protein Deficiency Adversely Affects the Phosphatidylcholine Composition, Respiratory Activity, and Cristae Structure of Mitochondria	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 24880-24891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M116.736793	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 Mizuki Y, Takaki M, Sakamoto S, Okamoto S, Kishimoto M, Okahisa Y, Itoh M, Yamada N	4. 巻 18(1)
2. 論文標題 Human Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 11 (ARHGEF11) Regulates Dendritic Morphogenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18010067	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 Ando H, Aoyama C, Horibata Y, Satou M, Mitsuhashi S, Itoh M, Hosaka K, Sugimoto H	4. 巻 471
2. 論文標題 Transcriptional suppression of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase by 25-hydroxycholesterol is mediated by nuclear factor-Y and Yin Yang 1	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 369-379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BJ20150318	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 伊藤雅彦
2. 発表標題 上皮接着に関わる細胞骨格調節因子の浸潤癌における変化と機能解析
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀端康博, 安戸博美, Zhang Peixiang, Vergnes Laurent, 青山智英子, 伊藤雅彦, Reue Karen, 杉本博之
2. 発表標題 StarD7の欠損はミトコンドリアのホスファチジルコリンの組成を減少し、呼吸活性やクリステ構造に悪影響を与える
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 伊藤雅彦、寺田節、Walter Hunziker、杉本博之
2. 発表標題 Z0分子は肝細胞間タイト結合バリアと胆汁ホメオスタシスを制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----