

令和 2 年 9 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05121

研究課題名(和文) 構造解析を基盤としたタイトジャンクションクロードインファミリーの分子生理学的解析

研究課題名(英文) Molecular physiology of tight junction Claudin-family based on structural analysis

研究代表者

田村 淳(Tamura, Atsushi)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授

研究者番号：00362525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞は、多細胞生物の体内外表面を覆い、皮膚・肝臓・腎臓などの主要な臓器の機能と構造を担う生体内最多の細胞群である。上皮細胞間には、クロードイン(Cldn)ファミリー蛋白質のポリマーで構築されるタイトジャンクション(Tight Junction: TJ密着結合)が存在し細胞間透過性が制御されることで、組織の微小環境を維持し生体機能が営まれ、その破綻は種々の病的状態に直結する。本申請では進展著しいゲノム編集技術CRISPR/CAS9系を用いてCldnを発現しない上皮細胞の樹立と解析を進め、細胞生物およびマウス解析に加え、クロードイン分子の情報をもとに個々のCldn分子の機能解析を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞生物は、隣り合う上皮細胞同士が接着することで形成された上皮細胞シートにより、体内環境と体外環境が隔絶されることで、体内環境を維持する。このとき、適切に制御された上皮細胞シートバリアが必要である。上皮細胞シートバリアが重度に障害されると、脱水や生命に必要な酵素活性低下し生命も脅かされる。より軽度であっても、炎症や栄養分吸収障害などの機能障害を惹起する場合がある。申請者は、上皮細胞シートバリアの中でも、特に、上皮細胞間バリアに関わるタイトジャンクションおよびその構成タンパク質クロードインの構造と機能解析を進めている。胃酸と炎症など、今後の展開により疾患の治療と予防につながる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cells are the largest number of cells in the body that cover the internal and external surfaces of multicellular organisms. They are responsible for the functions and structures of major organs such as the skin, liver, and kidneys. The TJ (Tight Junction), composed of the polymer of claudin (Cldn) family protein molecules, reside in between epithelial cells. The paracellular permeability is mainly determined to maintain the tissue microenvironment properly. Biological functions are carried out within the exactly regulated tissue microenvironment. The failure of it is linked to various pathological conditions directly. In this application, we generate the Cldn null epithelial cells by using the CRISPR/CAS9 system to advance the functional analysis of Cldn-based TJ.

研究分野：細胞生物学

キーワード：クロードイン タイトジャンクション 上皮細胞 細胞間接着装置 上皮細胞間バリア 構造解析 炎症 生体機能

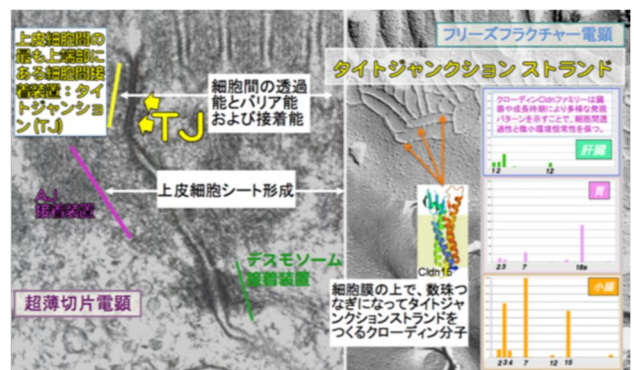
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

身体の表面をおおう「上皮細胞」は、外から見える皮膚や角膜に加え、口から体内につながる口腔粘膜、胃、腸管、肝臓、膵臓、肺や、腎臓や膀胱など主要臓器を構築する体内最多の細胞群の総称である。タイトジャンクション(TJ)により、上皮細胞間のバリアや透過性が制御された1枚の上皮細胞シートとして働くことで、栄養吸収や、生体一次防御など、上皮性臓器が担う多彩な機能を効率的に遂行可能となる。TJは、クローディン Cldn と呼ばれる分子量約 23kDa の小さな4回膜貫通蛋白質が、紐状に重合してできた網目状構造からなる(Furuse, J.Cell Biol.(1999):Tamura, Semin in Dev. Cell Biol. (2015))。この網目状構造が、生体内のすべての上皮細胞の細胞間隙を隙間なく、臓器ごとに特異的な透過特性で取り囲むことで、各々の組織臓器にとって適切な細胞間透過性を構築する。Cldn は人やマウスでは 27 のサブタイプからなる大きなファミリーを構築する。そしてサブタイプごとに特異的な臓器や組織での発現量や分布を違えることで、TJ 透過特性を変化させる。そのため、Cldn 蛋白質の欠損や変異にもとづく TJ の透過性異常は、組織の適切な環境を破壊し、病的状態に直結する。

申請者は、所属研究室の Cldn ノックアウトマウスを解析し、臓器・組織の“微小環境制御因子としての TJ-Cldn”の重要性を示してきた(Wada, Gastroenterology (2013)など)。TJ における Cldn の機能は、2つに大別される。1つは、単純な物理障壁の構築(バリア)である。例えば、胃型 Cldn18 の KO マウスではプロトンに対する TJ バリアが障害され、粘膜下に漏れた胃酸が胃炎を生じる。もう1つは、イオンや水を透過させる TJ ポアの構築と、イオン環境や浸透圧などの液相の微小環境を制御する TJ-Cldn である(ポア、チャネル)。

例えば、Cldn15-KO マウスでは、小腸の上皮細胞間の TJ ポアが障害されてイオン透過性が大きく低下することで、腸管内 Na⁺イオン濃度(WT で 80-100mM)が劇的に低下(KO で 10-20mM)する。その結果、Na⁺イオン依存性の栄養吸収が抑制される。このように、TJ-Cldn が上皮性臓器・組織の組織微小環境の制御因子として非常に重要である。



TJ 透過性については、培養細胞やマウスを用いた Cldn の過剰発現や発現欠損/抑制の解析により、TJ の生理学的特性や、その特性をつくる Cldn 種についての理解が得られてきた。しかし、その理解は、TJ の総合的な理解であり、1種類の Cldn がつくる1種類のポアの特性を正確に反映するものではない。これまでの解析は、いずれの場合でも、必ず数種類の Cldn 種が発現した状態での特性解析であった。Cldn ノックアウトマウスの場合、特定の Cldn が欠失することで見える表現型であり、その特定 Cldn の重要性は明らかではあるが、得られた表現型がその Cldn の欠損の直接の影響なのか、残った Cldn の組み合わせから生み出された表現型なのかは、厳密には分からない。特定の Cldn 分子の直接的な機能を理解するには、単一の Cldn 種のみを発現する上皮細胞系を構築する以外に方法はない。

最近の2つの進歩が、本申請の基盤である。

(1), 複数の遺伝子発現を同時に欠失できるゲノム編集の技術の進歩: 特定の Cldn 分子の直接的な機能を理解するには、単一の Cldn サブタイプのみを発現する上皮細胞系を構築する以外に方法はない。最近、ゲノム編集による複数遺伝子欠損の道が開け、Cldn を全く発現しない上皮細胞の作製が技術的にも現実的にも可能となった。

(2), Cldn15 の結晶構造解析の成功: TJ を構築する Cldn の生理機能の重要性が明らかにされる一方、透過性や接着を決める TJ の分子機構は、推測の域を出なかった。ごく最近、申請者の所属研究室、名大藤吉研、東大濡木研の3教室の研究で、Cldn15 の高分解能構造解析に成功した。Cldn15 は、申請者が長い間 KO マウス解析を進めてきたサブタイプである。これらの進歩を利用し、以下の点を主に明らかにする。

2. 研究の目的

(1), 接着分子およびチャネル・バリア分子としての Cldn 分子の理解: 個々の Cldn サブタイプの「接着活性」「バリア特性」の異同を知り、その差を創出する分子機序を解明する。複数の Cldn の組み合わせが作る接着活性についても、分子機序の解明を目指す。さらに、TJ の機能的構造的複合体としてのアピカル構造や細胞骨格・細胞極性との関連、TJ からの細胞内シグナル伝達について細胞生物学的に明らかにする。

(2), タイトジャンクションの数理的な理解: 構造解析をもとにした分子動力的解析のパラメータ設定および検証用の実験データを得る。

(3), 生体におけるタイトジャンクション機能の理解: ノックアウトマウスの解析を進め、生体と分子機能の整合性を検討する。

3. 研究の方法

クローディング (Cldn) の構造と機能の理解をつなげるために、(1)CRISPR のゲノム編集技術を利用して内在する複数種の Cldn をまったく発現しない Cldn 完全ノックアウト上皮細胞を作製し、単一種 Cldn の細胞間バリア特性を調べる実験系を樹立する。ストランドの分岐解析、タイトジャンクション (TJ) の位置決めなども含む。(2) TJ ポア内でのイオンや水の透過経路について、分子動力学シミュレーションを行う。実験系との整合性を確かめる。(3) Cldn ノックアウトマウスの解析を進め、生体における Cldn 分子の機能的役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1), 接着分子およびチャネル・バリア分子としての理解: 個々の Cldn サブタイプの「接着活性」「バリア特性」の異同を知り、その差を創出する分子機序を解明する。複数の Cldn の組み合わせが「接着活性」や「バリア特性」についても、分子機序の解明を目指す。

このために、上皮細胞研究で、よく使用される上皮細胞について、すべての内在性の Cldns 分子を発現しない細胞の樹立を目指してきた。得られた細胞を用い、現在も論文文化に向けた細胞生物学的な解析を進めている。

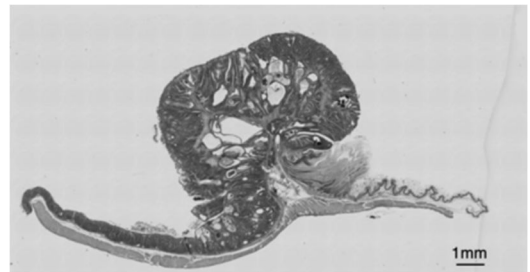
(2), タイトジャンクションの数理学的な理解: 構造解析をもととした分子動力学解析のパラメータ設定および検証用の実験データを得る。Cldn15 の分子構造が、高い分解能で、解かれたことから、分子動力学解析による、タイトジャンクションの動的な形成機序やチャネル・バリア機能と分子相互作用について、シミュレーションを用いた解明を目指してきた。

タイトジャンクションは、通常の細胞膜タンパク質とは異なり、細胞同士が接する部分に形成される上、Cldn 分子の複雑なシスとトランスの重合を描出の必要があり、さらに、トランス (細胞間) の結合様式が未解明であることから、シミュレーションの構築が困難であった。研究期間の進展の間に、電子顕微鏡を用いた単粒子解析技術の進展など、分子の構造解析の進展と創薬を含めた解析の進展に合わせ、分子動力学解析環境も進展した。

CHARMM-GROMACS の系を用いて、Cldn 分子の変異導入とタイトジャンクションの構造構築への影響を検討している。

(3), 生体におけるタイトジャンクション機能の理解: ノックアウトマウスの解析を進め、生体と分子機能の整合性を検討する。ノックアウトマウスでは、特に胃型 Cldn18 の解析が進展した。

胃型 Cldn18 マウスは、胃の上皮細胞に発現の多い胃型 Cldn18 の発現が消失している。胃酸に対する上皮細胞間のバリアが障害されている。その結果、胃が成長し、胃酸分泌が始まるとともに (生後 3.5 日目) 胃炎を惹起する。壁細胞から分泌された胃酸は、細胞間を通過して、粘膜下に漏出することから、周辺の細胞を障害する。本マウスは、oxyntic-atrophic gastritis となり、壁細胞や主細胞の数が著しく減少する。本マウスの経過を追うと、生後 8 週齢程度までは、好中球優位の急性胃炎の状態が継続する活動性胃炎の状態を示す。本病態は、ピロリ菌が感染したヒトで良く見られる病態である (Hayashi & Tamura et al., 2012, Gastroenterology)。



本研究では、さらにその後のマウスの生涯における胃の病態について、解析を進めた。胃がんは、炎症がんと言われ、炎症の継続とがん化の関係が指摘されてきた。胃型 Cldn18 マウスの胃の病態がピロリ菌感染性の胃炎に類似するという点、また、ピロリ菌の感染で細胞間バリアの障害が見られるという点、は、ピロリ菌の感染にともない高頻度で生じる胃がんの病態形成に、細胞間バリアの障害が関わる可能性を示す。ヒトの胃炎や胃がんの多くで、胃型 Cldn18 の発現量の低下も報告されている。

本マウスを 2 歳齢 (100 週齢) までの各週齢で追跡した。追跡することで新規に見出された生物学的に意義あると思われる現象は、好中球優位の活動性炎症から、リンパ球も同時に観察される慢性・活動性胃炎が観察されたことである。病的に興味深かったことは、マウス中年期に、サイトカイン CCL28 の発現上昇が見られた点である。CCL28 は慢性炎症化に関わると可能性がある。胃型 Cldn18 では、多数のマウスで胃粘膜に肥厚 (壁細胞や主細胞数は少ない) を生じ、30% 程度のマウスで胃に腫瘍を生じる。HIF (Hypoxia Inducible Factor) の増加からも示唆される細胞増殖と、同時に、発現亢進が示唆される CD44 による CCL28 発現誘導の可能性が示唆された。さらに週齢が進み、マウス高齢期にかけると、サイトカイン CXCL5 の発現上昇が見られた点も、胃腫瘍形成の形成機序の点から、生物学的に意義あると思われる。CXCL5 は、EMT を誘導することが報告されている。このことは、胃の正常な上皮構造を崩し、腫瘍向性の構造・特性に変化させる可能性を示唆する。胃型 Cldn18 の胃腫瘍形成に寄与する可能性が示唆された。CXCL5 は、同時に、好中球を呼び寄せる働きも知られており、本マウスの特徴である、慢性活動性胃炎の病態形成にも寄与する可能性が示唆される。

本マウスでは、マウスの生涯を観察しても、腫瘍の悪性化は見られなかった。しかし、幹細胞性マーカーなど、マウスが高齢になって初めて上昇する因子も見出され、週齢を追うごとに、1 単語で「良性腫瘍」とまとめられる病態でも、変化している可能性が示唆された。より詳細な、4 次元解析の必要性が示唆されるものであり、本研究については、さらに深い解析を計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Yamaga Kosuke, Murota Hiroyuki, Tamura Atsushi, Miyata Hirofumi, Ohmi Masato, Kikuta Junichi, Ishii Masaru, Tsukita Sachiko, Katayama Ichiro | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Claudin-3 Loss Causes Leakage of Sweat from the Sweat Gland to Contribute to the Pathogenesis of Atopic Dermatitis | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2017.11.040 | 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 - |
| 1. 著者名 Tanaka Hiroo, Tamura Atsushi, Suzuki Koya, Tsukita Sachiko | 4. 巻 1405 |
| 2. 論文標題 Site-specific distribution of claudin-based paracellular channels with roles in biological fluid flow and metabolism | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Annals of the New York Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 44～52 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nyas.13438 | 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 - |
| 1. 著者名 Yano Tomoki, Kanoh Hatsuho, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko | 4. 巻 1405 |
| 2. 論文標題 Apical cytoskeletons and junctional complexes as a combined system in epithelial cell sheets | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Annals of the New York Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 32～43 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nyas.13432 | 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 - |
| 1. 著者名 Tokumasu Reitaro, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Time- and dose-dependent claudin contribution to biological functions: Lessons from claudin-1 in skin | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Tissue Barriers | 6. 最初と最後の頁 e1336194 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21688370.2017.1336194 | 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 - |

| | |
|---|----------------------------|
| 1. 著者名 Tsai Pei-Yun, Zhang Bingkun, He Wei-Qi, Zha Juan-Min, Odenwald Matthew A., Singh Gurminder, Tamura Atsushi, Shen Le, Sailer Anne, Yeruva Sunil, Kuo Wei-Ting, Fu Yang-Xin, Tsukita Sachiko, Turner Jerrold R. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 IL-22?Upregulates Epithelial Claudin-2 to Drive Diarrhea and Enteric Pathogen Clearance | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Cell Host & Microbe | 6. 最初と最後の頁 671 ~ 681.e4 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chom.2017.05.009 | 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Tokumasu R, Yamaga K, Yamazaki Y, Murota H, Suzuki K, Tamura A, Bando K, Furuta Y, Katayama I, Tsukita S. | 4. 巻 113 |
| 2. 論文標題 Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis. | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A. | 6. 最初と最後の頁 E4061-8 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1525474113 | 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Shun Nakamura, Katsumasa Irie, Hiroo Tanaka, Kouki Nishikawa, Hiroshi Suzuki, Yasunori Saitoh, Atsushi Tamura, Sachiko Tsukita, Yoshinori Fujiyoshi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Morphologic determinant of tight junctions revealed by claudin-3 structures | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nat Commun. | 6. 最初と最後の頁 816-816 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08760-7. | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Juan-Min Zha, Hua-Shan Li, Qian Lin, Wei-Ting Kuo, Zhi-Hui Jiang, Pei-Yun Tsai, Ning Ding, Jia Wu, Shao-Fang Xu, Yi-Tang Wang, Jian Pan, Xiu-Min Zhou, Kai Chen, Min Tao, Matthew A. Odenwald, Atsushi Tamura, Sachiko Tsukita, Jerrold R. Turner, Wei-Qi He | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Interleukin 22 Expands Transit-Amplifying Cells While Depleting Lgr5+ Stem Cells via Inhibition of Wnt and Notch Signaling | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cell Mol Gastroenterol Hepatol. | 6. 最初と最後の頁 255-274 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2018.09.006 | 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 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Ryo Hatano, Ai Takeda, Yukiko Abe, Kotoku Kawaguchi, Itsuro Kazama, Mitsunobu Matsubara, Shinji Asano | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Loss of ezrin expression reduced the susceptibility to the glomerular injury in mice | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep. | 6. 最初と最後の頁 4512 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22846-0 | 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5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 加納初穂、矢野智樹、氏昌末、田村朋宏、田村淳、月田早智子 |
| 2. 発表標題 上皮細胞シート形態形成におけるタイトジャンクション微小管結合タンパク質の解析 |
| 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 鈴木浩也、武知真希、谷一寿、田村淳、藤吉好則、月田早智子 |
| 2. 発表標題 クローディン15における細胞間チャネル機能のイオン選択性とサイズ選択性制御機構の検討 |
| 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 月田早智子、加納初穂、Elisa Herawati、小西聡史、立石和博、矢野智樹、田村淳 |
| 2. 発表標題 気管多繊毛上皮細胞における繊毛配列動態 |
| 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 田村淳、田中啓雄、高橋信之、月田早智子 |
| 2. 発表標題 タイトジャンクション構成タンパク質クローディングが規定する生体微小環境恒常性と消化管機能 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Atsushi Tamura |
| 2. 発表標題 Bile flow and gallstone diseases induced by the deficiency of claudin family proteins |
| 3. 学会等名 International conference Tight junction and their proteins（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2016年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 大阪大学月田研究室 http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/ 大阪大学生命機能研究科 http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ 大阪大学医学系研究科 http://www.med.osaka-u.ac.jp/ 大阪大学大学院生命機能研究科/医学系研究科 月田研究室 http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/ |
|---|

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 |