

令和 4 年 10 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02437

研究課題名(和文)上皮バリア形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Dissecting the mechanism by which epithelial barrier is formed

研究代表者

小田 裕香子(Oda, Yukako)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：70452498

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)：上皮組織は、異なる環境を分けるバリアとして働く。このバリア機能はタイトジャンクション(TJ)と呼ばれる細胞間接着装置によって担われる。TJは生体内におけるバリア機能に必須の役割を果たしており、その分子構築については精力的に研究が行われてきたが、TJがどのようにして形成されるかについては未だにほとんど不明であった。我々は、マウス上皮組織由来の分泌液中にTJ形成を誘導する液性因子が存在することを見出し、新規ペプチドを同定した。本研究では、このペプチドの培養上皮細胞におけるバリア形成の評価、炎症モデルに対する投与の効果を検証するとともに、その産生メカニズム・作用メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでTJ形成をトリガーする因子が生体内に存在するのか、ほとんど不明であった。本研究では、我々が本研究の準備段階で見出していたTJを形成誘導するペプチドの機能解析および作用機序の解明を行なった。本ペプチドによるバリア形成メカニズムの解析を通じ、生体由来因子による上皮バリアの形成・維持の理解に迫ることが可能になり、基礎生物学の発展に寄与するものと考えられる。さらに本ペプチドは、炎症を始めとするバリア破綻が原因となる様々な病態に対する創薬ターゲットとして治療にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Epithelial barriers that prevent dehydration and pathogen invasion are established by tight junctions (TJs), and their disruption leads to various inflammatory diseases and tissue destruction. Despite extensive studies on the structural and functional bases of TJ, the mechanism by which TJ formation is induced remains unclear. Here, we discovered TJ-inducing peptides (JIPs) in mice and humans. In a mouse intestinal epithelial injury model established by dextran sodium sulfate (DSS), mouse or human JIPs administration restored TJ integrity and strongly prevented colitis. Our study has revealed TJ-inducing anti-inflammatory physiological peptides that play a critical role in tissue repair and proposes a novel therapeutic strategy for TJ-disrupted diseases.

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮細胞 バリア タイトジャンクション 生理活性ペプチド 細胞間接着

## 1. 研究開始当初の背景

上皮組織は体表面、管腔、体腔などの表面を覆う細胞シートであり、体内と外界、あるいは体内の内部環境を隔てるバリアとして機能する。そのバリア機能を担うのが細胞間接着装置であるタイトジャンクション(TJ)である(図1)。TJの構成因子であるclaudinファミリーのノックアウトマウスは、胎生致死や脱水、難聴などの病態を示すことから、TJは生体内におけるバリア機能に必須の役割を果たしているといえる。TJ構成因子の分子構築が解明されつつある一方で、TJがどのようにして形成されるかについては未だにほとんど不明であった。研究代表者はこれまでに、上皮細胞におけるTJおよびTCJ(トリセルラージャンクション;3細胞間接着を担う)の構築基盤とその機能を明らかにしてきた(Masuda and Oda et al., *J. Cell. Sci.* 2011, Oda et al., *J. Cell. Sci.* 2014, Oda et al., *J. Biol. Chem.* 2020)。その過程で、上皮細胞のバリア獲得メカニズムの解明はこの分野の重要な課題であると考えていた。

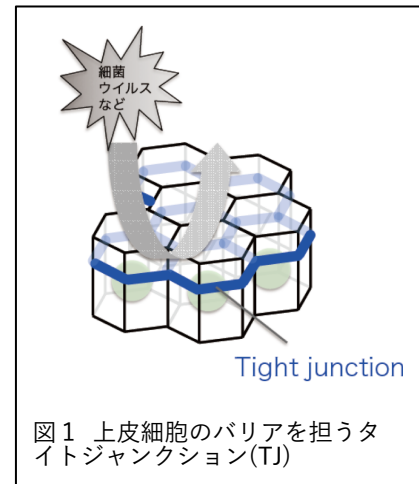


図1 上皮細胞のバリアを担うタイトジャンクション(TJ)

## 2. 研究の目的

本研究の準備段階において、マウス発生過程における皮膚構築に着目し上皮重層化とバリア形成を時空間的に観察していたところ、外因性因子によってTJが形成されるのではないかとこの着想を得た。そこで、培養皮膚細胞A431を用い、羊水、羊膜を始めとする様々なマウス上皮組織由来分泌液を培養液中に添加すると、TJバリア形成が誘導されることを見出した(図2)。これらの結果は、上皮・中皮組織由来の分泌液中にTJ形成を誘導する因子が存在するという全く新しい概念を提示するものである。研究代表者はさらに、その因子はペプチドであることを突き止め、配列の同定に成功した。そこで本研究では、この分泌型TJ形成誘導ペプチドを軸にした上皮組織のバリアシステム形成機構とその役割を明らかにすることを目的とした。

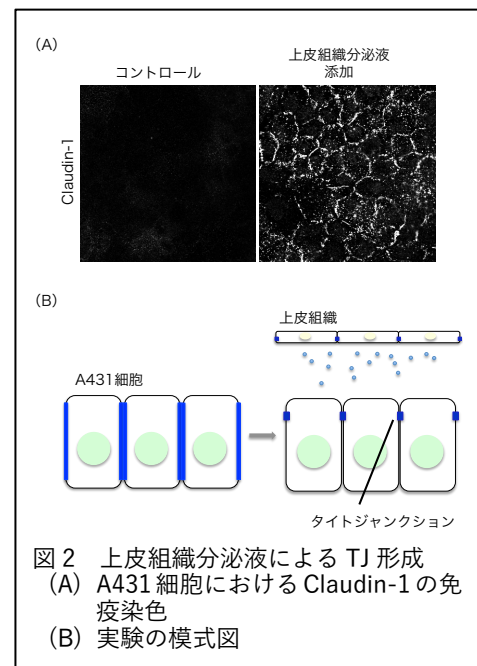


図2 上皮組織分泌液によるTJ形成  
(A) A431細胞におけるClaudin-1の免疫染色  
(B) 実験の模式図

## 3. 研究の方法

### (i) 分泌型TJ形成誘導因子の同定と培養上皮細胞を用いた解析

マウス腹膜組織の培養上清は、陰イオン交換カラム・C18カラムを用い精製し、質量分析解析を行なった。ペプチドはSyn Peptideに受託合成を依頼した。A431細胞、EpH4細胞、MCF7細胞、HT29細胞に合成JIPペプチドを添加し、免疫染色、FITC-dextranを用いたparacellular flux assayおよびTER測定を行なった。

### (i) 炎症モデルマウスに対するJIP投与の評価

実験動物として、清水実験材料より購入した8週齢のICR雌マウスを用いた。22+2°Cの動物飼育室にておがくずを敷いたプラスチックケージ内で飼育した。デキストラン硫酸ナ

トリウム (DSS) (富士フィルム和光純薬) は水道水で 4% に溶解した。実験には、コントロール群と DSS 処理群を準備した。コントロール群には水道水を自由飲水させた。DSS 処理群には 4% DSS を自由飲水させた。JIP ペプチドは、2.3 mg/kg/day 皮下投与した。コントロール群には vehicle (HBSS) を投与した。実験 10 日目にマウスの大腸をサンプリングし、肛門側から 3cm 切り出した。組織を液体窒素で凍結後、5µm の薄切切片を作成し、H&E 染色により組織学的評価を行なった。また、Gr-1 抗体による免疫染色を行った。腸管バリア機能の測定は、マウスに 4 kDa FITC-dextran を経口投与し、4 時間後に回収した血漿中の蛍光強度をプレートリーダーにて測定した。腸炎の病態は、下痢と血便の各スコアを合計した Disease Activity Index により評価した。すなわち下痢と血便の程度をそれぞれ 3 段階に分類して評価した。下痢は、Score0: 普通便、Score1: ピンセットで掴むと便が崩れてしまう下痢便、Score2: ピンセットで掴むことができない激しい下痢便とした。血便は、Score0: 普通便、Score1: 便の表面のみに出血が見られる便、Score2: 便の表面と内部の両方に出血が見られる便、とした。

#### (ii) 産生・作用メカニズムの解明

MMP-1, MMP-8, MMP-9 は APMA (1mM) で活性化した後、最終的に 40 µM になるように調整したヒト alpha1-antitrypsin に加え 37°C で 24 時間反応させた。サンプルは 20% Tricine ゲルで電気泳動を行い、銀染色および質量分析解析を行なった。組織における MMP 阻害解析では、腹膜や腸組織の conditioned medium を採取する際に GM6001 (50 µM) あるいは vehicle を加え、回収した。ターゲット G13 に対する siRNA を A431 細胞、EpH4 細胞に導入し、claudin の免疫染色、TER 測定などによりバリア機能の評価した。

### 4. 研究成果

#### (ii) 分泌型 TJ 形成誘導因子の同定と培養上皮細胞を用いた解析

予備的解析において、TJ 形成誘導因子として alpha1-antitrypsin の C 末端由来の 35 アミノ酸からなるペプチドの同定に成功していた。本研究ではさらに、alpha1-antitrypsin の C 末端由来 36, 40 アミノ酸からなるペプチドの同定に成功し、それぞれを JIPm35, JIPm36, JIPm40 と名付けた。合成 JIP ペプチドを A431 細胞培養液に添加すると、claudin-1 が細胞境界に濃縮して局在するようになり、TJ-like strand が誘導されることがわかった。様々な培養上皮細胞に合成 JIP ペプチドを添加し、TER (経上皮電気抵抗値) の測定を行い、バリア機能の評価を行った。JIP 添加により EpH4 細胞では最大 2.2 倍、MCF7 細胞では最大 8.2 倍、HT29 細胞では最大 9.9 倍の TER 値の上昇が見られた。一方で A431 細胞では JIP 添加により TER 値の上昇は見られず、A431 細胞では完全な TJ は誘導されないことがわかった。しかしながら、A431 細胞において合成 JIP ペプチド添加すると FITC-dextran の透過性が下がったことから、一定のバリア機能は充進していると考えられた。これらの結果より、JIP により誘導される TJ の機能性については、cell-context dependent であると考えられた。

#### (iii) 炎症モデルマウスに対する JIP 投与の評価

生体における JIP の効果を検証するため、炎症モデルマウスに対して合成 JIP ペプチドを投与し、病態を評価するとともに TJ バリア形成が促進されるかを検討した。腸管上皮に傷害を起こす薬剤として DSS を用い、マウスに飲水させることで DSS 誘導性の急性大腸炎を起こした。大

腸組織の HE 染色により、DSS 飲水によりクリプト構造が崩壊するが、JIP を隔日皮下投与するとクリプト構造が保持されることがわかった (図 3)。また、血中 FITC-dextran 濃度の測定により腸管バリア機能の評価を行なったところ、DSS により低下したバリア機能が、JIP 投与により回復することがわかった。これらの結果と一致して、① 糞便をスコア化して得られる Disease Activity Index は DSS で高値になるが、JIP 投与でコントロールと同程度に回復すること、② 好中球の上皮細胞層への浸潤が JIP 投与により抑えられること、③ DSS による体重減少が JIP 投与により抑えられること、④ DSS による死亡率の上昇が JIP 投与により抑えられることがわかった。

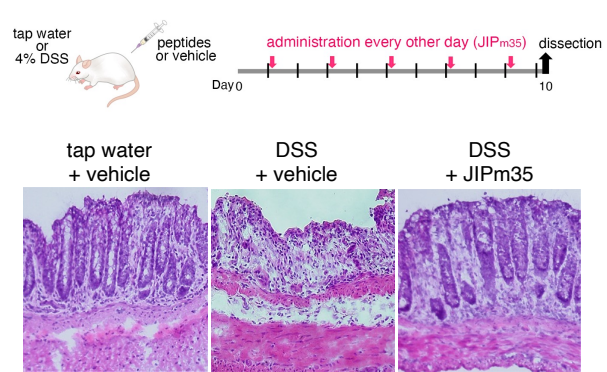


図 3. DSS 誘導性腸炎マウスへの JIP 投与により、症状が緩和する

### (iii) 産生・作用メカニズムの解明

続いて、JIP の産生メカニズムの解明に取り組んだ。これまで alpha1-antitrypsin を切断するプロテアーゼとして、Matrix metalloproteinase (MMP) を含むいくつかのセリンプロテアーゼが報告されていた。精製 alpha1-antitrypsin と MMP-1, -8, -9 を反応させたところ、約~5 kDa の断片が検出され、質量分析により C 末端 37 アミノ酸のペプチドが同定された。また、MMP 阻害剤を用いた解析から、JIP の産生には MMP が関与していることがわかった。作用メカニズムについては、ドイツマックスプランク分子細胞研究所のグループと共同研究を実施し phase separation などの様々な検討を行った結果、JIP はアクチンの再編成を担うことがわかり、直接のターゲット分子 G13 の同定に成功した。A431 細胞および EpH4 細胞を用いて G13 の過剰発現あるいはノックダウンを行い、JIP を介した TJ の形成に G13 が必要十分であることを示すことができた。さらに G13 の *in vitro* activation assay を行ったところ、JIP は G13 を直接活性化することがわかった。加えて、JIP は細胞の形質膜上に局在し、膜に挿さることでこのターゲット G13 を活性化すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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<br>Oda Y, Sugawara T, Fukata Y, Izumi Y, Otani T, Higashi T, Fukata M, Furuse M  | 4. 巻<br>295(13)         |
| 2. 論文標題<br>The extracellular domain of angulin-1 and palmitoylation of its cytoplasmic region are required for angulin-1 assembly at tricellular contacts | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biological Chemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>4289-4302 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1074/jbc.RA119.010491   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yukako Oda, Chisato Takahashi, Shota Harada, Shun Nakamura, Kazumi Kiso, Yoshinori Fujiyoshi, Seiichi Uchida, Yasushi Ishihama, Fumiko Toyoshima |
| 2. 発表標題<br>Discovery of mammalian tissue-derived peptides that induce tight junction formation  |
| 3. 学会等名<br>Joint International Symposium on AMED-CREST Homeostasis & Adaptation/Repair（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

|                                 |                       |               |
|---------------------------------|-----------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>タイトジャンクション形成誘導剤     | 発明者<br>小田裕香子、豊島文子、石濱泰 | 権利者<br>京都大学   |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2019-115248 | 出願年<br>2019年          | 国内・外国の別<br>国内 |

|   |                                       |                         |
|---|---------------------------------------|-------------------------|
| 産業財産権の名称<br>Agent for inducing tight junction formation | 発明者<br>Y Oda, F Toyoshima, Y Ishihama | 権利者<br>Kyoto University |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、PCT/JP2020/024154                     | 出願年<br>2020年                          | 国内・外国の別<br>外国           |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

|                           |                       |    |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関              |  |  |  |
|---------|----------------------|--|--|--|
| ドイツ     | Max Planck Institute |  |  |  |