

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590082

研究課題名（和文）ノックダウンマウスを用いたエズリンの生理機能探索とガン転移における働きの解明

研究課題名（英文）Study on the roles of ezrin on epithelial physiology and cancer metastasis using ezrin knockdown mice.

研究代表者

浅野 真司 (ASANO SHINJI)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：90167891

研究成果の概要（和文）:

アクチン結合タンパク質であるエズリンは、細胞内で膜タンパク質と細胞骨格とを有機的に連結して、上皮細胞の頂端膜や神経組織の形態形成に働く。近年になって、エズリンがホルモンや細胞内シグナルに応答した膜融合や、エンドサイトーシス、エキソサイトーシス、特定の膜輸送タンパク質の細胞表面へのターゲティングに関わることが明らかにされた。本研究プロジェクトでは、エズリン遺伝子を改変したノックダウンマウスなどを用いて、主に動物個体におけるエズリンの上皮組織構築、上皮輸送調節、腫瘍の発生、進展に対する役割を検討した。その結果、エズリンが消化管の組織構築、腎臓におけるリン酸代謝や、ガンの進展に対して重要な役割を果たすことを見出した。

研究成果の概要（英文）:

Ezrin is an actin-binding protein which cross-links between plasma membrane proteins and cytoskeletons. It is essential for morphogenesis of the apical domain of epithelial cells as well as neuronal tissues. Recently, ezrin has been reported to be involved in membrane fusion, endocytosis/exocytosis, and targeting of specific transport proteins to the cell surface under the control of hormones and cellular signals. In this research project, we studied the roles of ezrin in the whole body *in vivo* using “ezrin-knock-down mice”, and especially focused on its roles on epithelial architecture, transport, and tumor development. In conclusion, we found that ezrin is involved in epithelial architecture of GI tract, phosphate re-absorption in kidneys, and tumor development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：エズリン・細胞骨格・遺伝子改変マウス・ガン転移・トランスポーター・上皮組

## 織・神経ネットワーク

### 1. 研究開始当初の背景

アクチン結合タンパク質であるエズリン、ラディキシン、モエシンはERMファミリータンパク質と総称され、原形質膜下のアクチン細胞骨格と膜輸送タンパク質（トランスポーターやイオンチャネルなど）とを有機的に連結し、膜輸送タンパク質の細胞内トラフィッキングや細胞表面での発現を調節する。培養細胞を用いた *in vitro* の実験系では、3つのERMファミリータンパク質の間では代替的、補完的な作用も見られ、その機能的な違いは明らかではなかった。しかしながら、ヒトを含む動物個体に目を転じると、各ERMタンパク質の発現分布は組織や臓器ごとに異なり、それぞれの遺伝子を破壊したノックアウトマウスの形質にも大きな違いが見られた（エズリンについては生後2週間以内で致死、ラディキシン、モエシンについては致死的なダメージはない）。こうしたことから、個体レベル（*in vivo* 条件下）では、3つのERMタンパク質はそれぞれに固有の生理機能を持ち、異なる調節を受けることが考えられた。しかしながら、これらの点を明らかにした研究はなかった。また、エズリン遺伝子を破壊した時に、誕生から2週間の間で死に至るメカニズムや、この間における生死を分けるエズリンの生理的な役割についても明らかではなかった。

また、ガン細胞の悪性度や転移能とエズリンの発現レベルとの間には相関があり、エズリン高発現細胞では悪性度が高く、転移能が上昇することが報告されていたが、エズリンがガンの発生や転移に関わるメカニズムについては十分には知られていなかった。

### 2. 研究の目的

(1) 動物個体におけるエズリンの上皮組織構築、上皮輸送調節における役割の解明を目指した。エズリン遺伝子の改変マウスを用いて、エズリンが高発現する消化管（胃、小腸）や腎臓における上皮組織の構築、トランスポーターの発現、機能調節の変化を解析した。

(2) 動物個体、初代培養細胞系を用いて、胎仔脳の神経繊維のネットワーク形成におけるエズリンの役割の解明を目指した。

(3) 腸内容物の逆流によって惹起される転移性食道ガンにおけるエズリンの発現変化を解析するとともに、エズリンがガンの進展にどのように関わるかを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

エズリン遺伝子のイントロン部分に変異カセットを導入して、エズリンタンパク質の

発現を野生型の10%以下にまで低下させたノックダウンマウス（大阪大学大学院月田早智子教授より受精卵の提供を受けて繁殖させた）を用いて研究を行った。

(1)-1 マウスの消化管上皮に対する影響評価：

エズリンは胃や小腸粘膜に高発現する。エズリンノックダウンマウスの胃粘膜や小腸の組織学的な観察を行い、組織を構成する各種細胞に特異的なマーカータンパク質に対する抗体や特異的な粘液ムチンに対する抗体を用いて組織染色を行った。各組織からRNAを調製し、定量的RT-PCR法を用いて遺伝子発現を解析した。マウス糞便を回収し、含水量やイオン組成を測定した。

(1)-2 マウスの腎臓に対する影響評価：

エズリンは腎臓の近位尿細管に高発現するほか、糸球体にも発現が見られる。エズリンノックダウンマウスの血清や尿を採取して、グルコース含量、尿素窒素含量や、リン酸、カルシウムなどの濃度を測定した。尿中のタンパク質、浸透圧、クレアチニン、尿糖量などを分析した。代謝ケージを用いて摂食量、給水量、排尿、排便量等を確認した。

組織からRNAを調製し、定量的RT-PCR法を用いて遺伝子発現を解析した。組織を粉碎後、遠心分離を行って膜画分を調製して、各トランスポーターに特異的な抗体を用いてタンパク質レベルでの発現を確認した。

(1)-3 マウスの骨に対する影響評価：

エズリンノックダウンマウスの大腿骨を採取し、組織学的な観察を行った。骨密度を定量し、石灰化を確認した。

(2) マウスの神経繊維のネットワーク形成に対する影響評価：

エズリンノックダウンマウスの大脳を採取し、組織学的な観察を行い、脳内における発現分布を確認した。胎仔脳から神経細胞の初代培養を行い、神経繊維の形成（伸長、分岐の具合）や成長円錐の形成を確認した。

(3) 食道ガンの発生や浸潤とエズリンの発現との関連性の評価：

十二指腸内容物の逆流処理によって作製したラットの転移性扁平上皮食道ガンから作製したESCC-DR細胞株の網羅的な遺伝子発現をマイクロアレイ解析で確認した。ESCC-DR細胞株やガン組織におけるエズリンタンパク質の発現をウェスタンブロットや免疫組織染色法で確認した。

### 4. 研究成果

(1)-1 エズリンの消化管上皮組織の構築、上皮輸送に対する働き：

エズリンノックダウンマウスでは、胃酸分泌障害がおり、ガストリン分泌の亢進と対

応して被蓋上皮細胞の過形成が観察された。また、壁細胞や主細胞数の減少をとまなう胃腺の萎縮が観察された。また、胃腺底部にCFTRをする副細胞の過形成が観察された。全体として、前ガン状態に対応するといわれる SPEM (Spasmolytic polypeptide expressing metaplasia), または疑幽門腺化生が観察された。こうした事実から、エズリンは胃粘膜上皮組織の構築や細胞分化に関わることが確認できた。

野生型、ノックダウンマウス(変異体)の胃腺を構成する細胞種の比較

	壁細胞	主細胞	副細胞	その他
野生型	31%	24%	15%	30%
変異体	12%	8%	65%	16%

(1)-2 エズリンの腎臓上皮組織の構築, 上皮輸送に対する働き:

腎臓において, エズリンは近位尿細管, 糸球体に発現するが, エズリンノックダウンマウスの腎臓には大きな変化や損傷は認められなかった。他方, エズリンノックダウンマウスでは, 尿中へのリン酸の漏出や血漿中のリン酸濃度の低下(低リン酸血症)が観察された。これと対応する形で, 近位尿細管に発現してリン酸の再吸収にあたることが知られているリン酸輸送体 NaPi-IIa の刷子縁膜上での発現の低下が観察された。NaPi-IIa は *in vitro* 実験条件下で, 足場タンパク質である NHERF1 を介してエズリンと結合することが知られていることから, エズリンの発現が低下した結果, NaPi-IIa の刷子縁膜上での発現低下が生じ, 近位尿細管でのリン酸の再吸収阻害が生じたものと考えられた。こうした事実から, エズリンは腎近位尿細管での NaPi-IIa の細胞膜表面へのトラフィッキングや安定化に重要な役割を果たし, リン酸代謝に関わることが確認できた。

(1)-3 エズリンの骨形成に対する働き:

エズリンノックダウンマウスでは, 成長障害, 骨格の矮小化, 低リン酸血症, 低カルシウム血症が観察されたため, 大腿骨を採取し, 組織学的な観察や骨密度の定量を行った。その結果, 骨密度の低下や骨石灰化の遅延が観察された。こうした事実から, エズリンはリン酸代謝, カルシウム代謝に対する影響を介して, 骨形成に関わることが確認できた。

(2) エズリンの神経繊維のネットワーク形成に対する働き:

従来は, ERM タンパク質の中ではラディキシン, モエシンが神経細胞で発現し, エズリンはグリア細胞で発現し, 神経細胞での発現は低い, またはないものと考えられてきた。これに対して, 神経細胞における成長円錐の形成段階の特定時期に, エズリンが一過性に発現することを確認した。また, ノックダウ

ンマウスでは, 神経繊維の分岐の阻害や, 成長円錐のサイズの縮小が確認できた。こうした事実から, エズリンは胎生期に時間依存的に神経細胞のネットワーク形成に働くことが考えられた。

(3) 食道ガンの発生に伴うエズリン遺伝子の変化と過剰発現:

胃腸の内容物の逆流は, 飲酒や喫煙と並んで食道ガンの発生リスク, 発生原因となることが知られている。十二指腸内容物の逆流処理によって作製したラットの扁平上皮食道ガン由来の細胞株 ESCC-DR の遺伝子発現をアレイ解析で検討したところ, エズリン遺伝子の増幅が確認された。また, 本細胞株では, ラットの肺, 食道の正常組織と比較して著明なエズリンタンパク質の発現上昇が確認できた。また, エズリンを含むリン酸化を受けた ERM タンパク質の発現が leading edge に確認された。以上の結果から, エズリンの発現やリン酸化による活性化が扁平上皮食道ガンの発生, 浸潤, 転移に関わることが示唆された。

## 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8件)

(1) Hatano, R., Onoe, K., Obara, M., Matsubara, M., Kanai, Y., Muto, S. and Asano, S. Sex hormones induce gender-related difference in renal expression of a novel prostaglandin transporter, OAT-PG, influencing basal PGE<sub>2</sub> concentration. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **302**: F342-F349, 2012. (査読あり)

(2) Matsumoto Y., Murakami, H., Hattori N., Yoshimoto, K., Asano, S. and Inden M. Excessive expression of hippocampal ezrin is induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Biol. Pharm. Bull.* **34**: 1753-1758, 2011. (査読あり)

(3) Yamamoto, H., Mukaisho, K., Sugihara, H., Hattori, T., and Asano, S.: Down-regulation of FXRD3 is induced by transforming growth factor-β signaling via ZEB1/δEF1 in human mammary epithelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **34**: 324-329, 2011. (査読あり)

(4) 浅野真司: 胃壁細胞における胃酸分泌の分子基盤. 膜(Membrane) **36**, 278-285, 2011. (査読なし)

(5) Shiraya, K., Hirata, T., Hatano, R., Nagamori, S., Wiriyasermkul, P., Jutabha, P., Matsubara, M., Muto, S., Tanaka, H., Asano, S., Anzai, N., Endou, H., Yamada, A., Sakurai, H. and Kanai, Y. A novel

transporter of SLC22 family specifically transports prostaglandins and co-localizes with 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in renal proximal tubules. *J. Biol. Chem.* **285** (29): 22141-22151, 2010. (査読あり)

(6) Ling, Z-Q., Mukaisho, K., Yamamoto, H., Chen, K.-H., Asano, S., Araki, Y., Sugihara, H., Mao, W.-M., Hattori, T.: Initiation of malignancy by duodenal contents reflux and the role of ezrin in developing esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* **101**: 624-630, 2010. (査読あり)

(7) 浅野真司:ERM タンパク質による膜輸送タンパク質の機能制御,膜(Membrane) **35**, 278-284, 2010. (査読なし)

(8) Yamamoto, H., Okumura, K., Toshima, S., Mukaisho, K., Sugihara, H., Hattori, T., Kato, M. and Asano, S.: FXYD3 protein involved in tumor cell proliferation is overproduced in human breast cancer tissues. *Biol. Pharm. Bull.* **32**: 1148-1154, 2009. (査読あり)

[学会発表](計 26 件)

(1) 波多野亮, 藤井詠子, 田村淳, 月田早智子, 向所賢一, 服部隆則, 浅野真司:アクチン結合タンパク質エズリンの腎リン酸吸収に対する働き:日本薬学会第 132 年会, 2012.3.29, 北海道大学(北海道)

(2) 松本洋亮, 位田雅俊, 村上博紀, 服部尚樹, 浅野真司:6-OHDA 投与マウスにおける空間認知障害への ERM タンパク質の関連性:日本薬学会第 132 年会, 2012.3.29, 北海道大学(北海道)

(3) 浅野真司, 波多野亮, 田村淳, 月田早智子, 瀬川博子, 宮本賢一:アクチン結合タンパク質エズリンのリン酸代謝に対する働き:第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2011.11.24, 岡山大学(岡山県)

(4) 浅野真司, 波多野亮, 田村淳, 月田早智子, 向所賢一, 服部隆則:アクチン結合タンパク質エズリンの上皮輸送、組織構築に対する働き:2011 年度生理学研究所研究会「上皮細胞の恒常性維持機構におけるイオン・物質輸送の新しい分子生理」, 2011.11.21, 生理学研究所(愛知県)

(5) Matsumoto Y., Murakami H., Inden M., Hattori N., Yoshimoto K., Asano S.: Intraatrial injection of 6-hydroxydopamine causes excessive expression of ezrin in hippocampus in mice.: Neuroscience 2011, 2011.11.13, Washington, DC (USA)

(6) Hatano R., Tamura A., Segawa H., Miyamoto K., Tsukita S., Asano S.: Ezrin is Essential for the Phosphate Reabsorption

in the Renal Proximal Tubule. Kidney Week 2011, 2011.11.12 Philadelphia (USA)

(7) 安倍真美, 波多野亮, 田村淳, 月田早智子, 向所賢一, 服部隆則, 浅野真司:腎尿細管でのリン酸再吸収におけるアクチン結合タンパク質エズリンの働き:エズリン遺伝子改変マウスに見られるリン酸代謝異常:第 61 回日本薬学会近畿支部大会, 2011.10.22, 神戸学院大学(兵庫県)

(8) 波多野亮, 田村淳, 瀬川博子, 松原光伸, 宮本賢一, 月田早智子, 浅野真司:腎リン酸再吸収における ezrin の生理的役割について:第 84 回日本生化学会大会, 2011.9.23, 京都国際会館(京都府)

(9) 浅野真司, 青木浩太郎, 波多野亮, 田村淳, 月田早智子, 向所賢一, 杉原洋行, 服部隆則:アクチン結合タンパク質エズリンの小腸の組織構築、上皮輸送に対する働きの検討:第 84 回日本生化学会大会, 2011.9.22, 京都国際会館(京都府)

(10) Asano S.: The roles of an actin-binding protein, ezrin, in the epithelial transport and architecture. International Joint Meeting of Cellular and Molecular Physiology in Epithelia. 2011.7.31, 北里大学(東京都)

(11) 青木浩太郎, 小早川友香, 波多野亮, 鉄井崇仁, 田村淳, 月田早智子, 向所賢一, 服部隆則, 浅野真司:足場タンパク質エズリンの小腸の組織構築、上皮輸送に対する働き:日本薬学会第 131 年会, 2011.3.31, 静岡ツインメッセ(静岡県)

(12) 波多野亮, 藤井詠子, 安倍真美, 田村淳, 月田早智子, 瀬川博子, 松原光伸, 浅野真司:Ezrin の腎リン酸再吸収における生理的役割:日本薬学会第 131 年会, 2011.3.30, 静岡ツインメッセ(静岡県)

(13) 松本洋亮, 位田雅俊, 服部尚樹, 向所賢一, 服部隆則, 田村淳, 月田早智子, 浅野真司:エズリンノックダウンマウス大脳皮質における免疫組織学的解析:日本薬学会第 131 年会, 2011.3.30, 静岡ツインメッセ(静岡県)

(14) 浅野真司:アクチン結合タンパク質エズリンの上皮機能構築における役割:日本薬学会第 131 年会, 2011.3.29, 静岡ツインメッセ(静岡県)

(15) Asano S., Kobayakawa Y., Tetsui T., Tamura A., Tsukita S., Mukaisho K., Hattori T.: Ezrin is involved in the development of gastric epithelial cells and the architecture of gastric epithelia. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会(BMB 2010), 2010.12.7, 神戸ポートピアホテル(兵庫県)

(16) 小早川友香, 鉄井崇仁, 田村淳, 月田早智子, 服部隆則, 向所賢一, 浅野真司:胃粘膜の構築におけるエズリンの機能の検討:第 32

回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム，  
2010.11.30，富山国際会議場（富山県）

(17) 波多野亮，藤井詠子，安倍真美，松原光伸，月田早智子，浅野真司：Ezrin ノックダウンマウスにおける腎リン酸輸送異常と腎機能障害の解析：第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム，2010.11.30，富山国際会議場（富山県）

(18) 小早川友香，鉄井崇仁，月田早智子，田村淳，服部隆則，向所賢一，浅野真司：胃粘膜構築におけるエズリンの機能の検討，第 60 回日本薬学会近畿支部大会，2010.10.30，摂南大学（大阪府）

(19) 松本洋亮，位田雅俊，向所賢一，服部隆則，田村淳，月田早智子，浅野真司：エズリンノックダウンマウスの大脳皮質の形態学的解析，第 60 回日本薬学会近畿支部大会，2010.10.30，摂南大学（大阪府）

(20) 青木浩太郎，小早川友香，波多野亮，鉄井崇仁，田村淳，月田早智子，向所賢一，服部隆則，浅野真司：足場タンパク質エズリンの小腸の組織構築、上皮輸送に対する働き，第 60 回日本薬学会近畿支部大会 2010.10.30，摂南大学（大阪府）

(21) 小早川友香，鉄井崇仁，月田早智子，田村淳，服部隆則，向所賢一，浅野真司：胃粘膜の構築におけるエズリンの機能の検討：第 9 回ファーマ・バイオフォーラム 2010，2010.10.2，京都大学（京都府）

(22) Asano S., Tetsui T., Kobayamawa Y., Tamura A., Tsukita S., Mukaisho K. and Hattori T.: Effect of ezrin knockdown on the architecture of gastric mucosa. EB2010 2010.4.27, Anaheim, USA

(23) 小早川友香，鉄井崇仁，月田早智子，田村淳，服部隆則，向所賢一，浅野真司：胃粘膜形成におけるエズリンノックダウンの影響：日本薬学会第 130 年会，2010.3.30，桃太郎アリーナ（岡山県）

(24) Tetsui T., Kobayakawa Y., Tamura A., Tsukita S., Mukaisho K., Hattori T., Asano S.: Effects of Ezrin Knockdown on the Architecture of Gastric Epithelia and on the Expression of Transporters Involved in Gastric Acid Secretion. 第 31 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム，2009.12.1，大阪大学（大阪府）

(25) 鉄井崇仁，小早川友香，田村淳，月田早智子，服部隆則，向所賢一，浅野真司：遺伝子改変マウスを用いたエズリンの胃粘膜形成に対する効果の検討：第 59 回日本薬学会近畿支部大会，2009.10.24，近畿大学（大阪府）

(26) 向所賢一，山本裕人，浅野真司，荒木克夫，杉原洋行，服部隆則：食道扁平上皮癌発生における十二指腸液逆流のイニシエーション作用とエズリンの役割：第 68 回日本癌学会学術総会，2009.10.3，横浜パシフィコ（神

奈川県）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅野 真司 (ASANO SHINJI)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：90167891

### (2) 研究分担者

向所 賢一 (MUKAISHO KENICHI)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50343223

位田 雅俊 (INDEN MASATOSHI)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：70512424

波多野 亮 (HATANO RYO)

立命館大学・薬学部・助手

研究者番号：60521713