

令和 6 年 9 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02698

研究課題名(和文) 上皮細胞と肝細胞における細胞極性化・再極性化の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism for polarization and repolarization of epithelial cells and hepatocytes

研究代表者

住本 英樹 (Sumimoto, Hideki)

九州大学・先端医療オープンイノベーションセンター・特任教授

研究者番号：30179303

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)：「上皮細胞の再極性化」においては、細胞極性喪失時に生成された「細胞内 apical 膜凝集体」に由来する顆粒が exocytosis され apical 膜が再形成されることを示し、この過程には Cdc42 が中心的な役割を担うことを明らかにした。さらに Par3 は、「claudin のオリゴマー化」を阻害する新規膜タンパク質 TMEM25 を抑制することで、「TJ 形成」および「上皮細胞の再極性化」を促進することを明らかにした。また、肝細胞の細胞極性形成には、TJ タンパク質 Par3 および apical 膜に形成される「Cdc42-Par6-aPKC 複合体」が必要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性腎傷害等の組織傷害時には上皮細胞の極性が失われ、再生時には上皮細胞は再極性化することが知られている。また、がん細胞(がん細胞は上皮細胞由来)は転移する時に極性を失い、転移した場所では再び極性化すると考えられている。本研究は、上皮細胞の再極性化の分子機構の一端を明らかにしたものであり、その成果は、急性腎傷害等の病態の理解、がん細胞の転移機構の解明において、さらには新たな治療法を開発する上でも大きく貢献すると期待される。また本研究は、肝細胞の機能に必須である細胞極性形成の分子機構も明らかにしており、その成果は、肝臓における種々の病態の理解を深める上で有用だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have shown that re-establishment of epithelial cell polarity (apico-basal polarity) involves exocytosis of vesicles derived from the intracellular apical component that is formed during a loss of cell polarity: Cdc42 plays a central role in the exocytosis. We have also clarified that Par3 promotes re-formation of tight junction and subsequent re-establishment of epithelial cell polarity by suppressing TMEM25, a novel membrane protein that inhibits claudin oligomerization. Furthermore, the present study has shown that hepatocytes require the TJ protein Par3 and the Cdc42-Par6-aPKC complex formed on the apical membrane to establish cell polarity.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：細胞極性 上皮細胞 肝細胞

## 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞が正しく機能するためには、細胞膜がタイトジャンクション (tight junction, TJ) によって、管腔側に面した「apical 膜」と細胞間および基底側に面した「basolateral 膜」とに分けられた『細胞極性』(apico-basal polarity) が形成される必要がある。上皮細胞の極性形成は、また、「上皮間葉転換 (EMT)」あるいは「がん化などによる上皮細胞の極性喪失」からも分るように、発生・分化などにおいても極めて重要な現象である。また、例えば、腎臓への血流量が低下しておこる急性腎傷害時などでは、尿管上皮細胞は一時的に極性を失うが、血流が再開すると上皮細胞は再極性化することが知られている。また、最近の知見に従えば、がん細胞の転移時における変化は、EMT がおこるといよりも、もっと動的・可逆的なものであり、「がん細胞は、非極性化して転移し、転移部位で再極性化する」と考えられるようになった。

上皮細胞の細胞極性が失われると、まず apical 膜が消失し、細胞膜は全体に basolateral 膜類似の性質を持つようになる。この極性を失った上皮細胞の細胞内には直径 1~数  $\mu\text{m}$  の「細胞内 apical 膜凝集体」が出現する。再極性化においては「細胞内 apical 膜凝集体」から apical 膜が再形成されるが、そのための分子機構は解っていなかった。同様に apical 膜に由来すると考えられる構造物が、 $\text{Ca}^{2+}$ 除去後に現れ  $\text{Ca}^{2+}$ 再添加後数時間で消失することは、1987年に米国の Rodriguez-Boulton のグループにより報告されていた (Vega-Salas et al. *J. Cell Biol.*, 1987)。Rodriguez-Boulton らは、この構造物が中心部に vacuole をもつことから VAC (vacuolar apical compartment) と命名し、VAC は apical 膜の再形成に重要であると考えられたが、分子レベルの解析は余りなされないままに VAC は世界的にも殆んど忘れられていた。

また、上皮細胞の再極性化時の apical 膜の再構成には、同時に tight junction (TJ) が再構成されることが必要である。TJ 形成には「claudin (TJ の膜タンパク質) の assembly」すなわち「claudin のオリゴマー化」が必須であるが、驚いたことに、「claudin のオリゴマー化」がどのように調節されているのかについては、殆ど研究がなされていなかった。

一方、肝細胞 (hepatocyte) も上皮細胞様の細胞極性を示し、隣の細胞との間に apical 膜に囲まれた毛細胆管を形成するが、この肝細胞における極性形成の分子機構については、意外なことに殆ど手を付けられていなかった。その理由の一つは、上皮細胞における MDCK 細胞のように、細胞極性の解析に適した培養細胞系がないことによると考えられた。

## 2. 研究の目的

組織傷害時などでは上皮細胞の極性が失われ、再生時には上皮細胞は再極性化することが知られている。また、がん細胞 (がん細胞は上皮細胞に由来する) は転移する時に極性を失い、転移した場所ではがん細胞は再び極性化することと考えられている。極性を失う過程では、apical 膜は全体が細胞内に取り込まれて「細胞内 apical 膜凝集体」が形成され、再極性化においては「細胞内 apical 膜凝集体」をもとに apical 膜が再形成されるが、そのための分子機構は殆ど解っていなかった。また上皮細胞の再極性化には TJ 再形成が必要であり、TJ 形成には「claudin のオリゴマー化」が必須である。つまり、『上皮細胞の再極性化』には「claudin のオリゴマー化」すなわち「claudin のオリゴマー化」が必要なのであるが、そもそも「claudin のオリゴマー化」の調節分子・調節機構一般が殆んど分かっていなかった。また、肝細胞も上皮細胞に類似した細胞極性を示し、隣の細胞との間に apical 膜に囲まれた毛細胆管を形成するが、肝細胞における極性形成の分子機構も殆ど解っていなかった。本研究では、「細胞内 apical 膜凝集体」

と「claudin のオリゴマー化」に注目して『上皮細胞の再極性化の分子機構』を明らかにすること、および、肝細胞の極性解析に適した培養系を構築して『肝細胞の極性形成の分子機構』を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 上皮細胞の再極性化の分子機構：一度極性を得た培養上皮細胞（イヌ腎尿細管由来 MDCK 上皮細胞やヒト大腸癌由来 Caco-2 上皮細胞など）を、「Ca<sup>2+</sup> switch 法」と「ATP switch 法」により細胞極性を失わせた後で再極性化させ、この過程を共焦点レーザー顕微鏡、超解像顕微鏡 (SIM)、あるいは live imaging 法などを用いて解析した。「Ca<sup>2+</sup> switch 法」は、培養上皮細胞が一度 TJ を形成した後で、通常の培地を低 Ca<sup>2+</sup>濃度培地に交換すると細胞接着が阻害されて細胞極性を失われるが、極性を失った上皮細胞に改めて Ca<sup>2+</sup>を添加すると再極性化がおり再び「apico-basal polarity」が形成されることを利用した方法である。一方、「ATP switch 法」は、解糖系と TCA 回路をとともに阻害して上皮細胞内の ATP 濃度を低下させると、細胞極性が可逆的に失われることを利用した方法である。また、上皮細胞に発現しているタンパク質を knock-down するには siRNA を用いた RNA 干渉法を、knock-out するには CRISPR-Cas9 法を用いた。さらに、関連するタンパク質の相互作用については、「IP (immuno-precipitation)-IB (immuno-blot) 法」、「GST pull-down 法」、「PLA (proximity ligation assay) 法」などを駆使して解析した。

(2) 肝細胞の極性形成の分子機構：ヒト肝臓がん由来 HepG2 細胞を、本研究により確立した「Matrigel を用いた 3 次元培養系」で培養し、共焦点レーザー顕微鏡さらには超解像顕微鏡 (SIM) を用いて、TJ タンパク質 Par3、apical 膜タンパク質複合体 (Cdc42-Par6-aPKC 複合体)、および basolateral 膜タンパク質 Lgl などのタンパク質の肝細胞の細胞極性形成における役割について解析を行った。さらに、マウス肝臓から調製した初代培養肝細胞の「collagen sandwich 培養系」を用いて、肝細胞における極性形成（管腔形成）から毛細胆管ネットワーク形成過程を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 上皮細胞の再極性化の分子機構：

本研究ではまず、通常認められる「細胞内 apical 膜凝集体」は「小胞 (vesicle) の集まり」であり「vacuolar」な構造は殆んど持たず、従来から知られていた VAC とは同じものではないことを示した（ただし、「細胞内 apical 膜凝集体」は条件により VAC に変化し、この変化は可逆的である）。さらに、「細胞内 apical 膜凝集体」は、apical 膜由来の細胞内顆粒と低分子量 G タンパク質 Rab11a をもつ顆粒の 2 種類の顆粒の集合体であること、細胞の再極性化時にはこの「細胞内 apical 膜凝集体」から新たな apical 膜由来顆粒が形成され『apical 膜が再構成される場所』へと exocytosis されること、この exocytosis の過程には低分子量 G タンパク質の 1 つである Cdc42 が中心的な役割を担うことを明らかにした。

一方、上皮細胞の再極性化時の apical 膜の再構成には、同時に tight junction (TJ) が再構成されることが必要である。TJ 形成には「claudin のオリゴマー化」が必須であるが、「claudin のオリゴマー化」がどのように調節されているのかについては今まで不明だった。本研究では、TJ 形成の制御因子として知られている Par3 に結合する新規タンパク質として TMEM25 を同定し、TMEM25 が TJ に局在する Ig ファミリー I 型の膜タンパク質であること、TMEM25 が「claudin のオリゴマー化」を阻害することで TJ 形成を負に調節していることを明らかにした。さらに Par3 は、TMEM25 に結合して TMEM25 を抑制することで、「claudin のオリゴマー化」さらに「TJ 形成」

を促進することを示した。以上のように本研究では、Cdc42 と Par3 が協調して働くことで上皮細胞の再極性化が行われることを明らかにし、その詳細な分子機構を解明した。

さらに本研究により、上皮細胞の極性が失われた時には「細胞内 apical 膜凝集体」に加えて、basolateral 膜タンパク質の一部により「細胞内 basolateral 膜由来凝集体」が形成されることを見いだした。この「細胞内 basolateral 膜由来凝集体」には 3 量体 G タンパク質共役型受容体 GPR125 が含まれること、その basolateral 膜への輸送にはアダプタータンパク質である Dlg1 が必要であること等も明らかにした。

## (2) 肝細胞の極性形成の分子機構

肝細胞の極性形成機構の解明のために、本研究ではまず、ヒト肝臓がん由来 HepG2 細胞の Matrigel を用いた 3 次元培養系を確立した。この系を用いて、肝細胞の極性形成には、TJ タンパク質 Par3 および apical 膜に形成される「Cdc42-Par6-aPKC 複合体」が必要であること、極性形成では、まず Par3 が、続いて Cdc42 が細胞間接着部位に輸送されること、さらに Par6-aPKC は Par3 と Cdc42 の両者に依存して輸送されること、などを明らかにした。これらのタンパク質の肝細胞の細胞極性形成における役割については、本研究以前には全く報告がなされていなかった。さらに、肝細胞の極性形成後の分子機構については、aPKC が毛細胆管ネットワーク形成に必要であることも示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sakurai, T., Kamakura, S., Hayase, J., Kohda, A., Nakamura, M., Sumimoto, H.	4. 巻 298
2. 論文標題 GPR125 (ADGRA3) is an autocleavable adhesion GPCR that traffics with Dlg1 to the basolateral membrane and regulates epithelial apicobasal polarity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102475	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 Tocan, V., Hayase, J., Kamakura, S., Kohda, A., Ohga, S., Kohjima, M., Sumimoto, H.	4. 巻 297
2. 論文標題 Hepatocyte polarity establishment and apical lumen formation are organized by Par3, Cdc42, and aPKC in conjunction with Lgl	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101354	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 Kamakura Sachiko, Hayase Junya, Kohda Akira, Iwakiri Yuko, Chishiki Kanako, Izaki Tomoko, Sumimoto Hideki	4. 巻 25
2. 論文標題 TMEM25 is a Par3-binding protein that attenuates claudin assembly during tight junction development	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 EMBO Reports	6. 最初と最後の頁 144 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s44319-023-00018-0	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 Matsunaga Shogo, Kohda Akira, Kamakura Sachiko, Hayase Junya, Miyano Kei, Shiose Akira, Sumimoto Hideki	4. 巻 29
2. 論文標題 Hypoxia stabilizes the H2O2 producing oxidase Nox4 in cardiomyocytes via suppressing autophagy related lysosomal degradation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 63 ~ 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13085	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 Boussaty Ely Cheikh, Ninoyu Yuzuru, Andrade Leonardo R., Li Qingzhong, Takeya Ryu, Sumimoto Hideki, Ohyama Takahiro, Wahlin Karl J., Manor Uri, Friedman Rick A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Altered Fhod3 expression involved in progressive high-frequency hearing loss via dysregulation of actin polymerization stoichiometry in the cuticular plate	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1011211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1011211	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

[学会発表] 計4件(うち招待講演 4件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 住本 英樹
2. 発表標題 特別講演: 消化管での生体防御・炎症と活性酸素生成酵素 NOX/DUOX
3. 学会等名 第58回日本消化管免疫学会総会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 住本 英樹
2. 発表標題 NADPH オキシダーゼ (NOX) の構造と機能: 食細胞の酵素から全身の調節分子へ
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鎌倉 幸子、住本 英樹
2. 発表標題 細胞極性制御因子によるtight junction形成の制御機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神田 朗、住本 英樹
2. 発表標題 上皮細胞におけるNoxファミリーの局在制御の分子メカニズム
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Sumimoto, H., Kohda, A., Hayase, J., Kamakura, S.	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer International Publishing	5. 総ページ数 608
3. 書名 NADPH Oxidases Revisited: From Function to Structure	

1. 著者名 住本 英樹，神田 朗，鎌倉 幸子	4. 発行年 2024年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 532
3. 書名 酸化ストレスの医学 改訂第3版	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------