

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790390

研究課題名(和文) 幹細胞の上皮分化過程におけるクローディン - 6 シグナルの機能

研究課題名(英文) The function of Cldn6 signaling during the differentiation from stem cells to epithelial cells

研究代表者

富川 直樹 (Tomikawa, Naoki)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80468587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：マウスF9幹細胞やマウスES細胞において、クローディン - 6 は他のタイト結合分子の発現を誘導し、成熟した上皮細胞へ分化誘導することが分かった。また、クローディン - 6 の細胞間接着部位への局在、クローディン - 6 の2番目の細胞外ドメインとC末端細胞質内ドメインの前半部分、特に196番目と200番目のチロシン残基が、上皮分化誘導能に重要であることを明らかにした。更に、クローディン - 6 は、SFKsと相互作用し、196番目と200番目のチロシン残基がリン酸化されることで、上皮分化誘導シグナルを惹起していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We hypothesize that claudin-6 (Cldn6), tight junction protein, function as the coordinator in the differentiation from stem cells to epithelial cells. In mouse F9 stem cell lines and embryonic stem cells, the expression of Cldn6 increased other tight junction protein and induced the differentiation to mature epithelial cells. Moreover, the localization of Cldn6 to cell-cell adhesion, second extracellular domain of Cldn6, and 196 and 200 tyrosine residues in C-terminal intracellular domain of Cldn6 were essential for Cldn6-induced epithelial differentiation. In addition, Cldn6 interacted with src-family kinases (SFKs), and then activated SFKs phosphorylated 196 and 200 tyrosine residues in Cldn6. These results indicate that Cldn6 and SFKs cooperatively induced the signaling for epithelial differentiation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：再生医学 幹細胞 上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は全ての細胞の供給源となり、組織・臓器の形成・維持・修復を可能としている。上皮細胞では、タイト結合・アドヘレンス結合・デスモソームからなる細胞間接着装置がよく発達しており、高度の細胞極性を有する組織構築がみられ、これによって上皮は異なる内部環境を持つ生体コンパートメントを隔て、病原体や異物の侵入を防ぐとともに、方向性のある物質交換を行う。したがって、幹細胞が上皮細胞に分化するためには、細胞接着や細胞極性を獲得する必要がある。しかし、幹細胞を効率よく上皮細胞に誘導する方法や、その分子メカニズムについては、未だ不明な点が多い。

申請者所属研究室では、細胞間接着装置タイト結合の膜貫通分子であるオクルディンやクロードインファミリーについて、各種cDNAの単離や特異抗体の作製を進め、上皮細胞における発現や機能、制御機構との関連を明らかにしてきた (Kubota et al., *Exp Cell Res*, 2001; Chiba et al., *Exp Cell Res*, 2003; Satohisa et al., *Exp Cell Res*, 2005; Chiba et al., *J Cell Biol*, 2006; Chiba et al., *Sci STKE*, 2006; Fujita et al., *Mol Biol Cell*, 2008)。この過程において、タイト結合膜貫通分子クロードイン 6 が、幹細胞の上皮分化過程で発現が著しく誘導されることを発見し、クロードイン-6が上皮分化過程において、機能していることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、タイト結合膜貫通分子であるクロードイン-6とsrc-family kinases (SFKs)に着目して研究を進め、幹細胞の上皮分化誘導において、クロードイン-6シグナルという新たな分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

マウスF9幹細胞株、マウスES細胞にクロードイン-6を過剰発現させた細胞株や、クロードイン-6の各ドメインの欠損体、チロシン残基のアラニン置換体を発現するF9幹細胞株を樹立した。これらの細胞において、上皮分化の有無を位相差顕微鏡、電子顕微鏡によって観察した。また、タイト結合分子や極性関連分子、微絨毛構成分子の発現をウェスタンブロット法やRT-PCR法にて、局在については蛍光免疫染色法にて解析

した。食中毒菌 *Clostridium perfringens* の腸毒素 (CPE) の C 末ペプチドは、発現プラスミドを大腸菌にトランスフェクションし、作製した。また、クロードイン-6とSFKsとの相互作用は、免疫沈降法やPLAアッセイにて検証した。

4. 研究成果

クロードイン-6をマウスF9幹細胞やマウスES細胞に発現させた結果、クロードイン-6は他のタイト結合分子の発現を誘導し、成熟した上皮細胞へ分化誘導することが分かった。また、クロードイン-6を細胞間接着部位から除外出来る食中毒菌 *Clostridium perfringens* の腸毒素 (CPE) の C 末ペプチドを作製した結果、クロードイン-6の細胞間接着部位への局在が、上皮分化誘導に重要であることが示唆された。

次に、クロードイン-6の様々な変異体を発現するF9幹細胞株を樹立し、解析を行った結果、クロードイン-6の2番目の細胞外ドメインとC末端細胞質内ドメインの前半部分、更に196番目と200番目のチロシン残基が、上皮分化誘導能に重要であることを明らかにした。

更に、SFKsの阻害剤の添加によって、クロードイン-6の上皮分化が顕著に抑制されることや、活性化SFKsはクロードイン-6と相互作用すること、上皮分化を誘導できないクロードイン-6変異体では、活性化SFKsとの相互作用が減少することを明らかにした。これらの成果から、クロードイン-6は、SFKsと相互作用し、196番目と200番目のチロシン残基がリン酸化されることで、上皮分化誘導シグナルを惹起してい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5件)

1. Ning L, Kurihara H, Vega S, Ichikawa-Tomikawa N, Xu Z, Nonaka R, Kazuno S, Yamada Y, Miner JH, Arikawa-Hirasawa E. Laminin α 1 regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial

matrix accumulation through the TGFβ pathway. **Am J Pathol. In press**

2. Sugimoto K*, Ichikawa-Tomikawa N*, Satohisa S, Akashi Y, Kanai R, Saito T, Sawada N, Chiba H. The Tight-Junction Protein Claudin-6 Induces Epithelial Differentiation from Mouse F9 and Embryonic Stem Cells. **PLoS One. 2013. 8 (10):e75106**
*: equal contribution to this paper.
3. Nakazawa N, Miyahara K, Okawada M, Yamataka A, Suzuki R, Akazawa C, Ichikawa-Tomikawa N, Arikawa-Hirasawa E. Laminin-1 promotes enteric nervous system development in mouse embryo. **Pediatric Surgery International. 2013. 29 (11):1205-8**
4. Kaneko H, Ishijima M, Furami I, Ichikawa-Tomikawa N, Kosaki K, Sadatsuki R, Yamada Y, Kurosawa H, Kaneko K, and Arikawa-Hirasawa E. Synovial prelecan is required for osteophyte formation in knee osteoarthritis **Matrix Biology.2013. 32:178-87**
5. Futami I, Ishijima M, Kaneko H, Tsuji K, Ichikawa-Tomikawa N, Sadatsuki R, Muneta T, Arikawa-Hirasawa E, Sekiya I, and Kaneko K. Isolation and characterization of multi-potential mesenchymal cells from the mouse synovium. **PLoS One. 2012. 7(9):e45517**

[学会発表](計4件)

1. Naoki Tomikawa, Kotaro Sugimoto, Hideki Chiba. Claudin-6-mediated cell adhesion induces intracellular signaling for epithelial morphogenesis in mouse F9 and embryonic stem cells
第65回日本細胞生物学会大会、名古屋、6月19日-21日、2013年シンポジウム

2. 富川直樹、杉本幸太郎、金居李紗、田中瑞子、杉野隆、千葉英樹
クローディン-6による幹細胞の新規上皮分化誘導機構
第102回日本病理学会総会、札幌、6月6-8日、2013. ワークショップ
3. Naoki Tomikawa-Ichikawa, Kotaro Sugimoto, Risa Kanai, Hideki Chiba. Src family kinase involves in the differentiation of stem cells to epithelial cells.
International Tight Junction Conference. 1th - 4st November 2012, Merida. Mexico. Oral presentation.
4. 富川-市川直樹、杉本幸太郎、金居李紗、田中瑞子、杉野隆、千葉英樹
クローディン-6によるF9幹細胞の上皮分化へのsrc family kinaseの関与
第101回日本病理学会総会、東京、4月26-28日、2012
ポスター発表

[図書](計2件)

1. 富川直樹、千葉英樹
蛍光ダイレクトラベリングによる生細胞蛍光イメージング
Surgery Frontier. 2012. 19 (3). 95-100.
2. 富川直樹、千葉英樹
Stereotaxic injectionの手法と応用
Surgery Frontier. 2012. 19 (4). 69-74.

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ
<http://www.fmu.ac.jp/home/p2/sub3.html>

Facebook
<https://www.facebook.com/pages/福島県立医科大学-基礎病理学講座/212109418952102>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富川直樹 (TOMIKAWA, Naoki)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：80468587

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：