

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460475

研究課題名(和文)タイト結合分子クローディンによる新規上皮分化誘導機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation the mechanism of epithelial differentiation induced by claudin, tight junction protein.

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、マウス胚性幹細胞株やマウス幹細胞(ES細胞)を用いて、細胞間を接着する機能を持つクローディン-6分子が幹細胞の上皮分化を誘導することを明らかにした。また、そのメカニズムとして、クローディン-6は、細胞内シグナル伝達分子であるSrc、Blkと直接的に結合し、活性化させることで、下流分子PI3K、Akt、mTORを介して核内受容体であるレチノイド受容体へとシグナルを伝え、上皮分化に必要な分子の発現を制御することを解明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified that claudin-6, cell-cell adhesion protein, induces the differentiation from stem cells to epithelial cells using mouse embryonic stem cell line and mouse embryonic stem cells. Moreover, we identified the mechanism that claudin-6 activated Src and Blk, a intracellular signaling molecule by directly interaction and subsequently activated PI3K, Akt and mTOR. Claudin-6-induced signaling cascade arrived in retinoid receptor, a nuclear receptor, and regulate the expression of the epithelial differentiation-related molecules.

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮分化 幹細胞 細胞間接着分子

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞の運命は、種々の転写因子、成長因子、小分子、細胞接着によって制御される。申請者の研究室でも、核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子であるレチノイド受容体及び hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) が幹細胞の上皮分化を誘導することを明らかにしている (Chiba et al., *J Cell Biol*, 1997; Chiba et al., *Mol Cell Biol*, 1997; 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., *Biochim Biophys Acta*, 2008; Ichikawa-Tomikawa et al., *J Biomed Biotechnol*, 2011)。しかし、幹細胞の上皮分化誘導機構については、未だ不明な点が多い。

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複合体が発達しており、高度の細胞極性を有する組織構築がみられる。したがって、幹細胞が上皮細胞に分化するためには、細胞間接着や細胞極性を獲得する必要がある。一方、細胞間接着分子が幹細胞の上皮分化に関わるかについては、殆ど分かっていない。

申請者は最近、胎生期上皮組織で最も早期に発現するタイト結合分子クロードイン-6 (Cldn6) に着目し、この単一分子による細胞間接着シグナルがマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) 及び F9 幹細胞の上皮分化を誘導することを発見した (Sugimoto and Tomikawa-Ichikawa et al., *PLoS ONE*, 2013)。また、この新規上皮分化誘導機構について、現在までに、1) クロードインの対合に関わる第 2 細胞外ドメインと、シグナル伝達を担う C 末端細胞内ドメイン、特に C 末前半にある 196 番目と 200 番目のチロシン残基が必要不可欠である、2) 活性化型 Src-family kinases (SFKs) がクロードイン-6 と細胞間接着領域において相互作用し、上皮分化を誘導する、3) クロードイン-6 の上皮分化誘導シグナルは、HNF4 $\alpha$  やレチノイド受容体といった核内受容体とクロストークする、ことを明らかにしている (Tomikawa-Ichikawa et al., in preparation;)。しかし、クロードイン-6 と相互作用する SFK 分子の同定など、この新規上皮分化誘導機構の詳細は不明である。また、他のクロードイン分子の上皮分化誘導の有無や、クロードインによる細胞間接着シグナルがマウス胚や成体幹細胞の上皮分化過程においても機能しているかについては、未解決のままである。

## 2. 研究の目的

本研究では、上皮分化を誘導するクロードインシグナルの全貌を解明し、幹細胞の新規上皮分化誘導機構を提唱することを目的とする。具体的には、クロードイン-6 と相互作用し、上皮分化に機能する SFK 分子の同定、その下流シグナル分子を明らかにする。更には、他クロードイン分子の関与やクロードイン-6 が成体幹細胞においても上皮分化を誘導するかを検討する。

## 3. 研究の方法

恒常的またはコンディショナルにクロードイン-6 を発現する F9 幹細胞 (F9:Cldn6 及び F9 L32T2:Cldn6) を用いて、クロードイン-6 による上皮分化誘導過程における各 SFK 分子の発現発現が認められた SFK 分子に対する抗体を用いて免疫沈降法を行い、抗活性化型 SFK 抗体を用いたウェスタンブロットによって、上皮分化過程で活性化している SFK 分子を同定する。同定された分子について、shRNA ノックダウンやドミナントネガティブ体の発現導入により、クロードイン-6 による上皮分化誘導への関与を明らかにする。更に、上皮分化誘導に関わる SFK 分子とクロードイン-6 について、免疫沈降法やリコンビナントタンパク質の作製により、相互作用を検討する。

次に、細胞間接着シグナルによって活性化されるシグナル分子としては、PI3K-Akt、Rac、aPKC、JNK、JAK などが報告されている。そこで、これら分子の特異的活性化阻害剤が F9:Cldn6 細胞における SFK のリン酸化に及ぼす影響をスクリーニングし、SFK の活性化に関わる分子を同定する。

また、クロードインを F9 幹細胞に発現させ、上皮分化が誘導されるかを検討し、上皮分化誘導機能が認められたクロードインについて、クロードイン-6 と同じメカニズムで上皮分化を誘導しているか解析する。

最後に、マウス腸管上皮の器官培養を用いて、腸組織において発現が認められたクロードイン分子の強制発現や siRNA ノックダウンを行い、腸管幹細胞から腸上皮細胞への分化亢進または減弱を検討する。更に、幹細胞マーカーと上皮マーカー分子の免疫染色を行い、上皮分化の効率と精度などを明確にする。

## 4. 研究成果

まず、恒常的またはコンディショナルにクロードイン-6 を発現する F9 幹細胞 (F9:Cldn6 及び F9 L32T2:Cldn6) を用いて、クロードイン-6 と相互作用して上皮分化を誘導する SFK 分子の同定を行った。その結果、Src、Blk、Hck、Fgr がクロ-

ディン-6 発現とともに、活性化していることが分かった。また、HEK293 細胞にクローディン-6 と各 SFK 分子の遺伝子を導入し、免疫沈降を行ったところ、Src と Blk がクローディン-6 と相互作用することが分かった。更に、GDT 融合 Src と Blk、FLAG tag 融合クローディン-6 C 末端ドメインのリコンビナントタンパクを作製し、GST pull down 法と ELISA 法により検討した結果、Src と Blk はクローディン-6 C 末端ドメインと直接的に結合することが明らかとなった。そこで、CRISPR/Cas9 を用いて Src と Blk をノックアウトした F9:Cldn6 細胞株を樹立したところ、それぞれのノックアウト細胞株では、クローディン-6 による上皮分化誘導が顕著に減少した。

次に、SFK 分子の下流シグナル分子の同定を行った。様々な阻害剤を用いた検討から、PI3K、Akt、mToR が SFK の下流シグナル分子としてクローディン-6 の上皮分化誘導に機能していることが分かった。また、核内受容体であるレチノイド受容体とエストロゲン受容体について検討した結果、クローディン-6 の上皮分化誘導シグナルは核内受容体であるレチノイド受容体とクロストークすることが示唆された。これらの結果から、クローディン-6 は Src、Blk と直接的に結合し、PI3K、Akt、mToR を介して、レチノイド受容体とクロストークし、上皮分化を制御していることが明らかとなった。

最後に、他クローディン分子(くろーで1~8)を F9 幹細胞に発現させ、上皮分化が誘導されるかを検討した。結果として、クローディン-6 と同程度に上皮分化誘導するクローディン分子は認められなかった。

## 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 3 件)

1. Kaneko T\*, Kanno C\*, Ichikawa-Tomikawa N\*, Kashiwagi K, Yaginuma N, Ohkoshi C, Tanaka M, Sugino T, Imura T, Hasegawa H, Chiba H. Liver X receptor reduces proliferation of human oral cancer cells by promoting cholesterol efflux via up-regulation of ABCA1 expression. *Oncotarget*, 6(32): 33345-57, 2015.

2. Tanaka M, Ichikawa-Tomikawa N, Shishito N, Nishiura K, Miura T, Hozumi A, Chiba H, Yoshida S, Ohtake T, Sugino T. Co-expression of S100A14 and S100A16 correlates with a poor prognosis in human breast cancer and promotes cancer cell invasion. *BMC Cancer*, 15:53, 2015.

3. Ning L, Kurihara H, Vega S, Ichikawa-Tomikawa N, Xu Z, Nonaka R, Kazuno S, Yamada Y, Miner JH, Arikawa-Hirasawa E.

Laminin  $\alpha$ 1 regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF $\beta$  pathway.

*Am J Pathol*, 184(6):1683-94, 2014

[学会発表](計 4 件)

1. 富川直樹、西浦継介、井村徹也、佐々木隆子、千葉英樹

統合失調症における血管基底膜分子 Lama1, Lama2 並びに血液脳関門分子 claudin-5 の解析

The analysis of Lama1, Lama2 and CLDN5 in schizophrenia.

第48回日本結合組織学会大会、長崎、6月24日-6月25日、2016、ポスター発表

2. 富川直樹、柏木維人、杉本幸太郎、渡部哲也、千葉英樹

Cldn6 による上皮分化誘導シグナルの全貌解明

Cldn6-induced signaling cascade for epithelial differentiation.

第68回日本細胞生物学会大会、京都、6月15日-6月17日、2016、一般口演

3. 富川直樹(医大)、柏木維人(医大)、田中瑞子(医大)、井村徹也(医大)、杉野隆(静岡がんセンター)、千葉英樹(医大) ヒト口腔扁平上皮癌の担癌マウスにおける LXR アゴニストの抗腫瘍効果

The effect of liver X receptor agonist to xenograft model of human oral squamous epithelial cancer cells.

第105回日本病理学会大会、仙台、5月12日-5月14日、2015、一般口演

4. 富川直樹、柏木維人、杉本幸太郎、千葉英樹

クローディン-6 の上皮分化誘導シグナルには、Src と Blk が機能している。

第104回日本病理学会大会、名古屋、4月30日-5月2日、2015、ポスター発表

5. 富川直樹、柏木維人、杉本幸太郎、千葉英樹

クロードイン-6/Src ファミリーキナーゼシグナルは幹細胞の上皮分化を誘導する

第 87 回日本生化学会大会、京都、10月15-18日、2014、一般口演

6. 富川直樹、柏木維人、杉本幸太郎、渡部哲也、千葉英樹

細胞間接着シグナルとク核内受容体のクロストークによる幹細胞の新規上皮分化機構  
第 66 回日本細胞生物学会大会、奈良、6月11-13日、2014、一般口演

7. 富川直樹、柏木維人、杉本幸太郎、渡部哲也、千葉英樹

クロードイン-6による上皮分化誘導シグナルに關与する src family kinase 分子の同定

第 103 回日本病理学会大会、広島、4月24-26日、2014、一般口演

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：C型肝炎ウイルス(HCV)の感染を阻害する抗体

発明者：富川直樹、千葉英樹、大平弘正、岡井研

権利者：公立大学法人福島県立医科大学

種類：PCT/JP

番号：79955

出願年月日：2016.10.07

国内外の別：国内

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：