

課題番号	LS084
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 24 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	上皮バリア機能を制御する細胞間接着の分子基盤の解明
研究機関・ 部局・職名	神戸大学大学院医学研究科・教授
氏名	古瀬幹夫

1. 当該年度の研究目的

上皮細胞シートのバリア機能を制御する細胞間結合の形成と機能制御のメカニズムの分子基盤を解明するために、前年度に引き続き、以下の研究を行う。1) 3つの細胞が接する点であるトリセルラージャンクション(TCJ)の分子基盤と制御機構を理解するため、TCJ の新規構成分子として我々が同定した LSR、ILDR1、ILDR2、および TCJ の既知分子トリセルリンの機能を培養細胞レベルで解明する。2) 個体レベルで TCJ が上皮バリア機能に果たす役割を解明するために LSR 遺伝子を組織特異的に欠失させたマウスを作製する。3) タイトジャンクションの形成制御機構の研究のモデルとなるショウジョウバエ腸管上皮の細胞間結合スムーズセプテートジャンクションの分子基盤を明らかにする。

2. 研究の実施状況

1) TCJ に局在し、トリセルリンを TCJ にリクルートすることを前年度に見出した LSR の相同分子 ILDR1、ILDR2 が、脊椎動物において進化的に保存されていることを見出し、この3つの TCJ 関連膜タンパク質をアンギュリンファミリー(angulin family)と名付けた。興味深いことに、LSR、ILDR1 は上皮細胞シートのイオン透過に対する強いバリア機能を有するのに対し、ILDR2 はバリア機能に対する寄与がほとんど見られなかった。このことは、アンギュリンファミリーが TCJ において強い上皮バリア機能を果たすメカニズムとして、トリセルリンをリクルートするだけでは不十分であることを意味しており、さらに追求すべき課題となっている。さらに、ヒトの遺伝性難聴DFNB42の原因遺伝子として同定されていた ILDR1 の変異、および遺伝性難聴DFNB49の原因遺伝子であるトリセルリンの変異について、それぞれの変異タンパク質の動態をTCJの観点で解析した結果、ILDR1、トリセルリンの変異分子がいずれも TCJ への局在能に異常が見られることが明らかになった。以上のデータを学術論文として発表した (Higashi et al. 2013)。

2) LSR 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作製している。LSR 遺伝子のホモ欠失マウスが生まれないことを確認した。現在、腸管、皮膚特異的に LSR 遺伝子を欠失させるマウスを作製するための交配を進めている。

3) ショウジョウバエの腸管上皮のバリア機能を担う細胞間結合スムーズセプテートジャンクション(SSJ)を構成する新規膜タンパク質を同定し、Mesh と名付けた。Mesh は細胞接着能を有し、SSJ の形成と腸管バリア機能に必須であることを見出して学術論文として発表した (Izumi et al. 2012)。現在、Mesh の局在を指標とする遺伝学的スクリーニングにより、SSJ 形成に必要な新たな因子群を同定、解析しつつある。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計6件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計3件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Izumi, Y., Yanagihashi, Y., and Furuse, M. (2012). A novel protein complex, Mesh-Ssk, is required for septate junction formation in the Drosophila midgut. <i>J Cell Sci</i> 125: 4923-4933. 2. Matsumoto-Okazaki, Y., Furuse, M., and Kajiya, K. (2012). Claudin-5 haploinsufficiency exacerbates UVB-induced oedema formation by inducing lymphatic vessel leakage. <i>Exp Dermatol</i> 21: 557-559. 3. Higashi, T., Tokuda, S., Kitajiri, S.I., Masuda, S., Nakamura, H., Oda, Y., and Furuse, M. (2013). Analysis of the angulin family consisting of LSR, ILDR1 and ILDR2: tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. <i>J Cell Sci</i>. 136: 966-977 <p>(掲載済み一査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計3件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sugawara, T., Iwamoto, N., Akashi, M., Kojima, T., Hisatsune, J., Sugai, M., and Furuse, M. (2013). Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. <i>J Dermatol Sci</i>. [Epub ahead of print] 2. Kirschner, N., Rosenthal, R., Furuse, M., Moll, I., Fromm, M., and Brandner, J.M. (2013). Contribution of Tight Junction Proteins to Ion, Macromolecule, and Water Barrier in Keratinocytes. <i>J Invest Dermatol</i>. [Epub ahead of print] 3. Nishida, M., Yoshida, M., Nishiumi, S., Furuse, M., and Azuma, T. (2013). Claudin-2 Regulates Colorectal Inflammation via Myosin Light Chain Kinase-Dependent Signaling. <i>Dig Dis Sci</i>. [Epub ahead of print]
<p>会議発表 計11件</p>	<p>専門家向け 計11件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 小田裕香子、大谷哲久、池ノ内順一、古瀬幹夫. Tricellulin regulates epithelial cell shape by controlling actomyosin organization via a Cdc42GEF Tuba. 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会 2012年5月28-31日(神戸) 2. 徳田深作、古瀬幹夫. Regulation of tight junctions and actin cytoskeletons by the osmotic gradient in two different renal cell lines. 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会 2012年5月28-31日(神戸) 3. 東智仁、北尻真一郎、中村一輝、古瀬幹夫. ILDR1 and ILDR2 recruit Tricellulin to tricellular tight junctions. 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会 2012年5月28-31日(神戸) 4. Mikio Furuse, Noriko Iwamoto, Yukako Oda, Tomohito Higashi. The structure of tight junctions in brain endothelial cells. 第35回日本神経科学学会/Nueroscience 2012 シンポジウム「神経血管相互作用」. 2012年9月18-21日(名古屋)招待講演 5. Mikio Furuse. Molecular dissection of smooth septate junctions in the Drosophila midgut. Symposium "Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia" 2012.11.1-4 (Merida, Mexico) 招待講演 6. Tomohito Higashi, Shinsaku Tokuda, Shin-ichiro, Kitajiri, Hiroki Nakamura, Yukako Oda, Mikio Furuse. Analysis of LSR, ILDR1 and ILDR2: Tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. Symposium "Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia" 2012.11.1-4 (Merida, Mexico) 7. Shinsaku Tokuda, Tomohito Higashi, Mikio Furuse. Regulation of tight junctions by the osmotic gradient in two different renal cell lines. Symposium "Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia" 2012.11.1-4 (Merida, Mexico) 8. Noriko Iwamoto, Tomohito Higashi, Mikio Furuse. Evidences of tricellular tight junctions in brain endothelial cells. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Blood Brain Barrier. (Cold Spring Harbor, USA)

様式19 別紙1

	<p>9. Tomohito Higashi, Shinsaku Tokuda, Shin-ichiro, Kitajiri, Hiroki Nakamura, Yukako Oda, Mikio Furuse. Analysis of the angulin family consisting of LSR, ILDR1 and ILDR2: Tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. The 2012 ASCB Annual Meeting. 2012.12.15-19 (San Francisco, USA)</p> <p>10. Mikio Furuse. Tricellular junctions: molecular organization, function and implication in deafness pathogenesis. NIDCD Seminar Series 2012-2013. 2013.3.5 (NIH, Bethesda, USA) 招待講演</p> <p>11. 古瀬幹夫. トリセルラータイトジャンクションの分子構築と上皮バリア機能における役割. 日本薬学会第133年会 シンポジウム「上皮を標的とした創薬研究の新展開」2013年3月28日(横浜) 招待講演</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>http://www.med.kobe-u.ac.jp/cellb</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>NPO が開催する「第 21 回サイエンスカフェ伊丹」に講師として参加し、「からだをつくるもれない細胞シートのはなし」と題して、本研究の背景となる上皮、細胞接着、上皮バリア機能について、一般市民の参加者に話題を提供し、対話を行った。(平成 24 年 11 月 17 日 14-16 時、伊丹市立生涯学習センター) 開催報告: http://cafeitami.web.fc2.com/#121117saibo</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	115,000,000	38,420,000	40,340,000	36,240,000	0
間接経費	34,500,000	11,526,000	12,102,000	10,872,000	0
合計	149,500,000	49,946,000	52,442,000	47,112,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	3,757,997	40,340,000	0	44,097,997	40,785,450	3,312,547	0
間接経費	0	12,102,000	0	12,102,000	12,102,000	0	0
合計	3,757,997	52,442,000	0	56,199,997	52,887,450	3,312,547	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	17,539,207	実験試薬、消耗品器具、実験用マウス等
旅費	898,490	研究打ち合わせに係る旅費
謝金・人件費等	15,219,304	非常勤職員人件費
その他	7,128,449	動物実験施設使用料、英文校正料等
直接経費計	40,785,450	
間接経費計	12,102,000	
合計	52,887,450	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
Milli-Q 水製造装置 メルク株式会社製	Milli-Q Advantage本体 1台 他2件	1	1,068,243	1,068,243	2012/9/20	神戸大学
JEM-1011後付け デジタルCCDカメラ ユニット	独国OLYMPUS SOFT IMAGING SOLUTIONS社製	1	6,090,000	6,090,000	2013/2/28	神戸大学
				0		