

**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25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

上皮細胞シートの十分なバリア機能に必要と考えられている細胞間接着構造トリセルラージャンクション(TCJ)の構成分子の解析を通じて TCJ の役割とその分子基盤を明らかにするため、平成 25 年度は以下の目的で研究を行った。1)TCJ 形成の分子機構の解明:TCJ 構成分子 LSR の TCJ 局在化機構を翻訳後修飾の観点から明らかにする。また LSR 結合分子の動態を解析する。2)個体における TCJ の機能の解明:LSR 遺伝子腸管上皮特異的欠失マウスを作出し、その表現型を解析する。LSR の相同分子 ILDR1 の遺伝子欠失マウスの表現型を解析する。3)遊走性血球細胞の上皮細胞シート透過に伴う細胞間接着構造の動態の解明:タイトジャンクション(TJ)、TCJ の構成分子の蛍光標識タンパク質を発現させた上皮細胞株における好中球の透過を観察する。

2. 研究の実施状況

1)TCJ 形成の分子機構の解明:TCJ 構成分子でアンギュリンファミリーの一つである LSR が多角形の上皮細胞の頂点の部分に濃縮する仕組みを、その翻訳後修飾に着目して解析した結果、LSR の細胞膜直下の細胞質領域が局在化に重要であること、この領域が脂質化修飾を受けることを明らかにした。

2)個体における TCJ の機能の解明:LSR 遺伝子を腸管上皮特異的に欠失させたマウスの作出に成功した。このマウスでは小腸において、LSR の発現が消失するのに伴い、もう一つの TCJ 構成分子トリセルリンの TCJ における濃縮が見られなくなり、アンギュリンファミリーがトリセルリンの局在を規定していることを個体レベルで証明した。現在、小腸の異常の有無について形態学的な解析を進めている。次に、LSR と同じアンギュリンファミリーの一つであり、ヒトの遺伝性難聴において変異が最近報告された ILDR1 の遺伝子欠失マウスを入手してその聴覚を解析したところ、ILDR1 マウスは生後、内耳の有毛細胞が死滅するのに伴い重度の難聴を示すことを見出した。

3)遊走性血球細胞の上皮細胞シート透過に伴う細胞間接着構造の動態の解明:フィルターカップ上に培養した蛍光緑色タンパク質-TJタンパク質融合分子を発現する MDCK 上皮細胞に対して基底側からヒト単離好中球を与え、好中球が MDCK 細胞シートの TJ を透過する様子を蛍光顕微鏡下でライブイメージングすることに初めて成功した。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 8 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 5 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>. 70:12-8 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>. 133:1161-9) 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> 58:1546-59 4. Iwamoto, N., Higashi, T., Furuse, M. (2013). Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells in vivo. <i>Cell Struct. Funct.</i> 39:1-8 5. Higashi, T., Lenz, D.R., Furuse, M., Avraham, KB. (2013). A "Tric" to tighten cell-cell junctions in the cochlea for hearing. <i>J. Clin. Invest.</i> 123:3712-5 <p>(掲載済み一査読無し) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 6 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 <i>Yakugaku Zasshi</i> 134:615-621 <p>(未掲載) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 7. Nakatsu, D., Kano, F., Taguchi, Y., Sugawara T., Nishizono, T., Nishikawa, K., Oda, Y., Furuse, M., Murata, M. JNK1/2 dependent-phosphorylation of angulin-1/LSR is required for the exclusive localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts in EpH4 epithelial sheet. <i>Genes to Cells</i> (in press) 8. Furuse, M., Izumi, Y., Oda, Y., Higashi, Y., Iwamoto, N. Molecular organization of tricellular junctions. <i>Tissue Barriers</i>. (in press)
<p>会議発表 計 4 件</p>	<p>専門家向け 計 4 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 岩本典子、東智仁、古瀬幹夫. Evidences of tricellular tight junctions in brain endothelial cells. 第 65 会 日本細胞生物学会大会 2013 年 6 月 19-21 日 (名古屋) 2. Moriwaki, K., Asahi, M., Furuse, M. Generation of an inhibitory antibody against claudin-15 for modulation of the intestinal barrier function. 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19-21 日(仙台) 3. Furuse, M. Molecular organization of tricellular tight junctions. Joint Workshop Universite Catholique de Louvain and Kobe University "Cell polarity and cell adhesion". March 10, 2014 (Brussels) 4. Furuse, M. Tricellular Tight Junctions: Molecular Organization and Implication in Epithelial Barrier Function. University of Washington-Kobe University Symposium on Membrane Biology. March 27-18, 2014 (Seattle) <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</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>神戸大学大学院医学研究科細胞生物学分野ホームページ 研究内容 http://www.med.kobe-u.ac.jp/cellb/</p>

様式19 別紙1

国民との科学・技術対話の実施状況	2013年12月17日17:00-18:30に私立立命館守山高校(滋賀県守山市)において、高校1-2年生(参加者数・20名)を対象に「からだをつくるもれない細胞シートのはなし」というタイトルで、本研究計画の背景に関する話題提供とともに対話を行った。
新聞・一般雑誌等掲載計0件	なし
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25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	78,760,000	36,240,000	0	0
間接経費	34,500,000	23,628,000	10,872,000	0	0
合計	149,500,000	102,388,000	47,112,000	0	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	3,312,547	36,240,000	0	39,552,547	39,552,547	0	0
間接経費	0	10,872,000	0	10,872,000	10,872,000	0	0
合計	3,312,547	47,112,000	0	50,424,547	50,424,547	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	14,989,530	実験試薬、消耗品器具、実験用マウス等
旅費	660,070	研究打ち合わせに係る旅費
謝金・人件費等	15,234,109	非常勤職員人件費
その他	8,668,838	動物実験施設使用料、英文校正料等
直接経費計	39,552,547	
間接経費計	10,872,000	
合計	50,424,547	

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
Gold 96-well GeneAmp PCRシステ ム9700	ライフテクノロジーズ ジャパン(株)製 9700G	1	628,845	628,845	2013/4/24	神戸大学
デジタルCMOSカメ ラ	浜松ホトニクス(株)製 ORCA-Flash4.0 C11578-22U	1	2,204,475	2,204,475	2013/7/18	神戸大学