

令和 2年 8月 8日

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成30年度

受付番号 201860061

氏名 徳田 深作

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

### 記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：University of Kansas Medical Center（国名：USA）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

タイトジャンクション構成タンパク質クロードインの新たな機能の解明

3. 派遣期間：平成 30年 7月 19日 ~ 令和 2年 7月 18日

4. 受入機関名及び部局名

University of Kansas Medical Center, Kidney Institute

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式10-別紙1~4に記入の上、併せて提出すること。

上皮細胞は管腔側と基底側の間の浸透圧、静水圧の勾配に応答して経上皮輸送・細胞骨格・細胞増殖・アポトーシス・細胞極性など様々な細胞機能の調節を行うことが知られている。しかし、上皮細胞がこれらの環境変化を感知するメカニズムは未だによく分かっていない。本研究者のこれまでの研究結果から、上皮細胞のタイトジャンクションがこれらの環境変化の感知に関与する可能性が示唆されている。本派遣ではこの可能性の検討をさらに進めてメカニズムを解明することを目的として研究を行った。

上皮細胞のタイトジャンクションが浸透圧・静水圧などの環境変化の感知に関与する可能性を検討する最も直接的な方法としては、タイトジャンクションを構成するタンパク質を遺伝子ノックアウトしてノックアウトが環境変化によって引き起こされる細胞応答にもたらす影響を調べる方法が考えられる。しかしタイトジャンクションは非常に多種類のタンパク質から構成される複合体であるため、本研究の仮説を検証するには複数の遺伝子をノックアウトする必要があることが予想された。近年の遺伝子工学の発展によって開発されたTALEN法やCRISPR/Cas9システムは遺伝子ノックアウトの効率を劇的に改善させたが、培養細胞における遺伝子ノックアウトクローンの樹立ではターゲットとなる遺伝子の全てのアリルをノックアウトする必要があり、複数の遺伝子をノックアウトするには薬剤選択が行えないなど様々な技術的な問題点があった。そこで、本研究ではまずノックアウトクローンを樹立する方法の改善を目指した。

まず、本研究では複数の遺伝子をノックアウトする必要があることを考慮してオフターゲット効果の少ないTALEN法を選択した。TALEN法による遺伝子ノックアウトではleft armとright armの2つのTALENを細胞にトランスフェクトする必要があるため、internal ribosome entry site (IRES) を用いてTALENのleft armとright armをつなげたコンストラクトを作成し、このコンストラクトをpuromycinに抵抗性の遺伝子を有したベクターにクローニングした(図1)。このベクターを用いて一過性の薬剤選択を行うことによってノックアウト効率の改善が得られた。

しかし、一部の遺伝子は依然としてノックアウトが困難であり、その原因として一部の遺伝子ではノックアウトが細胞の生存に不利に働いている可能性が考えられた。そこで上記のベクターにIRESを用いてレスキュー遺伝子さらにつなげ、遺伝子がノックアウトされてもレスキュー遺伝子の発現がしばらく続くためにノックアウトの影響が軽減されるようにした。このベクターを用いることによって一部の遺伝子ではノックアウトの効率をさらに改善することに成功した。

このベクターを用いてタイトジャンクションストランドの主要な構成タンパク質であるクローデインのノックアウトを行い、MDCK細胞に発現するクローデイン-1, -2, -3, -4, -7のノックアウトクローンをそれぞれ樹立した。これらのクローンを解析すると、クローデイン-1のノックアウトクローンでは細胞間接着部位の細胞骨格に著明な変化が認められた(図2)。さらに、細胞骨格の変化の程度にはクローン間でばらつきが認められたが特に変化の大きいクローンでは上皮の重層化と重層化内部にタイトジャンクションを伴う管腔が形成される極性異常が認められた(図3)。同様の重層化や極性異常は上皮に静水圧

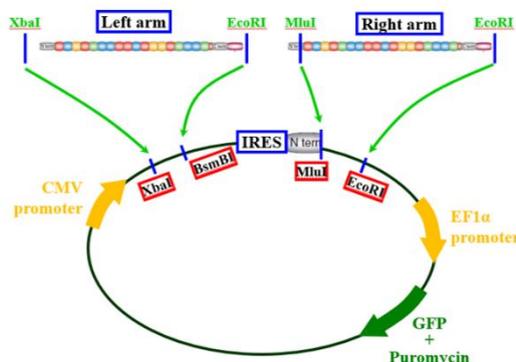


図1 TALEN法によるノックアウト効率の改善のために作成したベクター。left armとright armのTALENをIRESでつなぐようにデザインされている。

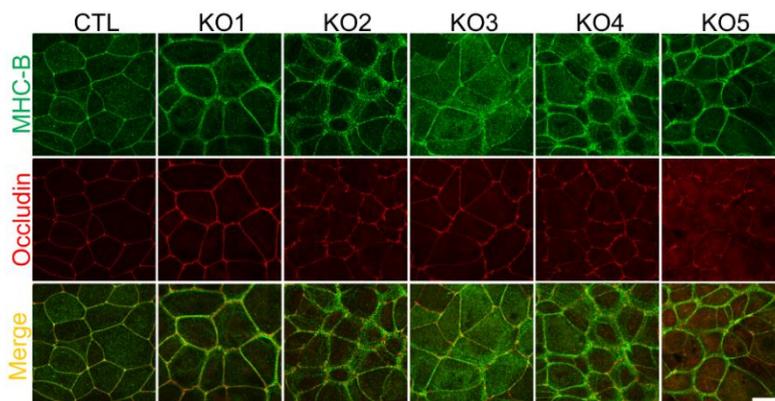


図2 クローデイン-1ノックアウト細胞の免疫染色像。ノックアウト細胞では細胞間接着部位の点状のミオシンがタイトジャンクション(Occludin)を挟んで二列に配列している。Bar, 10µm。

を伴う管腔が形成される極性異常が認められた(図3)。同様の重層化や極性異常は上皮に静水圧

を基底側から加えた時にも認められることから、上皮が細胞外の静水圧を感知するメカニズムにクローディン-1 が関与する可能性が示唆された。

これらの結果からクローディン-1

ノックアウト細胞では細胞間接着部位でアクトミオシンの収縮が亢進している可能性が考えられたため、ミオシンの ATPase を阻害してその収縮を阻害する blebbistatin や Rho-associated protein kinase (ROCK-1) を阻害してミオシンの収縮を阻害する Y27632 がクローディン-1 ノックアウト細胞に及ぼす影響を検討した。その結果、blebbistatin や Y27632 処理によってミオシンの構造変化が元に戻ることを確認された (図4)。これらの結果から、クローディン-1 のノックアウト細胞では ROCK-1 経路を介して細胞間接着部位の収縮力が亢進していることが示唆された。

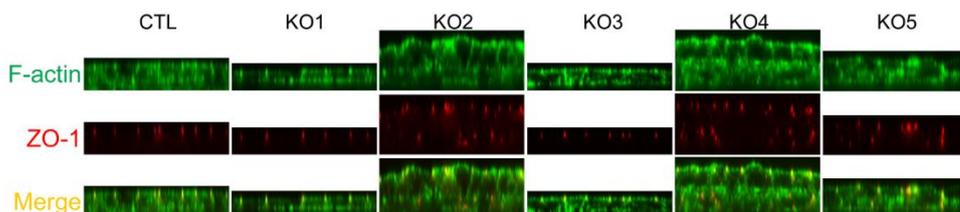


図3 クローディン-1 ノックアウト細胞の免疫染色像 (垂直断面像)。細胞骨格の変化が顕著なノックアウトクローン 2, 4, 5 (KO2, KO4, KO5) では上皮の重層化が認められ、重層化内部に形成された管腔にはタイトジャンクション構成タンパク質の ZO-1 が局在している。Bar, 10 $\mu$ m。

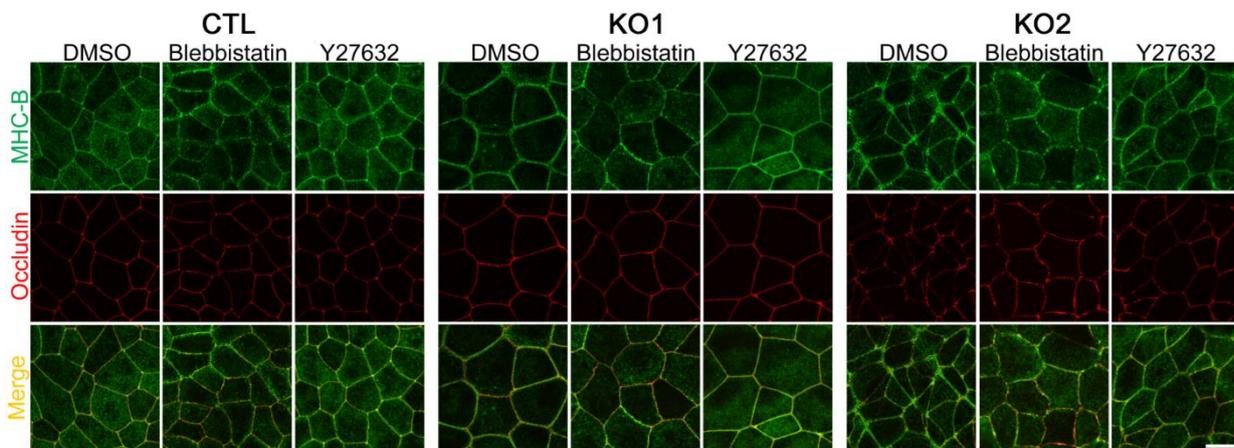


図4 blebbistatin, Y27632 がクローディン-1 ノックアウト細胞の細胞骨格に及ぼす影響。Blebbistatin や Y27632 を 2 時間処理することによってミオシンの構造変化がコントロール細胞と同程度まで元に戻ることが確認された。Bar, 10 $\mu$ m。

クローディンは C 末端に PDZ 結合ドメインを有しており、タイトジャンクションに局在する様々なタンパク質と結合することが知られている。クローディンと結合するタンパク質の中で ZO タンパク質はクローディンだけでなくアクチンや細胞骨格の調節に関わる様々なタンパク質と結合することが知られている。そこで、クローディン-1 と ZO タンパクをダブルノックアウトしたクローンを樹立し、その影響を検討した。

クローディン-1 と ZO-1 をダブルノックアウトしたクローンでは、細胞骨格の変化が比較的弱かったクローン (KO1 クローン) と変化が強かったクローン (KO2 クローン) のいずれにおいても細胞間接着部位の細胞骨格の変化がより顕著になった (図5)。さらに、タイトジャン

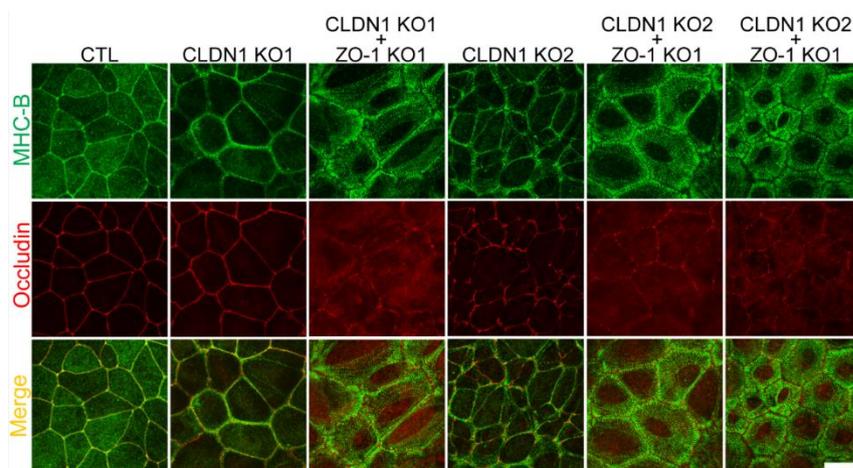


図5 クローディン-1 と ZO-1 のダブルノックアウトクローンの免疫染色像。ダブルノックアウトクローンでは細胞間接着部位のミオシンが細胞内全体に広がり、核を囲むように配列している。Bar, 10 $\mu$ m。

クシヨンの細胞間隙で物質の透過を調節するバリアとしての機能を評価したところ、電荷選択性は完全に失われており、4kDaのデキストランの透過性も著明な増加が認められた

(図6)。これらの結果から、クローディン-1とZO-1のダブルノックアウトによってタイトジャンクションのバリア機能がほぼ失われていることが示唆された。

一方、クローディン-1とZO-2やZO-3とのダブルノックアウトでは、細胞骨格の変化が比較的少なかった。K01クローンではダブルノックアウトによって細胞骨格の変化が弱くなったのに対して、細胞骨格の変化が強かった。K02クローンではダブルノックアウトによって細胞骨格の変化がより顕著になった(図7、8)。また、ZO-2やZO-3とのダブルノックアウトはクローディン-1単独のノックアウトと比較してタイトジャンクションのバリア機能に明らかな変化はもたらさなかった。これらの結果から、ZO-2やZO-3は細胞骨格を適度に調節することに寄与する可能性が示唆された。

最後にクローディン-1とZOタンパクのダブルノックアウトがクローディン-1ノックアウトで認められた上皮の重層化に及ぼす影響を検討した。その結果、ZO-1、-2、-3のいずれもダブルノックアウトによって上皮の重層化を認めなくなった(図9)。

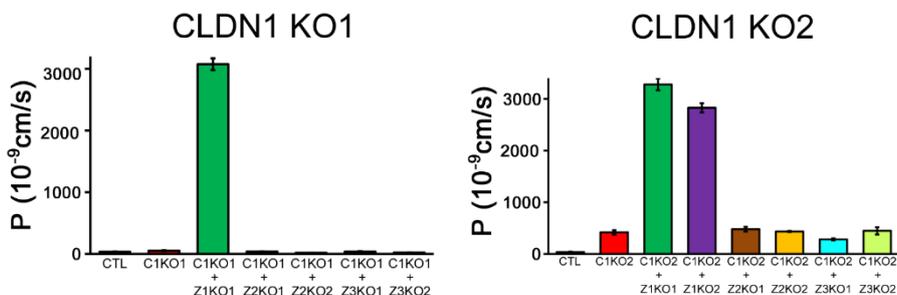


図6 4kDaデキストランの透過性。クローディン-1ノックアウトクローン1(K01, 左グラフ)では軽度の透過性増加が見られただけだったが、ZO-1とのダブルノックアウトによって約100倍の透過性増加が認められた。クローディン-1ノックアウトクローン2(K02, 右グラフ)では約10倍の透過性増加が認められたが、ZO-1とのダブルノックアウトクローンではコントロールと比べて約100倍の透過性増加が認められた。ZO-2やZO-3とのダブルノックアウトクローンではクローディン-1単独のノックアウトと比較して4kDaデキストランの透過性に著明な変化は認められなかった。

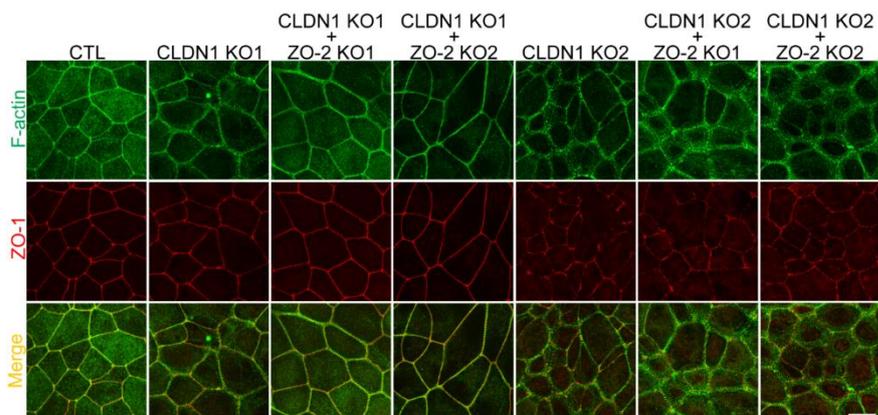


図7 クローディン-1とZO-2のダブルノックアウトクローンの免疫染色像。詳細は本文参照。Bar, 10μm。

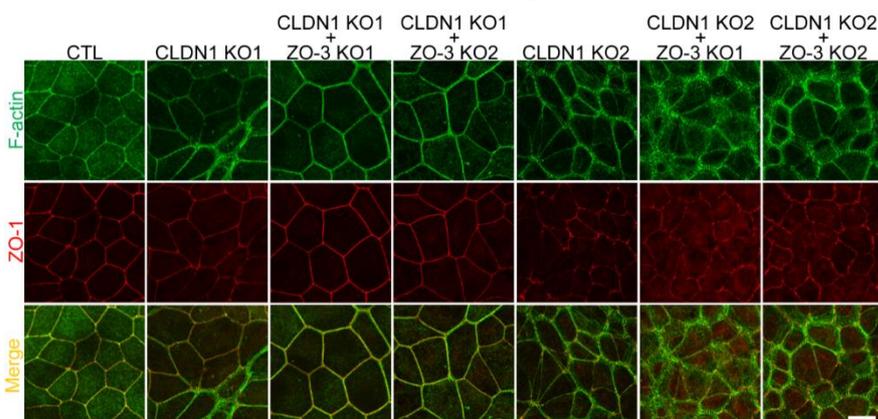


図8 クローディン-1とZO-3のダブルノックアウトクローンの免疫染色像。詳細は本文参照。Bar, 10μm。

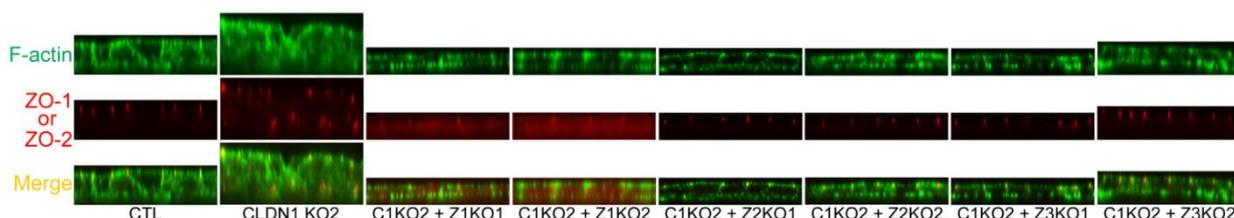


図9 クローディン-1とZOタンパクのダブルノックアウトクローンの免疫染色像(垂直断面像)。ZOタンパクとのダブルノックアウトによって重層化は認められなくなった。Bar, 10μm。

以上の結果から、

- ・MDCK 細胞では、タイトジャンクションのストランドを構成する主要なタンパク質であるクローデインの中でクローデイン-1 だけが細胞骨格の調節に関わる
- ・クローデイン-1 は ROCK を経由した signaling pathway を介してミオシンの収縮を抑える方向で細胞骨格の調節を行う
- ・クローデイン-1 による細胞骨格の調節はタイトジャンクションのバリア機能にも影響する
- ・ZO-1 も細胞骨格の調節やタイトジャンクションのバリア機能に関与しており、クローデイン-1 とのダブルロックアウトによってタイトジャンクションのバリア機能はほぼ失われる
- ・ZO-2, ZO-3 は細胞骨格の微調節に関与しており、状況によってミオシンの収縮の促進または抑制のいずれにも働く
- ・クローデイン-1 は上皮の重層化や極性の調節にも関与しており、ロックアウトによってクローデイン-1 が失われると重層化が認められるようになることから重層化を抑制する方向に働くと考えられる
- ・クローデイン-1 と ZO タンパクのダブルロックアウトによって重層化が認められなくなることから、ZO タンパクは重層化を促進する方向に働くと考えられることが示唆された (図 10)。

本研究ではクローデイン-1 のノックアウトクローンに上皮の基底側から静水圧を加えたときに見られる重層化や極性異常と同様の変化が認められた。上皮が管腔側と基底側間の静水圧の勾配を感知するメカニズムについては、タイトジャンクションはその勾配の境界に位置してバリアとして機能することやこれまでの研究結果から、タイトジャンクションが細胞外環境 (静水圧の勾配) のセンサーとして機能する可能性が示唆されているが (Tokuda and Yu. Int J Mol Sci. 2019)、本研究結果はこの可能性をさらに支持すると考えられる。

さらに、クローデインの中でも特定のクローデインが静水圧を感知して重層化を引き起こす反応に関与して促進あるいは抑制に働く可能性や、静水圧を感知するメカニズムにタイトジャンクションの裏打ちタンパク質である ZO タンパクが関与する可能性を示唆している。

今後は癌細胞などを用いてさらに検討を進めることでさらなるメカニズムの解明や臨床応用に向けた知見の蓄積を目指している。具体的には、

- ・癌細胞で知られている既知の signaling pathway との関連の検討
- ・本研究で認められた細胞骨格の変化が静水圧による重層化反応との関係の検討
- ・多くの癌組織では CLDN 発現パターンの変化が認められるが、これらの発現パターンの変化と静水圧による重層化反応との関係の検討

などを考えている。本派遣ではこれらの研究の前提となるメカニズムを解明することができ、申請書にも記載した将来的に癌治療における新たな治療戦略の開拓に寄与する研究の土台となる重要な結果が得られたと考えている。このような機会をいただいたことに深く感謝している。

本研究者はこれらの成果を The Kidney Institute's 2018 Fall Retreat, EB meeting, Pre-EB Epithelial Transport Meeting for Young Researchers 2019, 2019 Kidney Institute Retreat で発表し、2019 Meritorious Research Travel Award (Epithelial Transport Group of the American Physiological Society) を受賞した。また International Journal of Molecular Sciences に上皮が静水圧などを感知するメカニズムについての総説を報告した (Tokuda S, Yu ASL. 'Regulation of epithelial cell functions by the osmolality and hydrostatic pressure gradients: a possible role of the tight junction as a sensor')。上記の研究結果は論文投稿に向けて準備を進めている。

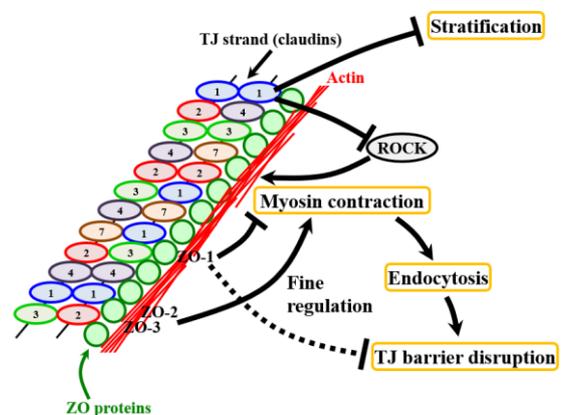


図 10 本研究で得られた結果のまとめ。詳細は本文参照。