

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

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・医学研究科・教授
氏名	古瀬 幹夫

【研究目的】

上皮が、外界から体を保護して恒常性を維持するバリアとして機能するためには、敷石状に並んで接着した上皮細胞同士の隙間からの物質の漏れを防ぐ必要がある。そのために上皮細胞は細胞間接着装置タイトジャンクション(TJ)によって細胞間隙をシールしている。近年、TJの接着分子クローディングファミリーをターゲットとしたTJの分子生物学的解析が飛躍的に進んだことにより、この研究領域ではTJの機能を調節する分子機構の解明が次の重要な研究課題となってきた。そこで本研究は、クローディング後の研究の新しい展開として、3つの細胞の間に形成される細胞接着構造トリセルラージャンクション(以下TCJ、図1)の分子基盤の解明、遊走性血球細胞の細胞シート透過における細胞間接着の開閉の制御機構の解明、上皮バリア機能を規定するTJの構造の多様性の分子機構の解明に取り組んだ。そして、研究成果を従来のTJ研究の知見と統合させ、上皮バリア機能を担う細胞間接着の動態と機能制御機構の全貌を理解することを目指した。各プロジェクトの具体的な目標は以下のとおりである。

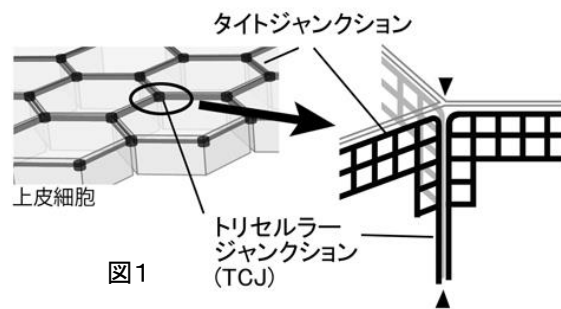


図1

1) トリセルラージャンクション (TCJ) の分子基盤の解明

TCJは、上皮機能における潜在的な重要性にもかかわらず、その分子構築の解明が遅れていたために、これまで分子細胞生物学による研究がほとんど進んでいなかった。研究代表者は、本研究の直前に、TCJを構成する新規膜タンパク質LSRを同定し、LSRが正常なTCJ形成と十分な上皮バリア機能に必要であり、しかも既知のTCJ構成タンパク質であるトリセルリンをTCJにリクルートすることを世界に先駆けて見出した。そこで本研究ではLSR-トリセルリン系を手がかりにして、TCJの分子基盤の解明を進めた。具体的には、LSR-トリセルリン系の上流としてLSRがTCJに局在化するメカニズム、下流としてトリセルリンが上皮細胞においてアクチオシン線維の形成と細胞辺縁の張力を制御するメカニズムの解明を目指して研究を行った。さらに、LSR遺伝子の組織特異的ノックアウトマウスを作製して表現型を解析することにより、個体におけるTCJの役割とその異常にともなう病態の解析を計画した。途中からLSRの相同分子の性状も解析した。

2) 遊走性血球細胞の上皮細胞シート透過における細胞間接着の開閉の制御機構の解明

炎症等により、免疫に関わる遊走性血球細胞が上皮細胞シートを通り抜けることが知られている。このとき、血球細胞が透過するために TJ が開閉すると考えられているが、その分子機構には不明な点が多く、その仕組みを解明することは学術的にも医学的にも意義が大きい。そこで、本研究では、上皮細胞シートを遊走性血球細胞が透過する過程を観察できる培養系を確立し、 TJ 、TCJ 構成分子、アクチン細胞骨格等の動態に着目して血球細胞透過の過程を詳細に記載して、細胞間接着構造が動的に開閉する仕組みを解析することを目的とし、培養細胞でこの過程を可視化できる実験系の確立を目指した。

3) 上皮バリア機能を規定する TJ の構造の多様性の分子機構の解明

TJ のバリア機能は各上皮の様々な生理機能に応じて多様である。TJ 機能の多様性を生み出す重要な要素の一つとして、その形態の多様性があげられるが、それを規定する分子機構はこれまでほとんど解明されていなかった。本研究では、TJ および TCJ 構成分子の組成、上皮細胞極性を規定する情報伝達、細胞間接着構造を裏打ちする細胞骨格の張力等の視点から、TJ の形態の多様性を生み出す分子メカニズムの解明を進めた。さらに、タイトジャンクションの量的制御を解析するモデルとして、ショウジョウバエのセプテートジャンクションに着目し、遺伝学的アプローチによって細胞膜上における細胞間接着構造形成の制御機構の解明を目指した。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

タイトジャンクションの研究分野において、オクルディン、クローディンの発見から、現在のトリセルラージャンクションの研究まで、ぶれずに一貫したテーマを追究している。また、新規の分子を発見し、それを解析しながら、分子基盤を解明していく手法もきちんと確立されている。トリセルラージャンクションに関わるタンパク質の同定（アンギュリンファミリータンパク質など）、上皮バリア機能に関する分子基盤の研究は独自性の高い研究であり、一定の成果が得られつつあることは評価できる。LSR 遺伝子の条件ノックアウトなど、予定より遅れたものも見られたが、それぞれの研究目標について英文原著論文をまとめつつあることがうかがわれ、研究は概ね順調に達成されつつあると考えられる。今後は研究を継続し、質・量ともにさらなる実績を示すことが期待される。

② 目的の達成状況

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

研究目的として1) TCJ の分子基盤の解明、2) 遊走性血球細胞の上皮細胞シート透過における細胞接着の開閉の制御機構の解明、3) 上皮バリア機能を規定する TJ の構造の多様性の分子機構の解明が挙げられておりそれぞれ具体的な目標と方法論が設定されている。進捗状況は、1) LSR の conditional KO mouse の作製と解析が遅れている。2) については、上皮細胞シートを透過する現象の確認と生細胞観察できる顕微鏡光学系の確立に苦戦し、解析が遅れていたが、最終年度において生細胞の観察に成功しており、一定の成果が得られると期待される。3) についてショウジョウバエのセプテートジャンクションの研究は、一定の進展がみられるが、TJ ストランドの網目構造形成に関するトリセルリンの役割についての解析が遅れていたが、研究期間内に原因遺伝子を同定することに成功した。以上のように研究は全般的にはやや遅れつつも、それぞれの研究目標について一定の成果が得られており、本課題終了後も着実に英文原著論文として発表されることが期待できる。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

TCJ 構成蛋白質 LSR の相同分子 ILDR1 と ILDR2 の解析から、これらが LSR と合わせると同時に TCJ に局在してトリセルリンをリクルートする性質があることの解明、及び、トリセルリンの N 末端側細胞質領域が Cdc42GEF である Tuba と結合して Cdc42 を活性化し、細胞間接着形成時に上皮細胞辺縁部のアクチンフィラメント形成と聴力の発生に関与することの解明は、先進性があると評価できる。またヒト遺伝性難聴 DFNB42、DFNB49 の病態メカニズムについて、TCJ の構成分子の局在異常の観点から論じ、病気への関与も示している。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

タイトジャンクションの研究が皮膚バリア、腸管バリア、血液脳関門など、臨床医学的な研究へと発展したように、トリセルラージャンクションの分子、ショウジョウ

バエのセプテートジャンクションの新規分子のヒトオルソログの研究も同様の発展が期待できる。社会的、経済的課題の解決への貢献という観点からは、この研究課題は基礎研究であり、いわば知の創造を主な目的としているもので、現在のところ社会的、経済的課題の解決への貢献は見込まれない。しかし基礎研究として独自性が高く、評価されるべきである。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが（行われた ・ 行われなかった）

研究実施マネジメントは概ね適切に行われていると思われる。当初は本事業の水準から見ると、発表論文数が少ないと言わざるを得なかったが、最終年度になって徐々に論文が発表されている。着実に論文を発表していると思われるが、今後はより高い水準の雑誌を目指してほしいものと思う。