

Basic and Clinical Aspects of Tight Junction-associated Proteins

Tetsushi KINUGASA¹⁾²⁾, Masahide KUROIKI¹⁾, Motomu KUROIKI¹⁾,
Hiroto SHIBAGUCHI¹⁾, Jian HUANG¹⁾, Kitaro FUTAMI³⁾,
Takayuki SHIRAKUSA²⁾ and Yuichi YAMASHITA²⁾

¹⁾ Department of Biochemistry, Fukuoka University School of Medicine, Fukuoka 814-0180, Japan

²⁾ Department of Surgery, Fukuoka University School of Medicine, Fukuoka 814-0180, Japan

³⁾ Department of Surgery, Fukuoka University Chikushi Hospital, Chikushino 818-8502, Japan

Abstract: The intercellular tight junction (TJ) has two important functions; one is a 'barrier function' and the other is a 'fence function'. TJ-associated proteins are key molecular components governing cellular adhesion, polarity and glandular differentiation. In recent years, numerous proteins have been newly described as TJ-associated proteins and they have also been shown to play critical roles in the cellular proliferation and neoplastic pathway via their functions as intracellular signaling pathways. We herein present an overview of the basic and clinical aspects of the structures and functions of TJ-associated proteins.

Key words: Cell adhesion molecule, Tight junction, Occludin, Claudin family

タイトジャンクション (TJ) 関連タンパク質の基礎と臨床

衣笠 哲史¹⁾²⁾ 黒木 政秀¹⁾ 黒木 求¹⁾
芝口 浩智¹⁾ 黄 健¹⁾ 二見喜太郎³⁾
白日 高歩²⁾ 山下 裕一²⁾

¹⁾ 福岡大学医学部生化学

²⁾ 福岡大学医学部第2外科

³⁾ 福岡大学筑紫病院外科

要旨: 細胞間のタイトジャンクション (tight junction: TJ) には2つの機能, すなわちバリア機能とフェンス機能が知られている。また, TJを形成する TJ 関連タンパク質は細胞間の接着のみならず, 細胞の極性形成や腺の分化をも支配することが知られている。近年, 多くのタンパク質が新しく TJ 関連タンパク質として細胞内に同定されるとともに, これらのタンパク質が細胞内シグナル伝達に関与する分子であり, 細胞の増殖や腫瘍発生過程にも重要な役割を担っていることが明らかにされている。ここでは, 細胞間接着分子としての TJ 関連タンパク質の位置づけと分子生物学的性状を整理し, その発現と疾患との関わりについて概説する。

索引用語: タイトジャンクション, オクルディン, クローディン, 細胞間接着分子

はじめに

人間などの多細胞生物は上皮細胞のシートによって外界と体内を区別し, また体内においてはさまざまな器官

を空間的に区画化する。こうした区画化が各器官に適したイオン環境や分子環境を作り出し, それぞれの器官が正常に機能するのを可能にすることによって恒常性が維持されている¹⁾。このようなシート形成あるいは区画化には細胞の接着機能が必須であり, 細胞間接着とその制

御は、多細胞動物が個体を形成・維持していく上で最も重要な機能の1つである。

多細胞生物もはじめは1個の受精卵である。受精卵は分化を伴う細胞分裂を繰り返し、最終的には高度に機能分化した種々の組織・器官を形成する。これらの組織・器官が形成されていくためには、まず特定の分化形質をもつ一群の細胞が集まらなければならない。このとき、これら一群の細胞が同じ接着特異性をもつ細胞間接着分子を発現すると、容易に細胞集団を形成することができる。さらに、これら細胞集団が機能的な組織・器官を構築するためには、それぞれの細胞が全体としては接着性を保ちつつ相対的に位置を変えたり、逆にお互いにより密接に結合したりする必要がある。このような場合、細胞間接着の制御が重要な働きを果たすと考えられる²⁾。一方で、細胞間接着の制御の乱れが細胞の癌化や癌細胞の転移・浸潤能の亢進などに結びついていることを示す例が数多く報告されている。

ここでは、細胞間接着分子としての TJ 関連タンパク質の位置づけと分子生物学的性状を整理するとともに、その発現と疾患との関係について概説する。

1. 細胞間接着分子と細胞間接着装置

細胞間接着分子は、その大部分がカドヘリンスーパーファミリー、免疫グロブリンスーパーファミリー、クロロディンファミリー、セレクトインファミリー、インテグリンファミリーに属している²⁾。これらの接着分子は細胞の種類に対応して特異的な組み合わせで発現している²⁾。また、カドヘリンスーパーファミリーやクロロディンファミリーに属する分子はさまざまな細胞質因子と複合体を形成することにより、電子顕微鏡レベルで識別できる特徴的な細胞間接着装置 (cell adhesion complex) を構成している場合が多い³⁾。

主な細胞間接着装置は、タイトジャンクション (tight junction: TJ) とアドヘレンスジャンクション (adherence junction: AJ)、それにデスモソーム (desmosome: DS) の3種である (図1)³⁾。

2. 細胞間接着装置としての TJ の機能

細胞間接着装置の中の TJ は、ラテラル面 (上皮細胞の細胞と細胞が触れ合う側面) の最もアピカル面 (上皮細胞の外腔ないし腺腔に面した頂端面) に近い領域で細胞間膜の距離をほぼゼロに近づけることにより上皮細胞間をシールしており、ベイスル面 (基底膜側の底面) 寄りには存在しない (図1)²⁾。したがって、TJ を電子顕微鏡で観察すると、隣り合う細胞の細胞膜が完全に癒合しているように見え、フリーズフラクチャー法では直径約 10nm の特徴的な紐状 (ストランド) 構造として観察される⁴⁾。

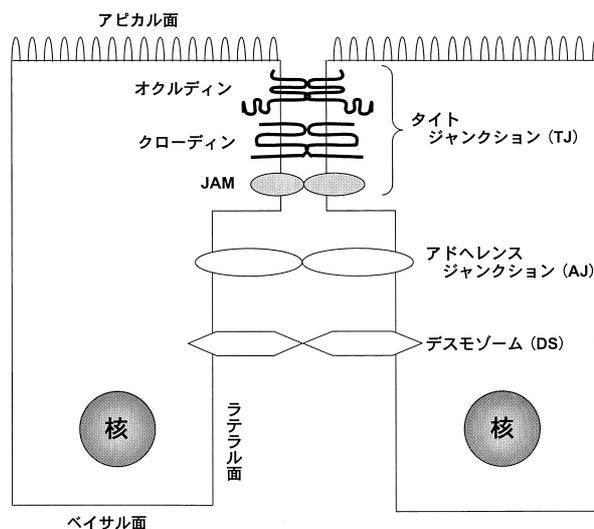


図1 上皮細胞における3種類の細胞間接着装置
上皮細胞ではこれら3種類の装置がまとまり接着装置複合体 (junction complex) を形成している場合が多い。複合体の中では基本的にはアピカル面から TJ, AJ, DS の順にならんでおち、TJ は細胞間膜の距離をほぼゼロに近づけることで、上皮細胞間をシールしバリア機能を果たしている。また、DS はさらにラテラル面全体にも分布する。

TJ はイオンや分子などの細胞間を通過する物質の往来 (paracellular pathway) を一定の条件で制限するバリア機能を有している。また、TJ は細胞膜のアピカル側とベイスラテラル面 (側底面すなわち側面と底面) 領域に局在する脂質やタンパク質が拡散により混じり合うことを防ぐフェンス機能も果たしていると考えられている。さらに、TJ はこのように極性をもった細胞膜の境界領域に位置することから、上皮細胞の極性形成においても重要な役割を果たすのではないかと考えられている。近年になって、TJ の細胞内領域にはさまざまなタンパク質が局在していることが明らかになっており、TJ がバリアやフェンス機能のみならず細胞内シグナル伝達に関与する膜ドメインとしても注目を集めている¹⁾。

3. TJ 関連タンパク質の分子種と組織分布

TJ は開いたり閉じたりする小孔を内包し、完全なバリアというよりはむしろ低分子量物質の透過を制御する構造だと考えられるようになった。さらに、TJ のバリア機能は、種々の生理学的条件や物理学的刺激によってダイナミックに変化することから、その制御機構についても関心がもたれていた。1990年代になってようやく TJ の構造タンパク質が次々と同定され、その機能制御を分子レベルで調べるのが可能となった。

TJ を構成する接着分子としては細胞膜を4回貫通する型のオクルディン (Occludin) とクロロディン

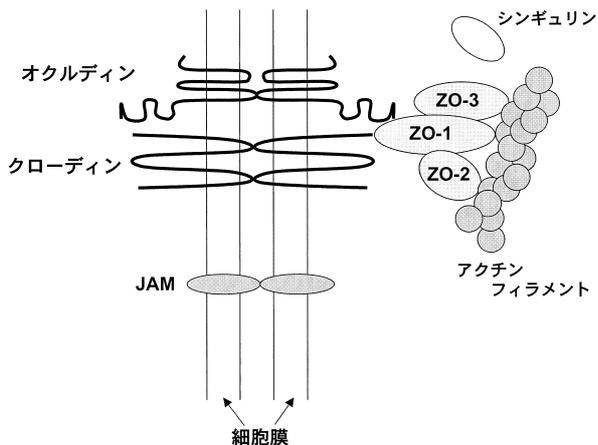


図2 タイトジャンクション (TJ) 構成する分子群
TJ の細胞質内領域に ZO-1, ZO-2, ZO-3, およびシンギュリンなどが局在することから, TJ は細胞内情報伝達にも関与することが明らかにされている。

(Claudin), それに免疫グロブリンスーパーファミリーに属する junctional adhesion molecule (JAM) などが明らかになっている (図1)。また, TJ の細胞質内領域に局在し細胞内情報伝達にも関与する分子としては, Zonula occludens (ZO)-1, ZO-2, ZO-3, それにシンギュリンなどが明らかにされている (図2)。以下, 後述する疾患との関連性が指摘されているオクルディンとクローディンについて略述する。

1) オクルディン

オクルディンは TJ のストランドに局在する膜タンパク質として, 1990年にニワトリ肝臓より調整した細胞間接着構造分画に対するモノクローナル抗体で同定された分子量約 60kDa の分子で 4 つの膜貫通部位を有する⁵⁾⁶⁾。以後, 初めて同定された TJ の膜タンパク質ということで注目され, オクルディンが TJ の構造と機能に

関与するといった報告が相次いだ⁷⁾⁸⁾。オクルディンは, 正常組織ではほとんど全ての上皮細胞と内皮細胞の TJ 部分に存在する。

一方, 例外的ではあるがオクルディンの発現を検出できない TJ の存在も明らかになり⁹⁾, さらにオクルディンを完全にノックアウトした ES 細胞を上皮細胞に分化させて解析したところ, 当初の予想に反して, 正常細胞と全く変わらない TJ ストランド構造が観察された¹⁰⁾。その結果, TJ のストランドを構成するオクルディン以外の膜タンパク質の存在が示唆された。

2) クローディン

オクルディンノックアウト研究の結果を受け新しいタンパク質の探索が続けられた結果, 1998年, ニワトリ肝臓から TJ を粗精製する過程で, オクルディンと挙動をともにする一本のタンパク質バンドが同定された¹¹⁾。このバンドはお互いに約40%の相同性を有する分子量約 22kDa の 2 つの新規膜タンパク質を含んでいて, それぞれが実際に TJ のストランドに局在することが明らかとなり, クローディン-1 および-2 と命名された¹¹⁾。クローディンはオクルディンと同じ 4 回膜貫通型タンパク質であるが, 両者間に一次構造上に相同性は見られない。

クローディンは強力な TJ 形成能を有する¹²⁾。TJ を持たないマウス線維芽細胞にクローディンを発現させると, 細胞と細胞の接着面にネットワーク状にホモフィリックな様式で非常に発達した TJ ストランド構造にクローディンが局在する。また, このクローディン発現線維芽細胞は細胞接着能を獲得することから, クローディンが細胞間でホモフィリックに接着分子として相互作用し, さらに細胞膜内で一次元のポリマーとして会合することによって TJ を形成する構造タンパク質であることを意味する。

表1 正常組織中におけるクローディンファミリーの発現

	心臓	脳	肺	肝臓	腎臓	精巣	その他
クローディン-1	+	+	+	+	+	+	
クローディン-2	-	-	-	+	+	-	
クローディン-3	-	-	+	+	+	±	
クローディン-4	-	-	+	-	+	-	
クローディン-5	+	+	+	+	+	+	内皮細胞
クローディン-6	-	-	-	-	-	-	胎児性組織
クローディン-7	-	-	+	-	+	±	
クローディン-8	-	-	+	±	+	±	
クローディン-10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
クローディン-11	-	+	-	-	-	+	希突起神経膠細胞, セルトリ細胞
クローディン-14	-	-	-	+	+	ND	蝸牛の有毛細胞
クローディン-16	-	-	-	-	+	ND	ヘンレループの上行脚

発現はノーザンブロットによる確認。クローディン-9, -12, -13, -15 と -17~24 については, まだ十分に解析されていない。ND: not determined

その後の解析で、クロードインは遺伝子ファミリーを形成することが明らかになった¹³⁾。これまでにマウスとヒトでは24種の遺伝子がクロードインファミリーとして同定されている¹⁴⁾。興味深いのは、それぞれのクロードインが特有の組織発現パターンを示すことである(表1)。例えばクロードイン-2は肝臓と腎臓に強く発現しているが肺では発現がみられないのに対し、クロードイン-3は肺と肝臓に強く発現している。さらに、1つの細胞が複数のクロードインを発現していることが多い。例えば肝実質の細胞のTJには少なくともクロードイン-1, -2, -3が、また腎臓の遠位尿細管上皮細胞のTJには少なくともクロードイン-4, -8が発現している。

4. TJ 関連タンパク質の臨床

以下、TJ 関連タンパク質の疾患との関連性について整理する。

1) オクルディン

(1) 大腸癌

高分化大腸癌において、癌胎児性抗原(CEA)の極性分布と免疫染色にて認められるオクルディンの分布とが密接に関連しており¹⁵⁾、また、胃癌同様、大腸癌で腺管様構造を示す腺癌は正常上皮細胞と同様にアピカル側にオクルディンとZO-1の発現が認められている¹⁶⁾。一方、興味あることに、大腸および直腸カルチノイド40例におけるオクルディン発現を検討した結果、その発現は認められなかった¹⁷⁾。

(2) 肺癌

腺癌ではオクルディンの発現は正常肺胞や気管支と同じように癌細胞の管腔側肺胞上皮に発現が認められたが、扁平上皮癌や大細胞癌、小細胞癌などではオクルディンの発現は認められなかった¹⁸⁾。

(3) 前立腺癌

前立腺癌では、グレードに関係なく全ての癌細胞でオクルディンの発現が認められた¹⁹⁾。

(4) 子宮内膜腺癌(子宮体癌)

子宮内膜腺癌の進行度とともにオクルディンの発現は次第に減少したとの報告がある²⁰⁾。

(5) 皮膚科領域

扁平上皮癌とボーエン病において、オクルディンとZO-1およびクロードイン-4の発現と角化との関連が認められている²¹⁾。

2) クロードインファミリー

(1) 乳癌

乳癌でクロードイン-1のmRNAレベルが減少しているとの報告²²⁾やクロードイン-7タンパク質発現と癌の進行度との関係は認められないものの、そのタンパク質の欠損はinvasive ductal carcinomaにおいて病理学的なグレードとの相関が認められた²³⁾。

(2) 胃癌

intestinal-typeの胃癌ではクロードイン-23の発現が減少しているとの報告がある²⁴⁾。

(3) 大腸癌

クロードイン-1は正常粘膜に比べ腫瘍組織でup-regulateされており²⁵⁾、また大腸癌の原発巣と転移巣から確立した樹立癌細胞においてクロードイン-1は増加している²⁶⁾。さらに、クロードイン-1発現の低下はTMN分類のステージIIの大腸癌で再発や予後の指標になると報告されている²⁷⁾。

(4) 膵臓癌と卵巣癌

膵管内腫瘍や卵巣癌ではクロードイン-4の発現がup-regulateされているとの報告がある²⁸⁾⁻³¹⁾。一方で、in vitroの系では膵臓癌においてクロードイン-4の過剰発現が浸潤能や転移の可能性を減少するとの報告も認められる³²⁾。

(5) 子宮頸癌

子宮頸癌(扁平上皮癌)における発育過程においてクロードイン-1や-7が重要な役割を果たしており、この疾患の悪性化に関する有用な指標となりえるようである³³⁾。

(6) その他の疾患

著者らは炎症性腸疾患モデルとして、in vitroの系においてクロードインファミリーの発現とサイトカインとの関連性を検討し報告した³⁴⁾。本研究では、T-cell由来のインターロイキン-17(IL-17)を用い、腸管上皮細胞でのバリア機能についてクロードイン-1と-2発現の調節機構と共にMAP kinase/ERK kinase(MEK)の活性化を含め、その再構築についてT84という株化細胞を用いて検討された。その結果、IL-17はヒト腸管上皮細胞のTJ形成を誘導させたが、MEK inhibitorであるPD98059はT84における自然なTJ形成やIL-17で誘導されるTJ形成をいずれも阻害した。また、IL-17はmRNAおよびタンパク質レベルでクロードイン-1およびクロードイン-2の発現をup-regulateし、TJ形成に関与していることが判明した。驚くべきことにPD98059存在下でクロードイン-2の発現はmRNAとタンパク質レベルで抑制されたのに対し、クロードイン-1の発現には影響を与えなかった。さらに、PD98059で発現が抑制されたクロードイン-2はIL-17の刺激により再びその発現が認められた。従って、T84においてはfunctional MEKがTJの構成成分であるクロードイン-2の発現に必要であること、IL-17はその発現に関与していることなどがわかった。

以上の結果は、MEKの活性化はクロードインが関与しているTJ形成に必要であり、またIL-17はERK MAPK pathwayを介して腸管のバリア機能を調節しその再構築に関与していることを示唆している。

おわりに

TJ 関連タンパク質のオクルディンとクローディンにつき教室のデータも入れて概説した。我々の教室では、現在臨床検体を用い癌および炎症性腸疾患における TJ 関連タンパク質の変化を解析している。今後さらに症例を重ね、病態と TJ 関連タンパク質発現の関連性を追究していく予定である。

文 献

- 1) 濱崎洋子, 古瀬幹夫: タイトジャンクションの膜裏打ち領域と上皮細胞極性. 実験医学 21: 479-485, 2003.
- 2) 清水正幸, 永淵昭良: 細胞接着 [1] 細胞-細胞間相互作用. 山本 雅・仙波憲太郎 (編): シグナル促進イラストマップ, pp. 111-120, 羊土社 (東京), 2004.
- 3) 伊藤雅彦: 接着分子と細胞骨格. 月田承一郎 (編): 細胞接着分子の生物学, pp. 90-97, 中山書房 (東京), 1995.
- 4) 古瀬幹夫: タイトジャンクション: 細胞間隙における物質通過を調節する分子機構. 実験医学 17: 1786-1791, 1999.
- 5) Furuse M, Hirase T, Itho M, et al: Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. J Cell Biol 123: 1777-1788, 1993.
- 6) Stevenson BR, Keon BH: The tight junction: morphology to molecules. Annu Rev Cell Dev Biol 14: 89-109, 1998.
- 7) MS Balda, JA Whitney, C Flores, et al: Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. J Cell Biol 134: 1031-1049, 1996.
- 8) Wong V, Gumbiner BM: A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. J Cell Biol 136: 399-409, 1997.
- 9) Moroi S, Saitou M, Fujimoto K, et al: Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. Am J Physiol 274: C1708-C1717, 1998.
- 10) Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, et al: Occludin-deficient Embryonic Stem Cells Can Differentiate into Polarized Epithelial Cells Bearing Tight Junctions. J. Cell Biol 141: 397-408, 1998.
- 11) Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, et al: Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. J Cell Biol 141: 1539-1550, 1998.
- 12) Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, et al: A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. J Cell Biol 143: 391-401, 1998.
- 13) Morita K, Furuse M, Fujimoto K, et al: Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. Proc Natl Acad Sci USA 96: 511-516, 1999.
- 14) Tsukita S, Furuse M, Itoh M: Multifunctional strands in tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol 2: 285-93, 2001.
- 15) Tobioka H, Isomura H, Kokai Y, et al: Polarized distribution of carcinoembryonic antigen is associated with a tight junction molecule in human colorectal adenocarcinoma. J Pathol 198: 207-212, 2002.
- 16) Kimura Y, Shiozaki H, Hirao M, et al: Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract. Am J Pathol 151: 45-54, 1997.
- 17) Tokunaga Y, Tobioka H, Isomura H, et al: Expression of occludin in human rectal carcinoid tumours as a possible marker of glandular differentiation. Histopathology 44: 247-250, 2004.
- 18) Tobioka H, Tokunaga Y, Isomura H, et al: Expression of occludin, a tight-junction-associated protein, in human lung carcinomas. Virchows Arch 445: 472-476, 2004.
- 19) Busch C, Hanssen TA, Wagener C, et al: Down-regulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with loss of cell polarity, increased proliferation rate, and Gleason grade 3 to 4 transition. Hum Pathol 33: 290-298, 2002.
- 20) Tobioka H, Isomura H, Kokai Y, et al: Occludin expression decreases with the progression of human endometrial carcinoma. Hum Pathol 35: 159-164, 2004.
- 21) Morita K, Tsukita S, Miyachi Y: Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. Br J Dermatol 151: 328-34, 2004.
- 22) Kramer F, White K, Kubbies M, et al: Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. Hum Genet 107: 249-256, 2000.
- 23) Kominsky SL, Argani P, Korz D, et al: Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. Oncogene 22: 2021-2033, 2003.
- 24) Katoh M and Katoh M: CLDN 23 gene, frequently down-regulated in intestinal-type gastric cancer, is a novel member of CLAUDIN gene family. Int J Mol Med 11: 683-689, 2003.
- 25) Miwa N, Furuse M, Tsukita S, et al: Involvement of claudin-1 in the b-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. Oncol Res 12: 469-476, 2001.
- 26) Dhawan P, Singh BA, Deane GN, et al: Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. J Clin Invest 115: 1765-1776, 2005.
- 27) Resnick B. M, Konkin T, Routhier J, et al: Claudin-

- 1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer : a tissue microarray study. *Modern Pathology* 18 : 511-518, 2005.
- 28) Sato N, Fukushima N, Maitra A : Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Am J Pathol* 164 : 903-914, 2004.
- 29) Nichols LS, Ashfaq R, Iacobuzio-Donahue CA : Claudin 4 expression in primary and metastatic pancreatic cancer : support for use as a therapeutic target. *Am J Clin Path* 121 : 226-230, 2004.
- 30) Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, et al : Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 60 : 6281-6287, 2000.
- 31) Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, et al : Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res* 9 : 2567-2575, 2003.
- 32) Michl P, Barth C, Buchholz M, et al : Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res* 63 : 6265-6271, 2003.
- 33) Lee JW, Lee SJ, Seo J, et al : Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 97 : 53-59, 2005.
- 34) Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, et al : Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 118 : 1001-11, 2000.

(平成17. 8.10受付, 17.10.5 受理)