

Tight Junction 開口物質のスクリーニング系構築と探索

神田 祐輔 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

高等真核生物は、常に外界から微生物やウイルス、毒性化合物などの進入により生命が脅かされている。そのため、危険な物質の生体内への進入を阻止する様々なバリア機構が存在する。その一つに Tight Junction (TJ) と呼ばれる細胞間接着構造がある。TJ は互いに密着したシート状の構造を形成して隣接した細胞間を強く接着することで、上皮細胞間の隙間を介した物質の自由な移動を防ぎ、外界の有害物質の侵入を阻止している。

一方、医療分野では抗体やサイトカインなど、タンパク質主体のバイオ医薬品の開発・使用が盛んになってきている。こうしたバイオ医薬品は一般に生体膜透過性が低く、注射といった侵襲的投与法に頼らざるを得ない。そこで TJ を可逆的に開口し、上皮細胞間隙を介した非侵襲的薬剤投与 (Figure 1) が可能になれば、患者の QOL (Quality of Life; 生活の質) が改善すると考えられる。よって TJ 開口物質の探索を行うこととした。

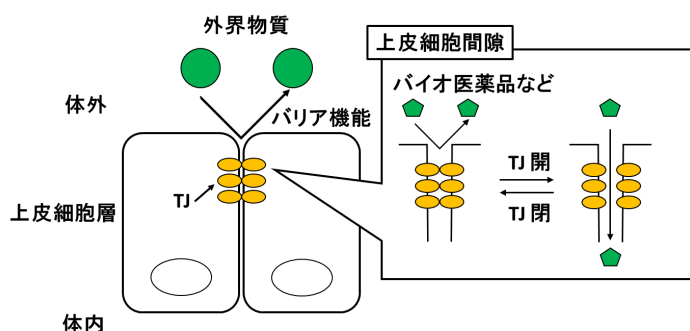


Figure 1. 可逆的 TJ 開口による薬剤投与模式図

材料および方法

新規可逆的 TJ 開口物質をスクリーニングするに当たり、以下の二種類のアプローチを用いた。

アプローチ 1. Aggregation assay

TJ のバリア機能には、主に claudin と呼ばれる一群の 4 回貫通膜タンパク質が隣接する細胞の claudin と結合し密着することが重要である。特に claudin-1 は皮膚や腸粘膜など薬剤吸収に重要な部位での発現が確認されている。よって claudin-1 同士を結合を阻害する化合物が TJ 開口物質になり得ると考え、claudin-1 の結合活性を阻害する化合物を探索する。

【方法】 TJ 構造を持たないマウス L 細胞に claudin-1 を導入し、claudin-1 安定発現細胞を作製した。この細胞を弱く trypsin 処理し、緩衝液中で浮遊させ穏やかに攪拌すると、claudin-1 発現依存的な細胞凝集ができる。この claudin-1 依存的細胞凝集形成の阻害を指標に化合物スクリーニングを行った。

アプローチ 2. Ca²⁺ assay

我々は唐辛子の辛み成分として知られているカプサイシンが、腸管上皮細胞モデル系において TJ を可逆的に開口することを見出し、その機構を明らかにしてきた。これまでの解析から、カプサイシンによる可逆的 TJ 開口に細胞内への Ca²⁺ 流入が重要であることが明らかになっている²⁾。そこで上皮細胞に Ca²⁺ 流入を引き起こす化合物を探索する。

【方法】 単層形成させた MDCKII 細胞 (イヌ腎臓尿管上皮細胞) に Ca²⁺ indicator の Fluo-8 を取りこませ、薬剤添加とともに Fluo-8 の蛍光を経時計測した。Capsaicin と同程度の Ca²⁺ 流入を引き起こす活性を指標に化合物スクリーニングを行った。

結果および今後の展望

詳細は発表会にて紹介する。

参考文献

- 1) K. Kubota, M. Furuse, H. Sasaki, N. Sonoda, K. Fujita, A. Nagafuchi, and S. Tsukita. "Ca²⁺-independent cell adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions" *Curr Biol.*, **9**, 1035–1038 (1999)
- 2) T. Shiobara, T. Usui, J. Han, H. Isoda and Y. Nagumo. "The reversible increase in tight junction permeability induced by capsaicin is mediated via cofilin-actin cytoskeletal dynamics and decreased level of occludin" *PLoS ONE*, **8**, e79954 (2013)