

可逆的タイトジャンクション開口物質の作用機構解析

向山 海風 (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・目的】

上皮細胞間接着構造の一つである Tight Junction (TJ) は、外界からの異物や病原菌等の侵入を防ぐバリア機能を担うと同時に、バイオ医薬品などの親水性高分子の通過障壁ともなっている (Fig. 1)。このためバイオ医薬品等の高分子薬剤の投与は、注射や点滴などの侵襲的な方法を取らざるを得ない。仮に TJ を短時間可逆的に開口することができれば、異物に対するバリア機能を損ねることなく、経口・経皮・経粘膜など患者の負担が少ない投薬が可能になり、患者の QOL 向上が期待できると考えられる。

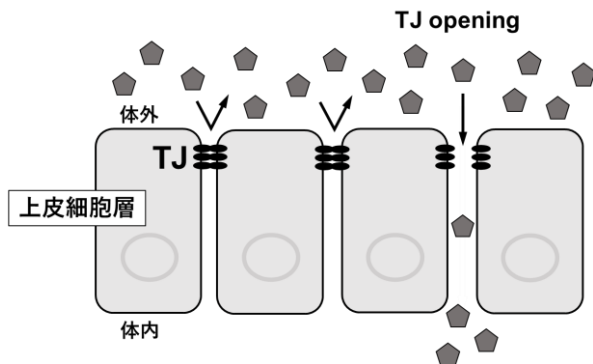


Fig. 1 上皮細胞層と Tight Junction の模式図

そこで当研究室では可逆的 TJ 開口物質の探索、作用機構解析を進めてきた。これまでにトウガラシの辛み成分であり、TRPV1 の agonist として知られている capsaicin による可逆的な TJ 開口機構解析を行い、capsaicin が TRPV1 ではなく TRPA1 依存的な Ca^{2+} 流入を引き金にして、cofilin の一時的な脱リン酸化 (活性化) と actin 局在変化、及び TJ 構成タンパク質 occludin 分解を誘導することで TJ を開口すること、一方で TJ 開口には actin 局在が回復することが重要であることを報告してきた^{1,2)}。

TRPA1 を代表とする TRP ファミリーイオンチャネルは、6 回膜貫通タンパク質であり、外界からの物理的・化学的刺激により活性化することで Ca^{2+} などのカチオンを細胞内へと流入させるイオンチャネルである (Fig. 2)。層形成させたイヌ腎臓上皮細胞 MDCK II の TRP ファミリータンパク質の mRNA 発現を調べたところ、TRPA1 以外の TRP チャネル発現が確認された。そこで本研究では、発現が確認された TRP チャネルの活性化が TJ 開口に及ぼす影響を検討した。

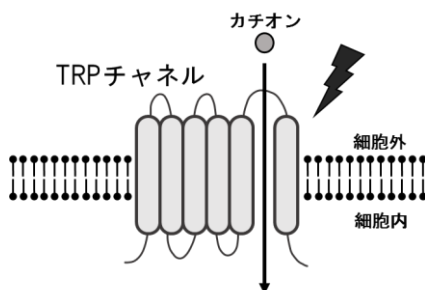


Fig. 2 TRP イオンチャネル模式図

【材料・方法】

細胞透過性試験

MDCK II 細胞を Transwell 上に単層形成させ、細胞の頂端側に薬剤を添加し、添加後 5 時間まで細胞透過性の変動を評価した。評価方法として、TER (経上皮抵抗値) 測定、及び 4 kDa の蛍光標識デキストラン (FD4) の透過量の測定を行った (Fig. 3)。

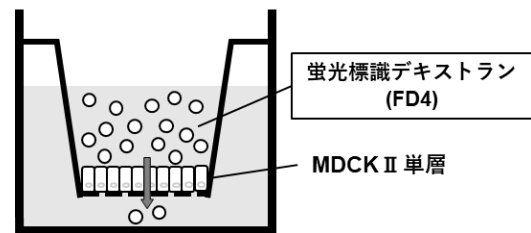


Fig. 3 細胞透過性試験の概略図

Cofilin 活性化検討

単層形成した MDCK II 細胞に薬剤処理を行い、SDS Sample Buffer で回収しサンプルとした。SDS-PAGE の後、Western blot 法を用いてリン酸化 cofilin のタンパク量の変動を解析した。

【結果・考察】

詳細は発表会にて報告する。

【参考文献】

- 1) Tomoko Shiobara, Takeo Usui, Junkyu Han, Hiroko Isoda, and Yoko 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)
- 2) Yusuke Kanda, Yohei Yamasaki, Yoshie Sasaki-Yamaguchi, Noriko Ida-Koga, Shinji Kamisuki, Fumio Sugawara, Yoko Nagumo and Takeo Usui “TRPA1-dependent reversible opening of tight junction by natural compounds with an α,β -unsaturated moiety and capsaicin” *Sci. Rep.*, **8**, 2251 (2018)