

博士学位論文

新規薬物吸収促進法構築のための密着結合
(tight junction) の開閉速度の制御及び
メカニズムに関する研究

平成25年度

昭和薬科大学大学院 薬学研究科

薬学専攻 博士課程

薬剤学研究室

鷺山 真紀子

【目次】

【緒論】	4
【本論】	6
第1章 TJ 開口過程の解明 —物理モデルの構築と実験的検証—	6
第1節 緒言	6
第2節 結果	6
第1項 MDCK 及び Caco-2 細胞における電気伝導度の変化	7
第2項 Claudin-4 (CLDN-4) の分布変化の検討	8
第3項 TJ 開口物質による細胞ダメージの評価	9
第3節 物理モデルの構築	9
第1項 TJ のモデル化	9
第2項 細胞単層膜の直流等価回路	12
第3項 パーコレーションの数学的基礎	13
第4項 解析のための方程式の導出	14
第4節 物理モデルの解析と検証	14
第1項 閾値 t_c の決定方法	14
第2項 臨界指数 μ の決定方法	16
第3項 異なる細胞、及び TJ 開口物質により得られる μ の検討	18
第5節 考察	18
第1項 μ と p_c に関する検討	18
第2項 有限サイズスケールリング効果に関する検討	19
第3項 C-CPE と C10 の挙動の差異に関する検討	20
第4項 本解析方法の応用と適用限界について	22
第5項 TJ 開閉の時間変化を司る因子に関する検討	23

第6節 小括	24
第2章 Sec61 β 過剰発現による TJ 開閉速度向上とメカニズムの検討	25
第1節 緒言	25
第2節 結果	27
第1項 Sec61 β 過剰発現による MDCK 細胞への影響	27
第2項 C-CPE 処理による TER の時間変化に及ぼす Sec61 β 過剰発現の影響	29
第3項 Claudin (CLDN) の発現量に及ぼす Sec61 β 過剰発現の影響	31
第4項 CLDN の分布に及ぼす Sec61 β 過剰発現の影響	34
第5項 CLDN-4 と Sec61 β の複合体形成に関する検討	37
第3節 考察	39
第1項 Sec61 β 過剰発現による TJ バリア性への影響に関する検討	39
第2項 Sec61 β 過剰発現による TJ 開閉速度への影響に関する検討	40
第3項 TJ バリア性の制御に関する戦略について	41
第4節 小括	42
【結論】	43
【実験の部】	44
第1章に関する実験	44
第2章に関する実験	49
【謝辞】	59
【参考文献】	60
【補遺】	66
APPENDIX-1 装置伝達関数の影響について	66
APPENDIX-2 $T_{1/2}$ の物理的背景について	68
APPENDIX-3 結合性評価のための方程式の導出	69

【略号・変数】	71
略号の定義	71
変数の定義	72
【外部発表】	75
学会発表	75
論文発表	75

【緒論】

薬物を組織内に送達するためには、一般的な低分子薬物の透過経路である経細胞膜ルート (transcellular route)、及び細胞間隙ルート (paracellular route) がある。ペプチドや核酸などの水溶性高分子の薬物は、細胞膜を透過しにくいいため、細胞間隙ルートによる透過が重要となる。しかし、細胞間隙にはタイトジャンクション (tight junction; TJ) と呼ばれる密着結合が存在しており、物質の透過が制限されている。TJ は上皮細胞間結合点の最も上部 (apical) に存在し、有害物質の侵入や有用物質の漏洩を防止する役割があり、TJ は主に分子量が約 20–30 kDa の膜タンパク質である claudin (CLDN) によって構成されていることが報告されている。CLDN は、4 個の膜ドメイン、及び 2 個の細胞外ループ (extracellular loop; ECL) を有し、現在までに 28 種類以上のサブタイプが知られている[1–3]。隣接する細胞の細胞膜上に存在する CLDN の 2 番目の ECL (ECL2) 間の *trans*-相互作用を通じて、TJ ストランドのネットワークを形成する[4–7]。TJ ストランドは直径が 5–10 nm のパーティクルが連続的に繋がった構造を有し、上皮細胞のバリア性を担っている [8]。これまで TJ からの薬物吸収を目的に TJ の物質透過性を制御するために数多くの取り組みがなされてきた[3,9–13]。

一方、唯一臨床で実績のあるカプリン酸ナトリウム (C10) をはじめ、Decanoylcarnitine、キレート剤であるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、菌毒素の一種である *Clostridium perfringens* enterotoxin の毒性部位欠損体である C 末端フラグメント (C-CPE) などが TJ を開口させる物質として見出されている。種々の上皮細胞単層膜をこれらの物質で処理すると、TJ のバリア性が低下し (TJ の開口)、経上皮膜電気抵抗 (TER) の低下や、物質透過性の向上を引き起こすことが明らかにされている。これら物質の作用機序および薬物促進剤としての利用について、広く研究がなされている[14–18]。

これまでに TJ を開口させる物質 C-CPE を利用して薬物吸収促進の検討がなされ、CLDN4 が発現しているラット小腸において、C-CPE が難吸収性モデル高分子薬物をして用いられる平均分子量 4000 の FITC-dextran (FD-4) の吸収を促進すること、また、この吸収促進作用に

は C-CPE と CLDN-4 の相互作用を介していること、小腸上皮細胞への障害性を伴わないことが見出されてきた[19]。C-CPE は物質透過の亢進作用は CLDN の発現分布により組織依存性があり、CLDN-4 を発現している空腸では亢進されるが CLDN-4 を発現していない結腸では認められない。一方、C10 は空腸と結腸の両方で、物質透過の亢進作用が認められた[19]。*In vivo* においては、ラットの腸管に C10 を作用させることで、TJ が開口するため、特に結腸膜を通した insulin 透過性が亢進し、EDTA や sodium deoxycholate と比較して相対的に細胞毒性が低いことが報告されている[20]。また、C10 をラットの頸動脈から投与することで、脳血管における脳関門の TJ バリア性を低下させ、中枢神経系への薬物送達を亢進するという報告もあり[21]、有用性と透過性向上を目指した C10 の投与方法に関する技術開発が行われている[22]。

これらの報告は、冒頭で指摘した、細胞間隙経路を利用した薬物送達法の開発が期待できることを示唆する[23]。その反面、不可逆的、或いは長時間の TJ のバリア機能の低下は、水などの有用物質の漏洩、有害物質の侵入により、深刻な副作用を引き起こす可能性がある。従って、細胞間隙経路を利用した薬物送達では、TJ 開口のみならず、TJ 再形成の制御技術が必要であり、これら両方を正確に制御することで、はじめて体内の薬物濃度を制御するとともに、有害な副作用を抑制することが可能となる。このためには、迅速な TJ の開閉が求められ、TJ 開閉の時間変化に関する知見が必要となる。しかしながら、これまで TJ 開口に関する研究が精力的に実施されてきたが、TJ 再形成、及び TJ 開閉の時間変化に関する研究例は少なく、十分な知見が蓄積されていないのが現状である。そこで、本研究では細胞間隙経路による薬物送達に重要となる TJ の開口、再形成の時間変化に着目した。このため、TJ 開閉の時間変化を説明するための物理モデルを構築し、TJ 開口・再形成の時間変化を司る因子を明らかにするとともに、TJ 開口・再形成を迅速化するための方策を検討することによって、TJ の開閉速度を考慮した新規薬物吸収促進法の基盤を構築することを目的とした。

【本論】

第1章 TJ 開口過程の解明 —物理モデルの構築と実験的検証—

第1節 緒言

吸収促進剤を作用させたときの TJ 開口に関する多くの研究がなされている。一方、TJ 閉機能の時間依存性は、薬物送達の観点から重要であるにも拘らず、十分理解されているとはいえない。そこで、本章では TJ 開閉の時間変化を説明するための物理モデルを構築し、実験的に検証するとともに、TJ 開閉の時間変化を制御する因子を解明することを目的とした。この目的のため、消化管上皮細胞の薬物透過モデルとして用いられるヒト結腸癌由来細胞 (human epithelial colorectal adenocarcinoma; Caco-2) と、イヌ腎尿細管由来細胞 (Madin-Darby canine kidney ; MDCK) 細胞を用い、吸収促進剤として唯一臨床で使用実績のある C10、及び研究段階ではあるが CLDN-3、CLDN-4 などと特異的に結合し TJ を開口する C-CPE を使用し TJ 開口の時間変化について検討した。まず、TJ バリア性の指標として TER の逆数である電気伝導度 (Σ_{TJ}) の経時変化を計測することによって、TJ 開口物質 (C10 または C-CPE) を Caco-2 細胞または MDCK 細胞の単層膜に作用させた際の、TJ 開閉の時間変化を詳細に検討した。次いで、得られた TJ 開閉状態を表す Σ_{TJ} の時間変化を説明する物理モデル (ランダム抵抗網) を構築し、 Σ_{TJ} の時間変化を記述する方程式をパーコレーション理論に基づき解析することによって、モデルの妥当性を検証した。最後に、モデルを考察することによって TJ 開閉の時間変化を制御する因子を検討した。

第2節 結果

本節では、TJ 開口物質 (C10、C-CPE) を細胞 (Caco-2、MDCK) 単層膜に作用させて TJ を開口させたときの、TJ バリア性の指標である電気伝導度 (Σ_{TJ}) の経時変化を詳細に検討した。物理モデルを構築・検証するために、約 10 s という短い間隔で計測し、TJ 開口初期における Σ_{TJ} の変化を検討した。

第1項 MDCK 及び Caco-2 細胞における電気伝導度の変化

Fig. 1-1 に、Caco-2 または MDCK 細胞の単層膜に C10 または C-CPE を作用させた後、細胞単層膜の電気伝導度 ($\Sigma_{\text{cell}}(t)$) を TJ 開口物質を添加する前の値 ($\Sigma_{\text{cell}}(0)$) で除した $r(t) = \Sigma_{\text{cell}}(t)/\Sigma_{\text{cell}}(0)$ の時間変化を示す。コンフルエントな Caco-2 細胞、及び MDCK 細胞単層膜の典型的な TER の値は、それぞれ $250 \Omega\text{cm}^2$ 、 $700 \Omega\text{cm}^2$ であった。Caco-2 細胞を C-CPE で処理した場合、 $r(t)$ はほぼ一定値 (約 1.1) に留まった後、増加し始める。一方、Caco-2 細胞を C10 で処理した場合、 $r(t)$ は t と共に増加した後、ほぼ一定値に留まった後、再度増加を開始した。MDCK 細胞を C10 または C-CPE で処理した場合も、Caco-2 細胞と同様な結果が得られた (Fig. 1-1)。これらの挙動に特徴的なのは、TJ 開口物質を作用させると、電気伝導度は、矢印で示す時間 (閾値) まではほぼ一定値に留まり、それ以降で急激に上昇することである。

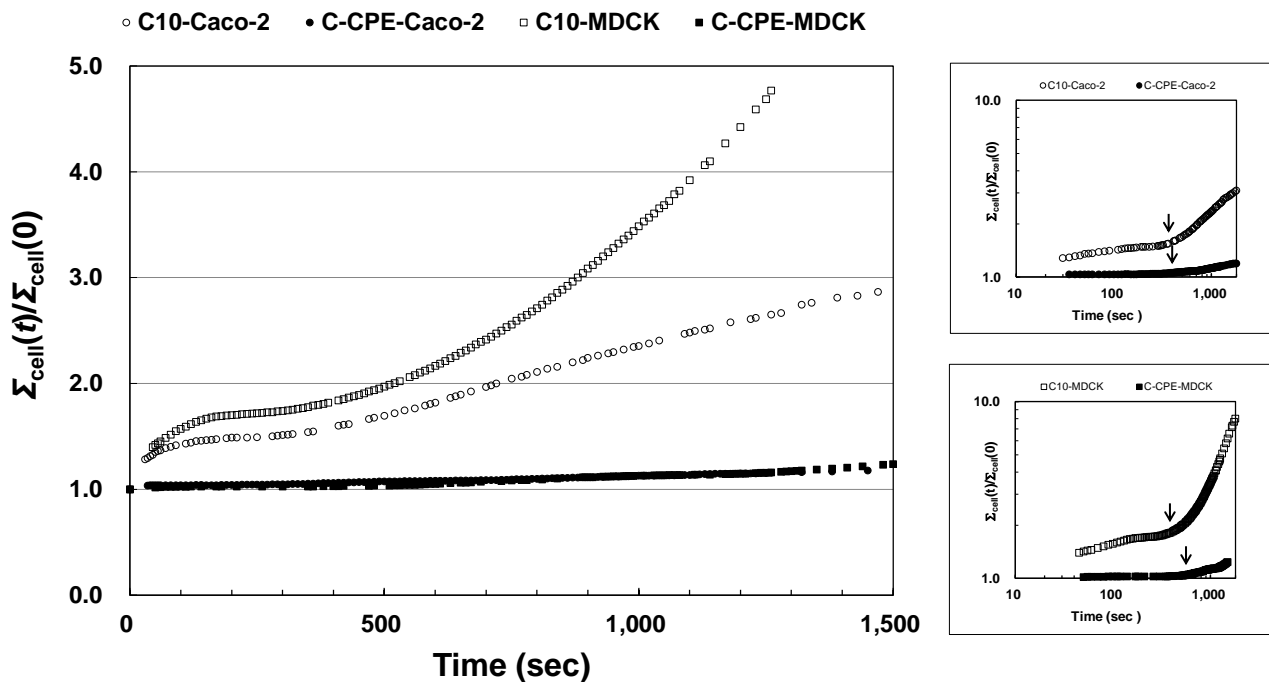


Fig. 1-1: Time course of $\Sigma_{\text{cell}}(t)/\Sigma_{\text{cell}}(0)$ in MDCK and Caco-2. Left panel: $\Sigma_{\text{cell}}(t)/\Sigma_{\text{cell}}(0)$ is plotted as a function of t for MDCK and Caco-2 cells. (○): C10-Caco-2; (●): C-CPE-Caco-2; (□): C10-MDCK; and (■): C-CPE-MDCK. Right panel: log-log graphs for Caco-2 (top) and MDCK (bottom) are illustrated.

第2項 Claudin-4 (CLDN-4) の分布変化の検討

次に、MDCK や Caco-2 細胞において、TJ のバリア性を支配する CLDN-4 の分布変化について検討した。その結果を Fig. 1-2 に示す。TJ 開口物質添加直前 ($t = 0$) では CLDN-4 は MDCK 細胞 (Fig. 1-2, row 1)、Caco-2 細胞 (Fig. 1-2, row 2) とも細胞膜に局在化している。両細胞とも CLDN-4 の局在状態は、C10 や C-CPE で処理せずに 24 h インキュベートしたものと変化は観られなかった (Fig. 1-2, Control 24 h; 最右列)。両細胞とも C10 で処理した場合、 $t = 3 \text{ min}$ でも CLDN-4 は細胞膜に局在化しているが、 $t = 30 \text{ min}$ では細胞膜での局在化は消失し、細胞質中に分布した。これは、ZO-1 の PDZ1 ドメインが CLDN-4 の C 末端の YV モチーフと結合するため[4]、C10 によって zonula occludens (ZO-1) が細胞質中へ分布[24]するのに伴い、CLDN-4 も細胞質中に分布したと考えられる。一方、C-CPE 処理では両細胞とも $t = 3 \text{ min}$ でも CLDN-4 は細胞膜に局在化しているが、 $t = 2 \text{ h}$ では細胞膜での局在化は弱まり (一部の非局在化)、 $t = 24 \text{ h}$ では CLDN-4 は殆ど消失した。CLDN-4 の分布状態の変化と、電気伝導度の変化はよく対応するので、 Σ_{cell} や Σ_{TJ} の挙動には、CLDN-4 が細胞膜から非局在化する速度が反映されると考えられる。

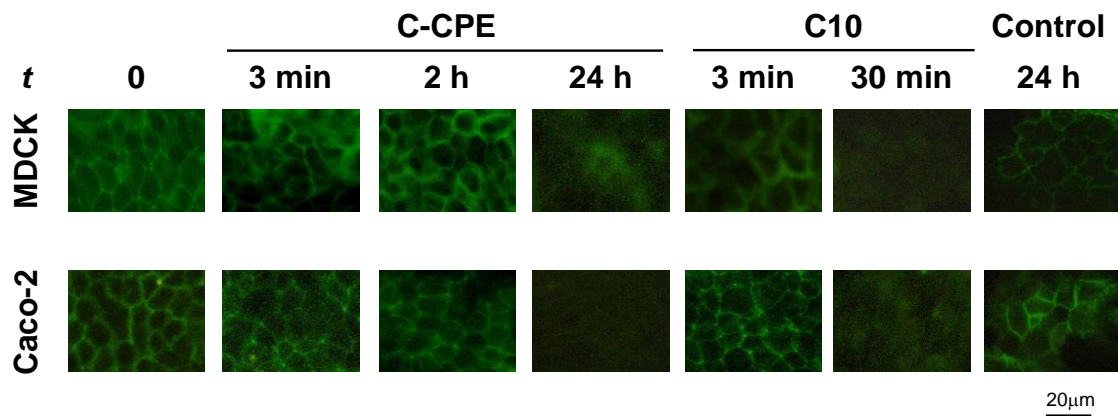


Fig. 1-2: Time Course of the Distribution of Claudin-4. MDCK (row-1) and Caco-2 (row-2). The most right images were negative controls, where incubation was performed without the addition of C10 or C-CPE.

第3項 TJ 開口物質による細胞ダメージの評価

C10またはC-CPE処理によって、細胞膜にダメージが加わった場合、Lactate Dehydrogenase release rate (*LRR*)が大きくなる。本研究では、TJの電気伝導に着目しているため、細胞ダメージの影響を把握することが必要となる。Table 1-1にCaco-2またはMDCK細胞をC10またはC-CPEで処理した場合の*LRR*の値をまとめた。その結果、*LRR* < 5.1% (C10)、*LRR* < 1% (C-CPE)であり、細胞毒性は、本実験の時間の範囲では無視できると考えられる。

Table 1-1: Lactate Dehydrogenase release rate (*LRR*) for Caco-2 and MDCK cells treated with C10 or C-CPE for 30 min. (unit in %)

	Caco-2	MDCK
C10	5.1	3.7
C-CPE	1.0	0.0

第3節 物理モデルの構築

第1項 TJ のモデル化

TJ の構造とバリア機能を関連付けるための多くのモデルが提案されてきた。その中で strand-count model [25]と binary sieving model [26]が典型的なものである。前者のモデルでは、TJ ストランド数と TER を関連付けるもので、TJ ストランドの電気抵抗は細胞に依らず一定であることを仮定している。現在、TJ ストランドの電気抵抗値は CLDN の組み合わせ（即ち細胞種）に強く依存することが知られているため、このモデルは必ずしも妥当ではないという指摘がある[2,13]。それに対し、後者のモデルは、内径の異なる中空管（物質の導通路）を並列に結合したもので、透過係数の分子量依存性を説明することができる。TJ 開口物質を作用させたときの TJ 開口過程を考えた場合、前者の strand-count model では、TJ ストランド数が時間と共に減少することにより、後者の binary sieving model では、中空管の数が増加することにより説明される。いずれのモデルも、TJ の深さ方向の輸送のみを考慮し、垂直方向（ラテラル方向と呼ぶ）の移動は考慮していないため、Fig. 1-1 で観察された閾値の存

在を予測することが困難である。また、静的な TJ ストランドの構造を基にしているため、TJ の電気伝導度の時間変化を表わすことができない。このため、TJ の構造を表すパラメータを各時間の電気伝導度の実測値に合わせる必要があり、実用的ではないという問題がある。そこで、本章では、TJ ストランドの構造変化を基にした物理モデルの構築を検討した。

TJ ストランドは、TJ 開口物質を作用させない場合でも、約 30 min 以下という短い時間内で動的にそのトポロジーを変化させていることが報告されている[27]。従って、TJ 中では、TJ ストランドが未形成で電気伝導度の高い部分（以下□）と、TJ ストランドが形成され電気伝導度の低い部分（以下■）が固定化されているわけではなく、ランダムに分布して連結していると考えられる。この状況を考慮すると、TJ 開口物質を作用させることにより、TJ ストランドが未形成で電気伝導度の高い部分（□）の割合（ p ）が増加し、系の電気伝導度に変化するというモデル化が可能であると考えた。この物理的な現象は、ランダム抵抗網における電気伝導度と等価である。

TJ の構造をランダム抵抗網で表すと、Fig. 1-3 の様にモデル化できる。Fig. 1-3 に、□の割合（ p ）が 0.3（ $p = 0.3$: 左図）、及び $p = 0.7$ （右図）の場合について、 20×20 の正方格子を用いてコンピューターシミュレーションした結果を示す。 $p = 0.3$ の場合、□の塊（クラスターと呼ぶ）は孤立し、系全体に広がっていないが、 $p = 0.7$ の場合、□のクラスターは系全体に広がり、上下、左右に端から端まで繋がることが判る。系全体に広がるクラスターは、 p がある値（ p_c : 閾値）を境にして出現することが知られており、このような現象はパーコレーション（または浸透）と呼ばれる。Fig. 1-3 の正方格子の場合、 $p_c = 0.593$ であることが報告されている[28]。

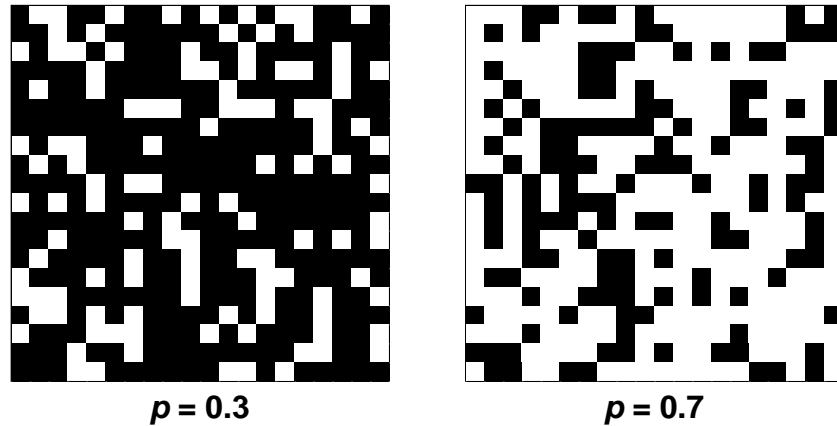


Fig. 1-3 : Percolation on a square lattice (20×20) obtained by computer simulation. White and black cells represent electrical conductor and insulator, respectively. For $p < p_c$ ($p_c = 0.593$ in this square lattice), white clusters are isolated (not percolate), while for $p > p_c$, a single white cluster percolating throughout the system can be seen.

このようなモデルの電気伝導度を考えると、 $p \leq p_c$ では□が孤立しているために、系の電気伝導度は低く、 $p > p_c$ で□が系全体に広がるため、電気伝導度は急激に増加することが判る。このようなパーコレーション現象は、複合材料における電気伝導度、森林火災の広がり、強磁性体など多くの系で観察されている[28]。これらの挙動は、Fig. 1-1 で得られた細胞単層膜の電気伝導度の挙動の特徴とよく一致するものである。

ランダム抵抗網における電気伝導度に関する理論的、及びコンピューターシミュレーションによる研究により、電気伝導度は、 $p > p_c$ の時に臨界指数 (μ) を用いて $\Sigma \propto (p - p_c)^\mu$ のように、べき乗則に従って急激に増加することが明らかにされている[28]。 p_c は系の空間次元 (d)、及び詳細 (格子形状など) に依存するが、 μ は系の詳細に依らず、 d のみに依存することが知られている[28]。理論、実験、コンピューターシミュレーションによる研究によって、多くの格子形状や d に対して p_c と μ の値が報告されている[28]。生物学的な系では細胞骨格を通した物質輸送、シグナル伝達についてパーコレーションネットワークモデルが検討され、細胞骨格を構成するフィラメントの濃度が増加し、ある閾値を超えると、急激にタンパク質の細胞膜から核への到達時間が短くなることが報告されている[29]。

第2項 細胞単層膜の直流等価回路

本項では、TJ の電気伝導度をランダム抵抗網におけるパーコレーションによってモデル化し、関連する数学的基礎を与え、今後の解析を行うための基礎方程式を導くことを目的とする。TER の測定は直流で実施するので、細胞単層膜の直流等価回路は Fig. 1-4 の様に表現できる。以下の取り扱いでは、TER に反比例する電気伝導度 (Σ) を用いて方程式を構築する。

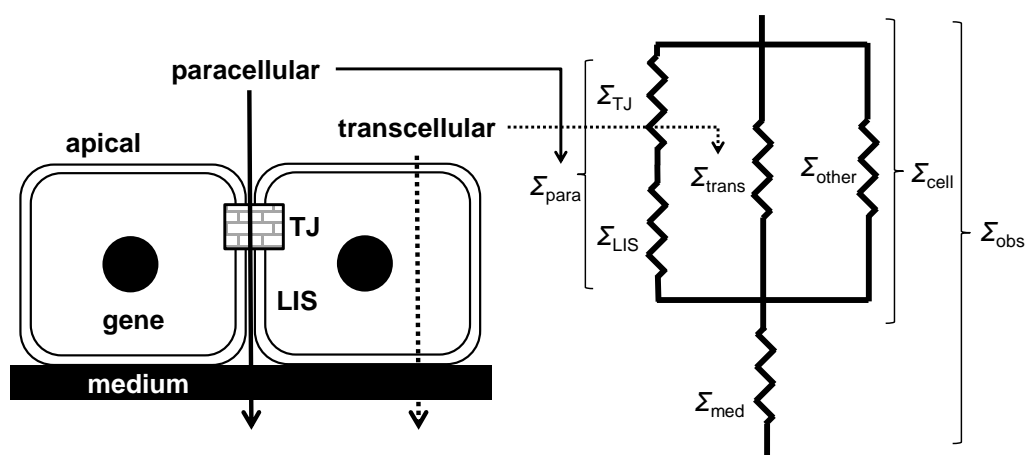


Fig. 1-4 : Equivalent direct current (DC) circuit for the TJ system. In paracellular route, TJ connects with LIS in series with which connect the transcellular and other routes in parallel. The resulting circuit connects with medium (corresponding to a blank dish without cell monolayer) in series. Σ_{obs} and Σ_{med} can be obtained experimentally.

細胞間隙部は、直列に結合した TJ とデスモゾーム等の lateral intercellular space (LIS) から構成され、電気伝導度はそれぞれ Σ_{TJ} 、 Σ_{LIS} である。細胞膜部 (Σ_{trans})、及びピンホールなどのそれ以外 (Σ_{other}) の部分が細胞間隙部と並列に結合している。TJ が十分に発達した場合は、 $\Sigma_{TJ} \ll \Sigma_{LIS}$ であることが報告されている[13]。この中で、実測可能な値は、 Σ_{obs} と、 Σ_{med} であり、細胞単層膜の電気伝導度 (Σ_{cell}) は $\Sigma_{cell} = \Sigma_{obs} - \Sigma_{med}$ で与えられる。従って、このような回路の Σ_{cell} は、 $\Sigma_{TJ} \ll \Sigma_{LIS}$ を考慮すると近似的に(1-1)式で表すことができる。

$$\Sigma_{cell}(t) \approx \theta_{para} \Sigma_{TJ}(t) + \theta_{trans} \Sigma_{trans}(t) + \theta_{other} \Sigma_{other}(t) \quad (1-1)$$

式中の θ_{para} 、 θ_{trans} 、 θ_{other} は、それぞれ細胞間隙部、細胞膜部、それ以外の部分の分率を表す。

第3項 パーコレーションの数学的基礎

TJ 中で、電気伝導度の高い要素、及び低い要素の電気伝導度をそれぞれ σ_1 と σ_2 とした。

(先に定義したように、電気伝導度が高い要素 (□) の割合は p である。) 以下の議論のため、各要素の電気伝導度の比 ($h = \sigma_2/\sigma_1 < 1$) を導入しておく。有効媒質近似 (平均場近似に相当する) [30] や実空間繰り込み群 (疎視化・スケール変換の繰り返し (Kadanoff 変換と呼ぶ) によって、系の大域的な挙動を抽出する) [31] によるアプローチによれば、TJ をランダム抵抗網でモデル化したときの Σ_{TJ} は (1-2)、(1-3) 式で記述できる[30–32]。

$$\Sigma_{\text{TJ}} = \sigma_1 |\Delta p|^\mu \Phi_\pm(z) \quad (1-2)$$

$$z \equiv h/|\Delta p|^{s+\mu} \quad (1-3)$$

ここで、 z は TJ のバリア性を反映し、タイトな TJ 系では $z \ll 1$ となる。 $\Delta p = p - p_c$: p_c は p の閾値 (threshold) である。 μ 及び s は、それぞれ $\sigma_2 = 0$ (絶縁体)、 $\sigma_1 \rightarrow \infty$ (超伝導体) の場合の臨界指数を表す。 $\Phi_\pm(z)$ は、スケーリング関数と呼ばれ、(1-4) 式で与えられる[32] : 下添字の \pm は Δp の符号を表す。

$$\Phi_+(z) \cong A_{1+} + A_{2+}z + \dots \quad \text{for } z \ll 1 \text{ and } \Delta p > 0 \quad (1-4A)$$

$$\Phi_-(z) \cong A_{1-}z + A_{2-}z^2 + \dots \quad \text{for } z \ll 1 \text{ and } \Delta p < 0 \quad (1-4B)$$

TJ 開口過程では、TJ 開口物質の添加によって、 p は $p < p_c$ の状態から、閾値を超えて増加する ($p > p_c$)。この過程を解析するために、 $p = p_c$ を挟んだ領域における Σ_{TJ} の挙動を表す方程式を導出する。 $z \ll 1$ の場合、(1-2)、(1-3)、(1-4) 式から (1-5) 式を得る。

$$\Sigma_{\text{TJ}}/\sigma_1 \propto h \times |\Delta p|^{-s} \rightarrow 0 \quad \text{for } \Delta p < 0 \quad (1-5A)$$

$$\Sigma_{\text{TJ}}/\sigma_1 \propto h^{\mu/(s+\mu)} \rightarrow 0 \quad \text{for } \Delta p = 0 \quad (1-5B)$$

$$\Sigma_{\text{TJ}}/\sigma_1 \propto \Delta p^\mu \quad \text{for } \Delta p > 0 \quad (1-5C)$$

(1-5) 式から $p \leq p_c$ では Σ_{TJ} はほぼ一定値 ($\rightarrow 0$) に留まり、 $p > p_c$ では Σ_{TJ} はべき乗則に従って急激に増加することを示す。一方、 $0 < z < 1$ の場合、 $\Phi_+(z)$ は(1-4A)式において第2項ある

いはより高次の項を必要とし、(1-5C)式のスケーリング則からの乖離が起る。例えば、(1-4A)式の第2項まで考慮し、(1-5C)式と比較することにより、 $0 < z < 1$ の場合は、 μ は $z \ll 1$ の場合よりも小さくなることを容易に示すことができる。実空間繰り込み群による計算でも、 μ は $z \ll 1$ の場合よりも小さくなることが示されている[31]。本実験系で、TJが十分に開口した時の電気伝導度は、TJが閉じた時の50–100倍程度であるので、 $z \ll 1$ であり、密なTJに相当する。

第4項 解析のための方程式の導出

一般的に、 p は時間の関数 ($p = f(t)$ とする) であるので、これを $p = p_c$ に相当する時間である $t = t_c$ と $p = p_c$ の近傍でTaylor展開すると(1-6)式を得る。即ち、 t_c 近傍では、 Δp は Δt ($= t - t_c$)に比例する。

$$\Delta p \approx \left. \frac{\partial f(t)}{\partial t} \right|_{t=t_c} \times \Delta t \quad (1-6)$$

(1-1)、(1-5C)、(1-6)式を組み合わせると、閾値を越えた領域で(1-7)式を得る

$$\frac{\Sigma_{\text{cell}}(t) - \Sigma_{\text{cell}}(t_c)}{\Sigma_{\text{cell}}(t_c)} = \frac{\Sigma_{\text{cell}}(t)}{\Sigma_{\text{cell}}(t_c)} - 1 \propto \Sigma_{\text{TJ}}(t) - \Sigma_{\text{TJ}}(t_c) \approx \Sigma_{\text{TJ}}(t) \propto \Delta t^\mu \quad (1-7)$$

ここで、左辺の分子で、時間 $t = t$ と $t = t_c$ における電気伝導度の差を取るのには、Fig.1-4における $\Sigma_{\text{trans}}(t)$ 、 $\Sigma_{\text{other}}(t)$ からの寄与を相殺し Σ_{TJ} を取り出すためである。また、 $\Sigma_{\text{cell}}(t_c)$ で除するのは、無次元化することによって取り扱いを簡便にするためである。以降の解析には (1-7)式を使用する。

第4節 物理モデルの解析と検証

第1項 閾値 t_c の決定方法

本項では、(1-5)式の t_c を決定する方法を説明する。Fig. 1-5 に Caco-2 細胞を C10、または C-CPE で処理した場合を例として、縦軸に $\log[\Sigma_{\text{cell}}(t) / \Sigma_{\text{cell}}(0) - 1]$ を、横軸に $\log(t)$ をプロットした。このプロットの屈曲点が閾値 t_c に対応し、各々矢印で示す。

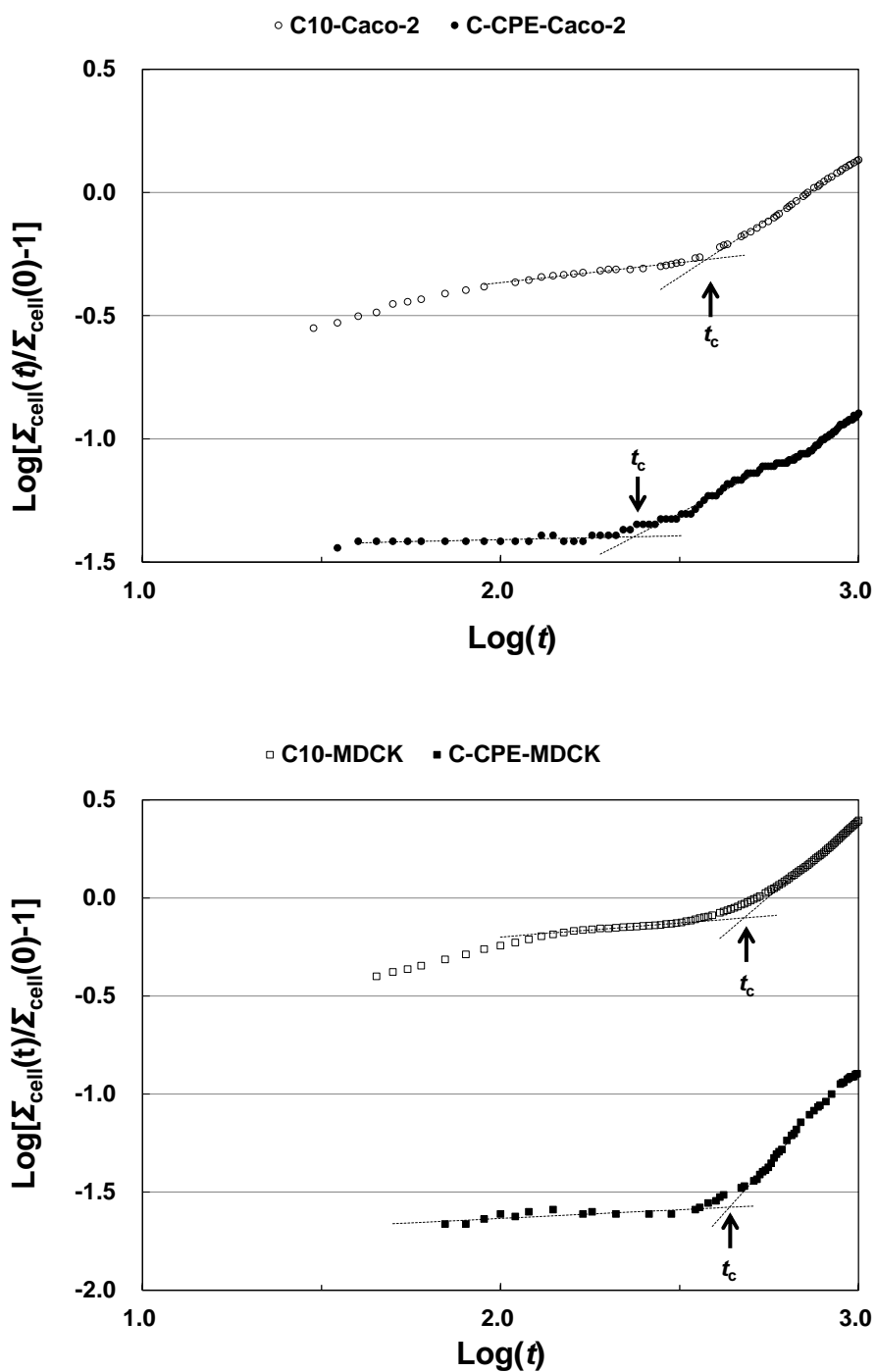


Fig. 1-5: Relationship between $\text{Log}[\Sigma_{\text{cell}}(t)/\Sigma_{\text{cell}}(0) - 1]$ and $\text{Log}(t)$. $\text{Log}[\Sigma_{\text{cell}}(t)/\Sigma_{\text{cell}}(0) - 1]$ is plotted as a function of $\text{Log}(t)$ to calculate t_c (arrows). The dotted lines are calculated from the least squares regression analysis. Top (○): representative C10-Caco-2; (●): representative C-CPE-Caco-2, Bottom. representative C10-MDCK; (●): representative C-CPE-MDCK. The arrows represent the t_c .

第2項 臨界指数 μ の決定方法

先項で、 t_c を決定したので、本項では μ の決定法を説明する。(1-7)式を参考にして、 $\Delta t \geq 0$ に対して $\text{Log}[\Sigma_{\text{cell}}(t)/\Sigma_{\text{cell}}(t_c) - 1]$ vs. $\text{Log}(\Delta t)$ のプロットを Fig. 1-6 に示す。このプロットは直線となり、べき乗則が成立することを示す。閾値の存在とべき乗則の成立が確認できたため、TJ の開口過程はパーコレーション理論で説明できることが明らかとなった。Fig. 1-6 の直線の傾きから臨界指数 μ を求めることができる。

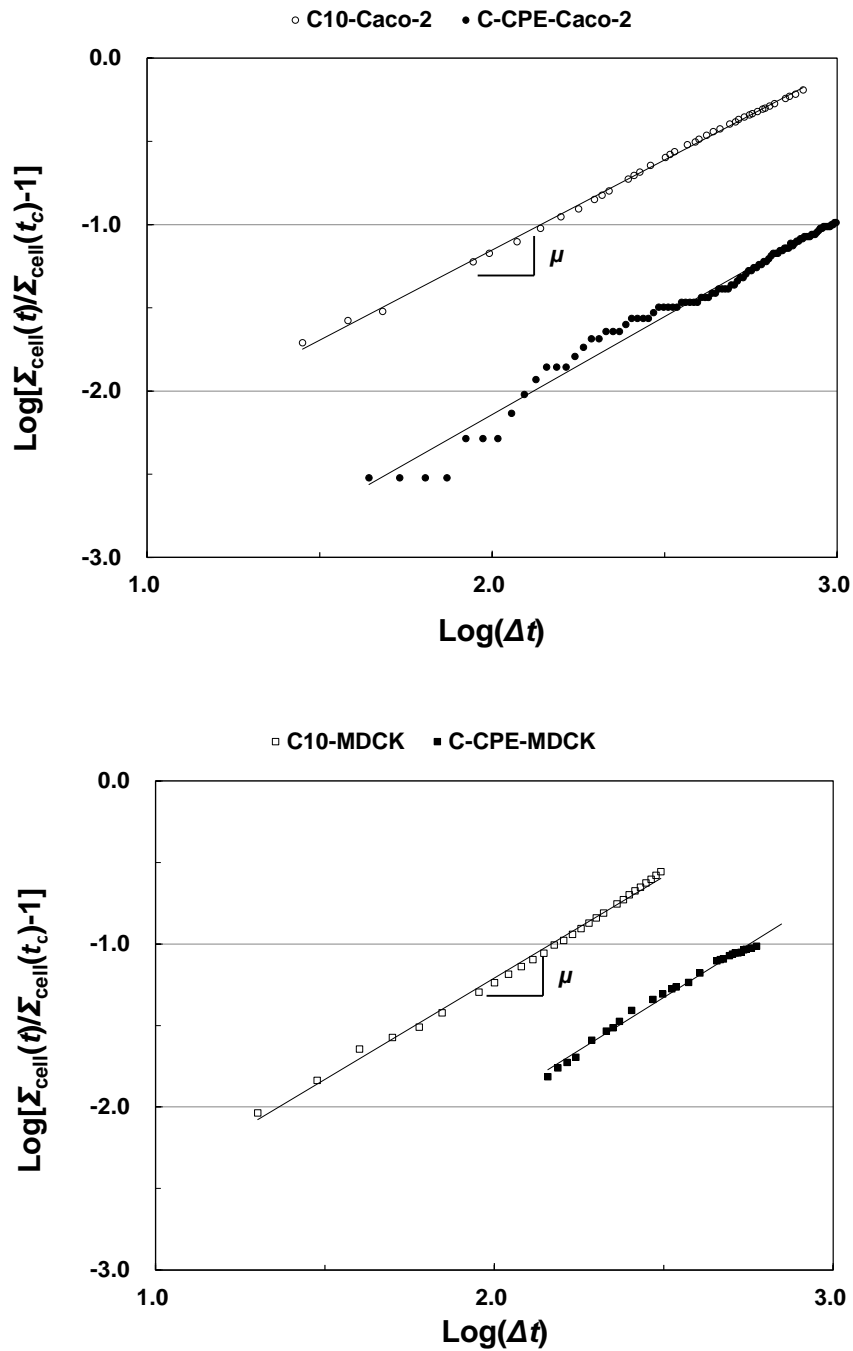


Fig. 1-6: Relationship between $\text{Log}[\Sigma_{\text{cell}}(t)/\Sigma_{\text{cell}}(t_c) - 1]$ and $\text{Log}(\Delta t)$. $\text{Log}[\Sigma_{\text{cell}}(t)/\Sigma_{\text{cell}}(t_c) - 1]$ is plotted as a function of $\text{Log}(\Delta t)$. Top (○): C10-Caco-2; (●): C-CPE-Caco-2. The slope, which corresponds to μ , for C10-Caco-2 and C-CPE-Caco-2 is 1.08 ($R^2 = 0.998$) and 1.18 ($R^2 = 0.981$), respectively. Bottom (□): C10-MDCK ($R^2 = 0.996$); (■): C-CPE-MDCK ($R^2 = 0.992$). The solid lines are calculated from the least-squares regression analysis.

第3項 異なる細胞、及び TJ 開口物質により得られる μ の検討

Table 1-2 に本研究で得られた μ の値を示す。また、Table 1-3 に $d = 2$ (正方格子)、3 (立方格子)、Bethe 格子について理論やシミュレーションで得られた μ の値を示す[28,32]。

Table 1-2: The critical exponent, μ , obtained in this study.

Cell	Modulator	μ
MDCK	C10	1.18 ± 0.06
MDCK	C-CPE	1.12 ± 0.06
Caco-2	C10	1.15 ± 0.03
Caco-2	C-CPE	1.12 ± 0.05

Table 1-3: The critical exponent, μ , obtained for $d = 2$ square, $d = 3$ cubic, and Bethe lattice.

Lattice	Method	μ
$d = 2$	simulation	~ 1.3
$d = 2$	theory	1.26–1.33
$d = 3$	simulation	2.0
$d = 3$	theory	1.80–2.05
Bethe	simulation	3.0
Bethe	theory	3.0

本研究では細胞や TJ 開口物質の種類に依らず $\mu = 1.1-1.2$ を得た。これらの値は $d = 2$ に相当する値 ($\mu = 1.3$) に近く、TJ の開口は $d = 2$ のパーコレーション現象であることを示唆する。

第5節 考察

第1項 μ と p_c に関する検討

TJ 開口は細胞間隙で起り、その厚みは水和イオンのサイズである 1 nm 程度であることが知られている[26]。従って、細胞間隙ではイオンは深さ方向と、それと垂直な方向 (ラテラル方向) の移動のみが可能となる。また、深さ方向の TJ ストランドネットワークのサイズは 200–500 nm であり[8]、3 個の細胞が接触する tricellular-point 間の距離である 10–20 μm

(Fig. 1-2 参照) よりも極めて小さい。このため、イオンが tricellular-point を超えて隣の TJ 中に入るという経路を通過する割合は極めて小さく、tricellular-point の効果は無視できると考えられる (Fig. 1-7)。このため、個々の細胞側面に存在する TJ は独立したものとして取り扱うことができると考えられる。従って、TJ 中のイオンの移動は深さ方向とラテラル方向の2次元となり、 μ が $d=2$ に相当する値となったと解釈できる。

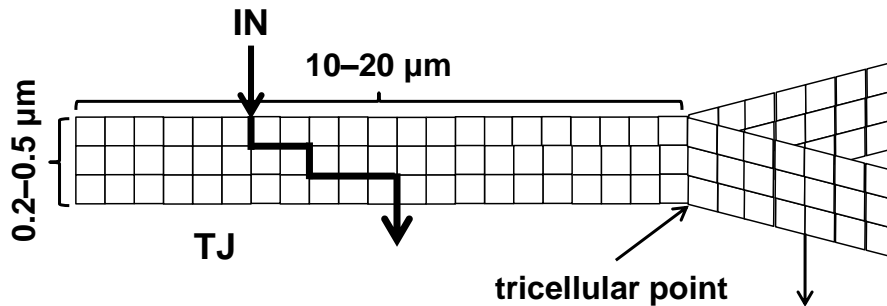


Fig. 1-7: TJ near a tricellular point. The size of TJ is approximately 10–20 μm (length) × 1 nm (width) × 0.2–0.5 μm (depth).

穴の空いたグラファイトシート (サイズ: 50 × 50) における電気伝導度は、 $p_c = 0.6$ で増加し始めることが報告されており[33]、この時の p_c は正方格子上的サイトパーコレーション (格子のマス目の繋がりを反映) における閾値である $p_c = 0.593$ とほぼ等しい。しかしながら、本研究の系では、細胞の形状や、TJ ストランドネットワークは、完全な正方格子ではなく乱れがあるので、正確な p_c の値を得ることは困難である。ただし、本研究の系はボンドパーコレーション (格子の辺の繋がりを反映) であり、TJ ストランドネットワークの形状は正方格子と六方格子の中間的なものであることから、 $p_c = 0.50-0.65$ と見積もることができると考えられる[28]。

第2項 有限サイズスケーリング効果に関する検討

先項で指摘したように、本研究の系では TJ ストランドネットワークの深さ方向のサイズはラテラル方向のサイズに比べて非常に小さい。このため、系を無限大のサイズとするには十分な大きさとはいえない。このようなサイズの影響は、有限サイズ効果とよばれ、 p_c や μ

が小さくなることが報告されている[34,35]。実際に、Table 1-2 にまとめた μ は、Table 1-3 の $d=2$ の値よりも小さくなっている。有限サイズの効果のため、系の電気伝導度 Σ は系のサイズに依存し、(1-8)式で表せることが報告されている[34,35]。

$$\Sigma \propto L_z^{-\mu/\nu} = L_z^{-0.975} \approx L_z^{-1} \quad (1-8)$$

ここで、 L_z 、 ν はそれぞれ深さ方向の系の大きさ（電気伝導体の数に比例）、相関長に対する臨界指数であり、 $d=2$ に対して $\nu=4/3$ である[32,34,35]。もし、 L_z が CLDN-4 の量 (Q_{CLDN4}) に比例するならば、 Σ は近似的に Q_{CLDN4} に反比例（或いは TER は Q_{CLDN4} に比例）することを示唆する。TER が CLDN-4 の発現量 (Q_{CLDN4}) に比例するという結果[36]が報告されているので、有限サイズ効果によって、Table 1-2 に示すように、 μ の値が小さくなったと考えられる。

第3項 C10 と C-CPE の挙動の差異に関する検討

Fig. 1-1 に示すように、両細胞とも C10 と C-CPE では TJ 開口の挙動が異なる。このような C10 による二段階の TER ($1/\Sigma_{\text{cell}}$ に比例) の変化は過去にも報告されている。以下の議論で $r(t)$ が最初に増加したところ (2-3 min) までを early-stage、次に増加する過程 ($t > t_c$) を late-stage と呼ぶことにする。C10 で処理した場合、early-stage において $r(t_c)$ は約 2.0 (Caco-2 細胞) ないし約 1.6 (MDCK 細胞) であり (Fig. 1-1)、それぞれ過去の報告 (約 2.0 : Caco-2 細胞、約 1.4 : MDCK 細胞) とよく一致する[24,26,37,38]。Caco-2 細胞と MDCK 細胞における $r(t_c)$ の差は、C10 に対する感受性の違いのためと考えられる。

C10 で処理した場合、以下の機序で TJ 開口が起こることが報告されている。第一に、細胞間隙が開くことによって、 Σ_{TJ} 、 Σ_{LIS} が大きくなる。この過程は C10 によって phospholipase C (PLC) が活性化されて細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇するため、myosin light chain kinase (MLCK) がリン酸化される。この結果、actin-myosin フィラメントが収縮し[24,39] 細胞間隙のギャップが開く。しかしながら、C10 処理後 1-2 min 程度で細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇する[15]にも拘らず、MLCK の阻害剤が late-stage ($t > t_c$) でのみ効果があるので、この機序は late-stage でのみ作用していると考えられる[24]。

第二に、ZO-1 の細胞膜からの非局在化[24]、或は脂質 rafts の破壊に伴う CLDN-4 の細胞膜からの非局在化により Σ_{TJ} は増加する[38]。しかし、Fig. 1-2 の結果から、C10 添加後 3 min 以内では、CLDN-4 の細胞膜からの非局在化は起こらず、30 min 程度で起こることが観察されたため、early stage における Σ_{TJ} の増加は、CLDN-4 の細胞膜からの非局在化により TJ スtrandが解離したものとは考えにくい。最後に、細胞膜の乱れ (membrane perturbation) は、3 min 以内で Σ_{trans} を増加させる[40]。この 3 min という時間は、本研究で観察された early-stage の時間 (数分) とほぼ同等である。Table 1-1 の結果から、C10 による 30 min の処理では、 $LRR < 5\%$ であったため、C10 による細胞膜のダメージは小さく、 Σ_{trans} の増加は限定的と考えられるが、 θ_{trans} は大きいので、ここからの寄与である $\theta_{trans}\Sigma_{trans}$ は無視できない。さらにモルフォロジーの変化も Σ_{other} に影響を与える可能性がある。

上記の観察結果に対する考察から、early-stage における $r(t)$ の増加は、 Σ_{TJ} の増加によるものではなく、細胞膜の乱れに起因した Σ_{trans} の増加によるものと考えられる。Binary sieving model に基づく解析から、C10 処理による透過性の向上は、中空管の内径が増加するのではなく、中空管の数が増加によることが明らかにされた[26]。この結果は、本研究のパーコレーションモデルにおいて、 σ_1 や σ_2 が増加したのではなく、 p が増加したことに相当する。従って、(1-5)式から、もし early-stage において Σ_{TJ} が主として Σ_{cell} を制御しているのであれば、 $r(t)$ は C-CPE の場合の様に、ほぼ一定値に留まるはずであるが、実際はそうになってはいない。さらに、酵素活性が著しく抑制される 4 °C で実験を行うと、 $t = 200$ s までに $r(t)$ は 1.2–1.3 に増加するが、その後 $t = 1200$ s までほぼ一定となる。これらの結果は、early-stage は物理化学的な過程であることを示唆する。従って、early-stage における $r(t)$ の増加は、少なくとも細胞膜の乱れ、ないしは細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇による Σ_{trans} の増加が関与して引き起こされると考えられる。 $r(t_c)$ はほぼ一定の値であるので、early-stage は $t = t_c$ までに完了すると考えられる。対照的に、C-CPE は細胞膜を透過しないので[8,16]、著しい細胞膜の乱れを引き起こさない。このため、early-stage では、 $r(t) \approx r(t_c) < 1.1$ とほぼ一定となる。もし細胞膜の乱れが起るならば、 $r(t_c) < 1.1$ よりもむしろ $r(t_c) = 1.6–2.0$ になるはずである。この結果は、

C-CPE は、 $LRR < 1\%$ であり、C10 の LRR 値に比べて小さく、細胞膜のダメージが少なかったこととも対応する。

第4項 本解析方法の応用と適用限界に関する検討

本研究では、異なった動物種・臓器から得られた上皮細胞である Caco-2、MDCK 細胞を使用した。また、異なる TJ 開口物質（従って TJ 開口機序が異なる）を使用した。さらに Caco-2 細胞と MDCK 細胞では CLDN のサブタイプの発現量（特に CLDN-2、-3）が異なる [5,39,41,42]。このような差異があるにも拘らず、細胞、及び TJ 開口物質に依らず臨界指数の値は、 $\mu = 1.1-1.2$ とほぼ一定値であった。即ち、 μ は TJ 開口の機序や TJ のバリア性に関与する CLDN のサブタイプには依存しない。従って、パーコレーションは、TJ 開口時における上皮細胞単層膜の電気伝導度において普遍的な現象であると考えられる。このため、複数の細胞膜層（複層系）から構成されている場合にも、本研究のパーコレーション理論に基づいた解析方法は、適用できると考えられる。しかしながら、その様な系に対する μ の値は単層膜の値とは異なると考えられる。この場合、細胞層間の電気伝導を考慮すべきであるため、深さ方向のサイズは大きくなり、Fig. 1-7 で示した tricellular point を超えて、下層に存在する細胞のラテラル面を通過する経路は無視できなくなる。従って、個々の細胞側面に存在する TJ は最早独立したものとして取り扱うことができず、イオンの透過経路は3次元に近づく。このため、 $d > 2$ となり、Table 1-3 で $d = 2$ と 3 の比較から分かるように、 μ の値は大きくなると考えられる。

緒言でも指摘したように、一般的に、タンパク質や核酸などの水溶性高分子薬物の送達においては、TJ を通した拡散・透過が、ますます重要になってくる。電気伝導度と拡散係数 (D) のアナロジーから、 D についても、(1-5C)、(1-7)式と同じ関係（スケーリング関係）が成立する[28]。このため、本章で示したパーコレーションの解析方法は TJ を通した拡散現象にも適用可能である。

本章のパーコレーション解析方法は、いくつかの適用限界があることを指摘しておく。第一に、 $h \rightarrow 1$ ($0 < z < 1$) の様な非常に leaky な TJ 系に適用するには (1-5)式の近似は適切では

なく、傾き $\mu = \partial \text{Log}(\Sigma) / \partial \text{Log}(\Delta p)$ は、 $p = p_c$ 近傍で一定値にはならず、また、第3節、第3項で指摘したように、 $z \ll 1$ の時よりも小さくなる[31,32]。最も極端で簡単な例として、 $h = 1$ の場合では、 $\mu = \partial \text{Log}(\Sigma) / \partial \text{Log}(\Delta p) = 0$ となり、 μ の値は $z \ll 1$ の時よりも小さい。実空間繰り込み群によるスケーリング関数 $\Phi_{\pm}(z)$ の計算から、(1-5)式の近似は $h < 0.1$ で良い近似となると考えられる。第二に、細胞膜の乱れなどにより $\Sigma_{\text{trans}}(t)$ 、或は $\Sigma_{\text{other}}(t)$ が、 $t > t_c$ でも増加する場合は、これらからの寄与があるため、(1-7)式は良い近似とはいえず、 μ の値は大きくなる。この場合、 $\Sigma_{\text{trans}}(t)$ 、或は $\Sigma_{\text{other}}(t)$ の寄与を差し引かなくてはならない。この影響は、細胞の種類、TJ 開口物質の種類・濃度に依存すると考えられる。

第5項 TJ 開閉の時間変化を司る因子に関する検討

最後に、TJ 開閉の時間変化を司る因子について考察する。(1-5C)、(1-6)式から、TJ 開口過程では、 $t > t_c$ における TJ の電気伝導度 Σ_{TJ} は、(1-9)式で与えられる。

$$\Sigma_{\text{TJ}} \propto \Delta p^{\mu} \propto \left[\left. \frac{\partial f(t)}{\partial t} \right|_{t=t_c} \times \Delta t \right]^{\mu} \quad (1-9)$$

従って、 Σ_{TJ} の時間変化を支配するのは Δp と μ であり、(1-9)式右辺を参照すると $\partial f(t)/\partial t$ と μ となる。Table 1-2 の結果から、臨界指数 μ は、細胞や、TJ 開口物質の種類に依らずほぼ一定値であったことから、 Σ_{TJ} の時間変化は $\partial f(t)/\partial t$ に依存することが示唆される。より一般的に TJ 開口過程だけでなく、TJ の再形成過程も含めて考えても、 Σ_{TJ} の時間変化は、(1-2)、(1-3)式から Δp と μ の関数となるため、 $\partial f(t)/\partial t$ に依存するという同じ結果を得る。 p の定義と(1-6)式から、 $\partial f(t)/\partial t$ は、TJ ストランドが未形成な高電気伝導部分の割合の時間変化に相当することから、TJ 開閉状態の制御のためには、TJ ストランドの形成状態の制御が重要であることが示された。

第6節 小括

本章では、TJ 開閉の時間変化を解明するために、TJ 開閉に対応する TJ の電気伝導度 (Σ_{TJ}) を記述する物理モデルを構築し、実験的に検証することを目的とした。第一に、MDCK、及び Caco-2 細胞、また TJ 開口物質として、C10、及び C-CPE を用いて Σ の時間依存性を計測・解析した。その結果、 Σ_{TJ} は、ある時間 ($t = t_c$) までほぼ一定値に留まり、 $t > t_c$ で急激に増加することを見出した。第二に、パーコレーション理論に基づいて TJ の開口過程における Σ_{TJ} の時間依存性を記述する物理モデルを構築し、解析のための方程式を導いた。その結果、 Σ_{TJ} は、ある時間 ($t = t_c$) まで、ほぼ一定値に留まり (閾値の存在)、 $t > t_c$ で、 $\Sigma_{TJ} \propto (t - t_c)^\mu$ のようなべき乗則に従い増加することが示された。実験で得られた結果の解析から、 $\Sigma_{TJ} \propto (t - t_c)^\mu$ のようなべき乗則が成立することを確認し、モデルの妥当性を実験的に検証した。さらに、細胞や TJ 開口物質の種類が μ に及ぼす影響を検討した結果、細胞や TJ 開口物質の種類に依らず、 $d = 2$ の値に相当する $\mu = 1.1-1.2$ となり、TJ の開口は、2 次元的なパーコレーションであることを明らかにした。さらに、TJ の深さ方向のサイズ (200–500 nm) は細胞の大きさ (10–20 μm) と比較して非常に小さいので、有限サイズの効果のため、得られた μ の値は、十分に大きなサイズの系の値 (約 1.3) よりも小さくなることを明らかにした。最後に、本物理モデルから、TJ の開閉状態の制御には、TJ ストランドの形成状態 (解離・形成) の制御が重要であることが示された。

第2章 MDCK 細胞における *Sec61 β* 遺伝子の TJ バリア機能に及ぼす影響

第1節 緒言

第1章の結果より、TJ 開閉速度の制御には、TJ ストランドの形成状態の制御が重要なことが示されたことから、TJ ストランドの本体である CLDN の合成速度の亢進、CLDN の輸送速度の亢進等によって TJ 開閉速度を向上できると考えられる。本章では、CLDN の輸送速度を亢進することで、TJ ストランドの解離・形成速度の亢進を通じて、TJ 開閉速度を向上させる方策について検討した。このため、タンパク質の細胞内輸送促進作用があるという報告がなされている *Sec61 β* に着目した。

Sec61 β はトランスロコンである *Sec61* (α 、 β 、 γ の3種類のサブユニットから構成される) の β サブユニットであり、主として小胞体 (ER) 上に存在する[43]。*Sec61* の役割は、膜タンパク質の合成時における輸送 (co-translational translocation) である。ER 上のリボソームで合成されたこれらの膜タンパク質は、小胞輸送によって最終的な目的地に輸送される。*Sec61 α* (タンパク質の透過チャネル) や *Sec61 γ* (安定化) の機能について報告されているが、*Sec61 β* の機能については十分に理解されておらず、ごく最近になって、*Sec61 β* の新しい機能が報告されてきた。第一に、*in vitro* で、*Sec61 β* は翻訳に携わらないリボソームを ER へリクルートし、その結合を媒介することによって、タンパク質の合成を促進する[44]。さらに *Sec61 β* は、ER 中の 25 kDa の分子量を持つシグナルペプチド複合体と結合し、co-translational translocation の速度を亢進する[45]。ただし、リボソームと ER の結合には *Sec61 β* による媒介が必須というわけではない[45,46]。第二に、細胞を上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF) で処理すると、*Sec61 β* は、EGF 受容体 (EGFR) と核内膜での共局在化を通じ、EGFR の核内移行を促進する。EGFR は cyclin D の転写プロモーターであるため、核内移行した EGFR によって cyclin D の発現が亢進することが報告されている[46]。第三に、分泌タンパク質や、側底型 (basolateral) 膜タンパク質の合成、輸送、細胞膜への融合に関与する exocyst 複合体 (*Sec3*, *Sec5*, *Sec6*, *Sec8*, *Sec10*, *Sec15*, *Exo70* and *Exo84* から構成される) と *Sec61 β* は相互作用することが報告されている[47–49]。この相互作用によ

って生成した Sec61 β /exocyst 複合体は、側底型膜タンパク質の合成[47-49]や、輸送[47,48]を亢進することが明らかにされてきた。この場合、これらのタンパク質の発現量の亢進は、転写後過程で起ることが報告されている[47,48]。一例として、exocyst の要素である sec10 を過剰発現させると、側底型タンパク質である高分子量免疫グロブリン受容体の輸送、及び発現が亢進するが、これに Sec61 β が関与している[49]。さらに、Sec61 β は exocyst との相互作用を通じて、EGFR のリガンドで分泌型タンパク質である gurken の細胞膜への輸送を亢進することも報告されている[50]。CLDN は、側底型膜タンパク質であるため、Sec61 β により媒介されるタンパク質の合成、及び Sec61 β と exocyst との相互作用を通じて輸送の亢進作用が働くと考え、以下の仮説を立てた。

①Sec61 β を過剰発現させることによって、側底型膜タンパク質である CLDN の細胞内輸送が速くなるため、CLDN の TJ への局在化・非局在化の速度が亢進する。②このため、TJ スtrandの解離・形成速度が亢進して、TJ の開閉速度の向上が期待できる。渡辺らの検討で、siRNA 法により Sec61 β をノックダウンさせた Caco-2 細胞に C-CPE 添加すると、TJ 開口速度の指標である TER 低下が遅延したという結果もあり、本仮説を支持するものと考えられる。迅速な TJ 開閉という性能は、緒論でも指摘した通り、新規薬物吸収促進法の構築という観点で重要と考えられる。

そこで本章では、Sec61 β の過剰発現が TJ バリア性や TJ 開口・再形成速度に及ぼす影響を明らかにし、TJ の開閉速度を考慮した新規薬物吸収促進法構築のための基盤としての可能性を検討することを目的とした。このため、Sec61 β 発現プラスミドを導入した MDCK 細胞 (MDCK(Sec)とする)、及びコントロールプラスミドを導入した MDCK 細胞 (MDCK(Cont)とする) を作製し、C-CPE を添加・除去した時の、TJ バリア性、TJ 開閉速度、CLDN の発現量や分布の変化に加え、Sec61 β と CLDN の結合性についても検討した。

第2節 結果

第1項 Sec61 β 過剰発現による MDCK 細胞への影響

まず作製した細胞について、以下のことを確認した。第一に、MDCK(Sec)がどの程度のSec61 β を過剰発現しているかを確認するために、予備検討を行った。Fig. 2-1 に結果を示す。Sec61 β のバンド強度を GAPDH のバンド強度で補正して比較すると、MDCK(Sec)細胞はMDCK(Cont)細胞の約 1.5 倍のバンド強度を示した。また、MDCK(Cont)細胞と MDCK parent 細胞のバンド強度比は、1.03 倍と同等であった。以上の結果から、MDCK(Sec)は、Sec61 β を過剰発現していることが確認できた。

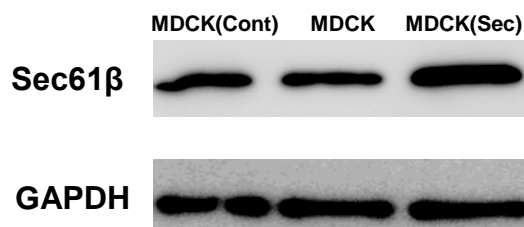


Fig. 2-1: Sec61 β expression in MDCK(cont) and MDCK(sec) as well as in MDCK parent cells.

次に、C-CPE 処理による細胞へのダメージを比較した。細胞へのダメージは、TER の変化を伴うため、この差が MDCK(Cont)と MDCK(Sec)の間で大きいと、TER で TJ の開閉を論じる場合に問題となるためである。細胞ダメージの指標として、LRR を用いて評価し、結果を Table 2-1 にまとめた。C-CPE で 24 h 処理した後の LRR を (E1-2) 式から算出した結果、LRR < 1% となり、本章の実験時間の範囲では細胞毒性、細胞膜の乱れは無視できると考えられる。

Table 2-1: Lactate Dehydrogenase release rate (LRR) for MDCK(Cont) and MDCK(Sec) cells treated with C-CPE for 24 h. (unit in %)

MDCK(Cont)	MDCK(Sec)
1.0	0.5

最後に、Sec61 β の過剰発現により、細胞の性質が著しく変化していないかを確認するため、Alamar Blue Assay によって、MDCK(Cont)と MDCK(Sec)細胞の細胞分裂速度 (E) を比較し、その結果を Fig. 2-2 に示した。細胞分裂速度 E は、 $\text{Ln}[N(t)]$ vs. t プロットの初期の傾きから算出した。 E の単位は、(h^{-1}) である。 $E = 0.032 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$ (MDCK(Cont)細胞)、 $E = 0.029 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ (MDCK(Sec)細胞) を得て、両者には有意差は観られなかった。従って、MDCK 細胞における Sec61 β の過剰発現は、細胞分裂速度には影響を及ぼさないことが判った。ここで得た E の値は、MDCK 細胞における値と同程度 (CLDN-4 過剰発現の有無に依らず、約 0.038 h^{-1}) であった[52]。

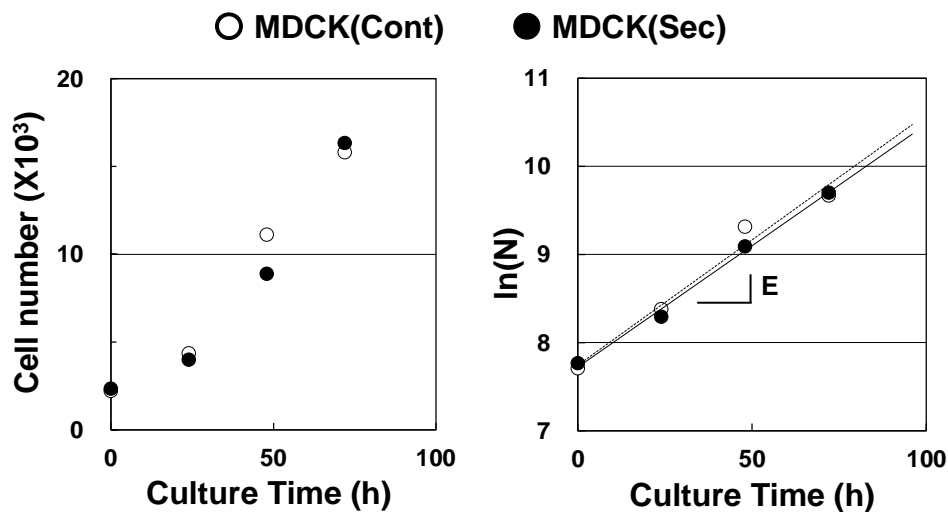


Fig. 2-2: $\text{Ln}[N(t)]$ ($N(t)$: cell number) vs. culture time in MDCK(Cont) and MDCK(Sec). $\text{Ln}[N(t)]$ is plotted as a function of culture time, t , in MDCK(Cont) cell (○) and MDCK(Sec) cell (●). The slope corresponds to cell proliferation rate. Solid and dotted lines are calculated from the least-squares regression analysis.

これらの結果より、Sec61 β の過剰発現細胞が得られたこと (Fig. 2-1)、及び MDCK(Cont) と MDCK(Sec)の間に、C-CPE 処理による細胞へのダメージ (Table 2-1) や細胞成長速度 (Fig. 2-2) に差がないことを確認し、TJ バリア機能の検討に用いることとした。

第2項 C-CPE 処理による TER の時間変化に及ぼす Sec61 β 過剰発現の影響

Fig. 2-2 に、MDCK(Cont)、または MDCK(Sec)に C-CPE を作用させたときの典型的な TER の時間変化である $TER(t)$ を示す。図中には併せて、C-CPE を添加しない場合の結果も示した。 $TER(t)$ は、コンフルエント状態となる $t=0$ まで増加し、C-CPE で処理すると減少し始める。 $t=24$ h で C-CPE を除去すると、再び $TER(t)$ は増加する。以下に 3 つの Phase である Phase-1 ($t < 0$)、Phase-2 ($0 \leq t < 24$ h)、Phase-3 ($t \geq 24$ h) を定義する。各 Phase はそれぞれ、TJ の形成、開口、再形成の過程に相当する。典型的な $TER(0)$ の値は、MDCK(Cont)細胞では 1340 ± 110 (Ωcm^2)、MDCK(Sec)細胞では 2150 ± 250 (Ωcm^2) であり、MDCK(Sec)細胞の TER は MDCK(Cont)細胞よりも有意に大きい ($p < 0.01$)。この結果から、Sec61 β の過剰発現によって、バリア性が向上することが明らかになった。

以降では、TJ 開口 (Phase-2)、及び TJ 再形成 (Phase-3) に着目して検討した。

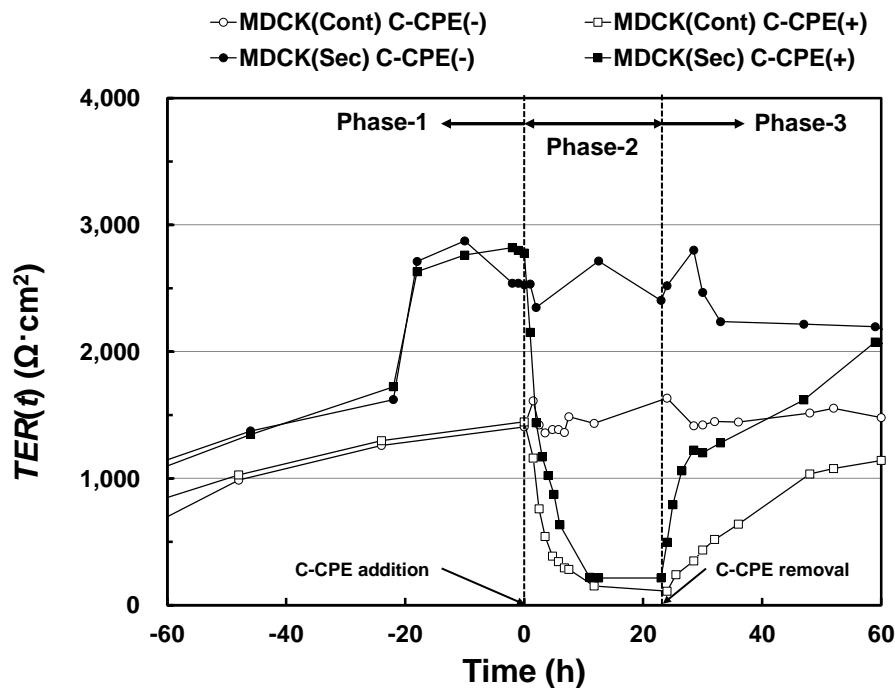


Fig. 2-3: Effect of Sec61 β on C-CPE-mediated modulation in TER. A typical time course of TER in MDCK(Cont) and MDCK(Sec) cells. C-CPE was added at $t = 0$ and removed at $t = 24$ h to allow recovery; \circ MDCK(Cont) without C-CPE, \square MDCK(Cont) with C-CPE, \bullet MDCK(Sec) without C-CPE, and \blacksquare MDCK(Sec) with C-CPE.

Fig. 2-3 の結果をもとに TJ 開閉速度を比較するために、Phase-2、Phase-3 における TJ 開閉速度の指標として $T_{1/2}$ を定義・導入した。Fig. 2-4 に示す通り、 $T_{1/2}$ は、 $TER_N(t) = [TER^+(t)/TER^+(0)]/[TER^-(t)/TER^-(0)] = 1/2$ になるまでに要する時間である。上添字の+、-はそれぞれ、C-CPE 処理の有無であり、分母の $TER^-(t)/TER^-(0)$ は、ベースラインである C-CPE 無添加時に対する補正である。Phase-3 では、 $TER_N(t)$ を $TER_N(t) = 0$ まで外挿し、そこからの時間で $T_{1/2}$ を求めた。これは $TER_N(24)$ が 0 でないことを考慮するためである。この補正量は両細胞とも $T_{1/2}$ の 12% 程度であった。

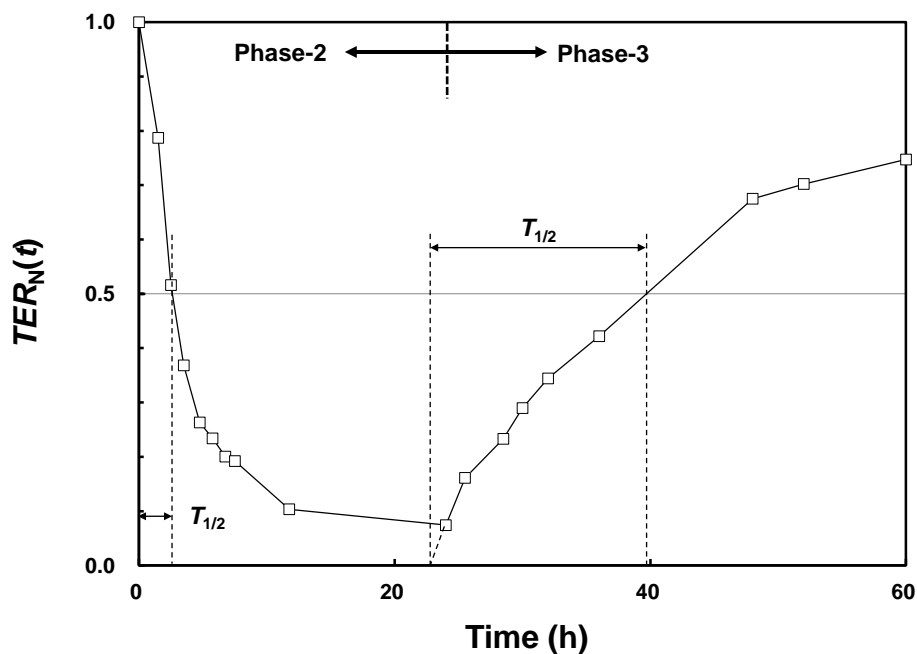


Fig. 2-4: Time course of normalized TER, $TER_N(t) = [TER^+(t)/TER^+(0)]/[TER^-(t)/TER^-(0)]$ for MDCK(Cont); definition of $T_{1/2}$. Superscripts, + and -, indicate with or without C-CPE treatment, respectively. $T_{1/2}$ in Phase-2 or Phase-3 was used as a measure for TJ modulation rates. $T_{1/2}$ is defined the $TER_N(t) = 1/2$. Note that $TER_N(t)$ is extrapolated to zero to compensate the none-zero TER_N at $t = 24$ h in Phase-3.

次に、Fig. 2-4 の手法により Phase-2、-3 における $T_{1/2}$ を求め、結果を Fig. 2-5 に示した。両細胞とも Phase-2 における $T_{1/2}$ は Phase-3 よりも有意に小さいことが判る。これは、TJ 開

口が、TJ 再形成よりも速く起こることを示唆する。さらに、両 Phase ともに MDCK(Sec)細胞における $T_{1/2}$ は MDCK(Cont)細胞よりも有意に小さく、特に Phase-3 で差が顕著であったことから、Sec61 β 過剰発現は特に TJ 再形成速度の亢進に寄与することが明らかとなった。

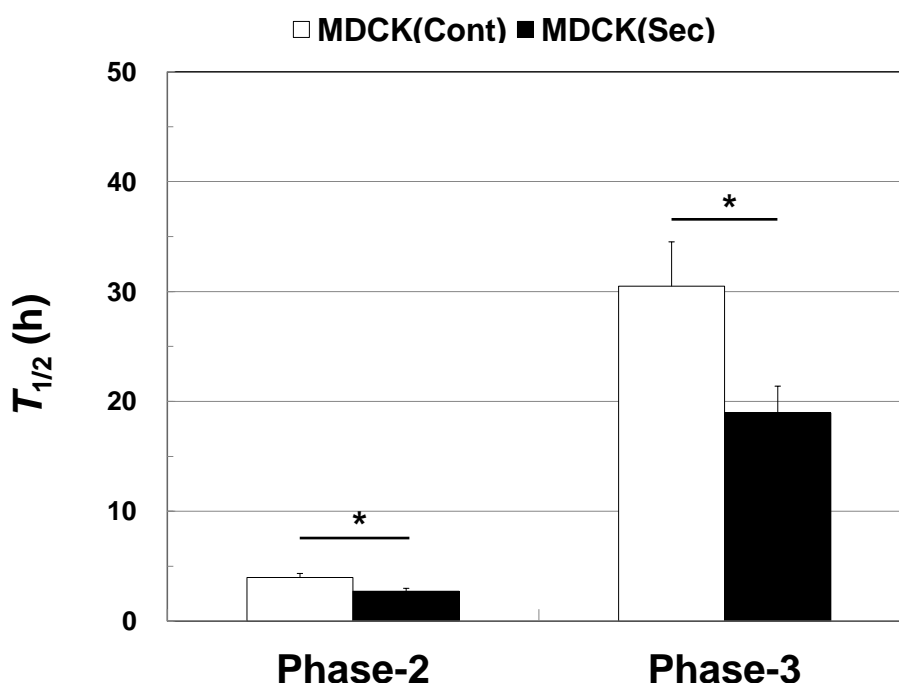


Fig. 2-5: $T_{1/2}$ during phase 2 and 3 in MDCK(Cont) (open column) and MDCK(Sec) (filled column) cells;. * $p < 0.05$, denote significant differences in data from at least four independent experiments performed in triplicate.

第3項 Claudin (CLDN) の発現量に及ぼす Sec61 β 過剰発現の影響

第2項で Sec61 β の過剰発現により、バリア性、及び TJ 開閉速度が亢進したことから、第1節で述べた仮説を証明するため、そのメカニズムについて詳細に検討を行った。まず、TJ のバリア機能の本体である CLDN の発現量の時間変化を検討した。Fig. 2-6 に、各時間における CLDN-1、-3、-4、Sec61 β 、GAPDH についてのウェスタンブロッティングの結果を示す。

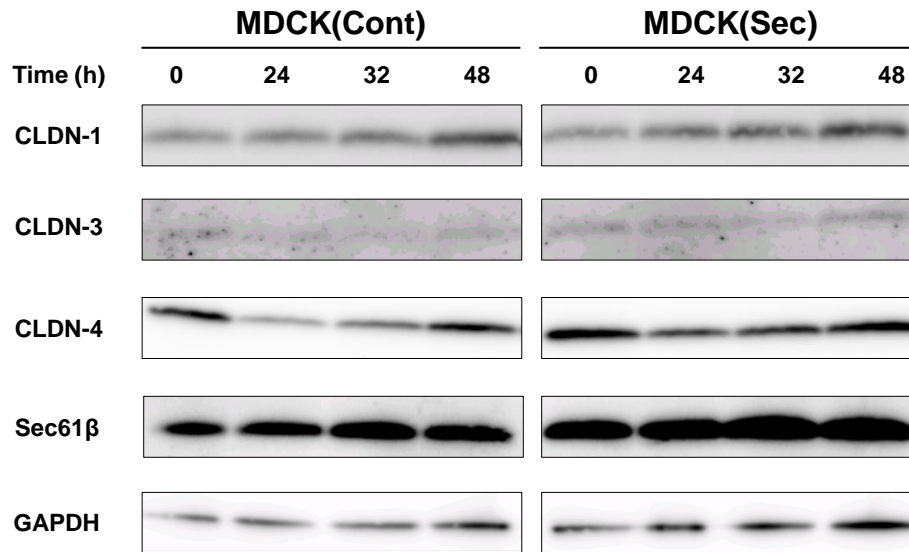


Fig. 2-6: Effect of Sec61β on C-CPE-mediated modulation in CLDNs protein expression. Immunoblotting for CLDN-1, -3, -4, Sec61β, and GAPDH in MDCK(Cont) and MDCK(Sec) cells.

得られた各バンドの強度を GAPDH のバンド強度で補正して比較し、Fig. 2-7 に示した。その結果、両細胞とも C-CPE の添加・除去による Sec61β の発現量の変動は認められず、MDCK(Sec)細胞における Sec61β の発現量は、MDCK(Cont)細胞の 1.3–1.5 倍であった。CLDN-1 の発現量は、MDCK(Cont)細胞と MDCK(Sec)細胞では差が無く、C-CPE の添加・除去によって変化は認められなかった。一方、CLDN-3 の発現量は、 $t = 0-48$ h で MDCK(Sec)細胞の方が MDCK(Cont)細胞よりも高く、C-CPE の添加・除去によって、わずかな減少・回復が観察された。CLDN-4 の発現量は、CLDN-3 と同様に $t = 0-48$ h で MDCK(Sec)細胞の方が MDCK(Cont)細胞よりも高かった。また、C-CPE の添加・除去によって大きく減少 ($t = 24$ h) ・回復 ($t = 48$ h) し、TER の開口・再形成状態との間に強い相関が確認された。MDCK細胞においては、主として CLDN-4 が TER を制御するという報告[36,51–53]もあることから、今後は、CLDN-4 に着目して検討した。

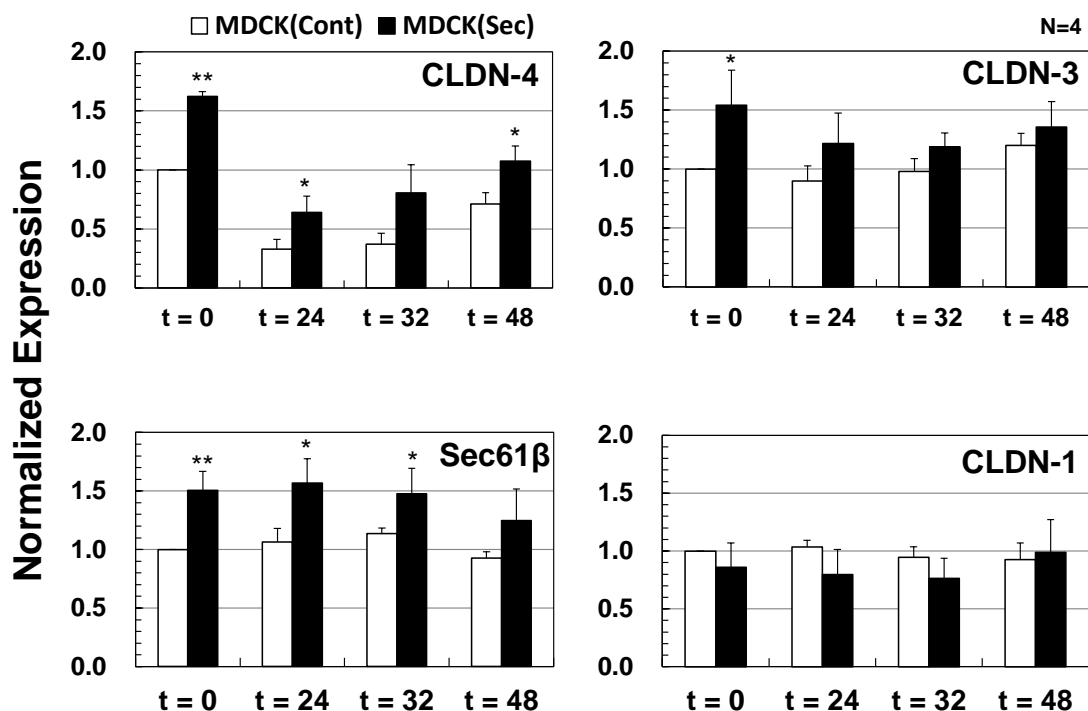


Fig. 2-7: Relative protein expression. Protein band intensities are normalized with respect to the loading control GAPDH. Normalized band intensities for MDCK(Cont) cells at $t = 0$ are defined as 1.0. Open and filled columns denote MDCK(Cont) and MDCK(Sec) cells, respectively. The error bars represent standard errors of the mean of at least four independent experiments. (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

次に、Fig. 2-7 で観察された Sec61 β 過剰発現による CLDN-4 タンパク質の発現量増加への転写の関与について検討するため、Taqman probe 法を用いた定量的 RT-PCR 法によって CLDN-4 mRNA 発現量を測定し、その発現量に及ぼす Sec61 β 過剰発現と C-CPE 処理の影響を検討した。その結果を Fig. 2-8 に示した。CLDN-4 mRNA の発現量は、 $t = 0$ 、24、48 h で MDCK(Cont)細胞と MDCK(Sec)細胞の間に差は認められなかった。両細胞とも、C-CPE を添加し、24 h 経過すると ($t = 24$)、CLDN-4 mRNA の発現量は C-CPE 添加前の約 2.5 倍に増加した。C-CPE を除去し、24 h 経過すると ($t = 48$)、CLDN-4 mRNA の発現量は、 $t = 0$ のレベルに戻った。

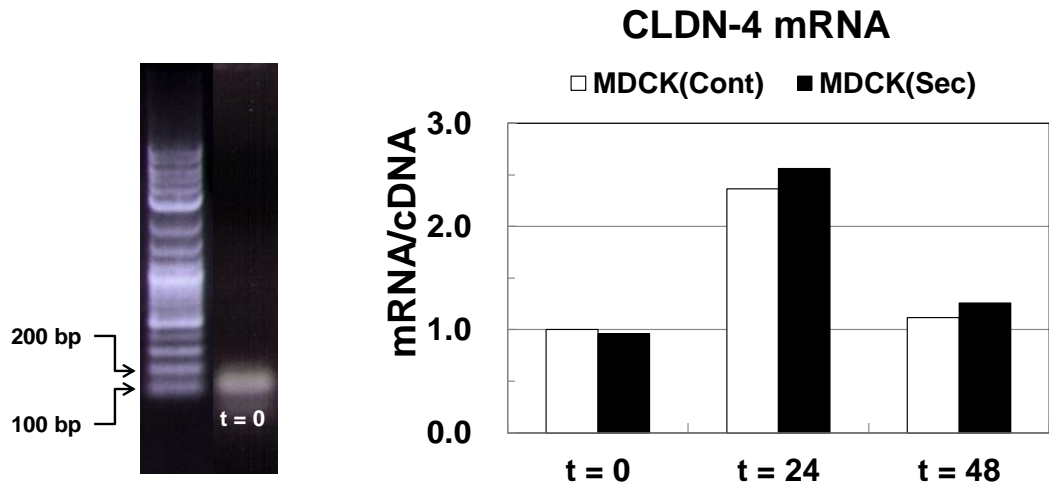


Fig. 2-8: RT-PCR for CLDN-4 mRNA. The left panel shows amplicons (153 bp) from MDCK(Sec) cells at $t = 0$ after 40 cycles. Quantitative RT-PCR data are shown in the right panel. The quantity of CLDN-4 mRNA is normalized with respect to loading control cDNA. Open and filled columns denote MDCK(Cont) and MDCK(Sec) cells, respectively. Data are presented as means from duplicate experiments.

第4項 CLDNの分布に及ぼす Sec61 β 過剰発現の影響

CLDNは細胞膜に局在化することで、TJを形成することから、TJのバリア性に関係の深いCLDN-4の分布に及ぼすSec61 β 過剰発現の効果を検討し、結果をFig. 2-9に示した。Sec61 β の分布は、C-CPEの添加・除去によるTJ形成時($t = 0$)、開口時($t = 24$)、再形成時($t = 32, 48$)における変化は認められなかった。C-CPEの添加・除去によってSec61 β タンパク質の発現量は変化しないというFig. 2-7の結果と併せると、本実験の時間内では、Sec61 β は安定であり、各時間で等しく作用したと考えられる。両細胞とも $t = 0$ で、CLDN-4は極めて強く細胞膜に局在化することが認められたが、 $t = 24$ hで局在化はほぼ消失した。TJ再形成時($t = 32, 48$ h)では、再びCLDN-4の細胞膜への局在化が認められた。TJ再形成期($t = 32, 48$ h)において、細胞膜に存在するCLDN-4は、不連続な点状に分布しており、MDCK(Cont)細胞の方が、MDCK(Sec)細胞よりも不連続性が顕著であった。さらに、細胞

質中に点状に分布する CLDN-4 は MDCK(Sec) 細胞の方が MDCK(Cont) 細胞よりも多く、時間が経過 ($t = 48$ h) すると、これらは減少し、細胞膜での局在化が亢進する為、これは細胞膜に輸送される途中であると考えられる。以上のことから、CLDN-4 の細胞膜への局在化は、Sec61 β 過剰発現によって亢進する傾向があると考えられる。

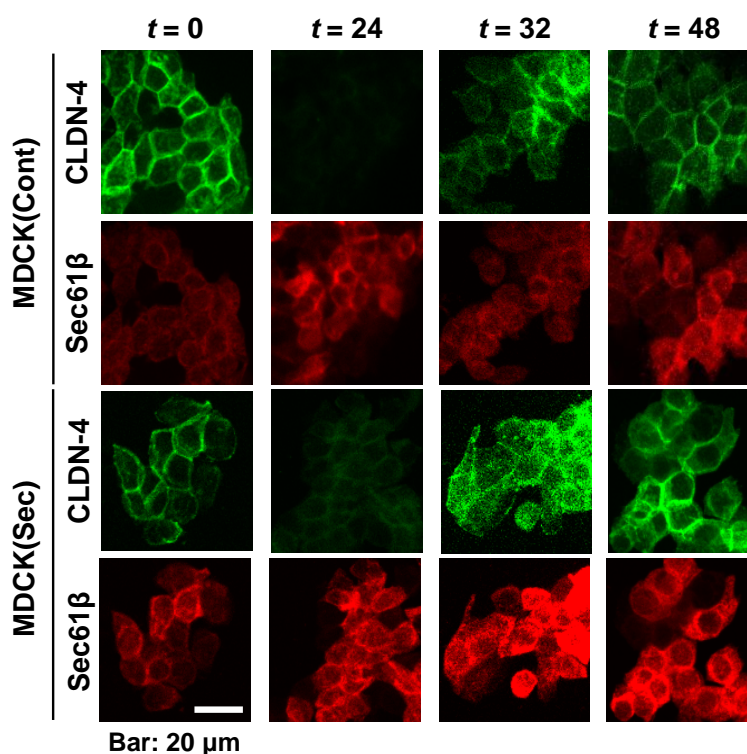


Fig. 2-9: Effect of Sec61 β on C-CPE-mediated modulation in CLDNs protein distribution. Confocal laser scanning microscopic images for CLDN-4 (green), and Sec61 β (red) at $t = 0, 24, 32,$ and 48 h. CLDN-4 and Sec61 β were double stained: the scale bar represents $20 \mu\text{m}$.

次に、CLDN-4 と Sec61 β の共存状態を検討し、結果を Fig. 2-10 の left panel に示した。両細胞とも $t = 0$ では、細胞膜近傍における CLDN-4 と Sec61 β の共存は弱かった。TJ 再形成時 ($t = 32$ h) において、MDCK(Sec)細胞では、細胞膜近傍で CLDN-4 と Sec61 β の共存 (黄色) が強く観察される一方、MDCK(Cont)細胞では、共存はあまり観られなかった。深さ方向のスキャンの結果から、 $t = 0, 32$ h とも CLDN-4 と Sec61 β は、細胞膜近傍の細胞質中の同一

深さに存在することが確認された。3.5 μm 下の面では、CLDN-4 と Sec61 β の共存は認められなかった(Fig. 2-10, right)。

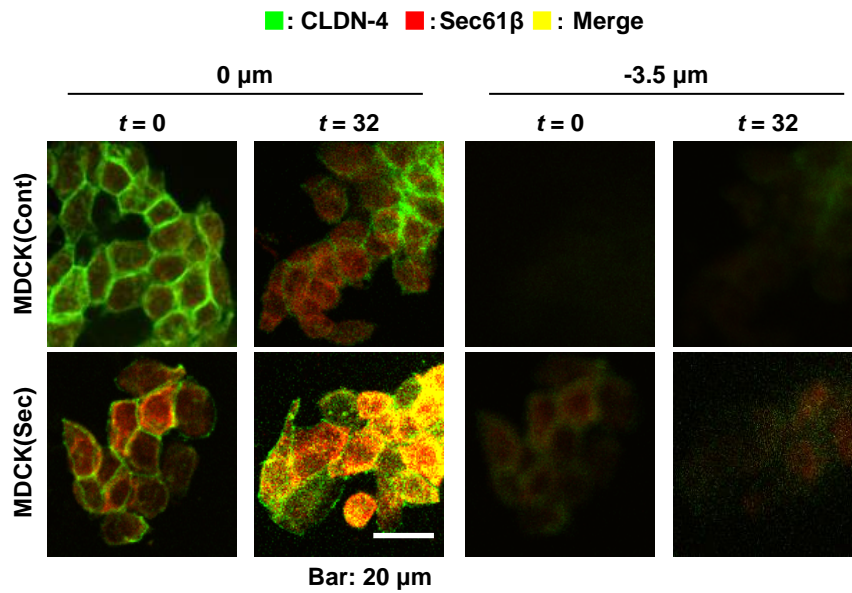


Fig. 2-10: Co-distribution of CLDN-4 and Sec61 β . Left panel: Enlarged images for MDCK(cont) and MDCK(sec) cells at $t = 0$ and 32 h. Yellow particles represent co-distribution (arrow head) of CLDN-4 and Sec61 β : the scale bar represents 20 μm . Right panel: Same image 3.5 μm beneath left.

小胞体 (ER) のマーカーである calnexin による染色を試みたところ、calnexin は、核近傍にのみ分布し、細胞膜近傍の細胞質中には存在しないことが認められた。一方、Sec61 β は、核近傍 (暗: arrow)、及び細胞質 (明: arrow head) に分布していることが明らかとなった (Fig.2-11)。これらの結果は、CLDN-4 と Sec61 β は、ER 外の細胞膜近傍でも共分布していることを示唆しており、CLDN-4 と共存している Sec61 β は、CLDN-4 の細胞膜への局在化に関与したと考えられる。

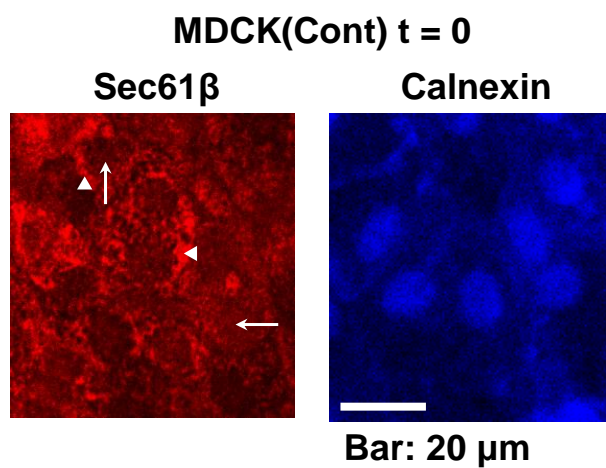


Fig. 2-11: Distribution of Sec61 β (left) and calnexin (right) in MDCK(cont) cells at $t = 0$: images are obtained from independent experiments. Arrow and arrow heads represent ER and outside ER, respectively: the scale bar represents 20 μ m.

第5項 CLDN-4 と Sec61 β の複合体形成に関する検討

本項では、detergent-soluble (細胞質中の画分に相当) について、免疫共沈降を行うことによって、細胞質中で CLDN-4 と Sec61 β の複合体を形成について検討した。抽出には、NP-40 と NaCl を用いることで、細胞膜からタンパク質が取り除かれ、細胞膜の欠陥やベシクル化を引き起こすことが報告されているため[54]、間接的に結合した複合体も一部回収できると考えられる。MDCK(Sec)細胞と MDCK(Cont)細胞の $t = 0$ 、32 h を実験に用いたところ、Fig. 2-12 から、MDCK(Sec)細胞の $t = 0$ における CLDN-4 による免疫共沈降物中に、わずかに Sec61 β が検出された一方、Sec61 β 抗体による免疫共沈降物中には、殆ど CLDN-4 は検出さ

れなかった。MDCK(Cont)細胞の $t = 0$ でも CLDN-4 は殆ど検出されなかった。一方、MDCK(Sec)細胞の $t = 32$ では、Sec61 β 抗体による免疫共沈降物中に、CLDN-4 が検出されたが、MDCK(Cont)細胞では、CLDN-4 は検出されなかった。



Fig. 2-12: Immuno-co-precipitation of CLDN-4 and Sec61 β in MDCK(Cont) and MDCK(Sec) cells. The left panel shows immuno-co-precipitation with CLDN-4 mAb and subsequent IB with Sec61 β (top) or CLDN-4 (bottom) antibodies at $t = 0$ in MDCK(Sec) cells. “IP”, “Ab”, and “L” denote immuno-co-precipitate, CLDN-4 mAb, and lysate, respectively. The middle panel shows immuno-co-precipitation with Sec61 β pAb and subsequent IB with CLDN-4 and Sec61 β antibodies at $t = 0$ and 32 in MDCK(Sec) cells. “Ab” denotes Sec61 β pAb. The “#” denotes IgG light chain (approximately 25 kDa). The right panel, immune-co-precipitated with Sec61 β pAb and subsequent IB with CLDN-4 and Sec61 β antibodies at $t = 0$ and 32 in MDCK(Cont) cells. Sample dilutions were used for subsequent calculation of r_{CS} .

次に、APPENDIX-3 の解析法に従い、全 CLDN-4 の中で、Sec61 β と結合する CLDN-4 の割合 (r_{CS}) を Fig. 2-12 で得られたバンド強度から算出し、定量的に比較した。その結果を Table 2-2 にまとめた。

Table 2-2: r_{CS} for CLDN-4 in MDCK(Cont) and MDCK(Sec) cells. r_{CS} is shown in %.

Cell	IP	t	IB	IB
			CLDN-4	Sec61 β
MDCK(Cont)	Sec61 β	0	< 0.01	-
		32	< 0.01	-
MDCK(Sec)	Sec61 β	0	0.35	-
		32	4.47	-
	CLDN-4	0	-	0.55

r_{CS} は $t = 0$ よりも $t = 32$ h の方が大きかった。さらに、 r_{CS} は MDCK(Sec)細胞の方が、MDCK(Cont)細胞よりも大きかった。これらの結果は、Fig. 2-10 の CLDN-4 と Sec61 β の共存の傾向とよく対応する。また、いずれの場合も、 r_{CS} は、5%以下であり、ごく一部の CLDN-4 と Sec61 β の複合体が回収されたことを示唆する。従って、Fig. 2-10 で観察された Sec61 β と共存した CLDN-4 の一部が検出されたと考えられる。

第3節 考察

第1項 Sec61 β 過剰発現による TJ バリア性への影響に関する検討

CLDN-4 mRNA の発現量に変化が観られず (Fig. 2-8)、CLDN-4 タンパク質の発現量が増大した (Fig. 2-7) ことから、CLDN-4 タンパク質の発現量の増大は、転写後過程に起因することが示唆される。実際 Sec61 β 過剰発現は、翻訳時の co-translational translocation を亢進することが報告されている[44,45]。また、Sec61 β は exocyst と相互作用することによって、側底型タンパク質の発現量を亢進するという報告がある [47–49]。これらのことから、側底型膜タンパク質である CLDN-4 についても Sec61 β によるタンパク質の発現量を亢進する効果が認められたと考えられる。MDCK 細胞では CLDN-4 が TJ バリア性を制御するという報告があるため[36,51–53]、TER の上昇 (Fig. 2-3) は、Sec61 β 過剰発現による CLDN-4 の発現量亢進のためであると考えられる。 $t = 0$ において、MDCK(Sec)細胞の TER は MDCK(Cont)細胞の約 1.5 倍であり、この値は $t = 0$ における CLDN-4 の発現量の比である約 1.6 倍と同程度であった。この結果は、MDCK 細胞単層膜において TER が CLDN-4 の量に相関するという報告

からも[36]、Sec61 β 過剰発現による CLDN-4 の発現量増加によって、TER が増加したと考えられる。

一方、Sec61 β 過剰発現によって、CLDN-4 の発現量は亢進したが、CLDN-1 の発現量の亢進は認められなかった (Fig. 2-7)。CLDN-1 の細胞内分布変化の解析も含め、CLDN-4 との挙動の違いについての詳細なメカニズムの解明は今後の課題とする。

第2項 Sec61 β 過剰発現による TJ 開閉速度への影響に関する検討

APPENDIX-2 を参照すると、 $T_{1/2}$ は、近似的に細胞間隙経路の抵抗値が C-CPE を添加する前の 1/2 になる時間に対応する。これは、 Σ_{TJ} が 2 倍になることを意味する。MDCK 細胞では、TER は CLDN-4 の量と相関があることから[36]、 $T_{1/2}$ は、TJ 中の CLDN-4 量の変化速度を反映すると考えられる。また、 $T_{1/2}$ という指標は CLDN を含む物質の分解、生成速度の指標として一般的に使用されている[7,53]。

特に Phase-3 において MDCK(Sec)細胞の $T_{1/2}$ は MDCK(Cont)細胞よりも短いため、TJ 再形成速度が速いと考えられる (Fig. 2-5)。Phase-3 では、CLDN-4 発現量の増加 (Fig. 2-7)、及び細胞膜への局在化が起こるという結果 (Fig. 2-9) から、CLDN-4 の合成、及び細胞膜への局在化が TER に関与したことが示唆される。TJ 再形成時に CLDN-4 の細胞膜への局在化は、MDCK(Sec)細胞の方が MDCK(Cont)細胞よりも速く起こる傾向があり (Fig. 2-9)、さらに、Sec61 β と CLDN-4 の共存の程度 (Fig. 2-10)、及び結合量 (Fig. 2-12, Table 2-2) は、MDCK(Sec)細胞の方が MDCK(Cont)細胞よりも多かったことから、Sec61 β 過剰発現によって CLDN-4 の細胞膜への局在化が速くなったと考えられる。一方、Phase-3 において、 $t = 24$ h に対する $t = 24 \rightarrow 32$ h、48 h における CLDN-4 発現レベルの増加割合で比較したところ、それぞれ MDCK(Sec)細胞 (約 26%、68%) と MDCK(Cont)細胞 (約 13%、116%) の間では、系統的な差が認められなかったことから (Fig. 2-7)、Sec61 β 過剰発現による CLDN-4 合成速度の亢進作用については明確には示されなかった。これらの結果は、Phase-3 (TJ 再形成) において、Sec61 β 過剰発現によって、CLDN-4 の TJ への局在化が速くなることから、TJ 再形成速度が速くなることを示唆している。実際、輸送小胞と exocyst の複合体[55]に Sec61 β が結合する

ことによって、分泌タンパク質、側底型タンパク質の輸送を亢進することが報告されている [47,48]。従って、輸送小胞によって細胞膜へ運ばれる際も、CLDN-4 を含む輸送小胞が exocyst を介して Sec61 β と複合体を形成することによって、CLDN-4 の細胞膜への局在化が亢進したと考えられる。

免疫共沈降の実験において、細胞質中に存在する複合体の一部も検出されるため、CLDN-4 を含む輸送小胞と exocyst に結合した Sec61 β の複合体の一部が回収され、CLDN-4 と Sec61 β の複合体の形成がわずかに認められたと考えられる。Phase-3 において、CLDN-4 はトランスゴルジネットワーク (TGN) から細胞膜へ輸送されることが考えられるため、Sec61 β 過剰発現によって、CLDN-4 の TGN から細胞膜への輸送が亢進され、TJ への局在化が速くなることで、TJ 再形成速度が向上した可能性が考えられる。

対照的に、Phase-2 では CLDN-4 の mRNA の発現量は増加するが (Fig. 2-8)、タンパク質発現量は減少 (Fig. 2-7) することから、CLDN-4 の分解が示唆される。このような mRNA の発現量の増加を伴ったタンパク質の発現量の低下は、Caco-2 細胞を *Staphylococcus aureus* alpha-toxin で処理した場合の、ZO-1 や occludin でも報告されており、タンパク質の分解が示唆されている [56]。Sec61 β は、主として膜タンパク質の TGN から細胞膜への輸送に関与すると考えられるため、Phase-2 における Sec61 β 過剰発現による TJ 開口速度の亢進効果は、有意ではあるが限定的であったと考えられる。しかしながら、CLDN-4 の過剰発現によって、CLDN-1、-3 などが TJ に引き寄せられるという報告もあり [51]、CLDN-4 が TJ から消失する際、CLDN-1、-3 なども一緒に TJ から消失することによって、TJ ストランドの消失が促進され、 $T_{1/2}$ が短くなった可能性もある。

第3項 TJ バリア性の制御に関する戦略について

緒論でも指摘したように、細胞間隙経路を使用した薬物送達において、TJ 開口だけではなく TJ 再形成、及びそれらの速度の制御が重要となる。しかし、これまでの研究は、TJ の開口を制御して物質透過性を向上させることに主眼を置くものであり、TJ の開閉速度 (特に再形成速度) についての報告は極めて少ない。これらの観点から、Sec61 β の過剰発現に

より CLDN-4 の細胞膜への局在化を速めることによって、TJ バリア性や開閉速度が向上するという本研究における発見は、TJ の開閉速度を考慮した新規薬物吸収促進法構築の可能性を示したと考えられる。特に、CLDN などの TJ タンパク質の細胞内コンパートメント間の輸送制御に関する詳細な知見は、薬物送達システムのみならず、CLDN の初期エンドソームから TJ への輸送メカニズムにも重要な知見であると考えられる。

第 4 節 小括

本章では、迅速な TJ 開口・再形成を実現するために、細胞内タンパク質輸送促進作用を有する Sec61 β を MDCK 細胞に過剰発現させて、CLDN-4 の TJ への輸送を亢進することによって、TJ 開閉速度を向上させることを目的とした。第一に、TER が、C-CPE 添加前の 1/2 になるまでの時間である $T_{1/2}$ を TJ 開口・再形成速度の指標とし、MDCK 細胞に Sec61 β を過剰発現（約 1.5 倍）させると、TJ 開口時、再形成時ともに $T_{1/2}$ が有意に小さくなることを明らかにした。すなわち、Sec61 β の過剰発現によって、TJ 開口、及び再形成の速度が向上した。第二に、C-CPE 添加・除去による CLDN の発現量の変動を検討した結果、CLDN-4 の発現量の変動と TER の変動に強く対応することが認められた。第三に、C-CPE 添加・除去による、CLDN-4 と Sec61 β の分布状態の変化、及び CLDN-4 と Sec61 β の共存状態を観察し、TJ 再形成過程では、CLDN-4 の細胞膜への局在化に、Sec61 β との共存が強く関与することを明らかにした。さらに、CLDN-4 と Sec61 β は複合体を形成する可能性を示した。

以上の結果をまとめると、過剰発現された Sec61 β は、CLDN-4 を含む複合体を形成し、CLDN-4 の細胞膜への局在化の亢進を通じて、TJ スtrandの再形成を促進し、TJ 再形成速度を亢進したと考えられる。従って、Sec61 β は、TJ の開閉速度を考慮した新規薬物吸収促進法に関する基盤構築のターゲット分子となる可能性があると考えられる。

【結論】

細胞間隙経路による薬物送達では、不可逆的、長時間の TJ 開口は副作用が問題となり、迅速な TJ の開閉が要求される。新規薬物吸収促進法の構築のためには、TJ 開閉状態の時間変化を制御することが必要であるが、時間変化に着目した報告例は非常に少ない。そこで、TJ 開閉の時間変化を説明する物理モデルを構築し、TJ 開閉に係る因子を明確にするともに、迅速な TJ 開口・再形成を実現するために、細胞内タンパク質輸送促進作用を有する Sec61 β を MDCK 細胞に過剰発現させて、TJ 開閉速度への影響、及びそのメカニズムを解析することを目的とした。本研究では、消化管上皮細胞の薬物透過のモデルとして広範に使用されるヒト結腸癌由来(Caco-2)細胞、Madin-Darby canine kidney (MDCK)細胞に、TJ 開口物質として、カプリン酸ナトリウム(C10)、及びウエルシュ菌毒素の C 末端(C-CPE)を作用させたときの、TJ バリア性を上皮膜電気抵抗(TER)により評価した。

第 1 章では、TJ 開閉の時間変化を説明する物理モデルの構築と実験的検証を行った。細胞単層膜の電気伝導度を用いて TJ 開口挙動を検討した結果、電気伝導度は、ある時間（閾値）までほぼ一定であるが、閾値を越えるとべき乗則に従い急激に上昇した。パーコレーション理論に基づき、その挙動を表すための物理モデルを構築した。この物理モデルによって、実験で得られた電気伝導度の時間変化を説明すること可能となり、物質透過性の制御には、TJ スtrandの制御が重要であることが明らかになった。

第 2 章では、MDCK 細胞に Sec61 β を過剰発現させ、細胞内タンパク質輸送を促進することによって TJ 開閉速度を亢進させることを試みた。Sec61 β の過剰発現により、CLDN-4 の発現量が転写後に増加し、それに伴い TER が上昇することを見出した。また、Sec61 β の過剰発現により、Sec61 β と CLDN-4 は複合体を形成し、CLDN-4 の細胞膜への局在化が亢進し、特に TJ 再形成速度が上昇することを見出した。

以上を総括すると、本研究の成果は、TJ の開閉速度を考慮した新規薬物吸収促進法構築のための基盤となると考えられる。

【実験の部】

第1章に関する実験

1-1: 抗体と材料

本研究で使用した抗体は Table E-1 にまとめた。

Table E-1: Antibodies used in the present study

Protein	Primary	Secondary (IB)	Secondary (IFM)
CLDN-1 (23 kDa)	Rabbit anti-claudin-1 pAb (Invitrogen)	Goat anti-Rabbit IgG (Millipore)	-
CLDN-3 (23 kDa)	Rabbit anti-claudin-3 pAb (Invitrogen)	Goat anti-Rabbit IgG (Millipore)	Chicken anti-Rabbit IgG Alexa594 conjugate (Invitrogen)
CLDN-4 (22 kDa)	Mouse anti-claudin-4 mAb Clone: 3E2C1 (Invitrogen)	Goat anti-Mouse IgG (Cosmo bio)	Goat anti-Mouse IgG FITC conjugate (Invitrogen)
Sec61 β (10 kDa)	Rabbit anti-Sec61b pAb (Millipore)	Goat anti-Rabbit IgG (Millipore)	Chicken anti-Rabbit IgG Alexa594 conjugate (Invitrogen)
Calnexin (68 kDa)	Mouse anti-calnexin mAb Clone: 37 (BD Bioscience)	Goat anti-Mouse IgG (Cosmo bio)	Goat anti-Mouse IgG Alexa680 conjugate (Invitrogen)
EphA2 (110 kDa)	Rabbit anti-EphA2 pAb (Santa Cruz Biotechnology)	Goat anti-Rabbit IgG (Millipore)	Chicken anti-Rabbit IgG Alexa594 conjugate (Invitrogen)
GAPDH (36 kDa)	Mouse anti-GAPDH mAb Clone: 6C5 (Millipore)	Goat anti-Mouse IgG (Cosmo bio)	-

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、phosphate-buffered saline (PBS)、bovine serum albumin (BSA)、Penicillin-streptomycin mixed solution (PSS)は、Sigma-Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO)品を使用した。Fetal bovine serum (FBS)は、Nichirei Biosciences Inc. (Tokyo, Japan)品を使用した。Non-essential amino acids solution (MEM)、Triton-X は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)品

を使用した。Sodium caprate (C10)、formaldehydeは、それぞれTokyo Chemical Industries (Tokyo, Japan)、Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)品を使用した。

1-2: C-CPEの調整

1-2-1: 形質導入

His-tagを付加したC-CPEの遺伝子をpET16b (Invitrogen) に組み込んだpET-H10PER (CPEの184–319の残基を発現するplasmidは、大阪大学大学院の近藤昌夫准教授より提供を受けた) 1 μ LをBL21 (DE3) SinglesTMCompetent Cells (Novagen Inc., Madison, WI) 10 μ Lに加えた。氷上で30分間放置した後、42°Cで30 s heat shockを行い、氷上で約2分間放置した。LB培地に終濃度50 μ g/mLとなるようにampicilin sodium (WaKo Pure Chemicals)を加えて作製したプレート (LAプレート) に播種し、37°Cで一晩振とう培養した後、終濃度0.8mMとなるようにisopropyl- β -D(-) thiogalactopyranoside (WaKo Pure Chemicals) を添加し、さらに37°Cで約3時間振とう培養した。培養液を3500 rpmで10 min遠心分離し、ペレット(大腸菌) を回収した。

1-2-2: 精製

大腸菌に、buffer A [10 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 400 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol]を1 mL/100 mL cultureの割合で加え、氷冷しながら40 sソニケーター処理を3回繰り返す、大腸菌を破砕してライセートを得た。4°C、15000 rpmで15 min遠心分離を行い、上清(*E.coli* lysate) を回収した。予めHiTrapTMChelating (GE Healthcare, Japan) に6 M guanidine/EDTA 5 mM、超純水10 mL、0.1 M NiSO₄ 500 μ L、超純水5 mL、bufferA 10 mLを順に流して平衡化し、*E.coli* lysateを流した。200 mM imidazole (Sigma Chemical Co., USA) 溶液10 mLを流して洗浄した後、400 mM imidazole 溶液10 mLを流して溶出液を1mLずつ分取した。各溶出液20 μ Lに4 \times SDS buffer [250 mM Tris-HCl, 20% 2-mercaptoethanol, 8% SDS, 20% glycerol, 0.008% bromophenol blue] 6.7 μ Lを添加し、99°Cで3分間加熱した。15% polyacrylamide gelを用いて20 mA/枚で電気泳動を行い、coomassie brilliant blue (CBBStain One, Nacalai Tesque) で1時間染色した後、超純水で洗浄し

た。

1-2-3: Buffer置換

予めPD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) にDMEMを30 mL流して平衡化し、1-2-2で得られた溶出液の1 mLを流した。その後PBSを500 μ Lずつ流してPD-10 columnからの溶出液を分取した。得られたC-CPE溶液を使用するまで、 -80°C で貯蔵した。

1-2-4: タンパク定量

検量線を得るために、10 mg/mL BSAを1000 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$ 、62.5 $\mu\text{g/mL}$ 、31.25 $\mu\text{g/mL}$ 、15.625 $\mu\text{g/mL}$ 、7.8125 $\mu\text{g/mL}$ 、0 $\mu\text{g/mL}$ となるようにPBSで希釈した。検量線用の溶液とタンパク質(C-CPE) をそれぞれ50 μL ずつ96 wells plateに加えた。検量線用の溶液は2 wellずつ加え、平均値から検量線を得た。溶液を加えたwellにBCATM Protein Assay Reagent A (Thermo Scientific, Yokohama, Japan) : BCATM Protein Assay Reagent B (Thermo Scientific) = 50 : 1で調整した溶液を100 μL ずつ加え、15分間反応させた。マイクロプレートリーダー (SUNRISE CLASSIC, TECAN, Kawasaki, Japan) を用い、波長560 nmにて吸光度を測定し、検量線からタンパク質の濃度を算出した。

1-3: Cell の培養

37°C 、湿度 95%、 CO_2 分圧 5% の環境に調節して、supplemented DMEM [DMEM/FBS/PSS/MEM = 500/50/5/5 in volume]中でMadin-Darby canine kidney (MDCK)、及びhuman epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) 細胞を24-well Intercell[®] dish (Kurabo, Osaka, Japan) 上で培養した。培養液は、TER が一定値になるまで毎日交換した。

1-4: TER Assay

抵抗値が一定の値になるまでMillicell[®]抵抗計 (Millipore, Billerica, MA) を用いて24 h 間隔で測定した。細胞単層膜の抵抗値は、(E1-1) 式に従い計算した。

$$R_{\text{cell}}(t) = R_{\text{obs}}(t) - R_{\text{med}} \quad (\text{E1-1})$$

ここで、 $R_{\text{obs}}(t)$ 、 $R_{\text{cell}}(t)$ 、 R_{med} は、それぞれ時刻 t における、全系の抵抗値、細胞単層膜の抵抗値、培養液の抵抗値（細胞単層膜がない場合：ブランク）を示す。TER は $\text{TER} = A \times R_{\text{cell}}(t)$ で算出した[38]： A は、dish の面積である。TER が一定値に達した後、直ちに C10 (3 mg/mL) または C-CPE (0.01 mg/mL) をそれぞれ apical-dish、basal-dish に加えた。次いで、37°C にて R_{cell} を 10 s 間隔で 30 min 間計測した。ここで、C10 ないし C-CPE を添加した時点をも $t=0$ とする。後述の解析では、TER ではなく、 $\Sigma (= 1 / R_{\text{cell}})$ を使用した。APPENDIX-1 で示すように、計測の時間スケールに比べて、電極の応答が十分速いので、装置伝達関数の deconvolution は実施なかった。いずれの場合も、最低 3 回の独立した実験を行った。

1-5: Lactate Dehydrogenase (LDH) Assay

C10 ないし C-CPE 処理による細胞のダメージを評価するため、Cytotox 96 Assay kit (Promega: Madison, WI) を用いてマニュアルに従い、LDH 活性を測定した。30 min 間の C10 ないし C-CPE 処理の後、培養液を 10 μL ずつ吸光度測定用 96-well plate に加え、次いで、各 well に Assay buffer で希釈した Substrate Mix [Substrate MIX/Assay buffer = 1 vial/12 mL] を 50 μL ずつ加え、アルミフイルで遮光し、RT で 30 min 静置した。4°C の Stop solution を各 well に 50 μL 加えた。492 nm における Absorbance をマイクロプレートリーダー (SUNRISE CLASSIC, TECAN) で読み取った。30 min 間の C10 ないし C-CPE 処理による相対的な LDH 放出比 (LRR) を (E1-2) 式を用いて算出した。

$$LRR (\%) = \frac{ABS_S - ABS_{\text{MIN}}}{ABS_{\text{MAX}} - ABS_{\text{MIN}}} \times 100 \quad (\text{E1-2})$$

ここで、 ABS_S 、 ABS_{MAX} 、 ABS_{MIN} は、それぞれ 30 min 間 C10 ないし C-CPE で処理した場合、1% Triton-X100 で処理した場合、処理をしなかった場合の吸光度を示す。

1-6: Immunofluorescence Microscopy (IFM)

Intercell dish 上で培養した細胞単層膜を、1% formaldehyde を用い、4°C にて 3 h 処理した後、0.1% の Triton X-100 で 15 min 処理した。PBS に浸漬した後、細胞を PBS 中の 5% BSA で 45 min

処理し、室温（RT）にてCLDN-4の第1抗体に1 h浸漬した。PBSで数回洗浄後、RTにて、細胞を第2抗体に1 h浸漬した。さらにPBSで洗浄した後、細胞単層膜を注意深く剥がして、ガラス板上にマウントした。細胞単層膜の画像を、バイオイメージング顕微鏡（CKX41 and IMT2; Olympus, Tokyo, Japan)を用いて観察した。

第2章に関する実験

2-1: 抗体と材料

本研究で使用した抗体は Table E-1 にまとめた。本章では、CLDN-1、-3、-4、Sec61 β 、GAPDH、calnexin の第 1 抗体、第 2 抗体を使用した。その他の材料は、実験の部 第 1 章の「1-1: 抗体と材料」の項を参照のこと。

2-2: C-CPEの調整

実験の部 第1章の「1-2: C-CPEの調整」の項に従って実施した。

2-3: Vector and *Sec61 β* Gene Transfection

手順の概略のフロー図をFig. E-1に示す。

2-3-1: h*Sec61 β* cDNAの増幅

0.5 μ L KOD plus (TOYOBO, Tokyo, Japan) 、 2.5 μ L KODplus \times 10buffer (TOYOBO) 、 2.0 μ L dNTPmix (TOYOBO) 、 1.2 μ L MgSO₄ (TOYOBO) 、 0.5 μ L primer-F、 0.5 μ L primer-R、 0.5 μ L Human cDNA library placenta (TaKaRa, Tokyo, Japan) 、 16.8 μ L DWをマイクロチューブに混合して、熱変性 (94°C for 10 s) 、アニーリング (55°C for 20 s) 後、伸長反応 (94°C for 10 sec + 55°C for 60 sec) 40 cycleのPCRを行い、h*Sec61 β* cDNAの増幅を行った。

primer-F: GGactagtAAAATGCCTGGTCCGACCCCCAG

primer-R: GGgcgccgcCTACGAACGAGTGTACTTGC

PCR後、0.7 % agarose gelで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色してバンドを確認した。バンドのサイズは、 λ -Hind III fragment (TaKaRa) を参考にした。

2-3-2: DNAの回収

上記で得られたバンドをゲルごとカットし、500 μ L Buffer QGとともにマイクロチューブに入れ、50°Cで10 min溶解した。溶解液をQIAquick Spinカラムに移し、12000 rpmで10 s遠心した後、500 μ L Buffer QGを加えて遠心した。700 μ L Buffer PEを加えて遠心を行い、カラム

を洗浄した後、乾燥させるため、空のカラムをさらに遠心した。新しいマイクロチューブにカラムを移し、Buffer EBを15 μ L加えて、12000 rpmで60 s遠心することにより、ゲルからhSec61 β cDNAを回収した。

2-3-3: ライゲーション

回収したhSec61 β cDNA溶液3 μ L、pcDNA3.1(-)をEcoR Vでカットしたplasmid 1 μ L、1 μ L T4 DNA Ligase (Invitrogen) 、1.0 μ L \times 10buffer、1.0 μ L BSA、3.0 μ L DWを混合し、16°C, 24 h作用させた。

2-3-4: plasmidの精製

10 μ Lライゲーション溶液、90 μ L DW、100 μ L フェノール-クロロホルムをマイクロチューブに加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、15000 rpmで5 min遠心した。上清を回収し、100 μ L 100 %エタノール、50 μ L 3M酢酸ナトリウム、1 μ L グリコーゲンをマイクロチューブに加えて、再度ボルテックスミキサーで攪拌した後、15000 rpmで5 min遠心した。遠心後、上清を捨て、100 μ L 70 %エタノールを加えてスピンドウンした。上清を捨てて、3 min風乾した。

2-3-5: Plasmidの増幅

上記で得られたplasmidを増幅するために大腸菌に導入した。10 μ L DH5 α と1 μ Lの上記ライゲーション産物を氷上で30 min混和させた。その後、42°C 30 sヒートショックを行い、予め37°Cで溶解したSOCを100 μ L加え、37°C, 1 h放置した。ampicilinを含む培地に播き、培地を上にして37°Cで12 h培養した。シングルコロニーをピックアップし、LB Amp培地 2 mLを用いて、37°C 8 h振とうした。

2-3-6: mini prepによる大腸菌からのplasmidの回収

1 mLの培養した溶液を12000 rpmで2 min遠心を行い、大腸菌を回収し、250 μ L, Buffer P1を加え、ボルテックスミキサーで攪拌・溶解した。その後、250 μ L, Buffer P2を加え、転倒混和した後、300 μ L, Buffer N3を加えて転倒混和した。15000 rpmで5 min遠心した後、上清をQIA prep spincolumnに加え、12000 rpmで30 s遠心し、さらに何も加えずに12000 rpmで1 min

遠心した。遠心の際生じた廃液は、その都度廃棄した。新しいマイクロチューブにカラムを移し、50 μ L, Buffer EBを加え、1 min 遠心し、plasmidを回収した。

2-3-7: 電気泳動によるplasmidの確認

上記plasmidにhSec61 β DNAが正しく組み込まれているかを確認するために、制限酵素で切断し、断片のサイズを確認した。plasmidを制限酵素Not Iでカットした後、0.7 % agarose gelで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色してバンドを確認した。バンドのサイズは、 λ -Hind III fragment (TaKaRa) を参考にした。正しくhSec61 β DNAが挿入されたコロニーを選抜した。Sec61 β を導入したplasmidをpcDNA3.1(-)-hSec61 β 、コントロールplasmidはpcDNA3.1(-)とした。

2-3-8: plasmid DNAの濃度測定

Gene Quant (GE Healthcare) を用いて上記で作製したpcDNA3.1(-)-hSec61 β の濃度を測定した。plasmidをDWで50倍に希釈して、100 μ L溶液を作製した。予め100 μ L DWでゼロ点調整したBlack/Spectrosilセルに溶液を加え、260 nmで吸光度を測定し、吸光度に2500を乗じてDNAの濃度 (μ g/mL) を算出した。

2-3-9: MDCK細胞へのplasmidトランスフェクション

pcDNA3.1(-)-Sec61 β 、またはpcDNA3.1(-) plasmidを操作マニュアルに従い、FuGENE[®] 6 transcription reagent (Promega) を使用して、MDCK細胞にトランスフェクションした。60 mmのdishにMDCK細胞を 5.0×10^5 cells/dishの濃度で播種した。1 d培養後、メディウムを除去し、PBSで細胞表面を洗浄した後、新たに4 mLメディウムを加え、6 μ L FuGENE[®] 6と2-3-6で得たプラスミド溶液4.5 μ Lを37°C 24 h作用させた。

2-3-10: G418によるセレクション

2-3-9で得られた細胞をトリプシンで剥離し、3000 rpmで5 min遠心し、細胞のペレットを作製した。細胞ペレットを10 mLのメディウムに懸濁させ、100 mm dishに濃度を変えて(9 mL, 1 mL, 0.1 mL, 0.01 mL) 播種した。1 mLの細胞懸濁液を1 mg/mL G418 (Millipore) を含む培地で培養して生存細胞のシングルコロニーを採取した。pcDNA3.1(-)-hSec61 β 、及び

pcDNA3.1(-)をトランスフェクションさせた細胞を、それぞれ MDCK(Sec)細胞、MDCK(Cont)細胞とした。Human Sec61 β とcanine Sec61 β のアミノ酸配列は同一である。(塩基配列は異なる)

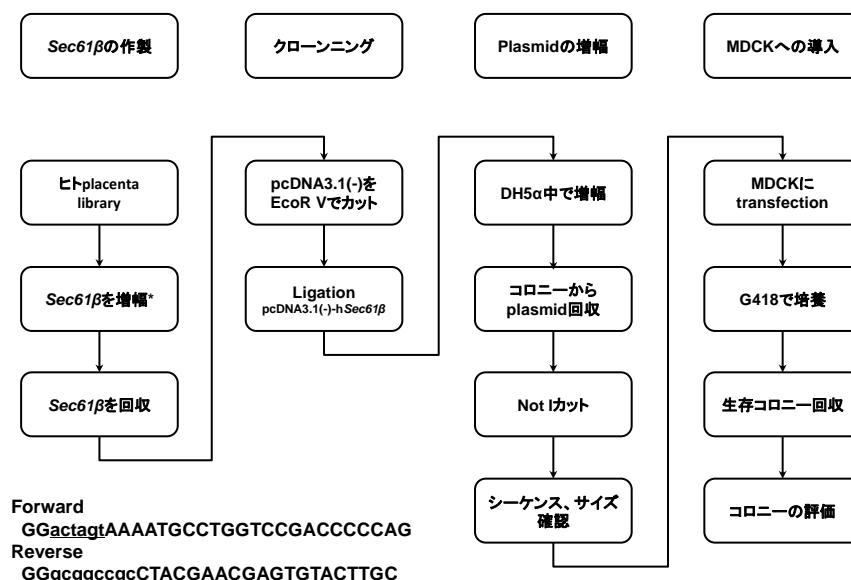


Fig. E-1: Schematic flow diagram of vector generation and transfection. hSec61 β cDNA was amplified using primers shown in the figure. pcDNA3.1(-) plasmid was digested with EcoR V, then the hSec61 β cDNA was ligated into the plasmid. The plasmid was transfected into DH5 α and cultured, then selected colonies. Plasmid was recovered and digested with Not I to check the plasmid size, direction, and sequence. Selected (pcDNA3.1(-)-Sec61 β) and vacant plasmid were then transfected into MDCK cell to obtain MDCK(Sec) and MDCK(Cont), respectively.

2-4: Cell の培養

実験の部 第1章の「1-3: Cell の培養」の項に従って実施した。但し、24-well Intercell dishの代わりに、24-well Transwell[®] dishes (Corning Inc.: Corning, NY) を使用し、MDCK(Sec)、MDCK(Cont)細胞を培養した。

2-5: TER Assay

実験の部 第1章の「1-4: TER Assay」の項に準じて実施した。抵抗値が一定の値になるまで Millicell[®]抵抗計 (Millipore) を用いて 24 h 間隔で測定した。

TER が一定値に達したら、C-CPE (0.01 mg/mL) を basal-dish に加えた。次いで、37°C にて R_{cell} を所定の間隔で計測した。また、ベースラインとして、C-CPE を添加せずに R_{cell} を測定した。 R_{cell} から(E1-1)式を用いて TER を算出した。ここで、C-CPE を添加した時点を $t = 0$ とした。最低 4 回の独立した実験を実施し、1 回あたり 3 個の測定値を得た。

2-6: Lactate Dehydrogenase (LDH) Assay

実験の部 第 1 章の「1-5: Lactate Dehydrogenase (LDH) Assay」の項に従って実施した。

2-7: Alamar Blue® Assay (AB)

Sec61 β 遺伝子を MDCK 細胞に導入した時、細胞に異常が観られないかを確認するために、Alamar Blue® assay (Cosmo Bio) を用いて、細胞の分裂速度を評価した。MDCK(Cont)細胞ないし MDCK(Sec)細胞を 96-well プレートに 2000 cells/well で播種した。 $t = 24, 48, 72$ h 培養した後、Alamar Blue® を加えて 37°C で 3 h 培養した。続いて蛍光強度を計測した。(excitation、及び emission 光の波長は、それぞれ 544 nm、590 nm であった。) バックグラウンドを差し引いて、蛍光強度を求め、事前に作成した検量線を用いて、蛍光強度を細胞の数 $N(t)$ に変換した。

2-8: SDS-PAGE と Immunoblotting (IB)

2-8-1: タンパク質の回収

「2-4: Cell の培養」に従って培養した MDCK(Cont)、及び MDCK(Sec)細胞 ($t = 0, 24, 32, 48$ h) を 2 回以上 PBS で洗浄して培養液を取り除いた後、4°C の 200 μ L の lysis buffer [1% TritonX-100 in PBS] を加えて、4°C で 40 min 放置した。スクレイパーで細胞膜を剥がして懸濁させた。懸濁液をマイクロチューブに入れ、氷上で超音波処理を 40 s 3 回行った後、4°C で 3000 rpm 3 min 遠心し、注意深く上清を回収して lysate とした。

2-8-2: SDS-PAGE

2-8-1 で得た 20 μ L lysate に 6.7 μ L 4 \times SDS buffer を加え、99°C、5 min 加熱し、泳動用試料とした。15% polyacrylamide gel を用いて、20 mA/枚で SDS-PAGE を行った後、RT で 3 回純水によ

り洗浄した。

2-8-3: Immunoblotting

Polyvinylidene fluoride (PVDF)膜をRTにて60%メタノールで5 min浸漬し、メタノールを除去した後、blotting buffer [20% MeOH in running buffer]にRTで20 min浸漬した：(running buffer [25 mM Tris/0.192 M Glycine/0.1% SDS inミリ-Q])。Blotting用濾紙、及び2-8-2で得られたゲルもblotting bufferにRTで20 min浸漬した。濾紙3枚の上にPVDF膜、ゲル、さらに濾紙3枚を重ね、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan)を用いて、ゲル中のタンパク質をPVDF膜に3.32 mA/cm², 24 min転写した。その後、PVDF膜をTBST [10 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl]中に、2% Block Ace® (Megmilk Snow Brand, Japan)を溶解した液に浸漬し、4°Cで1 dインキュベートした。TBSTで3回洗浄した後、RTで1 h第1抗体で処理し、TBSTで3回洗浄した。続いてRTで1 h対応する第2抗体で処理した。TBSTで3回洗浄後、PVDF膜をECL prime (GE Healthcare Bio-Sciences) A液、B液の等量混合液で5 minインキュベートして可視化した。バンド強度をLAS-4000 mini (ImageQuant®: GE Healthcare Bio-Science)を用いて定量化した。

2-9: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

$t = 0, 24, 48$ hにおける両細胞の全RNAを抽出した後、cDNAに逆転写した後、PCRによって、各 t におけるCLDN-4 mRNAの量を計測した。cDNAで規格化することによって比較を行った。

2-9-1: 全RNAの抽出

培地を除去し、PBSで洗浄した後、RNeasy® kit from (Qiagen, Tokyo, Japan)を用いて、 $t = 0, 24, 48$ hにおける両細胞の全RNAをプロトコールに従って抽出した。細胞の入ったエッペンに250 μ L Buffer RLTを加え、ピペッティングを10回行った。次に、250 μ L 70% ethanolを加え、カラムにサンプル全量をのせ、10000 rpmで15 s遠心を行った。その後、カラムに700 μ L Buffer RW1をのせ、再度遠心を行った。そして、500 μ L Buffer RPEをのせ10000 rpm

で 15 s 遠心後、さらに、500 μ L Buffer RPE をのせ 13200 rpm で 2 min 遠心を行った。新しいエッペンにカラムをのせ、30 μ L RNase free water をのせ 10000 rpm で 15 s 遠心を行い、全 RNA を溶解させた。

2-9-2: mRNA 濃度の測定

得られた 2 μ L の RNA を 98 μ L の DW で 50 倍に希釈し、石英セルに注入した後、DW でゼロ点を調節して、260 nm の波長における吸光度を測定した。mRNA の濃度 (μ g/mL) = 吸光度 \times 2000 によって算出した。

2-9-3: cDNA への逆転写

Superscript™, First-strand synthesis system (Invitrogen)を用い、プロトコールに従って cDNA に逆転写した。2-9-1 で得られた全 RNA 1 μ L に、0.7 μ L 10 \times DNase buffer、0.5 μ L 50mM EDTA を加え、75°C で 10min 静置後、氷上に置いた。さらに、1 μ L Odt、1 μ L dNTP、0.2 μ L DEPC-Treated Water を加え、65°C で 5 min 静置後、再度氷上で冷却した。その後、2 μ L 10 \times RT buffer、4 μ L 25mM MgCl₂、2 μ L 0.1M Dithiothreitol(DTT) 、1 μ L RNase Out を加え、遠心を行った。遠心後、42°C で 2min おき、1 μ L Super Script II RT を加え、42°C で 5 min、70°C で 15 min 静置後、氷上で冷却した。最後に、1 μ L RNaseH を加え、37°C で 20 min 置き cDNA を作製した。

2-9-4: cDNA の定量

Quant-iT™ PicoGreen® DNA Reagent and kit (Invitrogen) を用い、cDNA の定量を行った。DW 7600 μ L 中に 20 \times TE を 400 μ L 加え、Component B とする。Component B 36000 μ L に Pico Green® 試薬を 1.8 μ L 加え、Component A とする。 λ -DNA 希釈系 (25, 12.5 6.25, 3.125, 1.563, 0.781 ng/mL) を検量線作成のため調整した。検体 2 μ L に Component B を 998 μ L 加えた。検量線用、及び検体を 100 μ L/well 加え、各 well に Component A を 100 μ L 加えた。RT にて遮光して 5 min 静置した。励起光 (480 nm)、測定光 (538 nm) にて、吸光度を測定した。検量線を用いて、吸光度から、cDNA 濃度を算出した。

2-9-5: RT-PCR

生成された cDNA について TaqMan® probe assay kit (Qiagen) を用いて PCR を行った。

CLDN-4 の primer や FAM/TAMRA probe は DNA 配列[52]に基づき設計した。

forward primer: 5'-gatgcagtgcaaggtgtacg-3' reverse primer: 5'-ctctcatcctccacgcagtt-3'

FAM/TAMRA probe: 5'-ctcatggctcgcagcatcat-3'

両 primer, 10 pmol、FAM/TAMRA probe, 5 pmol、25 μ L PCR Master Mix (Life Technologies: Tokyo, Japan)に DW を加え、45 μ L の混合液を調整し、50°C で 2 min、その後 94°C で 10 min インキュベートした。7300 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) を用いて、蛍光強度を 40 cycle (94°C for 10 s + 55°C for 60 s) の間モニターした。CLDN-4 mRNA は cDNA の量で規格化して、相対的な量を比較した。amplicon size の観察された値 (150 bp) と、計算値 (153 bp) は、ほぼ一致した (Fig. 2-8, left panel)。

2-10: Immunoprecipitation (IP)

$t = 0$ 、32 hにおけるMDCK(Sec)細胞、及びMDCK(Cont)細胞の単層膜から採取されたライセートについて、免疫沈降を行い、Sec61 β とCLDNの結合性を評価した。

2-10-1: 細胞の溶解

培養した細胞を2回以上PBSで洗浄して培養液を取り除いた後、PBSを加えて、スクレイパーで細胞膜を剥がして懸濁させた。懸濁液をマイクロチューブに入れ、4°Cで3000 rpm 3 min 遠心し、上清を除去した。遠心・上清除去の操作を再度実施し、pelletを得た。pelletに4°C 1 mLのlysis buffer [50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, protease inhibitor] (Roche Diagnostics: Tokyo, Japan) を加え、4°C, 2h低速でローテーションした後、4°Cで12000 rpm 10 min遠心して、注意深く上清を回収した。

2-10-2: プレクリア

50 μ Lのprotein G-agarose (Roche Diagnostics) を加えて、4°Cで3 h低速でローテーションすることによって非特異的な結合成分を除去した。12000 rpm, 20 s遠心後、上清をマイクロチューブに回収した。(以下、lysate)

2-10-3: 抗原抗体反応

2-10-2で得たlysate 1000 μ Lを10 μ LのCLDN-4 mAb (IP CLDN-4に相当)、ないし1.0 μ Lの

Sec61 β pAb (IP Sec61 β に相当) と共に4°Cで2 hインキュベートした後、100 μ Lのprotein G-agarose を加え、4°Cで3 hインキュベートして沈殿させた。次いで、12000 rpm, 20 s遠心後、上清液を注意深く除去した。

2-10-4: 複合体の回収

2-10-3 で得られた沈殿物を 1 mL lysis buffer で 4°C 20 min 振とうし、12000 \times g 20 s 遠心後、上清を注意深く除き、1 mL washing buffer 2 [50mM Tris-HCl (ph 7.5) 500mM NaCl 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate] で 4°C, 20 min 振とうし、12000 \times g 20 s 遠心後、上清を注意深く除いた。その後、1 mL washing buffer 3 [50mM Tris-HCl (ph 7.5) Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate] で 4°C, 20 min 振とうし、12000 \times g 20 s 遠心後、上清を注意深く除き、75 μ L の PBS を加えた。

2-10-5: SDS-PAGEとIB

2-10-4で得られた懸濁物を99°C 6 min加熱し、12000 \times g 20 min遠心後上清を回収した。その後、2-8-2に従ってタンパク質を分離した後、2-8-3に従ってIBを実施し、バンド強度を定量化した。IBは免疫共沈降物 (以下 "IP")、lysate (以下 "L") について同時に実施した。併せて、使用した抗体 (以下 "Ab") についてもIBを行った。全CLDN-4のうち、Sec61 β と結合したCLDN-4の割合 (r_{CS}) をAPPENDIX-3に従って算出した。positive controlとして、CLDN-4とEphA2との結合を確認した(Fig. E-2)。

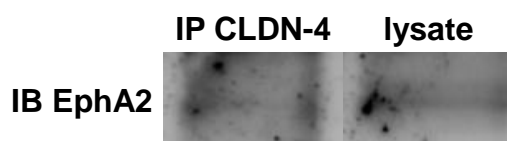


Fig. E-2: IB for EphA2 Ab. Left: Immunoprecipitated with CLDN-4 mAb, then immunoblotted with EphA2. Right: Lysate was immunoblotted with EphA2 Ab.

2-11: Immunofluorescence Microscopy (IFM)

実験の部 第1章の「1-6: Immunofluorescence Microscopy (IFM)」の項に準じて実施した。

Transwell® dish上で培養した細胞単層膜を、1% formaldehydeを用い、4°Cにて3 h処理した後、0.1%のTriton X-100で15 min 処理した。PBSに浸漬した後、細胞をPBS中の5% BSAで45 min 処理し、CLDN-3の第1抗体に浸漬（4°C、16h）した。PBSで数回洗浄後、RTにて細胞を第2抗体に1 h浸漬した。さらにPBSで洗浄した後、細胞単層膜をCLDN-4とSec61βの第1抗体で同時に浸漬（RT、1h）し、PBSで数回洗浄後、室温にて対応する第2抗体に同時に浸漬した（RT、1 h）。さらにPBSで洗浄した後、細胞単層膜を注意深く剥がして、ガラス板上にマウントした。細胞単層膜の画像を、共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）（ECLIPS TI-E）（Nikon: Tokyo, Japan）を用いて観察した。

アミノ酸配列

CLDN-1、-3、-4、Sec61βのアミノ酸配列データは、<http://asia.ensembl.org/index.html>を参照。

CLDN-1 (canine): ENSCAFT00000047131

CLDN-3 (canine): ENCAFT00000019892

CLDN-4 (canine): ENSCAFT00000019888

Sec61β (canine): ENSCAFT00000003996

Sec61β (human): ENST00000223641

【謝辞】

本研究の遂行及び博士学位論文の作成にあたり、暖かい励ましとご指導を賜りました昭和薬科大学 薬剤学研究室 渡辺善照 教授、藤井まき子 准教授、及び小泉直也 講師に感謝いたします。また、貴重な C-CPE 発現 plasmid を提供していただきました、大阪大学大学院薬学研究科 医療薬学専攻 近藤昌夫 博士に御礼申し上げます。薬剤学研究室の大学院生と学生の皆様には、実験手技の協力をいただき有難うございました。本学位論文の審査及びご指導を賜りました、昭和薬科大学、小椋康光 教授、秋澤宏行 教授、並びに田口恭治 教授に深謝いたします。最後に、博士課程への挑戦に対して理解を示し、応援してくれました家族、両親に感謝いたします。

本研究は、文部科学省の科学研究費 C 21590178 (第 1 章)、同 C25460222 (第 2 章) によってサポートされたことを付記いたします。

【参考文献】

- [1] González-Mariscal L. Tight Junctions. NY, Springer Science (2006).
- [2] Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a002907 (2010).
- [3] Lal-Nag M and Morin PJ. The claudins. *Genome Biology*, **10**, 235 (2009).
- [4] Furuse M, Sasaki H and Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J. Cell. Biol.*, **147**, 891-903 (1999).
- [5] Furuse M, Furuse K, Sasaki H and Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J. Cell. Biol.*, **153**, 263-272 (2001).
- [6] Daugherty BL, Ward C, Smith T, Ritzenthaler JD and Koval M. Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J. Biol. Chem.*, **282**, 30005-30013 (2007).
- [7] Piontek J, Fritzsche S, Cording J, Richter S, Hartwig J, Walter M, Yu D, Turner JR, Gehring C, Rahn HP, Wolburg H and Blasig IE. Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell. Mol. Life Sci.*, **68**, 3903–3918 (2011).
- [8] Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y and Tsukita S. *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J. Cell. Biol.*, **147**, 195-204 (1999).
- [9] Gonzalez-Mariscal L, Nava P and Hernandez S. Critical role of tight junctions in drug delivery across epithelial and endothelial cell layers. *J. Membr. Biol.*, **207**, 55-68 (2005).
- [10] Salama NN, Eddington ND and Fasano A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 15-28 (2006).

- [11] Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A and Tsukita S. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene*, **27**, 6930-6938 (2008).
- [12] González-Mariscal L, Tapia R and Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1778**, 729-756 (2008).
- [13] Anderson JM and van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**, a002584 (2009).
- [14] Tomita M., Hayashi M. and Awazu S. Absorption-enhancing mechanism of sodium caprate and decanoylcarnitine in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 739-743 (1995).
- [15] Tomita M, Hayashi M and Awazu S. Absorption-enhancing mechanism of EDTA, caprate, and decanoylcarnitine in Caco-2 Cells. *J. Pharm. Sci.*, **85**, 608-611 (1996).
- [16] Takahashi A, Kondoh M, Masuyama A, Fujii M, Mizuguchi H, Horiguchi Y and Watanabe Y. Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin in its interaction with claudin-4. *J. Control Release*, **108**, 56-62 (2005).
- [17] Takahashi A, Komiya E, Kakutani H, Yoshida T, Fujii M, Mizuguchi H, Tsunoda S, Koizumi N, Isoda K, Yagi K, Watanabe Y and Kondoh M. Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.*, **75**, 1639-1648 (2008).
- [18] Veshnyakova A, Piontek J, Protze J, Waziri N, Heise I and Krause G. Mechanism of *Clostridium perfringens* enterotoxin interaction with claudin-3/4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins. *J. Biol. Chem.*, **287**, 1698-1708 (2012).
- [19] Kondoh M, Masuyama A, Takahashi A, Asano N, Mizuguchi H, Koizumi N, Fujii M, Hayakawa T, Horiguchi Y and Watanabe Y. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol. Pharmacol.*, **67**, 749-756 (2005).
- [20] Uchiyama T, Sugiyama T, Quan YS, Kotani A, Okada N, Fujita T, Muranishi S and Yamamoto A. Enhanced permeability of insulin across the rat intestinal membrane by various absorption

- enhancers: their intestinal mucosal toxicity and absorption-enhancing mechanism of n-lauryl-beta-D-maltopyranoside. *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 1241-1250 (1999).
- [21] Preston E, Slinn J, Vinokourov I and Stanimirovic D. Graded reversible opening of the rat blood-brain barrier by intracarotid infusion of sodium caprate. *J. Neurosci Methods*, **168**, 443-449 (2008).
- [22] Maher S, Leonard TW, Jacobsen J and Brayden DJ. Safety and efficacy of sodium caprate in promoting oral drug absorption: from in vitro to the clinic. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 1427-1449 (2009).
- [23] Gao Z, Xu X, McClane B, Zeng Q, Litkouhi B, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC and Garner EI. C terminus of *Clostridium perfringens* enterotoxin downregulates CLDN4 and sensitizes ovarian cancer cells to taxol and carboplatin. *Clin. Cancer Res.*, **17**, 1065-1074 (2011).
- [24] Lindmark T, Kimura Y and Artursson P. Absorption enhancement through Intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**, 362-369 (1998).
- [25] Claude P. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J. Membr. Biol.*, **39**, 219-232 (1978).
- [26] Watson CJ, Rowland M and Warhurst G. Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **281**, C388-C397 (2001).
- [27] Sasaki H, Matsui C, Furuse K, Kiyosue Y, Furuse M and Tsukita S. Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 3971-3976 (2003).
- [28] Stauffer D and Aharony A. Introduction to percolation theory. 2nd ed. London, Taylor and Francis (1994).

- [29] Shafrir Y, ben-Avraham D and Forgacs G. Trafficking and signaling through the cytoskeleton: a specific mechanism. *J. Cell. Sci.*, **113**, 2747-2757 (2000).
- [30] Kirkpatrick S. Percolation and conduction. *Rev. Mod. Phys.*, **45**, 574-588 (1973).
- [31] Costa UMS, Tsallis C and Schwachheim G. Conductivity of square-lattice bond-mixed resistor network. *Phys. Rev.*, **B33**, 510-514 (1986).
- [32] Clerc JP, Giraud G, Laugier JM and Luck JM. The electrical conductivity of binary disordered systems, percolation clusters, fractals and related models. *Adv. Phys.*, **39**, 191-309 (1990).
- [33] Last BJ and Thouless DJ. Percolation theory and electrical conductivity. *Phys. Rev. Lett.*, **27**, 1719-1721 (1971).
- [34] Sahimi M, Hughes BD, Scriven LE and Davis HT. Critical exponent of percolation conductivity by finite-size scaling. *J. Phys. C: Solid State Phys.*, **16**, L521-L527 (1983).
- [35] Cardy J. Scaling and renormalization in statistical physics. *Cambridge Lecture Notes in Physics* **5**. Cambridge, Cambridge University Press (1997).
- [36] van Itallie CM, Rahner C and Anderson JM. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J. Clin. Invest.*, **107**, 1319-1327 (2001).
- [37] Söderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzen LE, Lindmark T, Wiren M, Tagesson C and Sjö Dahl R. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*, **50**, 307-313 (2002).
- [38] Sugibayashi K, Onuki Y. and Takayama K. Displacement of tight junction proteins from detergent-resistant membrane domains by treatment with sodium caprate. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **36**, 246-253 (2009).
- [39] Hayashi M, Sakai T, Hasegawa Y, Nishikawahara T, Tomioka H, Iida A, Shimizu N, Tomita M and Awazu S. Physiological mechanism for enhancement of paracellular drug transport. *J. Contr. Rel.*, **62**, 141-148 (1999).

- [40] Tomita M, Hayashi M, Horie T, Ishizawa T and Awazu S. Enhancement of colonic drug absorption by the transcellular permeation route. *Pharm. Res.*, **5**, 786-789 (1988).
- [41] McLaughlin J, Padfield P, Burt PH and O'Neill CA.. Ochratoxin A increases permeability through tight junctions by removal of specific claudin isoforms. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **287**, C1412-C1417 (2004).
- [42] Doi N, Tomita M and Hayashi M. Absorption enhancement effect of acylcarnitines through changes in tight junction protein in Caco-2 cell monolayers. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **26**, 162-170 (2011).
- [43] Johnson AE and Haigh NG. The ER translocon and retrotranslocation: Is the shift into reverse manual or automatic? *Cell*, **102**, 709-712 (2000).
- [44] Levy R, Wiedmann M and Kreibich G. In vitro binding of ribosomes to the β subunit of the Sec61p protein translocation complex. *J. Biol. Chem.*, **276**, 2340-2346 (2001).
- [45] Kalies KU, Rapoport TA and Hartmann E. The β subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J. Cell. Biol.*, **141**, 887-894 (1998).
- [46] Wang YN, Yamaguchi H, Huo L, Du Y, Lee HJ, Lee HH, Wang H, Hsu JM and Hung MC. The translocon Sec61beta localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus. *J. Biol. Chem.*, **285**, 38720-38729 (2010).
- [47] Lipschutz JH, Guo W, O'Brien LE, Nguyen YH, Novick P and Mostov KE. Exocyst is involved in cystogenesis and tubulogenesis and acts by modulating synthesis and delivery of basolateral plasma membrane and secretory proteins. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 4259-4275 (2000).
- [48] Lipschutz JH, Lingappa VR and Mostov KE. The exocyst affects protein synthesis by acting on the translocation machinery of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **278**, 20954-20960 (2003).
- [49] Toikkanen JH, Miller KJ, Söderlund K, Jääntti J and Keränen S. The β Subunit of the Sed61p

- endoplasmic reticulum translocon interact with exocyst complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 20946-20953 (2003).
- [50] Kelkar A and Dobberstein B. Sec61beta, a subunit of the Sec61 protein translocation channel at the endoplasmic reticulum, is involved in the transport of Gurken to the PM. *BMC Cell. Biol.*, **10**, 11 (2009).
- [51] Ikari A, Atomi K, Takiguchi A, Yamazaki Y, Hayashi H, Hirakawa J, and Sugatani J. Enhancement of cell-cell contact by claudin-4 in renal epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell. Biochem.*, **113**, 499-507 (2012).
- [52] Hou JH, Gomes AS, Paul DL and Goodneough DA. Study of claudin function by RNA interference. *J. Biol. Chem.*, **281**, 36117-36123 (2006).
- [53] van Itallie CM, Colegio OR and Anderson JM. The cytoplasmic tails of claudins can influence tight junction barrier properties through effects on protein stability. *J. Membr. Biol.*, **199**, 29-39 (2004).
- [54] Kramers MTC and Robinson GB. Studies on the structure of the rabbit kidney brush border. *Eur. J. Biochem.*, **99**, 345-351 (1979).
- [55] He B and Guo W. The exocyst complex in polarized exocytosis. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **21**, 537-542 (2009).
- [56] Kwak YK, Vikström E, Magnusson KE, Vécsey-Semjén B, Colque-Navarro P and Möllby R. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin perturbs the barrier function in Caco-2 epithelial cell monolayers by altering junctional integrity. *Infect. Immun.*, **80**, 1670-1680 (2012).

【補遺】

APPENDIX-1 装置伝達関数の影響について

A1-1 装置伝達関数と Laplace 変換

刺激応答理論によれば、観測される信号 $y(t)$ は真の信号 $x(t)$ と装置伝達関数 $h(t)$ との合成積 (convolution) になり、(A1-1)式で表せる。

$$x(t) * h(t) = y(t) \quad (\text{A1-1})$$

ここで、convolution は(A1-2)式で定義される。

$$x(t) * h(t) = \int_0^t x(\tau)h(t-\tau)d\tau \quad (\text{A1-2})$$

ここでの課題は、観測された $y(t)$ から真の信号 $x(t)$ を求めることである。

(A1-2)式の両辺を Laplace 変換すると(A1-3)式となる。

$$X(s) \times H(s) = Y(s) \quad (\text{A1-3})$$

Laplace 変換とは、 t -space から、 s -space への変換であり、 s -space では時間の逆数 (波数) が単位となっている。即ち、 t -space で $t \gg 1$ は、 s -space では $s \ll 1$ に相当する。

(A1-3)式から、 $x(t)$ に関する式を求めると、(A1-4)式を得る。

$$x(t) = L^{-1} \left[\frac{Y(s)}{H(s)} \right] \quad (\text{A1-4})$$

ここで、 $L^{-1}[\cdot]$ は逆 Laplace 変換を意味する。(A1-4)式から、真の信号は、観測された信号の Laplace 変換を装置伝達関数の Laplace 変換で除した関数の逆 Laplace 変換で与えられる。

A1-2 装置伝達関数の決定

装置伝達関数を求めるためには既知の入力に対応する応答を調べればよい。ここでは、 $t = 0$ で $x(t < -0) = 0$ 、 $x(t > +0) = b$ という信号を入力してその応答を調べた。この入力は(A1-5)式で表せる。

$$x_0(t) = bu(t) \quad (\text{A1-5})$$

ここで、 $u(t)$ は Heaviside unit 関数である。この時の応答は、(A1-6)式のように $t = a$ まで、直線

的に増加し b に達した。

$$y_0(t) = \frac{b}{a}t \quad \text{for } (0 \leq t \leq a) \quad (\text{A1-6A})$$

$$y_0(t) = b \quad \text{for } (t > a) \quad (\text{A1-6B})$$

(A1-5)、(A1-6)式を Laplace 変換すると(A1-7)、(A1-8)式を得る。

$$X_0(s) = \frac{b}{s} \quad (\text{A1-7})$$

$$Y_0(s) = \frac{b}{a} \left\{ \frac{1}{s^2} [1 - \exp(-as)] \right\} \quad (\text{A1-8})$$

(A1-7)、(A1-8)式を(A1-3)式に代入すると(A1-9)式を得る。

$$H(s) = \frac{1}{as} [1 - \exp(-as)] \quad (\text{A1-9})$$

(A1-9)式を as で Taylor 展開すると(A1-10)式を得る。

$$H(s) = 1 - \frac{1}{2}as + \frac{1}{3!}(as)^2 + \dots + \frac{(-1)^n}{(n+1)!}(as)^n + \dots \quad (\text{A1-10})$$

A1-3 装置伝達関数の影響の検討

(A1-10)式で、 $as \ll 1$ について近似を行うと、(A1-11)式を得る。

$$H(s) \approx \exp\left(-\frac{a}{2}s\right) \quad (\text{A1-11})$$

この近似を行った場合、 as の 2 次の項までの誤差 Δ は、(A1-12)式で与えられる。

$$\Delta \approx \frac{(as)^2}{24} \quad (\text{A1-12})$$

予備実験から $a = 2 \text{ s}$ 、 $t \gg 100 \text{ s}$ ($as \sim 0.02 \ll 1$) なので、 $\Delta \sim 1.7 \times 10^{-5}$ となり、(A1-11)式の近似は十分な精度が確保できていると考えられる。

伝達関数 $h(t)$ は、(A1-11)式の逆 Laplace 変換なので(A1-13)式で与えられる。

$$h(t) \approx \delta\left(t - \frac{a}{2}\right) \quad (\text{A1-13})$$

ここで、 $\delta(\cdot)$ は、デルタ関数であり、 $h(t)$ は、時間を $a/2$ (約 1 s) だけ戻せばよい結果となる。実際の解析では第1章の (1-7)式のように $\Delta t = t - t_c$ を用いるので、この時間軸のシフト量は相殺されるため無視できる。

APPENDIX-2 $T_{1/2}$ の物理的背景について

A2-1 R_{para} や TER の比の関係について

$\Sigma_{\text{para}}(0)$ と $\Sigma_{\text{para}}(t)$ の比 $\rho(t)$ は第 1 章 (1-1) 式を用いて (A2-1A)、(A2-1B) 式で与えられる。ここで、 $\Sigma_{\text{trans}}(0) = \Sigma_{\text{trans}}(t) = \Sigma_{\text{trans}}$ 、 $\Sigma_{\text{other}}(0) = \Sigma_{\text{other}}(t) = \Sigma_{\text{other}}$ とした。

$$\rho(t) = \frac{\Sigma_{\text{para}}(0)}{\Sigma_{\text{para}}(t)} = \frac{[1-\xi]}{\left[1-\xi \times \frac{\Sigma_{\text{cell}}(0)}{\Sigma_{\text{cell}}(t)}\right]} \times \frac{\Sigma_{\text{cell}}(0)}{\Sigma_{\text{cell}}(t)} \quad (\text{A2-1A})$$

$$\xi \equiv \left(\frac{\theta_{\text{trans}} \Sigma_{\text{trans}}}{\Sigma_{\text{cell}}(0)} + \frac{\theta_{\text{other}} \Sigma_{\text{other}}}{\Sigma_{\text{cell}}(0)} \right) \approx \frac{\theta_{\text{trans}} \Sigma_{\text{trans}}}{\Sigma_{\text{cell}}(0)} < 1 \quad (\text{A2-1B})$$

A2-2 $\rho(T_{1/2})$ に関する表式

$t = T_{1/2}$ で $\Sigma_{\text{cell}}(0)/\Sigma_{\text{cell}}(T_{1/2}) = 1/2$ を (A2-1A) 式に代入すると、(A2-2) 式を得る。

$$\rho(T_{1/2}) = \frac{1}{2} \times \frac{[1-\xi]}{[1-\xi/2]} = \frac{1}{2} \times \left(1 - \frac{1}{2}\xi - \frac{1}{4}\xi^2 - \frac{1}{8}\xi^3 + \dots \right) \quad (\text{A2-2})$$

細胞間隙や、細胞膜の欠陥の分率は小さいので、 $\theta_{\text{trans}} \rightarrow 1$ である。また細胞膜経路の TER は $10^4 (\Omega\text{cm}^2)$ と見積もられるので [25]、 $\Sigma_{\text{trans}} \ll 10^{-4} (\Omega^{-1})$ となる。このことから、 $\theta_{\text{trans}} \Sigma_{\text{trans}} \ll 10^{-4} (\Omega^{-1})$ となる。本実験系で $\Sigma_{\text{cell}}(0)$ は $10^{-3} (\Omega^{-1})$ 程度であるので、 $\xi \ll 1$ となる。(A2-2) 式の第 1 項で近似すると $\rho(T_{1/2})$ に対して (A2-3) 式を得る。

$$\rho(T_{1/2}) = \frac{\Sigma_{\text{para}}(0)}{\Sigma_{\text{para}}(T_{1/2})} \approx \frac{\Sigma_{\text{TJ}}(0)}{\Sigma_{\text{TJ}}(T_{1/2})} \approx \frac{1}{2} \quad (\text{A2-3})$$

A2-3 $T_{1/2}$ の物理的意味

(A2-3) 式が $T_{1/2}$ の物理的意味を与える。即ち、 $t = T_{1/2}$ では TJ の電気伝導度 Σ_{para} が 2 倍になる (TER が 1/2 になる) 時間に相当する。実際、 $\xi = 0.05$ では $\rho(T_{1/2}) = 0.48$ となる。細胞膜の強い乱れ (Σ_{trans} が Σ_{para} に対して無視できないくらい大きい時)、あるいはピンホールなどの物理的欠陥が多い (θ_{other} が無視できない時) 場合は、 $\xi \ll 1$ の条件が破綻するため、(A2-2) 式で ξ のより高次の項を考慮する必要がある。

APPENDIX-3 結合性評価のための方程式の導出

A3-1 化学種の分子数の定義

ここでは、例としてSec61 β による免疫共沈降物を、CLDN-4によってIBを行った系について論じる。以下の変数を導入する。

N_{f-S} : ライセート中のフリーな (結合していない) Sec61 β の数

N_{f-C} : ライセート中のフリーなCLDN-4の数

N_{CS} : ライセート中のSec61 β /CLDN-4複合体の数

N_{SG} : 免疫共沈降物中のG-agaroseと結合しているSec61 β の数

N_{CSG} : 免疫共沈降物中のG-agaroseと結合しているSec61 β /CLDN-4複合体の数

N_{t-S} : 全Sec61 β の数

N_{t-C} : 全CLDN-4の数

N_{t-S} 、 N_{t-C} は(A3-1)式で与えられる。

$$\begin{aligned} N_{t-S} &= N_{f-S} + N_{CS} \\ N_{t-C} &= N_{f-C} + N_{CS} \end{aligned} \tag{A3-1}$$

A3-2 バンド強度に関する表式

IBにおけるSec61 β 、或はCLDN-4のバンド強度 (I) は、対応する成分の分子数に比例し、その比例定数をそれぞれ f_S 、 f_C とする。免疫共沈降物、lysateにおけるSec61 β のバンド強度は(A3-2)式で与えられる。

$$\begin{aligned} I(\text{Sec61}\beta)_{IP} &= (N_{CSG} + N_{SG}) \times f_S \\ I(\text{Sec61}\beta)_L &= N_{t-S} \times f_S \end{aligned} \tag{A3-2}$$

ここで、下添字のIP、Lは、それぞれ免疫共沈降物、ライセートを意味する。

同様にライセートにおけるCLDN-4のバンド強度は、(A3-3)式で与えられる。

$$\begin{aligned} I(\text{CLDN-4})_{IP} &= N_{CSG} \times f_C \\ I(\text{CLDN-4})_L &= N_{t-C} \times f_C \end{aligned} \tag{A3-3}$$

A3-3 r_{CS} に関する表式

次に全CLDN-4の内、Sec61 β と結合しているCLDN-4の割合を与える方程式を導出する。

(A3-2)、(A3-3)式から(A3-4)式を得る。

$$\frac{I(\text{CLDN-4})_{\text{IP}}}{I(\text{CLDN-4})_{\text{L}}} = \frac{N_{\text{CSG}}}{(N_{\text{CSG}} + N_{\text{SG}})} \times \frac{N_{\text{t-S}}}{N_{\text{t-C}}} \quad (\text{A3-4})$$

G-agarose の Sec61β に対する結合性はフリーな Sec61β と Sec61β/CLDN-4 複合体とで等しいと考えられるので、(A3-5)式が成り立つ。

$$\frac{N_{\text{CSG}}}{(N_{\text{CSG}} + N_{\text{SG}})} = \frac{N_{\text{CS}}}{(N_{\text{CS}} + N_{\text{S}})} = \frac{N_{\text{CS}}}{N_{\text{t-S}}} \quad (\text{A3-5})$$

(A3-5) 式を(A3-4) 式に代入すると、(A3-6)式を得る。

$$\frac{I(\text{CLDN-4})_{\text{IP}}}{I(\text{CLDN-4})_{\text{L}}} = \frac{N_{\text{CS}}}{N_{\text{t-C}}} \equiv r_{\text{CS}} \quad (\text{A3-6})$$

即ち、全 CLDN-4 の内、Sec61β と結合している CLDN-4 の割合 (r_{CS}) を見積もるためには、免疫共沈降物、ライセートについて IB を行い、(A3-6) 式を用いて、 r_{CS} を算出すればよい。

【略号・変数】

略号の定義

Ab	antibody
Caco-2	human epithelial colorectal adenocarcinoma
CLDN	claudin
CLSM	confocal laser scanning microscope (共焦点レーザー顕微鏡)
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin (ウエルシュ菌エンテロトキシン)
C-CPE	C-terminal fragment of CPE
ECL	extracellular loop (細胞外ループ)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
EGF	epidermal growth factor (上皮成長因子)
ER	endoplasmic reticulum (小胞体)
FITC	fluorescein isothiocyanate
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
IB	immunoblotting (ウェスタンブロッティング)
IFM	immunofluorescence microscopy (免疫蛍光顕微鏡)
IgG	immunoglobulin G
IP	immunoprecipitation (免疫沈降)
LDH	lactate dehydrogenase
LE	late endosome (後期エンドソーム)
MDCK	Madin-Darby canine kidney
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
TER	transepithelial electrical resistance (経上皮電気抵抗)
TGN	trans Golgi network (トランスゴルジネットワーク)

TJ	tight junction (密着結合)
ZO-1	zonula occludens

変数の定義

第 1 章

Σ	electrical conductance (bulk) (バルクの電気伝導度)
σ	electrical conductance (element) (要素の電気伝導度)
p	probability of conductor having σ_1 (高い電気伝導度(σ_1) 成分の分率)
p_c	probability at threshold (p の閾値)
Δp	$p - p_c$
t	time (時間)
t_c	time at threshold (t の閾値)
Δt	$t - t_c$
Φ_{\pm}	scaling function (スケーリング関数 : (1-4) 式)
h	σ_2/σ_1
z	defined in (1-3)
θ	fraction (paracellular、transcellular、other の分率)
s, μ, ν	critical exponent (臨界指数)
$r(t)$	$\Sigma_{\text{cell}}(t) / \Sigma_{\text{cell}}(0)$
L_Z	system size (系の大きさ)

第 2 章

$TER(t)$	TER at t (時刻 t における TER)
$TER_N(t)$	Normalized TER at t (時刻 t における規格化した TER)
R	electrical resistance (電気抵抗)
LRR	LDH release rate (LDH 放出率)

$N(t)$	cell number (細胞の数)
E	cell proliferation rate (細胞分裂速度)

補遺

APPENDIX-1

$x(t)$	true signal (真の信号)
$X(s)$	Laplace transformation of $x(t)$ ($x(t)$ のラプラス変換)
$y(t)$	observed signal (観測される信号)
$Y(s)$	Laplace transformation of $y(t)$ ($y(t)$ のラプラス変換)
$h(t)$	transmission function (装置伝達関数)
$H(s)$	Laplace transformation of $h(t)$ ($h(t)$ のラプラス変換)
$L[\cdot]$	Laplace transformation (関数・のラプラス変換)
$L^{-1}[\cdot]$	inverse Laplace transformation (関数・の逆ラプラス変換)
a, b	defined in (A1-6A) and (A1-6B)
$u(\cdot)$	Heaviside unit function (ヘビサイドのユニット関数)
$\delta(\cdot)$	delta function (デルタ関数)
Δ	defined in (A1-12)

APPENDIX-2

$\rho(t)$	defined in (A2-1A)
ξ	defined in (A2-1B)

APPENDIX-3

N_{f-s}	number of free Sec61 β molecules in lysate (lysate中のSec61 β の分子数)
N_{f-c}	number of free CLDN-4 molecules in lysate (lysate中のCLDN-4の分子数)
N_{CS}	number of Sec61 β /CLDN-4 complex in lysate (lysate中のSec61 β /CLDN-4の数)
N_{SG}	number of free Sec61 β molecules associating with G-agarose in IP

	(免疫共沈降物中のG-agaroseと結合したSec61 β の分子数)
N_{CSG}	number of free Sec61 β /CLDN-4 complex associating with G-agarose in IP (免疫共沈降物中のG-agaroseと結合したSec61 β /CLDN-4の数)
N_{t-S}	number of total Sec61 β molecules (全Sec61 β の分子数)
N_{t-C}	number of total CLDN-4 molecules (全 CLDN-4 の分子数)
$I(\cdot)$	band intensity (バンド強度)
f_s	pre-factor for the band intensity of Sec61 β (バンド強度と Sec61 β 数の比例係数)
f_c	pre-factor for the band intensity of CLDN-4 (バンド強度と CLDN-4 数の比例係数)
r_{CS}	ratio of CLDN-4 associating with Sec61 β and defined in (A3-6) (全 CLDN-4 に対する Sec61 β と結合した CLDN-4 の割合)

【外部発表】

学会発表

第 1 章

FIP 2012 Congress, Amsterdam, Netherland (2012).

第 2 章

132nd Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Sapporo, Japan (2012).

40th Controlled Release Society, Honolulu, Hawaii, USA (2013).

2013 Asian Federation for Pharmaceutical Sciences, Jeju, Korea (2013).

134th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Kumamoto, Japan (2014).

FIP 2014 Congress, Melbourne, Australia (2014).

論文発表

第 1 章

Washiyama M, Koizumi N, Fujii M, Kondoh M, Yagi K and Watanabe Y. Percolation analysis in electrical conductivity of MDCK and Caco-2 cells by permeation enhancing agents. *Biol Pharm Bull.*, **36**, 384-389 (2013).

第 2 章

Washiyama M, Koizumi N, Fujii M, and Watanabe Y. Sec61 β Regulates Barrier Functions of Tight Junction through Expression of Claudin-4 in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Biol. Pharm. Bull.*, (2014) in press.