

# 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

鷲山真紀子

## 緒言

細胞膜の透過性が著しく低いペプチドや核酸などの水溶性高分子薬物を、効率的に標的臓器に送達するため、細胞間隙経路が注目されている。上皮細胞層の細胞間隙は種々の機能性タンパク質からなる密着結合 (tight junction, TJ) を形成しており、claudin (CLDN)は、TJ 中でストランドを形成し、物質の侵入・漏洩を制御するバリア機能の本体である。細胞間隙経路による薬物送達では、不可逆的、及び長時間の TJ 開口は副作用が問題となり、迅速な TJ の開閉が課題となる。新規吸収促進法の構築のためには、TJ 開閉状態の時間依存性に関する研究が必要であるが、報告例は非常に少ない。そこで、本研究では、物理学化学的、及び分子生物学的アプローチを用いて、これらの課題に取り組んだ。

TJ 開口過程の時間依存性の実験結果を説明する物理モデルを構築し、検証するとともに、迅速な TJ 開口・再形成を調べるために、細胞内タンパク質輸送促進作用を有する Sec61 $\beta$  を上皮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、上皮細胞のモデルとして使用されている Madin-Darby canine kidney (MDCK)細胞、Human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2)細胞を用いた。TJ 開口物質として臨床で使用実績のある吸収促進剤のカプリン酸ナトリウム(C10)、及び CLDN に作用するウエルシュ菌毒素の C 末端(C-CPE)を選択し、TJ のバリア性や開閉状態の指標として上皮膜電気抵抗(TER)を評価した。

## TJ 開口過程の解明 —物理モデルの構築と実験的検証—<sup>1)</sup>

これまで詳細な報告例のない TJ の開口状態の指標である電気伝導度( $\Sigma_{TJ} \propto 1/TER$ )の時間変化を検討し、物理的モデルの構築、及び実験的検証を行った。上皮細胞単層膜(MDCK 又は Caco-2)に、TJ 開口物質(C10 又は C-CPE)を作用させると、 $\Sigma_{TJ}$ はある時間( $t = t_c$ )までほとんど変化せず、一定時間後( $t > t_c$ )から急激に増加した。(Fig. 1A)

この挙動を説明するため、TJ は、ストランドが未形成で導電性の高い部分(割合:  $p$ )とストランドを形成した低導電性の部分が連結したランダム抵抗網で表せると考え、 $p$  の時間変化により  $\Sigma_{TJ}$ が変化するというモデルを構築した。本モデルをパーコレーション理論で解析し、 $\Sigma_{TJ}$ は  $p$  の閾値( $p = p_c$ )となる時間( $t = t_c$ )までほとんど変化せず、 $t > t_c$  で、べき乗則に従い増加することが示された。べき指数は臨界指数( $\mu$ )とよばれ、空間の次元に依存する。

$$\begin{aligned} \Sigma_{TJ} &\rightarrow \text{constant} & t \leq t_c & \quad \text{TJ が閉じた状態} \\ \Sigma_{TJ} &\propto (t - t_c)^\mu = (\Delta t)^\mu & t > t_c & \quad \text{TJ 開口過程} \end{aligned}$$

解析した結果、閾値の存在(Fig. 1A)、及びべき乗則(Fig. 1B) が確

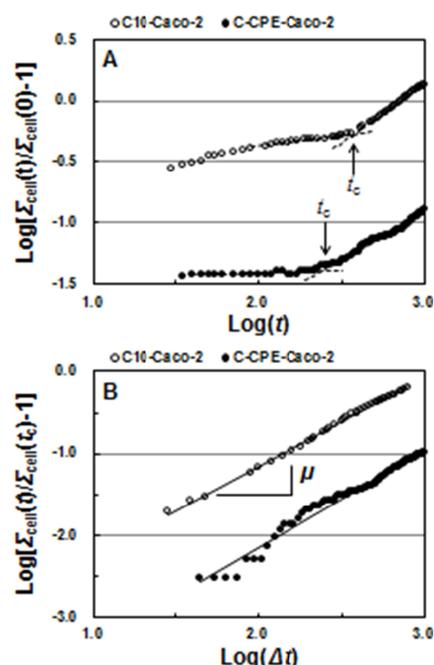


Fig. 1: Time course of  $\Sigma_{TJ}$ . A) Threshold and B) logarithmic relation in  $\Sigma_{TJ}$  and  $\Delta t$

認され、パーコレーション理論により実験結果を説明できることを明らかにした。また、Fig. 1B の直線の傾きから求めた  $\mu$  は細胞や TJ 開口物質の種類によらず、2次元の値に相当する  $\mu = 1.1-1.2$  となり、TJ 開閉速度増加には、TJ 中のストランドの解離・形成速度 ( $p$  の変化速度) の増加が重要なことが判った。

## Sec61β 過剰発現による TJ 開閉速度向上とメカニズムの検討<sup>2)</sup>

Sec61β は分泌型タンパク質、及び側底型膜タンパク質のトランスゴルジネットワーク(TGN)から側底膜への輸送促進効果があることが報告されている。そこで、MDCK 細胞に Sec61β を過剰発現させ、CL の細胞内輸送を促進させることによって TJ 開閉速度の向上を試みた。以下、Sec61β 発現、及び vacant な plasmid を導入した細胞をそれぞれ MDCK(Sec)、MDCK(Cont)とする。これらの上皮細胞単層膜の TER が飽和値に達した後、C-CPE (0.01 mg/mL)を作用させ(TJ 開口過程)、24 h 後に C-CPE を除去し(TJ 再形成過程)、TER の変化を測定した。

TER が飽和した後、C-CPE 添加・除去すると TJ の開閉に伴い、TER は減少・増加した。TJ 開閉速度の指標として、TER が飽和値の 1/2 になる時間( $T_{1/2}$ )を評価した。その結果、Sec61β 過剰発現により TJ 開口、再形成ともに  $T_{1/2}$  が有意に低下し、特に TJ 再形成速度が増加することを見出した(Fig. 2)。

このメカニズムの解明のため、免疫染色法で Sec61β と CLDN-4 の共存状態を観察した結果、TJ 再形成過程( $t = 32$  h)で、細胞膜近傍において MDCK(Sec)の方が MDCK(Cont)よりも Sec61β と CLDN-4 は強く共存した。次に、免疫沈降法にて CLDN-4 と Sec61β の結合性を検討した結果、TJ 再形成時において、Sec61β 抗体による沈降物中に CLDN-4 が検出されたことから、両タンパク質が複合体を形成することを発見した(Fig. 3)。沈降物中の CLDN-4 は細胞内総 CLDN-4 量の 5%以下であったことから、Sec61β と CLDN-4 の共存は、輸送小胞複合体を介した間接的結合によることが示唆される。TJ 再形成時において、側底型膜タンパク質である CLDN-4 は、TGN を経由して側底膜に輸送されることから、過剰発現された Sec61β は、CLDN-4 を含む輸送小胞と複合体を形成し、CLDN-4 の TGN から側底膜への輸送を促進した結果、特に TJ 再形成速度が増加したためと考えられる。

## 結論

本研究では、これまで報告例のない TJ 開口に伴う上皮細胞単層膜の  $\Sigma_{TJ}$  の時間変化を検討した結果、TJ の開口過程がパーコレーション理論で説明できることを見出し、TJ 開口速度の制御因子の主体は、TJ 中のストランドの解離・形成速度 ( $p$  の変化速度)であることを明らかにした。また、Sec61β を過剰発現させると、過剰発現された Sec61β が CLDN-4 を含む輸送小胞と複合体を形成し、CLDN-4 の細胞内輸送を促進することによって、TJ 開閉速度が促進することを初めて実証した。これは、先に論じた TJ 中のストランドの解離・形成速度  $p$  の変化速度が増加したものと考えられる。特定の分子を標的とすることで TJ 開閉を制御できることが示唆される。本研究の結果は、TJ 開閉速度を促進する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。

## 本研究の誌上発表

- 1) Washiyama M, Koizumi N, Fujii M, Kondoh M, Yagi K, Watanabe Y. Percolation analysis in electrical conductivity of Madin-Darby Canine Kidney and Caco-2 Cells by permeation-enhancing agents. *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 384–389 (2013).
- 2) Washiyama M, Koizumi N, Fujii M and Watanabe Y. Sec61β Regulates Barrier Functions of Tight Junction through Expression of Claudin-4 in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Biol. Pharm. Bull.* (2014) in press.

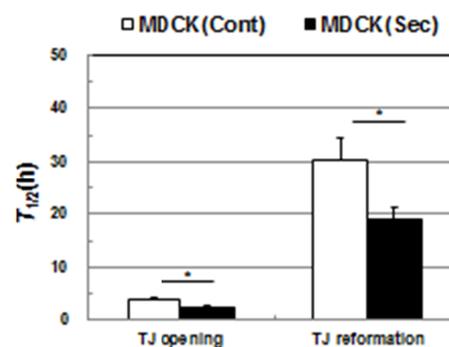


Fig. 2:  $T_{1/2}$  in TJ opening and recovery.

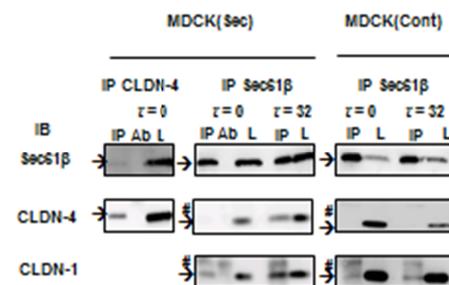


Fig. 3: Association of Sec61β with CLDN-4.