

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658107

研究課題名(和文)新規タイトジャンクション阻害物質スクリーニング法の開発と薬剤探索

研究課題名(英文)Construction of screening system and screening of novel tight junction inhibitors

研究代表者

臼井 健郎 (Usui, Takeo)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：60281648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：タイトジャンクション(TJ)は皮膚や腸の上皮細胞同士をきつく接着する構造であり、外界からの有害な物質に対する防御機能を担っているが、同時にバイオ医薬品等の吸収障壁ともなっている。このためバイオ医薬品の投与は注射等の侵襲的な手法に頼らざるを得ない。しかしながら、TJを一時的、かつ可逆的に緩めることが出来れば、貼り薬などの、より簡便で痛みを伴わない投与が可能になると考えられる。そこでTJを一次的・可逆的に緩める薬剤の探索系を二種類構築し、薬剤探索を行った。その結果、一つの探索系では活性物質が得られなかったものの、もう一つの探索系で、目的とする可逆的TJ開口パターンを示す化合物を見出した。

研究成果の概要(英文)：Tight Junction is a sealing structure in the closely associated area of two adjacent cells located in epithelium of skin, intestine and so on. TJ functions not only a impermeable barrier to bacteria and exogenous toxins, but also to medical drug, especially biomedicines. Therefore, it is required for injection or the other invasive methods to give medication the biomedicines to patients. However, if we have a compound which open the TJ transiently, it would be possible to give the orally or percutaneous medication.

Therefore, we constructed the two screening systems, and screened the compounds which open the TJ transiently. We successfully obtained one compound.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 生物生産化学・生物有機化学

キーワード：タイトジャンクション 化合物探索 可逆的TJ開口

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 多細胞生物の上皮細胞層は、外界と体内を仕切ること、病原微生物や有害な化合物といった体外からの異物の侵入を防いだり、体内の水分の漏出を防ぐなどの恒常性維持に深く関わっている。この仕切りとしての本体は、隣り合った細胞同士をきつく接着する構造であるタイトジャンクション(TJ)であり、claudin、occludin、tricellulin、Zo-1などの蛋白質複合体から構成されている。しかしながら、TJは体内を守るバリア機能を果たす一方、核酸・ペプチド・抗体などの近年開発が盛んなバイオ医薬品の吸収障壁となっている。そのためバイオ医薬品の多くは注射などの侵襲的投与方法が用いられているが、肉体的・経済的に患者の負担が重く、QOLの低下につながっている。もしTJの開閉を可逆的に制御できれば、バイオ医薬品を経皮・経粘膜などの非侵襲的投与方法が可能になり、患者のQOL向上が期待できる。しかしながら、既存のTJ開口を引き起こす薬剤はCa<sup>2+</sup>イオノフォアやアクチン阻害剤など、可逆性に乏しく細胞毒性も強いものがほとんどであり、臨床で使用できるのはDodecanate一剤に限られている。

(2) 我々はこれまで腸管上皮細胞層をモデル系として、唐辛子の辛味成分として知られているカプサイシンが、TJ構造を一過的に緩ませることを見出した。その作用機構解析を行ったところ、カプサイシン刺激によりCa<sup>2+</sup>流入が引き金となり、コフィリンの脱リン酸化がまず起こり、続いて二細胞間に局在しているアクチンが三細胞結合部への局在変化、並びにoccludinの分解が同時に引き起こされることがTJ開口に必要なことを見出した。さらにTJ開口にはTJ開口後にコフィリンのリン酸化に伴ったアクチン局在の回復が必要であり、occludin蛋白質量の回復は不要であることが明らかとなった。

(3) これまで行われているTJ関係の薬剤スクリーニングは、TJを持続的に開口させる、あるいはTJ機能を高める活性を指標としており、TJの一過的開口着目したスクリーニングは例が無い。そのため、これまでに報告されているTJ開口を引き起こす薬剤のほとんどは可逆性に乏しく、毒性が強いものやTJ開口に時間のかかるものがほとんどであり、TJを可逆的に開口させる低毒性かつ安全性が高い物質が必要である。

## 2. 研究の目的

(1) 現在までにTJ開口を短時間かつ一過的に引き起こす小分子化合物はカプサイシン以外に報告が無く、TJ開口機構解明の障害

となっている。カプサイシンによるTJ開口機構以外の開口機構の発見や解析、さらにバイオ医薬品の吸収補助剤の開発には新たな活性物質の発見・開発が必要である。

(2) そこでTJを一過的・可逆的に開口させる薬剤を、安価で効率的にスクリーニング法を開発するとともに化合物スクリーニングを行い、リード化合物となり得る新たな小分子化合物を見出すことを目的として研究を行う。

(3) また、カプサイシンの作用機構解析で得られた知見を用いたスクリーニング系も同時に構築し、低濃度かつ低毒性でカプサイシンと同様の活性を示す可逆的TJ開口誘導剤の探索も行うこととした。

## 3. 研究の方法

(1) 浮遊性またはTJ構造を持たない動物細胞を利用し、安価で簡便なスクリーニング系の構築を試みる。まず浮遊性のヒト白血病細胞Jurkat、あるいはTJ構造を持たないことが報告されているマウス細胞L932にclaudin-1またはclaudin-4を安定発現させた後、導入したclaudin-1またはclaudin-4の発現依存的に細胞が凝集性を獲得したことを確認する。次に凝集阻害を指標したスクリーニング系を構築する。凝集阻害は、凝集せずに分散している細胞と比較し、沈降速度が速い細胞塊を形成することを利用した方法や、顕微鏡観察により凝集塊を直接観察する方法により評価を行う。

(2) カプサイシンによる可逆的TJ開口機構解析より得られた知見を利用し、カプサイシンと同様の機構で可逆的TJを引き起こす薬剤のスクリーニング系を構築する。カプサイシンによる可逆的TJ開口には、まず細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入が必要であることから、上皮細胞系に対してCa<sup>2+</sup>流入を引き起こす薬剤を、Ca<sup>2+</sup>を検出する蛍光物質(Fura-2など)を用いて探索するスクリーニング系を構築する。

(3) (1)及び(2)で構築したスクリーニング系を用いて化合物探索を行う。研究室でこれまでに集めた約100種類の化合物、独立行政法人理化学研究所ケミカルバイオロジー研究センターNPDepo保有のauthentic、Pilot Libraryの合計約400化合物、その他各種大学との共同研究で集めた化合物を対象にスクリーニングを行う。

## 4. 研究成果

(1) 浮遊系の動物細胞であるJurkat細胞にclaudin-1及びclaudin-4発現ベクターを導入した。それぞれの蛋白質の一過的発現を確認した後、ベクターに応じた抗生物質により安定発現細胞の確立を試みたが、安定発現

細胞株は確立できなかった。そこで、TJ 構造を持たないマウス L 細胞に claudin-1 及び claudin-4 発現ベクターを導入したところ、それぞれの遺伝子を安定発現する細胞 (Cldn1-L 及び Cldn4-L) を構築することが出来た。

(2) まず claudin-1 安定発現細胞を用いて、claudin-1 発現依存的に細胞凝集が起きる条件を検討した。最初に Kubota らの報告 (*Curr. Biol.* 9, 1035-1038 (1999)) を参考に、細胞凝集が起こるかを検討した。親細胞の L 細胞と claudin-1 発現細胞である Cldn1-L を弱くトリプシン処理し、HCMF バッファー (25 mM HEPES, 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/L glucose) に懸濁・浮遊させた後、12 孔プレートで 1 時間、80 rpm で穏やかに攪拌することにより、Cldn1-L のみが細胞凝集を引き起こすことが確認できた。

次に、より効率よくスクリーニングを行うための条件検討を行った。用いる細胞プレート (6 孔、12 孔、24 孔、48 孔、96 孔プレート) 細胞密度 (1.0 × 10<sup>6</sup>、3.0 × 10<sup>6</sup>、10 × 10<sup>6</sup> cells/ml) 及びアッセイバッファーの pH (pH6.0、6.5、7.0、7.5、8.0) などの検討を行ったところ、24 孔プレートを用い、各孔に 250 μL の HCMF バッファー (25 mM HEPES, 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/L glucose) を、3.0 × 10<sup>6</sup> cells/ml の細胞密度で加え、80 rpm/min の速度で 1 時間攪拌することで、もっとも効率よく細胞凝集を引き起こすことが明らかとなった。さらに pH の条件を振ったところ、pH7.5 が最も良く細胞凝集を引き起こすことが分かった (図 1)。

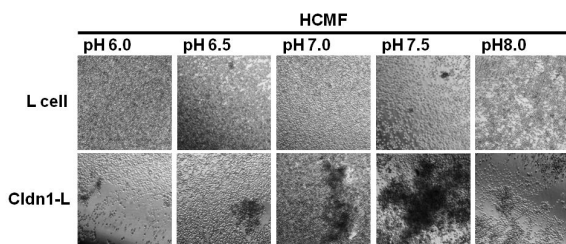


図 1 細胞凝集形成の pH 依存性

一方、Cldn4-L 細胞は同条件下、claudin4 依存的な細胞凝集は確認できなかった。Cldn4-L の細胞凝集条件は現在も検討中である。

(3) また、別のスクリーニング系として、カプサイシンと同様のメカニズムで TJ 開口を引き起こす薬剤を評価する系を構築した。上皮系細胞である MDCKII を 96 孔プレートに各孔 3.4 × 10<sup>4</sup> cells ずつ蒔き、培地交換をしながら 3 日間培養することで層状に生育させ、TJ を形成させた。単層膜形成を確認後、培地を Ca<sup>2+</sup> と結合することで蛍光を示す Fluo-8、弱い界面活性剤、及び薬剤排出ポン

プ阻害剤を加えた HBSS バッファーに交換して一時間おいた後、薬剤を処理し、Fluo-8 の蛍光変化を経時的に検討した。Positive control の ionomycin、及びカプサイシン処理細胞では、ともに強い Fluo-8 の蛍光が観察されたことから、本系において Ca<sup>2+</sup> 流入が定量出来ることが示された (図 2)。

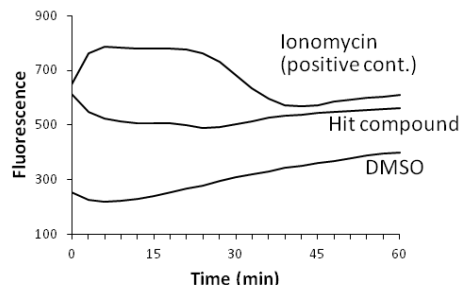


図 2 Fluo-8 を用いた Ca<sup>2+</sup> 流入測定

(4) (2) (3) で決定した条件下、凝集を阻害する薬剤の探索を行った。

二つのアッセイ系を用いて合計約 600 化合物の活性を検討したところ、細胞凝集阻害活性を指標にスクリーニングする系では 3 化合物に活性が見られた。一方、Ca<sup>2+</sup> 流入を引き起こす薬剤のスクリーニング系では、4 化合物に活性が見出された。

(5) 活性が見られた化合物に対し、FD4 を用いた透過実験を行い、可逆的 TJ 開口を引き起こすかどうか検討した。MDCKII 細胞 3.4 × 10<sup>4</sup> を 6.5 mm 直径の Transwell に蒔き、三日間培地を交換しながら培養することで単層を形成させた。薬剤添加時に Apical 側の培地を 1% FD-4 を含む HBSS バッファーに、また basal 側の培地は FD-4 を含まない HBSS バッファーと交換し、30 分おきに basal 側の HBSS バッファーを回収した。5 時間後、回収した HBSS バッファーに含まれる FD-4 の蛍光を定量し、透過性を評価した。その結果、Ca<sup>2+</sup> 流入を促進した一化合物に、目的とする可逆的 TJ 開口パターンを示す活性が、また他の一化合物に不可逆的 TJ 開口パターンを示す活性があることが明らかとなった (図 3)。

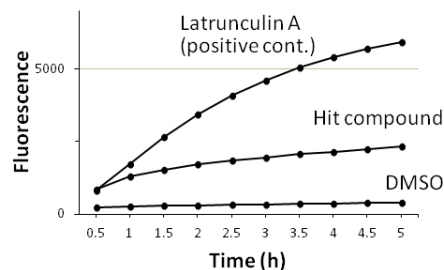


図 3 FD-4 を用いた可逆的 TJ 開口評価

今後、これらの化合物の類縁体を取得し、構造活性相関検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Shiobara T, Usui T, Han J, Isoda H,  
and Nagumo Y.  
"The reversible increase in tight  
junction permeability induced by  
capsaicin is mediated via  
cofilin-actin cytoskeletal dynamics  
and decreased level of occludin"  
*PLoS One*, (2013)  
DOI:10.1371/journal.pone.0079954  
査読あり・原著論文

[学会発表](計 1件)

神田祐輔、臼井健郎「Tight Junction  
開口物質のスクリーニング系の構築と  
化合物スクリーニング」日本農芸化学会  
関東支部大会、2013年11月22日(慶応  
義塾大学・日吉キャンパス)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agbi.tsukuba.ac.jp/~usui/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

臼井 健郎 (USUI, Takeo)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：60281648