

2009 39058A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

腸管粘膜免疫組織パイエル板上皮細胞バリアの分子
基盤に立脚した迅速かつ簡便な食物アレルギー予測
評価系の開発に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成22(2010)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

腸管粘膜免疫組織パリエル板上皮細胞バリアの分子
基盤に立脚した迅速かつ簡便な食物アレルギー予測
評価系の開発に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成22(2010)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

腸管粘膜免疫組織パリエル板上皮細胞バリアの分子基盤に立脚した迅速かつ簡便な食物アレルギー予測評価系の開発に関する研究 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 3 2

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 3 3

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「腸管粘膜免疫組織パイエル板上皮細胞バリアの分子基盤に立脚した迅速かつ簡便な食物アレルギー予測評価系の開発」

総括報告書

代表研究者 近藤 昌夫 大阪大学薬学研究科 准教授

研究要旨

周知のように、食品添加物は人類の食生活に多大な恩恵を齎しており、安心かつ安全な食生活を実現するうえで食品添加物の安全性確保は最重要課題となっている。しかしながら、食品添加物の安全性評価は一般毒性試験を中心に進められているのが現状であり、アレルギー性評価系すら皆無に等しい。

腸管粘膜は生体内外を隔てるバリアとして機能し、腸管粘膜免疫組織パイエル板(PP)が細菌・微生物等の生体内侵入に対する防御網を構築している。PP は一層の上皮細胞層に覆われており、上皮細胞層の細胞間隙は密着結合(TJ)によってシールされ、通常食物未消化物が非特異的に PP 内に侵入することはない。この TJ シール機能の破綻は食物アレルギーの誘因となりうるものの、未だ TJ シール機能に着目した食物アレルギーリスク評価系の構築は皆無である。

本研究は、TJ の本体である claudin に着目し、claudin レポーター遺伝子を利用して TJ バリア機能を迅速かつ簡便に評価するという、PP 上皮細胞バリアを指標にした初めての食物アレルギーリスク評価系を構築することを目的とする。

本年度は 1) 食品添加物による TJ バリアへの影響についての検討、2) Claudin レポーター遺伝子の構築、3) Claudin レポーター遺伝子の妥当性の検証、4) Claudin レポーター遺伝子安定発現株の作製及び妥当性の検証を行い、以下の結果を得た。

- 1) 食品添加物には腸管上皮細胞による TJ バリア機能に影響を与えるものが存在することを明らかにした。
- 2) 進化的に保存され、Snail などの転写調節領域を含んだ claudin-4 転写開始領域約 500bp をプロモーターとした、claudin-4 レポーター遺伝子を作製した。
- 3) Claudin-4 の発現量が異なる細胞株や claudin-4 の発現調節因子(Snail gene 及び TGF-β) による検証により、作製した claudin-4 レポーター遺伝子は claudin-4 の発現量と相関したレポーター活性を示す事を明らかにした。
- 4) 単離した多数の claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株において、claudin-4 の発現調節因子(Snail gene、HRasV12 gene、TGF-β及び EGF)による検証を行った結果、適切なレポーター活性を示す細胞株を複数作製する事に成功した。

以上本年度は、claudin-4 の発現を迅速かつ簡便にモニターできる食物アレルギーリスク評価系のための細胞株の単離に成功した。

A. 研究目的

本研究は、我が国において増加傾向にある食物アレルギーのリスクを回避し、国民の安心かつ安全な食生活を確保するため、腸管粘膜免疫組織パイエル板(PP)上皮細胞バリアを指標にした初めての食物アレルギーリスク評価系を構築することを目的とする。

我が国の食生活は、輸入食品の増加、食品添加物の

開発、遺伝子組換え食品開発などのため大きく変化し、天然物のみならず人工合成した食品を摂取する機会が急増しつつある。この腸管粘膜を取り巻く食環境の多様化・激変に伴い食物アレルギーが増加傾向にある。既に小児および成人の約 10%が食物アレルギーに罹患しており、アトピー性皮膚炎・喘息の誘因になることも示されている。食物アレルギーの罹患期間は 2~20 年

間の長期に渡ることや社会生活に支障を来すことから、食物アレルギーリスク評価は食品安全行政上の義務となっている。特に、食料の約6割を輸入に頼り地産池消が困難な本邦の食糧供給体制を踏まえると、ほぼ全ての食品に使用されている食品添加物の安全性確保は最重要課題と言える。実際、食品添加物のアレルギー性は、米国食品医薬品局のGRAS再評価項目の特に留意すべき評価項目として位置づけられている。そのため、食品添加物の安全性評価が不可欠であるものの、マウスやラットを用いた毒性試験や繁殖試験、催奇形性試験などが行われているに過ぎず、食品添加物の安全性に関する基礎的知見は著しく不足し、アレルギー性評価系すらほとんど存在しないのが現状である。

腸管粘膜は生体内外を隔てるバリアとして機能し、腸管粘膜免疫組織パイエル板(PP)が細菌・微生物等の生体内侵入に対する防御網を構築している。PPは一層の上皮細胞層に覆われており、上皮細胞層の細胞間隙は密着結合(TJ)によってシールされ、通常食物未消化物が非特異的にPP内に侵入することはない。このTJシール機能の破綻は食物アレルギーの誘因となりうるものの、未だTJシール機能に着目した食物アレルギーリスク評価系の構築は皆無である。

そこで、我々は上皮細胞層が形成するTJバリア機能を指標とした、迅速かつ簡便な新規食物アレルギー性予測評価系の開発を試みた。食物アレルギーに対する新たなリスク予測評価系が開発されれば、国民の安全・安心な食生活を確保することで国民生活向上に寄与するだけでなく、食物アレルギーリスク評価系等のレギュレトリーサイエンスの確立にも寄与し、社会面のみならず食品行政面においても多大な貢献が期待される。

B. 研究方法

B.1. 食品添加物の毒性濃度の検討

B.1.1 細胞

ヒト結腸がん細胞株であるCaco-2は、10%ウシ血清、7.8% NaHCO₃、4mM L-glutamin、19.4 mM

D-glucose、1% Non-essential amino acid solution (GIBCO)を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM, 日水製薬)で培養した。

B.1.2 細胞毒性試験

Caco-2細胞を96穴プレートに播種し、培養した。2日間培養後、食品添加物であるEDTAを10、7.5、5、2.5 mM、硫酸銅を0.1、0.05、0.01 mM、グルコン酸鉄を5、1、0.5、0.1 mM、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)を0.01、0.005、0.001 mM、臭酸カリウムを10、5、1、0.1 mM、亜硫酸ナトリウムを1、0.5、0.2、0.1 mM、乳酸を0.1、0.05、0.01、0.001%、シヨ糖脂肪酸エステルを0.1、0.01、0.001%、ソルビトールを10、5、1 mMの濃度になるよう添加した。添加18時間後に生細胞数測定試薬SF(ナカライテスク)を加え1時間培養後、Tristar LB 941(ベルトールド)で450nmの吸光度を測定した。食品添加物を加えていないコントロール(DMSO)の吸光度を基準として、相対的な吸光度の値を求めた。

B.2 食品添加物による細胞膜電気抵抗性への影響

Caco-2によるtransepithelial electric resistance (TER)を測定するため、Caco-2細胞4 x 10⁵ cells/ml、200 μl/wellを6.5 mm Transwell (0.3 cm², Corning)に播種し、培養した。2日1回の頻度で培地交換を行い、細胞のTJ形成度合いをMillicell®-ERS (Millipore)によるTERの測定により評価した。10~14日の培養後、TERの安定を確認し、7.8% NaHCO₃、19.4 mM、D-glucose、4 mM L-glutamin、1% Non-essential amino acid solution (GIBCO)を含むイーグルMEM培地(日水製薬)に交換し、24時間培養した。培養後、各種食品添加物をEDTA 5 mM、硫酸銅0.01 mM、グルコン酸鉄1 mM、BHA 0.001 mM、亜硫酸ナトリウム5 mM、臭酸カリウム0.2 mM、乳酸0.01%、シヨ糖脂肪酸エステル0.001%、ソルビトール10 mMになるように添加し、18、42、66、

90 時間後に TER を測定した。食品添加物により TER の低下が見られた細胞は、DMEM により洗浄し、食品添加物を除去した。洗浄後、更に食品添加物を含まない DMEM により培養を行い、TER を測定した。

B.3 Claudin-4 レポーター遺伝子の作製

B.3.1 Claudin-4 の転写調節の決定

Claudin-4 の転写調節領域を決定するため UCSC ゲノムブラウザを利用した。Claudin-4 のゲノム領域周辺で、進化的に保存されている claudin-4 転写開始領域の約 500bp を claudin-4 転写調節領域とした。

B.3.2 Claudin-4 レポーター遺伝子発現ベクターの作製

Claudin-4 転写調節領域制御下でルシフェラーゼを発現する claudin-4 レポーター遺伝子発現ベクターのプラスミドである pGVBclaudin4p は、以下の手順で作製した。最初に、ヒト胎児線維芽細胞である HEF を Simian virus 40 の LT 抗原により不死化させた細胞株である HFI から細胞 DNA を精製した。精製した細胞 DNA 溶液 (0.5 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer 2.5 μ l、dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 18.4 μ l、5 U/ml Takara Pyrobest 0.1 μ l を混合し PCR を行った。Claudin-4 転写調節領域クローニング用のプライマー配列は、Forward; 5' -GCGCTAGCGGTTGCCCCCTGGCCTAAC-3'、Reverse; 5' -CGCTCGAGGTCCACGGGAGTTGAGGACC-3' とした。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C 2 min の後、94 $^{\circ}$ C 30 sec、55 $^{\circ}$ C 15 sec、72 $^{\circ}$ C 1 min を 35 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製した。精製した PCR 産物を制限酵素である XhoI と NheI により切断し、電気泳動により分離・精製した。また、ルシフェラーゼ発現用ベクターとしてピッカジーンベシックベクター2 (pGV-B2) を使い、pGV-B2 ベクタープラスミドのマルチクローニングサイト上にある XhoI と NheI サイトも同様に

XhoI と NheI により切断し、電気泳動により分離・精製した。制限酵素により切断した PCR 産物及び pGV-B2 をライゲーションし、ライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析とシーケンス解析により pGVBclaudin4p を得た。

B.4. 細胞株を用いた claudin-4 レポーター遺伝子の検討

B.4.1 細胞

ヒト線維芽細胞腫である HT1080、ヒト子宮頸癌細胞株である SiHa、ヒト乳がん細胞株である MCF7、ヒト正常皮膚角化細胞株である Hacat は 10% ウシ血清、7.8% NaHCO₃、4 mM L-glutamin を含んだダルベッコ改変イーグル培地 (日水製薬) により培養した。

B.4.2 ルシフェラーゼアッセイ

HT1080、SiHa、MCF7、Hacat を 12 穴プレートに播種し、培養した。翌日、pGVBclaudin4p を Eugene 6 (ロシュ) により 1 μ g トランスフェクションした。同様に、ネガティブコントロールとして pGV-B2 プラスミド、ポジティブコントロールとして SV40 early プロモーター制御下でルシフェラーゼを発現する pGV-C プラスミドを 1 μ g トランスフェクションした。2 日間培養した後、ルシフェラーゼ活性を Luciferase assay system (ピッカジーン、東洋インキ) を使い、Tristar LB 941 (ベルトールド) により測定した。

B.5 Snail 遺伝子の発現による claudin-4 レポーター遺伝子の検討

B.5.1 Snail 発現ベクターの作製

ヒト Snail 発現ベクターである pCXbsrSnail を以下の手順で作製した。ヒト胎児線維芽細胞である HEF を LT 抗原により不死化させた細胞株である HFI から Trizol (インビトロジェン) により

total RNA を回収し、Superscript first strand 合成システム（インビトロジェン）を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA 溶液 1 μ l、10 x PCR buffer 2.5 μ l、dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 18.4 μ l、5 U/ml Takara Pyrobest 0.1 μ l を混合し PCR を行った。Snail 遺伝子クローニング用のプライマー配列は、Forward: 5' -CGGAATTCACCATGCCGCGCTCTTCTCCTCGT-3' , Reverse: 5' -CCGACGCGTGCGGGGACATCCTGAGC-3' とした。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C 2 min の後、94 $^{\circ}$ C 30 sec, 55 $^{\circ}$ C 15 sec, 72 $^{\circ}$ C 1 min を 35 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製した。精製した PCR 産物を制限酵素の EcoRI と MluI により切断し、電気泳動により分離・精製した。また、Snail 発現用ベクターとして LTR プロモーターを含んだ pCXbsr を用い、pCXbsr のマルチクローニングサイトにある EcoRI と MluI サイトも同様に EcoRI と MluI により切断し、電気泳動により分離・精製を行った。制限酵素により切断した PCR 産物及び pCXbsr をライゲーションし、ライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、シーケンス解析により pCXbsrSnail を得た。

B. 5. 2 Snail 安定発現株の作製

MCF7 細胞を 6 穴プレートに播種し、培養した。翌日、pCXbsrSnail を Fugene 6（ロシュ）により 1 μ g トランスフェクションした。1 日培養した後、細胞を 100mm dish に植継ぎ、blasticidin により薬剤選択を行った。薬剤選択により生き残った細胞株（MCF/Snail）を Snail 安定発現細胞株として得た。また、コントロール細胞（MCF/vector）は pCXbsr をトランスフェクションし、blasticidin により薬剤選択を行うことにより作成した。各細胞株は 10%ウシ血清を含んだダルベッコ改変イーグル培地により培養した。

B. 5. 3 Snail 発現細胞株における claudin-4 の発現検討

MCF/vector 及び MCF/Snail から Trizol（インビトロジェン）により Total RNA を回収した。回収した Total RNA から Superscript first strand 合成システム（インビトロジェン）を用いて cDNA を合成した。cDNA 溶液 1 μ l、10 x PCR buffer 2.5 μ l、dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 18.4 μ l、5 U/ml Takara ExTaqTM 0.1 μ l を混合して RT-PCR を行った。Claudin-4 の発現確認用プライマー配列は、Forward: 5' -CAACATTGTCACCTCGCAGACCATC-3' , Reverse: 5' -TATCACCATAAGGCCGGCCAACAG-3' とした。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C 5 min の後、94 $^{\circ}$ C 30 sec, 55 $^{\circ}$ C 15 sec, 72 $^{\circ}$ C 30 sec を 32 サイクル。内部コントロールとして GAPDH の発現量を確認した。cDNA 溶液 1 μ l、10 x PCR buffer 2.5 μ l、dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 18.4 μ l、5U/ml Takara ExTaqTM 0.1 μ l を混合して RT-PCR を行った。GAPDH の発現確認用プライマー配列は、Forward: 5' -TCTTCACCACCATGGAGAAG-3' , Reverse: 5' -ACCACCTGGTGCTCAGTGTA-3' とした。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C 5 min の後、94 $^{\circ}$ C 30 sec, 55 $^{\circ}$ C 15 sec, 72 $^{\circ}$ C 1 min を 20 サイクル。PCR の後、1%アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を分離し、エチジウムブロマイドで DNA を染色した。

B. 5. 4 ルシフェラーゼアッセイ

MCF/vector 及び MCF/Snail を 12 穴プレートに播種し、培養した。翌日、1 μ g の pGVBclaudin4p を Fugene 6（ロシュ）によりトランスフェクションし、2 日間培養した。培養後、Luciferase assay system（ピッカーズ、東洋インキ）を用いて、ルシフェラーゼ活性を Tristar LB 941（ベルトルド）により測定した。

B. 6 TGF- β を用いた claudin-4 レポーター遺伝子の検討

B. 6. 1 TGF- β による claudin-4 発現変化の検討

MCF7細胞を12穴プレートに播種し、培養した。翌日、ヒトTGF- β (R&D systems) を0、0.1、1、10 ng/ml になるように添加し、2日間培養した。培養後、MCF7細胞株からTrizol (インビトロジェン) により Total RNA を回収した。回収した Total RNA から Superscript first strand 合成システム (インビトロジェン) を用いて cDNA を合成した。cDNA 溶液 1 μ l、10 x PCR buffer 2.5 μ l、dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 18.4 μ l、5 U/ml Takara ExTaqTM 0.1 μ l を混合して RT-PCR を行った。Claudin-4 の発現確認用プライマー配列は、Forward: 5' -CAACATTGTCACCTCGCAGACCATC-3' , Reverse: 5' -TATCACCATAAGGCCGGCCAACAG-3' とした。PCR の条件は、94°C 5 min の後、94°C 30 sec, 55°C 15 sec、72°C 30 sec を 32 サイクル。内部コントロールとして GAPDH の発現量を確認した。cDNA 溶液 1 μ l、10 x PCR buffer 2.5 μ l、dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 18.4 μ l、5U/ml Takara ExTaqTM 0.1 μ l を混合して RT-PCR を行った。GAPDH の発現確認用プライマー配列は、Forward: 5' -TCTTACCACCATGGAGAAG-3' , Reverse: 5' -ACCACCTGGTGCTCAGTGTA-3' とした。PCR の条件は、94°C 5 min の後、94°C 30 sec, 55°C 15 sec、72°C 1 min を 20 サイクル。PCR の後、1%アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を分離し、エチジウムブロマイドで DNA を染色した。

B. 6.2 ルシフェラーゼアッセイ

MCF7細胞を12穴プレートに播種し、培養した。翌日、1 μ g の pGVBclaudin4p を Fugene 6 (ロシユ) によりトランスフェクションし、更にヒトTGF- β (R&D systems) を0、10 ng/ml になるように添加し、2日間培養した。培養後、Luciferase assay system (ピッカージーン、東洋インキ) を用いて、ルシフェラーゼ活性を Tristar LB 941 (ベルトールド) により測定した。

B. 7 Claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株のク

ローニング

7.1 Claudin-4 レポーター遺伝子の導入及びクローニング

MCF7細胞を60 mm dishに播種し、培養した。翌日、pGVBclaudin4p と blasticidin 耐性遺伝子発現ベクターである pCXbsr 及び puromycin 耐性遺伝子発現ベクターである pCXpuro を Fugene 6 (ロシユ) により co-transfection した。1日間培養した後、細胞を100 mm dish に植継ぎ、blasticidin 及び puromycin により薬剤選択を行った。薬剤選択により生き残った細胞を pick up しクローニングを行った。クローニングした細胞を claudin-4 レポーター遺伝子安定発現細胞株 (MPCP 及び MPCB) とした。各細胞株は10%ウシ血清を含んだダルベッコ改変イーグル培地により培養した。

B. 7.2 ルシフェラーゼアッセイ

複数の claudin-4 レポーター遺伝子安定発現細胞株 (MPCP 及び MPCB) を12穴プレートで細胞数が同数になるように培養した。翌日、Luciferase assay system (ピッカージーン、東洋インキ) を用いて、ルシフェラーゼ活性を Tristar LB 941 (ベルトールド) により測定した。

B. 8 Claudin-4 発現制御遺伝子による Claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株の検討

B. 8.1 HRasV12 発現ベクターの作製

ヒト HRasV12 発現ベクターである pCXpuroHRasV12 を以下の手順で作製した。ヒト胎児線維芽細胞である HEF を LT 抗原により不死化させた細胞株である HFI から Trizol (インビトロジェン) により total RNA を回収し、Superscript first strand 合成システム (インビトロジェン) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA 溶液 1 μ l、10 x PCR buffer 2.5 μ l、dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 18.4 μ l、5 U/ml Takara Pyrobest 0.1 μ l を混合し PCR を行った。HRas 遺伝子クローニング

用プライマー配列は、Forward: 5' - CGGAATTCACCATGACGGAATATAAGCTGGT-3', Reverse: 5' - CCGACGGCTTCAGGAGAGCACACTTGC-3' とした。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製した。精製した PCR 産物を制限酵素の EcoRI と MluI により切断し、電気泳動により分離・精製した。また、HRas 発現用ベクターとして LTR プロモーターを含んだ pCXpuro を用い、pCXpuro のマルチクローニングサイトにある EcoRI と MluI サイトも同様に EcoRI と MluI により切断し、電気泳動により分離・精製を行った。制限酵素により切断した PCR 産物及び pCXpuro をライゲーションし、ライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、シーケンス解析により pCXpuroHRas を得た。次に、Site-Directed Mutagenesis 法により pCXpuroHRas ベクターの Hras 遺伝子に point mutation を入れ、pCXpuroHRas を pCXpuroHRasV12 に改変した。pCXpuroHRas のプラスミド DNA (10 ng/ml) 1 μ l、125 ng/ μ l oligonucleotide primers 2 μ l、10 x KOD-Plus-DNA polymerase buffer 5 μ l、2 mM dNTP mix 5 μ l、25 mM MgSO₄ 2 μ l、滅菌精製水 34 μ l、KOD-Plus-DNA polymerase 1 μ l を混合し PCR を行った。Oligonucleotide primers として GGTGGGCGCCGTGGGTGGGCA と TGCCACACCGACGGCGCCACC を用いた。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C 5min の後、94 $^{\circ}$ C 30 sec、55 $^{\circ}$ C 1 min、68 $^{\circ}$ C 7 min を 18 サイクル。PCR 後、PCR 産物を制限酵素である DpnI で 1 時間処理し、処理産物でコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、シーケンス解析により pCXpuroHRasV12 を得た。

B. 8. 2 HRasV12 安定発現株の作製

MCF7 細胞を 6 穴プレートに播種し、培養した。翌日、pCXpuroHRasV12 を Fugene 6 (ロシュ) に

より 1 μ g トランスフェクションした。1 日培養した後、細胞を 100 mm dish に植継ぎ、puromycin により薬剤選択を行った。薬剤選択により生き残った細胞株 (MCF/HRasV12) を HRasV12 の安定発現細胞株として得た。また、コントロール細胞 (MCF/vector) は pCXpuro をトランスフェクションし、puromycin により薬剤選択を行うことにより作成した。各細胞株は 10% ウシ血清を含んだダルベッコ改変イーグル培地により培養した。

B. 8. 3 HRasV12 発現細胞株における claudin-4 の発現検討

MCF/vector 及び MCF/HRasV12 から Trizol (インビトロジェン) により total RNA を回収した。回収した total RNA から Superscript first strand 合成システム (インビトロジェン) を用いて cDNA を合成した。cDNA 溶液 1 μ l、10 x PCR buffer 2.5 μ l、dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 18.4 μ l、5 U/ml Takara ExTaqTM 0.1 μ l を混合して RT-PCR を行った。Claudin-4 の発現確認用プライマー配列は、Forward: 5' -CAACATTGTCACCTGCGAGACCATC-3'、Reverse: 5' -TATCACCATAAGGCGGCCAACAG-3' とした。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C 5 min の後、94 $^{\circ}$ C 30 sec、55 $^{\circ}$ C 15 sec、72 $^{\circ}$ C 30 sec を 32 サイクル。内部コントロールとして GAPDH の発現量を確認した。cDNA 溶液 1 μ l、10 x PCR buffer 2.5 μ l、dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 18.4 μ l、5 U/ml Takara ExTaqTM 0.1 μ l を混合して RT-PCR を行った。GAPDH の発現確認用プライマー配列は、Forward: 5' -TGTTCCACCACCATGGAGAAG-3'、Reverse: 5' -ACCACCTGGTGCTCAGTGTA-3' とした。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C 5 min の後、94 $^{\circ}$ C 30 sec、55 $^{\circ}$ C 15 sec、72 $^{\circ}$ C 1 min を 20 サイクル。PCR の後、1% アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を分離し、エチジウムブロマイドで DNA を染色した。

B. 8. 4 Snail 及び HRasV12 安定発現株の作製

Claudin-4 レポーター遺伝子安定発現細胞株 (MPCP 及び MPCB) を 6 穴プレートに播種し、培養した。翌日、pCXbsrSnail 及び pCXpuroHRasV12 を Fugene 6 (ロシュ) により 1 μ g トランスフェクションした。1 日培養した後、細胞を 100mm dish に植継ぎ、blasticidin 及び puromycin により薬剤選択を行った。薬剤選択により生き残った細胞株 (MPCP/Snail, MPCB/Snail, MPCP/HRasV12, MPCB/HRasV12) を Snail 及び HRasV12 の安定発現細胞株として得た。また、コントロール細胞 (MCPC/pCXbsr, MCPC/pCXpuro, MPCB/pCXbsr, MPCB/pCXpuro) は pCXbsr 及び pCXpuro をトランスフェクションし、blasticidin 及び puromycin により薬剤選択を行うことにより作成した。各細胞株は 10%ウシ血清を含んだダルベッコ改変イーグル培地により培養した。

B. 8.5 ルシフェラーゼアッセイ

Snail を発現させた claudin-4 レポーター遺伝子安定発現細胞株 (MPCP/Snail と MPCB/Snail)、HRasV12 を発現させた claudin-4 レポーター遺伝子安定発現細胞株 (MPCP/HRasV12 と MPCB/HRasV12) 及びそれぞれのコントロール細胞を 12 穴プレートに播種し、培養した。翌日、Luciferase assay system (ピッカージーン、東洋インキ) を用いて、ルシフェラーゼ活性を Tristar LB 941 (ベルトールド) により測定した。

B. 9 サイトカインを用いた claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株の検討

Claudin-4 レポーター遺伝子安定発現細胞株 (MPCP 及び MPCB) を 12 穴プレートに播種し、培養した。翌日、ヒト TGF- β (R&D systems) を 0、10 ng/ml になるように添加し、2 日間培養した。また、ヒト EGF (Peprotech Inc) は 0、100 ng/ml になるように添加し、4 時間培養した。培養後、Luciferase assay system (ピッカージーン、東洋インキ) を用いて、ルシフェラーゼ活性を Tristar LB 941 (ベルトールド) により測定した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

D.1 各種食品添加物の毒性濃度の検討

食品添加物は品質を改良し、保存性を延長し、嗜好性を増加する目的で食品に添加される化学物質であり、近年、人類の食生活に多大な恩恵をもたらしてきた。現代の食環境の大きな変動と共に、食品添加物の開発も増加の一途を辿っていることから、食品添加物が誘発する食物アレルギーの問題が危惧されている。従って、食品添加物の安全性評価は国民における安全・安心な食生活の確保にとって重要課題であるが、安全性を評価する方法がほとんど存在しないのが現状である。そこで我々は、食品添加物のアレルギー性を評価する方法として、食物アレルギー発症に関わる腸管粘膜免疫組織パイエル板 (PP) を覆う上皮細胞による密着結合 (TJ) バリア機能に着目した。

腸管粘膜での上皮細胞層は生体内外を隔てるバリアとして機能し、食物未消化物などの非特異的な物質透過を防いでいる。そのため、このバリア機構が破綻すると様々な食物未消化物などが体内に侵入し、食物アレルギーを誘発してしまう恐れがある。実際に我々の研究から、腸管上皮細胞層のバリア機構を減弱させることにより腸管での物質透過性が亢進することが明らかとなっている。従って、腸管上皮細胞層におけるバリア機能をモニターすることは、食物アレルギーリスクを評価する方法として有効であると考えられる。そこで、食品添加物のアレルギー性を評価する方法として上皮細胞のバリア機能をモニターすることが妥当であるかを検証するため、食品添加物による上皮細胞バリア機能への影響について検討した。

既存の食品添加物のうち、既に食物アレルギー誘発の危険性について報告のある食品添加物を複数選んだ。図 1 に示すように、様々な食品添加物において胃腸障害、嘔吐、下痢などアレルギーとの関連性が指摘されている。しかし、これらの食品添加物が誘発するアレルギー性の症状は、原因解析がほとんど行われていない。そこで、これらの食品添加物が腸管上皮細胞によ

る TJ バリア機能に影響を及ぼしたためアレルギー性の症状を誘発した可能性が想定された。そのため、図 1 に挙げた食品添加物による TJ バリアへの影響を検討した。まず、腸管上皮細胞株 Caco-2 における各食品添加物の細胞毒性濃度を検討した。Caco-2 細胞に各種食品添加物を添加し、18 時間後の細胞毒性について検討することにより、各種食品添加物の毒性濃度を明らかにした(図 2)。

D.2 食品添加物による細胞膜電気抵抗性への影響

図 1 に挙げた食物アレルギー誘発の報告がある食品添加物に関して、腸管上皮細胞による TJ バリア機能への影響を検討するため、TJ バリア機能の指標である膜電気抵抗値(transcellular electrical resistance ; TER)を測定した。この方法は、単層膜にヒト腸管上皮細胞 Caco-2 を播種し、Caco-2 が形成する TJ バリア機能を TER により評価するものである。この方法を用いて各種食品添加物による TJ への影響を調べた結果、図 3 に示すようにブテルヒドロキシアニソール(BHA)、シヨ糖脂肪酸エステル、ソルビトールでは、細胞毒性を示さない濃度において Caco-2 が形成する TJ による TER に影響を与えなかった。一方、EDTA、グルコン酸鉄、乳酸は添加後 16~65 時間後に TER の低下が観察された(図 4A)。EDTA においては濃度依存的な TER の低下が観察された(図 5)。TER 低下後に洗浄し、食品添加物を含まない培地で更に培養すると TER の回復が観察された(図 4A 及び 図 5)。TER の低下が観察された時間における各食品添加物の細胞毒性について調べた結果、細胞毒性は観察されなかった(図 4B)。従って、これらの食品添加物は上皮細胞が形成する TJ バリア機能を低下させる可能性が示唆された。実際、EDTA は細胞接着分子であるカドヘリンなどの細胞間接着作用を阻害するキレート剤としても知られていることから、腸管上皮細胞の TJ バリアを崩壊させ、食物アレルギーを誘発する可能性が高いと考えられる。TER の低下は、硫酸銅、臭素酸カリウム、亜硫酸ナトリウムを添加して 42~65 時間後においても観察された(図 6A)。しかし、TER 低下後に洗浄、再培養を行ったが、TER の回復は観察されなかった。そのため、TER の低下が観察され

た時間における各食品添加物の細胞毒性について調べた結果、42 時間以上の培養では細胞毒性が観察された(図 6B)。従って、これらの食品添加物が誘導する TER の低下は、TJ バリア機能の低下によるものではなく、細胞毒性に起因することが考えられた。以上の結果から、食物アレルギーとの関連性が指摘されている食品添加物の中には、TJ バリア機能に影響を与えるものが存在した。今後、更に他の食品添加物についても検討する必要がある。

D.3 Claudin-4 レポーター遺伝子の作成

現在のところ、腸管粘膜上皮細胞層におけるバリア機能の評価系は、前述した単層膜にヒト腸管上皮細胞 Caco-2 を播種し、膜電気抵抗値を測定する系しか存在しない。本系は、細胞を播種後、2 週間程度培養する必要があること、アッセイ系に使用できる培養プレートは 24 穴しかないことから、利便性が低く、スループット性に乏しい評価系である。そこで本研究では、TJ の本体である claudin の発現に着目し、claudin レポーター遺伝子を利用することで、迅速かつ簡便な TJ バリア機能の評価系構築を試みた。

上皮細胞層のバリア機能を担う TJ は、様々な接着分子によって構成されている。その中でも腸管粘膜上皮細胞において発現が認められる claudin-4 は、腸管上皮細胞層での TJ において主要な分子として働いている。また、我々のこれまでの研究から、claudin-4 の機能阻害により腸管上皮細胞層での物質透過性が亢進することを明らかにしている。そのため、claudin-4 の発現を指標とすることにより腸管上皮細胞層での TJ バリア機能を評価することが可能であると考えた。更に、claudin-4 レポーター遺伝子を作製することにより、スループット性を考慮した TJ バリア評価系の構築を考え

た。Claudin-4 レポーター遺伝子を作成するため、UCSC プログラムを利用し、claudin-4 の発現調節領域を決定した。本プログラムにより claudin-4 ゲノム領域周辺において進化的に保存された領域を調べた結果、claudin-4 の mRNA をコードしている領域で高い保存領域を確認した以外に、claudin-4 転写開始点の周辺約

500bp においても高い保存領域を確認した(図 7)。続いて、claudin-4 転写開始領域の約 500bp において、転写因子の結合モチーフを調べた結果、claudin ファミリーの転写抑制に関わる転写因子 Snail が結合する E-box モチーフが5カ所存在することが認められた(図 8)。また、Snail と協調して claudin ファミリーの転写制御を行う Smad の結合モチーフである SEB モチーフが E-box の近くに存在することが認められた。従って、claudin-4 転写開始領域の約 500bp には Snail と Smad が協調して claudin-4 の転写調節に関わると予想される領域が存在することが認められた。更に、E-box や SEB モチーフ以外にも SP1 や PPUR1 結合領域などの転写因子結合モチーフの存在が認められた。以上の結果から、claudin-4 転写開始領域の約 500bp をプロモーターとした claudin-4 レポーター遺伝子の作製を試みた。

正常ヒト細胞株から細胞 DNA を精製し、この DNA を鋳型として PCR により claudin-4 の転写調節領域を増幅した。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用い、上流に増幅した claudin-4 転写調節領域を挿入することで claudin-4 レポーター遺伝子を作製した(図 8)。

D.4 細胞株を用いた claudin-4 レポーター遺伝子の検討

作製した claudin-4 レポーター遺伝子のレポーター活性を評価するため、claudin-4 の発現が異なる細胞株を用いて検討を行った。最初に、claudin-4 の発現が異なる細胞株の検索を行った。Claudin は上皮細胞が形成する TJ の構成分子のため、主に上皮細胞において発現が高い。従って、分化型上皮構造を形成するヒト乳がん細胞株の MCF7、ヒト正常皮膚角化細胞株の Hacat を claudin-4 の発現が高い細胞株として選定した。一方、claudin-4 の発現が低い細胞株として、線維芽細胞由来であるヒト線維芽細胞腫の HT1080、上皮細胞由来でありながら上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition; EMT)により間葉系細胞へと分化転換した形態を示すヒト子宮頸癌細胞株の SiHa を選定した。これら4つの細胞株における claudin-4 の発現を RT-PCR により調べた結果、予想

どおり claudin-4 の発現は HT1080、SiHa で低く、MCF7、Hacat で高かった(図 10A)。そこで、claudin-4 レポーター遺伝子をこれらの細胞株に導入し、レポーター活性と claudin-4 の発現が相関するかを検証した。HT1080、SiHa、MCF7、Hacat に claudin-4 レポーター遺伝子を導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した結果、全ての細胞株においてネガティブコントロールに比べルシフェラーゼ活性が高いことを確認した(図 10B)。更に、claudin-4 の発現が低い HT1080、SiHa と比較し、発現の高い MCF7、Hacat ではルシフェラーゼ活性が高いことを確認した。以上の結果から、作製した claudin-4 レポーター遺伝子は、様々な細胞株における異なった claudin-4 の発現と相関したレポーター活性を有していることが明らかとなった。

D.5 Snail を用いた claudin-4 レポーター遺伝子の検討

Claudin の発現は、様々なシグナル伝達因子や転写因子により制御を受けていることが知られている。中でも Snail は claudin の発現抑制因子として多くの報告が存在する。Snail は上皮間葉移行(EMT)を誘導する主要な転写因子として働くことから、EMT を誘導する際、上皮細胞特有の様々な細胞接着因子の発現を調節することが知られている。Snail が発現調節する細胞接着因子の中には claudin ファミリーも含まれ、Snail は claudin ファミリーの転写調節領域に結合することで発現抑制に関わることが報告されている。今回我々が作製した claudin-4 レポーター遺伝子の発現調節領域には、Snail の DNA 結合モチーフである E-Box が数カ所存在していること(図 8)、更に Snail と協調して claudin の発現を調節に関わる Smad の DNA 結合モチーフである SEB も存在することから、claudin-4 レポーター遺伝子は Snail が誘導する claudin-4 の発現抑制作用をモニターできると考えられる。そこで、claudin-4 レポーター遺伝子が Snail により誘導される claudin-4 の発現抑制作用をモニターできるかを、Snail 発現細胞を用いることにより検討した。最初に、Snail が誘導する claudin-4 の発現変化を MCF7 細胞において検証した。MCF7 細胞に Snail 遺伝子を安定的に発現させた細胞を作成し、claudin-4 の発現を RT-PCR により検討した。その結果、

Snail 安定発現株では claudin-4 の発現が低下することが確認された(図 11A)。続いて、Snail が誘導する claudin-4 の発現低下を claudin-4 レポーター遺伝子がモニターできるかを検討した。Claudin-4 レポーター遺伝子を細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した結果、Snail を発現した細胞においてルシフェラーゼ活性が低下することが確認された(図 11B)。また Snail が誘導する claudin-4 の発現変化と同程度のルシフェラーゼ活性低下が確認された。以上の結果から、作製した claudin-4 レポーター遺伝子は Snail が誘導する claudin-4 の発現低下と関連したレポーター活性を有していることが明らかとなった。また、今回作製した claudin-4 レポーター遺伝子はその転写調節領域に E-box モチーフが複数存在し、Snail による活性変化をモニターできたことから、Snail の発現をモニターするレポーター遺伝子としても利用可能ではないかと考えられた。

D.6 TGF- β を用いた claudin-4 レポーター遺伝子の検討

Transforming growth factor beta (TGF- β) は細胞増殖、分化、接着、移動など様々な細胞機能を制御する増殖因子の1つである。近年、TGF- β は上皮間葉移行 (EMT) を誘導する重要な因子として注目され、TGF- β が誘導する EMT に伴い TJ の主要構成分子である claudin の発現が抑制されることが報告されている。そのメカニズムとして、TGF- β は Snail や Smad の活性を制御し、これらの因子が協調して claudin の発現調節を行っていることが報告されている。前述したように、今回我々が作成した claudin-4 レポーター遺伝子の転写調節領域には Snail や Smad が結合するモチーフ (E-box 及び SEB) が存在する。そこで、TGF- β のような生理的な刺激による claudin-4 の発現変化を、作製した claudin-4 レポーター遺伝子がモニターできるかを検証した。

最初に、TGF- β が誘導する claudin-4 の発現変化を MCF7 細胞において確認した。MCF7 細胞に様々な濃度の TGF- β を添加し、claudin-4 の発現量を RT-PCR により検討した。その結果、TGF- β の濃度依存的に

claudin-4 の発現が低下することが確認された(図 12A)。そこで、TGF- β が誘導する claudin-4 の発現低下を claudin-4 レポーター遺伝子がモニターできるかを調べた。MCF7 細胞に claudin-4 レポーター遺伝子を導入した後、TGF- β を添加して2日間培養した。培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した結果、TGF- β の量依存的にルシフェラーゼ活性が低下することが確認された(図 12B)。また、TGF- β が誘導する claudin-4 の発現低下とルシフェラーゼ活性の低下は同程度であることが確認された。以上の結果から、作製した claudin-4 レポーター遺伝子は TGF- β により誘導される生理的な claudin-4 の発現変化と関連したレポーター活性を有していることが明らかとなった。

従って、今回作製した claudin-4 レポーター遺伝子は、様々な細胞株における claudin-4 の発現と関連したレポーター活性を持ち、Snail や TGF- β が誘導する claudin-4 の発現調節もモニター可能であったことから、claudin-4 のレポーター遺伝子として妥当であると評価した。

D.7 Claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株のクローニング

多くの食品添加物についてアレルギー予測を行うにはハイスループットなスクリーニング系が必要となる。そのため、作製したレポーター遺伝子を安定的に発現した細胞が必要となる。そこで、claudin-4 レポーター遺伝子を安定的に発現する MCF7 細胞の単離を試みた。

Claudin-4 レポーター遺伝子のプラスミドと薬剤耐性遺伝子を発現するプラスミドを同時に導入し、MCF7細胞で共発現させた。その後、薬剤選択を行うことで形成したコロニー (blasticidin 耐性株を25株、puromycin 耐性株を39株) を単離した(図 13)。単離した細胞株のルシフェラーゼ活性を測定した結果、様々なルシフェラーゼ活性を持った細胞株の単離に成功した。多様なルシフェラーゼ活性をもった細胞株が単離された原因として、claudin-4 レポーター遺伝子の切断部位や挿入されたゲノムの位置による影響が考えられる。ルシフェラーゼ活性を持った複数の細胞株の中から、比較的ルシフェラーゼ活性が高い細胞株を選び、以下の検討を行っ

た。

D.8 Claudin-4 発現制御遺伝子を用いた claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株の検討

作製した claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株の中から、claudin-4 発現制御遺伝子による claudin-4 の発現変化と相関したルシフェラーゼ活性を示す細胞株を選択した。

まず、claudin-4 の発現低下を誘導する Snail を用い、Snail による claudin-4 発現調節をモニターできる細胞株を選別した。Claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株に Snail を安定的に発現させ、ルシフェラーゼ活性を調べた。その結果、図 14 に示すように複数の細胞株(#1, 8, b-24, b-25)でルシフェラーゼ活性の低下が観察された。一方、Snail が発現しているにもかかわらずルシフェラーゼ活性の低下が観察されなかった細胞株(#36)も存在した。以上の結果から、複数取得した claudin-4 安定発現細胞株の中には Snail の発現により異なったレポーター活性を示すものが存在したが、その中には Snail が誘導する claudin-4 の発現低下と相関するレポーター活性を示す細胞株が複数存在した。

続いて、活性型 H-Ras(HRasV12)による claudin-4 の発現亢進作用をモニターできる claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株の選別を行った。現在までに、細胞増殖など関わるシグナル伝達因子である Ras 及びその下流の因子が claudin の発現亢進に関わることが報告されている。従って、作製した claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株が HRasV12 により誘導される claudin-4 の発現亢進をモニターできるかを検討した。まず、HRasV12 が誘導する claudin-4 の発現変化を MCF7 細胞において検討した。MCF7 細胞に HRasV12 を安定的に発現させた細胞を作成し、claudin-4 の発現変化を RT-PCR により検討した。その結果、HRasV12 の発現により claudin-4 の発現が上昇することを確認した(図 15A)。そこで、claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株に HRasV12 を安定的に発現させた細胞株作成し、ルシフェラーゼ活性を調べた。その結果、HrasV12 を発現した細胞においてルシフェラーゼ活性が低下する細胞株(#b-25)、変化しない細胞株(#36)が確認されたにも

かわらず、複数の細胞株(#1, 8, 35, b-24)でルシフェラーゼ活性の亢進が確認された(図 15B)。以上の結果から、複数取得した claudin-4 安定発現細胞株の中には HRasV12 の発現により様々なレポーター活性を示すものが存在したが、その中には HRasV12 が誘導する claudin-4 の発現亢進と相関するレポーター活性を示す細胞株が複数存在した。

Claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株のレポーター活性を検討するため、claudin-4 発現制御遺伝子を用いた結果、claudin-4 の発現を正、及び負に制御する活性と相関したレポーター活性を示す細胞株を複数単離することに成功した。レポーター活性が相関しなかった細胞株は、レポーター遺伝子の切断部位やレポーター遺伝子が挿入されるゲノムの位置の影響により、適切な発現誘導がモニターできなかったと考えられる。

D.9 サイトカインを用いた claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株の検討

続いて、生理的な claudin-4 の発現調節をモニターできる claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株を選定するため、サイトカインを用いた検討を行った。

まず、TGF- β による検討を行った。Claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株に TGF- β を添加し、レポーター活性を調べた結果、図 16 に示すように複数の細胞株(#1, 8, b-24 他)でルシフェラーゼ活性の低下が観察された。一方、TGF- β を添加したにもかかわらずルシフェラーゼ活性の低下が観察されなかった細胞株(#21, 36 他)も存在した。また、著しい活性低下が観察された細胞株(#b-25)も存在した。以上の結果から、単離した claudin-4 安定発現細胞株の中には、TGF- β により様々なレポーター活性を示すものが存在したが、TGF- β が誘導する claudin-4 の発現変化と相関したレポーター活性をもった細胞株も複数存在した。

次に claudin-4 の発現を上昇させることが知られている EGF を用いた検討を行った。EGF は MEK/ERK 経路を介して claudin-4 の発現を上昇させることが報告されている。そこで、EGF が誘導する claudin-4 の発現変化をモニターできる細胞株の選別を行った。図 17 に示すように複数の細胞株(#1, 8, 35, b-24)でルシフェラーゼ

活性の亢進が観察された。一方、ルシフェラーゼ活性の亢進が観察されなかった細胞株(#21, 36)、減少した細胞株(#b-25)も存在した。以上の結果から、EGFにより様々なレポーター活性を示すものが存在したが、その中にはEGFが誘導する claudin-4 の発現亢進と関連したレポーター活性を示す細胞株も複数存在した。

Claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株のレポーター活性を検討するため、生理的な claudin-4 の発現調節を誘導するサイトカインを用いた結果、EGF や TGF- β が誘導する正、及び負の claudin-4 発現調節と関連したレポーター活性を示す細胞株を複数単離することに成功した。レポーター活性が関連しない細胞株は、レポーター遺伝子の切断部位やレポーター遺伝子が挿入されるゲノムの位置の影響により、適切な発現誘導がモニターできなかつたと考えられる。

E. 結論

1. 食品添加物には腸管上皮細胞による TJ/バリア機能に影響を与えるものが存在することを明らかにした。
2. 進化的に保存され、Snail、Smad などの転写調節領域を含んだ claudin-4 転写開始領域約 500bp をプロモーターとした、claudin-4 レポーター遺伝子を作製した。
3. Claudin-4 レポーター遺伝子は、様々な細胞株における異なった claudin-4 の発現量と関連したレポーター活性を示すことを明らかにした。
4. Claudin-4 レポーター遺伝子は、TGF- β や Snail が誘導する claudin-4 の発現低下と関連したレポーター活性を示すことを明らかにした。
5. ハイスループット性をもつ食物アレルギー評価系の構築のため、claudin-4 レポーター遺伝子を安定的に発現させた細胞株を作製し、ルシフェラーゼ活性を示す細胞株を複数単離した。
6. Claudin-4 の発現を抑制する TGF- β や Snail、亢進させる EGF や HRasV12 による claudin-4 の発現調節と

関連したレポーター活性を持つ claudin-4 レポーター遺伝子安定発現細胞株を複数単離することに成功した。従って、claudin-4 の発現を迅速かつ簡便にモニターできる食物アレルギーリスク評価系のための細胞株の単離に成功した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

Matsuhisa K, Kondoh M, Takahashi A and Yagi K (2009) Tight junction modulator and drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 6(5):509-515.

Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y and Yagi K (2009) A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol* 76(4):918-926.

近藤昌夫、高橋梓、佐伯理恵、八木清仁、生体バリアを利用した創薬研究、*Drug Delivery System*, 24, 532-537, 2009.

Kakutani H, Kondoh M, Saeki R, Fujii M, Watanabe Y, Mizuguchi H and Yagi K (in press) Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur J Pharm Biopharm.*

Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T and Yagi K (in press) Mucosal vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials.*

G-2 学会発表

Claudin 発現の迅速かつ簡便なモニタリングシステムの開発

渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁(阪大院薬)

日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月、岡山

生体バリアを利用した薬物送達研究

近藤昌夫(阪大院薬)

日本薬学会第25年会、平成21年5月21-23日、静岡

生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究

近藤昌夫(阪大院薬)

第25回日本DDS学会学術集会、平成21年7月3、4日、東京

生体バリアの分子基盤を利用した経粘膜DDS

近藤昌夫、八木清仁(阪大院薬)

第25回日本DDS学会学術集会、平成21年7月3、4日、東京

Claudinを利用した創薬研究の可能性

近藤昌夫(阪大院薬)

彩都バイオサイエンスセミナー、平成21年10月15日、大阪

創薬ターゲットとしてのタイトジャンクションの可能性

近藤昌夫、八木清仁(阪大院薬)

創剤フォーラム 第15回シンポジウム「タイトジャンクションをめぐる最近の研究成果と創薬への応用」、平成21年10月23日、東京

A novel type of absorption enhancer, claudin-4 modulator

Koji Matsuhisa, Ryota Okude, Masuo Kondoh and Kiyohito Yagi

36rd annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 18-22, 2009, Copenhagen, Denmark.

Claudin as a target molecule for mucosal absorption of peptide drug

Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American

society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA.

Development of a novel screening system for claudin binder using baculovirus display.

Toshiaki Yamaura, Azusa Takahashi, Hideki Kakutani, Masuo Kondoh, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA

Preparation of a controllable RNA polymerase I-dependent expression vector

Takeshi Yoshida, Manabu Ojima, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA

Claudin-4を介した新規粘膜ワクチンの創製

鈴木 英彦、角谷 秀樹、深坂 昌弘、近藤 昌夫、八木 清仁(阪大院薬)、日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

出芽バキュロウィルスを用いた claudin binder スクリーニング系の構築

松下 恭平¹、角谷 秀樹¹、高橋 梓¹、山浦 利章¹、浜窪 隆雄²、近藤 昌夫¹、八木 清仁¹(¹阪大院薬、²東大先端研)、日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

ウエルシュ菌エンテロトキシン断片をプロトタイプとした新規claudin-4 modulator

の創製

各務 洋平¹、山浦 利章¹、松下 恭平¹、高橋 梓¹、内田 博司²、花田 雄志²、松久 幸司¹、渡利 彰浩¹、近藤 昌夫¹、八木 清仁¹(¹阪大院薬、²アスピオファーマ)、日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当なし

H-2 実用新案登録

該当なし

H-3 その他

該当なし

1. 研究協力者

渡利 彰浩 (薬学研究科 助教)

角谷 秀樹 (薬学研究科 大学院生)

高橋 梓 (薬学研究科 大学院生)

物質名	毒性	使用用途
EDTA	胃腸障害、カルシウム不足症など	酸化防止剤: 缶詰、瓶詰食品など
硫酸銅	粘膜刺激、胃痛、下痢など	栄養強化剤: 粉ミルク
グルコン酸鉄	胃腸刺激・障害、肝臓障害など	着色補助剤・鉄強化剤: オリーブの実、粉ミルク
BHA(ブチルヒドロキシアニソール)	消化管出血、潰瘍形成など	酸化防止剤: パーム原料油
臭素酸カリウム	下痢、嘔吐など	小麦改良剤: パン、イーストなど
亜硫酸ナトリウム	胃腸刺激、嘔吐、下痢など	保存料・漂白剤: 天然果実、かんぴょう、水飴など
乳酸	小腸結膜炎、急性出血性胃炎など	酸味料・保存料: 酒、菓子、食肉、パンなど
シヨ糖脂肪酸エステル	胃腸障害など	乳化剤: 乳飲料、パン、マーガリン、アイスクリーム
ソルビトール	胃腸障害など	合成甘味料: カステラ、ケーキ、ハムなど

図1 アレルギー性、胃腸障害等が報告されている食品添加物

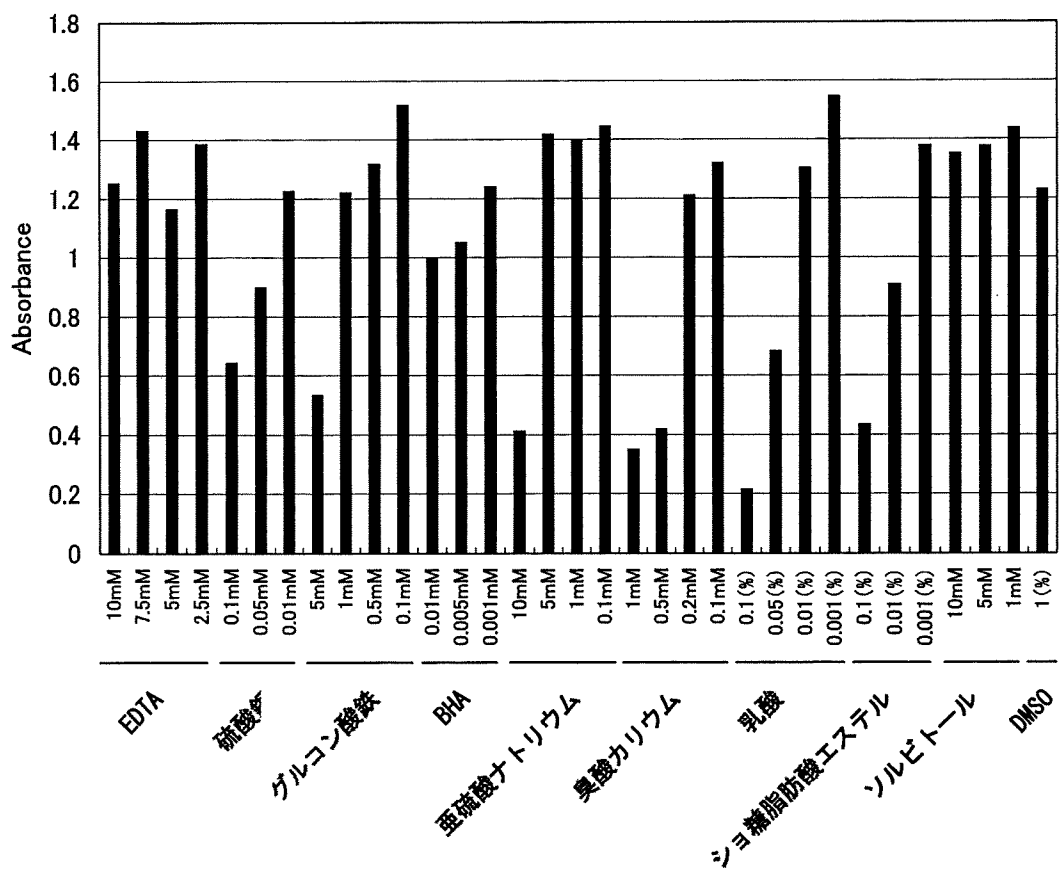


図2 各種食品添加物における細胞毒性濃度。
Caco-2細胞に各種食品添加物を加えた後、18時間培養した。培養後、WST-8を加え更に1時間培養した後、450nmの吸光度を測定した。

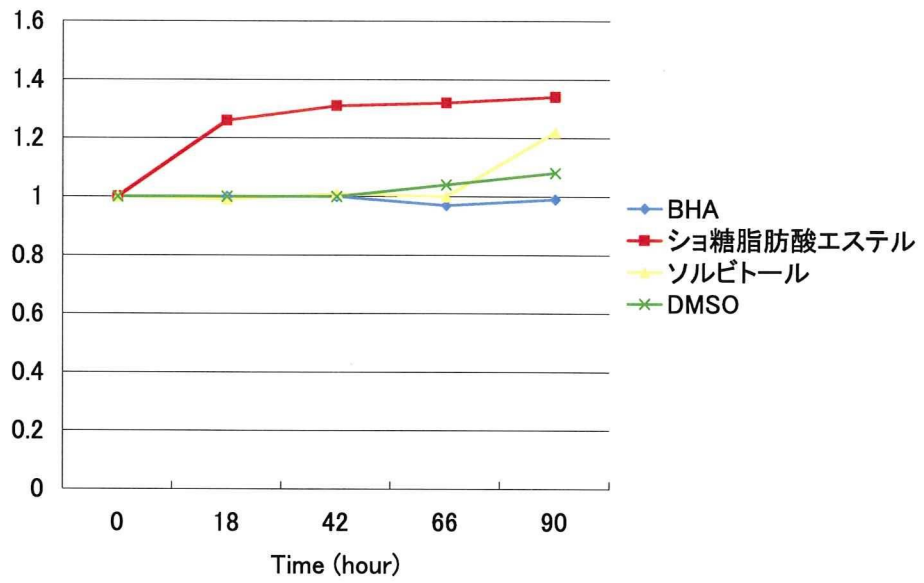


図3 BHA、シヨ糖脂肪酸エステル、ソルビトールによる TJ バリア機能への影響。
Caco-2細胞をTranswellに播種し、2週間培養した。培養後、BHA、シヨ糖脂肪酸エステル、ソルビトールを添加し、18、42、66、90時間後に 膜電気抵抗値(TER)を測定した。