

Table 1 Amino acid sequence of hCL1 immune ScFv phage library

VL

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	(G4S)3
Clone 1	DIVLTQSHTFMSTS VGDRVSIIC	KASQDVST AVA	WYQQKPGQS PKLLIY	WASTRHT	GVPDRFTGSGSGTDYT LTISSVQAEDLALYYC	QQHYSTPYT	FGGGTKLEI KR	GGGGS GGGGS
Clone 2	DIVMTQSHKFMSTS VGDRVSIIC	KASQDVNT AVA	WYQQKPGQS PKLLIY	WASTRHT	GVPDRFTGSGSGTDYT LTISSVQAEDLALYYC	QQYYRIPYT	FGGGTKLEI KR	GGGGS GGGGS
Clone 3	DIQITQSHKFMSTS VGDRVSIIC	KASQDVGT AVA	WYQQKPGQS PKLLIY	WASTRHT	GVPDRFTGSGSGTDYT LTISSVQAEDLAVYYC	QQHYSTPW T	FGGGTKLEI KR	GGGGS GGGGS

VH

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Clone 1	EVQLVESGGGLVQPG GSLKLSCAASGFTFS	SYGMS	WVRQTPDKRLTINSNGGST ELVA	RFTISRDNAKNTLYLQM YYPDSVKG	DGDGYYDYF DY	WGQGTTLT RSS	
Clone 2	EVQLVESGGGLVKPGG SLKISCAASGFTFS	RHTMS	WVRQTPEKRLYISNGGGTT EWVA	RFTISRDNAKNTLYLQM YYPDTVKG	DRGYAALYA MDY	WGHGTSLK ASS	
Clone 3	EVNLVESGGGLVKPGG SLKLSCAASGFTFS	SYAMS	WVRQTPEKRLTISSGGSYT EWVA	RFTISRDNAKNTLYLQM YYPDSVKG	PYGHYHYFD Y	WGQGTTLT VSS	

Phage clones were randomly picked up from the scFv phage library, and the amino acids sequences of scFv clones were analyzed.

Claudin-1 および Claudin-4 のヒトがんにおける発現

研究分担者 國安弘基 奈良県立医科大学 教授

研究要旨

Claudin-1 および Claudin-4 の種々のヒトがんにおける発現を病理組織標本を用いて検索し、臨床病理学的因子との相関を検討した。また、培養がん細胞に対する Claudin-1 または Claudin-4 に対する抗体処理や TGF β 処理による Claudin-1 および Claudin-4 等の発現変化を検討した。その結果、以下のことが示唆された。①一般に Claudin-1 はその発現低下とがん進行が相関していたが、Claudin-4 ではがんの種類により発現低下ががん進行と相関するものと発現亢進が相関するものの両者が見られた。②Claudin-1 および Claudin-4 の発現低下は分化度の低下と相関し、EMT 形質に関連する可能性がある。③Claudin-4 の発現はがんの増殖や生存に関与する可能性がある。

C. 研究目的

Claudin-1 および Claudin-4 は、細胞間接着因子として正常上皮組織に広く発現している。一方、がんにおける Claudin-1・Claudin-4 の発現は多くの報告があるものの差異が大きく、増減に関して一定の傾向を断定することは困難である。Claudin-1 および Claudin-4 をがん治療の分子標的とする際に、種々の癌腫における Claudin-1 および Claudin-4 の発現とその意義を広く検討し、がんにおける Claudin-1 および Claudin-4 の共通した役割ならびに臓器特異性について知見を得ることが必要と考えられる。

D. 研究方法

B-1. 免疫染色によるヒトがん病理組織での Claudin-1 および Claudin-4 の発現の検討

臨床病理学的情報の明らかなヒトがん組織のパラフィン包埋切片を用いて Claudin-1 および Claudin-4 の発現を免疫染色により検討した。検討した症例数は、頭頸部癌 65 例、肺癌 208 例、胃癌 196 例、大腸癌 108 例、膵癌 91 例、肝癌 110 例、腎癌 202 例、膀胱癌 86 例、前立腺癌 40 例、乳癌 88 例の 1194 例である。免疫染色の結果は、

染色強度を 4 段階(0-3)に判定し染色面積(%)と積算したもの(0-300)を発現指数として、組織分化度(Grade)、病期(Stage)、腫瘍進展(T)、リンパ節転移(N)、遠隔転移(M)と比較した。

B-2. 癌細胞における Claudin-1 および Claudin-4 の機能に関する予備実験

C-1 で示すように、Claudin-1 および Claudin-4 は癌の抑制・進展に何らかの役割りを果たしていることがヒトがん組織の検討から示唆されたため、癌細胞株を用いて preliminary な検討を行った。Claudin-1 または Claudin-4 に対する抗体で癌細胞を処理し、細胞増殖に与える影響、および、5FU による増殖抑制効果の変化について検討を行った。また、形態に及ぼす影響として TGF β 処理による Claudin-1・Claudin-4 の発現変化を検討した。

C. 研究結果

C-1. 免疫染色によるヒトがん病理組織での Claudin-1 および Claudin-4 の発現の検討

Fig. 1 に示すように、がん組織における Claudin-1・Claudin-4 の発現パターンはほとんどは細胞間接着面を中心とする細胞膜に見られ、細

胞質に免疫活性を示すものも認められた。これは tight junction 構成タンパクとして正常な分布パターンと考えられた。少数の症例では、核に染色性が見られるものや、細胞膜に数珠状の染色性を示すものも認められた。

発現と臨床病理学的因子とを比較すると、いずれの臓器癌においても何らかの因子との間に相関、または、逆相関が認められた (Table 1)。Claudin-1・Claudin-4 と分化度との関連ではほとんどの正常組織で高発現しているのに対し、ほとんどの癌組織では分化度が低下するにつれて発現の低下が認められた。また、発現レベルはすべての臓器癌において Claudin-4 が Claudin-1 を上回っていた。Stage、T 因子、N 因子、M 因子など癌の進展度との相関を検討すると、Claudin-1 では膵癌をのぞくすべての癌でいずれかの進展度との間に逆相関が認められたのに対し、Claudin-4 では胃癌、大腸癌、乳癌では進展度との間に逆相関が、頭頸部癌、肺癌、膵癌、肝癌、腎癌、膀胱癌では相関が認められた。Claudin-1 と Claudin-4 の発現を比較すると正の相関が認められた。

C-2. 癌細胞における Claudin-1 および Claudin-4 の機能に関する予備実験

Claudin-1・Claudin-4 の両者の発現が認められる、大腸癌細胞 CT26、膀胱癌細胞 T24 細胞を用いて Claudin-1 または Claudin-4 に対する抗体を処理し細胞増殖に及ぼす影響を検討したところ、Fig. 2 のように、CT26 では抗 Claudin-4 抗体処理では増殖抑制が生じ、T24 では抗 Claudin-1 抗体・抗 Claudin-4 抗体のいずれの処理においても増殖抑制が認められた。

また、膵癌細胞 MIA-PaCa に対して 5FU 処理を行い、そのとき Claudin-1 または Claudin-4 に対する抗体を処理し細胞増殖に及ぼす影響を検討したところ、Fig. 3 に示すように、抗 Claudin-4 抗体処理により 5FU による細胞増殖抑制が著明に促進された。図には示さないが抗 Claudin-1 抗体では効果は明かではなかった。

一方、大腸癌細胞 HT29 の TGF- β 処理におけ

る Claudin-1・Claudin-4 発現変化を検討すると、Fig. 4 に示すように TGF- β 処理により TGF- β 濃度依存性に Snail・ZEB1 発現亢進とともに ECD 発現低下、Vimentin 発現亢進が認められた。これらの発現変化から EMT が誘導されたものと見なされ、このとき Claudin-1 と Claudin-4 の発現はいずれも TGF- β 濃度依存性に低下した。また、その程度はとくに Claudin-1 で著明であった。

D. 考察

このように、各種がんにおける Claudin-1・Claudin-4 の発現の検討からは、Claudin-1 は癌の進展に伴い発現の低下が認められるが、Claudin-4 では発現の亢進する場合も低下する場合も認められた。Claudin-1 が組織分化度と相関しており、がん抑制性の機能を有する可能性があるのに対し、Claudin-4 ではより複雑でがんの抑制・進展のいずれにも役割を果たす可能性が考えられた。

なお、核内の染色性や細胞膜における数珠状の染色性については何らかの特異的な機能と関連する可能性もあり、今後検討して行きたい。

抗体を用いた Claudin-1 または Claudin-4 の抑制により、増殖抑制や抗癌剤効果の増強が認められた。膀胱癌・膵癌では症例検討により Claudin-4 の発現亢進ががんの進行と相関したが、がん促進性の作用を有することが示唆された。

TGF- β 誘導 EMT 関連遺伝子発現変化と Claudin-1・Claudin-4 発現低下が相関したことから、症例検討で見られた、Claudin-1 または Claudin-4 の発現低下とがん進行度との相関や組織分化度との逆相関については、EMT phenotype への変化とも考えられる。今後も詳細を検討したい。

E. 結論

Claudin-1 および Claudin-4 のヒトがんにおける役割を臨床症例における発現から検討し、培養細胞を用いた検討を加味すると、Claudin-1・Claudin-4 の発現低下は EMT と関連する分化度の低下との相関しており、Claudin-4 発現亢進は、がんの増殖

や生存に関与する可能性が示唆された。このように、Claudin-1・Claudin-4 は種々のヒトがんにおいてその悪性度に様々な機序を介して関与していると考えられる。分子治療の標的として有効と考えら

れるが、今後、より詳細な検討を行い、targetingの適応や投与の最適化につながる条件を解明して行く予定である。

Table 1. ヒトがんにおける claudin-1, claudin-4 の発現と臨床病理学的因子との相関

	n		Grade	T	N	M	Stage	Cln1 vs Cln4
Head and Neck	65	Cln1			inverse	nt		direct
		Cln4		direct		nt	direct	
Lung	208	Cln1			inverse	nt	inverse	
		Cln4		direct	direct	nt	direct	
Stomach	196	Cln1	inverse	inverse			inverse	direct
		Cln4	inverse	inverse				
Colorectum	108	Cln1	inverse		inverse	inverse	inverse	direct
		Cln4	inverse	inverse	inverse			
Pancreas	91	Cln1						
		Cln4			direct	direct	direct	
Liver (HCC)	110	Cln1	inverse		inverse		inverse	direct
		Cln4	inverse	direct			direct	
Kidney	202	Cln1		inverse		nt	inverse	
		Cln4				nt	direct	
Bladder	86	Cln1		inverse		nt	inverse	
		Cln4		direct	direct	nt	direct	
Prostate	40	Cln1	inverse					direct
		Cln4	inverse					
Breast	88	Cln1	direct		inverse	nt	inverse	direct
		Cln4	inverse		inverse	nt	inverse	

Fig. 1. 各がん組織における claudin-1, claudin-4 の発現

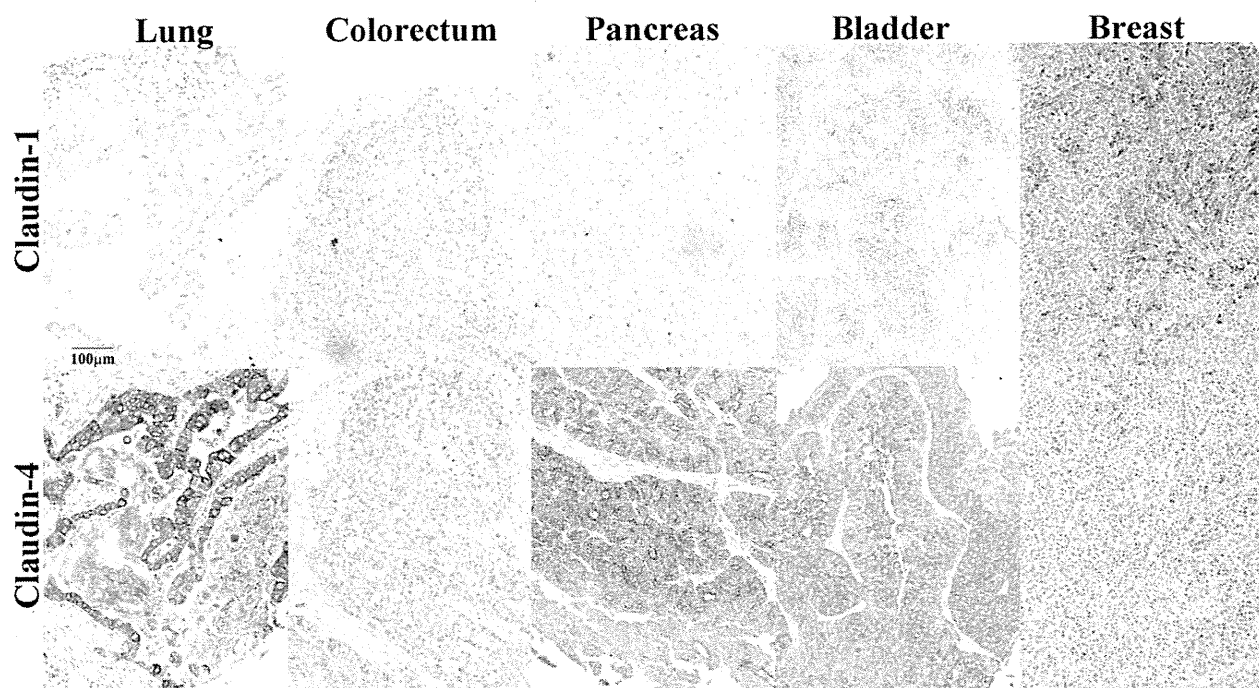


Fig. 2. 抗 Claudin 抗体処理による細胞増殖への影響

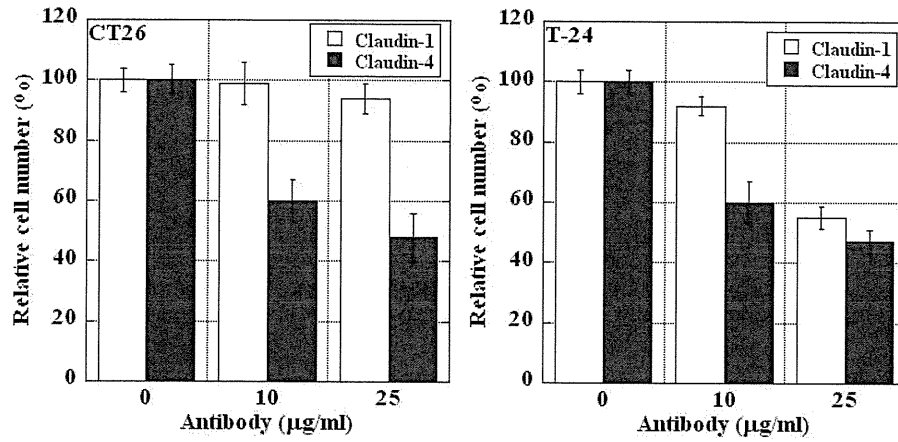


Fig. 3. 抗 Claudin 抗体処理による 5FU 効果への影響

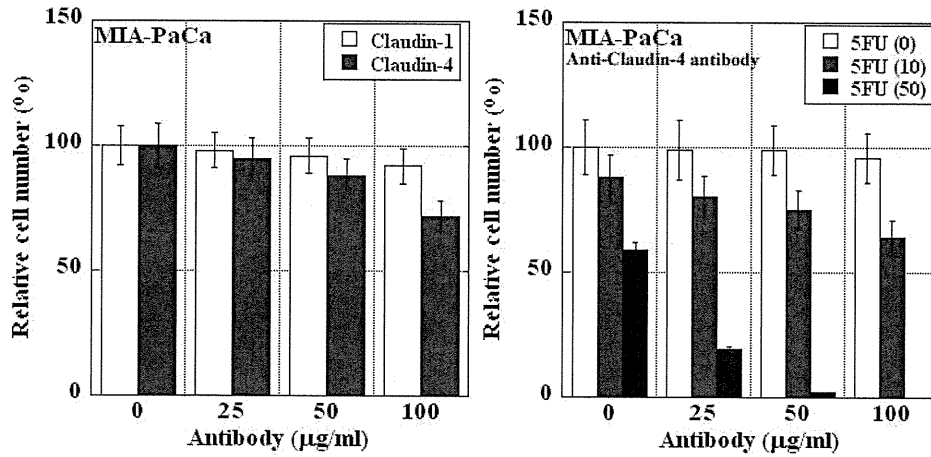
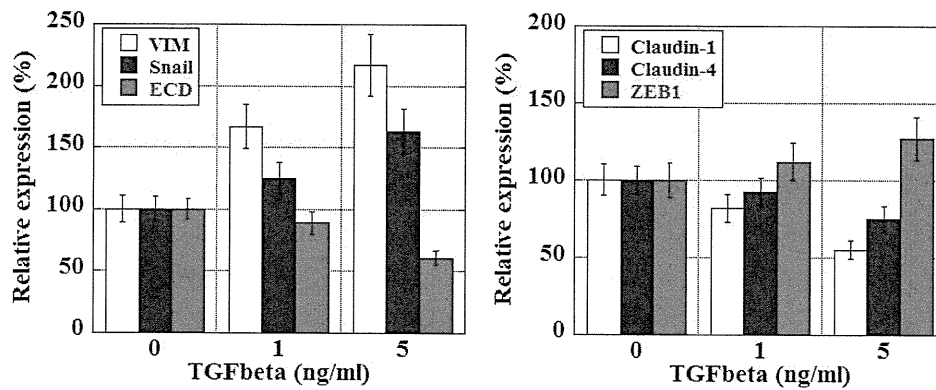


Fig. 4. TGF- β 誘導 EMT における Claudin-1 および Claudin-4 の発現変化



「C型肝炎ウイルス感染阻害評価系確立のための予備検討」

研究分担者 深澤 征義（国立感染症研究所細胞化学部 室長）

研究要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は、本邦における肝がん発症の主要な原因であり、その対策が強く求められている。タイトジャンクション分子である Claudin-1 (CL-1)は HCV 感染時の侵入過程に必須の宿主因子である。CL-1 を標的とした抗 HCV 創薬基盤の確立を目指し、本年度は以下の検討を行った。まず、今後樹立を試みる CL-1 結合因子 (CL-1 binder) の HCV 感染阻害能を評価するにあたり、培養細胞を用いた簡便・高感度な HCV 感染測定系の確立が重要である。そこで、ヒト肝由来培養細胞株 Huh7.5.1 に HCV-JFH-1 株を繰り返し感染・継代することで感染能が 1,000 倍以上上昇した適応変異株を分離した。さらに、HCV 感染に高感受性を示す宿主細胞株 (Huh7.5.1 細胞由来) も樹立した。これらを用い in vitro 感染阻害評価系を構築し、その最適化を行った。また、創薬プローブとなる有用な CL-1 binder を取得するためには、適したスクリーニング系を確立することが重要である。そこで、Huh7.5.1 細胞より HCV に耐性を示す株を分離し、その中から CL-1 欠損株を樹立した。親株および CL-1 欠損株に対する CL-1 binder の結合能を比較することで、細胞表面での CL-1 結合特異性の評価 (スクリーニング) が可能となり、さらに同細胞を用い HCV 感染阻害評価も行うことができるため、これら細胞は今後のスクリーニングに大変有用である。

E. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は、本邦における肝がん発症の主要な原因と考えられており、その感染治療対策が強く求められている。HCV が肝細胞に侵入する過程にはタイトジャンクション分子である Claudin-1 (CL-1) が関与することが明らかとなり、宿主因子である CL-1 を標的とした HCV 感染阻害法の可能性が考えられる。本分担研究では CL-1 を標的とした抗 HCV 創薬基盤の確立を最終目標とする。そこで本年度はまず、より簡便・高感度な HCV 感染阻害評価系確立の予備検討を進めること、また、創薬プローブとなりうる CL-1 binder の取得に有用なスクリーニング系を確立することを目的とする。

F. 研究方法

B-1. 高感度 HCV 感染阻害評価系の確立

HCV に対する感染阻害能を評価する系を構築する場合、感染能の高いウイルス株を用いること

ができれば感染の検出が容易となる。つまり、CL-1 binder による感染阻害活性解析が簡便・迅速になり、有用なツールになると期待される。そこで、Huh7.5.1 細胞に HCV-JFH-1 株を繰り返し感染・継代することで感染能が上昇した適応変異株の分離を行った。

また、宿主細胞側についても、より HCV 感染感受性の高い細胞を用いることが感染の検出に有利である。そこで、Huh7.5.1 細胞をあらためてクローニングすることで複数の株を樹立し、感染感受性の高い株の選別を行った。

HCV 感染の検出は、宿主細胞中のウイルスゲノム RNA 及び蛋白質 (core, NS3, NS5A) を qRT-PCR・免疫染色・イムノブロットで、培養上清中に放出されたウイルス粒子 (RNA 及び蛋白質 (core)) を qRT-PCR・HCV core に対する ELISA で測定することにより行うこととした。

B-2. CL-1 binder の取得に有用なスクリーニン

グ系の確立

CL-1 を介した HCV 侵入過程を阻害するプローブ(CL-1 binder)の性質としては、細胞表面上の非変性 CL-1 に結合能を有することが必須である。このような CL-1 binder (抗体など)を樹立するためには、CL-1 を発現している細胞と発現していない細胞を持っていることが非常に有用である。HCV 感染が認められる細胞は肝細胞に限られるため、肝細胞由来で CL-1 を発現していない細胞を手に入れることができればさらに有用である。そこで、以下の方法で肝細胞由来 Huh7.5.1 細胞より CL-1 欠損細胞の樹立を行った。

Huh7.5.1 細胞に高用量で HCV 感染を行うと宿主細胞死が起こる。この条件下で HCV 感染させても生き残る細胞(HCV 耐性細胞)が存在すれば、その細胞株は HCV 感染能を欠損した、すなわち HCV 感染に必須の因子(CL-1 など)が欠損した宿主細胞変異株である可能性がある。そこで、Huh7.5.1 細胞を高用量(MOI ≥ 50)HCV で繰り返し処理し、長期間培養後、生き残る細胞をクローニングした。本条件では(HCV 感染に必須な分子の一つである)CD81 欠損株ばかりが分離されることから、Huh7.5.1 細胞にあらかじめ CD81 を発現した Huh7.5.1 細胞を用いて HCV 感染耐性細胞の分離・クローニングを行った。

C. 研究結果

C-1. 高感度 HCV 感染阻害評価系の確立

Huh7.5.1 細胞に HCV-JFH-1 株を繰り返し感染・継代を行った結果、感染能が明らかに上昇した適応変異ウイルス株が分離された(図1)。感染能を測定した結果、親株である HCV-JFH1 株に比べ 1,000 倍以上の感染能の上昇が見られた(表 1)。

また、宿主細胞である Huh7.5.1 細胞をクローニングして複数の亜株を樹立した。クローニング前に比べ数十倍感染感受性が高い亜株が分離できた。この感染感受性の形質は非常に安定しており、半年以上長期培養しても同等の高い感染感受性を維持していた。

以上で樹立した高感染性 HCV 適応変異株および感染高感受性宿主細胞株を用いることで HCV 感染を簡便・迅速に検出する系を確立した。本感

染検出系を用い、既知の阻害剤であるインターフェロン α の効果を検討したところ、用量依存的な感染阻害効果が見られた。また、下記の CL-1 欠損株では、本感染検出系を用いても感染が全く検出されなかった。

C-2. CL-1 binder の取得に有用なスクリーニング系の確立

CD81 を発現した Huh7.5.1 細胞から HCV 感染耐性細胞の分離を試みた結果、複数の株が分離された。それらの細胞株の中には、CL-1 の発現が欠損した細胞株も含まれていた。その中の一つの株の遺伝子(mRNA)発現解析(DNA チップ解析)の結果を図 2 に示す。CL-1 の発現がかなり特異的に欠損していることが明らかとなった。抗 CL-1 抗体(細胞内ドメインに対する抗体)によるイムノブロットおよび免疫染色の結果からも CL-1 タンパク質の欠損が確認された(図 3、4)。また、得られた CL-1 欠損細胞には HCV 感染が全く起こらないことも確認された(図 4)。さらに、CL-1 欠損細胞に CL-1 発現ベクターを導入し、CL-1 の発現を戻した細胞では、HCV 感染が回復することも確認された(図 4)。これらの結果からも CL-1 が HCV 感染に必須の因子であることが確認された。

D. 考察

樹立した HCV-JFH-1 由来の高感染性 HCV 適応変異株と Huh7.5.1 細胞由来の感染高感受性宿主細胞株を用いることで HCV 感染を簡便・迅速に検出・測定する系を確立した。インターフェロン α などの既知の阻害剤や CL-1 欠損株を用いた検討から、当該感染測定系は HCV 感染阻害を正確に評価できる系であることが確認された。今後、この系を用いて CL-1 binder による HCV 感染阻害を評価していきたい。

上述したように、ヒト肝細胞由来の CL-1 欠損細胞株が樹立されたので、CL-1 を発現する親株(Huh7.5.1 細胞)には結合するが CL-1 欠損細胞には結合しないプローブ(抗体など)をスクリーニングすることが可能となった。この系を用いることで、細胞表面に存在する非変性の CL-1 に対して特異的に結合する分子をスクリーニングできるものと考え

えている。さらに、本スクリーニング系は肝細胞系を用いていることから、得られた CL-1 binder は HCV 感染阻害能も有する可能性が極めて高いと考えている。

最近臨床開発された抗 HCV 薬は、HCV 自身の持つ NS3 プロテアーゼの阻害剤である。HCV 増殖の抑制に非常に有効であるものの、耐性ウイルスの出現により効果が減弱することも将来懸念される。本課題のような宿主-病原体相互作用部位を標的とする HCV 感染阻害法は、広範な遺伝子型のウイルスに適用でき、耐性ウイルスも生じにくいことが考えられ、検討を進めることは極めて重要であると考えている。

E. 結論

高感染性 HCV 適応変異株および感染高感受性宿主細胞株を用いた HCV 感染を簡便・迅速に検出・定量化する系を確立した。本感染測定系は、今後樹立を試みる CL-1 binder の HCV 感染阻害能を正確に評価できる系として有用である。

また、ヒト肝培養細胞株 Huh7.5.1 由来の CL-1 欠損細胞株を樹立したことで、細胞表面に存在する非変性の CL-1 と特異的に結合する分子を選別できる系が構築できた。今後行う予定である、HCV 感染を阻害できる CL-1 binder のスクリーニングに非常に有用である。

以上のように、本年度の目標は十分達成されたと考えている。

図1

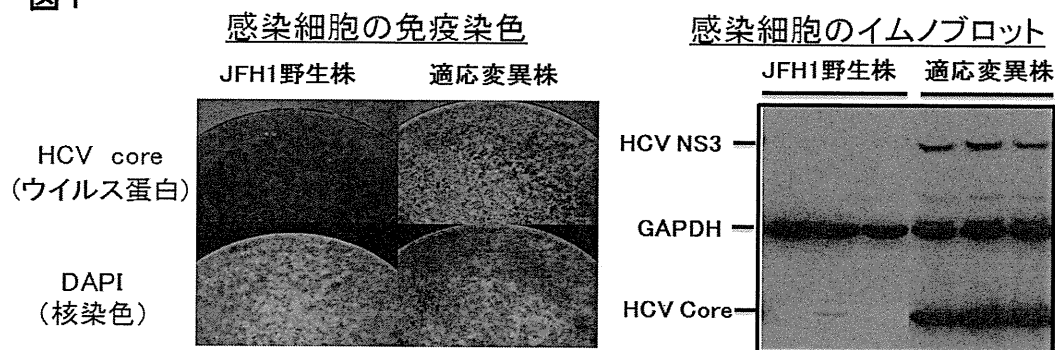


表1

	ffu/fmol HCV core protein	fold
JFH1野生株	4.4×10^2	1
適応変異株	4.9×10^5	1.1×10^3

図2

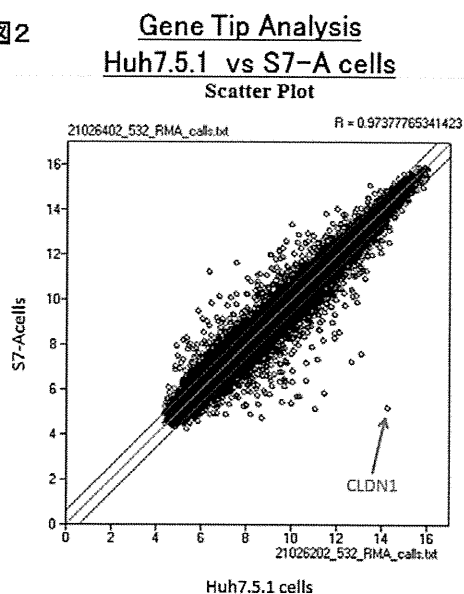


図3

Immunoblot analysis

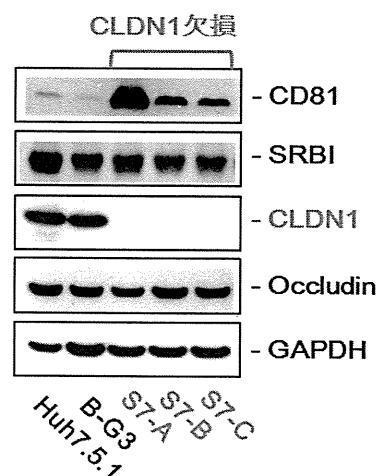
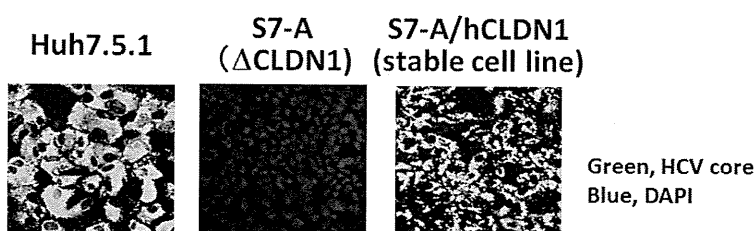


図4

CLDN1 immunostaining



HCV core staining after HCV infection



Claudin 標的型粘膜ワクチンの開発に向けた呼吸器粘膜組織における抗原取り込み上皮細胞の同定と解析

研究分担者 國澤 純 東京大学医科学研究所 講師

研究要旨

抗原を“吸わせる・飲ませる”といった方法で免疫することで特異的免疫応答を誘導しようとする粘膜ワクチンが実用化されつつある。これら粘膜ワクチンを多くのワクチンに応用していくためにはワクチン抗原やアジュバントの開発に加え、抗原送達技術の開発が重要となってくる。本研究では、粘膜組織における物理的バリアである上皮細胞層に着目し、上皮細胞層バリアを形成する Claudin を標的とした粘膜ワクチンの開発を目指した研究を展開する。初年度にあたる本年度は上記目的達成に向けた基礎検討として、粘膜ワクチンの標的組織の一つである呼吸器に着目し、鼻腔上皮細胞層における抗原取り込みネットワークを解析した。その結果、鼻腔組織においては鼻腔リンパ組織だけではなく上皮細胞層にも抗原取り込みに特化した M 細胞が存在することを見出し、鼻腔 M 細胞と命名した。鼻腔 M 細胞は溶液状抗原や病原体細菌を周辺の上皮細胞よりも効率よく抗原を取り込み、また抗原提示細胞である樹状細胞とクラスターを形成することで取り込んだ抗原を樹状細胞へ送達していた。これらの結果から、鼻腔 M 細胞は鼻腔上皮細胞層における抗原取り込みとその後誘導される免疫応答に関わっていることが強く示唆され、本事業でおこなう Claudin 標的型粘膜ワクチン開発の送達対象細胞の一つとして重要であると考えられた。

A. 研究目的

消化器や呼吸器に代表される粘膜組織は多くの病原微生物の侵入門戸となっている。生体は粘膜組織に粘膜免疫システムと呼ばれる精密かつダイナミックな免疫制御システムを備えることで、粘膜組織を介し侵入してくる病原体に対する生体防御を担っている。

これら粘膜免疫システムを応用した免疫療法の一つとして“吸わせる、飲ませる”といった方法により抗原を投与する粘膜ワクチンが注目されている。従来の注射による方法は脾臓などの全身免疫系には免疫応答を誘導できるが、粘膜組織には免疫応答を誘導することができない。これに対し、粘膜ワクチンは粘膜免疫と全身系免疫の両部位に免疫応答を誘導できることから、粘膜組織での初

発感染防御とそこをくぐり抜けて体内に侵入してきた病原体に対する第2の防御バリアを同時に誘導できる。

このように優れた効果が期待できる粘膜ワクチンであるが、実用化に向けてはいくつかの課題があり、その一つが抗原送達である。すなわち生体の異物排除組織である粘膜組織において抗原を生体に取り込ませ、粘膜免疫システムに認識させるためには、上皮細胞によるバリアをくぐり抜け、免疫系に認識させる必要がある。また上皮細胞は物理的バリアとして機能するだけでなく、B 細胞や T 細胞、樹状細胞といった免疫担当細胞と相互作用することで免疫制御にも関わっている。特に上皮細胞層に存在し、抗原取り込みに特化しているといわれている M 細胞は、樹状細胞や T 細胞、

B 細胞を含むポケットを有し外来異物を取り込み、免疫系細胞に引き渡す中核的な役割を担っている。

本事業においては上皮細胞層でのバリアを形成する Claudin を標的とした粘膜ワクチンの開発を目指した研究を展開する。初年度にあたる本年度は上記目的達成に向けた基礎検討として、粘膜ワクチンの標的組織の一つである呼吸器、特に鼻腔に着目し鼻腔組織の上皮細胞層を解析した結果、鼻腔リンパ組織以外の鼻腔上皮細胞層にも抗原取り込み専門細胞である M 細胞が存在することを見出し、リンパ組織非依存的な免疫応答の誘導に関わることを見出した。

B. 研究方法

B-1. 鼻腔 M 細胞の観察

鼻腔 M 細胞の観察のために、OCT で包埋し凍結した鼻孔組織を用い 5 μ m 厚の凍結切片を作製した。鼻腔凍結組織切片を Fc block 溶液でブロッキングした後、ローダミン標識 Ulex europaeus agglutinin-1 (UEA-1)ならびに FITC 標識 M 細胞特異的モノクローナル抗体(NKM 16-2-4)で染色した。調整した組織は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

B-2. M 細胞を介した抗原の取り込みと樹状細胞への受け渡し

溶液状の抗原取り込みの解析のために蛍光標識した OVA (DQ-OVA)を用いた。また病原体の取り込み解析のために、 5×10^8 CFU の GFP 発現サルモネラ属菌や A 群連鎖球菌(GAS)を鼻腔内に投与した。30 分後における鼻腔組織での取り込みをフローサイトメトリー法と共焦点レーザー顕微鏡で測定した。さらに代表的抗原提示細胞である樹状細胞のマーカーの一つである CD11c に特異的な抗体を用い、樹状細胞を検出した。

C. 研究結果

C-1. 鼻腔 M 細胞の観察

鼻腔上皮細胞層に存在する M 細胞を観察するた

めに、鼻腔凍結組織を M 細胞マーカーの一つである UEA-1 レクチンで染色した。その結果、鼻腔組織のうち、単層上皮細胞層から形成されている部位に UEA-1 で染色される細胞が存在した(図 1A, B)。またこれらの細胞は M 細胞特異的マーカーである NKM-16-24 抗体にも同様に反応することから M 細胞の一種であることが示された(図 2A)。また電子顕微鏡を用いた解析からも、これらの細胞は微絨毛が短く背丈が低いという特徴を持っていた(図 2B)。これらのことから少なくともマーカー分子の発現と形態的特徴はこれまで粘膜関連リンパ組織や腸管上皮細胞に存在することが示されている M 細胞と同様であることから、この細胞を鼻腔 M 細胞と命名した。

C-2. 鼻腔 M 細胞による抗原取り込み

次に鼻腔 M 細胞の機能的特徴の一つである抗原取り込み能力を検証した。溶液状の抗原として OVA を用い蛍光標識した OVA (DQ-OVA)をマウスに経鼻投与した。共焦点レーザー顕微鏡を用い 30 分後の分布を解析したところ、これまで報告されていたように鼻腔リンパ組織に存在する UEA-1 陽性 M 細胞における高い抗原取り込みが認められた(図 2A)。また今回我々が同定した鼻腔 M 細胞においても同様の取り込みが認められた(図 2B)。さらにフローサイトメトリーを用い、UEA-1 陽性細胞と陰性細胞の取り込み効率を比較したところ、共焦点レーザー顕微鏡の結果と同様、UEA-1 陽性 M 細胞での高い抗原取り込みが認められた(図 2C, D)。

さらに病原体の取り込み解析のために、 5×10^8 CFU の GFP 発現サルモネラ属を鼻腔内に投与し 30 分後における鼻腔組織での取り込みを同様の方法で解析したところ、OVA の結果と同様、UEA-1 陽性細胞での高い抗原取り込みが認められた(図 3A-D)。

また実際の呼吸器感染症を引き起こす GAS の取り込みを検討したところ同様に鼻腔 M 細胞を介した抗原取り込みが認められた。さらに M 細胞の下層には樹状細胞の集積が認められ、M 細胞を

介して取り込んだ GAS を補足している像が観察された(図 2E)。

D. 考察

今回の検討において、これまで鼻腔リンパ組織やパイエル板といった粘膜関連リンパ組織や腸管の絨毛組織の一部にしか存在しないと言われていた M 細胞が鼻腔上皮細胞層にも存在することを見出した。これら鼻腔 M 細胞は M 細胞特異的マーカーの発現や形態的特徴だけではなく、実際に溶液状抗原や病原体の補足・取り込み能力が高いといった機能的な面からもこれまで知られている M 細胞と同様であった。また自らの下層に樹状細胞を集積させ、取り込んだ抗原を樹状細胞に引き渡していることから、経鼻ワクチンにおける重要な標的の一つであると考えられる。実際に鼻腔リンパ組織を欠損させたマウスに経鼻免疫を行ったところ、これまで経鼻ワクチンにおける主要免疫誘導組織として考えられていた鼻腔リンパ組織がないのにも関わらず、免疫応答の誘導が認められた。今後はこれらの知見をもとに、鼻腔 M 細胞における Claudin の発現や樹状細胞を介した免疫誘導経路の詳細を解明することで、本事業における Claudin 標的型粘膜ワクチンの開発における対象細胞としての有用性が明らかになると期待される。

E. 結論

鼻腔組織に存在する新たな抗原取り込み細胞として鼻腔 M 細胞を同定し、経鼻ワクチンにおける標的細胞として有用であることを示した。

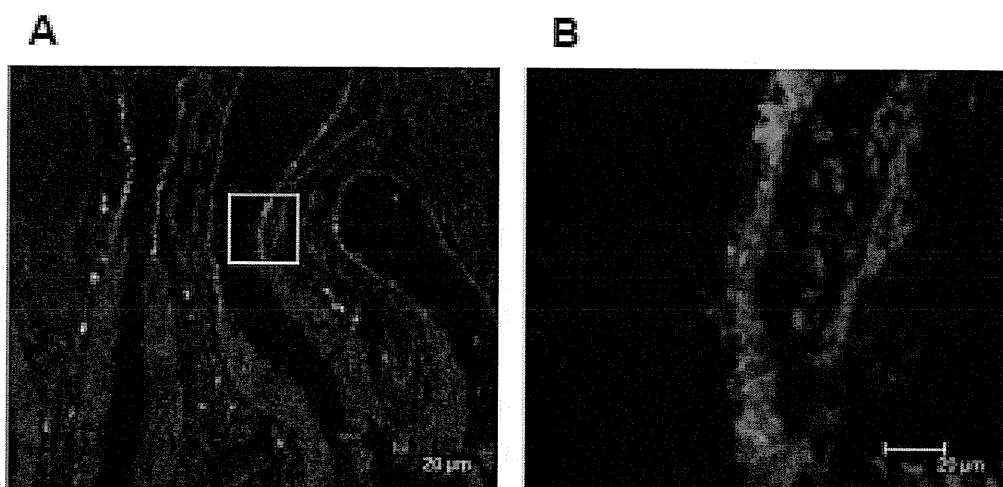
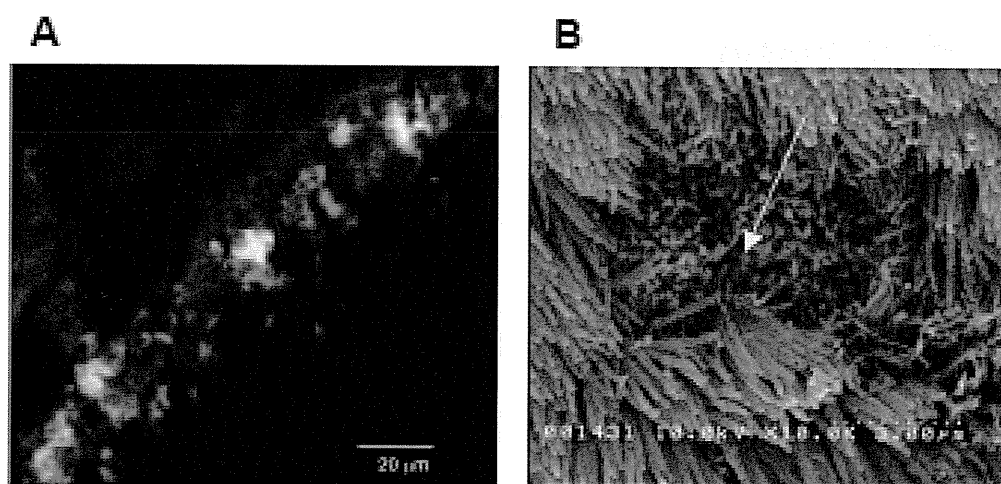


図1 鼻腔上皮細胞層におけるUEA-1陽性細胞の同定
 鼻腔組織の凍結切片をDAPI(青)と共にローダミン標識UEA-1
 レクチン(赤)で染色した。単層上皮細胞層にUEA-1陽性の細胞が
 点在する像が観察された。BはAの白枠の部分を拡大したもの。



**図2 鼻腔UEA-1陽性細胞におけるM細胞特異的マーカーの発現
 と形態観察**

A. 鼻腔組織の凍結切片をDAPI(青)、ローダミン標識UEA-1レクチン
 (赤)、M細胞特異的抗体(NKM16-2-4、緑)で染色した。UEA-1陽性
 細胞がM細胞特異的抗体と反応していることが確認された。
 B. 鼻腔組織を電子顕微鏡(SEM)で観察した。矢印で示すように
 M細胞の特徴である微絨毛が短い細胞が点在する像が得られた。

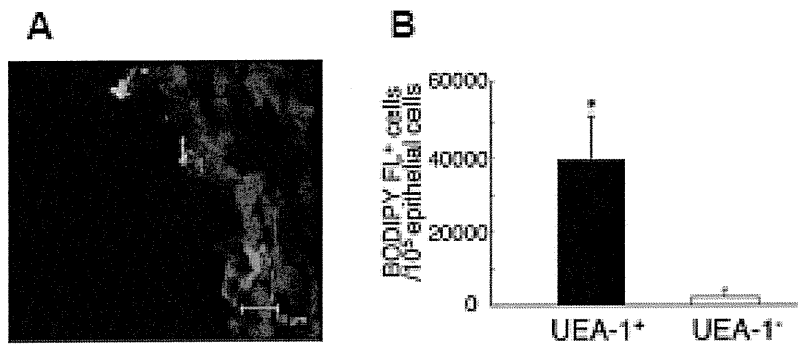


図3 鼻腔M細胞による溶液状抗原の取り込み

A. マウスに蛍光標識したOVA(緑)を投与した後、30分後に鼻腔組織を回収し凍結切片を作製した。DAPI(青)と共にローダミン標識UEA-1レクチン(赤)で染色したところ、UEA-1陽性のM細胞にOVAが取り込まれている像が観察された。

B. フローサイトメトリー法にてOVA取り込み細胞を測定したところ、UEA-1陽性細胞にて高い抗原取り込みが認められた。

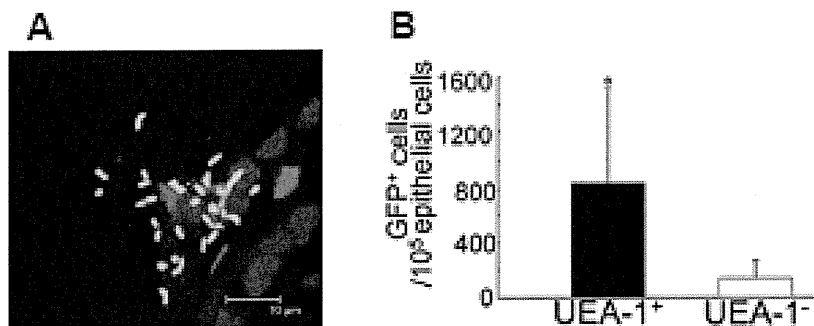


図4 鼻腔M細胞によるサルモネラの取り込み

A. マウスにGFP発現サルモネラを投与した後、30分後に鼻腔組織を回収し凍結切片を作製した。図3と同様、DAPI(青)とローダミン標識UEA-1レクチン(赤)で染色したところ、UEA-1陽性のM細胞にサルモネラが取り込まれている像が観察された。

B. フローサイトメトリー法にてサルモネラ取り込み細胞を測定したところ、UEA-1陽性細胞にて高い取り込みが認められた。

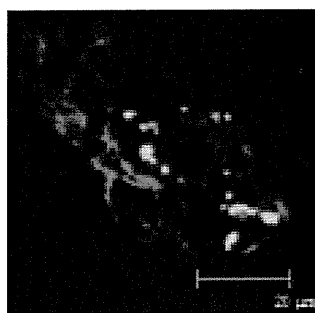


図5 鼻腔M細胞によるGASの取り込みと樹状細胞の集積

マウスにGASを投与した後、30分後に鼻腔組織を回収し凍結切片を作製した。樹状細胞のマーカーであるCD11c特異的抗体(青)とローダミン標識UEA-1レクチン(赤)、GAS特異的抗体(緑)で染色したところ、UEA-1陽性のM細胞の下層に樹状細胞が集積し、GASを取り込んでいる像が観察された。

DNA メチル化による血管内皮細胞特異的遺伝子発現制御

研究分担者 岡田 欣晃 大阪大学大学院薬学研究科 助教

研究要旨

Claudin-5 は生体内においてユニークな発現分布を示し、特に血管内皮細胞に特異的に発現することが知られている。今回我々は、Claudin-5 と同じく血管内皮細胞特異的に発現することが知られている Robo4 遺伝子をモデルとし、血管内皮細胞特異的な遺伝子発現の制御メカニズムをエピジェネティクスの側面から解析し、血管内皮細胞特異性を生み出す DNA メチル化サイトの同定と、メチル化パターンが決定される時期についての知見を得た。

A. 研究目的

我々は血管内皮細胞特異的な遺伝子発現の制御メカニズムの解明を目的とし、Claudin-5 と同様に血管内皮細胞特異的に発現する Robo4 遺伝子の発現制御機構の解析をエピジェネティクスの側面から行ってきた。これまでに、Robo4 プロモーターの CpG 配列のメチル化が Robo4 の組織特異的な発現を生み出すことを明らかにしてきた。今回我々は、DNA メチル化による遺伝子発現制御メカニズムの詳細を解明するため、Robo4 遺伝子の血管内皮細胞特異的な発現を制御する CpG 配列の同定と、プロモーターのメチル化パターンが規定される時期について解析を行った。

B. 研究方法

B-1. 組織特異的発現を制御する CpG 配列同定

Robo4 遺伝子の組織特異的な発現を制御する CpG 配列を同定するために、転写開始点上流 1、2、5、7、11 個の CpG 配列を CpT に置換した変異プロモーターと LacZ 遺伝子を併せ持つ 5 種の ES 細胞を樹立した。得られた細胞を胚様体へと分化させ (Fig.1A)、各胚様体における LacZ 遺伝子の発現量を X-gal 染色とリアルタイム RT-PCR により解析した。

B-2. メチル化パターンの規定時期の解析

野生型プロモーターを持つ ES 細胞を OP9 細胞上で分化させ、MACS により Flk1⁺細胞 (中胚葉系細胞) を純化した (Fig.2)。得られた Flk1⁺細胞を VEGF と cAMP と共にコラーゲン IV コートプレート上で分化させ、MACS により CD31⁺細胞 (血管内皮細胞) を純化した (Fig.2)。Flk1⁺、CD31⁺細胞からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイトシーケンス法を用いてプロモーターのメチル化状態を解析した。

C. 研究結果

C-1. 組織特異的発現を制御する CpG 配列同定

X-gal 染色、リアルタイム RT-PCR の両方において、7 個以下の CpG 配列に変異を導入したプロモーターを持つ胚様体では LacZ の発現量は野生型と同等であったが、11 個の変異を導入したプロモーターを持つ胚様体では、LacZ 発現量が野生型に比べ顕著に増加した (Fig.1B,C)。また、X-gal 染色では、11 個の変異を持つ胚様体のみ、野生型と異なる広範囲での強い染色がみられた (Fig.1B)。この結果から、7 個の CpG への変異導入はプロモーターの組織特異性には影響を与えないが、11 個への導入はプロモーターの組織特異性を破壊することが明らかになった。

C-2. . メチル化パターンの規定時期の解析

ES 細胞においては Robo4 プロモーターが全領域にわたって高度にメチル化されていたが、Flk1⁺ 細胞では、転写開始点付近が脱メチル化され CD31⁺細胞とどのような似たパターンをとることが明らかになった。

D. 考察

Robo4 プロモーターの転写開始点上流11個の CpG 配列への変異は、プロモーターの組織特異性を破壊し、胚様体中の非血管内皮細胞におけ

る Robo4 プロモーターの活性化を誘導したことが明らかになった。1～7個目までの CpG の必要性については今後さらに検討する必要がある。

E. 結論

プロモーターの組織特異性の制御には転写開始点上流 8～11 個目の 4 つの CpG 配列が必須である。また、Robo4 プロモーターの血管内皮細胞特異的なメチル化パターンは ES 細胞から Flk1 陽性細胞へと分化する過程で決定される。

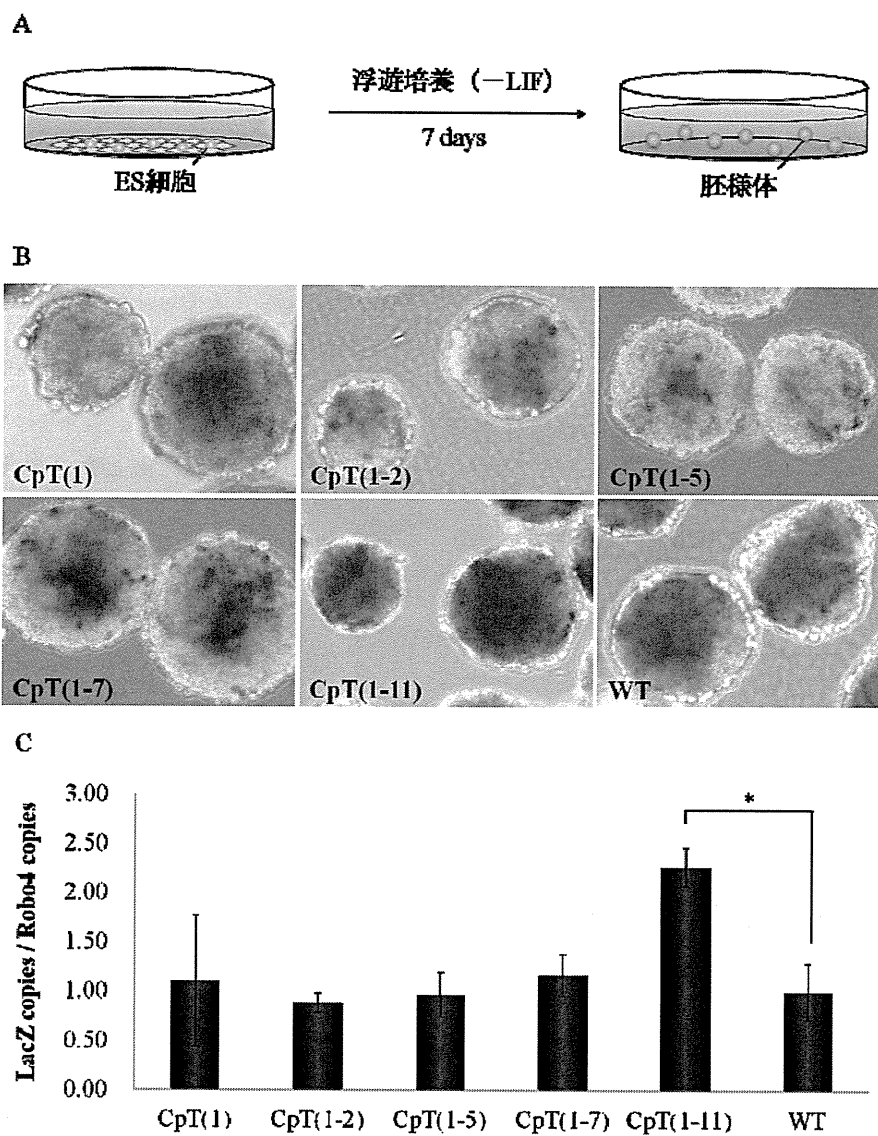


Fig. 1 変異プロモーターを持つ ES 細胞の胚様体への分化と LacZ 発現量の解析
 A) ES 細胞から胚様体への分化誘導法。B) 胚様体の LacZ 染色。野生型および、1～11 個の CpG 配列に変異を導入したプロモーターを持つ胚様体を LacZ 染色した。C) 各胚様体における LacZ mRNA の発現量のリアルタイム PCR を用いた解析。(*, $p < 0.05$)

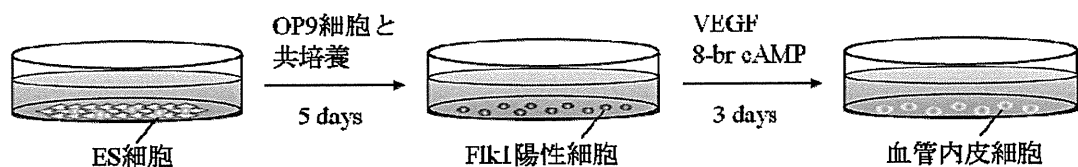


Fig. 2 ES 細胞から血管内皮細胞への分化誘導

ES 細胞を OP9 細胞上で 5 日間分化させ、MACS により Flk1⁺細胞を純化した。得られた細胞をコラーゲンIVコートプレートに再播種し、VEGF と 8-br cAMP 存在下で 3 日間分化させ、MACS により CD31⁺の血管内皮細胞を純化した。

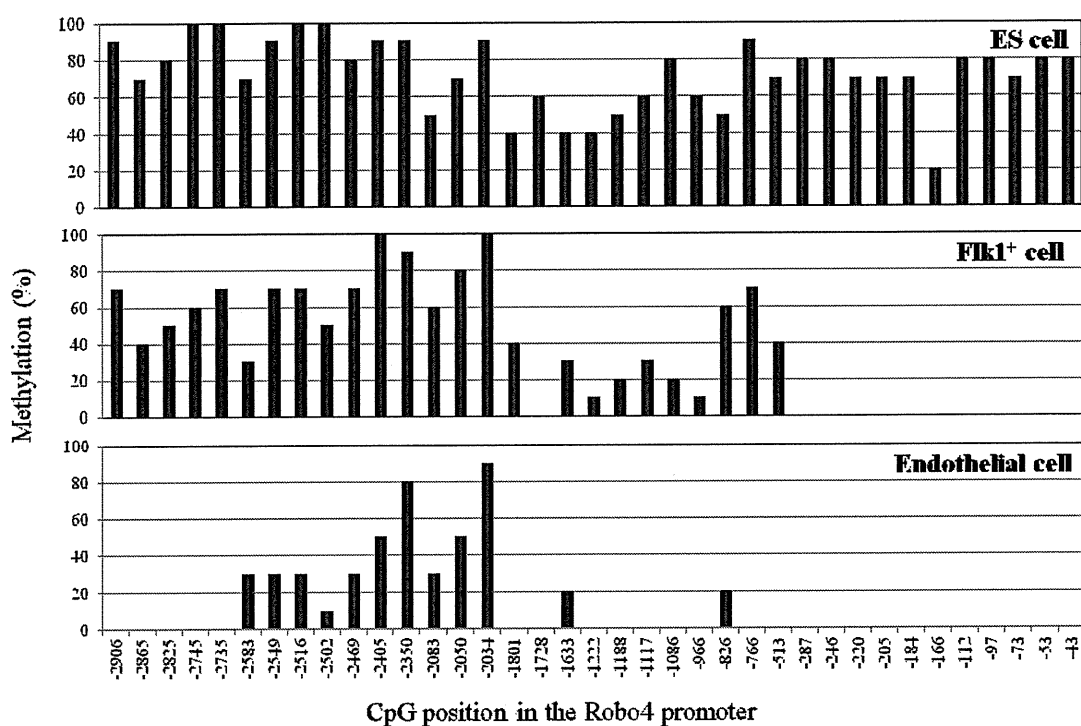


Fig. 3 ES 細胞から血管内皮細胞への分化過程における Robo4 プロモーターのメチル化状態

ES 細胞、Flk1⁺細胞、CD31⁺細胞における Robo4 プロモーターの DNA メチル化状態。縦軸はメチル化された CpG 配列の割合を、横軸は Robo4 プロモーター上の CpG 配列の位置を示す。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小高美樹 近藤昌夫 八木清仁	Claudin modulator を用いたペプチド ・タンパク性医薬 品の経粘膜吸収促 進	山本昌	ペプチド・タ ンパク性医薬 品の新規 DDS 製剤の開発と 応用	メディカ ルドウ	日本	2011	66-69
近藤昌夫 八木清仁	Claudin modulator を用いた難吸収性 薬物の消化管・経 粘膜デリバリー	山本昌	難吸収性薬物 の吸収改善と 新規投与製剤 の開発	株式会社 シーエム シー出版	日本		印刷中
Luo Y, Ohmori H, Fujii K, Kuniyasu H	HMGB1 induces drug resistance in cancer cells	Sunitha M	Current research in cancer 5	Research Media	Kerala, India	2011	1-8

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kakutani H Takahashi A Kondoh M Saito Y Yamaura T Sakihama T Hamakubo T Yagi K	A novel screening system for claudin binder using baculoviral display	<i>PLoS One</i>	6	e16611	2011
Suzuki H Kondoh M Li X Takahashi A Matsuhisa K Matsushita K Kakamu Y Yamane S Kodaka M Isoda K Yagi K	A toxicological evaluation of a claudin modulator, C-terminal fragment of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin, in mice	<i>Pharmazie</i>	66	543-546	2011
Isoda K Hasezaki T Kondoh M Tsutsumi Y Yagi K	Effect of surface charge on nano-sized silica particles-induced liver injury	<i>Pharmazie</i>	66	278-281	2011