

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 21 年度博士課程 進学

氏 名 藤岡 郁也

指導教員名 小野 憲一郎

論文題目

犬のタイトジャンクション関連タンパク質クローディンに関する研究

タイトジャンクション (TJ) は上皮組織において隣り合った細胞の細胞膜を強固に連続的につなぎ合わせる構造である。TJにより細胞間隙と細胞の自由表面は分断され、細胞間隙における溶質移動が制限されることとなり、上皮バリアシステムが構築される。TJ はクローディン (CL) やオクルディン (Oc) といった膜貫通タンパク質と ZO-1、ZO-2、ZO-3 といった膜タンパク質から構成されている。このうち CL ファミリー分子はヒトやマウスで様々な上皮系の組織に発現が確認され、また組織によって異なる発現パターンを示している。また、CL 同士の結合の組み合わせによって TJ の強度や選択的な物質の透過性を調節していると考えられている。近年、TJ と遺伝性疾患との関連が明らかにされ、ヒト CL-16 分子異常で尿細管における Mg^{2+} の再吸収低下が、黒毛和種牛で CL-16 完全欠損による腎尿細管形成不全が報告されている。また、CL-1 ノックアウトマウスでは、皮膚バリアシステムの破綻により体内の水分保持が出来なくなり斃死する。さらにアトピー性皮膚炎では CL-1 の発現が低下しており、TJ の破綻が各種皮

膚疾患の病態を左右する重要な因子であると推測されている。

そこで本研究では、TJ 構成分子のうち CL ファミリーに注目し、まず第一章では犬の CL ファミリー遺伝子の同定、および各臓器における発現について検討した。ついで第二章では犬株化ケラチノサイトを三次元培養し、培養皮膚組織における CL ファミリー分子の発現を免疫染色で検討した。さらに第三章では、CL-1 をノックダウンした培養皮膚組織を作成し、皮膚バリアシステムにおける CL-1 の機能を検討した。

第一章 犬における CL 遺伝子/蛋白の同定

健康犬の組織サンプルを用い、CL-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10b2、-11、-12、-14、-15、-17、-18、-19 の遺伝子配列および CL 蛋白の発現について検討した。また Oc についてもあわせて検討した。

1) cDNA のクローニングとその塩基配列

CL-1 (腎臓髄質)、-2 (腎臓皮質)、-3 (肝臓)、-4 (腎臓髄質)、-5 (肝臓、肺)、-6 (肝臓)、-7 (腎臓髄質)、-8 (腎臓皮質)、-10b2 ((腎臓皮質)、-12 ((腎臓皮質)、-14 (肝臓)、-17 (小腸)、-18 (肺) ならびに Oc (肝臓) について cDNA のクローニングを実施したところ、CL-1、-3、-17 は全てのクローンの塩基配列が Genebank に登録されている予想配列と一致した。CL-2、-4、-12 では一部のクローンで塩基配列の置換が認められたが、アミノ酸配列の置換はなかった。CL-5 は予想配列にイントロン 1 (245 塩基) が挿入されたクローンが得られた。CL-6、-8、-14、-18 にはアミノ酸残基の置換を伴う塩基置換が認められた。CL-7 は全てのクローンで予想配列から 18 塩基が欠損していた。また CL-10b2 では 2 塩基置換、57 塩基欠損、219 塩基欠損のクローンが得られた。

2) 各組織における CL 分子の発現

ウエスタンブロットで、CL-1 は腎臓皮質、腎臓髄質、肝臓、肺、小腸、脾臓と皮膚に発現が認められ、とくに皮膚における発現が顕著であった。CL-2 は腎臓皮質、腎臓髄質、肝臓、小腸、大腸、CL-3 は腎臓皮質、腎臓髄質、肝臓、小腸、大腸、皮膚に発現が認められた。CL-4 は腎臓髄質、肺、脾臓、皮膚に、CL-8 は腎臓皮質、腎臓髄質、肝臓、肺、小腸、脾臓に発現が認められた。また Oc は腎臓皮質、腎臓髄質、肝臓、肺、小腸、大腸、脾臓、皮膚に発現が認められた。

以上の結果、犬の CL ファミリーの 13 分子の遺伝子が同定でき、皮膚には CL-1、CL-3、CL-4、Oc の発現が確認されたが、CL-1 の発現の著しいことが明らかとなった。

第二章 培養皮膚組織の作成および CL 分子の局在

三次元培養法で培養皮膚組織を作成し、CL の局在を正常皮膚組織と比較検討した。また合わせて Oc の局在も検討した。

1) 培養皮膚組織の作成および組織構築

犬株化ケラチノサイト(CPEK 細胞)を三次元培養し、ヘマトキシリン・エオジン

(HE) 染色を行った。単層であった CPEK 細胞は培養 8 日目で数層の細胞シートを形成した。培養 8 日目以降半気相培養条件とし 14 日目では、基底層、有棘層の形成および 2-3 層の錯角化層の形成が認められた。培養 21 日目ではさらに錯角化層の重層化(5-7 層)が認められ犬の皮膚構造と同様の構造を形成した。

2) CL 分子の局在

CL-1, -2, -3, -4, -8 および Oc の局在を免疫染色により培養皮膚組織と犬正常皮膚組織で比較検討した。CL-1 は培養早期の単層時では非常に弱い発現しか認められなかったが、培養 8 日目の培養皮膚組織においては細胞間に発現が認められ、培養 14 日目、21 日目では基底層に弱い発現が、有棘層、顆粒層で強い発現が認められた。CL-2 は培養 8 日目には細胞間での発現が、培養 14 日目には基底層と有棘層の境界から顆粒層にかけて斑状に発現が見られた。CL-3 はいずれの時点でも発現が認められなかった。CL-4 は培養 8 日目では発現は認められなかったが、培養 14 日目、21 日目では顆粒層に発現が認められた。CL-8 は培養 8 日目には細胞間で発現が認められ、14 日目、21 日目では基底層では斑状に、有棘層と顆粒層には層状に強い発現が認められた。また Oc は培養 8 日目には発現は認められなかったが 14 日目、21 日目では顆粒層で発現が認められた。一方、対照とした正常犬皮膚組織においても CL-1, -2, -3, -4, -8, Oc 分子の局在は、培養 14 日以降の培養皮膚組織と同様であった。

以上の結果、培養 14 日目以降の錯角化層まで構築された培養皮膚組織における CL-1, -2, -3, -4, -8 の発現、局在は正常皮膚組織の局在と一致しており、とくに CL-1 は有棘層、顆粒層に強く発現していることが明らかとなった。また三次元皮膚培養組織は *in vitro* における皮膚バリア機構の評価に有用なモデルと考えられた。

第三章 CL-1 ノックダウンの培養皮膚組織におけるバリア機能

マイクロ RNAi システムを用い CL-1 をノックダウンした CPEK 細胞の三次元培養皮膚組織 (miR-CL1) における CL 分子の発現をウエスタンブロットならびに免疫染色で検討した。またバリア機能については傍細胞間の電気的なバリア機能の指標として一般的に用いられている Transepithelial electrical resistance (TER) と非極性物質であるデキストラン (MW: 4 kD) の透過性について検討した。対照としては CL-1 をノックダウンする際に用いた vector のみを導入した CPEK 細胞の三次元培養皮膚組織 (miR-Ct) を用いた。

1) CL 分子の発現

培養 8 日目、14 日目、21 日目の miR-CL1 について、CL-1, -2, -3, -4, -8, Oc 分子の発現をウエスタンブロットのデンシトメトリー解析ならびに免疫染色で検討した。CL-1 は培養 8 日目、14 日目、21 日目に発現が認められたが、対照とした miR-Ct における発現に比較して明らかに低下していた (miR-CL1/ miR-Ct 比 : 8 日目 = 0.35、14 日

目= 0.19、21 日目= 0.10)していた。CL-2 は培養 8 日目、14 日目、21 日目の miR-CL1、miR-Ct のいずれにも発現しており、その発現に差は認められなかった。CL-3 は培養 8 日目で共に発現が認められたが、14 日目と 21 日目では発現は確認できなかった。CL-4 は培養 8 日目、14 日目で両者に発現を認めたが、8 日目の miR-CL1 の発現は対照とした miR-Ct と比較して高かった (miR-CL1/miR-Ct 比 : 2.22)。CL-8 の発現は両者共に確認できなかった。

2) Transepithelial electrical resistance : TER 測定

皮膚組織培養 4 日目、8 日目、14 日目、21 日目の miR-CL1 について TER を測定した。また単層培養時の miR-CL-1 についても検討した。なお単層培養時の比較対照として犬腎株化細胞 (MDCK 細胞) を同様の方法で CL-1 をノックダウンした MDCK miR-CL1 とベクターのみを導入した MDCK miR-Ct についても検討した。培養 4 日目、8 日目、14 日目、21 日目の miR-CL1 と miR-Ct の TER に有意な差は認められなかった。一方、単層培養時の miR-CL1 ならびに miR-Ct についても差は観察されなかったが、MDCK mRi-CL1 ($16.83 \pm 6.66 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$) は MDCK mRi-Ct ($493.7 \pm 1.818 \text{ } \Omega/\text{cm}^2$) と比較して有意な低値を示した ($P < 0.0001$)。

3) dextran の透過性

三次元培養 8 日目の miR-CL1 の dextran の透過性を検討したところ、miR-Ct と差は認められなかった。また単層培養時においても両者に差は認められなかった。単層培養時の MDCK miR-CL1 と MDCK miR-Ct においても両者に差は認められなかった。

以上の結果、培養皮膚組織においては CL-1 は電氣的なバリア機能ならびに非極性の溶質の透過性には影響しないと考えられた。また単層培養では CL-1 は MDCK 細胞については電氣的なバリア機能に関与するものの、CPEK 細胞では関与していないと考えられた。

以上のことから、犬の CL ファミリー分子は組織によって様々な発現パターンを持ち、CL-1 は特に皮膚の有棘層に強く発現することが明らかとなった。また、三次元培養皮膚組織は *in vitro* における皮膚バリア機構の評価に有用なモデルと考えられた。さらに CL-1 ノックダウンで犬腎株化細胞の単層培養で電気抵抗が有意に低下するのに対し、皮膚ケラチノサイトでは影響がないことから、CL-1 は少なくとも皮膚の電氣的バリア一機能には関与していないことが明らかとなった。