

報道関係各位

2019年1月24日

国立大学法人 東京医科歯科大学

「上皮組織のバリア機能を非侵襲かつ選択的に評価する新規手法を開発」 — タイトジャンクションを標的とした薬剤開発や組織工学での評価応用に期待 —

【ポイント】

- 上皮細胞¹どうしを密着させるタイトジャンクション²の破綻を選択的・高感度に測定する技術の開発は、再生組織の機能評価や創薬スクリーニング、薬物送達系³の開発において重要です。
- 本研究では、細胞微小環境における水素イオンの“動き”をトランジスタで計測することで、タイトジャンクションの破綻を非侵襲かつ選択的・高感度・簡便に検出することに成功しました。
- 従来、困難であった上皮バリア機能の非侵襲・選択的・高感度な評価の実現は、がんや発生に関わる上皮アダプテーション⁴機構の解明や Organ-on-Chips⁵による毒性検査応用が期待されます。

東京医科歯科大学生体材料工学研究所の合田達郎助教、宮原裕二教授らの研究グループは、上皮タイトジャンクションによるバリア機能を選択的に計測する新たな電気化学的手法を開発しました。この研究は、中谷医工計測技術振興財団「開発研究助成」、立石科学技術振興財団「研究助成(A)」、神奈川県立産業技術総合研究所(KISTEC)などの支援のもと遂行され、その研究成果は、国際学術雑誌 *Analytical Chemistry* (アナリティカル ケミストリー)に、2018年12月31日にオンライン版で発表されました。

【研究の背景】

細胞間接着は多細胞生物にみられる共通の構造であり、特に、体表面や臓器表面を構成する上皮(内皮)細胞においては、「タイトジャンクション(TJ)」と呼ばれる強固な細胞-細胞間接着が存在します(図1)。これにより、組織表面は頂端部側と基底部側とに厳密に隔てられ、物質の吸収・分泌が可能になります。組織のバリア機能を担うTJは、化学毒物や生物毒素の暴露によって破綻し、重篤な症状を招きます。また、発生の過程や、炎症、細胞のがん化によってもTJは消失します。さらに、TJの異常によって、免疫障害、炎症、潰瘍などが引き起こされることが明らかになっています。このように、TJのバリア機能を計測することは、様々な分野でニーズがあります。

従来、TJバリア性を測る手法として、“経上皮電気抵抗法(TEER)”と“透過率法”があります。前者は、微弱な交流電場を上皮シートに加えた際のインピーダンス(電気抵抗)を計測するものであり、後者は、低分子蛍光マーカーなどの色素が上皮シートを透過した率を計測するものです。これらの手法は標準的に使用されている

ものの、以下に示す問題点が存在します。①TJ のバリア機能を選択的に計測できない、②細胞シートの凹凸といった形状の影響を受ける、③細胞シートの局所的な変化を検出できない、④バリア機能の急速な喪失といった素早い変化を捉えられない。したがって、これらの課題を解決する新しい測定手法の開発が求められていました。

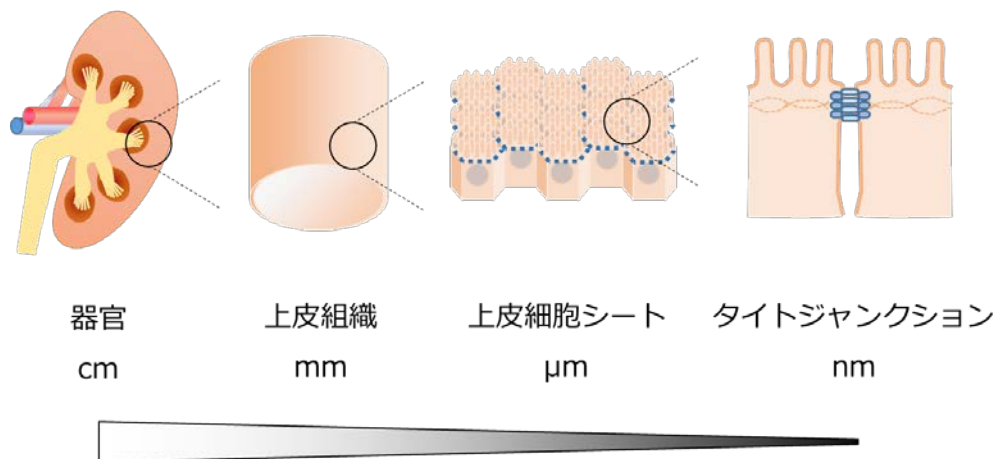


図1. 上皮生体組織の階層性と大きさを表した模式図。

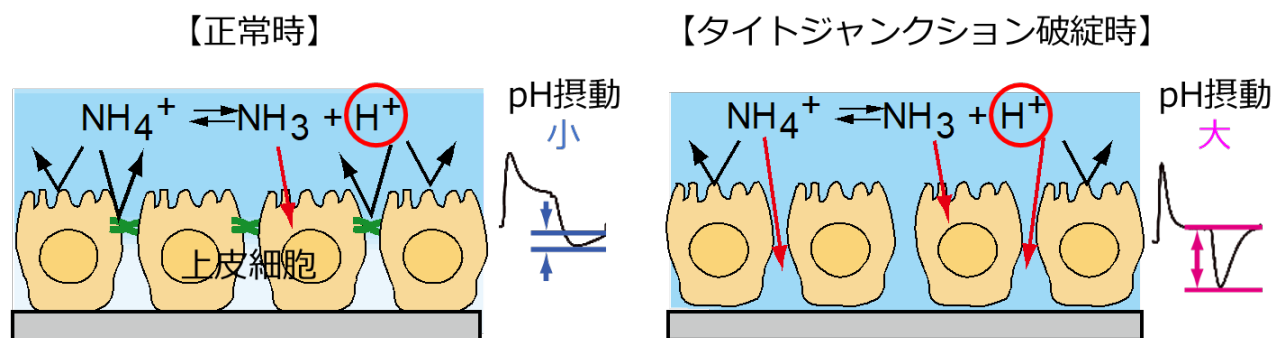


図2. pH 摂動によるタイトジャンクションの評価。正常な上皮シートと TJ 破綻時の上皮シートの模式図。

【研究成果の概要】

水素イオン(H^+)は、直径 0.1 ナノメートル程度の大きさであり、世の中に存在する分子のなかで最小の分子ですが、正常な TJ に対しては容易に通過できません。我々はこの性質に着目し、TJ での水素イオンの“動き”を電気化学的に計測することによって上皮バリアの破綻を検出する新しい方法を開発しました。上皮細胞シート近傍での水素イオン濃度(pH)を正確に測定するために、既存の pH センサーであるイオン応答性電界効果トランジスタ(ISFET)⁶上に、直接、上皮細胞を培養しました。細胞の代謝にともなう緩やかな pH 変動の影響を受けないようにするために、細胞毒性のない塩化アンモニウムを外部刺激として加えた際の pH の過渡的な変動(pH 摂動)から、TJ バリアの破綻を非侵襲かつ選択的に評価できることを見出しました(図2)。原理証明実験として TJ を形成する／しない細胞を用いて、TJ を解消させる化合物を細胞に作用させたところ、TJ 形成細胞においてのみ特徴的な変化が見られました。一方、従来法である TEER 法では、TJ を形成しない細胞においてもインピーダンスの変化が観測されました。次に、TJ に特異的に作用する生物毒素であるウェルシュ菌エンテ

ロトキシン(CPE)を用いて上皮バリアを破綻させたところ、我々の手法は、TEER 法と比べて 10 倍以上の検出感度の向上に成功しました。

【研究成果の意義】

TJ は上皮／内皮組織に広く発現している生物学的に重要な細胞間接着形態であることから、その破綻を非侵襲かつ選択的・高感度・簡便に検出する本手法は、基礎・応用の両方で利用価値が高いと考えられます。例えば、上皮間葉転換(EMT)にみられるように、上皮細胞は炎症やがん化といった様々な要因でその形質を適用させることが知られています。したがって、細胞間バリアの消失といった組織の機能変化がどのような分子生物学的なイベントと関連しているかを明らかにすることによって、様々ながんや病気の機構解明および治療法の開発に役立つと考えられます。また、応用面では、Organ-on-Chips やオルガノイド⁷ 培養系と本評価系を組み合わせることで、動物実験代替的な毒性評価や微生物感染実験、薬物送達キャリア分子の開発が可能になると見込まれます。それ以外にも、組織工学的に再建された組織や臓器(の一部)の機能評価や品質管理にも本手法を用いることが期待されます。さらに、pH センサーとして使用された半導体デバイスは、小型化・高集積化が容易であることから、高スループットな TJ 標的創薬スクリーニング応用への道が開かれます。

【用語の説明】

上皮細胞¹: 多細胞生物において、各器官の内外の表面などをシート状にびっしりと隙間なく配列している細胞で、お互いどうしが強固に接着することで仕切りとしての役割をもちます。上皮細胞は、皮膚、あるいは小腸や血管、リンパ管、尿管、呼吸器等の内壁に存在し、その頂端面と基底面に差異(極性)があることで、物質の吸収や分泌が可能になります。

タイトジャンクション(TJ)²: クローディンやオクルーディン、トリセルリン等からなる複合タンパク質構造体であり、細胞骨格に裏打ちされた状態で上皮細胞どうしの隙間をジッパーで閉じるようにして存在します。密着結合とも呼ばれ、様々な分子が細胞間を自由に透過するのを防ぐバリア機能を示すばかりでなく、特定の分子やイオンのみを選択的に輸送するチャネルとしての機能も有します。近年、これらのタンパク質の立体構造が同定され、新たな薬剤ターゲットとして注目されています。

薬物送達系³: ドラッグデリバリーシステム(DDS)とも呼ばれるナノテクノロジーを駆使した次世代の製剤技術で、疾患のある臓器や組織に対し、必要な量の薬物を必要な時間のみ作用するように調節することで、副作用を減らそうとする試みのこと。

上皮アダプテーション⁴: 細胞生物学や病態生理学において、周囲の環境変化に適応して上皮細胞がその構造や性質を変容させること。ストレスに応じて、恒常性の維持や組織再生などの良い作用を示すばかりでなく、繊維症や腫瘍形成を誘発したりもする。

Organ-on-Chips⁵: 微小流路細胞培養チップで構成された臓器の機能を体現する素子。将来、動物実験に代わり、ヒト細胞のチップを用いて医薬品の有効性と安全性の評価を行うといった応用が期待される。

イオン応答性電界効果トランジスタ(ISFET)⁶: 水素イオンやナトリウムイオンなど、液中の特定イオンに選択的に応答し、その濃度に対応した電気化学的な電位(電圧)を発生・検知する半導体デバイスを指します。通常の

電界効果トランジスタとは異なり、ゲート電極の代わりに金属酸化物からなるゲート絶縁膜、あるいはイオン感応膜を塗布したゲート絶縁膜を直接溶液に浸し、その界面で発生する電位あるいはドレイン・ソース間の電流値からイオン濃度を算出します。

オルガノイド⁷⁾:試験管内で作られた臓器のような三次元構造と機能を示す細胞塊を指す。オルガノイドは、組織細胞や ES 細胞、iPS 細胞が三次元培養化で自己複製と分化を繰り返し、自己組織化により形成される。実際の臓器よりも小型かつ単純な構造をもつ。

【論文情報】

掲載誌: Analytical Chemistry

論文タイトル: Induced Proton Perturbation for Sensitive and Selective Detection of Tight Junction Breakdown

【研究者プロフィール】

合田 達郎 (ゴウダ タツロウ) Goda Tatsuro

東京医科歯科大学

バイオエレクトロニクス分野 助教

・研究領域

バイオセンサ、バイオインターフェース



【問い合わせ先】

<研究に関すること>

東京医科歯科大学 学生体材料工学研究所 バイオエレクトロニクス分野

助教 合田 達郎(ゴウダ タツロウ)

教授 宮原 裕二(ミヤハラ ユウジ)

TEL: 03-5280-8097 FAX: 03-5280-8135

E-mail: goda.bsr@tmd.ac.jp

<報道に関すること>

東京医科歯科大学 総務部総務秘書課広報係

〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

TEL: 03-5803-5833 FAX: 03-5803-0272

E-mail: kouhou.adm@tmd.ac.jp