

腸管上皮クローデインバリアに着目した 食物アレルギーリスク評価系の開発

渡利 彰 浩

大阪大学大学院薬学研究科生体機能分子化学分野 助教

緒 言

輸入食品の増加、遺伝子組換え食品の開発、機能性食品の需要拡大など国民の食環境は大きく変化し、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り、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年間の長期に亘ること、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法の確立は急務となっている。また、国際的な流通網の発達により、食の安全性確保は全世界の課題であることは言うまでもないが、食料の約6割を輸入に頼り地産地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我が国において最重要課題と言える。しかしながら、食品添加物の安全性試験に関しては一部の既存添加物に関

して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確保に繋がるレギュラトリーサイエンスの科学的知見は著しく不足しているのが現状である。とりわけ、食物アレルギー誘因性は一部の食品添加物に関してのみ直接的な免疫活性化能が知られているだけで、腸管免疫組織パイエル板 (PP) 上皮細胞バリアの分子基盤に着目した解析ははまだ皆無である。

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。一方、食品および食品を加工する際に用いられる添加物によりTJシール機能が破綻すれば、食物アレルギーの誘因となりうる (図1)。しかしながら、いまだTJシール機能に着目した食物ア

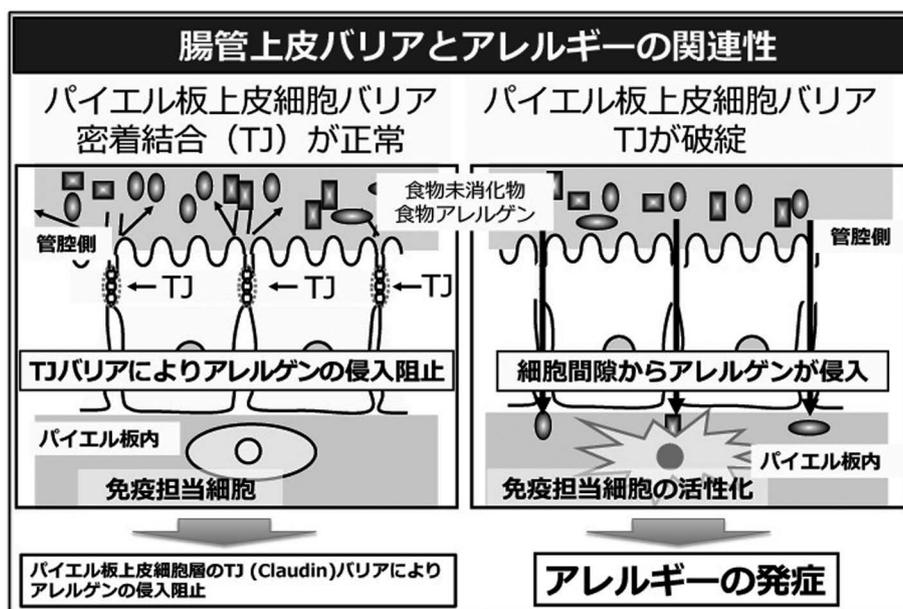


図1 腸管上皮腸管上皮バリアと食物アレルギーの関連性

レルギーリスク評価系の構築は皆無である。

PPを覆う腸粘膜上皮細胞層に存在するTJにおいて、中心的な役割を担っているのが膜タンパク質claudin (CLDN)である。CLDNは分子量~23 kDaの4回膜貫通蛋白質であり、現在までに27種類の分子種が見出されている¹⁾。さらにCLDNの発現およびバリア機能には組織特異性が知られており、腸管上皮バリアではCLDN-1, -4, -5がバリアを強める作用、CLDN-2がバリアを弱める作用を有している。つまり、腸管上皮細胞においてCLDN-1, -4, -5の発現低下、もしくはCLDN-2の発現上昇が引き起こされると腸管バリア機能が破綻し、腸管内から非特異的に物質が流入することで食物アレルギーが惹起されると考えられる。これらの腸管上皮バリア制御機構に着目し、筆者はすでにCLDN-4バリア制御活性解析系を確立しており²⁾、バリア制御活性を有する食品添加物の同定に成功している。本研究では、腸管での炎症により発現上昇が認められるCLDN-2 (バリアを弱める作用を有する)に着目し、CLDN-2バリア制御活性を示す食品添加物の迅速かつ簡便なスクリーニングシステムを構築することで、腸管上皮CLDNバリアを指標にした食物アレルギーリスク評価系の構築を目指した。

実験方法

1. CLDN-2の転写調節領域の決定

CLDN-2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。CLDN-2のゲノム領域周辺で進化的に保存されている領域として、CLDN-2転写開始点を含む約1000 bpの領域をCLDN-2プロモーター領域とした。

2. CLDN-2レポーター遺伝子発現ベクターの作製

CLDN-2プロモーター領域下にルシフェラーゼ遺伝子を搭載したCLDN-2レポーター遺伝子ベクターとしてpGLCLDN2pを作製した。ヒト腸管上皮細胞株であるCaco-2細胞から細胞DNAを精製し、PCR法によりCLDN-2プロモーター領域をクローニングした。作製したベクターは制限酵素解析とシーケンス解析を行うことでpGLCLDN2pを得た。

3. ルシフェラーゼアッセイ

HT29細胞を96 wellプレートに播種し、CO₂インキュベータにおいて培養した。翌日、培養液を除去し、PBS 100 μ Lで2回washした後、ピッカジーンLT 2.0 (東洋インキ)を100 μ L/well加え、30分間室温にてshakerに

かけた。その後、発光量をTristar LB 941 (ベルトールド)により測定した。

結 果

1. CLDN-2プロモーター領域のクローニング

CLDN-2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、CLDN-2の発現調節領域を決定した。本プログラムによりCLDN-2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、CLDN-2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、CLDN-2転写開始点の周辺約1000 bpにおいて保存領域を確認した。続いて、CLDN-2プロモーター領域における転写因子の結合モチーフを調べた結果、AP-1やE-boxモチーフが存在することが認められた。そこで、Caco-2細胞から細胞DNAを精製し、このDNAを鋳型としてPCRによりCLDN-2プロモーター領域を増幅した。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CLDN-2プロモーター領域を挿入することでCLDN-2レポーター遺伝子を作製した。

CLDN-2レポーター遺伝子を安定的に発現した細胞を作製するため、ヒト結腸腺癌細胞株HT29にレポーター遺伝子を導入し、薬剤選択を行うことでCLDN-2レポーター遺伝子を発現させた細胞を21クローン単離した。中でも比較的ルシフェラーゼ活性の高い細胞株を選択し、以下の実験に用いた。

2. Snailを用いたCLDN-2レポーター遺伝子の検討

CLDN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CLDNの発現抑制因子として多くの報告が存在する³⁾。Snailは上皮間葉転換 (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CLDNファミリーも含まれ、SnailはCLDN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³⁾。そこで、CLDN-2レポーター遺伝子がSnailにより誘導されるCLDN-2の発現抑制作用をモニターできるかを検討した。まず、Snailが誘導するCLDN-2の発現変化をHT29細胞において検証した。HT29細胞にSnail遺伝子を発現させ、CLDN-2の発現をリアルタイムPCRにより検討した。その結果、snail発現量依存的なCLDN-2発現の低下が

確認された(図2A)。続いて、Snailが誘導するCLDN-2の発現低下をCLDN-2レポーター遺伝子がモニターできるかを検討した。HT29/CLDN2p細胞にsnail遺伝子を導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した結果、Snail発現量依存的なルシフェラーゼ活性の低下が確認された(図2B)。以上の結果から、作製したCLDN-2レポーター遺伝子はSnailが誘導するCLDN-2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。

3. TNF- α を用いたCLDN-2レポーター遺伝子の検討

Tumor Necrosis Factor (TNF)- α は食物アレルギー発症時に上昇する炎症性サイトカインの一つであり、CLDN-2の発現上昇を誘導することが知られている⁴⁾。そこで、TNF- α のような生理的な刺激によるCLDN-2の発現変化を、作製したCLDN-2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、TNF- α が誘導するCLDN-2の発現変化をHT29細胞において確認した。HT29細胞に様々な濃度のTNF- α を添加し、CLDN-2の発現量をリアルタイムPCRにより検討した。その結果、TNF- α の濃度依存的にCLDN-2の発現が上昇することが確認された(図3A)。次に、TNF- α が誘導するCLDN-2の発現上昇をCLDN-2レポーター遺伝子がモニターできるかを調べた。HT29/CLDN2pにTNF- α を添加した後、ルシフェラーゼ活性を測定した結果、TNF- α の添加量依存的にルシフェラーゼ活性が上昇することが確認された(図3B)。以上の結果から、作製したCLDN-2レポーター遺伝子はTNF- α により誘導される生理的なCLDN-2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。

以上の結果より、作製したCLDN-2レポーター遺伝子は、snailやTNF- α によるCLDN-2の発現調節と関連し

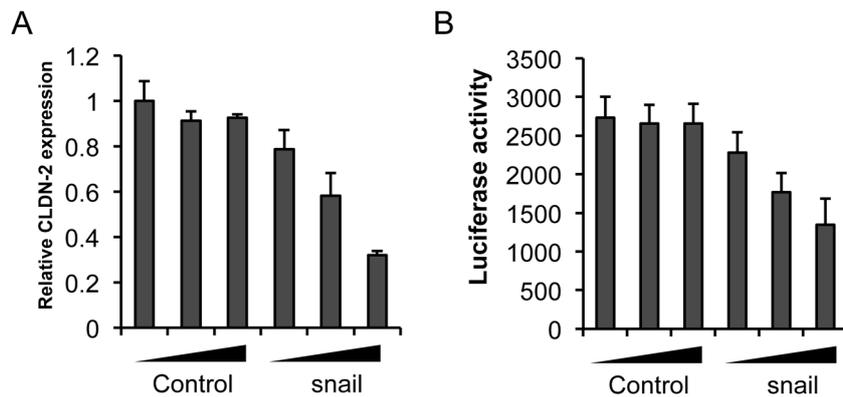


図2 Snail遺伝子発現によるCLDN-2レポーターシステムの評価

A. Snail発現量依存的にCLDN-2発現が低下した。CLDN-2遺伝子発現はリアルタイムPCRにより評価した。B. Snail発現量依存的にCLDN-2レポーター活性が低下した。

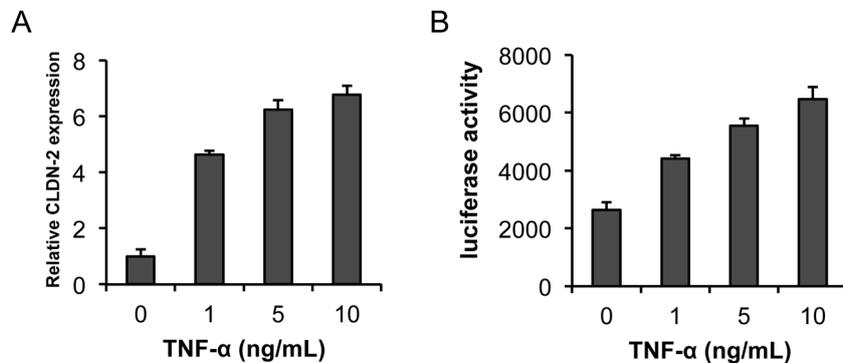


図3 TNF- α によるCLDN-2レポーターシステムの評価

A. TNF- α 添加量依存的にCLDN-2発現が上昇した。CLDN-2遺伝子発現はリアルタイムPCRにより評価した。B. TNF- α 添加量依存的にCLDN-2レポーター活性が上昇した。

たレポーター活性を示したことから、CLDN-2のレポーター遺伝子として妥当であると判断した。

4. CLDN-2発現制御因子のスクリーニング

樹立したHT29/CLDN2p細胞がより広範なCLDN-2発現制御因子によるCLDN-2発現変動をモニターできるかどうかを確かめるため、2430種の化合物ライブラリーからCLDN-2発現変動を誘導する化合物のスクリーニングを試みた。その結果、複数のCLDN-2発現制御化合物の同定に成功した。

考 察

本研究ではCLDN-2バリアに影響を及ぼす可能性のある食品添加物の迅速かつ簡便なスクリーニングシステムを構築することを目指し、CLDN-2発現モニター細胞の樹立を試みた。進化的に保存されたCLDN-2プロモーター領域をクローニングし、本領域におけるCLDN-2発現モニタリング能をCLDN-2発現低下活性を有するsnailおよびCLDN-2発現亢進作用を有するTNF- α を利用して検証した。その結果、両者によるCLDN-2発現制御活性と相関したレポーター活性を示すことが明らかとなったことから、確立したCLDN-2レポーターシステムによりCLDN-2発現がモニター可能であると判断した。続いて、より広範にCLDN-2発現に影響を及ぼす因子のモニタリングに対応可能かを検討するため、2430種の化合物ライブラリーを利用し、CLDN-2発現に影響を及ぼす化合物のスクリーニングを行った結果、新規のCLDN-2発現制御化合物の同定に成功することができた。この結果は、本CLDN-2発現レポーターシステムがCLDN-2発現に影響を及ぼす未知の因子が同定可能であることを示している。したがって、本システムを利用することで、CLDN-2の発現変動を誘発する可能性のある食品添加物の同定が可能であると考えられる。

本研究は、現在の食品において必要不可欠な食品添加

物の腸管上皮バリアへの影響を包括的なCLDNバリア活性を指標に評価する系を構築しようとするものであるが、本評価系は、食品添加物による食物アレルギー誘因性評価系としての側面のみならず、遺伝子組換え食品成分、有害微生物、カビ毒素、残留農薬、残留性金属・有機化合物（食品製造工程で使用する機器成分等）など食品中に含まれる可能性のあるあらゆる物質による腸管上皮バリアへの影響を検知できる評価系となりうる発展性を秘めている。したがって、本研究において開発を試みた食物アレルギーリスク評価系は次世代の食品の安全性を確保するためのリスク管理・評価に向けたレギュラトリーサイエンス確立に資するものと考えられる。

要 約

本研究は、腸管での炎症により発現上昇が認められるCLDN-2に着目し、CLDN-2バリア制御活性を示す食品添加物の迅速かつ簡便なスクリーニングシステムとしてCLDN-2レポーターシステムを構築し、本システムによりこれまでCLDN-2発現制御能が未知であった因子を同定することに成功した。本システムを利用することで、CLDN-2の発現変動を誘発する可能性のある食品添加物の同定が可能であると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりご支援を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深謝いたします。

文 献

- 1) A. Tamura, S. Tsukita: *Semin. Cell Dev. Biol.*, **36**, 177–185, 2014.
- 2) A. Watari et al: *BBRC*, **426**(4), 454–460, 2012.
- 3) F. Carrozzino, et al: *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **289**(4), C1002–C1014, 2005.
- 4) Y. Amoozadeh et al: *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **309**(1), C38–C50, 2015.