

氏 名	まる やま まさと 丸 山 正 人
学位の種類	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 548 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	極性を有する上皮細胞のインターフェロン遺伝子導入後の分泌方向性に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 高倉喜信 教授 乾 賢一 教授 橋田 充

### 論 文 内 容 の 要 旨

上皮細胞は体表面積の大部分を占めており、薬物投与経路として最も簡便な部位である。しかしながら、病原微生物や異物の侵入に対する強力な物理的、酵素的バリアー機能を持つため、遺伝子組み換えタンパク質医薬品の投与は大きく制限されている。このような問題を解決できる有用なアプローチの1つとして、上皮細胞にサイトカインなどの分泌性生理活性タンパク質をコードした治療用遺伝子を導入・発現させる試みが考えられる。この方法を用いて極性を有する上皮細胞からタンパク質を方向選択的に分泌させることができれば、タンパク質医薬品の局所あるいは全身循環へのデリバリーが可能になると考えられる。しかしながら、タンパク質の分泌方向性を支配するメカニズムを含め分泌現象自体に関する基礎情報は極めて乏しいのが現状である。そこで著者は、多様な生物活性を有するインターフェロン (IFN) をモデルに取り上げ、極性を有する上皮細胞へ遺伝子導入後、発現させた IFN の方向選択的デリバリーを検討することを目的に、種々の培養上皮細胞における分泌方向性、クラゲ緑色蛍光タンパク (green fluorescent protein: GFP) との融合タンパクを用いた細胞内動態解析及び分泌方向性を支配するメカニズムについて検討した。

#### I. 各種上皮細胞への IFN 遺伝子導入後の分泌方向性の検討

IFN の分泌方向性を系統的に調べるため、マウス皮膚癌上皮細胞 Pam-T, ヒト大腸癌上皮細胞 Caco-2, イヌ腎上皮細胞 MDCK type I, type II 及びブタ腎臓上皮細胞株 LLC-PK<sub>1</sub> 細胞, 合計 5 種類の IFN 安定発現細胞を作製し、分泌方向性を示した。その結果、いずれの安定性発現細胞においてもヒト IFN- $\beta$  は、頂側膜 (apical) 側あるいは基底膜 (basal) 側へ偏ることなく両方向へほぼ均等に分泌された。一方、カチオン性リポソームとヒト IFN- $\beta$  遺伝子との複合体を用いて、細胞層の apical 側及び basal 側から導入し、一過性に実現させた IFN の分泌方向性を検討したところ、Pam-T, Caco-2, MDCK type I 細胞で発現した IFN を両方向へ分泌する Pam-T 安定発現細胞に対して、apical 及び basal 側からマウス IFN 遺伝子を導入した場合、両方向へ均等に分泌されるヒト IFN の分泌方向性に影響を与えることなく、マウス IFN は導入方向選択的に分泌された。以上の結果より、異なる様式で発現させた IFN は導入方向選択的に分泌された。以上の結果より、異なる様式で発現させた IFN は、同一タンパク質であるにも関わらず、異なる分泌方向性を示すことが明らかとなった。また、この現象は、カチオン性リポソームによる細胞への刺激に対する反応でないことも確認された。

#### II. ヒト IFN- $\beta$ /GFP 融合タンパク質 (HuIFN $\beta$ -GFP) を用いた細胞内局在解析

前章より、特定の上皮細胞では、安定及び一過性に発現した IFN は、分泌方向性が異なることを明らかにした。そこで、IFN の異なる分泌方向性が、細胞内のいずれの部位において生じるかを解明することを目的に、GFP とヒト IFN- $\beta$  との融合タンパク質ベクターを作製し、MDCK type I 細胞に発現させた融合タンパク質の細胞内局在を可視化した。その結果、いずれの場合においても発現させた IFN は、細胞内のゴルジ体/トランスゴルジネットワーク (TGN) に局在した。また、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドと、新たなタンパク質を選別輸送の中心的なオルガネラである TGN に蓄積させる 20°C 低温処理とを組み合わせることで、TGN 以降の小胞輸送過程について検討した。その結果、安定及び一過性に発現し

たIFNは、TGN以降、それぞれ異なる小胞輸送系により運ばれるものと推察された。以上の結果より異なる様式で発現させたIFNは、小胞体で合成後、ゴルジ体/TGNまで見かけ上選別を受けることなく輸送され、TGNにおいて選別を受けた後、遺伝子発現様式に依存した異なる分泌経路を介して輸送される結果、最終的な分泌方向性が異なる可能性が示された。

### Ⅲ. 上皮細胞におけるIFNのapical優先的

近年、極性を持った上皮細胞のapical側へのタンパク質輸送に、コレステロールがスフィンゴ脂質と会合して形成された膜ドメイン、ラフトが関与することが多数報告されている。そこで本章では、MDCK細胞に発現させたIFNのapical優先的な分泌に、ラフト依存的な輸送が関与する可能性を検討した。まず、メチル- $\beta$ -シクロデキストリン (M $\beta$ CD) 処理によるコレステロール除去の分泌方向性に与える影響を検討した。その結果、M $\beta$ CD処理により、IFNのapical優先的な分泌方向性にはほとんど差が見られなかった。このときの細胞層の状態を調べた結果、M $\beta$ CD処理により、コレステロール含量の低下のみならず、上皮細胞層の電気抵抗の低下及びタイトジャンクションの部分的な消失も認められた。細胞膜を界面活性剤 Triton X-100 で処理し、不溶性の成分を密度勾配遠心法で分画すると、ラフトに存在するタンパク質は軽い浮遊性画分に濃縮されることが知られている。そこで、さらに詳細にラフトとの関わりを調べるため、Triton X-100 に細胞を溶解させ、ショ糖密度勾配遠心を行った結果ラフトに存在することが知られている caveolin-1は、軽い浮遊性画分に検出されるのに対し、安定及び一過性に発現したIFNは、総タンパク質と同様、密度の高い画分に検出された。以上より、MDCK細胞に発現させたIFNの分泌方向性には、ラフト非存在的な輸送経路が関与している可能性が示された。

以上の著者は、未だ徐放の乏しい上皮細胞におけるタンパク質の分泌方向性について多角的に検討し、分泌性生理活性タンパク質発現後の方向性に関する基礎的情報を得た。制御するための有用な知見となるものと考えた。

## 論文審査の結果の要旨

上皮細胞は体表面積の大部分を占めており、薬物投与経路として最も簡便な部位である。しかしながら、病原微生物や異物の侵入に対する強力な物理的、酵素的バリアー機能を持つため、遺伝子組み換えタンパク質医薬品の投与は大きく制限されている。このような問題を解決できる有用なアプローチの1つとして、上皮細胞にサイトカインなどの分泌性生理活性タンパク質をコードした治療用遺伝子を導入・発現させる試みが考えられる。この方法を用いて極性を有する上皮細胞からタンパク質を方向選択的に分泌させることができれば、タンパク質医薬品の局所あるいは全身循環へのデリバリーが可能になると考えられる。しかしながら、タンパク質の分泌方向性を支配するメカニズムを含め分泌現象自体に関する基礎情報は極めて乏しいのが現状である。そこで著者は、多様な生物活性を有するインターフェロン (IFN) をモデルに取り上げ、極性を有する上皮細胞へ遺伝子導入後、発現させたIFNの方向選択的デリバリーを検討することを目的に、種々の培養上皮細胞における分泌方向性、クラゲ緑色蛍光タンパク (green fluorescent protein: GFP) との融合タンパクを用いた細胞内動態解析及び分泌方向性を支配するメカニズムについて検討した。

IFNの分泌方向性を系統的に調べるため、マウス皮膚癌上皮細胞Pam-T、ヒト大腸癌上皮細胞Caco-2、イヌ腎上皮細胞MDCK type I, type II及びブタ腎臓上皮細胞株LLC-PK<sub>1</sub>細胞、合計5種類のIFN安定発現細胞を作製し、分泌方向性を示した。その結果、いずれの安定発現細胞においてもヒトIFN- $\beta$ は、頂側膜 (apical) 側あるいは基底膜 (basal) 側へ偏ることなく両方向へほぼ均等に分泌された。一方、カチオン性リポソームとヒトIFN- $\beta$  遺伝子との複合体を用いて、細胞層のapical側及びbasal側から導入した場合にはbasal側へ優先的に分泌され、遺伝子導入方向選択的な分泌が起こることが示された。さらにヒトIFNを両方向へ分泌するPam-T安定発現細胞に対して、apical及びbasal側からマウスIFN遺伝子を導入した安定発現細胞に対して、apical及びbasal側からマウスIFNを遺伝子導入した場合、両方向へ均等に分泌されるヒトIFNの分泌方向性に影響を与えることなく、マウスIFNをは導入方向選択的に分泌された。以上の結果より、異なる様式で発現させたIFNは導入方向選択的に分泌された。以上の結果より、異なる様式で発現させたIFNは、同一タンパク質であるにも関わらず、異なる分泌方向性を示すことが明らかとなった。また、この現象は、カチオン性リポソームによる細胞への刺激に対する反応でないことも確認された。

前章より、特定の上皮細胞では、安定及び一過性に発現したIFNは、分泌方向性が異なることを明らかにした。そこで、IFNの異なる分泌方向性が、細胞内のいずれの部位において生じるかを解明することを目的に、GFPとヒトIFN- $\beta$ との融

合タンパク質ベクターを作製し、MDCK type I 細胞に発現させた融合タンパク質の細胞内局在を可視化した。その結果、いずれの場合においても発現させたIFNは、細胞内のゴルジ体/トランスゴルジネットワーク (TGN) に局在した。また、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドと、新たなタンパク質を選別輸送の中心的なオルガネラであるTGNに蓄積させる20℃低温処理とを組み合わせることで、TGN以降の小胞輸送過程について検討した。その結果、安定及び一過性に発現したIFNは、TGN以降、それぞれ異なる小胞輸送系により運ばれるものと推察された。以上の結果より異なる様式で発現させたIFNは、小胞体で生合成後、ゴルジ体/TGNまで見かけ上選別を受けることなく輸送され、TGNにおいて選別を受けた後、遺伝子発現様式に依存した異なる分泌経路を介して輸送される結果、最終的な分泌方向性が異なる可能性が示された。

近年、極性を持った上皮細胞のapical側へのタンパク質輸送に、コレステロールがスフィンゴ脂質と会合して形成された膜ドメイン、ラフトが関与することが多数報告されている。そこで本章では、MDCK細胞に発現させたIFNのapical優先的な分泌に、ラフト依存的な輸送が関与する可能性を検討した。まず、メチル- $\beta$ -シクロデキストリン (M $\beta$ CD) 処理によるコレステロール除去の分泌方向性に与える影響を検討した。その結果、M $\beta$ CD処理により、IFNのapical優先的な分泌方向性にはほとんど差が見られなかった。このときの細胞層の状態を調べた結果、M $\beta$ CD処理により、コレステロール含量の低下のみならず、上皮細胞層の電気抵抗の低下及びタイトジャンクションの部分的な消失も認められた。細胞膜を界面活性剤 Triton X-100 で処理し、不溶性の成分を密度勾配遠心法で分画すると、ラフトに存在するタンパク質は軽い浮遊性画分に濃縮されることが知られている。そこで、さらに詳細にラフトとの関わりを調べるため、Triton X-100 に細胞を溶解させ、ショ糖密度勾配遠心を行った結果ラフトに存在することが知られている caveolin-1 は、軽い浮遊性画分に検出されるのに対し、安定及び一過性に発現したIFNは、総タンパク質と同様、密度の高い画分に検出された。以上より、MDCK細胞に発現させたIFNの分泌方向性には、ラフト非存在的な輸送経路が関与している可能性が示された。

以上、著者は、未だ徐放の乏しい上皮細胞におけるタンパク質の分泌方向性について多角的に検討し、分泌性生理活性タンパク質発現後の方向性に関する基礎的情報を得た。これらの知見は上皮細胞に発現させた外来遺伝子の方向選択的デリバリーを制御するための有用な知見となるものと考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年2月24日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。