

氏 名	齋 藤 通 紀
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2107 号
学位授与の日付	平成 11 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	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Occludin-deficient Embryonic Stem Cells Can Differentiate into Polarized Epithelial Cells Bearing Tight Junctions (オクルディン欠損マウス胚性幹細胞株はタイトジャンクションを有する極性をもった上皮細胞に分化しうる) (主査) 論 文 調 査 委 員 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 塩 田 浩 平 教 授 月 田 承 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

多細胞生物は、調和のとれた機能を維持するために、様々な上皮細胞層により環境の異なる多くのコンパートメントに仕切られている。上皮細胞層が仕切りとして働くためには、その細胞間が密閉される必要があり、その機能を果たしているのが細胞側面の頂上部に存在するタイトジャンクション (TJ) と呼ばれる細胞接着装置である。電子顕微鏡では、TJは隣接する細胞膜が互いに接する部位として観察され、フリーズフラクチャー法では、その場所に対応して互いに吻合しながら紐状に伸びる膜内粒子構造が認められる。この膜内粒子こそがTJを構成する分子であろうと考えられ、多くの研究者により追及されてきたが、長い間その同定には至らなかった。

我々の研究室は、ニワトリ肝臓より得た細胞間接着装置に富む分画を抗原とすることで、TJを特異的に染色する抗体の作成に成功した。オクルディンと名付けられたこの抗原は遺伝子クローニングの結果4回膜貫通構造をとることが示され、TJの膜内粒子の本体である可能性が強く示唆された。申請者はオクルディンがTJの膜内粒子の本体であるのか、さらにはその細胞及び個体レベルでの機能を明らかにするために、オクルディンのマウスホモログを同定、遺伝子破壊法による機能解析を行った。

オクルディン遺伝子のゲノム構造を決定し、相同組み換えベクターを作成、定法によりマウス胚性幹細胞 (ES細胞) 相同組み換え体を得た。さらに選択薬剤の濃度を上げることで両方のアレルに変異を起こした細胞株 (オクルディン欠損細胞) を単離した。ES細胞は、細菌培養皿の上で浮遊培養すると、自己集合し胎児様の細胞塊 (embryoid body; EB) を形成する。その最外層は極性を持ち、TJを有する上皮細胞に分化する。さらに培養を続けると細胞塊は内部に液体を貯留した緊満な構造 (cystic EB; CEB) に分化する。オクルディン欠損細胞を浮遊培養すると野性型のES細胞と同様、EB、さらには緊満なCEBへと分化した。このことはオクルディン欠損状態でも内部からの静水圧に耐えうる細胞構造が形成されることを示している。次にオクルディン欠損EBに形成される最外層細胞を蛍光抗体法及び電子顕微鏡で観察すると、極性を持った上皮構造をとり、TJを含む細胞接着装置複合体が形成されていることが明らかとなった。さらにフリーズフラクチャー法により、明瞭に発達したTJの紐状膜内粒子構造が観察された。以上の事実から、オクルディン欠損下でも、上皮細胞への分化はおこり、観察しうる限りの方法で形態学的に正常なTJが形成されることが明らかとなった。次に、共焦点レーザー顕微鏡及び免疫電子顕微鏡法により、オクルディン欠損EBにおけるTJの裏打ち蛋白質ZO-1の局在を詳細に検討した。その結果、ZO-1はTJに濃縮していることが示され、ZO-1の局在にオクルディンは必要でないことが示された。最後に、オクルディン欠損TJの細胞間透過性を、ビオチンをトレーサーとして検討した。その結果、オクルディン欠損TJは野性型のTJと同じくビオチンを細胞間に透過させないことが明らかとなった。以上の事実は、オクルディン非存在下でも、バリア機能を有するTJを構成し、ZO-1などの裏打ち蛋白質をTJに局在させうる他の膜蛋白質群が存在していることを示している。TJ機能

の全体像をつかむためには、オクルディン欠損マウスの解析とともに、新規膜蛋白質群の同定、機能解析が必須であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

我々の体を構成する消化管や血管などの管腔構造には、組織内へ異物や体液が自由に透過するのを防ぐ機構が備わっている。逆に言えば、この機構の破綻は、感染や浮腫といった様な病態を引き起こしうる。その機構を担う最も重要な構造が消化管上皮や血管内皮細胞間に存在し、隣り合う細胞の形質膜を互いに接するほどに近づけるタイトジャンクション (TJ) と呼ばれる細胞接装置である。

申請者は、本研究室で同定されたTJに局在する唯一の膜蛋白質オクルディンのマウスホモログの単離に成功、その組織分布といった基礎的な性質を明らかにしてきた。

本研究室では、オクルディンの機能を最も直接的に追及すべく、遺伝子破壊法によりオクルディン欠損細胞株を樹立しその影響を解析した。オクルディン欠損ES細胞株を分化させ、その形態を解析した結果、驚くべき事にオクルディンの全く存在しない状態においても、形態学的に正常なTJを有する、極性を持った上皮細胞が形成されることがわかった。さらに、細胞間トレーサーを用いてオクルディン欠損TJのバリアー機能を定性的に解析したが、その結果も正常なTJと大きな変化はないことが示された。これらの事実はTJにオクルディン以外の膜蛋白質が存在することを示しており、TJが当初考えられていたほど単純な構造体ではないことが明らかとなった。

以上の研究は、タイトジャンクションがオクルディンのみから構成されている単純な構造体ではないことを明らかにし、その後タイトジャンクションを構成する新しい膜蛋白質群クローディンファミリーの同定につながった。この研究によってタイトジャンクションの分子構築及び機能制御に関して新しい視点が開けたと考えられる。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成11年2月18日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。