

氏 名	いけ の うち じゅん いち 池 ノ 内 順 一
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3037 号
学位授与の日付	平 成 19 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	Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. (上皮細胞の3細胞結合 Tricellular Junction に局在する新規4回膜貫通蛋白質 Tricellulin の発見とその機能に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 篠 原 隆 司 教 授 宮 地 良 樹 教 授 塩 田 浩 平

論 文 内 容 の 要 旨

多細胞生物のからだは、上皮細胞のシートによって液体環境の異なる複数のコンパートメントに分けられている。上皮細胞のシートにより分け隔てられた異なる溶液環境間のイオンや小分子の自由拡散を防ぐ機能を上皮細胞のバリア機能と呼ぶ。上皮細胞の間の隙間をシールするメカニズムとして、上皮細胞に特異的な細胞間接着装置であるタイトジャンクション(TJ)が重要である。

今まで TJ については、隣あった2細胞間の TJ (bicellular tight junction, bTJ) について研究が進められてきたが、3つの細胞が接する点(3細胞結合)において、どのようにして2細胞間で対合して形成される TJ が細胞間隙をシールしているか、という点については、長らく問題として認識されてこなかった。1970年台の電子顕微鏡を用いた形態学的な観察から、3細胞結合における TJ (tricellular tight junction, tTJ) は、bTJ ストランドに対して垂直に走行し、深く落ち込んでいることが知られている。また一つの細胞の細胞膜上で、一方の細胞と形成する TJ ストランドともう一方の細胞と形成する TJ ストランドが、3細胞結合において非常に接近し、結果として、3つの細胞の間隙にできる空間を可能な限りゼロにしている。このように tTJ はユニークな構造をとっているが、その分子構築はまったく不明であった。

本研究では上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) という現象に着目して、tTJ を含む、TJ に局在する分子の網羅的なスクリーニングを行った。近年、培養上皮細胞に Snail を強制発現するだけで、EMT を引き起こせることが示された。先行研究として、この培養細胞における EMT の系を用いて、上皮細胞特異的な細胞接着装置である TJ の構成分子であるクローディンとオクルーディンの転写調節領域に、Snail が直接結合し、それらの発現を抑制することを見出した。そこで、本研究では、他の TJ に局在する遺伝子群も同様に、Snail によってその発現が抑制されるのではないかという仮説のもと、Snail によって間葉細胞様に形質転換した上皮細胞と、元の上皮細胞の遺伝子発現を、オリゴヌクレオチドアレイを用いて比較して、上皮細胞が間葉細胞に転換される際に発現の著しく低下する遺伝子群の探索を行った。それらの遺伝子群のなかで、(1)機能が未知のもの、(2)膜タンパク質であると予想されるものについて、cDNA 全長をクローニングし、GFP との融合タンパク質を細胞内で作らせて、その局在を指標にスクリーニングを行った。その結果、3細胞結合に局在する新規膜タンパク質トリセルリン Tricellulin が同定された。

トリセルリンは、555アミノ酸 (Mw=66Kd) からなる4回膜貫通タンパク質で、カルボキシル末端側の細胞質領域は、オクルーディンと弱い相同性を示す。発現は広く上皮細胞に認められ、蛍光抗体法および藤本法によって、トリセルリンは上皮細胞の tTJ に濃縮していることが確かめられた。またトリセルリンの発現を、shRNA を用いて恒常的に抑制した上皮細胞においては、tTJ の構築が障害されているのみならず、bTJ におけるオクルーディンの染色がコントロールの細胞に比べて脆弱になり、バリア機能が低下していた。

以上の研究は、3細胞結合に特別なタンパク質が濃縮して存在していることを示す初めての研究であり、3細胞結合におけるバリア機構という新たな問題を提起し、新たなドラッグデリバリー法の開発等に寄与するところが多い。

論文審査の結果の要旨

上皮細胞シートの持つバリア機構の内、3つの細胞が接した点（3細胞結合）の細胞間隙からの物質の漏れがいかに抑えられているかという問題は、これまで全く未解明だった。本学位授与申請者は、先行研究において、タイトジャンクション構成因子グローデインおよびオクルーデインの発現が、転写因子 Snail によって強く抑制されることを見出した。本研究では、他のタイトジャンクション構成分子も Snail によって転写抑制されるという仮説を立て、培養上皮細胞と、Snail 強制発現細胞との遺伝子発現プロファイルを比較し、Snail によって強く発現抑制される遺伝子について、遺伝子産物の細胞内局在を網羅的に調べた。その結果、3細胞結合に局在する新規4回膜貫通タンパク質「tricellulin」を見出した。また、shRNA によるノックダウン実験から、tricellulin が3細胞結合におけるバリア機能に必須であることが示された。

以上の研究は、上皮細胞の持つバリア機能の分子機構解明に貢献し、細胞浸潤、薬剤透過など、医学にとって重要な現象の理解に新たな手掛かりを与えるものである。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18年11月8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。