



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	重層扁平上皮におけるタイトジャンクション関連タンパク (Zonula occludens-1) の分布は上皮ターンオーバー速度に依存する [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	今福, 恵輔
Description	配架番号 : 2678
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14934号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85743
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	IMAFUKU_Keisuke_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 今福 恵輔

学位論文題名

重層扁平上皮におけるタイトジャンクション関連タンパク (Zonula occludens-1) の分布は
上皮ターンオーバー速度に依存する

(The distributions of zonula occludens-1 in stratified squamous epithelium
depend on the turnover interval)

【背景と目的】タイトジャンクション (Tight junction: TJ) は上皮細胞同士を強固に接着する構造の一つであり、多くの分子より形成される。中でも TJ ストランドを形成する claudin ファミリーや細胞内足場タンパクである Zonula occludens (ZO) などは過去に多くの研究がある。過去の文献では MDCK-II に代表されるような単層上皮による研究が主であったが、皮膚や口腔粘膜のような重層扁平上皮、特に頬粘膜についてはほとんど検証されていないため、第一章では頬粘膜の TJ の分布について詳細に解析することを目的とした。第二章では第一章では明らかにされなかった皮膚と粘膜上皮の TJ の相違のメカニズムに迫ることとした。皮膚に対して頬粘膜ではターンオーバー期間が著しく短縮していることが知られている。そこで皮膚に対してターンオーバー速度が加速している乾癬組織、頬粘膜に対してターンオーバー速度が低下している口腔扁平苔癬 (Oral lichen planus: OLP) の組織を用いることで、ターンオーバー期間の違いが ZO-1 の分布を異にするという仮説を検証した。

【材料と方法】第一章: Claudin, occludin, ZO について網羅的に定量的 PCR を行い、どの分子に着目するか決定した。ヒト正常皮膚、正常頬粘膜において蛍光染色やホールマウント染色、水平断切片、電子顕微鏡、超解像顕微鏡を用いて詳細な観察を行った。またビオチン透過アッセイを行い、マウス頬粘膜のバリア機能を評価した。siRNA を用いて特定の分子をノックダウンし、それらが頬粘膜細胞のバリア機能に影響を与えるか transepithelial resistance (TER) 測定や paracellular flux measurement (PFM) を行い検証した。第二章: 頬粘膜及び口腔扁平苔癬、皮膚及び乾癬の組織の ZO-1 染色を比較し、画像解析ソフトを用いて ZO-1 の分布を定量化し、また細胞増殖能を評価するために Ki-67 染色の陽性率を測定した。In vivo でも細胞増殖能を増減させることで頬粘膜の ZO-1 の分布を変化させることができるかの検証を試みた。扁平苔癬は炎症細胞が基底層をターゲットとするため、分裂細胞が減少する。これを再現すべくマイトマイシン C (mitomycin C: MMC) をマウスに腹腔内投与した。また皮膚に対してイミキモドクリーム (imiquimod: IQM) を外用することで乾癬モデルを作成し、再現性があるかを検証した。In vitro でも細胞増殖を促進させることで ZO-1 の発現量やバリア機能に影響があるかを検証した。

【結果】第一章: マウス頬粘膜の qPCR 結果から、claudin-1 をコードする *CLDN1*, ZO-1 をコードする *TJP1* の発現がその他の TJ 構成タンパクをコードする遺伝子よりも高度にみられた。ヒトおよびマウス皮膚では ZO-1 が顆粒層の 1-2 層に分布していたが、頬粘膜では最外層から約 1/3 まで分布していた。正常皮膚では ZO-1 と claudin-1 は顆粒層の 1-2 層で共局在するが、頬粘膜では claudin-1 と粘膜の中層で複数層にわたり共局在していた。また、頬粘膜では ZO-1 は細胞膜の全周ではなく細胞膜の一部に不規則に染色された。ホールマウント染色及び水平断切片作成し ZO-1 染色を行った。皮膚では細胞膜の全体に沈着し、顆粒層細胞の形を反映して六角形構造を呈したが、頬粘膜では細胞膜の全周ではなく、一部線状に染色された。水平断切片では不規則な線状に観察された。Z-stack 画像を撮影し、立体再構成すると、線が途切れているように見えていた領域は、上下の層の細胞膜と連続していた。電子顕微鏡では頬粘膜の中層で TJ と思われる kissing point を認め

た。また超解像顕微鏡ではZO-1のドット状の沈着がclaudin-1と共局在していた。ビオチントレーサーアッセイではclaudin-1の局在する層ではビオチンは細胞間を通過したが、ZO-1が局在する層の下2-3層は通過するものの、徐々にトレーサーの拡散はせき止められた。細胞シート培養を行いTERを測定した。*TJPI*および*CLDN1*ノックダウンは20.3-31.0%のTERの低下を認めた。またPFM測定ではMockの頂端側の蛍光強度と比較して、*TJPI*および*CLDN1*ノックダウンの蛍光強度の有意差はなかった。第二章：上皮全体に対するZO-1の分布は頬粘膜に対しOLPで縮小し、皮膚に対して乾癬で拡大していた。Ki-67陽性細胞数は頬粘膜に対しOLPでは減少し、また皮膚に対して乾癬では増加した。MMCをマウスに腹腔内投与するとMMC投与量に伴い頬粘膜の菲薄化を認めた。DMSO及びMMC10mg/kg投与後のマウス頬粘膜組織では、MMC10mg/kgを投与すると、Ki-67の陽性細胞率が低下した。上皮全体に対するZO-1の分布はDMSOに対し10mg/kg投与群で縮小した。IMQをマウス耳に外用し水平断切片を作成し、ZO-1染色を行うと、vehicleではZO-1が細胞膜上に規則的な六角形構造を呈するが、IMQではZO-1で囲まれる形状が不規則な多角形状に染色された。ZO-1で囲まれる面積はvehicleに対しIMQでは縮小した。また、ZO-1で囲まれる形状の長径に対する短径の割合はvehicleで79%、IMQで59%であった。次にマウスback skinにIMQを外用しKi-67染色を行った。Vehicleに対しIMQではKi-67陽性細胞の増加を認めた。Vehicleでビオチントレーサーは角層直下のZO-1に一致して拡散は止まった。IMQでビオチントレーサーは基底層ないし有棘層の側面を通過し、ZO-1が局在する層を数層通過したが、角層直下付近で拡散は止まった。培養細胞では細胞を播種後、Day3で細胞数を計測するとEGFの濃度依存性に細胞数は増加した。さらに、コントロール群では β -tubulin当たりのZO-1の発現量が多く、EGFを投与するとZO-1の相対的発現割合は減少した。

【考察】第一章：ClaudinはTJストランド形成するタンパクであるが、細胞内足場タンパクであるZOファミリーと強固に結合することでバリア機能を発揮する。そのため、本研究ではZO-1およびclaudin-1が共局在している領域にTJが存在していると考えた。Claudin-1は皮膚及び頬粘膜においておおむね全層に局在しているが、ZO-1の分布範囲は皮膚では顆粒層付近であるのに対し、頬粘膜では最外層から約1/3の深さまで局在していた。それに伴い、claudin-1と粘膜の中層で複数層にわたり共局在していた。ZO-1が細胞膜の全周ではなく途切れるように観察されたが、これはz-stack画像を撮影することで、隣接する細胞の細胞膜へとZO-1が連続していたことが確認できた。これは、頬粘膜は皮膚ほど平坦ではないため、包埋が斜めになっている可能性、複数層のZO-1が同一切片で観察されている可能性が考えられた。ビオチン透過試験や、また、*TJPI*や*CLDN1*単独のノックダウンでわずかにTERの低下を認めているものの、PFMでは蛍光強度に大きな差はなかったことから、*TJPI*や*CLDN1*は他のサブタイプがTJのバリア機能を補完している可能性が考えられた。第二章：細胞増殖能についてはKi-67染色で評価した。MMCの投与により細胞増殖能を減速させ、IMQの外用により細胞増殖能を加速できることを確認した。蛍光染色では頬粘膜及び乾癬では上皮全層に対して広くZO-1が分布し、皮膚及びOLPでは数層にZO-1が分布していた。このためMMC投与によりOLPと同様のTJ分布を、IMQクリーム外用により乾癬と同様のTJ分布を再現できると判断した。In vitroでEGFを用いて細胞増殖を加速させた場合、細胞あたりの相対的ZO-1の発現は定常状態に比べ減少した。これは細胞増殖が加速したため、細胞の全周にZO-1が発現する前に次の層でZO-1が発現しているためと考えられ、水平切片のZO-1染色の結果もこのことを支持している。

【結論】頬粘膜においてはZO-1の分布と蛍光染色が皮膚とは大きく異なり粘膜の外層1/3に不規則な線状構造として存在した。ZO-1の分布の変化は上皮ターンオーバー速度により規定されていた。一方で、TJは複数層にわたり形成されバリア機能は保持されていた。