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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14934
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85879
Type	doctoral thesis
File Information	IMAFUKU_Keisuke.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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)

2022 年 3 月

北　海　道　大　学

今　福　恵　輔

学　位　論　文

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)

2022 年 3 月

北　海　道　大　学

今　福　恵　輔

目　次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1 頁
要旨　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2 頁
略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・6 頁
諸言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7 頁
第一章　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9 頁
　諸言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10 頁
　方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11 頁
　結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20 頁
　考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・40 頁
第二章　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・44 頁
　諸言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・45 頁
　方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46 頁
　結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・48 頁
　考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・71 頁
結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・73 頁
謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・74 頁
利益相反　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・75 頁
引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・76 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した

1. Imafuku K, Kamaguchi M, Natsuga K, Nakamura H, Shimizu H, Iwata H. Zonula occludens-1 demonstrates a unique appearance in buccal mucosa over several layers
   Cell Tissue Res 384, 691-702, 2021.

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. Imafuku K, Iwata H, Natsuga K, Shimizu H:
   The distributions of claudin-1 and zonula occludens-1 in oral mucosa are different from those of skin
   The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Nov. 2019, Aomori, Japan

要　旨

【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である。MDCK-II など単層上皮細胞を用いた研究が主で、皮膚や口腔粘膜のような重層扁平上皮、特に頬粘膜の TJ 研究はほぼない。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発見した皮膚と粘膜上皮における TJ 分布の違いの機序について、皮膚のターンオーバー速度に着目した。正常皮膚のターンオーバーは、40-56 日であるのに対し頬粘膜では 3.2-5.8 日と早い。ターンオーバー期間の異なる皮膚疾患、乾癬（ターンオーバー速度亢進）と扁平苔癬（同低下）で TJ 分布の変化を検証した。

【材料と方法】第一章: TJ 構成タンパクである claudin, occludin, zonula occludens（ZO）について網羅的に qPCR（quantitative polymerase chain reaction）を行った。ヒト正常皮膚、正常頬粘膜においてホールマウントサンプル、水平断切片を用いた免疫蛍光法、電子顕微鏡、超解像顕微鏡を用いて TJ 構成タンパクの観察を行った。またビオチン透過試験を用いてマウス頬粘膜のバリア機能を評価した。siRNA を用いて TJ 構成タンパクをノックダウン（KD）し、バリア機能に与える影響を transepithelial resistance（TER）測定や paracellular flux measurement（PFM）で検証した。

第二章: 正常頬粘膜と口腔扁平苔癬（oral lichen planus, OLP)、正常皮膚と乾癬組織に対して抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光法を行い、画像解析ソフトで分布を定量化した。各組織の細胞増殖能を Ki-67 陽性率で評価した。マウスで細胞増殖能を増減させることで ZO-1 分布の変化を評価した。扁平苔癬は炎症細胞が基底細胞を標的とするため分裂細胞が減少する。これを模倣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。一方、乾癬を模倣すべくイミキモドクリーム（imiquimod: IQM）を外用する乾癬モデルを用いて、ZO-1 の分布を評価した。In vitro でも細胞増殖を促進させ ZO-1 の発現量、バリア機能への影響を検証した。

【結果】第一章: マウス頬粘膜の qPCR では、*CLDN1*（タンパク名：claudin-1)、*TJP1*（同：ZO-1）が高発現していた。ヒト正常皮膚の ZO-1 は顆粒層の 1-2 層に限局し、claudin-1 と共局在した。一方、頬粘膜の ZO-1 は粘表層直下の有棘層上部 1/3 まで分布し claudin-1 と中層で複数層にわ

たり共局在した。マウス組織でもヒトと同様であった。水平断観察した ZO-1 の分布は、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、頬粘膜では部分的に途切れた線状に観察された。Z-stack 画像を立体再構築すると、途切れるように観察された線状の染色は、上下の層の細胞膜と連続していた。電子顕微鏡で頬粘膜の中層に kissing point を認めた。また超解像顕微鏡で ZO-1 がドット状に検出され、claudin-1 と共局在していた。ビオチン透過試験では claudin-1 のみ局在する下層ではビオチンは細胞間を通過した。一方、ZO-1 の局在する部分で徐々にトレーサーの拡散は減少した。培養細胞で TER は *TJP1* KD で 20.3-21.7%、*CLDN1* KD で 23.7-31.0%低下した（それぞれ control に対し $p < 0.05$）。PFM 測定では、control に対し *TJP1* および *CLDN1* KD で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 の分布領域は、頬粘膜及び OLP は 23%及び 50%であった。皮膚及び乾癬では 16%, 31%であった。100 μm 当たりの Ki-67 陽性細胞数は、頬粘膜 49.9, OLP 12.7 ($p<0.001$)、乾癬 62.6, 正常皮膚 11.0 ($p<0.001$) であった。MMC 投与マウスの頬粘膜の厚さは、ネガティブコントロール (Dimethyl sulfoxide: DMSO) が 61-247 μm であるのに対し、5 mg/kg で 32-98 μm ($p=0.006$), 10 mg/kg で 25-72 μm ($p<0.001$) であった。ZO-1 の分布は上皮全体に対し DMSO で 27%, 10 mg/kg で 16%であった。IMQ 外用マウス耳を水平断観察すると、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 外用マウスの ZO-1 は不規則な多角形が観察された。EGF (epidermal growth factor: EGF) 刺激をした培養細胞では、細胞増殖速度が促進したが、ZO-1 の β-tubulin に対する相対的発現量は減少した。

【考察】第一章: Claudin は、細胞内タンパクである ZO ファミリーと強固に結合し TJ ストランドを形成してバリア機能を発揮する。本研究では粘膜組織の ZO-1, claudin-1 が共局在する領域に TJ が存在すると考えた。Claudin-1 は皮膚及び頬粘膜でほぼ全層に局在するが、ZO-1 の分布は皮膚では顆粒層に限局していた。一方、頬粘膜では表層直下の有棘層上部 1/3 の深さまで局在し、claudin-1 と粘膜の中層で複数層にわたり共局在した。ZO-1 が細胞膜の全周でなく途切れるように観察されたが、これは z-stack 画像の立体再構築により、隣接する細胞の細胞膜へと ZO-1 が連続することが証明できた。これは皮膚と粘膜の ZO-1 のリモデリングの違いと推察する。ビオチン透過試験や、*TJP1* や *CLDN1* 単独の KD でわずかに TER の低下を認めているが、PFM では蛍光強度に大きな差はなく *TJP1* 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: マウス実験で 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が加速することを確認した。免疫蛍光法では頬粘膜及び乾癬では上皮全層に対して広く ZO-1 が分布したが、皮膚及び OLP では ZO-1 の分布は限局していた。すなわち MMC 投与で OLP を、IMQ 外用で乾癬組織の増殖形態を模倣し、個々の疾患における TJ 分布を再現していると判断した。EGF を用いた細胞増殖実験で、細胞あたりの相対的 ZO-1 の発現がコントロールに比べ減少した。これは細胞増殖が促進した場合、細胞の全周に ZO-1 が発現する前に次の層で ZO-1 が発現し始めると考えられ、増殖の速い乾癬や粘膜の組織の結果を反映する。つまり、TJ のリモデリングに組織の増殖速度が影響している結果であると推察した。
【結論】頬粘膜においては ZO-1 の分布と免疫蛍光法の像が皮膚とは大きく異なり粘膜表層直下の有棘層上部 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。

略　語　表

本文中及び図表で使用した略語は以下の通りである。

BM	Buccal mucosa
CCD	Charge coupled device
DAPI	4’, 6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco’s modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EGF	Epidermal growth factor
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HE	Hematoxylin & eosin
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
IBMK	Immortalized buccal mucosal keratinocyte
IMQ	Imiquimod
JAM	Junctional adhesion molecule
MAL	Myelin and lymphocyte
MARVEL	MAL and related proteins for vesicle traffic and membrane link
MDCKII	Madin-Darby canine kidney II
OLP	Oral lichen planus
PBS	Phosphate-buffered saline
PMA	Phorbol myristate acetate
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SIM	Structured illumination microscopy
TER	Trans epithelial measurement
TJ	Tight junction
ZO	Zonula occludens

諸　言

細胞間接着や細胞極性の分子機構ないし細胞膜タンパク、細胞骨格、シグナル伝達系はこれまで盛んに研究されてきた分野である。多細胞生物は上皮細胞や内皮細胞に取り囲まれることにより、自己を内と外を区別する。また細胞間を通過する物質の制御という観点から、細胞間の接着機構は本質的に重要なものとされてきた。脊椎動物においては接着結合、密着結合（Tight junction: TJ)、ギャップ結合、デスモソームという４つの上皮結合様式が知られている。TJ は非カドヘリン依存性の細胞接着装置であり、上皮のバリア機能において重要な役割を担っている（Natsuga, 2014)。皮膚バリア機能は、外-内（Out-In）バリアを担う角層と、内-外（In-Out）バリアを担う TJ に大別される。In-Out バリアの TJ は、細胞間の水やイオンの体外への拡散を制御している（Schneeberger and Lynch, 2004)。

TJ の破綻は様々な疾患群において知られており、例えば、悪性腫瘍の浸潤(Okegawa et al., 2004)、遠隔転移（Bendas and Borsig, 2012)、心血管系疾患（Jang et al., 1994)、炎症性腸疾患（Jones et al., 1995）などがある。他にも *Clostridium perfringens* が産生する毒素が TJ の破綻を招き（Sonoda et al., 1999)、これが Crohn 病を引き起こしている可能性が示唆されている(Banaszkiewicz et al., 2014)。

TJ を構成する分子は多岐にわたり、40 以上のタンパクが同定されている(Anderson and Van Itallie, 2009)。これまで多く研究されているものとして、細胞膜タンパクである occludin（Furuse et al., 1993), tricellulin (Ikenouchi et al., 2005), angulin (Higashi et al., 2013), JAM ファミリー（Bazzoni, 2003)、TJ ストランドを形成する主要分子である claudin ファミリー（Furuse et al., 1998)、また、細胞内の足場タンパク Zonula occludens (ZO) ファミリー（González-Mariscal et al., 2000; Stevenson et al., 1986）が知られている（図 1)。Claudin ファミリーは臓器ごとに異なるサブタイプが発現するが、claudin-1 については肝臓、肺胞、表皮、腸管、前立腺など様々な組織での発現がみられる（Gunzel and Yu, 2013)。

Claudin による TJ ストランドのバリア機能は、同サブタイプ同士での結合で強化され（Simon et al., 1999)、ZO ファミリーは claudin のような膜貫通タンパクを細胞骨格に固定する足場タンパクとして重要な機能を果たしている(Itoh et al., 1997)（図 1)。つまり、claudin ファミリーによる TJ のバリア機能の形成は ZO ファミリーとの相互作用によって調整されている（Umeda et al., 2006)。

今日までTJに関する研究は多岐にわたるが、その多くが近位尿細管由来であるMDCK-II細胞（Beutel et al., 2019; Furuse et al., 1999）や大腸がん由来であるCaCo-2細胞（Suzuki, 2013）などの単層上皮を用いたものが多くを占めている。生体内で単層上皮は胸膜、血管内皮、尿細管、消化管、卵管、子宮などの多くの組織に分布しており、さらに単層上皮は重層化させる必要がなく培養条件がシンプルであるため、細胞接着能のみに焦点を当てるのであれば、単層上皮のTJを評価することは理にかなっている。これらのような理由から単層上皮を用いた研究が主であった。一方で重層扁平上皮は生体内で皮膚や口腔粘膜、食道、肛門、膣など、外的刺激を受ける組織に分布している。皮膚では角層、口腔では唾液など、バリア機能の代わりとなりえる構造を有している。重層扁平上皮のモデルを作製する場合、三次元培養技術が必要である。すでに三次元培養皮膚の研究も盛んに行われているが、角層やTJを忠実に再現できるモデルはほとんどない。

本研究では、まず組織のTJ観察に始まり、培養細胞実験への将来的な展開・応用へとつなげる研究を目指す。特に、重層扁平上皮の中で粘膜のTJは組織観察の研究すらほとんどされていないのが現状であるため、重層扁平上皮の解析については通常のヒトサンプルだけでなく乾癬の疾患モデルマウスの一つであるイミキモドクリーム外用マウスなどを用いて、免疫蛍光法や、ホールマウント免疫蛍光法による分布の評価、ビオチントレーサーを用いたバリア機能評価、さらには電子顕微鏡や超解像顕微鏡を用いた詳細な観察を行う。重層扁平上皮におけるTJについて詳細に解析することで、皮膚や粘膜疾患の病態解明や創薬の足掛かりとすることを目的とする。

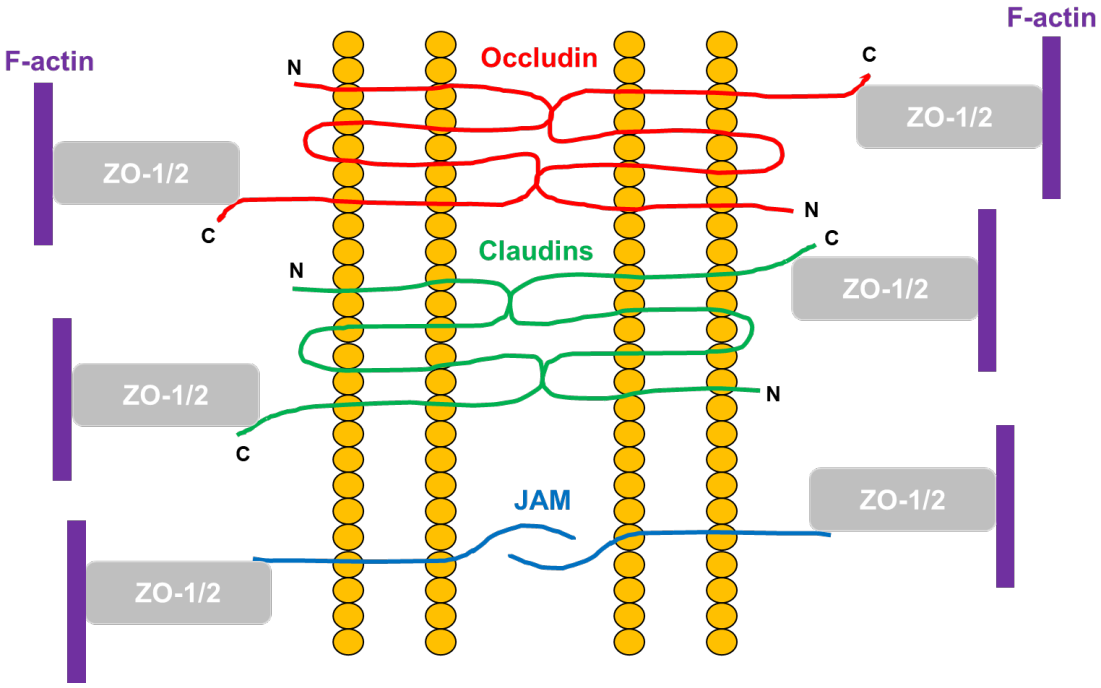


図 1　TJ の模式図

Occludin（緑），claudin（赤）はそれぞれ 4 回細胞膜を貫通し、C 末端側の細胞質内で ZO-1（灰色）と結合する。ZO-1 は細胞質内で F-actin（紫）と結合する。JAM は 1 回膜貫通タンパクで ZO-1 とも細胞質内で結合している。

第　一　章

頬粘膜の ZO-1 は上皮内複数層に連続性に局在する。

諸　言

皮膚は角層、顆粒層、有棘層、基底層で構成され、外気にさらされている。TJ は多くの哺乳類皮膚において存在することが知られている（Brandner et al., 2002)。例えばマウス耳皮膚においては顆粒層の第二層に限局して TJ が存在している（Yokouchi et al., 2016）（図 2)。一方、口腔粘膜も重層扁平上皮であるが、皮膚と異なり、外気ではなく粘液にさらされており、組織学的に咀嚼粘膜、被覆粘膜、特殊粘膜という 3 つのカテゴリーに分類される。咀嚼粘膜は角層を有し組織学的に皮膚と類似しており、舌・硬口蓋・歯肉などでみられる。被覆粘膜は角層を有さず、頬・唇・肺胞などでみられる。特殊粘膜は舌乳頭上の味蕾が神経終末と共局在している。角層を有さない頬粘膜は、基底層及び有棘層は皮膚と共通しているが、顆粒層に対応するものが中間層、角層に対応するものを表層と表現する（Ten Cate and Nanci, 2008)。口腔粘膜における TJ の分布、構造、機能の研究はごく少数であり、それらはヒト食道、ウシ歯肉、ウシ舌（Langbein et al., 2002）のような前述の角化粘膜を解析しているものが多い（Shi et al., 2018)。一方で頬粘膜のような非角化粘膜に関する研究は化学療法患者における TJ の破綻が示唆された報告があるが（Wardill et al., 2016)、正常組織に対する詳細な研究はない。本研究ではまず、ヒト及びマウスの頬粘膜を用いて、免疫蛍光法や電子顕微鏡などを用いて詳細に TJ 関連タンパクを観察することを目的とした。

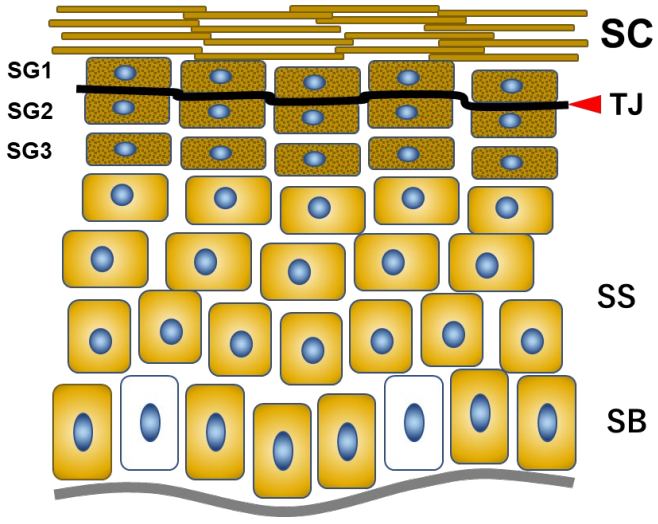


図 2　皮膚における TJ の分布

皮膚は角層（Stratum corneum: SC)、顆粒層（Stratum granulosum: SG)、有棘層（Stratum spinosum: SS)、基底層（Stratum basale: SB)に分かれており、TJ は顆粒層の 2 層目（SG2）の SG1 側に限局して存在する。

方　法

【実験動物】

本研究の動物実験は北海道大学大学院医学研究院の機関審査委員会の承認を得て、北海道大学動物実験に関する規定に従って行った（#15-0166, #19-0164)。C57Bl/6 マウスは Clea（東京、日本）から購入した。マウスは生後 6-8 週齢のものを使用した。マウスに対する麻酔は PBS (Phosphate-buffered saline)：2.9 mL/kg, 塩酸メデトミジン：0.3 mg/kg（共立ファーマ、東京、日本)、ミダゾラム：4 mg/kg（アステラス製薬、東京、日本)、ブトルファノール酒石酸塩：5 mg/kg（Meiji Seika ファルマ、東京、日本）を混合して調製し、うち 100 µL をマウス腹腔内投与した。また麻酔拮抗薬として、PBS：4.4 µL/kg、アチパメゾール塩酸塩：3.0 mg/kg（共立ファーマ）を混合して調製し、100 µL を腹腔内投与した。

【ヒト検体】

北海道大学大学院医学研究院の施設内倫理審査委員会によってヒト研究のすべてを承認された（医 14-063、医 15-025)。この研究はヘルシンキ宣言に則り実施した。ヒト頬粘膜及び皮膚サンプルは参加者またはその法定後見人により書面にて同意を得た。その際に包括同意書及び研究同意書に署名を頂戴したのちに採取及び使用した。頬粘膜は全体で 15 サンプル（平均 65.3 才、男性 6、女性 9）であり、これらはすべて組織学的に正常頬粘膜と診断した。8 サンプルには炎症細胞浸潤はほぼ認めず、7 サンプルはわずかに炎症細胞浸潤が認められた（表 1)。

表 1　ヒト頬粘膜サンプル

sample	age/sex	location	inflammation
No1	69F	Buccal	±
No2	58F	Buccal	±
No3	60F	Buccal	-
No4	52F	Buccal	-
No5	91F	Buccal	-
No6	83M	Buccal	-
No7	64F	Buccal	-
No8	67F	Buccal	±
No9	67M	Buccal	-
No10	70F	Buccal	-
No11	49M	Buccal	-
No12	78M	Buccal	±
No13	84M	Buccal	±
No14	67F	Buccal	+
No15	76M	Buccal	±

【定量的 PCR（quantitative polymerase chain reaction; qPCR)】

マウス組織からのトータル RNA は RNeasy kit（74104; Qiagen, Hilden, Germany）を用いて抽出した。トータル RNA から cDNA を作製するにあたり superscript IV（18090010; Invitrogen, Carlsbad, CA）を使用した。作製した cDNA は SYBR®Green（4309155; Thermo Fisher Scientific）による定量化及びメルトカーブ作製のため、StepOnePlus（4376374; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）を用いて qPCR を行った。qPCR に使用したプライマーは Integrated DNA Technologies（IDT, Coralville, IA）から購入し、リストを以下に示す（表 2)。インターナルコントロールとしては glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）を使用した。TJ に関連する遺伝子の GAPDH に対する相対的な発現レベルを ΔΔCT 法で算出した。

表 2　使用したプライマーのリスト

	Forward 5′→3′	Reverse 5′→3′
mCLDN1	TGGGGCTGATCGCAATCTTT	CACTAATGTCGCCAGACCTGA
mCLDN2	GAAAGGACGGCTCCGTTTTC	CAGTGTCTCTGGCAAGCTGA
mCLDN3	CCTAGGAACTGTCCAAGCCG	CCCGTTTCATGGTTTGCCTG
mCLDN4	CCACTCTGTCCACATTGCCT	CTTTGCACAGTCCGGGTTTG
mCLDN5	GTTAAGGCACGGGTAGCACT	TACTTCTGTGACACCGGCAC
mCLDN6	CAGTCTCTTTTGCAGGCTCGG	GGTCAGGACGATCCCCAAGA
mCLDN7	GAGCGGTGAAGCGGGTC	GCCAAGCATGGCCATTGAAA
mCLDN8	GCAGTGCAAGGTCTACGACT	CATTCCGAGGATGGCTGTCA
mCLDN9	CTCCTCTGCTGTACGTGTCC	GAAGCCTCAGCCTCACACAT
mCLDN10	GCAGGAGCTTCTCTCTGCAT	AGCCCATTCTGGGTGTCTTG
mCLDN11	CCACCTGCCGAAAAATGGAC	CACGTAGCCTGGAAGGATGAG
mCLDN12	CCCGTTTCCGAGTCTTTTGC	GATAATCTGGACCTCCTCGGC
mCLDN13	TGCAGAGACTTTCCCCGTTG	GCTGGCCATCAAACATCTAAGG
mCLDN14	TGGTGTCCTTGCTGTGTCTC	CCCGCAGGAAGCCTGAC
mCLDN15	AACGTGGGCAACATGGATCT	CCACAGGCTCCAGCAAGTAT
mCLDN16	TGTTGGATGGTGAACGCTGA	ACCACCAGCTTCAAGGGATG
mCLDN17	AGTGTCAGCTTTCATCGGCA	TTCCAGTACCGGAGGGAGAG
mCLDN18	ACACCAGATGACAGCAACTTCA	AAGCCAGTGCTGGCCTTAAA
mCLDN19	CTGCCAGAGAACCTGTTGTT	TGGAACCCTGGCCTTTACAC
mCLDN20	GCACTGGGATGTTTAGCTGC	CCCCAAGCAGACAGAACACA
mCLDN22	CAGTCGGACTTGGTAGGCTC	GAACTTGTGTCTGAGGCGGA
mCLDN23	AGCTCAAGGTTGGATTCCCG	CTCAAGCACATCCATCGGGT
mCLDN24	CTTCAGAACGGCCATGCAATC	CCCATGGTCCAGTTCTCCATC
mTJP1	GATGTTTATGCGGACGGTGG	CATTGCTGTGCTCTTAGCGG
mTJP2	AGGAGGACGTGCGGGAA	TGGAATCCTTCTGCAGGGTC
mTJP3	AAGCTTGACAGCGGGTGG	ATGGCCTCCAGAGACAGCTA
mOCLN	CCCCTCTTTCCTTAGGCGAC	AAGATAAGCGAACCTGCCGA
mMARVELD2	GCCGCGCAGGTGTGAAA	ACTATAGCCCCTGTCCCGAA
mMARVELD3	ACGGGCTTCGGAAAGATACG	CATCTGGCAGCAGGCTCTC
GAPDH	ACCATCTTCCAGGAGCGAGA	GACTCCACGACGTACTCAGC

【免疫蛍光法】

ヒト及びマウスの正常皮膚及び頬粘膜は、クリオマウント（Cryomount I, 33351; Muto Pure Chemicals、東京、日本）を用いて凍結標本として包埋した。包埋した凍結標本はクリオスタット（Leica CM1950, Leica Biosystems, Wetzlar Germany）を用いて5 μmに薄切し、プレパラート上で15分以上風乾した。その後PBSで15分以上洗浄した後にブロッキングおよび固定、透過処理を挟まずに一次抗体をアプライした。37℃で60分間反応させたのちにPBSで5分×3回洗浄した。二次抗体及び核染色をアプライしたのちに37℃, 60分反応させた。再度PBSで5分×3回洗浄した。最後に包埋（TA-006-FM; Thermo Fisher Scientific）して蛍光顕微鏡で観察した（BZ9000, Biorevo; Keyence, Osaka, Japan)。

使用した抗体は一次抗体として、抗ZO-1抗体（PA5-19090, dilution 1: 200, Thermo Fisher Scientific)、抗claudin-1抗体（ab15098, dilution 1: 200, abcam, Cambridge, UK)、抗claudin-4抗体（ab53156, dilution 1: 200, abcam)、抗occludin抗体（ab216327, dilution 1: 200, abcam)。二次抗体としてAlexa Fluor® 488標識ロバ由来抗ヤギ抗体（A-11055, dilution 1: 200, Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor® 594標識ロバ由来抗ウサギ抗体（ab150068, dilution 1: 200, abcam)。核染色としてDAPI（4’, 6-diamidino-2-phenylindole, D3571, 0.5 μg/mL, Thermo Fisher Scientific）を使用した。

【HE染色】

前述で作製した凍結標本のHE染色を行った。クリオスタットで5 μmの厚さになるよう凍結切片を作製し、標本を20%/vホルマリン（133-10311; Mildform 10N, Wako）に浸し、2分間室温で固定した。PBSで洗浄した後に、標本をメイヤーズヘマトキシリン（30002; 武藤純薬）で3分間染色した。蒸留水で洗浄した後、標本を1%エオジンY（32001; 武藤純薬）で1分間染色した後に99.5%エタノールで3分間脱水処理を行い、キシレンに3分浸した後にマリノール（4197193; 武藤化学）溶液で包埋した（Kamaguchi et al., 2018)。

【電子顕微鏡標本作製】

頬粘膜における TJ の存在を示すために電子顕微鏡で kissing point を同定することとした。透過電子顕微鏡は過去の文献に基づき包埋、観察を行った (Takashima et al., 2019)。マウスの頬粘膜を 2%グルタールアルデヒド溶液に浸し、固定後に 1%四酸化オスミウムで再度固定、脱水処理後に Epon821 で包埋した。このプロセスは花市電子顕微鏡技術研究所に依頼した（愛知、日本)。70 nm の超薄切片を酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡で観察した（H-7100; Hitachi, 東京、日本)。

【超解像顕微鏡】

Plan Apo VC×60 対物レンズ（NA1.40、ニコン）とマイクロスキャニングステージ（BI XY ステージ、中央精機株式会社、東京、日本）を備えた構造化照明顕微鏡（N-SIM、ニコン）を使用して観察した。蛍光画像は CCD カメラ (ORCA-Flash 4.0 v3、浜松ホトニクス）によって撮影した。この観察は北大ニコンイメージングセンターの協力を得て行った。

【ホールマウント免疫蛍光法】

TJの局在を水平方向から観察すべくホールマウント免疫蛍光法を行った。過去の文献を参考に（Kubo et al., 2013）以下のごとく改変して行った。

正常なマウスの口腔粘膜と耳の皮膚を95%エタノールで室温60分間固定した。次に、真皮または固有層から上皮シートを剥離するために、組織を、1.8 mMカルシウム（14040-133; Thermo Fisher Scientific）を含むPBS中の1,000 PU/mLの濃度のディスパーゼⅠ（386-02271; Fujifilm、東京、日本）の溶液に浸し、4℃で一晩インキュベーション後、上皮シートを機械的に剥がした。シートを10%ウシ血清アルブミン（最終濃度5%）と0.25% オクトキシノール（Triton™X-100; Sigma-Aldrich, St Louis, MO）（最終濃度0.125%）の溶液に4℃で18時間浮遊させた。次に、サンプルをPBSで洗浄し、抗ZO-1抗体をアプライし、4℃で一晩インキュベートした。翌日、サンプルをPBSで洗浄し、Alexa Fluor488、室温で60分間インキュベートした。 PBSで洗浄した後、2.4 g Mowiol（81381-250G; Sigma-Aldrich、St Louis, MO)、6.0 gグリセロール、1.6 mL 1.5 M tris-HCl（pH8.8）および16.4 mLの蒸留水の混合液でサンプルを包埋した。共焦点顕微鏡（FV1000、オリンパス、日本）を用いて画像を撮影した。

ホールマウント免疫蛍光法の代わりに水平スライス切片を作製した。皮膚および口腔粘膜を包埋剤（Cryomount I, 33351; Muto）に水平に包埋した。クリオスタット（Leica CM1950, Leica Biosystems）により、厚さ5 μmの切片を作製し、前述のように免疫蛍光法を行った。

【ビオチン透過試験】

口腔粘膜TJのバリア機能はこれまでにも報告があるように（Yokouchi et al., 2015）ビオチントレーサーを用いた方法を改変し、in vivoで評価した。10 mg/mL EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin（21355; Thermo Fisher Scientific）に調製した1 mM CaCl2（C-34006; PromoCell, Germany）を含むPBS中の50 μLをマイジェクターシリンジ（SS-05M2913; Terumo Corporation, Tokyo, Japan）で口腔内粘膜下層に注射した。前述の麻酔下でC57BL/6Jマウスの頬粘膜にビオチントレーサを投与し、次に、前述の麻酔薬拮抗薬で覚醒させた。60分後、マウスに再度麻酔を行い安楽死させた後に、頬粘膜サンプルを採取し、クリオマウント（Cryomount I, 33351; Muto Pure Chemicals）に浸し、クリオスタット（Leica CM1950、Leica Biosystems）で切片化した。Texas red標識ストレプトアビジン（189738, dilution 1: 300, Merck）を二次抗体の溶液にさらに混合し、免疫蛍光法を行い、蛍光顕微鏡画像を撮影した（BZ9000, BioRevo; Keyence)。

【培養細胞】

我々のグループが樹立、不死化した頬粘膜細胞を使用した（immortalized buccal mucosal keratinocyte; IBMK）(Kamaguchi et al., 2019)。細胞は CnT-PR 培地（#CnT-PR; Cellntec, Bern, Switzerland）を用いて、37℃, 5% CO_2 下で培養した。

【RNA 干渉】

以下に使用した siRNA のリストを示す（表 3)。siRNA を用いて TJ 関連遺伝子を in vitro でノックダウンした。siRNA は 10 nM で使用した。スクランブルコントロールを含め siRNA はすべて IDT より購入した。IBMK に lipofectamin3000（L3000015; Thermo Fisher scientific）を用いて siRNA をトランスフェクションした。ノックダウン効率はウエスタンブロッティング法で推定した。

表 3　siRNA のリスト

	Sence 5′→3′	Antisence 5′→3′
hCLDN1 ①	GACUCCUUGCUGAAUCUGAtt	UCAGAUUCAGCAAGGAGUCaa
hCLDN2 ②	ACCUCUUACCCAACACCAAtt	UUGGUGUUGGGUAAGAGGUtg
hTJP1 ①	CGAUCUCAUAAACUUCGUAtt	UACGAAGUUUAUGAGAUCGct
hTJP1 ②	CUGUCAUACUUUGACCGAAtt	UUCGGUCAAAGUAUGACAGct

【ウエスタンブロッティング法】

細胞溶解バッファー・RIPA buffer（Thermo Fisher scientific）100 μLにつき1 μLのインヒビターカクテル（sigma）を混合して調製した。対象細胞をPBSで3回洗浄した後に細胞溶解バッファーをアプライ、10分間氷上で静置したのちにセルスクレーパーを用いて各ウェルの細胞をかきとり、融解液を回収、4℃, 20000 g, 25分遠心の後に上清を回収し、5×sodium dodecyl sulfate（SDS）サンプルバッファー（250 mM Tris-HCl（pH6.8）、8% SDS、0.1% Bromophenol blue、40% glycerol、100 mM DTT）と混合した。混合液は95℃、5分ボイルしサンプルとした。10%ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEで分離、ニトロセルロース膜（BioRad）へ転写した。2% skim milkで60分、室温でブロッキングし、一次抗体をアプライ、4℃で一晩インキュベートした。Tris-bufferd saline（TBS）+ polysorbate20（Tween®20; P1379-500ML; Sigma-Aldrich, St Louis, MO）（TBS-T）で5分×3回洗浄した後に二次抗体をアプライ、室温で60分反応させた。再度TBS-Tで5分×3回洗浄後にECL-plus（GE Healthcare）と室温で 5 分間反応させ、LAS-4000 mini（富士フイルム）でシグナルを検出した。一次抗体として抗claudin-1抗体（ab15098, dilution 1: 1000, abcam）、抗ZO-1抗体（ab216880, dilution 1: 5000, abcam）、抗β-tubulin抗体（ab6046, dilution 1: 5000, abcam）、二次抗体としてHorseradish peroxidase標識anti-rabbit IgG（dilution 1: 5000, Invitrogen）を用いた。

【Trans epithelial resistance（TER)測定】

In vitro でのバリア機能の評価として細胞シートでのTER測定がある。過去の文献を一部改変し（Otani et al., 2019）細胞シートのTER測定を行った。IBMKはMillicell Hanging Cell Culture Inserts（0.4 μmポアサイズ、MCHT24H48、Merck）で、CnT-PR培地（#CnT-PR; Cellntec）を使用して2〜3日間培養した。培地をCnT-PRから10% Fetal bovine serum（FBS）を含むダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM; Gibco, Gaitgibohersburg, MD）に変更し、2日間培養した。インサート内外間の電気抵抗は、Millicella®ERS-2電気抵抗システム（MERS00002, Merck）を用いて測定した。サンプルのTERを計算するために、ブランク値を測定値から差し引き、次にTranswellフィルターの面積を掛けて、単位面積抵抗（Ω・cm^2）を求めた。

【Paracellular flux measurement】

細胞シートを通過する蛍光色素の強度を測定することで、外―内のバリア機能を評価することができる。過去の文献にのっとり（Otani *et al.*, 2019)、一部改変を加えた。IBMK を Millicell Hanging Cell Culture Inserts (Merck) を用いて上記の方法で培養した。さまざまな分子量の蛍光共役デキストランをインサート内にアプライし、細胞シートを通過した FITC-デキストラン溶液の蛍光強度を測定した。次の蛍光共役トレーサーを頂端側に適用した: 200 µM フルオレセイン（065-00252、富士フイルム)、200 µM 4-kD FITC デキストラン（FD4, 60842-46-8; Sigma-Aldrich)、および 50 µM 40-kD FITC デキストラン（FD40, 60842-46-8; Sigma-Aldrich)。頂端および基底チャンバー内の培地の量は、それぞれ 100 および 1000 µL とした。チャンバーを 37℃ 5% CO_2 下で 1 時間インキュベートした。 SpectraMax Paradigm マルチモードマイクロプレートリーダー（Molecular Devices, CA）を使用して、頂端チャンバーと底部チャンバーのトレーサー蛍光強度を測定した。下側の蛍光に対する比率は、頂端側に基づいて計算されました。比率=（底（サンプル）/頂端（サンプル））×（頂端（control）/底（control））。

【統計解析】

グループ間の統計的な有意差は、分散検定にて等分散であれば Student *t* 検定、等分散でない場合には Welch *t* 検定を用いて分析した（JMP, SAS institute, NC)。$p<0.05$ を統計的に有意と判定した。

結　果

1. マウス類粘膜では *CLDN1*、*4*、*17*、*TJP1* の mRNA が高発現していた

はじめに、TJ を構成する分子は多岐にわたるため、どの分子に着目するかを判断すべくマウス類粘膜において mRNA レベルでの解析を行った。過去の文献でも解析がなされている、claudin ファミリーをコードする遺伝子である *CLDN,* occludin ファミリーをコードする *OCLN* ないし *MARVEL*、ZO ファミリーをコードする *TJP* について網羅的に qPCR を行った。Claudin ファミリーにおいて *CLDN1, 4, 17*、が高発現していた。ZO ファミリーの中では *TJP1* が *TJP2-3* よりも発現上昇がみられたため、以降はこれらの分子に絞って解析を進めていくこととした（図 3)。

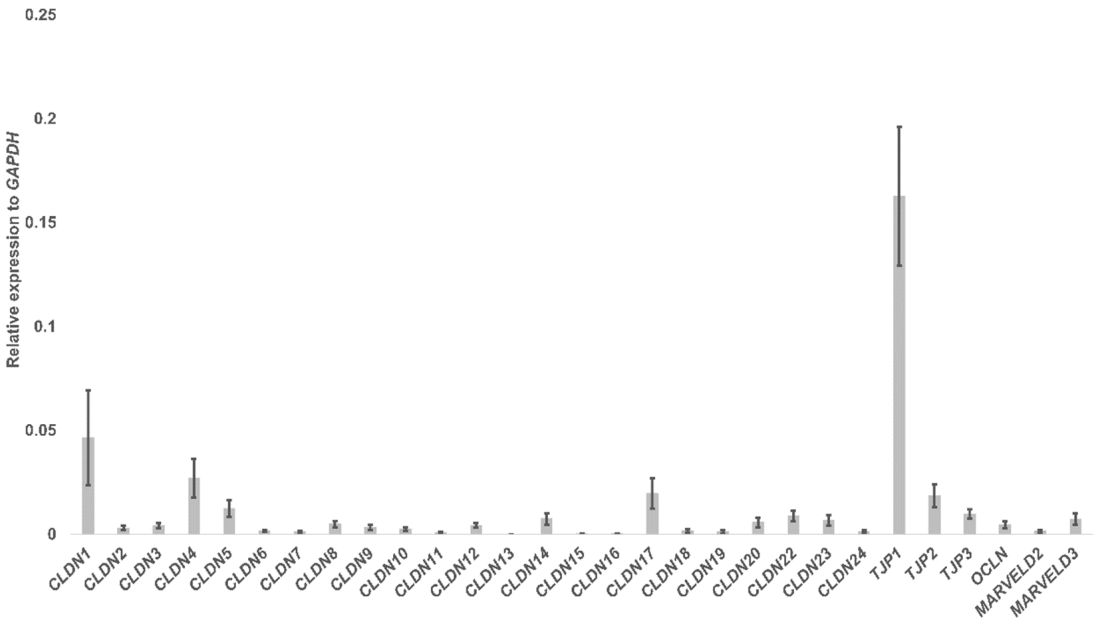


図 3　マウス類粘膜における mRNA の発現レベル

マウス類粘膜（N=5）を採取し、claudin ファミリー、occludin ファミリー、ZO ファミリーをコードする遺伝子のプライマーを用いて qPCR を行った。インターナルコントロールは GAPDH を用いた。

2. ヒト頬粘膜では粘膜表層直下の有棘層上部 1/3 に ZO-1 が分布していた

前述の mRNA 発現レベルの解析より膜タンパクでは *CLDN1*、足場タンパクでは *TJP1* 遺伝子の発現が多くみられたため、claudin-1 および ZO-1 に着目して解析を進めた。ヒト正常皮膚サンプルの凍結切片を用いて抗 ZO-1 抗体、抗 claudin-1 抗体を用いた免疫蛍光法を行った。代表的な染色像を以下に示す(図 4)。正常皮膚では ZO-1 が角層直下、顆粒層の 1-2 層にみられた（図 4-a, a’）。一方 claudin-1 については基底細胞の底面を除いた基底層、有棘層、顆粒層の細胞膜に染色された（図 4-b, b’）。ZO-1 と claudin-1 は顆粒層で共局在していた（図 4-c, c’）。

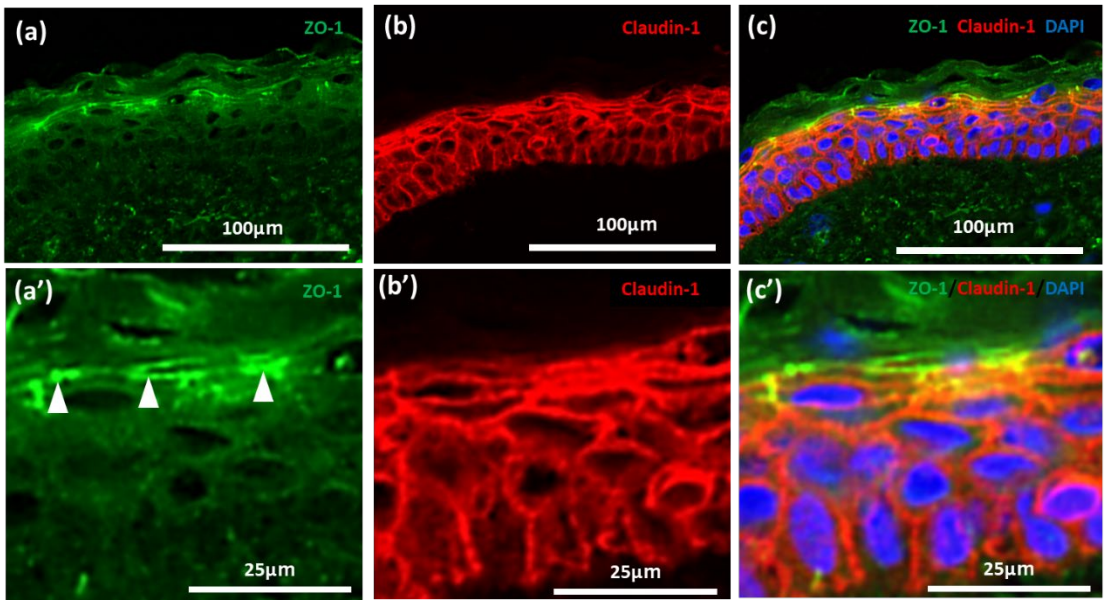


図 4　ヒト正常皮膚の抗 ZO-1 抗体、抗 claudin-1 抗体を用いた免疫蛍光法

(a)抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(a’)(a) の強拡大像。白三角: ZO-1 の検出部位。

(b)抗 claudin-1 抗体を Alexa Fluor® 594 標識二次抗体で検出。

(b’)(b) の強拡大像。

(c) (a) と (b) のマージ画像。核染色: DAPI (青)。

(c’)(c) の強拡大像。

ヒト頬粘膜についても同様に抗 ZO-1 抗体、抗 claudin-1 抗体を用いた免疫蛍光法を行った。代表的な染色像を以下に示す（図 5)。ZO-1 は粘膜の最外層から上 1/3 までに細胞膜上に線状に染色された（図 5-a)、claudin-1 は基底層を避け細胞膜を取り囲むように、下 3/4 まで染色された（図 5-b)。ZO-1 と claudin-1 は粘膜の中層付近で複数層にわたって共局在していた（図 5-c)。

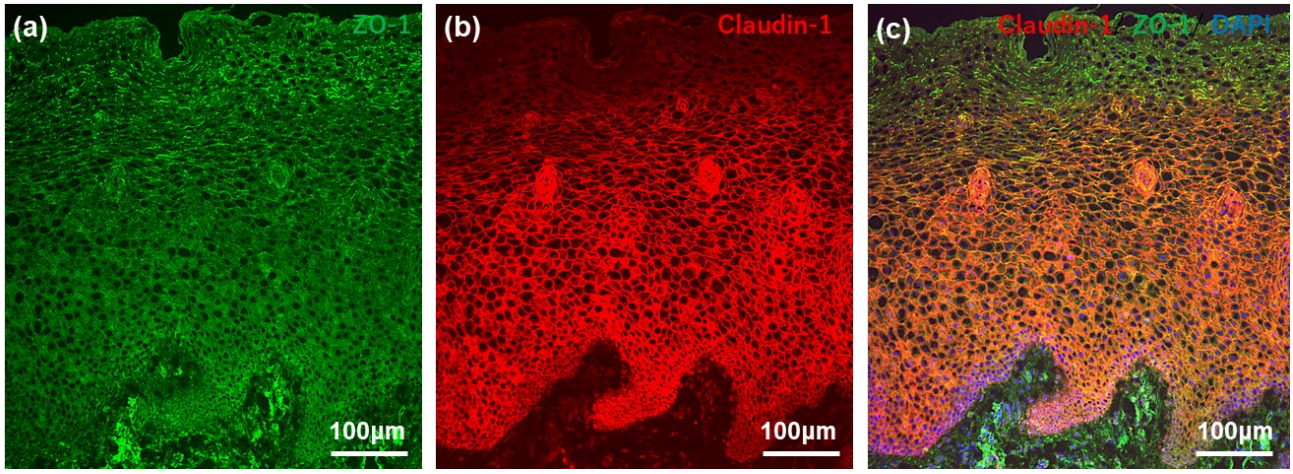


図 5　ヒト正常頬粘膜の抗 ZO-1 抗体、抗 claudin-1 抗体を用いた免疫蛍光法

(a)抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(b)抗 claudin-1 抗体を Alexa Fluor® 594 標識二次抗体で検出。

(c)(a) と (b) のマージ画像。核染色： DAPI（青）

図 5（c）の強拡大像を示す。抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光法では、claduin-1 のように細胞膜の全周で検出されるわけではなく、細胞膜上に線状または点状に観察された（図 6）。

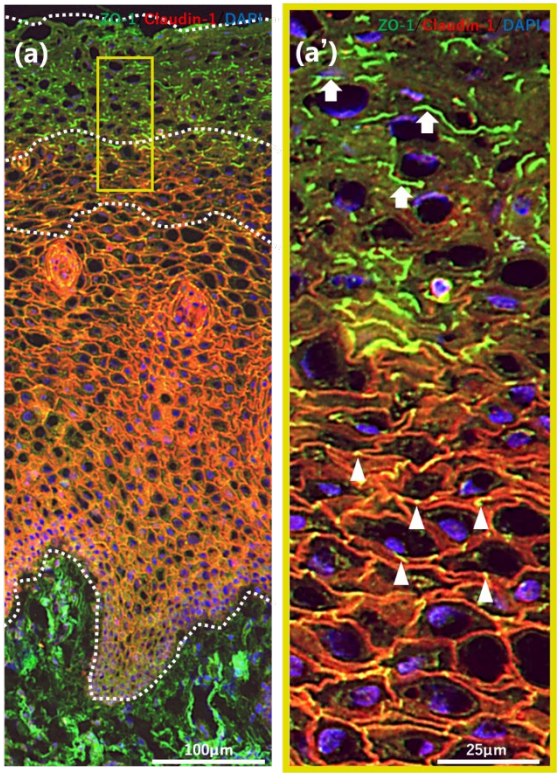


図 6　ヒト正常類粘膜の抗 ZO-1 抗体、抗 claudin-1 抗体を用いた免疫蛍光法の拡大像

(a)　抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出、抗 claudin-1 抗体を Alexa Fluor® 594 標識二次抗体で検出しマージした画像。核染色：DAPI（青）、白点線：最外層、基底層、ZO-1 が検出された最下層、claudin-1 が検出された最上層。

(a')(a) の黄四角部の拡大像。

3. マウス頬粘膜においてZO-1は点状ないし線状の染色が不規則に観察された

代表的なマウス組織のHE染色の像を示す（図7）。マウス正常皮膚では表皮は1-2層であり顆粒層は角層直下に1層のみ認めた（図7-a）。頬粘膜と皮膚の移行部の組織では表皮は5-8層程度で、顆粒層はあまり目立たないが、角層を認めた（図7-b）。頬粘膜では複数層の上皮を有し、顆粒層は目立たず、角層を有さない（図7-c）。

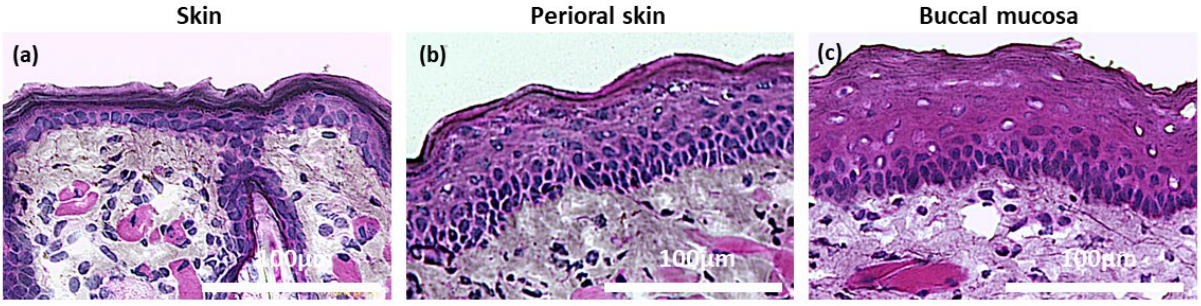


図7　マウス正常皮膚、粘膜移行部、正常頬粘膜のHE染色

(a)マウス正常皮膚のHE染色。

(b)マウス正常皮膚粘膜移行部のHE染色。

(c)マウス正常頬粘膜のHE染色。

マウス正常皮膚における抗 ZO-1 抗体、抗 claudin-1 抗体を用いた免疫蛍光法の像を示す（図 8）。ZO-1 は角層直下の 1 層に限定して観察された（図 8-a, a’）。Claudin-1 は基底細胞の底面を避け、細胞膜上に検出された（図 8-b, b’）。ZO-1 及び claudin-1 は顆粒層直下で共局在していた（図 8-c）。

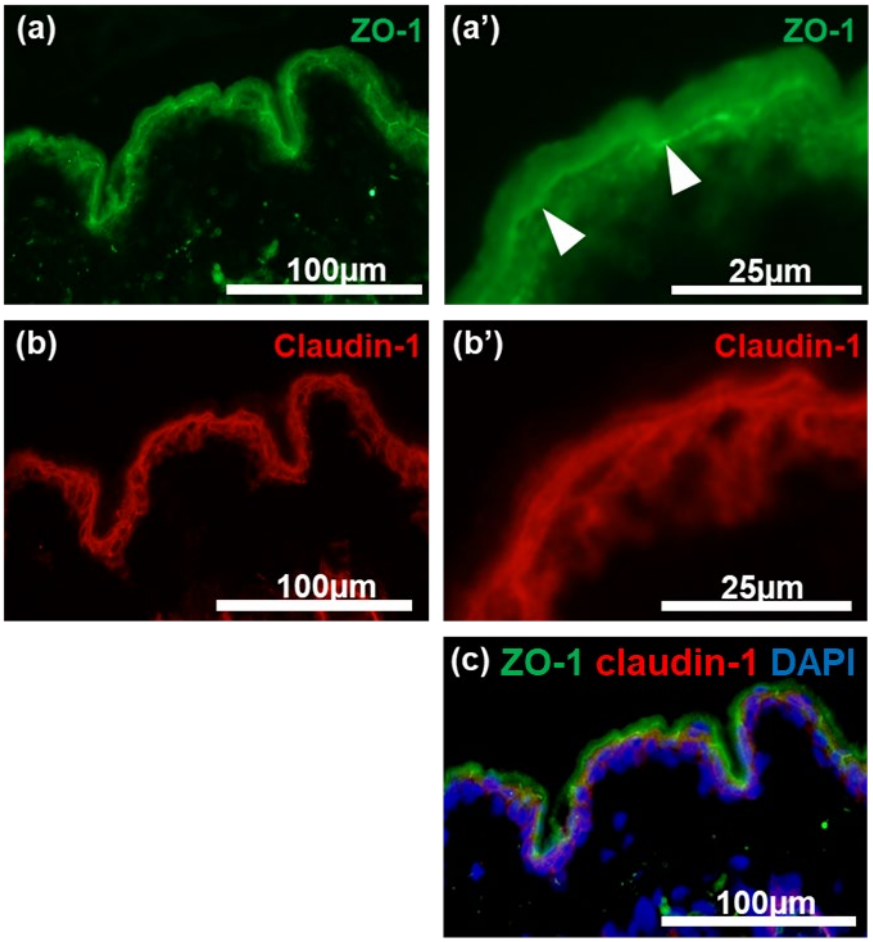


図 8　マウス正常皮膚の抗 ZO-1 抗体、抗 claudin-1 抗体を用いた免疫蛍光法

(a)抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(a’)(a) の強拡大像。白三角：ZO-1 の検出部位。

(b)抗 claudin-1 抗体を Alexa Fluor® 594 標識二次抗体で検出。

(b’)(b) の強拡大像。

(c)(a) と (b) のマージ画像。核染色：DAPI（青）

抗 ZO-1 抗体、抗 claudin-1 抗体を用いてマウス正常皮膚粘膜移行部の ZO-1 及び claudin-1 を検出した（図 9）。ZO-1 は角層直下の 3-4 層に限定して観察された（図 9-a, a’）。Claudin-1 は基底細胞の底面を避け、細胞膜上に検出された（図 9-b, b’）。ZO-1 及び claudin-1 は顆粒層直下から 3-4 層にわたり共局在していた（図 9-c）。

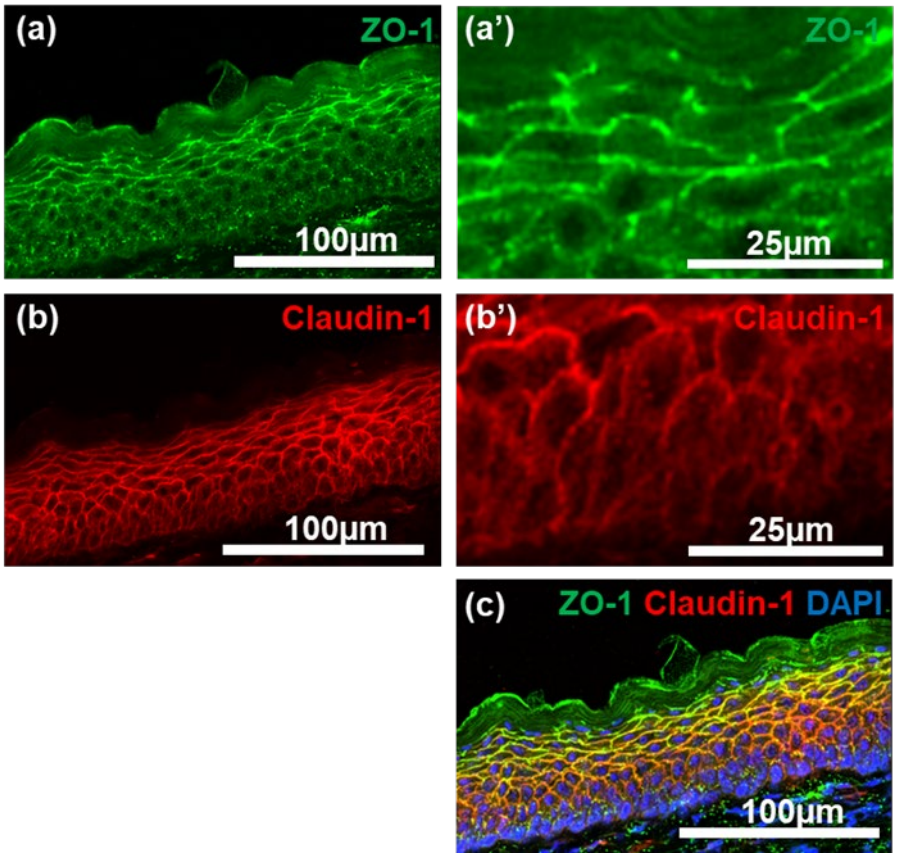


図 9　マウス正常皮膚粘膜移行部の抗 ZO-1 抗体、抗 claudin-1 抗体を用いた免疫蛍光法

(a)抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。
(a’)(a) の強拡大像。
(b)抗 claudin-1 抗体を Alexa Fluor® 594 標識二次抗体で検出。
(b’)(b) の強拡大像。
(c)(a) と (b) のマージ画像。核染色: DAPI（青）。

マウス頬粘膜の抗 ZO-1 抗体及び抗 claudin-1 抗体による免疫蛍光法の像を示す（図 10）。ZO-1 は最外層から上 3/4 程度に局在し、線状あるいは点状の染色が不規則に観察された（図 10-a，a’）。Claudin-1 は基底細胞の底面を避け、基底層から下 4/5 程度に局在し、細胞膜上に検出された（図 10-b，b’）。ZO-1 及び claudin-1 は粘膜の中層で複数層にわたり共局在していた（図 10-c）。

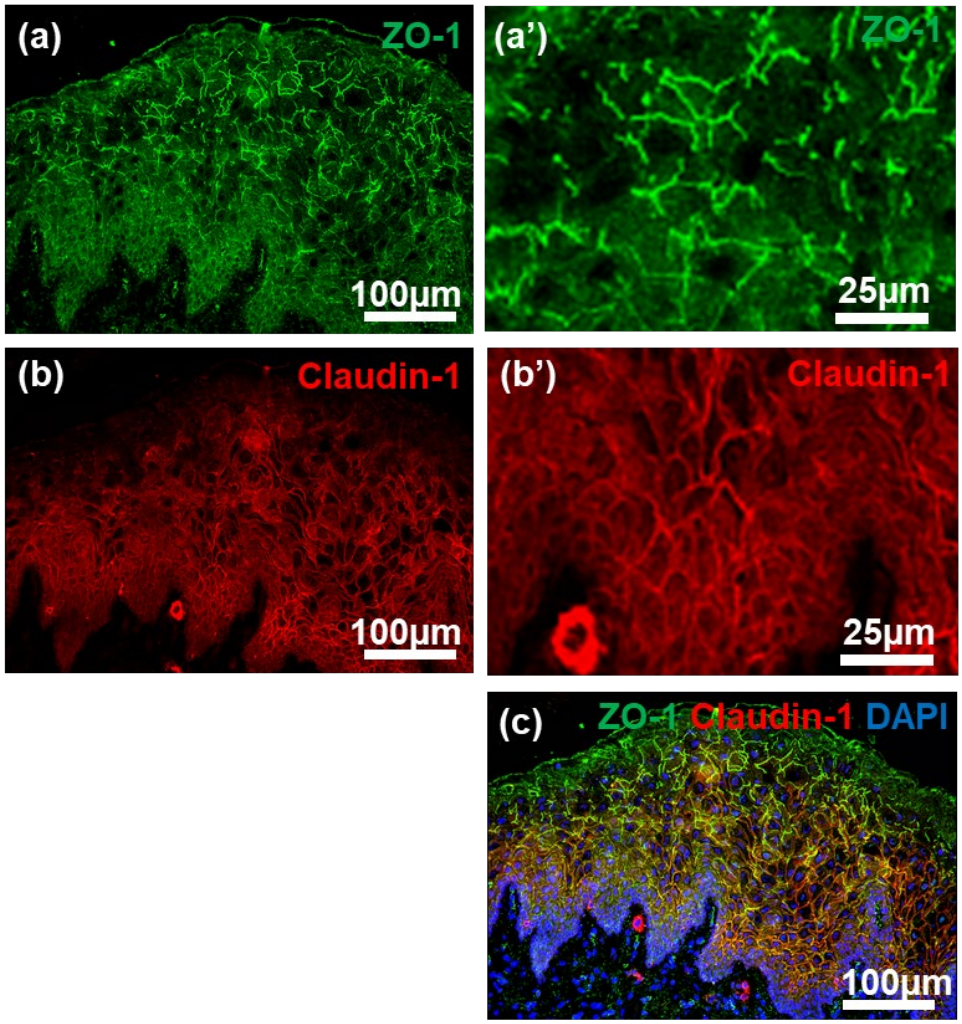


図 10　マウス正常頬粘膜の抗 ZO-1 抗体及び抗 claudin-1 抗体を用いた免疫蛍光法

(a)抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。
(a’)(a) の強拡大像。
(b)抗 claudin-1 抗体を Alexa Fluor® 594 標識二次抗体で検出。
(b’)(b) の強拡大像。
(c)(a) と (b) のマージ画像。核染色：DAPI（青）。

qPCR では *CLDN4* の発現も上昇していたため、マウス頬粘膜を用いて claudin-4 と ZO-1 の二重染色も行った（図 11）。ZO-1 は細胞膜上、上 2/3 程度に検出され、claudin-4 は細胞膜上、ほぼ全層で検出された。ZO-1 と Clauidn-4 は複数層で共局在した。

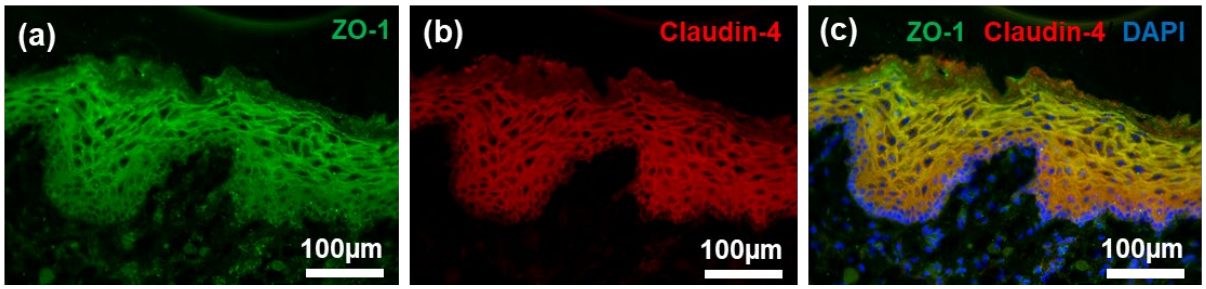


図 11　マウス正常皮膚粘膜の抗 ZO-1 抗体、抗 claudin-4 抗体を用いた免疫蛍光法

(a)抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。
(b)抗 claudin-4 抗体を Alexa Fluor® 594 標識二次抗体で検出。
(c)(a) と (b) のマージ画像。核染色: DAPI（青）。

4. ZO-1 は水平面の観察で規則的な六角形を呈するが、頬粘膜では不規則な多角形パターンを呈した

これまでは組織の垂直切片を用いて抗 ZO-1 抗体による免疫蛍光法の像を観察し、ZO-1 は線状の染色が不規則に検出されることが分かった。続いて、水平切片ないしホールマウント免疫蛍光法を行い水平面でどのように観察されるかを確認した（図 12)。ホールマウント免疫蛍光法、水平切片、水平切片の見え方のシェーマを示す（図 12-a, d, g)。ホールマウント免疫蛍光法では皮膚では細胞膜上に観察され、規則的な六角形を呈した。顆粒層の側面では一部顆粒状に観察された（図 12-b)。一方で頬粘膜のホールマウント免疫蛍光法では細胞膜上で線状に観察されるものの、それが取り囲む構造は不正な多角形であり、さらにその線は不規則に途切れるように観察された。一部細胞膜上に顆粒状に観察された（図 12-c)。水平断切片で観察すると、皮膚では規則的な六角形構造を呈し（図 12-e)、頬粘膜においては不規則な多角形構造が観察された(図 12-f)。垂直切片において皮膚では線状に 1 層だけ観察される（図 12-h)一方で頬粘膜では不規則で細胞膜を 1 周しないような線状の沈着を認めた（図 12-i)。

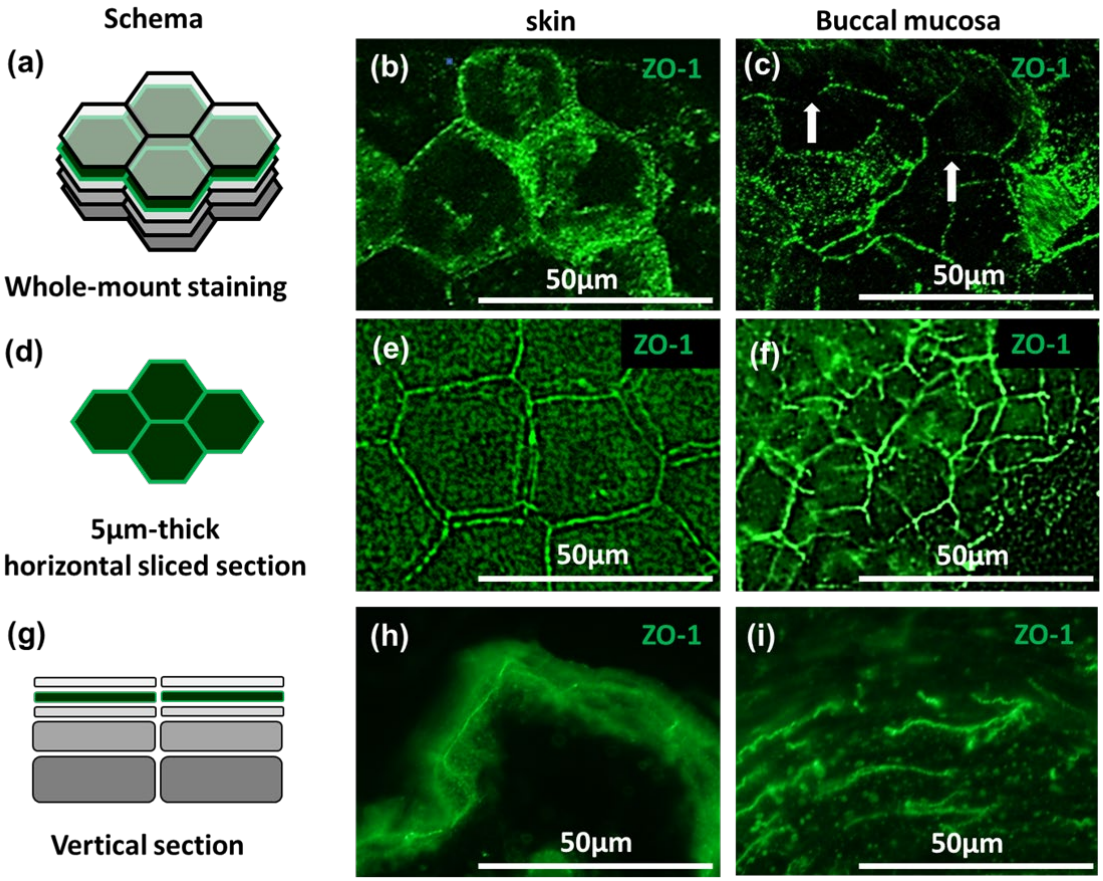


図 12　抗 ZO-1 抗体を用いたマウス正常皮膚、頬粘膜のホールマウントサンプル及び、水平、垂直切片の免疫蛍光法

(a)ホールマウントサンプルのシェーマ

(b)マウス正常皮膚のホールマウントサンプルにおいて抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(c)マウス正常頬粘膜のホールマウントサンプルにおいて抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(d)水平切片のシェーマ

(e)マウス正常皮膚の水平切片において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(f)マウス正常頬粘膜の水平切片において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(g)垂直切片のシェーマ

(h)マウス正常皮膚の垂直切片において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(i)マウス正常頬粘膜の垂直切片において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

正常頬粘膜では水平方向から観察しても ZO-1 は不規則な線状に観察された。ホールマウント免疫蛍光法や、水平切片ではある 1 面のみを観察することになる。このためこれまで観察してきた不規則な線状構造の三次元的な連続性を確認するため z-stack 画像を取得し立体再構築した。細胞膜の一部で途切れて観察された ZO-1 は、周囲の隣り合う細胞の細胞膜へ連続していた（図 13)。

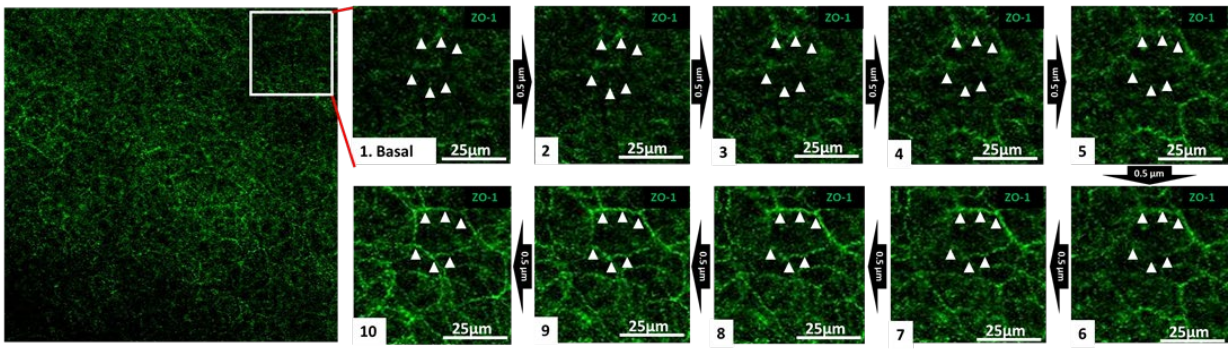


図 13　抗 ZO-1 抗体を用いたマウス頬粘膜のホールマウント免疫蛍光法の z-stack 画像

左:マウス正常頬粘膜のホールマウントサンプルにおいて抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

右: 左の四角の中を基底層側から顆粒層側に向けて 0.5 µm 間隔で撮影した。三角: ZO-1 の検出部。

5. マウス正常頬粘膜に kissing point が存在した

これまでの免疫蛍光法の結果、正常頬粘膜では ZO-1 が不規則に分布し、正常皮膚とは異なるパターンを呈していた。このため、頬粘膜に TJ が存在するかを確認すべく、透過型電子顕微鏡にて TJ に相当する kissing point の観察を行った。サンプル観察部位はおよび頬粘膜の中層であったが、下記に図示するとおり、明瞭な kissing point を確認した（図 14)。

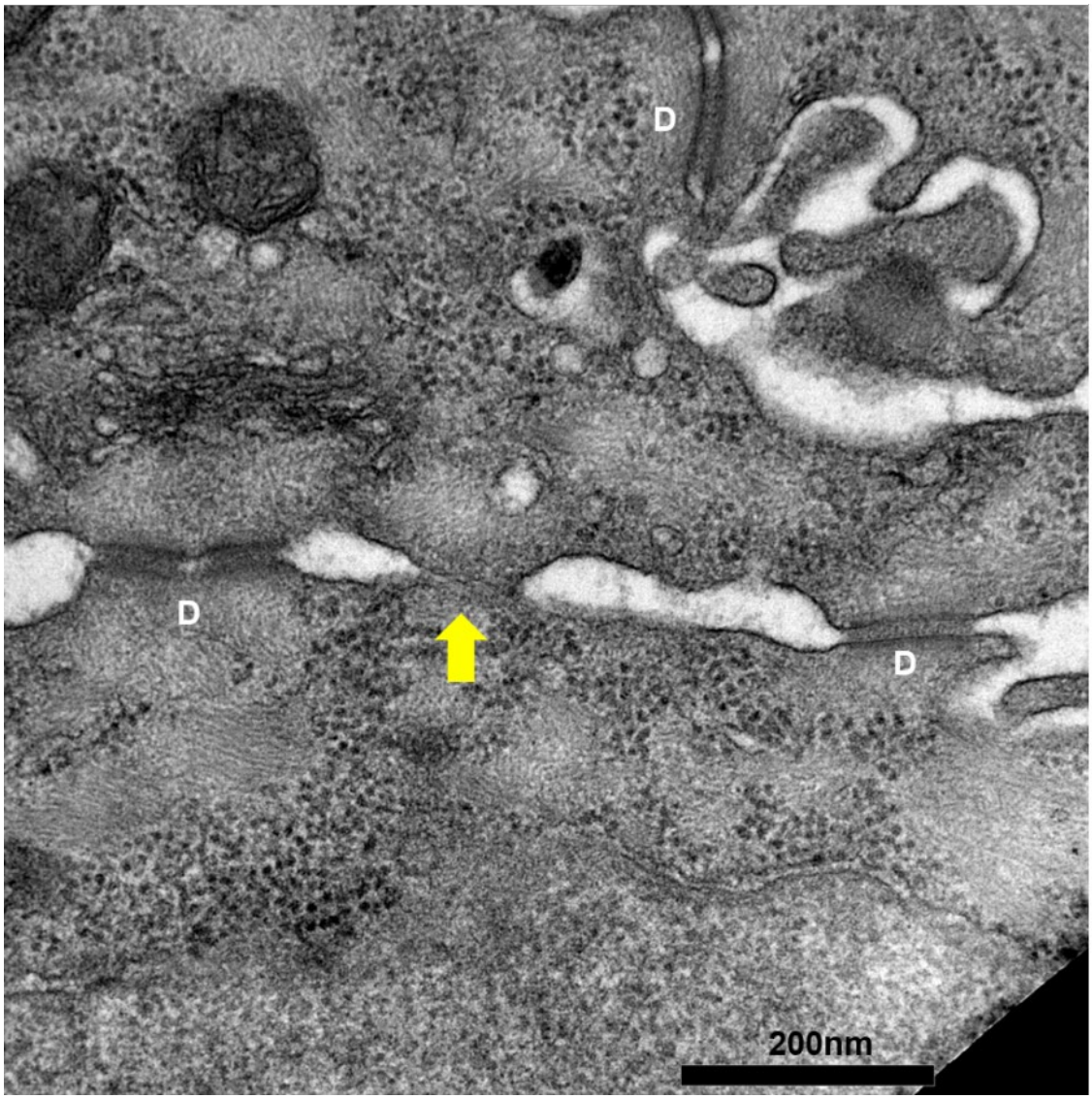


図 14　マウス正常頬粘膜の透過型電子顕微鏡写真

矢印: kissing point、D: デスモソーム

電子顕微鏡で確認した kissing point を超解像顕微鏡 N-SIM を用いて観察した。N-SIM による観察では蛍光顕微鏡で線状に見えていた ZO-1 がドット状に沈着しており、それぞれが線状の claudin-1 と共局在していた（図 15)。

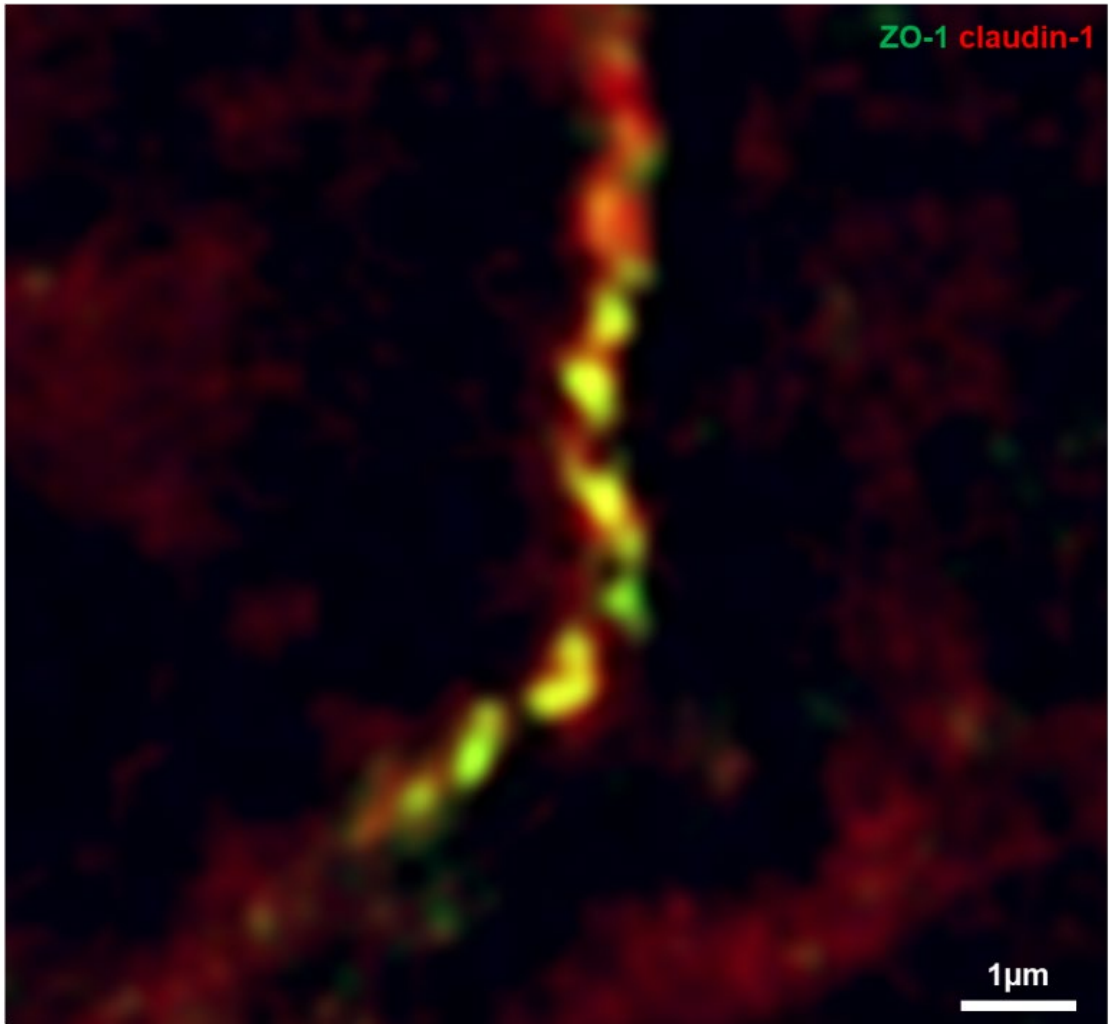


図 15　抗 ZO-1 抗体、抗 claudin-1 抗体を用いたマウス正常頬粘膜の免疫蛍光法、N-SIM による観察

マウス正常頬粘膜において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。抗 claudin-1 抗体を Alexa Fluor® 594 標識二次抗体で検出。N-SIM で撮影した。

6. マウス正常頬粘膜において、内-外のバリア機能は保たれていた

電子顕微鏡および N-SIM の観察において頬粘膜に TJ が存在することが確認できた。続いて、そのバリア機能についても評価すべくビオチン透過試験を行った。ビオチンは基底層側から体表に向かって徐々に減衰しながら拡散した（図 16-a)。Claudin-1, 4 が局在する層をビオチンは通過した（図 16-b, c)。ZO-1 の局在する層の下 2-3 層をビオチンは通過したが、徐々にビオチンは徐々に減衰した（図 16-d, d’)。Occludin が検出された層（白三角）よりも 2-3 層下でビオチンの検出が途絶えた（図 16-e, e’)。

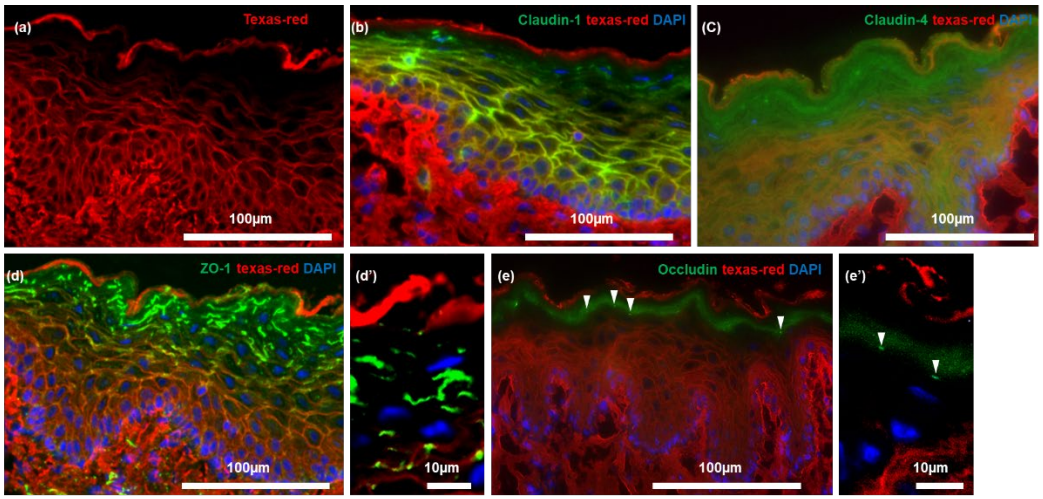


図 16　マウス頬粘膜のビオチン及び TJ 関連分子の免疫蛍光法

(a) ビオチンを texas-red 標識の streptavidin で検出した。
(b) 抗 claudin-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。ビオチントレーサーを texas-red 標識 streptavidin で検出した。核染色：DAPI（青）
(c) 抗 claudin-4 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。ビオチントレーサーを texas-red 標識 streptavidin で検出した。核染色：DAPI（青）
(d) 抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。ビオチントレーサーを texas-red 標識 streptavidin で検出した。核染色：DAPI（青）
(d’) (d) の強拡大像。
(e) 抗 occludin 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。ビオチントレーサーを texas-red 標識 streptavidin で検出した。核染色：DAPI（青）
(f) (e’) (e) の強拡大像。

皮膚粘膜移行部も同様にビオチンと ZO-1 及び claudin-1 の関係を観察した。ビオチンは基底層から体表に向かって徐々に減衰した（図 17-a)。ビオチンは ZO-1 の局在する層を 2-3 層通過したが、徐々に減衰し、完全には通過しなかった（図 17-b)。一方ビオチンは claudin-1 の局在する層を通過した（図 17-c)。

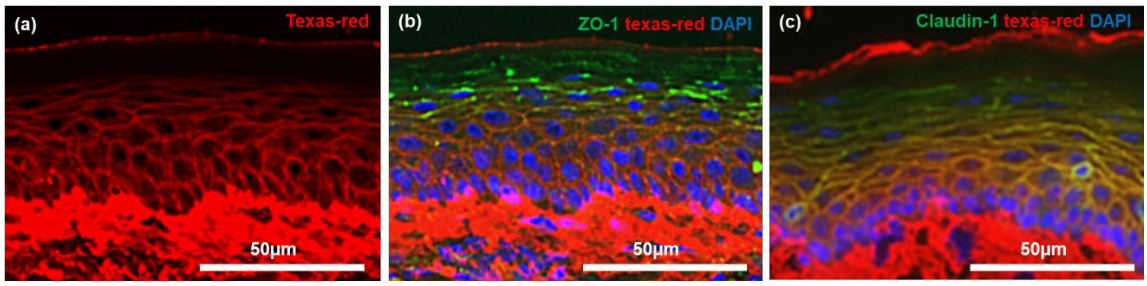


図 17　マウス正常皮膚粘膜移行部のビオチン及び ZO-1、claudin-1 との二重染色

(a) ビオチンを texas-red 標識の streptavidin で検出した。

(b) 抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。Texas-red 標識 streptavidin でビオチンを検出した。核染色：DAPI（青）

(c) 抗 claudin-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。Texas-red 標識 streptavidin でビオチンを検出した。核染色：DAPI（青）

7. *TJP1* および *CLDN1* のノックダウンにより TER が低下した

マウス正常頬粘膜の ZO-1 は不規則に分布するが、内ー外のバリア機能を有していると思われた。次に、ZO-1 ないし claudin-1 が頬粘膜のバリア機能に与える影響を、培養細胞を用いて検証した。*TJP1* および *CLDN1* を、それぞれ siRNA を用いてノックダウンし、その細胞を用いて TER 測定することでバリア機能を評価した。IBMK に siRNA をそれぞれトランスフェクションし qPCR で *TJP1* 及び *CLDN1* の mRNA 発現を評価したところ、*TJP1* は 87-90%（図 18-a)、*CLDN1* は 85.4-85.5%（図 18-b）のノックダウン効率であった。

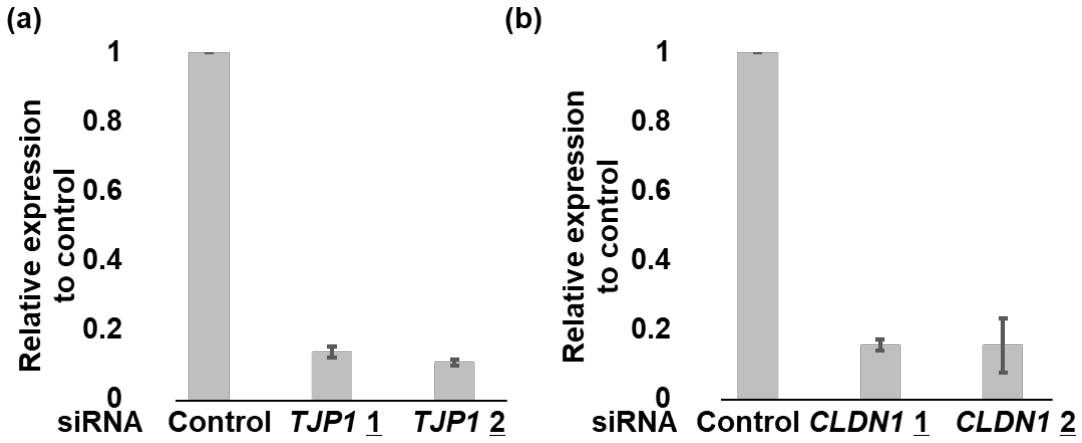


図 18　IBMK に siRNA をトランスフェクションした際のノックダウン効率を qPCR で評価した

(a) IBMK に *TJP1* の siRNA をトランスフェクションし、*TJP1* の発現量を control siRNA と比較した。

(b) IBMK に *CLDN1* の siRNA をトランスフェクションし、*CLDN1* の発現量を control siRNA と比較した

ウエスタンブロットでタンパク量のノックダウン効率を評価した。
ウエスタンブロットのバンドの intensity を Image J で定量化した。タンパクレベルでのノックダウン効率は *TJP1* が 85-87%（図 19-a）、*CLDN1* が 84-98%（図 19-b）であった。

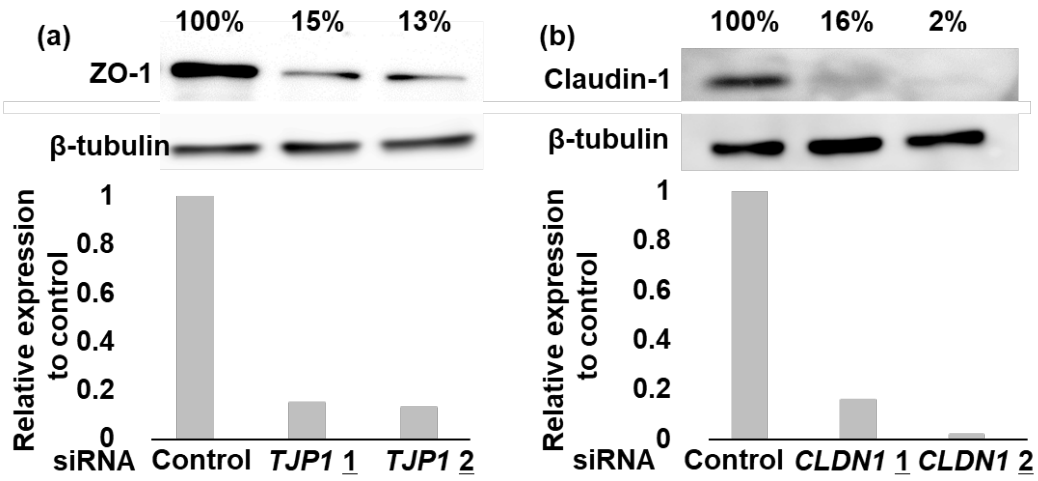


図 19　IBMK に siRNA をトランスフェクションした際のノックダウン効率をウエスタンブロットで評価した

(a) IBMK に *TJP1* の siRNA をトランスフェクション　上：ウエスタンブロットのバンド、下：ウエスタンブロットのバンドを Image J で定量グラフ化した

(b) IBMK に *CLDN1* の siRNA をトランスフェクション　上：ウエスタンブロットのバンド、下：ウエスタンブロットのバンドを Image J で定量グラフ化した

siRNA は機能していたため、これらの細胞をインサートに播種したのちに細胞シートの TER を測定した。*TJP1* のノックダウンは 20.3-21.7%の TER の低下を認め（$p<0.05$）、*CLDN1* のノックダウンは 23.7-31.0%の TER の低下を認めた。これらは control に対して有意な低下であった（$p<0.05$）（図 20）。

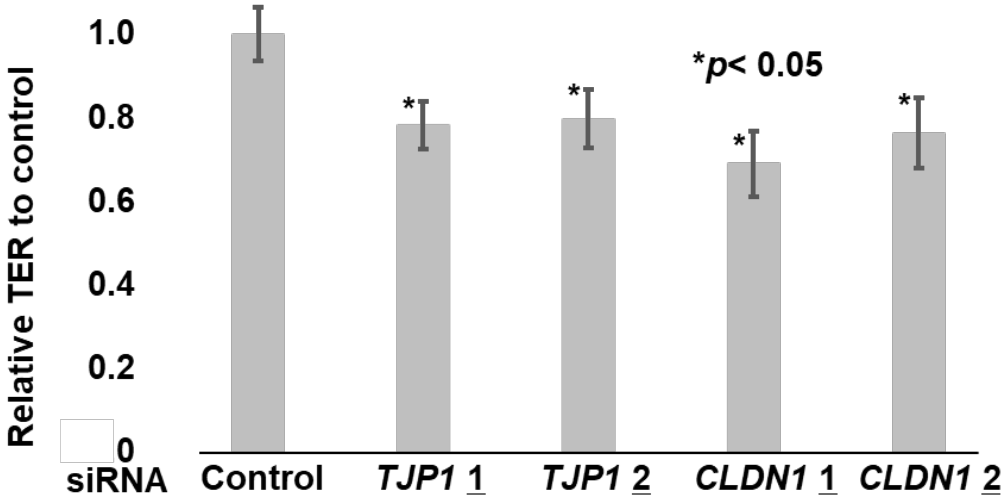


図 20　*TJP1* 及び *CLDN1* をノックダウンした際の TER の変化

TJP1, *CLDN1* を siRNA を用いてノックダウンした。ノックダウンした細胞をインサート内に播種、培地変更の後に TER を測定した。siRNA それぞれの TER 値を control の TER 値で比をとった。

8. *TJP1*, *CLDN1* をノックダウンしても paracellular flux は変化しなかった

TJP1 及び *CLDN1* をノックダウンした IBMK を用いた細胞シート上に、FITC 標識デキストランを投与し、細胞シートをどの程度通過するかを評価した。異なる分子量の FITC 標識デキストランを細胞シートの頂端側にアプライし、通過したデキストランの蛍光強度を測定し、頂端側の蛍光と比較した。Control siRNA 処理した細胞シートの頂端側に対する蛍光強度の比は、40 KDa, 4 KDa, およびフルオレセインでそれぞれ 0.002, 0.017, および 0.021 であった。*TJP1* ノックダウン細胞は、それぞれ 0.002, 0.007, 0.014 であった。*TJP1, 2* ノックダウン細胞は、それぞれ 0.002, 0.007, 0.013 であった。 *CLDN1* ノックダウン細胞は、それぞれ 0.002, 0.007, 0.011。*CLDN1, 2* ノックダウン細胞は、それぞれ 0.002, 0.007, 0.019 であった（図 21）。Control siRNA 処理した細胞の蛍光強度と比較して、いずれの分子量においても *TJP1* および *CLDN1* ノックダウン細胞の蛍光強度に有意差はなかった。

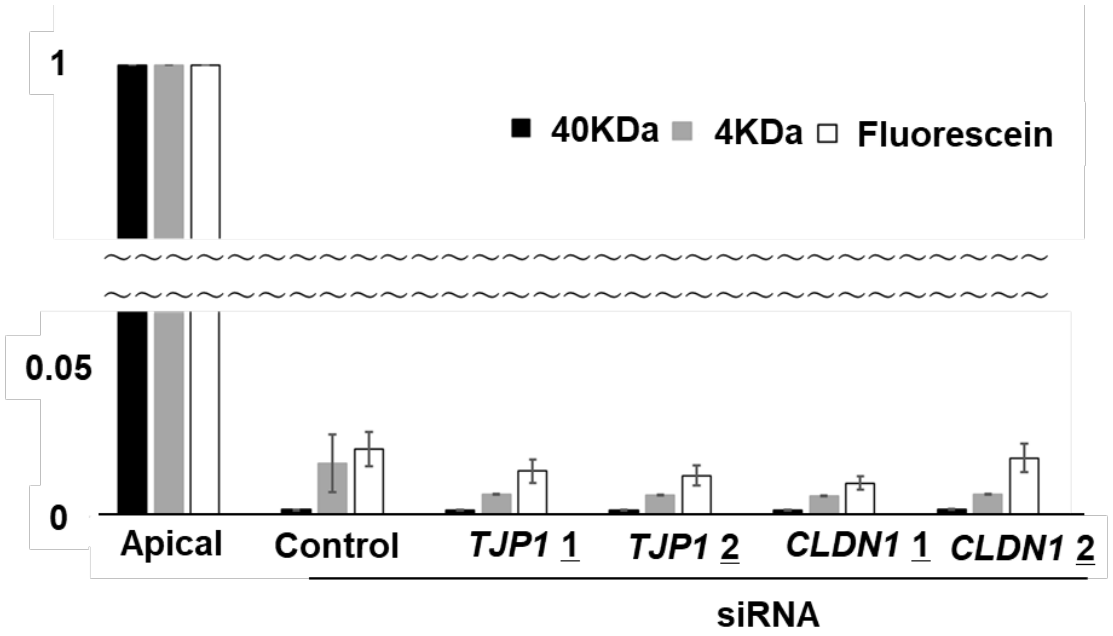


図 21　*TJP1* 及び *CLDN1* をノックダウンした細胞シートを通過した蛍光色素の量

FITC 標識デキストラン（40-KDa デキストラン、4-KDa デキストラン、およびフルオレセイン）を細胞シートの頂端側にアプライした。頂端側の蛍光強度に対して細胞シートを通過した蛍光強度の割合を算出した。

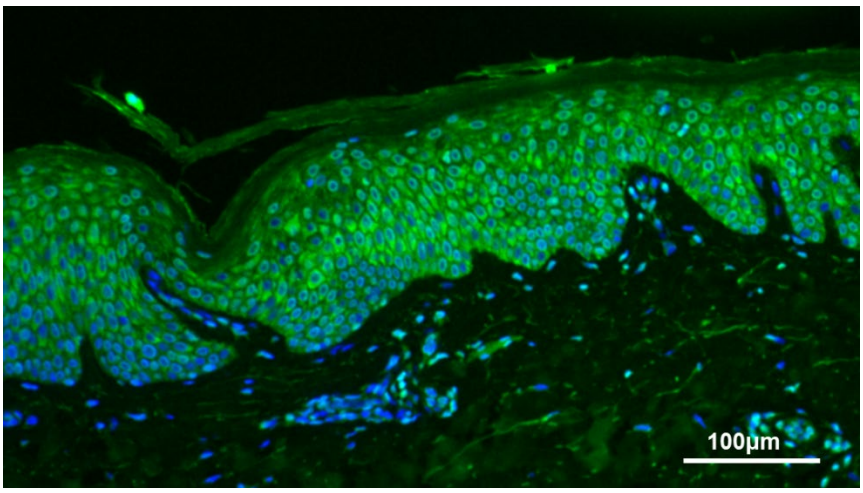


図 22 ヒト正常皮膚の抗 claudin-17 抗体を用いた免疫蛍光法

抗 claudin-17 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。核染色: DAPI（青）。

考　察

第一章ではヒトとマウスの頬粘膜にけるTJタンパクの局在ないし分布を調べた。TJは多数の膜タンパク及び足場タンパクファミリーから構成されており、どの分子に着目して解析していくべきかを判断する必要があった。このため、qPCR法を用いてmRNA発現レベルでのスクリーニングを行った。その際、過去の文献でも報告の多いclaudinファミリー、occludin ファミリー、ZOファミリーの中でどのサブタイプに注目すべきかを判断した。Occludin はTJ関連MARVELタンパクとも表記され、marvelD1-3までのサブタイプがある(Raleigh et al., 2010)。このmarvelD1はoccludinと同義であり、今回は遺伝子名を *OCLN, MARVELD2, 3* と表記した。qPCRの結果から、claudin ファミリーでは *CLDN1* は最も発現が多く、次いで *CLDN4, 17* の発現が多くみられた。*CLDN17* がコードするclaudin-17については過去の報告が乏しいため、市販抗体を購入して免疫蛍光法を行ったが（dilution 1: 200, ab232333, abcam)、細胞膜への染色が得られず、膜に染色されるclaudin-1とパターンが異なるため、本研究での解析は省略した（図22)。最も発現レベルの高かった細胞内足場タンパクの *TJP1* がコードするZO-1および膜タンパクの *CLDN1* がコードするclaudin-1に着目して解析を進めた。粘膜に多いとされる *CLDN4* がコードするclaudin-4についても免疫蛍光法の像を提示した。

粘膜の免疫蛍光法の結果から、claudin-1とZO-1は、それぞれ基底層からの4分の3と最外層からの3分の1に分布していた。特に口腔粘膜におけるZO-1の染色分布は、皮膚とは大きく異なっていた。これは、ホールマウント免疫蛍光法から、ZO-1が隣接する上層に続いていることを示していた。頬粘膜のZO-1は皮膚とは異なり不規則に分布しているが、ビオチン透過試験でのin vivoでの小分子、およびTER測定からのin vitroでのイオンに対してバリア機能を有していることを証明した。ただし、前述のqPCRデータから着目する分子を限定しており、すべての分子をチェックしなかったため、この研究ではin vivoまたはin vitroにおいてバリア機能が完全に皮膚と同等であるかは定かではない。さらに今回のin vitroの実験は単層の上皮を模倣しているため、in vitroのバリア構造は重層扁平上皮であるin vivoと完全に同じであるとは言えないだろう。

皮膚においてケラチノサイトは基底層で立方体、顆粒層で扁平になり、顆粒層でTJが形成される。対照的に、頬粘膜では、扁平な細胞ではなく立方体上の細胞が中間層と表層に配置されている。本研究では口腔粘膜のZO-1は主に中間層から表層に染色された。この中間層から表層は、皮膚の顆粒層よりもはるかに肥厚している。このような組織学的な違いは、皮膚と粘膜の間のZO-1

の分布の違いを反映していると考えられる。頬粘膜の ZO-1 の水平断切片の染色が不規則で細胞膜を全周に取り囲まず、途切れるように観察された。これは in vivo で解釈するのは困難であった。過去の研究で TJ の動的観察とコンピュータシミュレーションにより、細胞がターンオーバーするとき、その細胞の周りでだけタイトジャンクションは一時的に二重になり、新しいバリアが形成されてから古いバリアが消えることで、細胞が入れ替わってもバリアはなくならない。また、規則正しく立体的に配列した細胞どうしで、互いの位置とタイミングを合わせながら順序立って細胞が入れ替わることで、皮膚全体でのバリア機能が保持されていることが分かっている(Yokouchi *et al.*, 2016)。その結果、皮膚の ZO-1 は、顆粒層に限局して存在し、規則的な六角形として観察される。粘膜上皮も同様に TJ リモデリングシステムがあると予想される。本研究で得られたホールマウントサンプルないし水平切片の免疫蛍光法の像から、粘膜の TJ は連続的に複数層にわたり形成されている。しかし、皮膚と異なり細胞全周を取り囲むことはない。このため、ZO-1 の分布は不規則な多角形の外観を示すと解釈した。

口腔粘膜は、分化の程度によって、歯肉のような角化粘膜と頬粘膜のような非角化粘膜の 2 つの異なる領域に分類できる。皮膚の角質層と口腔粘膜の粘膜層が最も強い外-内バリアとして機能するが、TJ は内-外のバリアとして機能する。皮膚とは異なり、頬粘膜の ZO-1 は閉じた六角形の構造を示していない。開いた不規則な多角形の構造であるが、バリア機能を有していた。本研究では、透過型電子顕微鏡にて TJ と解釈される kissing point が頬粘膜の中間層に複数みられた。これは TJ が存在することを示すだけでなく、顆粒層付近の皮膚と異なり、粘膜中層にも TJ が存在することを示した。このことは、超解像度顕微鏡（N-SIM 画像）でも、ドット状の ZO-1 が細胞膜の claudin-1 に部分的に共局在していることで裏付けされ、電子顕微鏡画像を補助する技術となりえた（Shao et al., 2011)。

粘膜の In-Out バリア機能の評価で、ビオチントレーサーは ZO-1 が局在する層の下から 2-3 の層を通過したのちにブロックされた。対照的に claudin-1 はビオチントレーサーの浸潤を妨げなかった。このことは、claudin-1 単独でバリア機能は発揮せず、ZO-1 の裏打ち構造は必須であることを示唆している。また、バリア機能は、分子量の大きさも重要な要素である。そこで、in vitro でイオンや高分子量分子に対するバリア機能を評価した。siRNA を用いて *TJP1* または *CLDN1* をノックダウンされた細胞シートは、TER の有意な減少を示した。この結果は、*TJP1* または *CLDN1* がイオンバリアに重要な影響を与える可能性を示している。対照的に、大分子に対するバリア機能は *TJP1* または *CLDN1* ノックダウンは影響しなかった。これは、マウスの頬粘膜がビオチントレーサーを

ブロックしているという、in vivo の結果と一致していた。過去の報告では、複数の TJ 関連タンパクを同時にノックアウトすると、大分子に対するバリアが破綻することが知られている（Otani et al.2019)。本研究の結果から、頬粘膜の TJ では、1 つの分子をノックダウンしてもバリア機能に影響はなく、ファミリー内の他の分子（ZO-2, ZO-3 など）が補完していると考えた。

第　二　章

重層扁平上皮における ZO-1 の分布は上皮のターンオーバー速度に依存する

諸　言

第一章では頬粘膜と皮膚で ZO-1 の分布と染色パターンが異なることを報告したが（Imafuku et al., 2021)、その機序については明言することはできなかった。第一章で得られたホールマウントサンプルや水平切片の免疫蛍光法の像から、粘膜では複数層の細胞に ZO-1 が線状に連続性に局在し TJ を形成することが示唆された。皮膚と粘膜でこのような差が生じる理由として、私は「組織のターンオーバー期間の違いが ZO-1 の分布と染色パターンの違いに関与する」という仮説をたてた。一般的に、頬粘膜のターンオーバー期間は 3.2-5.8 日（Cutright and Bauer, 1967）に対して、皮膚では 40-56 日(Halprin, 1972)と大きな差がある。そこで、正常組織に対してターンオーバー速度の変化する皮膚疾患と比較することで、ZO-1 の分布の違いを検証できると推察した。炎症性皮膚疾患の一つ乾癬は皮膚のターンオーバー期間は 4-5 日と大幅に短縮することが知られている（Lowes et al., 2014)。一方、扁平苔癬は基底細胞が炎症細胞浸潤により障害されるためターンオーバー期間は延長する(Lehman et al., 2009)。さらに、マイトマイシン C は DNA 複製を阻害することで、細胞の増殖を低下させることができる。一方でイミキモド外用マウスは乾癬モデルマウスとしてよく用いられており（Gilliet et al., 2004)、細胞増殖を加速させることができる。これらの薬剤やマウスモデルを使用することで in vivo で ZO-1 の発現量の変化が生じるかを検証した。

TJ の分布が変化する原因を探ることで、バリア機能が破綻する様々な疾患の病態解明や治療法開発へとつなげていく。

方　法

【実験動物】

本研究の動物実験は北海道大学大学院医学研究院の機関審査委員会の承認を得て、北海道大学動物実験に関する規定に従って行った（#15-0166, #19-0164)。C57Bl/6 マウスは Clea（東京、日本）から購入した。マウスは生後 6-8 週齢のものを使用した。マウスに対する麻酔は PBS (Phosphate-buffered saline): 2.9 mL/kg, 塩酸メデトミジン: 0.3 mg/kg（共立ファーマ、東京、日本)、ミダゾラム: 4 mg/kg（アステラス製薬、東京、日本)、ブトルファノール酒石酸塩: 5 mg/kg（Meiji Seika ファルマ、東京、日本）を混合して調製し、うち 100 µL をマウス腹腔内投与した。また麻酔拮抗薬として、PBS: 4.4 µL/kg、アチパメゾール塩酸塩: 3.0 mg/kg（共立ファーマ）を混合して調製し、100 µL を腹腔内投与した。

【ヒト検体】

北海道大学大学院医学研究院の施設内倫理審査委員会によって人研究のすべてを承認された（医 14-063、医 15-025)。この研究はヘルシンキ宣言に則り実施した。ヒト頬粘膜及び皮膚サンプルは参加者またはその法定後見人により書面にて同意を得た。その際に包括同意書及び研究同意書に署名を頂戴したのちに採取及び使用した。ヒト正常皮膚（N=3)、ヒト乾癬組織（N=3)、ヒト正常頬粘膜（buccal mucosa: BM）(N=3)、ヒト口腔扁平苔癬（oral lichen planus: OLP）(N=3)。

【HE 染色】

ヒト検体の HE 染色は、北海道大学病院病理部の検体を使用し、マウス検体の HE 染色は Morpho Technology 社への外注にて行った。

【免疫組織化学】

ヒト皮膚及び頬粘膜検体をホルマリン固定後パラフィンに包埋した標本を厚さ 3 μm で連続切片とし，キシレンと段階希釈したアルコールによって脱パラフィン化した．TBS で洗浄し，切片を Dako EnVision FLEX Target Retrieval Solution (pH 9.0) (K8004, DAKO)で 95℃, 20 分間反応させ、抗原賦活化を行った。切片を H_2O_2 でブロッキングし、抗 Ki-67 抗体(NB600-152, dilution 1: 200, Novus Biologicals)と 60 分間反応させ、HRP 標識の抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体（ヒストファインシンプルステイン MAX-PO (MULTI), 424151, ニチレイバイオサイエンス)で 30 分間反応させた後、発色の為に 5 分間 DAB (3,3’-diaminobenzidine, 425011, ニチレイバイオサイエンス）と反応させた。カウンター染色としてヘマトキシリン染色を行い、1.5 分間反応させた。(Fujimura et al., 2021)。

【免疫蛍光法】

第一章に追加して、本研究で用いた抗体は一次抗体として抗 Ki-67 抗体 (NB600-152, dilution 1: 200, Novus Biologicals)、抗 ZO-1 抗体 (ab216880, dilution 1: 200, abcam)、二次抗体として、FITC-anti-rabbit IgG (234, dilution 1: 200, MBL) を第一章と同様の方法で使用した。

【細胞培養】

不死化ヒト角化細胞を購入した (Ker-CT®, ATCC)。ヒトケラチノサイトは KGMT™-Gold Keratinocyte Growth Medium BulletKit™ (#00192060, Lonza Bioscience, Switzerland) 中、 37℃, 5% CO_2 下で培養した。培養中に使用した試薬は PMA (phorbol myristate acetate, P1585-1MG, sigma) および EGF (epidermal growth factor, AF-100-15, PeproTech, NJ) を用いた。

【TER 測定】

ヒトケラチノサイトは Millicell Hanging Cell Culture Inserts (0.4 μm ポアサイズ、MCHT24H48、Merck) で、KGMT™-Gold Keratinocyte Growth Medium BulletKit™ (#00192060, Lonza Bioscience, Switzerland) 中、 37℃, 5% CO_2 下で 2-3 日培養し、培地を KGMT™-Gold から 10% Fetal bovine serum (FBS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM; Gibco, Gaitgibohersburg, MD) に変更し、2 日間培養した。インサート内外間の電気抵抗は、Millicella®ERS-2 電気抵抗システム (MERS00002, Merck) を用いて測定した。サンプルの TER を計算するために、ブランク値を測定値から差し引き、次に Transwell フィルターの面積を掛けて、単位面積抵抗 (Ω・cm2) を求めた。

【3 次元培養】

ヒトケラチノサイトは Millicell Hanging Cell Culture Inserts (0.4 μm ポアサイズ、MCHT24H48、Merck) を用いて、KGMT™-Gold Keratinocyte Growth Medium BulletKit™ (#00192060, Lonza Bioscience, Switzerland) 中、37℃, 5% CO_2 下で 2-3 日培養し、インサート内の培地を破棄、その後インサート外の培地を CnT-Prime epithelial 3D airlift medium (#CnT-PR-3D; Cellntec)に変更し 10 日間培養した。

【画像解析】

免疫蛍光法の輝度解析に Image J の plugin “Extract maxvalue”を使用 (千葉大学、北畑教授より提供)。

【マイトマイシンC投与マウス】

過去の文献を参考に一部改変を加え実施た（Palomo et al., 2018)。マイトマイシンC（富士フイルム株式会社）を購入し、PBSを溶媒として2 mg/mLに溶液を調製した。C57BL/6Jマウスに5-10 mg/kgのマイトマイシンC溶液を腹腔内注射し10日後に安楽死させ、口腔粘膜組織を回収した。投薬前と安楽死前で体重測定を行った。

【イミキモドマウスモデル】

5%イミキモドクリーム（持田製薬株式会社）をC57BL/6Jマウス耳の背側に連続4日間外用した。対側耳はvehicleとしてワセリンを外用した。毎日耳の厚さを pocket thickness gauge (Mitutoyo Europe GmbH, Dusseldorf, Germany）を使用して測定した。外用開始から4日後に安楽死させ、サンプルを回収した。

【ウエスタンブロッティング法】

一章と同様の方法でライセート回収、サンプル調製を行った。

結　果

1. ZO-1 の分布はヒト正常頬粘膜と OLP で異なり、ヒト乾癬組織と正常皮膚でも異なっていた

ヒト正常頬粘膜及び OLP の代表的な HE 染色を示す。正常頬粘膜と OLP の上皮の厚さを比較すると正常頬粘膜では平均 664 μm、OLP では平均 195 μm となり OLP の上皮は菲薄化していた（図 23-a, c)。抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光法では、頬粘膜では最外層から粘膜上皮の 1/2 程度まで検出され、不規則な点状ないし線状に観察された（図 23-b, b’)。OLP では最外層から粘膜の 1/5 程度まで ZO-1 が検出され、点状及び線状の沈着がみられた（図 23-d, d’)。

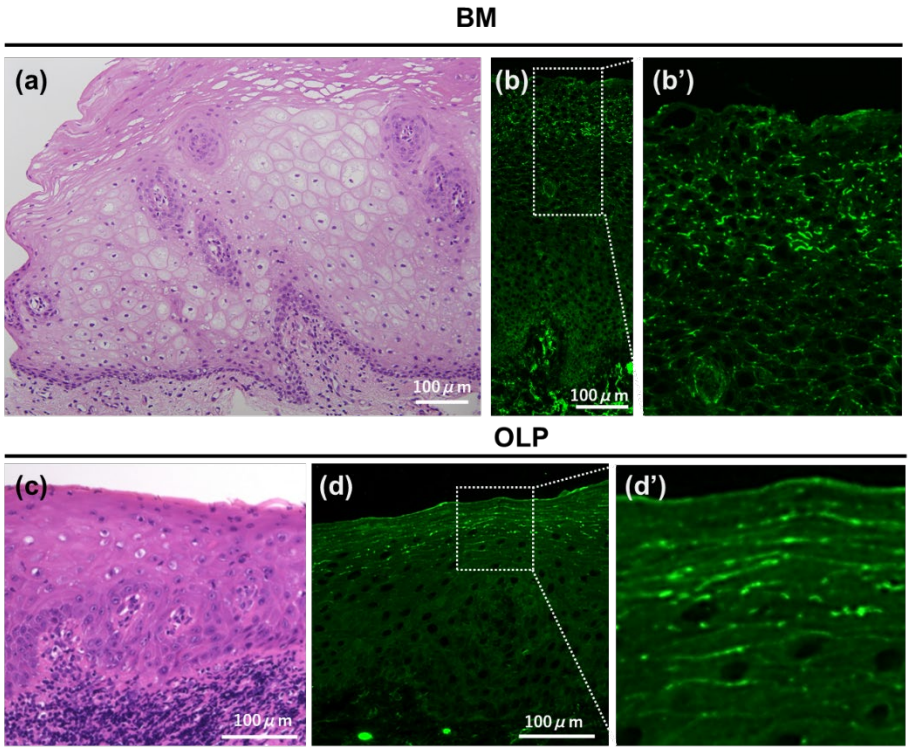


図 23　ヒト正常頬粘膜及び OLP の HE 染色及び抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光法

(a) ヒト正常頬粘膜（BM）の HE 染色。

(b) 正常頬粘膜において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(b’) (b) で四角の領域の強拡大像。

(c) ヒト OLP の HE 染色。

(d) OLP において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(d’) (d) で四角の領域の強拡大像。

次に、ヒト乾癬組織及びヒト正常皮膚の代表的な HE 染色を示す（図 24-a, c)。表皮の厚さを比較すると、乾癬組織では平均 410 μm、正常皮膚では 52 μm と明らかに表皮の厚さが異なっていた（図 24-a, c)。抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光法では、乾癬では角層直下から表皮全層の 1/3 程度まで検出され、細胞膜の一部を取り囲むような線状及び点状の沈着がみられた（図 24-b, b’)。正常皮膚では顆粒層付近から 1-2 層まで ZO-1 がみられ、細胞膜を取り囲むように観察された（図 24-d, d’)。

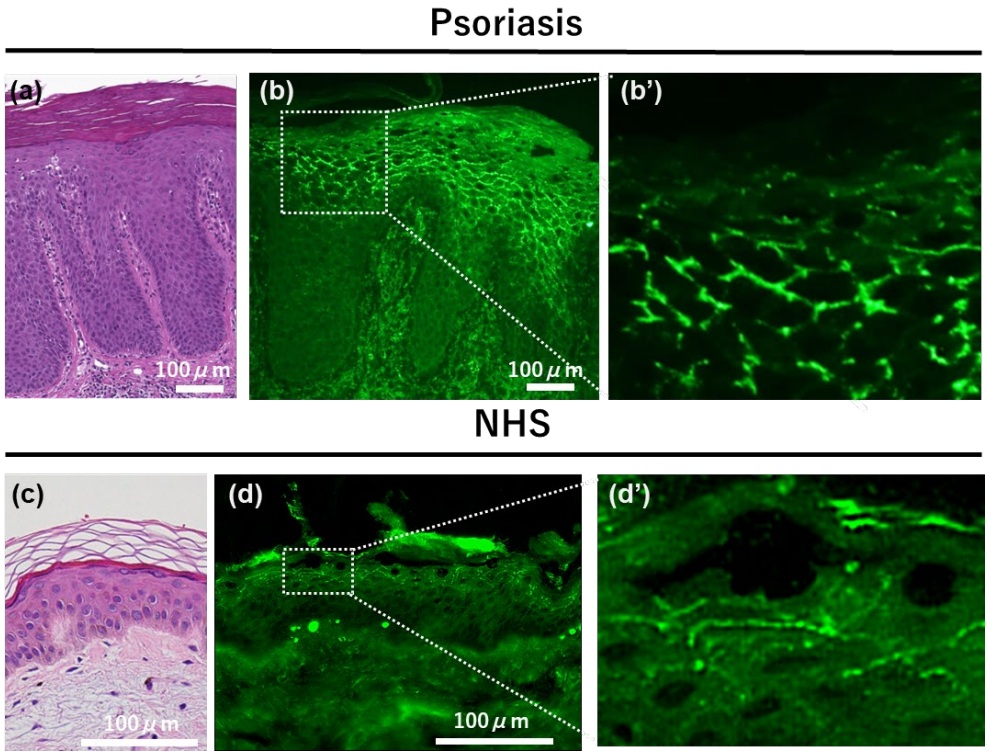


図 24　ヒト乾癬組織及びヒト正常皮膚のＨＥ染色及び抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光法

(a) ヒト乾癬組織の HE 染色。
(b) 乾癬において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。
(b’) (b) で四角の領域の強拡大像。
(c) ヒト正常皮膚の HE 染色。
(d) 正常皮膚において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。
(d’) (d) で四角の領域の強拡大像。

上皮全層に対する ZO-1 が検出される範囲を定量化するために Image J の plugin である”Extract Maxvalue”を使用した。正常頬粘膜と OLP の抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光法の像を示す（図 25-a, c, c’）。これらの画像を用いて plugin を使用し、輝度の推移をグラフ化した（図 25-b, d)。上皮全体の輝度をとり、ZO-1 が検出されている箇所は最大輝度の 75%をカットオフとして設定した。頬粘膜で ZO-1 は上皮全体の約 50%に分布していたが、OLP では約 23%であった（図 25-e）（p<0.001)。

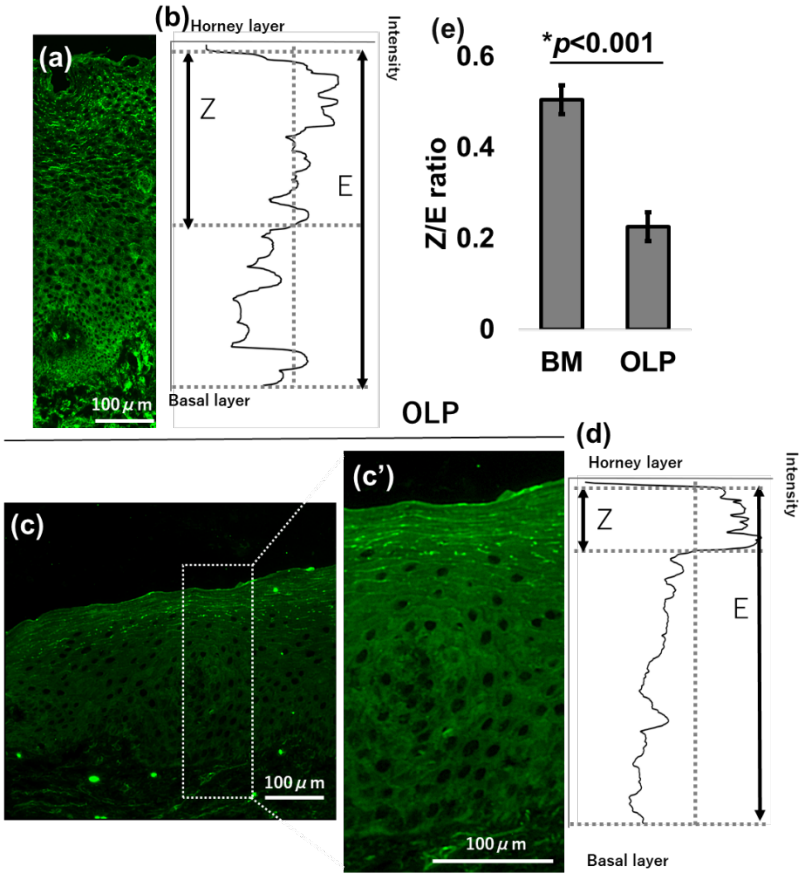


図 25　ヒト正常頬粘膜及び OLP 組織で ZO-1 が局在する範囲を定量化した

(a)正常頬粘膜において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(b)Image J を用いて上皮の全層の輝度を測定した。縦軸: 輝度、横軸: 角層からの距離、E: 上皮全体、Z: ZO-1 が検出された範囲

(c)OLP において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(c’)(c) の四角の領域の強拡大像。

(d)Image J を用いて上皮の全層の輝度を測定した。縦軸: 輝度、横軸: 角層からの距離、E: 上皮全体、Z: ZO-1 が検出された範囲

(e)(b) と (d) の Z と E の距離の比をとりグラフ化した。

同様に正常皮膚と乾癬組織の抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光法の像を示す（図 26-a，a’，c）。これらの画像を用いて plugin を使用し、輝度の推移をグラフ化した（図 26-b，d）。正常皮膚で ZO-1 は上皮全体の約 16%に分布していたが、乾癬では約 31%であった（図 26-e）（p=0.03）。

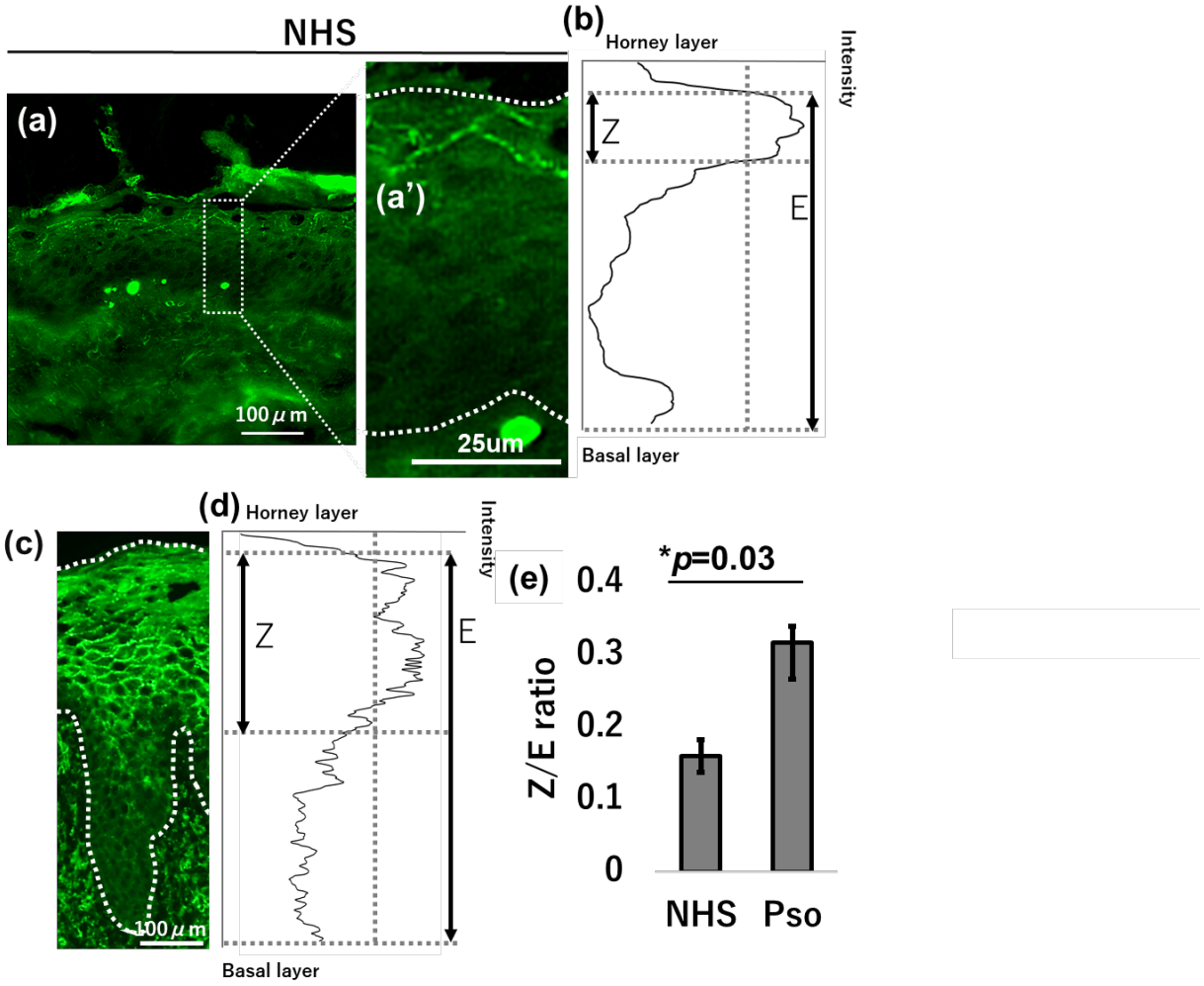


図 26　ヒト正常皮膚及び乾癬組織で ZO-1 が局在する範囲を定量化した

(a)正常皮膚において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(a’)(a) の四角の領域の強拡大像。

(b)Image J を用いて上皮の全層の輝度を測定した。縦軸：輝度、横軸：角層からの距離、E：上皮全体、Z：ZO-1 が検出された範囲

(c)乾癬において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(d)Image J を用いて上皮の全層の輝度を測定した。縦軸：輝度、横軸：角層からの距離、E：上皮全体、Z：ZO-1 が検出された範囲

(e)(b) と (d) の Z と E の距離の比をとりグラフ化した。

正常頬粘膜に対して OLP の細胞増殖能が低下していること、さらに正常皮膚に対して乾癬組織の細胞増殖能が上昇していることを確認するために、抗 Ki-67 抗体を用いた免疫染色を行った。代表的な染色結果を示す（図 27-a, b, d, e)。100 μm 当たりの陽性細胞数を測定すると頬粘膜は 49.9、OLP では 12.7 と有意差を認めた（p<0.001）（図 27-c)。乾癬では 62.6、正常皮膚は 11.0 であり有意差を認めた（p<0.001）（図 27-f)。

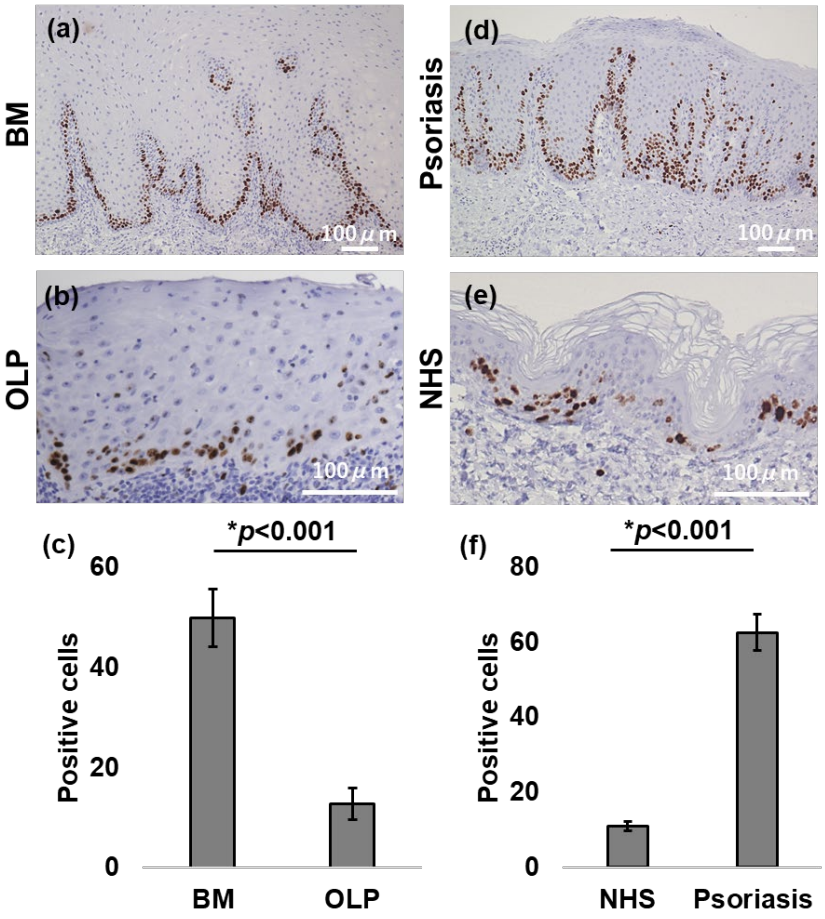


図 27　ヒト正常頬粘膜、OLP、乾癬、正常皮膚の抗 Ki-67 抗体を用いた免疫染色

(a) ヒト正常頬粘膜（BM）
(b) ヒト OLP
(c) ヒト正常頬粘膜（BM）と OLP の 100 μm 当たりの Ki-67 陽性細胞数の比較
(d) ヒト乾癬組織
(e) ヒト正常皮膚
(f) ヒト正常皮膚と乾癬組織の 100 μm 当たりの Ki-67 陽性細胞数の比較

8. マイトマイシンＣを腹腔内投与したマウスの頬粘膜は菲薄化し、ZO-1 が分布する層が減少した

OLP の組織が正常頬粘膜と比較して上皮の菲薄化がみられ、Ki-67 染色からも細胞増殖能が低下していると思われた。OLP と同様に口腔粘膜の細胞周期を遅くするために、マイトマイシンＣ（mitomycin C: MMC）を用いた。マウス腹腔内に MMC を 5-10 mg/kg で腹腔内投与し、10 日後に頬粘膜を採取した。ネガティブコントロールとしてジメチルスルホキシド（Dimethyl sulfoxide: DMSO）を使用した（図 28-a)。10 mg/kg 投与したマウスの体重を MMC の投与前と安楽死前で測定したところ、投与前の体重を 100%とすると DMSO で 110%、MMC 投与で 88%であった。MMC 投与マウスの方が体重は低下傾向であったが、有意差はなかった（p=0.07）（図 28-b)。

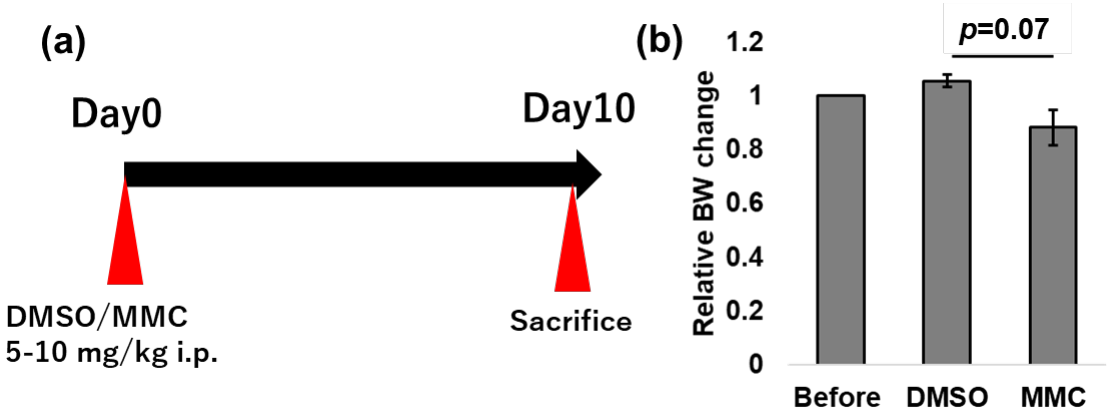


図 28　MMC 投与マウスの体重変化

(a)MMC を投与する際のスケジュール

(b)MMC ないし DMSO 投与前と安楽死前の体重変化

採取したマウスの頬粘膜の代表的な HE 染色を示す（図 29-a, b, c）。頬粘膜の最も厚みのある個所を測定し、グラフ化した。頬粘膜の厚さは DMSO で 61-247 μm, 5 mg/kg 投与群で 32-98 μm, 10 mg/kg 投与群で 25-72 μm であった。DMSO と 5 mg/kg（p=0.006）, DMSO と 10 mg/kg（p<0.001）, 5 mg/kg と 10 mg/kg（p=0.033）とそれぞれ有意差を認め、MMC 投与量に依存して頬粘膜の菲薄化を認めた（図 29-d）。次に、粘膜上皮全層に対する顆粒層の比率を測定した。上皮全層を 100%とすると、顆粒層の割合は DMSO 群で 63%, 5 mg/kg で 42%, 10 mg/kg で 22%であった。DMSO と 5 mg/kg（p<0.001）, DMSO と 10 mg/kg（p<0.001）, 5 mg/kg と 10 mg/kg（p=0.004）とそれぞれ有意差を認めた（図 29-e）。

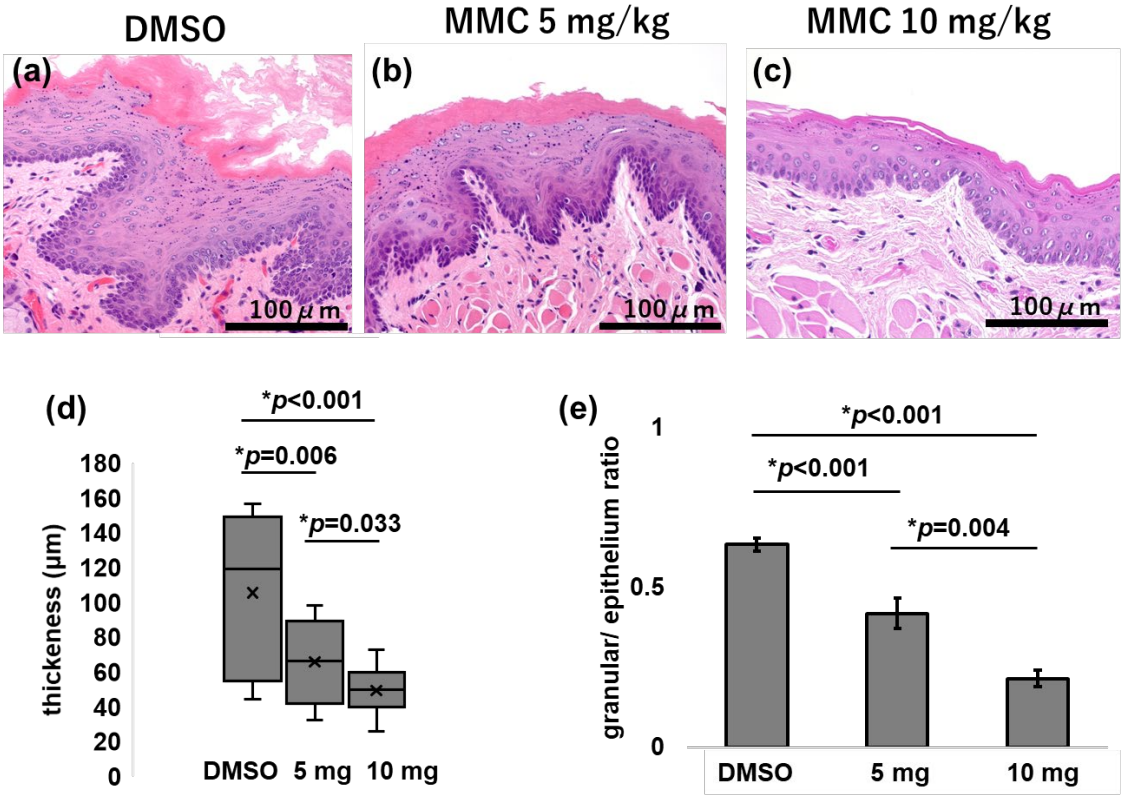


図 29　MMC 投与後のマウス頬粘膜

(a)DMSO 投与後のマウス頬粘膜の HE 染色。

(b)MMC 5 mg/kg 投与後のマウス頬粘膜の HE 染色。

(c)MMC 10 mg/kg 投与後のマウス頬粘膜の HE 染色。

(d)MMC ないし DMSO 投与後のマウス頬粘膜上皮の厚さを測定しグラフ化した。

(e)MMC ないし DMSO 投与後のマウス頬粘膜上皮全層に対する顆粒層の比をグラフ化した。

MMC の投与により頬粘膜の細胞増殖能が低下することを確認すべく、DMSO 及び MMC10 mg/kg 投与後のマウス頬粘膜組織の抗 Ki-67 抗体を用いた免疫蛍光法をおこなった。代表的な結果を示す（図 29-a, b)。MMC 10 mg/kg を投与すると、Ki-67 の陽性細胞率が低下した。

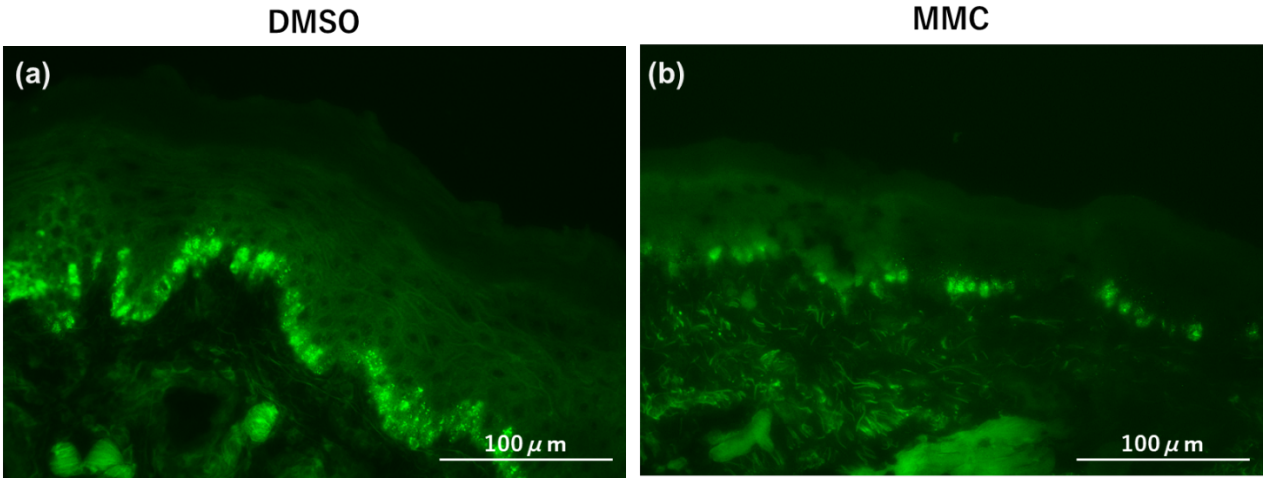


図 29　DMSO 及び MMC 投与後のマウス頬粘膜の抗 Ki-67 抗体を用いた免疫蛍光法

(a)DMSO 投与後のマウス頬粘膜。

(b)MMC 10 mg/kg 投与後のマウス頬粘膜。

次に DMSO および MMC 10 mg/kg 投与後のマウス頬粘膜の抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光法の像を示す（図 30-a, b)。Image J の plugin である”Extract maxvalue”を用いて上皮全体の輝度測定を行い、全層に対する ZO-1 の層の比率を測定した（図 30-a’, b’)。それぞれの比率は DMSO で 27%, 10 mg/kg で 16%であった（図 30-c）(p=0.037)。

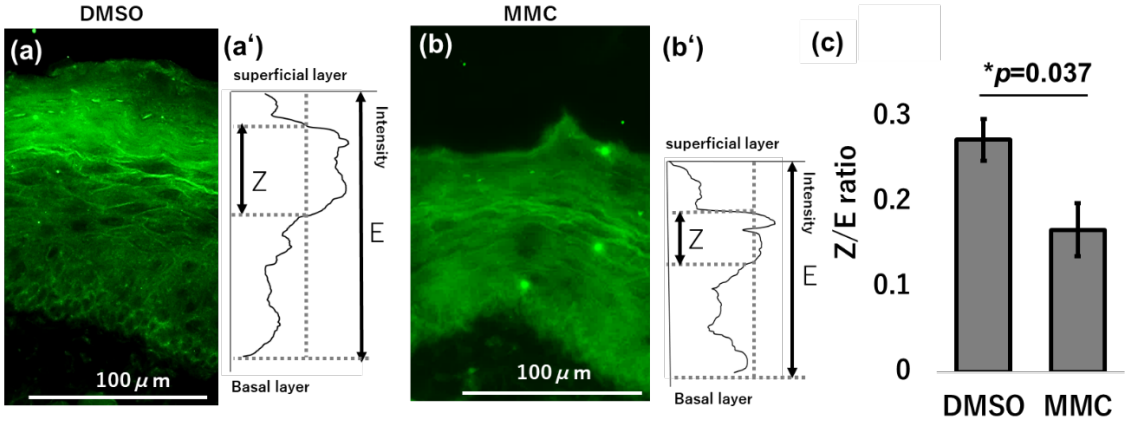


図 30　MMC 及び DMSO 投与後のマウス頬粘膜における ZO-1 の分布

(a)DMSO マウスにおいて抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(a’)Image J を用いて上皮の全層の輝度を測定した（右)。縦軸: 輝度、横軸: 角層からの距離、E: 上皮全体、Z: ZO-1 が検出された範囲

(b)MMC マウスにおいて抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(b’)Image J を用いて上皮の全層の輝度を測定した。縦軸: 輝度、横軸: 角層からの距離、E: 上皮全体、Z: ZO-1 が検出された範囲

(c)(b) と (d) の Z と E の距離の比をとりグラフ化した。

9. イミキモドクリーム外用マウスの耳は肥厚し、ZO-1 が分布する層が増加した

マウス正常耳皮膚にイミキモド（Imiquimod: IMQ）を外用して乾癬を誘導し ZO-1 分布の変化を検証した。連日マウスの耳の背側に IMQ ないし vehicle としてワセリンを外用し、４日目に安楽死させたのちに耳のサンプルを回収した（図 31-a）。Day4 で vehicle の耳は大きな変化は見られなかったが、IMQ では淡い紅斑及び鱗屑を付着していた。耳の厚さは、Day0 で vehicle が 0.214-0.252 mm であるのに対し IMQ グループは 0.252-0.271 mm であった。Day4 のサンプル回収前に測定したところ、vehicle では 0.209-0.258 mm, IMQ では 0.325-0.434 mm であり、IMQ 外用側の耳は有意に肥厚した（p<0.001）（図 31-b）。

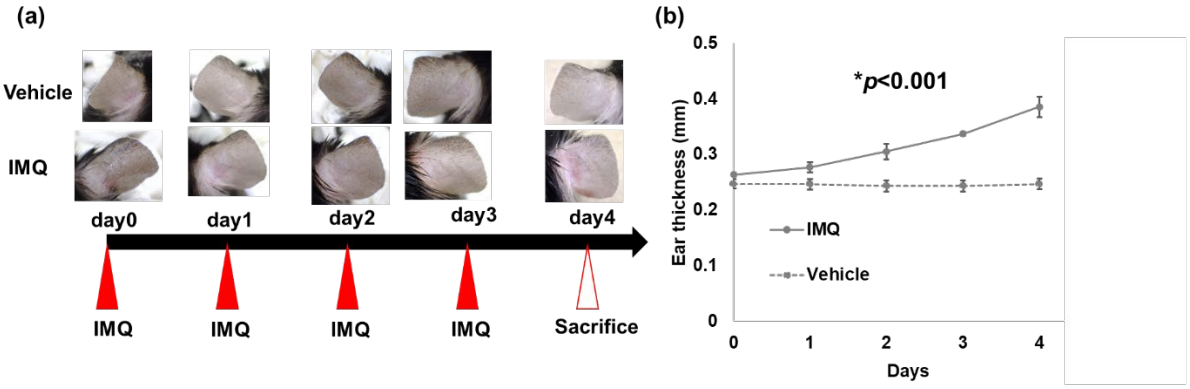


図 31　マウス耳皮膚に IMQ を外用した

(a) IMQ 外用のスケジュール

(b) Day0 に IMQ クリームをマウスの耳背側に外用し、Day4 までマウスの耳の厚さを毎日計測した。

IMQ を外用したマウス耳の HE 染色を示す（図 32-a)。IMQ を外用した側は角層がコンパクトになり、表皮の肥厚とそれに伴う顆粒層の肥厚がみられた。顆粒層の細胞 1 個当たりの厚さと横幅を測定したところ、vehicle を外用した身側の耳の厚みは 0.49-1.8 μm, IMQ を外用した耳の厚みは 3.03-7.07 μm となり、有意差を認めた（p<0.001）（図 32-b)。細胞の横幅については vehicle が 17.2-22.5 μm, IMQ が 17.1-34.8 μm となり、やや IMQ の方が幅広になる傾向はあったが有意差はなかった（p=0.06）（図 32-c)。

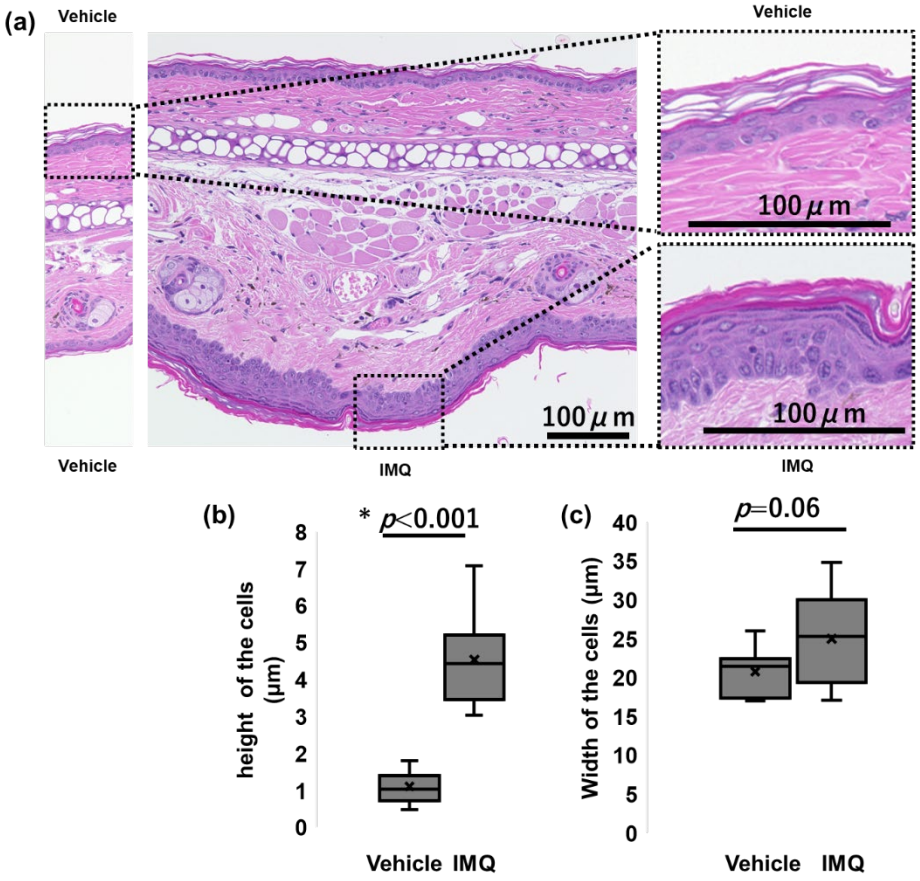


図 32　IMQ マウス耳皮膚の HE 染色及び顆粒層細胞の大きさ

(a)マウス耳皮膚の HE 染色。

(b)マウス耳皮膚の顆粒層細胞 1 個当たりの厚さの比較

(c)マウス耳皮膚の顆粒層細胞 1 個あたりの横幅の比較

マウス耳皮膚の水平断切片を作製し、抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光法を行った。Vehicle を外用した耳では ZO-1 が細胞膜上に規則的な六角形構造を呈した。一方で IMQ を外用した耳では ZO-1 で囲まれる形状が不規則な多角形を呈した（図 33-a, b)。

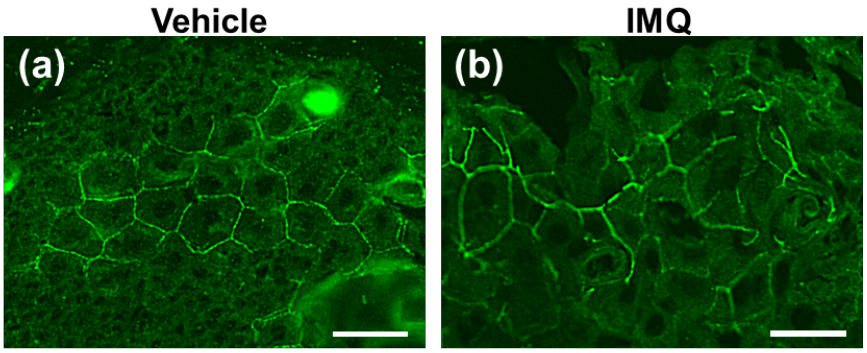


図 33　IMQ マウス耳皮膚の水平断切片の抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光法

(a)Vehicle マウスにおいて抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(b)IMQ マウスにおいて抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

マウスの back skin を用いて同様に IMQ マウスを作製した。Day4 の写真を示す。IMQ 外用側は鱗屑を伴う紅斑を認めた（図 34-a)。抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光法での垂直切片及び水平切片の像を示す。垂直切片において vehicle では角層直下に ZO-1 が検出されたが、IMQ では表皮の肥厚に伴い顆粒層から複数層にかけて ZO-1 が線状、一部点状に観察された（図 34-b, c)。水平切片で、vehicle では規則的な六角形状、IMQ では ZO-1 が細かく不規則な線状に観察された（図 34-d, e)。

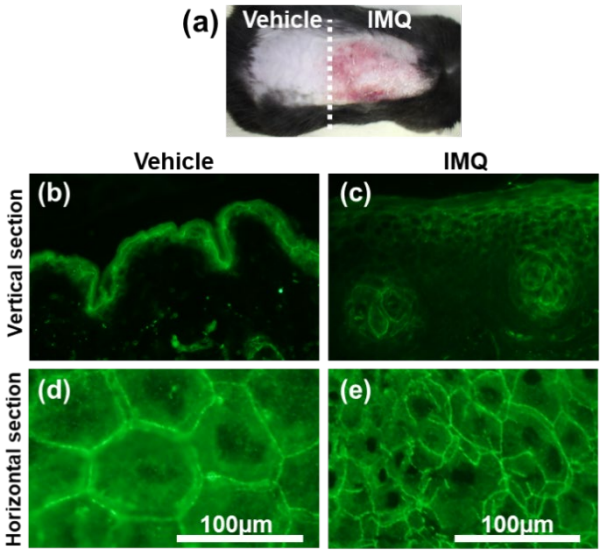


図 34　IMQ をマウス back skin に外用した時の抗 ZO-1 抗体を用いた免疫蛍光法

(a)マウス back skin に IMQ を外用し day4 の写真。
(b)Vehicle マウス back skin 垂直切片において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。
(c)IMQ マウス back skin 垂直切片において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。
(d)Vehicle マウス back skin 水平切片において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。
(e)IMQ マウス back skin 水平切片において抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

IMQ を外用した時の細胞増殖能が増加しているかを確認すべく抗 Ki-67 抗体を用いた免疫蛍光法を行った。Vehicle と比較して IMQ の方で Ki-67 陽性細胞の増加を認めた（図 35-a, b)。

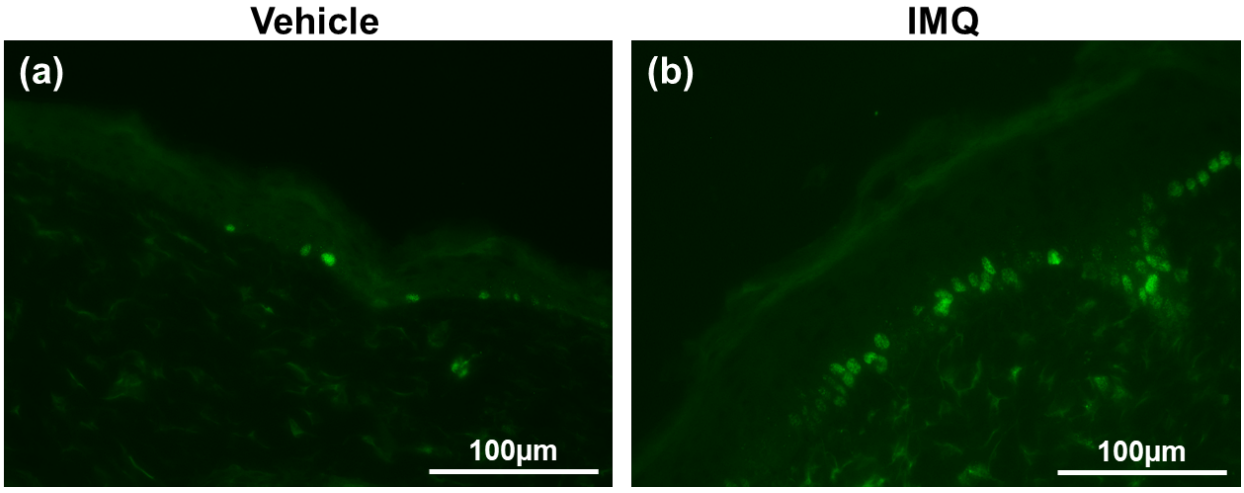


図 35　マウス back skin の抗 Ki-67 抗体を用いた免疫蛍光法

(a) Vehicle マウス back skin において抗 Ki-67 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

(b) IMQ マウス back skin において抗 Ki-67 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。

IMQ マウスにおいても正常粘膜同様に ZO-1 が観察される像が不規則になるため、バリア機能を検証する目的でビオチン透過試験を行った。Vehicle ではビオチントレーサーは基底層を通過したが、角層直下の ZO-1 が局在しているところに一致してビオチントレーサーのシグナルは減衰した(図 14F-a)。IMQ で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、角層直下付近でビオチントレーサーのシグナルは減衰した（白三角）(図 36-b)。

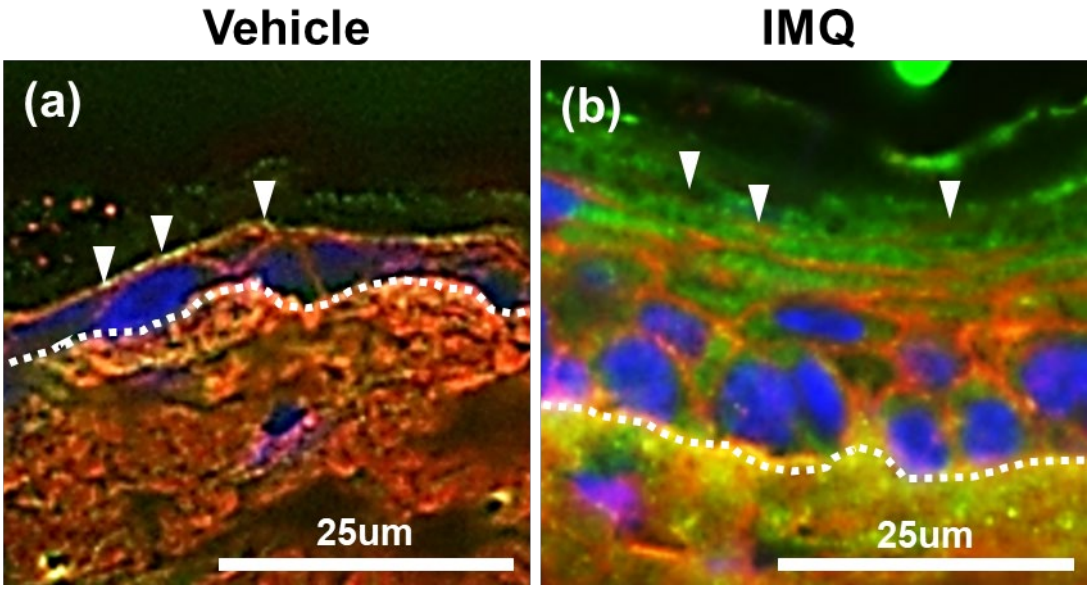


図 36　マウス back skin のビオチン透過試験

(a)Vehicle マウス back skin において、抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。ビオチントレーサーを texas-red 標識 streptavidin で検出。基底膜（白点線)。

(b)IMQ マウス back skin において、抗 ZO-1 抗体を Alexa Fluor® 488 標識二次抗体で検出。ビオチントレーサーを texas-red 標識 streptavidin で検出。基底膜（白点線)。

10. In vitro で IMQ と PMA はヒトケラチノサイトを増殖させなかった

In vivo で MMC を投与すると細胞増殖能を低下させ、IMQ を外用すると細胞増殖を促進させることが確認できた。これらの現象を in vitro で検証すべく、IMQ 及び MMC を培養細胞に添加し細胞増殖能を変化させ、ZO-1 のタンパクレベルでの発現や TER 測定を行いバリア機能にどれほど影響を与えるかを確認した。

ヒトケラチノサイトを 1×10^4 個、12 well プレートに播種し、DMSO, IMQ, MMC をそれぞれ投与した。3 日間培養し、毎日細胞数を計測した。Day3 の時点での細胞数は DMSO, IMQ, MMC それぞれ 12.8×10^4, 11.8×10^4, 0.13×10^4 であった（図 37）。DMSO と IMQ で有意差はなかった。

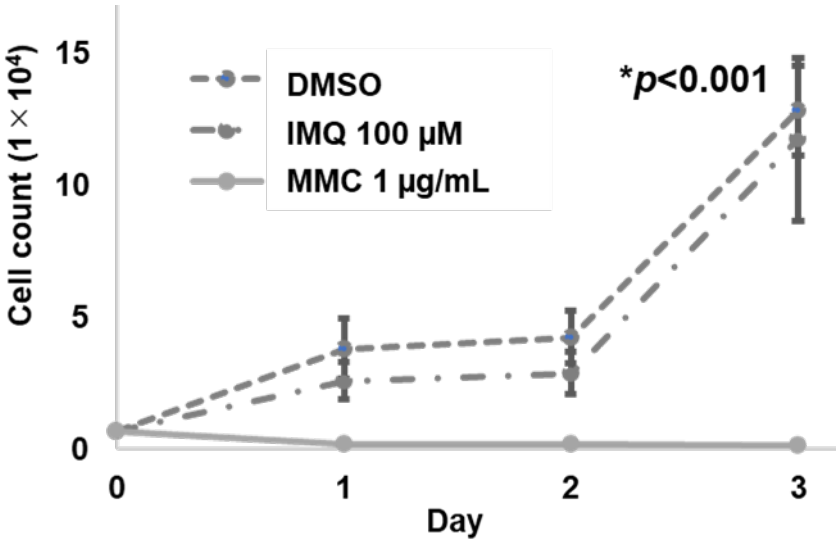


図 37　IMQ, DMSO を投与した際の細胞数の推移

Day0 で 1×10^4 個のヒトケラチノサイトを播種し、DMSO, IMQ を最終濃度 100 μM, MMC を最終濃度 1 μg/mL になるようにそれぞれ投与した。Day1-3 での細胞数をそれぞれ計測した。

Day0 で 1×10^4 個のヒトケラチノサイトを播種し、DMSO, IMQ を最終濃度 100 μM, MMC を最終濃度 1 μg/mL になるようにそれぞれ投与した。Day3 の時点で細胞溶解バッファーを用いてライセートを回収しウエスタンブロットを行った。細胞数の推移と同様に MMC では β-tubulin の減弱がみられ、それに伴い、ZO-1 の発現も低下した（図 38-a)。Image J を用いて定量化し、β-tubulin に対する ZO-1 の比率を算出したところ、DMSO が 52.3%, IMQ が 51.8%, MMC が 40.9% であった（図 38-b)。

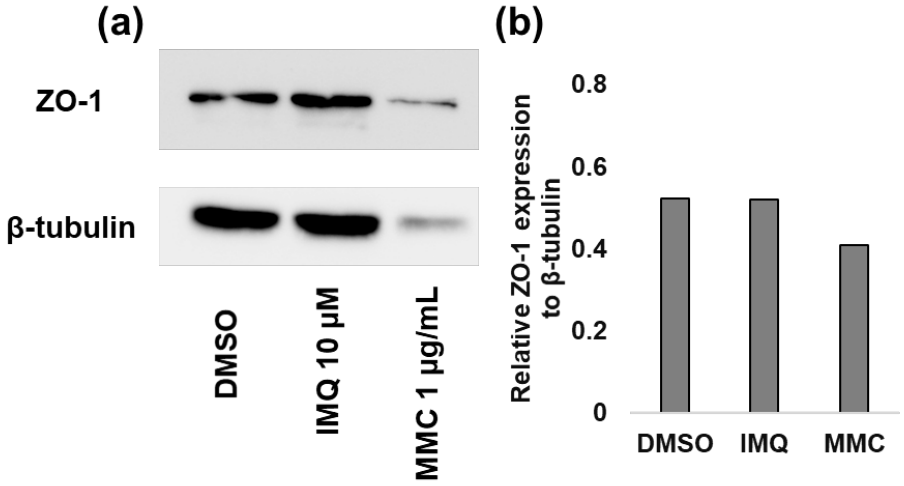


図 38　ヒトケラチノサイトに IMQ, MMC を投与した際のウエスタンブロット

(a)Day0 で 1×10^4 個のヒトケラチノサイトを播種し、DMSO, IMQ を最終濃度 100 μM, MMC を最終濃度 1 μg/mL になるようにそれぞれ投与した。Day3 の時点で細胞溶解バッファーを用いてライセートを回収し、ウエスタンブロットを行った。

(b)(a) のバンドを Image J で定量化し、β-tubulin に対する ZO-1 の発現量を定量化した。

Day0 でヒトケラチノサイトをインサートに 1×10^5/insert となるよう播種し、DMSO および IMQ が最終濃度 100 μM となるように投与した。Day3 の時点で TER を測定し IMQ が in vitro でバリア機能に影響を与えるかを調べた。DMSO で 34.2-38.1 Ω・cm^2, IMQ は 32.4-37.5 Ω・cm^2 であり、有意差はなかった（p＝0.614）（図 39）。

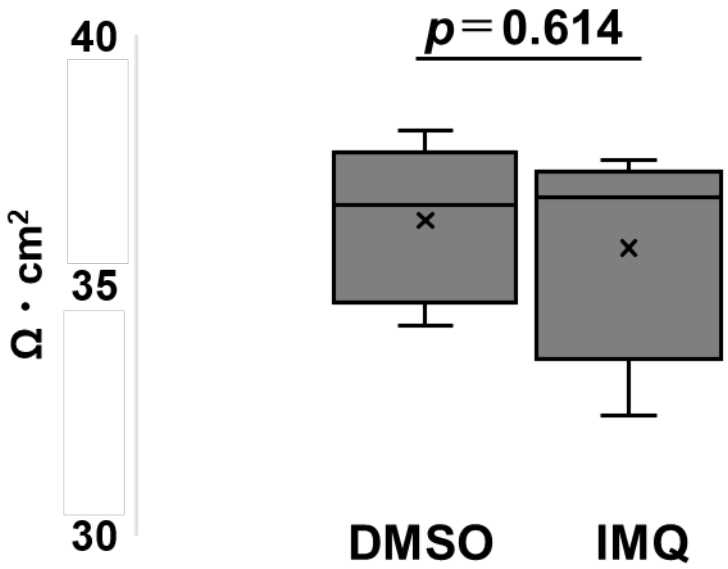


図 39　細胞シートに IMQ を投与した時の TER

Day0 でヒトケラチノサイトをインサートに 1×10^5/insert となるよう播種し、DMSO および IMQ が最終濃度 100 μM となるように投与した。Day3 の時点で TER を測定した。

IMQ は細胞増殖や ZO-1 の発現量、バリア機能には影響を与えなかった。そのため、別の乾癬モデルとして使われている PMA を用いて細胞増殖を促せるかを確認した(Hvid et al., 2008)。Day3 で細胞数をカウントすると、DMSO は 30.25×10^4, PMA 100 ng/mL は 21.50×10^4, PMA10 ng/mL は 20.00×10^4 であった。 DMSO と PMA の間に有意差を認めた（p=0.002）（図 40)。

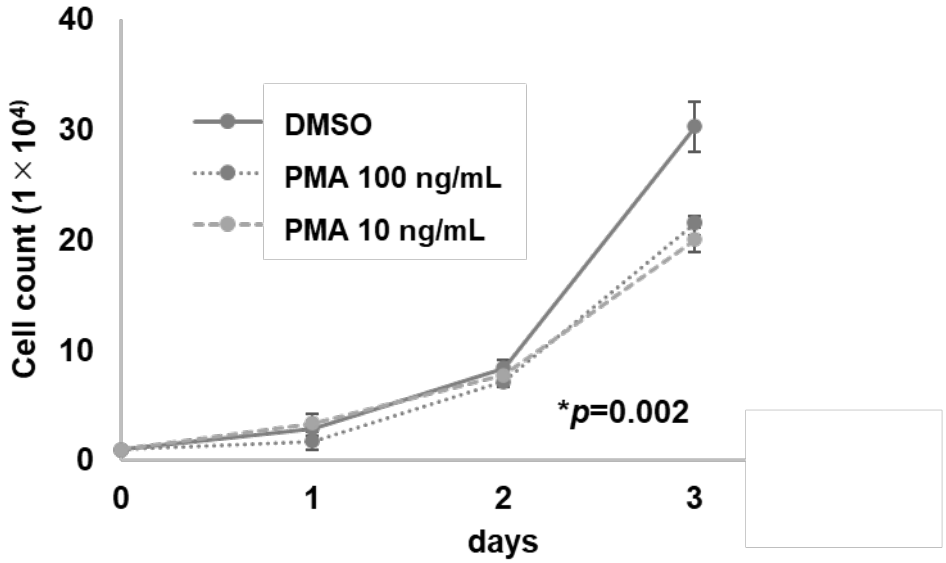


図 40　培養細胞に PMA を投与した際の細胞数の推移

Day0 で 1×10^4 個のヒトケラチノサイトを播種し、DMSO, PMA を最終濃度 100 ng/mL, 10 ng/mL になるようにそれぞれ投与した。Day1-3 での細胞数をそれぞれ計測した。

11. EGF はヒトケラチノサイトを in vitro で増殖させたが、相対的な ZO-1 の発現量は減少した

乾癬モデルで使用されるような IMQ, PMA を投与しても細胞増殖がみられなかったため、単に細胞増殖を加速させるべく EGF を使用した。

1×10^4/well で細胞を播種し、ネガティブコントロールとして PBS (EGF 0 ng/mL)を使用した。Day3 の時点で PBS が 2.1×10^4, EGF 10 ng/mL が 23.5×10^4, EGF 50 ng/mL が 21×10^4, EGF 100 ng/mL が 25.9×10^4 であった。PBS と 10 ng/mL (p=0.003), PBS と 50 ng/mL (p=0.031), PBS と 100 ng/mL (p<0.001) と有意に EGF 群で細胞の増殖がみられた。EGF 10-100 ng/mL で各群同士の有意差は認められなかった (図 41)。

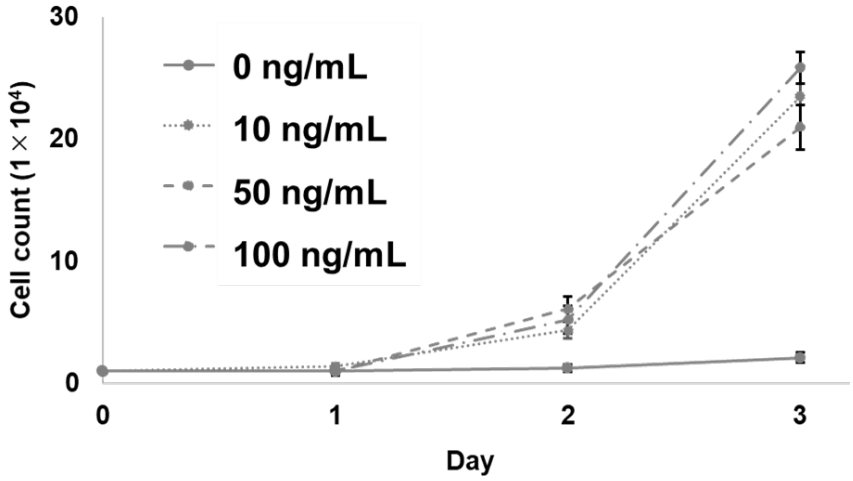


図 41　EGF を投与した時の細胞数の推移

Day0 の時点で 1×10^4/well になるよう細胞を播種し、EGF を最終濃度 0 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL になるようにそれぞれ投与した。Day1-3 で細胞数をそれぞれ計測した。

EGF は細胞増殖を促進させるため、三次元培養を行い、EGF が TER にどれほど影響を与えるかを検証した。Day0 でヒトケラチノサイトをインサートに 1×10^5/insert となるよう播種した。Day3 でインサート内の培地を廃棄し、インサート外を CnT-PR-3D で満たした。その際に EGF を最終濃度 0 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL になるように投与した。Day14 の時点で TER を測定した。EGF0 ng/mL で 572 Ω・cm^2, 10 ng mL で 679 Ω・cm^2, 50 ng/mL で 769 Ω・cm^2, 100 ng/mL で 820 Ω・cm^2 と濃度依存性に TER の上昇を認めた。PBS と 10, 50, 100 ng/mL 各グループで有意に TER 上昇を認めた（p=0.005, p<0.001, p<0.001)。50 ng/mL と 100 ng/mL では 100 ng/mL で TER が上昇する傾向はみられたが、有意差はなかった（p=0.062）（図 42)。

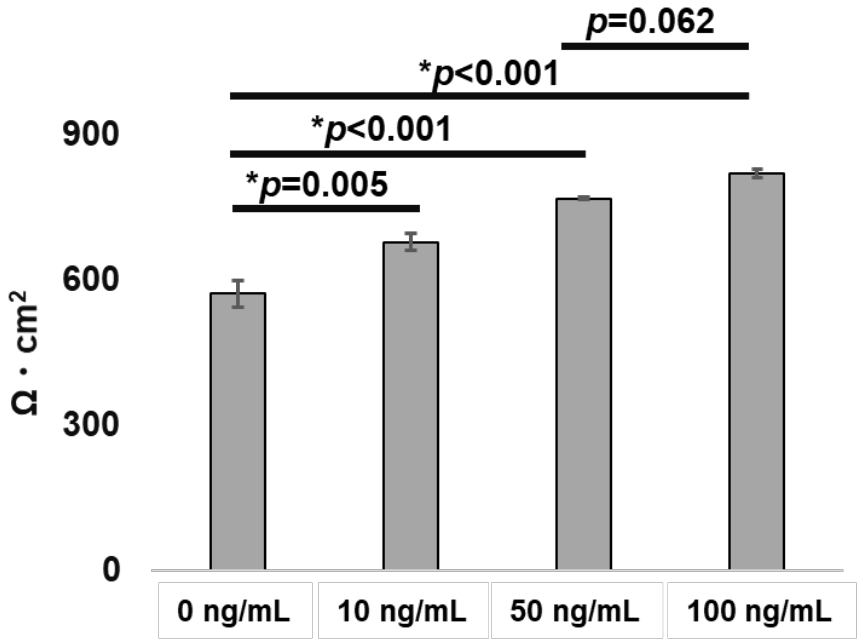


図 42　EGF が三次元培養において TER に与える影響

Day0 でヒトケラチノサイトをインサートに 1×10^5/insert となるよう播種した。Day3 でインサート内の培地を廃棄し、インサート外を CnT-PR-3D で満たした。その際に EGF を最終濃度 0 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL になるように投与した。Day14 の時点で TER を測定した。

EGF がタンパクレベルで ZO-1 に影響を与えるかどうかをウエスタンブロットで確認した。β-tubulin は EGF 投与に伴い徐々に発現が増加した。一方で ZO-1 は PBS の時点で最も発現量が多く、EGF 投与に伴い減少した。グラフ化すると PBS では最もβ-tubulin 当たりの ZO-1 の発現量が多く、EGF を投与すると ZO-1 の発現割合は減少した（図 43)。

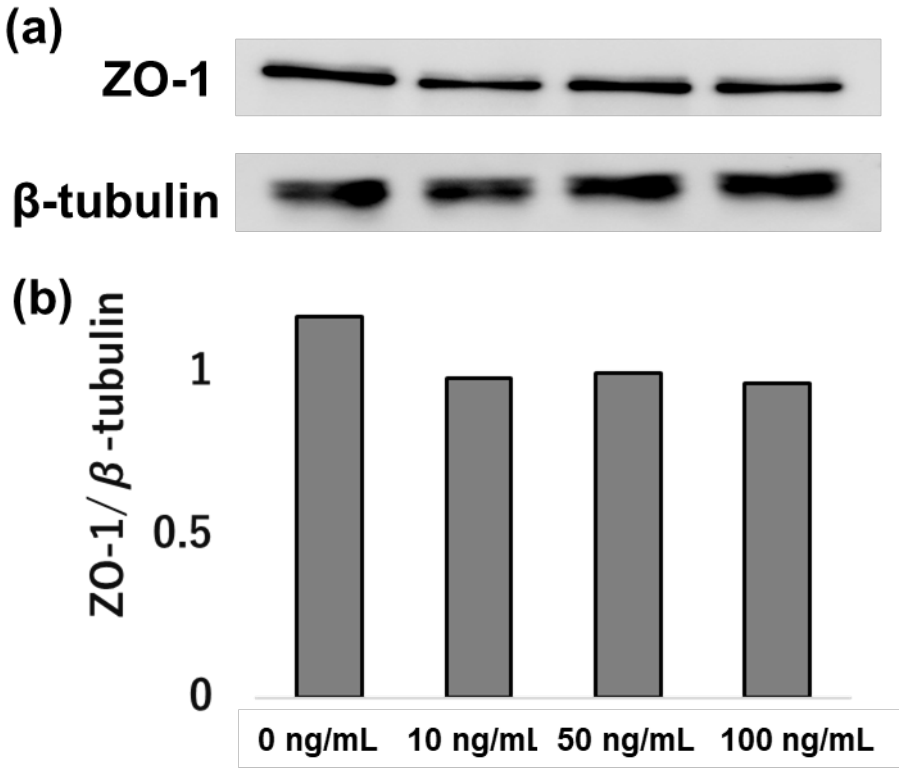


図 43　培養細胞に EGF を投与した時のウエスタンブロット

(a)培養細胞に EGF 最終濃度が 0 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL になるように投与し Day3 の時点で細胞溶解バッファーを用いてライセートを回収しウエスタンブロットを行った。

(b)(a) のバンドを Image J で定量、グラフ化した。

考　察

第二章では、第一章で得た口腔粘膜と皮膚における ZO-1 の分布相違の機序解明に迫った。ヒトおよびマウスの皮膚・粘膜を用いた疾患モデルの検証から、TJ タンパクである ZO-1 が上皮内の上層で複数層にわたり線状の構造として観察されるのは、上下に存在する細胞と連続する線状の構造を形成しているためであることが明らかとなった。その際、組織のターンオーバー速度の違いに着目し、頬粘膜や乾癬といったターンオーバー速度が速い組織で ZO-1 の分布と染色パターンが複数層になることが示された。つまり、ZO-1 の分布が変化する理由として上皮の増殖速度が関与することが明らかになった。

本研究では、皮膚と粘膜それぞれに対して、組織のターンオーバー速度が異なる疾患あるいはマウスモデルを用いて ZO-1 の分布の変化を検証した。具体的には増殖が速い頬粘膜に対して細胞増殖能が低下する OLP あるいは MMC を投与したマウス頬粘膜、一方、増殖が遅い皮膚に対して細胞増殖が速い乾癬あるいはイミキモド外用乾癬マウスモデルを対比した。その結果、ZO-1 の分布や染色パターンは、我々の仮説通り増殖速度の相違により異なることが示された。

今回、ZO-1 の分布を定量化する方法を考案した。Image J の plugin を用いて、染色の輝度をプロットすることで ZO-1 が分布する範囲を定量化することに成功した。これは、パラーメーターを微調整することで、その他の分子の研究にも応用できる手法であり大きな意味を持つ解析手法である。

OLP は基底細胞が炎症のターゲットとなり壊死することで分裂細胞が減少するが、本研究では抗がん剤 MMC を用いることで模倣した。一方、イミキモドマウスモデルを乾癬マウスモデルを用いた。この乾癬モデルは、顆粒層を有し、表皮突起の規則的な延長などヒトの乾癬の特徴的な所見をすべて満たすわけではない。しかし、前述したように細胞増殖という点においては Ki-67 陽性率などからも、本研究の目的を検証するために使用できると判断した。

ヒトおよびマウスの結果を、In vitro でより詳細を検証することを試みた。同様に増殖速度を変化させることで TJ タンパクの変化を観察できると推察した。この際、ヒトテロメア逆転写酵素（hTERT; Human Telomerase Reverse Transcriptase）遺伝子を初代培養細胞に導入した不死化ヒトケラチノサイト（KerCT の細胞株）(Vaughan et al., 2009) を使用した。この細胞は、三次元培養を行うと、おおむね正常ヒトケラチノサイトと同様に取り扱うことが可能である（Cardinali et al., 2021)。マウスモデルに用いた IMQ を培養細胞でも同様に用いたが、ヒトケラチノサイトの増殖を誘発しなかった。IMQ は Toll-like receptor（TLR）7/8 のリガンドであり、強力な免疫活性物質である（Beutner and Tyring, 1997）ため、尖圭コンジローマなどのウイルス

性疾患の治療に用いられるが、ヒトケラチノサイトではTLR7/8の発現がみられないことが知られている（Lebre et al., 2007)。このため、IMQマウス乾癬モデルはヒトケラチノサイト単独では再現できず、炎症細胞を必要とすることが推察された。また、PMAも乾癬モデルとして使用される一方で、培養細胞株では細胞増殖を抑制する可能性が示唆されているため（Zhou et al., 2016)、細胞増殖促進を再現できなかったと考えた。これを解決するため、より直接的な細胞増殖作用があるEGFを用いてZO-1の変化を検証した。細胞数の変化からEGFが細胞増殖に影響することは明らかであった。TER測定はEGFの濃度に依存して上昇がみられていたが、これはEGF投与により、三次元培養で作製した培養表皮の層数に影響していると考えられ、これもEGFの細胞増殖能を示唆する結果と思われ、PBS及びEGF投与群では皮膚と乾癬ないしOLPと頬粘膜の対応が成立すると考えられた。粘膜のZO-1の免疫染色において不規則な線状に、細胞膜の全周を取り囲まないように観察できたため、粘膜や乾癬の細胞1個あたりに発現するZO-1の量は減少していると思われた。そこでタンパク量の比較は、ウエスタンブロットでβ-tubulinに対するZO-1の発現量を比較した。予想通りEGFを投与すると、相対的に細胞1個当たりのZO-1の発現は減少している結果だった。

In vivoとin vitroの結果を総合すると、皮膚のようにターンオーバー期間を十分に確保することができれば、顆粒層で細胞は扁平になり、ZO-1を十分に発現することができ、顆粒層に限局する強固なTJを形成する。一方で、乾癬や粘膜ではターンオーバー期間が短いため、顆粒層を形成せず細胞を扁平にする時間的猶予がない。そのため、細胞膜の全周にZO-1を発現しきる前に次の層を形成してしまうため、染色で見られるような細胞膜を完全に取り囲まないような不規則な線状の沈着を呈し、かつ、複数層にわたってZO-1が存在すると考えた。

結　論

① ヒト正常皮膚及び正常頬粘膜では ZO-1 の分布及び染色パターンが異なる。
② 正常頬粘膜を水平断切片で観察すると ZO-1 は線状の染色が不規則になることが観察され、細胞膜を全周に取り囲まない。
③ ZO-1 の染色分布やパターンは皮膚と著しく異なるが、正常頬粘膜もバリア機能を有する TJ が存在する。
④ 正常頬粘膜に対し OLP では細胞増殖能は低下し、一方で正常皮膚に対し乾癬では細胞増殖能は促進される。
⑤ OLP では正常頬粘膜と比較して ZO-1 の局在する層は減少し、乾癬では正常皮膚と比較して ZO-1 の局在する層は増加する。
⑥ EGF 投与下では、細胞増殖は見られるが、細胞 1 個当たりの ZO-1 の発現が低下した。

頬粘膜において ZO-1 の分布や局在が皮膚と異なっていることを示した。上皮のターンオーバー速度が ZO-1 の分布に影響を与えている可能性を示唆していると考えた。

第一章は頬粘膜についての解析であった。口腔粘膜疾患は多岐にわたるが、口腔粘膜のバリア機能について未知な領域が多かったため、口腔粘膜疾患の病態解明や創薬などの一助になることを期待している。

第二章、特に二章の後半では、皮膚疾患の一つ乾癬に着目して ZO-1 の解析を行った。乾癬は欧米での有病率が特に高く、近年治療方針が劇的に変化している疾患の一つである。TJ などのバリア機能に着目した治療法はないため、今後は乾癬などの炎症性角化症のバリア機能についての解析や TJ 関連分子について新たな治療法を模索したいと考えている。

謝　辞

本研究では以下の研究者にご協力いただきました。深く御礼申し上げます。

電子顕微鏡技術支援：中村秀樹
超解像顕微鏡技術提供：小林健太郎
画像解析ソフト plugin の提供：北畑裕之
実験の指導、統括：夏賀　健、氏家英之、清水　宏、岩田浩明
実験技術支援：田邊美香

(すべて敬称略)

利　益　相　反

開示すべき利益相反状態はない。

引 用 文 献

Anderson, J.M., and Van Itallie, C.M. (2009). Physiology and function of the tight junction. Cold Spring Harb.Perspect.Biol.*1*. a002584.

Banaszkiewicz, A., Kądzielska, J., Gawrońska, A., Pituch, H., Obuch-Woszczatyński, P., Albrecht, P., Młynarczyk, G., and Radzikowski, A. (2014). Enterotoxigenic Clostridium perfringens infection and pediatric patients with inflammatory bowel disease. J.Crohns Colitis.*8*. 276-281.

Bazzoni, G. (2003). The JAM family of junctional adhesion molecules. Curr.Opin.Cell Biol.*15*, 525-530.

Bendas, G., and Borsig, L. (2012). Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. Int.J.Cell Biol.*2012*, 676731.

Beutel, O., Maraspini, R., Pombo-García, K., Martin-Lemaitre, C., and Honigmann, A. (2019). Phase Separation of Zonula Occludens Proteins Drives Formation of Tight Junctions. Cell.*179*, 923-936.

Beutner, K.R., and Tyring, S. (1997). Human papillomavirus and human disease. Am.J.Med.*102*, 9-15.

Brandner, J.M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W.W., and Moll, I. (2002). Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. Eur.J.Cell Biol.*81*, 253-263.

Cardinali, G., Flori, E., Mastrofrancesco, A., Mosca, S., Ottaviani, M., Dell'Anna, M.L., Truglio, M., Vento, A., Zaccarini, M., Zouboulis, C.C., and Picardo, M. (2021). Anti-Inflammatory and Pro-Differentiating Properties of the Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands NPD-0614-13 and NPD-0614-24: Potential Therapeutic Benefits in Psoriasis. Int.J.Mol.Sci.*22*. 7501.

Cutright, D.E., and Bauer, H. (1967). Cell renewal in the oral mucosa and skin of the rat. I. Turnover time. Oral Surg.Oral.Med.Oral Pathol.*23*, 249-259.

Fujimura, Y., Watanabe, M., Ohno, K., Kobayashi, Y., Takashima, S., Nakamura, H., Kosumi, H., Wang, Y., Mai, Y., Lauria, A., et al. (2021). Hair follicle stem cell progeny heal blisters while pausing skin development. EMBO Rep.*22*, e50882.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., and Tsukita, S. (1993). OCCLUDIN - A NOVEL INTEGRAL MEMBRANE-PROTEIN LOCALIZING AT TIGHT JUNCTIONS. J.Cell Biol.*123*, 1777-1788.

Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. J.Cell Biol.*143*, 391-401.

Furuse, M., Sasaki, H., and Tsukita, S. (1999). Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. J.Cell Biol.*147*, 891-903.

Gilliet, M., Conrad, C., Geiges, M., Cozzio, A., Thürlimann, W., Burg, G., Nestle, F.O., and Dummer, R. (2004). Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. Arch.Dermatol.*140*, 1490-1495.

González-Mariscal, L., Betanzos, A., and Avila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. Semin. Cell Dev. Biol.*11*, 315-324.

Gunzel, D., and Yu, A.S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiol.Rev.*93*, 525-569.

Halprin, K.M. (1972). Epidermal "turnover time"--a re-examination. Br.J.Dermatol.*86*, 14-19.

Higashi, T., Tokuda, S., Kitajiri, S., Masuda, S., Nakamura, H., Oda, Y., and Furuse, M. (2013). Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. J.Cell Sci.*126*, 966-977.

Hvid, H., Teige, I., Kvist, P.H., Svensson, L., and Kemp, K. (2008). TPA induction leads to a Th17-like response in transgenic K14/VEGF mice: a novel in vivo screening model of psoriasis. Int. Immunol.*20*, 1097-1106.

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., and Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. J.Cell Biol.*171*, 939-945.

Imafuku, K., Kamaguchi, M., Natsuga, K., Nakamura, H., Shimizu, H., and Iwata, H. (2021). Zonula occludens-1 demonstrates a unique appearance in buccal mucosa over several layers. Cell Tissue Res.*384,* 691-702.

Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., and Tsukita, S. (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. J.Cell Biol.*138*, 181-192.

Jang, Y., Lincoff, A.M., Plow, E.F., and Topol, E.J. (1994). Cell adhesion molecules in coronary artery disease. J.Am.Coll.Cardiol.*24*, 1591-1601.

Jones, S.C., Banks, R.E., Haidar, A., Gearing, A.J., Hemingway, I.K., Ibbotson, S.H., Dixon, M.F., and Axon, A.T. (1995). Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. Gut.*36*, 724-730.

Kamaguchi, M., Iwata, H., Miyauchi, T., Ujiie, H., Ujiie, I., Nomura, T., Ohga, N., Shimizu, H., and Kitagawa, Y. (2019). The identification of autoantigens in mucous membrane pemphigoid using immortalized oral mucosal keratinocytes. J.Oral Pathol.Med.*48*, 60-67.

Kamaguchi, M., Iwata, H., Ujiie, H., Natsuga, K., Nishie, W., Kitagawa, Y., and Shimizu, H. (2018). High Expression of Collagen XVII Compensates

for its Depletion Induced by Pemphigoid IgG in the Oral Mucosa. J.Invest.Dermatol.*138*, 1707-1715.

Kubo, A., Nagao, K., and Amagai, M. (2013). 3D visualization of epidermal Langerhans cells. Methods Mol.Biol.*961*, 119-127.

Langbein, L., Grund, C., Kuhn, C., Praetzel, S., Kartenbeck, J., Brandner, J.M., Moll, I., and Franke, W.W. (2002). Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. Eur.J.Cell Biol.*81*, 419-435.

Lebre, M.C., van der Aar, A.M., van Baarsen, L., van Capel, T.M., Schuitemaker, J.H., Kapsenberg, M.L., and de Jong, E.C. (2007). Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. J.Invest.Dermatol.*127*, 331-341.

Lehman, J.S., Tollefson, M.M., and Gibson, L.E. (2009). Lichen planus. Int.J.Dermatol.*48*, 682-694.

Lowes, M.A., Suárez-Fariñas, M., and Krueger, J.G. (2014). Immunology of psoriasis. Annu.Rev.Immunol.*32*, 227-255.

Natsuga, K. (2014). Epidermal barriers. Cold Spring Harb.Perspect.Med.*4*, a018218.

Okegawa, T., Pong, R.C., Li, Y., and Hsieh, J.T. (2004). The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. Acta.Biochim.Pol.*51*, 445-457.

Otani, T., Nguyen, T.P., Tokuda, S., Sugihara, K., Sugawara, T., Furuse, K., Miura, T., Ebnet, K., and Furuse, M. (2019). Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity. J.Cell Biol.*10,* 3372-3396.

Palomo, J., Troccaz, S., Talabot-Ayer, D., Rodriguez, E., and Palmer, G.

(2018). The severity of imiquimod-induced mouse skin inflammation is independent of endogenous IL-38 expression. PLoS One.*13*, e0194667.

Raleigh, D.R., Marchiando, A.M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M., and Turner, J.R. (2010). Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. Mol.Biol.Cell.*21*, 1200-1213.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat.Methods.*9*, 676-682.

Schneeberger, E.E., and Lynch, R.D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. Am.J.Physiol.Cell Physiol.*286*, C1213-1228.

Shao, L., Kner, P., Rego, E.H., and Gustafsson, M.G. (2011). Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination. Nat.Methods.*8*, 1044-1046.

Shi, J., Barakat, M., Chen, D., and Chen, L. (2018). Bicellular Tight Junctions and Wound Healing. Int.J.Mol.Sci.*19*, 3862.

Simon, D.B., Lu, Y., Choate, K.A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., et al. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg2+ resorption. Science.*285*, 103-106.

Sonoda, N., Furuse, M., Sasaki, H., Yonemura, S., Katahira, J., Horiguchi, Y., and Tsukita, S. (1999). Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. J.Cell Biol.*147*, 195-204.

Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S., and Goodenough, D.A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide

associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. J.Cell Biol.*103*, 755-766.

Suzuki, T. (2013). Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. Cell Mol. Life Sci.*70*, 631-659.

Takashima, S., Shinkuma, S., Fujita, Y., Nomura, T., Ujiie, H., Natsuga, K., Iwata, H., Nakamura, H., Vorobyev, A., Abe, R., and Shimizu, H. (2019). Efficient Gene Reframing Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa with CRISPR/Cas9. J.Invest.Dermatol.*139*, 1711-1721.

Ten Cate, A.R., and Nanci, A. (2008). Ten Cate's oral histology: development, structure, and function (Mosby).

Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., and Furuse, M. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. Cell.*126*, 741-754.

Vaughan, M.B., Ramirez, R.D., Andrews, C.M., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2009). H-ras expression in immortalized keratinocytes produces an invasive epithelium in cultured skin equivalents. PLoS One.*4*, e7908.

Wardill, H.R., Logan, R.M., Bowen, J.M., Van Sebille, Y.Z., and Gibson, R.J. (2016). Tight junction defects are seen in the buccal mucosa of patients receiving standard dose chemotherapy for cancer. Support Care Cancer.*24*, 1779-1788.

Yokouchi, M., Atsugi, T., van Logtestijn, M., Tanaka, R.J., Kajimura, M., Suematsu, M., Furuse, M., Amagai, M., and Kubo, A. (2016). Epidermal cell turnover across tight junctions based on Kelvin's tetrakaidecahedron cell shape. Elife *5*, e19593.

Yokouchi, M., Kubo, A., Kawasaki, H., Yoshida, K., Ishii, K., Furuse, M., and Amagai, M. (2015). Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum

corneum. J.Dermatol.Sci. *77*, 28-36.

Zhou, H., Wang, Y., Zhou, Q., Wu, B., Wang, A., Jiang, W., and Wang, L. (2016). Down-Regulation of Protein Kinase C-ε by Prolonged Incubation with PMA Inhibits the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells. Cell Physiol.Biochem. *40*, 379-390.