

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15747

研究課題名(和文) 口腔粘膜上皮バリア機能の3D解析

研究課題名(英文) 3D analysis of the oral mucosa epithelium barrier function

研究代表者

加藤 伸 (KATO, SHIN)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80383719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに報告されている共焦点顕微鏡と3D構築ソフトを用いたマウス耳介上皮におけるタイトジャンクションの観測方法を基本として、より口腔粘膜上皮に適したタイトジャンクションの観察方法を確立するために染色時間や試薬濃度のといった条件を検討した。その結果、1次染色時間を増加することで従来の方法よりもより鮮明にマウス口腔粘膜のタイトジャンクションの構成タンパク質であるClaudin-1、Claudin-4や裏打ちタンパク質であるZO-1の観察が可能となった。

研究成果の概要(英文)：On the basis of the reported cofocus microscope and observation method of the tight junction in the mouse auricle epithelium using the 3D construction software, I examined a condition such as one of reagent density so far at dyeing time to establish the observation method of the tight junction suitable for an oral mucosa epithelium more. As a result, observation of ZO-1 which was Claudin-1 which was the constitution protein of the tight junction of the mouse oral mucosa than a conventional method more clearly, Claudin-4 and lining protein was enabled by increasing primary dyeing time.

研究分野：口腔外科

キーワード：タイトジャンクション 口腔粘膜 三次元的観察

1. 研究開始当初の背景

タイトジャンクション(tight junction: TJ)は上皮細胞、内皮細胞、中皮細胞において、細胞膜側面の最頂端部に局在する接着装置で、TJの細胞表面関連蛋白は、裏打ち蛋白であるZO-1、膜蛋白のoccludin、claudinなどのjunctional adhesion moleculeが次々と発見されている。口腔粘膜と類似する組織構築を有する皮膚表皮においては、最表層の角質層バリアと顆粒層に存在するTJバリアの存在が確認されており、両者が協働する事により、強力なバリア機能を発揮していると考えられている。口腔粘膜上皮では頬粘膜や口底粘膜のように角化層を欠く非角化粘膜においても、様々な刺激に曝される過酷な環境の中で防御機能が維持されている。これらの事実は上皮TJでは皮膚と異なる何らかのバリア機構が機能している可能性が考えられる。一方で、これら蛋白質の発現パターンがTJバリア機能の制御に関わる(Van Itallie C, et al: J clin invest,2001.)事実や、炎症性腸疾患におけるTJ蛋白発現の変化により、バリア機能障害がおきているという報告(Oshima T, et al: J Gastroenterol hepatol,2008.)もあり、慢性炎症を呈する様々な口腔粘膜疾患にも同様のメカニズムが生じている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

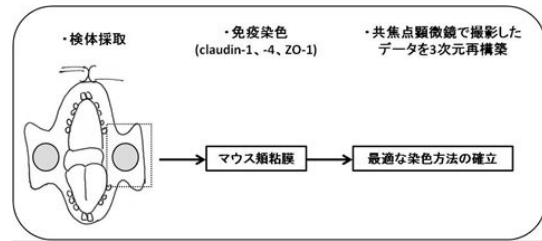
口腔粘膜は生体内腔の組織でありながら自己と外界との境界の役割をなす特殊性を有する。その主な機能の一つとして、機械的刺激や病原微生物、アレルゲンなどに対するバリア機能がある。皮膚や消化管上皮、血管内皮に存在するTJは細胞側面膜再頂端部に局在する細胞間接着装置の一つで、バリア機能とフェンス機能において重要な役割を果たしている。口腔粘膜上皮では存在が確認されているものの、その構造や分布の詳細は未だ明らかにされていない。そこで、口腔粘膜上皮においてTJおよび免疫担当細胞の三次元的観察方法を確立することにより、口腔粘膜特異的な防御機構と免疫機構の関係を明らかにし、更には免疫の関与する難治性口腔粘膜疾患の病態解明につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)マウス口腔粘膜における三次元的TJ構造観察法の確立

TJ構成蛋白質にはclaudinファミリー蛋白があり(Furuse M, et al.: Trends cell Biol. 2006)、表皮においてはClaudin-1と-4が発現していることが既に示されている。本研究では抗Claudin-1、-4抗体に加え、TJ裏打ち

蛋白である抗ZO-1抗体を用いて、野生型マウス口腔粘膜上皮を各種抗体でホルムウント染色を行う。1日毎における経時的な染色程度(抗体浸透度)を確認することで、口腔粘膜上皮における適切な染色条件を確立する。(図1)



(図1)

具体的な方法は以下の手順で行った。

- ・Blocking buffer [0.5%(w/v) saponin, 0.2%Triton X-100, 2%FBS, 0.03%Sodium Azide/in PBS]
- ・Antibody diluent buffer [0.5%(w/v) saponin, 2%FBS/in PBS]
- ・Wash buffer [0.5%(w/v) saponin, 0.03%Sodium Azide/in PBS]

マウス口蓋粘膜の採取、背側を除去。

4%PFA中で60min固定。

Blocking Bufferにて、緩やかに振盪、室温にて18時間保管。

Antibody diluent bufferで希釈した1次抗体を適量添加し、湿箱にて37℃で18時間保管。

Wash bufferで37℃で2時間振盪を3回繰り返す。

2次染色 2次抗体を適量添加し、湿箱にいれ37℃で18時間保管。

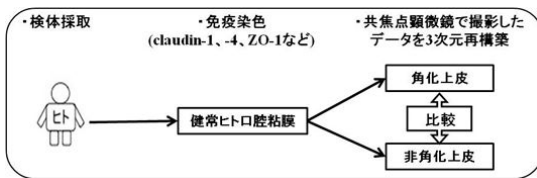
Wash bufferで37℃で2時間振盪を3回繰り返す。

MOWIOLで封入し、室温にて遮光し保管。

共焦点顕微鏡(BZ-9000; Keyence)と3D構築ソフト(TCS sp5; Leica)を用い、観察を行う。

(2)健常ヒト口腔粘膜の三次元的TJ構造観察法の確立

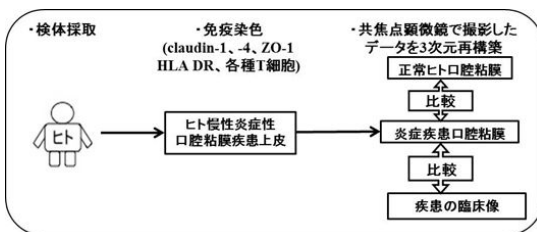
前項(1)で得られた実験結果を基に、健常ヒト口腔粘膜上皮におけるプロトコルを確立し、同様にTJ構造を三次元的に観察することを次の目標とした。口腔粘膜上皮は部位により角化・非角化上皮に分類することができる。このため、表面バリア機能の脆弱と考えられる頬粘膜や舌下粘膜などの非角化上皮と口蓋、舌、歯肉といった角化上皮におけるTJ分布、また各種接着蛋白(claudin,ZO-1)発現についてはリアルタイムPCR法などを用いながら比較検討を行う。(図2)



(図2)

(3) 炎症性口腔粘膜疾患における TJ 構造と免疫細胞局在の検討、正常像・臨床像との比較

さらに、前項(2)で得られた実験結果を基に、口腔扁平苔癬やアフタ性口内炎などの慢性炎症性粘膜疾患患者の生検組織を用いて、claudin-1、-4、ZO-1、HLA DR によって免疫染色を行い、正常粘膜との TJ や樹状細胞の構造的変化や局在、構成蛋白の変化について観察を行う。これに追加し、CD-3、-4、-8、FOX P3、T-BET などに対する各種抗体で染色を行い、免疫組織学的に免疫担当細胞の存在や三次元的局在について観察を行う。得られた結果について clinical phenotype と cellular type の相関解析を実施することで、口腔扁平苔癬の病型 (clinical phenotype) と本研究で得られた結果 (cellular type) の相関性について詳細な検討を行う。(図3)



(図3)

4. 研究成果

口腔粘膜における TJ の立体的な位置関係は、いまだ明らかになっていない。そのためマウス口腔粘膜における TJ の存在を確認し、その三次元的観察方法を確立することを第一段階の目標としていた。これまでに報告されているマウス耳介上皮における共焦点顕微鏡と 3D 構築ソフトを用いた観測方法を基本として、より口腔粘膜上皮に適した方法を確立するために染色時間や試薬濃度といった条件を検討した。その結果、1 次染色時間を増加することでマウス口腔粘膜の TJ 構成タンパク質である Claudin-1、Claudin-4 や裏打ちタンパク質である ZO-1 の観察が可能となった。今後の展望は、得られた実験結果を基に健常ヒト口腔粘膜上皮におけるプロトコルを確立し、同様に TJ 構造を三次元的に観察することが目標となる。現時点では実験条件の検討までしかできておらず、今後、口腔粘膜上皮を角化・非角化上皮に分類し、表面バリア機能の脆弱と考えられる頬粘膜や舌下粘膜などの非角化上皮と口蓋、舌、歯肉といった角化上皮における TJ の分布、ま

た各種接着蛋白 (claudin, ZO-1) 発現についてはリアルタイム PCR 法なども用いながら比較検討を行う。

さらに、本研究によって口腔粘膜上皮における新たな TJ 観察方法が確立された場合、TJ と同時に免疫担当細胞の観察が可能となり、口腔粘膜上皮におけるバリア機構と免疫応答の関連性を明らかにすることが期待できる。その結果、病変局所における炎症・自己免疫応答機構の解明や、これまで病態が解明されていない口腔扁平苔癬やアフタ性口内炎などに代表される、慢性炎症を主体とする粘膜疾患のメカニズム解明に発展することが期待できる。また、各疾患の物理的バリアの障害機構を解明し、新たなバリア補充方法を開発することで新しい診断・治療方法の開発にもつながる可能性を有する。また、消化器がんでは cadherin などの接着結合分子が悪性度や予後に関与していることが知られているが、近年 TJ 蛋白質である claudin についても検討がなされ、その発現パターンの違いが、悪性度、予後に関わっていることが報告されている。同様に、口腔癌の悪性度、予後についても TJ 構造や機能を解明することでその関連性が明らかになる可能性も考えられる。さらには、効率的な経口粘膜薬剤を開発する上で上皮バリア構造を明らかにすることは重要視されており、本研究内容は高効率の経口粘膜薬剤開発など、創薬分野においても貢献できる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

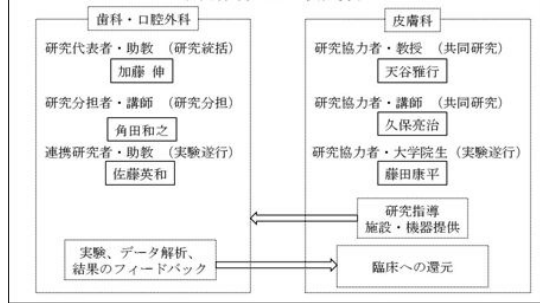
〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織



(1)研究代表者

加藤 伸 (KATO, Shin)
 慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
 研究者番号：80383719

(2)研究分担者

角田 和之 (TSUNODA, Kazuyuki)
 慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師
 研究者番号：60265915

(3)連携研究者

佐藤 英和 (SATO, Hidekazu)

(4)研究協力者

天谷 雅行 (AMAGAI, Masayuki)
 久保 亮治 (KUBO, Ryouji)
 藤田 康平 (FUJITA, KOHEI)