

学位申請論文

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
総合歯科学分野

塩津 範子

口蓋粘膜上皮におけるタイトジャンクションの細胞生物学的研究

塩津 範子

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 総合歯科学分野

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 総合歯科学分野 (指導: 鳥井康弘教授)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔形態学分野 (委託: 山本敏男教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2013 年 3 月 香川)

第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (2013 年 9 月 岡山)

(緒言)

上皮は生体の外表と内腔面を覆うとともに、種々の器官の構成にあずかっている。いわゆる被蓋上皮には、生体内部と外界を隔てるため上皮細胞間に種々の接着装置が存在し、内部環境の維持などの機能を担っている。一般に上皮細胞には極性があり、外界や内腔に面する自由表面と生体内側の基底面をもつ。

上皮細胞間の接着装置については、1963年に Farquhar と Palade が単層上皮において上皮細胞間に自由表面側より順にタイトジャンクション (TJ)、アドヘレンスジャンクション、デスモゾームという 3 種類の接着装置が存在することを微細構造学的に報告した¹⁾。また、アドヘレンスジャンクションとデスモゾームは細胞間を機械的に接着する接着装置であり、隣接する細胞膜間の距離が約 20nm であるのに対して、 TJ は隣接する細胞膜間の距離がほぼゼロになるまで近づいていることも明らかにした¹⁾。TJ の部位をフリーズフラクチャー法で観察すると、protoplasmic face (P 面)では「ひも状隆起」として、他方 extracellular face (E 面)では「ひも状溝」として観察され、これらの構造はネットワークを形成しつつ細胞を取り巻いており、 TJ スtrandと呼ばれる²⁾。TJ の機能には細胞間隙の物質輸送を制御するバリア機能と細胞膜の機能局在を維持するフェンス機能の二つあることが知られており³⁾、また TJ を構成している主な膜タンパクにはオクルディン (OCD)⁴⁾、クローディン (CLD)⁵⁾ がある。OCD は TJ で最初に発見された構成タンパクであり、 TJ に普遍的に存在

するといわれている⁴⁾。CLDはファミリーを形成し、哺乳類では少なくとも27種⁶⁾、フグでは56種⁷⁾が存在しており、これらは組織・細胞特異的に発現することが知られている⁸⁾。このことから、CLDには組織または細胞に特有の機能があることが示唆されている⁹⁾。

重層扁平上皮におけるTJについては、1971年にHashimotoが微細構造学的にヒト表皮の顆粒層においてTJの存在を報告した¹⁰⁾。しかし、扁平な細胞でのTJの存在や分布形態の評価は技術的に難しく、また表皮では角化層の細胞やその細胞膜を裏打ちする周辺帯および細胞間脂質がバリア機能の点で重要視されたため¹¹⁾、表皮におけるTJの存在およびバリアとしての機能については懐疑的な報告がなされてきた¹²⁻¹⁴⁾。しかしながら、2002年にFuruseらにより微細構造学的ならびに免疫組織化学的にマウス表皮においてTJの存在が示され、かつレーザー浸透実験よりバリアとして機能していることが証明された¹¹⁾。

口腔は消化管の始まりであり、摂食や咀嚼などを行う。口腔表面を覆う粘膜は重層扁平上皮であり、摂食や咀嚼による機械的刺激にさらされている。なかでも咀嚼粘膜は食物の咀嚼時に最も圧迫や摩擦などが激しい部位を覆っている。従来、皮膚と同様に重層扁平上皮である口腔粘膜上皮におけるTJの存在やバリア機能などについては疑問視されていたが¹⁵⁻¹⁷⁾、近年口腔粘膜上皮においてもTJの存在が報告されるようになり、歯肉や頬粘膜において微細構造学的にTJ

の分布¹⁸⁾や分子生物学的、免疫組織化学的に CLD 組成などの構成タンパクの存在¹⁹⁻²⁵⁾が報告されている。しかしながら、バリア機能について観察したものはなく、特に咀嚼粘膜に分類される口蓋粘膜上皮における TJ の存在や構成タンパクについての報告はない。そこで本研究では、口蓋粘膜を用いて TJ の分布およびその構成タンパクである OCD、CLD の発現ならびに局在とバリア機能について調べた。

(材料と方法)

実験動物には 8 週齢のマウス (ICR, ♂)を用い、口蓋粘膜を微細構造学的、免疫組織化学的および分子生物学的に検索した。

1. 微細構造学的観察

1) 超薄切片による観察

試料は以下の二つの方法により作製し、透過型電子顕微鏡 (TEM) (H-7100S, 日立)で観察を行った。超薄切片の電子染色は酢酸ウランとクエン酸鉛による二重染色を施した。TEM による観察に先立ち、TEM 用試料から約 1 μ m の厚切切片を作製し、トルイジンブルー染色を施し光学顕微鏡で口蓋粘膜の観察を行った。

a. 通法による微細構造学的観察

ネンブタールによる麻酔後、0.05 M のリン酸で緩衝 (pH.7.4)した 2% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde 混合固定液で灌流固定し、口蓋を採取した。同固定液で 24 時間浸漬固定後、5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH.7.4)で 2 週間脱灰を行った。脱灰前後にそれぞれ 0.05 M リン酸緩衝液 (pH.7.4)で 12 時間洗浄した。1% osmium tetroxide (OsO_4)-0.05 M リン酸緩衝液 (pH.7.4)で後固定を 1 時間行い、その後、アセトン系列で脱水し、Epon812 (TAAB)に包埋した。

b. ランタン浸漬法による微細構造学的観察

ネンブタールによる麻酔後、断頭屠殺し、金属ヘラを用いて口蓋骨より口蓋粘膜を剥離、採取した。採取した口蓋粘膜を Hashimoto によるランタン浸漬法¹⁰⁾に従い、以下のとおりに試料作製した。1% 硝酸ランタンを含む 2% glutaraldehyde-0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH.7.3)で 2 時間浸漬固定を行った。引き続き 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH.7.3)で 12 時間洗浄し、1% OsO_4 -0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH.7.3)で 2 時間後固定を行った。固定後、エタノール系列で脱水し、Epon812 で包埋した。なお、洗浄液、後固定液ならびに脱水液はいずれも硝酸ランタンを 1%の割合で含むように調整した。

2) フリーズフラクチャー法による微細構造学的観察

ネンブタールによる麻酔後，断頭屠殺し，前述と同様の方法で口蓋粘膜を口蓋骨より剥離，採取した。2% glutaraldehyde-0.05 M リン酸緩衝液 (pH.7.4) で24時間固定し，同緩衝液 (pH.7.4) で12時間洗浄した。凍結前に氷晶防止のため，30% グリセリン水溶液に約12時間浸漬した。試料の凍結は，減圧し固体と液体が混在したスラッシュ窒素で行い，凍結切断装置 (BAL-TEC) に装着し， -110°C で切断した。切断後，白金を蒸着 ($\angle 60^{\circ}$ ，膜厚 2nm) し，その後カーボンを蒸着 ($\angle 90^{\circ}$ ，膜厚 20nm) して補強した。蒸着した試料を市販のハイター液中に浸漬して組織を溶解した後，蒸着膜をグリット上に採取し，TEM で観察を行った。

2. 免疫組織化学的観察

ネンブタールによる麻酔後，断頭屠殺し，試料を以下の二つの方法により作製した。頭部の外皮を除き，採取した頭部を液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結し，川本法^{26,27)}を用いて，クリオスタットで接着フィルムに貼り付けたマウス頭部の未固定未脱灰凍結切片を作製した。他法の切片作製は，口蓋骨より剥離，採取した口蓋粘膜をコンパウンドに凍結包埋し，クリオスタットを用いての未固定凍結切片を作製した。いずれも前頭断の $5\mu\text{m}$ 切片とし，以下同じように処理を行った。ドライヤーの冷風で10秒間乾燥後， -20°C の95% アルコ

ールに 30 分間浸漬固定した。固定後、室温のアセトンに 1 分間浸漬し、1% ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 1 時間ブロッキングを行った。一次抗体は抗 OCD goat ポリクロナール抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 CLD-1, -3, -4 rabbit ポリクロナール抗体 (Invitrogen), 抗 CLD-2, -5 rabbit ポリクロナール抗体 (Abcam) を用いた。各種抗体は PBS で 100~200 倍希釈し、室温で 4 時間反応させた。二次抗体は抗 goat IgG Alexa 488 rabbit 抗体 (Abcam) または抗 rabbit IgG Alexa 488 goat 抗体 (Molecular Probes) を用いた。各抗体は PBS で 100 倍に希釈し、室温で 1 時間反応させた。核染は Hoechst 33342 (Molecular Probes) で 10 分間行い、ベクターシールド (Vector Laboratories) で封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM780, ZEISS) で観察した。また、一部の切片を用いて CLD-1 および CLD-4 について OCD との二重染色も行った。一次抗体は上記と同様の抗体を用い、二次抗体には抗 goat IgG Alexa 594 rabbit 抗体 (Molecular Probes) および抗 rabbit IgG Alexa 488 chicken 抗体 (Molecular Probes) を使用した。

3. ウェスタンブロット解析

抗OCD, CLD-1, -3, -4 rabbit ポリクロナール抗体 (Invitrogen) ならびに抗 CLD-2, -5 rabbit ポリクロナール抗体 (Abcam) を用いて、下記のとおりウェスタンブロット解析を行った。

ネンブタールによる麻酔後，断頭屠殺し，前述と同様の方法で口蓋骨より剥離，採取した口蓋粘膜に500 μ lのドデシル硫酸ナトリウム (SDS)処理液 (0.5 M Tris-HCl緩衝液 (pH 6.8)，1 % SDS，20% グリセリン，1% 2-メルカプトエタノール)を加え，100 $^{\circ}$ Cで5分間処理した。引き続きポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-polyacrylamido gel electrophoresis (SDS-PAGE)を行い，タンパク質をpolyvinylidene difluoride (PVDF)膜 (ImmobilonTM Transfer Membranes, Merck Millipore)にブロットイングした。ブロットイングにはセミドライ式ブロットイング装置 (Trans-blot SD Semi-Transfer cell, BIO RAD)を用いた。次に3% スキムミルク (和光)を含むPBSで20分間ブロッッキングを行い，一次抗体を4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。反応終了後，PBSで洗浄し，3000倍に希釈したHorseradish Peroxidase標識抗rabbit IgG donkey ポリクロナール抗体 (Abcam)を室温で90分間反応させた。PVDF膜を洗浄し，続いてPierce Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific)を1分間反応させた。その後，PVDF膜をX線フィルム (富士フィルム)へ30分間感光させ，バンドを検出した。

4. トレーサー浸透実験

Chen ら²⁸⁾ および Furuse ら¹¹⁾ が用いた方法にしたがって行った。水溶性ビオチン (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Thermo scientific)を 1 mM 塩化カルシウム含有の PBS で希釈し，10mg/ml の割合になるように調節した。生体マウ

スの口蓋の粘膜固有層に上記ビオチン液を 50 μ l 注入した。3 時間経過後、ネンブタールによる麻酔を行い、断頭屠殺し、前述と同様の方法で口蓋粘膜を口蓋骨より剥離、採取した。コンパウンドに凍結包埋し、クリオスタットを用いて 5 μ m の未固定凍結切片を作製した。切片はドライヤーの冷風で 10 秒間乾燥後、-20 $^{\circ}$ C の 95% アルコールに 30 分間浸漬固定した。固定後、室温のアセトンに 1 分間浸漬し、1% ウシ血清アルブミンを含む PBS で 1 時間ブロッキングを行った。一次抗体は抗 OCD goat ポリクロナール抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用い、室温で 4 時間、二次抗体は抗 goat IgG Alexa 488 rabbit 抗体 (Abcam) を用い、室温で 30 分間反応させた。その後に Streptavidin Alexa 594 conjugate (Molecular Probes) を室温で 30 分間反応させ、ビオチンの染色を行った。各種抗体は PBS で 100 倍に希釈した。核染色は Hoechst 33342 で 10 分間行い、ベクターシールドで封入後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(結果)

1. 微細構造学的観察

1) 超薄切片による観察

エポンブロックから厚切切片を作製し、トルイジンブルー染色を行い観察すると、マウス口蓋粘膜上皮は基底側より基底層、有棘層、顆粒層、角化層から構成されていることが確認された。基底層は一層の細胞から、有棘層は数層の

細胞からなり、これらの細胞はいずれも立方ないし円柱状を呈していた。顆粒層は数層の扁平な細胞からなり、細胞質にトルイジンブルー濃染の微細な顆粒を豊富に含んでいた。角化層は正角化しており、上皮の 1/3~1/4 の厚さを占めていた (図 1)。

a. 通法による微細構造学的観察

通法にしたがって超薄切片を作製し、粘膜上皮を観察した。基底層の細胞はミトコンドリアが比較的多数存在し、電子密度中等度のトノフィラメントの束が散在していた。また、遊離リボゾームが豊富であった。基底層と有棘層の細胞間にはデスモゾームがよく発達しており、TJ は観察されなかった。有棘層の細胞ではトノフィラメント束が増加しており、細胞間のデスモゾームは極めてよく発達していたが、TJ は観察されなかった。顆粒層の細胞は扁平で、細胞質中には高電子密度の顆粒が豊富に認められた。細胞質縁にはトノフィラメントが密に分布し、電子密度中等度のベルト状を呈していた。顆粒層上層の細胞間に TJ が認められた (図 2A)。しかしながら、出現頻度は低かった。

b. ランタン浸漬法による微細構造学的観察

ランタン浸漬法を用いて顆粒層の細胞を観察すると、細胞間に浸透した硝酸ランタンが高電子密度に認められ、隣接する細胞は小突起により複雑に絡み合っていることが明瞭であった。顆粒層上層の細胞間では頻度は低いが、硝酸ラ

ンタンの浸透が中断されている TJ に相当する部位が認められた (図 2B)。

2) フリーズフラクチャー法による微細構造学的観察

フリーズフラクチャー法を用いて顆粒層に相当する部位を観察すると, TJ スtrandが認められ, P 面では隆起したストランド, E 面では溝状のストランドがそれぞれ観察された。これら数条のストランドはネットワークを構成していたが, 直線的かつ断続的に走行し, 長さには長短があった (図 2C, D)。

2. 免疫組織化学的観察

口蓋粘膜上皮において OCD, CLD-1, -4 で陽性反応が認められ, CLD-2, -3, -5 は反応が認められなかった。OCD は顆粒層上層の細胞間に, 点状の陽性反応が認められた (図 3A)。組織像の立体構築を行うと, 点状の反応は細胞層と平行する線状の陽性反応として認められた (図 3B)。CLD-1 は OCD と同様に顆粒層上層の細胞間に, 点状もしくは線状の陽性反応が認められた。さらに, 上記の部位より基底層側の顆粒層の中間層から有棘層全層で, 細胞の輪郭に沿って網目状の陽性反応が認められた (図 3C)。CLD-4 も OCD と同様に顆粒層上層の細胞間に, 点状もしくは線状の陽性反応が認められた。さらに, 顆粒層の中間層から有棘層上層で, 細胞の輪郭に沿って網目状の陽性反応が認められた (図 3D)。OCD と CLD-1 または CLD-4 について蛍光二重染色を施して観察すると, いずれも顆粒層上層の細胞間に認められた点状の反応部位は一致していた (図 4)。

CLD-2, -3, -5 は粘膜上皮には陽性反応が認められなかった。粘膜固有層において CLD-2 は唾液腺 (図 5A) で, CLD-5 は血管 (図 5B) で陽性反応が認められた。

3. ウェスタンブロット解析

OCD, CLD-1, -2, -4, -5 で陽性のバンドが認められ, CLD-3 については陽性反応が認められなかった (図 6)。

4. トレーサー浸透実験

粘膜下組織に注入したトレーサーであるビオチンが上皮細胞の細胞間隙を通過し, 角化層方向に浸透したことが認められた。ビオチンが OCD 陽性反応部位を越えて浸透している部位と OCD 陽性反応部位で停止している部位の両方が観察された (図 7)。

(考察)

TJ は単層上皮に存在し, 細胞間隙の物質の輸送を制御するバリア機能を有していることが知られている³⁾。近年, 重層扁平上皮である表皮においても, TJ の存在およびバリア機能が示された¹¹⁾。同じ重層扁平上皮である口腔粘膜上皮においては, 従来電子顕微鏡による TJ の観察は報告されているが, その分布, 存在形態からバリア機能については疑問視されていた¹⁵⁻¹⁷⁾。最近になり, 免疫

組織化学的，分子生物学的にその構成タンパクが報告されているが¹⁹⁻²⁵⁾，口腔粘膜上皮の TJ の分布，形態やバリア機能についてはよくわかっていない。特に咀嚼粘膜に分類される口蓋粘膜上皮における TJ の存在や構成タンパク，さらにバリア機能についての報告はない。本研究は口腔粘膜上皮の TJ とバリア機能を調べる目的で，咀嚼粘膜である口蓋粘膜を用いて，TJ の分布，形態とその構成タンパク，およびバリア機能の解明を微細構造学的，分子生物学的，免疫組織化学的に行った。

微細構造学的観察により，顆粒層上層の細胞間で頻度は低いが外葉同士が癒合した部位が認められ，かつランタン浸漬法においても顆粒層上層の細胞間で硝酸ランタンの浸透が中断されている微小領域が認められた。これまで口蓋粘膜上皮でフリーズフラクチャー法により TJ の分布など発達程度を観察した報告はみられない。そこで，フリーズフラクチャー法で観察したところ，複雑な網目状の分布をするものではなく，走行は単純な直線的なものであり，かつ不連続な数条のストランドが観察される程度であった。以上の所見から，口蓋粘膜上皮における TJ の発達程度は低いことが強く推察された。最近，重層上皮においては微細構造学的に以下の3種類のタイプの TJ が存在するという報告がある²⁹⁾。①細胞膜の外葉同士が点状に接触し，いわゆるキッキングポイントを形成するもの，②細胞膜間に電子密度の高く薄い中間層が介在し，面状に接触する

もの、③細胞膜間に電子密度が高く厚い中間層が介在し、サンドイッチ状に接触するものの3種類である。本研究で観察された TJ は外葉同士がほぼ点状に癒合または接触しており、また、フリーズフラクチャー像においてもストランドが細かったことから、面状に接する TJ とは考えられず、口蓋粘膜上皮の TJ はいわゆるキッシングポイントのタイプであると考えられた。なお、これら3種類の TJ の機能的相違については分かっていない。

従来、頬粘膜や歯肉では免疫組織化学的に OCD や CLD の存在が報告されているが^{19,25)}、しかし構成タンパクの存在には報告によりばらつきがある。例えば、イヌの頬粘膜で OCD、CLD-1²⁵⁾ が、豚の歯肉上皮で OCD、CLD-1、-4、-7、付着上皮で CLD-4、-7²²⁾ が、ヒトの頬粘膜で CLD-7、歯肉上皮で OCD、CLD-1^{19,21,24)} の存在がそれぞれ報告されている。これらの相違は動物種の違いや角化の違い、試料作製法の違いがあるためと思われる。今回、検索を行った構成タンパクのうち OCD、CLD-1、-4 については口腔粘膜上皮で存在する報告が多く^{19,21-23,25)}、CLD-3、-5 は口腔粘膜上皮では存在しない報告の方が多い^{20,22,23)}、CLD-2 については報告がない。本研究において、免疫組織化学的観察ならびにウエスタンブロット解析を用いて TJ の分布、構成タンパクを調べた。免疫組織化学的観察では、TJ に普遍的に存在する OCD⁴⁾ が顆粒層上層に局限して陽性であり、このことから口蓋粘膜上皮において顆粒層上層に TJ が存在

することが裏付けられる。CLD-1は顆粒層に加え有棘層全層で、またCLD-4もCLD-1同様に顆粒層から有棘層に陽性反応が認められたが、CLD-4の有棘層の陽性反応は有棘層の上層に限局していた。CLD-2, -3, -5は陰性反応であった。他方、ウエスタンブロット解析では、OCD, CLD-1, -3, -4, -5のバンドは認められたがCLD-2は認められなかった。今回得られた免疫組織化学的なOCDとCLDの局在性ならびに発現パターンは角化重層扁平上皮である表皮におけるTJの構成分子の種類とその分布に一致していた^{30,31)}。ウエスタンブロット解析では陽性であり、免疫組織化学的観察では陰性であったCLD-2, -5については、上皮外の粘膜固有層において唾液腺、血管で陽性反応であったこと、さらにCLD-2は唾液腺^{32,33)}で、CLD-5は血管^{33,34)}で存在が報告されていることから、ウエスタンブロットで検出されたCLD-2, -5は組織採集の際に含まれていた唾液腺や血管によるものと考えられ、これらのCLDは口蓋粘膜上皮には存在しないものと思われた。したがって、本研究では免疫組織化学的観察とウエスタンブロット解析より口蓋粘膜上皮のTJの構成分子としてOCD, CLD-1, -4が存在することが明らかとなった。CLDの種類については哺乳類では少なくとも27種が存在することが報告⁶⁾されている。本研究で発現を検討したCLDは5種類であり、他のCLDの存在も考慮する必要があるものと考えられる。

TJのバリア機能はストランドの数が多い程バリア機能が強固であるといわれ

ており³⁵⁾、Elias らはフリーズフラクチャー法で重層扁平上皮の TJ を観察した結果、皮膚では三段程度の粗い網目状構造であり、また食道および膈では一段もしくは二段程度の簡素な構造であることから重層扁平上皮の TJ はバリア機能が低いと報告している¹³⁾。近年、Furuse らは表皮についてビオチンによるトレーサー浸透実験を行った結果、TJ の指標となる OCD 陽性反応部位でビオチンの浸透が停止していることを観察し、表皮の TJ はバリアとして機能していることを報告した¹¹⁾。本研究ではビオチンが OCD 陽性反応部位で停止している部位も観察されたが、OCD 陽性反応部位を越えて浸透している部位も比較的高頻度に観察された。また、フリーズフラクチャー法による観察では TJ ストランドの網目は粗く、かつ断続的な走行箇所が多かった。これらのことより、口蓋粘膜上皮における TJ のバリア機能は強固ではないと考えられた。事実、口蓋は皮膚と比べて水やタンパク高分子を透過させやすいという生理学的な報告もある³⁶⁾。TJ 以外にバリアに関与しているものとしては、皮膚においては物理的バリアとしては角化層、リゾチームや抗菌ペプチドなどの化学的バリアならびに免疫学的バリアがあり、特に角化層は強固であり、かつバリアとして非常に重要な役割を果たしているといわれている³⁷⁾。したがって、今回観察した口蓋も皮膚と同様に角化した重層扁平上皮であるため、上皮としてのバリア機能は角化層が大きな役割を果たしているものと考えられた。

CLD は組織または細胞特異的に発現し特有の機能があることが示唆されており⁹⁾、バリアとして機能しているもの、チャンネル形成をしているものおよび機能が不明なものに大きくわけることができる^{38,39)}。例えば、CLD-1 のノックアウトマウスは皮膚バリア異常による脱水により生後一日以内に死亡することから、CLD-1 は水分蒸散に対するバリア機能を有していると考えられている¹¹⁾。CLD-2 は強発現した場合に、経表皮電気抵抗値を減少させるタンパクであり⁴⁰⁾、陽イオンおよび水のチャンネルを形成することがわかっている⁴¹⁻⁴³⁾。CLD-4 についてはバリア機能を有するという報告^{44,45)}とチャンネルとして機能するという報告⁴⁶⁾の両者がある。今回、チャンネルを形成すると考えられている CLD-2 が発現していないことより、口蓋粘膜上皮の TJ には前述のような陽イオンまたは水に対するチャンネル形成はないものと考えられる。また、バリアとして機能すると考えられている CLD-1 が発現していることから口蓋粘膜上皮の TJ は主としてバリアとして機能すると考えられるが、前述したようにトレーサーであるピオチンが一部浸透していることならびに TJ スtrand が断続的に走行していることから、口蓋粘膜上皮における TJ のバリア機能は強固なものではなく、ある程度の物質浸透性を有していると推測された。

本研究では、CLD は TJ が存在する顆粒層上層以外でも発現しており、部位および分布形態からも上皮においてかなり広範に分布していることがわかった。

TJ が形成されていない細胞層において CLD が発現している意義については判然としないが，例えば培養皮膚モデルおよび皮膚損傷治癒モデルにおいて成長および治癒に伴い OCD は顆粒層上層に，CLD-1 は顆粒層から有棘層に発現するという報告がみられる⁴⁷⁾。したがって，本研究で観察された TJ 存在部位以外の広範な CLD の発現は，細胞分化に伴って顆粒層上層で形成される TJ のために予め顆粒層の下層で発現するのではないかと推察された。

(結論)

口蓋粘膜上皮では，顆粒層上層に TJ が存在し，その構成タンパクとして OCD，CLD-1，-4 が存在することが明らかとなった。口蓋粘膜上皮における TJ のバリア機能は形態およびトレーサーの浸透性より強固なものではないと考えられた。

(謝辞)

稿を終えるにあたり，本研究を行う貴重な機会を与えて頂き終始懇切なる御指導ならびに御高閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 総合歯科学分野 鳥井康弘教授に深甚なる謝意を表しますとともに，御指導ならびに御教示を賜りました口腔形態学分野 山本敏男教授に謹んで感謝いたします。

研究の実施に際し，多大な御協力を頂きました帝京平成大学 地域医療学部 理学療法学科 佐々木博之教授，切片作製について多大な御協力を頂きました鶴見大学歯学部 RI センター 川本忠文講師に心から感謝いたします。最後に様々な面で貴重な御助言と多大な御援助をいただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔形態学分野ならびに総合歯科学分野の諸先生方にこの場をお借りして深謝いたします。

(参考文献)

- 1) Farquhar, G. M. and Palade, E. G. : Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.*, **17**, 375-412, 1963.
- 2) Pinto da Silva, P. and Kachar, B. : On tight-junction structure. *Cell*, **28(3)**, 441-450, 1982.
- 3) Schneeberger, E. E. and Lynch, R. D. : Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am. J. Physiol.*, **262(6)**, L647-661, 1992.
- 4) Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S. : Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.*, **123(6)**, 1777-1788, 1993.
- 5) Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. and Tsukita, S. : Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.*, **141(7)**, 1539-1550, 1998.
- 6) Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K. and Tsukita, S. : Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.*, **585(4)**, 606-612, 2011.
- 7) Loh, Y. H., Christoffels, A., Brenner, S., Hunziker, W. and Venkatesh, B. :

Extensive expansion of the claudin gene family in the teleost fish, *Fugu rubripes*. *Genome Res.*, **14(7)**, 1248-1257, 2004.

8) Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K. and Tsukita, S. : Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **96(2)**, 511-516, 1999.

9) Turksen, K. and Troy, T. C. : Barriers built on claudins. *J. Cell Sci.*, **117(12)**, 2435-2447, 2004.

10) Hashimoto, K. : Intercellular of the human epidermis as demonstrated with lanthanum. *J. Invest. Dermatol.*, **57(1)**, 17-31, 1971.

11) Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. and Tsukita, S. : Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.*, **156(6)**, 1099-1111, 2002.

12) Elias, M. P. and Friend, S. D. : The permeability barrier in mammalian epidermis. *J. Cell Biol.*, **65**, 180-191, 1975.

13) Elias, M. P., McNutt, S. N. and Friend, S. D. : Membrane alterations during cornification of mamalian squamous epithelia: Afreeze-fracture, tracer, and thin-section study., *Anat. Rec.*, **189(4)**, 577-594, 1977.

- 14) Caputo, R. and Peluchetti, D. : The junctions of normal human epidermis. A freeze-fracture study. *J. Ultrastruct. Res.*, **61 (1)**, 44-61, 1977.
- 15) Palekar, S. M. and Sirsat, M. S. : Lanthanum staining of cell surface and junctional complexes in normal and malignant human oral mucosa. *J. Oral Pathol.*, **4 (5)**, 231-243, 1975.
- 16) Shimono, M. and Clementi, F. : Intercellular junctions of oral epithelium. I. Studies with freeze-fracture and tracing methods of normal rat keratinized oral epithelium. *J. Ultrastruct. Res.*, **56 (1)**, 121-136, 1976.
- 17) Shimono, M., Sugira, K. and Yamamura, T. : Intercellular junctions of normal human gingival epithelium. A study using freeze-fracture. *Bull. Tokyo Dent. Coll.*, **22 (4)**, 223-236, 1981.
- 18) Langbein, L., Grund, C., Kuhn, C., Praetzel, S., Kartenbeck, J., Brandner, J. M., Moll, I. and Franke, W. W. : Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur. J. Cell Biol.*, **81 (8)**, 419-435, 2002.
- 19) Hatakeyama, S., Yaegashi, T., Oikawa, Y., Fujiwara, H., Mikami, T., Takeda, Y. and Satoh, M. : Expression pattern of adhesion molecules in junctional epithelium differs from that in other gingival epithelia. *J.*

Periodont. Res., **41 (4)**, 322-328, 2006.

20) Troy, C. T., Arabzadeh, A., Yerlikaya, S. and Turksen, K. : Claudin immunolocalization in neonatal mouse epithelial tissues. *Cell Tissue Res.*, **330 (2)**, 381-388, 2007.

21) Dos, Reis, P. P., Bharadwaj, R. R., Machado, J., Macmillan, C., Pintilie, M., Sukhai, M. A., Perez-Ordóñez, B., Gullane, P., Irish, J. and Kamel-Reid, S. : Claudin 1 overexpression increases invasion and is associated with aggressive histological features in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, **113 (11)**, 3169-3180, 2008.

22) Saitoh, M., Kurashige, Y., Nishimura, M., Yamazaki, M., Igarashi, S., Kaku, T. and Abiko, Y. : Expression of claudin-4 and -7 in porcine gingival junctional epithelium. *Med. Mol. Morphol.*, **42 (4)**, 212-215, 2009.

23) Fujita, T., Hayashida, K., Shiba, H., Kishimoto, A., Matsuda, S., Takeda, K., Kawaguchi, H. and Kurihara, H. : The expressions of claudin-1 and E-cadherin in junctional epithelium. *J. Periodon. Res.*, **45 (4)**, 579-582, 2010.

24) Lourenço, S. V., Coutinho-Camillo, C. M., Buim, M. E., de Carvalho, A. C., Lessa, R. C., Pereira, C. M., Vettore, A. L., Carvalho, A. L., Fregnani, J. H., Kowalski, L. P. and Soares, F. A. : Claudin-7 down-regulation is an

important feature in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*, **57 (5)**, 689-698, 2010.

25) Bizikova, P., Linder, K. E., and Olivry, T. : Immunomapping of desmosomal and nondesmosomal adhesion molecules in healthy canine footpad, haired skin and buccal mucosal epithelia: comparison with canine pemphigus foliaceus serum immunoglobulin G staining patterns. *Vet. Dermatol.*, **22 (2)**, 132-142, 2011.

26) Kawamoto, T., Shimizu, M. : A method for preparing 2- to 50-micron-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochem. Cell Biol.*, **113 (5)**, 331-339, 2000.

27) Kawamoto, T. : Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Arch. Histol. Cytol.*, **66 (2)**, 123-143, 2003.

28) Chen, Y., Merzdorf, C., Paul, L. D. and Goodenough, A. D. : COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos. *J. Cell Biol.*, **138 (4)**, 891-899, 1997.

29) Franke, W. W., and Pape, U. F. : Diverse types of junctions containing tight junction proteins in stratified mammalian epithelia. *Ann. N. Y. Acad.*

Sci., **1257**, 152-157, 2012.

30) Brandner, J. M. : Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **72 (2)**, 289-294, 2009.

31) Kirschner, N., and Brandner, J. M. : Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1257**, 158-166, 2012.

32) Hashizume, A., Ueno, T., Furuse, M., Tsukita, S., Nakanishi, Y. and Hieda, Y. : Expression patterns of claudin family of tight junction membrane proteins in developing mouse submandibular gland. *Dev. Dyn.*, **231 (2)**, 425-431, 2004.

33) Maria, O. M., Kim, J. W., Gerstenhaber, J. A., Baum, B. J. and Tran, S. D. : Distribution of tight junction proteins in adult human salivary glands. *J. Histochem. Cytochem.*, **56 (12)**, 1093-1098, 2008.

34) Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M. and Tsukita, S. : Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.*, **147 (1)**, 185-194, 1999.

35) Claude, P. : Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J. Membr. Biol.*, **39**, 219-232, 1978.

- 36) Squier, C. A. : The Permeability of Oral Mucosa. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **2**, 13-32, 1991.
- 37) Proksch, E., Brandner, J. M. and Jensen, J. M. : The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.*, **17(12)**, 1063-1072, 2008.
- 38) Schulzke, J. D., Günzel, D., John, L. J. and Fromm, M. : Perspectives on tight junction research. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1257**, 1-19, 2012.
- 39) Krug, S. M., Günzel, D., Conrad, M. P., Lee, I. F., Amasheh, S., Fromm, M. and Yu, A. S. : Charge-selective claudin channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1257**, 20-28, 2012.
- 40) Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H. and Tsukita, S. : Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J. Cell Biol.*, **153(2)**, 263-272, 2001.
- 41) Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A. H., Schöneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J. D. and Fromm, M. : Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.*, **115**, 4969-4976, 2002.
- 42) Van Itallie, C. M., Holmes, J., Bridges, A., Gookin, J. L., Coccaro, M. R., Proctor, W., Colegio, O. R. and Anderson, J. M. : The density of small tight

junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J. Cell Sci.*, **121**, 298-305, 2008.

43) Rosenthal, R., Milatz, S., Krug, S. M., Oelrich, B., Schulzke, J. D., Amasheh, S., Günzel, D. and Fromm, M. : Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J. Cell Sci.*, **123**, 1913-1921, 2010.

44) Van Itallie, C., Rahner, C. and Anderson, J. M. : Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J. Clin. Invest.*, **107(10)**, 1319-1327, 2001.

45) Van Itallie, C. M., Fanning, A. S. and Anderson, J. M. : Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **285(6)**, F1078-84, 2003.

46) Hou, J., Renigunta, A., Yang, J., and Waldegger, S. : Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107(42)**, 18010-18015, 2010.

47) Brandner, J. M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W. W. and Moll, I. : Organization and formation of

the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes.

Eur. J. Cell Biol., **81** (5), 253-263, 2002.

(付図)

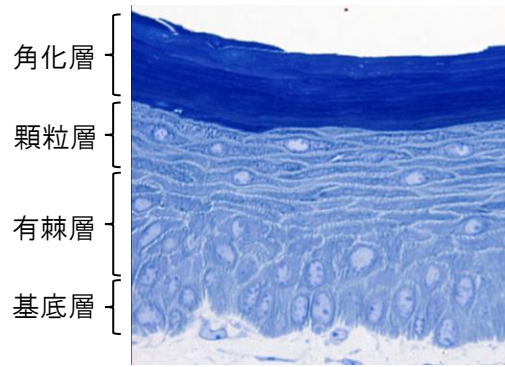


図1. 口蓋粘膜上皮の光学顕微鏡像

口蓋粘膜上皮は基底側より基底層，有棘層，顆粒層，角化層から構成されている。基底層は一層，有棘層は数層の立方ないし円柱状の細胞から構成されている。顆粒層は数層の扁平な細胞からなり，細胞質にトリージンブルー濃染の微細な顆粒を豊富に含んでいる。角化層の角化様式は正角化である。(Original mag. ×400)

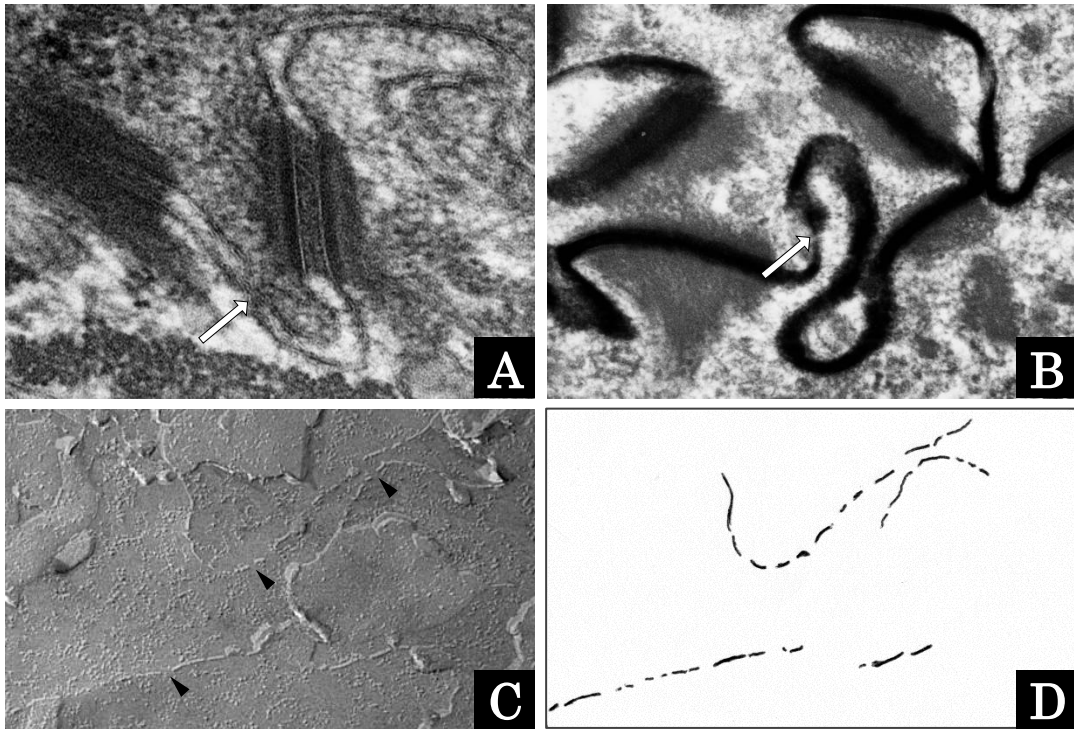


図2. 口蓋粘膜上皮の顆粒層の細胞の電子顕微鏡像

A：通法による観察

顆粒層の細胞の細胞膜が癒合し，TJ (矢印)の形成が認められる。

(Original mag. ×30000)

B：ランタン浸漬法による観察

顆粒層の細胞の細胞間に硝酸ランタンが浸透している。一部分ではTJに相当する硝酸ランタンの浸透が中断されている部位 (矢印)が認められる。

(Original mag. ×30000)

C：フリーズフラクチャー法による観察

TJストランド (P面)が認められる。ストランド (矢頭)は断続的であるが，数条のネットワークを構成している。(Original mag. ×40000)

D：CのTJストランドのトレース図

CでみられたTJストランドの数，走行，不連続性を示す。

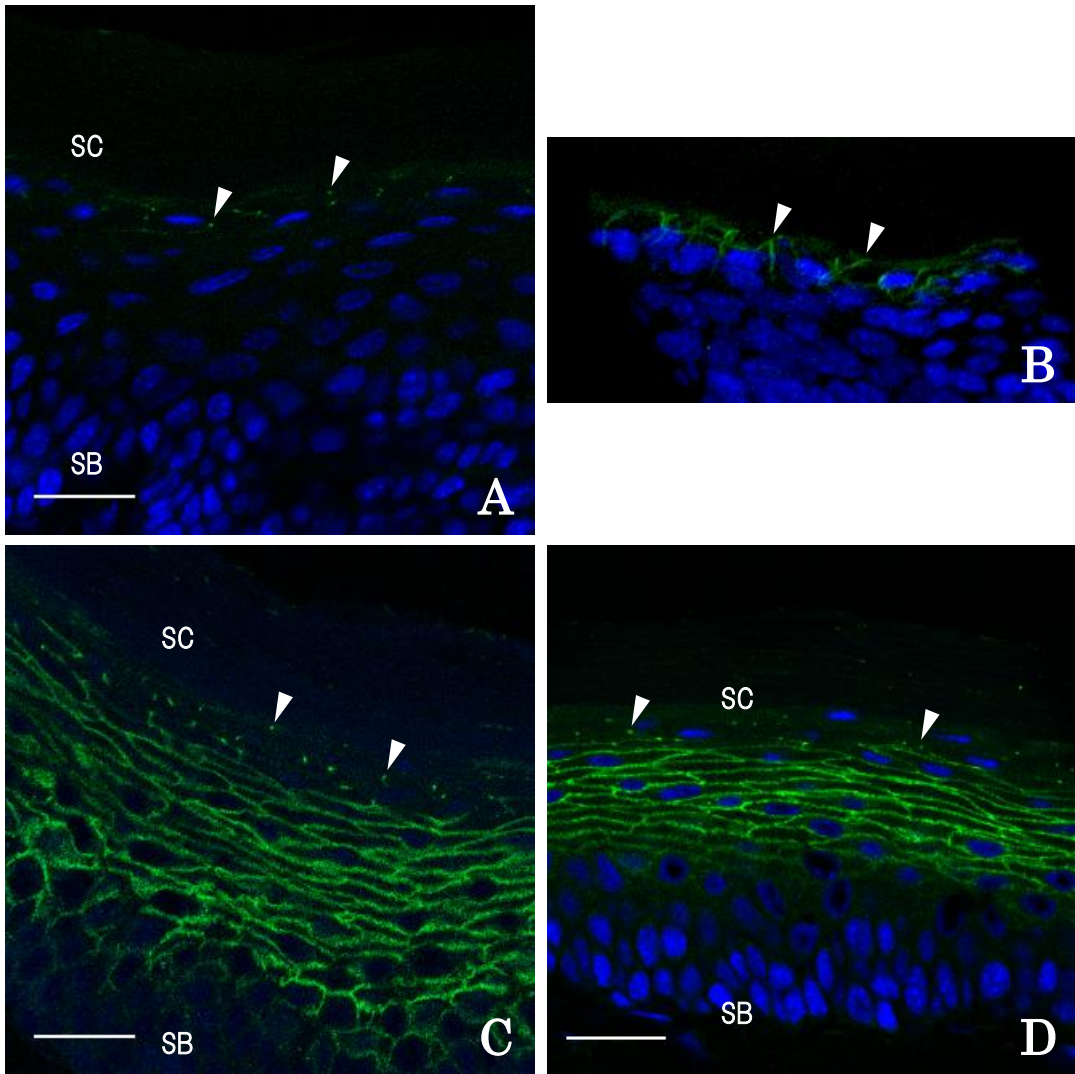


図3. 口蓋粘膜上皮におけるOCD, CLDの局在

A : OCDの免疫蛍光組織像

顆粒層上層の細胞間に点状の陽性反応 (矢頭)が認められる。

B : OCD (A)の立体構築像

顆粒層上層の細胞間の反応が線状の陽性反応 (矢頭)であることがわかる。

C : CLD-1の免疫蛍光組織像

顆粒層上層の細胞間に点状の陽性反応 (矢頭)と顆粒層の中間層から有棘層全層に網目状の陽性反応が認められる。

D : CLD-4の免疫蛍光組織像

顆粒層上層の細胞間に点状の陽性反応 (矢頭)と顆粒層の中間層から有棘層全層に網目状の陽性反応が認められる。

SC : 角化層 SB : 基底層

緑 : OCDもしくはCLD 青 : 核

Scale bar = 25 μ m

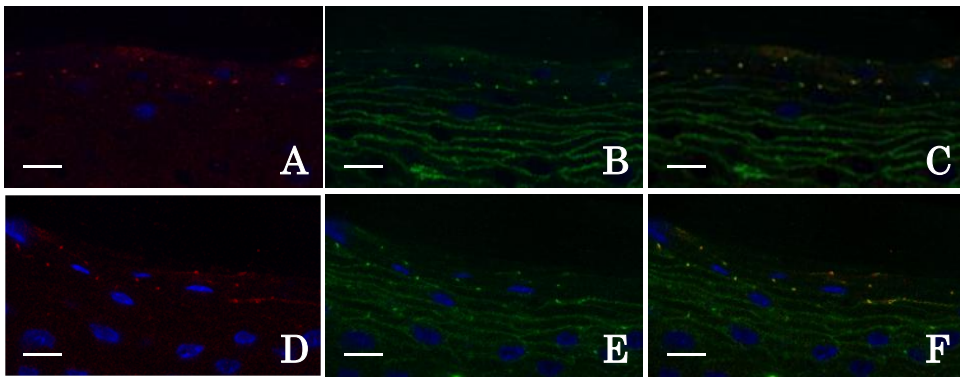


図4. 口蓋粘膜上皮におけるOCDとCLD-1, -4の局在

A : OCDの免疫蛍光組織像

顆粒層上層の細胞間に点状の陽性反応が認められる。

B : CLD-1の免疫蛍光組織像

顆粒層上層の細胞間に点状の反応とその下層より網目状の陽性反応が認められる。

C : OCD (A)とCLD-1 (B)の免疫蛍光組織像の合成像

OCD陽性反応部位とCLD-1の顆粒層上層の細胞間の点状の陽性反応部位が一致している。

D : OCDの免疫蛍光組織像

顆粒層上層の細胞間に点状の陽性反応が認められる。

E : CLD-4の免疫蛍光組織像

顆粒層上層の細胞間に点状の反応とその下層より網目状の陽性反応が認められる。

F : OCD (D)とCLD-4 (E)の免疫蛍光組織像の合成像

OCD陽性反応部位とCLD-4の顆粒層上層の細胞間の点状の陽性反応部位が一致している。

赤 : OCD 緑 : CLD 青 : 核

Scale bar = 10 μ m

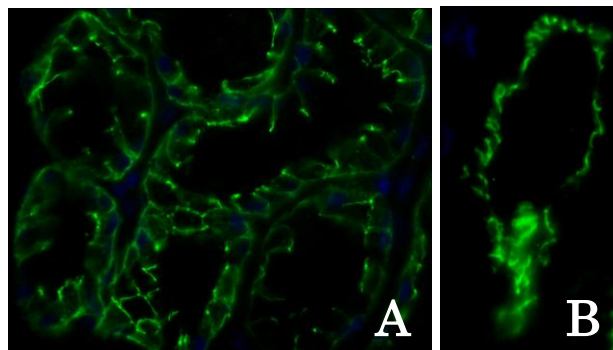


図5. CLD-2, -5の免疫蛍光組織像

A : 粘膜固有層の唾液腺でCLD-2は陽性反応が認められる。

B : 粘膜固有層の血管でCLD-5は陽性反応が認められる。

緑 : CLD 青 : 核 (Original mag. $\times 400$)

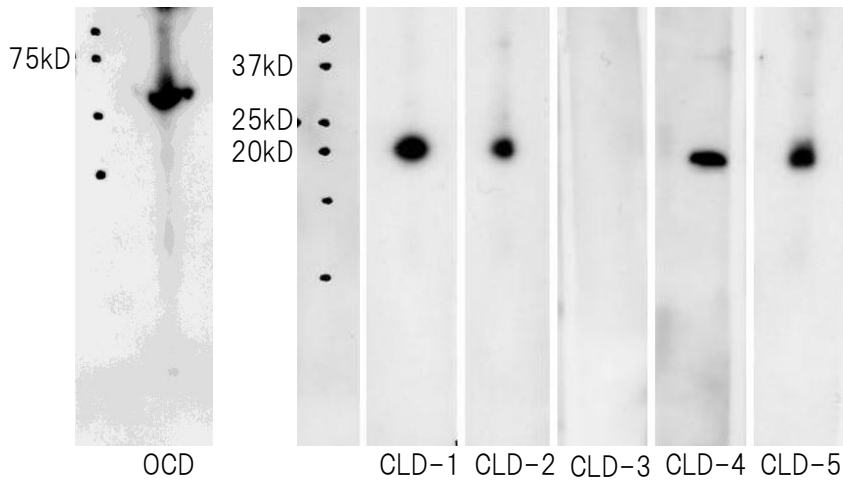


図6. OCD, CLD-1, -2, -3, -4, -5のウエスタンブロット解析結果
OCD, CLD-1, -2, -4, -5で陽性反応が認められる。

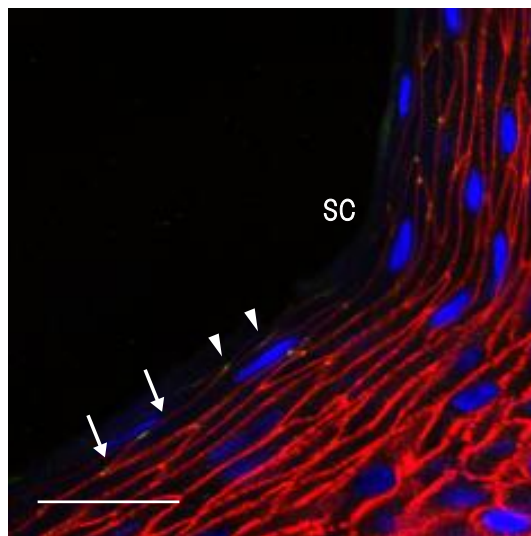


図7. 口蓋粘膜上皮のトレーサーの浸透性

基底層側から角化層に向かってトレーサーであるビオチンが細胞間隙に浸透している。OCD陽性反応部位をビオチンが通過している部位(矢印)とOCD陽性反応部位でビオチンが停止している部位(矢頭)の両者が認められる。

SC : 角化層

赤 : ビオチン 緑 : OCD 青 : 核

Scale bar = 25 μ m