

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16470

研究課題名(和文) 胃壁細胞のエストロゲン産生の機序解明：胃酸分泌制御機構に着目して

研究課題名(英文) Mechanism elucidation of estrogen production in gastric parietal cells: Focusing on the gastric acid regulating systems

研究代表者

小林 裕人 (Kobayashi, Hiroto)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：40588125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃酸とともに胃壁細胞で行なわれるエストロゲン産生の基礎的研究を行った。24ヶ月齢の老齢ラットでも胃粘膜上皮中にアロマトラーゼは発現していたものの、産生されるエストロゲン量は3ヶ月齢と比較して減少した。ヒト胃癌由来細胞株MKN45を用いた検討では、いずれの胃酸分泌調節因子もアロマトラーゼ発現量に有意な影響を及ぼさなかった。以上の結果から、胃壁細胞のエストロゲン産生は加齢に伴う形態学的変化に起因して減衰し、制御機構は胃酸分泌とは異なるものである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃壁細胞におけるエストロゲン産生は発見以来、その制御機構や存在意義が明らかではなく、近年に脂質代謝への関与は報告されたが、直接的な制御因子の解明など基礎的研究は不十分であった。今回、同一細胞内で行なわれる事象であるにもかかわらず、胃酸分泌とは異なる制御機構である可能性が示唆された。これは胃壁細胞におけるエストロゲン産生のさらなる解明の足掛かりとなると考えられる。また、癌患者の中で最も多い胃癌にはエストロゲン産生腫瘍が報告されていることから、胃のエストロゲン産生は胃癌との関連性も推察される。このことから、本研究のさらなる進展は胃癌の新たな治療・診断法開発の端緒となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted a basic study of estrogen production in gastric parietal cells along with gastric acid.

Although aromatase was expressed in the gastric mucosa in 24 month old aged rats, the amount of estrogen produced from the stomach decreased compared to 3 month old rats. In a study using the human gastric cancer-derived cell line MKN45, none of the gastric acid regulators had a significant effect on the expression of aromatase.

These results suggest that estrogen production in gastric parietal cells is attenuated due to morphological changes associated with aging, and that the regulatory mechanism may be different from that of gastric acid secretion.

研究分野：解剖学

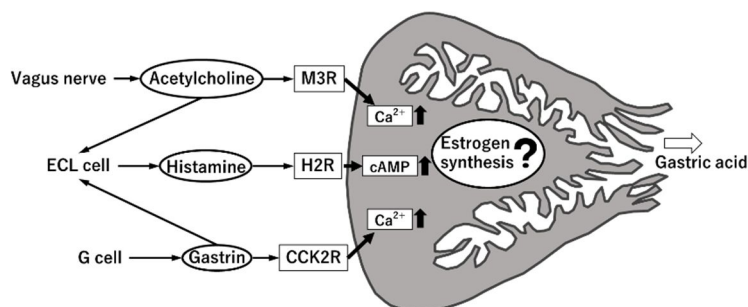
キーワード：胃 壁細胞 胃酸分泌 エストロゲン 女性ホルモン アロマトラーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 胃壁細胞の代表的な機能は胃内腔への胃酸分泌だが、他にも様々な機能を有している。特に、エストロゲン合成酵素のアロマターゼを有し、テストステロンを基質に多量のエストロゲンを合成、門脈へと分泌することがラットを用いた検討によって明らかとなっている。このエストロゲン産生能は卵巣と同程度の遺伝子発現量や酵素活性を示し、性差はなく、性周期にも左右されることなく恒常的に機能していることが報告されている<sup>1,2)</sup>。しかし、発見以来その制御機構や存在意義は明らかではなく、近年に血中脂質制御への関与は報告<sup>3)</sup>されたが、直接的な制御因子の解明など基礎的研究は不十分であった。

(2) 胃酸分泌(細胞外へのH<sup>+</sup>の放出)は壁細胞内にあるH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseにより行なわれる。この機構にはアセチルコリン、ヒスタミン、ガストリンが各受容体に結合し、活性化される複数の経路があり、細胞内の動態に違いはあるが、いずれの因子も胃酸分泌を亢進させる。一方、加齢に伴って胃粘膜内粘液や粘膜血流量が低下<sup>4)</sup>すると胃壁が傷害され炎症が起こる。慢性持続的な炎症により腺管密度や粘膜の丈が低下し、胃底腺を構成する主細胞や壁細胞が減少する萎縮性胃炎となり、結果的に胃酸分泌が減衰する。壁細胞におけるエストロゲン産生は胃酸分泌と同一の細胞内で行なわれるため両者の間には関連性が推考されるが、加齢に伴うエストロゲン産生の変化については調べられていなかった。



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、胃壁細胞におけるエストロゲン産生と胃酸分泌の関係性について明らかにし、エストロゲン産生の制御機構解明の端緒を得ることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 老齢ラット胃壁細胞におけるエストロゲン産生

実験動物のWistar系ラットは一般的に3週齢頃に離乳し、6週齢頃から性成熟が始まり、繁殖適齢期となる12週齢(3ヶ月)程度(体重200-300g)で頻用される。ラットの平均寿命は24ヶ月から30ヶ月程度とされており<sup>5-7)</sup>、平均寿命付近になると前立腺や下垂体等に腫瘍の発生頻度が増加することが報告されている<sup>5,8,9)</sup>。したがって、3ヶ月齢をコントロールとし、6、12、18、24ヶ月齢まで自由摂食、自由飲水で飼育したWistar系ラットの胃のエストロゲン産生について検討した。

各点において麻酔下で重量測定後、門脈から採血し、胃と肝臓を採取した。組織学的解析用に組織をBouin固定・脱水・透徹後、パラフィン包埋し、切片を作成した。切片は色素染色や免疫組織化学に供した。生化学的解析用には組織を液体窒素で急速凍結し、real-time PCRを用いて*Actb*のC<sub>T</sub>値を基に胃粘膜上皮中の*Cyp19a1*遺伝子発現量を相対的に算出した。また、Estradiol ELISA kitを用いて、Calibration standardから門脈血中のエストラジオール相当量(pg/mL)を算出した。

#### (2) ヒト胃癌由来細胞株MKN45を用いた胃酸分泌調整因子の検討

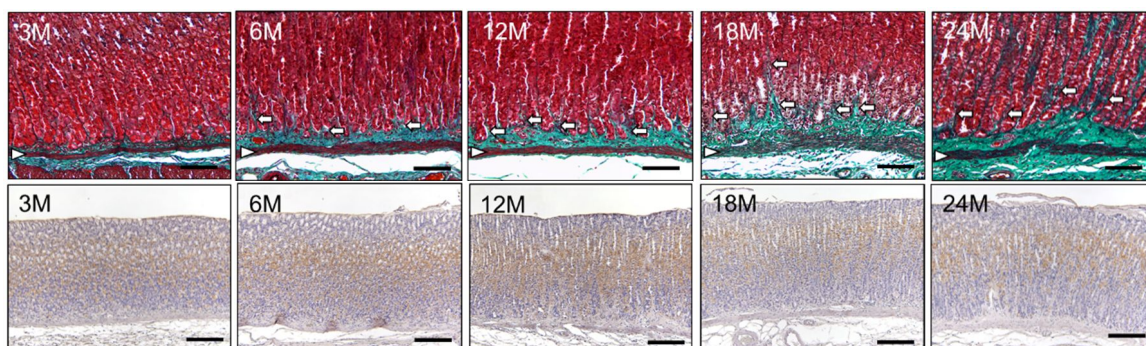
ヒト胃癌由来細胞株MKN45は低分化腺癌由来であるが、電顕上まれに壁細胞に固有の細胞内分泌小管を有し、形態的に壁細胞に似た形態を呈している。また、プロトンポンプであるH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseを有していることに加え、ヒスタミンがMKN45の細胞内cAMP濃度を容量依存的に上昇させ、H<sub>2</sub>受容体アンタゴニストによってcAMP合成を容量依存的に抑制していることが明らかとなっている。さらに、MKN45はアロマターゼも有し、基質のテストステロンをエストラジオールに変換することが確認されており<sup>10)</sup>、形態的にも機能的にも本研究テーマに適した材料である。

MKN45 の培養液 RPMI-1640 (w/o Phenol red) に 10% FBS と Penicillin-Streptomycin Solution ( $\times 100$ ) を混和し、5% CO<sub>2</sub> 下 37 °C で培養を行なった。培養液にヒスタミン、アセチルコリン、ガストリン、プロスタグランジン E<sub>2</sub>、ヒドロコルチゾン、上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor; EGF)、黄体ホルモン放出ホルモン、カルシウム、cAMP を各濃度で添加し、24 時間培養後、Trizol と RIPA Buffer を用いてサンプル採取を行なった。アロマターゼと  $\beta$ -actin に対する抗体を用いて Western blotting 解析を行なった。また、tRNA 抽出後、逆転写して得られた cDNA から real-time PCR を用いて *Actb* の C<sub>T</sub> 値を基に胃粘膜上皮中の *Cyp19a1* 遺伝子発現量を相対的に算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 老齢ラット胃壁細胞におけるエストロゲン産生

6、12、18、24 ヶ月齢のラットの胃粘膜上皮にはびらんや炎症、腸上皮化生などの病理変化は認められなかった。一方、粘膜筋板側の膠原線維の面積が日数の経過とともに増加し、18、24 ヶ月齢では胃底腺の間にも増生している像が観察された (図)。各点において、胃粘膜上皮にはアロマターゼが発現しており、24 ヶ月齢でも発現が確認された。しかし、18 ヶ月齢以降にアロマターゼタンパク質量や *Cyp19a1* 遺伝子発現量は有意に減少し、組織学的解析では壁細胞のマーカである H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit とともにアロマターゼの抗体陽性細胞の面積が特に胃粘膜上皮の粘膜筋板側半側における領域で有意に減少していた。産生されるエストロゲン量は 3 ヶ月齢と比較して 12 ヶ月齢では増加したが、18 ヶ月齢以降は減少したことが明らかとなった。また、肝臓のエストロゲン受容体も胃のアロマターゼと同様に 18 ヶ月齢以降に減少した。以上の結果から、胃壁細胞のアロマターゼは生涯にわたって発現し続けることが明らかとなったと同時に、炎症などの病理変化が生じなくても、加齢に伴った胃底腺構成細胞の形態学的変化によって減衰することが明らかとなった。また、産生されるエストロゲン量の低下は肝臓のエストロゲン受容体の動態にも影響を及ぼすこと示唆された<sup>11)</sup>。



Kobayashi *et al.*, Histochem Cell Biol, 2022

#### 図. 各月齢におけるラット胃粘膜上皮の組織像

上段：エラスチカ マッソン染色、下段：抗アロマターゼ抗体による免疫組織化学染色。

エラスチカ マッソン染色では日数の経過、特に 18 ヶ月齢以降から膠原線維 (緑色) の増生が顕著になる。免疫組織化学染色ではアロマターゼ (茶色) の染色性は 18 ヶ月齢以降に低下する。矢印：胃底腺間に増生する膠原線維、矢頭：粘膜筋板、Bar: 100  $\mu$ m (上段)、200  $\mu$ m (下段)。

##### (2) ヒト胃癌由来細胞株 MKN45 を用いた胃酸分泌調整因子の検討

胃壁細胞に直接作用し、胃酸分泌を亢進させる因子であるヒスタミン、アセチルコリン、ガストリンは MKN45 のアロマターゼタンパク質量および *Cyp19a1* 遺伝子発現量には有意な影響を及ぼさなかった。特に、MKN45 は先行研究においてヒスタミンの受容体である H<sub>2</sub> 受容体を有し、細胞内 cAMP の濃度を上昇させる<sup>12)</sup>ことが報告されていたが、アロマターゼ発現には作用しなかった。また、胃酸分泌の調節において抑制および促進の二面性を示す<sup>13)</sup>とされるプロスタグランジン E<sub>2</sub>、プロスタグランジン生成抑制に伴う胃粘液分泌抑制と胃酸分泌促進作用を示すヒドロコルチゾン、胃酸分泌抑制因子として知られる EGF も MKN45 のアロマターゼ発現には有意な影響を及ぼさなかった。さらに、壁細胞に受容体を持つ<sup>14)</sup>とされる黄体ホルモン放出ホルモンに留まらず、カルシウムや cAMP を直接投与した場合も MKN45 のアロマターゼ発現には有意な影響を及ぼさなかった。以上の結果から、胃壁細胞におけるアロマターゼ発現は胃酸分泌調節因子の影響を受けず、同一細胞内ではあるが、それぞれの制御機構は独立している可能性が示唆された。

#### < 引用文献 >

- 1) Ueyama *et al.*, Gastric parietal cells: potent endocrine role in secreting estrogen as a possible regulator of gastro-hepatic axis, *Endocrinol*, 143(8), 2002, 3162-70

- 2) Kobayashi, Estrogen synthesis in gastric parietal cells and secretion into portal vein, *Anat Sci Int*, 95(1), 2020, 22-30
- 3) Ito *et al.*, Stomach secretes estrogen in response to the blood triglyceride levels, *Commun Biol*, 4(1), 2021, 1364
- 4) 渡辺嘉久ら、酸分泌抑制時の粘液分泌動態、胃粘膜の防御機構、1985
- 5) Snyder *et al.*, Life span, morphology, and pathology of diet-restricted germ-free and conventional Lobund-Wistar rats, *J Gerontol*, 45(2), 1990, B52-8
- 6) Waki *et al.*, Effect of aging on gastrin receptor gene expression in rat stomach, *Peptides*, 19(2), 1998, 225-9
- 7) Altum *et al.*, Behavioral impairments of the aging rat, *Physiol Behav*, 92(5), 2007, 911-23
- 8) Barsoum *et al.*, Morphologic features and incidence of spontaneous hyperplastic and neoplastic mammary gland lesions in Wistar rats, *Toxicol Pathol*, 12(1), 1984, 26-38
- 9) van Nesselrooij *et al.*, Correlations between presence of spontaneous lesions of the pituitary (adenohypophysis) and plasma prolactin concentration in aged Wistar rats, *Vet Pathol*, 29(4), 1992, 288-300
- 10) Izawa *et al.*, Cytochrome P450 aromatase gene (CYP19) expression in gastric cancer, *Gastric Cancer*, 11(2), 2008, 103-10
- 11) Kobayashi *et al.*, Age-related alterations of gastric mucosa and estrogen synthesis in rat parietal cells, *Histochem Cell Biol*, 157(2), 2022, 195-204
- 12) 有馬範幸ら、ヒト胃癌培養細胞株 MKN45 は Histamine H<sub>2</sub> 受容体を有する、日本消化器病学会雑誌、1991、88(1)、115
- 13) Shinichi Kato *et al.*, Dual action of prostaglandin E2 on gastric acid secretion through different EP-receptor subtypes in the rat, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289(1), 2005, G64-9
- 14) W Huang *et al.*, Immunohistochemical and in situ hybridization studies of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and its receptor in rat digestive tract, *Life Sci*, 68(15), 2001, 1727-34

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Hiroto, Shirasawa Nobuyuki, Naito Akira	4. 巻 157
2. 論文標題 Age-related alterations of gastric mucosa and estrogen synthesis in rat parietal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 195 ~ 204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-021-02054-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林裕人、白澤信行、内藤輝
2. 発表標題 ラット胃壁細胞Aromataseの加齢変化
3. 学会等名 日本解剖学会第66回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroto Kobayashi, Nobuyuki Shirasawa, Akira Naito.
2. 発表標題 Age-related changes of estrogen synthesis in the rat gastric mucosa.
3. 学会等名 The 126th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	白澤 信行  (Shirasawa Nobuyuki)  (40133392)	東北文化学園大学・医療福祉学部・教授    (31310)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	内藤 輝  (Naito Akira)  (90188855)	山形大学・医学部・教授    (11501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関