

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590238

研究課題名(和文) 高圧凍結技法による胃酸分泌関連蛋白と細胞膜動態に関する超微形態研究

研究課題名(英文) Ultrastructural studies on the intracellular trafficking of membranes and HCl-secreting proteins in gastric parietal cells by high-pressure freezing.

研究代表者

澤口 朗 (Sawaguchi, Akira)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：30336292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ラットに摂食刺激を加えた胃酸分泌期と、胃酸分泌抑制剤を投与した胃酸分泌休止期における胃底腺壁細胞の細胞膜動態について、高圧凍結技法により作製した電子顕微鏡観察試料をもとに超微形態学的解析を加えた。特に、細胞膜動態に関わる膜融合蛋白やKCNQ1等のイオンチャネルの胃酸分泌期と休止期における細胞内局在について、電顕レベルに及ぶ詳細な免疫組織化学的解析を行ない、当該研究分野における形態学的基盤となる新たな知見を得た。さらに、胃底腺壁細胞の細胞膜動態に関わるTRIM50の細胞内局在変化を探索し、TRIM50KOマウスにおける機能形態解析について、電子顕微鏡レベルの詳細な解析を行い、論文報告した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the intracellular trafficking of membranes and HCl-secreting proteins in rat gastric parietal cells by taking advantages of the ex vivo experimental model, named rat isolated gastric mucosa, and the high-pressure freezing followed by freeze substitution cryo-techniques. As results, we obtained a new insight concerning the intracellular trafficking of membrane fusion proteins, such as syntaxin3 and Hip1r, and ion-transporter channel proteins, such as KCNQ1, between the resting state and the active acid-secreting state of the parietal cell by the application of immuno-histochemistry. In addition, we revealed a unique change in functional morphology in the gastric parietal cells of TRIM50 knock-out mice at the electron microscopical level.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：高圧凍結技法 胃粘膜 胃酸分泌 壁細胞 超微形態 細胞膜動態 免疫組織化学 蛋白局在

1. 研究開始当初の背景

胃底腺壁細胞は摂食等の刺激を受けて胃酸分泌活動期に入ると、細胞内に貯留していた細管小胞膜が頂上膜に融合しながら微絨毛を形成する著明な形態変化を呈し、腺腔に面した頂上膜へ移行したプロトンポンプ (H^+/K^+ -ATPase) を機能させて胃酸を分泌することが知られていた。この休止状態から酸分泌状態へ移行する「酸分泌刺激時」の壁細胞動態については、1980年代の初代培養壁細胞や単離胃底腺などの実験モデル確立以来、数多くの知見が集められてきた。一方で胃底腺壁細胞は摂食等の刺激が解消すると次の刺激に備えて再び細管小胞を貯留した休止状態へ戻るが、この回復過程における細胞膜動態については再現性の高い実験モデルが確立されておらず、解剖生理学的に極めて重要な研究課題でありながら不明な点が多く残されていた。

我々は生体胃粘膜の組織形態を保ち、ヒスタミン等の試薬に速やかな反応性を示す「ラット単離胃粘膜モデル」を開発し、その応用研究により胃酸分泌刺激時から休止状態に戻る胃酸分泌後回復期壁細胞の *in vitro* 実験モデル確立にも成功した。その後の高圧凍結技法を用いた研究により、胃酸分泌後回復期壁細胞がオートファゴソームを形成しながら細胞膜を取り込み、次の摂食刺激に備える過程を初めて明らかにしている。

近年、胃酸分泌への関与が示唆される KCNQ1 や KCNE2 などのイオンチャネルや細胞膜動態に関わる syntaxin3, VAMP8, Hip1r などが胃底腺壁細胞に発現することが相次いで報告され、プロトンポンプ阻害剤に代わる新たな作用機序による胃酸分泌抑制剤の開発を視野に入れた研究が展開されているが、いずれも電子顕微鏡レベルの詳細な細胞内局在解析には至っておらず、微細形態と生体物質の保存に優れた凍結技法の応用による

解析が待たれていた。さらにはこれらの胃酸分泌関連蛋白が胃酸分泌後回復期に示す動態については未だ検討されておらず、我々が独自に開発した酸分泌期回復期モデルを応用した研究に期待が寄せられていた。

2. 研究の目的

胃酸分泌に与る胃底腺壁細胞が生理的条件下の変化に応じて示す著明な膜動態と形態変化については近年の研究進展によって新たな重要課題が生まれ、その解明は消化機構の研究基盤提出はもとより、臨床における胃粘膜傷害の予防や治療に繋がるものと期待されている。本研究は独自に開発したラット単離胃粘膜モデルの生理的条件下を振り分け、微細形態と生体物質の保持に卓越した能力を示す高圧凍結技法による試料作製を遂行し、胃底腺壁細胞の膜動態やイオンチャネルの細胞内局在を可視化する形態学的アプローチにより追求するもので、プロトンポンプ阻害剤に代わる新たな胃酸分泌抑制剤の創薬ターゲットの探索も視野に入れた研究を目的として立案、遂行された。

3. 研究の方法

はじめに生体ラット胃底腺壁細胞の胃酸分泌期と休止期における細胞膜動態と胃酸分泌関連蛋白の局在解析を進め、本研究の基盤となる形態学的所見の収集にあたった。この所見をもとに、ラット単離胃粘膜モデルの生理的条件下を振り分け、胃底腺壁細胞が摂食後の胃酸分泌刺激状態から次の食餌に備えて休止状態に至る全ての生理的条件下における細胞膜動態と胃酸分泌関連蛋白の細胞内局在解析を進めた。

ラット単離胃粘膜の胃酸分泌後回復期壁細胞モデルは、24時間絶食後の再摂食によって酸分泌を刺激した胃から単離胃粘膜を作製し、胃酸分泌阻害剤 (H_2 -receptor 阻害剤) 添加培養液中で一定時間処理するもので、こ

の間に壁細胞は胃酸分泌状態から休止状態へ移行する胃酸分泌後回復過程を呈することが確認されていた。なお、電子顕微鏡観察試料は全て高圧凍結技法によって作製された。

4. 研究成果

ラットに摂食刺激を加えた胃酸分泌期と、胃酸分泌抑制剤を投与した胃酸分泌休止期における胃底腺壁細胞の細胞膜動態について、高圧凍結技法により作製した電子顕微鏡観察試料をもとに細胞膜動態に関わる syntaxin3, VAMP8, Hip1r 等の細胞内局在の変化を探索し、本研究の基盤となる形態学的所見を収集した。また、胃酸分泌への関与が示唆される KCNQ1 などのイオンチャネルの胃酸分泌期と休止期における細胞内局在について、免疫組織化学的手法による電子顕微鏡レベルの詳細な解析を行った。

次に胃酸分泌後回復期における細胞膜動態について、独自に開発したラット単離胃粘膜の胃酸分泌後回復期壁細胞モデルを実験材料に詳細な解析を行った結果、胃酸分泌後の回復過程で細胞膜を処理する役割を果たすと考えられるオートファジーの関与が免疫組織化学的解析によって明らかとなった。

さらに胃底腺壁細胞の細胞膜動態に関わる TRIM50 の細胞内局在変化を探索し、TRIM50 ノックアウトマウスにおける機能形態解析について、電子顕微鏡レベルの詳細な解析を行い、論文報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Aoyama, F., Sawaguchi, A.: Functional transformation of gastric parietal cells and intracellular trafficking of ion channels/transporters in the apical canalicular membrane associated with acid secretion.

Biol Pharm Bull, 34: 813-816 (2011)

査読無し(招待総説)

Nishi, M., Aoyama, F., Kisa, F., Zhu, H., Sun, M., Lin, P., Ohta, H., Van, B., Yamamoto, S., Kakizawa, S., Sakai, H., Ma, J., Sawaguchi, A., Takeshima, H.: TRIM50 regulates vesicular trafficking for acid secretion in gastric parietal cells.

J of Biol Chem, 287(40): 33523-32 (2012)

査読有り

高橋伸育、豊嶋典世、澤口 朗: 樹脂包埋補助ツールを用いたピンポイント電顕試料作製法

顕微鏡 48(2): 113-117 (2013)

査読無し(招待総説)

澤口 朗: 超微形態と生体物質の保存に優れた加圧凍結技法

Plant Morphology 25: 7-10 (2013)

査読無し(招待総説)

〔学会発表〕(計7件)

澤口 朗、豊嶋典世、高橋伸育: 高圧凍結技法を応用した胃酸分泌関連蛋白の局在解析

第52回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2011年9月24日. 金沢

豊嶋典世、高橋伸育、井手惣幸、澤口 朗: 凍結技法と単離胃粘膜モデルを応用した

胃酸分泌関連疾患の病態解析

第 117 回日本解剖学会全国学術集会、2012 年
3 月 27 日．山梨

澤口 朗、豊嶋典世、高橋伸育：加圧凍
結技法が広げる次世代電顕解析の可能性
日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会、2012 年
5 月 14 日．つくば

Aoyama, F., Takahashi, N., Ide, S.,
Sawaguchi, A.: Autophagic degeneration
and subsequent exfoliation of gastric
pit-parietal cells into the gastric lumen
associated with a stimulation of
acid-secretion: an *in vitro* study observed
in isolated rat gastric mucosa model.
14th International Congress of
Histochemistry and Cytochemistry. 2012 年
8 月 26 日．Kyoto, Japan.

澤口 朗：加圧凍結技法の基礎と応用の
歴史
日本植物学会第 76 回大会、2012 年 9 月 15 日．
姫路

豊嶋典世、高橋伸育、井手惣幸、澤口
朗：ラット単離胃粘膜モデルで見い出された
オートファジーを介する胃小窩壁細胞剥離
現象の凍結技法を応用した機能形態解析
第 68 回日本解剖学会九州支部学術集会、2012
年 10 月 13 日．久留米

澤口 朗，青山典世，高橋伸育：胃酸分
泌後壁細胞のプロトンポンプ回収機構にお
けるオートファジーの関与
第 45 回日本臨床分子形態学会総会・学術集
会、2013 年 9 月 14 日．福岡

6．研究組織

(1) 研究代表者

澤口 朗 (SAWAGUCHI, Akira)

宮崎大学医学部解剖学講座

超微形態科学分野 教授

研究者番号：30336292