

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460278

研究課題名(和文) 高圧凍結技法を用いた細胞剥離と上皮連続性再構築機構を解明する超微細形態研究

研究課題名(英文) Ultrastructural study on epithelial cell exfoliation and reconstruction 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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は独自に開発した「細胞剥離」実験解析モデルをもとに、細胞剥離とそれに伴う上皮連続性再構築機構の解明を研究目的とした。高圧凍結技法による試料作製を実施し、剥離する壁細胞における細胞内小器官や細胞骨格、細胞膜の経時的形態変化の他、オートファゴソムの超微細構造と、その形成過程に関する詳細を明らかにした。さらに、剥離細胞と隣接する細胞の接着解離、伸長する細胞突起内の細胞骨格動態等を超微細形態レベルで明らかにした。また、胃酸分泌抑制剤が胃小窩壁細胞の剥離を顕著に抑制することが確認された。本研究の成果から、ピロリ菌感染による胃粘膜傷害をはじめ重要課題の解決に繋がる端緒が得られるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated ultrastructural change in epithelial cell exfoliation and reconstruction by taking advantages of original cell exfoliation experimental model. As results, exfoliating cell exhibited drastic morphological changes in the subcellular organelle, plasma membrane, cytoskeleton, and autophagosomes processed by high-pressure freezing. Moreover, electron microscopy revealed ultrastructural changes of adhesion complex, and cytoskeletal dynamics in the cell process extending from the neighboring cells. In this study, we also verified that both H2 receptor blocker and proton pump inhibitor reduced the number of cell exfoliation. Taken together, the present results are highly anticipated to reach a solution for gastric mucosal injury due to H. Pylori infection, etc.

研究分野：解剖学

キーワード：高圧凍結技法 上皮更新 超微細形態 電子顕微鏡 胃粘膜傷害

1. 研究開始当初の背景

本研究が解明を目指す「細胞剥離」に関する研究は、数々の細胞接着分子が明らかになっている「細胞接着」に比して大きな進展を見ずに今日を迎えている。この要因として、細胞剥離の誘発と抑制を組織レベルで意図的に制御できる理想的な実験解析モデルが未確立であることが挙げられる。研究代表者は生体胃粘膜に極めて近い組織形態を保ち、速やかな試薬反応性が得られる「ラット単離胃粘膜モデル」の独自開発に成功し、その応用研究の過程で“摂食刺激を加えたラットの胃小窩壁細胞が胃内腔へ剥離する胃小窩壁細胞剥離現象”を見出して論文報告した。これは胃酸分泌刺激の加減によって細胞剥離を制御できる胃小窩壁細胞に特有の現象であり、新たな研究領域を切り拓く画期的な「細胞剥離」実験解析モデルとして注目されている。これまでの研究成果から、剥離する胃小窩壁細胞内でオートファジー特異マーカー：LC-3の発現が確認され、剥離に際し不要となったプロトンポンプを有する細胞膜を処理する細胞内分解系が活発に機能していることも示唆されている。

さらに注目される所見として、剥離する細胞に隣接する粘液細胞の一部が足様突起として基底膜に沿って伸長し、上皮の連続性が欠失しないよう基底側を裏打ちする電顕像が捉えられている。胃粘膜上皮連続性の破綻はびらんや潰瘍の発症をもたらす可能性が高く、胃小窩壁細胞の剥離制御や上皮細胞連続性を保持する隣接細胞の裏打ち機構の解明に期待が寄せられている。

2. 研究の目的

本研究は独自に開発したラット単離胃粘膜の応用研究により確立された「細胞剥離」実験解析モデルをもとに、胃酸分泌刺激の加減によって細胞剥離を制御できる特性を活かしながら、生体における細胞剥離とそれに伴

う上皮連続性再構築機構の解明を研究目的とする。電子顕微鏡解析試料は超微細構造の保持に優れ、研究代表者が世界をリードする高圧凍結技法を駆使して作製するもので、細胞接着部位の解離や細胞骨格の局在変化、細胞内小器官や細胞膜の動態に関する詳細について解析を加える。期待される研究成果は成体における上皮細胞の更新や発生過程の組織形成、癌細胞の転移機構解明にも繋がる重要課題であり、電子顕微鏡レベルの詳細な解析を遂行することで、ブレイクスルーをもたらす形態学的研究基盤の提出を目指す。

3. 研究の方法

はじめに剥離細胞における形態変化に照準を絞り、超微細構造の保持に優れた高圧凍結技法の利点を活かして、剥離の初期段階から経時的に細胞骨格や細胞膜動態の変化を追究する。続いて、剥離細胞に隣接する細胞が上皮の連続性を保持するために細胞突起を伸長し、剥離細胞の基底側で突起同士が再接着する生理機構の解明に着手する。細胞単位の解析結果に基づき、剥離細胞を補充する細胞分裂や分化促進など組織レベルの細胞動態解析を展開し、最終年度には単離胃粘膜モデルを更に発展させた「胃粘膜傷害モデル」の開発を手がけ、ヘリコバクター・ピロリ菌感染による胃粘膜傷害をはじめとする重要課題の解決に繋がる端緒を採取する。

4. 研究成果

(1) 独自に遂行した従前の研究成果から、ラットに摂食刺激を加えて作製した単離胃粘膜モデルにおいて、胃小窩壁細胞が顕著に剥離する現象を見出している。本研究を遂行する第一段階として、微細構造の保持に優れた高圧凍結技法による試料作製を実施し、詳細な超微形態解析を行い、剥離する壁細胞における細胞内小器官や細胞骨格、細胞膜の経時的形態変化を中心に、基盤となる形態学的所

見を収集した。この結果、オートファゴソームの超微細構造と、その形成過程に関する詳細を明らかにすることができ、解析基盤の確立に成功した。

(2) 上記(1)の解析で得られた超微形態学的所見に基づき、剥離に際して必要となる細胞接着の解離機構を明らかにするため、E-cadherin、 β -Catenin、Occludin、Claudin 1、ZO-1 などの細胞接着分子の細胞内局在について、金コロイド標識抗体を用いた電子顕微鏡レベルの探索を含む免疫組織化学的解析方法を確立した。

(3) 本研究が目指した細胞剥離のメカニズム解明に繋がる特異な胃小窩壁細胞の剥離に際しては、胃底腺上皮細胞の連続性を欠失しないよう、剥離する細胞の基底膜側を裏打ちするように、隣接する表層粘液細胞が基底膜に沿って細胞突起を伸長することが判明していた。そこで、前年度に解析された剥離細胞自体の形態変化を参考に、剥離細胞と隣接する細胞の接着解離、伸長する細胞突起内の細胞骨格動態、さらには伸長された突起が再接着する詳細を超微細形態レベルで明らかにした。

(4) 本研究が対象とする胃小窩壁細胞の剥離は胃酸分泌刺激により著しく亢進することが判明していることから、臨床で用いられる H₂-receptor 阻害剤やプロトンポンプ阻害剤による胃酸分泌抑制が剥離を抑制する可能性が強く示唆された。そこで、剥離亢進と抑制の対極的な試料作製に続き、細胞接着関連蛋白の発現を中心とした分子生物学的比較解析を加え、剥離制御因子の同定と細胞剥離の背景にある生理機構の解明にむけた研究基盤を確立した。

(5) 胃底腺峡部は幹細胞が位置する細胞増殖帯となっており、胃小窩壁細胞の剥離亢進に伴って細胞分裂と壁細胞への分化が亢進することが予想された。そこで、BrdU、PCNA、Ki67 をはじめとする細胞分裂マーカーや、分

化した胃小窩壁細胞と選択的に結合するピーナッツ・レクチンを用いることで、細胞剥離に伴う細胞動態の変化を組織化学的に可視化して検討を加えた結果、剥離亢進から 120 分までは顕著な細胞分裂の増加は認められないことが明らかとなった。

(6) 胃小窩壁細胞の剥離に伴う上皮細胞連続性再構築が破綻した場合、欠損部から強酸性を示す胃酸やペプシンをはじめとする強力な消化酵素が胃粘膜固有層に流入し、胃粘膜傷害をもたらすことが予想された。そこで、剥離現象に基づく胃粘膜傷害発症メカニズムの解明を目指した応用研究として、臨床で汎用される H₂-receptor 阻害剤やプロトンポンプ阻害剤などの胃酸分泌抑制剤が、胃小窩壁細胞の剥離を抑制するか否かを検討した結果、いずれの薬剤も剥離を顕著に抑制することが確認された。本研究で得られた成果をもとに、ヘリコバクター・ピロリ菌感染による胃粘膜傷害をはじめとする重要課題の解決に繋がる端緒が得られるものと期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Sawaguchi, A., Aoyama, F., Takahashi, N.: Ultrastructural dynamics of autophagy-related membrane myelination and subsequent exfoliation of gastric pit-parietal cells in isolated rat gastric mucosa processed by high-pressure freezing.

2016 Cell Biology ASCB Annual Meeting.

2016 年 12 月 5 日 モスコニー・コンベンションセンター (米国カリフォルニア州サンフランシスコ)

(2) 澤口 朗、豊嶋典世、高橋伸育: ラット胃小窩から剥離する壁細胞内における特異

な多重膜構造に関する高圧凍結技法を用いた超微形態学的研究
第 58 回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会、
2016 年 12 月 3 日・産業医科大学(福岡県北九州市)

(3) 澤口 朗、豊嶋典世、高橋伸育：高圧凍結技法を用いた胃小窩壁細胞剥離現象の超微形態学的研究

第 57 回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会、
2015 年 11 月 21 日・九州大学筑紫キャンパス(福岡県春日市)

(4) 豊嶋典世、高橋伸育、澤口 朗：ラット単離胃粘膜モデルに見られる胃小窩壁細胞の特異な剥離現象

認定 NPO 法人 総合画像研究支援 (IIRS) 創立十周年記念学術講演会、2014 年 11 月 7 日・
東京大学 (東京都・文京区)

〔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〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/2anat/>

6 . 研究組織

(1) 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

(2) 連携研究者

豊嶋 典世 (TOYOSHIMA, Fumiyo)

宮崎大学医学部・講師

研究者番号：10468035

高橋 伸育 (TAKAHASHI, Nobuyasu)

宮崎大学医学部・助教

研究者番号：20404436