

## Immunohistochemical Detection of the Cytoskeletal Components in Gastric Parietal Cells

(胃底腺壁細胞における細胞骨格成分の免疫組織化学的研究)

若松 大介

## 【目的】

胃底腺壁細胞は微細構造的特徴として細胞内分泌細管と小管小胞をもつ。この二つの細胞小器官の形態は胃酸分泌の状態によって大きく変化する。また、胃酸分泌をつかさどる細胞膜上のプロトンポンプ: $H^+K^+$ -ATPase はこの形態変化に密接に関連している。この壁細胞の形態変化 transformation 機構については多くの研究がなされてきた。その結果、アクチンが transformation を誘導しておりそのアクチンはエズリン蛋白の存在によって細胞膜に固定されて transformation 機構が働く事、また、エズリンのリン酸化ないし脱リン酸化が細胞膜への結合ないし解離として関与している事が明らかになってきた。

しかし、これらは生理生化学的データであり、形態的データはまだ明らかとなっていない。本研究は、胃底腺壁細胞の形態変化とプロトンポンプ機能との関係を超微構造的に把握し、形態変化およびエズリン蛋白の動態を光顕・電顕免疫組織化学的に検討した。

## 【材料と方法】

250-300g の Wistar 系雄ラットを 5 匹ずつ、給食群と絶食群に分けて用いた。

光顕用標本として、胃組織を急速凍結固定後、アセトンで凍結置換しパラフィン包埋した。免疫染色の一次抗体にウサギ抗  $H^+K^+$ -ATPase  $\alpha$  ないし  $\beta$  サブユニット抗体、ウサギ抗リン酸化エズリン抗体、マウス抗非リン酸化エズリン抗体、ウサギ抗アクチン抗体等を用いた。二次抗体にはビオチン化 IgG 抗体、その後ストレプトアビジン-HRP を適用し DAB による可視化を行った。

電顕用標本には、胃組織を高圧凍結後、オスミウムないしアクロレイン、グルタルアルデヒドを含むアセトンで凍結置換し、Epon812 と LowicrylK4M に包埋して前者を超微形態観察用、後者を免疫染色用とした。形態観察には Epon812 包埋超薄切片を用いて、酢酸ウラニルと鉛で二重染色して行なった。免疫染色は LowicrylK4M 包埋超薄切片を用いて免疫金法で行った。使用した抗体は基本的に光顕免疫染色と同様であるが、可視化にコロイド金標識のストレプトアビジンを用いた。

## 【結果】

### 光顕観察

H<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  ないし  $\beta$  subunit 抗体で壁細胞は強く染色された。分泌期では細胞内分泌細管表面に、分泌休止期では細胞内にびまん性に染色が観察された。分泌期壁細胞は、リン酸化エズリン抗体染色で胃底腺の峽部に近い上部 1/3 が強く染色され、非リン酸化エズリン抗体では染色されなかった。

分泌休止期壁細胞は、リン酸化エズリン抗体では弱く染色され、非リン酸化エズリン抗体では染色されなかった。

### 電顕観察

形態的には、分泌期では細胞内分泌細管は大きく拡がり、発達した微絨毛が観察された。小管小胞は狭い範囲にみられた。分泌休止期では細胞内分泌細管は狭まり、小管小胞は細胞頂部の広い範囲を占めた。

H<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase 抗  $\alpha$  ないし  $\beta$  subunit 抗体で染色すると、分泌期で細胞内分泌細管膜と小管小胞膜が強く染色された。分泌休止期では拡がった小管小胞膜が強く染色された。

リン酸化エズリン抗体とアクチン抗体染色では、分泌期で細胞内分泌細管膜と微絨毛膜が染色され、分泌休止期では弱く染色された。非リン酸化エズリン抗体染色では分泌期、分泌休止期にかかわらず膜の染色は殆ど見られなかった。

## 【考察】

分泌期の壁細胞でリン酸化エズリン抗体染色は胃底腺の上部 1/3 の壁細胞に強い陽性を示した。これは壁細胞の塩酸分泌高活性部位が胃底腺上部とする生理的・生化学的データとも一致するものであった。

プロトンポンプは、分泌期に細胞内分泌細管や微絨毛膜を含む膜表面で活性化されている。分泌休止期では細胞内分泌細管は小管小胞膜に変化して細胞質内に取り込まれる。そのため K<sup>+</sup>イオンの取込みが停止してプロトンポンプは休止、不活性となる。エズリン分子はリン酸化によりアクチンと結合し、脱リン酸化によりアクチンと解離して細胞内に散在する。つまり、胃酸の分泌期、非分泌期に応じた壁細胞の形態変化は、細胞膜-エズリン-アクチン系により起こされており、それはエズリン分子のリン酸化の有無に影響されている。

本研究の結果は、エズリン分子のリン酸化がプロトンポンプの細胞内分泌細管膜と小管小胞膜との間での相互移行に関連している事を形態学的、免疫組織化学的に提示でき、そのメカニズムの一端を明らかにし得たと考える。

(Acta Histochemica et Cytochemica 38 巻 5 号 2005 年掲載)

## 論文審査の要旨

報告番号	医論第1430号	氏名	若松大介
審査委員	主査	米澤 傑	
	副査	坪内博仁	中河志朗

### Immunohistochemical Detection of the Cytoskeletal Components in Gastric Parietal Cells

(胃底腺壁細胞における細胞骨格成分の免疫組織化学的研究)

胃底腺壁細胞は微細構造的特徴として細胞内分泌細管と小管小胞をもち、この二つの細胞小器官は胃酸分泌の状態によって大きく形態が変化する。また、胃酸分泌をつかさどる細胞膜上のプロトンポンプ: $H^+K^+$ -ATPase はこの形態変化に密接に関連している。細胞内分泌細管と小管小胞は相互に移行すると考えられている膜構造である。この相互移行による形態変化 (transformation) により壁細胞膜上に存在するプロトンポンプは細胞内分泌細管膜上で活性化し、一方、小管小胞膜上ではポンプ機能は休止状態となる。またアクチンがこの transformation を誘導しており、そのアクチンはエズリン蛋白の介在によって細胞膜に固定されて transformation 機構が働く事、さらに、エズリンのリン酸化ないし脱リン酸化が細胞膜への結合ないし解離として関係している事が明らかになってきた。しかし、これらの形態的データはまだ明らかとなっていない。胃底腺壁細胞の形態変化とプロトンポンプ機能との関係を超微構造的に把握し、形態変化およびエズリン蛋白の動態を光顕・電顕免疫組織化学的に検討し、以下の所見を得た。

1. 抗  $H^+K^+$ -ATPase 抗体染色により、小窩深部、腺体部の壁細胞が標識される。
2. 抗  $H^+K^+$ -ATPase 抗体染色により、酸分泌期では細胞内分泌細管膜が、休止期では小管小胞膜が標識される。
3. 抗リン酸化エズリン抗体は酸分泌期で染まり、特に腺上部 1/3 が強い。
4. 抗アクチン抗体は酸分泌期の細胞内分泌細管および小管小胞を染める。

結論：壁細胞の胃酸分泌に関わる transformation にはプロトンポンプの分布遷移、エズリンのリン酸化の有無、およびアクチンが関連している。

以上のごとく、本研究は胃酸分泌状態によって変化する胃底腺壁細胞の transformation とプロトンポンプ、アクチン、エズリンのリン酸化ないし脱リン酸化との関係を形態的に明らかにした。本研究結果は、胃酸分泌のメカニズムの一端を形態、免疫組織化学的観点から明らかにしており、その評価は高く、学位論文に相当する内容と判定された。

## 試験(学力確認)の結果の要旨

報告番号	医論第1430号	氏名	若松大介
審査委員	主査	米澤 傑	
	副査	坪内博仁	中河志朗
<p>主査及び副査の3名は、平成18年6月28日、学位申請者若松大介君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 非分泌期の非リン酸化エズリン染色で染まらないのはなぜか。 →細胞質内に分散していると考えられ膜直下に集積していない為、膜結合分子として検出され難いと思われる。</li> <li>2. 分泌期の非リン酸化エズリン染色は「染まらない」のではなく、細胞質全体が微慢性に染まっているのではないか。 →「染まらない」のではなく、非常に弱く染まるというのも一見解であると思われる。</li> <li>3. エズリンはリン酸化と非リン酸化では形を変化させているのでは。 →エズリン分子の三次構造(conformation)に変化が起こって抗原エピトープがマスクされているという可能性は否定は出来ないが、文献的な記載は見えていない。</li> <li>4. リン酸化エズリンが腺上 1/3 に染まるのはなぜか。壁細胞は深い部分(腺下 2/3)では胃酸分泌能が低下しているか。 →腺上 1/3 の壁細胞の胃酸分泌能が強い。リン酸化エズリンの存在が transformation の trigger になると考えられているので、腺上 1/3 の壁細胞の胃酸分泌能が強いことが示唆される。</li> <li>5. エズリン以外の ERM-family protein である moesin, radixin で実験を行ったか。 →行っていない。</li> <li>6. CD44 を染色したか。 →行っていない。</li> <li>7. CD44 を介して細胞内に影響しているものがあるか。 →CD44 の細胞外部分になんらかの関連するリガンドがあるかも知れないが、今回の実験では検討していない。</li> <li>8. アクチンを染めたのはなぜか。(他の細胞骨格を選ばなかった理由) →細胞骨格の主であること。また、胃底腺に存在するアクチンは、そのほとんどが壁細胞に存在するためでもある。</li> </ol>			

9. 非分泌期の絶食時間は 48 時間だけか。12 時間や 24 時間などを行って比べてみたらどうか。

→今回は行っていないが、先の実験で 24 時間でも絶食期像、典型的な休止期像はみられたので、より確実性を増す為に 48 時間絶食を行った。

10. Proton Pump 阻害剤を投与して実験したか。

→行っていない。

11. 高圧凍結を使った理由は

→標本の硝子様凍結の範囲は、通常の 1 気圧下の凍結方法では 10–15  $\mu\text{m}$  の深さしか得られないが、高圧凍結法ではその約 10 倍の深さまで可能となる。凍結固定・凍結置換を行う事は、凍結状態で脱水が行われている為に、構造保存、可溶性成分の保持に極めて優れ、化学的固定液で固定した標本に比べ最も生体に近い像が得られる。

12. 胃酸分泌のきっかけは何か

→胃相、腸相、脳相があり、胃への直接的刺激だけではない。

13. 胃酸の水素イオンはどこからくるのか。

→ $\text{H}_2\text{O}$  と血液中の  $\text{CO}_2$  から、 $\text{H}$  イオンと  $\text{HCO}_3$  イオンが産生される。

以上の結果から、3 名の審査委員は、本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。