



Title	Deficiency of Claudin-18 Causes Paracellular H ⁺ Leakage, Up-regulation of Interleukin-1 β , and Atrophic Gastritis in Mice
Author(s)	林, 大祐
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58987
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【65】			
氏 名	はやし だい すけ	林 大 祐	
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)		
学 位 記 番 号	第 2 5 1 1 1 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻		
学 位 論 文 名	Deficiency of Claudin-18 Causes Paracellular H ⁺ Leakage, Up-regulation of Interleukin-1 β , and Atrophic Gastritis in Mice (クローディン 18 欠損マウスはプロトン透過性の亢進により IL-1 β の上昇と萎縮性胃炎を惹起する)		
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 月田早智子 (副査) 教 授 竹原 徹郎 教 授 森 正樹		

論 文 内 容 の 要 旨

【 目 的 】
正常胃粘膜は恒常的に酸や消化酵素に暴露されている。そのため、粘液による保護や重炭酸による酸の中和、恒常的な細胞の再生など、さまざまな粘膜保護機構が働いているが、上皮細胞のバリアーとしてのタイトジャンクション(TJ)による保護機構の重要性については指摘あるものの、十分な解析がない。
今回われわれは、生体の胃におけるタイトジャンクションの機能と重要性を検討する目的で、胃に最も多く発現する胃型Claudin-18のノックアウトマウス(以下Cl1dn18^{-/-}マウス)を作製、解析した。
【 方法ならびに成績 】
Cl1dn-18は2つのスプライシング型をもちそれぞれ胃と肺に特異的に発現している。今回、胃型のスプライシング型のみを欠失するマウスを作製し、生体の胃上皮組織におけるCl1dn/TJの機能およびその重要性について解析した。Cl1dn18^{-/-}マウスは、野生型マウスと同様の外観と成長を示した。初めに、生後7週令マウスの胃を解析すると、HE染色において壁細胞の減少および粘膜下への好中球を主体とした炎症細胞浸潤を認めた。病理組織学的には幽門腺化生様の所見と考えられ、野生型マウスの胃では壁細胞が占拠する胃底腺体部領域の一部にTFF2とIFが共染色されるSPERM細胞の出現が確認され、幽門腺化生との整合性が確認された。次に、胃炎の特性を調べる目的で炎症性サイトカインの発現を定量的RT-PCR法を用いて調べると、TNF α 、IL-1 β 、KCなどの発現増加を認めた。一方、IL-2、-6などの上昇は認められなかった。少なくとも、検討した20週令までのマウスにおいては、HE染色および蛍光染色法、胃組織を用いたFACSいずれにおいても、通常の慢性炎症で認められるリンパ球の浸潤はほとんど認められず、好中球優位の炎症細胞浸潤が確認された。
次に、こうした変化の発生時期と原因を検討する目的で、胃が未成熟で胃酸の分泌もほとんどない出生2日目から、日令を追った検討を行った。すると、生後2日目までは明らかな差は認められないものの、Cl1dn18^{-/-}マウスの生後4日目では、H⁺K⁺-ATPaseに対する蛍光染色やHE染色により壁細胞の減少が認められ、この傾向は、日を追って顕著になった。生後3日目は、胃酸分泌による胃内容物のpH低下が開始する時期に相当する。また、胃組織のmRNAを用いた定量的RT-PCR法により、IL-1 β の発現も時期を同じく上昇が認められた。これらの結果は、胃型cl1dn18が欠失したことで、TJの性質が変化し、壁細胞から胃内へ分泌されたプロトンが粘膜下へ透過するために生じることを示唆するものと考えられた。
そこで、TJの特性変化を検討する目的で、微細形態の検討を行った。超薄切片電顕像では、Cl1dn18^{-/-}マウスにおいてTJはやや幅が狭い印象だがしっかりと形成が認められた。一方、Cl1dn18^{-/-}マウスにお

けるフリーズフラクチャー法では、野生型マウスでは上皮細胞間の最も頂端部に認められた緻密なストランドが消失しており、この緻密なストランドが胃型cln18由来である可能性とTJの性質変化の原因の少なくとも1部を担うと考えられた。

次に、ウッシングチャンバーを用いて胃上皮組織TJの生理学的な検討を行った。すると、イオン透過性試験では、新生仔、成長マウスともにCldn18-/-マウスにおいてイオンの通りやすさの指標であるConductanceとNa⁺透過性の亢進が認められた。また、壁細胞が未成熟である生後2日目の新生マウスに経口的に弱塩酸を投与しアピカル側(胃内腔側)のpHを人為的に低下させたところ、野生型では認められなかったIL-1 β やCOX-2のmRNAの発現亢進が認められた。一方、Cldn18-/-マウスにおいてもBiotin(443Da)や4kD FITC-Dextranの透過性の亢進は認めなかった。なお、Cldn18-/-マウスでは、胃における肺型Cldn18の発現が代償的に上昇していたが、胃型claudin-18の欠失を機能的に補うことはできなかった。

以上の結果は、胃型Cldn18の欠失によりTJを介するプロトンの透過性が亢進し、幽門腺化生をとまう胃炎を惹起する可能性を示す。ヒトの胃炎サンプルにおける検証でも、胃炎の進行にともなった胃型Claudin-18の発現低下が認められたことから、胃型Cldn18による胃酸に対するバリアーの重要性は一般性を有すると考えられた。

〔 総 括 〕

マウスの胃に多く発現する胃型Cldn18の消失により酸の透過性の上昇とそれにとまう幽門腺化生性の胃炎を生じた。今回の結果は胃酸防御機構におけるTJバリアーの重要性を実験的に明確に示した初めての報告である。さらに、ヒトの胃炎でもCldn18の発現量の低下を認めることから、ヒトの胃炎発症や進展における機序としても重要であることが示唆された。

胃酸に対するTJバリアーの重要性とその破綻により生じる病態を初めて明確に示した意義は、胃炎および慢性炎症を下地とする胃癌の治療戦略を考える上でも大きいものと考ええる。

論文審査の結果の要旨

上皮細胞のタイトジャンクション(TJ)は細胞間接着を形成することにより生体防御に重要な役割を演じる。またクローディン(Cldn)はTJの構成膜貫通蛋白質でありTJの形態と機能の維持に必須な蛋白質と考えられている。

胃におけるTJ機能の重要性を検討するため胃型Cldn18(2型スプライシング型)のノックアウトマウス(Cldn18-/-マウス)を作製解析したところ、まず乳児期において胃内pHの低下に引き続いて壁細胞が減少した。生後7週には幽門腺化生を認め、フリーズフラクチャー法ではTJストランドの構造上の変化を認めた。生理学的実験ではCldn18-/-マウスにおいてプロトンの透過性の上昇を認め胃酸に対するバリアー破綻が、胃炎発症の原因と考えられた。

胃酸に対するTJバリアーの重要性とその破綻により生じる病態を初めて明確に明らかにした意義は胃炎を下地にした胃癌の治療戦略を考える上でも大きいと考えられ学位に値すると考える。