

|           |  |
|-----------|--|
| 氏 名(本 籍)  | 和 栗 聡 (新潟県)  |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (医 学)  |
| 学 位 記 番 号 | 博 甲 第 1012 号   |
| 学位授与年月日   | 平成 4 年 3 月 25 日  |
| 学位授与の要件   | 学位規則第 5 条第 1 項該当   |
| 審 査 研 究 科 | 医 学 研 究 科  |
| 学位論文題目    | FUNCTIONAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL ASPECTS OF<br>RAT HEPATOCYTES<br>(ラット肝細胞の機能動態と免疫細胞化学) (Dissertation形式) |
| 主 査       | 筑波大学教授 医学博士 大 菅 俊 明  |
| 副 査       | 筑波大学教授 医学博士 小 泉 準 三  |
| 副 査       | 筑波大学教授 医学博士 村 上 正 孝  |
| 副 査       | 筑波大学助教授 理学博士 入 江 勇 治   |
| 副 査       | エーザイ(株)筑波研究所理事<br>薬学博士 橘 眞 郎   |

## 論 文 の 要 旨

### 〈目 的〉

肝細胞のグリコーゲン及び各細胞内小器官の量には明瞭な日周リズムが存在する。このことは、肝細胞における蛋白質の合成、分泌及び分解能にもリズムの存在することを示唆している。本研究では、このような肝細胞の動的機能を、血圧調節に関与するアンギオテンシノーゲンを分泌蛋白質の合成の指標として、またリゾーム酵素として知られるカテプシンB, H, Lを蛋白分解の指標として解析した。

第 1 章では、肝細胞におけるアンギオテンシノーゲンの分泌調整にカテプシンB, H, Lがどのように関連するのかを検索する目的で、コルヒチンを投与し、分泌を抑制した状態で、これら蛋白質の肝細胞内局在を免疫細胞化学的手法を用いて調べた。第 2 章では、肝細胞における蛋白合成及び分解活動の日周リズムを検索するために、アンギオテンシノーゲン及びカテプシンB, Hの細胞内動態を中心静脈領域と門脈領域において免疫組織学的に検索した。

### 〈対象及び方法〉

Bouhnikらの方法に基づき、アンギオテンシノーゲンを精製し、これに対するポリクローナル抗体を作製し、アフィニティークロマトグラフィにより精製した。

対照及びコルヒチンを投与したウィスター系成熟雄ラットより肝組織を採取し、肝組織中にお

けるアンギオテンシノーゲン濃度をラジオイムノアッセイ (RIA) により測定し、免疫細胞化学的手法にて、アンギオテンシノーゲン及びカテプシンB, H, Lの細胞内局在を検索した。

また、アンギオテンシノーゲンとカテプシンB, H, Lの日周リズムを調べるために、24時間を6時点に分け、それぞれの時点のラット肝組織中の門脈領域及び中心静脈領域において、アンギオテンシノーゲンとカテプシンB, Hの免疫反応性を画像解析により定量化し、肝組織中の同酵素の活性を測定した。

#### 〈結果及び考察〉

##### 1) ラット肝細胞におけるアンギオテンシノーゲン及びカテプシンB, H, Lの局在

RIAの結果、コルヒチン投与群の肝組織中アンギオテンシノーゲン濃度は、対照群に比し、顕著な増加が見られた。光顕的に見ると、アンギオテンシノーゲンの免疫反応性は、対照では核周囲の細胞質にびまん性に弱く染まるが、コルヒチン投与群では細胞質全体に粗大顆粒状に強く染まること分かった。カテプシンB, H, Lは対照群では毛細胆管周囲に小顆粒状に局在していた。しかし、コルヒチン投与群では、細胞質全体に粗大顆粒状に分布し、アンギオテンシノーゲンの局在と類似していた。電顕レベルの金コロイド法で観察した結果、コルヒチン投与群では、アンギオテンシノーゲンは小胞、空胞、及びリソゾーム様構造物に認められた。カテプシンB, H, Lとの金コロイド二重染色法を試みた結果、毛細胆管周囲のリソゾーム様構造において、これらプロテアーゼとの共存が認められた。

以上の結果、コルヒチン投与により肝細胞からアンギオテンシノーゲンの分泌を抑制すると、細胞内に過剰に存在する同蛋白はリソゾームに取り込まれ、分解されるものと思われた。即ち、リソゾームのシステインプロテアーゼは細胞内で合成された過剰な蛋白を分解し、その量的調節に関与する可能性が示唆された。

##### 2) 日周リズムからみた、ラット肝アンギオテンシノーゲン及びカテプシンB, H, Lの局在

アンギオテンシノーゲンの免疫反応性は、明期（ラットの休息期）の初めに強く、暗期（ラットの活動期）の初めに弱かった。この変化は血中アンギオテンシノーゲン濃度及び粗面小胞体量の日周リズムにほぼ一致した。また、どの時点でも肝小葉内では、中心静脈領域より門脈領域の肝細胞に強い局在を示した。カテプシンB, Hの免疫反応性は、両者とも肝細胞の毛細胆管周囲に顆粒状に局在し、明期の終わりに強く、暗期の終わりから明期の初めにかけて弱かった。さらに、各時点における肝組織中のカテプシンB, Hの酵素活性を測定したところ、免疫反応性の変化とほぼ一致した結果が得られた。肝小葉内では門脈領域より中心静脈領域に強く局在した。

以上より、肝細胞における蛋白質の合成、分解には明瞭な日周リズムが存在し、アンギオテンシノーゲンに代表される分泌蛋白の合成は明期の初めに盛んであり、一方、リソゾーム酵素による代謝産物の分解は明期の終わりに盛んであることが示唆された。また肝小葉内での局在の差より、門脈領域は分泌蛋白合成に、中心静脈領域は蛋白の分解に深く関わっていることが示唆された。

## 審 査 の 要 旨

肝細胞における蛋白質の合成、及び分解能について、これらに明瞭な日周リズムのあること、また肝小葉内において機能分担の存在することを明かにした本論文は、今後の肝細胞の研究に貴重な知見をもたらすと考えられる。さらにアンギオテンシノーゲンの分泌調節に関して蛋白分解酵素であるカテプシンB, H, Lと関連して観察した点もユニークである。抗体など、材料の準備から実験計画の立て方、そして結果の評価まで自ら行うことができ、審査会における質疑に対しても的確な解答が得られたことから、申請者は研究者としての資質を充分備えているものと評価した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。