学 位 論 文 題 名

ウシ肝細胞の初代培養法の確立と

それを用いたハプトグロビンと

C-反応性タンパク質の合成調節機構の解析

学位論文内容の要旨

急性相タンパク質は、生体に感染症や炎症がおこると血中レベルが急激に増加する一群のタンパク質の総称である。その血中レベルの変動については、従来、単胃動物で主に調べられてきたが、種による大きな違いは認められない。しかし、反芻動物の急性相タンパク質の血中レベルの変動については、単胃動物とは異なる例がいくつか報告されており、反芻動物の肝臓での急性相タンパク質の合成および分泌には、他の動物とは異なる特有の機構が存在することを示唆している。本研究では、ウシの急性相タンパク質の肝臓での合成調節機構を明らかにすることを目的とし、1) その実験系として極めて有効であるウシ肝細胞の分離と培養法を確立するとともに培養細胞の生化学的性状を明らかにし、2) 1) で確立した系を用いて、特に単胃動物とは異なりウシ特有の血中レベルの変動が認められる、ハプトグロビン (Hp) (炎症時に急激に増加する) とC-反応性タンパク質 (CRP) (泌乳量に応じて増加する) の合成調節について解析し、以下の知見を得た。

1) ウシ肝細胞を分離、培養し、代謝特性を調べた。肝細胞は、ウシ肝臓の尾状葉に0.25 mMエチレングリコールビス (2-アミノエチルエーテル) 四酢酸と0.05%コラゲナーゼを灌流して分離した。細胞の生存率は70-93%で、収量は $0.1-3.6 \times 10^7$ 個/g 肝臓だった。

分離肝細胞をウィリアムスE培地で培養したところ、3時間後に伸展が始まり、24時間後には単層を形成し、この単層は6日間維持された。肝特異的な代謝機能の一つであるアルブミンの合成および分泌について、細胞を [³⁵S]-メチオニン存在下で培養しその上清を免疫沈降して分析したところ、合成および分泌は分離直後の肝細胞では低かったが培養1-3日後には増加し6日後には再び減少した。一方、アルブミンのmRNAレベルは、分離直後から培養後3日目まで同程度に維持されていた。したがって、分離直後の細胞では翻訳以降の機能が低下しており、培養することによりその機能が回復したことが示された。さらに、エピネフリンによって活性化されるグリコーゲン分解を、培養上清中に放出されるグルコース量で調べたところ、アルブミンの合成および分泌と同様に、分離直後に比べて培養1-3日後に増加したが6日後には減少した。このように、分離した肝細胞を培養すると、肝特異的な機能であるアルブミンの合成能とグリコーゲン分解能が、数日間保持されており、この実験系はウシの肝機能を細胞、分子レベルで研究するのに有用と考えられる。

2) 反芻動物の肝臓での急性相タンパク質の合成調節について、他の動物とは異なる特有の機構を解明するため、ウシ初代培養肝細胞を用いてHpとCRPの合成について、インターロイキン (IL) -1 β 、IL-6、腫瘍壊死因子 (TNF) - α 、グルココルチコイド、およびプロラクチン (PRL) の効果を調べた。肝細胞を各因子で刺激後、タンパク質の合成および分泌量とmRNAレベルを免疫沈降法とノーザンプロット法でそれぞれ分析した。Hpの合成および分泌はIL-6とTNF- α により増加したが、IL-1 β では効果はなかった。これらはmRNAレベルの変化と平行なので、主に翻訳前調節の効果と考えられる。また、デキサメサゾン¹はウシHpの合成および分泌に対するサイトカインの作用を増強させなかった。CRPのmRNAレベルもIL-6とTNF- α により増加したが、IL-1 β では変化せず、Hpの合成調節と同様の結果が得られた。これらの結果は、他の動物種の急性相タンパク質合成において、TNF- α とIL-1 β は共通した伝達

経路により作用するという報告とは一致しない。さらに、従来、急性相タンパク質合成調節については報告がなかったPRLによっても、HpとCRPの合成が誘導された。したがって、これらの結果は、ウシHpおよびCRPの遺伝子の転写調節にはウシ特有の情報伝達経路が存在することを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之
副 査 教 授 藤 田 正 一
副 査 教 授 藤 永 徹
副 査 教 授 首 藤 文 栄 (岩手大学農学部)

学位論文題名

ウシ肝細胞の初代培養法の確立と それを用いたハプトグロビンと C-反応性タンパク質の合成調節機構の解析

急性相タンパク質は、感染や炎症に伴って血中レベルが急激に増加する一群のタンパク質の総称である。本研究では、ウシの急性相タンパク質の肝臓での合成調節機構を明らかにすることを目的とし、1) ウシ肝細胞の分離と初代培養法を確立し、2) これを用いて、ウシ特有の血中動態がみられるハプトグロビン (Hp, 炎症時に急激に増加する) とC-反応性タンパク質 (CRP, 泌乳量に応じて増加する) の合成調節について解析し、以下の知見を得た。

1) ウシ肝臓の尾状葉にエチレンジグリコールビス (2-アミノエチルエーテル) 四酢酸とコラゲナーゼを灌流して肝細胞を分離し、ウィリアムスE培地で培養したところ、3時間後に伸展が始まり、24時間後には単層を形成し、この単層は6日間維持された。肝特異的な代謝機能の一つであるアルブミンの合成および分泌について、細胞を [³⁵S]-メチオニン存在下で培養し、その上清を免疫沈降して分析したところ、分離直後の肝細胞では低かったが培養1-3日後には増加し6日後には再び減少した。一方、アルブミンの mRNA レベルは、分離直後から培養後3日目まで同程度に維持されていた。

したがって、分離直後の細胞では翻訳以降の機能が低下しており、培養することによりその機能が回復したことが示された。さらに、エピネフリンによって活性化されるグリコーゲン分解反応を調べたところ、アルブミンの合成および分泌と同様に、培養1-3日後に増加したが6日後には減少した。このように、分離した肝細胞を培養すると、肝特異的な機能が、数日間保持されており、この実験系がウシの肝機能の細胞、分子レベルでの研究に有用であることが明らかとなった。

2) ウシ初代培養肝細胞を用いて、HpとCRPの合成に対するインターロイキン (IL) -1β 、IL-6、腫瘍壊死因子 (TNF) $-\alpha$ 、グルココルチコイド、およびプロラクチン (PRL) の効果について、各々のタンパク質の合成および分泌量とmRNAレベルの測定により分析した。Hpの合成および分泌はIL-6とTNF- α により増加したが、IL- 1β では効果はなかった。これらはmRNAレベルの変化と平行なので、主に翻訳前調節の効果と考えられた。また、これらのサイトカインの作用に対してデキサメサゾンに影響を与えなかった。CRPのmRNAレベルもIL-6とTNF- α により増加したが、IL- 1β では変化しなかった。これらの成績は、他の動物種の急性相タンパク質合成においてTNF- α とIL- 1β は共通した伝達経路により作用するという報告とは一致しない。さらに、従来、知見がなかったPRLによっても、HpとCRPの合成が誘導された。これら全ての結果は、ウシHpおよびCRPの遺伝子の転写調節にはウシ特有の情報伝達経路が存在することを示唆している。

以上のように本論文は、ウシ肝細胞の初代培養法を用いて、急性相タンパク質の新しい合成調節様式を明らかにしており、ウシ特有の生体防御機構の解明に寄与するものである。よって審査員一同は、中川紀子氏が博士(獣医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。