

Identification of the Bile Canalicular Cell Surface Antigen HAM.4 as Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) and Altered Regulation of DPP-IV during Hepatic Regeneration after Partial Hepatectomy in the Rat

メタデータ	言語: en 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 次木, 稔 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1037

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 184号	学位授与年月日	平成 7年 3月27日
氏 名	次 木 稔		
論文題目	Identification of the Bile Canalicular Cell Surface Antigen HAM.4 as Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) and Altered Regulation of DPP-IV during Hepatic Regeneration after Partial Hepatectomy in the Rat (毛細胆管側肝細胞膜抗原 HAM.4 のジペプチジルペプチダーゼIVとしての同定およびラット肝再生過程におけるジペプチジルペプチダーゼIVの変化)		

博士(医学) 次 木 稔

論文題目

Identification of the Bile Canalicular Cell Surface Antigen HAM. 4 as Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) and Altered Regulation of DPP-IV during Hepatic Regeneration after Partial Hepatectomy in the Rat

(毛細胆管側肝細胞膜抗原 HAM. 4 のジペプチジルペプチダーゼ IV としての同定およびラット肝再生過程における ジペプチジルペプチダーゼ IV の変化)

論文の内容の要旨

【目的】

ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-IV) は肝細胞膜の毛細胆管面に存在する糖蛋白である。近年、DPP-IV はサイトカインやホルモンを分解することにより細胞の成長や分化を調節する酵素の一つである可能性が示唆され、肝細胞の成長や分化に関与している可能性が考えられた。1985年、玉腰らはラット肝細胞膜に対する単クローン抗体 (HAM. 4 抗体) を作製し、我々は、その認識する抗原 (HAM. 4 抗原) が DPP-IV と類似していることを報告してきた。今回、この HAM. 4 抗原が DPP-IV であることを証明するとともに、肝細胞の成長や分化における DPP-IV の役割を明らかにするため、肝再生過程における血中および肝組織中 DPP-IV の蛋白量と酵素活性の変化を検討した。

【方法】

HAM. 4 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにてラット肝組織より HAM. 4 抗原を精製し、気相シーケンサーを用いてエドマン法により N 末端のアミノ酸配列を決定した。また、Sprague-Dawley 雄生ラットに70%肝部分切除を行い、sham 手術群を対照群とし経時的に採血と肝切片の採取を行った。血清中および肝組織中の DPP-IV 蛋白量は、HAM. 4 抗体による細胞性ラジオイムノアッセイを用いて測定し、DPP-IV 活性はグリシルプロリル-p-ニトロアニリドを基質として測定した。さらに、蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサマイドを投与し血清中、組織中 DPP-IV の変化も検討した。また、DPP-IV と同様に毛細胆管面に存在するアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性についても同様な検討を加えた。肝組織における DPP-IV の局在は、HAM. 4 抗体を用いた間接酵素抗体法にて検討した。また、血清中 DPP-IV の N 末端アミノ酸配列も上記と同様の方法にて決定した。

【結果】

肝組織より精製された HAM. 4 抗原の部分アミノ酸配列 (11残基) は DPP-IV のアミノ酸配列と一致した。肝切除後、血清中 DPP-IV 蛋白量とその酵素活性は24時間で有意に増加し、72時間で最高値に達し以後漸減した。一方、肝組織中の DPP-IV 蛋白量および酵素活性の変化は認められなかった。血清 ALP 活性および肝組織中 ALP 活性は肝切除後増加し、それぞれ24時間、48時間で最高値に達した。肝切除後72時間では対照群に比べ DPP-IV 蛋白の肝組織上の局在や染色性に変化は認められなかった。サイクロヘキサマイド投与により肝切除後24時間における血清中 DPP-IV 活性および蛋白量の増加は抑制されず、肝組織中の DPP-IV 活性および蛋白量にも変化を与えなかった。一方、肝切除後の血清および肝組織中 ALP 活性の増加は、サイクロヘキサマイド投与により抑制された。血清中 DPP-IV の N 末端アミノ酸配列は、膜結合型 DPP-IV のアミノ酸配列の N 末端37番目 (セリン) より開始していた。

【考察ならびに結語】

肝組織より精製された HAM. 4 抗原は DPP-IV 蛋白と同定された。DPP-IV は肝再生時に血清中の酵素活性および蛋白量の増加を示したが、肝組織中の酵素活性および蛋白量には変化を認めず、蛋白合成阻害剤の投与でも血清中の増加は抑制されなかった。一方、肝再生時に *de novo synthesis* が知られている ALP においては、蛋白合成阻害剤の投与により血清中および肝組織中の酵素活性の増加が抑制された。また、血清中に存在する DPP-IV は、その N 末端のアミノ酸配列から、膜結合型 DPP-IV の細胞外領域の一部であることが示された。このことから肝再生過程における血清中 DPP-IV の増加は蛋白合成を介さない機序によるものと思われ、血清中に増加する DPP-IV は、その N 末端のアミノ酸配列から、膜結合型 DPP-IV が蛋白分解を受け、細胞表面より遊離したものと推察された。

論文審査の結果の要旨

肝細胞癌や転移性肝癌などの治療として、しばしば行われる肝部分切除後に起こる肝再生の機序については不明な点が多い。申請者は肝細胞の成長や分化を調節する酵素の一つと考えられている肝細胞膜の毛細胆管面に存在する dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) に注目し、ラット肝再生モデルを用いて肝再生過程における血中、および肝組織中の同酵素活性の変化を、生化学的ならびに免疫組織化学的に検討した。

審査の結果、評価された点は次のとおりである。

(1)用いた材料および方法は、本研究目的を追求する上でほぼ適切であると評価された。まず、ラット肝細胞膜の毛細胆管面の抗原を選択的に認識する単クローン抗体 (HAM. 4) を用い、その対応抗原を解析した結果、DPP-IV と同一であることを明らかにし、ついで、HAM. 4 を用い細胞性ラジオイムノアッセイによって DPP-IV 蛋白量の定量を行い、その酵素活性は Nagatsu 法で、その組織局在は間接型酵素抗体法によってそれぞれ検討している。また、HAM-4 抗原、および血清中 DPP-IV の N 末端アミノ酸配列は気相シーケンサーを用いたエドマン法によって決定した。これらはいずれも精度、および再現性において問題がないと判定された。

(2)Sprague-Dawley 雄ラットを用い 70% 肝部分切除を行うと、血清中 DPP-IV 蛋白量と酵素活性は 72 時間後にピークとなり以後減少したが、肝組織内の DPP-IV には変化が認められなかった。また、DPP-IV 蛋白の肝組織上の局在や染色性にも変化は認められなかった。さらに、サイクロヘキサマイド投与により蛋白合成阻害を行っても、肝切除後の血清中 DPP-IV の増加は抑制されず、肝組織中の同酵素にも変化はみられなかった。

酵素対照として、肝細胞で *de novo* 合成されているアルカリ性フォスファターゼ活性についても同様に解析した。肝切除後血清中、および肝組織中アルカリ性フォスファターゼ活性は増加し、サイクロヘキサマイド投与により抑制された。これらの所見から、申請者は、肝再生に伴い DPP-IV は肝組織内での蛋白合成を介さない機序で血清中に増加すると推測している。

(3)また、血清中と肝組織中の DPP-IV の N 末端アミノ酸配列の解析結果から、血清中 DPP-IV は膜結合型 DPP-IV の細胞外領域の一部であることを見出し、肝再生過程において、肝細胞膜上の膜結合型 DPP-IV が蛋白分解を受けて遊離型となり、血清中へ放出されると推測している。

(2)、および(3)の所見と見解は、肝再生において惹起される DPP-IV の特異な動態の変化を把握した点と、肝細胞の再生に DPP-IV が調節作用を発揮する可能性を示唆する点において、今後の研究の発展

が期待されるとして評価された。しかし、腎、その他の組織における DPP-IV の動態とも合わせて解析する必要性があり、その他残された問題点については、今後の研究が期待された。

なお、審査の過程において、申請者に対し次のような質疑がなされた。

- 1) N 末端アミノ酸配列の解析法の精度と再現性について
- 2) 再生肝における細胞増殖と蛋白合成との関連性について
- 3) DPP-IV の生体内における生理学的活性と turnover について
- 4) 肝からの DPP-IV 放出を直接的に証明する根拠は
- 5) 腎近位尿細管の刷子縁から DPP-IV が遊離する可能性
- 6) 活性化 T 細胞や B 細胞からの DPP-IV 分泌の可能性
- 7) 肝細胞の毛細胆管面に分布する酵素について
- 8) 胆道系疾患時における DPP-IV の変化について

以上の質問に対する申請者の解答はおおむね適切であり、問題点も充分把握しており、本論文は博士（医学）の学位を授与するに値する内容をもつことを審査委員全員が一致して判定した。

論文審査担当者 主査 教授 山 下 昭

副査 教授 大 野 龍 三 副査 教授 金 子 榮 藏

副査 助教授 上 里 忠 良 副査 助教授 中 村 達