



Inhibition effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on mouse-liver lysosomal vacuolar H⁺ -ATPase

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 王, 滔 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1225

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 372号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏 名	王 滔		
論文題目	Inhibition effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on mouse-liver lysosomal vacuolar H ⁺ -ATPase (Di(2-ethylhexyl)phthalate によるマウス肝細胞内 vacuolar H ⁺ - ATPase に与える抑制効果)		

博士(医学) 王 滔

論文題目

Inhibition effectes of di(2-ethylhexyl)phthalate on mouse-liver lysosomal vacuolar H⁺-ATPase
(Di(2-ethylhexyl)phthalate によるマウス肝細胞内 vacuolar H⁺-ATPase に与える抑制効果)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

DEHP は環境ホルモンの一つであり、またペルオキシソーム増生剤として知られている。齧歯類動物に投与すると肝細胞内のペルオキシソームが顕著に増加し、投与を中止すると正常に戻る。この増殖にはペルオキシソーム増殖活性化受容体(PPAR-Alpha)が介在することが証明され、さらに DEHP の影響によりペルオキシソームだけではなくミトコンドリア、マイクロソームなどの細胞内小器官も増殖することが知られている。長期に投与すると実験動物の肝重量増加、肝脂肪変性、さらに肝腫瘍を発生させたという報告もある。過剰増殖したペルオキシソームなどの細胞内小器官は、オートファゴソームシステムによって分解されていることが以前に示されている。このオートファゴソームの消化機能に重要な役割を果たしている酵素が V-ATPase である。膜に存在する V-ATPase の働きによってライソソーム内の酸性化が維持されている。この酸性環境は消化酵素の活性に必須の条件である。V-ATPase が阻害されると、後期オートファゴソーム内での消化酵素が十分作用できないため、ミトコンドリアなどを分解することが部分的に抑制される。その結果、細胞内小器官の増加が起こる。このことが細胞内小器官増加及び肝重量増加の原因の一つと考えられている。しかし、DEHP 投与により引き起こされる細胞内小器官の増加がどのようなメカニズムによっているかは明らかにはなっていない。

本研究では DEHP 処理による V-ATPase に対する効果を検討し、DEHP による細胞内小器官蓄積の機構を明らかにした。

〔材料ならびに方法〕

1. C3H 雄性マウスに DEHP 2 % 添加飼料を与え、0、1、2、3 週間投与、及び 3 週間投与 1 週休止、のマウスから肝臓を摘出した。
2. V-ATPase 蛋白質の挙動を解析するために V-ATPase サブユニット A に対する特異抗体を作製した。V-ATPase サブユニット A のアミノ酸配列 367-382 番目の 16 残基からなるオリゴペプチドを合成し、これを KLH と結合させた後、アジュバントと混ぜて兎に免疫して抗血清を得た。抗原ペプチドカラムを用いてサブユニット A 特異抗体を精製した。この抗体を用いて免疫電顕を行ったところ、主にライソソーム膜(細胞質側)に金粒子が観察され、抗体が正しい抗原を認識していることを確認した。
3. 上記の抗体を用いて、DEHP を投与した後の肝細胞 V-ATPase サブユニット A 蛋白質量の変化を Western Blot と Immunostaining にて解析した。
4. 正常マウスの肝臓の Total RNA を抽出して RT-PCR を行った。PCR 産物から得たサブユニット A cDNA プローブを用いて DEHP 処理したマウス肝臓 RNA の Northern Blot 解析を行った。
5. DEHP 投与によりマウス肝細胞のオートファゴソーム内の消化酵素が影響を受けるかどうかを調べるために、Acid Phosphatase の酵素組織化学的染色や電子顕微鏡による細胞内小器官の形態の観察を行っ

た。

〔結果〕

1. DEHP を投与した後のマウス肝 V-ATPase サブユニット A 蛋白量は 1 週目から 2 週目と減少していき、3 週目ではほとんど消失してしまった。そして DEHP 投与を中止すると、1 週間で正常レベルに回復することが明らかになった。
2. 同様に処理したマウス肝臓から RNA を調製して Northern Blot 解析を行った結果、DEHP 処理により V-ATPase サブユニット A mRNA も減少し、DEHP 投与の中止により正常に回復した。
3. DEHP 投与によりライソソーム内の消化酵素及びオートファゴソームへの融合には影響を与えないことが明らかになった。
4. DEHP 投与後に、初期オートファゴソームの数は変化しなかったが、後期オートファゴソームの数は増加した。そして、DEHP 投与中止によりもとの数まで戻った。

〔考察〕

以上の研究結果により、DEHP がマウス肝細胞 V-ATPase に次のような影響を与える事が示された。つまり、DEHP により肝細胞 V-ATPase サブユニット A の mRNA が減少し、同蛋白が減少する。ATP 結合 domain と触媒 domain であるサブユニット A 蛋白の減少はプロトンポンプ機能に影響する。そしてライソソーム内の酸性環境を維持できなくなる。その結果、後期 autophagosome 内の消化酵素が十分作用できなくなるために、細胞内小器官の分解が部分的に抑えられ、細胞内小器官の増加及び肝重量の増加が起こる。DEHP 投与による細胞内小器官増加のメカニズムはこれだけがすべてではないかもしれない、少なくとも重要なメカニズムの一つであると考えられる。

〔結論〕

1. DEHP 投与により、齧歯類動物の肝細胞 V-ATPase サブユニット A 蛋白量が著しく減少した。投与を中止すると再び正常レベルに回復した。
2. サブユニット A mRNA の変動が蛋白レベルと平行に変化することから、DEHP の効果は転写レベルで作用していることが示唆された。
3. DEHP 投与により、初期オートファゴソームの数は変化しなかったが、後期オートファゴソームの数の増加が見られた。そして、DEHP 投与中止によりもとの数まで戻った。

論文審査の結果の要旨

環境ホルモンである di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) は齧歯類に投与すると、ペルオキシソームをはじめ、ミトコンドリア、マイクロソームなどの細胞内小器官を増殖することが報告されている。一方で過剰増殖した細胞内小器官はオートファゴソームシステムによって分解される。オートファゴソームでは Vacuolar-ATPase (V-ATPase) がライソソーム内の酸性を維持しており、消化酵素の活性に必須である。申請者はこの点に着目し、DEHP の細胞内小器官増殖作用のメカニズムにアプローチした。V-ATPase 特異的抗体を作製し、それを用いて DEHP 投与ラットの肝細胞における V-ATPase の発現量の変動を解析した。さらにその細胞内の小器官を免疫電顕により観察した。これらの一連の解析により以下の結果を得

ている。

- 1) V-ATPase サブユニット A に対する特異抗体の作製に成功した。
- 2) ウェスタンブロット解析により、DEHP 投与によりラット肝における V-ATPase サブユニット A タンパク質の量は投与 1 から 2 週で経時的に減少し、3 週目で消失することを見いだした。
- 3) ノーザン解析により V-ATPase の減少は転写レベルの減少によることが示唆された。
- 4) 2) および 3) で観察された V-ATPase の減少は DEHP 投与の中止により 1 週間で回復した。
- 5) DEHP 投与により初期オートファゴソームの量は変化しないのに対し、後期オートファゴソームの量が減少した。

以上の結果より DEHP の細胞内小器官増生の作用機序は V-ATPase の発現の転写レベルでの抑制にあることが推察された。V-ATPase の減少によりライソソーム内の酸性が維持できなくなり、細胞内小器官の分解が抑制され、細胞内小器官の増加をもたらすと考えられた。

このように申請者は環境ホルモンである DEHP の作用機構を明らかにし、審査委員会ではこの研究成果を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑応答を行った。

- 1) この研究の医学的意義は
- 2) 本研究で用いた DEHP の投与量は環境ホルモンとして適正か
- 3) V-ATPase のウェスタン解析とノーザン解析の定量性について
- 4) DEHP による V-ATPase の減少がこの実験で転写レベルでの作用といえるか
- 5) DEHP による V-ATPase の減少は PPAR を介するものか
- 6) DEHP による V-ATPase の減少の臓器特異性は
- 7) V-ATPase 遺伝子の上流に存在する既知の転写因子結合部位について
- 8) V-ATPase 発現の組織特異性は
- 9) DEHP の生殖機能への影響は
- 10) オートファゴソームの面積の計算方法について
- 11) V-ATPase 抗体の作製及び精製法について
- 12) 本実験データの統計学的解析について

これらの質問に対し申請者の解答はほぼ適切であり、問題点も十分理解していた。よって博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	北川 雅 敏	
	副査	中村 浩 淑	副査 梶 村 春 彦