



Changes in Density and Distribution of Gap Junctions after Partial Hepatectomy : Immunohistochemical and Morphometric Studies

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 杉山, 靖 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/934

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 81号	学位授与年月日	平成 元年 3月27日
氏 名	杉 山 靖		
論文題目	Changes in Density and Distribution of Gap Junctions after Partial Hepatectomy : Immunohistochemical and Morphometric Studies (部分肝切除後のギャップ結合の密度と分布の変化：免疫組織化学的、形態計測的研究)		

Changes in Density and Distribution of Gap Junctions after Partial Hepatectomy: Immunohistochemical and Morphometric Studies

(部分肝切除後のギャップ結合の密度と分布の変化: 免疫組織化学的、形態計測的研究)

論文の内容の要旨

ギャップ結合は細胞と細胞をつなぐ構造で、みかけ上の分子量が 27,000 ダルトンのサブユニット蛋白が 12 個結合して管腔を形成し、このチャンネルをイオンや小分子物質が自由に通過し、細胞間の情報伝達が行われることが知られている。また、ギャップ結合は細胞の分化、増殖および癌化の過程で重要な役割を果たすことに興味をもたれている。われわれは、ギャップ結合が豊富なラット肝臓からギャップ結合蛋白質を精製し、これに対する家兎のポリクローナル抗体を作製した。さらにギャップ結合蛋白質の C 末端に近い部分の合成ペプチドに対する抗体も作製し、これらを用いた免疫組織化学的な検索を行った。細胞の増殖過程におけるギャップ結合の変化について、部分肝切除後の再生肝では、今までに電子顕微鏡による計測ならびにギャップ結合蛋白質に対する抗体を用いた測定で、ギャップ結合が初期に減少し、再生の進行とともに再び出現することが報告されている。しかし、再生肝では DNA 合成や細胞分裂が門脈域から中心静脈に向かって進行し、再生は肝小葉内で一様ではなくまたギャップ結合の肝小葉内での領域による量的な変化は詳しく検討されていない。われわれは、免疫組織化学的に再生肝のギャップ結合の動態を調べ、特に肝小葉との関係を明らかにするために、ギャップ結合の染色の半定量化を試みた。

Hertzberg の方法を簡略化してラット肝臓から単離したギャップ結合蛋白質でウサギを免疫し、得られた抗体はアフィニティークラムで精製した。また、ギャップ結合蛋白質の C 末端に近く、細胞質側に存在すると考えられる部分の合成ペプチドをウサギに免疫し抗体を得た。これらの抗体は、ともにウェスタン・ブロット法にてギャップ結合蛋白質と特異的に反応した。

次に Higgins と Anderson の方法に従い、離乳期のラットの部分肝切除を施行し、切除後 12-48 時間までは 2 時間間隔で、さらに 168 時間までは 12 時間間隔で、再生肝について新鮮凍結切片を作製し、蛍光抗体間接法で染色した。なお各々の連続切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、門脈ならびに中心静脈を同定した。対照のラットではギャップ結合蛋白質に対する抗体により、ギャップ結合は肝実質細胞が隣接細胞と接する部分の細胞膜上に点状に染色され、電子顕微鏡による観察から考えられる局在と一致していた。また点状の特異蛍光は肝小葉内に一様に分布していた。さらに、マウスの肝臓およびラットとマウスの脾臓の外分泌腺の細胞膜が同様に点状に染色された。この結果は従来の報告と一致し、合成ペプチドに対する抗体でも同様の染色が得られたことから、われわれの作製したギャップ結合蛋白質に対する抗体の特異性が裏付けられた。

部分肝切除後の再生肝では、ギャップ結合蛋白質に対する抗体による肝小葉全体の点状の特異蛍光は 20 時間後より急速に減少し、48 時間で最も少なくなり 72 時間後より再出現が認められた。これらの変化を半定量化するため、撮影された写真上で、門脈に接する門脈域、中心静脈に接する小葉中心域および両者から離れた中間域について、直径 120 μ の円を設定し、その中に含まれる点状の特異蛍光の数を計測した。解析には浜松ホトニクス社の画像解析装置アルガス 100 を用いた。特異蛍光の数は 28 時間後では対照の約 44%、48 時間後では約 13% まで低下していた。ギャップ結合の再出現は 72 時間後より明らかとなり、168 時間ではほぼ対照のレベルまで回復した。この結果は、ギャップ結合の消失が始まる時間については今までの報告とほぼ一致したが、再出現については 48 時間で術前のレベルに回復するとする従来の報告に比べて、かなり長い時間を要した点で異なっていた。

肝小葉内の部位による変化を調べると、20 時間後からまず門脈域よりギャップ結合が消失し、次第に中心静脈に向かって消失が及んだ。経過中、小葉中心域には常に門脈域より多くのギャップ結合が存在した。ギ

ギャップ結合の再出現は肝小葉内で比較的均一に認められた。肝小葉内の門脈域から中心静脈に向かって進行するギャップ結合の消失は DNA 合成や細胞分裂とほぼ平行した変化を示した。従って、細胞分裂の準備状態にある細胞よりギャップ結合が消失すること、さらに肝再生のギャップ結合の動態は門脈から中心静脈に向かう肝微小循環の影響を受ける可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

ギャップ結合（以下GJと略）は小分子の細胞間通過を許す膜装置として近年注目を惹いていた。本研究ではラット肝2/3切除後の再生の際のGJ分布の経時的变化を、免疫化学・形態計測によって解析した。

その結果、肝切除後のGJの消失は門脈域から中心静脈に向かって進行し、48時間で最大の消失を示し、168時間までに対照のレベルに回復することが分かった。回復の際には方向性（異所性）は見られなかった。これらは大綱において従来の報告と一致するが、蛍光抗体法による光顕レベルでの解析は今回が最初であり、肝切除後のGJの消長の時間経過も従来の報告と較べて遅延していることが分かった。以上の研究方法と観察事実は審査委員会において評価された。

研究発表は質疑を交えつつ行われ、発表後も質疑が続行された。それらのうち主なものは以下のとおりである。

- 1) GJのサブユニット構造
- 2) GJタンパク質の調製法
- 3) 肝切除の方法
- 4) 侵襲の程度による差
- 5) 計測における蛍光強度の閾値
- 6) 組織片を採取した肝部分
- 7) Rappaportのゾーン3の局在のしかた
- 8) GJ消失の細胞内過程
- 9) 先人の仕事との比較
- 10) 肝癌、肝硬変におけるGJの挙動

以上の設問に対する申請者の回答はおおむね適切であり、本研究は医学博士の学位授与に値するものであると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	藤田	道也		
	副査	教授	白澤	春之	副査	教授 松下 寛
	副査	教授	山下	昭	副査	講師 中島 猛行