



Title	Calpain Activation in Plasma Membrane Bleb Formation During tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Rat Hepatocyte Injury
Author(s)	三好, 秀幸
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40277">https://hdl.handle.net/11094/40277</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	三 好 秀 幸
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 7 4 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 12 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Calpain Activation in Plasma Membrane Bleb Formation During tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Rat Hepatocyte Injury (TBHPによるラット肝細胞傷害におけるプレブ形成とカルパインの活性化に関する研究)
論 文 審 査 委 員	<p>(主査) 教 授 門 田 守 人</p> <p>(副査) 教 授 内 山 安 男 教 授 祖 父 江 憲 治</p>

### 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】肝細胞が虚血、oxydative stress にさらされると、傷害による初期変化として細胞膜に bleb を形成することが知られている。教室では、oxydative stress による肝細胞傷害で細胞外カルシウムの流入が bleb を発生させ、また calpain(カルシウム依存性蛋白分解酵素)阻害剤は bleb 形成を抑制することを報告してきた。一方、ある種の細胞骨格蛋白は calpain の基質である。以上のことから、bleb 形成の機序を知るために bleb 形成と細胞骨格の変化、さらに calpain 活性化との関係を検討した。

【方法・成績】7-8 週齢雄性 Wistar rat からコラゲナーゼ灌流法にて肝細胞を分離し、24時間培養後以下の実験に用いた。CaCl<sub>2</sub> を 1.27 mM 添加した Krebs-Henseleit buffer (KHB(+)) と CaCl<sub>2</sub> を添加せず EGTA 0.5 mM を添加した KHB (KHB(-)) 中で、培養肝細胞に tert-butyl hydroperoxide (TBHP) 0.5 mM を反応させた。TBHP 添加後の培養液中の LDH 量を測定した。また、肝細胞の形態を位相差顕微鏡、透過電子顕微鏡 (TEM) で、細胞骨格蛋白、procalpain  $\mu$ 、活性型(中間型)calpain  $\mu$  の変化をイムノプロットで検討した。LDH の漏出は KHB(+)と KHB(-)の両方で TBHP 添加後40分から始まったが、KHB(+)の方が急激であった。KHB(+)では TBHP 添加後25分で光顕上細胞膜に bleb を確認できるようになったが、KHB(-)では bleb 形成を認めなかった。KHB(+)中で TBHP を負荷してから30分後の細胞の TEM 像で、bleb 発生部位では細胞質と bleb 内部が径 6 nm の纖維の束状構造物で仕切られており、細胞膜とこの束状構造物の解離を認めた。この束状構造物は micro filament と考えられ、F-actin の構造はおおむね維持されていると思われた。また、この時細胞骨格蛋白である talin,  $\alpha$ -actinin が減少していたが、vinculin には変化はなかった。KHB(-)中で TBHP を負荷した細胞では30分経過しても talin,  $\alpha$ -actinin の蛋白量に変化を認めなかった。さらに、calpain  $\mu$  の活性化を、抗中間型 calpain  $\mu$  抗体を用いて検討すると、KHB(+)では TBHP 負荷後20分で中間型が出現したが、KHB(-)では検出できなかった。カルパインの特異的な阻害剤 calpeptin 30  $\mu$ M の存在下に KHB(+)中で TBHP を負荷し、同様の実験を行った。calpeptin により、bleb 形成、talin,  $\alpha$ -actinin の減少および calpain  $\mu$  の活性化は、いずれも抑制された。

【総 括】TBHP による oxidative stress で肝細胞表面に bleb を生じるが、細胞外に Ca<sup>2+</sup> が存在していない場合に

は, bleb 発生が抑制され LDH の漏出もゆるやかである。TBHP による肝細胞傷害において, 細胞外に  $\text{Ca}^{2+}$  が存在する場合に bleb が発生し, 細胞外に  $\text{Ca}^{2+}$  が存在していない場合には bleb の発生が抑制されるという事から bleb 形成に  $\text{Ca}^{2+}$  の流入が大きく関与していることが示唆される。細胞骨格の見地からみると, TEM 像で, TBHP により傷害され bleb を生じた細胞でも F-actin の構造はほぼ保たれ, 膜が F-actin から解離している。これは, 細胞膜と F-actin の結合に関係する蛋白が分解, 解離など何らかの機序で機能していないことを示す。細胞骨格蛋白の talin,  $\alpha$ -actinin, vinculin は F-actin と細胞膜の間の結合に関係する蛋白と考えられているが, TBHP で傷害を受け bleb を生じた細胞のイムノプロットにおいて, talin,  $\alpha$ -actinin は分解されていたが, vinculin には変化が無かった。また, bleb 形成, talin,  $\alpha$ -actinin の分解に先だって calpain  $\mu$  の活性化が認められ, calpain に特異的な阻害剤である calpeptin により bleb 発生, さらに talin,  $\alpha$ -actinin の分解も抑制された。以上より, TBHP による肝細胞傷害では, calpain 活性化によるこれらの蛋白の分解により bleb が発生することが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

肝切除あるいは肝移植の際に肝臓は虚血再灌流傷害を受ける。再灌流傷害には, 再灌流時に発生するフリーラジカルが大きく関与していることが報告されている。しかし, フリーラジカルによる肝細胞傷害の機序には不明な点が多い。

本論文は, フリーラジカルの一種である tert-butyl hydroperoxide (TBHP) による肝細胞傷害の系で, 細胞骨格蛋白の変化, カルシウム依存性蛋白分解酵素 ( $\mu$  カルパイン) の活性化を検討することで, 細胞傷害の結果の一つである bleb formation の発生機序を解析したものである。TBHP 添加により肝細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し, それに伴い  $\mu$  カルパインが活性化して talin,  $\alpha$ -actinin などの細胞骨格蛋白が分解されて bleb が発生することを明らかにした。

本論文は, フリーラジカルによる肝細胞傷害で  $\mu$  カルパインが活性化し傷害に大きく関与していることを初めて示したものであり, 学位に値すると考えられる。