

(75)

氏名(生年月日)	ヌノ 布	ムラ 村	ワタル 渉
本籍	.		
学位の種類	博士(医学)		
学位授与の番号	乙第1529号		
学位授与の日付	平成7年2月17日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)		
学位論文題目	Changes in serum concentration and mRNA level of rat C-reactive protein (ラット C-反応性蛋白の血中濃度と mRNA の変化)		
論文審査委員	(主査) 教授 高桑 雄一 (副査) 教授 小林 慎雄, 鈴木 英弘		

論文内容の要旨

[目的] C-反応性蛋白(CRP)は、肺炎双球菌を Ca^{2+} 存在下で凝集させる急性期相蛋白の一種である。著者は、これまでラット CRP の物理化学的性状および血中動態について解析し、CRP の合成、分泌が estradiol $17-\beta$ (E_2) によって抑制されることを明らかにした(Review; Nunomura W, Zool Sci 9: 499, 1992)。本研究では、化学物質により炎症を惹起した場合と E_2 を注射した場合の血中 CRP 濃度と肝 CRP-mRNA レベルの変化を経時的に観察することにより、刺激によるラット CRP の合成と分泌の関連について解析した。

[材料および方法] 雄 Wistar ラット(7週齢)の大腿筋にテレピン油(1ml/体重 kg)を注射し炎症を惹起した。雌 Wistar ラット(7週齢)の皮下に E_2 (1mg/体重 kg)を注射(24時間間隔で2回)した。

精製ラット CRP を用いて特異抗血清を作製し、ロケット免疫電気泳動法により血中 CRP 濃度を測定した。肝より総 RNA を抽出し、電気泳動後、ナイロン膜へ転写した。

CRP 遺伝子(アミノ酸#75~#206をコードする396 bp)を PCR 法により増幅し、ジゴキシゲニン(DIG)標識した DNA をプローブとして用いて Northern hybridization を行い、画像解析装置(ATTO AE6900 M)で解析した。その際、 β -actin mRNA を内部対照とした。

[結果] DIG 標識プローブを用いた Northern hybridization により、ラット CRP-mRNA は 16.6S

の位置に単一のバンドとして肝のみに検出された。

テレピン油の注射によりラットに炎症を惹起すると、血中 CRP 濃度は刺激後4時間目から上昇を開始し、48時間後に最高値を達した。肝 CRP-mRNA は血中 CRP に先行して約2時間目から上昇を開始し、30時間後に最高値に達した。

血中 CRP 濃度は、 E_2 注射により初回の注射後12時間目まで減少(約20%)した。2回目の注射後は、3~7時間目に急激に減少(約40%)した。この間、肝 CRP-mRNA レベルには有意な変化を認めなかった。

[考察] 化学物質による炎症の場合、血中 CRP 濃度が上昇する機序として肝における mRNA の合成の増加が考えられた。ラットでは、炎症により誘導された IL-6 が肝細胞を刺激し、NF-IL6 が急性期相蛋白遺伝子に結合することにより転写が開始されると考えられている。本研究の結果から、この転写に至る時間は約2時間であると考えられた。

一方、 E_2 注射による血中 CRP 濃度の減少は mRNA の合成の減少に起因しないことが明らかとなった。Northern hybridization による解析では mRNA の短縮やアンチセンスの合成は認められなかったことから、CRP-mRNA の核膜透過の阻害、蛋白合成の減少、CRP の細胞膜への移行或いは分泌の減少などが想定された。

[結論] Wistar 系ラットをテレピン油或いは E_2 で刺激し、血中 CRP 濃度および肝細胞の mRNA を経時的

に測定した。テレピン油注射後、血中 CRP 濃度および肝 CRP-mRNA は経時的に増加した。E₂注射後、血中 CRP 濃度は急激に減少したが、肝 CRP-mRNA には顕著な変化は認められなかった。以上から、刺激の種

類によりラット CRP の血中濃度の経時変化と肝 mRNA 合成が呼応する場合としない場合があることが示された。

論文審査の要旨

血中の C-反応性蛋白 (CRP) が炎症で上昇することは広く知られているが、著者は、以前に estradiol 17- β (E₂) 投与で著しく低下することを見出した。本研究では、ラットを用いて炎症で血中 CRP が上昇する場合と E₂ で低下する場合について肝における CRP-mRNA を測定し、血中 CRP 変動との比較を行った。著者は CRP-mRNA 測定のための Northern blot 用の DIG 標識 DNA プローブを独自に作製し、CRP 測定にもロケット型電気泳動など精度の高い方法を用いた。その結果、肝における CRP-mRNA と血中 CRP が呼応する場合としない場合があることが明確に示された。また、これらの結果に基づき、刺激による CRP の合成-分泌過程が詳細に討論され、今後の検討課題も示された。本研究はこれまでの知見を基に妥当な目的をもって行われ、適確な方法を用いて実験された結果が事実に基づいて解釈され、刺激による CRP の分泌機構に重要な知見を与えた価値ある論文である。

主論文公表誌

Changes in serum concentration and mRNA level of rat C-reactive protein (ラット C-反応性蛋白の血中濃度と mRNA の変化)

Biochimica et Biophysica Acta Vol 1227 74-78頁 (1994年発行) Nunomura W, Takakuwa Y, Higashi T

副論文公表誌

- 1) Monoclonal antibodies to human C-reactive protein (CRP) and some characterization of a rat serum protein related to CRP (ヒト C-反応性蛋白 (CRP) に対する単クローン抗体とラット血清の CRP 相同蛋白について). Protid Biol Fluid 34 : 283-286 (1986) Hirai H, Nunomura W, Hatakeyama M
- 2) Interaction of C-reactive protein with macrophages in rat (ラットにおける C-反応性蛋白とマクロファージの関わり). Zool Sci 7 : 767-770 (1990) Nunomura W, Watanabe HK, Hirai H
- 3) Binding of low density lipoprotein (LDL) to C-reactive protein (CRP) : a possible binding through apolipoprotein B in LDL at phosphorylcholine-binding site of CRP (低比重リポ蛋白 (LDL) と C-反応性蛋白 (CRP) の結合 : CRP のリン酸コリン結合部位と LDL のアポリポ蛋白 B との結合の可能性). Hokkaido J Med Sci 65 : 474-480 (1990) Nunomura W, Hatakeyama M
- 4) C-reactive protein in rat : in development, pregnancy and effect of sex hormones (ラットの C-反応性蛋白 (CRP) : 発生、妊娠および性ホルモンの影響). Comp Biochem Physiol 96A : 489-493 (1990) Nunomura W
- 5) Purification of C-reactive protein by immunoaffinity chromatography using mouse monoclonal antibody (マウス単クローン抗体を用いた免疫親和クロマトグラフィーによる C-反応性蛋白の精製). J Biochem Biophys Methods 21 : 75-80 (1990) Nunomura W, Hatakeyama M, Hirai H
- 6) Rat C-reactive protein in chemically induced inflammation : changes in serum concentration and tissue distribution (化学炎症を惹起したラットにおける C-反応性蛋白 : 血中量の変化と組織分布). Zool Sci 8 : 277-286 (1991) Nunomura W
- 7) C-reactive protein in eel : purification and agglutinating activity (ウナギの C-反応性蛋白 : 精製および凝集活性). Biochim Biophysiol Acta 1076 : 191-196 (1991) Nunomura W
- 8) Immune response of the thymus to sheep red blood cells in white spotted char (*Salverinus leucomaenis*) (アメマス *Salverinus leucomaenis* 胸腺の緬羊赤血球に対する免疫反応). Bull Fac Fish Hokkaido Univ 42 : 85-89 (1991) Nunomura W
- 9) C-reactive protein (CRP) in animals : its chemical properties and biological functions (Review) (総説 : 動物の C-反応性蛋白 : 化学的性質と生物学的機能). Zool Sci 9 : 499-533 (1992) Nunomura W
- 10) Novel female protein with biological activities of C-reactive protein and lectin in a viviparous rockfish, *Sebastes taczanowskii* (卵胎生魚エゾメバル *Sebastes taczanowskii* の C-反応性蛋白とレクチンの生物学的活性を有する新しい雌特異蛋白). J Exp Zool 266 : 188-194 (1993) Takemura A, Nunomura W, Takano K, Hirai H