

氏 名 (本籍)                    やま            だ            たか            ひと  
山            田            孝            彦

学 位 の 種 類                    医            学            博            士

学 位 記 番 号                    医            第            1 9 9 0            号

学 位 授 与 年 月 日                昭 和 6 3 年 2 月 2 4 日

学 位 授 与 の 要 件                学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴                        昭 和 5 6 年 3 月  
    東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目                    眼 組 織 に お け る カ テ プ シ ン D の 分 布    — 網 膜 色 素  
    上 皮 細 胞 を 中 心 と し た 免 疫 組 織 化 学 的 検 索 —

(主 査)

論 文 審 査 委 員                    教 授 玉 井            信            教 授 京 極 方 久

    教 授 田 崎 京 二

## 論 文 内 容 要 旨

カテプシンDは酸性領域で強い蛋白分解能を有するライソゾーム酵素である。眼内では、角膜内皮細胞、虹彩、毛様体、脈絡膜、網膜色素上皮細胞（以下RPEと略す）で、カテプシンD活性が高いことが生化学的に証明されている。特に、RPEにおいては、他の眼組織に比べてカテプシンD活性が圧倒的に高い。RPEにおいては、視細胞杆体外節（以下ROSと略す）の10分の1が、毎日、明暗の光周期に合わせて分解されており、その分解はRPE内の phagolysosome システムによって行なわれていることが、組織化学的手法を用いて明らかにされている。in vitro の実験では、ROSおよびROS内の重要な視物質であり蛋白部分の85%以上を占めるロドプシンを、カテプシンDが分解し、ロドプシン由来の糖ペプチドを生成することなどから、カテプシンDがRPEでのROSの貪食、消化に深く関わっていることがほぼ確実である。また、ライソゾーム酵素である acidphosphatase は、光周期に合わせて、RPEでの局在が変化することが報告されている。RPEカテプシンDの局在も同様に変化することが予想され、ROSの分解過程に関与するカテプシンDの作用発現に対して、調節機構が存在すると考えられる。さらに、老化や病的状態で、ライソゾーム酵素の関与や変化が示されている。目的：第1に、以上の生理的、病的状態でのカテプシンDの検索を、細胞レベルで行うために、実験動物と人間の双方で使える免疫組織化学的方法を確立することである。第2は、この方法を用いて、生化学的には困難であった細胞レベルでのカテプシンDの眼内分布検索を行なうこと。第3は、RPEでのROSの貪食消化とカテプシンDの関係を組織学的に調べること。最後に、本研究の今後の発展の一方向として、RPEのカテプシンDの光周期による調節を調べる研究に、本方法が応用できるか否かを確認することである。方法：抗カテプシンDマウスモノクロナル抗体（以下MCAと略す）と抗カテプシンD家兎ポリクロナル抗体（以下PCAと略す）を作製し、免疫染色を行なった。MCAは牛RPE由来のカテプシンDを抗原とし、PCAは牛脾臓由来のカテプシンDを抗原として作製した。MCA、PCA共に牛のRPE、脾臓各々に由来するカテプシンDに親和性を持つことを確認した上で用いた。免疫染色は、MCAはABC法、PCAは間接法で行ない、いずれもDABによる発色（褐色の反応産物）を行なった。カテプシンDの眼内分布とRPEの観察には牛眼を用い、他に白色家兎眼、ラット（RCS, rdy/+）眼、人眼、牛脾臓も染色した。光周期の実験には、12時間ずつの明暗周期で少なくとも2週間飼育したラットを用い、点灯の1時間前（a期）、1時間後（b期）、3時間後（c期）、6時間後（d期）の4点で比較した。固定は全てPLP固定（4℃、72時間）を行ない、牛眼のRPEは光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察した。他は全て光学顕微鏡による観察を行なった。結果：MCAによる染色は、牛眼、牛脾臓、

白色家兎眼，人眼に使用でき，PCAによる染色は，牛眼，牛脾臓，ラット眼，人眼で使用できた。眼内分布の結果は，角膜の上皮，内皮細胞，ケラトサイト，虹彩の色素上皮細胞，毛様体の無色素，色素上皮細胞，水晶体の上皮細胞，皮質の一部，網膜のミュラー細胞，神経節細胞，RPE，脈絡膜の血管内皮細胞で，各々の胞体内に染色を認めた。RPEは，顕微鏡では，胞体内に，顆粒状の染色と円形～楕円形の染色を認めた。電顕では貪食されたりRPEの突起に囲まれたROSの周囲にDABの反応産物を認め，phagosomeも染色された。光周期では，RPEにのみ染色の変化を認めた。a期では，顆粒状の染色を胞体内に一様に認め，b期では顆粒状の染色は減少し，胞体内に核の5分の1大の円形の染色を多数認めた。c期では，円形の染色は減少し，顆粒状の染色が見られた。d期では，胞体内の染色はほとんど消失した。考察：今回作製したMCA，PCAによって，知る限り初めて，カテプシンDの眼組織内分布を免疫組織化学的に検索できた。この方法は，実験動物や人間にも使え，眼以外の組織でも使えるため，応用範囲の広いものである。眼内で染色陽性であった細胞では，いずれも蛋白異化作用が活発に行なわれていることが推察された。RPEの所見は，*in vitro* でカテプシンDがロドプシンを分解することと，カテプシンDがROSと接しているという部位的相互関係が初めて一致した所見と考えられ，*in vivo* では，ROSがカテプシンDによって消化されていることを強く示唆するものである。光周期の実験は予備実験の域を出ないが，染色が時間で変化し，phagosomeと思われる染色を認めることから確度が高く，今後，この分野での研究に応用できることがわかった。

## 審査結果の要旨

本論文はライソゾーム酵素の1つで、強い蛋白分解能を有するカテプシンDについて、以下に記す研究内容が記載されている。

- (1)モノクローナル抗体の作製
- (2)ポリクローナル抗体の作製
- (3)以上を用い本酵素の眼内分布を免疫組織化学的手法を用い検索
- (4)視細胞の代謝における本酵素の役割
- (5)視細胞の代謝にみられる概日性と本酵素活性との関係。

本酵素の局在は作製された抗カテプシンDマウスモノクローナル抗体、抗カテプシンD家兎ポリクローナル抗体を用いて行なわれ、角膜上皮、内皮細胞、ケラトサイト、虹彩の色素上皮細胞、毛様体の無色素、色素上皮細胞水晶体の上皮細胞、皮質の一部、網膜のミュラー細胞、神経節細胞、色素上皮細胞、脈絡膜の血管内皮細胞の胞体内に局在を認めた。

網膜色素上皮は視細胞外節の貪食、消化を行なっているが、光顕では胞体内に顆粒状の染色や円形ないし楕円形の染色を認めた。免疫電顕では貪食された視細胞外節の周囲や、それを取り囲んでいる色素上皮の突起に反応産物が認められ貪食とともにカテプシンDによる消化がおこりつつあること示した。

概日性リズムとの関連に関する実験では、光周期と一致して色素上皮のみに染色性の変化が証明され、視細胞外節の貪食作用のみでなく、その消化作用にも概日リズムが存在することを示唆した。

これらの実験は、いずれも免疫組織化学的手法を用いた眼組織における蛋白代謝機能に関わる新知見であるばかりでなく、視細胞の biological renewal の面から新しい、より深い解析が可能であることを示したことで十分博士論文として価値あるものである。