<原 著>

Mallory body 形成と肝細胞中間径フィラメントの ubiquitination に関する研究

岡上 武 森本 道雄 太田 正治 太田 義治
岡 正直 長尾 泰孝 南 祐仁 香川 恵造*

要 旨：マロリー体 (MB) 形成過程における中間径フィラメント (IF) の Ub 化 (ubiquitination) について、グリセオフルビン (GF) 投与マウスを用い、間接蛍光抗体法、免疫電顕法で検討した。正常肝組織では、抗サイトケラチン (CK) モノクローナル抗体 (RPN 1160) による蛍光は、細胞周囲、核周囲、細胞質内に網状に認められたが、抗ユビキチン (Ub) モノクローナル抗体 (ラット IgM クラス) による蛍光は、これらの部分には淡く観察された。凍結切片を detergent 処理したものでは CK の染色性に変化はなかったが、Ub の染色性は著減した。GF 投与マウスの肝組織を免疫二重染色すると MB に一致して CK と Ub の強い蛍光を認めた。免疫電顕では、正常肝細胞 IF にはほとんど Ub を標識する金粒子は存在しなかったが、MB とその周囲 IF には多数の金粒子が存在した。この結果から MB 形成過程において IF は強い Ub 化を受けていることが判明した。

索引用語： ユビキチン マロリー体 肝細胞中間径フィラメント
グリセオフルビン投与マウス

はじめに

アルコール硝子体 (Mallory body : MB) は、アルコール性肝炎を初めとして肝細胞癌、原発性胆汁性肝硬変、胆汁うっ滞など種々の肝疾患において、肝細胞細胞質に出現する細胞内封入体である。この MB は肝細胞細胞骨格の 1 つである中間径フィラメント (IF) が変化し集合したものと考えられている^{1,2,3)}が、その形成機序は未だ明らかでない。

細胞内蛋白代謝の機構は最近少しずつ明らかにされてはいるが、肝細胞の IF の構成蛋白であるケラチンの細胞内での代謝の機構はほとんど解明されていない。真核細胞が出来た 30 億年以上前からほとんど変化することなく存在してきた ubiquitin (Ub) は、細胞内蛋白代謝に重要な役割を果たしており、Ub が細胞内蛋白に結合することにより蛋白の崩壊がおきることが近年判明した⁴⁾。そして、老人性痴呆を来す Alzheimer 病にみられるフィラメントの集合体 (paired helical filament : PHF) に Ub が関係していることが明らかになり⁵⁾、Ub が Alzheimer 病の発症に関係し

ているものとして大いに注目されている。

IF からなる細胞内封入体様のもとして、MB や PHF 以外に、Parkinson 病の Lewy body、Pick 病の Pick body などがあり、これら封入体の全てに Ub が関与していることも明らかにされている^{6,7)}。MB と IF の Ubiquitination (Ub 化) に関しては、最近 Ub ポリクローナル抗体を用いての光顕的検討^{6,7)}や Ohta ら⁸⁾による電顕レベルでの詳細な報告がある。

今回、著者らはグリセオフルビン (GF) 投与マウスに MB を作成し、Ub モノクローナル抗体 (mAb) を使用し、MB と肝細胞 IF の Ub 化について検討したので報告する。

対象および方法

10 匹の雄性 C3H マウスを Denk らの方法⁹⁾に従い 2.5% (W/W) GF 含有粉末飼料で 1~6 カ月飼育し実験に供した (GF 群)。7 匹の C3H 雄性マウスを GF を含まない標準固形飼料で 1~6 カ月飼育し、コントロールとした (C 群)。屠殺後、肝臓を摘出し、2×2×5mm 角に細切し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結した。試料は使用時まで -80℃ で保存した。蛍光抗体法には 4μm の凍結切片を用い、Katsuma らの方法¹⁰⁾に従い detergent 処理したものとは処理しない

*京都府立医科大学第 3 内科

<受付日 1989 年 7 月 12 日>

Fig. 1 Immunofluorescence of a normal mouse liver stained with anticytokeratin monoclonal antibody is observed at the cell border, in the cytoplasm and around the nuclear rim of the hepatocytes. $\times 900$.

Fig. 3 Immunofluorescence of an extracted unembedded normal mouse liver stained with anticytokeratin antibody shows almost the same pattern as Fig. 1. $\times 900$.

Fig. 2 Immunofluorescence of a normal mouse liver stained with anti-ubiquitin monoclonal antibody is diffusely noted at the cytoplasm. $\times 900$.

Fig. 4 The fluorescence of an extracted unembedded normal mouse liver stained with anti-ubiquitin monoclonal antibody is lightly recognized around the cell border. $\times 900$.

ものを作製し、冷アセトンで固定後、抗サイトケラチン(CK)mAb(Amersham, RPN, 1160)〔マウスIgGクラス〕とMori, Iharaらが作成した抗Ub mAb DF2⁹〔ラットIgMクラス〕で二重染色した。MBとIFの免疫電顕による観察には厚さ6 μ mの凍結切片を用い、前述のごとく、detergent処理し、PBSで洗浄後、5%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBSで20分間ブロックを行い、抗Ub mAbを室温で1時間反応させ

た。次に、1%BSAを含むPBSで希釈したビオチン化マウス抗ラットIgM mAb (Zymed Laboratories, Inc. San Francisco) (8倍希釈)、金コロイド(径10 nm)標識ストレプトアビジン (Janssen Biotech, Belgium) (32倍希釈)を順次反応させ、氷上でグルタルアルデヒドにて30分間固定した。エタノール系列で脱水し、臨界点乾燥後、カーボン蒸着し、日立H-500H透過型電顕で観察した。

A

B

Fig. 5 Double-label immunofluorescence micrograph of an extracted unembedded griseofulvin-treated mouse liver stained with anti-cytokeratin monoclonal antibody labeled by rhodamine (A) and anti-ubiquitin monoclonal antibody labeled by FITC (B). Mallory bodies are heavily stained with both antibodies. $\times 900$.

結 果

蛍光抗体法では、C 群ラットの肝組織は、CK が微細な網目状に肝細胞全体に存在し (Fig. 1), Ub の蛍光を細胞質全体に弱く認めた (Fig. 2). detergent 処理後、CK の分布パターンに著変は見られなかったが (Fig. 3), Ub は細胞辺縁に若干その蛍光が存在するのみで、細胞質では不明瞭であった (Fig. 4). GF 群では、CK

Fig. 6 Immunoelectron micrograph of an extracted unembedded normal mouse liver stained with anti-ubiquitin monoclonal antibody labeled by 10nm gold particles. IFs are weakly stained with this antibody. Bar measures $0.5\mu\text{m}$.

Fig. 7 Electron micrograph of an extracted unembedded griseofulvin-treated mouse liver. Mallory body is observed as the aggregate of the filaments. Bar measures $2\mu\text{m}$.
N : nuclear filamentous shell MB : Mallory body, Arrowheads mean cell border.

の染色性は各細胞間で著明な差があり、MB にはきわめて強い蛍光が存在した (Fig. 5A). Ub の蛍光は、二重染色法により MB に一致して強かった (Fig. 5B).

次に、電顕による観察で、detergent 処理により 10 nm フィラメント (IF) を細胞質に網目状に認めた。そして、C 群では Ub をラベルする少数の金粒子がそのフィラメント上に存在した (Fig. 6). GF 群では、フィ

Fig. 8 Immunoelectron micrograph of an extracted unembedded griseofulvin-treated mouse liver stained without anti-ubiquitin monoclonal antibody. 10nm gold particles labeling for ubiquitin are scarcely seen. Bar measures 0.5 μ m.

Fig. 9 Immunoelectron micrograph of an extracted unembedded griseofulvin-treated mouse liver stained with anti-ubiquitin monoclonal antibody. 10nm gold particles labeling for ubiquitin are dotted on the Mallory body and the IFs around Mallory body. Bar measures 0.5 μ m.

ラメントの集合体であるMBが観察され(Fig. 7), 金粒子はそのMBを構成するフィラメント上とその周囲のIFに多数存在した(Fig. 8). これに対し, 一次抗体を省略したものではIF上に金粒子の標識は観察されなかった(Fig. 9). なお, GF投与1~2カ月でMBが未だ形成されていない時期では, 肝細胞のIFのUb化は明らかでなかった.

考 案

IFはcytokeratinからなるpolypeptidesであるが, 細胞質内に存在するこれらの蛋白代謝には種々のシステムが働いている. 細胞骨格蛋白はcalcium-activated proteaseの基質であると同時に, ATP-dependent Ub

systemにより代謝されていることが明らかになっている¹¹⁾.

MBは肝細胞IFが変化して形成された細胞質内封入体と理解されているが, MBの構成フィラメントはIFとは異なりcalcium-dependent degradationに抵抗性を示す¹²⁾. そしてUbがMBの構成フィラメントに結合していることが最近明らかになった⁸⁾.

今回著者らは免疫組織化学的検討により, MBを構成しているフィラメントと主としてその周囲に存在するIFにUbが結合している(UQ化)所見をえた. 著者らの使用した抗体はIgM型の抗Ubモノクローナル抗体である. この抗体で正常肝細胞のIFを検討すると, 光顕および電顕レベルでIFに明らかなUb化は見られなかった. 一方, Ohtaら⁸⁾はウサギIgG affinity-purified Ub抗体とcytokeratin Endo A (TROMA 1)に対するラットIgGモノクローナル抗体を使用し, GF投与マウスでのMB形成とIFのUb化について詳細に検討している. その結果, 正常肝細胞でも細胞辺縁部や核周囲に明らかなUbの存在をみ, TROMA 1との2重染色免疫蛍光法でUbはTROMA 1陽性のcytokeratinの分布とほぼ一致して存在していることを報告している. 免疫電顕で正常肝のIFでも軽度Ub化が起きており, MBやその周囲のIFでは強いUb化がみられている. そして, TROMA 1のepitopeを持たないIFはUbのepitopeも持っていない. しかし, 著者らは正常肝で明らかなUbの存在を証明しえなかった. Ohtaらの成績と著者らの成績の相違は, 著者らの使用した抗体がIgM型のモノクローナル抗体であったのに対し, Ohtaらの使用した抗体がIgG型のポリクローナル抗体である点に由来するものと思われる.

Ubの機能について現在までに明らかになっているのは, 細胞質でATP依存性の蛋白分解に関与していること⁴⁾, 核内でヒストンH2Bと結合しヌクレオソームのユニットを形成していること¹³⁾, リンパ球のhomologous receptor¹⁴⁾や血小板由来増殖因子の受容体と結合していること¹⁵⁾などである. 最近, 老人性痴呆やアルツハイマー病の脳組織にみられるsenile plaqueやPHFを構成する蛋白質がUb化していることが明らかになり⁹⁾, Ubは臨床医の間でもにわかに脚光を浴びることとなった.

Manettoら⁷⁾も述べているごとく, Lafora bodyやamyloid bodyを除くと, 現在までに判明しているUb化のみられる封入体はMBを含めてすべてIF蛋白を

含んだものである。MB を構成するフィラメントやその周囲の IF に強い Ub 化がみられることが MB 形成の原因なのか結果なのか、大変興味のあるところである。Ohta ら⁸⁾が明らかにしているごとく、Ub は正常肝細胞 IF にも結合していることから、彼ら⁸⁾、Manetto ら⁷⁾は MB 形成と Ub との関連性について次の 2 つの可能性を考えている。Ub は MB 形成に無関係との考えと、MB を初めとして Ub 化した封入体は細胞に慢性ストレスがかかった結果、蓄積した細胞骨格やその他の異常蛋白を十分に排除しえなくなり形成された可能性の 2 つを考えている。著者らの GF 投与 1 ~ 2 カ月のマウスでは IF に明らかな Ub 化は見られていない。著者ら⁹⁾は、GF 投与マウスにおいて、MB 形成のない肝細胞においても IF の disorganization がみられることを報告し、また Hazan ら¹⁶⁾、Barbitis ら¹⁷⁾、Rey¹⁸⁾は GF マウスあるいはヒトのアルコール性肝障害患者を対象とした研究から、MB 形成の前段階から IF に免疫学的、生化学的に変化が生じていることを報告している。このような段階から IF の Ub 化が起き、それが MB 形成の一過程となっているのかどうか、現段階では判定しえない。heat shock protein が注目されてきた昨今、heat shock protein の一種である Ub の肝疾患における役割りに興味を持たれる。GF 投与マウスあるいはヒトのアルコール性肝炎の MB は細胞骨格と Ub あるいは heat shock protein の関連性を研究する上で格好の対象と思われる。

結 論

マロリー体形成過程における肝細胞中間径フィラメントの Ub 化についてグリセオフルビン投与マウスを使って検討した。そして、マロリー体およびその周囲の中間径フィラメントは、正常に比し強いユビキチン化を受けていることが蛍光抗体法及び免疫電顕にて示された。

抗ユビキチンモノクローナル抗体 DF₂を御提供下さいました、東京都老人総合研究所第二生理室長井原康夫博士に深謝致します。なお、本研究の一部は昭和62年度科学研究費補助金（一般研究（B）課題番号62480198）によった。

文 献

- 1) Denk H, Franke WW, Dragosics B, et al: Pathology of cytoskeleton of liver diseases: Demonstration of Mallory bodies (alcoholic hyaline) in murine and human hepatocytes by immunofluorescence microscopy using anti-

- bodies to cytokeratin polypeptides from hepatocytes. *Hepatology* 1: 9—20, 1981
- 2) French SW: Present understanding of the development of Mallory body. *Arch Pathol Lab Med* 107: 445—450, 1983
- 3) Okanoue T, Ohta M, Kachi K, et al: Relationship of Mallory bodies to intermediate filaments in hepatocytes. A scanning electron microscopy study. *Lab Invest* 53: 534—540, 1985
- 4) Rechsteiner M: Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. *Ann Rev Cell Biol* 3: 1—30, 1987
- 5) Mori H, Kondo J, Ihara Y: Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 27: 1641—1644, 1987
- 6) Lowe J, Blanchard A, Morrel K, et al: Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibers in cerebellar astrocytes, cytoplasmic bodies in muscle, and Mallory bodies in alcoholic liver disease. *J Pathol* 155: 9—15, 1988
- 7) Manetto V, Abdul-Karim F, Perry G, et al: Selective presence of ubiquitin in intracellular inclusions. *Am J Pathol* 134: 505—513, 1989
- 8) Ohta M, Marceau N, Perry G, et al: Ubiquitin is present on the cytokeratin intermediate filaments and Mallory bodies of hepatocytes. *Lab Invest* 59: 846—856, 1988
- 9) Denk H, Eckerstorfer R, Gschnait F, et al: Experimental induction of hepatocellular hyaline (Mallory bodies) in mice by griseofulvin treatment. *Lab Invest* 35: 377—382, 1976
- 10) Katsuma Y, Marceau N, Ohta M, et al: Cytokeratin intermediate filaments of rat hepatocytes: Different cytoskeletal domains and their three-dimensional structure. *Hepatology* 8: 559—568, 1988
- 11) Vorgias CE, Traub P: Efficient degradation in vitro of all intermediate filament subunit protein by the Ca²⁺-activated neutral thiol proteinase from Ehrlich ascites tumor cells and porcine kidney. *Biosci Rep* 6: 57—64, 1986
- 12) Irie, T, Benson NC, French SW: Electron microscopic study of the in vitro calcium-

- dependent degradation of Mallory bodies and intermediate filaments in hepatocytes. *Lab Invest* 50 : 303—312, 1984
- 13) Busch H, Goldknopf IL : Ubiquitin-protein conjugates. *Mol Cell Biochem* 40 : 173—187, 1981
 - 14) Siegelman M, Bond MW, Gallatin MW, et al : Cell surface molecule associated with lymphocyte homing is a ubiquitinated branched-chain glycoprotein. *Science* 231 : 823—829, 1986
 - 15) Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, et al : Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* 323 : 226—232, 1986
 - 16) Hazan R, Denk H, Franke WW, et al : Change of cytokeratin organization during development of Mallory bodies as revealed by a monoclonal antibody. *Lab Invest* 54 : 543—553, 1986
 - 17) Barbitis C, Morton J, Woods JC, et al : Disorganization of intermediate filament structure in alcoholic and other liver disease. *Gut* 27 : 765—770, 1986
 - 18) Ray M : Distribution patterns of cytokeratin antigen determinants in alcoholic and nonalcoholic liver disease. *Hum Pathol* 18 : 61—66, 1987

Ubiquitination of intermediate filaments of hepatocytes in Mallory body formation

Takeshi OKANOUE, Michio MORIMOTO, Masaharu OHTA, Yoshiharu OHTA, Masanao OKA,
Yasutaka NAGAO, Masahito MINAMI and Keizo KAGAWA*

To investigate the ubiquitination of intermediate filaments (IFs) of hepatocyte in Mallory body (MB) formation, we performed immunofluorescence and immunocytochemistry for cytokeratin IFs and MBs of mouse liver fed griseofulvin for 1 to 6 months. Immunofluorescence using cytokeratin monoclonal antibody (RPN 1160) for control mouse was seen at the cell border, in the cytoplasm and around the nuclear rim of the hepatocytes, however, monoclonal antibody (IgM) specific to ubiquitin weakly stained these areas. MBs in griseofulvin-fed liver cells were stained in a similar pattern by an ubiquitin monoclonal antibody and a monoclonal antibody specific for cytokeratin. Immunocytochemistry revealed that the ubiquitin antiserum heavily decorated the IFs around MBs as well as MB filaments. The IFs of hepatocytes in controls were weakly decorated by the ubiquitin monoclonal antibody. Although the role of ubiquitin in the degradation of IFs is elucidated partially, our results indicate that excessive ubiquitination of IFs is noted in MB formation.

* Third Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine (Kyoto)