



A Cell-Binding, Immunoglobulin-Like Protein from human Plasma. II. Cell-Binding Activity

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 深水, 秀一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1298

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	医博論第 2 1 号	学位授与年月日	昭和 6 2 年 2 月 2 0 日
氏 名	深 水 秀 一		
論文題目	A Cell-Binding, Immunoglobulin-Like Protein from human Plasma. II. Cell-Binding Activity (ヒト血漿より単離された細胞結合性免疫グロブリン様蛋白質 II. 細胞接着活性について)		

論文題目

A Cell-Binding, Immunoglobulin-Like Protein from Human Plasma.

II. Cell-Binding Activity

(ヒト血漿より単離された細胞結合性免疫グロブリン様蛋白質 II. 細胞接着活性について)

論文の内容の要旨

ヒト血漿中にはフィブロンクチンをはじめいくつかの細胞接着性蛋白が存在している。大堀らは、ヒト血漿よりエラスチノーセファロースカラムを用いて高分子量蛋白質を分離し、それが免疫グロブリン(IgM, IgA, IgG)の重鎖と類似のサブユニットを持つ新しい蛋白質であることを報告している。

この蛋白質の細胞接着活性を検討した。この蛋白質に対して細胞が接着することを見出し、細胞結合性免疫グロブリン様蛋白質(cell-binding, immunoglobulin-like protein, 以下CIPと略す)と命名した。

〔方法〕

- 1) CIPの分離、精製: 大堀らの方法に従い、エラスチノーセファロースカラムを用い、正常ヒト血漿から、4M尿素で溶出した画分を、さらに蔗糖密度勾配遠心法で精製した。
- 2) 細胞接着活性: CIPで平底ポリスチレンウエルをコートした後、0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)で非特異的吸着をブロックした。ここへ細胞浮遊液を入れ、炭酸ガスふ卵器中で37℃、2時間培養した。阻害実験としては、あらかじめCIPをコートした上へ、抗ヒトIgMまたは抗ヒトIgGを結合させた後行った。接着した細胞は、位相差顕微鏡で観察した後、染色して形態を調べた。
- 3) 免疫蛍光抗体法: 浮遊細胞にCIPを結合させた後、ウサギ抗CIP血清、FITC標識抗ウサギ抗体を用い、細胞に結合したCIPを確認した。
- 4) 赤血球凝集反応: ウエルに、正常ウサギ血清添加phosphate buffered salineをいれた後、CIPの希釈系列を加え、赤血球浮遊液を1滴滴下して37℃、2時間反応させた。

〔結果〕

- 1) マウス皮下線維芽細胞(L-929)はCIPに対して、対照に用いたフィブロンクチン(FN)およびコンカナバリンAレクチン(Con A)に対するのと同程度の接着性を示した。ハムスター腎細胞(GHK)、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUE)、ヒト皮膚線維芽細胞(HSF)は、FNおよびCon Aの場合よりやや弱い接着性を示した。ヒト胃癌細胞(MKN-45)、ヒト乳癌細胞(MCB-1)は、FNおよびCon Aの場合と異なり、CIPに対してほとんど接着しなかった。
- 2) 接着した細胞の形態を比較すると、FNに対して接着した細胞は伸展が著しかったが、CIPの場合はほとんど伸展がみられなかった。
- 3) FNではコートする蛋白濃度が30μg/mlで、さらにCon Aでは3μg/mlの濃度で、接着細胞はほぼ飽和に達していたが、CIPでは300μg/mlの濃度でも飽和に達しなかった。
- 4) CIPに対する細胞接着は、抗ヒトIgMによって阻害されたが、抗ヒトIgGによっては阻害されなかった。
- 5) 免疫蛍光抗体法を用いてCIPの結合したL-929細胞の存在を確認した。一方MCB-1細胞では確認できなかった。
- 6) CIPは赤血球凝集作用を示さなかった。

〔まとめ〕

ヒト血漿よりエラスチノーセファロースカラムを用いて分離した高分子量蛋白質について以下の結果を得

た。

- 1) 細胞接着活性を示した。
- 2) 上皮系細胞、非上皮系細胞とも、程度の差はあるが接着した。
- 3) 調べた限りの癌細胞は接着しなかった。
- 4) 接着した細胞の形態をFNと比較すると、細胞の伸展性に関して異なっていた。
- 5) 抗ヒトIgMは接着を阻害した。
- 6) 赤血球凝集作用は示さなかった。

これまでに知られている細胞接着性蛋白と同様、細胞結合性免疫グロブリン様蛋白質CIPは、細胞の増殖や細胞-細胞間基質相互作用に何らかの寄与をしている可能性がある。さらに、サブユニット中に免疫グロブリンの重鎖様構造が存在することから、生体防御における役割も示唆され、新しいタイプの細胞結合性蛋白質であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ヒト血漿中に細胞接着タンパク質のあることが知られている。申請者らはヒト血漿中にIgM、IgGと共通抗原をもち、細胞接着活性のある巨大分子(Cell-binding, Immunoglobulin-Like Protein, CIPと略)を見つけたので、その性質を検討した。

対象とした細胞は、マウス皮下線維芽細胞株(L-929)、ゴールデンハムスター腎細胞(GHK)、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUE)、正常ヒト皮膚線維芽細胞(HSF)、ヒト胃癌細胞株(MKN-45)、ヒト乳癌細胞株(MCB-1)の6種である。細胞接着はRauvalaら(1981)の方法を改変して行った。

L-929はCIP、及び比較のために用いたフィブロネクチン、Con Aなどのタンパク質で被覆したすべてのウェルに接着した。フィブロネクチンは6種の細胞すべてを結合するが、CIPはそのうちMKN-45とMCB-1を結合しない。対照として用いたウシ血清アルブミンはいずれの細胞をも結合しない。

細胞接着の接着物質濃度依存性を調べたところCon Aが最も強力でありフィブロネクチン、CIPの順に効力は落ちる。

本研究で最も興味をもたれるのは、CIPへの細胞接着が抗ヒトIgMによって著明に阻害されることである。抗ヒトIgGによっては阻害されない。また、IgM自体には細胞接着作用がない。フィブロネクチンの細胞結合作用は抗IgMで影響を受けない。

このようにCIPはその生理機能については未知であるが、このようなタンパク質が血漿に見出されたのは初めてのことであり、今後の解明が期待される。

また、次のような質疑を行った。

1. 細胞分散の方法
2. ウェルのタンパク質被覆の方法
3. CIPの溶解度
4. CIPの抽出法
5. インキュベーション時間
6. CIPの生理機能
7. CIPの血中濃度

これらの質疑に対する申請者の応答はおおむね適切であった。以上から本論文は医学博士の学位論文としてふさわしいものであることを全委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	山下 昭	副査	教授
				菅野 剛史	
	副査	教授	藤瀬 裕	副査	副学長
				山田 瑞穂	