



A monoclonal antibody to a rat hepato-renal membrane antigen

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: 玉腰, 勝敏 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/887

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	医博第 34号	学位授与年月日	昭和61年 3月26日
氏 名	玉 腰 勝 敏		
論文題目	A monoclonal antibody to a rat hepato-renal membrane antigen (ラット肝および腎の細胞膜抗原に反応する単クローン性抗体)		

博士論文 玉腰勝敏
論文題目

A monoclonal antibody to a rat hepato-renal membrane antigen
(ラット肝および腎の細胞膜抗原に反応する単クローン性抗体)

論文の内容の要旨

肝細胞の細胞膜蛋白の性状を明らかにすることは、慢性肝障害の自己免疫学的発症機序における標的分子の関与を解明する上できわめて重要である。これまで多くの研究者により、各種の細胞成分が抽出され、病態との関連性が解析されているが、それらの多くは未精製のもので、抗原蛋白分子の詳細については、未だ不明な点が多い。本研究は、肝細胞膜抗原分子の性状を明らかにする目的で、ラット肝細胞膜抗原と反応する単クローン性抗体を作製し、その対応抗原の性状解析を行なった。

DA系雄ラットの肝ホモジェネイトより肝細胞膜分画を分離し、可溶化したのち小麦胚レクチン吸着性の糖蛋白分画を抽出し、抗原とした。これを用いて雄BALB/cマウスを過免疫し、得られた免疫脾細胞とマウス骨髓腫細胞(NS-1)との細胞融合を行なった。融合細胞培養液上清中の抗体活性は、遊離肝細胞を標的細胞とした細胞性ラジオイムノアッセイ(cRIA)により検索した。抗体産生株は、クローンニングをしたのち、単クローン性抗体産生融合株として培養増殖させた。単クローン性抗体の性状の解析はcRIAおよび、flow cytofluorographyを用い、対応抗原の性状は、Binding Inhibition Assay(BIA)および、間接型酵素抗体法による免疫組織化学的方法により解析した。

得られた抗肝細胞膜抗原-単クローン性抗体(HAM.4)は、正常肝細胞に対し強い結合性を示すにもかかわらず、ラット腹水型肝癌細胞とはほとんど結合性を認めなかった。BIAによる解析では、肝以外に、腎、脾、胸腺等とも交叉反応性が認められ、特に、腎には肝以上の抗原濃度があることが判明した。対応抗原の組織局在の解析では、肝細胞膜のうち、毛細胆管遊離面のみに限局的に染色像が認められた。腎では、近位尿細管の刷子縁に強い染色像が認められた。以上の結果から、HAM.4は肝細胞膜の極性を表す3種類の面、すなわち、類洞面、毛細胆管面、結合面のうち、毛細胆管面の解析に有用であると考えられ、また、HAM.4が肝癌細胞と結合性をほとんど示さないことは癌化の過程における正常肝細胞膜蛋白の発現様式の変化の指標となる可能性があると考えられる。さらに、腎の尿細管刷子縁抗原は膜性腎症の実験モデルであるHeymann腎炎を発症させる抗原と考えられていることから、HAM.4対応抗原が刷子縁に局在することは、Heymann腎炎の解析にも有力な手段となりうると考えられる。

以上より、HAM.4は、肝および腎の細胞膜蛋白の分化と機能の解析に有用な単クローン性抗体であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

慢性肝障害の自己免疫学的発症機序における肝細胞膜抗原成分の役割については多くの検討がなされているが、その詳細は明らかでない。本研究では、肝細胞膜に存在する小麦胚レクチン吸着性糖蛋白(分子量、20万前後)と反応する単クローン性抗体(HAM.4と命名)を作製し、その性状、対応抗原の臓器分布につき細胞性ラジオイムノアッセイ、flow cytofluorography、binding inhibition assay、

及び免疫組織化学的方法を用いて解析した。

審査委員会において、申請者によりなされた口頭発表と論文内容等について審議した結果、本論文の特徴として次の点が評価された。

1. HAM. 4 は、これまで発見された肝細胞膜のレンズ豆レクチン吸着性糖蛋白に対する抗体、即ちHAM. 1、HAM. 2、HAM. 3 と異なる新しい単クローン性抗体である。
2. HAM. 4 は肝細胞膜のうち毛細胆管側膜の抗原蛋白を認識する。
3. HAM. 4 の対応抗原が腎近位尿細管刷子縁に高濃度に存在し、又この抗原の分子量、臓器分布がnephritogenic tubular antigen に極めてよく類似することからHeymann 腎炎の発症機序、肝腎相関の解析に有用と考えられる。
4. HAM. 4 は正常肝細胞と結合するにもかかわらず、腹水型肝癌細胞との結合性がないことから、癌化への進行過程を知る指標となりうる可能性がある。

また、以下の点に関して審査員と申請者との間に討論が行なわれた。

1. 慢性肝障害の自己免疫学的発生機序に関する最近の動向について。
2. 抗原性蛋白として小麦胚レクチン吸着性糖蛋白に着目した理由は何か。
3. 感作した糖蛋白のなかでHAM. 4 と結合するのはどれか、ブロッティング法で確認したか。
4. 肝細胞を分離するさいコラーゲナーゼにより細胞膜が障害されないか。
5. AH 44 を用いてHAM. 4 のbinding inhibition test を行ったことがあるか。
6. 免疫組織化学方法を用いて腎組織のHAM. 4 対応抗原を染色したさい、皮質よりも髄質外層でより強く染まるのは何故か。

以上の点について、申請者は概ね適切な応答をするとともに、対応抗原の詳細な分析など残された問題については今後検討を進める旨の回答を行った。

以上の審議の結果、本審査委員会は本論文が学位授与に値する十分な内容を備えているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 副学長 本 田 西 男

副査 教授 西 村 順 治 副査 教授 吉 見 輝 也

副査 助教授 小 出 幸 夫 副査 助教授 吉 澤 浩 司