



CHARACTERIZATION OF MICROVILLI IN 'INTRACELLULAR LUMINA' IN KATO-III CELLS, GASTRIC CARCINOMA-DERIVED CELL LINE, WITH ANTIBODIES AGAINST MICROVILLUS MEMBRANE AND AGAINST VILLIN: IMPLICATIONS FOR DISORDERED INTRACELLULAR TRAFFIC

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 嵩, 眞佐子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/990

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 137号	学位授与年月日	平成 5年 3月26日
氏 名	嵩 眞佐子		
論文題目	CHARACTERIZATION OF MICROVILLI IN 'INTRACELLULAR LUMINA' IN KATO - III CELLS, GASTRIC CARCINOMA - DERIVED CELL LINE, WITH ANTIBODIES AGAINST MICROVILLUS MEMBRANE AND AGAINST VILLIN : IMPLICATIONS FOR DISORDERED INTRACELLULAR TRAFFIC (微絨毛膜抗体とビリン抗体を用いての、ヒト胃癌細胞由来 KATO-III細胞に見られる細胞内微小嚢胞における微絨毛についての研究—細胞内輸送異常との関連から—)		

医学博士 嵩 眞佐子

論文題目

CHARACTERIZATION OF MICROVILLI IN 'INTRACELLULAR LUMINA' IN KATO-III CELLS, GASTRIC CARCINOMA-DERIVED CELL LINE, WITH ANTIBODIES AGAINST MICROVILLUS MEMBRANE AND AGAINST VILLIN:IMPLICATIONS FOR DISORDERED INTRACELLULAR TRAFFIC

(微絨毛膜抗体とビリジン抗体を用いての、ヒト胃癌細胞由来 KATO-III細胞に見られる細胞内微小嚢胞における微絨毛についての研究—細胞内輸送異常との関連から—)

論文の内容の要旨

目的：小腸上皮細胞や腎尿細管上皮に見られる微絨毛が、ヒト胃癌細胞由来 KATO-III細胞の表面と細胞内微小嚢胞（ICL）に見られる。私たちはこの細胞表面と ICL の微絨毛と、小腸上皮細胞の微絨毛との形態的または生化学的な類似点を検討し、さらに ICL の微絨毛の成因を、その細胞内輸送異常との関連から探ろうと試みた。

方法：この目的のためマウスの微絨毛膜を精製して、微絨毛に対する抗血清（MVM抗体）を作成した。この抗体は免疫染色法により、マウスとヒトの小腸上皮細胞の微絨毛に特異的に反応することがわかった。また微絨毛の細胞骨格系蛋白質であるビリジンに対する抗体を用いて合わせて検討した。ビリジンは小腸や腎尿細管上皮細胞の微絨毛に局在することが既に報告されている。

結果：PAP法、蛍光抗体法による免疫染色等により、KATO-III細胞の表面と ICL の微絨毛がともに MVM抗体と抗ビリジン抗体により、陽性を示した。免疫透過電顕及び免疫走査電顕法により KATO-III細胞の表面と ICL の微絨毛に、MVM抗体に対する金コロイド粒子の付着が見られた。従って、組織化学的手法では KATO-III細胞の表面と ICL の微絨毛との差異は見られなかった。

生化学的には、KATO-III細胞のホモジネートのマイクロゾーム分画を SDS-電気泳動後、ウェスタンブロットを行うと 30K、60K の蛋白質が MVM抗体と反応した。30K、60K の蛋白質は KATO-III細胞と同様にマウスの小腸や腎尿細管上皮細胞の微絨毛にも確認された。しかし、マウスの小腸微絨毛膜構成蛋白質に特徴的に存在する、200K 蛋白質と 140K 蛋白質は、KATO-III細胞のマイクロゾーム分画には確認されなかった。

このような実験結果から、正常微絨毛と、KATO-III細胞の表面と ICL の微絨毛の間には質的差異があることが推察された。細胞内輸送異常との関連から、ICL の成因について研究を続けるに値すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

細胞形態の形成・分化の機構はほとんど未知の分野である。本論文は、ヒト胃癌細胞由来の KATO-III細胞が、微絨毛を細胞表面だけでなく細胞内の微小嚢胞表面にももつことに着目し、この微絨毛の異所的発現が微絨毛構成物質の細胞内輸送の異常の結果ではないか、との仮説を立て、まず両微絨毛の異同を形態学的・生化学的に検討したものである。

この研究の特徴および結果は以下のように要約できる。

1. マウス小腸微絨毛膜に対する抗体および微絨毛の特異的骨格蛋白であるビリジンに対する抗体を用いて行っ

た光顕的免疫細胞化学および金コロイド法による免疫透過電顕法・免疫走査電顕法において、両微絨毛に差異は認められなかった。

2. SDS-PAGE・ウェスタンブロット法ではKATO-Ⅲ細胞のミクロゾーム分画が抗微絨毛膜抗体ともっとも強く反応した。
3. KATO-Ⅲ細胞のミクロゾーム分画に抗微絨毛膜抗体と反応する15K、30K、および60K蛋白が見いだされた。
4. SDS-PAGEにて分離したマウス小腸絨毛膜蛋白と交差する抗体を抽出し(01msted法)、それぞれの抗体の特異性を検討すると、抗30K蛋白および抗60K蛋白抗体は小腸上皮細胞、KATO-Ⅲ細胞のほか、マウスの腎尿管上皮にも反応するのに対し、70-80K～200K蛋白は小腸および腎と反応するが、KATO-Ⅲ細胞とは反応しなかった。
5. このような観察結果からKATO-Ⅲ細胞の細胞表面微絨毛と細胞内微小嚢胞微絨毛は形態学的・免疫組織化学的に差異はないが、正常微絨毛と比べて、生化学的に正常微絨毛構成蛋白にみられる大型分子蛋白が欠落していると考えられた。

本論文審査委員会は、以上について討議し、本論文が細胞構成の細胞内輸送について先駆的意義をもつ研究である可能性があると評価した。

なお、本論文審査の過程において、討議された事項は以下のようである。

1. 本研究で用いられた微絨毛膜精製法により採取されるのは微絨毛膜だけで他の成分の混入はないか
2. KATO-Ⅲ細胞の微小嚢胞についての従来の考え
3. KATO-Ⅲ細胞が腸上皮的といわれる根拠
4. KATO-Ⅲ細胞の形態が多形性にとむ理由
5. 15Kおよび30K蛋白がPAS染色陰性の意義
6. 細胞内微小嚢胞の発現を規定する条件は知られていないか
7. ビリンの微絨毛における局在
8. マウス小腸微絨毛膜に対する抗体が通常の細胞骨格を認識している可能性はないか
9. 細胞表面微絨毛膜と微小嚢胞表面微絨毛膜を識別できる抗体はないか
10. KATO-Ⅲ細胞に大分子蛋白が証明されなかったことの意義
11. 細胞内蛋白輸送機構の一般的研究方法

これらに対する申請者の応答はおおむね適切であり、この研究のその後の進展と将来についての展望も示され、本論文が博士(医学)の学位授与に値する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 教授 白 澤 春 之

副査 教授 市 山 新 副査 教授 金 子 榮 藏

副査 助教授 梶 村 春 彦 副査 助教授 藤 井 正 子