



Title	ヒト培養腎癌細胞株、OUR-10の γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) に関する研究
Author(s)	澄川, 一英
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34892
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	澄	川	一	英
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6522	号	
学位授与の日付	昭和	59年	5月	7日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	ヒト培養腎癌細胞株, OUR-10のr-グルタミルトランスペプチダーゼ(r-GTP)に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授	大河内寿一		
	(副査) 教授	岸本	進	教授園田孝夫

論文内容の要旨

(目的)

ヒト腎細胞癌由来の培養細胞株を樹立した報告はいくつかあるが、常に問題となるのは樹立された細胞株を如何にして腎癌細胞株と同定するかということである。形態学的検討は現在のところ細胞同定の有力な手段であるが、さらに確かな同定のために生化学的マーカーの開発が望まれている。近年、腎癌組織には正常腎組織r-GTPとは電気的易動度および分子量の異なるr-GTP(腎癌特異r-GTP)が存在することが報告されている。そこで本研究は、新たに樹立されたヒト腎癌由来のOUR-10培養細胞に、この腎癌特異r-GTPと同一の性質をもつr-GTPがなお存在しているか否かを詳細に検討し、腎癌特異r-GTPがOUR-10培養細胞を腎癌細胞と同定するための有用なマーカーとなるかを明らかにすることを目的とした。

(方法)

OUR-10培養腎癌細胞、腎癌特異r-GTPをもつ腎癌組織、および正常腎組織よりbromelainにてr-GTPを可溶化後、DEAE-cellulose、Sephadex G-200を用いて部分精製し、それぞれのr-GTPの諸性質を比較検討した。

1) r-GTP活性の測定

r-GTP活性はSzaszの変法に従ってL-r-glutamyl-p-nitroanilideを基質とし、反応後遊離するp-nitroanilineを定量することにより測定した。

2) polyacrylamide gel disc電気泳動

Davisの方法に従い、7.5% polyacrylamide gelに検体を充填後、1管あたり2mAで4℃約1.5時

間泳動した。 γ -GTP活性帯の染色は宮崎らの方法に従い, *N*- γ -L-glutamyl- β -naphthylamideを基質にしておこなった。

3) Con A-Sepharoseカラムクロマトグラフィー

1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂を含む50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したCon A-Sepharoseカラム (1 × 4 cm) を用いた。溶出は 0.2 M α -methyl-D-mannoside を含む同緩衝液にておこなった。

4) 抗ヒト正常腎組織 γ -GTPモルモット抗血清の作製および抗血清を用いた検討

部分精製した正常腎組織 γ -GTP 20 μ g を含む溶液と complete Freund's adjuvant を等量混合し, モルモットに 2 週毎 3 回免疫することより抗血清を得た。抗体による活性阻害は, 一定活性にした γ -GTP 標品を稀釀抗血清と等量混合し, 4°C 24 時間後の残存活性を測定することにより検討した。

(成 績)

1) 電気泳動像

OUR-10細胞 γ -GTPの電気的易動度は, 正常腎組織 γ -GTPより速く, 腎癌特異 γ -GTPと等しかった。neuraminidase処理後, いずれの電気的易動度も処理前と比較し遅くなつたが, OUR-10細胞 γ -GTPと腎癌特異 γ -GTPは等しく, 正常腎組織 γ -GTPとはやはり差があった。

2) 至適pH, 分子量, Km値

OUR-10細胞 γ -GTPおよび腎癌特異 γ -GTPとも至適pHは 8.5, Sephadex G-200による分子量は 130,000 と等しく, glycylglycineを一定濃度とした時の L- γ -glutamyl- β -nitroanilideに対する Km値は, OUR-10細胞 γ -GTPが 1.47 mM, 腎癌特異 γ -GTPが 1.43 mMで差がみられなかった。

3) Con A-Sepharoseに対する親和性

正常腎組織 γ -GTPでは全活性の10%以下がCon A-Sepharoseに吸着されたが, 腎癌特異 γ -GTPでは約40%, OUR-10細胞 γ -GTPでは約50%が吸着された。neuraminidase処理後では, 正常腎組織 γ -GTP活性の25%, 腎癌特異 γ -GTP, OUR-10細胞 γ -GTPとも全活性の約80%が吸着した。したがつて腎癌特異 γ -GTPとOUR-10細胞 γ -GTPはCon A-Sepharoseに対する親和性が類似していることが示された。

4) その他の酵素学的性質

γ -グルタミル基アクセプターとしての各種アミノ酸の添加効果, 金属イオンやEDTAおよび阻害剤の影響, 熱安定性はいずれもOUR-10細胞 γ -GTPと腎癌特異 γ -GTPの間に差を認めなかつた。

5) 抗正常腎組織 γ -GTP抗血清に対する反応

OUR-10細胞 γ -GTP, 腎癌特異 γ -GTP, 正常腎組織 γ -GTPとも10倍希釀の抗血清で約80%の活性が阻害され, micro-Ouchterlonyの免疫拡散法では互いに融合する一本の沈降線を形成し, いずれも抗原性が等しいことが示された。

(総 括)

1) 腎癌由来の培養細胞株, OUR-10の γ -GTPは腎癌特異 γ -GTPと同一の酵素であることが示された。したがつて腎癌特異 γ -GTPは, OUR-10培養細胞を腎癌細胞株と同定する場合の有用なマーカー

となると考えられる。

2) Con A-Sepharoseに対する親和性の違いより、腎癌特異 r -GTPは、正常腎組織 r -GTPとは異なる糖鎖構造をもつことが示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒト腎癌由来のOUR-10培養細胞が母組織中に存在する腎癌特異 r -GTPと同一の酵素を保持していることを、酵素学的、免疫学的に明らかにしたものである。現在までのところ腎癌より樹立された細胞株の同定のためには、形態学的検討が唯一の手段としてとられてきたが、本研究の結果は、OUR-10培養細胞を腎癌細胞と同定するために腎癌特異 r -GTPが有用な生化学的マーカーであることを明らかにしたのみならず、今後ヒト腎癌より樹立される細胞株を腎癌細胞株と同定する場合にも、この腎癌特異 r -GTPが有用となることを示唆したものであり、価値ある研究と評価できる。