



Title	ヒト肝細胞癌株細胞HuH-7によるVitamin D結合蛋白の産生及びそのホルモン応答能
Author(s)	榮川, 隆信
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36014
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【1】

氏名・(本籍)	榮	川	隆	信
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7868	号	
学位授与の日付	昭和62年9月30日			
学位授与の要件	医学研究科内科系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	ヒト肝細胞癌株細胞HuH-7によるVitamin D結合蛋白の産生及びそのホルモン応答能			
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 進 (副査) 教授 藪内 百治 教授 大河内寿一			

論文内容の要旨

[目 的]

Vitamin D及びその代謝物の血清中の特異的結合蛋白質であるVitamin D binding protein (DBP)の産生臓器は肝臓又はリンパ球とされ、妊娠の継続につれて血清中のDBP (VDBP)濃度が増加するがこれまで産生細胞の同定及び産生のホルモン調節について、明確に示された事は無い。これらの事を、明らかにする目的で、高度に分化し様々な肝細胞機能を保ったヒト肝細胞癌組織由来の株細胞HuH-7を用いてDBPの産生とそのホルモン応答について検討した。

[方 法]

HuH-7細胞は無血清のRPMI 1640 (Na_2SeO_3 を含む)にて5% CO_2 95%大気中で維持培養し、conditioned serum free media (CSFM)を限外濾過にて濃縮した。CSFMと正常ヒト血清中のDBPを $^3\text{H}25\text{-OHD}_3$ とのbinding assayにより同定し、両者を下記の項目について比較検討を加えた。
①5-20% (w/v) 蔗糖密度勾配法にて沈降定数 ($S_{20,w}$) の測定 ②Sephadex G-150を用いたゲル濾過法による分子量 (Mr) 測定 ③Scatchard plotによる親和定数 (Ka) の測定 ④ウサギ抗ヒトDBP抗血清を用いたOuchterlony法とHirschfeld法による免疫学的検討 ⑤蔗糖密度勾配法とゲル濾過法によるDBP-actin複合体形成能の分析

また、0.1% Triton X-100を含んだ抗ヒトDBP抗血清を用いて、蛍光抗体染色法にてHuH-7細胞内のDBPの同定を行った。

HuH-7細胞を 10^5 コ/2 cm^2 wellに調整後、各種ホルモン (Insulin, Glucagon, Estradiol, Dihydrotestosterone, Triamcinolone, EGF) 添加培地を加え96時間培養し、細胞数及び培地中のDBPの

³H25-OHD₃との結合活性を検討した。

[成績]

HuH-7は、 $S_{20,w}^0=4.1S$, $Mr=58,000$, $Ka=8.4 \times 10^8 M^{-1}$ でinter- α 領域に電気泳動されVDBPと免疫学的同一性をもつDBPを産生した。VDBPは各々4.0S, $8.6 \times 10^8 M^{-1}$ であった。両者ともF-actinを解縮してG-actinと1:1結合し $S_{20,w}^0=5.5S$, $Mr=100,000$ の複合体を形成した。

蛍光抗体染色法では、HuH-7の細胞質が特異的に染色された。

Insulinは $10^{-10}M$ でDBP産生が2.5倍となり、 $10^{-11}M$ で細胞数が1.5倍となった。glucagonでは $10^{-12}M$ でDBP産生は1.7倍、 $10^{-8}M$ で細胞数は1.4倍となった。Estradiolでは $10^{-9}M$ で2.7倍の、Dihydrotestosteroneでは $10^{-11}M$ で2.6倍の、Triamcinoloneでは $10^{-9}M$ で3.1倍、EGFでは $10^{-12}g/l$ で3.1倍のDBP産生の最大の増加を認めた。これらのホルモンでは、細胞数の変化は僅かであった。

[総括]

ヒト肝細胞癌組織由来の株細胞HuH-7は、正常ヒト血清中のDBPとほぼ同一の免疫学的、生化学的性質を示すDBPを産生、分泌し、これは各種ホルモンによる応答を受ける事を示した。

論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒト血清Vitamin D結合蛋白の産生の調節と起源を明らかにするため、HuH-7細胞株(ヒト肝癌由来)を用いて検討したものである。その結果、本細胞株はVitamin D結合蛋白を産生することが明らかになり、これを精製して、ヒト血清中のVitamin D結合蛋白と比較検討を行ったところ、同一であることが確認された。さらに種々のホルモンに対する応答性についても検討を行った。これらの成績は、Vitamin D結合蛋白の産生起源と産生調節に新知見を加えたものである。