

Title	ラット α 2-macroglobulinの発現について : 特にWF系自然発生大腸癌ラットと妊娠ラットについて
Author(s)	廣田, 誠一
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36018
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	ひろ 廣	た 田	せい 誠	いち 一
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8105	号	
学位授与の日付	昭和63年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科病理系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	ラットα2-macroglobulinの発現について —特にWF系自然発生大腸癌ラットと妊娠ラットについて—			
論文審査委員	(主査) 教授	加藤 四郎		
	(副査) 教授	北村 旦	教授	谷口 直之

論文内容の要旨

〔目 的〕

本学病理学教室にて宮本らが兄妹交配にて継代維持しているWF系ラットには上行結腸癌が好発し、この担癌ラット血清中には非担癌ラットでは検出できない分子量16万（SDS-PAGE上）の蛋白（以下P16と略す）が存在することがわかっていた。本研究ではWF系自然発生大腸癌ラットにおけるP16の同定と、妊娠ラット、胎仔を含めその発現部位がどの臓器・細胞かを解明するのを目的として行った。

〔方法ならびに成績〕

1. P16に対するモノクローナル抗体及び抗血清の作製とその検定

ゲル濾過及び陰イオン交換クロマトグラフィーにて分離精製したP16をBalb/cマウス腹腔内に注射し、追加免疫後脾細胞を取り出した。Balb/cマウス由来ミエローマ株X-63とhybridomaを形成させELISA法にてスクリーニングし、陽性細胞をクローニングした。このモノクローナル抗体をCNBr-activated Sepharose 4Bに結合させたカラムを用いたaffinity chromatographyにより精製度の高いP16を得ることができた。この精製P16を家兎背部皮下に免疫を繰り返し抗血清を得、その特異性はOuchterlony法、Western blotting法にて確認した。

2. P16のcDNAのクローニング

WF系ラット自然発生大腸癌組織3gからCsCl solution法による超遠心にてtotal RNA粗分画を得た。total RNAを精製後oligo dT cellulose columnに通してmRNAを分離し、これよりcDNA libraryを作製した。ECoRIで切断後、発現ベクターλgt11に組み込み大腸菌株Y1090に感染させた。

β -D-thiogalactopyranosideを添加して蛋白を発現させ、1の抗血清を用いた酵素抗体法によるスクリーニングにて3個の陽性クローンを得、そのDNA sequenceを決定した。

3. P16の同定について

1で得られた抗血清、モノクローナル抗体を用いた免疫電気泳動によりP16は $\alpha 2$ globulin分画に位置し、2で得られたcDNA sequenceが報告されているrat $\alpha 2$ -macroglobulin (以下 $\alpha 2$ -Mと略す)のDNA sequenceとほぼ一致することから、分子量、等電点、抗ヒト $\alpha 2$ -M抗血清との交叉性等と合わせrat $\alpha 2$ -Mであることを確定した。

4. Northern blotting法によるrat $\alpha 2$ -Mの発現臓器の検討

原発大腸癌、担癌ラット肝・脾、非担癌ラット大腸・肝・脾、妊娠ラット肝・後期胎盤、炎症ラット肝、大腸癌培養細胞の1-3gを上記2と同様の方法でtotal RNA, mRNAを分離し電気泳動後nitrocellulose膜に転写し、上記2で得られたcDNAより合成した³²P labeled probeとhybridizationを行ってRNA levelでの $\alpha 2$ -Mの発現を比較した。担癌ラット肝、炎症ラット肝、妊娠ラット胎盤では強い感光がみられ、原発大腸癌、非担癌ラット肝、妊娠ラット肝では弱く、その他では感光は殆ど見られなかった。

5. 免疫組織化学的方法によるrat $\alpha 2$ -Mの発現細胞の検討

原発大腸癌、担癌ラット肝、炎症ラット肝、非担癌ラット大腸・肝、妊娠ラット肝・胎盤、胎仔肝等を1で得られた抗血清を用い酵素抗体法にて染色した。担癌ラット肝では肝細胞が散在性に強陽性を示し、炎症ラット肝では同様に細胞質が散在性に陽性を、非担癌・妊娠ラット肝では少数の肝細胞が弱陽性に、胎仔肝では肝細胞がびまん性に陽性を示した。原発大腸癌・非担癌ラット大腸では明らかな陽性所見は得られなかった。初期胎盤では多くのtrophoblastが強陽性で脱落膜細胞も全体に陽性を示し、後期胎盤では脱落膜細胞がびまん性に陽性でtrophoblastは少数が散在性に陽性を示した。

[総括]

1. WF系自然発生大腸癌ラットの血清中に存在するP16は $\alpha 2$ -Mであることが分かり、大腸癌発生のスクリーニングに利用できると共に、その発現時期・調節機構の解明に有用な系と考えられた。
2. 抗rat $\alpha 2$ -Mモノクローナル抗体を用いたaffinity chromatographyにより容易に大量のrat $\alpha 2$ -Mの精製が可能となった。
3. WF系自然発生大腸癌ラットでは、催炎症ラットと同様に肝でのmRNA及び蛋白レベルでの $\alpha 2$ -Mの発現が確認され、原発大腸癌組織においても少量ではあるがmRNAレベルでの $\alpha 2$ -Mの発現が確認された。非担癌ラット肝では少量の発現がみられ非担癌ラット大腸・脾、担癌ラット脾、培養大腸癌細胞で発現は見られなかった。
4. 妊娠ラット肝では、非担癌ラット肝と同様に少量の $\alpha 2$ -Mの発現がみられるのみで、胎盤において多量の発現がみられ、妊娠ラットの血清 $\alpha 2$ -M濃度が高いのは胎盤での合成の影響が大きいと思われる。胎盤での合成部位は初期胎盤では多くのtrophoblastと脱落膜と考えられ、後期胎盤では脱落膜が主体でtrophoblastは初期にみられるほどには産生量は多くないと考えられた。胎仔肝では免疫染色上、多量の $\alpha 2$ -Mの産生がみられた。

論文の審査結果の要旨

WF系自然発生大腸癌ラットの血清中に存在する分子量16万の蛋白はその分子量, 等電点, 免疫電気泳動, cDNA sequenceの決定により rat $\alpha 2$ -macroglobulinであることが証明された。その発現部位をNorthern blotting法, 免疫組織化学を用い mRNA および蛋白レベルで並行して検討した。担癌ラットでは肝臓がその発現の主な部位であり, 原発大腸癌組織では mRNA レベルでのみ少量の発現が確認された。妊娠ラットの肝での発現は非担癌ラットと同レベルであるが胎盤での産生が強く, 免疫組織化学的に初期では栄養芽細胞と脱落膜が強く染まり, 後期では主として脱落膜が強く染まった。また rat $\alpha 2$ -macroglobulin に対する単クローン抗体を作成し, affinity chromatography を用いて rat $\alpha 2$ -macroglobulin の精製分離が容易となった。以上の業績は実験腫瘍病理学上有用であり, よって学位論文に値すると考える。