The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 抗Gc蛋白 (Vitamin D binding protein) 家兎抗体によるヒトNK細胞活性抑制に関する検討 |
| Author(s) | 副島, 鉄子 |
| Citation | 大阪大学, 1989, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/36046 |
| 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

【41】

| | |
|---|---|
| 氏名・(本籍) | 副島鉄子（そえじまてつこ） |
| 学位の種類 | 医学博士 |
| 学位記番号 | 第 8611 号 |
| 学位授与の日付 | 平成元年3月24日 |
| 学位授与の要件 | 医学研究科内科系専攻<br>学位規則第5条第1項該当 |
| 学位論文題目 | **抗Gc蛋白（Vitamin D binding protein）家兎抗体によるヒトNK細胞活性抑制に関する検討** |
| 論文審査委員 | (主査)<br>教授 木谷 照夫<br>(副査)<br>教授 垂井清一郎　教授 藤尾 啓 |

## 論文内容の要旨

〔目　的〕

Group specific component protein（以下Gc）は正常ヒト血漿中の$\alpha_2$グロブリン分画に存在する分子量56,000の蛋白で，血漿中のビタミンD及びその代謝物のcarrier proteinとして働いていることが知られていたが，近年このGcがActin結合性を有することや，ヒト末梢単核細胞中のB細胞表面に存在することが明らかとなり，細胞機能との関連においても注目をあびつつある。我々は，抗ヒトGc家兎抗体を作成し，正常ヒト末梢単核球について検討を行ったところ，このGc家兎抗体を作成し，正常ヒト末梢単核球について検討を行ったところ，このGcがLeu11陽性分画のNK細胞膜表面にも存在していることを見出した。そこでこの抗Gc抗体のNK細胞活性に与える影響について今回検討を加えた。

〔方法ならびに成績〕

1. 抗Gc抗体の作成：ヒト血清中より分離したGc（阪大法医：木村博士より分与）をcomplete freund adjuvandと混じ家兎に1ケ月間隔で2度免疫，採血し，56℃30分で非働化した。Ig分画は抗血清を硫安塩析した後，抗家兎Igセファロースを用いた親和性クロマトグラフィー法で抽出した。作成した抗Gc抗体はオクタロニー法及び免疫電気泳動法でGc蛋白と特異的に反応した。

2. NK-effector cellの作成法とcytotoxic assay：健常成人5人よりヘパリン採血した末梢血液に10% v/vのKAC2を加え10分毎に撹拌しながら37℃，1時間培養しmonocytesを除去後，Ficoll-Paque比重遠沈法で単核球を分離した。さらにplastic culture dishにて37℃，1時間培養し付着細胞を除去した後，得られたリンパ球を$1\times10^7$/mlで使用した。cytotoxic assayは型通り$^{51}$Cr release法で行い，target cellはK562細胞とMolt-4細胞を用い，E：T ratioは15：1と30：1で

行った。

3. 抗Gc抗体のNK細胞活性に及ぼす影響の検討：抗Gc抗体とそのIg分画をeffector細胞$1\times10^7$／mlに対して種々の量で加え，37℃45分間反応させた後，Hanks solutionで3回洗浄した後4時間後のNK活性を測定した。対照群としては5羽の正常家兎血清（NRS）とそのIg分画について添加濃度を変えて反応させた。また抗体による非特異的なNK細胞活性の抑制について検討する為にLeu 11b抗体を添加してNK活性を測定した。抗Gc抗体ならびにそのIg分画は著明にNK活性を抑制し，添加濃度とNK細胞活性抑制の間には濃度依存性が認められた。抗血清10μl／ml添加時に抑制率は最大となり，69.3％の抑制率，抗GcのIg分画では90μg／ml添加時に61.4％の抑制率を示した。NRS及びそのIg分画，Leu 11b MoAbによるNK細胞活性の有意な抑制は認められなかった。

抗Gc抗体の反応時間とNK細胞活性の相関を検討する為に抗Gc抗体添加後37℃，45分，24時間，48時間培養した後にNK細胞活性を測定したがいずれも抑制率は変らなかった。また抗Gc抗体反応後に洗浄したeffector細胞を24時間，48時間培養した後にNK細胞活性を測定したところ，4時間後に比べそれぞれ11.4％，55.1％，抑制は回復し，抗Gc抗体によるNK細胞活性抑制は可逆性であった。

4. NK細胞活性抑制が抗Gc抗体による特異的な影響によるのかどうかを検討する為にpurified Gc proteinを各種量で添加した後，抗Gc抗体を作用させ洗浄しNK細胞を測定したところ，NK細胞活性の抑制効果はGcの添加濃度依存性に阻害され，25μg／mlのGc添加時において抑制は50％阻害された。以上よりNK細胞活性の抑制は抗Gc抗体による特異的作用であることが示された。

5. 抗Gc抗体のeffector細胞とtarget細胞の結合に及ぼす影響の検討：抗Gc抗体で処理したeffector細胞と未処理effector細胞，各々$1.0\times10^6$／mlとtarget細胞（K562，Molt−4）各々$1.0\times10^6$／mlを混合し37℃で5分間培養後，500Gで5分間遠沈，細胞を緩やかにピペッティングし結合細胞の割合を計測した。K562，Molt−4いずれのtarget細胞に対しても抗Gc処理によるeffector細胞の結合率の差は認められなかった。

〔総　括〕

NK細胞膜表面に存在するGc蛋白に対する抗Gc抗体がNK細胞機能の発現に関与していることが明らかとなった。

抗Gc抗体はヒトNK細胞活性を著明に抑制し，この抑制作用は非特異的な反応ではなくGcに特異的なものであることが示された。抗Gc抗体がNK−effector cellとtarget cellの結合には影響を与えないことより，抗Gc抗体が，NK細胞障害機構におけるeffector−target結合以後の段階で関与していることが示された。

## 論文の審査結果の要旨

本研究はリンパ球表面のGc蛋白と細胞機能との関係を抗ヒトGc家兎抗体を用いて検討したものである。その結果，ヒトリンパ球ではB細胞の他にLeu11陽性分画のNK細胞表面にもGcが表現していることを

見出した。その抗体処理によりNK機能は著明に抑制され，特異的かつ可逆的であった。またこの抑制はNK細胞障害機構におけるNK effector-target 結合以後の段階で関与することを明らかにした。このことは，ビタミンD及びアクチン結合性を有するGcがNK機能発現に重要な役割を果していることを示唆するものである。

故に，本論文は血液学・腫瘍学上有意義な研究であり，学位に値すると考える。