

Title	抗Gc蛋白 (Vitamin D binding protein) 家兔抗体によるヒトNK細胞活性抑制に関する検討
Author(s)	副島, 鉄子
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36046">https://hdl.handle.net/11094/36046</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 【41】

氏名・(本籍)	そえ	じま	てつ	こ
	副	島	鉄	子
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 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) 教授	木谷 照夫		
	(副査) 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ヶ月間隔で2度免疫、採血し、56℃30分で非働化した。Ig分画は抗血清を硫酸塩析した後、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分毎に攪拌しながら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 $1 \times 10^7$ /mlで使用した。cytotoxic assayは型通り $^{51}\text{Cr}$  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 $1 \times 10^7$ /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 $10 \mu\text{l}/\text{ml}$ 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 $90 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $1.0 \times 10^6$ /mlとtarget細胞（K562, Molt-4）各々 $1.0 \times 10^6$ /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。