

Title	N-グリコリルノイラミン酸を有するヒト腫瘍関連 Hanganutz iu-Deicher 抗原糖蛋白質の解析
Author(s)	福井, 幸夫
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36553
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 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【68】

氏名・(本籍)	ふく 福	い 井	ゆき 幸	お 夫
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8502	号	
学位授与の日付	平成元年3月10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	N-グリコリルノイラミン酸を有するヒト腫瘍関連Hanganutziu -Deicher 抗原糖蛋白質の解析			
論文審査委員	(主査)			
	教授 加藤 四郎			
	(副査)			
	教授 濱岡 利之 教授 谷口 直之			

論文内容の要旨

〔目 的〕

異好性抗原のひとつである Hanganutziu-Deicher (HD) 抗原は、N-グリコリルノイラミン酸を抗原決定基とする複合糖質であり、正常なヒトとニワトリに欠損している。しかしながら、ヒトおよびニワトリの細胞の腫瘍化に伴って糖脂質型のHD抗原が細胞表面に出現することを私達は明らかにしてきた。ところが、膜蛍光抗体法(MIF)の陽性率と糖脂質型HD抗原の検出率との間に差があることから、糖蛋白型HD抗原の存在が示唆された。本研究は、ヒト腫瘍細胞株および腫瘍組織における糖蛋白型HD抗原の検出、解析を目的としたものである。

〔方 法〕

腫瘍細胞株：ヒト胃癌細胞株NUGC4は、無血清培地セルグロッサーH(目黒研)を用いて9ヶ月以上培養した。

腫瘍組織：ヒト奇形腫組織に0.5%NP-40のPBS溶液を加えて、1分間超音波処理の後、10,000xg、10分間遠沈し、その上清を採取した。

MIF：NUGC4の生細胞(1x10⁶個)に一次抗体としてアフィニティ精製ニワトリHD抗体、または対照として正常ニワトリ血清を反応させた(37℃、30min)。次に二次抗体としてFITC結合抗ニワトリIgG抗体(Cappel)を反応させた(37℃、30min)。

Flow cytometry：MIFと同様に処理した細胞を、FACS_{scan}(Becton-Dickinson)を用いて蛍光陽性細胞の比率を測定した。

NUGC4の[³⁵S]-メチオニンmetabolic labelingと免疫沈降、SDS-PAGE：2x10⁶個

のNUGC4細胞を50 μ Ciの [35 S]-メチオニンで、8時間、標識を行なった。その後、細胞ペレットを集めRIPA bufferに可溶化の後、10,000 xg, 30 minの超遠心により上清を得た。この上清にアフィニティ精製ニワトリHD抗体、または正常ニワトリ血清を添加し反応させた(4°C, overnight)。次にウサギ抗ニワトリIgGを反応(室温1hr)させ、続いてProtein A-Sepharose CL-4Bを反応させた(室温1hr)。反応後、数回RIPA bufferで洗浄した。沈降物にSDS-sample bufferを添加、可溶化の後、Laemmliの方法によりSDS-PAGEを行ない、続いてautoradiography (ARG)を実施した。

Western blottingと免疫染色：Towbinの方法に準じて泳動後のゲルをニトロセルロース膜へ転写し、peroxidase法またはalkaline phosphatase-Streptavidin complex (ABC-AP)法により免疫染色を行なった。

HPLC分析：ヒト奇形腫のNP-40抽出液を、ゲルろ過カラムTSK-G3000SWを用いてPBSにより溶出し、UV280nmで検出、かつ分取を行なった。

〔成 績〕

1. NUGC4のMIFにおいては、細胞の周囲にリング状の蛍光を認め、全細胞の約6%が陽性であった。
2. NUGC4の [35 S]-メチオニン標識に続き、SDS-PAGE (還元条件下)、ARGの実施により、主に分子量90, 70, 65, 60, 40 kdのバンドが認められた。
3. ABC-AP法によるNUGC4のHD抗原の解析において、免疫沈降物と等しい分子量を持つそれぞれのバンドを認めた。またsampleをneuraminidase処理することにより、それらのバンドが消失した。
4. 奇形腫のNP-40抽出液をimmunoblot (peroxidase染色) することにより、90, 55, 30 kdのバンドを検出した。またHPLC分析においては、fraction 22, 33にHD抗原陽性を認め、それらのimmunoblottingでは、それぞれ上記に対応する90, 55 kdのバンドを確認した。なお、前もってsampleをneuraminidaseあるいはN-glycanaseで処理することによって両バンドは消失した。

〔総 括〕

ヒト腫瘍細胞株NUGC4および奇形腫組織において、糖脂質型ではなく糖蛋白型のHD抗原の存在を認めた。さらに奇形腫におけるこの糖蛋白質はN-glycanaseによって、そのHD抗原性を喪失することから、アスパラギン結合型糖鎖の存在と、その非還元末端のN-グリコシルノイラミン酸に抗原性の担われていることが確認された。このようにヒト腫瘍組織には、糖蛋白型HD抗原が、糖脂質型とともに (and/or) 発現されるものが存在すると考えられる。

論文の審査結果の要旨

Hanganutziu-Deicher (HD) 抗原は、N-グリコシルノイラミン酸を抗原決定基とする糖脂質と

して同定され、多くの動物種に広範に存在するが、ヒトおよびニワトリの正常個体には認められていない。

近年、HD 抗原がニワトリのマレック病腫瘍細胞ならびにヒト腫瘍細胞の細胞表面に発現することが示された。

本研究は、培養ヒト胃癌細胞株 NUGC4 および奇形腫組織において、糖蛋白型の HD 抗原の存在することを初めて見出したものである。癌の免疫学的性格に関する研究に重要な知見を加えたものであり、博士論文に値するものと考える。