

| | |
|--------------|---|
| Title | 器壁接着・伸展能(Spreading)を有する形質細胞腫株FR4dsの樹立とそのSpreading機序の検討 |
| Author(s) | 服部, 英喜 |
| Citation | |
| Issue Date | |
| Text Version | ETD |
| URL | https://doi.org/10.11501/3065836 |
| DOI | 10.11501/3065836 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

| | |
|------------|--|
| 氏名 | はっ どり ひで き 服 部 英 喜 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) |
| 学位記番号 | 第 1 0 6 6 4 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 5 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科内科系専攻 |
| 学位論文名 | 器壁接着・伸展能 (Spreading) を有する形質細胞腫株 FR 4 ds の樹立とその Spreading 機序の検討 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 木谷 照夫 (副査) 教授 濱岡 利之 教授 北村 幸彦 |

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

新鮮或は株化形質細胞は通常浮遊状態にあり、一部に接着・伸展 Spreading (SP) 形態を呈する細胞のあることが知られている。今回私はアミラーゼ産生能を有し、フィブロネクチン (FN) によって SP が誘導される形質細胞腫株 FR 4 ds を樹立した。さらに骨髓腫白血化末梢血由来の骨髓腫細胞株 OPM-1 の培養を続けている間に、SP 形態を呈する亜株 OPM-1 ds を得た。これら 3 株を用い、FN 誘導 SP 機序について検討した。

(方法ならびに結果)

1) 細胞表面形質: FR 4 ds, OPM-1, OPM-1 ds のすべて VLA- β 1 および α 4 陽性であった。一方、 α 5 は FR 4 ds では陽性、OPM-1, OPM-1 ds では陰性の点が異なっていた。SP 能に差のある OPM-1 と OPM-1 ds の間には違いは認められなかった。

2) SP 能の検討: FR 4 ds, OPM-1 ds とともに FN 添加により濃度依存症に SP の発現がみられ、ともに FN 160 μ g/ml でプラトーに達し、VLA- α 5 陽性の FR 4 ds の方がより高率に誘導された。さらに FR 4 ds および OPM-1 ds の FN 誘導 SP において、抗 VLA 抗体を添加し SP 発現抑制の有無を検討した。両細胞株ともに α 4 抗体により SP 形成が抑制された。

OPM-1 ds においては α 5 の関与はなかったが、FR 4 ds にて単独では SP 抑制のない α 5 抗体を α 4 抗体と同時に添加すると、SP は完全に抑制され FN 誘導 SP における α 5 の α 4 補助作用が明らかとなった。

3) Western blot 法による FN 産生の検討: 抗 FN 8-12 抗体を用いて検討したところ、OPM-1 ds にのみ通常より短い 160kd の FN 産生を認め、FR 4 ds および OPM-1 では FN 産生は見られなかった。

4) ヒト血清アルブミンおよびヒト血清による SP 阻害: FR 4 ds および OPM-1 ds とともにアルブミンにより FN 誘導 SP が濃度依存性に抑制され、境界点はそれぞれ、1.5 g/dl, 0.5 g/dl のところにあった。つぎに生体において血液中での状態を知るため、血清濃度を変えて培養すると、無血清状態では両株とも浮遊状態にあったが、10% 血清にて最大の SP を示し以後漸減し 100% 血清では浮遊状態となり、可逆的に二形態を取り得た。HeLa 細胞、中皮腫細胞では常に SP、逆に OPM-1, ヒト末梢血リンパ球では常に浮遊していた。

5) FR 4 ds の SP におけるセカンドメッセンジャーの関与: FN シグナル伝達を担うセカンドメッセンジャーの関与を明らかにすべく以下の実験を行った。C キナーゼ (PKC) に関しては阻害剤 H-7, それと対比する阻害剤 HA10

04を用い、スタウロスポリン、スフィンゴシンについても検索を行った。さらにTPAあるいはTPAにCaイオノフォアを加えPKC活性増強を図り、SPが誘導されるかを観察した。その結果SP形成はH-7、スタウロスポリン、スフィンゴシンで抑制されたが、TPAを添加した系では誘導されず、さらにPKCアッセイの成績からも関与は否定された。またH-7は他にカルモジュリン(CaM)キナーゼも抑制するためにその阻害剤W-7により抑制されたがカルミダゾリウムでは抑制みられず、関与は否定的であった。さらにチロシンキナーゼに関してハービマイシンAおよびST638はともにSP抑制みられず関与は否定的であった。したがってセカンドメッセンジャーの関与はPKC、CaMキナーゼ以外でH-7、W-7等によりSP阻害のみられる系と考えられる。またサイトカラシンBによりSP抑制みられ、アクチン繊維の関与が示唆された。

6) FR 4 dsにおける免疫グロブリン(IgA)産生能: 10%FCS/RPMI1640培養下では細胞増殖とともにIgAの分泌が認められた。一方無血清培地にFNを添加しても、IgA産生が誘導された。

7) FR 4 dsの細胞周期: 接着細胞では浮遊細胞に比し、S期および(G2+M)期にある細胞が約1.5倍多くSP形成による細胞増殖の促進がみられた。

(総括)

1. VLA-5+のFR 4 dsの方が、VLA-5-のOPM-1 dsに比しFN感受性が高度であり、SPがより誘導された。
2. FR 4 ds, OPM-1 dsとせにFNおよびアルブミン濃度により浮遊、SPの二形態を可逆的にとるという新知見が得られた。
3. FR 4 dsのFN誘導SP形成のシグナル伝達機序においてPKC, CaMキナーゼ, チロシンキナーゼの関与は否定的であった。また、アクチン繊維の関与が示唆された。
4. FR 4 dsにおけるSP形成刺激により、免疫グロブリン産生および細胞増殖の促進がみられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は器壁接着・伸展[Spreading (SP)]形態を呈する形質細胞腫株FR 4 dsを中心に、骨髄腫細胞株OPM-1, SP形態をとるその亜株OPM-1 dsの3株を用い、SP機序ならびに形質細胞の機能発現におけるSP形式の意義について検討したものである。

まずこれらの細胞のSPがフィブロネクチン(FN)によって誘導されることを明らかにした。従来形質細胞ならびにB細胞の接着に関与するFNレセプターはびらVLA-4のみとされていた。しかしVLA-5-のOPM-1 dsを比べると前者はよりFN感受性が高く、SPがより効率に誘導され、しかも接着・SP発現の際VLA-5もVLA-4と協同作用をすることが初めて明らかとなった。またこれらの細胞のSPはアルブミンにより濃度依存性に抑制され、FNおよびアルブミン濃度により可逆的に浮遊、SPの2形態をとり、さらにSP形成刺激は形質細胞の増殖、免疫グロブリン産生の増強をもたらすことが明らかとなった。

これらの成績は形質細胞腫瘍の腫瘍細胞の生体内における移動と増殖の場を考える上で示唆に富む成績であり、学位に値するものとする。