



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	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3065836
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	はつ 服 部 英 喜
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 10664 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FR4ds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FR4ds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-1ds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：FR4ds, OPM-1, OPM-1ds のすべて VLA- β 1 および α 4 陽性であった。一方、 α 5 は FR4ds では陽性、OPM-1, OPM-1ds では陰性の点が異なっていた。SP能に差のある OPM-1 と OPM-1ds の間には違いは認められなかった。

2) SP能の検討：FR4ds, OPM-1ds ともに FN 添加により濃度依存性に 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 FR4ds の方がより高率に誘導された。さらに FR4ds および OPM-1ds 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-1dsにおいては α 5 の関与はなかったが、FR4ds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-1ds にのみ通常より短い 160kd の FN 産生を認め、FR4ds 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：FR4ds および OPM-1ds 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) FR4ds 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、スタウロスボリン、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、スタウロスボリン、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、アクチン纖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、アクチン纖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細胞の接着に関するFNレセプターは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考える。