



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

主論文

①

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

Establishment of Plasmacytoma Cell Line, FR4ds Having

Features of Adhesion and Spreading

and Mechanism of the Spreading

大阪大学医学部血液腫瘍内科学

(微生物病研究所付属病院臨床部門内科)

Dept. of Internal Medicine., Clinical Hematology

and Oncology, Osaka Univ. Med. School

(Division of Internal Medicine., Dept. of Clinical

Research, Research Institute for Microbial Diseases,

Osaka Univ.)

服部 英喜 Hideki Hattori

(主任 木谷 照夫教授)

Key Word: fibronectin, FR4, integrin family, multiple
myeloma, plasma cell, spreading,

和文抄録

私は接着・伸展[Spreading(SP)]を呈する形質細胞腫FR4dsを樹立した。さらに骨髓腫白血化末梢血由来のOPM-1を培養している間に、SP形態を呈する亜株OPM-1dsを得た。本研究はこれら3株を用いSPの機序およびSP形態の細胞生物学的意義について検討したものである。FR4dsおよびOPM-1dsのSPはフィブロネクチン(FN)により特異的に誘導され、アルブミンの濃度依存性に抑制された。すなわち形質細胞はFNおよび血清アルブミン濃度により、浮遊、SPの二形態を可逆的に取り得る細胞であることをみいだした。さらにFN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、FNは形質細胞に働き液性免疫の増強を促すことが明らかとなった。

英文抄録

I established plasmacytoma cell line, FR4ds, which had a feature of spreading(SP). During the cultivation of OPM-1 established from peripheral blood of a patient with multiple myeloma who underwent leukemic change, I established subline, OPM-1ds which had the feature of SP. In this study, I investigated mechanism of SP and cell biological significance of SP using these three human plasma cell lines. FR4ds and OPM-1ds showed SP when they were cultivated with serum free medium containing fibronectin(FN). In contrast, serum albumin blocked the effects of FN. These results indicate that plasma cells may be floating in peripheral blood containing abundant albumin and they show SP in tissue containing low concentration of albumin. As FN enhanced immunoglobulin production and cell proliferation of plasma cells, it is concluded that FN enhance the humoral immunity.

緒言

繊維芽細胞や癌細胞の細胞外基質 extracellular matrix (ECM)への接着 adhesionならびに接着伸展 spreading (SP)は細胞の生存、増殖、及び癌細胞では転移機序とも深く関わりあっていることから、その細胞生物学的意義が注目されている。またECMにもフィブロネクチン(FN)、ラミニン、コラーゲン等があり、そのそれぞれの役割の相違についても多くの報告がある。

一方、浮遊性に特徴のある血液細胞、特にリンパ球はリンパ組織内で生育した後に、流血中に出現するが、組織への親和性と流血中での浮遊性がいかに制御されているかについては不明である。株化血液細胞も通常浮遊状態にあり、一部のものでは、TPAなどの刺激があれば、接着・SPするようになるが、無刺激ではほとんどのものは浮遊性である。

形質細胞 plasma cell(PC)は、B細胞分化の最終段階に位置する細胞で、免疫グロブリン産生を担当するところから液性免疫担当細胞と位置付けされている。このPCの腫瘍性増殖疾患は興味深いことに多発性骨髄腫 multiple myeloma(MM)と形質細胞性白血病 plasma cell leukemia

(PCL)、形質細胞腫 plasmacytoma の異なった三種の臨床病態を示すことが知られているが、その原因は明かでない。

正常PC分画中及びMMの症例でPCがSP形態を呈するものがある事は、1978年Polliackらの報告以来幾つかの報告があった¹⁾²⁾。また、PCは通常末梢血中や組織中ではまれに存在する分画であるが、ある種の感染症等の病的状態において、流血中や組織内で増加することが知られている。しかし、いかにして流血中の浮遊状態と組織での接着状態を使い分けているかが不明であった。SPを呈するPCの詳細なる検討は、一つは健常PCが分離し難いこと、二つ目には腫瘍化PC株でSP形態を呈するものが希少であるという二つの難点があつて、今まで行われていないのが現状である。

今回私は、形質細胞腫患者腹水より、器壁接着・SP能を有するという形質細胞腫株ではいまだかつて報告のないFR4dsを分離した。さらに片桐らが骨髓腫白血化末梢血より樹立したOPM-1³⁾を譲り受け、フラスコを変えず培養したところSP形態を呈する亜株を得た。これをOPM-1dsと名付けた。そこで本研究はFR4dsの研究を端緒にOPM-1およびOPM-1dsを適宜用い

ることにより、SP形成機序を明かにし、その知見を基にPCはいかにして浮遊状態と接着・SP状態を使い分けするか解明する事を意図とした。さらにSP形態を呈する事で、PCの機能発現上に変化がみられるかという細胞生物学的意義についても検討した。

方法

1) 細胞および培養法：形質細胞腫患者腹水細胞由来のアミラーゼおよびIgA産生能を有する細胞株FR4と骨髄腫白血化細胞由来のOPM-1の樹立に関してはそれぞれ報告した通りである³⁾⁴⁾。FR4、OPM-1の培養は25cm²プラスチックフラスコ(Corning Iwaki Glass, Tokyo)底にて、10% FCS/RPMIを用い、37°C 5% CO²培養器でおこなった。

2) 細胞表面マーカー：FACSscan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) を用いて行った。CD38、PCA-1、cIg、sIg またFNレセプターであるCD29 (VLA-β1)⁵⁾、CDw49d (VLA-α4)⁶⁾、CDw49e (VLA-α5)⁶⁾、および表面FNの発現について検索した。モノクローナル抗体はCD38は

Becton Dickinson Co., Sunnyvale, CA、PCA-1 および CD29 は Coulter Co., Hialeah, FL、CDw49 は双方共に immunotech S.A., Marseille, FL を用い、FN の検索は抗 FN8-12 抗体 および 抗 12-8 抗体⁷⁾ (Takarashuzou, Kyoto) を用いた。このうち CD38 のみ直接法、それ以外のものは間接法を用い二次抗体として FITC-conjugated goat antimouse IgG (Cappel Laboratories, Cochranville, PA) を用いた。

3) 染色体分析: FR4ds 細胞につき G-band にて検索した⁸⁾。

4) 器壁 SP 能についての検討: プラスチックフラスコ底に接着伸展している FR4ds、OPM-1ds をそれぞれ Cell scraper にて剥し Hanks balanced saline solution (HBSS) にて 3 回洗浄後、無血清培地 Cosmedium (COSM) (Cosmo Bio, Tokyo) を用い、細胞数 100/ μ l となるように 24 穴マイクロタイタープレート (Corning) に再浮遊させた。各 well に精製 FN (Cosmo Bio) を 40、80、160、320 μ g/ml の最終濃度となるように添加培養し、漸次 SP のみられる細胞数を倒立顕微鏡下にて測定した。FN 添加実験の対照として、無添加 (COSM のみで FN

(一)) のものを一つの対照としてとった。さらに、走査型電子顕微鏡 (Hitachi HSM-2A型、Tokyo) により S P 形態を観察した⁹⁾。また S P のみられない O P M - 1 についても同様に F N 160 μ g/ml を添加して S P が誘導されるかを検索した。

5) F N レセプター抗体による S P 阻害: F N レセプターである V L A インテグリンに対するモノクローナル抗体 β 1 m A b (Coulter)、 α 4 m A b (Immunotech)、 α 5 m A b (Immunotech) の F N 誘導 S P に対する最大阻止は予備実験にて濃度 5 ng/ μ l であることが判明したので、それぞれ最大阻止濃度にて F N と同時に添加し F R 4 d s および O P M - 1 d s の S P の阻害がそれぞれみられるかを検索した。対照実験として F N + I g G 1、I g G 2 をそれぞれ β 1、 α 4 m A b および α 5 m A b の species-matched antibody として用いた。

6) 接着能についての検討: 倒立顕微鏡下においては S P 細胞が接着していることは明らかとして、その他の細胞は浮遊しているのか接着しているのか不明瞭なものがあるため、実際の S P 細胞の%が接着細胞の%と一致するのかが明らかでなかった。そこで以下の実験を行った。F R 4

d s を 96 穴 マイクロタイタープレート (Corning) に再浮遊させた後、 $160 \mu\text{g/ml}$ の FN を添加または FN 無添加の well に $[^3\text{H}]$ チミジンを 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で 5 時間ラベルした¹⁰⁾。培養後上澄を 3 回緩くピペッティングして浮遊してきた細胞を他の well に移し換え、 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み分の放射活性を測定し、接着率を算出した。

接着率 =

接着細胞の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み (CPM)

浮遊細胞および接着細胞の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み (CPM)

残存接着細胞の取り込みは、トリプシン処理にて細胞を剥し測定した。予備実験で 3 回ピペッティングは、接着率を測定するのに至適である事を確認している。またそれぞれの well に $\beta 1\text{mAb}$ 、 $\alpha 4\text{mAb}$ 、 $\alpha 5\text{mAb}$ を $5\text{ng}/\mu\text{l}$ となるように添加し、接着能の変化を検討した。組織培養に汎用されているこのマイクロタイタープレートは、非特異的接着が起こるように加工されているので¹¹⁾、無血清培地 COSM のみの FN 非添加のものを一つの対照としてとり、FN 因子非依存性の接着現象を観察した。さらに SP 能の

検討の時同様 F N + I g G を抗体 block の対照としてとつた。

7) 抗 F N 抗体による western blotting: F N 産生が F R 4 d s、O P M - 1 および O P M - 1 d s において行われているかみるために抗 F N 8 - 1 2 抗体を用い、細胞を可溶化し western blot 法で検索した。Positive control として精製 F N および繊維芽細胞 N I H 3 T 3 を用いた。

Laemmli's SDS/PAGE sample buffer¹²⁾にて細胞を可溶化し、5% polyacrylamide gelにて電気泳動したあと polyvinylidene difluoride 膜 (商品名イモビロン)

(Millipore, Massachusetts, USA) に転写した。F N は抗 F N 8 - 1 2 抗体および ¹²⁵I 標識二次抗体にて検出した。

8) 血清中における S P 抑制物質の検索

a ヒト血清アルブミンによる S P の抑制: F R 4 d s および O P M - 1 d s にて 160 μ g/ml F N 含有 C O S M の培養液を用い、それぞれにヒト血清アルブミン (H S A) (Sigma Chem Co., St Louis, USA) を濃度別に添加していき、24 時間培養後 S P 細胞を測定した。

b ヒト血清による S P の抑制: ヒト血清を 10、25、50、100% と、それぞれ C O S M にて希釈したものを培地にし

て、FR4dsおよびOPM-1dsをそれぞれ再浮遊させた。24時間培養後、それぞれの培地におけるSP細胞の%を測定した。対照にSP細胞の代表としてHela細胞株および中皮腫細胞株の細胞を用い、さらに浮遊細胞としてOPM-1、ヒト末梢血リンパ球(PBL)を用い同様の実験を行った。

9) SPにおけるリン酸化反応の関与について

a 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 添加：プロテインキナーゼC(PKC)活性化作用を有することで知られるTPA¹³⁾(Sigma)を無血清培地COSMに再浮遊しているFR4dsに濃度別(1-100 μ M)に添加していきSPが誘導されるや否かを検討した。

さらに、細胞内Ca濃度を上昇させる事が知られているCaイオノフォア、A23187(Sigma)¹⁴⁾をTPAと共に添加してCaイオン流入とPKCでSPにおけるFNの代償が可能かを検索した。

b PKCアッセイ：培養フラスコに接着伸展しているFR4dsをcell scraperにて剥し取り、HBSSにて3回洗浄した後、10%FCS/RPMI 1640にて1時間培養し、SP形態をとりだしている際の細胞にてPKCアッセ

イを行った¹⁵⁾。FR4dS1*10⁷を5mM 2-MEを含むbuffer A (20mM Tris PH7.5、2mM EDTA、5mM EGTA、2mM PMSF) にsuspendする。sonicationにて細胞を破壊した後ホモジネートを100,000gで60分4°Cで超遠心し上清をcytosol分画とした。pelletをbuffer Aにsuspendし、sonicationを行った後、10% NP-40を加えて60分氷上で培養し細胞膜成分を抽出した。100,000gで60分4°Cで超遠心し上清をparticulate分画とした。サンプルが準備できたところでアッセイシステムキット (Amersham International plc., Buckinghamshire, Engl) を用いて、PKCの活性を測定した。測定原理は[γ -³²P]ATPからPKCに特異性の高い合成基質ペプチドにトランスファーしたPのモル数を酵素活性として表すことによる。

C 各キナーゼ阻害剤によるSP形成の変化：FNにてSPが誘導される系に種々のキナーゼ阻害剤を至適濃度にて添加し、それぞれのキナーゼの関与を調べた。PKC、A、Gキナーゼおよびカルモジュリン (CaM) キナーゼを抑制するといわれるH-7 (Seikagaku Kogyo, Tokyo)¹⁶⁾、PKC阻害弱くPKCの関与をみる上でH-7のコントロールとして常用されるHA1004 (Seikagaku Kogyo)

¹⁷⁾にてまず検討した。ついで、P K C、Aキナーゼおよび p 60^{v-src}チロシンキナーゼを抑制することで知られるスタウロスポリン (Kyowa Hakko, Tokyo) ¹⁸⁾、P K C、C a Mキナーゼと拮抗作用のあるスフィンゴシン (Sigma) ¹⁹⁾を添加してみた。さらにC a Mキナーゼ阻害剤であるW-7 (Sigma) ²⁰⁾²¹⁾、カルミダゾリウム (Sigma) ²¹⁾、種々のチロシンキナーゼ阻害剤であるハービマイシン A (Wako chemicals, Osaka) ²²⁾およびS T 638²³⁾²⁴⁾のF N誘導S Pにおける影響をみてみた。またW-7濃度別(10、25、50、100 μ M)に添加した後V L A-β 1レセプターの細胞表面マーカーの発現量の変化を検索した。

10) S Pにおける細胞骨格についての検討：F NによってS Pが達成される系に微小管重合阻害剤であるコルヒチン (Sigma) ²⁵⁾、アクチン繊維阻害剤のサイトカラシン B (Sigma) ²⁶⁾をそれぞれ至適濃度にて処理し、いずれが関与しているかを調べた。

11) F R 4 d sにおけるS Pの細胞生物学的意義：S Pの細胞生物学的意義を明かにするためにF N添加時の細胞周期及びI g A、アミラーゼ産生の測定を行った。

a F R 4 d sにおける浮遊および接着細胞の細胞周

期：F R 4 d s 培養中のフラスコから、培養液交換直前の培養液を集め、その中の細胞を浮遊細胞とする。また培養フラスコに接着・伸展していたF R 4 d s を cell scraper にて剥しとり、剥しとった細胞を接着細胞とする。両細胞の細胞周期は、フローサイトメトリーを利用し、G 1、S および (G 2 + M) 期の細胞集団の分布を調べることにより、解析した²⁷⁾。

b I g A およびアミラーゼ産生：200細胞/ μ l の F R 4 d s をマイクロタイタープレート (12穴、Corning) にて3日間培養した。培養液は10% F C S / R P M I 1640、160 μ g/ml の F N を含有した C O S M または C O S M のみ、の計3種類を用い、各日ごとに培養上澄を集め-20°C で保存した。凍結上澄中の I g A は ELISA法にて測定し、アミラーゼについても F R 4 同様酵素法にて検討した³⁾。

結果

1) F R 4 d s および O P M - 1 d s の分離：F R 4 の系代培養中 S P 形態を呈する株に変換したので F R 4 d s と名付けた。O P M - 1³⁾ について培養フラスコを換えずに培養液のみの交換を3カ月間行っていたところ F R 4 d s

よりは少数のSP細胞のみられるOPM-1dsに変換した。

2) 細胞表面マーカー：表面形質の結果をTable 1に示した。FR4dsはFR4同様の表面形質、細胞内IgA κ の存在を示した。FR4dsおよびOPM-1dsともにそれぞれPCA-1 57.3%、99.9%、CD38 73.6%、99.0%、Intracytoplasmic IgとしてIgA κ 100%、IgG λ 100%とPCとしての性格を有していた。VLAレセプターの表現を調べると、FR4dsは β 1 74.7%、 α 4 78.5%、 α 5 78.6%とFNに関するレセプターすべて陽性であったが、OPM-1およびOPM-1dsは β 1 α 4の発現はみられたものの、 α 5はそれぞれ3.9%、6.9%と陰性であった点がFR4dsとの大きな差異であった。SP能に差のあるOPM-1およびOPM-1dsの間には変化はみられなかった。細胞表面FNはFR4ds、OPM-1dsでそれぞれFN8-12 15.0%、2.5%、FN12-8 35.5%、4.6%であった。

3) 染色体分析： Table 2に示すごとくFR4dsは親株FR4同様 t(8;14)(q24.1;q32)の染色体異常が保持されていた。

4) SP性: FR4dsおよびOPM-1ds共にSPは無血清培地COSMに再浮遊時には認められなかった。しかしながら、FNを濃度別に添加していくことによりSPが出現した(Figure 1)。SPはOPM-1dsに比し、FR4dsにおいてより多く誘導された。しかもSP%はFR4dsにおいては5時間にてプラトーに達し、OPM-1dsでは24時間を要した(成績記さず)。また通常培養時にはSPの見られないOPM-1においてもCOSMにFNを添加すると、OPM-1ds同様にSPの誘導が可能であった(成績記さず)。SP形態はFigure 2のごとくで、2aはFR4ds倒立顕微鏡像、2bはFR4ds走査型電子顕微鏡像、2cはOPM-1倒立顕微鏡像、2dはOPM-1ds倒立顕微鏡像を示している。FR4ds、OPM-1dsともにFN 160 μ g/mlにてSP細胞はそれぞれ約80%、45%とプラトーに達したので以下同濃度のFNにてSPを誘導することとした。Figure 3に示した通りFR4dsおよびOPM-1ds双方ともにFN誘導SPは β 1mA b添加によって完全に抑制された。 α 4mA bにてFR4dsでは50%抑制、OPM-1dsではほぼ完全に抑制された。 α 5mA bでは両細胞ともに抑制

はみられなかった。しかし、F R 4 d s では $\alpha 4m A b$ 、
および $\alpha 5m A b$ の両者を同時添加することによって S P
は完全に抑制された。

一方、F N 無添加の状態では F R 4 d s に $\alpha 4m A b$ 、 $\beta 1m A b$ または $\alpha 5m A b$ を単独添加しても S P はみられず、
両者をそれぞれ $\beta 1m A b$ と同時添加しても S P はみられ
なかった。さらに各 V L A m A b に二次抗体として抗マウ
ス I g G 抗体を同時添加し、架橋しても S P は達成されず、
抗 F N レセプター抗体は F N の代替者とはなりえなかった
(成績記さず)。

5) 接着性：F R 4 d s の接着性を調べた結果は Figure 4
に示した。F N を添加した well においては 90% 以上の接着
率がみられ、S P 細胞以外の細胞の中にも接着細胞が存在
することが明らかとなった。また、F N を添加していない
well においても 40% 前後の接着率がみられ、プラスチック
器壁への接着に関しては F N 以外の因子が関与する非特異
的細胞接着の存在が示唆された。 $\beta 1m A b$ 添加で F N に
よる接着はほぼ完全に抑制されたが、非特異的細胞接着に
は影響はなかった。 $\alpha 4m A b$ 、 $\alpha 5m A b$ では、それぞれ
66%、73% の接着率までにしか抑制できなかったが、両者

同時添加したものでは接着率55%にまで抑制された。

6) 抗FN抗体によるwestern blotting: Figure 5のように精製FN同様220kdにある通常のFN産性が認められたのは繊維芽細胞のみであった。また繊維芽細胞の一部およびOPM-1dsにおいて160kdと短鎖のFN産性がみられた。

7) 血清中におけるSP抑制物質の検索

a 血清アルブミンによるSP抑制: Figure 6に示したようにHSAは、濃度依存性にFR4dsおよびOPM-1dsにおけるFN誘導SPを完全阻害した。従ってFNによるSPはアルブミンによって制御されていることが明らかとなった。FR4dsではその境界点は1.5g/dlのところであり、OPM-1dsではそれよりも低い0.5g/dlのところにあった。

b ヒト血清によるSP抑制: Figure 7に示したようにFR4dsおよびOPM-1dsにおけるSPは無血清の状態では出現せず、しかも明らかに両細胞ともに浮遊状態にあった。。しかし、両細胞ともに10%血清の時SPは最大に達し、以後はヒト血清濃度依存性に完全抑制されることが判明した。しかもこの現象は可逆的にみられた(成績

記さず)。一方、Hela細胞および中皮腫細胞においては、無血清の状態から100%血清の状態まで常にSPが達成されており、逆にOPM-1およびPBLでは常時浮遊状態にあった。この点にFR4dsおよびOPM1dsと他の細胞との差があることが明かになった。PCはFNとアルブミンの比率により、上皮様SPと浮遊状態の二態を取り得る細胞で、ユニークな性格を有していることが今回はじめて明らかになった。FR4dsの場合、FN濃度は10%血清でも $25\text{--}30\mu\text{g/ml}$ あり10%血清でもSPするのに十分な量と考えて差し支えないが、アルブミンは10%血清では 0.35g/dl であるのに100%血清では 3.5g/dl となり、阻害するのに十分な量である事がわかった。

8) SPにおけるリン酸化反応の関与について

a TPAの効果：FR4dsにおいてTPAを濃度別に添加してもSPは誘導されなかった。さらにTPAに加えてCaイオノフォア(A23187)を同時添加した系においても、SPは誘導されなかった(Figure 8)。

b PKCアッセイ：Table 3に示すようにFR4dsのPKCは、そのほとんどがcytosol分画に存在し、しかもその活性値は低く、さらにassay時にTPAを添加し

た系においても変化はなかった。したがってPKC活性化状態にあるとは言えず、PKCの関与は否定した。TPAではSP誘導出来なかった結果はこれで説明できた。

c 各キナーゼ阻害剤によるSP形成の変化：Figure 8に示したとおり、FR4dsのFN誘導SPはH-7、スタウロスポリン、スフィンゴシン、W-7によって、抑制された。しかしHA1004、カルミダゾリウム、ST638、ハービマイシンではSPは抑制されなかった。以上の結果より、A、Gキナーゼ及びチロシンキナーゼの関与は否定的であった。H-7、W-7にてSPが阻害されたことより、CaMキナーゼの関与も疑われたが、特異的阻害剤の一つであるカルミダゾリウムでは抑制されなかったことより、否定された。なお、W-7を濃度別に添加しても $\beta 1$ の発現量は、88%と変化はみられなかった（成績記さず）。

9) SPにおける細胞骨格について：Figure 9のように微小管重合阻害剤であるコルヒチンではFN誘導SPの阻害はみられなかったが、アクチン繊維阻害剤であるサイトカラシンBにてSP抑制認められ、FR4dsのSPにおいてはアクチン繊維の関与が示唆された。

10) FR4dsにおけるSPの細胞生物学的意義

a F R 4 d s における浮遊および接着細胞の細胞周期：Table 4 のように接着細胞では S 期、G 2 + M 期にある細胞は、浮遊細胞に比し約 1.5 倍多く、接着することにより増殖が促進されることが明かとなった。

b I g A 及びアミラーゼ産生：Figure 1 O に示すように、通常の培養条件（10% F C S / R P M I 1640）では、培養上澄中の I g A および唾液型アミラーゼは、F R 4 同様時間及び細胞増殖依存性に F R 4 d s より分泌されていることが明かとなった。つぎに無血清培地 C O S M に F N を添加した well において、F C S 加培養液と同じく I g A 産生の増加が認められ、F N のみで F C S の I g A 産生補助作用が置き換えられることが解った。すなわち F N 単独で I g A 産生促進作用がみいだされた。しかしアミラーゼは F N 無添加時と比し差はみられなかった。ただ C O S M のみ、または C O S M + F N にて培養した F R 4 d s の 3 日間の細胞増殖は 10% F C S にて培養したものに比べ、明かな増殖傾向得られなかった。S P 形成において細胞周期はより回転しているので、次々に死滅していると考えられた。

考察

FR4 ds は SP という特異な形状を示すが、FR4 と同様の $t(8;14)(q24.1;q32)$ の染色体異常、同様の IgA κ の産生能、同様の細胞内 IgA κ の存在、同様の細胞表面マーカー、アミラーゼ産生能の保持から FR4 の亜株であると同定し得た。OPM-1 ds も OPM-1 から生まれたもので、その細胞表面形質上でも OPM-1 の亜株であることが明らかである。FR4 ds は SP 形態を有する形質細胞腫株としては今まで例をみないもので、血液細胞株全体を考えても稀である。この特異な形質細胞腫株 FR4 ds の SP は以下のような特性を有していた。(1) SP は FN により誘導される。しかし Western blot 法では FN は検出されず、自ら FN を産生していなかった。よって、表面形質上の FN は 10% FCS/RPMI 下での培養中ウシ FN が FN レセプターに結合し、交叉反応を示したものであると推定される。Western blot 法で表面結合 FN の検出がみられなかったのは、検出可能な量まで結合していないためであろう。(2) SP において、FN レセプターのうち $\beta 1$ および $\alpha 4$ は SP 誘導に直接的に関与する。一方、 $\alpha 5$ は単独では FN シグナルを伝達しないが、 $\alpha 4$ を補助す

る作用を有することが見いだされた。(3) 一方、接着においては $\alpha 4$ および $\alpha 5$ がそれぞれ単独でも関与した。

(4) FN誘導SPはアルブミンにより、濃度依存性に阻害され、完全阻害も達成された。(5) ヒト血清を用いると10%でSPが最大になり、濃度が上昇するに従い逆に抑制された。この点はSPを呈する通常株(Hela細胞、中皮腫細胞)と著しい差異となっていて、これらの株では0%から100%血清に至るまでSPが出現し変化はみられなかった。また血清アルブミン濃度が組織液の濃度と一致する1.5g/dlを境にFR4dsが浮遊とSPの二様の形態変化を取り得た。(6) SP機序におけるリン酸化等の二次伝達機構の関与はH-7、スタウロスポリン、スフィンゴシン、W-7により阻害を受けるものであり、最終的にはアクチン繊維によって達成されることが判明した。PKCの関与は否定できた。(7) FR4dsのFN誘導SPの細胞生物学的意義は増殖促進とIg産生増進を介する液性免疫の増強にあった。

近年血液細胞の機能発現におけるFNおよびFNレセプターの関与が注目を浴びるようになってきている。VLAファミリー・レセプターは α および β の2つのサブユニッ

トから成り立っている。共通の $\beta 1$ サブユニットと $\alpha 4$ サブユニットあるいは $\alpha 5$ サブユニット等との組み合わせにより、それぞれVLA-4 ($\alpha 4\beta 1$)、VLA-5 ($\alpha 5\beta 1$)が構成される。VLA-4、VLA-5ともにFNをリガンドの一つとする。VLA-4はFNのCSI領域を認識して²⁸⁾、VLA-5はRGD配列を認識する²⁹⁾。B細胞においては多くはVLA-4とVLA-5のうち双方発現するが、接着を誘導するのはVLA-4だと報告されている³⁰⁾。逆にT細胞や繊維芽細胞において、FNとの接着は逆にVLA-5が関与していることが知られている³¹⁾。

株化PCの多くはVLA-4+、VLA-5-で形質細胞性白血病から樹立されたごく一部の株がVLA-4+、VLA-5+ということが知られている。しかしVLA-4+、VLA-5-や、VLA-4+、VLA-5+のいずれのphenotypeのものにしても、SPを呈する細胞に関する研究は為されておらず、PCにおけるVLA-4、5の発現形式とSPとの関係は不明であった。一方、健常人の骨髄細胞を用いたGarcia-Pardoらの報告によれば、FNはVLA-4を介して免疫グロブリン産生を増強させるという³²⁾。従ってPCにおいてVLA-4の役割は比較的よ

く調べられているがVLA-5の役割に関しては不明の点が多い。これは上皮細胞において、接着機能を担っているVLA-5の役割解明が進んでいるのと大きな差異である。

私の検索によればFR4dsのFN誘導接着では単独で関与がみられた $\alpha 5$ レセプターは、FN誘導SPにおいては単独関与は見られなかった。しかしながら、 $\alpha 5$ は、 $\alpha 4$ と同時に働く場合には $\alpha 4$ のSP誘導能を補助するという新事実が明かとなった。 $\alpha 5$ の発現がみられないOPM1dsにおいてSP誘導性が $\alpha 5$ 陽性のFR4dsより低く、より低濃度のアルブミンでもSPが抑制される。したがって、 $\alpha 5$ はFNに対する感受性を促進させるために働いていることが推定された。無血清培地にFNを添加してやればSPが達成できるOPM-1においても、通常培養時にはSPできないことを考えると $\alpha 4$ 陽性のみではFN感受性は低いといえる。

骨髄腫(MM)患者の骨髄から採取したMM細胞は、多くの症例でVLA-4+、VLA-5-であることが知られている³³⁾。河野らはGreippら³⁴⁾の細胞形態分類を利用し、VLA4+、VLA-5-は未熟型MMに特徴的で、VLA4+、VLA-5+は成熟型MMに特徴的としている³⁵⁾。

私のデータによると、V L A - 5 + の成熟型 F R 4 d s は V L A - 5 - の未熟型に比しより S P することはより組織固着性である事を示唆している。単独で働かないものがかんして共同作用を示すかは現在のところ明かではない。ただし逆の V L A - 4 の V L A - 5 補助作用は T 細胞で証明されている³²⁾。

アルブミンはマイクロタイタープレート等の器壁への非特異的細胞接着を防御することにしばしば用いられ、その他種々の動物細胞における F N による細胞接着現象を抑制することが知られているが³⁶⁻³⁷⁾、アルブミンの F N の作用阻害機序については、アルブミンには C S I 配列および R G D 配列という V L A - 4、5 レセプターにより認識されるアミノ酸配列がないところから、阻害能は非特異的なものであることが推定される。F R 4 d s および O P M - 1 d s の F N 誘導 S P に対する阻害に必要とするアルブミン濃度が F R 4 d s において O P M - 1 d s の 3 倍なのは、F R 4 d s の有する $\alpha 5$ の $\alpha 4$ 補助作用に打ち勝つために、より大量のアルブミンが必要なのだろう。

血清濃度を種々変更した系における Hela 細胞および中皮腫細胞の実験で確かめたように、上皮細胞、中皮細胞や実

質を形成する細胞は液体培養中に播種するとプラスチック底に付着する性格があり、組織形成性を反映していると思われる。一方健常リンパ球及びOPM-1で確かめたように、リンパ球は血液中では浮遊状態にあることが特徴とされる。しかし、リンパ球はリンパ節等の組織で増殖する場合には、相互に接着し、増殖していると推定されている。ではいかにして浮遊と接着を使い分けているのだろうか。この疑問を解く成績は従来知られてなかった。今回FR4dsならびにOPM-1dsを用いた研究より、SP能を有するPCはアルブミン濃度に応じてSPと浮遊状態の二態を取り得ることが解った。本知見は、PCの二態の使い分けにFNとアルブミン濃度が関与していることを示唆する新知見といえよう。無血清培地を用いた実験から、FNは $20\mu\text{g/ml}$ 以上あればSPには充分であることがわかった。一方アルブミンは $15\mu\text{g/ml}$ (1.5g/dl)で既に充分のSP抑制を示す。抑制因子であるアルブミンについていえば、血清のアルブミン濃度は 3.5g/dl 付近にあるが、各臓器のアルブミン濃度は $0.1\sim 0.8\text{g/dl}$ の低濃度のところにある³⁸⁾。このことは、一部のPCは組織ではSP状態を達成しており、一方流血中には入れば浮遊状態となり、しかもこの転

換が可逆的におこっていることを示唆している。実際のところ、私がSPを呈するPC株について報告を行ってから、MM症例より樹立されたRPMI 8226、U266は接着SPする傾向があるとの所見が寄せられている（高橋ら、personal communication）。したがってSPはFR4dsおよびOPM-1dsという特殊な株の例外的性格というより、むしろ健常ならびに腫瘍化PCに、ごく小数存在する亜分画に共通する性格とみなすべきではないかと思われる。このPCの性格は血流にのって液性免疫を必要とする臓器に流れつき、炎症巣では病原体を貪食したマクロファージが大量に産生するFNのある近傍でSPし、液性免疫を効率よく仲介するのに好都合であるといえる。

近年、FNレセプター刺激から、最終的に接着伸展をもたらすストレスファイバーの活性化までの伝達経路はリン酸化によって制御を受けているという報告が見受けられる。Kornbergらは、KB細胞という癌細胞を用い接着の過程でおこる $\beta 1$ インテグリンの凝集を抗 $\beta 1$ 抗体を用いひきおこしてみた。するとpp130と呼ぶ蛋白のチロシン残基のリン酸化が認められるという³⁹⁾。またSchallerらもchicken embryo (CE) 細胞においてfocal adhesionが見られる際、

pp125^{FAK}という蛋白のチロシンリン酸化がおけると報告している⁴⁰⁾。そこで、私もFR4dsのFNレセプター刺激後のSPに至る伝達経路におけるリン酸化反応の関与はないか検討した。FR4dsにおいて、FNレセプターを介した後のSPに至る刺激伝達経路には少なくともA、C、G各キナーゼ、CaMキナーゼ、チロシンキナーゼに代表されるリン酸化反応の関与は否定的であった。しかしながら、H-7、W-7、スフィンゴシン、スタウロスポリンにて阻害されるsecond messengerの関与が示唆された。この現象の更なる解釈は今後の大きな課題と言えよう。

また、一般的に細胞の形態は、アクチン繊維、中間径繊維、微小管等の細胞骨格により、最終的に規定されると言われる。多くの動物細胞のFNへの接着・伸展は細胞内のアクチン繊維と連絡しその生理作用を達成している⁴¹⁾。FR4dsにおいても形質細胞のSPに至る細胞骨格系を検索したところ、アクチン繊維によって達成されることが明らかになった。

最後にFR4dsのFN誘導SPの細胞生物学的意義は何かという問題がある。FR4dsの結果から言うとFNを介してプラスチック底上でSP状態にあることが細胞増

殖の点からしてメリットがあることが解った。浮遊細胞の F N レセプターにも F N は結合している可能性があるので F N が F N レセプターに結合するだけでは駄目で、S P 状態という伸展状態自体が増殖を増強するものと推測される。

つぎに F N 添加時には I g A の産生が無添加時に比し、経時的に増強がみられた。Ernestらも骨髓接着細胞において、V L A - 4 レセプター刺激を介して免疫グロブリン産生が促進され、さらにこの現象は IL-6 により増強されることを報告している³²⁾。一方 F R 4 d s のアミラーゼ産生能においては F N の有無で差は見られていないので、この F N の作用は I g 産生増強特異性がある。以上 F N は P C に対して増殖増強作用と I g 産生増強作用を合わせもつので、液性免疫力の増強という結果を生じせしめる作用が明かとなった。

以上より、生体内における形質細胞の浮遊状態ならびに S P 状態の二様の形態は、基本的に接着分子である F N と抑制因子であるアルブミンとの量的兼ね合いによって規定されていることが判明した。これは上皮細胞や中皮細胞と異なり、さらにリンパ球とも異なる形質細胞独自の性格であるといえる。つぎに F N は S P 状態を引き起こすことに

より、増殖シグナルとして貢献していることが明らかとなった。さらに、FNはPCに免疫グロブリン産性能を促進させることが解った。したがってFNはPCにおいてSPを仲介させ、増殖と免疫グロブリン産性能の増強の作用を持ち、全体として液性免疫の増強に貢献していることが明らかになった。

文献

- 1 . Polliak A, Nilsson K, Laskov R, Biberfeld P. Characteristic surface morphology of human and murine myeloma cells: A scanning and transmission electron microscopic study. Br J Haematol 39:25-32, 1978.
- 2 . Berneman ZN, Chen ZZ, Peetermans ME. Morphological evidence for a motile behavior by plasma cells. Leukemia 4:53-59, 1990.
- 3 . Katagiri S, Yonezawa T, Kuyama J, Kanayama Y, Nishida K, Abe T, Tamaki T, Ohnishi M, Tarui S. Two distinct human myeloma cell lines originating from one patient with myeloma. Int J Cancer 36: 241-246, 1985.
- 4 . Tagawa S, Doi S, Taniwaki M, Abe T, Kanayama Y, Nojima J, Matsubara K, Kitani T. Amylase-producing plasmacytoma cell line, AD3 and FR4, with der(14)t(8;14) and dic(8)t(1;8) established from ascites. Leukemia 4:600-605, 1990.
- 5 . Morimoto C, Letvin NL, Boyd AW, Hagan M, Brown H

M, Kornacki MM, Schlossman SF. The isolation and characterization of the human helper inducer T cell subset. *J Immunol* 134:3762-3769, 1985.

6. Hemler M, Huang C, Takada Y, Schwarz L, Strominger J, Clabby M. Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides. *J Biol Chem* 262:11478-11485, 1987.

7. Sekiguchi K, Siri A, Zardi L, Hakomori S. Differences in domain structure between human fibronectins isolated from plasma and from culture supernatanta of normal and transformed fibroblasts. *J Biol Chem* 260:5105-5114, 1985.

8. Maekawa T, Sonoda Y, Taniwaki M, Misawa S, Abe T, Takino T. Ph1-positive acute lymphoblastic leukemia with a 14q-chromosome abnormality. *Blood* 63:310-313, 1984.

9. Morita T, Tagawa S, Inoue R, Kitani T. A scanning electron microscopic (SEM) study of human peripheral blood lymphocytes showing a peculiar feature of lamellipodia. *J Clin Elecrtion Microsc* 23:5-6, 1990.

1 0 . Grinnell F, Feld MK. Initial adhesion of human fibroblasts in serum-free medium; Possible role of secreted fibronectin. Cell 17:117-129, 1979.

1 1 . Yamada KM, Kennedy DW. Dualistic nature of adhesive protein function: Fibronectin and its biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function. J Cell Biol 99:29-36, 1984.

1 2 . Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685, 1970.

1 3 . Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. J Biol Chem 275:7847-7851, 1982.

1 4 . Robinson JM, Badwey JA, Karnovsky ML, Karnovsky M J. Superoxide release by neutrophils: Synergistic effects of a phorbol ester and a calcium ionophore. Biochem Biophys Res Commun 122:734-739, 1984.

15. 多田芳史、長沢浩平. プロテインキナーゼCの測定.
臨床免疫 22:191-196, 1990.

16. Kawamoto S, Hidaka H. 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine(H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. Biochem Biophys Res Commun 109:1129-1133, 1984.

17. Hidaka H, Inagaki M, Kawamoto S, Sasaki Y. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. Biochemistry 23:5036-5041, 1984.

18. Yamamoto S, Kiyoto I, Aizu E, Nakadate T, Hosoda Y, Kato R. Differential inhibition by staurosporine, a potent protein kinase C inhibitor of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-caused skin tumor promotion, epidermal ornithin decarboxylase induction, hyperplasia and inflammation. Carcinogenesis 10:1315-1322, 1989.

19. Malnow R, Madison DV, Tsien RW. Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. Nature 335:820-824, 1988.

20 . Reymann K, Brodemann R, Kase H, Matthies H.
Inhibitors of calmodulin and protein kinase C block
different phases of hippocampal long-term
potentiation. Brain Research 461:388-392, 1988.

21 . Brumley LM, Wallace RW. Calmodulin and protein
kinase C antagonists also inhibit the Ca^{2+} -dependent
protein protease, calpain I. Biochem Biophys Res
Commun 159:1297-1303, 1989.

22 . Uehara Y, Hori M, Takeuchi T, Umezawa H. Screening
of agents which convert transformed morphology of
Rous Sarcoma virus-infected rat kidney cells to
normal morphology: Identification of an active agent
as herbimycin and its inhibition of intercellular src
kinase. Jpn J Cancer Res 76:672-675, 1985.

23 . Shiraishi T, Owada K, Tatsuka M, Yamashita T,
Watanabe K, Kakunaga T. Specific inhibitors of
tyrosine-specific protein kinases: Properties of
4-hydroxycinnamide derivatives in vitro. Cancer Res
49:2374-2378, 1989.

24 . Shiraishi T, Owada K, Tatsuka M, Fuse Y, Watanabe

K, Kakunaga T. A tyrosine-specific protein kinase inhibitor, α -cyano-3ethoxy-4-hydroxy-5-phenylthio-methylcinnamamide, blocks the phospholylation of tyrosine kinase substrate in intact cells. *Jpn J Cancer Res* 81:645-652,1990.

25. Chang C. Effect of colchicine and cytochalasin B on axonal particle movement and outgrowth in vitro. *J Cell Biol* 55:37a,1972.

26. Letourneau PC, Shattuck TA, Ressler AH. Pull and push in neurite elongation: Observations on the effects of different concentration of cytochalasin B and taxol. *Cell Motility* 8:193-209,1987.

27. Adams RLP (山田正あつ、山根績訳)、細胞周期、Burdon RH, Knippenberg PH編。細胞培養法。東京化学同人、1992:189-212.

28. Takada Y, Huang C, Helmer M. Fibronectin receptor structures in the VLA family of heterodimers. *Nature* 326:607-609,1987.

29. Wayner E, Garcia-Pardo A, Humphries M, McDonald J, Carter W. Identification and characterization of the

lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain plasma fibrinogen. J Cell Biol 109: 1321-1330, 1989.

30. Garcia-Pardo A, Wayner E, Carter W, Ferrera O. Human B lymphocytes define an alternative mechanism of adhesion to fibronectin. J Immunol 144:3361-3366, 1990.

31. Shimizu Y, Van Seventer G, Horgan K, Shaw S. Regulated expression and binding of three VLA (β 1) integrin receptors on T cells. Nature 345:250-253, 1990.

32. Roldan E, Garcia-Pardo A, Brieva JA. VLA-4-fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion. J Exp Med 175:1739-1747, 1992.

33. Moller P, Eichelmann A, Koretz K, Mechtersheimer G. Adhesion molecules VLA-1 to VLA-6 define discrete stages of peripheral B lymphocyte development and characterize different types of B cell neoplasia.

leukemia 6:265-271,1992.

34. Grepp PR, Raymond NM, Kyle RA, Michael O'Fallon W. Multiple myeloma: Significance of plasmablastic subtype in morphological classification. Blood 65: 305-310, 1985.

35. 河野道生. 形質細胞増殖性疾患とサイトカイン. 臨床血液 33:999-1011, 1992.

36. Grinnell F, Hays DG, Minter D. Cell adhesion and spreading factor. Exp Cell Res 110:175-190, 1977.

37. Kan M, Minamoto Y, Sunami S, Yamane I, Umeda M. The effects on cell adhesion of fibronectin and serum-free, bovine serum albumin medium. Cell Struct and Funct 7:245-252, 1982.

38. Theodore Peters Jr, Serum albumin, In: Putnam FW, eds. The plasma proteins I. NY: Academic Press, Inc, 1977: Structure, function, and genetic control, 133-181.

39. Kornberg LJ, Shelton Earp H, Turner CE, Prockop C, Juliano RL. Signal transduction by integrins: Increased protein tyrosine Phosphorylation caused by clustering of $\beta 1$ integrins. Proc Natl Acad Sci USA

88:8392-8396, 1991.

40. Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Thomas Parsons J. pp125^{FAK}, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesion. Proc Natl Acad Sci USA 89: 5192-5196, 1992.

41. Unnisa Ali I, Hynes RO. Effects of cytochalasin B and colchicine on attachment of a major surface protein of fibroblasts. Biochim Biophys Acta 471:16-24, 1977.

Table 1. Surface Markers

Markers	% Reactivity				
	FR4	FR4ds	OPM-1	OPM-1ds	Hela
CD38	99.9	73.6	99.6	99.0	ND
PCA-1	42.2	57.3	97.6	99.9	ND
IcIg	IgA κ	IgA κ	IgG λ	IgG λ	ND
VLA- β_1	ND	74.7	95.1	98.3	99.6
VLA- α_4	ND	78.5	98.4	99.7	20.2
VLA- α_5	ND	78.6	3.9	6.9	98.9
* FN8-12	ND	15.0	1.7	2.5	12.8
‡ FN12-8	ND	35.5	0.7	4.6	18.8

* FN8-12, ‡12-8 はいずれも抗フィブロネクチン抗体。

Table 2. Representative Karyotypes

FR4

67, X, -Y, +3, +7, +9, +11, +11, +12, -13, -13, -14, -15, +16, +17, +18, +19, +20, +22, +22, del(1)(q21), del(1)(q21), +der(1) t (1 ; 7)(q11 ; p11.2), +der(1) t (? ; 1)(1 ; ?)(? ; p32q22 ; ?), del(5)(q22q35), +i(6q), +der(8)dic(1 ; 8)(p13 ; q24.1), +der(8) t (8 ; ?)(q24 ; ?), +der(13) t (1 ; 13)(q11 ; p11), +der(13) t (1 ; 13)(q11 ; p11), der(14) t (8 ; 14)(q24.1 ; q32), +der(14) t (8 ; 14)(q24.1;q32), +der(15) t (9 ; 15)(q13 ; p11), 1(21q), +3mars

FR4ds

115, del(X)(q24q28), -Y, t(X ; 10)(q24 ; q22), +2, +2, +3, +3, +4, +4, +4, +4, +5, +5, +6, +6, +7, +7, +7, +7, +9, +10, +11, +11, +11, +12, +12, +12, +12, +12, +12, +12, +15, +16, +16, +17, +17, +18, +18, +18, +19, +19, +19, +19, +20, +20, +22, +22, +der(1)t(1 ; ?)(p22.3 ; ?), t(1 ; 13)(q21 ; p13), t(1 ; 13)(q21 ; p13), +i(3q), +del(5)(q21 ; q35), +del(5)(q21 ; q35), i(6p), +t(7 ; 22)(p15 ; q13.1), +der(7)t(1 ; 7)(p13.3 ; q22), +der(7)t(1 ; 7), +dic(8)t(1 ; 8)(p22 ; q24.1), +der(8)t(8 ; ?)(q24.1 ; ?), t(9 ; 15)(q11.1 ; p13), +t(9 ; 15)(q11.1 ; p13), +del(12)(q13.1 ; q24), +del(12)(q13.1 ; q24), +del(12)(q13.1 ; q24), +der(13)t(1 ; 13)(q11.1 ; p13), +der(13)t(1 ; 13)(q11.1 ; p13), +der(14)t(8 ; 14)(q24.1 ; q32), +der(14)t(8 ; 14)(q24.1 ; q32), +der(14)(8 ; 14)(q24.1 ; q32), +?der(17)t(? ; 17 ; ?)(? ; p13 ; q25 ; ?), i(21q), +i(21q), +i(21q), +der(22)t(7 ; 22)(p15 ; q13.1), +der(22)t(22 ; ?)(q13.1 ; ?)

Table 3. PKC assay

Phase	PKC activity (p mol/ min/ 10 ⁷ cell)					
	FR4ds			KM101		
	cytosol (%)	membrane (%)	total	cytosol (%)	membrane (%)	total
TPA(-)	2.60 (92)	0.22 (8)	2.82	4.44 (93)	0.32 (7)	4.76
TPA (24 μg/ml)	3.60 (82)	0.80 (18)	4.40	17.16 (99)	0.22 (1)	17.38

Table 4. Effect of adherence on cell cycle

Phase	FR 4ds	
	Adherent Cell (%)	Floating Cell (%)
G1	28.3	49.8
S	65.2	45.3
G2+M	6.5	4.9
Total	100.0	100.0

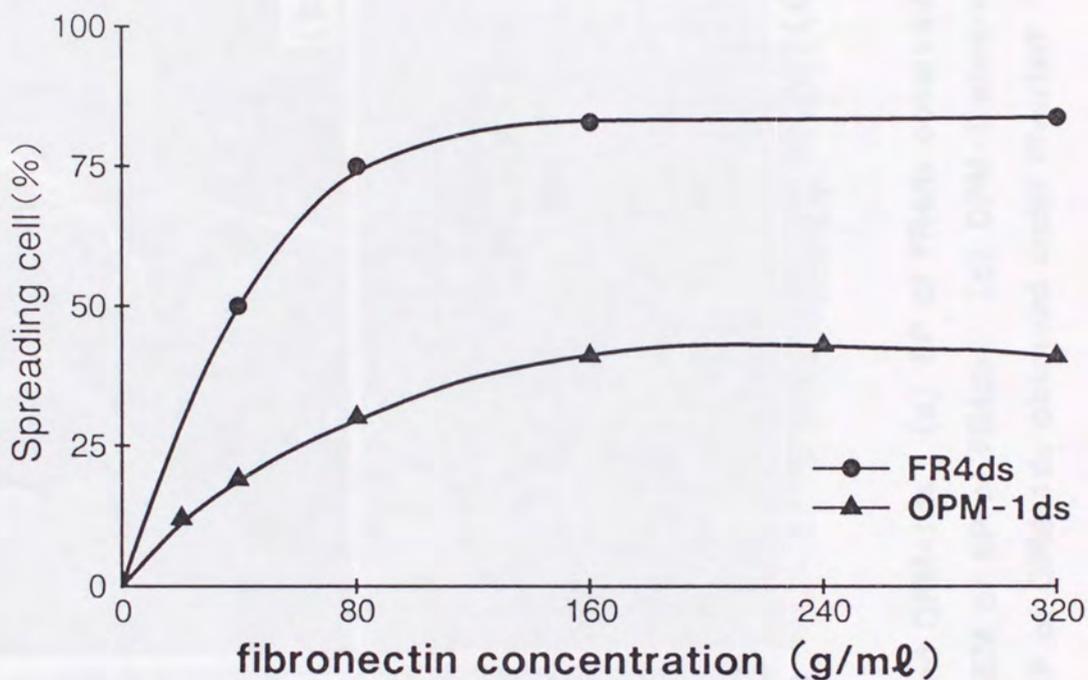


Figure 1. Effects of FN on SP of FR4ds and OPM-1ds.

(●) FR4ds; (▲) OPM-1ds. FN induced SP of FR4ds and OPM-1ds as a dose-dependently manner. The percentage of cells with SP reached to a plateau on both cell lines when $160 \mu\text{g/ml}$ of FN was added to the culture.

FR4ds expressing $\alpha 5$ was more sensitive for FN to spread than OPM-1ds which did not express $\alpha 5$.

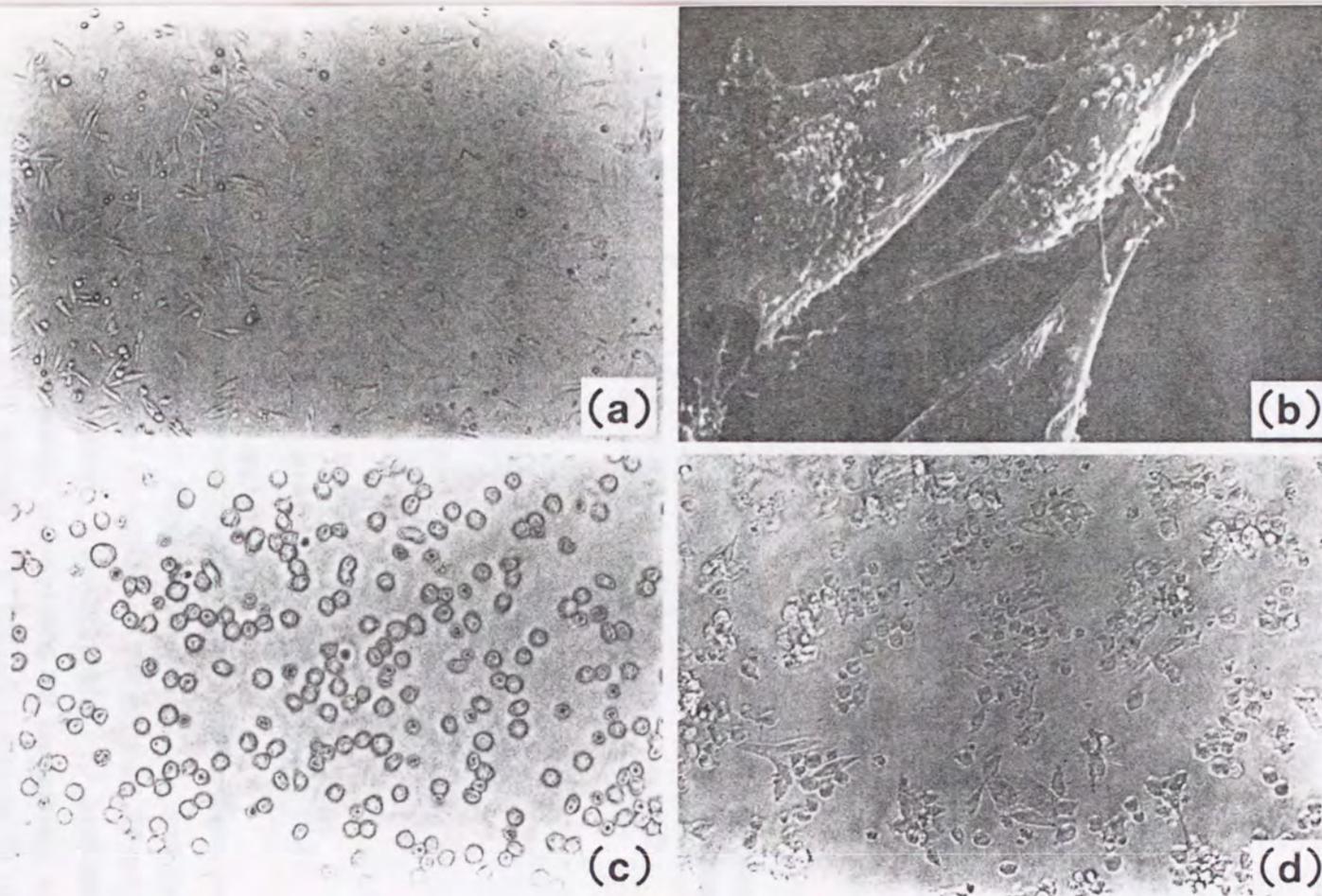
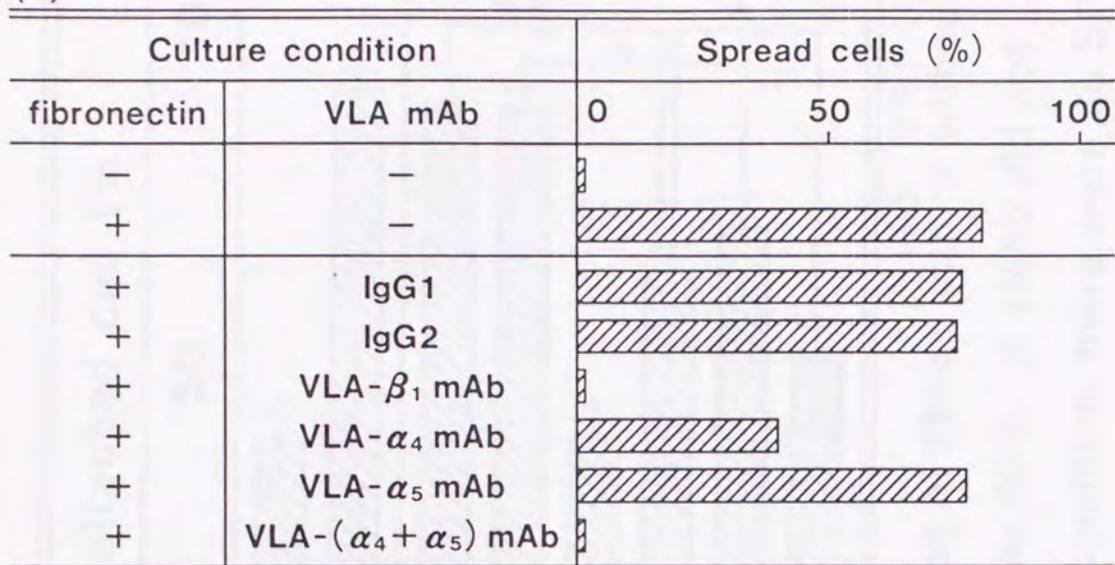


Figure 2. Morphology of SP of FR4ds and OPM-1ds. (a) SP of FR4ds observed under inverted light microscope ; (b) SEM of SP of FR4ds ; (c) OPM-1 observed under inverted light microscope ; (d) SP of OPM-1ds observed under inverted light microscope.

(a)



(b)

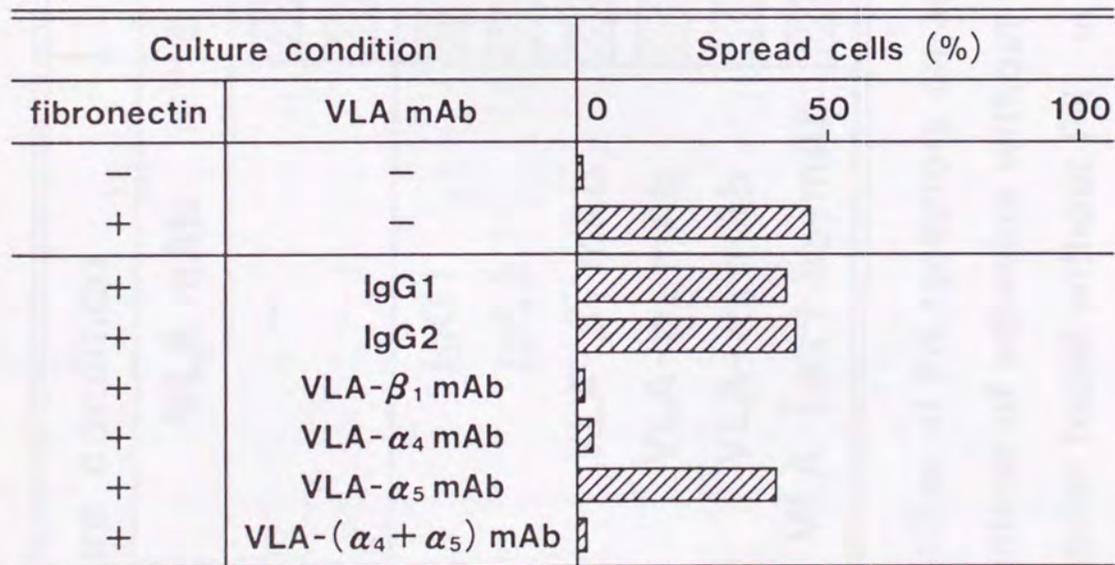
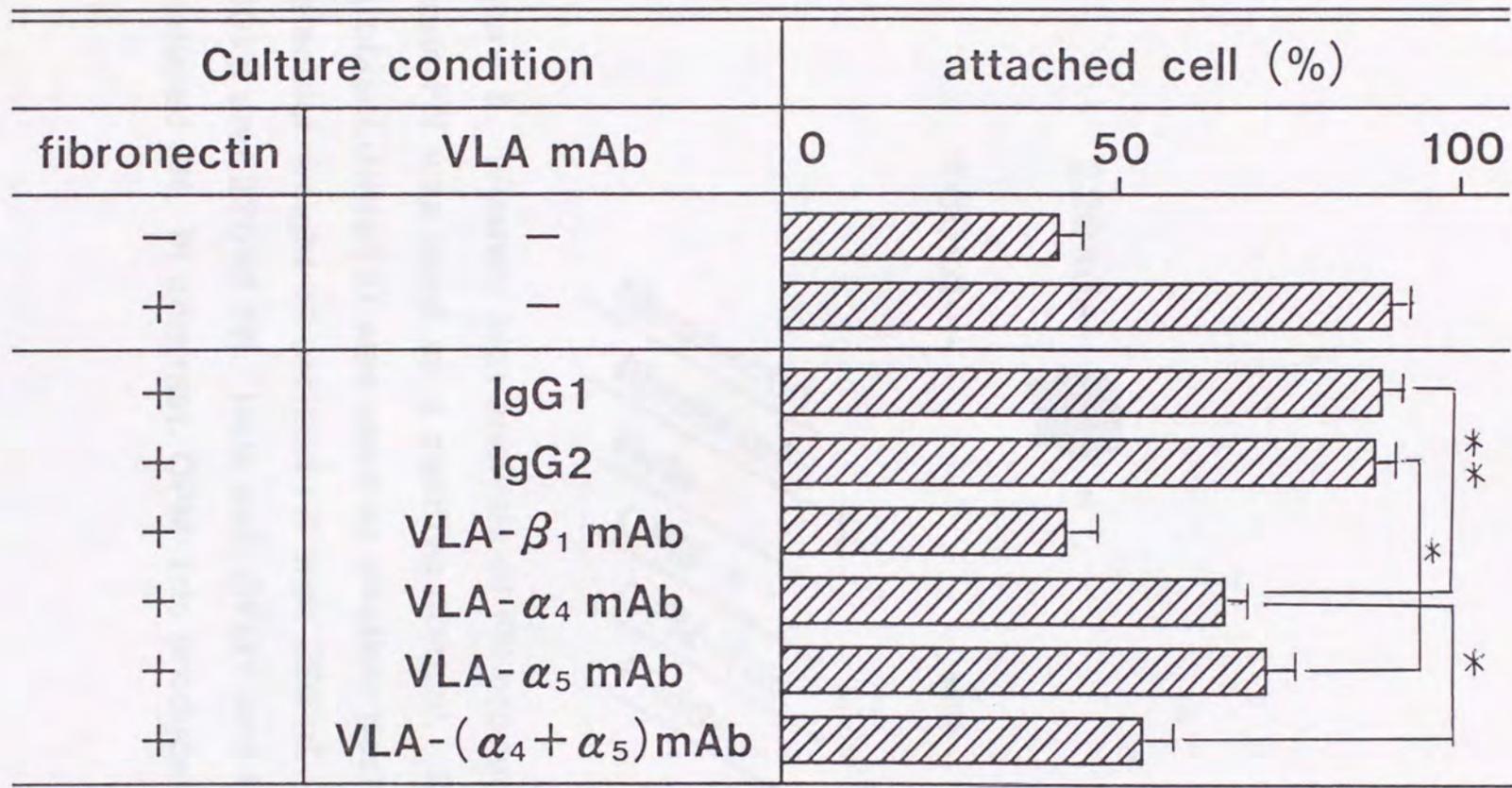


Figure 3. The contribution of FN receptors of β_1 , α_4 , and α_5 on FN induced SP. (a) Blocking effects of VLAMAbs on FN induced SP of FR4ds. β_1 mAb inhibited SP completely. α_4 mAb inhibited SP partially. α_5 mAb did not effect SP at all. However, α_5 inhibited SP completely when it was synergistically used with α_4 mAb; (b) Blocking effects of VLAMAbs on FN induced SP of OPM-1ds. β_1 mAb inhibited SP completely. α_4 mAb inhibited SP completely. α_5 mAb did not affect SP.



* $p < 0.05$ ** $p < 0.005$

Figure 4. The roles of FN receptors on adhesion of FR4ds with or without FN. The percentage of adhesion without FN was 40%. β 1mAb did not inhibit the adhesion found without FN. In this condition, there were no SP cells.

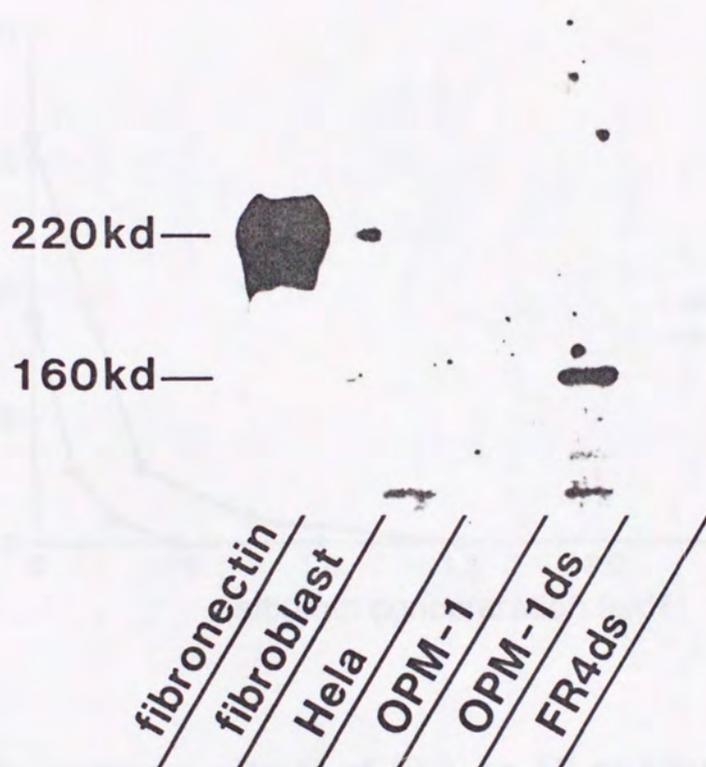


Figure 5. Western blot analysis of FN production. Purified serum FN was used as a positive control. Cell lysate of fibroblast (NIH3T3) was used as another positive control. The molecular weight of purified FN was 220kd. NIH3T3 produced 160kd and 220kd FN. Hela cell, OPM1 and FR4ds did not produced FN. In contrast, OPM-1ds produced 160kd FN.

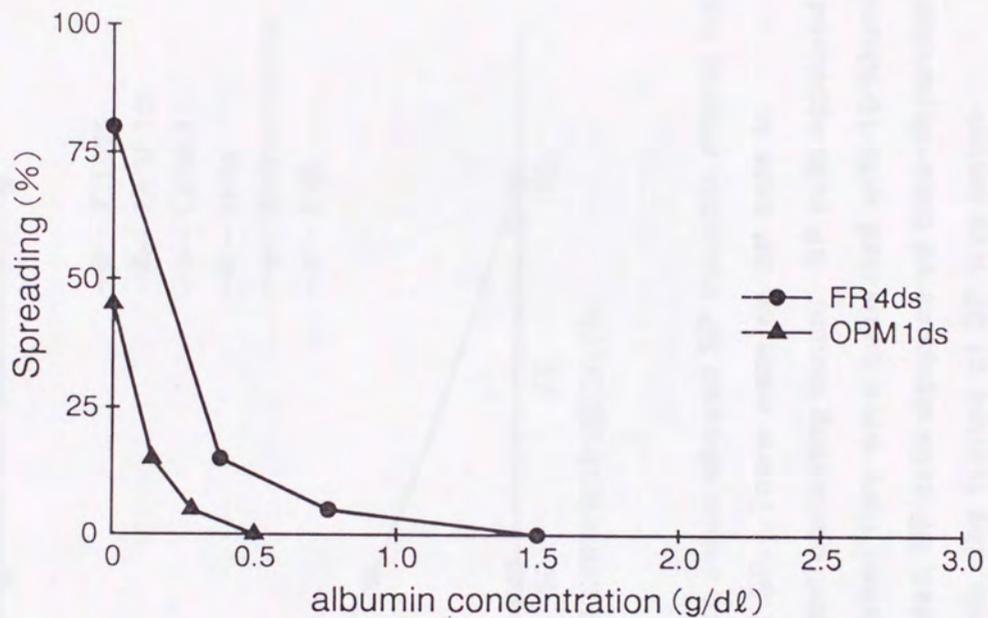


Figure 6. Inhibitory effects of HSA on SP of FR4ds and OPM-1ds induced by FN. HSA inhibited SP of FR4ds induced by $160 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ FN. The inhibitory effects were dose-dependent. HSA inhibited SP of OPM-1ds induced by $160 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ FN. The inhibitory effect was dose-dependent. The concentration of albumin that blocked SP of FR4ds completely was $1.5 \text{ g}/\text{d}\ell$ and the concentration of albumin which blocked SP of OPM-1ds was $0.5 \text{ g}/\text{d}\ell$.

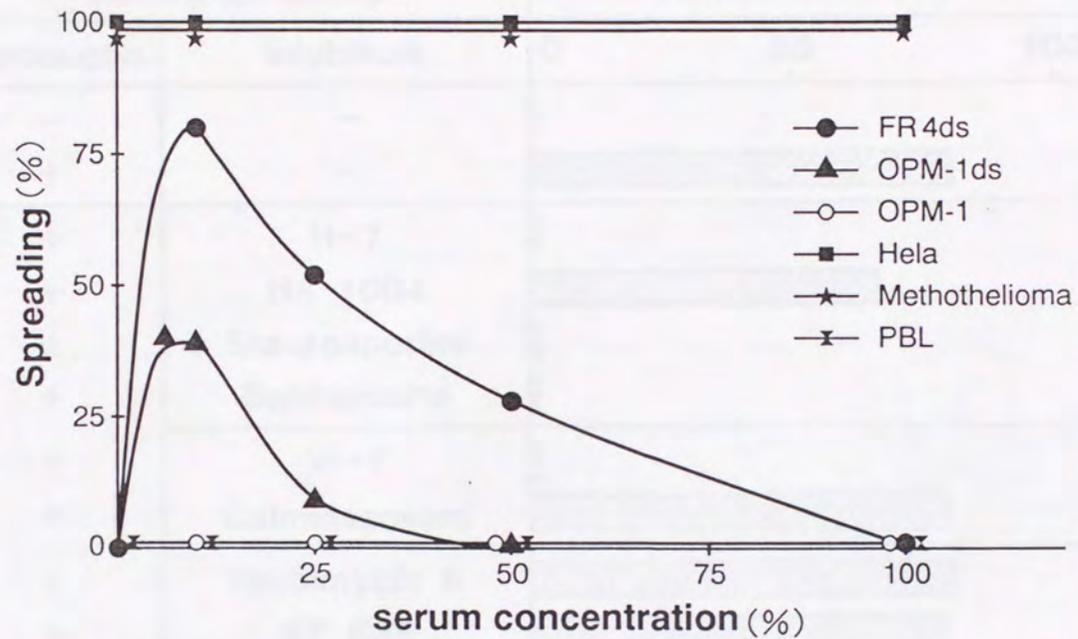


Figure 7. Low percentage of human serum showed SP inducible effects but high percentage of serum inhibited SP. There were no SP cells in FR4ds and OPM-1ds with medium not containing serum. SP cells appeared maximally in FR4ds and OPM-1ds when they were cultivated with 10% human serum. When more serum was added, SP cells disappeared dose-dependently. In Hela cells and methothelioma cells, the feature of SP was serum-independent. On the other hand, in OPM-1 and PBL there were no SP cells under any concentration of serum.

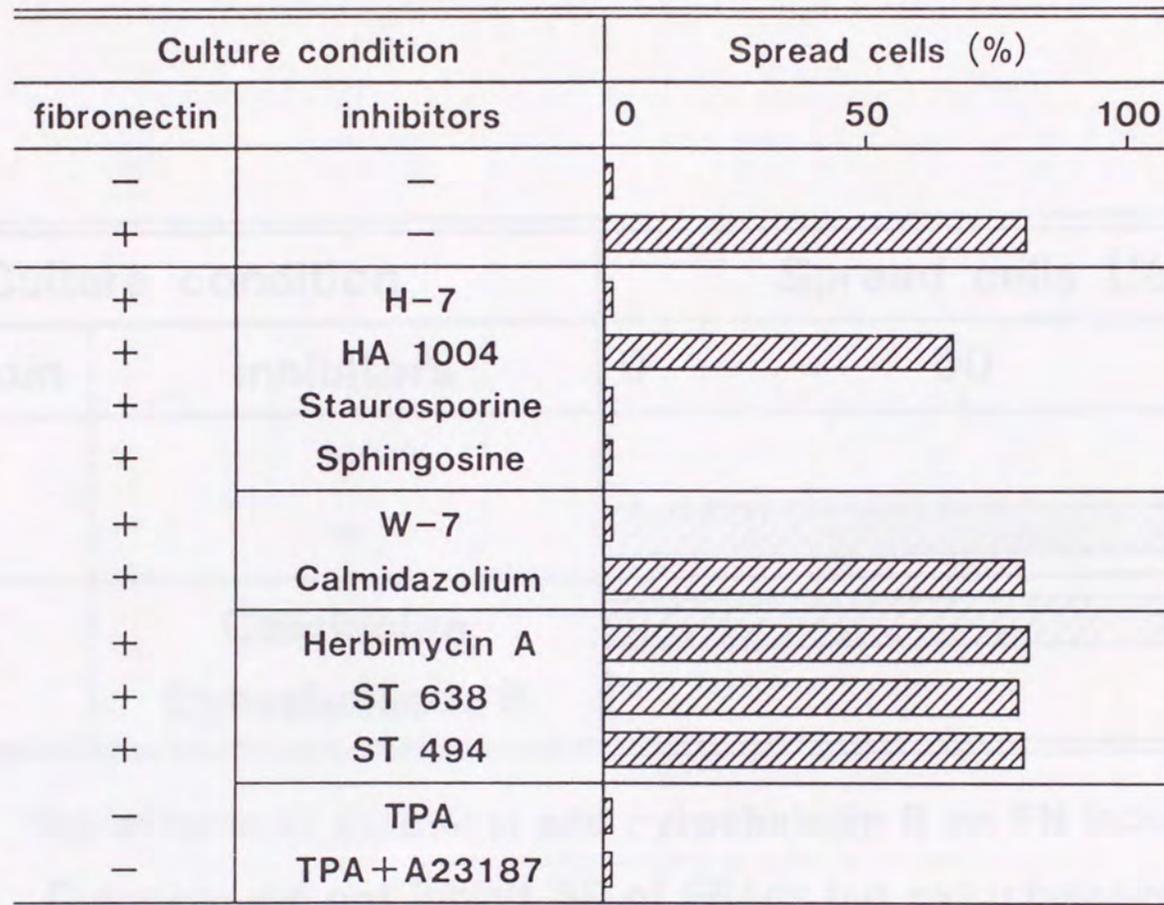


Figure 8. Effects of protein kinase inhibitors on SP of FR4ds induced by FN. FN induced SP of FR4ds were inhibited by H-7. However, TPA or TPA and A23187 did not induce SP when FR4ds were cultivated without FN. Staurosporine, sphingosine and W-7 also blocked SP induced by FN.

Culture condition		Spread cells (%)		
fibronectin	inhibitors	0	50	100
-	-	0	0	0
+	-	0	100	100
+	Colchicine	0	100	100
+	Cytochalasin B	0	0	0

Figure 9. The effects of colchicin and cytochalasin B on FN induced SP of FR4ds. Colchicin did not inhibit SP of FR4ds but cytochalasin B inhibit SP completely.

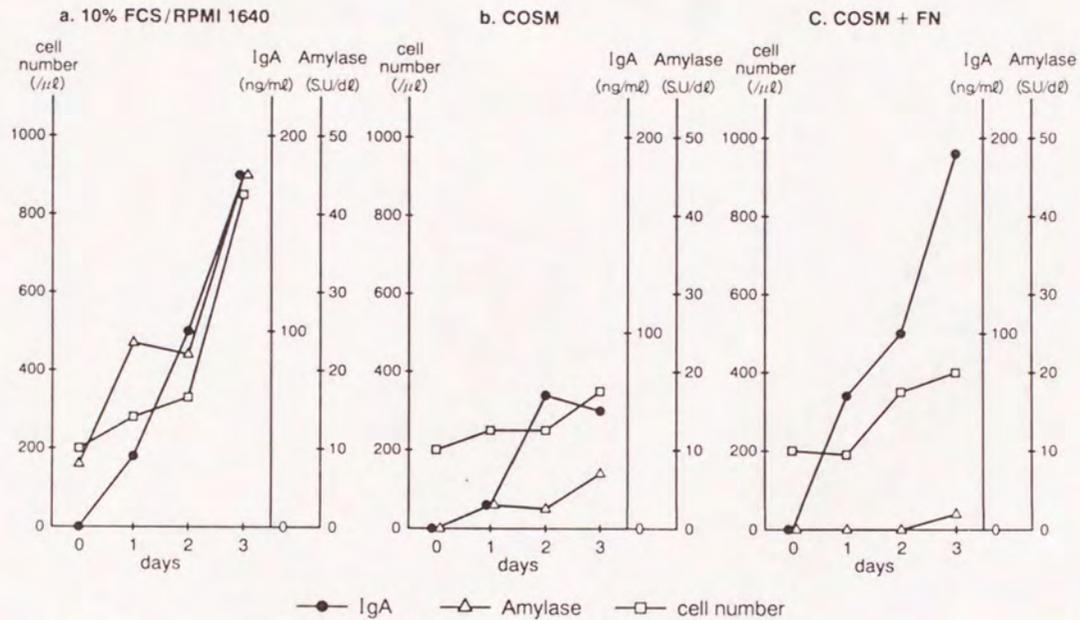


Figure 10. Fibronectin enhanced the production of immunoglobulin of FR4ds. The relationship between cell number of FR4ds and the production of IgA and amylase was examined. The concentration of IgA is indicated by (●). Amylase concentration is indicated by (△). cell number is indicated by (□). (a) The culture condition is 10% FCS/RPMI; (b) The culture condition is COSM; (c) The culture condition is FN supplemented COSM of 160 μg/ml. The effect of FN on the production of immunoglobulin was examined. The amounts of IgA and amylase increased time- and cell-number dependently when FR4ds was cultured with 10% FCS/RPMI 1640. IgA production was low when FR4ds was cultured with COSM. When FR4ds was cultured with both COSM and FN, the production of immunoglobulin was enhanced just same as it was cultured with 10% FCS/RPMI 1640. However, the cell number did not increase as they were cultured with 10% FCS/RPMI 1640.

