

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | やぎ た ひで お 八 木 田 秀 雄 |
| 学位の種類 | 薬 学 博 士 |
| 学位記番号 | 薬 博 第 1 6 1 号 |
| 学位授与年月日 | 昭和 6 1 年 3 月 2 5 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当 |
| 研究科専門課程 | 東北大学大学院薬学研究科 (博士課程)薬学専攻 |
| 学位論文題目 | A Novel Cell Surface Glycoprotein Requisite for Cell Activation and Proliferation (細胞の活性化及び増殖過程において必 須な機能を有する新しい糖蛋白質) |

(主 査)

論文審査委員 教授 橋 本 嘉 幸 教授 鶴 藤 丞

教授 鈴 木 康 男

論文内容要旨

細胞増殖制御機構の解明は、細胞の癌化の問題と関係して、現代生物学に課せられた最大の課題の1つである。近年のこの分野における最大の成果は、細胞内癌遺伝子 (Cellular Proto-oncogene, C-onc) の発見であり、これらの遺伝子産物のいくつかは、細胞増殖の調節に直接関わる事が知られている。

細胞増殖制御機構に関する多くの知見は、低血清培地に感受性のマウス培養線維芽細胞を用いて得られてきたが、もう1つの優れた系は、抗原あるいはmitogenの刺激によるリンパ球の活性化・増殖である。生体防御機構の中心的存在である免疫系は、主に起源・機能を異にするT細胞、B細胞、マクロファージにより担われていて、多様な抗原に対応して自己と非自己を認識し、特異的な免疫反応を起こすことにより生体を防御している。多くの場合、与えられた抗原に特異的なT細胞あるいはB細胞クローンの増殖・拡大が、十分な免疫反応の発現に必要であると考えられる。この際、免疫反応の抗原特異性を決定するのは、T細胞膜上の clonotypicなT細胞レセプター及びB細胞膜上の idiotypicな表面免疫グロブリンである。与えられた抗原に適合するクローンにのみ、これらの抗原受容体から Competentなシグナルが発せられ、種々の増殖因子に対する受容体の発現が誘起される。以後の反応は、それ自体は抗原に非特異的な増殖因子に制御される (Progression Signal), そのような増殖因子としては、interleukin 2 (IL2) 及び B cell growth factor (BCGF) が知られている。これらとその受容体の反応は、さらに、DNA合成に必須なトランスフェリン (Tf) に対する受容体の発現を誘起する。リンパ球の活性化・増殖の過程では、これらIL2受容体、Tf受容体などの他にも、数々の膜蛋白の変動・発現を伴う事が知られている。これら膜蛋白の多くは、近年、数々のモノクローナル抗体 (MoAb) により同定されており、リンパ球の増殖・分化の過程において、何らかの機能を有することが次第に明らかにされている。

筆者らは、ラット及びヒト膀胱癌細胞に対して作製したMoAbの中に、それぞれの種に特異的に、homologousな抗原を認識する抗体を見出し、その対応抗原が細胞の活性化・増殖過程一般において重要な機能を有することを示す知見を得たので報告する。

1. ラットB3抗原の分布と発現

マウスMoAb.B3 ($r_{1,k}$)は、本来ラット膀胱癌細胞BC47に対して作製されたものであるが、認識される抗原 (B3抗原) は線維芽細胞を含むラット培養細胞の全て及びあらゆる臓器由来の腫瘍には強く表現されているが、正常組織においては、皮膚の基底層などの増殖性に富む部分に局限される。発癌剤投与による膀胱発癌過程においては、上皮の肥厚の見られる前癌状態において既にその発現が確認される。造血系の細胞の中では、増殖性を有する骨髓細胞上には強く表現

されているが、末梢に至るに従って抗原量の低下が著しい。唯一、例外的にマクロファージ上には、おそらく constitutive な B3 抗原の表現が見られる。殆んど B3 抗原の消失した末梢リンパ球は、抗原あるいは mitogen の刺激により B3 抗原の再発現を誘導される。その発現は DNA 合成の促進 (S 期) をはるかに先行し、さらに、RNA 合成の促進 (G₁ 期) にも先行して、新たな RNA 合成を必要とせず、translational level で調節されているらしい。IL2 受容体は G₁ 前期に、Tf 受容体は G₁ 後期に発現されると報告されており、B3 抗原は活性化の最も早期から発現する抗原である。さらに B3 抗原発現量は cell cycle progression とともに増加することも示された。

以上の結果は、B3 抗原の発現は、癌化・リンパ球の活性化を含むあらゆる細胞の活性化・増殖に密接に関連しているであろうことを示す。

2. ヒト HB J 127 抗原の分布と発現

ヒト膀胱癌細胞 T-24 に対して作製されたマウス MoAb, HB J 127 (r₁, k) 及び HB J 98 (r_{2a}, k) は、ラットにおける B3 抗原と同様に、ヒト培養細胞、癌組織、正常の増殖性組織に限局して分布する抗原 (HB J 127 抗原) を認識することが判明した。例外的には、末梢血中の単球にもこの抗原は表現されている。一方、本抗原は正常の末梢リンパ球には表現されていないが、mitogen あるいはアロ抗原の刺激によりその発現を誘導される。また、その発現は MoAb .αTac により同定される IL2 受容体の発現に先行することが確認された。

3. B3 抗原及び HB J 127 抗原の性状

細胞表面蛋白を ¹²⁵I 標識した BC 47 から immunoprecipitation により得られた B3 抗原は、分子量が 95,000 の heavy 鎖と分子量 35,000 の light 鎖が disulfide 結合した分子量 130,000 前後の糖蛋白である。同様に T-24 から得られた HB J 127 抗原及び HB J 98 抗原も、共に分子量 90,000 の heavy 鎖と分子量 35,000 の light 鎖から成る分子量 125,000 前後の糖蛋白である。Sequential immunoprecipitation により、HB J 127 及び HB J 98 は同一抗原分子を認識することが明らかとなったが、両抗体は互いに競合しないことから、異なる抗原決定基 (epitope) を認識するらしい。また、³H-glucosamine を用いた biosynthetic labeling により、B3 抗原及び HB J 127 抗原は共に heavy 鎖にのみ糖鎖を含むことが示された (gp125~130=gp90~95+p35)。抗原を還元後、immunoprecipitation することにより、MoAb, B3, HB J 127, 及び HB J 98 により認識される epitope は、全て heavy 鎖上に存在することが示され、また、熱、glycosidase、あるいは tunicamycin 処理等に対する感受性から、B3, HB J 127 epitope は polypeptide、HB J 98 epitope は O-linked carbohydrate であることが明らかとなった。

以上の様に、B3 抗原と HB J 127 抗原の性状は相同性が高く、また、その分布・発現の類似性からも、両者はそれぞれラット及びヒトにおける homologous な抗原であると考えられる。

4. ラット腫瘍細胞の増殖におけるB3抗原の機能と意義

MoAb .B3 は, in vitroでのラット腫瘍細胞の増殖を濃度依存的に抑制する。この抑制作用は抗原特異的で, B3 抗原を有しないマウス腫瘍細胞の増殖には何ら影響しない。また, pan-rat 抗原を認識する同一Subclass の MoAb .B31 によっては, このような増殖抑制は見られない。

以上の事から, B3 抗原は, ラット腫瘍細胞の増殖において, 何らかの必須な機能を有し, 対応する B3 抗体は, その機能を完全に抑制しうることが示された。

5. ヒト腫瘍細胞の増殖におけるHB J 127 抗原の機能と意義

ヒトにおけるラット B3 抗原の homologue を認識する MoAb .HB J 127 及び HB J 98 は, ラットにおける MoAb .B3 の作用から予想される様に, ヒト腫瘍細胞の増殖を濃度依存的に抑制する。その抑制作用は抗原特異的で, また, 他の抗原に対する MoAb ではこのような抑制作用は見られない。HB J 98 による増殖抑制には, HB J 127 と比較し, 常に高濃度の抗体を要したが, この点に関しては次のような可能性が考えられる ; (1) HB J 127 epitope は HB J 98 epitope より gp125 の functional Site に近い位置にある ; (2) HB J 127 は HB J 98 より抗原との affinity が高い ; (3) HB J 98 epitope である O-linked carbobydrate の processing を完全に受けていない gp 125 が存在する。Sequential immunoprecipitation の結果は (3) を支持しているが, (1) (2) の可能性も現在は否定できない。

以上の様に, ヒト腫瘍細胞の増殖に関しても, HB J 127 抗原は, 何らかの必須な機能を有することは明らかである。

次に, HB J 127 によるヒト白血病細胞 Molt-4 の増殖抑制をモデルに, その作用の解析を行なった。増殖抑制作用の発現には 16 時間以上の連続的な接触を要すること, 及び, その抑制作用は cytostatic で, 培地中の抗体を除く事により, 完全に可逆的であることが示された。また, 増殖を完全に抑制された細胞の細胞周期分布は, 未処理のものと有意な差はなく, HB J 127 抗原の機能は細胞周期中のある特定の phase にのみ必須なものではないことを示す。このことは, 抗 T_f 受容体抗体による増殖抑制が処理細胞の S 期への accumulation を起こすという報告と好対照をなす。また, 多くの増殖因子受容体については, ligand もしくはその受容体に対する抗体による受容体分子の細胞表面からの消失 (down regulation) が報告されているが, HB J 127 抗原に関しては, そのような modulation は認められない。

以上の様に, HB J 127 抗体による増殖抑制作用は, 既に報告されている抗増殖因子受容体抗体による増殖抑制作用とは, その性格を異にし, HB J 127 抗原による本来の増殖抑制機構の unique さを示している。

6. リンパ球の活性化・増殖における B3 抗原及び HB J 127 抗原の機能と意義

MoAb B3 及び MoAb .HB J 127, HB J 98 は, それぞれラットあるいはヒトのリンパ球の mitogen

またはアロ抗原刺激による増殖を濃度依存的に抑制する。以下、主にラット T 細胞の ConA 反応の MoAb.B3 による抑制をモデルに、その抑制作用を解析した。幼若化を完全に阻害された ConA 刺激 T 細胞の細胞周期の解析から、MoAb.B3 は DNA 合成に先行する RNA 合成の促進を完全に阻害し、 $G_0 \rightarrow G_1$ transition つまり活性化を block することが明らかとなった。この時、MoAb B3 が ConA による triggering を妨害している訳ではないことは、抗体により活性化を阻害された ConA 刺激 T 細胞上に B3 抗原の発現が既に認められることから明らかである。つまり、B3 抗原は、mitogen あるいは抗原刺激直後の Competence Stage において、静止期 (G_0) にあった細胞が RNA 合成を開始して細胞周期に入る際に、決定的な役割を果たしていることは明らかである。

また、ConA 刺激後 24～48 時間に抗体を加えても、その 24 時間後には同程度の DNA 合成阻害が見られることから、B3 抗原は、T 細胞活性化の最も初期の段階でのみならず、その後の cell cycle progression においても、依然、必須な機能を担っているものと思われる。このことは MoAb.B3 が IL2 依存性のラット T cell line の増殖を濃度依存的に抑制することからも支持される。この時、先に述べた Molt-4 の HB J 127 による増殖抑制の際と同様に、その抑制作用は cytostatic で、cell cycle 中の特定の phase への accumulation、B3 抗原の modulation は認められない。

以上、細胞の活性化・増殖における B3 抗原及び HB J 127 抗原発現の意義について述べてきたが、最も興味深いのは、細胞の活性化 ($G_0 \rightarrow G_1$ transition) において決定的な役割を果たすことである。その抗原分布・発現から予想される様に、同抗原系は、発癌までも含むあらゆる細胞の活性化過程においても、同様な役割を果たしているものと思われる。今後、同抗原系の生物学的機能、既知の増殖因子受容体との関連、さらには C-onc 及びその産物との関連などが解析されよう。そして、それは細胞の活性化・増殖の制御機構の解明に新たな知見を提供するものと思われる。

審査結果の要旨

細胞増殖は種々の増殖因子によって媒介される。本論文はがん細胞に対して作成されたモノクローナル抗体により認識される抗原の一つが、細胞増殖に関係する新しい細胞表面構成成分であることを明らかにしたものである。

まず、ラット膀胱がんに対して作成されたモノクローナル抗体、B3, に関してそのラットにおける対応抗原の分布を検索した。B3 抗原は扁平上皮の基底層、腸上皮などの増殖の活発な組織には表現されているが、他の部分の正常組織には存在しないし、またがん細胞およびすべての培養細胞には強く表現されていること、並びに正常リンパ球には表現されていないが、マイトーゲンで刺激すると強く表現されることなどから、B3 抗原の細胞増殖との関連性が示唆された。一方、ヒト膀胱がんに対して作成されたモノクローナル抗体、HBJ 98 および HBJ 127 に対するヒトの抗原も同様の分布を示し、この抗原はラットでの B3 抗原に対応するものであることが推定された。

次に以上の抗原の分子構造が追求された。免疫沈降法などの方法で解析された結果、B3 抗原は分子量約 9 万の糖蛋白長鎖と分子量約 4 万の蛋白短鎖とがジスルフィド結合で結合した分子量約 13 万の分子であることが明らかにされた。HBJ 98 抗原および HBJ 127 抗原も共に B3 抗原と殆んど同じ分子構造を有すること、並びに前者は長鎖の糖部分を、後者は同じく長鎖の蛋白部分を抗原決定基にしていることが確認された。

以上の抗原系が実際に細胞増殖に関係するものであればこの抗原をブロックすることにより細胞増殖が抑制される可能性がある。そこで培養がん細胞にモノクローナル抗体を添加してその効果を検索した。その結果、B3 抗体はラットのがん細胞の、また HBJ 127 および HBJ 98 抗体はヒトがん細胞の DNA 合成並びに細胞増殖を強く抑制することが明らかにされた。また、この抑制は細胞周期のある時期に限定されることなく全周期にわたって抑制がかかることも判明した。

さらにリンパ球における抗原出現および抗体の作用に関する研究が主にラット系を用いて進められた。リンパ球を刺激した場合、B3 抗原は分裂の早期に発現すること、また B3 抗体はその発現を細胞回転の G₁ 時期で抑制することなどが示された。

以上の一連の研究は新しい増殖関連抗原の発見とその性格を明らかにした点で高く評価され、博士論文に値するものと考えられる。