

氏 名 (本籍) 高 野 亮^{りょう}

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 2 2 3 3 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 2 年 9 月 12 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 56 年 3 月 25 日
 東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Recognition of N-glycosidic carbohydrates on
 esophageal carcinoma cells by macrophage
 cell line THP-1.

(マクロファージ細胞株THP-1による食道癌
細胞表層のN-グリコシド糖鎖の認識)

(主 査)
論 文 審 査 委 員 教 授 森 昌 造 教 授 成 澤 邦 明

 教 授 橘 武 彦

論文内容要旨

目 的

食道癌に対する生体防御機構については不明な点が多いが、マクロファージは、この機構において重要な役割を果たすものと考えられている。しかし、マクロファージの食道癌細胞の認識機構の最初のメカニズムについては不明である。マクロファージが放出する活性酸素は抗微生物活性、抗腫瘍活性、炎症性活性を持つことが知られる。NK細胞のある種の腫瘍細胞に対する傷害作用には、活性酸素が関与することが報告され、腫瘍細胞の表層構造が活性酸素放出につながる認識機構に関わるものと考えられている。今回の研究では、マクロファージを刺激し、マクロファージからの活性酸素の放出につながる食道癌細胞の細胞表層の構造を解析することを目的とした。

方 法

1. 食道癌細胞株TE1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12とマクロファージ株THP-1を混合培養し、培地内にTHP-1より放出される活性酸素の量を比色法により定量し、食道癌細胞のマクロファージに対する「刺激」の指標とした。定量にあたっては、サイトクロームCの還元反応に基づく96穴マイクロプレート法を確立した。2. TE1とTE2の細胞表層の構造を修飾し、マクロファージに対する活性酸素放出誘導能の変化を比較検討した。修飾の方法としてタンパク分解酵素であるトリプシン処理と細胞表層糖鎖の合成阻害剤であるツニカマイシン処理を行なった。3. TE1, TE2とTHP-1の混合培養系から結合していないTHP-1を除きTHP-1のNBT還元反応に基づきTE細胞に結合しているTHP-1の数を定量した。4. TE1, TE2とTHP-1の混合培養系に単糖を加え、活性酸素の放出が抑制されるかどうかをみた。12.5–50mMの濃度でGalactose, Mannose, N-acetyl-glucosamine, L-fucoseをTE1, TE2とTHP-1の混合培養系に添加し放出される活性酸素量をサイトフローム還元法により定量した。5. TE1における細胞表層の糖鎖構造とマクロファージに対する活性酸素放出誘導の関連をさらに明らかにするために、TE1のConA耐性のmutant株であるTE1Cを選択した。TE1とTE1CのL-PHA結合性の細胞表面糖鎖をSDS-PAGE, フローサイトメトリーを用いて比較検討した。

結 果

1. 食道癌由来のTE細胞の中でもマクロファージに対する活性酸素放出誘導能には差のあることが明らかになった。この中でもTE1は活性酸素放出誘導能の大きい細胞株であったので、この細胞株の何がマクロファージに対する「刺激」に関与しているかをTE2を対照として検討した。

2. トリプシンで処理すると活性酸素放出誘導能はTE1, TE2でともに減少した。ツニカマイシン処理によりTE1の活性酸素放出誘導能は減少したが, TE2での減少は少なかった。このときTE1ではTHP-1への結合性の減少をともなった。3. THP-1からの活性酸素放出はMannose, N-acetyl-glucosamineでは抑制が見られたが, Galactose, Fucoseでの抑制は明らかではなかった。4. TE1のConA耐性株であるTE1CではTHP-1に対する活性酸素放出誘導能に減少が見られた。TE1とTE1Cをn-octyl-beta-thioglucopyranosideにより可溶化しSDS-PAGEにかけると両者のペプチドの分子量の大きさに変動は見られなかった。lectin-blottingによっても両者の間に変動はみられなかったが, フローサイトメトリーによれば, TE1CにはL-PHA結合性の増大が認められた。

考察および結論

今回我々は、活性酸素の定量のために、96穴マイクロプレートを用いたサイトクロームC還元法を確立したが、これにより食道癌細胞のマクロファージ刺激能と細胞表面層の特性を定量的かつ容易に分析することが可能となった。いくつかのTE細胞の中でもTE1がより大きなマクロファージ刺激能をもつ事は、これが細胞の組織型のちがいでではなく細胞表面層の特性によるものと考えた。TE1, TE2をトリプシン, ツニカマイシンで処理すると、活性酸素放出誘導能が減少したことは細胞表面層の糖鎖構造がマクロファージの刺激に関わることを示し、またある種の単糖は競合阻害的に活性酸素の放出を抑制した。TE1のConA耐性株TE1Cでは活性酸素放出誘導能が減少していた。TE1とTE1Cの細胞膜糖タンパクをSDS-PAGEにより比較するとペプチド, L-PHA結合糖鎖の分子量に変動はみられなかったが、フローサイトメトリーによればL-PHA結合親和性の増大が見られた。以上よりL-PHAに結合親和性のあるGlcNAc- β -1 \rightarrow 6分岐構造をもつN-glycosideの増加はマクロファージ刺激能を減少させ、食道癌細胞の生体防御機構からの回避につながる。これにより、L-PHAは食道癌の悪性度, 転移能を病理組織学的に知るための有用な指標となることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、マクロファージ細胞株THP-1と食道癌細胞株TEとの混合培養系において、THP-1から放出される活性酸素量の測定から、THP-1が食道癌細胞の何を認識しているかを解析することを目的としたものである。活性酸素はNK細胞、マクロファージの腫瘍細胞に対する傷害機構において、これら細胞から放出されるmediatorの候補と考えられる物質であり、この研究の臨床応用を考えるうえで定目される。活性酸素の定量にあたっては、96穴マイクロプレートを用いた比色法によるmicroassay法を開発している。この方法は活性酸素の定量に従来用いられたチトクロームC還元法を応用したものであるが、この方法の確立によって多くの検体を、同時にしかも容易に測定することが可能となり、以後の研究を進めるうえで有用であった。9種の食道癌細胞株とTHP-1を混合培養した結果、TE-1はこれらのなかで最もTHP-1を刺激し活性酸素を放出誘導する活性をもつ細胞であることが判明した。さらにTE-1の細胞表層の構造を修飾したあとの活性酸素放出誘導能がどのように変化するかをみることにより、逆にマクロファージがTE-1の細胞表層のいかなる構造を認識するかを推定する方法をとっている。細胞表層の構造を修飾する方法として、タンパク分解酵素トリプシンと糖鎖合成阻害剤（ツニカマイシン）を用いているが、これによってTE-1の活性酸素放出誘導能は減少し、THP-1が認識する構造は細胞表層の糖鎖構造であると推定している。つぎにいかなる構造の糖鎖であるかを明らかにするため、レクチン抵抗性の細胞株TE-1Cを選択し、TE-1CにおけるL-PHA結合親和性の増加に活性酸素放出誘導能の減少を伴うことを示している。この結合親和性の変化が膜タンパクの変化によるものではなく膜結合糖鎖構造の変化であることをLectin blot、フローサイトメトリーを用いた結果より示している。以上より『L-PHAに結合親和性のあるGlc-NAC β 1-6分岐構造をもつN-glycosideの増加はマクロファージ刺激能を減少させ、食道癌細胞の生体防御機構からの回避につながるものであり、又L-PHAは食道癌の悪性度、転移能を病理学的見地より検討するうえで有用な指標となる』と結論づけている。

本論文では、食道癌細胞の細胞表層糖鎖をマクロファージが認識し、活性酸素を放出することをのべているが、糖鎖構造の機能をマクロファージとの関連からみた点で独創性がある。またL-PHAをもちいることで臨床病理学的に食道癌の悪性度を知りうる事を、マクロファージからの回避という基礎医学的データから示したことも注目に値する。

よって、本論文は学位授与に値するものと認める。