

博士（医学） 大田光仁

学位論文題名

A unique monoclonal antibody 29A stains the cytoplasm of amniotic epithelia and cutaneous basement membrane

（卵膜上皮細胞の細胞質と皮膚基底膜部を認識する
ユニークなモノクローナル抗体29A）

学位論文内容の要旨

上皮細胞は種々の器官の最外層に存在する細胞であり、物理的にあるいは免疫機構や内分泌機構を通じて外界に対するバリアとして機能するなど、各臓器において共通した機能をもつ。それゆえに分子レベルにおいて上皮系組織には多くの共通したタンパクが存在し、例えば皮膚と胎盤卵膜では電子顕微鏡学的にも共通した分子が非常に似た形態をとっていることが知られている。さらに、上皮細胞は間葉細胞との間に基底膜を形成している。基底膜に共通した機能として、間葉細胞との間の接着を強固なものとすることに加え、上皮細胞の成長、分化、遊走に関与する機能を果たしていることも知られている。これらの重要な機能を果たすために、数多くの分子が関わっており、それら分子の解明にこれまで多くのモノクローナル抗体が貢献してきた。上皮細胞において、現在もなお未知の重要な分子の存在が示唆されており、未知の分子の同定は正常組織のさらなる機能解明、あるいは未知の疾患の病態解明において必要不可欠と考えられる。

本研究は、上皮細胞に存在する未知の分子を同定することを目的として、はじめに正常ヒト胎盤卵膜細胞抽出物を抗原としたマウスモノクローナル抗体を作成した。モノクローナル抗体は正常ヒト胎盤組織を用いて免疫組織化学的にスクリーニングし、興味ある染色性を示したモノクローナル抗体についてイムノスクリーニング法によりその抗原を同定することを試みた。得られた候補分子についてリコンビナントタンパクを作成しモノクローナル抗体との反応性を調べ、さらに卵膜細胞での候補タンパクの局在を免疫組織化学的に調べた。続いて、別の上皮系組織である皮膚において、作成されたモノクローナル抗体の抗原の発現を検討した。

最初に、正常ヒト卵膜細胞抽出物を BALB/c マウスに免疫した後、脾臓よりリンパ球を取り出し培養マウスミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを作成した。モノクローナルに単離されたハイブリドーマの培養上清を正常ヒト胎盤組織で免疫組織化学的にスクリーニングしたところ、作成されたモノクローナル抗体の1つは IgM クラスで卵膜細胞の細胞内的一部分に染色され、これまでの既知の抗体の染色パターンとは異なっていた。この抗体を 29A と名付け、29A が認識する分子の検索を開始した。まず、正常ヒト卵膜抽出物を用いたウエスタンブロット法では、還元条件でも非還元条件でも陽性バンドは検出されなかった。このことから、29A はコンフォメーションエピトープを認識するものと考えられた。卵膜細胞と表皮細胞は非常に類似しているとされていることから、イムノスクリーニングには、正常ヒト表皮細胞 cDNA ライブラリーを用いた。8 × 10⁶ クローンの cDNA についてタンパクを発現させ、29A を使ってイムノスクリーニングを行ったところ、最終的に3種類の陽性クローンを得た。これらの陽性クローンはシーケンスの結果、それぞれほぼ全長に近いラミニンレセプター(laminin receptor; LR)の cDNA の断片であることが判

明した。リコンビナント LR タンパクは全長の正常ヒト LR cDNA を組み込んだバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞で作成し、実際に 29A がリコンビナント LR タンパクと反応することをドットプロット法で確認した。さらに 29A 抗体と LR に対する抗体を用いた蛍光抗体 2 重染色法により正常ヒト卵巣細胞において 29A が認識する抗原と LR の局在性が一致することを確認した。驚くべきことに、この 29A 抗体を用いて正常ヒト皮膚を染色したところ、胎盤組織での染色性とは異なり、表皮細胞の細胞内は染色されず基底膜部に線状に染色された。一方、LR の正常ヒト皮膚における局在を LR に対するモノクローナル抗体 MLuC5 を用いて確認したところ、LR の局在性も胎盤と皮膚では大きく異なり、主に表皮細胞の細胞膜に染色されたが、非常に弱く基底膜にも染色された。

イムノスクリーニング法による cDNA ライブラリーのスクリーニングの結果、ドットプロット法によるリコンビナントタンパクとの反応性および蛍光抗体 2 重染色法による卵巣細胞での局在性が LR と一致したことより、29A は LR あるいは少なくとも LR に関連した分子を認識するものと結論した。29A が皮膚においても LR を認識しているか、あるいは構造上、別の似た抗原決定基をもつ分子を認識しているかを結論付けることは重要であるが非常に困難であり、今後も慎重に検討を続けることが必要であると考える。しかしながら、今まで明らかにされている皮膚基底膜のタンパクは胎盤においても基底膜に存在しており、胎盤組織では卵巣上皮細胞の細胞質を認識し、皮膚では基底膜部を認識するという 29A の染色性は非常にユニークであり、この 29A 抗体は今後、正常あるいは様々な疾患における上皮細胞、さらには基底膜の研究に有用なモノクローナル抗体になり得ると考えた。

学位論文審査の要旨

主査教授 畠山 鎮次

副査教授 守内 哲也

副査教授 清水 宏

学位論文題名

A unique monoclonal antibody 29A stains the cytoplasm of amniotic epithelia and cutaneous basement membrane

(卵膜上皮細胞の細胞質と皮膚基底膜部を認識する
ユニークなモノクローナル抗体29A)

上皮細胞は種々の器官の最外層に存在する細胞であり、外界に対するバリアとして機能するなど各臓器において共通した機能をもつ。それゆえ分子レベルにおいても、多くの共通したタンパクが存在することが知られている。さらに、上皮細胞は間葉細胞との間に基底膜を形成し、間葉細胞との間の接着を強固なものとしている。これらの機能を果たすために、多くの分子が関与しており、それら分子の解明に多くのモノクローナル抗体が貢献してきた。上皮細胞において、現在もなお未知の重要な分子の存在が示唆されており、未知の分子の同定は正常組織の機能解明、あるいは未知の疾患の病態解明において必要不可欠と考えられる。本研究は、上皮細胞に存在する未知の分子を同定することを目的として、はじめに正常ヒト胎盤卵膜細胞抽出物を抗原としたマウスモノクローナル抗体を作製した。正常ヒト卵膜細胞抽出物を BALB/c マウスに免疫した後、脾臓よりリンパ球を取り出し培養マウスミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを作製した。モノクローナルに単離されたハイブリドーマの培養上清を正常ヒト胎盤組織で免疫組織化学的にスクリーニングしたところ、作製されたモノクローナル抗体の 1 つは卵膜細胞の細胞内的一部分に染色され、これまでの既知の抗体の染色パターンとは異なっていた。この抗体を 29A と名付け、29A が認識する分子の検索を開始した。まず、正常ヒト卵膜抽出物を用いたウエスタンプロット法では、還元条件でも非還元条件でも陽性バンドは検出されなかった。正常ヒト表皮細胞 cDNA ライブラリーを用いたイムノスクリーニング法を行い、 8×10^6 クローンの cDNA を発現させてスクリーニングしたところ、最終的に 3 種類の陽性クローンを得た。これらの陽性クローンはシークエンスの結果、全てラミニンレセプター(laminin receptor; LR)の cDNA の断片であることが判明した。全長のリコンビナント LR タンパクを昆虫細胞で作製し、実際に 29A が LR タンパクと反応することをドットプロット法で確認した。さらに 29A 抗体と LR に対する抗体を用いた蛍光抗体 2 重染色法により正常ヒト卵膜細胞において 29A 抗原と LR の局在性が一致することを確認した。驚くべきことに、この 29A 抗体を用いて別の上皮系細胞である正常ヒト皮膚を染色したところ、胎盤卵膜での染色性とは異なり、基底膜部に線状に染色された。

一方、抗 LR 抗体で正常ヒト皮膚を染色したところ、胎盤と皮膚では大きく異なり、主に表皮細胞の細胞膜に染色されたが非常に弱く基底膜にも染色された。イムノスクリーニングの結果、ドットプロット法によるリコンビナントタンパクとの反応性および卵膜細胞での局在性が一致したことより 29A は LR あるいは少なくとも LR に関連した分子を認識するものと結論した。しかし、29A が皮膚においても LR を認識しているか、あるいは構造上、別の似た抗原決定基をもつ分子を認識しているかを結論付けることは重要であるが非常に困難であり、今後も慎重に検討を続けることが必要であると思われる。現在まで明らかにされている皮膚基底膜のタンパクは胎盤においても基底膜に存在しており、胎盤組織では卵膜上皮細胞の細胞質を認識し皮膚では基底膜部を認識するという 29A の染色性は非常にユニークである。この 29A 抗体は今後、正常あるいは様々な疾患における上皮細胞、さらには基底膜の研究に有用なモノクローナル抗体になり得ると考えられた。

公開発表に際し、副査の守内哲也教授からは、イムノスクリーニング法以外の別の遺伝子クローニング法などについての質問、副査の清水宏教授からは免疫沈降法に関する質問、今回の研究で最も困難だった点などについての質問、主査の畠山鎮次教授からはラミニンレセプターの分子に関する質問、モノクローナル抗体のエピトープマッピングに関する質問、免疫沈降法に関する質問、その他多くの質問が有ったが申請者は大概適切な回答をなし得た。

この論文は、上皮細胞において新しいモノクローナル抗体を作製した点、さらにその抗原クローニングを行った点で高く評価され、今後作製されたモノクローナル抗体により上皮系細胞の研究がさらに発展することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。