



Melanosomal antigenic expression on the cell surface and intracellular sub-units within melanogenic compartments of pigment cells : analysis by anti-melanosome associated...

林部, 一人

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1986-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0608

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000608>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	はやし べ かず ひと 人 （大阪府）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第500号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	昭和61年3月31日
学位論文題目	Melanosomal Antigenic Expression on the Cell Surface and Intracellular Sub-units within Melanogenic Compartments of Pigment Cells: Analysis by Anti-Melanosome Associated Monoclonal Antibody （色素細胞膜ならびにメラニン生成関連細胞内小器 管におけるメラノソーム抗原性の発現：単クロー ン性抗メラノソーム関連抗体による解析）

審査委員	主査 教授 三 島 豊
	教授 田 中 千賀子 教授 河 野 通 雄

論文内容の要旨

序 文

1975年、G. Köhler & C. Milstein により免疫学領域へ導入された細胞融合技術は現代免疫学に多大の進歩をもたらし、なかでも腫瘍特異抗原をはじめとする細胞膜抗原解析に威力を発揮したといえる。

特に悪性黒色腫においては、その細胞株易用性や黒色腫患者が示す腫瘍自然消退、黒色腫関連白斑の発生をはじめとする免疫現象故に、1978年の Koprowski らによる報告以来、実に60を超える抗黒色腫単クローン性抗体が樹立されてきた。

しかし、それらいずれの視点も黒色腫細胞が有する癌化形質を追求するものであり、黒色腫及びその発生母地である色素細胞の特異的機能すなわち melanin 蛋白合成能との関連を追求するものではなかった。換言すれば、色素細胞に特異的な細胞内小器管 melanosome と抗黒色腫単クローン性抗体が認識する細胞膜抗原との免疫学的関連についての解析が残されてきたわけである。

Melanosome および premelanosome は黒色腫担癌ハムスター由来リンパ球を用いた幼若化反応にて、その高い抗原性が示されている。加えて melanogenesis の key enzyme である tyrosinase の糖蛋白合成及びその修飾過程の生化学的ならびに超微形態学的研究により、色素細胞内における糖蛋白、tyrosinase の輸送経路は、coated vesicle を担体とする premelanosome 指向及び細胞膜指向の2つの

流れがあることが立証されてきた。

そこで色素細胞内における melanosome 構造骨格に表出されている抗原性の局在部位と、上述糖蛋白合成輸送経路に基づいた細胞膜表面表出の有無を検索すると共に、その免疫学的特質を皮膚科学領域における抗色素細胞自己免疫病変発症機序に還元すべく、単クローン性抗 melanosome 関連抗体を樹立、応用した。

方 法

1. melanosome の分離

ヌードマウス可移植人悪性黒色腫株 (Mm-1-JCK) よりショ糖密度勾配超遠沈分離法を用い単離。分画の純度検定は標識酵素活性と電顕的検定によった。

2. 細胞及び細胞株

Radioimmunoassay (RIA) 及び間接蛍光抗体法に供された細胞及び細胞株は、10% FCS, 1mM glutamine 含 RPMI 1640 medium 中で維持。人正常メラノサイトは成人包皮より phorbol ester 及び cholera toxin 含 growth medium 中にて維持された。

3. 単クローン性抗 melanosome 関連抗体の作成

単離された人 melanosome 分画を complete Freund's adjuvant とともに Balb/c mouse 皮下に免疫。摘出脾細胞を P3X63Ag8UI mouse myeloma と 50% ポリエチレングリコール存在下に細胞融合。Melanosome を標的として Indirect RIA 及び Quantitative absorption assay にてスクリーニングした。対照として正常人肝臓より分離した細胞内分画を使用。Ouchterlony 法により、樹立された単クローン性抗体の免疫グロブリンサブクラスは IgG2b と決定した。

4. 間接蛍光抗体法

培養細胞及び凍結切片はアセント固定後、単クローン性抗体次いでフルオレセイン結合ウサギ抗マウス IgG (ab')₂ で処理された。

5. サポニン浸透法を用いた免疫電子顕微鏡的検索

培養黒色腫細胞を 2% Paraformaldehyde, 0.02% glutaraldehyde にて固定後, 0.02% サポニン存在下に単クローン性抗体にて処理。次いで, peroxidase 結合ウサギ抗マウス IgG を同じく, 0.02% サポニン存在下で反応させた。

6. Western blotting

Melanosome 分画並びに肝小顆粒分画を, SDS-PAGE 及びニトロセルロース膜転写, 次いで単クローン性抗体, ¹²⁵I 結合ウサギ抗マウス免疫グロブリンにて処理, オートラジオグラフィーにて検出。

結 果

1. 単クローン性抗 melanosome 関連抗体 (MoAb A4F11) の色素細胞内小器官特異性

黒色腫および肝より分離された各細胞内小器官分画を標的とした MoAb A4F11 結合試験では、黒色腫由来 premelanosome, melanosome, 粗面および滑面小胞体分画に高い反応性が認められたが、

肝由来細胞内小器官には反応性を認めなかった。中等度の反応性を有した黒色腫由来 mitochondria 分画には未成熟 premelanosome が混入していることは、よく知られており、その混入 premelanosome の結合試験結果に及ぼす影響を判定するため、各分画を用いた量的吸収実験を行ったところ、黒色腫 mitochondria 分画では同 premelanosome 分画に比し、著しい未反応性が検出された。

免疫電顕的に MoAb A4F11 の黒色腫細胞内抗原局在部位を検索したところ、premelanosome, melanosome, および Golgi-associated endoplasmic reticulum lysosome (GERL) に対象と比較し、明瞭な peroxidase 反応産物を見出した。核、核膜、mitochondria および小胞体には陽性所見を認めなかった。

間接蛍光抗体法では、黒色腫細胞、悪性青色母斑細胞および正常メラノサイトの細胞質内に明瞭な顆粒状反応性を認めたが、正常線維芽細胞、正常角化細胞、他臓器由来培養腫瘍細胞には全く反応性を示さなかった。

2. MoAb A4F11 認識抗原の細胞膜表出

Indirect RIA による細胞結合試験では、検索された3種の人黒色腫培養細胞および正常人培養メラノサイトの細胞膜に、MoAb A4F11 の高い反応性を認めた。他哺乳類黒色腫細胞 (B16, Green's) および検索された他の人培養正常細胞、他臓器由来培養腫瘍細胞との反応性は認めなかった。

3. 他正常臓器との交叉反応性 (in vivo)

MoAb A4F11 は色素細胞以外では、間接蛍光抗体法にて副腎、胆嚢上皮、脾臓、扁桃、小腸上皮および皮膚エクリン汗腺分泌部管腔側に弱陽性ながら、その反応性を有する。

4. MoAb A4F11 認識抗原分子量

SDS-PAGE ならびに Western blotting により、MoAb A4F11 は 50K, 18K および 17K の分子量を有する melanosome 抗原と反応することが明らかになった。

考 察

Melanosome 抗原性の細胞内および細胞膜局在：臓器特異的マイクロゾーム抗原が当該臓器構成細胞の膜表面へ表出されていることは、甲状腺、副腎などにおいて Bottazzo ら (1984) により推定されている。

MoAb A4F11 は黒色腫細胞内 melanosome, premelanosome および GERL と共に、その細胞膜表面にも同一の抗原決定基が存在することを明らかにした。尚、本抗原決定基が Ia 様抗原ではないことは、MoAb A4F11 が正常人リンパ球と交叉反応を示さないことより明らかである。RIA において本抗体が、粗面及び滑面小胞体分画との反応性を示しながら、免疫電顕においては小胞体と反応性を示さなかったのは、細胞内分画分離過程において小胞体分画に混入する GERL がもたらす影響と解釈される。

Melanosome 形成能喪失機序：後天性進行性白斑である尋常性白斑は、正常人に比し、自己免疫疾患と高頻度に合併するが、本白斑病巣における特徴的変化である色素細胞内における melanosome 形

成能喪失の機序解明は、現在まで効果的手法を欠いたため、推論の域を出なかった。しかし、色素細胞各種癌化段階に一貫して MoAb A4F11 が示した melanosome および細胞膜の共通抗原性は、以下の如く、尋常性白斑および黒色腫関連白斑における melanosome 形成能喪失機序解明に還元されうると考察する。

すなわち、生体において melanosome の抗原提示が熱傷、皮膚炎、minortrauma 等により露呈されるメラノサイト由来 melanosome によってなされ、その高い抗原性に応答する自己抗体が生成される。次いで、この自己抗体がメラノサイト表面に表出されている共通抗原決定基と反応し、細胞変性又は障害活性を示すことにより、進行性の白斑が惹起されてゆくと考えられる。つまり細胞変性過程で、melanosome がまず消失してゆき、ついでメラノサイト自身も選択的に表皮より消失してゆくのである。これに対応する尋常性白斑病期に一致した形態学的変化は、melanosome をもたない α 樹枝状細胞の出現として報告されている。

以上のような後天的白斑発症機序を支持する所見として、尋常性白斑患者血清中に抗メラノサイト抗体が、その病勢に一致する力価をもって証明されている。

MoAb A4F11 の脾臓、副腎など他正常臓器に対する交叉反応性は、尋常性白斑患者に高頻度で合併する他臓器自己免疫病変の発生機序に同一抗原決定基の関与を示唆するものとして、更に検索中である。

論文審査の結果の要旨

1975年、G. Köhler 及び C. Milstern により、免疫学領域に導入された細胞融合技術は、腫瘍特異抗原をはじめとする細胞膜抗原解析に、一つの新たな展開をもたらしたといえる。

特に悪性黒色腫においては、多数の特徴的細胞株が樹立されており、また黒色腫の自然消退、黒色腫関連白斑の発生をはじめとする免疫現象故に、1978年の Koprowski らによる報告以来、実に60を超える抗黒色腫単クローン性抗体が樹立されてきた。

しかし、それらいずれの抗体の視点も黒色腫細胞が有する一般的癌化形質を追求するものであり、黒色腫及びその発生母細胞である色素細胞にのみ存在する固有の特異的機能すなわちメラニン蛋白合成能との関連を追求するものではなかった。つまり正常より癌化に至る過程を通して保持され、表出され続ける色素細胞独自の表現分化形質の解析が残されてきたわけであり、この解析には色素細胞特異的細胞内小管でありメラニン蛋白合成の場である melanosome の免疫学的特質にアプローチする事が不可欠である。

Melanosome 及び Premelanosome は黒色腫担癌ハムスター由来リンパ球を用いた幼若化反応にて、その高い抗原性が示されている。加えて melanogenesis の key enzyme である tyrosinase の糖蛋白合成及びその修飾過程の生化学的ならび超微形態学的研究により、色素細胞内における糖蛋白、tyrosinase の輸送経路は、coated vesicle を担体とする premelanosome 指向および細胞膜指向の2つの流

れがある事が我々により、既に立証されている。

したがって、melanosome 構造骨格上に表出される抗原性の細胞膜表面への発現の有無を検索する事は、色素細胞独自の表現分化形質を解析するにとどまらず、生体内において選択的に色素細胞が標的とされる自己免疫病変に、細胞膜に発現された melanosome 抗原の関与を提示する事にもなる。

そこで我々は単クローン性抗 melanosome 関連抗体を樹立、応用し上述理念に沿った結果を見い出すことができた。

得られた単クローン性抗体は、IgG 2b の subclass で、Indirect Radioimmunoassay ならびに免疫電子顕微鏡学的にその Specificity を同定しえた。すなわち、本単クローン性抗体は、色素細胞各種癌化段階に共通して、細胞内 melanogenic compartments である melanosome, premelanosome 及び GERL に強い反応性を有し、かつ細胞結合試験にて正常および悪性の色素細胞膜表面にも同一抗原決定基の存在を検出した。認識抗原分子量は SDS-PAGE, Western immunoblotting により、50K, 18K および 17K である事を決定した。

前述した所見を臨床的観点より抗色素細胞自己免疫病変発症機序に環元すると、次の如く展開される。生体において melanosome の抗原提示が、表皮基底層に至る何らかの炎症、minor trauma 等により、メラノサイト外へ露呈された melanosome によってなされ、その高い抗原性に応答する自己抗体が生成される。次いで、この自己抗体がメラノサイト表面に発現されている共通抗原決定基と反応し、細胞変性または障害活性を示すことにより、選択的にメラノサイトが消失、進行性の白斑が惹起されてゆくと考えられる。細胞変性過程では melanosome がまず消失、ついでメラノサイト自身も表皮より脱落してゆくのである。これに対応する尋常性白斑病期に一致した電顕的検索は、melanosome をもたない α 樹枝状細胞の出現を同定した。このような後天的白斑発症機序を支持する所見として、白斑患者血清中に抗メラノサイト抗体が、その病勢に一致する力価をもって証明されている。

尚、本単クローン性抗体の脾臓、副腎など他正常臓器に対する交叉反応性は、尋常性白斑患者に高頻度で合併する他臓器自己免疫病変の発症機序に同一抗原決定基の関与を示唆するものとして、更に検索中である。

本研究は、後天的進行性白斑における特徴的変化である色素細胞内 melanosome 形成能喪失の機序を、単クローン性抗体により検出し得た melanosome および色素細胞膜共通抗原決定基の存在に基づき、自己免疫応答の立場より初めて示唆するものであり、かつ色素細胞各種癌化段階に一貫して色素細胞独自の表現分化形質が存在し続ける事をその機能的特徴であるメラニン蛋白合成の場合、melanosome の免疫学的解析により立証し得た価値ある集積であると認める。

よって本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。