

氏名(本籍)	しほ や かず こ 渋谷和子(秋田県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 1144 号		
学位授与年月日	平成 5 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
審査研究科	医 学 研 究 科		
学位論文題目	ヒト単球上Decay-accelerating factorの情報伝達分子としての役割		
主 査	筑波大学教授	医学博士	中 井 利 昭
副 査	筑波大学教授	薬学博士	後 藤 勝 年
副 査	筑波大学教授	医学博士	田 村 昇
副 査	筑波大学教授	理学博士	坂 内 四 郎
副 査	筑波大学助教授	理学博士	入 江 勇 治

論 文 の 要 旨

〈目的〉

Decay-accelerating factor (DAF) は、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) を介して膜と結合している分子量70,000の膜蛋白である。DAFの機能としては、膜上でC 3分解酵素からC 2 aやBbの解離失活を促進することによってC 3分解酵素を失活させるという補体の制御因子としての役割が証明されているが、その他の機能の詳細は未だ明らかとなっていない。本研究は、細胞内に蛋白分子を持たないGPIアンカー型膜蛋白のひとつであるDAFの情報伝達分子としての機能と情報伝達経路を、ヒト単球を用いて明らかにすることを目的とする。

〈対象と方法〉

(1) 抗DAFモノクローナル抗体が単球に及ぼす影響。単球をDAFの活性部位をエピトープとして認識する抗DAFモノクローナル抗体1 C 6や1 C 6のF(ab')₂およびFabフラグメント、1 C 6とは別の部位をエピトープとして認識する抗DAF抗体5 B 2やLPSの存在下、非存在下で培養し、単球が活性化されるか否かを観察した。活性化の指標としては、グルコース消費率、貧食能、TNF- α 、 β などのモノカインの産生能を用いた。

(2) ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC (PIPLC) 処理の影響。単球を0.5U/mlのPIPLCで37°C、1時間処理し、単球上のDAFを切断した。PIPLC処理前後の単球における1 C 6に対する反応の相違をグルコース消費率、貧食能を指標にして観察した。

(3) 細胞内イノシトール三リン酸(InsP₃)の変化。1 C 6刺激時単球の細胞内InsP₃の変化をInsP₃

[³H] assay systemを用いて経時的に測定した。

(4) 抗DAF抗体による免疫沈降と抗リン酸化チロシン抗体によるイムノブロットィング。単球を1 C 6刺激後、ジキトニン処理し、抗DAF抗体を用いてDAFならびにその会合物を免疫沈降した。その沈降物中にリン酸化チロシン蛋白が存在するか否かを確認するために、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロットィングを施行した。

(5) チロシンキナーゼ阻害剤処理の単球活性化への影響。チロシンキナーゼ阻害剤、ジェネスタインで前処理した単球を1 C 6で刺激し、グルコース消費率や細胞内InsP₃の変化を観察した。

(結果と考察)

(1) 1 C 6で単球を刺激するとグルコース消費率や貧食能が有意に亢進し (p<0.01), 単球が活性化された。1 C 6のF (ab')₂フラグメントでも同様の現象が観察され、この活性化はDAFを介した刺激によるものであって、Fcレセプターを介した刺激によるものではないことが判明した。1 C 6による刺激はモノカインの産生能は亢進せさず、単球の活性化機構が単一ではないことを示唆していると考えられた。

(2) PIPLC処理にての単球上のDAF量を減少させると、1 C 6刺激時のグルコース消費率や貧食能の亢進の程度も低下した。これも単球の活性化がDAFを介した刺激によるものであることを示唆している。

(3) 1 C 6刺激後単球の細胞内InsP₃の上昇が観察された。これによりInsP₃がセカンドメッセンジャーとして関与していることが明らかとなった。

(4) 1 C 6刺激後単球の細胞溶解液を抗DAF抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロットィングすると陽性バンドが検出され、DAFがリン酸化チロシン蛋白と物理的に会合していることが明らかとなった。

(5) 単球をチロシンキナーゼ阻害剤で処理すると1 C 6で刺激してもグルコース消費率の亢進は観察されなくなり、DAFを介した刺激による細胞内情報伝達には、チロシンキナーゼが関係していることが示唆された。

審 査 の 要 旨

補体の制御因子としての役割を有するDAFについてその情報伝達の機能と伝達経路をヒト単球を用いて検討した。まずDAFの活性部位を認識する抗DAFモノクローナル抗体1 C 6で単球を刺激すると、単球の活性化がみられた。このことによりDAFが情報伝達分子としても機能することが明らかとなった。ついでチロシンキナーゼ阻害剤を用いた実験および1 C 6刺激時のInsP₃の細胞内の動態の検討より、チロシンキナーゼとこれに制御されているInsP₃がDAFを介した刺激の情報伝達系に関与していることを証明した。DAFはリン酸化チロシン蛋白と物理的に会合しており、これがトランスデューサーとして細胞内に情報を伝達しているものと考えられた。DAFの細胞情報伝達分子としての役割の一面を明らかにした有意義な研究であると評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。