

氏 名	な 須 たか あき 那 須 孝 昭
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2354 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Studies on Function and Mechanism of Cell Adhesion Mediated by Carcinoembryonic Antigen (CEA) or L-selectin (がん胎児性抗原 (CEA) および L セレクチンが介する細胞接着の機能およ び作用機序に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 佐々木隆造 教 授 井上國世 教 授 天知輝夫

論 文 内 容 の 要 旨

近年、細胞接着分子に関する研究は目覚しく進展している。これらは細胞表面に発現し、細胞—細胞間あるいは細胞—細胞外マトリックス間の接着を媒介する。そして、接着分子は、その発現量の増減、接着能の増減、または細胞内へのシグナル伝達を通じて「発生」、「免疫」、「炎症」、「がん転移」など多くの生物学的現象に関与する。

本論文では、現在研究されている多くの細胞接着分子の中から免疫グロブリン・スーパージーン・ファミリーに属するがん胎児性抗原 (Carcinoembryonic antigen, 以下 CEA) およびセレクチン・ファミリーに属する L セレクチンに着目し、CEA の細胞接着部位の解析並びに L セレクチンの遅延型過敏症反応における役割に関する研究が行われている。その成果は以下のように要約される。

第 1 章では、CEA の細胞接着における作用機序を明らかにする目的で、CEA の N ドメインに対する単クローン抗体 (以下 MoAb) のうち、細胞接着阻害活性を有し、そして CEA と同一のファミリーに属する Nonspecific Cross-reacting Antigen (以下 NCA) には交差反応性を示さない 4 種の MoAb (C249, K348, K1338, K1444) の認識アミノ酸配列 (以下 エピトープ) を解析している。

CEA と NCA の N ドメインが 108 アミノ酸残基のうち僅か 12 残基のみが異なることに着目し、NCA と CEA の各 N ドメインを同じ位置で 4 個の断片に分け、CEA または NCA 由来の各断片を組み合わせた 7 種の NCA 様キメラ蛋白質を作製している。これらの NCA 様キメラ蛋白質に対する 4 種の MoAb の反応性を検討した結果、C249 および K1338 は CEA の N ドメインのテミノ酸 1～32 残基から成る断片を、K1444 はアミノ酸 33～59 残基から成る断片をそれぞれ認識することを明らかにした。更に、K348 はアミノ酸 1～32 残基および 60～93 残基から成る 2 つの断片と結合した。以上の結果および各断片の CEA と NCA とのアミノ酸配列の相異を勘案すると、K348 のエピトープ形成にはアミノ酸残基 21V, 27H, 28L, 29F, 66I, 78I, 79I, 89H のうちのいくつかに関与する可能性が示唆され、C249 (あるいは K1338) のエピトープ形成にはアミノ酸残基 21V, 27H, 28L, 29F が、K1444 のエピトープ形成にはアミノ酸残基 43R, 44Q, 46I が関与する可能性が示唆された。これらのアミノ酸残基は CEA の細胞接着部位そのものか或いはその近傍に位置すると考えられた。

第 2 章では、L セレクチンの慢性炎症における役割を解析する目的で、慢性炎症導入期に相当するマウス遅延型過敏症反応を用いて、L セレクチンの生理的機能の阻害作用を有する海草由来の硫酸化フコース重合体であるフコイジンの影響が検討されている。

マウス接触型過敏症モデルにおいてフコイジンを炎症惹起前に静脈内投与した結果、ハプテンである trinitrochlorobenzene による耳介の浮腫は用量依存的に抑制され、10mg/kg 以上の用量において有意な抑制が認められた。組織学的な解析を行ったところ、フコイジン投与により浮腫の顕著な抑制および白血球浸潤の抑制が観察された。フコイジンの抗炎症作用はハプテン感作前にフコイジンを静脈内投与した場合にも同様に認められた。観察されたフコイジンの浮腫抑制効果の特異性を検討するために、フコイジンと類似する構造を持つ数種の糖類、すなわち、L-フコース、コンドロイチン 4-硫酸、コンドロイチン 6-硫酸の本モデルに及ぼす影響を調べた。これら糖類を 100mg/kg の用量で炎症惹起前に静脈内投与した

結果、浮腫の抑制は全く観察されなかった。本モデルにおける末梢血中の白血球数の変化を調べたところ、接触型過敏症の惹起により24時間後の白血球数は非感作群の約70%に減少したが、フコイジン投与により白血球数は対照となる非感作群と同程度まで回復した。この結果は、炎症惹起により白血球が炎症部位へ浸潤したために末梢血中の白血球数が減少すること、フコイジン投与によって白血球浸潤が阻害されて末梢血中の白血球数減少が抑制されること、並びに浮腫の抑制が白血球に対する細胞毒性に依るものではないことを示唆した。以上、Lセレクトインの阻害活性を有するフコイジンを用いることにより、遅延型過敏症反応にLセレクトインが深く関与することが示され、Lセレクトインが慢性炎症において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

細胞接着分子に関する研究は近年目覚しく進展しており、これらは「発生」、「免疫」、「炎症」、「がん転移」など多くの生物学的現象に関与することが明らかにされつつある。本論文は細胞接着分子のうちがん胎児性抗原（Carcinoembryonic antigen, 以下CEA）およびLセレクトインに着目して、CEAの細胞接着部位の解析並びにLセレクトインの遅延型過敏症反応における役割の解析を行ったものである。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. CEAのNドメインに対する単クローン抗体（以下MoAb）の認識アミノ酸配列（以下エピトープ）を解析することにより、Nドメイン中の細胞接着に関与する部位を特定した。

CEAの細胞接着はNドメインに依存している。Nドメイン中の細胞接着に関与する部位を同定することを目的として、Nドメインを認識しCEAの細胞接着作用を阻害するが、CEAと同一のファミリーに属するNonspecific Cross-reacting Antigen（以下NCA）には交差反応を示さない4種のMoAb（C249, K348, K1338, K1444）を選択し、そのエピトープ解析を行った。CEAとNCAのNドメインが108アミノ酸残基のうち僅か12残基が異なることに着目して、NCAとCEAの各Nドメインを同じ位置で4個の断片に分け、CEAまたはNCA由来の各断片を組み合わせた7種のNCA様キメラ蛋白質を作製した。これらのNCA様キメラ蛋白質に対するMoAbの反応性の検討結果から、C249およびK1338はCEAのNドメインのアミノ酸1～32残基から成る断片を、K1444はアミノ酸33～59残基から成る断片をそれぞれ認識することを明らかとした。更に、K348がアミノ酸1～32残基および60～93残基から成る2つの断片と結合することも明らかとした。CEAとNCAの各Nドメインのアミノ酸配列を比較することにより、それぞれの抗体の認識に深く関与すると考えられるアミノ酸残基が特定された。これらのアミノ酸残基はCEA分子の細胞接着作用の接着部位そのものか或いはその近傍に位置すると考えられた。以上の知見は、CEAを介する細胞接着の抑制薬、すなわち、がん転移の阻害剤の開発などへの応用が期待できる。

2. Lセレクトインの慢性炎症における役割を解析した。従来、急性炎症におけるLセレクトインの関与は実証されていたが、慢性炎症における役割は十分に解明されていなかった。

慢性炎症の導入期に相当する遅延型過敏症反応におけるLセレクトインの役割の解析を目的として、Lセレクトイン阻害活性を有するフコイジンの遅延型過敏症反応の一種であるマウス接触型過敏症モデルに及ぼす影響が検討された。抗原感作前あるいは炎症惹起前にフコイジンを投与することによって、浮腫の抑制および白血球の浸潤抑制が認められた。これらの抑制作用は、フコイジンと類似の構造を持つ数種の糖類では全く認められなかったことから、フコイジンに特異的な作用であると考えられた。更に、末梢血中の白血球数の検討からフコイジンによる浮腫抑制が白血球に対する細胞毒性に依るものではないことが示唆された。これらの結果は、慢性炎症の導入期にあたる遅延型過敏症反応における白血球の浸潤や浮腫の形成にLセレクトインが深く関与することを示している。

以上、Lセレクトインが急性炎症のみならず慢性炎症においても重要な役割を担っている可能性を示唆した。これらの知見は、Lセレクトインの生理機能阻害剤がアレルギー性接触皮膚炎などの慢性炎症の治療にも応用できることを示している。

以上のように本論文は、細胞接着分子であるCEAおよびLセレクトインが介する細胞接着の作用機序および機能を詳細に解析した研究であり、今後の細胞接着分子に関する研究、あるいはそれに基づいた新規治療薬の開発に有用であり、応用生命科学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年1月11日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。