

[過程-2]

審査結果の要旨

氏名 森 健

本研究は autotaxin(ATX)に対するモノクローナル抗体(2A12, 4F1)を用いて、正常腸管組織における ATX の発現を免疫組織染色、蛍光免疫2重染色、フローサイトメトリー法、ウェスタンブロット法を用いて、蛋白質のレベルで解析されており、以下の結果を得ている。

1. ATX に対するモノクローナル抗体(2A12)を用いて、ヒト腸管組織の連続切片を免疫組織染色したところ、腸管組織の粘膜下層の間質に細胞室が茶色に染色される楕円形の細胞が存在し、連続切片で比較すると ATX で染色される細胞の多くは、抗トリプターゼ抗体(AA1)で染色される肥満細胞と形態学的に類似していた。
2. ATX に対するモノクローナル抗体(4F1)を FITC で標識し、トリプターゼに対する抗体(AA1)およびキマーゼに対する抗体(CC1)をロダミンで標識し、免疫蛍光2重染色を行うと、ATX を発現する細胞はトリプターゼおよびキマーゼで染色される肥満細胞の分画であることが確認された。
3. ATX を発現する細胞は肥満細胞の分画であるという事実をもとに、トリプターゼ陽性肥満細胞のうち、ATX を発現する細胞の割合を胃、大腸、小腸で、粘膜、粘膜下、筋層においてそれぞれカウントすると、粘膜下層ではいずれの組織でも 50%以上の肥満細胞が ATX を発現していた。粘膜層、筋層では ATX を発現する肥満細胞の割合は低い傾向であった。
4. 正常胃切除標本より、4 ステップ酵素組織分離法および CD117 抗体を用いた、auto MACS システムにより肥満細胞を抽出した(purity: 70%以上、viability: 80%以上)。抽出した肥満細胞を免疫組織染色すると、約 82%の細胞はトリプターゼ陽性細胞であった。一方キマーゼ陽性細胞は約 17%であった。さらに、抽出した肥満細胞を肥満細胞の特異的表面抗原である CD203c に対する抗体および、FITC で標識した抗 ATX 抗体により2重染色し、フローサイトメトリー法により解析すると、70%以上の細胞は CD203c 陽性であり、CD203c 陽性細胞のうち約 20%が有意に細胞内に ATX を発現していた。
5. 正常胃切除標本より抽出した肥満細胞は、ATX を発現していることが、ウェスタンブロット法により確認された。さらに、抽出した肥満細胞を 48 時間培養し、その上清液の ATX 蛋白をウェスタンブロット法により検討すると、細胞上清にも有意な ATX 蛋白が確認された。

以上、本論分は正常腸管組織において、粘膜下層の結合組織型肥満細胞が ATX の主な供給細胞であることが発見された。これまで、ATX の発現に関しては、mRNA のレベルでの研究は行われているが、蛋白レベルでの研究はなされていなかった。肥満細胞は、ヒスタミン、ヘパリン、TNF $\alpha$ 、VEGF などのメディエーターを放出することは知られているが、ATX を発現し、細部外に分泌するということは全く新しい知見である。今後、腸管組織における肥満細胞の生理学的・病理組織学的役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。