

胃潰瘍治癒過程における神経細胞接着分子 (NCAM) の発現

一 柳 伸 吾 杉 山 敏 郎 矢 花 剛

札幌医科大学医学部内科学第1講座 (主任 今井浩三 教授)

The Expression of Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) during the Healing Process of Gastric Ulcer

Shingo ICHIYANAGI, Toshiro SUGIYAMA, Tsuyoshi YABANA

First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine

(Chief: Prof. K. IMAI)

ABSTRACT Neural cell adhesion molecule (NCAM) is a glycoprotein, which belongs to the immunoglobulin superfamily and functions as homophilic adhesion molecule and is considered to play an important role in cell formation and tissue structure. NCAM is mainly expressed on neurogenic cells, myogenic cells and NK cells, but there is no report that NCAM is expressed on the gastric mucosal epithelium. In this study, we investigated the expression of NCAM in the healing process of human gastric ulcer and rat acetic acid induced ulcer with immunohistological methods, the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Southern blot analysis. The results were as follows.

1) Immunohistologically NCAM was expressed in the gastric mucosal epithelium in human gastric ulcer and rat acetic acid induced ulcer in the healing stage.

2) NCAM was also expressed in the fraction of gastric mucosa adjacent to the ulcer by dot blot analysis.

3) RT-PCR and Southern blot analysis revealed that NCAM mRNA was expressed in the gastric mucosa in the healing stage and it contained a transmembrane domain, suggesting that it plays an important role in mucosal repair of gastric ulcer. (Received May 8, 1995 and accepted May 29, 1995)

Key words: NCAM, Gastric ulcer, Adhesion molecule, Healing process

1 緒 言

細胞接着分子は細胞間のシグナル伝達にとって重要な分子のひとつである。特に器官形成期において、この分子は、細胞移動あるいは誘導に深く関与し、組織構築に重要な役割を果たす機能的分子と考えられている¹⁾。潰瘍治癒は、組織欠損の再生であり、その組織再構築過程は、器官形成期と同様に、よく制御された再生過程とも考えられる。しかし、実際にはその過程にどのような細胞接着分子が関与しているかはほとんど明らかにされていない。

Neural cell adhesion molecule (NCAM) は、お

もに神経細胞などにおいて細胞間の細胞接着分子として重要な役割を果たしている²⁾が、胃粘膜上皮に発現しているという報告はない。本研究では、ヒト胃潰瘍およびラット酢酸潰瘍モデルを用いて潰瘍治癒過程に伴う NCAM 発現とその意義を検討した。

2 対象および方法

2.1 対象および材料

2.1.1 ヒト胃潰瘍

内視鏡施行時に得られたヒト胃潰瘍各ステージ (活動期 8 例, 治癒期 9 例, 瘢痕期 7 例) を用いた。なお生検に際して、全て informed consent を得た。

2・1・2 ラット酢酸潰瘍の作製

Takagi *et al.*³⁾の方法に従った。体重250~300gのWistar系雄性ラットを、ペントバルビタール麻酔下に、腹部を正中切開し、胃前壁の漿膜側より20%酢酸を0.04 ml 粘膜下層に注入し酢酸潰瘍を作製した。

2・2 ウェスタンブロット法による抗NCAMモノクローナル抗体の特異性の検討

ラット脳1gをphenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma, USA) および trypsin inhibitor (STI) (Sigma, USA) を含んだ1% Triton X-100 加 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) 中でポリトロン (Kinematica, Switzerland) を用いて25,000 rpm, 10秒間, 3回ホモゲネートし、氷水中で2時間放置した後、4°C, 6,000 rpm, 15分間遠心分離した。次にその上清を採取し可溶性抗原溶液として用いた。この可溶性抗原80 µg/レーンにサンプルバッファー (6.25 mM tris, HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.0025% bromophenol blue) を加え、7.5%ゲルを用いて、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った後ニトロセルロース膜に転写し、3% bovine serum albumin (BSA) で蛋白の非特異的吸着を阻止した。一次抗体として、400倍希釈のマウス抗ラットNCAMモノクローナル抗体 (No. C-9672, IgG1) (Sigma Chemical, USA) あるいは対照としてマウス抗腺癌関連イディオタイプ抗体 (AI206, IgG1)⁴⁾と4°C, 一夜反応させた。次に、二次抗体として100倍希釈のビオチン化ウマ抗マウスIgG抗体 (Vector社, USA) と室温で60分間、次いでABC試薬 (Vectastain ABCキット, USA) と室温60分間反応させ、4-chloro-1-naphthol (Bio-Rad, USA) で10分間発色させた。

2・3 組織学および免疫組織学的検討

2・3・1 ヒト胃潰瘍からの生検材料

2・1・1で得られた生検材料を10%中性ホルマリン液で24時間固定し、パラフィン包埋後連続切片 (5 µm) を作製、組織学的ならびに免疫組織学的検討に供した。以下にその概略を述べる。キシレンとエタノール系列により脱パラフィンを行い、0.3% H₂O₂ 処理により内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した後、0.01 M PBS (pH 7.4) で洗浄し、3% BSA 溶液を反応させ、蛋白の非特異的吸着を阻止した。洗浄後、一次抗体として前述のマウス抗NCAMモノクローナル抗体、50倍希釈のマウス抗ヒトPCNAモノクローナル

抗体 (DAKO, Denmark) および50倍希釈のマウス抗ヒトepithelial membrane antigen (EMA)モノクローナル抗体 (No. M613, IgG2a) (DAKO, Denmark) を反応させた (4°C, 一夜)。抗EMA抗体は、粘膜上皮細胞と反応することが報告されている^{5,6)}。次に、二次抗体として150倍希釈のビオチン化ウマ抗マウスIgG抗体 (Vector社, USA) と室温で30分間反応させ、ABC試薬と室温で30分間反応後、0.015% 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (片山化学, 東京), 0.01% H₂O₂ で発色、ヘマトキシリンで核染色を行った。顕微鏡下に観察し、対照抗体との比較で、標本中明らかに強い染色性を示す切片のみを陽性と判定した。

2・3・2 酢酸潰瘍

ラット酢酸潰瘍作製2週間後および6週間後に軽エーテル麻酔下に屠殺し、胃を摘出し病変を確認後10%中性ホルマリン液で24時間固定しパラフィン包埋後連続切片 (5 µm) を作製、2・3・1と同様に組織学的ならびに免疫組織学的検討に供した。

2・4 ドット・ブロット法

酢酸潰瘍周囲胃粘膜を剝離しPMSFおよびSTIを含んだTriton X-100加PBS中でポリトロンを用いて25,000 rpm, 10秒間, 3回ホモゲネートし、氷水中で2時間放置した後4°C, 6,000 rpm, 15分間遠心分離し、その上清を採取し吸着固定装置 (Bio-Rad, USA) を用いてニトロセルロース膜に吸着した。3% BSA で蛋白の非特異的吸着を阻止した後、一次抗体として、前述の抗NCAMモノクローナル抗体と反応させ (4°C, 一夜)、以下2・2に記載した方法と同様の操作を行った。

2・5 NCAM mRNA の検討

2・5・1 RNA の抽出

Total RNA は潰瘍辺縁粘膜を剝離後、速やかに凍結、保存した後guanidinium thiocyanate法⁷⁾により抽出した。

2・5・2 プライマーの作製

Small *et al.*⁸⁾によりクローニングされたラットNCAM 140 kD のcDNAの配列に基づきFig. 1のごとくプライマーを作製した。Sense primerとして、5'-GGCCAGTCCGGGAACCCAGC-3', antisense primerとして5'-GGCAGGTTAACAGCGATGCA-3'の20merの合成オリゴヌクレオチドを作製した。増幅される領域は、プライマー部分を含めて456bpであり、膜貫通部位を挟むようにした。

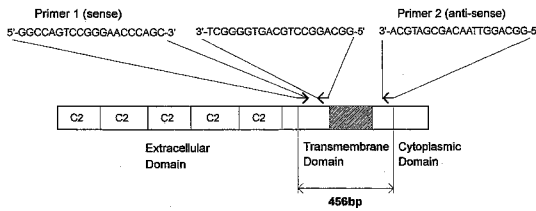


Fig. 1 Schematic illustration of the primers used for RT-PCR to detect the NCAM mRNA and oligonucleotides used for Southern blot analysis.

2.5.3 Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

2.5.1 で得られた total RNA $1\mu\text{g}$ に $10\times$ amplification buffer $2\mu\text{l}$, dATP, dCTP, dGTP, dTTP をそれぞれ $2\mu\text{l}$ (10 mM), RNase inhibitor $1\mu\text{l}$ (20 U/ μl), random hexamers $1\mu\text{l}$ (50 μM), reverse transcriptase $1\mu\text{l}$ (50 U/ μl) および無菌蒸留水を加えて $20\mu\text{l}$ とし, 15 分間 42°C に保ち, 次に 99°C 5 分間の加熱により reverse transcriptase を不活化し, cDNA を作製した. 次に 2.5.2 で作製した sense primer, antisense primer および AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus, USA) を加え, DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, USA) を使用して PCR を施行した. PCR の条件は, 95°C 1 分, 60°C 1 分を 1 サイクルとし, 35 サイクル行った. 増幅終了後, 反応液の一部をとり, 1% アガロースゲル (Agarose, Bio-Rad, USA) 上で電気泳動を行って, 臭化エチジウムで染色した.

2.5.4 NCAM cDNA プロブの作製

ラット脳から 2.5.1 と同様に total RNA を抽出し, 2.5.3 と同様の方法で cDNA を作製し 2.5.2 で作製した sense primer および antisense primer を用い同様に PCR を行った. 1.5% アガロースゲル (Sea Plaque, USA) 上で電気泳動を行い, 臭化エチジウムで染色した後, 目的の 456 bp のバンドを切り出し, GENE CREAN II Kit (Bio101, USA) を用いて抽出した. この抽出物を, 制限酵素 (Msp I Takara, 東京) で処理し, 予測される 172 bp と 284 bp に分かれることを確認した⁸⁾. この抽出した鋳型 DNA 25ng に, random primer $2\mu\text{l}$, 無菌蒸留水 $2\mu\text{l}$ を加え 95°C で 3 分間加熱後, 急冷し鋳型 DNA を 1 本鎖とし, $10\times$ buffer, dNTP mixture 各 $2.5\mu\text{l}$, [α - ^{32}P] dCTP $5\mu\text{l}$, Klenow fragment $1\mu\text{l}$ を加え 37°C で

時間保温した後, 65°C で 5 分間加熱し酵素を失活させた. 95°C で 3 分間加熱した後水中で急冷し, 得られた産物をエタノール沈殿し, NCAM cDNA プロブとして使用した.

さらに Fig. 1 に示す sense primer と antisense primer の間に含まれる合成ヌクレオチドを作製した. この合成ヌクレオチド $1\mu\text{l}$ (500 ng) に, $10\times$ kinase buffer $2.5\mu\text{l}$, T4 polynucleotide kinase (10 u/ml) $1.5\mu\text{l}$, [γ - ^{32}P] dATP $15\mu\text{l}$, 無菌蒸留水 $5\mu\text{l}$ を加え, 37°C で 45 分間保温した後, 65°C で 5 分間加熱, セントリコン-3 (Amicon, USA) を用い 6,500 rpm, 25°C , 2 時間遠心し, 次に回収用キャップを装着後 2,500 rpm, 2 分間遠心後濃縮液を回収し, DNA プロブとして使用した.

2.5.5 PCR-サザンプロット

2.5.3 で得られた PCR 産物を 1.5% アガロースゲル (Agarose, Bio-Rad, USA) で電気泳動後, ニトロセルロース膜に転写し, プレハイブリダイゼーション (42°C , 一昼夜) 後, 2.5.4 で作製した NCAM cDNA プロブと共に恒温槽内でハイブリダイゼーション (42°C , 一昼夜) を行った. 次にニトロセルロース膜を洗浄後 XAR-5 (Kodak, USA) フィルムを用い, -80°C においてオートラジオグラフィを行った. さらに, 2.5.4 で作製した合成オリゴヌクレオチドプロブを用い同様にサザンプロットを行った.

3 研究成績

3.1 抗 NCAM 抗体の特異性

今回使用した抗 NCAM モノクローナル抗体の特異性を検討するために, ラット脳との反応性をウェスタンブロット法により確認した. Fig. 2 のレーン 3 に示すように, 還元条件下において対照に用いたモノクローナル抗体は可溶性抗原と反応性を示さなかったが, レーン 2 に示すように抗 NCAM 抗体は, ラット脳可溶性抗原の 180 kD および 140 kD 分子と反応した. ラットの脳に存在する NCAM は主として 180 kD, 140 kD であることが知られており⁹⁾, この抗体が NCAM と特異的に反応することが確認された.

3.2 ヒト胃粘膜の免疫組織学的検討

ヒト胃潰瘍各ステージの潰瘍辺縁より得られた生検組織と抗 NCAM 抗体との反応性を免疫組織学的に検討した. Fig. 3a は治癒期のヘマトキシリン-エオシン (H-E) 染色であるが, 高度の炎症細胞浸潤を認める. これを抗 NCAM 抗体と反応させると, Fig. 3b に示すように腺管上皮細胞と強く反応した. 連続切片

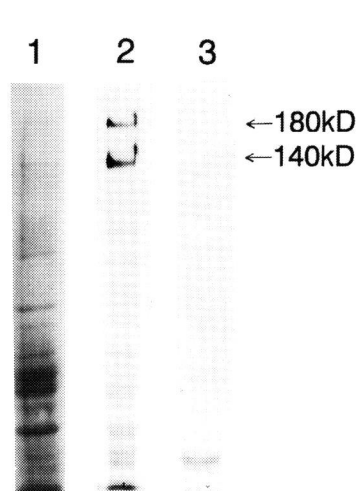


Fig. 2 Western blot analysis of the extract from rat brain by anti-NCAM monoclonal antibody under reducing condition.

1. Coomassie staining
2. Anti-NCAM monoclonal antibody (IgG1)
3. Control antibody (anti-idiotypic monoclonal antibody to YH206, IgG1)

における検討で、ほぼ同部位が抗 PCNA 抗体および抗 EMA 抗体とも反応していた (Fig. 3c, 3d)。これを詳細にみれば、抗 EMA 抗体は抗 NCAM 抗体に比較して、表層に近い腺管を染色していた。Fig. 3e は抗 NCAM 抗体を使用した際の強拡大 ($\times 170$) 写真であるが、上皮細胞の側・基底膜面が強く染まっている。一方、図には示していないが、瘢痕期組織では、その染色性は減弱もしくは消失していた。

3.3 ラット胃粘膜との反応性

ラット酢酸潰瘍を作製後 14 日後の胃粘膜には、中心部に炎症細胞浸潤と壊死物質が認められ、潰瘍底には一層の円柱上皮が認められることより、ヒト胃潰瘍治癒過程期に相当すると判断される。これを healing stage とし、肉眼的に潰瘍底が認められず瘢痕化したものを, scarring stage とした。

これらの組織について免疫組織学的検討を行ったが、Fig. 4a に示すように、ラット酢酸潰瘍においても辺縁粘膜腺管上皮細胞に抗 NCAM 抗体が強い反応を示した。また、その局在は細胞質核上部および細胞膜に認められた。連続切片を用い抗 PCNA 抗体と反応させたところ、ほぼ同じ部位に陽性所見が得られた (Fig. 4b)。興味あることに、抗 NCAM 抗体との反応性は、瘢痕期にはもはや認められなかった (Fig. 5a,

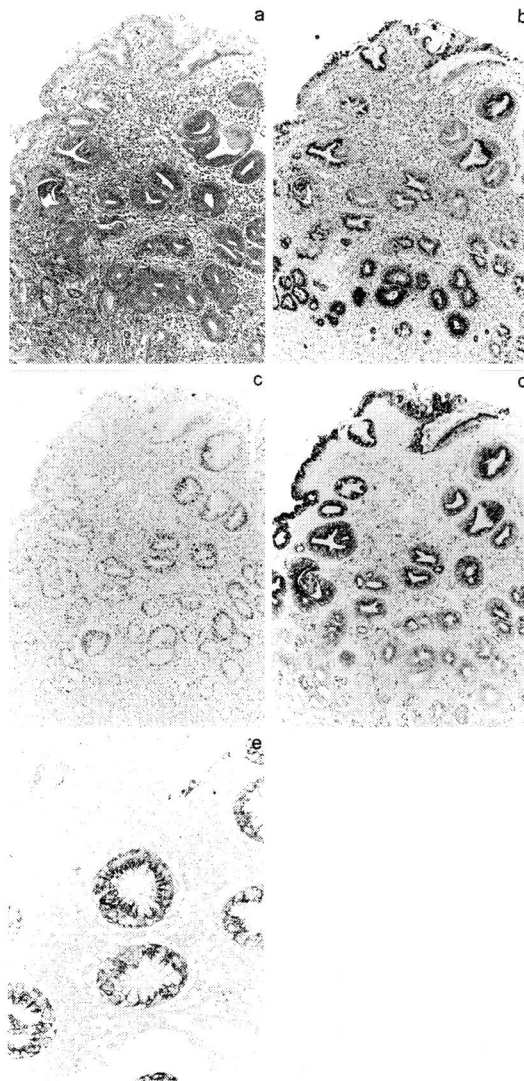


Fig. 3 Immunohistological findings of the gastric epithelial cells adjacent to a human gastric ulcer in the healing stage.

- 3a. H-E staining (magnification: $\times 85$)
- 3b. anti-NCAM monoclonal antibody ($\times 85$)
- 3c. anti-PCNA monoclonal antibody ($\times 85$)
- 3d. anti-EMA monoclonal antibody ($\times 85$)
- 3e. anti-NCAM monoclonal antibody ($\times 170$)

5b)。

3.4 ヒト胃潰瘍およびラット酢酸潰瘍各ステージごとの比較

そこで多数例について比較を行った。まず、ヒト胃潰瘍各ステージごとに NCAM の発現を免疫組織学的に検討すると、Table 1 に示すように、活動期 50%

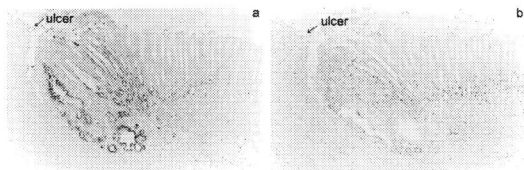


Fig. 4 Immunohistological findings of rat gastric epithelial cells adjacent to an acetic acid induced gastric ulcer (healing stage).

4a. anti-NCAM monoclonal antibody ($\times 85$)

4b. anti-PCNA monoclonal antibody ($\times 85$)

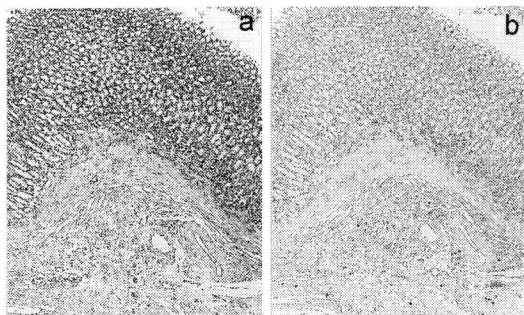


Fig. 5 Histological and immunohistological findings of rat gastric mucosa adjacent to an ulcer scar.

5a. H-E staining (magnification: $\times 85$)

5b. anti-NCAM monoclonal antibody ($\times 85$)

($n=8$), 治癒過程期 89% ($n=9$), 癒痕期 29% ($n=7$) に陽性例が認められ, 活動期および治癒過程期あわせて 71% (17 例中 12 例) と正常粘膜および癒痕期と比較して, 有意の差をもって高頻度に陽性例が認められた ($p<0.01$, χ^2 検定). ラット酢酸潰瘍においても (Table 2), healing stage で 100% 陽性 ($n=27$), scarring stage 33% ($n=10$), 正常部 10% ($n=10$) であり, 活動期および治癒過程期の胃粘膜上皮は正常粘膜および癒痕期と比較して, 明らかに NCAM の発現が増強していた ($p<0.01$, χ^2 検定). すなわち, ヒトおよびラットいずれの場合にも, 活動期および治癒過程期の場合に, 正常粘膜および癒痕期と比較して高頻度に NCAM の発現が認められた.

3・5 胃粘膜抽出物のドットプロット解析

ラット酢酸潰瘍辺縁粘膜からの抽出物を抗原として, 抗 NCAM 抗体によりドットプロットを行うと, Fig. 6 に示すように, 組織蛋白濃度 1 mg の胃粘膜抽出物との間に陽性反応を認めた. またこの反応は, ラット脳抽出物による吸収試験で吸収された. 正常胃粘膜抽出物ならびにコントロールとして用いた BSA とは反応しなかった. このことより, ラット酢酸潰瘍

Table 1 Immunohistological reactivity of anti-NCAM antibody to human gastric mucosa adjacent to gastric ulcer at each stage.

	Stage			Normal
	Active	Healing	Scarring	
No. positive/	4/8	8/9	2/7	2/15
No. tested	(50%)	(89%)	(29%)	(13%)

Table 2 Immunohistological reactivity of anti-NCAM antibody to rat gastric mucosa adjacent to gastric ulcer at each stage.

	Stage		Normal
	Healing	Scarring	
No. positive/	27/27	3/10	1/10
No. tested	(100%)	(33%)	(10%)

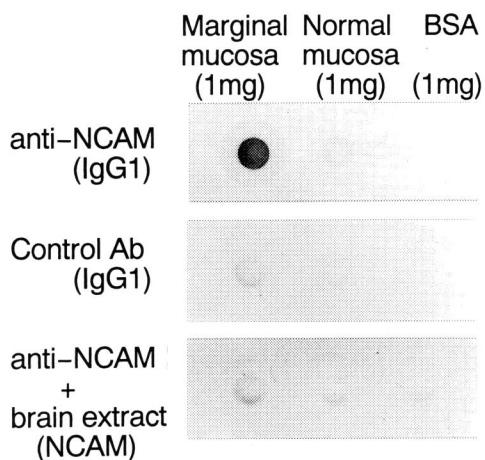


Fig. 6 Dot blot analysis of rat gastric mucosal extract. Rat gastric mucosal extract from the margin of gastric ulcer (Marginal mucosa) reacted with anti-NCAM antibody, but this reaction was halted by adding rat brain extract.

辺縁粘膜には NCAM 蛋白の発現が確認された.

3・6 胃粘膜における NCAM mRNA の発現

以上の点をさらに検討するため, ラット胃粘膜を用いて NCAM mRNA について実験を行った. まず, RT-PCR の結果を Fig. 7a に示す. ラット脳から抽出した mRNA では 456 bp にバンドを認めた. また, ラット酢酸潰瘍辺縁粘膜から抽出した mRNA の場合には, 数本のバンドを認めたが, 脳と同様に 456 bp の位置にもバンドを認めた. 一方, ラット胃正常粘膜から抽出した mRNA でも数本のバンドを検出した

が、456 bp の位置にはバンドは認めなかった。次に、2・5・4 に述べた方法で 456 bp のバンドを切り出し、これをプローブとして PCR-サザンプロットを施行した。その結果を Fig. 7b に示す。陽性コントロールとして用いたラット脳とは 456 bp に強いバンドを認め、これと同じ位置にラット胃潰瘍辺縁粘膜においてもバンドを検出した。正常粘膜ではバンドを認めなかった。

さらに、Fig. 1 に示した合成オリゴヌクレオチドプローブ (5'-GGCAGGCCTGCAGTGGGGCT-3') を用いたサザンプロットでも、同様にラット脳およびラット胃粘膜とも 456 bp にバンドを認めた (Fig. 7c)。今回使用した sense および antisense primer により増幅される部分は Fig. 1 に示すように膜貫通部分を含んでおり、さらにこの間に位置する合成オリゴヌクレオチドプローブとも反応することから、胃粘膜治癒過程期に発現する NCAM は膜貫通部分を有するものと考えられた。

4 考 察

NCAM は、主に胎生期の神経系細胞や筋細胞に発現するホモフィリックな細胞間接着分子として機能することが知られている。また、その構造より NCAM は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、5 個の免疫グロブリンドメインとフィブロネクチンタイプ III 様ドメインを有する糖蛋白質である^{10,11)} (Fig. 8)。ラットでは 3 種類の isoform が知られており、その N 端は 3 種類とも全く同様に、膜貫通部位および細胞質ドメインが異なっている。最も長い NCAM は 180 kD で主にニューロンに発現している。140 kD の NCAM は細胞内ドメインが短縮しており、主にニューロンおよび筋細胞に発現している。また 120 kD の NCAM は膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを欠いており¹²⁾、細胞膜には phosphatidyl inositol glycan を介して結合しているとされる¹³⁾。細胞間の結合に際しては、N 端側の 4 個の C2 ドメインがお互いに結合する¹⁴⁾。

今回使用したモノクローナル抗 NCAM 抗体は、ウェスタンブロット法でラット脳抽出物と反応し、180 kD および 140 kD にバンドを認め、細胞質ドメインを有する NCAM を検出し得ることが示された。

次に、NCAM の神経あるいは筋以外の組織分布については、内分泌組織や内分泌系腫瘍¹⁵⁾、あるいはナチュラルキラー (NK) 細胞に発現しているとする報告¹⁶⁾があるが、胃粘膜上皮との関係については我々

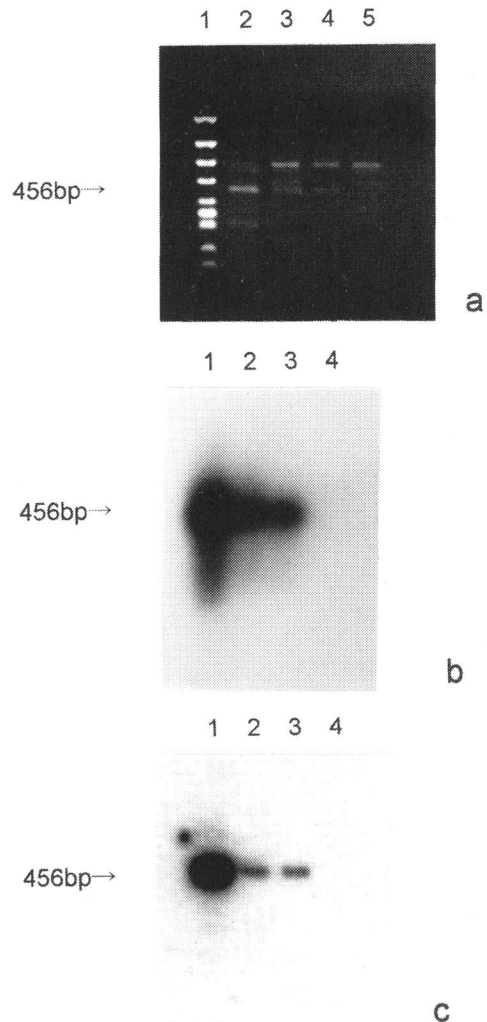


Fig. 7 Genetic analysis of RNA derived from rat gastric mucosa.

7a: RT-PCR findings

1. Marker
2. Total RNA from brain extract
- 3, 4. Total RNA from gastric extract from rat gastric mucosa adjacent to the acetic acid induced ulcer
5. Gastric extract from normal mucosa

7b: PCR Southern blot analysis (probe: NCAM cDNA)

1. Brain RNA
- 2, 3. Gastric RNA taken from the margin of a rat acetic acid induced ulcer
4. Gastric RNA taken from normal gastric mucosa

7c: Southern blot analysis (probe: oligonucleotide)

1. Brain RNA
- 2, 3. Gastric RNA taken from the margin of rat acetic acid induced ulcer
4. Gastric RNA taken from normal gastric mucosa

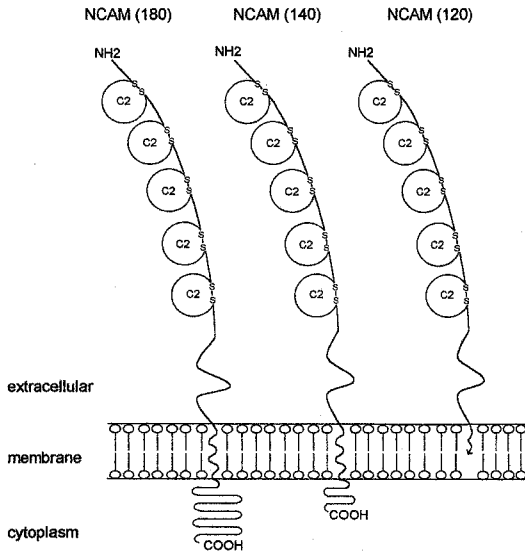


Fig. 8 Schematic illustration of the NCAM structure. The NCAM consists of three major isoforms with different molecular sizes (180, 140 and 120 kD). NCAM-180 and -140 have transmembrane domains, but their cytoplasmic domains are different. The NCAM-120 lacks a transmembrane domain and is bound to the membrane by phosphatidyl inositol linkage.

の知る限り報告されていない。そこで、次にこの抗体を用いて、ヒト胃潰瘍および実験潰瘍モデルであるラット酢酸潰瘍において、免疫組織学的検討を行った。ラットのNCAMとヒトのそれとに関しては、アミノ酸レベルで強い相同性があることが知られており、今回用いた抗NCAMモノクローナル抗体もヒトNCAMと反応することが確認されている。

今回の研究により、治癒期のヒト胃潰瘍およびhealing stageのラット酢酸潰瘍辺縁粘膜上皮細胞の細胞質および細胞膜に、NCAMの発現が高頻度に認められることを明らかにした。この反応は正常粘膜および癒着期に減弱あるいは消失していたことから、胃潰瘍の修復過程にNCAMが関与していることが推測される。間質に存在するNK細胞にも発現しているという報告¹⁶⁾もあるため、ヒト胃潰瘍において連続切片を用い、抗ヒトEMA抗体(上皮細胞と反応する)との反応性を検討した。その結果、抗NCAM抗体と同様の染色性を示したことから、NCAMが治癒期の胃潰瘍辺縁粘膜上皮に発現していることはこの面からも強く示唆された。興味あることにこれらの染色性はPCNAの分布と一致しており、増殖の盛んな細胞群

にNCAMが多量に発現しているものと推察される。また、その染色結果から、NCAMは、細胞質内の核上部および細胞膜に強く発現していると思われた。さらに、治癒期の潰瘍辺縁粘膜上皮を用いたドットプロット解析からも、NCAMタンパクの発現を認めた。この反応はラット脳抽出物による吸収試験では消失しており、また、コントロールとして用いたBSAとは反応しない。このことから、NCAMは治癒期の潰瘍辺縁粘膜に発現していることが確認された。このNCAMの分子量を推定するため同じ材料を用いてウェスタンブロット法を数度試みたが成功しなかった。そこで、mRNAレベルでの検索を行った。

すなわち、膜貫通部および細胞内ドメインを一部含むようにprimerを設定しRT-PCRおよびサザンブロットを施行した。その結果、予測された456 bpにバンドを認めた。この解析により胃粘膜上皮に発現するNCAMの分子量は、膜貫通部位および細胞内ドメインを有する140 kDまたは(および)180 kDを含むものと推測された。最近、140 kDのNCAMならびに180 kDのNCAMが細胞の側・基底膜に発現し、120 kDのNCAMがapical membraneに局在することが、トランスフェクション法をもちいたイヌの腎上皮における実験系によって明らかにされており、膜貫通部位および細胞内ドメイン構造が、極性を持ったNCAM発現のシグナルとなっている可能性が示唆されている¹⁷⁾。この点からも、胃粘膜上皮に発現するNCAMは、細胞間の結合、組織再構築に関わり、潰瘍治癒過程に何らかの重要な役割を果しているものと推測される。今後はこのNCAMの発現を誘導する機序を明らかにすることにより、胃潰瘍の修復過程がさらに明確になるものと推察された。

5 要 約

1) ヒト胃潰瘍およびラット酢酸潰瘍治癒期の辺縁粘膜上皮細胞において、免疫組織学的検索によりNCAMの発現を高頻度に認めた。

2) ラット酢酸潰瘍治癒期の辺縁粘膜からの可溶性抗原におけるドットプロット解析によってもNCAM蛋白の発現を認めた。

3) RT-PCR法およびPCRサザンブロット法によりラット酢酸潰瘍辺縁粘膜細胞に発現するNCAMは膜貫通部位を含むことが明らかになった。

以上よりヒト胃潰瘍およびラット酢酸潰瘍治癒期においてその辺縁粘膜にNCAMが発現していることが明らかとなった。この分子は組織修復など潰瘍治癒に

何らかの役割を果たしているものと思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲いただいた札幌医科大学谷内 昭学長ならびに今井浩三教授に深謝いたします。また、RT-PCR法の解釈に貴重なご示唆をいただいた伊東文生博士(同大学内科学第一講座)に感謝いたします。

文 献

1. Edelman GM. Cell adhesion and morphogenesis. The regulator hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81: 1460-1464.
2. Edelman GM. Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 1985, 54: 135-169.
3. Takagi K, Okabe S, Saziki R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. *Jpn J Pharmacol* 1969, 19: 418-426.
4. Sugiyama T, Imai K, Ono A, Takayama Y, Tsujisaki M, Taki T, Hinoda Y, Yachi A. Conformational structure of monoclonal anti-idiotypic antibody to the monoclonal anti-adenocarcinoma-associated carbohydrate antibody YH206. *J Immunol* 1991, 146: 3097-3101.
5. Heyderman E, Strudley I, Powell G, Richardson TC, Cordell JL, Mason DY. A new monoclonal antibody to epithelial membrane antigen (EMA)-E29. A comparison of its immunocytochemical reactivity with polyclonal anti-EMA antibodies and with another monoclonal antibody, HMFG-2. *Br J Cancer* 1985, 52: 355-361.
6. Cordell J, Richardson TC, Pulford KAF, Ghosh AK, Gatter KC, Heyderman E, Mason DY. Production of monoclonal antibodies against human epithelial membrane antigen for use in diagnostic immunocytochemistry. *Br J Cancer* 1985, 52: 347-354.
7. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979, 18: 5294-5299.
8. Small SJ, Shull GE, Santoni MJ, Akeson R. Identification of a cDNA clone that contains the complete coding sequence for a 140-kD rat NCAM polypeptide. *J Cell Biol* 1987, 105: 2335-2345.
9. Chuong C-M, McClain DA, Streit P, Edelman GM. Neural cell adhesion molecules in rodent brains isolated by monoclonal antibodies with cross-species reactivity. *Neurobiology* 1982, 79: 4234-4238.
10. Rothbard JB, Brackenbury R, Cunningham BA, Edelman GM. Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains. *J Biol Chem* 1982, 257: 11064-11069.
11. Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Früh K, Schachner M. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 1988, 334: 701-703.
12. Nybroe O, Albrechtsen M, Dahlin J, Linnemann D, Lyles JM, Moller CJ, Bock E. Biosynthesis of the neural cell adhesion molecule: characterization of polypeptide C. *J Cell Biol* 1985, 101: 2310-2315.
13. He H-T, Barbet J, Chaix J-C, Goridis C. Phosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of NCAM-120, the smallest component of the neural cell adhesion molecule. *Eur Mol Biol Organ J* 1986, 5: 2489-2494.
14. Cunningham BA, Hoffman S, Rutishauser U, Hemperly JJ, Edelman GM. Molecular topography of the neural cell adhesion molecule NCAM: Surface orientation and location of sialic acid-rich and binding regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80: 3116-3120.
15. Langley OK, Aletsee-ufrecht MC, Grant NJ, Gratzl M. Expression of the neural cell adhesion molecule NCAM in endocrine cells. *J Histochem Cytochem* 1989, 37: 781-791.
16. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* 1991, 146: 4421-4426.
17. Powell SK, Cunningham BA, Edelman GM, Rodriguez-Boulan E. Targeting of transmembrane and GPI-anchored forms of N-CAM to opposite domains of a polarized epithelial cell. *Nature* 1991, 353: 76-77.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部内科学第1講座 一柳伸吾