

モノクローナル抗体によるラット肝細胞膜 Wheat Germ Agglutinin 結合糖蛋白の解析

高坂 一 小川 勝 洋
札幌医科大学病理学第2講座 (主任 森 道夫 教授)

Analysis of Wheat Germ Agglutinin-Binding Glycoproteins of
Rat Hepatocyte Plasma Membrane by Monoclonal Antibodies

Hajime TAKASAKA and Katsuhiko OGAWA
Departement of Pathology (Section 2), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. M. Mori)

ABSTRACT Five monoclonal antibodies (2D2, 3C3, 6B4, 10B1 and Y-1) directed to the rat hepatocyte plasma membrane were prepared by immunizing mice with a wheat germ agglutinin (WGA)-binding fraction of a solubilized liver plasma membrane. By the indirect immunocytochemical method, 2D2 and 10B1 could label specifically the bile canalicular membrane. On the other hand, 3C3, 6B4 and Y-1 predominantly labeled the sinusoidal surface of the hepatocytes and the surface of endothelium of all tissues, and to a lesser degree the lateral and bile canalicular membrane of hepatocytes. By Western blotting analysis, each antibody was directed to proteins with a different molecular weight. After isolation of hepatocytes by collagenase, the plasma membrane specialization was lost, and all the antibodies reacted to the entire surface of the isolated hepatocytes. When the hepatocytes were cultured, 2D2 (specific for the bile canalicular membrane) labeled the cell-cell adherent sites and the membrane of bile canaliculus-like structures, indicating that the bile canaliculus specific molecules are redistributed to these sites. Supplement of 3C3, 6B4 and Y-1 (predominantly reacting to the sinusoidal membrane) to the culture medium resulted in a strong inhibition of adhesion of hepatocytes to the substrate. This suggested that those antibodies (3C3, 6B4 and Y-1) inhibit the receptor molecules which may involve in cell substrate adhesion. (Received January 9, 1988 and accepted March 28, 1988)

Key words: Rat hepatocyte plasma membrane, Wheat germ agglutinin, Monoclonal antibodies, Bile canaliculus, Cell adhesion

1 緒 言

肝細胞は極性を持つ上皮細胞で、その細胞膜は、形態と機能の上で異なった、3つのドメインに分けられる。第1のドメインは類洞に面する細胞膜で、不規則な microvilli を有し、asialoglycoprotein レセプターや、ホルモンレセプターが豊富なことから、血液との物質交換や、情報の受容が行われると考えられている。第2のドメインは、細胞膜同士が、隣接する側壁の細胞膜で、ここには gap junction などの接着装置が存在し、細胞同士の接着や、コミュニケーションが行われている。

第3のドメインは毛細胆管膜で、側壁の細胞膜とは tight junction によって隔てられ、microvilli を持ち、胆汁の分泌を行っている。それぞれのドメインには、このような形態と機能の違いに関連した、特異な分子が存在することが想定されているが、これまで明らかにされた分子種は、必ずしも多くない¹⁾。

一方、肝細胞をコラゲナーゼなどで分離し、浮遊化すると、肝細胞は球形となり、細胞表面はほぼ均等に microvilli に被われ、*in situ* で見られる各ドメインの形態の特徴は失われる²⁻⁴⁾。これらの細胞を培養すると、肝細胞は短時間内に、基質または細胞同士で接着し、

細胞間の接着面には、再び毛細尿管に類似する構造が出現することが知られている^{6,7)}。これらの過程には、細胞接着分子(L-CAM)⁸⁻¹¹⁾の反応、細胞外基質とそのレセプターの反応、細胞接着装置の再形成、各ドメイン特異分子の再集合など、多彩な変化に伴うことが予想されるが、細胞表面分子の変化については、これまでほとんど明らかにされていない。

肝細胞膜には多くの糖蛋白が存在し、wheat germ agglutinin (WGA) は肝細胞膜の全てのドメインと結合することが明らかにされている^{12,13)}。そこで我々は、WGAに親和性を持つ肝細胞膜糖蛋白を抗原として、モノクローナル抗体(MoAb)を作製し、毛細尿管膜ドメインに特異的なMoAbと、主に類洞面細胞膜に強く反応するMoAbを得ることができた。本研究では、これらのMoAbをprobeとして、①各MoAbにより認識される抗原の分子量と、正常組織中での分布を明らかにするとともに、②分離肝細胞での、培養後の経時的形態変化と抗原分布との関係、③培養肝細胞の、基質接着性に対する各MoAbの影響について検索を行い、それぞれの抗原の特性を検討した。

2 実験方法

2.1 抗原の調製

2.1.1 ラット肝細胞膜の分離

ラット肝細胞膜の分離は、Ray¹⁴⁾の方法を改良して行った。Sprague-Dawley (SD) ラット(体重200~300g)をエーテル麻酔下で開腹し、門脈よりphosphate buffered saline (PBS)を灌流して脱血後、肝を摘出し、food millで細切した。これをルーズなPotter Elvehjem型ホモジナイザーで0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride添加1mM炭酸水素ナトリウム緩衝液中でホモジナイズし、ガーゼで濾過したのち、上清が透明になるまで4,420×g、10分間遠心を繰り返した。沈澱を上記緩衝液中に再びホモジナイズし、これにシヨ糖を加えて45%(W/W)シヨ糖溶液とし、30%-45%不連続シヨ糖密度勾配遠心法にて15,900×g、12時間遠心し、30%-45%の境界に浮遊する分画を得た。これをさらに45%(W)シヨ糖溶液とし、この上に43%, 39%, 30%シヨ糖溶液を重ね、日立RPS27-2型ローターを用いて、90,000×gで1時間超遠心(日立65p)し、39%-30%境界に浮遊する分画を得た。これを電子顕微鏡で観察したところ、ほぼ純粋な肝細胞膜であり、またglucose-6-phosphatase及び5'-nucleotidase活性の測定では、後者の活性が強く、前者の活性はほとんど見られなかったことから、肝

細胞膜分画として抗原の調製に用いた。

2.1.2 膜蛋白の可溶化と抗原の調製

次に、得られた肝細胞膜を0.15M NaCl, 50mM Hepes, 0.1% Triton X-100, 0.01% sodium dodecyl sulfate (SDS) 溶液(pH 7.6)中で、4℃で攪拌して可溶化した。これを10,000×g、1時間超遠心し、上清をWGAを固定したagaroseカラム(0.8×1.5cm)(Vector Lab. Inc.)に吸着させ、次いで0.15M NaCl, 50mM Hepes, 0.1% Triton X-100 溶液(pH 7.6)でカラムを充分洗浄した後、0.3M N-acetylglucosamineを含む同溶液で溶出し、得られた糖蛋白を抗原として以後の実験に用いた¹⁵⁾。

尚、ラット15匹分の肝より膜蛋白50mgが得られ、これより約1mgのWGA結合糖蛋白が得られた。

2.2 モノクローナル抗体の作製

Balb/cマウス腹腔内に、上記糖蛋白20μgをFreund's complete adjuvantと混合して投与し、その後毎週1回、同量の抗原をFreund's incomplete adjuvantと共に計4回投与して、追加免疫を行った。最終免疫の4日後に、免疫マウス脾細胞 1×10^8 個と、Balb/cマウス由来骨髄腫細胞株NS-1 2×10^7 個を、Köhler and Milstein¹⁶⁾の方法に準じて、polyethylene glycol #4000(半井化学)を用いて融合させた。融合細胞を10%FCS加HAT medium (1×10^{-4} M hypoxanthine, 4×10^{-7} M aminopterin, 1.6×10^{-5} M thymidine in RPMI-1640)に浮遊し、24穴プレートで5%CO₂, 37℃にて約10日間培養した。

抗体産生クローンのスクリーニングは、下記のenzyme linked immunosorbent assay (ELISA)、および蛍光抗体法で行った。ELISA法は、上記抗原溶液(10μg/ml)100μlをmicroplate (Immulon 2, Dynatech Lab. Inc., Alexandria, U. S. A.)に吸着させ、これら融合細胞上清、peroxidase conjugated rabbit anti-mouse Ig (DAKO) 50μlを順次反応させ、0.015% 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 0.01% H₂O₂, 0.05Mクエン酸緩衝液(pH 4.0)にて発色させ、自動ELISA reader (Dynatech MR600)を用い、410nmの波長の吸光度を測定した。

MoAb産生株を、Balb/cマウス腹腔内に移植して腹水化し、得られた腹水から、硫酸塩析にて免疫グロブリンを精製した。

MoAbのiso-typeは、rabbit anti-mouse IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM, IgA (Zymed Lab. Inc., San Francisco, U. S. A.)を用い、ELISA法に検索

した。

2.3 抗ラット肝細胞膜蛋白ポリクローナル抗体 Fab フラグメントの作製

2.1 で分離、可溶化したラット肝細胞膜蛋白を、Freund's complete adjuvant と共に、10 日ごとに 5 回、家兎に皮下注射し、抗血清を得た。これを硫酸で塩析し、DE-52 カラムによるイオン交換クロマトグラフィを行い、IgG 分画を得た。IgG 50 mg あたり 1 mg のペパイン(Sigma)を加え、0.01 M cystein-HCl, 2 mM EDTA 溶液中で 37°C, 12 時間消化し、Sephadex G-100 カラムにてゲル濾過し、次に Protein-A Sepharose により未消化の IgG と Fc フラグメントを吸着除去し、Fab 分画を得た。また、蛍光抗体法により、この抗体が特異的に肝細胞膜と反応することを確認した。

2.4 抗原分子の検索

可溶化した膜蛋白 1 mg を、5% 2-mercaptoethanol, 2% SDS を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) 100 μ l に溶解し、約 3 分間沸騰した。これを試料として、Laemmli¹⁷⁾の方法に準じて、7.5% polyacrylamide, 0.1% SDS (SDS-PAGE) の条件で、スラブゲルを用いて電気泳動を行い、ゲルの分子量マーカー蛋白のレーンと、可溶化した膜蛋白を展開した部分とを切り離し、前者を silver stain kit (Bio-rad, California, U. S. A.) を用いて銀染色し、後者を Western blotting に用いた。

泳動分離した膜蛋白は、トランスブロッティング装置 (東洋化学) にて、Zeta-probe membrane (Bio-rad) に上に blotting した。次いで 5% スキムミルク, 0.1% Triton X-100 (PBS) 液に浸漬後、名 MoAb を室温で 1 時間反応させた。洗浄後、200 倍希釈の peroxidase conjugated rabbit anti-mouse Ig (DAKO) を加え、室温で 1 時間反応させ、十分な洗浄後、0.015% 3, 3'-diaminobenzidine (DAB), 0.01% H₂O₂, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) で発色させた。

2.5 各 MoAb による免疫染色

2.5.1 酵素抗体法

SD, Fisher 344 (F344) 及び Wistar ラットの肝、腎、消化管、心、脾、膵、表皮、唾液腺の凍結切片、及びホルマリン固定パラフィン切片、SD ラットの培養肝細胞について、酵素抗体法 (間接法) により抗原の分布を検索した。

凍結切片又は培養細胞を、95% 冷エタノールで 10 分間固定後、PBS で洗浄し、0.3% H₂O₂ を含むメタノールで 20 分間処理して、内因性ペルオキシダーゼ活性を

阻害した。PBS で洗浄したのち、5% スキムミルク PBS にて非特異反応をブロックし、一次抗体として各 MoAb を、室温で 1 時間反応させた。洗浄後、二次抗体として、200 倍希釈の peroxidase conjugated rabbit anti-mouse Ig (DAKO) を、室温で反応させた。十分な洗浄後、0.015% DAB, 0.01% H₂O₂, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) で発色させ、ヘマトキシリンにて約 10 秒間核染した。また、パラフィン切片についても、脱パラフィン後、同様の方法で染色を行った。

2.5.2 蛍光抗体法

蛍光抗体法による観察を分離肝細胞及び肝組織について行った。分離肝細胞については未固定で、凍結切片は 95% 冷エタノール 10 分間固定後、一次抗体を反応させ、次いで fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated rabbit anti-mouse Ig (DAKO) を反応させ、十分な洗浄後 buffered glycerine に封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

2.5.3 分離肝細胞の免疫電顕

免疫電顕は分離肝細胞について行った。各 MoAb を 4°C で 30 分間反応させ、二次抗体として peroxidase conjugated rabbit anti-mouse Ig (DAKO) を加え、4°C で 30 分間反応させた後、2% グルターアルデヒドで 4°C, 20 分間固定した。その後、冷 PBS で 10 分間 3 回洗浄し、0.015% DAB, 0.01% H₂O₂, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) と室温で 5 分間反応後、冷 PBS で充分洗浄し、1% オスミウム酸 (PBS) で 1 時間固定した。PBS で洗浄後エタノールで脱水し、エポキシ包埋、超薄切片として電顕観察した。

2.6 肝細胞の分離・培養

Berry and Friend²⁾の方法に準じ、ラットをエーテル麻酔下に開腹後、門脈内にカニューレを挿入し、Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free Hanks (CMF-Hanks) 液で 3 分間、流速 10 ml/min にて灌流脱血後、37°C に加温した 0.1% コラゲナーゼを含む CMF-Hanks 液で、約 15 分間再灌流 (50 ml/min) し、同液中で肝をハサミにより細切し、ガーゼ 2 枚で濾過した。これを 50 × g, 1 分間の遠心分離を 2 回繰り返して洗浄し、Kreamer *et al.*¹⁸⁾の方法に準じて、30% Percoll を含む CMF-Hanks 液肝細胞浮遊液として、50 × g, 10 分間遠心分離した。沈澱した肝細胞を CMF-Hanks 液に浮遊させ、50 × g, 1 分間の遠心分離を 2 回繰り返して、ナイロンメッシュで濾過した。分離肝細胞の viability は、トリパンブルーによる dye exclusion test によって測定し、95% 以上の viability を示すものを、以下の実験に使用した。

肝細胞の培養は、あらかじめカバーガラス (20 × 24

cm) を底に敷いた直径 3 cm のプラスチックディッシュに、それぞれ 2×10^5 個の分離肝細胞を加え、10% FCS 加 Williams E 培地にて培養した。

2.7 分離肝細胞の基質接着に対する各 MoAb の作用

上記の方法で分離した肝細胞を、24 穴プレート (Falcon) で、1 well あたり 1.5×10^4 個、10% FCS 加 Williams E 培地 1 ml 中で 24 時間培養した。培地には、あらかじめ各 MoAb を 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{well}$ 加えておき、経時的に肝細胞の形態を観察した。24 時間後に培地を吸引除去し、PBS で各 well を洗浄し、95% 冷エタノール 10 分間固定後風乾して、ギムザ染色を施し、プレートに接着した細胞数を ocular meter を用いて測定した。対照群としては、抗体又は WGA を添加しない培地で培養したもの、抗肝細胞膜抗体 Fab, WGA を、それぞれ 1, 10 ないし 100 $\mu\text{g}/\text{well}$ 添加したものをを用いた。なお、抗体又は WGA を添加しない培地で培養した 24 時間後の接着細胞数を 100 として、他の群の細胞数を % で現し、細胞接着率とした。また各 MoAb, Fab は、それぞれ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、十分に凍結切片と反応することを蛍光抗体法により確認した。

3 結 果

3.1 Western blotting による各 MoAb の対応抗原の解析

培養上清が、ELISA 法で WGA 吸着肝細胞膜蛋白に強く反応し、蛍光抗体法でも肝細胞膜と反応する、5 種の MoAb 産生株 (2D2, 3C3, 6B4, 10B1, Y-1) を得た (Table 1)。可溶性化したラット肝細胞膜蛋白を SDS-PAGE により展開し、Western blotting によって、各 MoAb の認識する蛋白を解析した結果 (Fig. 1, Table 1), 2D2 は、85 と 105kD の 2 本のバンドを示し、85kD に強く、105kD に弱く(A)層した。3C3 は、83 と 127kD の 2 本のバンドを示したが、ともに反応は弱かった。6B4 は、主に 80~95kD の広いバンドと麒 127kD の想本のバンドを示したが、これらの他にも、弱く反応する複数

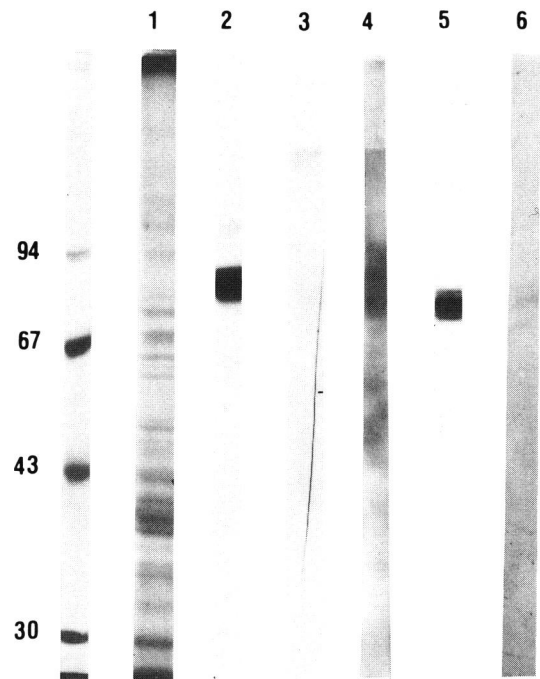


Fig. 1 Western blotting of solubilized rat hepatocyte plasma membrane proteins. Marker proteins (left lane), plasma membrane proteins, silver staining (1), 2D2 (2), 3C3 (3), 6B4 (4), 10B1 (5), and Y-1 (6).

のバンドが認められた。10B 含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) 100 μl に溶解し、約 3 分間沸騰した。これを試料として、Laemmli¹⁷⁾ の方法に準じて、7.5% polyacrylamide, 0.1% SDS (SDS-PAGE) の条件で、スラブゲルを用いて電気泳動を行い、ゲルの分子量マーカー蛋白のレーンと、可溶性化した膜蛋白を展開した部分とを切り離し、前者を silver stain kit (Bio-rad, California, U. S. A.) を用いて銀染色し、後者を Western blotting に用いた。

泳動分離した膜蛋白は、トランスブロッティング装置 (東洋化学) にて、Zeta-probe membrane (Bio-

Table 1 The reactivity of MoAbs against rat liver and other tissues.

MoAb	MW of Ag (kD) by SDS-PAGE	Ig class subclass	Distribution of Ag	
			liver	others
2D2	85, 105	IgG ₁	BC	—
3C3	83, 127	IgM	S, L, BC	endothelium
6B4	80~95, 127	IgM	S, L, BC	endothelium
10B1	81	IgM	BC	—
Y-1	82	IgM	S, L, BC	endothelium

S: sinusoidal surface, L: lateral surface, BC: bile canalicular surface

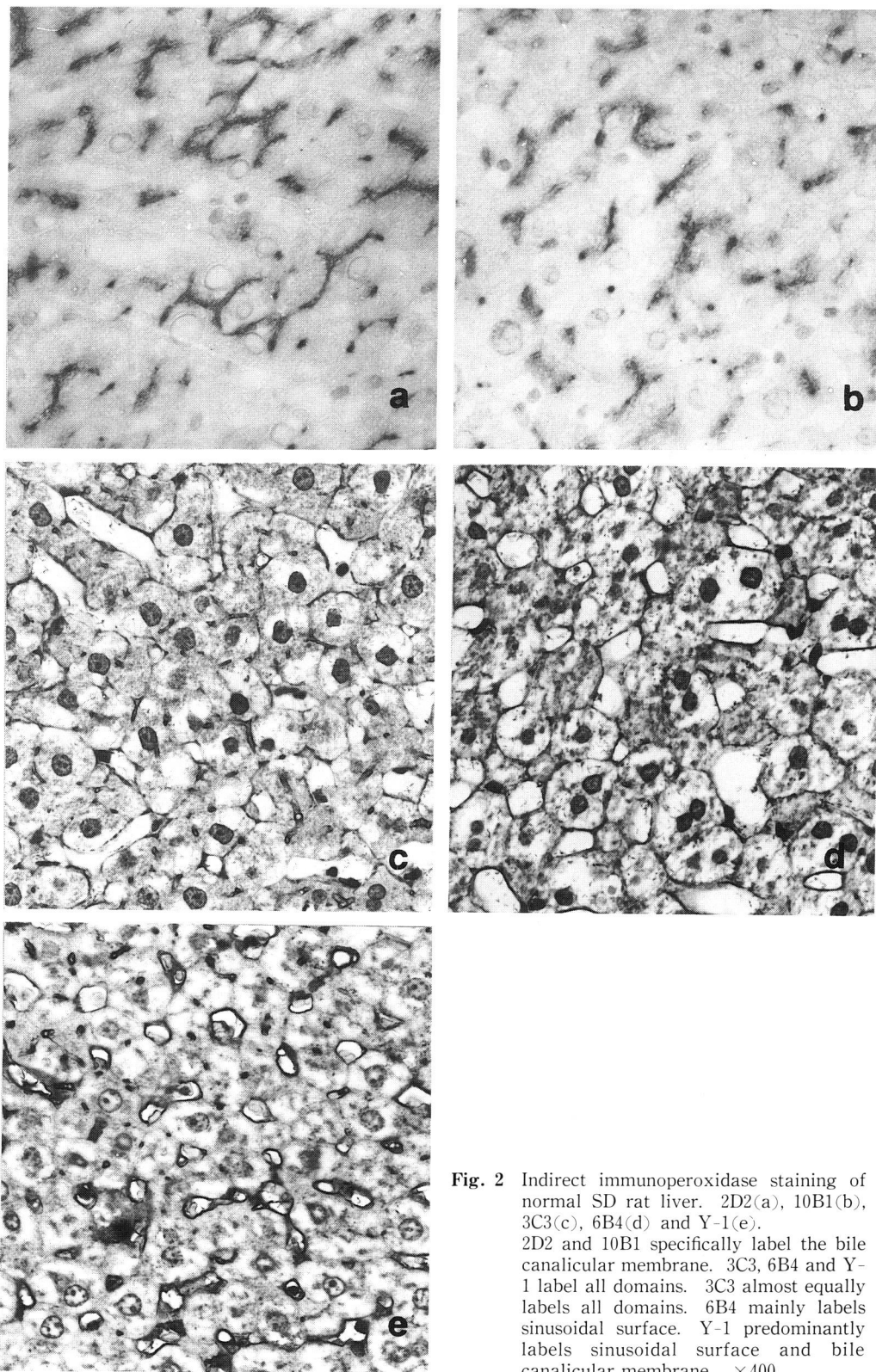


Fig. 2 Indirect immunoperoxidase staining of normal SD rat liver. 2D2(a), 10B1(b), 3C3(c), 6B4(d) and Y-1(e). 2D2 and 10B1 specifically label the bile canalicular membrane. 3C3, 6B4 and Y-1 label all domains. 3C3 almost equally labels all domains. 6B4 mainly labels sinusoidal surface. Y-1 predominantly labels sinusoidal surface and bile canalicular membrane. $\times 400$

rad) に上に blotting した. 次いで 5% スキムミルク, 0.1% Triton X-100 (PBS) 液に浸漬後, 名 MoAb を室温で 1 時間反応させた. 洗浄後, 200 倍希釈の peroxidase conjugated rabbit anti-mouse Ig (DAKO) を加え, 室温で 1 時間対して (Fig. 2c), 6B4 は類洞面に特に強く染まり, 毛細胆管及び側壁面の細胞膜では弱かった (Fig. 2d). Y-1 では類洞面, 毛細胆管に強く発現したが, 側壁面の細胞膜では弱い傾向が見られた (Fig. 2e). 3C3, 6B4, Y-1 はこの他, 肝の類洞内皮細胞を初め, 種々の組織で血管内皮細胞と反応した (Table 1). また血管内皮細胞との反応は, ホルマリン固定パラフィン包埋組織でも認められ, また検索した 3 種類のラットの系の, いずれとも同様に反応した.

3・3 培養ラット肝細胞における抗原の局在

分離直後の電顕観察では, 肝細胞は球形で, 表面は全体に microvilli を持ち, 類洞面, 側壁面, 毛細胆管面のいずれのドメインも, 同定できなかった (Fig. 3a).

分離肝細胞の蛍光抗体法 (Fig. 4a, b), 及び免疫電顕 (Fig. 3b, c) による観察では, いずれの MoAb を用いても, 細胞表面に全周性の均一な反応が見られた.

in situ の肝で, 肝細胞膜と全周性に反応する 3C3, および, 毛細胆管面とのみ反応する 2D2 を用いて, 培養肝細胞における抗原の分布を, 経時的に観察した. 培養後 2 時間では, 分離細胞同士および, 肝細胞とディッシュ面の接着が見られたが, 多くの細胞はまだ球形に近く, 伸展していなかった. いずれの抗体も, これらの細胞の細胞膜と全周性に反応したが (Fig. 5a, b), 2D2 は, 細胞同士が接着した部分に, 特に強い反応を示した (Fig. 5a). 培養後 6 時間では, 細胞は周囲に突起を伸ばし始め, 細胞同士が接着した部分に, 拡張した毛細胆管様の囊状構造が出現した. この時期でも, 3C3 は全周性に細胞膜と反応したが (Fig. 5d), 2D2 では細胞同士の接着部と, 毛細胆管様構造の膜面に, 特に強い反応を示した (Fig. 5c). 培養後 12 時間以後では, 細

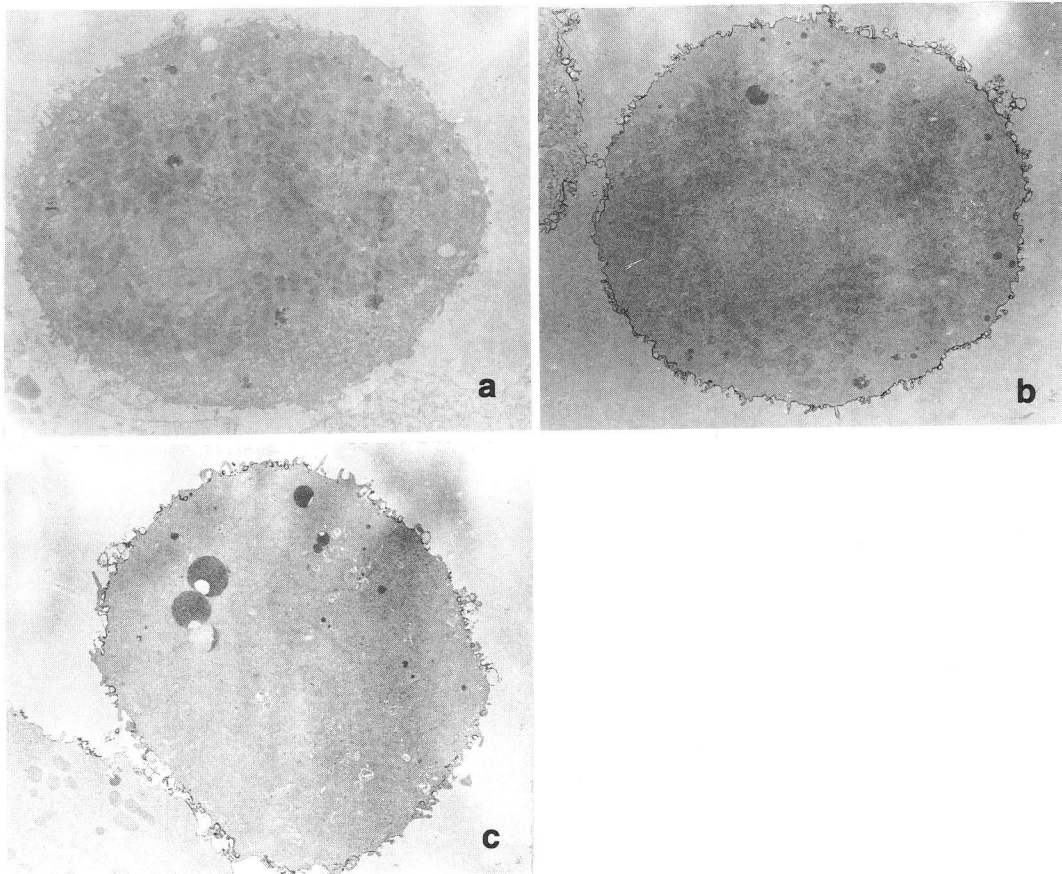


Fig. 3 Immunoelectron microscopy of freshly isolated hepatocytes labeled with MoAb. Unlabeled control (a), 2D2 (b) and Y-1 (c). Both MoAbs homogeneously label the entire surface of the cells. $\times 3000$

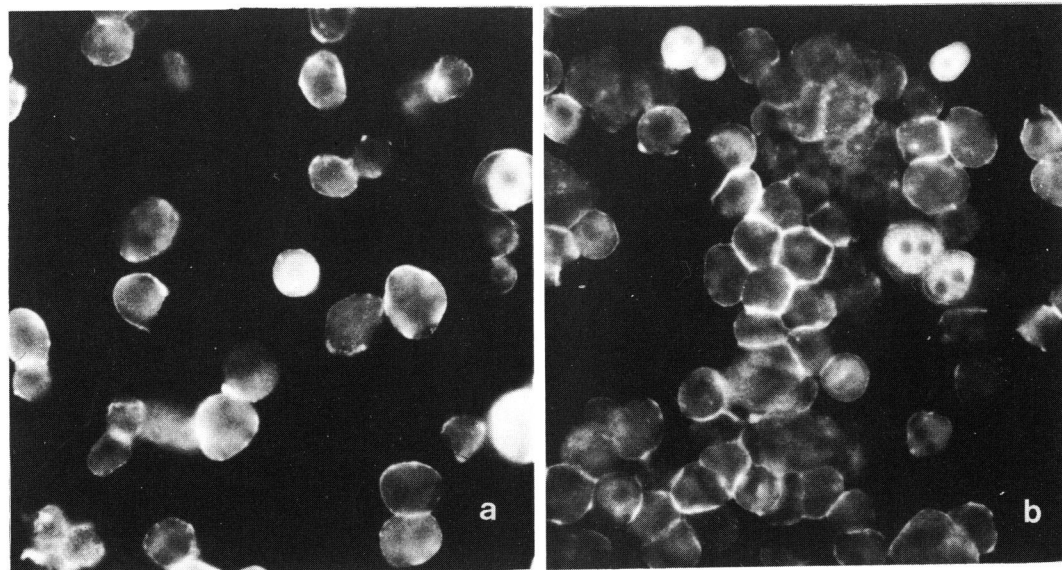


Fig. 4 Indirect immunofluorescent reactivity of MoAb to freshly isolated hepatocytes. 2D2(a) and 3C3(b). Fluorescence is seen on the entire surface of the cells. $\times 400$

胞は伸展し、薄く平らになり、毛細胆管様構造は不規則な拡張を示した。この時点では、いくつかの毛細胆管様構造の膜に2D2が反応する以外、いずれの抗体との反応も、一般に不明瞭となった (Fig. 5e, f)。

3・4 各 MoAb の細胞接着に対する作用

各 MoAb を培地中にあらかじめ添加して、肝細胞を培養し、各 MoAb の細胞接着に対する作用を経時的に観察した。類洞面の膜と強く反応する 3C3, 6B4, Y-1 を加えた場合には、培養後 1~3 時間で肝細胞の凝集が起り、24 時間までに、数十個の細胞からなる球形の塊りを形成し (Fig. 6a)、これに対し、基質と接着した細胞は僅かであった。これに対し、2D2 を加えた場合には、対照に比べて形態はほとんど変わらなかった (Fig. 6b)。10B1 を加えた場合では、1 ないし 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では、ほとんど影響が見られなかったが、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、細胞の凝集が軽度に認められた。

次に各 MoAb を培地に加え、分離肝細胞を 24 時間培養した後の、細胞接着率を検討した。2D2 は、1, 10 および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のいずれの濃度でも、細胞接着率に影響を及ぼさなかった。3C3, 6B4, Y-1 では、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で約 40~60% の接着阻止を認め、また、濃度に依存して接着阻止が増強し、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では約 80~95% の接着阻止率を示した。10B1 は、1 ないし 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では影響を与えなかったが、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、約 50% の細胞接着阻止を認めた。Fab では、1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で影響を与えなかったが、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、

約 50% の細胞接着阻止を示した。また WGA では、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では影響が見られなかったが、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では 37%、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では 83% の接着阻止が見られた (Fig. 7)。

4 考 察

4・1 MoAb と抗原分子の分布および分子量

ラット肝細胞膜の WGA 結合糖蛋白を抗原として MoAb を作製し、肝細胞膜の類洞面、側壁面、毛細胆管ドメインの全て、及び血管内皮細胞と反応する抗体 (3C3, 6B4, Y-1) と、毛細胆管ドメインのみと反応する抗体 (2D2, 10B1) を得た。これらの MoAb によって認識される抗原は、いずれも細胞膜表面のみに分布していた。

Kawakami *et al.*¹²⁾, McMillan *et al.*¹³⁾ は、標識した WGA をラット肝組織に反応させ、WGA 結合分子の局在を調べたところ、肝細胞の 3 つのドメインと、内皮細胞の表面に分布するという結果を得ている。我々の MoAb による検索では、WGA 結合分子の中に、少なくとも毛細胆管面だけに分布する分子と、全てのドメインと内皮細胞に分布するものが、それぞれ複数存在することが明らかになった。

肝細胞の毛細胆管膜に特異的に反応した 2D2 と 10B1 は、Western blotting では、それぞれ異なる分子と反応することが示唆された。これまで毛細胆管膜ドメインに特異的な蛋白として、その機能と性質が明らかに

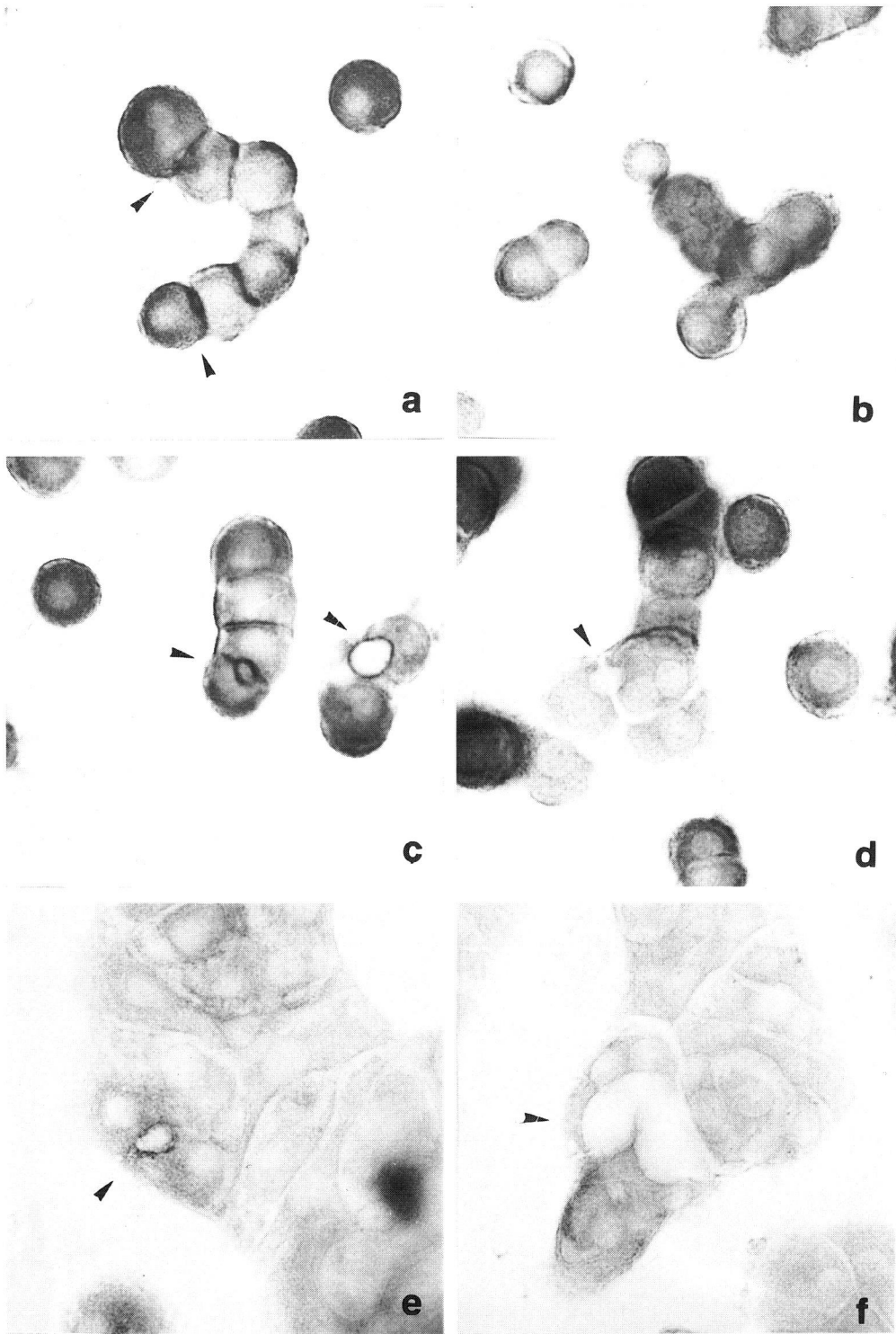


Fig. 5 Indirect immunoperoxidase staining of cultured hepatocytes with MoAb. 2hr(a, b), 6hr(c, d) and 12hr(e, f), 2D2(a, c, e) and 3C3(b, d, f) Arrow heads show bile canaliculus-like structures. 2D2 labels bile canaliculus-like structures. 3C3 labels the entire surface of the cells. $\times 400$

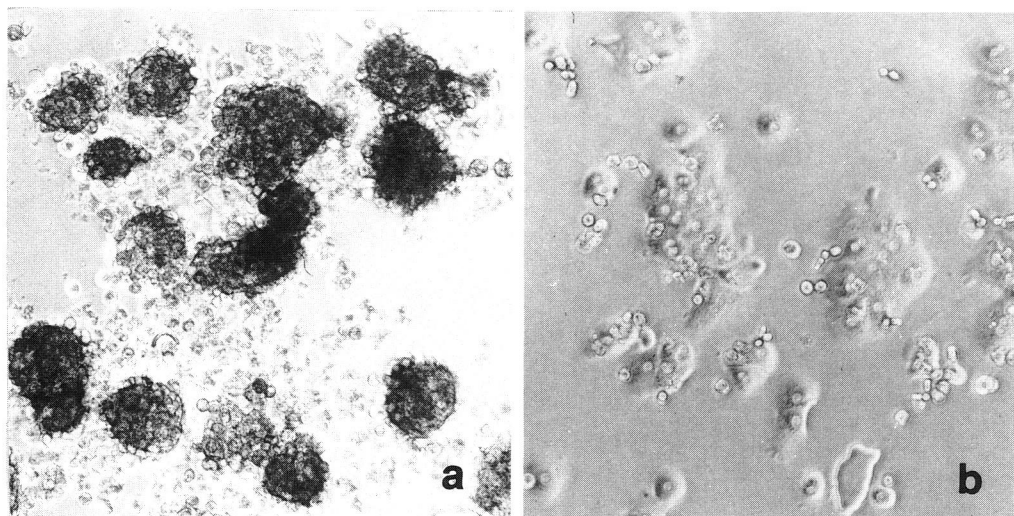


Fig. 6 Hepatocytes cultured in the medium containing MoAb for 24hr. Y-1(a) and 2D2(b). Hepatocytes aggregate and form spheroids of compact morphology(a). Cells are attached and spreaded (b). $\times 100$

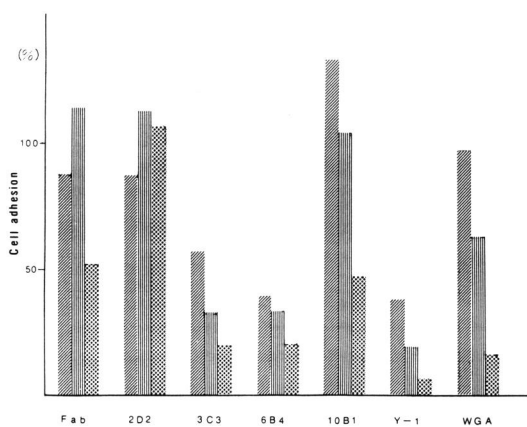


Fig. 7 Effects of MoAbs on adhesion of hepatocytes to the substrate. Supplemental amounts of MoAbs, Fab and WGA.

▨ 1 µg/ml ▮ 10 µg/ml ▩ 100 µg/ml

されているものは, leucine aminopeptidase (LAP)¹⁹⁾と, dipeptidyl peptidase IV²⁰⁾の2つである. このほか Cook *et al.*²¹⁾は, 5'-nucleotidase 活性と Con A 結合能を有する肝細胞膜分画を抗原として, ポリクローナル抗体を作製し, これと反応する3種類の毛細胆管特異的な蛋白を得た. そのうち, 110kDの蛋白は胆汁酸の輸送に関係すると推測されている. しかし, LAP, dipeptidyl peptidase IV を含めて, これらの蛋白は, いずれも分子量が105~160kDで, 今回我々の作製した

MoAbで認識される抗原とは, 分子量で異なっている. 今回見出されたこれら2つの抗原分子の機能, 性質は未だ不明であるが, 他の臓器, 組織には存在せず, 毛細胆管にのみ発現することから, 胆汁分泌などの毛細胆管の特異機能と, 深く関わる分子である可能性が強い.

一方, 3C3, 6B4, Y-1によって認識される分子は, 肝細胞のみでなく, 検索した全ての臓器, 組織で, 血管内皮細胞に発現していたが, 実質細胞では, 肝細胞のみと反応した. しかし, これまで, このような組織分布を示す蛋白については報告が見られず, どのような機能を持った分子かは不明である. また, これについても, 肝細胞膜各ドメインに対する反応の程度に多少の差異があり, また, Western blottingでは, それぞれの認識抗原の分子量に相違が見られ, それぞれ異なる分子を認識している可能性が考えられた.

4・2 MoAb 認識抗原の分離肝細胞および培養肝細胞での分布

分離肝細胞は球形化し, 細胞表面には全体に microvilli を有し, 形態的に3つのドメインを区別することは不可能であった. Wanson *et al.*²²⁾, Drochmans *et al.*³⁾, Penasse *et al.*²³⁾は, コラゲナーゼによる肝細胞の分離過程を経時的に観察し, 細胞間隙の拡大と細胞間接着装置の消失が起り, 次いで隣接する細胞間に microvilli が出現して, 全体が microvilli に被われるとともに球形化することを報告している. このよう

な形態の変化に伴って、各抗原は、類洞側に主に局在するもの(3C3, 6B4, Y-1)も、毛細胆管に局在するもの(2D2, 10B1)も、細胞膜全周に均等な分布を示すようになった。

Groothuis *et al.*²⁴⁾ は電顕組織化学的に、毛細胆管膜に主に局在する alkaline phosphatase, ATPase などの酵素活性が、分離肝細胞では、細胞膜全周性に現われることを報告している。このように、単離されることによって、肝細胞膜の性質は、形態のみならず、生化学的にも均一化するものと考えられる。しかも、このような変化は極めて短時間に起こることから、新たに合成された分子が細胞表面に均等に分布するのではなく、細胞同士ないしは細胞と細胞外基質との接着が失われることにより、膜の極性の維持能が失われ、特定のドメインに局在していた分子が、膜全体に拡散することによって起こるものと考えられる。特に細胞が単離されたことによる tight junction の消失は、蛋白質分子の拡散を引き起すとされている^{25,26)}。

一方、分離肝細胞を培養して、経時的に毛細胆管膜特異抗原の分布を検索したところ、いったん細胞膜全周に分布した毛細胆管抗原は、肝細胞同士の接着面に再び強く局在し、次いで隣接細胞間に形成された毛細胆管様構造の部分に強く発現するようになった。それに伴って、その他の細胞膜における反応性は、次第に減弱した。このような毛細胆管特異抗原の再分布は、一個で基質に接着した肝細胞には、全く認められなかった。したがって培養肝細胞では、毛細胆管様構造の再構成とともに、毛細胆管ドメインに特異的な分子の再集合が起こるが、そのためには、細胞同士の接着が必要と考えられた。肝細胞表面には、細胞間の接着に関与する L-CAM^{9-11,27)}, cadherin²⁷⁾, uvomorlin²⁷⁾ などの分子が存在することが知られており、また adherens junction-specific cell adhesion molecule (A-CAM)²⁸⁾ 同士の反応に続いて、細胞形態や細胞骨格の配列が変化することが示されている。膜の極性の再形成には、細胞接着蛋白の反応が引き金になっている可能性が考えられ、その後毛細胆管様構造の形成、tight junction の形成、毛細胆管膜抗原の集合などの、一連の反応が起るものと考えられた。

一方、*in situ* の肝細胞で主に類洞側のドメインの分布を示した抗原については、培養に伴う細胞の形態変化に関わらず、細胞膜全周性の分布を示した。これらの分子は *in situ* の肝細胞でも、類洞ドメインだけでなく、毛細胆管膜、側壁膜にも分布しており、細胞の極性とは直接関係を持たないことが示唆された。

4.3 各 MoAb の細胞接着に対する作用の検討

各 MoAb の培地中に添加して肝細胞を培養したところ、細胞膜全周に反応する 3C3, 6B4, Y-1 は、肝細胞の基質への接着を強く阻害した。これに対して毛細胆管膜に反応する 2D2 及び 10B1 では、このような作用は見られなかった。我々の得た 5 種類の MoAb が認識する全ての抗原が、分離肝細胞の膜全周に分布するにもかかわらず、これら 3 つの MoAb (3C3, 6B4, Y-1) のみが接着を阻止したことは、この結果が単に MoAb が細胞表面に結合したことによるものではなく、抗原の特異的機能が阻止されている可能性を示唆している。これと同様の効果は、WGA 及び抗肝細胞膜抗体 Fab でも認められた。これまでにも、植物レクチンを細胞表面に結合させたり、基質に添加すると、細胞の接着が修飾されることが明らかにされており、レクチンが、細胞膜の基質接着分子と反応する可能性が示されている^{8,29)}。Oppenheimer-Marks and Grinnell³⁰⁾ は、ハムスターの腎細胞が WGA 基質に接着し、また WGA がフィブロネクチンと細胞の結合を阻害することから、WGA がフィブロネクチンレセプターに結合する可能性を示唆した。したがって、WGA 結合肝細胞膜糖蛋白の中には、細胞外基質レセプター蛋白が含まれている可能性が考えられ、今回の実験で見られた基質への接着阻止は、MoAb がこれらの蛋白と反応した結果である可能性が考えられる。しかし、これまで明らかにされたフィブロネクチンレセプターと比較すると、3C3, 6B4, Y-1 で認識される抗原は分子量の点で一致しなかった。またコラーゲンなど、他の細胞外基質に対するラット肝細胞膜のレセプターの性質は充分分っていないため、レセプターを介したメカニズムによることを確定できなかった。

一方これらの MoAb を反応させると、肝細胞は凝集し、球形の塊りを形成して、やがてディッシュに接した部分に接着し、伸展することが観察された。

Landre *et al.*³¹⁾ は、ディッシュを poly (2-hydroxyethyl methacrylate) で処理して肝細胞を培養すると、基質に接着せず、凝集して球形の塊りを形成し、生存し続けることを観察している。今回の結果は、この場合に類似しており、したがって、分離肝細胞のこのような凝集は、細胞が基質に接着できなかった結果と解釈することができる。しかし一方、MoAb が細胞同士の接着を積極的に促進し、細胞が集塊を形成したため、基質に接着しにくくなった可能性も考えられる。特に 3C3, 6B4, Y-1 は、いずれも IgM で polyvalent であるため、細胞表面に反応することにより、凝集を強く促

進した可能性も否定できない。毛細胆管に特異的に細胞する2つの抗体のうち、IgG₁の2D2を高濃度に加えても、細胞基質接着に対する抑制効果が見られなかったのに対して、IgM抗体の10B1を高濃度(100 μg/ml)に加えた場合には、軽度ながら接着阻止が見られたことから、このような要素も加味されている可能性が考えられた。

5 結 論

1) ラット肝細胞膜 WGA 結合糖蛋白を分離し、これを抗原として5種類のMoAbを作製した。このうち2種類は肝細胞の毛細胆管膜に特異的に反応し、他の組織には全く反応しなかった。他の3種類は肝細胞の類洞面の溝に強く反応するほか、側壁膜、毛細胆管膜にも反応し、また、全ての組織の血管内皮細胞と反応した。

2) Western blottingにより各抗原の分子量を調べたところ、各MoAbは、それぞれ異なる蛋白と反応することが示された。

3) コラゲナーゼにより分離した肝細胞では、形態上の極性が消失するのに伴って、いずれのMoAbも細胞膜全体と反応するようになった。しかし、分離細胞を培養すると、細胞同士の接着面に再び毛細胆管膜特異抗原が集積し、そこに形成される毛細胆管様構造に強く発現するようになった。したがって、細胞同士の接着が、本抗原の局在に重要であることが示唆された。

4) *in situ* で主に類洞面の膜と反応するMoAbを培養液中に添加すると、肝細胞の基質との接着が強く阻止され、なんらかの細胞基質接着に関与するメカニズムを阻害している可能性が示唆された。

謝 辞

御指導、御校閲いただきました本学病理学第2講座 森 道夫教授並びに外科第1講座早坂 滉教授に深謝致します。また御協力、御指導いただきました病理学第2講座、病理学第1講座の諸先生、標本の作製にたずさわった研究補助員の方々に感謝致します。

文 献

- Evans, W. H.: A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochim. Biophys. Acta* **604**, 27-64 (1980).
- Berry, M. N. and Friend, D. S.: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* **43**, 506-520 (1969).
- Drochmans, P., Wanson, J. C., May, C. and Bernaert, D.: Ultrastructural and metabolic studies of isolated and cultured hepatocytes, In: Elsevier/Exerpta Medica/North Holland and Elsevier North Holland (ed.): *Hepatotropic Factors*. (Ciba Foundation Symposium 55) p.7. Amsterdam (1978).
- Phillips, M. J., Oda, M., Edwards, V. D., Greenberg, G. R. and Jeejeeboy, K. N.: Ultrastructural and functional studies of cultured hepatocytes. *Lab. Invest.* **31**, 533-542 (1974).
- Seglen, P. O.: Preparation of isolated rat liver cells, In: Prescott, D. M.: *Methods in Cell Biology*. Vol. **13**, 29-83, Academic Press, New York (1976).
- Wanson, J. C., Drochmans, P., Mosselmans, R. and Ronveaux, M. F.: Adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. Ultra-structural characteristics of intercellular contacts and cell membrane differentiations. *J. Cell Biol.* **74**, 858-877 (1977).
- Gebhardt, R., Jung, W. and Robenek, H.: Primary cultures of rat hepatocytes as a model system of canalicular development, biliary secretion, and intrahepatic cholestasis. I. Distribution of filipin-cholesterol complexes during *de novo* formation of bile canaliculi. *Eur. J. Cell Biol.* **29**, 68-76 (1982).
- Rubin, K., Johansson, S., Hook, M. and Öbrink, B.: Substrate adhesion of rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* **135**, 127-135 (1981).
- Ocklind, C., Rubin, K. and Öbrink, B.: Different cell surface glycoproteins are involved in cell-cell and cell-collagen adhesion of rat hepatocytes. *FEBS Lett.* **121**, 47-50 (1980).
- Ocklind, C. and Öbrink, B.: Intercellular adhesion of rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **257**, 6788-6795 (1982).
- Edelman, G. M.: Cell adhesion molecules. *Science* **219**, 450-457 (1983).
- Kawakami, H. and Hirano, H.: Lectin-binding patterns on the plasma membranes of dissociated rat liver cells. *Histochemistry* **80**, 415-420 (1984).
- McMillan, P. N., Ferayorni, L. S., Gerhardt, C. O. and Jauregui, H. O.: Light and electron microscope analysis of lectin binding to adult rat liver *in situ*. *Lab. Invest.* **50**, 408-420 (1984).
- Ray, T. K.: A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **196**, 1-9 (1970).
- Hedo, J. A.: Lectins as tools for purification of membrane receptors, In: *Receptor Purification Procedures*. 45-60 Alan R. Liss, Inc., New York (1984).

16. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** **256**, 495-497 (1975).
17. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **277**, 680-685 (1970).
18. Kreamer, B. L., Staecker, J. L., Sawada, N., Sattler, G. L., Hsia, M. T. S. and Pitot, H. C.: Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations. **In Vitro** **22**, 202-211 (1986).
19. Roman, L. M. and Hubbard, A. L.: A domain-specific marker for the hepatocyte plasma membrane: localization of leucine aminopeptidase to the bile canalicular domain. **J. Cell Biol.** **96**, 1548-1558 (1983).
20. Bartles, J. R., Braiterman, L. T. and Hubbard, A. L.: Biochemical characterization of domain-specific glycoproteins of the rat hepatocyte plasma membrane. **J. Biol. Chem.** **260**, 12792-12802 (1985).
21. Cook, J., Hou, E., Hou, Y., Cairo, A., and Doyle, D.: Establishment of plasma membrane domains in hepatocytes. I. Characterization and localization to the bile canaliculus of three antigens externally oriented in the plasma membrane. **J. Cell Biol.** **97**, 1823-1833 (1983).
22. Wanson, J. C., Bernaert, D. and May, C.: Morphology and functional properties of isolated and cultured hepatocytes. **Prog. Liver Dis.** **6**, 1-22 (1979).
23. Penasse, W., Bernaert, D., Mosselmans, R., Wanson, J. C. and Drochman, P.: Scanning electron microscopy of adult rat hepatocytes in situ, after isolation of pure fractions by elutriation and after culture. **Biologie Cellulaire** **34**, 175-186 (1979).
24. Groothuis, G. M. M., Hulstaert, C. E., Kalicharan, D. and Hardonk, M. J.: Plasma membrane specialization and intracellular polarity of freshly isolated rat hepatocytes. **Eur. J. Cell Biol.** **26**, 43-51 (1981).
25. Galli, P., Brenna, A., deCamilli, P. and Meldolesi, J.: Extracellular calcium and organization of tight junctions in pancreatic acinar cells. **Exp. Cell Res.** **99**, 178-183 (1976).
26. Hoi Sang, U., Saier, M. H. and Ellisman, M. H.: Tight junction formation is closely linked to polar redistribution of intramembranous particles in aggregating MDCK cells. **Exp. Cell Res.** **122**, 384-391 (1979).
27. Öbrink, B.: Epithelial cell adhesion molecules. **Exp. Cell Res.** **163**, 1-12 (1986).
28. Volk, T. and Geiger, B.: A 135kd membrane protein of intercellular adherens junctions. **EMBO** **3**, 2249-2260 (1984).
29. Hatten, M. E. and François, A. M.: Adhesive specificity of developing cerebellar cells on lectin substrata. **Dev. Biol.** **87**, 102-113 (1981).
30. Oppenheimer-Marks, N. and Grinnell, F.: Effects of plant lectins on the adhesive properties of baby hamster kidney cells. **Eur. J. Cell Biol.** **23**, 286-294 (1981).
31. Landry, J., Bernier, D., Ouellet, C., Goyette, R. and Marceau, N.: Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. **J. Cell Biol.** **101**, 914-923 (1985).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学病理学第2講座 高坂 一

訂正のお願い

本誌57巻3号(昭和63年6月)に掲載いたしました高坂 一・他の論文に間違いがありました。お手数ですが、下記の訂正文をお手許の該当箇所へ貼付訂正をお願いいたしますと共に、お詫び申し上げます。

訂正箇所 353頁 5 結 論

5 結 論

1) ラット肝細胞膜 WGA 結合糖蛋白を分離し、これを抗原として5種類の MoAb を作製した。このうち2種類は肝細胞の毛細胆管膜に特異的に反応し、他の組織には全く反応しなかった。他の3種類は肝細胞の類洞面の溝に強く反応するほか、側壁膜、毛細胆管膜にも反応し、また、全ての組織の血管内皮細胞と反応した。

2) Western blotting により各抗原の分子量を調べたところ、各 MoAb は、それぞれ異なる蛋白と反応することが示された。

3) コラゲナーゼにより分離した肝細胞では、形態上の極性が消失するのに伴って、いずれの MoAb も細胞膜全体と反応するようになった。しかし、分離細胞を培養すると、細胞同士の接着面に再び毛細胆管膜特異抗原が集積し、そこに形成される毛細胆管様構造に強く発現するようになった。したがって、細胞同士の接着が、本抗原の局在に重要であることが示唆された。

4) *in situ* で主に類洞面の膜と反応する MoAb を培養液中に添加すると、肝細胞の基質との接着が強く阻止され、なんらかの細胞基質接着に関与するメカニズムを阻害している可能性が示唆された。

謝 辞

御指導、御校閲いただきました本学病理学第2講座 森 道夫教授並びに外科第1講座早坂 滉教授に深謝致します。また御協力、御指導いただきました病理学第2講座、病理学第1講座の諸先生、標本の作製にたずさわった研究補助員の方々に感謝致します。

文 献