

ヒト培養細胞株の Transferrin Receptor に関する研究

漆 崎 洋 一

札幌医科大学内科学第4講座 (主任 漆崎一朗 教授)

Studies on Transferrin Receptors of Human Cultured Cell Lines

Yoichi URUSHIZAKI

Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. I. Urushizaki)

Transferrin is a serum glycoprotein of which the molecular weight is 75,000 daltons and it binds two atoms of iron on its specific binding sites. The main role of transferrin is to deliver inorganic iron to erythron and placenta through its specific receptor on the cell surface, which is purified from human reticulocytes and placental microvillous membranes. Recently transferrin receptors have been found also in several established cell lines. However, the binding specificity of transferrin receptors against transferrins with different iron content and the actual significance of the expression of the transferrin receptors on cultured tumor cells still remain controversial.

In the present paper, a receptor assay using ^{125}I -labelled transferrin was performed on various cultured cell lines and the following results were obtained: (1) Specific binding of ^{125}I -labelled transferrin on K 562 cells was obtained with K_a of $1.98 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ and the number of transferrin receptors on K 562 cells was $5.10 \times 10^5/\text{cell}$. (2) Among transferrins with different iron content, only diferric transferrin could bind the transferrin receptors on K 562 cells specifically. Apotransferrin and two forms of monoferric transferrins (C-site bound and N-site bound) did not show any significant bindings to K 562 cells. (3) A transferrin receptor assay was also performed on eight established cell lines (K 562, HL 60, U 937, Chang liver cell, C-Hc4, M 7609, HGC-25 and HMV) of various origins of human tumors. Transferrin receptors were expressed in all the established cell lines examined and the association constant was around $2.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. (4) An increase of transferrin receptors was found in K 562 cells after S phase synchronization using 2.5 mM thymidine and 1 mM hydroxyurea. (5) The number of transferrin receptors during the subconfluent phase of mouse Balb/c 3T3 fibroblasts was 11 times greater than that during the quiescent phase. (6) Mitogenic stimulation of human peripheral blood lymphocytes by phytohemagglutinin also increased the expression of transferrin receptors on the cell surface. These experimental results clarified the specificity of transferrin receptors and suggested the possibility of transferrin receptors as a marker for cell proliferation.

(Received January 14, 1983 and accepted January, 31 1983)

Key words: Transferrin receptor, Diferric transferrin, Binding specificity, Cultured tumor cells, Cell proliferation

Abbreviations :

Tf	: transferrin	PBS	: phosphate buffered saline
apo Tf	: apotransferrin	BSA	: bovine serum albumin
FCS	: fetal calf serum	PHA	: phytohemagglutinin

1 緒 言

Transferrin (以下 Tf と略記する) は、血中に存在する分子量 75,000 ダルトンの糖蛋白質であり、1 分子当り 2 分子の鉄イオンを結合する¹⁾。Tf の生理機能は、骨髄・胎盤など生体の鉄需要の盛んな臓器へ鉄を供給することにあると考えられている²⁾。1959 年 Jandl and Katz³⁾ は、Tf が網赤血球と特異的に結合して、鉄イオンを細胞に受け渡す現象を見だし、細胞表面に Tf レセプターが存在する可能性を示唆した。その後、van Bockxmeer *et al.*⁴⁾、Liebman and Aisen⁵⁾、Sullivan and Weintraub⁶⁾ は、家兎・ラットの網赤血球膜から、Wada *et al.*⁷⁾、Seligman *et al.*⁸⁾ は、ヒト胎盤絨毛膜から Tf レセプターを単離し、Tf と Tf レセプターの結合が、その後のヘモグロビン合成や胎児への鉄イオン運搬の最初の段階であることが明らかとなってきた。一方、Hayashi *et al.*⁹⁾ Hutchings and Sato¹⁰⁾ は、Tf の添加が無血清培地での培養細胞の増殖に必須であることを認め、Tf が血清中の増殖因子の 1 つであることを記載した。1979 年 Hamilton *et al.*¹¹⁾ は、ヒト癌細胞由来培養細胞株である BeWo 細胞にも Tf レセプターが出現していることを見だし、Tf レセプターの出現が培養細胞の増殖に必要な Tf の要求性と密接な関連があるとした。その後、OKT9¹²⁾、B 3/25¹³⁾ などのモノクローナル抗体が、Tf レセプターを認識していることが明らかとなり、細胞表面の Tf レセプターの細胞表面マーカーとしての意義が注目されている。Tf レセプターの生化学的性状に関して、Trowbridge and Omary¹³⁾ は、分子量約 100,000 のサブユニットを同定したが、Tf レセプターの、Tf に対する特異性、ことに異なった鉄含量の Tf に対する結合態度の差異について、いまだ一致した結論が得られていない¹⁴⁻¹⁶⁾。本論文では、¹²⁵I 標識 Tf を用い、ヒト培養細胞表面の Tf レセプターの特異性、さらに細胞増殖性との関連について検索を試みた。

2 実験材料と方法

2.1 培養細胞株

研究対象として取り上げた 8 種類のヒト悪性腫瘍由来培養細胞株とマウス Balb/c 3T3 細胞を Table 1 に示した。K562¹⁷⁾ は、持田製薬試薬研究所から、HL60¹⁸⁾、U 937¹⁹⁾ は自治医科大学血液科の斉藤政樹講師から、Chang liver cell²⁰⁾ は大日本製薬組織培養センター、C-Hc 4²¹⁾ は北海道大学第 1 外科葛西洋一教授、M 7609²²⁾ は弘前大学第 1 外科町田清朗博士、HGC-25²³⁾

Table 1 Established cell lines

cell lines	origin
K 562	chronic myelogenous leukemia
HL 60	promyelocytic leukemia
U 937	histiocytic lymphoma
Chang liver cell	liver cell
C-Hc4	primary hepatoma
M7609	colon cancer
HGC-25	pancreas cancer
HMV	malignant melanoma
Balb/c3T3	mouse fibroblast

は藤沢薬品中央研究室、HMV²⁴⁾ は札幌医大病理学教室石井良文助教授、マウス Balb/c3T3 は札幌医大がん研究所分子生物学部門の関川賢二博士から恵与を受け、当教室で継代したものである。

2.2 細胞培養

8 種類のヒト培養細胞株は、細胞培養スラスコ (Costar 社製, 3050) に、10% 牛胎児血清 (FCS) 添加 RPMI 1640 medium (GIBCO) で、CO₂ インキュベーター (Forma 社)、37°C、7 日間培養した。マウス 3T3 の培養には、Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO, Dulbecco's MEM) を用いた。さらに、K 562、U 937、HL 60 については、RPMI 1640 medium に 1×10^6 /ml に調整した細胞を 35 m/m の 6 穴クラスターディッシュ (Costar 社製, 3506) に 0.2 ml ずつ分注し、CO₂ インキュベーターで培養、4 日間にわたり 24 時間毎に、全細胞数を数え、細胞倍加時間 (doubling time, D. T.) を算出した。

2.3 ヒト transferrin の抽出および apotransferrin の作製

2.3.1 塩化第 2 鉄溶液の作製

塩化第 2 鉄 (キンダ化学株式会社) を 0.5 N 塩酸 10 ml 中で溶解、3,000 × g、10 分間遠心した後、上清を得た。含有鉄量の測定には Hill²⁵⁾ の方法を用い、蒸留水で 17 倍および 34 倍に希釈した塩化第 2 鉄溶液 1.7 ml と 1.5 M sodium sulfite 0.1 ml、0.5% bipyridine-60% 酢酸溶液 0.2 ml を加え、1 時間煮沸した後、室温まで冷却、3,000 × g、10 分間遠心、上清を分光光度計 (島津, UV 200) を用い波長 520 nm で測定した。鉄量は吸光度 0.073 あたり 1 μg として計算し、65 mM の塩化第 2 鉄溶液を作製した。

2.3.2 ヒト diferric transferrin の抽出

ヒト Tf の抽出は、Aisen *et al.*²⁶⁾、Okada *et al.*²⁷⁾

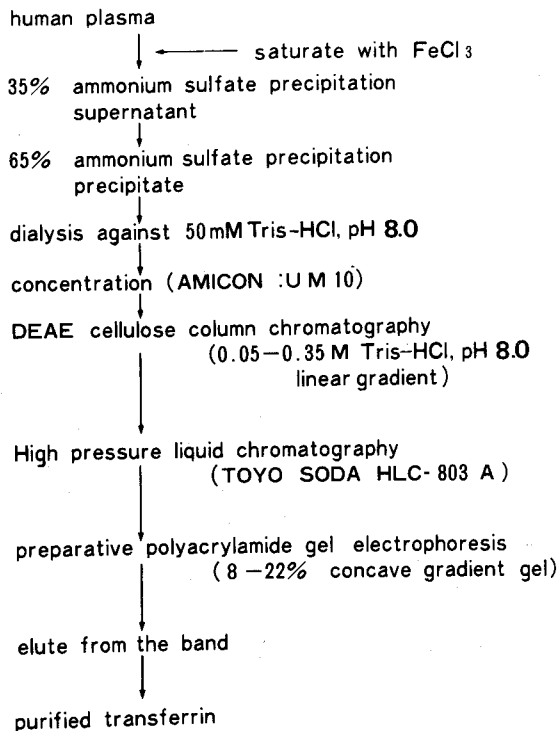


Fig. 1 Method for purification of human transferrin.

の方法に準じ、Fig. 1 に示すようにおこなった。北海道赤十字血液センターの保存血 200 ml を 12,000 rpm 5 分間遠心、血漿成分を得た後、等量の 0.01 M sodium phosphate, pH 7.2, 0.15 M sodium chloride (PBS) で希釈し、65 mM の塩化第 2 鉄溶液 0.5 ml を添加して血清中の Tf を鉄飽和した。35% 硫酸アンモニウムによる塩析を一昼夜おこない上清を得、さらに硫酸アンモニウム濃度を 65% として一昼夜塩析をおこなった。得られた沈澱物を 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 に溶解、同緩衝液で 4 時間おきに 3 回透析をくり返した後、Amicon membrane, UM 10 で濃縮した。濃縮試料はあらかじめ 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 で平衡化してある DEAE セルロース・カラム (1.5×40 cm) に添加し、Tris-HCl, pH 8.0 (総量 300 ml) で 50 mM から 350 mM までの直線濃度勾配により、流速 15 ml/hr, 分画量 3.75 ml で溶出、淡紅色を示す第 18 から 26 分画を回収した。さらに、濃縮後の試料を調整用高速液体クロマトグラフィー (東洋ソーダ社製, HLC-803 A) に添加し、50 mM Tris-HCl, pH 8.0 で溶出、淡紅色の分画を回収した。抽出の最終段階ではポリアクリルアミドの濃度が 8~22% の、分取用ゲル電気泳動を用いた²⁸⁾。25 ml の light solution (0.375 M Tris-HCl,

pH 8.8) と 12.5 ml の dense solution (0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 21.9% アクリルアミド, 0.6% N, N'-methylenebisacrylamide, 56.3% グリセロール) の 2 チャンバーで、一点重層法により、0.2×10×14 cm のスラブ・ゲル・プレート (和科盛社製) 内で濃度勾配ゲルを作製し、stacking gel として 5 ml の 4% アクリルアミド, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8 を重層した。試料 1 ml (20 mg/ml) を等量の 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8, 25% (v/v) グリセロールと混和し stacking gel に重層した。泳動用緩衝液には 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.4 を用い、150 V, 5 時間泳動した。泳動後、ゲルから淡紅色のバンドを切り出し、18 ゲージ注射針を用いて摩砕し、2 倍量の 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.15 M sodium chloride を加え、18~24 時間振盪混和し、Tf をゲル細片から溶出した。

2-3-3 精製 transferrin の純度検定

2-3-3-1 ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

スラブゲル電気泳動装置を用いた。0.2×10×14 cm の plate 内に、25 ml の 9% アクリルアミド, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8 の running gel を作製し、その上部に 4% アクリルアミド, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8 の discontinuous gel を重層した。泳動は、0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.4 を緩衝液として用い、150 V, 4 時間おこなった。泳動後ゲルを 0.05% coomassie brilliant blue R-250, 0.1% 硫酸銅, 13% 酢酸, 27% メタノール溶液中で 4 時間染色し、ついで 10% 酢酸, 10% メタノール溶液を用いて一昼夜脱色した。

2-3-3-2 免疫電気泳動法

免疫電気泳動は Grabar and Williams²⁹⁾ の方法に準じ、ゲルは 1% アガロース, 0.2 M Tris-HCl, pH 8.6, 5.0×7.5 cm を用いた。抗原としては正常人血清および抽出したヒト diferric Tf (2 mg/ml) を、抗血清としては抗ヒト血清ヤギ血清 (フジ臓器社製) および抗ヒト Tf 家兔血清 (DAKO 社製) を用いた。ゲル内に抗原を添加し、免疫電気泳動装置 (常光産業株式会社) を用い、50 V, 2 時間泳動した後、抗血清を添加、室温 24 時間インキュベートした。

2-3-4 蛋白定量法

蛋白質は牛血清アルブミンを標準として、Lowry 法³⁰⁾ で定量した。

2-3-5 ガラス器具および緩衝液の除鉄

以下に述べる apo Tf の作製および 6 M 尿素ゲル電気泳動には、あらかじめ 6 N 塩酸に一昼夜浸した後、脱イオン 2 回蒸留水で洗浄、自然乾燥したガラス器具、ピ

ベットを用いた。緩衝液作製には、除鉄器具、脱イオン2回蒸留水を用い、apo Tfおよび低鉄飽和 Tfの遊離鉄イオンによる汚染を防いだ。

2・3・6 Apotransferrin の作製

Apo Tfの作製は、Aisen *et al.*³¹⁾の方法に準じた。抽出したヒト diferric Tf 溶液 5 ml (2 mg/ml)を、10 mM sodium citrate, pH 5.0 中で3回、蒸留水で3回透析して apo Tfを得た。純度は6 M 尿素ゲル電気泳動法を用い、単一の apo Tf のバンドであることを確認した。

2・4 6 M 尿素ゲル電気泳動法

鉄飽和度の異なる Tf の4分子型を分離し、Tf 鉄飽和度を算出するため、Makey and Seal³²⁾の報告した6 M 尿素ゲル電気泳動法をおこなった。0.2×10×14 cmのスラブゲルプレート内に、25 mlの5.77%アクリルアミド、0.23% N, N'-methylenebisacrylamide, 0.03% N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), 0.03% ammonium persulfate, 6 M 尿素 (Schwarz/Mann, Inc., 821519), 0.1 M Tris・0.01 M borate, pH 8.6 を重合、ゲルの上部に12個の試料溝をcombで作製した。試料は0.1 M Tris・0.01 M borate, pH 8.6, 6 M 尿素, 6%グリセロールに調整した。泳動用緩衝液として、0.1 M Tris・0.01 M borateを用い、75 V, 30分間予備通電をおこなった後、同緩衝液を交換、試料を添加、75 V, 16時間泳動した。ゲルの染色と脱色は2・3・3・1に述べた方法に従った。¹²⁵I標識 Tf を泳動した際には、ゲルを1 mm 間隔で切り出し、放射活性をオートガンマー・カウンター (LKB, Wallac 1280) で計測、同時に泳動した carrier Tf の染色バンドと対比した。鉄飽和度は、次式に示すように、スキャンした4本のバンドの面積比から算出した。
% Tf 飽和度 =

$$\frac{(N\text{-site Tf} + C\text{-site Tf}) \times 1/2 + \text{Diferric Tf}}{\text{Apo Tf} + N\text{-site Tf} + C\text{-site Tf} + \text{Diferric Tf}} \times 100$$

2・5 培養細胞株の Tf レセプター・アッセイ

2・5・1 ¹²⁵I 標識 transferrin の作製

ヒト diferric Tf の標識は、Hunter³³⁾の方法に準じた。Diferric Tf 溶液 (40 μg/20 μl) と 50 μl の 0.5 M sodium phosphate, pH 7.4 および carrier free Na ¹²⁵I (第1ラジオアイソトープ研究所) 1 mCi/20 μl を混和した後、クロラミン T (10 mg/5 ml) 10 μl を加え、1分間軽く振盪、sodium metabisulfite (10 mg/5 ml) 50 μl, 1 M ヨウ化カリウム 5 μl を加え反応を終えた。あらかじめ 1 mg/ml 濃度に牛血清アルブミン (BSA) を含む 0.02 M Tris・HCl, pH 7.6, 0.1 M

sodium chloride で膨潤したセファデックス G 75 カラム (0.8×12.5 cm) に添加し、1 mg/ml BSA 含有の同緩衝液で 0.5 ml ずつ溶出し、ガンマー・カウンター (LKB 社, Wallac 1280) で放射活性を計測し、第5から9分画に溶出される ¹²⁵I 標識 Tf 分画を得た。

2・5・2 ¹²⁵I 標識 diferric transferrin を用いたヒト培養細胞株の Tf レセプター・アッセイ

培養細胞の Tf レセプター・アッセイは、Hamilton *et al.*¹¹⁾の方法に準じておこなった。2・2で述べた方法で培養した細胞を用いたが、付着細胞はラバー・ポリスマンで培養フラスコから剥離・回収し、浮遊細胞はそのまま Falcon 207 tube に移し、RPMI 1640 で、1,400 rpm 10分間遠心 (KN-45 遠心器, 久保田社製) を5回くり返し、細胞を洗浄した。その後、細胞数を 5×10⁶/ml に調整、2% BSA を含む RPMI 1640 液中に浮遊させた。比活性 4.71×10⁶cpm/pmole の ¹²⁵I 標識 Tf は最終濃度 0.18 nM に希釈、無標識の carrier Tf は最終濃度 1 nM, 2 nM, 3 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 100 nM, 1,000 nM の8段階に希釈した。細胞浮遊液 200 μl (1×10⁶個) に対し、¹²⁵I 標識 Tf 0.043 pmole (1.31×10⁵ cpm/20 μl) と各種濃度の carrier Tf 20 μl を加え、あらかじめ 2% BSA で被覆した容量 2 ml のマイクロチューブ (東亜医用電子株式会社, MT-40) 内でかくはん、CO₂ インキュベーターで 37°C, 30分間インキュベートした。その後 RPMI 1640 で 2,000 rpm, 5分間遠心 (久保田社製, KH-150 遠心器) を3回くり返し、細胞を洗浄、細胞に結合している ¹²⁵I-Tf の放射活性を測定した。対照としてヒト Ig G (SIGMA 社製), ヒトアルブミン (SIGMA 社製) を用い、¹²⁵I 標識 Tf とともにインキュベートし、放射活性を計測した。

2・5・3 種々の鉄飽和度の ¹²⁵I 標識 transferrin による Tf レセプター・アッセイ

2・3・6で述べた方法で作製した ¹²⁵I 標識 apo Tf を、1.5 nM の濃度で、RPMI 1640 培養液単独、RPMI 1640 に 100 μM の tropolone (東京化成工業) または 100 μM の desferrioxamine (チバガイギー) を添加した培養液に加えて、鉄飽和度の異なった ¹²⁵I 標識 Tf を作製した。50 μl の培養液を直ちに 2・4で述べた 6 M 尿素ゲル電気泳動し、Tf の分子型を鉄含量により分離し、計測した ¹²⁵I の放射活性の分布から、鉄飽和度を算出した。一方、RPMI 単独、RPMI+100 μM tropolone, RPMI+100 μM desferrioxamine で洗浄した K 562 細胞を 1×10⁶/240 μl の濃度になるよう ¹²⁵I 標識 Tf 含有培養液に加え、インキュベーション時間 15 分で、レ

セプター・アッセイをおこなった。

2・5・4 S 期同調培養した K 562 細胞の Tf レセプター・アッセイ

S 期同調培養は山田³⁴⁾の方法に準じた。10% FCS 添加 RPMI 1640 に浮遊した K 562 細胞 (2.5×10^6 個/50 ml) を、培養スラスコ (Costar, 3275) 中で、48 時間培養、50 mM thymidine 溶液 2.5 ml を加え、さらに 24 時間培養した。RPMI 1640 で 1,400 rpm, 10 分間遠心を 2 回くり返し細胞を洗浄した後、再び 10% FCS 添加 RPMI 1640 で 10 時間培養し、20 mM hydroxyurea 溶液 2.5 ml を加え、さらに 14 時間培養して細胞を S 期に同調した。同調された細胞は、10% FCS 添加 RPMI 1640 50 ml に浮遊し、200 μ l (1×10^5 個) ずつ 12 検体を 96 穴マイクロプレート (Costar, 3596) に分注し、残りの細胞はカルチャー・フラスコに入れたまま再び培養した。96 穴マイクロプレートに培養した細胞は、培養 1, 3, 5, 7, 9 および 11 時間後に各々 duplicate で 10 μ Ci/ml に調整した 3 H-thymidine (New England Nuclear) 10 μ l を添加、30 分間パルスラベルした。1 mg/ml アジ化ナトリウム溶液 10 μ l を添加、アイス・バスで冷却、反応を停止させた。メカニカル・ハーベスター (LABO MASH, LABO Science Co.) を使用して細胞を濾紙片に吸着させ乾燥、シンチレーション・カクテル (トルエン 1 l, 2-5-diphenyl-oxazol 4 g/l, 1-4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)]-ベンゼン 0.1 g/l) を 5 ml 加え、放射活性を液体シンチレーション・カウンター (Packard, LSC 3255) で測定した。また、培養フラスコ内の細胞は、培養直後、2 時間、5 時間、10 時間後に 15 ml ずつ取り出し、RPMI 1640 で 1,400 rpm, 10 分間遠心を 5 回くり返して細胞を充分洗浄した後、2・5・2 で述べた方法でレセプター・アッセイをおこなった。

2・5・5 Phytohemagglutinin (PHA) 刺激リンパ球の Tf レセプター・アッセイ

ヒト末梢単核球の分離は Böyum³⁵⁾ の報告に従い、Ficoll-Isopaque 比重遠心法によった。蒸留水により 9% に調整した Ficoll 400 (Pharmacia Fine Chemicals Inc.) 116 ml と 48% (w/v) に希釈した Isopaque (鳥居薬品) 48 ml を混和後、オートクレーブ (富永社製) で 120°C, 20 分間滅菌し、Ficoll-Isopaque 液を製作した。この Ficoll-Isopaque 液を Falcon 2070 tube に 20 ml ずつ分注し、その上層に滅菌生理食塩液で 2 倍に希釈した正常ヒトヘパリン (ノボ社) 加末梢血 20 ml を静かに重層した。1,400 rpm 30 分間遠心後、境界面に浮遊する単核球層 (peripheral blood lympho-

cyte, PBL) を得た。細胞を 1×10^6 /ml の濃度に調整し、培養フラスコ (Costar, 3596) を使い、10% FCS-10 μ g/ml PHA-P (Difco)-RPMI 1640 medium で、CO₂ インキュベーター、37°C, 72 時間培養した。培養開始後 48 時間で、細胞浮遊液 0.5 ml をとり、96 穴マイクロプレートに 100 μ l ずつ triplicate で分注し、 3 H-thymidine (New England Nuclear, 比活性 5 Ci/mM) を 1 ウェルあたり 1 μ Ci 加え、24 時間後に、2・5・4 に述べた方法で細胞へのトリチウムのとりこみをみた。残りの細胞は、Tf レセプター・アッセイに用いた。

2・5・6 マウス Balb/c 3T3 細胞の Tf レセプター・アッセイ

2・2 で述べた方法で培養した 3T3 細胞が、培養フラスコ中で接触阻止現象をおこし、confluent になった細胞を静止期とした。一方、細胞の初濃度を 1×10^4 /ml に調整、培養開始後 48 時間のものを、増殖期とし、両者の Tf レセプター・アッセイを 2・5・2 に述べた方法でおこなった。

3 結 果

3・1 精製 transferrin の純度

ヒト血漿より得られた Tf は、Fig. 2 の 9% ポリアクリルアミドゲル電気泳動に示すように、単一のバンドを示した。また Fig. 3 に示すように、免疫電気泳動上、抗ヒト Tf 抗血清とのみ反応した。

3・2 6 M 尿素ゲル電気泳動による diferric trans-

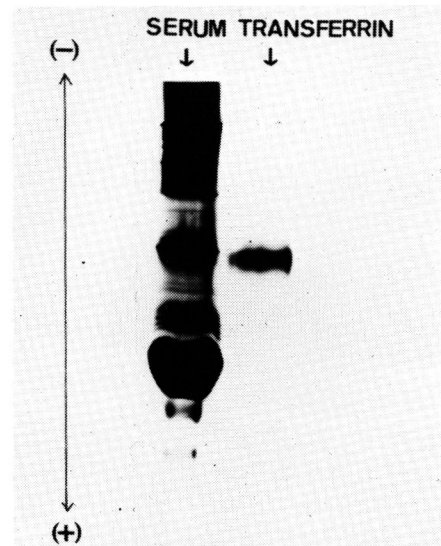


Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of purified human transferrin.

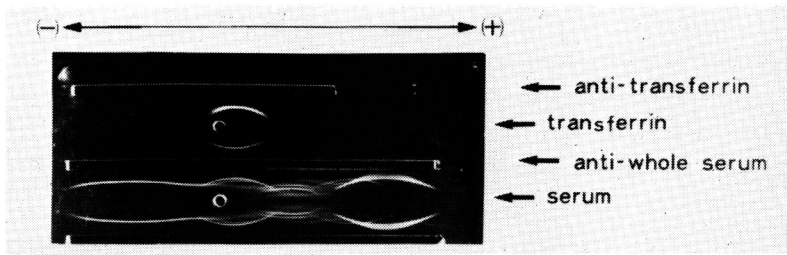


Fig. 3 Immunoelectrophoresis of purified human transferrin.

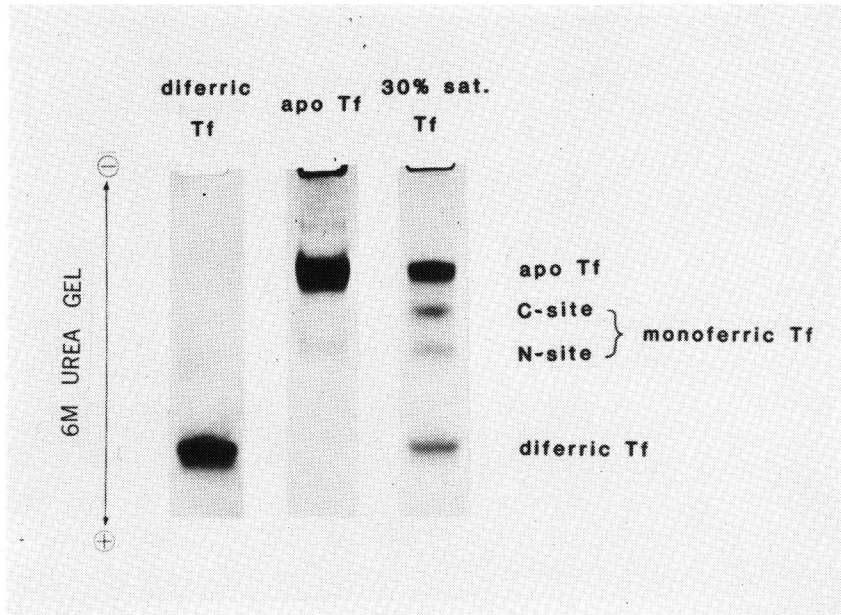


Fig. 4 6M urea gel electrophoresis of purified human diferric and apo-transferrin. The right column of the gel indicates the reference transferrin with 30% saturation.

ferrin および apotransferrin の純度

精製した diferric Tf およびクエン酸緩衝液で透析作製した apo Tf を、6 M 尿素ゲル電気泳動した結果を Fig. 4 に示す。対照として 30% 鉄飽和 Tf を泳動したが、右端に示すように陰極から陽極に向けて、諸家の報告のように^{31,32)} apo Tf, C-site bound monoferric Tf, N-site bound monoferric Tf, diferric Tf の 4 つの band に分離された。それに対し、作製した diferric Tf および apo Tf は、各々該当する単一のバンドとして泳動された。

3.3 K 562 細胞表面への ¹²⁵I 標識 diferric transferrin の結合

3.3.1 Transferrin 結合量の経時的变化

3 nM の ¹²⁵I 標識 diferric Tf を、 $10^6/200 \mu\text{l}$ の K 562 細胞とインキュベートし、経時的に細胞に結合した

Tf 量を、放射活性より算定した。Fig. 5 に示すように、細胞表面への Tf 結合量は、インキュベーション開始後 15-30 分でプラトーに達し、 10^6 個の細胞あたり 0.3 pmole の Tf が結合した。

3.3.2 Transferrin 結合の特異性

K 562 細胞に対する Tf 結合の特異性について、¹²⁵I 標識 diferric Tf に対して未標識 Tf, ヒトアルブミン および Ig G の競合作用につき検討したのが Fig. 6 である。¹²⁵I 標識 diferric Tf に対して、アルブミン、Ig G の添加では結合の抑制がなく、未標識 Tf の添加でのみ結合の抑制がみられた。

3.3.3 レセプター・アッセイ

0.18 nM の ¹²⁵I 標識 diferric Tf に、20 nM までの非標識 diferric Tf を加え、細胞表面に結合した Tf 量を Fig. 7 の実線に示した。この曲線には、Tf レセプター

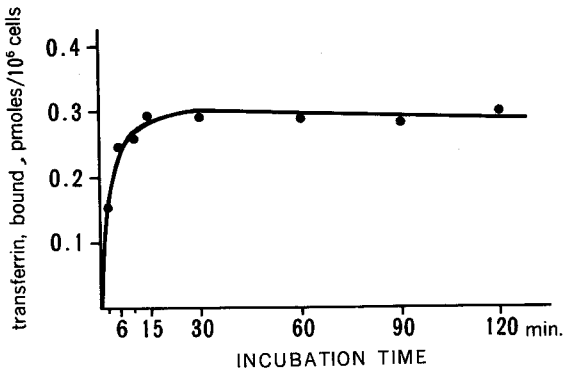


Fig. 5 Time course for transferrin binding to the surface of K 562 cells.

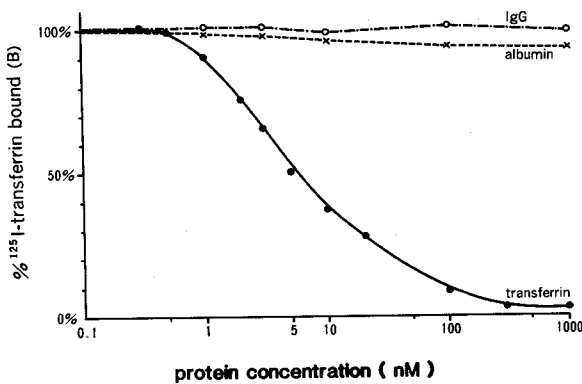


Fig. 6 Specificity of transferrin receptors on K 562 cells. Diferric transferrin (●—●), albumin (×---×), and Ig G (○---○) were tested for their effects on ¹²⁵I-diferric transferrin binding.

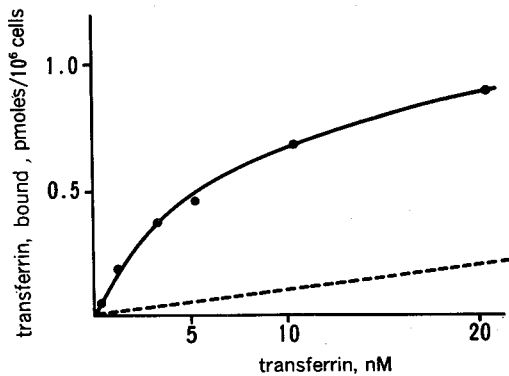


Fig. 7 Binding curves of diferric transferrin to K 562 cells. The solid line indicates total transferrin binding and the dotted line indicates low affinity binding.

を介した high affinity binding と、非特異的な low affinity binding が含まれているため、さらに非標識 Tf を 100 nM および 1 μ M の濃度で添加し、破線に示す low affinity binding を得た。実線の ¹²⁵I-Tf の総結合量から、非特異的 low affinity binding を減じ、特異的結合を求めると、Fig. 8 に示す実線が得られた。メディウム中の Tf 濃度が 5 nM でレセプターの 1/2 が飽和され、10⁶個の K 562 細胞あたり 0.4 pmoles の Tf が結合した。Fig. 9 の横軸に細胞 10⁶個に結合した Tf 量 (bound) を、縦軸に bound と free の Tf 比をとり、Scatchard plot 解析³⁶⁾をおこなったところ、K 562 細胞表面の Tf レセプター数は、 5.10×10^5 /cell、結合定数 (K_a) は $1.98 \times 10^8 M^{-1}$ であった。

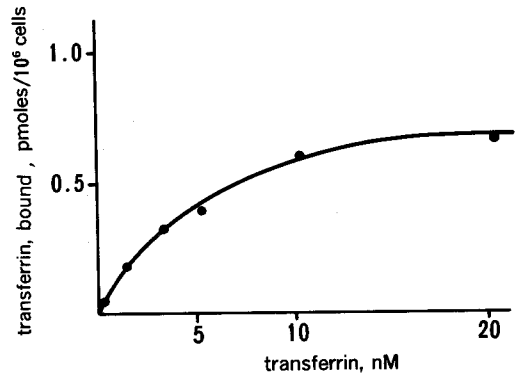


Fig. 8 High affinity binding curve of ¹²⁵I-labelled diferric transferrin to K 562 cells.

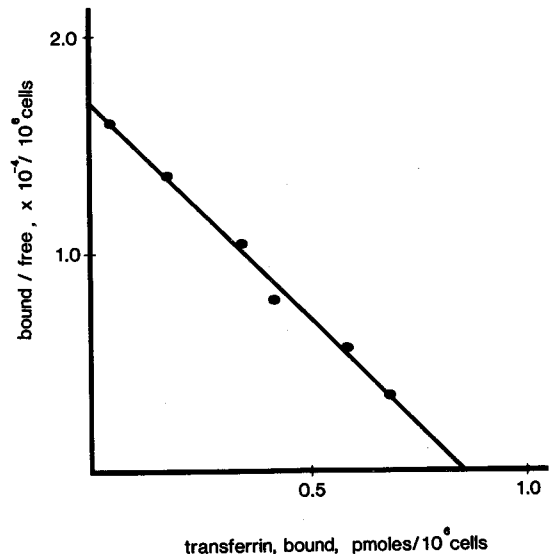


Fig. 9 Scatchard plot analysis of transferrin binding to K 562 cells.

3.4 異なった鉄飽和度の transferrin の K 562 細胞への結合

3.4.1 ^{125}I 標識 diferric transferrin のレセプター結合に対する非標識 apotransferrin の競合

^{125}I 標識 diferric Tf の K 562 細胞表面レセプターへの結合に対する非標識 diferric および apo Tf の競合をみた。添加した apo Tf への鉄イオンの結合を防ぐため、 ^{125}I 標識 Tf 含有培地に、 $100\ \mu\text{M}$ の鉄キレート剤 (desferrioxamine) を加え、インキュベーション時間 15 分で結合量を算出した。Fig. 10 に示すように、 $0.9\ \text{nM}$ の ^{125}I 標識 diferric Tf に対し、 $1\ \text{nM}$ から $100\ \text{nM}$ までの無標識 diferric Tf を加えると添加量に比例して結合抑制が認められた。一方、無標識の apo Tf を添加した際には、 ^{125}I 標識 diferric Tf の Tf レセプターに対する結合に対し、有意な競合を示さなかった。

3.4.2 種々の鉄飽和度の ^{125}I 標識 transferrin の K 562 細胞への結合

^{125}I 標識 diferric Tf または ^{125}I 標識 apo Tf を RPMI 1640 液と鉄キレート剤でインキュベートした上清を、 $6\ \text{M}$ 尿素ゲル電気泳動し、 $1\ \text{mm}$ 間隔で切り出したゲルの放射活性を、Fig. 11 に示した。上段から ^{125}I 標識 diferric Tf (A)、鉄キレート剤無添加 ^{125}I 標識 apo Tf (B)、 $100\ \mu\text{M}$ tropolone 添加 ^{125}I 標識 apo Tf (C)、 $100\ \mu\text{M}$ desferrioxamine 添加 ^{125}I 標識 apo Tf (D) の泳動パターンであり、同時に泳動した最下段の 40% 鉄飽和 Tf を対照として、その面積比から Table 2 に示すように、4 つの分子型の比率と鉄飽和度を算出した。4 つの試料の % Tf 飽和度は各々、 98% 、 82% 、 25% 、 2% であり、A は diferric Tf、B は diferric Tf と C-site および N-site bound monoferric Tf、C は C-site および N-site bound monoferric Tf と apo

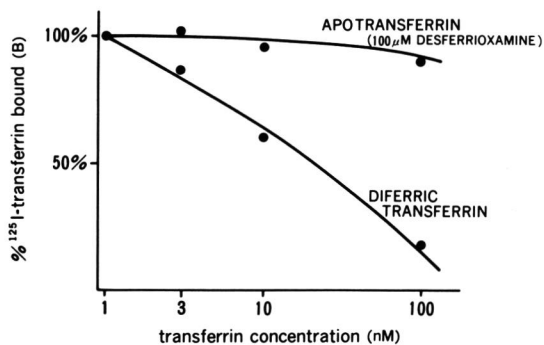


Fig. 10 The effect of increasing concentrations of unlabelled apotransferrin and diferric transferrin on the binding of ^{125}I -labelled diferric transferrin.

Tf が、D は apo Tf が主体であった。

レセプター・アッセイによる各種鉄飽和度の ^{125}I 標識 Tf の K 562 細胞に対する結合の Scatchard plot 解析を Fig. 12 に示した。試料 (A) および (B) では結合定数は各々、 $2.58 \times 10^8\ \text{M}^{-1}$ 、 $1.96 \times 10^8\ \text{M}^{-1}$ であった。計算されたレセプター数は細胞 1 個当たり各々 5.58×10^5 、 4.71×10^5 であった。試料 (C) および (D) では、ほとんど有意の結合を示さなかった。

次に、同上の 4 試料について、Tf 濃度を $1.5\ \text{nM}$ に調整した培養液中の diferric Tf 濃度、細胞表面に結合した ^{125}I 標識 Tf の量を比較したのが Table 3 である。細胞表面に特異的に結合した Tf 量 (pmole/ 10^6 cells) は、総 Tf 量よりも diferric Tf 量と相関する結果を得た。

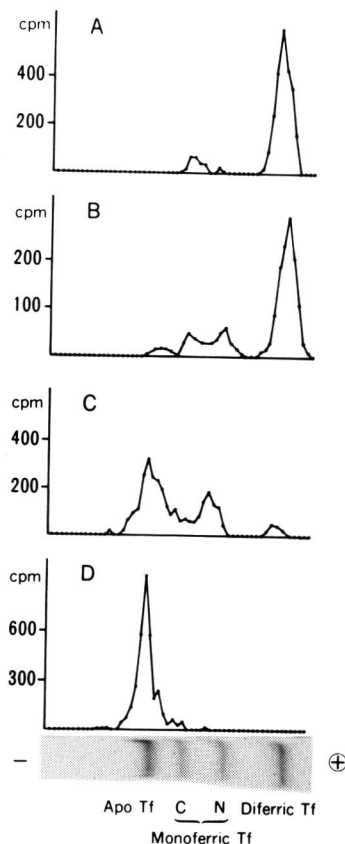


Fig. 11 6M urea gel electrophoretic patterns of ^{125}I -labelled transferrin with different iron content. Analysis of the pattern is presented in Table 2. Transferrin saturation: A : 96% , B : 82% , C : 25% , D : 2% . The control was 40% saturated transferrin and was divided into four types of transferrin.

Table 2 The relative proportion and percent saturation of transferrins with different iron content.

transferrin sample	relative proportion of transferrin				% transferrin saturation
	apo	monoferric		diferric	
		C-site	N-site		
A	0 %	8.4%	0.6%	91.0%	96
B	4.5%	16.0%	11.0%	68.5%	82
C	55.9%	14.0%	24.8%	5.3%	25
D	95.4%	4.2%	0.4%	0 %	2

Transferrin samples with different iron content were prepared as indicated in Materials and Method.

3.5 各種培養細胞の Tf レセプター

3.5.1 各種ヒト培養細胞株の Tf レセプター・アッセイ

^{125}I 標識 diferric Tf を用いた、8 種類のヒト培養細胞株の、Tf レセプター・アッセイの結果を Table 4 に示した。造血器悪性腫瘍由来の K 562, HL 60, U 937 の Tf レセプター数は細胞 1 個当り各々 $4.96 \pm 0.61 \times 10^5$, $3.96 \pm 0.53 \times 10^5$, $0.67 \pm 0.07 \times 10^5$ で、K 562 と HL 60 にレセプター数が多く、U 937 ではそれに比較して低値をとった。肝由来の Chang liver cell, C-Hc 4 の Tf レセプター数は、細胞 1 個当り各々 $0.98 \pm 0.40 \times 10^5$, 2.81×10^5 , 大腸癌由来 M 7609 では $1.23 \pm 0.41 \times 10^5$, 膵癌由来 HGC-25 では $0.37 \pm 0.22 \times 10^5$, 悪性黒色腫由来 HMV では $0.95 \pm 0.34 \times 10^5$ と、各々の培養細胞系で、一定の値をとった。結合定数については、今回アッセイをおこなったすべての細胞で、 $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 前後の値をとった。細胞倍加時間は Table 5 に示すように、K 562 で 26.5 ± 5.7 時間、HL 60 で 25.1 ± 6.5 時間、U 937 で 28.1 ± 5.2 時間であり、有意差をみとめず、各々の細胞のレセプター数との相関

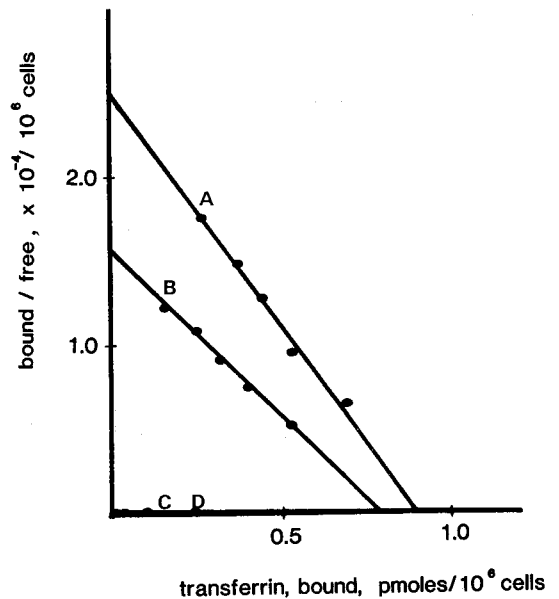


Fig. 12 Scatchard plot of binding of transferrin with different iron content. The percent saturation of transferrin samples (A), (B), (C), (D) are indicated in Table 2.

Table 3 Relationship between specific transferrin binding to K 562 cells and the concentration of diferric transferrin in culture medium.

transferrin sample	total amount of transferrin (nM)	concentration of diferric transferrin (nM)	specific binding of transferrin (pmol/ 10^6 cells)
A	1.5	1.37	0.254
B	1.5	1.02	0.181
C	1.5	0.08	0.005
D	1.5	0.00	0.001

Table 4 *Transferrin receptors on the surface of various human established cell lines.*

cell line	number of experiments	transferrin receptor	
		number/cell	Ka(M ⁻¹)
K 562	(5)	4.96±0.61×10 ⁵	1.91±0.48×10 ⁸
HL 60	(3)	3.96±0.53×10 ⁵	2.22±0.57×10 ⁸
U 937	(5)	0.67±0.07×10 ⁵	2.23±0.66×10 ⁸
Chang liver cell	(5)	0.98±0.40×10 ⁵	2.19±0.28×10 ⁸
C-Hc4	(2)	2.81×10 ⁵	2.72×10 ⁸
M 7609	(5)	1.23±0.41×10 ⁵	2.06±0.21×10 ⁸
HGC-25	(3)	0.37±0.22×10 ⁵	2.58±0.80×10 ⁸
HMV	(3)	0.95±0.34×10 ⁵	2.29±0.66×10 ⁸

Data represent the mean±S. D.

はなかった。

3.5.2 K 562 細胞の S 期同調培養と Tf レセプターの推移

Fig. 13 に K 562 細胞を過剰の thymidine と hydroxyurea で同調培養した際の、³H-thymidine の細胞への取り込みと、Tf レセプター数を示した。S 期同調後、実線に示す細胞内への急速な³H-thymidine の取り込みが始まり、約 3 時間でピークに達し、以後漸減した。一方、ヒストグラムで示す Tf レセプター数は、当初 4×10⁵/cell であったが、同調後 2 から 5 時間で 8×10⁵/cell と、非同調時の約 2 倍に増加し、DNA 合成の亢進と一致した Tf レセプターの増加をみ、10 時間後には、ほぼ前値に復した。

3.5.3 Mitogen 刺激ヒト末梢リンパ球の Tf レセプター

PHA により、ヒト末梢リンパ球を刺激し、Tf レセプターの数および結合定数について検討した。Table 6 に示すように、PHA 刺激により、DNA への³H-thymidine の取り込みは、78.2 倍に増加したが、同時に、細胞 1 個当りの Tf レセプター数は、対照の PHA 非添加群が、0.04×10⁵/cell であるのに対し、0.21×10⁵/cell と約 5 倍に増加した。一方、結合定数は、PHA 刺激群で 2.92×10⁸ M⁻¹、対照群で 2.73×10⁸ M⁻¹ と有意差を認めなかった。

3.5.4 マウス Balb/c 3T3 細胞の増殖形態と Tf レセプター

継代中に、接触阻止現象をおこし、静止期に入るマ

Table 5 *Doubling time of three human established cell lines.*

cell line	doubling time (hours)
K 562	26.5±5.7
HL 60	25.1±6.5
U 937	28.1±5.2

Data represent the mean±S. D. of 10 experiments.

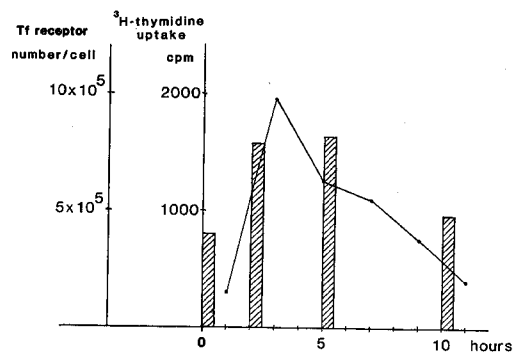


Fig. 13 Expression of transferrin receptors after S phase synchronization of K 562 cells using 2.5 mM thymidine and 1 mM hydroxyurea. The histogram and the solid line indicate the number of transferrin receptors/cell and incorporation of ³H-thymidine, respectively.

Table 6 Expression of transferrin receptors of PHA-stimulated peripheral blood lymphocytes.

lymphocyte	³ H-thymidine uptake (cpm/10 ⁵ cells)	transferrin receptor	
		number/cell	Ka(M ⁻¹)
control	3,044±203	0.04×10 ⁵	2.73×10 ⁸
PHA stimulated	238,025±7284	0.21×10 ⁵	2.92×10 ⁸

Data represent the mean±S. D.

ウス Balb/c 3T3 細胞を用い、増殖期と静止期の Tf レセプター数の比較を Table 7 に示した。静止期には Tf レセプター数 0.06×10^5 個/cell であったが、増殖期には 0.67×10^5 と約 11 倍の増加を示した。結合定数は各々 2.74×10^8 M⁻¹, 2.05×10^8 M⁻¹ とほぼ一定であった。

Table 7 Comparison of transferrin receptors of mouse Balb/c 3T3 fibroblasts in subconfluent and quiescent phases.

growth phase	transferrin receptor	
	number/cell	Ka(M ⁻¹)
subconfluent	0.67×10^5	2.05×10^8
quiescent	0.06×10^5	2.74×10^8

4 考 察

生体膜にかんする生化学の進歩に伴い、細胞膜レセプターの存在が種々の生体反応系で明らかにされてきた。インスリン³⁷⁾をはじめ多くのペプチドホルモン、ステロイド³⁸⁾ および神経伝達物質がそれぞれ特有の生物学的作用を発揮するには、それらの物質が細胞膜表面または細胞内に存在する各受容体(レセプター)に結合することが必須条件とされている。Tf は鉄と特異的に結合する β グロブリン領域の血清蛋白であるが、この Tf から鉄を摂取し利用するために細胞膜面における Tf レセプターの存在が明らかにされてきた⁴⁻⁸⁾。

4.1 Tf レセプター・アッセイについて

培養細胞の Tf レセプターを同定する方法には、¹²⁵I 標識 Tf を用いたレセプター・アッセイで定量する方法¹¹⁾ と抗 Tf 抗体³⁹⁾ や抗 Tf レセプター抗体¹²⁾ を用いて蛍光ないし酵素抗体法で Tf レセプター出現細胞を同定する方法⁴⁰⁾ とに大別される。今回の研究では、個々の培養細胞株の Tf レセプターの個数と結合定数を比較することを目的としたため、¹²⁵I 標識 Tf を用いた binding assay 法をおこなった。この binding assay はインキュベートした ¹²⁵I 標識 Tf が細胞表面の Tf レセプターと結合し、膜レセプターの internalization が生ずること、

また Tf はすでに Tf で占められた Tf レセプターとは結合しないなどの要因をかかえてはいるものの、同一アッセイ条件でのレセプターの動態を知る際の、もっとも簡便ですぐれた方法として広く用いられている。著者はまず K 562 細胞を用い、レセプター・アッセイの基礎的検討をおこなった。アッセイは、Hamilton *et al.* の方法¹¹⁾ に従い、最大の結合を示す 37°C の条件でおこなったが、インキュベーション開始 15~30 分で結合はプラトーに達した。この ¹²⁵I 標識 diferric Tf の結合は、未標識の Tf によってのみ抑制され、ヒトアルブミンや Ig G の添加では抑制されず、Tf は特異的に K 562 細胞表面に結合したといえる。Scatchard plot 解析の結果からは、K 562 細胞表面の Tf レセプター数は 5.10×10^5 /cell、結合定数(Ka)は 1.98×10^8 M⁻¹ と算出された。最近 Schulman *et al.*⁴¹⁾ は同様の方法で K 562 細胞に対する ¹²⁵I-Tf の結合性を検討し、Tf レセプター数は 1×10^6 /cell、結合定数 8×10^7 M⁻¹ と、著者らの成績と近似した値を得ている。以上の Tf レセプター・アッセイの成績を前提として、鉄飽和度の異なる Tf の Tf レセプターに対する結合親和性と、培養細胞株の Tf レセプター出現とその意義について検討を加えた。

4.2 鉄飽和度の異なる transferrin の Tf レセプターに対する結合親和性について

Tf と鉄イオンの結合は、 $K_d = 10^{-24}$ M⁴²⁾ と、きわめて安定で、遊離の鉄イオンと容易に結合するため、apo Tf ないし低鉄飽和度の Tf を用いた実験は、手技上、困難な点が多い。実験操作中の鉄イオンの汚染は、2・3・5 で述べた方法で可及的に防ぐこととし、apo Tf の作製、Tf の鉄飽和度を算定する際に用いた 6 M 尿素ゲル電気泳動では、ほぼその目的を達し得た。しかし、培養細胞を用いた、Tf レセプター・アッセイの際には、細胞、培養液、培養フラスコ等の使用器具の除鉄を完全におこなうことは、実際上困難である。ことに添加する Tf 量が 0.5 nM から 20 nM と比較的微量な濃度を用いるため、培養液中で Tf を apo ないし低鉄飽和度の状

態で維持することは不可能であった。著者は、1.5 nM apo Tf を RPMI 1640 液中に添加した場合、15 分以内に鉄飽和度が約 80% まで増加する現象をみとめている。⁴³⁾ ところで、Tf レセプターと鉄含量の異なる Tf との結合について、Brown *et al.*¹⁴⁾ は、胎盤絨毛膜 Tf レセプターが apo Tf を diferric Tf とほぼ同じ結合定数、個数で認識するとし、Ward *et al.*¹⁵⁾ は HeLa 細胞の Tf 結合部位は、apo と diferric に対して差がないとしている。一方、Kornferd¹⁶⁾ は網赤血球表面の Tf レセプターは、apo Tf に対する結合性が diferric Tf の約 20% であるとし、報告者により一致をみていない。そこで、培養液中の遊離鉄イオンをキレートするため、desferrioxamine ないし、tropolone を添加し、¹²⁵I 標識 Tf の遊離鉄結合による飽和度の変化を防ぐことにした。これらの鉄キレート剤の存在下でも、インキュベーション開始後 15 分以内では、ほぼ 95% の鉄イオンが Tf から遊離せず、また鉄キレート剤の存在自体は、細胞表面の Tf レセプターに対する Tf の結合に影響を与えないことが確かめられている(著者ら、未発表データ)。その結果、Fig. 10 に示したように、非標識 apo Tf は、diferric Tf と有意な競合を示さず、¹²⁵I 標識 diferric Tf と特異性の高い結合を生じていると考えられた。さらに、¹²⁵I 標識 apo Tf と培養液をキレート剤の存在下でインキュベート、低飽和度の ¹²⁵I 標識 Tf を作製し、その Tf レセプターに対する結合をみたが、N-site および C-site bound monoferric Tf と apo Tf が主体の試料 (C) と、apo Tf が主体の試料 (D) では、有意の結合を示さず、diferric Tf のみが Tf レセプターの結合に関与しているものといえる。このように、Tf レセプターが、diferric Tf を認識することは Rosseneu-Moutreff *et al.*⁴⁴⁾ が指摘したように、Tf の hydrodynamic study の結果から、Tf へ鉄が 2 個結合することにより、Tf の長軸・短軸比が 2.5 から 2.0 に変わることと関連し、Tf のコンフォメーションの変化が、Tf レセプターの認識に重要な役割をもっていることを示唆するものといえる。

4.3 各種培養細胞株の Tf レセプターについて

当教室で継代している 8 種類のヒト培養細胞株の Tf レセプター・アッセイをおこなった。一般に、培養細胞株の Tf レセプターの出現については、その細胞起源⁴⁵⁾、分化度⁴⁶⁾、培養細胞の鉄イオン要求性^{41,47)}、分裂増殖能⁴⁸⁾ などいくつかの要因が考えられている。造血器悪性腫瘍由来、K 562, HL 60, U 937 では細胞 1 個当たりの Tf レセプターは、各々、 $4.96 \pm 0.61 \times 10^5$ 、 $3.96 \pm 0.53 \times 10^5$ 、 $0.67 \pm 0.07 \times 10^5$ であり、肝細胞由

来 Chang liver cell では $0.98 \pm 0.40 \times 10^5$ 、原発性肝細胞癌由来 C-Hc 4 では 2.81×10^5 、大腸癌由来 M 7609 では $1.23 \pm 0.41 \times 10^5$ 、膵癌由来 HGC-25 では $0.37 \pm 0.22 \times 10^5$ 、黒色腫由来 HMV では $0.95 \pm 0.34 \times 10^5$ で、検索したすべての培養細胞系に Tf レセプターをみとめた。このことは、Hamilton *et al.*¹¹⁾ が指摘しているように、培養細胞株に共通した形質と考えられ、増殖細胞に共通した現象である可能性が大きい。しかしながら、Table 5 で K 562, HL 60, U 937 の細胞倍加時間との相関が認められないように、異った細胞株での比較は、起源、分化度、増殖能などの関連する要因が多すぎ、解析が困難なため、各々 K 562 細胞の S 期同調培養、Balb/c 3T3 細胞の増殖期の調整、ヒト末梢リンパ球の PHA 幼若化現象と Tf レセプター出現の推移を検討した。その結果、K 562 細胞の S 期同調培養で DNA 合成の亢進と一致して Tf レセプターの増加をみ、Balb/c 3T3 細胞では増殖期に Tf レセプターが著増し、さらに PHA によるヒト末梢リンパ球の幼若化に伴い、Tf レセプターが増加するなど、同一細胞でも、細胞の分裂、増殖、ことに DNA 合成の亢進と併行して Tf レセプターの増加がみとめられた。鉄イオンは、ヘモグロビン合成ばかりでなく、cytochrome c oxidase などの呼吸鎖のヘム酵素、DNA 合成に必要な ribonucleotide reductase など、細胞の代謝・増殖と密接な関連をもつ酵素に必須な金属であり^{2,49)}、その細胞内への取り込みに関与する Tf レセプターの増加は、合目的意義をもつものといえる。ことに、Tf レセプターが、diferric Tf とのみ強い結合親和性をもつことは、培養細胞株の鉄イオンの取りこみに、能動的に関与していることを裏付けるものといえる。最近、Shindelman *et al.*⁵⁰⁾ は、ヒト乳癌組織のマイクロソーム分画を用い、¹²⁵I 標識 Tf の結合量を測定し、11 例の乳癌について全例に 11~35% の特異的な Tf の結合をみたが、乳癌症で 4%、正常乳癌組織で 4% であったとし、Tf レセプターが悪性腫瘍組織のマーカーであることを示唆した。しかしながら、培養細胞株にみられる Tf レセプターの出現に関する本研究の結果からは、むしろ、悪性・良性をとわず、細胞周期と関係し、細胞分裂・細胞増殖の盛んな細胞に等しく出現する現象であり、細胞分裂の指標としての可能性を示唆するものといえよう。

4 結 論

ヒト血漿より抽出した Tf を、¹²⁵I 標識した後、8 種類のヒト培養細胞株、Balb/c 3T3 細胞、および PHA 刺激ヒト末梢リンパ球を実験材料として Tf レセプター・

アッセイをおこない、異った鉄含量の Tf のレセプターに対する特異性と、培養細胞表面の Tf レセプター出現の意義について検討し、以下の成績を得た。

(1) ^{125}I 標識した diferric Tf の K 562 細胞表面への特異的結合は、 37°C 、15 分でプラトーに達し、Scatchard plot 解析で細胞 1 個当りのレセプター数は 5.10×10^5 、結合定数 (K_a) は $1.98 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ であった。

(2) 鉄含量の異なる Tf の Tf レセプターに対する結合は、鉄の飽和した diferric Tf に特異的で、apo Tf および monoferric Tf は、Tf レセプターに有意な結合を示さなかった。

(3) 8 種類のヒト培養細胞株の Tf レセプター・アッセイでは、検討したすべての細胞株に $K_a = 2.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 前後の Tf レセプターの出現をみると、各々の細胞 1 個あたりの Tf レセプター数は $0.3 \sim 5.0 \times 10^5$ の間にあった。しかしながら、細胞の起源、倍加時間との関連は明確ではなかった。

(4) S 期に同調培養した K 562 細胞では、 ^3H -thymidine の取りこみと一致して、細胞 1 個あたりの Tf レセプター数は非同調時にくらべ約 2 倍に増加した。

(5) Balb/c 3T3 細胞では、静止期に比べ、増殖期にはレセプター数が約 11 倍に増加した。

(6) ヒト末梢リンパ球を PHA で幼若化した際には、PHA 非刺激時のリンパ球に比べ、Tf レセプター数が $0.21 \times 10^5/\text{cell}$ と著明に増加した。

これらの実験成績は、Tf レセプターが鉄の飽和した diferric Tf のみを認識することを示すとともに、Tf レセプターが細胞の分裂・増殖に必要な鉄イオンの需要と密接に関連した分裂・増殖の細胞表面マーカーとなり得る可能性を示唆した。

稿を終えるにあたり、御指導を頂いた本学内科学第 4 講座 漆崎一朗教授、新津洋司郎助教授、高後裕講師に深謝致します。

なお、本研究は文部省科学研究費：がん特 I 「腫瘍マーカーの生化学的研究班」の助成による。

文 献

- Putnam, F. W.: 6 Transferrin, In: Putnam, F. W.: The plasma proteins I, 265-316, Academic, New York (1975).
- Aisen, P. and Listowsky, I.: Iron transport and storage proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 357-393 (1980).
- Jandl, J. H. and Katz, J. H.: The plasma-to cell cycle of transferrin. *J. Clin. Invest.* **42**, 314-326 (1963).
- van Bockxmeer, F. M., Yates, G. K. and Morgan, E. H.: Interaction of transferrin with solubilized receptors from reticulocytes. *Eur. J. Biochem.* **92**, 147-154 (1978).
- Liebman, A. and Aisen, P.: Transferrin receptor of the rabbit reticulocyte. *Biochemistry* **16**, 1268-1272 (1977).
- Sullivan, A. L. and Weintraub, L. R.: Identification of ^{125}I -labeled rat reticulocyte membrane proteins with affinity for transferrin. *Blood* **52**, 436-466 (1978).
- Wada, H. G., Hass, P. E. and Sussman, H. H.: Transferrin receptor in human placental brush border membranes. *J. Biol. Chem.* **254**, 12629-12635 (1979).
- Seligman, P. A., Schleicher, R. B. and Allen, R. H.: Isolation and characterization of the transferrin receptor from human placenta. *J. Biol. Chem.* **254**, 9943-9946 (1979).
- Hayashi, I., Lerner, J. and Sato, G.: Hormonal growth control of cells in culture. *In Vitro* **14**, 23-30 (1978).
- Hutchings, S. E. and Sato, G. H.: Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 901-904 (1978).
- Hamilton, T. A., Wada, H. G. and Sussman, H. H.: Identification of transferrin receptor on the surface of human cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6406-6410 (1979).
- Goding, J. W. and Burns, G. F.: Monoclonal antibody OKT 9 recognizes the receptor for transferrin on human acute lymphocytic leukemia cells. *J. Immunol.* **127**, 1256-1258 (1981).
- Trowbridge, L. S. and Omary, M. B.: Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3039-3043 (1981).
- Brown, P. J., Molloy, C. M. and Johnson, P. M.: Transferrin receptor affinity and iron transport in the human placenta. *Placenta* **3**, 21-28 (1982).
- Ward, J. H., Kushner, J. P. and Kaplan, J.: Regulation of HeLa cell transferrin receptors. *J. Biol. Chem.* **257**, 10317-10323 (1982).
- Kornferd, S.: The effect of metal attachment to human apotransferrin of its binding to reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **194**, 25-33 (1969).

17. Lozzio, C. B. and Lozzio, B. B.: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive philadelphia chromosome. *Blood* **45**, 321-334 (1975).
18. Collins, S. J., Gallo, R. C. and Gallagher, R. E.: Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. *Nature* **270**, 347-349 (1977).
19. Sundström, C. and Nilsson, K.: Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* **17**, 565-577 (1976).
20. Chang, R. S.: Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **87**, 440-443 (1954).
21. 桑原武彦: ヒト肝癌のヌードマウスへの移植に関する研究. *肝臓* **21**, 303-315 (1980).
22. 町田清朗・石岡 隆・高嶋一敏・西川鼎二・福島松郎・石川義信: 人悪性腫瘍細胞の培養. *癌と化学療法* **6**, 265-273 (1979).
23. 赤木忠厚・谷内万子: ヒト腫瘍癌培養細胞株の樹立. *医学のあゆみ* **93**, 12-13 (1980).
24. 坂本吾偉・青木幹雄・春日 孟・菅野晴夫・増淵一正・木村光男: 腔原発の悪性黒色腫. *癌の臨床* **17**, 276-283 (1971).
25. Hill, R.: A method for the estimation of iron in biological material. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* **107**, 205-214 (1930).
26. Aisen, P., Leibman, A. and Reich, H. A.: Studies on the binding of iron to transferrin and conalbumin. *J. Biol. Chem.* **241**, 1666-1671 (1966).
27. Okada, S., Jarvis, B. and Brown, E. B.: *In vivo* evidence for the functional heterogeneity of transferrin-bound iron. V. Isotransferrins: An explanation of the Fletcher-Huehns phenomenon in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* **93**, 189-198 (1979).
28. O' Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021 (1975).
29. Grabar, P. and Williams, C. A.: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta* **10**, 193-194 (1953).
30. Lowry, O. H., Rosebrodgh, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
31. Aisen, P., Leibman, A. and Zweier, J.: Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* **253**, 1930-1937 (1978).
32. Makey, D. G. and Seal, U. S.: The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron binding process. *Biochim. Biophys. Acta* **453**, 250-256 (1976).
33. Hunter, W. M.: 17 Radioimmunoassay, In: Weir, D. M. ed.: *Handbook of experimental immunology*. 2nd ed. 1-36, Blackwell Scientific, Oxford (1973).
34. 山田正篤: 同調培養法, 組織培養(中川準之助ら編). 80-90, 朝倉書店, 東京 (1976).
35. Böyum, A.: Separation of white blood cells. *Nature* **204**, 793-794 (1964).
36. Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672 (1949).
37. Jacobs, S., Hazum, E. and Cuatrecasas, P.: The subunit structure of rat liver insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **255**, 6937-6940 (1980).
38. O'Malley, B. W. and Means, A. R.: The effects of steroid hormones on target cell nuclei are of major importance in the induction of new cell functions. *Science* **183**, 610-620 (1974).
39. Galbraith, G. M. P., Galbraith, R. M., Temple, A. and Faulk, W. P.: Demonstration of transferrin receptors on human placental trophoblast. *Blood* **55**, 240-242 (1980).
40. Sutherland, R., Delia, D., Schneider, C., Newman, R., Kemshead, J. and Greaves, M.: Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4515-4519 (1981).
41. Schulman, H. M., Wilezyska, A. and Ponka, P.: Transferrin and iron uptake by human lymphoblastoid and K 562 cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **100**, 1523-1530 (1981).
42. Aasa, R. and Aisen, P.: An electron paramagnetic resonance study of the iron and copper complexes of transferrin. *J. Biol. Chem.* **243**, 2399-2404 (1968).
43. 高後 裕・漆崎洋一: トランスフェリンの多様性とトランスフェリン・レセプター. *生物物理化学*, 印刷中.
44. Rosseneu-Moutreff, M. Y., Soetewey, F., Lamote, R. and Peeters, H.: Size and shape determination of apotransferrin and transferrin monomers. *Biopolymers* **10**, 1039-1048 (1971).
45. Lebman, D., Trucco, M., Bottero, L., Lange, B., Pessano, S. and Rovera, G.: A monoclonal antibody that detects expression of transferrin

- receptor in human erythroid precursor cells. *Blood* **59**, 671-678 (1982).
46. Yeh, C. G., Papamichael, M. and Faulk, W. P.: Loss of transferrin receptors following induced differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Exp. Cell Res.* **138**, 429-433 (1982).
47. Glass, J., Nunez, M. T., Fischer, S. and Robinson, S. H.: Transferrin receptors, iron transport and ferritin metabolism in Friend erythroleukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta* **542**, 154-162 (1978).
48. Omary, M. B., Trowbridge, I. S. and Minowada, J.: Human cell-surface glycoprotein with unusual properties. *Nature* **286**, 888-891 (1980).
49. Hemmaphard, D. and Morgan, E. H.: Transferrin and iron uptake by human cells in culture. *Exp. Cell Res.* **87**, 207-212 (1974).
50. Shindelman, J. E., Ortmeyer, A. E. and Sussman, H. H.: Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells. *Int. J. Cancer* **27**, 329-334 (1981).
-
- 別刷請求先：
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学内科学第4講座 漆崎洋一