

2. $\alpha 2$ HS 糖蛋白質によるマクロファージの活性増強*

松島綱治**・程 明**・右田俊介**

大圓修身***・野竹邦弘***

$\alpha 2$ HS 糖蛋白質は、1960年 Heremans により高濃度の Zn^{++} イオンにて可溶性の蛋白として単離された ($\alpha 2$ -Z グロブリンと命名)¹⁾。一方、Schmid と Bürgi は、1961年エタノール分画より Ba^{++} イオン存在下で沈殿する蛋白として単離するとともに (Ba- $\alpha 2$ -糖蛋白質と命名)、物理化学的性状を決定した²⁾。1962年 Shultze は、両蛋白が同一の蛋白であることを Ouchterlony 法にて確認し、発見者兩名の頭文字をとり $\alpha 2$ HS 糖蛋白質と命名した³⁾。

$\alpha 2$ HS の機能については、まだほとんど不明だが、1974年に Van Oss らは、 $\alpha 2$ HS がヒト好中球の *in vitro* における *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* の貪食能を高めるオプソニン効果を有することを報告した⁴⁾。また、1980年に Lewis らは、ヒト $\alpha 2$ HS が、マウスマクロファージの Latex Beads 取り込みをも増加させることを報告している⁵⁾。一方、1978年 Triffitt らは、ウサギ $\alpha 2$ HS が肝臓で生成され、骨基質に多く集積することを報告している^{6,7)}。

著者らは、これまでに3,000検体を超えるヒト血清を一元放射状免疫拡散法にて測定を行い、 $\alpha 2$ HS の濃度が臍帯血中で最も高く、加齢とともに減少することを見出した⁸⁾。また、悪性腫瘍のとき有意な低下を来し、OK432 (ピシバニール) 治療にて回復する点から、この蛋白が癌に対する宿主抵抗性、特に細胞性免疫能に関連を持つのではないかと考え以下の実験を行った。その結果、ヒト $\alpha 2$ HS は、活性化マクロファージの抗腫瘍活性を増強させることが判明した。

材料と方法

1. ヒトプール血清 21 より $\alpha 2$ HS を精製した。
2. 硫酸塩析法：血清 21 に蒸留水 0.81 加え、pH

を7.0に調製した。硫酸粉末 588 g (37%飽和に相当) を攪拌しながら少量ずつ加え、全部加え終わったあと30分間攪拌した。以上の操作はすべて氷浴にて行い、その後6,000 rpm, 30分, 4°C にて遠心し沈殿物を得た。

3. DEAE Sephadex, DEAE cellulose カラムクロマトグラフィー：ともにカラムサイズは $\phi 4 \times 40$ cm, 流量は 150 ml/hr で、15.4 ml/tube に採取した。出発緩衝液として 0.01 M リン酸緩衝液 pH 7.5, 0.07 M NaCl を用い、溶出は NaCl の濃度のみを変え、0.3 M まで上げる linear gradient 法によった。

4. Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィー：カラムサイズは $\phi 4 \times 120$ cm, 平衡化緩衝液は 0.01 M リン酸緩衝液 pH 7.5, 0.15 M NaCl, 流量は 25 ml/hr で 7.2 ml/tube 採取した。

5. Hydroxylapatite カラムクロマトグラフィー：カラムサイズは $\phi 2.7 \times 7.5$ cm, 出発緩衝液は K-リン酸緩衝液 pH 7.3, 伝導度 5×10^{-3} mmho/cm で liner gradient により 25×10^{-8} mmho/cm まで上げ溶出した。

6. Blue Sepharose 4B アフィニティー・カラムクロマトグラフィー：カラムサイズは $\phi 2.8 \times 12$ cm, 平衡化緩衝液は 0.05 M Tris-HCl pH 7.0 であり、 $\alpha 2$ HS はこの条件では吸着せず通過した。Alb は吸着するので両者を分離できた。

7. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動：Weber と Osborn らの方法⁹⁾により行った。ゲル濃度は 7.5%, 泳動用緩衝液は、0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.2, 0.1% SDS であり、還元は dithiothreitol により行った。

8. 寒天等電点電気泳動¹⁰⁾：0.8% アガロース (Litex type HSIF)。ファルマライト pH 3~10, pH 2.5~5 を 2:1 の割合で混ぜ、最終的にファルマライトとして 2%になるようにした。8 V/cm 1時間, 16 V/cm 6.5

* $\alpha 2$ HS glycoprotein augments the function of macrophage.

** Kouji Matsushima, Ming Cheng, Shunsuke Migita, Osami Daimaru, 金沢大学癌研究所分子免疫部。

*** Kunihiro Notake, 愛知医科大学細菌学教室。

時間電気泳動を行った。

9. Neuraminidase 処理: サンプルは 0.2 M 酢酸緩衝液 pH 5.5 にて一夜透析を行い, 3:5 の割合で neuraminidase (*Vibrio cholerae* 由来 1 U/ml) を加え, 24 時間まで, 37°C にて incubation を行った。

10. Circular Dichroism (C.D.) Spectrum の測定: サンプルは 0.02 M Tris-HCl pH 7.0, 0.15 M NaCl で溶解希釈を行った。% α -helix 含量は $\frac{[\theta]_{208} - 4,000}{33,000 - 4,000}$, % β -structure は $\frac{[\theta]_{216}}{-9,200} \times 100$ より計算した。

11. Phagocytosis の測定: カルボキシル化された latex beads, ϕ 0.36 μ m を 3 H-tyramine と carhodiiimide で結合させた (220 cpm/ 10^6 particles). 貪食細胞としてマウスマクロファージ培養株 CAMU-3 を用い, 2×10^4 cells/well/0.2 ml RPMI 1640, 0.5% BSA にヒト α 2 HS を最終濃度 600 μ g/ml (ヒトの生理的な量) になるように加え, 3 時間まで incubation し, 3 H-latex beads の取り込みを調べた。Control 群として, ヒト Alb 600 μ g/ml ならびに PBS を用いた。

12. ヒト末梢血リンパ球の幼若化反応, ならびに混合培養: 健康正常ヒト末梢血から Lymphoprep を用い, 400 \times G 30分にてリンパ球を分離した。リンパ球幼若化反応は, 2×10^5 cells/0.2 ml RPMI 1640, 5% FCS/well の細胞数で, PHA 7.5 μ g/ml または Con A 2.5 μ g/ml または PWM 0.1 μ g/ml (suboptimal な濃度), 37°C, 5% CO₂ の条件にて72時間培養を行った。終了6時間前に 3 H-TdR を 0.5 μ Ci パルスした。混合培養はそれぞれの細胞数 1×10^5 cells/0.2 ml RPMI 1640, 5% FCS/well の two way で5日と7日培養を行い終了24時間前に 3 H-TdR を 0.5 μ Ci パルスした。

13. マウス腹腔マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制反応: C3H/He, BALB/c マウス 8 週齢を用い, 標的細胞

として, マウス乳癌 MM2 細胞, 形質細胞腫 X 5563 ならびに MPC 11 を用いた。活性化マクロファージは, OK432, 2KE を5日前に i.p. 接種して得た。正常非刺激マクロファージは, C3H/He または BALB/c の SPF マウスよりヘパリン加培養液の腹腔洗浄により得た。マクロファージ 5×10^4 cells, 1×10^5 cells ならびに 2×10^5 cells と標的細胞 1×10^4 cells をマイクロプレート法にて24時間培養し, 終了6時間前に 3 H-TdR 0.5 μ Ci パルスし細胞増殖抑制効果を測定した。

結 果

1. ヒト α 2 HS の精製と性状: 精製に用いたヒトブール血清中の α 2 HS の総量は 890 mg であった。最終的に精製された量は 130 mg であり, yield は 14.6%, purification は222倍であった (Table 1)。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (Fig. 1), 免疫電気泳動にて単一であることを確認した。寒天等電点電気泳動において, 精製 α 2 HS は pI 4.4~5.0 の少なくとも8本のバンド

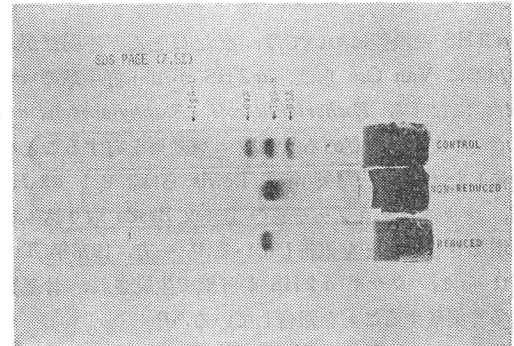


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of human α 2 HS glycoprotein.

Table 1. Purification of human α 2 HS glycoprotein.

Fraction	Volume (ml)	Total protein* (mg)	α 2 HS** (mg)	Yield (%)	Purification
Normal human serum	2,000	67,200	890	100	\times 1
Ammonium sulfate Ppt. (0~37%)	235	14,664	268	30.1	1.4
DEAE Sephadex A-50	1,075	2,494	257	28.9	7.8
DEAE Cellulose	610	476	195	21.9	31.1
Sephadex G-200	270	221	180	20.2	61.6
Hydroxylapatite	102	110	136	15.3	93.3
Blue Sepharose 4B	102	44	130	14.6	221.8

* Performed by the Folin procedure of Lowry et al employing a rabbit IgG standard curve.

** Determined by SRID method.

に分離するが、neuraminidase の処理にて pI 5.5 の 2本のバンドになった (Fig. 2)。C. D. spectrum の検索にて α -helix 含量 4.9%, β -structure 含量 43% であることが判った。また、56°C, 30分もしくは60°C, 15分の処理にてほとんど変化はみられなかった (Table 2)。

2. α 2 HS によるマクロファージの食能増進: マウスマクロファージ培養株 CAMU-3 の ^3H -latex beads 取り込みの測定に際し、使用する培養液を RPMI 1640, 5% FCS ならびに RPMI 1640, 0.5% BSA を用いたところ、RPMI 1640, 0.5% BSA のほうが latex beads の取り込みが多くみられ、また、取り込みは3時間でプラトーに達した。次に RPMI 1640, 0.5% BSA 培養液にヒト Alb (600 $\mu\text{g}/\text{ml}$), α 2 HS (600 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えたときの影響を培養時間30分, 1時間, 2時間, 3時間

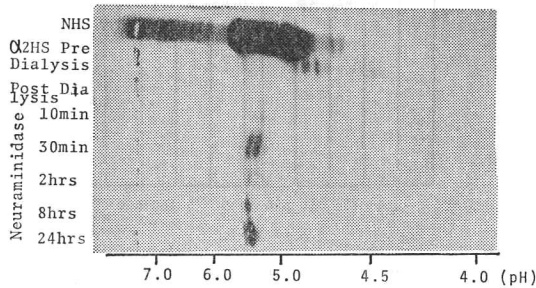


Fig. 2. Agarose isoelectric focusing of human α 2 HS glycoprotein.

Table 2. Secondary structure of human α 2 HS glycoprotein.

	% α -Helix	% β -Structure
Purified α 2 HS	4.9	43
After incubation at 56°C for 30 min	4.0	41.1
After incubation at 60°C for 15 min	3.5	39.7

で測定したところ、いずれの時間でも α 2 HS 添加群は、ヒト Alb 添加群、PBS 群より高い取り込みを示した。ヒト Alb 添加群は、PBS 群と比べ差がなかった。そこで RPMI 1640, 0.5% BSA 培養液を用い、培養時間3時間にて、独立した実験として3回 PBS, ヒト Alb, α 2 HS 添加時の測定を行ったところ、 α 2 HS は CAMU-3 の ^3H -latex beads の取り込みを 1.25~2 倍増加させた (Table 3)。

3. ヒトリンパ球幼若化反応、ならびに混合培養に α 2 HS を最終濃度 75, 150, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えて、 ^3H -TdR の取り込みを測定したが影響はなかった。

4. α 2 HS による活性化マクロファージの抗腫瘍活性増強: i) C3H/He マウスより得た OK432 活性化マクロファージと標的細胞マウス乳癌 MM2 の E/T 比を 5:1, 10:1, 20:1 にて細胞増殖抑制効果を調べたところ、同数の正常マクロファージと標的細胞の ^3H -TdR の取り込みカウント数を基準にすると、それぞれ50%, 55%, 90% 抑制であった。それゆえに、以後は、E/T 比を 5:1, 10:1 の2点にて行った。ii) 上記の条件においてわれわれの精製した α 2 HS ならびに富士臓器より得た α 2 HS を最終濃度 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えると E/T 比 5:1, 10:1 いずれにおいても α 2 HS は、活性化マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果を増強した (Fig. 3)。iii) 同様の実験にて、 α 2 HS の濃度をヒトの生理的少量である 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで変化させ、正常マウスマクロファージ、OK432 活性化マウスマクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果に対する影響をみた。OK432 活性化マクロファージに対しては、dose dependent に細胞増殖抑制効果を増強した。一方、正常非刺激マクロファージに対しては影響を与えなかった (Fig. 4)。同様の結果は C3H/He マウスマクロファージと X5563, BALB/c マウスマクロファージと MPC 11 (Fig. 5) の組み合わせにて得られた。iv) α 2 HS 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃

Table 3. Enhancement of phagocytic activity of mouse macrophage cell line CAMU-3 by human α 2 HS glycoprotein.

Treatment ^3H -Latex	PBS (-)	PBS (+)	Alb (600 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (+)	α 2 HS (600 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (+)
Exp. I	245.5 \pm 16.3*	720.7 \pm 71.7	783.5 \pm 55.9	1404.5 \pm 77.1
Exp. II	405.0 \pm 56.4	633.3 \pm 80.4	700.0 \pm 56.1	1216.3 \pm 130.4
Exp. III	587.5 \pm 53.0	1300.0 \pm 106.1	1350.0 \pm 147.5	1625.0 \pm 41.4

* count/5 minute.

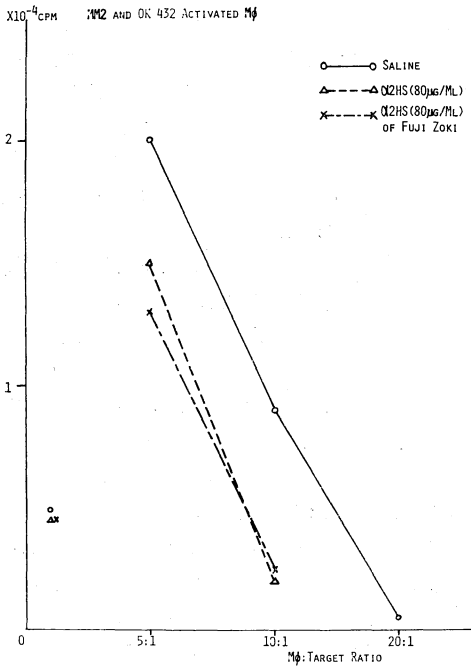


Fig. 3. Cytostatic effect of OK 432 activated macrophages on MM2 mouse mammary carcinoma cells.

Both $\alpha 2$ HS glycoprotein preparations ours and Fuji-Zoki's were equally effective.

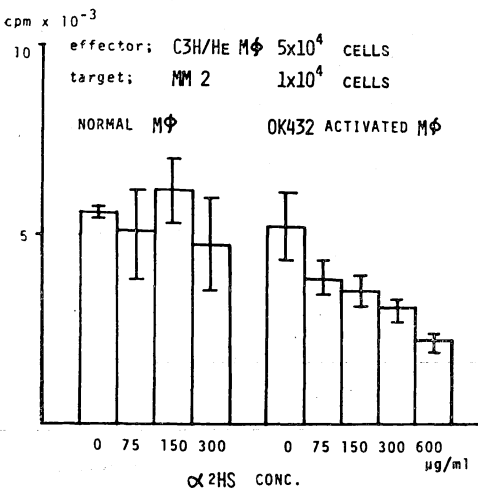


Fig. 4. Enhancement of cytostatic effects on MM2 mouse mammary carcinoma cells by OK432 activated macrophages cocultured with human $\alpha 2$ HS glycoprotein.

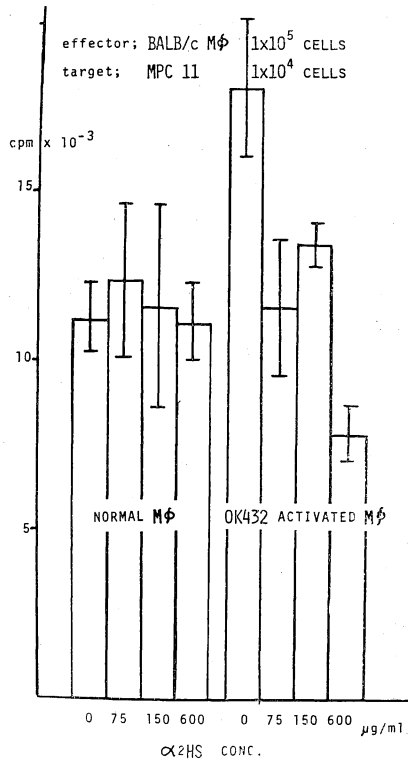


Fig. 5. Enhancement of cytostatic effects on MPC 11 mouse myeloma cells by OK432 activated macrophages cocultured with human $\alpha 2$ HS glycoprotein.

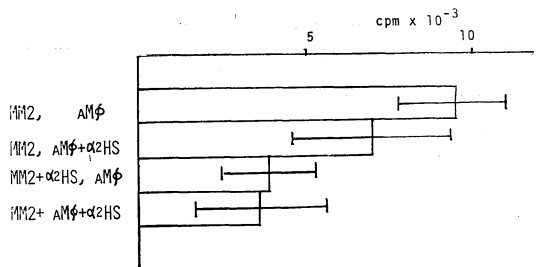


Fig. 6. Preincubation experiment of MM2 mouse mammary carcinoma cells or OK432 activated macrophages with $\alpha 2$ HS glycoprotein (600 $\mu\text{g/ml}$).

度にて OK432 活性化 C3H/He マウスマクロファージもしくは MM2 の一方と 37°C, 1 時間 preincubation を行い, 洗浄後 $\alpha 2$ HS なしの状態で細胞増殖抑制効果を調べた. いずれの場合にも対照群と比べ, $\alpha 2$ HS との preincubation により抑制効果の増強を認めた (Fig. 6). $\alpha 2$ HS が両細胞に結合性を有することを示唆する.

結論ならびに考察

ヒト $\alpha 2$ HS をプール血清より大量に精製する方法を開発した。Lebreton らが報告している精製中の $\alpha 2$ HS の分解産物は出現しなかった。 $\alpha 2$ HS の分子量は49,000であり、単鎖である。寒天電気泳動では Inter- α glob で、等電天上の heterogeneity は、neuraminidase の処理にてほとんど消失し、pI が 4.4~5.0 が 5.5 に変化することより、シアル酸を含む糖鎖によるものと考えられる。C. D. spectrum にて、 α -helix 含量が 4.9% と helix 含量の少ない蛋白であることが判明した。この結果は、 $\alpha 2$ HS のアミノ酸組成において Pro が 7.9% と多く含まれるという結果²⁾ と一致する。

$\alpha 2$ HS の機能についてはまだほとんど不明だが、オプソニン効果を有することをわれわれもマウスマクロファージ培養株 CAMU-3 の ³H-latex beads 取り込みを用いて追試し得た。さらにわれわれは、 $\alpha 2$ HS の年齢ならびに疾患時の変動より、 $\alpha 2$ HS が生体内における細胞性免疫能の非特異的増強因子の1つと考え検索を行った結果、 $\alpha 2$ HS が活性化マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果を増強する働きがあることが判明した。正常非刺激マクロファージには影響を与えない。preincubation の実験より、 $\alpha 2$ HS がマクロファージならびに腫瘍細胞に対して結合性を有することから $\alpha 2$ HS が、マクロファージと腫瘍細胞の接合を強めることによりマ

クロファージの腫瘍細胞増殖抑制効果を増強すると考えられる。 $\alpha 2$ HS の細胞への結合がどのような種類の結合かは不明である。

$\alpha 2$ HS がマウスにも存在するかどうか、また、今回みられたようなマウス細胞へのヒト $\alpha 2$ HS の効果がヒトの細胞でもみられるのかどうか現在検索中である。

文 献

- 1) Heremans, J. : Les globulines sériques du système Gamma, *Brux Med., Belgium*, 1960, p. 103.
- 2) Schmid, K. and Bürgi, W. : *Biochim. Biophys. Acta*, **47** : 440, 1961.
- 3) Shultze et al. : *Naturwiss.*, **49** : 15, 1962.
- 4) Van Oss et al. : *Immunol. Commun.*, **4** : 329, 1974.
- 5) Lewis, J. G. and André, C. M. : *Immunology*, **39** : 317, 1980.
- 6) Triffitt, J. T. et al. : *Calcif. Tiss. Res.*, **26** : 155, 1978.
- 7) Triffitt, J. T. et al. : *Nature*, **262** : 226, 1976.
- 8) 平山千里, 右田俊介 : 血漿蛋白質, 医歯薬出版, 1979, p. 242.
- 9) Weber, K. and Osborn, M. : *J. Biol. Chem.*, **244** : 4406, 1969.
- 10) Anders, R. et al. : *J. Immunol. Method*, **28** : 1, 1979.
- 11) Lebreton, J. P. : *FEBS Letters*, **80** : 351, 1977.