

博士論文

ニワトリ栓球由来細胞増殖因子に関する研究

平成15年5月

堀内浩幸

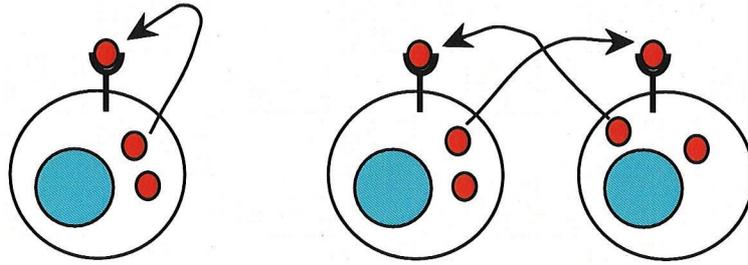
目次

	頁
第1章 緒論	1
第2章 ニワトリ栓球の分離とその検出	
2-1 はじめに	8
2-2 材料と方法	10
2-3 結果	19
2-4 考察	37
第3章 栓球無血清培養上清の細胞増殖活性と免疫学的解析	
3-1 はじめに	44
3-2 材料と方法	46
3-3 結果	51
3-4 考察	66
第4章 栓球無血清培養上清の細胞接着伸展活性と接着因子の同定	
4-1 はじめに	70
4-2 材料と方法	71
4-3 結果	77
4-4 考察	92
第5章 栓球由来増殖因子の分子生物学的解析	
5-1 はじめに	99
5-2 材料と方法	101
5-3 結果	114
5-4 考察	138
第6章 総括	147
謝辞	152
参考文献	153

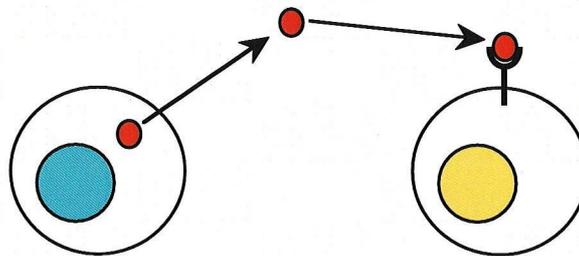
第1章 緒論

動物の生体は、初期発生段階から種々の液性因子の作用を受け、細胞の分化・増殖の調節を行っている。発生段階におけるこれらの液性因子の作用は、極めてドラステックであるが、生体は成熟してからも恒常性維持のために種々の液性因子を産生し続ける。このように、生体の分化・増殖およびその恒常性の維持に必要な、細胞間情報伝達を担う一群の液性因子を総称してサイトカイン (cytokine) と呼ぶ。サイトカインは種々の動物が産生する約 10-50 キロダルトン (kDa) のタンパク質あるいは糖タンパク質性の因子で、オートクライン、パラクラインもしくはエンドクライン的に細胞に作用する (Fig. 1)。サイトカインはこれまでに 50 種類以上が報告されており、その産生細胞、作用細胞、生理活性作用などからいくつかのグループに分類されている。その中でリンパ球が産生し、主に免疫系の調節因子として機能しているリンフォカイン (lymphokine) は、発見者がそれぞれ独自に命名していたが、1979 年の国際リンフォカインワークショップで整理統合され、インターロイキン (interleukine, IL) を頭にして番号を付けるようになった。現在、IL-1 から IL-25 までが知られている。また、IL と同様、リンパ球、単球および線維芽細胞などが産生する抗ウイルス因子として発見されたインターフェロン (interferon, IFN) は、抗腫瘍活性や免疫系の活性化に作用することが明らかとなり、現在までに IFN- α [1], - β [2], - γ [3], - ω [4] の 4 種類が知られている。次にコロニー刺激因子 (colony stimulating factor, CSF) に代表される造血因子は、造血幹細胞が種々の血液細胞へ分化する際に作用するサイトカインであり、IL や後述する増殖因子の中にも同様の作用を有するものがある。IFN とは異なる抗腫瘍活性をもつ細胞障害因子として、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) が知られており、TNF- α [5] および - β [6] が明らかにされている。これら以外にも細胞の走化性を誘起するサイトカインとして、ケモカイン (chemokine) が知られている。ケモカインは C-X-C と C-C の 2 つのサブファミリーに分類される。IL-8 [7] や IL-18 [8] は、IL に分類されているが、生物活性から分類すると、ケモカインのグループに分類される。増殖因子 (growth factor) は最も古くから解析されたサイトカインであり、種々の細胞の増殖を促進する因子として命名されている。増殖因子の生理活性は多岐にわたっており、増殖抑制、細胞の走化性、分化調節、炎症反応や免疫調節などにも関与しており、広義のサイトカインとして分類さ

(A) Autocrine signaling



(B) Paracrine signaling



(C) Endocrine signaling

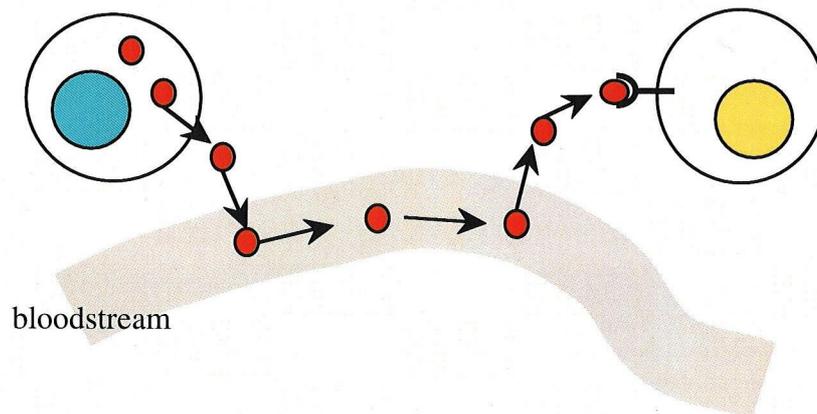


Fig. 1. Autocrine (A), Paracrine (B) and Endocrine (C) signaling

- (A) A cell secretes cytokines that can bind back to its own receptors.
- (B) Paracrine signaling depends on cytokines that are released into the extracellular space and act locally on neighboring cells.
- (C) Endocrine signaling depends on endocrine cells, which secrete hormones into the bloodstream that are then distributed widely throughout the body.

れる。サイトカイン研究は主にマウスやヒトを中心とした哺乳類で進められ、そのいくつかは、薬剤として臨床応用も行なわれている。

一方、鳥類におけるサイトカイン研究は、発生生物学領域で増殖因子を中心に解析されてきた。これは、ニワトリ胚が初期発生を解析する上で、恰好の実験材料であることに起因している。哺乳類で発見された増殖因子の多くは、ニワトリでも遺伝子クローニングされ、ニワトリ初期発生における増殖因子の機能が解析されている。しかし、鳥類では成体におけるサイトカイン研究は極めて遅れているのが現状である。この主な要因は、哺乳類と鳥類間におけるサイトカインの遺伝的保存性に起因しているものと考えられる。すなわち、初期発生に関わる多くのサイトカインは、哺乳類と鳥類間で遺伝子塩基配列が極めてよく保存されており、相同分子の解析が容易であるのに対して、生体の恒常性に関わるサイトカインは遺伝的保存性が極めて低く、相同分子の解析が困難であったためである。Table 1 と Table 2 にニワトリにおいて遺伝子がクローニングされた代表的なサイトカインをまとめてみた。Table 1 に示したように、初期発生に関わるサイトカイン、特に増殖因子群は、鳥類と哺乳類間で相同性が極めて高いのに対して、Table 2 に示した、成体で重要な機能を有する免疫系サイトカインの保存性は極めて低いことがわかる。このことは、鳥類が約 2~2.5 億年前に哺乳類の進化から分岐した後も、個体発生のしくみは維持したまま、成体の恒常性に関わる機能は、その環境に合わせて鳥類独自に進化させてきたためではないかと考えられる。

ところで、鳥類は、サイトカイン以外にも独自に進化させたと考えられるユニークな生物学的特徴が多々見受けられる。例えば、鳥類の血液系細胞は、哺乳類と大きく異なっている点が存在する。哺乳類の赤血球および血小板には核が存在しないが、鳥類の赤血球および血小板には核が存在し、形態も大きく異なっている。特に血小板は、鳥類では歴史的背景から栓球と呼ばれ、血小板がその前駆体細胞である巨核球の細胞質片で約 1 μm の小型の細胞であるのに対して、栓球は前駆体細胞である栓芽球が分裂増殖して産生されたものであり、血小板に比べて大型の有核細胞 (8~12 μm) である。栓球の主な機能は、血小板と同様、止血作用であり、損傷した血管壁で凝集し止血血栓を形成することが知られている [9, 10]。哺乳類の血小板は無核であるが、その細胞質内に多くの顆粒を有し、これまでの研究からこの顆粒中に複数のサイトカインを保有し、止血と同時にこのサイトカインを放出することが知られている。そして、パラ

Table 1. Chicken growth factor genes: a comparison with mammalian homologues

Growth factor	Source of gene	% Identity ^a	References
NGF	Brain	83-87	[11]
FGF1	Embryo	89-90	[12]
FGF2	Embryo	90-92	[13]
TGF- β 1	Embryo	88-93	[14]
TGF- β 2	Embryo	88-90	[15]
TGF- β 3	Embryo	87	[16]
TGF- β 4	Embryo	—	[17]
HGF	Embryo	75-80	[18]
VEGF	Embryo	70-77	[19]

^a Percent amino acid identity to mammalian growth factor homologues.
 NGF: nerve growth factor FGF: fibroblast growth factor
 TGF: transforming growth factor HGF: hepatocyte growth factor
 VEGF: vascular endothelial growth factor

Table 2. Chicken interleukin (IL) genes: a comparison with mammalian homologues

IL	Source of gene	% Identity ^a	References
IL-1 β	HD11 ^b	25-29	[20]
IL-2	Splenocyte	16-24	[21]
IL-6	HD11	25-39	[22]
IL-8	Erythrocyte	28-48	[23]
IL-15	Liver	34-36	[24]
IL-18	HD11	30	[25]

^a Percent amino acid identity to mammalian IL homologues.

^b HD11: chicken macrophage-like cell line.

クラインもしくはエンドクラインの損傷組織に作用し、損傷組織の周りの細胞の増殖を促進し、損傷部位の修復を行っていることが明らかとなっている [26]。一方、鳥類の栓球は、主に止血機能や貪食能の研究が行われているだけで、栓球の持つサイトカイン研究はこれまで行なわれてこなかった。血小板が放出する増殖因子のひとつである血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) は、ニワトリ胚線維芽細胞 (chicken embryo fibroblast, CEF) の培養実験が契機となり、発見された増殖因子である。1973年に Balk [27]は、CEFを *in vitro* で培養する際にニワトリ血清とニワトリ血漿を培地に用いた場合、血清には細胞増殖効果が認められるのに対して、血漿には細胞増殖効果が低いことを見いだした。血漿と血清の違いは、単純に言うと血液凝固成分であるフィブリノーゲンを含むか含まないかの違いであるが、血清の場合、血液が凝固する際に血小板が破壊され多くの血小板由来成分が含まれている。Rossら [28]はこの点に着目し、1974年に血清中の細胞増殖因子は血小板に由来することを明らかにした。この研究のきっかけはニワトリを用いた研究であったが、その後、血小板由来の増殖因子の研究はニワトリから哺乳類に移行し、血小板中にはPDGFをはじめとした多くの増殖因子が含まれていることが明らかとなり、血小板は止血機能だけでなく、組織修復という生理的に重要な役割を持つことが広く知られるようになった。このように血小板と栓球の機能的相同性や Balk [27]の実験結果から考えると、栓球もまた多くの増殖因子の産生細胞であることが容易に想像できる。また、栓球は有核細胞であること、また血小板ほど多くの顆粒を細胞内に保持していないことから考えて、栓球が外来刺激に応じて増殖因子遺伝子を転写し、増殖因子を産生している可能性も考えられる。

さて、鳥類の血球成分は、哺乳類と同様、赤血球、栓球 (血小板)、白血球 (リンパ球、単球、顆粒球) から成る。哺乳類の場合、白血球は有核であり、無核の赤血球および血小板と容易に区別できる。また赤血球と血小板は、細胞の大きさが著しく異なり、また、ヘモグロビンを持つ赤血球は、血小板と比重が全く異なることから、単一の細胞種を簡単に分離することが可能である。さらに哺乳類では、200種以上の血液細胞膜上抗原が発見され、それらの抗原に対するモノクローナル抗体 (mAb) が作成されている。この mAb を用いてフローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) 解析を行えば、血液細胞の種別の分布や単離までの詳細な解析が可能である。これに対して、ニワトリではすべての細胞が有核であり、栓球とリンパ球の形態が似ている上、哺乳類ほど多く

の膜抗原が明らかにされているわけではない。また、比重も栓球とリンパ球では僅差なために、栓球のみを単一に分離して解析することが困難である。これらのことから、ニワトリ栓球に関する研究はほとんど行なわれておらず、その知見も少ないのが現状である。さらに、鳥類以外でも栓球は魚類から爬虫類に至るまで存在し、哺乳類とは異なった独特の進化を遂げたユニークな細胞種であり、鳥類と哺乳類における系統進化を論じる上でも非常に興味深い細胞である。

そこで本研究では、ニワトリ栓球に由来する増殖因子に焦点を絞り、第 2 章では栓球の効率の良い分離方法の構築、また栓球の細胞表面マーカーを明らかにすることを目的に、栓球特異的モノクローナル抗体の作成を行った。また、第 3 章から第 5 章では、栓球内に存在するサイトカインを明らかにするために、栓球放出因子の生物活性の測定および免疫学的・分子生物学的解析を行った。

第2章 ニワトリ栓球の分離とその検出

2-1 はじめに

血液から単一種の細胞のみを分離する方法には、その細胞の形態、大きさ、比重および細胞膜抗原などが利用される。哺乳類の血液細胞は、形態的特徴がそれぞれの細胞種で大きく異なっているために、比較的簡単な操作で高純度の細胞集団が得られる。一方、ニワトリ血液細胞の分離では、哺乳類と同様な方法が適用できない場合がある。特にニワトリ栓球は、小リンパ球と形態が似ており、また比重も大きな差はなく、単一細胞として得られにくいことが知られている [29, 30]。また、哺乳類では血液細胞の膜抗原に対して多くのモノクローナル抗体 (mAb) が樹立されており、これらの抗体を用いて識別される膜抗原は、CD (cluster of differentiation) と呼ばれ、番号により整理されている。CDには細胞種特異的なものも多く、細胞の解析から分離にいたるまで幅広く利用されている。ニワトリでは1991年に鳥類CD命名ワークショップが設立され、統一化が進められているが、その数は哺乳類に比べ圧倒的に少なく、その多くが白血球膜抗原であり、栓球膜上のCD抗原はCD41とCD61が知られているのみである [31]。

一般的に血球細胞の簡易分離には、フィコールやパーコールを用いた濃度比重遠心分離法が用いられる。この方法は個々の細胞種の比重が異なることを利用したもので、血液細胞を濃度比重分離液に重層後、遠心分離することにより、単一細胞種が試験管内で一群の層をなして分離できるわけである。ニワトリでは、細胞の大きさから大・中・小のリンパ球が知られており [32]、栓球が大・中リンパ球よりも比重が軽いことを利用し、低速遠心法やパーコールを用いた比重遠心分離法による両者の分離が試みられてきた [33]。しかしこの方法では、90%以上の純度で栓球のみを分離する系は構築されていない。また、逆に栓球が混入しないリンパ球のみの分離法も、この方法では確立されていない。現在、血液細胞から単一の細胞種を分離する方法として最も優れているものは、抗体を用いる方法である。この方法は、細胞特異的抗体と細胞を反応させたのち、2次抗体として荷電標識抗体と反応後、FACS (fluorescent activated cell sorter) を用いて標識された細胞のみを分取するか、もしくは磁気標識抗体を反応させた後、MACS (magnetic activated cell sorter) を用いて標識細胞を分取するか、

または非標識細胞のみを分取するものである。これらの方法では、抗体の特異性に基づいて細胞を分離できるために、高純度に単一細胞を分離することが可能である。しかし、抗体による細胞の刺激や抗体反応、分取操作に時間がかかるため、細胞に種々の刺激が加わることが予想されるため、分離した細胞の生物活性を測定するには、目的に応じた方法の選択が必要である。ニワトリ栓球の場合、有用な栓球特異抗体がほとんど得られていないため、現在のところこの方法を汎用することはできない。また同様の理由から、分離した栓球の純度評価は血球染色を施した後その形態的特徴から算出するしかなく、客観的評価が不十分であった。

そこで本章の研究では、栓球分離方法の確立を行うとともに、栓球特異的マーカーの検出のため栓球特異的 mAb の作出を行い、この抗体の特異性の解析を行った。

2.2 材料と方法

(1) 供試動物

本研究には、白色プリマスロックニワトリもしくは H-B15 系ニワトリの受精卵、幼雛および成鶏を用いた。また、モノクローナル抗体の作出には、8 週齢の BALB/c 雌マウスを用いた。

(2) 供試細胞株

本研究には、Table 3 に示した 7 種の細胞株を使用した。供試細胞株はすべて 10%FBS (fetal bovine serum)-IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) で継代培養したものをを用い、ニワトリ由来細胞株は 38.5℃、5% CO₂ 条件下で、マウス由来細胞株は 37℃、5% CO₂ 条件下で培養した。また、培養には CO₂ インキュベーターを使用した。

(3) 供試組織および細胞

本研究には 3 週齢のニワトリから採血して得られた血液細胞（赤血球、白血球、栓球）と同ニワトリから剖検により得られた脾臓、胸腺、ファブリキウス嚢を用いた。また、初生雛からは骨髓（bone marrow）を採取した。さらに、Fig. 2 に示した計画に添って、ニワトリ受精卵から胚盤葉（blastoderm）、胚血液および胚骨髓を分離した。また、正常ヒト血液から血小板を分離した。なお、いずれの場合も 3~5 検体を使用した。

血液細胞は、77 mM EDTA-PBS (phosphate buffered saline), pH 7.4 を 1/10 容含むように、翼下静脈から採血した。採血した血液は、700 g で 10 分間遠心し、血漿層、 Buffy coat、赤血球層に分離した。血漿層を除去した後、Buffy coat を PBS に再浮遊させ、Ficoll-paque (Amersham biosciences KK) 1 に対して、Buffy coat 浮遊液 2 の割合で重層し、700 g で 10 分間遠心して混入した赤血球を除去した。中間層に位置する白血球層を回収し、PBS で遠心洗浄後、末梢血白血球（peripheral blood leukocyte, PBL）として使用した。Buffy coat を除去した赤血球は PBS に再浮遊させ、700 g で 10 分間遠心後に残存する Buffy coat を完全に除去し、さらに HBSS (Hanks' balanced salt solution, 日水製薬) で遠心洗浄して、赤血球を回収した。

剖検から得られた組織は、細切した後、ガラス製のホモジナイザーで細胞浮

Table 3. Cell lines used in this study

Cell line	Source	Reference
Chicken cell lines		
MDCC-MSB1	T lymphocyte	[34]
MDCC-JP2	T lymphocyte	[35]
MDCC-RP1	T lymphocyte	[36]
LSCC-1104B	B lymphocyte	[37]
IN24	Monocyte	[38]
HD11	Macrophage	[39]
Mouse cell line		
SP2/0-Ag14	Myeloma	[40]

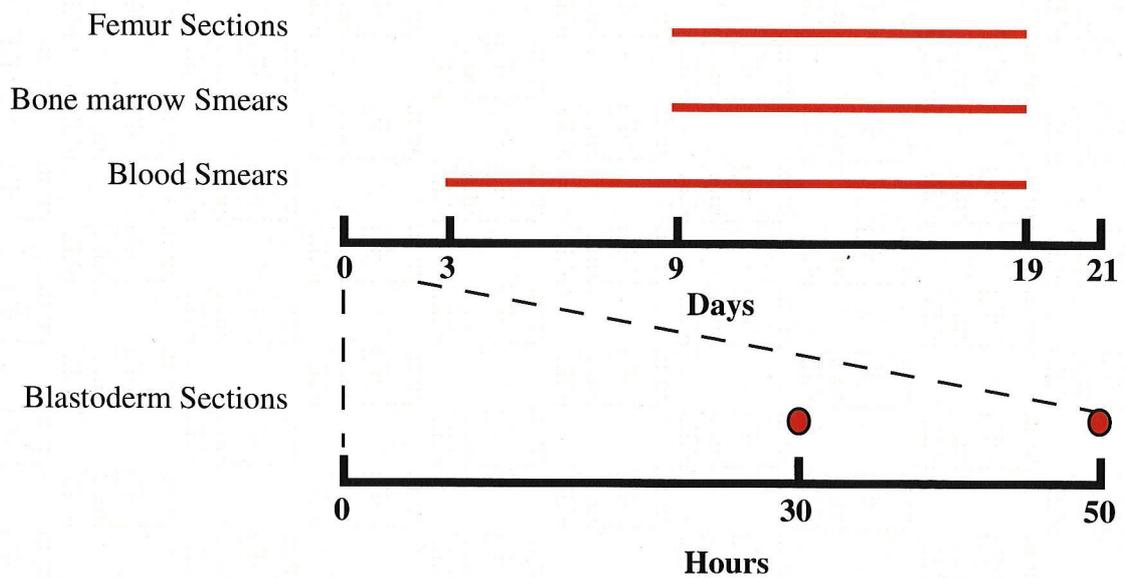


Fig. 2. Time and period for preparation of cell smears and sections from chicken embryos for immunohistochemical analysis

For preparation of the bone marrow sections and smears, the femurs of chick embryos were collected from day 9 of embryonic development (E9) until several weeks after hatching. Smears were made of blood collected by glass capillary from the vitelline and allantoic veins, or heart, of chick embryo from E3 to several weeks after hatching. Blastoderms were collected from chick embryo after both 30 and 50 hr incubation.

遊液を調製した。細胞浮遊液は、セルフィルターを通して組織片を除去した。組織片を除去した細胞浮遊液は、PBL の分離法の場合と同様に Ficoll-paque に重層し、遠心後、中間層に位置する細胞層を回収した。回収した細胞は、HBSS で遠心洗浄後、脾臓から得られた細胞は脾細胞 (splenocyte)、ファブリキウス嚢から得られた細胞はブルザ細胞 (bursal cell)、胸腺から得られた細胞は胸腺細胞 (thymic cell) として使用した。

初生雛の骨髓組織は、剖検により大腿骨 (femur) を採取して行った。大腿骨の両端を切断し、7.7 mM EDTA-PBS, pH 7.4 を一端から注入し、骨髓組織ができるだけ損傷しないように注意深く回収した。押し出された骨髓組織は、凍結切片の作成に使用した。

胚血液は、胚の孵卵日齢に応じて、それぞれ周縁洞、卵黄静脈、心臓および尿膜血管から採血し、7.7 mM EDTA-PBS, pH 7.4 に浮遊させ、遠心洗浄を行った後、使用した。

大腿骨は、孵卵 9 日目から毎日、胚体を取り出し実体顕微鏡下で剖検により取りだした。取りだした大腿骨は、PBS で洗浄後、凍結切片に供試した。

胚盤葉は、孵卵 30 および 50 時間の胚から血管域を含むように切り取り、HBSS 中でよく洗浄して使用した。

ヒト血小板は、健常人から末梢血を採血し、得られた末梢血を 200 g で 15 分間遠心した。この遠心により、赤血球と白血球は沈降するため、その上清を回収し、2,500 g で 15 分間遠心した。得られた細胞は HBSS に再浮遊させ、遠心洗浄後、ヒト血小板として使用した。

(4) 供試抗体

本研究には、作成したマウスモノクローナル抗体 (mAb) 以外に、以下の抗体を使用した。標識抗体には FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識抗マウス IgG+M (H+L) (Kirkegarrrd and Perry Laboratories), FITC 標識抗マウス IgG [F(ab')₂] (Silenus) および AP (alkaline phosphatase) 標識抗マウス IgG+M (H+L) 抗体 (Kirkegarrrd and perry Laboratories) を使用した。また、ニワトリ白血球共通膜抗原 (CD45) を認識する抗 CD45 マウス mAb (Southern Biotechnology Associates), T 細胞共通膜抗原 (CD3) を認識する抗 CD3 マウス mAb (Southern Biotechnology Associates), および Dr. Vainio (Turku University, Finland) から分与された B 細胞膜抗原 (Bu-1^a) を認識する抗 Bu-1^a マウス mAb を使用し

た。

(5) 栓球

ニワトリ栓球の分離は、Higashihara らの方法 [33]を一部改変して行った。ニワトリ末梢血を 77 mM EDTA-PBS, pH 7.4 を 1/10 容含むように翼下静脈から採血し、直ちに 7.7 mM EDTA-PBS, pH 7.4 で 2 倍に希釈した。希釈した血液は、Ficoll-paque 1 容に対して 2 容を重層し、1,500 g で 20 分間遠心した。中間層に位置する細胞層を 7.7 mM EDTA-PBS, pH 7.4 に再浮遊し、同様の条件で再度、Ficoll-paque に重層して遠心した。中間層に位置する細胞層を HBSS 中に回収し、遠心洗浄後得られた細胞を栓球として使用した。なお、その操作方は Fig. 3 に示した。

(6) メイ・グリーンワルド・ギムザ染色

分離した PBL は、メイ・グリーンワルド・ギムザ染色に供試した。メイ・グリーンワルド・ギムザ染色は、PBL の塗抹標本をカバーガラス上に作成して行った。塗抹標本は風乾後、メイ・グリーンワルド染色液（和光純薬工業）で 2-3 分間染色した。染色後、メイ・グリーンワルド染色液を除去し、7 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4) で 10 倍に希釈したギムザ染色液（和光純薬工業）を用いて 30 分間染色し、水洗後乾燥させ光学顕微鏡 (BX50, オリンパス光学工業) を用いて観察した。

(7) 抗栓球モノクローナル抗体の作成

免疫原には、末梢血から分離した栓球を使用した。1×10⁸ 個の細胞を PBS に浮遊させ、フロイント・コンプリートアジュバント（和光純薬工業）と混和し、8 週齢の BALB/c 雌マウスの腹腔内に初回免疫した。初回免疫後 3 週間毎に 1×10⁸ 個の細胞を腹腔内に追加免疫した。追加免疫してから 1 週間後に、尾動脈から採血を行い、血清を回収し、後述する ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay) 法を用いて、栓球に対する抗体価をチェックした。ELISA 法で抗体価の上昇が十分に確認されてから、尾静脈内に 1×10⁸ 個の細胞を最終免疫し、そのマウスは 3 日後に細胞融合法に供試した。

免疫マウスは、頸椎脱臼法を用いて安楽死させた後、無菌的に脾臓を摘出し脾臓細胞を調製した。細胞融合は、マウス骨髄腫細胞株 SP2/O-Ag14 と免疫脾

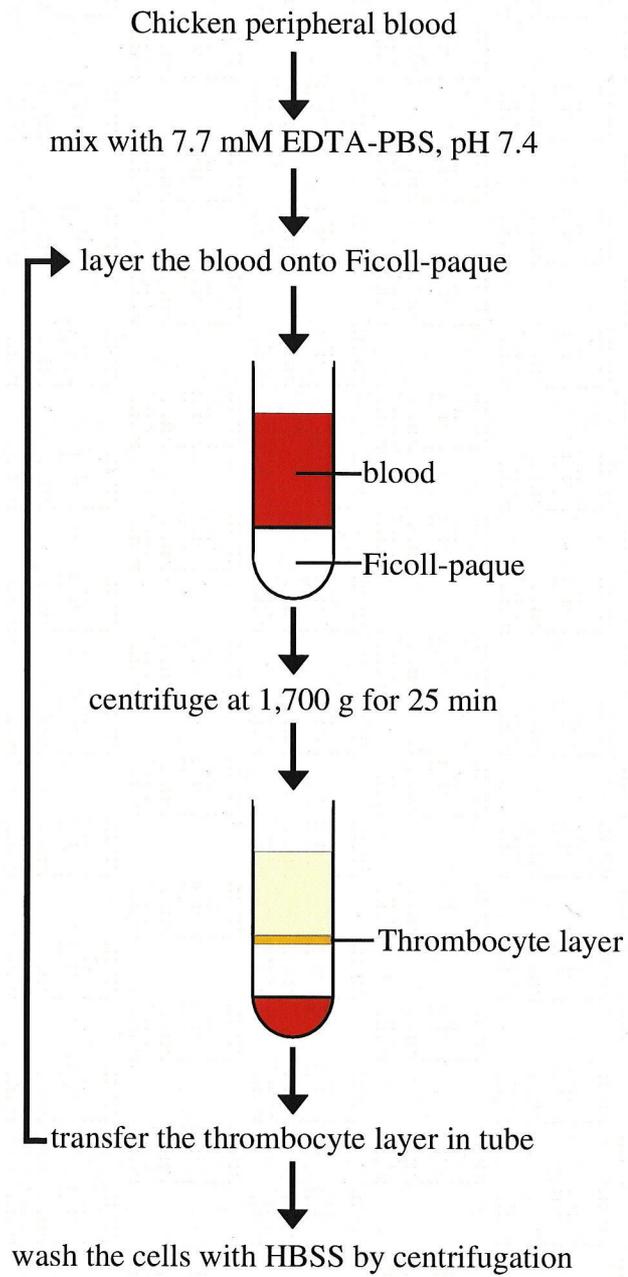


Fig. 3. Isolation method of chicken thrombocyte-enriched PBL

臓細胞がそれぞれ 1:5 になるように混合し、PEG1500 (Roche) を用いて行った。融合後、5% HCF (hybridoma cloning factor, ORIGEN IGEN), 1×HAT (Gibco BRL) を含む 10% FBS-IMDM で培養した。ハイブリドーマの初回スクリーニングは ELISA 法を用いて行い、陽性反応を示すハイブリドーマの選別を行った。さらに 2 次スクリーニングとして、後述する FCM (flow cytometry) 解析を行った。FCM 解析で陽性反応を示したハイブリドーマは、10% HCF, 10% FBS-IMDM を用いた限界希釈法によるクローニングを行った。

クローニングした陽性ハイブリドーマを安定して増殖する状態まで培養した後、抗体クラス同定の同定と腹水抗体の作成を行った。抗体クラス同定には mouse monoclonal sub-isotyping kit (American Qualex) を用いて行い、その方法はキット添付のプロトコルに準じた。腹水抗体の作成には、雌マウスの腹腔内に 0.5 ml のプリスタン (2, 6, 10, 14-tetramethyl pentadecane, SIGMA) を接種し、2 週間経過したものを使用した。陽性ハイブリドーマクローンは、血清不含 IMDM で 2×10^6 個となるように調製し、腹腔内に接種した。腹水はその産生が顕著になった段階で注射針を用いて、0.3 ml のヘパリン (Aventis) が入った遠心管に回収した。回収した腹水は 800 g で 10 分間遠心し、その上清を 40% 飽和硫酸アンモニウムに使用した。遠心後の沈澱物は少量の PBS へ溶解させた後 PBS に対して透析し、ゲル濾過クロマトグラフィー用サンプルとした。ゲル濾過クロマトグラフィーは、HiPrep Sephacryl S-200 HR で実施し (流速: 0.5 ml/min, バッファー: PBS), IgG フラクシオンを回収後、抗体濃度を測定し、使用時まで -80°C で保存した。

(8) ELISA 法

抗体の反応性は、ELISA 法で解析した。 5×10^6 cells/ml の濃度に調製した栓球浮遊液を 96 ウェルプレートにウェル当たり 100 μl ずつ添加し、90 g, 15 分間遠心して細胞を固相化した。細胞を固相化したプレートは、1% ゼラチン (Bio-Rad laboratories), 1% PVP (polyvinylpyrrolidone 25, ナカライテック) -PBS を用いてブロッッキングした。一次抗体反応は、免疫マウスから回収した抗血清もしくはハイブリドーマ培養上清をウェル当たり 50 μl ずつ加え、 37°C , 1 時間静置して行った。0.05% Tween 20-PBS で 5 回洗浄後、二次抗体としてブロッッキング液で 3,000 倍希釈した HRPO 標識抗マウス IgG 抗体をウェル当たり 50 μl 加え、 37°C , 1 時間静置した。0.05% Tween 20-PBS で 5 回洗浄後、 σ

フェニレンジアミン (SIGMA) を用いて 10 分間の発色を行い, 492 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー MPR-A4i (東ソー) で測定した。

(9) FCM 解析

陽性反応を示すハイブリドーマ培養上清および得られた mAb の種々の細胞に対する反応性は, 間接蛍光抗体法を用いた FCM 解析により検討した。1×10⁶ 個の細胞に対してハイブリドーマ培養上清もしくは 50 倍に希釈した精製 mAb を 50 μl 添加して懸濁後, 氷上で 30 分間反応させた。反応後, 1% FBS, 0.1% NaN₃-HBSS で遠心洗浄を行った。洗浄後, 50 倍に希釈した FITC 標識抗マウス IgG 抗体を 50 μl 添加して懸濁後, 氷上で 30 分間反応させた。反応後, 1% FBS, 0.1% NaN₃-HBSS で遠心洗浄を行い FCM 解析の試料とした。

作出した mAb の PBL に対する反応性を試験するために, 2 重蛍光染色法を用いた FCM 解析を行った。1 反応系当たり, 1×10⁶ 個の PBL に対して, 50 倍に希釈した精製 mAb を 50 μl 添加して懸濁後, 氷上で 30 分間反応させた。反応後, 1% FBS, 0.1% NaN₃-HBSS で遠心洗浄を行った。洗浄後, 50 倍に希釈した FITC 標識抗マウス IgG 抗体を 50 μl 添加して懸濁後, 氷上で 30 分間反応させた。反応後, 1% FBS, 0.1% NaN₃-HBSS で遠心洗浄を行い, 2 重染色用に, 正常マウス血清を 100 μl 添加して懸濁し, ブロッキングを行った。次に, 2 重染色として, biotin 標識抗 Bu-1^a 抗体, 同標識抗 CD3 抗体もしくは同標識抗 CD45 抗体をそれぞれ 500 倍, 50 倍および 10 倍希釈濃度で 50 μl 添加して懸濁後, 氷上で 30 分間反応させた。反応後, 遠心洗浄により標識抗体を除去し, 50 μl の streptavidin-PE (phycoerythrin, PharMingen) を加えて氷上で 30 分間反応させ, 遠心洗浄後, 100 μl の 1% FBS, 0.1% NaN₃-HBSS に再浮遊させて FCM 解析の試料とした。

染色した細胞は, FACS Calibur™ (Becton Dickinson) を用いて測定し, 得られた測定結果は, CellQuest™ (Becton Dickinson) ソフトを用いて解析した。

(10) ウエスタンブロットティング解析

得られた抗栓球 mAb の認識抗原を検出するために, ウエスタンブロットティング解析を行った。末梢血から分離した栓球は, 0.025% NaN₃, 0.14 M NaCl, 2 mM Tris-HCl (pH 8.0) に浮遊させ, 等量の可溶化バッファー [2% Triton X-100, 5 mM iodoacetamide, 1 mM PMSF, 0.025% NaN₃, 0.14 M NaCl, 2 mM Tris-HCl (pH

8.0))を加え懸濁後、4℃で一時間処理して可溶化させた。4,000 g で 10 分間遠心し、その上清を SDS-PAGE の試料とし、可溶化栓球はサンプルバッファー[2% SDS, 10% glycerin, 0.1% bromophenol blue, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)]もしくは還元化サンプルバッファー（サンプルバッファーに 5% 濃度で 2-mercapto ethanol を加えたもの）を等量加えて、3 分間煮沸した。煮沸した試料は、7.5% ポリアクリルアミドゲル中、20 mA の定電流で電気泳動した。SDS-PAGE 後のゲルは、ナイロン膜（Amersham）もしくは PVDF 膜（Bio-Rad）にウエットタイププロッター（BioCrafto）を用いて、180 mA の定電流で転写した。転写後の抗栓球 mAb の認識抗原の検出には、PhototopeTM-Star Western Blot Detection Kit (BioLabs)を使用し、その方法はキット内のプロトコルに準じて行った。

(11) 免疫組織化学的解析

免疫組織化学的解析には、骨髄および胚体の凍結切片及び塗抹標本を試料として使用した。採取した組織は、凍結組織包埋剤（O.C.T. compound, Miles）を用いて凍結ブロックを作成した。凍結ブロックは、クリオスタット（Bright）で約 6-10 μm に薄切し、0.01% poly-L-lysine をコートしたスライドガラス上にのせて風乾させ、冷アセトンで 10 分間固定した。細胞塗抹標本も同様に、冷アセトンで 10 分間固定した。酵素抗体法は、VECTASTAYN Elite ABC peroxidase kit (Vector Laboratories)を使用し、その方法は添付のプロトコルに準じた。検出抗体には、精製抗栓球 mAb を使用し、凍結切片には 16,000 倍、塗抹標本には 3,000 倍に PBS で希釈して用いた。対比染色には、ヘマトキシリンもしくはメチルグリーンを用いた。

ニワトリ胚の凍結切片は、間接蛍光抗体法を用いて観察した。1 次抗体には、精製抗栓球 mAb を 16,000 倍希釈で使用し、4℃で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、50 倍に希釈した FITC 標識抗マウス Ig 抗体をマウントし、4℃で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、検体は落射型蛍光顕微鏡（BX50, オリンパス）で観察した。

一部の凍結切片は、免疫染色と対比させるためにヘマトキシリン・エオシン（hematoxylin-eosin, HE）染色を行った。アセトン固定を行った検体は、ヘマトキシリン染色液で 5 分間、エオシン染色液で 4 分間染色し、水洗後、エタノール脱水、キシレンによる透徹を行い、カナダバルサムでスライドガラス上に封入した。

2.3. 結果

(1) 末梢血栓球の形態

末梢血栓球の形態を観察するために、ニワトリ PBL のメイ・グリュンワルド・ギムザ染色をおこなった。末梢血栓球は長径約 10~12 μm 、短径約 6~8 μm の紡錘形もしくは楕円形で、核も楕円形であることが特徴であり、リンパ球と区別することができた (Fig. 4)。この染色像では細胞質が不明瞭ではあるが、リンパ球よりも細胞質/核の割合が大きいことが観察された。また、染色像の視野内には、顆粒球、大小のリンパ球が観察され、PBL 中の約 70% が栓球であった。

(2) 抗栓球 mAb の樹立

細胞融合法から得られたハイブリドーマ培養上清は、栓球を抗原とした ELISA 法に供試した。その結果、最終的に 5 種の陽性クローンが得られた。この 5 種の陽性クローンの培養上清は、栓球、赤血球、脾細胞、胸腺細胞、ファブリキウス嚢細胞および 6 種のニワトリ細胞株 (MSB1, RP1, JP2, 1104B, IN24 および HD11) に対して FCM 解析を実施し、5 種の陽性クローン中で栓球にのみ反応する 1 種の陽性クローンを選抜した。選抜したクローンは、限界希釈法をもちいてクローニングし、得られたクローンを HUKT、産生する mAb を HUKT mAb と名付けて、以下の実験に供試した。

HUKT mAb の免疫グロブリンサブクラスは IgG1 であることがわかった。HUKT は、プリスタン接種マウスの腹腔内で *in vivo* 培養後、腹水抗体の作出を行い、精製後に小分けして -80°C に保存した。以下のすべての研究には、この精製 HUKT mAb を使用した。

精製 HUKT mAb は、まず、ニワトリ PBL 塗抹標本に対する反応性を試験した。その結果、Fig. 5 に示したように、PBL 中の栓球膜表面が HUKT mAb によって染色された。

(3) HUKT mAb を用いた FCM 解析

本研究で行った栓球分離法の評価と HUKT mAb の特異性の解析は、FCM 解析を用いて行った。その結果、Table 4 に示したように、HUKT mAb は PBL、TEP (thrombocyte-enriched PBL) および脾臓細胞 (splenocyte) 以外の細胞お

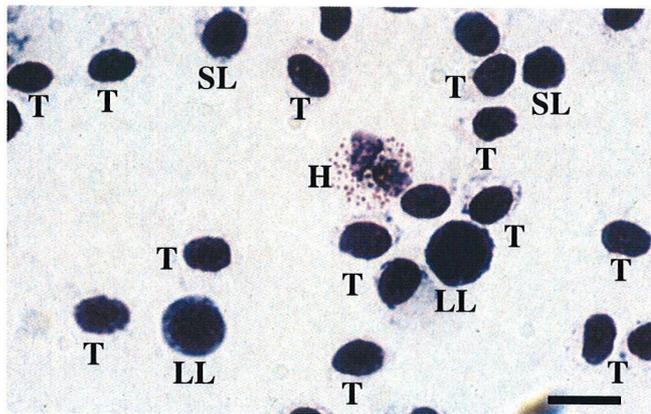


Fig. 4. May-Grunwald-Giemsa staining of adult chicken PBL

H: heterophil, LL: large lymphocyte, SL: small lymphocyte
T: thrombocyte

bar: 10 μm

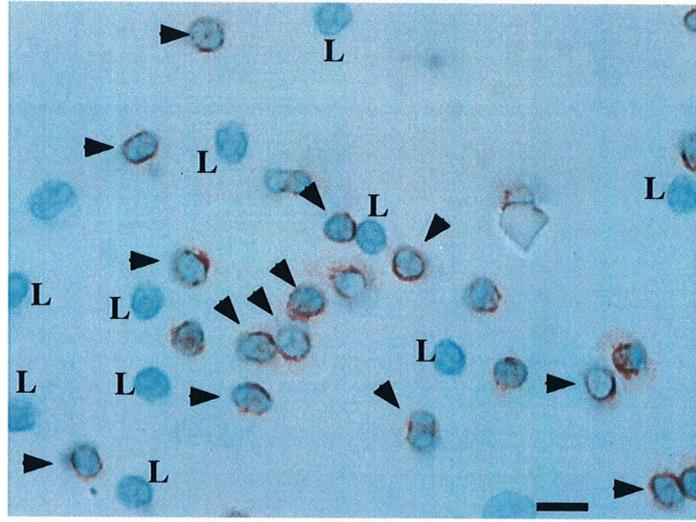


Fig. 5. Immunostaining for HUKT⁺ cells

L: lymphocyte Arrowheads: HUKT⁺ cells (thrombocyte)
Bar: 10 μ m

Table 4. Reactions of HUKT mAb with live cells as determined by flow cytometry

Cell origin or cell type	HUKT-Positive cells (% \pm SD) ^a
PBL (P21) ^b	70 \pm 8.2
Thrombocyte-enriched PBL (TEP) (P21)	86 \pm 7.2
Erythrocyte (P21)	0
Splenocyte (P21)	2 \pm 1.1
Bursal cell (P21)	0
Thymic cell (P21)	0
Human platelet	0
Cell lines	
MSB1	0
JP2	0
RP1	0
1104B	0
HD11	0
IN24	0

^a mean \pm standard deviation (SD), n=5

^b P_n, number of days posthatching

よび細胞株とは全く反応しなかった。また、PBL 中には 70 ± 8.2 (平均値 \pm 標準偏差, $n=5$) %の割合で陽性細胞が認められ、本研究で行った栓球分離法で回収した TEP では陽性細胞率が $86 \pm 7.2\%$ に増加していることがわかった。また、脾細胞中の陽性細胞率はわずかであることがわかった。

次に PBL 中の HUKT mAb 陽性細胞膜表面抗原の特徴を解析するために、2重抗体染色法を用いた FCM 解析をおこなった。まず、HUKT 陽性細胞 (HUKT⁺) が、T 細胞マーカーである CD3 やニワトリ B 細胞マーカーである Bu-1^aを発現しているかどうかを試験した。その結果、PI (propidium iodide) を取り込んでいない (生細胞) PBL は、前方・側方散乱光ビットマップ領域において 1 細胞集団で得られた (Fig. 6A)。次に、この細胞集団内の HUKT⁺および Bu-1^{a+}もしくは CD3⁺細胞の割合を 2 重抗体染色法により解析した。その結果、Fig. 6B, C に示したように Bu-1^{a+}, HUKT 陰性 (HUKT⁻) の細胞率は 5.0 ± 2 , CD3⁺, HUKT⁻の細胞率は $26.6 \pm 3\%$ ($n=5$) であることがわかった。この陽性細胞率はそれぞれニワトリ PBL 中の B 細胞と T 細胞の割合にほぼ一致していた [41, 42]。また、Bu-1^{a-}, CD3⁻, HUKT⁺の細胞率は $68.2 \pm 3.8\%$ であることがわかった (Fig. 6B, C)。さらに、Bu-1^{a+}, HUKT⁺細胞と CD3⁺, HUKT⁺細胞の割合は、いずれも 1% 未満であることがわかった。以上の結果から、HUKT⁺細胞は栓球であること、また、HUKT mAb 認識抗原は栓球特異的であることがわかった。

次に、栓球の細胞膜表面抗原の特徴を白血球共通抗原である CD45 の有無により解析した。CD45 は哺乳類で明らかにされた白血球共通抗原であり、哺乳類では成熟赤血球と成熟血小板を除くすべての血球に共通に発現する膜抗原である。ニワトリ CD45 に対する mAb は 1991 年に Paramithiotis ら [43]によって得られている。ニワトリ CD45 の PBL における発現様式は CD45 強発現 (CD45^{high}) と CD45 弱発現 (CD45^{low}) に分れることがわかっており、これまでの研究から CD45^{high}は B, T 細胞であることがわかってきた。しかし、CD45^{low}細胞の細胞種は特定されてはいなかった。本研究でも同様に、ニワトリ PBL の抗 CD45 mAb の反応性を FCM 解析したところ、Fig. 6D, E に示したように、ニワトリ PBL は CD45^{high}細胞と CD45^{low}細胞に分離されることがわかった。次に、抗 CD45 mAb と HUKT mAb を用いて 2 重抗体染色法を行ったところ、Fig. 6F に示したように CD45^{low}細胞はすべて HUKT⁺細胞であり、その PBL に占める割合は $73.1 \pm 8.2\%$ ($n=5$) であり、PBL 中に存在する栓球の割合とほぼ一致していることがわかった。また、結果は示していないが、ニワトリで明らか

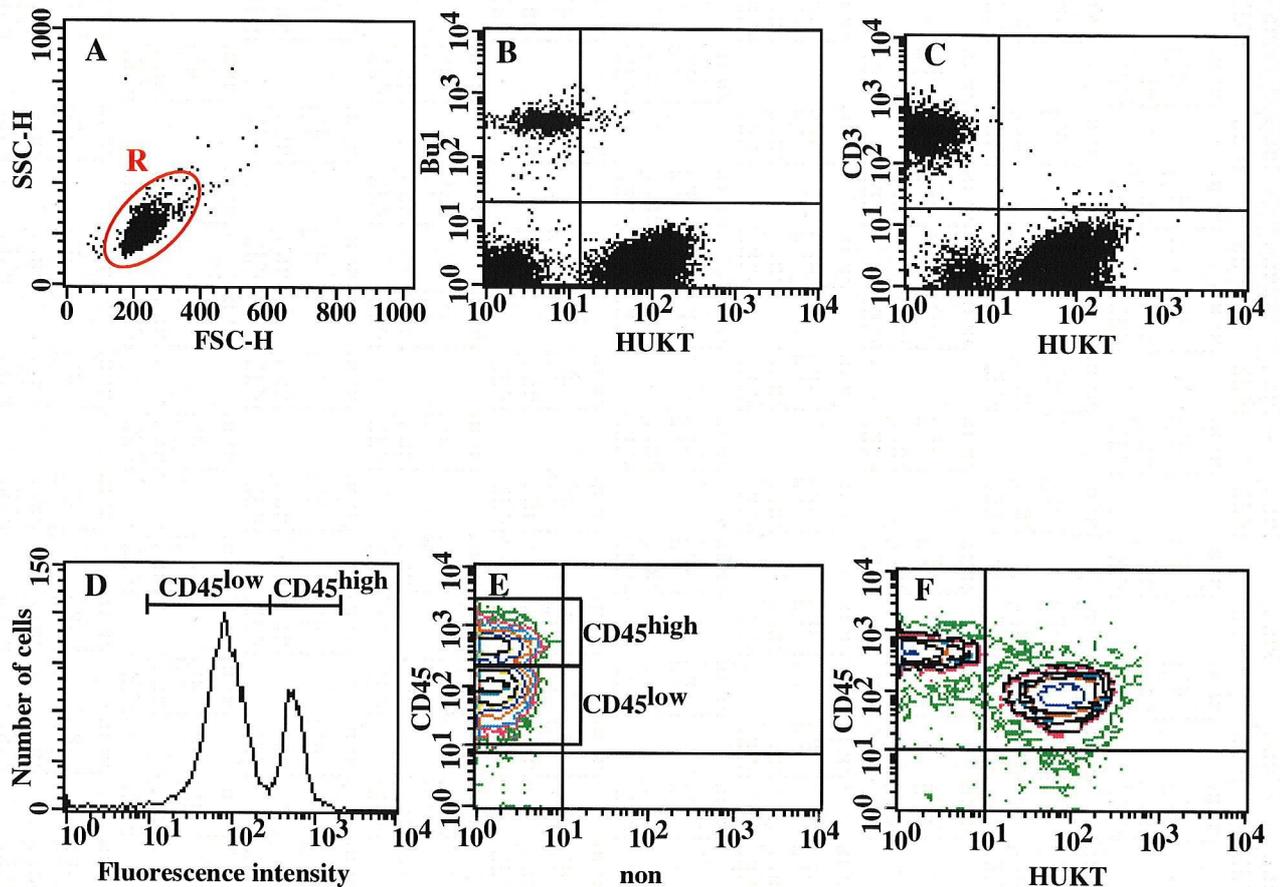


Fig. 6. Flow cytometric analysis of HUKT⁺ cells in chicken PBL

A: A bidirectional control plot of chicken PBL based on the light-scattering characteristics of HUKT⁺, Bu-1^{a+} and CD3⁺ cells. B and C: Two-color staining with HUKT, and anti-Bu-1^a (B) or anti-CD3 (C) in region 'R' of Fig 6A. D and E: The fluorescence profiles of anti-CD45 mAb in region 'R' of Fig 6A. F: Two-color staining with HUKT and anti-CD45 mAb.

にされている T 細胞膜抗原である CD2, CD4 および CD8 に対する mAb を用いて同様の実験を行った結果, HUKT⁺細胞はこれらの抗原がすべて陰性であることを確認した. 以上のことから, ニワトリ栓球は, CD45^{low}, HUKT⁺細胞であることが明らかとなった.

(4) HUKT mAb 認識抗原の検出

HUKT mAb 認識抗原はウエスタンブロッティング法を用いて検出した. その結果, Fig. 7 に示したように, 非還元 (lane 3), 還元 (lane 4) 条件下において, 約 150 キロダルトン(kDa) の 1 本のバンドが検出された. また, 60 kDa 付近にも単一のバンド (lane 3, 4) が検出されたが, 正常マウス IgG₁ を用いて検出した場合においても同様の位置にバンド (lane 1, 2) が検出されたことから, このバンドは使用した正常マウス IgG₁ かもしくは 2 次抗体による非特異的反応の結果によるものであることがわかった. 還元, 非還元条件下で HUKT mAb 認識抗原の分子量が変化しなかったことから, この抗原は単量体のタンパク質であることが示唆された.

(5) HUKT mAb 認識抗原の骨髄 (bone marrow) における発現

HUKT mAb を用いた FCM 解析から, 本研究で供試した細胞の中では, HUKT mAb 認識抗原は栓球にのみ発現していることが明らかとなった. そこで, HUKT mAb 認識抗原が末梢血栓球にのみ発現しているのか, もしくは未熟な栓球 (栓球前駆体細胞) に発現しているのかどうかを解析するために, 骨髄中の HUKT⁺細胞の解析を行った.

まず, ニワトリ骨髄の形態を観察するために, 3.5 週齢幼雛の骨髄から凍結切片を作成し, HE 染色を行った. その結果, 染色操作により空洞化した脂肪球 (FC) 蓄積部分が多数観察された (Fig. 8). また, その空洞域に取り囲まれるように細胞密集領域が観察され, 赤血球系細胞の分化成熟が起これると考えられている薄ピンク色の髓洞 (VS) 領域と白血球系細胞の分化成熟が起これると考えられる紫色に染色された髓外部 (EV) が観察された (Fig. 8). 次に, 3.5 週齢幼雛と初生雛の骨髄凍結切片を用いて, HUKT⁺細胞の分布を観察した. 初生雛の骨髄では, 空洞部に挟まれた髓洞部辺縁領域に陽性細胞が密集していることがわかった (Fig. 9A and B). 3.5 週齢幼雛骨髄では, 髓洞領域に密集して陽性細胞が観察された (Fig. 9C and D). さらに, 採取した骨髄から塗抹標本を

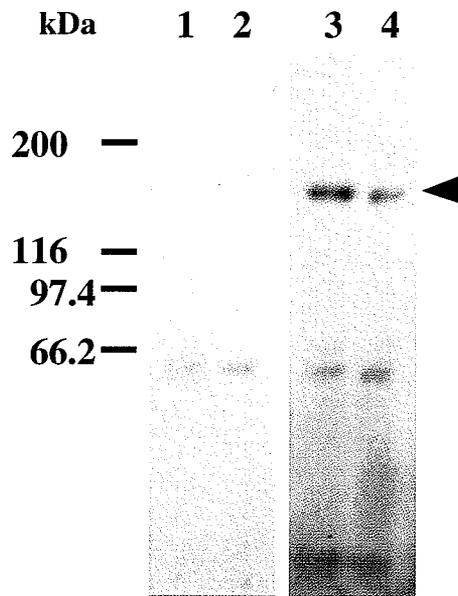


Fig. 7. Western blotting profile of thrombocyte-enriched PBL lysates

Ten μ l samples were subjected to electrophoresis on a 10% SDS-polyacrylamide gel under non-reducing (lanes 1 and 3) and reducing (lanes 2 and 4) conditions. Lanes 1 and 2 were stained with normal mouse antibody (IgG1) as a control. Lanes 3 and 4 were stained with HUKT mAb. Arrow indicates the position of the molecule recognized by HUKT. Protein molecular weight markers are indicated on the left.

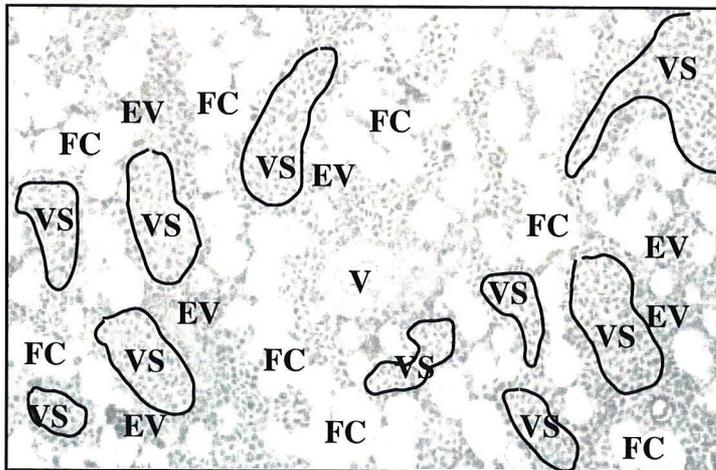
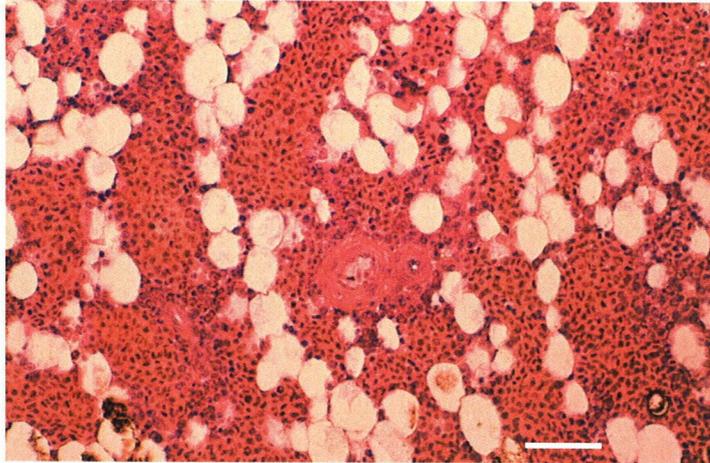


Fig. 8. HE staining of bone marrow from a 3.5-week-old chicken

V: blood vessel VS: venous sinuse EV: extravascular position
 FC: fat cell bar: 50 μ m

1-day-old chick

3.5-week-old chicken

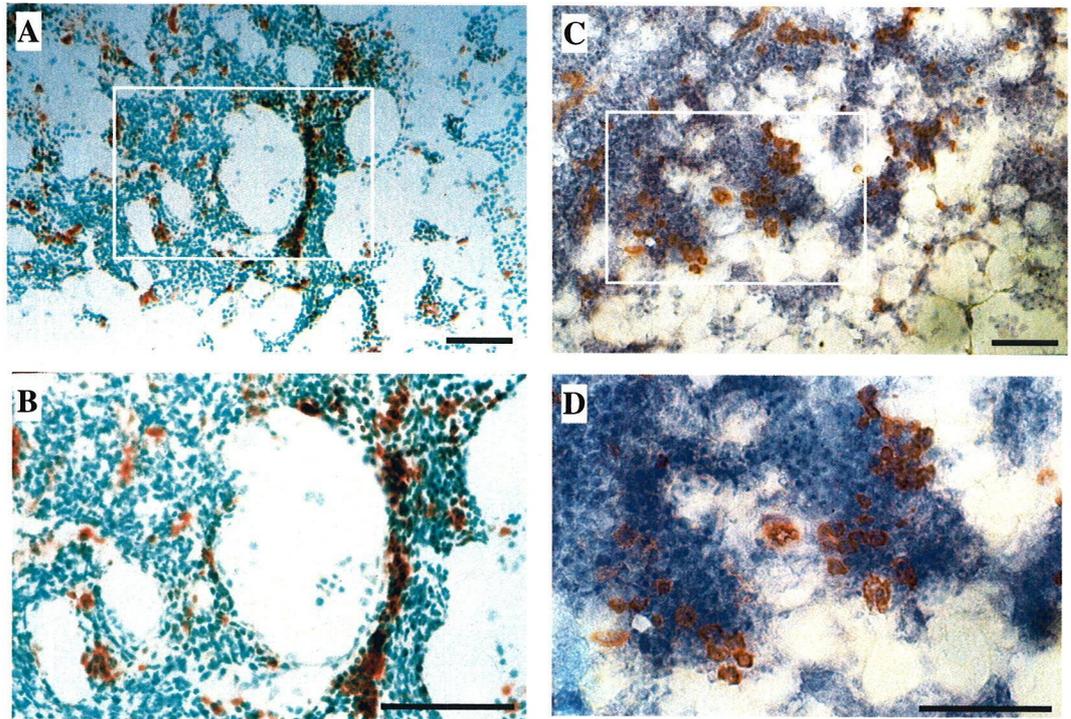


Fig. 9. Immunostaining of bone marrow sections of 1-day-old chick (A and B) and 3.5-week-old chicken (C and D) with HUKT mAb

B and D correspond to the fields boxed in A and C. The bone marrow sections of 1-day-old chick and 3.5-week-old chicken counterstained in methyl green and hematoxylin, respectively. (bar: 50 μm).

作成し、HUKT⁺細胞の形態を観察した。その結果、Fig. 10 に示したように、骨髄中には明らかに末梢血栓球とは形態の異なる大型の細胞（直径約 14 μm）から小型の細胞（直径約 7 μm）の陽性細胞が観察された。これらの細胞は、Campbell [33]が記載している栓球前駆細胞（栓芽球）と形態が一致していた。

(6) 胚発生段階における HUKT 陽性細胞の分布

骨髄において、栓芽球と思われる細胞が HUKT⁺細胞であったことから、HUKT mAb 認識抗原は未熟な栓球にも発現する抗原であり栓球分化抗原として利用できる可能性が示唆された。そこで、栓球の分化段階と胚発生段階における HUKT mAb 認識抗原の出現時期を明らかにする目的で、胚血液、胚骨髄、胚体における HUKT⁺細胞の分布を免疫染色法により解析した。

まず、胚血液内の HUKT⁺細胞を検出した。血液の採取が可能な 3 日胚から 19 日胚までの血液塗抹標本を作成し、HUKT mAb を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、3 日胚から 19 日胚までの血液塗抹標本中すべてで HUKT⁺細胞が認められた (Fig. 11)。3 日胚の血液中に認められた HUKT⁺細胞は、観察された塗抹標本の中で最も大型で、直径が約 12 μm、末梢血栓球よりも核が円形であり、骨髄中に認められた栓芽球と同様の形態であった (Fig. 11 E3)。この HUKT⁺細胞は 14 日胚血液中まで観察され、その陽性細胞は徐々に小型化していくことがわかった (Fig. 11 E3, E7, E11, E14)。また、14 日胚からは核が楕円形の末梢血栓球に類似した細胞も陽性細胞として観察されるようになり、徐々にその数も増大し、18 日胚血液中では、ほぼ末梢血栓球と同形の細胞種のみが陽性細胞として観察された (Fig. 11 E14, E16, E18)。この傾向は、HUKT⁺細胞でヘモグロビンを持つ赤血球でも同様の形態変化が観察された。

次に、胚大腿骨 (embryonic femur) から作成した骨髄凍結切片中の HUKT⁺細胞を観察した。骨髄の発達は 10 日胚前後から始まることが知られているために、9 日胚骨髄から 19 日胚骨髄のすべての検体を調べた。その結果、9 日胚から 10 日胚までは骨形成は認められるものの、骨髄は認められず、HUKT⁺細胞は検出されなかった (Fig. 12 A, B)。骨髄は 11 日胚から観察され、12 日胚では未熟な軟骨 (cartilage, Ca) 組織（一部は骨膜骨, periosteal bone, PB) の中央に広い骨髄が形成され、その中に豊富な細胞集団が認められた (Fig. 12C)。また、HUKT⁺細胞は骨髄形成直後から認められ、12 日胚骨髄中では HUKT⁺細胞が散在していることがわかった (Fig. 12D)。13 日胚になると、骨髄は大腿骨

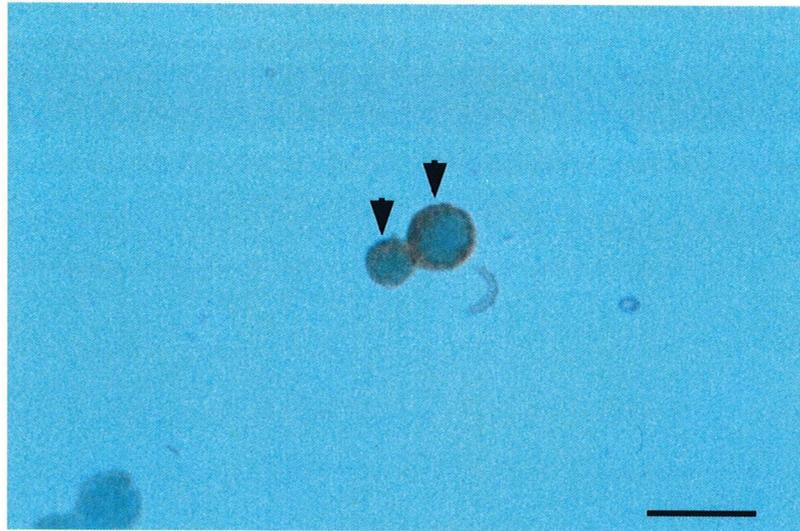


Fig. 10. Immunostaining of bone marrow sections of 3.5-week-old chicken with HUKT mAb

Arrows indicate HUKT⁺ cells. (bar: 20 μ m)

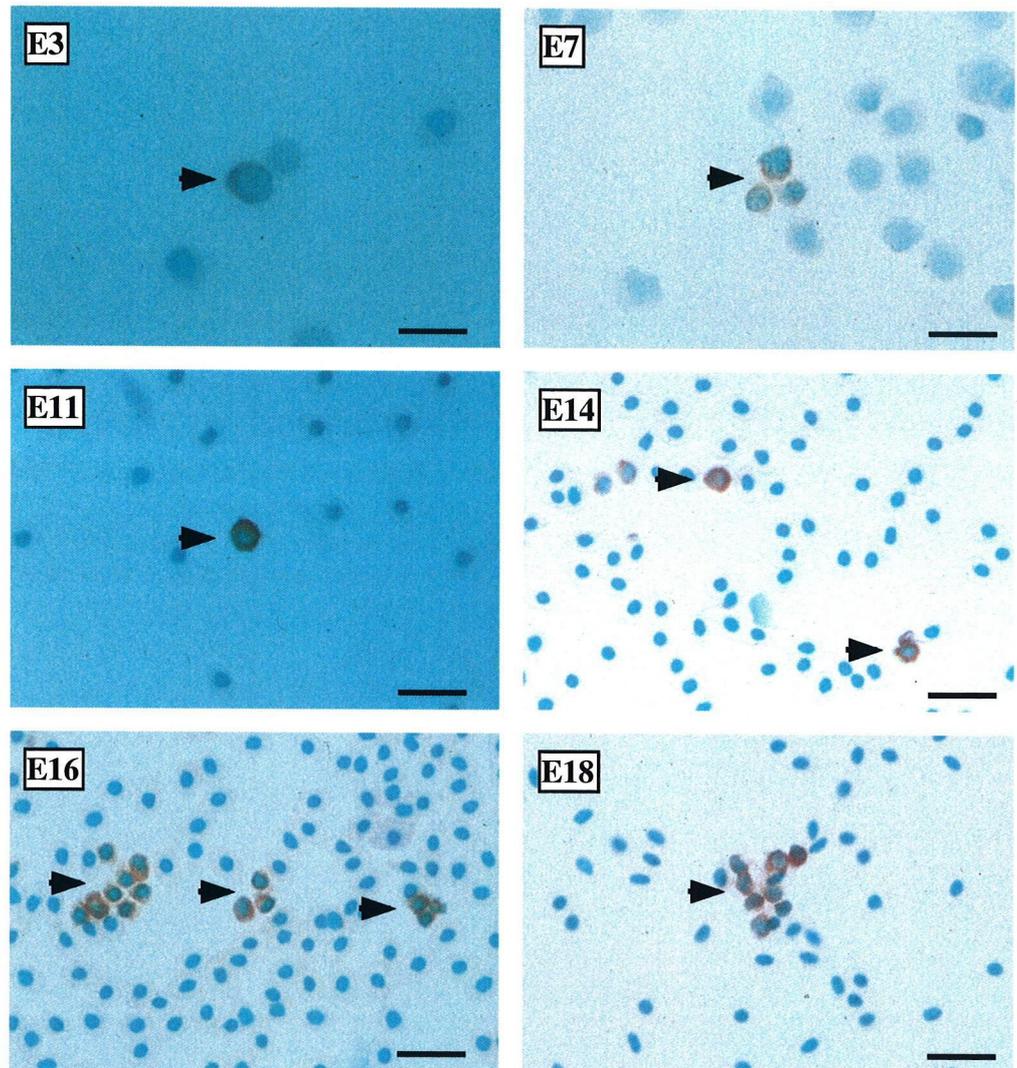


Fig. 11. Immunostaining of embrionic blood smears with HUKT mAb at day 3, 7, 11, 14, 16 and 18 of embryonic development (E3, 7, 11, 14, 16 and 18)

Arrows indicate HUKT⁺ cells. HUKT⁻ cells are almost all erythrocytes or erythroblasts. (bar: 20 μ m).

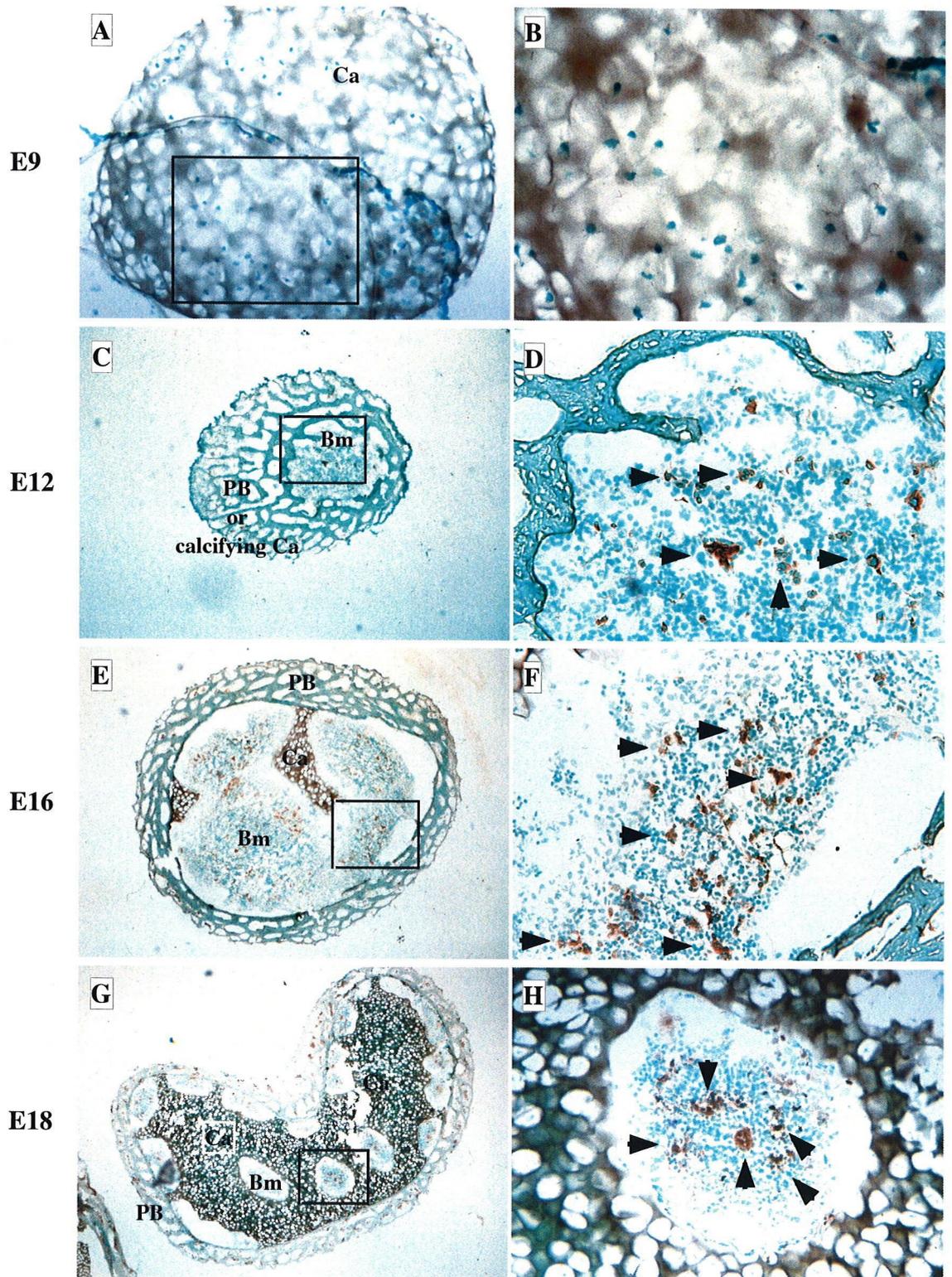


Fig. 12. Immunostaining of embryonic femur sections with HUKT mAb

A and B, C and D, E and F, and G and H are from the same section at E9, E12, E16 and E18, respectively. (Magnification: A, x74; C, E and G, x37). B, D, F and H correspond to the field boxed in A, C, E and G, respectively. Ca, cartilage; Bm, bone marrow; PB, periosteal bone. Arrow heads indicate HUKT⁺ cells.

の骨端の方まで広がっていた（結果は示していない）。16 日胚骨髄では、軟骨が石灰化（calcifying）して形成される骨膜骨がはっきりと観察され、その中に細胞が密に広がる骨髄とその骨髄を区切るように軟骨が観察された（Fig. 12E）。この時期の HUKT⁺細胞は、いくつかの細胞が集合し、骨髄中に散在していた（Fig. 12F）。18 日胚骨髄では、大腿骨全体がエンドウ豆状の形態となり、薄くて密な骨膜骨の中に発達した軟骨組織が形成され、軟骨組織と骨組織の間と中央部に細胞を密に含む骨髄が、十数個観察されるようになった（Fig. 12G）。その 1 つの骨髄中の HUKT⁺細胞は骨髄中に散在しているものの、密集して観察された（Fig. 12H）。胚骨髄中の HUKT⁺細胞の形態を観察するために、12 胚と 18 日胚骨髄を採取し、塗抹標本を作成後、HUKT mAb で免疫染色を行った。その結果、幼雛骨髄中に観察された栓芽球と同様の細胞が HUKT⁺細胞であることがわかった（Fig. 13）。

(7) 初期胚における HUKT 陽性細胞の出現時期の解析

HUKT⁺細胞は、胚骨髄では 11 日胚から、胚血液では 3 日胚から観察されたことから、初期胚における HUKT⁺細胞の出現時期を解析するために、孵卵 30 時間および 50 時間の初期胚の凍結切片を作成し、HE 染色および HUKT mAb を用いた免疫蛍光染色を行った。孵卵 30-50 時間のニワトリ胚盤葉では、Fig. 14A に示したように、体節形成が始まり胚盤葉後半分暗域（血管域，area vasculosa）に血島（blood island）が形成されている。血島とは胚の血管および血液形成の最も初期の段階で認められる形成体であり、血島中では卵黄囊内胚葉上部に血管に囲まれるように血球が生じる（Fig. 14B）。この領域に相当する凍結切片を HE 染色すると、卵黄囊内胚葉上部に血管域と思われる空洞域が観察された（Fig. 15A）。この領域を HUKT mAb を用いた蛍光免疫染色法で観察したところ、孵卵 30 時間後には、卵黄囊内胚葉上部に極めて微弱ではあるが HUKT⁺細胞が観察された（結果は示していない）。孵卵 50 時間後には、卵黄囊内胚葉上部の広範囲で陽性細胞が観察された（Fig. 15B）。これらの結果から、HUKT mAb 認識抗原は発生初期の最も未熟な細胞にも発現していることがわかった。

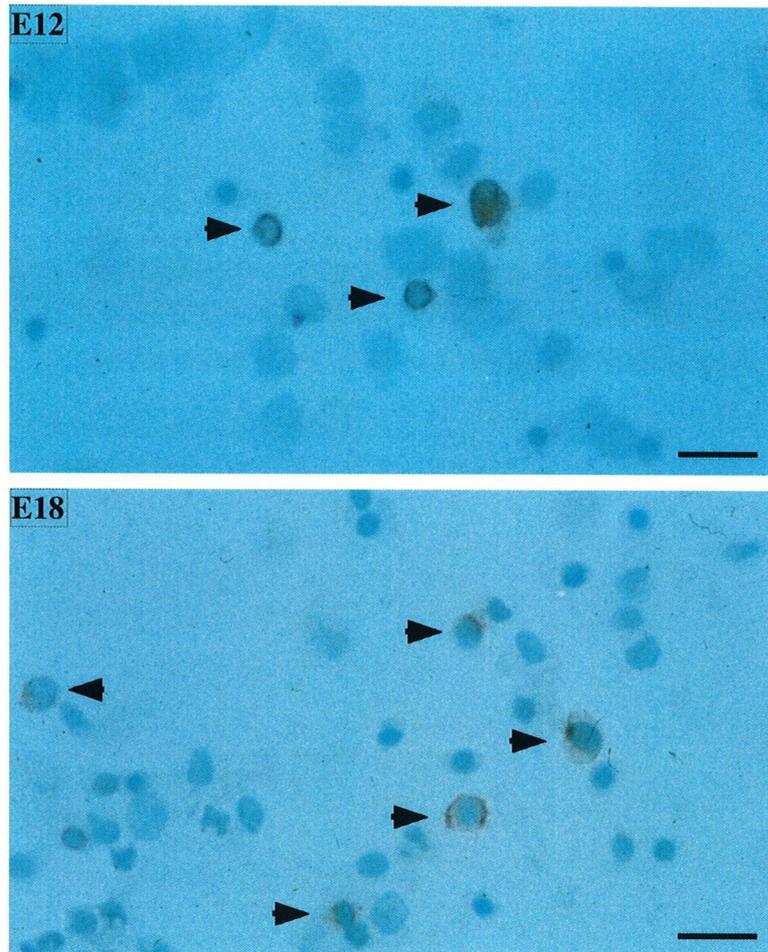
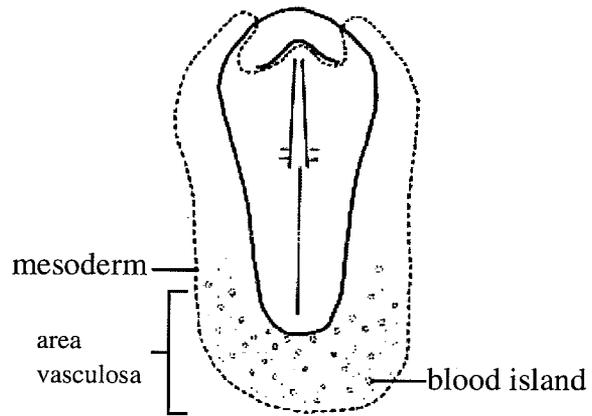


Fig. 13. Immunostaining of bone marrow smears of E12 and E18 with HUKT mAb

Arrows indicate HUKT⁺ cells. (bar; 20 μ m)

A. Blastderm (26-50 hr)



B. Cross section of area vasculosa (33-38 hr)

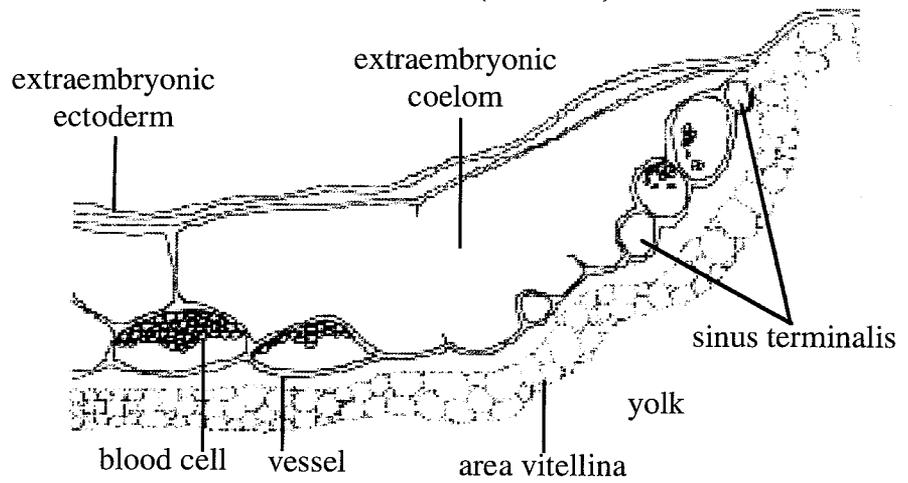


Fig. 14. Appearance of blood island in blastderm (A) and a cross section of area opaca vasculosa (B)

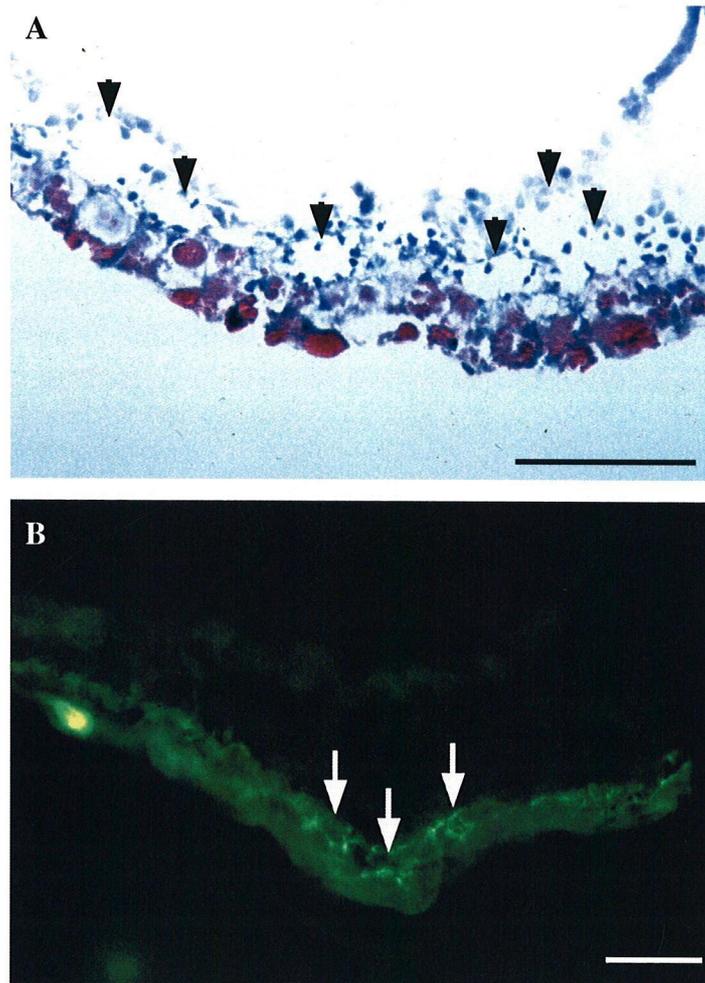


Fig. 15. HE staining (A) and immunofluorescence staining (B) of blastoderm (incubation for 50 hr) sections

Arrow heads indicate the blood islands. Arrows indicate HUKT⁺ cells. (bar: 10 μ m).

2.4. 考察

本章では、本研究で一貫して使用するニワトリ末梢血栓球の分離方法の確立と分離した栓球の正確な純度を検討するために、抗栓球 mAb の作出と特異性の解析を行った。その結果、栓球特異的膜抗原を認識する HUKT mAb の作出に成功し、栓球が CD45^{low}, HUKT⁺細胞であり、簡便な濃度比重遠心法を用いることで約 85%の純度でニワトリ末梢血から分離できることが明らかとなった。また、HUKT 認識抗原は、成熟栓球膜表面だけでなく、骨髓中の栓芽球や血島中にも発現していることが明らかとなった。

ニワトリ栓球は、哺乳類血小板と機能的に一致しているものの、形態的には大きく異なっている。そのため、ニワトリでは末梢血中のリンパ球や栓球の解析が哺乳類に比べて非常に遅れていた。この最大の要因は、哺乳類血小板と異なり、ニワトリリンパ球や栓球は、末梢血中から単独で分離することが困難であり、また、細胞膜抗原の免疫学的な特徴がほとんど解明されていないためである。一般に、末梢血中の細胞の解析には、解析したい細胞種に特異的な CD 抗原に対する mAb が用いられることが多い。ニワトリでも、T 細胞や B 細胞表面抗原に対する複数種の mAb が特徴づけされており、FCM 解析や免疫組織化学染色等に利用されている。しかし、これまで栓球に特異的な細胞表面抗原に対する mAb はわずかしかなかったため、栓球の FCM 解析や免疫組織化学染色等はほとんど行なわれていなかった。そのため、栓球分離方法の改変を行っても、栓球がどれだけ高純度に分離されたかの判断は、塗抹標本を作成後に、栓球の形態的特徴を目安に細胞数をカウントするという主観的な方法に頼るしかなく、研究者の間でばらつきが多かった。本研究では、栓球中に存在することが予想される細胞増殖因子を解析することが目的のため、いかに栓球を刺激することなく簡便に、しかも高純度に分離する必要があった。そのため、過去の報告の中から最も簡潔で高純度で栓球を分離する方法を一部改変して栓球を分離し、分離した栓球は HUKT mAb を用いて解析した。

作出した HUKT mAb は、ELISA 法および FCM 解析の結果、栓球特異的抗原を認識していることがわかった。HUKT を用いて、従来ニワトリ PBL として分離されてきた細胞中の栓球の割合を FCM 解析したところ、70±8.2%が栓球であることがわかった。次に、本研究で改変した栓球分離方法で得た栓球を解析したところ、栓球の割合が 86±7.2%に増加し、これまで報告されている栓球

分離方法の中で最も高純度に分離できることがわかった。またこの方法は、濃度比重遠心法を改変したものであるため簡潔であり、抗体等の添加を行わないため外来物質による栓球の刺激がなく、本研究に適していると考えられる。

ニワトリ栓球で最初に報告された CD 抗原は、血小板主要膜タンパク質である CD41 (GPIIb) と CD61 (GPIIIa) の相同分子である [31]。また、このニワトリ GPIIb と GPIIIa のヘテロダイマーを認識する mAb として、11C3 という抗体が作出された [44]。GPIIb-IIIa はフィブリノーゲン受容体であり、血小板の止血血栓形成に寄与しており、細胞接着因子の中のインテグリンファミリーに属している。すなわち GPIIb-IIIa は、一般的なインテグリンファミリーと同様、 α 鎖 (IIb) と β 鎖 (IIIa) のヘテロダイマーからなり、血小板の活性化にともない複合体を形成する。11C3 は、可溶化栓球を試料にしたウエスタンブロッティングでは認識抗原を検出することができないが、免疫沈降法では 90 kDa の IIIa 以外に 116 kDa の IIb を沈降させることが明らかにされている [44]。これらの結果は、11C3 が GPIIb-IIIa の複合体を認識する抗体であり、GPIIb と GPIIIa を別々に認識できないことを示している。HUKT mAb 認識抗原は、還元および非還元条件下で約 150 kDa であり、哺乳類 GPIIb の分子量に近いが、GPIIb は軽鎖と重鎖がジスルフィド結合した 2 量体であること、また、11C3 の認識抗原分子量と異なることから考えて、ニワトリ GPIIb を認識しているとは考えにくい。現在報告されている血小板特異的膜タンパク質で HUKT 認識分子に近い抗原は、約 170 kDa の GPIb が考えられる。GPIb は血小板特異的であり、また血小板前駆体細胞でも発現が認められることから、HUKT 認識抗原の特徴に近似しているように思われる。

ところで、本研究における栓球特異的 mAb の作出は、本来、分離した栓球の純度を評価することを目的に行ったが、作成した HUKT mAb は本来の目的以上に興味深い知見を与えてくれた。血液細胞の分化抗原とその mAb は、免疫学領域において、血液細胞の特徴付け、単一細胞のみの分離、また血液細胞の分化成熟段階を探る上で欠かすことのできない実験材料となっている。鳥類においても、リンパ球系分化マーカーは早くから解析され、T 細胞では膜表面抗原である CD3, CD4 や CD8, B 細胞では Bu-1^a や Bu-1^b といった細胞種特異的抗原に対する mAb が次々に作出され [41, 42]、鳥類免疫学の研究に活用されている。しかし、その数は、哺乳類と比較して圧倒的に少ない。特にリンパ球系以外の膜表面抗原に関しては、限られた数しか解析されていない。栓球に関し

では、先に 11C3 の報告があるが、11C3 は先にも述べたように、GPIIb-IIIa の複合体を認識する抗体であるために、活性化した栓球しか認識できない。すなわち、栓球分化マーカーとして利用する場合、11C3 よりも HUKT mAbの方が、より優れているものと思われる。そこで本研究では、HUKT mAb の分化マーカーとしての有用性を実証するために、末梢血栓球と栓球前駆体細胞の分化マーカーの特徴付けを行った。

末梢血細胞を分化マーカーで分類するには、FCM 解析がもっとも簡便な方法である。また、分化マーカーを用いた FCM 解析は、臨床分野から基礎研究まで幅広く利用されている。FCM 解析の利点は、細胞を生存させたまま蛍光標識した抗体を反応させて、その陽性細胞を検出することが可能なことである。また、抗体の種類に応じて別の励起波長をもつ蛍光物質を組み合わせることで、同一細胞集団中の複数種の抗原を解析することができる。さらに、FCM の分収機能を用いることで、一定の抗原を発現した細胞だけを単離することもできる。例えば、末梢血中のリンパ球の分布を FCM 解析する場合、白血球共通抗原である CD45 で白血球集団を特定する。次に、B 細胞特異抗原である CD45R, T 細胞特異抗原である CD2 もしくは CD3 で染色することにより、一度の測定から、末梢血中の B 細胞、T 細胞の割合を算出することができる。さらに、ヘルパー T 細胞特異抗原である CD4 とキラーもしくはサプレッサー T 細胞特異抗原である CD8 を多重染色することで、T 細胞の種別の割合を算出することも可能となる。この方法は、単に末梢血細胞にのみ可能なのではなく、リンパ系組織やその他の組織においても、細胞を単一分離できる試料であれば応用可能である。実際にマウスなどでは、特定組織中に存在するリンパ球の分布の測定や細胞の特徴付けに利用されている。ニワトリの場合でも、同様の解析が可能であるが、ニワトリの場合に問題となるのがリンパ球中に混入する栓球の存在である。通常、FCM 解析では、測定の最初に、細胞の大きさを示す FSC (前方散乱光) と細胞内の核の大きさを示す SSC (側方散乱光) の 2 方向で細胞の分布をビットマップ上に表示させる。哺乳類の場合、末梢血細胞の種類によって細胞の大きさ、核の有無により、この最初のビットマップ上に血小板、赤血球、リンパ球および単球、顆粒球が個別の集団として認識することができる。しかし、ニワトリの場合、ビットマップ上では栓球とリンパ球は同一細胞集団として認識されてしまう。すなわち、ニワトリではリンパ球中の B 細胞や T 細胞の割合を、栓球の混入を排除した状態での正確な解析ができなかった。この問題

を解決するためには、リンパ球特異的もしくは栓球特異的な抗体が必要であった。1991年に Paramithiotis ら [43]は、ニワトリ白血球共通抗原の CD45 を明らかにし、抗 CD45 mAb の作出にも成功した。この抗 CD45 mAb を用いて、ニワトリ PBL を FCM 解析すると、CD45 を強発現している CD45^{high} 細胞と低発現の CD45^{low} に分れることがわかった。Paramithiotis ら[43]は、抗 Bu-1 抗体、抗 CD3, 4, 8 各種抗体を用いて、CD45^{high} 細胞が B および T 細胞であることを明らかにした。しかし、哺乳類では CD45 が成熟赤血球や血小板には発現していないことや種々の分化マーカーでも CD45^{low} 細胞を特徴づけることができず、現在に至っている。本研究においても、ニワトリ PBL と抗 CD45 mAb を用いて FCM 解析すると、過去の報告通り、CD45^{high} 細胞と CD45^{low} 細胞の 2 つの集団に分離した (Fig. 6)。そこで、抗 CD45 mAb と HUKT mAb を用いて 2 重染色による FCM 解析を実施したところ、ニワトリ PBL 中の CD45^{low} 細胞はすべて、HUKT 陽性細胞であることがわかった (Fig. 6)。この解析結果から、これまで不明であった CD45^{low} 細胞の細胞種は栓球であることが明らかとなり、栓球細胞膜表面抗原の新規の特徴として、CD45^{low}, HUKT⁺であることが判明した。また、これまで鳥類免疫学分野で解析されてきたニワトリ PBL 中の約 70%は栓球であり、残りの約 30%が B および T 細胞であることも証明することができた。以上の結果は、ニワトリ PBL を FCM 解析に供試する際、抗 CD45 mAb と HUKT mAb を組み合わせて使用することにより、ニワトリのリンパ球を栓球の混入がない状態で、より正確な解析が可能になることを示しており、HUKT mAb の有効性を証明している。事実、当研究室では、これまでニワトリでは解析が困難であった CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻細胞を HUKT mAb を併用することで明らかにしている (未発表)。哺乳類 CD45 は成熟血小板では発現がなく、血小板前駆体細胞の巨核球では発現が認められる。しかし、鳥類では血小板の相同細胞である栓球には CD45 が発現しており、系統進化的観点からも興味深い結果である。

本研究において、HUKT mAb は FCM 解析における栓球膜表面マーカーとしてだけでなく、血液細胞の分化成熟段階を解析する上でも有用な抗体であることが明らかとなった。すなわち、HUKT mAb を用いた免疫組織化学的解析から、HUKT mAb 認識抗原は、骨髄中の栓球前駆細胞である栓芽球に発現しているだけでなく、初期発生段階の血球系細胞にも発現していることが明らかとなった。鳥類の造血系には、胚型造血系と成体型造血系の 2 種類が知られている

[45]. Fig. 16 にニワトリ造血系の発生段階と確認された HUKT⁺ 細胞の動向をまとめてみた. 陽性細胞は驚くことに, 孵卵 30 時間の胚の血島領域に認められた. 胚体内の最初の造血はこの血島で起こることが知られており, 血島の内側の細胞は扁平化して血管内皮細胞へ分化し, 外側の細胞は血液細胞を形成する. この血島中の血液細胞と血管内皮細胞は中胚葉細胞塊から同時期に出現することから, ヘマンジオブラスト (hemangioblast, 血球血管前駆細胞) と呼ばれる共通の前駆体に由来すると考えられている. HUKT mAb 認識抗原は, このヘマンジオブラストにも発現していることが示唆される. また, この時期の血球前駆細胞はすべての血液細胞には分化しないことが示されており, 孵卵 4 日後までの胚生期の一過性のものであり, 成体骨髄での造血には寄与しないことがわかっている. Tahara ら [45]は, この時期の胚血液細胞中に胚型栓球が存在し, 栄養物質運搬細胞として機能しているのではないかと述べている. 本研究でもこの時期の胚血液中に HUKT mAb 陽性細胞を検出しており, HUKT mAb はこの胚型栓球を検出しているのかもしれない. 鳥類胚において, いわゆる造血幹細胞は孵卵 4 日前後の大動脈領域と孵卵 6 日前後のパラ大動脈巢に出現し, 連続的な造血を開始することが観察されている [46]. この現象は当初, 鳥類と両生類に特異的な現象と考えられていたが, 最近, マウスでもパラ大動脈臓側中胚葉や大動脈-生殖隆起-中腎において造血幹細胞が発見され, この領域を *in vitro* で種々の分化因子とともに培養することで赤血球系, リンパ球系や顆粒球系細胞に分化させることができたことから, 成体型造血幹細胞の起源ではないかと考えられている [47]. 本研究では, この領域の観察は行っていないが, 成体型造血の中心となる骨髄が形成される孵卵 10 日までの胚血液中に HUKT⁺ 細胞が観察されることから, 大動脈領域中に HUKT⁺ 細胞が存在するかどうか, またこの時期の HUKT⁺ 細胞の機能などは興味深い点である. HUKT⁺ 細胞は, その後, 骨髄が発達する孵卵 11 日前後から骨髄中に散在して存在するようになり, この陽性細胞は, その形態から栓芽球であることがわかった. また, 同時にこの時期から胚血液中の HUKT⁺ 細胞や赤血球の形態が, 円形から成体で観察される成熟栓球や赤血球の形態に変化し, 孵卵 19 日には成体の血球と全く同じ形態をもつことが観察された. このことは, 造血の場が大動脈領域から骨髄領域に完全に移行し, 成体型造血が開始されたことを示すものと考えられる.

最近, ニワトリ胚細胞を急性白血病ウイルス・E26 でトランスフォームした

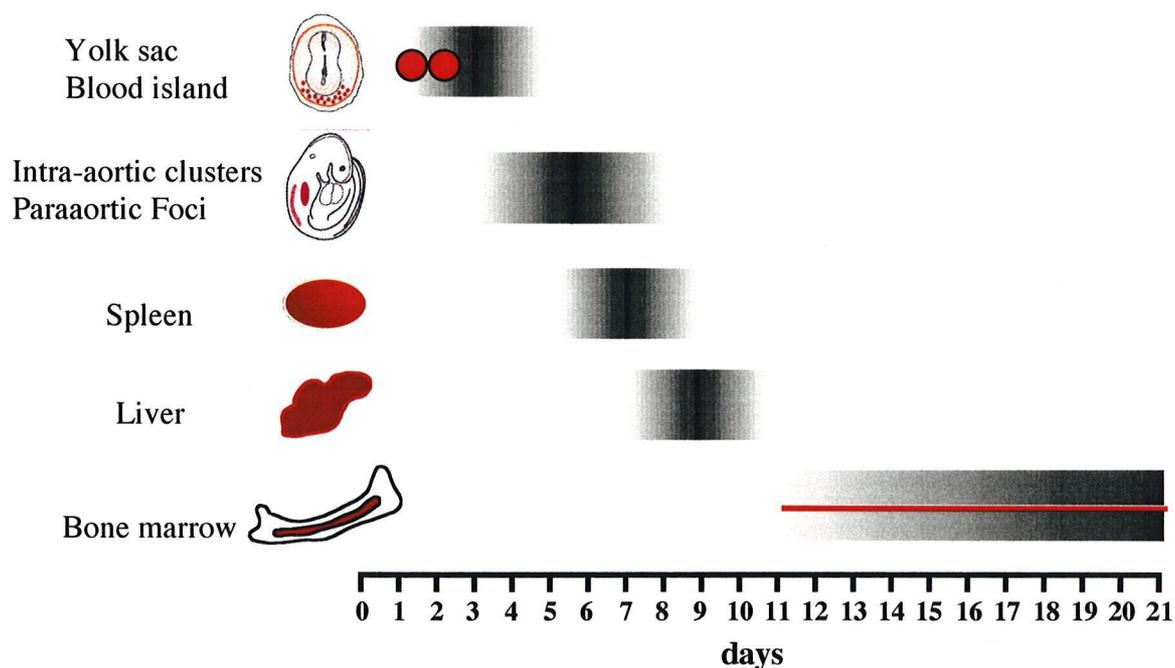


Fig. 16. Schematic representation of the sequence of haemopoiesis in the developing chicken embryo and appearance of HUKT⁺ cells

The yolk sac (blood island) is the main erythropoietic organ during development. Haemopoietic activity in the embryo proper occurs initially in the intra-aortic clusters, then in the para-aortic foci which are an irregular group of cells that occupy the whole dorsal mesentery. The spleen receives the first incoming haemopoietic stem cell as early as E4, and carries out transient erythropoietic and granulopoietic functions before becoming a secondary lymphoid organ at the time of hatch. Unlike the mammalian liver, the chicken liver plays a minor role in haemopoiesis, with erythrocytes and myeloid cells predominating. The bone marrow is the last haemopoietic organ to develop and become colonised. red points or line indicate appearance of HUKT⁺ cells indicates.

細胞を免疫原に作出された mAb の一つ、MEP21 [48]が栓球と造血系幹細胞に反応することが判明し、その認識抗原が解析された。その結果、MEP21 が認識する分子は約 150 kDa であり、哺乳類で造血幹細胞に発現する CD34 に類似したタンパク質であることが明らかとなり、thrombomucin と命名されている [49]。この thrombomucin は、分子量および種々の組織における発現分布が HUKT 認識抗原に極めて類似しており、HUKT は thrombomucin を認識しているのかもしれない。本研究では、HUKT mAb を用いて HUKT mAb 認識抗原をアフィニティー精製し、N 末アミノ酸解析を行ったが、N 末端がブロックされているためか、アミノ酸配列を決定することができなかった（結果は示していない）。現在、HUKT mAb 認識抗原を多量に精製し、限定分解法によるアミノ酸の一次解析を行う準備を進めている。

鳥類ではウズラとニワトリ胚を用いた卵黄嚢キメラの実験から、造血幹細胞の起源を解析する研究が行われており、成体型造血幹細胞と胚型造血幹細胞は違うものであるという説が大勢を占めている。しかし哺乳類では、まだこの問題に明快な回答は得られていない。本研究において、HUKT mAb 認識抗原は、成体型造血幹細胞系では一貫して栓球系列細胞に発現していることは明白であるが、胚型造血幹細胞系に見られる HUKT⁺ 細胞を特徴づけることはできなかった。今後、HUKT mAb 認識抗原を明らかにするとともに、他の分化抗原等を活用することで、鳥類血液の発生・分化研究に新たな情報を提供できるのではないかと考えられる。

第3章 栓球無血清培養上清の細胞増殖活性と免疫学的解析

3-1 はじめに

血小板は無核であり、他の細胞系と違って種々の刺激に迅速に反応して活性化され、著しい形態変化を伴う細胞応答が顕著な細胞である。そのため、細胞の外來刺激の応答機構解明に好都合な研究対象として、古くから研究されてきた。また、血小板は止血機能の他に、損傷部位での凝集に伴って血小板顆粒中に蓄積された血小板由来増殖因子 (PDGF, platelet-derived growth factor)、肝細胞増殖因子 (HGF, hepatocyte growth factor)、上皮増殖因子 (EGF, epidermal growth factor) や血管内皮細胞増殖因子 (VEGF, vascular endothelial growth factor) など複数の増殖因子を放出し、損傷組織の修復を促進するという役割を持つ [26, 50, 51, 52]。さらに、血小板中には細胞増殖抑制活性をもつトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β , transforming growth factor- β) や血小板由来増殖抑制因子 (platelet derived growth inhibitor) も存在しており、損傷部位の修復という生体にとって即効性が要求される生体反応を直接的に調節していると考えられている [53, 54]。

一方、ニワトリ栓球は哺乳類の血小板と同様、止血血栓形成過程において、損傷部位への粘着、形態変化、顆粒の放出、フィブリン形成、血栓形成という過程をたどることが知られている [9, 10]。しかし、これまでに栓球に由来する増殖因子は全く報告されていない。1979年に Wachowicz ら [55]は、血小板惹起因子であるトロンビン、コラーゲンやセロトニンでニワトリおよびガチョウの栓球を刺激し、その放出物質をゲル濾過法の溶出パターンで解析した。その結果、トロンビンで刺激して得られた栓球分泌タンパク質は、ブタ血小板から得られた分泌タンパク質と同様の溶出パターンであることを明らかにしている。しかし、その後、栓球分泌タンパク質に関する研究は全く行なわれていない。栓球と血小板の機能的相同性を考えれば、栓球中にも血小板と同様、多種多様な増殖因子を保有していることは十分予測可能であり、また、栓球特異的な新規増殖因子の発見も期待できる。

細胞増殖因子は動物の発生過程から生体の恒常性の維持まで、生体にとって重要な役割をもつ。哺乳類では growth factor と命名されたものだけでも数十種を数え、その生理機能や細胞内シグナル伝達系・細胞増殖周期、発癌機構の解

明など幅広い分野で研究が進められている。これらの研究分野において、細胞培養技術は欠かすことのできないものとなっている。また近年、分子生物学的手法が進歩し、特定タンパク質の機能解析や有用タンパク質生産にも遺伝子導入もしくは特定遺伝子を欠失させた培養細胞が利用されている。細胞培養には、一般的に 10%程度の FBS を含む基礎培地が用いられるが、ある因子の培養細胞に対する影響の解析や、培養液から細胞が産生する有用物質を精製する際に、未知因子を多数含む血清の存在は、しばしば悪影響を及ぼす場合がある。こういった場合、その細胞の増殖を促進するいくつかの増殖因子を添加した無血清培地が利用され、一部は市販化されている。しかしニワトリの場合、培養可能な株化細胞が哺乳類に比べて少なく、また、細胞培養系における増殖因子の研究が少ないため、ニワトリ細胞培養系にニワトリ由来増殖因子が応用されている例が極めて少ない。すなわち、ニワトリ由来増殖因子の培養細胞に対する解析が進展すれば、ニワトリ培養細胞の無血清化や新規株化細胞の作出にも道が開けるものと考えられる。

そこで本章の研究では、ニワトリ由来増殖因子を多数保有することが予想されるニワトリ栓球中の増殖因子を特徴付けるために、栓球抽出物および栓球放出因子の生物活性を測定するとともに、栓球由来増殖因子の免疫学的解析を行った。

3-2 材料と方法

(1) 供試動物

本研究には、白色プリマスロック成鶏と 8 週齢の BALB/c 雌マウスを用いた。

(2) 供試細胞

本研究には、Table 5 に示した 6 種の細胞株と基礎培地を使用した。供試細胞株はすべて 5% もしくは 10% FBS を含む基礎培地で継代培養したものを扱い、哺乳類由来細胞株は 37℃、5% CO₂ 条件下で培養し、培養には CO₂ インキュベーターを使用した。また、本研究には上記細胞株以外に、ニワトリ胚線維芽細胞 (CEF, chicken embryo fibroblasts) と末梢血栓球を使用した。

CEF は孵卵 10 日後の SPF 卵 (ゲンコーポレーション株式会社から分与) の胚から以下のように調製した。孵卵 10 日胚から胚体を取りだし、四肢、頭部および内蔵を除去し、軽くホモジナイズした。ホモジナイズした胚体には、0.25% トリプシン (DIFCO) -PBS を加え 37℃ で 20 分間反応させた。上清を静かに回収し、少量の FBS 入り遠心管に回収し、この操作をさらに 2 回繰り返した。回収した細胞浮遊液は水中で一時的に保存しておき、反応終了後、セルフィルターを通して組織片を除去した。その後、細胞浮遊液は MEM (Eagle's minimum essential medium) で数回遠心洗浄し、5% FBS-MEM で培養維持した。培養は 38.5℃、5% CO₂ 条件下で行った。また、以降のすべての研究には、1 代継代した CEF を使用した。

なお、末梢血栓球は第 2 章の方法に準じて調製した。

(3) 供試抗体および抗原

本研究には、抗ウシ bFGF (basic fibroblast growth factor) 抗体とウシ bFGF (R&D systems)、抗マウス EGF 抗体とマウス EGF (Biomedical Technologies Inc.)、抗ヒト PDGF 抗体とヒト PDGF (R&D systems)、抗ブタ TGF- β 抗体とブタ TGF- β (R&D systems) を使用した。また、標識抗体として、HRPO (horse radish peroxidase) 標識抗マウス IgG+M (H+L) (Kirkegarrrd and Perry Laboratories)、HRPO 標識抗ウサギ IgG+M (H+L) (Kirkegarrrd and Perry Laboratories)、AP 標識抗マウス IgG+M (H+L) (Kirkegarrrd and Perry Laboratories) および AP 標識抗ウサギ IgG+M (H+L) (Kirkegarrrd and Perry

Table 5. Cell lines used in this study

Cell line	Source	Culture Medium
CHO-K1	Chinese hamster ovary	Ham F-12
HeLa	Carcinoma of human cervix	MEM ^a
MDBK	Bovine kidney	DMEM ^b
RK-13	Rabbit kidney	DMEM
Vero	Monkey kidney	MEM
SP2/0-Ag14	Mouse myeloma	IMDM

^a Eagle's minimum essential medium

^b Dulbecco's modified Eagle medium

Laboratories)を使用した。

(4) 栓球抽出物および栓球放出物

末梢血から分離した栓球は、栓球抽出物と栓球放出物の作成に供試した。分離した栓球は、 1×10^8 cells/ml となるように PBS に浮遊させ、100 mM PMSF (phenylmethylsulfony fluoride) を 1/100 容と、終濃度で 10 μ g/ml となるように aprotinin を加えて、超音波発生装置を用いて一分おきに 4~6 回、氷上でホモジナイズした。その後、4°C、12,000 g、30 分間遠心し、上清を回収した。その上清は 0.22 μ m ポアファイフター (ミリポア) を用いてろ過滅菌し、Dye-binding assay キット (Bio-rad) を用いてタンパク量を測定し、小分けして使用時まで -80°C に保存した。この上清を栓球抽出物として供試した。また、保存は最長で 2 週間とした。

栓球放出物の作成には、栓球抽出物の場合と同様、 1×10^8 cells/ml となるように血清不含 MEM に浮遊させ、38°C、CO₂ インキュベーター内で 48 時間培養し、経時的に培養上清を回収した。回収した培養上清には、直ちに 100 mM PMSF を 1/100 容加えて冷却し、細胞を遠心により除去した。遠心後、Dye-binding assay キットを用いてタンパク量を測定し、小分けして使用時まで -85°C に保存した。この上清を栓球放出物として供試した。また、保存は栓球放出物と同様、最長で 2 週間とした。

(5) 細胞増殖活性

栓球より得られた試料 (栓球抽出物と栓球放出物) の各種培養細胞に対する細胞増殖活性は、顕微鏡下での増殖形態の観察、細胞染色法を利用した細胞数を指標にした方法、及び DNA 合成活性を指標とした ³H-チミジンの取り込み試験を用いて評価した。

細胞増殖活性の測定では、安定で再現性の高い結果を得るために、培養細胞は可能な限り細胞周期の揃った状態で試験する必要がある。そこで、本研究では、低血清培養法による簡易細胞周期同調法を試みた。各種細胞は、それぞれの増殖培地で単層シートを形成するまで培養した。その後、血清不含培地で培養用ディッシュを数回洗浄後、1% FBS を含む培地で 3 日以上維持した。その細胞は 0.3% Nonidet P-40 (ナカライテック)、2.5% PI (propidium iodide, ナカライテック)-PBS で脱核染色を施し、遠心により細胞核を回収し FCM 法により

細胞周期を解析した。

栓球から得られた試料は種々のタンパク濃度で無血清培地に添加し、顕微鏡下での増殖形態の観察を行った。CEF は 6×10^4 cells/cm²、その他の細胞は 3×10^4 cells/cm² となるように培地に調製し、培養用ディッシュまたは培養用 96-ウエルプレートに添加した後、CEF は 38℃、その他の細胞は 37℃の CO₂ インキュベーター内で培養し経時的に観察した。

細胞数の測定には、Kull らの Neutral red 染色法 [56]を一部改変して行った。この方法は、生細胞のみを染色する色素である Neutral red の特徴を利用したもので、細胞数と細胞染色後の比色を相関させて、細胞数を吸光度の相対値で表す方法である。細胞は顕微鏡観察の場合と同条件で培養用 96-ウエルプレートに添加した後、経時的に培地を除き、0.006% Neutral red-PBS をウエル当たり 200 μl ずつ添加し、37℃で 1 時間染色した。染色後、各ウエルは静かに PBS で洗浄し、10 mM NaH₂PO₄-50% エタノールを添加してよく攪拌した。攪拌後、測定波長 540 nm、参照波長 630 nm の 2 波長をマイクロプレート・リーダー (Bio-Tek) で測定した。測定は 5 つの同一条件の測定値の平均値および標準偏差を算定した。なお、本方法は予備試験として細胞数と吸光度の相関を試験し、 5×10^3 から 1×10^6 個の細胞数の範囲内で高い相関 ($n=40$, $r=0.993$, $p < 0.001$) が得られた。

³H-チミジンの取り込み試験は、Kawahara らの方法 [57]を一部変更して行った。上記方法と同様に培養用 96-ウエルプレートで細胞を培養し、経時的に ³H-チミジン (比活性 1.5-2.2 TBq/mmol, Amersham) を 185 kBq/ml となるようにそれぞれの試料添加培地に加え、ウエル当たり 60 μl ずつ分注し、37℃、5% CO₂ インキュベーター内で 6 時間培養した。培養後、培地をすべて除去し、0.1N NaOH を 50 μl ずつ分注し、37℃で 1 時間培養して細胞を溶解させた。1 時間後、各ウエルを軽く攪拌して、溶解液をガラスフィルター (GF/C, 直径 21 mm, Whatman) に吸着させて乾燥させた。乾燥させたフィルターは 5%トリクロロ酢酸で 3 回洗浄し、100% エタノールで洗浄後乾燥させた。乾燥後、フィルターをシンチレーションバイアルに移し、シンチレーター (ACS-III, Amersham) を加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-3500, Aloka) でカウントした。測定は 3 つの同一条件の測定値の平均値および標準偏差を算定した。

(6) モノクローナル抗体の作成

免疫原には、栓球放出物を使用した。タンパク量で 100 μg の栓球放出物をフロイント・コンプリートアジュバント（和光純薬工業）と混和し、8 週齢の BALB/c 雌マウスの腹腔内に初回免疫した。初回免疫後 3 週間毎に 100 μg の栓球放出物を腹腔内に追加免疫した。追加免疫から 1 週間後に尾動脈から採血を行い、血清を回収し、ELISA 法を用いて栓球に対する抗体価をチェックした。ELISA 法は第 2 章と同様の方法で行い、ELISA 法で抗体価の上昇が十分に確認されたマウスには、尾静脈内に 50 μg の栓球放出物を最終免疫し、そのマウスは 3 日後に細胞融合法に供試した。

細胞融合は第 2 章と同様の方法で行い、陽性ハイブリドーマの選抜は ELISA 法を用いて行った。ELISA 法は第 2 章と同様の手法を用いて行い、固相化抗原にはタンパク濃度で 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調製した栓球放出物を使用した。

(7) ELISA 法

栓球放出物中に存在することが予想される既知増殖因子を ELISA 法により解析した。ELISA 法は第 2 章と同様の方法で行い、固相化抗原にはタンパク濃度で 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調製した栓球放出物もしくは栓球抽出物を使用した。検出抗体には各種哺乳類由来増殖因子（bFGF, EGF, PDGF および TGF- β ）に対するウサギポリクローナル抗体を使用した。また、検出には HRPO 標識抗ウサギ Ig を使用した。

(8) ウエスタンブロッティング解析

得られた抗栓球放出物 mAb の認識抗原と各種哺乳類由来増殖因子抗体の反応性を検出するために、ウエスタンブロッティング解析を行った。方法は第 2 章に記載した方法に準拠して行い、試料には栓球放出物をレーン当たり 10 μg 添加できるように調製し、8% ポリアクリルアミドゲルを用いて泳動した。検出抗体には各種哺乳類由来増殖因子（bFGF, EGF, PDGF および TGF- β ）に対するウサギポリクローナル抗体もしくは抗栓球放出物 mAb を使用した。また、検出には AP 標識抗ウサギ Ig もしくは AP 標識抗マウス Ig 抗体を使用した。

3-3 結果

(1) 供試細胞の細胞周期の解析

培養細胞は、増殖培地中で DNA 合成準備期 (G1 期), DNA 合成期 (S 期), 細胞分裂準備期 (G2 期), 細胞分裂期 (M 期) の順に繰り返し増殖する。増殖培地中では、この周期が個々の細胞でばらばらであり、また、増殖因子はその種類により細胞周期の作用点が異なっている。このような状態で細胞増殖活性を試験すると細胞の状態に左右され、安定性に欠く再現性のない結果が得られやすい。そこで、活性因子の細胞増殖活性を試験する際には、できるだけ細胞周期を同調させて使用することが望まれる。細胞周期の同調法には、簡易法として低血清培養法がある [58]。接着性の培養細胞は単相シートを形成後、通常の増殖培地の 5-10% の血清濃度から 1% 以下の低血清濃度で培養すると G1 期で細胞周期を停止させる。本研究では、この現象を利用し、細胞周期の簡易同調を試み、同調されたかどうかを PI の DNA 結合性を利用した FCM 解析による細胞周期の解析を行った。その結果、Fig. 17 に示したように 10% FBS 存在下で培養した CEF は、約 60% の細胞が G1 期であり、約 40% の細胞が S 期もしくは G2/M 期にあることがわかった。次に低血清培養条件下で 3 日間培養した CEF は約 90% の細胞が G1 期にあり、完全ではないもののほとんどの細胞の細胞周期が同調されていることがわかった。また、他の細胞株でも同様の結果が得られた (結果は示していない)。以上の結果から、以下の研究には低血清培養下で同調培養を施した細胞を使用した。

(2) CEF に対する栓球抽出物および放出物の細胞増殖活性

栓球放出物および抽出物中に細胞増殖活性が存在するかどうか、まず CEF を用いて解析した。タンパク濃度で 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度となるように栓球抽出物を血清不含 MEM で調製し細胞培養に供試した。その結果、栓球抽出物を含む培地で培養した CEF は培養直後から培養器面への急速な細胞接着が認められ、培養 3 日後には単層シートを形成するまで細胞が増殖していた (Fig. 18-A)。これに対して、栓球抽出物を含まない培地で培養した細胞では、わずかな増殖しか認められなかった (Fig. 18-B)。

次に、栓球抽出物の細胞増殖活性を Neutral red 染色法を用いて比較した。種々の濃度で調製した試料添加培地で CEF を 3 日間培養し、相対的細胞数を比

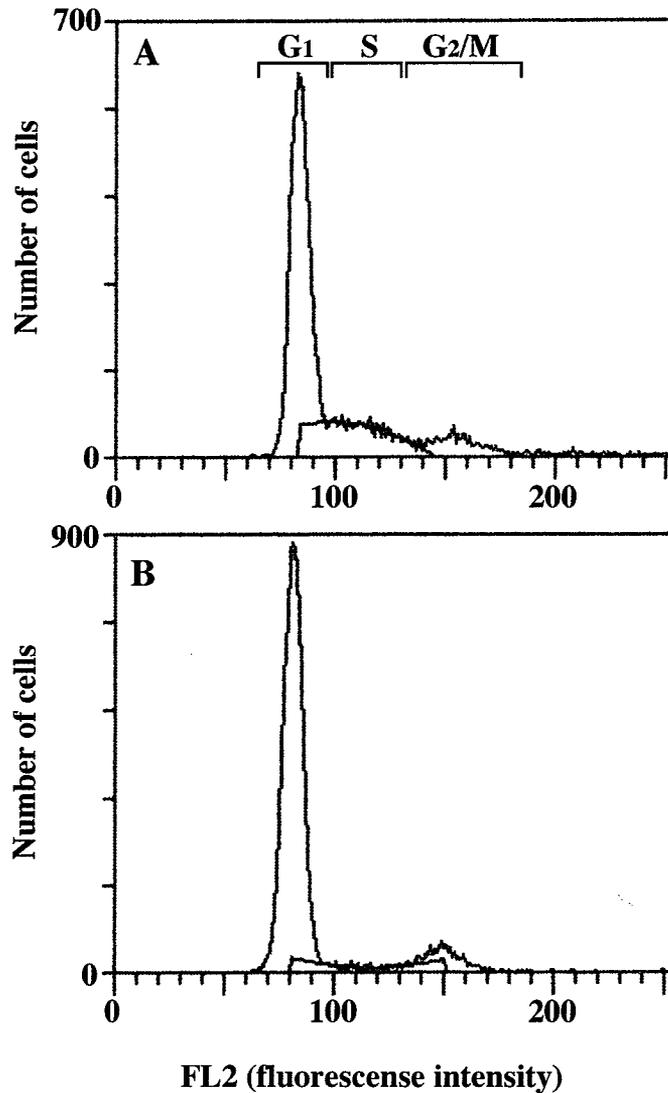


Fig. 17. DNA contents of CEF with FCM analysis

Cell cycle analysis was performed using flow cytometry monovariate propidium iodide (PI) analysis. The cells fall into three categories: those that have an unreplicated complement of DNA and are therefore in G₁ phase, those that have a fully replicated complement of DNA (twice the G₁ DNA content) and are in G₂ or M phase, and those that have an intermediate amount of DNA and are in S phase. A: CEF were grown in MEM supplemented with 5% FBS. B: CEF were grown in MEM supplemented with 5% FBS, and then cultured in MEM supplemented with 1% FBS for 3 days.

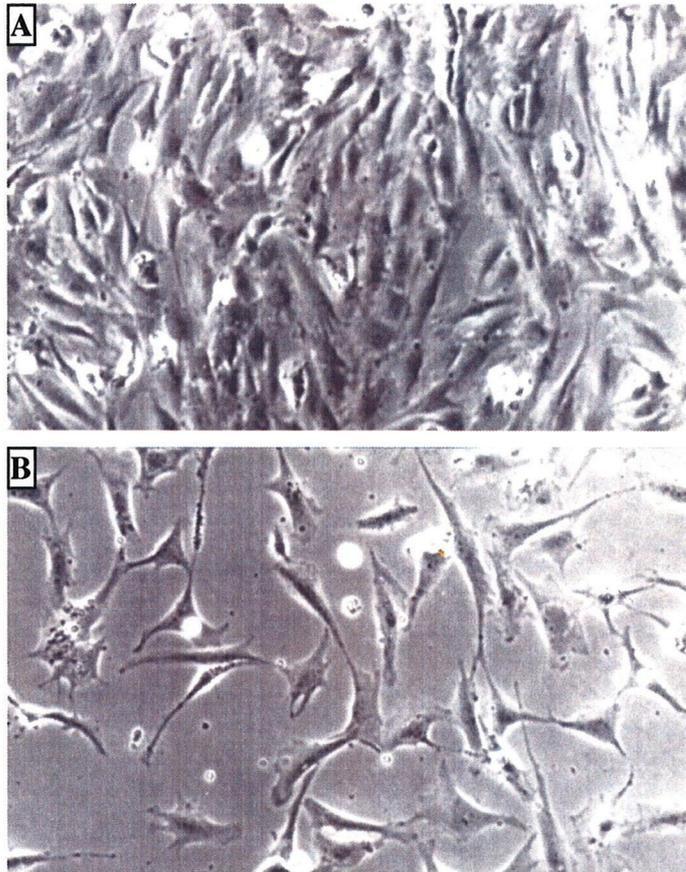


Fig. 18. Phase-contrast micrograph of CEF cultures with 50 μg protein/ml thrombocyte extracts (A) and without thrombocyte extracts (B)

The micrographs were taken at 3 days after seeding. (x 500).

較したところ、Fig. 19 に示したように、栓球抽出物は濃度依存的に CEF の細胞増殖を促進していることがわかった。また、その活性は 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でプラトーに達した。

栓球放出物は栓球を無血清で培養した培養上清である。栓球は培養開始直後から、培養器面へ急速に接着し、培養 5 日後にはマクロファージ様に底面に広がることが確認されたが、細胞の増殖は認められなかった (Fig. 20)。次にこの栓球培養上清中のタンパク質濃度を経時的に測定した。その結果、Fig. 21 に示したように、72 時間後まで培養上清中のタンパク質濃度が上昇していることがわかった。結果には示していないが、この測定は最大で 5 日後まで行い、72 時間 (3 日間) 以降は減少していた。栓球の培養時間による栓球無血清培養上清 (栓球放出物) 中の細胞増殖活性を比較するために、種々の培養時間で回収した栓球放出物を、CEF に対する細胞増殖活性試験に供試した。その結果、Fig. 22 に示したように培養開始 1 時間後の上清中にすでに CEF に対する増殖活性が認められ、24 時間後に最大となることがわかった。また 24 時間以降では徐々に活性が低下することが明らかとなった。以上の結果から、栓球を 24 時間培養した無血清培養上清を栓球放出物として、以下の研究に使用した。

次に、栓球抽出物と栓球放出物の CEF に対する細胞増殖活性を比較した。その結果、Fig. 23 に示したように栓球放出物の方が CEF に対する強い増殖活性を有することがわかった。さらに、栓球放出物に関して CEF に対する DNA 合成活性を促進するかどうか試験したところ、細胞数と同様、栓球放出物は CEF の DNA 合成を濃度依存的に促進していることがわかった (Fig. 24)。

(3) 哺乳類由来細胞に対する栓球放出物の細胞増殖活性

栓球中に CEF に対する細胞増殖を促進する因子の存在が明らかになったことから、次に哺乳類由来細胞株に対する細胞増殖活性を試験した。活性試験には、CEF を用いた測定で最も強い増殖活性を示した 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で行い、培養はすべて 3 日間おこなった。その結果、Fig. 25 に示したように供試したすべての細胞株で栓球放出物による細胞増殖の促進が認められ、特に Vero, RK-13 および CHO で顕著に認められた。また、HeLa 細胞は栓球放出物を添加して培養した場合、細胞が凝集した形で増殖し、通常の培養形態 (単層) での増殖は認められなかった。

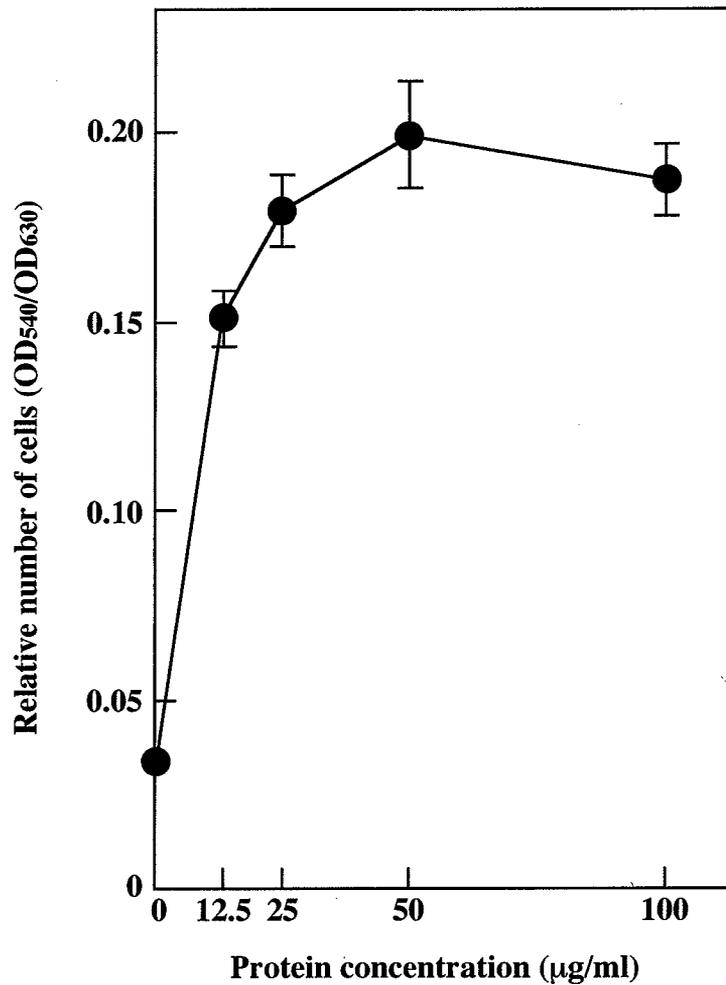


Fig. 19. Stimulation of cell growth by different concentrations of thrombocyte extracts

CEF cells were seeded in 96-well plates in MEM with thrombocyte extracts (0–100 µg protein/ml). The relative number of cells was determined by neutral red staining method at 6 days after seeding. The results were presented as mean ± SD (n=5).

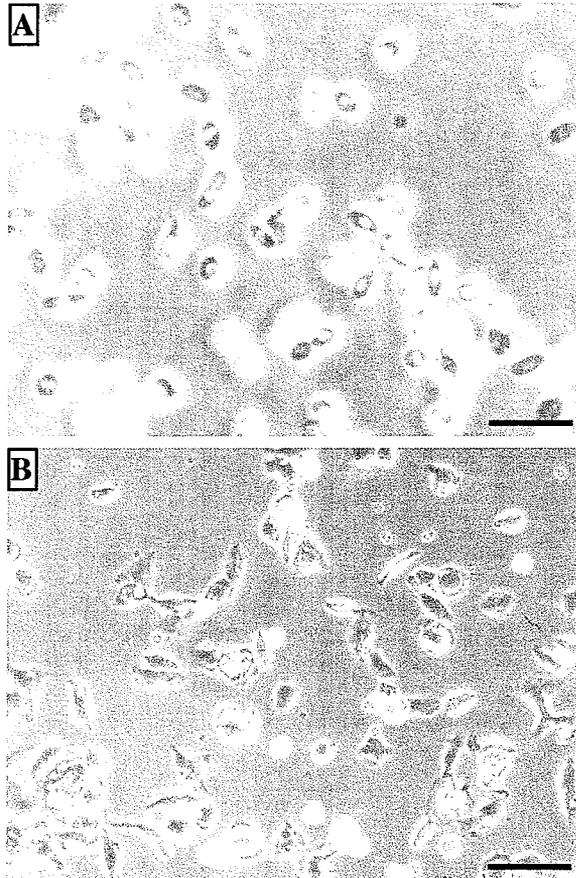


Fig. 20. Morphological properties of cultured thrombocytes

Chicken thrombocytes were cultured in serum-free MEM. The micrograph (A) was taken soon after seeding and the micrograph (B) was taken at 5 days. Bar: 50 μm .

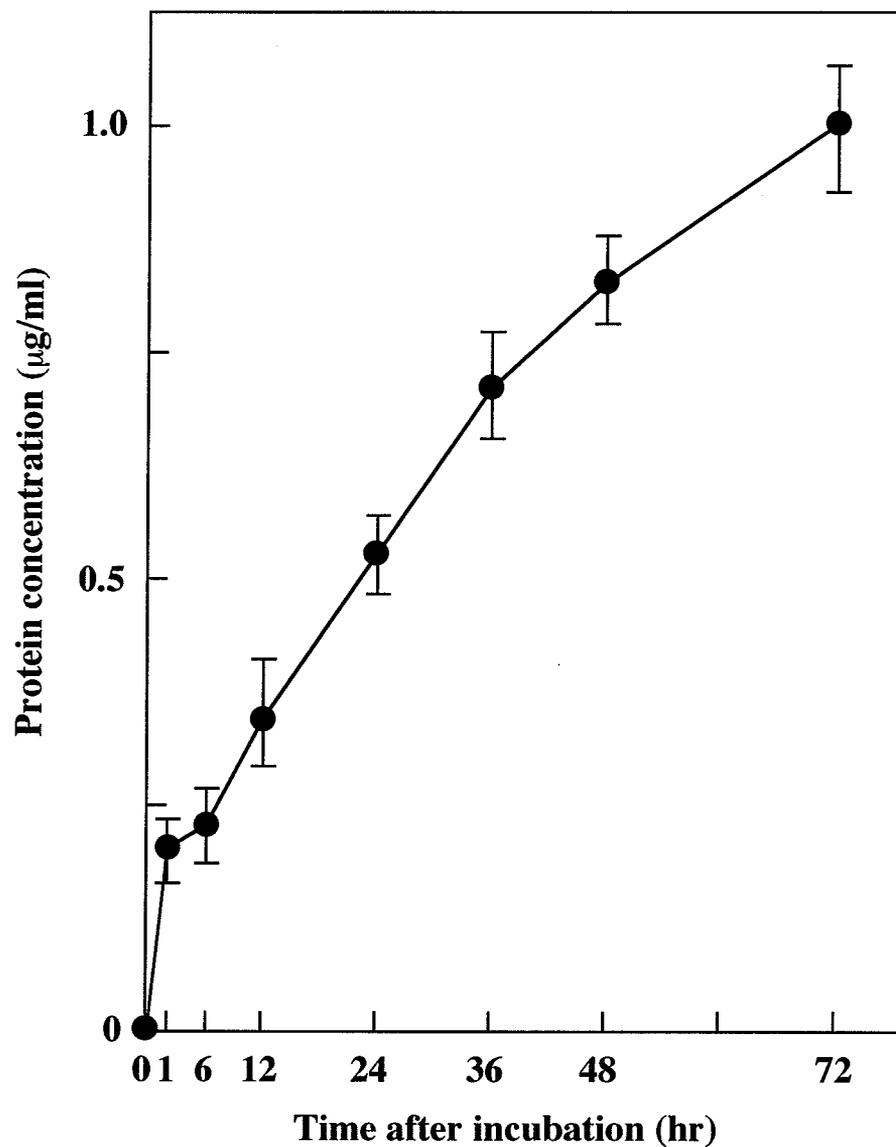


Fig. 21. The protein concentrations of supernatants obtained from thrombocyte cultures

The thrombocytes (1×10^8 cells/ml) suspended in serum-free MEM were cultured in 6-cm dishes and incubated at 38°C . The supernatants were collected at 0–72 hr. The protein concentration of the supernatant was determined by a protein-dye binding assay. The results were presented as mean \pm SD ($n=3$).

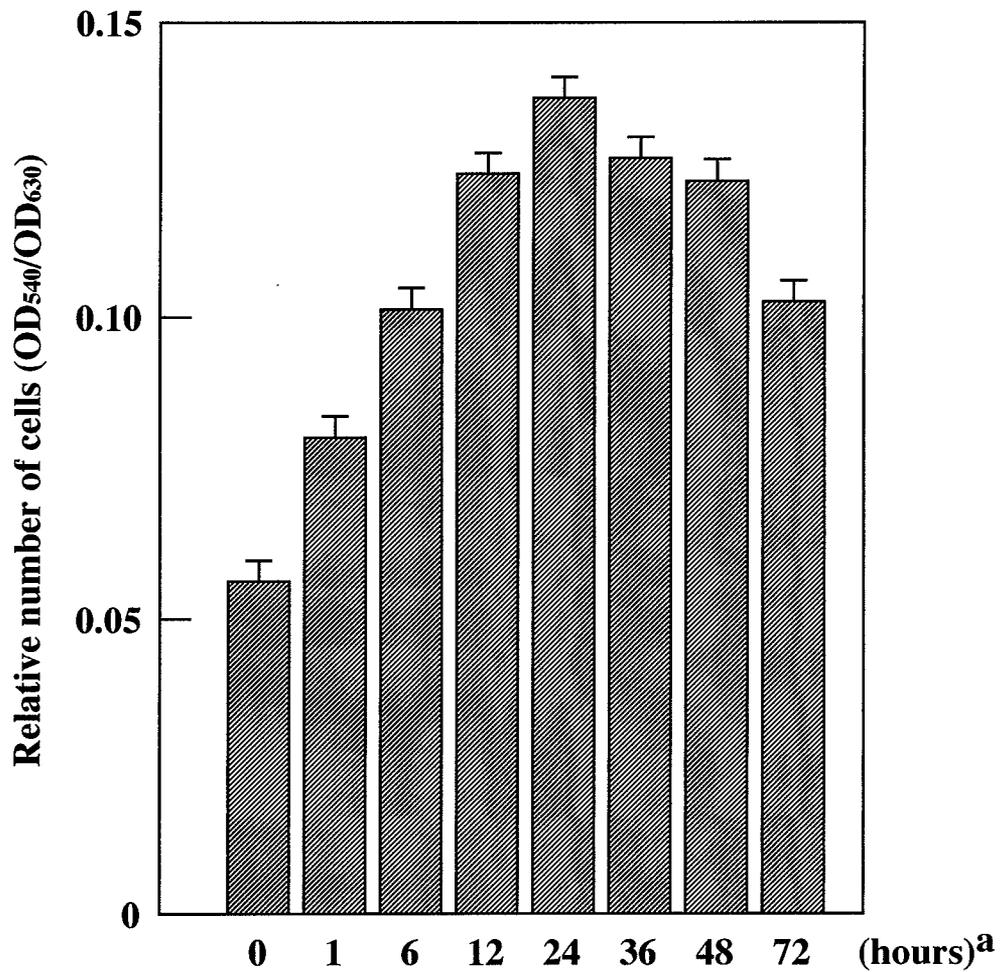


Fig. 22. Growth effect of serum-free thrombocyte cultured media

CEF cells were seeded in 96-well plates in the thrombocyte cultured media harvested at different time after seeding. The "a" indicates the collected time (hour) after seeding. The relative number of cells was determined by neutral red staining method at 3 days after seeding. The results were presented as mean \pm SD (n=5).

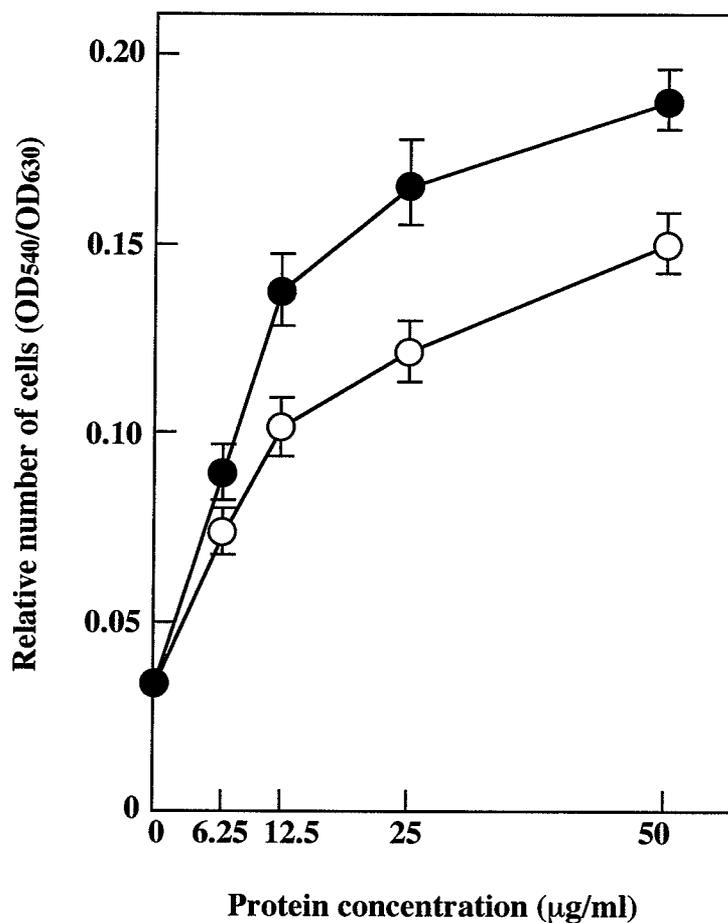


Fig. 23. Stimulation of cell growth by different concentrations of thrombocyte extracts (○) and thrombocyte-released proteins (●)

CEF cells were seeded in 96-well plates in MEM with thrombocyte extracts and thrombocyte-released proteins (0–50 µg protein/ml). The relative number of cells was determined by neutral red staining method at 3 days after seeding. The results were presented as mean ± SD (n=5).

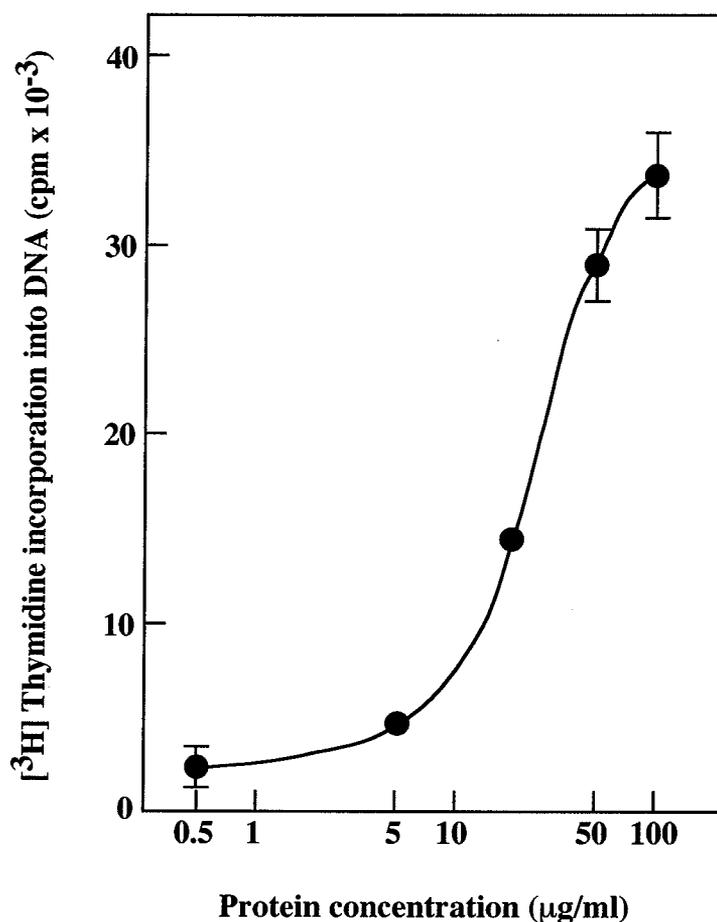


Fig. 24. Stimulation of DNA synthesis in CEF cells to different concentrations of thrombocyte-released proteins

CEF cells were seeded in 96-well plates in MEM with thrombocyte-released proteins (0–100 µg protein/ml). Each well contained 18.5 kBq of [³H] thymidine. After a 6-hr incubation, the radioactivity was determined by liquid scintillation counting. The results were presented as mean ± SD (n=3).

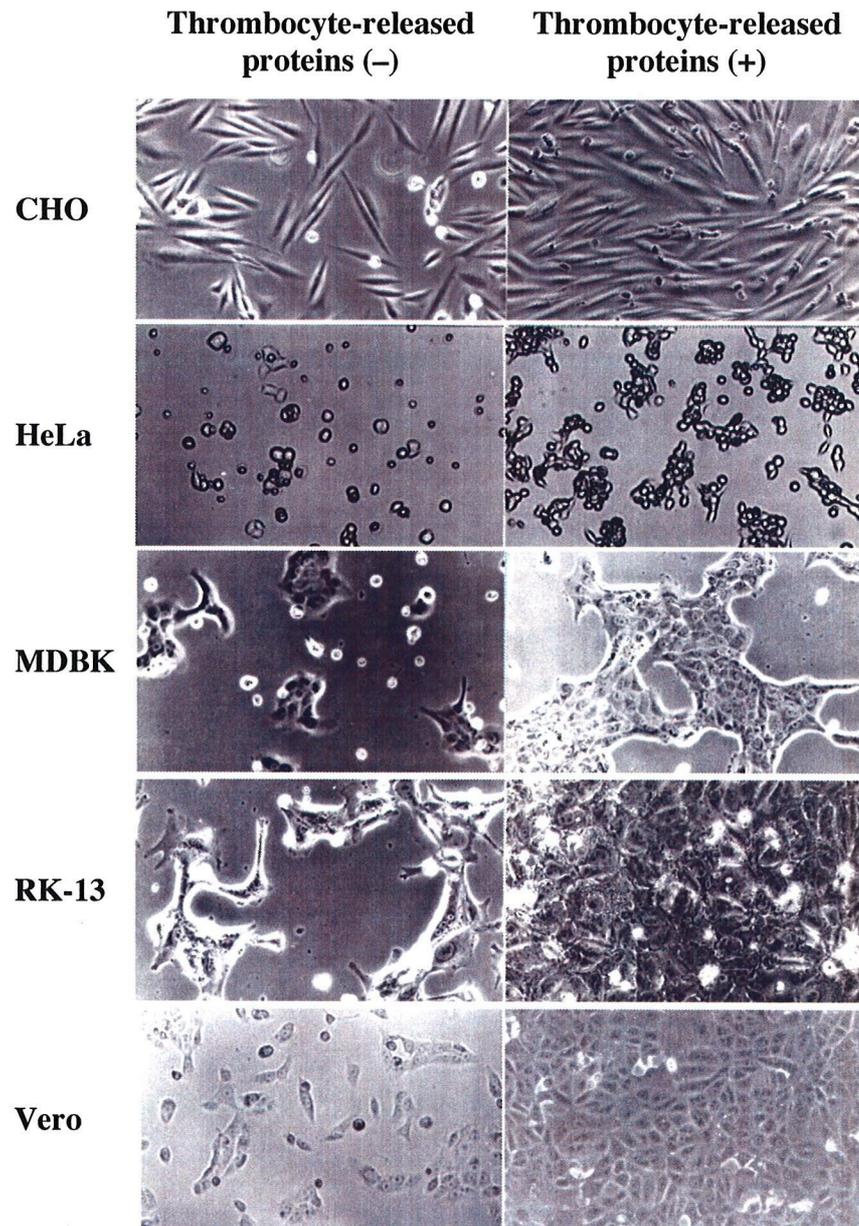


Fig. 25. Phase-contrast micrographs of various mammalian-derived cell line cultures with 50 μg protein/ml of thrombocyte-released proteins

Cell lines were seeded in culture dishes in media with (+) or without (-) thrombocyte-released proteins (50 μg protein/ml). The micrographs were taken at 3 days after seeding.

(4) 栓球放出物に対する mAb の作成

栓球放出物中に存在することが予想される細胞増殖因子を検出するために、栓球放出物に対する mAb の作成を行った。その結果、栓球放出物に反応する 5 種のハイブリドーマの作出に成功した。これらの 5 種のハイブリドーマ培養上清を用いて、既知哺乳類由来増殖因子 (bFGF, EGF, PDGF および TGF- β) に対する反応性を ELISA 法により解析した。その結果、Table 6 に示したように 5 種のハイブリドーマ培養上清は、いくつかの増殖因子と反応することがわかった。そこで、これらのハイブリドーマをクローニングし、同様に既知哺乳類由来増殖因子に対する反応性を ELISA 法により解析した。その結果、Table 7 に示したように計 12 種類の mAb を得たが、いずれの抗体も既知増殖因子に対する反応性が弱く、またひとつの増殖因子特異的に反応する抗体は得られなかった。さらに得られたすべての抗体をウエスタンブロットリング法に供試したが、栓球放出物および既知増殖因子ともに反応が認められなかった (結果は示していない)。

(5) 既知哺乳類由来細胞増殖因子に対する抗体を用いた免疫学的解析

栓球放出物は、CEF だけでなく各種哺乳類由来細胞の増殖を促進したことから、哺乳類由来細胞増殖因子の相同因子を含むことが示唆された。また、相同分子の解析には、本章の結果(4)に示したように、特異性の高い mAb を用いた解析では困難であることがわかった。そこで、哺乳類由来細胞増殖因子に対するポリクローナル抗体を用いた免疫学的解析を行った。

まず、ELISA 法を用いて、栓球放出物および栓球抽出物に対する各種ポリクローナル抗体の反応性を解析した。その結果、Table 8 に示したように抗 bFGF および抗 PDGF 抗体が、栓球放出物および栓球抽出物と反応することがわかった。そこで次に、この 2 種の抗体を用いて、ウエスタンブロットリング解析を行った。その結果、Fig. 26 に示したように、抗 bFGF 抗体は約 220 kDa、抗 PDGF 抗体は約 107 kDa の栓球放出物中のタンパク質を検出することがわかった。なお、陰性対照には 1 次抗体に正常ウサギ血清を使用した。

Table 6. Reactivities of supernatant of hybridomas against various growth factors

Hybridoma	ELISA value (Absorbance at 492 nm)			
	bFGF	EGF	PDGF	TGFβ
A	0.082	0.213	0.094	0.079
B	0.093	0.210	0.079	0.072
C	0.198	0.106	0.212	0.218
D	0.218	0.123	0.048	0.210
E	0.497	0.166	0.742	0.650

Table 7. Reactivities of mAbs against various growth factors

Hybridoma	ELISA value (Absorbance at 492 nm)			
	bFGF	EGF	PDGF	TGFβ
A1	0.019	0.034	0.027	0.031
A2	0.016	0.026	0.023	0.009
A3	0.053	0.106	0.084	0.051
B1	0.008	0.012	0.007	0.009
B2	0.011	0.025	0.012	0.012
C1	0.045	0.008	0.238	0.173
C2	0.017	0.004	0.186	0.080
C3	0.016	0.002	0.166	0.078
D1	0.122	0.067	0.059	0.151
E1	0.258	0.015	0.104	0.305
E2	0.336	0.029	0.174	0.348
E3	0.250	0.018	0.120	0.273

Table 8. Reactivities of thrombocyte-released proteins and thrombocyte lysate with antisera against various growth factors

Antiserum against	ELISA value (Absorbance at 492 nm)		
	Positive control ^a	Thrombocyte- released proteins	Thrombocyte lysate
bFGF	0.688	0.378	0.391
EGF	1.523	0.045	0.061
PDGF	0.577	0.336	0.393
TGF β	0.066	0.008	0.005

^a ELISA microplate wells were coated with the antigen against antiserum.

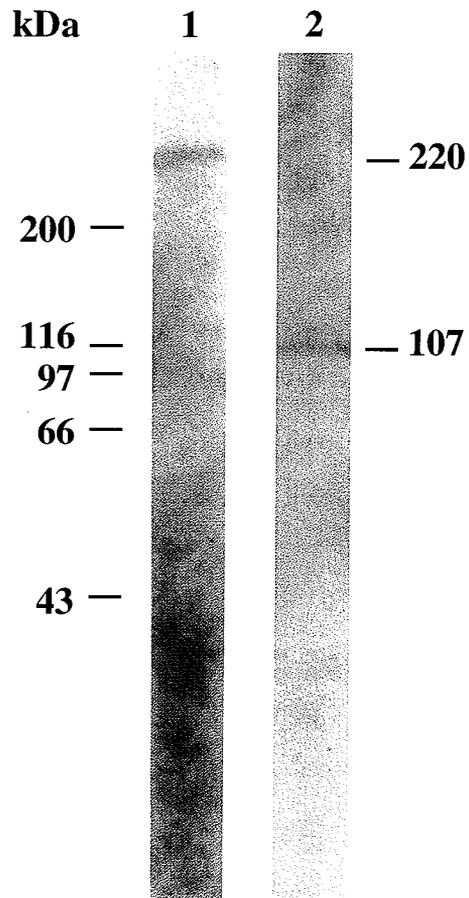


Fig. 26. Western blotting analysis of thrombocyte-released proteins with antisera against bFGF (1) or PDGF (2)

Thrombocyte-released proteins were subjected to electrophoresis on a 8% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS under non-reducing conditions. The protein molecular weight markers are shown on the left.

3.4. 考察

本章では、第 2 章で構築した高純度栓球分離法を用いて分離した栓球中に、細胞増殖活性が存在するかどうかを試験した。また免疫学的手法を用いて栓球中に既知増殖因子が存在するかどうか検討した。その結果、栓球中には種々の細胞の増殖を促進する因子が存在することが明らかとなった。しかしながら、免疫学的手法では、この増殖因子を同定することはできなかった。

細胞中の生理活性物質を解析するには、その因子の生理活性を保持したまま分離・精製し、標的細胞を選択し生物活性を測定しなければならない。また、その生理活性因子を同定するには抗体を利用した免疫学的解析や遺伝子クローニングを行わなければならない。細胞が産生する生理活性因子を分離・精製、もしくは生物活性を測定する場合、一般的にプロテアーゼ阻害剤存在下で細胞を破碎し試料とする場合が多い。血小板から最初に精製されたヒト PDGF は、50 リットルの血液から分離した血小板を破碎して精製している [59]。本研究でもまず、栓球を超音波により破碎した栓球抽出物を用いて、CEF に対する細胞増殖活性を試験した。その結果、極めて粗雑である栓球抽出物中に CEF に対する細胞増殖活性が存在することが判明した (Fig. 18)。しかし、この抽出物は、プロテアーゼ阻害剤存在下で -80°C 保存を行っても、その活性が 2 週間以内に低下することがわかった (結果は示していない)。栓球は有核細胞であり、巨核球の細胞片である血小板とはその内容物構成が大きく異なっていると考えられる。すなわち、血小板の抽出物と栓球の抽出物では、細胞を破碎した際に生じる分解産物が栓球では血小板より多量に含まれており、この影響で栓球中に存在する活性因子の生理活性の安定性を低下させていると考えられる。PDGF に続き血小板から分離された HGF は、その生理活性の安定性試験で PDGF よりも酸や熱に対して不安定であることがわかっている [50]。これらのことは、細胞から生理活性物質を抽出するには、熱やプロテアーゼに対する対策はもちろんのこと、細胞を破碎することなく穏やかな条件で抽出する必要性を示唆している。生理活性の不安定な HGF は、ラット血小板をトロンビンで刺激した放出因子の中から精製されている [50]。この方法は細胞の分泌機構を利用したもので、細胞を物理的に破壊しないために夾雑物が少なく、目的の生理活性物質が得られやすかったと考えられる。ニワトリ栓球は血小板と同様、トロンビン、セロトニンやコラーゲンといった凝集惹起因子の刺激により凝集し細胞内

タンパク質を放出することが知られている。しかし、栓球をこれらの因子で刺激するには、血小板を刺激する場合よりも 10 倍以上の高濃度で使用する必要がある [55]。すなわち、栓球放出物質を得るために、これらの凝集惹起因子を利用すると、栓球放出物質中にこれらの惹起因子が高濃度混入した状態となる。このような試料を用いて細胞に対する生物活性を測定するには、これらの因子の混入を考慮しなければならない。本研究では、栓球放出物質が有する細胞増殖活性を測定しているが、コラーゲン、トロンビンやセロトニンなどいずれの惹起因子も細胞に対して、増殖促進効果を示すことが知られている [60, 61, 62]。実際、栓球を凝集させる濃度のトロンビンとセロトニンを用いて、混入する濃度で調製した MEM で CEF に対する細胞増殖活性を測定したところ、栓球抽出物質と同程度の細胞増殖活性が検出された（結果は示していない）。そこで本研究では凝集惹起因子を使用しない方法で栓球を刺激し、放出因子を回収する方法を考案した。栓球は生体外において、ガラスやプラスチック表面に速やかに粘着することが知られている。この現象はちょうど生体内で栓球が損傷部位に粘着し、止血血栓を形成する過程に類似している。そこで、栓球を組織培養用ディッシュで培養する方法を発想した。栓球は培養により増殖することはないが、培養直後に速やかに培養用ディッシュに接着し、その後、偽足を伸ばす細胞などマクロファージ様の形態変化を起こすことがわかった (Fig. 20)。また、栓球培養上清中のタンパク質濃度は経時的に増加し、培養 72 時間後に最大となった (Fig. 21)。これらの結果は、凝集惹起因子を加えなくても、栓球を培養するだけで栓球放出タンパク質を得ることができることを示している。また、これらの栓球放出タンパク質を 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で MEM に添加して培養した CEF は、24 時間後に回収した栓球放出タンパク質で最も強く細胞増殖が促進されることがわかった (Fig. 22)。さらに、24 時間後に回収した栓球放出タンパク質中には、栓球を破碎して得た栓球抽出物より CEF に対して高い増殖活性が認められることがわかった (Fig. 23)。このことは栓球放出物質中に含まれる増殖因子の量が栓球抽出物よりも多いためか、もしくは栓球放出物質中には選択的に増殖因子が放出されその濃度が高められたためではないかと考えられる。本研究で考案した栓球放出タンパク質回収方法は、物理的・化学的なタンパク質の変性が少なく、また、外来因子の添加のない方法であり、栓球中の増殖因子の生物活性の測定ならびに精製を行う際の試料に最も適していると思われる。

一般的に増殖因子を含めた多くのサイトカインは多機能性を持つことが知られている。例えば PDGF は、間葉系細胞の遊走・増殖刺激活性を有する因子として分離精製されたが、その後の研究から中胚葉由来細胞の平滑筋細胞、線維芽細胞、グリア細胞や軟骨細胞など多様な細胞に対して増殖活性を示すことが明らかとなっている [26]。また、TGF- β は線維芽細胞や平滑筋細胞など一部の細胞に対しては細胞増殖を促進するのに対して、それ以外の多くの細胞に対しては細胞増殖を抑制する [63]。このように増殖因子は、細胞の種類により細胞内情報伝達系を調節し、種々の細胞に対し多機能性を発揮しながら、生体の恒常性を維持していると考えられている。そこで栓球放出物が、CEF 以外の細胞株に対して細胞増殖活性を有するかどうかを試験した。ニワトリでは、哺乳類ほど多くの接着性の細胞株が得られていないため、本研究では当研究室で継代維持している哺乳類由来培養細胞を供試した。その結果、栓球放出物中には種々の哺乳類由来細胞に対する増殖活性を有する因子の存在が明らかとなった (Fig. 25)。この結果は、栓球中に血小板と同様、複数種の増殖因子の存在を示唆している。

ところで Table 1 に示したように発生過程で重要な役割を持つ FGF や TGF- β などの増殖因子は、哺乳類とニワトリ間でそのアミノ酸配列がよく保存されている。すなわち、栓球中にこれらの増殖因子が存在するならば、これらの因子に対して作成された抗体はニワトリ由来因子と交差することが予想される。また逆に、栓球放出物質に対して作成した mAb は哺乳類由来増殖因子と交差することも考えられる。さらに、mAb は増殖活性の中和試験やタンパク質の抗体アフィニティー精製にも利用できる。そこで、本研究では栓球放出物中に存在することが予想される増殖因子を検出することを目的に、二つの免疫学的手法を用いて解析した。栓球放出物質に対する mAb 作成実験では、栓球放出物に反応するいくつかの mAb を得たが (Table 7)、その中には哺乳類由来増殖因子を特異的に認識する mAb は含まれていなかった。mAb は極めて特異性の高い抗体であり、哺乳類由来増殖因子と異なるエピトープを認識しているか、もしくは哺乳類由来増殖因子と相同性の高い部分に対しては抗体が産生されにくいことが予想される。そこで次に、哺乳類由来増殖因子に対するポリクローナル抗体を用いて、栓球放出物中に存在する増殖因子の検出を試みた。ポリクローナル抗体は、モノクローナル抗体とは異なり、特異性は低いものの抗原に対して複数のエピトープを認識できる。すなわち、栓球放出物中の増殖因子と交差

反応を示す確率が高いものと思われた。栓球抽出物を抗原に用いた ELISA では、bFGF と PDGF に対する抗体が交差反応を示すことがわかった。そこでこれらの抗体を用いたウエスタンブロッティング法により交差反応を示すタンパク質の分子量の比較を行った。その結果、Fig. 26 に示したように抗 bFGF 抗体は 220 kDa、抗 PDGF 抗体は 107 kDa の栓球抽出物中のタンパク質と交差反応を示すことがわかった。しかし、遺伝子クローニングされたニワトリ bFGF の塩基配列から予想されるタンパク質は約 20 kDa であり、抗 bFGF 抗体と交差反応を示したバンドと比較して高分子であった。また、PDGF もまた、哺乳類 PDGF が約 20 kDa であり、やはり栓球抽出物中に検出されたタンパク質は高分子であった。哺乳類では、bFGF や PDGF は細胞から産生され放出されるとすぐに α 2-マクログロブリンといった巨大タンパク質と複合体を形成し、実際の分子量よりも高分子で検出されることが知られており [64, 65]、ニワトリの場合も同様に別のタンパク質と複合体を形成しているのかもしれない。いずれにしろ、異種動物間で交差性が明らかではない抗体では、非特異的反應の可能性も十分に考えられ、免疫学的な手法を用いることの限界を示していると思われる。

ところで、本研究では種々の細胞を栓球抽出物と放出物を添加して培養した場合、細胞増殖の促進活性以外に、強力な細胞接着促進活性が認められた。この活性は通常、細胞増殖因子にはない活性であることから、栓球中に細胞接着因子の存在が示唆される。細胞接着因子は *in vivo* では細胞外マトリクスとして機能し、*in vitro* では培養用基質に対する細胞接着を促進し、また同時に細胞増殖を促進する。この栓球中に存在する接着因子に関しては、第 4 章で詳細に解析した。

本章では、栓球中に複数種の細胞株に対する増殖因子の存在を生物活性の面から確認することができたが、免疫学的な手法ではその因子の同定を行うことができなかった。今後、栓球中の増殖因子を明らかにするためには活性を指標としたタンパク質精製や分子生物学的な解析方法を取入れる必要があると考えられた。

第 4 章 栓球無血清培養上清の細胞接着伸展活性と接着因子の同定

4-1 はじめに

第 3 章において、栓球無血清培養上清（栓球放出物）は種々の細胞に対する増殖促進活性だけではなく、培養開始直後に培養基質への著しい接着促進活性を有することが観察された。一般的に細胞増殖因子には細胞接着促進活性はなく、栓球には増殖因子とは別に細胞接着因子の存在が示唆された。

細胞接着には細胞が接着する相手によって大きく 2 つに分類される。接着する相手が細胞の場合には、細胞-細胞間接着と呼ばれ、相手が基質の場合には細胞-基質間接着と呼ばれる。栓球放出物中に含まれる接着因子は、基質への細胞接着を促進しているため、後者の細胞-基質間接着に分類される因子の存在が想定される。*in vivo*において基質とは一般的に細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) と呼ばれ、コラーゲン (collagen)、ラミニン (laminin)、フィブロネクチン (fibronectin) やビトロネクチン (vitronectin) など 20 種程が知られている。これらの接着因子は *in vitro* では培養器面と細胞の間で培養器面への細胞接着を促す役割をもつ。特にフィブロネクチンやビトロネクチンは血小板中に存在することが報告されており、血小板の凝集刺激に応じて血小板から放出される [66, 67]。フィブロネクチンやビトロネクチンは血漿中にも多量に存在するために、血小板中のこれらの接着因子の生理的意義については現在もなお不明な点が多いが、ニワトリ栓球中にもこれらの接着因子が存在することは容易に想像できる。

細胞接着因子は単に細胞と細胞同士を接着させたり、細胞を基質面に固定するだけの機能ではなく、細胞走化性、細胞情報伝達、細胞増殖、細胞分化、細胞認識と広範な生命現象に関与しており、その研究も莫大である。本研究においても、ニワトリ栓球中の増殖因子を解明する上で、接着因子の存在を明らかにすることは重要であり、増殖因子とともに生体内における栓球の機能を明らかにするための新しい知見を提供できるものと思われる。

そこで本章では、栓球中に存在する細胞接着因子の生物活性の測定を行い、免疫学的手法を用いた接着因子の同定、並びに栓球からの接着分子の放出機構の解析を行った。

4-2 材料と方法

(1) 供試動物

本研究には、白色プリマスロック成鶏を用いた。

(2) 供試細胞

本研究には、第 3 章、Table 5 に示した 6 種の細胞株のうち SP2/0 を除く 5 種の細胞株および CEF と、それぞれの細胞に適した基礎培地を使用した。供試細胞はすべて 5% もしくは 10% FBS を含む基礎培地で継代培養したものを扱い、CEF は 38.5℃、5% CO₂ 条件下で、哺乳類由来細胞株は 37℃、5% CO₂ 条件下で培養した。また、培養には CO₂ インキュベーターを使用した。なお、CEF は孵卵 10 日後の SPF 卵（ゲンコーポレーション株式会社から分与）の胚から調製し、その方法は第 3 章に記載した方法と同様におこなった。また、末梢血栓球は第 2 章の方法に準じて調製した。

(3) 供試抗体および抗原

本研究には、お茶の水女子大学理学部の林正男助教授から分与された精製ニワトリビトロネクチンと市販の精製ニワトリフィブロネクチン（Biomedical Technologies）、およびそれぞれの接着因子に対するウサギポリクローナル抗体を使用した。また標識抗体として、FITC 標識抗ウサギ IgG+M (H+L)抗体（Kirkegarrrd and Perry Laboratories）および AP 標識抗ウサギ IgG+M (H+L)抗体（Kirkegarrrd and Perry Laboratories）を使用した。

(4) 栓球放出物

栓球放出物の作成には、第 3 章に記述したように 1×10^8 cells/ml となるように血清不含 MEM に浮遊させ、38℃ CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養し、その培養上清を回収した。回収した培養上清には、直ちに 100 mM PMSF を 1/100 溶加えて冷却し、細胞を遠心により除去した。遠心後、Dye-binding assay キットを用いてタンパク量を測定し、小分けして後、使用時まで -80℃ に保存し、この上清を栓球放出物として供試した。また、保存は最長で 2 週間とした。

(5) 細胞接着活性

種々の細胞に対する栓球放出物の細胞接着・伸展活性は，栓球放出物をタンパク濃度で 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む血清不含培地で細胞培養し，経時的に細胞を倒立型位相差顕微鏡 (IMT-2, オリンパス) 下で観察した。

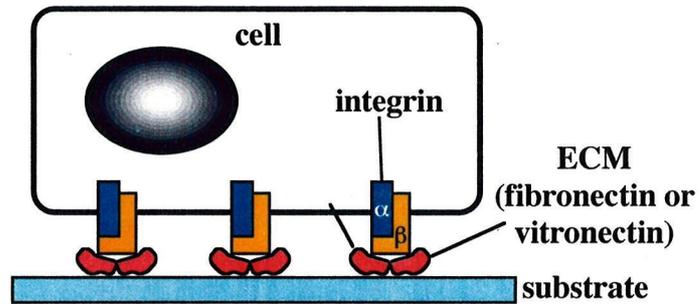
CEF に対する栓球放出物の細胞接着活性測定は，Vilcek らのアミドブラック 10B (amido black 10B) を用いた染色法 [68] を一部変更して行った。栓球放出物は 0~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，精製ニワトリフィブロネクチンとビトロネクチンは 0~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 96 ウエルプレートに 50 μl ずつ添加して，37°C で 1 時間インキュベートした。1 時間後，プレートを PBS で 3 回洗浄した。次に細胞のプレート面への非特異的接着を防ぐために，1% ウシ血清アルブミン (BSA, bovine serum albumin) -PBS を各ウエルに 100 μl ずつ添加して 37°C，30 分間インキュベートした。インキュベート後，プレートを PBS で 3 回洗浄した。1 \times 10⁵ cells/ml に調製した CEF をウエルあたり 100 μl 添加して，37°C，5% CO₂ 条件下で培養した。細胞は培養開始 30 分から 4 時間まで培養し，血清不含培地で各ウエルを軽く洗浄し，接着していない細胞を除去した。次に，10% ホルマリン，9% 酢酸，0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液をウエル当たり 50 μl ずつ加え，室温で 15 分間細胞の固定を行った。15 分後固定液を除去し，0.05% アミドブラック 10B，9% 酢酸，0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液をウエル当たり 50 μl ずつ加え，室温で 30 分間細胞の染色を行った。染色後，各ウエルは蒸留水でよく洗浄し，乾燥後，50 mM NaOH を各ウエルに 100 μl ずつ添加し，よく攪拌した。攪拌後，マイクロプレートリーダー (Bio-Tek) を用いて，測定波長 540 nm，参照波長 630 nm の 2 波長を測定した。測定結果は 5 ウエルの同一条件の測定値の平均値および標準偏差を算出した。なお，本方法は予備試験として細胞数と吸光度の相関を試験し，1 \times 10³ から 2 \times 10⁴ 個の細胞数の範囲内で高い相関 ($n=40$, $r=0.998$, $p<0.001$) が得られた。

(6) 細胞接着阻害試験

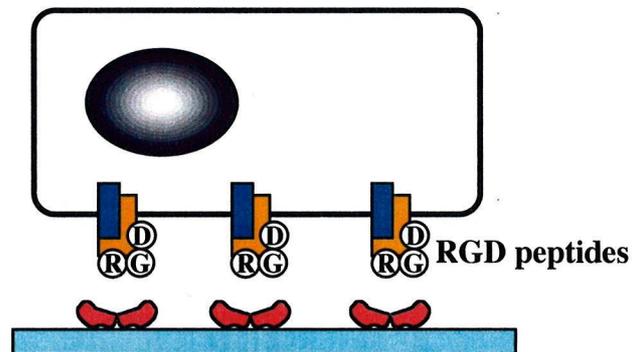
細胞接着阻害試験は，合成ペプチドを用いた受容体ブロック法と抗体を用いたりガンドブロック法の 2 つの方法を用いて行った。また，その阻害様式を Fig. 27 に示した。

フィブロネクチンやビトロネクチンは，インテグリンと称される受容体ファミリーと結合することで細胞に対して接着活性を発揮する。1984 年に

A. Cell attachment of ECM



B. Inhibition of cell attachment by RGD peptides



C. Inhibition of cell attachment by anti-ECM antibodies

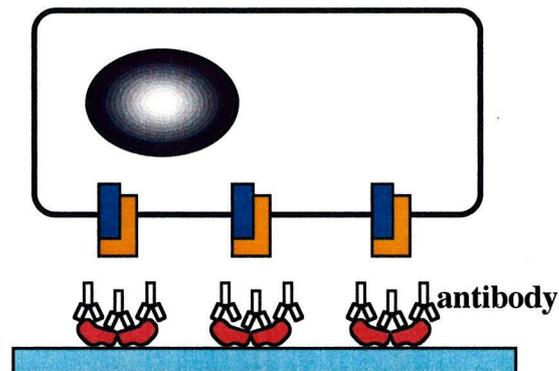


Fig. 27. Inhibition of cell attachment by RGD-peptides or anti-ECM antibodies

The linkage of the extracellular matrix (ECM, e. g. fibronectin, vitronectin etc.) to the cell requires transmembrane cell adhesion proteins, integrin, that act as matrix receptors and tie matrix to the cell's cytoskeleton. Short peptides containing RGD sequence can compete with both fibronectin and vitronectin for the binding site on cells, thereby inhibiting the attachment of the cells to ECM. Anti-ECM antibodies also inhibited the attachment of the cells to ECM.

Pierschbacher ら [69]は、フィブロネクチンやビトロネクチンのアミノ酸配列の中で、インテグリンに結合する際に重要な4つのアミノ酸 (Arg-Gly-Asp-Ser, RGDS) を特定した。さらに、合成された RGD ペプチドは単独で細胞接着を促進すること、また細胞浮遊液に合成 RGD ペプチドを添加しておくこと、細胞側のインテグリンの結合領域がブロックされて、フィブロネクチンやビトロネクチンをコートしたプレートに接着できないことがわかっている (Fig. 27B)。そこでこの原理を利用して細胞接着阻害試験をおこなった。その方法は本章 4-2 材料と方法(5)の細胞接着活性をアミドブラック 10B 染色法で測定する際に、最初の CEF の細胞浮遊液に 0.85 M 合成 GRGDSP ペプチド (岩城硝子) と対照として同濃度の合成 GRGESP ペプチド (岩城硝子) を添加して行った。それ以外の部分はアミドブラック 10B 染色法と同様に行った。

リガンドブロック法は、フィブロネクチンもしくはビトロネクチンに対するポリクローナル抗体を用いて行った。タンパク質濃度で 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の栓球放出物を 96 ウエルプレートに 50 μl ずつ添加して、37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間インキュベートした。1 時間後、プレートは PBS で 3 回洗浄した。その後、100~10,000 倍に希釈したそれぞれの抗体を 50 μl ずつ添加して、37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間インキュベートした。次にアミドブラック 10B 染色法で測定する際と同様の方法で 1% BSA-PBS でブロック操作を行い、細胞数をアミドブラック染色による相対値で測定した。なお、対照実験として、上記実験と合わせて、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で同様にコートしたフィブロネクチンプレートとビトロネクチンプレートを使用した。また、対照実験では、抗体を反応させていない条件から得られた値を接着率 100%とした割合で示した。

(7) ウエスタンブロッティング法

栓球放出物中に存在する細胞接着因子を同定するために、フィブロネクチンもしくはビトロネクチンに対するポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティング解析を行った。方法は第 2 章に記載した方法に準拠して行い、試料には栓球放出物をレーン当たり 10 μg 添加できるように調製し、SDS-PAGE は 6%もしくは 10%ポリアクリルアミドゲルで行った。一次抗体には抗フィブロネクチンもしくは抗ビトロネクチン・ウサギポリクローナル抗体を 3,000 倍希釈で使用し、検出抗体には 1,000 倍希釈の AP 標識抗ウサギ Ig 抗体を使用した。また、検出には化学発光法を利用したスマイライト・ウエスタンブロッティ

ングキット（住友金属）を用いて行った。

(8) 蛍光抗体法

栓球中に存在する細胞接着因子を同定するために、フィブロネクチンもしくはビトロネクチンに対するポリクローナル抗体を用いて間接蛍光抗体法を実施した。分離した末梢血栓球をカバースリップ上にスメアーし、冷アセトンで -20°C 、10分間の固定か、もしくは3.7%ホルマリン-PBSで5分間固定したスメアーを準備した。固定後、カバースリップはPBSで洗浄し、ホルマリン固定した試料は、細胞質検出には0.1% Triton-X100-PBSで5分間反応させ、細胞膜検出はそのまま使用した。抗体は1% BSA-PBSで100倍に希釈したそれぞれのポリクローナル抗体を使用し、湿潤箱内で 37°C 、1時間反応させた。反応後、1% BSA-PBSで3回洗浄し、1% BSA-PBSで50倍に希釈したFITC標識抗ウサギIg抗体をマウントし、湿潤箱内で 37°C 、30分間反応させた。反応後、1% BSA-PBSで3回洗浄し、試料は落射型蛍光顕微鏡（BX50, オリンパス）で観察した。

(9) サンドイッチ ELISA 法

栓球から放出されるフィブロネクチン量を定量するために、フィブロネクチンのゼラチン高親和性を利用したサンドイッチ ELISA を行った。その方法は Ruoslahti らの方法 [70] を一部改変して行った。定量には栓球放出物と1% NP-40-PBSもしくは1% Triton-X100-PBSで 2×10^8 個の栓球を可溶化したものを使用した。いずれの試料も回収後直ちに終濃度で0.1 mM PMSF と10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin を添加し、細胞内プロテアーゼを阻害した。

また、栓球を凝集惹起因子で刺激した際に放出されるフィブロネクチン量を定量した。分離した末梢血栓球は2 mM CaCl_2 -PBSに 2×10^8 cells/mlとなるように浮遊させて、シリコナイズ処理した1.5 ml チューブに1 ml ずつ分注した。それぞれのチューブに終濃度で5 units/ml ウシトロニン、2 mM セロトニンおよび20 μM カルシウムイオノフォア A23187 を別々に添加し、穏やかに攪拌して 38°C 恒温槽内でインキュベートした。経時的にチューブを回収し、直ちに終濃度で1 mM PMSF と10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin を添加した後、遠心により細胞を除去し、その上清を別のチューブに回収した。

サンドイッチ ELISA には3 $\mu\text{g/ml}$ ゼラチン-0.1 M sodium carbonate buffer (pH

9.5) を 96 ウェルプレートにウェル当たり 100 μl ずつ添加して、室温で一昼夜コートものを使用した。プレートは使用前にゼラチン溶液を除去して、0.15% Tween-20-PBS で軽く洗浄した。洗浄後、0.03~1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製した精製ニワトリフィブロネクチンと試料をウェル当たり 100 μl 加え、室温で 3 時間反応させた。反応後、0.15% Tween-20-PBS で各ウェルを 3 回洗浄し、洗浄液を除去後、5,000 倍に PBS で希釈した抗ニワトリフィブロネクチン抗体をウェル当たり 50 μl ずつ添加した。抗体反応は 37°C で 1 時間行い、反応後、0.15% Tween-20-PBS で各ウェルを 5 回洗浄した。洗浄液を除去した後、PBS で 3,000 倍に希釈した HRPO 標識抗ウサギ Ig 抗体をウェル当たり 50 μl ずつ添加し、37°C で 1 時間反応させた。発色反応は *o*-フェニレンジアミンを用いて 10 分間行い、492 nm の吸光度をマイクロプレート・リーダー (Bio-Tek) で測定した。なお、測定は 3 ウェルの同一試料について行い、測定値は平均値と標準偏差を算定した。また、精製フィブロネクチンを試料とした場合には、測定値から標準曲線と相関係数を決定した。

4-3 結果

(1) 種々の培養細胞に対する栓球放出物の細胞接着促進効果

栓球放出物 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む無血清培地で種々の培養細胞を培養し、経時的に顕微鏡下で観察した。その結果、すべての細胞は栓球放出物存在下で速やかに培養面に接着することが観察された。また、培養1時間後にはCHOとHeLaを除く細胞で細胞伸展の促進が観察された (Fig. 28)。また、その活性はCEFとVeroで特に顕著であった。

(2) CEFを用いた細胞接着促進活性の測定

栓球放出物中に種々の細胞に対する細胞接着・伸展促進活性が認められたことから、次にニワトリ由来細胞であるCEFを用いて、細胞接着促進活性の測定を行った。(1)の実験では通常の培養系に栓球放出物を添加して培養しているため、栓球放出物を含まない培養系においても培養面の特性から細胞の接着が起きることもあり、顕微鏡観察では客観的な結果が得られにくい。そこで、栓球放出物中にフィブロネクチンなどのECMが存在するのであれば、栓球放出物成分を培養液に直接添加するのではなく、培養器面にコートできると考えた。また、培養器面へのコートが可能であれば、コート後BSAなどの接着活性を持たないタンパク質で培養器面をブロックすることで、培養器面への非特異的な細胞接着を排除した状態で客観的に測定できる。そこで、まず栓球放出物を種々の濃度で培養用プレートにコートし、BSAでブロック後の細胞接着をアミドブラック10B染色法で測定した。その結果、Fig. 29に示したように、栓球放出物を含まないプレート上でも細胞の接着は認められたものの、栓球放出物コートプレートではタンパク濃度で50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで濃度依存的に細胞接着が増加し、それ以降プラトーに達することがわかった。そこで以降の実験には、栓球放出物を50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のタンパク濃度でコートしたプレートを使用した。次に、栓球放出物コートプレート上におけるCEFの細胞接着を経時的に測定した。その結果、Fig. 30に示したように、栓球放出物をコートしていないBSAコートプレートでは、培養開始15分で細胞が接着し、以後接着細胞数は増加しなかった。これに対して、栓球放出物コートプレートでは、15分間の培養時間からすでにBSAコートプレートを上回る接着細胞数が測定され、60分まで増加することがわかった。また、60分後にはBSAコートプレートの約3倍の細胞が栓球放

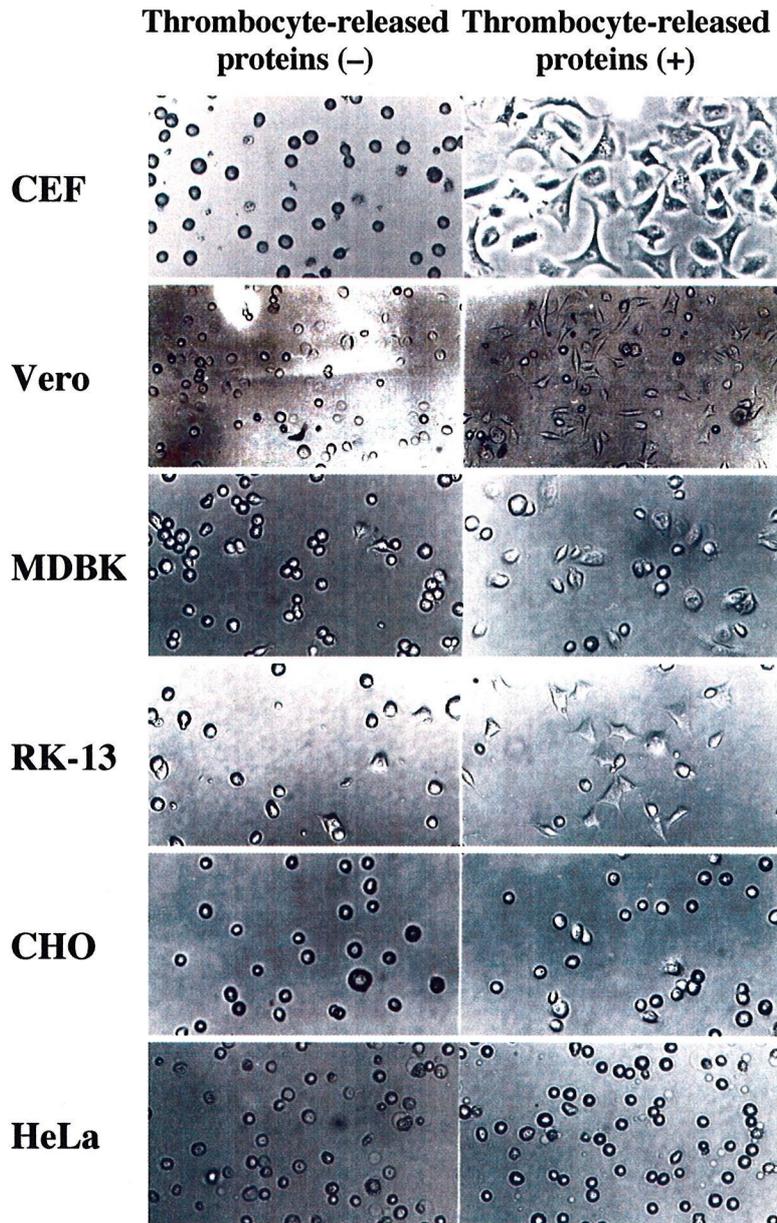


Fig. 28. Phase-contrast micrograph of various mammalian derived cell line cultures with 50 μg protein/ml of thrombocyte-released proteins

Cell lines were seeded in culture dishes in media with (+) or without (-) thrombocyte-released proteins (50 μg protein/ml). The micrographs were taken at 1 hour after seeding.

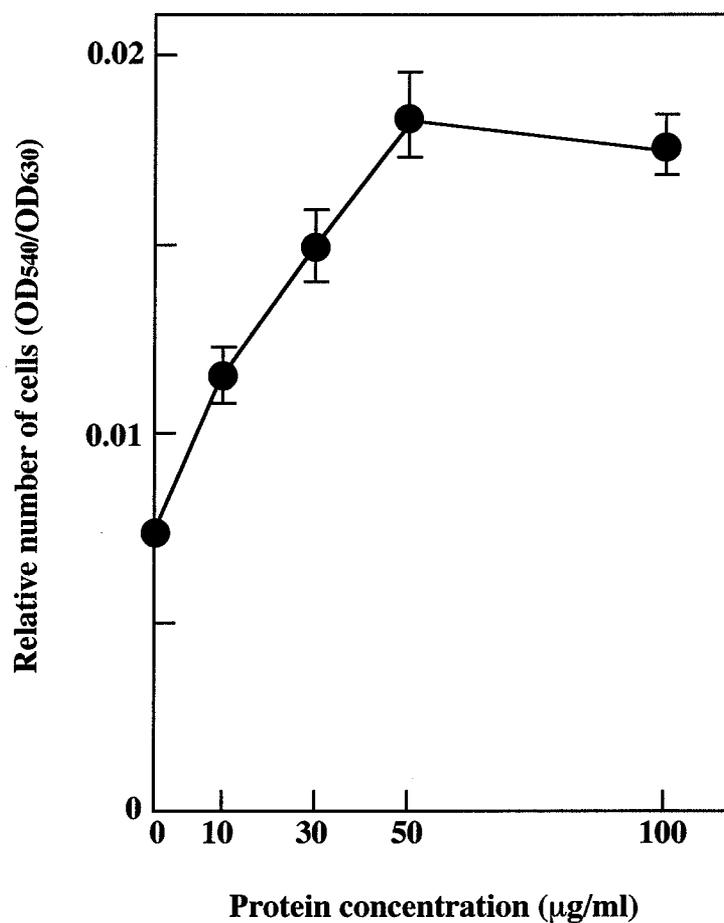


Fig. 29. Cell attachment assay by different concentrations of thrombocyte-released proteins

CEF cells were seeded in 96-well plates in MEM with thrombocyte-released proteins (0–100 µg protein/ml). The relative number of cells was determined by amido black 10B staining method at 1 hour after seeding. The results were presented as mean \pm SD (n=5).

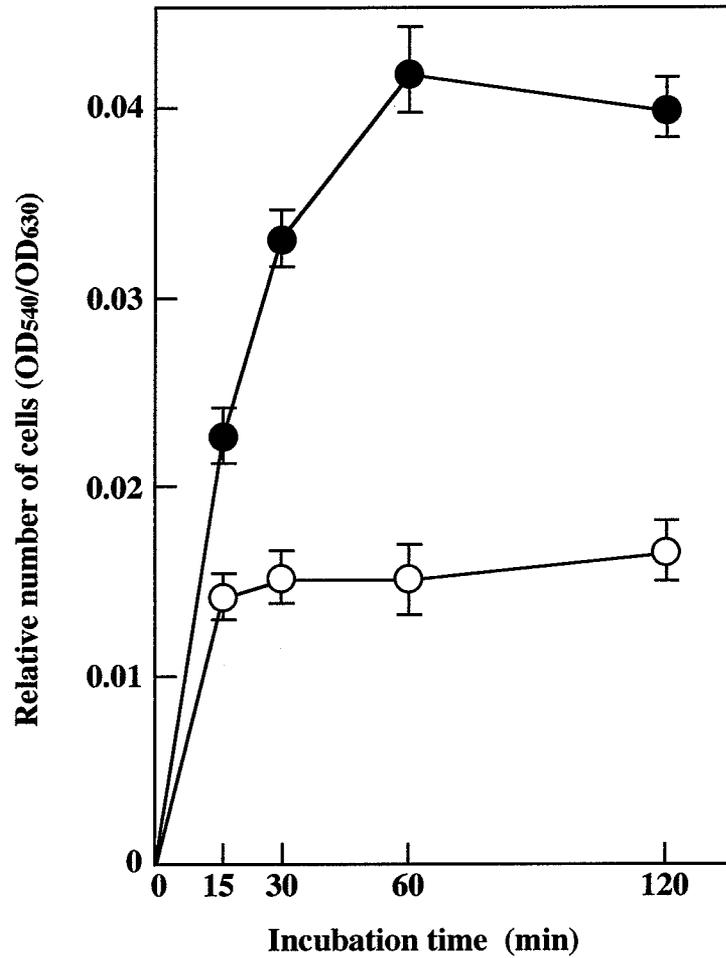


Fig. 30. Time kinetics in cell attachment activity of thrombocyte-released proteins

CEF cells were seeded in 96-well plates coated with thrombocyte-released proteins (●) or BSA (○). The relative number of cells was determined by amido black 10B staining method after seeding. The results were presented as mean \pm SD (n=5).

出物コートプレートに接着していることがわかった。

(3) 合成ペプチドを用いた細胞接着阻害試験

栓球放出物中に存在する接着因子を特定するために、接着因子中に RGD 配列が存在するかどうか試験した。その結果、Fig. 31 に示したように、栓球放出物コートプレートにおける CEF の接着促進活性は GRGESP ペプチドでは阻害されず、GRGDSP ペプチドの添加により阻害されることがわかった。この結果は、栓球放出物中に存在する接着因子が RGD 配列に関連した接着因子であることを示している。

(4) 栓球放出物中の接着因子のウエスタンブロッティング解析

栓球放出物中に存在する接着因子を免疫学的に同定するために、栓球放出物とニワトリフィブロネクチンおよびビトロネクチンに対するポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティング解析を行った。

その結果、抗フィブロネクチン抗体を用いた解析では、栓球放出物中に血漿フィブロネクチンを示す約 220 kDa (Fig. 32-A1) とほぼ同じ位置に抗体と反応するバンドが検出された (Fig. 32-A2)。抗ビトロネクチン抗体を用いた解析では、ニワトリ血漿に存在するビトロネクチンを示す約 70kDa (Fig. 32-B3) とほぼ同じ位置に抗体と反応するバンドが検出された (Fig. 32-B2)。以上の結果は、栓球放出物中にフィブロネクチンとビトロネクチンが存在することを示している。

(5) 抗体を用いた細胞接着阻害試験

RGD 配列に関連した接着因子で、血小板中に存在する接着因子にはフィブロネクチンやビトロネクチンがあげられる。そこで次に、ニワトリフィブロネクチンおよびビトロネクチンに対するポリクローナル抗体を用いた接着阻害試験を行い、接着活性因子の特定を行った。はじめに、使用したポリクローナル抗体が、特異的にフィブロネクチンやビトロネクチンの細胞接着を阻害するかどうか、フィブロネクチンもしくはビトロネクチンコートプレートを用いて接着阻害試験を行った。その結果、Fig. 33 に示したようにいずれの抗体も、10,000 倍希釈抗体の添加では接着阻害が認められなかったものの、反応させる抗体濃度を高めることで細胞接着阻害効果が認められ、100 倍希釈抗体を使用するこ

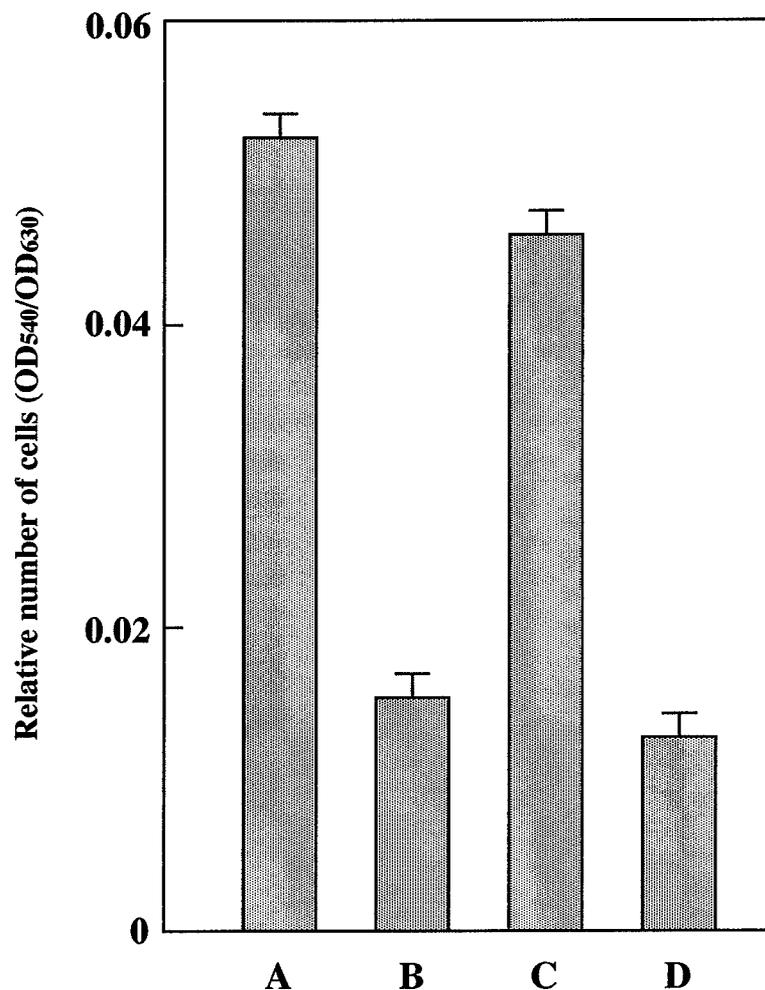


Fig. 31. Inhibition of cell attachment activity of thrombocyte-released proteins by RGD-containing peptide

After distribution into each of the microculture wells coated with thrombocyte-released proteins (A-C) or BSA (D), CEF cells were incubated without (A) or with the synthetic peptides, GRGDSP (B) and GRGESP (C) and cell attachment activities were then measured by amido black 10B staining method. The results were presented as mean \pm SD (n=5).

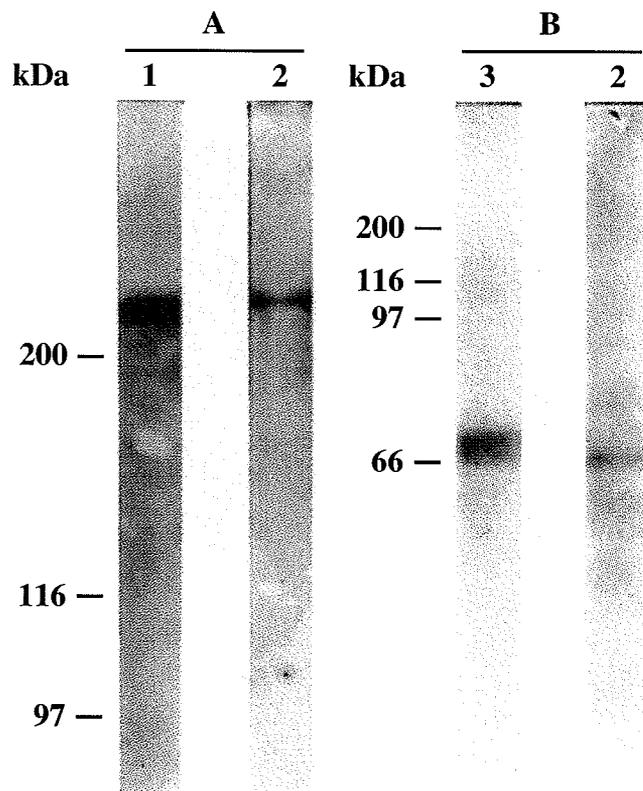


Fig. 32. Western blotting analysis of purified chicken plasma fibronectin (1), thrombocyte-released proteins (2) and chicken plasma (3) by using anti-chicken fibronectin antibody (A) and anti-chicken vitronectin antibody (B)

The samples were subjected to electrophoresis on a 6% (A) or 10% (B) polyacrylamide slab gel containing 0.1% SDS under reducing conditions. The protein molecular weight markers are shown on the left.

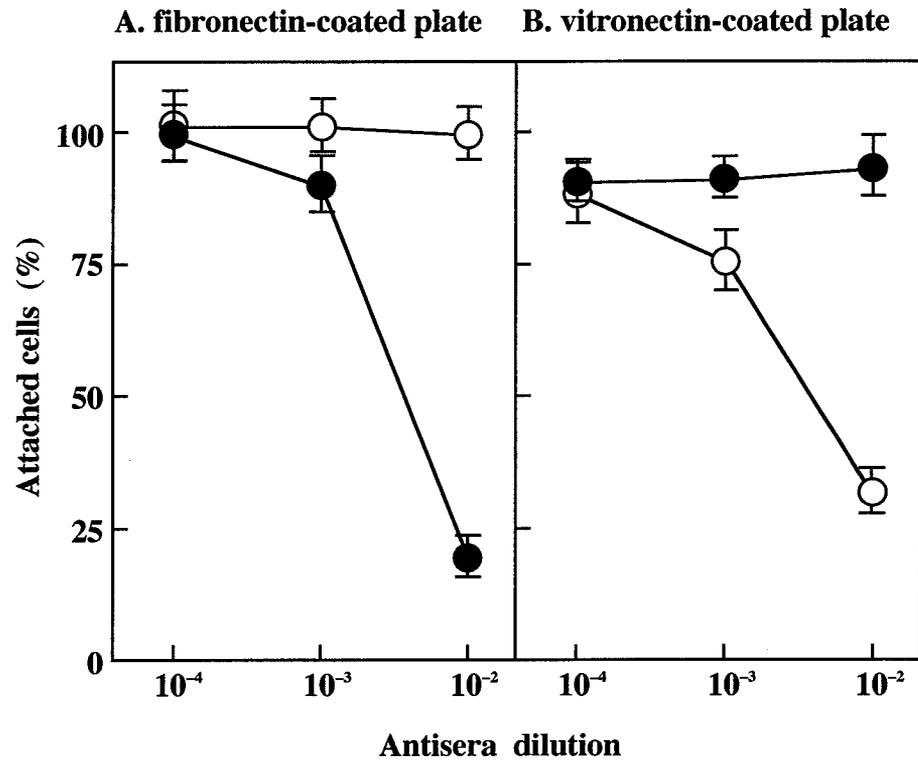


Fig. 33. Inhibitory effect of antibodies against chicken fibronectin and vitronectin on cell attachment

Serial diluted anti-fibronectin serum (●) or anti-vitronectin serum (○) was added to culture wells of plate coated with fibronectin (A) and vitronectin (B), and the plates were incubated for 1 hr at 37°C. After rinsing extensively, CEF cells were distributed into each well of the plates and incubated for 2 hr at 37°C. The attached cells were then measured by amido black 10B staining method. Percentage of attached cells was calculated as (OD540 value of the staining cells with antiserum/OD540 value of the staining cells without antiserum) x100. The results were presented as mean ± SD (n=5).

とで 50%以上の細胞が抗体特異的に接着阻害を受けることがわかった。そこで次に、栓球放出物コートプレートと 100 倍希釈の抗フィブロネクチンもしくはビトロネクチン抗体を使用して、CEF の接着阻害試験を行った。その結果、Fig. 34 に示したように、栓球放出物の細胞接着促進効果は抗ビトロネクチン抗体では阻害を受けないものの、抗フィブロネクチン抗体では陽性対照実験 (Fig. 33) の場合と同様、100 倍希釈濃度で強い接着阻害効果を示すことがわかった。以上の結果は、栓球放出物の細胞接着促進活性の 1 つはニワトリフィブロネクチンによる効果であることを示している。

(6) 栓球中フィブロネクチンおよびビトロネクチンの免疫蛍光観察

ここまでの研究から、栓球放出物中の細胞接着活性はフィブロネクチンによるものであることが判明したが、栓球放出物中にはフィブロネクチンもビトロネクチンもともに含まれていることが明らかとなった。そこで、栓球のフィブロネクチンやビトロネクチンの局在を解析するために、抗体を用いた免疫蛍光法を実施した。その結果、Fig. 35 に示したように、栓球中にフィブロネクチンおよびビトロネクチンの存在を示すそれぞれの抗体の陽性蛍光像が認められた。しかし、フィブロネクチンの局在は細胞質全体に広がっているのに対して、ビトロネクチンの局在は細胞膜や凝集した細胞同士が接する細胞膜領域に強く認められることがわかった。また、蛍光強度も抗フィブロネクチン抗体を使用した方が強いことがわかった。以上の結果は、回収直後の栓球において栓球フィブロネクチンは細胞質中に存在し、栓球ビトロネクチンは細胞膜周辺に局在していることを示している。

(7) 栓球フィブロネクチンの潜在的存在量と放出量の解析

栓球細胞質中にフィブロネクチンの存在を示す強い免疫蛍光像が得られたことから、次にこの栓球フィブロネクチンの放出機構を解析した。まず、フィブロネクチンが強いゼラチン親和性を有することを利用した定量的サンドイッチ ELISA の有効性を試験した。ゼラチンを固相化したプレート上に精製ニワトリフィブロネクチンを種々の濃度で添加し、吸着したフィブロネクチンを ELISA 法で検出し、得られた吸光度と添加したフィブロネクチン量を相関させたところ、Fig. 36 に示したように相関係数が 0.995 と高い相関が得られ、試験した 0.03 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間であれば試料中のフィブロネクチン量が算出できることが明ら

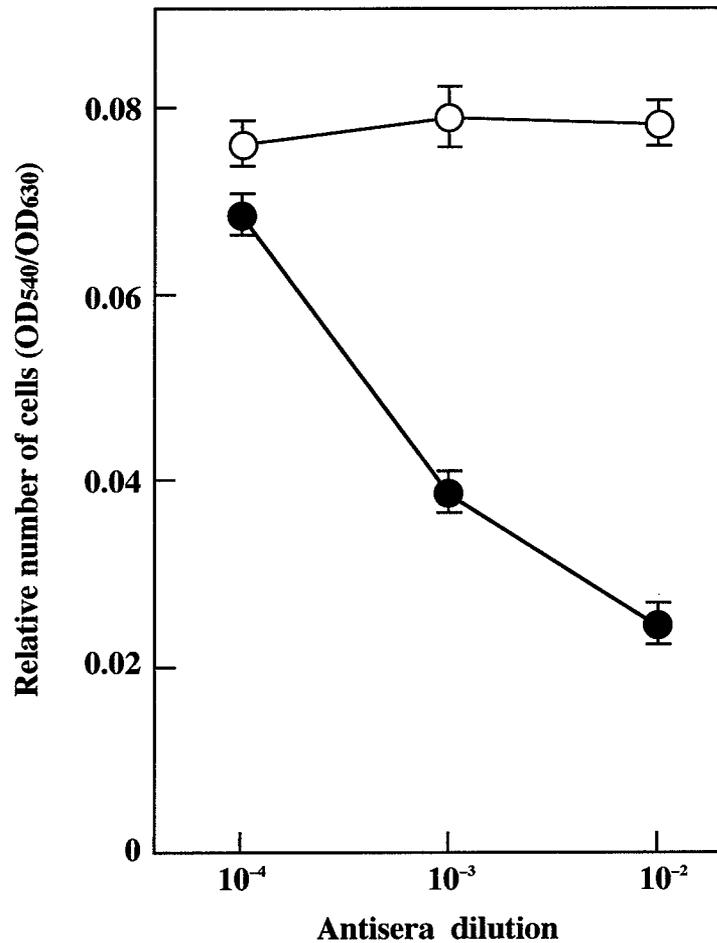


Fig. 34. Inhibitory effect of antibodies against chicken fibronectin and vitronectin on cell attachment

Serial diluted anti-fibronectin serum (●) or anti-vitronectin serum (○) was added to culture wells of plate coated with thrombocyte-released proteins (50 μg protein/ml), and the plates were incubated for 1 hr at 37°C. After rinsing extensively, CEF cells were distributed into each well of the plates and incubated for 2 hr at 37°C. The attached cells were then measured by amido black 10B staining method. The results were presented as mean ± SD (n=5).

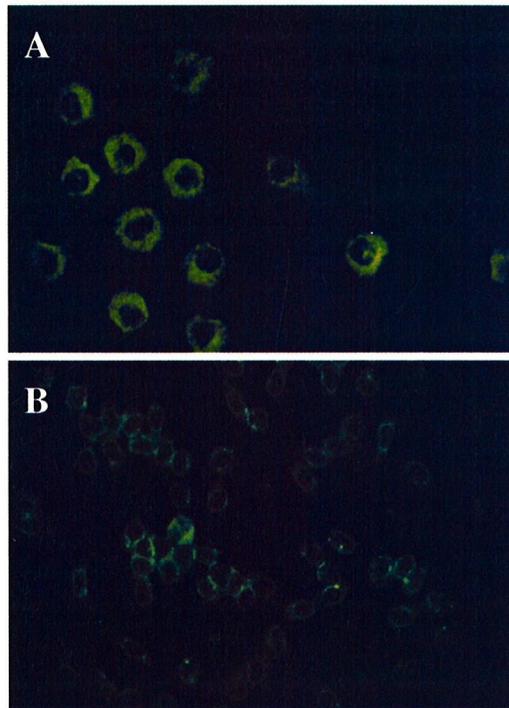


Fig. 35. Localization of fibronectin (A) and vitronectin (B) in chicken thrombocytes by indirect immunofluorescent test

Acetone-fixed thrombocytes were stained with anti-chicken fibronectin antibody and FITC-conjugated anti-rabbit Ig (A). Formaldehyde-fixed thrombocytes were stained with anti-chicken vitronectin antibody and FITC-conjugated anti-rabbit Ig (B).

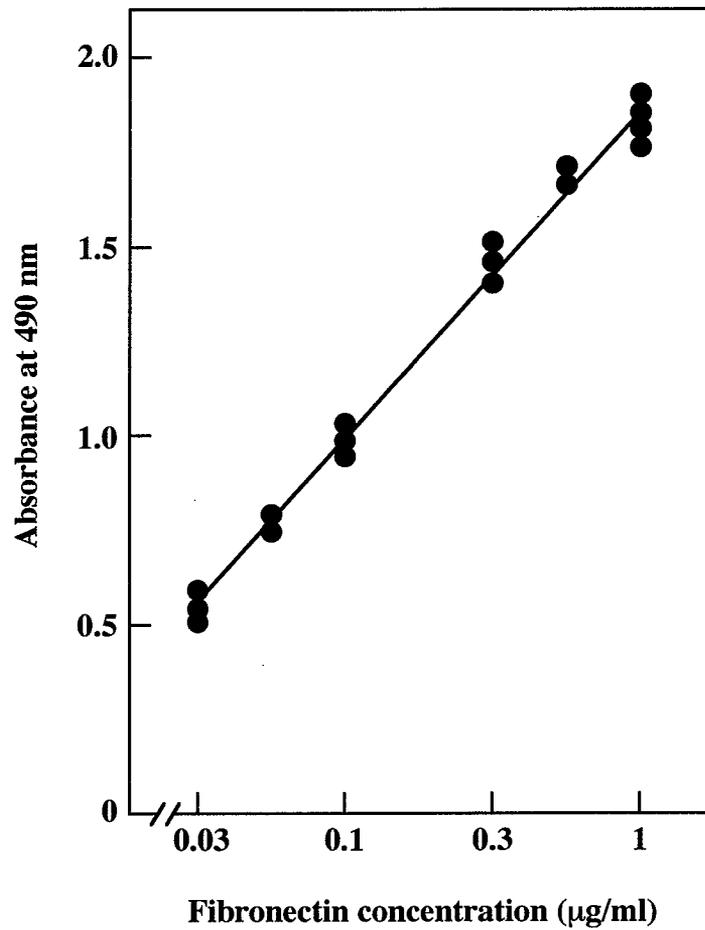


Fig. 36. Quantitation of fibronectin by binding to gelatin

A standard binding curve was obtained with increasing amounts of chicken fibronectin in gelatin-coated 96-well plate. Anti-chicken fibronectin antibody and HRPO-labeled anti-rabbit Ig were used to detect the bound fibronectin. (n=30, r=0.995, p<0.001).

かとなった。

次に、栓球を可溶化した試料と栓球放出物質に含まれるフィブロネクチン量を定量した。その結果、可溶化栓球中には $0.55 \pm 0.12 \mu\text{g}/1 \times 10^8$ 栓球 ($n=10$) のフィブロネクチンが検出された。また、栓球放出物中には $0.45 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n=5$) の濃度でフィブロネクチンが検出された。そこで、栓球無血清培養条件下でのフィブロネクチンの放出量をトロンビン存在下と非存在下で経時的に比較した。その結果、Fig. 37 に示したようにトロンビン非存在下で培養した栓球から 120 分後までフィブロネクチンの放出量が徐々に増加し、その放出量は $0.414 \pm 0.004 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n=5$) に達していた。さらにトロンビン存在下では 30 分後以降に放出量が激増し、その量は $0.773 \pm 0.004 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n=5$) に達することがわかった。以上の結果から、凝集惹起因子であるトロンビンで栓球を刺激することで、栓球中のフィブロネクチンの放出が促進されることがわかった。しかし、この実験条件は栓球放出物を回収する方法にトロンビンを添加しているために、培養面への栓球の吸着 (Fig. 20) など、トロンビン以外の要因も含まれた結果となっている。また、放出されたフィブロネクチンが培養器面へ吸着することも考えられる。そこで次に、培養器面への接着などが無い状態で種々の凝集惹起因子によるフィブロネクチンの放出量を検討するために、シリコンコート処理を施したプラスチックチューブ内でフィブロネクチン放出実験を行った。その結果、Fig. 38 に示したようにトロンビンで刺激した栓球からは添加 10 分後に $0.685 \pm 0.005 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n=3$) のフィブロネクチンが放出されることがわかった。その後、トロンビンで刺激した栓球上清中のフィブロネクチンは $0.273 \pm 0.003 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n=3$) まで減少した。一方、他の凝集惹起因子の添加では、トロンビン添加程多くのフィブロネクチンの放出は起こらず、イオノフォア A23187 の添加で 10 分後に $0.226 \pm 0.003 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n=3$) の最大放出量が認められ、逆にセロトニンの添加では凝集惹起因子非添加の場合よりもフィブロネクチンの放出が抑制されていた。また、トロンビン以外の凝集惹起因子添加群と非添加群では 5 分後に放出されたフィブロネクチン量が 30 分後まで変化しなかった。

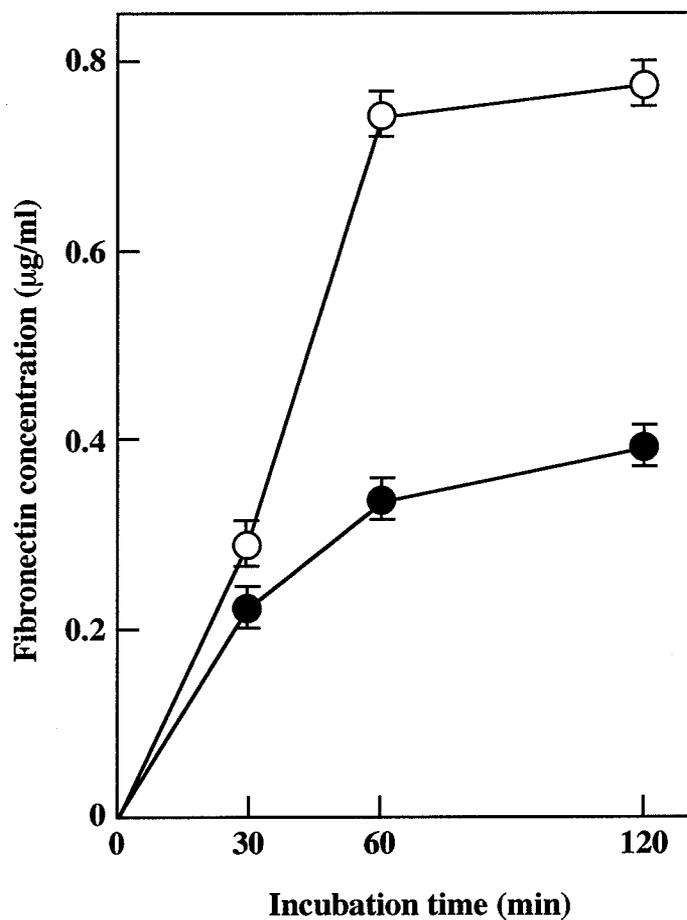


Fig. 37. Release of fibronectin from chicken thrombocytes by thrombin stimulation

Chicken fibronectin from thrombocyte cultures with (○) or without (●) thrombin was measured using a sensitive ELISA. The results were presented as mean \pm SD (n=3).

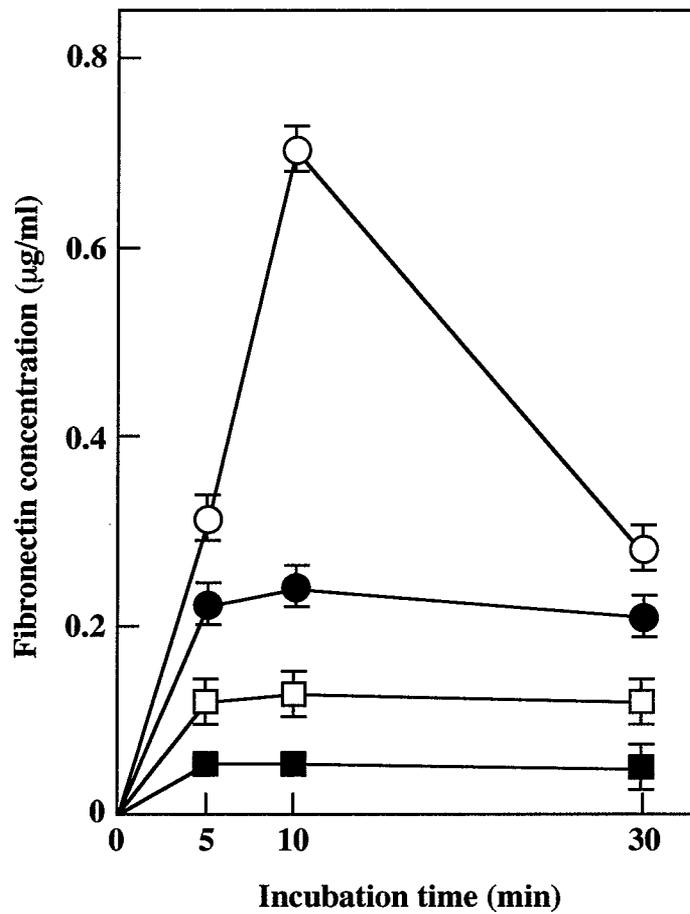


Fig. 38. Release of fibronectin from chicken thrombocytes by various aggregating agents

Chicken fibronectin from thrombocyte cultures with carboxyl ionophore A23187 (●), thrombin (○) or serotonin (■), or without agents (□) was measured using a sensitive ELISA. The results were presented as mean \pm SD (n=3).

4-4 考察

本章では、栓球放出物中に存在する細胞接着因子を明らかにすることを目的に栓球放出物質の接着促進活性と阻害試験から接着因子の絞り込みを行い、最終的に免疫学的手法を用いることで、栓球放出物並びに栓球中に ECM のひとつであるフィブロネクチンとビトロネクチンが存在することを明らかにした。

接着性の培養細胞の継代は、継代毎に低濃度のトリプシンや EDTA で細胞を培養器面から剥離させ、また細胞-細胞間結合を分離させて単一細胞までばらばらにして行う。その後、単一細胞は血清入り培地で培養器へ植えつぐと、細胞は速やかに培養器面に接着し、球型の細胞から伸展を始め、細胞分裂を開始する。通常の培養器は細胞が接着しやすいように表面が加工されており、また、血清中には種々の細胞接着因子が含まれており、これらの作用により、細胞は *in vitro* で継代維持されている。この ECM を介した細胞の接着様式は Fig. 27 に示したが、培養細胞における主要な接着因子は補体系の膜侵襲複合体 C5b-9 の細胞障害作用を阻害する因子として知られていた S タンパク質と同一であることがわかり、*in vitro* で細胞の接着を促す因子という意味からビトロネクチンと命名された [71]。また、血清中にはビトロネクチン以外にもフィブロネクチンも存在しており、これらが培養器面への細胞接着・伸展作用を担っていると考えられている。本章では、第 3 章において栓球放出物を添加して培養した種々の培養細胞において、接着伸展の著しい促進が観察されたことから、栓球放出物中に ECM 成分が含まれていることが予想された。

現在、ECM 成分には 20 種類もの因子が知られており、この中から栓球放出物に含まれる接着因子を同定することは困難である。しかし、哺乳類血小板中にはフィブロネクチンとビトロネクチンが共に存在し、トロンビンなど凝集刺激に応じて放出されることが知られていた [66, 67]。そこで、本章ではフィブロネクチンとビトロネクチンに焦点を絞り、解析をおこなった。フィブロネクチンやビトロネクチンはそのアミノ酸配列中に RGD 配列を有し、フィブロネクチンはインテグリンファミリーである VLA-5 受容体 ($\alpha 5/\beta 1$ のヘテロダイマー) と、ビトロネクチンは同じくインテグリンファミリーの $\alpha v/\beta 3$ のヘテロダイマーと結合する。これらのインテグリンと接着因子が結合する際に重要な領域が RGD 配列である。RGD 配列の最初の発見はフィブロネクチンの研究による。フィブロネクチンが発見された当時はまだそのリセプターであるイ

ンテグリンが詳細に解析されておらず、フィブロネクチンのどの領域が細胞接着に重要な部分かを競って解析していた。そして 1984 年に Pierschbacher ら [68]は、フィブロネクチンのアミノ酸配列の中でたった 3 つのアミノ酸配列である RGD 配列が細胞接着活性に重要な領域であることを見いだした。さらに RGD 配列を含む短い合成ペプチドは完全ではないものの、フィブロネクチンと細胞との結合を阻害すること、また RGD 配列を用いたアフィニティークロマトグラフィーによりフィブロネクチン受容体も明らかにされた。驚くべきことは、同時期に発見された別の接着因子であるビトロネクチン中にもこの RGD 配列が存在し、RGD 配列を含む短い合成ペプチドは、ビトロネクチンと細胞の結合をも阻害するというものであった [71]。その後、この RGD 配列はいろいろな生理活性物質中に存在することが明らかにされている。本章の実験でも、この RGD 配列を利用した細胞接着阻害実験を行い、RGD を含む合成ペプチドで栓球抽出物コートプレート上での細胞接着が阻害され (Fig. 31)、予想通り栓球抽出物中に細胞接着に関連した RGD 配列を持つフィブロネクチンやビトロネクチンといった細胞接着因子の存在を間接的に証明することができた。

そこで次に、栓球放出物中にフィブロネクチンやビトロネクチンが存在するかどうかを明らかにするために、これらの接着因子に対するポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティング解析を実施した。その結果、栓球放出物中にフィブロネクチンもビトロネクチンも存在することが明らかとなった (Fig. 34)。フィブロネクチンには血漿性フィブロネクチンと細胞性フィブロネクチンの 2 種が存在する [72]。血漿性フィブロネクチンの起源は肝臓であり、肝細胞により産生されたフィブロネクチンが血漿中に放出されたものである。この血漿性フィブロネクチンと細胞性フィブロネクチンを SDS-PAGE で比較すると、分子種の違いが明らかとなる。すなわち、血漿性フィブロネクチンと細胞性フィブロネクチンは選択的スプライシングにより、異なる分子量として発現される [73, 74, 75]。Fig. 39 にフィブロネクチンのドメイン構造とモジュール構造を示した。フィブロネクチンは、スプライシングの違いにより産生される A 鎖と B 鎖が C 末側でジスルフィド (S-S) 結合して約 460 kDa の巨大分子として存在する。A 鎖と B 鎖の違いは、RGD 以外の細胞接着に関係していることが知られる IIICS が B 鎖では欠失している点である。さらに、血漿性フィブロネクチンではモジュール構造のうち ED-A と ED-B が B 鎖で欠失している。そのため、A 鎖と B 鎖では分子量に差が生じ、還元条件下における SDS-PAGE では

A. Domain structure



B. Module structure

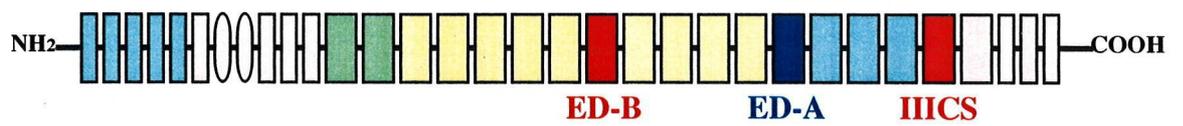


Fig. 39. Domain and module structure of fibronectin

約 220–230 kDa 付近に 2 本のバンドとして検出される。これに対して細胞性フィブロンネクチンは、ED-A と ED-B がともに発現しているかもしくは一方が欠失しているだけなので、SDS-PAGE 上では血漿性フィブロンネクチンの A 鎖の位置に一本のバンドで検出される。栓球放出物中で検出されたフィブロンネクチンは (Fig. 34A-2), 約 230 kDa 付近に単一のバンドとして検出されたことから、栓球に存在するフィブロンネクチンは細胞性であると考えられる。血小板中に検出されるフィブロンネクチンもまた、細胞性であることが証明されている [76]。一方、ビトロネクチンはそのアミノ酸配列から約 52 kDa と推定されるが、糖鎖付加の違いにより SDS-PAGE 上では 70 kDa 前後の分子として検出される。ニワトリ血漿から精製されたビトロネクチンは約 68 kDa 付近にブロードなバンドとして検出されたが、栓球放出物中から検出されたビトロネクチンはほぼ 68 kDa の位置に単一のバンドとして検出された。これは血漿ビトロネクチンと栓球ビトロネクチンで糖鎖付加が異なっているためかもしれない。

本研究では、栓球放出物中にフィブロンネクチンとビトロネクチンがともに存在することを明らかにした。しかし、栓球放出物をプレートにコートした際に認められる細胞接着活性はどちらによるものであるのか、もしくはそれ以外の接着因子も存在するかは不明である。細胞培養に用いる FBS 中にはフィブロンネクチンもビトロネクチンも存在するが、フィブロンネクチンを除いた血清でも細胞は接着伸展するのに対して、ビトロネクチンを除いた血清では細胞接着伸展が起こらないことから、FBS における細胞接着伸展活性はビトロネクチンの効果によることが知られている [77]。しかし、本研究ではフィブロンネクチンとビトロネクチンに対するそれぞれの抗体を用いた接着阻害試験を行った結果、栓球放出物コートプレートではフィブロンネクチンが CEF の細胞接着に寄与し、ビトロネクチンは細胞接着に寄与していないことがわかった (Fig. 34)。この FBS と栓球放出物の違いは、単純に栓球放出物に含まれるそれぞれの接着因子の量を反映したものかもしれないが、哺乳類とニワトリでは接着活性の強さに違いがある可能性も否定できない。事実、ニワトリビトロネクチンの糖鎖構造は哺乳類由来ビトロネクチンと大きく異なっていることがわかっており [78]、興味深い知見である。

栓球に由来するフィブロンネクチンとビトロネクチンは、その活性以外にも栓球中の局在にも大きな違いが認められた。Fig. 35 に示したように、フィブロンネクチンが栓球の細胞質全体に広く分布しているのに対して、ビトロネクチンは

主に細胞膜に観察された。また、ビトロネクチンは細胞同士が凝集した部位で特に強く発現していることがわかった。これらの結果は、フィブロネクチンは栓球の細胞内に蓄積された後放出されるが、一方ビトロネクチンは細胞膜リセプターに結合した状態で膜から分離していることが考えられる。血小板では、細胞内顆粒中にフィブロネクチンとビトロネクチンが蓄積されており、また血小板の活性化に伴い細胞膜上に存在するそれぞれのリセプターにも、両方の因子が結合することがわかっている [79, 80]。本研究で得られたフィブロネクチンとビトロネクチンの局在の知見は、血小板とは異なっているものの、血小板と同様の現象が起きているのかもしれない。栓球は血小板と異なり核を有しており、種々の刺激に応じてフィブロネクチンとビトロネクチンを合成している可能性もあり、今後、分子生物学的な解析が必要である。

ところで、哺乳類ではフィブロネクチンやビトロネクチンの簡易定量法が確立されており、血漿や血小板中に存在するこれらの接着因子量が算出されている。例えば、フィブロネクチンはゼラチン高親和性であることを利用して、ゼラチンコートプレートを利用したサンドイッチ ELISA 法により定量される [70]。すなわち、コートされたゼラチンに一定量のフィブロネクチンを結合させ、それを標識抗体法により検出し、その発色反応を標準フィブロネクチンの標準曲線から算出する。この方法を用いて、ヒト血漿中には約 0.3 mg/ml のフィブロネクチンが存在し [70]、血小板中には $2.85 \pm 1.24 \mu\text{g}/1 \times 10^9 \text{ cells}$ のフィブロネクチンが存在することが明らかとなっている [79]。また、ビトロネクチンの定量は、ビトロネクチンがフィブロネクチンと同じようにヘパリン高親和性領域を持っているものの、通常この領域が立体構造の中に隠れて露出していないために、2 抗体法が利用される。すなわち、ビトロネクチンに対する抗体をプレートにコートし、ビトロネクチンを抗体によって一定量結合させたのち異種動物由来の抗体で検出する方法である。この方法から血漿および血清中には約 0.2 mg/ml の濃度で、血小板中には $8.1 \pm 4.6 \mu\text{g}/1 \times 10^9 \text{ cells}$ のビトロネクチンが存在することが明らかとなっている [67]。ニワトリでは、これらの接着因子に対する抗体の種類が哺乳類に比べ極端に少ないため、1 種類の抗体で測定できるフィブロネクチンの定量は可能であったが、2 種類の抗体が必要なビトロネクチンの定量はできなかった。フィブロネクチンはゼラチンコートプレートを用いて定量したところ、ニワトリ血漿中のフィブロネクチンはヒト血漿中のフィブロネクチンとほぼ同量の約 0.2 mg/ml の濃度で存在し、一方、栓球中では、

約 $0.55 \pm 0.12 \mu\text{g}/1 \times 10^8 \text{ cells}$ のフィブロネクチンが存在することがわかった。この量は細胞当たりで換算すると、血小板中に存在するフィブロネクチンの約 2 倍量含まれることになるが、栓球は血小板よりも 5 倍以上大きい細胞であることを考えると栓球のほうがより多くのフィブロネクチンを保有していることは十分予測できる。本研究で生物活性試験に供試した栓球放出物中には、 $0.414 \pm 0.004 \mu\text{g}/\text{ml}$ のフィブロネクチンが検出され、栓球中のフィブロネクチンの約 75% が栓球を培養することで放出されることがわかった。驚くべきことにこの培養系へウシトロンビンを添加すると 60 分後には無添加のもの約 2 倍ものフィブロネクチンが放出されることがわかった。この量は栓球中に保有されるフィブロネクチン量をも上回っており、栓球がトロンビンの刺激で活性化されフィブロネクチンを合成する可能性を示唆している。無核の血小板にはこの能力はないため、この点は哺乳類とニワトリの大きな違いであろう。

血小板も栓球も種々の刺激に対して極めて感受性が高く、*in vivo* のネイティブな状態を維持したまま、*in vitro* で解析することが極めて困難な細胞である。血液からの分離過程における物理的な刺激や抗凝固剤の種類によってもこれらの細胞を刺激してしまう。しかし、本研究では血小板の *in vitro* 研究における豊富な知見を参考に栓球放出試験を実施した。例えば、使用する器具はすべて栓球の吸着が少ないプラスチック製のものを使用し、抗凝固剤には最も刺激の少ないクエン酸ナトリウムを使用した。また、放出試験を行うチューブはすべてシリコンコートをした。血小板からはトロンビンやイオノフォアの刺激により、多量のフィブロネクチンとビトロネクチンが放出される。栓球ではイオノフォアによるフィブロネクチン放出の促進はわずかであったが、トロンビン刺激では 10 分後に多量のフィブロネクチンが放出されることがわかった (Fig. 38)。この結果は、血小板と栓球では凝集惹起因子に対する感受性が異なっていることを示している。さらに、栓球から放出されたフィブロネクチンは短時間に急速に減少することがわかった。本研究ではこの現象を解明することはできなかったが、二つのことが予想される。一つは、フィブロネクチンはプロテアーゼに対して感受性が高く、放出後速やかに分解されてしまったのかもしれない。もう一つは、血小板を用いたフィブロネクチン研究から、トロンビンで活性化した血小板にフィブロネクチンが結合することがわかっている。すなわち、栓球から放出されたフィブロネクチンは活性化した栓球の膜上に速やかに結合したためかもしれない。

本章では、栓球中に存在する接着因子に焦点を絞り、栓球放出物中に存在する接着因子を同定するとともに、その放出実験を行った。その結果、すでに血小板で明らかにされている結果と同様の結果が得られたが、いくつかの点で血小板とは異なる点が明らかとなった。これらの違いは、鳥類と哺乳類における系統進化の違いによる可能性が高く、今後さらに解析する必要がある。また、栓球は有核細胞であり、血小板と違い分子生物学的解析が可能のため、栓球におけるフィブロネクチンやビトロネクチンの合成といった問題も分子レベルで解析が可能ではないかと考えられる。

第 5 章 栓球由来細胞増殖因子の分子生物学的解析

5-1 はじめに

第 4 章までの研究では、ニワトリ栓球中に存在する細胞増殖因子の存在を解明するために種々の実験を行い、栓球中にも血小板と同様、細胞増殖因子の存在を示唆する生物活性を得るとともに、接着因子であるフィブロネクチンとビトロネクチンが存在することを明らかにした。しかし、細胞増殖因子に関しては、確かな免疫学的交差性は得られず、また因子を単離精製し活性因子を特定するまでには至らなかった。

血小板と栓球は止血血栓形成という機能的類似性だけではなく、損傷組織の修復という生体にとって重要な機能においても類似していると考えられる。しかし、その一方で血小板と栓球には大きな違いも明らかになってきた。例えば、第 4 章において栓球中のフィブロネクチンは、トロンピンで刺激することで、栓球が無刺激状態で保持している量以上に細胞外へ放出していることが明らかとなった。また、Kunicki ら [31]は血小板膜糖タンパク質である GPIIb-IIIa のニワトリ相同分子が栓球中で生合成されていることを明らかにしている。栓球は血小板と異なり有核細胞であることを合わせて考えると、栓球は自らの遺伝情報を基に mRNA を転写し、タンパク質を合成していることが考えられる。

一方、ニワトリ由来の細胞増殖因子遺伝子の解析は、哺乳類と比較してかなり遅れていたが、近年の分子生物学的手法の進歩にともない多くのニワトリ増殖因子遺伝子がクローニングされている。その一部を Table 1 に示したが、発生に関わる増殖因子群はニワトリと哺乳類間で相同性が高く、比較的遺伝子クローニングが容易であったものと思われる。哺乳類の血小板中に存在する増殖因子のうち、ニワトリでは TGF- β 、HGF や VEGF がクローニングされているが (Table 1)、血小板中の増殖因子で最初に発見された PDGF 遺伝子だけはニワトリではまだクローニングされてはいない。

哺乳類で発見された PDGF は、異なる遺伝子から翻訳された A 鎖と B 鎖のホモもしくはヘテロダイマーとして機能する。最近、PDGF もまた他の増殖因子と同様発生過程における役割が注目されている。しかし、発生生物学で恰好の実験動物であるニワトリでは、PDGF 遺伝子がクローニングされていないため、ニワトリ胚を用いた解析では、哺乳類由来 PDGF やその抗体が使用されて

きた。もし、ニワトリ栓球が mRNA の転写とタンパク質の翻訳能力を有しているとすれば、栓球中には、PDGF を含めた増殖因子の mRNA が発現していることが予想される。

そこで本章では、栓球に由来する細胞増殖因子の機能を分子生物学的手法により明らかにすることを目的に、ニワトリ PDGF 遺伝子のクローニングと種々の増殖因子の栓球における発現解析を行った。

5.2 材料と方法

(1) 供試動物

本研究には、H-B15 系鶏の幼雛および成鶏を使用した。

(2) 供試細胞株

本研究には、Table 9 に示した 5 種の細胞株と基礎培地を使用した。供試細胞株はすべて 10% FBS 存在下で継代培養し、LMH は 37°C、それ以外の細胞株は 38.5°C の 5% CO₂ 条件の CO₂ インキュベーター内で培養した。

(3) 供試細胞および組織

末梢血栓球は第 2 章の方法に準じて調製した。また、本研究には 7 週齢の H-B15 鶏から剖検により摘出した骨髓、脳、ファブリキウス嚢、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓および胸腺を使用した。各組織はシャーレ上で細切後、ホモジナイザーを用いて、さらに細切した。細切した組織は PBS で洗浄後、RNA 抽出もしくはゲノム DNA の分離に使用した。

(4) 栓球の刺激培養

種々の増殖因子 mRNA の発現を試験するために、栓球の刺激培養を行った。分離した栓球は、培養面への吸着による刺激が加わらないように、直径 3 cm の浮遊細胞培養用ディッシュを使用し、シリコンコートをしたものとコラーゲンコートをしたものを準備した。コラーゲンは、I 型ニワトリコラーゲン (Chemicon International) を用いて、1 mg/ml の濃度で 20 mM 酢酸に溶解し、非培養用ディッシュに薄く塗り広げた。その後すぐコラーゲン溶液を除去し、クリーンベンチ内で 1 時間乾燥させた。培地で数回洗浄後、1% BSA-PBS で室温 1 時間ブロッキングを行い、コラーゲンコート・ディッシュとして使用した。また、シリコンコート・ディッシュでは、トロンビン添加もしくは非添加の培地で栓球を培養した。トロンビンは、ウシトロンビン (ナカライテック) を 1 unit/ml の濃度で HBSS に添加した。栓球の培養は、1 ディッシュ当たり 1×10^8 cells で行い、38.5°C、5% CO₂ 条件下の CO₂ インキュベーター内で行い、4 時間置きに細胞を回収し RNA を抽出した。

Table 9. Cell lines used in this study

Chicken Cell line	Source	Culture Medium
HD11	macrophage	IMDM
IN24	monocyte	IMDM
LMH	hepatocyte	IMDM
MSB1	T lymphocyte	IMDM
1104B1	B lymphocyte	IMDM

(5) 全 RNA の抽出と poly(A)⁺ RNA の精製

種々の組織および細胞からの全 RNA の抽出には、ISOGEN-LS (和光純薬) を、全 RNA から poly(A)⁺ RNA の精製には、Oligotex-dT30 <Super> (第一化学薬品) を使用した。

培養細胞からの全 RNA の抽出は、接着細胞の場合は培地を完全に除去した後、直接ディッシュに ISOGEN-LS を添加し、また、浮遊細胞、組織細胞および栓球の場合、遠心により遠心管底部に回収した細胞から培地を完全に除去した後、タッピングにより細胞塊を攪拌し ISOGEN-LS を添加した。いずれの場合も細胞が完全に溶解するまで少量ずつ (1 ml 単位) ISOGEN-LS を添加した。なお、この操作以降の方法は添付のプロトコルに準じて行った。

抽出した全 RNA の一部は、poly(A)⁺ RNA の精製に供試し、その方法は Oligotex-dT30<Super>に添付の方法に準じて行った。精製は必要に応じて 2 回行った。

(6) ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA の抽出は、孵卵 10 日胚の肝臓から行った。剖検で摘出した肝臓は細切後ホモジネイトし、冷 PBS で遠心洗浄した。細胞沈渣に 10~40 倍量の可溶化緩衝液 [10 mg protease K, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA 2Na, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)] を加えて攪拌後、1/100 容の 10% SDS を添加した。添加後、55℃で 1 時間加温し、この間時々穏やかに攪拌し、続いて 37℃で一昼夜穏やかに攪拌しながらインキュベートした。等量の中性飽和フェノールを加え、室温で穏やかに 1 時間回転混和した。2,300 g で 10 分間遠心した後、口太のピペットで穏やかに上層を回収した。回収した上層には、中性飽和フェノール、クロロホルムおよびイソアミルアルコールを 25:24:1 の割合で混合した PCI を等量加え、室温で 20 分間回転混和した。混和後、2,300 g で 10 分間遠心し、口太のピペットで穏やかに上層を回収した。回収した上層の 2 倍量の 100% エタノールを重層し、ガラス棒で静かに攪拌しながらゲノム DNA をガラス棒に巻き取った。巻き取ったガラス棒は 70% エタノールで数回洗浄し、風乾させた。風乾したゲノム DNA は適量の TE にガラス棒ごと浸けて、4℃で一昼夜溶解させた。溶解後、OD₂₆₀ の吸光度によりゲノム DNA 濃度を測定し、0.8% アガロースゲル電気泳動によりゲノム DNA に切断がないことを確認した。

(7) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)とゲノム PCR

各組織および細胞から調製した全 RNA もしくは poly(A)⁺ RNA は、ニワトリ PDGF 遺伝子解析と各種増殖因子の発現解析に使用した。また、ニワトリ胚肝臓から調製したゲノム DNA は、ゲノム PCR に使用した。

全 RNA (5 μg) もしくは poly(A)⁺ RNA (0.5 μg) は SuperScript preamplification system (GIBCO BRL)を用いた逆転写反応により、一本鎖 cDNA を合成した。その方法は添付のプロトコルに準じて行った。合成した cDNA はフェノール・クロロホルム抽出とクロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿後適量の TE 緩衝液 (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) に溶解後、OD₂₆₀ の吸光度を測定し cDNA 濃度を概算した。

PCR には、10~100 ng の cDNA, もしくは 40 ng のゲノム DNA を鋳型とし、DNA ポリメラーゼには、AmpliTaq-Gold (アプライドバイオシステムズジャパン)を使用した。基本反応液は、10 mM プライマーセット (センスとアンチセンスプライマー), 0.2 mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP と dCTP の混合液), 1× Taq ポリメラーゼ緩衝液 (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3) を用い、1.5 units の Taq ポリメラーゼを添加して使用した。基本条件は、95℃, 10 分間の加熱のあと、94℃, 1 分間 (変性), プライマーの至適アニーリング温度 1 分間および 72℃, 2-3 分間 (伸長, 目的の長さに応じて時間を変更) を 1 サイクルとして目的に応じて 25~40 サイクル行い、最後に 70℃, 10 分間反応させた。反応後、PCR 産物 (5 μl) は 0.8~1.5% アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色により PCR 産物を確認した。サーマルサイクラーは PC-700 (アステック), PTC-100 (エムジェイジャパン), RoboCycler GRADIENT96 (Stratagene)を使用した。

ニワトリ PDGF-A 鎖遺伝子解析に使用したプライマー配列, プライマーセットおよびその至適アニーリング温度は Table 10 に示した。また、同様に PDGF-B 鎖解析に使用したプライマー情報は Table 11 に、種々の増殖因子の発現解析に使用したプライマー情報は Table 12 に示した。また、プライマー配列中の下線はベクタークローニングの際に利用する制限酵素部位を示し、発現解析を行う前にすべての増幅断片は後述する方法でベクターへクローニングし、塩基配列の決定を行った。なお、本章で使用した合成オリゴプライマーはすべて、北海道システム・サイエンス社に依頼して合成した。

Table 10. PCR primers (5'-3') used in the analyses of the chicken PDGF-A chain gene

Code	Sequence	optimal annealing temperature (°C)
RT-PCR		
A2F	ATGGATCCTGGCCGAGGAAGCCGAGAT	60
A2R	ATAAGCTTGCCTGGCACTTGACACTGCTC	
A3F	CACCCTGAATGCGGAGAGC	54
A3R	GAAAATCTTTGCTTCTATCA	
A4F	GGCTACCTGTCCCTTACCTC	54
A4R	TGTTAACATAAGGGCAGGG	
genomic PCR		
AL1F	AGCGGCCGCACCTGTACATCAACAAA	50
AL1R	CCCTCGAGACTCCCAATAAATACCTG	

Table 11. PCR primers (5'-3') used in the analyses of the chicken PDGF-B chain gene

Code	Sequence	optimal annealing temperature (°C)
RT-PCR		
PB2F	GCGGATCCCGAGGAGCTTTATGAGAT	58
PB2R	GCGAATTCGGCCACACCAGGAAGTTGG	
B2F	GCGGATCCTCTAGCCTGGACCTGAATGC	60
B2R	GCAAGCTTAAATAAACCTGCCTTGTGC	
3'-RACE		
Adaptor primer	GACTCGAGTCGACATCGA	48
RA2	GCGAATTCACACGGACGGTGGTCTTTGA	
RA3	GCGAATTCATGGTGGACAGCACCAAT	
5'-RACE		
AP1	GGCAATGTCGACCTCCCTACAAC	58
GSP1	CGAAGCTTGGTGAATGGACGGGCGAGAA	
AP2	CTCCCTACAACCCGAATTCCTAC	58
GSP2	CGAAGCTTGAGTTGCATTCAGGTCCAGGCTA	
genomic PCR		
5BNR	CGAAGCTTTCACCATGTCACGGGAGAT	57

Table 12. PCR primers (5'-3') used in the expression analyses

Code	Sequence	optimal annealing temperature (°C)
HGF		
cHG1F	<u>CGGGATCCC</u> AGTGCCAACGGTGGGACTC	52
cHG1R	CCAAGCTTTTGGGATTCCATTTACAAC	
PDGF-A (S1)		
A4F	GGCTACCTGTCCTTTACCTC	54
A4R	TGTTAACATAAGGGCAGGG	
PDGF-A (S1, S2, L)		
A4F	GGCTACCTGTCCTTTACCTC	52
A3R	GAAAATCTTTGCTTCTATCA	
PDGF-B		
B2F	<u>GCGGATCCT</u> CTAGCCTGGACCTGAATGC	60
B2R	GCAAGCTTAAATAAACCTGCCTTGTGC	
TGF-β2		
CTg2F	<u>CGGGATCC</u> GCGAGAGGGAGCGGAGCGAC	53
CTg2R	CCAAGCTTTTGACATCAAAGACAACCAT	
TGF-β3		
CTg3F	<u>CGGGATCC</u> GCTGCTCTCGCTGCTGAGCT	60
CTg3R	CCAAGCTTTTCTTCTCTGCGGAGGACACG	
TGF-β4		
T4CF	<u>CGGAATTC</u> GTTCAACGTCGTCCCGCGTG	62
T4CR	CCAAGCTTGTGTCGGCGCTCCAGATGTA	
β-actin		
BAC-F	<u>GCGGATCCT</u> TACCACAATGTACCCCTGGC	60
BAC-R	GCAAGCTTCTCGTCTTGT'TTTATGCGC	
GAPDH		
GAP-F	<u>GCGGATCCT</u> CACAGCCACACAGAAGACG	57
GAP-R	GCGAATTCAGCAGGGGCTCCAACAAAGG	

(8) PCR 産物のベクタークローニングと塩基配列の決定

PCR 産物は目的に応じて pBluescript II SK (-) (Stratagene) ベクターへクローニングし、塩基配列の決定を行った。pBluescript II SK (-)への PCR 産物のクローニングには、ベクター内のマルチクローニングサイト内にある制限酵素部位を利用してライゲーション反応を行った。ベクターと PCR 産物は制限酵素処理を行い、低融点アガロースである 1.5% SeaPlaque GTG アガロースゲル（宝酒造）で電気泳動を行った。泳動後、アガロースゲルは EtBr 染色を行い目的のバンドを切り出し、65℃で 5 分間の加温によりゲルを溶解させて目的のベクターおよび PCR 産物を回収した。ベクターと PCR 産物のライゲーションは、TAKARA ligation kit ver. 1（宝酒造）を使用し、その方法は添付のプロトコルに従った。ライゲーション産物は、XL1-Blue (Stratagene) コンピテント大腸菌に形質転換し、PCR もしくは制限酵素処理により目的の遺伝子断片を持つクローンを選抜した。

得られた遺伝子断片が 500 bp 以上の場合、そのクローンのディレーション変異クローンを作成し、塩基配列の決定を行った。ディレーション変異クローンの作成には、Takara キロシークエンス用ディレーションキットを用いて行い、方法は添付のプロトコルに従って行った。

ベクターにクローニングした遺伝子断片の塩基配列は Dye terminator sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech) およびオートシクエンサー (Model373A, Applied Biosystems) を用いて決定した。なお、使用したキット並びに使用した機器の使用は添付のプロトコルに従って行った。また、得られた塩基配列は、GENETYX-MAC ver. 9.0 (SOFTWARE DEVELOPMENT) を用いて解析した。なお、サイクルシークエンスに使用したベクター特異的プライマー (T3 および T7 プライマー) は Table 13 に示した。

(9) cDNA ライブラリーの作成

ニワトリ PDGF cDNA をクローニングするために、栓球と LMH から調製した poly(A)⁺ RNA から cDNA ライブラリーを作成した。それぞれ 5 μg の poly(A)⁺ RNA から Zap-cDNA Synthesis kit (Stratagene) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA はキット内の Uni-ZAP XR ベクターにライゲーションし、GIGPACK II Gold (Stratagene) を用いて λ Zap II ファージにパッケージングした。パッケージングしたファージライブラリーは XL1-Blue MRF' (Stratagene)

Table 13. Sequence primers (5'-3')

Code	Sequence	T _m (melting out temperature, °C)
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	50
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	50

に感染させてファージ力価を測定した。また、ファージ力価測定に使用したプレートからファージ DNA を回収し、Table 13 の T3 と T7 プライマーセットで PCR を行い、ライブラリー中の平均インサート長を割り出した。なお、PCR は本章 (7) に記述した方法で、アニーリング温度は 50°C で行った。

初期 cDNA ライブラリーは不安定であるため、このライブラリーから目的の遺伝子を選抜することが困難な場合が多い。そこで、安定した cDNA ライブラリーを保存するために 2 次増幅をかけた。2 次増幅は直径 150 mm デイッシュに 3×10^4 pfu となるようにファージプラークを形成させ、デイッシュ当たり 10 ml の SM 緩衝液 (0.1 M NaCl, 10 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) 中にファージを浮遊させ、デイッシュ毎に回収した。回収したファージ溶液は、プローブの増幅に使用した PDGF 用プライマーペアを用いて PCR に供試し、どのライブラリーストック中に PDGF cDNA が含まれるかを確認した。また、各ライブラリーは小分けして、-80°C に保存した。

(10) プラークハイブリダイゼーション法

ニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA のクローニングは、LMH cDNA ライブラリーからプラークハイブリダイゼーション法を用いて行った。PCR により PDGF-A 鎖 cDNA の増幅が認められた LMH cDNA ライブラリーストックから 2.5×10^4 pfu となるように XL1-Blue MRF' に感染させ、10×14 cm の角形デイッシュにプラークを形成させた。なお、一つのライブラリーストックからデイッシュ 4 枚分 (1×10^5 プラーク) を選抜した。プラークが形成されたプレートは、4°C で 1 時間冷却した後、9×13 cm にカットした Hybond N⁺ 膜 (Amersham Pharmacia Biotech) に転写した。転写膜は変性液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) をしみ込ませた濾紙上に 5 分間置き、直ちに中和液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0) をしみ込ませた濾紙上に 5 分間静置し、0.3 M NaCl, 30 mM クエン酸 3 ナトリウム, 0.2 M Tris-HCl, pH 7.5 に浸した。その後、転写膜は濾紙上で乾燥させ、120°C, 30 分の加熱でファージ DNA を固定した。固定した転写膜は使用時までデシケーター内で保存した。

プローブは、DIG-DNA ラベリングキット (Boehringer Mannheim) を用いて、Table 10 の A2F-A2R プライマーセットで増幅したニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA 断片を DIG ラベルして使用した。固定した転写膜はプレハイブリダイゼーション液 [2% blocking reagent (Boehringer Mannheim), 50% ホルムアミド, 0.02%

SDS, 0.1% N-ラウリルサルコシン Na, 5×SSC] に浸し, 42°C, 2 時間以上加温した. 次にプレハイブリダイゼーション液に 50 ng/ml の濃度でプローブを添加し, このハイブリダイゼーション液に転写膜を浸し, 42°Cで一昼夜反応させた. 転写膜は DIG 緩衝液 1 (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5) で軽く洗浄後, 転写膜を 0.1% SDS, 2×SSC に移し, 室温で浸透しながら 5 分間 2 回洗浄した. 次に 0.1% SDS, 0.1×SSC に転写膜を移した後, 68°Cで 15 分間洗浄し, この操作を計 2 回行った.

転写膜上の陽性プラークは, ハイブリダイズした DIG-プローブを, AP 標識抗 DIG 抗体 (Boehringer Mannheim) と CDP-Star (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた化学発光抗体法により検出した. 洗浄した転写膜は, MBS (maleic buffered saline, 0.15 M NaCl, 0.1 M maleic acid, pH 7.5) で軽く洗浄後, 1% blocking reagent-MBS に浸し, 室温で 1 時間振盪した. 次に, 転写膜は 1% blocking reagent-MBS で 5,000 倍に希釈した AP 標識抗 DIG 抗体に移し, 室温で 30 分間振盪した. 抗体を反応させた転写膜は, 洗浄液 (0.2% Tween-20-MBS) で 1 回 10 分の間隔で洗浄液を交換し, 合計 3 回室温で振盪洗浄した. 洗浄後, 転写膜を CDP-Star と 5 分間反応させた後ラップに包み, 37°Cで 15 分間加温し, X 線フィルム (フジフィルム) に感光させた. X 線フィルムを現像後, 転写膜とファージプレートを重ね合わせ, 陽性プラークを SM 緩衝液中に回収した後, 上記方法と同様にファージ力価を測定し 2 次選抜を行った. 2 次選抜後, 陽性ファージクローンは, ExAssist helper phage (Stratagene) を用いた *in vivo* excision 法により pBluescript ファージミドに変換し, 本章, 材料と方法 (8) に記載した方法で塩基配列の決定を行った.

(11) RACE (rapid amplification of cDNA end) 法

ニワトリ PDGF-B 鎖 cDNA のクローニングは, RT-PCR 法から得られた PDGF-B 鎖様塩基配列を利用した 3'-RACE および 5'-RACE 法により行った.

3'-RACE 法は Frohman らの方法 [81] に準じて行った. また, 3'-RACE 法に使用したプライマー配列は Table 11 に示した. ニワトリ栓球から精製した poly(A)⁺ RNA と poly(dT) アダプタープライマー (dT17-A) [5'-GACTCGAGTCGACATCGA(T)17-3'] を用いて, 本章, 材料と方法 (7) に記載した方法と同様に cDNA を合成した. 次に, この cDNA を鋳型に RA2 プライマーとアダプタープライマーを用いて一次 PCR を行った. この PCR 産物を鋳型

とし、RA3 プライマーとアダプタープライマーを用いて二次 PCR を行った。得られた cDNA 断片は pBluescript II (SK-)にクローニングし、塩基配列の決定を行った。なお、PCR およびクローニング方法は本章、材料と方法 (7)および(8)に記載した方法と同様に行った。また、PCR のアニーリングは 48°Cで行った。

5'-RACE 法は Chen の方法 [82]に準じて行った。また、5'-RACE 法に使用したプライマー配列は Table 11 に示した。1 μ g の栓球 poly(A)⁺ RNA から本章の材料と方法 (7)に記載した方法に準じて cDNA を合成し、Sephacryl-S300 cDNA spin column (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて cDNA を精製した。次に 20 units の T4 RNA ligase (New England BioLab)を用いて cDNA の 3'側にアダプター (5'-GTAGGAATTCGGGTTGTAGGGAGGTCGACATTGCC-3') を連結させた。アダプター中の配列を持つ AP1 と GSP1 で一次 PCR を行った後、その PCR 産物を鋳型として、AP2 と GSP2 のプライマー対で nested PCR を行った。PCR は本章、材料と方法 (7)に記載した方法と同様に行い、PCR におけるアニーリングは 58°Cで行った。得られた PCR 産物は本章、材料と方法 (7)および(8)に記載した方法で pBluescript II (SK-)にクローニングし、塩基配列の決定を行った。

(12) ノーザンブロッティング法

いくつかの細胞から抽出した全 RNA を用いて、ニワトリ PDGF-A 鎖と B 鎖のノーザンブロッティング解析を行った。抽出した全 RNA は、試料緩衝液 [18% formaldehyde, 50% formamide, 1×MOPS 緩衝液 pH 7.0 (0.2 M MOPS, 50 mM 酢酸ナトリウム, 10 mM EDTA · 2Na)]を用いて、泳動レーン当たり 1 μ g の RNA が泳動できるように調製した。電気泳動は Mupid ミニゲル泳動槽 (ADOVANCE Co.)を用いて、ゲル溶液の 1/6 が formaldehyde 溶液となるように調製した 1% アガロースゲルを用いて 50V の定電圧で泳動した。泳動後、ゲル内で分離した RNA は Hybond N⁺膜にキャピラリー法を用いて一昼夜転写した。RNA を転写した膜は、50 mM NaOH で 5 分間反応させ (アルカリ固定)、2×SSC で軽く洗浄して風乾した。乾燥した転写膜は 80°C、2 時間の加熱で膜上に固定した。

プローブは、RT-PCR 法から得られた cDNA 断片を鋳型として使用し、PDGF-A 鎖 mRNA の検出には A2F-A2R 増幅断片を、PDGF-B 鎖 mRNA の検出には B2F-B2R 増幅断片を DIG-RNA ラベリングキット (Boehringer Mannheim) により DIG 標識した RNA プローブを使用した。なお、プレハイブリダイゼーショ

ン以降の操作は本章・材料と方法(10)に準じて行い、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーション温度を 68℃、使用プローブ濃度を 100 ng/ml に変更して行った。また、ニワトリ GAPDH cDNA からプローブを作成し、対照として使用した。

(13) サザンブロッティング法

ニワトリ PDGF-A 鎖と B 鎖のゲノム解析を行うために、10 日胚から得た肝臓ゲノム DNA を用いて、サザンブロッティング解析を行った。7 μ g のゲノム DNA を *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III, *Kpn* I もしくは *Pst* I で完全に制限酵素処理 (37℃で 16 時間) し、0.8% アガロースゲルで電気泳動した。泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い、ゲノム DNA が完全に制限酵素処理されていることを確認した。次に、ゲルを 0.25 N HCl に移し、5 分間振盪しゲノム DNA の脱プリン反応を行った。蒸留水でゲルを洗浄後、1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH の溶液へ移し 15 分間 2 回の反応でゲノム DNA の変性を行った。変性後、3 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.5 にゲルを移し、15 分間 2 回の振盪でゲルを中和し、ゲル中のゲノム DNA は Hybond N⁺膜にキャピラリー法を用いて一昼夜転写した。転写膜は、2×SSC で軽く洗浄し、風乾後、120℃、30 分間の加熱により、ゲノム DNA を膜上に固定した。

サザンブロッティング解析のためのプローブには、ゲノム PCR から得られた A2F-A2R の PDGF-A 鎖ゲノム DNA 増幅断片と B2F-5BNR の PDGF-B 鎖ゲノム DNA 増幅断片を DIG-DNA ラベリングキットにより DIG 標識して使用した。なお、プレハイブリダイゼーション以降の操作は本章・材料と方法(10)に準じて行い、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーション温度を 68℃、使用プローブ濃度を 20 ng/ml に変更して行った。

(14) 半定量的 PCR

ニワトリ由来細胞増殖因子 (HGF, PDGF-A 鎖, PDGF-B 鎖および TGF- β) の mRNA 発現解析を行うために、半定量的 PCR を行った。半定量的 PCR では、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH もしくは β -アクチンの発現量をもとに PCR に使用する cDNA 量を均一化し、また各プライマー対毎に PCR 産物が対数増幅期にあり、かつ、エチジウムブロマイド染色下で可視化できる PCR サイクル数を検討した。まず、cDNA 量を均一化するために、OD₂₆₀ の吸光度を基

に算出した 10 ng の cDNA を鋳型に用いて 20, 25, 30, 35 サイクルで β -アクトニンもしくは GAPDH の PCR を行った。PCR 産物はアガロース電気泳動後エチジウムブロマイドで染色し、染色像をポラロイドカメラで撮影後 NIH image (National Institute of Health, USA) でバンドの濃淡を定量し、至適サイクル数を決定した。次に OD₂₆₀ の吸光度を基に算出した量の cDNA (1, 5, 10, 20, 50 ng) と決定したサイクル数で PCR を行い、上記と同様の方法でバンドの濃淡を定量し、ハウスキーピング遺伝子の発現量に換算した。換算したそれぞれの cDNA が均一かつエチジウムブロマイド染色下で可視化できる cDNA 量を算出し、決定したサイクル数及び cDNA 量でハウスキーピング遺伝子と種々の増殖因子遺伝子の発現解析を行った。なお、それぞれの増殖因子において、上記と同じ方法で PCR サイクル数を検討し、また PCR の基本操作は本章・材料と方法(7)に準じて行い、発現解析に使用したプライマーは Table 12 に示した。

(15) 分子生物学的手法における基本操作

本章で行った分子生物学的手法における基本操作 (エタノール沈殿, フェノール・クロロホルム抽出, 制限酵素処理, アガロース電気泳動, RNA の取扱等) はすべて “Molecular Cloning; A LABORATORY MANUAL” (CSHL PRESS) [83] に準じて行った。

5-3 結果

(1) ニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA のクローニング

本実験では、まずニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA を LMH mRNA からクローニングした。Fig. 40A に cDNA の 3'側の塩基配列が異なる 3 種のニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA の模式図とニワトリ PDGF-A 鎖遺伝子解析に使用した PCR プライマーの位置を示した (プライマーの情報は材料と方法の Table 10 に示している)。

ニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA のクローニングは、異種動物間 (ヒトとマウス) で高度に保存されている PDGF-A 鎖アミノ酸配列の中から、さらに塩基配列の保存性が高い領域をもとに A2F と A2R プライマーを設計し、種々のニワトリ細胞から作成した cDNA を鋳型に PCR を行った。その結果、Fig. 40B、レーン 1 に示したように、LMH cDNA を鋳型に用いた場合に約 400 bp の位置に明瞭に増幅産物が認められた。そこでこの PCR 産物をクローニングし、塩基配列を決定後、決定した塩基配列は BLASTN プログラム [84]を用いて GenBank データベースに照合したところ、ヒト PDGF-A 鎖塩基配列と最も高い相同性を示すことがわかった (結果は示していない)。そこで次に LMH cDNA ライブラリーを作成し、この PCR 産物をプローブに PDGF-A 鎖 cDNA のクローニングを行った。

LMH cDNA ライブラリーの約 2.5×10^5 プラークを P2 プローブ (A2F-A2R PCR 産物) でスクリーニングしたところ、19 個の陽性ファージクローンを得た。これらのファージクローンは *in vivo* excision 法により pBluescript ファージミドに置換し、すべての塩基配列を決定した。その結果、最終的に 2 種の PDGF-A 鎖 cDNA を得た。一つは全長 1,137 bp で 597 bp の ORF (open reading frame) をもつクローンであり “PDGF-A short form type 1 (S1)” と名付けた。もう一つは、全長が 1,290 bp で S1 よりも長い 636 bp の ORF を持つクローンであることから “PDGF-A long form (L)” と名付けた。塩基配列を解析した結果、この二つのクローンの違いは、ORF の 3'側の違いであることがわかった。すなわち、Fig. 40A に示したように、S1 には L に存在しない 20 bp の塩基が存在し、非翻訳領域に L の 3'側 ORF の塩基配列が存在していた。また L は S1 の 20 bp の塩基が存在せず、結果的に ORF が L において長くなっていることがわかった。そこで次に、これらのクローンがライブラリー構築の際に生じたエラーでないことを確認するために、LMH poly(A)⁺ RNA と A3F-A3R プライマ

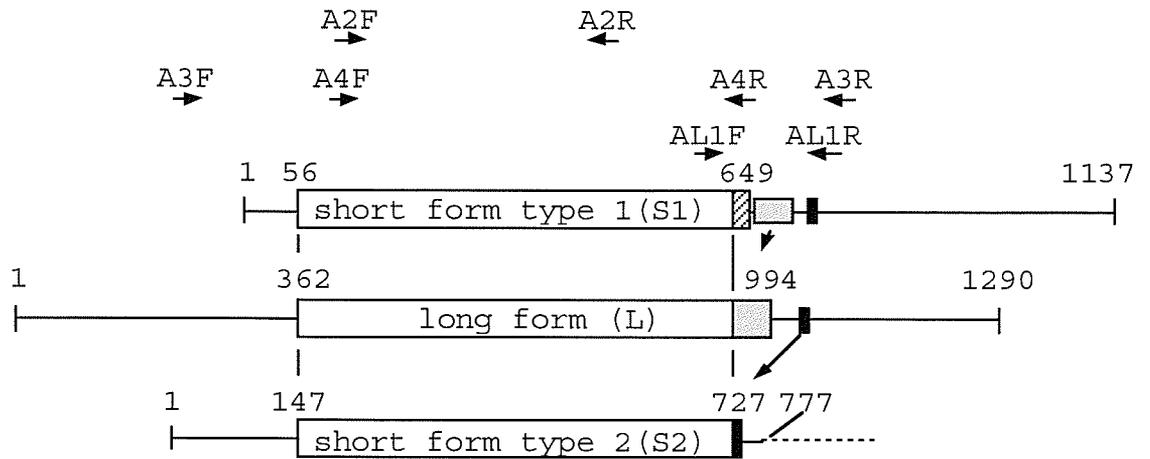
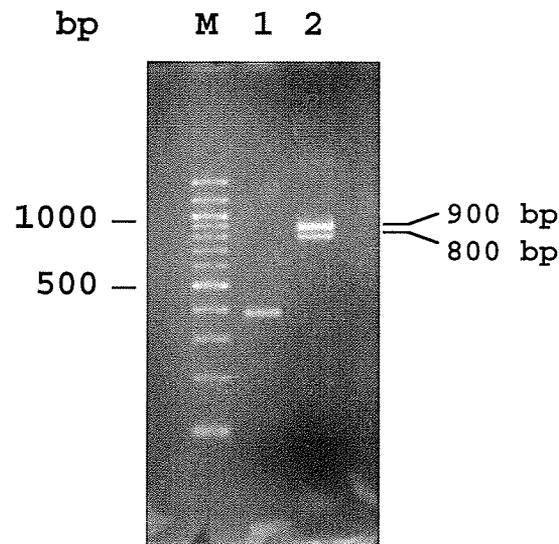
A**B**

Fig. 40. Isolation and cloning of three forms of chicken PDGF-A cDNA

(A) Schematic diagram of three forms of chicken PDGF-A cDNA and PCR primers. The coding regions are indicated by large boxes. Small dotted and closed boxes in S1 and L cDNA show areas of untranslated regions that are translated after mRNA splicing. The primer positions are shown above cDNA illustration by arrows. Base pair numbers are shown above and below sequences of two clones.

(B) PCR product of chicken PDGF-A cDNAs amplified with two primer pairs (lane 1, A2F-A2R; lane 2, A3F-A3R). DNA size marker (100-base ladder) and 10 μ l of PCR products were separated on 1% agarose gel and stained with EtdBr.

一ペアーを用いて RT-PCR を行った。その結果, Fig. 40B, レーン 2 に示したように, 約 900 bp と約 800 bp の増幅断片が得られることがわかった。そこで, これらの PCR 産物をクローニングし塩基配列の決定を行ったところ, 約 900 bp の増幅断片中には S1 と L の 2 種の cDNA が含まれていることがわかった。また, 約 800 bp の増幅断片の塩基配列を決定したところ, 全長 777 bp で S1 よりさらに短い 585 bp の ORF を持つことがわかった。さらに, この cDNA は 5' 末端から 726 bp までは S1 の配列と完全に一致していることがわかった。また, この配列は L の 103 塩基が欠失している配列であることがわかった (Fig. 40A)。そこで, この cDNA を “PDGF-A short form type 2 (S2)” と名付けた。

(2) ニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA の特徴

決定した 3 種のニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA の塩基配列と予想されるアミノ酸配列を Fig. 41 に示した。図中の塩基配列は S1 に関しては全長を記載し, L と S2 に関しては異なる部分のみの塩基配列を示し, 一致した部分は線で省略した。ORF の検索は GENETYX-MAC ver. 9.0 を用いて行った。その結果, 予想されるアミノ酸は S1 が 198, S2 が 194, L が 211 アミノ酸であることがわかった。L の 5' 側 UTR (非翻訳領域) には, 開始コドンである ATG (Fig. 41, Δ) が 2 ヶ所存在したが, その直後に停止コドンである TGA (Fig. 41, \circ) が位置し, ともに開始コドンとして機能しないことがわかった。また, ORF 検索によって得られた開始コドンは, ヒト PDGF-A 鎖の開始コドンと一致しており, また一般的に開始コドンの上流および下流にみられるコザック配列がニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA の開始コドンにも認められた。塩基の違いは L で 2 ヶ所認められ, L の 339 塩基が T に, 526 塩基が C に置き変わっていた。しかし, これらの置換はアミノ酸配列には影響がないことから, どちらか一方は対立遺伝子の可能性が示唆された。3' 側 UTR には, A が連続して連なる特徴的な配列が認められた (Fig. 41, 点線)。また, ニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA の 3' 側 UTR は AT が豊富な配列であることがわかった。3' 側 UTR は S1 で最も長く, 3' 末端には poly(A) テイルと思われる A の連続した配列が認められた。一般的に真核細胞では poly(A) テイルの上流 30 bp 前後に AATAAA というシグナル配列が認められるが, 本章で得られたニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA にはこのシグナル配列は認められなかった。予想されるアミノ酸配列の特徴としては, 潜在的な糖鎖付加部位として知られるアミノ酸配列 (Asn-X-Ser もしくは Asn-X-Thr) が 134-136

L: 1 GGCACGAGTTCCGGCTGCGCTCCGGATCGACTCCTTGGGTTTCACTTTGGTCTGATCTAAG
 L: 61 CAAATATGCAGAAGTACCGGCTGGTCTAGTCCTAAGAGCCAAGAGGAGCGAGCGAGAGCG
 L:121 GCAGAAAGGAGAGCGGCCGCGCTCCCGTTGGAGAGGAACGTACAACAGCGGCAGCGCCG
 L:181 TAATTCCAGCACCGCCGCCCGCCGAGCCGACCCCTGAATGCGGAGGACCCCGG
 S2: 1
 L:241 AAGCCACCCCGCTGCCTTTCCCTGAGGGATGGTACTGAATTTCTGCGCGCAGGAGCCG
 S2: 26
 S1: 1 AGCTCCTCTCCATCAGCGTTGCTTCCCTCCGCATCTAAAGTGCACTAGACCGC
 L:301 GCCTGC-----T-----
 S2: 86

 1 M R T W A C V L L I G F G Y L S F T S C
 S1: 55 GATGAGGACCTGGGCTTGCCTTTGCTGATAGGTTTGGCTACCTGTCTTTACCTCTGT
 L:361
 S2:146

 21 E E A E I P Q E L I E R L A H S E I H S
 S1:115 CGAGGAGGCCGAGATCCCGCAGGAGCTGATCGAGCGGCTGGCGCACAGCGAGATCCACAG
 L:421
 S2:206

 41 I R D L Q R L L E I D S V G Y D D V S E
 S1:175 CATCCGCGACTTGCAGCGCCTCCTGGAGATTGACTCCGTAGGATATGATGATGTTTCAGA
 L:481
 S2:266 C-----

 61 T N L R S Y S V H S A K H V Q E N R P V
 S1:235 GACAACTTGAGGTCTTATAGTGTTCATTCTGCTAAACATGTGCAAGAGAACCCTCCTGT
 L:541
 S2:326

 81 P I R R K R S I E E A I P A V C K T R T
 S1:295 GCCCATTTCGAGAAAAGAAGCATTGAGGAGGCCATCCCGGCTGTCTGCAAAACACGGAC
 L:601
 S2:386

 101 V I Y E I P R S Q I D P T S A N F L I W
 S1:355 GGTGATATATGAGATACCTCGGAGTCAGATTGATCCCACCTCGGCCAACTTCTGATATG
 L:661
 S2:446

 121 P P C V E V K R C T G C C [N T S] S V K C
 S1:415 GCCGCGTGCCTGGAGGTGAAGCGCTGCACTGGCTGCTGCAACACCAGCAGTGTGAAATG
 L:721
 S2:506

 141 Q P S R I H H R S V K V A K V E Y V R K
 S1:475 CCAGCCCTCCCGGATACATCACAGAAGTGTCAAGGTGGCAAAAGTGAATATGTTAGAAA
 L:781
 S2:566

 161 K P K L K E V L V R L E E H M E C T C T
 S1:535 AAAGCCAAAATTAAGAAGTTCTGGTGTGAGATTAGAAGAGCATATGGAATGCACCTGTAC
 L:841
 S2:626

 181 S T N T N S D Y R E E E T A L P L C ***198(S1)
 S1:595 ATCAACAAATACTAATTCAGATTATAGAGAAGAAGAACTGCCCTGCCCTTATGTTAACA
 L:901
 S2:686

 194 G R P R E S G K K R K R K K L K P T ***211(L)
 S1:655 GGAAGGCCTAGGAATCAGGTAAAAACGGAAACGAAAAAGTTAAAAACCAACATAAAAC
 L:942

 194 D ***194(S2)
 S1:715 CTACTGGAACTATTTGATATTCAGATTAACAGGTATTTATTGGGAGTAGTATGATAGAAG
 L:1001
 S2:727

 S1:775 CAAAGATTTTCTAAAATTCAACCTTAAAGTGCGCATGTAAACTCAATCAGAGCAGCATG
 L:1061
 S2:763 ----- 773(S2)

 S1:835 TAGAGCTTCTTGCCCCAGATGTAAGGTGAAAATAAGCTAGAAAAAAACTTCTCTCTGGG
 L:1121

 S1:895 ACATGGATGTACATGGTTTGTACATTCTGAACCTACTATGTATGGTGCTTATTGACTG
 L:1181

 S1:955 TATACTTTATTTGTTCTCTGTGTGGAAAAAATAAGCTAGAAAAAAACTGGCTGAAAAGAAC
 L:1241 ----- 1290(L)

 S1:1015 ACTTAATGAGAACAAGAGACAATGTACATTTGTTTAAATGTGACATCAAAGCAAGTATTG
 S1:1075 TAGCACTCTGTGAAACAATAGGAAGCTTCCCTGTCCAAAAAAGAAAAAATAAAGA
 S1:1135 AAA 1137(S1)

Fig. 41. Nucleotide and deduced amino acid sequences of three forms of chicken PDGF-A cDNAs (S1, L and S2)

The cDNA and deduced amino acid sequences of S1 cDNA are shown in full. The sequences of L and S2 show only differences from S1 nucleotides and identical sequences are shown by lines. A potential N-glycosylation site is boxed. The termination codons of three cDNAs are indicated by three asterisks. The oligo-(dA) stretch of 3'-UTR is over-lined with a broken line. ATG and TGA codons in the 5'-UTR are indicated by three open triangles and open circles, respectively.

アミノ酸に一ヶ所認められた (Fig. 41, □内).

なお, 本章で得られた 3 種のニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA の塩基配列は, DDBJ/EMBL/GenBank のデータベースに, S1 は AB031021, L は AB031022, S2 は AB031023 で登録した.

(3) ニワトリ PDGF-A 鎖のゲノム解析

本章で得られた 3 種のニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA は, 塩基配列の 3'側の一部が付加もしくは欠失することにより発現することがわかった. この現象は mRNA の転写過程におこるスプライシングで説明できる. そこで, ニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA の 3'側領域に限定してゲノム解析を行った. ゲノム解析には Table 10 と Fig. 40A に記載した AL1F と AL1R プライマーを用いて, 10 日胚肝臓から抽出したゲノム DNA を鋳型とした genomic PCR により解析した. その結果約 2,600 bp の増幅断片が得られ, この増幅断片をクローニングし塩基配列の決定を行った. 決定した塩基は 2,596 bp であり, 3 種のニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA との塩基配列の比較から, エクソン, イントロン構造を推測した. その結果, Fig. 42A に示したように, AL1F と AL1R プライマー間には 3 つのエクソン (a, b, c) と 2 つのイントロン (a, b) が存在することがわかった. エクソン a とエクソン b に挟まれたイントロン a は 1,340 bp で, エクソン b とエクソン c に挟まれたイントロン b は 969 bp であることがわかった. またイントロン両末端にはスプライシング部位を示す GU-AG (ドナーとアクセプター) が存在した. また, エクソン b 中には S1 と L の 3'側翻訳領域と非翻訳領域の一部が連続してコードされており (エクソン b1 とエクソン b2), エクソン b1 の末端にはスプライシング部位のアクセプター配列 (AG) が存在していた.

以上の結果から, ニワトリ PDGF-A 鎖の部分的ゲノム構造を模式的に Fig. 42 B にまとめた. 3 つのニワトリ PDGF-A 鎖 mRNA は, S1 がエクソン a -エクソン b -エクソン c, L がエクソン a -エクソン b2 -エクソン c, S2 がエクソン a -エクソン c という順に転写されたものであることがわかった.

そこで次に, PDGF-A 鎖遺伝子がニワトリゲノム上に何コピー存在するのかを確認するために, サザンブロッティング解析を行った. その結果, Fig. 43 に示したように, 4 種の制限酵素 (*Bam*H I, *Hind* III, *Kpn* I, *Pst* I) で処理したゲノム上で単一のバンドが検出され, PDGF-A 鎖遺伝子がニワトリゲノム上に 1 コピー存在することがわかった. 以上の結果から, ニワトリ PDGF-A 鎖 mRNA は,

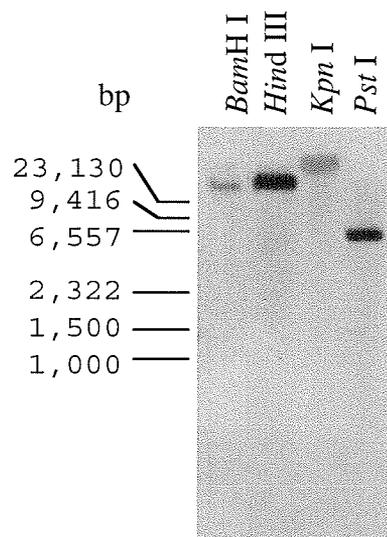


Fig. 43. Southern blot of chicken PDGF-A gene

Chicken genomic DNA from chick liver was digested with *Bam* H I, *Hind* III, *Kpn* I and *Pst* I and hybridized with a chicken PDGF-A cDNA probe as described in Materials and Methods.

ゲノム上にコードされた単一コピーの DNA から選択的スプライシングを経て、3 種の mRNA を転写可能であることが明らかとなった。

(4) 異種動物間における PDGF-A 鎖アミノ酸配列の比較

本章でクローニングした 3 種のニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を、既知の異種動物由来 PDGF-A 鎖アミノ酸配列と比較した。ニワトリ、ヒト及びアフリカツメガエル (*Xenopus*) の PDGF-A 鎖アミノ酸配列 [85, 86, 87] を GCG program の Pileup command (GCG sequence analysis software v. 9, GCG Inc.) を用いて相同性を比較した。その結果, Fig. 44 に示したように、予想されるシグナルおよびプロペプチドの領域では異種動物間で異なるアミノ酸配列が多く認められたが、成熟型 PDGF-A の領域は良く保存されていることがわかった。また、成熟型 PDGF-A 鎖に存在する 8 ヶ所のシステイン残基 (▼) の位置と、1 ヶ所存在する潜在的糖鎖付加部位 (▽▽▽) の位置が完全に保存されていることがわかった。また、哺乳類由来 PDGF の解析から明らかになっている受容体結合部位であり、増殖活性の重要な配列ではないかと考えられている RKKP の塩基性に富んだ配列 [88] (Fig. 44○) は、ニワトリでも完全に保存されていた。ニワトリ PDGF-A 鎖アミノ酸配列のシグナル配列は Nielsen らの方法 [89] に基づいて推定したところ 20 残基目の Cys と 21 残基目の Glu で切断されやすいことがわかり、シグナル配列は 20 残基であることが推定された。ヒト及びアフリカツメガエルでは、選択的スプライシングにより 2 種 (long form と short form) の PDGF-A 鎖タンパク質が産生されることが知られている [87, 90]。これらの種とニワトリとのアミノ酸配列を比較すると、long form はニワトリ PDGF-A 鎖の L タイプに相当し、short form はニワトリ PDGF-A 鎖の S2 タイプに相当することが示唆された (Fig. 44)。また、ニワトリの S1 タイプはニワトリ特有のタイプと考えられ、C 末端の Cys を除く 4 残基は疎水性アミノ酸から構成されていることがわかった。

次に、異種動物間における PDGF-A 鎖の long form のアミノ酸配列の相同性 (%) を比較した。その結果, Table 14 に示したようにニワトリ PDGF-A は、ヒトとマウス PDGF-A のシグナル配列を含む前駆体との比較で 80% 以上の相同性があり、成熟型だけで比較すると約 90% の高い相同性があることがわかった。一方、アフリカツメガエルの PDGF-A 鎖との比較では、前駆体で約 75%、成熟型で約 85% の相同性があり、ニワトリ PDGF-A 鎖はアフリカツメガエルよりは

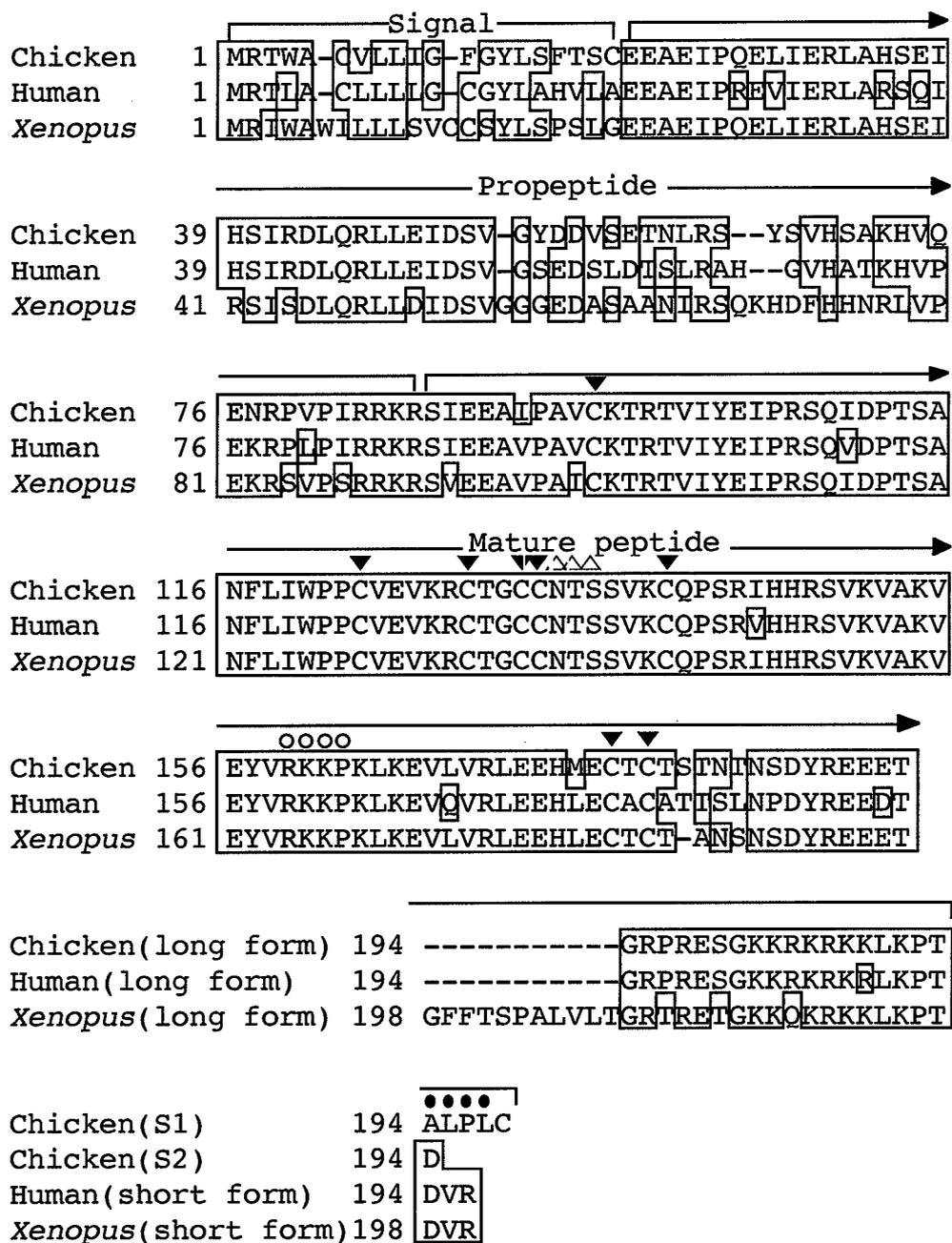


Fig. 44. Comparison of predicted amino acid sequences among three forms of PDGF-A precursor peptides among chicken, human and *Xenopus*

Residue numbers are indicated on the left. Arrowheads indicate eight conserved cysteine residues of mature peptide. Potential N-glycosylation site is indicated by three open triangles. Hydrophobic amino acid residues (ALPL) are shown by closed circles in C-terminus region of S1. Sequences listed are cited as follows: human PDGF long form [85], human PDGF short form [86], and *Xenopus* PDGF long and short forms [87].

Table 14. Homology score at the amino acid level among the chicken, human, mouse and *Xenopus* PDGF-A chains

	Amino acid homology (%)		
	Human	Mouse	<i>Xenopus</i>
Chicken	81 (89.6)^a	81.0 (88.8)	74.9 (84.6)
Human		93.4 (96.0)	71.7 (80.1)
Mouse			72.6 (79.4)
<i>Xenopus</i>			—

^a Precursor (mature)

哺乳類に近縁であることがわかった。

(5) ニワトリ PDGF-B 鎖 cDNA のクローニング

ニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA に続き、PDGF-B 鎖 cDNA のクローニングを行った。最終的にクローニングされたニワトリ PDGF-B 鎖 cDNA の模式図とクローニングに使用したプライマーの位置とその手順を Fig. 45 に示した。

ニワトリ PDGF-B 鎖 cDNA のクローニングは、ヒトとラットの PDGF-B 鎖 cDNA 塩基配列の高度保存領域をもとに作成した PB2F-PB2R プライマーセットを用いた RT-PCR から始めた。種々のニワトリ細胞から調製した cDNA を鋳型に PCR を行い、栓球 cDNA を鋳型にした場合に約 250 bp の明瞭な増幅産物を得た。この増幅産物をクローニングし 246 bp の塩基配列を決定し、BLASTN プログラムを用いて GenBank データベースに照合したところ、ヒト PDGF-B 鎖塩基配列と約 67% の相同性を示すことがわかった (結果は示していない)。

そこで次に、ニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA のクローニングと同様、栓球 mRNA から cDNA ライブラリーを作成し、PB2F-PB2R の PCR 断片をプローブに用いてプラークハイブリダイゼーションを行ったが、陽性クローンは得られたものの、長い cDNA クローンは得られなかった。そこで、ニワトリ PDGF-B 鎖 cDNA のクローニングには、RACE 法を用いて行った。

RACE 法はクローニングされた短い遺伝子断片から 3'側と 5'側に付加したアダプター配列を利用して、未決定の 3'側と 5'側の遺伝子を PCR により増幅し、クローニングする方法である。そこで、RT-PCR から得られたニワトリ PDGF-B 鎖 cDNA 断片である 246 bp の PB2 塩基配列をもとに、5'-RACE 用に GSP1 と GSP2, 3'-RACE 用に RA2 と RA3 プライマーを合成し、材料と方法に記載した方法に従って RACE 法を実施した。実施した RACE 法では、最終的に nested PCR もしくは 2 次 PCR から得られた PCR 産物をクローニングし塩基配列を決定した。その結果、Fig. 45 の模式図に示したように、295 bp の 5'-RACE クローンと 664 bp の 3'-RACE クローンを得た。次に得られた 3 つのクローンをオーバーラップさせて全長 1,083 bp のニワトリ PDGF-B 鎖 cDNA の塩基配列を決定した。決定した塩基配列が正しいかどうかを確認するために、5'-RACE クローンの塩基配列中に B2F プライマーと、3'-RACE クローンの塩基配列中に B2R プライマーを設計し、栓球 cDNA を用いて PCR を行い、目的の長さ (601 bp) の増幅断片が得られた。また、この断片をクローニングし塩基配列を決定

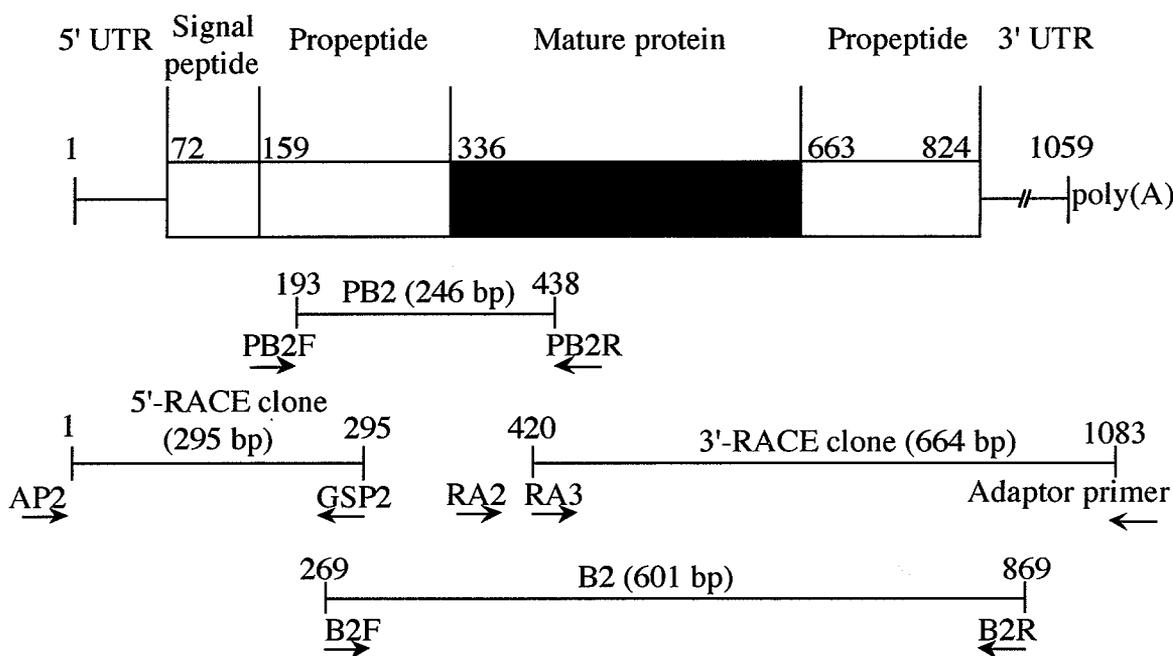


Fig. 45. Schematic diagram of chicken PDGF-B cDNA and the strategy for cloning

The top line represents chicken PDGF-B cDNA. The ORF for the PDGF-B protein was depicted by a box, in which the regions encoding the signal peptide, propeptide, and mature protein (closed box) are indicated. The strategy for cloning of chicken PDGF-B cDNA is shown below by lines. PB2 and B2 clone were derived from RT-PCR, and 3'- and 5'-RACE clone were obtained by RACE method. The primers used for each amplification and the sizes of the PCR products are indicated.

後、オーバーラップさせたニワトリ PDGF-B 鎖 cDNA 塩基配列と一致することを確認した。

(6) ニワトリ PDGF-B 鎖 cDNA 塩基配列の特徴

RT-PCR 法および RACE 法を用いて決定したニワトリ PDGF-B 鎖 cDNA 塩基配列の特徴を Fig. 46 に示した。決定した塩基配列は全長 1,083 bp であり、ORF 検索の結果 753 bp の ORF を含み、251 残基の完全長のニワトリ PDGF-B 鎖をコードしていることがわかった (Fig. 46, □内)。また、予想されるアミノ酸配列から N 末側のシグナル配列を Nielsen らの方法 [88]に基づいて推定したところ、31 残基目の Gly と 32 残基目の Asp の間がシグナルペプチダーゼにより切断されやすいことがわかり、シグナル配列は 31 残基のアミノ酸からなることがわかった (Fig. 46, 矢印及び上線部)。ニワトリ PDGF-B 鎖 cDNA の 3'末端には、poly(A)テイルと思われる 24 塩基の連続した A 配列が存在し、poly(A)テイルの始めから約 30 塩基上流には、poly(A)シグナル配列 (AATAAA) と類似した CTTAAA 配列が存在した。また、予想されるアミノ酸配列中には潜在的な糖鎖付加部位を示す配列は認められなかった。

なお、本章で得られたニワトリ PDGF-B 鎖 cDNA の塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank のデータベースに AB031025 で登録した。

(7) ニワトリ PDGF-B 鎖のゲノム解析

ニワトリ PDGF-B 鎖遺伝子のゲノム上におけるコピー数を解析するために、サザンブロッティングを行った。サザンブロッティングには、10 日胚肝臓から抽出したゲノムを *Bam*H I, *Eco*R I もしくは *Hind* III の制限酵素で処理して使用した。検出プローブには、B2F と新たに作成した 5BNR プライマー (Table 11) を用いた genomic PCR から得られた 381 bp のイントロンを含む増幅断片を使用した。その結果、Fig. 47 に示したように 3 種の制限酵素で処理したゲノム中で単一のシグナルが検出され、ニワトリ PDGF-B 鎖遺伝子はゲノム上に 1 コピー存在することがわかった。

(8) 異種動物間における PDGF-B 鎖アミノ酸配列の比較

クローニングしたニワトリ PDGF-B 鎖 cDNA 塩基配列から予想されるアミノ酸配列を、本章・結果(4)と同様の手法を用いて、ヒトおよびマウス PDGF-B 鎖

1 ACGCGGGAACAGGCAGCCTGCTTGCTGCCTGAGCCGGCTGCCACCGCTTCCCTCCCGGGGCTCTCCGTCC

	1	10	20
72	MET Cys Pro Gln Pro Ala Arg Leu Glu Pro Gly MET Asn Phe Gly Val Val Phe Ala Val	ATG TGC CCG CAG CCG GCA AGG CTT GAA CCC GGC ATG AAT TTC GGC GTG GTC TTC GCC GTC	
132	Ile Leu Ser Leu Pro Leu Ala Arg Leu Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Asp Ile Tyr Glu	ATC CTC TCC CTG CCC CTG GCC CGC CTG GAG GGG GAC CCC ATA CCC GAA GAT ATT TAT GAG	40
192	Ile Leu Gly Gly Ser Ser Val Arg Ser Ile Ser Asp Leu Gln Arg Ala Leu Arg Ile Asp	ATT TTG GGT GGC AGC TCC GTG CGC TCC ATC AGT GAC CTC CAG CGT GCC CTG CGG ATA GAC	60
252	Ser Val Glu Glu Asp Ser Ser Ser Leu Asp Leu Asn Ala Thr Gln Pro Ser Gln Asn His	TCC GTA GAG GAG GAC AGC TCT AGC CTG GAC CTG AAT GCA ACT CAG CCC AGC CAA AAC CAT	80
312	Val Ser Leu Ser Arg Glu Arg Arg Ser Leu Asp Ala Leu Ala Ala Ala Glu Pro Ala Val	GTG TCC CTG TCT CGA GAG AGG CGA AGC CTT GAT GCT CTG GCA GCA GCA GAG CCA GCT GTC	100
372	Leu Ala Glu Cys Lys Thr Arg Thr Val Val Phe Glu Ile Ser Arg Asp MET Val Asp Ser	CTC GCC GAG TGC AAG ACA CGG ACG GTG GTC TTT GAG ATC TCC CGT GAC ATG GTG GAC AGC	120
432	Thr Asn Ala Asn Phe Val Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln Arg Cys Ser Gly Cys	ACC AAT GCC AAC TTC GTG GTG TGG CCA CCC TGC GTG GAG GTG CAG CGG TGC TCC GGC TGC	140
492	Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro MET Gln Ile Arg Val Arg His Val Gln Val	TGC AAC AAC CGC AAC GTG CAG TGC CGC CCC ATG CAG ATT CGC GTC CGG CAT GTC CAG GTG	160
552	Asn Lys Ile Glu Phe Phe Gln Arg Lys Pro Ile Phe Lys Lys Val Ile Val Pro Leu Glu	AAC AAG ATT GAG TTT TTC CAG AGG AAG CCA ATA TTC AAA AAA GTC ATC GTG CCT TTG GAG	180
612	Asp His Val Gln Cys Arg Cys Glu Val Val Ser Arg Pro Pro Pro Arg Ser Asn Arg Pro	GAC CAC GTG CAG TGC CGG TGC GAA GTG GTG TCC CGG CCG CCA CCC AGG AGC AAC CGA CCG	200
672	Ala Ser Arg Glu Gln Arg Arg Phe Ser Pro Ser Phe Thr Thr Ala Ala Ile Ser Gln Arg	GCA TCC CGT GAG CAG AGA CGC TTC TCG CCG TCA TTC ACC ACA GCC GCC ATC TCC CAG AGG	220
732	Lys Arg Val Arg Arg Pro Pro Ala Gln Lys Arg Lys His Lys Lys Tyr Lys His Val Asn	AAG CGG GTA CGC CGG CCG CCA GCA CAG AAG AGA AAA CAC AAG AAA TAC AAG CAT GTC AAC	240
792	Asp Lys Lys Val Leu Lys Glu Ile Leu Ile Ala ***	GAT AAG AAA GTG CTG AAA GAA ATC CTC ATA GCA TAG AAGTGTGGCAGGGGAGAGAGAGACAAGGC	250

859 AGGTTTATTTAATATATTTGCTGTATTGCCCCATGGGGTCTTGGAGTGATAACTTTTCCCTCTTTGCCGGTCTGCCTC

938 AACGACTGATT CAGGCGCAAATGGTGCTTCCCTTCCATCAGTGGACCTTCTCCTACCGAAGCCTCTCCCTCTTTCA

1017 TTTATTAACATCTTAAAGTTTTACAAAAACAAAAACCAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1083

Fig. 46. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the chicken PDGF-B cDNA

The numbers above refer to the amino acid sequence; the numbers on the left referred to the nucleotide sequence. The ORF of 753 bp is boxed. The putative signal peptide of the 5' termini are overlined. The predicted cleavage site for the signal peptidase is indicated by an arrow. A termination codon is marked with three asterisks. The sequence of CTAAA which is similar to the typical polyadenylation signal (AATAAA) is underlined.

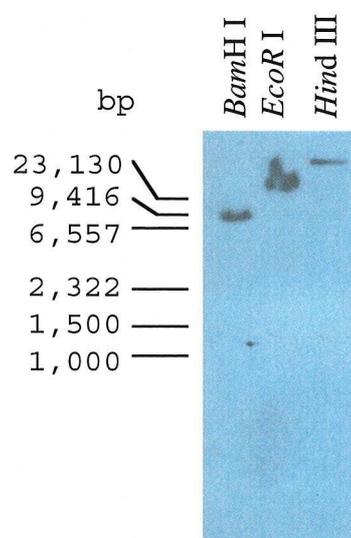


Fig. 47. Southern blot of chicken PDGF-B gene

Chicken genomic DNA from chick liver was digested with *Bam* H I, *Eco*R I and *Hind* III and hybridized with a chicken PDGF-B probe as described in Materials and Methods.

アミノ酸配列 [91, 92]と比較した。その結果、3つのアミノ酸配列をアライメントで配列させたものを Fig. 48 に示した。

ヒトおよびマウス PDGF-B 鎖アミノ酸は全長 241 アミノ酸残基からなり、N 末から 22 アミノ酸からなるシグナル配列、59 アミノ酸からなるプロペプチドと続き、109 アミノ酸からなる成熟型ペプチドがある。また、PDGF-B 鎖アミノ酸配列で特徴的なことは、成熟型ペプチドの C 末端側にさらに 51 アミノ酸からなるプロペプチドが存在している点である。アライメント解析の結果、Fig. 48 に示したように、ニワトリ PDGF-B 鎖アミノ酸は哺乳類よりも 10 アミノ酸長い 251 アミノ酸からなり、N 末から 31 アミノ酸からなるシグナル配列、57 アミノ酸からなるプロペプチドと続き、ヒトやマウスと同様 109 アミノ酸からなる成熟型ペプチドがあり、さらに 54 アミノ酸からなるプロペプチドにより構成されていることが予想された。哺乳類間で保存されている 8ヶ所のシステイン残基の位置は、ニワトリにおいても完全に保存されていた (Fig. 48, *)。また、PDGF- β 受容体との結合に重要と考えられている CNNRNV 配列 (93) はニワトリでも完全に保存されているのに対し、ニワトリ PDGF-A 鎖アミノ酸配列でも完全に保存されていた PDGF の活性中心と考えられている VRKK 配列は、ニワトリ PDGF-B 鎖アミノ酸配列中では異なっていた (Fig. 48, *)。

次に、ニワトリと哺乳類由来 PDGF-B 鎖アミノ酸配列の前駆体と成熟型で相同性 (%) を比較した。その結果、異種動物間における PDGF-B 鎖アミノ酸配列の相同性は、Table 15 に示したように哺乳類間での相同性がいずれも 85%以上で高度に保存されたタンパク質であるのに対して、ニワトリ PDGF-B 鎖は前駆体で 56~57%、成熟型でも 67~70%と哺乳類間との相同性と比べて低いことがわかった。

(9) 種々の組織及び細胞におけるニワトリ PDGF mRNA の発現

本研究でクローニングしたニワトリ PDGF mRNA の発現は、種々のニワトリ細胞株及び組織から調製した mRNA を用いた半定量的 PCR により解析した。解析には、 β -actin の発現量をもとに cDNA 量を統一した各種細胞および組織由来 cDNA を使用し、使用したプライマー毎に対数増幅期にある PCR サイクル数を設定した。

その結果、Fig. 49 に示したように、PDGF-A 鎖の S1 タイプは、PCR サイクル数 30 において、IN24, LMH および腎臓で強い発現が認められた。また、PCR

			Signal peptide		
Chicken	1	MCPQPARLEPGMNF	GVVFAVILSL	PLARIEGDPIPEDIYEIILGGSSVRS	
Human	1	MNRCWA-L-----F	LSLCCYLRL	VS-AEGDPIPEELYEMLSDHSIRS	
Mouse	1	MNRCWA-L-----F	LPLCCYLRL	VS-AEGDPIPEELYEMLSDHSIRS	
			Propeptide		
Chicken	50	ISDLQRAIRIDSVEEDSSSLDLNATQ	PSONHV-SLSRE	RRSIDALAAA	
Human	41	FDDLQRLRHGDPGEEDGAELDLNMTRSHSGGELESLARGRRSLGSLTIA			
Mouse	41	FDDLQRLRHDSVDEDGAELDLNMTRAHSGVELES	SSRGR	RRSLGSLAAA	
			Mature protein		
Chicken	97	EPAVLAECKTRTIVFEISRDMVDS	STNANFVWPPC	VEVQRC	SGCCNNRN
Human	90	EPAMIAECKTRTEVFEISRRLIDRTNANFLVWPPC		VEVQRC	SGCCNNRN
Mouse	90	EPAVIAECKTRTEVFOISRNLIDRTNANFLVWPPC		VEVQRC	SGCCNNRN
			Propeptide		
Chicken	146	*VQCRPMQIRVRHVQVNKIEFFQ	RKPIFKKVI	MPLE	DHVCRC
Human	139	VQCRPTQVQLRPVQVRKIEIVRKKPIFKKATVTLEDHLACKCETVAAAR			
Mouse	139	VQCRASQVQMRPVQVRKIEIVRKKPIFKKATVTLEDHLACKCETIVTPR			
			Propeptide		
Chicken	195	FRSNRPASREORRFSPSFTTAAIT	SORKRVR	RRPPAQR	KRKHKKYKHVNDKK
Human	188	PVTRSPGGSQEQRAKTPQTRVTI	RTVVR	RRPP	--KGKHRKFKHTHDKT
Mouse	188	PVTRSPGTSREORAKTPQARVTI	RTVRI	RRPP	--KGKHRKFKHTHDKA
Chicken	244	VLKEITLIA			251
Human	234	ALKETLGA			241
Mouse	234	ALKETLGA			241

Fig. 48. Comparison of predicted amino acid sequences among three forms of PDGF-B precursor peptides from chicken, human and Mouse

The residue numbers are indicated on the left. Arrowheads indicate the eight conserved cysteine residues of the mature peptide. Two regions that were important for binding to the receptor are indicated with asterisks. The sequences listed are cited as follows: human PDGF-B [91], mouse PDGF-B [92].

Table 15. Homology score at the amino acid level among the chicken and mammalian PDGF-Bs

	Amino Acid homology (%)			
	Chicken	Cat	Human	Mouse
Cat	56 (67)*	-	-	-
Human	57 (69)	91 (94)	-	-
Mouse	57 (70)	85 (85)	89 (89)	-
Sheep	56 (70)	89 (87)	91 (88)	86 (83)

***precursor (mature)**

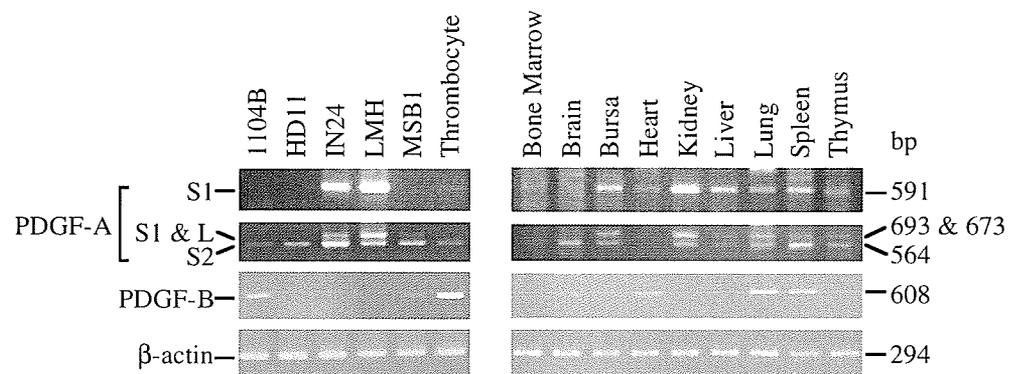


Fig. 49. Expression of chicken PDGF-A and -B mRNA in various cells and tissues

Poly(A)⁺ RNA was isolated from various chicken cells and tissues and amplified by RT-PCR using chicken PDGF primers as indicated in Table 10 and 11. The primers positions in nucleotide sequences were indicated in Fig. 40 and 45. PCR products were separated on 1% agarose gels. Chicken β-actin amplification products were served as internal controls.

産物がプラトーに達する PCR サイクル数 40 で増幅した場合、1104B と HD11 では S1 タイプの発現は全く検出されなかった（結果は示していない）。次に PDGF-A 鎖の L タイプと S2 タイプの発現解析を行った。S1 タイプの発現解析では、S1 タイプにのみ存在する塩基配列を用いて PCR プライマーを設計することで、S1 タイプのみの発現解析を行うことができたが、PDGF-A 鎖の L タイプと S2 タイプは、S1 の塩基配列と一致しているため (Fig. 40)、タイプ別の発現解析は不可能である。そこで、S1 と L タイプおよび S2 を同時に検出して比較した。その結果、S2 タイプは IN24, LMH, MSB1, 脳、腎臓と脾臓で強い発現が観察され、その他の細胞でも発現が認められた。また、PCR 産物がプラトーに達する PCR サイクル数 40 で増幅した場合、1104B では S1 と L の増幅を示す 564 bp のバンドが検出されず、1104B では S2 タイプのみが発現していることがわかった。また、HD11 では S1 タイプの発現が認められなかったことから、L タイプと S2 タイプが発現していることがわかった。その他の細胞及び組織では、S1 タイプと S2 タイプが発現量に差があるものの、少なくとも同時に発現していることがわかった。

PDGF-B 鎖の発現は、1104B, 栓球、肺および脾臓で強い発現が認められ、特に栓球で最も強く発現していることがわかった。HD11, IN24 や LMH ではほとんど発現が認められず、その他の細胞および組織でも PDGF-B 鎖 mRNA の発現は微弱であった。

次にニワトリ PDGF の mRNA 転写産物を検出するためにノーザンブロットティング解析を実施した。mRNA は、PDGF-A 鎖の発現が強かった IN24 と LMH を、また PDGF-B 鎖の発現が強かった 1104B と栓球から抽出したものを使用した。その結果、Fig. 50 に示したように、PDGF-A 鎖の転写産物は約 4 kb と約 2 kb の位置にバンドが検出された。また、PDGF-B 鎖の転写産物は約 4.2 kb の位置に確認された。

(10) 活性化栓球におけるニワトリ PDGF mRNA の発現解析

コラーゲンやトロンビンで栓球を刺激した際に、栓球における PDGF mRNA の発現量を半定量的 PCR 法により解析した。陰性対照には、培養器をシリコン処理したものを使用した。その結果、Fig. 51 に示したように、非刺激栓球ではほとんど発現が認められない PDGF-A 鎖 mRNA は、コラーゲン刺激およびトロンビン刺激 4 時間後で強い発現が認められ経時的に減少することがわかった。

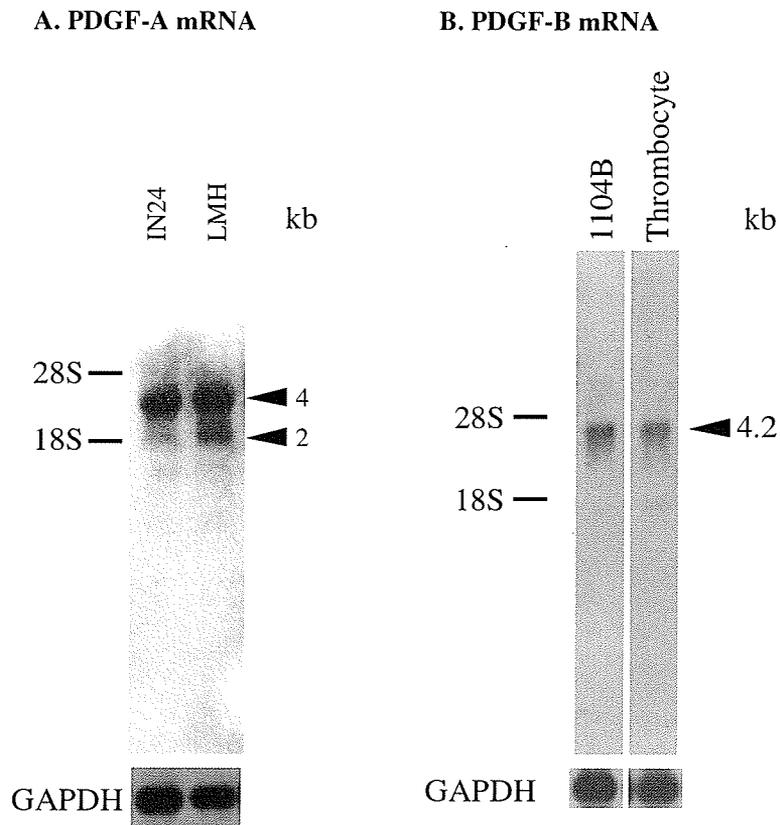


Fig. 50. Northern blot analyses of RNAs from the cultured cells and chicken thrombocytes

Total RNAs (1 μ g) from various cells were subjected to Northern analysis. The antisense RNA transcripts of PDGF-A (A) and PDGF-B (B) cDNA were used as a probe. Hybridization with a chicken GAPDH probe is shown below for comparison. As size markers, 18S and 28S ribosomal RNAs are indicated on the left.

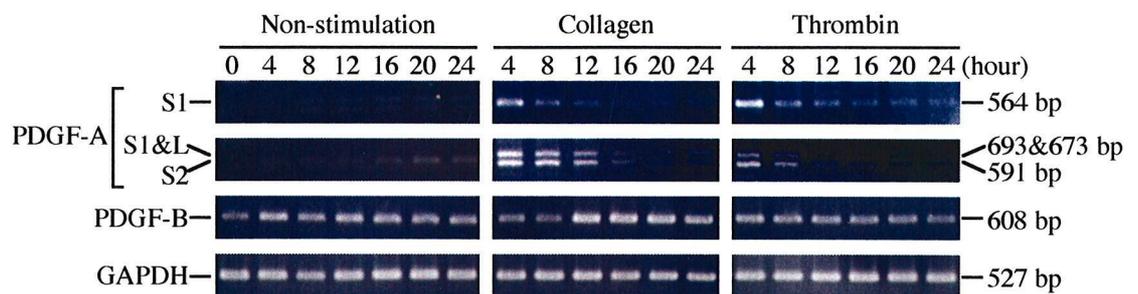


Fig. 51. Expression of chicken PDGF-A and -B mRNA in thrombocytes stimulated with type 1 collagen or thrombin *in vitro*

A Poly(A)⁺RNA was isolated from various chicken cells and tissues, and RT-PCR was performed using the chicken PDGF-A-specific primers (A2F-A2R) and chicken PDGF-B-specific primers (B2F-B2R). PCR products were separated on a 1% agarose gel. Chicken GAPDH amplification products were used as an internal control.

また、A 鎖の S1 タイプはコラーゲン刺激よりもトロンビン刺激で強く発現が誘導され、また、L タイプは相対的にコラーゲン刺激で強い発現が観察された。また、S2 タイプはコラーゲン刺激でトロンビン刺激よりも強い発現が認められた。これに対して、PDGF-B 鎖 mRNA は、未刺激の状態でも培養時間に係わらず一定の発現が認められ、トロンビン刺激による発現の変化は認められなかった。一方、コラーゲン刺激では、12 時間後に発現が強くなりその後徐々に減少することがわかった。

(11) 活性化栓球における種々の増殖因子 mRNA の発現解析

ニワトリでクローニングされている種々の増殖因子のうち、HGF と TGF- β ファミリー遺伝子の発現を、活性化栓球から分離した mRNA の半定量的 PCR により解析した。その結果、Fig. 52 に示したように、試験したいずれの増殖因子 mRNA も分離直後の培養 0 時間ではわずかな発現しか認められないものの、刺激・未刺激に関わらず培養 4 時間後に発現が高まることがわかった。HGF mRNA は、未刺激状態で培養した 12 時間後に最も強い発現が認められ、培養 24 時間後までその発現が維持されていた。一方、コラーゲン刺激では、刺激から徐々に HGF mRNA の発現が強くなり、16 時間後に最も強い発現が認められたが、未刺激に比べ発現量が低いことがわかった。HGF mRNA の発現を最も強く誘導したのはトロンビン刺激であった。トロンビン刺激後、12 時間で最も強い発現が認められ、この発現は 20 時間後まで持続し、24 時間後には減少していることがわかった。TGF- β 2 mRNA の発現解析では、HGF の場合と同様な結果が得られたが、未刺激よりはコラーゲンもしくはトロンビン刺激で発現が強くなっており、特にトロンビン刺激では刺激 4 時間後に強い発現が認められ、20 時間後までその発現が維持されていた。また、TGF- β 3 mRNA の発現は、TGF- β 2 mRNA の発現パターンに類似していたが、トロンビン刺激による強い発現誘導は観察されなかった。TGF- β 4 mRNA の発現は、いずれの条件においても培養 4 時間後から強い発現が認められ、特にコラーゲン刺激で強い発現誘導が認められた。トロンビン刺激において、8 時間後に発現の一過的な低下が認められたが、追試験においては同様の現象が認められなかった（結果は示していない）。

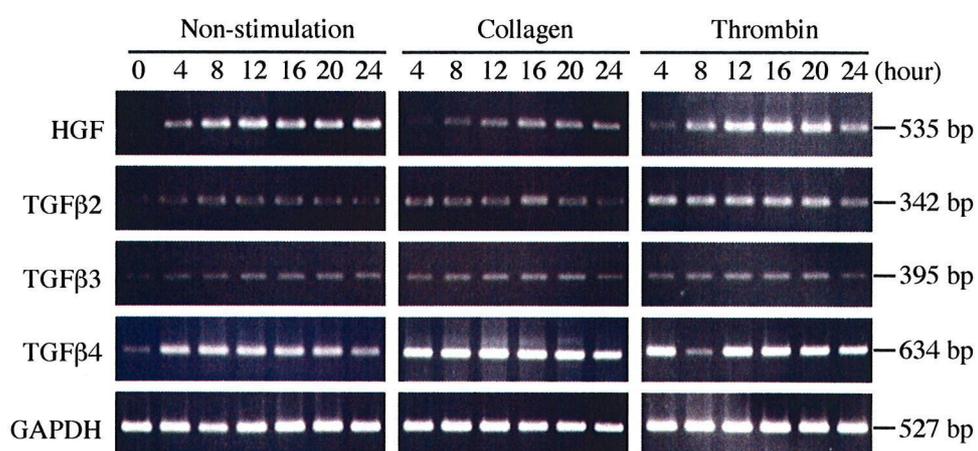


Fig. 52. Expression of chicken various growth factor mRNA in thrombocytes stimulated with type 1 collagen or thrombin *in vitro*

A Poly(A)⁺RNA was isolated from various chicken cells and tissues, and RT-PCR was performed using the chicken HGF and TGFβ_{2~4}-specific primers. The primer sequences were indicated in Table 12. PCR products were separated on a 1% agarose gel. Chicken GAPDH amplification products were used as an internal control.

5-4 考察

PDGF は血小板中に存在し，間葉系細胞に対して遊走・増殖刺激活性を有する因子として 1979 年に精製された [59]．その後，PDGF は先に精製された A 鎖と構造が類似した B 鎖とダイマーを形成することが明らかとなった [26]．現在，PDGF は血小板以外の多くの細胞が産生・分泌することが解り，生物の発生過程や損傷治癒過程といった生理的現象の他，動脈硬化症などの種々の病態発症にも重要な関わりがあることが判明し，現在もなお研究が進められている．これに対して，鳥類では FGF を始めとする発生に関わる多くの増殖因子遺伝子がクローニングされ，その機能が解析されているにも関わらず，鳥類 PDGF 遺伝子の解析は全く行なわれてこなかった．

そこで，本研究ではニワトリ栓球が有核細胞であり分子細胞学的解析に適していること，また，ニワトリ栓球が mRNA からタンパク質を翻訳している可能性が示唆されていたことから，栓球からの PDGF 遺伝子のクローニングを試みた．まず，既知哺乳類由来 PDGF-A 鎖もしくは B 鎖のアミノ酸配列から，異種動物間で高度に保存されている領域を数ヶ所選抜して，その塩基配列をもとに数種の PCR プライマーを作出した．これらのプライマーと栓球を含む各種ニワトリ由来細胞 RNA を用いて RT-PCR を行った．その結果，PDGF-A 鎖増幅用プライマーでは LMH から，PDGF-B 鎖増幅用プライマーでは栓球から，プライマー設計から予想される増幅産物が認められた．そこでこれらの産物をクローニングし塩基配列を決定したところ，それぞれ既知 PDGF-A 鎖および B 鎖と相同性があることがわかり，最終的に cDNA ライブラリーからのスクリーニングもしくは RACE 法を行ってニワトリ PDGF のクローニングに成功した．

クローニングしたニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA は，ゲノム解析から mRNA のスプライシングの差違により 3 種存在することが明らかとなった．既にクローニングされているヒト，マウス及びアフリカツメガエルの PDGF-A 鎖は，スプライシングの差異により長短の 2 種が存在することが解っており [87, 90]，ニワトリにおいて 3 種存在するのは鳥類の特徴であるものと思われる．また，哺乳類のゲノム解析から，PDGF-A 鎖のエクソンの数は 7 つであり，エクソン 6 に長型が，エクソン 7 に短型の C 末端がコードされており，エクソン 6 が転写されないことで短型が翻訳される [90]．ニワトリでは PDGF-A の全ゲノム遺伝子の解析は行っていないが，その部分的解析から (Fig. 44)，ニワトリでもエク

ソン b2 に長型と相同性の高い L タイプがコードされており、エクソン c に短型と相同性が高い S2 タイプがコードされていた (Fig. 42). すなわち、エクソン b1 にコードされたニワトリ PDGF-A 鎖 S1 タイプは、ニワトリ特有の転写産物であることが想像される。クローニングされたニワトリ PDGF-A 鎖 cDNA の 3'非翻訳領域は AT の豊富な特徴的な配列であり、S1 タイプや L タイプの 3'末端には poly(A)の配列が認められるが、いずれも真核細胞に見られる本質的な poly(A) tail に比べて短く、poly(A)が途中で切断されたのか、それともニワトリ PDGF-A 鎖の 3' 非翻訳領域は、さらに長いのもかもしれない。また、塩基配列から予想されるアミノ酸配列では哺乳類で保存されている 8 ヶ所のシステイン残基の位置、潜在的糖鎖付加部位がニワトリでも完全に保存されており、また成熟型 PDGF-A の比較では哺乳類由来のものと 90%近い相同性があり、NGF や FGF といった他の増殖因子と同様、鳥類と哺乳類間で良く保存されたタンパク質の一つであることがわかった。

一方、ニワトリ栓球からクローニングされた PDGF-B 鎖 cDNA は、全長が 1,083 bp であり、既知の哺乳類由来 B 鎖 cDNA と同様、A 鎖のスプライシングの差違により翻訳される数種のアイソフォームは認められなかった。また、cDNA の 3'末端には 24 bp の長い poly(A) tail とその 30 bp 上流には poly(A) シグナル配列である AATAAA と似た CTATAA の配列があり (Fig. 46), A 鎖 cDNA とは異なり、B 鎖 cDNA は 3'末端までクローニングされた可能性が考えられる。塩基配列から予想されるアミノ酸配列の特徴は、A 鎖と同様、哺乳類で保存されている 8 ヶ所のシステイン残基の位置が完全に保存されており、また潜在的糖鎖付加部位が存在しない点も一致していたが、ニワトリ PDGF-B 鎖では、シグナル配列が哺乳類よりも長いという特徴が認められた (Fig. 48)。アミノ酸レベルでの哺乳類とニワトリでの比較では、A 鎖が 80%以上の高い相同性が認められたのに対して、B 鎖では 60%以下の低い相同性であった。しかし、成熟型 B 鎖のみの比較では、70%前後に相同性が上昇することが明らかとなった。哺乳類の PDGF-B 鎖は生合成の際に、N 末端と C 末端が切断を受け、成熟蛋白質となる。この前駆体と成熟型で比較すると明らかに切断を受ける前駆体部分の相同性が低いことがわかった (Fig. 48)。さらに、哺乳類では成熟型の A 鎖と B 鎖で約 60%の相同性が認められるが、ニワトリでは 53%であることがわかった。これらの相違点は、生物活性をもつ成熟型タンパク質のアミノ酸配列は、異種動物間でもよく保存されていることを示しており、鳥類と哺乳類の系統進化を

考える上で非常に興味深い点であると思われる。

PDGF は先にも述べたように、A 鎖と B 鎖のホモもしくはヘテロ 2 量体として細胞外に分泌されることが明らかとなっている [26, 94]。この様式は、Fig. 53 に示したように A 鎖と B 鎖の前駆体が別々に翻訳された後、保存された 8 つのシステイン残基のうち N 末側から 2 番目と 4 番目でジスルフィド結合し、PDGF-AA, -AB, -BB の 3 種の前駆体が生合成され、修飾を受けた後、細胞外へ分泌される。また、PDGF-BB の大部分は膜結合型として細胞膜表面にとどまることも解っている。このように、PDGF は 2 種（ニワトリでは 3 種）の A 鎖と 1 種の B 鎖が 3 種の異なったアイソフォームを形成し、それらの生物活性にどのような相違があるのか関心が寄せられているが、未だ明確な解答は得られていない。というのも、PDGF 受容体がさらに問題を複雑にしているためである。ニワトリではまだ、PDGF 受容体の解析は進んでいないが、哺乳類での知見から、PDGF 受容体には α サブユニットと β サブユニットの 2 種があることが明らかとなった [95, 96]。 α サブユニットは A および B 鎖と、 β サブユニットは B 鎖のみと結合する (Fig. 54)。細胞膜上では α サブユニットと β サブユニットはともに単量体で存在するが、PDGF のダイマーが近づくとその種類に応じて、 α - α , α - β , β - β の 3 種の受容体サブユニットの 2 量体が形成されることが明らかとなった [97] (Fig. 54)。即ち、PDGF-AA は α - α 受容体にのみ結合するが、PDGF-AB は α - α と α - β 受容体に、PDGF-BB は α - α , α - β と β - β 受容体といったように複数の受容体に結合できることになる [97]。このことは一見、すべての受容体に結合できる PDGF-BB が最も活性が強く、また、幅広い細胞に生物活性を示すように考えがちであるが、問題はそう単純ではない。これは、産生細胞と作用細胞間で、産生細胞がどのような状況で、どのタイプの PDGF を産生するのか、また、作用細胞はどのタイプの受容体をどの程度の割合で発現するかにより生物活性に変化が見られることが予想され、PDGF の生物学的解析をさらに困難にしている。最近、受容体もしくはリガンドに対する部位特異的モノクローナル抗体を用いた受容体-リガンド結合阻害・活性阻害実験や PDGF 分子の立体構造解析から、受容体の結合や細胞内情報伝達に重要なリガンド部位が明らかにされつつある。これらの知見から、PDGF の受容体結合や活性中心として、ヒトでは A 鎖及び B 鎖に共通して保存されている VRKK(P) の塩基性の配列が重要であることが報告されている [88]。また、 β サブユニットの結合に重要な配列として、B 鎖中の CNNRNV が明らかとなって

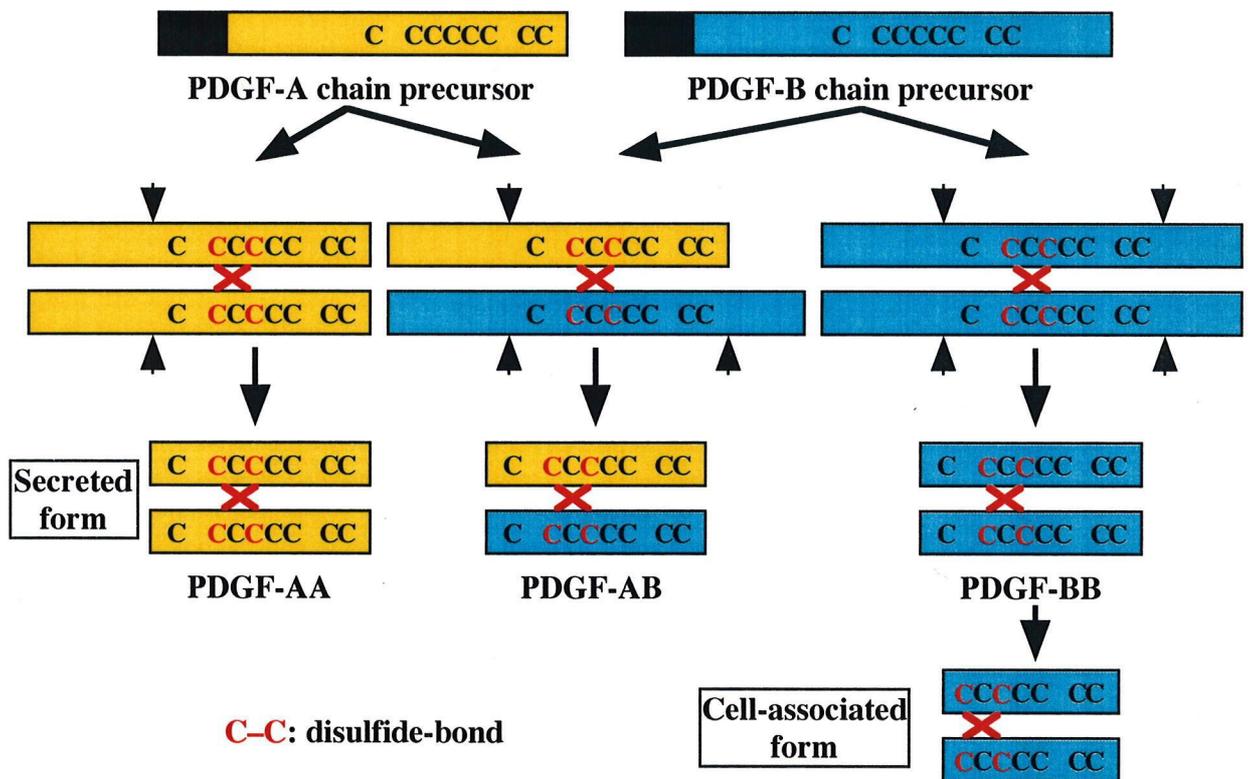


Fig. 53. Schematic illustration of the biosynthesis, assembly, and processing of the dimeric forms of PDGF

The A and B chains of PDGF are synthesized as precursor molecules with single peptides. After assembly into disulfide-bonded dimers proteolytic processing occurs (arrow heads).

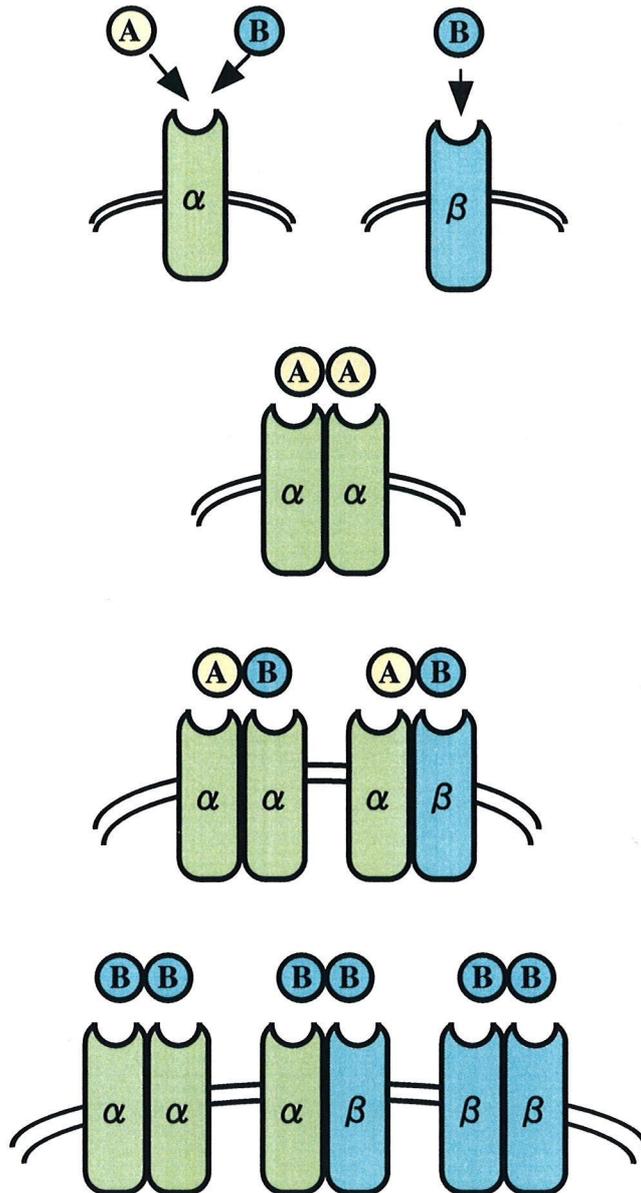


Fig. 54. Schematic illustration of the model of the dimeric forms of PDGF receptors

The α subunit binds both A- and B-chains, while the β subunit binds only B-chain. Thus, PDGF-AA binds α - α receptor, PDGF-AB binds α - α and α - β receptors, and PDGF-BB binds α - α , α - β and β - β receptors.

いる [93]. ニワトリでは, A 鎖アミノ酸配列には VRKK(P)配列が完全に保存されている (Fig. 44) ものの, B 鎖アミノ酸配列中では保存されていないことがわかった (Fig. 48). また, β サブユニットの結合に重要な CNNRNV 配列はニワトリでも完全に保存されていることがわかった (Fig. 48). 哺乳類では A 鎖および B 鎖ともに VRKK(P)の配列が重要であることが示唆されており, この部分がニワトリ PDGF-B 鎖で異なっている点は興味深い. また, Fig. 55 に示したように, ニワトリとヒト PDGF で共通に保存されている配列が他にも数ヶ所存在しており, まだ未解析のこのような部分が受容体結合や PDGF の立体構造の決定に関わっている可能性も考えられる. 今後, ニワトリ PDGF 受容体の解析の進展により, さらにリガンド-受容体の相互作用に重要な配列が解析されるのではないかと考えられる.

このように, PDGF とその受容体の複数の組合せと生物活性の多様性を, 受容体とリガンドの相互作用だけで解析することは困難である. すなわち, 上述の解析以外にも培養細胞や組織での PDGF の発現, またその中から細胞もしくは組織特異的な発現を考慮してモデル化することが重要である. そこで, 今後ニワトリ PDGF の解析結果を, 哺乳類を含めた PDGF の機能解析に活用できるように, ニワトリ PDGF の種々の細胞及び組織における発現解析をおこなった. 哺乳類では 2 種の PDGF-A 鎖のうち, 短型が種々の細胞ではるかに有意に発現していることが知られている [85]. ニワトリでは 2 種の短型 (S1 と S2) が存在するが, mRNA レベルでは L タイプと S1 タイプとの区別ができないものの, 哺乳類と同様, 短型 (S1 と S2) が強く発現していることがわかった (Fig. 49). また, B 鎖 mRNA が特定の細胞や組織に局限して発現しているのに対して, A 鎖 mRNA はいずれかのタイプが, 解析したすべての細胞で発現していることがわかった (Fig. 49). 特に興味深い点は, ニワトリ特有の転写産物である PDGF-A 鎖 S1 タイプが単球系細胞株 (IN24), 肝細胞系細胞株 (LMH) と腎臓で特に強く発現していることと, B 鎖 mRNA は組織および細胞の中で栓球が最も強い発現を示した点である. さらに栓球では A 鎖 mRNA の発現はわずかであり, B 鎖遺伝子をはるかに有意に発現していることは非常に興味深い点である. ヒトでは血小板中には PDGF-AB が多く存在する [98]. また, プタ血小板では PDGF-BB が多いことがわかっている [99]. ニワトリ栓球は, 発現解析の結果から踏まえると BB タイプが主であり, 常時膜結合型の PDGF-BB が存在していることが予想される. いずれにしる, 今後これらの細胞種特異的な発現様式

chicken A chain	1	-----SIEEAI	PAVCKTRTVIYEI	IPRSQIDPTS	SANFLI	IW	34	
chicken B chain	1	SLDALAAAE	PAVLAECKTRTVVFEI	SRDMVDS	TNANFV	VW	40	
human A chain	1	-----SIEEAV	PAVCKTRTVIYEI	IPRSQVDPTS	SANFLI	IW	34	
human B chain	1	SLGSLTIAE	FAMIAECKTRTEVF	ISRRLIDRT	NANFLV	W	40	
chicken A chain	35	PPC	VEVKRC	IGCCNTSSV	KCQPSRIH	HRSVKVAKVEYV	VRK	74
chicken B chain	41	PPC	VEVQRC	SGCCN	NRNVQCR	PMQIRVRHVQV	NKIEFFQR	80
human A chain	35	PPC	VEVKRC	IGCCNTSSV	KCQPSRVH	HRSVKVAKVEYV	VRK	74
human B chain	41	PPC	VEVQRC	SGCCN	NRNVQCR	PTQVQLRPVQ	VRKIEIVRK	80
chicken A chain	75	KPKLKEV	LVRL	EEHME	CTCTSTNT	NSDYREEET	107	
chicken B chain	81	KPIFKK	VIVPLE	DHVQCR	CEVVS	RPPRS----	109	
human A chain	75	KPKLKEV	QVRL	EEHLE	CACAT	TSLNPDYREEDT	107	
human B chain	81	KPIFKK	ATVILE	DHLACK	ETVAA	ARPVT----	109	

Fig. 55. Comparison of amino acid sequences of PDGF mature peptides between chicken and human

The residue numbers were indicated on the left and the right.

とその細胞から産生された PDGF の作用細胞の間で、受容体解析を含めた解析が重要であると思われる。

ところで、本研究における重要な要点は、栓球中の増殖因子の解析にある。本章のニワトリ PDGF のクローニングとその遺伝子の解析から、ニワトリ栓球では、A 鎖遺伝子よりも B 鎖遺伝子のほうがはるかに有意に発現していることが明らかとなった。そこで、栓球における PDGF の機能解析を行うための一つの手段として、栓球の凝集刺激における PDGF mRNA の発現の変化を解析した。なお、この実験は有核細胞であるニワトリ栓球でのみ可能なもので、無核である哺乳類血小板では不可能な実験系である。ニワトリ栓球を凝集惹起因子であるコラーゲンやトロンピンで刺激したところ、無刺激ではわずかな発現しか認められなかった PDGF-A 鎖 mRNA が刺激により短時間に発現を高め、その後また短時間のうちに発現レベルを低下させることが明らかとなった (Fig. 51)。PDGF-B 鎖 mRNA は、コラーゲン処理においてのみ刺激 16 時間後に発現の上昇が観察されたが、それ以外は刺激・無刺激に関わらずほぼ一定の発現レベルを保っていた。哺乳類では、一部の細胞種において PDGF-AA よりも PDGF-AB のほうがはるかに高い増殖活性を示すことが解っており [98]、栓球は活性化することで、産生する PDGF のタイプと発現量を変化させているものと思われる。栓球が活性化される生理学的な部位は、生体にとって緊急性を要する損傷部位であり、今後この仮説を裏付けるためには、タンパク質レベルでの生化学的な解析が必要であると思われる。

最後に本研究では、これまでにニワトリで遺伝子クローニングが行なわれている増殖因子のうち、哺乳類血小板に存在し損傷組織の修復や免疫・炎症反応に関係が深い HGF と TGF- β に関して、栓球における発現解析を実施した。なお本論文を作成中に、血小板中に存在し血管内皮細胞を増殖させる VEGF がニワトリからクローニングされた (データベースへの登録のみ) が、残念ながら栓球における解析はできなかった。TGF- β は正常の線維芽細胞を *in vitro* で形質転換させる因子として発見され、哺乳類では $\beta 1$ から $\beta 3$ までの 3 つのアイソフォームが存在する。ニワトリでは、これまでの解析から $\beta 2$ と $\beta 3$ の相同分子の他に、 $\beta 4$ のニワトリ固有の TGF- β がクローニングされている [17]。TGF- β の生物活性は、細胞増殖に関して線維芽細胞や血管内皮細胞に対しては促進活性を持つのに対して、上皮細胞や血球細胞に対しては抑制活性を示すユニークな多機能性サイトカインである。また、TGF- β はアイソフォーム間でも

く保存されており、アイソフォーム間に生物活性の違いは少ないと考えられている。ニワトリ栓球を凝集惹起因子であるコラーゲンやトロンビンで刺激したところ、これらの増殖因子 mRNA は無刺激ではいずれも低い発現レベルであったのに対し、刺激後にその発現レベルを一斉に上昇させることがわかった (Fig. 52)。特徴的なことは、凝集惹起因子の刺激を加えなくても、*in vitro* の培養系へ栓球を移しただけで、栓球が鋭敏に反応し発現が上昇することである。この点は PDGF の発現と大きく異なっている点である。中でも、HGF はトロンビン刺激により刺激 16-20 時間で最も発現が強くなり、また、TGF- β 2 は明らかにトロンビン刺激に対して鋭敏に発現を強めていることがわかった。これらの PDGF とその他の増殖因子の発現パターンの相違は、栓球の活性化、即ち止血凝集過程に密接に関わっていることが容易に想像され、栓球は増殖因子の産生を短時間のうちに微妙に調節し、損傷組織の修復における細胞の増殖命令と増殖停止命令を調節していることが予想される。今後、これらの増殖因子 mRNA の発現パターンと実際の生合成されたタンパク質レベルでの解析を融合させた *in vivo* もしくは *in vitro* でのモデル実験を構築することで、複雑な生体内でのサイトカイン作用の一端を解明できるのでないかと考える。

本章では、栓球由来細胞増殖因子を分子生物学的に明らかにすることを目的に、PDGF のクローニングからいくつかの実験を行った。その中で、ニワトリを実験動物に用いることで初めて明らかとなった多くの知見を得ることができた。今後、血小板の研究から得られている多くの知見と、栓球を利用することから明らかにできる分子レベルでの解析を合わせて考えることで、哺乳類血小板では明らかにできなかった部分の解明ができるのではないかと考えられる。

第6章 総括

本論文は、哺乳類血小板に相当するニワトリ栓球に着目し、ニワトリの発生段階における栓球の特徴と、栓球中に存在する細胞接着因子を含む細胞増殖因子を免疫学的、生化学的および分子生物学的に解析を行ったものである。

鳥類は 2~2.5 億年前に哺乳類と共通の祖先から分岐し、独自の進化を遂げてきたと考えられている。すなわち、その形態的特徴や生理学的な観点から、哺乳類とは異なった鳥類独自の機能を発達させてきた。しかし、その一方で鳥類と哺乳類間では共通に発達させた機能も少なくない。例えば個体発生では、卵生と胎生の違いはあるものの、その発生の過程は極めて類似している。また、ニワトリの免疫機構は哺乳類に次いで良く発達しており、免疫グロブリンの多様性獲得機構こそ違いがあるものの、その多様性はヒトと比べても劣ることはない。さらに糖鎖構造に関しては、ヒト以外の哺乳類よりもニワトリはヒトに近いことが解っている。このように、鳥類は、はるか昔に哺乳類と進化の袂を分かち独自に進化してきたにも関わらず、地球環境に適応するために重要な生体の機能は哺乳類と同様に高度に進化させ、またその類似点が多いことには驚かされる。

一方、鳥類と哺乳類では大きく異なっている点も多々存在し、その一例が血液細胞である。鳥類も哺乳類も血液細胞の構成は同じであり、赤血球、血小板（栓球）、リンパ球、単球、顆粒球からなり、その構成割合は 90%以上が赤血球と血小板（栓球）が占めている。この 2 種の細胞に関して哺乳類と鳥類で形態的に大きく異なっており、哺乳類では無核細胞であるのに対して、鳥類では有核細胞である。魚類から鳥類まではすべて有核細胞であることから考えると、哺乳類が進化の過程で有核から無核へ変化したと考えられる。なぜ、哺乳類では無核になってしまったのかについては明確な証拠は得られていないが、赤血球は生体の酸素運搬に携わり、また血小板は止血血栓形成に携わっており、その機能を特化させるために核をなくしてしまったのではないかと想像される。そのため、血小板では実質的な核酸からのタンパク質の生合成が行えず、細胞内に存在する多くの顆粒中に増殖因子等の必要なタンパク質を貯蔵していると考えられている。これに対して栓球は有核細胞であり、機能に関連したタンパク質の生合成を核酸から行うことが可能である。

ニワトリ栓球の研究は、1961 年に形態的特徴を解析したものが初めての報告

であり [100], その後の研究からこの細胞が血栓を形成する細胞として栓球 (thrombocyte) と名付けられた. 栓球という言葉はもともとヒトの血小板 (platelet) の別名として使用されていたもので, 血小板がその形態的特徴からの名称であり, 栓球はその機能的特徴に由来するが, 1910 年以降血小板 (platelet) に統一された. その後, 血小板に関する研究は, 初期の止血機構に関する研究から, 現在では動脈硬化症, 癌転移, 炎症, 移植, 免疫応答といった生体内生理現象の多岐多様な分野の基礎から応用まで広範囲に行なわれている. しかし, ニワトリ栓球はその細胞の発見から血小板と同様, 止血との関わりを中心に解析が進められてきたが, その他の機能に関してはほとんど解析されていないのが実状である. その要因の一つには, 栓球を特徴づける種々のマーカーが少ないことが挙げられる. 栓球は, 個体発生的にも血小板と大きく異なっており, また有核細胞であることから血小板では不可能な分子生物学的解析が可能な極めてユニークな細胞である. 本研究では, 血小板の持つ止血機能の次に重要な機能である損傷組織の修復に関わる増殖因子群に着目し, まず, 栓球の免疫学的な特徴付けから分化段階の解明を行い, 続いて栓球中に存在することが予想される増殖因子群の生物学的・生化学的特徴付けを行うとともに, 最終的に栓球の有する核酸を利用した分子生物学的手法を用いて, 栓球由来増殖因子の解析を行った.

第 2 章では, ニワトリ栓球分離方法の確立を行うとともに, 栓球特異的マーカーの検出のため栓球特異的 mAb の作出を行い, この抗体の特異性解析を行うと同時に, 栓球の分化過程を胚発生をさかのぼって解析した. その結果, 栓球を特異的に認識する HUKT mAb の作出に成功し, 栓球の新たな膜表面抗原の特徴として, HUKT⁺, CD45^{low} 細胞であることを発見した. また, 本研究で改良した簡便な濃度比重遠心法を用いることで, ニワトリ末梢血から約 85% の純度で栓球を分離できることが解った. HUKT mAb は約 150 kDa の単量体膜タンパク質を認識しており, これまで唯一栓球マーカーとして報告されている gpIIb-IIIa とは異なる分子を認識していることがわかった. また, HUKT 認識抗原は成熟栓球膜表面抗原だけではなく, 未分化な骨髄中の栓芽球や胚骨髄中の栓球前駆体細胞と思われる細胞にも発現していることが明らかとなった. さらに, HUKT 認識抗原は胚性血液のみならず, 発生過程で最初に血液細胞が出現する血島領域にも認められた. 以上の結果は, HUKT mAb が栓球の特異的マーカーとしてだけでなく, 栓球の分化マーカーとしても使用できることを示し

ている。

第 3 章では、ニワトリ栓球が哺乳類血小板と同様、止血機構のみならず損傷組織の修復に関与するならば、多くの増殖因子を細胞内に保有していると考えた。そこで、栓球抽出物並びに栓球放出物の種々の培養細胞に対する生物活性を測定すると共に、既知哺乳類由来増殖因子に対する抗体を用いて、栓球由来増殖因子の免疫学的解析を試みた。その結果、栓球を超音波破碎して得られた栓球抽出物が、ニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) の接着伸展と細胞増殖を促進することを明らかにした。また、栓球を 24 時間培養して回収した栓球放出物は、同じ細胞数を超音波破碎して得られた栓球抽出物よりも CEF に対して強い増殖活性を示すことが判った。この栓球抽出物は、CEF の DNA 合成活性をタンパク質濃度依存的に促進し、また、CEF 以外の哺乳類由来細胞株である CHO, MDBK, RK-13 や Vero 細胞の増殖をも促進した。以上の結果は、栓球中に血小板と同様複数種の増殖因子の存在を示唆していた。そこで、栓球放出物質に対する mAb を作出し、作出した mAb の中から既知増殖因子 (bFGF, EGF, PDGF, TGF- β) に対する抗体が含まれているかどうか試験したが、使用した増殖因子を特異的に認識する mAb を得ることはできなかった。次に、既知増殖因子に対するポリクローナル抗体を用いて、栓球放出物質中に含まれる増殖因子の同定を試みた。その結果、ELISA 及びウエスタンブロッティング解析から、抗 bFGF 抗体と抗 PDGF 抗体を用いた場合に特異的な反応を示す結果を得たが、最終的に栓球中のこれらの増殖因子の生化学的な同定には至らなかった。しかし、本実験結果から、明らかに栓球中に複数種の増殖因子の存在を示す生物学的証拠を得ることができた。

第 4 章では、第 3 章で認められた栓球放出物質中の細胞接着伸展促進活性に着目し、栓球放出物質の細胞接着活性の測定、免疫学的手法を用いた接着因子の同定と栓球からの接着因子の放出機構の解析を行った。その結果、栓球放出物質は、培養面にコートすることで種々の培養細胞の接着と伸展を促進すること、また、この活性はコートする蛋白濃度依存的に増加し、50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でコートした場合にプラトーに達することがわかった。さらに、この活性は、フィブロネクチンやビトロネクチンといった既知細胞接着因子の細胞結合部位である RGD 配列の添加により、有意に接着活性が阻害されることがわかった。そこで、次に抗フィブロネクチン抗体と抗ビトロネクチン抗体を用いて栓球放出物質中のフィブロネクチンやビトロネクチンの存在を検討したところ、栓球

放出物質中にはフィブロネクチンとビトロネクチンが共に存在することがわかった。また、ウエスタンブロットイングの結果から、血漿中に存在するフィブロネクチンやビトロネクチンと分子種が異なっていることがわかり、フィブロネクチンは細胞性フィブロネクチンであることが示唆された。さらに、これらの抗体を用いた細胞接着阻害試験を実施し、栓球放出物質中の接着活性は主に栓球由来フィブロネクチンによるものであることがわかった。また、同抗体を用いた免疫蛍光染色により、フィブロネクチンは栓球細胞質中に、ビトロネクチンは細胞膜表面に局在していることがわかった。簡便な定量法が確立しているフィブロネクチンの系を用いて、栓球由来フィブロネクチン量を定量したところ、約 $0.55 \mu\text{g}/1 \times 10^8 \text{ cells}$ のフィブロネクチンが栓球中に存在することが明らかとなり、また、このフィブロネクチンはトロンビン刺激により 10 分間という短時間の間に放出されることを明らかにした。

第 5 章では、栓球に由来する細胞増殖因子の存在を分子生物学的手法により明らかにすることを目的に、これまで未解析であったニワトリ PDGF 遺伝子のクローニングとその遺伝子の特徴付けを行い、さらに、ニワトリでクローニングされている増殖因子の栓球における遺伝子発現解析を行った。その結果、LMH 細胞株から PDGF-A 鎖 cDNA が、栓球から PDGF-B 鎖 cDNA がクローニングされた。ニワトリ PDGF-A 鎖及び B 鎖遺伝子はニワトリゲノム上にいずれも 1 コピー存在し、ニワトリ PDGF-A 鎖は既知 PDGF-A 鎖とは異なり、選択的スプライシングにより 3 種の転写産物を産生することが明らかとなった。また、ニワトリ PDGF-A 鎖のアミノ酸配列は哺乳類由来 PDGF-A 鎖のものと約 80% の相同性を示したのに対して、ニワトリ PDGF-B 鎖アミノ酸配列は哺乳類由来 PDGF-B 鎖と約 50% の相同性しかなく PDGF-A 鎖は、異種動物間で良く保存されている増殖因子の一つであることがわかった。ニワトリ PDGF の種々の細胞及び組織における発現解析から、PDGF-A 鎖 mRNA はいずれかのタイプの A 鎖 mRNA が広範に発現しているのに対して、B 鎖 mRNA はいくつかの組織および細胞に限局して発現しており、特に栓球で高発現していた。コラーゲンやトロンビンで刺激した活性化栓球における PDGF mRNA の発現解析の結果、PDGF-A 鎖 mRNA は刺激 4 時間後の短時間で急速に発現が高まることが明らかとなり、産生する PDGF のダイマータイプを変化させていることが示唆された。同様に HGF 及び TGF β ファミリーの mRNA 発現解析では、いずれの増殖因子も PDGF とは異なり、*in vitro* の培養系へ栓球を移しただけで、それぞれの増殖因子 mRNA

の発現が増加することがわかったが、HGF と TGF β 2 はトロンビン刺激に鋭敏に反応し、刺激 16 時間後に最も強く発現していることが明らかとなった。以上の結果は、栓球は血小板とは異なり、凝集刺激により活性化した際に細胞内で核酸からの転写、翻訳を経て増殖因子を発現させ、また、その発現時期を調節して増殖因子を放出し、損傷組織の修復を行っている可能性を示唆している。

以上のように、本研究では、ニワトリ栓球に由来する増殖因子の解析から、これまでニワトリでは不明であったいくつかの新しい知見を得ることができた。これらの知見は、哺乳類血小板を用いた研究からは得られないものも多く、今後、鳥類の系統進化を考える上で重要な情報源になるとともに、哺乳類のサイトカイン研究や血小板の機能解析にフィードバックできるものと思われる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり，終始変わらぬご指導とご鞭撻を賜りました広島大学・大学院生物圏科学研究科免疫生物学研究室 松田治男教授並びに古澤修一助教授に心から感謝申し上げます。また，本論文を作成するにあたり，貴重なご助言とご校閲を賜りました広島大学・大学院生物圏科学研究科家畜育種学研究室 山本義雄教授，同研究科家畜生体機構学研究室 吉村幸則教授，同研究科酵素化学研究室 江坂宗春教授並びに同研究科動物資源化学研究室 西村敏英教授に深く感謝いたします。

また，発生生物学の基礎と分子生物学的手法に関してご教授頂いた前熊本大学学長 江口吾朗教授，広島大学総合科学部 渡邊一雄教授，発生・再生科学総合研究センター進化再生研究グループ 阿形清和先生並びに姫路工業大学理学部 餅井 真助教授，さらに貴重な精製ニワトリフィブロネクチン，ビトロネクチン及びそれらに対する抗体をご分与いただき，また実験手法に関して貴重なご助言を賜りましたお茶の水女子大学理学部生物学科 林 正男助教授に厚くお礼申し上げます。

最後に常日ごろ暖かく励ましていただきました広島大学・大学院生物圏科学研究科免疫生物学研究室の皆様方，多くの卒業，修了生の皆様並びに家族に深く感謝いたします。

参考文献

- [1] Mantei, N., Schwarzstein, M., Streuli, M., Panem, S., Nagata, S. and Weissmann, C. (1980) The nucleotide sequence of a cloned human leukocyte interferon cDNA *Gene* 10: 1-10.
- [2] Derynck, R., Content, J., DeClercq, E., Volckaert, G., Tavernier, J., Devos, R. and Fiers, W. (1980) Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene. *Nature* 285: 542-547.
- [3] Gray, PW., Leung, DW., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, CC., Derynck, R., Sherwood, PJ., Wallace, DM., Berger, SL., Levinson, AD. and Goeddel, DV. (1982) Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. *Nature* 295: 503-508.
- [4] Adolf, GR., Maurer-Fogy, I., Kalsner, I. and Cantell, K. (1990) Purification and characterization of natural human interferon omega 1. Two alternative cleavage sites for the signal peptidase. *J. Biol. Chem.* 265: 9290-9295.
- [5] Nedwin, GE., Naylor, SL., Sakaguchi, AY., Smith, D., Jarrett-Nedwin, J., Pennica, D., Goeddel, DV. and Gray, PW. (1985) Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res.* 13: 6361-6373.
- [6] Browning, JL., Ngam-ek, A., Lawton, P., DeMarinis, J., Tizard, R., Chow, EP., Hession, C., O'Brine-Greco, B., Foley, SF. and Ware, CF. (1993) Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* 72: 847-856.
- [7] Mukaida, N., Shiroo, M. and Matsushima, K. (1989) Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J. Immunol.* 143: 1366-1371.
- [8] Ushio, S., Namba, M., Okura, T., Hattori, K., Nukada, Y., Akita, K., Tanabe, F., Konishi, K., Miellef, M., Fujii, M., Torigoe, K., Tanimoto, T., Fukuda, S., Ikeda, M., Okamura, H. and Kurimoto, M. (1996) Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J. Immunol.* 156: 4274-4279.
- [9] Edmonds, RH. (1968) Electron microscope studies on the hemostatic process in bird embryos. I. The initial plug. *Ultrastruct. Res.* 24: 295-310.

- [10] Grant, RA. and Zucker, MB. (1973) Avian thrombocyte aggregation and shape change *in vitro*. *Am. J. Physiol.* 225: 340-343.
- [11] Meier, R., Becker-Andre, M., Gotz, R., Heumann, R., Shaw, A. and Thoenen, H. (1986) Molecular cloning of bovine and chick nerve growth factor (NGF): delineation of conserved domains and their relationship to the biological activity and antigenicity of NGF. *EMBO J.* 5: 1489-1493.
- [12] Schnurch, H. and Risau, W. (1991) Differentiating and mature neurons express the acidic fibroblast growth factor gene during chick neural development. *Development* 111: 1143-1154.
- [13] Zuniga Mejia Borja, A., Meijers, C. and Zeller, R. (1993) Expression of alternatively spliced bFGF first coding exons and antisense mRNAs during chicken embryogenesis. *Dev. Biol.* 157: 110-118.
- [14] Jakowlew, SB., Dillard, PJ., Sporn, MB. and Roberts, AB. (1988) Nucleotide sequence of chicken transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1). *Nucleic Acids. Res.* 16: 8730.
- [15] Burt, DW. and Paton, IR. (1991) Molecular cloning and primary structure of the chicken transforming growth factor-beta 2 gene. *DNA Cell Biol.* 10: 723-734.
- [16] Jakowlew, SB., Dillard, PJ., Kondaiah, P., Sporn, MB. and Roberts, AB. (1988) Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a novel transforming growth factor-beta messenger ribonucleic acid from chick embryo chondrocytes. *Mol. Endocrinol.* 2: 747-755.
- [17] Jakowlew, SB., Dillard, PJ., Sporn, MB. and Roberts, AB. (1988) Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor beta 4 from chick embryo chondrocytes. *Mol. Endocrinol.* 2: 1186-1195.
- [18] Thery, C., Sharpe, MJ., Batley, SJ., Stern, CD. and Gherardi, E. (1995) Expression of HGF/SF, HGF1/MSP, and c-met suggests new functions during early chick development. *Dev. Genet.* 17: 90-101.
- [19] Flamme, I., von Reutern, M., Drexler, HC., Syed-Ali, S. and Risau, W. (1995) Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation. *Dev. Biol.* 171: 399-414.
- [20] Weining, KC., Sick, C., Kaspers, B. and Staeheli, P. (1998) A chicken homolog

- of mammalian interleukin-1 β : cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *Eur. J. Biochem.* 258: 994-1000.
- [21] Sundick, RS. and Gill-Dixon, CA. (1997) A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *J. Immunol.* 159: 720-725.
- [22] Schneider, K., Klass, R., Kaspers, B. and Staeheli, P. (2001) Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties. *Eur. J. Biochem.* 268: 4200-4206.
- [23] Kaiser, P., Hughes, S. and Bumstead, N. (1999) The chicken 9E3/CEF4 CXC chemokine is the avian orthologue of IL8 and maps to chicken chromosome 4 syntenic with genes flanking the mammalian chemokine cluster. *Immunogenetics* 49: 673-684.
- [24] Lillehoj, HS., Min, W., Choi, KD., Babu, US., Burnside, J., Miyamoto, T., Rosenthal, BM. and Lillehoj, EP. (2001) Molecular, cellular, and functional characterization of chicken cytokines homologous to mammalian IL-15 and IL-2. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 82: 229-244.
- [25] Schneider, K., Pehler, F., Baeuerle, D., Elvers, S., Staeheli, P., Kaspers, B. and Weining, KC. (2000) cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18. *J. Interferon Cytokine Res.* 20: 879-883.
- [26] Ross, R., Raines, EW. and Bowen-Pope, DF. (1986) The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46: 155-169.
- [27] Balk, SD. (1971) Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not of transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 271-275.
- [28] Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. and Harker, L. (1974) A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1207-1210.
- [29] Janzarik, H., Schauenstein, K., Wolf, H. and Wick, G. (1980) Antigenic surface determinants of chicken thrombocytoid cells. *Dev. Comp. Immunol.* 4:123-135.
- [30] Traill, KN., Bock, G., Boyd, R. and Wick, G. (1983) Chicken thrombocytes. Isolation, serological and functional characterization using the fluorescence activated cell sorter. *Dev. Comp. Immunol.* 7:111-125.
- [31] Kunicki, TJ. and Newman, PJ. (1985) Synthesis of analogs of human platelet membrane glycoprotein Iib-IIIa complex by chicken peripheral blood thrombocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7319-7323.

- [32] Campbell, TW. (1988) Avian hematology and cytology. Iowa State University press, Ames.
- [33] Higashihara, T., Mikami, T., Kodama, H., Izawa, H. and Tamura, H. (1986) Detection of a new antigen associated with chicken thrombocytes on Marek's disease lymphoblastoid cell line. *J. Natl. Cancer Inst.* 76: 1085-1094.
- [34] Akiyama, Y. and Kato, S. (1974) Two cell lines from lymphomas of Marek's disease. *Biken J.* 17: 105-116.
- [35] Yamaguchi, S., Kawamura, H., Matsuda, H. and Kato, S. (1979) Establishment of Marek's disease lymphoblastoid cell lines from chickens with BABK of B blood groups. *Biken J.* 22: 35-40.
- [36] Nazerian, K., Stephens, EA., Sharma, JM., Lee, LE., Gailities, M. and Witter, RL. (1977) A nonproducer T lymphoblastoid cell line from Marek's disease transplantable tumor (JMV). *Avian Dis.* 21: 69-76.
- [37] Hihara, H., Shimizu, T. and Yamamoto, H. (1974) Establishment of tumor cell lines cultured from chickens with avian lymphoid leucosis. *Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo)* 14: 163-173.
- [38] Inoue, M. and Sato, A. (1988) Establishment and in vitro differentiation of a chicken monocytic leukemia cell line. *Jpn J. Vet. Sci.* 50: 648-653.
- [39] Beug, H., von Kirchbach, A., Doderlein, G., Conscience, JF. and Graf, T. (1979) Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* 18: 375-390.
- [40] Shulman, M., Wilde, CD. and Kohler, G. (1978) A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 276: 269-270.
- [41] Veromaa, T., Vainio, O., Eerola, E. and Toivanen, P. (1988) Monoclonal antibodies against chicken Bu-1a and Bu-1b alloantigens. *Hybridoma* 7: 41-48.
- [42] Chan, MM., Chen, CL., Ager, LL. and Cooper, MD. (1988) Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. *J. Immunol.* 140: 2133-2138.
- [43] Paramithiotis, E., Tkalec, L. and Ratcliffe, JH. (1991) High levels of CD45 are coordinately expressed with CD4 and CD8 on avian thymocytes. *J. Immunol.* 147: 3710-3717.
- [44] Lacoste-Eleau, A-S., Bleux, C., Quere, P., Coudert, F., Corbel, C. and

- Kanellopoulos-Langevin, C. (1994) Biochemical and functional characterization of an avian homolog of the integrin GPIIb-IIIa present on chicken thrombocytes. *Exp. Cell Res.* 213: 198-209.
- [45] Tahara, Y. and Morinaka, T. (1990) The blood island is a site of formation of the primary embryo thrombocyte in the chicken blastoderm. *Dev. Growth Differ.* 32: 403-409.
- [46] Dieterlen-Lievre, F. and Martin, C. (1981) Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev. Biol.* 88: 180-191.
- [47] Medvinsky, A. and Dzierzak, E. (1996) Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86: 897-906.
- [48] McNagny, KM., Lim, F., Grieser, S. and Graf, T. (1992) Cell surface proteins of chicken hematopoietic progenitors, thrombocytes and eosinophils detected by novel monoclonal antibodies. *LEUKEMIA* 6: 975-984.
- [49] McNagny, KM., Pettersson, I., Rossi, F., Flamme, I., Shevchenko, A., Mann, M. and Graf, T. (1997) Thrombomucin, a novel cell surface protein that defines thrombocytes and multipotent hematopoietic progenitors. *J. Cell Biol.* 138: 1395-1407.
- [50] Nakamura, T., Teramoto, H. and Ichihara, A. (1986) Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6489-6493.
- [51] Savage, AP., Chatterjee, VK., Gregory, H. and Bloom, SR. (1986) Epidermal growth factor in blood. *Regul. Pept.* 16: 199-206.
- [52] Mohle, R., Green, D., Moore, MA., Nachman, RL. and Rafii, S. (1997) Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 663-668.
- [53] Assoian, RK. and Sporn, MB. (1986) Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 102: 1217-1223.
- [54] Nakamura, T., Teramoto, H., Tomita, Y. and Ichihara, A. (1986) Two types of growth inhibitor in rat platelets for primary cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 755-763.
- [55] Wachowicz, B. and Krajewski, T. (1979) The released proteins from avian

- thrombocytes. *Thromb. Haemost.* 42: 1289-1295.
- [56] Kull, FC. and Cuatrecasas, P. (1981) Preliminary characterization of the tumor cell cytotoxin in tumor necrosis serum. *J. Immunol.* 126: 1279-1283.
- [57] Kawahara, A., Ishikawa, S. and Amano, M. (1985) In vitro growth of adult amphibian (*Xenopus laevis*) hepatocytes and characterization of hepatocyte-proliferating activity in homologous serum. *Exp. Cell Res.* 159: 344-352.
- [58] Raines, EW. and Ross, R. (1982) Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J. Biol. Chem.* 257: 5154-5160.
- [59] Antoniades, HN., Scher, CD. and Stiles, CD. (1979) Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1809-1813.
- [60] Kleinman, HK., Klebe, RJ. and Martin, GR. (1981) Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.* 88: 476-485.
- [61] Chen, LB. and Buchanan, JM. (1975) Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 131-135.
- [62] Hannan, GN. and McAuslan, BR. (1987) Immobilized serotonin: a novel substrate for cell culture. *Exp. Cell Res.* 171: 153-163.
- [63] Sporn, MB. and Roberts, AB. (1992) Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J. Cell Biol.* 119: 1017-1021.
- [64] Raines, EW., Bowen-Pope, DF. and Ross, R. (1984) Plasma binding proteins for platelet-derived growth factor that inhibit its binding to cell-surface receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3424-3428.
- [65] LaMarre, J., Wollenberg, GK., Gonias, SL. and Hayes, MA. (1991) Cytokine binding and clearance properties of proteinase-activated alpha2-macroglobulins. *Lab. Invest.* 65: 3-14.
- [66] Zucker, MB., Mosesson, MW., Broekman, MJ. and Kaplan, KL. (1979) Release of platelet fibronectin (cold-insoluble globulin) from alpha granules induced by thrombin or collagen; lack of requirement for plasma fibronectin in ADP-induced platelet aggregation. *Blood* 54: 8-12.
- [67] Preissner KT., Holzhter, S., Justus, C. and Muller-Berghaus, G. (1989) Identification of and partial characterization of platelet vitronectin: evidence for complex formation with platelet-derived plasminogen activator inhibitor-1. *Blood* 74: 1989-1996.
- [68] Vilcek, J., Palombella, VJ., Henriksen-DeStefano, D., Swenson, C., Feinman, R.,

- Hirai, M. and Tujimoto, M. (1986) Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J. Exp. Med.* 163: 632-643.
- [69] Pierschbacher, MD. and Ruoslahti, E. (1984) Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309: 30-33.
- [70] Ruoslahti, E., Hayman, EG. and Pierschbacher, MD. (1982) Fibronectin: Purification, immunochemical properties, and biological activities. *In* Methods in Enzymology (Cunningham, LW. and Frederiksen, DW., eds) Vol. 82: pp. 803-831.
- [71] Preissner KT (1991) Structure and biological role of vitronectin. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 275-310.
- [72] Yamada, KM. and Kennedy, DW. (1979) Fibroblast cellular and plasma fibronectins are similar but not identical. *J. Cell Biol.* 80: 492-498.
- [73] Sekiguchi, K., Siri, A., Zardi, L. and Hakomori, S. (1985) Differences in domain structure between human fibronectins isolated from plasma and from culture supernatants of normal and transformed fibroblasts. Studies with domain-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 260: 5105-5114.
- [74] Umezawa, K., Kornblihtt, AR. and Baralle, FE. (1985) Isolation and characterization of cDNA clones for human liver fibronectin. *FEBS Lett.* 186: 31-34.
- [75] Gutman, A. and Kornblihtt, AR. (1987) Identification of a third region of cell-specific alternative splicing in human fibronectin mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7179-7182.
- [76] Paul, JI., Schwarzbauer, JE., Tamkun, JW. and Hynes, RO. (1986) Cell-type-specific fibronectin subunits generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 261: 12258-12265.
- [77] Underwood, PA. and Bennett, FA. (1989) A comparison of the biological activities of the cell-adhesive proteins vitronectin and fibronectin. *J. Cell Sci.* 93: 641-649.
- [78] Kitagaki-Ogawa, H., Yatohgo, T., Izumi, M., Hayashi, M., Kashiwagi, H., Matsumoto, I. and Seno, N. (1990) Diversities in animal vitronectins. Differences in molecular weight, immunoreactivity and carbohydrate chains.

- Biochim. Biophys. Acta.* 1033: 49-56.
- [79] Plow, EF., Birdwell, C. and Ginsberg, MH. (1979) Identification and quantitation of platelet-associated fibronectin antigen. *J. Clin. Invest.* 63: 540-543.
- [80] Parker, CJ., Stone, OL., White, VF. and Bernshaw, NJ. (1989) Vitronectin (S protein) is associated with platelets. *Br. J. Haematol.* 71: 245-252.
- [81] Frohman, MA., Dush, MK. and Martin, GR. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002.
- [82] Chen, Z. (1996) Simple modification to increase specificity of the 5' RACE procedure. *Trends Genet.* 12: 87-88.
- [83] Sambrook, J. and Russell, DW. (2001) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Third ed. CSHL press, USA.
- [84] Altschul, SF., Gish, W., Miller, W., Myers EW. and Lipman, DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- [85] Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, CH., Westermark, B., Lind, P., Urdea, MS., Eddy, R., Shows, TB., Philpott, K., Mellor, AL., Knott, TJ. and Scott, J. (1986) cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature* 320: 695-699.
- [86] Hoppe, J., Schumacher, L., Eichner, W. and Weich, HA. (1987) The long 3'- untranslated regions of the PDGF-A and -B mRNAs are only distantly related. *FEBS Lett.* 223: 243-246.
- [87] Mercola, M., Melton, DA. and Stiles, CD. (1988) Platelet-derived growth factor A chain is maternally encoded in *Xenopus* embryos. *Science* 241: 1223-1225.
- [88] Fenstermaker, RA., Poptic, E., Bonfield, TL., Knauss, TC., Corsillo, L., Piskurich, JF., Kaetzel, CS., Jentoft, JE., Gelfand, C., DiCorleto, PE. and Kaetzel, Jr. DM. (1993) A cationic region of the platelet-derived growth factor (PDGF) A-chain (Arg159-Lys160-Lys161) is required for receptor binding and mitogenic activity of the PDGF-AA homodimer. *J. Biol. Chem.* 268: 10482-10489.
- [89] Nielsen, H., Engelbrecht, J., von Heijne, G. and Brunak, S. (1996) Defining a similarity threshold for a functional protein sequence pattern: the signal peptide cleavage site. *Proteins* 24: 165-177.

- [90] Rorsman, F., Bywater, M., Knott, T.J., Scott, J. and Betsholtz, C. (1988) Structural characterization of the human platelet-derived growth factor A-chain cDNA and gene: alternative exon usage predicts two different precursor proteins. *J. Mol. Cell. Biol.* 8: 571-577.
- [91] Josephs, S.F., Ratner, L., Clarke, M.F., Westin, E.H., Reitz, M.S. and Wong-Staal, F. (1984) Transforming potential of human c-sis nucleotide sequences encoding platelet-derived growth factor. *Science* 225: 636-639.
- [92] Bonthron, D.T., Sultan, P. and Collins, T. (1991) Structure of the murine c-sis proto-oncogene (Sis, PDGFB) encoding the B chain of platelet-derived growth factor. *Genomics* 10: 287-292.
- [93] Andersson, M., Ostman, A., Kreysing, J., Backstrom, G., Van de Poll, M. and Heldin, C.H. (1995) Involvement of loop 2 of platelet-derived growth factor-AA and -BB in receptor binding. *Growth Factors* 12: 159-164.
- [94] Ostman, A., Rall, L., Hammacher, A., Wormstead, M.A., Coit, D., Valenzuela, P., Betsholtz, C., Westermark, B. and Heldin, C.H. (1988) Synthesis and assembly of a functionally active recombinant platelet-derived growth factor AB heterodimer. *J. Biol. Chem.* 263: 16202-16208.
- [95] Claesson-Welsh, L., Eriksson, A., Westermark, B. and Heldin, C.H. (1989) cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4917-4921.
- [96] Claesson-Welsh, L., Eriksson, A., Moren, A., Severinsson, L., Ek, B., Ostman, A., Betsholtz, C. and Heldin, C.H. (1988) cDNA cloning and expression of a human platelet-derived growth factor (PDGF) receptor specific for B-chain-containing PDGF molecules. *Mol. Cell Biol.* 8: 3476-3486.
- [97] Seifert, R.A., Hart, C.E., Phillips, P.E., Forstrom, J.W., Ross, R., Murray, M.J. and Bowen-Pope, D.F. (1989) Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 264: 8771-8778.
- [98] Nister, M., Hammacher, A., Mellstrom, K., Siegbahn, A., Ronnstrand, L., Westermark, B. and Heldin, C.H. (1988) A glioma-derived PDGF A chain homodimer has different functional activities from a PDGF AB heterodimer purified from human platelets. *Cell* 52: 791-799.
- [99] Stroobant, P. and Waterfield, M.D. (1984) Purification and properties of porcine

platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 3: 2963-2967.

[100] Lucas, AM. and Jamroz, C. (1961) Atlas of Avian Hematology. United States
Dept. of Agriculture, Washington.