サイトケラチンモノクローナル抗体の作製および ヒト唾液腺に対する反応性

浜川 裕之・谷岡 博昭

Preparation and reactivity to human salivary gland of cytokeratin monoclonal antibodies

Hiroyuki HAMAKAWA・Hiroaki TANIOKA

Abstract: Determination of the distribution of cytokeratin (CK) is prerequisite to using CK monoclonal antibodies (MAB) as a salivary gland tumor marker. The availability of monospecific antibodies to all CKs of simple epithelia provides an opportunity to analyze the CK profiles of salivary ductal, acinar and myoepithelial cells. In the present study, a battery of MABs to CK were produced and their reactivities to human salivary gland were examined immunohistochemically.

Cytokeratin was extracted and purified from bovine hoof according to Achtstaetter's method. Mice were immunized with a cytokeratin preparation containing seven polypeptides in the 50~68 kDa range. Out of 226 hybridomas, 21, resulting from fusion with SP 2/0 cells, produced antibodies that were positive by ELISA. Fifteen of them strongly stained the human salivary gland with diverse reactivities which were classified in to 6 types.

- I) MABs reacting with all epithelia (KH-21)
- II) MABs reacting with all epithelia except myoepithelial cells (MECs) (KH-1, KH-2, KH-3, KH-7, KH-8, KH-14)
- III) MABs recognizing all epithelia except acinar cells (KH-4, KH-20)
- IV) MAB recognizing MECs and basal cells (KH-5)
- V) MAB recognizing only basal cells (KH-6)
- VI) MABs staining acinar cells and intercalated ducts (KH-11, KH-12, KH-13, KH-16)

Immunoblotting demonstrated that a common epitope of the MECs and basal cells recognized by KH-5 was located in the 60 kDa polypeptide, and that many CK MABs produced by us share a common antigenic determinant existing in multiple CKs. The usefulness of the KH-series was demonstrated immunohistochemically.

Key words: cytokeratin (サイトケラチン), bovine hoof (ウシ蹄), monoclonal antibody (モノクローナル抗体), cell fusion (細胞融合), salivary gland (唾液腺)

緒 言

近年, 細胞骨格に関する機能的, 形態的研究は著しく

進展しつつある。加えて, 免疫組織化学の進歩に伴い, サイトケラチン (以下 CK), デスミン, ビメンチン, ニューロフィラメント, GFAP などの中間径フィラメント (以下 IF) に対する抗体が種々の腫瘍の病理診断あ

愛媛大学医学部歯科口腔外科学教室
(主任: 谷岡博昭教授)
Department of Oral & Maxillofacial Surgery,

School of Medicine, Ehime University (Chief:
Prof. Hiroaki Tanioka)
受付日: 平成5年3月5日

- 1) ウン蹄の表皮を採取.
- 2) 材料の10倍容量の緩衝液A (96 mM NaCl, 8 mM KH_2PO_4 , 5.6 mM $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5 mM KCl, 10 mM EDTA, 0.1 mM DTT, pH 6.8) 中にて細切後, ポリトロノホモゲナイザー (Polytron, Kinematica GmbH) にてホモゲナイズ.
- 3) ガーゼで濾過後, 残渣を3倍容量の緩衝液B (10 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 2 M KCl, 0.1 mM DTT, pH 7.4) にて4°Cで30分攪拌.
- 4) 遠沈 (10,000 g, 4°C, 20分).
- 5) 沈殿を湿重量1g当たり5mlの緩衝液C (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 1.5 M KCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 5 mM DTT, pH 7.6) にてホモゲナイズし, 4°Cで30分攪拌.
- 6) 遠沈 (10,000 g, 4°C, 20分).
- 7) 5)~6) を繰り返す.
- 8) 5 mM DTT を含む PBS で洗浄後, 4本のチューブに分割, 冷凍保存
- 9) 使用時に沈澱を解冻後, 1% SDS, 5% 2-ME 溶液または O'farrell の溶解用緩衝液にて溶解.

図1 サイトケラチンの分離, 精製法

るいは発生学の分野において新しい知見をもたらしている. このうち, CK は二次元電気泳動で展開すると分子量, 等電点の違いにより M.W. 40~68 kDa, pH 4.9~7.8 の間に20種類のスポットに分かれ, タイプI (#1~#8) の酸性ケラチンとタイプII (#9~#20) の中性・塩基性ケラチンに大別されている^{1,2)}. したがって, 本蛋白に対する抗体を各種の腫瘍マーカーとして活用するためには, 正常組織におけるCK分布を明確にすることが必須である.

1984年度のノーベル医学賞に輝いた Köhler と Milstein³⁾ は独創的な発想のもとにハイブリドーマ抗体産生法を確立した. 本法により作製されたモノクローナル抗体は, 医学生物学の広範な研究領域において汎用されつつあり, 各分野の研究の著しい進歩に貢献している. ところが現在までに他施設で作製され市販されているCKモノクローナル抗体はその多くが複数のCKペプチドを認識するため, 各臓器構成細胞におけるCKファミリーの局在決定を困難にしている.

そこで, われわれは唾液腺各構成細胞のCK分布を同定し, その特異的マーカーを開発するための基礎研究として, ウン蹄からCKを分離, 精製し, 多くのモノクローナル抗体を作製するとともにこれらの抗体の組織反応性を検討したので報告する.

実験材料および方法

1. 抗原の分離, 精製

屠殺場より4本のウン蹄を入手し, 蹄後方の足底部皮膚をメスを用いて5×20mmの短冊状に切除した. この皮膚短冊を表皮層と真皮層間でおおむね切離し, 20.5gの牛蹄表皮を採取した Achtstaetter の方法⁴⁾に準じ, CKの分離, 精製を行った (図1). なお, 表皮層と真皮層はその色調の違いを利用して区別したが, 逐次凍結切片

を作製し, その位置を確認した.

2. 抗原蛋白の電気泳動

1.5 mm 厚, 10% ゲルを作製し, タテ型電気泳動装置 (LKB マルチフォー社製) を用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (以下 SDS-PAGE) を行った. 精製 CK 蛋白は 10 mg/ml に調整し, サンプル量は 20~30 μg とした. 濃縮ゲルは 10 mA, 分離ゲルは 20 mA で 15°C にて 2 時間 40 分~3 時間泳動した. 泳動後ただちにトリクロロ酢酸・スルホサリチル酸にて固定し, 60°C で 1 時間クマジーブリアントブルー中にて染色した.

3. モノクローナル抗体の作製

1 mg/ml に調整した精製 CK 蛋白をフロイント完全アジュバントと 1:1.2 の比で混和後, BALB/C マウスに約 50 μg の蛋白量を腹腔内投与した. 3 週間後, マウスの尾部血管内に 1 mg/ml に調整した抗原溶液を 50 μl 静注した. 3 日後, 頸部脱臼によりマウスを屠殺し, マウス脾細胞 (8×10^7 個) と SP2/0-Ag14 ミエローマ細胞 (1.3×10^7 個) を約 6:1 で混和後, 37°C に加温した 45% PEG 1 ml を加えて細胞融合を行った (図2). HAT 選択培地中で融合細胞のみを増殖させ, ELISA にて抗体産生陽性ウエルのアッセイを行い, 限界希釈法によりクローニングを行った. 培養上清または腹水を 40% 硫酸アンモニウムで塩析し, セファデックス G-25 カラムを通して硫酸を除去し, 抗体を精製した.

4. 抗体の検定

各クローンの産生する抗体のクラス, サブクラスはマウスタイパーキット (Bio-Rad 社製) を用いて決定した. また, 各抗体が認識する抗原蛋白はイムノブロットィング法により同定した. すなわち, SDS-PAGE 後, ニトロセルロースメンブレン (SCHLEICHER & SCHUELL 社製) 上に 4°C で 30 V, 1 時間の条件にて蛋白の転写を行った. メンブレンを 0.3% ツィーン・PBS にて十分に洗浄後, 各泳動レーンに一致させて短

- 1) 免疫マウスの脾臓を RPMI 1640 (37°C) 中で細切.
- 2) 脾細胞, ミエローマ細胞をそれぞれ RPMI 1640 中で 3 回洗浄 (1,800 rpm, 5 min.).
- 3) マウス脾細胞 (1.3×10^8) とミエローマ細胞を 6:1 で混和 (1,800 rpm, 5 min.).
- 4) 上清を除去し, 37°C の 45% ポリエチレングリコール 1 ml を 1 分かけて少量ずつかき混ぜながら添加.
- 5) 37°C で 6 分30秒静置.
- 6) 37°C の RPMI 1640 を 5 分かけて 15 ml 加える.
- 7) 37°C の RPMI 1640 を一度に 25 ml 加え, 遠沈 (1,000 rpm, 5 min.).
- 8) RPMI 1640 にて洗浄 (1,800 rpm, 5 min.).
- 9) 10% FCS 添加 RPMI 1640 を加え, 5×10^6 細胞/ml に調整後, 96穴プレートに 0.1 ml ずつ分注, 培養.

図 2 細胞融合法

冊状に切り, おおのを酵素抗体法 (PAP 法) により染色した. なお, 発色基質としては 4-クロロ-1-ナフトールを使用した.

5. 抗体の組織反応性

材料としてはヒト唾液腺 (顎下腺, 口蓋腺) および口蓋粘膜を用いた. 外来または手術室にて採取後ただちに 3~4 mm 幅に細切し, カルノワ固定液中にて 2 時間固定した. PAP 法にて染色したが, 切片はすべて 0.01% トリプシンにて 10 分間消化後, 約 50 μ g/ml に調整した各抗体を 1 次抗体として反応させた. 2 次抗体にはウサギ IG 抗マウス IG (DAKO 社製), PAP-complex にはマウス PAP (Jackson Immuno Research Laboratories 社製) を使用し, 発色基質には DAB (和光社製) を用いた.

実験結果

1. 抗原蛋白の分離, 精製

凍結保存したチューブ 2 本を解凍し, それぞれ 1% SDS, 5% 2 ME 溶液または O'Farrell⁵⁾ の緩衝液中で溶解した. 各チューブから 20 mg/ml のウシ蹄由来精製 CK 15 ml を得た. SDS-PAGE の溶解液として 1% SDS, 5% 2 ME 溶液を使用した方が各バンドの分離が良好であった. 7 本のバンドを認め, その分子量はそれぞれ 68, 67, 65, 64, 60, 57, 50 kDa であった (図 3).

2. 細胞融合

226/384 ウェルに 1~5 個の融合細胞を認めたが, 培養中の汚染, 融合細胞の増殖不良などもきたしたため, ELISA で抗体産生陽性を示したウェル数は最終的に 21 であった. これを KH シリーズと命名し, KH-1 から KH-21 までの番号を付与した.

3. 抗体の特性および組織反応性

精製した各抗体を液体クロマトグラフィー (PW-3000 カラム) にて分析した. それぞれの抗体成分以外には FCS 中のトランスフェリン, アルブミンが少量存在していた. これらの抗体を 1 次抗体としてヒト唾液腺, 口

図 3 精製サイトケラチンの SDS-PAGE

1% SDS, 5% 2 ME 溶液に溶解した精製サイトケラチンをレーン 2, 3 にそれぞれ 2 μ l, 3 μ l 添加した電気泳動像. レーン 1 は分子量マーカーで上から 94 kDa, 67 kDa, 43 kDa, 30 kDa.

腔粘膜の免疫組織染色を行ったところ, 21 抗体中 16 抗体に陽性所見を認めた. 唾液腺組織には反応せず, ヒト口蓋粘膜の棘細胞のみを染色する抗体 (KH-19) や唾液腺上皮とは反応せず, 粘液細胞細胞質と導管の luminal border を顆粒状に染色する抗体 (KH-10) (写真 1) もあったが, 本研究からは除外した. 抗体クラスは IgG が最も多く, 次いで IgM, IgA の順であった. KH-11, KH-12, KH-13, KH-14, KH-16, KH-21 は十分な量の抗体を精製できないうちに融合細胞の増殖不良をきたしたので抗体クラスの決定は行わなかった.

15 抗体のうち, 主要抗体のイムノブロッティングを検討した. KH-1 は 68/67, 60, 57, 50 kDa, KH-2, KH-4 および KH-6 は 68/67, 65/64, 60, 57 kDa のバン

KH-1 KH-2 KH-3 KH-4 KH-5 KH-6

図 4 イムノブロッティングの結果

右端のレーンは精製サイトケラチンの SDS-PAGE.

表 1 イムノブロッティングの結果

	68/67 K	65/64 K	60 K	57 K	50 K
KH-1	◎		◎	◎	○
KH-2	◎	◎	○	○	
KH-3	○				
KH-4	◎	◎	○	◎	
KH-5			○		
KH-6	◎	◎	◎	◎	

ドを認識していた。一方、KH-3 と KH-5 はそれぞれ 68/67 kDa, 60 kDa のバンドのみと反応した (図 4, 表 1)。各抗体の唾液腺および口腔粘膜における組織反応性を表 2 に示した。21種類の抗体のうち、ヒト唾液腺に関しては、

- 1) すべての唾液腺上皮細胞に反応する抗体 (KH-2, KH-21) (写真 2)
- 2) 筋上皮細胞以外の唾液腺上皮細胞, すなわち, すべての導管上皮 (介在部, 線条部, 排泄管) および腺上皮に反応する抗体 (KH-1, KH-3, KH-7, KH-8, KH-14) (写真 3)
- 3) 腺房細胞以外のすべての上皮細胞に反応する抗体 (KH-4, KH-20) (写真 4)
- 4) 筋上皮細胞と導管基底細胞に反応する抗体 (KH-5) (写真 5)
- 5) 導管基底細胞のみを認識する抗体 (KH-6) (写真 6)

表 2 抗体の組織反応性

	KH-1	KH-2	KH-3	KH-4	KH-5	KH-6	KH-7	KH-8	KH-11	KH-12	KH-13	KH-14	KH-16	KH-19	KH-20	KH-21
抗体	G ₁	M	G ₁	G ₁	A	G _{2b}	G _{2b}	M						G _{2a}	M	
腺	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
筋	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
介在部	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
線条部	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
排泄管	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
円柱上皮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
基底細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
基底細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
棘細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

図 5 中間径フィラメントの生化学的構造

桿状のロッドドメインは 1A, 1B, 2A, 2B の 4 個のセグメントから構成されており，L1, L12, L2 の 3 個の linker により互いに結合している。ロッドドメインのアミノ酸組成は IF 間で顕著な相同性を示す。N 末端，C 末端領域の構造の違いにより Type I～IV に分類される。
V: variety, H: homology, L: linker.
(Steinert & Parry¹¹⁾ より引用)。

6) 腺房細胞と介在部導管細胞に弱陽性を示す抗体 (KH-11, KH-12, KH-13, KH-16)

の 6 グループに分類された。しかし，各構成細胞における染色性は抗体間で決して一定ではなく，たとえば導管基底細胞では細胞膜があたかもふちどられるかのごとく膜近傍の細胞質に強い陽性を示すもの (KH-4, KH-5, KH-6) と細胞質全体が顆粒状に陽性であるもの (その他の基底細胞陽性抗体) とが観察された。腺房細胞においても，細胞質全体を顆粒状に染色する抗体，主として腺腔側を染色する抗体，細胞膜を縁どりするごとく染色する抗体など，染色性に違いがみられた。

考 察

ほとんどすべての脊椎動物の細胞内には 3 種類の細胞骨格が存在する^{1,6,7)}。すなわち，actin-containing microfilaments (6～7 nm)，tubulin-containing microtubules (25 nm)，intermediate filaments (7～11 nm) である。これらの線維性タンパク質は一般に種特異性は低いが，免疫学的，生化学的にいくつかのサブクラスに分類される。このうち中間径フィラメントは現在 5 種類存在しており，CK (40～68 kDa) は上皮細胞に，ビメンチン (53 kDa) は間葉系細胞，星状膠細胞，Sertoli cells，血管平滑筋細胞，多くの培養細胞に，デスミン (52 kDa) は多くの筋細胞に，GFAP (50 kDa) は星状膠細胞に，ニューロフィラメント (NF-L: 60～70 kDa, NF-M:

105～110 kDa, NF-H: -135～150 kDa) は神経細胞に存在している^{1,7)}。

IF の詳細な機能はいまだ解明されていないが，細胞形態の決定，細胞内小器官の運動，細胞骨格の機械的な協調，細胞核の細胞質中央部への位置付けなどに関与するとされている⁸⁻¹⁰⁾。一方，最近の分子生物学の発展とともにその分子構造はかなり解明されている。すべての IF の構造は類似しており，中心部のおよそ 311～314 のアミノ酸からなる α ラせん構造の桿状領域 (ロッドドメイン) と，その両端の非ラセンの N および C 末端領域 (エンドドメイン) から構成されている (図 5)。ロッドドメインは各 IF 間で著しい相同性を有しており，その長さはおよそ 45 nm で 4 個のセグメントからなり，7 つのアミノ酸の準繰り返し (heptad) 構造になっている。この 4 個のセグメントは 3 個の非ラせん linker (L1, L12, L2) で連結されている。エンドドメインはアミノ酸配列に相同性がある H 副領域，多様性がある V 副領域，荷電分布のある N または C 副領域から構成されている。エンドドメインの構造で注目すべきは N 末端，C 末端にそれぞれ続く V1, V2 副領域である。アミノ酸配列に変化の富んだ V 副領域こそが個々の IF の分子量，機能的特徴を決定している。したがって，この末端領域の違いにより，タイプ I (酸性ケラチン)，タイプ II (中性・塩基性ケラチン)，タイプ III (デスミン，ビメンチン，FG-AP)，タイプ IV (ニューロフィラメント) の 4 タイプに分類されている。CK の場合，重層扁平上皮細胞では

V1は50~90のアミノ酸残基をもち、グリシンがその40%を占め、V2は48アミノ酸残基であり、グリシンは少ない。一方、単層上皮細胞のV副領域は不明であるが、アミノ酸配列はわずかであるか、欠如していると推測されている¹¹⁾。

1982年 Moll¹¹⁾によって作製されたケラチンマップは多くの組織、器官における19種類のCKファミリーの分布とその特性をあきらかにした。最近、Moll¹²⁾は従来ITタンパクと呼ばれていたヒト腸管上皮の主要ペプチドである分子量46kDaの蛋白を解析した。腸管上皮の2次元電気泳動法で出現するこのITタンパクを彼は最初#8のフラグメントと考えていたが、その後この蛋白がmRNAの産物であり、イムノブロッティングでCK抗血清中のただ1つと反応し、どのCKモノクローナル抗体にも反応しないことを確認した。インビトロではITタンパクはタイプIIの#8とheterotypicな複合体を形成すること、また至適条件下でこの複合体は集合し、IFを形成することから、#20としてCKカタログに加えることを提唱している。口腔領域ではこの#20CKはメルケル細胞と味蕾に存在している¹²⁾。

ところで、すべての上皮細胞は2~10種類のCKペプチドを保有しており¹³⁾、タイプIとタイプIIのペプチドがケラチンペアーを構成しており、2種以上のケラチンペプチドが存在しないとフィラメント集合を起こさない¹⁴⁾。たとえば、#1、2/#10は角化上皮、#3/#12は角膜上皮、#4/#13は食道上皮に存在している。#5/#14、15は基底細胞やケラチノサイト、#6/#16はターンオーバーの速い重層扁平上皮や培養細胞に出現し、#7/#17は単層上皮と一部の重層上皮に、#8/#18は単層上皮にケラチンペアーとして存在している¹³⁾。注目すべきことにこのペアーの分子量の差は常にほぼ8kDaである。これはH1、H2副領域がタイプIIのみにあり、タイプIに存在しないために生じた差であるとされている¹¹⁾。

α ケラチンは α らせんのポリペプチド鎖4本（または2本、あるいは3本）が左巻きらせんに捻じれあって構成されており、 α らせん上の側鎖に存在する多量のシステイン残基がS-S結合をすることにより強固な構造を作り上げている^{11,15)}。このポリペプチドは以前は3本鎖^{14,16,17)}とされていたが、最近ではタイプI、タイプIIからなる2本鎖、あるいはこの2本鎖がcoiled-coilを形成し4本鎖になるとする説^{18,19)}が有力である。

1. CK蛋白の分離精製について

著者はCK蛋白の分離、精製をするためにまず材料の選択を検討した。条件として、

- 1) 同蛋白が豊富にあること
- 2) 組織のホモジェナイズが困難でないこと
- 3) 材料が容易に入手可能なこと

を考慮し、ウシ蹄を使用することとした。近年、各種の上皮性腫瘍からCK抗体作製が報告されている^{20~23)}が、

再現性のある実験材料としては動物材料が最適である。

CKの分離精製法は1960年代半ばから1980年代にかけてMatoltsy²⁴⁾、Franke^{25~27)}、Sun²⁸⁾、Steinert^{29,30)}らによって開発されてきた。特にHeidelberg癌研究所のFrankeを中心としたグループはCKの生化学的、免疫組織化学的知見を数多く与えている^{31~33)}。Matoltsy²⁴⁾はクエン酸を用いてウシ鼻面の表皮から線維性蛋白が抽出されることを見出した。SteinertやFrankeらによってこの蛋白が多くのポリペプチドから構成されており、SDS-PAGEで分離されることがあきらかにされた。

著者は以前筋上皮細胞に存在する収縮蛋白であるアクトミオシンに着目し、ニワトリの砂嚢を材料として重合、脱重合法によりアクチン、ミオシン蛋白の分離精製を行った³⁴⁾。ところが、IF蛋白はアクチンやチューブリンとは異なり、単量体のブールがないため、その分離、精製に当たっては重合-脱重合操作を利用することができない。IF蛋白質は蛋白質変性剤や酸を加えないと可溶化しない。Achtstaetter⁴⁾によるとIFタンパクは原則的に次の2つの形で可溶化する。

(1) 4M尿素や2Mグアニジン塩酸を用いると水素結合を切断するが、 α らせんやポリペプチド鎖は離れられないため、4量体のサブユニットとして可溶化する。

(2) 9~10M尿素、4~6Mグアニジン塩酸やSDSのような変性剤を用いて変性モノマーとして溶解する。

われわれは当初、Matoltsyの方法により、クエン酸存在下にpH2.6にてCKを可溶化させたが、沈殿が生じやすく、またSDS-PAGEでの分離が良くないため、9M尿素の存在下に可溶化させる(2)の方法を選択した。また、CKの分離、精製に当たってはホモゲナイズ時の発泡を抑えたり、低温操作を確実に行うことによって、蛋白のフラグメント化や修飾を回避すべく注意を払った。今回の実験では20.5gのウシ蹄表皮から分離、精製したCK蛋白量は1,200mgであり、生化学的分析用、モノクローナル抗体作製用抗原材料としては十分であった。精製CKの分子量は68, 67, 65, 64, 60, 57, 50kDaであり、ウシ蹄の表皮に存在するCKをほとんど抽出していたが、minor bandsである54kDaと48kDa²⁵⁾は含まれていなかった。

最近、B. Meiklejohn³⁵⁾らはヒト膀胱上皮と食道上皮から得たCKベレットを8.0~9.5M尿素で可溶化し、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、逆相HPLCカラムを用いてCKの精製を行い、良好な結果を得ている。重層上皮に比べて単層上皮からのCK精製は容易でないことを考えると、この方法も今後利用されるべきである。

2. モノクローナル抗体の作製について

融合細胞は226/384ウエルにみられ、陽性率は約59%と良好な結果を得た。融合効率を高めるためにはミエロマ細胞が対数増殖期にあることはもちろんであるが、

融合後は細胞膜が軟弱になっているため, RPMI 1640 培地を使っの洗浄操作やピペッティングをできるだけ優しく慎重に行うことが大切である。

3. 抗体の組織反応性について

今回作製された21種類の抗ウシ蹄 CK モノクローナル抗体の組織反応性を免疫組織化学的に検討した。抗原材料として高分子側の CK ポリペプチドを用いたため、唾液腺に対する反応性は乏しい抗体が多いと予想されていたが、組織反応性を示した抗体のうちヒト口蓋粘膜腺細胞に陽性で、唾液腺に陰性であった KH-19 を除き、16抗体が唾液腺に対しそれぞれ多様な染色性を示した。このうち KH-10 は粘液細胞中に存在する糖蛋白を認識していると考えられたので除外した。この15抗体は唾液腺を構成するすべての上皮細胞を認識する抗体から、単一の構成細胞のみに反応する抗体まで6グループに分類される抗体群であった。筋上皮細胞以外のすべての上皮細胞に反応する抗体(グループ2)が5抗体、腺房細胞と介在部導管細胞を認識する抗体(グループ6)が4抗体であったことから、広域スペクトラムを有する抗体が作製されやすい傾向がみられた。興味ある抗体は KH-2, KH-5, KH-6 である。KH-2 はすべての唾液腺上皮細胞を染色することから、KG 8.13³⁶⁾ や KS 18.18³⁷⁾ 抗体と同様に唾液腺の汎 CK 抗体として利用価値があると考えられた。KH-5 はヒト唾液腺の筋上皮細胞と導管基底細胞のみを認識し、Göttingen マックスプランク研究所の Osborn, Weber が作製した CKB1³⁸⁾ と同様に、両細胞間に特異的に存在する共通の抗原決定基を認識する特異的マーカーである。同様の染色性を示す抗体としてはこのほかに KA-1³⁹⁾、312C8-1²⁰⁾ が挙げられる。CKB1 は当初 #5 のみとの反応性が推測されていたが、現在 #14 特異抗体として市販されている。KH-6 はヒト唾液腺では導管基底細胞のみを認識することから、ヒト唾液腺基底細胞特異的マーカーと考えられた。KH-6 と同様の染色性をもつ抗体としては KS 8.58³⁷⁾ が知られている。

ところで、今回の一連の CK モノクローナル抗体作製のなかで、結局唾液腺筋上皮細胞のみを特異的に認識する抗体は作製できなかった。はたして、筋上皮細胞のみに存在する CK は存在するのであろうか。また、筋上皮細胞のみと特異的に反応する CK 抗体は作製可能であろうか。最近10数年間に世界中の多くの施設で CK モノクローナル抗体の作製が試みられているが、真に筋上皮細胞のみを認識する抗体は作り出されていない。1985年に Dairkee²⁰⁾ らがヒト乳癌組織から作製した312C8-1は筋上皮細胞を同定する抗体ということで当時注目を集めたが、彼らは唾液腺排泄管基底細胞を筋上皮細胞と見誤ったため誤解を招くこととなった。312C8-1はヒト唾液腺では KH-5 と同様に筋上皮細胞と基底細胞を染色し⁴⁰⁾、後に #14 特異的であることがあきらかと

なった⁴¹⁾。また、Allen⁴²⁾ らがウシ鼻口部 CK を抗原として作製した 1A10 はラット乳腺筋上皮細胞特異的であると報告したが、基底細胞の染色性については記載がなかった。筋上皮細胞陽性の抗体はすべて排泄管基底細胞陽性であることから、筋上皮細胞特異的 CK が存在するとすれば、これは換言すれば基底細胞ではなく、筋上皮細胞のみに発現する CK が存在するという仮説が成立することになる。

一般に胎生期、生後の CK 発現については上皮の分化、発育という形態形成に伴うか、わずかに先行して CK 蛋白の出現がみられるといわれており、数種類の CK モノクローナル抗体を利用してモルモット顎下腺の発生を追った Marshak ら⁴³⁾の論文でもそれを裏づけている。したがって、唾液腺筋上皮細胞の分化、発育過程で本細胞特異的な上皮性抗原形質が獲得されることは否定しえないと考えている。ところが、世界中で抗体が作製されているにもかかわらず、特異抗体が見い出せないことを考慮すると、CK ポリペプチドに対する抗体作製という手法のみでなく、CK 遺伝子発現や筋上皮細胞の膜抗原という側面からの研究が必要になるう。

では、筋上皮細胞が保有する CK は判明しているのだろうか。いまだ20種類すべての CK に対する単ペプチド特異的抗体は作製されておらず、複数のサイトケラチンを認識する抗体群の組み合わせによってもすべてを同定しえない現在、これを完全には解明することはできない。その上、唾液腺構成細胞におけるケラチンペアーの生化学的検討はされていない。一般に、多くの単層上皮ではタイプⅠの #18, 19 とタイプⅡの #7, 8 で heterotypic tetramer を作っている。#8/#18; #8/18, 19; #7, #8/#18, 19 の3通りの組み合わせが主なパターンであるが、#7, 8/#18 の組み合わせもまれに存在すると報告されている²⁾。唾液腺腺房細胞のケラチンペアーは #8/#18, 導管管腔細胞のそれは #7, 8/#18, 19 であると状況証拠は多くなってきた^{37,41,43,44)}が、筋上皮細胞のケラチンペアーは2本鎖なのか4本鎖なのかすらも不明である。

Geiger³⁷⁾ らは、KG 8.13 (#1, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 18 と反応)、KM 4.62 (#19 特異抗体)、KS 18.18 (#18 特異抗体)、KA-1 (#4, 5, 6 と反応、ただし Nagle によれば #5 特異抗体)、KS 8.58 (#13, 16 を認識)の抗体群を使用して、ヒト唾液腺における CK 分布を調査した結果、ヒト筋上皮細胞には #4, 5, 6 のいずれかと #18 が存在し、#13, 16, 19 は存在しないことを報告した。一方、Caselitz²⁹⁾ らは CK5 染色の結果、#18 は存在しないとしており、同じ #18 のみを認識する KS 18.18 と CK5 の間においても異なる染色性を示す結果となっている。また、KS-1A3⁴⁵⁾ (#13 を認識)陽性で KS 8.58 (#13, 16 を認識)陰性という矛盾も生じており、筋上皮細胞における CK の明確な局在は解明されてい

ない。ただ、KA-1が#5, CKB1が#14に monospecific であるならば、KG 8.13, KA-1, CKB-1 陽性であることから少なくとも#5と#14は存在することになる。この結果は重層扁平上皮や Moll らが名付けた“complex” epithelia における基底細胞に#5/#14のケラチンペアーが1次ケラチンとして存在する事実とも合致している。筋上皮細胞のケラチンペアーが#5/#14の2本鎖、または4本鎖、それとも#5/#14, 15の3本鎖なのかは前述のごとく不明であるし、KS-1A3 (#13 特異的) 陽性の報告もあることを加味すれば今後さらに検討していく必要がある。

現在までに各施設で作られた CK モノクローナル抗体は K 8.13, PCK-26, K 8.12, K 8.60, K 4.62, PKK-1, KL-1 などのように2~8種の CK を認識する広域スペクトラム抗体が多いが、単一の CK バンドを認識する抗体も増加傾向にある。現在、単一ポリペプチドのみを認識する抗体としては、#2⁴⁶⁾, #4⁴⁷⁾, #5⁴¹⁾, #7^{48, 49)}, #8⁵⁰⁾, #10⁵¹⁾, #13⁴⁵⁾, #14⁴¹⁾, #16⁵²⁾, #17⁵³⁾, #18^{38, 45, 54)}, #19³⁹⁾, #20¹²⁾ に対する抗体などがある。逆にいえば large CK である#1, #9や角膜特異 CK である#3, #12に対する抗体作製は困難なようであるが、いずれ20種類の CK それぞれを単独で認識する抗体群が完成されるであろう。

イムノブロットングの結果からはいくつかの興味ある知見が得られた。KH-3は筋上皮細胞を除くヒト唾液腺上皮細胞を認識するにもかかわらず、イムノブロットングでは腺上皮細胞には存在しない68/67 kDaのCKのみと反応した。同様に、KH-5で認識される筋上皮細胞と基底細胞に共通する抗原決定基はウシ蹄 CK のうち分子量60 kDaのポリペプチド上にあることがあきらかとなった。これとは逆に、染色態度の異なる KH-2, KH-4, KH-6はそれぞれ反応の強さは異なるものの、同じタイプⅡ CK (68/67 kDa, 65/64 kDa, 60 kDa, 57 kDa) と反応した。ウシ蹄から精製した CK 抗原のうち、タイプⅡ large keratin である68/67 kDa, 65/64 kDaはヒト唾液腺に存在しないことを勘案すれば、われわれが作製した多くの CK モノクローナル抗体が認識する抗原決定基は特定の CK に特異的ではなく、複数の CK に存在する共通の抗原決定基であることがあきらかである。おそらくはロッドドメインに存在する共通抗原と推測される。このことは、酸性ケラチンの約半数 (#10, 14/15, 16, 19) を認識する AE1 や中性・塩基性ケラチンすべて (#1~#9) と反応する AE3^{13, 55)} はそれぞれタイプⅡ, I に共通する抗原決定基を認識する抗体であることや、Pruss⁵⁶⁾ らがヒト GFAP を抗原として作製した抗体が GFAP のみならずほとんどすべての IF (GFAP, NF, デスミン, ビメンチン, 数種の CK) と反応したという事実などと合わせて、IF 構造の類似性に基づいた共通抗原決定基の存在を支持している。ま

た、KH-1とKH-3は筋上皮細胞以外のすべての唾液腺上皮細胞を染色するという同じ染色態度をとりながらもそれぞれのイムノブロットング所見は全く異なっている。これはそれぞれが認識する抗原決定基の違いによることと、組織染色性とイムノブロットングの反応性とは必ずしも相関しないということを意味している。事実、#14の泳動ゲルを免疫して作製された LH6, LH8⁴¹⁾ は基底細胞に対し強陽性であり、基底細胞マーカーとされているがイムノブロットングではどの CK とも反応しない。

今回の研究では CK 抗原の採取材料としてウシ蹄、つまり、角化傾向の強い重層扁平上皮を用いたため、抗原の分子量が CK のなかでも高分子側に偏ることとなった。ヒト足底部の表皮でも分子量は48 kDa以上であることから、低分子側の酸性ケラチンを抽出するためには唾液腺上皮や消化管上皮を利用すべきである。今後、ヒト唾液腺を材料として各種 CK 蛋白の単離、精製を行い、筋上皮細胞特異的上皮性マーカーの作製を試みるとともに、唾液腺各構成細胞における CK の分布を明確にする必要がある。

KH-2, KH-5, KH-6の3種類の上皮性マーカーに加え、仮に筋上皮細胞特異的 CK 抗体が見い出されたならば、これらの抗体を組み合わせることにより、唾液腺腫瘍の発生由来や腫瘍細胞の分化の方向を同定することが可能であり、その病理学的意義は大きいと考えられる。

結 語

ウシ蹄表皮を材料として、CK の分離、精製を行い、これを抗原として CK モノクローナル抗体を作製し、ヒト唾液腺における組織反応性を検討した。

1. 精製 CK の分子量は68, 67, 65, 64, 60, 57, 50 kDa であった。
2. 226/384 ユエルに融合細胞を認めた。ELISA 陽性の21抗体を KH シリーズと命名した。
3. 15抗体がヒト唾液腺上皮細胞と反応し、その反応性は6グループに分類された。
4. ヒト唾液腺の筋上皮と導管基底細胞の2種類の細胞に反応する抗体 (KH-5) や導管基底細胞マーカー抗体 (KH-6) を作製することができた。
5. KH シリーズの多くは複数の CK に存在する共通の抗原決定基を認識していた。

引 用 文 献

- 1) Moll, R., Franke, W.W., et al.: The catalogue of human cytokeratins: Pattern of expression in normal epithelia, tumors and

- cultured cells. *Cell* 31: 11-24 1982.
- 2) Moll, R., Schiller, D.L., et al.: Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a noble type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol* 111: 567-580 1990.
 - 3) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 494-497 1975.
 - 4) Achtstaetter, T., Hatzfeld, M., et al.: Separation of cytokeratin polypeptides by gel electrophoretic and chromatographic techniques and their identification by immunoblotting. *Methods Enzymol* 134: 355-371 1986.
 - 5) O'farrell, P.H.: High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-4021 1975.
 - 6) Lazarides, E.: Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Ann Rev Biochem* 51: 219-250 1982.
 - 7) Osborn, M. and Weber, K.: Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Inv* 48: 372-394 1983.
 - 8) Lazarides, E.: Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283: 249-256 1980.
 - 9) Jones, J.C.R., Goldman, A.E., et al.: The organizational fate of intermediate filament networks in two epithelial cell types during mitosis. *J Cell Biol* 100: 93-102 1985.
 - 10) Fey, E.G., Capco, D.G., et al.: Epithelial structure revealed by chemical dissection and unembedded electron microscopy. *J Cell Biol* 99: 203s-208s 1984.
 - 11) Steinert, P.M. and Parry, D.A.D.: Intermediate filaments: conformity and diversity of expression and structure. *Ann Rev Cell Biol* 1: 41-65 1985.
 - 12) Moll, R., Löwe, A., et al.: Cytokeratin 20 in human carcinomas. *Am J Path* 140: 427-447 1992.
 - 13) Sun, T.T., Tseng, S.C.G., et al.: Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: A review. *Ann NY Acad Sci* 455: 307-329 1985.
 - 14) Lee, L.D. and Baden, H.P.: Organization of the polypeptide chains in mammalian keratin. *Nature* 264: 377-397 1976.
 - 15) Darnell, J., Lodish, H., 他: 分子細胞生物学 (下) (訳). 第1版, 東京化学同人, 東京, 1989, 858-860頁.
 - 16) Crewther, W.G. and Harrap, B.S.: The preparation and properties of a helix-rich fraction obtained by partial proteolysis of low sulfur S-carboxymethyl-keratine from wool. *J Biol Chem* 242: 4310-4319 1967.
 - 17) Steinert, P.M., Idler, W.W., et al.: Intermediate filaments of baby hamster kidney (BHK-21) cells and bovine epidermal keratinocytes have similar ultrastructures and subunit domain structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4534-4538 1980.
 - 18) Gruen, L.C. and Woods, E.F.: Structural studies on the microfibrillar proteins of wool. Interaction between α -helical segments and reassembly of a four-chain structure. *Biochem J* 209: 587-595 1983.
 - 19) Woods, E.F. and Inglis, A.S.: Organization of the coiled-coils in the wool microfibril. *Int J Biol Macromol* 6: 277-283 1984.
 - 20) Dairkee, S.H., Blayney, C., et al.: Monoclonal antibody that defines human myoepithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7409-7413 1985.
 - 21) Skaletsky, E., Oh, E., et al.: A human monoclonal antibody to cytokeratin intermediate filament antigens derived from a tumor draining lymph node. *Hybridoma* 7: 367-376 1988.
 - 22) Sundström, B.E., Nathrath W.B.J., et al.: Diversity in immunoreactivity of tumor-derived cytokeratin monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 37: 1845-1854 1989.
 - 23) Abe, T., Fukumoto, M., et al.: Human monoclonal antibodies against cytokeratin 18 generated from patients with gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 80: 271-276 1989.
 - 24) Matoltsy, A.G.: Soluble prekeratin. Lyne, A.G., Short, B.F.: *Biology of the skin and hair growth*. Angus & Robertson Ltd., Sydney, 1965, p 291-305.
 - 25) Franke, W.W., Weber, K., et al.: Antibody to prekeratin. Decoration of tonofilament-like arrays in various cells of epithelial character. *Exp Cell Res* 116: 429-445 1978.
 - 26) Franke, W.W., Schmid, E., et al.: Intermediate-sized filaments of the prekeratin type in myoepithelial cells. *J Cell Biol* 84: 633-654 1980.
 - 27) Franke, W.W., Schiller, D.L., et al.: Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J Mol Biol* 153: 933-959 1981.
 - 28) Sun, T.T. and Green, H.: Keratin filaments of cultured human epidermal cells. Formation of intermolecular disulfide bonds during terminal differentiation. *J Biol Chem* 253:

- 2053-2060 1978.
- 29) Steinert, P.M.: The extraction and characterization of bovine epidermal α -keratin. *Biochem J* 149: 39-48 1975.
 - 30) Steinert, P.M. and Idler, W.W.: Self-assembly of bovine epidermal keratin filaments *in vitro*. *J Mol Biol* 108: 547-567 1976.
 - 31) Bader, B.L., Magin, T.M., et al.: Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19, an exceptional tail-less intermediate filament protein. *The EMBO J* 5: 1865-1875 1986.
 - 32) Magin, T.M., Jorcano, J.L., et al.: Cytokeratin expression in simple epithelia. II. cDNA cloning and sequence characteristics of bovine cytokeratin A (No. 8). *Differentiation* 30: 254-264 1986.
 - 33) Franke, W.W., Winter, S., et al.: Identification of the conserved, conformation-dependent cytokeratin epitope recognized by monoclonal antibody (lu-5). *Virchows Arch A* 411: 137-147 1987.
 - 34) 浜川裕之, 谷岡博昭: 抗平滑筋ミオシン抗体を用いた筋上皮細胞の免疫組織化学的研究. *日口外誌* 31: 406-416 1985.
 - 35) Meiklejohn, B., Nagle, R.B., et al.: Improved methods for separation of human cytokeratins. *Life Sci* 47: 637-645 1990.
 - 36) Gigi-Leitner, O., Geiger, B., et al.: Cytokeratin expression in squamous metaplasia of the human uterine cervix. *Differentiation* 31: 191-205 1986.
 - 37) Geiger, S., Geiger, B., et al.: Cytokeratin polypeptides expression in different epithelial elements of human salivary glands. *Virchows Arch [Path Anat]* 410: 403-414 1987.
 - 38) Caselitz, J., Walther, B., et al.: A monoclonal antibody that detects myoepithelial cells in exocrine glands, basal cells in other epithelia and basal and suprabasal cells in certain hyperplastic tissues. *Virchows Arch [Path Anat]* 409: 725-738 1986.
 - 39) Nagle, R.B., Boecker, W., et al.: Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 34: 869-882 1986.
 - 40) Dardick, I., Parks, W.R., et al.: Characterization of cytoskeletal proteins in basal cells of human parotid salivary gland ducts. *Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol* 412: 525-532 1988.
 - 41) Purkis, P.E., Steel, J.B., et al.: Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J Cell Sci* 97: 39-50 1990.
 - 42) Allen, R., Dulbecco, P., et al.: Developmental regulation of cytokeratins in cells of the rat mammary gland studied with monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1203-1207 1984.
 - 43) Marshak, G., Leitner, O., et al.: Cytokeratin polypeptide expression during the histogenesis of guinea pig submandibular salivary gland. *Development* 100: 699-711 1987.
 - 44) Draeger, A., Nathrath, W.B.J., et al.: Cytokeratins, smooth muscle actin and vimentin in human normal salivary gland and pleomorphic adenomas. *APMIS* 99: 405-415 1991.
 - 45) Levy, R., Czernobilsky, B., et al.: Subtyping of epithelial cells of normal and metaplastic human uterine cervix, using polypeptide-specific cytokeratin antibodies. *Differentiation* 39: 185-196 1988.
 - 46) Collin, C., Moll, R., et al.: Characterization of human cytokeratin 2, an epidermal cytoskeletal protein synthesized late during differentiation. *Exp Cell Res* 202: 132-141 1992.
 - 47) Van Muijen, G.N.P., Ruiter, D.J., et al.: Cell type heterogeneity of cytokeratin expression in complex epithelia and carcinomas as demonstrated by monoclonal antibodies specific for cytokeratins nos. 4 and 13. *Exp Cell Res* 162: 97-113 1986.
 - 48) Southgate, J., Williams, H.K., et al.: Primary culture of human oral epithelial cell. Growth requirements and expression of differentiated characteristics. *Lab Invest* 56: 211-223 1987.
 - 49) Lane, E.B., Bartek, J., et al.: Keratin antigens in differentiating skin. In: Wang, E., Fischman, D., et al.: Intermediate filaments. *NY Acad Sci Ann* 455: 241-258 1985.
 - 50) Van Muijen, G.N.P., Ruiter, D.J., et al.: Coexpression of intermediate filament polypeptides in human fetal and adult tissues. *Lab Invest* 57: 359-369 1987.
 - 51) Ramaekers, F.C.S., Moesker, O., et al.: Intermediate filament proteins in the study of tumor heterogeneity: an in-depth study of tumors of the urinary and respiratory tracts. *Ann NY Acad Sci* 455: 614-634 1985.
 - 52) Broekaert, D., Goeman, L., et al.: An investigation of cytokeratin expression in skin epithelial cysts and some uncommon types of cystic tumours using chain-specific antibodies. *Arch Dermatol Res* 282: 383-391 1990.
 - 53) Guelstein, V.I., Tchypysheva, T.A., et al.: Monoclonal antibody mapping of keratins 8

- and 17 and of vimentin in normal human mammary gland, benign tumors, dysplasias and breast cancer. *Int J Cancer* 42: 147-153 1988.
- 54) Tölle, H.G., Weber, K., et al.: Microinjection of monoclonal antibodies specific for one intermediate filament protein in cells containing multiple keratins allow insight into the composition of particular 10 nm filaments. *Eur J Cell Biol* 38: 234-244 1985.
- 55) Nielsen, L.N., Hørding, U., et al.: Cytokeratin intermediate filament pattern and human papillomavirus type in uterine cervical biopsy with different histological diagnosis. *Gynecol Obstet Invest* 32: 232-238 1991.
- 56) Pruss, R.M., Mirsky, R., et al.: All classes of intermediate filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Cell* 27: 419-428 1981.

写真説明

写真 1 KH-10 染色

粘液細胞細胞質に陽性で, 導管の luminal border にも反応している (以下すべてヒト顎下腺の PAP 染色, 倍率: $\times 75$).

写真 2 KH-2 染色

すべての上皮細胞に反応 (核は未染色, 倍率: $\times 50$).

写真 3 KH-7 染色

筋上皮細胞以外の顎下腺上皮細胞を染色. ただし粘液腺細胞質は陰性 (倍率: $\times 150$).

写真 4 KH-4 染色

腺房細胞以外のすべての上皮細胞に反応 (倍率: $\times 30$).

写真 5 KH-5 染色

筋上皮細胞と導管基底細胞に反応 (倍率: $\times 75$).

写真 6 KH-6 染色

導管基底細胞のみを認識 (倍率: $\times 75$).

1

2

3

4

5

6

Cytophot. 34: 329-332 (1982).

40) Gundersen, L., Parke, W.R., et al.: Characterization of histological sections of human parotid gland. *Virchows Archiv A* 412: 535-540 (1988).

41) Parke, F.L., Neeb, J.E., et al.: Anatomical studies of human parotid gland. *J Oral Med Pathol* 28: 28-30 (1980).

42) Allen, R., Duxbury, P., et al.: *Immunohistochemistry*. Ann NY Acad Sci 455: 414-424 (1985).

43) Horiuchi, H., Kawano, J., et al.: A study on the histological changes in the parotid gland during aging. *Ann Pathol Japan* 32: 255-262 (1982).

44) Horiuchi, H., Kawano, J., et al.: Histological studies on the parotid gland. *Ann Pathol Japan* 32: 255-262 (1982).