

氏 名 (本籍) ほし 星 ひろ 宏 よし 良

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 8 7 1 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 5 7 年 3 月 2 5 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
(博 士 課 程) 病 理 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 ヒト正常二倍体線維芽細胞の無血清培養
I 細胞増殖および細胞老化に与える増殖因子、血清因子およびグルココルチコイドホルモンの役割
II 増殖因子およびグルココルチコイドホルモンの作用機序について

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 山 根 績 教 授 松 沢 大 樹

教 授 石 田 名 香 雄

論 文 内 容 要 旨

ヒト二倍体線維芽細胞は、①増殖因子、ホルモン、栄養素などの要求性が厳密なためこれら因子の作用機序解明、②限られた細胞分裂回数を示すことから細胞老化モデル、③先天性代謝異常の早期発見、④ヒト遺伝子地図作成など広範な体細胞遺伝学への応用、⑤インターフェロン、ワクチン等生理活性物質の生産、などに広く用いられている。

細胞培養の際、通常血清を培地に添加することが常法として用いられている。この血清は In Vitro 細胞培養の生存と増殖に重要な役割を果し、さらに血清中に含まれる生理活性物質は In Vivo の細胞の機能の発現と密接な関係があることが知られている。しかし血清中には数多くの未知成分が混在しており、細胞の分裂や分化に関係した重要な因子の正確な生理的作用の生化学的解析が困難をきわめている。

近年この血清の代りに、成分既知のホルモン、栄養素、結合タンパク質、細胞接着因子などを用いた無血清培養法がいくつかの細胞の生存、増殖を可能にすることがわかってきた。

この無血清培養の有用性として、各種栄養素、ホルモン、増殖因子等の作用機序解明、細胞分化に影響をおよぼすホルモンや薬剤の同定、初代混合細胞からの選択的細胞培養、正常細胞と癌細胞の栄養要求性の相違、細胞寿命を延長する因子の発見、などがあげられる。

本論文ではヒト胎児肺由来線維芽細胞を用いて、無血清培養に必要な因子の同定とそれら因子の作用機序について報告する。

① ヒト二倍体線維芽細胞の無血清基礎培地として RITC78-6 と RITC80-7 培地を開発し、この培地では 0.5% 微量血清添加で BME-10% 血清培地と同様の細胞増殖を示し、長期継代培養も可能であった。血清の減量の重要な因子は増殖因子類 (EGF, インシュリン, トランスフェリン, T_3) であり、若い細胞の細胞飽和密度や DNA 合成を促進した。しかし老化細胞では上記の増殖因子類の細胞に対する反応性が消失した。

② ヒト二倍体線維芽細胞の無血清培地での初代培養、さらには長期継代培養にはフィブロネクチンと牛血清アルブミン (BSA) が必要であることが判明した。フィブロネクチンは細胞のシャーレへの接着促進因子として、BSA は主に脂質の担体タンパク質として作用することもわかった。特に老化細胞では、細胞自身で産生するフィブロネクチン量が減少してくるためか、より多量のフィブロネクチン添加が要求された。血清培地でヒト二倍体線維芽細胞の細胞寿命の延命効果が報告されているヒドロコチゾンについて、フィブロネクチン、BSA を含む無血清培地を用いて検討したが、ほとんど延命効果は認められなかった。

③ 血清を消費させ細胞周期上 G_0 期にある細胞に増殖因子添加無血清培地 (RITC80-7) を加

えると、DNA合成が促進され、細胞周期の区分は、おおよそG₀期（0—4 hr）、G₁期（4—12 hr）S期（12—24 hr）、G₂+M期（24—32 hr）となることが示唆された。増殖因子のうちDNA合成、細胞増殖促進因子は、EGF、インシュリン、トランスフェリンであり、それぞれの増殖因子には、細胞周期上固有の作用点がありDNA合成促進に寄与していることが示唆された。

④ ハイドロコチゾンは、EGFの細胞増殖促進作用を増幅させ、単独では生理的作用を示さないこと、増殖因子存在下でハイドロコチゾンはDNA合成前期においてのみ作用してDNA合成を促進した。またハイドロコチゾン処理により、個体間の生理的作用の違い（ある個体から得られた細胞は、DNA合成が促進的に、また他の個体からの細胞は、逆に阻害的に）があらわれた。この結果は、ハイドロコチゾンは個体の発生段階の違いによって反応性が異なることが示唆された。

⑤ ステロイドホルモンの生理的作用発現の上で、ホルモーンレセプター結合は重要と考えられている。ヒト二倍体細胞は無血清培地でデキサメサゾンと特異的結合を示し、その結合反応は、20—30分という短時間で平衡に達する極めてすみやかな反応であった。さらに細胞周期上の特異的結合活性はG₁/S期に最大になることがわかった。

増殖因子や血清因子の培地への添加により、無血清培養系でヒト二倍体線維芽細胞の初代培養および長期継代培養が可能になった。今後この無血清培地は、既存の増殖因子、血清因子、ホルモンなどの作用機序解明、未知のそれら因子の発見、ひいては細胞老化変更因子の検索、生理活性物質の大量生産などに重要な手段を提供するであろう。

審査結果の要旨

本論文はヒト胎児肺由来の二倍体線維芽細胞を当研究室既報の無血清培地に培養して、培養継代の若い細胞と終末期に近い古い細胞との、培地添加各 growth factor, ファイブロネクチンおよびヒドロコチゾンに対する反応性を比較検討し、さらに各 growth factor とヒドロコチゾンの相互作用について詳細に検討したものである。

その結果各 growth factor は、若い細胞では細胞飽和密度を高め、DNA合成を促進したが、老化細胞では上記指標に対する反応性が著しく低下していることが判明した。また細胞の容器基質接着に必要なファイブロネクチンの要求量は若い細胞は老化細胞に比べて少いことも明らかになった。一方、ヒドロコチゾンは培地添加の各 growth factor のうち、EGFのみの細胞増殖促進能を増殖すること、およびヒドロコチゾン単独では細胞増殖促進能を持っていないことが判明した。

さらにヒドロコチゾンは細胞周期のG₁期にのみ作用して、細胞のDNA合成を促進した。ところがこのような作用は当研究室保有のヒト二倍体線維芽細胞系により、時に全く現れないか、逆に阻害的に作用する細胞系を見出され、その原因につき、検討中である。

この研究に使用された無血清培地は、論文中に示されているように、在来の血清添加培地と全く同様に、ヒト二倍体線維芽細胞を長期継代培養できる培地で、この培地に添加されている各 growth factor, ファイブロネクチンおよびヒドロコチゾンの細胞に対する相互作用や、幼若および老化細胞のこれら因子に対する反応性の研究も、本無血清培地を用いることにより初めて達成されたものである。これらの所見は今後細胞老化の機序の究明に寄与することが大きいので、本研究は学位授与に値するものと考えられる。