

氏 名（本籍）	か とう けい いち 加 藤 圭 一
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 第 2726 号
学位授与年月日	平 成 7 年 3 月 8 日
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当
最 終 学 歴	昭 和 63 年 3 月 22 日 秋田大学医学部医学科卒業
学位論文題目	SV40 large T 抗原遺伝子導入マウス網膜色素上 皮由来細胞の性質

(主 査)

論文審査委員	教授 玉 井 信 教授 柴 原 茂 樹
	教授 宮 崎 純 一

論 文 内 容 要 旨

網膜色素上皮細胞は網膜最外層に位置し、視機能の維持に重要な役割を持ち視サイクル中で重要な役割を果たす細胞であるが、また同時に各種眼内増殖性疾患で強力な憎悪因子ともなる細胞である。今回筆者は網膜色素上皮細胞の各種研究のため、温度感受性 SV40 large T 抗原遺伝子を導入したマウスの網膜色素上皮細胞株の樹立を試みた。単離・クローニングした細胞 (RPET 細胞) の各種増殖因子及び細胞外基質に対する性質を調べたところ、正常網膜色素上皮細胞とは異なった興味深い知見を得た。

今回得られた細胞には温度感受性があり、33°Cでは増殖するが、37°Cにては増殖しなかった。形態的には、電子顕微鏡にて網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium : RPE) 細胞に特有な細胞表面微絨毛を豊富に持ち、細胞質にはゴルジ装置周囲に多数のライソゾーム様構造が認められた。また、メラノソームは認めなかったが T1-チロシナーゼに対する抗体には反応性があった。Western blotting にて上皮細胞に特徴的な cytokeratin を保持していた。機能的にはウシ視細胞外節貪食能を有していた。

33°Cの温度条件下においても通常の培養条件下では増殖できず、温度感受性 SV40 large T 抗原遺伝子導入神経網膜細胞の培養上清 (conditioned medium : CM) を必要とした。CM 存在下においては塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 及び上皮増殖因子 (EGF) で強い増殖効果がみられ、インスリン、I 型インスリン様増殖因子 (IGF-I) 及び II 型インスリン様増殖因子 (IGF-II) では軽度の増殖効果が認められた。しかし、CM 非存在下ではその増殖効果は殆ど得られず、既知の RPE 細胞に対する主要増殖因子以外の物質がこの細胞の増殖に必要と考えられた。また、この CM 中の物質の増殖効果はトリプシン処理には安定であったが、熱及び酸処理に不安定であった。

各種細胞外基質に対しては EHS-Natrix® 及びファイブロネクチンに増殖効果がみられた。また、ラミニン上では可逆性の形態変化がみられ、細胞は接着性が低下し浮遊しながら増殖した。この浮遊状態にある細胞を通常の無塗布ディッシュに戻すと細胞は速やかに接着し元の形態に戻った。

温度感受性 SV40 large T 抗原遺伝子導入マウス網膜色素上皮由来 (RPET) 細胞は細胞接着に関するモデル及び新しい増殖因子発見の良い材料と考えられた。

審査結果の要旨

本論文は温度感受性 SV40 Large T 抗原遺伝子を導入したマウス由来の網膜色素上皮細胞株樹立を試みたものである。単離・クローニングした細胞は 33°C では増殖するが、37°C では増殖しないという特徴を持っていた。また、色素上皮細胞としての特徴としては 1. 形態的に細胞表面微絨毛を豊富に持ち、細胞質にゴルジ装置および多数のライソゾーム様構造を認めたこと。2. メラノソームは認めなかったが、T1-チロシナーゼに対する抗体に陽性反応を示したこと。3. ウェスタンブロッティング法にて、上皮細胞として特徴的なサイトケラチンを保有していたこと。機能的には、ウシ視細胞外節貧食能を有していたこと、等である。

これらの単離温度感受性細胞が果して、網膜色素上皮細胞であるかどうか、予備審査で問題になった。しかし、上記のようないくつかの特徴が示されたことから、これらの細胞が色素上皮細胞であると考えても差し支えないように思われる。しかし今後さらに、メラノソーム形成または、細胞間のデスモソームの存在を証明する等のより積極的な色素上皮細胞であることの証明が必要になるものと思われる。

さらに、これらの細胞が神経網膜培養上清 (Conditioned medium) を必要とし、その効果は色素上皮細胞に対する既知の主要増殖因子では認められないことから、新規の増殖因子発見のよい材料と思われる。また、ラミニンに対する接着性が低下するという興味深い発見もなされた。一般的にはラミニンは形態変化や増殖を促すことが知られており、ここに分離された網膜色素上皮細胞に対しては、増殖効果を示さなかったが、接着変化を引き起こした。これらの性質は今後、色素上皮細胞の細胞外基質に対する増殖、接着、分化、遊走等の研究のうえで非常に興味深い現象であり、これらのことからこの細胞株が分離されたことは、今後の研究に役立つものと思われる。これらの研究結果は新しい知見も十分に含まれており、また予備審査で指摘された点についても実験が加えられており、博士論文として十分値するものと考えられる。