

# 論文内容要旨

論文題目

ブタ硝子体細胞株におけるサイトカインによるヒアルロナン産生制御

責任分野：情報構造統御学講座視覚病態学分野

氏名：西塚 三

【内容要旨】(1,200字以内)

硝子体細胞の眼内増殖性疾患における病態の関与が近年注目されている。我々は、ブタより得られた硝子体組織由来細胞の初代培養・不死化遺伝子導入による株化に初めて成功した。初代培養細胞、細胞株は共に PDGF $\alpha$ レセプター・PDGF $\beta$ レセプター・TGF- $\beta$  I 型レセプター・TGF- $\beta$  II 型レセプター・CD44・I 型コラーゲン・II 型コラーゲン・GFAP を発現しており、S-100 蛋白・サイトケラチンの発現はみられなかった。樹立した細胞株からは比較的安定した性質の細胞が供給されるため、病態の解明に有用である。これらの細胞を TGF- $\beta$ 、PDGF で刺激したところ、mRNA レベルでヒアルロナン合成酵素 2(HAS2)の発現亢進し、ヒアルロナン産生亢進がみられたことから機能蛋白質としての HAS の発現亢進が考えられた。ヒアルロナンは分子量により多様な生物活性を示すことからサイトカイン刺激による HAS の発現制御、眼内増殖疾患の病態への関与の可能性が今後の研究課題である。

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 西塚弘一

報告書題目： ブタ硝子体細胞株におけるサイトカインによるヒアルロナン産生制御

審査委員：主審査委員

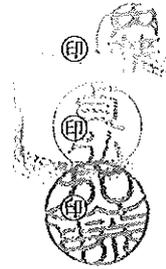
内藤 輝

副審査委員

貞弘 光章

副審査委員

加藤 丈夫



審査終了日：平成 21 年 1 月 28 日

### 【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

ヒアルロナンは細胞外マトリックスの一つであり眼球硝子体の主成分である。ヒアルロン酸合成酵素 (HAS1、2、3) により合成され、細胞の増殖、遊走、接着、分化などに機能する。申請者は、ブタ眼球より採取し不死化処理して得られたヒアルロナン合成細胞について調べた。

2歳ブタ眼球の硝子体から採取した組織を 3—5 代継代培養して得られた(不死化前)細胞に不死化遺伝子 SV40T を導入して継代培養し、継代毎の細胞倍加時間を計測した。不死化前と不死化後 40 代培養した(不死化後)細胞について、RT-PCR により PDGF $\alpha$ ・b レセプター、TGF- $\beta$  I・II 型レセプター、CD44、I・II 型コラーゲン、ウェスタンブロットにより glial fibrillary acidic protein (GFAP)、S-100 蛋白、サイトケラチンの発現を調べた。またヒアルロナン産生に関して、TGF- $\beta$ 1 および PDGF-BB の刺激を用いて、不死化前と後の細胞に対し RT-PCR により HAS2、3 の発現、不死化後に対し ELISA により培養液中のヒアルロナン濃度の変化、RT-PCR により smad2、3、4 遺伝子導入後の HAS2 の発現を調べた。

その結果、不死化により 50 代以上の継代が可能となり、細胞倍加時間は継代につれ延長がみられるものの軽微であること、不死化前と後の細胞ともに PDGF $\alpha$ ・b レセプター、TGF- $\beta$  I・II 型レセプター、CD44、I・II 型コラーゲン、GFAP が発現し、S-100 蛋白とサイトケラチンは発現しないこと、TGF- $\beta$ 1 および PDGF-BB の刺激により、不死化前と後の細胞ともに HAS2 の発現が亢進し HAS3 は変化しないこと、不死化後の細胞で培養液中のヒアルロナン濃度が上昇し、smad2、3、4 遺伝子導入により HAS2 の発現が亢進することなどが示された。

以上の結果から、申請者は、ブタ硝子体から採取した細胞の不死化処理によりヒアルロナン合成・調節を含め不死化前と同様な性質を示す安定した硝子体細胞株が得られると結論した。

審査会では、本研究で得られた不死化細胞の起源について、特に GFAP の発現は従来報告されている硝子体細胞の特徴と一致しないことから、さらに組織学的検索が必要との提言がなされた。そこで申請者は、ブタ眼球硝子体と毛様体およびその周辺組織、上述の方法で採取した組織とこの組織を 3—5 代培養して得られた細胞、保存してあった不死化後の細胞について免疫組織により調べたところ、GFAP 陽性細胞は毛様体と網膜にみられ硝子体には認められないこと、採取組織には硝子体周辺の組織(毛様体など)の断片が含まれその中に GFAP 陽性細胞がみられること、3—5 代培養後には GFAP 陽性と陰性の両方の細胞がみられるのに対し、不死化後には陽性細胞だけがみられるようになることなどが新たに示された。審査会では、これらの結果をふまえ慎重に審議した結果、未だ培養細胞の由来が不明確、不死化後の GFAP 陰性細胞の行方が調べられていないなど不備な点がみられるものの、不死化により不死化前と同様な性質を持つ安定したヒアルロナン合成細胞が得られることを示した点は新規であり、本研究が学位授与に値すると判断した。なお、学位論文内容については、免疫組織の結果および不備な点に関する考察を加え修正すること、題目は、培養細胞は毛様体あるいは網膜由来と考えるのが最も適当なので、「硝子体細胞株」を使わずに修正後論文に相応しいものに変更することなどの要請がなされた。