



Title	ラット培養メサングウム細胞系の確立とangiotensin IIによる細胞収縮性に関する研究
Author(s)	田中, 敏博
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33299
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	たなかとしひろ 田 中 敏 博
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 5 9 9 5 号
学位授与の日付	昭 和 58 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	ラット培養メサングウム細胞系の確立と angiotensin II による細胞収縮性に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 北村 旦 (副査) 教 授 阿部 裕 教 授 松本 圭史

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

腎糸球体メサングウム細胞は、糸球体における免疫学的反応の場となるのみでなく、その解剖学的位置、形態学的特徴から血管平滑筋との類似が指摘されており、細胞収縮を介して糸球体濾過値 (GFR) の調節にも重要な役割を果たすものと推定される。しかし、メサングウム細胞の性質を詳細に検討するに際して、糸球体構成細胞からメサングウム細胞のみを純粹にえることは現在不可能であり、糸球体培養によってえられるメサングウム由来細胞を用いることが唯一の手段と考えられる。そこで本研究は、ラット単離糸球体培養を行い、形態学的、機能的にメサングウム細胞系の確立を試みるとともに、in vitroでの性質、特に血管収縮物質である angiotensin II (AII) による細胞収縮性について検討を加えた。

〔方法ならびに成績〕

I. 4 週齢雄性 Sprague-Dawley rats を使用し、皮質を細切後 sieving technique により糸球体のみを単離した。単離糸球体は、20% ウシ胎児血清 (FCS) 添加 RPMI 1640 medium に懸濁し 5 % CO₂ incubator 内で培養した。培養 3 日目には既に糸球体由来細胞が出現し、7～10 日目には典型的な敷石状配列を呈する上皮細胞 (E cells) のピークが観察されるが、その後急速に消退し、21 日目には E cells とは全く形態が異なる矩形で細胞内線維状構造の著明な細胞 (M cells) に置換される。この細胞は、出現時期、形態学的特徴からメサングウム由来細胞と推定され、継代するとともにさらに詳細に検討した。継代 M cells は、電顕的には細胞膜直下や核周辺に豊富な micro-filaments がみられ、蛍光標識 heavy meromyosin 結合法を用いると細胞内に fibrillar pattern で

強く染色され、多量のactinを有することが確認された。さらに、M cellsの細胞外にはband構造を認めない非膠原性物質がみられ、これは抗 fibronectin抗体を用いた蛍光抗体法にてその一部が fibronectinであることを確認した。また、in vitroでのhorse-radish peroxidase (HRP), 感作ヒツジ赤血球 (EA) を用いた貪食能の検討ならびにEA, EAC 4, 3を用いた Fc, C3b binding sitesの検討では、M cellsは陰性を呈した。一方、糸球体培養によりこれらE cells, M cellsの他、少数ながら小円形細胞がみられるが、M cellsとは異なり貪食能、Fc, C3b receptorともに陽性を示し糸球体血管腔由来の流血中monocyteのmacrophageへの転換したものと考えられた。しかし今回の培養条件では、その後の増殖傾向はみられず継代培養には殆んど出現しなかった。

II. A IIは、糸球体構成細胞のいずれかに直接作用することによりGFR低下作用を発揮することが知られている。その標的細胞としてメサンギウム細胞に最も可能性が強いと考えられるが、この点を直接証明するため、前述の如くメサンギウム細胞由来であることを確認したM cells系を用いてA IIによる細胞収縮を検討した。収縮実験は、1時間前からFCS-freeのHanks液 (HBSS) に置換し、 $\text{Ca}^{++}2\text{mM}$, $\text{Mg}^{++}2\text{mM}$ に調整したHBSS中で、ラット血中生理的濃度 ($10^{-9}\sim 10^{-11}\text{M}$) のA IIとともに incubate し施行した。尚、この実験は 37°C 、10% CO_2 の条件に設定した CO_2 incubatorを装備した位相差顕微鏡下に行った。個々の細胞動態は10秒毎に写真に収め現像後、projector (OLYMPUS UP-350) で5000倍に拡大し綿密にtraceした後 tablet digitizerにて画像解析を行った。細胞は投与直後から活発な運動を開始し、4～7分で収縮傾向を示し、 10^{-9}M 濃度で7分後に最大収縮 $29.8\pm 3.5\%$ をえた。しかも、5分における各濃度での収縮度は明らかに dose-dependencyを示し、A IIによるM cellsの収縮を初めて定量的に確認した。以上のことより、M cellsは収縮能を有し、A IIを介するGFR調節に大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。

[総括]

I. ラット単離糸球体培養法により3種類の細胞 (E cells, M cells, macrophage) が確認された。そのうち、初代培養21日目に継代することによりえられた細胞 (M cells) は、

- (1) E cellsとは異なり、矩形で線維状構造が著明で多数の収縮蛋白actinを有していた。
- (2) macrophageとは異なり、in vitroでのhorse-radish peroxidase (HRP), 感作ヒツジ赤血球 (EA) 貪食能は検出しえず、また、Fc, C3b binding sitesを有していなかった。
- (3) 細胞外物質としてfibronectinの存在が確認された。

以上のことより、M cellsはメサンギウム細胞由来と考えられた。

II. 培養M cellsは、生理的濃度のangiotensin II (A II) に対し収縮能を有し、最大収縮率 $29.8\pm 3.5\%$ (Mean $\pm$ SE) を呈した。この事実は、メサンギウム細胞の収縮が糸球体濾過値 (GFR) 調節という腎の最も基本的な機能に対しても大きな影響を及ぼす可能性を示唆するものである。

論文の審査結果の要旨

腎糸球体メサンギウム細胞（M細胞）は、その収縮能を介して糸球体濾過に影響を及ぼす事が考えられるが、その性質を検討するために、単離糸球体培養法を改良して培養M細胞系の確立を試み、M細胞の性質につき次の二点を明らかにした。

1. M細胞は、FITC標識 heavy meromyosinと特異的に結合する多量の収縮蛋白 actinを有し、蛍光抗体法によって細胞外に fibronectinが存在することを証明した。
2. M細胞は、生理的濃度の angiotensin II によって細胞収縮性を示し、それを定量的に解析した。この研究は、腎臓の病理学に意義を有するものと認める。