



Title	I-cell病由来の培養皮膚線維芽細胞のSucrose負荷による正常化
Author(s)	加藤, 伴親
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33526
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)	加藤 伴親
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5837 号
学位授与の日付	昭和 57 年 12 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	I-cell 病由来の培養皮膚線維芽細胞の Sucrose 負荷による正常化
論文審査委員	(主査) 教授 藪内 百治 (副査) 教授 山野 俊雄 教授 田川 邦夫

論文内容の要旨

〔目的〕

I-Cell 病(ICD)は、遺伝性リソゾーム酵素欠損症の中で、各種のリソゾーム酵素活性の細胞内低下と、当該酵素の体液、培養液中での活性上昇を伴う特異な疾患であり、リソゾーム酵素の動態を解析する上で、ICDは有用である。培養液への Sucrose 添加が、リソゾーム酵素活性の上昇をもたらすことについてはヒト以外の培養細胞における報告がほとんどであった。ICD由来の培養皮膚線維芽細胞において、この Sucrose 負荷を行い、形態的ならびに酵素学的に著明な変化が起ることを見出したので検討を加えた。

〔方法ならびに成績〕

1. 皮膚線維芽細胞の培養

皮膚線維芽細胞の培養は、Eagle's MEMを基本培養液とし、ウシ胎児血清を10%の割合に加えて、5% CO₂, 95% 空気の条件で37℃で行った。Sucrose 負荷は、最終濃度88mMになるよう培養液に加えて行った。用いた細胞は、ICD由来のもの2例のほか、GM₁-ガングリオシドーシス、マンノシドーシス、Sandhoff病由来のもの、ならびに正常のものを用いた。

2. リソゾーム酵素活性の測定

細胞を0.9% NaClで洗滌し、rubber policemanで機械的に剥離し、遠心にて細胞を集め、蒸留水に浮遊して超音波処理を行い、酵素源とした。酵素活性測定は、4-メチルウンベリフェロン化合物を用いて行い、蛋白量の測定はLowry法で行った。

3. 正常ならびに単一リソゾーム酵素欠損症由来の培養細胞での Sucrose 負荷

正常細胞での Sucrose 負荷13日間（培養液の交換無し）により， β -ヘキシサミニダーゼ(β -Hex)は約1.6倍， β -ガラクトシダーゼ(β -Gal)は約2倍， α -マンノシダーゼ(α -Man)は約3.5倍， α -フコシダーゼ(α -Fuc)は約3.3倍の活性上昇を認めたが， β -グルクロニダーゼ(β -Glc)は有意の変化を示さなかった。単一リソゾーム酵素欠損症である GM₁-ガングリオシドーシス，マンノシドーシス由来の細胞では，欠損酵素である β -Gal， α -Manはそれぞれ Sucrose 負荷によっても変化しなかった。Sandhoff 病由来の細胞では，Sucrose 負荷により β -Hex の上昇が認められたが，これは残存している S 活性の上昇と考えられた (Fig. 1)。

4. ICD 由来の培養細胞での Sucrose 負荷

2 例の ICD 由来の培養細胞では，Sucrose 負荷を行うことにより継続的に，低下していたリソゾーム酵素活性の上昇が認められ，負荷13日後では，低下していた β -Gal， β -Hex， α -Man， α -Fucは正常域にまで上昇した。 β -Glc 活性は上昇を示したが，正常域には達しなかった (Fig. 2)。ICD 由来の細胞において，Sucrose 負荷を行い，その後に通常の培養液にもどして培養を続けると，正常化したリソゾーム酵素活性は，約12日間で元の低値にまで変化した。ICD 由来の細胞で，Sucrose 負荷を3日毎に培養液交換をして行くと，リソゾーム酵素活性の上昇は抑制を受けた。

5. ICD 由来の細胞での，Sucrose 負荷による形態学的変化

ICD 由来の培養皮膚線維芽細胞は，位相差顕微鏡で封入体 (Inclusion body) が多数認められるのが特徴であるが，Sucrose 負荷を行うことにより，この封入体は減少，消失した。この変化は，電子顕微鏡でも確認した。

6. NH₄Cl 負荷による，培養液中リソゾーム酵素活性の変化

最終濃度10mMの NH₄Cl の培養液への添加は，リソゾーム内 pH を上昇させ，リソゾーム酵素リセプターの recycle を阻害して，新生リソゾーム酵素の培養液中への放出が起ることが知られている。ICD 由来の細胞において，血清フリーの条件でこの NH₄Cl 負荷を行った。通常の培養液で培養した群では，NH₄Cl 負荷によっても培養液中のリソゾーム酵素活性の変化はなかったが，Sucrose 負荷群より約2～3倍の酵素活性の放出があり，これは Sucrose 負荷によりリソゾーム酵素の新生が亢進することを示すと考えられた。

〔総括〕

1. ICD 由来の培養皮膚線維芽細胞において，Sucrose 負荷を行うことにより，低下していたリソゾーム酵素活性の正常化と，封入体の消失を認めた。
2. 正常由来の細胞では， β -Glc 活性は Sucrose 負荷でも変化しなかったが，ICD 由来の細胞では上昇が認められ，各酵素の Turnover に差のあることが考えられた。リソゾーム酵素の動態解析，Turnover Study に，Sucrose 負荷は有用である。
3. 遺伝性単一リソゾーム酵素欠損症由来の細胞では，Sucrose 負荷によっても欠損している酵素は変化しなかったが，その保因者由来の細胞では，Sucrose 負荷により中間値を示していた酵素活性の上昇が認められ，羊水診断に際して，患者・保因者の診断への応用が可能と考えられた。
4. Sucrose の作用機序の本態は不明であるが，ICD の病態解明，治療への糸口となるものとする。

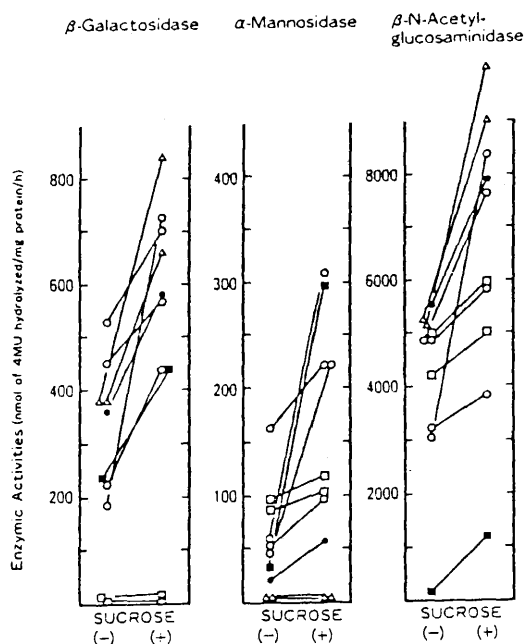


Fig. 1 Effects of sucrose (88mM, 13 days) on the induction of three lysosomal hydrolases in the cultured skin fibroblasts derived from normal subjects (○); two unrelated patients with GM1-gangliosidosis (□); two siblings with mannosidosis (Δ) and their mother (●); and one case with Sandhoff disease (■). Enzyme activity is expressed as nmol of 4-methylumbelliferone released from substrate per mg of cellular protein per hour.

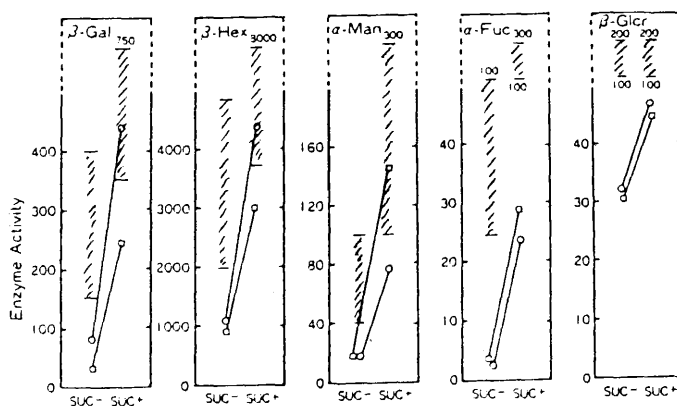


Fig. 2 Changes of lysosomal hydrolase activities with sucrose loading in two ICD fibroblasts. Equal number of cell were subcultured with or without 88mM sucrose. After 13 days of incubation, intracellular lysosomal hydrolase activities were determined. Shaded areas in SUC+ and SUC- column show the range of the activities in normal cell with and without sucrose, respectively. Enzyme activity is expressed as nmol of 4-methylumbelliferone released from substrate per mg of cellular protein per hour.

論文の審査結果の要旨

I-cell病は、細胞内で複数のリソゾーム酵素の活性低下と、体液・培養液中での活性上昇を認める。本研究はI-cell病由来の皮膚線維芽細胞の培養液中に、Sucroseを負荷することにより、リソゾーム酵素の正常化が起ることを見出し、これが酵素の新生によるものであることを示した。この知見は、I-cell病の病態解明のみならず、リソゾーム酵素の動態解析にも新しい方向性を示すものであり、高く評価される。