The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	人培養ケラチノサイトの増殖能におよぼすコレラ毒素の影響 : 細胞内cyclic AMP濃度に関連して
Author(s)	岡田, 奈津子
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33565
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

【14】

氏名・(本籍)	岡田奈津子（おかだ なつこ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5743 号
学位授与の日付	昭和57年6月30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	**人培養ケラチノサイトの増殖能におよぼすコレラ毒素の影響** **ー細胞内 cyclic AMP濃度に関連してー**
論文審査委員	(主査) 教授 佐野 栄春 (副査) 教授 垂井清一郎 教授 垣内 史朗

論文内容の要旨

〔目　的〕

人表皮細胞の体外培養において，ケラチノサイトは増殖，成熟し，ほぼ完全に近い角化を営み，またこの培養において，増殖したケラチノサイトは重層して生体の表皮に相当する構造を有したシートを再構成することが認められている。過去に Voorhees らが表皮ケラチノサイトの異常増殖を示す尋常性乾癬では，表皮内 cAMP 量が低下していると報告して以来，表皮ケラチノサイトの増殖調節はサイクリックスクレオチド系を介してなされると考えられてきている。しかし細胞内 cAMP レベルとケラチノサイトの増殖能の関係については異論が多い。今日，細胞内 cAMP 濃度を高めるものとして種々の物質があげられるが，中でもコレラ毒素はその効果が最も強い。本研究は上記ケラチノサイトの培養系を用いて，コレラ毒素を与えることにより培養ケラチノサイト内の cAMP 濃度を上昇させ，その増殖能におよぼす影響を明らかにすることを目的とした。

〔方法と成績〕

1）培養の経過

健康人の皮膚をトリプシン処理し，表皮と真皮を分離した後，表皮細胞浮遊液を得る。Eagle 基本培地に牛胎児血清20％を含む培養液にこの細胞を再浮遊させ，37℃，5％ CO_2 を含む培養器の中でケラチノサイトの培養を開始する。ケラチノサイトの初代培養では，細胞は24時間以内に培養皿の底面に附着し，数日後には遊走してお互いに接合し島状細胞集団を形成する。培養10日目頃から扁平に伸びたケラチノサイトの間に小型の多角形の細胞が現れ，やがてこの細胞は増殖しはじめ培養面全体を覆うシートが形成される。更に増殖が進むと，細胞は重層してきて次第に上層と下層の間に分化が生じてくる。

培養30日目頃になると，細胞層の表面から角化細胞が脱落し浮遊するようになる。培養50日頃になると，細胞は変性しはじめシート自体に破れ目が生じ，増殖能をもつと思われる細胞は認められなくなってくる。

2）コレラ毒素（CTX）を加えることによる培養ケラチノサイト内 cAMP 濃度の変化

培養皿を覆い重層しはじめた増殖期の培養ケラチノサイトにCTXを10^{-14}～10^{-8} M加え，6時間処理した後 PBS で洗い，6％ TCA を加えてホモジェナイズした後遠沈し，上清から cAMP を抽出した。cAMP 濃度の測定は Steiner らの radioimmunoassay に従った。対照群に比べ，CTX を加えた後の培養ケラチノサイト内 cAMP 量は，加えたCTX の濃度に依存し，上記の広い濃度幅で，単位蛋白当り80倍から200倍の増加を呈した。同様の方法で増殖期に CTX を10^{-10} M加えた後，培養ケラチノサイト内 cAMP 濃度の時間的変化を測定した。約1時間の lag period の後，急速に上昇し，3～48時間にわたり加える前の100倍以上の高値を保った。細胞数の少い疎な培養初期，重層しはじめた増殖期，および比較的後期の培養ケラチノサイトに CTX を10^{-10} M加え，24時間後に cAMP 濃度を測定したところ，いずれの培養時期でも CTX への反応性はほぼ同様で約100倍の増加を呈した。

3）培養ケラチノサイトの増殖能におよぼす CTX の影響

少数のケラチノサイト（10^5個を60×15mmの tissue culture dish）で培養を開始し，培養3日目から CTX 10^{-10} Mを加えて，その後3日毎に CTX を含む培養液を新しく交換していくと，2週間で対照群に比べてコロニー形成は明らかに促進された。しかし比較的多数のケラチノサイト（8×10^5個）から培養を開始して CTX10^{-10} Mを加え，経時的に細胞数の増加を測定した場合，CTX は培養初期には増殖を促進するが，細胞がシートを形成して培養皿を覆い重層しはじめる頃になるとむしろ抑制的に働くようになった。平行して培養皿あたりの DNA 量，蛋白質量を測定したが，増殖期ではいずれも対照群に比して抑制されていた。また増殖期に入ってから CTX を加えはじめると，CTX によってその後の細胞増殖は抑制された。CTX の培養ケラチノサイトの DNA 合成への影響を調べる為に，培養初期，および増殖期に CTX 10^{-10} Mを短時間（12時間および24時間）作用させ，その後 ^{3}H-TdR でパルスラベルし，^{3}H-TdRの培養ケラチノサイトへのとり込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。培養7日目（初期）では CTX を作用させた場合，^{3}H-TdR のとり込みは単位 DNA 量あたり対照群の2倍に増加していた。しかし培養20日目（増殖期）では対照群に比して有意に低下していた。

〔総　括〕

1）CTX 10^{-14}～10^{-8} M作用させると培養ケラチノサイトの cAMP 濃度は対照群の100倍程度に増加し，加えてから48時間までそのレベルを維持していた。またいずれの培養時期でもCTXを作用させた後のcAMP 濃度の上昇程度に差を認めなかった。

2）cAMP 濃度が上昇することによる培養ケラチノサイトの増殖能におよぼす CTX の影響は，初期の疎な培養条件下では増殖を促進し，細胞が増殖し過密状態になった培養条件下では，むしろ抑制するという二相性の作用を示した。

論文の審査結果の要旨

培養ケラチノサイトにおいて細胞内 cAMP 濃度，増殖能におよぼすコレラ毒素の影響を検討した。その結果，コレラ毒素は培養のいずれの時期においても cAMP の上昇をきたすが，細胞数，^{3}H-TdR のとりこみは，初期では促進し，増殖期ではむしろ抑制するという二相性の効果を示した。以上のことから，培養細胞レベルで表皮の増殖と分化につき有意義な示唆を与えた論文であり，学位授与に値する。