Osaka University Knowledge Archive

Title	培養家兎角膜細胞によるフィブロネクチン産生について
Author(s)	粟田, 隆
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36524
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【80】

氏名・(本籍)	粟田(あわた) 隆(たかし)
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8383 号
学位授与の日付	昭和63年12月1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	**培養家兎角膜細胞によるフィブロネクチン産生について**
論文審査委員	(主査) 教授 真鍋 禮三 (副査) 教授 谷口 直之　教授 藤田 尚男

論文内容の要旨

〔目　的〕

私達の研究室では，これまでにフィブロネクチン（FN）が，角膜の様々な創傷部に出現することを報告してきた。またFNは上皮細胞の接着・伸展や実質細胞による貪食作用を促進することにより角膜創傷治癒過程に重要な役割を果たすことを示してきた。しかし，創傷過程で出現するFNが，角膜のどの細胞を由来とするか，またこの産生がどのように制御されているかについては明らかでない。そこで，家兎角膜より上皮，実質および内皮細胞を分離して培養し，各々の細胞によるFNの産生と，FN産生の培養条件による変化について検討した。

〔方　法〕

家兎角膜より上皮，実質および内皮細胞を分離して培養した。培養液にはダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）を用い，血清としては牛胎児血清を用いた。なお，血清中のFNは，アフィニティクロマトグラフィによってあらかじめ除去した。間接蛍光抗体法によってFNの局在を観察するために，まずDMEMに血清を10%になるように加えたもので3日間培養し，ついで培養液を3種（基本培養液，すなわちDMEMに血清を0.5%になるように添加した培養液・基本培養液に血清を10%になるように添加した培養液・基本培養液にEGFを100ng／mℓ添加した培養液）に変え，更に3日間培養した後，固定し抗家兎FN抗体を用いた間接蛍光抗体法によって蛍光染色した。またFNの産生を定量的に調べ，細胞増殖との関連をみるために，FNへの放射性アミノ酸の取り込みと細胞DNAへの放射性チミジンの取り込みを測定した。まず細胞を10%血清を含むDMEMで3日間培養した後，培養液を3種のものに変え，^{3}H－アミノ酸混合物で3日間，^{14}C－チミジンで1日間ラベルした。FNの産生は培養液上清

を抗家兎ＦＮ抗体と反応させ，沈澱物中の ^{3}Hの放射活性を測定することによって調べた。また，タンパク質の産生は培養液上清をＴＣＡにより沈澱させ，その ^{3}Hの放射活性を測定することによって調べた。細胞のＤＮＡ合成は細胞をＴＣＡによって処理し，沈澱物中の ^{14}Cの放射活性を測定することによって調べた。

〔成　　績〕

１）間接蛍光抗体法によるＦＮ局在の観察

上皮細胞

基本培養液で培養した場合には，核の周囲の細胞質に点状の強い蛍光が観察されたが，血清を10％添加した場合や，ＥＧＦを添加した場合には，細胞質全体に弱い蛍光が認められるのみであった。

実質細胞

いずれの培養液で培養した時にも同様に，細胞質内に強い蛍光が観察された。

内皮細胞

細胞質内および細胞質外に強い蛍光がみられ，実質細胞の場合と同様，培養条件の違いによって程度に差はなかった。

２）放射性アミノ酸の取り込みによるＦＮ産生と，チミジンの取り込みによるＤＮＡ合成の測定

上皮細胞

ＦＮ産生は，基本培養液で培養した場合に最も高く，血清やＥＧＦを添加すると有意に低下した。タンパク質産生に対するＦＮ産生の比（Ｆ／Ｐ比）を求めることによりＦＮ産生の特異的変化を調べると，血清やＥＧＦの添加によってＦ／Ｐ比は顕著に低下した。一方，細胞ＤＮＡ合成は基本培養液で培養したものでは非常に低く，血清を10％添加した場合やＥＧＦを添加した場合には顕著に増加した。

実質細胞

Ｆ／Ｐ比を求めたところ，上皮細胞とは逆にＥＧＦの添加によって有意に増加した。ＤＮＡ合成は，基本培養液で培養した場合，最も低く，血清やＥＧＦの添加によって有意な増加がみられた。

内皮細胞

Ｆ／Ｐ比は実質細胞の場合と同様にＥＧＦの添加によって有意な増加がみられた。ＤＮＡ合成は培養条件の違いによって差はなかった。

〔総　　括〕

角膜上皮，実質および内皮細胞はいずれもＦＮを産生することが明らかとなった。上皮細胞においては，血清濃度の低い培養液で培養すると，高いＦＮ産生がみられた。この時，ＤＮＡ合成は非常に低く，角膜上皮細胞では細胞増殖とＦＮ産生とは逆の相関を示した。一方，実質細胞や内皮細胞では，ＦＮ産生はＥＧＦにより特異的に促進された。これらの結果より，角膜上皮細胞によるＦＮ産生は実質細胞や内皮細胞と異なった制御を受け，このことは，これらの角膜細胞が創傷治癒環境下においてもＦＮ産生に関して異なった反応を示すことを示唆する。

論文の審査結果の要旨

フィブロネクチンは角膜の創傷治癒過程に重要な役割を果たすが，これまで角膜の細胞，特に上皮細胞がフィブロネクチンを産生するかについては明らかにされていない。本研究は，角膜の上皮，実質および内皮細胞を分離して培養することによって，いずれの細胞もフィブロネクチンを産生することを証明した。さらに，上皮細胞は培養環境の変化に対し，フィブロネクチンの産生に関して実質細胞や内皮細胞とは異なった反応を示すことを明らかにした。これは角膜上皮疾患の発症機構の理解と治療につながる重要な知見であり，学位に値するものと考える。