



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 培養家兔角膜細胞によるフィブロネクチン産生について   |
| Author(s)    | 栗田, 隆   |
| Citation     | 大阪大学, 1988, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/36524">https://hdl.handle.net/11094/36524</a>   |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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) | あわ 栗                      | た 田     | たかし 隆     |
| 学位の種類   | 医                         | 学       | 博 士       |
| 学位記番号   | 第                         | 8 3 8 3 | 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ー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、 $^3\text{H}$ -アミノ酸混合物で 3 日間、 $^{14}\text{C}$ -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 $^3\text{H}$ 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 $^3\text{H}$ 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 $^{14}\text{C}$ 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産生の特異的变化を調べると、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える。