



Title	Altered Adhesion Efficiency and Fibronectin Content in Fibroblasts from Schizophrenic Patients
Author(s)	宮前, 康之
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40779
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	宮前康之
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13730号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Altered Adhesion Efficiency and Fibronectin Content in Fibroblasts from Schizophrenic Patients (精神分裂病患者線維芽細胞における接着効率およびファイブロネクチン量の変化)
論文審査委員	(主査) 教授 武田 雅俊
	(副査) 教授 杉田 義郎 教授 米田 悅啓

論文内容の要旨

【目的】

精神分裂病は一般人口における生涯罹病危険率が約0.8%の難治性精神疾患である。その病因は未だに不明であり、その診断基準についても臨床症状の評価が中心であり、生物学的指標に乏しい。しかし、遺伝学的知見や神経薬理学的知見を考慮すると、その病態には何らかの生物学的基盤があるものと考えられている。一方、線維芽細胞は継代培養可能であり、細胞の形態学的特徴、細胞の動態、蛋白発現やその他の分子調節過程を研究するのに非常に有用である。これまで精神分裂病患者の線維芽細胞についても、チロシン輸送の低下、成長異常などの研究が報告されている。このような背景に基づき、本研究では、精神分裂病患者線維芽細胞の接着性を健常対照者のそれと比較し、さらに細胞接着に関連する細胞接着蛋白および細胞骨格蛋白について免疫組織化学、ウェスタンプロット法、免疫比濁法などを用いて検討した。

【方法】

対象：16例の分裂病者および16例の健常対照者からの培養線維芽細胞を用いた。精神分裂病群の平均年齢は51.9歳(30～65歳)で、対照群は平均43.8歳(18～67歳)であった。得た皮膚組織は細断後、シャーレ底面に圧迫固定し細胞の分裂増殖を確認しながら継代培養し、継代数4～6代のものを本実験に用いた。

接着率の測定：定常状態に達した線維芽細胞をトリプシン処理にて剥離回収し、単細胞浮遊液を調整した。細胞を同一条件にて培養フラスコに播種し、底面に対する細胞の接着率を経時的に90分間測定し、両群間を比較した。接着率は以下の計算式にて算出した。

$$(播種細胞数 - 浮遊細胞数) \times 100 / \text{播種細胞数} (\%)$$

ファイブロネクチンの測定：線維芽細胞が定常状態になってから48時間にメディウム中に分泌されたファイブロネクチン量を免疫比濁法により測定した(n=8)。更に、接着が有意に低下していた分裂病線維芽細胞4例を用いて、細胞播種後にメディウム中に分泌されたファイブロネクチン量と細胞ライセートにおけるファイブロネクチン量を、経時的に48時間、同様の測定法を用いて測定した。

免疫組織化学およびウェスタンプロット法：接着関連蛋白であるファイブロネクチン、インテグリン(VLA5)、Focal Adhesion Kinase(FAK)、タリン、ビンキュリンおよび細胞骨格蛋白であるフォドリン、ビメンチン、アンキリ

ン、プレクチンの各々に対するモノクロナール抗体を用いてDAB染色およびウエスタンプロットを行い両群を比較検討した。

【成績】

接着率測定実験：対照群においては、細胞播種後20分および30分後では、それぞれ68.8%および81.2%がフラスコ底面に接着していたのに対して、精神分裂病群ではそれぞれ42.1%および54.4%しか接着を認めず、精神分裂病群に有意な接着率の低下を認めた（ $P<0.05$, $n=16$ ）。細胞播種後90分では両群共に90%以上の細胞が接着を完了しており、両群間に有意差を認めなかった。また、播種した細胞の50%が接着を完了するのに要する時間は、対照群で平均12.0分であったのに対して、精神分裂病群では平均27.3分を要し、精神分裂病群で有意にその接着が遅延していた（ $P<0.05$, $n=16$ ）。

免疫比濁法によるファイブロネクチン量の測定：定常状態においてメディウム中に分泌されたファイブロネクチン量は、対照群および精神分裂病群でそれぞれ 1.97 ± 0.23 （ $\mu\text{g}/\text{ml}/10^5\text{ cells}/48\text{ hours}$, $n=8$ ）、 2.42 ± 0.42 （ $\mu\text{g}/\text{ml}/10^5\text{ cells}/48\text{ hours}$, $n=8$ ）であり、両群間に有意差を認めなかった。また、ファイブロネクチンの分泌は細胞播種後48時間以内には、メディウム中にはほとんど認められず、48時間以降においては一定の割合でメディウム中に分泌されており、両群間に有意差を認めなかった。一方、細胞播種後48時間以内において、精神分裂病線維芽細胞ライセート中に発現していたファイブロネクチン量は、対照群に比して低値を示し、特に12および18時間後においては有意な低値を示した（ $P<0.05$, $n=4$ ）。

免疫組織化学およびウエスタンプロット法：免疫組織化学では、各々の蛋白の分布、局在、染色性の均一性などについて、接着関連蛋白に対する抗体を用いて両群間を比較検討したが、明らかな差異を認めなかった。また、ウエスタンプロットにおいても、各バンドの分子量、分解パターン等に有意な差異を認めなかった。また、各バンドのデンシトメトリー解析を行ったが、蛋白の発現量についても両群間に有意な差異を認めなかった。

【総括】

今回の研究では精神分裂病線維芽細胞において健常対照細胞と比較して明らかな初期接着の低下が認められた。その原因を探るために精神分裂病線維芽細胞において接着関連蛋白について、免疫組織化学及びウエスタンプロットを行ったが、有意な結果は得られなかった。精神分裂病線維芽細胞のメディウム及びライセート中のファイブロネクチン量の測定を免疫比濁法により行ったところ、細胞播種後48時間において精神分裂病線維芽細胞ライセート中のファイブロネクチン量の有意な低下が認められた。接着初期において精神分裂病線維芽細胞のファイブロネクチン発現・分泌能が低下していることが初期接着能の低下を引き起こしている可能性が示された。以上の結果は、精神分裂病線維芽細胞において、細胞が基質に接触した直後からおこる情報伝達系に何らかの異常が存在する可能性を示唆するものであり、精神分裂病線維芽細胞の初期接着の低下及びファイブロネクチン発現・分泌の低下を引き起こしている生物学的過程が精神分裂病の病態に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、未だ病態の神経生物学的解明のなされていない精神分裂病の患者皮膚組織から培養した線維芽細胞について検討したものである。精神分裂病患者（16名）および健常対照者（16名）の皮膚線維芽細胞を培養し、その細胞接着性を検討したところ、精神分裂病線維芽細胞において細胞播種後初期における接着性の低下が認められることが明らかにした。さらにこの接着性低下の原因を調べるために、代表的な接着蛋白であるファイブロネクチンをはじめとして、インテグリン、Focal Adhesion Kinase (FAK)、タリン、ビンキュリンなどの接着関連蛋白およびフォドリン、ビメンチン、アンキリン、プレクチンなどの細胞骨格蛋白について免疫組織化学的手法、ウエスタンプロット法、免疫比濁法などを用いて比較検討した。その結果、精神分裂病線維芽細胞では、初期接着期のファイブロネクチン分泌が有意に低下していた。本研究の結果は、精神分裂病線維芽細胞では細胞接着によりトリガーされるファイブ

ロネクチン分泌までの経路に異常があることを示唆しており、精神分裂病者の細胞レベルでの機能異常を示唆した興味深い研究である。本研究で示された細胞レベルでの機能異常は、精神分裂病の病態生理を理解していくための基礎的な生物学的データとなり得ると考えられ、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。