



Title	Elucidation of the mechanism of crystal-cell interaction using fibronectin-overexpressing Madin-Darby canine kidney cells
Author(s)	辻川, 浩三
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49024
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	辻 川 浩 三
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 4 8 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 6 月 20 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Elucidation of the mechanism of crystal-cell interaction using fibronectin-overexpressing Madin-Darby canine kidney cells (Fibronectin 過剰発現 MDCK 細胞を用いた尿路結石症の機構解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 奥山 明彦 (副査) 教 授 堀 正二 教 授 中村 仁信

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

シュウ酸カルシウム結石形成の初期過程において腎尿細管上皮細胞とシュウ酸カルシウム (COM) 結晶との相互作用、いわゆる *crystal-cell interaction* が重要なステップであると考えられている。*crystal-cell interaction* とは COM 結晶が細胞表面に付着し、さらに細胞内に取り込まれることである。最近の研究では、Tamm-Horsfall protein や Osteopontin などの高分子物質が形成過程に関与していることが報告されている。

これまで我々は、細胞外マトリックスや体液中に存在する多機能的糖蛋白である fibronectin (FN : 220-250 kDa) を用いて *crystal-cell interaction* と細胞傷害との関連性を解析し、蔞酸カルシウム結石の成因解明について研究を行い報告してきた。その内容はイヌ遠位尿細管由来の MDCK 細胞に COM 結晶を曝露することにより FN が過剰分泌され、FN が結晶凝集抑制作用および MDCK 細胞への付着抑制作用を有するというものである。しかし、それらの正確な作用機序は明らかではない。*crystal-cell interaction* における FN の作用機序を解析するため MDCK 細胞に FN の遺伝子導入を行い、FN 過剰発現細胞株を樹立したのち検討を開始した。

〔 方法ならびに成績 〕

まず FN を大量産生しているラット肺細胞上皮株より total RNA を抽出、Kozak 配列を含んだプライマーを用いて RT-PCR を施行した。PCR product より DNA を精製し、蛋白発現ベクターへ TA クローニング施行後、プラスミド DNA を大量精製し、リポフェクション法にて MDCK 細胞へ遺伝子導入を行った。その後 Western blot, RT-PCR にてラット FN が遺伝子導入され、過剰発現していることを確認した。さらに G-418 を用いて安定形質発現細胞を作製し、遺伝子導入細胞株は正常な成長・増殖能を有することを確認した。

次に遺伝子導入細胞における FN 発現部位を蛍光免疫染色にて検討したところ、control MDCK 細胞と比較して細胞表面に非常に強い発現を有し、細胞質にも発現を認めた。

続いて原子吸光光度計を用いて遺伝子導入細胞と control MDCK 細胞の COM 結晶に対する付着活性を検討した。その結果遺伝子導入細胞に付着した結晶量は control MDCK 細胞と比較して有意に減少していた。

FN と細胞傷害の関連を検討するため、遺伝子導入細胞と control MDCK 細胞に COM 結晶を曝露して経時的に培養上清の LDH を測定した。その結果、曝露後 6 時間以降遺伝子導入細胞は control MDCK 細胞と比べて有意に LDH

が減少していた。

次に COM 結晶曝露による細胞の形態学的変化を観察するため、走査電子顕微鏡を用いて検討を行った。その結果曝露前は遺伝子導入細胞と control MDCK 細胞に形態学的に相違を認めなかったが、曝露後の control MDCK 細胞は表面に微絨毛を伴いながら多くの結晶が付着していることを確認した。一方曝露後の遺伝子導入細胞においては、細胞表面の変性を伴ってはいるものの、control MDCK 細胞と比較して結晶付着が減少していることを確認した。

[総 括]

本研究において、FN 過剰発現 MDCK 細胞は COM 結晶の付着ならびに細胞傷害に対し抑制的に作用することが確認された。また FN は、結晶表面ではなく腎尿細管上皮細胞表面に直接作用することにより結晶付着ならびに結晶の取り込みを抑制していることが確認された。

尿路結石症の生涯罹患率は、本邦においても食生活の欧米化に伴い確実に増加している。将来的にもその罹患率は、増加傾向が続くと予想されており、その対策は急務となっている。尿路結石症の形成に関しては尿中高分子物質が重要な役割を果たすと考えられており、それらが腎尿細管上皮細胞での結石形成プロセスにおいてどのように関与しているかも明らかにされつつある。基礎研究は臨床との結びつきが重要であり、新たな薬物療法の開発も含め尿路結石症治療にいかに関与できるかがポイントである。これまで積み重ねてきた FN と蔞酸カルシウム結石形成抑制効果について *in vitro* 及び *in vivo* においてさらに研究を進めていくことは、尿路結石の領域において大いに貢献するものになると考える。

論文審査の結果の要旨

シュウ酸カルシウム結石形成の初期過程において腎尿細管上皮細胞とシュウ酸カルシウム (CaOX) 結晶との相互作用 (crystal-cell interaction) が重要なステップであると考えられている。これまで我々は、fibronectin (FN) を用いて crystal-cell interaction と細胞傷害との関連性を解析し、蔞酸カルシウム結石の成因解明について研究を行い報告してきた。その内容はイヌ遠位尿細管由来の MDCK 細胞に CaOX 結晶を曝露することにより FN が過剰分泌され、FN が結晶凝集抑制作用および MDCK 細胞への付着抑制作用を有するというものである。しかし、それらの正確な作用機序は明らかではない。本論文では MDCK 細胞に FN の遺伝子導入を行って FN 過剰発現細胞株を樹立した。また FN 過剰発現細胞株は CaOX 結晶の付着ならびに細胞傷害に対し抑制的に作用することが確認された。これらより FN は、結晶表面ではなく腎尿細管上皮細胞表面に直接作用することにより結晶付着ならびに細胞傷害を抑制していることが確認された。以上より FN を用いた *in vivo* での研究をすすめていくうえで重要な知見が得られ、本論文は学位に値するものと認める。