

学位論文内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 論文審査担当者 |
|--|--|
| 弓場 一秀 | 主査 教授 木下 光雄 主査 教授 森 浩志 副査 教授 河野 公一 副査 教授 芝山 雄老 副査 教授 大槻 勝紀 |
| 主論文題名 Frequent Establishment of Long-term-cultured Myofibroblast Cell Lines Derived from Dupuytren's Nodules, Which Are Implantable into Nude Mice (Dupuytren 拘縮患者より採取され、ヌードマウスに移植可能な筋線維芽細胞株の樹立) | |
| 学位論文内容の要旨 | |
| <p>【 研究の目的 】 Dupuytren 拘縮(Dupuytren's contracture:以下、DC)は、手掌腱膜に結節を形成し、手指の拘縮をもたらす線維増殖性病変である。主な治療方法は病巣切除であるが、切除術後の再発率が高く、本疾患の病態解明とともに薬物療法の開発が望まれている。筋線維芽細胞はα smooth muscle actin (以下、α SMA)を多量に発現する線維芽細胞の phenotype であるが、DC 組織内にはこの筋線維芽細胞が多数存在し、それが本疾患の病態の主因と考えられている。しかし、今日まで DC 由来細胞株を長期間継代培養しえたとする報告は無く、DC の詳細な病態解明や、治療薬の開発には DC 患者由来の筋線維芽細胞株の樹立が期待されてきた。 本研究では、遺伝子操作を加えることなく、DC 患者由来の筋線維芽細胞株を樹立し、その特徴を明らかにするとともに DC の動物モデルの作製を試みた。</p> <p>【 材料と方法 】 検体は、6名のDC患者から手術時に切除したDC結節である。これを約3mm角に細切し、一ヶ月間静置培養した。6細胞株の内、4細胞株は2年以上に互り継代し得たので、樹立細胞株とみなして、それぞれ Dup1、Dup2、Dup3、Dup4 と名づけ、以下の方法に従って核型分析、形態観察、α SMA mRNA の発現、α SMA の局在部位とその分子量、細胞培養上清中の TGF β 1 発現量および異種移植による腫瘍形成能を検討した。</p> <ol style="list-style-type: none"> トリプシン-ギムザ法により、それぞれ約20個の細胞について核型分析を行った。 形態観察は、倒立位相差光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡によって行った。 遺伝子検索には、Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)を用い、α SMA mRNA の産生の有無を確認した。 α SMA の細胞内局在は、抗ヒトα SMA マウスモノクローナル抗体を用いる蛍光抗体法によって観察した。α SMA 分子量の解析は、Western-Blot 法(以下、WB)にて行った。 異種移植による腫瘍形成能の検討は、ヌードマウスの皮下に樹立細胞浮遊液を接種して行った。 <p>【 結果 】 各樹立細胞株の染色体分析では、いずれにも特異的な核型異常を認めなかった。細胞増殖形態</p> | |

は、不規則な細胞配列と cramping formation であった。樹立細胞系の超微形態においては、細胞膜直下に electron dense な微細構造を認め、筋線維芽細胞に特徴的な α SMA の線維束に相当すると思われた。RT-PCR では、全ての細胞系において約 591bp の位置に single band を認め、 α SMA mRNA の存在が確認できた。抗 α SMA 抗体を用いた免疫蛍光染色では、細胞膜周辺に α SMA bundle に相当する点状や線状の強い蛍光信号を認めた。WB では、各細胞間で α SMA の分子量に大きな相違は認めなかった。

以上の結果から、4つの樹立細胞系は筋線維芽細胞の特徴を維持し続けていることが証明されたので、次に可移植性を検討するために、これらの細胞浮遊液をヌードマウスの皮下に接種したところ、腫瘤形成率は 33%から 100%であった。この腫瘤は毛細血管に富み、間葉系細胞が不規則に配列していた。強拡大像では、これらの間葉系細胞は紡錘形細胞からなり、類円形または短紡錘形、ときに波状の核を有し、クロマチン網は繊細で均一な分布を示し、小型の核小体を有する細胞も見られた。免疫組織染色では、腫瘤組織を形成する紡錘形細胞にヒト α SMA の存在が確認された。これらの結果より、増殖細胞はヒト筋線維芽細胞であると同定され、樹立細胞系のヌードマウスへの可移植性が証明された。

【 考察 】

樹立細胞系が α SMA を継続して産生する理由の一つに、樹立細胞系内での TGF β 1 における autocrine system が存在すると考え、培養上清中の TGF β 1 濃度を酵素免疫法を用いて測定した。すると、TGF β 1 濃度は、対照線維芽細胞株の培養上清に比して、樹立細胞系の培養上清で有意に高かった。今後、TGF β 1 のレセプターが存在や、他のサイトカインについての実験も必要であるが、この結果は、樹立細胞系での TGF β 1 における autocrine system の存在を示唆するものであると考えた。

これまで、DC や他の拘縮性疾患より採取された筋線維芽細胞を長期間継代し続けたとする報告はなく、筋線維芽細胞は継代を重ねるごとに α SMA の産生量を減じ、その性質を失うものとされていた。また、Kischerら(1988)は、DC 由来の結節組織片をヌードマウスに移植することで DC の動物モデルの作製を試みたが、移植片はその体積とともに細胞外基質の分泌を徐々に減じ、組織片の移植による動物モデルの作製は困難であると報告した。今後、さらに形成された腫瘤の生理学的特徴に関する実験が必要であるが、本研究では、樹立細胞系の細胞浮遊液をヌードマウスに接種することで動物モデルの作製を簡素化したことにより、疾患の病態解明や薬剤スクリーニングへの道が開かれたと考えられる。

審査結果の要旨および担当者

| 報告番号 | 甲 第 号 | 氏 名 | 弓場 一秀 |
|---|-------|----------------|-------|
| 論文審査担当者 | | 主 査 教授 木 下 光 雄 | |
| | | 主 査 教授 森 浩 志 | |
| | | 副 査 教授 河 野 公 一 | |
| | | 副 査 教授 芝 山 雄 老 | |
| | | 副 査 教授 大 槻 勝 紀 | |
| 主論文題名 Frequent Establishment of Long-term-cultured Myofibroblast Cell Lines Derived from Dupuytren's Nodules, Which Are Implantable into Nude Mice (Dupuytren 拘縮患者より採取され、ヌードマウスに移植可能な筋線維芽細胞株の樹立) | | | |
| 論文審査結果の要旨 | | | |
| <p>筋線維芽細胞は、α smooth muscle actin (以下、α SMA)を多量に発現する線維芽細胞の phenotype であり、局所における本細胞の異常増殖が Dupuytren 拘縮の病態の主因と考えられている。申請者は、4 例の Dupuytren 拘縮患者より得られた筋線維芽細胞株の樹立に成功したため、この樹立細胞株の細胞生物学的特徴を明らかにするとともに、Dupuytren 拘縮動物モデルの作製を試みた。</p> <p>申請者は、全ての樹立細胞株が特異的な核型異常をもたないこと、顕微鏡観察によって樹立細胞株が筋線維芽細胞の形態的特徴を有することを示した。また、全ての樹立細胞株が α SMA からなる線維束を細胞膜直下に有することを免疫組織化学的に証明し、α SMA mRNA を発現することを reverse transcription polymerase chain reaction を用いて示した。これらの結果より、申請者は本研究において、4 株の筋線維芽細胞株が樹立されたことを確認した。次に申請者は、細胞培養上清中の、transforming growth factor β 1 (以下、TGF β 1)分泌量を酵素免疫法を用いて測定し、豊富な TGF β 1 分泌による autocrine system が、樹立細胞系における筋線維芽細胞の性質維持の一因であることを示唆した。さらに申請者は、樹立細胞株のヌードマウスに対する異種移植を試み、マウス内の増殖細胞が、ヒト筋線維芽細胞であることを免疫組織染色法で確認し、樹立細胞系が 33~100%の可移植性を有することを示した。</p> <p>本研究は、従来不可能であるとされていたヒト筋線維芽細胞株を樹立し、Dupuytren 拘縮のみならず、筋線維芽細胞を主因とする他の線維増殖性疾患の病態解明や、治療薬開発に応用できる可能性がある。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Bulletin of the Osaka Medical College 53(2) 000-000, 2007 (in press)</p> | | | |