

(79)

氏名(生年月日)	筒 井 貴 朗
本 籍	
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第1807号
学位授与の日付	平成9年11月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	培養ヒト腎糸球体臓側上皮細胞の継代培養に関する基礎的検討
論文審査委員	(主査) 教授 二瓶 宏 (副査) 教授 小林 慎雄, 笠貫 宏

論文内容の要旨

〔目的〕

糸球体臓側上皮細胞は足突起を有する高度に分化した細胞で、継代培養は困難とされる。そこで培養ヒト腎糸球体臓側上皮細胞を用い、継代不能となる際のアポトーシスの関与を検討した。またアポトー시스に対するヘパリンの作用および protein kinase C (PKC) 阻害薬を用い本過程での PKC の関与を検討した。

〔材料および方法〕

培養細胞は腎腫瘍のため摘出したヒト腎の正常部分より得た単離糸球体から採取し、免疫組織化学的に糸球体臓側上皮細胞と同定したクローンのみを選別した。12穴のプレートで subconfluent になるまで培養後、無血清培地におき経時的に浮遊細胞と接着細胞を算定し、死細胞数の割合から細胞活性を判定した。次いで本細胞が死に至る際のアポトーシスの関与につき、flow cytometric analysis (FCM) とアガロースゲル電気泳動で確認した。最後にアポトー시스発現へのヘパリンと PKC 阻害薬 ($10^{-7}M$ の H-7, staurosporin) 添加の影響を検討した。

〔結果〕

糸球体臓側上皮細胞は無血清培地におくと、経時的に死細胞数が増加するが、ヘパリン ($10\mu g/ml$) の添加で死細胞数は有意に減少した。FCM では preG1 peak が観察され DNA の断片化が推察された。アガロースゲル電気泳動では無血清培地24時間後あるいは通常の継代培養6代目において DNA の断片化を認め、アポトー시스発現が証明された。ヘパリン添加により DNA の断片化は濃度依存性に抑制され、ヘパリン

のアポトー시스抑制作用が示された。PKC 阻害薬である $10^{-7}M$ の H-7, staurosporin を添加すると死細胞数は有意に減少し、アポトー시스発現に PKC の活性化が関与していると考えられた。

〔考察〕

培養ヒト腎糸球体臓側上皮細胞が継代培養不能となる際のアポトーシスの関与とヘパリンのアポトー시스抑制効果が示された。糸球体臓側上皮細胞は分裂増殖しないため、in vivo で本細胞が障害をうけて減少すると残存する上皮細胞が機能を代償する。その代償機転が破綻すると、糸球体は不可逆性硬化へ至ると報告されている。ネフローゼ症候群を呈する微少変化群ではしばしば本細胞に障害を認め、治療としてヘパリン持続静注が行われる。ヘパリンが in vivo でもアポトーシスを抑制し、本細胞の機能を維持することで有効性を発揮している可能性が示唆された。

〔結論〕

培養ヒト腎糸球体臓側上皮細胞は6代以上継代培養が困難で、その理由としてアポトーシスの関与が証明された。またアポトー시스発現には PKC の活性化が関与していると考えられた。微少変化群によるネフローゼ症候群に対するヘパリンの臨床的有効性には抗凝固作用以外に糸球体上皮細胞のアポトー시스抑制という新たな機序が想定される。

論文審査の要旨

糸球体臓側上皮細胞は高度に分化した細胞で、継代培養が困難である。本論文は、継代培養が不能となる際のアポトーシスの関与、それに対するヘパリンの効果、さらにプロテインカイネース C (PKC) の関与を解明することを目的とした。

無血清培地下24時間後あるいは通常継代6代目でDNAの断片化を認め、アポトーシス発現が証明された。ヘパリンの添加によりDNAの断片化が濃度依存性に抑制された。PKCの阻害薬を添加すると死細胞数が有意に減少し、アポトーシス発現にPKCの活性化が関与すると推察された。ネフローゼ症候群では臓側上皮細胞に障害を認め、治療としてヘパリンの持続静注が行われている。上皮細胞の障害にアポトーシスが関与すること、ヘパリンの臨床的有効性には抗凝固作用以外に糸球体上皮細胞のアポトーシス抑制という新しい機序が想定されることを培養系で明らかにした学術的に価値ある論文である。

主論文公表誌

培養ヒト腎糸球体臓側上皮細胞の継代培養に関する基礎的検討

東京女子医科大学雑誌 第67巻 第7号
457-464頁 (平成9年7月25日発行) 筒井貴朗,
新田孝作, 湯村和子, 二瓶 宏

副論文公表誌

- 1) ヒト培養糸球体上皮細胞における membrane attack complex inhibitory factor 発現の意義.
日腎会誌 36(2) : 89-94 (1994) 筒井貴朗, 新田孝作, 湯村和子, 二瓶 宏
- 2) Establishment and characterization of an immortalized bovine glomerular endothelial cell line (不死化ウシ腎糸球体内皮細胞株の確立とその特性). Jpn J Nephrol 36(8) : 883-889 (1994) 新田孝作, 内田啓子, 筒井貴朗, 堀田 茂, 他5名
- 3) The role of novel 30-kD protein in human podocytes: special relevance to proteinuria in

glomerulonephritis (ヒト足細胞での新たな30-kD 蛋白の役割: 特に糸球体腎炎での蛋白尿との関連について). Jpn J Nephrol 35(11) : 1205-1211 (1993) 新田孝作, 内田啓子, 川嶋 朗, 筒井貴朗, 他4名

- 4) Expression of intercellular adhesion molecule-1 on cultured glomerular endothelial cells by pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide (培養糸球体内皮細胞での炎症性サイトカイン, リポ多糖体による ICAM-1 の発現について). Jpn J Nephrol 37(2) : 100-104 (1995) 新田孝作, 湯村和子, 三輪奈穂子, 筒井貴朗, 他4名
- 5) Cyclosporin A induces glomerular endothelial cell injury in vitro (in vitro でのサイクロスポリン A による糸球体内皮細胞障害について). Acta Pathol Jpn 43 : 367-371 (1993) 新田孝作, 内田啓子, 筒井貴朗, 堀田 茂, 他5名