

氏名 小 阪 淳

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第24号

学位授与の日付 平成4年 3月16日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻
学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 色素上皮細胞の無血清培養法の確立と同細胞種の分化
転換性に関する研究

論文審査委員 主 査 教 授 江 口 吾 朗
教 授 長 濱 嘉 孝
教 授 鈴 木 義 昭

論文内容の要旨

研究目的

脊椎動物の色素上皮細胞は普遍的にレンズ細胞への分化転換性を維持していることが江口らによって実証され、また、色素上皮細胞の分化状態やレンズ細胞への分化転換を完全に人為操作できる細胞培養系が伊藤と江口（1986）によって確立されている。この細胞培養分化転換系は、細胞分化の安定性と転換性を探究する上で、優れて有用であり、現在、分化転換のしくみについて分子レベルでの解析が進んでいる。しかし、この細胞培養実験系は、一般の細胞培養法と同じく、牛胎児血清を必要としているので、培養液に添加される外来因子が単独に作用しているのか、それらが血清中の成分と協調して働いているのかといったことが全く不明であった。したがって、無血清条件下の分化転換系が確立できれば、培養液に添加される因子や、血清中の増殖因子、細胞外基質因子などが、どのように、色素上皮細胞分化に影響を与えているのかということ、より明確に追求できると考えられる。

そのような見地から、本研究では、ニワトリ色素上皮細胞の無血清培養法を確立し、それによって、無血清条件下で色素上皮細胞の水晶体細胞への分化転換を成立させることを目的とした。

研究方法と結果

I. ニワトリ胚色素上皮細胞の無血清培養法の確立

①、ふ卵9日目のニワトリ胚より単離した網膜色素上皮細胞を、イーグルMEM培養液のみの、いわゆる完全合成培養液で初代培養すると、細胞は、一度はプラスチック上に接着するが、伸展は不十分で、増殖ができなかった。そのうえ、細胞は短期間内に培養器底面から離脱し、培養を維持することが困難であった。そこで、色素上皮細胞を、まず、血清存在下で3～4日間維持した後に、再び解離し、無血清条件下に二次培養（secondary culture）として35mm径培養器1枚あたり 1.0×10^5 個を植え継いだ。血清存在下で短期間培養することで、二次培養細胞は上記の無血清培養液でも培養器に接着し、伸展することができ

た。しかし、この条件下では、細胞増殖は、ほとんど観察できなかつた。さらに、培養開始4日目前後で、ある細胞は丸い形となって伸展を弱め、また、ある細胞はプロテアーゼで処理された様に融解現象を起こして、最終的には培養器より離脱する現象を示した。そこで、培養器よりの離脱と自己融解現象の抑制が不可欠と考え、ラット肝実質細胞の初代培養系で、牛肺由来トリプシン・インヒビターが細胞の融解を防ぐという事実を参考とし、色素上皮細胞に対してもトリプシン・インヒビターの効果を検討した。大豆トリプシン・インヒビターを最終濃度1.0mg/ml（培養液）で添加すると、この離脱、自己融解現象が抑えられ、色素上皮細胞が、4日間を超えて維持できることを見いだした。さらに、ニワトリ卵由来トランスフェリンを0.1mg/ml（培養液）の濃度で添加することで、細胞の生理状態がより向上されることを確認した。

②、さらに、無血清培養液に牛インシュリンを0.1unit/ml（培養液）の濃度で添加し、培養器1枚あたり 1.0×10^5 個の二次細胞を植え継いだ。その結果、色素上皮細胞は増殖を始め、植え継ぎ後8日目には細胞数は 1.0×10^6 個/培養器に達した。インシュリンが色素上皮細胞の増殖に大きな役割を担っていることが確認された。

③、基質分子がコートされていないプラスチック基質は、細胞の初期接着を可能にはするが、その後の細胞伸展を充分促すことはできなかつた。この点を克服するため、ラット尾より抽出したコラーゲンでプラスチック基質面をコーティングし、その上に細胞を植え継いだ。その結果、伸展が著しく促進され、色素上皮細胞は、培養器にコンフルエントの状態にまで増殖し、生体内で形成される色素上皮と同様な、メラニン色素顆粒に富んだ敷石状の単層上皮構造を形成した。プラスチック基質上では、この様な上皮構造は全く形成されなかつた。

II. 無血清条件下の分化転換

牛胎児血清、フェニルチオウレア及び羊精巣由来ヒアルロニダーゼを添加した培養液で培養することで、色素上皮細胞は脱分化し、さらに、水晶体細胞へ分化転換することが明らかになっている。そこで、無血清培養液にも、フェニルチオウレアと、ヒアルロニダーゼをそれぞれ最終濃度0.5mM及び0.1mg/ml（培養液）で添加し、無血清脱分化用培養液とした。 1.0×10^5 細胞/35mm培養器の濃度で色素上皮細胞を、コラーゲン基質上または、フィブロネクチン基質

上に植え継ぎ、無血清脱分化用培養液で培養した。色素上皮細胞は増殖しながら徐々に色素顆粒を失い、一部で、細胞の重層化が見られた。培養約14日目で、細胞の重層化部分より、特徴的なレンズ様体が出現した。

これらのレンズ様体が含むタンパク質の検索を目的として、水晶体特異的タンパク質である α A-クリスタリンと β -クリスタリンに対するモノ・クローナル抗体を用いて、ウェスタン・ブロッティングを行なった。その結果、無血清条件下で分化転換したレンズ様体にも、 α A-クリスタリンと β -クリスタリンのタンパク質が存在することが確認された。以上より、無血清条件下でも、ニワトリ色素上皮細胞は、水晶体細胞に分化転換することが明らかになった。

研究成果の考察と結論

本研究の無血清培養系では、培養液中に大豆トリプシン・インヒビターを添加することにより、長期間、色素上皮細胞を無血清条件下で維持することに初めて成功した。また、生体内の色素上皮層と同様な、敷石状単層上皮構造の構築には、コラーゲン基質などのコーティングが不可欠であることが判明した。このことから、色素上皮細胞の組織構築の足場として、コラーゲンなどの細胞外基質分子が、大きな役割を担っていることが強く示唆された。

また、フェニルチオウレアとヒアルロニダーゼを含んだ無血清脱分化用培養液で色素上皮細胞を培養する時には、コラーゲン基質か、フィブロネクチン基質のコーティングが不可欠で、プラスチック基質上では、細胞は直ちに培養器より剥がれ、維持できなかった。このことは、脱分化、分化転換を促進する試薬であるフェニルチオウレアとヒアルロニダーゼが、細胞-細胞外基質接着をその標的として作用していることを強く推察させる。この結果は、色素上皮細胞の分化形質発現の安定化には細胞外基質の作用が不可欠であり、その変化が水晶体細胞への分化転換に深く関わっているという江口らの見解を裏付けるものである。

色素上皮細胞の長期間の無血清培養システムが確立し、無血清条件下の分化転換が成功したことは、細胞分化形質の安定性と転換性の分子機構を研究する上で極めて意義深いと考える。

論文の審査結果の要旨

脊椎動物の色素上皮細胞には、レンズ細胞への分化形質転換性が保持されていることが知られている。ニワトリ胚色素上皮細胞について、レンズ細胞への分化転換の全過程を再現し、かつ人為的に制御しうる細胞培養実験系が確立されている。しかし、この実験系では、培養液に牛胎児血清が常に添加されているので、分化転換の調節機構、ことに環境因子の作用機作を解析する上で大きな障壁となっていた。申請者、小阪淳はこの点に着目し、色素上皮細胞を無血清条件下で培養維持し、さらには、レンズ細胞に分化転換させる研究に着手した。本論文はその研究の成果を内容とするものである。

従来、各種の株細胞で試みられている無血清培養の知見を基礎とし、インシュリン、トランスフェリンの効果について検討を加え、色素上皮細胞に無血清条件下でも増殖を促しうることを見出した。次いで、色素上皮細胞の分化形質発現がその細胞外基質に大きく依存していることに着目し、各種の基質分子の効果に検討を加え、コラーゲン基質を導入することで、従来の牛胎児血清存在下におけると同程度の無血清培養法を確立することに成功した。また、この過程で、色素上皮細胞の増殖と単層上皮形成が細胞外基質との相互作用によって調節されていることを具体的に示した。この無血清培養法を応用し、色素上皮細胞のレンズ細胞への分化転換を試みた。その結果、無血清条件下でも基本的には血清存在下で成立する分化転換と同等のプロセスで、色素上皮細胞がレンズ細胞に分化転換しうることを明らかにした。

この研究成果は、従来非常に困難視されていた環境感受性の高い色素上皮細胞の無血清培養法を確立すると共に、それによって同細胞種の分化転換に成功したもので、組織細胞の分化形質発現の安定化並びに分化転換の制御機構を分子レベルで解析する上で価値の高い成果である。したがって、この研究を内容とする申請者の論文は、博士学位論文としての水準に達していると評価した。

学位論文として提出された論文内容を口頭発表させ、その主要な部分を重点的に各審査委員が試問し、申請者の研究の目的、意義、独創性、さらには得られた知見の学術的位置付け及び価値等を詳細かつ厳密に審査検討した。次いで、申請者の学識を関連研究の動向及び研究の基礎となる一般的知識を中心として

試問をおこない、申請者の研究者としての独自性及び水準を審査検討した。その結果、研究は指導者の指導の下に、申請者自身が主体的に計画を立て実施されたものであり、その成果は学術的に価値のあるものと判断された。また、申請者の研究者の独自性と学識も認めることができた。以上の試験の結果に基づき、申請者は学位取得に値すると判定した。