

氏名	原田 隆
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第1182号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Establishment of Immortalized Human Glomerular Endothelial Cell Lines and Their Application (ヒト糸球体内皮細胞の不活化細胞株の確立とその応用)
論文審査委員	主査 教授 山本 格 副査 教授 下條 文武 副査 教授 追手 巍

博士論文の要旨

【目的】血管内皮細胞に関する研究において、内皮細胞特有の性質を維持する均一な微小血管内皮細胞を大量に得ることは極めて重要である。

一方、抗血管内皮細胞抗体は、血管障害を引き起こす原因の一つとして近年、注目を集めているが、この測定法には患者血清中の抗体と培養血管内皮細胞による免疫学的測定法が用いられる。しかし血管内皮細胞は単離と培養が難しく、得られる細胞に量的な制限があり、長い継代により細胞形質が変化するという問題があるため、多くの検体に対し再現性のある測定を行うことは困難であった。また、近年、内皮細胞の形態や機能は血管の種類や臓器組織によって異なるという所謂、血管内皮細胞の部位特異性も明らかになりつつある。

このため、特有の性状を維持している微小血管内皮細胞を大量に得る目的で、SV40によりヒト糸球体内皮細胞を不活化し、長期維持可能な細胞株樹立を試みた。更に、この細胞株を用いた抗血管内皮細胞抗体測定標準化の可能性についても検討した。

【方法】1.初代培養から5継代以内の培養ヒト糸球体内皮細胞(HGEC)に、野生型Simian virus SV40をリン酸カルシウム法によりtransfectしクローニングを行った。

2.得られた細胞株を形態的特徴、免疫染色法による血管内皮細胞に特異的であるvon Willebrand 因子の発現、SV40によるtransformation を誘導する large T 抗原の発現について検討した。次に内皮細胞に特異的である各種接着分子の発現と上述のマーカーを共焦点レーザー顕微鏡を用いた二重免疫染色法により検索した。

3.さらにCellular ELISA法を用い、HGEC及びクローニングした細胞株のTNF- α 刺激に反応して発現する細胞接着分子について解析した。

4.抗血管内皮細胞抗体測定の方法は、計16例のSLE患者の血清に対して、培養糸球体内皮細胞を用いたELISA法を行い、その吸光度を測定し、比較した。

【結果】SV40virusのtransfection後、著しい細胞数の減少が認められ、その後2週から3週にかけて出現したコロニーを単離、培養し、12の細胞株を得た。得られた細胞は元の糸球体内皮細胞と同様、コンフルエント時に単層敷石状配列を有し、SV40T抗原が核の中に染色された。また培養血管内皮細胞では10継代以降、細胞の膨化、増殖速度の低下が生じた。しかし今回得られた不活化細胞株 (SV-HGEC) では60代継代後でも単層敷石状配列及びvon Willebrand 因子、PECAM-1の発現が認められた。

次にTNF- α 刺激に反応して発現する細胞接着分子についてELISA法により比較した。ICAM-1はHGEC, SV-HGECともTNF- α の用量依存性に発現が増加していた。PECAM-1は双方の細胞ともTNF alpha刺激なしでも細胞膜上に発現していた。E-selectinも、双方の細胞ともTNF- α の

用量依存性に発現が増加していた。これらの性状は現在に至る60継代目まで不変であった。

抗血管内皮細胞抗体測定では、HGEC, SV-HGECを用いたELISAで測定した抗体価間に弱いながら有意な正相関性($r=0.558$, $P=0.0231$)を示した。

【結論】ヒト系球体内皮細胞(HGEC)との類似性から、今回確立された不死化培養ヒト系球体内皮細胞株は、血管内皮細胞を用いる細胞間及び細胞基質間の相互作用、情報伝達等の研究に有用と考えられた。さらに、同じ性質を持つ細胞を長期間、大量に供給できる利点があり、抗血管内皮細胞抗体測定の標準化にも役立ち得る。

審査結果の要旨

微小血管内皮細胞は単離と培養が困難で、その形態や機能は由来血管の部位特異性を有し、それらの細胞形質は長い継代によって変化する。本研究では、微小血管の代表であるヒト腎系球体内皮細胞(HGEC)を不死化し、長期維持可能な細胞株の確立を試みた。培養HGECに野生型 Simian virus (SV) 40 をリン酸カルシウム法により transfect させ、コロニー形成してくる細胞をクローニングし、12細胞株を得た。これらの細胞株は transformation を誘導する SV40-T 抗原を核中に発現していた。この中、3株の細胞は血管内皮細胞に特異的な von Willebrand 因子を発現し、元の HGEC と同様、単層敷石状配列を示した。得られた不死化細胞は血管内皮細胞の細胞接着分子 (ICAM-1, PECAM-1, E-selectin) を表出し、TNF- α 刺激により HGEC と同様な発現パターンを示したが、これらの性状は 60 継代以上でも維持された。更に、この細胞株を用いることにより、HGEC を用いた場合と相関性のある抗血管内皮細胞抗体価測定が可能であった。今回確立された不死化培養ヒト系球体内皮細胞株は、今後、血管内皮細胞を用いる細胞間及び細胞基質間の相互作用、情報伝達等の基礎的研究だけでなく、ヒト抗血管内皮細胞抗体価測定法の世界的標準化にも有用と考えられる。

以上の点に、本研究の学位論文としての価値を認める。