

	さかい たけひと	
氏名	坂井 勇仁	
学位	博士 (医学)	
学位記番号	新大院博(医)第1194号	
学位授与の日付	平成19年3月22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	ヒトアデノウイルス 12 型でトランスフォームしたラットメサンギウム細胞のラット腎臓への移植	
論文審査委員	主査 教授 下 條 文 武	
	副査 教授 山 本 格	
	副査 教授 追 手 巍	

#### 博士論文の要旨

申請者は、腎糸球体構成細胞由来と思われる腫瘍の報告が未だなされていないことに興味を持ち、ウイルスによる培養糸球体構成細胞のトランスフォーメーション実験を行ってきた。ラット培養糸球体メサンギウム細胞をヒトアデノウイルス 12 型でトランスフォームさせ、不死化細胞株を得る試みを行った。また得られた不死化細胞株の造腫瘍性についても検討した。

6 ～8 週の雄 Wistar ラットの腎臓から糸球体を単離し培養した後、均一化した細胞を 4 回以上継代し培養メサンギウム細胞として使用した。ヒトアデノウイルス 12 型を培養細胞に添加し継代を繰り返し、均一な transformed 細胞群を得た。ラットの腎被膜下にポケットを作成し transformed 細胞を挿入、移植した。transformed 細胞を移植後 9 日目で屠殺し、細胞移植した被膜下部位を観察した後、腎臓を単離した。その後組織学的、免疫組織学的検索を行った。

培養ラットメサンギウム細胞にアデノウイルス 12 型を感染させ継代培養すると一様の形態と成長パターンを取る細胞群となる。元のメサンギウム細胞は線維芽細胞のように紡錘状であるのに比して、これらの細胞は小型の核細胞比の大きな細胞で、上皮細胞様の集団を形成する。この均一化した細胞は 100 代以上継代してもその形状、増殖度を変化させることはなく不死化したと考えることが出来る。不死化した根拠は、抗ヒトアデノウイルス 12 型 E1A 抗体による免疫染色により、トランスフォームした細胞が E1A 抗原陽性となることから明らかである。免疫組織化学的検索から、トランスフォームした細胞は  $\alpha$  平滑筋 actin および vimentin が陽性であるが cytokeratin、desmin は陰性であった。腎被膜下に移植されたトランスフォーム細胞は 3 週程で腫瘍塊を形成してくるが周囲腎組織との境界は明瞭で固形腫瘍として敷石状に増殖していた。組織学的所見では腫瘍周囲にリンパ球、マクロファージの細胞浸潤を認めた。また腫瘍中心部に壊死を伴っていた。腫瘍細胞は中型で紡錘形の核を持ちクロマチンが凝集していた。核胞体比は大きく幼若性の目立つものであった。腫瘍中には

小血管の増生を認めるが angiogenesis として目立つ程ではなかった。以上の所見から、この腫瘍は undifferentiated malignant tumor と考えた。

ヒトアデノウイルス 12 型が培養げっ歯動物細胞をトランスフォームすることは良く知られている。トランスフォームの責任遺伝子は E1A と E1B であることが判明しているが本研究で得られたトランスフォーム細胞の細胞質中にも E1A 遺伝子産物が免疫組織学的に検出された。トランスフォームする前のメサンギウム細胞は比較的大型で紡錘状の線維芽細胞様形態を取り、突起を交差しながら増殖するが、トランスフォームした細胞は小型で上皮細胞様の配列をとり、細胞増殖も著しい。また 100 代以上の継代培養後も形態変化は認められず、Wistar rat の腎被膜下への移植後の造腫瘍性、腫瘍の細胞形状も維持されている。

今回得られたトランスフォーム細胞は市販 Wistar rat の培養糸球体メサンギウム細胞由来であり市販 Wistar rat は純系化されていないので同種組織を移植すると組織適合抗原が一致しないことから移植拒絶反応を起こす。私どものヒトアデノウイルス 12 型トランスフォーム細胞は移植すると造腫瘍性を示し、可移植性で、宿主の拒絶免疫反応も極めて弱い。同じアデノウイルスでも 5 型でトランスフォームした培養細胞は造腫瘍活性を示さない。この分子機構として 12 型 E1A は 5 型 E1A と異なり感染細胞の主要組織適合抗原系クラス I 遺伝子の発現を強く抑制し、その結果、12 型でトランスフォームされた細胞は移植宿主の免疫監視機構を免れるとも解釈される。

申請者のヒトアデノウイルス 12 型トランスフォーム細胞は keratin (-), vimentin (+),  $\alpha$  平滑筋 actin (+) の形質を示し、間葉系細胞の特徴を維持しているが、desmin は陰性化し、形態も明らかに変化し、敷石上の配列を示すなど上皮細胞類似の性格を獲得していた。被膜下に増生した腫瘍は未分化で幼若性が目立ち悪性腫瘍と考えられるが、ヒトの metanephric Wilms tumor に見られる尿細管様構造物は認められず、平滑筋細胞、横紋筋細胞への分化も認められない。すなわち本来の糸球体メサンギウム細胞と、かけ離れた細胞に変異したことになる。ウイルスによる細胞形質転換は各種ウイルスに依存するが、宿主細胞の性状にも支配されるのかもしれない。現在まで、げっ歯動物において、糸球体固有細胞由来腫瘍を確実に示す報告が認められない事は注目に値するが、この事実と糸球体細胞固有の性状を維持したウイルス誘導トランスフォーム細胞を確立するのが困難な事とは関連しているか否かは不明であり細胞生物学的に興味ある問題と言える。

(論文審査の要旨)

これまでげっ歯動物において腎糸球体構成細胞由来と思われる腫瘍の報告はない。本研究は、まずラットメサンギウム細胞をヒトアデノウイルス 12 型でトランスフォームさせ、不死化細胞株を得る試みを行った。次に得られた不死化細胞株の造腫瘍性についても検討した。

6～8週の雄 Wistar ラットの腎臓から単離糸球体を得て初代培養し、継代培養後、培養メサンギウム細胞を得た。この培養メサンギウム細胞にヒトアデノウイルス 12 型を tranfect させ、コロニー形成してくる細胞を継代培養した。この継代培養した細胞は 60 代の継代でも均一な形態を示し、ヒトアデノウイルス 12 型 E1A 抗原陽性であることから不死化 transformed 細胞であると判定した。この細胞の免疫組織学的検索では  $\alpha$  平滑筋 actin および vimentin が陽性であるが cytokeratin、desmin は陰性であり間葉系の特徴を維持しつつ上皮細胞類似の細胞形態を示していた。この不死化 transformed 細胞を雄 Wistar ラット腎皮膜下へ移植すると、境界鮮明な腫瘍を形成した。腫瘍細胞の形態は敷石状の小型上皮細胞に類似していて、腫瘍の中心部に壊死を伴っていた。腫瘍細胞は中型で紡錘形の核を持ちクロマチンが凝集していて、核胞体比は大きく幼若性の目立つものであり、病理組織学的には undifferentiated malignant tumor であると考えられた。

以上、ラット培養糸球体メサンギウム細胞をヒトアデノウイルス 12 型でトランスフォームし不死化細胞株を得、その細胞群が造腫瘍性を有することを明らかにした点に新規性があり、本研究の学位論文としての価値を認める。