

氏名(本籍)	後藤幸夫(茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博乙第1,525号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文題目	線維芽細胞由来気道上皮細胞分化因子の検討		
主査	筑波大学教授	理学博士	坂内四郎
副査	筑波大学教授	医学博士	野口雅之
副査	筑波大学教授	医学博士	住田孝之
副査	筑波大学講師	医学博士	青柳一正

論文の内容の要旨

(目的)

気道は、絶え間ない換気により、常時異物にさらされている。外界からの化学的な刺激物質およびウイルスや細菌、あるいは喘息などの気道の疾病により気道粘膜を構成する気道上皮細胞は容易に脱落、剥離する。この後、新たな気道上皮細胞が分化し気道粘膜が修復される。しかし、現在のところ、この気道上皮細胞の分化に関わる因子は詳細には解明されていない。

そこで、間葉系細胞が上皮系の細胞を分化するという報告、線維芽細胞が気道上皮に近接する粘膜固有層に存在することから、気道上皮細胞と気管由来線維芽細胞をco-cultureし、気道上皮細胞の形態から気管由来線維芽細胞の分化誘導能を判定した。さらに、線維芽細胞の臓器特異性を調べる目的で、皮膚由来線維芽細胞を、また、間葉系細胞の対照として平滑筋細胞を単離し、気道上皮細胞の分化に及ぼす影響を検討した。さらに、気管由来線維芽細胞から産生される気道上皮細胞分化誘導因子の同定を試みた。

(方法)

気道上皮細胞とのco-culture

モルモット気管より酵素的に単離した気道上皮細胞をヒト羊膜上で1週間液相状態、さらに2週間気相状態で培養を継続した。この後、単離した気管由来線維芽細胞、皮膚由来線維芽細胞あるいは平滑筋細胞と10日間co-cultureを行い、気道上皮細胞の形態から分化誘導を評価した。

気管由来線維芽細胞培養上清による気道上皮細胞の分化誘導

モルモット気管より酵素的に単離した気道上皮細胞をヒト羊膜上で1週間液相状態、さらに2週間気相状態で培養を継続した。この後、2日間培養した気管由来線維芽細胞の培養上清を用いて、気道上皮細胞を気相状態で10日間培養し、気道上皮細胞の形態から気管由来線維芽細胞培養上清の分化誘導能を評価した。

細胞増殖因子による気道上皮細胞の分化誘導

モルモット気管より酵素的に単離した気道上皮細胞をヒト羊膜上で1週間液相状態、さらに2週間気相状態で培養を継続した。この後、8種類の細胞増殖因子を用いて、気道上皮細胞を気相状態で10日間培養し、気道上皮細胞の形態から各々の細胞増殖因子の分化誘導能を評価した。

気管由来線維芽細胞のaFGF, bFGF, KGF mRNAの検出と同定

気管由来線維芽細胞からtotal RNAを抽出後、RT-PCR法にてaFGF, bFGF, KGF mRNAを検出した。検出されたmRNAはその塩基配列をシーケンスし、同定した。

(結果と考察)

気管由来線維芽細胞とco-cultureすることで、気道上皮細胞は単層立方上皮から多列線毛上皮へ分化し、生体の上皮の形態に酷似した。この形態学的変化は上皮の重層度の変化と構成細胞の変化からなり、重層度の変化は気道上皮細胞単独培養では単層立方であった気道上皮細胞が、線維芽細胞とco-cultureすることにより、円柱状化し、偽重層化し上皮の丈は著しく高くなった。構成細胞の変化は単層立方上皮では認められなかった基底細胞や杯細胞がco-cultureした培養上皮に出現した。これらのことから、気管由来線維芽細胞から気道上皮細胞を分化する因子が産生されていると考えられる。

次に、皮膚由来線維芽細胞と気道上皮細胞をco-cultureしたところ、気管線維芽細胞と同様の効果が認められた。このことから、気道上皮細胞の分化に線維芽細胞の臓器特異性はないと考えられる。さらに、同じ間葉系の細胞であるが、平滑筋細胞には気道上皮細胞を分化する効果は認められなかった。

気管由来線維芽細胞と気道上皮細胞のco-cultureは羊膜に隔てられ、細胞間接触がなかったと考えられるが、より直接的に証明するために、気管由来線維芽細胞の培養上清で気道上皮細胞を培養した。この結果、単層立方上皮は多列線毛上皮へと分化した。このことから、気道上皮細胞の分化に気管由来線維芽細胞との細胞間接触は必要とせず、気管由来線維芽細胞の培養上清中に気道上皮細胞の分化を促す液性因子が存在することが明らかとなった。

この液性因子を解明するために、8種類の細胞増殖因子の気道上皮細胞誘導効果を検討した結果、aFGF, bFGF, KGFに気管由来線維芽細胞とのco-culture同様、気道上皮細胞の分化誘導が認められた。

次に、気管由来線維芽細胞がaFGF, bFGF, KGFを産出しているか否かを検討する目的でRT-PCR法を行い、得られたfragmentの塩基配列を解析した結果、ヒトaFGF, bFGF, KGF mRNAと比較し、aFGFで94.0%、bFGFで92.4%、KGFで83.2%と高い相同性が認められた。このことから、気管由来線維芽細胞はaFGF, bFGF, KGF mRNAを発現していると考えられる。

以上のことから、気管由来線維芽細胞による気道上皮細胞の分化にaFGF, bFGF, KGFが関わっている可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は高度に工夫された気道上皮細胞の培養系を用い、線維芽細胞からの液性因子が気道上皮細胞の分化を引き起こすことを明らかにした。この液性因子の本体については既知の増殖因子類である可能性が示されている。しかし、定量的実験は行われていないので、どの因子がどの程度寄与するのか、また、これら以外の未知の因子が関与するのかわかり不明であり、今後の課題となっている。気道上皮細胞の分化機構の理解は気道炎症後の修復など気道病変の治療法の開発に有用であり、本論文で示された培養モデル系での成果はユニークでオリジナリティーも高い。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。