

氏名・(本籍) 五月女 隆 男 (栃木県)
 学位の種類 博士(医学)
 学位記番号 博士 第243号
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
 学位授与年月日 平成9年3月24日
 学位論文題目 Morphological and Immunocytochemical Identification of Periacinar Fibroblast-like Cells Derived from Human Pancreatic Acini
 (ヒト膵腺房より分離培養した腺房周囲線維芽様細胞の形態学および免疫組織学的同定)

審査委員 主査 教授 服 部 隆 則
 副査 教授 前 田 敏 博
 副査 教授 馬 場 忠 雄

論文内容の要旨

【目的】

ヒトアルコール性慢性膵炎早期に腺房周囲に線維化が観察されることより、膵腺房周囲線維芽様細胞(Periacinar Fibroblast-like Cells; PFCs)が膵線維化に関与する可能性が示唆されている。また、肝、肺など他臓器においては、線維化過程で線維芽細胞から筋線維芽細胞への形質転換が重要とされている。本研究はヒト切除膵組織からPFCsを分離培養し、その特徴を形態学および免疫組織学的に同定するとともに、筋線維芽細胞への形質転換の可能性、PFCsの細胞増殖能およびコラーゲン合成能に与えるtransforming growth factor- β 1(TGF- β 1), platelet-derived growth factor(PDGF)の影響につき検討した。

【方法】

- 1) 手術時に得られた切除膵組織をプロテアーゼ処理し、単離膵腺房を作成、組織培養プレートに播種した。播種後1日目より紡錘形の細胞が膵腺房周囲に増殖し、これをPFCsとした。
- 2) 継代3代目PFCsに対し、細胞外基質産生能の指標としてtype I collagen、type III collagen、prolylhydroxylase β subunit、type IV collagen、laminin、fibronectin、細胞骨格蛋白として α -smooth muscle actin(α -SMA)、vimentin、nonmuscle myosinの免疫染色を行った。
- 3) 継代3代目PFCsを透過型電子顕微鏡で観察した。
- 4) 継代2代目および4代目PFCsにTGF- β 1を添加、 α -SMAの発現をWestern blot法にて比較した。
- 5) 継代3代目PFCsの培養液にTGF- β 1(10^{-4} ~1ng/ml)、PDGF(10^{-3} ~1ng/ml)を添加、24時間培養後、 14 C-prolineを4時間添加し、コラーゲン合成量を測定した。
- 6) 継代3代目PFCsをTGF- β 1(10^{-3} ~1ng/ml)、PDGF(10^{-3} ~1ng/ml)存在下に18時間培養し、 3 H-thymidine添加後さらに6時間培養してDNAに取り込まれた 3 Hの放射活性を測定し、細胞増殖能とした。

【結果】

- 1) 単離膵腺房播種後1日目には少数の紡錘形細胞が膵腺房周囲に観察され、3~5日目には膵腺房は培養上清中に浮遊した。播種後10日目には紡錘形細胞のみとなった。
- 2) type I collagen、type III collagenは核周囲に強い免疫活性を示した。fibronectinの免疫活性は細胞質全体に弱く認められた。prolylhydroxylase β subunitの免疫活性は核周囲から細胞質全体に認められた。type IV collagenとlamininは細胞膜に近接する細胞辺縁部に免疫活性を認めた。 α -SMA、vimentin、nonmuscle myosinは細胞質に線維状に染色された。
- 3) 細胞質には多数のmicrofilamentが長軸方向に配列し、dense bodyを形成していた。

- 4) α -SMAの発現は継代による自然増強が認められたが、TGF- β 1添加にても濃度依存性に増強された。
- 5) TGF- β 1はコラーゲン合成量を濃度依存性に増強したが、PDGFは影響を与えなかった。
- 6) TGF- β 1は細胞増殖能に影響を与えなかったが、PDGFは濃度依存性に細胞増殖能を増強した。

【考 察】

正常膵では腺房間に線維芽細胞の存在が証明されているが、今回、ヒト膵腺房周囲線維芽様細胞をはじめて分離培養に成功した。単離膵腺房より二次的に培養したため、上皮細胞や平滑筋細胞との鑑別が必要となるが、PFCsは免疫組織学的に α -SMA陽性、nonmuscle myosin陽性、vimentin陽性であり、形態学的にmicrofilamentを有し、筋線維芽細胞と同定された。また α -SMAは筋線維芽細胞のマーカーとされているが、TGF- β 1添加により α -SMAの発現が増強され、筋線維芽細胞への形質転換がTGF- β 1により誘導されることが示された。コラーゲン合成能がTGF- β 1添加にて増強することと考え合わせると、PFCsは筋線維芽細胞の性格を獲得することにより線維化の進展に関与している可能性が示唆された。組織障害時には種々の炎症性サイトカインが放出されるが、中でもTGF- β 1は細胞外基質産生能を、PDGFは細胞増殖能を刺激するものとして知られ、今回の検討でもそれらはPFCsに対して既報に一致した作用を示した。TGF- β 1やPDGFによりPFCsが活性化されることから、慢性膵炎の腺房周囲線維化の進展においてPFCsは重要な役割をもつ可能性が示された。

【結 論】

ヒト切除膵組織により膵腺房周囲線維芽様細胞を培養し、形態学および免疫組織学的に筋線維芽細胞と同定した。TGF- β 1はPFCsの筋線維芽細胞への形質転換を誘導するとともにコラーゲン合成能を増強し、PDGFは細胞増殖能を増強した。以上より、PFCsは膵腺房周囲線維化に関与するものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

慢性膵炎における線維化の機序は不明であるが、膵腺房周囲線維芽様細胞 (periacinar fibroblast-like cells; PFCs) が関与している可能性が示唆されている。本研究は、切除膵組織より膵腺房を単離しPFCsを培養し、その特徴を形態学的ならびに免疫組織化学的に調べるとともに、増殖能およびコラーゲン合成能とそれに対するTGF(transforming growth factor)- β 1, PDGF(platelet-derived growth factor)の影響などについて検討したもので、得られた結果は以下の通りである。

- 1) 膵腺房単離、播種後1日目より、紡錘形細胞が遊離、増殖し、10日目にはconfluent状態にまで数を増した。
- 2) この細胞は線維芽細胞様で、細胞骨格蛋白である α -SMA(smooth muscle actin)、vimentinとnonmuscle myosin、細胞外基質蛋白のtype I & type III collagen、fibronectinとprolyl hydroxylase β subunit、基底膜構成蛋白のtype IV collagenとlamininなどに対する免疫組織化学染色で陽性所見を示し、微細形態学的に細胞質にmicrofilamentを認めた。これらの所見から、筋線維芽細胞と考えられた。
- 3) 紡錘形細胞にTGF- β 1を添加すると α -SMA発現とコラーゲン合成能が増強された。
- 4) 紡錘形細胞の増殖能はPDGFにより増強された。

本研究は、ヒトPFCsが筋線維芽細胞の性質を有することと、PFCsが炎症反応を介して膵線維化に役割を果たしている可能性を示したもので、博士(医学)の学位論文として価値あるものと認められる。