



Induction of apoptotic cell death by pancreatitis-associated ascitic fluid in Madin- Darby canine kidney cells

西川, 淳介

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1487

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001487>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	にし かわ じゅん すけ 西 川 淳 介	（京都府）
博士の専攻分野の名称	博 士（医 学）	
学位記番号	博い第1013号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成8年3月31日	
学位論文題目	Induction of apoptotic cell death by pancreatitis associated ascitic fluid in Madin-Darby canine kidney cells （急性膵炎腹水によるMDCK細胞におけるアポトーシス誘導）	

審 査 委 員	主査 教授 齋 藤 洋 一	
	教授 尾 原 秀 史	教授 千 葉 勉

論 文 内 容 の 要 旨

1 目的

重症急性膵炎においては発症早期に併発する肝、腎、肺などの多臓器不全が治療上の問題となっている。また、その病態に腹水の存在が重要な役割を果たしていることが以前から知られており、実験膵炎モデルにおいて急性膵炎腹水中に細胞障害物質や臓器障害因子が含まれていることが報告されている。また、臨床的にも腹膜灌流による腹水の除去が急性膵炎の治療として効果があるとされている。一方、近年アポトーシスが、生体内において不要な細胞を除去する際のみならず、炎症性疾患や抗癌剤投与による細胞障害においても誘導され、この誘導は各種サイトカインによって引き起こされることがわかってきた。今回われわれは、急性膵炎腹水（以下PAAF）の細胞障害性とアポトーシス誘導能を明らかにするため、ラット実験急性膵炎モデルより得られたPAAFを培養細胞に作用させ解析を行った。本研究では標的細胞としてイヌ正常尿細管細胞由来の細胞であり、hypoxia、ウイルス感染等によりアポトーシスが誘導されることが確認されているMadin-Darby canine kidney cell（MDCK細胞）を使用した。

2 材料と方法

体重約250 gのWistar系雄性ラットをエーテル麻酔下を開腹し、肝門部胆管をクランプした上で十二指腸側胆管より逆行性に30%デオキシコール酸（DCA）を0.1ml注入して出血性壊死性膵炎を作成した。約5時間後にラットの腹腔内より回収した血性腹水を遠心分離し、その上清を急性膵炎腹水（PAAF）とした。MDCK細胞は10%FCSを添加したDMEM培地を用いて37℃で培養した。PAAFのMDCK細胞に対する細胞障害性はMTT assay法を用いて評価した。即ち、 1×10^4 個/wellのMDCK細胞を96wellプレートで培養し、各濃度のPAAFを添加、37℃で4, 8, 12, 16, 24時間培養を行い、培養終了4時間前にMTT反応液を加え、570nmで吸光度を測定した。アポトーシスの指標であるDNA断片化はDNAアガロースゲル電気泳動法にて解析した。MDCK細胞を 1×10^6 個培養した60mmdishに20%PAAFを添加して37℃で8, 12時間培養した後、細胞をproteinase Kで融解し、

phenol/chloroform法を用いてDNAを回収した。このDNAを用いてアガロースゲル電気泳動を行った。さらにMDCK細胞の細胞内DNA断片化はベーリンガー社のthe cellular DNA fragmentation ELISAキットを使用して定量した。DNAをあらかじめBrdUでラベルしたMDCK細胞を 1×10^4 個/wellで96wellプレートに培養し、各濃度のPAAFを添加して2, 4, 6, 8, 12, 18時間培養を行った後、細胞膜を破壊し、溶出された細胞内DNAとDNA抗体を反応させ、470nmで吸光度を測定した。

3 結果

MTT assay法によりPAAFのMDCK細胞に対する細胞障害性を解析したところ、PAAFの濃度と作用時間に依存してMDCK細胞のviabilityは低下し、24時間後の20, 30%のPAAF添加ではMDCK細胞の生存は認められなかった。

PAAFを添加したMDCK細胞より回収したDNAのアガロースゲル電気泳動では、切断されたDNAが梯子状のバンドとして認められたが、PAAFを添加しない対照群のMDCK細胞のDNAにはこのような変化は認められなかった。さらに、あらかじめBrdUでラベルしたMDCK細胞を0, 10, 20, 30%のPAAFが添加されたDMEM培地で2~18時間培養し、細胞上清中のDNA断片量をELISA法を用いて測定したところ、PAAFの濃度と作用時間に依存してDNA断片の増加を認めた。またPAAFを添加しない場合にはDNAの断片化は培養時間に関係無くほとんど認められなかった。

4 考察

アポトーシスの特徴としては核の凝縮とDNAの断片化や細胞膜のblebbing, アポトーシス小体の形成などが報告されている。特にDNAの断片化はアポトーシスによる細胞死の決定的な現象であるとされている。本研究ではPAAF添加によりMDCK細胞は作用時間、濃度に依存して細胞障害をきたし、同時にアガロースゲル電気泳動法、ELISA法でも作用時間、濃度に依存してDNAの断片化が認められることからアポトーシスを介する細胞障害であることが判明した。現在、アポトーシスの誘導機構としては2つのメカニズムが考えられている。1つはhypoxic stressのような非特異的な機構であるが、この場合にはアポトーシス誘導に24時間から48時間以上必要であることが知られており、今回の実験結果ではアポトーシスの誘導が数時間以内に起きていることから、非特異的なアポトーシス誘導機構の関与は否定的であると考えられる。もう1つの誘導機構として、細胞外シグナルを介したアポトーシス誘導因子の存在が考えられる。今回の実験ではアポトーシス誘導に数時間しかかかっていないこと、PAAFの濃度に依存してアポトーシスが認められること、PAAFには数々のサイトカインが含まれていると考えられることから、MDCK細胞には細胞外シグナルを介したアポトーシス誘導が起きているものと考えられる。今回の実験結果から急性脾炎腹水中にアポトーシスを誘導する因子が存在することが判明した。アポトーシスと多臓器不全に関する報告は現在のところないが、本疾患における多臓器不全発症にアポトーシスが関与している可能性をも示唆する結果であると考えられた。

5 結語

ラット実験出血性壊死性脾炎腹水(PAAF)によるMDCK細胞に対する細胞障害性につき検討を行い以下の結果を得た。

1. PAAFはMDCK細胞のviabilityを時間、濃度依存性に低下させた。
2. アポトーシスに特徴的なDNAの断片化が認められた。

3. PAAFはMDCK細胞にアポトーシスを誘導する因子を含んでおり、また急性膵炎における多臓器不全がアポトーシスを介する細胞死によるものである可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

重症急性膵炎においては発症早期に併発する肝、腎、肺などの多臓器不全が治療上の問題となっている。また、その病態に腹水の存在が重要な役割を果たしていることが以前から知られており、実験膵炎モデルにおいて急性膵炎腹水中に細胞障害物質や臓器障害因子が含まれていることが報告されている。また、臨床的にも腹膜灌流による腹水の除去が急性膵炎の治療として効果があるとされている。一方、近年アポトーシスが、生体内において不要な細胞を除去する際のみならず、炎症性疾患や抗癌剤投与による細胞障害においても誘導され、この誘導は各種サイトカインによって引き起こされることがわかってきた。今回本研究者は、急性膵炎腹水（以下、PAAF）の細胞障害性とアポトーシス誘導能を明らかにするため、ラット実験急性膵炎モデルより得られたPAAFを培養細胞に作用させ解析を行った。

I 材料と方法

体重約250 gのWistar系雄性ラットを用い膵管より逆行性に30%デオキシコール酸（DCA）を0.1 ml注入して出血性壊死性膵炎を作成した。約5時間後にラットの腹腔内より回収した血性腹水を遠心分離し、その上清を急性膵炎腹水（PAAF）とした。MDCK細胞は10%FCSを添加したDMEM培地を用いて37℃で培養した。PAAFのMDCK細胞に対する細胞障害性はMTT assay法を用いて評価した。すなわち、DNAをあらかじめBrdUでラベルしたMDCKを 1×10^4 個/wellで96wellプレートに培養し、各濃度のPAAFを添加して2, 4, 6, 8, 12, 18, 時間培養を行った後、細胞膜を破壊し、溶出された細胞内DNAとDNA抗体を反応させ、470nmで吸光度を測定した。

II 成績

MTT assay法によりPAAFのMDCK細胞に対する細胞障害性を解析したところ、PAAFの濃度と作用時間に依存してMDCK細胞のviabilityは低下し、24時間後の20, 30%のPAAF添加ではMDCK細胞の生存は認められなかった。PAAFを添加したMDCK細胞より回収したDNAのアガロースゲル電気泳動では、切断されたDNAが梯子状のバンドとして認められたが、PAAFを添加しない対照群のMDCK細胞のDNAにはこのような変化は認められなかった。さらに、あらかじめBrdUでラベルしたMDCK細胞を0, 10, 20, 30%のPAAFが添加されたDMEM培地で2～18時間培養し、細胞上清中のDNA断片量をELISA法を用いて測定したところ、PAAFの濃度と作用時間に依存してDNA断片の増加を認めた。また、PAAFを添加しない場合にはDNAの断片化は培養時間に関係無くほとんど認められなかった。

これらの成績から次の様な結論を導き出している。すなわち、

- (1) PAAFはMDCK細胞のviabilityを時間、濃度依存性に低下させた。
- (2) アポトーシスに特徴的なDNAの断片化が認められた。
- (3) PAAFはMDCK細胞にアポトーシスを誘導する因子を含んでおり、また、急性膵炎における多臓器不全がアポトーシスを介する細胞死によるものである可能性が示唆された。

本研究は、急性膵炎についてその腹水の働きを研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったアポトーシス誘導について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。