

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	新井 慎平
論文審査担当者	主査 樋口 京一 副査 青山 俊文・田中 榮司
論文題目	The fibrous form of intracellular inclusion bodies in recombinant variant fibrinogen-producing cells is specific to the hepatic fibrinogen storage disease-inducible variant fibrinogen (異常フィブリノゲン産生細胞における繊維状の細胞内封入体は、フィブリノゲン蓄積病を引き起こす異常フィブリノゲンに特異的である)
(論文の内容の要旨)	<p>【背景と目的】 フィブリノゲン蓄積病 (fibrinogen storage disease : FSD) は、肝細胞の小胞体内に異常フィブリノゲン (Fbg) が蓄積し肝傷害を生じる疾患である。FSD を呈する Fbg 低下症の原因として、6 種の Fbg γ 鎖の遺伝子異常 (284R、314P、316N、ΔG346-Q350、366S、375W) が報告されている。γ375W の Fbg 産生 CHO 細胞において、Fbg が粗大顆粒状 (large granular : LG) および繊維状 (fibrous form : F) を呈し、封入体として存在することを明らかにしている。本研究では、細胞内封入体が FSD を引き起こす異常 Fbg に特異的な現象かを検討した。</p> <p>【材料と方法】 FSD を呈する上記 6 種の遺伝子変異、および FSD 報告のない Fbg 低下症 (Non-FSD) 7 種を対象とした。正常 γ 鎖 cDNA を有するプラスミドから遺伝子改変キットを用いて変異 γ 鎖プラスミドを作製した。プラスミドを $A\alpha B\beta$ 産生 CHO 細胞に遺伝子導入して安定化発現細胞株 (stable 株) を樹立し、Fbg 分泌能 (ELISA による培養液中および細胞内 Fbg 濃度の測定) と Fbg の細胞内分布 (蛍光抗体法および電子顕微鏡による観察) を検討した。また、CHO 細胞と肝細胞癌由来 HuH-7 細胞を用いた一過性発現細胞株 (transient 株) を作製し、遺伝子導入法の違いによる細胞内封入体を比較した。さらに、異常 γ 鎖を含むペプチド鎖産生 CHO 細胞 (正常 $A\alpha$ 鎖+異常 γ 鎖、正常 $B\beta$ 鎖+異常 γ 鎖、異常 γ 鎖産生細胞) を作製し、封入体形成について検討した。</p> <p>【結果】 FSD および Non-FSD stable 株では、正常 Fbg 産生 CHO 細胞に比して、細胞内 Fbg 濃度が培養液中より有意に上昇していた。FSD の 3 株 (314P、316N、ΔG346-Q350) では、γ375W 同様に 'LG' および 'F' 封入体を認めた。一方、FSD の 2 株 (284R、366S) と Non-FSD 株では 'LG' 封入体のみ認められた。電子顕微鏡では、FSD 株において拡張した小胞体とその内部に一定の配列を有する構造物を確認した。肝細胞由来の HuH-7 細胞においても同様の封入体が形成された。CHO/HuH-7 の transient 株では FSD 全例で 'F' 封入体を認めた。Non-FSD transient 株では stable 株同様に 'F' 封入体は認められなかった。ペプチド鎖産生 CHO 細胞では封入体形成は認めず、異常 Fbg 産生 CHO 細胞でのみ認めた。</p> <p>【結論】 繊維状封入体は、FSD を呈する 6 種の Fbg γ 鎖遺伝子変異を導入した培養細胞にのみ認められ、FSD 株に特徴的であった。細胞内封入体は異常 γ 鎖のみでは形成されず、正常 $A\alpha$ 鎖・$B\beta$ 鎖とともに異常 Fbg として組み立てられることで初めて形成された。FSD は稀な疾患であるが致死的であり、先天性 Fbg 低下症を呈した患者において FSD を発症するかは患者の予後および QOL を左右する重要な因子である。本研究から、先天性 Fbg 低下症の患者において、CHO 細胞を用いて異常 Fbg 産生 transient 株を作製し蛍光抗体法で繊維状封入体をスクリーニングすれば、非侵襲的に FSD 発症の可能性を判断できる。</p>