

Title	加齢にともなうヒトリンパ球サブセットの分裂能の変化～細胞性癌遺伝子の発現及びメチル化の加齢変化
Author(s)	出口, 安裕
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36038">https://hdl.handle.net/11094/36038</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【43】

氏名・(本籍)	で 出	ぐち 口	やす 安	ひろ 裕
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8613	号	
学位授与の日付	平成元年3月24日			
学位授与の要件	医学研究科内科系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	加齢にともなうヒトリンパ球サブセットの分裂能の変化～細胞性癌遺伝子の発現及びメチル化の加齢変化			
論文審査委員	(主査) 教授	岸本 進		
	(副査) 教授	濱岡 利之	教授	鎌田 武信

論文内容の要旨

〔目的〕

老化に伴うヒト免疫機能変化の特徴は、外来性抗原に対する免疫応答能の低下と、逆に自己成分に対する抗体産生の亢進である。免疫担当細胞の分裂繰り返し能の低下、T細胞の Interleukin 2 (IL-2) 産生能や IL-2 レセプター発現能の低下、B細胞分化因子産生の亢進等が報告されているが、より詳細なメカニズムは不明である。一方、細胞の分裂、分化やその機能発現の際に、各種の細胞性癌遺伝子(protooncogene)の発現及びその調節が重要であることが最近明らかになりつつある。今回、ヒトリンパ球サブセットにおいて、カルシウムイオノフォア(イオノマイシン)及びホルボールエステル(PMA)刺激によるリンパ球の分裂過程における細胞性癌遺伝子の発現及び遺伝子発現の調節機構のひとつと考えられているDNAのメチル化程度に加齢の影響がどの様に認められるかを検討した。

〔方法〕

SENIEURプロトコールにもとづき老年群は75歳から89歳の健常者24例、若年コントロール群は23歳から29歳の健常者23例を対象とした。常法により末梢血リンパ球をAET-ロゼット形成T細胞(Tw),マクロファージ欠如T細胞(Twp),T4(CD4)及びT8(CD8)陽性T細胞(T4,T8),B細胞(Bp)に分画し以下の検討を行なった。①イオノマイシン及びPMAによる各リンパ球サブセットにおける分裂能:  $2.5 \times 10^5/ml$ の細胞濃度にて4日間  $1 \mu M$ イオノマイシン, InM PMA 存在下にて培養し, 4日目のハーベスト8時間前にサイミジン( $^3H$ -TdR)を加えその取りこみにより細胞分裂能を測定した。②上記刺激による細胞性癌遺伝子の発現及びキネティクス:各ヒトリンパ球サブセットを  $1 \mu M$ イオノマイシン及び InM PMAで刺激下, 0, 2, 5, 8, 24時間後にグアニジンイソチオシアネート法によりRNA

を抽出し、oligo(dT)-cellulose カラムにより、mRNA (poly(A)-tailed RNA)を得た。このRNAを用いて、ドットハイブリダイゼーション法によりc-myc, v-myb,  $\beta$ -actin DNAをプローブとしてRNA量を検討した。また同様の刺激後のヒトリンパ球サブセット単離核を用いたnuclear run on assay により転写レベルを各時点で解析した。③細胞性癌遺伝子DNAメチル化レベルの解析：老年群及び若年群の各ヒトリンパ球サブセットよりDNAをSDS/プロテイナーースK法により抽出し、制限酵素切断後、サザンハイブリダイゼーション法にて細胞性癌遺伝子DNA,  $\beta$ -actinDNAプローブを用いて検討した。

#### 〔結 果〕

① イオノマイシン及びPMA刺激による各リンパ球サブセットの分裂能は、Tw:  $71,248 \pm 2,745$  (cpm) (老年群),  $224,935 \pm 2,574$  (若年群), A/Y比 (=老年群/若年群) 0.317, Twp:  $72,158 \pm 2,866$  (老年群),  $226,418 \pm 2,459$  (若年群), A/Y比 0.319, Bp:  $38,549 \pm 2,012$  (老年群),  $80,701 \pm 2,137$  (若年群), A/Y比 0.478 でいずれも老年群で有意に細胞分裂能の低下が認められたが、T細胞でより顕著であった。

② actin RNA量は各時点において著変を認めなかった。c-myc RNAは2時間時点, c-myb RNAは5時間時点をピークとして一過性の増加を老年群, 若年群とも認めたが, 若年群に比し老年群において, c-myc RNAはとくにT細胞においてピーク後の減少が遷延することがわかった。また, nuclear run on assay により, c-myc, c-myb,  $\beta$ -actin 転写量は, 老年群及び若年群において著変を認めなかった。以上より, 老年群においては, T細胞サブセットにおいて, c-myc RNAの転写後の分解過程における変化が示唆される。

③ DNAをEcoRI, Hind III及びメチル化感受性制限酵素であるXhoIにより完全分解後, サザン法による各バンドをデンストメトリーにより解析したところ, c-myc 遺伝子において, 老年群において有意に4.6 kbのバンドに比し, 8.2 kbのバンドの減少を認めた。この変化はT細胞, とくにT8陽性サブセットにおいて顕著であった。actin遺伝子においては老年群及び若年群で有意の変化を認めなかった。このことは, c-myc 遺伝子において遺伝子特異的に, 老年群でメチル化レベルが減少していることを示し, 遺伝子発現調節機構のひとつとしてDNAメチル化が関与すると考えられる点において非常に興味深い見解であり, 加齢におけるDNA結合因子の変化等が考えられる。

#### 〔総 括〕

ヒト末梢血リンパ球において, イオノマイシン及びPMA刺激における分裂能は, 老年群で有意の低下を認めた。同様の刺激後の細胞性癌遺伝子の発現において, 老年群にc-myc RNAの転写段階後の変化が示唆される。c-myc 遺伝子DNAは老年群, とくにT8陽性サブセットにおいて, メチル化レベルが減少しており, 遺伝子レベルにおける加齢変化が示唆される。

## 論文の審査結果の要旨

老化にともなうヒトリンパ球の繰り返し分裂能低下がこれまでの研究から明らかとなっている。

本研究は、その機構を分子レベルでより詳細に検討するため、カルシウムイオノフォア及びホルボールエステル刺激によるリンパ球分裂過程における細胞性癌遺伝子の発現とメチル化の加齢変化を解析した。老年群の特にT細胞サブセットにおいてc-myc 癌遺伝子の転写段階後の変化、メチル化レベルの変化を初めて見出し、遺伝子レベルにおける加齢変化を示唆する興味ある知見である。