OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Identification of the IL-6-responsive element in an acute-phase-responsive human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI)-encoding gene
Author(s)	安田, 直史
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38682
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 89 】

氏名	安田直史（やすだただし）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 11011 号
学位授与年月日	平成 5 年 12 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Identification of the IL-6 -responsive element in an acute-phase-responsive human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) -encoding gene **(ヒト膵分泌性トリプシンインヒビター（PSTI）遺伝子における IL-6 反応性領域の同定)**
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 松原 謙一　教授 辻本 賀英

論文内容の要旨

[目 的]

膵分泌性トリプシンインヒビター（PSTI）は膵液中に外分泌される Kazal 型のトリプシンインヒビターとして知られてきた。教室では各種癌細胞が PSTI を高率に発現していること，さらに PSTI が手術，外傷，炎症の際に血中に増加する急性相反応物質のひとつであることを明らかにした。最近，この急性相反応物質の誘導に IL-6 を中心とした炎症性サイトカインが関与していることが報告されている。

本研究は，急性相反応物質としての PSTI の誘導機序の解明のため，IL-6 をはじめとしたサイトカインの刺激で PSTI 遺伝子がどのように発現し，またその刺激に反応する責任領域が遺伝子上のどこにあるかを in vitro モデルを用いて検討したものである。

[方法ならびに成績]

1) 培養細胞

正常肝細胞の代用として高分子型ヒト肝芽腫由来の細胞株 HuH6を用いた（JCRB より供与)。

2) サイトカイン刺激による PSTI 分泌

HuH6細胞をそれぞれリコンビナントヒト TNFα，IL-1 β，IL-6，および LPS 刺激マクロファージの培養上清で刺激し，培養液中の PSTI 量の変化を RIA で測定した。IL-6 では PSTI 分泌量は濃度依存性に著明に増加したが，TNFα，IL-1 βではその分泌増加はわずかであり，濃度依存性も見られなかった。またこの反応は蛋白合成阻害剤である cycloheximide（100 μg/ml）の添加で完全に阻害され，新しい蛋白合成を介した反応であることが示された。

3) サイトカイン刺激による PSTI 遺伝子の発現

2) で刺激した細胞を用いて Northern blot により PSTI 遺伝子の発現を調べたところ，やはり IL-6 が最も強力に PSTI 遺伝子の発現を促進した。従って，この反応は遺伝子の転写促進のレベルで起こるものと考えられた。

4）転写開始点の解析

Primer extension を用いて HuH6細胞における PSTI 遺伝子の転写開始点を検討した。無刺激の HuH6細胞で正常膵と全く同じ2ヵ所の転写開始点が利用されていること，さらに，IL-6の刺激によってもこれら2ヵ所からの転写が共に促進されていることが明らかとなった。

5）CAT assay による IL-6反応領域の決定

PSTI 遺伝子の5'側非翻訳領域4.8kb に CAT 遺伝子の翻訳領域を結合した構造のプラスミドを作成し，さらに PSTI の4.8kb にさまざまな欠失変異をもったクローンを用意した。これらのプラスミドをそれぞれリン酸カルシウム法で HuH6細胞に導入し，それらを IL-6で刺激した際の CAT 活性を測定して，PSTI 遺伝子のどの領域が IL-6に反応して転写を促進するのに必要かを解析した。その結果，－3.84から－3.8kb の40bp（領域 B）がこの反応に必要であることが示された。この中には，他の急性相反応物質にも共通して認められ，IL-6 responsive element（IL6RE）として知られる塩基配列（TTGAGCAATG）が存在した。逆に，この配列のみを4個連結させただけでも IL-6に対する反応性が再現された。また，領域 B は IL-6による転写の促進だけではなく，未刺激状態における基礎転写活性の維持にも関与し，この作用はさらに約100bp 上流にある領域 A（－4.0～－3.9kb）の影響を受けて増強された。領域 A の中には AP-1の結合配列に類似した部分が2ヵ所(TGAATAA，TGAATCA)あり，その関与が示唆された。

［総　括］

1）肝癌細胞 HuH6は IL-6の刺激に反応して PSTI 遺伝子の転写を促進し，培地中への PSTI 分泌を増加した。

2）HuH6細胞で，IL-6依存性に起る PSTI 遺伝子の転写も，IL-6非依存性に起こる転写も同じ転写開始点を利用したものであり，これはさらに正常膵での転写と全く同じパターンであった。

3）急性相反応物質として発現する PSTI 遺伝子の IL-6による転写促進には PSTI 遺伝子の上流－3.84から－3.8kb の40bp の領域が必要で，この部分には他の急性相反応物質の遺伝子上にも存在し，IL6RE と呼ばれる特定の塩基配列がみられた。IL-6非依存性の基礎転写活性には，この領域とともに－4.0から－3.9kb の部分が関与している。その領域に AP-1結合配列に類似した部分が2ヵ所あったことから，AP-1が関与をしている可能性も考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は，膵分泌性トリプシンインヒビター(PSTI）が血中で急性相反応物質としての挙動を示すことに注目し，IL-6によるその遺伝子発現の機序を検討して，PSTI 遺伝子上に IL-6反応性領域を同定したものである。PSTI 遺伝子は肝癌細胞においても膵と同じ転写開始点を用いており，IL-6に反応して転写が促進されたが，この反応には－3.84／－3.80kb の領域が重要で，この領域は IL-6刺激によらない基礎転写活性にも必要であることが示された。同時に，この領域には他の急性相反応物質の遺伝子にも共通して保存されている塩基配列が存在した。また，さらに上流にある－4.0／－3.9kb の部分がこれらの転写をより促進させていることも明らかになった。侵襲に対する反応としての急性相反応物質誘導の機序を知ることは生体防御機構解明の上で意義が大きく，学位に値するものと考える。