

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | The Interleukin-6 (IL-6)/IL-6-receptor System Induces Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Production by Activating Tyrosine Kinase-Dependent Signal Transduction Pathway Different from Pathways Triggered by Protein Kinase Activators Including Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH)                             |
| Author(s)    | 根木, 玲子                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Citation     | 大阪大学, 1994, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/38758">https://hdl.handle.net/11094/38758</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">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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | ね 木 れい 子                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 1 0 6 4 号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 6 年 2 月 1 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     | The Interleukin-6 (IL-6)/IL-6-receptor System Induces Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Production by Activating Tyrosine Kinase-Dependent Signal Transduction Pathway Different from Pathways Triggered by Protein Kinase Activators Including Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH)<br>(インターロイキン6 / インターロイキン6 レセプターシステムを介したヒト絨毛性ゴナドトロピン産生系における細胞内情報伝達機構の解析) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 谷 澤 修<br>(副査)<br>教 授 濱 岡 利 之 教 授 平 野 俊 夫                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目 的】

ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) は、胎盤より産生分泌される代表的なホルモンであり、妊娠の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。このホルモンの産生分泌の調節には、上皮成長因子 (EGF), gonadotropin releasing hormone (GnRH) あるいは胎盤由来のサイトカインであるインターロイキン1 (IL-1), インターロイキン6 (IL-6), 腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) などが報告されている。また IL-1 と TNF- $\alpha$  は相乗的に絨毛細胞よりの IL-6 産生を刺激しさらにその IL-6 が IL-6 レセプターを介して絨毛細胞の hCG 産生を促進している事が報告されている。しかしながら IL-6 / IL-6-レセプター (-R) システムを介した hCG 産生における細胞内情報伝達経路の特性については明らかにされていない。一方これまでに絨毛細胞における hCG 産生に関するいくつかの細胞内情報伝達経路が報告されている。protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase 等である。そこで今回は、IL-6 / IL-6-R システムを介した hCG 産生における細胞内情報伝達経路の解析のために、各種タンパク質磷酸化酵素刺激剤あるいは阻害剤を用いて検討を行った。

### 【方 法】

- ① 胎盤絨毛細胞の精製：妊娠7-8週の初期胎盤を用い、コラゲナーゼ及びDNaseを用いて酵素処理の後、パーコール比重遠心法にて絨毛細胞分画を採取し、 $1 \times 10^5/ml$ に調整、その後2日間、RPMI 1640+10%FCSの条件下で培養後、培養上清を廃棄洗浄し、実験に供した。
- ② 絨毛細胞の刺激：上記にて調整した絨毛細胞に $4.0 \mu g/L$ の r (recombinant) IL-6,  $20 \mu g/L$ の rIL-1 $\alpha$ ,  $200 \mu g/L$ の rTNF- $\alpha$  あるいは GnRH の agonist (GnRHa) である leuprolide acetate,  $1.0 \mu M$  にて刺激し、150分後の培養上清中の hCG を測定した。
- ③ 各種タンパク質磷酸化酵素の影響：PKA の阻害剤である $20 \mu M$  の H8, PKC の阻害剤である $20 \mu M$  の H7, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase の阻害剤である $40 \mu M$  の W7, tyrosine kinase の阻害剤である $20mg/L$  の genistein をそれぞれ②の系に添加した。また $1.5mM$  の 8-bromo-cyclic AMP (8-Br-cAMP),  $1.5mM$  の 8-

bromo-cyclic GMP (8-Br-cGMP), 1.0  $\mu$ M の12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA), 1.0  $\mu$ M の calcium ionophore A23187をそれぞれ単独で添加し, 150分後の hCG 濃度を測定した。

④ hCG の測定:  $\beta$ -subunit に対し特異性を有するモノクローナル抗体を用いた EIA (enzyme immunoassay) 法により行った。

⑤ IL-6 の測定: ヒト IL-6 に対する EIA 法を用いた。

#### 【結 果】

① rIL-6, 各種タンパク質リン酸化酵素及びそれら阻害剤の絨毛細胞における hCG 産生に及ぼす影響: 精製した絨毛細胞を 8-Br-cAMP, TPA, A23187それぞれ単独で刺激した結果, rIL-6 単独刺激により産生される hCG 量に相当する hCG 産生を認めた。しかし, 8-Br-cGMP では hCG 産生の有意な上昇を認めなかった。次に IL-6/IL-6-R を介した hCG 産生におけるこれら細胞内情報伝達経路の関与を調べるために rIL-6 刺激系にそれぞれ H8, H7, あるいは W7の同時添加を行った。しかしこれら阻害剤による hCG 産生の抑制は認められなかった。しかしながら 8-Br-cAMP, TPA あるいは, GnRHa による刺激では, それぞれの阻害剤による hCG 産生は有意に抑制された。

② Genistein の hCG 産生に及ぼす影響: rIL-6 に genistein を同時添加したところ, rIL-6 による hCG 産生が有意に抑制された。また genistein による濃度依存性抑制も認められた。しかし, genistein は 8-Br-cAMP, TPA, あるいは A23187による hCG 産生は抑制しなかった。さらに GnRHa による hCG 産生系に genistein を添加した結果でも, hCG 産生の有意な抑制は認められなかった。

③ rIL-1 $\alpha$ , rTNF- $\alpha$  による IL-6, hCG 産生に及ぼす genistein の影響: rIL-1 $\alpha$  あるいは rTNF- $\alpha$  と genistein の同時添加を行った結果, hCG 産生は有意に抑制されるも, IL-6 産生の変化は認められなかった。

#### 【総 括】

① 絨毛細胞における IL-6/IL-6-R 系を介した hCG 産生には, tyrosine kinase の関与が明かとなった。

② 絨毛細胞における GnRH/GnRH-R 系を介した hCG 産生には tyrosine kinase は関与せず, IL-6/IL-6-R 系とは全く異なる  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase による細胞内情報伝達経路を介している事が明かとなった。

③ IL-1 あるいは TNF- $\alpha$  より産生される IL-6 の過程には tyrosine kinase は関与せず, IL-6 から hCG が産生される過程に tyrosine kinase が関与している事が明かとなった。

④ マウスの系での IL-6/IL-6-R 系において tyrosine kinase が細胞の分化及び増殖に重要な役割を果たしている事が報告されているが, 今回の結果によりヒトの内分泌調節機序で IL-6/IL-6-R 系が tyrosine kinase を介して働いている事が初めて証明された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究はヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の胎盤からの産生分泌調節機構の解析を, 胎盤から産生されるサイトカインを介した hCG 産生について, その細胞内情報伝達機構の観点から行ったものである。その結果, 絨毛細胞における Interleukin-6 (IL-6)/IL-6R システムを介した hCG 産生には tyrosine kinase が関与していることを初めて明らかにした。よって本研究は学位に値するものと認める。