The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	GROWTH INHIBITION OF HUMAN KERATINOCYTES BY 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D3 IS LINKED TO DEPHOSPHORYLATION OF RETINOBLASTOMA GENE PRODUCT
Author(s)	小林, 照明
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38950
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	小林照明（こばやしてるあき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11295　号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	**GROWTH INHIBITION OF HUMAN KERATINOCYTES BY 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D_3 IS LINKED TO DEPHOSPHORYLATION OF RETINOBLASTOMA GENE PRODUCT** **（1,25（OH）$_2$ D_3 によるヒトケラチノサイトの増殖抑制への網膜芽細胞腫遺伝子産物の脱リン酸化の関与）**
論文審査委員	（主査） 教　授　吉川　邦彦 （副査） 教　授　祖父江憲治　　教　授　三木　直正

論文内容の要旨

【目的】

活性型 VitaminD$_3$ である1,25-dihydroxyvitaminD$_3$［1,25（OH）$_2$ D$_3$］は，血中のカルシウムレベルの調節のみならず，細胞の増殖，分化にも重要な役割を演じていることが明らかになってきた。近年皮膚科領域では，難治性疾患である尋常性乾癬に活性型 VitaminD$_3$ が有効であることが見いだされ，乾癬の病態が炎症と表皮ケラチノサイトの増殖亢進，分化障害を主徴とすることより，我々は，Vitamin D$_3$ がケラチノサイトにおいてその増殖，分化に大きく関与すると考えた。

また，癌抑制遺伝子の1つである網膜芽細胞腫タンパク（pRB）は，G1／G0期ではリン酸化を受けていない状態にあるが，G1／S境界でリン酸化を受け，SおよびG2／M期では，リン酸化pRBが優位になる。つまり，脱リン酸化pRBがG1／S移行を抑制することにより，細胞周期，細胞増殖を調節していると考えられている。

我々は，無血清培養法を用いて1,25（OH）$_2$ D$_3$ のケラチノサイトにおける細胞周期への作用を明らかにすると共に，TGF-βが，pRBの脱リン酸化を介して細胞をG1後期で停止させることが示された事より，TGF-βと同様に1,25（OH）$_2$ D$_3$ もpRBを介して細胞増殖を調節しているのではないかと考え，解析した。

【方法】

細胞は，正常ヒトケラチノサイトを無血清培地のMCDB153で培養したsecond passage cellを用いた。

細胞周期の分析では，1x10^{-8} M及び，1x10^{-6} M1,25（OH）$_2$ D$_3$ を培養液中に入れて48時間培養した。一方で，1x10^{-6} M1,25（OH）$_2$ D$_3$ を添加後，時間経過を追って30時間後まで3時間ごとに細胞を採取した。採取する120分前に培養液中に10μM5-bromodeoxyuridine（BrdU）を添加し，37℃で培養した。次にマウス抗BrdU抗体，FITC標識抗マウスIgG抗体，Propidium Iodideを用いて染色し，Flow cytometryで分析した。

網膜芽細胞腫タンパク（pRB）のリン酸化の分析では，細胞をLysis buffer（1% SDS, 0.08 M Tris, 10% Glycerol, DTT 15.4 mg／ml, Aprotinin 50 μg／ml, Leupeptin 21.2μg／ml, E-64 10μg／ml）により溶かして，これをSDS-PAGE，ウエスタンブロッティング法，及びデンシトメーターを用いて解析した。

【成績】

細胞周期の分析では，1x10^{-8} M及び，1x10^{-6}M1,25（OH）$_2$D$_3$ を48時間添加後，1x10^{-8}Mでは全く変化が見られなかったのに対し，1x10^{-6}Mでは，S期の細胞は，36.4±1.8%から15.2±0.7%に減少し，G1／G0やG2＋M期の細胞は，そ

れぞれ52.7±1.2%から63.4±1.4%へ，10.9±0.8%から21.5±0.6%へ増加した。つまり，G1／G0，G2＋M休止が見られた。また，$1x10^{-6}$ M 1,25 $(OH)_2D_3$ を添加後，時間経過を追って細胞周期の変化をみると，添加直後よりS期の細胞は減少し始め，18時間以降はほぼ15%以下となっている。

またウエスタンブロッティング法によって，$1x10^{-6}$ M1,25 $(OH)_2D_3$ 添加後，脱リン酸化pRBの増加とリン酸化pRBの減少が確かめられた。同じ方法によって，10ng／ml TGF-β1の添加後にも同様の現象が認められた。

【総括】

以上の結果より，1,25 $(OH)_2D_3$ によって，G1／G0，G2＋M休止が引き起こされ，特にG1／G0休止は，脱リン酸化pRBの増加のために起こっていると考えられる。また最近，1,25 $(OH)_2D_3$ がTGF-β1のmRNA量を増加させるという報告もあることより，1,25 $(OH)_2D_3$ からTGF-β1，さらにpRBへという流れが，1,25 $(OH)_2D_3$ の増殖抑制のメカニズムとして推測された。

論文審査の結果の要旨

難治性皮膚疾患である尋常性乾癬に対する活性型Vitamin-D_3 の有効性が明らかとなり，臨床的に使用され始めた。

本研究は，活性型Vitamin-D_3 の本症に対する作用機序解明を目指して行われたものであり，1,25 $(OH)_2D_3$ の正常ヒトケラチノサイトにおける細胞周期の休止作用，さらにはその増殖抑制には，癌抑制遺伝子の一つである網膜芽細胞腫遺伝子産物（pRB）が関与している可能性を示し，活性型Vitamin-D_3 の皮膚疾患への臨床応用に対しての大きな礎となったものである。

すなわち，本研究により以下のことが示された。

1,25 $(OH)_2D_3$ は，培養正常ヒトケラチノサイトの細胞周期をG1／G0期及びG2＋M期に休止させる。現在，pRBは脱リン酸化pRBがG1／S移行を抑制することにより，細胞周期，細胞増殖を調節していると考えられており，この1,25 $(OH)_2D_3$ のG1／G0期休止作用は，1,25 $(OH)_2D_3$ が脱リン酸化pRBを増加させることによって起こっていると考えられる。

以上より本研究は，活性型Vitamin-D_3 が乾癬表皮ケラチノサイトの過剰増殖を抑えることにより効果を発揮する可能性を示すとともに，皮膚と活性型Vitamin-D_3 との関係の一部をも明らかにした価値あるものであり，学位に値すると考えられる。