



Title	心筋細胞における低酸素刺激時のInterleukin-6（IL-6）の発現調節に関する研究
Author(s)	松井, 秀夫
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41099">https://hdl.handle.net/11094/41099</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">大阪大学の博士論文について</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	まつ い ひで お 松 井 秀 夫
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 0 2 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 4 月 23 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	心筋細胞における低酸素刺激時の Interleukin-6 (IL-6) の発現調節に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岸本 忠三 教 授 松澤 佑次 (副査) 教 授 多田 道彦 教 授 荻原 俊男

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目 的】

心筋の虚血再灌流時に種々のサイトカインが関与することが知られている。培養心筋細胞において低酸素刺激により interleukin (IL)-6 の発現が誘導されること、また、IL-6 遺伝子の発現調節には、転写因子である NF- $\kappa$ B と NF-IL6 とが深く関与していることが他の細胞系で報告されている。本研究では心筋細胞において低酸素刺激あるいは IL-1 $\beta$  刺激による IL-6 遺伝子の発現の分子機構について検討する。

### 【方法ならびに成績】

IL-6 プロモーター・ルシフェラーゼ・プラスミドは、転写開始点から -179 bps から +12 bps までの IL-6 プロモーターを、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子に挿入して作成した (p179)。3 種類の変異 IL-6 プロモーター・ルシフェラーゼ・プラスミドは、それぞれ、NF- $\kappa$ B 結合部位または NF-IL6 結合部位に変異を加える (pm $\kappa$ B, pmIL6)、あるいは、その両方に変異を加える (pm $\kappa$ B/IL6) ことにより作成した。これらのプラスミドを心筋細胞に導入し低酸素刺激あるいは IL-1 $\beta$  刺激を行い、ルシフェラーゼ活性を測定した。

心筋細胞を 4 時間 IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) にて刺激したところ、非刺激群に比して 12.0 倍のルシフェラーゼ活性の上昇を認め、pm $\kappa$ B, pmIL6 を導入した心筋細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性の IL-6 発現は、それぞれ 3.1 倍、9.0 倍に減弱した。これらの結果から、NF- $\kappa$ B, NF-IL6 結合部位の塩基配列の置換は、ルシフェラーゼ活性をそれぞれ有意に約 75%, 25% 減弱し、特に、NF- $\kappa$ B は心筋細胞での IL-1 $\beta$  による IL-6 発現に極めて重要であると考えられた。

また、心筋細胞を 4 時間の低酸素刺激に暴露させたとき、5.9 倍のルシフェラーゼ活性の上昇を認め、pm $\kappa$ B, pmIL6 を心筋細胞に導入したときは、それぞれ 2.9 倍、4.1 倍に有意に減弱した。さらに、NF- $\kappa$ B と NF-IL6 の両方の結合部位の塩基配列を置換したプラスミドである pm $\kappa$ B/IL6 を心筋細胞に導入した群ではルシフェラーゼ活性は、1.8 倍に減弱した。これらの結果から、NF- $\kappa$ B, NF-IL6 結合部位の塩基配列の置換は低酸素刺激後のルシフェラーゼ活性をそれぞれ約 51%, 22%, 両方とも置換したときは 70% 低下させ、低酸素刺激後の心筋細胞においても、NF- $\kappa$ B は IL-6 の発現に極めて重要な役割を果たすものと考えられた。

次に、NF- $\kappa$ B または NF-IL6 結合領域のモチーフを含む24塩基よりなるオリゴヌクレオチドをプローブとし、低酸素刺激後の心筋細胞の粗核抽出液を用いて、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行った。NF- $\kappa$ B モチーフを含むプローブで EMSA を行ったところ、刺激により DNA 蛋白複合体の増加を認め、過剰の非標識 NF- $\kappa$ B モチーフを含むオリゴヌクレオチドの添加でこの複合体の増加は消失した。NF- $\kappa$ B の構成要素である p50, p65 に対する抗体を用いた supershift assay を行い、この NF- $\kappa$ B モチーフと結合する蛋白質は p50 と p65 よりなることが確認された。NF-IL6 モチーフを含むプローブによる EMSA では、同じく低酸素刺激で DNA 蛋白複合体の増加を認め、過剰の非標識の NF-IL6 モチーフを含むオリゴヌクレオチドの添加でこの複合体の増加は消失した。抗 C/EBP $\beta$  (NF-IL6) 抗体を添加した supershift assay により、低酸素刺激で誘導される DNA 蛋白質複合体が NF-IL6 であることが確認された。

#### 【総括】

変異 IL-6 プロモーター・ルシフェラーゼ・プラスミドを用いた遺伝子導入実験、NF- $\kappa$ B または NF-IL6 結合領域のモチーフをプローブとした EMSA および supershift assay の結果より、心筋細胞において低酸素刺激により、NF- $\kappa$ B, NF-IL6 が活性化され、低酸素時の IL-6 産生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

心筋炎や虚血再灌流障害に種々のサイトカインが関与しており、その病態における役割の解明が期待されている。Interleukin-6 (IL-6) は急性心筋梗塞の発症早期に血中濃度が上昇し、また培養心筋細胞の系でも低酸素刺激によりその転写活性および産生が増加することが知られている。しかし、低酸素刺激による IL-6 遺伝子の発現調節機構に関してはいまだ十分な検討はなされていない。

申請者は IL-6 遺伝子の promoter 領域を含む plasmid を作製し培養心筋細胞に transfection することで低酸素刺激による IL-6 遺伝子の発現調節を詳細に検討し、hypoxia responsive element が転写因子 NF- $\kappa$ B, NF-IL6 結合領域を含む領域にあること、また低酸素刺激による IL-6 遺伝子の発現には転写因子 NF- $\kappa$ B がより重要な役割を果たすことを見い出し、さらに Electrophoretic Mobility Shift Assay を用いることで低酸素刺激によりこれらの転写因子が活性化されていることを明らかにした。

心筋細胞において低酸素刺激で活性化される転写因子群が本研究により明らかとなり、またこれらの転写因子により発現調節を受ける遺伝子群の解明は、虚血心筋障害の病態の理解や新たな治療法にもつながるものと考えられ、本研究は、学位に値すると考えられる。