



Title	マウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1において恒常的活性型変異Gs $\alpha$ 蛋白の発現からIL-6産生誘導に至る分子機構の解析
Author(s)	元村, 卓嗣
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41116">https://hdl.handle.net/11094/41116</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=" <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>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	もと 元	むら 村	たか 卓	じ 嗣
博士の専攻分野の名称	博	士	(医	学)
学 位 記 番 号	第	1 4 0 3 3	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	マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 において恒常的活性型変異 Gs $\alpha$ 蛋白の発現から IL-6 產生誘導に至る分子機構の解析			
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岸本 忠三	教 授 松澤 佑次		
	(副査) 教 授 岡田伸太郎	教 授 高井 義美		

### 論 文 内 容 の 要 旨

(目的) McCune-Albright 症候群 (MAS) は, polyostotic fibrous dysplasia, カフェオレ斑, 多内分泌腺の機能亢進症を主徴する疾患である。病変部位の Gs $\alpha$  蛋白の点突然異変の結果, 内在性の GTPase の活性が低下し, cAMP を介したホルモン作用の恒常的活性化がその病因と考えられている。polyostotic fibrous dysplasia の病態は不明であったが, MAS 患者の骨代謝マーカーの解析と骨病変部生検組織の解析より, 骨吸収の促進が本症候群における骨病変の主体であることが明らかとなった。また, MAS 患者骨病変部位より得た初代培養細胞を用いた解析より, この細胞における Gs $\alpha$  蛋白の変異 (Arg<sup>201</sup>→ His) と細胞内 cAMP 含量の増加が証明された。さらに, 細胞培養上清中の骨吸収性サイトカイン IL-6 と IL-11 活性の上昇が認められた。(J. Clin. Invest. 1996, 98 : 30-35) したがって, MAS 患者骨病変部では点突然変異の結果, Gs $\alpha$  蛋白の恒常的活性化が生じ, 増加した IL-6・IL-11 が骨吸収を促進するものと推察された。本研究では骨芽細胞において Gs $\alpha$  蛋白の活性型変異から IL-6 の產生誘導に至る分子機構を明らかにすることを目的とした。

(方法ならびに成績) MC3T3-E1 細胞に膜透過性 cAMP アナログである dibutyryl cAMP を添加し, 培養上清中の IL-6 濃度を ELISA 法にて測定した。その結果, dibutyryl cAMP の添加により培養上清中の IL-6 濃度は著明に増加し, この産生増加は Rp-8Br-cAMP の添加により抑制された。次に, 野生型 Gs $\alpha$  蛋白発現ベクターまたは活性型変異 (Glu<sup>227</sup>→ Lys) Gs $\alpha$  蛋白発現ベクター (J.-P. Loeffler 博士より供与) を neo 耐性遺伝子と共に, マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 にリポフェクタミン法にて移入した。MC3T3-E1 を G418 存在下に培養し, 恒常的に野生型または変異型 Gs $\alpha$  蛋白を発現する MC3T3-E1 細胞株を得た。各々の細胞中の cAMP 含量と細胞培養液中の IL-6 活性を ELISA により測定した。その結果, 活性型変異 Gs $\alpha$  発現細胞における細胞中 cAMP 含量は, 対照細胞, 野生型 Gs $\alpha$  発現細胞に比べ著明に増加していた。また活性型変異 Gs $\alpha$  発現細胞の培養上清中の IL-6 活性は, 対照細胞, 野生型 Gs $\alpha$  発現細胞に比べて著明な増加を示した。各々の細胞より核蛋白を抽出した後 [<sup>32</sup>P] 標識オリゴヌクレオチドとインキュベートし, IL-6 遺伝子のプロモーター領域に結合しうる 4 つの転写因子の活性をゲルシフトアッセイにて解析した。その結果, 活性型変異 Gs $\alpha$  蛋白発現細胞において, phospho(Ser<sup>133</sup>)CREB の DNA 結合活性の増加を認めた。

さらに、AP-1やNF-IL6結合配列を含むオリゴヌクレオチドに特異的に結合する特異的蛋白の増加を認めたが、NF- $\kappa$ B結合配列を含むオリゴヌクレオチドに結合する特異的蛋白の増加は顕著でなかった。

(総括) 恒常的活性型変異 Gs $\alpha$ 蛋白を発現する骨芽細胞様株を樹立した。本細胞では、細胞内cAMPの上昇と培養上清中IL-6濃度の上昇を認めた。また、本細胞ではCREB、AP-1、NF-IL6の転写因子が活性化しており、これがIL-6の産生誘導に関与するものと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

McCune-Albright症候群における骨病変 polyostotic fibrous dysplasiaの病態として病変部の骨吸収性サイトカインの産生増加が報告されているが、その分子機構は不明であった。本研究において、元村君は活性型変異 Gs $\alpha$ 蛋白を発現する骨芽細胞様細胞株を樹立した。この細胞株では対照細胞や野生型 Gs $\alpha$ 蛋白発現細胞株に対して細胞内cAMP含量とIL-6産生量が著明に高値であった。さらに、それぞれの樹立細胞株より得た核蛋白を用いたゲルシフト解析の結果より、活性型変異 Gs $\alpha$ 蛋白の発現からIL-6産生誘導に至るカスケードにリン酸化CREB、AP-1、NF-IL6の各転写因子が関与することが判明した。本研究は polyostotic fibrous dysplasiaの分子病態を詳細に解明したものであり、本疾患のより特異的な治療にも貢献しうる可能性を有している。したがって本論文は学位論文に値するものと考えられる。