The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Induction of Apoptosis by Extracellular Ubiquitin in Human Hematopoietic Cells : Possible Involvement of STAT3 Degradation by Proteasome Pathway in Interleukin 6-dependent Hematopoietic cells
Author(s)	臺野, 華子
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41799
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	臺　野　華　子（だい の はな こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15279　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学　位　論　文　名	Induction of Apoptosis by Extracellular Ubiquitin in Human Hematopoietic Cells : Possible Involvement of STAT 3 Degradation by Proteasome Pathway in Interleukin 6 -dependent Hematopoietic Cells （細胞外ユビキチンによるヒト造血細胞のアポトーシス誘導機構：IL－6依存性細胞におけるプロテアゾームを介するSTAT 3分解の関与）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　金倉　　譲 （副査） 教　授　竹田　潤二　　教　授　平野　俊夫

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

我々はHairy Cell Leukemia（HCL）細胞から分泌されるヒト造血前駆細胞のコロニー形成能を抑制する分子を単離し、それがユビキチンであることを明らかにした。ユビキチンは細胞内においてプロテアゾーム系と協調して細胞周期制御分子や細胞内シグナル伝達分子などの蛋白分解を制御する分子であることが示されているが、細胞外に分泌されたユビキチンの作用の詳細は不明である。本研究では細胞外ユビキチンによる造血細胞の増殖抑制機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

【方法ならびに成績】

1）　細胞内ユビキチンの細胞外への分泌機構

マウスプロB細胞株Ba／F3、ヒト腎癌細胞株293Tにユビキチンの発現ベクターを導入し、培養上清中のユビキチン濃度をラジオイムノアッセイにより測定した。Ba／F3、293Tいずれにおいてもユビキチンを発現させた場合、培養上清中にはコントロールと比較して約10倍量のユビキチンが検出された。この結果から細胞内に高濃度にユビキチンが存在する場合、細胞死などによる細胞膜の崩壊がなくともユビキチンが細胞外へ分泌されると考えられた。

2）　細胞外ユビキチンによる造血細胞の増殖・細胞死制御

ユビキチンが造血細胞の増殖に及ぼす影響について短期（48時間）培養系を用いてMTTアッセイで検討を行った。ユビキチンは骨髄系細胞株U937、HL－60、リンパ系細胞株KT－3、Daudi、MT－4、YTC－3、MOLT－4およびPHAで刺激した末梢血単核球の増殖を濃度依存性に抑制した。ユビキチンによる増殖抑制はプロテアソーム系の阻害剤であるPSI、MG132によって解除された。また、ユビキチンによる増殖抑制が顕著であったKT－3、HL－60では、ユビキチン添加36～48時間後より大部分の細胞がFACS解析においてTUNEL染色、Annexin－V染色陽性となり、カスペース3の活性化を伴うアポトーシスが誘導された。

3）　IL－6依存性KT－3細胞に対する細胞外ユビキチンのアポトーシス誘導機構

KT－3はIL－6依存性細胞株でありその増殖、細胞死の抑制にはIL－6が必須の役割を果たす。IL－6による遺伝子の発現誘導をユビキチンによる前処置を行った場合と行わなかった場合とでノザンブロット法で比較した結果、TIS11、IRF－1の発現誘導には明らかな差は認められなかったが、c－myc、JunBの発現誘導はユビキチン処理を行った場合には強く阻害されていた。また、ユビキチン処理を行った場合、ウエスタンブロット解析でIL－6刺激

後のSTAT 3のチロシンリン酸化がほぼ完全に阻害され、これはSTAT 3蛋白そのものの消失が原因であった。一方、IL－6によるMAPKのリン酸化誘導及びMAPKの蛋白量はユビキチン処置によって影響されなかった。ユビキチン添加後STAT 3蛋白の減少は30分後より認められ、90分後には細胞内のSTAT 3はほとんど消失し、その作用はMG132により阻害された。ユビキチン添加によるSTAT 3消失の機構を解析するためにビオチン標識したユビキチンを用いて検討を行った。KT－3にビオチン化ユビキチンを添加しウェスタンブロット法で解析した結果、ビオチン化ユビキチンは細胞内に取り込まれ、STAT 3と結合することが明らかとなった。一方、他のSTATファミリー分子であるSTAT 1、STAT 5の蛋白発現レベルはユビキチン添加の影響を受けなかった。次に、ユビキチン添加時のアポトーシス関連分子の発現をノザンブロット法で検討を行った。Bcl－XL、Bcl－XS、Baxなどの発現はユビキチン処理により影響されなかったが、IL－6によるBcl－2の発現誘導がユビキチン処理したKT－3ではほぼ完全に阻害されていた。STAT 3はアポトーシス抑制分子Bcl－2の発現を制御することが報告されており、細胞外ユビキチンはKT－3においてIL－6からのSTAT 3を介するアポトーシス抑制シグナルを阻害することによりアポトーシスを誘導すると考えられた。

【総括】

HCL細胞から分泌されるユビキチンは造血細胞内に取り込まれ、細胞内ユビキチンと同様にプロテアゾーム系を介してSTAT 3などの分子を選択的に分解することによりヒト造血細胞に増殖抑制やアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

ユビキチンは本来細胞内においてプロテアゾーム系と協調して細胞内蛋白の選択的な分解に関与することが知られている。臺野らはHairy Cell Leukemia（HCL）細胞から分泌されるヒト造血前駆細胞のコロニー形成能を抑制する分子を単離し、それがユビキチンであることを明らかにしてきた。本研究では、細胞外ユビキチンが造血細胞の増殖・生存に及ぼす影響及びその分子機構についての解析が行われた。その結果、細胞外ユビキチンが各種の造血細胞に対して増殖抑制を誘導すること、また、IL－6依存性細胞株KT－3においては細胞外ユビキチンが細胞内に取り込まれ、プロテアソーム系を介してSTAT 3などの分子を選択的に分解しアポトーシスを誘導することが明らかにされた。

本研究成果は細胞内分子であるユビキチンの新たな機能及びその分子機構を明らかにしたものである。また、基礎的研究としての意義のみでなく、臨床的にもHCL患者の造血障害の病態を解明するにあたって極めて重要な発見であり、学位に値する研究であると考えられる。