The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	IL-6によるStat3依存的な細胞増殖停止機構の解析
Author(s)	成松, 雅博
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41888
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

【9】

氏　　名	成　松　雅　博（なり まつ まさ ひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　15337　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 歯学研究科歯学臨床系専攻
学　位　論　文　名	**IL－6によるStat3依存的な細胞増殖停止機構の解析**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　恵比須繁之 （副査） 教　授　米田　俊之　　講　師　村上　伸也　　講　師　豊澤　　悟

論　文　内　容　の　要　旨

【研究目的】

IL－6は、B細胞の抗体産生細胞への分化を誘導するだけでなく、多彩な機能を持つサイトカインである。IL－6のレセプターのサブユニットであるgp130からは、SH2ドメインを持つ転写因子であるStat3（signal transducer and activator of transcription 3）が活性化される。マウス白血病細胞株M1細胞では、IL－6刺激により*c－myc*および*c－myb*の発現抑制、G1期での増殖停止、さらにはマクロファージへの分化が誘導されるが、これにはStat3活性化が重要であることが明らかにされている。一方で、IL－6による増殖停止や分化には*c－myc*の発現抑制が関与することが報告されているが、*c－myc*の発現抑制以外にも、IL－6によるM1細胞の増殖停止機序の存在が示唆されている。

本研究は、IL－6によって誘導されるM1細胞の、*c－myc*発現抑制以外による増殖停止機序を検索することを目的とした。

【研究方法】

1．網膜芽細胞腫蛋白（Rb）のリン酸化状態の検討：M1細胞をヒト型リコンビナントIL－6（50ng／ml）で刺激し、ウエスタンブロットでのバンドの移動度の変化からRbのリン酸化状態の検討を行った。

2．IL－6刺激によるサイクリン依存性キナーゼ（CDK）およびサイクリンの発現量の検討：Rbをリン酸化するCDKおよびサイクリンの発現量の変化を、特異抗体を用いた免疫沈降法およびノーザンブロット法にて検討した。

3．IL－6刺激によるCDK 4結合分子の検索：^{35}S標識システインおよびメチオニンにて16時間代謝標識を行い、抗CDK 4抗体による免疫沈降物をSDS－PAGEにて展開後、オートラジオグラフィーに供し、IL－6刺激依存的にCDK 4に結合する分子を免疫沈降法にて検索した。

4．IL－6刺激依存的CDK 4結合分子の同定：IL－6刺激依存的にCDK 4に結合する分子を既知のCDKインヒビターに対する特異抗体を用いて検討した。また、優性抑制型Stat 3（dominant-negative Stat 3）を発現させたM1細胞（M1－Stat 3 D）を用いてその発現誘導がStat 3依存的であるかどうかを検討した。そして、その発現がmRNAレベルで誘導されるかをノーザンブロット法にて検討した。さらに、IFN－γ刺激による増殖停止においても、IL－6刺激と同様のCDKインヒビターが誘導されるかどうかを検討した。

【結果および考察】

1．IL－6刺激24時間後からSDS－PAGE上で移動度の高い低リン酸化型Rbの出現が認められた。これは、IL－6刺激によりCDKのキナーゼ活性が低下したことによるものと考えられた。

2．IL－6刺激24時間後では、CDK2、4、6、およびサイクリンD1、D2、D3のいずれも蛋白レベルでの発現量の減少は認めなかった。また、サイクリンAおよびサイクリンEのmRNAも、刺激24時間後での発現量の減少は認めなかった。以上の結果から、低リン酸化型Rbの出現は、CDKを構成するサブユニットの発現量の低下によるものではなく、CDKの活性を抑制する分子が誘導されることに起因すると考えられた。

3．^{35}S－システインおよびメチオニンを用いて代謝標識を行い、IL－6刺激依存的にCDK4に結合する分子を免疫沈降法にて検討したところ、IL－6刺激後ではCDK4に特異的に結合する約20kDaの分子が認められた。

4．特異抗体を用いて約20kDaのCDK4結合分子を同定した結果、この分子はCDKインヒビターの1つであるp19^{INK4D}であることが明らかになった。一方、優性抑制型Stat3を導入したM1細胞であるM1－Stat3Dにおいては、CDK4に結合するp19^{INK4D}蛋白の誘導は全く認められず、CDK4に結合するp19^{INK4D}蛋白の発現誘導はStat3依存的であることが明らかになった。

5．p19^{INK4D}mRNAは、IL－6刺激により1時間後から速やかに誘導され、その発現は24時間後に至るまで増加することが明らかになった。これに対し、M1－Stat3DにおいてはIL－6によるp19^{INK4D}mRNA発現誘導は認めず、IL－6によるp19^{INK4D}の発現誘導はStat3依存的にmRNAレベルで制御されていることが明らかになった。また、シクロヘキシミドで処理したM1細胞においても、IL－6によりp19^{INK4D}mRNAが誘導されることから、IL－6によるp19^{INK4D}の発現誘導には新たな蛋白合成を必要としないことが分かった。以上の結果から、p19^{INK4D}はStat3の直接の標的遺伝子であることが示唆された。

6．IFN－γ刺激においてはp19^{INK4D}mRNAおよび蛋白の誘導は認めず、IFN－γによる増殖停止は、IL－6によるそれとは機序が異なることが示唆された。

【結論】

IL－6刺激により増殖を停止し、マクロファージへ分化するマウス白血病細胞株M1細胞において、IL－6によりCDKインヒビターの1つであるp19^{INK4D}がmRNAレベルで誘導されることを示し、その発現誘導にはStat3が重要であることを明らかにした。さらに、その誘導には新たな蛋白合成を必要としないことを明らかにした。このことからp19^{INK4D}はStat3の直接の標的遺伝子であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、マウス白血病細胞株M1細胞の、IL－6による新規の増殖停止機序を検索したものである。その結果、IL－6刺激により、CDKインヒビターの1つであるp19^{INK4D}の発現が誘導されることを明らかにした。また、このp19^{INK4D}の発現誘導にはStat3活性化が重要であり、mRNAレベルでその発現が調節されていること、さらにp19^{INK4D}mRNAの誘導には新たな蛋白合成を必要としないことを示し、これらの結果から、p19^{INK4D}がStat3の直接の標的遺伝子であることが示唆された。

以上の研究結果は、IL－6による細胞の増殖停止と分化の機序の解明に重要な知見を提供するものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。