

Title	Induction of Chromosomal Aberrations and Growth-Transformation of Lymphoblastoid Cell Lines by Inhibition of Reactive Oxygen Species-Induced Apoptosis with Interleukin-6
Author(s)	三輪, 秀明
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42688">https://hdl.handle.net/11094/42688</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	三輪秀明
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15745 号
学位授与年月日	平成12年10月13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	Induction of Chromosomal Aberrations and Growth-Transformation of Lymphoblastoid Cell Lines by Inhibition of Reactive Oxygen Species-Induced Apoptosis with Interleukin-6 (活性酸素による lymphoblastoid cell line の apoptosis 誘導系における Interleukin-6 の apoptosis 抑制、細胞増殖促進および染色体異常蓄積効果)
論文審査委員	(主査) 教授 青笹 克之  (副査) 教授 北村 幸彦 教授 金倉 謙

### 論文内容の要旨

#### [目的]

慢性炎症を背景としてリンパ腫が高頻度で発生することが膵臓関連リンパ腫、甲状腺リンパ腫、胃リンパ腫等で疫学的に明らかにされているが、リンパ腫発生における炎症の関与の分子機序は解明されていない。炎症巣では種々の炎症細胞からさまざまな chemical mediator が産生・放出されている。この中で、炎症性サイトカインはリンパ球の増殖や分化に影響を与えること、また活性酸素が細胞死や DNA 損傷をもたらすことが知られている。そこで、*in vitro* の系を用いて、リンパ球の悪性転化に炎症性サイトカインと活性酸素とがいかに関与しうるかを明らかにすることを目的として本研究を行った。

#### [材料と方法]

培養細胞としては、非腫瘍性の lymphoblastoid cell line (LCL) を用いた。活性酸素産生系としては、Xanthine/Xanthine oxidase (X/XOD) を用いた。炎症性サイトカインとしては、Interleukin-6 (IL-6)、Interleukin-10 (IL-10)、Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) を用いた。細胞の生存率の検定は、trypan blue dye exclusion assay および 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay によった。colony 形成能は培養液を含んだ 0.25% アガロースで細胞を 21 日間培養し、50 個以上の細胞の aggregate を colony として算定することにより検定した。apoptosis の検定は、DNA アガロースゲル電気泳動におけるラダーの検出および flow cytometry における hypodiploidy 分画の検出によった。bc1-2 の発現は Northern blot 法で検討した。染色体分析は trypsin-Giemsa banding 法によった。

#### [結果]

まず、X/XOD による apoptosis 誘導系を確立した。種々の濃度の X および XOD を培地に加え、24 時間後に細胞の生存率を調べた結果、生存率は X および XOD の濃度に依存して低下した。DNA アガロースゲル電気泳動でのラダーの出現および Flow cytometry での hypodiploidy 分画の増加から本細胞死が apoptosis であることを確認した。X/XOD は  $O_2^{\cdot -}$  と  $H_2O_2$  の 2 種類の活性酸素を産生することが知られているが、superoxide dismutase による  $O_2^{\cdot -}$  の除去試験、硫酸鉄アンモニア法による  $H_2O_2$  測定結果および  $H_2O_2$  添加試験から本細胞死は  $H_2O_2$  がもたらすことがわかった。この結果から、sublethal な apoptosis 系として 200  $\mu$ g/ml の X および 1 U/ml の XOD を用いることとした。

次に、X/XODによるapoptosis誘導系におけるIL-6、IL-10、IFN $\gamma$ の影響を調べた。種々の濃度およびtimingについて検討した結果、10U/ml以上のIL-6で48時間前処理した時にX/XODによるapoptosisに対する抑制効果を認めた。生存率の上昇はIL-6 100U/mlの時最大で35%であった。IL-10およびIFN $\gamma$ ではこの効果は見られなかった。IL-6で48時間処理したLCLからmRNAを抽出しNorthern blot法を行った結果、*bcl-2*の発現の上昇を認めた。以上の結果から、IL-6がLCLに活性酸素に対する耐性を付与することが明らかとなった。この機構に*bcl-2*の発現増強が関与すると推定された。

次に、IL-6前処理-X/XOD後処理を6回反復して長期間培養し、LCLの挙動の変化を調べた。その結果、培養前に比して増殖速度の増加および軟寒天上でのcolony形成率の上昇を認めた。染色体分析の結果、同処理による染色体異常の蓄積を認めた。

[総括]

本研究によって、LCLがIL-6によって活性酸素に対する抵抗性を獲得することが明らかとなった。また、その機構に*bcl-2*の発現の増強が関与することが推定された。さらに、IL-6・X/XODの長期反復処理により細胞の増殖速度の増加、軟寒天上でのcolony形成率の上昇、および染色体異常の蓄積がもたらされることが明らかとなった。以上の結果は、慢性炎症巣におけるリンパ球の腫瘍化にサイトカインと活性酸素が関与している可能性を示唆している。

#### 論文審査の結果の要旨

種々のリンパ腫が慢性炎症を背景として発生することが疫学的に明らかにされているが、その分子機序は解明されてはいない。膿胸関連リンパ腫(pyothorax-associated lymphoma; PAL)は、結核に対する人工気胸術後の長期の膿胸を背景として胸膜腔に発生する特異なリンパ腫で、Epstein-Barr virus (EBV)が陽性のDiffuse large B-cell lymphomaという共通した特徴を有する。申請者は、PALの発生における慢性炎症局所で産生される活性酸素の関与を検討する目的でBリンパ球にEBVを感染させて不死化したlymphoblastoid cell line (LCL)に*in vitro*で活性酸素と炎症性サイトカインを作用させ、(1) Interleukin-6が活性酸素によるLCLのapoptosisを抑制すること、(2) 活性酸素とInterleukin-6の反復処理が細胞に増殖速度の増加、軟寒天上でのcolony形成率の上昇および染色体異常の蓄積という腫瘍化と考えられる変化をもたらすことを明らかにした。この成果は、慢性炎症とリンパ腫発生との関連について新しい知見を加えたと評価され、学位の授与に値すると考えられる。