OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system.
Author(s)	萩原, 圭祐
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45293
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	萩原圭祐（はぎはらけいすけ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 18495 号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system. （IL-6はサイトカイン誘導SAA相乗発現に必須である。）
論文審査委員	（主査） 教授 吉崎 和幸 （副査） 教授 金倉 譲　教授 平野 俊夫

論文内容の要旨

[目的]

AAアミロイドーシスは、IL-6、IL-1、TNFαなどのproinflammatory cytokineの産生異常による関節リウマチなどの炎症性疾患に続発する予後不良の疾患である。血清アミロイドA（SAA）は、主に肝臓で産生される急性炎症蛋白のひとつであるが、アミロイドA蛋白（AA）の前駆蛋白としても知られる。AAアミロイドーシスの治療は、現在確立されたものはないが、SAAを正常化し、維持することが重要であると報告されている。近年、抗サイトカイン療法による関節リウマチ治療に注目が集まっているが、その中でも、ヒト化抗IL-6レセプター抗体によるIL-6阻害療法のみ、SAAの速やかな正常化がみられる。今回我々は、AAアミロイドーシスの発症に主に関与するといわれるSAA1に注目し、IL-6、IL-1、TNFαの組み合わせによるSAAの発現誘導効果を検討した。さらに、臨床結果を踏まえ、IL-6、IL-1、TNFαそれぞれの阻害薬によるSAA発現の阻害効果を検討した。

[方法ならびに成績]

SAAのアイソフォームを認識するELISAシステムがないため、SAA1、SAA2、SAA4それぞれのmRNAを測定するリアルタイム定量的RT-PCRによるアッセイ系を作成した。SAA1、SAA2、SAA4それぞれのPCR産物を、プラスミドに組み込みこんだものをスタンダードとし、検量線を作製した。6穴プレートに 5×10^5 のヒト肝芽腫由来のHepG2細胞を播き込み、72時間後にサイトカイン刺激を行い、回収したtotal RNAを使って、cDNAを合成し、リアルタイム定量的PCRによる測定を行った。当初、SAAの発現量の補正には、GAPDHを用いていたが、サイトカイン刺激後では、GAPDHの発現が安定しなかった。そこで、無刺激コントロールを1として、サイトカイン刺激後の同一サンプル（n＝11）を用いて、GAPDH、β-actin、β2-microgloblin（β2M）の発現を比較したところ、GAPDH 1.60±0.82、β-actin 1.50±046、β2M 1.21±0.39と明らかにβ2Mのばらつきが小さく、統計学的有意差を示した（GAPDH vs. β2M $p<0.04$、β-actin vs. β2M $p<0.03$）。そこで、SAAの発現量の補正にβ2Mを用いたところ、より安定した定量が可能となった。

サイトカイン刺激後のSAAl、SAA2発現の経時的変化は、IL-6 10 ng/ml刺激後3時間、IL-1β 10 ng/ml刺激後6～12時間で最大値に達した。しかし、TNFα 10 ng/ml刺激では明らかな増加を示さなかった。SAA4の発現はいずれのサイトカイン刺激でもほぼ一定であった。以下の実験では、刺激後6時間にSAAの測定を行った。容量依存性の検討では、SAA1、SAA2の発現は、IL-6 100 ng/ml、IL-1β 1 ng/mlの刺激で最大の増加を示した。SAAの発現誘導における組み合わせ効果をIL-6 10 ng/ml、IL-1β 1 ng/ml、TNFα 10 ng/mlの濃度で検討したところ、SAA1、SAA2の発現においてIL-6＋IL-1β、IL-6＋TNFαで相乗効果を認めた。しかし、IL-1β＋TNFαでは、相乗効果を認めなかった。IL-6、IL-1β、TNFα三者の刺激では更なる発現増強はみられなかったが、その刺激下においてIL-6阻害を示すヒト化抗IL-6レセプター抗体は、SAA1の相乗効果発現を完全に抑制した。しかし、IL-1、又はTNFα阻害では部分的にしか抑制できなかった。ヒト肝癌由来のHep3B細胞、PLC/PRF/5細胞でも、ほぼ同様の結果が得られた。何故、IL-6阻害が最も有効であるのかJak2阻害薬AG490、MEKl,2阻害薬U0126を用いて検討を行った。IL-6＋IL-1刺激において、U0126は阻害効果を示さなかったが、AG490は約30%までSAA1の相乗効果を抑制した。従来、IL-6＋IL-1による相乗効果の発現は、NF-κBとMAPK系の下流に位置するC/EBPβ（NF-IL6）の作用によると報告されているが、この結果から、Jak-Stat系の関与も示唆された。

［総括］

臨床結果を裏付けるように、ヒト化抗IL-6レセプター抗体は、サイトカインによるSAA1の相乗効果発現を完全に抑制した。本現象は、3種の肝癌由来の細胞株で確認できたことから、IL-6はサイトカイン誘導SAA相乗発現に必須であり、IL-6阻害が難治性のAAアミロイドーシスの予防、治療に有用であることが示された。さらに、Jak2阻害薬AG490によりSAAの相乗発現が抑制されたことから、SAAのプロモーター上にSTAT3のコンセンサス配列がないにも関わらずSTAT3が関与する転写因子の新たな活性機序の存在が示唆された。

論文審査の結果の要旨

AAアミロイドーシスの前駆蛋白、血清アミロイドA（SAA）発現を、3種の肝細胞株を用いて定量的RT-PCRで検討した。IL-6とIL-1β、IL-6とTNFαにより著名なSAAの相乗効果発現を認めたが、IL-1βとTNFαではみられなかった。IL-6，IL-1β、TNFαではさらなる増強はみられず、IL-6阻害は相乗効果発現を完全に抑制し、IL-1又はTNFα阻害は部分的にしか抑制しなかった。更に、SAA発現にNF-κB、C/EBPβの関与が知られていたが、Jak2阻害薬AG490により相乗発現が30%にまで抑制されSTAT3の関与が示唆された。本研究により、IL-6阻害が難治性のAAアミロイドーシスの予防、治療に有用であるばかりでなく、SAAのプロモーター上にSTAT3のコンセンサス配列がないにも関わらずSTAT3が関与する転写因子の新たな活性機序が示唆された。以上より、本研究は学位授与に値する。