

# DOWN-REGULATION OF INTERLEUKIN-8 GENE EXPRESSION IN HL60 CELL LINE BY HUMAN KUNITZ-TYPE TRYPSIN INHIBITOR

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 前原, 佳代子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1059">http://hdl.handle.net/10271/1059</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 206号	学位授与年月日	平成 8年 3月26日
氏名	前原 佳代子		
論文題目	DOWN-REGULATION OF INTERLEUKIN-8 GENE EXPRESSION IN HL60 CELL LINE BY HUMAN KUNITZ-TYPE TRYPSIN INHIBITOR (ヒト Kunitz-type trypsin inhibitor は HL60 cell line の interleukin-8 遺伝子発現を抑制する)		

博士(医学) 前原佳代子

## 論文題目

DOWN-REGULATION OF INTERLEUKIN-8 GENE EXPRESSION IN HL60 CELL LINE BY HUMAN KUNITZ-TYPE TRYPSIN INHIBITOR

(ヒト Kunitz-type trypsin inhibitor は HL60 cell line の interleukin-8 遺伝子発現を抑制する)

## 論文の内容の要旨

### 目的

urinary trypsin inhibitor (UTI) はヒト Kunitz-type trypsin inhibitor のひとつであり、ヒト血中、尿中に存在する分子量6.7Kの糖蛋白である。

UTI は抗炎症性物質として既に肺炎、細菌性ショック、切迫早産の治療に臨床応用されているが、その作用機序は UTI の酵素阻害作用によると考えられている。UTI のトリプシン、プラスミン、エラスターゼ等のプロテアーゼの抑制作用については、今までに多くの報告がされているが、最近酵素阻害作用以外の新しい作用が見出されてきている。

炎症には interleukin-1 (IL-1)、interleukin-6 (IL-6)、interleukin-8 (IL-8) 等の各種サイトカインが関与することが知られている。そこで我々は炎症性サイトカインである IL-8 遺伝子発現に対する UTI の作用を検討した。

### 方法

HL60 cell を用い、UTI (0.64、2.5、6.4  $\mu$ M) 存在下、非存在下で lipopolysaccharide (LPS) (10  $\mu$ g/ml)、A23187 (0.1、1、10  $\mu$ M) で6時間刺激し、その後細胞から RNA を抽出し、Northern blot analysis で IL-8 mRNA の検出を行った。更に UTI (6.4  $\mu$ M) 存在下、非存在下で LPS (10  $\mu$ g/ml)、A23187 (1  $\mu$ M) で刺激した時 (0、3、6、12、24時間) の上清及び細胞内の IL-8 濃度を ELISA 法にて測定した。

また、fura-2 AM を load した HL60 cell を用い、UTI (10  $\mu$ M) 存在下、非存在下で LPS (0.2、1 mg/ml) A23187 (0.01、0.1 mM) で刺激し、細胞内カルシウム濃度を ARGUS100 にて I 340/I 380 nm ratio から測定した。

### 結果

HL60 cell において LPS あるいは A23187 は、IL-8 mRNA の発現を誘導した。UTI (6.4  $\mu$ M) は LPS による IL-8 mRNA の発現を抑制した。LPS による IL-8 mRNA の発現に対する UTI の抑制効果は濃度依存性であった。一方、UTI は A23187 による IL-8 mRNA の発現を A23187 の濃度に拘わらず抑制しなかった。上清中の IL-8 濃度は LPS (10  $\mu$ g/ml) あるいは A23187 (1  $\mu$ M) の刺激により上昇した。LPS 刺激では6時間より上清中 IL-8 濃度が上昇し始め12時間から24時間にかけて急激に増加した。UTI (6.4  $\mu$ M) は LPS 刺激による上清中 IL-8 濃度の増加を50%抑制した。A23187 刺激では上清中 IL-8 濃度は3時間後から急激に増加し24時間にわたり増加し続けた。UTI は A23187 刺激による上清中 IL-8 濃度の上昇を全く抑制しなかった。細胞内 IL-8 濃度に関しても UTI は LPS 刺激による上昇を抑制したが、A23187 刺激に対しては抑制しなかった。

細胞内カルシウム濃度は LPS、A23187 刺激により速やかに上昇した。UTI は LPS による細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制したが、A23187 による上昇を抑制しなかった。

## 考察

UTI は HL60 cell において LPS 刺激による IL-8 mRNA の発現を抑制した。このサイトカイン抑制効果が UTI の酵素阻害作用以外の主要な抗炎症作用であると推測された。LPS は炎症惹起物質として知られ、各種の細胞からの IL-8 産生を引き起こす。LPS の情報伝達機構ははまだ明らかではないが、膜介在性のシグナル伝達物質を介して細胞内に情報を伝えることや、LPS 刺激により細胞内カルシウム濃度が増加することが近年明らかにされている。今回の結果から、カルシウムイオノフォアである A23187 によるカルシウムインフラックスに対しては、UTI は全く抑制作用を持たないが、膜介在性シグナル伝達物質を必要とする LPS に対しては極めて強い抑制作用をもつことが明らかとなった。UTI は血中、尿中のみならず、細胞膜上にも存在することから、UTI の IL-8 mRNA の発現抑制は、カルシウムインフラックスの調節を含む細胞膜に対する作用によることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

前期破水による早産や切迫早産は、ほとんどの場合子宮頸部等の炎症に原因があり、インターロイキン-1 (IL-1), インターロイキン 8 (IL-8), 腫瘍壊死因子 (TNF) などの炎症性メディエーターが関与する機構により起こることが明らかにされている。これら炎症性サイトカインのうち、ケモカインとも呼ばれる IL-8 は炎症の初期に局所で生産され、さまざまな炎症細胞を遊走させるという炎症初発因子としての役割を演じているらしい。集まった好中球から分泌されるプロテアーゼが卵膜を破壊し、マクロファージ等から放出される様々なサイトカインが頸管熟化や子宮収縮を引き起こすと説明されている。一方、早産の新しい治療薬（膣座薬として使用）として注目されている urinary trypsin inhibitor (UTI) はトリプシン、キモトリプシン、プラスミン、エラスターゼ等の阻害活性を持つ分子量 6.7k の糖蛋白質であり、中心的作用機構は炎症性プロテアーゼの抑制と考えられていた。しかし、申請者らは臨床での使用例の観察から、UTI に子宮収縮および頸管熟化抑制効果もあることに気が付いた。以上の経緯を背景として、IL-8 遺伝子発現に対する UTI の作用を検討したのが本研究である。

申請者は、HL60細胞（ヒト白血病細胞株の1つ）を用い、まずリポポリサッカリド(LPS)およびA23187による刺激に呼応して起こるIL-8生合成に対するUTIの効果を検討した。また、LPSは形質膜の受容体に作用し、細胞内（サイトソル）の $Ca^{2+}$ 濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）を上昇させることが知られているので、前もってfura-2 AMを負荷したHL60細胞を用いてLPSおよびA23187による $[Ca^{2+}]_i$ の変化に対するUTIの影響も調べた。その結果、(1)Northernプロット解析により、UTIはLPS刺激によるIL-8 mRNAの上昇を濃度依存的に抑制するが、A23187による上昇には濃度に拘わらず影響を及ぼさないことが明らかになった。(2)培地および細胞内のIL-8濃度はA23187で刺激した時には3時間後から急速に上昇し、LPSではそれより遅れて徐々に上昇した。そして、UTIはLPS刺激による培地と細胞内のIL-8の上昇を抑制するが、A23187刺激による上昇には顕著な影響を及ぼさないというmRNA発現の抑制と整合性のある結果が得られた。(3)UTIはLPS刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の速やかな上昇を抑制するが、A23187による上昇には影響を及ぼさないことが明らかになった。LPSが $[Ca^{2+}]_i$ の上昇をもたらすこと、および $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がIL-8遺伝子を含むいくつかの遺伝子の発現を促進することが明らかにされているので、UTIの作用機構はLPS刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制と考えられる。UTIは、形質膜の受容体を介して働くLPSのIL-8遺伝子発現促進作用および $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用を強く抑制するが、 $Ca^{2+}$ イオノフォアであるA23187の効果には影響しないことか

ら、作用部位は形質膜レベルと推定された。申請者は以上より、UTIはプロテアーゼ阻害作用とこのサイトカイン抑制作用を合わせ持つことにより優秀な抗炎症効果を示すのであらうと提唱した。尚、UTIは胎児尿、羊水中に多量に含まれるので、胎児期に羊水中で重要な作用を持つと推察されている。UTI膾炙薬による早産の治療は胎児の生理的防御因子の補充という意味でも極めて理にかなったものという説明があった。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

- 1) I $\alpha$ I(inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor, UTIの前駆体蛋白質)の構造, 合成部位, 存在部位, 存在様式, 生合成調節機構, I $\alpha$ IからのUTIの生成部位とその機構, UTIとI $\alpha$ Iの測り分け法等について
- 2) 癌や炎症における血液のUTIの上昇の機構, I $\alpha$ I生合成の調節因子
- 3) Kunitz-type protease inhibitorの作用, 構造の特徴, および蛋白分子としての性質の特徴
- 4) IL-8の構造, 作用, 分泌細胞, 測定法とその精度, およびTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 等他のサイトカインによるIL-8発現とそれに対するUTIの効果
- 5) 化学誘引作用を持つサイトカインはIL-8だけか
- 6) LPS受容体の種類, 構造, および個々のLPS受容体を介する信号伝達機構
- 7) HL60を用いた理由, かなり高濃度のLPS, A23187を用いた理由
- 8) 申請者の実験において, 細胞をUTIとプレインキュベートしてからLPSを加えていることと関連して, UTIを同時投与あるいは後から加えたときの効果, UTIを一旦洗ってからLPSを加えたときの効果
- 9) エンドセリン, オキシトシン, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 等他のペプチドホルモンによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇および子宮筋の収縮に対するUTIの効果

これらの質問に対する申請者の答えは適切であり, 問題点をよく把握していることを示した。本研究が臨床の現場における観察から出発して, IL-8遺伝子発現の抑制というUTIの新しい作用の分子レベルでの解析に至った見事なものであることと合わせて, 本論文は博士(医学)の学位授与に値すると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	市山	新			
	副査	教授	寺川	進	副査	教授	堀内 健太郎
	副査	助教授	小出	幸夫	副査	講師	大橋 弘幸