



## Effects of interleukins on EGF-stimulated growth promotion in human thyroid cells-Differential modifications by IL-2 and IL-6 in Grave's and normal thyroid cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 下村, 奈津子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/998">http://hdl.handle.net/10271/998</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 145号	学位授与年月日	平成 5年 3月26日
氏名	下村 奈津子		
論文題目	<p>Effects of interleukins on EGF – stimulated growth promotion in human thyroid cells – Differential modifications by IL-2 and IL-6 in Graves' and normal thyroid cells                      (EGF によるヒト甲状腺細胞成長促進に対するインターロイキンの作用—バセドウ病甲状腺細胞と正常甲状腺細胞における IL-2 と IL-6 の影響)</p>		

医学博士 下村 奈津子

論文題目

Effects of interleukins on EGF-stimulated growth promotion in human thyroid cells - Differential modifications by IL-2 and IL-6 in Graves' and normal thyroid cells

(EGFによるヒト甲状腺細胞成長促進に対するインターロイキンの作用—バセドウ病甲状腺細胞と正常甲状腺細胞におけるIL-2とIL-6の影響)

論文の内容の要旨

甲状腺刺激ホルモン (TSH) は正常甲状腺細胞では主たる成長因子であるが、バセドウ病では TSH が抑制されている状態でも甲状腺腫の増大がみられ、上皮成長因子 (EGF)、甲状腺刺激抗体 (TSAb)、あるいは、甲状腺組織内の浸潤単核球より産生されるサイトカインが、甲状腺腫の形成に関与している可能性が考えられている。最近、インターロイキン (IL-)2 投与による甲状腺機能低下症の報告、T<sub>3</sub> 産生や TPO gene 発現に対する IL-1 あるいは IL-6 による抑制の報告が散見されるが、サイトカインの甲状腺濾胞細胞の成長に果たす役割については解明されていない。そこで、培養ヒト甲状腺細胞の成長、及び、EGF で誘導される c-fos mRNA の発現に対するインターロイキンの影響を検討した。

【対象及び方法】 甲状腺亜全摘術時のバセドウ病甲状腺組織18例と、上咽頭癌などの咽頭摘除術時の正常甲状腺組織16例を得、コラゲナーゼにて処理した。沈渣を DME + 4% FCS 中に浮遊させ、5% CO<sub>2</sub> 培養器内で培養し、単層培養細胞を得、以下の実験に供した。① [<sup>3</sup>H]-thymidine (TdR) の取り込み：細胞を DME + 1% FCS に浮遊させ、microplate の各 well に 1 万個/200 μl ずつ分注。EGF を最終濃度 10 ng/ml となるよう添加した群と非添加群の双方に IL-2 (10<sup>-4</sup>~1 U/ml)、IL-6 (10<sup>-4</sup>~10 ng/ml)、IL-4 (0.1~100 pg/ml) を添加した。回収 24 時間前に、[<sup>3</sup>H]-TdR (9.25 kBq/well) を添加、48、72 時間後に細胞の放射活性を測定した。② Flow cytometry による細胞周期の解析：microplate 各 well 当たり 10 万個/2 ml の細胞とし、EGF を添加した群と非添加群の双方に、IL-2 (1 U/ml)、IL-6 (1 ng/ml)、IL-4 (0.1、100 pg/ml) を添加し、24 時間ごとに細胞の DNA 量を EPICS Profile を用いて測定した。③ Northern blot 解析による c-fos mRNA の発現—72 時間培養した細胞 (50 万個/dish) に、EGF (10 ng/ml)、IL-2 (1 U/ml)、IL-6 (1 ng/ml) を加え、30、60、120 分後に Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform で RNA を抽出した。15 μg の RNA を電気泳動後、ニトロセルロース膜へ転写。Prehybridization 後、<sup>32</sup>P 標識 c-fos cDNA と Hybridization を行った。フィルターを洗浄後、オートラジオグラフィーを施行した。

【結果】 ① 培養ヒト甲状腺細胞に対する IL-2 の作用：IL-2 は、バセドウ病甲状腺細胞において、EGF による、[<sup>3</sup>H]-TdR の取り込みの増加、細胞周期 S+G<sub>2</sub>/M 期細胞の増加、並びに c-fos mRNA の発現をいずれも抑制した。EGF で増加した S+G<sub>2</sub>/M 期細胞の割合は、1 U/ml の IL-2 により EGF 無添加時のレベルまで抑制された。また、IL-2 単独でも、[<sup>3</sup>H]-TdR の取り込み、S+G<sub>2</sub>/M 期の減少が認められた。一方、正常甲状腺細胞では、IL-2 の添加により、[<sup>3</sup>H]-TdR の取り込み、S+G<sub>2</sub>/M 期に変化を認めなかったが、0.1 U/ml 以上で、EGF による c-fos mRNA の発現を濃度依存性に増強した。② 培養ヒト甲状腺細胞に対する IL-6 の作用：IL-6 は、バセドウ病甲状腺細胞においては、[<sup>3</sup>H]-TdR の取り込み、S+G<sub>2</sub>/M 期、EGF による c-fos mRNA の発現に影響しなかったが、正常甲状腺細胞において、0.01~10 ng/ml の IL-6 は [<sup>3</sup>H]-TdR の取り込みを EGF 無添加時のレベルの 218~303% まで増加、s+G<sub>2</sub>/M 期

細胞もIL-6によりEGFと同程度まで増加し、EGFによるc-fos mRNAの発現も増強した。③培養ヒト甲状腺細胞に対するIL-4の作用：IL-4はバセドウ病、正常甲状腺細胞ともにこれら指標に影響しなかった。

【考察】 IL-2は、バセドウ病甲状腺細胞のDNA合成を抑制し、EGFによるc-fos mRNAの発現を抑制することが示された。これは培養甲状腺細胞中のCD<sub>3</sub>、CD<sub>20</sub>陽性細胞がIL-2処理前後で変化ないことより、従来示されているkiller cellによる甲状腺細胞への障害作用ではなく、IL-2の甲状腺細胞への直接的な作用と考えられる。また、ヒト甲状腺細胞にはIL-6の特異的受容体があること、バセドウ病と比較すると弱い正常甲状腺細胞もIL-6を分泌していることが報告されており、正常甲状腺細胞においてIL-6はautocrine growth factorの一つであることが考えられる。

【結語】 IL-2はバセドウ病甲状腺細胞の増殖を抑制し、IL-6は正常甲状腺細胞の増殖を促進すると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

バセドウ病をはじめとする各種の甲状腺疾患の発症には、自己免疫学的機序が関与することが提唱されており、その際、多くの免疫系細胞（リンパ球、マクロファージ等）が甲状腺組織内に浸潤し、各種のサイトカインを産生してその病態の発症、及び変動に密接に関係することが明らかにされている。しかし、サイトカインのうちインターロイキン（interleukin, IL）が甲状腺濾胞上皮細胞に与える影響については不明な点が多い。そこで申請者は、バセドウ病患者における甲状腺濾胞上皮細胞の成長とc-fosプロトオンコジーンmRNAの発現に与えるインターロイキン、とくに、IL-2、IL-6、IL-4の添加効果について解析し、正常甲状腺細胞と比較検討して、その作用機序を追及しようとした。

審査委員会において、申請者によりなされた口頭発表と論文内容について審査した結果、本論文の特徴として次の点が評価された。

1. バセドウ病患者（18例）の甲状腺組織と、正常甲状腺部位の組織（16検体）を材料として遊離甲状腺上皮細胞浮遊液を準備し、単層培養を行った。これらの細胞について、1）<sup>3</sup>H-thymidine (TdR) 摂取により細胞増殖能を、2）上皮成長因子（EGF）の添加、非添加時におけるS+G<sub>2</sub>/M期細胞の測定をflow cytometry (EPICS) により、3）Northern blot解析法により、c-fos mRNA発現をそれぞれ解析した。

この際用いた実験材料、解析法、測定法等はいずれも本研究目的を解明する上で適切であると判断された。とくに、解析法の精度、再現性においても問題がないと評価された。

2. IL-2 (10<sup>-4</sup>~1 $\mu$ /ml) 添加によって、バセドウ病甲状腺細胞 (G・Tc) の場合は、EGFによる<sup>3</sup>H-TdR 摂取の増加、S+G<sub>2</sub>/M期細胞の増加、c-fos mRNA発現がいずれも抑制された。一方、正常甲状腺細胞 (N・Tc) の場合は、0.1 $\mu$ /ml以上の添加でc-fos mRNA発現が増強される以外は変化が認められなかった。以上の所見から、申請者はIL-2はG・Tcの細胞増殖や、EGFによるc-fos mRNA発現に対し抑制的に作用すると推論した。
3. IL-6 (10<sup>-4</sup>~10ng/ml) は、G・Tcに対してはいずれのパラメータにも変化を与えなかったが、N・Tcに対しては0.01~10ng/mlの濃度で、いずれのパラメータに対しても増強作用を発揮した。IL-4 (0.1、100pg/ml) は、G・Tc、N・Tcともに、いずれのパラメータにも影響を与えなかった。これらの所見から、申請者は、IL-6はN・Tcに対するautocrine growth factorの1つであると主張した。

委員会において、とくに独創的な所見として評価した点は、in vitro系において、IL-2はG・Tcの増殖に抑制的に、IL-6はN・Tcに対し促進的に作用することを明らかにしたことである。これらは甲状腺腫瘍形成とその病態変化に対する局所サイトカインの調節～修飾作用を考える上で示唆に富むものとして今後の発展が期待された。

審査の過程において申請者に対し次のような質疑が行われた。

- 1) 用いたG・TcとN・Tc標品について、その生存率、混在する他細胞の可能性、形態学的変化、年齢差の有無について検討したか
- 2) G・TcとN・Tcからの培養上清中へのT<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、IL-6等の分泌の可能性について
- 3) G・TcとN・Tcの膜表面におけるIL-2レセプタの発現性の違いを検討したか
- 4) G・TcとN・TcのIL2に対する反応性の違いをどのように説明するか
- 5) IL-2、IL-6、IL-4の添加量を決定した根拠について
- 6) EGF添加によりG・TcにクラスII抗原が発現しないか
- 7) 悪性腫瘍化甲状腺上皮細胞に対するIL-2、IL-6の作用について
- 8) バセドウ病甲状腺組織へ浸潤するリンパ球亜群とマクロファージの程度について

以上の試問に対し、申請者はほぼ適切な解答を行ったので、本論文は博士（医学）の学位授与に値するものと、審査委員全員で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 山下 昭

副査 教授 五十嵐 良雄 副査 教授 吉田 孝人

副査 教授 吉見 輝也 副査 助教授 小田 敏明