



Deregulated c-Fos/AP-1 accelerates cell cycle progression of B lymphocytes stimulated with lipopolysaccharide

Phuchareon, Janyaporn

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1460

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001460>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	ブチャレオン PHUCHAREON, JANYAPORN	(タイ国)
博士の専攻 分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博い第992号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成8年3月31日	
学位論文題目	Deregulated c-Fos/AP-1 accelerates cell cycle progression of B lymphocytes stimulated with lipopolysaccharide (Bリンパ球のリポポリサッカライド刺激に対する細胞増殖反応にお ける過剰のc-Fos/AP-1の増強効果の解析)	
審査委員	主査 教授 松尾 雅 文 教授 千原 和 夫 教授 堀 田 博	

論文内容の要旨

Introduction

The proto-oncogene c-fos encodes a phosphoprotein (c-Fos) that acts as a transcriptional regulator in the form of a heterodimeric complex with c-jun gene product (c-Jun) in the nucleus. This protein complex (AP-1) regulates expression of target genes by binding to the AP-1 consensus sequence in their promoter region. Since an immediate and transient expression of c-fos RNA is induced in mitogen-stimulated lymphocytes, c-Fos/AP-1 may serve as a nuclear transmitter of the lymphocytes. Suppression of c-Fos activity either by expression of antisense RNA or by microinjection of anti-c-Fos antibody inhibited the induction of cell cycle progression of fibroblasts by serum stimulation, suggesting that c-Fos expression is a primary event in the transduction of mitogenic signals leading to cell proliferation. However, a function of c-Fos in lymphocyte proliferation is still unknown.

When we examined the effect of deregulated c-Fos on proliferative response of splenic B lymphocytes stimulated with lipopolysaccharide (LPS), the response was augmented. We further investigated mechanisms of the augmentation by the c-Fos. Here we show that cell cycle progression of the B cells was accelerated. This acceleration correlated with the amount of c-Fos/AP-1 in those B cells. We discuss a functional role of c-Fos/AP-1 in proliferation of B cells activated with LPS.

Materials and Methods

Splenic B cell preparation and proliferation assay

Splenic B cells from Mx-c-fosD transgenic mice and control littermates were prepared by the treatment of spleen cells with anti-Thy-1.2 antibody and rabbit

complements. The cells were cultured with various concentrations of LPS in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum. The culture was pulsed with (^3H) - Thymidine and the radioactivity was measured by liquid scintillation counter.

Limiting dilution assay

Spleen cells were cultured with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of LPS. The number of cells in each well was examined under microscope on day 0 and day 4 after stimulation. The wells showing no increase in total cells were scored as nonresponder. Frequencies of LPS responding spleen cells were determined by poisson analyses of the plot between the percentage of nonresponder and the input cell number.

Cell cycle analysis.

The cultured cells were stained with propidium iodide solution. Fluorescence greater than 570 nm emitted from the propidium iodide-DNA complex in each nucleus was measured by FACScan. Percentages of cells within G1, S and G2/M phase of cell cycle were analyzed using the CellFit computer program.

Gel retardation assay and western blot analysis

Nuclear proteins were extracted from cultured spleen cells by the midi-method. The proteins were incubated with radioisotope-labelled oligonucleotide containing AP-1 binding site. The resulting DNA-protein complex was analyzed by electrophoresis on polyacrylamide gel. The proteins were fractionated on polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane and stained with anti-c-Fos and c-Jun antibodies. The Ab-detection reaction was performed using the ECL chemiluminescence detection system.

Results

When splenic B cells were cultured with LPS, proliferative response of Mx-c-fosD B cells was about 4 times higher than that of the control B cells. Kinetic analysis of those B cell proliferations demonstrated that the peak responses of the Mx-c-fosD B cells is about 1 day earlier than those of the control B cells. Cell cycle analysis also indicated that cell cycle progression of the Mx-c-fosD B cells into the S phase was accelerated.

By limiting dilution assay, the number of LPS responding cells in spleen cells between Mx-c-fosD and control littermate mice were similar. The duplication time was calculated from the cell proliferation curve by exponential equation. The time of the Mx-c-fosD B cells was shorter than that of the control B cells. These results indicate that the augmentation of cell proliferation in the Mx-c-fosD B cells is mainly due to their shorter duplication time.

Using gel retardation assay, the Mx-c-fosD B cells showed higher amount of AP-1 binding protein than the control B cells did. The AP-1 protein in the Mx-c-fosD B cells were induced faster and maintained in higher level than those in control B cells. These expression patterns of AP-1 proteins correlated with the proliferation patterns of the cells. The component of AP-1 protein was also analyzed in the Mx-c-fosD B cells by

Western blot analysis. The AP-1 protein in the Mx-c-fos D B cells was mainly composed of c-Fos protein (Fos/Jun heterodimer) whereas it was Jun protein (Jun/Jun homodimer) in the control B cells.

Discussion

The augmentation of cell proliferation in the Mx-c-fosD B cells stimulated with LPS is mainly due to their shorter duplication time. Since the level of AP-1 in those B cells correlated with the length of a cell cycle and the expression time inversely correlated with the time to enter S phase of cell cycle, the AP-1 may accelerate cell cycle progression of those B cells. Therefore, AP-1 is a major regulatory factor for cell cycle progression of B cells stimulated with LPS.

Major part of AP-1 molecule induced in the Mx-c-fosD B cells was composed of a c-Fos/Jun heterodimer. That was difference from the control B cells which was mainly Jun homodimer. The different composition of AP-1 protein in those B cells may also effect on the deregulation of cell cycle progression and contribute to the augmentation of cell proliferation of the Mx-c-fosD B cells.

Summary

In the Mx-c-fosD splenic B cells stimulated with LPS, the level of DNA synthesis was augmented in proportion to the amount of AP-1. The augmentation is explained by acceleration of cell cycle progression leading to the shorter duplication time. These results suggest that AP-1 is a major regulatory factor for cell cycle progression of B cells activated with LPS.

論文審査の結果の要旨

c-Fosがん遺伝子は、c-Junがん遺伝子とヘテロダイマーを形成することにより、転写因子AP-1として他の遺伝子の発現をコントロールすることが明らかにされている。このc-Fosはリンパ球が抗原刺激を受けて細胞増殖を開始する時にも、一過性にその発現が誘導される。しかし、そのリンパ球増殖反応における機能についてはいまだ不明である。

本研究では、c-Fosのリンパ球増殖反応における機能を解明する目的で、c-Fosを過剰発現するトランスジェニックマウス由来のBリンパ球をリポポリサッカライド (LPS) で刺激した後の増殖反応をコントロールマウス由来のBリンパ球のそれと比較検討したものである。

方法は、c-Fosトランスジェニックマウス脾臓由来のBリンパ球をLPSで刺激した後のDNA合成能をチミジンの取り込みで解析したり、細胞周期の変化をフローサイトメーターを用いて解析した。また、LPS刺激後のBリンパ球核内のAP-1活性をゲルシフト法により解析した。

その結果、c-Fosマウス由来のBリンパ球のDNA合成能は正常マウスのBリンパ球と比べて著しく増強されていた。またLPS刺激後の生細胞数にも著しい増加が見られたことから、c-Fosマウス由来のBリンパ球のDNA合成能の増強は、そのまま細胞分裂を経て細胞数の増加となっていることが明らかにされた。また、その細胞増殖増強の程度は、Bリンパ球が産生するc-fos mRNA量と比例して

いたことから、過剰のc-FosがBリンパ球のLPS刺激に対する増殖反応を増強していると考えられた。

この増強の原因として以下の二つの可能性が考えられた。

一つは脾臓由来の正常Bリンパ球の約1/3しかLPSに反応しないので、LPSと反応するBリンパ球の数がc-Fosトランスジェニックマウスでは、コントロールマウスよりも多いことが示唆された。そこで、限界希釈法を用いてLPSと反応するBリンパ球の数を調べたところ、両者には差が見られなかった。次に、第二の可能性として、一つのBリンパ球の細胞周期が短くなるためにその増殖反応が増強することが示唆された。そこで、細胞周期の解析をしたところ、c-FosBリンパ球では、1個のBリンパ球が細胞分裂に要する時間がコントロールマウスのBリンパ球と比較して細胞周期のG1期において短縮していることが明らかになった。これらの結果から過剰のc-Fosは、Bリンパ球の細胞周期を加速することにより、その細胞増殖反応増強効果を示していると考えられた。

次に、c-FosBリンパ球に見られる過剰のc-FosがLPSで刺激されたBリンパ球中においてAP-1として機能しているかどうかをゲルシフト法により調べた。その結果、c-FosBリンパ球のAP-1活性は正常Bリンパ球のそれよりも著しく増加していた。これらの結果から、過剰のc-FosはBリンパ球内でAP-1を形成し、LPS刺激によるBリンパ球の増殖反応を増強することが明らかにされた。このことから正常Bリンパ球をLPSで刺激した時に誘導されるAP-1の機能は、細胞増殖に対して正の機能を示すことが示唆された。

以上の結果から、本研究は、転写因子AP-1の構成成分であるc-Fosを過剰発現するトランスジェニックマウス由来のBリンパ球を用いることにより、LPS刺激時に誘導されてくるAP-1の機能を解析した研究であるが、その増加は、Bリンパ球の細胞増殖反応を細胞周期のG1期のレベルで短縮することにより、増強することを明らかにしたものであり、c-Fosの細胞増殖反応における機能の一部を明らかにした価値のある集積と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。