



Title	Nitric oxide mediates interleukin-1-induced prostaglandin E2 production by vascular smooth muscle cells
Author(s)	井上, 卓夫
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38724">https://hdl.handle.net/11094/38724</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 href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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	井上卓夫
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 11100 号
学位授与年月日	平成 6 年 2 月 25 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	Nitric oxide mediates interleukin-1-induced prostaglandin E <sub>2</sub> production by vascular smooth muscle cells (血管平滑筋細胞におけるインターロイキン-1による一酸化窒素を介したプロスタグランジン E <sub>2</sub> 産生機構)
論文審査委員	(主査) 教授 荻原 俊男 (副査) 教授 祖父江憲治 教授 谷口 直之

### 論文内容の要旨

#### [目的]

一酸化窒素 (NO) は最近、血管系、免疫系、神経系などにおいて多様な作用を持つ強力な生理活性物質であることが明らかにされつつある。例えば血管系においては、内皮依存性血管拡張因子の本体の一つが NO であることが明らかにされた。すなわち、内皮細胞より産生された NO は血管平滑筋細胞 (VSMC) に働いて soluble guanylate cyclase の heme に結合してこの酵素を活性化し、cyclic GMP を上昇させて平滑筋を弛緩させる。ところで、最近 VSMC においてもインターロイキン-1 (IL-1) などの cytokine や lipopolysaccharide の刺激により持続的で大量の NO 産生がもたされることが報告された。しかし、この VSMC において産生される NO のもつ病態生理学的意義については十分明らかにされていない。そこで本研究では、VSMC における内因性 NO の役割を明らかにするため、IL-1 により産生された NO が、heme をもつ酵素の一つである cyclooxygenase を活性化しプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の産生を増強する可能性につき検討した。

#### [方法]

VSMC は Wistar rat 胸部大動脈中膜より explant 法によって単離培養した。培養は 10% ウシ胎仔血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いて 37°C 5% CO<sub>2</sub> 気相下にて行い、confluent に達した細胞は trypsin-EDTA を用いて継代し、3-8 継代の細胞を実験に供した。実験では、confluent に達した細胞を 0.1% BSA を含む血清不含 DMEM を用いて 48 時間培養し、培養液を新たな血清不含 DMEM に交換した後各種刺激を加え、各実験に示した時間培養し培養液を採取した。採取した培養液は、500 x g にて遠心し、NO 産生の指標として培養上清中の nitrite 濃度を Griess 液を用いて測定した。PGE<sub>2</sub> は培養上清中の濃度を enzyme immunoassay 法により測定した。

#### [成績]

1) IL-1 (10 ng/ml) は VSMC において持続性の NO 産生とともに PGE<sub>2</sub> の産生を増強した。IL-1 によると NO と PGE<sub>2</sub> 産生の time course はほぼ同様に、刺激後 24 時間および 48 時間において時間依存性に有意な上昇を認めた。

- 2) NO 合成酵素阻害剤である N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, 3 mM) を IL-1 とともに同時添加すると NO 産生とともに PGE<sub>2</sub> 産生も有意に抑制された。しかしながら PGE<sub>2</sub> 産生の抑制は部分的であった。また、この L-NMMA の抑制作用は、NO の基質である L-arginine を L-NMMA の10倍量同時添加することにより有意に reverse された。
- 3) これに対し、Indomethacin (1 mM) は PGE<sub>2</sub> の産生を完全に抑制したが、NO の産生には影響をおよぼさなかった。
- 4) superoxide radical の生成を抑制して NO の半減期を延長する superoxide dismutase (SOD, 100u/ml) を IL-1 とともに同時添加すると、IL-1 による PGE<sub>2</sub> 産生は有意に増強された。
- 5) NO を直接産生する sodium nitroprusside (SNP, 0.2 mM) は単独で VSMC による PGE<sub>2</sub> 産生を刺激した。しかし、SNP による PGE<sub>2</sub> の産生量は、SNP が IL-1 とほぼ同等の NO を産生したにもかかわらず、IL-1 による PGE<sub>2</sub> 産生量に比して少量であった。
- 6) cyclic GMP の誘導体である 8-bromo-cyclic GMP (8Br-cGMP) は PGE<sub>2</sub> 産生を増強しなかった。

[総括]

- 1) NO 合成酵素阻害剤により NO 産生を完全に抑制すると PGE<sub>2</sub> の産生も有意に抑制されたが、その抑制が部分的であったことにより、IL-1 による PGE<sub>2</sub> 産生には NO 依存性と NO 非依存性の2つの機構が存在することが示された。
- 2) NO は guanylate cyclase を活性化して cyclic GMP を上昇させるが、8Br-cGMP は PGE<sub>2</sub> の産生を刺激せず、SNP は単独で PGE<sub>2</sub> 産生を刺激したことにより、NO 依存性の PGE<sub>2</sub> 産生機構には cyclic GMP を介さず、NO が直接 cyclooxygenase の heme に結合してこの酵素を活性化すること示唆された。
- 3) 以上より、VSMC において産生される NO は guanylate cyclase 以外にプロスタグランデインの産生に関与する cyclooxygenase をも標的とし、この酵素を活性化する細胞内シグナルとしての役割を有することが明らかにされた。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は血管平滑筋細胞における内因性一酸化窒素の役割を明らかにするため、インターロイキン-1により産生された一酸化窒素が、ヘムをもつ酵素の一つであるサイクロオキシゲナーゼを活性化しプロスタグランدين E<sub>2</sub> の産生を増強する可能性につき検討したものである。一酸化窒素は最近、血管系、免疫系、神経系などにおいて多様な作用を持つ強力な生理活性物質であることが明らかにされつつある。例えば血管系においては、内皮依存性血管拡張因子の本体の一つが一酸化窒素であることが明らかにされた。すなわち、内皮細胞より産生された NO は血管平滑筋細胞に働いて soluble guanylate cyclase のヘムに結合してこの酵素を活性化し、cyclic GMP を上昇させて平滑筋を弛緩させる。ところで、最近血管平滑筋細胞においてもインターロイキン-1などのサイトカインや lipopolysaccharide の刺激により持続的で大量の一酸化窒素産生がもたらされることが報告された。本研究は培養血管平滑筋細胞を用いて、インターロイキン-1により一酸化窒素およびプロスタグランدين E<sub>2</sub> の産生が刺激され、一酸化窒素の産生を抑制するとプロスタグランدين E<sub>2</sub> の産生も有意に抑制されたことにより、インターロイキン-1によるプロスタグランدين E<sub>2</sub> の産生には一酸化窒素依存性と非依存性の機構が存在することを示した。また、この一酸化窒素依存性の機構は、cyclic GMP を介さず、一酸化窒素が直接サイクロオキシゲナーゼのヘムに結合してこの酵素を活性化することを示した。以上の如く本研究は平滑筋細胞における内因性一酸化窒素の新たな作用を明らかにしたものである。したがって本研究は学位に値するものと認める。