The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the central nervous system of mice correlates with the severity of actively induced experimental allergic encephalomyelitis
Author(s)	奥田, 佳延
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40008
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

【79】

氏　　名	奥（おく）田（だ）佳（よし）延（のぶ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　13045　号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the central nervous system of mice correlates with the severity of actively induced experimental allergic encephalomyelitis （実験的自己免疫性脳脊髄炎の推移における誘導型一酸化窒素合成酵素の発現と意義）
論文審査委員	（主査） 教　授　柳原　武彦 （副査） 教　授　平野　俊夫　　教　授　宮坂　昌之

論文内容の要旨

【目的】

実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）は中枢神経系（CNS）のミエリン構成成分であるmyelin basic protein（MBP），proteolipid protein（PLP）やmyelin oligodendrocyte glycoprotein（MOG）を免疫することで誘発可能な脱髄性脳脊髄炎であり，多発性硬化症（MS）の動物モデルと考えられている。近年，サイトカインなどの刺激で誘導される誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）によって産生される一酸化窒素（NO）が炎症や免疫反応に関与することが知られるようになり，EAEの発症過程においてもNOが関与していることが報告されるようになった。しかし，EAEにおいて過剰のNOがどこで，どの時期に，どの細胞によって，どのように生じるのか，そしてどのような作用を及ぼすのかなど明らかでない点が多かった。本研究では生化学的方法と組織学的方法を用いたiNOSの発現，ニトロ化された蛋白の同定によるNOの存在，NO合成酵素（NOS）阻害剤がEAEに及ぼす影響，などを総合的に検討しこれらの点を明らかにした。

【方法】

（SJL × PLJ）F1マウスをMBPとFreund完全アジュバントで感作し，EAEを誘導した。脊髄を病前期，病初期，病極期，回復期，慢性期の5つの段階にわけて取り出し，RNAを抽出し，iNOS，iNOS誘導性サイトカイン，およびiNOS抑制性サイトカインの半定量的reverse－transcriptase－polymerase chain reaction（RT／PCR）を行い，各病期のmRNAレベルを比較した。組織学的検索として，各病期の脊髄をパラホルムアルデヒドで固定し，ニトロチロシン抗体，iNOS抗体，GFAP抗体，Mac－1抗体，CD－5抗体を用いた免疫組織化学，およびアポトーシスによる細胞死を同定するためのin situ terminal deoxynucleotidyl transferase－mediated dUTP nick end labeling（TUNEL）法を行った。またiNOS阻害剤であるアミノグアニジンを腹腔内投与しEAEの発症からその症状の推移を50日間観察した。

【成績】

iNOS，およびiNOS誘導性サイトカイン（IFN－γ，TNF－α，TNF－β，IL1－β）のmRNAレベルはいずれも病初期～極期にかけて明らかな上昇を認めた。これに比し，iNOS抑制性サイトカイン（TGF－β，IL－4，IL－10）のmRNAレベルは各病期を通じてあまり変化しなかった。これらのことから，発症期のEAEマウスの脊髄は主に浸潤リンパ球の産生するサイトカインによってiNOSが誘導されやすい環境にあると考えられた。また免疫

組織学的検討によって，iNOSは主に病極期の病変部のマクロファージに発現していること，ニトロチロシンは主に病変部の浸潤細胞とグリア細胞に認められ，iNOSの発現と関係があること，TUNEL陽性細胞は主に病極期～回復期の浸潤細胞であり，これもiNOSの局在と関係があることがわかった。これらの結果から，過剰のNOはEAEの発症期に病変局所で主に浸潤マクロファージのiNOSより生じていると考えられ，CNS組織のみならず，浸潤リンパ球やマクロファージに対しても障害作用を及ぼしていることが推察された。さらに，アミノグアニジンをEAE発症後に投与すると重症度が高くなり，再発時期も早まることがわかった。このことから，iNOSにより産生されたNOはEAEの寛解因子の作用を有することが示唆された。

【総括】

NOはラジカル種であり，免疫系細胞を含め様々な細胞に対して障害性を持つことが知られている。本研究は，EAEの発症期にiNOSから生じる過剰なNOが存在することを証明し，そのNOが病変部の炎症細胞自身を障害しその除去作用に働く可能性を示唆した。EAEの自然寛解のメカニズムは未だ不明であるが，本研究の結果を総合的に判断すると，iNOSによるNOは炎症細胞の死を誘導することによってEAEの寛解因子として働いていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

多発性硬化症（MS）のモデルである実験的自己免疫性脳炎（EAE）については，多くの研究がなされているが，その症状が自然寛解するメカニズムについては未だ明らかでない。一方，一酸化窒素（NO）は炎症や免疫反応に関与することが知られているが，EAEにおけるNOの関与については不明な点が多い。本研究は，EAEの病変部において主にマクロファージ由来の誘導型NO合成酵素から生じる過剰のNOが存在することを証明し，このNOが組織学的にみて炎症細胞の細胞死と関連していることを見い出した。このことはNOが浸潤炎症細胞の除去に働く可能性を示唆した。実際，NO合成酵素の阻害剤によってEAEの経過は有意に悪化した。これらの結果はNOがEAEの回復過程の一要素であることを示唆し，EAEの寛解のメカニズムを探る上で有意義な知見であると思われる。

本研究はEAEの寛解因子としていままで注目されていなかったNOの役割を示したという点で意義があり，今後のMSの病態解明にも寄与すると考えられ，学位に値すると考えられる。