The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	炎症における核内レセプターのニトロ化とその核内移行抑制
Author(s)	渋谷, 敦人
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44007
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

【35】

氏　　名	渋　谷　敦　人（しぶや　あつひと）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　１７７５３　号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学　位　論　文　名	**炎症における核内レセプターのニトロ化とその核内移行抑制**
論文審査委員	（主査） 教　授　丹羽　　均 （副査） 教　授　上﨑　善規　　助教授　西村　理行　　助教授　岡橋　暢夫

論文内容の要旨

（目的）

核内受容体は各々のリガンドと結合し、核内へ移行後、転写制御因子として働き、抗炎症作用、免疫抑制作用等の様々な作用を示すことが知られている。一方、炎症時にはマクロファージから産生されるパーオキシナイトライトにより、タンパク質のチロシン残基がニトロ化されることが報告されている。しかしながら、ニトロ化の標的となるタンパク質の種類、さらにはニトロ化によってそれらのタンパク質の機能がどのように変化するかなど不明な点が多い。一方、この核内受容体に属する Peroxisome proliferator-activated receptor γ（PPAR γ）と Glucocorticoid 受容体及び Estrogen 受容体はその構造内に多数のチロシン残基をもつことより、ニトロ化の標的になる可能性が考えられる。そこで、マウス腹腔内マクロファージ由来の RAW264 細胞を用い、これら核内受容体タンパク質のニトロ化と、それによる核内移行性の変化について検討した。さらに動物モデルを用いて、虚血-再灌流傷害における核内レセプターのニトロ化が、in vivo でもおこりうるのかどうかについても検討した。

（方法）

1．細胞処置

マウス腹腔内マクロファージ由来培養細胞 RAW264 を、Lipopolysaccharide（LPS）と Tumor necrosis factor-α（TNF-α）、あるいはパーオキシナイトライトで処置した後、PPAR γ、Glucocorticoid 受容体、Estrogen 受容体のそれぞれのリガンドであるロジグリタゾンやデキサメタゾンあるいはエストラジオールを投与した。

2．細胞生存率

LPS と TNF-α刺激あるいはパーオキシナイトライト処置での細胞生存率を、MTT 法及びトリパンブルー染色により測定した。

3．ウェスタンブロッティング

RAW264 を上記の様に処置した後、抗受容体抗体で免疫沈降行を行った。そのサンプルを抗ニトロチロシン抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法でニトロ化の有無について検討した。

また、核内への移行性の変化を検討するために、同様に処置後、細胞質分画と核分画を分離調製し、それぞれの抗受容体抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

4．共焦点レーザー顕微鏡

RAW264を同様に処置した後、一次抗体として抗受容体抗体を、二次抗体としてAlexa Fluorラベル抗体を用い、それぞれの受容体の存在を緑色光で検出した。さらに核を赤色に染色し、核内移行性の変化を検討した。

5．動物処置

C57BL6雄性のマウスを全身麻酔下に、上腸間膜動脈をクリッピングすることにより虚血状態とした30分後、クリップを除去して再灌流した。その60分後、腸管及び肺を取り出し、凍結粉砕した後、可溶化してサンプルを調製した。抗受容体抗体で免疫沈降した後、ウェスタンブロッティングにてそのニトロ化の有無を検討した。

（結果）

1．炎症条件下における細胞生存率

MTT法及びトリパンブルー染色を用いた解析により、パーオキシナイトライトあるいはLPSとTNF-αなどの炎症性刺激下でも、細胞生存率は減少しなかった。

2．炎症条件下における核内レセプターのニトロ化

免疫沈降サンプルを用いたウェスタンプロッティング法により、三種類の核内受容体は、炎症性刺激によりニトロ化を受けることを確認した。

3．受容体の核内への移行性の変化

PPARγやGlucocorticoid受容体は炎症性条件下において、ニトロ化によりリガンド依存性の核内移行が抑制された。一方、Estrogen受容体はリガンド処置の有無にかかわらず常に核内に存在したため、ニトロ化による局在性に変化は認められなかった。

4．動物モデルを用いたin vivoでの核内受容体のニトロ化

虚血－再灌流処置したマウスから採取した腸管では、PPARγ及びEstrogen受容体が強くニトロ化を受けたが、Glucocorticoid受容体はほとんどニトロ化を受けなかった。また、遠隔臓器である肺においても同様の結果を得た。

（考察）

核内受容体のうちPPARγ、Glucocorticoid受容体及びEstrogen受容体が、炎症性刺激によりin vitroでニトロ化を受けた。またPPARγ及びGlucocorticoid受容体は、ニトロ化によってリガンド結合後の核内移行が抑制された。さらにin vivoにおいても、虚血・再灌流マウスの腸管及び肺においてPPARγ及びEstrogen受容体がニトロ化を受けることを確認した。これらの結果から、慢性炎症時などニトロ化が促進している状態では、PPARγやGlucocorticoid受容体がニトロ化を受けることにより、それらの抗炎症作用が抑制され、炎症が増悪する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、炎症性刺激などによる核内受容体のニトロ化とその機能変化との関係について明らかにすることを目的とした。

マクロファージ様培養細胞は、炎症性刺激によりその核内受容体がニトロ化を受け、その結果として受容体の核内への移行が抑制され、虚血・再灌流傷害を与えたマウスの生体内でも、受容体のニトロ化が起こっていることを確認した。

この研究は、炎症時や虚血・再灌流傷害時のニトロ化と核内受容体の機能変化を考察する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。