

Title	マクロファージにおける一酸化窒素による細胞死制御機構に関する薬理学的研究
Author(s)	吉岡, 靖啓
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47240
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	吉 岡 靖 啓
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 20639 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 8 月 2 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	マクロファージにおける一酸化窒素による細胞死制御機構に関する薬理学的研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 田 敏 夫 (副査) 教 授 馬 場 明 道 教 授 東 純 一 教 授 土 井 健 史

論 文 内 容 の 要 旨

マクロファージは、サイトカイン等の刺激により活性化され、貪食作用や抗原の提示、炎症性サイトカインの産生など生体の感染防御に重要な役割を担っている。炎症反応の収束に伴い、炎症部位へ集積したマクロファージは細胞死やリンパ節への移動により減少するが、マクロファージの活性化が持続すると、種々の炎症性疾患を引き起こされることが知られている。これらのことから、マクロファージの細胞死の制御は、炎症性疾患の治療の標的となる可能性が示唆されているが、その細胞死制御機構の詳細は不明である。生体内で産生される一酸化窒素 (NO) や過酸化水素 (H_2O_2) などの活性酸素種は、細胞傷害作用を有しており、種々の細胞に細胞死を誘導することが知られているが、低濃度の NO が細胞保護作用を持つことも報告されており、細胞死に対する NO の 2 面性が注目されている。炎症部位では、活性酸素種が多量に産生されており、また、マクロファージ自身も NO や H_2O_2 などの活性酸素種を産生する。従って、炎症部位へ集積するマクロファージは、活性酸素種に暴露され細胞傷害を引き起こすが、NO の 2 相性の作用はマクロファージ防御機構の一端を担っていることが考えられる。本研究は、マクロファージの自己防御機構における NO の役割を明らかにする目的で、lipopolysaccharide (LPS) 刺激あるいは NO や H_2O_2 などの活性酸素によるマウスマクロファージ様細胞 RAW264 の細胞死に対する NO の作用について検討した。

RAW264 細胞において、LPS の 24 時間処置は、濃度依存的に細胞死を誘導した。また、LPS による細胞死は、NO 合成酵素阻害薬の NG-nitro-L-arginine methylester により有意に抑制された。これらの結果から、マクロファージにおいて、LPS は NO 産生を介して細胞死を引き起こすことが示唆された。RAW264 細胞における LPS による細胞死は、NO 放出薬である sodium nitroprusside (SNP) を低濃度 (30-300 μ M) で 24 時間前処置することにより、濃度依存的に抑制された。このことから、低濃度 NO は LPS により産生される活性酸素種による細胞死からマクロファージを保護する可能性が考えられた。

低濃度 NO によるマクロファージの細胞死保護作用のメカニズムをさらに詳細に検討する目的で、NO 誘発細胞死に対する低濃度 NO 前処置の影響を検討した。RAW264 細胞において、4 mM SNP 処置により経時的に細胞死が誘発された。4 mM SNP 処置 24 時間後にみられる細胞死は、30-300 μ M SNP を 24 時間前処置することにより有意に抑制された。NO の持つ生理作用の多くが、グアニル酸シクラーゼの活性化による cyclic GMP (cGMP) の産生とそれに引き続くプロテインキナーゼ G (PKG) の活性化を介して制御されている。RAW264 細胞において、グアニル酸シクラーゼ阻害薬の LY83583 および ODQ は、100 μ M SNP 前処置による SNP 誘発細胞死抑制作用を阻害した。また、細胞膜透過性の cGMP アナログである dibutyryl cGMP (DBcGMP) の前処置は SNP 誘発細胞死を抑制した。

さらに、100 μ M SNP および DBcGMP 前処置による SNP 誘発細胞死抑制作用は、PKG 阻害薬の KT5823 により阻害された。また、4 mM SNP 処置後のアポトーシスを起こした細胞の増加は、100 μ M SNP および DBcGMP 前処置により抑制された。これらの結果から、低濃度 NO は cGMP/PKG 系を介して NO 誘発アポトーシスを抑制していることが示唆された。Bcl-2 family 蛋白質は、ミトコンドリアからのシトクロム *c* の放出を調節し、アポトーシスの調節因子として働くことが知られている。Bcl-2 family タンパク質のアポトーシス促進因子である Bax は、通常、細胞質に存在しており、アポトーシス誘導刺激によりミトコンドリアへと移行し、ミトコンドリアからのシトクロム *c* の放出を惹起する。RAW264 細胞において、4 mM SNP 処置により Bax のミトコンドリアへの移行がみられ、シトクロム *c* の放出がみられた。4 mM SNP によるシトクロム *c* の放出および Bax のミトコンドリアへの移行は、100 μ M SNP および DBcGMP の前処置により抑制された。これらの結果から、低濃度 NO は、cGMP 系を介して、Bax のミトコンドリアへの移行を抑制することによりシトクロム *c* の放出を抑制し、NO 誘発アポトーシスを抑制することが示唆された。

次に、H₂O₂ 誘発細胞死に対する低濃度 NO 前処置の影響を検討した。RAW264 細胞において、1 mM H₂O₂ 処置により経時的に細胞死が誘発された。1 mM H₂O₂ により誘発される細胞死は、SNP および自発的 NO 放出薬である 1-hydroxy-2-oxo-3,3-bis-(2-aminoethyl)-1-triazene (NOC18) を 24 時間前処置することにより、濃度依存的に抑制された。また、H₂O₂ 処置後のアポトーシスを起こした細胞の増加は、100 μ M SNP および 100 μ M NOC18 の前処置により抑制された。このことから、低濃度 NO の前処置は H₂O₂ 誘発アポトーシスを抑制することが明らかになった。細胞における H₂O₂ の代謝は、主にグルタチオンレドックスサイクルおよびカタラーゼにより担われていることが知られている。RAW264 細胞において、グルタチオン合成阻害薬 DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine は H₂O₂ 誘発細胞死を促進したが、SNP や NOC18 前処置による H₂O₂ 細胞死抑制作用には影響を与えなかった。一方、カタラーゼ阻害薬 3-amino-1,2,4-triazole は、H₂O₂ 誘発細胞死を促進し、SNP や NOC18 前処置による H₂O₂ 細胞死抑制作用をほぼ完全に消失させた。SNP および NOC18 は濃度依存的にカタラーゼ活性を上昇させ、カタラーゼの発現量を増加させた。また、DBcGMP は、カタラーゼの発現量および H₂O₂ 誘発細胞死にほとんど影響を与えなかった。これらの結果から、低濃度 NO は、cGMP 系非依存的にカタラーゼを発現誘導し、H₂O₂ 誘発アポトーシスを抑制することが示唆された。

以上、本研究により、マクロファージにおいて、LPS 刺激あるいは高濃度 NO や H₂O₂ などの酸化ストレスによる細胞死が低濃度 NO 前処置により保護されること、低濃度 NO による細胞死保護作用には cGMP 依存性、非依存性の 2 つの異なる経路が存在していることが明らかになった。これらの成果は、炎症時などにおけるマクロファージ障害保護の機構解明に貢献するもので、細胞死制御機構を標的とした炎症性疾患治療薬の開発に貢献することが期待される。

論文審査の結果の要旨

マクロファージは、サイトカイン等の刺激により活性化され、貪食作用や抗原の提示、炎症性サイトカインの産生などの生体の感染防御に重要な役割を担っている。マクロファージの活性化が持続すると、種々の炎症性疾患が引き起こされることが知られており、本細胞死は何らかの機構により制御されていることが考えられているが、その詳細は不明である。

本研究は、マクロファージ活性化時の自己防御システムの解明を目的とし、マウスマクロファージ様細胞 RAW264 細胞を用いて、酸化ストレスによる細胞障害に対する一酸化窒素 (NO) の保護作用のメカニズムを明らかにしている。すなわち、マクロファージ活性化による細胞障害が酸化ストレスに起因することを示し、そのメカニズムを高用量 NO あるいは過酸化水素暴露による細胞障害の系において検討し、細胞障害発現に p38/MAP キナーゼ系-Bax 蛋白質が関与していること、低用量 NO の保護作用の機構に cGMP/PKG シグナルやカタラーゼ誘導が関わっていることを示している。これらの研究成果は、マクロファージの活性酸素種による細胞障害に対する自己防御機構の存在を明らかにし、また細胞死制御の薬理的標的分子を提示した研究であり、博士 (薬学) の学位を授与するに値するものである。