



Parallel Induction of Nitric Oxide and Tetrahydrobiopterin Synthesis by cytokines in Rat Glial Cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 酒井, 直樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1505

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 228号	学位授与年月日	平成 8年 1月 9日
氏名	酒井直樹		
論文題目	Parallel Induction of Nitric Oxide and Tetrahydrobiopterin Synthesis by Cytokines in Rat Glial Cells (サイトカインによるラットグリア細胞の一酸化窒素合成とテトラヒドロビオプテリン合成の誘導の類似性)		

博士(医学) 酒井直樹

論文題目

Parallel Induction of Nitric Oxide and Tetrahydrobiopterin Synthesis by Cytokines in Rat Glial Cells

(サイトカインによるラットグリア細胞の一酸化窒素合成とテトラヒドロビオプテリン合成の誘導の類似性)

論文の内容の要旨

〈目的〉

中枢神経系の炎症性疾患では一酸化窒素 (nitric oxide, NO) 産生の関与が示唆されている。本研究では中枢神経系のどの細胞において、どの様な機序により NO 産生が行われているのかを検討する目的で、ミクログリアとアストロサイトの NO 産生能及び NO 産生に重要な補因子であるテトラヒドロビオプテリン (tetrahydrobiopterin, BH₄) の誘導を種々のサイトカイン刺激により検討した。

また、ミクログリアは他のマクロファージ系細胞と類似している一方、免疫学的表現型や働きなどの相違も指摘されている。今回ミクログリアと腹腔内マクロファージにおいて NO および BH₄ 産生の反応が類似の機序で行われているか比較検討した。

〈方法〉

Sprague-Dawley 系ラットの生後 2～3 日の新生児大脳皮質からミクログリアとアストロサイトを分離培養した。腹腔内マクロファージは同系ラットの雄にチオグリコール酸塩腹腔内投与により得た。

ミクログリア、アストロサイトおよび腹腔内マクロファージを種々の濃度の interferon- γ (IFN- γ)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-2 (IL-2)、lipopolysaccharide (LPS) 単独あるいは 2 者を併用した培養液で 24 時間培養した後、培養液中亜硝酸塩 (nitrite, NO₂) と細胞内 BH₄ を測定した。またミクログリアを IFN- γ と LPS の併用にて刺激する際、BH₄ 合成阻害剤あるいは外因性 BH₄ 供給剤を含む培養液を用い 24 時間培養した後の NO₂ と BH₄ を測定した。

NO 産生は培養液中の NO 代謝物である NO₂ をグリース反応により測定し、細胞内 BH₄ は逆相高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

〈結果〉

- ① ミクログリアの NO、BH₄ 産生は LPS により誘導されるが、IFN- γ 、TNF- α 単独では誘導されず、低濃度 LPS と IFN- γ 、IFN- γ と TNF- α の併用は相乗的効果を示した。また NO、BH₄ 両者はほぼ並行して誘導され、NO 産生を認めるときは必ず BH₄ も誘導されていた。
- ② ミクログリアにおいて IL-2 単独では NO 産生は認めなかった BH₄ はわずかに誘導された。IL-2 と IFN- γ との併用で NO、BH₄ の産生が相乗的に増加した。
- ③ BH₄ 合成阻害剤はミクログリアでの LPS と IFN- γ の併用による細胞内 BH₄ 産生を 95% 以上抑制し、NO 産生も 56% まで低下させた。この NO 産生抑制は、外因性 BH₄ 供給剤投与により細胞内 BH₄ レベルを上昇させることで消失した。
- ④ アストロサイトにおける NO、BH₄ 誘導はミクログリアとほぼ同様に誘導されたが、NO 誘導に対

しより高濃度の LPS を必要とし、低値にとどまる傾向にあった。

- ⑤ 腹腔内マクロファージもミクログリアとほぼ同様の NO、BH₄の産生を示したが、IFN- γ 単独により誘導されたこと、IFN- γ と TNF- α の併用による相乗効果は LPS 及び LPS と IFN- γ の併用と同程度であったことが相違点として認められた。

〈考察および結論〉

脳内ミクログリアとアストロサイトは共に NO 産生およびその補因子 BH₄誘導を行うことが明らかになった。ミクログリアはアストロサイトに比しより低濃度の LPS で NO 産生を行った。このことから中枢神経系の炎症性疾患での脳内 NO 産生にミクログリアとアストロサイトの両者の関与がありうること、中でもミクログリアがより重要な役割を果たしている可能性があることを示した。

ミクログリアとアストロサイトの NO および BH₄産生は多くの条件でほぼ並行して動き、NO 産生が認められるときは必ず BH₄も誘導された。また BH₄産生を抑制すると NO 産生も低下することから BH₄生合成系の抑制は中枢神経系の炎症性疾患の治療的なターゲットに成りうるかもしれない。

ミクログリアの NO、BH₄産生は腹腔内マクロファージにおけるものと類似していたがある種のサイトカインに対する反応性には差があり、同系ラットのマクロファージ系細胞でありながら、異なる機序で調節されている可能性があることが示された。

論文審査の結果の要旨

アルギニンからの一酸化窒素 (NO) の生成を触媒する NO 合成酵素 (NOS) が補因子としてテトラヒドロbiopterin (BH₄) を必要とすることが知られている。また、いくつかの中枢神経系の炎症性疾患においてネオプテリンと NO の合成が共に上昇しているという観察がある。ネオプテリンの生成増加は BH₄生合成の初発反応を触媒する GTP シクロヒドロラーゼの誘導の結果であり、マクロファージ活性化および BH₄生合成の指標とされている。マクロファージやグリア細胞には各種サイトカインによる誘導を受ける誘導型 NOS が装備されており、且つ中枢神経系疾患の脳で種々のサイトカインの増加が観察されている。中枢神経系の炎症性疾患への NO の関与が注目される所以である。

申請者は、中枢神経系でサイトカインやリポポリサッカライド (LPS) に呼応して NO を生産する細胞の同定およびこれらの刺激による NO 生成と BH₄生成の誘導の比較を目的として本研究を行った。実験で使用された細胞は、生後 2-3 日のラットの大脳皮質から得たミクログリア、アストロサイト、および比較のためのラット腹腔内マクロファージである。これらの細胞を種々の濃度のインターフェロン γ (IFN- γ)、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターロイキン 2 (IL-2)、LPS の単独あるいは二者存在下で 24 時間培養した後、NO 合成の指標としての培養液中の亜硝酸塩 (NO₂⁻) と BH₄合成の指標としての細胞内 BH₄レベルの測定を行った。更に BH₄合成阻害剤あるいは BH₄の前駆体を添加することにより NO 合成における BH₄合成誘導の役割の査定を行った。その結果、ミクログリアとアストロサイトにおける NO 合成はマクロファージと同様に LPS の単独投与、IFN- γ と TNF- α の複合投与により顕著な誘導を受けること、およびこれら細胞における NO 合成誘導パターンは BH₄合成のそれと酷似していることが明らかになった。ミクログリアでは IFN- γ と IL-2 の複合投与によっても NO および BH₄合成の誘導が見られた。IFN- γ は単独での作用は微弱であるが、LPS、TNF- α 、IL-2 と組み合わせると顕著な相乗効果を顕した。また BH₄合成を抑制すると NO 産生も低下した。ミクログリアやアストロサイトでは BH₄の基底レベルが低いので、同一刺激による NOS と BH₄合成の両者の誘導は NO 合成促進にとって好都合と理解された。申請者は以上の実験結果に基づ

いて、中枢神経系の炎症性疾患での脳内 NO 産生にミクログリアやアストロサイトが関与しているのではないかと考えた。論文審査委員会では、以上の内容の本論文はミクログリアやアストロサイトで LPS 等による NO 合成の誘導が起こることおよび NO 合成と BH₄ 合成の誘導の対応を明らかにした点で有意義であり、関連研究分野の知見の蓄積に寄与すると評価された。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

- 1) NO による細胞傷害の機構、NO の半減期、NO からのヒドロキシラジカル生成の有無・機構
- 2) NO から生産されるペルオキシ亜硝酸塩の生物活性
- 3) 腹腔内マクロファージを得る時、予めラットにチオグリコール酸を投与した理由
- 4) ミクログリア、アストロサイトの純化過程でのニューロンの行方
- 5) LPS 等による NO 蓄積と BH₄ 蓄積のタイムコース、LPS 投与からショックに至る時間経過と NO 蓄積のタイムコースの関連
- 6) BH₄ は誘導された NOS の活性の補因子としての役割以外に NOS の誘導そのものにも必要か
- 7) BH₄ 供給のため BH₄ そのものではなく BH₄ の前駆体を添加した理由、もし BH₄ そのものは有害とすればその機構
- 8) BH₄ 代謝回転について
- 9) LPS や IFN- γ と TNF- α あるいは IL-2 の組み合わせによる GTP シクロヒドロラーゼ誘導の生物学的意義
- 10) LPS を作用させたグリア細胞あるいはマクロファージにおける TNF- α 発現の有無

これらの質問に対する申請者の答えは適切であり、問題点をよく把握していることを示した。以上より、本論文は博士（医学）の学位授与に値する内容を備えていると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	市山	新			
	副査	教授	筒井	祥博	副査	教授	中原 大一郎
	副査	助教授	梅村	和夫	副査	助教授	菱田 明