



Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in L6 rat skeletal muscle cells

奥田, 志保

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1809

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001809>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	奥 田 志 保 （大阪府）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第1156号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成10年3月31日
学位論文題目	Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in L6 rat skeletal muscle cells （培養骨格筋細胞におけるサイトカイン誘導型 nitric oxide 合成酵素の調節機構）
審査委員	主査 教授 千 原 和 夫 教授 玉 木 紀 彦 教授 岡 村 均

論文内容の要旨

I. 緒 言；

炎症性サイトカイン刺激によって産生されるnitric oxide (NO) は、いくつかの細胞において細胞障害性に働くことが明らかにされている。骨格筋細胞においては、これまでマウスC2C12培養骨格筋細胞をサイトカインで刺激するとNO産生が誘導されることが報告され、また筋炎組織中に誘導型NO合成酵素 (iNOS) の発現が亢進していたという報告もあることから、筋炎における筋障害とNOとの関連が注目されている。

NO産生の調節機構として、これまでに、チロシンキナーゼ、Aキナーゼ、Cキナーゼといったリン酸化酵素による細胞内情報伝達系の関与が示されているが、その調節のメカニズムは異なっており、骨格筋細胞におけるNO産生調節機構に関しては、全く不明であった。

我々は、培養骨格筋細胞の代表的な細胞株として最もよく用いられているL6細胞におけるNO産生調節機構をiNOSのmRNA及び蛋白レベルで解析した。

II. 方 法；

1) 細胞培養

ラットL6培養骨格筋芽細胞を10%胎牛血清でコンフルエントになるまで培養した。その後、培養液を2%に馬血清にかえ3日間培養し骨格筋を分化させた後、炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL) -1 β (50ng/ml), インターフェロン (IFN)- γ (100IU/ml) で刺激した。

2) NO産生量の解析

培養上清中の代謝産物であるnitrite産生量をNO産生量としてグリース法で測定した。

3) iNOS mRNAの解析 (ノザンブロット法)

AGPC法によって回収した総RNAを、ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルを用いて電気泳動した。RNAをニトロセルロース膜上へ移し、[P³²] でラベルした iNOS cDNA プローブによりランダムプライマー法でハイブリダイゼーションを行った。膜を十分洗浄した後、バイオイメージング

アナライザーによって、iNOS mRNA レベルを解析した。

4) iNOS 蛋白の解析 (ウェスタンブロット法)

細胞抽出液を SDS-PAGE した後、分離された蛋白をニトロセルロース膜上に移した。抗 iNOS モノクローナル抗体を一次抗体とし、また、ペルオキシダーゼでラベルしたヒツジ抗マウス IgG 抗体を二次抗体として用いた。ペルオキシダーゼでラベルした蛋白はジアミノベンジジンを基質として可視化された。

III. 結 果 ;

1) サイトカイン刺激による nitrite 産生と iNOS 発現の経時的变化

投与したサイトカインはいずれも単独では L6 細胞の nitrite 産生を誘導しなかったが、IL-1 β (50 ng/ml), IFN- γ (100 IU/ml) の併用投与後において、24 時間以内に nitrite が産生された。iNOS mRNA の発現は、同様のサイトカインで刺激後 3 時間以内に確認され、12 時間以後は減少した。iNOS 蛋白はサイトカイン刺激後 6 時間以内に発現し、24 時間まで増加したが、48 時間以後は減少した。

2) nitrite 産生及び iNOS 発現におけるチロシンキナーゼ阻害剤の影響

チロシンキナーゼ阻害剤であるハービマイシン A (1-1,000 nM) を前投与し 30 分後に IL-1 β (50 ng/ml), IFN- γ (100 IU/ml) の併用投与を行ったところ、nitrite の産生は容量依存性に抑制され、1,000 nM ハービマイシン A で nitrite の産生は完全に抑制された。更に 1,000 nM ハービマイシン A 前投与後に同様のサイトカイン刺激を行い、6 時間後の iNOS mRNA の発現、24 時間後の iNOS 蛋白の発現を調べたところ、iNOS mRNA および蛋白の発現も完全に抑制されていた。別の作用機序を持つチロシンキナーゼ阻害剤であるゲニスタイン (1-100 μ g/ml) の前投与でも nitrite の産生は容量依存性に抑制され、100 μ g/ml ゲニスタインで nitrite, iNOS mRNA, iNOS 蛋白の発現のいずれも完全に抑制された。

3) nitrite 産生および iNOS 発現における A キナーゼ活性化剤及び C キナーゼ活性化剤の影響

A キナーゼ活性化剤であるホルスコリン (0.1-100 mM), C キナーゼ活性化剤である PMA (0.1-100 nM) を前投与し 1 時間後に IL-1 β (50 ng/ml), IFN- γ (100 IU/ml) の併用投与を行ったところ、nitrite の産生は容量依存性に増強された。更に、100 mM ホルスコリン、10 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) をそれぞれ前投与した後、同様のサイトカイン刺激を行い、6 時間後の iNOS mRNA の発現、24 時間後の iNOS 蛋白の発現を調べたところ、mRNA レベルおよび蛋白レベルでも iNOS 発現が増強した。

IV. 考 察 ;

骨格筋におけるサイトカイン誘導型の NO の役割は、いまだ明らかではないが、Tamir らは筋炎を自然発症するマウスを用いて、筋炎の重症度が尿中の nitrate の濃度と比例関係にあり、NO 合成阻害剤の投与により筋炎が改善すること、また免疫組織化学染色にて炎症骨格筋に iNOS タンパクが著明に発現していることを報告し、NO の産生が筋炎の病態に重要な役割をしている可能性を示唆した。

これまで、サイトカインによる誘導型 NO の産生は、チロシンキナーゼ、A キナーゼ、C キナーゼといった蛋白リン酸化酵素の活性化を介して調節されることが明らかにされており、培養細胞を用いた実験によって、これらリン酸化酵素の活性に影響を与える生理的因子が実際に NO の産生を調節していることも証明されている。すなわち、iNOS の発現調節機構を分子レベルで解析することは、NO

産生の機序解明とともに、NOの関与する病態の解明にも結び付く可能性がある。しかしながら、iNOS発現の調節機構は細胞特異性があり、種々の細胞で非常に異なっている。例えばチロシンキナーゼ抑制剤はマクロファージや膵島細胞、メサングウム細胞においてiNOS発現を抑制する。Aキナーゼ系の活性化は、血管平滑筋細胞においてはiNOS発現を増強するが、マクロファージでは抑制する。また、Cキナーゼの活性化は肝細胞においてiNOS発現を刺激するが、血管平滑筋細胞では抑制することが確認されている。

我々は、L6骨格筋細胞を用いたこの研究において、IL-1 β 、IFN- γ の併用刺激によりiNOSの発現がmRNA及び蛋白レベルで誘導され、その結果、多量のNOが産生されることを見出した。2種の異なった作用機序をもつチロシンキナーゼ阻害剤はiNOSの発現を完全に抑制したため、iNOS誘導によるNO産生にチロシンキナーゼの活性化が関与していることが示唆された。我々は、Aキナーゼ、Cキナーゼ活性化因子のiNOS発現に及ぼす影響についても検討した。Aキナーゼ活性化因子はサイトカイン刺激によるiNOS発現を増強したが、Aキナーゼ活性化因子の単独投与ではiNOS発現は誘導されなかった。これは血管平滑筋細胞において、Aキナーゼ活性化因子によりiNOS発現が増強した点と一致するが、血管平滑筋細胞ではAキナーゼ活性化因子単独投与でもiNOS発現が誘導された点が我々の細胞と異なっており、Aキナーゼ活性化のiNOS誘導に対する効果は細胞により異なることが示唆された。更にCキナーゼ活性化因子もL6細胞においてiNOS発現を増強した。これらの結果より、L6細胞におけるiNOS発現はAキナーゼ、Cキナーゼ活性化因子によって、促進性に修飾をうけることが考えられた。今後、筋炎などの炎症性筋疾患におけるNOの役割をより明らかにするために、これらの蛋白リン酸化酵素活性に影響を与える病態生理学的な因子を同定し、検討を加えることが重要と思われる。

論文審査の結果の要旨

筋炎における筋細胞障害の機序についてはまだ十分には明らかでないが、近年炎症性サイトカイン刺激によって産生されるnitric oxide (NO) が筋細胞障害性に働く可能性が注目されている。申請者達は、培養骨格筋細胞の代表的な細胞株として最もよく用いられているL6細胞におけるNO産生調節機構をiNOSのmRNA及び蛋白レベルで解析した。ラットL6培養骨格筋芽細胞を3日間培養し骨格筋細胞に分化させた後、炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL)-1 β 、インターフェロン (INF)- γ で刺激した。いずれも単独ではL6細胞培養上清中の nitrite 産生を誘導しなかったが、IL-1 β とIFN- γ の併用投与後有意に nitrite 産生量は増大した。iNOS mRNA および iNOS 蛋白の発現も促進された。

次に nitrite 産生及び iNOS 発現における細胞内チロシンキナーゼの関与を調べるためハービマイシンAとゲニスチンの2種類のチロシンキナーゼ阻害剤を前投与したところIL-1 β とIFN- γ の併用投与によるnitrite産生、iNOS mRNA および蛋白の発現は完全に抑制され、iNOS誘導によるNO産生にチロシンキナーゼの活性化が関与していることが示唆された。さらに申請者は、Aキナーゼ、Cキナーゼ活性化因子のiNOS発現に及ぼす影響についても検討した。Aキナーゼ活性化剤であるホルスコリンはサイトカイン刺激によるiNOS発現を増強したが、ホルスコリンの単独投与ではiNOS発現は誘導されなかった。これは血管平滑筋細胞において、Aキナーゼ活性化因子によりiNOS発現が増強した点と一致するが、血管平滑筋細胞ではAキナーゼ活性化因子単独投与でもiNOS発現が誘導された点が我々の細胞と異なることが示唆された。更にCキナーゼ活性化剤であるPMAもL6細胞に

においてiNOS発現を増強した。これらの結果より、L6細胞におけるiNOS発現はAキナーゼ、Cキナーゼ活性化因子によって、促進性に修飾を受けることが考えられた。今後、筋炎などの炎症性筋疾患におけるNOの役割をより明らかにするために、これらの蛋白リン酸化酵素活性に影響を与える病態生理学的な因子を同定し、検討を加えることが重要と思われる。以上、本研究は筋炎における筋細胞の障害のメカニズムについて、nitric oxideの関与を研究したものであるが、従来ほとんど知られていなかった炎症性サイトカインによるNO産生機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。