

氏 名	中 泉 敦 子
(ふりがな)	(なかいずみ あつこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 24年 2月 7日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Nitric oxide potentiates TNF- $\alpha$ -induced neurotoxicity through suppression of NF- $\kappa$ B (一酸化窒素は NF- $\kappa$ B の作用を抑制し TNF $\alpha$ 誘発の神経細胞死を誘導する)
論文審査委員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 黒 岩 敏 彦 教授 大 槻 勝 紀 教授 林 秀 行

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 《目 的》

一酸化窒素(NO)は網膜血管、神経、グリア細胞など様々な細胞で一酸化窒素合成酵素(NOS)により合成され、網膜において血流調節、神経伝達、炎症、アポトーシス誘導などに深く関与している。その作用の多くは cyclic GMP を介して発揮されるが、最近 NO が SH 基をニトロソ化して、様々な酵素活性を調整することが明らかにされた。TNF $\alpha$ は炎症促進性サイトカインで、中枢神経の炎症性疾患や変性疾患で上昇することが知られ、網膜虚血やブドウ膜炎などの網膜傷害においても大きな役割を果たす。TNF $\alpha$ はその受容体である TNFR I に作用しアポトーシスを誘導する一方で、転写因子である NF- $\kappa$ B を活性化し抗アポトーシス蛋白を誘導する。このため NF- $\kappa$ B は TNF $\alpha$ 暴露後の細胞生存に非常に重要である。今回我々は NO がニトロソ化を介し NF- $\kappa$ B の作用を抑制し、アポトーシス

を促進させるという仮説をたてた。この仮説を検証するために、網膜神経細胞株である RGC-5 を培養し NO 供与体である SNAP を用いて TNF $\alpha$ 誘導細胞死と NF- $\kappa$ B 活性の関連を検討した。

#### 《方 法》

RGC-5 に TNF $\alpha$ を暴露し、TNF $\alpha$ 誘導網膜神経細胞死の程度を WST-8 assay 及び annexin-V およびヨウ化プロピジウムの二重染色による FACS 解析を用いて測定し細胞傷害に対する用量依存性を検討した。次に NF- $\kappa$ B の活性を検討するため RGC-5 に TNF $\alpha$ を暴露し、同時に TNF $\alpha$ 阻害剤であるエタネルセプト、NO 供与体である SNAP、NOS 阻害剤であるアミノグアニジンおよび L-NAME、NF- $\kappa$ B 阻害剤である QNZ をそれぞれ添加し ELISA 法により検討した。また NO 活性の評価には免疫ブロット法を用いた。NO の産生は培地中の nitrite を Griess 法で測定した。NF- $\kappa$ B を活性化する IKK $\beta$  に対する SNAP の関与を免疫ブロット法で検討し、さらにキナーゼ活性を測定した。

#### 《結 果》

WST-8 assay による解析で TNF $\alpha$ は濃度依存的に RGC の細胞死を惹起し、エタネルセプトは、TNF $\alpha$ 誘導細胞死をほぼ完全に抑制した。QNZ により NF- $\kappa$ B を抑制すると、細胞死は有意に増加した。NO 供与体の SNAP でも細胞死は有意に増加し、NOS 阻害剤である L-NAME、アミノグアニジンは TNF $\alpha$ 誘導細胞死を有意に抑制した。このことから TNF $\alpha$ 誘導細胞死と NO の関連が示唆された。FACS 法による解析では、TNF $\alpha$ は annexin-V 陽性細胞を有意に増加させ、主にアポトーシスを介して神経細胞死を惹起させると考えられた。WST-8 assay と同様に、エタネルセプトは有意にアポトーシスを抑制し、L-NAME (1.0 $\mu$ M)とアミノグアニジン(1.0 $\mu$ M)も TNF $\alpha$ 誘導細胞死を有意に抑制した。一方で QNZ と SNAP は TNF $\alpha$ によるアポトーシスを有意に増加させた。これら二つの異なるアッセイで、TNF $\alpha$ 誘導細胞死が NF- $\kappa$ B を阻害すると増強されることが示され、同様の変化が NO 供与体である SNAP でも生じることが確認された。ELISA による測定では、NF- $\kappa$ B 活性

は TNF $\alpha$  暴露により約 4 倍亢進し、QNZ の同時投与で有意に抑制されたが、同様に SNAP の同時投与でも NF- $\kappa$ B 活性は抑制された。免疫ブロットによる検討では、TNF $\alpha$  暴露による iNOS 発現の増加が確認された。この iNOS 発現の変化は、NF- $\kappa$ B 活性の変化と非常に良く関連し、QNZ と SNAP は TNF $\alpha$  暴露による iNOS 発現を有意に抑制した。この変化は ELISA 法による NO 産生量の測定でも確認された。さらに免疫ブロット法により、SNAP により IKK $\beta$  のニトロソ化が認められ、キナーゼ活性の低下が確認された。

#### 《考 察》

今回の結果から、NO は IKK $\beta$  のニトロソ化を通して NF- $\kappa$ B の作用を抑制することで TNF $\alpha$  と相乗的に働き、TNF $\alpha$  の神経毒性を増強することが示された。また、iNOS の発現が NF- $\kappa$ B 活性と深く関連しており、iNOS 発現が NF- $\kappa$ B に依存していると考えられた。すなわち NO が NF- $\kappa$ B 活性を調整し、iNOS 発現を抑制するフィードバック機構が認められた。NO 供与体である SNAP は QNZ 同様に NF- $\kappa$ B を抑制し、TNF $\alpha$  による iNOS 発現を抑制したが、TNF $\alpha$  誘導細胞死を逆に増加させた。従って、NF- $\kappa$ B は iNOS を誘導するが、TNF $\alpha$  誘導神経細胞死に対しては神経保護作用的に働くと考えられた。網膜虚血などで NO と TNF $\alpha$  がともに増加する環境では、NO は NF- $\kappa$ B 活性を抑制して抗炎症作用を発揮する一方で神経細胞死を誘導すると考えられ、炎症反応やアポトーシス誘導に重要な役割を果たすと考えられた。

## 論文審査結果の要旨

一酸化窒素(NO)は中枢神経系において、一酸化窒素合成酵素 (NOS) により合成され、網膜において血流調節、神経伝達、アポトーシス誘導などに複雑に関与している。また、TNF $\alpha$ は網膜虚血時には神経細胞のアポトーシスを誘導するが、その一方で、転写因子である NF- $\kappa$ B を活性化し抗アポトーシス蛋白を誘導することが知られている。これまでの研究ではNOがTNF $\alpha$ の神経傷害作用にどのように関与しているかは明らかにされていない。申請者は網膜神経細胞株である RGC-5 を培養し NO 供与体である SNAP を用いて TNF $\alpha$  誘導細胞死と NF- $\kappa$ B 活性の関連を検討している。

その結果、NO の存在下では TNF $\alpha$ 誘導細胞死が有意に増加し両者が関連していることを示している。さらに、その作用機序として NO が IKK $\beta$  のニトロソ化を通して NF- $\kappa$ B の作用を抑制することで TNF $\alpha$ と相乗的に働くということを示している。また、iNOS の発現は NF- $\kappa$ B に依存していることを明らかにしている。以上のことから、NO が NF- $\kappa$ B 活性を調整しその結果 iNOS 発現を抑制するというフィードバック機構の存在を示している。また、網膜虚血などで NO と TNF $\alpha$ がともに増加する環境では、NO は NF- $\kappa$ B 活性を抑制し抗炎症作用を発揮する一方で神経細胞死を誘導するという知見は新しい。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Cellular and Molecular Neurobiology 32(1): 95-106, 2012