

氏 名	おか 岡 さとし 論
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1883 号
学位授与の日付	平 成 17 年 7 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Nitric oxide derived from human umbilical vein endothelial cells inhibits transendothelial migration of neutrophils (ヒト臍帯静脈内皮細胞由来一酸化窒素による好中球血管外遊走の抑制)
論文調査委員	(主 査) 教 授 前 川 平 教 授 淀 井 淳 司 教 授 生 田 宏 一

論 文 内 容 の 要 旨

好中球が組織において生体防御機能を発揮するためには、血管内皮細胞を通過して組織へ移動することが必要である。一方、血管内皮細胞は血管内皮機能の修飾に重要な一酸化窒素 (NO) を産生する。そこで、好中球が血管外に遊走する過程において、血管内皮細胞由来の NO が果たす役割を解析した。

好中球の血管外遊走は、単層培養したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を NO 合成酵素の阻害剤であるアルギニン誘導体の NG-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) あるいは NG-monomethyl L-arginine (L-NMMA) で前処理することにより亢進した。また、NO 消去剤である 2-(4-carboxyphenyl)-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (carboxy-PTIO) の存在下においても好中球の血管外遊走は亢進した。HUVEC を L-NAME や L-NMMA で前処理することにより亢進する好中球の血管外遊走は、NO の供与体である 3-morpholinostyrene N-ethylcarbamide (SIN-1) や N-ethyl-2-(1-ethyl-2-hydroxy-2-nitrosohydrazino)-ethanamine (NOC 12) の添加により抑制された。以上の成績から、HUVEC 由来の NO が好中球の血管外遊走を抑制すると考えられた。

HUVEC が NO を産生することを確認するため、NO 反応性蛍光色素である Diaminofluorescein-FM diacetate (DAF-FM DA) を用いたフローサイトメトリー法で細胞内 NO を測定した。L-NAME で処理した HUVEC では、未処理と比較して細胞内 NO は有意に低値であった。さらに NO 合成酵素の一つである endothelial NO synthase (eNOS) が存在することをウエスタンブロット法で確認した。

次に、HUVEC の産生する NO が好中球に作用することを DAF-FM DA で標識した好中球を用いてフローサイトメトリー解析により評価した。未処理 HUVEC と共培養した好中球は L-NAME で前処理した HUVEC と共培養した好中球と比較して、好中球内 NO が有意に高値であった。この成績は好中球を L-NAME で前処理した時も同様であった。以上より、好中球における NO は、HUVEC 由来の NO を反映したものと考えられた。

さらに、好中球の血管外遊走が HUVEC 由来の NO に影響される機序を明らかにする目的で、NO の重要な標的分子の一つである可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) が好中球の血管外遊走にどのように関わるかを検討した。sGC の活性化剤である 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole (YC-1) は L-NAME で促進された好中球の血管外遊走を抑制した。一方 sGC の阻害剤である 1-H[1,2,4-]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) は好中球の血管外遊走を促進した。以上より sGC は好中球血管外遊走に関与することが確認された。

以上の検討に用いた L-NAME, carboxy-PTIO は無刺激の HUVEC に対する好中球の接着に影響を与えず、また HUVEC の CD31 (PECAM-1) や CD54 (ICAM-1) の発現に影響しなかった。さらに NOC 12 は好中球の CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD15, CD47, CD62L の発現に変化を及ぼさなかった。

これらの結果より、好中球の血管外遊走に対して血管内皮細胞由来の NO は好中球に作用し抑制的に機能すること、そしてその機序として NO により好中球内の sGC の活性化を介することが示唆された。血管内皮細胞から恒常的に産生される NO は好中球の血管外遊走に抑制的に作用し、促進的に作用するケモカインや種々サイトカイン、液性因子とともに

好中球の動態，機能の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

好中球が組織において生体防御機能を発揮するためには，血管内皮細胞を通過して組織へ移動することが必要である。また，血管内皮細胞は，血管内皮機能の修飾に重要な一酸化窒素（NO）を産生する。本研究では，好中球が血管外に遊走する過程において，血管内皮細胞由来の NO が果たす役割を解析した。

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を NO 合成酵素阻害剤で前処理したとき，好中球の血管外遊走（TEM, transendothelial migration）が亢進し，この TEM の亢進に対して，NO 供与体は抑制的に作用した。NO 消去剤の存在下においても同様に好中球の TEM が亢進した。これらの成績より，NO が好中球の TEM に対して抑制的に作用していると考えられた。

次に，HUVEC と好中球の相互作用における好中球の細胞内 NO 量の測定結果から，HUVEC 由来の NO が好中球に作用していることを確認した。さらに，可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）に対する活性化剤や抑制剤による好中球の TEM に対する効果から，NO は，好中球の sGC の活性化を介して TEM に関与していると考えられた。血管内皮細胞から恒常的に産生される NO は好中球の TEM に抑制的に作用し，促進的に作用するケモカインやサイトカインなどの液性因子とともに好中球の動態，機能の制御に重要な役割を果たしていると考えられた。

以上の研究は好中球の血管外遊走の機序解明に貢献し，炎症性疾患等の病態解明に寄与するところが多い。したがって，本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお，学位授与申請者は，平成17年5月16日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け，合格と認められたものである。