

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

アンチセンス法による iNOS 抑制の骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) に及ぼす影響

指導教官 高戸 毅 教授

東京大学大学院医学系研究科  
平成 10 年 4 月入学  
医学博士課程・外科学専攻  
安部 貴大

### I. 要約

[背景] 1992 年に NO が Science 誌の "Molecule of the year" として取り上げられ、現在までに NO 合成酵素として 3 種のアイソザイム、すなわち神経型 (nNOS, NOS I)、誘導型 NOS (iNOS, NOS II)、血管内皮型 (eNOS, NOS III) NOS が同定されている。iNOS は腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )、インターロイキン 1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) などの炎症性サイトカインや、細菌菌体成分のリポ多糖類 (LPS) の刺激によって誘導され発現する。iNOS によって産生される NO は  $\mu$ M のオーダーであり、eNOS や nNOS によって産生される nM 量の 1000 倍高値である。従って iNOS によって産生される高濃度の NO がサイトカインとともに

炎症反応に深く関与するとされている。NO の骨代謝における作用について検討した報告は少ないが、炎症性サイトカイン  $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$  が骨吸収活性を促進することは広く知られている。これらのサイトカインの刺激により、iNOS 遺伝子が誘導され、骨芽細胞の NO 産生量は増加する。一方、NO は破骨細胞の骨吸収活性を抑制する。そのため、NO は骨形成あるいは骨吸収のいずれの作用があるのか不明であった。引地らは骨芽細胞分化マーカーのアルカリフォスファターゼ (AlPase) 活性とオステオカルシン mRNA の発現を指標として NO 自身の骨芽細胞に対する作用を検討し、NO 供与薬の投与によって AlPase 活性、オステオカルシン発現は共に上昇するが NOS 阻害薬  $\text{N}^G$ -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) により抑制されることを薬理的に示した。このことは NO そのものには骨芽細胞の分化促進作用があることを示す。そこで炎症性サイトカインは骨吸収作用があり、大量の NO を産生することに対し、NO そのものは骨吸収作用を持たないことから、NO から生じる細胞障害性物質であるペルオキシナイトライト ( $\text{ONOO}^-$ ) が骨吸収作用を持つとかれらは考え、薬理的にその事実を示した。

[目的] 本研究では骨芽細胞に対してサイトカイン刺激より生ずる NO の産生を強制的に抑制することは  $\text{ONOO}^-$  の産生を抑制し、骨芽細胞の分化抑制を回復させる、すなわち iNOS による NO 産生の制御は将来的に炎症性の骨吸収の阻害に有効かと考えた。引地らはアルギニンの拮抗阻害物質の L-NMMA を用いて薬理的に骨芽細胞に対する  $\text{ONOO}^-$  の作用を示したが、この薬剤の特異性は完全ではない。そこでかれらが示した作用を、マウス胎仔頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 cell の iNOS をブロックすることにより遺伝子レベ

ルで検証し、更に将来の遺伝子治療に結びつけたいと考えた。そこで本研究の目的は、iNOS のアンチセンスベクターによる NO 産生の制御が、骨芽細胞の分化および骨芽細胞による ONOO<sup>-</sup> 産生に対しどのような影響を及ぼすかを検討することとした。

[方法] アンチセンス法は、アンチセンス DNA を標的遺伝子より転写されるセンス RNA に対して相補的に結合させ転写レベルで遺伝情報をブロックするか、あるいは翻訳された蛋白質の活性中心およびその近傍に結合することにより翻訳レベルで遺伝情報をブロックする、といった一連の手法を総称する。本研究では iNOS アンチセンスベクターを MC3T3-E1 cell へ導入してアンチセンス RNA を内因性に発現させる方法を用いた。手順は以下の項目に従って行った。

まず ① ベクターの作製は iNOS の開始コドンを含む領域 (213 bp) を MC3T3-E1 cell より調整し、これを insert ととしてプラスミドベクターへセンスおよびアンチセンスの方向で組込んだ。② これを MC3T3-E1 cell へ transfect し抗菌剤であるネオマイシン (G418) による選択培養を行い、ネオマイシン耐性株を単離した。③ 構成的に iNOS 発現を抑制するアンチセンス株を同定するため次の4つの選択基準を設定し検討を行った。(1) RT-PCR 法を用いた transcript の確認、(2) NADPH diaphorase 染色を用いた transgene の NOS 活性の抑制の検討、(3) 免疫染色による transgene の iNOS 蛋白発現の抑制の検討、(4) Griess 法を用いた NO 産生の抑制の検討を行い、これらの選択基準の条件を満たすものをアンチセンス株として同定した。この代表株を用いて骨芽細胞の分化マーカー指標である ④ アルカリフォスファターゼ (AlPase) 活性、⑤ オステオカルシン mRNA の発現への影響を検討し、

また ⑥ ニトロチロシンをマーカーとして ONOO<sup>-</sup>の産生への影響を免疫組織学的に検討した。

[結果] 今回、iNOS のアンチセンスベクターを作製し、これを MC3T3-E1 cell に transfect して NOS 活性、iNOS 蛋白、NO 産生を抑制する細胞株を選択培養することができた。またこの iNOS のアンチセンス導入株において、2 種の骨芽細胞の分化マーカーである AlPase 活性およびオステオカルシンの mRNA 発現に対する影響を検討した結果、サイトカインによる骨芽細胞分化の抑制を回復することができた。そしてニトロチロシンをマーカーとしてアンチセンス株の ONOO<sup>-</sup> 産生への影響を検討した結果、NO の産生のみならずニトロチロシンの発現量で推定した ONOO<sup>-</sup>の産生も抑制されることを示した。ONOO<sup>-</sup>には強い酸化力、ニトロ化作用があるため脂質過酸化やチロシン残基のニトロ化によって種々の酵素が不活性化され細胞障害性作用を及ぼす。よって NO 産生を制御し ONOO<sup>-</sup>の産生を抑制することが炎症性の骨吸収の抑制に有効であることを示唆し、炎症性骨破壊病変の防止に対して iNOS をターゲットとしたアンチセンス法が有用であると考えられた。

[結語] 本研究はアンチセンスベクターによる MC3T3-E1 cell の iNOS の構成的発現抑制系を用いて細胞機能を検討した。その結果 iNOS 発現抑制系のアンチセンス株ではサイトカイン (TNF $\alpha$ および IL-1 $\beta$ ) の刺激により、NOS 活性、iNOS 蛋白、NO、さらに ONOO<sup>-</sup>の産生が抑制された。このことは iNOS を特異的にブロックすればサイトカインの刺激で生成される ONOO<sup>-</sup>を抑制し、骨芽細胞分化の抑制を回復することを示唆する。