

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 安部 貴大

本研究は細胞調節因子の1つである nitric oxide (NO) の合成酵素 (NOS) のうち、特に炎症反応において重要な役割を演じていると考えられる誘導型 NOS (iNOS) をアンチセンス法によって抑制し、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1 cell) に及ぼす影響を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. マウス iNOS 遺伝子の ATG 開始コドンを含む領域 (213 bp) を単離し、これを insert としてプラスミドベクター (pTARGET) へ組み込んだ。制限酵素 Hinc II および PCR 法を利用してセンス、アンチセンスの方向を判別し、direct Sequence によって塩基配列を確認した後、iNOS アンチセンスベクターとコントロールとしてセンスベクターを確定した。
2. 本研究で作製したプラスミドを MC3T3-E1 cell へリポフェクション法 (lipofectamine®) で遺伝子導入し、pTARGET ベクター内に組み込まれているネオマイシン耐性遺伝子により導入細胞を選択するため、ネオマイシン G418 含有の培地にて選択培養を行った。この株を単離することにより stable transformant を樹立した。
3. アンチセンスベクター、センスベクターおよび empty vector を MC3T3-E1 cell へ導入し株化した細胞のうち、本実験の目的であるアンチセンス株を同定するため以下の4つの選択基準を設定し検討した。
  - i) RT-PCR 法を用いた transcript の確認；pTARGET にデザインしたプライマーを用いて RT-PCR を行い、insert 領域の発現を確認し、さらにその細胞を3世代継代し発現が安定であることを確認した。
  - ii) transgene の iNOS 蛋白発現の抑制の検討；iNOS 抗体を用いて免疫組織学的に検討した。アンチセンス株においてサイトカイン (TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$ ) の刺激による iNOS 蛋白発現は非刺激の対照と比較し、著明に減少していることが示された。

iii) transgene の NOS 活性の抑制の検討；NOS 活性のマーカーとして用いられている NADPH diaphorase 染色を行い検討した。アンチセンス株はサイトカイン刺激条件下で NOS 活性が減少していることが示された。

iv) NO 産生の抑制の検討；NO の代謝最終産物である nitrate/nitrite を検出する Griess 法を用いて検討した。アンチセンス株はサイトカイン刺激による NO 産生が約 73% (66-78 %) 抑制されることが示された。

これらの条件を満たす代表株をアンチセンス株として選択した。

4. 選択したアンチセンス株を用いてアルカリフォスファターゼ (AlPase) 活性を測定したところ、wild type、センス株、empty vector 株ではサイトカイン刺激により AlPase 活性が減少するのに対し、アンチセンス株では減少しないことが示された。
5. RT-PCR 法を用いてオステオカルシン mRNA の発現を検討した。PCR のサイクル数を 24 cycles、26 cycles、28 cycles、30 cycles について行い直線的に増幅する範囲を用いて、半定量的に検討した。サイトカイン刺激条件下において対照株ではオステオカルシン mRNA の発現が減少するのに対し、アンチセンス株では刺激条件下においても発現レベルは減少せず、よりもむしろ増加傾向を示した。
6. 強い細胞障害性作用を持つ ONOO<sup>-</sup> に関する検討を行うため、ONOO<sup>-</sup> のマーカーとして用いられているニトロチロシンを指標として免疫組織学的検討を加えた。ニトロチロシン蛋白の発現は刺激条件下において、対照株で強い染色性が認められたのに対し、アンチセンス株では染色性が弱いことが示された。

以上、本論文は ONOO<sup>-</sup> に強い骨芽細胞抑制作用があることに注目し、アンチセンスベクターによる iNOS の発現抑制によって NO 産生を抑制し、さらに ONOO<sup>-</sup> 産生を抑制することを示した。本研究は iNOS を特異的にブロックすればサイトカインによる骨芽細胞分化指標の抑制が回復することを示唆するものであり、iNOS およびその産物としての NO、ONOO<sup>-</sup> の骨芽細胞に対する効果を直接的に証明するものであった。よって NO の骨代謝における作用の検討に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと思われる。