慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	マクロファージ由来のnitric oxideによる肝細胞酸化的DNA傷害の検討
Sub Title	
Author	渡部, 直行
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.2 (2003. 6) ,p.31-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030602-0031

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

マクロファージ由来のnitric oxideによる肝細胞酸化的DNA傷害の検討

渡　部　　直　行

内容の要旨

ウイルス、細菌および寄生虫感染などによる慢性的な炎症状態が、宿主の発癌リスクを高めることは多くの研究から明らかであり、肝臓病学の領域においても慢性肝疾患は肝細胞癌の発生母地であることが知られている。Nitric oxide（以下NO）が血管内皮由来の平滑筋弛緩因子として発見され、肝疾患においても血行動態、肝傷害、抗腫瘍活性などの様々な病態生理に関することが明らかになってきた。肝臓に炎症が生じている状態では、NO過剰産生が認められており、これが細胞傷害因子として働き、腫瘍細胞や正常細胞に対して傷害作用を有することが知られている。さらに活性化されたマクロファージは、NOだけでなくO_2^-も産生し、その結果放出されたO_2^-はNOと反応し短時間で$ONOO^-$となり強力な細胞毒性を持つことが報告されている。エンドトキシン血症の時には脾マクロファージは肝に遊走し、肝細胞に対する傷害性因子の一つとなる可能性が考えられる。したがって本研究では、活性化された脾マクロファージを肝細胞と共培養することによってNOの産生、さらに肝細胞に酸化的DNAを生じさせるかどうかについて検討し、脾マクロファージの肝細胞傷害における役割とそのメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

まず、IFN-γやLPSで刺激した脾マクロファージと肝細胞の共培養により、NOが産生されることが明らかになり、さらに免疫蛍光染色により、$ONOO^-$の関与が疑われた。肝細胞の酸化的DNA傷害を見るために8-OHdG/dG比を測定したところコントロールと比較して有意に上昇した。DNA傷害のもう一つのマーカーであるDNA単鎖を見るためにAO染色を行ったところ、生き残った肝細胞内での単鎖DNAの増加を示しており、それはやはりSODやNO阻害薬によって抑制された。次に活性化された脾マクロファージと共培養した後の肝細胞DNA変化における活性酸素の役割を見るために、NOとO_2^-両者を産生するSIN-1の効果や、$ONOO^-$の効果、およびSIN-1や$ONOO^-$投与下でのSODの効果につき検討した。SIN-1（＞1 mM）や$ONOO^-$（＞100μM）と24時間共培養後、肝細胞の8-OH-dG/dG、肝細胞の単鎖DNA比率は用量依存的に上昇を認めた。以上のことより、もし肝細胞に炎症が続き慢性化した場合には、活性化されたマクロファージやその近傍に存在する肝細胞より放出されるNOおよび$ONOO^-$が、肝細胞にDNA傷害を引き起こす可能性があり、将来的な発癌にもつながることが示唆された。

論文審査の要旨

慢性肝疾患において、肝細胞の壊死－再生のサイクルの亢進と不規則再生が、肝発癌の原因となると考えられている。また肝炎、肝硬変においては活性酸素の過剰産生が認められ、エンドトキシン血症により肝傷害が生じた際には、脾マクロファージが重要な役割を担っている。今回の研究では、IFN-γやLPSで刺激した脾マクロファージより、NOが産生されることが明らかとなり、肝細胞と共培養することによってNOだけでなくO_2^-も産生し$ONOO^-$となり、産生放出される可能性が免疫蛍光染色により考えられた。さらに、肝細胞の8-OH-dG/dG、単鎖DNA比率の検討によりNOとO_2^-の代謝経路の関与が示唆された。これは、NOとO_2^-両者を産生するSIN-1や、$ONOO^-$を肝細胞に添加、単培養したのちの肝細胞の8-OH-dG/dG、単鎖DNA比率より、いっそう明らかとなった。以上のことより、活性化された脾マクロファージがNOや$ONOO^-$を産生放出し、肝細胞に酸化的DNAを引き起こす可能性が明らかとなった。

審査においては、まず、肝細胞、脾マクロファージのpurityについて問われ、90％と88％と回答された。また、nitrite, nitrateの抑制実験にて、共培養の系の方が抑制効果が少ない理由について問われ、これは肝細胞からもnitrite, nitrateが相乗相加的に増加しており、抑制が十分にかからなかった可能性があると説明された。肝細胞処理、分離過程においてNOの値に影響がでないかについては、影響は少ないであろうと回答された。次に脾マクロファージの臨床的重要性について問われ、エンドトキシン血症により肝傷害が生じた際には、摘脾によって肝傷害がおさえられる可能性があると説明された。またこの実験理論上では、発癌を抑える可能性も考えられるも、他のサイトカインの影響やクッパー細胞を始めとする肝類洞内の細胞の影響が除外されており、これらの影響を踏まえた上での検討が必要であると説明がされた。正常肝細胞からのNO産生能につき質問を受け、IFN-γやLPS単独ではNO産生は上昇せず、活性化された脾マクロファージを肝細胞と共培養することによって上昇を認めると回答された。又、肝細胞の酸化的DNA傷害は$ONOO^-$のみが重要なのか、ヒドロキシラジカルが重要であり、鉄をキレートした際にはどうなるかの質問に関しては、$ONOO^-$が重要である証拠が、免疫蛍光染色の形態学的変化では不十分であり、HPLCで定量を測定する必要があったと回答された。今後、肝臓でのNOの役割については、未解決の部分もあり、今回の実験についてもなお検討すべき点が残されているが、エンドトキシン肝傷害における脾マクロファージの役割、及びこれが肝細胞におよぼす影響についてNOの関与を示した本研究は肝臓学上有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　石井　裕正
　　医化学　末松　　誠　　外科学　北島　政樹
　　病理学　坂元　亨宇　　病理学　岡田　保典
学力確認担当者：北島　政樹、末松　誠
　審査委員長：末松　誠

試問日：平成15年２月18日