

氏名・(本籍)	おお はた たけ じ 大 畠 武 二
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	理第1136号
学位授与年月日	平成11年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
研究科, 専攻	昭和58年3月25日 東北大学理学部生物学科卒業
学位論文題目	マクロファージにおける発癌抑制物質のNO産生抑制作用に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 井出宏之 教授 山本和生 助教授 山本博章

## 論 文 目 次

### 第1章：総合序論

### 第2章：材料および方法

### 第3章：多価不飽和脂肪酸のNO産生への影響

#### 序論

#### 結果

1. NO産生刺激と測定条件の検討
2. 脂肪酸によるNO産生への影響および細胞の生存率
3. ω3多価不飽和脂肪酸によるiNOS蛋白質の発現抑制
4. Docosahexaenoic acidによるiNOS mRNAの発現抑制
5. Docosahexaenoic acidによるiNOS発現抑制作用発現時間の検討

### 第4章：1'-Acetoxychavicol acetateのNO産生抑制作用

#### 序論

#### 結果

1. 1'-Acetoxychavicol acetateによるNO産生抑制作用および細胞の生存率
2. 1'-Acetoxychavicol acetateによるiNOSおよびiNOS mRNA発現の抑制作用
3. 1'-Acetoxychavicol acetateによるiNOS発現抑制作用発現時間の検討
4. 1'-Acetoxychavicol acetateによるiNOS遺伝子の転写因子への影響
5. NF-kB阻害剤によるNO産生抑制作用
6. Xanthine oxidase阻害剤によるNO産生抑制作用
7. タンパク質リン酸化酵素阻害剤によるNO産生抑制作用

#### 考察

### 第5章：大腸におけるNOS発現

1. 炎症性大腸炎
2. 大腸癌

## 序論

第6章：総合討論

第7章：要約

第8章：謝辞

第9章：参考文献

第10章：図表

# 論文内容要旨

一酸化窒素(NO)は炎症や感染等により大量に産生されミトコンドリアの活性抑制や細胞傷害作用を示す。また、NOはO<sub>2</sub>と反応してより反応性の高いONOO<sup>-</sup>を生成し、DNAの傷害や細胞傷害作用により発癌を亢進する可能性が示唆されている。さらに、tyrosineやcysteineをニトロ化してタンパク質の機能を阻害し、アポトーシスや細胞周期に影響する結果、発癌にも影響していると考えられている。

そこで種々の脂肪酸のNO産生への影響を、lipopolysaccharide (LPS)及びinterferon(IFN)- $\gamma$ で刺激したマクロファージ由来細胞株RAW264を用いて検討した。実験はRAW264細胞をLPSで刺激し、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)を誘導した。iNOSを誘導したRAW264細胞に $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸(docosahexaenoic acid: DHA, eicosapentaenoic acid: EPA,  $\alpha$ -linolenic acid),  $\omega$ 6多価不飽和脂肪酸(linoleic acid),  $\omega$ 9多価不飽和脂肪酸(oleic acid)及び飽和脂肪酸(stearic acid)を添加し、培養液中に蓄積したNOの安定酸化体であるNO<sub>2</sub>をGriess法, iNOS蛋白質をwestern blot analysis, iNOS mRNA量をnorthern blot analysisにより測定した。その結果 $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸は用量依存的にNO<sub>2</sub>産生量を減少させ、細胞内のiNOS蛋白質及びiNOS mRNAの発現レベルを顕著に低下させた。一方、 $\omega$ 3以外の脂肪酸ではこれらの作用はほとんど認められなかった。以上より、発癌抑制作用を示すDHA等の $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸はLPS刺激により誘導されるiNOSの発現を抑制し、その結果、NO産生を著明に減少させる事が判った。

DHAと同様、発癌抑制作用を示すことが知られているcurcuminやindomethacin等のNSAIDsにもNO産生抑制作用があることが報告されている。そこで他の発癌抑制物質についても検討したところ、1'-acetoxychavicol acetate(ACA)に強いNO産生抑制作用を見いだした。ACAはショウガ科に属するナンキョウに含まれており、これまで種々の動物発癌実験において強い発癌抑制作用を示すことが報告されている。ACAは細胞の生存率に影響のない濃度でNO<sub>2</sub>産生を用量依存的に抑制し、NO<sub>2</sub>産生量と相関してiNOS蛋白質及びmRNAレベルを低下させることが明らかとなった。さらに、ACAはiNOS遺伝子の転写因子であるNF- $\kappa$ B, AP-1及びStat1の転写活性化を抑制することもわかった。また、NF- $\kappa$ Bの活性化抑制はNF- $\kappa$ Bの抑制因子であるI $\kappa$ B- $\alpha$ の分解を抑制していることが寄与していると考えられた。以上のことより、ACAは転写レベルでNO産生を抑制し、この作用が発癌抑制作用に寄与している可能性が示唆された。

この様に、いくつかの抗発癌物質に共通してNO産生抑制作用が認められた。NOは潰瘍性大腸炎や肝炎等の種々の炎症に少なからぬ関与があると考えられているが、炎症だけでなく癌組織でもiNOSの発現が報告されつつある。本論文でもラットの大腸癌においてiNOSが高度に発現していることを報告した。NOは発癌に深く関与し、その発生の低減化は発癌抑制作用に大きな役割を果たしているものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

炎症や感染等によりマクロファージで大量に産生されたNOは、窒素ラジカルを生成し、突然異変を誘発し、細胞障害を起こす。また酸化ストレスを増大させ、アポトーシスを抑制する。これらの作用は、長期的には発癌の原因となる。

DHA等の $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸は発癌を抑制する。本研究では、種々の脂肪酸のNO産生への影響を、マクロファージ由来株細胞であるRAW264細胞をLPSやINF- $\gamma$ で刺激して、誘導型NO合成酵素(iNOS)を発現させ、NO生産を測定することで解析した。その結果、 $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸は、濃度依存的にNO生産を抑制し、またiNOSタンパク質およびiNOS mRNAの発現を顕著に抑制することを明らかにした。他の発現抑制物質ACAも同様に、iNOSタンパク質およびiNOS mRNAの発現を顕著に抑制し、さらにACAは、iNOS遺伝子の転写因子であるNF- $\kappa$ Bの転写抑制因子I- $\kappa$ Bの分解を抑制し、AP-1、Stat1の活性化も抑制することを見出した。

マクロファージのアポトーシスが抑制されると炎症の悪化が起こり、発癌のリスクが高くなる。そこで、NaBでRAW264細胞にアポトーシスを誘導し、このアポトーシスをLPS、TNF- $\alpha$ 等の炎症刺激で抑制させた。ACAはこの培養系でのアポトーシスを回復させ、その際、NF- $\kappa$ B、AP-1の活性化を阻害し、アポトーシス抑制タンパク質Bcl-X1の発現を抑制することを見出した。

さらに大腸癌株細胞のひとつWiDr細胞にINF- $\gamma$ でアポトーシスを誘導する際、DHAはアポトーシスを促進した。

発癌を抑制するDHAやACAはNO生産の抑制以外に、種々の発癌機構に対して抑制的に作用しているが、その一つとしてマクロファージのアポトーシスに対する感受性を回復させ、また大腸癌のアポトーシスを促進する作用を示した。

これらの研究は、著者が自立した研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、大畠武二提出の論文は、博士(理学)の学位論文として合格と認める。