

# Inducible Nitric Oxide Synthase in a Human Glioblastoma Cell Line

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/15410">http://hdl.handle.net/2297/15410</a>

学位授与番号	医博乙第1363号
学位授与年月日	平成7年12月20日
氏名	藤沢弘範
学位論文題目	Inducible Nitric Oxide Synthase in a Human Glioblastoma Cell Line

論文審査委員	主査	教授	松島綱治
	副査	教授	山本博
		教授	東田陽博

### 内容の要旨及び審査の結果の要旨

サイトカイン刺激による誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase : iNOS) の誘導は、マウスやラットのアストロサイト、ミクログリアで証明され、遺伝子レベルで誘導機構が解明されつつある。しかし、ヒトでは実験系の難しさから、cDNAクローニングの段階で大きく遅れた。著者らは、ヒトグリオブラストーマ細胞においてiNOSを発現する細胞を見出し、分子レベルでその誘導機構を解明することを目的とした。以下に実験結果を示す。

1. 株化ヒトグリオブラストーマ細胞 (A-172) をリポポリサッカライド (LPS), ヒトIFN- $\gamma$ , ヒトTNF- $\alpha$  で処理後、細胞質中のNOS活性を測定した。処理した細胞にのみ活性が誘導され、これは基質L-アルギニンの競合的阻害剤であるN-モノメチル-L-アルギニン (L-NMMA), N-ニトロ-L-アルギニン (L-NNA) でそれぞれ64%, 30%低下した。
2. 処理した細胞から全RNAを抽出し、RT-PCR法でヒトiNOS cDNA断片 (約550塩基対長) を得た。この断片は497塩基対をコードし、165アミノ酸に相当した。蛋白レベルでマウスマクロファージ、ラット肝由来のものとそれぞれ78%, 75%の相同性を認めた。
3. ノーザンブロット法によるiNOS mRNAの解析から、単独刺激としてはIFN- $\gamma$  で4.5kbのmRNAが誘導された。その発現はLPS, TNF- $\alpha$ , 特にヒトIL-1 $\beta$  の同時処理で相乗的に増強され、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミド, RNA合成阻害剤であるアクチノマイシンDで完全に抑制された。
4. マウスマクロファージiNOS遺伝子のプロモーター領域 (約4 kb) をA-172細胞に導入し、CATアッセイ法で各種サイトカイン刺激による転写活性を調べた。転写活性はLPS, TNF- $\alpha$  がIFN- $\gamma$  やIL-1 $\beta$  と各々単独であるいは組み合わされて刺激されたときに高く、全体のパターンはノーザンブロットの結果とほぼ一致した。
5. 蛋白の発現は、ラットiNOS抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。最も誘導効率の高いLPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  の同時処理でマウスやラットのものと同様大きさのヒトiNOS蛋白 (130kDa) を検出した。

以上、A-172細胞におけるiNOSの誘導は、サイトカインによる遺伝子転写亢進に基づくものであり、さらにマウスとヒトiNOS遺伝子プロモーター領域の類似性が示された。本研究は、ヒトグリオブラストーマ細胞において、初めてサイトカインによるiNOSの誘導とそのメカニズムを分子生物学的に解明したものと評価された。