

平成18年12月

森山直樹 学位論文審査要旨

主査 稲垣喜三
副主査 重政千秋
同 渡邊達生

主論文

ANP inhibits LPS-induced stimulation of rat microglial cells by suppressing NF- κ B and AP-1 activations

(ANPはNF- κ BとAP-1の活性化を阻害してLPSのラットミクログリアへの刺激作用を抑制する)

(著者：森山直樹、谷口真、宮野加奈子、三好美智夫、渡邊達生)

平成18年11月 Biochemical and Biophysical Research Communications 350巻 322頁～
328頁

学位論文要旨

ANP inhibits LPS-induced stimulation of rat microglial cells by suppressing NF- κ B and AP-1 activations

(ANPはNF- κ BとAP-1の活性化を阻害してLPSのラットミクログリアへの刺激作用を抑制する)

血圧・体液調節に関与する心房性ナトリウム利尿ペプチド(atrial natriuretic peptide; ANP) は炎症抑制物質として働いていることが知られている。例えば、細菌性内毒素 (lipopolysaccharide; LPS) などの炎症誘発因子によるマクロファージの一酸化窒素 (NO) やサイトカイン産生さらにはNF- κ BやAP-1の活性化に対するANPの抑制作用が報告されている。

一方、脳内にもANP産生系やその受容体の存在が証明されている。さらに、脳内のマクロファージであるミクログリアはLPSにより活性化することが知られており、この活性化へのNF- κ BやAP-1などの転写因子の関与が推察されている。しかし、ミクログリア活性に対するANPの抑制作用の有無についてはこれまで検討がなされていない。

それゆえ、LPSによるミクログリアへの刺激作用として、NOやinterleukin-1 (IL-1) の産生、ミクログリアの形態変化、及びNF- κ BやAP-1の活性化を初代培養細胞を用いて調べた。さらに、これらの刺激作用に及ぼすANPの効果について検討した。

方法

ラットミクログリアの初代培養細胞を用いた。胎児ラットの脳から得たアストロサイトとミクログリアを2週間培養し、振盪によりミクログリアを分離後、実験を行った。薬剤は、チフス菌のLPS、ANP、およびNP受容体 (type A and B) 拮抗薬 (HS-142-1) をPhosphate-buffered salineに溶解して用いた。実験を以下の5つに分けた。

実験1: ミクログリアにNP受容体が発現しているか否かをRT-PCR法により調べた。実験2: ミクログリアの培養液にLPSとANPを添加して、LPSによるNOの産生増加に及ぼすANPの効果を検討した。薬物投与48時間後の培養液中のNOを、Griess法により測定した。さらに、ANPによるNO産生抑制作用に及ぼすHS-142-1の影響について調べた。実験3: ミクログリアの培養液にLPSとANPを添加して、LPSによるIL-1 β の産生に及ぼすANPの効果タンパクレベルとmRNAレベルで検討した。ELISA法を用いて6時間後の細胞内のIL-1 β の測定を行った。また、RT-PCRにより4時間後のIL-1 β のmRNA変化を測定した。実験4: ミクログリアの培養液にLPS

とANPを添加して、LPSによるミクログリアの形態変化（6時間後）に及ぼすANPの効果を検討した。実験5：ミクログリアの培養液にLPSとANPを添加して、LPSによる転写因子の活性化に及ぼすANPの効果を検討した。投与4時間後の細胞の核抽出を行い、NF- κ BとAP-1活性をElectrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) 法にて定量した。

結 果

ミクログリアにNP受容体mRNAの発現があることが確認された（実験1）。LPS刺激により、ミクログリアのNO産生は増加した。ANPを作用させるとこのNO反応は減弱した。さらに、ANPによるNO反応抑制はHS-142-1によりブロックされた（実験2）。LPS刺激によりIL-1 β はタンパク、mRNAレベルで増加したがANPにより双方とも有意に抑制された（実験3）。LPSによりミクログリアの形態は球形から突起を持つ紡錘形に変化したが、その変化はANPにより抑制された（実験4）。LPSによるミクログリアのNF- κ BとAP-1の活性化は、ANPにより抑制された。

考 察

LPS刺激によりミクログリアのNOとサイトカインの産生、形態変化、さらにはNF- κ BとAP-1の活性化が起こった。これらの効果はすべてANPにより抑制された。したがって、ANPはNF- κ BとAP-1の活性化を阻害してLPSのラットミクログリアへの刺激作用を抑制するものと考えられる。一方、NP受容体（type A及びtype B）拮抗薬であるHS-142-1によりANPのNO反応抑制効果が阻害された事実と、ミクログリアにNPレセプター（type A、type B及びtype C）の発現が認められたことより、ANPの効果はNP受容体のtype Aあるいはtype Bを介して発現するものと推察される。

結 語

LPSがラットミクログリアへ及ぼす刺激作用は、NP受容体に結合したANPが転写因子の活性化を阻害することにより抑制される事実が判明した。