

論文内容要旨

Downregulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and endothelin-1 (ET-1) in a co-culture system with human stimulated X-linked CGD neutrophils

(X連鎖性慢性肉芽腫症患者の刺激下好中球と共培養させた血管内皮細胞における eNOS ならびに ET-1 発現は低下する)

PLoS One , 2020, in press.

指導教員：岡田 賢教授
(医系科学研究科 小児科学)

宇都宮 朱里

X連鎖性慢性肉芽腫症 (X-CGD) は、*CYBB* 遺伝子異常による食細胞の NADPH oxidase を構成する gp91^{phox} 欠損での活性酸素産生障害から、易感染性を示す原発性免疫不全症である。X-CGD 患者では、血管内皮機能検査 (Flow Mediated Dilatation) での著明な血管拡張反応を認めることが報告されているが、その詳細は明らかでない。本研究では、gp91^{phox} 欠損患者好中球の血管内皮細胞に与える影響を、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells: HUVECs) との共培養系を用い、血管内皮機能に関わる NO 合成酵素 (eNOS, NOS3) / エンドセリン 1 (ET-1, EDN1) 発現を中心に解析した。今回の研究は、説明同意が得られた患者 20 名と年齢、性別を一致させた健康対象者 20 名からの末梢血好中球を用いた。X-CGD 患者好中球は種々の刺激下での活性酸素産生障害を認めるが、本研究に利用するカルシウムイオノフォア、A23187 による活性酸素産生障害とともに、NO 代謝産物の有意な増加を確認した。

HUVEC に対する好中球の影響を検討する目的で、細胞間の直接接触を防ぐ Transwell® による共培養系を利用した。健康人ならびに X-CGD 患者好中球の A23187 刺激下で、HUVEC の *NOS3* mRNA の発現は、X-CGD 好中球刺激では正常好中球の約 1/3 に有意の低下が認められた。X-CGD 好中球では H₂O₂ の著明な低下と NO 代謝産物の有意な増加が確認されたことから、*NOS3* 発現と H₂O₂、NO との関係が示唆された。また、X-CGD 好中球刺激による eNOS 蛋白の発現低下ならびに Ser1177 部位のリン酸化の低下が認められた。同様に *EDN1* の mRNA の発現低下と ET-1 蛋白の発現低下も認められた。

eNOS と ET-1 蛋白発現変化の機序を検討するために、シグナル伝達系の鍵となる NFκB の発現とその活性化に重要である NFκB p6 の Ser536 部位のリン酸化を検討した。A23187 刺激下、正常好中球では NFκB p65 での活性化部位である Ser536 部位の増加傾向がみられたのに対し、X-CGD 好中球では NFκB p65 の Ser536 部位のリン酸化の有意な低下が認められた。

これらの X-CGD 好中球を用いた結果を検証するために、無細胞系で産生される H₂O₂ と NO の影響を検討した。活性酸素産生系には Xanthine-Xanthine oxidase (X-XO) 系を、NO 産生系には NO donor S-nitrosoglutathione (NO donor) 系を用いた。NO donor による NO 代謝産物の産生は X-XO 系で産生される活性酸素によって、最高濃度の 10% 程度までに抑制されたことから、活性酸素の産生が NO 代謝産物に影響を与え、活性酸素が産生できない X-CGD 好中球での NO 代謝産物の過剰生成に関与していることが明らかとされた。次に X-XO 系による活性酸素と、NO donor 系の NO の HUVEC における *NOS3* と *EDN1* mRNA への影響を検討した。*NOS3* と *EDN1* mRNA の発現は X-XO による活性酸素産生系により増加、NO donor による NO 産生系で低下し、同時産生の系では、HUVEC 単独での発現とほぼ同程度であつ

た。また、eNOS と ET-1 の蛋白発現においても活性酸素産生系と NO 産生系で、mRNA の発現と同様な変化が認められた。HUVEC の *NOS3* と *EDN1* mRNA 発現は NO donor S-nitrosoglutathione の量による、NO 濃度依存性に低下することが明らかとなった。一方、活性酸素系では HUVEC の *NOS3* と *EDN1* mRNA 発現は H_2O_2 の濃度依存性に増加することが確認された。

血管内皮細胞は、過酸化水素存在下で eNOS 発現増加を、NADPH oxidase により産生される O_2 存在下で ET-1 発現増加を示すことが報告されている。また、eNOS は活性化により、Ser1177 部位のリン酸化 (eNOS リン酸化) を示すが、NO は eNOS リン酸化を直接的に抑制し、下流の NF κ B 経路の抑制を介して ET-1 の発現低下を誘導する。

これらの結果から、HUVEC における *NOS3* と *EDN1* 発現は活性酸素と NO のバランスによって制御されていることが明らかとなり、X-CGD 好中球でみられた *NOS3* と *EDN1* mRNA 発現低下ならびに eNOS, ET1 発現低下は好中球での活性酸素産生障害に伴った NO 代謝産物の増加によるものと考えられた。これらの *in vitro* での結果が、X-CGD 患者における血管内皮機能検査における血管拡張反応に寄与していることが推測された。