

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	宇都宮 朱里
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査	教授	一戸 辰夫	印
審査委員	教授	吉栖 正生	
審査委員	教授	東 幸仁	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>X連鎖性慢性肉芽腫症（X-linked chronic granulomatous disease: X-CGD）は，食細胞の NADPH oxidase を構成する gp91^{phox}（責任遺伝子 <i>CYBB</i>）欠損により発症する。NADPH oxidase を構成する 6 分子は，定常状態では，細胞膜成分（gp91^{phox} を含む 2 分子），細胞質成分（4 分子）に分かれて存在するが，刺激をうけて活性化されると細胞膜上に集合してスーパーオキシドイオンの産生を促進させて殺菌能を発揮する。X-CGD では，NADPH oxidase 構成成分が障害されており，活性酸素の産生障害が原因となり非 H₂O₂ 産生カタラーゼ陽性菌の殺菌が障害される。一酸化窒素（nitric oxide : NO）の不活化には，スーパーオキシドイオンが必要であり，X-CGD 患者の好中球では，Ca ionophore 等の刺激下で，NO が不活化されずに高値を示す。</p> <p>X-CGD 患者は，血管内皮機能検査（flow mediated dilatation : FMD）で著明な血管拡張反応を示すことが，2009 年に報告されている。患者好中球における NO 過剰状態が原因と予測されたが，実験的な検証はなされていない。そこで，X-CGD 患者の好中球が血管内皮細胞へ及ぼす影響を調査するため，endothelial nitric oxide synthase : eNOS（責任遺伝子 <i>NOS3</i>），endothelin-1 : ET-1（責任遺伝子 <i>EDN1</i>）の発現解析を中心とした検討を実施した。</p> <p>2009 年から 2015 年にかけて，X-CGD 患者 20 名と，年齢・性別を一致させた正常健康者 20 名を研究対象とした。血管内皮培養細胞（human umbilical vein endothelial cells: HUVECs）と好中球との共培養系を樹立し，X-CGD 患者の好中球が HUVECs に及ぼす影響を real time PCR 法，Western Blotting 法で検討した。X-CGD 患者好中球と共培養した HUVECs では，eNOS, ET-1 の発現が mRNA，タンパクレベルで有意に低下していた。</p> <p>次に，X-CGD 患者好中球と HUVECs との共培養実験で得られた結果が，NO 過剰状態に起因することの検証実験を行った。フローサイトメトリーで，X-CGD 患者の好中球は，</p>			

Ca ionophore である A23187 刺激により、NO 高値を示した。好中球の単独培養後、上清中の NO 代謝産物と hydrogen peroxide : (H_2O_2) を測定したところ、X-CGD 患者由来好中球は、NO 代謝産物の増加ならびに H_2O_2 濃度の低下を示した。A23187 刺激による NO 代謝産物の増加は、xanthine-xanthine oxidase (X-XO) による H_2O_2 添加により、最大値の 10%程度までに抑制された。活性酸素は NO 代謝産物を抑制しており、X-CGD 患者の好中球は活性酸素の産生障害に起因して NO 代謝産物が高値を示していた。

続いて、無細胞系で産生される H_2O_2 , NO が、HUVECs に及ぼす影響を検討した。活性酸素産生系には X-XO を、NO 産生系には NO donor S-nitrosoglutathione (NO donor) を用いた。HUVECs における、*NOS3* と *EDN1* mRNA の発現は、NO donor の容量依存性に低下し、X-XO の容量依存性に増加した。これらの結果より、X-CGD 患者の好中球は、活性酸素の産生障害により高濃度 NO 状態にあり、上清中の NO 濃度の増加を介して、HUVECs での eNOS と ET-1 発現低下を惹起していると考えられた。

最後に、eNOS, ET-1 の発現を正に制御する NF κ B の活性化状態を検討した。HUVECs と好中球の共培養後、HUVECs における、NF κ B p65 での Ser536 部位のリン酸化を検討した。X-CGD 患者好中球では、Ser536 部位のリン酸化が有意に低下しており、eNOS, ET-1 の発現低下は、NF κ B の活性化抑制によると考えられた。

以上の研究成果から、本論文は、X-CGD 好中球との共培養で認められた HUVECs における eNOS, ET-1 の発現低下は、活性酸素産生障害に起因した NO 代謝産物の増加によるものと考えられた。本論文の成果は、gp91^{phox} の制御を介した動脈硬化の治療へ繋がる可能性が示唆され、臨床的にも意義深い。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。