（別紙様式第３号）

論　文　要　旨

論　文　題　目

Interferon-β confers on mouse macrophages a resistance to glucocorticoid suppression of inducible nitric-oxide synthase mRNA expression

（マウスマクロファージの誘導型 NO 合成酵素 mRNA 発現はインターフェロン-β によりグルココルチコイドの抑制作用に対する抵抗性を獲得する）

氏名　具志　真希子　㊞

背景と目的

生体防御反応の一つとして、マクロファージはリポ多糖（LPS）等の菌体成分に反応して誘導性一酸化窒素合成酵素（iNOS）を発現し、NOを産生する。このiNOS発現誘導はグルココルチコイドにより抑制される。私共はマクロファージ培養細胞を用いて種々の細胞状態におけるグルココルチコイドの抑制効果を検討し、高密度培養状態では抑制効果が減弱する現象（ステロイド抵抗性）を観察したので、その機構の解析と併せて報告する。

材料と方法

iNOS遺伝子発現の解析

マウスマクロファージJ774細胞を低密度（$2 \times 10^4/cm^2$）又は高密度（$2 \times 10^5/cm^2$）で培養した。これらの細胞をLPSで刺激し、細胞から抽出したRNAからcDNAを合成して、リアルタイムPCR法（TaqMan PCR法）でiNOS遺伝子の発現量を測定した。また、デキサメサゾン（Dex）存在下で刺激した細胞でのiNOS遺伝子発現抑制効果を測定し、ステロイド抵抗性を検討した。

ステロイド抵抗性因子の解析

高密度細胞をLPSで刺激した培養上清を回収して未刺激低密度細胞に添加し、細胞がステロイド抵抗性を示すか調べた。また、抵抗性を付与する候補因子としてインターフェロン-β（IFN-β）を添加して同様の検討を行った。さらに、IFN-βの下流分子であるSTAT1の活性化について、活性化STAT1に対する抗体（抗リン酸化STAT1抗体）を用いてウエスタンブロット法で解析した。

結果と考察

高密度細胞では低密度細胞と比較してLPSによるiNOS遺伝子の発現増強とDexによる抑制に対する抵抗性が見られた。低密度細胞も、高密度細胞培養上清あるいはIFN-βを添加すると、高密度細胞と同様のiNOS遺伝子発現増強とDex抵抗性を示した。さらに、高密度細胞とIFN-β添加低密度細胞では、いずれもSTAT1が強く活性化されていた。

マクロファージがLPSに反応してIFN-βを分泌すること、このIFN-βがLPSによるiNOS遺伝子発現にも関与することが報告されてい

る。しかし、IFN-βのステロイド抵抗性への関与は知られていなかった。今回、高密度細胞培養上清にステロイド抵抗性因子が含まれていたこと、IFN-βが高密度細胞培養上清と同様の作用を示したことから、ステロイド抵抗性因子の一つとして、LPS刺激細胞から分泌されたIFN-βがオートクライン的に作用している可能性が考えられた。この可能性は、高密度細胞でSTAT1の活性化が強いという結果とも矛盾しない。侵入した病原体に対する局所の免疫・炎症反応は、hypothalamic-pituitary-adrenal axisを介して血中コルチゾール濃度を上昇させる。これにより全身の過剰反応は予防されるが、局所での病原体排除反応は減弱すると考えられる。一方、今回の解析結果から、局所に高密度に集積したマクロファージがIFN-βを介するオートクライン機構によりステロイド抵抗性iNOS発現能を獲得する可能性が示唆される。局所における病原体排除を効果的に遂行するためにマクロファージが生体内でこのような自律的制御能を有するか否か、今後検討する必要がある。

(別紙様式第7号)　　平成16年11月4日

論文審査結果の要旨

(1)

報告番号	*課程博 ~~論文博~~	第　号	氏名	具志　真希子
論文審査委員	審査日	平成16年11月2日		
	主査教授	澤りかー		
	副査教授	森　直樹		
	副査教授	佐藤良也		

（論文題目）

Interferon-β confers on mouse macrophages a resistance to glucocorticoid suppression of inducible nitric-oxide synthase mRNA expression

（論文審査結果の要旨）

上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義と学術的水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。

1. 研究の背景と目的

合成グルココルチコイド（ステロイド剤）は強力な抗炎症作用や免疫抑制作用を持つため、幅広く臨床応用されている。しかし、ステロイド剤に対する感受性に乏しい、いわゆるステロイド抵抗性を示す患者が少なからず存在する。

一方、マクロファージはリポ多糖（LPS）等の菌体成分に反応して誘導性一酸化窒素合成酵素（iNOS）を発現するが、この iNOS 発現はステロイド剤により抑制される。マクロファージ培養細胞を用いて種々の細胞状態におけるステロイド剤の iNOS 発現抑制効果を検討し、高密度培養状態では効果が減弱する現象（ステロイド抵抗性）を観察したので、その機構を解析した。

備考　1　用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
　　2　要旨は800字～1200字以内にまとめること。
　　3　＊印は記入しないこと。

(別紙様式第7号)

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

2. 研究内容

マウスマクロファージ J774 細胞を低密度（2 x 10^4/cm^2）又は高密度（2 x 10^5/cm^2）で培養して LPS で刺激し、リアルタイム RT-PCR 法で iNOS 遺伝子の発現量を測定した。また、ステロイド剤デキサメサゾンの存在下で刺激した細胞での iNOS 遺伝子発現抑制効果を測定し、ステロイド抵抗性を検討した。

高密度培養細胞では、低密度培養細胞に比較して LPS 刺激による iNOS 遺伝子の発現の増強とステロイド抵抗性が認められた。また、細胞にこれらの性質を付与する液性因子が、LPS で刺激された高密度培養細胞から分泌されていることが判明した。その液性因子の候補として IFN-β を想定して低密度培養細胞に添加したところ、高密度培養細胞と同様の iNOS 遺伝子発現の増強とステロイド抵抗性が認められた。

IFN-β の下流分子である STAT1 の活性化についてウエスタンブロット法により解析したところ、高密度培養細胞では LPS 刺激による STAT1 の活性化が亢進しており、IFN-β を添加した低密度培養細胞でも同様の活性化亢進が認められた。これらの結果から、高密度培養細胞のステロイド抵抗性に IFN-β が関与する可能性が示唆された。

3. 研究結果の意義と学術水準

本研究は、培養マクロファージ細胞の解析により IFN-β が細胞にステロイド抵抗性を付与することを示したものである。個体におけるステロイド抵抗性の機序は極めて複雑であり多数の因子が関与するが、本研究は、その一端を明らかにするための解析の端緒となりうる有意義なものであり、高い水準にあると考えられる。

以上により、本論文は学位授与に十分に値すると判断した。