

## 北里 周 論文内容の要旨

### 主論文

#### Inflammatory Cytokines Promote Inducible Nitric Oxide Synthase-Mediated DNA Damage on Gallbladder Epithelial Cells of the Hamster

(ハムスター胆嚢上皮細胞を用いた炎症性サイトカインと一酸化窒素合成酵素を介した DNA 障害に関する検討)

北里 周、田島義証、黒木 保、堤 竜二、足立智彦、三島壯太、兼松隆之

World Journal of Gastroenterology, 13 卷 47 号 6379-6384. 2007 年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学 専攻  
(主任指導教員： 兼松 隆之 教授)

### 緒 言

膵胆管合流異常、肝内結石症、原発性硬化性胆管炎など、慢性炎症が胆道癌を惹起することはよく認識されている。我々は現在までの研究で、胆道再建術後に遷延性の胆管炎が生じると胆道発癌の危険性が高くなることをハムスター発癌実験で明らかにしてきた。しかしながら、その発癌機序に関しては未だ不明な点が多い。炎症組織においては誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が誘導され、これにより多量の一酸化窒素(NO)が発生し、様々な生体反応が引き起こされる。今回、コラーゲンゲル培養法により単一分離したハムスター正常胆嚢上皮分離細胞に炎症性サイトカイン刺激を加え、iNOS 発現、NO 産生、DNA 障害の観点から、炎症を背景とした胆道発癌の機序について検討を行った。

### 材料と方法

#### 実験動物

5-6 週齢雌性 Syrian golden hamster を用いた。

コラーゲンゲル培養法によりハムスター正常胆嚢上皮細胞を分離し、再浮遊させた胆嚢上皮細胞 ( $1 \times 10^5/\text{ml}$ ) をコラーゲンコートしたディッシュに散布した。

#### 実験群

Control 群：培養液のみを加え、24 時間培養

CM 群 : Cytokine mixture (IL1- $\beta$  : 0.5ng/ml、IFN- $\gamma$  : 5ng/ml、TNF- $\alpha$  : 250ng/ml) を加え、24 時間培養

L-NMMA 群 : Cytokine mixture と特異的 iNOS 阻害剤である L-NMMA (0.03mM) を加え、24 時間培養

### 検討項目

- (1) HPLC 法にて、培地内に存在する NO<sub>2</sub> および NO<sub>3</sub> の濃度を測定。
- (2) RT-PCR 法にて、NC 群と CM 群における iNOS mRNA の発現について検討。
- (3) Comet Assay 法を用いて、NO によって障害された DNA の割合を評価。

### 結果

- (1) 培地内の NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> 濃度は、Control 群が 10.35 $\pm$ 0.47 $\mu$ M、CM 群が 11.06 $\pm$ 0.18 $\mu$ M、L-NMMA 群が 10.46 $\pm$ 0.18 $\mu$ M で、Control 群に比し CM 群で有意に高値を示した (p<0.001)。また、L-NMMA 群の NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> 濃度は Control 群と同程度まで減少し、CM 群に比し有意に低値を示した (p<0.001)。
- (2) RT-PCR による検討では、CM 群において、iNOS mRNA の発現を認めた。
- (3) 傷害された DNA の割合は NC 群 2.14 $\pm$ 0.59%、CM 群 5.14 $\pm$ 0.69%、LN 群 1.70 $\pm$ 0.62% であり、CM 群は NC 群に比し有意に高値を示し (p<0.001)、LN 群は CM 群に比し有意に低値を示した (p<0.001)。

### 考察

サイトカイン刺激により、正常胆嚢上皮細胞での NO 産生は著明に増加し、この NO 産生は iNOS 阻害剤を加えることで抑制された。また、サイトカイン刺激下で胆嚢上皮細胞に iNOS mRNA の発現を認めたが、非刺激群では認めなかった。このことから、ハムスター正常胆嚢上皮細胞において、サイトカイン刺激により iNOS 発現と NO 産生が促進されることが示された。さらに comet assay 法による DNA 障害の評価では、サイトカイン刺激群で DNA 障害が有意に高度であり、この DNA 障害は iNOS 阻害剤により抑制された。これらのデータは、正常胆嚢上皮細胞においてサイトカイン刺激により iNOS を介した DNA 障害が誘導されることを示している。

以上の実験結果から、炎症を基盤とした胆道発癌過程の一つとして、iNOS 発現を介した NO 産生による DNA 障害の関与が示唆された。