

論文の内容の要旨

氏名：土屋 久

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題目：イヌの皮膚由来線維芽細胞におけるインターロイキン-1 β によるシクロオキシゲナーゼ-2
の発現調節

創傷治癒は、受傷の直後に生じる出血と凝固止血に始まり、その後の炎症反応による壊死組織・細菌等の除去、肉芽組織の形成、再上皮化、マトリックス形成と続き、組織修復の終了後は、それ以上の炎症反応や細胞増殖を抑制し定常状態に戻るといった複雑な生物学的事象である。皮膚の創傷治癒の場合、最終的な組織修復を担うのは線維芽細胞と表皮角化細胞である。

皮膚の創傷治癒は、各種インターロイキン、トランスフォーミング増殖因子 β 、上皮増殖因子、血小板由来増殖因子、血管内皮細胞増殖因子など多くのサイトカインや成長因子により調節されている。皮膚の創傷部位において、これらの因子は、白血球やマクロファージといった炎症細胞、血小板、表皮角化細胞、線維芽細胞などから分泌される。

プロスタグランジンはエイコサノイドのメンバーである。その1種であるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) は様々な通常生理機能や病態生理機能の調節に関与している。炎症では腫脹、疼痛および発赤といった典型的な徴候に至るすべての過程に PGE₂ が関わっている。

インターロイキン-1 (IL-1) は免疫反応や炎症反応に関与する強力な炎症性サイトカインである。IL-1 は PGE₂ を含む種々の生理活性物質の産生と放出を誘導することで、様々な生物学的反応を引き起こす。

本研究は、イヌの皮膚炎症メカニズムを解明することを目的とし、初代培養したイヌの皮膚由来線維芽細胞における IL-1 β 刺激による PGE₂ 産生のメカニズムを検討した。

1. IL-1 β による PGE₂ 放出とシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 発現

イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 β で 0~24 時間刺激を行い、培養液中に放出される PGE₂ 濃度を、ELISA を用いて測定したところ、6~24 時間において時間依存的に PGE₂ の放出が認められた。0~100 pM の IL-1 β で線維芽細胞を 12 時間刺激したところ、5~100 pM IL-1 β で用量依存的な PGE₂ の放出が認められた。

プロスタグランジンはアラキドン酸から律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) を触媒として産生される。COX には構成性の COX-1 と誘導性の COX-2 の 2 つのアイソフォームが知られている。そこで、IL-1 β による COX-1 および COX-2 の mRNA 発現をリアルタイム PCR にて検討した。イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 β で 0~12 時間刺激を行ったところ、1~6 時間で時間依存的に COX-2 mRNA 発現が誘導され、その後減少した。1~100 pM の IL-1 β で線維芽細胞を 3 時間刺激したところ、用量依存的な COX-2 mRNA 発現の上昇が認められた。一方、IL-1 β は COX-1 mRNA 発現に全く影響を与えなかった。

次に、IL-1 β による COX-2 タンパク質の発現を、抗 COX-2 抗体を用いたイムノブロット法により検討した。イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM の IL-1 β で 0~12 時間刺激したところ、3~9 時間で時間依存的に COX-2 タンパク質の発現が促進され、以後減少した。

以上の結果より、イヌ皮膚由来線維芽細胞においては、IL-1 β は COX-2 発現を介して PGE₂ 産生と放出

を引き起こすことが明らかとなった。

2. IL-1 β による PGE₂ 放出と COX-2 mRNA 発現における MAP キナーゼの関与

種々の細胞において IL-1 β による COX-2 発現にマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAP キナーゼ) の関与が報告されている。MAP キナーゼ経路としては主として細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) 経路, p38 MAP キナーゼ経路, c-Jun-N 末端キナーゼ (JNK) 経路の 3 種類の検討が進められている。また ERK の活性化には MAP キナーゼ-ERK キナーゼ (MEK) を介することが報告されている。そこで、本研究においては、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 β による PGE₂ 放出と COX-2 mRNA 発現における MAP キナーゼの関与を検討した。

イヌ皮膚由来線維芽細胞を MEK 阻害剤 U0126 (10 μ M), ERK 阻害剤 FR180204 (25 μ M), p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20 μ M), または JNK 阻害剤 SP600125 (10 μ M) で 1 時間前処理した後 100 pM IL-1 β で 3 時間刺激を行い、その時の COX-2 mRNA 発現をリアルタイム PCR にて検討した。その結果、IL-1 β は COX-2 mRNA 発現を誘導したが、MEK 阻害剤および ERK 阻害剤は有意に IL-1 β の効果を阻害した。p38 MAP キナーゼ阻害剤 および JNK 阻害剤は有意な効果を示さなかった。

IL-1 β 刺激は COX-2 発現を介して PGE₂ 産生と放出を惹起する。そのため、MEK 阻害剤 U0126 (10 μ M) および ERK 阻害剤 FR180204 (25 μ M) で 1 時間前処理したイヌ皮膚由来線維芽細胞を IL-1 β により 12 時間刺激を行った後、培養液中に放出される PGE₂ 濃度を ELISA にて測定したところ、IL-1 β 刺激による PGE₂ 放出は MEK 阻害剤および ERK 阻害剤により有意に阻害された。これらのことから、IL-1 β による PGE₂ 放出と COX-2 mRNA 発現には MEK/ERK 経路の活性化が関与することが考えられた。

実際に、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 β 刺激による ERK の活性化を抗リン酸化 ERK1/2 抗体を用いたイムノブロット法により検討したところ、100 pM IL-1 β 刺激後 15~30 分にリン酸化 ERK1/2 が検出され、その後減少した。この 100 pM IL-1 β 刺激による ERK1/2 のリン酸化は、MEK 阻害剤 U0126 (10 μ M) およびあるいは ERK 阻害剤 FR180204 (25 μ M) で 1 時間前処理したイヌ皮膚由来線維芽細胞においては認められなかった。

以上の結果より、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 β 刺激による COX-2 発現には MAP キナーゼ経路の MEK/ERK 経路の活性化が関わっていることが示唆された。

3. IL-1 β による PGE₂ 放出と COX-2 mRNA 発現における NF- κ B の関与

Nuclear factor κ B (NF- κ B) は炎症、細胞分化・増殖、アポトーシスなど種々の細胞機能制御に関わる転写因子の一つとして知られている。また、MAP キナーゼ経路の調節に関わることも報告されていることから、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 β による PGE₂ 放出と COX-2 mRNA 発現における NF- κ B の関与について検討した。

NF- κ B 阻害剤である BAY11-7082 (10 μ M) で 1 時間前処理をしたイヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 β で 3 時間刺激を行い、COX-2 mRNA 発現をリアルタイム PCR にて検討した。その結果、IL-1 β による COX-2 mRNA 発現は NF- κ B 阻害剤処理により有意に阻害された。

次に IL-1 β 刺激による PGE₂ 放出に対する NF- κ B 阻害剤の効果を検討した。NF- κ B 阻害剤 BAY11-7082 (10 μ M) で 1 時間前処理をしたイヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 β により 12 時間刺激を行った後、培

養液中に放出される PGE₂ 濃度を ELISA にて測定したところ、IL-1 β 刺激による PGE₂ 放出は NF- κ B 阻害剤により有意に阻害された。これらのことから、IL-1 β による PGE₂ 放出と COX-2 mRNA 発現には NF- κ B の活性化が関わるということが考えられた。

NF- κ B は p50 と p65 (RelA) サブユニットの二量体であり、不活性状態ではそれに抑制因子である I κ B が結合した複合体として細胞質に存在する。IL-1 β などの炎症性サイトカインによって刺激された細胞では、p65 サブユニットのリン酸化が起こり、I κ B はユビキチン化されプロテアソームでの分解が起こり、p65 と p50 の核への移行が起これと考えられている。そこで、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 β 刺激時の NF- κ B の活性化を、抗 I κ B α 抗体と抗リン酸化 p65 抗体を用いたイムノブロット法により検討した。その結果、100 pM IL-1 β 刺激後 15~60 分で時間依存的に I κ B α は消失し、リン酸化 p65 が検出され、その後非刺激時の状態に戻った。BAY11-7082 (10 μ M) で 1 時間前処理をしたイヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 β により 15 分刺激すると、IL-1 β による p65 のリン酸化は完全に阻害された。

以上の結果より、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 β 刺激による COX-2 発現には NF- κ B の活性化が関わっていることが示唆された。

4. NF- κ B 活性化による MAP キナーゼの活性化

IL-1 β のような炎症性サイトカイン刺激による MAP キナーゼの活性化は、NF- κ B の活性化を介して、細胞機能に関与することが考えられている。そのため、IL-1 β 刺激によるイヌ皮膚由来線維芽細胞における MAP キナーゼと NF- κ B の活性化の相互作用について検討を行った。

MEK 阻害剤 U0126 (10 μ M) および ERK 阻害剤 FR180204 (25 μ M) で 1 時間前処理したイヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 β で 15 分刺激をした後、抗リン酸化 p65 抗体を用いたイムノブロット法により p65 のリン酸化を指標に NF- κ B の活性化を検討した。しかし、MEK 阻害剤も ERK 阻害剤も IL-1 β 刺激で認められた p65 のリン酸化にまったく効果を示さなかった。そこで、次に NF- κ B 阻害剤 BAY11-7082 (10 μ M) で 1 時間前処理をしたイヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 β により刺激し、抗リン酸化 ERK1/2 抗体を用いたイムノブロット法により ERK1/2 のリン酸化を検討したところ、NF- κ B 阻害剤により ERK1/2 のリン酸化は完全に抑制された。このことは、一般的に考えられている MAP キナーゼの活性化が NF- κ B の活性化調節に関わることと異なっていた。そこで、次にイヌ特異的 I κ B α siRNA をイヌ皮膚由来線維芽細胞に導入し、I κ B α のノックダウンを行った時の p65 のリン酸化と ERK1/2 のリン酸化についてイムノブロット法により検討した。その結果、I κ B α をノックダウンした細胞においては p65 のリン酸化と ERK1/2 のリン酸化が認められた。一方、スクランブル配列の RNA を導入した細胞では、p65 と ERK には変化がなかった。これらの結果は、NF- κ B の活性化により ERK1/2 が活性化されることを強く示唆するものである。

近年、NF- κ B のサブユニットである p65 が様々なタンパク質と結合し、転写調節を介さずに機能する可能性が報告されている。上記の結果から、イヌ皮膚由来線維芽細胞においても、p65 が直接的または間接的に ERK1/2 の調節因子として機能することが考えられる。

結論

本研究においては、イヌ皮膚由来線維芽細胞において炎症性サイトカインの一つである IL-1 β が、COX-

2 の発現を介して PGE_2 の産生と放出を促すことを明らかにした。また、その COX-2 発現には MAP キナーゼ経路の一つである MEK/ERK 経路の活性化が必要であることを明らかにした。さらに、MEK/ERK 経路の活性化には、従来はその下流で転写調節に関わると考えられている NF- κ B が MEK/ERK 経路の調節因子としての役割を担うことを明らかにした。

本研究は、イヌの皮膚炎症発症のメカニズムの一端を明らかにしたものであり、皮膚の抗炎症治療法や治療薬の開発に役立つものと考えられる。