

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主査） 教授 杉 谷 博 士

（副査） 教授 中 山 智 宏

教授 森 友 忠 昭

プロスタグランジンはエイコサノイドのメンバーであり、その1種であるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) は様々な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り、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。

本論文は、イヌの皮膚炎症機序の解明を目的とし、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ものである。

イヌ皮膚由来線維芽細胞を IL-1 β で刺激を行うと、時間依存的に、また IL-1 β の用量依存的に培養液中への PGE₂ の放出が認められた。IL-1 β で刺激した細胞においては、プロスタグランジン合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) の誘導型 COX-2 の mRNA 発現が、時間依存的および IL-1 β の用量依存的に促進され、さらに COX-2 タンパク質発現も促進されたことから、イヌ皮膚由来線維芽細胞において IL-1 β は COX-2 発現を介する PGE₂ 産生と放出が示唆された。

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ことから、イヌ皮膚由来線維芽細胞の IL-1 β 誘導性の COX-2 mRNA 発現への MAP キナーゼの関与を、阻害剤を用いて検討した。細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) 経路、p38 MAP キナーゼ経路および c-Jun-N 末端キナーゼ (JNK) 経路が主たる MAP キナーゼ経路であるが、ERK 阻害剤は有意に IL-1 β の効果を阻害したが、p38 MAP キナーゼおよび JNK 阻害剤は有意な効果を示さなかった。また ERK の活性化に関与する MAP キナーゼ-ERK キナーゼ (MEK) 阻害剤も IL-1 β 誘導性の COX-2 mRNA 発現を阻害した。ERK および MEK 阻害剤処理した細胞においては、IL-1 β 誘導性の PGE₂ 放出も阻害された。これらのことから、IL-1 β による COX-2 mRNA 発現と PGE₂ 放出には MEK/ERK 経路の活性化が関わるということが考えられたので、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 β 刺激による ERK の活性化をリン酸化を指標に測定したところ、ERK のリン酸化が認められ、さらに、MEK および ERK 阻害剤はそれを阻害した。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。

次に、転写因子として知られている Nuclear factor κ B (NF- κ B) が炎症に関わることが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 の関与について阻害剤を用いて検討したところ、NF- κ B 阻害剤で前処理をした細胞においては、IL-1 β 誘導性の COX-2 mRNA 発現と PGE₂ 放出は阻害された。NF- κ B の構成サブユニットの一つである p65 のリン酸化と、不活性状態では NF- κ B に結合している抑制因子 I κ B の分解を指標に NF- κ B の活性化を検討したところ、IL-1 β 刺激時にイヌ皮膚由来線維芽細胞における NF- κ B の活性化が認められ、NF- κ B 阻害剤処理により活性化が阻害された。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 の活性化が関わることを示唆された。

続いて、MAP キナーゼの活性化と NF- κ B の活性化の関連を検討したところ、MEK および ERK 阻害剤は IL-1 β 誘導性の p65 のリン酸化にはまったく効果を示さなかった。一方、NF- κ B 阻害剤で前処理をしたイヌ皮膚由来線維芽細胞においては、IL-1 β 刺激による ERK のリン酸化は完全に抑制された。そこで、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うと、I κ B α ノックダウン細胞においては p65 のリン酸化と ERK のリン酸化が認められ、NF- κ B の活性化により ERK が活性化されることが強く示唆された。

以上の結果より、イヌ皮膚由来線維芽細胞において炎症性サイトカイン IL-1 β が、COX-2 の発現を介して PGE₂ の産生と放出を促すこと、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、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 が調節因子として機能することを明らかにした。

本論文は、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、皮膚の炎症治療法や治療薬の開発に役立つものと考えられる。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上