

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 $\beta$  による  
シクロオキシゲナーゼ-2 の発現調節

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

博士課程

土屋 久

2015

## 目次

第 1 章 序論	1
第 2 章 IL-1 $\beta$ による PGE <sub>2</sub> 放出とシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 発現	4
2.1 緒言	5
2.2 材料および方法	6
2.2.1 材料	6
2.2.2 細胞培養	6
2.2.3 Real-time RT-PCR	7
2.2.4 Western blotting	7
2.2.5 PGE <sub>2</sub> 測定	8
2.2.6 統計学的分析	8
2.3 結果	9
2.4 考察	10
第 3 章 IL-1 $\beta$ による PGE <sub>2</sub> 放出と COX-2 mRNA 発現における MAP キナーゼの関与	16
3.1 緒言	17
3.2 材料および方法	18
3.2.1 材料	18
3.2.2 細胞培養	18
3.2.3 Real-time RT-PCR	19
3.2.4 Western blotting	19
3.2.5 PGE <sub>2</sub> 測定	20

3.2.6 統計学的分析	20
2.3 結果	21
2.4 考察	23
第4章 IL-1 $\beta$ による PGE <sub>2</sub> 放出と COX-2 mRNA 発現における NF- $\kappa$ B の関与	29
4.1 緒言	30
4.2 材料および方法	31
4.2.1 材料	31
4.2.2 細胞培養	31
4.2.3 Real-time RT-PCR	32
4.2.4 Western blotting	32
4.2.5 PGE <sub>2</sub> 測定	33
4.2.6 統計学的分析	33
4.3 結果	34
4.4 考察	35
第5章 NF- $\kappa$ B 活性化による MAP キナーゼの活性化	40
5.1 緒言	41
5.2 材料および方法	42
5.2.1 材料	42
5.2.2 細胞培養	42
5.2.3 Western blotting	43
5.2.4 siRNA の細胞導入	43
5.3 結果	44

5.4 考察	45
第 6 章 総括	50
謝辞	54
引用文献	55

# 第 1 章

## 序論

創傷治癒は炎症，肉芽形成，再上皮化，マトリックス形成，リモデリングなどを含む複合的な生体反応である（Martin, 1997; Werner and Grose, 2003）。皮膚における創傷治癒においても，インターロイキンを含むサイトカインや上皮成長因子，血小板誘導由来成長因子，血管内皮細胞増殖因子など様々な成長因子により調節がなされている（Werner and Grose, 2003）。創傷治癒課程において，線維芽細胞は細胞外マトリックス産生や結合組織形成に関わることで，また，種々のサイトカインや生理活性物質に反応し活性化するなど，重要な役割を担うと考えられている（Heughan and Hunt, 1975; Gabbiani, 2003）。

げっ歯類での皮膚の創傷治癒において，シクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）が大きな役割を担うことが報告されていた（Futagami et al., 2002; Lauderkind et al., 2002）が，その後イヌにおいても報告がなされた（Hamamoto et al., 2009）。COX-2は炎症性サイトカイン等により誘導され，アラキドン酸からプロスタグランジンを産生する酵素である（Smith et al., 2000; Simmons et al., 2004; Dey et al., 2006; Park et al., 2006）。産生されたプロスタグランジンは様々な生理的および病態生理的な生体反応に関わっている。特にプロスタグランジン E<sub>2</sub>（PGE<sub>2</sub>）は炎症反応に関わることから，創傷治癒課程においても重要と考えられる。

獣医療においても皮膚の創傷治癒は重要であるが，そのメカニズムについての検討は多くなされているとはいえない。そこで，本研究は，イヌ皮膚由来線維芽細胞を培養し，炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン-1 $\beta$ （IL-1 $\beta$ ）による PGE<sub>2</sub> 産生のメカニズムを明らかにすることを目的として次の検討を行った。

第2章ではイヌ皮膚由来線維芽細胞における PGE<sub>2</sub> 放出および COX-2 mRNA およびタンパク質発現に対する IL-1 $\beta$  の時間依存性および用量依存性効果を検討し，放出される PGE<sub>2</sub> が COX-2 発現によることを検討した。

第3章では、種々の細胞で IL-1 $\beta$  刺激によりマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAP キナーゼ) 経路が活性化されることが報告されている (Guan et al., 1998; LaPointe and Isenovic, 1999; Fan et al., 2001; Thomas et al., 2002; Yang et al., 2002; Jiang et al., 2004; Wang et al., 2010) ことから、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 発現に対する MAP キナーゼ経路について検討した。MAP キナーゼ経路には、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種類が知られている (Kyriakis and Avruch, 2001; Kaminska, 2005)。また, ERK の上流には MAP キナーゼ-ERK キナーゼ (MEK) が存在し ERK の活性調節を行うことが知られている (Kyriakis and Avruch, 2001; Kaminska, 2005)。そこで, この MEK/ERK 経路, p38 MAP キナーゼ経路および JNK 経路について検討した。

第4章では, IL-1 $\beta$  刺激において炎症などの細胞制御に関わるとされる転写調節因子 Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の活性化が報告されている (Bird et al., 1997; Vermeulen et al., 2002; Viatour et al., 2005; Lawrence, 2009; Hayden and Ghosh, 2012) ことから, イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  による PGE<sub>2</sub> 放出に関わる COX-2 発現への NF- $\kappa$ B の関与を検討した。

第5章では, IL-1 $\beta$  刺激などにより MAP キナーゼの活性化が NF- $\kappa$ B の活性化を介して COX-2 のようなタンパク質発現に関わることが報告されている (Tak and Firestein, 2001; Yang et al., 2002; Kishore et al., 2003; Jiang et al., 2004; Fan et al., 2006; Arai et al., 2011) ことから, イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  による MAP キナーゼの活性化と NF- $\kappa$ B の活性化の相互作用について検討した。

## 第 2 章

### IL-1 $\beta$ による PGE<sub>2</sub> 放出とシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)

#### 発現



## 2.1 緒言

プロスタノイドは、通常は細胞内に貯蔵されておらず、必要に応じて合成、放出され、局所で作用を発揮する重要なオートコイドである。プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) はプロスタノイドの 1 種であり、様々な生理的、病態生理的機能に関わっている (Park et al., 2006; Wang et al., 2007)。炎症反応にも関わっており、発赤、腫脹、疼痛といった炎症の兆候は、PGE<sub>2</sub> が原因となっている (Funk, 2001; Harris et al., 2002)。

細胞が生理的、病理的な様々な刺激を受けると、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> により生体膜リン脂質からアラキドン酸が遊離される。PGE<sub>2</sub> を含むプロスタグランジンはこのアラキドン酸を基質として産生されるが、その反応を触媒する酵素がシクロオキシゲナーゼ (COX) である。COX には、COX-1、COX-2 および COX-3 の 3 種類のアイソフォームが存在する。細胞が刺激を受け、急速なプロスタグランジン産生は構成性の COX-1 によるものである。COX-2 はサイトカインや増殖因子により誘導される酵素であり、炎症調節にも関わっている。COX-3 は COX-1 のスプライシングバリエーションであり、主として脳や心臓に発現が認められる (Smith et al., 2000; Harris et al., 2002; Simmons et al., 2004; Park et al., 2006; Wang et al., 2007)。

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 PGE<sub>2</sub> 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 (Lawrence, 2009; Hayden and Ghosh, 2012)。

第 1 章では、イヌの皮膚由来培養細胞における IL-1 $\beta$  による PGE<sub>2</sub> 放出と COX-2 発現について検討した。

## 2.2 材料および方法

### 2.2.1 材料

TRIzol は、Life Technologies 株式会社 (Carlsbad, CA) から購入した。PrimeScript RT Master Mix, SYBRPremix Ex Taq II, Thermal Cycler Dice Real Time System II と TP900 Dice Real v 4.02B は Takara-Bio 株式会社 (滋賀, 日本) から入手した。抗 COX-2 rabbit monoclonal 抗体は、Abcam 社 (Cambridge, UK) から購入した。Horseradish peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) 抗 rabbit IgG 抗体, ECL Western Blotting Analysis System, ImageQuant LAS4000 mini は、GE Healthcare 社 (Piscataway, NJ) から購入した。Mini-PROTEAN TGX gel および polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は Bio-Rad 社 (Hercules, CA) から入手した。Complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail と Block Ace は Roche 社 (Mannheim, Germany) から購入した。Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), sodium fluoride および 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) は、和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) から購入した。PGE<sub>2</sub> 酵素免疫測定 (ELISA) kit は Cayman chemical 社 (ANN Arbor, MI) から購入した。StatMate IV は ATMS (東京, 日本) から購入した。

### 2.2.2 細胞培養

本研究は、日本大学動物管理使用委員会 (AP13B051) によって承認されたものである。イヌ皮膚由来線維芽細胞は Bratka-Robia ら (2002) の方法を基にして調整した。3 頭の臨床的に健康なビーグル犬 (オス, 3 歳) を使用し, 10  $\mu$ g/ml の adrenaline および 1% lidocaine で麻酔した後, イヌの背部皮膚を採材した。酒石酸ブトルファノール (0.2 mg/kg) を治療後に痛みの軽減のために静脈内投与し

た。イヌの真皮を収集し、3 mm<sup>2</sup> に切断した後、90 mm の培養皿に付着させ、10% 牛胎児血清 (FCS) を含む  $\alpha$ -MEM 培地を使用し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で、37°C の温度下で静置培養した。培地交換は週に一度行った。イヌの皮膚由来線維芽細胞は伸長細胞として得られた。細胞が約 90%コンフルエンスに達した後に 0.25% trypsin-EDTA を用いて回収した。回収した細胞を、75 cm<sup>2</sup> の培養フラスコに  $1 \times 10^6$  細胞の密度で播種し実験に使用した。

### 2.2.3 Real-time RT-PCR

TRIzol 試薬を用いて、イヌ皮膚由来線維芽細胞から Total RNA を抽出した。PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix を用いて、500 ng の total RNA から cDNA を合成した。Real-time RT-PCR は 2  $\mu$ l の cDNA, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II およびイヌ COX-1, -2 および TATA ボックス結合タンパク質 (TBP) に特異的なプライマーを用いて行った (表 2-1)。2  $\mu$ l の RNase および DNase free water を no template control として用い、2  $\mu$ l の RNA サンプルを no-reverse transcription control として用いた。PCR 反応は、Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System II を用いて、以下の条件で行った; 初期変性を 95°C, 30 分  $\times$ 1 回, 次いで変性を 95°C, 5 秒, アニーリングと伸長を 60°C, 30 秒 $\times$ 40 回。プライマーの特異性は融解解離曲線分析と PCR 産物のダイレクトシーケンスを行なって確認した。データの解析は TP900 DiceRealTime v4.02B を用いて、second derivative method と comparative cycle threshold ( $\Delta\Delta$ Ct) 法を適用した。校正標準として使用した cDNA の同じ量の TBP の増幅は、内在性コントロール、およびイヌの皮膚線維芽細胞 (time: 0) からの cDNA の増幅を用いた。

### 2.2.4 Western blotting

サンプルバッファー（100 mM HEPES; pH 7.4, 1 mM PMSF および complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail）を用いてタンパク質を回収した。タンパク質濃度を Bradford 法（Bradford, 1976）にて定量し，dithiothreitol（DTT）添加 sodium dodecyl sulfate（SDS）バッファーで 95°C，5 分間インキュベートした。サンプルを 10 µg ずつ 7.5% Mini-PROTEAN TGX gel に添加し電気泳動を行った。分離したサンプルは PVDF 膜へ転写し，Block Ace にて 50 分間，室温でブロッキングを行った。その後，膜を一次抗体の抗 COX-2 抗体（1 : 1000）を用いて，室温で 120 分間インキュベートした。洗浄後，膜を，HRP-conjugated anti-Rabbit IgG（1 : 10000）を用いて，室温で 90 分間インキュベートした。免疫反応は，ECL Western Blotting Analysis System を用いて検出した。膜の化学発光シグナルは ImageQuant LAS 4000 mini を用いて測定した。

#### 2.2.5 PGE<sub>2</sub> 測定

イヌ皮膚由来線維芽細胞は，6-well 培養プレートに  $3.0 \times 10^5$  cells/well の密度で播種した。細胞を 24 時間 1% FCS を含む  $\alpha$ -MEM 培地で培養後，IL-1 $\beta$  で処理し，培養上清を回収した。培養上清中の PGE<sub>2</sub> の濃度を，ELISA kit を用いて測定した。

#### 2.2.6 統計学的分析

実験データは平均  $\pm$  標準誤差として算出した。統計分析は StatMate IV を用いて実施した。データを，双方向の分散分析を用いて分析し，他の実験からのデータは，一元配置分散分析を用いて分析した。

## 2.3 結果

イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  で 0~24 時間刺激を行い、培養液中に放出される PGE<sub>2</sub> 濃度を、ELISA を用いて測定したところ、6~12 時間において急激な放出増加が認められ、その後 24 時間においてゆっくりとした時間依存的な PGE<sub>2</sub> の放出が認められた (図 2-1A)。0~100 pM の IL-1 $\beta$  で線維芽細胞を 12 時間刺激したところ、5~100 pM IL-1 $\beta$  で用量依存的な PGE<sub>2</sub> の放出が認められた (図 2-1B)。

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 $\beta$  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 $\beta$  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 (図 2-2A)。1~100 pM の IL-1 $\beta$  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 (図 2-2B)。一方、結果には示さないが、IL-1 $\beta$  は COX-1 mRNA 発現に全く影響を与えなかった。

次に、IL-1 $\beta$  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 $\beta$  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 (図 2-3)。

## 2.4 考察

第2章ではイヌ皮膚由来線維芽細胞における炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  による PGE<sub>2</sub> 産生と、プロスタグランジン産生に関わる COX との関連を検討した。

PGE<sub>2</sub> はアラキドン酸を基質として産生され、細胞内に留まることがないことから、産生後すぐに放出される (Park et al., 2006; Wang et al., 2007)。このことから PGE<sub>2</sub> 放出を PGE<sub>2</sub> 産生とみなすことが可能である PGE<sub>2</sub> は IL-1 $\beta$  刺激後 6 時間から 12 時間で急激な放出が認められたことから、この間に PGE<sub>2</sub> 産生が促進されたことが考えられた。

PGE<sub>2</sub> 産生には構成性の COX-1 の活性化および炎症時に誘導される COX-2 が関わることが知られている (Smith, 1989; Funk, 2001; Harris et al., 2002; Park et al., 2006; Wang et al., 2007)。COX-1 および COX-2 の mRNA 発現について検討を行ったところ、IL-1 $\beta$  刺激後 1~6 時間で急激な COX-2 mRNA 発現が促進され、その後減少したことから、COX-2 の発現が PGE<sub>2</sub> 産生に関与することが示唆された。また、PGE<sub>2</sub> 放出を促進する IL-1 $\beta$  の濃度は COX-2 mRNA 発現を用量依存的に促進することから、PGE<sub>2</sub> 産生は COX-2 の誘導によると考えられた。一方、構成性の COX-1 の mRNA 発現は IL-1 $\beta$  によっては全く促進がされなかった。このことから、誘導性の COX-2 発現が PGE<sub>2</sub> 産生に関わることが強く示唆された。

さらに、COX-2 発現と PGE<sub>2</sub> 産生の関連を明らかにするため COX-2 タンパク質の発現についても検討したところ、IL-1 $\beta$  刺激後 3 時間から増加し、9 時間でピークに到達し、その後減少した。このことは、IL-1 $\beta$  刺激が COX-2 mRNA 発現を介した COX-2 タンパク質発現を介し、PGE<sub>2</sub> 産生を惹起したことを示している。

以上の結果より，イヌ皮膚由来線維芽細胞において，IL-1 $\beta$  は COX-2 発現を介して PGE<sub>2</sub> 産生を引き起こすことが明らかとなった。

表 2-1. プライマーの配列

Gene	Gene bank ID	Primer sequences	Size (bps)
<i>COX-2</i>	NM_001003354.1	F: 5'-TGTGTCTCATTAACCTGCATGTACC-3'	115
		F: 5'-CAGTGATATTTGCACCTGTGTCCTC-3'	
<i>COX-1</i>	NM_001003023.2	F: 5'-ACGTGGCTGTGGAAACCATC-3'	164
		R: 5'-GGCATCAATGTCTCCATACAGCTC-3'	
<i>TBP</i>	XM_863452	F: 5'-ACTGTTGGTGGGTCAGCACAAG-3'	124
		R: 5'-ATGGTGTGTACGGGAGCCAAG-3'	



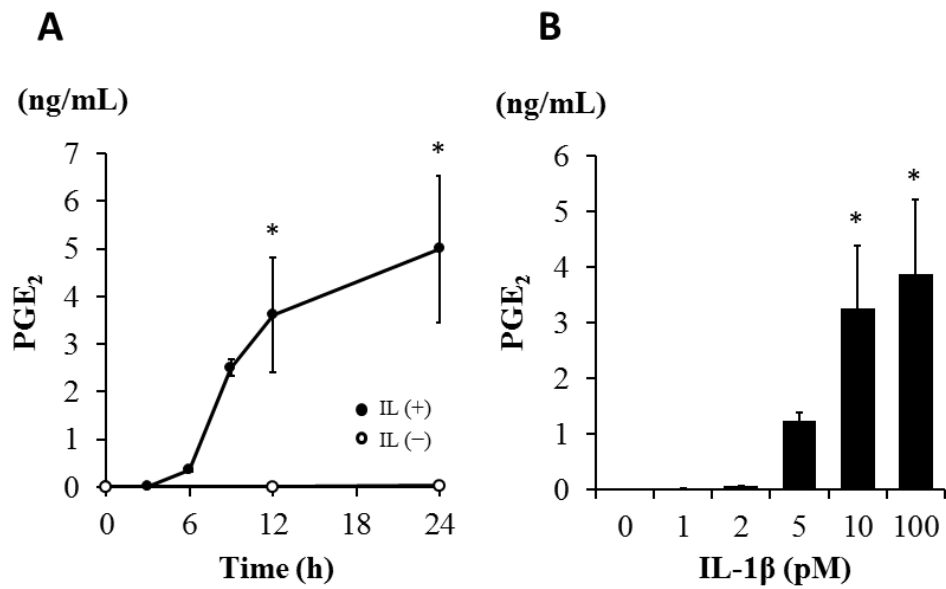


図 2-1. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  による PGE<sub>2</sub> の放出。(A) イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  存在下または非存在下で 0~24 時間インキュベートした後、メジウム中に放出された PGE<sub>2</sub> を ELISA にて測定した。(B) イヌ皮膚由来線維芽細胞を 0~100 pM IL-1 $\beta$  存在下で 3 時間インキュベートした後、メジウム中に放出された PGE<sub>2</sub> を ELISA にて測定した。値は 3 例の平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。\* $P < 0.05$

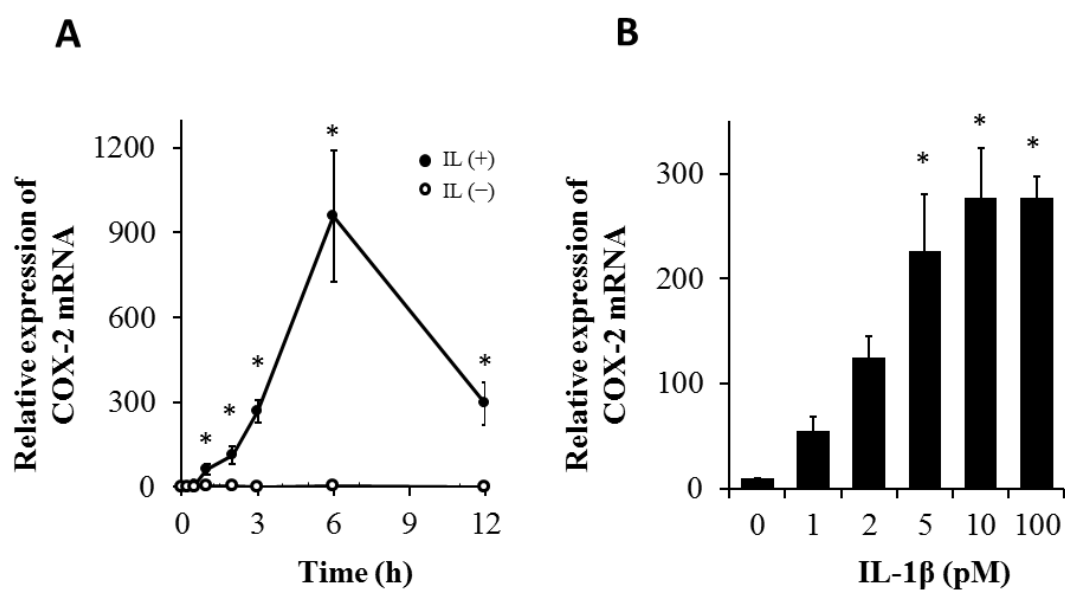


図2-2. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  による COX-2 mRNA 発現。(A) イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  存在下または非存在下で 0~24 時間インキュベートした後、COX-2 mRNA 発現の変化をリアルタイム PCR にて検討した。(B) イヌ皮膚由来線維芽細胞を 0~100 pM IL-1 $\beta$  存在下で 3 時間インキュベートした後、COX-2 mRNA 発現の変化をリアルタイム PCR にて検討した。値は 3 例の平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。\* $P < 0.05$

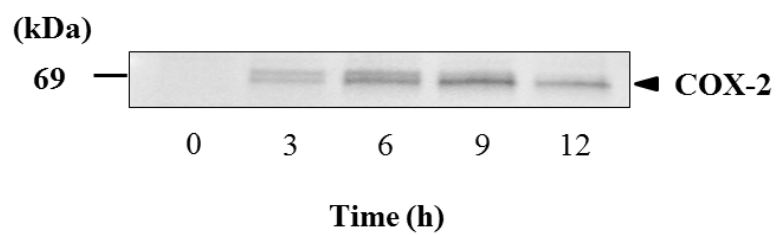


図2-3. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  による COX-2 タンパク質発現。  
イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  存在下または非存在下で 0~24 時間インキュベートした後, COX-2 タンパク質発現の変化をウェスタンブロット法にて検討した。

## 第 3 章

### IL-1 $\beta$ による PGE<sub>2</sub> 放出と COX-2 mRNA 発現における MAP キナーゼの関与

### 3.1 緒言

炎症に関与する細胞内シグナル伝達としてマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAP キナーゼ) の関与が知られている (Kyriakis and Avruch, 2001; Kaminska, 2005)。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おり, さらに, ERK の活性化には MAP キナーゼ-ERK キナーゼ (MEK) を介すると考えられている (Kyriakis and Avruch, 2001; Kaminska, 2005)。

種々の細胞において, IL-1 $\beta$  による COX-2 発現に MAP キナーゼが関与することが報告されている。ラット腎のメサングウム細胞や心筋単核細胞においては, JNK と p38MAP キナーゼの両経路を介し IL-1 $\beta$  は COX-2 発現を引き起こす (Guan et al., 1998; LaPointe and Isenovic, 1999)。ラット血管平滑筋細胞においては, ERK1/2 の活性化が IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 発現に関与する (Jiang et al., 2004)。さらに, ヒト胃がん細胞や軟骨細胞においては, ERK1/2 および p 38 MAP キナーゼの活性化が IL-1 $\beta$  による COX-2 発現に必要である (Fan et al., 2001; Thomas et al., 2002; Wang et al., 2010)。イヌにおいても, 気管平滑筋の IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 発現は ERK1/2 および p38 MAP キナーゼを介していることが報告されている (Yang et al., 2002)。

そこで, 第 2 章では, イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  による PGE<sub>2</sub> 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。

## 3.2 材料および方法

### 3.2.1 材料

TRIzol は Life Technologies 株式会社 (Carlsbad, CA) から購入した。PrimeScript RT Master Mix, SYBRPremix Ex Taq II, Thermal Cycler Dice Real Time System II と TP900 Dice Real v 4.02B は Takara-Bio 株式会社 (滋賀, 日本) から入手した。リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) および total ERK1/2 (t-ERK1/2) に対する rabbit monoclonal 抗体および MEK 阻害剤 U0126 は Cell Signaling Technology Japan 株式会社 (東京, 日本) から購入した。Horseradish peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) anti-rabbit IgG 抗体, ECL Western Blotting Analysis System, ImageQuant LAS4000 mini は, GE Healthcare 社 (Piscataway, NJ) から購入した。Mini-PROTEAN TGX gel および polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は Bio-Rad 社 (Hercules, CA) から入手した。Complete mini EDTA-free protease inhibitor Complex は Roche 社 (Mannheim, Germany) から購入した。Block Ace は DS Pharma Biomedical (大阪, 日本) から購入した。PGE<sub>2</sub> 酵素免疫測定 kit は Cayman chemical 社 (ANN Arbor, MI) から購入した。StatMate IV は ATMS (東京, 日本) から購入した。ERK 阻害剤 FR180204 および p38 阻害剤 SB239063 は Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO) から, また, JNK 阻害剤 SP600125 は和光純薬 (大阪, 日本) より購入した。

### 3.2.2 細胞培養

第 2 章で示したように, イヌ皮膚由来線維芽細胞は, Bratka-Robia ら (2002) の方法を基にして調整し, 10%牛胎児血清 (FCS) を含む  $\alpha$ -MEM 培地を使用し, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で, 37°C の温度下で静的培養した。培地交換は週

に一度行った。細胞が約 90%コンフルエンスに達した後に 0.25% trypsin-EDTA を用いて回収した。回収した細胞を、75 cm<sup>2</sup> の培養フラスコに 1×10<sup>6</sup> 細胞の密度で播種し実験に使用した。

### 3.2.3 Real-time RT-PCR

TRIzol 試薬を用いてイヌ皮膚由来線維芽細胞から Total RNA を抽出した。PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix を用いて、500 ng の total RNA から cDNA を合成した。Real-time RT-PCR は 2 µl の cDNA, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II, イヌ COX-2 および TATA ボックス結合タンパク質 (TBP) に特異的なプライマーを用いて、第 2 章と同様に行った (表 2-1)。2 µl の RNase および DNase free water を no template control として用い、2 µl の RNA サンプルを no-reverse transcription control として用いた。PCR 反応は、Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System II を用いて、次の条件で行った。すなわち、初期変性を 95°C, 30 分 ×1 回、次いで変性を 95°C, 5 秒、アニーリングと伸長を 60°C, 30 秒×40 回。プライマーの特異性は融解解離曲線分析と PCR 産物のダイレクトシーケンスを行なって確認した。データの解析は TP900 DiceRealTime v4.02B を用いて、second derivative method と comparative cycle threshold (ΔΔCt) 法を適用した。校正標準として使用した cDNA の同じ量の TBP の増幅は、内在性コントロール、およびイヌの皮膚線維芽細胞 (time:0) からの cDNA の増幅を用いた。

### 3.2.4 Western blotting

1 mM PMSF および complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail を含む 100 mM HEPES バッファー (pH 7.4) を用いてタンパク質を回収した。タンパク質濃度を Bradford 法 (Bradford, 1976) にて定量し、DTT 添加 SDS バッファー

で 95°C , 5 分間インキュベートした。サンプルを 10 µg ずつ 12% Mini-PROTEAN TGX gel に添加し電気泳動を行った。分画したタンパク質は PVDF 膜へ転写し, Block Ace にて 50 分間, 室温でブロッキングを行った。その後, 一次抗体 [p-ERK 1/2 (1:1000), t-ERK1/2 (1:1000) ]と室温で 120 分間反応させた。洗浄後, PVDF 膜を, HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1 : 10000) を用いて, 室温で 90 分間反応させた。免疫反応は, ECL Western blotting Analysis System を用いて検出した。膜の化学発光シグナルは ImageQuant LAS 4000 mini を用いて測定した。

### 3.2.5 PGE<sub>2</sub> 測定

イヌ皮膚由来線維芽細胞は, 6-well 培養プレートに  $3.0 \times 10^5$  cells/well の密度で播種した。細胞を 24 時間 1% FCS を含む  $\alpha$ -MEM 培地で培養後, IL-1 $\beta$  で処理し, 培養上清を回収した。培養上清中の PGE<sub>2</sub> の濃度を, 市販の ELISA kit を用いて測定した。

### 3.2.6 統計学的分析

実験データは平均 $\pm$ 標準誤差として算出した。統計分析は StatMate IV を用いて実施した。データを, 双方向の分散分析を用いて分析し, 他の実験からのデータは, 一元配置分散分析を用いて分析した。



### 3.3 結果

IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現に対する各種 MAP キナーゼ阻害剤の効果より MAP キナーゼ経路の関与を検討した。イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  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 にて測定すると、有意な発現の促進が認められた。しかし、MEK 阻害剤 U0126 (10  $\mu$ M) あるいは ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) を用いて細胞を 1 時間処理した後、IL-1 $\beta$  刺激を行うと、IL-1 $\beta$  による COX-2 mRNA 発現は抑制された (図 3-1)。一方、p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M) または JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) で処理した細胞においては、IL-1 $\beta$  の効果は阻害されなかった (図 3-1)。

第 1 章で示されたように、IL-1 $\beta$  刺激は COX-2 発現を介して PGE<sub>2</sub> 産生と放出を惹起する。そこで、MEK 阻害剤 U0126 (10  $\mu$ M) および ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) で 1 時間前処理したイヌ皮膚由来線維芽細胞を IL-1 $\beta$  により 12 時間刺激を行った後、培養液中に放出される PGE<sub>2</sub> 濃度を ELISA にて測定した。図 3-2 に示すように、IL-1 $\beta$  刺激による PGE<sub>2</sub> 放出は MEK 阻害剤および ERK 阻害剤前処理により有意に阻害された。これらのことから、IL-1 $\beta$  による PGE<sub>2</sub> 放出と COX-2 mRNA 発現には MEK/ERK 経路の活性化が関わることが考えられた。

次にイヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  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。図 3-3 に示すように、100 pM IL-1 $\beta$  刺激後 15~30 分にリン酸化 ERK1/2 が促進され、その後対照レベルに戻った。さらに、この IL-1 $\beta$  誘導性の ERK1/2 のリン酸化に対する阻害剤の効果を確認した。100 pM IL-1 $\beta$  で 30 分間刺激による ERK1/2 のリン酸化が促進されたが、MEK 阻害剤 U0126 (10  $\mu$ M) あるいは ERK 阻害剤 FR180204 (25

μM) 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, IL-1β の効果は認められなかった (図 3-4)。

### 3.4 考察

本章では、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現を介した PGE<sub>2</sub> 産生に対する MAP キナーゼ経路の関与を、MAP キナーゼ阻害剤を用いて検討した。その結果、MEK および ERK 経路の阻害剤が IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現および PGE<sub>2</sub> 放出を抑制したことから、MEK および ERK 経路の関与が示唆された。実際に IL-1 $\beta$  刺激後の早い時期に ERK1/2 のリン酸化が引き起こされること、さらにそのリン酸化が MEK および ERK 阻害剤で抑制されたことから、IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 発現には MEK および ERK 経路が関わっていることが強く示唆された。ERK の活性化には MEK によるリン酸化が考えられている (Kyriakis and Avruch, 2001; Kaminska, 2005; Zassadowski et al., 2012) ことから、MEK/ERK 経路が COX-2 発現に関与すると考えられる。

前述のごとく、種々の細胞において、IL-1 $\beta$  による COX-2 発現に MAP キナーゼが関与することが報告されている (Guan et al., 1998; LaPointe and Isenovic, 1999; Fan et al., 2001; Thomas et al., 2002; Wang et al., 2010)。イヌにおいては、気管平滑筋の IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 発現は ERK1/2 および p38 MAP キナーゼを介していることが報告されている (Yang et al., 2002)。しかし、本研究で示されたように、イヌの皮膚由来線維芽細胞においては p38 MAP キナーゼの関与は低いものと考えられる。また、皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 に関与する MAP キナーゼ経路としては、ヒトの場合は p38 MAP キナーゼの活性化が必要とされている (Yoshida et al., 2006)。これらの結果は、IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 発現に関与する MAP キナーゼは一様でなく、動物種による差や臓器による差が大きいものと考えられる。以上の結果より、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  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。

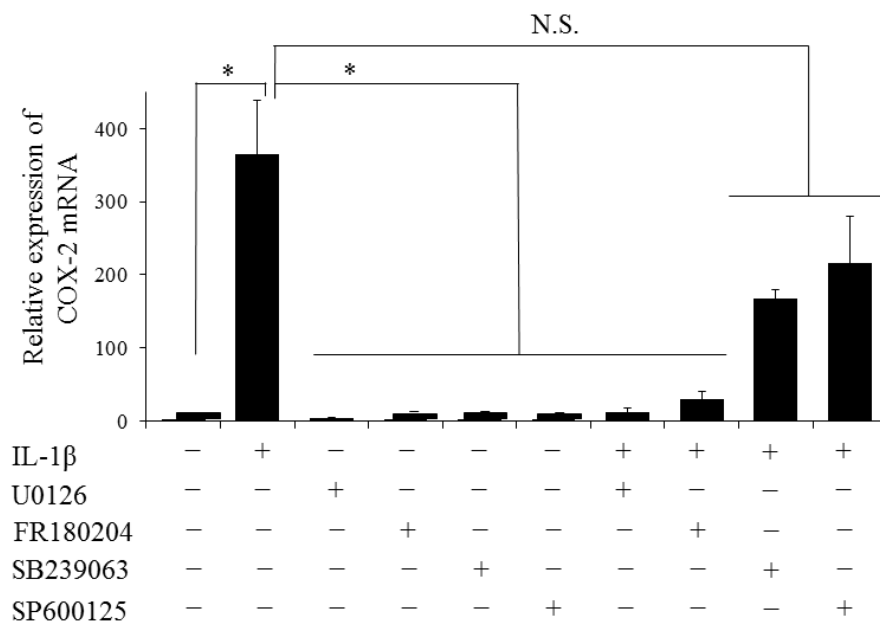


図 3-1. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果。イヌ皮膚由来線維芽細胞を MEK 阻害剤 U0126 (10  $\mu$ M), ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M), p38 阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M) または JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした後, 100 pM IL-1 $\beta$  存在下または非存在下で 3 時間インキュベートし, COX-2 mRNA 発現の変化をリアルタイム PCR にて検討した。値は 3 例の平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。\* $P < 0.05$

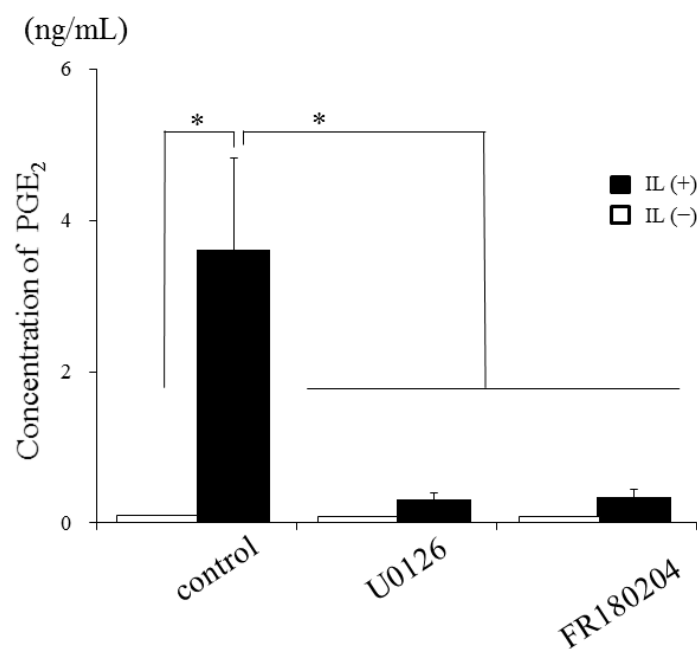


図 3-2. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 PGE<sub>2</sub> 放出に対する MEK および ERK 阻害剤の効果。イヌ皮膚由来線維芽細胞を MEK 阻害剤 U0126 (10  $\mu$ M) または ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした後, 100 pM IL-1 $\beta$  存在下または非存在下で 12 時間インキュベートし, メジウム中に放出された PGE<sub>2</sub> を ELISA にて測定した。値は 3 例の平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。\* $P$  < 0.05

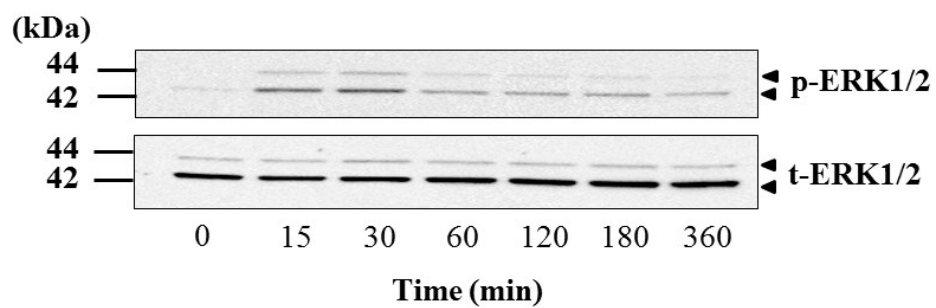


図 3-3. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  による ERK1/2 のリン酸化。イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  で 0~360 分間刺激をした後，リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) および総 ERK1/2 (t-ERK1/2) を，特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。

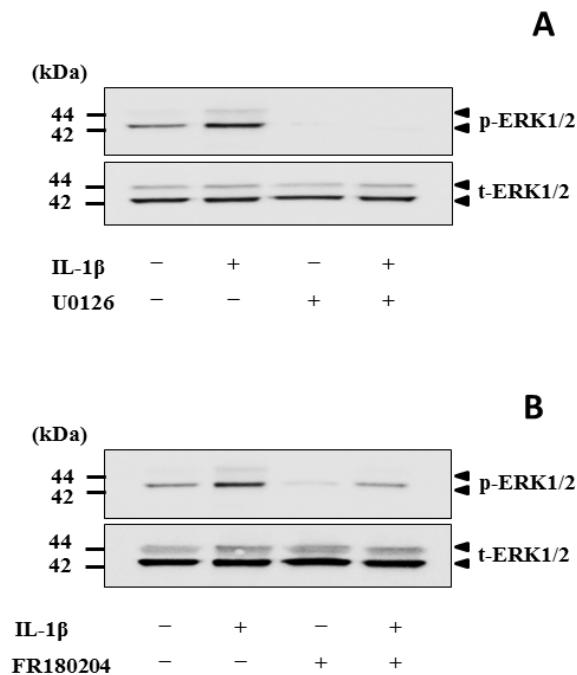


図 3-4. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 ERK1/2 のリン酸化に対する MEK および ERK 阻害剤の効果。イヌ皮膚由来線維芽細胞を MEK 阻害剤 U0126 (10  $\mu$ M) または ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした後, 100 pM IL-1 $\beta$  存在下または非存在下で 30 分間インキュベートし, リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) および総 ERK1/2 (t-ERK1/2) を, 特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。



## 第 4 章

### IL-1 $\beta$ による PGE<sub>2</sub> 放出と COX-2 mRNA 発現における NF- $\kappa$ B の関与

#### 4.1 緒言

Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ 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 (Lawrence, 2009; Hayden and Ghosh, 2012)。NF- $\kappa$ B は RelA (p65), RelB, cRel, p50 および p52 といった Rel ファミリータンパク質がホモあるいはヘテロの二量体で構成されている (Hayden and Ghosh, 2012)。NF- $\kappa$ B の活性は主に I $\kappa$ B のような阻害タンパク質との相互作用によって調節されており、阻害タンパク質と複合体を形成しているときは不活性型の NF- $\kappa$ B として細胞質に存在する。I $\kappa$ B がリン酸化され、NF- $\kappa$ B 二量体が I $\kappa$ B から遊離すること NF- $\kappa$ B が活性化する。遊離した NF- $\kappa$ B 二量体は核に移行し、プロモーター領域に結合することにより様々な免疫や炎症に関連する遺伝子発現に関与すると考えられている (Hayden and Ghosh, 2012)。IL-1 $\beta$  のような炎症性サイトカインに応答する細胞においては、不活性状態で p50 と p65 の二量体に I $\kappa$ B $\alpha$  が結合した複合体が存在し、IL-1 $\beta$  刺激により I $\kappa$ B $\alpha$  のプロテアソームでの分解と p65 のリン酸化が惹起され、遊離した二量体 NF- $\kappa$ B が核に移行する経路が考えられている (Bird et al., 1997; Vermeulen et al., 2002; Viatour et al., 2005; Lawrence, 2009; Hayden and Ghosh, 2012)。

そこで、第 4 章では、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  による PGE<sub>2</sub> 放出と COX-2 mRNA 発現における NF- $\kappa$ B の関与について検討した。

## 4.2 材料および方法

### 4.2.1 材料

リン酸化 p65 (p-p65) および total I $\kappa$ B $\alpha$  (t-I $\kappa$ B $\alpha$ ) に対する rabbit monoclonal 抗体は Cell Signaling Technology Japan 株式会社 (東京, 日本) から購入した。NF- $\kappa$ B 阻害薬である BAY 11-7082 は和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) から購入した。その他は第 1 章および第 2 章と同様に, TRIzol は Life Technologies 株式会社 (Carlsbad, CA) から, PrimeScript RT Master Mix, SYBRPremix Ex Taq II, Thermal Cycler Dice Real Time System II および TP900 Dice Real v 4.02B は Takara-Bio 株式会社 (滋賀, 日本) から, HRP-conjugated anti-rabbit IgG 抗体, ECL Westan Biotting System 分析システムおよび ImageQuant LAS4000 mini は GE Healthcare 社 (Piscataway, NJ) から購入した。Mini-PROTEAN TGX gel および PVDF 膜は Bio-Rad 社 (Hercules, CA) から, Complete mini EDTA-free protease inhibitor complex は Roche 社 (Mannheim, Germany) から, Block Ace は DS Pharma Biomedical (大阪, 日本) から購入した。PGE<sub>2</sub> 酵素免疫測定 (ELISA) kit は Cayman chemical 社 (ANN Arbor, MI) から購入した。StatMate IV は ATMS (東京, 日本) から購入した。

### 4.2.2 細胞培養

第 2 章および第 3 章で示したように, イヌ皮膚由来線維芽細胞は, Bratka-Robia ら (2002) の方法を基にして調整し, 10% 牛胎児血清 (FCS) を含む  $\alpha$ -MEM 培地を使用し, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で, 37°C の温度下で静的培養した。培地交換は週に一度行った。細胞が約 90%コンフルエンスに達した後に 0.25% trypsin-EDTA を用いて回収した。回収した細胞を, 75 cm<sup>2</sup> の培養フラスコに

1×10<sup>6</sup> 細胞の密度で播種し実験に使用した。

#### 4.2.3 Real-time RT-PCR

第 2 章および第 3 章と同様に，TRIzol 試薬を用いてイヌ皮膚由来線維芽細胞から Total RNA を抽出した。PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix を用いて，500 ng の total RNA から cDNA を合成した。Real-time RT-PCR は 2 μl の cDNA，SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II，イヌ COX-2 および TATA ボックス結合タンパク質（TBP）に特異的なプライマーを用いて，第 1 章と同様に行った（表 2-1）。2 μl の RNase および DNase free water を no template control として用い，2 μl の RNA サンプルを no-reverse transcription control として用いた。PCR 反応は，Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System II を用いて，次の条件で行った。すなわち，初期変性を 95°C，30 分×1 回，次いで変性を 95°C，5 秒，アニーリングと伸長を 60°C，30 秒×40 回。プライマーの特異性は融解解離曲線分析と PCR 産物のダイレクトシーケンスを行なって確認した。データの解析は TP900 DiceRealTime v4.02B を用いて，second derivative method と comparative cycle threshold (ΔΔCt) 法を適用した。較正標準として使用した cDNA の同じ量の TBP の増幅は，内在性コントロール，およびイヌの皮膚線維芽細胞 (time:0) からの cDNA の増幅を用いた。

#### 4.2.4 Western blotting

1 mM PMSF および complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail を含む 100 mM HEPES バッファー (pH 7.4) を用いてタンパク質を回収した。タンパク質濃度を Bradford 法 (Bradford, 1976) にて定量し，DTT 添加 SDS バッファーで 95°C，5 分間インキュベートした。サンプルを 10 μg ずつ 12% Mini-PROTEAN TGX gel に添加し電気泳動を行った。分画したタンパク質は PVDF 膜へ転写し，

Block Ace にて 50 分間、室温でブロッキングを行った。その後、一次抗体[t-IkB $\alpha$  (1: 1000), p-p65 (1: 1000) ]と室温で 120 分間反応させた。洗浄後、PVDF 膜を、HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1: 10000) を、室温で 90 分間反応させた。免疫反応は、分析システムを ECL Western blotting Analysis System を用いて検出した。膜の化学発光シグナルは ImageQuant LAS 4000 mini を用いて測定した。

#### 4.2.5 PGE<sub>2</sub> 測定

イヌ皮膚由来線維芽細胞は、6-well 培養プレートに  $3.0 \times 10^5$  cells/well の密度で播種した。細胞を 24 時間 1% FCS を含む  $\alpha$ -MEM 培地で培養後、IL-1 $\beta$  で処理し、培養上清を回収した。培養上清中の PGE<sub>2</sub> の濃度を、市販の ELISA kit を用いて測定した。

#### 4.2.6 統計学的分析

実験データは平均 $\pm$ 標準誤差として算出した。統計分析は StatMate IV を用いて実施した。データを、双方向の分散分析を用いて分析し、他の実験からのデータは、一元配置分散分析を用いて分析した。

### 4.3 結果

NF- $\kappa$ B 阻害剤である BAY11-7082 (10  $\mu$ M) は I $\kappa$ B キナーゼを阻害し、NF- $\kappa$ B の活性化を阻害する。そこで IL-1 $\beta$  により誘導される COX-2 mRNA 発現に対する BAY11-7082 の効果を検討した。イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  で 3 時間刺激を行うと COX-2 mRNA 発現の増強がリアルタイム PCR にて認められたが、BAY11-7082 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした細胞においては、IL-1 $\beta$  による COX-2 mRNA 発現は有意に阻害された (図 4-1)。

次に IL-1 $\beta$  刺激による PGE<sub>2</sub> 放出に対する NF- $\kappa$ B 阻害剤の効果を検討した。イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  により 12 時間刺激を行うと、培養液中への PGE<sub>2</sub> 放出は促進されたが、NF- $\kappa$ B 阻害剤 BAY11-7082 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした細胞においては、IL-1 $\beta$  刺激による PGE<sub>2</sub> 放出は有意に阻害された (図 4-2)。これらのことから、IL-1 $\beta$  による COX-2 mRNA 発現と PGE<sub>2</sub> 放出には NF- $\kappa$ B の活性化が関わることが考えられた。

そこで、NF- $\kappa$ B 活性化時に認められる I $\kappa$ B $\alpha$  の分解と p65 サブユニットのリン酸化を指標に、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  による NF- $\kappa$ B の活性化を検討した。イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  で 0~360 分間刺激を行うと、刺激後 15~60 分で時間依存的に I $\kappa$ B $\alpha$  は消失し、その後 180 分で非刺激時の発現レベルに戻った (図 4-3)。また、同時に、p65 のリン酸化の促進が認められ、その後非刺激時の状態に戻った (図 4-3)。NF- $\kappa$ B 阻害剤 BAY11-7082 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理をしたイヌ皮膚由来線維芽細胞においては、100 pM IL-1 $\beta$  の 15 分間刺激による p65 のリン酸化は完全に阻害された (図 4-4)。

#### 4.4 考察

IL-1 $\beta$  刺激されたイヌ皮膚由来線維芽細胞において、時間依存性の I $\kappa$ B $\alpha$  の分解が認められ、さらに同時に p65 のリン酸化が促進された。不活性状態の NF- $\kappa$ B に結合した抑制タンパク質 I $\kappa$ B $\alpha$  がユビキチン化され、プロテアソームにて分解されて NF- $\kappa$ B は活性化されることが知られている (Bird et al., 1997; Vermeulen et al., 2002; Viatour et al., 2005; Lawrence, 2009; Hayden and Ghosh, 2012) ことから、イヌ皮膚由来線維芽細胞においても同様な NF- $\kappa$ B 活性化機序が存在することを示唆している。I $\kappa$ B $\alpha$  の分解には I $\kappa$ B キナーゼによるリン酸化の過程が必要である (Bird et al., 1997; Vermeulen et al., 2002; Viatour et al., 2005; Lawrence, 2009; Hayden and Ghosh, 2012)。BAY11-7082 は I $\kappa$ B $\alpha$  をリン酸化する I $\kappa$ B キナーゼ阻害剤であることから、BAY11-7082 による IL-1 $\beta$  誘導性の p65 のリン酸化阻害は、I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化が阻害された結果、NF- $\kappa$ B の活性化が抑制されたと考えられる。

NF- $\kappa$ B は炎症を含む種々の細胞機能制御に関わるタンパク質の発現において、転写因子として機能することが知られている (Lawrence, 2009; Hayden and Ghosh, 2012)。また、COX-2 の発現にも関与することが報告されている (Nakao et al., 2000; Yang et al., 2002; Jung et al., 2003; Jiang et al., 2004)。本研究においては、イヌ皮膚由来線維芽細胞の IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現と PGE<sub>2</sub> 放出が NF- $\kappa$ B 阻害剤である BAY11-7082 により阻害されたことから、PGE<sub>2</sub> 産生に関わる COX-2 発現に NF- $\kappa$ B の活性化が深く関与することが示唆された。

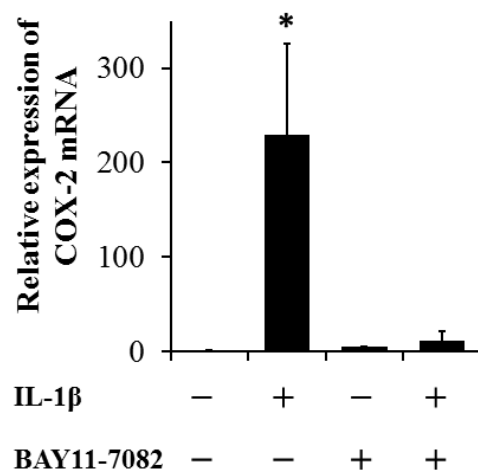


図 4-1. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現に対する I $\kappa$ B キナーゼ阻害剤の効果。イヌ皮膚由来線維芽細胞を I $\kappa$ B キナーゼ阻害剤 BAY11-7082 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした後、100 pM IL-1 $\beta$  存在下または非存在下で 3 時間インキュベートし、COX-2 mRNA 発現の変化をリアルタイム PCR にて検討した。値は 3 例の平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。\* $P < 0.05$



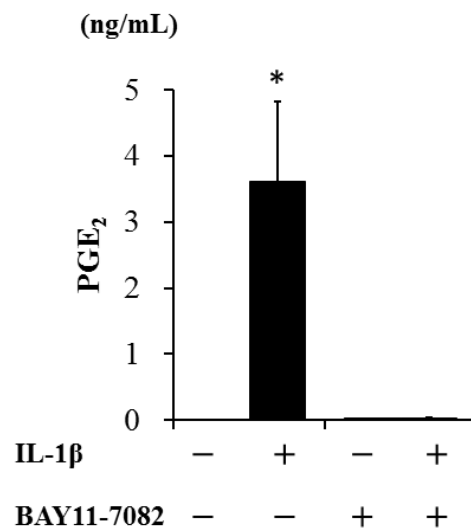


図 4-2. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 PGE<sub>2</sub> 放出に対するに対する I $\kappa$ B キナーゼ阻害剤の効果。イヌ皮膚由来線維芽細胞を I $\kappa$ B キナーゼ阻害剤 BAY11-7082 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした後, 100 pM IL-1 $\beta$  存在下または非存在下で 12 時間インキュベートし, メジウム中に放出された PGE<sub>2</sub> を ELISA にて測定した。値は 3 例の平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。\* $P < 0.05$

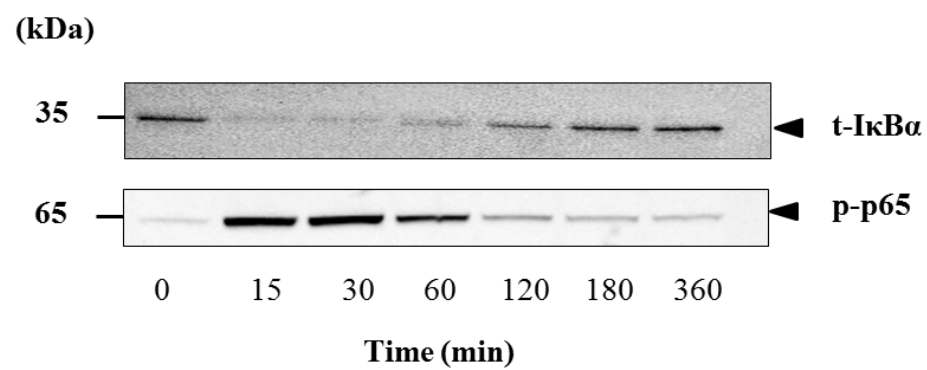


図 4-3. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  による IkB $\alpha$  の発現の変化 p65 のリン酸化。イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  で 0~360 分間刺激をした後、総 IkB $\alpha$  (t-IkB $\alpha$ ) の発現および p65 のリン酸化 (p-p65) を、特異的抗体を用いたウエスタンブロット法により検出した。

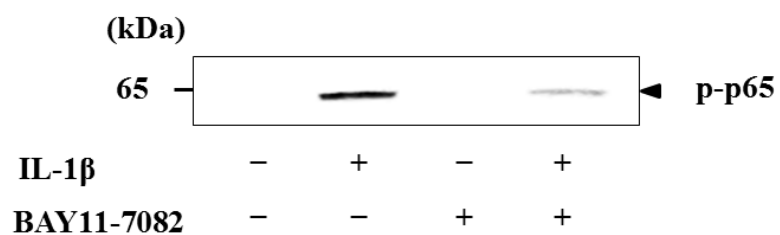


図 4-4. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 p65 リン酸化に対する I $\kappa$ B キナーゼ阻害剤の効果。イヌ皮膚由来線維芽細胞を I $\kappa$ B キナーゼ阻害剤 BAY11-7082 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした後, 100 pM IL-1 $\beta$  存在下または非存在下で 15 分間インキュベートし, p65 のリン酸化 (p-p65) を, 特異的抗体を用いたウエスタンブロット法により検出した。

## 第 5 章

### NF- $\kappa$ B 活性化による MAP キナーゼの活性化

## 5.1 緒言

IL-1 $\beta$ のような炎症性サイトカイン刺激による ERK を含む MAP キナーゼの活性化が、NF- $\kappa$ B の活性化を介して、COX-2 のような炎症に関与するタンパク質発現に関わることが報告されている (Tak and Firestein, 2001; Yang et al., 2002; Kishore et al., 2003; Jiang et al., 2004; Fan et al., 2006; Arai et al., 2011)。MAP キナーゼの活性化が I $\kappa$ B の分解を惹起し、遊離された NF- $\kappa$ B が核内に移行し、タンパク質発現に関わると考えられている (Bird et al., 1997; Vermeulen et al., 2002; Viatour et al., 2005; Lawrence, 2009; Hayden and Ghosh, 2012)。第 2 章および第 3 章では、イヌ皮膚由来線維芽細胞において IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 発現を介した PGE<sub>2</sub> 発現に MAP キナーゼ経路の一つである MEK/ERK 経路が関わること、また、NF- $\kappa$ B の活性化が関わることを示した。そこで、第 5 章では、IL-1 $\beta$  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- $\kappa$ B の活性化の相互作用について検討を行った。

## 5.2 材料および方法

### 5.2.1 材料

第2章から第4章で述べたように、HRP-conjugated anti-rabbit IgG 抗体、ECL Westan Biotting System 分析システムおよび ImageQuant LAS4000 mini は GE Healthcare 社 (Piscataway, NJ) から購入した。Mini-PROTEAN TGX gel および PVDF 膜は Bio-Rad 社 (Hercules, CA) から、Complete mini EDTA-free protease inhibitor complex は Roche 社 (Mannheim, Germany) から、Block Ace は DS Pharma Biomedical (大阪, 日本) から購入した。StatMate IV は ATMS (東京, 日本) から購入した。リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2), total ERK1/2 (t-ERK1/2), リン酸化 p65 (p-p65) および total I $\kappa$ B $\alpha$  (t-I $\kappa$ B $\alpha$ ) に対する rabbit monoclonal 抗体と MEK 阻害剤 U0126 は Cell Signaling Technology Japan 株式会社 (東京, 日本) から購入した。ERK 阻害剤 FR180204 および p38 阻害剤 SB239063 は Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO) から、また、JNK 阻害剤 SP600125 および NF- $\kappa$ B 阻害薬 BAY 11-7082 は和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) から購入した。Lipofectamine 2000 は Thermo Fisher Scientific 社 (東京, 日本) より購入した。

### 5.2.2 細胞培養

第2章から第4章で示したように、イヌ皮膚由来線維芽細胞は、Bratka-Robia ら (2002) の方法を基にして調整し、10% 牛胎児血清 (FCS) を含む  $\alpha$ -MEM 培地を使用し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で、37°C の温度下で静的培養した。培地交換は週に一度行った。細胞が約 90%コンフルエンスに達した後に 0.25% trypsin-EDTA を用いて回収した。回収した細胞を、75 cm<sup>2</sup> の培養フラスコに 1 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞の密度で播種し実験に使用した。

### 5.2.3 Western blotting

第 2 章から第 4 章と同様に, 1 mM PMSF および complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail を含む 100 mM HEPES バッファー (pH 7.4) を用いてタンパク質を回収した。タンパク質濃度を Bradford 法 (Bradford, 1976) にて定量し, DTT 添加 SDS バッファーで 95°C , 5 分間インキュベートした。サンプルを 10 µg ずつ 12% Mini-PROTEAN TGX gel に添加し電気泳動を行った。分画したタンパク質は PVDF 膜へ転写し, Block Ace にて 50 分間, 室温でブロッキングを行った。その後, 一次抗体 [t-IkBα (1: 1000), p-p65 (1: 1000), p-ERK 1/2 (1: 1000), t-ERK1/2 (1:1000) ] と室温で 120 分間反応させた。洗浄後, PVDF 膜を, HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1: 10000) を, 室温で 90 分間反応させた。免疫反応は, 分析システムを ECL Western blotting Analysis System を用いて検出した。膜の化学発光シグナルは ImageQuant LAS 4000 mini を用いて測定した。

### 5.2.4 siRNA の細胞導入

イヌ皮膚由来線維芽細胞に製造業者のプロトコールに従って IkBα siRNA を Lipofectamine 2000 を使用してトランスフェクトした。細胞を  $1 \times 10^6$  /90-mm dish に播種した後, 1% FCS を含む α-MEM 中で培養し, 8 µg の IkBα siRNA またはスクランブル siRNA をトランスフェクトした。51 時間培養後に siRNA の効果を anti-t-IkBα 抗体を用いた Western blotting により確認した。

### 5.3 結果

イヌ皮膚由来線維芽細胞における NF- $\kappa$ B の活性化を第 4 章で示したように p65 のリン酸化を指標に検討したところ、100 pM IL-1 $\beta$  で 15 分刺激をした細胞において p65 のリン酸化が促進され、NF- $\kappa$ B の活性化が認められた (図 5-1)。次に、IL-1 $\beta$  誘導性の NF- $\kappa$ B に対する MEK/ERK 経路の関与の検討のため、MEK 阻害剤 U0126 (10  $\mu$ M) および ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) で 1 時間前処理したイヌ皮膚由来線維芽細胞を IL-1 $\beta$  で刺激した。しかし、MEK 阻害剤も ERK 阻害剤も IL-1 $\beta$  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 (図 5-1)。

次に、IL-1 $\beta$  誘導性の MEK/ERK 経路の活性化を ERK1/2 のリン酸化を指標にして、NF- $\kappa$ B の関与を阻害剤 BAY11-7082 により検討したところ、100 pM IL-1 $\beta$  の 30 分刺激で認められたイヌ皮膚由来線維芽細胞の ERK1/2 のリン酸化は、BAY11-7082 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした場合には認められなかった (図 5-2)。この結果は、NF- $\kappa$ B の活性化が MAP キナーゼの活性調節に関わることを示唆している。

そこで、次にイヌ特異的 IkB $\alpha$  siRNA をイヌ皮膚由来線維芽細胞に導入し、IkB $\alpha$  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。図 5-3 に示すように、スクランブル配列の RNA を導入した細胞を対照としたとき、IkB $\alpha$  をノックダウンした細胞においては、IkB $\alpha$  の発現は抑制されていた。同時に、IkB $\alpha$  のノックダウン細胞においては、p65 のリン酸化と ERK1/2 のリン酸化の促進が認められた。これらの結果は、NF- $\kappa$ B の活性化により ERK1/2 が活性化されることを強く示唆している。



## 5.4 考察

イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 発現に MEK/ERK 経路の活性化と NF- $\kappa$ B の活性化が関与することから、その相互作用について検討を行った。多くの細胞では、MAP キナーゼが NF- $\kappa$ B の調節に関わると考えられている (Bird et al., 1997; Vermeulen et al., 2002; Viatour et al., 2005; Lawrence, 2009; Hayden and Ghosh, 2012)。ラット血管平滑筋 (Jiang et al., 2004) では ERK が NF- $\kappa$ B の活性調節に関与し、IL-1 $\beta$  誘導性の遺伝子発現に関与することが報告されている。また、ヒト単球由来 THP-1 細胞 (García-García et al., 2001) やウサギ滑膜線維芽細胞 (Pillinger et al., 2004) においても、ERK が NF- $\kappa$ B の活性調節因子として報告されている。しかし、イヌ皮膚由来線維芽細胞においては、ERK 阻害剤で NF- $\kappa$ B 活性に変化がなく、一方、NF- $\kappa$ B 阻害剤で ERK の活性化が阻害されたことから、NF- $\kappa$ B が MAP キナーゼ (MEK/ERK 経路) の調節因子として働くことが示唆された。NF- $\kappa$ B の p50 と p65 の二量体の活性化は抑制タンパク質 I $\kappa$ B $\alpha$  の結合により抑制されている (Bird et al., 1997; Tak and Firestein, 2001; Vermeulen et al., 2002; Viatour et al., 2005; Lawrence, 2009; Hayden and Ghosh, 2012) ことから、I $\kappa$ B $\alpha$  発現を siRNA 導入によりノックダウンしたところ、NF- $\kappa$ B の活性化と ERK の活性化が認められたことは、MAP キナーゼの調節因子としての NF- $\kappa$ B の役割を強くサポートしている。

近年、NF- $\kappa$ 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 (Tieri et al., 2012; Hoesel and Schmid, 2013)。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。また、tumor progression locus 2 (TPL-2) がマクロファージのリポ多糖や TNF- $\alpha$  刺激時の ERK の活性化

に関わること (Dumitru et al., 2000; Eliopoulos et al., 2003; Sugimoto et al., 2004) やマウス胎児線維芽細胞の IL-1 $\beta$  刺激による ERK 活性化の制御に関わること (Das et al., 2005) が報告されている。TPL-2 は非刺激時の細胞で I $\kappa$ B ファミリーに属する p105 と複合体を形成し、刺激時に p105 から離れ、ERK 活性化因子となると考えられている (Beinke et al., 2004; Waterfield et al., 2004)。NF- $\kappa$ B がどのように ERK を活性化するかはいまだ不明であるが、TPL-2 シグナルのような経路がイヌ皮膚由来線維芽細胞の IL-1 $\beta$  誘導性の ERK 活性化に関わることは可能性として考えられる。

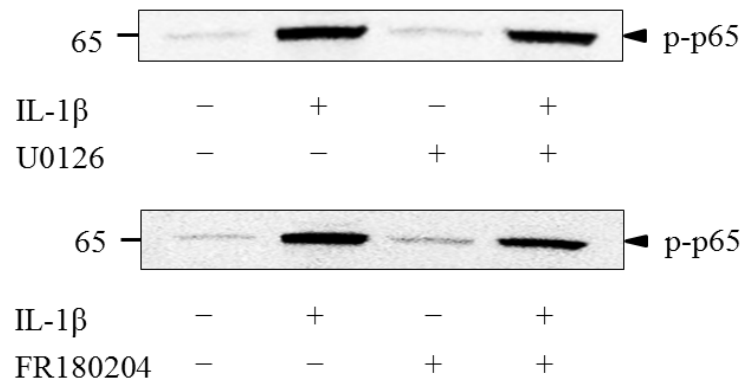


図 5-1. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 p65 リン酸化に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果。イヌ皮膚由来線維芽細胞を MEK 阻害剤 U0126 (10  $\mu$ M) または ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした後, 100 pM IL-1 $\beta$  存在下または非存在下で 15 分間インキュベートし, p65 のリン酸化 (p-p65) を, 特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。

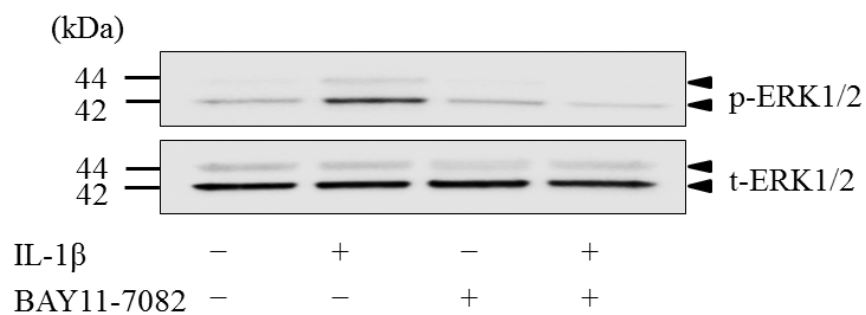


図 5-2. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 ERK1/2 のリン酸化に対する I $\kappa$ B キナーゼ阻害剤の効果。イヌ皮膚由来線維芽細胞を I $\kappa$ B キナーゼ阻害剤 BAY11-7082 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした後, 100 pM IL-1 $\beta$  存在下または非存在下で 30 分間インキュベートし, リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) および総 ERK1/2 (t-ERK1/2) を, 特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。

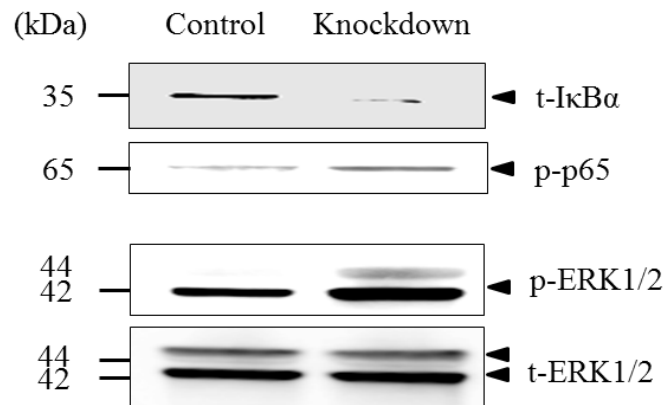


図 5-3. IκBα をノックダウンしたイヌ皮膚由来線維芽細胞における p65 および ERK1/2 のリン酸化。イヌ皮膚由来線維芽細胞に IκBα siRNA を導入し IκBα をノックダウンした。一方、スクランブル siRNA を導入したものを対照 (Control) とした。それぞれ導入後の細胞において、総 IκBα 発現 (t-IκBα), リン酸化 p65 (p-p65), リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) および総 ERK1/2 発現 (t-ERK1/2) をそれぞれに対する特異的抗体を用い、ウエスタンブロット法により検出した。

## 第 6 章

### 総括

本研究は、イヌにおける皮膚の創傷治癒課程において重要な炎症制御について、イヌの皮膚由来線維芽細胞を培養し、炎症性サイトカインの 1 種であるインターロイキン 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 刺激により放出されるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の産生メカニズムについて、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 発現の関与、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAP キナーゼ) 経路の関与、転写因子の 1 つと考えられている Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の関与、さらに MAP キナーゼ経路と NF- $\kappa$ B 活性化の関連について検討し、次の結果を得た。

第 2 章では、IL-1 $\beta$  で刺激をしたイヌ皮膚由来線維芽細胞からの時間依存性および用量依存性 PGE<sub>2</sub> 放出を認めた。PGE<sub>2</sub> 放出は産生に伴い放出されることから、IL-1 $\beta$  は PGE<sub>2</sub> 産生を引き起こすことが明らかとなった。PGE<sub>2</sub> 産生に関わる酵素として COX が知られており、mRNA 発現およびタンパク質発現の検出より、イヌ皮膚由来線維芽細胞において、IL-1 $\beta$  は誘導性の COX-2 発現を介して PGE<sub>2</sub> 産生を引き起こすことが明らかとなった。

第 3 章では、種々の細胞で IL-1 $\beta$  刺激により MAP キナーゼ経路が活性化され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 $\beta$  誘導性の COX-2 発現に対する MAP キナーゼ経路について検討した。MAP キナーゼ経路に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 種類が知られている。また、ERK の上流には MAP キナーゼ-ERK キナーゼ (MEK) が存在し ERK の活性調節を行うことが知られている。本研究では、阻害剤を用いた検討により、MEK/ERK の活性化がイヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 発現に関与すること明らかとなった。実際に、IL-1 $\beta$  で刺激したイヌ皮膚由来線維芽細胞では ERK1/2 のリン酸化が認められた。

第 4 章では、NF- $\kappa$ B の活性化シグナル経路において抑制タンパク質のリン酸

化を触媒する I $\kappa$ B キナーゼ阻害剤が IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現を抑えること、また、実際に NF- $\kappa$ B 抑制タンパク質 I $\kappa$ B $\alpha$  の分解促進と同時に NF- $\kappa$ B サブユニット p65 のリン酸化が認められたことから、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 発現には NF- $\kappa$ B の活性化が関わることが明らかとなった。

第5章では、IL-1 $\beta$  刺激などにより MAP キナーゼの活性化が NF- $\kappa$ B の活性化を介して COX-2 のようなタンパク質発現に関わることが報告されていることから、ERK の活性化と NF- $\kappa$ B の活性化の関連について阻害剤を用いて検討を行ったところ、NF- $\kappa$ B の活性化が ERK のリン酸化に関与することが示唆された。さらに、I $\kappa$ B $\alpha$  をノックダウンした細胞において NF- $\kappa$ B サブユニット p65 のリン酸化と ERK のリン酸化が認められたことから、イヌ皮膚由来線維芽細胞においては、ERK 活性化の調節因子として NF- $\kappa$ B が機能することが明らかとなった。

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 $\beta$  刺激により NF- $\kappa$ B が活性化され、続いて MEK/ERK 経路の活性化が起こり、COX-2 mRNA 発現を介した COX-2 タンパク質発現が誘導され、PGE<sub>2</sub> 産生を導く経路が明らかとなった（図 6-1）。このことは従来考えられていた MAP キナーゼ経路を介した NF- $\kappa$ B の活性化とは大きく異なる細胞内シグナル経路の発見と考えられる。よって、本研究結果は、イヌ皮膚炎症の新たな治療法や治療薬の開発に貢献するものと期待される。



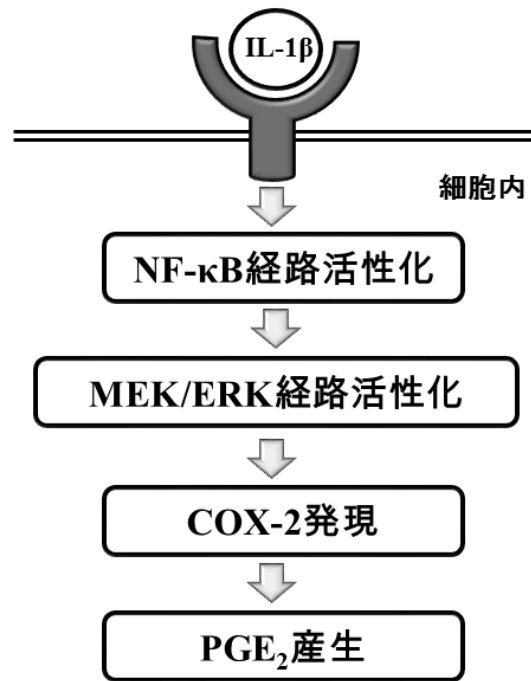


図 6-1. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 PGE<sub>2</sub> 産生に関わる COX-2 発現に至る細胞内シグナル経路。

## 謝辞

本研究を纏めるにあたり，終始ご指導を賜りました日本大学大学院獣医学研究科の杉谷 博士教授に深謝いたしますとともに，ご助言を賜りました同研究科の森友 忠昭教授並びに中山 智宏教授に謹んで感謝をいたします。また，本研究の実施にあたり様々な点でご指導を賜りました日本大学生物資源科学部獣医学科の中野 令先生に心より感謝をいたします。さらに，本研究に際し様々なご助言とご協力を賜りました日本大学生物資源科学部獣医学科の岡林 堅先生，成田 貴則先生並びに獣医生化学研究室の諸氏にお礼を申し上げます。そして，常に大学院生としての生活を理解し，応援をしてくれた妻と家族と土屋犬猫病院のスタッフに心より感謝をいたします。

## 引用文献

- Arai, K.Y., Ono, M, Kudo, C., Fujioka, A., Okamura, R., Nomura, Y., Nishiyama, T., 2011. IL-1 $\beta$  stimulates activating  $\beta$ A mRNA expression in human skin fibroblasts through the MAPK pathways, the nuclear factor- $\kappa$ B pathway, and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Endocrinol.* 152, 3779-3790.
- Beinke, S., Robinson, M.J., Hugunin, M., Ley, S.C., 2004. Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by I $\kappa$ B kinase-induced proteolysis of NF- $\kappa$ B1 p105. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9658-9667.
- Bird, T.A., Schooley, K., Dower, S.K., Hagen, H., Virca, G.D., 1997. Activation of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B by interleukin-1 is accompanied by casein kinase II-mediated phosphorylation of the p65 subunit. *J. Biol. Chem.* 272, 32606-32612.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bratka-Robia, C.B., Mitteregger, G., Aichinger, A., Egerbacher, M., Helmreich, M., Bamberg, E., 2002. Primary cell culture and morphological characterization of canine dermal papilla cells and dermal fibroblasts. *Vet. Dermatol.* 13, 1-6.

- Das, S., Cho, J., Lambertz, I., Kelliher, M.A., Eliopoulos, A.G., Du, K., Tsiachlis, P.N., 2005. Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF- $\kappa$ B in a cell-type and stimulus-specific manner. *J. Biol. Chem.* 280, 23748-52377.
- Dey, I., Lejeune, M., Chadee, K., 2006. Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br. J. Pharmacol.* 149, 611-623.
- Dumitru, C.D., Ceci, J.D., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D., Stamatakis, K., Lin, J.H., Patriotis, C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kollias, G., Tsiachlis, P.N., 2000. TNF- $\alpha$  induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103, 1071-1083.
- Eliopoulos, A.G., Wang, C.C., Dumitru, C.D., Tsiachlis, P.N., 2003. Tpl2 transduces CD40 and TNF signals that activate ERK and regulates IgE induction by CD40. *EMBO J.* 22, 3855-3864.
- Fan, X.M., Wong, B.C., Lin, M.C., Cho, C.H., Wang, W.P., Kung, H.F., Lam, S.K., 2001. Interleukin-1 $\beta$  induces cyclo-oxygenase-2 expression in gastric cancer cells by the p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 1098-1104.
- Fan, Z., Yang, H., Bau, B., Söder, S., Aigner, T., 2006. Role of mitogen-activated protein kinases and NF $\kappa$ B on IL-1 $\beta$ -induced effects on collagen type II, MMP-1

and 13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes. *Rheumatol. Int.* 26, 900-903.

Funk, C.D., 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science* 294, 1871-1875.

Futagami, A., Ishizaki, M., Fukuda, Y., Kawana, S., Yamanaka, N., 2002. Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. *Lab. Invest.* 82, 1503-1513.

Gabbiani G., 2003. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* 200, 500–503.

Gantke, T., Sriskantharajah, S., Ley, S.C., 2011. Regulation and function of TPL-2, an I $\kappa$ B kinase-regulated MAP kinase kinase kinase. *Cell Res.* 21, 131-145.

Guan, Z., Buckman, S.Y., Miller, B.W., Springer, L.D., Morrison, A.R., 1998. Interleukin-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 28670-28676.

Hamamoto, T., Yabuki, A., Yamato, O., Fujiki, M., Misumi, K., Matsumoto, M., 2009. Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 induction during wound healing in dog skin. *Res. Vet. Sci.* 87, 349-354.

- Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., Phipps, R.P., 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol*, 23, 144-150.
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2012. NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 26, 203-234.
- Heughan C, Hunt T., 1975. Some aspects of wound healing research: a review. *Can. J. Surg.* 18, 118–126.
- Hoesel B, Schmid JA., 2013. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 12, 86.
- Jiang, B., Xu, S., Hou, X., Pimentel, D.R., Brecher, P., Cohen, R.A., 2004. Temporal control of NF- $\kappa$ B activation by ERK differentially regulates interleukin-1 $\beta$ -induced gene expression..*J. Biol. Chem.* 279, 1323-1329.
- Jung, Y.J., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., Neckers, L., 2003. IL-1 $\beta$ -mediated up-regulation of HIF-1 $\alpha$  via an NF $\kappa$ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J.* 17, 2115-2117.
- Kaminska, B., 2005. MAPK signaling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy-from molecular mechanisms to therapeutic benefits.

Biochim. Biophys. Acta 1754, 253-262.

Kishore, N., Sommers, C., Mathialagan, S., Guzova, J., Yao, M., Hauser, S., Huynh, K., Bonar, S., Mielke, C., Albee, L., Weier, R., Graneto, M., Hanau, C., Perry, T., Tripp, C.S., 2003. A selective IKK-2 inhibitor blocks NF- $\kappa$ B-dependent gene expression in interleukin-1 $\beta$ -stimulated synovial fibroblasts. J. Biol. Chem. 278, 32861-32871.

Kyriakis, J.M., Avruch, J., 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiol. Rev. 81, 807-869.

LaPointe, M.C. and Isenović, E., 1999. Interleukin-1 $\beta$  regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involves the p42/44 and p38 MAPK signaling pathways in cardiac myocytes. Hypertension 33, 276-282.

Laulederkind, S.J.F., Thompson-Jaeger, S., Goorha, S., Chen, Q., Fu, A., Rho, J.-Y., Ballou, L.R., Raghow, R., 2002. Both constitutive and inducible prostaglandin H synthase affect dermal wound healing in mice. Lab. Invest. 82, 919-927.

Lawrence, T., 2009. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 1, a001651.

Martin, P., 1997. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.

Nakao, S., Ogata, Y., Shimizu-Sasaki, E., Yamazaki, M., Furuyama, S., Sugiya, H., 2000. Activation of NF $\kappa$ B is necessary for IL-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human gingival fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 209, 113-118.

Park, J.Y., Pillinger, M.H., Abramson, S.B., 2006. Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis and secretion: the role of PGE<sub>2</sub> synthesis. *Clin. Immunol.* 119, 229-240.

Pillinger, M.H., Dinsell, V., Apsel, B., Tolani, S.N., Marjanovic, N., Chan, E.S., Gomez, P., Clancy, R., Chang, L.F., Abramson, S.B., 2004. Regulation of metalloproteinases and NF- $\kappa$ B activation in rabbit synovial fibroblasts via E prostaglandins and Erk: contrasting effects of nabumetone and 6MNA. *Br. J. Pharmacol.* 142, 973-982.

Simmons, D.L., Botting, R.M., Hla, T., 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56, 387-437.

Smith, W.L., DeWitt, D.L., Garavito, R.M., 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145-182.

Sugimoto, K., Ohata, M., Miyoshi, J., Ishizaki, H., Tsuboi, N., Masuda, A., Yoshikai, Y.,



- Takamoto, M., Sugane, K., Matsuo, S., Shimada, Y., Matsuguchi, T., 2004. A serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, modulates bacterial DNA-induced IL-12 production and Th cell differentiation. *J. Clin. Invest.* 14, 857-866.
- Tak, P.P., Firestein, G.S., 2001. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 107, 7-11.
- Thomas, B., Thirion, S., Humbert, L., Tan, L., Goldring, M.B., B  r  ziat, G., Berenbaum, F., 2002. Differentiation regulates interleukin-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 in human articular chondrocytes: role of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. J.* 362, 367-373.
- Tieri P, Termanini A, Bellavista E, Salvioli S, Capri M, Franceschi C., 2012. Charting the NF- $\kappa$ B pathway interactome map. *PLoS One.* 7, e32678.
- Vermeulen, L., De Wilde, G., Notebaert, S., Vanden Berghe, W., Haegeman, G., 2002. Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor- $\kappa$ B p65 subunit. *Biochem. Pharmacol.* 64, 963-970.
- Viatour, P., Merville, M.P., Bours, V., Chariot, A., 2005. Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem. Sci.* 30, 43-52.

- Wang, M.T., Honn, K.V., Nie, D., 2007. Cyclooxygenases, prostanooids, and tumor progeression. *Cancer Metast. Rev.* 26, 525-534.
- Wang, X., Li, F., Fan, C., Wang, C., Ruan, H., 2010. Analysis of isoform specific ERK signaling on the effects of interleulin-1 $\beta$  on COX-2 expression and PGE2 production in human chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402, 23-29.
- Waterfield, M., Jin, W., Reiley, W., Zhang, M., Sun, S.C., 2004. I $\kappa$ B kinase is an essential component of the Tpl2 signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6040-6048.
- Werner, S., Grose, R., 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83, 835-870.
- Yang, C.M., Chien, C.S., Hsiao, L.D., Luo, S.F., Wang, C.C., 2002. Interleukin-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 expression is mediated through activation of p42/44 and p38 MAPKS, and NF- $\kappa$ B pathways in canine tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal.* 14, 899-911.
- Yoshida, N., Kanekura, T., Hogashi, Y., Kanazaki, T., 2006. *Bidens pilosa* suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of mitogen activated protein kinases phosphorylation in normal human dermal fibroblasts. *J. Dermatol.* 33, 676-683.

Zassadowski F, Rochette-Egly C, Chomienne C, Cassinat B., 2012. Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cell Signal.* 24, 2369-2377.