

論文の内容の要旨

氏名： 難波 信一

博士の専攻分野の名称： 博士(獣医学)

論文題目： イヌ滑膜由来線維芽細胞における腫瘍壊死因子 α 誘導性インターロイキン 8 産生に関わる MAP キナーゼ活性調節

イヌの免疫介在性関節炎はリウマチ様関節炎をはじめとして、多くが難治性であり、非ステロイド性消炎鎮痛薬 (NSAIDs) や各種免疫抑制剤による治療が行われているものの十分な治療効果が得られてはいない。また、慢性疼痛が生涯にわたることから、生活の質 (Quality of Life; QOL) が顕著に低下する病態でもある。この疾患の病態発生には滑膜炎が関与しており、また、種々の炎症性サイトカインが関わりとされているが、詳細なメカニズムについては不明な点が多く残されている。

関節を構成する滑膜の滑膜線維芽細胞は細胞外マトリクスや滑液を産生するが、滑膜炎発症時には、種々のサイトカインや生理活性物質に反応して活性化される。この滑膜炎発症が関節炎の初期の病態発生において重要な役割を果たしていると考えられている。

腫瘍壊死因子 (TNF- α) は主に活性化したマクロファージから産生されるサイトカインであり、リウマチ様関節炎を含めた種々の炎症の急性期反応に関わっている。

インターロイキン 8 (IL-8) は主にマクロファージから産生され、白血球の遊走性、血管内皮細胞への接着、血管新生ならびに好中球の活性化に関与するケモカインであり、炎症性刺激がある状態で産生される。関節炎では滑液中に著明に IL-8 濃度が増加することが知られている。

Mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ) は、細胞の増殖、分化、細胞死、炎症など多くの現象に関与するリン酸化酵素であり、細胞外からの情報を核へ伝達する中心的な役割を担っている。細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK)、p38 MAP キナーゼおよび c-Jun-N 末端キナーゼ (JNK) を介する 3 経路が主たる MAP キナーゼ経路として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おり、MEK/ERK 経路と呼ばれる。様々な細胞で、TNF- α 刺激による MEK/ERK、p38 MAP キナーゼ、JNK 経路の活性化が知られている。

本研究は、イヌの滑膜炎の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滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性の IL-8 産生に関わる MAP キナーゼの活性化について検討した。

1. TNF- α 誘導性 IL-8 の発現と放出

イヌ滑膜由来線維芽細胞を 50 ng/ml TNF- α で 0~24 時間刺激を行い、培養液中に放出された IL-8

濃度について ELISA を用いて解析したところ、TNF- α は 24 時間まで時間依存的に IL-8 の放出を促進した。また、0~100 ng/ml の TNF- α でイヌ滑膜由来線維芽細胞を 24 時間刺激したところ、100 ng/ml まで TNF- α は用量依存的に IL-8 の放出を促した。

次に、TNF- α 刺激による IL-8 の mRNA 発現の変化をリアルタイム PCR にて検討した。イヌ滑膜由来線維芽細胞を 50 ng/ml の TNF- α で 0~48 時間刺激したところ、0~6 時間で時間依存的な IL-8 mRNA 発現の上昇が認められ、その後下降した。イヌ滑膜由来線維芽細胞を 0~100 ng/ml の TNF- α で刺激したところ、1~100 ng/ml で用量依存的に IL-8 mRNA 発現の上昇が認められた。

以上の結果より、TNF- α 刺激はイヌ滑膜由来線維芽細胞の IL-8 mRNA 発現ならびに放出を引き起こすことが明らかとなった。

2. TNF- α 誘導性 IL-8 発現と放出における MAP キナーゼの関与

種々の細胞において、TNF- α 刺激による IL-8 発現における MAP キナーゼの関与が報告されている。MAP キナーゼは炎症反応において中心的な役割を担っていることから、本研究においては、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 放出と IL-8 mRNA 発現における MAP キナーゼの関与を、阻害剤を用いて検討した。

イヌ滑膜由来線維芽細胞を ERK1/2 阻害剤 FR180204 (25 μ M)、JNK 阻害剤 SP600125 (10 μ M)、p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20 μ M) および SKF86002 (10 μ M) で 1 時間前処理した後、50 ng/ml の TNF- α で 6 時間刺激を行い、その時点での IL-8 mRNA を検討した。その結果、ERK1/2 阻害剤と JNK 阻害剤は、それぞれ有意に IL-8 mRNA 発現を阻害したが、2 種類の p38 MAP キナーゼ阻害剤においては有意な抑制効果は認められなかった。

次に、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性の IL-8 放出について検討したところ、ERK1/2 阻害剤 FR180204 (25 μ M)、または JNK 阻害剤 SP600125 (10 μ M) で 1 時間前処理した細胞においては、50 ng/ml の TNF- α の 6 時間刺激による IL-8 放出は有意に阻害された。

MAP キナーゼはリン酸化によって活性化される。そこで、TNF- α による ERK1/2 と JNK の活性化についてそれぞれの抗リン酸化抗体を用い、イムノブロット法にて検討した。イヌ滑膜由来線維芽細胞を 50 ng/ml の TNF- α で刺激をすると、刺激後 5~15 分後にリン酸化 ERK1/2 が検出され、その後減少した。また、リン酸化 JNK は刺激後 15~30 分後に検出され、その後減少した。TNF- α 誘導性の ERK1/2 のリン酸化は ERK1/2 阻害剤 FR180204 (25 μ M) の 1 時間前処理で、また、JNK のリン酸化は JNK 阻害剤 SP600125 (10 μ M) の 1 時間前処理で完全に抑制された。

以上の結果より、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性の IL-8 発現ならびに放出には、ERK1/2 および JNK 経路の活性化が関与することが示唆された。

3. TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる ERK サブタイプ

阻害剤を用いた検討により、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現と放出には ERK1/2 経路が関与することが示唆されたことから、次に TNF- α 誘導性 IL-8 発現における関わる ERK のサブタイプについて、ERK1 および ERK2 のノックダウンにより検討した。

イヌ滑膜由来線維芽細胞に ERK1 siRNA、ERK2 siRNA または scramble siRNA を導入した後、抗 total-ERK1/2 (t-ERK1/2) 抗体を用いたイムノブロット法にて ERK1 および ERK2 の発現を検討したところ、ERK1 siRNA を導入した細胞では ERK1 の発現のみが、ERK2 siRNA を導入した細胞では ERK2 の発現のみが有意に抑えられていることが確認され、ERK1 または ERK2 がノックダウンされた細胞を得ることができた。

そこで、ERK1 あるいは ERK2 ノックダウン細胞における TNF- α 誘導性の IL-8 mRNA 発現について検討した。その結果、TNF- α 誘導性の IL-8 mRNA 発現は ERK2 ノックダウン細胞において有意に抑制されたが、ERK1 ノックダウン細胞において抑制は認められなかった。

次に、ERK2 ノックダウン細胞における TNF- α 誘導性の ERK および JNK のリン酸化についてイムノブロット法により検討したところ、ERK のリン酸化は有意に抑制されたが、JNK のリン酸化は抑制されなかった。

以上の結果から、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現には ERK2 が関与し、ERK1 とは独立して機能することが示された。

4. TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる JNK サブタイプ

阻害剤を用いた検討により、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現と放出には ERK および JNK 経路が関与することが示唆され、また、ノックダウン細胞では ERK のサブタイプである ERK2 が TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わることを示されたことから、JNK のサブタイプについてもノックダウン細胞を用いて検討を行った。

イヌ滑膜由来線維芽細胞に JNK1 siRNA、JNK2 siRNA または scramble siRNA を導入した後、抗 total-JNK1/2 (t-JNK1/2) 抗体を用いたイムノブロット法にて JNK1 および JNK2 の発現を検討したところ、JNK1 siRNA を導入した細胞では JNK1 の発現のみが、JNK2 siRNA を導入した細胞では JNK2 の発現のみが有意に抑えられていることが確認され、JNK1 または JNK2 がノックダウンされた細胞を得ることができた。

そこで、JNK1 あるいは JNK2 ノックダウン細胞における TNF- α 誘導性の IL-8 mRNA 発現について検討したところ、TNF- α 誘導性の IL-8 mRNA 発現は JNK1 ノックダウン細胞において有意に抑制されたが、JNK2 ノックダウン細胞において抑制は認められなかった。

次に、JNK1 ノックダウン細胞における TNF- α 誘導性の ERK および JNK のリン酸化についてイムノ

ブロット法により検討したところ、JNK のリン酸化は有意に抑制されたが、ERK のリン酸化は抑制されなかった。

以上の結果から、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現には JNK1 が関与しており、JNK2 から独立して機能することが示された。

結論

本研究は、イヌの滑膜炎の病態発生機序を明らかにする目的の一つとして、初代培養したイヌ滑膜由来線維芽細胞を用い、炎症性サイトカインである TNF- α 刺激により引き起こされるケモカイン IL-8 発現における MAP キナーゼの活性化の関与を検討し、TNF- α 誘導性 IL-8 の発現と放出には MAP キナーゼ経路のうち ERK 経路および JNK 経路が関わることを明らかにした。

関節炎を有する患者から分離培養したヒト滑膜由来線維芽細胞においては、TNF- α 誘導性 IL-8 放出が ERK、JNK および p38 の 3 つの MAP キナーゼ経路が同時に活性化されると報告されている。一方で、それらの MAP キナーゼ阻害剤は TNF- α 誘導性 IL-8 放出に影響しないという報告もなされている。また、p38 阻害剤が TNF- α 誘導性 IL-8 発現を抑制したという報告があるが、一方で p38 阻害剤による亢進効果も報告されている。そのため、滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現と放出に関わる MAP キナーゼの関与については一致した見解は得られていない。過去の研究では、滑膜炎に罹患した患者からの細胞を用いているが、患者由来の細胞では、滑膜炎の発症原因や病期、反応性が各々異なるため、安定した再現性を得ることが困難であることが原因と考えられる。本研究においては、健常なイヌの滑膜由来線維芽細胞を用いて、実験を行った結果、TNF- α 誘導性 IL-8 放出 ERK1/2 および JNK 経路が関わることを明らかとなった。近年、正常ヒトの滑膜由来線維芽細胞では、同一の見解が示唆されている。

本研究では、さらに、ERK および JNK のサブタイプについて検討し、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現と放出には ERK2 および JNK1 が関わることを明らかとなった。ERK1 および ERK2 はアミノ酸組成の相同性が高いことから、同一の機能を有すると考えられてきたが、別機能を有することが示された。JNK は、JNK1~JNK3 の 3 種類のサブタイプが存在する。JNK3 は心臓、脳、精巣の細胞に発現が限定されているが、JNK1 および JNK2 が様々な細胞に発現している。しかし、そのサブタイプの機能の差については不明な点が多い。本研究においては JNK1 と JNK2 も異なった機能を有することが示された。また、ERK および JNK がそれぞれ相互作用するという報告もあるが、本研究では ERK2 および JNK1 は独立して TNF- α 誘導性 IL-8 発現と放出に関わることも明らかとなった。

これらの結果は、イヌの関節炎発症における新たな知見を提供したものと思われ、関節炎に対する治療法ならびに予防が確立される礎になると期待される。