

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

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻
博士課程

難波 信一

2018

第1章 序 論	1
第2章 TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現とタンパク質放出	5
2.1 緒 言	6
2.2 材料と方法	7
2.2.1 材 料	7
2.2.2 細胞培養	7
2.2.3 Real-time RT-PCR	8
2.2.4 IL-8 測定	9
2.2.5 統計学的分析	9
2.3 結 果	10
2.4 考 察	11
第3章 TNF- α 誘導性 IL-8 発現における MAP キナーゼの関与	16
3.1 緒 言	17
3.2 材料と方法	17
3.2.1 材 料	17
3.2.2 細胞培養	19
3.2.3 Real-time RT-PCR	19
3.2.4 Western blotting	20
3.2.5 統計学的分析	20
3.3 結 果	20

3.3.1	TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果	21
3.3.2	TNF- α 誘導性 IL-8 放出に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果	21
3.3.3	TNF- α 誘導性 MAP キナーゼの活性化	22
3.3.4	TNF- α 誘導性 MAP キナーゼのリン酸化に対する阻害剤の効果	22
3.4	考 察	22
第 4 章 TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる ERK サブタイプ		30
4.1	緒 言	31
4.2	材料と方法	31
4.2.1	材 料	31
4.2.2	細胞培養	32
4.2.3	Real-time RT-PCR	33
4.2.4	siRNA の細胞導入 による ERK のノックダウン	33
4.2.5	Western blotting	34
4.2.6	統計学的分析	34
4.3	結 果	35
4.3.1	siRNA によるノックダウン細胞における ERK1 および ERK2 発現抑制	35
4.3.2	ERK2 ノックダウン細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA	

発現抑制	35
4.4 考 察	36
第 5 章 TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる JNK サブタイプ	41
5.1 緒 言	42
5.2 材料と方法	42
5.2.1 材 料	42
5.2.2 細胞培養	43
5.2.3 Real-time RT-PCR	43
5.2.4 siRNA の細胞導入による JNK のノックダウン	44
5.2.5 Western blotting	45
5.2.6 統計学的分析	45
5.3 結 果	46
5.3.1 siRNA による JNK1 と JNK2 のノックダウン細胞におけるタ ンパク質発現抑制	46
5.3.2 JNK1 ノックダウン細胞における IL-8 mRNA の発現抑制	46
5.4 考 察	47
第 6 章 TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる MAP キナーゼ間相互作用	52
6.1 緒 言	53
6.2 材料と方法	53
6.2.1 材 料	53

6.2.2	細胞培養	54
6.2.3	siRNA の細胞導入による ERK2 および JNK 1 のノックダウン	54
6.2.4	Western blotting	55
6.3	結果	56
6.3.1	ERK2 ノックダウン細胞における TNF- α 誘導性 JNK1 発現 とリン酸化	56
6.3.2	JNK1 ノックダウン細胞における TNF- α 誘導性 ERK2 発現 とリン酸化	56
6.4	考察	56
第7章 総括		61
謝辞		66
引用文献		67

第 1 章

序 論

リウマチ性関節炎 (RA) は、慢性進行性かつ炎症性の自己免疫性疾患であり、関節滑膜の免疫調節機構が破綻することにより軟骨と骨の重度な傷害ならびに破壊を引き起こす (Huber et al., 2006; Choy, 2012)。イヌにおいても RA をはじめとする免疫介在性関節炎が認められているが、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。滑膜の炎症である滑膜炎は RA の特徴と認識されており、腫瘍壊死因子 α (TNF- α) やインターロイキン 1 β (IL-1 β) などの炎症性サイトカインが滑膜炎の発生と進行性の関節破壊において極めて重要な役割を果たしている (Firestein, 2003; Smolen et al., 2003)。しかしながら、病態発生の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。

インターロイキン 8 (IL-8) は炎症性ケモカインの 1 つであり、炎症性刺激により産生され、好中球の遊走と血管新生を惹起する (Szekanecz et al., 2001; Cotton et al., 2016)。また、IL-8 は RA の関節疼痛を引き起こす原因としても報告されている (Catrina et al., 2017)。IL-8 は、ヒト RA 患者の滑液中や血清中 (Koch et al., 1991; Seitz et al., 1991; Szekanecz et al., 1998; Bodolay et al., 2002; Szekanecz et al., 2003)、また、イヌの RA 膝関節の滑液中から検出されることから (Hegemann et al., 2005; Doom et al., 2008)、関節炎における最も重要な炎症性ケモカインと考えられている (Kobayashi, 2008; Szekanecz et al., 2010)。ヒト RA の滑膜線維芽細胞においては、単球および軟骨細胞と同様に、炎症性サイトカインである TNF- α が IL-8 mRNA 発現とタンパク質放出を誘導することが報告されており (Suzuki et al., 2000; Juarranz et al., 2004; Westra et al., 2004; Kunisch et al., 2007; García et al.,

2008; Luo et al., 2008; Filer et al., 2009), RA などの炎症性関節疾患においては、滑膜線維芽細胞が IL-8 の産生と分泌に関与することを示している (Loetscher et al., 1994; Rodenburg et al., 1999; Berckmans et al., 2005)。

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAP キナーゼ) 経路は、TNF- α を含む炎症性サイトカイン刺激により活性化し、多くの生理的あるいは病的細胞機能において中心的な役割を担っているシグナル伝達経路であり、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) , c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) ならびに p38 が主要な MAP キナーゼとして関わっている (Kyriakis et al., 2001; Kaminska, 2005; Kyriakis et al., 2012)。RA 患者の滑膜組織ならびに滑膜線維芽細胞において、MAP キナーゼと、活性型であるリン酸化 MAP キナーゼの発現が認められ (Schett et al., 2000), また、RA 滑膜線維芽細胞において、MAP キナーゼが TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関与していることが報告されている (Suzuki et al., 2000; Juarranz et al., 2004; Luo et al., 2008; Akutsu et al., 2013)。

滑膜線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現と MAP キナーゼシグナル伝達経路の関連については、これまで RA 患者由来の滑膜線維芽細胞を用いた研究が行われてきた。しかしながら、RA 発症メカニズムを解明するためには、RA を含めた炎症反応がない状態の滑膜線維芽細胞を用いて、正常な細胞における炎症性サイトカイン刺激による活性化機序を理解する必要がある。

本研究は、イヌ関節炎の病態メカニズムの解明を目指し、健康な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 MAP キナーゼの活性化について明らかにすることを目的として、以下の検討を行った。

第2章では、イヌ滑膜由来線維芽細胞における IL-8 mRNA 発現と IL-8 タンパク質の放出に対する TNF- α の時間依存性および用量依存性効果を検討した。

第3章では、ERK, JNK および p38 MAP キナーゼ阻害剤を用いて、TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現とタンパク質放出に関与する MAP キナーゼ経路について検討した。

第4章では、TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現に関わる ERK サブタイプについて siRNA 導入したノックダウン細胞を用いて検討した。

第5章では、TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現に関わる JNK サブタイプについて siRNA 導入したノックダウン細胞を用いて検討した。

第6章では、TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現に関わる ERK と JNK の相互作用について検討した。

第 2 章

TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現とタンパク質放出

2.1 緒言

インターロイキン 8 (IL-8) は、炎症性ケモカインの 1 つであり、炎症性刺激により産生される炎症関連性メディエーターである (Harada et al, 1994)。産生された IL-8 は、好中球の遊走と血管新生を引き起こし、炎症反応に関わっている (Szekanecz et al., 2001; Cotton et al., 2016)。

ヒト RA 患者の滑液中ならびに血清中に IL-8 が検出されることが報告されている (Koch et al., 1991; Seitz et al., 1991; Szekanecz et al., 1998; Bodolay et al., 2002; Szekanecz et al., 2003)。また、イヌにおいても、RA の膝関節滑液中から IL-8 が検出されたと報告されている (Hegemann et al., 2005; Doom et al., 2008)。IL-8 は、RA 患者の関節に疼痛を引き起こす原因との報告もあり (Catrina et al., 2017)、関節炎における重要な炎症性ケモカインと考えられている (Kobayashi, 2008; Szekanecz et al., 2010)。

ヒト RA の滑膜線維芽細胞において、単球と軟骨細胞と同様に、炎症性サイトカインである TNF- α が IL-8 mRNA 発現とタンパク質放出を誘導することが報告されており (Suzuki et al., 2000; Juarranz et al., 2004; Westra et al., 2004; Kunisch et al., 2007; García et al., 2008; Luo et al., 2008; Filer et al., 2009)、RA などの炎症性関節疾患において、滑膜線維芽細胞が IL-8 の産生と放出に関与していることを示している (Loetscher et al., 1994; Rodenburg et al., 1999; Berckmans et al., 2005)。

本章では、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 刺激による IL-8 mRNA の発現と IL-8 タンパク質の放出について検討した。

2.2 材料と方法

2.2.1 材料

TRIzol は, Life Technology Co. (Carlsbad, CA, USA) より購入した。CELLBANKER 1 plus medium, PrimeScript[®] RT Master Mix, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, Thermal Cycler Dice[®] Real Time System II および TP900 DiceRealTime v4.02B は TaKaRa Bio Inc. (Shiga) より購入した。低グルコース添加ダルベッコ変法イーグル培地 (D-MEM 培地) およびトリプシンは Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka) より購入した。イヌ TNF- α は King fischer biotec inc. (St Paul, MN, USA) から、また、イヌ IL-8 酵素結合免疫吸着測定 (ELISA) キットは R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA) から購入した。StatMate IV は ATMS (Tokyo) より購入した。BICELL は Nihon Freezer Co., Ltd. (Tokyo) より購入した。

2.2.2 細胞培養

本研究では、帝京大学医学部の大森重紀氏より提供された臨床的に健康なイヌ (ビーグル犬, 雄, n=3、動物実験番号 13030) の膝関節から採取された滑膜を用いた。

イヌ滑膜を 3 mm 四方に切り, 90 mm のペトリ皿に貼り付け, 10%牛胎子血清 (FBS) を添加した D-MEM 培地を用い, 5% CO₂, 37°C のインキュベーター内で静置培養した。培地は 1 週間に一度交換した。イヌ滑膜由来線維芽細胞は, 貼り付けた組織の周囲に増殖した細胞から採取し, ディッシュ底面積の 90~95%に

まで増殖した時点で、0.25% のトリプシン/EDTA を用いて細胞を剥離して採取した。採取した細胞は、CELLBANKER 1 plus medium を用いて細胞数が 2×10^6 個 / 500 μ l, に調整し、滅菌セラムチューブにて保存した。セラムチューブは BICELL 容器に入れて -80°C で凍結保存した。実験前には、BICELL 容器からセラムチューブを取り出し、 37°C のウォーターバスに浸して細胞浮遊液を解凍した。細胞浮遊液を 10%FBS 添加 D-MEM 培地を入れた遠心用チューブに移し、300 g で 3 分間遠心分離した。上澄みを除去した後、細胞塊を培地に浮遊させ 75 cm^2 の培養フラスコに移し、凍結保存する前と同じ条件で培養器内に静置培養した。培養フラスコの底面積の約 90% にまで増殖した時点で 0.25% のトリプシン EDTA を用いて細胞を剥離し、細胞数が 1×10^6 個になるように 75 cm^2 の培養フラスコに播種した。これを繰り返すことにより細胞の継代を行った。本研究における全ての実験には、6~8 代目の細胞を使用した。

滑膜線維芽細胞の同定は、フローサイトメトリーにて線維芽細胞のマーカーである CD29、CD44 ならびに CD90 が陽性を示しており、血球系の細胞マーカーである CD14、CD34、CD45 ならびに HLA-DR が陰性であった。これらのことから、この細胞集団は血球系の細胞の混在を認めない均一集団であり、滑膜由来線維芽細胞と同定した。

2.2.3 Real-time RT-PCR

TRIzol 試薬を用いて、イヌ滑膜由来線維芽細胞から total RNA を抽出した。PrimeScript[®] 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 μ l の cDNA, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, イヌ IL-8 のプライマーを含む全量 25 μ l の反応液を用いて行った。表 2-1 に、Real-time RT-PCR に用いたプライマーの配列を示す。no-template control の Real-time RT-PCR は、2 μ l の RNase と DNase free water を用いて行った。no-reverse transcription control の Real-time RT-PCR は 2 μ l の各 RNA サンプルを用いて行った。PCR は、Thermal Cycler Dice[®] Real Time System II を用い、95°C 30 秒間の初期変性を 1 回、次いで 95°C 5 秒間の熱変性、アニーリングと伸長を 60°C で 30 秒間 \times 40 回の条件で行った。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。同量の cDNA を使用したイヌ TBP の増幅を内在性コントロールとし、また、イヌ滑膜由来線維芽細胞 (time : 0) からの cDNA の増幅を較正標準として用いた。

2.2.4 IL-8 測定

イヌ滑膜由来線維芽細胞は、6-well 培養プレートに 3.0×10^5 cells/well の密度で播種した。細胞を 24 時間 0.5% FBS を含む D-MEM 培地で培養後、各濃度の TNF- α で 0-24 時間処理し、培養上清を回収した。培養上清中の IL-8 の濃度は ELISA kit を用いて測定した。

2.2.5 統計学的分析

実験データは平均±標準誤差として算出した。統計解析は、StatMate IV を用いて実施した。タイムコースの実験データは、双方向の分散分析を用いて解析し、その他の実験データは、一元配置分散分析を用いて解析した。

2.3 結果

最初に、イヌ滑膜由来線維芽細胞における IL-8 mRNA 発現に対する TNF- α の効果を検討した。細胞を 50 ng/ml TNF- α で 0~48 時間刺激培養した後、TRIzol を用いて細胞から total RNA を回収し、IL-8 mRNA 発現の変化を Real-time RT-PCR を用いて測定した。図 2-1-A に示すように、IL-8 mRNA 発現は TNF- α 刺激後 6 時間をピークに上昇し、その後下降した。また、細胞を 0~100 ng/ml TNF- α で 24 時間刺激した後、同様に IL-8 mRNA 発現の変化を Real-time RT-PCR を用いて測定したところ、用量依存的に発現は上昇した (図 2-1-B)。

続いて、イヌ滑膜由来線維芽細胞における IL-8 タンパク質の放出に対する TNF- α の効果を検討した。細胞を 50 ng/ml TNF- α で 0~24 時間刺激を行い、培養上清中に放出される IL-8 濃度を、ELISA を用いて測定したところ、培養上清中の IL-8 濃度は 24 時間まで時間依存的に上昇した(図 2-2-A)。また、細胞を 0~100 ng/ml TNF- α で 24 時間刺激し、培養上清の IL-8 を ELISA にて測定したところ、TNF- α の用量依存的に放出量の上昇が認められた (図 2-2-B)。

2.4 考察

本章では、イヌ滑膜由来線維芽細胞において、炎症性サイトカインである TNF- α が経時的および用量依存的に IL-8 mRNA 発現を促進し、IL-8 タンパク質の放出を促進することを明らかにした。

TNF- α による細胞における IL-8 タンパク質発現についての検討の必要性はあるが、Western blotting による発現確認が困難であったため、IL-8 の細胞外への放出の検討を行った。TNF- α 刺激細胞において、刺激後 6 時間目まで有意に IL-8 mRNA 発現の促進が認められ、それに伴った IL-8 放出が認められた。また、IL-8 mRNA 発現促進は添加した TNF- α の用量に依存して認められたが、その用量範囲において、同様に用量依存的に IL-8 放出が引き起こされたことから、TNF- α 刺激により IL-8 mRNA の発現が促され、その結果 IL-8 タンパク質発現も促進されたものと考えられることができる。

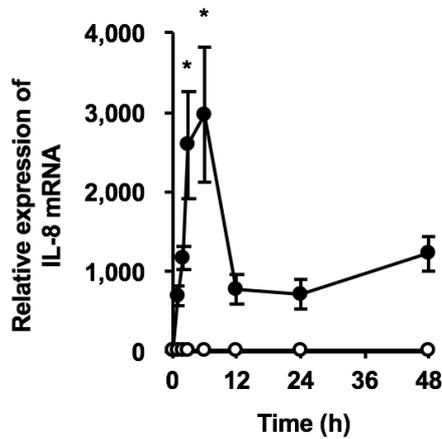
IL-8 は、ヒト RA 患者の滑液中や血清中 (Koch et al., 1991; Seitz et al., 1991; Szekanecz et al., 1998; Bodolay et al., 2002; Szekanecz et al., 2003)、また、イヌの RA 膝関節の滑液中から検出されている (Hegemann et al., 2005; Doom et al., 2008)。IL-8 の由来は、炎症時の免疫応答に関わる単球や白血球などが考えられる (Dong et al., 2015) が、RA 疾患を有するヒトの滑膜線維芽細胞においても、TNF- α が IL-8 mRNA 発現とタンパク質分泌を誘導することが報告されている (Suzuki et al., 2000; Juarranz et al., 2004; Westra et al., 2004; Kunisch et al., 2007; García et al., 2008; Luo et al., 2008; Filer et al., 2009)。炎症性関節疾患においては、滑膜線維芽細胞が IL-8 の産生と分泌に関与すると考えられている (Loetscher et al., 1994; Rodenburg

et al., 1999; Berckmans et al., 2005)。本研究においても、正常なイヌの滑膜由来線維芽細胞において、TNF- α によりIL-8 mRNA発現およびタンパク質の放出が促進されたことから、滑膜線維芽細胞が炎症性サイトカインに応答したIL-8の産生と放出を担う細胞であることが明らかとなった。IL-8は好中球の遊走活性や血管新生誘導能を有しており (Szekanecz et al., 2001; Cotton et al., 2016)、また、RAの関節疼痛を引き起こす原因としても報告されている (Catrina et al., 2017)ことから、TNF- α 刺激された滑膜由来線維芽細胞から放出されたIL-8が関節炎の進行に関与することが考えられる。

表 2-1. Real-time RT-PCR に用いたプライマーの配列

Gene Name	Accession No.	Primer sequences
<i>Canine IL-8</i>	Z70048.1	F: 5'-CACCTCAAGAACATCCAGAGCT-3' R: 5'-CAAGCAGAACTGAACTACCATCG-3'
<i>Canine TBP</i>	XM_863452	F: 5'-GGCGGATCAAGTGTTGGAAGGGAG-3' R: 5'-ACGCTTGGGATTGTATTCGGCATT-3'

A



B

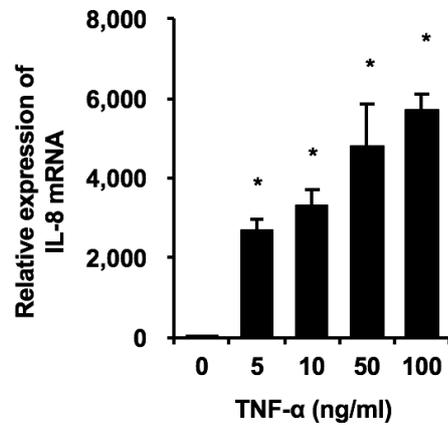
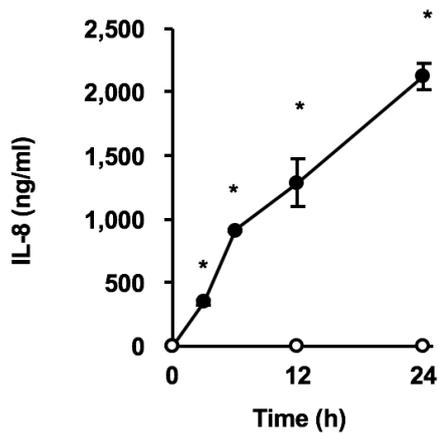


図 2-1. イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 刺激による IL-8 mRNA 発現の変化

(A) イヌ滑膜由来線維芽細胞を 50 ng/ml TNF- α 存在下 (●) または非存在下 (○) で 0 ~ 48 時間培養し、示された時間に TRIzol を用いて RNA を回収し、細胞内の IL-8 mRNA を Real-time RT-PCR にて測定した。(B) イヌ滑膜由来線維芽細胞を 0 ~ 100 ng/ml TNF- α で 24 時間刺激し、IL-8 mRNA を Real-time RT-PCR にて測定した。値は 3 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。* $P < 0.05$

A



B

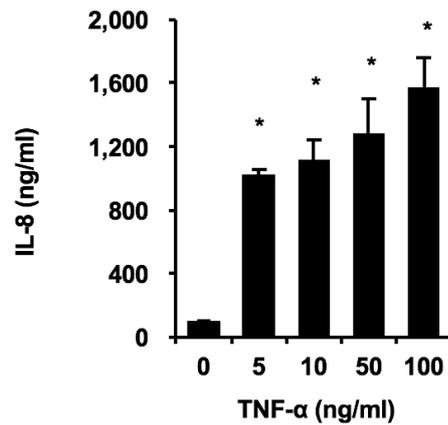


図 2-2. イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 刺激による IL-8 の放出

(A) イヌ滑膜由来線維芽細胞を 50 ng/ml TNF- α 存在下 (●) または非存在下 (○) で 0 ~ 48 時間培養し、示された時間に培養上清中に放出された IL-8 を ELISA にて測定した。(B) イヌ滑膜由来線維芽細胞を 0 ~ 100 ng/ml TNF- α で 24 時間刺激し、培養上清中に放出された IL-8 を ELISA にて測定した。値は、3 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。* $P < 0.05$

第3章

TNF- α 誘導性 IL-8 発現における MAP キナーゼの関与

3.1 緒言

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (mitogen-activated protein kinase: MAP キナーゼ) 経路は, 細胞増殖, 分化, ストレス応答など様々な細胞機能制御に関わる細胞内シグナル経路であり, 炎症にも関与する (Kyriakis et al., 2001; Kaminska, 2005; Kyriakis et al., 2012)。細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase: ERK), c-Jun N 末端キナーゼ (c-Jun N-terminal kinase: JNK) および p38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (p38 MAP キナーゼ) の 3 つが主たる MAP キナーゼとして検討が進められている (Kyriakis et al., 2001; Kaminska, 2005; Kyriakis et al., 2012)。

ヒトリウマチ 性関節炎 (RA) 患者の滑膜組織ならびに滑膜線維芽細胞に, MAP キナーゼおよび活性型であるリン酸化された MAP キナーゼの発現が認められている (Schett et al., 2000)。また, ヒト RA 患者由来の滑膜線維芽細胞において, MAP キナーゼは TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関与していることが報告されている (Suzuki et al., 2000; Juarranz et al., 2004; Luo et al., 2008; Akutsu et al., 2013)。

本章では, イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 刺激による IL-8 発現における MAP キナーゼの関与を検討した。

3.2 材料と方法

3.2.1 材料

TRIzol は, Life Technology Co. (Carlsbad, CA, USA) より購入した。

CELLBANKER 1 plus medium, PrimeScript® RT Master Mix, SYBR® Premix Ex Taq™ II, Thermal Cycler Dice® Real Time System IIおよび TP900 DiceRealTime v4.02B は TaKaRa Bio Inc. (Shiga) より購入した。ヒトリン酸化-ERK1/2 に対するウサギモノクローナル抗体(抗 p-ERK1/2, D13.14.4E)およびラット total-ERK1/2 に対するウサギモノクローナル抗体(抗 t-ERK1/2, 137F5)は, Cell Signaling Technology Japan, KK (東京), ヒトリン酸化-JNK に対するウサギモノクローナル抗体 (抗 t-JNK) は Promega Corporation (Madison, WI), ヒト total-JNK に対するウサギモノクローナル抗体は Abcam (Cambridge, UK) より購入した。なお。以上のヒト MAP キナーゼに対するモノクローナル抗体は、いずれもイヌの MAP キナーゼにも交差反応することを予め確認した。FR180204, SP600125, SB239063, SKF86002, 抗ヒト β -アクチン (AC74) マウスモノクローナル抗体は Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO) より購入した。horseradish peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) 抗ウサギおよび抗マウス IgG 抗体, ECL Western blotting Analysis System, ImageQuant LAS 4000 mini, protein A plus G Sepharose は GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA) より購入した。Mini-PROTEAN TGX gel, polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は Bio-Rad (Hercules, CA, USA) より購入した。Complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture と Block Ace は Roche (Mannheim, Germany) より購入した。低グルコース添加ダルベッコ変法イーグル培地 (D-MEM 培地) およびトリプシンは Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka) より購入した。イヌ TNF- α は King fischer biotec inc. (St Paul, MN, USA)から、イヌ IL-8 酵素免疫測定 (ELISA) kit は R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA) から購入した。StatMate IV は ATMS (Tokyo)

より購入した。BICELL は Nihon Freezer Co., Ltd. (Tokyo) より購入した。

3.2.2 細胞培養

第 2 章と同様に、イヌ滑膜由来線維芽細胞を分離し、細胞数が 1×10^6 個になるように 75 cm^2 の培養フラスコに播種し、10% FBS を添加した D-MEM 培地を用い、5% CO_2 、 37°C のインキュベーター内で培養した。

3.2.3 Real-time RT-PCR

前章と同様に、TRIzol 試薬を用いて、イヌ滑膜由来線維芽細胞から total RNA を抽出した。PrimeScript[®] 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 $2 \mu\text{l}$ の cDNA、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II、イヌ IL-8 あるいはイヌ TBP のプライマーを含む $25 \mu\text{l}$ の反応液を用いて行った。PCR は、Thermal Cycler Dice[®] Real Time System II を用い、 95°C 30 秒間の初期変性を 1 回、次いで 95°C 5 秒間の熱変性、アニーリングと伸長を 60°C で 30 秒間 $\times 40$ 回の条件で行った。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 ($\Delta\Delta\text{Ct}$) 法を適用した。同量の cDNA を使用したイヌ TBP の増幅を内在性コントロールとし、また、イヌ滑膜由来線維芽細胞 (time: 0) からの cDNA の増幅を較正標準として用いた。

3.2.4 Western blotting

サンプルバッファー (20 mM HEPES, 1 mM PMSF, 10 mM フッ化ナトリウム および complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, 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, dithiothreitol (DDT) 添加 sodium dodecyl sulfate (SDS) バッファーで 95°C, 5 分間煮沸した。サンプルを 10 µg ずつ 7.5% または 12% 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 分間室温にてブロッキングを行った。その後, PVDF 膜を一次抗体 [抗 p-ERK (1:1,000), 抗 t-ERK (1:1,000), 抗 p-JNK (1:1,000), 抗 t-JNK (1:1,000), 抗 β アクチン (1:10,000)] を用いて, 室温で 120 分間インキュベートした。洗浄後, PVDF 膜を HRP-conjugated anti-rabbit IgG または HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:10,000) 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。PVDF 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 統計学的分析

実験データは平均±標準誤差として算出した。統計解析は, StatMate IV を用いて実施した。実験データは, 一元配置分散分析を用いて解析した。

3.3 結果

3.3.1 TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果

前章で示したように、イヌ滑膜由来線維芽細胞を 50 ng/ml TNF- α で 6 時間刺激すると、TNF- α 誘導性の IL-8 mRNA の発現上昇を real-time RT-PCR にて確認できる。そこで、50 ng/ml TNF- α で刺激後 6 時間における TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現に対する各種 MAP キナーゼ阻害薬の効果により MAP キナーゼの関与を検討した。

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)を用いて細胞を 1 時間前処理した後、50 ng/ml TNF- α で刺激を行なったところ、TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA の発現は FR180204 ならびに SP600125 ではほぼ完全に抑制されたが、SB239063 ならびに SKF86002 では完全には抑制されなかった (図 3-1)。

3.3.2 TNF- α 誘導性 IL-8 放出に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果

前章で示したように、TNF- α 刺激は IL-8 の放出と産生を惹起する。そこで、ERK1/2 阻害剤 FR180204 (25 μ M)あるいは JNK 阻害剤 SP600125 (10 μ M) にて 1 時間前処理したイヌ滑膜由来線維芽細胞を TNF- α で刺激を行ない、刺激後 24 時間までの培養液中に放出される IL-8 濃度を ELISA にて測定した。図 3-2 に示すように、TNF- α 誘導性 IL-8 放出は、ERK1/2 あるいは JNK 阻害剤によりほぼ完全に抑制された。

これらのことから、TNF- α 誘導性の IL-8 mRNA 発現と IL-8 放出には、ERK 経路と JNK 経路の活性化が関与していることが考えられた。

3.3.3 TNF- α 誘導性 MAP キナーゼの活性化

MAP キナーゼの活性化はリン酸化により確認ができる。そこで、次に、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 刺激による各 MAP キナーゼの活性化を、それぞれの抗リン酸化抗体を用いた Western blotting により検討した。図 3-3 に示すように、ERK 1/2 は、50 ng/ml TNF- α 刺激後、約 15 分をピークに、約 5 分から約 15 分でリン酸化が確認され、その後対照レベルに戻った。また、図 3-4 に示すように、JNK は、50 ng/ml TNF- α 刺激後、約 15 分をピークに、約 15 分から約 30 分でリン酸化が確認され、その後対照レベルに戻った。

以上の結果より、イヌ滑膜由来線維芽細胞において、TNF- α は ERK1/2 と JNK を活性化することが示された。

3.3.4 TNF- α 誘導性 MAP キナーゼのリン酸化に対する阻害剤の効果

TNF- α 誘導性の ERK1/2 ならびに JNK のリン酸化に対する阻害剤の効果を検討した。50 ng/ml TNF- α で刺激後 15 分の ERK1/2 キナーゼのリン酸化は、ERK1/2 阻害剤 FR180204 (25 μ M) の前処理された細胞では抑制された。また、JNK 阻害剤 SP600125 (10 μ M) で前処理された細胞では、TNF- α 誘導性の JNK のリン酸化が抑制された (図 3-5A および B)。

3.4 考察

本章では、イヌ滑膜由来線維芽細胞における、TNF- α 誘導性の IL-8 産生に対する MAP キナーゼの関与を検討し、ERK1/2 阻害剤ならびに JNK 阻害剤にて TNF- α 誘導性の IL-8 mRNA 発現およびタンパク質放出が抑制されたこと、TNF- α 刺激によって ERK1/2 と JNK のリン酸化が引き起こされること、ERK1/2 と JNK のリン酸化がそれぞれの特異的阻害剤によって抑制されたことから、TNF- α 誘導性 IL-8 産生には、ERK1/2 と JNK の活性化が関わっていることが示された。

MAP キナーゼシグナル伝達経路は、関節炎を含む炎症において重要な細胞機能調節経路と考えられている (Thalhamer et al., 2008)。さらに、炎症性サイトカインにより誘導される IL-8 発現にも深く関わるということが報告されている (Suzuki et al., 2000; Juarranz et al., 2004; Luo et al., 2008; Akutsu et al., 2013)。RA 患者由来の滑膜線維芽細胞において、熱ショックタンパク質 70 が TNF- α 刺激による IL-8 分泌を抑制するが、同時に MAP キナーゼ経路の抑制が認められたことから、TNF- α 誘導性 IL-8 分泌に MAP キナーゼ経路の関与が示唆された (Luo et al., 2008)。また、RA 滑膜線維芽細胞において、TNF- α 刺激による IL-8 の分泌時に、哺乳動物の主要な MAP キナーゼ経路である p38, ERK1/2 および JNK の 3 つがすべて活性化されたと報告されている (Kunisch et al., 2007; Luo et al., 2008)。さらに、p38 阻害剤が RA 滑膜線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 を減弱することから、p38 MAP キナーゼの関与も報告されている (Suzuki et al., 2000; Westra et al., 2004)。しかし、一方で、p38, ERK1/2 および JNK の 3 つの MAP キナーゼ阻害剤は、早期継代 RA 滑膜線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 タンパク質

分泌には影響を及ぼさなかったとも報告されている (Kunisch et al., 2007)。また、p38 阻害剤が、RA 滑膜線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 の分泌を増強すると報告されている (Dulos et al., 2013) ことから、滑膜線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現と分泌における MAP キナーゼの関与においては定まった見解がなされていないのが現状である。これらの異なる結果は、異なる状態の RA 患者由来の滑膜線維芽細胞が原因となっていると考えられる。本研究においては、健常なイヌからの滑膜由来線維が細胞を使用し、TNF- α 誘導性 IL-8 産生には、ERK1/2 と JNK の活性化が関わっていることを示している。近年、健常なヒトの滑膜由来線維芽細胞において、TNF- α 誘導性 IL-8 産生に ERK1/2 と JNK の活性化が関わるということが報告されていることから (Chen et al., 2011)、滑膜線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現と分泌における MAP キナーゼの関与の見解の不一致は、異なる状態の RA 患者由来の細胞に起因するものと考えられる。

滑膜由来線維芽細胞の ERK1/2 と JNK の活性化には、細胞接着および遊走誘導に関わる即時初期遺伝子産物 Cyr61/CCN1 が関わり、IL-8 の産生および分泌を刺激すると報告されている (Zhu et al., 2013)。また、ヒト口腔連鎖球菌由来の病原体や壊死細胞から分泌されるタンパク質 I/II および尿酸が、ERK1/2 および JNK を活性化して IL-8 の産生および分泌を刺激すると報告されている (Neff et al., 2003; Chen et al., 2011)。ヒトの RA 患者における関節の進行性破壊においても、ERK1/2 と JNK の活性化増強が観察されたとの報告からも (de Launay., 2012)、滑膜由来線維芽細胞の TNF- α 誘導性 IL-8 産生に ERK1/2 と JNK の活性化が関わりと考えられる。

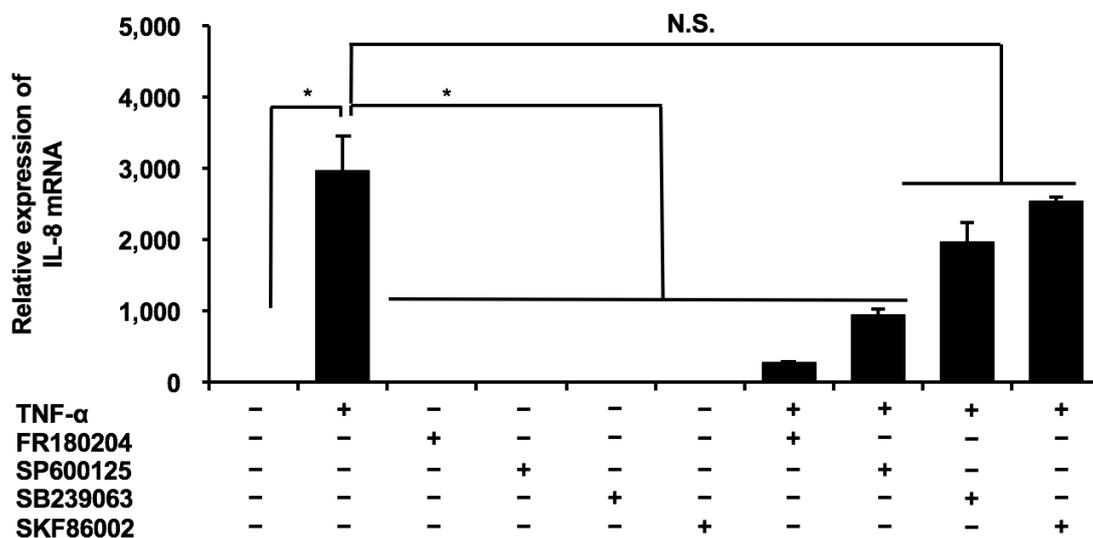


図 3-1. イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果

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) と SKF86002 (20 μ M) で 1 時間前処理した後, 50 ng/ml TNF- α 存在下または非存在下で 6 時間インキュベートし, IL-8 mRNA 発現の変化を Real-time RT-PCR にて検討した。値は独立に繰り返し実施した 3 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。* $P < 0.05$

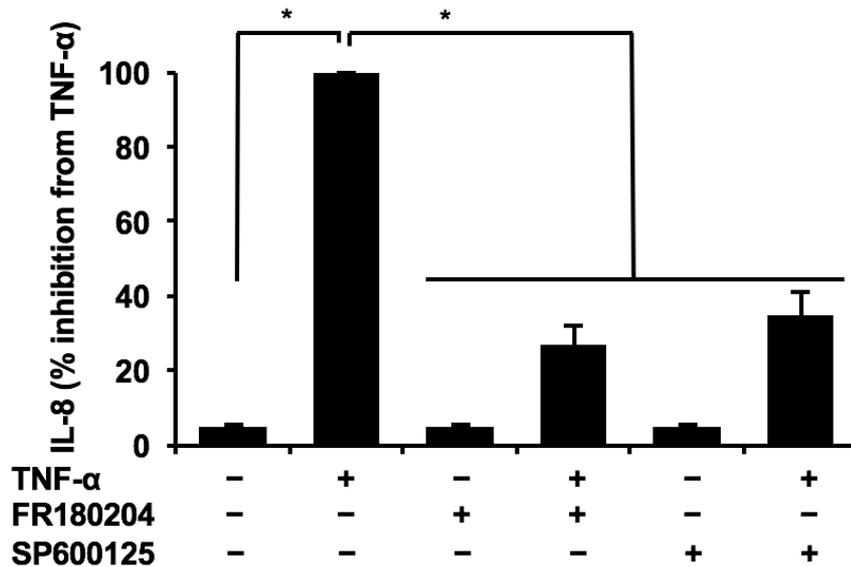


図 3-2. イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 放出に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果

ERK1/2 阻害剤 FR180204 (25 μ M), JNK 阻害剤 SP600125 (10 μ M) で 1 時間前処理した後, 50 ng/ml TNF- α 存在下または非存在下で 24 時間インキュベートし, 培養上清中に放出された IL-8 濃度を ELISA にて測定した。阻害剤の効果は, TNF- α 誘導性 IL-8 放出を 100%とした場合の相対値で示してある。値は独立に繰り返し実施した 3 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。* $P < 0.05$

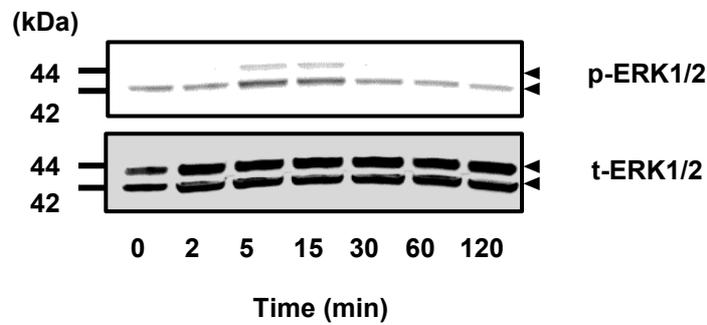


図 3-3. イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α による ERK1/2 リン酸化の経時的変化

イヌ滑膜由来線維芽細胞を 50 ng/ml TNF- α で 0~120 分間刺激した後，リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) および total-ERK1/2 (t-ERK1/2) について特異的抗体を用いた Western blotting により検出した。独立に繰り返し実施した 3 例の中の代表的な結果を示す。

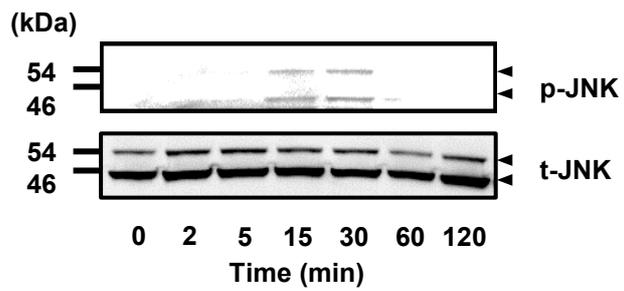


図 3-4. イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α による JNK リン酸化の経時的変化

イヌ滑膜由来線維芽細胞を 50 ng/ml TNF- α で 0~120 分間刺激した後，リン酸化 JNK (p-JNK) および total-JNK (t-JNK) について特異的抗体を用いた Western blotting により検出した。独立に繰り返し実施した 3 例の中の代表的な結果を示す。

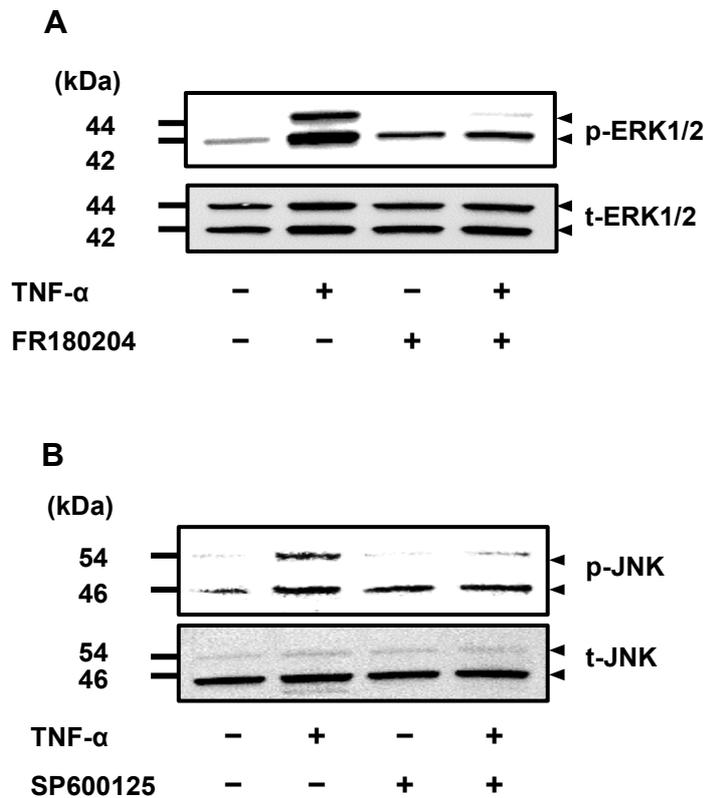


図 3-5 イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 ERK1/2 ならびに JNK のリン酸化に対する ERK1/2 および JNK 阻害剤の効果

(A) イヌ滑膜由来線維芽細胞を ERK1/2 阻害剤 FR180204 (25 μ M) で 1 時間前処理した後, 50 ng/ml TNF- α 存在下または非存在下で 15 分間インキュベートし, リン酸化 ERK1/2 (p-ERK) および total-ERK (t-ERK) を特異的抗体を用いた Western blotting により検出した。(B) 同様に JNK1/2 阻害剤 SP600125 (10 μ M) で 1 時間前処理した細胞を, 50 ng/ml TNF- α 存在下または非存在下で 15 分間インキュベートし, リン酸化 JNK (p-JNK) および total JNK (t-JNK) を特異的抗体を用いた Western blotting により検出した。それぞれ独立に繰り返し実施した 3 例の中の代表的な結果を示す。

第 4 章

TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる ERK サブタイプ

4.1 緒言

炎症に関与するシグナル伝達経路として、MAP キナーゼの存在が知られており、ERK, JNK, p38 を中心として検討が進められていることは前述した (Kyriakis et al., 2001; Kaminska, 2005; Kyriakis et al., 2012)。第 3 章において、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現およびタンパク質の放出は ERK 阻害剤と JNK 阻害剤によって抑制されたが、p38 阻害剤によって阻害されなかったことから、TNF- α 誘導性 IL-8 発現には ERK と JNK が関与していることが示唆された。

ERK および JNK には異なるサブタイプが存在することが知られている (Kyriakis et al., 2001; 2012)。しかし、サブタイプに特異的な阻害剤が存在しないため、それぞれのサブタイプの細胞機能への関わりは不明な点が多い。第 3 章で使用した ERK 阻害剤 FR180204 も ERK1 および ERK2 の両者に効果を示す。そこで本章では、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる ERK のサブタイプを明らかにする目的で、ERK1 または ERK2 を特異的にノックダウンした細胞を用い、検討を行った。

4.2 材料と方法

4.2.1 材料

TRIzol は、Life Technology Co. (Carlsbad, CA, USA) より購入した。CELLBANKER 1 plus medium, PrimeScript[®] RT Master Mix, SYBR[®] Premix Ex Taq[™]

II, Thermal Cycler Dice[®] Real Time System II および TP900 DiceRealTime v4.02B は TaKaRa Bio Inc. (Shiga) より購入した。抗ラット total-ERK1/2 ウサギモノクローナル抗体(抗 t-ERK1/2, 137F5)は Cell Signaling Technology Japan, KK (東京) より, 抗 β -アクチン (AC74) マウスモノクローナル抗体は Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO, USA) より購入した。Scramble siRNA, ERK1 および ERK2 に対する siRNA は Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO, USA) に合成を依頼した。horseradish peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) 抗ウサギおよび抗マウス IgG 抗体, ECL Western blotting Analysis System, ImageQuant LAS 4000 mini, protein A plus G Sepharose は GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA) より購入した。Mini-PROTEAN TGX gel, polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は Bio-Rad (Hercules, CA, USA) より購入した。Complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture と Block Ace は Roche (Mannheim, Germany) より購入した。低グルコース添加ダルベッコ変法イーグル培地 (D-MEM 培地) およびトリプシンは Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka) より購入した。イヌ TNF- α は King fischer biotec inc. (St Paul, MN, USA) から購入した。StatMate IV は ATMS (Tokyo) より購入した。BICELL は Nihon Freezer Co., Ltd. (Tokyo) より購入した。

4.2.2 細胞培養

前章までと同様に, イヌ滑膜由来線維芽細胞を分離し, 細胞数が 1×10^6 個になるように 75 cm^2 の培養フラスコに播種し, 10% FBS を添加した D-MEM 培地を用い, 5% CO_2 , 37°C のインキュベーター内で培養した。

4.2.3 Real-time RT-PCR

TRIzol 試薬を用いて、イヌ滑膜由来線維芽細胞から Total RNA を抽出した。PrimeScript[®] 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 μ l の cDNA, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, イヌ IL-8 のプライマーを含む 25 μ l の反応液を用いて行った。プライマーは第 2 章の表 2-1 に示した配列と同じものを使用した。no-template control の Real-time RT-PCR は、2 μ l の RNase と DNase free water を用いて行った。no-reverse transcription control の Real-time RT-PCR は 2 μ l の各 RNA サンプルを用いて行った。PCR は、Thermal Cycler Dice[®] Real Time System II を用い、95°C 30 秒間の初期変性を 1 回、次いで 95°C 5 秒間の熱変性、アニーリングと伸長を 60°C で 30 秒間×40 回の条件で行った。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。同量の cDNA を使用したイヌ TBP の増幅を内在性コントロールとし、また、イヌ滑膜由来線維芽細胞 (time : 0) からの cDNA の増幅を較正標準として用いた。

4.2.4 siRNA の細胞導入による ERK のノックダウン

イヌ滑膜由来線維芽細胞を、35 mm のディッシュに 1.0×10^5 cells/well, もしくは 90 mm のディッシュに 5.0×10^5 cells/well の密度で播種し、100 nM の ERK1 siRNA, ERK2 siRNA, または Scramble siRNA を、10 μ l/ml の Lipofectamine 2000

を含む Opti-MEM を使用して 6 時間インキュベーター内で静置することにより siRNA を細胞へトランスフェクトした。表 4-1 に ERK1 ならびに ERK2 の siRNA の配列を示す。siRNA の効果は抗 t-ERK1/2 抗体および抗 β アクチン抗体を用いた Western blotting により確認した。

4.2.5 Western blotting

サンプルバッファー (20 mM HEPES, 1 mM PMSF, 10 mM フッ化ナトリウムおよび complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, 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、dithiothreitol (DDT) 添加 sodium dodecyl sulfate (SDS) バッファーで 95°C, 5 分間煮沸した。サンプルを 10 μ g ずつ 7.5% または 12% 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 分間室温にてブロッキングを行った。その後、PVDF 膜を一次抗体 [抗 t-ERK1/2 抗体 (1:1,000), 抗 β アクチン抗体 (1:10,000)] を用いて、室温で 120 分間インキュベートした。洗浄後、PVDF 膜を HRP-conjugated anti-rabbit IgG(1:10,000)または HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:10,000) 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。PVDF 膜の化学発光シグナルは ImageQuant LAS 4000 mini を用いて測定した。

4.2.6 統計学的分析

実験データは平均 ± 標準誤差として算出した。統計解析は、StatMate IV を用いて実施した。実験データは、一元配置分散分析を用いて解析した。

4.3 結果

4.3.1 siRNA によるノックダウン細胞における ERK1 および ERK2 の発現抑制

イヌ滑膜由来線維芽細胞に ERK1 siRNA または ERK2 siRNA を、また、対照として scramble siRNA を Lipofectamine 2000 を用いて導入した。それぞれの細胞において抗 t-ERK1/2 抗体を用いた Western blotting にて ERK1 および ERK2 発現を検討した。図 4-1 に示すように、対照として用いた scramble siRNA 導入細胞と比べて、ERK1 ノックダウン細胞では t-ERK1 発現は有意に抑えられており、また、ERK2 ノックダウン細胞では t-ERK2 発現が有意に抑えられていることが確認された。

4.3.2 ERK2 ノックダウン細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA の発現抑制

siRNA にて ERK1 あるいは ERK2 をノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現について Real-time RT-PCR を用いて検討した。図 4-2 に示すように、ERK1 ノックダウン細胞においては TNF- α の IL-8 mRNA 発現に対する効果は scramble siRNA 導入細胞と比べて有意な変化は認められなかったが、ERK2 ノックダウン細胞においては TNF- α 誘導性の IL-8 mRNA 発現は有意に抑制された。両ノックダウン細胞において、 β アクチンの発現

に変化は認められなかった。

4.4 考察

第3章での阻害剤を用いた結果より、イヌ滑膜由来線維芽細胞において、ERKとJNKがTNF- α 誘導性のIL-8の発現調節に関わることが示唆されたことから、本章では、ERKのサブタイプについて検討を行った。その結果、ERK2ノックダウン細胞においてTNF- α 誘導性のIL-8 mRNA発現が抑制されたことから、ERK2が機能的なサブタイプとして関与することを明らかにした。

ERKには異なるサブタイプが存在し、その中で最も広く研究されているのはERK1およびERK2である。ヒトにおいてERK1およびERK2は、83%のアミノ酸同一性を共有し、ほとんどの組織で共に発現される (Boulton et al., 1991a; 1991b; Shin et al., 2010)。これらの2つのサブタイプは、一般に、複数の細胞外刺激に応答して共に活性化される (Meloche, 1995; Lewis et al., 1998; Cobb et al., 2000)。以前の研究では、活性化対立遺伝子またはサブタイプ特異的阻害剤が利用できなかったため、2つのサブタイプ間の機能的差異は不明であった (Radtke et al., 2013; Saba-El-Leil et al., 2016)。近年、アンチセンス技術またはsiRNAトランスフェクションは、滑膜線維芽細胞を含むいくつかのタイプの細胞におけるERKサブタイプを阻害するための非常に特異的な方法として導入されている (Li et al., 2006; Frémin et al., 2007; Bessard et al., 2008; Li et al., 2009; Shin et al., 2010; 2013; Bonito et al., 2014; Kitanaka et al., 2017)。

本研究では、ERK サブタイプ特異的 siRNA をイヌ滑膜由来線維芽細胞に導入することにより ERK のノックダウンを行った。ERK2 ノックダウン細胞では、TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現は減弱したが、ERK1 ノックダウン細胞では減弱しなかった。この結果より、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現において ERK2 が優位に機能するサブタイプであることが示された。

表 4-1. siRNA に用いた RNA の遺伝子配列

Gene Name	Accession No.	siRNA sequences
<i>Canine ERK1</i>	NM_001252035.1	F: 5'-CCAAUGUGCUCCACCGGGA-3' R: 5'-UCCCGGUGGAGCACAUUGG-3'
<i>Canine ERK2</i>	NM_001110800.1	F: 5'-CCCAAUGCUGACUCGAAA-3' R: 5'-UUUCGAGUCAGCAUUUGGG-3'

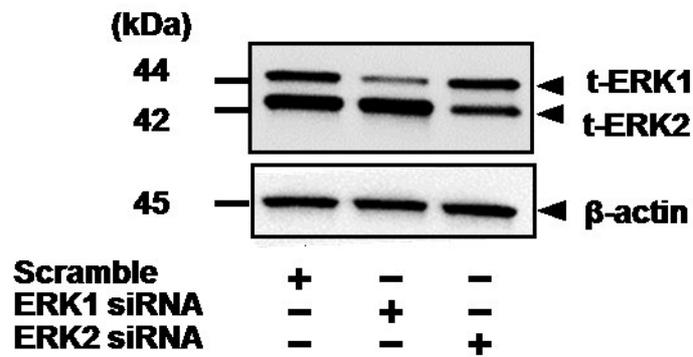


図 4-1. siRNA による ERK1 と ERK2 のノックダウン細胞におけるタンパク質発現抑制

siRNA により, ERK1 と ERK2 をそれぞれノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞におけるタンパク質の発現抑制を抗 t-ERK1/2 抗体を用いた Western blotting にて確認した。β アクチン発現を内部標準として用いた。独立に繰り返し実施した 3 例の中の代表的な結果を示す。

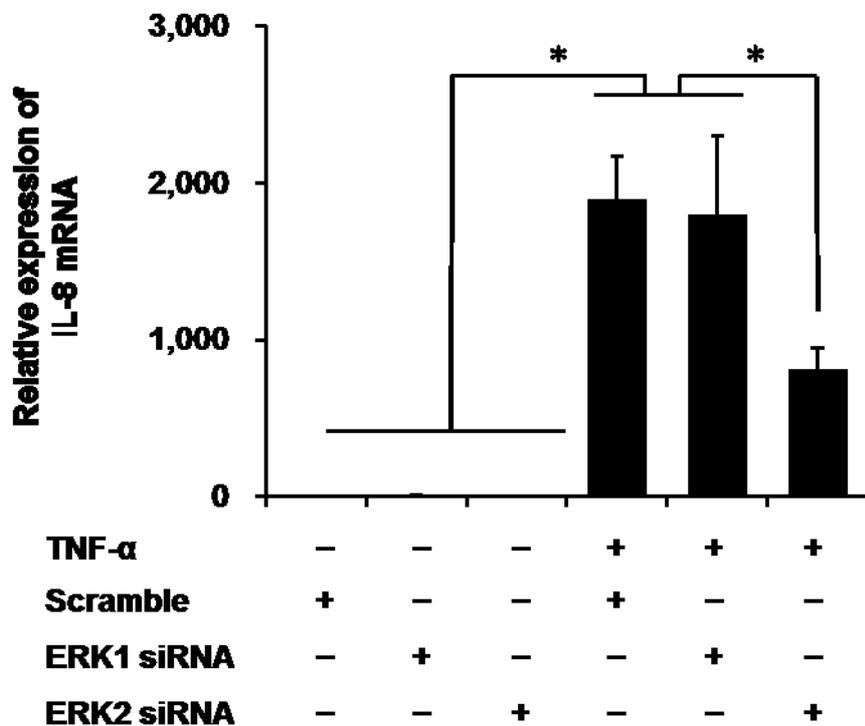


図 4-2. ERK1 および ERK2 をノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 刺激による IL-8 mRNA 発現

siRNA を用いて、ERK1 と ERK2 をそれぞれノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞において、24 時間の TNF- α 刺激を行った後、IL-8 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて検討した。TNF- α 誘導性の IL-8 mRNA 発現は、Scramble siRNA 導入細胞を対照とすると、ERK2 ノックダウン細胞では有意に減少し、ERK1 ノックダウン細胞では有意な差は認められなかった。結果は、3 例の独立した実験結果の平均 \pm 標準誤差を示す。* $P < 0.05$

第 5 章

TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる JNK サブタイプ

5.1 緒言

イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 刺激による IL-8 発現について、第 3 章では TNF- α 刺激による IL-8 mRNA 発現およびタンパク質放出に対する ERK1/2 阻害剤, JNK 阻害剤ならびに p38 阻害剤の効果より, TNF- α 誘導性 IL-8 発現に ERK1/2 と JNK が関与していることを明らかにした。さらに第 4 章では, イヌ滑膜由来線維芽細胞に対して siRNA による ERK1 と ERK2 のノックダウンを行うことで, TNF- α 刺激による IL-8 の発現に ERK のサブタイプである ERK2 が関与することを明らかにした。そこで, 本章では TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる JNK のサブタイプを明らかにすることを目的とした。JNK は JNK1~3 の 3 種類のサブタイプが知られている (Kyriakis et al, 2001; 2012)。JNK1 および JNK2 は種々の組織や細胞で発現が認められるが, JNK3 は脳, 心臓および精巣にのみ特異的に発現が認められる (Yang et al., 1997) ことから, 本章では JNK1 および JNK2 を標的とし, JNK1 または JNK2 を特異的にノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞を用い, 検討を行った。

5.2 材料と方法

5.2.1 材料

TRIzol は, Life Technology Co. (Carlsbad, CA, USA) より購入した。CELLBANKER 1 plus medium, PrimeScript[®] RT Master Mix, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, Thermal Cycler Dice[®] Real Time System II および TP900 DiceRealTime v4.02B は TaKaRa Bio

Inc. (Shiga, Japan) より購入した。ヒト total-JNK1[抗 t-JNK1, EPR140(2)]およびヒト total-JNK2 に対するウサギモノクローナル抗体(抗 t-JNK2, EP1595Y)は Abcam (Cambridge, UK) より、また、抗 β -アクチン (AC74) マウスモノクローナル抗体は Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO, USA) より購入した。Scramble siRNA, JNK1 および JNK2 に対する siRNA は Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO, USA)に合成を依頼した。horseradish peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) 抗ウサギおよび抗マウス IgG 抗体, ECL Western blotting Analysis System, ImageQuant LAS 4000 mini は GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA) より購入した。Mini-PROTEAN TGX gel, polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は Bio-Rad (Hercules, CA, USA) より購入した。Complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture と Block Ace は Roche (Mannheim, Germany) より購入した。低グルコース添加ダルベッコ変法イーグル培地 (D-MEM 培地) およびトリプシンは Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka) より購入した。StatMate IV は ATMS (Tokyo) より購入した。BICELL は Nihon Freezer Co., Ltd. (Tokyo) より購入した。

5.2.2 細胞培養

前章までと同様に、イヌ滑膜由来線維芽細胞を分離し、細胞数が 1×10^6 個になるように 75 cm^2 の培養フラスコに播種し、10% FBS を添加した D-MEM 培地を用い、5% CO_2 , 37°C のインキュベーター内で培養した。

5.2.3 Real-time RT-PCR

TRIzol 試薬を用いて、イヌ滑膜由来線維芽細胞から total RNA を抽出した。PrimeScript® 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® Premix Ex Taq™ II, イヌ IL-8 のプライマーを含む 25 µl の反応液を用いて行った。プライマーは第 2 章の表 2-1 に示した配列と同じものを使用した。no-template control の Real-time RT-PCR は、2 µl の RNase と DNase free water を用いて行った。no-reverse transcription control の Real-time RT-PCR は 2 µl の各 RNA サンプルを用いて行った。PCR は、Thermal Cycler Dice® Real Time System II を用い、95°C 30 秒間の初期変性を 1 回、次いで 95°C 5 秒間の熱変性、アニーリングと伸長を 60°C で 30 秒間× 40 回の条件で行った。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。同量の cDNA を使用したイヌ TBP の増幅を内在性コントロールとし、また、イヌ滑膜由来線維芽細胞 (time : 0) からの cDNA の増幅を較正標準として用いた。

5.2.4 siRNA の細胞導入による JNK のノックダウン

イヌ滑膜由来線維芽細胞を、35 mm のディッシュに 1.0×10^5 cells/well, もしくは 90 mm のディッシュに 5.0×10^5 cells/well の密度で播種し、100 nM の JNK1 siRNA, JNK2 siRNA, または Scramble siRNA を、10 µl/ml の Lipofectamine 2000 を含む Opti-MEM を使用して 6 時間インキュベーター内で静置することにより siRNA を細胞へトランスフェクトした。表 5-1 に JNK1 ならびに JNK2 の siRNA

の配列を示す。siRNA の効果を抗 t-JNK1 抗体, 抗 t-JNK2 抗体および抗 β アクチン抗体を用いた Western blotting により確認した。

5.2.5 Western blotting

サンプルバッファー (20 mM HEPES, 1 mM PMSF, 10 mM フッ化ナトリウムおよび complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, 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, dithiothreitol (DDT) 添加 sodium dodecyl sulfate (SDS) バッファーで 95°C, 5 分間煮沸した。サンプルを 10 μ g ずつ 7.5% または 12% 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 分間室温にてブロッキングを行った。その後, PVDF 膜を一次抗体[抗 t-JNK 抗体 (1:1,000), 抗 t-JNK2 抗体 (1:1,000), 抗 β アクチン抗体 (1:10,000)] を用いて, 室温で 120 分間インキュベートした。洗浄後, PVDF 膜を HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:10,000) または HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:10,000) 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。PVDF 膜の化学発光シグナルは ImageQuant LAS 4000 mini を用いて測定した。

5.2.6 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。統計解析は, StatMate IV を用いて実施した。実験データは, 一元配置分散分析を用いて解析した。

5.3 結果

5.3.1 siRNA による JNK1 と JNK2 のノックダウン細胞におけるタンパク質発現抑制

イヌ滑膜由来線維芽細胞に JNK1 siRNA, JNK2 siRNA および scramble siRNA を Lipofectamine 2000 を使用して導入し, 抗 t-JNK1 および t-JNK2 抗体を用いた Western blotting にて JNK1 および JNK2 発現を検討した。JNK1 をノックダウンした細胞では t-JNK1 発現が有意に抑えられており, 一方, JNK2 をノックダウンした細胞では t-JNK2 発現が有意に抑えられていることが確認された。JNK1 および JNK2 ノックダウン細胞において, β アクチン発現に変化は認められなかった (図 5-1)。

5.3.2 JNK1 ノックダウン細胞における IL-8 mRNA の発現抑制

siRNA を導入することにより JNK1 または JNK2 の発現が抑えられたことから, 次に JNK1 または JNK2 をノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現について Real-time RT-PCR を用いて検討した。図 5-2 に示すように, JNK1 ノックダウン細胞においては, TNF- α 誘導性 IL-8 mRNA 発現は有意に抑制された。しかし, JNK2 ノックダウン細胞における IL-8 mRNA 発現に対する TNF- α の効果は, 対照として用いた Scramble siRNA 導入細胞との間に有意な変化は認められなかった。

5.4 考察

第4章では ERK のサブタイプである ERK2 が TNF- α 誘導性 IL-8 産生ならびに分泌に関与していることが明らかとなった。本章では, JNK のサブタイプである JNK1 が IL-8 mRNA の相対発現に関与することを明らかにした。

JNK は 10 個のアイソフォームが同定されており, 3 つの異なる遺伝子, すなわち JNK1, JNK2 および JNK3 のサブタイプによってコードされている。ヒトにおいて JNK1 および JNK2 は, 様々な組織において普遍的に発現しているが, JNK3 は主に心臓, 精巣および脳に限定されている (Davis, 2000; Sehgal et al., 2013)。JNK1 遺伝子または JNK2 遺伝子のいずれかが欠損しているマウスでは, 異なる表現型を示す (Davis, 2000; Saba-El-Leil et al., 2016)。JNK1^{-/-} および JNK2^{-/-} のマウス胚由来線維芽細胞では, 増殖速度が明らかに阻害された (Sabapathy et al., 2004)。本研究では, siRNA トランスフェクションによって, JNK1 は滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現に寄与するが, JNK2 は寄与しないことが確認された。また, JNK 阻害剤は, アジュバント誘発性ラット関節炎の関節破壊を抑制し (Han et al., 2001), JNK1 阻害ペプチドは, マウス RA モデル (K/BxN) における滑膜炎を抑制した (Guma et al., 2010)。これらの所見は, JNK1 が滑膜炎を誘導し, RA の病因に重要な役割を果たすことを支持している。

本研究では, JNK サブタイプ特異的 siRNA でイヌ滑膜由来線維芽細胞をトラ

ンスフェクトすることにより JNK ノックダウンを行った。 JNK1 ノックダウン細胞では、TNF- α 誘発 IL-8 mRNA 発現は減弱したが、JNK2 ノックダウン細胞では減弱しなかった。これは、滑膜線維芽細胞における TNF- α 誘発 IL-8 発現において JNK1 が優性サブタイプであることを示している。

表 5-1. siRNA に用いた RNA の遺伝子配列

Gene Name	Accession No.	siRNA sequences
<i>Canine JNK1</i>	XM_011287267.1	F: 5'-GAAUCAGACUCAUGC UAAA-3' R: 5'-TTTAGCATGAGTCTGATTC-3'
<i>Canine JNK2</i>	XM_01281507.1	F: 5'-GGUAUUAUCGGGCACCCGA-3' R: 5'-UCGGGUGCCCGAUAAUACC-3'

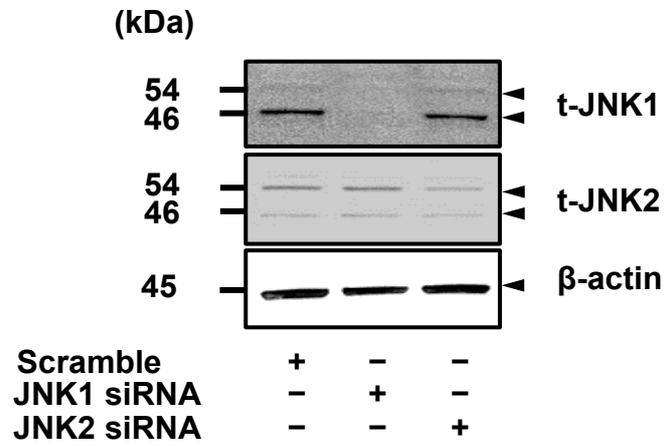


図 5-1. siRNA による JNK1 と JNK2 のノックダウン細胞におけるタンパク質発現抑制

siRNA により, JNK1 と JNK2 をそれぞれノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞におけるタンパク質の発現抑制を抗 t-JNK1 抗体, 抗 t-JNK2 抗体を用いた Western blotting にて確認した。β アクチン発現を内部標準として用いた。独立して実施した 3 例の中の代表的な結果を示す。

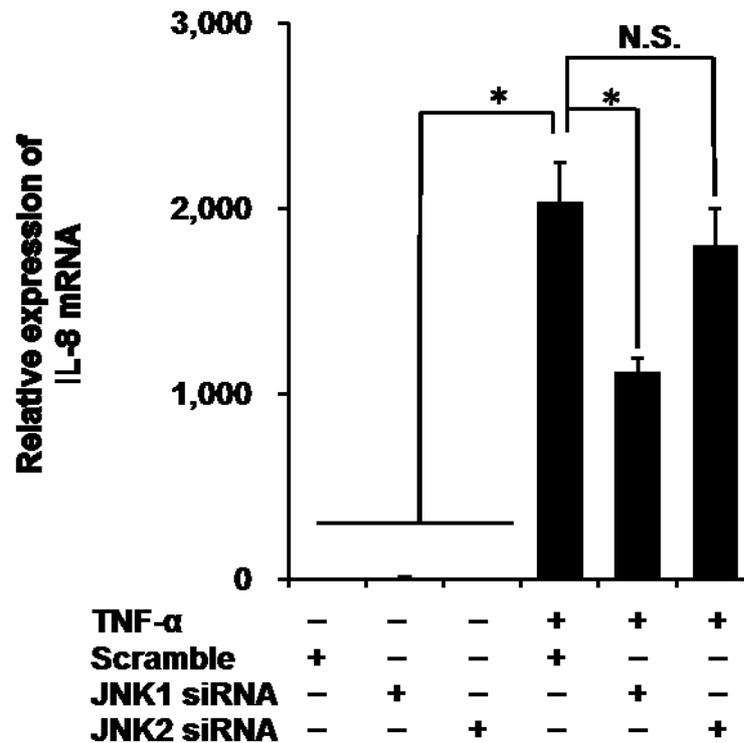


図 5-2. JNK1 および JNK2 をノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 刺激による IL-8 mRNA 発現

siRNA を用いて、JNK1 と JNK2 をそれぞれノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞において、24 時間の TNF- α 刺激を行った後、IL-8 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて検討した。TNF- α 誘導性の IL-8 mRNA 発現は、Scramble siRNA 導入細胞を対照とすると、JNK1 ノックダウン細胞では有意に減少し、JNK2 ノックダウン細胞では有意な差は認められなかった。結果は、3 例の独立した実験結果の平均 \pm 標準誤差を示す。* $P < 0.05$

第 6 章

TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる MAP キナーゼ間相互作用

6.1 緒言

イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる MAP キナーゼについて, 第4章では ERK サブタイプの siRNA を細胞導入することで ERK2 が関与することを明らかにした。また, 第5章では, JNK のサブタイプを siRNA を用いて検討し, JNK1 が関わることを明らかにした。ERK および JNK のそれぞれのシグナル伝達経路は多くの細胞においてパラレルに細胞機能に関与すると考えられているが, 一方で, ERK と JNK の伝達経路との間に相互作用 (クロストーク) があることも, いくつかのタイプの細胞において報告されている (Shen et al., 2003; Yu et al., 2003; Adler et al., 2005; Bavaria et al., 2014; Kitanaka et al., 2017)。そこで, 本章では, イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる ERK2 と JNK1 のクロストークについて検討した。

6.2 材料と方法

6.2.1 材料

ヒトリン酸化-ERK1/2 に対するウサギモノクローナル抗体 (抗 p-ERK1/2, D13.14.4E) およびラット total-ERK1/2 に対するウサギモノクローナル抗体(抗 t-ERK1/2, 137F5)は Cell Signaling Technology Japan, KK (東京) より, ヒト total-JNK1[抗 t-JNK1, EPR140(2)]およびヒト total-JNK2 に対するウサギモノクローナル抗体(抗 t-JNK2, EP1595Y)は Abcam (Cambridge, UK) より, リン酸化 JNK に対するウサギポリクローナル抗体 (抗 p-JNK) は Promega Co. (Madison, WI, USA)

より、また、抗 β -アクチン (AC74) マウスモノクローナル抗体(AC74)は Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO、USA)より購入した。Scramble siRNA, ERK2 および JNK1 に対する siRNA は Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO, USA)に合成を依頼した。horseradish peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) 抗ウサギおよび抗マウス IgG 抗体, ECL Western blotting Analysis System, ImageQuant LAS 4000 mini は GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA) より購入した。Mini-PROTEAN TGX gel, polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は Bio-Rad (Hercules, CA, USA) より購入した。Complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture と Block Ace は Roche (Mannheim, Germany) より購入した。低グルコース添加ダルベッコ変法イーグル培地 (D-MEM 培地) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka) より購入した。StatMate IV は ATMS (Tokyo) より購入した。BICELL は Nihon Freezer Co., Ltd. (Tokyo) より購入した。

6.2.2 細胞培養

前章までと同様に、イヌ滑膜由来線維芽細胞を分離し、細胞数が 1×10^6 個になるように 75 cm^2 の培養フラスコに播種し、10% FBS を添加した D-MEM 培地を用い、5% CO_2 , 37°C のインキュベーター内で培養した。

6.2.3 siRNA の細胞導入による ERK2 および JNK 1 のノックダウン

イヌ滑膜由来線維芽細胞を、35 mm のディッシュに 1.0×10^5 cells/well, もしくは 90 mm のディッシュに 5.0×10^5 cells/well の密度で播種し、100 nM の ERK2

siRNA, JNK1 siRNA, または scramble siRNA を, 10 μ l/ml の Lipofectamine 2000 を含む Opti-MEM を使用して 6 時間インキュベーター内で静置することにより siRNA を細胞へトランスフェクトした。ERK2 および JNK1 の siRNA の配列は第 4 章の表 4-1 および第 5 章の表 5-1 にそれぞれ示したものをを用いた。

6.2.4 Western blotting

サンプルバッファー (20 mM HEPES, 1 mM PMSF, 10 mM フッ化ナトリウム および complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, 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, dithiothreitol (DDT) 添加 sodium dodecyl sulfate (SDS) バッファーで 95°C, 5 分間煮沸した。サンプルを 10 μ g ずつ 7.5% または 12% 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 分間室温にてブロッキングを行った。その後, PVDF 膜を一次抗体[抗 t-ERK1/2 抗体 (1:1,000), 抗 p-ERK1/2 抗体 (1:1,000), 抗 t-JNK1 抗体 (1:1,000), 抗 p-JNK 抗体 (1:1,000), 抗 β アクチン抗体 (1:10,000)] を用いて, 室温で 120 分間インキュベートした。洗浄後, PVDF 膜を HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:10,000) または HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:10,000) 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。PVDF 膜の化学発光シグナルは ImageQuant LAS 4000 mini を用いて測定した。

6.3 結果

6.3.1 ERK2 ノックダウン細胞における TNF- α 誘導性 JNK1 発現とリン酸化

siRNA によって ERK2 をノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性の t-ERK2 発現とリン酸化は、対照とした Scramble siRNA 導入細胞のものと比較して有意に低下することが確認された (図 6-1)。この ERK2 ノックダウン細胞における TNF- α 誘導性の JNK1 発現とリン酸化について検討したところ、対照とした Scramble siRNA 導入細胞と比べて、有意な変化は認められなかった (図 6-1)。

6.3.2 JNK1 ノックダウン細胞における TNF- α 誘導性 ERK2 発現とリン酸化

siRNA によって JNK1 をノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性の t-JNK1 発現とリン酸化は、対照とした Scramble siRNA 導入細胞のものと比較して有意に低下することが確認された (図 6-2)。この JNK1 ノックダウン細胞における TNF- α 誘導性の ERK2 発現とリン酸化について検討したところ、対照とした Scramble siRNA 導入細胞と比べて、有意な変化は認められなかった (図 6-2)。

6.4 考察

本章では siRNA にて ERK2 および JNK1 をノックダウンしたイヌ滑膜由来線

維芽細胞を用い、TNF- α 誘導性 ERK2 および JNK1 発現とリン酸化を検討したが、ERK2 ノックダウンは JNK1 発現とリン酸化に影響を与えず、また、JNK1 ノックダウンは ERK2 発現とリン酸化に影響を与えなかったことから、両経路におけるクロストークはないことが示唆された。

JNK と ERK シグナル伝達との間の相互作用は、いくつかのタイプの細胞において報告されている。ラット腸上皮細胞 (IEC-6) において、ERK の活性化がカンプトテシン誘導性アポトーシスにおける JNK 活性化を制御していることが報告されている (Bavaria et al., 2014)。また、ヒト星状細胞株 (U-251) およびアフリカツメガエルの卵母細胞においては、ERK のリン酸化酵素である MEK (MAPK/ERK キナーゼ) とその活性化に関わる Raf から構成される Raf/MEK/ERK シグナル伝達と JNK シグナル伝達との間のポジティブなフィードバックループの存在が報告されている (Adler et al., 2005)。一方、COS-7 細胞においては、持続的な JNK 活性化が ERK 活性化を減弱するという JNK と ERK シグナル伝達間の負のフィードバックループが存在することも報告されている (Shen et al., 2003)。BCR/ABL 陽性ヒト白血病細胞では、JNK シグナル伝達の活性化は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によって誘発されたアポトーシスにおいて ERK シグナル伝達と協調したと報告されている (Yu et al., 2003)。また、滑膜由来線維芽細胞においては、近年、IL-1 β で刺激したネコの細胞において、JNK 活性化が MEK/ERK 活性調節に関わることが明らかにされている (Kitanaka et al., 2017)。しかしながら、本研究では ERK2 siRNA 導入が TNF- α 誘導性 JNK1 リン酸化に影響を及ぼさず、JNK1 siRNA 導入も TNF- α 誘導性 ERK2

リン酸化に影響しなかったことから、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 の産生と分泌には、ERK2 および JNK1 の活性化が独立して関わることを示唆している。ヒト線維芽細胞において、細胞内の酸化状態が UV 照射における ERK と JNK の活性化の違いに影響することが報告されている (Matsuda et al., 2000)。そのため、イヌ滑膜由来線維芽細胞における ERK2 と JNK1 経路の活性調節を行う細胞内環境因子が存在するかもしれないが、現在のところ不明であり、今後更なる検討が必要と思われる。

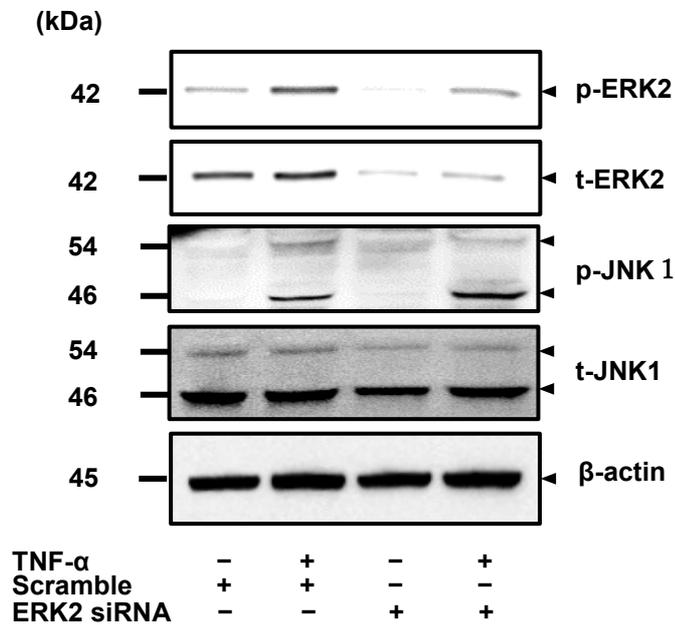


図 6-1. ERK2 をノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 JNK1 発現とリン酸化

siRNA を用いて ERK2 をノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞において、15 分間の TNF- α (50 ng/ml) 刺激を行った後、p-ERK2, t-ERK2, p-JNK1 および t-JNK1 を Western blotting にて検討した。β アクチン発現を内部標準として用いた。対照として用いた Scramble siRNA 導入細胞と比べ、p-ERK2 と t-ERK2 では有意な減少がみられ、ノックダウンが認められたが、p-JNK1 および t-JNK1 では有意な差は認められなかった。独立して実施した 3 例中の代表的な結果を示す。

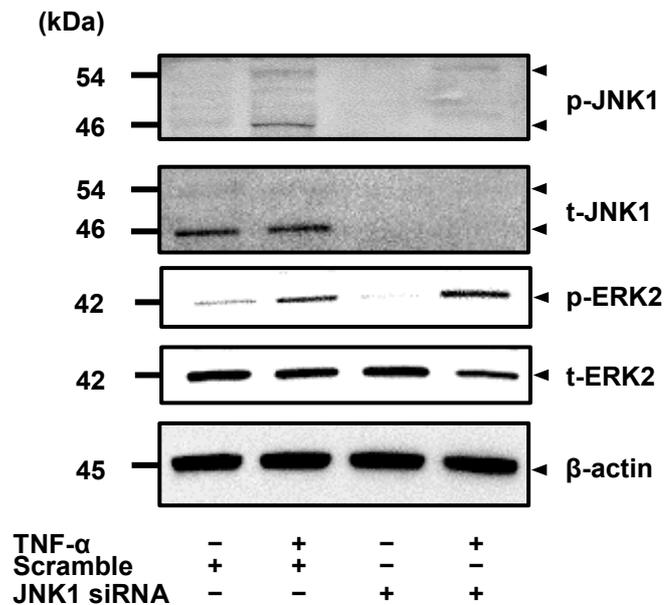


図 6-2. JNK1 をノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 ERK2 発現とリン酸化

siRNA を用いて JNK1 をノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞において、15 分間の TNF- α (50 ng/ml) 刺激を行った後、p-JNK1, t-JNK1, p-ERK2 および t-ERK2 を Western blotting にて検討した。β アクチン発現を内部標準として用いた。対照として用いた Scramble siRNA 導入細胞と比べ、p-JNK1 と t-JNK1 では有意な減少がみられ、ノックダウンが認められたが、p-ERK2 および t-ERK2 には有意な差は認められなかった。独立して実施した 3 例中の代表的な結果を示す。

第7章

総括

本研究は、イヌのリウマチ様関節炎や変形性関節症などの病態形成に重要な役割を果たす滑膜炎の病態発生機構を解明するために、正常なイヌ滑膜由来線維芽細胞を用いて、炎症性サイトカインの一種である TNF- α 刺激による IL-8 発現とタンパク質放出、また、それに関わる MAP キナーゼ経路の関与について検討し、以下の結果を得た。

第 2 章では、イヌ滑膜由来線維芽細胞において、TNF- α 刺激による時間依存性および用量依存性の IL-8 の mRNA 発現の促進と放出が認められた。IL-8 は産生に伴って放出されたことから、TNF- α 刺激は IL-8 発現を引き起こすことが明らかとなった。

第 3 章では、種々の細胞において、TNF- α 刺激により MAP キナーゼ経路の活性化が報告されていることから、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性の IL-8 発現への MAP キナーゼ経路の関与について検討した。MAP キナーゼ経路には、主として、ERK 経路、JNK 経路、p38 MAP キナーゼ経路の 3 種類が知られている。本研究では、阻害剤を用いた検討により、TNF- α 誘導性の IL-8 mRNA 発現には、ERK ならびに JNK の活性化が関与することが明らかとなった。実際に、TNF- α で刺激したイヌ滑膜由来線維芽細胞では、ERK1/2 および JNK の時間依存的なリン酸化が認められ、さらに、ERK 阻害剤および JNK 阻害剤によって、それぞれ ERK1/2 および JNK のリン酸化が阻害されたことから、ERK と JNK が TNF- α 誘導性 IL-8 発現と放出に関わっていることが示唆された。

第 4 章では、第 3 章で示唆された ERK 経路について、ERK のサブタイプである ERK1 または ERK2 について siRNA 導入によるノックダウンを行い、いずれ

のサブタイプが関与するかを検討した。ERK1 あるいは ERK2 をノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞を用いて、TNF- α 刺激による IL-8 mRNA の発現を検出したところ、ERK2 のノックダウンによって IL-8 mRNA の発現は有意に抑制された。この結果から、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる ERK のサブタイプは ERK2 であることが明らかとなった。

第 5 章では、第 3 章で示唆された JNK 経路について、そのサブタイプである JNK1 および JNK2 について、siRNA 導入によるノックダウンを行い、いずれのサブタイプの関与があるかを検討した。JNK1 あるいは JNK2 をノックダウンしたイヌ滑膜由来線維芽細胞を用いて、TNF- α 刺激による IL-8 mRNA の発現を検出したところ、JNK1 のノックダウンによって IL-8 mRNA の発現は有意に抑制された。この結果から、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる JNK のサブタイプは JNK1 であることが明らかとなった。

第 6 章では、MAP キナーゼ間の相互作用も報告されていることから、第 4 章および第 5 章で示した siRNA 導入によるノックダウンイヌ滑膜由来線維芽細胞を用いて、TNF- α 誘導性 IL-8 発現に関わる ERK2 と JNK1 の相互作用について検討した。ERK2 ノックダウン細胞においては、ERK2 タンパク質発現とリン酸化は抑制されたが JNK1 タンパク質発現およびリン酸化の抑制は認められず、また、JNK1 ノックダウン細胞においても、JNK1 タンパク質発現とリン酸化は抑制されたが ERK2 タンパク質発現およびリン酸化の抑制は認められなかったことから、TNF- α で刺激したイヌ滑膜由来線維芽細胞では、ERK2 および JNK1 の活性化が独立して起こることが示された (図 7-1)。

以上の結果より、ERK および JNK シグナル伝達の活性化が、イヌ滑膜由来線維芽細胞において TNF- α 誘導性の IL-8 発現と放出を惹起すること、さらに、その機序として ERK2 および JNK1 のサブタイプ特異的活性化が必要であることが明らかとなった。MAP キナーゼはヒトの RA における治療標的と考えられている (Thalhamer et al., 2008) ことから、ERK2 および JNK1 はイヌにおける RA 滑膜炎の治療のための有望な分子標的であると考えられる。

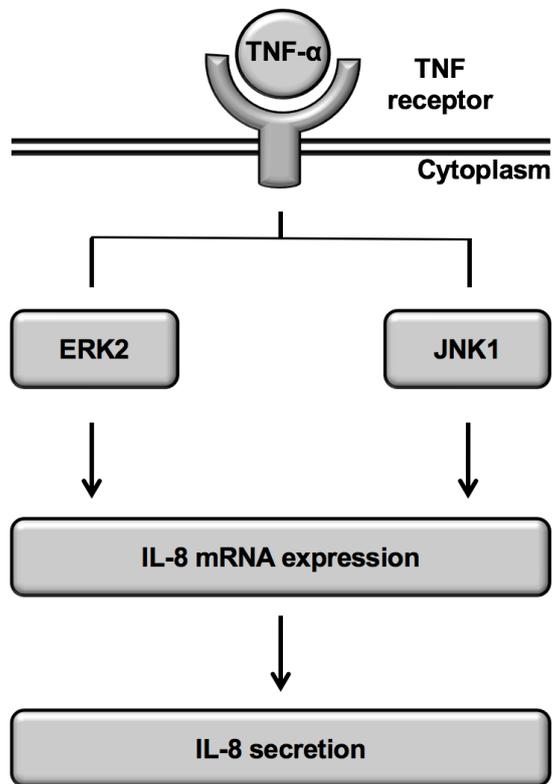


図 7-1. イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- α 刺激による IL-8 mRNA 発現および放出とそれに関わる ERK2 および JNK1 経路の模式図

イヌ滑膜由来線維芽細胞において、リガンドである TNF- α は受容体に結合し、MAP キナーゼである ERK2 と JNK1 がそれぞれ独立した経路としてリン酸化により活性化され、IL-8 mRNA 発現を介してタンパク質発現を促進し、放出に至る。

謝 辞

この博士論文は、筆者が日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻博士課程在学中に獣医生化学研究室において行った研究をまとめたものです。本研究をまとめるにあたって、多くの方々のご支援、ご協力を賜りました。ここに謹んで御礼申し上げます。

日本大学獣医学研究科の杉谷 博士教授には、社会人大学院生として研究室に迎え入れて頂き、サイエンスの面白さに目覚めさせて頂いた上に、このような研究成果を挙げられたこと、言葉に尽くしきれない感謝の意を表します。また、副査としていつも寄り添って励まし、ご助言を賜りました同研究科の中山 智宏教授ならびに伊藤 琢也教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の実施にあたって、手取り足取り指導して頂き、研究の楽しさを分かち合った日本大学生物資源科学部獣医学科の中野 令先生に心から感謝いたします。また、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、獣医生化学研究室の諸氏、ならびにイヌの滑膜を提供して頂いた帝京大学の大森 亜紀先生に厚く御礼申し上げます。さらに、思う存分研究に専念させてくれたマーブル動物医療センターのスタッフの皆さん、また、大学院進学を大きく後押しして頂いた日本大学大学院獣医学研究科の丸山 総一教授に心より御礼申し上げます。

最後になりますが、社会人大学院生活を陰ながら支えてくれた妻 宏美、頑張る元気を分けてくれた長女 美結、本当にありがとう。そして、この論文は誰よりも待ち望んでいた亡き母、難波 治子に捧げます。

引用文献

Adler V, Qu Y, Smith SJ, Izotova L, Pestka S, Kung HF, Lin M, Friedman FK, Chie L, Chung D, Boutjdir M, Pincus MR. Functional interactions of Raf and MEK with Jun-N-terminal kinase (JNK) result in a positive feedback loop on the oncogenic Ras signaling pathway. *Biochemistry*. 44, 10784-10795 (2005)

Akutsu M, Ogura N, Ito K, Kawashima M, Kishida T, Kondoh T. Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on macrophage inflammatory protein-3 α production in synovial fibroblast-like cells from human temporomandibular joints. *J Oral Pathol Med*. 42, 491-498 (2013)

Bavaria MN, Jin S, Ray RM, Johnson LR. The mechanism by which MEK/ERK regulates JNK and p38 activity in polyamine depleted IEC-6 cells during apoptosis. *Apoptosis*. 19, 467-479 (2014)

Berckmans RJ, Nieuwland R, Kraan MC, Schaap MC, Pots D, Smeets TJ, Sturk A, Tak PP. Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine and cytokine release by synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 7, R536-R544 (2005)

Bessard A, Fremin C, Ezan F, Fautrel A, Gailhouste L, Baffet G. RNAi-mediated ERK2 knockdown inhibits growth of tumor cells in vitro and in vivo. *Oncogene*. 27, 5315-

5325 (2008)

Bodolay E, Koch AE, Kim J, Szegedi G, Szekanecz Z. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. *J Cell Mol Med.* 6, 357-376 (2002)

Bonito NA, Drechsler J, Stoecker S, Carmo C R, Seckl MJ, Hermanns HM, Costa-Pereira AP. Control of gp130 expression by the mitogen-activated protein kinase ERK2. *Oncogene.* 33, 2255-2263 (2014)

Boulton TG, Cobb MH. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul.* 2, 357–371 (1991a)

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65, 663–675 (1991b)

Bradford MM. 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 (1976)

Catrina AI, Svensson CI, Malmström V, Schett G, Klareskog L. Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 13, 79-86 (2017)

Chen DP, Wong CK, Tam LS, Li EK, Lam CW. Activation of human fibroblast-like synoviocytes by uric acid crystals in rheumatoid arthritis. *Cell Mol Immunol.* 8, 469-478 (2011)

Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 51 (Suppl 5), v3-11 (2012).

Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci.* 25, 7-9 (2000)

Cotton JA, Platnich JM, Muruve DA, Jijon HB, Buret AG, Beck PL. Interleukin-8 in gastrointestinal inflammation and malignancy: induction and clinical consequences. *Int J Interferon Cytokine Mediator Res.* 8, 13-34 (2016)

Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-235 (2000)

de Launay D, van de Sande MG, de Hair MJ, Grabiec AM, van de Sande GP, Lehmann KA, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Gerlag DM, Tak PP, Reedquist KA. Selective involvement of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases in early rheumatoid arthritis (1987 ACR criteria compared to 2010 ACR/EULAR criteria): a prospective study aimed at identification of diagnostic and prognostic biomarkers as well as therapeutic targets. *Ann Rheum Dis.* 71, 415-423 (2012)

Dong R, Zheng S. Interleukin-8: A critical chemokine in biliary atresia. *J Gastroenterol Hepatol.* 30, 970-976 (2015)

Doom M, de Bruin T, de Rooster H, van Bree H, Cox E. Immunopathological mechanisms in dogs with rupture of the cranial cruciate ligament. *Vet Immunol Immunopathol.* 125, 143-161 (2008)

Dulos J, Wijnands FP, van den Hurk-van Alebeek JA, van Vugt MJ, Rullmann JA, Schot JJ, de Groot MW, Wagenaars JL, van Ravestein-van Os R, Smets RL, Vink PM, Hofstra CL, Nelissen RL, van Eenennaam H. p38 inhibition and not MK2 inhibition enhances the secretion of chemokines from TNF- α activated rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Clin Exp Rheumatol.* 31, 515-525 (2013)

Filer A, Bik M, Parsonage GN, Fitton J, Trebilcock E, Howlett K, Cook M, Raza K, Simmons DL, Thomas AM, Salmon M, Scheel-Toellner D, Lord JM, Rabinovich GA, Buckley CD. Galectin 3 induces a distinctive pattern of cytokine and chemokine production in rheumatoid synovial fibroblasts via selective signaling pathways. *Arthritis Rheum.* 60, 1604-1614 (2009)

Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356-361 (2003)

Frémin C, Ezan F, Boisselier P, Bessard A, Pagès G, Pouysségur J, Baffet G. ERK2 but not ERK1 plays a key role in hepatocyte replication: an RNA-mediated ERK2 knockdown approach in wild-type and ERK1 null hepatocytes. *Hepatology* 45, 1035-1045 (2007)

García S, Bodaño A, Pablos JL, Gómez-Reino JJ, Conde C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition reduces tumor necrosis factor-induced inflammatory response in rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis.* 67, 631-637 (2008)

Guma M, Kashiwakura J, Crain B, Kawakami Y, Beutler B, Firestein GS, Kawakami T, Karin M, Corr M. JNK1 controls mast cell degranulation and IL-1 β production in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107, 22122-22127 (2010)

- Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM, Firestein GS. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 108, 73-81 (2001)
- Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leuko Biolog.* 56, 559-564 (1994)
- Hegemann N, Wondimu A, Kohn B, Brunnberg L, Schmidt MF. Cytokine profile in canine immune-mediated polyarthritis and osteoarthritis. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 18, 67-72 (2005)
- Huber LC, Distler O, Turner I, Gay RE, Gay S, Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45, 669–675 (2006)
- Juarranz MG, Santiago B, Torroba M, Gutierrez-Cañas I, Palao G, Galindo M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Pablos JL, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology (Oxford)* 43, 416-422 (2004)
- Kaminska B. MAPK signaling pathways as molecular targets for anti-inflammatory

therapy-from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* 1754, 253-262 (2005)

Kitanaka T, Nakano R, Kitanaka N, Kimura T, Okabayashi K, Narita T, Sugiya H. JNK activation is essential for activation of MEK/ERK signaling in IL-1 β -induced COX-2 expression in synovial fibroblasts. *Sci Rep.* 7, 39914 (2017)

Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci.* 13, 2400-2407 (2008)

Koch AE, Kunkel SL, Burrows JC, Evanoff HL, Haines GK, Pope RM, Strieter RM. Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J Immunol.* 147, 2187-2195 (1991)

Kunisch E, Gandesiri M, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Kinne RW. Predominant activation of MAP kinases and pro-destructive/pro-inflammatory features by TNF α in early-passage synovial fibroblasts via TNF receptor-1: failure of p38 inhibition to suppress matrix metalloproteinase-1 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 66, 1043-1051 (2007)

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction

pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 81, 807-869 (2001)

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev.* 92, 689-737 (2012)

Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 74, 49–139 (1998)

Li F, Fan C, Cheng T, Jiang C, Zeng B. Efficient inhibition of fibroblast proliferation and collagen expression by ERK2 siRNAs. *Biochem Biophys Res Commun.* 382, 259-263 (2009)

Li J, Johnson SE. ERK2 is required for efficient terminal differentiation of skeletal myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 345, 1425-1433 (2006)

Loetscher P, Dewald B, Baggiolini M, Seitz M. Monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin 8 production by rheumatoid synoviocytes. Effects of anti-rheumatic drugs. *Cytokine.* 6, 162-170 (1994)

Luo X, Zuo X, Zhou Y, Zhang B, Shi Y, Liu M, Wang K, McMillian DR, Xiao X. Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor-alpha induced

proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther.* 10, R41 (2008)

Matsuda N, Horikawa M, Wang LH, Yoshida M, Okaichi K, Okumura Y, Watanabe M. Differential activation of ERK 1/2 and JNK in normal human fibroblast-like cells in response to UVC radiation under different oxygen tensions. *Photochem Photobiol.* 72, 334-339 (2000)

Meloche S. Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44mapk and p42mapk isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition. *J Cell Physiol.* 163, 577–588 (1995)

Neff L, Zeisel M, Druet V, Takeda K, Klein JP, Sibilica J, Wachsmann D. ERK 1/2- and JNKs-dependent synthesis of interleukins 6 and 8 by fibroblast-like synoviocytes stimulated with protein I/II, a modulin from oral streptococci, requires focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 278, 27721-27728 (2003)

Radtke S, Milanovic M, Rossé C, De Rycker M, Lachmann S, Hibbert A, Kermorgant S, Parker PJ. ERK2 but not ERK1 mediates HGF-induced motility in non-small cell lung carcinoma cell lines. *J Cell Sci.* 126, 2381-2391 (2013)

Rodenburg RJ, van Den Hoogen FH, Barrera P, van Venrooij WJ, van De Putte LB.

Superinduction of interleukin 8 mRNA in activated monocyte derived macrophages from rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis.* 58, 648-652 (1999)

Saba-El-Leil MK, Frémin C, Meloche S. Redundancy in the World of MAP Kinases: All for One. *Front Cell Dev Biol.* 4, 67 (2016)

Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam SY, Bauer A, Karin M, Wagner EF. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell* 15, 713-725 (2004)

Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, Zenz P, Redlich K, Xu Q, Steiner G. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 2501-2512 (2000)

Sehgal V, Ram PT. Network Motifs in JNK Signaling. *Genes Cancer* 4, 409-413 (2013).

Seitz M, Dewald B, Gerber N, Baggiolini M. Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 87, 463-469

(1991)

Shen YH, Godlewski J, Zhu J, Sathyanarayana P, Leaner V, Birrer MJ, et al. Cross-talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK pathways: sustained activation of JNK blocks ERK activation by mitogenic factors. *J Biol Chem.* 278, 26715-26721 (2003)

Shin J, Yang J, Lee JC, Baek KH. Depletion of ERK2 but not ERK1 abrogates oncogenic Ras-induced senescence. *Cell Signal.* 25, 2540-2547 (2013)

Shin S, Dimitri CA, Yoon SO, Dowdle W, Blenis J. ERK2 but not ERK1 induces epithelial-to-mesenchymal transformation via DEF motif-dependent signaling events. *Mol Cell.* 38, 114-127 (2010)

Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov.* 2, 473-488 (2003)

Suzuki M, Tetsuka T, Yoshida S, Watanabe N, Kobayashi M, Matsui N, Okamoto T. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF- α - or IL-1 β -stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *FEBS Lett.* 465, 23-27 (2000)

Szekanecz Z, Kim J, Koch AE. Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Semin Immunol.* 15, 15-21 (2003)

Szekanecz Z, Koch AE. Chemokines and angiogenesis. *Curr Opin Rheumatol.* 13, 202-208 (2001)

Szekanecz Z, Strieter RM, Kunkel SL, Koch AE. Chemokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 20, 115-132 (1998)

Szekanecz Z, Vegvari A, Szabo Z, Koch AE. Chemokines and chemokine receptors in arthritis. *Front Biosci.* 2, 153-167 (2010)

Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 47, 409-414 (2008)

Westra J, Limburg PC, de Boer P, van Rijswijk MH. Effects of RWJ 67657, a p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) inhibitor, on the production of inflammatory mediators by rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis.* 63, 1453-1459 (2004)

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincón M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389, 865-870 (1997)

Yu C, Subler M, Rahmani M, Reese E, Krystal G, Conrad D, et al. Induction of apoptosis in BCR/ABL+ cells by histone deacetylase inhibitors involves reciprocal effects on the RAF/MEK/ ERK and JNK pathways. *Cancer Biol Ther.* 2, 544-551 (2003)

Zhu X, Xiao L, Huo R, Zhang J, Lin J, Xie J, Sun S, He Y, Sun Y, Zhou Z, Shen B, Li N. Cyr61 is involved in neutrophil infiltration in joints by inducing IL-8 production by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 15, R187 (2013)