

## 論文の内容の要旨

氏名：北中 卓

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題目：ネコ滑膜由来線維芽細胞におけるインターロイキン 1 $\beta$  誘導性プロスタグランジン E<sub>2</sub> 産生に関わるシクロオキシゲナーゼ 2 発現と MAP キナーゼ活性調節

ネコの関節炎は、罹患率の高い疾患であり、ネコの QOL を低下させている可能性があることが問題となっている。しかしその病態に関してはほとんど知られていない。

関節を構成する滑膜は、細胞外マトリックスや滑液を産生する組織である。滑膜は、炎症において種々のサイトカイン等に反応して活性化する。滑膜の炎症は、関節炎の初期の病態発生において重要であると考えられている。

プロスタグランジンは、アラキドン酸から生合成されるエイコサノイドの一つである。その一種であるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) は、様々な生理学的、病理学的な反応に関与している。炎症においては、疼痛、腫脹、発赤といった典型的な徴候に至るすべての過程に関わっている。また、アラキドン酸からのプロスタグランジン産生には構成性のシクロオキシゲナーゼ 1 (COX-1) および誘導性のシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) が律速酵素として関わっている。

インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 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 $\beta$  は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。

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、細胞外からの刺激を核へ伝える中心的な役割を担っている。MAP キナーゼ経路は主として細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK)、p38 MAP キナーゼ、c-Jun-N 末端キナーゼ (JNK) の 3 経路の検討が進められている。また、ERK の活性化には MAP キナーゼ-ERK キナーゼ (MEK) を介することが報告されている。様々な細胞で、IL-1 $\beta$  刺激による MEK/ERK、p38、JNK の活性化が知られている。

本研究は、ネコの滑膜炎のメカニズムを解明することを目的とし、初代培養したネコの滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の PGE<sub>2</sub> 産生に関わる COX-2 発現と MAP キナーゼの活性化について検討した。

### 1. IL-1 $\beta$ 刺激による PGE<sub>2</sub> の放出と COX-2 発現

ネコ滑膜由来線維芽細胞を 50 pM IL-1 $\beta$  で 0~48 時間刺激を行い、培養液中に放出された PGE<sub>2</sub> 濃度を、ELISA を用いて解析したところ、PGE<sub>2</sub> の放出は、24~48 時間において時間依存的に認められた。また、0~100 pM の IL-1 $\beta$  でネコ滑膜由来線維芽細胞を 48 時間刺激したところ、5~100 pM の IL-1 $\beta$  で用量依存的な PGE<sub>2</sub> の放出が認められた。

次に、IL-1 $\beta$  刺激による構成性 COX-1 および誘導性 COX-2 の mRNA 発現をリアルタイム PCR にて検討した。ネコ滑膜由来線維芽細胞を 50 pM の IL-1 $\beta$  で 0~120 時間刺激を行ったところ、1~48 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。ネコ滑膜由来線維芽細胞を、1~200 pM の IL-1 $\beta$  で刺激したところ、1~100 pM の IL-1 $\beta$  で用量依存的な COX-2 mRNA 発現の上昇が認められた。一方、IL-1 $\beta$  は COX-1 mRNA 発現には影響を与えなかった。

続いて IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 タンパク質の発現を、抗 COX-2 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検討した。ネコ滑膜由来線維芽細胞を 50 pM の IL-1 $\beta$  で 0~48 時間刺激したところ、12~48 時間で時間依存的に COX-2 タンパク質の発現が促進され、以後減少した。

以上の結果より、ネコ滑膜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> 産生と放出を引き起こすことが明らかとなった。

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

種々の細胞において、IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 発現に、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う。そこで、本研究においては、ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  刺激による 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。

ネコ滑膜由来線維芽細胞を、MEK 阻害剤 PD98059 (50  $\mu$ M)、ERK 阻害剤 FR180204 (50  $\mu$ M)、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 1 時間前処理した後 50 pM IL-1 $\beta$  で 48 時間刺激を行い、その時の COX-2 mRNA 発現をリアルタイム PCR にて検討した。その結果、IL-1 $\beta$  は COX-2 mRNA 発現を誘導したが、MEK 阻害剤、ERK 阻害剤、p38 MAP キナーゼ阻害剤、および JNK 阻害剤は、それぞれ有意に COX-2 mRNA 発現を阻害した。

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。MEK 阻害剤 PD98059 (50  $\mu$ M)、ERK 阻害剤 FR180204 (50  $\mu$ M)、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 1 時間前処理したネコ滑膜由来線維芽細胞を IL-1 $\beta$  により 48 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 にて測定したところ、IL-1 $\beta$  刺激による PGE<sub>2</sub> 放出は、MEK 阻害剤、ERK 阻害剤、p38 MAP キナーゼ阻害剤、および JNK 阻害剤によりそれぞれ有意に阻害された。これらのことから、IL-1 $\beta$  刺激による PGE<sub>2</sub> 放出と COX-2 mRNA 発現には MEK/ERK 経路、p38 MAP キナーゼ経路、JNK 経路の活性化が関与することが示唆された。

MAP キナーゼはリン酸化により活性化される。そこで、各 MAP キナーゼの IL-1 $\beta$  による活性化を、抗リン酸化抗体を用い、ウェスタンブロッティング法にて確認した。

ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  刺激による p38 MAP キナーゼの活性化を、リン酸化 p38 MAP キナーゼを検出することで検討したところ、50 pM IL-1 $\beta$  刺激後 5~15 分にリン酸化 p38 MAP キナーゼが検出され、その後減少した。この 50 pM IL-1 $\beta$  刺激による p38 MAP キナーゼの活性化は p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M) で 1 時間前処理することで抑制された。一方、ERK 阻害剤 FR180204 (50  $\mu$ M) および JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) は p38 MAP キナーゼのリン酸化抑制効果を示さなかった。

次いで、IL-1 $\beta$  刺激による JNK の活性化を、リン酸化 JNK を検出することで検討したところ、50 pM IL-1 $\beta$  刺激後 5~15 分にリン酸化 JNK が検出され、その後減少した。この JNK の活性化は JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理することで、抑制された。一方、p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M) および ERK 阻害剤 FR180204 (50  $\mu$ M) は JNK のリン酸化抑制効果を示さなかった。

さらに、ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  刺激による ERK1/2 の活性化を、リン酸化 ERK1/2 を検出することで検討したところ、50 pM IL-1 $\beta$  刺激後 5~15 分にリン酸化 ERK1/2 が検出され、その後減少した。この 50 pM IL-1 $\beta$  刺激による ERK1/2 の活性化は、ERK 阻害剤 FR180204 (50  $\mu$ M) で 1 時間前処理したネコ滑膜由来線維芽細胞において抑制された。また、JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理したネコ滑膜由来線維芽細胞においても ERK のリン酸化は抑制された。一方で、p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M) の存在下では ERK のリン酸化は抑制されなかった。

以上の結果より、ネコ滑膜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、MEK/ERK 経路、p38 MAP キナーゼ経路、JNK 経路が関わっていることが示唆された。また、阻害剤を用いた検討から、JNK 経路が MEK/ERK 経路を活性化している可能性が示唆された。

### 3. JNK1 による MEK/ERK 活性調節

MEK/ERK 経路と JNK 経路の相互作用が示唆されたことから、免疫沈降法を用いて MEK、ERK、JNK の結合について検討を行った。

抗リン酸化 JNK 抗体を用いて共沈降を行い、ウェスタンブロッティング法にてリン酸化 ERK1/2 を検出したところ、IL-1 $\beta$  刺激によるリン酸化 JNK とリン酸化 ERK の結合が認められた。同様に、抗リン酸化 ERK 抗体を用いて共沈降を行ったところ、リン酸化 JNK が検出され、IL-1 $\beta$  刺激によるリン酸化 JNK とリン酸化 ERK の結合が示唆された。さらに、ERK1/2 の上流の MAP キナーゼ-ERK キナーゼである MEK について同様の検討を行ったところ、IL-1 $\beta$  によって、リン酸化 JNK、リン酸化 MEK、リン酸化 ERK1/2 が結合することが示された。

これまでに哺乳類における JNK は JNK1、JNK2 および JNK3 のサブタイプが報告されており、サブタイプの機能については不明な点が多い。本研究では、サブタイプ特異的な siRNA を用いて JNK をノックダウンすることにより、JNK による MEK/ERK 経路の活性化についてさらに検討を行った。RT-PCR によりネコ滑膜由来線維芽細胞の JNK サブタイプの mRNA 発現について検討したところ、JNK1 および JNK2 が検出された。さらに、JNK1 および JNK2 の siRNA (50 nM) をトランスフェクションすると、JNK1 および JNK2 の mRNA 発現は 24 時間後から低下し、タンパク質発現は 3 日後から低下した。JNK1 siRNA をトランスフェクションした細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現が有意に低下した。さらに、JNK1 siRNA の IL-1 $\beta$  誘導性の ERK1/2 の活性化に対する影響を検討したところ、JNK1 siRNA をトランスフェクションした細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性の ERK1/2 のリン酸化が抑制された。さらに、JNK1 siRNA をトランスフェクションした細胞における JNK1 と ERK1/2 の結合についてリン酸化 JNK 抗体を用いて共沈降を行って検討したところ、JNK1 siRNA をトランスフェクションした細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性のリン酸化 JNK とリン酸化 ERK1/2 の結合は抑制された。これらの結果は、JNK1 が MEK/ERK 経路の活性化因子として機能していることを強く示唆している。以上の結果から、ネコ滑膜由来線維芽細胞において、JNK1 が MEK/ERK 経路の活性化を介して COX-2 の発現に重要な因子として機能していることが明らかとなった。

### 結論

本研究では、ネコの滑膜炎の病態発生を明らかにするために、初代培養したネコの滑膜由来線維芽細胞を炎症性サイトカインの IL-1 $\beta$  で刺激を行い、PGE<sub>2</sub> 産生における COX-2 発現と MAP キナーゼの活性化の関与を検討した。ネコの滑膜由来線維芽細胞において IL-1 $\beta$  誘導性 PGE<sub>2</sub> 産生には COX-2 発現が関わり、COX-2 発現には主要な MAP キナーゼ経路である p38 MAP キナーゼ経路、MEK/ERK 経路、JNK 経路の全ての活性化が関わることを確認した。

従来、p38 MAP キナーゼ経路、MEK/ERK 経路、JNK 経路は、それぞれが独立して活性化すると考えられてきた。しかし、近年、これらの経路間の相互作用の存在が報告されている。今回、ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 発現において、JNK による MEK/ERK 経路の活性調節という新たなメカニズムの存在を明らかにした。さらに、これまで JNK1 と JNK2 は似た機能を持つと考えられていたが、本研究では JNK1 が IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 発現に関わることが明らかとなった。これらの所見は、ネコの関節炎のより緻密な治療法、予防法の確立のための大きな前進となることと確信している。