

## 論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主査） 教授 杉谷 博士  
（副査） 教授 森友 忠 昭  
教授 山谷 吉 樹

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り、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1つであり、様々な生理学的、病理学的な反応に関与している。プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) はその1種であり、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り、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、炎症を含む多くの生体機能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。様々な細胞において、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、ネコの関節炎である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ものである。

ネコ滑膜由来線維芽細胞を IL-1 $\beta$  で刺激を行うと、時間依存的および用量依的に PGE<sub>2</sub> の放出が認められた。PGE<sub>2</sub> 産生には関わる COX-1 および COX-2 発現について検討すると、IL-1 $\beta$  刺激においては COX-2 mRNA のみ時間依存的および用量依的な発現が誘導され、さらに、COX-2 タンパク質の発現も促進された。これらのことから、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。

次に、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、MAP キナーゼの特異的阻害剤を用いて検討した。MEK 阻害剤、ERK 阻害剤、p38 MAP キナーゼ阻害剤、または JNK 阻害剤で前処理した細胞において IL-1 $\beta$  刺激を行うと、IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現は有意に抑制された。また、MEK 阻害剤、ERK 阻害剤、p38 MAP キナーゼ阻害剤、または JNK 阻害剤の前処理は、IL-1 $\beta$  刺激による PGE<sub>2</sub> 放出も有意に抑制したことから、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> 放出に COX-2 発現が関わっており、その COX-2 発現に MEK/ERK 経路、

p38 MAP キナーゼ経路および JNK 経路の活性化が関わることを示唆された。

MAP キナーゼはリン酸化により活性化される。そこで、IL-1 $\beta$  による各 MAP キナーゼの活性化を、抗リン酸化抗体を用いたイムノブロット法にて検討したところ、IL-1 $\beta$  刺激後 5~15 分で一過性の p38 MAP キナーゼ、JNK および ERK1/2 のリン酸化が認められた。この IL-1 $\beta$  誘導性のリン酸化に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果も検討した。その結果、p38 MAP キナーゼ阻害剤は、p38 MAP キナーゼのリン酸化を阻害し、JNK や ERK1/2 のリン酸化は阻害しなかった。また、ERK1/2 の阻害剤は、ERK1/2 のリン酸化を阻害したが、p38 MAP キナーゼや JNK のリン酸化は阻害しなかった。しかし、JNK の阻害剤は、p38 MAP キナーゼのリン酸化は阻害しなかったが、JNK のリン酸化のみならず、ERK1/2 のリン酸化も阻害した。これらのことから、ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  刺激は、MEK/ERK 経路、p38 MAP キナーゼ経路および JNK 経路を活性化し、COX-2 発現に関わることを強く示唆された。加えて、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。

MEK/ERK 経路と JNK 経路の相互作用が示唆されたことから、さらに免疫沈降法を用いて MEK、ERK、JNK の結合についてイムノブロット法にて検討した。抗リン酸化 JNK 抗体を用いて共沈降した画分に IL-1 $\beta$  刺激によるリン酸化 JNK とリン酸化 ERK1/2 が認められ、同様に、抗リン酸化 ERK1/2 抗体を用いて共沈降した画分に IL-1 $\beta$  刺激によるリン酸化 JNK とリン酸化 ERK1/2 が認められたことから、IL-1 $\beta$  依存性にリン酸化 JNK とリン酸化 ERK1/2 が結合することが示唆された。さらに、ERK1/2 の上流の MEK について同様の検討を行ったところ、IL-1 $\beta$  依存性にリン酸化 JNK、リン酸化 MEK およびリン酸化 ERK1/2 が結合することが示された。

続いて、JNK のサブタイプについて検討した。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いるが、RT-PCR により、ネコ滑膜由来線維芽細胞には JNK1 および JNK2 mRNA 発現が認められた。JNK1 および JNK2 の siRNA をトランスフェクションしてそれぞれをノックダウンすると、JNK1 ノックダウン細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性の ERK1/2 のリン酸化が抑制され、さらに、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。

以上の結果より、ネコ滑膜由来線維芽細胞において炎症性サイトカインの IL-1 $\beta$  が COX-2 発現を介して PGE<sub>2</sub> 産生を促すこと、また、IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現に 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、さらに、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が、IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現において、JNK1 の活性化が MEK/ERK 経路を活性化して関わることを明らかにした。

本論文は、ネコ関節炎発症のメカニズムの一端を明らかにしたものであり、罹患率の高いネコ関節炎の治療法や治療薬の開発に役立つものと考えられる。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

平成 29 年 7 月 27 日