

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  $E_2$  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

日本大学大学院獣医学研究科

北中 卓

2017

第1章 序論	1
第2章 IL-1 $\beta$ 刺激による PGE <sub>2</sub> の放出と COX-2 発現	5
2.1 緒言	6
2.2 材料と方法	6
2.2.1 材料	6
2.2.2 細胞培養	7
2.2.3 Real-time RT-PCR	9
2.2.4 Western blotting	9
2.2.5 PGE <sub>2</sub> 測定	10
2.2.6 統計学的分析	10
2.3 結果	10
2.4 考察	11
第3章 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	17
3.1 緒言	18
3.2 材料と方法	18
3.2.1 材料	18
3.2.2 細胞培養	19
3.2.3 Real-time RT-PCR	20
3.2.4 Western blotting	20
3.2.5 統計学的分析	21
3.3 結果	21

3.3.1	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	21
3.3.2	IL-1 $\beta$ 誘導性 PGE <sub>2</sub> 放出に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果	22
3.3.3	IL-1 $\beta$ 誘導性 MAP キナーゼの活性化	22
3.3.4	IL-1 $\beta$ 誘導性 MAP キナーゼの活性化に対する阻害剤の効果	23
3.4	考 察	23
第 4 章 JNK1 による MEK/ERK の活性調節		31
4.1	緒 言	32
4.2	材料と方法	32
4.2.1	材 料	32
4.2.2	細胞培養	33
4.2.3	RT-PCR による JNK サブタイプの確認	33
4.2.4	Real-time RT-PCR	34
4.2.5	Western blotting	35
4.2.6	免疫共沈降法	35
4.2.7	siRNA の細胞導入による JNK のノックダウン	36
4.2.8	統計学的分析	36
4.3	結 果	36
4.3.1	IL-1 $\beta$ 依存性の JNK、MEK および ERK の相互作用	36
4.3.2	JNK1 による MEK/ERK 制御	37
4.4	考 察	38
第 5 章 統 括		49

謝 辞	53
参考文献	54

# 第 1 章

## 序 論

伴侶動物は、その寿命の延長に伴い、様々な加齢性疾患に罹患することが多くなっている。ネコの関節炎もその一つであり、罹患率の高さはアメリカやイギリスで報告されている (Clarke et al., 2005; Godfrey, 2005; Hardie et al., 2002)。我が国においても例外ではなく、X線学的診断上、5~10歳のドメスティックショートヘアの約70%が、11歳以上の90%以上が、関節炎の所見を有していると報告されている (木村ら, 2014)。関節炎に対して、非ステロイド性抗炎症薬の投与がプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生を抑え、痛みが緩和されることが動物モデルにおいて報告されている (Guillot et al., 2013; Sul et al., 2014) ことから、現状においては、quality of life (QOL) の低下が認められる個体に非ステロイド性抗炎症薬の投与を行うことが多い。しかしながら、ネコでの長期的な非ステロイド性抗炎症薬投与は、多くの国で、人体用医薬品の適応外処方となっている。

ネコの関節炎は、高齢になるに従って罹患率が高いことから加齢に伴う退行性変化であると考えられる。しかしながら、4歳以下のネコにおいても約15%に関節炎の所見が認められる (木村ら, 2014) ことから、ネコの関節炎は単なる加齢性変化として扱うべきではなく、その発症機序を明らかにし、有効な治療や予防策を打ち立てる必要がある。

関節炎の病態発生時には、滑膜炎が関与することが知られている (Goldring and Otero, 2011; Scanzello et al., 2012)。滑膜を構成する線維芽細胞は、種々のサイトカインにより活性化し、細胞外マトリクスや滑液を産生する。

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り、IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の二種類が知られている。IL-1 は、白血球、血管内皮細胞、線維芽細胞等から分泌され、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 (Hayden and Ghosh, 2012; Lawrence, 2009)。炎症において、プロスタグランジン類は重要な生

理活性物質であり、中でも PGE<sub>2</sub> は、炎症局所において血管透過性の亢進、血管拡張、疼痛をもたらす。アラキドン酸を基質として PGE<sub>2</sub> 産生を触媒する酵素はシクロオキシゲナーゼ (COX) であり、炎症時には誘導型の COX-2 発現が深く関わっている。

IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 発現に至る経路において、Mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ) の関与が知られている (Dray and Read, 2007; Guillot et al., 2013; Lee et al., 2013; Sul et al., 2014)。MAP キナーゼには、MEK/ERK, p38 MAP キナーゼ, JNK の三つの代表的な経路がある。MAP キナーゼは、細胞の増殖、分化、細胞死や炎症など多くの現象に関与しており、哺乳類の種々の細胞において、IL-1 $\beta$  刺激によって、細胞特異的に MEK/ERK, p38 MAP キナーゼ, あるいは JNK が活性化することが知られている。

本研究は、ネコの滑膜炎の病態発生メカニズムを明らかにすることを目的に、ネコの膝関節の滑膜から線維芽細胞を分離、培養し、IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 発現における MAP キナーゼ経路の関与について次の検討を行った。

第 2 章では、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> の放出の測定と COX-2 mRNA およびタンパク質発現の検出を行い、放出される PGE<sub>2</sub> が COX-2 発現に関与することを検討した。

第 3 章では、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> の放出と COX-2 発現における MAP キナーゼの三つの経路, MEK/ERK 経路, p38 MAP キナーゼ経路および JNK 経路の関わりを, MAP キナーゼ阻害剤を用いて検討した。

第 4 章では、免疫共沈降法を用いて、ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の MEK/ERK 経路の活性化と JNK の活性化の相互作用の有無を検討した。さらに、ネコ滑膜由来線維芽細胞に発現する JNK サブタイプを確認し、発現す

る JNK サブタイプを特異的にノックダウンし, これによる IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現と MEK/ERK の活性化への影響を検討した。

## 第2章

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

## 2.1 緒言

プロスタノイドは、通常は細胞内には貯蔵されておらず、必要に応じて合成、放出され、局所で作用するオートコイドである。プロスタノイドの一種であるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) は、様々な生理的、病態生理的機能に関わっており (Park et al., 2006; Wang et al., 2007), 炎症反応においては、血管透過性亢進、血管拡張、発痛等を引き起こす (Funk, 2001; Harris et al., 2002)。

細胞が生理的、病理的な刺激を受けると、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> 等のプロスタグランジンは、シクロオキシゲナーゼ (COX) の触媒によりアラキドン酸を基質として生成される。COX には、COX-1, COX-2 および COX-3 の三種類のアイソフォームが存在する。構成型の COX-1 とは異なり、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反応に深く関わる。COX-3 は、COX-1 のスプライシングバリエントであり、主として脳や心臓に発現が認められる (Harris et al., 2002; Park et al., 2006; Simmons et al., 2004; Smith et al., 2000; 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り、白血球や血管内皮細胞、そして線維芽細胞等から分泌される。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 (Hayden and Ghosh, 2012; Lawrence, 2009)。

本章では、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> の放出と COX-2 発現について検討した。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 材料

TRIzol は、Life Technology Co. (Carlsbad, CA) より購入した。CELLBANKER 1

plus medium, PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II, Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System II および TP900 DiceRealTime v4.02B は TaKaRa Bio Inc. (Shiga, Japan) より購入した。抗ヒト COX-1 モノクローナル抗体, 抗 COX-2 ウサギモノクローナルおよびポリクローナル抗体は Abcam (Cambridge, UK) より購入した。抗β-アクチン (AC74) マウスモノクローナル抗体は Shigma-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 は GE Healthcare (Piscataway, NJ) より購入した。Mini-PROTEAN TGX gel, polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は Bio-Rad (Hercules, CA) 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-LG 培地) およびトリプシン EDTA は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は Biowest (Nuaille, France) より購入した。PGE<sub>2</sub> 酵素免疫測定 (ELISA) kit は Cayman chemical Co. (ANN Arbor, MI) から購入した。StatMate IV は ATMS (Tokyo, Japan) より購入した。BICELL は Nihon Freezer Co., Ltd. (Tokyo, Japan) より購入した。

### 2.2.2 細胞培養

本研究では, ネコ (n=3, ドメスティックショートヘア, 4~7歳, 避妊メス) の大腿骨骨折に罹患した症例の膝関節の滑膜より, サンプルを採材した。すべての症例の一般状態は臨床上健康であり, 大腿骨骨折による膝関節への影響はなかった。実験は, 木村動物病院の研究倫理規定に則って行い (KAH2014-001, KAH2015-001, KAH2015-002), 全ての飼い主よりインフォームドコンセントを得

た。全頭ともに、硫酸アトロピン (0.05 mg/kg; Mitsubishi Tanabe Pharma Co., Osaka, Japan) を皮下注射にて麻酔前投与した。麻酔はプロポフォール (4 mg/kg; Intervet K.K, Osaka, Japan) の静脈内投与にて導入し、100 % 酸素を供給ガスとし、これに2 % イソフルラン (Intervet K.K, Osaka, Japan) ガスが維持されるようにして気管チューブより吸入させた。疼痛と感染の可能性を最小限にするためにレミフェンタニル塩酸塩 (3~5  $\mu$ g/kg/min; Janssen Pharmaceutical K.K, Tokyo, Japan) とセファゾリン (22 mg/kg; Nichi-Iko Pharmaceutical Co., Ltd., Toyama, Japan) を覚醒前に静脈内投与した。

滑膜は、膝関節の側面の滑膜を採取し、線維膜(線維層)は注意深く剥離した。ネコ滑膜を3 mm 四方に切り、90 mm のペトリ皿に貼り付け、10% FBS を添加した D-MEM-LG を用い、5 % CO<sub>2</sub>, 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。ネコ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得て、ディッシュの90~95 %にまで増殖した時に、0.25% のトリプシン EDTA を用いて細胞を剥がし採取した。採取した細胞は、CELLBANKER 1 plus medium を用いて細胞数が $2 \times 10^6$  個/500  $\mu$ 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 を添加した D-MEM-LG 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<sup>2</sup> 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% にまで増殖した時に0.25%のトリプシン EDTA を用いて細胞を剥がし、細胞数が $1 \times 10^6$  個になるように75 cm<sup>2</sup> の培養フラスコに播種した。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。

### 2.2.3 Real-time RT-PCR

TRIzol 試薬を用いて、ネコ滑膜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, ネコ COX-1, ネコ COX-2 あるいはネコ  $\beta$  アクチンのプライマーを含む 25  $\mu$ l の溶剤を用いて行った。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 controls の Real-time RT-PCR は、2  $\mu$ 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  $\mu$ l の各 RNA サンプルを用いて行った。PCR は、Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> 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、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 を使用したネコ  $\beta$  アクチンの増幅を内在性コントロールとし、また、ネコ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 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  $\mu$ 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 COX-2 抗体 (1:1,000), 抗  $\beta$  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 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。

#### 2.2.5 PGE<sub>2</sub> 測定

ネコ滑膜由来線維芽細胞は、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 0.5% FBS を含む D-MEM 培地で培養後、ネコ組み換え型 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

ネコ滑膜由来線維芽細胞を 50 pM IL-1 $\beta$  で 0~48 時間刺激を行ない、培養上清中に放出される PGE<sub>2</sub> 濃度を、ELISA を用いて測定したところ、48 時間までの時間依存的な上昇を確認した (図 2-1)。

種々の細胞でアラキドン酸を基質とした PGE<sub>2</sub> 産生には、構成型の COX-1 と誘導型の COX-2 の二つのアイソフォームが関わる。そこで、IL-1 $\beta$  刺激による COX-1 および COX-2 の mRNA 発現を Real-time PCR にて検討した。ネコ滑膜由来線維芽細胞を 50 pM IL-1 $\beta$  で刺激を行なったところ、刺激後 48 時間までの時間依存的な COX-2 mRNA 発現が誘導され、その後減少した (図 2-2)。1~200 pM の IL-1 $\beta$  で線維芽細胞を 48 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 2-2)。一方、IL-1 $\beta$  は、COX-1 mRNA 発現に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 Western blotting 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、時間依存性の COX-2 タンパク質の発現が確認された (図 2-3)。一方、IL-1 $\beta$  は、COX-1 タンパク質の発現に影響を与えなかった (図 2-3)。

## 2.4 考察

本章では、ネコ滑膜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> の産生と、PGE<sub>2</sub> 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り、IL-1 $\beta$  にて刺激を行ない観察した 48 時間までの間 PGE<sub>2</sub> の産生が持続していると考えられた。

PGE<sub>2</sub> 産生には、構成型の COX-1 の活性化および炎症時に誘導される COX-2 が関わるということが知られている (Funk, 2001; Harris et al., 2002; Park et al, 2006; Smith, 2000; 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 1~48 時間で 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> 放出は COX-2 の誘導によると考えられた。一方、構成型の COX-1 mRNA 発現は IL-1 $\beta$  によって全く促進されなかったことから、誘導型の COX-2 発現が PGE<sub>2</sub> 産生に関わるものが強く示唆された。

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> 産生を引き起こすことが明らかとなった。

表 2-1. Real-time RT-PCR に用いたプライマーの配列

Gene Name	Gene bank ID	Primer sequences
<i>COX-1</i>	XM_003995827	F: 5'-GGACAACCTGGAACGTCAGT-3' R: 5'-AAACACCTCCTGACCCACAG-3'
<i>COX-2</i>	EF036473.1	F: 5'-AACAGGAGCATCCAGAATGG-3' R: 5'-GCAGCTCTGGGTCAAACCTC-3'
<i><math>\beta</math>-actin</i>	AB051104.1	F: 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3' R: 5'- GACAGCACCGTGTTAGCGTA-3'

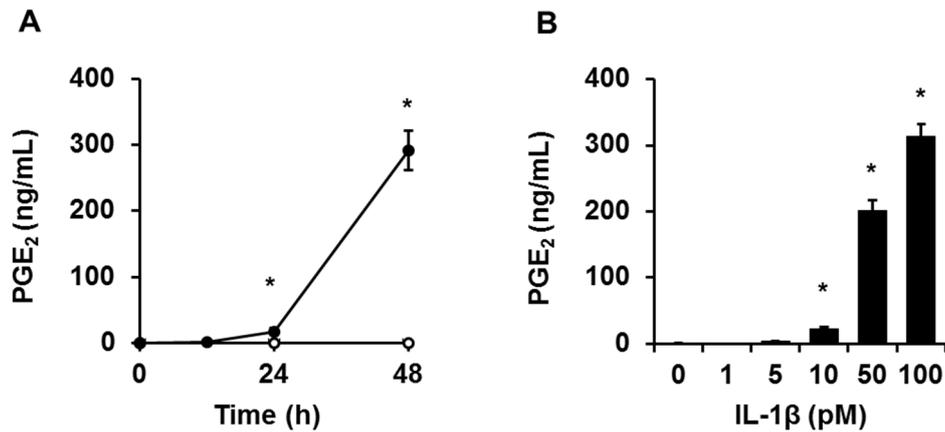


図 2-1. ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1β による PGE<sub>2</sub> の放出

ネコ滑膜由来線維芽細胞を 50 pM IL-1β 存在下，または非存在下で 0~48 時間インキュベートした後，培養上清中に放出された PGE<sub>2</sub> を ELISA にて測定した (A)。ネコ滑膜由来線維芽細胞を 0~100 pM IL-1β 存在下で 48 時間インキュベートした後，培養上清中に放出された PGE<sub>2</sub> を ELISA にて測定した (B)。値は，3 例の平均値 ± 標準誤差を示す。\* $P < 0.05$

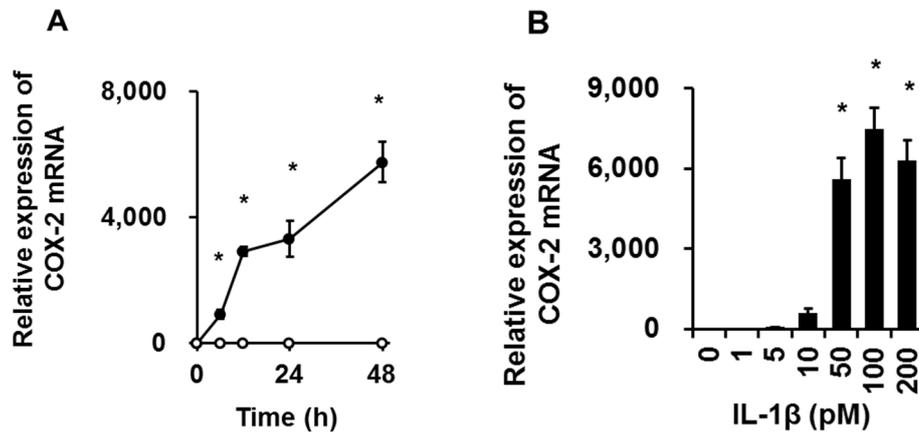


図 2-2. ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  による COX-2 mRNA の発現

ネコ滑膜由来線維芽細胞を 50 pM IL-1 $\beta$  存在下, または非存在下で 0~48 時間インキュベートした後, COX-2 mRNA の発現を Real-time PCR にて検討した (A)。ネコ滑膜由来線維芽細胞を 0~200 pM IL-1 $\beta$  存在下で 48 時間インキュベートした後, COX-2 mRNA の発現を Real-time PCR にて検討した (B)。値は, 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す。\* $P < 0.05$

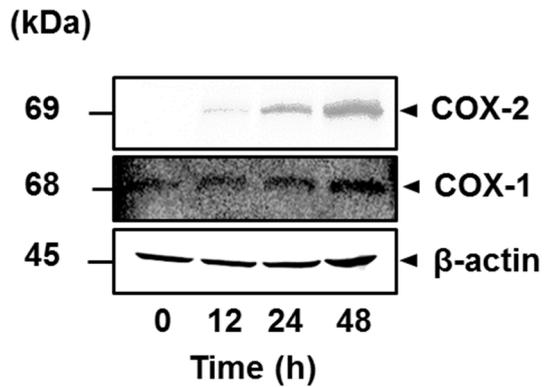


図 2-3. ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  による COX-2 タンパク質の発現

ネコ滑膜由来線維芽細胞を 50 pM IL-1 $\beta$  存在下または非存在下で 0~48 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 Western blotting にて検討した。COX-2 タンパク質が 48 時間までの時間依存性の発現増加を示すのに対し、COX-1 タンパク質および  $\beta$ -アクチンの発現量の変化は認められなかった。

## 第3章

**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**

### 3.1 緒言

炎症に関与する細胞内シグナル伝達として mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ) の関与が知られている (Kaminska, 2005; Kyriakis and Avruch, 2001)。MAP キナーゼ経路は、主として extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路, p38 MAP キナーゼ経路, c-Jun N-terminal kinase (JNK) 経路の三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 (Kaminska, 2005; Kyriakis and Avruch, 2001)。

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。ラット腎のメサンギウム細胞や心筋単核細胞においては, p38 MAP キナーゼと JNK 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 Isenović, 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 p38 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 キナーゼを介する (Yang et al., 2002) ことや, 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 MEK/ERK 経路が関与する (Tsuchiya et al., 2015) ことが報告されている。

そこで本章では, 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 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) より購入した。CELLBANKER 1

plus medium, PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II, Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System II および TP900 DiceRealTime v4.02B は TaKaRa Bio Inc. (Shiga, Japan) より購入した。抗ヒト total-JNK1 (t-JNK1, EPR140(2)), 抗ヒト total-JNK2 (t-JNK2, EP1595Y) および抗 COX-2 ウサギモノクローナルまたはポリクローナル抗体は Abcam (Cambridge, UK) より購入した。抗リン酸化 MEK (p-MEK), 抗 total-MEK (t-MEK, D1A5), 抗ヒトリン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2, D13.14.4E), 抗ラット total-ERK1/2 (t-ERK1/2, 137F5), 抗リン酸化 p38 (p-p38, 3D7) および抗ヒト total-p38 (t-p38, D13E1) ウサギモノクローナルまたはポリクローナル抗体は Cell Signaling Technology Japan (Tokyo, Japan) より購入した。抗  $\beta$ -アクチン (AC74) マウスモノクローナル抗体は Shigma-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) より購入した。Mini-PROTEAN TGX gel, polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は Bio-Rad (Hercules, CA) 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-LG 培地) およびトリプシン EDTA は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は Biowest (Nuaille, France) より購入した。PGE<sub>2</sub> 酵素免疫測定 (ELISA) kit は Cayman chemical Co. (Ann Arbor, MI) から購入した。StatMate IVは ATMS (Tokyo, Japan) より購入した。BICELL は Nihon Freezer Co., Ltd. (Tokyo, Japan) より購入した。

### 3.2.2 細胞培養

第2章と同様に、ネコ滑膜由来線維芽細胞を分離し、細胞数が $1 \times 10^6$ 個になるように75 cm<sup>2</sup>の培養フラスコに播種し、10% FBS を添加したD-MEM-LG を用い、5% CO<sub>2</sub>, 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、ネコ滑膜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, ネコ COX-2 あるいはネコ  $\beta$  アクチンのプライマーを含む 25  $\mu$ l の反応液を用いて行った。PCR は、Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> 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、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 を使用したネコ  $\beta$  アクチンの増幅を内在性コントロールとし、また、ネコ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  $\mu$ 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 COX-2 抗体 (1:1,000), 抗 p-MEK (1:1,000), 抗 t-MEK (1:1,000), 抗 p-ERK1/2 (1:1,000), 抗 t-ERK1/2 (1:1,000), 抗 p-p38 (1:1,000), 抗 t-p38 (1:1,000), 抗 p-JNK (1:1,000), 抗 t-JNK (1:1,000), 抗  $\beta$  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 $\pm$ 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。

## 3.3 結果

### 3.3.1 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

前章で示したように、ネコ滑膜由来線維芽細胞を 50 pM IL-1 $\beta$  で 48 時間刺激すると、IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA の発現上昇を Real-time RT-PCR にて確認できる。そこで、50 pM IL-1 $\beta$  で刺激後 48 時間における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 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。

MEK 阻害剤 PD98059 (50  $\mu$ M), ERK1/2 阻害剤 FR180204 (50  $\mu$ M), p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M) あるいは JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) を用い

て細胞を1時間前処理した後、50 pM IL-1 $\beta$  刺激を行なうと、IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA の発現はほぼ完全に抑制された (図 3-1)。

### 3.3.2 IL-1 $\beta$ 誘導性 PGE<sub>2</sub> 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、IL-1 $\beta$  刺激は COX-2 発現を介して PGE<sub>2</sub> 放出と産生を惹起する。そこで、MEK 阻害剤 PD98059 (50  $\mu$ M), ERK1/2 阻害剤 FR180204 (50  $\mu$ M), p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M) あるいは JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) にて1時間前処理したネコ滑膜由来線維芽細胞を IL-1 $\beta$  で刺激を行ない、刺激後48時間までの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 $\beta$  誘導性 PGE<sub>2</sub> 放出は、MEK, ERK1/2, p38MAP キナーゼあるいは JNK 阻害剤によりほぼ完全に抑制された (図 3-2)。

これらのことから、IL-1 $\beta$  誘導性の 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していることが考えられた。

### 3.3.3 IL-1 $\beta$ 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、ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  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、MEK は、50 pM IL-1 $\beta$  刺激後、約15分をピークに、約5分から約60分でリン酸化が確認され、その後対照レベルに戻った。ERK1/2, p38 MAP キナーゼ, JNK は、50 pM IL-1 $\beta$  刺激後、約5~15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、ネコ滑膜由来線維芽細胞において、IL-1 $\beta$  は ERK1/2, p38 MAP

キナーゼ, JNK を活性化することが示された。

### 3.3.4 IL-1 $\beta$ 誘導性 MAP キナーゼの活性化に対する阻害剤の効果

IL-1 $\beta$  誘導性の p38 MAP キナーゼ, JNK, ERK1/2 のリン酸化に対する阻害剤の効果を検討した。

50 pM IL-1 $\beta$  で刺激後 15 分の p38 MAP キナーゼのリン酸化は, p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M) によって抑制された。一方, JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M), MEK 阻害剤 PD98059 (50  $\mu$ M) および ERK1/2 阻害剤 FR180204 (50  $\mu$ M) では, 抑制されなかった (図 3-4)。

50 pM IL-1 $\beta$  で刺激後 15 分の JNK のリン酸化は, JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) で抑制された。しかし, p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M), MEK 阻害剤 PD98059 (50  $\mu$ M) および ERK1/2 阻害剤 FR180204 (50  $\mu$ M) によっては抑制されなかった (図 3-5)。

50 pM IL-1 $\beta$  刺激後 15 分の ERK1/2 のリン酸化は, ERK 阻害剤 FR180204 (50  $\mu$ M) および MEK 阻害剤 PD98059 (50  $\mu$ M) によって抑制された。しかし, p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M) では抑制されなかった。ところが, ERK1/2 のリン酸化は, JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) によっても抑制されることが認められた (図 3-6)。

## 3.4 考察

本章では, ネコ滑膜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 キナーゼの関与を, MAP キナーゼ阻害剤を用いて検討した。

それぞれの MAP キナーゼの特異的阻害剤を用いたところ, p38 MAP キナーゼ

阻害剤, JNK 阻害剤, MEK/ERK 阻害剤にて IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現を介した PGE<sub>2</sub> 放出が抑制されたことから, p38 MAP キナーゼ経路, JNK 経路, MEK/ERK 経路の関与が示唆された。IL-1 $\beta$  刺激後早い時期に p38 MAP キナーゼ, JNK, ERK1/2 のリン酸化が引き起こされること, さらに p38 MAP キナーゼ, JNK, ERK1/2 のリン酸化はそれぞれの特異的阻害剤によって抑制されたことから, IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 には, p38 MAP キナーゼ経路, JNK 経路, MEK/ERK 経路が関わっていることが強く示唆された。

本章の背景にて示したように, 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おり (Fan et al., 2001; Guan et al., 1998; LaPointe and Isenović, 1999; Thomas et al., 2002; Tsuchiya et al., 2015; Wang et al., 2010), IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 発現に関する MAP キナーゼは一様ではなく, 動物種や臓器による差が大きいものと考えられる。本研究により, ネコ滑膜由来線維芽細胞においては, p38 MAP キナーゼ, JNK, MEK/ERK 経路が関与することが明らかとなった。

また本章では, 興味深いことに, JNK 阻害剤によって, MEK と ERK1/2 の IL-1 $\beta$  刺激後のリン酸化が抑制されることが確認された。逆に, MEK 阻害剤と ERK 阻害剤によって, JNK の IL-1 $\beta$  刺激によるリン酸化が抑制されることはなかった。このことより, ネコ滑膜由来線維芽細胞においては, MEK/ERK 経路と JNK 経路には, 活性化において相互作用が存在し, MEK/ERK 経路の活性は JNK の制御を受けていることが示唆された。一方, p38 MAP キナーゼの IL-1 $\beta$  刺激後のリン酸化は, MEK 阻害剤, ERK 阻害剤, JNK 阻害剤の影響を受けなかったことから, p38 MAP キナーゼの活性化は MEK/ERK 経路と JNK 経路とは独立して機能することが示唆された。

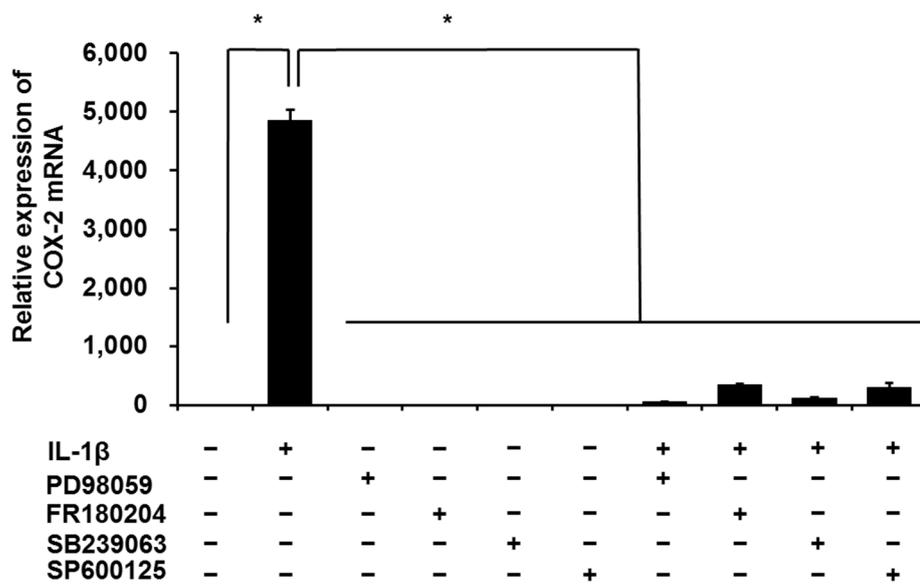


図 3-1. ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現に対する各 MAP キナーゼ阻害剤の効果

ネコ滑膜由来線維芽細胞を MEK 阻害剤 PD98059 (50  $\mu$ M), ERK1/2 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 時間前処理をした後, 50 pM IL-1 $\beta$  存在下または非存在下で 48 時間インキュベートし, COX-2 mRNA 発現の変化を Real-time RT-PCR にて検討した。値は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す。\* $P < 0.05$

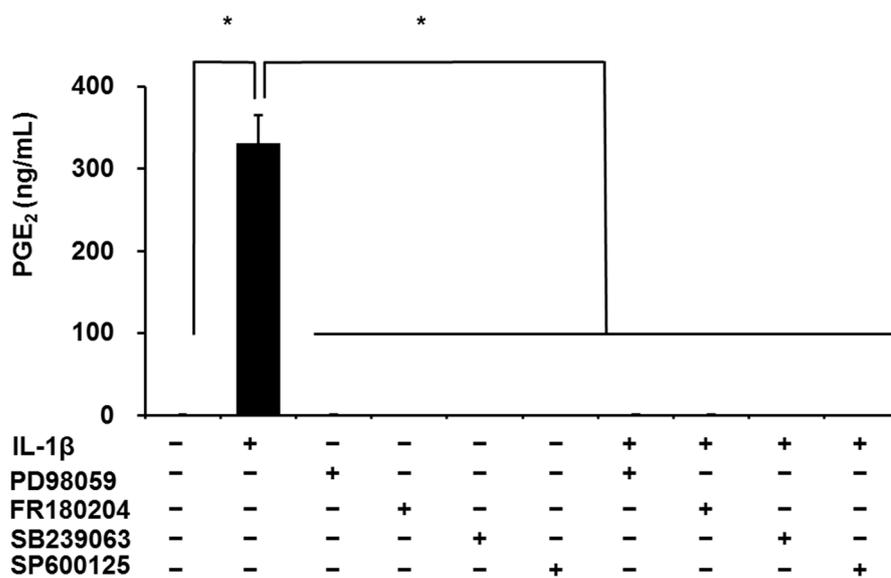


図 3-2. ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1β 誘導性 PGE<sub>2</sub> 放出に対する各 MAP キナーゼ阻害剤の効果

ネコ滑膜由来線維芽細胞を MEK 阻害剤 PD98059 (50 μM), ERK1/2 阻害剤 FR180204 (50 μM), p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20 μM) または JNK 阻害剤 SP600125 (10 μM) で 1 時間前処理をした後, 50 pM IL-1β 存在下または非存在下で 48 時間インキュベートし, 培養上清中への PGE<sub>2</sub> 放出を ELISA にて測定した。値は 3 例の平均値 ± 標準誤差を示す。\**P* < 0.05

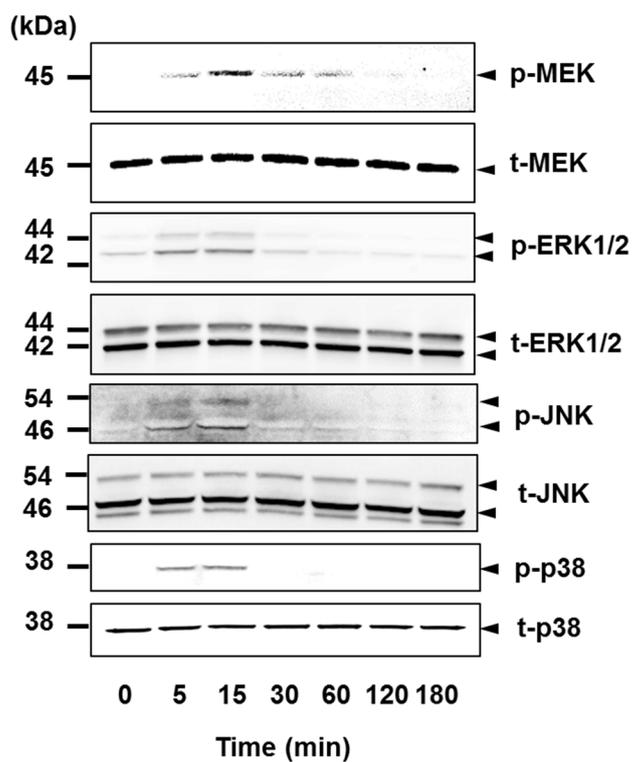


図 3-3. ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  刺激による MEK, ERK1/2, JNK, p38 MAP キナーゼのリン酸化

ネコ滑膜由来線維芽細胞を 50 pM IL-1 $\beta$  で 0~180 分間刺激をした後、リン酸化 MEK (p-MEK) および総 MEK (t-MEK), リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) および総 ERK1/2 (t-ERK1/2), リン酸化 JNK (p-JNK) および総 JNK (t-JNK), リン酸化 p38 MAP キナーゼ (p-p38) および総 p38 MAP キナーゼ (t-p38) を、特異的抗体を用いた Western blotting により検出した。

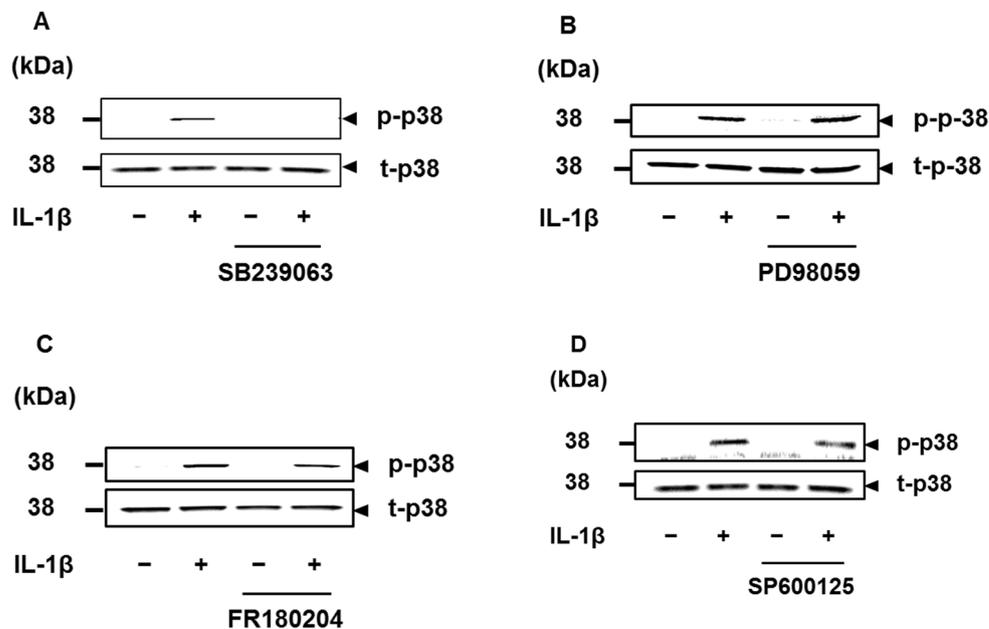


図 3-4. ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 p38 MAP キナーゼのリン酸化に対する p38 MAP キナーゼ阻害剤, MEK 阻害剤, ERK1/2 阻害剤, JNK 阻害剤の効果

ネコ滑膜由来線維芽細胞を p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M), MEK 阻害剤 PD98059 (50  $\mu$ M), ERK1/2 阻害剤 FR180204 (50  $\mu$ M), または JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした後, 50 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, リン酸化 p38 MAP キナーゼ (p-p38) および総 p38 MAP キナーゼ (t-p38) を, 特異的抗体を用いた Western blotting により検出した。p38 MAP キナーゼ阻害剤により p38 MAP キナーゼのリン酸化は抑制された (A)。MEK 阻害剤, ERK1/2 阻害剤, JNK 阻害剤は p38 MAP キナーゼのリン酸化を抑

制しなかった (B, C, D)。

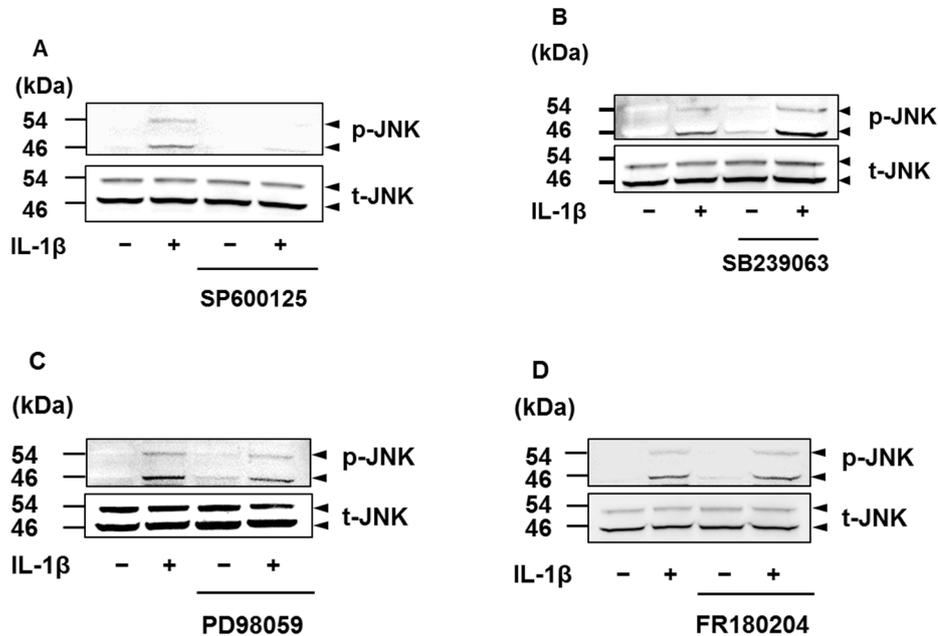


図 3-5. ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 JNK のリン酸化に対する JNK 阻害剤, p38 MAP キナーゼ阻害剤, MEK 阻害剤, ERK1/2 阻害剤の効果

ネコ滑膜由来線維芽細胞を JNK1/2 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M), p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M), MEK 阻害剤 PD98059 (50  $\mu$ M), または ERK1/2 阻害剤 FR180204 (50  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした後, 50 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, リン酸化 JNK (p-JNK) および総 JNK (t-JNK) を, 特異的抗体を用いた Western blotting により検出した。JNK 阻害剤により JNK のリン酸化は抑制された (A)。p38 MAP キナーゼ阻害剤, MEK 阻害剤, ERK1/2 阻害剤は JNK のリン酸化を抑制しなかった (B, C, D)。

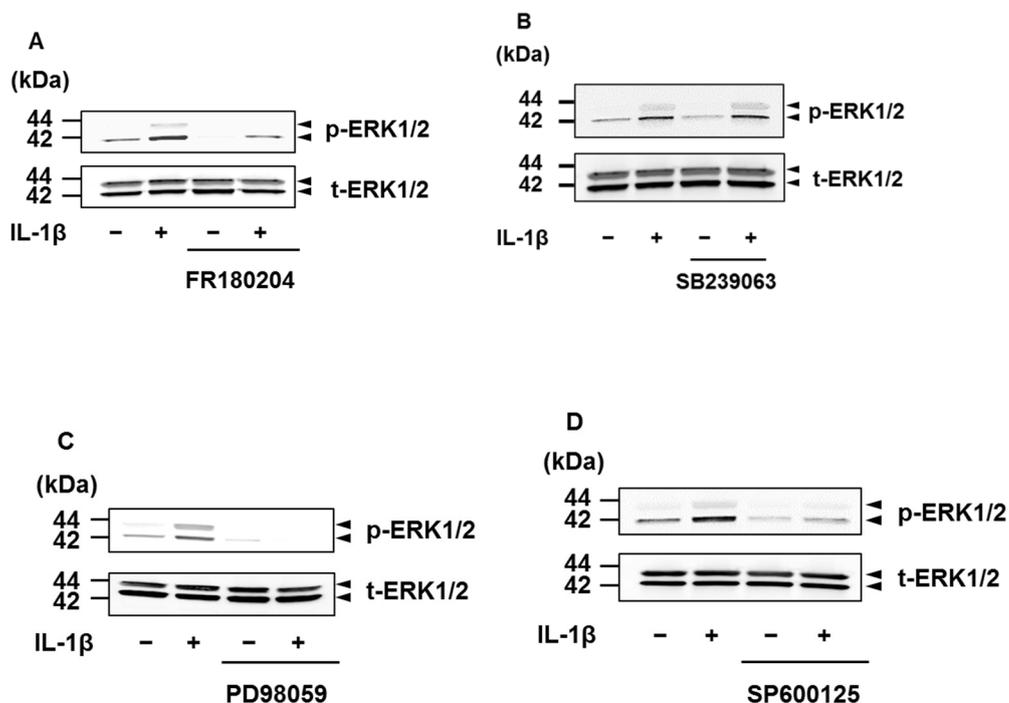


図 3-6. ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 ERK1/2 のリン酸化に対する ERK1/2 阻害剤, p38 MAP キナーゼ阻害剤, MEK 阻害剤, JNK 阻害剤の効果

ネコ滑膜由来線維芽細胞を ERK1/2 阻害剤 FR180204 (50  $\mu$ M), p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB239063 (20  $\mu$ M), MEK 阻害剤 PD98059 (50  $\mu$ M), または JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理をした後, 50 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, 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 Western blotting により検出した。ERK1/2 阻害剤により ERK1/2 のリン酸化は抑制された (A)。p38 MAP キナーゼ阻害剤および MEK 阻害剤は JNK のリン酸化を抑制しなかった (B, C)が, JNK 阻害剤は ERK1/2 のリン酸化を抑制した (D)。

## 第4章

### JNK1によるMEK/ERKの活性調節

## 4.1 緒言

様々な細胞において IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 発現に至る経路において, MAP キナーゼの関与が知られている (Dray et al., 2007; Guillot et al., 2013; Lee et al., 2013; Sul et al., 2014)。MAP キナーゼには, MEK/ERK, p 38 MAP キナーゼ, JNK の三つの代表的な経路がある (Kyriakis et al., 2001; 2012; Turjanski et al., 2007)。第 3 章では, IL-1 $\beta$  誘導性の MEK と ERK のリン酸化は JNK 阻害剤により抑制されるが, IL-1 $\beta$  誘導性の JNK のリン酸化は MEK および ERK 阻害剤によって抑制されなかったことから, ネコ滑膜由来線維芽細胞においては, IL-1 $\beta$  誘導性の MEK/ERK 経路の活性化が, 上流での JNK の活性化により制御されていることを示唆した。

そこで本章では, 免疫共沈降法を用いて, ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の MEK/ERK 経路の活性化と JNK の活性化の相互作用の有無を検討した。さらに JNK には JNK1 ~ 3 の三つのサブタイプが知られている (Bogoyevitch et al., 2006; Johnson, 2007) ことから, JNK をサブタイプ特異的にノックダウンし, これによる IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現と MEK/ERK の活性化への影響を検討した。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 材料

CELLBANKER 1 plus medium, PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II , Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System II および TP900 DiceRealTime v4.02B は TaKaRa Bio Inc. (Shiga, Japan) より購入した。抗ヒト total-JNK1 (t-JNK1, EPR140(2)), 抗ヒト total-JNK2 (t-JNK2, EP1595Y), 抗 COX-2 ウサギモノクローナルまたはポリクローナル抗体は Abcam (Cambridge, UK)より購入した。抗リン

酸化 MEK (p-MEK), 抗 total-MEK (t-MEK, D1A5), 抗ヒトリン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2, D13.14.4E) および抗ラット total-ERK1/2 (t-ERK1/2, 137F5) ウサギモノクローナルまたはポリクローナル抗体は, Cell Signaling Technology Japan (Tokyo, Japan) 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) より購入した。Mini-PROTEAN TGX gel, polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は Bio-Rad (Hercules, CA) 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-LG 培地), トリプシン EDTA およびエチジウムブロマイドは Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は Biowest (Nuaille, France) より購入した。StatMate IV は ATMS (Tokyo, Japan) より購入した。BICELL は Nihon Freezer Co., Ltd. (Tokyo, Japan) より購入した。

#### 4.2.2 細胞培養

前章までと同様に, ネコ滑膜由来線維芽細胞を分離し, 細胞数が  $1 \times 10^6$  個になるように  $75 \text{ cm}^2$  の培養フラスコに播種し, 10% FBS を添加した D-MEM-LG を用い, 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$  のインキュベーター内で培養した。

#### 4.2.3 RT-PCR による JNK サブタイプの確認

Total RNA は, TRIzol 試薬を用いて, ネコ滑膜由来線維芽細胞から抽出した。PrimeScript<sup>®</sup> RT Master Mix を用いて, 500 ng の total RNA から cDNA を合成した。RT-PCR は  $2 \mu\text{L}$  の cDNA, ネコ  $\beta$ -アクチン, JNK1, JNK2, JNK3 のプライ

マー, Ex Taq を含む 総量 10  $\mu$ L の反応液を用いて行った。表 4-1 に RT-PCR に用いたプライマーの配列を示す。PCR は, iCycler を用い, 94°C 2 分間の初期変性, 94°C 30 秒間の変性 30 回, 次いで 95°C 5 秒間, プライマーのアニーリングを 55°C で 30 秒間, プライマーの伸長を 72°C 30 秒にて行った。PCR 産物は, 2%アガロースゲルを用いて電気泳動しエチジウムブロマイドで染色し, 紫外線照射下で可視化した。

#### 4.2.4 Real-time RT-PCR

TRIzol 試薬を用いて, ネコ滑膜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, ネコ COX-2, ネコ  $\beta$  アクチンのプライマーを含む 25  $\mu$ 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 に示した配列と同様なものを使用した。no-template controls の Real-time RT-PCR は, 2  $\mu$ 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  $\mu$ l の各 RNA サンプルを用いて行った。PCR は, Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> 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, 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 を使用したネコ  $\beta$ -アクチンの増幅を内在性コントロールとし, また, ネコ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。

#### 4.2.5 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 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 COX-2 抗体 (1:1,000), 抗 p-MEK 抗体 (1:1,000), 抗 t-MEK 抗体 (1:1,000), 抗 p-ERK1/2 抗体 (1:1,000), 抗 t-ERK1/2 抗体 (1:1,000), 抗 p-JNK 抗体 (1:1,000), 抗 t-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 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 免疫共沈降法

細胞溶解物の量 (100 µg) は, Protein A plus G セファロースを用いて特異抗体でのインキュベーション前に明らかにした。細胞溶解物は 5 µg の p-MEK, t-MEK, p-ERK1/2, t-ERK1/2, p-JNK1/2 および t-JNK1/2 に対する特異抗体と共に, 4°C 18 時間のインキュベートを行った。沈降したタンパク質画分は, 溶解後, 電気泳動前に SDS バッファーで 95°C 5 分間煮沸し, Western blotting にて分析した。

#### 4.2.7 siRNA の細胞導入による JNK のノックダウン

ネコ滑膜由来線維芽細胞を、35 mm のディッシュに  $1.0 \times 10^5$  cells/well, もしくは 90 mm のディッシュに  $5.0 \times 10^5$  cells/well の密度で播種し、50 nM の JNK1 siRNA, JNK2 siRNA, scramble siRNA, 5  $\mu$ l/ml の Lipofectamine 2000 を含む Opti-MEM を使用して 6 時間トランスフェクトした。表 4-2 に siRNA の配列を示す。siRNA の効果をネコ JNK1, ネコ JNK2 のプライマーを用いた Real-time RT-PCR と、抗 t-JNK1 抗体, 抗 t-JNK2 抗体を用いた Western blotting により確認した。

#### 4.2.8 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。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 IL-1 $\beta$ 依存性の JNK, MEK および ERK の相互作用

ネコ滑膜由来線維芽細胞を 50 pM IL-1 $\beta$  の存在下および非存在下で 15 分間インキュベートした後、IL-1 $\beta$  依存性の JNK, MEK および ERK の相互作用を免疫沈降法により検討した。

初めに、抗リン酸化 JNK 抗体を用いて免疫共沈降した画分におけるリン酸化 JNK1/2, リン酸化 MEK, リン酸化 ERK1/2 を、特異抗体を用いた Western blotting にて検出した。非刺激の対照と比較して、IL-1 $\beta$  刺激時において有意に濃いリン酸化 JNK1/2, リン酸化 MEK, リン酸化 ERK1/2 のバンドが検出された (図 4-1A, 図 4-1D, 図 4-1E)。

次に、抗リン酸化 MEK 抗体を用いて免疫共沈降した画分におけるリン酸化 MEK, リン酸化 ERK1/2, リン酸化 JNK1/2 を、特異抗体を用いた Western blotting

にて検出した。非刺激の対照と比較して、IL-1 $\beta$  刺激を行なった時に有意に濃いリン酸化 MEK, リン酸化 ERK1/2, リン酸化 JNK1/2 のバンドが検出された (図 4-1B, 図 4-1F, 図 4-1G)。

さらに、抗リン酸化 ERK1/2 抗体を用いて免疫共沈降した画分におけるリン酸化 ERK1/2, リン酸化 MEK リン酸化 JNK1/2 を、特異抗体を用いた Western blotting にて検出した。この画分においても、非刺激の対照と比較して、IL-1 $\beta$  刺激を行なったサンプルにおいて有意に濃いリン酸化 ERK1/2, リン酸化 MEK, リン酸化 JNK1/2 のバンドが検出された (図 4-1C, 図 4-1H, 図 4-1I)。これらのことから、IL-1 $\beta$  依存性に MEK, ERK, JNK が相互作用することが確認された。

#### 4.3.2 JNK1 による MEK/ERK 制御

JNK には JNK1, JNK2, JNK3 の三種のサブタイプが存在することから、ネコ滑膜由来線維芽細胞より total RNA を抽出し、RT-PCR にてサブタイプを検討したところ、JNK1 と JNK2 のバンドが認められた (図 4-2)。

そこで、JNK1 と JNK2 を特異的にノックダウンした細胞における IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 mRNA 発現への影響と、ERK1/2 と MEK のリン酸化への影響を検討した (図 4-3)。

JNK1 ノックダウン細胞において、IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現は有意に抑制された。一方、JNK2 ノックダウン細胞では、IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 mRNA 発現は有意に増強された。JNK1 と JNK2 を同時にノックダウンした細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現は有意に抑制された (図 4-4)。

次に、JNK1 ノックダウンによる IL-1 $\beta$  誘導性の MEK と ERK1/2 のリン酸化への影響を検討した。JNK1 ノックダウン細胞において、IL-1 $\beta$  誘導性の MEK および ERK1/2 のリン酸化の有意な減弱が認められた。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 抗体を用いた免疫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 (図 4-5)。

#### 4.4 考察

第 3 章での阻害剤を用いた結果より、IL-1 $\beta$  刺激したネコ滑膜由来線維芽細胞において、JNK が MEK/ERK の活性を調節していることが示唆されていたが、本章では、MEK, ERK, JNK が相互作用することを、免疫共沈降法を用いて明らかにした。さらに、JNK1 をノックダウンすることにより IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現と MEK/ERK のリン酸化が有意に抑えられることを明らかにした。

MAP キナーゼシグナリングは、MAP キナーゼキナーゼキナーゼ、MAP キナーゼキナーゼ、MAP キナーゼという 3 つの連続したリン酸化酵素で構成され、MAP キナーゼキナーゼキナーゼが MAP キナーゼキナーゼをリン酸化し、さらに MAP キナーゼキナーゼが MAP キナーゼをリン酸化し活性化するという階層構造で成り立っていると考えられている。活性化された MAP キナーゼは、最初に細胞が受けた刺激の介在役として、細胞質内、核内の様々な標的をリン酸化させる。ERK は MAP キナーゼキナーゼである MEK により活性化を受け、MEK は Raf 等の MAP キナーゼキナーゼキナーゼにより活性化を受けることが知られている (Imajo et al., 2006; Kim and Choi, 2015)。しかしながら、ネコ滑膜由来線維芽細胞においては、IL-1 $\beta$  刺激によりリン酸化した JNK と MEK, ERK1/2 が結合すること、また、JNK1 のノックダウンでは IL-1 $\beta$  誘導性の MEK/ERK1/2 のリン酸化と COX-2 mRNA の発現が減弱したことから、JNK1 が MEK/ERK1/2 の上流の制御因子として機能し、JNK1 の活性化が MEK/ERK1/2 の活性化に必須である

ことを示している。ラット新生子の小腸上皮細胞の未分化細胞株である IEC-6 細胞のアポトーシスに関するシグナリングにおいて、MEK/ERK の活性化は、JNK の活性を制御しているという報告や (Bavaria et al., 2014), ヒトの星状膠細胞において、MEK が JNK をリン酸化させるという報告 (Lichtenstein et al., 2012) がある。また、(Val 12)-ras-p21 を注入した *Xenopus laevis* の卵母細胞で、Raf/MEK/ERK と JNK のクロストークが報告されている (Adler et al., 2005)。また、アフリカミドリザル腎臓由来細胞である COS-7 細胞では、持続する JNK の活性化が、MEK を介さずに ERK の活性化を阻害するという、JNK と ERK の負のフィードバックと考えられるクロストークが報告されている (Shen et al., 2003)。Bcr/Abl+ヒト白血病細胞では、Raf/MEK/ERK 経路の不活性化と JNK 経路の活性化の協調は、ヒストンジアセチラーゼ阻害剤誘導性のアポトーシスに関与することが報告されている (Yu et al., 2003)。しかしながら、それらの報告は、JNK と MEK/ERK 経路のクロストークについて不明瞭な点が多く残されていた。本研究結果は、JNK1 の活性化が MEK/ERK1/2 の活性化に必要であることを明確に示しており、新規のシグナル経路であると考えられる。

JNK はセリン/スレオニンキナーゼであり、JNK が基質を認識するには、JNK の C 末端にある基質結合部位と基質の JNK 結合モチーフとの相互作用が必要である (Bogoyevitch et al., 2006; 2010)。様々なリン酸化 JNK の基質が報告されているが (Bogoyevitch et al., 2006), JNK と MEK/ERK1/2 の直接的な相互作用については明らかにされていない。ヒト星状膠細胞株 U-251 において、JNK 誘発性の c-Raf のリン酸化が MEK の活性化をもたらすことが報告されており (Adler et al., 2005), JNK は、c-Raf のようなプロテインキナーゼの活性化を介して MEK/ERK1/2 経路を活性化する可能性がある。また、足場タンパク質は、複数のタンパク質に同時に結合することによりシグナルの効率的な伝達を促進し、こ

れは MAP キナーゼカスケードの複数の構成成分に結合することが示唆されている (Brown and Sacks, 2009; Dhanasekaran et al., 2007)。このような足場タンパク質が JNK により制御される MEK/ERK1/2 経路のシグナリングに貢献していることも考えられる。

表 4-1. RT-PCR に用いたプライマーの配列

Gene Name	Gene bank ID	Primer sequences
<i>JNK1</i>	XM_011287267.1	F: 5'-AACTCTTTGACGCTGCTTGC-3' R: 5'-TGAAGCACTGTGCCTTACC-3'
<i>JNK2</i>	XM_011281507.1	F: 5'-AGCCCAAGGGATTGTTTGTG-3' R: 5'-AGGACGAGTTCACGATAAGCTC-3'
<i>JNK3</i>	XM_011281754.1	F: 5'-TTTGTGCTGCGTATGATGCC-3' R: 5'-TTGGCATGCGTTGGTTCTG-3'
<i>β-actin</i>	AB051104.1	F: 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3' R: 5'-GACAGCACCGTGTTAGCGTA-3'

表 4-2. siRNA に用いた RNA の遺伝子配列

Gene Name	Gene bank ID	siRNA sequences
<i>JNK1</i>	XM_011287267.1	F: 5'-GAAUCAGACUCAUGC UAAA-3' R: 5'-TTTAGCATGAGTCTGATTC-3'
<i>JNK2</i>	XM_011281507.1	F: 5'-GGUAUUAUCGGGCACCCGA-3' R: 5'-UCGGGUGCCCGAUAAUACC-3'

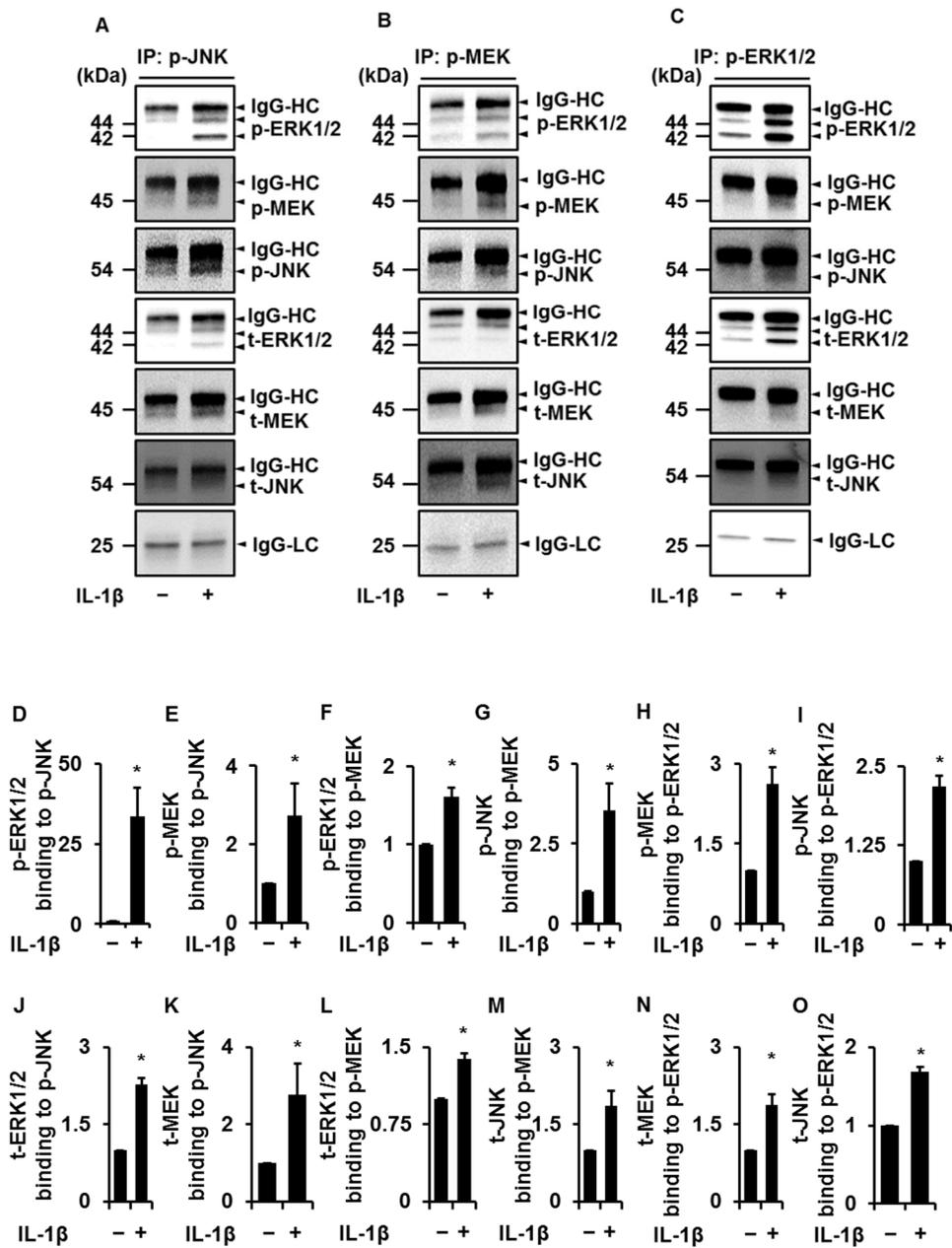


図 4-1. IL-1 $\beta$  で刺激したネコ滑膜由来線維芽細胞における JNK, MEK, ERK の相互作用

ネコ滑膜由来線維芽細胞を 50 pM IL-1 $\beta$  の存在下および非存在下で 15 分間イ

ンキュベートした後、抗リン酸化 JNK (p-JNK) 抗体を用い免疫沈降反応にて得た画分 (A, D, E, J, K), 抗リン酸化 MEK (p-MEK) 抗体を用い免疫沈降反応にて得た画分 (B, F, G, L, M) および抗リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 抗体を用い免疫沈降反応にて得た画分 (C, H, I, N, O) において、Western blotting にて p-ERK1/2, p-MEK, p-JNK の発現レベルを検出した。p-ERK (D, F), p-MEK (E, H), p-JNK (G, I), t-ERK (J, L), t-MEK (K, N), t-JNK (M, O) の発現レベルは、それぞれ IL-1 $\beta$  刺激の有無で比較した。IgG 重鎖 (HC) と IgG 軽鎖 (LC) はローディングコントロールとして使用した。IL-1 $\beta$  刺激の有無により HC と LC の発現レベルに有意差は認められなかった。結果は、3 つの独立した実験結果の平均  $\pm$  標準誤差を示す。\* $P < 0.05$

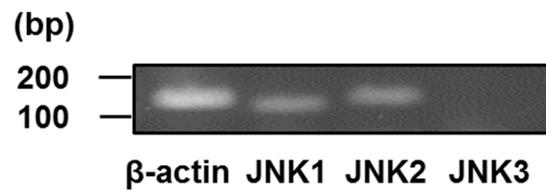


図 4-2. ネコ滑膜由来線維芽細胞における JNK1 および JNK2 mRNA 発現

ネコ滑膜由来線維芽細胞における JNK サブタイプの mRNA 発現を RT-PCR により検討した。JNK1 および JNK2 mRNA 発現は認められたが、JNK3 mRNA 発現は認められなかった。

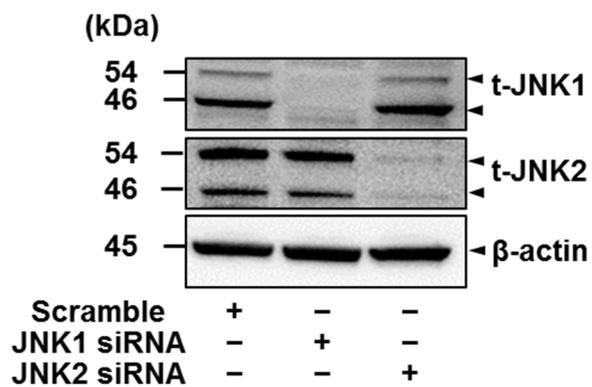


図 4-3. siRNA による JNK1 と JNK2 のノックダウン細胞におけるタンパク質発現抑制

siRNA により，JNK1 と JNK2 をそれぞれノックダウンしたネコ滑膜由来線維芽細胞におけるそれぞれの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。

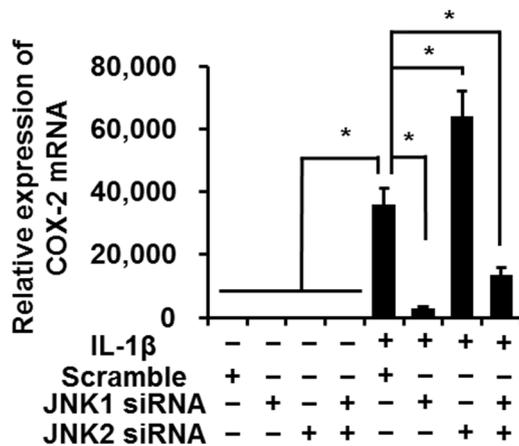


図 4-4. JNK1, JNK2 をノックダウンした細胞における IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 mRNA 発現

siRNA を用いて, JNK1 と JNK2 をそれぞれ単独に, また両者を同時にノックダウンしたネコ滑膜由来線維芽細胞において, 48 時間の IL-1 $\beta$  刺激を行った後, COX-2 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて検討した。IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現は, Scramble siRNA 導入細胞を対照とすると, JNK1 ノックダウン細胞および JNK1 と JNK2 を同時にノックダウンした細胞では有意に減少し, JNK2 ノックダウン細胞では増加した。結果は, 3 つの独立した実験結果の平均  $\pm$  標準誤差を示す。\* $P < 0.05$

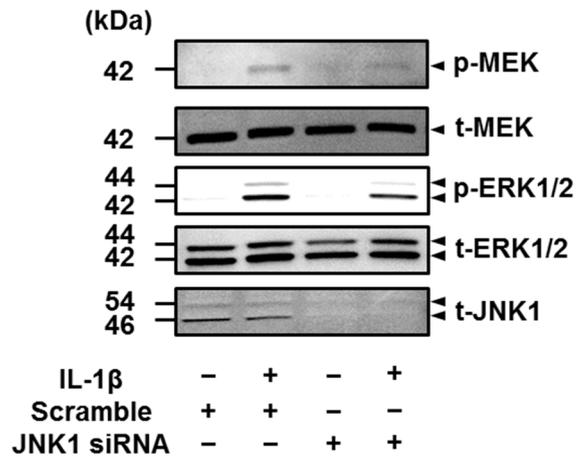


図 4-5. JNK1 ノックダウン細胞における IL-1β 刺激による MEK および ERK1/2 のリン酸化の低下

JNK1 ノックダウンネコ滑膜由来線維芽細胞を、IL-1β で刺激を行ない、刺激後 15 分における p-MEK, t-MEK, p-ERK1/2, t-ERK1/2, t-JNK1 の発現を、抗 p-MEK, 抗 t-MEK, 抗 p-ERK1/2, 抗 t-ERK1/2 および抗 t-JNK1 抗体を用い Western blotting にて解析した。Scramble siRNA 導入細胞を対照とすると、JNK1 ノックダウン細胞では、IL-1β 刺激による p-MEK および p-ERK1/2 発現低下が認められた。

## 第 5 章

## 統 括

本研究は、ネコの滑膜炎の病態発生機構を解明するために、ネコ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 (PGE<sub>2</sub>) の産生に関わる、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 発現の関与、mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ) 経路の関与について検討し、次の結果を得た。

第 2 章では、IL-1 $\beta$  で刺激したネコ滑膜由来線維芽細胞から、時間依存性および用量依存性の PGE<sub>2</sub> 放出を認めた。PGE<sub>2</sub> は、産生に伴い放出されることから、IL-1 $\beta$  刺激は、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> 産生に関わる酵素に COX-2 が知られており、その mRNA 発現およびタンパク質発現の検出により、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、IL-1 $\beta$  刺激により MAP キナーゼ経路が活性化されることから、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、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路、p38 MAP キナーゼ経路、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 経路 の三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 の活性調整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、IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 発現には、MEK/ERK、p38 MAP キナーゼ、JNK の活性化が関与することが明らかとなった。実際に、IL-1 $\beta$  で刺激したネコ滑膜由来線維芽細胞では、MEK、ERK1/2、p38 MAP キナーゼ、JNK の時間依存的なリン酸化が認められた。また、本章では、JNK 阻害剤にて ERK1/2 のリン酸化が抑制されたことから、JNK と ERK1/2 には相互作用があり、さらに JNK が ERK1/2 の上流に存在することが示唆された。

第4章では、第3章で示唆された JNK と ERK 経路の相互作用について詳細な検討を行った。JNK と MEK, ERK の相互作用の有無を、それぞれのリン酸化の特異抗体を用いて、免疫共沈降を行い確認したところ、IL-1 $\beta$  で刺激したネコ滑膜由来線維芽細胞からの免疫共沈降画分においてのみ、リン酸化 JNK とリン酸化 MEK, リン酸化 JNK とリン酸化 ERK, リン酸化 MEK とリン酸化 ERK の結合が確認された。このことより、ネコ滑膜由来線維芽細胞において、MEK, ERK, JNK は、IL-1 $\beta$  で刺激することによりリン酸化し、リン酸化することによって MEK, ERK, JNK が結合することが明らかとなった。

さらに、ネコ滑膜由来線維芽細胞において JNK のサブタイプである JNK1 および JNK2 mRNA の発現を認め、siRNA を用いてサブタイプ特異的にノックダウンすることによる IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現への影響を検討した。その結果、JNK1 をノックダウンしたネコ滑膜由来線維芽細胞において有意な COX-2 mRNA 発現抑制と、MEK および ERK のリン酸化が抑制されたことから、ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現は JNK1 の制御を受けることが強く示唆された (図 5-1)。

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 mRNA と COX-2 タンパク質発現を介して PGE<sub>2</sub> を放出し、これには MEK/ERK, p38 MAP キナーゼ, JNK が関与しており、さらに、MEK/ERK1/2 は JNK1 の制御を受けていることが明らかとなった。

MEK/ERK1/2 の活性化に JNK の活性化が必要であるという報告はこれまでになく、この研究結果は、本シグナル経路を標的とするネコ滑膜炎の予防、治療法確立に貢献するものと期待される。

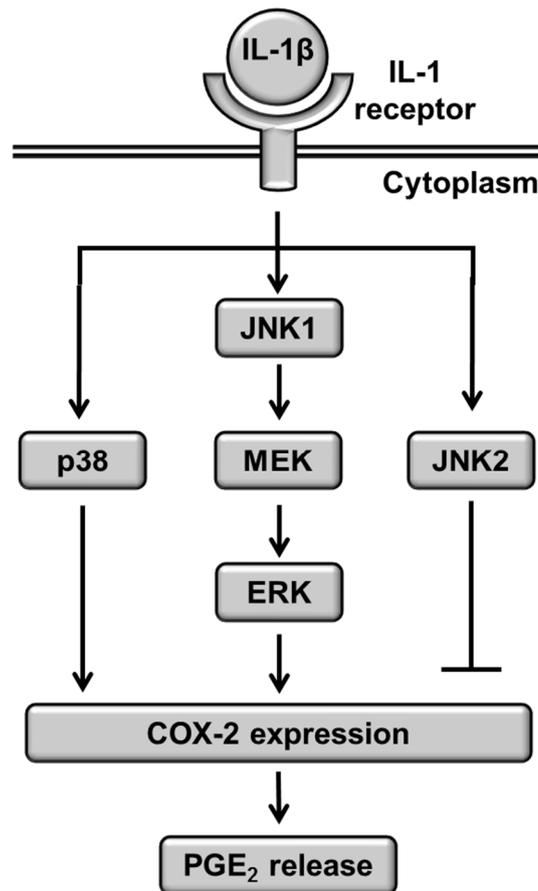


図 5-1. ネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 mRNA 発現における JNK1/MEK/ERK1/2 経路と p38 MAP キナーゼ経路の模式図

ネコ滑膜由来線維芽細胞において JNK1 のリン酸化は MEK/ERK シグナリングを活性化させ、COX-2 の発現と PGE<sub>2</sub> の合成に寄与する。一方で、JNK2 の経路は COX-2 の発現に抑制的に働く。p38 MAP キナーゼ経路も COX-2 の発現と PGE<sub>2</sub> の合成に寄与するが、JNK1/MEK/ERK1/2 経路とは独立している。

## 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 忠昭教授並びに山谷 吉樹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。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 貴則先生並びに獣医生化学研究室の諸氏に厚く謝意を表します。さらに、社会人大学院生という立場をご理解いただき、思う存分研究に専念させていただいたロイヤルカナンジャポンとその皆様、また、分野は異なりますがそれぞれの立場で獣医療を盛り上げようと切磋琢磨している盟友であり、無二の友人であり、本研究では共同研究者の一人となっただいた木村太郎先生に心よりお礼を申し上げます。そして、社会人大学院生活を理解し支えてくれた上、共に研究にも携わり、科学の楽しさを共有してくれた妻 菜菜子に心より感謝いたします。

## 参考文献

- 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)
- 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)
- Bogoyevitch MA, Kobe B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-jun N-terminal kinases. *Microbiol Micrimol Biol Rev.* 70, 1061-1095 (2006)
- Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY, Ng DC. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta* 1804, 463-475 (2010)
- 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)
- Brown MD, Sacks DB. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cell Signal.* 21, 462-469 (2009)

Clarke SP et al. Prevalence of radiographical signs of degenerative joint disease in a hospital population of cats. *Vet Rec.* 157, 793-799 (2005)

Dhanasekaran DN, Kashef K, Lee CM, Xu H, Reddy EP. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* 26, 3185-3202 (2007)

Dray A, Read SJ. Arthritis and pain. Future targets to control osteoarthritis pain. *Arthritis Res Ther.* 9, 212 (2007)

Fan XM, Wong BC, Lin MC, Cho CH, Wang WP, Kung HF, Lam SK. 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 (2001)

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science* 294, 1871-1875 (2001)

Godfrey DR. Osteoarthritis in cats: a retrospective radiological study. *J Small Anim Pract.* 46, 425-429 (2005)

Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 23, 471-478 (2011)

Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR. 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 (1998)

Guillot M, Moreau M, Heit M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Troncy E. Characterization of osteoarthritis in cats and meloxicam efficacy using objective chronic pain evaluation tools. *Vet.J.* 196, 360-367 (2013)

Hardie EM, Roe SC, Martin FR. Radiographic evidence of degenerative joint disease in geriatric cats: 100 cases (1994-1997). *J Am Vet Med Assoc.* 220, 628-632 (2002)

Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 23, 144-150 (2002)

Hayden MS, Ghosh S. NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 26, 203-234 (2012)

Imajo M, Tsuchiya Y, Nishida E. Regulatory mechanisms and functions of MAP kinase signaling pathways. *IUBMB Life* 58, 312-317 (2006)

Jiang B, Xu S, Hou X, Pimentel DR, Brecher P, Cohen RA. Temporal control of NF- $\kappa$ B activation by ERK differentially regulates interleukin-1 $\beta$ -induced gene expression. *J Biol Chem.* 279, 1323-1329 (2004)

Johnson GL, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: Regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1341-1348 (2007)

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)

Kim EK, Choi EJ. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol.* 89, 867-882 (2015)

木村 太郎, 木村 さや香, 鈴木 さやか, 北中 卓. ネコの四肢関節における骨関節炎に関する X 線検査を用いた疫学調査. *獣医麻酔外科学雑誌* 45, 199 (2014)

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)

LaPointe MC, Isenović E. 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 (1999)

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

Lee AS, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, van Wijnen AJ, Im HJ. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. Gene 527, 440-447 (2013)

Lichtenstein MP, Madrigal JL, Pujol A, Galea E. JNK/ERK/FAK mediate promigratory actions of basic fibroblast growth factor in astrocytes via CCL2 and COX2. Neurosignals 20, 86-102 (2012)

Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaaglandin E<sub>2</sub> synthesis and secretion: the role of PGE<sub>2</sub> synthesis. Clin Immunol. 119, 229-240 (2006)

Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. Bone 51, 249-257 (2012)

Shen YH, Godlewski J, Zhu J, Sathyanarayana P, Leaner V, Birrer MJ, Rana A, Tzivion G. 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)

Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacol Rev. 56, 387-437 (2004)

- Smith WL, DeWit DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Anne Rev Biochem.* 69, 145-182 (2000)
- Sul RM, Chase D, Parkin T, Bennett D. Comparison of meloxicam and a glucosamine-chondroitin supplement in management of feline osteoarthritis. A double-blind randomized, placebo-controlled, prospective trial. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 27, 20-26 (2014)
- Thomas B, Thirion S, Humbert L, Tan L, Goldring MB, Béréziat G, Berenbaum F. Differentiation regulates interleukin-1 $\beta$ -induced cyclo-oxygenase-2 in human articular chondrocytes: role of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem J.* 362, 367-373 (2002)
- Tsuchiya H, Nakano R, Konno T, Okabayashi K, Narita T, Sugiya H. Activation of MEK/ERK pathways through NF- $\kappa$ B activation is involved in interleukin-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 expression in canine dermal fibroblasts. *Vet Immunol Immunopathol.* 168, 223-232 (2015)
- Turjanski AG, Vaque JP, Gutkind JS. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26, 3240-3253 (2007)
- Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metast Rev.* 26, 525-534 (2007)

Wang X, Li F, Fan C, Wang C, Ruan H. Analysis of isoform specific ERK signaling on the effects of interleukin-1 $\beta$  on COX-2 expression and PGE2 production in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 402, 23-29 (2010)

Yang CM, Chien CS, Hsiao LD, Luo SF, Wang CC. 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 (2002)

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