

イヌにおけるインターロイキン 1 $\beta$  誘導性細胞応答と  
シグナル伝達

日本大学大学院獣医学研究科

北中菜菜子

2019

## 目次

第1章	序論	1
第2章	イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-6 の発現	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	8
2.2.3	Real-time RT-PCR	9
2.2.4	Western blotting	10
2.2.5	siRNA トランスフェクション	10
2.2.6	IL-6 assay	11
2.2.7	統計学的解析	11
2.3	結果	11
2.3.1	IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-6 産生	11
2.3.2	IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-6 発現における ERK1/2 経路の関与	12
2.3.3	IL-1 $\beta$ 誘導性 ERK1/2 リン酸化	13

2.3.4	ERK1 および ERK2 ノックダウン細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-6 mRNA 発現の抑制	13
2.4	考察	14
第3章	イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 MMP-3 発現	24
3.1	緒言	25
3.2	材料と方法	26
3.2.1	材料	26
3.2.2	細胞培養	26
3.2.3	Real-time RT-PCR	26
3.2.4	Western blotting	27
3.2.5	MMP-3 activity assay	28
3.2.6	siRNA トランスフェクション	28
3.2.7	細胞移動測定	28
3.2.8	統計学的解析	29
3.3	結果	29
3.3.1	IL-1 $\beta$ 誘導性 MMP-3 分泌と MMP-3 mRNA 発現	29

3.3.2	IL-1 $\beta$ 誘導性細胞遊走能への MMP-3 の関与	30
3.3.3	IL-1 $\beta$ 誘導性 MMP-3 発現における ATF-2 の関与	30
3.3.4	IL-1 $\beta$ 誘導性 MMP-3 発現への ERK 経路の関与	31
3.3.5	ERK による ATF-2 活性化の制御	32
3.4	考察	33
第4章	イヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 COX-2 発現	47
4.1	緒言	48
4.2	材料と方法	50
4.2.1	材料	50
4.2.2	細胞培養	51
4.2.3	Real-time RT-PCR	51
4.2.4	Western blotting	52
4.2.5	免疫細胞化学	52
4.2.6	プロスタグランジン E <sub>2</sub> 測定	53
4.2.7	siRNA トランスフェクション	53
4.2.8	統計学的解析	54

4.3	結果	54
4.3.1	IL-1 $\beta$ 誘導性プロスタグランジン E <sub>2</sub> 放出と COX-2 発現	54
4.3.2	NF- $\kappa$ B 阻害剤による IL-1 $\beta$ 誘導性プロスタグランジン E <sub>2</sub> 放出と COX-2 mRNA 発現抑制	55
4.3.3	IL-1 $\beta$ 誘導性 p65 および p105 のリン酸化	55
4.3.4	p65 または p105 ノックダウン細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 COX-2 mRNA 発現抑制	57
4.4	考察	57
第5章	統括	70
	謝辞	76
	参考文献	77

## 第 1 章

### 序 論

炎症は、外部からの侵害刺激、細菌やウイルスなどの病原体感染、毒物成分など様々な要因に対して引き起こされる免疫系の生物学的な反応で、生体に不可欠な防御機能である(Medzhitov, 2010)。炎症には、全身を循環している血漿、血管内皮細胞、白血球や血小板などの血液由来の細胞成分、線維芽細胞や筋線維芽細胞などの結合組織とそこに存在する肥満細胞、マクロファージ、細胞外マトリクスなどが関与し、それぞれ別々にあるいは共同して機能を担っている。生体局所に刺激が生じると、障害部位へ血管から液性成分が浸出し、白血球も血管外へ遊走し障害部位へと移動する。このような反応の多くはケミカルメディエーターやサイトカインなどの生体物質により制御されている (Chen et al., 2017)。

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炎症性サイトカインである。IL-1 $\beta$  は、白血球、血管内皮細胞、線維芽細胞など様々な細胞から分泌される。IL-1 $\beta$  の遺伝子発現は炎症を誘発する PAMPs (pathogen-associated molecular patterns : 病原体関連分子パターン) や DAMPs (damage-associated molecular patterns : ダメージ関連分子パターン) などの刺激により誘導される。この遺伝子発現誘導により前駆型 IL-1 $\beta$  タンパク質の発現が促進される。前駆型 IL-1 $\beta$  は、さらに、炎症誘導刺激によるインフラマソーム形成を介して活性化される caspase-1 によりプロセッシングを受け、成熟型 IL-1 $\beta$  となって分泌される (Bent et al., 2018; Shao et al., 2015)。

IL-1 $\beta$  は、細胞膜受容体に結合すると、細胞に依存した細胞内シグナル伝達を介して、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反応を引き起こす (Hayden & Ghosh, 2012)。IL-1 $\beta$  刺激により活性化されるシグナル伝達経路の1つが MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase) 経路である (Chen et al., 2017)。MAP キナーゼは、真核生物において、細胞外からの情報を核へ伝えるシグナル伝達経路に関わる主要な酵素であり、炎症性サイトカインを含む

様々な刺激に対する細胞応答に関与している。MAP キナーゼ経路としては、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 1/2, c-jun N-末端キナーゼ (JNK) および p38 の 3 つが主要な経路として知られている (Johnson & Lapadat, 2002; Kyriakis & Avruch, 2012)。

また、転写調節因子の 1 つである NF- $\kappa$ B を介した細胞内シグナル経路も IL-1 $\beta$  刺激により活性化される (Chen et al., 2017)。NF- $\kappa$ B は、特異的な細胞遺伝子の発現を増強することによって炎症反応を調節し、発がんにも関与すると考えられている (Luqman & Pezzuto, 2010; Xia et al., 2018)。哺乳類における NF- $\kappa$ B ファミリーは、RelA (p65), RelB, Rel (cRel), NF- $\kappa$ B1 (p50 とその前駆体 p105) および NF- $\kappa$ B2 (p52 とその前駆体 p100) の 5 つのメンバーで構成されている (Hayden and Ghosh, 2012)。NF- $\kappa$ B シグナル経路は、古典的経路と非古典的経路の 2 つの異なる経路で構成され、古典的経路は炎症反応を媒介し、非古典的経路は二次リンパ器官の形成だけでなく、免疫細胞の分化および成熟に関与する (Shih et al., 2011)。

本研究は、イヌの細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の細胞応答と細胞内シグナル伝達経路を検討し、イヌにおける炎症制御の機序を明らかにすることで、獣医療への貢献を目的としたものである。

第 2 章では、イヌ皮膚由来線維芽細胞の初代培養系を用いて、炎症に関わる炎症性サイトカイン IL-6 発現に対する IL-1 $\beta$  の効果を検討し、さらに、細胞内シグナル伝達系として MAP キナーゼの ERK1/2 の関与を検討した。

第 3 章では、第 2 章と同様にイヌ皮膚由来線維芽細胞の初代培養系を用いて、炎症に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の 1 つである MMP-3 発現に対する IL-1 $\beta$  について検討し、さらに、細胞内シグナル伝達系として MAP キナーゼの ERK1/2 と、それに共役する転写因子 ATF-2 の関与を検討した。

第4章では、イヌ由来悪性黒色腫細胞（メラノーマ細胞）を用いて、炎症時に産生されるプロスタグランジン合成の律速酵素シクロオキシゲナーゼ2（COX-2）発現がIL-1 $\beta$ 刺激により惹起されることと、細胞内シグナル伝達経路としてのNF- $\kappa$ Bの活性化の関与について検討した。

## 第2章

イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 の発現

## 2.1 緒言

インターロイキン 6 (IL-6) は、免疫応答および炎症の調節に関与するサイトカインであり、ヒトにおいては、生理的条件下では血清濃度は低く保たれているが、炎症の初期段階でその濃度が大きく増加する (Calabrese & Rose-John, 2014; Tanaka et al., 2014)。イヌにおいては、テレピン油の注射投与によって実験的に誘発した炎症時 (Yamashita et al., 1994) に、あるいは生きた大腸菌 (Coran et al., 1992) やリポ多糖 (LPS) (Floras et al., 2014; LeMay et al., 1990; Miyamoto et al., 1996) を投与して作製された敗血症モデルにおいて、血清中 IL-6 濃度が上昇することが観察されている。さらに、臨床的にも、特発性免疫介在性多発性関節障害によって引き起こされる関節炎症 (Foster et al., 2014) や骨の炎症である骨幹端骨症を発症しているイヌ (Safra et al., 2016) において、また、全身性炎症反応症候群や敗血症のイヌにおいて (Rau et al., 2007)、血漿中 IL-6 濃度が高くなることが観察されている。したがって、IL-6 はヒトと同様にイヌの炎症過程において重要なサイトカインであると考えられる。

皮膚炎症においても、IL-6 の発現および産生は、乾癬 (Grossman et al., 1989; Neuner et al., 1991)、扁平苔癬 (Yamaoto & Osaki, 1995)、全身性硬化症 (Koch et al., 1993) および全身性エリテマトーデス (Fugger et al., 1989) などの皮膚疾患に関連している。ラットにおいて、皮膚に IL-6 を過剰発現させると、表皮増殖および炎症を誘発することが明らかにされている (Sawamura et al., 1998)。さらに、IL-6 は皮膚の表皮や真皮を含む様々な細胞の増殖や分化などに関与し、局所性炎症においても重要な役割を担うことが報告されている (Paquet & Piérard, 1996)。

MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase) は、真核生物において、細胞外からの情報を核へ伝えるシグナル伝達経路に関わる主要な酵素であり、炎症性サイトカインを含む様々な刺激に対する細胞応答に関与している (Kyriakis &

Avruch, 2012)。MAP キナーゼ経路としては、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 1/2, c-jun N-末端キナーゼ (JNK) および p38 の3つが主要な経路として知られている (Johnson & Lapadat, 2002; Kyriakis & Avruch, 2012)。

線維芽細胞は、結合組織の主要な細胞成分であり、細菌のエンドトキシン、サイトカインおよび増殖因子などの多数のストレス刺激に応答して炎症性サイトカインおよびケモカインを産生し、免疫細胞の炎症反応の調節に関与している (Barrientos et al., 2008; Tracy et al., 2016)。一方、IL-1 $\beta$  は、宿主の免疫および炎症反応に関与する強力な炎症性サイトカインであり (Dinarello, 2011)、ヒトおよびラット細胞において MAP キナーゼ経路を介して IL-6 の発現を刺激し放出することが報告されている (Brinson et al., 2016; Chen et al., 2005; Kirchmeyer et al., 2008; Kloesch et al., 2010; Lee et al., 2009; Liu et al., 2015; Miyazawa et al., 1998; Tanabe et al., 2014; Westra et al., 2004)。本章では、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 発現および MAP キナーゼ経路の関与について検討した。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 材料

TRIzol, Lipofectamine 2000 および Opti-MEM は Life Technologies Co. (Carlsbad, CA) から購入した。CELLBANKER 1 plus medium, PrimeScript RT Master Mix, SYBR Premix Ex Taq II, Thermal Cycler Dice Real Time System II, TP900 DiceRealTime v4.02B は TaKaRa Bio Inc. (Shiga, Japan) から購入した。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抗体は Cell Signaling Technology Japan, K.K. (Tokyo, Japan) から購入した。Horseradish peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) 抗ウサギ IgG 抗体, ECL Western Blotting Analysis System と ImageQuant LAS

4000 mini は GE Healthcare (Piscataway, NJ) から購入した。Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜と Mini-PROTEAN TGX gel は、Bio-Rad (Hercules, CA) から購入した。Block Ace と complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture は Roche (Mannheim, Germany) から購入した。α-Modified Eagle minimum essential medium (α-MEM), Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), NaF および 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) を Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。イヌ IL-6 ELISA Kit は R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) から購入した。StatMate IV は ATMS (Tokyo, Japan) から購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は Biowest (Nuaille, France) から購入した。U0126, FR180204, SKF86002, SP600125 は Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO) から購入した。イヌリコンビナント IL-1β は、Kingfisher Biotech, Inc. (Saint Paul, MN) から購入した。

### 2.2.2 細胞培養

本研究は日本大学動物医療倫理委員会 (AP13B051) の承認を受けて行った。すべての実験は、関連するガイドラインと規則に従って行った。皮膚由来線維芽細胞は 3 匹の健常なビーグル犬 (3 歳, 雄) の背部皮膚より、先に報告した方法を用いて作成した (Nakano et al., 2018; Tsuchiya et al., 2015)。イヌに 1% リドカインと 10 μg/mL アドレナリンで局所麻酔を施した後、背部皮膚を採取した。痛みや感染を最小限に抑えるために、レミフェンタニル塩酸塩 (3~5 μg/kg/min; ヤンセン製薬, Tokyo, Japan) とセファゾリン (22 mg/kg; 日医工製薬株式会社, Toyama, Japan) を覚醒前に静脈内投与した。採取したイヌの皮膚を 3 mm<sup>2</sup> の切片に切断した。各切片を 90 mm のペトリ皿に入れ、10% FBS を添加した α-MEM を用いて 5% CO<sub>2</sub> と 37°C のインキュベーター内で静置培養した。培地

交換は 1 週間ごとに行った。培養した組織の周囲に増殖した皮膚由来線維芽細胞を、0.25% トリプシン-EDTA を使用して、ディッシュの 90-95% にまで増殖した後に採集した。採取した細胞を、 $2 \times 10^6$  個/500  $\mu\text{L}$  の密度で CELLBANKER 1 plus medium を用いて懸濁し、500  $\mu\text{L}$  の細胞懸濁液を滅菌セラムチューブに入れた。その後チューブを凍結容器 (BICELL; Nihon Freezer Co., Ltd., Tokyo, Japan) に入れ、 $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存した。実験の前に、BICELL 容器からセラムチューブを取り出し、 $37^\circ\text{C}$  のウォーターバスに浸した。融解した細胞懸濁液を 10% FBS を含む  $\alpha$ -MEM と合わせ、遠心分離チューブにて、300 g で 3 分間遠心分離した。上澄み液を除去した後、ペレットを 10% FBS を含む  $\alpha$ -MEM に懸濁し、75  $\text{cm}^2$  の培養フラスコに移し、凍結保存前と同じ条件でインキュベーター内に静置培養した。培養フラスコの約 90% まで細胞を増殖させた後、0.25% トリプシン-EDTA を使用して細胞を回収した。次いで、採取した細胞を、75  $\text{cm}^2$  培養フラスコ当たり  $1 \times 10^6$  個になるように播種した。本研究における全ての実験には、4 代目の細胞を使用した。実験では、1 個体由来の細胞を 1 例として使用した。

### 2.2.3 Real-time RT-PCR

TRIzol 試薬を用いてイヌ皮膚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  $\mu\text{L}$  の cDNA, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II, イヌ IL-6 またはハウスキーピングタンパク質の TATA box 結合タンパク質 (TBP) の特異的プライマーを含む 25  $\mu\text{L}$  の溶液を用いて行った。表 2-1 に、Real-time RT-PCR に用いたプライマーの配列を示す。no-reverse transcription control の Real-time RT-PCR は 2  $\mu\text{L}$  の各 RNase- と DNA-free water 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、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。結果は、Real-time RT-PCR 解析ソフトウェアを用いて、second derivative method と comparative cycle threshold ( $\Delta\Delta Ct$ ) 法を用いて解析した。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、イヌ皮膚由来線維芽細胞 (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 NaF および complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, pH 7.4) を用いて細胞の lysate を作成した。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 12% Mini-PROTEAN TGX gel に添加し、電気泳動を行った。タンパク質を分画後、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 [p-ERK1/2 (1:1000), t-ERK1/2 (1:1000)] を用いて、室温で 120 分間インキュベートした。洗浄後、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 siRNA トランスフェクション

以前に報告した方法 (Nakano et al., 2018) に従い、イヌ皮膚由来線維芽細胞を 35 mm のディッシュに  $1 \times 10^5$  個、または 90 mm ディッシュに  $5 \times 10^5$  個の密度で播種し、5  $\mu$ L/mL の Lipofectamine 2000 と 400 nM の ERK1, ERK2 または scramble siRNA を含む Opti-MEM を使用して 6 時間トランスフェクトした。使用した siRNA の配列を表 2-2 に示す。siRNA の効果は Western blotting により確認した。

### 2.2.6 IL-6 assay

イヌ皮膚由来線維芽細胞を 6 well 培養プレートに  $3 \times 10^5$  個/well の密度で播種した。24 時間飢餓状態にした後に、細胞を IL-1 $\beta$  で刺激し、培養上清を採取し、培養上清の IL-6 の濃度を市販の ELISA Kit を用いて測定した。

### 2.2.7 統計学的解析

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分散分析を用いて解析し、その他の実験データは一方向分散分析を用いて解析した。Turkey テストは、事後解析として使用した。P 値が 0.05 よりも少ない場合に統計的に有意と考えた。

## 2.3 結果

### 2.3.1 IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-6 産生

イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-6 の放出に対する IL-1 $\beta$  の効果を検討した。細胞を 200 pM の IL-1 $\beta$  で 0~24 時間刺激を行うと、6 時間から 24 時間の間で時間依存的に IL-6 の有意な放出が認められた (図 2-1a)。IL-1 $\beta$  の濃度を

変えて 24 時間刺激した細胞において、50~200 pM IL-1 $\beta$  は用量依存的に IL-6 の放出を促進した (図 2-1b)。次に、IL-6 mRNA 発現に対する IL-1 $\beta$  の効果について検討した。100 pM の IL-1 $\beta$  で刺激した細胞において、3 時間から IL-6 mRNA 発現の有意な増加が観察され、6 時間でピークレベルに達し、その後コントロールよりわずかに高いレベルに戻った (図 2-2a)。濃度の異なる IL-1 $\beta$  で 6 時間処理を行った細胞では、50~200 pM IL-1 $\beta$  は用量依存的に IL-6 mRNA 発現を促進した (図 2-2b)。これらの結果は、IL-1 $\beta$  はイヌ皮膚由来線維芽細胞において IL-6 産生を促進することを示唆している。

### 2.3.2 IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-6 発現における ERK1/2 経路の関与

IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 産生における MAP キナーゼシグナル伝達経路の関与を、阻害剤を用いて薬理的な検討を行った。ERK1/2 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M)、p38 阻害剤 SKF86002 (20  $\mu$ M) または JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理後、細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  で 6 時間刺激した。図 2-3a に示すように、ERK1/2 阻害剤 FR180204 は IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 mRNA 発現を有意に阻害したが、p38 MAPK 阻害剤 SKF86002 および JNK 阻害剤 SP600125 の効果は認められなかった。ERK1/2 は MAPK/ERK キナーゼ (MEK) によって活性化されることが知られている。そこで、MEK 阻害剤 U0126 の効果についても検討した。U0126 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理した細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 mRNA 発現が有意に低下した (図 2-3a)。

次に、FR180204 または U0126 で前処理した細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 放出についても検討したところ、図 2-3b に示すように IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 放出は有意に抑制された。

これらの結果は、ERK1/2 シグナル伝達経路が IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 産生に関与

していることを示唆している。

### 2.3.3 IL-1 $\beta$ 誘導性 ERK1/2 リン酸化

ERK1/2 はリン酸化によって活性化されることが知られている。そこで、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  による ERK1/2 の活性化を確認するために、IL-1 $\beta$  誘導性 ERK1/2 リン酸化を検討した。図 2-4a に、0~60 分間 IL-1 $\beta$  (100 pM) で刺激した細胞における ERK1/2 リン酸化の時間依存性を示す。IL-1 $\beta$  刺激により一過性の ERK1/2 リン酸化が認められ、15 分でピークに達した。

次に IL-1 $\beta$  誘導性 ERK1/2 リン酸化に対する阻害剤の効果を検討したところ、図 2-4b に示されるように、ERK1/2 阻害剤 FR180204 で前処理した細胞において IL-1 $\beta$  による ERK1/2 のリン酸化は抑制された。これらの結果から、ERK1/2 の活性化が IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 発現に関与している可能性が示された。

### 2.3.4 ERK1 および ERK2 ノックダウン細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-6 mRNA 発現の抑制

次に、IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 mRNA 発現における ERK1 および ERK2 のそれぞれの関与を検討するために、siRNA を用いた ERK1 および ERK2 のノックダウン実験を行った。ERK1 または ERK2 siRNA を導入した細胞において、ERK1 または ERK2 のタンパク質発現はそれぞれ有意に減少したが、対照とした scramble siRNA 導入細胞では減少は認められなかった (図 2-5a)。作成した ERK1 および ERK2 のそれぞれのノックダウン細胞において、対照と比較して、IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 mRNA 発現の部分的な低下が認められた (図 2-5b)。さらに、ERK1 および ERK2 ダブルノックダウン細胞においても IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 mRNA 発現の低下が認められたが、その低下レベルは ERK1 および ERK2 それぞれの

siRNA 導入細胞と同じレベルであった(図 2-5b)。これらのことから、ERK1 および ERK2 両キナーゼの活性化がイヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 mRNA 発現の促進に関わることが示された。

## 2.4 考察

創傷治癒は、炎症、肉芽組織の形成、再上皮化、マトリックス形成およびリモデリングを含むいくつかの重複した段階より構成される過程である (Martin, 1997)。創傷治癒を進行させるために、ケラチノサイト、線維芽細胞、内皮細胞、マクロファージおよび血小板を含む様々な細胞の相互作用が重要である。皮膚線維芽細胞は、細胞の増殖、マトリックスへの移行、細胞外マトリックスの産生および筋線維芽細胞への分化を介して皮膚創傷治癒過程において重要な役割を担うと考えられている (Yates et al., 2007; Tracy et al., 2016)。本研究では、イヌの皮膚由来線維芽細胞において、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  が IL-6 の産生と放出を惹起することを明らかにした。

ヒトにおいて、IL-6 は、皮膚創傷部位で急速に産生され、放出されることが報告されており、その現象は損傷後も 24 時間まで持続した (Grellner et al., 2000)。IL-6 はマウスの皮膚創傷部位でも容易に検出される (Kondo & Ohshima, 1996)。IL-6 の遺伝子欠損マウスにおいては、白血球浸潤、再上皮化、血管新生およびコラーゲンの蓄積などの低下を伴い、創傷治癒が有意に遅れることが確認されている (Lin et al., 2003)。さらに、IL-6 に対するモノクローナル中和抗体の投与は、正常マウスにおいて創傷の修復を著しく遅延させた (Lin et al., 2003)。IL-6 と可溶性 IL-6 受容体からなるキメラ融合タンパク質 (Hyper-IL-6) は、マウス皮膚損傷モデルにおける皮膚創傷治癒を促進することが知られており (Wang et al., 2004)、また、IL-6 は可溶性線維芽細胞由来因子の産生を介してケラチノサ

イト遊走を誘導することも報告されている (Gallucci et al. 2004)。これらの研究結果は IL-6 が皮膚の創傷治癒の主要な調節因子の 1 つであることを示唆している。

IL-1 $\beta$  は様々な組織における炎症の開始および増強において中心的な役割を果たしているサイトカインである。IL-1 $\beta$  は、主にマクロファージおよび単球で産生されるが、活性化された線維芽細胞やケラチノサイトを含む非免疫細胞によっても産生され、皮膚を含む組織の創傷治癒に寄与する (Barrientos et al., 2008; Werner & Grose, 2003)。ケラチノサイト由来の IL-1 は、線維芽細胞において IL-6 を含むサイトカインの産生を誘導することが報告されている (Boxman et al., 1993; 1996)。従って、IL-1 $\beta$  誘導性の IL-6 産生はイヌの皮膚の創傷治癒においても重要なプロセスである可能性が高い。

IL-1 $\beta$  による IL-6 の産生と放出には、MAP キナーゼシグナル伝達経路を介して引き起こすことが様々な細胞で報告されている。例えば、ヒト網膜ミュラー細胞においては p38 (Lin et al., 2015) が、ヒト関節滑膜線維芽細胞 (Lee et al., 2007; Miyazawa et al., 1998; Westra et al., 2004)、ヒト眼窩線維芽細胞 (Chen et al., 2005)、軟骨細胞株 C-28/I2 (Kloesch et al., 2010) および歯肉線維芽細胞 (Brinson et al., 2016) においては p38 および ERK1/2 が、ラットグリア細胞では p38 及び JNK (Tanabe et al., 2014) が、ラット滑膜線維芽細胞 (Kirchmeyer et al., 2008) においては ERK1/2 が IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 発現および産生に関与することが報告されている。これらの研究から、IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 発現に関与する MAP キナーゼ経路は細胞や種に依存することが考えられる。本研究では、ERK1/2 および MEK 阻害剤が IL-6 mRNA 発現に対する IL-1 $\beta$  の効果を抑制するが、p38 および JNK 阻害剤ではその影響は認められなかった。ERK1 および ERK2 ノックダウン細胞において、IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 発現は減少したことから、イヌ皮

膚由来線維芽細胞において、IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 発現には ERK1/2 シグナル伝達経路が深く関与する可能性が考えられる。

ヒト ERK1 および ERK2 のアミノ酸配列は 84% のホモロジーを有しており、多くの組織で両者ともに発現している (Boulton et al., 1991; Roskoski, 2012)。これら 2 つのアイソフォームは、一般的に、細胞外からの刺激によって同時に活性化される (Cobb & Goldsmith, 2000; Lewis et al., 1998; Meloche, 1995)。一方、2 つのアイソフォーム間の機能的差異も報告されている (Buscà et al., 2016; Frémin et al., 2007; Li et al., 2009; Radtke et al., 2013; Shin et al., 2013)。我々も、ERK1 および ERK2 がネコおよびイヌ滑膜線維芽細胞において異なる機能を有することを明らかにした (Kitanaka et al., 2017; Namba et al., 2017)。本研究では、ERK アイソフォーム特異的な siRNA で処理して作成した ERK1 および ERK2 ノックダウン細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 mRNA 発現の低下が、ERK1 と ERK2 のダブルノックダウン細胞における IL-1 $\beta$  誘導 IL-6 mRNA 発現低下の程度と変わらなかったことから、ERK1 と ERK2 の機能が同一であり、パラレルに機能することを示唆している。

IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 mRNA の発現は、ERK1/2 阻害剤で処理した細胞では完全に抑制されたが、ERK1/2 ノックダウン細胞においては部分的抑制しか認められなかった。この結果は、ERK 阻害剤が ERK1/2 以外の ERK にも影響して IL-1 $\beta$  誘導 IL-6 mRNA 発現を抑制した可能性が考えられる。現在、ERK のアイソフォームとして、ERK1/2 を含むに 8 つの存在が知られている (Cargnello & Roux, 2011; Roskoski, 2012)。使用した FR180204 は ERK1/2 の阻害剤として広く使用されているが、この阻害剤の他の ERK アイソフォームに対する効果の解明が必要と思われる。

表 2-1. Real-time RT-PCR に使用したプライマー

Gene Name	Gene bank ID	Primer sequences
<i>IL-6</i>	NM_001003301.1	F: 5'- CAAGATCCTGGTCCAGATGCTAAAG-3' R: 5'- CACTCATCCTGCGACTGCAA-3'
<i>TBP</i>	XM_863452	F: 5'-ACTGTTGGTGGGTCAGCACAAG-3' R: 5'-ATGGTGTGTACGGGAGCCAAG-3'

表 2-2. siRNA トランスフェクションに用いた配列

Gene name	Gene bank ID	Primer sequences
<i>ERK1</i>	NM_001252035.1	F: 5'-CCAAUGUGCUCCACCGGGA-3' R: 5'-UCCCGGUGGAGCACAUUGG-3'
<i>ERK2</i>	NM_001110800.1	F: 5'-CCCAAUGCUGACUCGAAA-3' R: 5'-UUUCGAGUCAGCAUUUGGG-3'

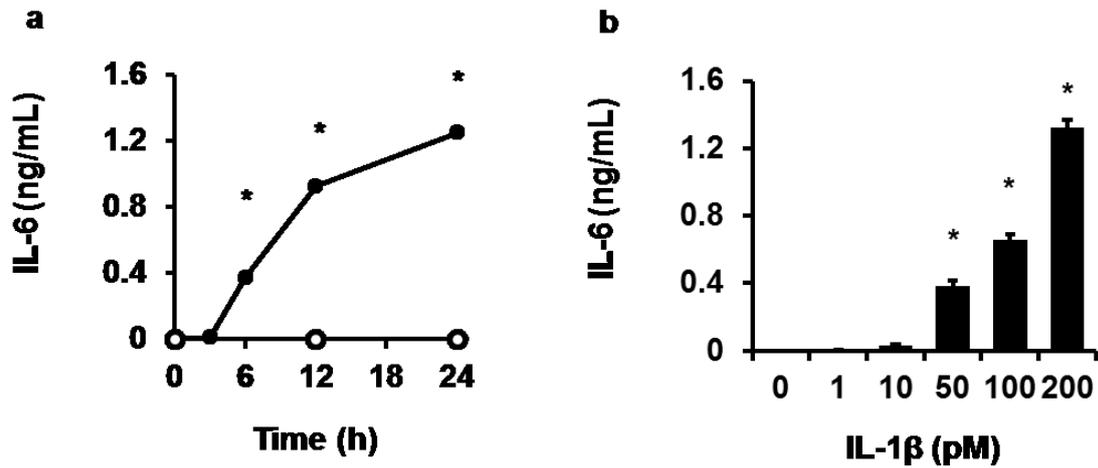


図 2-1. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 放出の時間および用量依存性. (a) 時間依存的な IL-1 $\beta$  誘導性の IL-6 放出を検討するため, 細胞を 200 pM IL-1 $\beta$  の存在下 (●) または非存在下 (○) で 0~24 時間インキュベートした. (b) 用量依存的な IL-1 $\beta$  誘導性の IL-6 放出を検討するため, 細胞を 0~200 pM の IL-1 $\beta$  で 24 時間刺激した. 刺激後, 培養上清中に放出された IL-6 を ELISA にて測定した. 値は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す. \* $P < 0.05$

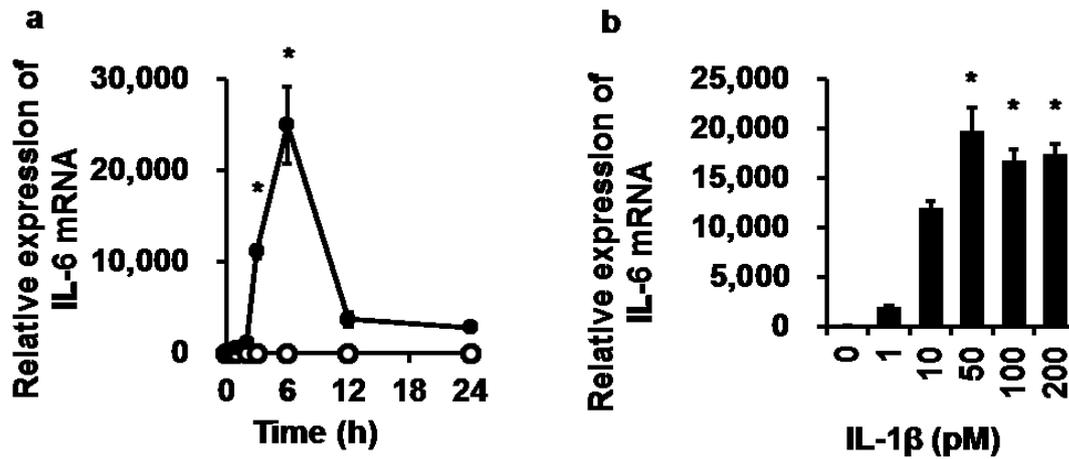


図 2-2. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 mRNA 発現の時間および用量依存性. (a) 時間依存的な IL-1 $\beta$  誘導性の IL-6 mRNA 発現の変化を検討するため, 細胞を 200 pM IL-1 $\beta$  の存在下 (●) または非存在下 (○) で 0~24 時間インキュベートした. (b) 用量依存的な IL-1 $\beta$  誘導性の IL-6 mRNA 発現の変化を検討するため, 細胞を 0~200 pM IL-1 $\beta$  で 24 時間刺激した. インキュベート後, Trizol を用いて total RNA を抽出し, IL-6 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて測定した. TBP を内部標準として使用した. 値は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す. \* $P < 0.05$

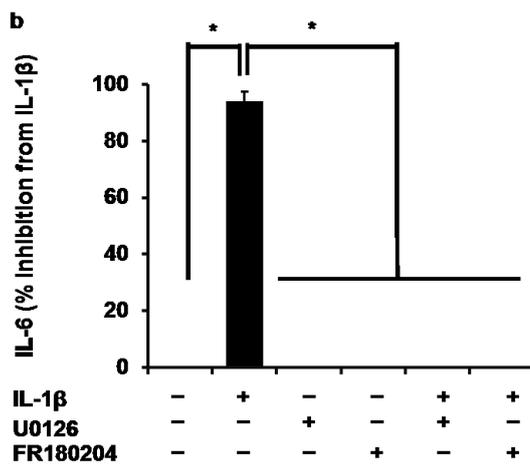
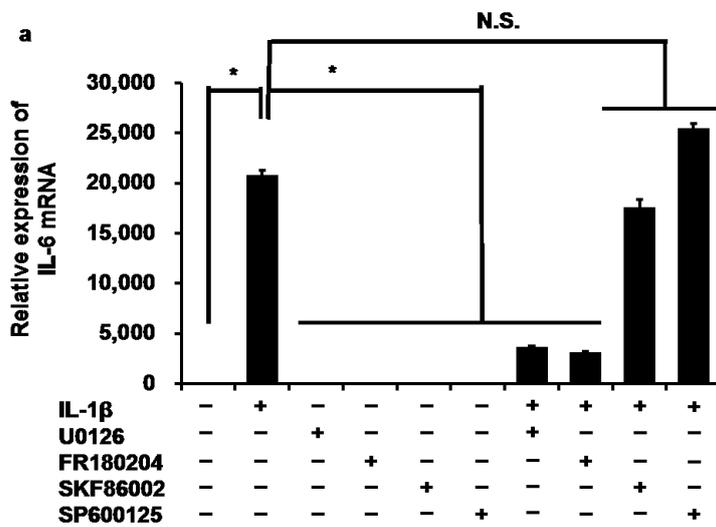


図 2-3. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 mRNA 発現および IL-6 放出に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果. (a) ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M), p38 阻害剤 SKF86002 (20  $\mu$ M), JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) および MEK 阻害剤 U0126 (10  $\mu$ M) の存在下および非存在下で 1 時間処理後, 100 pM IL-1 $\beta$  で 6 時間刺激した細胞における IL-6 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて測定した. TBP を内部標準として使用した. (b) 細胞を ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) の存在下および非存在下で 1 時間処理後, 100 pM IL-1 $\beta$  で 24 時間刺激した後, 培養上清中に放出された IL-6 を ELISA にて測定した. 値は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す. \* $P < 0.05$

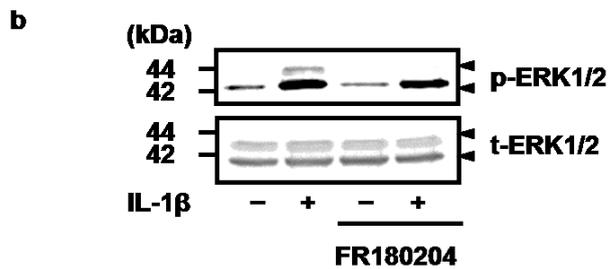
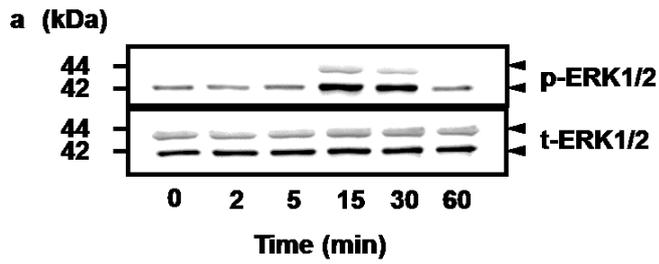


図 2-4. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 ERK1/2 のリン酸化の継時的変化と ERK 阻害剤による抑制効果. (a) 細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  で 0~60 分刺激した時のリン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) の継時的変化および総 ERK1/2 (t-ERK1/2) 発現. (b) 細胞を ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) 存在下および非存在下で 1 時間処理後, 100 pM IL-1 $\beta$  で 15 分間刺激した時の ERK1/2 のリン酸化阻害および総 ERK1/2 発現. p-ERK1/2 および t-ERK1/2 は Western blotting にて測定した. それぞれ独立して行われた 3 例の実験の代表的な結果を示す.

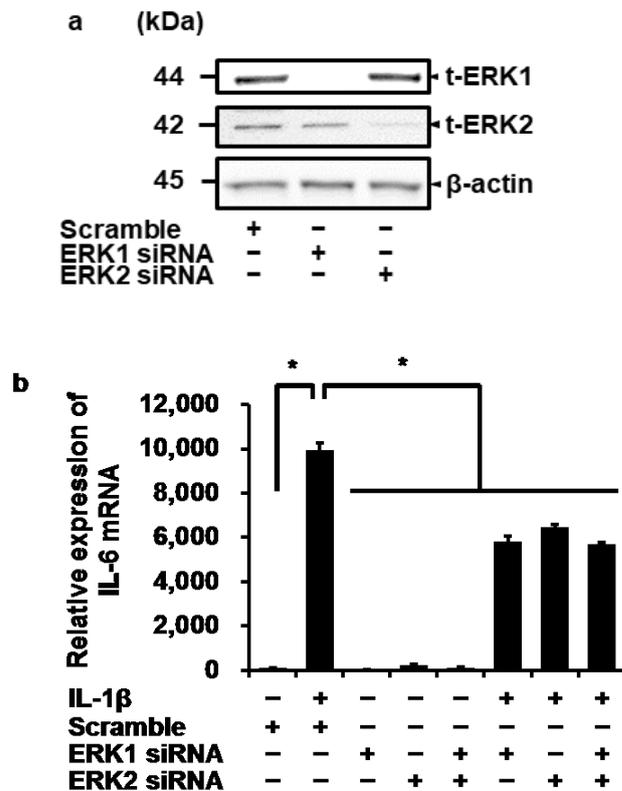


図 2-5. ERK1 および ERK2 siRNA 導入イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 mRNA 発現の抑制. (a) 細胞に ERK1, ERK2 あるいは scrambled siRNA を導入した時の t-ERK1, t-ERK2 および  $\beta$ -actin の発現を Western blotting にて測定した. 対照 (scrambled siRNA 導入) では変化が認められなかったが, ERK1 または ERK2 siRNA 導入細胞では, それぞれの発現低下が認められた. (b) ERK1, ERK2 あるいは scrambled siRNA を導入した細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  で 6 時間刺激し, IL-6 mRNA 発現を Real-time RT-PCR により測定した. TBP を内部標準として使用した. 対照(scrambled siRNA 導入)では IL-1 $\beta$  誘導性の IL-6 mRNA 発現増加が認められたが, ERK1, ERK2 siRNA 導入細胞または ERK1 および ERK2 siRNA 同時導入細胞では, IL-1 $\beta$  の効果が抑制された. 値は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す. \* $P < 0.05$

## 第3章

イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現

### 3.1 緒言

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は、細胞外マトリックス (ECM) 成分を分解し、組織のリモデリング過程において重要な役割を担っている (Brinckerhoff & Matrisian, 2002; Parks et al., 2004)。また、MMP は創傷治癒を含む正常細胞および病理細胞の様々なプロセスにも関与している (Ravanti & Kähäri, 2000; Xue et al., 2006)。MMP は、ドメイン構造の類似性や基質特異性から、コラゲナーゼ群、ゼラチナーゼ群、ストロメリシン群、エラスターゼ群、膜結合型、その他の MMP に広く分類されている (Brinckerhoff & Matrisian, 2002; Chaudhary et al., 2013; Pittayapruek et al., 2016)。MMP の 1 つである MMP-3 (stromelysin-1) は、プロテオグリカン、ラミニン、フィブロネクチンおよび非線維型コラーゲンなど様々な細胞外基質の分解に関わっている (Parsons et al., 1997)。また、MMP-3 は皮膚の創傷治癒に関与することが報告されている (Ågren et al., 2015; Babaei & Bayat, 2015; Li et al., 2014; Madlener et al., 1998; Tabandeh et al., 2013; 2014)。MMP の発現と活性は正常な状態で低いとされている。これは、炎症性サイトカインや増殖因子といった様々な刺激に応答して MMP の発現が誘導されるためであり、その発現は主に組織や細胞による特異的細胞内シグナリングを介した転写レベルでの制御が考えられている (Fanjul-Fernández et al., 2010; Vincenti & Brinckerhoff, 2007; Yan & Boyd, 2007)。

活性化転写因子-2 (ATF-2) は、ATF/cyclic AMP 応答性結合タンパク質 (CREB) ファミリーであり、ロイシンジッパー領域からなる b-Zip (basic leucine zipper) 構造を有し、遺伝子発現を調節することによって炎症に関与している (Watson et al., 2017; Yu et al., 2014)。ATF-2 は MMP-1 (Westermarck et al., 2000; Wilczynska et al., 2006), MMP-2 (Song et al., 2006), MMP-3 (Hosseini et al., 2006), MMP-9 (Hsieh et al., 2012), MMP-13 (Han et al., 2001) などの MMP の発現調節に

関与することが報告されている。これまでの研究では、IL-1 $\beta$  がヒト皮膚由来線維芽細胞における MMP-3 発現を誘導することが報告されている(Brenneisen et al., 2000; Kuroda & Shinkai 1997; Prontera et al., 1996)。しかし、MMP-3 発現における ATF-2 の関与と調節は十分には理解されていない。

本章では、第 2 章で用いたイヌ皮膚由来線維芽細胞を用い、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  により誘導される MMP-3 発現と、転写因子 ATF-2 およびその調節シグナルとしての MAP キナーゼについて検討した。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 材料

抗ヒトリン酸化 ATF-2 (p-ATF-2) および抗ヒト total-ATF-2 (t-ATF-2, 20F1) 抗体は Cell Signaling Technology Japan から購入した (Tokyo, Japan)。4-aminophenylmercuric acetate は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。SB239063, SBI-0087702 は、Sigma-Aldrich (St Lous, MO) から購入した。SensoLyte520 MMP-3 Assay Kit は AnaSpec EGT Co. (Fremont, CA) より購入した。Culture-Insert 2 Well は ibidi GmbH (Am Klopferspitz, Germany)より購入した。その他の試薬は、第 2 章に記載したものと同様のものを使用した。

### 3.2.2 細胞培養

第 2 章で記載した方法で作成したイヌ皮膚由来線維芽細胞を使用した。本研究も、日本大学動物医療利用委員会 (AP13B051) が承認したものであり、すべての実験は、関連するガイドラインと規則に従って行った。

### 3.2.3 Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR も前章に準じて行った。TRIzol 試薬を用いてイヌ皮膚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  $\mu$ L の cDNA, SYBR® Premix Ex Taq™ II, イヌ MMP-3 特異的プライマーおよびハウスキーピングタンパク質の TBP を含む 25  $\mu$ L の溶液を用いて行った。表 3-1 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® 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。データの解析は、リアルタイム RT-PCR 解析ソフトウェアを用いて、second derivative method と comparative cycle threshold ( $\Delta\Delta Ct$ ) 法を適用した。cDNA と同量の TBP の増幅を内在性コントロールとし、また、イヌ皮膚由来線維芽細胞 (time : 0) からの cDNA の増幅を校正標準として用いた。

#### 3.2.4 Western blotting

細胞から第 2 章と同様のサンプルバッファー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、DDT 添加 SDS バッファーで 95°C, 5 分間煮沸した。サンプルは 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 [p-ERK1/2 (1:1000), t-ERK1/2 (1:1000), p-ATF-2 (1:1000), t-ATF-2 (1:1000)] を用いて室温で 120 分間インキュベートした。洗浄後、PVDF 膜は 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 MMP-3 activity assay

イヌ皮膚由来線維芽細胞を 1 well あたり  $3.0 \times 10^5$  cells の密度で 6 well 培養プレートに播種し、24 時間飢餓状態にした後に IL-1 $\beta$  で刺激し、培養上清を採取した。pro-MMP を活性化するために、サンプルを 4-aminophenylmercuric acetate で 37°C で 24 時間インキュベートした。上清中の MMP 活性は MMP-3 Activity Kit の説明書に従って測定した。また、MMP-3 の活性は励起/発光波長 360 nm/460 nm の蛍光マイクロプレートリーダーによって検出した (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific K.K., Kanagawa, Japan)。

### 3.2.6 siRNA トランスフェクション

イヌ皮膚由来線維芽細胞を 35 mm のディッシュに  $1.0 \times 10^5$  cells/well, または 90 mm のディッシュに  $5.0 \times 10^5$  cells/well の密度で播種し、5  $\mu$ L/mL の Lipofectamine 2000 と 50 nM の ATF-2 または scramble siRNA を含む Opti-MEM を使用して 6 時間トランスフェクトした。表 3-2 は使用した siRNA の配列を示す。siRNA の効果は、Western blotting により確認した。

### 3.2.7 細胞移動測定

Culture-Insert 2 Well を 35 mm のディッシュに置き、 $1 \times 10^6$ /mL に調整した細胞懸濁液を Culture-Insert 2 Well のそれぞれの well に 70  $\mu$ L 播種した。24 時間培養

後、Culture-Inserts を取り除き、IL-1 $\beta$  にて細胞を刺激した。位相差画像は ImageJ の MRI Wound Healing Tool を用いて解析した (Baecker, 2012)。

### 3.2.8 統計学的解析

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分散分析を用いて解析し、その他の実験データは一方分散分析を用いて解析した。Turkey テストは、事後解析として使用した。P 値が 0.05 よりも少ない場合に統計的に有意と考えた。

## 3.3 結果

### 3.3.1 IL-1 $\beta$ 誘導性 MMP-3 放出と MMP-3 mRNA 発現

最初にイヌ皮膚由来線維芽細胞における MMP-3 タンパク質放出に対する IL-1 $\beta$  の効果を検討した。細胞を IL-1 $\beta$  (100 pM) で 0~24 時間刺激をした後、継時的に細胞培養液中の MMP-3 活性を測定すると、時間依存性の増加が認められた (図 3-1a)。また、IL-1 $\beta$  の濃度を 0~100 pM と変えて細胞を 24 時間刺激すると、細胞培養液中の MMP-3 活性の用量依存的な増加が認められた (図 3-1b)。

次に、Real-time RT-PCR により MMP-3 mRNA 発現について検討した。IL-1 $\beta$  (100 pM) で細胞を刺激すると MMP-3 mRNA 発現は時間依存的に促進され、刺激後 6 時間でピークに達し、12 時間以降では減少した (図 3-2a)。IL-1 $\beta$  の濃度を 0~100 pM と変化させて細胞を 6 時間刺激したところ、用量依存的な MMP-3 mRNA 発現が認められ (図 3-2b)、MMP-3 放出に対する IL-1 $\beta$  の用量依存効果に類似していた。これらの結果から、イヌ皮膚由来線維芽細胞において、IL-

IL-1 $\beta$  刺激は MMP-3 発現を誘導し、放出を促進することが示唆された。

### 3.3.2 IL-1 $\beta$ 誘導性細胞遊走能への MMP-3 の関与

次に、イヌ皮膚由来線維芽細胞における MMP-3 の機能を明らかにするために、IL-1 $\beta$  による細胞遊走能に対する MMP-3 阻害剤の効果を検討した。図 3-3 に示すように、100 pM IL-1 $\beta$  は細胞遊走を促進したが、MMP-3 阻害剤 UK356618 (2  $\mu$ M) で 2 時間処理した細胞においては、IL-1 $\beta$  の効果は有意に抑制された。この結果より、IL-1 $\beta$  は MMP-3 を介した細胞遊走に関与することが考えられる。

### 3.3.3 IL-1 $\beta$ 誘導性 MMP-3 発現における ATF-2 の関与

MMP ファミリーのほとんどがそのプロモーター配列に共通 *Cis*- 構造を持っており、MMP の発現は主に転写レベルで調節されると考えられている (Fanjul-Fernández et al., 2010; Vincenti & Brinckerhoff, 2007; Yan & Boyd, 2007)。転写因子 ATF-2 は多数のタンパク質の調節に関与することが知られており、その発現が IL-1 $\beta$  の効果において重要な役割を担っている (Sylvester et al., 2012; Wilczynska et al., 2006)。そこで、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現における ATF-2 の関与を検討した。ATF-2 阻害剤 SBI-0087702 (10  $\mu$ M) で 24 時間前処理した細胞を IL-1 $\beta$  で 6 時間刺激を行い、MMP-3 mRNA 発現を検討したところ、IL-1 $\beta$  の効果は部分的に抑制された (図 3-4a)。この結果は、ATF-2 が IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現に関与することを示唆している。

次に、IL-1 $\beta$  刺激した細胞における ATF-2 のリン酸化を検討した。ATF-2 のリン酸化は IL-1 $\beta$  刺激により促進され、刺激後 15 分でピークレベルに達した後、30 分以内に無刺激レベルに戻った (図 3-4b)。total-ATF-2 (t-ATF-2) 発現の変化は認められなかったことから、ATF-2 が IL-1 $\beta$  刺激によって活性化されること

が示された。

続いて、siRNA 導入を用いて ATF-2 をノックダウンした細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現について検討した。ATF-2 siRNA を導入した細胞において、ATF-2 のタンパク質発現は著しく低下したが、対照とした scramble siRNA 導入細胞ではタンパク質発現の低下は認められなかった (図 3-5a)。ATF-2 siRNA 導入細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現は部分的にはあるが低下した (図 3-5b)。これらの結果から、ATF-2 が IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現に関与することが示唆された。

### 3.3.4 IL-1 $\beta$ 誘導性 MMP-3 発現への ERK 経路の関与

IL-1 $\beta$  は MAP キナーゼシグナル伝達経路を介して MMP-3 発現を誘導することが報告されている (Chambers et al., 2013; Sinfield et al., 2013; Wang et al., 2013)。また、ATF-2 は炎症性サイトカインに応答した MAP キナーゼシグナル経路を介し調節されるという報告もある (Gupta et al., 1995; Ricote et al., 2006; Sylvester et al., 2012; Wilczynska et al., 2006)。そこで、ATF-2 と MAP キナーゼシグナル経路の関係を検討した。

IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現における MAP キナーゼの関与について、ERK, JNK および p38 MAP キナーゼの阻害剤を用いて検討した。図 3-6a に示すように、ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) を 1 時間処理した細胞において、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現は低下した。一方、p38 阻害剤 SB203963 (20  $\mu$ M) と JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) 処理細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現への影響はほとんど認められなかった。また、ERK 阻害剤 FR180204 で処理した細胞においては、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 放出も低下した。

第 2 章でも示したように、イヌ皮膚由来線維芽細胞において IL-1 $\beta$  は ERK1/2

を活性化することから、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現には ERK1/2 の活性化が関与することが考えられる。そこで、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現における ERK1/2 の関与を確認するために、siRNA 導入による ERK1/2 ノックダウン細胞を用いて MMP-3 mRNA 発現に対する IL-1 $\beta$  の効果を検討した。ERK1 および ERK2 siRNA の導入細胞において、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現は、scramble siRNA 導入細胞と比較して有意に低下した (図 3-7)。ERK1 および ERK2 のダブルノックダウン細胞においても IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現は低下したが、それぞれの単独のノックダウン細胞と比べて、低下が大きくなることはなかった (図 3-7)。これらの結果は、ERK1 および ERK2 の活性化は、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現に深く関与することを示唆している。

### 3.3.5 ERK による ATF-2 活性化の制御

次に、IL-1 $\beta$  刺激したイヌ皮膚由来線維芽細胞における、ERK シグナルによる ATF-2 の活性化制御について検討した。ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) で 1 時間処理した細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性 ATF-2 のリン酸化は抑制された (図 3-8)。さらに、ERK1 および ERK2 ノックダウン細胞を作成し、ATF-2 のリン酸化に関与する ERK のサブタイプの検討を行った。IL-1 $\beta$  誘導性 ATF-2 のリン酸化は、対照とした scramble siRNA 導入細胞と比べ ERK1 siRNA 導入細胞では有意に阻害されたが、ERK2 siRNA では阻害は認められなかった (図 3-9)。さらに、ERK1 と ERK2 ダブルノックダウン細胞においても IL-1 $\beta$  誘導性 ATF-2 のリン酸化は対照に比べて減少したが、ERK1 ノックダウン細胞に対する効果と変わらなかった (図 3-9)。これらの結果は、イヌ皮膚由来線維芽細胞においては、ERK1 の活性化が ATF-2 の活性化調節に関与し、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現に

関わっていると考えられる。

### 3.4 考察

創傷治癒障害を有する患者における MMP-3 発現は、通常の創傷治癒患者よりも低いことが報告されている (Utz et al., 2010)。また、MMP-3 遺伝子欠損マウスでは、創傷治癒の遅延が認められている。MMP-3 欠損線維芽細胞では、細胞のコラーゲンゲルに接触する能力の低下が認められることから、MMP-3 は創傷修復時の組織リモデリングに重要な役割を有すると考えられている (Bullard et al., 1999a; 1999b)。MMP-3 はタイプ I コラーゲン分解に関与することも知られている (Ågren et al., 2015)。これらの研究から、MMP-3 は創傷治癒に重要な役割を担うと考えられている (Martins et al., 2013)。

本研究では、ATF-2 阻害剤と ATF-2 ノックダウン処理が、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の MMP-3 mRNA 発現を阻害することを示した。これらの結果は、ATF-2 はイヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現に関与することを強く示唆している。非刺激時の細胞では、ATF-2 の転写活性は不活性化された状態、すなわち DNA 結合ドメインが折り畳まれてアミノ基末端トランス活性化ドメインに結合した分子内阻害状態で維持されている (Li & Green, 1996)。刺激に応答して、アミノ基末端のリン酸化が分子内阻害を緩和し、ATF-2 の転写活性化につながることを示されている (Abdel-Hafiz et al., 1992; Tsai et al., 1996; van Dam et al., 1995)。活性化された ATF-2 は、CREB, Fos, Maf, Jun family など転写因子である他の AP-1 family とホモまたはヘテロ二量化を介して遺伝子発現を調節するとされている (Hai & Curran, 1991; Shaulian & Karin, 2002)。また、リン酸化は転写活性化のための ATF-2 の分解を制御することも報告されている (Fuchs et al., 2000)。イヌ皮膚由来線維芽

細胞において、IL-1 $\beta$  は ATF-2 のリン酸化を引き起こしたことから、同様な機序が IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現に関わると考えられる。

ATF-2 のリン酸化には MAP キナーゼ経路の関与が報告されている。炎症性サイトカイン刺激に対して、JNK および p38 MAPK により ATF-2 のアミノ酸 Thr69 および Thr71 がリン酸化をうける (Chambers et al., 2013; Raingeaud et al., 1995; van Dam et al., 1995)。また ERK1/2 は、紫外線応答により ATF-2 の Thr71 でリン酸化 を引き起こす (Zhu et al., 2004)。インスリンや上皮成長因子などの成長因子刺激を受けた細胞では、Ras-Raf-MEK-ERK 経路が ATF-2 の Thr71 リン酸化を引き起こし、Ras-Ral-Src-p38 経路は、ATF-2 の Thr69 リン酸化を引き起こす ERK と p38 経路との相互作用が 2 段階に起こることが示唆されている (Ouwens et al., 2002)。本研究では、ERK 阻害剤は IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現を有意に抑制したが、p38 および JNK 阻害剤による抑制効果は認められなかった。また、ERK 阻害剤は IL-1 $\beta$  誘導性 ATF-2 リン酸化を抑制した。したがって、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現には、ATF-2 の Thr71 リン酸化が関与している可能性が高い。

ERK アイソフォームはである ERK1 と ERK2 は、83% のアミノ酸の同一性があり、多くの細胞では共発現している (Boulton et al., 1991; Shin et al., 2010)。また、この 2 つのアイソフォームは、様々な細胞外刺激に対応して同時に活性化されることが多く報告されている (Cobb & Goldsmith, 2000; Lewis et al., 1998; Meloche et al., 1995)。しかしながら、最近、2 つのアイソフォームの機能的な違いがアンチセンス技術や siRNA 導入によって検討がなされている (Frémin et al., 2007; Kitanaka et al., 2017; Li et al., 2009; Namba et al., 2017; Radtke et al., 2013; Shin et al., 2010; 2013)。本研究では、ERK アイソフォーム特異的 siRNA 導入により作成した ERK1 および ERK2 ノックダウン細胞において、IL-1 $\beta$  誘導性

MMP-3 mRNA 発現の抑制が認められた。しかしながら、IL-1 $\beta$  誘導性 ATF-2 のリン酸化の抑制は、ERK1 ノックダウン細胞で認められたが、ERK2 ノックダウン細胞では認められなかった。これらの結果は、イヌ皮膚由来線維芽細胞においては、ERK1 は ERK2 とは独立して ATF-2 の転写活性化を引き起こし、MMP-3 発現に関与することを示唆している。ERK2 経路を介した MMP-3 の転写制御因子に関しては、未だ不明のままである。

ATF-2 阻害剤や ATF-2 siRNA 導入では、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA の発現は部分的に阻害された。一方、ERK1 siRNA を導入した ERK 阻害剤で処理した細胞においては、MMP-3 mRNA 発現に対する IL-1 $\beta$  の効果が完全に阻害された。これらの結果から、ATF-2 だけでなく他の転写因子が、おそらく、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現に関与することを示唆している。MMP-3 を含む MMP family の遺伝子は、そのプロモーター配列にいくつかの cis-elements が含まれていて、polymavirus enhancer-A binding protein-3 (PEA3) と NF- $\kappa$ B だけでなく、ATF-2 などの様々な転写活性因子による細胞特異的な MMP 遺伝子発現のタイトな制御を可能にする (Overall & López-Otín, 2002; Yan & Boyd, 2007)。したがって、ERK2 経路は他の転写因子を介して IL-1 $\beta$  によって誘発される MMP-3 の発現を制御すると考えられる。本研究室では、ERK2 によって制御されている転写因子に関するさらなる研究が進められている。

結論として、本章では、イヌ皮膚由来線維芽細胞において IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現には ERK1 MAP キナーゼ と転写因子 ATF-2 がシグナリング制御に強く関与していることが明らかとなった。MMP-3 発現のこのようなシグナル制御は、皮膚創傷治癒のための重要なプロセスであると考えられる。

表 3-1. Real-time RT-PCR に用いたプライマー

Gene name	Gene bank ID	Primer sequences
<i>MMP-3</i>	NM_001002967.1	F: 5'- TGACGATGATGAACAATGGACAAG-3' R: 5'- GCTAGGGTCAGCCGAGTGAAAG-3'
<i>TBP</i>	XM_863452	F: 5'-ACTGTTGGTGGGTCAGCACAAG-3' R: 5'-ATGGTGTGTACGGGAGCCAAG-3'

表 3-2. siRNA transfection の配列

Gene name	Gene bank ID	siRNA sequences
<i>ATF-2</i>	XM_005640334.2	F: 5'-GUCCAUUUGAGAAUGAAUU-3' R: 5'-AAUUCAUUCUCAAUUGGAC-3'
<i>ERK1</i>	NM_001252035.1	F: 5'-CCAAUGUGCUCCACCGGGA-3' R: 5'-UCCCGGUGGAGCACAUUGG-3'
<i>ERK2</i>	NM_001110800.1	F: 5'-CCCAAUGCUGACUCGAAA-3' R: 5'-UUUCGAGUCAGCAUUUGGG-3'

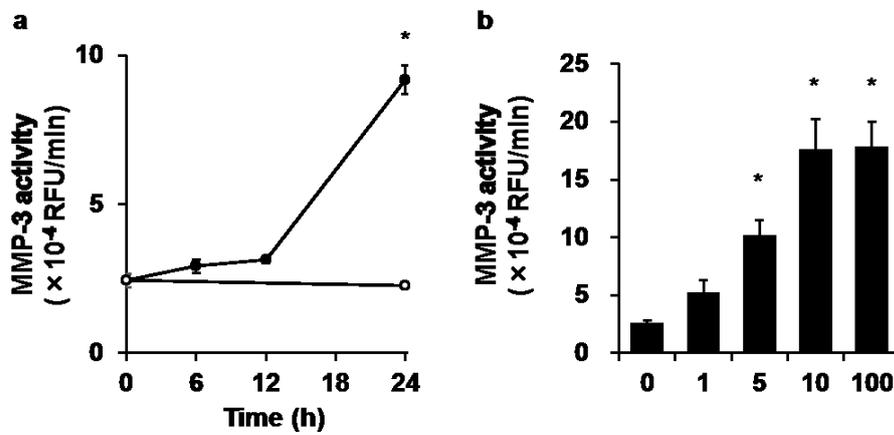


図 3-1. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 放出の時間および用量依存性. (a) 時間依存的な IL-1 $\beta$  誘導性の MMP-3 放出を検討するため, 細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  存在下 (●) または非存在下 (○) で 0~24 時間でインキュベートした. (b) 用量依存的な IL-1 $\beta$  誘導性の MMP-3 放出を検討するため, 細胞を 0-100 pM の IL-1 $\beta$  で 24 時間インキュベートした. インキュベート後, 培養上清中に放出された MMP-3 活性を MMP Activity Kit により測定した. 値は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す. \* $P < 0.05$

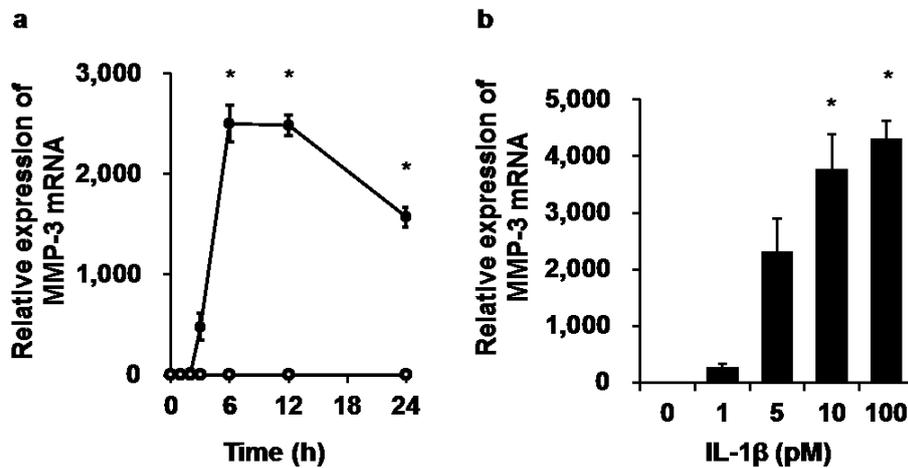


図 3-2. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現の時間および用量依存性. (a) 時間依存的な IL-1 $\beta$  誘導性の MMP-3 mRNA 発現の変化を検討するため, 細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  の存在下 (●) または非存在下 (○) で 0~24 時間インキュベートした. (b) 用量依存的な IL-1 $\beta$  誘導性の MMP-3 mRNA 発現の変化を検討するため, 細胞を 0~100 pM の IL-1 $\beta$  で 6 時間インキュベートした. インキュベート後, Trizol を用いて total RNA を抽出し, MMP-3 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて測定した. TBP を内部標準として使用した. 値は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す. \* $P < 0.05$

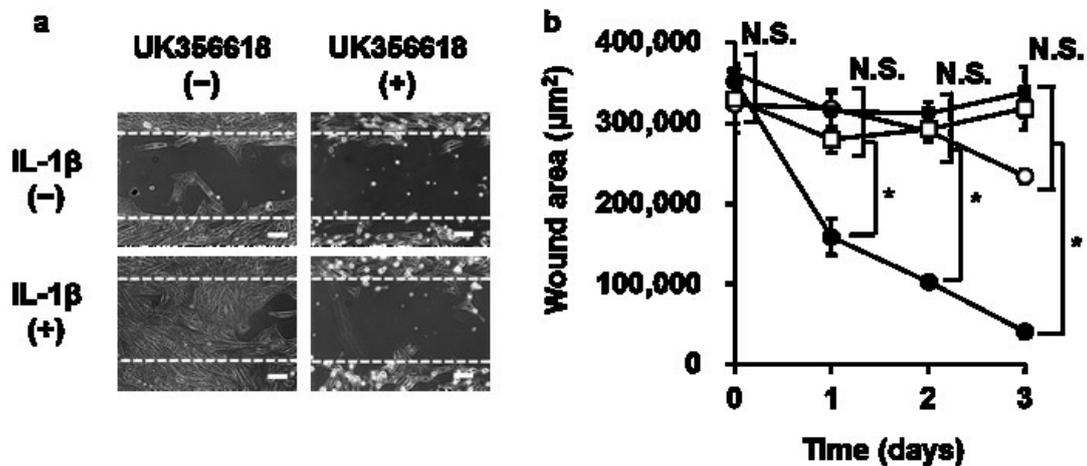


図 3-3. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性細胞遊走の MMP-3 阻害薬による抑制. 培養細胞単層にギャップを作成した後, MMP-3 阻害剤 UK356618 (2  $\mu$ M) の存在下および非存在下で 2 時間処理後, 細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  と共に 0~3 日間培養した. **(a)** 3 日間の IL-1 $\beta$  非存在下の対照に比べ, IL-1 $\beta$  処理によりギャップが埋め尽くされるが, UK356618 により IL-1 $\beta$  の効果は阻害された. 3 回の代表結果を示す. **(b)** 0~3 日のギャップ面積の継時的変化. MMP-3 阻害剤 UK356618 (2  $\mu$ M) の存在下 (□, ■) および非存在下 (○, ●) で 2 時間処理後, 細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  存在下 (●, ■) および非存在下 (○, □) で 0~3 日間培養した. MMP 値は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す. \* $P < 0.05$

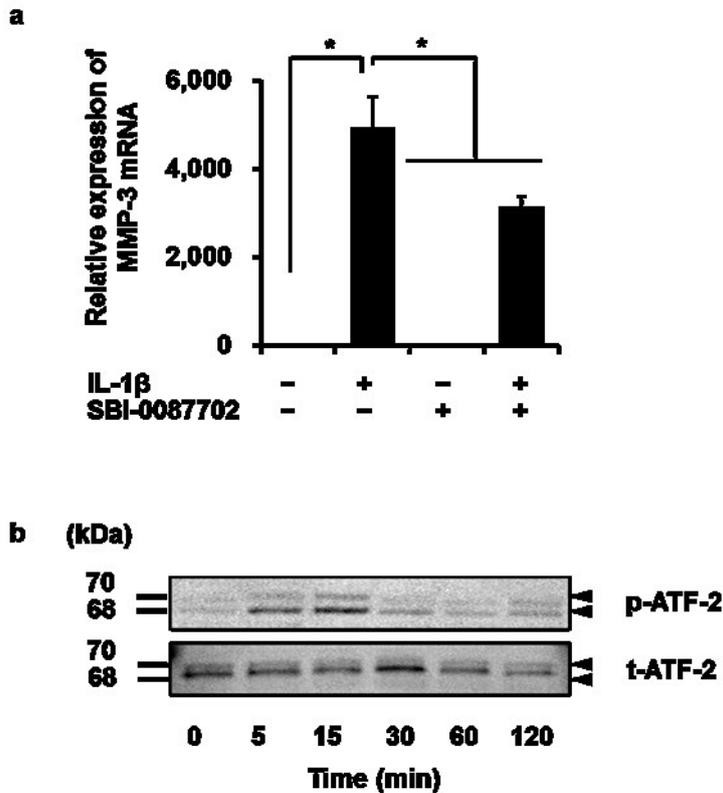


図 3-4. イヌ皮膚由来線維芽細胞における ATF-2 阻害剤による IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現の抑制(a)と IL-1 $\beta$  誘導性 ATF-2 のリン酸化(b). (a) ATF-2 阻害剤 SBI-0087702 (10  $\mu$ M) の存在下または非存在下で 24 時間処理後, 細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  で 6 時間刺激した. 刺激後, Trizol を用いて total RNA を抽出し, MMP-3 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて測定した. TBP を内部標準として使用した. 値は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す. \* $P$ <0.05 (b) 細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  で 0~120 分間刺激した. 刺激後, リン酸化 ATF-2 (p-ATF-2)および総 ATF-2(t-ATF-2)発現を Western blotting により検出した. 結果は, 独立して行われた 3 例の実験の代表的な結果を示す.

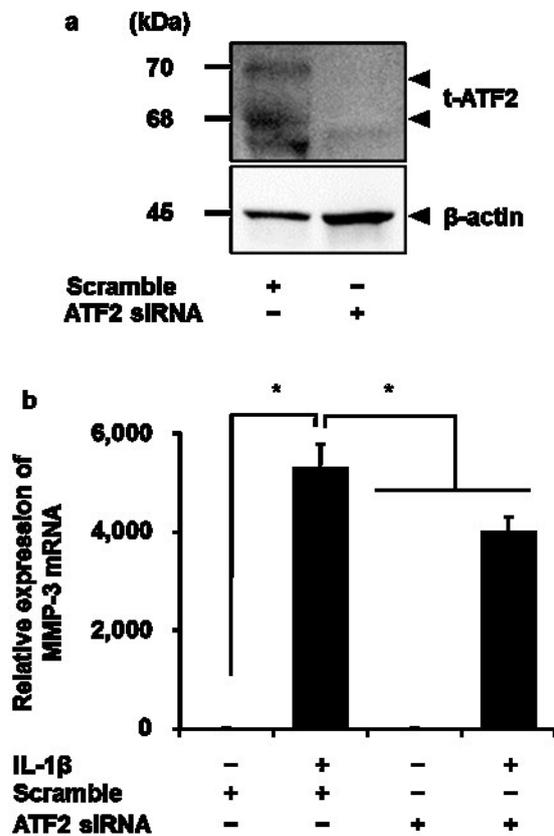


図 3-5. ATF-2 siRNA を導入したイヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現の低下. (a) ATF-2 siRNA および scramble siRNAs を導入した細胞の t-ATF-2 と内部標準としての  $\beta$ -アクチン発現を Western blotting により検出した. (b) ATF-2 siRNA および scramble siRNAs 導入後, 細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  の存在下または非存在下で 6 時間インキュベートした. インキュベート後に, MMP-3 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて測定した. TBP を内部標準として使用した. 結果は, 3 回の独立した実験結果の平均  $\pm$  標準誤差を示す. \*  $P < 0.05$

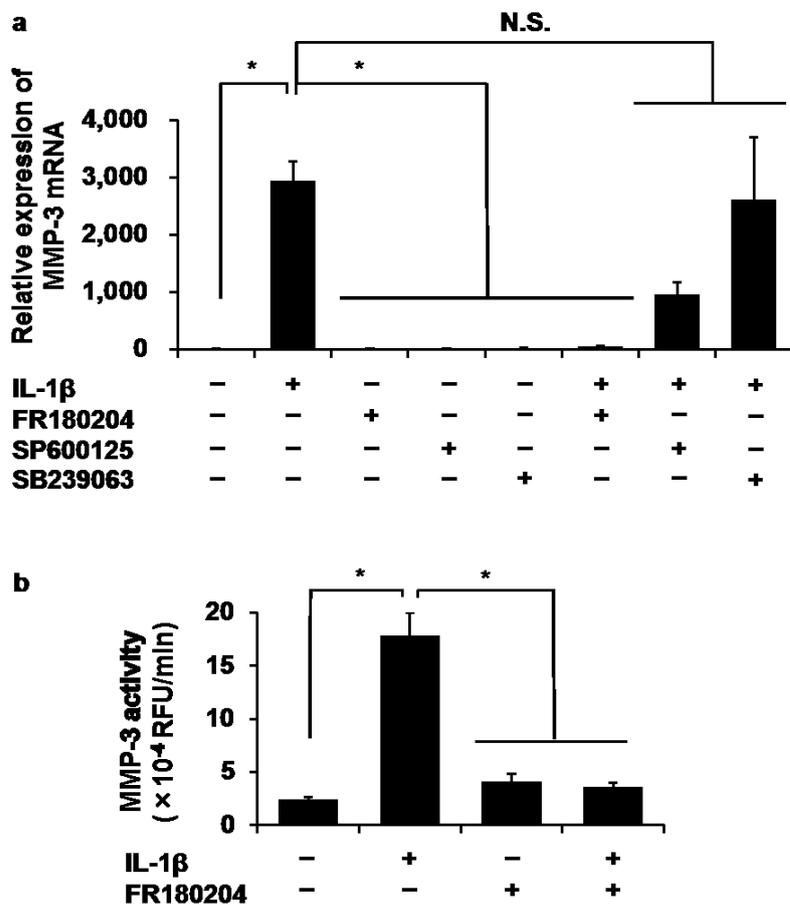


図 3-6. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現と MMP-3 放出の ERK 阻害剤による抑制. (a) 細胞を ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M), p38 阻害剤 SB203963 (20  $\mu$ M) および JNK 阻害剤 SP600125 (10  $\mu$ M) の存在下または非存在下で 1 時間処理後, 100 pM IL-1 $\beta$  で 6 時間刺激または無刺激処置を行った. インキュベート後, MMP-3 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて測定した. TBP を内部標準として使用した. (b) 細胞を ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) の存在下または非存在下で 1 時間処理後, 100 pM IL-1 $\beta$  で 24 時間刺激または無刺激処置を行った. インキュベート後, 培養上清中に放出された MMP-3 活性を MMP Activity Kit により測定した. 値は, 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す. \* $P < 0.05$

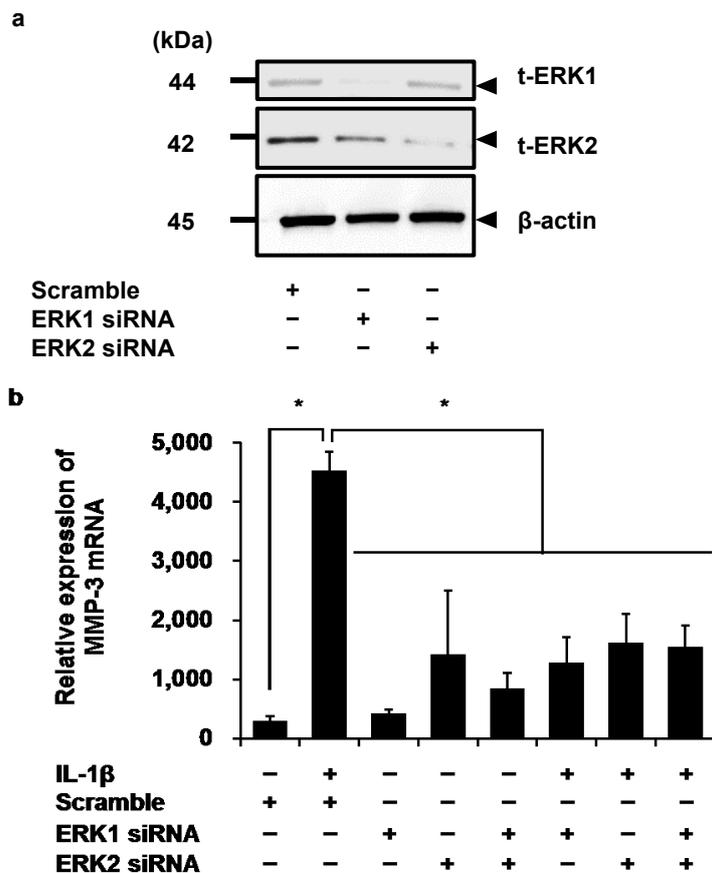


図 3-7. ERK1 および ERK2 siRNA を導入したイヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現の低下. (a) ERK1 , ERK2 または scramble siRNA (対照) を導入した細胞における t-ERK1 および t-ERK2 発現の低下を Western blotting により確認した.  $\beta$ -アクチンは内部標準として使用した. (b) ERK1, ERK2 または scramble siRNA (対照) 導入後, 細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  存在下, または非存在下で 6 時間インキュベートした後, MMP-3 mRNA 発現を Real-time RT-PCR により測定した. TBP は内部標準として使用した. ERK1 siRNA または ERK2 siRNA の単独導入あるいは共導入細胞では, 対照と比較して, IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現の有意な低下が認められた. 結果は 3 回の独立した実験結果の平均  $\pm$  標準誤差を示す. \*  $P < 0.05$

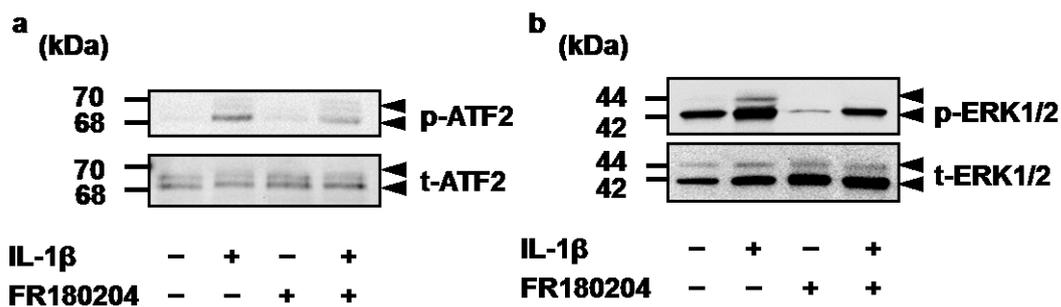


図 3-8. イヌ皮膚由来線維芽細胞における ERK 阻害剤による IL-1 $\beta$  誘導性 ATF-2 リン酸化の低下. 細胞を, ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) 存在下または非存在下で 1 時間処理後, 100 pM IL-1 $\beta$  存在下および非存在下で 15 分間インキュベートした. インキュベート後, リン酸化 ATF-2 (p-ATF-2) および total ATF-2 (t-ATF-2) (a), またはリン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) および total ERK1/2 (t-ERK1/2) (b) を Western blotting にて検出した. 結果は, 3 回の独立した実験結果の代表例を示す.

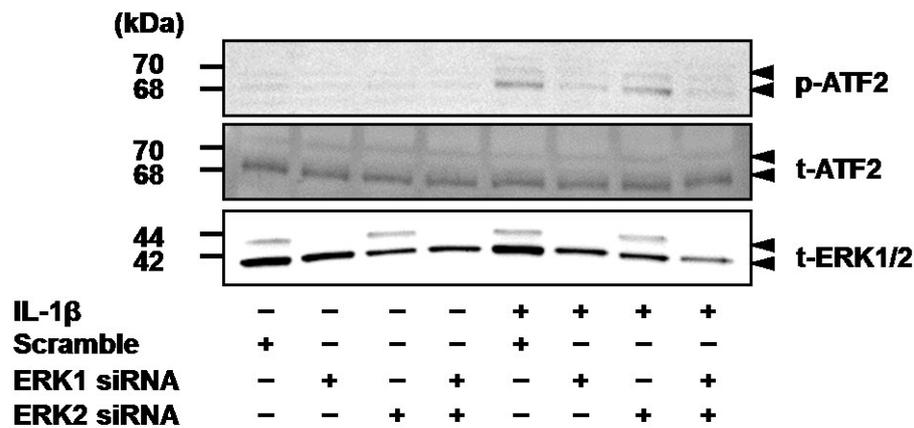


図 3-9. ERK1 siRNA 導入イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1β 誘導性 ATF-2 リン酸化の低下. ERK1, ERK2 または scramble siRNA 導入細胞を 100 pM IL-1β の存在下または非存在下で 15 分間インキュベートした. インキュベート後, リン酸化 ATF-2 (p-ATF-2), total ATF-2 (t-ATF-2) または total ERK1/2 (t-ERK1/2)を Western blotting にて検出した. ERK1 siRNA の単独導入あるいは ERK1 および ERK2 siRNA 共導入細胞では, 対照と比較して, IL-1β 誘導性 ATF-2 のリン酸化の有意な低下が認められた. 結果は, 3 回の独立した実験結果の代表例を示す.

## 第4章

イヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現

#### 4.1 緒言

微小環境が腫瘍細胞の増殖や浸潤，転移などの悪性化において重要な要因となることが知られており，炎症もその1つと考えられている。腫瘍細胞自体や，間質または腫瘍に浸潤する白血球による炎症が，直接的または間接的に腫瘍細胞の増殖を促進することが報告されている (Coussens et al., 2013; Grivennikov et al., 2010; Mantovani et al., 2008; Schneider et al., 2015)。炎症に関与するプロスタグランジンは，腫瘍細胞の生存，増殖，浸潤および血管新生を高めることにより，発がんにも関与している (Wang & Dubois, 2010; Zelenay et al., 2015)。

プロスタグランジンはアラキドン酸から生産されるが，シクロオキシゲナーゼ (COXs) はそれを触媒する酵素であり，COX-1 と COX-2 の 2 つのアイソザイムが存在する (Simmons et al., 2004)。COX-1 はほとんどの組織で恒常的に発現しているが，COX-2 はサイトカイン，成長因子，および腫瘍プロモーターのようないくつかの刺激に応答して誘導される (Clària, 2003; Pang et al., 2016; Turini & DuBois 2002)。ヒトの腫瘍細胞では COX-2 の過剰発現が認められるケースも報告されている (Chwirot & Kuźbicki 2007; Pang et al., 2016)。また，非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) を含む COX 阻害剤による シクロオキシゲナーゼの阻害は，様々な腫瘍の発生率と，転移，死亡率を減少させることも報告されている (Crusz & Balkwill, 2015; Harris et al., 2012; Sanz-Motilva et al., 2012)。これらのことから，COX-2 の活性化とそれによるプロスタグランジン類の生成は，腫瘍細胞の生存，増殖，遊走，血管新生および免疫抑制の増強と関連していると考えられている (Wang & Dubois, 2010)。

悪性黒色腫 (メラノーマ) 細胞において，プロスタグランジンの 1 つであるプロスタグランジン E<sub>2</sub> の受容体作動薬は細胞遊走を促進し，一方で，プロスタグランジン E<sub>2</sub> 受容体拮抗薬は遊走を抑制することが報告されている (Vaid et al.,

2015)。また、メラノーマ細胞では COX-2 の過剰発現がプロスタグランジン E<sub>2</sub> レベルとプロスタグランジン E<sub>2</sub> 受容体発現を増加させ、細胞遊走の促進をもたらすことも報告されている (Kim et al., 2016)。これらの報告から、プロスタグランジン E<sub>2</sub> がメラノーマ細胞において COX-2 発現を介して産生され、オートクリンまたはパラクリン因子として機能すると考えられている。腫瘍微小環境内では、腫瘍細胞によって作られるプロスタグランジン E<sub>2</sub> は、樹状細胞の分化、浸潤および活性化、M2 マクロファージ表現型への単球の誘導、および骨髄由来サプレッサー細胞の分化への誘導を介して免疫抑制を誘発することも知られている (Zelenay, 2015)。

転写調節因子の 1 つである NF- $\kappa$ B は、特異的な細胞遺伝子の発現を増強することによって炎症反応を調節し、発がんに関与すると考えられている (Luqman & Pezzuto, 2010; Xia et al., 2018)。COX-2 は NF- $\kappa$ B の主要な分子標的であり、様々な炎症性刺激およびメディエーターは NF- $\kappa$ B の活性化を介して COX-2 発現を増加させ、炎症が誘発し、結果的に腫瘍形成がなされると考えられている (Kontos et al., 2010; Konturek et al., 2004; O'Riordan et al., 2005; Rakhesh et al., 2012; Yamamoto & Gaynor, 2001)。哺乳類では、NF- $\kappa$ B ファミリーは、RelA (p65), RelB, Rel(cRel), NF- $\kappa$ B1 (p50 とその前駆体 p105) および NF- $\kappa$ B2 (p52 とその前駆体 p100) の 5 つのメンバーで構成されている (Hayden & Ghosh, 2004; 2012)。5 つの NF- $\kappa$ B は、異なる機能を持つホモダイマーまたはヘテロダイマーを形成する (Smale, 2012)。NF- $\kappa$ B シグナリングは、古典的経路と非古典的経路の 2 つの異なる経路で構成され、古典的経路は炎症反応を媒介し、非古典的経路は二次リンパ器官の形成だけでなく、免疫細胞の分化および成熟に関与する (Shih et al., 2011)。

イヌの口腔内のメラノーマは、自然発生する腫瘍であり (Bergman, 2007), 非常

に転移しやすく，通常は予後不良で，ヒトのメラノーマ同様，積極的な治療を必要とすることから，ヒトメラノーマの適したモデルとも考えられている (Atherton et al., 2016; Simpson et al., 2014)。ヒトおよびイヌのメラノーマは複数の分子生物学的類似性を持ち，COX-2 発現の調節を含むシグナル経路も報告されている (Becker et al., 2009; Martínez et al., 2011)。本章では，イヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現と，NF- $\kappa$ B p65 と p105 の関与を検討した。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 材料

イヌのメラノーマ細胞 (MCM-N1 細胞株, 13 歳の雄イヌ由来) は DS Pharma Biomedical Co., Ltd (Osaka, Japan) から購入した。抗 COX-1 および抗 COX-2 ウサギポリクローナル抗体は Abcam (Cambridge, UK) から購入した。抗ヒト lamin A/C (4C11) マウスモノクローナル抗体，抗ヒトリン酸化 p65 (p-p65, 93H1)，抗ヒト total p65，抗ヒトリン酸化 p105 (p-p105) および抗ヒト total p105 ウサギモノクローナル抗体は Cell Signaling Technology Japan, K.K. (Tokyo, Japan) から購入した。抗マウス  $\beta$  アクチンマウスモノクローナル抗体 (AC74) は Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO) から購入した。Horseradish peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) 抗ウサギ IgG および抗マウス IgG 抗体，プロスタグランジン E<sub>2</sub> 測定用 ELISA kit は Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI) から購入した。Triton X-100 と，p65，p105 および scramble siRNA は Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO) から購入した。4% パラホルムアルデヒドは Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan) から購入した。ProLong Gold Antifade Reagent は Thermo Fisher Scientific K.K. (Tokyo, Japan) から購入した。StatMate IV は ATMS (東京) から購入した。その他は，第 2 章で記載したものを使用した。

#### 4.2.2 細胞培養

イヌメラノーマ細胞は、10% のウシ胎児血清 (FBS) を添加した DMEM-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。培地交換は週に1度行った。細胞がディッシュの90~95%にまで増殖した時点で、0.25% トリプシン-EDTA を用いて細胞を剥がして採取し、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、凍結保存した。細胞懸濁液 (500  $\mu$ L) を滅菌したセラムチューブに入れ、これを凍結容器 (BICELL) に入れ、-80°C で凍結保存した。実験前、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解凍した。細胞懸濁液を、10% FBS を添加した DMEM-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。上澄みを除去したあと、細胞塊を10% FBS で DMEM-LG に再懸濁し、75-cm<sup>2</sup> の培養フラスコに移した。その後、凍結保存前と同様の条件で培養器の中で静置培養した。細胞が培養フラスコの底面積の約90%に増殖した時に、0.25% トリプシン-EDTA を用いて細胞を回収し、細胞数が  $1 \times 10^6$  / 75 cm<sup>2</sup> の密度で培養フラスコに播種した。

#### 4.2.3 Real-time RT-PCR

TRIzol 試薬を用いてイヌメラノーマ細胞から 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  $\mu$ L の cDNA, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II, イヌ COX-1 , COX-2 または TATA box 結合タンパク質 (TBP) の特異的プライマーを含む 25  $\mu$ L の溶液を用いて行った。表 1 に、Real-time RT-PCR に用いたプライマーの配列を示す。no-reverse transcription の Real-time RT-PCR は 2  $\mu$ L の各 RNA サ

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 × 40 回の条件で行った。データの解析は、Real-time RT-PCR 解析ソフトウェアを用いて、second derivative method と comparative cycle threshold ( $\Delta\Delta Ct$ ) 法を適用した。cDNA と同量の TBP の増幅を内在性コントロールとし、また、イヌメラノーマ細胞 (time : 0) からの cDNA の増幅を較正標準として用いた。

#### 4.2.4 Western blotting

メラノーマ細胞をサンプルバッファー (20 mM HEPES, 1 mM PMSF, 10 mM NaF および complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, pH 7.4) を用いて破碎し、lysate を作成した。タンパク質濃度は Bradford 法 (Bradford, 1976) で定量し、dithiothreitol (DDT) 添加 sodium dodecyl sulfate (SDS) バッファーで 95°C, 5 分間煮沸した。サンプルは 7.5% または 12% の Mini-PROTEAN TGX gel に添加し、電気泳動を行った。分画したタンパク質は PVDF 膜に転写し、Block Ace にて室温で 50 分間処理し、一次抗体 [COX-2 (1:1000), COX-1 (1:1000), p-p65 (1:1000), t-p65 (1:1000), p-p105 (1:1000), t-p105 (1:1000) または  $\beta$ -actin (1:10,000)] と共に室温で 120 分間インキュベートした。洗浄後、PVDF 膜は 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。

#### 4.2.5 免疫細胞化学

t-p65 と lamin A/C の細胞内局在の検討は、以前に報告した免疫組織化学法に進じて行った (Nakano et al., 2018)。細胞を 35 mm のガラス底ディッシュ (Iwaki, Tokyo, Japan) に  $3 \times 10^5$  /mL の密度で播種し、IL-1 $\beta$  で刺激後、4% パラホルムアルデヒドで 15 分間固定した。固定した細胞を室温で 15 分間 0.2% Triton X-100 でインキュベートして透過処理を行った後、Block Ace で 30 分間処理をして非特異抗体反応をブロックした。その後、細胞を抗 t-p65 ウサギ抗体 (1:500) と抗 lamin A/C マウス抗体 (1:1000) 存在下で、室温で 90 分間インキュベートし、0.2% polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate を含む PBS で洗浄した後、Alexa Fluor 488-conjugated F(ab')<sub>2</sub> 断片ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) (1:1,000) と Alexa Fluor 594-conjugated F(ab')<sub>2</sub> 断片ヤギ抗マウス IgG (H+L) (1:1,000) の 2 つと 60 分、25 °C の暗所でインキュベートした。細胞はまた、抗体の非特異的結合と対照として二次抗体のみと共にインキュベートした。これらの試料を 0.2% polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate を含む PBS で 3 回洗浄し、乾燥、ProLong Gold Antifade Reagent をのせ、共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) を用いて可視化した。

#### 4.2.6 プロスタグランジン E<sub>2</sub> 測定

細胞を 6 well 培養プレートに  $3.0 \times 10^5$  cells /well の密度で播種し、IL-1 $\beta$  で処理後、培養上清を回収した。培養上清中のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 濃度は、市販の ELISA kit を用いて測定した。

#### 4.2.7 siRNA トランスフェクション

siRNA トランスフェクションは既に報告した方法に若干の改変を加えて実施した (Nakano et al., 2018; Namba et al., 2017)。イヌメラノーマ細胞を 35 mm ま

たは 90 mm ディッシュにそれぞれ  $1 \times 10^5$  cells または  $5 \times 10^5$  cells の密度になるように播種し、5  $\mu$ L/mL の Lipofectamine 2000 と 100 nM p-65, p-105 または scramble siRNA を含む Opti-MEM を使用して 6 時間トランスフェクトした。トランスフェクション後、培地を 10% FBS を含む DMEM-LG に変更し、5% CO<sub>2</sub>, 37°C で 5 日間維持した。siRNA 配列を表 2 に示す。siRNA の効果は、Western blotting によって確認した。

#### 4.2.8 統計学的解析

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 を用いて行った。タイムコースのデータは、双方向分散分析を用いて解析し、その他の実験データは、一方向分散分析を用いて解析した。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 IL-1 $\beta$ 誘導性プロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出と COX-2 発現

イヌメラノーマ細胞における炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出に対する効果について検討した。図 4-1a に示すように、細胞を IL-1 $\beta$  (100 pM) で 0~48 時間刺激すると、培養上清中に時間依存的なプロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出が認められた。さらに図 4-1b で示すように、細胞を 0~200 pM の IL-1 $\beta$  で 48 時間刺激を行うと、IL-1 $\beta$  は用量依存的にプロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出を促進した。

プロスタグランジン類の産生は、律速酵素である COX-1 および COX-2 によって調節されているので、IL-1 $\beta$  による COX-1 および COX-2 の mRNA の発現を検討した。IL-1 $\beta$  (100 pM) で 0~24 時間刺激を行うと 6 時間をピークに、時間依存的に COX-2 mRNA 発現が促進された (図 4-2a)。一方、COX-1 mRNA

発現に対する IL-1 $\beta$  の効果は認められなかった (図 4-2b)。細胞を様々な濃度の IL-1 $\beta$  で 6 時間刺激したとき, 0-200 pM の IL-1 $\beta$  による用量依存的 COX-2 mRNA 発現の促進が認められた (図 4-2c)。IL-1 $\beta$  の用量はプロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出とほぼ同様の濃度であった。

次に, COX-2 タンパク質発現に対する IL-1 $\beta$  の効果を検討した。細胞を IL-1 $\beta$  (100 pM) で 0~24 時間刺激を行うと, 6 時間をピークに, 時間依存的な COX-2 タンパク質発現促進が認められた (図 4-3)。一方, IL-1 $\beta$  刺激による COX-1 タンパク質発現への効果は認められなかった。これらのことから, イヌメラノーマ細胞において, IL-1 $\beta$  により COX-2 発現を介してプロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出が引き起こされていることが強く示唆された。

#### 4.3.2 NF- $\kappa$ B 阻害剤による IL-1 $\beta$ 誘導性プロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出と COX-2 mRNA 発現抑制

次に, イヌメラノーマ細胞の IL-1 $\beta$  誘導性プロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出と COX-2 mRNA 発現における NF- $\kappa$ B シグナル経路の関与について阻害剤を用いて検討した。NF- $\kappa$ B 阻害剤 BAY11-7082 (10  $\mu$ M) または TPCA-1 (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理を行った後, IL-1 $\beta$  (100 pM) で細胞を 48 時間刺激すると, IL-1 $\beta$  誘導性プロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出は有意に減少した (図 4-4a)。NF- $\kappa$ B 阻害剤 BAY11-7082 または TPCA-1 で前処理された細胞においては, IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現も有意に抑制された (図 4-4b)。これらの結果は, NF- $\kappa$ B シグナル経路が IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現を介したプロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出に関与することを強く示唆している。

#### 4.3.3 IL-1 $\beta$ 誘導性 p65 および p105 のリン酸化

IL-1 $\beta$  のような炎症性サイトカインに応答して、p65 サブユニットのリン酸化が起こることが、NF- $\kappa$ B の転写活性に重要であることが知られている (Cartwright et al., 2016; Christian et al., 2016; Huang et al., 2010; Perkins, 2006; Vermeulen et al., 2002; Viatour et al., 2005)。サイトカインで刺激された細胞における p105 タンパク質のリン酸化も炎症およびがんに関与することが知られている (Cartwright et al., 2016; Christian et al., 2016; Perkins, 2006; Viatour et al., 2005)。そこで、IL-1 $\beta$  刺激した細胞における p65 サブユニットおよび p105 前駆体のリン酸化について検討した。

細胞を IL-1 $\beta$  (100 pM) で 0~180 分間刺激すると、p65 および p105 タンパク質の両方が 15 分をピークにリン酸化された (図 4-5)。一方、データには示さないが、NF- $\kappa$ B ファミリーの他のメンバーである RelB, c-Rel および p100 のリン酸化に対する IL-1 $\beta$  の効果は認められなかった。これらの結果から、p65 と p105 が IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現において主たる役割を担うと考えられる。さらに、免疫細胞化学により、p65 の核移行についても検討した。イヌメラノーマ細胞を IL-1 $\beta$  (100 pM) で 15 分間刺激すると、細胞質の p65 の核への移行が認められた (図 4-6)。NF- $\kappa$ B シグナル伝達の活性化を引き起こすと考えられるしたがって、イヌメラノーマ細胞において IL-1 $\beta$  は NF- $\kappa$ B シグナル伝達の活性化を引き起こすことが示された。

NF- $\kappa$ B 阻害剤 BAY11-7082 または TPCA-1 で 1 時間前処理した細胞を、IL-1 $\beta$  で 15 分刺激を行うと、図 4-6 に示すように、p65 および p105 の両タンパク質の IL-1 $\beta$  によるリン酸化は有意に抑制された。これらの結果から、p65 と p50 のヘテロダイマー複合体である NF- $\kappa$ B が、イヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の機能に関与することが示唆される。

#### 4.3.4 p65 または p105 ノックダウン細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 COX-2 mRNA 発現抑制

IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現における p65 と p105 の関与を確認するために、p65 および p105 siRNA 導入によるノックダウン細胞における COX-2 mRNA 発現に対する IL-1 $\beta$  の効果を検討した。p65 または p105 siRNAs を導入し、対照とした scramble siRNA を導入した細胞に比較して total p65 (t-p65) または total p105 (t-p105) タンパク質の発現は低下した (図 4-8a)。その p65 または p105 siRNAs 導入細胞においては、IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現の有意な低下が認められた (図 4-8b)。IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現の低下は p65 と p105 の両 siRNAs を同時に導入した細胞においても認められたが、p65 または p105 どちらか片方の siRNA を導入した細胞の場合と比べて有意な差は認められなかった (図 4-8b)。これらの結果は、p65 と p105 がイヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現に平行に寄与することを示唆している。

#### 4.4 考察

本章では、イヌメラノーマ細胞において IL-1 $\beta$  が COX-2 発現とそれに続くプロスタグランジン E<sub>2</sub> を産生することを明らかにした。メラノーマにおいて IL-1 $\beta$  を含む炎症性サイトカインが有意に上昇することが報告されている (Qin et al., 2011)。IL-1 $\beta$  は、単球、マクロファージおよび樹状細胞などの免疫細胞から分泌される (Dinarello, 2009) が、メラノーマ細胞自身も IL-1 $\beta$  を産生および放出することも報告されており、インフラマソームの恒常的な活性化によるものと考えられている (Okamoto et al., 2010)。したがって、免疫細胞やメラノーマ細胞など腫瘍微小環境から分泌される IL-1 $\beta$  が、COX-2 発現を介してプロスタグランジン E<sub>2</sub> の産生と放出を経て、血管新生、浸潤および転移を含むがんの

進行に寄与すると考えられる (Arend, 2002; Elaraj et al., 2006; Lavi et al., 2007)。実際に、COX-2 発現の上昇は、様々ながんにおける腫瘍の進行および転移促進の特徴とされており (Dannenberg et al., 2001), メラノーマに関しても、浸潤と転移における COX-2 の機能的役割が報告されている (Denkert et al., 2001; Goulet et al., 2003)。COX-2 発現はメラノーマの進行のステージおよび病理組織学的型の両方に関与し (Chwirot & Kuźbicki, 2007; Kuźbicki et al., 2006), COX-2 発現は腫瘍の再発および転移と関連することが示唆されている (Martínez et al., 2011)。COX-2 特異的阻害剤であるセレコキシブはメラノーマ細胞の増殖を減弱させることから、COX-2 がメラノーマの進行に関与することが示されている (Bundscherer et al., 2008)。

本研究では、NF- $\kappa$ B p65 および p105 がメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現に関与していることも明らかにした。NF- $\kappa$ B は、生理学的および病理学的機能に関与する広範囲の遺伝子調節に関与する転写因子である。がん細胞では、NF- $\kappa$ B は、免疫反応から細胞を保護するための良好な微小環境の構築において重要な役割を担うと考えられている (Chaturvedi et al., 2011; Karin & Greten, 2005; Perkins, 2012)。NF- $\kappa$ B ファミリーは、p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 および p52 の 5 つのメンバーで構成されており、互いにホモダイマーまたはヘテロダイマーを形成し機能する (Smale, 2012)。これらの中で、p50/p65 ヘテロダイマーは、NF- $\kappa$ B 活性化のカギとなっている (Chen et al., 1999; Phelps et al., 2000)。平常時の細胞では、p50/p65 ヘテロダイマーは、阻害タンパク質 I $\kappa$ B $\alpha$  との不活性複合体形態として細胞質中に存在する。さらに、NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路は古典的経路と非古典的経路の 2 つの異なる経路に分類されているが (Bonizzi & Karin, 2004), 古典的経路において、I $\kappa$ B キナーゼは、IL-1 $\beta$  などの外因性シグナルによって活性化され、I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化を介し、ユビキチン化

とプロテアソーム分解を誘発する。I $\kappa$ B $\alpha$  から分離した p50/p65 ヘテロダイマーは核へ移行し NF- $\kappa$ B 標的遺伝子を調節する (Bonizzi & Karin, 2004)。本研究で示されたように、I $\kappa$ B $\alpha$  および I $\kappa$ B キナーゼの選択的阻害剤である BAY11-7082 および TPCA-1 で前処理を行った細胞や、p65 と p50 の前駆体 p105 をノックダウンした細胞において IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA は明らかに低下した。これらの結果は、イヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現においては、NF- $\kappa$ B シグナル伝達の古典的経路の活性化が重要であることを示唆している。

本研究では、IL-1 $\beta$  がイヌメラノーマ細胞における p65 のリン酸化を一過性に促進することを明らかにした。p65 タンパク質は、N-terminal Rel homology domain (RHD) と、C-terminal transactivation domain (TAD) をもつタンパク質で、両方のドメインと、TAD から RHD のリンカー領域に、11 個以上のリン酸化部位があることが報告されている (Christian et al., 2016; Perkins, 2006)。細胞質と核の両方で認められる p65 のリン酸化は標的遺伝子の転写を効率的に行うための NF- $\kappa$ B の重要な翻訳後修飾と考えられている (Huang et al., 2010; Perkins, 2006)。個々のアミノ酸のリン酸化が、DNA 結合、二量体化、転写調節物質との結合、細胞内局在、安定化および転写活性に関連しており、最終的には、修復されたアミノ酸に応じて転写の増減が制御される (Chen & Greene, 2004; Christian et al., 2016; Huang et al., 2010; Perkins, 2006)。p65 のリン酸化を介した NF- $\kappa$ B の転写活性は、刺激に依存している。IL-1 $\beta$  は、p65 リン酸化を介して標的遺伝子の転写を調節することが報告されている (Geng et al., 2009; Reber et al., 2009; Wang et al., 2015)。IL-1 $\beta$  によって誘導される p65 リン酸化は、立体構造の変化を引き起こすと考えられており、それが転写補助因子との会合やユビキチン化に関与する (Milanovic et al., 2014)。したがって、イヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$

誘導性 COX-2 発現に関わる特定のリン酸化部位のさらなる検討は必要と考えられる。

p105 ノックダウン細胞では IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現が有意に低下したため、メラノーマ細胞において p105 が転写活性因子として重要であることが考えられる。さらに、p105 は大きな前駆体タンパク質であり、部分的にプロテアソームによって分解され、p50 サブユニットを生成する (Hayden & Ghosh, 2004)。p50 は、炎症性シグナルによって誘発される古典的経路における転写調節能を有する p50/p65 ヘテロダイマーを形成する (Chen et al., 1999; Phelps et al., 2000)。したがって、p105 は、IL-1 $\beta$  で刺激したメラノーマ細胞において p50 の前駆体として機能する可能性が高い。p50/p65 は中心的な二量体であるが、p50 はホモダイマー自体を形成することもできる (Guan et al., 2005; Saccani et al., 2003; Tong et al., 2004)。p50/p50 ホモダイマーは核内に存在、サブユニットが転写活性化ドメインを有しないので、転写アクチベーターとして作用することはできない。このことから、p50/p50 ホモダイマーは、NF- $\kappa$ B 伝達経路においてはリプレッサーとして携わっていると考えられている (Guan et al., 2005; Saccani et al., 2003; Tong et al., 2004)。したがって、p50 の機能の検討も必要と思われる。

また、本研究では、IL-1 $\beta$  が一過性に p105 リン酸化を促進することも明らかにした。したがって、IL-1 $\beta$  誘導性の p105 のリン酸化は COX-2 mRNA 発現における NF- $\kappa$ B の転写活性に関与しているように思われる。p105 のリン酸化は、プロテアソーム分解にとって重要であることが以前に報告されている (Fujimoto et al., 1995)。しかしながら、p105 から p50 へのプロセッシングの大部分は恒常的に起こり (Lin et al., 1998)、p105 のリン酸化はユビキチン化を誘導し、p50 の生成なしに p105 の完全な分解をもたらす (Cohen et al., 2004; Hayden

& Ghosh, 2004)。現在，E3 ユビキチンリガーゼである Kip1 ubiquitination-promoting complex 1 (KPC1) によって媒介されるユビキチン化は，I $\kappa$ B キナーゼ  $\beta$  による p105 リン酸化に続いて起こる p105 から p50 へのプロテアソーム分解をひきおこすことが知られている (Kravtsova-Ivantsiv et al., 2015)。しかし，KPC1 による p105 から p50 へのプロセッシングは，NF- $\kappa$ B 経路のダウンレギュレーションに関与し，メラノーマを含む腫瘍の進行を抑制する (Iida et al., 2017; Kravtsova-Ivantsiv et al., 2015)。一方，p105 は，p50 の前駆体としてではなく，MAP キナーゼシグナル伝達における負のレギュレーターとして機能する独自の役割を持つことが報告されている (Beinke et al., 2003; Waterfield et al., 2003)。p105 タンパク質は MAP キナーゼの上方にあるキナーゼである tumor progression focus 2 (Tpl-2) を不活性型で安定化させるために，Tpl-2 に結合して，MAP キナーゼシグナル伝達の活性化を妨げる (Beinke et al., 2003; Waterfield et al., 2003)。p105 のリン酸化とその後の p105 プロテアソーム分解の結果，活性型 Tpl-2 が遊離すると，遊離した Tpl-2 が MEK1/2 を活性化し，ERK1/2 の活性化を誘導する (Beinke et al., 2003; Waterfield et al., 2003)。イヌの皮膚由来線維芽細胞において NF- $\kappa$ B 経路が ERK1/2 活性化に寄与すること (Tsuchiya et al., 2015) から，このような p105 の調節は，メラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現に関与していると思われる。

イヌメラノーマ細胞において IL-1 $\beta$  は COX-2 発現を促進してプロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出を促すこと，また，シグナル伝達経路として NF- $\kappa$ B の p65 および p105 が転写因子として機能することを明らかにした。このことから，NF- $\kappa$ B 経路ならびに IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 の発現は，メラノーマにおける治療標的になると考えられる (Xis et al., 2018)。

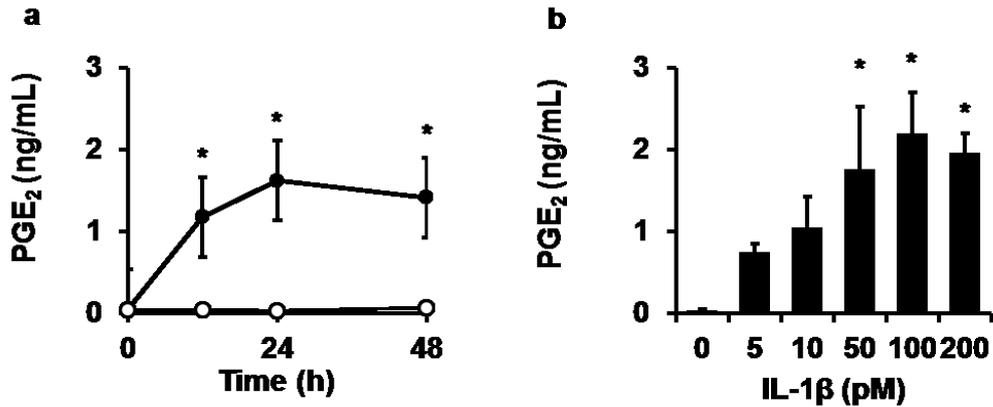


図 4-1. イヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  誘導性のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出の時間および用量依存性. (a) 時間依存的な IL-1 $\beta$  誘導性のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出を検討するため, 細胞を 200 pM IL-1 $\beta$  の存在下 (●) または非存在下 (○) で 0~48 時間インキュベートした. (b) 用量依存的な IL-1 $\beta$  誘導性のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出を検討するため, 細胞を 0~200 pM の IL-1 $\beta$  で 48 時間刺激した. 刺激後, 培養上清中に放出されたプロスタグランジン E<sub>2</sub> を ELISA にて測定した. 値は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す. \* $P < 0.05$

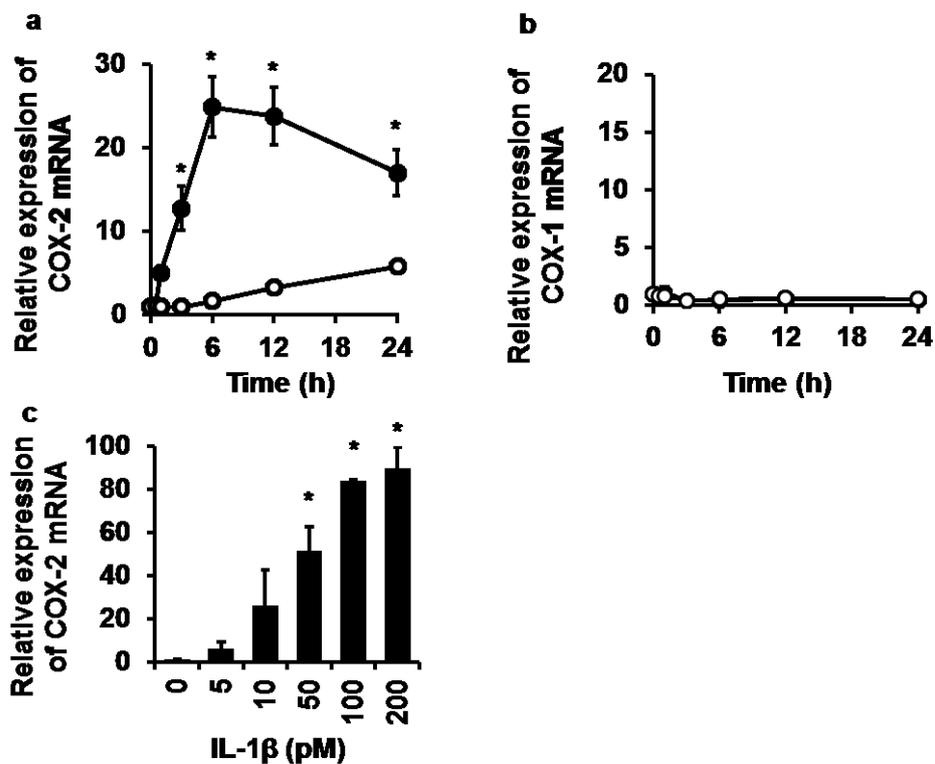


図 4-2. イヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現の時間および用量依存性. (a, b) 時間依存的な IL-1 $\beta$  誘導性の COX-1 および COX-2 mRNA 発現の変化を検討するため, 細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  の存在下 (●) または非存在下 (○) で 0~24 時間インキュベートした. (c) 用量依存的な IL-1 $\beta$  誘導性の COX-2 mRNA 発現の変化を検討するため, 細胞を 0~200 pM IL-1 $\beta$  で 6 時間刺激した. インキュベート後, Trizol を用いて total RNA を抽出し, COX-2 mRNA (a, c) および COX-1 mRNA (b) 発現を Real-time RT-PCR にて測定した. TBP を内部標準として使用した. COX-1 mRNA 発現促進は認められなかった. 値は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す. \* $P < 0.05$

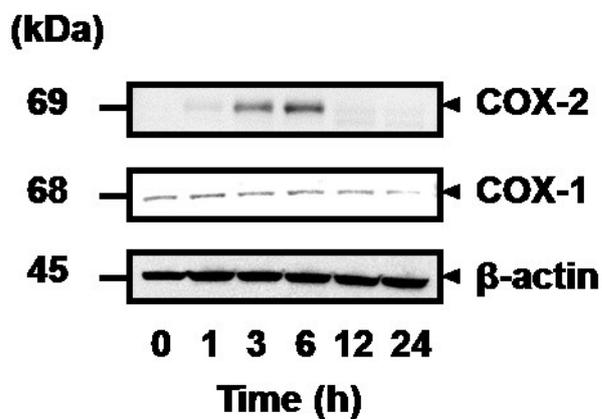


図 4-3. イヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 タンパク質発現の時間依存性. 細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  で 0~24 時間刺激した. 刺激後, COX-1 および COX-2 タンパク質発現を Western blotting にて測定した. 内部標準として  $\beta$ -actin の発現を使用した. COX-1 タンパク質発現促進は認められなかったが, 6 時間をピークに, 時間依存的な COX-2 タンパク質発現促進が認められた. それぞれ独立して行われた 3 例の実験の代表的な結果を示す.

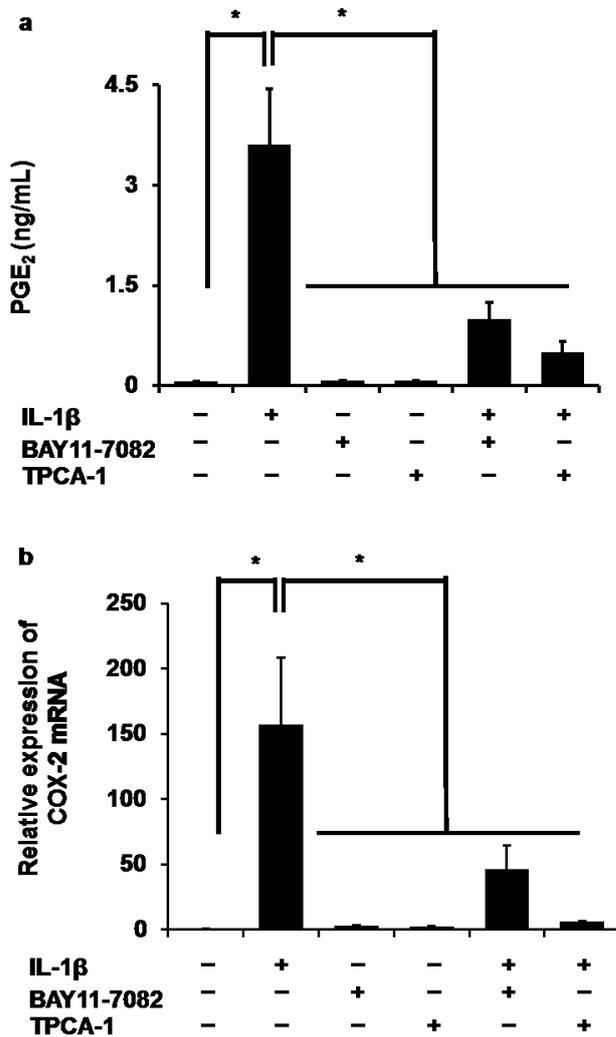


図 4-4. NF-κB 阻害剤による IL-1β 誘導性プロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出と COX-2 mRNA 発現抑制. イヌメラノーマ細胞を NF-κB 阻害剤 BAY11-7082 (10 μM) または TPCA-1 (10 μM) の存在下および非存在下で 1 時間前処理した。その後, IL-1β (100 pM) の存在下および非存在下で 48 時間 (a) または刺激 6 時間 (b) インキュベートし, 培養上清中に放出されたプロスタグランジン E<sub>2</sub> を ELISA にて (a), また, 細胞における COX-2 mRNA 発現変化を Real-time RT-PCR にて (b) 測定した。COX-2 mRNA 発現変化においては TBP を内部標準として使用した。値は 3 例の平均値 ± 標準誤差を示す。 \**P* < 0.05

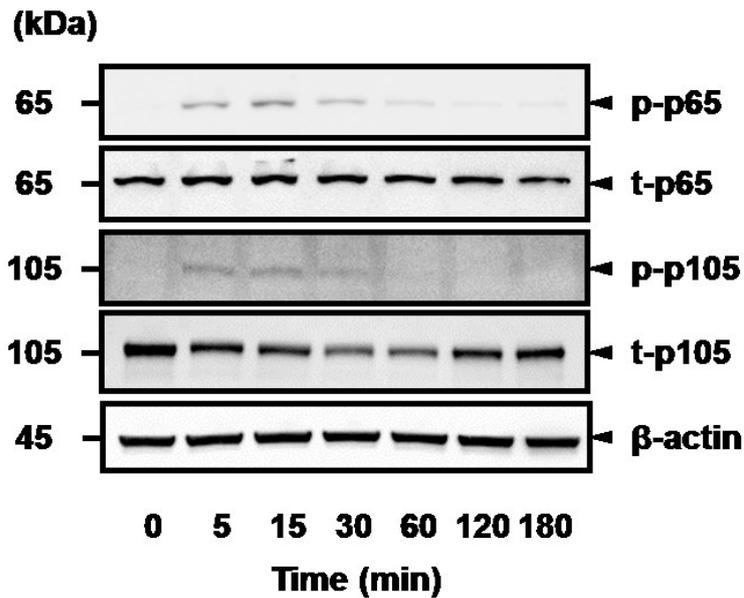


図 4-5. イヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 p65 および p105 のリン酸化の時間依存性. 細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  で 0~180 分間刺激した. 刺激後, リン酸化 p65 (p-p65) および total p65 (t-p65), リン酸化 p105 (p-p105) および total p105 (t-p105), また, 内部標準として  $\beta$ -actin の発現を Western blotting にて測定した. 刺激後 5~15 分をピークに, 時間依存的な p65 および p105 のリン酸化の促進が認められた. それぞれ独立して行われた 3 例の実験の代表的な結果を示す.

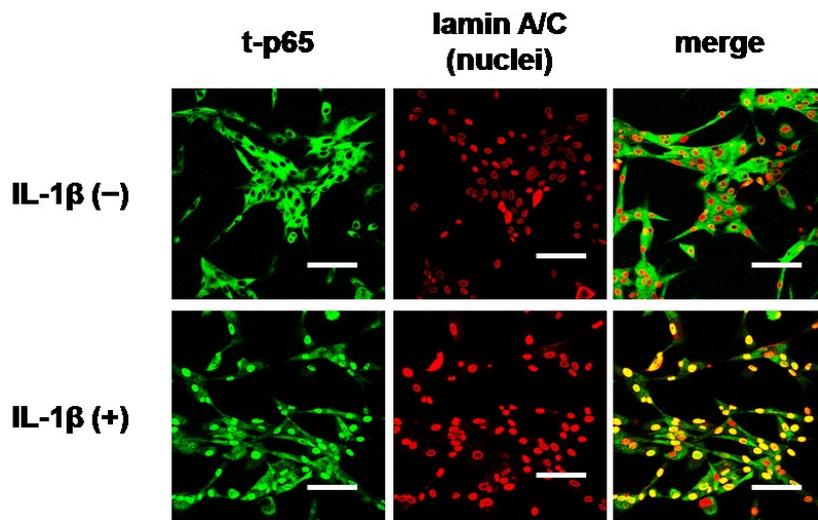


図 4-6. イヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 p65 の核移行. 細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  の存在下および非存在下で 15 分間刺激した。刺激後, 抗 total p65 (t-p65 抗体 (緑)および核マーカーとして抗 lamin A/C 抗体 (赤) を用いて免疫染色を行った。IL-1 $\beta$  刺激細胞において両抗体のマージ (黄) が認められ、IL-1 $\beta$  誘導性の p65 の核移行が認められた。独立して行われた 3 例の実験の代表的な結果を示す。

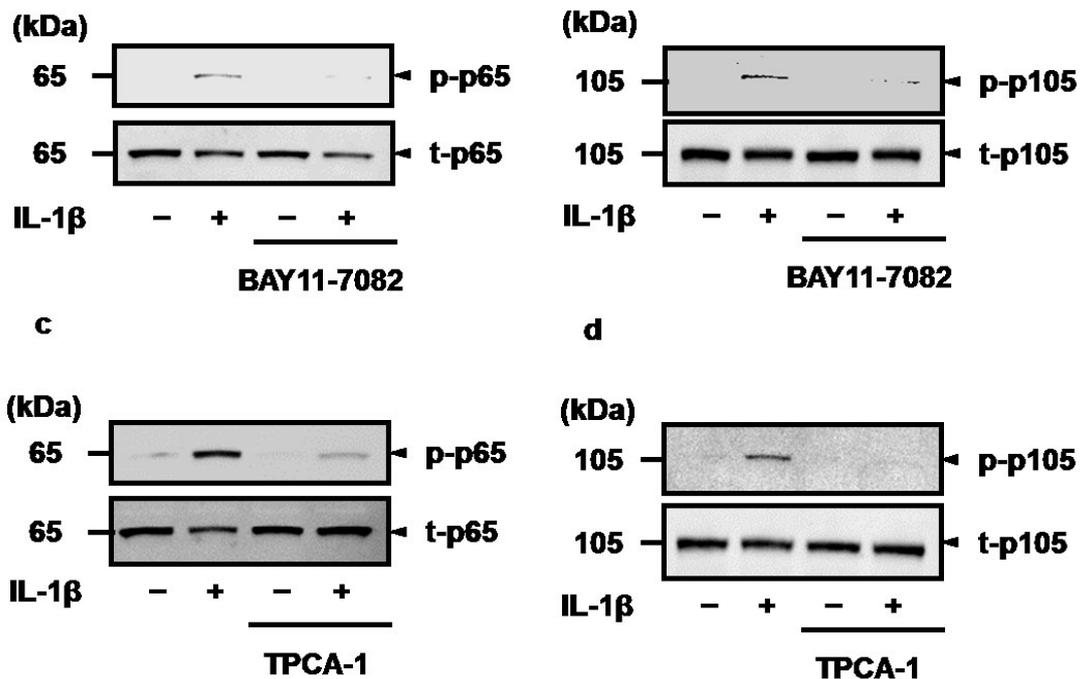


図 4-7. イヌメラノーマ細胞における NF-κB 阻害剤による IL-1β 誘導性 p65 および p105 リン酸の抑制. イヌメラノーマ細胞を NF-κB 阻害剤 BAY11-7082 (10 μM) または TPCA-1 (10 μM) の存在下および非存在下で 1 時間前処理後, IL-1β (100 pM) の存在下および非存在下で 15 分間インキュベートした. その後, リン酸化 p65 (p-p65) および total p65 (t-p65), リン酸化 p105 (p-p105) および total p105 (t-p105) の発現を Western blotting にて測定した. BAY11-7082 および TPCA-1 は IL-1β 誘導性 p65 および p105 のリン酸化を抑制した. それぞれ独立して行われた 3 例の実験の代表的な結果を示す.

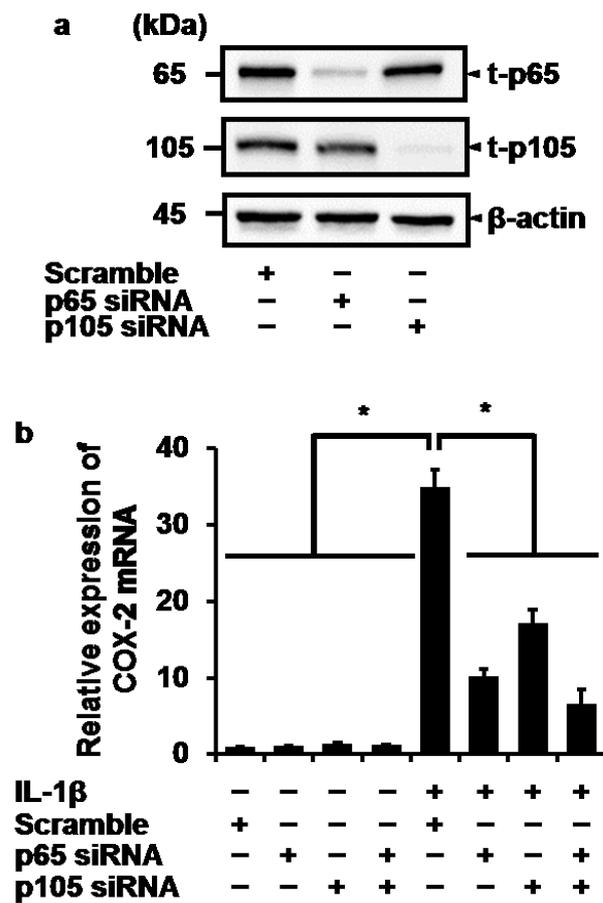


図 4-8. p65 および p105 siRNA 導入イヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現の低下. (a) p65, p105 または scramble siRNA 導入細胞における total p65 (t-p65) または total p105 (t-105) タンパク質発現の低下を Western blotting にて確認した. 内部標準として  $\beta$ -actin の発現を使用した. それぞれ独立して行われた 3 例の実験の代表的な結果を示す. (b) p65, p105 または scramble siRNA 導入細胞を 100 pM IL-1 $\beta$  の存在下または非存在下で 6 時間インキュベートした後, COX-2 mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて測定した. TBP を内部標準として使用した. 値は 3 例の平均値  $\pm$  標準誤差を示す. \* $P < 0.05$

## 第5章

### 総括

本研究では、イヌにおける炎症制御の機序の一部を明らかにするために、イヌの皮膚由来線維芽細胞および悪性黒色腫細胞（メラノーマ細胞）を炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  で刺激を行い、IL-1 $\beta$  誘導性の細胞応答と細胞内シグナル伝達経路を検討し、次の結果を得た。

第2章ではイヌの皮膚由来線維芽細胞における炎症に関わる IL-6 発現への IL-1 $\beta$  の効果を検討した。IL-1 $\beta$  は、時間および用量依存的に IL-6 mRNA 発現および IL-6 放出を誘導した。さらに、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、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  応答への MAP キナーゼ経路の関与について検討を行った。MAP キナーゼ経路には、ERK 経路、p38 MAP キナーゼ経路、JNK 経路の3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、MEK および ERK 阻害剤により IL-1 $\beta$  の効果が抑制されることから ERK の関与を認め、さらに、ERK サブタイプの特異的ノックダウンにより、イヌ皮膚由来線維芽細胞においては、IL-1 $\beta$  誘導性 IL-6 発現に ERK1/2 シグナル伝達経路が関与することが明らかとなった（図 5-1）(Kitanaka et al., 2019b)。

第3章では、第2章で用いた同様のイヌ皮膚由来線維芽細胞を用い、炎症に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の1つである MMP-3 発現に対する IL-1 $\beta$  の効果を標的とした。IL-1 $\beta$  刺激を与えた細胞において、時間および用量依存的に MMP-3 mRNA の発現と MMP-3 放出が促進された。また、活性化転写因子である ATF-2 の関与について、阻害剤と siRNA を用いると IL-1 $\beta$  の効果が抑制されることから、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 発現に ATF-2 が関与することが明らかとなった。さらに、MAP キナーゼとの関連を検討し、ERK 阻害剤は IL-1 $\beta$  誘導性の MMP-3 mRNA 発現を抑制し、siRNAs 導入細胞による ERK1

と ERK2 ノックダウン細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 mRNA 発現が減少したことから、IL-1 $\beta$  誘導性の MMP-3 発現において ERK1 と ERK2 が関与していることが示された。IL-1 $\beta$  誘導性の ATF-2 リン酸化は、ERK 阻害剤で抑制され、また、siRNAs 導入による ERK1 ノックダウン細胞でも抑制されたが、ERK2 ノックダウン細胞では認められなかった。以上の結果から、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 MMP-3 の発現には ERK1/ATF-2 経路が関与していることが明らかとなった (図 5-2) (Kitanaka et al., 2019a)。

第 4 章では、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  で刺激したイヌメラノーマ細胞を用いて、IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現における転写調節因子 NF- $\kappa$ B の関与について検討した。IL-1 $\beta$  は、時間および用量依存的にプロスタグランジン E<sub>2</sub> の放出と COX-2 mRNA 発現を誘導した。NF- $\kappa$ B 阻害剤で処理した細胞において IL-1 $\beta$  誘導性のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 放出および COX-2 mRNA 発現が抑制された。また、IL-1 $\beta$  は NF- $\kappa$ B ファミリーである p65/RelA および p105/NF- $\kappa$ B1 のリン酸化を誘発したが、NF- $\kappa$ B 阻害剤の存在下では抑制された。p65 または p105 の siRNA を導入したメラノーマ細胞において、IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現は阻害された。これらのことから、イヌメラノーマ細胞において、IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現に NF- $\kappa$ B シグナル伝達の活性化が必要であることが明らかとなり、炎症に重要な役割を果たすことが示唆された (図 5-3) (Kitanaka et al., 2018)。

これらの知見は、イヌの様々な炎症、腫瘍化に対するより優れた治療法、予防法の確立に大きく貢献するものと期待される。

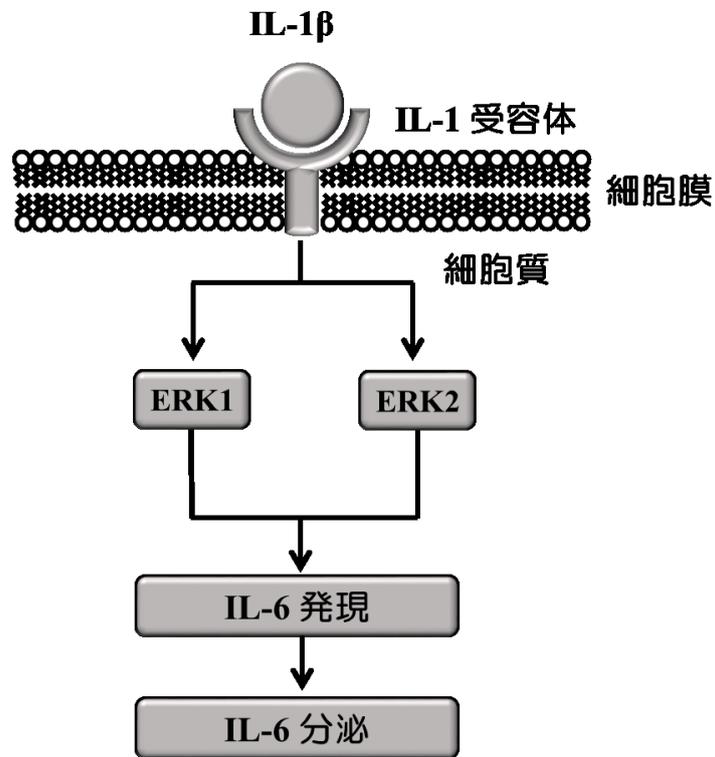


図 5-1. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  刺激による ERK1/2 シグナル経路を介した IL-6 発現と放出の模式図. イヌ皮膚由来線維芽細胞において IL-1 $\beta$  刺激は, ERK アイソフォームである ERK1 および ERK2 を活性化し, 炎症に関わるサイトカインの 1 つ IL-6 発現を促進し, 放出する.

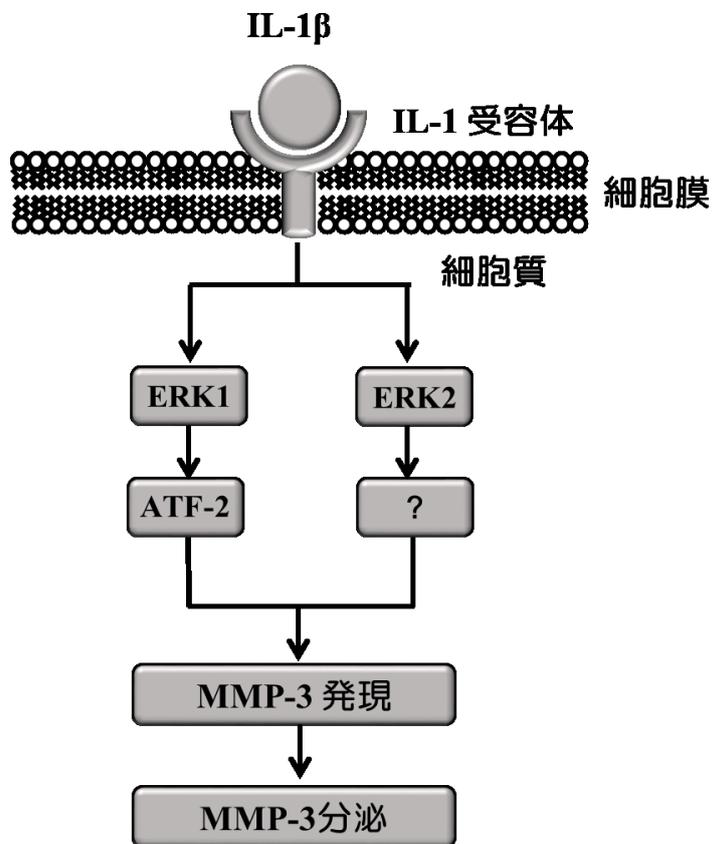


図 5-2. イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  刺激による ERK1/2 と ATF-2 シグナル経路を介した MMP-3 発現と放出の模式図. イヌ皮膚由来線維芽細胞において IL-1 $\beta$  刺激は, ERK アイソフォームである ERK1 および ERK2 を活性化し, さらに, ERK1 は転写因子 ATF-2 を活性化し, 炎症に関わるメタルプロテアーゼの 1 つ MMP-3 発現を促進し, 放出する.

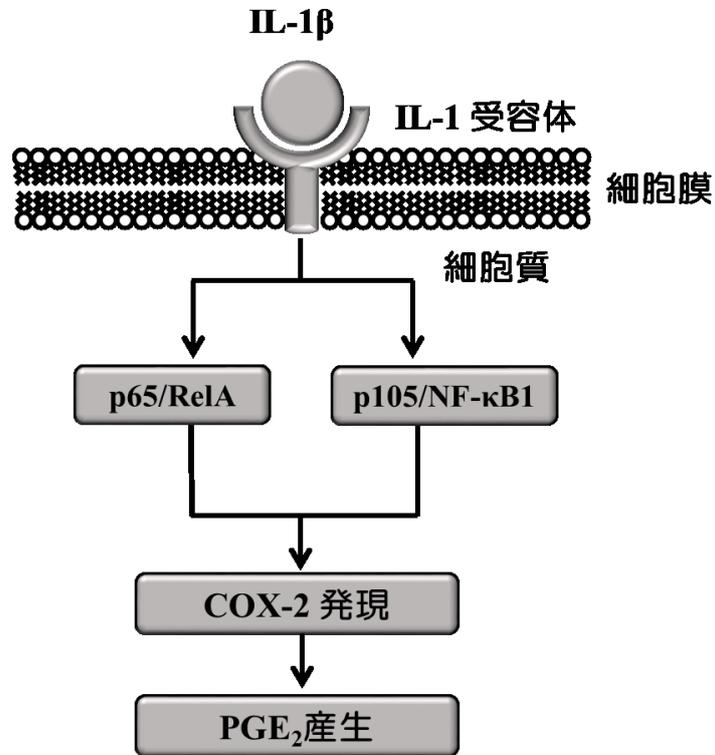


図 5-3. イヌメラノーマ細胞における IL-1 $\beta$  刺激による NF- $\kappa$ B 経路を介した COX-2 発現とプロスタグランジン E<sub>2</sub> 産生の模式図. イヌメラノーマ細胞において IL-1 $\beta$  刺激は, NF- $\kappa$ B の p65/RelA および p105/NF- $\kappa$ B1 を活性化し, プロスタグランジン産生における律速酵素 COX-2 発現を促進し, プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) を産生し, 放出する.

## 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 博士教授に深く感謝いたしますとともに、ご助言を賜りました同研究科の中山 智宏教授並びに山崎 純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受け賜りました理化学研究所の中野 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坂井 学先生、岡林 堅先生、成田 貴則先生並びに獣医生化学研究室および獣医放射線学研究室の諸氏に厚く謝意を表します。さらに、大学院研究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ペット医療センターとその皆様に心よりお礼を申し上げます。そして、研究への道を導いてくれた上、ともに研究に携わり、研究生活を様々な面で支えてくれた夫 北中 卓と家族に心より感謝をいたします。

## 参考文献

- Abdel-Hafiz HA, Heasley LE, Kyriakis JM, Avruch J, Kroll DJ, Johnson GL, et al. Activating transcription factor-2 DNA-binding activity is stimulated by phosphorylation catalyzed by p42 and p54 microtubule-associated protein kinases. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 2079-2089.
- Ågren MS, Schnabel R, Christensen LH, Mirastschijski U. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 ex vivo. *Eur J Cell Biol* 2015; 94: 12-21.
- Angel P, Szabowski A. Function of AP-1 target genes in mesenchymal- epithelial cross-talk in skin. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 949-956.
- Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 323-340.
- Atherton MJ, Morris JS, McDermott MR, Lichty BD. Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. *Vet Immunol Immunopathol* 2016; 169: 15-26.
- Babaei S, Bayat M. Pentoxifylline Accelerates Wound Healing Process by Modulating Gene Expression of MMP-1, MMP-3, and TIMP-1 in Normoglycemic Rats. *J Invest Surg* 2015; 28: 196-201.
- Baecker V. ImageJ macro tool sets for biological image analysis. Paper presented at the ImageJ User and Developer Conference, Luxembourg, Centre de Recherche Public Henri Tudor, 2012.
- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 585-601.

- Becker MR, Siegelin MD, Rompel R, Enk AH, Gaiser T. COX-2 expression in malignant melanoma: a novel prognostic marker? *Melanoma Res* 2009; 19: 8-16.
- Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 beta—a friend or foe in malignancies? *Int J Mol Sci* 2018; 19: 2155.
- Bergman PJ. Canine oral melanoma. *Clin Tech Small Anim Pract* 2007; 22: 55-60.
- Bonizzi G, Karin M. The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25: 280-288.
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991; 65: 663-675.
- Boxman I, Löwik C, Aarden L, Ponc M. Modulation of IL-6 production and IL-1 activity by keratinocyte-fibroblast interaction. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 316-324.
- Boxman IL, Ruwhof C, Boerman OC, Löwik CW, Ponc M. Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 391-398.
- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analy Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Brenneisen P, Wenk J, Wlaschek M, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K. Activation of p70 ribosomal protein S6 kinase is an essential step in the DNA damage-dependent signaling pathway responsible for the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 2000; 275: 4336-4344.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a

- prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 207-214.
- Brinson CW, Lu Z, Li Y, Lopes-Virella MF, Huang Y. Lipopolysaccharide and IL-1 $\beta$  coordinate a synergy on cytokine production by upregulating MyD88 expression in human gingival fibroblasts. *Mol Immunol* 2016; 79: 47-54.
- Bullard KM, Lund L, Mudgett JS, Mellin TN, Hunt TK, Murphy B, et al. Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Ann Surg* 1999a; 230: 260-265.
- Bullard KM, Mudgett J, Scheuenstuhl H, Hunt TK, Banda MJ. Stromelysin-1-deficient fibroblasts display impaired contraction in vitro. *J Surg Res* 1999b; 84: 31-34.
- Bundscherer A, Hafner C, Maisch T, Becker B, Landthaler M, Vogt T. Antiproliferative and proapoptotic effects of rapamycin and celecoxib in malignant melanoma cell lines. *Oncol Rep* 2008; 19: 547-553.
- Buscà R, Pouysségur J, Lenormand P. ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Front Cell Dev Biol* 2016; 4: 53.
- Calabrese LH, Rose-John S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10: 720-727.
- Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75: 50-83.
- Cartwright T, Perkins ND, Wilson CL. NF $\kappa$ B1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer. *FEBS J* 2016; 283: 1812-1822.
- Chambers M, Kirkpatrick G, Evans M, Gorski G, Foster S, Borghaei RC. IL-4 inhibition of IL-1 induced Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression in human fibroblasts involves decreased AP-1 activation via negative crosstalk involving of Jun N-terminal kinase (JNK). *Exp Cell Res* 2013; 319: 1398-1408.
- Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR, Kannappan R, Aggarwal BB. NF- $\kappa$ B addiction and

- its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene* 2011; 30: 1615-1630.
- Chaudhary AK, Pandya S, Ghosh K, Nadkarni A. Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies: an overview. *Mutat Res* 2013; 753: 7-23.
- Chen B, Tsui S, Smith TJ. IL-1 $\beta$  induces IL-6 expression in human orbital fibroblasts: identification of an anatomic-site specific phenotypic attribute relevant to thyroid-associated ophthalmopathy. *J Immunol* 2005; 175: 1310-1319.
- Chen FE, Kempiak S, Huang DB, Phelps C, Ghosh G. Construction, expression, purification and functional analysis of recombinant NF $\kappa$ B p50/p65 heterodimer. *Protein Eng* 1999; 12: 423-428.
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 2017; 9:7204-7218.
- Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF- $\kappa$ B. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 392-401.
- Christian F, Smith EL, Carmody RJ. The Regulation of NF- $\kappa$ B Subunits by Phosphorylation. *Cells* 2016; 5: E12.
- Chwirot BW, Kuźbicki Ł. Cyclooxygenase-2 (COX-2): first immunohistochemical marker distinguishing early cutaneous melanomas from benign melanocytic skin tumours. *Melanoma Res* 2007; 17: 139-145.
- Clària J. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 2177-2190.
- Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 7-9.
- Cohen S, Achbert-Weiner H, Ciechanover A. Dual effects of I $\kappa$ B kinase  $\beta$ -mediated phosphorylation on p105 Fate: SCF $\beta$ -TrCP-dependent degradation and SCF $\beta$ -TrCP-

- independent processing. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 475-486.
- Coran AG, Drongowski RA, Paik JJ, Remick DG. Ibuprofen intervention in canine septic shock: reduction of pathophysiology without decreased cytokines. *J Surg Res* 1992; 53: 272-279.
- Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* 2013; 339: 286-291.
- Crusz SM, Balkwill FR. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12: 584-596.
- Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, Subbaramaiah K. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2001; 2: 544-551.
- Denkert C, Köbel M, Berger S, Siegert A, Leclere A, Trefzer U, Hauptmann S. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 2001; 61: 303-308.
- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 519-550.
- Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 $\beta$  as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol*. 2011; 41: 1203-1217.
- Elaraj DM, Weinreich DM, Varghese S, Puhlmann M, Hewitt SM, Carroll NM, Feldman ED, Turner EM, Alexander HR. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1088-1096.
- Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 3-19.
- Floras ANK, Holowaychuk MK, Bienzle D, Bersenas AME, Sharif S, Harvey T, et al. N-

- terminal pro-C-natriuretic peptide and cytokine kinetics in dogs with endotoxemia. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 1447-1453.
- Florin L, Hummerich L, Dittrich BT, Kokocinski F, Wrobel G, Gack S, et al. Identification of novel AP-1 target genes in fibroblasts regulated during cutaneous wound healing. *Oncogene* 2004; 23: 7005-7017.
- Foster JD, Sample S, Kohler R, Watson K, Muir P, Trepanier LA. Serum biomarkers of clinical and cytologic response in dogs with idiopathic immune-mediated polyarthropathy. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 905-911.
- Frémin C, Ezan F, Boisselier P, Bessard A, Pagès G, Pouysségur J, et al. ERK2 but not ERK1 plays a key role in hepatocyte replication: an RNAi-mediated ERK2 knockdown approach in wild-type and ERK1 null hepatocytes. *Hepatology* 2007; 45: 1035–1045.
- Fuchs SY, Tappin I, Ronai Z. Stability of the ATF2 transcription factor is regulated by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 2000; 275: 12560-12564.
- Fugger L, Morling N, Bendtzen K, Ryder L, Andersen V, Heilman C, et al. IL-6 gene polymorphism in rheumatoid arthritis, pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and in healthy Danes. *J Immunogenet* 1989; 16: 461-465.
- Fujimoto K, Yasuda H, Sato Y, Yamamoto K. A role for phosphorylation in the proteolytic processing of the human NF- $\kappa$ B1 precursor. *Gene* 1995; 165: 183-189.
- Gallucci RM, Sloan DK, Heck JM, Murray AR, O'Dell SJ. Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 764-772.
- Gao D, Bing C. Macrophage-induced expression and release of matrix metalloproteinase 1 and 3 by human preadipocytes is mediated by IL-1 $\beta$  via activation of MAPK

- signaling. *J Cell Physiol* 2011; 226: 2869-2880.
- Geng H, Wittwer T, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Schmitz ML. Phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 at Ser468 controls its COMMD1-dependent ubiquitination and target gene-specific proteasomal elimination. *EMBO Rep* 2009; 10: 381-386.
- Goulet AC, Einsphar JG, Alberts DS, Beas A, Burk C, Bhattacharyya A, Bangert J, Harmon JM, Fujiwara H, Koki A, Nelson MA. Analysis of cyclooxygenase 2 (COX-2) expression during malignant melanoma progression. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: 713-718.
- Grellner W, Georg T, Wilske J. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) in human skin wounds. *Forensic Sci Int* 2000; 113: 251-264.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140: 883-899.
- Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, et al. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 6367-6371.
- Guan H, Hou S, Ricciardi RP. DNA binding of repressor nuclear factor- $\kappa$ B p50/p50 depends on phosphorylation of Ser337 by the protein kinase A catalytic subunit. *J Biol Chem* 2005; 280: 9957-9962.
- Gupta S, Campbell D, Dérijard B, Davis RJ. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 1995; 267: 389-393.
- Hai T, Curran T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3720-3724.
- Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, et al. c-Jun N-terminal kinase

- is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001; 108: 73-81.
- Harris RE, Beebe J, Alshafie GA. Reduction in cancer risk by selective and nonselective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *J Exp Pharmacol* 2012; 4: 91-96.
- Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev* 2004; 18: 2195-2224.
- Hayden MS, Ghosh S. NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 2012; 26: 203-234.
- Hosseini M, Rose AY, Song K, Bohan C, Alexander JP, Kelley MJ, et al. IL-1 and TNF induction of matrix metalloproteinase-3 by c-Jun N-terminal kinase in trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1469-1476.
- Hsieh HL, Lin CC, Shih RH, Hsiao LD, Yang CM. NADPH oxidase-mediated redox signal contributes to lipoteichoic acid-induced MMP-9 upregulation in brain astrocytes. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 110.
- Huang B, Yang XD, Lamb A, Chen LF. Posttranslational modifications of NF- $\kappa$ B: another layer of regulation for NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Signal* 2010; 22: 1282-1290.
- Hübner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fässler R, Werner S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* 1996; 8: 548-556.
- Hwang BM, Noh EM, Kim JS, Kim JM, You YO, Hwang JK, et al. Curcumin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase-1/3 expression by suppressing the MAPK-p38/JNK pathways in human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* 2013; 22: 371-374.
- Iida Y, Ciechanover A, Marzese DM, Hata K, Bustos M, Ono S, Wang J, Salomon MP, Tran K, Lam S, Hsu S, Nelson N, Kravtsova-Ivantsiv Y, Mills GB, Davies MA, Hoon DSB. Epigenetic Regulation of KPC1 Ubiquitin Ligase Affects the NF- $\kappa$ B Pathway

- in Melanoma. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 4831-4842.
- Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298: 1911-1912.
- Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1754: 253-262.
- Karin M, Greten FR. NF- $\kappa$ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 749-759.
- Kim KM, Im AR, Kim SH, Hyun JW, Chae S. Timosaponin AIII inhibits melanoma cell migration by suppressing COX-2 and in vivo tumor metastasis. *Cancer Sci* 2016; 107: 181-188.
- Kirchmeyer M, Koufany M, Sebillaud S, Netter P, Jouzeau JY, Bianchi A All-trans retinoic acid suppresses interleukin-6 expression in interleukin-1-stimulated synovial fibroblasts by inhibition of ERK1/2 pathway independently of RAR activation. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R141.
- Kitanaka N, Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Konno T, Nakayama T, et al. NF- $\kappa$ B p65 and p105 implicate in interleukin 1 $\beta$ -mediated COX-2 expression in melanoma cells. *PLOS ONE* 2018; 13: e0208955.
- Kitanaka N, Nakano R, Sakai M, Kitanaka T, Namba S, Konno T, et al. ERK1/ATF-2 signaling axis contributes to interleukin-1 $\beta$ -induced MMP-3 expression in dermal fibroblasts. *PLOS ONE* 2019a; 14: e0222869
- Kitanaka N, Nakano R, Sugiura K, Kitanaka T, Namba S, Konno T, et al. Interleukin-1 $\beta$  promotes interleukin-6 expression via ERK1/2 signaling pathway in canine dermal fibroblasts. *PLOS ONE* 2019b; 14: e0220262.

Kitanaka T, Nakano R, Kitanaka N, Kimura T, Okabayashi K, Narita T, et al. JNK activation is essential for activation of MEK/ERK signaling in IL-1 $\beta$ -induced COX-2 expression in synovial fibroblasts. *Sci Rep* 2017; 7: 39914.

Kloesch B, Liszt M, Broell J. H<sub>2</sub>S transiently blocks IL-6 expression in rheumatoid arthritic fibroblast-like synoviocytes and deactivates p44/42 mitogen-activated protein kinase. *Cell Biol Int* 2010; 34: 477-484.

Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, Cho MM, Haines GK, Harlow LA, et al. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. Their role in early and late disease. *Pathobiology* 1993; 61: 239-246.

Kondo T, Ohshima T. The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: a preliminary study for possible wound age determination. *Int J Legal Med* 1996 ;108: 231-236.

Kontos S, Sotiropoulou-Bonikou G, Kominea A, Melachrinou M, Balampani E, Bonikos D. Coordinated increased expression of Cyclooxygenase2 and nuclear factor  $\kappa$  B is a steady feature of urinary bladder carcinogenesis. *Adv Urol* 2010. pii: 871356.

Konturek PC, Nikiforuk A, Kania J, Raithel M, Hahn EG, Mühlendorfer S. Activation of NF $\kappa$ B represents the central event in the neoplastic progression associated with Barrett's esophagus: a possible link to the inflammation and overexpression of COX-2, PPAR $\gamma$  and growth factors. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1075-1083.

Kravtsova-Ivantsiv Y, Shomer I, Cohen-Kaplan V, Snijder B, Superti-Furga G, Gonen H, Sommer T, Ziv T, Admon A, Naroditsky I, Jbara M, Brik A, Pikarsky E, Kwon YT, Doweck I, Ciechanover A. KPC1-mediated ubiquitination and proteasomal processing of NF- $\kappa$ B1 p105 to p50 restricts tumor growth. *Cell* 2015; 161: 333-347.

- Kuroda K, Shinkai H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 1997; 289: 567-572.
- Kuźbicki Ł, Sarnecka A, Chwirot BW. Expression of cyclooxygenase-2 in benign naevi and during human cutaneous melanoma progression. *Melanoma Res* 2006; 1: 29-36.
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev* 2012; 92: 689-737.
- Lavi G, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN, Cohen S. Sustained delivery of IL-1 Ra from biodegradable microspheres reduces the number of murine B16 melanoma lung metastases. *J Control Release* 2007; 123: 123-130.
- Li XY, Green MR. Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain. *Genes Dev* 1996; 10: 517-527.
- Lee JD, Huh JE, Jeon G, Yang HR, Woo HS, Choi DY, et al. Flavonol-rich RVHxR from *Rhus verniciflua* Stokes and its major compound fisetin inhibits inflammation-related cytokines and angiogenic factor in rheumatoid arthritic fibroblast-like synovial cells and in vivo models. *Int Immunopharmacol* 2009; 9: 268-276.
- LeMay DR, LeMay LG, Kluger MJ, D'Alecy LG. Plasma profiles of IL-6 and TNF with fever-inducing doses of lipopolysaccharide in dogs. *Am J Physiol* 1990; 259: R126-R132.
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74: 49-139.
- 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* 2009; 382: 259-263.

- Li XY, Green MR. Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain. *Genes Dev* 1996; 10: 517-527.
- Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 713-721.
- Li Y, Kilani RT, Rahmani-Neishaboor E, Jalili RB, Ghahary A. Kynurenine increases matrix metalloproteinase-1 and -3 expression in cultured dermal fibroblasts and improves scarring in vivo. *J Invest Dermatol* 2014; 134: 643-650.
- Lin L, DeMartino GN, Greene WC. Cotranslational biogenesis of NF- $\kappa$ B p50 by the 26S proteasome. *Cell* 1998; 92: 819-828.
- Liu X, Ye F, Xiong H, Hu DN, Limb GA, Xie T, et al. IL-1 $\beta$  induces IL-6 production in retinal Müller cells predominantly through the activation of p38 MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Exp Cell Res* 2015; 331: 223-231.
- Luqman S, Pezzuto JM. NF $\kappa$ B: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res* 2010; 24: 949-963.
- Madlener M, Parks WC, Werner S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res* 1998; 242: 201-210.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-444.
- Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276: 75-81.
- Martínez CM, Peñafiel-Verdú C, Vilafranca M, Ramírez G, Méndez-Gallego M, Buendía AJ, et al. Cyclooxygenase-2 expression is related with localization, proliferation, and

- overall survival in canine melanocytic neoplasms. *Vet Pathol* 2011; 48: 1204-1211.
- Martins VL, Caley M, O'Toole EA. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res* 2013; 351: 255-268.
- Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling in skin: stromal to epithelial cross-talk. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 7-9.
- Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 2010; 140:771-776.
- 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* 1995; 163: 577-588.
- Milanovic M, Kracht M, Schmitz ML. The cytokine-induced conformational switch of nuclear factor  $\kappa$ B p65 is mediated by p65 phosphorylation. *Biochem J* 2014; 457: 401-413.
- Miyamoto T, Fujinaga T, Yamashita K, Hagio M. Changes of serum cytokine activities and other parameters in dogs with experimentally induced endotoxic shock. *Jpn J Vet Res* 1996; 44: 107-118.
- Miyazawa K, Mori A, Miyata H, Akahane M, Ajisawa Y, Okudaira H. Regulation of interleukin-1 $\beta$ -induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1998; 273: 24832-24838.
- Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Kitanaka N, Sugiya H. Protein kinase C $\epsilon$  regulates nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase, which contributes to bradykinin-induced cyclooxygenase-2 expression. *Sci Rep* 2018; 8: 8535.
- Namba S, Nakano R, Kitanaka T, Kitanaka N, Nakayama T, Sugiya H. ERK2 and JNK1

- contribute to TNF- $\alpha$ -induced IL-8 expression in synovial fibroblasts. *PLoS One* 2017; 12: e0182923.
- Neuner P, Urbanski A, Trautinger F, Möller A, Kirnbauer R, Kapp A, et al. Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 27-33.
- Okamoto M, Liu W, Luo Y, Tanaka A, Cai X, Norris DA, Dinarello CA, Fujita M. Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1 $\beta$ . *J Biol Chem* 2010; 285: 6477-6488.
- O'Riordan JM, Abdel-latif MM, Ravi N, McNamara D, Byrne PJ, McDonald GS, Keeling PW, Kelleher D, Reynolds JV. Proinflammatory cytokine and nuclear factor kappa-B expression along the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1257-1264.
- Ouwens DM, de Ruiter ND, van der Zon GC, Carter AP, Schouten J, van der Burgt C, et al. Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *EMBO J* 2002; 21: 3782-3793.
- Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 657-672.
- Pang LY, Hurst EA, Argyle DJ. Cyclooxygenase-2: a role in cancer stem cell survival and repopulation of cancer cells during therapy. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 2048731.
- Paquet P, Piérard GE. Interleukin-6 and the skin. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109: 308-317.
- Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of

- inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 617-629.
- Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJ. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg* 1997; 84: 160-166.
- Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 2006; 25: 6717-6730.
- Perkins ND. The diverse and complex roles of NF- $\kappa$ B subunits in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 121-132.
- Phelps CB, Sengchanthalangsy LL, Huxford T, Ghosh G. Mechanism of I $\kappa$ B $\alpha$  binding to NF- $\kappa$ B dimers. *J Biol Chem* 2000; 275: 29840-29846.
- Pittayapruerk P, Meehansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; 17: E868.
- Prontera C, Crescenzi G, Rotilio D. Inhibition by Interleukin-4 of stromelysin expression in human skin fibroblasts: role of PKC. *Exp Cell Res* 1996; 224: 183-188.
- Qin Y, Ekmekcioglu S, Liu P, Duncan LM, Lizée G, Poindexter N, et al. Constitutive aberrant endogenous interleukin-1 facilitates inflammation and growth in human melanoma. *Mol Cancer Res* 2011; 9:1537-1550.
- Radtke S, Milanovic M, Rossé C, De Rycker M, Lachmann S, Hibbert A, et al. ERK2 but not ERK1 mediates HGF-induced motility in non-small cell lung carcinoma cell lines. *J Cell Sci* 2013; 126: 2381-2391.
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995; 270: 7420-7426.

- Rakhesh M, Cate M, Vijay R, Shrikant A, Shanjana A. A TLR4-interacting peptide inhibits lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses, migration and invasion of colon cancer SW480 cells. *Oncoimmunology*. 2012; 1: 1495-1506.
- Rau S, Kohn B, Richter C, Fenske N, Küchenhoff H, Hartmann K, et al. Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Vet Clin Pathol* 2007; 36: 253-260.
- Ravanti L, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in wound repair. *Int J Mol Med* 2000; 6: 391-407.
- Reber L, Vermeulen L, Haegeman G, Frossard N. Ser276 phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 by MSK1 controls SCF expression in inflammation. *PLoS One* 2009; 4: e4393.
- Ricote M, García-Tuñón I, Bethencourt F, Fraile B, Onsurbe P, Paniagua R, et al. The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia. *J Pathol* 2006; 208: 401-407.
- Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012; 66: 105-143.
- Saccani S, Pantano S, Natoli G. Modulation of NF- $\kappa$ B activity by exchange of dimers. *Mol Cell* 2003; 11: 1563-1574.
- Safra N, Hitchens PL, Maverakis E, Mitra A, Korff C, Johnson E, et al. Serum levels of innate immunity cytokines are elevated in dogs with metaphyseal osteopathy (hypertrophic osteodystrophy) during active disease and remission. *Vet Immunol Immunopathol* 2016; 179: 32-35.
- Sanz-Motilva V, Martorell-Calatayud A, Nagore E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and melanoma. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 3966-3978.
- Sawamura D, Meng X, Ina S, Sato M, Tamai K, Hanada K, et al. Induction of keratinocyte proliferation and lymphocytic infiltration by in vivo introduction of the IL-6 gene

- into keratinocytes and possibility of keratinocyte gene therapy for inflammatory skin diseases using IL-6 mutant genes. *J Immunol* 1998; 161: 5633-5639.
- Schneider SL, Ross AL, Grichnik JM. Do inflammatory pathways drive melanomagenesis? *Exp Dermatol* 2015; 24: 86-90.
- Shao BZ, Xu ZQ, Han BZ, Su DF, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol* 2015; 6: 262.
- Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E131-E136.
- Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NF $\kappa$ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res* 2011; 21: 86-102.
- Shin J, Yang J, Lee JC, Baek KH. Depletion of ERK2 but not ERK1 abrogates oncogenic Ras-induced senescence. *Cell Signal* 2013; 25: 2540–2547.
- 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* 2010; 38: 114-127.
- Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 387-437.
- Simpson RM, Bastian BC, Michael HT, Webster JD, Prasad ML, Conway CM, et al. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014; 27: 37-47.
- Sinfield JK, Das A, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE, Turner NA. p38 MAPK  $\alpha$  mediates cytokine-induced IL-6 and MMP-3 expression in human cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430: 419-424.
- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738-746.

- Smale ST. Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF- $\kappa$ B family of transcription factors. *Immunol Rev* 2012; 246: 193-204.
- Song H, Ki SH, Kim SG, Moon A. Activating transcription factor 2 mediates matrix metalloproteinase-2 transcriptional activation induced by p38 in breast epithelial cells. *Cancer Res* 2006; 66: 10487-10496.
- Sylvester J, El Mabrouk M, Ahmad R, Chaudry A, Zafarullah M. Interleukin-1 induction of aggrecanase gene expression in human articular chondrocytes is mediated by mitogen-activated protein kinases. *Cell Physiol Biochem* 2012; 30: 563-574.
- Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Fusenig NE, et al. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell* 2000; 103: 745-755.
- Tabandeh MR, Oryan A, Mohammadalipour A. Polysaccharides of Aloe vera induce MMP-3 and TIMP-2 gene expression during the skin wound repair of rat. *Int J Biol Macromol* 2014; 65: 424-430.
- Tabandeh MR, Oryan A, Mohammad-Alipour A, Tabatabaei-Naieni A. Silibinin regulates matrix metalloproteinase 3 (stromelysin1) gene expression, hexoseamines and collagen production during rat skin wound healing. *Phytother Res* 2013; 27: 1149-1153.
- Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Iida H. Dexmedetomidine suppresses interleukin-1 $\beta$ -induced interleukin-6 synthesis in rat glial cells. *Int J Mol Med* 2014; 34: 1032-1038.
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6: a016295.
- Tong X, Yin L, Washington R, Rosenberg DW, Giardina C. The p50-p50 NF- $\kappa$ B complex

- as a stimulus-specific repressor of gene activation. *Mol Cell Biochem* 2004; 265: 171-183.
- Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2016; 5: 119-136.
- Tsai EY, Jain J, Pesavento PA, Rao A, Goldfeld AE. Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 459-467.
- 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* 2015;168: 223-232.
- Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med* 2002; 53: 35-57.
- Utz ER, Elster EA, Tadaki DK, Gage F, Perdue PW, Forsberg JA, et al. Metalloproteinase expression is associated with traumatic wound failure. *J Surg Res* 2010; 159: 633-639.
- Vaid M, Singh T, Prasad R, Kappes JC, Katiyar SK. Therapeutic intervention of proanthocyanidins on the migration capacity of melanoma cells is mediated through PGE2 receptors and  $\beta$ -catenin signaling molecules. *Am J Cancer Res* 2015; 5 : 3325-3338.
- van Dam H, Wilhelm D, Herr I, Steffen A, Herrlich P, Angel P. ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J* 1995; 14: 1798-1811.
- Vermeulen L, De Wilde G, Notebaert S, Vanden Berghe W, Haegeman G. Regulation of

- the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 963-970.
- Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 43-52.
- Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J Cell Physiol* 2007; 213: 355-364.
- Wang B, Wei H, Prabhu L, Zhao W, Martin M, Hartley AV, Lu T. Role of novel serine 316 phosphorylation of the p65 subunit of NF- $\kappa$ B in differential gene regulation. *J Biol Chem* 2015; 290: 20336-20347.
- Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10: 181-193.
- Wang Q, Siminovitch KA, Downey GP, McCulloch CA. Ras-guanine-nucleotide-releasing factors 1 and 2 interact with PLC $\gamma$  at focal adhesions to enable IL-1-induced Ca<sup>2+</sup> signalling, ERK activation and MMP-3 expression. *Biochem J* 2013; 449: 771-782.
- Wang XP, Schunck M, Kallen KJ, Neumann C, Trautwein C, Rose-John S, et al. The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 124-131.
- Waterfield MR, Zhang M, Norman LP, Sun SC. NF- $\kappa$ B1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Mol Cell* 2003; 11: 685-694.
- Watson G, Ronai ZA, Lau E. ATF2, a paradigm of the multifaceted regulation of transcription factors in biology and disease. *Pharmacol Res* 2017; 119: 347-357.
- Weinheimer-Haus EM, Mirza RE, Koh TJ. Nod-like receptor protein-3 inflammasome

- plays an important role during early stages of wound healing. *PLoS One* 2015; 10: e0119106.
- Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83: 835-870.
- Westermarck J, Li S, Jaakkola P, Kallunki T, Grénman R, Kähäri VM. Activation of fibroblast collagenase-1 expression by tumor cells of squamous cell carcinomas is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase-2. *Cancer Res* 2000; 60: 7156-7162.
- 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* 2004; 63: 1453-1459.
- Wilczynska KM, Gopalan SM, Bugno M, Kasza A, Konik BS, Bryan L, et al. A novel mechanism of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 activation by interleukin-1 in primary human astrocytes. *J Biol Chem* 2006; 281: 34955-34964.
- Xia L, Tan S, Zhou Y, Lin J, Wang H, Oyang L, et al. Role of the NFκB-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther* 2018; 11: 2063-2073.
- Xue M, Le NT, Jackson CJ. Targeting matrix metalloproteases to improve cutaneous wound healing. *Expert Opin Ther Targets* 2006; 10: 143-155.
- Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-κB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001; 107: 135-142.
- Yamamoto T, Osaki T. Characteristic cytokines generated by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 784-788.
- Yamashita K, Fujinaga T, Miyamoto T, Hagio M, Izumisawa Y, Kotani T. Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein

- in dogs. *J Vet Med Sci* 1994; 56: 487-492.
- Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 2007; 211: 19-26.
- Yates CC, Whaley D, Kulasekeran P, Hancock WW, Lu B, Bodnar R, et al. Delayed and deficient dermal maturation in mice lacking the CXCR3 ELR-negative CXC chemokine receptor. *Am J Pathol* 2007; 171: 484-495.
- Yu T, Li YJ, Bian AH, Zuo HB, Zhu TW, Ji SX, et al. The regulatory role of activating transcription factor 2 in inflammation. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 950472.
- Zelenay S, van der Veen AG, Böttcher JP, Snelgrove KJ, Rogers N, Acton SE, et al. Cyclooxygenase-dependent tumor growth through evasion of immunity. *Cell* 2015; 162: 1257-1270.
- Zhu F, Zhang Y, Bode AM, Dong Z. Involvement of ERKs and mitogen- and stress-activated protein kinase in UVC-induced phosphorylation of ATF2 in JB6 cells. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1847-1852.