

## 論文の内容の要旨

氏名：成毛 淳人

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：イヌ皮膚由来線維芽細胞におけるインターロイキン 1 $\beta$  誘導性インターロイキン 8 の発現と細胞内シグナルに関する研究

炎症は、免疫系による生体に不可欠な防御機能である。炎症には、白血球、血小板、血漿などの血液由来の細胞や液性成分、血管内皮細胞、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、細胞外マトリックスなどが関与し、それぞれが単独に、あるいは共働して機能を担っている。

サイトカインは炎症反応の制御に関わる生体分子である。インターロイキン 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) はその 1 つであり、細菌やウイルスの構成成分や DAMPs と呼ばれる体内成分が刺激となって、白血球、リンパ球、血管内皮細胞、上皮細胞、線維芽細胞など様々な細胞から産生・分泌される。分泌された IL-1 $\beta$  は、標的となる細胞の受容体に結合し、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分泌を誘導し様々な反応を引き起こす。

MAP キナーゼ(mitogen-activated protein kinase) は、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、IL-1 $\beta$  を含む炎症性サイトカインなどの様々な刺激により活性化され、細胞応答に関与している。

線維芽細胞は全ての組織において、特に結合組織に多く存在し、コラーゲンやエラスチン繊維合成、細胞外マトリックスの分解調節に関わっている。近年、炎症性サイトカイン、ケモカイン、抗菌性ペプチドなど微生物に対する自然免疫にかかわる様々な因子を合成し、免疫系の Sentinel (歩哨) 細胞としての機能が明らかになりつつある。

本研究は、イヌにおける炎症制御の機序の一端を明らかにすることで獣医療への貢献を目的とし、初代培養したイヌ皮膚由来線維芽細胞 (cDFBs) における IL-1 $\beta$  刺激により惹起されるインターロイキン-8 (IL-8) と MAP キナーゼシグナル伝達経路について検討した。

### 1. cDFBs における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 の発現と分泌

IL-8 は、CXC ケモカインファミリーの一員であり、好中球などの自然免疫細胞を活性化し炎症部位へ動員する。また、好中球の呼吸バースト、エキソサイトーシス、貯蔵タンパク質の脱顆粒を促進し、創傷治癒や炎症に関与する。IL-8 は、マクロファージ、血管内皮細胞、線維芽細胞など様々な細胞に炎症性刺激が加わると、産生・分泌される。

本章では、cDFBs における IL-8 の発現と分泌に対する IL-1 $\beta$  の効果を検討した。

IL-1 $\beta$  刺激により、cDFBs から IL-8 の培養液中への分泌が時間依存的に増加した。また、IL-1 $\beta$  刺激は cDFBs における IL-8 mRNA 発現を時間依存的および用量依存的に促進した。これらの結果より、IL-1 $\beta$  が cDFBs において IL-8 の発現と分泌を誘導することが示唆された。

イヌにおいて、自然発症の炎症性疾患やがん罹患した場合や、LPS 投与による実験的炎症モデルで IL-8 の血清濃度やタンパク質発現の増加が報告されている。イヌ滑膜線維芽細胞や子宮内膜間質細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性に IL-8 発現が促進されることから、IL-8 の組織的および局所的炎症への関与が示唆されており、本章の結果からも、IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 がイヌ皮膚炎症に関わる可能性が考えられる。

### 2. cDFBs における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 発現への MAP キナーゼの関与

MAP キナーゼは様々な細胞機能に関わる重要なリン酸化酵素であり、IL-1 $\beta$  を含む炎症性サイトカイン刺激により活性化される。哺乳類では、MAP キナーゼ経路としては、Extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2)、c-Jun N-terminal kinases (JNK)、p38 の 3 つが主要な経路として知られている。本章では、cDFBs における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 発現に関わる MAP キナーゼについて検討した。

阻害剤を用いた検討では、ERK1/2 阻害剤 FR180204 は IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 mRNA 発現を有意に抑制したが、JNK 阻害剤 SP600125, p38 阻害剤 SB239063 または SKF86002 は効果を示さなかった。

IL-1 $\beta$  刺激した cDFBs では、刺激後速やかな ERK1/2 のリン酸化 (活性化) が観察され、ERK 阻害剤存在下では IL-1 $\beta$  誘導性 ERK1/2 のリン酸化は有意に減少した。siRNA 導入によるノックダウン cDFBs では、ERK1 または ERK2 をノックダウンすると IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 mRNA 発現は有意に減少した。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-8 mRNA 発現は、ERK1 または ERK2 単独ノックダウン細胞での結果と比べて有意な差は認められなかった。

ERK1 と ERK2 は ERK のアイソフォームであり、様々な細胞で共発現し、刺激を受けると共に活性化すると考えられている。一方で、cDFBs における IL-1 $\beta$  誘導性の Matrix metalloproteinase-3 発現、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- $\alpha$  誘導性 IL-8 発現やネコ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現において、ERK アイソフォーム特異的 siRNA を導入して作製したノックダウン細胞を用いた研究により、ERK1 と ERK2 の機能差が明らかにされている。本章の結果より、cDFBs においては、IL-1 $\beta$  は ERK1/2 の活性化を介して IL-8 mRNA の発現を誘導することが示唆された。しかし、ERK1 および ERK2 のダブルノックダウンした細胞における IL-1 $\beta$  による IL-8 mRNA 発現の減少は、ERK1 または ERK2 単独ノックダウン細胞と有意差はなかったことから、cDFBs における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 発現には、ERK1 経路と ERK2 経路が重複して機能していると考えられる。

### 3. cDFBs における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 発現への Tpl2 の関与

Tumor progression locus 2 (Tpl2) は、セリン/スレオニンリン酸化酵素であり、ヒトの単球やマウスマクロファージにおける MAP キナーゼシグナル伝達系の上流で ERK や p38 を調節して炎症反応に関わることが報告されている。本章では、cDFBs における Tpl2 の IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 発現への関与と ERK1/2 活性化の関与について検討した。

阻害剤を用いた検討では、Tpl2 阻害剤の Tpl2 kinase inhibitor II 前処理細胞において IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 mRNA 発現は有意に抑制され、また、Tpl2 阻害剤存在下では、IL-1 $\beta$  誘導性の ERK1/2 のリン酸化は抑制された。siRNA 導入による Tpl2 ノックダウン cDFBs においては、IL-1 $\beta$  誘導性の ERK1/2 のリン酸化と IL-8 mRNA 発現の有意な低下が認められた。以上の結果は、IL-1 $\beta$  刺激された cDFBs においては、Tpl2 は ERK1/2 の活性化を介して IL-8 発現調節に関わることを示唆している。

病態モデルマウスにおいては、Tpl2 を欠損させると、LPS 誘導性の敗血症性ショック、炎症性腸疾患、実験的自己免疫性脳脊髄炎における多発的硬化症、急性膵炎などが抑えられることが報告されている。これらの病態モデルにおいては、炎症性細胞数の減少や炎症性サイトカインの産生減少がそれらの炎症性疾患の軽減が原因と考えられている。免疫系においては、マクロファージは種々の炎症性サイトカインを産生するが、Tpl2 を欠損すると、IL-1 $\beta$  を含む種々のサイトカインの産生が抑えられる。これらのことから、Tpl2 はサイトカインやケモカインの産生などを介して、炎症制御に関わると考えられている。本章で示された結果は、cDFBs においても Tpl2 が IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 発現調節を介して炎症制御に関わることを示唆している。

本章では、Tpl2 が ERK1/2 の活性化を介して IL-8 発現に関与することを示した。マウス胎児線維芽細胞やヒトの関節リウマチに関わる滑膜由来線維芽細胞においては、IL-1 $\beta$  刺激が Tpl2 を介した ERK1/2 の活性化を誘導する。しかし、HeLa 細胞やラット INS-1E $\beta$ -細胞においては、IL-1 $\beta$  は他の MAP キナーゼである p38 や JNK シグナル系を活性化して細胞機能に関わると報告されている。マウス胎児線維芽細胞では、TNF- $\alpha$  刺激による Tpl2 の活性化は ERK1/2 のみならず JNK シグナル系の活性化すると報告されている。これらの報告から、Tpl2 と MAP キナーゼシグナルの関連は細胞種やリガンドに依存するものと考えられ、さらに Tpl2 から MAP キナーゼシグナル系への伝達には他の因子の存在の必要性が考えられ、cDFBs における IL-1 $\beta$  誘導性の Tpl2 を介した ERK1/2 活性化の詳細な機序の解明が必要と思われる。

### 4. 総括

本研究では、cDFBs におけるケモカインファミリーの一員であり、炎症や創傷治癒に関与することが知られている IL-8 の発現と分泌に対する炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の効果について検討し、IL-1 $\beta$  が IL-8 発

現と分泌を誘導することを明らかにした。また、cDFBs における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 発現に関わる細胞内シグナル伝達として、阻害剤と siRNA 導入によるノックダウン細胞を用いて、MAP キナーゼ経路の ERK1/2 を活性化し、ERK1 と ERK2 の両者が IL-8 発現に関わることを明らかにした。さらに、阻害剤と siRNA 導入によるノックダウン細胞を用いて、IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 発現には、炎症を含む細胞機能に関わると考えられている Tpl2 による ERK1/2 の活性化制御に関わることを明らかにした。線維芽細胞は結合組織に多く存在する細胞であるが、すべての組織に存在し、自然免疫に関わる様々な因子を合成し、免疫系の Sentinel 細胞としての機能が明らかになりつつある。本研究で明らかにしたように、IL-1 $\beta$  誘導性に炎症反応に重要な役割を担う IL-8 発現が認められたことから、cDFBs も Sentinel 細胞として免疫系において重要な役割を担っていると考えられる。以上の結果は、イヌの皮膚炎症制御メカニズムの一端を明らかにしたものであり、獣医療への貢献が期待される。