

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

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻  
博士課程

成毛 淳人

2023

## 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-8 の発現と分泌	5
2.1	緒言	6
2.2	材料と方法	6
2.2.1	材料	7
2.2.2	細胞培養	7
2.2.3	Real-time RT-PCR	9
2.2.4	IL-8 測定	9
2.2.5	統計学的解析	10
2.3	結果	10
2.3.1	イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 分泌	10
2.3.2	イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 mRNA 発現	10
2.4	考察	11
第3章	イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 発現への MAP キナーゼの関与	15
3.1	緒言	16
3.2	材料と方法	16
3.2.1	材料	16
3.2.2	細胞培養	17

3.2.3	Real-time RT-PCR	18
3.2.4	Western blotting	18
3.2.5	siRNA の細胞導入	19
3.2.6	統計学的解析	20
3.3	結果	20
3.3.1	IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 mRNA 発現に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果	20
3.3.2	イヌ皮膚線維芽細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 ERK1/2 のリン酸化	20
3.3.3	イヌ皮膚線維芽細胞における ERK1/2 阻害剤による IL-1 $\beta$ 誘導性 ERK1/2 リン酸化の抑制	21
3.3.4	ERK1 および ERK2 ノックダウン細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 mRNA 発現	21
3.4	考察	22
第 4 章	イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 発現への Tpl2 の関与	30
4.1	緒言	31
4.2	材料と方法	31
4.2.1	材料	31
4.2.2	細胞培養	32
4.2.3	Real-time RT-PCR	33
4.2.4	Western blotting	34
4.2.5	siRNA の細胞導入	34

4.2.9	統計学的解析	35
4.3	結果	35
4.3.1	IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 mRNA 発現に対する Tpl2 阻害剤の効果	35
4.3.2	IL-1 $\beta$ 誘導性 ERK1/2 リン酸化に対する Tpl2 阻害剤の効果	35
4.3.3	IL-1 $\beta$ 誘導性 ERK1/2 リン酸化に対する Tpl2 ノックダウン の効果	36
4.3.4	Tpl2 ノックダウン細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 mRNA 発現の低下	36
4.4	考察	37
第5章	総括	46
	謝辞	49
	参考文献	50

## 第1章

### 序 論

炎症は、免疫系による生体に不可欠な防御機能である。炎症反応は細菌やウイルスなどの病原体感染、組織障害、毒物成分など様々な要因に対して引き起こされ、正常組織の恒常機能を維持している (Medzhitov, 2010 ; Ahmed, 2011)。炎症には、全身を循環している白血球、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、細胞外マトリクスなどが関与し、それぞれに単独に、あるいは共働して機能を担っている。生体局所に障害が生じると、血管から血液液性成分が浸出し、白血球も血管外へ遊走し障害部位へと移動する。このような反応の制御には、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が関わっている (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の1つである。IL-1 $\beta$  は、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 (Naoe et al., 2019)。病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns、PAMPs) と総称される細菌やウイルスの構成成分、ダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns、DAMPs) と呼ばれる体内成分が炎症刺激としてパターン認識受容体 (pattern-recognition receptors、PRRs) で認識されると、IL-1 $\beta$  の遺伝子発現は誘導される。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、前駆型 IL-1 $\beta$  は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、IL-1 $\beta$  は成熟型となって分泌される (Bent et al., 2018; Shao et al., 2015)。分泌された IL-1 $\beta$  は、標的となる細胞の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 (Gabay et al., 2010)。

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 (Kyriakis et al., 2012)。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、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 (Kyriakis et al., 2012)。

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する細胞である。機能として、収縮性や可動性を維持し、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は知られていた。しかし、近年、Toll 様受容体、抗菌性ペプチド、炎症性サイトカイン、ケモカイン、成長因子、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 (Bautista-Hernández et al., 2017)。

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における IL-1 $\beta$  刺激により惹起される細胞応答と細胞内シグナル伝達経路を検討した。

第2章では、イヌ皮膚由来線維芽細胞におけるインターロイキン-8 (IL-8) の発現と分泌に対する IL-1 $\beta$  の効果について検討した。IL-8 は、CXCL8 としても知られている CXC 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 (Lindley et al., 1988; Peveri et al., 1988; Baggiolini et al., 1992; Harada et al., 1994; Kany et al., 2019)。

第3章では、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 発現に関わる細胞内シグナル伝達として、MAP キナーゼ経路について注目し、特にその1つである ERK1/2 の関与を検討した。

第 4 章では、Cot としても知られているセリン/スレオニンリン酸化酵素であり、サイトカインを含む様々な刺激に応答して、炎症を含む細胞機能に関わると考えられている Tumor Progression Locus 2 (Tpl2) (Vougioukalaki et al., 2011; Xu et al., 2018) のイヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 発現への関与と ERK1/2 活性化への関与を検討した。



## 第2章

イヌ皮膚由来線維芽細胞における  $IL-1\beta$  誘導性  $IL-8$  の発現と分泌

## 2.1 緒言

インターロイキン-8 (IL-8) は、CXC ケモカインファミリーの一員であり、CXCL8 としても知られている。その役割の1つは、好中球などの自然免疫細胞を活性化し、炎症部位に動員することである (Baggiolini et al., 1992; Harada et al., 1994)[1,2]。また、IL-8 は、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も促進し、創傷治癒や炎症に関与することが知られている (Lindley et al., 1988; Peveri et al., 1988; Baggiolini et al., 1992; Kany et al., 2019) [1,3-5]。さらに、IL-8 は血管内皮細胞の増殖、成長、生存を促進し、血管新生にも関与している (Li et al., 2003; Rosenkilde et al., 2004) [6,7]。IL-8 は、最初はリポポリサッカライド (LPS) で刺激したヒト単球から精製された (Yoshimura et al., 1987; Walz et al., 1987)[8,9]。しかし、現在では、このケモカインは、線維芽細胞や内皮細胞のような非免疫細胞を含む様々な細胞で産生・分泌されることが知られている (Larsen et al., 1989; Strieter et al., 1989; Hoffmann et al., 2002) [10-12]。

IL-8 発現は、非刺激細胞ではほとんど認められないが、炎症性サイトカインを含む様々な刺激によって促進される (Hoffmann et al., 2002) [12]。炎症性サイトカインの1つである IL-1 $\beta$  は、炎症組織において他のサイトカインやケモカインの発現・分泌を促進し、急性および慢性炎症に関与する (Dinarello, 2011; Mantovani et al., 2019) [13,14]。様々な細胞において、IL-1 $\beta$  が IL-8 の発現と分泌を促進することが報告されている (Abruzzo et al., 1992; Rathanaswami et al., 1993; Sodin-Semrl et al., 2000; Nourbakhsh et al., 2001)[15-18]。

本章では、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-8 の発現と分泌に対する IL-1 $\beta$  の効果を検討した。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 材料

Dulbecco's Modified Eagle medium with 1 g/L glucose (DMEM) およびウシ胎児血清 (FBS) は富士フィルム和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。リコンビナントイヌ IL-1 $\beta$  は、Kingfisher Biotech, Inc. (Saint Paul, MN) から購入した。TRIzol は、Life Technologies Co. (Carlsbad, CA) から入手した。Thermal Cycler Dice Real Time System I、TP900 Dice Real Time v4.02B、SYBR Premix Ex Taq II、PrimeScript RT Master Mix および CELLBANKER 1 plus medium は TaKaRa Bio Inc. (Shiga, Japan) から入手した。イヌ IL-8 測定用 ELISA キットは R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) から購入した。凍結容器 (BICELL) は日本フリーザー (Tokyo, Japan) から、また、StatMate IV は ATMS (Tokyo, Japan) からそれぞれ購入した。

### 2.2.2 細胞培養

本研究は、日本大学動物実験倫理委員会 (AP13B051) の承認を得て行われた。健康なビーグル3頭 (オス、3歳) を株式会社日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入し、ケージ (高さ: 137 cm、幅: 80 cm、長さ: 86 cm) 内で飼育・維持した。実験食 TC- 2 (250g/頭; オリエンタル酵母工業株式会社) を1日1回、全ての試験動物に提供した。飼育施設内 (1日1回) および屋外 (月1回) で、いくつかのおもちゃを使用して犬を運動させた。飼育施設の物理的条件は1日1回モニターした。感染症予防のため、犬同士を隔離して飼育した。動物福祉を向上させ、不快感を最小限にするためにあらゆる努力を払った。この研究で使用された犬は、今後の研究に使用するために飼育を継続した。

皮膚由来線維芽細胞を作成するため、1%リドカインと 10 g/mL アドレナリンによる局所麻酔後、イヌ背部皮膚サンプルを採取した。処置後の痛みを和らげる

ため、酒石酸ブトルファノール (0.2 mg/kg) を静脈内投与した。イヌ皮膚線維芽細胞は、以前に記載された方法 (Tsuchiya et al., 2015; Nakano et al., 2018; Kitanaka et al., 2019a; 2019b) に若干の修正を加えた方法を用いて作成した。背部皮膚から採取したイヌの真皮を 3 mm<sup>2</sup> の切片にし、90 mm シャーレに入れた。付着した摘出物は、10% FBS 添加 DMEM を用いて、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C のインキュベーター内で静置培養し、週に 1 度培地交換を行った。その後、イヌ皮膚由来線維芽細胞を伸長細胞として得た。得られた細胞において、Netrin-1、Netrin-3、Ephrin-A3、Ephrin-A4、Semaphorin-4D の mRNA を発現し、走化性因子の mRNA 発現は低いことなどから皮膚由来線維芽細胞としての特徴を備えることを確認した (Tsuchiya et al., 2015)。細胞が 90~95%コンフルエンスに達した時点で、0.25% トリプシン-EDTA を用いて採取し、CELLBANKER 1 plus 培地を用いて 2×10<sup>6</sup> 個/500 μL の密度で懸濁し、滅菌した血清チューブに分注した。その後、チューブを凍結容器 BICELL に入れ、-80°C で凍結保存した。実験に使用する時は、BICELL 容器から血清チューブを取り出し、37°C のウォーターバスに浸した。解凍した細胞懸濁液を、10% FBS を含む DMEM が入った遠心チューブに移し、300×g で 3 分間遠心分離し、上清を除去した後、ペレットを 10%FBS 含有 DMEM に懸濁し、75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコに移した。その後、凍結保存前と同じ条件下で静置培養を行った。線維芽細胞は、約 90%コンフルエントに達した時点で 0.25% トリプシン-EDTA を用いて回収し、75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコあたり 1×10<sup>6</sup> 個の密度で播種した。実験には 4 継代後の線維芽細胞を使用し、1 頭の犬由来の細胞を用いた実験結果を 1 例とした。フラスコ当たり 1 × 10<sup>6</sup> 個となるよう播種し、凍結保存前と同じ条件で静置培養した。細胞は約 90%まで細胞を増殖させ、0.25% trypsin-EDTA を使用し回収した。

### 2.2.3 Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR は以前に報告された方法に従って行った (Tsuchiya et al., 2015; Nakano et al., 2018; Kitanaka et al., 2019a; 2019b)。培養イヌ皮膚線維芽細胞からの total RNA 抽出は、TRIzol を用い、メーカーの説明書に従って行った。RNA 濃度は 260 nm/280 nm の吸光度で分光光度計により測定された。一本鎖 cDNA の合成は、PrimeScript RT Master Mix を使用し、500 ng の total RNA を用いて行った。2  $\mu$ L の一本鎖 cDNA、SYBR Premix Ex Taq II およびイヌ IL-8 またはハウスキーピング遺伝子として TATA box binding protein (TBP) を標的とするプライマーを用いて、総反応量 25  $\mu$ L で行った。用いたプライマーの配列は表 2-1 に示す。ノーテンプレートコントロールまたはノー逆転写コントロールとして、それぞれ 2  $\mu$ L の RNase および DNA フリー水または 2  $\mu$ L の各 RNA サンプルを用いた。PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System II を使用し、95°C 30 秒の変性を 1 サイクル、95°C 5 秒の変性を 40 サイクル、60°C 30 秒のアニーリング/エクステンションを 1 サイクルで行った。結果は、Real-time RT-PCR 解析ソフトを用い、二次微分最大法、比較サイクル閾値 ( $\Delta\Delta C_t$ ) 法で解析した。内因性コントロールとして、同量の cDNA からの TBP の増幅を適用し、校正標準として、時間 0 のイヌ皮膚由来線維芽細胞からの cDNA 増幅を使用した。

### 2.2.4 IL-8 測定

イヌ皮膚由来線維芽細胞を 6 ウェル培養プレートに  $3.0 \times 10^5$  cells/well の密度で播種した。24 時間飢餓状態にした後、線維芽細胞を IL-1 $\beta$  で 0~24 時間処理し、培養液を回収した。培養液中の IL-8 濃度は、市販の ELISA キットを用いてアッセイした。

### 2.2.5 統計学的解析

統計解析は StatMate IV を用いて行い、すべての実験のデータは平均値±標準誤差として示した。時間経過研究およびその他の実験のデータは、それぞれ二元配置分散分析 (ANOVA) および一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を用いて分析した。ポストホック解析として Tukey's test を用いた。0.05 以下の *P* 値は統計的に有意であるとみなした。

## 2.3 結果

### 2.3.1 イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 分泌

イヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM の IL-1 $\beta$  にて 0-24 時間刺激し、培養液中に分泌された IL-8 濃度を測定した。図 2-1 に示すように、非刺激細胞からの IL-8 分泌は認められなかったが、IL-1 $\beta$  刺激細胞からは、時間依存的な IL-8 の分泌の増加が認められた。

### 2.3.2 イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 mRNA 発現

次に、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-8 mRNA の発現に対する IL-1 $\beta$  の効果を検討した。細胞を 100 pM の IL-1 $\beta$  で 0~24 時間刺激をすると、図 2-2a に示すように、IL-8 mRNA の発現は時間依存的に増加し、6 時間で到達し、その後減少した。一方、非刺激細胞においては、IL-8 mRNA 発現はほとんど認められなかった。

IL-1 $\beta$  の濃度を 0~200 pM と変化をさせてイヌ皮膚由来線維芽細胞を 6 時間刺激すると、図 2-2b に示すように、IL-8 mRNA 発現は IL-1 $\beta$  の用量に依存して増加し、50 pM 以上ではプラトーレベルに達した。これらのことから、IL-1 $\beta$  はイヌ皮膚由来線維芽細胞において、IL-8 の発現を介して分泌を誘発することが示

唆された。

## 2.4. 考察

本章では、イヌ皮膚由来線維芽細胞において、炎症性サイトカインの 1 つである IL-1 $\beta$  がケモカインの IL-8 の mRNA 発現とタンパク質分泌を促進することを示した。ヒトにおいては、慢性閉塞性肺疾患、高血圧、発がん、特発性肺線維症、慢性歯周炎などの多くの疾患に起因した IL-8 発現の上昇が認められている (Mavropoulou et al., 2016)[68]。イヌにおいても、自然発症の炎症性疾患やがん罹患した場合に、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 (Karlsson et al., 2012; Haas et al., 2016; Mei et al., 2018; Avazi et al., 2019; Gelaleti et al., 2012; Mavropoulou et al., 2016; El-Hadi et al., 2012) [63-69]。また、実験的には LPS を投与して作成した炎症モデルのイヌでも観察されている (Floras et al., 2014; Karlsson et al., 2015)[70,71]。細胞実験においても、イヌの滑膜線維芽細胞や子宮内膜間質細胞を LPS と炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) で刺激すると、IL-8 の mRNA の発現が増加することが報告されている (Benakanakere et al., 2016; Namba et al., 2017)[54, 72]。これらの報告は、IL-1 $\beta$  によって誘導された IL-8 が組織的および局所的な炎症に関与していることを強く示唆している。そのため、本章の結果からは、IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 がイヌ皮膚炎症に深く関わる可能性が考えられる。

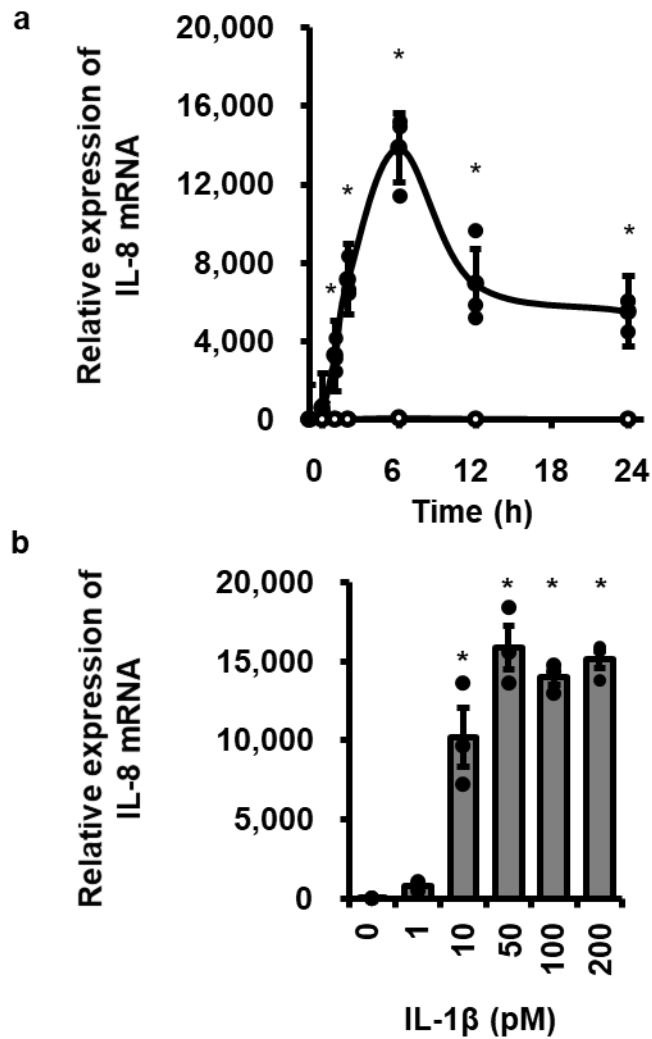


図 2-1. イヌ皮膚線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 タンパク質の放出  
 イヌ皮膚由来線維芽細胞を IL-1 $\beta$  (100 pM) の存在下 (●) および非存在下 (○) で 0~24 時間で処理後、培養液中に分泌された IL-8 濃度を測定した。IL-1 $\beta$  により IL-8 分泌は時間依存的に促進された。結果は、3 回の独立した実験結果の平均  $\pm$  標準誤差を示す。\*  $P < 0.05$ 。



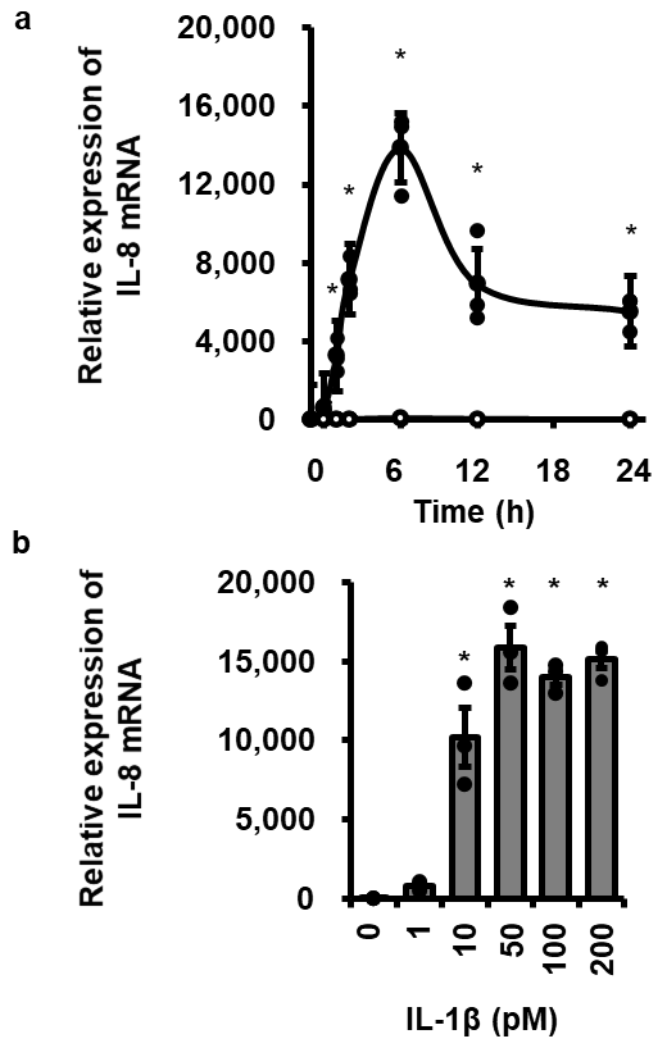


図 2-2. イヌ皮膚線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 mRNA 発現

(a)イヌ皮膚由来線維芽細胞を IL-1 $\beta$  (100 pM) の存在下 (●) および非存在下 (○) で 0~24 時間で処理後、IL-8 mRNA 発現を real-time PCR にて測定した。IL-1 $\beta$  により IL-8 mRNA 発現は時間依存的に促進された。(b)イヌ皮膚由来線維芽細胞を 0-200 pM IL-1 $\beta$  (100 pM) で 6 時間で刺激した。IL-8 mRNA 発現は IL-1 $\beta$  の濃度に依存して促進された。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。\*  $P < 0.05$ 。

**表 2-1. Primer sequences for RT-qPCR**

Gene Name	Gene bank ID	Primer sequences
<i>IL-8</i>	NM_001003200.1	F: 5'-CACCTCAAGAACATCCAGAGCT-3' R: 5'- CAAGCAGAACTGAACTACCATCG-3'
<i>TBP</i>	XM_863452	F: 5'-ACTGTTGGTGGGTCAGCACAAG-3' R: 5'-ATGGTGTGTACGGGAGCCAAG-3'

## 第3章

イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 発現への

MAP キナーゼの関与

### 3.1 緒言

Mitogen-activated protein kinases (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る。IL-1 $\beta$  や腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などの炎症性サイトカインを含む様々な刺激によって活性化される (Kyriakis et al., 2012)。哺乳類には、Extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2)、c-Jun N-terminal kinases (JNK)、p38 の 3 つの主要な MAP キナーゼが存在する (Johnson et al., 2002; Kyriakis [19,20]。ヒトにおいては、様々な細胞において MAP キナーゼの活性化が IL-1 $\beta$ -誘導性の IL-8 の発現に関与することが報告されている (Carroll et al., 2005; Sooranna et al., 2005; Rasmussen et al., 2008; Yang et al., 2008; Liu et al., 2014; Ou et al., 2016)。しかし、どの MAP キナーゼの活性化に関わるかは細胞の種類により異なっている。ヒト気管支上皮細胞 (Carroll et al., 2005) と子宮筋腫細胞 (Sooranna et al., 2005) では p38 と ERK が、Hela 細胞 (Yang et al., 2008) とヒト Muller 細胞 (Liu et al., 2014) では ERK と p38 の両方が、HepG2 細胞 (Rasmussen et al., 2008) とヒト卵巣顆粒膜細胞 (Ou et al., 2016) では JNK と p38 の両方が IL-1 $\beta$  刺激により活性化され、IL-8 の発現が引き起こされる。

前章ではイヌ皮膚由来線維芽細胞において IL-1 $\beta$  刺激が IL-8 発現を促進することを示した。そこで、本章では、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 発現に関わる 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

Dulbecco's Modified Eagle medium with 1 g/L glucose (DMEM) およびウシ胎児血清 (FBS) は富士フィルム和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。リコンビナントイヌ IL-1 $\beta$  は、Kingfisher Biotech, Inc. (Saint Paul, MN) から

購入した。TRIzol は、Life Technologies Co. (Carlsbad, CA) から入手した。Thermal Cycler Dice Real Time System I、TP900 Dice Real Time v4.02B、SYBR Premix Ex Taq II、PrimeScript RT Master Mix および CELLBANKER 1 plus medium は TaKaRa Bio Inc. (Shiga, Japan) から入手した。FR180204、SP600125、SB239063、SKF86002、抗  $\beta$ -actin マウスモノクローナル抗体 (AC74、Cat# A5441、RRID : AB\_476744)、ERK1 および ERK2 の siRNA、および scramble siRNA は Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO) から購入した。ラット total-ERK1/2 (t-ERK1/2, 137F5) およびヒト phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2, D13.14.4E) に対するウサギモノクローナル抗体は、Cell Signaling Technology Japan (Tokyo, Japan) より購入した。Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウスおよび抗ウサギ IgG 抗体、ECL Western Blotting Analysis System、ImageQuant LAS 4000 mini は GE Healthcare (Piscataway, NJ) より購入した。Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes と Mini-PROTEAN TGX gel は Bio-Rad (Hercules, CA) から入手した。Complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture と Block Ace は Roche (Mannheim, Germany) から購入した。凍結容器 (BICELL) は日本フリーザー (Tokyo, Japan) から、また、StatMate IV は ATMS (Tokyo, Japan) からそれぞれ購入した。

### 3.2.2 細胞培養

第 2 章に記載した方法で調整したイヌ皮膚由来線維芽細胞を、BICELL 容器から血清チューブを取り出し、37°C のウォーターバスに浸した。解凍した細胞懸濁液を、10% FBS を含む DMEM が入った遠心チューブに移し、300×g で 3 分間遠心分離し、上清を除去した後、ペレットを 10%FBS 含有 DMEM に懸濁し、75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコに移した。その後、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C のインキュベーター内で静置培養し、週に 1 度培地交換を行った。線維芽細胞は、約 90%コンフルエ

ントに達した時点で 0.25% トリプシン-EDTA を用いて回収し、75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコあたり 1×10<sup>6</sup> 個の密度で播種した。実験には 4 継代後の線維芽細胞を使用し、1 頭の犬由来の細胞を用いた実験結果を 1 例とした。

### 3.2.3 Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR は第 2 章に示した方法で行った。線維芽細胞からの total RNA 抽出は、TRIzol を用い、メーカーの説明書に従って行った。RNA 濃度は 260 nm/280 nm の吸光度で分光光度計により測定された。一本鎖 cDNA の合成は、PrimeScript RT Master Mix を使用し、500 ng の total RNA を用いて行った。

2 μL の一本鎖 cDNA、SYBR Premix Ex Taq II およびイヌ IL-8 またはハウスキーピング遺伝子として TATA box binding protein (TBP) を標的とするプライマーを用いて、総反応量 25 μL で行った。使用したプライマーの配列は第 2 章の表 2-1 に示したものである。ノーテンプレートコントロールまたはノー逆転写コントロールとして、それぞれ 2 μL の RNase および DNA フリー水または 2 μL の各 RNA サンプルを用いた。PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System II を使用し、95°C 30 秒の変性を 1 サイクル、95°C 5 秒の変性を 40 サイクル、60°C 30 秒のアニーリング/エクステンションを 1 サイクルで行った。結果は、Real-time RT-PCR 解析ソフトを用い、二次微分最大法、比較サイクル閾値 ( $\Delta\Delta C_t$ ) 法で解析した。内因性コントロールとして、同量の cDNA からの TBP の増幅を適用し、校正標準として、時間 0 のイヌ皮膚由来線維芽細胞からの cDNA 増幅を使用した。

### 3.2.4 Western blotting

Western blotting は、以前に報告された方法に従って行った (Tsuchiya et al., 2015; Namba et al., 2017; Nakano et al., 2018; Kitanaka et al., 2019a; 2019b; Nakano et al., 2020a; 2020b) [47-59]。線維芽細胞を、1 mM PMSF、10 mM フッ化ナトリウムおよび Complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture を含む 20 mM HEPES バッファー (pH 7.4) で溶解した。タンパク質濃度を Bradford 法 (Bradford, 1976) で測定し、使用濃度に調整した。Laemmli サンプルバッファーを加えて 98°C で 5 分間煮沸後、抽出したタンパク質サンプルを 12% Mini-PROTEAN TGX ゲルにロードし、電気泳動で分離した。次に、分離したタンパク質を PVDF 膜に転写した。その後、その PVDF 膜を Block Ace で 50 分間室温処理した後、一次抗体 [p-ERK1/2 (1:1,000), t-ERK1/2 (1:1,000),  $\beta$ -actin (1:10,000)] と 120 分間室温でインキュベートした。洗浄後、膜を HRP 標識抗ウサギまたは抗マウス IgG (1:10,000) と共に室温で 90 分間インキュベートした。ECL Western Blotting Analysis System を用いて免疫反応を検出し、ImageQuant LAS 4000 mini を用いて膜の化学発光シグナルを測定した。

### 3.2.5 siRNA の細胞導入

siRNA の細胞への導入は、以前に報告した方法を用いて実施した (Tsuchiya et al., 2015; Namba et al., 2017; Nakano et al., 2018; Kitanaka et al., 2019a; 2019b; Nakano et al., 2020a; 2020b)。イヌ皮膚由来線維芽細胞を  $1 \times 10^5$  cells/35 mm ディッシュまたは  $5 \times 10^5$  cells/90 mm ディッシュの密度で播種し、10  $\mu$ L/mL Lipofectamine 2000 および ERK1 または ERK2 の 100 nM siRNA、または scramble siRNA を含む Opti-MEM を用いて 6 時間培養して細胞への導入を行った。用いた siRNA の配列は表 3-1 に示す。細胞への導入後、培地を 10% FBS を含む DMEM に変更し、

5日間培養を継続した。培養は5%CO<sub>2</sub>濃度、37°Cのインキュベーター内で行った。

### 3.2.6 統計解析

前章と同様に、統計解析はStatMate IVを用いて行い、すべての実験のデータは平均値±標準誤差として示した。時間経過研究およびその他の実験のデータは、それぞれ二元配置分散分析(ANOVA)および一元配置分散分析(one-way ANOVA)を用いて分析した。ポストホック解析としてTukey's testを用いた。0.05以下のP値は統計的に有意であるとみなした。

## 3.3 結果

### 3.3.1 IL-1 $\beta$ 誘導性IL-8 mRNA発現に対するMAPキナーゼ阻害剤の効果

イヌ皮膚由来線維芽細胞のIL-1 $\beta$ 誘導性IL-8 mRNA発現におけるMAPキナーゼシグナル伝達経路の関与を調べるため、最初にMAPキナーゼ阻害剤を用いて検討した。線維芽細胞をERK1/2阻害剤FR180204(25  $\mu$ M)、JNK阻害剤SP600125(10  $\mu$ M)、p38阻害剤SB239063(20  $\mu$ M)またはSKF86002(20  $\mu$ M)で1時間前処理し、100 pM IL-1 $\beta$ で6時間刺激後、Real-time PCRでIL-8 mRNA発現を検討した。図3-1に示すように、ERK1/2阻害剤は有意にIL-8 mRNA発現に対するIL-1 $\beta$ の効果を抑制したが、JNK阻害剤およびp38阻害剤には有意な効果は認められなかった。

### 3.3.2 イヌ皮膚線維芽細胞におけるIL-1 $\beta$ 誘導性ERK1/2のリン酸化

次に、イヌ皮膚線維芽細胞におけるIL-1 $\beta$ によるERK1/2の活性化をリン酸化の変化により確認をした。線維芽細胞を100 pMのIL-1 $\beta$ で0-60分間刺激する



と、図 3-2a および 3-2b に示すように、刺激後 5-15 分に ERK1/2 のリン酸化が観察され、IL-1 $\beta$  による ERK1/2 の一過性の活性化が認められた。

### 3.3.3 イヌ皮膚線維芽細胞における ERK1/2 阻害剤による IL-1 $\beta$ 誘導性 ERK1/2 リン酸化の抑制

ERK 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) で 1 時間前処理した細胞では、図 3-3a および 3-3b に示すように、IL-1 $\beta$  による ERK1/2 のリン酸化は有意に減少した。これらの結果から、イヌ皮膚由来線維芽細胞においては、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。

### 3.3.4 ERK1 および ERK2 ノックダウン線維芽細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 mRNA 発現

次に、IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 mRNA 発現に対する ERK1 および ERK2 のそれぞれの関与について、siRNA を用いてノックダウン細胞を作成して検討した。図 3-4 に示すように、ERK1 および ERK2 の siRNA を導入した細胞においては、対照とした Scramble RNA 導入細胞で認められる ERK1 または ERK2 タンパク質の発現は有意に抑えられ、それぞれがノックダウンされたことが確認された。

そこで、ERK1 および ERK2 siRNA を導入した細胞における IL-8 mRNA 発現に対する IL-1 $\beta$  の効果を検討した。図 3-5 に示すように、対照とした Scramble RNA を導入したイヌ皮膚由来線維芽細胞では IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 mRNA 発現が認められたのに対して、ERK1 または ERK2 siRNA を導入した細胞では IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 mRNA 発現は有意に減少した。ERK1 と ERK2 の両方の siRNA を導入した細胞における IL-1 $\beta$  誘導 IL-8 mRNA 発現は、ERK1 または ERK2 siRNA 導入細胞での結果と比べて有意な差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いて、IL-1 $\beta$  は ERK1 および ERK2 の活性化を介して IL-8 mRNA の発現を誘導していることが示された。

### 3.4 考察

イヌ皮膚由来線維芽細胞では、IL-1 $\beta$  刺激が ERK1/2 のリン酸化を惹起することから、IL-1 $\beta$  による ERK1/2 シグナル経路の活性化が示された。ERK1/2 に対する特異的薬理的阻害剤がこの IL-1 $\beta$  による ERK1/2 の活性化を抑制し、同時に IL-1 $\beta$  刺激による IL-8 mRNA 発現を抑制したことは、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 発現には ERK1/2 シグナル経路が関与していることを強く示唆している。さらに、ERK1 または ERK2 をノックダウンしたイヌ皮膚由来線維芽細胞において IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 mRNA 発現を検討し、IL-1 $\beta$  による IL-8 mRNA の発現に ERK1/2 が関わることを明確にした。

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、刺激を受けると一般には共に活性化すると考えられている (El-Hadi et al., 2012; Roskoski, 2012) [69,73]。一方で、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の Matrix metalloproteinase-3 発現 (Kitanaka et al., 2019b)[50]、イヌ滑膜由来線維芽細胞にける TNF- $\alpha$  誘導性 IL-8 発現 (Namba et al., 2017)[54] 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 (Kitanaka et al., 2017)[53]において、ERK アイソフォーム特異的 siRNA を導入して作成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。本章では、ERK1 および ERK2 を共にノックダウンした細胞を用いて検討したところ、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。本章の結果からは、様々な組織で示されているように、イヌ皮膚

由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 発現には、ERK1 経路と ERK2 経路が機能的に重複していると考えられる。

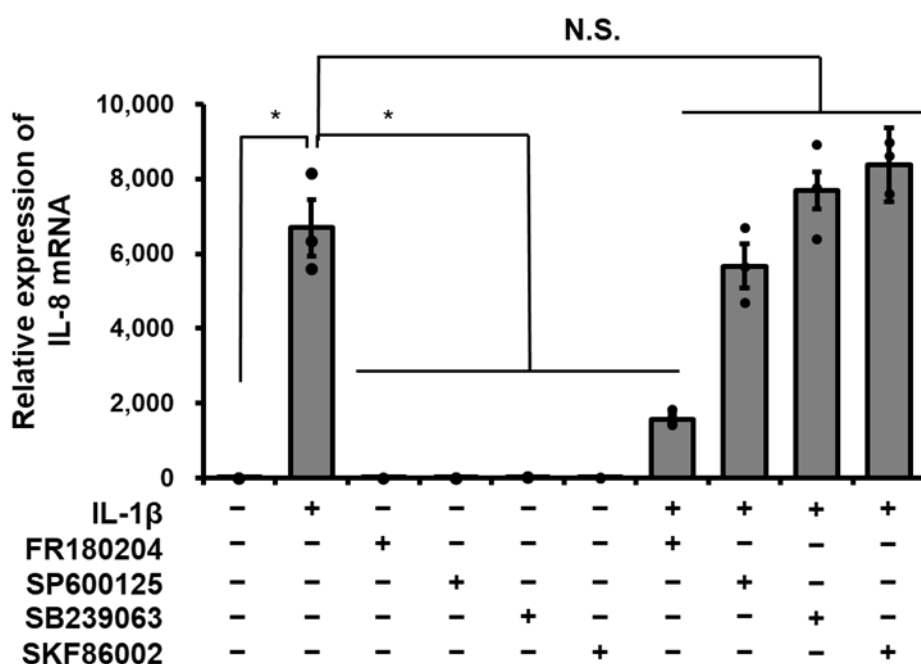


図 3-1. イヌ皮膚線維芽細胞における IL-1β 誘導性 IL-8 mRNA 発現に対する MAP キナーゼ阻害剤の効果

イヌ皮膚由来線維芽細胞を ERK1/2 阻害剤 FR180204 (25 μM)、JNK 阻害剤 SP600125 (10 μM)、p38 阻害剤 SB239063 (20 μM) または SKF86002 (20 μM) で 1 時間前処理した後、100 pM IL-1β の存在下または非存在下で 6 時間インキュベート後、Real-time PCR で IL-8 mRNA 発現を検討した。ERK1/2 阻害剤 FR180204 のみ有意に IL-1β 誘導性 IL-8 mRNA 発現を抑制した。結果は、3 回の独立した実験結果の平均 ± 標準誤差を示す。\*  $P < 0.05$ 。

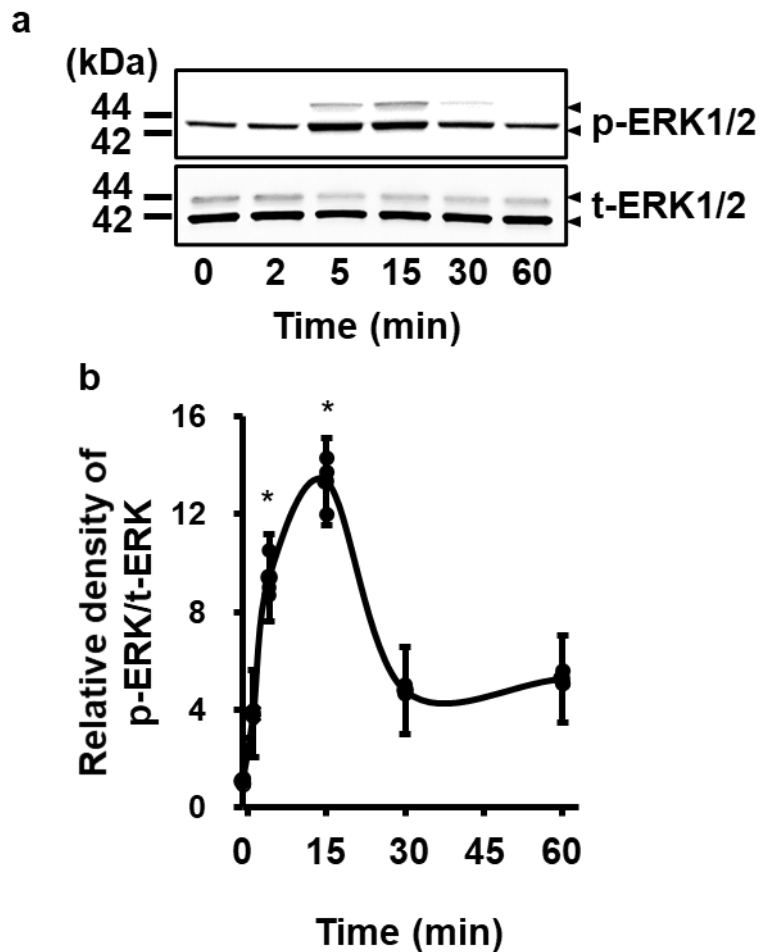


図 3-2. イヌ皮膚線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 ERK1/2 のリン酸化

イヌ皮膚由来線維芽細胞を IL-1 $\beta$  (100 pM)で 0~60 分刺激後、リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) および total-ERK1/2 (t-ERK1/2) を Western blotting により検出した。IL-1 $\beta$  により時間依存的に一過性のリン酸化が促進された。(a) 代表的な Western blotting の結果。(b) 結果を[(p-ERK1/2)/(t-ERK1/2)]で数値化し、0 time を 1 としたときの値。3 回の独立した実験結果 の平均  $\pm$  標準誤差を示す。\*  $P < 0.05$ 。

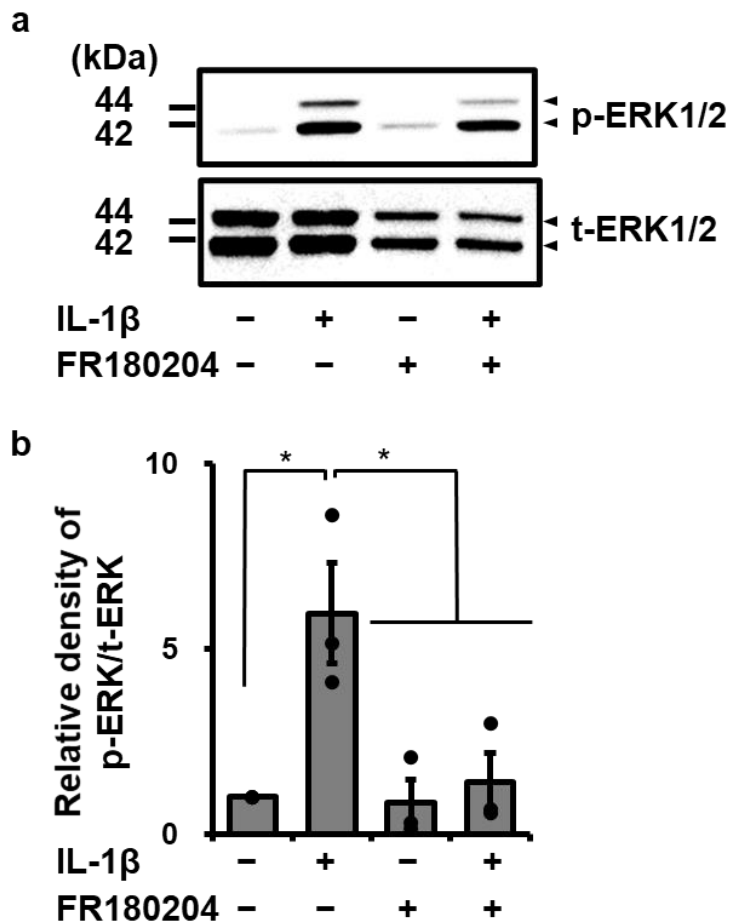


図3-3. イヌ皮膚線維芽細胞における ERK1/2 阻害剤による IL-1 $\beta$  誘導性 ERK1/2 リン酸化の抑制

イヌ皮膚由来線維芽細胞を ERK1/2 阻害剤 FR180204 (25  $\mu$ M) で 1 時間前処理した後、100 pM IL-1 $\beta$  の存在下または非存在下で 15 分間インキュベート後、リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) および total-ERK1/2 (t-ERK1/2) を Western blotting により検出した。ERK1/2 阻害剤 FR180204 により有意に IL-1 $\beta$  誘導性 ERK1/2 リン酸化は抑制された。(a) 代表的な Western blotting の結果。(b) 結果を [(p-ERK1/2)/(t-ERK1/2)] で数値化し、IL-1 $\beta$  および阻害剤の非存在下を 1 としたときの値。3 回の独立した実験結果 の平均  $\pm$  標準誤差を示す。\*  $P < 0.05$ 。

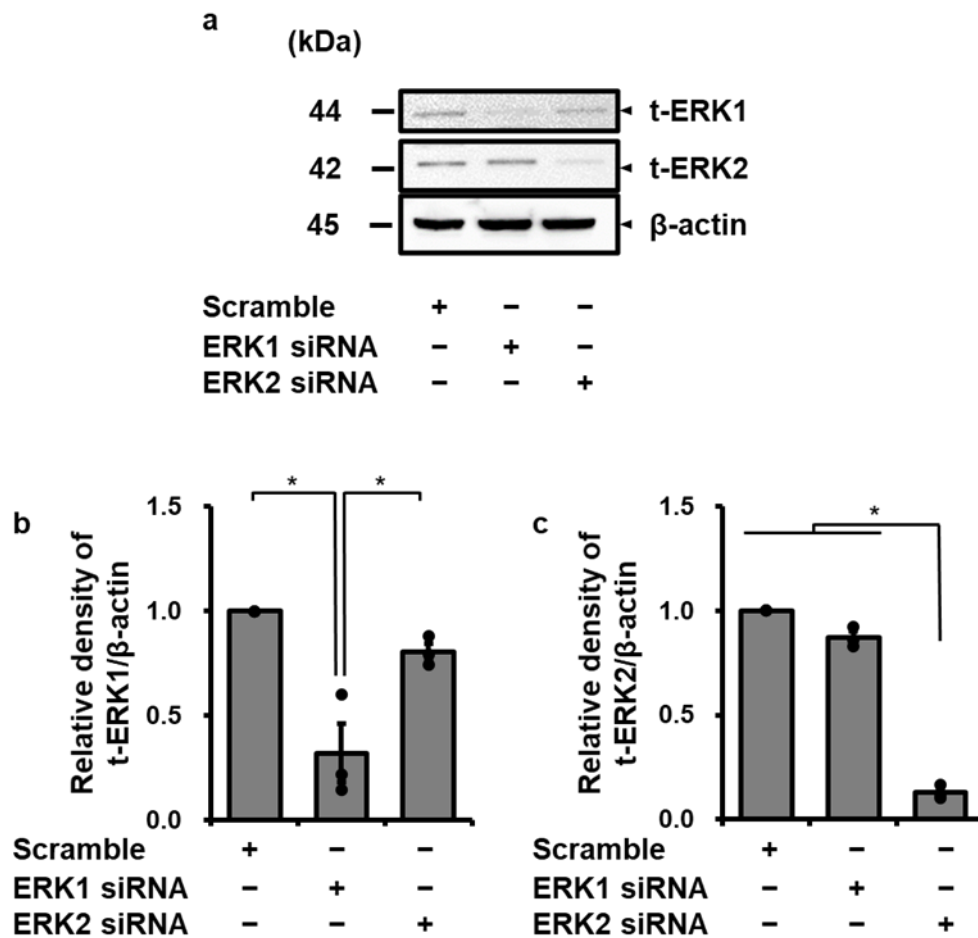


図 3-4. イヌ皮膚線維芽細胞における ERK1 および ERK2 ノックダウン

イヌ皮膚由来線維芽細胞に ERK1 または ERK2 の siRNA を、また、対照として Scramble RNA 導入し、導入細胞における ERK1 または ERK2 タンパク質発現を Western blotting にて検出した。内部標準タンパク質として  $\beta$ -actin を検出した。ERK1 または ERK2 の siRNA 導入によりそれぞれがノックダウンされたことが確認された。(a) 代表的な Western blotting の結果。(b, c) 結果を[t-ERK1/ $\beta$ -actin](b)または[t-ERK2/ $\beta$ -actin](c)で数値化し、Scramble RNA 導入細胞を 1 としたときの値。3 回の独立した実験結果の平均  $\pm$  標準誤差を示す。\*  $P < 0.05$ 。

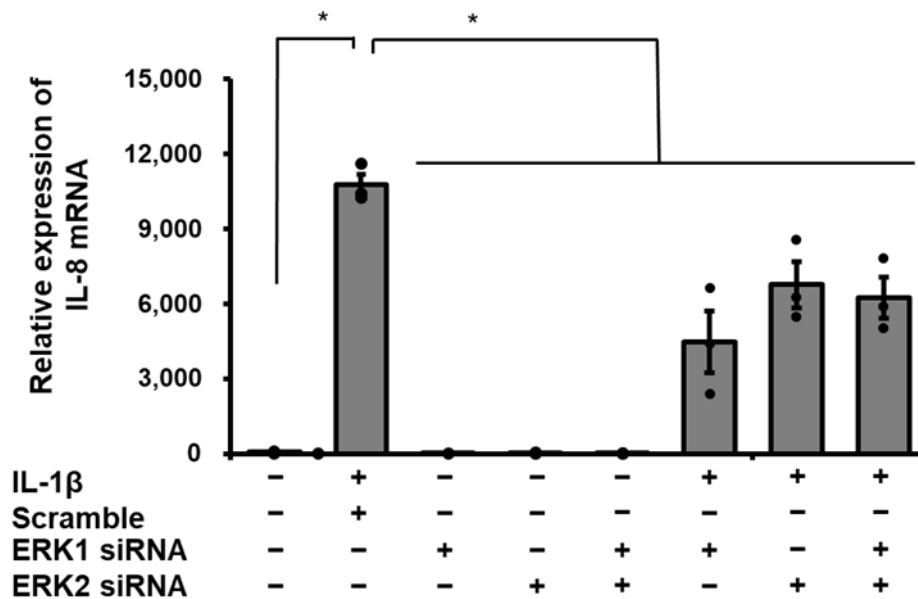


図 3-5. ERK1 および ERK2 ノックダウン線維芽細胞における IL-1β 誘導性 IL-8 mRNA 発現

siRNA 導入により作成された ERK1、ERK2、ERK1/ERK2 ノックダウンイヌ皮膚由来線維芽細胞を IL-1β (100 pM) の存在下または非存在下で 6 時間インキュベート後に Real-time RT-PCR にて IL-8 mRNA 発現を検討した。対照として Scramble RNA 導入細胞を用いた。ERK1、ERK2、ERK1/ERK2 ノックダウン細胞において IL-1β 誘導性 IL-8 mRNA 発現は有意に減少した。結果は、3 回の独立した実験結果の平均 ± 標準誤差を示す。\*  $P < 0.05$ 。



表 3-1. 細胞導入した siRNA 配列

<b>Gene Name</b>	<b>GenBank ID</b>	<b>siRNA sequences</b>
<i>ERK1</i>	NM_001252035.1	CCAATGTGCTCCACCGGGA
<i>ERK2</i>	NM_001110800.1	CCCAAATGCTGACTCGAAA

## 第4章

イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8

発現への Tpl2 の関与

## 4.1 緒言

Tumor Progression Locus 2 (Tpl2) は、Cot としても知られているセリン/スレオニンリン酸化酵素であり、自然免疫や適応免疫、炎症に関与する MAP3 キナーゼファミリーのメンバーである (Gantke et al., 2012; Vougioukalaki et al., 2012; Xu et al., 2018)[27-29]。Tpl2 は、サイトカインを含む様々な刺激に応答して、細胞機能に関わると考えられている (Das et al., 2005; Gantke et al., 2012; Vougioukalaki et al., 2012; Xu et al., 2018) [27-30]。マクロファージや好中球などの免疫系細胞における Tpl2 の役割は報告されているが、線維芽細胞などにおける Tpl2 の役割は不明な点が残されている (Acuff et al., 2017; Senger et al., 2017; Xu et al., 2018; Zarrin et al., 2021)[31-34]。

ヒトの単球やマウスマクロファージにおいて Tpl2 が炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  刺激による細胞応答に関与することが報告されている (Hall et al., 2007; Schultz et al., 2011)[39,75]。また、Tpl2 は MAP キナーゼシグナル伝達系の上流に位置し、ERK や p38 を調節して炎症反応に関与することが報告されている (Das et al., 2005; Hall et al., 2007; Gantke et al., 2012; Vougioukalaki et al., 2012; Xu et al., 2018) [27-30, 75]。前章では、イヌ皮膚由来線維芽細胞において、IL-1 $\beta$  刺激が ERK1/2 を活性化して IL-8 発現に関与することを明らかにした。そこで、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-8 発現への関与と ERK1/2 活性化の関与について検討した。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 材料

Dulbecco's Modified Eagle medium with 1 g/L glucose (DMEM) およびウシ胎児血清 (FBS) は富士フィルム和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。

リコンビナントイヌ IL-1 $\beta$  は、Kingfisher Biotech, Inc. (Saint Paul, MN) から購入した。Lipofectamine 2000、Opti-MEM および TRIzol は、Life Technologies Co. (Carlsbad, CA) から入手した。Thermal Cycler Dice Real Time System I、TP900 Dice Real Time v4.02B、SYBR Premix Ex Taq II、PrimeScript RT Master Mix および CELLBANKER 1 plus medium は TaKaRa Bio Inc. (Shiga, Japan) から入手した。Tpl2 kinase inhibitor II は Calbiochem (San Diego, CA) より入手した。抗  $\beta$ -actin マウスモノクローナル抗体 (AC74、Cat# A5441、RRID : AB\_476744)、Tpl2 siRNA、および scramble siRNA は Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO) から購入した。ラット total-ERK1/2 (t-ERK1/2, 137F5) およびヒト phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2, D13.14.4E) に対するウサギモノクローナル抗体は、Cell Signaling Technology Japan (Tokyo, Japan) より購入した。Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウスおよび抗ウサギ IgG 抗体、ECL Western Blotting Analysis System、ImageQuant LAS 4000 mini は GE Healthcare (Piscataway, NJ) より購入した。Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes と Mini-PROTEAN TGX gel は Bio-Rad (Hercules, CA) から入手した。Complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture と Block Ace は Roche (Mannheim, Germany) から購入した。凍結容器 (BICELL) は日本フリーザー (Tokyo, Japan) から、また、StatMate IV は ATMS (Tokyo, Japan) からそれぞれ購入した。

#### 4.2.2 細胞培養

第 2 章および第 3 章に記載した方法で調整したイヌ皮膚由来線維芽細胞を、BICELL 容器から血清チューブを取り出し、37°C のウォーターバスに浸した。解凍した細胞懸濁液を、10% FBS を含む DMEM が入った遠心チューブに移し、300 $\times$ g で 3 分間遠心分離し、上清を除去した後、ペレットを 10%FBS 含有 DMEM

に懸濁し、75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコに移した。その後、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C のインキュベーター内で静置培養し、週に 1 度培地交換を行った。線維芽細胞は、約 90% コンフルエントに達した時点で 0.25% トリプシン-EDTA を用いて回収し、75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコあたり 1×10<sup>6</sup> 個の密度で播種した。実験には 4 継代後の線維芽細胞を使用し、1 頭の犬由来の細胞を用いた実験結果を 1 例とした。

#### 4.2.3 Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR は第 2 章および第 3 章に示した方法で行った。線維芽細胞からの total RNA 抽出は、TRIzol を用い、メーカーの説明書に従って行った。RNA 濃度は 260 nm/280 nm の吸光度で分光光度計により測定された。一本鎖 cDNA の合成は、PrimeScript RT Master Mix を使用し、500 ng の total RNA を用いて行った。2 μL の一本鎖 cDNA、SYBR Premix Ex Taq II およびイヌ IL-8 またはハウスキーピング遺伝子として TATA box binding protein (TBP) を標的とするプライマーを用いて、総反応量 25 μL で行った。使用したプライマーの配列は第 2 章の表 2-1 に示したものである。ノーテンプレートコントロールまたはノー逆転写コントロールとして、それぞれ 2 μL の RNase および DNA フリー水または 2 μL の各 RNA サンプルを用いた。PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System II を使用し、95°C 30 秒の変性を 1 サイクル、95°C 5 秒の変性を 40 サイクル、60°C 30 秒のアニーリング/エクステンションを 1 サイクルで行った。結果は、Real-time RT-PCR 解析ソフトを用い、二次微分最大法、比較サイクル閾値 ( $\Delta\Delta Ct$ ) 法で解析した。内因性コントロールとして、同量の cDNA からの TBP の増幅を適用し、校正標準として、時間 0 のイヌ皮膚由来線維芽細胞からの cDNA 増幅を使用した。

#### 4.2.4 Western blotting

Western blotting は、第 3 章に記載した方法に従って行った。線維芽細胞を、1 mM PMSF、10 mM フッ化ナトリウムおよび Complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture を含む 20 mM HEPES バッファー (pH 7.4) で溶解した。タンパク質濃度を Bradford 法 (Bradford, 1976)[61] で測定し、使用濃度に調整した。Laemmli サンプルバッファーを加えて 98°C で 5 分間煮沸後、抽出したタンパク質サンプルを 12% Mini-PROTEAN TGX ゲルにロードし、電気泳動で分離した。次に、分離したタンパク質を PVDF 膜に転写した。その後、その PVDF 膜を Block Ace で 50 分間室温処理した後、一次抗体 [Tpl2 (1:1,000),  $\beta$ -actin (1:10,000)] と 120 分間室温でインキュベートした。洗浄後、膜を HRP 標識抗ウサギまたは抗マウス IgG (1:10,000) と共に室温で 90 分間インキュベートした。ECL Western Blotting Analysis System を用いて免疫反応を検出し、ImageQuant LAS 4000 mini を用いて膜の化学発光シグナルを測定した。

#### 4.2.5 siRNA の細胞導入

siRNA の細胞への導入は、第 3 章に記載した方法を用いて実施した。イヌ皮膚由来線維芽細胞を  $1 \times 10^5$  cells/35 mm ディッシュまたは  $5 \times 10^5$  cells/90 mm ディッシュの密度で播種し、10  $\mu$ L/mL Lipofectamine 2000 および ERK1、ERK2、または Tpl2 の 100 nM siRNA、または scramble siRNA を含む Opti-MEM を用いて 6 時間培養して細胞への導入を行った。ERK1 と ERK1 の siRNA の配列は第 3 章の表 3-1 に示したものを、また、Tpl2 の siRNA の配列は表 4-1 に示すものを用いた。細胞への導入後、培地を 10% FBS を含む DMEM に変更し、5 日間培養を継続した。培養は 5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C のインキュベーター内で行った。

#### 4.2.6 統計解析

前章までと同様に、統計解析は StatMate IV を用いて行い、すべての実験のデータは平均値  $\pm$  標準誤差として示した。時間経過研究およびその他の実験のデータは、それぞれ二元配置分散分析 (ANOVA) および一元配置分散分析 (One-way ANOVA) を用いて分析した。ポストホック解析として Tukey's test を用いた。0.05 以下の *P* 値は統計的に有意であるとみなした。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 mRNA 発現に対する Tpl2 阻害剤の効果

イヌ皮膚由来線維芽細胞の IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 mRNA における Tpl2 の関与を調べるため、Tpl2 阻害剤を用いて検討した。線維芽細胞を Tpl2 阻害剤である Tpl2 kinase inhibitor II (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理し、100 pM IL-1 $\beta$  で 6 時間刺激後、Real-time PCR で IL-8 mRNA 発現を検討した。図 4-1 に示すように、Tpl2 阻害剤は有意に IL-1 $\beta$  による IL-8 mRNA 発現を抑制した。この結果は、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 発現に Tpl2 が関わっていることを示唆している。

#### 4.3.2 IL-1 $\beta$ 誘導性 ERK1/2 リン酸化に対する Tpl2 阻害剤の効果

第 3 章で明らかにしたように、IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 mRNA 発現には ERK1/2 の活性化が関わっている。そこで、IL-1 $\beta$  による ERK1/2 活性化に対する Tpl2 の関与を、Tpl2 阻害剤を用いて検討した。イヌ皮膚線維芽細胞を Tpl2 阻害剤である Tpl2 kinase inhibitor II (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理し、100 pM IL-1 $\beta$  で 15 分間刺激後、Western blotting で ERK1/2 のリン酸化を検討した。図 4-2 に示すように、Tpl2 阻害剤は有意に IL-1 $\beta$  による ERK1/2 のリン酸化を抑制した。この結果は、イヌ

皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 発現に関わる ERK1/2 の活性化の上流で Tpl2 が関わっていることを示唆している。

#### 4.3.3 IL-1 $\beta$ 誘導性 ERK1/2 リン酸化に対する Tpl2 ノックダウンの効果

IL-1 $\beta$  誘導性の ERK1/2 活性化を介した IL-8 発現における Tpl2 の役割を確認するために、次に Tpl2 siRNA を用いて Tpl2 ノックダウンイヌ皮膚由来線維芽細胞を作成し、検討した。

図 4-3 に示すように、イヌ皮膚由来線維芽細胞に 2 種類の Tpl2 siRNA を導入したところ、対照として用いた Scramble RNA 導入細胞で認められた Tpl2 タンパク質発現が優位に減少しており、Tpl2 ノックダウン細胞であることが示された。

この 2 種類の Tpl2 ノックダウンしたイヌ皮膚由来線維芽細胞を 100 pM の IL-1 $\beta$  で 15 分間刺激すると、図 4-4 に示すように、対照である Scramble RNA 導入細胞において認められた IL-1 $\beta$  誘導性の ERK1/2 のリン酸化は有意に低下した。これらのことにより、Tpl2 が IL-1 $\beta$  誘導性の ERK1/2 の活性化の制御に関わることが明らかとなった。

#### 4.3.4 Tpl2 ノックダウン細胞における IL-1 $\beta$ 誘導性 IL-8 mRNA 発現の低下

Tpl2 siRNA 導入細胞において IL-1 $\beta$  による ERK1/2 の活性化が認められたことから、それに共役した IL-8 mRNA 発現についても検討を行った。図 4-5 に示すように、対照とした Scramble RNA の導入細胞において認められた IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 mRNA 発現は、Tpl2 siRNA を導入にした細胞においては有意に減少した。以上のことは、IL-1 $\beta$  刺激されたイヌ皮膚由来線維芽細胞においては、Tpl2 は ERK1/2 の活性化を介した IL-8 発現の調節に関わることを示唆している。



#### 4.4 考察

本章では、Tpl2 阻害剤で前処理した細胞において IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 mRNA 発現が抑えられることから、IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 発現調節に Tpl2 が関わることを示唆された。そこで、2 種類の Tpl2 siRNA を用いてノックダウン細胞を作成し、イヌ皮膚由来線維芽細胞において IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 発現調節に Tpl2 が関わることを明らかにした。

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 (Dumitru et al., 2000)、炎症性腸疾患 (Lawrenz et al., 2012)、実験的自己免疫性脳脊髄炎における多発的硬化症 (Sriskantharajah et al., 2014)、急性膵炎 (Van Acker et al., 2007) 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に結び付いていると考えられている。免疫系においてはマクロファージ、白血球、単球などでの Tpl2 の役割が報告されている (Hall et al., 2007; Schultz et al., 2011; Acuff et al., 2017; Senger et al., 2017; Xu et al., 2018; Zarrin et al., 2021) [29, 31-34, 39, 75]。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 (Dumitru et al., 2000; 28)。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。一方、Tpl2 が免疫系以外の組織や間葉系細胞である線維芽細胞での発現も認められている (Patriotis et al., 1993; Das et al., 2005; Gantke et al., 2011) [30, 62]。近年、線維芽細胞が免疫系と関連することが考えられている。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する細胞である。機能として、収縮性や可動性を維持し、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は知

られていたが、Toll 様受容体、抗菌性ペプチド、炎症性サイトカイン、ケモカイン、成長因子、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 (Bautista-Hernández et al., 2017)。本章で明らかにしたように、IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 発現に Tpl2 が調節因子として関わることから、イヌ皮膚由来線維芽細胞も 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。

前章では、IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 発現調節への MAP キナーゼシグナル伝達系として ERK1/2 の関与をあきらかにしたことから、Tpl2 と ERK1/2 の関連についても Tpl2 阻害剤とノックダウン細胞を使用して検討し、Tpl2 は ERK1/2 の活性化を制御し、IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 発現調節に関わることを明らかにした。IL-1 $\beta$  応答に Tpl2 が関わることはマウスマクロファージや (Hall et al., 2007; Schultz et al., 2011)[39, 75]やヒト単球 (Hall et al., 2007)[75]などで知られている。一方で、Tpl2 が ERK1/2 の活性化を介して炎症に関わるタンパク質の発現に関与することも知られている [Dumitru et al., 2000; Gantke et al., 2011; Gantke et al., 2012; 28, 62]。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 の活性化を誘発する (Das et al., 2005; Hall et al., 2007)[30, 75]。しかし、HeLa 細胞やラット INS-1E $\beta$ -細胞においては、IL-1 $\beta$  は ERK1/2 ばかりでなく他の 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ことを報告されている (Yang et al., 2008; Varin et al., 2016)[23,76]。マウス胎児線維芽細胞では、TNF- $\alpha$  刺激では IL-1 $\beta$  刺激と同様に Tpl2 の活性化が引き起こされるが、下流の MAP キナーゼとしては ERK1/2 のみならず JNK シグナル系の活性化も報告されている (Das et al., 2005)[30]。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

他の因子の介在の必要性が考えられる。イヌ皮膚由来線維芽細胞における 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。

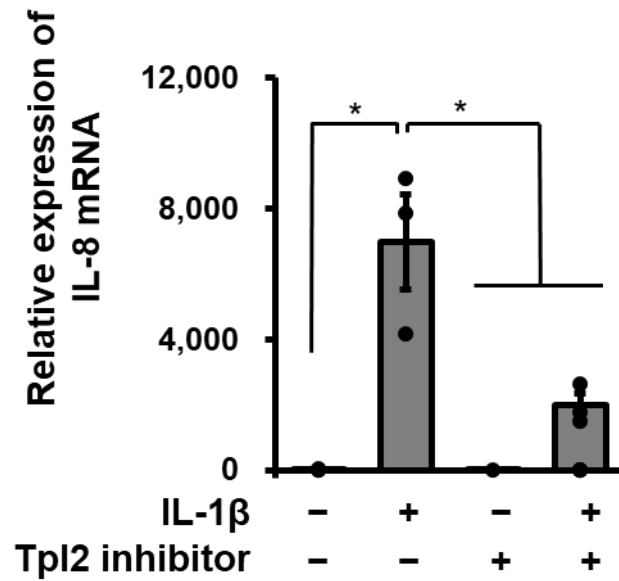


図 4-1. イヌ皮膚線維芽細胞における Tpl2 阻害剤による IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 mRNA 発現の抑制

イヌ皮膚由来線維芽細胞を Tpl2 阻害剤である Tpl2 kinase inhibitor II (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理後、100 pM IL-1 $\beta$  存在下および非存在下で 6 時間インキュベートし、Real-time PCR で IL-8 mRNA 発現を検討した。Tpl2 阻害剤により IL-1 $\beta$  誘導性 IL-8 mRNA 発現は有意に低下した。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。\*  $P < 0.05$ 。

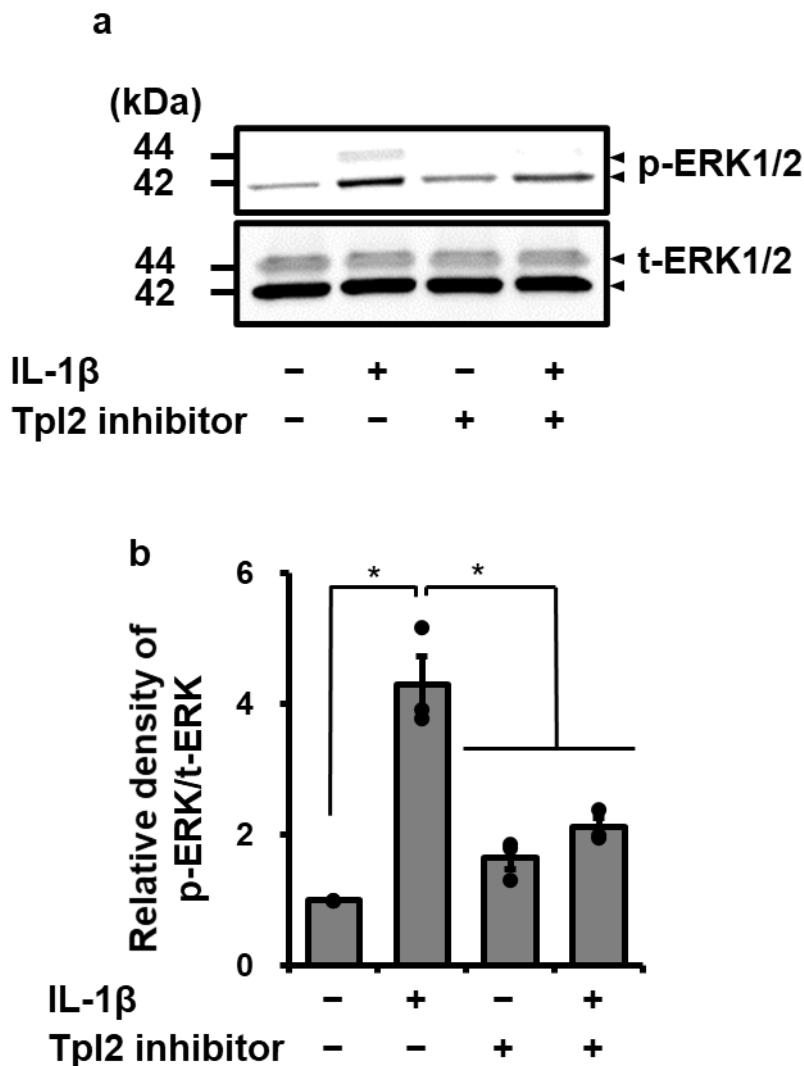


図 4-2. イヌ皮膚線維芽細胞における Tpl2 阻害剤による IL-1 $\beta$  誘導性 ERK1/2 リン酸化の抑制

イヌ皮膚由来線維芽細胞を Tpl2 阻害剤である Tpl2 kinase inhibitor II (10  $\mu$ M) で 1 時間前処理後、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、Western blotting にて ERK1/2 リン酸化を検討した。Tpl2 阻害剤により IL-1 $\beta$  誘導性 ERK1/2 リン酸化は有意に低下した。(a) 代表的な Western blotting の結果。(b) 結果を[(p-ERK1/2)/(t-ERK1/2)]で数値化し、0 time を 1 としたときの値。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。\*  $P < 0.05$ 。

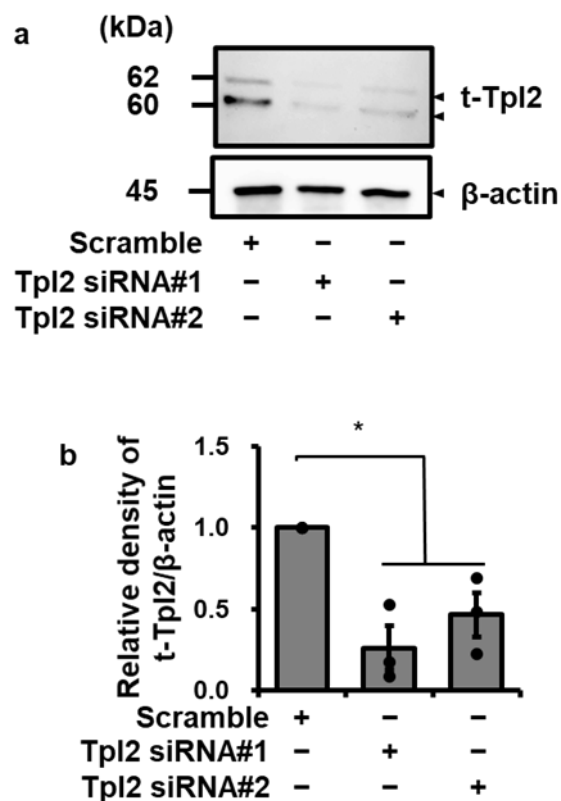


図 4-3. イヌ皮膚線維芽細胞における Tpl2 ノックダウン細胞

イヌ皮膚由来線維芽細胞に Tpl2 の 2 種類の異なる siRNA を、また、対照として Scramble RNA 導入し、導入細胞における Tpl2 タンパク質 (t-Tpl2) 発現を Western blotting にて検出した。内部標準タンパク質として β-actin を検出した。2 種類の Tpl2 siRNA 導入により Tpl2 がノックダウンされたことが確認された。(a) 代表的な Western blotting の結果。(b) 結果を[t-Tpl2/β-actin]で数値化し、Scramble RNA 導入細胞を 1 としたときの値。3 回の独立した実験結果の平均 ± 標準誤差を示す。\*  $P < 0.05$

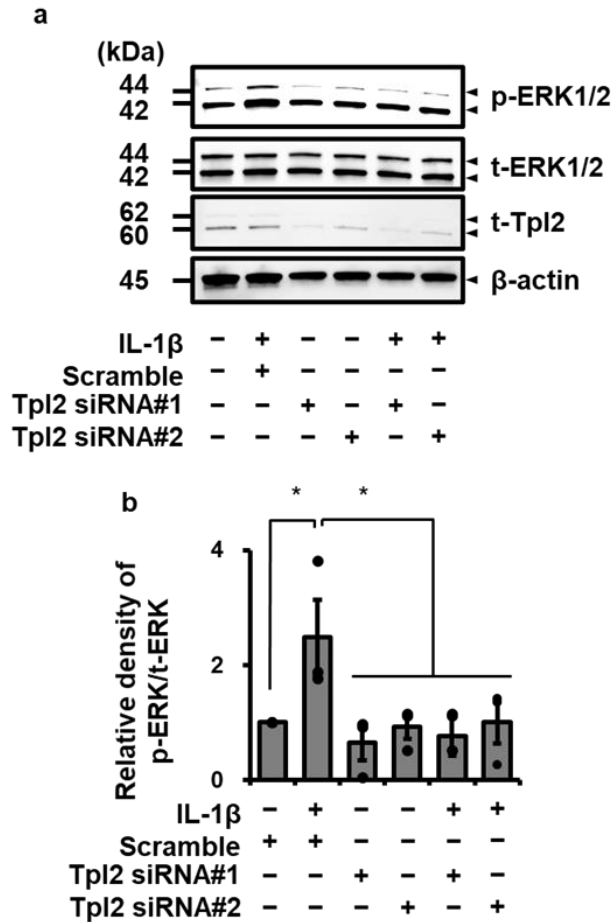


図 4-4. Tpl2 ノックダウンイヌ皮膚線維芽細胞における IL-1β 誘導性 ERK1/2 リン酸化の抑制

イヌ皮膚由来線維芽細胞に Tpl2 の 2 種類の異なる siRNA を、また、対照として Scramble RNA 導入し、100 pM IL-1β の存在下および非存在下で 15 分インキュベートし、Tpl2 (t-Tpl2)、リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2)、総 ERK1/2 (t-ERK1/2) 発現を Western blotting にて検出した。内部標準タンパク質として β-actin を検出した。Tpl2 siRNA 導入細胞において Tpl2 発現が低下し、ERK1/2 のリン酸化は低下した。(a) 代表的な Western blotting の結果。(b) 結果を[(p-ERK1/2)/(t-ERK1/2)]で数値化し、Scramble 導入細胞の結果を 1 としたときの値。3 回の独立した実験結果の平均 ± 標準誤差を示す。\*  $P < 0.05$ 。

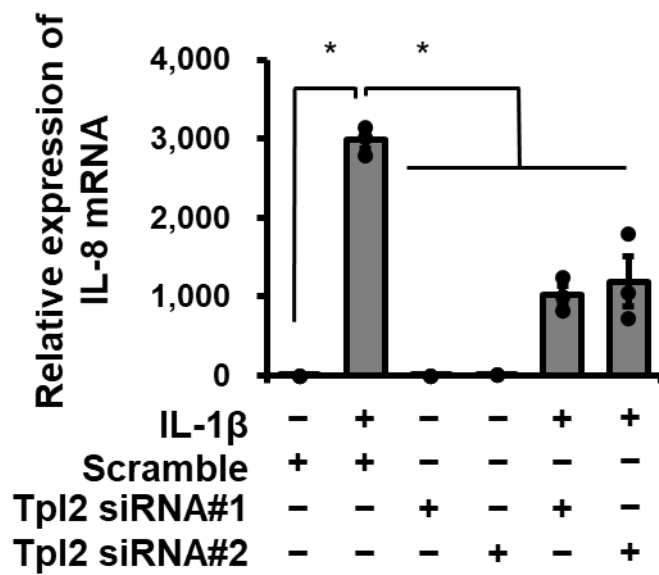


図4-5. Tpl2ノックダウンイヌ皮膚線維芽細胞におけるIL-1β誘導性IL-8 mRNA発現の抑制

イヌ皮膚由来線維芽細胞にTpl2の2種類の異なるsiRNAを、また、対照としてScramble RNA導入し、100 pM IL-1βの存在下および非存在下で6時間インキュベートし、IL-8 mRNA発現をReal-time RT-PCRにて検出した。Tpl2 siRNA導入細胞においてIL-1β誘導性IL-8 mRNA発現は有意に低下した。3回の独立した実験結果の平均 ± 標準誤差を示す。\*  $P < 0.05$ 。



表 4-1. 細胞導入した siRNA 配列

<b>Gene Name</b>	<b>GenBank ID</b>	<b>siRNA sequences</b>
<i>Tpl2 #1</i>	XM_005617057.3	GAAAGTGATTCATCATGAT
<i>Tpl2 #2</i>	XM_005617057.3	GAGAACATCGCTGAGTTAT

## 第5章

### 総括

本研究では、イヌ皮膚由来線維芽細胞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、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 発現に関わる細胞内シグナル伝達として、MAP キナーゼ経路について注目し、その1つである ERK1/2 の関与を阻害剤と siRNA 導入によるノックダウン細胞を作製して検討し、IL-1 $\beta$  が 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、ERK1/2 の活性化には、炎症を含む細胞機能に関わると考えられている Tpl2 の関与を阻害剤と siRNA 導入によるノックダウン細胞を作製して検討し、IL-1 $\beta$  誘導性の IL-8 発現には 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 (Naruke et al., 2021)。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する細胞であるが、近年、線維芽細胞が Toll 様受容体、抗菌性ペプチド、炎症性サイトカイン、ケモカイン、成長因子、微生物に対する自然免疫に関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 (Bautista-Hernández et al., 2017)。本章で明

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。

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始ご指導ご鞭撻いただきました日本大学獣医放射線学研究室教授 中山智宏 先生、日本大学獣医薬理学研究室教授 山崎 純先生、魚病／比較免疫学研究室教授 森友忠昭教授には感謝の意を表すとともに厚く御礼申し上げます。

本研究を実施にあたり、手取り足取りご指導いただき、研究の面白さ、論文発表の素晴らしさを教えてくださり、ことあるごとにご鞭撻いただいた日本大学名誉教授 杉谷博士 先生、理化学研究所 中野 令 先生に言葉では尽くせない感謝の意を表します。また、本研究のみに限らず、指導者としての大切な心構えなどご指導くださり、厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、優しく指導してくださった諏訪部陽子 先生、様々な面で助けてくださった岡田純一 先生に心から感謝申し上げます。社会人大学院生として大学院進学を大きく後押ししてくださり、ご指導ご鞭撻してくださったマーブル動物医療センター 難波信一 先生、苦難を共に過ごしてくださった布村順一 先生に心より御礼申し上げます。本研究に際し、様々なご協力を賜りました中野真澄 氏、北中菜菜子 先生、獣医放射線学研究室の諸氏に感謝いたします。

最後に、社会人大学院生活を様々な面で支えてくれた妻 裕子と子供たち 琥太郎、大和、美咲、本当にありがとう。シンシア動物病院のスタッフの皆、本当にありがとうございました。そして、この論文を見せることが出来なかった亡き父 成毛信男に捧げます。

## 参考文献

- Acuff NV, LaGatta M, Nagy T, Watford WT. Severe dermatitis associated with spontaneous *Staphylococcus xylosum* infection in Rag<sup>-/-</sup>Tp12<sup>-/-</sup> mice. *Comp Med*. 2017; 67: 344–349.
- Ahmed AU. An overview of inflammation: Mechanism and consequences. *Front Biol*. 2011; 6: 274-281.
- Avazi DO, Awasum AC, Hassan AZ, Ayo JO, Aluwong T, Muhammed ST, Simon AY, Suleiman MH, Kudi AC. Evaluation of levels of interleukin-6, interleukin-8 and some haematologic parameters of dogs with cutaneous wounds. *Cytokine* 2019; 113: 128–138.
- Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*. 1992; 307: 97–101.
- Bautista-Hernández LA, Gómez-Olivares JL, Buentello-Volante B, Bautista-de Lucio VM. Fibroblasts: The unknown sentinels eliciting immune responses against microorganisms. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2017; 7: 151-157.
- Benakanakere MR, Finoti LS, Tanaka U, Grant GR, Scarel-Caminaga RM, Kinane DF. Investigation of the functional role of human interleukin-8 gene haplotypes by CRISPR/Cas9 mediated genome editing. *Sci Rep*. 2016; 6: 31180.
- Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 beta-a friend or foe in malignancies? *Int J Mol Sci*. 2018; 19: 2155.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248–254.
- Carroll TP, Greene CM, Taggart CC, Bowie AG, O'Neill SJ, McElvaney NG. Viral inhibition of IL-1- and neutrophil elastase-induced inflammatory responses in bronchial epithelial cells. *J Immunol*. 2005; 175: 7594–7601.

- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Inflammatory responses and inflammation associated diseases in organs. *Oncotarget* 2017; 9: 7204-7218.
- Das S, Cho J, Lambertz I, Kelliher MA, Eliopoulos AG, Du K, Tschilis PN. Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF- $\kappa$ B in a cell-type and stimulus-specific manner. *J Biol Chem*. 2005; 280: 23748–23757.
- Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, Patriotis C, Jenkins NA, Copeland NG, Kollias G, Tschilis PN. TNF- $\alpha$  induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 2000; 103: 1071-1083.
- El-Hadi M, Charavaryamath C, Aebischer A, Smith CW, Shmon C, Singh B. Expression of interleukin-8 and intercellular cell adhesion molecule-1 in the synovial membrane and cranial cruciate ligament of dogs after rupture of the ligament. *Can J Vet Res*. 2012; 76: 8–15.
- Floras AN, Holowaychuk MK, Bienzle D, Bersenas AM, Sharif S, Harvey T, Nordone SK, Wood GA. N-terminal pro-C-natriuretic peptide and cytokine kinetics in dogs with endotoxemia. *J Vet Intern Med*. 2014; 28: 1447–1453.
- Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2010; 6: 232-241.
- Gantke T, Sriskantharajah S, Ley SC. Regulation and function of TPL2, an I $\kappa$ B kinase-regulated MAP kinase kinase kinase. *Cell Res*. 2011; 21: 131–145.
- Gantke T, Sriskantharajah S, Sadowski M, Ley SC. I $\kappa$ B kinase regulation of the TPL-2/ERK MAPK pathway. *Immunol Rev*. 2012; 246: 168–182.
- Gelaleti GB, Jardim BV, Leonel C, Moschetta MG, Zuccari DA. Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias. *Vet Immunol Immunopathol*. 2012; 146: 106–112.
- Haas M, Kaup FJ, Neumann S. Canine pyometra: a model for the analysis of serum

- CXCL8 in inflammation. *J Vet Med Sci.* 2016; 78: 375–381.
- Hall JP, Kurdi Y, Hsu S, Cuzzo J, Liu J, Telliez JB, Seidi KJ, Winkler A, Hu Y, Green N, Askew GR, Tam S, Clark JD, Lin LL. Pharmacologic inhibition of tlr2 blocks inflammatory responses in primary human monocytes, synoviocytes, and blood. *J Biol Chem.* 2007; 282: 33295–33304.
- Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol.* 1994; 56: 559–564.
- Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regen.* 2019; 39: 12.
- Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in inflammatory disease. *Int J Mol Sci.* 2019; 20: 6008.
- Karlsson I, Hagman R, Guo Y, Humblot P, Wang L, Wernersson S. Pathogenic *Escherichia coli* and lipopolysaccharide enhance the expression of IL-8, CXCL5, and CXCL10 in canine endometrial stromal cells. *Theriogenol.* 2015; 84: 34–42.
- Karlsson I, Hagman R, Johannisson A, Wang L, Karlstam E, Wernersson S. Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. *Reprod Domest Anim.* 2012; 47: 337–341.
- Kitanaka N, Nakano R, Sakai M, Kitanaka T, Namba N, Konno T, Nakayama T, Sugiya H. 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, Nakayama T, Sugiya H. Interleukin-1 $\beta$  promotes interleukin-6 expression via ERK1/2 signaling pathway in canine dermal fibroblasts. *PLOS ONE* 2019b; 14: e0220262.
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10 year update. *Physiol Rev.* 2012; 92: 689-737.



- Lawrenz M, Visekruna A, Kühl A, Schmidt N, Kaufmann SH, Steinhoff U. Genetic and pharmacological targeting of TPL-2 kinase ameliorates experimental colitis: a potential target for the treatment of Crohn's disease? *Mucosal Immunol.* 2012; 5: 129-139.
- Lindley I, Aschauer H, Seifert JM, Lam C, Brunowsky W, Kownatzki E, Thelen M, Peveri P, Dewald B, Tschärner VV. Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor: biological equivalence between natural and recombinant neutrophil-activating factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 9199–9203.
- Liu X, Ye F, Xiong H, Hu D, Limb GA, Xie T, Peng L, Yang W, Sun Y, Zhou M, Song E, Zhang DY. IL-1 $\beta$  upregulates IL-8 production in human Müller cells through activation of the p38 MAPK and ERK1/2 signaling pathways. *Inflammation* 2014; 37: 1486–1495.
- Mavropoulou A, Guazzetti S, Borghetti P, De Angelis E, Quintavalla C. Cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with mitral valve disease. *Vet J.* 2016; 211: 45-51.
- Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 2010; 140: 771-776.
- Mei B, Yang S, Yue Y, Hou J, Wang K, Chen G, Liang M, Wu Z. Acute adrenal cortex injury during cardiopulmonary bypass in a canine model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2018; 156: 696–706.
- Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Kitanaka N, Sato M, Shibukawa Y, Masuhiro Y, Kano K, Matsumoto T, Sugiya H. All-trans retinoic acid induces reprogramming of canine dedifferentiated cells into neuron-like cells. *PLOS ONE* 2020a; 15: e0229892.
- 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.

Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Kitanaka N, Suwabe Y, Konno T, Yamazaki J, Nakayama T, Sugiya H. Non-transcriptional and translational function of canonical NF- $\kappa$ B signaling in activating ERK1/2 in IL-1 $\beta$ -induced COX-2 expression in synovial fibroblasts. *Front Immunol.* 2020b; 11: 579266.

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.

Naruke A, Nakano R, Nunomura J, Suwabe Y, Nakano M, Namba S, Kitanaka T, Kitanaka N, Sugiya H, Nakayama T. Tpl2 contributes to IL-1 $\beta$ -induced IL-8 expression via ERK1/2 activation in canine dermal fibroblasts. *PLOS ONE* 2021; 16, e0259489.

Ou HL, Sun D, Peng YC, Wu YL. Novel effects of the cyclooxygenase-2-selective inhibitor NS-398 on IL-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 and IL-8 expression in human ovarian granulosa cells. *Innate Immun.* 2016; 22: 452–465.

Patriotis C, Makris A, Bear SE, Tschlis PN. Tumor progression locus 2 (Tpl-2) encodes a protein kinase involved in the progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 2251-2255.

Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 1988; 167: 1547–1559.

Rasmussen MK, Iversen L, Johansen C, Finnemann J, Olsen LS, Kragballe K, Gesser B. IL-8 and p53 are inversely regulated through JNK, p38 and NF- $\kappa$ B p65 in HepG2 cells during an inflammatory response. *Inflamm Res.* 2008; 57: 329–339.

Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* 2012; 66: 105–143.

Schultz GS, Davidson JM, Kirsner RS, Bornstein P, Herman IM. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair Regen.* 2011; 19: 134–148.

Senger K, Pham VC, Varfolomeev E, Hackney JA, Corzo CA, Collier J, Lau VC, Huang Z, Hamidzhadeh K, Caplazi P, Peng I, Setiadi AF, Francis R, Paler-Martinez A,

Kwon YC, Ramirez-Carrozzi V, Sun Y, Grigg PW, Roose-Girma M, Jeet S, Barck KH, Pham A, Ota N, Ha C, Stinson J, Guillory J, Tam L, Modrusan Z, Emson C, Mckenzie BS, Townsend MJ, Carano RAD, Warming S, Vucic D, Devoss J, Lee WP, Lill JR, Zarrin AA. The kinase TPL2 activates ERK and p38 signaling to promote neutrophilic inflammation. *Sci Signal*. 2017; 10: eaah4273.

Shao BZ, Xu ZQ, Han BZ, Su DF, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol*. 2015; 6: 262.

Sooranna SR, Engineer N, Loudon JA, Terzidou V, Bennett PR, Johnson MR. The mitogen-activated protein kinase dependent expression of prostaglandin H synthase-2 and interleukin-8 messenger ribonucleic acid by myometrial cells: the differential effect of stretch and interleukin-1 $\beta$ . *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90: 3517–3527.

Sriskantharajah S, Gückel E, Tsakiri N, Kierdorf K, Brender C, Ben-Addi A, Veldhoen M, Tschlis PN, Stockinger B, O'Garra A, Prinz M, Kollias G, Ley SC. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by TPL-2 kinase. *J Immunol*. 2014; 192: 3518-3529.

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.

Van Acker GJD, Perides G, Weiss ER, Das S, Tschlis PN, Steer ML. Tumor progression locus-2 is a critical regulator of pancreatic and lung inflammation during acute pancreatitis. *J Biol Chem*. 2007; 282: 22140-22149.

Varin EM, Wojtuszczyzn A, Broca C, Muller D, Ravier MA, Ceppo F, Renard E, Tanti JF, Dalle S. Inhibition of the MAP3 kinase Tpl2 protects rodent and human  $\beta$ -cells from apoptosis and dysfunction induced by cytokines and enhances anti-inflammatory actions of exendin-4. *Cell Death Dis*. 2016; 7: e2065.

Vougioukalaki M, Kanellis DC, Gkouskou K, Eliopoulos AG. Tpl2 kinase signal transduction in inflammation and cancer. *Cancer Lett*. 2011; 304: 80–89.

Xu D, Matsumoto ML, McKenzie BS, Zarrin AA. TPL2 kinase action and control of inflammation. *Pharmacol Res.* 2018; 129: 188–193.

Yang HT, Cohen P, Rousseau S. IL-1 $\beta$ -stimulated activation of ERK1/2 and p38 $\alpha$  MAPK mediates the transcriptional up-regulation of IL-6, IL-8 and GRO- $\alpha$  in HeLa cells. *Cell Signal.* 2008; 20: 375–380.

Zarrin AA, Bao K, Lupardus P, Vucic D. Kinase inhibition in autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Drug Discov.* 2021; 20: 39–63.