

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07728

研究課題名(和文) イヌ皮膚線維芽細胞におけるセラミド代謝物による炎症制御

研究課題名(英文) Regulation of inflammation by ceramide and its metabolites in canine dermal fibroblasts

研究代表者

杉谷 博士 (SUGIYA, Hiroshi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20050114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではイヌの皮膚線維芽細胞(fDFB)でのIL-1誘導性PGE2産生系を、滑膜線維芽細胞(fSFB)でのTNF- $\alpha$ 誘導性IL-8産生系も炎症モデルとして確立した。fDFBでのIL-1誘導性PGE2産生には、転写因子NF- $\kappa$ B(p65)を介したMAPKのMEK/ERK経路の活性化が関わっていた。fSFBでのTNF- $\alpha$ 誘導性IL-8発現にはMAPKのERK2及びJNK1アイソフォームが関わっていた。この炎症モデル系でセラミド代謝物であるセラミド-1-リン酸およびスフィンゴシン-1-リン酸の効果を検討したが、有意な効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the inflammatory regulation by ceramide metabolites such as ceramide 1-phosphate (C-1-P) and sphingosine 1-phosphate (S-1-P), IL-1 $\alpha$ -mediated PGE2 production system in canine dermal fibroblasts (cDFB) and TNF- $\alpha$ -mediated IL-8 expression system in canine synovial fibroblasts (cSFB) were established as a model of inflammation first. In cDFB, IL-1 $\alpha$ -mediated PGE2 production via COX-2 expression. MEK/ERK MAPK signaling was involved in the IL-1 $\alpha$ -mediated COX-2 expression via the activation of NF- $\kappa$ B (p65), a transcription factor. In cSFB, ERK2 and JNK1, ERK and JNK MAPK isoforms, respectively, were involved in the TNF- $\alpha$ -mediated IL-8 expression. Then the effects of C-1-P and S-1-P on IL-1 $\alpha$ -mediated PGE2 production in cDFB and TNF- $\alpha$ -mediated IL-8 expression in cSFB was examined. However, no significant effect of these ceramide metabolites was observed.

研究分野：獣医学

キーワード：炎症制御 セラミド代謝物 炎症性サイトカイン COX-2 MAPキナーゼ NF- $\kappa$ B PGE2 イヌ線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) スフィンゴ脂質は細胞増殖，分化，発生，血管新生や細胞死など種々の細胞機能において重要な役割を担っている。炎症においても重要な調節因子と考えられている。特に，スフィンゴ脂質の代謝物の中で，セラミドやその代謝物であるスフィンゴシン 1-リン酸は調節因子としての役割が明らかになりつつある。( )

(2) スフィンゴ脂質代謝の中でも，セラミド代謝物であるスフィンゴシン 1-リン酸の炎症制御に関わる因子としての報告がなされている。また，スフィンゴシン 1-リン酸受容体も明らかにされており，G タンパク質共役型受容体であり，5 種類のサブタイプが存在することも知られている( )。一方，近年，別のセラミド代謝物であるセラミド 1-リン酸の炎症制御における役割が注目されている( )。しかし，その作用機序やセラミド代謝物との相互作用については不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究においては，研究材料としてイヌ皮膚及び滑膜由来線維芽細胞の初代培養系を確立すること，確立した初代培養系を用い，サイトカイン誘導性炎症反応を指標にして，イヌにおける皮膚炎症のモデルを確立すること，その炎症モデルに対するセラミド代謝物の炎症制御を明らかにすることを目的とした。

(2) 炎症反応としては，炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 及び腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) をリガンドとして用い，細胞応答としてはプロスタグランジン E $2$  (PGE $2$ ) 放出を測定し，さらに，その律速酵素である

シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) 発現を検出し，その細胞内シグナルに対する制御を明らかにすることを目的とした。また，別の応答としてケモカインである IL-8 の発現と放出も検討した。

## 3. 研究方法

(1) 細胞培養：皮膚由来線維芽細胞は，麻酔下のイヌ(ビーグル犬) 背部皮膚から真皮を収集し，細断した後，10%ウシ胎児血清を含む  $\alpha$ -MEM 培地で 37 で培養し，得た。滑膜由来線維芽細胞は，イヌ滑膜を細断し，同様に線維芽細胞として培養した。

(2) real-time RT-PCR：COX-2 mRNA 及び IL-8 mRNA 発現は，TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出し，特異的なプライマーを用いて，real-time-RT-PCR により検討した。

(3) western blotting：タンパク質を回収し，SDS 電気泳動法によりタンパク質を分画後，PVDF 膜へ転写し，特異抗体を用い western blotting にてタンパク質発現及びリン酸化を検討した。

(4) PGE $2$  及び IL-8 測定：リガンドで刺激したイヌ線維芽細胞の培養上清を回収し，培養上清中の PGE $2$  及び IL-8 の濃度を，市販の ELISA kit を用いて測定した。

## 4. 研究成果

(1) イヌ皮膚由来線維芽細胞の IL-1 $\beta$  刺激応答：イヌ皮膚由来線維芽細胞を IL-1 $\beta$  で刺激を行うと，時間依存的に，また用量依存的に培養液中への PGE $2$  の放出が認められた。IL-1 $\beta$  で刺激した細胞においては，COX-2 の mRNA とタンパク質発現が促進され，COX-2

発現を介する PGE2 産生と放出が示唆された。

(2) IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現と MAPK: イヌ皮膚由来線維芽細胞の IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現と PGE2 産生への MAPK の関与を、阻害剤を用いて検討した。MAPK の 1 つ ERK 経路阻害剤、MEK 阻害剤は IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 mRNA 発現と PGE2 放出を阻害した。IL-1 $\beta$  刺激による ERK リン酸化を測定すると、ERK のリン酸化が認められ、MEK 及び ERK 阻害剤はそれを阻害した。以上の結果より、イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 発現には MAPK 経路の MEK/ERK 経路の活性化が関与することが示唆された。

(3) IL-1 $\beta$  誘導性 COX-2 発現と NF- $\kappa$ B: 転写因子 Nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の関与を阻害剤を用いて検討した。阻害剤前処理細胞では、IL-1 $\beta$  誘導性の効果が阻害された。NF- $\kappa$ B の構成サブユニットの 1 つである p65 のリン酸化と、不活性化状態では NF- $\kappa$ B に結合している抑制因子 I $\kappa$ B の分解が IL-1 $\beta$  刺激で認められ、NF- $\kappa$ B 阻害剤が阻害したことから、IL-1 $\beta$  刺激による COX-2 発現には NF- $\kappa$ B の活性化が関与することが示唆された。

(4) IL-1 $\beta$  誘導性 MAPK 活性化と NF- $\kappa$ B : MEK 及び ERK 阻害剤は IL-1 $\beta$  誘導性 p65 リン酸化にはまったく効果を示さず、一方で NF- $\kappa$ B 阻害剤では、IL-1 $\beta$  刺激による ERK リン酸化は完全に抑制された。siRNA による I $\kappa$ B $\alpha$  のノックダウンは、p65 と ERK のリン酸化が認められ、NF- $\kappa$ B 活性化が ERK を活性化することが強く示唆された。

(5) イヌ皮膚由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  誘導性応答へのセラミド代謝物の効果: 上記ごとく確立したイヌ皮膚由来線維芽細胞の IL-1 $\beta$  による NF- $\kappa$ B/MEK/ERK/COX-2 PGE2 産生に対するセラミド代謝物の効果を検討したが、有意な抑制も活性化も認められなかったことから、セラミド代謝物は関与しないと考えられた。

(6) イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- $\alpha$  刺激応答: 別の炎症モデルとして、イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- $\alpha$  刺激による IL-8 放出を検討したところ、時間依存的及び用量依存的な IL-8 放出と IL-8 mRNA 発現変化上昇が認められた。

(7) TNF- $\alpha$  誘導性 IL-8 発現と MAPK: TNF- $\alpha$  誘導性 IL-8 mRNA 発現における MAPK の関与を、阻害剤を用いて検討したところ、ERK と JNK 阻害剤は有意に IL-8 mRNA 発現を阻害した。TNF- $\alpha$  は ERK1/2 及び JNK のリン酸化を促進し、それぞれの阻害剤はそれを抑制したことから、TNF- $\alpha$  誘導性の IL-8 発現ならびに放出には、ERK1/2 及び JNK 経路の活性化が関与することが示唆された。

(8) TNF- $\alpha$  誘導性 IL-8 発現に関わる ERK 及び JNK サブタイプ: TNF- $\alpha$  誘導性 IL-8 発現に関わる ERK のサブタイプについて siRNA 導入によるノックダウン細胞を用いて検討した。TNF- $\alpha$  誘導性の IL-8 mRNA 発現は ERK2 及び JNK1 ノックダウン細胞において、TNF- $\alpha$  誘導性 IL-8 mRNA 発現は有意に抑制された。ERK2 ノックダウン細胞において TNF- $\alpha$  誘導性 JNK1 のリン酸化、JNK1 ノックダウン細胞において TNF- $\alpha$  誘導性 ERK2 のリン酸化は認められなかったことから、それぞ

れの経路は単独で関与することも明らかとなった。

(9) イヌ滑膜由来線維芽細胞における TNF- $\alpha$  誘導性応答へのセラミド代謝物の効果：上記のごとく確立したイヌ滑膜由来線維芽細胞において TNF- $\alpha$  刺激による ERK2 及び JNK1 経路を介した IL-8 産生に対するセラミド代謝物の効果を検討したが、有意な抑制も活性化も認められなかったことから、イヌ滑膜由来線維芽細胞における IL-1 $\beta$  刺激応答には関わっていないものと考えられた。

#### <引用文献>

Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008, 9, 139-150.

Pyne S, Lee SC, Long J, Pyne NJ. Role of sphingosine kinases and lipid phosphate phosphatases in regulating spatial sphingosine 1-phosphate signalling in health and disease. *Cell Signal.* 2009, 21, 14-21.

Lamour NF, Chalfant CE. Ceramide-1-phosphate: the "missing" link in eicosanoid biosynthesis and inflammation. *Mol Interv.* 2005, 5, 358-367.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

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(8), e0182923. doi: 10.1371/journal.pone.0182923. eCollection 2017. 査読有

Kitanaka T, Nakano R, Kitanaka N, Kimura T, Okabayashi K, Narita T, Sugiya H. 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. doi: 10.1038/srep39914. 査読有

Konno T, Nakano R, Mamiya R, Tsuchiya H, Kitanaka T, Namba S, Kitanaka N, Okabayashi K, Narita T, Sugiya H. Expression and function of interleukin-1 $\beta$ -induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin in renal tubular cells. *PLoS One* 2016, 11(11), e0166707. doi: 10.1371/journal.pone.0166707. eCollection 2016. 査読有

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(3-4), 223-232. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.10.003. 査読有

Nakano R, Edamura K, Nakayama T, Narita T, Okabayashi K, Sugiya H. Fibroblast growth factor receptor-2 contributes to the basic fibroblast growth factor-induced neuronal differentiation in canine bone marrow stromal cells via phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *PLoS One.* 2015, 10(11), e0141581. doi: 10.1371/journal.pone.0141581.

eCollection 2015. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

中野 令, 北中 卓, 難波 信一, 北中 菜菜子, 澁川 義幸, 加野 浩一郎, 松本 太郎, 杉谷 博士: イヌ脱分化脂肪細胞のレチノイン酸及び塩基性線維芽細胞成長因子による神経分化. 第 17 回日本再生医療学会総会, 2018.3.21 (横浜)

中野 令, 北中 卓, 難波 信一, 北中 菜菜子, 澁川 義幸, 加野 浩一郎, 松本 太郎, 杉谷 博士: イヌ脱分化脂肪細胞のレチノイン酸及び塩基性線維芽脂肪成長因子による神経分化. 第 160 回日本獣医学会学術集会, 2017.9.13 (鹿児島)

北中 卓, 中野 令, 北中 菜菜子, 木村 太郎, 岡林 堅, 成田 貴則, 杉谷 博士: 滑膜由来線維芽細胞における JNK1 による MEK/ERK1/2 活性調節. 第 69 回日本細胞生物学会大会, 2017.6.13 (仙台)

Sugiya H, Nakano R, Tsuchiya H: NF- $\kappa$ B regulates MEK/ERK signaling pathway in fibroblasts. 4th International Symposium on Salivary glands in Honor of Niels Stensen, 2016.12.2 (Okazaki, Japan)

Nakano R, Sugiya H: PKC $\epsilon$  regulates MEK/ERK signaling pathway in fibroblasts. 4th International Symposium on Salivary glands in Honor of Niels Stensen, 2016.12.1 (Okazaki, Japan)

難波信一, 中野令, 北中卓, 岡林堅, 成田

貴則, 杉谷博士: イヌ滑膜線維芽細胞の TNF- $\alpha$  処理による IL-8 の発現と MAPK 経路の関与 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016.9.7 (藤沢)

北中卓, 中野令, 北中菜菜子, 木村太郎, 岡林堅, 成田貴則, 杉谷博士: ネコ滑膜線維芽細胞における IL-1 誘導性の新規 ERK 活性調節: JNK 依存性 MEK/ERK 経路. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016.9.7 (藤沢)

中野令, 北中卓, 難波信一, 岡林堅, 成田貴則, 杉谷博士: イヌ皮膚線維芽細胞におけるブラジキニン誘導性 COX-2 発現: B2 受容体/Gq/PLD/PDK による PKC $\epsilon$  を介した ERK 核移行制御. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016.9.6 (藤沢)

Nakano R, Kitanaka T, Kitanaka N, Namba S, Konno T, Okabayashi K, Narita T, Sugiya H: JNK-1 p54 isoform regulates MEK/RK signaling pathway, which contributes to interleukin-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 expression in fibroblasts from synovial membrane. 12th International Congress of Cell Biology, 2016.7.23 (Prague, Czech Republic)

Konno T, Nakano R, Mamiya R, Tsuchiya H, Okabayashi K, Narita T, Sugiya H: Interleukin-1 $\beta$ -induced expression and function of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in renal tubular cells. 12th International Congress of Cell Biology, 2016.7.23 (Prague, Czech Republic)

中野令, 北中卓, 難波信一, 岡林堅, 成田貴則, 杉谷博士: イヌ皮膚線維芽細胞におけるブラジキニン誘導性の COX-2 発現: PKC $\epsilon$  による MEK/ERK 経路調節. 第 158 回日本獣医学会学術集会, 2015.9.7 (十和田)

北中卓, 中野令, 北中菜菜子, 木村太郎, 岡林堅, 成田貴則, 杉谷博士: ネコ滑膜線維芽細胞におけるインターロイキン-1 $\beta$  刺激による炎症誘起メカニズム: p38 経路と JNK 依存性 ERK1/2 経路を介した COX-2 発現. 第 158 回日本獣医学会学術集会, 2015.9.7 (十和田)

難波信一, 中野令, 北中卓, 岡林堅, 成田貴則, 杉谷博士: イヌ滑膜線維芽細胞における TNF- $\alpha$  による IL-6, IL-8 の発現と MAPK 経路の関与. 第 158 回日本獣医学会学術集会, 2015.9.7 (十和田)

#### [産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: 哺乳動物由来の脱分化脂肪細胞から神経細胞を製造する方法及び哺乳動物由来の脱分化脂肪細胞から神経細胞への分化誘導用キット

発明者: 杉谷博士, 中野令, 松本太郎, 加野浩一郎

権利者: 日本大学

種類: 特許

番号: 特許願 2017-237231

出願年月日: 平成 29 年 12 月 11 日

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

杉谷 博士 (SUGIYA, Hiroshi)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 20050114

##### (2) 連携研究者

成田 貴則 (NARITA, Takanori)  
日本大学・生物資源科学部・講師  
研究者番号: 70453884

岡林 堅 (OKABAYASHI, Ken)  
日本大学・生物資源科学部・講師  
研究者番号: 20409072