

氏名(本籍)	澤野宏隆(大阪府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第401号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位論文題目	15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J <sub>2</sub> inhibits IL-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells (メサンギウム細胞において15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J <sub>2</sub> はIL-1 $\beta$ によるcyclooxygenase-2発現を抑制する)

審査委員	主査	教授	服部	隆則
	副査	教授	西	克治
	副査	教授	木村	宏

## 論文内容の要旨

### 【目的】

腎糸球体メサンギウム細胞は糸球体疾患の病態形成に重要な役割を担っており、種々の刺激に反応してサイトカイン、増殖因子、プロスタグランジン (PG) などの生理活性物質を産生する。特に、PGは腎臓の血行動態や局所の炎症に関与することが指摘されている。Cyclooxygenase (COX) はアラキドン酸からPGG<sub>2</sub>、さらにPGH<sub>2</sub>への反応を触媒する酵素で、構成的発現を示すCOX-1と誘導酵素であるCOX-2の2種類のアイソザイムが存在し、各種PG産生に寄与している。COX-2は定常状態では観察されず、IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインの刺激により短時間で誘導され、抗炎症作用を持つデキサメサゾンで抑制されることから、炎症との関連が指摘されている。近年、核内受容体peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )の内因性リガンドである15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>)の抗炎症作用が種々の細胞において注目されているが、15d-PGJ<sub>2</sub>はCOXにより産生が誘導されるPGD<sub>2</sub>の代謝産物のひとつである。そこで、我々は、培養メサンギウム細胞におけるCOX-2とその発現を介して産生される15d-PGJ<sub>2</sub>との関連を明らかにする目的で、まず炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ によるCOX-2発現に対する15d-PGJ<sub>2</sub>の効果について、次いで、その作用機序を細胞内情報伝達系に注目して検討した。

### 【方法】

SDラットから単離した腎糸球体よりメサンギウム細胞を培養し、4から10継代までの細胞を以下の実験に使用した。15d-PGJ<sub>2</sub>の効果について検討した実験では、15d-PGJ<sub>2</sub>を30分間前処置した後、IL-1 $\beta$ の刺激を行った。

1. IL-1 $\beta$ 刺激によるCOX-2 mRNA発現をNorthern blot法で、蛋白発現をWestern blot法で、PGE<sub>2</sub>産生をELISA法にて評価した。
2. メサンギウム細胞におけるPPAR $\gamma$ の発現はRT-PCR法にて検出し、PPARresponsive elements (PPRE) 活性は、PPREルシフェラーゼレポーターアッセイにて検討した。
3. NF- $\kappa$ B経路の活性はI $\kappa$ B $\alpha$ の分解をWestern blot法で、NF- $\kappa$ BのDNA結合能についてはEMSA法にて検討した。
4. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)の活性についてはリン酸化抗体を用いたWestern blot法で、また、転写因子AP-1のDNA結合能についてはEMSA法にて検討した。なお、AP-1のEMSAにはconsensusとCOX-2 promoter AP-1 like site両方のoligonucleotideを用いた。

### 【結果】

1. 15d-PGJ<sub>2</sub>は、IL-1 $\beta$ によるCOX-2 mRNA発現を濃度依存性に抑制し、COX-2蛋白発現、

及びPGE<sub>2</sub>産生も10 μMの15d-PGJ<sub>2</sub>により有意に抑制された。

2. 一方、合成PPAR $\gamma$ リガンドであるチアゾリジン誘導体のtroglitazoneやpioglitazoneは、COX-2の発現に影響を及ぼさなかった。メサンギウム細胞におけるPPAR $\gamma$ の発現は、Northern blot法では検出不能で、RT-PCR法にてのみ検出したが、15d-PGJ<sub>2</sub>はその発現量及びPPRE活性に影響を与えなかった。しかし、PPAR $\gamma$ の強発現により15d-PGJ<sub>2</sub>のPPRE活性は濃度依存性に増加した。
3. 15d-PGJ<sub>2</sub>は、IL-1 $\beta$ によるI $\kappa$ B $\alpha$ の分解やNF- $\kappa$ BのDNA結合増強を抑制しなかった。
4. MAPKs経路について検討したところ、15d-PGJ<sub>2</sub>は、IL-1 $\beta$ によるERKとJNKの活性化を抑制したが、p38MAPKの活性化を抑制しなかった。さらに、15d-PGJ<sub>2</sub>は、MAPKsにより活性化されるAP-1のDNA結合活性も抑制した。

#### 【考 察】

メサンギウム細胞において、15d-PGJ<sub>2</sub>はIL-1 $\beta$ によるCOX-2の発現増強とPGE<sub>2</sub>産生増加を抑制することが明らかとなった。すなわち、炎症時のCOX-2の発現増強を介して産生されるPGsのひとつである15d-PGJ<sub>2</sub>は、自らCOX-2発現を負に制御するnegative feedbackの役割を担っている可能性が考えられた。15d-PGJ<sub>2</sub>の作用機序については、各種細胞でPPAR $\gamma$ 依存性機序と非依存性機序の両方の報告がある。我々の結果では、メサンギウム細胞ではPPAR $\gamma$ の発現量が少量であること、チアゾリジン誘導体の効果が見られないこと、15d-PGJ<sub>2</sub>がPPRE活性を増加させないことより、PPAR $\gamma$ 非依存性に抑制効果を示すものと考えられた。PPAR $\gamma$ 以外の経路を検討した結果、15d-PGJ<sub>2</sub>はNF- $\kappa$ B経路には影響を与えなかったが、ERK及びJNKの活性化を抑制し、さらにCOX-2 promoter活性に重要なAP-1の活性化をも制御することが明らかになった。以上の結果より、メサンギウム細胞における15d-PGJ<sub>2</sub>の新たなメカニズムを解明するとともに、抗炎症作用により腎炎の治療にも応用できる可能性が示唆された。

#### 【結 論】

メサンギウム細胞において、15d-PGJ<sub>2</sub>はERK及びJNK経路を抑制し、AP-1活性の減弱を介して、PPAR $\gamma$ 非依存性にIL-1 $\beta$ のCOX-2発現増強作用を抑制することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) によるcyclooxygenase-2 (COX-2) 発現に対する効果を検討したものである。

- 1) メサンギウム細胞において15d-PGJ<sub>2</sub>はIL-1 $\beta$ によるCOX-2発現増強作用をproliferator-activated receptor $\gamma$ 非依存性に抑制することが示された。
- 2) 15d-PGJ<sub>2</sub>はnuclear factor- $\kappa$ B経路には影響を与えず、extracellular signal-regulated kinase及びc-Jun NH2-terminal kinaseの活性化を抑制していた。
- 3) 15d-PGJ<sub>2</sub>は転写因子activator protein-1活性を減弱し、この機序を介してCOX-2発現を抑制する事が示唆された。

本論文は炎症の病態下におけるCOX-2発現に対する15d-PGJ<sub>2</sub>の重要性について新たな知見を与えたものであり、博士(医学)の学位論文に値するものである。

なお、本学位授与申請者は平成14年2月15日実施の論文内容に関連した試問を受け、合格と認められたものである。