

氏名(本籍)	おおにし ようこ 大西 洋子(香川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2945号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in inflammatory responses. — <i>in vivo</i> analyses by using a p38 inhibitor, SB202190, and p38 α heterozygous mice — (炎症反応における p38 MAPK の役割— p38 阻害剤 SB202190 および p38 α ヘテロ接合体マウスを用いた個体レベルの解析—)
主査	筑波大学教授 医学博士 三輪 正直
副査	筑波大学助教授 博士(獣医学) 杉山 文博
副査	筑波大学講師 博士(理学) 小林 麻巳人
副査	筑波大学講師 医学博士 宮内 卓

論文の内容の要旨

(目的)

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) family は、細胞外の刺激を核に伝達するリン酸化酵素群であり、細胞の増殖、分化、形質転換、生存、アポトーシス等の様々な反応を制御している。ほ乳類において MAPKs は、Extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK (p38) に分類されるが、なかでも p38 は紫外線や浸透圧ショック等の細胞外ストレスにより活性化され、特に炎症性 cytokine の産生およびそのシグナル伝達に関与することが知られている。これら MAPKs 経路の詳細は主に *in vitro* での解析によって明らかになってきたものであるが、解析を個体レベルまで広げた研究は非常に少ない。

本研究では個体レベルでの炎症における p38 の関与を、p38 阻害剤の効果と p38 α ヘテロ接合体マウス (p38 α +/−) を用いた解析から明らかにすることを目的として、以下の検討を行った。①表層の炎症モデルとして接触皮膚炎マウスを用い、cytokine や chemokine 等の化学伝達物質の経時的、空間的な変化を追い、*in vivo* での炎症と p38 の関与を詳細に解析する。②炎症ストレス状態ともいえる分娩時における p38 の役割について検討する。特に炎症性早産における p38 の動向と Prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) をはじめとする陣痛誘発物質との関連について検討する。

(対象と方法)

① 8週齢の C57Black/6J 雌マウスの背部に 0.5% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) を剃毛後塗布、5日後に耳介に塗布し、時間依存的に耳介炎症(耳介肥厚の程度、組織学的検討及び cytokine, chemokine の発現)をモニターした。また、p38 特異的阻害剤 SB202190 を耳介に前投与し、その効果を上記炎症のパラメーターについて比較した。p38 α +/− を用い、DNFB による炎症反応を野生型マウスと比較検討した。

② 非妊娠時・妊娠中期・妊娠末期・分娩中及び分娩後の C57Black/6J マウス子宮における MAPKs の活性を *in vitro* kinase assay 法及び免疫組織化学的手法を用いて検討した。筑波大学倫理委員会にて承認された方法により、インフォームドコンセントを得て採取された正常分娩後の胎盤より脱落膜細胞を分離培養し、炎症性 cytokine ;

interleukine-1 β (IL-1 β) による cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現及び PGF_{2 α} の産生を, SB202190 存在下および非存在下で比較検討した。また, 妊娠 15 日目のマウスに Lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与し, 早産誘発までの時間を野生型マウス及び p38 α + / - で比較検討した。

(結果)

① DNFB は特に 24 時間後にピークを持つ耳の肥厚を誘導し, 組織学的には表皮および真皮への白血球細胞の浸潤と細胞間浮腫を促したが, SB202190 はこれらを有意に阻害した。Th1-like cytokine (IL-2 及び IFN (interferon) - γ), Th2-like cytokine (IL-4 及び IL-5), IL-1 β , IL-18, TNF- α の発現, chemokine では IFN- γ inducible protein-10 (IP-10), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の組織内発現が DNFB により誘導されたが, SB202190 は IL-4 を除いた cytokine および chemokine の発現誘導を有意に抑制した。p38 α + / - では DNFB による IFN- γ , IL-18 の発現誘導が野生型に比べ顕著に減弱していた。また, 各 chemokine は resting の状態でも非常に低値を示し, DNFB 刺激によっても発現誘導が微弱であった。

② 妊娠時期依存的に末期及び分娩中で p38 が活性化しており, その活性は脱落膜細胞に局限していた。初代培養脱落膜細胞を IL-1 β で刺激すると COX-2 の発現に相関して PGF_{2 α} の産生は亢進し, これは SB202190 により有意に抑制された。LPS 投与による早産誘発刺激では, 野生型マウスは刺激後 2 日以内に早産が誘発され, 仔は分娩後死亡した。一方, p38 α + / - では早産は認められず, 妊娠は末期まで持続し 5 ~ 6 匹の生仔を得た。

(考察)

p38 は, 炎症性反応において, cytokine, chemokine, COX-2 等の発現誘導を促すことが, 様々な細胞レベルですでに明らかになっている。本研究から, 個体レベルの炎症反応においても p38 が一連の cytokine, chemokine の発現制御を介して密接に関与することが明らかとなった。特に, 接触皮膚炎モデルでは, SB202190 のこれまで試されたことのない経皮的投与という実践的な投与方法が有効であることを初めて示し, その臨床応用の可能性も示唆した。また, 分娩発来において重要と考えられている炎症性 cytokine 発現 / COX-2 発現 / PGF_{2 α} 産生というカスケードに脱落膜細胞における p38 が関与することも初めて明らかにした。

審 査 の 結 果 の 要 旨

著者は, 社会還元を念頭においたアイデアをもとに炎症ストレスと p38 の役割について PART I ではマウスを用いた個体レベルの研究を行い, 耳介に塗布するだけという簡単な方法で接触皮膚炎の著明な改善が得られたことや, PART II では脱落膜細胞における p38 の一つの役割が証明されたことは, 基礎研究上たいへん興味深いだけでなく, 将来の臨床応用への可能性という面でも価値が高いものである。また研究に利用した実験の構築の仕方なども評価できるものである。

よって, 著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。