Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

PLCε cooperates with the NF-κB pathway to augment TNFα-stimulated CCL2/MCP1 expression in human keratinocyte

Sanada, Yuko(Harada, Yuko)

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2013-10-09

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
乙第3232号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003232

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（論文博士関係）

学位論文の内容要旨

PLCε cooperates with the NF-κB pathway to augment TNFα-stimulated CCL2/MCP1 expression in human keratinocyte

ヒト角化細胞において TNFα刺激依存的な CCL2/MCP1 の発現誘導は
ホスホリパーゼ Cεと NF-κB 経路によって制御される

（指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻　片岡徹教授）
眞田（原田）裕子

緒言

ホスホイノシチド特異的ホスホリパーゼ C (PLC) はホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸をジアシルグリセロールとイノシトール 1,4,5-三リン酸に加水分解することによって細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たしている。哺乳類細胞の PLC には少なくとも 13 のアイソフォームがあり、β,γ,δ,ε,ζ,ηの 6 つのクラスに分類される。その中でも PLCεは Ras ファミリー低分子量 G 蛋白質である Ras, Rap1, Rap2 の活性型（GTP 結合型）との直接の結合により PLC 活性を示すという特性を持っている。さらに、他の低分子量 G 蛋白質である RhoA や三量体 G 蛋白質 Gα12、Gβ1γ2 によっても PLCεが活性化されることがこれまでに報告されている。

当研究室における PLCε遺伝子改変マウスを用いた解析の結果、PLCεが発癌や皮膚の炎症反応において重要な役割を果たすことが明らかになった。PLCεノックアウトマウスは、ホルボールエステル（TPA）をプロモーターとして用いた二段階皮膚化学発癌において腫瘍形成に強い抵抗性を示すとともに、TPA 誘発による皮膚炎が抑制された（Bai *et al.*, 2004; Ikuta *et al.*, 2008）。アレルギー性接触性皮膚炎モデルでは、皮膚細胞からの炎症性サイトカインの産生において PLCεの関与が重要である（Hu *et al.*, 2010）。一方、表皮角化細胞（ケラチノサイト）特異的に PLCεを過剰発現させたトランスジェニックマウスは、ヒト皮膚炎における関与が示唆されている炎症性サイトカインの産生増加を伴う慢性皮膚炎を発症する(Takenaka *et al.*, 2011)。これらの結果から、ケラチノサイトに存在する PLCεは炎症性サイトカインの発現量を増加させることによって皮膚炎の発症に重要な役割を果たしていると考えられた。しかしながら、PLCεによる炎症性サイトカイン類の産生制御機構は不明であり、特にその細胞内シグナル伝達機構は明らかになっていない。そこで本研究では、皮膚炎における PLCεの機能に焦点をあて、ケラチノサイトにおけるサイトカイン産生のシグナル伝達機構における PLCεの機能を解析することを目的とした。

腫瘍壊死因子(TNF)αは炎症性サイトカインや接着因子、成長因子などの転写発現を誘導したり、カスパーゼを活性化してアポトーシスを誘導することが知られている多機能分子である。TNFα が TNF 受容体 I と結合すると、アダプター分子である TRADD (TNFR-associated death domain)と TRAF2 (TNFR-associated factor 2)、キナーゼである RIP (receptor interacting protein) が結合し、その結果 IKK (inhibitor of NF-κB (IκB) kinase) 複合体が活性化される。活性化された IKK 複合体は IκB をリン酸化することにより、IκB のユビキチン化およびプロテアソーム経路による分解を導く。すると、刺激非存在下では IκB と結合して細胞質に存在していた NF-κB が核移行できるようになり、標的遺伝子の転写を誘導する。一方、NF-κB そのものもリン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾を受けることにより、転写活性や DNA 結合能、安定性が制御されている。例えば、NF-κB ファミリー分子の一つである p65/RelA は様々なキナーゼにより、Ser276, Ser311, Ser536 がリン酸化されて転写活性が制御される。また、TNFα刺激は NF-κB

経路のみならず、Jun N-terminal kinase(JNK)や p38 MAP キナーゼ経路も活性化することが知られている。

実験方法と結果

1. ケラチノサイトにおいて TNFα刺激によって発現誘導されるサイトカインの解析

ヒト・ケラチノサイト培養細胞株 (PHK16-0b)において TNFα(100 ng/mL)刺激依存的に mRNA 量が上昇するサイトカインを逆転写 (RT) -ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法によって探索した。その結果、CXCL1, CXCL8, CCL20, CCL2/MCP1(monocyte chemotactic protein-1)の発現量が増加すること、さらに siRNA を用いて PLCεをノックダウンすることによって、CCL2 の発現上昇に PLCεが要求されることが明らかとなった。逆に、PHK16-0b 細胞に PLCεをトランスフェクションにより過剰発現させると、CCL2 mRNA 量が対象群と比べて 9 倍に上昇した。一方、PHK16-0b 細胞を低濃度 (4 ng/mL)の TNFαで刺激したところ対象群では CCL2 mRNA 量が約 5 倍になるのに対して、PLCε発現プラスミドをトランスフェクトした細胞群では 1130 倍にまで上昇するという発現の亢進が観察された。また、ケラチノサイト特異的に PLCεを発現させたトランスジェニックマウスの皮膚においても、CCL2 の発現増加が認められた。

2. TNFα刺激による CCL2 の発現誘導に関与する細胞内シグナル伝達経路の解析

JNK 阻害剤 (JNK inhibitor II) や p38 MAP キナーゼ阻害剤 (SB203580) による PHK16-0b 細胞の前処理は、TNFα刺激による CCL2 の発現誘導に影響を与えなかった。一方、IKK 阻害剤 (BAY11-7085) による前処理によって NF-κB の活性化を阻害したところ、TNFα刺激による CCL2 の発現誘導は完全に抑制された。プロテアソーム阻害剤 (MG-132) による IκB の分解抑制を介して NF-κB の活性化を阻害した場合も、同様の結果が得られた。逆に、IKKαを PHK16-0b 細胞に発現させると CCL2 の発現量が上昇した。

3. NF-κB の活性化に PLCεが関与している可能性の検討

siRNA による PLCεのノックダウンは、IKKα過剰発現に伴う CCL2 の発現誘導をほぼ完全に抑制した。一方、PLCε過剰発現による CCL2 の発現誘導は BAY11-7085 によって部分的にしか阻害されなかった。また、CCL2 の発現誘導において認められる PLCε過剰発現と低濃度 (4 ng/mL)TNFα刺激との相乗的効果も、BAY11-7085 によって部分的にしか阻害されなかった。次に、NF-κB シスエレメントを用いたルシフェラーゼレポーター解析を行ったが、siRNA による PLCεのノックダウンは TNFα刺激依存的なルシフェラーゼ活性の上昇は抑制しなかった。また、PLCεをノックダウンした細胞においても対象群と同様に TNFα刺激による NF-κB の核移行を認めた。さらに、NF-κB の活性制御に関与する Ser276, Ser311, Ser526 のリン酸化レベルを特異的抗体によるウエスタンブロットで解析したが、PLCεをノックダウンしてもこれらの残基のリン酸化レベルに影響はなかった。

4. PLCε活性を制御する上流因子の解析

構成的活性型の Ras [H-Ras(G12V)]、Rap1 [Rap1A(G12V)]、Rap2 [Rap2B(G12V)]、RhoA [RhoA(Q63L)]を PHK16-0b 細胞に発現させたが、RhoA(Q63L)だけが CCL2 の発現量を上昇させた。TNFα刺激によって GTP 結合型 RhoA は増加したが、siRNA を用いて PLCεをノックダウンしても RhoA(Q63L)依存的な CCL2 の発現増加は抑制されなかった。また、RhoA の活性化を阻害する C3 トランスフェラーゼで PHK16-0b 細胞を処理しても TNFα刺激依存的な CCL2 の発現誘導は抑制されなかったことから、PLCε活性化における RhoA の関与の可能性は否定された。一方、構成的活性型 Gα12 [Gα12 (Q229L)]を過剰発現させたところ CCL2 の発現量は増加し、さらにこの構成的活性型 Gα12 による CCL2 の発現増加は PLCεノックダウンによって有意に低下した。さらに、TNFα刺激による CCL2 の発現誘導は siRNA を用いて Gα12 をノックダウンすることにより抑制された。

考察

本研究から、ヒト・ケラチノサイトにおいて PLCεは TNFα刺激による CCL2 の発現誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。TNFα刺激による CCL2 の発現誘導に NF-κB 経路は必要であるため、PLCεと NF-κB 経路の関係性について検討したが、PLCεは TNFα刺激依存的な NF-κB の活性化に直接関与しているのではなく、NF-κB 経路と協調的に作用することによって、TNFα刺激による CCL2 の発現誘導に相乗的な効果をもたらしていることが明らかとなった。このことは炎症誘発刺激下において PLCεが炎症反応の進展や過敏性を高めている可能性を示唆していると考えられる。

また、PLCεの上流因子についての解析の結果、TNFα受容体から PLCεへ至る経路に Gα12 が少なくとも部分的に関与していることが明らかになった。今後、PLCεのシグナル伝達経路の更なる解析を通して、炎症反応の調節メカニズムにつての理解が深まると考える。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	乙 第２１２１号	氏　名	眞田（原田）裕子
論文題目 Title of Dissertation	ヒト角化細胞において TNFα刺激依存的な CCL2/MCP1 の発現誘導はホスホリパーゼ Cε と NF-κB 経路によって制御される PLCε cooperates with the NF-κB pathway to augment TNFα-stimulated CCL2/MCP1 expression in human keratinocyte		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 菊 康博 副　査 Vice-examiner 的崎尚 印 副　査 Vice-examiner 古瀬幹夫		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

ホスホイノシチド特異的ホスホリパーゼ C（PLC）はホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸をジアシルグリセロールとイノシトール 1,4,5-三リン酸に加水分解することによって細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たしている。その中でも PLCεは低分子量 G 蛋白質 Ras, Rap, RhoA や三量体 G 蛋白質 Gα12、Gβ1γ2 によって活性が制御されているという特徴をもつ。PLCε遺伝子改変マウスを用いた解析の結果、PLCεが発癌や皮膚の炎症反応において重要な役割を果たすことが明らかになってきたが、PLCεによる炎症性サイトカイン類の産生制御機構は明らかになっていない。そこで本研究では、皮膚炎における PLCεの機能に焦点をあて、ケラチノサイトにおけるサイトカイン産生のシグナル伝達機構における PLCε の機能を解析することを目的とした。

ヒト・ケラチノサイト培養細胞株（PHK16-0b）を TNFα(100 ng/mL) で刺激すると CCL2/MCP1(monocyte chemotactic protein-1)の発現量が増加すること、さらに siRNA を用いて PLCεをノックダウンすることによって CCL2 の発現上昇は PLCε依存的であること明らかとした。逆に、PHK16-0b 細胞に PLCεをトランスフェクションにより過剰発現させると、*CCL2* mRNA 量が上昇することを見出した。また、PLCε発現プラスミドをトランスフェクトしたケラチノサイトを低濃度（4 ng/mL)TNFαで刺激すると、*CCL2* mRNA の顕著な発現の亢進が観察された。これらのことは炎症誘発刺激下において PLCεが炎症反応の進展や過敏性を高めている可能性を示唆していると考えられる。また、NF-κB 経路の阻害剤である BAY11-7085 を培地に添加することにより、TNFα刺激による CCL2 の発現誘導に NF-κB 経路が必要であることを示した。NF-κB の上流因子である IKKα過剰発現に伴い CCL2 の発現量は上昇するが、この発現誘導は PLCεをノックダウンすることによって完全に抑制された。一方、PLCε過剰発現による CCL2 の発現誘導は BAY11-7085 によって部分的に阻害された。このように、TNFα刺激による CCL2 の発現誘導において、PLCε と NF-κB 経路は互いに影響を及ぼし合うことにより、CCL2 の発現誘導に相乗的な効果をもたらしていることが明らかとなった。さらに PLCεの上流因子についての解析の結果、TNFα受容体から PLCεへ至る経路に Gα12 が少なくとも部分的に関与していることが明らかになった。

本研究は、TNFα刺激（炎症誘発刺激）によるヒト・ケラチノサイトにおける *CCL2* の発現誘導における PLCεの機能について研究したものであるが、従来解明されていなかった PLCε と NF-κB 経路との協調作用による *CCL2* 遺伝子の新しい発現誘導機構をはじめて明らかにしたものとして価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。