

Title	Involvement of nuclear factor- $\kappa$ B activation through RhoA/Rho-kinase pathway in LPS-induced IL-8 production in human cervical stromal cells
Author(s)	清水, 彰子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47551">https://hdl.handle.net/11094/47551</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	清水彰子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第20983号
学位授与年月日	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Involvement of nuclear factor- $\kappa$ B activation through RhoA/Rho-kinase pathway in LPS-induced IL-8 production in human cervical stromal cells (ヒト子宮頸管細胞における IL-8 産生制御機構の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 木村 正 (副査) 教授 高井 義美 教授 大菌 恵一

## 論文内容の要旨

### [ 目的 ]

分娩時にみられる子宮頸管の熟化(頸管の軟化開大)は、そのメカニズムの上では炎症様の反応であり、特に早産の誘因となる羊膜絨毛膜炎では炎症性ケモカイン IL-8 が頸管熟化における重要な因子であることが知られている。IL-8 産生は転写因子 NF- $\kappa$ B によって調節されているが、最近炎症担当細胞における NF- $\kappa$ B 活性化に低分子量 G 蛋白質 Rho/Rho-kinase を介する系が関与していると報告された。また先行研究により、Rho-kinase 抑制剤 Y27632 は、マウスの早産を予防することが示された。今回ヒト子宮頸管細胞による IL-8 産生の細胞内制御機構を明らかにするため、NF- $\kappa$ B 活性化における RhoA/Rho-kinase 経路の関与を検討した。

### [ 方法ならびに成績 ]

#### 1. 子宮頸管間質細胞での IL-8 産生における LPS、IL-1 $\beta$ の作用

良性疾患により子宮全摘手術を受けた非妊娠女性より、同意を得て摘出子宮頸管を一部採取し、間質細胞を分離培養し実験に供した。子宮頸管間質細胞を、LPS (1~100  $\mu$ g/ml)、IL-1 $\beta$  (1~10ng/ml) で 2~24 時間刺激した後、培養上清中の IL-8 濃度を ELISA 法にて測定した。LPS、IL-1 $\beta$  とも濃度、時間依存性に IL-8 産生を促進した。

#### 2. IL-8 産生における RhoA、Rho-kinase、NF- $\kappa$ B 阻害剤の効果

子宮頸管間質細胞を Rho 阻害剤 (C3 transferase exoenzyme) または Rho-kinase 阻害剤 (Y27632) にて前処理したのち、LPS 10  $\mu$ g/ml、IL-1 $\beta$  1 ng/ml で 8 時間刺激し、培養上清中の IL-8 濃度を ELISA 法を用いて測定した。C3、Y27632 は LPS による IL-8 産生を有意に抑制したが、IL-1 $\beta$  による IL-8 産生は抑制しなかった。NF- $\kappa$ B 阻害剤である BAY11-7082 にて前処理したのち、LPS、IL-1 $\beta$  で刺激し、培養上清中の IL-8 濃度を測定したところ、LPS および IL-1 $\beta$  による IL-8 産生はともに有意に抑制された。

#### 3. LPS、IL-1 $\beta$ による Rho の活性化

LPS、IL-1 $\beta$  が子宮頸管間質細胞において Rho を活性化するか否かを、pull down assay により検討した。LPS は Rho を活性化したが、IL-1 $\beta$  による Rho の活性化は軽微であった。

#### 4. siRNA を用いた RhoA knockdown が IL-8 産生におよぼす効果

子宮頸管間質細胞の IL-8 産生における RhoA の関与をさらに検討するため、RhoA siRNA を子宮頸管間質細胞に形質導入したのち、LPS、IL-1 $\beta$  にて刺激した際の培養上清中の IL-8 を ELISA 法にて測定した。RhoA knockdown により、LPS による IL-8 産生は抑制されたが、IL-1 $\beta$  による IL-8 産生は有意に抑制されなかった。

#### 5. LPS、IL-1 $\beta$ による I $\kappa$ B- $\alpha$ リン酸化

NF- $\kappa$ B の活性化機構として、I $\kappa$ B- $\alpha$  がリン酸化されることが知られている。子宮頸管間質細胞において LPS、IL-1 $\beta$  により I $\kappa$ B- $\alpha$  がリン酸化されるか否かを Western blotting 法にて検討した。LPS および IL-1 $\beta$  は子宮頸管間質細胞の I $\kappa$ B- $\alpha$  リン酸化を促進した。

#### 6. NF- $\kappa$ B 活性化における RhoA/Rho-kinase 経路の関与

子宮頸管間質細胞に NF- $\kappa$ B transcription reporter vector を導入し、LPS、IL-1 $\beta$  で刺激した際の NF- $\kappa$ B 活性化を luciferase assay を用いて測定した。LPS は NF- $\kappa$ B を活性化したが、C3、Y27632 および RhoA siRNA により、その活性化は有意に抑制された。また IL-1 $\beta$  による NF- $\kappa$ B 活性化は C3、Y27632 および RhoA siRNA では有意に抑制されなかった。

[ 総括 ]

LPS による子宮頸管間質細胞における IL-8 産生の制御機構には、Rho/Rho-kinase 経路を介した NF- $\kappa$ B 活性化が関与していることが示唆された。また IL-1 $\beta$  による IL-8 産生制御機構には、Rho/Rho-kinase 経路以外を介した NF- $\kappa$ B 活性化が関与していると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、早産や分娩発来時において子宮頸管の熟化に重要な役割を持つ IL-8 産生の調節機構を明らかとするため、ヒト子宮頸管間質細胞を用いて、IL-8 産生調節における転写因子 NF $\kappa$ B の関与や、NF $\kappa$ B の活性化における低分子量 G 蛋白質 RhoA/Rho-kinase 経路の役割を検討したものである。

LPS、IL-1 $\beta$  は子宮頸管間質細胞において IL-8 産生を刺激したが、NF $\kappa$ B 阻害剤によりこれらによる IL-8 産生は抑制された。また、LPS、IL-1 $\beta$  が子宮頸管間質細胞において NF $\kappa$ B を活性化することが示された。この NF $\kappa$ B 活性化を引き起こす細胞内調節機構を明らかとするため、siRNA による RhoA のノックダウン、Rho-kinase 阻害剤を用いて検討した結果、LPS による NF $\kappa$ B 活性化および IL-8 産生は、RhoA/Rho-kinase 経路の阻害により有意に抑制されたが、IL-1 $\beta$  による NF $\kappa$ B 活性化および IL-8 産生は有意に抑制されなかった。また、LPS は RhoA を活性化したが、IL-1 $\beta$  による RhoA の活性化は微弱であった。

本研究により、LPS 刺激による IL-8 産生の制御機構には Rho/Rho-kinase 経路を介した NF $\kappa$ B 活性化が関与しており、Rho/Rho-kinase 経路を制御することで早産にいたる子宮頸管熟化を予防する薬剤の開発につながる可能性を開くものであり、学位の授与に値するものであると考える。