

研 第 358 号

(別紙様式第 3 号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Inhibition by ethyl pyruvate of the nuclear translocation of nuclear factor- κ B
in cultured lung epithelial cells

(ヒト肺上皮細胞における Ethyl Pyruvate による NF- κ B の核内移行抑制)

氏 名 水谷 文子



論 文 要 旨

【 背 景 】 Ethyl pyruvate (EP) は *in vitro* および *in vivo* において抗炎症効果を示すことが報告されている。 Lipopolysaccharide 刺激ラットにおいて、EPはIL-6や誘導型一酸化窒素合成酵素の発現を抑制し、生存期間を延長させる (Venkataraman et al., 2002)。 EP の抗炎症効果の機序として、 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の活性化の抑制作用が報告されている。 しかし、その分子機構については不明である。

【 目 的 】 サイトカインの一つである Tumor necrosis factor α (TNF α) は、NF- κ B を活性化することが知られている。本研究では、急性肺障害の治療を目的として、肺胞上皮細胞の培養株細胞を用いた検討を行った。ヒト肺腺癌細胞由来の A549 細胞は、II型肺胞上皮細胞様の特徴を有する。今回、A549細胞を用いてTNF α 刺激によるNF- κ Bの活性化に対するEPの作用とその分子機構を検討した。

【 方 法 ・ 結 果 】 ① A549細胞にNF- κ Bルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入し、TNF α 刺激によるNF- κ Bの活性化を検討した。NF- κ B活性は

TNF α 刺激により約 7.5 倍に増加した。TNF α 刺激時の NF- κ B の活性を 100 % とすると、5 mM の EP では 51.8 \pm 9.4 % に、10 mM では 17.9 \pm 1.8 % に抑制された。② 免疫ブロット法により、I κ B α のリン酸化とタンパク量の変化を検討した。TNF α 刺激後 15 分以内に I κ B α のリン酸化と分解が認められた。30 分後から I κ B α のタンパク量が増加した。EP は、15 分以内の I κ B α のリン酸化と分解には影響を与えなかったが、30 分後からの I κ B α のタンパク量の増加を抑制した。③ RT-PCR 法により、I κ B α の mRNA の変化を検討した。mRNA は TNF α 刺激後 10 分で増加した。この増加は、EP の添加で完全に抑制された。④ A549 細胞の核抽出液を用いて RelA の核内移行を免疫ブロット法により検討した。TNF α 刺激後 5 分以内に RelA の核内移行が認められた。EP は RelA の核内移行を強く抑制した。⑤ ゲルシフトアッセイ法により、核抽出液を用いて、NF- κ B と DNA の結合を検討した。TNF α 刺激により NF- κ B と DNA の結合は増加し、EP により 75.3 \pm 11.9 % に抑制された。NF- κ B の各サブユニットに

対する抗体を用いたスーパーシフトアッセイにより、NF- κ B 複合体は RelA と p50 から成ることが確認された。

【考察】 これまでに、EP の抗炎症効果には NF- κ B シグナル経路の抑制が関与することが示唆されていた。本研究により、EP による NF- κ B シグナル経路の抑制の分子機構として、EP が TNF α による RelA の核内移行を抑制することが初めて明らかになった。現在、この核内移行の抑制の分子機構については不明であるが、EP により RelA のシステイン残基が化学修飾を受けるとを示唆する報告もある。最近、私たちは、精製した RelA が EP により *in vitro* で立体構造変化を受けるという結果を得ている。

今回の検討により、EP は NF- κ B シグナル経路の活性化が重要な役割を持つ炎症において、有効な抗炎症薬となる可能性が示唆された。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 第358号 論文博	氏名	水谷 文子
論文審査委員	審査日	平成22年4月28日	
	主査教授	水谷 研一	
	副査教授	渡部 久実	
	副査教授	澤口 昭一	
(論文題目)			
Inhibition by ethyl pyruvate of the nuclear translocation of nuclear factor- κ B in cultured lung epithelial cells (ヒト肺上皮細胞における Ethyl pyruvate による NF- κ B の核内移行抑制)			
(論文審査結果の要旨)			
1. 研究の背景と目的			
Ethyl pyruvate (EP)は <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> において様々な抗炎症効果を示し、その作用機序の1つとして nuclear factor-kappa B (NF- κ B)経路の活性化の抑制が報告されている。本研究では、肺胞上皮細胞様の特徴を有する A549 細胞を用いて、TNF α 刺激による NF- κ B 経路の活性化に対する EP の作用とその分子機構について検討した。			
2. 研究結果			
ルシフェラーゼ活性測定法によって、TNF α 刺激による NF- κ B 経路の活性化が確認できた。EP により、濃度依存性にこの活性化は抑制された。この抑制作用は、ビルビン酸やエタノールではみられず、EP に特異的であった。			
次に、この抑制の分子機構を検討した。1) Western blot 法において、I κ B α のタンパク量とリン酸化の程度は、EP 存在下でも、TNF α 刺激のみの場合と比べ、15分以内では変化がみられなかった。したがって、EP の作用は、I κ B α のリン酸化やユビキチン化および分解の抑制ではないことが明らかとなった。2) NF- κ B 経路の活性化による I κ B α の mRNA とタンパク量の増加が、EP によって強く抑制された。3) TNF α 刺激による NF- κ B の核内移行が抑制された。また、ゲルシフトアッセイ法により、DNA との結合も減少していることが明らかとなった。抗体添加によるスーパーシフトから、NF- κ B は、RelA/p50 の複合体であることが確認された。			
3. 研究の意義と学術的水準			
以上の結果から、EP は NF- κ B 経路の活性化を抑制すること、およびその分子機構として RelA/p50 複合体の核内移行を抑制することが明らかとなった。EP は前臨床試験で、抗炎症効果を示すことが知られており、本研究で得られた知見は、EP の臨床応用をめざすうえで重要であると考えられる。			
以上の結果から、本論文は学位授与に十分値するものと判断した。			

備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。

2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。

3 *印は記入しないこと。