

論文審査の結果の要旨

氏名：佐々木 秀 人

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Propiece IL-1 α の細胞内の局在と細胞障害による細胞外放出

審査委員：（主 査） 教授 川 戸 貴 行

（副 査） 教授 浅 野 正 岳

教授 磯 川 桂 太 郎

教授 鈴 木 直 人

Interleukin (IL)-1 α は IL-1 ファミリー分子群の中で、IL-1 β と共に最初に発見された分子である。それぞれ異なる遺伝子によりコードされ、アミノ酸レベルでの相同性は僅かに 27% である。しかし、共通したレセプターを介してシグナル伝達を行う、両者共に細胞内では前駆体として産生されたのち、酵素的に処理され、成熟型分子として細胞外に分泌される、さらに、いわゆる leader peptide を持たず、一般的な分泌タンパク質が辿る小胞体-ゴルジ装置を経由せずに分泌されるなどの共通点を有している。IL-1 β が炎症性サイトカインとしてその多彩な機能を発揮するのに対して、IL-1 α は細胞が障害を受けた時に分泌される分子として知られている。こうした分子は alarmin と総称され、周囲の細胞・組織に、自身の置かれた危機的状況を知らしめる分子とされている。

IL-1 α は約 34 kDa の前駆体 (precursor IL-1 α ; pIL-1 α) として産生され、Ca²⁺ 依存性タンパク質分解酵素であるカルパインにより分子のほぼ中央部分を切断され、N 末端側の propiece IL-1 α (ppIL-1 α) と C 末端側の mature IL-1 α (mIL-1 α) に分離する。また pIL-1 α は natural killer cell や好中球などが有する granzyme B などによっても分解されることが明らかとなっている。このようにして生じた mIL-1 α は、細胞外に分泌されサイトカインとして機能するが、ppIL-1 α および pIL-1 α は分子内に存在する nuclear localizing sequence のために、核内に局在するとされている。しかし、これまでに ppIL-1 α が細胞内に存在することを直接的に証明した報告はなく、また酵素的に切断された後に、ppIL-1 α が細胞外に放出されるのか否か、さらに放出された場合、どのような機能を有するのかなどについては全く解明されていない。そこで本研究では IL-1 α の 3 種類の分子種のうち ppIL-1 α に着目し、その核局在を確認するとともに、酸化ストレスによる細胞障害に際して、細胞外に放出されるか否かという点について検討した。

本研究では、pIL-1 α 、ppIL-1 α および mIL-1 α の N 末端に green fluorescence protein または HiBiT 配列を結合した発現プラスミドを構築し、ヒト子宮癌由来の培養細胞 HeLa に transfection した。これらの transfectant を 1 μ M H₂O₂ 存在下および非存在下で培養した。ppIL-1 α の細胞内局在については蛍光顕微鏡で観察した。また、Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System で測定される細胞溶解液中と培養上清中の蛍光強度から 3 種の IL-1 α の放出率を算出した。

その結果、以下の結論を得ている。

1. H₂O₂ 非存在下では、ppIL-1 α の発現を示す蛍光は主に transfectant の核内に局在して認められ、また、細胞質内にもわずかに確認された。
2. H₂O₂ 存在下では、transfectant の核内および細胞質内に観察された蛍光はほぼ完全に消失した。
3. H₂O₂ 存在下での IL-1 α の放出率は、IL-1 α の 3 種の分子間で有意差は認められなかったが、いずれの IL-1 α 分子も H₂O₂ 非存在下での放出率に比べて有意に上昇した。

以上のことから、酸化ストレスにより ppIL-1 α が細胞外に放出されることが明らかとなった。ppIL-1 α の細胞外での機能については不明であるが、炎症反応の消長に対して何らかの形で関与していることが予測され、これを解明する上で得られた結果が示す意義は高く、歯科医学の分野に貢献するところ大なるものと考えられた。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 3 年 3 月 1 0 日