

論文の内容の要旨

氏名：定 村 正 之

博士の専攻分野の名称：博士 (歯学)

論文題名：IL-1 receptor type 2 による細胞内 pIL-1 α の細胞外分泌抑制

細胞が障害を受けた際に周囲に危険を知らしめるために分泌される分子は alarmin と総称される。Interleukin-1 α (IL-1 α) は約 31 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 calpain や好中球などが有する granzyme B などの酵素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。このうち pIL-1 α と mIL-1 α は細胞外に放出されて alarmin として機能するが、ppIL-1 α の細胞内外での機能は未解明である。IL-1 α の主要な受容体サブユニットとしては interleukin-1 receptor type 1 (IL-1R1) と type 2 (IL-1R2) が知られているが、IL-1R1 は IL-1 α 結合シグナルを核に伝達しうる一方、シグナル伝達に必要な配列である Toll/IL-1 receptor domain を欠く IL-1R2 はシグナル伝達を惹起できないデコイ受容体として知られている。従って、IL-1R2 は炎症反応を抑制する分子であるとされており、IL-1R2 knockout マウスを用いた研究からその効果に細胞特異性があることが明らかにされたが、その詳細なメカニズムは不明である。

そこで本研究では IL-1 α の細胞外分泌に対する IL-1R2 の効果について検討した。すなわち、IL-1R2 は IL-1 α 分泌を阻害するか、また、その効果に細胞膜貫通領域の関与があるのかという点である。

実験にはヒト子宮癌由来線維芽細胞である HeLa 細胞を用いた。細胞の培養は 10% ウシ胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium にペニシリン・ストレプトマイシンを添加したものをを用い、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。Transfection には、理研 BRC より購入した発現ベクターである pCMV-SPORT 6 IL-1R2 (pCMV-R2) を用いた。このベクターを鑄型として細胞膜貫通領域を quick change 法により欠失させた Δ transmembrane IL-1R2 (Δ TM) を作製した。N-末端に HiBiT-tag、C-末端に histidine-tag を付与した pIL-1 α は Kudo らが作製した HiBiT-pIL-1 α の C-末端に histidine-tag を quick change 法により付与したものをを用いた。transfection 実験は Lipofectamine 3000 を用いて行った。免疫蛍光染色は、24-well plate 内にカバースリップを置き、HeLa 細胞 (5 \times 10⁴ cells/well) を播種、培養し、18 時間後に pIL-1 α および IL-1R2 を transfection した。更に 18 時間後、上清を除去し、カバースリップをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、2%パラホルムアルデヒドで室温、10 分間固定した。再び PBS にて洗浄し、1% triton-X 100/PBS を加え、室温で 10 分間処理した。PBS で洗浄し、1% BSA/PBS で室温、10 分間ブロッキングを行った。免疫蛍光染色には、1 次抗体として mouse anti-histidine monoclonal 抗体 (1:100)、mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体 (1:100) を、また、2 次抗体として FITC 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 (1:100) を用いた。核染色は、DAPI-Fluoromount-G を用いて行った。顕微鏡像は、オールインワン蛍光顕微鏡を用いて観察し、撮影した。transfection 後、6 時間後に培養上清を回収した。培養上清中の pIL-1 α の測定は human IL-1 α ELISA kit を用いて行った。transfection による、pIL-1 α および IL-1R2 の発現と両者の結合を免疫沈降 (IP) と western blot (WB) にて確認した。transfectant を PBS で洗浄後、細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100) によって回収した。遠心後、上清を採取しサンプルとした。IP には、Ni-agarose ビーズ 30 μ l または、mouse anti-human IL-1R2 抗体 0.2 μ g と Protein G SepharoseTM4 Fast Flow 30 μ l を用いた。免疫沈降物中の pIL-1 α の検出には Nano Glo HiBiT blotting system を、IL-1R2 の検出には mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体と horseradish peroxidase 標識 goat anti-mouse IgG 抗体を用いた。WB では、1 次抗体は mouse anti-HiBiT monoclonal 抗体、2 次抗体は horseradish peroxidase 標識 goat anti-mouse IgG 抗体を使用した。SDS sample buffer にサンプルを溶解し、95°C で 5 分間反応させ、15% SDS-PAGE で電気泳動した。泳動後 Immobilon Transfer Membrane に転写し、1% BSA-PBS でブロッキングした。

その結果、pIL-1 α は 31 kDa の単一のバンドとして、また IL-1R2 は 59 kDa と 51 kDa の 2 本のバンドとして検出された。一方、transfection されていない HeLa 細胞ではバンドは検出されなかったことから、HeLa 細胞においては内在性の IL-1R2 は検出限界以下であることが明らかとなった。次に、それぞれの分子の細胞内局在について免疫蛍光染色により確認したところ、pIL-1 α は主に核に局在した。一

方, IL-1R2 は核及び細胞質に拡散して存在することが明らかとなった。pIL-1 α transfectant による pIL-1 α の分泌量の経時的な変化について, ELISA を用いて測定を行った。その結果, 経時的に培養上清中の pIL-1 α 濃度は上昇した。一方, mock transfectant では IL-1 α は検出限界以下であった。次に, IL-1R2 が pIL-1 α の分泌にどのような影響を及ぼすのか検討した。その結果, pIL-1 α transfectant の 6 時間後の培養上清中には 222.2 \pm 71.6 pg/ml の pIL-1 α が検出されたのに対し, IL-1R2 存在下では 105.8 \pm 50.0 pg/ml にまで抑制され, pIL-1 α transfectant における pIL-1 α の分泌を 100%としたとき, pIL-1 α の分泌量は 47.0 \pm 0.2%に低下した。また, Δ TM による pIL-1 α 分泌の阻害効果を検討したところ, pIL-1 α の分泌量は 26.4 \pm 0.1%に低下した。また, それぞれの transfectant から作製した細胞溶解液を用いた IP と WB によって, pIL-1 α と IL-1R2 は, HeLa 細胞内で複合体を形成していることが明らかとなった。

以上の結果から, 以下の結論を得た。

1. HeLa 細胞において, IL-1R2 は pIL-1 α の細胞外分泌を抑制した。
2. Transmembrane 領域を欠失した Δ TM は, wild type IL-1R2 よりもさらに高い pIL-1 α の細胞外分泌抑制効果を示した。
3. HeLa 細胞内では, IL-1R2 と pIL-1 α は相互に結合し, 複合体を形成していた。

以上のことから, IL-1R2 は, HeLa 細胞においても pIL-1 α 細胞外分泌抑制効果を維持していることが示唆された。しかし, IL-1R2 による pIL-1 α 細胞外分泌抑制の詳細なメカニズム解明には, さらなる研究が必要であると考えられた。