

論文の内容の要旨

氏名：花 山 真知子

博士の専攻分野の名称：博士 (歯学)

論文題名：HeLa における interleukin-1 receptor type 2 の decoy receptor としての機能

Interleukin (IL)-1 α は、細胞が低酸素状態、酸化ストレス、熱刺激などに晒されたときに放出される代表的な alarmin である。Alarmin とは、壊死・損傷した細胞から放出される分子であり、周囲の組織に炎症反応を誘導する物質の総称である。IL-1 α は細胞質内で 31 kDa の precursor IL-1 α (pIL-1 α) として産生された後、calpain などの酵素によって分子の中央部を酵素的に切断され、N 末端の propeptide IL-1 α (ppIL-1 α) と C 末端の mature IL-1 α (mIL-1 α) に分離される。これら 3 分子種のうち、pIL-1 α と mIL-1 α は細胞外に分泌され、標的細胞の膜表面に発現する膜貫通型タンパク質である IL-1 receptor type I (IL-1R1) と結合する。IL-1R1 は細胞膜上で IL-1R3 と会合し、両分子の細胞質内領域にある toll-like receptor IL-1R (TIR) ドメインを介してシグナルを伝達する。一方、IL-1R family 分子のうち IL-1R2 は、細胞質内領域が僅か 29 アミノ酸残基によって構成され、TIR ドメインを欠損している。このことから、IL-1R2 は decoy receptor とよばれ、細胞膜上でそのリガンドである IL-1 α および IL-1 β に結合しても、シグナルを伝達できないとされている。また、IL-1R2 は細胞外領域を ADAM17 などのタンパク分解酵素によって切断後、細胞外に放出される。こうして細胞外に放出された IL-1R2 は IL-1 α や IL-1 β に結合し、これらの IL-1R1 への結合を阻害することによってその作用を抑制するため、炎症の進行を抑える機能があるとされている。著者はこれまでに、ヒト子宮癌由来である HeLa の IL-1R1 を欠損した細胞株 (CR-R1-4) を樹立した。

本研究では、HeLa および CR-R1-4 を用いて、IL-1R2 が decoy receptor として機能を維持しているかという点について検討を加えた。

細胞の培養には 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。IL-1R1 および IL-1R2 の発現 plasmid は、理化学研究所バイオリソース研究センターより購入した plasmid を改変して作製した。N-末端に HiBiT-tag、C-末端に histidine-tag を付与した pIL-1 α (HiBiT/His-pIL-1 α) は、Sata らにより作製されたベクターを鋳型として Quick-change site-directed mutagenesis kit により作製した。Transfection 実験は、Lipofectamine 3000 を用いて行った。24-well plate に、5 \times 10⁴/well で播種し固着させた HeLa または CR-R1-4 に発現 plasmid を加え、ともに 18 時間培養し、これを transfectant とした。それぞれの transfectant の培地を交換し、さらに 6 時間ないし 18 時間培養後、培養上清中の HiBiT/His-pIL-1 α および IL-8 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay により測定した。また、細胞溶解液を回収し、western blot 法により IL-1R2 および GAPDH のタンパク質発現を確認した。

CR-R1-4 には IL-1R2 の発現は確認できなかった。CR-R1-4 に IL-1R1 を transfection した後、recombinant human (rh) IL-1 β で刺激したところ、IL-8 産生が誘導され、IL-1 β 反応性が回復した。一方、IL-1R1 の配列を含まない plasmid の transfection では IL-1 β に対する反応を認めなかったことから、CR-R1-4 における IL-1R1 の特異的欠損が確認できた。次に、HeLa に IL-1R2 と HiBiT/His-pIL-1 α を co-transfection すると IL-1 α の分泌は阻害されたことから、IL-1R2 は細胞内においてその機能を発揮していると考えられた。続いて、HeLa に IL-1R2 を transfection したのち rhIL-1 α または rhIL-1 β で刺激して IL-8 産生を調べたところ、どちらの刺激によっても IL-8 の産生増加が認められた。さらに、CR-R1-4 に、IL-1R1 と IL-1R2 を co-transfection したのち rhIL-1 β によって刺激したところ、IL-1R1 の単独での transfection と同程度の IL-8 産生増加が認められた。すなわち、HeLa または CR-R1-4 に IL-1R2 を発現しても rhIL-1 α と rhIL-1 β に対する反応性は維持されており、細胞外における IL-1R2 の decoy receptor としての機能は確認されなかった。

これまでに、コラーゲン誘導性関節炎を発症させた IL-1R2 knockout mouse では、マクロファージにのみ、IL-1 に対する反応性の増強が認められことなどが報告されており、IL-1R2 の decoy receptor としての機能は、細胞種特異的であると考えられている。本研究では、HeLa に発現させた IL-1R2 は、細胞質内での機能は維持しているものの、細胞膜上での機能は失われていた。HeLa における IL-1R2 の部

分的な機能喪失については、IL-1R2 の細胞種特異的な機能発現のメカニズムの解明において極めて重要な知見であり、今後、さらなる検討が必要と考えられた。

以上のことから、HeLa および CR-R1-4 において、強制発現した IL-1R2 は、細胞内においてのみ decoy receptor として機能することが明らかとなった。