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

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

花　山　真知子

（指導：浅　野　正　岳　教授，角　田　麻里子　助教）

緒言

Interleukin (IL)-1α の cDNA クローニングがなされて以来[1]，IL-1 family に属する分子の同定が進み，現在では 11 種類により構成されている[2]。類縁分子である IL-1β と IL-1α との相同性は，アミノ酸レベルで僅かに 27% である[3]。しかし両者は，①共通のレセプターを介してシグナル伝達を行い，②細胞内で前駆体として産生されたのち，酵素的な処理を受けて成熟型分子として細胞外に分泌され，③leader peptide を持たないため小胞体-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[4, 5]。IL-1α は細胞が障害を受けた際に分泌される分子で，これらは alarmin と総称され[6]，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。

precursor IL-1α (pIL-1α) は質量約 31 kDa で，Ca^{2+}依存性タンパク質分解酵素であるカルパインなどにより分子のほぼ中央部分を切断され，N 末端側の propiece IL-1α (ppIL-1α) と C 末端側の mature IL-1α (mIL-1α) に分離する[7, 8]。こうして産生された ppIL-1α と pIL-1α は分子内に nuclear localizing sequence を有しており，核内に認められる[4]。一方，細胞外に分泌された mIL-1α と pIL-1α は，特異的なレセプターである IL-1 receptor type I (IL-1R1) に結合し，さらに IL-1R3 と呼ばれるアクセサリー受容体との複合体を形成する[2]。IL-1R1 と IL-1R3 はシグナル伝達に必須の toll-IL-1 receptor (TIR) ドメインを細胞質内に有しており，これによってシグナルを伝達する。これに対して IL-1R2 は TIR ドメインを欠いており，シグナルを伝達できないことから decoy receptor と呼ばれている[9]。本論文の著者は，これまでにヒト子宮頸癌由来 (HeLa) の IL-1R1 を欠失した細胞である CR-R1-4 の樹立に成功しており，この細胞が IL-1α および IL-1β のシグナルを伝達しないことを報告した[10]。そこで本研究では，HeLa にお

ける IL-1R2 の強制発現，または CR-R1-4 における IL-1R1 と IL-1R2 の強制発現が，IL-1R1 へのリガンド結合後のシグナルを遮断し得るかという点について検討した。

材料および方法

1. 細胞培養と試薬

本研究には，ヒト子宮頸癌由来 HeLa (ヒューマンサイエンス研究資源バンク，大阪) および HeLa の IL-1R1 を欠失した細胞である CR-R1-4 を用いた[10)]。培養は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco，Waltham，MA，USA) に 10% ウシ胎児血清 (FCS) および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich，St. Louis，MO，USA) を添加したものを用いて，37℃，5% CO_2 存在下で行った。それぞれの細胞を 24-well plate (イワキ，榛原) に 5×10^4 cells/well となるよう播種し，transfection 実験に用いた。ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC3 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク) は，10% FCS-Rosewell Park Memorial Institute (Gibco) 培地により培養した。細胞の刺激に用いたヒトリコンビナント IL-1α (rhIL-1α) およびヒトリコンビナント IL-1β (rhIL-1β) は，Pepro Tech (Cranbury，NJ，USA) から購入した。

2. 発現 plasmid の構築と transfection

IL-1R1 または IL-1R2 の full length cDNA を含有するベクターである pDNR-Dual-IL-1R1 と pSPORT-IL-1R2 は，理化学研究所バイオリソース研究センター (つくば) より購入した。このうち，IL-1R1 については発現ベクターpMKIT-neo vector の EcoRI site に Gibson assembly kit (New England BioLabs，Hitchin，UK) を用いて subcloning した (図 1)。N-末端に HiBiT-tag，C-末端に histidine-tag を付与した pIL-1α (HiBiT/His-pIL-1α) は Sata ら [11)] によって作製されたベクターを鋳型として Quick-change site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies，Santa Clara，CA，USA) により作製した (図 1)。

Transfection は，Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific，Waltham，MA，USA) を用いて行った。Plasmid を OPTI-MEM (25 µl) に溶解し，3000 Reagent (0.75 µl) と混和した。一方，Lipofectamine 3000 (0.75 µl) を OPTI-MEM (25 µl) に溶解した。両溶液を混合し，室温で 15 分間反応させて培養液に添加し，細胞と共に 18 時間培養した。このようにして作製した細胞を transfectant とした。

3. ELISA による IL-1α および IL-8 の定量

Transfectant への rhIL-1α または rhIL-1β による刺激は，表 1 に示す条件で行った。IL-1α および IL-8 の測定は，培養後，培養上清を回収し，遠心分離後 (16,900 × g，1 分間), 上清を新しいチューブに回収し, これをサンプルとして ELISA kit (Quantikine, R&D SYSTEMS，Minneapolis，MN, USA) を用いて行った。

4. Western blot (WB) 法

HSC3 および CR-R1-4 を phosphate buffer saline (PBS) で洗浄後, 細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl，pH 7.5，150 mM NaCl，0.5% Triton X-100) によって処理し，遠心後サンプルを回収した。総タンパク質量を測定し，western blot を行った。すなわち，両サンプル共に SDS sample buffer に溶解し，95℃で 5 分間反応させ，10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動した。泳動後 Immobilon Transfer Membrane (Merck, Darmstadt, Germany) に転写し，1% BSA-PBS でブロッキングした。1 次抗体としては，マウス抗ヒト IL-1R2 抗体 (× 1,000; Santa Cruz，Dallas，TX，USA) およびマウス抗ヒト GAPDH 抗体 (×10,000; Santa Cruz) を，2 次抗体としては，horseradish peroxidase 標識ヤギ抗マ

ウス IgG 抗体 (×5,000; Jackson Immuno Research，West Grove，PA，USA) を用いた。ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva，Marlborough，MA，USA) によって化学発光させて検出したバンドを，iBright 1500 (Thermo Fisher Scientific) を用いて画像として取り込んだ。

5. 統計学的解析

統計解析は，正規性を Shapiro-Wilk 検定，等分散性を Levene 検定で確認した。その後，図 4 および図 6 については Student's *t*-test を用い，図 3 および図 5 については，一元配置分散分析後の Tukey の多重比較を用いた。結果は，平均値 ± 標準偏差で表し，0.05 未満の p 値は統計的に有意であるとみなした。

結果

1. CR-R1-4 における IL-1R2 の発現

CR-R1-4 における IL-1R2 の発現について WB によって検索した。その結果，図 2 に示したように，ポジティブコントロールとして用いた HSC3 で確認された 56 kDa のバンドは，CR-R1-4 においては検出できなかった。

2. CR-R1-4 の rhIL-1β に対する反応性

HeLa は，rhIL-1β 刺激に反応して IL-8 産生を増強することが明らかとなっている[12)]。図 3A に示した通り，HeLa において 100 pg/ml rhIL-1β 存在下では 1.8 ± 73.3 ng/ml の IL-8 分泌が認められ，rhIL-1β 非存在下の 0.3 ± 0.1 ng/ml と比較して有意な分泌増加が確認された。そこで，CR-R1-4 に IL-1R1 発現ベクターを transfection したのち，rhIL-1β に対する反応性の回復について検討した。IL-1R1 transfectant における IL-8 分泌量は，rhIL-1β 非存在下では 129.2 ± 5.3 pg/ml であったが，10 pg/ml，100 pg/ml および 1,000 pg/ml の rhIL-1β 存在下では，それぞれ，490.0 ± 31.5 pg/ml，429.6 ± 9.7 pg/ml および 442.6 ± 6.9 pg/ml と有意に増加し，rhIL-1β 刺激に対する反応性が認められた。また，コントロールとして IL-1R1 の配列を含有しない pcDNA vector を transfection した CR-R1-4 では，rhIL-1β 刺激に対する反応は認められなかった (図 3B)。

3. HeLa における IL-1R2 の強制発現の効果

IL-1R2 の細胞内での decoy receptor としての機能を確認するため，HeLa に HiBiT/His-pIL-1α と IL-1R2 を強制発現し，HiBiT/His-pIL-1α の細胞外への分泌に対す

る影響を確認した。その結果，図 4 に示す通り，HiBiT/His-pIL-1α 単独の transfectant から分泌された HiBiT/His-pIL-1α を 100% としたときに，HiBiT/His-pIL-1α と IL-1R2 の co-transfectant では 53.3 ± 19.6% と有意に分泌が低下した。この結果から，IL-1R2 は HiBiT/His-pIL-1α の分泌に対して抑制的に作用することが明らかとなった。そこで，IL-1R2 を強制発現した HeLa における rhIL-1α または rhIL-1β の刺激に対する反応性を確認した。その結果，IL-1R2 transfectant における IL-8 の分泌量は，100 pg/ml rhIL-1α 存在下では 1.4 ± 0.1 ng/ml，100 pg/ml rhIL-1β 存在下では 2.1 ± 0.1 ng/ml であり，pcDNA transfectant と同様に IL-8 の分泌が増強された (図 5)。

4. IL-1R2 による rhIL-1β 反応性の阻害

CR-R1-4 では IL-1R2 が発現していなかった (図 2)。一方，CR-R1-4 への IL-1R1 の強制発現は，rhIL-1β に対する反応性を回復したことから (図 3)，CR-R1-4 における IL-1R1 および IL-1R2 の共発現が, IL-1β に対する反応性に対してどのような影響を及ぼすか検討した。その結果，IL-1R1 単独の transfection では rhIL-1β 非存在下に比べて 100 pg/ml rhIL-1β 存在下で 443.8 ± 80.8 pg/ml と有意に IL-8 の分泌が増強された。一方，IL-1R2 単独の transfection では，rhIL-1β 刺激に対して全く反応を示さなかった。さらに，両分子の共発現では 100 pg/ml rhIL-1β 存在下で 492.3 ± 82.8 pg/ml と，非存在下に比べて有意に IL-8 分泌が増強され，これは IL-1R1 単独の transfection と同程度の増強であった (図 6)。

考察

IL-1αは，生体内でubiquitousに発現しているとされるが，細胞死などに際して初めて細胞外に分泌される[5)]。このメカニズムについては以下の様に考えられている。すなわち，IL-1R2がpIL-1αと細胞内で複合体を形成しており，グラム陰性菌の菌体外成分であるリポポリサッカライドなどの刺激により細胞内のcaspaseが活性化されると，IL-1R2が分解される。その結果，この複合体が解消され，pIL-1αが細胞外に分泌されるというものである[13)]。そこで本研究では，IL-1R2を有しないHeLaにHiBiT/His-pIL-1αとIL-1R2をco-transfectionしたところ，HiBiT/His-pIL-1αの分泌が抑制された。このことは，HeLaにおいてもIL-1R2がこれまで報告されてきた細胞内における機能を発揮していることを示すものであり[13)]，HeLa内でHiBiT/His-pIL-1αとIL-1R2が結合した結果と考えられた。しかし，この結合によってHiBiT/His-pIL-1αの分泌が抑制されるメカニズムは明らかになっていない。IL-1R2はIL-1R1に次ぐ第2のレセプターとして発見された分子であり[14)]，細胞外領域でリガンドと結合すると考えられている。しかし，細胞内での複合体形成によってHiBiT/His-pIL-1αが細胞外に分泌されなくなるのであれば，細胞内領域または細胞膜貫通領域がHiBiT/His-pIL-1αの分泌に対して抑制的な機能を有する可能性が考えられ，この点についてはさらなる検討が必要である。

一方，IL-1R2の細胞外領域の細胞膜近傍は，matrix metalloproteinaseであるADAM17により切断され[15)]，細胞外領域のみが細胞外に移行することにより，炎症に際して分泌されたmIL-1αに結合し，その活性を低減させるとされている。本研究においても，HiBiT/His-pIL-1α-IとIL-1R2の複合体が細胞外で形成され，ELISAによる検出に影響

した可能性が考えられることから，Hela の細胞外における両者の複合体の形成についてはさらに追究すべきものと考えている。

IL-1R2 は TIR-ドメインを欠く decoy receptor とされており，細胞質内領域はわずか 29 アミノ酸により構成されている [14]。TIR-ドメインとは，マクロファージや樹状細胞などの細胞表面に発現し，病原体関連分子パターンを認識する toll-like receptor (TLR) と IL-1R1 の細胞質内に共通して見られる配列である [16]。TIR-ドメインを有するレセプター同士が会合することによって，myeloid differentiation factor 88 や Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN-beta などのアダプターを誘導し，これによって転写因子である nuclear factor κB，interferon regulatory factor などを活性化させシグナルを伝達する [16]。

IL-1α および IL-1β の IL-1R1 への結合は，IL-1R3 を IL-1R1 近傍に誘導し，両者の TIR ドメインが上記のメカニズムでシグナルを伝達する。HeLa に IL-1β を作用させると IL-8 産生が増強されることが明らかとなっており [12]，このことは HeLa に IL-1R3 が存在することを意味している。そこで，HeLa に IL-1R2 を強制発現させることにより，rhIL-1α または rhIL-1β 刺激に対する反応性が低減するのではないかと考えた。しかし，IL-1R2 を発現させた transfectant においては，rhIL-1α および rhIL-1β 依存性の IL-8 分泌増強には何ら抑制的な効果を認めなかった。さらに，CR-R1-4 における IL-1R1 の強制発現が，rhIL-1α および rhIL-1β に対する反応性を回復させた [10] ことから，この細胞における IL-1R1 および IL-1R2 の co-transfectant を作製し，rhIL-1β で刺激した。結果は，HeLa と同様で，IL-1R2 による IL-8 の分泌抑制効果は全く見られなかった。Shimizu ら [17] は，コラーゲン誘導性関節炎を発症させた IL-1R2 knockout mouse に

おいては，IL-1 に対する反応性の増強がマクロファージにのみに認められたことから，IL-1R2 の decoy receptor としての機能は，細胞種特異的であると結論している。線維芽細胞において IL-1R2 がシグナル伝達を抑制するという報告[18]もあるが，ヒトの細胞においてはこの現象は確認されていない。本研究では，HeLa における IL-1R2 の強制発現は，rhIL-1α および rhIL-1β に対する反応性を抑制することは無かったが，HiBiT/His-pIL-1α の分泌は抑制した。このことは，HeLa において 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ることを示すものであった。HeLa における IL-1R2 の部分的な機能喪失がいかなる機序によるのかという点については極めて重要であり，今後さらなる検討が必要と考えられた。

結論

本研究では，IL-1R2 の decoy receptor としての機能が，HeLa と HeLa の IL-1R1 を欠失させた CR-R1-4 においても維持されているかという点について検討した。その結果，以下の結論を得た。

1. CR-R1-4 においては，IL-1R2 発現は確認できなかった。
2. CR-R1-4 においては，rhIL-1β に対する反応性は消失していた。
3. HeLa における IL-1R2 強制発現は，pIL-1α の分泌を阻害した。
4. HeLa における IL-1R2 の強制発現は，rhIL-1 α と rhIL-1β に対する反応を阻害しなかった。
5. CR-R1-4 における IL-1R1 の強制発現は，rhIL-1β に対する反応性を回復した。
6. CR-R1-4 における IL-1R1 と L-1R2 の強制発現は，rhIL-1β に対する反応を阻害しなかった。

以上の結果から，HeLa および CR-R1-4 に強制発現させた 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。

文献

1) Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, Dinarello CA (1984) Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 81, 7907-7911.
2) Boraschi D (2022) What is IL-1 for? The functions of interleukin-1 across evolution. Front Immunol 13, 8721.
3) March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K, Conlon PJ, Hopp TP, Cosman D (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. Nature 315, 641-647.
4) Monteleone M, Stow JL, Schroder K (2015) Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. Cytokine 74, 213-218.
5) Di Paolo NC, Shayakhmetov DM (2016) Interleukin 1α and the inflammatory process. Nat Immunol 17, 906-913.
6) Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. Curr Opin Immunol 17, 359-365.
7) Carruth LM, Demczuk S, Mizel SB (1991) Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin 1 alpha precursor. J Biol Chem 266, 12162-12167.
8) Afonina IS, Tynan GA, Logue SE, Cullen SP, Bots M, Lüthi AU, Reeves EP, McElvaney NG, Medema JP, Lavelle EC, Martin SJ (2011) Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1α. Mol Cell 44, 265-278.

9) Boraschi D, Italiani P, Weil S, Martin MU (2018) The family of the interleukin-1 receptors. Immunol Rev 281, 197-232.

10) Hanayama M, Ishiyama Y, Sadamura M, Moriyama A, Imaoka S, Tsunoda M, Asano M (2022) Establishment of interleukin-1 receptor type I knockout HeLa strain by CRISP/Cas9 system. J Biomed Sci Res 4, 1-5.

11) Sata E, Takada L, Kaetsu R, Fukasawa M, Ohtsu M, Motoyoshi M, Asano M (2020) A new enzyme-linked immunosorbent assay system against the N-terminal propiece of interleukin-1α. J Oral Sci 62, 340-343.

12) Yang HT, Cohen P, Rousseau S (2008) IL-1beta-stimulated activation of ERK1/2 and p38alpha MAPK mediates the transcriptional up-regulation of IL-6, IL-8 and GRO-alpha in HeLa cells. Cell Signal 20, 375-380.

13) Zheng Y, Humphry M, Maguire JJ, Bennett MR, Clarke MC (2013) Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1α, controlling necrosis-induced sterile inflammation. Immunity 38, 285-295.

14) McMahan CJ, Slack CJ, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI (1991) A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. EMBO J 10, 2821-2832.

15) Uchikawa S, Yoda M, Tohmonda T, Kanaji A, Matsumoto M, Toyama Y, Horiuchi K (2015) ADAM17 regulates IL-1 signaling by selectively releasing IL-1 receptor type 2 from the cell surface. Cytokine 71, 238-245.

16) O'Neill LAJ, Bowie AG (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in

Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 7, 353-364.

17) Shimizu K, Nakajima A, Sudo K, Liu Y, Mizoroki A, Ikarashi T, Horai R, Kakuta S, Watanabe T, Iwakura Y (2015) IL-1 receptor type 2 suppresses collagen-induced arthritis by inhibiting IL-1 signal on macrophages. J Immunol 194, 3156-3168.

18) Re F, Sironi M, Muzio M, Matteucci C, Introna M, Orlando S, Penton-Rol G, Dower SK, Sims JE, Colotta F, Mantovani A (1996) Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface "receptor" with anti-interleukin-1 function. J Exp Med 183, 1841-1850.

図及び表

表 1. 各 Transfectant の培養と ELISA による分泌タンパクの測定の手順

図3B
CR-R1-4に18 時間transfection
(pcDNAまたはIL-1R2)
↓
rhIL-1β (10, 100, 1,000 pg/ml) 存在下または非存在下で6時間培養
↓
培養上清中のIL-8分泌量をELISAにより測定

図4
HeLaに18時間transfection
(HiBiT / His-pIL-1αとpcDNAまたはIL-1R2)
↓
培養液交換後さらに18時間培養
↓
培養液中のpIL-1αをELISAにより測定

図5
HeLaに18時間transfection
(pcDNAまたはIL-1R2)
↓
rhIL-1αまたはrhIL-1β (それぞれ100 pg/ml) 存在下または非存在下で6時間培養
↓
培養上清中のIL-8分泌量をELISAにより測定

図6
CR-R1-4に18時間transfection
(IL-1R1単独，IL-1R2単独またはIL-1R1とIL-1R2を共に)
↓
rhIL-1β (100 pg/ml) 存在下または非存在下で6時間培養
↓
培養上清中のIL-8分泌量をELISAにより測定

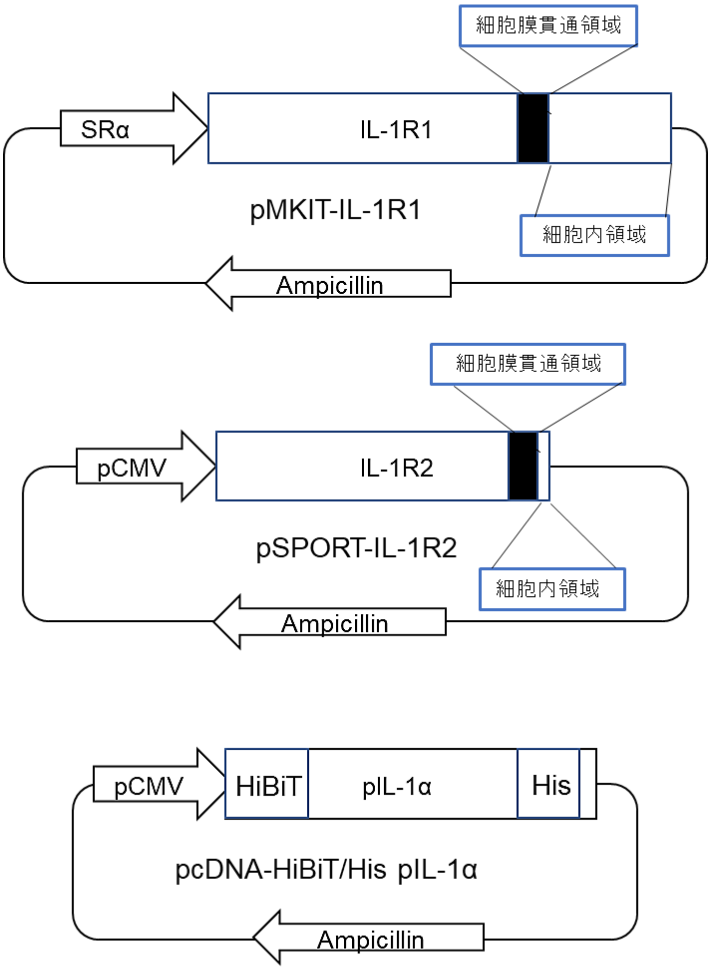

図 1. 実験に用いた発現プラスミドの構造

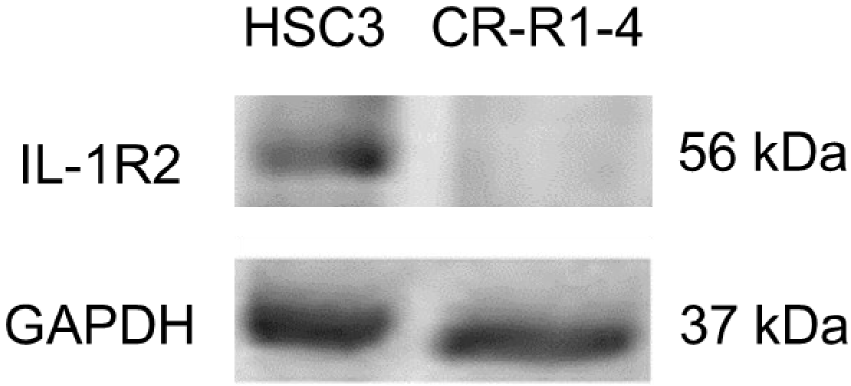

図 2. HSC3 および CR-R1-4 における IL-1R2 の発現

HSC3 および CR-R1-4 の細胞溶解液中の IL-1R2 (56 kDa) の発現を WB で確認した。

内部コントロールとして GAPDH (37 kDa) の検出を行った。

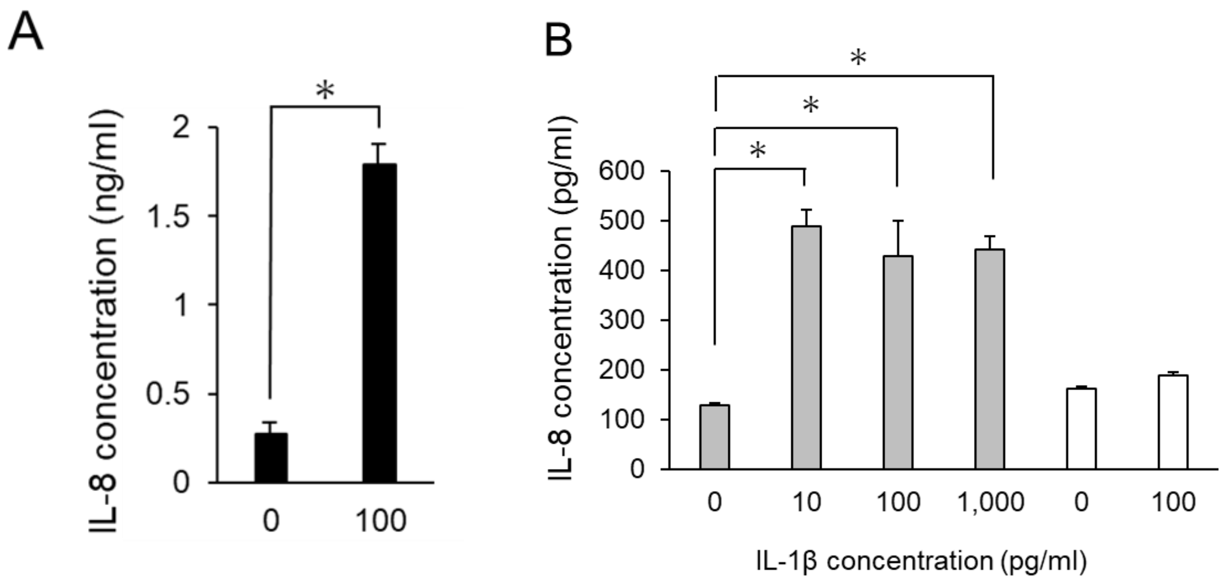

図 3. HeLa と IL-1R1 を強制発現させた CR-R1-4 の rhIL-1β に対する反応性

A. HeLa を rhIL-1β (100 pg/ml) 存在下または非存在下で 6 時間培養後，培養上清中の IL-8 分泌量を ELISA により測定した。n = 7, ＊p ＜ 0.05

B. CR-R1-4 に IL-1R1（灰色バー）またはコントロールとして pcDNA（白色バー）を transfection した。その後，培養液を交換し，transfectant を rhIL-1β (10, 100, 1,000 pg/ml) 存在下または非存在下で 6 時間培養した。培養後の培養上清中への IL-8 分泌量を ELISA により測定した。n = 5, ＊p ＜ 0.05

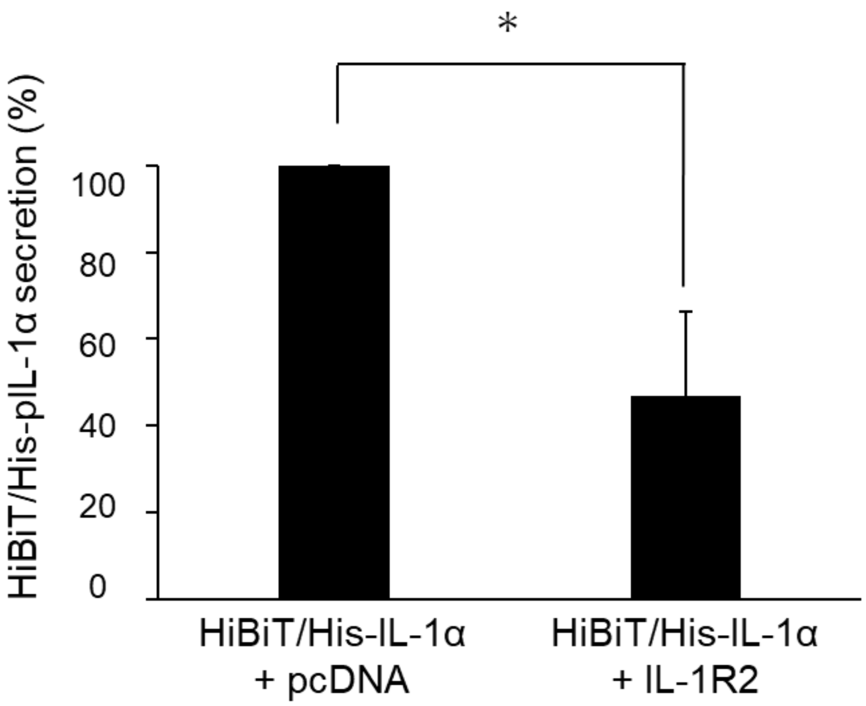

図 4. IL-1R2 による pIL-1α の分泌抑制

HeLa に pcDNA または IL-1R2 を，HiBiT/His-pIL-1α と共に co-transfection した。培養液を交換した後，それぞれの transfectant をさらに 18 時間培養した。培養後の上清中の HiBiT/His-pIL-1α 濃度を ELISA により測定した。n = 5，＊$p < 0.05$

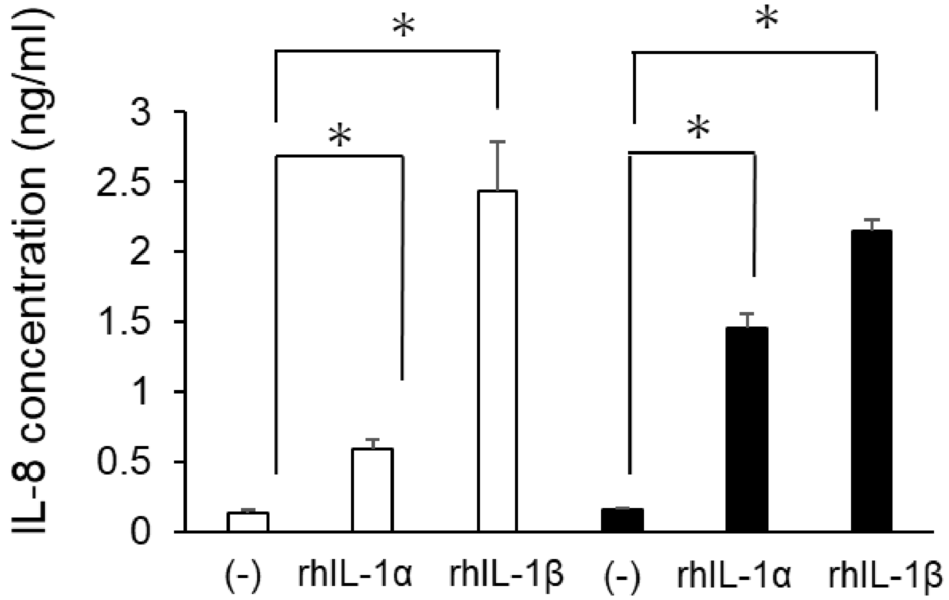

図 5. IL-1R2 を強制発現させた HeLa の rhIL-1α および rhIL-1 β 対する反応性

HeLa にコントロールとして pcDNA (白色バー) または IL-1R2 (黒色バー) を transfection した。Transfection 後，培養液を交換し，それぞれの transfectant を，rhIL-1α (100 pg/ml), rhIL-1β (100 pg/ml) の存在下または非存在下 (-) にて 6 時間培養した。刺激後の培養上清中の IL-8 分泌量を ELISA により測定した。n = 5，＊$p < 0.05$

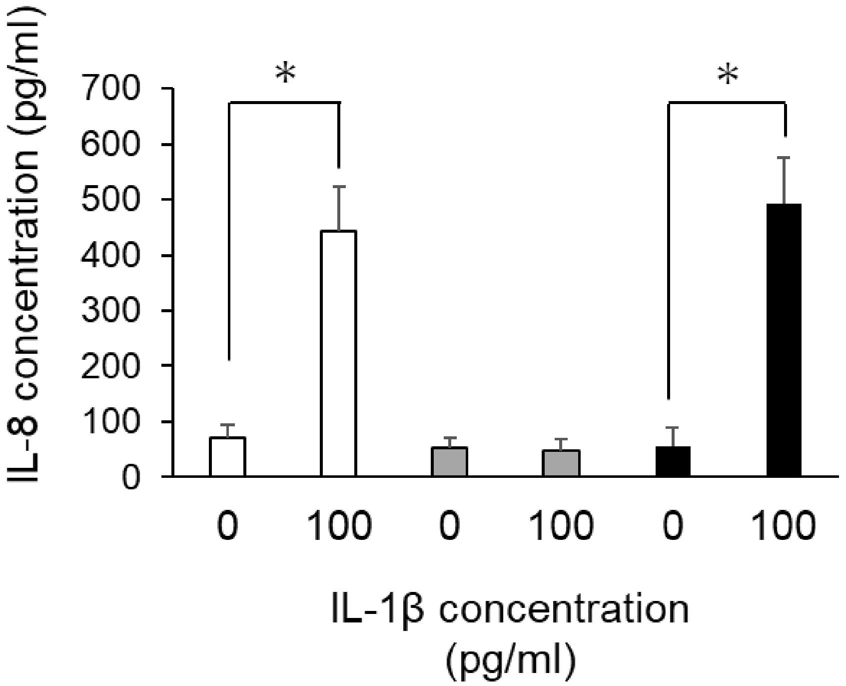

図 6. IL-1R1 または IL-1R2 を強制発現させた CR-R1-4 の rhIL-1 β に対する反応性

CR-R1-4 に IL-1R1 単独 (白色バー), IL-1R2 単独 (灰色バー) または IL-1R1 と IL-1R2 の両者 (黒色バー) を transfection した。その後，培養液を交換し，100 pg/ml rIL-1β 存在下または非存在下で 6 時間培養した。培養後の上清中への IL-8 分泌量を ELISA により測定した。n = 5，＊p ＜ 0.05