

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

定村正之

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野

日本大学歯学部病理学講座

(指導: 浅野正岳 教授)

要旨

【目的】 Interleukin-1 (IL-1) receptor (IL-1R) family の一員である IL-1R type 2 (IL-1R2) は、マクロファージ内において precursor IL-1 α (pIL-1 α) と結合して、その分泌を抑制することが知られている。本研究では、ヒト子宮頸癌由来線維芽細胞である HeLa 細胞においても、この抑制効果が維持されるか、その効果に細胞膜貫通領域の関与があるのかという点について検討した。

【方法】 HeLa 細胞に、pIL-1 α および IL-1R2 を単独または co-transfection し、pIL-1 α の細胞外分泌量を ELISA にて測定した。また、IL-1R2 の細胞膜貫通領域を欠失した mutant (Δ TM) を作製し、同様に pIL-1 α 細胞外分泌量を測定した。それぞれの分子の細胞内局在を蛍光免疫染色により確認した。また、pIL-1 α と IL-1R2 の結合を免疫沈降実験とこれに続く western blot により検出した。

【結果】 HeLa 細胞において、pIL-1 α は核に、IL-1R2 は細胞質に拡散して存在した。IL-1R2 存在下では、pIL-1 α の細胞外分泌を抑制した。また、 Δ TM は wild type IL-1R2 よりも pIL-1 α の細胞外分泌を強く抑制した。さらに、pIL-1 α と IL-1R2 は HeLa 細胞内で結合していることが確認された。

【結論】 HeLa 細胞において、IL-1R2 は pIL-1 α と細胞内で結合し、pIL-1 α の細胞外分泌を抑制していることが示唆された。また、IL-1R2 の細胞膜貫通領域の存在は、pIL-1 α 分泌に対して促進的に作用する可能性が考えられた。

キーワード: IL-1 α , IL-1R2, decoy receptor, 細胞膜貫通領域

Inhibition of pIL-1 α extracellular secretion by intracellular IL-1 receptor type 2

Masayuki Sadamura

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Applied Oral Sciences

Department of Pathology, Nihon University School of Dentistry

(Director: Prof. Masatake Asano)

Abstract

【Purpose】 Interleukin-1 (IL-1) receptor type 2 (IL-1R2) is a member of the IL-1R family. IL-1R2 was shown to bind with precursor IL-1 α (pIL-1 α) in macrophage and inhibit its extracellular secretion. Using the human uterine cervical cancer-derived fibroblastic cell line (HeLa cell), the inhibitory function of IL-1R2, especially the transmembrane region, on pIL-1 α extracellular secretion was examined.

【Methods】 HeLa cells were transfected with pIL-1 α , IL-1R2 or in combination with both plasmids and the pIL-1 α concentration in the culture supernatants were measured by ELISA. In addition, the plasmid containing the mutant IL-1R2 lacking the transmembrane region (Δ TM) was constructed and examined as well. Intracellular localization of pIL-1 α and IL-1R2 was examined by immunofluorescence staining. The binding between pIL-1 α and IL-1R2 was detected with immunoprecipitation followed by western blot.

【Results】 pIL-1 α was localized mainly in the nucleus. On the other hand, IL-1R2 was localized diffusely in the cytoplasm in HeLa cell. Intracellular IL-1R2 inhibited the extracellular secretion of pIL-1 α . The Δ TM much highly suppressed pIL-1 α extracellular secretion. Moreover, both pIL-1 α and IL-1R2 bind each other and made an intracellular complex in the cytoplasm.

【Conclusion】 Intracellular IL-1R2 inhibits the extracellular secretion of pIL-1 α by binding directly with intracellular pIL-1 α in the HeLa cell. The transmembrane region of IL-1R2 may have enhancing effect on pIL-1 α extracellular secretion.

Keywords: IL-1 α , IL-1R2, decoy receptor, transmembrane region

(受付: 令和5年1月13日)

責任著者連絡先: 定村正之

日本大学歯学部病理学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

TEL: 03-3219-8124

FAX: 03-3219-8340

E-mail: dema18018@gnihon-u.ac.jp

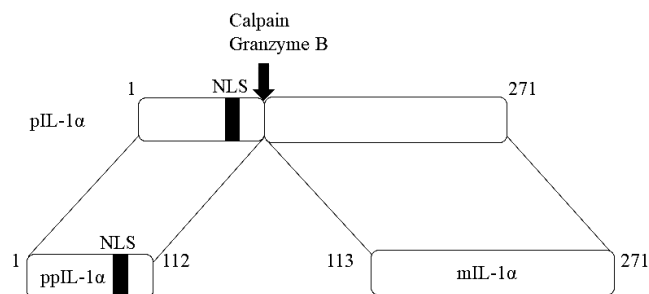


図1 pIL-1αの processing

IL-1αは pIL-1αとして細胞質内で産生されたのち、calpain や granzyme B などの酵素により分子のほぼ中央部で切断され、N 末端側の ppIL-1αと C 末端側の mIL-1αに分離する。ppIL-1α側に nuclear localization sequence (NLS) 配列が存在する²⁾。

緒言

細胞が障害を受けたときに放出される分子は alarmin と総称される¹⁾。Interleukin-1 (IL-1) αは代表的な alarmin として知られている。IL-1αは細胞内で約31 kDaの前駆体 precursor IL-1α (pIL-1α) として産生され、図1に示すように calpain や granzyme B などの酵素によって propiece (pp) IL-1αと mature (m) IL-1αに切断される²⁾。

IL-1αの主要な受容体サブユニットとして、IL-1 receptor type 1 (IL-1R1) と type 2 (IL-1R2) が知られている。IL-1R1はシグナルを伝達できるのに対し、シグナル伝達に必要な配列である Toll/IL-1 Receptor (TIR) ドメインを欠く IL-1R2はシグナル伝達できない。このことから、IL-1R2は decoy receptor と呼ばれている³⁾。IL-1R2は、IL-1α および IL-1βと直接結合することでシグナル伝達を阻止するだけでなく、IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) とも複合体を形成し、IL-1α結合に伴うシグナル伝達を抑制する^{3,4)}。IL-1R2ノックアウトマウスの解析から、IL-1R2の上記のような decoy receptor としての特性はマクロファージにおいて機能していることが明らかとなっているが、マクロファージ以外の細胞における IL-1R2の機能は未だ不明な点が多い⁴⁾。

Zheng ら⁵⁾は、IL-1R2は細胞膜上または細胞外で decoy receptor として機能しているだけでなく、細胞質内で pIL-1αと結合して pIL-1αの細胞外分泌を阻害することにより、無菌性炎症を抑制することを報告した。また、リポポリサッカライド (LPS) 刺激による caspase 活性化を介した細胞質内の IL-1R2分解は、pIL-1αと IL-1R2との結合を切断して pIL-1αの細胞外分泌を促進するとも報告している⁵⁾。本研究では、ヒト子宮頸癌由来線維芽細胞である HeLa 細胞に IL-1R2と pIL-1αを強制発現させ、同様に pIL-1αの細胞外分泌抑制が起きるのかという点について検討を行った。また、IL-1R2の細胞膜貫通領域の pIL-1α細胞外分泌に対する役割についても解析した。

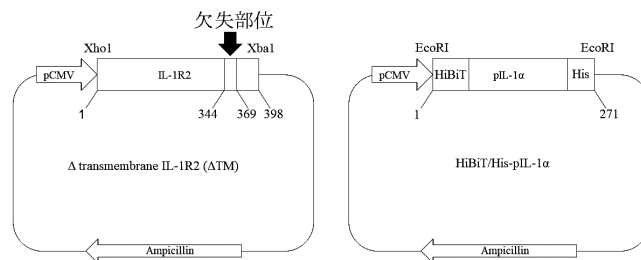


図2 Transfection に用いたベクター

ベクターの XhoI, XbaI間に IL-1R2を挿入した pCMV-SPORT 6 IL-1 receptor type 2 (pCMV-R2) を鋳型として transmembrane 領域 (黒矢印) である344-369のアミノ酸配列を欠失させたΔ transmembrane IL-1R2 (ΔTM) を作製した (左図)。pcDNA の EcoRI間へ N 末端に HiBiT-tag が付与されている pIL-1αを挿入した HiBiT-pIL-1αの C 末端に histidine-tag を付与した HiBiT/His-pIL-1αを作製した (右図)。

材料および方法

1. 細胞

本研究には、ヒト子宮頸癌由来線維芽細胞である HeLa 細胞 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク, 大阪) を用いた。培養は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に10% ウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific) および1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) を添加したものを用い、インキュベータ (37°C, 5% CO₂) で行った。HeLa 細胞を24-well plate に 5×10^4 cells/well となるように播種した。

2. Plasmid の構築と transfection

HeLa 細胞への IL-1R2の強制発現には、pCMV-SPORT 6 IL-1R2 (pCMV-R2, 理研 BRC, つくば) を用いた。このベクターを鋳型として細胞膜貫通領域の26アミノ酸残基 (ASSTFSWGI V L A P L S L A F L V L G G I W M) を欠失させた Δ transmembrane IL-1R2 (ΔTM plasmid) を、Quick change site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) により作製した (図2)。また、Kudo ら⁶⁾が作製した HiBiT-pIL-1αの C-末端に histidine-tag を同 kit で挿入し、このベクターを HiBiT/His-pIL-1αとした。ΔTM 作製時に使用した primer 配列は次の通りである (forward 5'-CAC CAC AGT CAA GGA ACA CAG ACG GTG CAA AC-3' reverse 5'-GTT TGC ACC GTC TGT GTT CCT TGA CTG TGG TG-3')。作製したすべての plasmid は、DNA sequence 解析 (ファスマック, 厚木) によって DNA 配列に間違いがないことを確認した。なお、pCMV-R2の transfection によって発現する IL-1R2を wild type IL-1R2とした。

Transfection は、Lipofectamine 3000 reagent kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、次のように行った。それぞれの plasmid (250 ng) を OPTI-MEM (25 μl; GE

表1 pIL-1 α とIL-1R2の複合体の検出のための免疫沈降とwestern blotの条件

沈殿物	IPに用いたreagent	容量	WB検出reagent	検出物	図
①pIL-1 α	Nickel-agarose beads	30 μ l	Nano Glo HiBiT	pIL-1 α	図 6 A
	Nickel-agarose beads	30 μ l	mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体	IL-1R2	図 6 B
②IL-1R2	mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体	30 μ l	mouse anti-HiBiT 抗体	pIL-1 α	図 6 C

免疫沈降実験において使用したbeadsおよび抗体を示す。

Healthcare, Chicago, IL, USA) に溶解し, 同 kit に含まれる3000 Reagent (0.75 μ l) と混和した。つぎに, 同 kit 中の Lipofectamine 3000 (0.75 μ l) を OPTI-MEM (25 μ l) に溶解した。両溶液を混合し, 室温で15分間反応させた。反応後, 混合液を培養液に添加し, 細胞と共に18時間培養した。培養後の細胞を transfectant として実験に用いた。

3. 蛍光免疫染色

HeLa 細胞 (5 \times 10⁴ cell/well) を24-well plate 中に置いたカバースリップ (10 mm diameter, 松浪硝子工業, 大阪) に播種し, 18時間培養した。培養後, pIL-1 α およびIL-1R2を transfection し, 更に18時間培養した。上清を吸引除去し, カバースリップを0.01 M 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にて室温で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にて室温で10分間非特異的のブロッキングを行った。蛍光免疫染色には, 一次抗体として mouse anti-histidine monoclonal 抗体 (\times 100希釈, Proteintech, Rosemont, IL, USA), mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体 (\times 100希釈, Santa Cruz, Dallas, TX, USA) を, 二次抗体として FITC 標識 goat anti-mouse IgG monoclonal 抗体 (\times 100希釈, Proteintech) を用いた。核染色は, DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) を用いて行った。細胞像は, オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X810, キーエンス, 大阪) を用いて観察し, 撮影した。

4. ELISA による pIL-1 α の定量

Transfection 後に培養液を交換し, 3, 6, 9 および12時間後に回収した培養上清を遠心分離し (16,900 \times g, 1分間), 抽出した上清をサンプルとした。Quantikine human IL-1 α ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて pIL-1 α を定量した。

5. Western blot (WB) 法

Transfectant を PBS で洗浄後, 細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.5) にて細胞を溶解した。溶解液を遠心分離し, 抽出された上清を回収してサンプルとした。BioRad protein assay kit (BioRad Hercules, USA) を用いてサンプルの総タンパ

表2 wild type IL-1R2および Δ TMのpIL-1 α 分泌抑制

transfectant	pIL-1 α 量 (%)
pIL-1 α + pcDNA	100
pIL-1 α + wild type IL-1R2	47.0 \pm 0.2*
pIL-1 α + Δ TM	26.4 \pm 0.1*

pIL-1 α transfectantにおける細胞外pIL-1 α 分泌量を100%とし, wild type IL-1R2または Δ TMとのco-transfectantにおける細胞外pIL-1 α 分泌量を示した。5サンプルを測定し, 結果を平均値 \pm 標準偏差で示した。*: $p < 0.05$ vs. pIL-1 α + pcDNA

ク量を定量し, 40 ng のタンパクを12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel を用いて電気泳動した。Immobilon Transfer Membrane (Merck, Darmstadt Germany) に泳動後のタンパクを転写し, 1% BSA-PBS でブロッキングした。IL-1R2の検出には, 1次抗体として mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体 (\times 500希釈, Santa Cruz), 2次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 (\times 5,000希釈, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) を用いた。pIL-1 α の検出は, 1次抗体として mouse anti-HiBiT monoclonal 抗体 (\times 1,000希釈, Promega Madison, USA), 2次抗体として HRP 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 (\times 5,000希釈, Jackson Immuno Research) を使用した。

6. 免疫沈降 (IP) と WB による pIL-1 α と IL-1R2 の複合体の検出

pIL-1 α と IL-1R2 の複合体形成の有無について, IP と WB により確認した。pIL-1 α の IP は, His-tag に特異的に結合する Nickel-agarose beads (タカラバイオ, 草津) を用いた (表1)。また, IL-1R2 の IP は, mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体 (Santa Cruz) と protein G sepharoseTM 4 Fast Flow (GE Healthcare) を用いた。それぞれの IP 後の WB による pIL-1 α および IL-1R2 の検出は, 表1に示した抗体または検出試薬を用いた。このうち, HiBiT-tag の検出は, HiBiT に特異的に結合する Lg-BiT に HRP を結合させた Nano Glo HiBiT blotting system (Promega) を用いた。

7. 統計学的解析

データの正規性を Shapiro-Wilk 検定, 等分散性を Levene 検定で確認した。表2は一元配置分散分析後 Tukey の多重比較を用いて解析した。図5は ANOVA の分散分析法

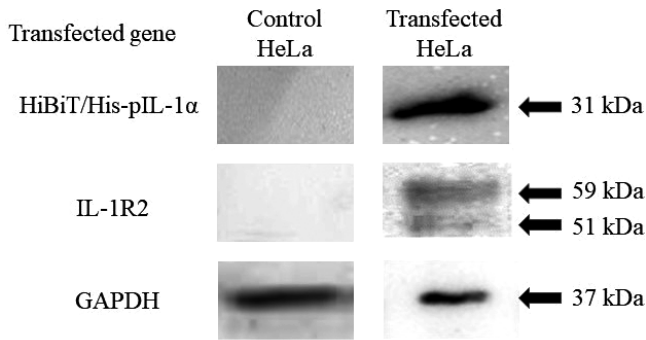


図3 Transfectant における pIL-1 α および IL-1R2 の発現
pIL-1 α は 31 kDa の単一のバンドとして、IL-1R2 は 59 kDa と 51 kDa の 2 本のバンドとして検出された。Control HeLa 細胞ではバンドが検出できなかった。

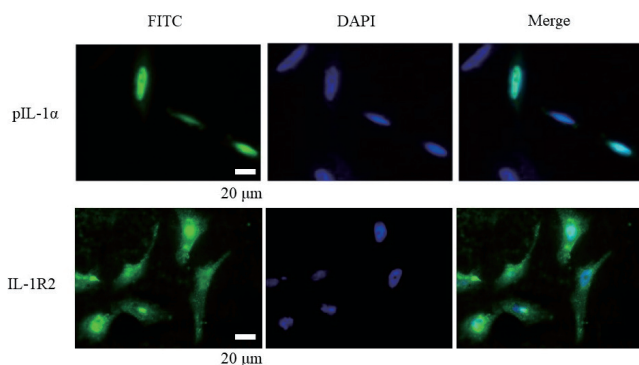


図4 Transfectant における pIL-1 α および IL-1R2 の細胞内局在
pIL-1 α または IL-1R2 を transfection した HeLa 細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

を用いて解析した。結果は、平均値 \pm 標準偏差で表した。0.05 未満の p 値は統計学的に有意であるとみなした。

結 果

1. pIL-1 α および IL-1R2 の細胞内局在

Transfectant における pIL-1 α および IL-1R2 の発現を WB により確認した。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 (図 3)。一方、pcDNA transfectant では、バンドは検出されなかった。以上の結果から、HeLa 細胞においては内在性の pIL-1 α および IL-1R2 は存在しない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、IL-1R2 は核および細胞質に拡散して存在することが明らかとなった (図 4)。

2. pIL-1 α 分泌量の経時的変化

pIL-1 α transfectant の培養上清中の pIL-1 α 量を、ELISA を用いて経時的に測定した。培地交換後、3 時間で 149.7 \pm

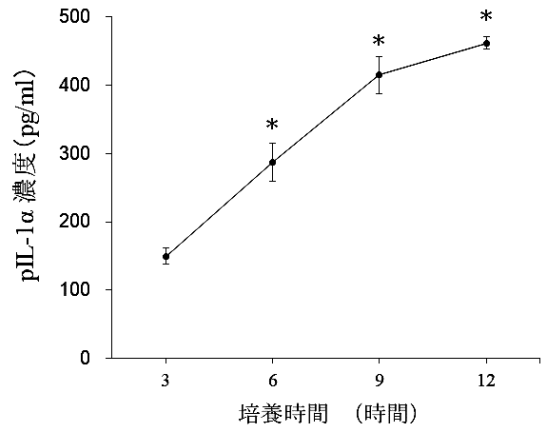


図5 pIL-1 α 分泌量の経時的変化

同じ実験を 5 回繰り返し、それぞれのサンプルを triplicate で測定した。平均値 \pm 標準偏差でデータを示した。*: $p < 0.05$ vs. 3 時間後の pIL-1 α 濃度

11.7 pg/ml, 6 時間で 287.0 ± 27.9 pg/ml, 9 時間で 414.8 ± 27.0 pg/ml, 12 時間で 461.9 ± 8.6 pg/ml となり、経時的に培養上清中の pIL-1 α 濃度は上昇した (図 5)。一方、insert の入っていないコントロールベクターである pcDNA transfectant では pIL-1 α 量は検出限界以下であった。以上の結果から、培地交換後 6 時間で、培養上清中に ELISA によって検出可能な量の pIL-1 α 分泌が認められたことから、以下の実験では、培地交換 6 時間後の培養上清中の pIL-1 α 濃度を測定することとした。

3. IL-1R2 による pIL-1 α の分泌抑制

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するために、IL-1R2 存在下および非存在下で培養上清中の pIL-1 α 量を測定した。その結果、pIL-1 α をコントロールベクター pcDNA と共に co-transfection した細胞における pIL-1 α 量を 100% としたとき、IL-1R2 と pIL-1 α の co-transfectant した細胞では、pIL-1 α 量は $47.0 \pm 0.2\%$ に低下した (表 2)。次に、IL-1R2 の細胞膜貫通領域の pIL-1 α 分泌に対する影響を確認するために、IL-1R2 の細胞膜貫通領域を欠失させた Δ TM plasmid を pIL-1 α と共に transfection し、培養上清中の pIL-1 α 量を測定した。その結果、pIL-1 α 量は、pIL-1 α のみ transfectant した細胞と比較して、 $26.4 \pm 0.1\%$ にまで低下した (表 2)。この結果から、細胞膜貫通領域を欠失した IL-1R2 は、wild type IL-1R2 よりも、pIL-1 α 分泌に対する抑制効果が高いことが明らかとなった。

4. pIL-1 α と IL-1R2 の結合の確認

pIL-1 α と IL-1R2 の細胞内での結合の有無について、IP とこれに続く WB により確認した。その結果、表 1 に示す ① 上段の条件で、pIL-1 α 単独および pIL-1 α と IL-1R2 の co-transfectant の両者において 31 kDa の pIL-1 α のバンド

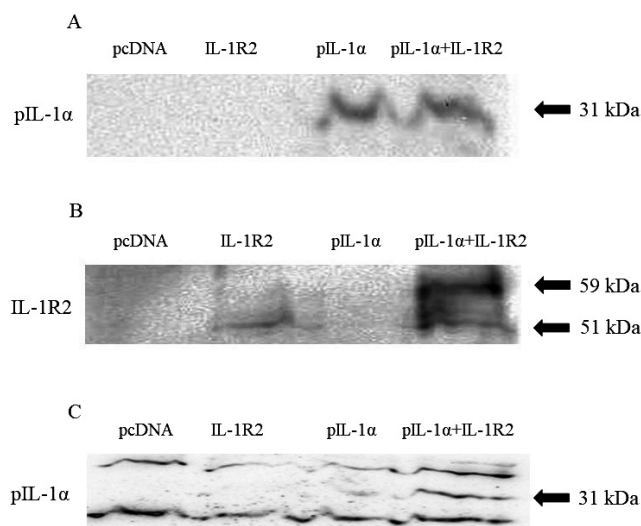


図6 pIL-1 α とIL-1R2の結合

pcDNA 単独, IL-1R2 単独, pIL-1 α 単独および pIL-1 α と IL-1R2 の co-transfectant の細胞溶解液を調整し, 表2の方法によって IP および WB を行った。A: 表1①の方法で IP を行い, Nano Glo HiBiT により pIL-1 α を検出した。B: 表1①の方法で IP を行い, mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体で IL-1R2 の検出を行った。C: 表1②の方法で IP を行い, mouse anti-HiBiT 抗体で pIL-1 α の検出を行った。

が検出された(図6A)。また, 同じメンブレンを抗IL-1R2抗体にてWBを行ったところ(表1①下段), pIL-1 α とIL-1R2のco-transfectantにおいてのみ, IL-1R2のバンド(59 kDaおよび51 kDa)が検出された(図6B)。また, 抗IL-1R2抗体でIPしたものでは(表1②の条件), pIL-1 α とIL-1R2のco-transfectantにおいてのみ, pIL-1 α のバンド(31 kDa)が検出された(図6C)。以上の結果から, pIL-1 α とIL-1R2が, 細胞質内で結合していることが明らかとなった。

考 察

pIL-1 α は, processingの結果ppIL-1 α とmIL-1 α に分断されるが, これら3種類の分子のうちpIL-1 α およびmIL-1 α のみが機能的分子であるとされる²⁾。また, サイトカインとしての活性は後者の方が高いとされ⁷⁾, 細胞内でprocessingされることによってより活性の高いmIL-1 α が細胞外に分泌され, 効率的に炎症を惹起するものと考えられている。活性は異なるものの, pIL-1 α およびmIL-1 α は細胞外に分泌され, 細胞膜表面で両者ともにIL-1R1に結合する。その後, アクセサリータンパクであるIL-1RAcPが会合し, 複合体を形成することでシグナルが伝達される。これによって転写因子NF- κ BやAP-1カスケードが活性化され, 種々のサイトカインが産生されるなどして炎症反応が進行する²⁾。IL-1 familyには, 構造的に類似した11種類の分子があるが, この中でIL-1 receptor antagonistは, IL-1R1に結合した後, IL-1RAcPとの複合体を形成で

きないため, シグナルが伝達されない^{8,9)}。また, IL-1 familyに属する分子であるIL-1R2はIL-1 α またはIL-1 β と結合し, さらにIL-1RAcPとの複合体を形成するにも関わらず, 細胞内領域にTIRドメインを持たないため, シグナルを伝達できない^{4,8)}。このようにIL-1 α シグナルの抑制系が複数存在することは, 炎症制御の多様性を示すものであるが, これに加えてZhengら⁵⁾は, I型の膜貫通タンパクであるIL-1R2が細胞質内でpIL-1 α と結合し, pIL-1 α の細胞外分泌を抑制するという新たなメカニズムを発見した。これによると, HeLa細胞と同様に内因性のIL-1R2の発現が見られない血管平滑筋細胞に対して, IL-1R2をtransfectionし, LPSとATPを作用させるとmIL-1 α 分泌が促進された⁵⁾。これは, LPSとATPによる刺激がinflammasomeを活性化させ, その構成成分であるcaspaseを活性化させることにより, 基質であるIL-1R2を分解することによるものであった。これによってpIL-1 α とIL-1R2との結合が解消され, pIL-1 α が細胞内でcalpainによる分解を受け, 生成されたmIL-1 α を細胞外に分泌するとされた⁵⁾。

本研究では, HeLa細胞においてもpIL-1 α の細胞外分泌抑制メカニズムが機能するの点について検討した。その結果, HeLa細胞においてもマクロファージなどと同様に, pIL-1 α とIL-1R2との結合に起因したpIL-1 α の細胞外分泌抑制が見られた。さらに, IL-1R2の細胞膜貫通領域を欠失した Δ TMでは, wild type IL-1R2よりもさらに高い抑制効果を示した。

また, IL-1R2はIL-1 α の第2のレセプターとしてクローニングされ, 細胞膜表面で機能すると考えられている¹⁰⁾。IL-1R2は, 細胞膜外でmatrix metalloproteinaseであるa disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 (ADAM17)によって切断される¹¹⁾。これまでの研究から, IL-1R2をHeLa細胞に強制発現させると, IL-1R2断端が細胞外領域に遊出されることを確認している。このような切断されたIL-1R2の細胞外領域はリガンド結合部を含んでおり, 血液中や細胞外液中に放出されるとIL-1 α およびIL-1 β と結合し, IL-1 α およびIL-1 β の作用を抑制することで炎症を終息させる^{12,14)}。これも, pIL-1 α の効果を減弱させるメカニズムの一つと考えられる。さらに, pIL-1 α のみtransfectionされたHeLa細胞から, 非常に多くのpIL-1 α が放出されていた。従って, 細胞外に分泌されたpIL-1 α が, HeLa細胞の細胞膜表面に発現されたIL-1R2に結合する可能性がある。あるいは, 放出されたpIL-1 α が, 細胞膜表面から酵素的に切断されたIL-1R2の細胞外領域と結合する可能性も考えられる。さらに, こうして形成されたpIL-1 α とIL-1R2複合体は, 本研究で用いたELISAでは検出不可能であったのかもしれない。このことは, IL-1R2が細胞質内でpIL-1 α 細胞外分泌を抑制しているという解釈とは相容れない現象であることから, 本研

究で得られた IL-1R2 による pIL-1 α の細胞外分泌抑制メカニズムの詳細についてはさらに検討する必要がある。

IL-1R2 による IL-1 α の細胞外分泌制御は、炎症反応の調節にも深く関係していると考えられる。IL-1R2 による IL-1 α の細胞外分泌機能調節メカニズムの解明は多くの病態の改善や治療法の開発にも貢献しうる可能性があり、今後更なる研究を行う必要があると考える。

結 論

IL-1R2 および pIL-1 α を transfection した HeLa 細胞を用いて、以下の結論を得た。

1. HeLa 細胞において、細胞内 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 IL-1R2 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 IL-1R2 と pIL-1 α は結合し、複合体を形成していた。

以上のことから、HeLa 細胞内に存在する IL-1R2 は、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。

本研究の遂行にあたり、病理学講座 浅野正岳教授および講座員の皆様にご指導いただいた。ここに深甚なる感謝の意を表す。本論文に関して、開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Jiang L, Shao Y, Tian Y, Ouyang C, Wang X (2020) Nuclear alarmin cytokines in inflammation. *J Immunol Res* 2020, 7206451.
- 2) Chiu JW, Binte Hanafi Z, Chew LCY, Mei Y, Liu H (2021) IL-1 α processing, signaling and its role in cancer progression. *Cells* 10, 92.
- 3) Supino D, Minute L, Mariancini A, Riva F, Magrini E, Garlanda C (2022) Negative regulation of the IL-1 system by IL-1R2 and IL-1R8: relevance in pathophysiology and disease. *Front Immunol* 13, 804641.
- 4) 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.
- 5) Zheng Y, Humphry M, Maguire JJ, Bennett MR, Clarke MC (2013) Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1 α , controlling necrosis-induced sterile inflammation. *Immunity* 38, 285-295.
- 6) Kudo Y, Tamagawa T, Nishio K, Kaneko T, Yonehara Y, Tsunoda M (2022) Nuclear localization of propeptide IL-1 α in HeLa cells. *J Oral Sci* 64, 151-155.
- 7) Kim B, Lee Y, Kim E, Kwak A, Ryoo S, Bae SH, Azam T, Kim S, Dinarello CA (2013) The interleukin-1 α precursor is biologically active and is likely a key alarmin in the IL-1 family of cytokines. *Front Immunol* 4, 391.
- 8) Schlüter T, Schelmbauer C, Karram K, Mufazalov IA (2018) Regulation of IL-1 signaling by the decoy receptor IL-1R2. *J Mol Med*, 96, 983-992.
- 9) Boraschi D (2022) What is IL-1 for? The functions of interleukin-1 across evolution. *Front Immunol* 13, 872155.
- 10) Liu C, Hart RP, Liu XJ, Clevenger W, Maki RA, De Souza EB (1996) Cloning and characterization of an alternatively processed human type II interleukin-1 receptor mRNA. *J Biol Chem* 271, 20965-20972.
- 11) 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.
- 12) Conti P, Panara MR, Porrini AM, Gambi D, Barbacane RC, Reale M, Bongrazio M, Dempsey RA (1992) Inhibition of interleukin-1 (alpha and beta), interleukin-2 secretion and surface expression of interleukin-2 receptor (IL-2R) by a novel cytokine interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra). *Scand J Immunol* 36, 27-33.
- 13) Peters VA, Joesting JJ, Freund GG (2013) IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. *Brain Behav Immun* 32, 1-8.
- 14) Molgora M, Supino D, Mantovani A, Garlanda C (2018) Tuning inflammation and immunity by the negative regulators IL-1R2 and IL-1R8. *Immunol Rev* 281, 233-247.