

ヒト線維芽細胞 HeLa における interleukin-1 receptor type 2 の decoy receptor としての機能

花山 真知子

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, 角田麻里子 助教)

要旨

【目的】 Interleukin (IL)-1 receptor (R) type 2 (IL-1R2) は、リガンドである IL-1 α や IL-1 β の結合シグナルを伝達できない decoy receptor であるとされている。本研究では、IL-1R2 がヒト子宮頸癌由来線維芽細胞である HeLa において、decoy receptor として機能するかについて検討した。

【方法】 HeLa または HeLa の IL-1R1 を欠失した CR-R1-4 に、IL-1R1、IL-1R2 または precursor IL-1 α (pIL-1 α) を transfection により強制的に発現させた。こうして作製した transfectant をヒトリコンビナント IL-1 α ないし IL-1 β で刺激し、IL-8 分泌増加の有無を ELISA によって確認した。また、HeLa における IL-1R2 の強制発現による pIL-1 α の分泌抑制についても ELISA により確認した。

【結果】 HeLa に pIL-1 α と IL-1R2 を co-transfection したところ、pIL-1 α の分泌は抑制された。HeLa への IL-1R2 の transfection は、ヒトリコンビナント IL-1 α ないし IL-1 β 刺激による IL-8 分泌増加を抑制しなかった。CR-R1-4 に IL-1R1 と IL-1R2 を co-transfection しても、ヒトリコンビナント IL-1 β 刺激による IL-8 分泌増加は抑制されなかった。

【結論】 線維芽細胞に強制発現させた IL-1R2 は、細胞内においてのみ decoy receptor としての機能を発揮した。

キーワード: IL-1R2, IL-1R1, IL-1 α , alarmin, IL-8

The decoy receptor function of interleukin-1 receptor type 2 in human fibroblastic cell line HeLa

Machiko Hanayama

Nihon University Graduate School of Dentistry

Major in Pathology

Department of Pathology, Nihon University School of Dentistry

(Directors: Prof. Masatake Asano, Assist. Prof. Mariko Tsunoda)

Abstract

【Purpose】 Interleukin (IL)-1 receptor (R) type 2 (IL-1R2) is known as a decoy receptor and it can not transduce the IL-1 α /IL-1 β binding signal. In the present study, IL-1R2 was introduced to HeLa by transfection and tested whether it can function as a decoy receptor.

【Methods】 HeLa-based IL-1R1 knockout cell line, CR-R1-4, was established. IL-1R1, IL-1R2 or precursor IL-1 α (pIL-1 α) was forced expressed in HeLa or CR-R1-4 by transfection. Based on the fact that HeLa can augment IL-8 secretion with IL-1 α /IL-1 β stimulation, the cells were stimulated with recombinant human (rh) IL-1 α or IL-1 β . The responsiveness was evaluated by measuring the production of IL-8 by ELISA. The inhibitory effect of IL-1R2 on pIL-1 α secretion was also evaluated with ELISA.

【Results】 Co-transfection of both pIL-1 α and IL-1R2 to HeLa resulted in the reduction of pIL-1 α secretion. The forced expression of IL-1R2 in HeLa did not lose the responsiveness to rhIL-1 β . Co-transfection of both IL-1R1 and IL-1R2 to CR-R1-4 still maintained the reactivity against rhIL-1 β .

【Conclusion】 In fibroblasts, forced expression of IL-1R2 exerts only intracellularly its function as a decoy receptor.

Keywords: IL-1R2, IL-1R1, IL-1 α , alarmin, IL-8

(受付: 令和 5 年 1 月 27 日)

責任著者連絡先: 花山真知子

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: hanayama.machiko@nihon-u.ac.jp

緒 言

Interleukin (IL)-1 α 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-1 β と IL-1 α 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, ③ leader 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-1 α 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况を知らしめる分子とされている。

precursor IL-1 α (pIL-1 α) は質量約31 kDa で, Ca²⁺ 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-1 α (ppIL-1 α) と C 末端側の mature IL-1 α (mIL-1 α) に分離する^{7,8)}。こうして産生された ppIL-1 α と pIL-1 α 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-1 α と pIL-1 α は, 特異的なレセプターである IL-1 receptor (R) 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線維芽細胞 (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-1 α および IL-1 β 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, ヒト子宮頸癌由来線維芽細胞 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) を添加したものをを用いて, 37°C, 5% CO₂ 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 × 10⁴ 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

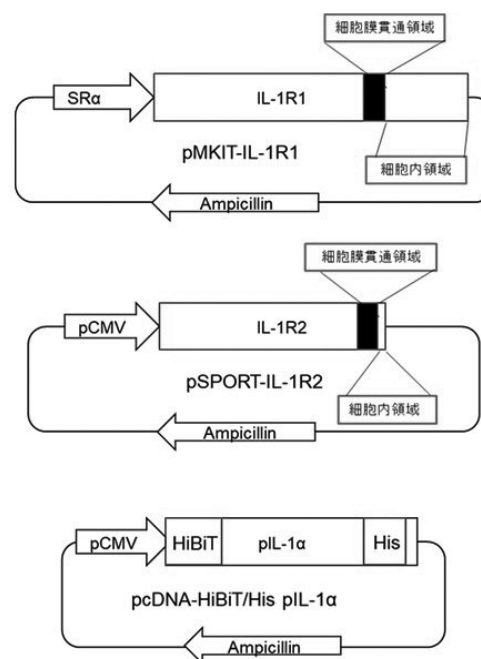


図1 実験に用いた発現プラスミドの構造

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-1 α (rhIL-1 α) およびヒトリコンビナント IL-1 β (rhIL-1 β) 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-1 α (HiBiT/His-pIL-1 α) 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 μ l) に溶解し, 3000 Reagent (0.75 μ l) と混和した。一方, 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-1 α および IL-8 の定量

Transfectant への rhIL-1 α または rhIL-1 β による刺激は,

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

<p>図 3 B 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</p>
<p>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</p>
<p>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</p>
<p>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</p>

表 1 に示す条件で行った。IL-1 α 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 \times 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、WB を行った。すなわち、両サンプル共に SDS sample buffer に溶解し、95 $^{\circ}$ C 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 (\times 1,000; Santa Cruz, Dallas, TX, USA) およびマウス抗ヒト GAPDH 抗体 (\times 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 (\times 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。

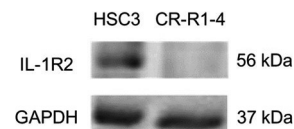


図 2 HSC3 および CR-R1-4 における IL-1R2 の発現
HSC3 および CR-R1-4 の細胞溶解液中の IL-1R2 (56 kDa) の発現を WB で確認した。内部コントロールとして GAPDH (37 kDa) の検出を行った。

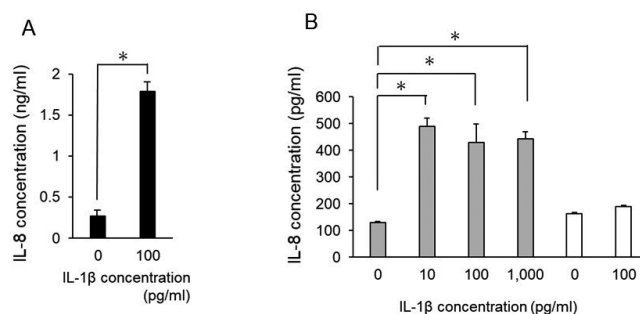


図 3 HeLa と IL-1R1 を強制発現させた CR-R1-4 の rhIL-1 β に対する反応性

- A. HeLa を rhIL-1 β (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-1 β (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

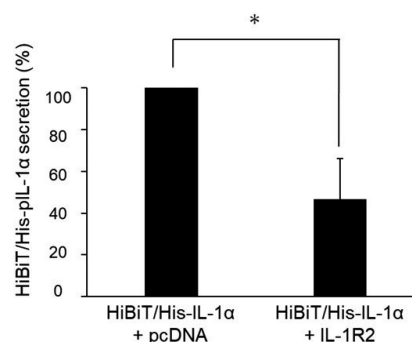


図 4 IL-1R2 による pIL-1 α の分泌抑制

HeLa に pcDNA または IL-1R2 を、HiBiT/His-pIL-1 α 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-1 α 濃度を ELISA により測定した。n = 5, * p < 0.05

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 \pm 標準偏差で表した、0.05 未満の p 値は統計的に有意であるとみなした。

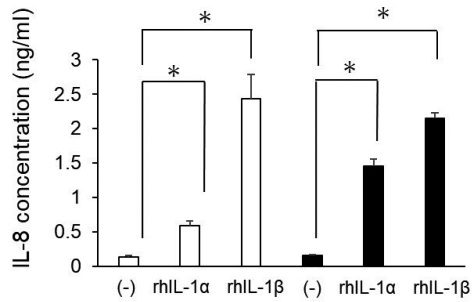


図5 IL-1R2を強制発現させたHeLaのrhIL-1αおよびrhIL-1βに対する反応性

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。それぞれのtransfectantは、rhIL-1α（100 pg/ml）、rhIL-1β（100 pg/ml）の存在下または非存在下（-）で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, * $p < 0.05$

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した後、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 $53.3 \pm 19.6\%$ と有意に分泌が低下した。

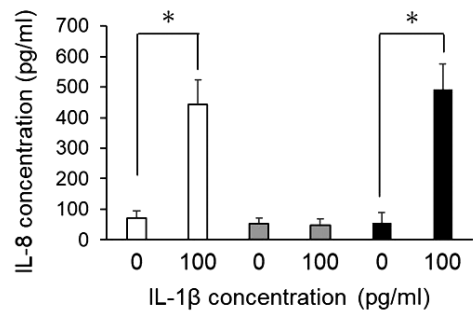


図6 IL-1R1またはIL-1R2を強制発現させたCR-R1-4のrhIL-1βに対する反応性

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 rhIL-1β存在下または非存在下で6時間培養した。培養後の上清中のIL-8分泌量をELISAにより測定した。n = 5, * $p < 0.05$

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-1 α と IL-1R2 を co-transfection したところ、HiBiT/His-pIL-1 α 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-1 α 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-1 α 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-1 α 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-1 α 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 a disintegrin and metalloprotease domain 17 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-1 α 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-1 α -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に 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- β 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 κ B、interferon regulatory factor などを活性化させシグナルを伝達する¹⁶⁾。

IL-1 α および IL-1 β 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-1 β 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-1 α または rhIL-1 β 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-1 α および rhIL-1 β 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-1 α および rhIL-1 β 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-1 β

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-1 α および rhIL-1 β に対する反応性を抑制することは無かったが、HiBiT/His-pIL-1 α 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-1 β 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-1 α 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-1 β に対する反応性を阻害しなかった。
5. CR-R1-4 における IL-1R1 の強制発現は、rhIL-1 β に対する反応性を回復した。
6. CR-R1-4 における IL-1R1 と IL-1R2 の強制発現は、rhIL-1 β に対する反応性を阻害しなかった。

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。

本研究の推進にあたり、病理学講座 浅野正岳教授、角田麻里子助教および講座員の皆様にご指導頂いた。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) Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolf 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, 872155.

- 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 1a 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-1a. *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-1a. *J Oral Sci* 62, 340-343.
- 12) Yang HT, Cohen P, Rousseau S (2008) IL-1 β -stimulated activation of ERK1/2 and p38 α MAPK mediates the transcriptional up-regulation of IL-6, IL-8 and GRO- α 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-1a, 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, Copeland NG, Huebner K, Croce CM, Cannizzaro LA, Benjamin D, Dower SK, Spriggs MK, Sims JE (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.