

I型インターロイキン1レセプターの発現調節機構に関する研究

瀧井 猛将

名古屋市立大学薬学部, 〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

In Vitro and In Vivo Study of Regulation Mechanisms of Type I Interleukin-1 Receptor

Takemasa TAKII

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University,
3-1, Tanabe-Dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

(Received September 1, 2000)

Interleukin 1 (IL-1) is one of the inflammatory cytokines, which plays a pivotal role in both host defense and homeostasis. Its signal is transduced by type I IL-1 receptor (IL-1RI). This report gives an insight into the regulatory mechanism of IL-1RI in both *in vitro* and *in vivo*. IL-1 up-regulates IL-1RI through prostaglandin E₂ (PGE₂) production on human fibroblasts. However, in the presence of indomethacin, IL-1 down-regulates the receptor by destabilizing IL-1 receptor mRNA. Type I and type II interferons (IFNs) up-regulate the expression of IL-1RI. This up-regulation leads to the increasing susceptibility of IL-1RI to IL-1, as the DNA binding of IL-1-induced NF- κ B and the production of IL-1-induced IL-6 from the fibroblasts are augmented by pretreatment with IFNs. On the other hand, the expression of cell surface IL-1RI is inhibited by tyrosine kinase inhibitors, herbimycin and genistein, resulting in reduction of the kinase activity of IRAK (IL-1 receptor associated kinase) and IL-1-induced IL-6 production from the fibroblasts. Lipopolysaccharide (LPS) augments the expression of IL-1RI mRNA and cell surface molecule in the hepatocytes of mice *in vivo*, and the augmentation is mediated by the interaction of IL-1, IL-6, and of glucocorticoid (GC). When hepatocytes were pretreated with dexamethasone (Dex) and IL-6, the activation of IRAK was augmented in response to IL-1, indicating that IL-1 signaling is also up-regulated. In addition, IL-1 treatment after combined administration of Dex and IL-6 into mice markedly increased the serum level of serum amyloid A. These data suggest that the expression of IL-1RI is regulated by inflammatory cytokines, PGE₂, GC and LPS *in vitro* and *in vivo*. This study shows that the biological activity of IL-1 can be controlled by regulating the expression of IL-1RI, and therefore proposes the use of pharmaceutical drugs for the regulation of cytokine expression.

Key words—Interleukin 1 receptor; fibroblasts; hepatocytes; cytokine; lipopolysaccharide

1. はじめに

インターロイキン1 (IL-1) は、様々な炎症や免疫反応に関与している生理活性物質である。その生物活性は多岐にわたっている (Table 1)。また、IL-1は多くの疾患に関与していることが知られている (Table 2)。IL-1は活性化されたマクロファージから産生される分子量約17 kDの単純タンパク質で、 α 、 β の2種類が存在している。両タイプのIL-1は約30 kDの前駆体型として産生され、プロテアーゼによって分解されて活性型となる。IL-1 α はカルパインによって成熟型に変換されるが、前駆体でも活性をもつ。¹⁾一方、IL-1 β はinterleukin-1 β converting enzyme (ICE)によって切断されて、初めて生物活性を示す。²⁾ICEはcaspaseファミリーの一員であり、細胞死関連のプロテアーゼでもあることが近年の研究で明らかとなった。³⁾ICEはイン

ターフェロン γ を強く誘導するサイトカインであるIL-18のプロセッシングにも関与している。²⁾IL-1の細胞伝達細胞内へのシグナル伝達は特異的なレセプターを介して行われる (Fig. 1)。II型IL-1Rは細胞内領域を欠き、リガンドを取り合うことでIL-1の生理活性を調節する型のレセプターであることが報告されている。⁴⁾IL-1 α 、 β 共にI型IL-1R (IL-1RI)に結合する。IL-1の生理活性を調節する分子としてIL-1Rアンタゴニスト (IL-1ra)が生理的に存在している。⁵⁾この分子はIL-1Rと結合できるが、シグナルは伝達できない。X線解析の研究からIL-1Rとの結合部位とシグナル伝達部位がIL-1 β との比較から明らかとなった。⁶⁾このように、生体内においてはIL-1の作用調節を行う機構が備わっていることが明らかとされてきた。IL-1は様々な疾患に関与していることが報告されており、その作用を調節

Table 1. Biological Activity of IL-1

T cell	Osteoclast
Growth promotion in the presence of lectin or specific antigen (Induction of IL-2, IL-2 receptor, and IL-4)	Augmentation of bone resorption
Induction of lymphokines, such as IL-2, IL-4, and CSF, in the presence of lectin or specific antigen	Liver
Augmentation of the proliferation and differentiation of thymocyte	Induction of acute phase proteins
Augmentation of the proliferation and differentiation of $\gamma\delta$ Tcell with IL-7	Reduction of the activity of P450
Radioresistance	Reduction of the production of albumin
B cell	Brain
Growth promotion and induction of antibody synthesis with IL-4, IL-5 and IL-6	Malady
Augmentation of the cell growth of EB virus infected B cell	Induction of the release of ACTH
Monocyte and macrophage	Bone marrow cell
Induction of PGE ₂ synthesis	Augmentation of the number of neutrophil
Augmentation of the cytotoxic activity against tumor cells	Smooth muscle cell
Induction of the production of TNF, IL-1, IL-6 and IL-8	Induction of the release of amino acid
Induction of differentiation of myelocytic leukemia cells to macrophages	Induction of NO production
NK cell	Vascular endothelial cell
Augmentation of the cytotoxic activity against tumor cells	Augmentation of the production of PGI ₂
Growth promotion	Augmentation of the production of PAI
	Augmentation of the adhesion of blood cells
	Fibroblast
	Growth promotion
	Induction of PGE ₂ synthesis
	Induction of the synthesis of IL-6 and IL-8

Table 2. Participation of IL-1 in Diseases

Diseases	Effect of IL-1
Rheumatoid arthritis	Pyrexia, growth of synovial cell, destruction of chondrocyte, osteoclastis
Osteoporosis	Augmentation of bone resorption
Kawasaki disease	Vascular injury
Endotoxin shock	Vascular injury
Toxic shock syndrome	Vascular injury
Ischemia-reperfusion injury	Vascular injury
Gout	Inflammation induced by IL-1 locally induced by uric acid crystal
Type I diabetes	Injury of β -langerhans cell
Glomerulonephritis	Augmentation of mesangial cell growth, induction of PGE ₂
Dilated cardiomyopathy	Inhibition of myocardial contraction by β -blocker
Mycocarditis by infection of coxsackie virus	Production of IL-1 in heart
Endometritis	Growth inhibition of fertilized ovum
Premature delivery	Uterine contraction by induction of PGE ₂ and PGF _{2α}
Granuloma	Augmentation of granuloma formation and fibroblast proliferation
Hodgkin's granuloma	Augmentation of fibroblast proliferation
Acute myelocytic leukemia	Cell growth by autocrinely
Kaposi sarcoma	Cell growth by autocrinely
Scleroderma	Activation of fibroblast
Alzheimer's disease and Down syndrome	Augmentation of cell growth of astroglia by IL-1 produced from microglia

することは、病態のコントロール、そして、新たな治療薬を開発する上でも重要である。本編では、IL-1RIの発現調節機構について紹介する。

2. ヒト線維芽細胞株における IL-1 による IL-1RI の発現制御

IL-1RIは、骨髄系の細胞では細胞あたり数 100

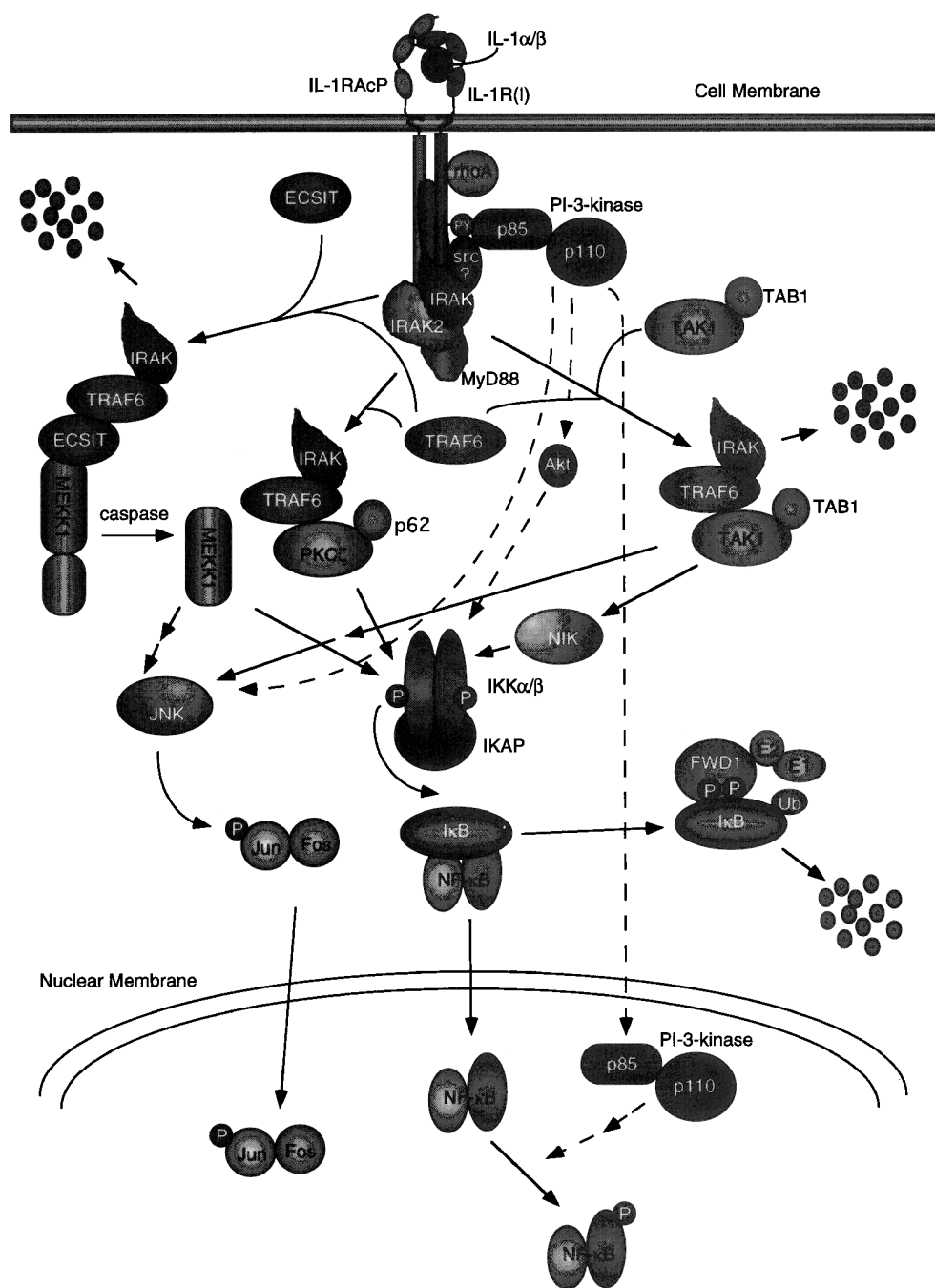


Fig. 1. Signal Transduction Pathway of IL-1

This figure was obtained from Dr. H. Hayashi (Nagoya City University) with his permission. NF- κ B: nuclear factor κ B, NIK: NF- κ B interacting kinase, I κ B: potential inhibitor of NF- κ B, IKK: I κ B kinase, IRAK: interleukin-1 receptor-associated kinase, TRAF: tumor necrosis factor-associated factor, IL-1RAcP: IL-1 receptor accessory protein, MyD: myeloid differentiation primary response, IKAP: IKK complex-associated protein, ECSIT: evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways, TAK: transforming growth factor-activated kinase, TAB: TAK1 binding protein, FWD: the mouse homologue of Drosophila Slimb and Xenopus bate-TrCP, MEKK: mitogen-activated kinase kinase, JNK: c-Jun NH₂-terminal kinase, PKC: protein kinase C, PI: phosphatidylinositol, Ub: ubiquitin, E1: Ub-activating enzyme, E2: Ub-conjugating enzyme, Caspase: protease, Jun/Fos: transcription factors, rho: family of small GTP-binding protein, PY: phosphorylated tyrosine.

個，線維芽細胞では数万個発現していることが報告されている。本研究では，ヒト肺由来正常線維芽細胞株 TIG-1 を用いて IL-1RI の発現調節機構を解析した。IL-1 は IL-1RI の mRNA の発現を経時的に上昇させた。この作用はシクロオキシゲナーゼの阻害剤であるインドメサシンにより完全に阻害された

(Fig. 2)。IL-1 刺激により線維芽細胞からプロスタグランジン E₂ (PGE₂) が産生されることが知られているが，TIG-1 を IL-1 刺激すると経時的に培養上清中の PGE₂ の量が上昇していた (Fig. 3a)。また，細胞内の cAMP の上昇も PGE₂ と比例して上昇していた (Fig. 3b)。いずれもインドメサシン添

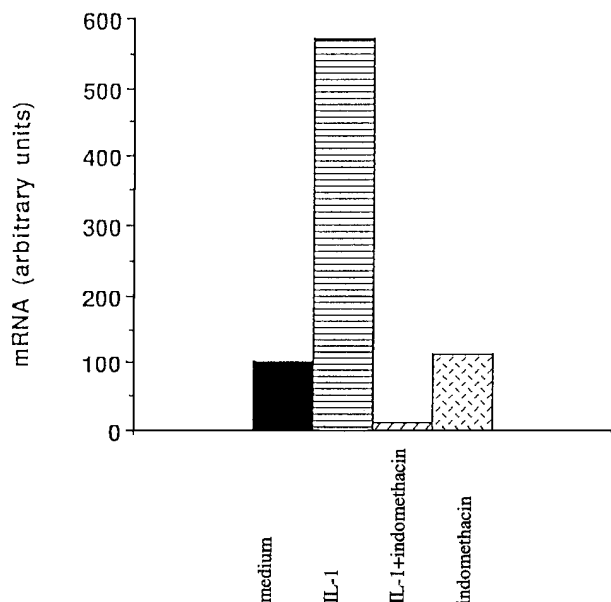


Fig. 2. The Effect of Indomethacin on the IL-1-Induced IL-1R mRNA Expression

Human fibroblast TIG-1 was cultured in medium alone, medium containing 100 U/ml IL-1 α , IL-1 α (100 U/ml) plus indomethacin (1 μ g/ml) or indomethacin alone at 37°C for 12 hr. Total RNA was isolated and Northern blot analysis was conducted using a specific probe to human IL-1RI. Values were normalized based on the band of β -actin.

加により阻害された。一方、図には示さないが、PGE₂や細胞内cAMPを上昇させる試薬、フォルスコリン、コレラトキシン、8-Br-cAMPにおいてもIL-1RI mRNAの発現上昇が認められた。¹²⁵Iで標識したIL-1 α を用いた結合実験により、TIG-1には細胞あたり約4万個のIL-1Rが発現していた。また、架橋実験から、TIG-1にはI型のIL-1Rのみが発現し、PGE₂添加によりIL-1の結合が上昇していた (Fig. 4)。以上のことから、IL-1はPGE₂産生を介してIL-1RIの発現を上昇させていることが本研究により明らかとなった。⁶⁾

一方、インドメサシン存在下、IL-1はIL-1RI mRNAの安定性を低下させることによって、IL-1RIの発現を減少させていた。また、蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキシミドで阻害されたことから、IL-1のこの作用には新たな蛋白合成が必要である。腫瘍壊死因子 (TNF) の mRNA の安定性に関する遺伝子配列について報告がある。⁷⁾ TNF 遺伝子の3'非翻訳領域にはATに富んだ33bの遺伝子配列が存在する。この配列は、他の炎症サイトカイン (リンホトキシン、コロニー刺激因子 (CSF)、IL-1、フィブロネクチン、インターフェロン (IFN) など) の遺伝子にも存在し、誘導された mRNA が速やかに減少するのにこの配列が関与していると考えられている。IL-1RIの3'にもATに富む配列が存在することから、同様な機構が働いていることが考えられる。このATに富んだ配列に結合する蛋白が同定

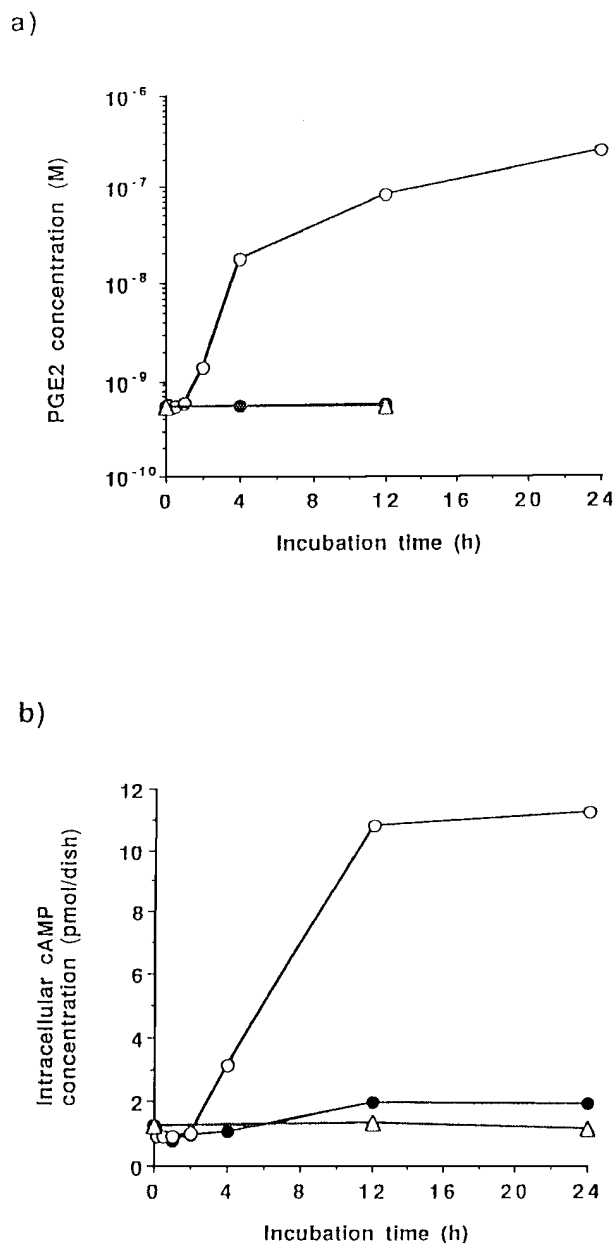


Fig. 3. Time Courses for IL-1-Induced PGE₂ and cAMP Production by TIG-1

Cells were cultured in medium alone (●), medium containing IL-1 α (100 U/ml) (○), or IL-1 α plus indomethacin (△) at 37°C for indicated period, and (a) the amount of PGE₂ in the culture supernatant and (b) the intracellular cAMP content were determined using an ELISA kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI) for PGE₂ and a radioimmunoassay kit (Yamasa Shoyu Co., Ltd., Chiba, Japan) for cAMP detection kits. Results are expressed as mean of duplicate cultures and is a representation of three (a) and two (b) experiments.

されているが、その機能はまだよく知られていない。⁸⁻¹¹⁾興味あることに、血清非存在下、若しくは合成培地ではこの現象は認められなかった (Fig. 5)。血清中に含まれている増殖因子類 (血小板由来増殖因子、線維芽細胞増殖因子) を合成培地に添加すると、IL-1の作用が回復したことからこれらの増殖因子との相乗効果であると考えられる。

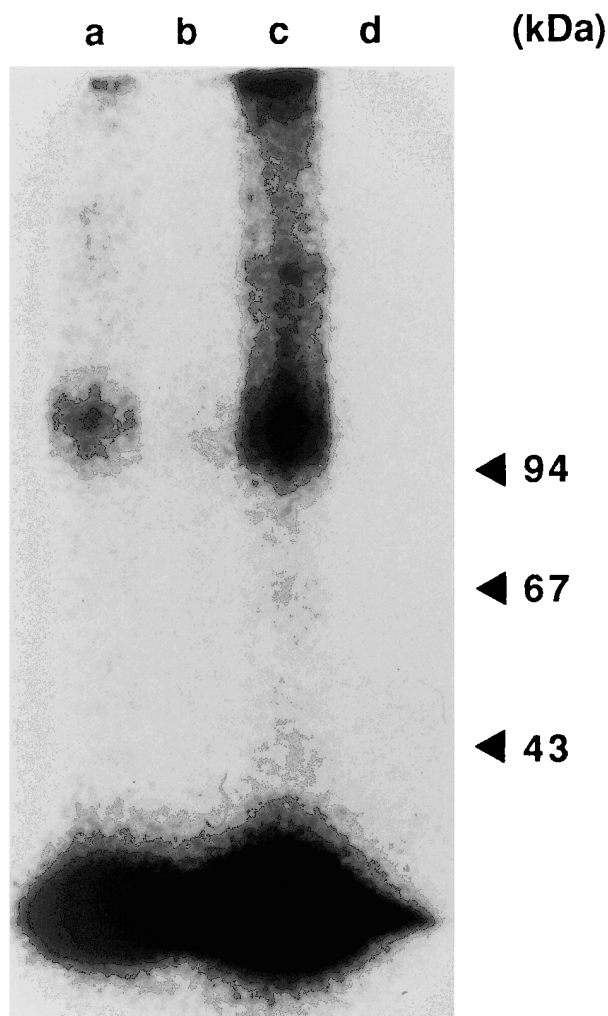


Fig. 4. Affinity Cross-Linking of IL-1R on TIG-1

Cells were cultured in the medium only (lane a, b) or medium containing PGE_2 (5×10^{-6} M) (c, d) at 37°C for 24 hr. Subsequently, the cells were cross linked to ^{125}I -IL-1 α in the absence (a, c) or presence (b, d) of excess unlabeled IL-1 α and analyzed on 10% polyacrylamide gel electrophoresis under reducing condition. Molecular mass markers are shown by arrows.

以上のように IL-1 は、IL-1RI の発現を PGE_2 産生を介して細胞内 cAMP を上昇させることで正方向性に制御していること、⁶⁾そして、インドメサシン存在下では mRNA を不安定化させることによって負に制御している。¹²⁾ IL-1 のこの負の作用はフィードバック機構として働いていると考えられることから、IL-1 は PGE_2 を産生しない細胞において、IL-1RI の発現抑制因子として働いている可能性がある。他のグループの研究から、マウス T 細胞株において同様の結果が報告されている。¹³⁾ このようなことを考えると、インドメサシンは IL-1 誘導 IL-1R mRNA 発現増強をシクロオキシゲナーゼの阻害だけでなく、IL-1 の負の効果によっても阻害している。この知見はインドメサシンの抗炎症効果を考える上で興味深い。

3. 各種インターフェロンによる IL-1RI の発現制御

IFN- α , β , γ のいずれも TIG-1 細胞及びヒト肺由来線維芽細胞株 MRC-5, 9 細胞において、IL-1RI の発現を mRNA レベル、細胞表面レベルで上昇させていた。¹⁴⁾ I 型 (IFN- α , β) 及び II 型 IFN (IFN- γ) はマクロファージの活性化、細胞増殖阻害、細胞表面上 MHC class I 抗原の発現誘導など共通の生物活性を有している。¹⁵⁾ しかし、IFN- γ は MHC class II 抗原の発現を多くの細胞で誘導するが、¹⁶⁾ この効果は I 型 IFN には見られない。これらの違いは I 型、及び II 型の IFN レセプターが異なり、シグナル伝達機構も異なるためであるとされている。本研究で見られた IL-1RI の発現増強効果は、I 型及び II 型 IFN に共に見られることから、両 IFN に共通なシグナル伝達を介しているものと考えられる。Nuclear run-on assay の結果から、IFNs は IL-1RI 遺伝子の転写を上昇させていた。IFNs による IL-1RI の発現増強効果は、サイクロヘキシミドによって阻害されないことから、新たな蛋白合成は必要としない。IFN により活性化される転写因子については、よく研究されている。IRF (interferon regulatory factor)-1 や IRF-2 などの転写因子¹⁷⁾だけでなく、ISGF (interferon stimulated gene factor)-3 などのような分子による制御機構についても明らかとされている。¹⁸⁾ IL-1RI 遺伝子の 5' 上流域に存在する遺伝子配列の 603—608 の配列は IRF-1 のコンセンサス配列¹⁹⁾と 1 塩基の違いが見られるだけであり、IFN により直接 IL-1R 遺伝子の発現が制御されている可能性がある。また、IFN により活性化された他の転写因子がトランスに働いている可能性もある。IL-1 は線維芽細胞から IL-6 の産生を誘導することが知られている。一方、IFN は IL-6 の産生は誘導しないことから、TIG-1 細胞を IFNs で前処理し培地を交換して培地中に残存する IFN を取り除いた後に、IL-1 で刺激したところ、IL-1RI の発現上昇と比例して IL-6 の産生量が上昇した。また、IL-6 遺伝子上流にある NF- κ B 部位をプローブに用いて electrophoretic-mobility-sift-assay を行った結果、IFNs 前処理した細胞では IL-1 誘導による NF- κ B の DNA 結合が上昇していた (Fig. 6)。この結果は、IL-1RI の発現量の変化により IL-1 の作用が調節されることを示している。

IL-1 と IFN は、細胞増殖阻害、分化、MHC 抗原の発現、nitric oxide (NO) 産生、血管新生阻害、IL-6 産生など相乗効果を示すことが報告されている。^{20—25)} ヒト線維芽細胞株における IL-1 と TNF- α による IL-8 遺伝子の転写誘導には、IFN は抑制的に働くとの報告がある。²⁶⁾ その研究は、IFN と IL-1 若しくは、TNF- α を共存させたものであり、IFN は IL-1, TNF- α のシグナルを IL-1R 以後の段階で修飾していると考えられる。一方、本研究における

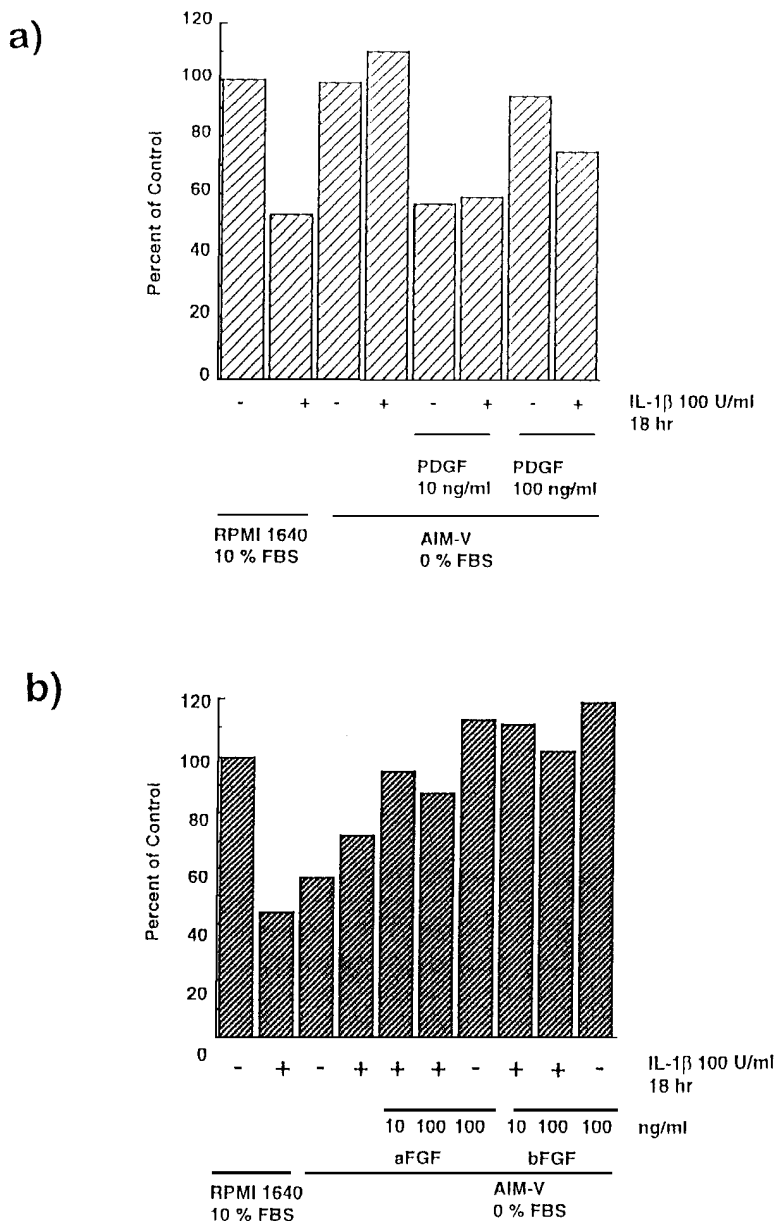


Fig. 5. Effect of PDGF, aFGF and bFGF on the IL-1-Induced Down-Regulation of IL-1RI

Indomethacin-pretreated cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS or serum free synthetic medium (AIM-V) containing indomethacin with or without a) PDGF (10, 100 ng/ml), b) aFGF (10, 100 ng/ml), or bFGF (10, 100 ng/ml) in the presence or absence of IL-1 β (100 U/ml) at 37°C for 18 hr. Total RNA was isolated and Northern blot analysis was conducted using a specific probe to IL-1RI.

IL-6の産生については、IL-1とIFNを共存させてもそのような効果は見られなかった。したがって、IFNはIL-1のIL-1R以後のシグナル伝達経路を修飾しているのではなく、IL-1Rを上昇させることによってIL-1によるIL-6産生を増強させていると考えられる。IL-6はマクロファージや線維芽細胞などのIL-1、IFN産生細胞の機能に影響を与えることが知られている。²⁷⁻²⁹ IL-6産生の亢進は、IL-1やIFNを含めたサイトカインネットワークによる生体防御やホメオスタシスに寄与しているものと考えられる。

IFNはB型、C型肝炎やエイズウイルスなどの

感染や、癌治療に用いられている。一方、IFNには発熱、頭痛、下痢、嘔吐、体重減少、倦怠、脱毛、精神障害などの副作用があることが知られている。³⁰ これらの副作用の多くはIL-1投与患者にも見られ、³¹ これらの副作用はIFNとIL-1の相乗効果である可能性がある。

4. 各種阻害剤によるIL-1RI発現に及ぼす効果

4-1. 5-リポキシゲナーゼ阻害剤によるIL-1RI mRNA発現に及ぼす効果 前述のように、IL-1はインドメサシン存在下でIL-1R mRNAの不安定化させる作用がある。IL-1はホスホリパーゼA₂ (PLA₂)を活性化し、細胞膜脂質からアラキドン酸

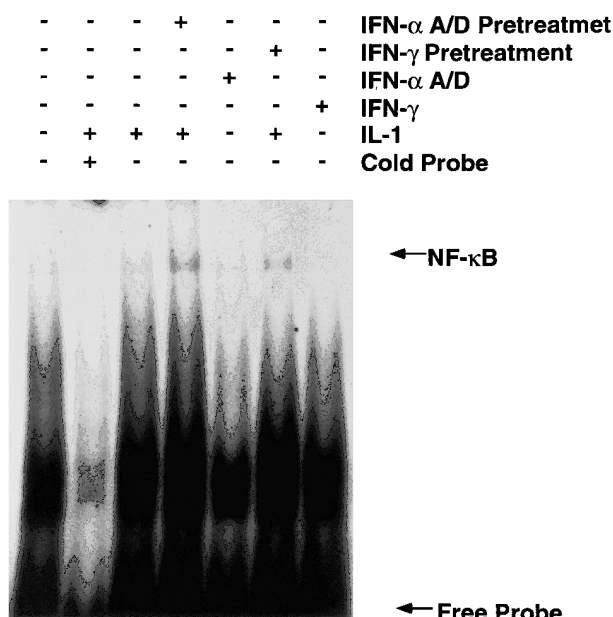


Fig. 6. IFNs Enhanced IL-1-Induced NF- κ B Binding to IL-6 Gene Promoter Region

The cells were pretreated with or without IFN- α A/D (1000 U/ml) and IFN- γ (1000 U/ml) for 2 hr. After washing out the medium, IL-1 α (100 U/ml), IFN- α A/D (1000 U/ml), or IFN- γ (1000 U/ml) was added and incubated for 1 hr. Nuclear extracts were prepared, and then electrophoretic mobility shift assay was performed using 32 P-labeled NF- κ B probe on IL-6 gene.

をつくる。³²⁾これを基質としてシクロオキシゲナーゼにより代謝された産物は、最終的に PGE₂ などのプロスタノイドになる。一方、同じアラキドン酸を基質として 5-リポキシゲナーゼにより代謝された産物は LTB₄ などのロイコトリエンになる。IL-1 の IL-1R mRNA 不安定化に 5-リポキシゲナーゼが関与しているか否か、5-リポキシゲナーゼの阻害剤である AA861 を用いて検討したところ、阻害されなかったことから 5-リポキシゲナーゼの経路は関与していないと考えられる。

4-2. プロテインキナーゼ (PK) 阻害剤の IL-1RI mRNA 発現に対する効果 PKA 阻害剤, HA1004 (10 μ M), PKC 阻害剤, H-7 (10 μ M), スタウロスポリン (100 μ M), それにチロシンキナーゼの阻害剤であるハービマイシン A (0.5 μ g/ml) を用いて, IL-1 の IL-1RI mRNA 不安定化に及ぼす影響を検討したところ, IL-1 の作用を阻害したのはハービマイシン A だけであった。また, IL-1 非存在の条件下でハービマイシン A は IL-1RI mRNA の発現, 及び安定性を下げていた。同じチロシンキナーゼの阻害剤であるゲニステインには, この活性が認められなかったことから, IL-1RI mRNA の不安定化作用はハービマイシン A 単独の効果であると考えられる。

4-3. チロシンキナーゼ阻害剤の細胞表面上 IL-1R 分子の発現に及ぼす影響 次に, IL-1RI の発

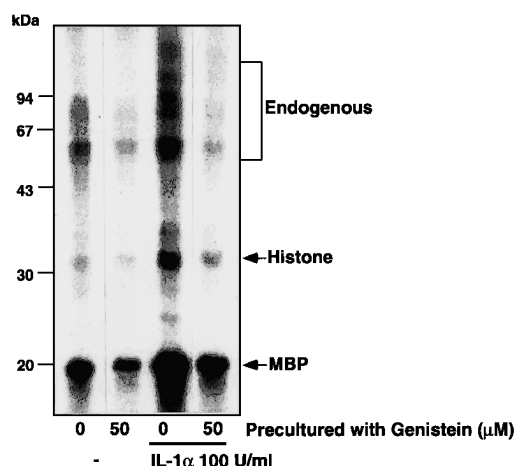


Fig. 7. Effect of Genistein on the IL-1-Induced IL-1R-Associated Protein Kinase Activity

TIG-1 cells were pre-incubated with genistein (50 μ M) for 6 hr, and then the medium was washed out. The cells were incubated with or without IL-1 α (100 U/ml) for 5 min, and were then solubilized and immunoprecipitated with anti-human IL-1RI rat mAb. *In vitro* kinase assay was performed.

現に及ぼす影響を結合実験で検討したところ, ハービマイシン A, ゲニステインともに IL-1 の結合量を減少させた。³³⁾これらの結果から, IL-1RI の恒常的発現にはチロシンキナーゼが関与していることが示唆された。さらに, この IL-1RI の減少により, 細胞内シグナル伝達分子である IRAK (IL-1 receptor associated kinase) の活性や (Fig. 7), IL-1 誘導 IL-6 の産生も抑えられていることから, 機能的な IL-1RI の発現にはチロシンキナーゼが必要である。³³⁾詳しい機構については今後の研究の発展が望まれる。

4-4. IL-1RI mRNA のレドックスによる制御 ハービマイシン A はチロシンキナーゼのチオール基に結合してキナーゼ活性を阻害するとされている。³⁴⁾その作用は 2-メルカプトエタノール (2-ME) やグルタチオンなどの抗酸化剤で阻害されることが知られている。³⁵⁾ハービマイシン A の IL-1RI mRNA 不安定化作用は, チオール基への結合によるものか否か検討した。ハービマイシンの効果は 2-メルカプトエタノール (2-ME), ジチオスレイトール (DTT) で阻害された。さらに, 2-ME, DTT, N-アセチル-L-システイン (NAC) などの抗酸化剤だけでも同様の作用があるか否か検討したところ, IL-1R mRNA の安定性を減少させたことから, IL-1R mRNA の不安定化にはレドックスによる制御が行われていることが考えられる。

5. LPS 投与によるマウス各臓器における IL-1RI の発現調節

リポ多糖 (LPS) は, グラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分であり, 内毒素 (エンドトキシン) の本態である。LPS は生体に侵入することにより局所的な炎症反応や全身性の毒性を引き起こす。このよ

うな LPS によって引き起こされる発熱や肝臓における急性期タンパクの合成、血圧低下などの急性反応は、LPS 自体によるものではなく、LPS により生体から誘導される IL-1 を含む多くのサイトカインなどの炎症性メディエーターが重要な働きをしている。しかし、ショック時における各臓器別での IL-1 の役割などの詳細は、まだ解明されていない。本研究では、エンドトキシンショックのモデルとして LPS 投与マウスを用い、各臓器での IL-1 に対する応答性が異なるのではないかと考え、脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓における IL-1RI mRNA 発現の変化を解析した³⁶⁾ (Fig. 8)。LPS 投与 2 時間後、肝臓における IL-1RI mRNA 発現に顕著な増強が認められた。その効果は 6 時間後にピークに達し、24 時間後においてもコントロールのレベルより高い発現が認められた。肺及び脾臓での IL-1RI mRNA 発現は、投与 2 時間後に増強が認められた。投与 6 時間後、肺の IL-1RI mRNA 発現はコントロールのレベルに回復したが、脾臓ではコントロールのレベル以下に低下し、その効果は 24 時間後まで持続した。腎臓では投与 2 時間後には増加し、6 時間にはコントロールのレベルに回復し、そして 24 時間後には再び高い発現が見られるという、二相性の変化が認められた。本研究では、脳での顕著な変化は認められなかったが、Reinisch らは LPS 投与 3 時間後にマウスの脳で IL-1RI mRNA 発現が増加し、20 時間後には定常状態のレベル以下に低下し減少することを報告している。³⁷⁾ Stalder らは、RNase protection assay により LPS 投与 16 時間後に肝臓、腎臓、脾臓において IL-1RI mRNA 発現が増加するこ

とを報告している。³⁸⁾

以上のことから、IL-1RI mRNA 発現の変化が臓器間で異なる理由として、臓器間や臓器内における環境の違いや臓器を構成する細胞の反応性の違いが考えられる。脾臓で IL-1RI mRNA 発現の低下が起こることを示したが、Takao らはマウスに LPS 投与後 6 時間及び 20 時間後に、脾臓切片上の ¹²⁵I-IL-1 α の結合数が減少することを報告している。³⁹⁾ Vogels らは、IL-1 投与マウスの脾臓で IL-1RI mRNA 発現の減少が起こることを報告している。⁴⁰⁾ IL-1R が減少する理由は明らかではないが、TGF- β は骨髄細胞、T 細胞、線維芽細胞の IL-1R を低下させることから、^{41,42)} 負の制御として TGF- β のような IL-1R を減少させる因子が誘導される可能性が考えられる。腎臓における IL-1RI mRNA 発現の二相性は非常に興味深い結果である。腎臓には早く反応する細胞種と遅く反応する細胞種の 2 種類が存在しているのかもしれない。このように臓器においては IL-1R の発現はより複雑に制御されており、IL-1 に対する反応性が異なることが予想される。

本研究では LPS による反応が顕著に現れた肝臓について、さらに詳しく検討した。LPS 投与により IL-1RI を高発現している細胞が浸潤し、肝臓の IL-1RI mRNA 発現を増強している可能性が考えられた。⁴¹⁾そこで、LPS 投与により誘導される肝臓での IL-1RI mRNA の発現増強が起こる細胞種を同定するために、antisense IL-1RI cRNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、LPS 投与により肝実質細胞において顕著なシグナルの増加が認められた (Fig. 9A)。Deyerle ら

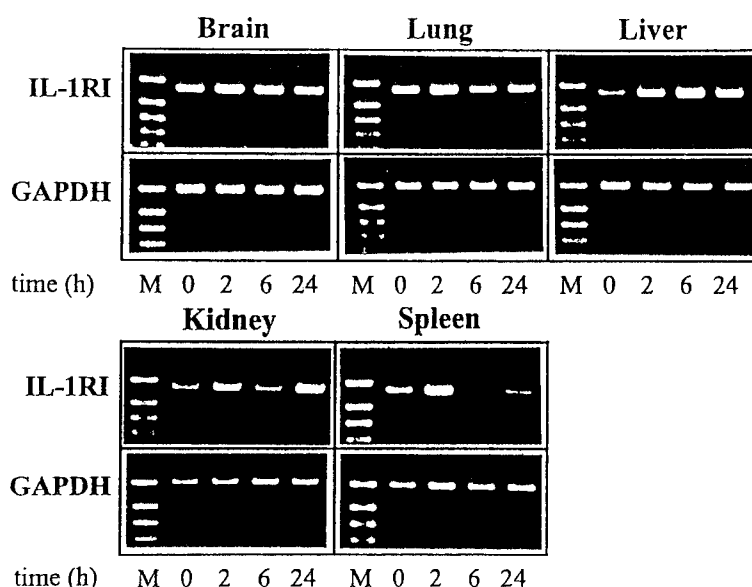


Fig. 8. Time Dependent Effect of LPS on IL-1RI mRNA Expression in Brain, Lung, Liver, Kidney, and Spleen

Mice were administered with LPS (10 mg/kg) i.p. After the indicated periods, total RNA was extracted from organs, and then IL-1RI and GAPDH mRNA expression levels were determined by RT-PCR.

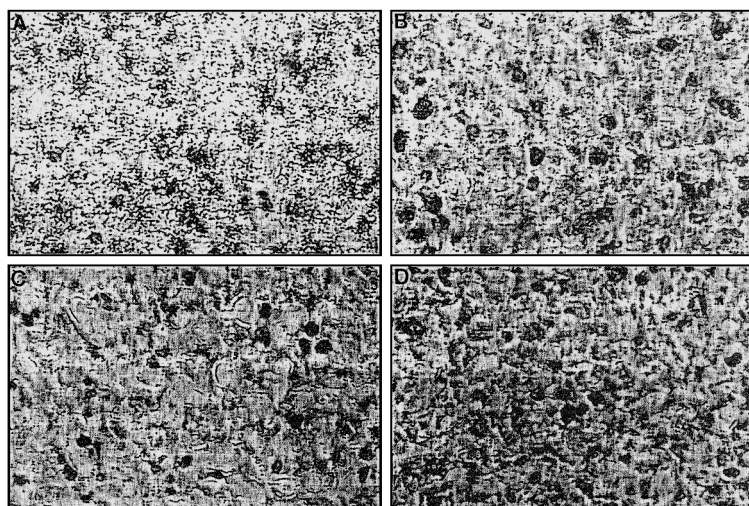


Fig. 9. *In Situ* Hybridization for IL-1RI mRNA in the Liver from Mice Treated with or without LPS

Mice were treated i.p. with or without LPS (10 mg/kg). Six hours after treatment, the livers were removed and sections were prepared. Sections from the livers of mice with LPS (A) or PBS (B) were hybridized with a ^{35}S -labeled cRNA probe for IL-1RI. (C) and (D) were sections from LPS or PBS injected mouse, and then hybridized with the sense probe for IL-1RI. Sections were counterstained with hematoxylin ($\times 400$).

は、定常状態のマウスの様々な臓器における IL-1R mRNA 発現を *in situ* ハイブリダイゼーションを用いて解析しており、肝臓での IL-1RI mRNA 発現は検出限界以下であったことを報告している。⁴³⁾ 本研究においても、定常状態の発現レベルは非常に低く検出限界に近かった。次に LPS の間接的な作用として、炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, TNF) の肝臓での IL-1RI mRNA 発現に及ぼす影響を検討したところ、LPS 投与と同様に IL-1RI mRNA の発現増強が認められた。特に、IL-1 の効果は顕著であり、2 ng/mouse でも増強効果が認められた。IL-6 や TNF は 2 μg /mouse 以上の投与量により著明な効果が認められた。

6. 初代培養マウス肝細胞における IL-1RI mRNA の発現調節

どのような因子が、肝細胞の IL-1RI mRNA 発現を直接増強するのかということを明らかにするために、初代培養マウス肝細胞を用いて検討した。マウス肝細胞を IL-1, IL-6, TNF, PGE₂, LPS 処理マウスマクロファージ培養上清 (CM), LPS, 正常マウス血清 (NMS), LPS 投与マウス血清 (LMS) で 6 時間刺激したところ、IL-1RI mRNA 発現増強は、IL-1, IL-6, CM, LMS 刺激で認められた。興味あることに、LPS, TNF は *in vivo* の投与実験では発現増強効果が認められたが、*in vitro* の実験において増強効果は認められなかった。TNF や LPS 単独では増強効果は認められなかった理由として、IL-1 や IL-6 産生を介して発現増強が誘導されたと考えられる。マウス肝細胞においては、PGE₂ に IL-1RI mRNA 発現の増強効果は認められなかった。IL-1 によるマウス肝細胞での IL-1RI mRNA 発現増強は、インドメサシンにより阻害されなかったことか

ら TIG-1 とは異なる機構で行われている。

マウス肝細胞表面上の IL-1R の分子種を調べるために、IL-6 で 24 時間刺激後、マウス IL-1RI に対する中和抗体、M147 存在下で結合実験を行ったところ、増加した ^{125}I -IL-1 α 結合活性は抗体によりほぼ完全に中和されたことから、IL-6 で誘導された IL-1R のほとんどが細胞内にシグナルを伝達しうる I 型であることが明らかとなった。

IL-1 は単独又は IL-6 と同時に作用し、肝細胞の急性期タンパク誘導やアルブミン産生低下を促す。ヒトではよく知られている急性期タンパクは CRP (C reactive protein) であるが、CRP の誘導には IL-1 と IL-6 の両方が必要であることが知られている。⁴⁴⁾ IL-1 はその他にも肝細胞における糖新生の阻害やセロトニン、NO 合成酵素、補体などを誘導することが知られている。⁴⁵⁻⁴⁷⁾ 本研究で示した LPS 投与マウス肝臓での IL-1RI mRNA 発現増強は、細菌感染時に IL-1 が肝細胞に対して作用する急性期反応の機構を解明する上で大変興味深い知見である。

7. LPS 投与マウスにおける IL-1RI 発現に及ぼすグルコルチコイドの影響

炎症反応は内分泌系と密接に結びついている。IL-1 は脳の視床下部からコルチコトロピン放出因子 (CRF) の放出を促し、CRF は脳下垂体前葉から副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を遊離させ、その結果、副腎皮質からグルコルチコイドが遊離し血中のグルコルチコイド濃度が上昇する。⁴⁸⁾ また、IL-1 が直接副腎皮質に働きグルコルチコイドの分泌を誘導することも報告されている。⁴⁹⁾ グルコルチコイドは、内因性の抗炎症・免疫抑制作用を持つホルモンであり、フィードバック機構として IL-1, IL-6, IL-8, TNF などの炎症性サイトカインの

産生を抑制する。また、デキサメサゾンやプレドニゾロンなどの合成グルココルチコイドは強力な抗炎症、免疫抑制剤として、炎症性疾患や自己免疫疾患に広く用いられている。一方、グルココルチコイドは IL-2R, IL-6R, IFNR などのサイトカインレセプターの発現を増加させることが報告されており,⁵⁰⁾ また、マクロファージ, 好中球, グリオーマ細胞株, 線維芽細胞で IL-1R の発現を増加させることも報告されている。⁵¹⁻⁵⁴⁾

LPS 投与マウスの肝臓での IL-1RI mRNA 発現増強に対するグルココルチコイドの影響について調べるために、副腎摘出マウスを作製して解析した結果、正常マウスや偽手術マウスの肝臓と同様に、IL-1RI mRNA 発現の増強が認められた。⁵⁵⁾ 副腎を摘出したマウスやラットに LPS を投与した場合に、IL-1 や IL-6 の血中濃度は正常な動物に LPS を投与した場合よりも高くなることが報告されていることから、^{56,57)} 過剰に産生された IL-1, IL-6 が、IL-1RI mRNA 発現を増強したと考えられる。デキサメサゾン投与による IL-1RI mRNA 発現増強は、高濃度 (10 mg/kg) のデキサメサゾンの場合にのみ見られたこと、初代培養肝細胞ではデキサメサゾン 10^{-8} M 以上の濃度で IL-1RI mRNA の弱い発現増強しか見られなかったことから、LPS によって誘導されたグルココルチコイド単独で、顕著な IL-1RI mRNA 発現増強を誘導することはできないと考えられる。しかしながら、デキサメサゾンと IL-1 や IL-6 との相互作用について検討したところ、デキサメサゾンは IL-1 や IL-6 との顕著な相乗効果が認められたこ

とから、*in vivo* ではこれらの因子が相乗的に働いていると考えられる。

デキサメサゾンは IL-6R を増加させることが報告されていることから、IL-6R mRNA の発現変化を解析したところ、デキサメサゾンは単独で IL-6R mRNA 発現を増強した。しかし、IL-1 や IL-6 で単独又は同時刺激した場合には、IL-6R mRNA 発現増強は認められなかったことから、グルココルチコイドの相乗作用は IL-1RI mRNA 発現増強に特異的であると考えられる。

8. *In vivo* における機能的 IL-1RI の誘導

In vitro の実験から導かれたように、細胞表面上の IL-1RI 発現増強は mRNA レベルで調節されている。この増強された IL-1RI の機能を明らかにするために、デキサメサゾン、IL-6 を単独又は同時投与し、IL-1RI を増加させた後に IL-1 を尾静脈より投与し、5 時間後における血清中の血清アミロイド A (SAA) 量を ELISA 法により解析したところ、血清中の SAA はデキサメサゾン又は IL-6 の単独投与により増加がみられた (Fig. 10)。また、同時投与により相乗的な増加が認められた。前処理後、IL-1 を投与することにより血清中の SAA はいずれの場合も対照群よりもさらに増加した。また、IRAK の抗体を用いた免疫沈降実験より、デキサメサゾン、IL-6 により IRAK の IL-1RI 近傍へのリクルートが行われ、IL-1 に対する応答性が増強していた (Fig. 11)。以上のことから、LPS 投与マウスにおける SAA の産生の増加の機構が、肝臓における IL-1RI の発現増強と引き続いて起こる IL-1 応答

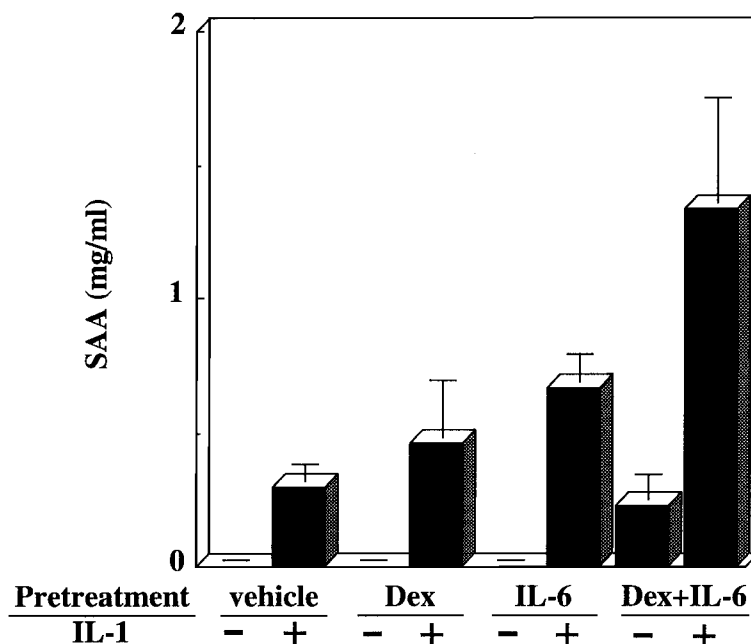


Fig. 10. Effect of the Pretreatment with Dex and IL-6 on IL-1-Induced Serum SAA Concentration

Mice were prechallenged i.p. with PBS, Dex (1 mg/kg), IL-6 (2 μ g/mouse), or combination of Dex for 6 hr, followed by IL-1 (2 μ g/mouse) or PBS injection i.v. Five hours after IL-1 injection, sera were collected, and serum SAA levels were determined by ELISA.

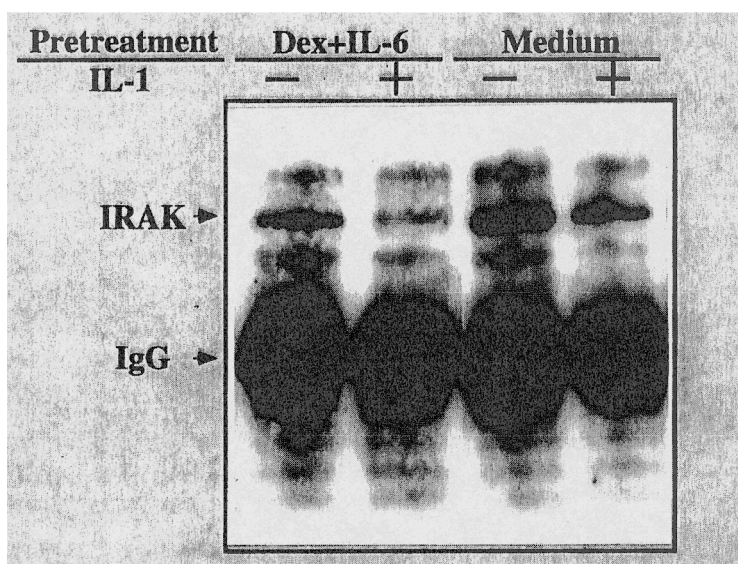


Fig. 11. IL-1-Induced Activation of IRAK in Mouse Hepatocytes

After mouse hepatocytes were pretreated with medium or the combination of Dex (10^{-6} M) and IL-6 (1000 U/ml) for 6 hr, the cells were treated with IL-1 (1000 U/ml) for 5 min. IRAK protein was immunoprecipitated from cell lysates, separated by SDS-PAGE, and immunoblotted with anti-serum to IRAK.

Table 3. Regulation of IL-1R

	Up-regulation	Down-regulation
IL-1	Lung fibroblast line TIG-1 (h) (via PG) Dermal fibroblast CRL 1507 (h) (via PG) Th2 cell line MD10 (m) (low dose) Th2 cell line MD10 (m) (+ IL-4) Hepatocyte (m)	PMN (h) Lung fibroblast line TIG-1 (h) (+ Indo) Th2 cell line D10S (m) T cell line EL-4 (m) Th2 cell line MD10 (m) (high dose)
IL-2	Th2 cell line D10S (m)	
IL-4	Th2 cell line MD10 (m), PMN (h), monocyte (h)	
IL-6	Hepatocyte (m)	
IL-13	PMN (h), monocyte (h)	
IL-3	BMC (m)	
GM-CSF	PMN (h), BMC (m)	
G-CSF	PMN (h), BMC (m)	
IFN	Keratinocyte (h), lung fibroblast line TIG-1 (h)	
PDGF	Fibroblast cell line Balb/3T3 (m)	
GC	PBMC (h), T cell (h), B cell (h), LGL (h) LGL cell line YT cell (h) PMN (h), monocytes (h) Dermal fibroblast CRL 1507 (h) BMC (m), hepatocyte (m)	
PGE ₂	Lung fibroblast line TIG-1 (h) Dermal fibroblast CRL 1507 (h)	
TNF		PMN (h), monocyte, (h) BMC (m)
TGF- β	Intestinal epithelial cell line IEC (r)	Thy-1 ⁺ pulmonary fibroblast (m) myeloid progenitor cell lines (m) BMC (m) T cell line EL-4 (m)

m: mouse, h: human, Indo: indomethacin, PG: prostaglandin.

性の増加によることが明らかとなった。⁵⁸⁾

9. おわりに

本研究では IL-1RI の発現調節について、ヒト線維芽細胞とマウス肝臓、及び初代培養肝細胞を材料に検討してきた。Table 3 に本研究の成果を含めた IL-1R の発現制御に関する報告をまとめた。本研究の知見で明らかになったポイントは IL-1RI の発現調節がサイトカインネットワークのみならず、グルココルチコイドやプロスタグランジンによっても制御されており、インドメサシンやデキサメサゾンなど臨床に使用されている薬によっても影響を受けている点である。インターフェロンの副作用やエンドトキシンショックにおける、IL-1RI の役割を示唆する結果も興味深い。そして、IL-1RI の発現を調節することで IL-1 の作用を調節できることを示した点は薬理的に大変意味のあることである。IL-1 の関与する疾患はリュウマチなど慢性疾患にもわたっており、IL-1 の作用を調節することはこれら疾患の治療につながる。本研究の知見が、今後の治療薬の開発に役立つことを期待したい。

謝辞 本総説で紹介させて頂いた研究成果は、名古屋市立大学薬学部衛生化学教室の小野寄菊夫教授の指導の下、伊藤淳博士をはじめ多くの学生達の協力により行われたものであり、心から感謝申し上げます。研究遂行にあたり、多大なご助力を頂きました藤田保健衛生大学総合医学研究所丸野内隼教授、北里大学医学部赤星透先生に感謝申し上げます。本研究は東海産業事業団研究助成金、及び文部省科学研究助成金の援助の下に行われたことを記して感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Kobayashi Y., Yamamoto K., Saido T., Kawasaki H., Oppenheim J. J., Matsushima K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **14**, 5548-5552 (1990).
- 2) Dinarello C. A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **856**, 1-11 (1998).
- 3) Wong W. W., *Agents Actions Suppl.*, **49**, 5-13 (1998).
- 4) Colotta F., Re F., Muzio M., Bertini R., Polentarutti N., Sironi M., Giri J. G., Dower S. K., Sims J. E., Mantovani A., *Science*, **261**, 472-475 (1993).
- 5) Mantovani A., Muzio M., Ghezzi P., Colotta C., Inrona M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **840**, 338-351 (1998).
- 6) Takii T., Akahoshi T., Kato K., Hayashi H., Marunouchi T., Onozaki K., *Eur. J. Immunol.*, **22**, 1221-1227 (1992).
- 7) Caput D., Beutler B., Hartog K., Thayer R., Brown-Shimer S., Cerami A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 1670-1674 (1986).
- 8) Vakalopoulou E., Schaach J., Shenk T. A., *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3355-3364 (1991).
- 9) Bohjanen P. R., Petryniak B., June C. M., Thompson C. A., Lindsten T., *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3288-3295 (1991).
- 10) Brewer G., *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 2460-2466 (1991).
- 11) Gillis P., Malter, J. S., *J. Biol. Chem.*, **266**, 3172-3177 (1991).
- 12) Takii T., Hayashi H., Marunouchi T., Onozaki K., *Lymphokine Cytokine Res.*, **13**, 213-219 (1994).
- 13) Ye K., Kock K-C., Clark B. D., Dinarello C. A., *Immunol.*, **75**, 427-434 (1992).
- 14) Takii T., Niki N., Yang D., Kimura H., Ito A., Hayashi H., Onozaki K., *J. Interferon Cytokine Res.*, **15**, 1065-1073 (1995).
- 15) Giese M., Kirchner H., *Onkologie.*, **11**, 151-154 (1988).
- 16) Giacomini P., Fisher P. B., Duigou G. J., Gambari R., Natali P. G., *Anticancer Res.*, **8**, 1153-1161 (1988).
- 17) Harada H., Takahashi E., Itoh S., Harada K., Hori T. A., Taniguchi T., *Mol. Cell Biol.*, **14**, 1500-1509 (1994).
- 18) Schindler C., Fu X. Y., Improta T., Aebersold R., Darnell J. E. Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 7836-7839 (1992).
- 19) Sims J. E., Painter S. L., Gow I. R., *Cytokine*, **7**, 483-490 (1995).
- 20) Takikawa O., Oku T., Yasui H., Yoshida R., *J. Immunol.*, **151**, 2070-2076 (1993).
- 21) Male D., Pryce G., *Immunol. Lett.*, **17**, 267-271 (1988).
- 22) Geller D. A., Nussler A. K., Di-Silvio M., Lowenstein C. J., Shapiro R. A., Wang S. C., Simmons R. L., Billiar T. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 522-526 (1993).
- 23) Norioka K., Mitaka T., Mochizuki Y., Hara M., Kawagoe M., Nakamura H., *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 522-529 (1994).
- 24) Glay A. H., Spits H., *J. Immunol.*, **147**, 3823-3830 (1991).
- 25) Onozaki K., Urawa H., Tamatani T., Iwamura Y., Hashimoto T., Baba T., Suzuki H., Yamada M., Yamamoto S., Oppenheim J. J., Matsushima K., *J. Immunol.*, **140**, 112-119 (1988).
- 26) Oliveira I. C., Sciavolino P. J., Lee T. H., Vilcek J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**,

- 9049–9053 (1992).
- 27) Tilg H., Mier J. W., Vogel W., Aulitzky W. E., Wiedermann C. J., Vannier E., Huber C., Dinarello C. A., *J. Immunol.*, **150**, 4687–4692 (1993).
- 28) Aderka D., Le J., Vilcek J., *J. Immunol.*, **143**, 3517–3523 (1989).
- 29) Fries K. M., Felch M. E., Phipps R. P., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **11**, 552–560 (1994).
- 30) Doganay M., *Mikrobiol. Bul.*, **17**, 69–73 (1983).
- 31) Dinarello C. A., Ikejima T., Warner S. J. C., Orencole S. F., Lonnemann G., Cannon J. G., Libby P., *J. Immunol.*, **139**, 1902–1910 (1987).
- 32) Schutze S., Machleidt T., Kronke M., *J. Leukoc. Biol.*, **56**, 533–541 (1994).
- 33) Takii T., Ito A., Kawashima S., Ninomiya A., Matsumura T., Hayashi H., Onozaki K., *Eur. Cytokine Netw.*, **10**, 237–246 (1999).
- 34) Uehara Y., Hori M., Takeuchi T., Umezawa H., *Jap. J. Cancer Res.*, **76**, 672–675 (1985).
- 35) Fukazawa H., Uehara Y., Murakami Y., Mizuno S., Hamada M., Takeuchi T., *FEBS Lett.*, **340**, 155–158 (1994).
- 36) Ito A., Takii T., Soji T., Onozaki K., *J. Interferon Cytokine Res.*, **17**, 55–61 (1997).
- 37) Reinisch N., Wolkersdorfer M., Kahler C. M., Ye K., Dinarello C. A., Wiedermann C. J., *Neurosci. Lett.*, **166**, 165–167 (1994).
- 38) Stalder A. K., Campbell I. L., *Lymphokine Cytokine Res.*, **13**, 107–112 (1994).
- 39) Takao T., Culp S. G., De S. E., *Endocrinology*, **132**, 1497–1504 (1993).
- 40) Vogels M. T., Mensink E. J., Ye K., Boerman O. C., Verschueren C. M., Dinarello C. A., van der Meer J. W. M., *J. Immunol.*, **153**, 5772–5780 (1994).
- 41) Silvera M. R., Sempowski G. D., Phipps R. P., *Lymphokine Cytokine Res.*, **13**, 277–285 (1994).
- 42) Dubois C. M., Ruscetti F. W., Palaszynski E. W., Falk L. A., Oppenheim J. J., Keller J. R., *J. Exp. Med.*, **172**, 37–744 (1990).
- 43) Deyerle K. L., Sims J. E., Dower S. K., Bothwell M. A., *J. Immunol.*, **149**, 1657–1665 (1992).
- 44) Baumann H., Gauldie J., *Immunol. Today*, **15**, 74–80 (1994).
- 45) Endo Y., *Br. J. Pharmacol.*, **81**, 645–650 (1984).
- 46) Geller D. A., De Vera M. E., Russell D. A., Shapiro R. A., Nussler A. K., Simmons R. L., Billiar T. R., *J. Immunol.*, **155**, 4890–4898 (1995).
- 47) Perlmutter D. H., Gordberg G., Dinarello C. A., Mizelm S. B., Colten H. R., *Science*, **232**, 850–852 (1986).
- 48) Sternberg E. M., *J. Clin. Invest.*, **100**, 2641–2647 (1998).
- 49) Tominaga T., Fukata J., Usui T., Murakami N., Fukushima M., Nakai Y., Hirai Y., Imura H., *Endocrinology*, **128**, 526–531 (1991).
- 50) Almawi W. Y., Beyhum H. N., Rahme A. A., Rieder M. J., *J. Leukocyte Biol.*, **60**, 563–572 (1996).
- 51) Akahoshi T., Oppenheim J. J., Matsushima K., *J. Clin. Invest.*, **82**, 1219–1224 (1988).
- 52) Re F., Muzio M., De R. M., Polentarutti N., Giri J. G., Mantovani A., Colotta F., *J. Exp. Med.*, **179**, 739–743 (1994).
- 53) Colotta F., Saccanai S., Giri J. G., Dower S. K., Sims J. E., Introna M., Mantovani A., *J. Immunol.*, **156**, 2534–2541 (1996).
- 54) Gottschall P. E., Koves K., Mizuno K., Tatsuno I., Arimura A., *Am. J. Physiol.*, **261**, E362–E368 (1991).
- 55) Ito A., Takii T., Goto N., Kito Y., Onozaki K., *J. Interferon Cytokine Res.*, **17**, 413–417 (1997).
- 56) Perretti M., Duncan G. S., Flower R. J., Peers S. H., *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 868–874 (1993).
- 57) Contel C. L., Parant F., Parant M., *Immunobiol.*, **186**, 199–213 (1992).
- 58) Ito A., Takii T., Matsumura T., Onozaki K., *J. Immunol.*, **162**, 4260–4265 (1999).