
原著

ラット IL-1 受容体-Ig ヘテロダイマーによる IL-1 阻害作用の検討

大 瀧 啓 太

新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器学分野

(主任:相澤義房教授)

Rat IL-1 Receptor-Ig Heterodimer as a IL-1 Inhibitor

Keita OTAKI

*Division of Cardiology,**Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences**(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)*

要 旨

生物学的製剤は、自己免疫疾患の治療に大きなパラダイムシフトを起こしつつあり、他の疾患にもその有用性がいくつか報告されてきている。その中でも、IL-1 は様々な炎症の中心的役割を担うサイトカインの一つであり、IL-1 を阻害する生物学的製剤は、幅広い疾患に有効性を示す可能性がある。

今回、私は、IL-1 受容体タイプ II (IL-1RII) -IgFc と IL-1 受容体アクセサリ蛋白 (IL-1Racp) -IgFc のヘテロダイマーを作成し、その IL-1 阻害作用を検討した。pCAGGS プラスミドベクターに IL-1RII-IgFc と IL-1Racp-IgFc をそれぞれ挿入したものを作成し、Cos7 培養細胞に遺伝子導入して得られた培養上清を用いて IL-1 阻害作用を検討した。IL-1 阻害作用は、NRK49F 培養細胞に IL-1 α とそれぞれの Cos7 培養上清を添加し、その MCP-1 の遺伝子発現の変化を定量的 RT-PCR で測定し、判定した。IL-1 阻害作用は、それぞれのホモダイマーではあまりみられず、ヘテロダイマーだけに非常に強い IL-1 阻害作用がみられた。その作用は、現在海外で市販されはじめたアナキンラの約 10000 倍強力であり、新しい生物学的製剤として期待できると考えられた。

キーワード：生物学的製剤, IL-1 阻害薬, IL-1 受容体ヘテロダイマー, 自己免疫疾患

Reprint requests to: Keita OTAKI
First Department of Internal Medicine
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1-754 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-754
新潟大学医学部第一内科学教室 大瀧 啓 太

はじめに

生物学的製剤は、自己免疫疾患の治療の大きなパラダイムシフトを起こしつつある^{1)–3)}。インフリキシマブ⁴⁾、エタネルセプト⁵⁾、アバタセプト⁶⁾、トシリズマブ⁷⁾、アナキンラ⁸⁾など、多くの生物学的製剤が開発され、臨床の場で使われるようになってきている。その中で、IL-1は、炎症の中心的役割を担うサイトカインの一つであり、多様な作用を有することが知られていた⁹⁾。更に、最近、IL-1は免疫細胞内のインフラマソームの活性化により放出され、アスベストによる肺傷害や肺癌の発生¹⁰⁾あるいは尿酸クリスタルによる痛風¹¹⁾にも関与する事が報告され、自己免疫疾患以外の疾患でも注目されている。

インフリキシマブ、エタネルセプトなど、TNF- α を阻害する生物学的製剤は、日本でも使われるようになってきた。しかし、TNF- α よりもIL-1を抑制した方が、より完全に、関節炎を抑制できることがマウスで証明され¹²⁾、以前からIL-1を抑制する薬剤は注目されていた。現在、IL-1を阻害する生物学的製剤としては、アナキンラが海外では使われつつある。アナキンラは、正常の生体内にも生理的に存在するIL-1受容体アンタゴニスト (IL-1RA) であり⁸⁾、それを製剤化したものである¹³⁾。しかし、アナキンラによるIL-1の抑制には、IL-1の約100倍の濃度が必要であると考えられており¹⁴⁾、その作用はかなり弱い。また最近、リロナセプトというIL-1Racp-IL-1RI-IgFcのホモダイマーが¹⁵⁾、IL-1を捕捉してIL-1の作用を抑制する薬剤として製剤化され、アナキンラよりも強力な作用があると期待されているが、その臨床的な効果はまだ明らかにはされていない。

IL-1には、同様な生理作用と同じ受容体と結合するIL-1 α ¹⁶⁾とIL-1 β ¹⁷⁾の2種類があり、またIL-1受容体にも2種類のIL-1RIとIL-1RIIがある¹⁸⁾¹⁹⁾。IL-1RIはIL-1と結合した後、さらにIL-1Racpと複合体をつくり、IL-1と高親和性となり、IL-1のシグナルを細胞内に伝える²⁰⁾。一方IL-1RIIはIL-1の標的のデコイ

として働き、IL-1の作用を抑制するとされているが²¹⁾、同様に、IL-1Racpとの複合体を作ることによって、IL-1と高親和性になる²²⁾。リロナセプトは、IL-1受容体の細胞外ドメインを連続させたIL-1Racp-IL-1RI-IgFcのホモダイマーの構造をとるため、IL-1RIがIL-1Racpと複合体を形成し、IL-1と高親和性になることを利用して作られた製剤である。しかし、そのホモダイマーの構造は、生理的なIL-1RIとIL-1Racp複合体の三次元構造とはかなり異なる可能性があり、IL-1の捕捉作用、抑制作用に影響を及ぼす可能性があると推測される。今回申請者はIL-1RII-IgFcとIL-1Racp-IgFcのヘテロダイマーはより生理的な三次元構造をとり、強力なIL-1阻害作用を有するのではないかと考え、そのIL-1阻害作用を検討した。

材料と方法

1. ベクターの作成

IL-1阻害作用を検討するための蛋白を作成するため、**図1**に示すような遺伝子をそれぞれpCAGGSに挿入した。要約すると、まずラットIgFcをコードする遺伝子を増幅するためEcoRI, SmaIとNotIの制限酵素部位を含むプライマー5'-gaGAATTCATTTAAATgagaGCGGCCGCcgtgcccgaaactgtg-3'と5'-tcaaccactgcacaaatcttggctttacccggagagtgggagagact-3'にて、ラットの脾臓から作ったcDNAを用い、KOD plus DNA polymerase (Toyobo)でPCRを行った。そのPCR産物を鋳型として、さらにグルカゴン標識を付加させるため²³⁾、同じプライマーの5'-gaGAATTCATTTAAATgagaGCGGCCGCcgtgcccgaaactgtg-3'とEcoRI制限酵素部位を含む5'-gagagagaGAATTCtcagggtattcatcaaccactgcacaaatcttgggc-3'で同様にPCRを行い、そのPCR産物をEcoRI制限酵素部位を用いpCAGGSに挿入し、そのプラスミドベクターをpCAGGS-SmaI-NotI-IgFc-glucagon^{19)–29)}-tag (glu)-とした。次に、ラットIL-1Racpの細胞外ドメインをコードする遺伝子を増幅するため、SmaI制限酵素部

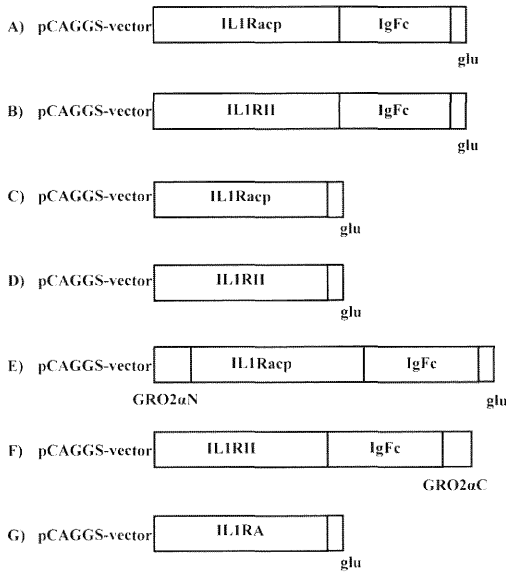


図1 作成したプラスミドベクター

IL-1Racp, ラット IL-1 受容体アクセサリ-蛋白細胞外ドメイン; IL-1RII, ラット IL-1 受容体タイプ II 細胞外ドメイン, glu, グルカゴン標識でグルカゴン 19-29 アミノ酸配列, GRO2 α N, ラット GRO/CINC2 α の N 端標識で RELRCQCLKTLPRVD のアミノ酸配列; GRO2 α C, ラット GRO/CINC2 α の C 端標識で KHIQKLLKSDKS のアミノ酸配列; IL-1RA, ラット IL-1 受容体アンタゴニスト

位を含む 5'-ttcATTTTAAATgggacttccttggtgtttgatg-3' と NotI 制限酵素部位を含む 5'-gcatcGCGGCCGcgtaccttgccggtatgactttctg-3' にて, ラットの自己免疫性心筋炎心臓の cDNA を用い²⁴⁾, 同様に PCR を行い, その PCR 産物を SmaI と NotI 制限酵素部位を用い pCAGGS-SmaI-NotI-IgFc-glu に挿入し, pCAGGS-IL-1Racp-IgFc-glu とした (図 1A)。また, 同様にラット IL-1RII の細胞外ドメインをコードする遺伝子を増幅するため, SmaI 制限酵素部位を含む 5'-ttcATTTTAAATgttcattcttgcttggttagta-3' と NotI 制限酵素部位を含む 5'-gcatcGCGGCCGcgaagaacttctttgactgtggt-3' にて, 同じ cDNA を用い同様に PCR を

行い, その PCR 産物を SmaI と NotI 制限酵素部位を用い, pCAGGS-SmaI-NotI-IgFc-glu に挿入し, pCAGGS-IL-1RII-IgFc-glu とした (図 1B)。IgFc を含まないプラスミドベクターを作成するためには, まず, EcoRI, SmaI と NotI の制限酵素部位を含む 5'-gaGAATTCATTTAAATgagaGCGGCCGcggcagtaagcccaagattttgtgcagtgggtg-3' と EcoRI 制限酵素部位を含む 5'-gagagagaGAATTCtcaggtattcatcaaccactgcacaaatcttgggc-3' にて, pCAGGS-IgFc-glu を鋳型にして PCR を行い, その PCR 産物を EcoRI を用いて pCAGGS に挿入し, pCAGGS-SmaI-NotI-glu とした。さらに, 上述したように作成した pCAGGS-IL-1Racp-IgFc-glu と pCAGGS-IL-1RII-IgFc-glu を SmaI と NotI でそれぞれ制限酵素処理して精製した挿入部位を, pCAGGS-SmaI-NotI-glu に同じ制限酵素を用いてそれぞれ挿入し, pCAGGS-IL-1Racp-glu (図 1C), pCAGGS-IL-1RII-glu (図 1D) とした。Gro/CINC2 α (GRO2 α) を標識としたプラスミドベクターを作成するためには, 以下の方法を用いた。まず, EcoRI, EcoRV, EcoT22I, SmaI と NotI の制限酵素部位を含む 5'-gaGAATTCGATATCATGCATATTTAAATgagGCGGCCGcgtgcccagaaactgtg-3' と EcoRI を含む 5'-gagagagaGAATTCtcaggtattcatcaaccactgcacaaatcttgggc-3' にて, pCAGGS-IgFc-glu を鋳型にして PCR を行い, その PCR 産物を EcoRI を用い, pCAGGS に挿入して, pCAGGS-EcoRV-EcoT22I-SmaI-NotI-IgFc-glu とした。次に, EcoRV 制限酵素部位を含む 5'-ttcGATATCatggcccctcccacccgccggtctc-3' と EcoT22I 制限酵素部位を含む 5'-ataATGCATGatcaacccttggtagggtcttcaggcaactgacagcgcagctcacgggc-3' にてラットの自己免疫性心筋炎心臓の cDNA を用いて PCR を行い, その PCR 産物を EcoRV と EcoT22I 制限酵素部位を用いて pCAGGS-EcoRV-EcoT22I-SmaI-NotI-IgFc-glu に挿入して pCAGGS-GRO2 α N-SmaI-NotI-IgFc-glu とした。さらに, SmaI 制限酵素部位を含む 5'-attcATTTTAAATtccgaacgtgtgactgactgggga-3' と NotI 制限酵素部位を含む 5'-

gcacGCGGCCGCGctaccttggcggatgactttctg-3'にて、ラットの自己免疫性心筋炎心臓のcDNAを用いてPCRを行い、そのPCR産物をSwaIとNotI制限酵素部位を用いてpCAGGS-GRO2 α N-SwaI-NotI-IgFc-gluに挿入し、pCAGGS-GRO2 α N-IL-1Racp-IgFc-glu (図1E)とした。また、EcoRI, SwaIとNotIの制限酵素部位を含むプライマー5'-gaGAATTCATTTAAATgagaGCGGCCGcggtgccagaaactgtg-3'と5'-ctcttcagtaactctggatgattttttaccgagagtgaggag-3'にてラットの自己免疫性心筋炎心臓のcDNAを用いてPCRを行い、そのPCR産物を鋳型にして、同じ5'-gaGAATTCATTTAAATgagaGCGGCCGcggtgccagaaactgtg-3'とEcoRI制限酵素部位を含む5'-gaGAATTCcagctggactgtcactcttcagtaactctggatgatt-3'にてPCRを行い、そのPCR産物をEcoRI制限酵素部位を用い、pCAGGSに挿入してpCAGGS-SwaI-NotI-IgFc-GRO2 α Cとした。さらに、pCAGGS-IL-1RII-IgFc-gluをSwaIとNotIで制限酵素処理して精製した挿入部位を、pCAGGS-SwaI-NotI-IgFc-GRO2 α Cに同じ制限酵素を用いて挿入し、pCAGGS-IL-1RII-IgFc-GRO2 α C (図1F)とした。ラットのIL-1RA (ヒトのアナキンラのアナログ)のプラスミドベクターを作成するため、SwaI制限酵素部位を含む5'-attcATTAAATggaaatctgcaggggacctac-3'とNotI制限酵素部位を含む5'-gcagcatcGCGGCCGcttggtcttcctggaagtagaact-3'にて、ラットの自己免疫性心筋炎心臓のcDNAを用いてPCRを行い、そのPCR産物をSwaIとNotI制限酵素部位を用いてpCAGGS-SwaI-NotI-gluに挿入してpCAGGS-IL-1RA-glu (図1G)とした。

すべてのプラスミドベクターは、大腸菌JM109コンピテントセルにトランスフォーメーションし、培養後、Quantum Prep Plasmid Maxiprep kit (Bio-Rad Laboratories)にて精製した。

2. Cos7細胞への遺伝子導入

6穴のプレートにRPMI 1640 (10% FBSを含む)で培養したCos7細胞に、1穴あたり3 μ lの

Fugene 6とそれぞれのプラスミド1 μ gと100 μ lのFBSを含まないRPMI 1640を加え、遺伝子導入した。3日後その培養液を収穫し、遠心後その上清を、後述するIL-1の抑制実験に用いた。

3. IL-1抑制効果測定のためのNRK49F細胞培養法

6穴のプレートにDMEM (10% FBSを含む)で培養したラット腎線維芽細胞NRK49F細胞に、rat IL-1 α (Pepro tech) 0.5ng/ml (0.028 nM)とそれぞれのCos7細胞の培養上清中のリコンビナント蛋白あるいは市販のラットIL-1RAを加え、24時間培養後、NRK49FからRNAを抽出した。その時のNRK49Fの培養条件を図2に示す。(D)~(K)の培養上清中のリコンビナント蛋白のモル濃度は、後述するように、標識として用いたグルカゴン濃度を測定することによって算出し、NRK49F培養中のグルカゴンの終濃度が3nMとなるように調整し、添加したリコンビナント蛋白濃度を統一した。また、GRO/CINC2 α 標識のIL-1RII-IgFcとIL-1Racp-IgFcのヘテロダイマーは、後述するGRO/CINC2 α ELISAキットを用いてリコンビナント蛋白の濃度を算出し、それを希釈して用いた。同様に、今回作成したラットのリコンビナントIL-1RAは、グルカゴン濃度を測定し蛋白濃度を算出し、希釈して培養に用いた。IL-1の抑制効果は、抽出したRNA中のMCP-1のmRNAを後述するような方法で測定し、判定した。

4. RNA抽出法と定量的RT-PCR

NRK49F細胞の培養液を取り除いた後、直接Trizolを加え、RNAを抽出した。抽出したRNA 5 μ gのRNAからランダムプライマーとマウスMoloney leukemia virus逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。MCP-1の定量的RT-PCRのコピー数を求めるスタンダードとして用いるプラスミドは、5'-ctgtctcagccagatgcagttaat-3'と5'-tatgggtcaagttcattcaaaag-3'を用いてPCRを行い、pGEM-T easyベクターに挿入し、大腸菌JM109コンピテントセルにトランスフォーメー

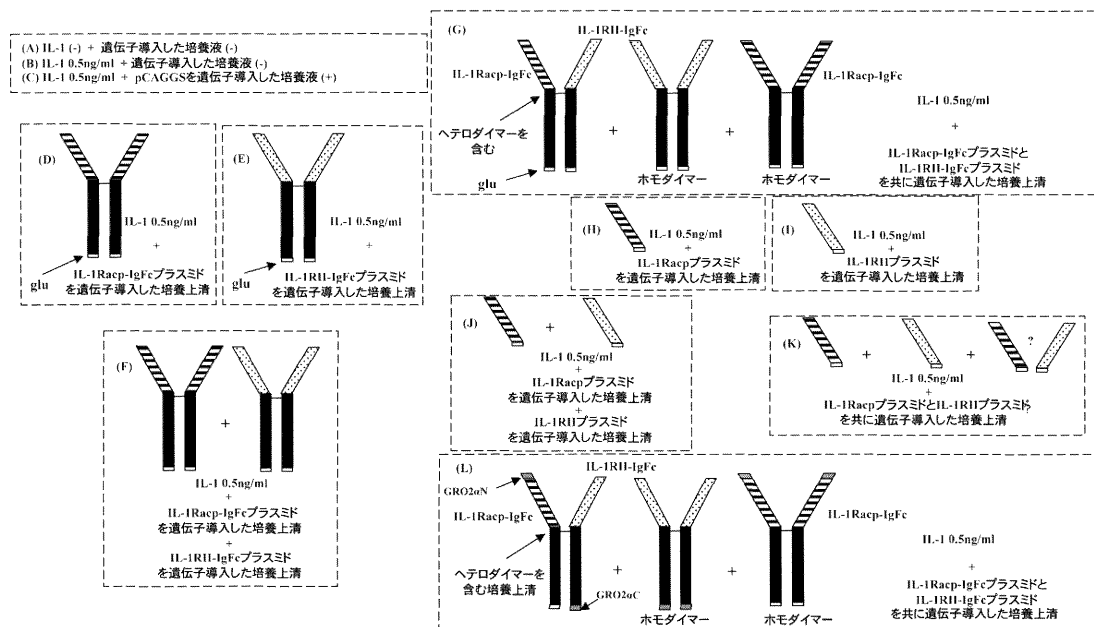


図2 NRK49F細胞に添加したCos7細胞培養上清中のリコンビナント蛋白

(A) はラット IL-1 α 無添加. (B) はラット IL-1 α 0.028 nM 添加. (C) から (L) はラット IL-1 α 0.028 nM 添加と同時にリコンビナント蛋白を含む培養上清を加えてある. (G) と (L) のみが IL-1RII-IgFc と IL-1Racp-IgFc のヘテロダイマーが存在すると考えられる.

ションし, MagExtractor プラスミドキット (Toyobo) を用いて作成した. それらの mRNA の絶対コピー数は, 上述の MCP-1 に対するプライマーと SYBR Premix Ex Taq (Takara) とライトサイクラーにて測定し (10 分間 95 $^{\circ}$ C, 次に 95 $^{\circ}$ C 10 秒, 62 $^{\circ}$ C 10 秒, 72 $^{\circ}$ C 13 秒を 45 サイクル), ライトサイクラーソフトウェアを用いてスタンダードカーブから求めた. 結果は, MCP-1 mRNA の絶対コピー数/総 RNA μ g あるいは 0.028 nM の IL-1 α のみで刺激したときの MCP-1 mRNA の増加比を 10 % として, それぞれの上清を加えた時の MCP-1 mRNA の増加した割合で示した.

5. ELISA 法および RIA 法

グルカゴンで標識した蛋白の濃度は, グルカゴンラジオイムノアッセイキット (Daiichi Radioisotope Laboratories) で測定した²⁵⁾. また, pCAGGS-GRO2 α N-IL-1Racp-IgFc-glu (図

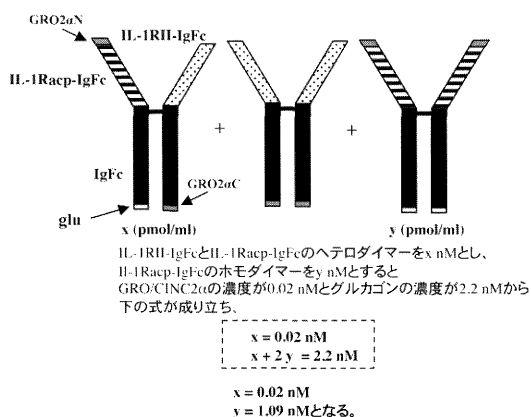


図3 ヘテロダイマーとホモダイマーの濃度計算法

pCAGGS-GRO2 α N-IL-1Racp-IgFc-glu (図 1E) と pCAGGS-SwaI-NotI-IgFc-GRO2Ac (図 1F) をそれぞれ 1 μ g 用い, 3 μ l の Fugene 6, 100 μ l の RPMI1640 (FBS 不含) で, 6 穴プレートに培養した Cos7 細胞に遺伝子導入し, その後 3 日間培養してその上清をえた.

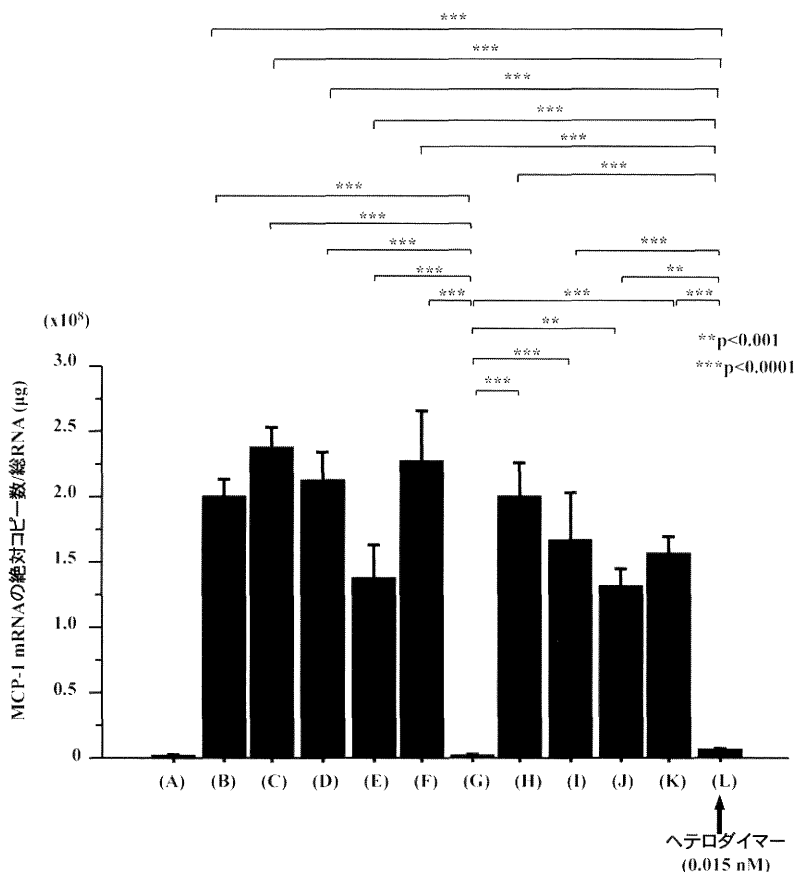


図4 MCP-1 mRNAの絶対コピー数/総RNA (μg)

図2に示す条件で24時間培養したNRK49FのRNAを抽出し、定量的RT-PCRでMCP-1 mRNAを測定した。(G)と他群および(L)と他群との有意差を示す。

1E)とpCAGGS-IL-1RII-IgFc-GRO2αC(図1F)を用いて共に発現させた培養上清については、GRO/CINC2αで標識したヘテロダイマー蛋白の濃度をGRO/CINC2αELISAキット(IBL)で測定し、さらにグルカゴン濃度も上述した方法で測定し、1RII-IgFcとIL-1Racp-IgFcのヘテロダイマーとIL-1Racp-IgFcのホモダイマーのモル濃度比を測定した。

6. 統計解析

統計解析は、one-way ANOVAとBonferroni

の多重比較testを用いた。定量的RT-PCRで求めた値は平均±標準誤差で示した。

結 果

1. 培養上清中のホモダイマーとヘテロダイマーの濃度

pCAGGS-GRO2αN-IL-1Racp-IgFc-glu 1.0 μgとpCAGGS-IL-1RII-IgFc-GRO2αC 1.0 μgを同時に用いてCos7細胞に共に遺伝子導入した時に得られた培養上清中のGRO/CINC2α

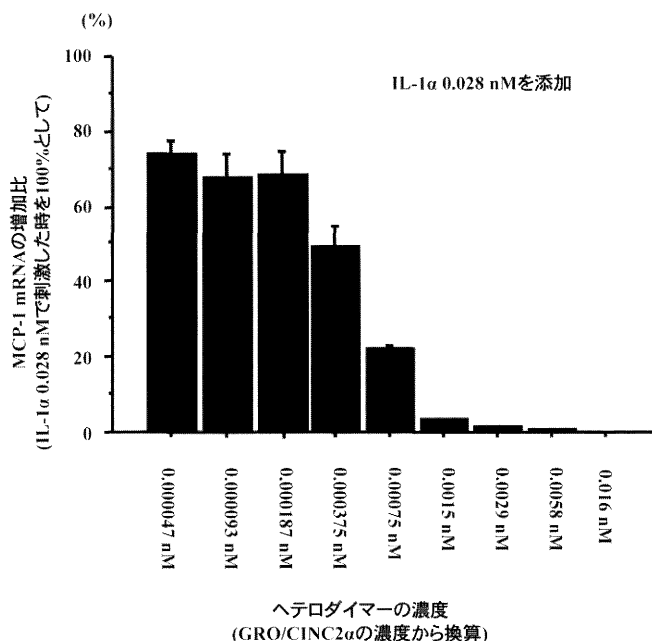


図5 IL-1 α と同時にIL-1RII-IgFcとIL-1Racp-IgFcのヘテロダイマー含有の培養上清を添加したときのMCP-1 mRNAの増加比

IL-1 α を0.028 nM添加して増加したMCP-1 mRNAを100%として計算した。

IL-1RII-IgFcとIL-1Racp-IgFcのヘテロダイマーはGRO/CINC2 α の濃度から換算して求めた。

の濃度は0.02nMであり、グルカゴンの濃度は2.2nMであった。よって、その時のIL-1RII-IgFcとIL-1Racp-IgFcのヘテロダイマーとIL-1Racp-IgFcのホモダイマーの濃度を図3のように算出すると、ヘテロダイマーが0.02nM、ホモダイマーが1.09nMとなり、約55倍ホモダイマーが多いと算出された(図3)。

2. 各種培養上清によるIL-1抑制効果

IL-1 α 0.028 nMの刺激によって、NRK49F細胞は、24時間後にMCP-1の著明な発現上昇を示し、各種Cos7細胞培養上清(図2)をIL-1 α と同時に添加したものでは、(G)と(L)に示すヘテロダイマーを含有する培養上清のみで、著明

なIL-1抑制効果がみられた(図4)。

3. IL-1RII-IgFcとIL-1Racp-IgFcのヘテロダイマーによるIL-1抑制効果

NRK49F細胞は、IL-1RII-IgFcとIL-1Racp-IgFcのヘテロダイマーを含む培養上清の添加で、著明なIL-1抑制を示した(図5)。その抑制効果は、IL-1 α を0.028 nM添加した時に、ヘテロダイマーの濃度をIL-1 α 濃度の1/10以下の0.0015 nM添加しただけにもかかわらず、95%以上抑制するという著明な効果であった。

4. アナキンラによるIL-1抑制効果

NRK49F細胞は、IL-1RAリコンビナント蛋白

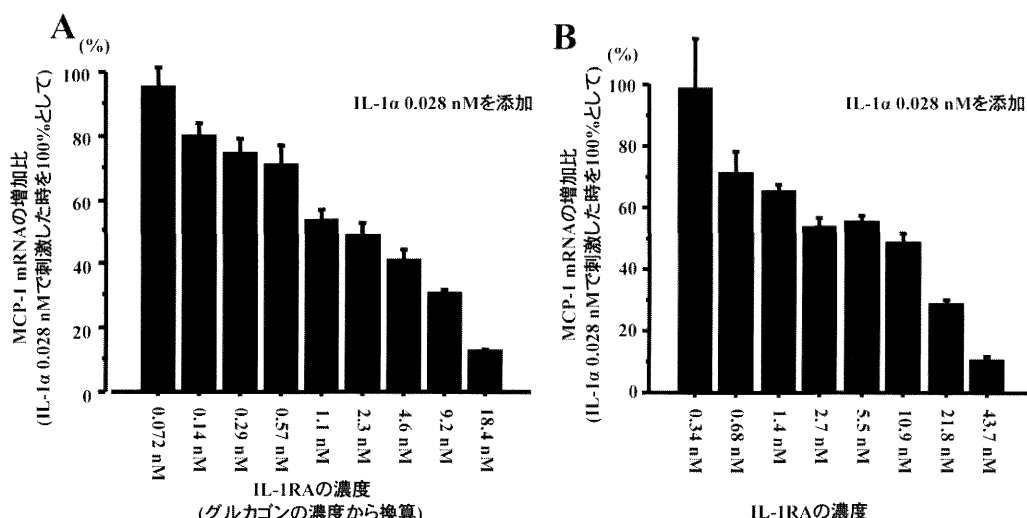


図6 IL-1 α と同時にIL-1RAを添加したときのMCP-1 mRNAの増加比

A, IL-1RA含有のCos7培養上清; B, 市販のIL-1RA

IL-1 α を0.028 nM添加して増加したMCP-1 mRNAを100%として計算した。

Cos7培養上清中のIL-1RAはグルカゴン濃度から換算して求めた。

を含む培養上清の添加で抑制を示したが、十分なIL-1抑制には、かなり高濃度のIL-1RAが必要であった(図6A)。市販のラットIL-1RAリコンビナント蛋白のIL-1抑制には、同様にかなり高濃度のIL-1RAが必要であった(図6B)。

考 察

今回検討したIL-1RII-IgFcとIL-1Racp-IgFcのヘテロダイマーは、アナキンラの約1000倍強いIL-1抑制効果が認められた。これは、アナキンラの約35倍強い¹⁵⁾効果が考えられているIL-1Racp-IL-1RI-IgFcのホモダイマーの構造をとるリロナセプトよりもさらに強い抑制効果である。今後、ヒトのIL-1RII-IgFcとIL-1Racp-IgFcのヘテロダイマーでも同様な効果が得られれば、強力なIL-1抑制作用をもつ生物学的製剤となる可能性がある。IL-1は、IL-1 α 、IL-1 β の2種類があり、ラットでもヒトでも、両

者は同じレセプターに作用すると考えられる。よって、IL-1に対する抗体を用いてIL-1 α および β を同時に抑制するには、2種類の抗体を投与する必要があると考えられる。しかし、申請者のヘテロダイマーは、IL-1 α および β 両者に作用することが想定されるため、単独でも効果がみられる可能性がある利点も考えられる。

今回、IL-1RII-IgFcとIL-1Racp-IgFcのヘテロダイマーが、そのホモダイマーよりも濃度がかなり低くなった事に関しては、それぞれのプラスミドの量比を変えて遺伝子導入を試みたが、ホモダイマーに対するヘテロダイマーの濃度比をあまり改善させることはできなかった(データ未提示)。リボソームでmRNAが翻訳され、蛋白が合成される時には、同時にたくさんのリボソームがmRNAに付着する事が知られている²⁶⁾。これは、一つのmRNAから次々と蛋白が作られることを意味していると考えられ、異なるmRNAからの蛋白とヘテロダイマーが作られるよりも、ホモダ

イマーの方がより簡単に形成されやすい事を意味しているのかもしれない。一方、今回の実験結果で、非常に少ないヘテロダイマーしか含まない培養上清でも、完全に IL-1 の抑制がみられたという事実は、ホモダイマーに比べて明らかにヘテロダイマーの効果が顕著であることを示している。また、刺激した IL-1 α のモル濃度よりも、ヘテロダイマーのモル濃度の方が低かったにもかかわらず強力な抑制効果がみられたという結果は、非常に興味深い結果である。Malinowsky らは、IL-1RII の阻害作用は、IL-1RII が標的細胞表面で IL-1Racp と結合し、IL-1 のシグナルを阻害するためではないかと推論している²²⁾。今回、IL-1RII-IgFc のホモダイマーでは、抑制効果がありみられなかったが、IL-1RII-IgFc と IL-1Racp-IgFc のヘテロダイマーは、ホモダイマーよりも、標的細胞表面でのこのような機序による強い IL-1 シグナルの抑制をしたのかもしれない。IL-1 の受容体が、シグナルを細胞内へ伝える時に、どのような構造をとるかは、まだ詳細不明である。しかし、IL-6、IL-6 受容体、gp-130 がどのような構造になると細胞へシグナルが入るかは、Boulanger らによって明らかにされている²⁷⁾。即ち IL-6 は IL-6 受容体と結合し、次に gp-130 と 3 量体をつくるが、その後さらに、これら 3 量体 2 つが結合し 6 量体を形成することによってシグナルを入れることが明らかになっている。IL-1 受容体も、IL-1 と二つの受容体の単なる 3 量体構造の形成だけでシグナルが入るのではなく、その後のさらなる多量体の形成が生じることによってシグナルが入るのだとすれば、今回の IL-1、IL-1Racp-Ig、IL-1RII-Ig が細胞表面でこの形成を阻害することによって、IL1 の作用を強力に阻害した可能性も考えられるかもしれない。今回観察された IL-1 阻害作用の詳細な機序の解明は今後の課題だが、いずれにしても、刺激した IL-1 の濃度よりもかなり低濃度のヘテロダイマーで強力な IL-1 阻害作用があったという結果は、単なる IL-1 の捕捉作用で阻害したのではないと考えられ、興味深い所見と思われる。

IL-1 を阻害するアナキンラは、近年様々な疾

患でその効用が報告されてきている。自己免疫疾患とはほど遠いと思われる 2 型糖尿病においてもその効果が報告され²⁸⁾、また急性心筋梗塞でも²⁹⁾、その後の心機能や梗塞サイズの改善に効果があったとの報告がなされている。インフラマソームの活性化による活性型 IL-1 β の放出が最近明らかにされ、IL-1 を強力に阻害するこのヘテロダイマーは、様々な疾患に対して有用となる可能性が考えられる。

結 語

ラットの IL-1RII-IgFc と IL-1Racp-IgFc のヘテロダイマーは、強力な IL-1 抑制効果を示し、このヘテロダイマーは、新しい生物学的製剤として考慮すべき蛋白と考えられた。今後、ヒトのヘテロダイマーでの検討やその詳細な作用機序に対して検討が必要と思われる。

謝 辞

本研究においてご指導を賜りました第一内科教室の講師 堀 晴雄先生、保健学科 助教 太田好美先生に深謝致します。

文 献

- 1) Miyasaka N, Takeuchi T and Eguchi K: Guidelines for the proper use of etanercept in Japan. *Mod Rheumatol* 16: 63 - 67, 2006.
- 2) Miyasaka N, Takeuchi T and Eguchi K: Proposed [corrected] Japanese guidelines for the use of infliximab for rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 15: 4 - 8, 2005.
- 3) Koike R, Takeuchi T, Eguchi K and Miyasaka N: Update on the Japanese guidelines for the use of infliximab and etanercept in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 17: 451 - 458, 2007.
- 4) Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedveld FC, Macfarlane JD and Bijl H: Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) ver-

- sus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 344: 1105 - 1110, 1994.
- 5) Suffredini AF, Reda D, Banks SM, Tropea M, Agosti JM and Miller R: Effects of recombinant dimeric TNF receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration. *J Immunol* 155: 5038 - 5045, 1995.
 - 6) Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, Montag A, Brady W, Gibson MG, Linsley PS and Bluestone JA: Long - term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4 Ig *Science* 257: 789 - 792, 1992.
 - 7) Mihara M, Nishimoto N and Ohsugi Y: The therapy of autoimmune diseases by anti - interleukin - 6 receptor antibody. *Expert Opin Biol Ther* 5: 683 - 690, 2005.
 - 8) Liao Z, Grimshaw RS and Rosenstreich DL: Identification of a specific interleukin 1 inhibitor in the urine of febrile patients. *J Exp Med* 159: 126 - 136, 1984.
 - 9) Dinarello CA: Interleukin - 1 and interleukin - 1 antagonism. *Blood* 77: 1627 - 1652, 1991.
 - 10) Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT and Tschopp J: Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320: 674 - 677, 2008.
 - 11) Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A and Tschopp J: Gout - associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237 - 241, 2006.
 - 12) Joosten LA, Helsen MM, Saxne T, van De Loo FA, Heinegard D and van Den Berg WB: IL - 1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen - induced arthritis, whereas TNF - alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol* 163: 5049 - 5055, 1999.
 - 13) Garces K: Anakinra: interleukin-1 receptor antagonist therapy for rheumatoid arthritis. *Issues Emerg Health Technol* 1 - 4, 2001.
 - 14) Arend WP, Welgus HG, Thompson RC and Eisenberg SP: Biological properties of recombinant human monocyte - derived interleukin 1 receptor antagonist. *J Clin Invest* 85: 1694 - 1697, 1990.
 - 15) Economides AN, Carpenter LR, Rudge JS, Wong V, Koehler - Stec EM, Hartnett C, Pyles EA, Xu X, Daly TJ, Young MR, Fandl JP, Lee F, Carver S, McNay J, Bailey K, Ramakanth S, Hutabarat R, Huang TT, Radziejewski C, Yancopoulos GD and Stahl N: Cytokine traps: multi - component, high - affinity blockers of cytokine action. *Nat Med* 9: 47 - 52, 2003.
 - 16) Lomedico PT, Gubler U, Hellmann CP, Dukovich M, Giri JG, Pan YC, Collier K, Semionow R, Chua AO and Mizel SB: Cloning and expression of murine interleukin - 1 cDNA in *Escherichia coli* *Nature* 312: 458 - 462, 1984.
 - 17) Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM and Dinarello CA: Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7907 - 7911, 1984.
 - 18) Bomszyk K, Sims JE, Stanton TH, Slack J, McMahan CJ, Valentine MA and Dower SK: Evidence for different interleukin 1 receptors in murine B - and T - cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8034 - 8038, 1989.
 - 19) Chizzonite R, Truitt T, Kilian PL, Stern AS, Nunes P, Parker KP, Kaffka KL, Chua AO, Lugg DK and Gubler U: Two high - affinity interleukin 1 receptors represent separate gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8029 - 8033, 1989.
 - 20) Cullinan EB, Kwee L, Nunes P, Shuster DJ, Ju G, McIntyre KW, Chizzonite RA and Labow MA: IL - 1 receptor accessory protein is an essential component of the IL - 1 receptor. *J Immunol* 161: 5614 - 5620, 1998.
 - 21) Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE and Mantovani A: Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL - 1 that is regulated by IL - 4. *Science* 261: 472 - 475, 1993.
 - 22) Malinowsky D, Lundkvist J, Laye S and Bartfai T: Interleukin - 1 receptor accessory protein interacts with the type II interleukin - 1 receptor. *FEBS Lett* 429: 299 - 302, 1998.

- 23) Hanawa H, Watanabe R, Hayashi M, Yoshida T, Abe S, Komura S, Liu H, Elnaggar R, Chang H, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J and Aizawa Y: A novel method to assay proteins in blood plasma after intravenous injection of plasmid DNA. *Tohoku J Exp Med* 202: 155 - 161, 2004.
- 24) Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T and Shibata A: A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clin Immunol Immunopathol* 57: 250 - 262, 1990.
- 25) Nishino T, Kodaira T, Shin S, Imagawa K, Shima K, Kumahara Y, Yanaihara C and Yanaihara N: Glucagon radioimmunoassay with use of anti-serum to glucagon C-terminal fragment. *Clin Chem* 27: 1690 - 1697, 1981.
- 26) Slayter H, Kiho Y, Hall C and Rich A: An electron microscopic study of large bacterial polyribosomes. *J Cell Biol* 37: 583 - 590, 1968.
- 27) Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE and Garcia KC: Hexameric structure and assembly of the interleukin - 6/IL - 6 alpha - receptor/gp130 complex. *Science* 300: 2101 - 2104, 2003.
- 28) Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, Seifert B, Mandrup - Poulsen T and Donath MY: Interleukin - 1 - receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356: 1517 - 1526, 2007.
- 29) Abbate A, Salloum FN, Vecile E, Das A, Hoke NN, Straino S, Biond - Zoccai GG, Houser JE, Qureshi IZ, Ownby ED, Gustini E, Biasucci LM, Severino A, Capogrossi MC, Vetrovec GW, Crea F, Baldi A, Kukreja RC and Dobrina A: Anakinra, a recombinant human interleukin - 1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* 117: 2670 - 2683, 2008.

(平成 21 年 1 月 19 日受付)