

2019 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	IL-1 α N 末断片の機能解析：定量システムの開発
キーワード	①ppIL-1 α 、②ELISA system の樹立、③電解酸性機能水

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ツノダ マリコ 角田 麻里子	所属等	日本大学 歯学部 助教
プロフィール	H 24 年 3 月に日本大学歯学部を卒業し、H25 年 4 月同大学大学院歯学研究科（歯周病科）へと進学し、日々診療と歯周病に特化した臨床研究に精進する日々を送る。大学院卒業後は、臨床研究の礎となっている基礎研究に興味を持ち、免疫・分子生物学的な実験を盛んに行っていた病理学講座に入室。現在は助教として alarmin（アラミン：炎症応答を誘導する分子）の細胞内外での動向と機能について研究を行う一方、大学院生への研究指導、大学生への教育に携わっている。		

1. 研究の概要

Interleukin-1 α (IL-1 α) はサイトカインの 1 種であり、血管新生や創傷治癒促進に貢献する分子であることが明らかとなっている。しかしながら、この **IL-1 α の N-末端側の propeptide IL-1 α (ppIL-1 α)** の細胞内外での機能や動向は未だ不明である。ppIL-1 α の機能に関しては、主に核内に局在し、ある種の遺伝子発現に転写レベルで貢献しているとする報告がある。しかし ppIL-1 α 自体に DNA 結合能がないことや、どの転写因子と協働するのかなど、そのメカニズムについては全く明らかにされていない。さらに細胞内局在や動態についての報告、生体内に存在するのか否か、そしてその機能は何かという点についても不明であり、**未知のタンパク質**と言っても過言ではない。そこで、以降の実験を試みた。

- (1) ppIL-1 α 特異的抗体の作製とこれを用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system の樹立

ppIL-1 α の性質を探るうえで、定量化を行うことは必須であり、ELISA system 樹立には抗体は必要不可欠なものである。このため、大腸菌を用いた recombinant ppIL-1 α (rppIL-1 α) の作製とウサギへの免疫を行った。得られた抗血清は rppIL-1 α を用いた affinity 精製が必要であり、これらの実験については外部業者に委託し行った。得られた抗体を用いて、口腔扁平上皮癌細胞や線維芽細胞などの培養細胞に作用させ、ウェスタンブロット (WB) および樹立した ELISA system を用いて細胞内の ppIL-1 α の存在の有無について検討した。

- (2) 生体における ppIL-1 α の存在の有無について実験動物を用いて免疫組織学的および生化学的に検討する

さらに、培養細胞内での ppIL-1 α の動態については蛍光免疫組織染色を用いて検索を行った。一方、マウス血清中の ppIL-1 α 濃度を、樹立した ELISA system を用いて測定する試みは現在も進行中である。また、rppIL-1 α を大量に精製し、これを口腔扁平上皮癌細胞や線維芽細胞などの培養細胞に作用させ、遺伝子発現の変化について microarray を用いた網羅的な解析を試みている。これらの実験のために、positive control として同時に IL-1 α の C-末端側の mature IL-1 α (mIL-1 α) 精製を行った。本実験を通じ、ppIL-1 α の定量が可能となり、さらに細胞外での機能と細胞内での動態を検索することで、ppIL-1 α の性質に迫った。

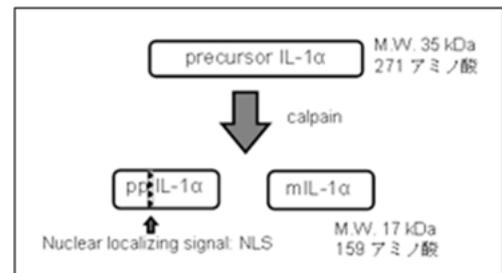
2. 研究の動機、目的

(1) IL-1 α の研究に至るまで

日本大学歯学部病理学講座において、数年前から電解酸性機能水 (Functional water: FW) の研究が行われていた。これは低濃度の食塩水を電気分解することにより得られる水であり、安全で有効な殺菌効果が得られることから、歯科臨床の場で多用されている次亜塩素酸水に代わる消毒剤あるいは根管治療剤として使用し得る可能性があり注目されている。当講座では、FW を培養細胞に作用させたときのサイトカインの産生変化について検討してきた。その中で、ヒト子宮頸癌由来細胞 HeLa では basic fibroblast growth factor (bFGF) や extracellular matrix proteinase inducer (EMMPRIN) が、口腔扁平上皮癌細胞 HSC3 では interleukin-1 α (IL-1 α) などのサイトカイン産生が顕著に増強されることを見出した。これらの分子は、血管新生や創傷治癒促進に貢献する分子であることが明らかとなっている。そこでまず IL-1 α に着目した。

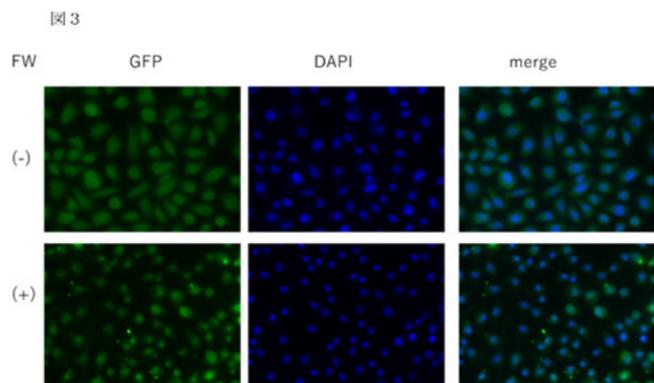
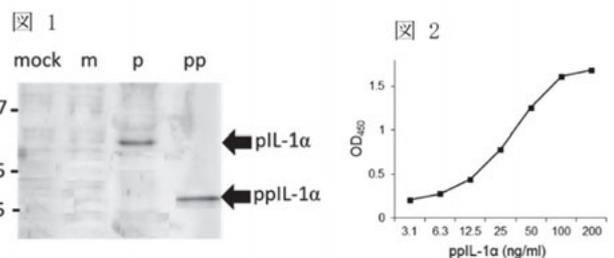
(2) IL-1 α の性質

IL-1 α は細胞質内で産生 (precursor IL-1 α : pIL-1 α) された後に、カルパインなどのタンパク質分解酵素の作用で N-末端側の propeptide IL-1 α (ppIL-1 α) と C-末端側の mature IL-1 α (mIL-1 α) に切断される。ppIL-1 α は核移行シグナルを有することから核に移行し、mIL-1 α は細胞外に分泌される (右図)。FW 作用後に分泌される分子の種類について検討したところ pIL-1 α については分泌されることが明らかとなった。しかし、核内に局在する ppIL-1 α については不明であった。これは ppIL-1 α に対する抗体が存在しないためである。では、ppIL-1 α のように核内に局在する分子はどのようなメカニズムによって分泌されるのであろうか? 近年の研究から、核内で染色体の基本構造の維持に関与しているヒストンタンパク質が、細胞外で抗菌作用を発揮しているという報告がなされ、これまで核にしか存在しないと考えられていたタンパク質が、細胞外では全く異なった機能を有している可能性が示唆されている。このように従来細胞外での機能が全く想定されていなかったタンパク質の機能を追求することは、医学生物学の新たな分野の開拓にもつながる極めて重要な問題であると考え興味を持つようになった。



3. 研究の結果

あらかじめ pcDNA (mock)、pcDNA-mIL-1 α 、pcDNA-pIL-1 α および pcDNA-ppIL-1 α をトランスフェクションした線維芽細胞 (HeLa 細胞) の細胞溶解液を用いて WB を行った。1 次抗体にはウサギへの免疫で得られた ppIL-1 α 抗体を使用した。その結果、pcDNA-pIL-1 α (34 kDa) および pcDNA-ppIL-1 α (17 kDa) においてバンドを確認することができた (図 1)。また、得られた抗体を用いて ELISA 法を行ったところ、3.1 ng/mL まで測定可能な検量線を得ることができ、ppIL-1 α の定量化が可能になった (図 2)。さらに、GFP をタグ付けした ppIL-1 α を口腔扁平上皮癌細胞 (HSC3) にトランスフェクションし、FW を作用させ蛍光免疫染色を行った。その結果、FW を作用させていない細胞では、核内に GFP-ppIL-1 α の集積が認められ、細胞内における ppIL-1 α の動態を観察することができた (図 3)。



4. 研究者としてのこれからの展望

本実験により、ppIL-1 α へと迫る第1歩となる定量システムの開発を行うことができた。ppIL-1 α が生体内に存在し、何らかの細胞外機能を有していることが明らかになれば、その作用メカニズムの解明は必須となる。レセプターの同定、シグナル経路の解明、標的分子の同定などを進めることで ppIL-1 α が関わる病態の有無を判定する必要も出てくる。そのためには、進行中である② ppIL-1 α を培養細胞に作用させ、遺伝子発現の変化について microarray を用いて網羅的な解析を行うことは必須である。ppIL-1 α の研究は始まったばかりであるが、着実に歩みを進めていき、また学生に研究のおもしろさを教えることにより、今より研究する人材を1人でも増やし、基礎研究の推進を図りたい。

5. 社会に対するメッセージ

本奨励金のご支援いただき誠にありがとうございます。研究のスタートを切ることができましたことを大変うれしく思っております。

本研究は基礎研究であり、これからこの ppIL-1 α がどのようなタンパク質であるのか、新たな細胞学的知見を秘めているものなのか、さらなる研究を通して迫っていきたいと思います。昨今は医療分野で新しい技術が開発され、人々の役に立っています。そうした技術もたくさんの基礎研究によりその礎は築かれています。そのような基礎研究のさらなる発展のためにも、どうか継続したご支援のほどをよろしくお願いいたします。私のように、助教を拝命したばかりでなおかつ基礎研究に携わっている身としましては、このように若手・女性に着目した支援の場があることは大変励みになります。研究ははじまったばかりの段階ですので、さらに精進してまいりたいと思います。