

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20890126
 研究課題名（和文） IL-1・とインテグリンとの直接結合によるシグナル伝達機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of signaling pathways induced by the binding of IL-1・ to integrins
 研究代表者
 三枝 淳（SAEGUSA JUN）
 神戸大学・大学院医学研究科・特命助教
 研究者番号：20514970

研究成果の概要（和文）：

インターロイキン-1・（IL-1・）は代表的な炎症性サイトカインであり、滑膜細胞などの標的細胞上の IL-1 受容体（IL-1R）に結合して炎症を引き起こす。我々は、IL-1・が細胞接着分子であるインテグリンに結合することを明らかにした。さらに、IL-1・に点突然変異を挿入したタンパクを数多く作成することにより、IL-1・のインテグリン結合部位は IL-1R 結合部位とは異なることを示した。そして、IL-1・が IL-1R に結合しなくても、IL-1R 非依存的に MAP キナーゼ経路や NF- κ B 経路を活性化することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Interleukin-1・（IL-1・） is a proinflammatory cytokine driving local as well as systemic inflammation by binding to its specific receptor, IL-1R type I, on target cells. In this study, we demonstrated that IL-1・ also specifically binds to integrin, which is known as a cell adhesion molecule. In addition, we showed that the integrin-binding site of IL-1・ is distinct from the IL-1R-binding site using mutagenesis. Furthermore, we found that IL-1・ can activate MAP kinase pathway or NF- κ B pathway in a manner independent of binding to IL-1R.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,340,000 | 402,000 | 1,742,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,540,000 | 762,000 | 3,302,000 |

研究分野：臨床免疫学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：インターロイキン-1、インテグリン、関節リウマチ、サイトカイン、滑膜細胞

1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞成長因子 (FGF) は線維芽細胞の増殖を促進する物質として発見され、その後の研究で線維芽細胞のみならず中胚葉や神経外胚葉由来の様々な細胞に対して増殖活性や分化誘導など多彩な作用を示すことが明らかとなった。FGF は構造上の類似性からヒトにおいて 23 種類からなるファミリーを形成しており、中でも FGF1 と FGF2 は中胚葉構造に対して強力な細胞分裂促進効果を与えることが知られている。FGF は FGF レセプター (FGF receptor; FGFR) と結合することにより細胞内にシグナルを伝達し機能を発揮する。近年、FGFR からのシグナルに、細胞接着分子であるインテグリンからのシグナルが影響を及ぼすことが明らかとなり、両シグナルのクロストークとして注目された (Biochem Soc Trans 32:443-6, 2004 Review)。ただしこれらの報告は、インテグリンと細胞外基質との結合から始まるよく知られたシグナルを想定しており、どのようなメカニズムで、またどの段階でインテグリンからのシグナルが FGF シグナルに関与するのかは全く不明であった。研究代表者らはコンピューターを用いたドッキングシミュレーションを用いて、FGF1 が FGFR との結合部位とは異なる部位で直接インテグリン・ α 3 に結合するという仮説をたてた。そして binding/adhesion アッセイ系及び表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance: SPR) により、FGF1 が実際に直接インテグリン・ α 3 に特異的に結合することを明らかにした。さらに同シミュレーションに基づいて FGF1 のインテグリン・ α 3 結合部位に点突然変異 (point mutation) を挿入し FGFR に結合するがインテグリンには結合しない FGF1 変異体を作成したところ、同変異体は野生型 FGF1 とは異なり、細胞の増殖、遊走を全く誘導しなかった。従って、FGF1 が機能を発揮するためには、FGFR との結合に加え、同時にインテグリンと結合することが必須であることを明らかにした。以上の結果をふまえ、主任研究者らは従来 1 対 1 と考えられていた FGF1 と FGFR の結合に加えて、インテグリン・ α 3 もまた同時に FGF1 と結合し、その共受容体 (coreceptor) として働くという “two-receptor” モデルを提唱した。

インターロイキン-1 (IL-1) は代表的な炎症性サイトカインであり、マクロファージや単球、滑膜表層細胞等多様な細胞から産生される。IL-1 が滑膜細胞、血管内皮細胞、リンパ球、マクロファージ等の標的細胞

に発現している IL-1 レセプター (IL-1R) に結合すると、種々のサイトカイン、ケモカイン、炎症性メディエーターの発現が誘導され、血管の透過性が亢進し、発熱や細胞浸潤を招き炎症を引き起こす。我々は上述のシミュレーションにて、IL-1 もまた FGF1 と同様に IL-1R との結合部位とは異なる部位でインテグリン・ α 3 に直接結合するという結果を得た。従って本研究では IL-1 が IL-1R に結合する際、同時にインテグリン・ α 3 も IL-1 に直接結合し、IL-1 の coreceptor としての役割を果たしていることを証明したいと考えている。

現在 IL-1 を含め、サイトカインはそのレセプターと 1 対 1 で結合すると考えられており、インテグリンがその coreceptor としての役割を果たしているという仮説は全く新しい発想である。Sahni らは、IL-1 とフィブリノーゲンの存在下において、IL-1R とインテグリン・ α 3 が共局在 (colocalization) することを報告している (Arterioscler Thromb Vasc Biol 25(10):2222-7, 2005)。この報告は我々の仮説を強く支持するものと考えられるが、IL-1 とインテグリン・ α 3 とが直接結合している可能性について論じている報告は全くない。

TNF 阻害薬の出現は、関節リウマチの治療に劇的な変革をもたらした。関節炎モデル動物では、IL-1 は TNF より強力な関節炎誘導能を有することが知られている。実際欧米では IL-1 阻害療法が臨床導入されている。我々は FGF1 の研究において、FGF1 のインテグリンとの結合部位に点置換変異を挿入して作成した「インテグリン非結合 FGF1 変異体」が、FGF1 としての生理活性を持たないが FGFR に競合的に結合することから、FGFR のアンタゴニストとして機能することを明らかにした。さらに、同変異体が *in vivo* において腫瘍細胞の増殖を有意に抑制することを示した。従って、本研究においても同様に「インテグリン非結合 IL-1 変異体」を作成することにより、新しい機序による IL-1 阻害剤の開発につながることを期待される。

2. 研究の目的

インターロイキン-1 (IL-1) は代表的な炎症性サイトカインであり、関節リウマチなどの慢性炎症性疾患の重要な増悪因子である。本研究では、我々の線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth

factor; FGF)の研究成果をふまえて、IL-1・がIL-1レセプター(IL-1 receptor; IL-1R)に結合すると同時に、細胞接着分子であるインテグリンにも結合することがその機能発揮に必須であることを明らかにしたい。そして、新たな発想によるIL-1・・阻害剤を作成し関節リウマチ等の炎症性疾患への治療応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) IL-1・・とインテグリン・v・3との結合の検討

Elisa-typeの結合分析(binding assay)により、リコンビナント・v・3がIL-1・に直接結合するかどうかを調べた。また、接着アッセイ(adhesion assay)により、v・3を発現したCHO細胞やK562細胞がIL-1・でコーティングされたプレートに接着するかどうかを調べた。

(2) IL-1・変異体タンパクの作成と精製

野生型ヒトIL-1・は、ヒト胎盤ライブラリーを鋳型として、Bgl IIとEco RIの認識配列を含むプライマーを用いてPCRで増幅した。そのPCR産物をpGEX-2T vectorへサブクローニングする。特定部位の突然変異導入に関しては、まずドッキングシミュレーションプログラムAUTODOCKによってIL-1・とIL-1Rおよびインテグリン・v・3との結合部位を特定し、QuickChange法(BioTechniques 26:680-2, 1999)を用いて同部位に点突然変異(point mutation)を導入した。変異体は、結合部位と思われる部位に点突然変異を1~4箇所程度挿入したものを数多く作成した。そして、野生型、あるいは変異体のIL-1・を含むベクターをE coli BL21に発現させ、まずタンパクをグルタチオンアフィニティークロマトグラフィーにて精製する。続いてエンドトキシン除去後、GSTタグをthrombin処理にて取り除き、ヘパリンセファロースカラムにてさらに精製したタンパクを回収した。

(3) IL-1・変異体タンパクの分析

AUTODOCKプログラムにて特定された部位に点突然変異を挿入したIL-1・変異体について、同様に結合分析及び接着アッセイによる解析を行い、実際に作成された変異体がIL-1Rやインテグリンに結合するか否かを検討した。

(4) IL-1・変異体タンパクの生理活性の検討

IL-1・は代表的な炎症性サイトカインであり、滑膜細胞、血管内皮細胞、リンパ球、マクロファージ等の標的細胞表面に発現しているIL-1Rに結合し、種々のサイトカイン、ケモカイン、炎症性メディエーターの産生を誘導する。我々は、リウマチ滑膜細胞を野生型IL-1・と各変異体でそれぞれ刺激し、IL-6

mRNAの誘導能をreal-time PCR法にて解析した。

(5) L-1・変異体タンパクからの細胞内シグナルの解析

IL-1・は細胞表面の受容体と結合すると、MAPキナーゼとNF- κ B経路の両経路を活性化することが知られている。本研究では、野生型および変異体IL-1・添加後の両シグナル経路の活性化について免疫ブロッティング法にて検討した。

4. 研究成果

(1) IL-1・とインテグリン・v・3との結合の検討

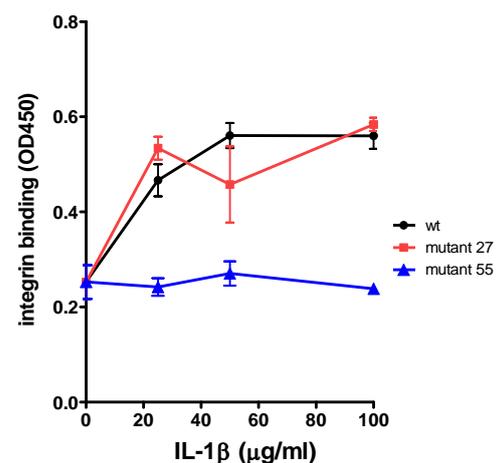
まず結合分析(binding assay)により、L-1・とインテグリン・v・3の結合について検討した。そして、リコンビナント・v・3がin vitroで実際にIL-1・に結合することを明らかにした(Fig.1)。また、接着アッセイ(adhesion assay)により、v・3を強発現したK562あるいはCHO細胞がIL-1・でcoatingされたplateに接着することを示した(Fig.2)。

(2) IL-1・変異体とインテグリン・v・3との結合の解析

① 結合分析

点突然変異(point mutation)の挿入により作成した複数の変異体タンパクのうちのいくつかはIL-1・とは結合しないことを結合分析にて確認した(Fig.1)(変異体(mutant)の番号は、IL-1・のアミノ酸配列においてmutationを挿入した部位を示している)。

Figure 1

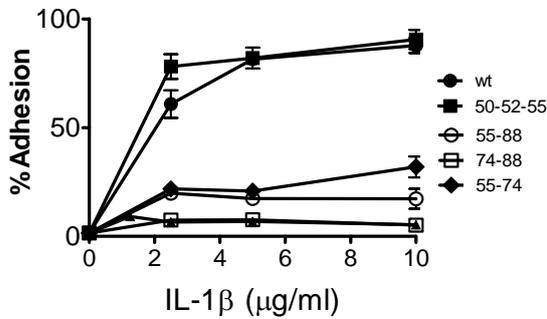


② 接着アッセイ

IL-1・の各変異体とv・3を強発現したCHO細胞との結合を調べることにより、IL-1・とインテグリンとの結合部位を推定

することができた。一連の解析により、IL-1 \cdot のアミノ酸配列における 55, 74, 88 といった部位は、インテグリンとの結合に重要であることが明らかとなった (Fig.1 and Fig.2)。

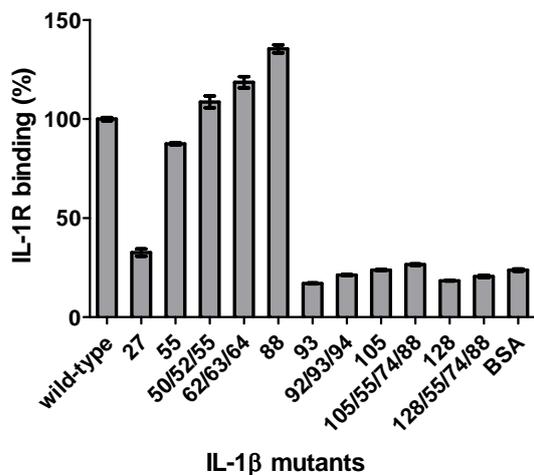
Figure 2



(3) IL-1 \cdot 変異体と IL-1R との結合の解析

ELISA-type binding assay により、各 IL-1 \cdot 変異体の IL-1R への結合能を解析した。105 と 128 については、同部位への point mutation 挿入によって IL-1R への結合が失われると過去に報告されており、我々も同様の結果を得た。27 や 93 といった部位は、過去には報告されていないが、同部位への mutation 挿入によって IL-1R への結合能が失われることが明らかとなった (Fig. 3)。55 や 88 といった部位に mutation を挿入すると、インテグリンへの結合能は失われたが (Fig. 1 and Fig. 2)、IL-1R への結合能は保たれていた (Fig. 3)。これらの結果から、IL-1 \cdot の IL-1R 結合部位とインテグリン結合部位は異なると考えられた。

Figure 3



(4) IL-1 \cdot 変異体による IL-6 mRNA の誘導

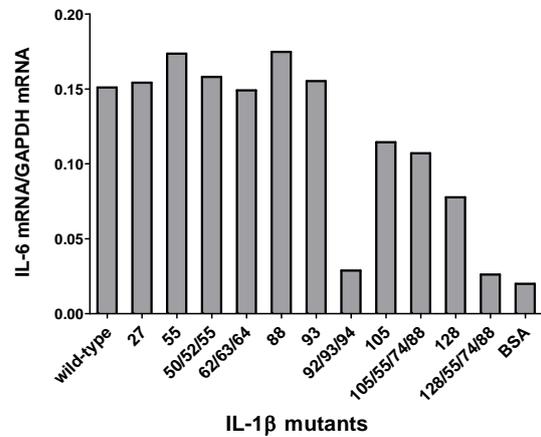
各変異体 IL-1 \cdot をヒトリウマチ滑膜細胞

株に反応させて、IL-6 mRNA の誘導能について検討した。

興味深いことに、IL-1R に結合しない mutant 27, 93, 105 といった変異体も、滑膜細胞に添加すると IL-6 mRNA を誘導した (Fig. 4)。すなわち、IL-1 \cdot が IL-1R 非依存的に細胞内にシグナルを伝える経路が存在することが示唆された。

そして、この 27, 93, 105 はインテグリンへは結合する変異体であるが、インテグリンと IL-1R へのどちらにも結合できない 92/93/94 や 128/55/74/88 といった変異体は IL-6 mRNA を誘導しなかった (Fig. 4)。従って、IL-1R あるいはインテグリンのどちらかへの結合が、IL-6 の誘導に必要であることが示唆された。

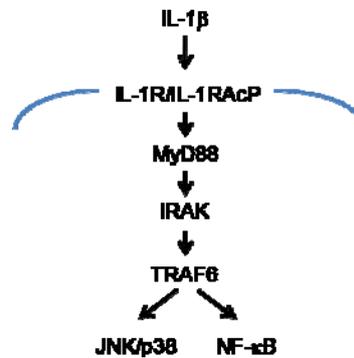
Figure 4



(5) IL-1 \cdot 変異体による細胞内シグナルの解析

IL-1 \cdot が細胞表面の受容体と結合すると、MAP キナーゼと NF- κ B 経路の両者が活性化されることが知られている (Fig. 5)。

Figure 5



Nat Rev Immunol. 1, 135-45, 2001 改変

① NF- κ B 経路の活性化の解析

Mutant 27 と 93 は、どちらも IL-1R への結合能を失っていたが、滑膜細胞に添加して刺激すると IL-6 を誘導した。従って、それぞれの変異体で刺激後の細胞内シグナルを検討したところ、27 は IKK \cdot / \cdot をリン酸化し、I \cdot B \cdot を分解した。すなわち NF- \cdot B 経路を活性化した。ところが、93 は NF- \cdot B 経路を活性化しなかった (Fig. 6 and Fig. 7)。

Figure 6

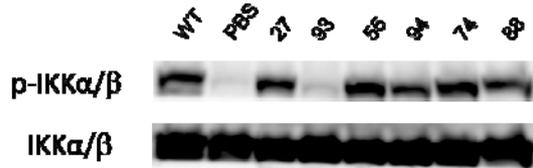
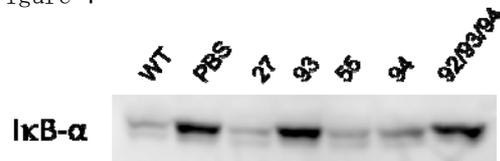


Figure 7



また、IL-1R に結合しない他の変異体である、105, 128, 105/55/74/88, 128/55/74/88 についても同様の検討を行った。すると、これら 4 つの変異体は、すべて IKK \cdot / \cdot をリン酸化したが (Fig. 8)、128 と 128/55/74/88 は I \cdot B \cdot を分解しなかった (Fig. 9)。

Figure 8

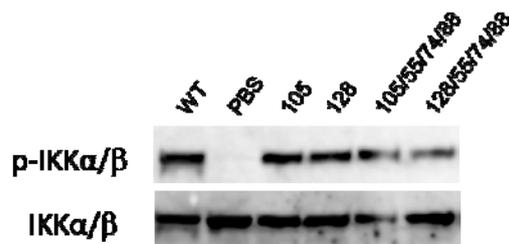
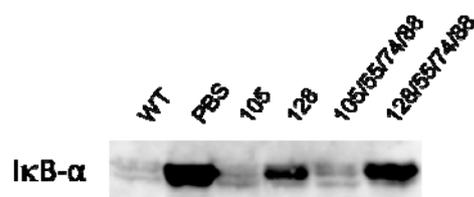


Figure 9



② MAPK 経路の活性化の解析

続いて、MAPK 経路についても同様に IL-1R

に結合しない変異体を中心に検討した。

興味深いことに、IL-1R 非結合で、NF- \cdot B 経路を活性化しなかった mutant 93 や 128 は、JNK, p38 といった MAPK 経路を活性化した。しかも、野生型 (wild-type; WT) よりも強く誘導していた (Fig. 10 and Fig. 11)。

Figure 10

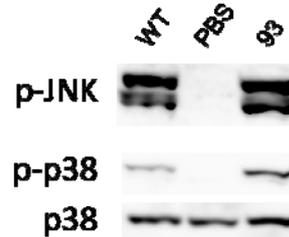
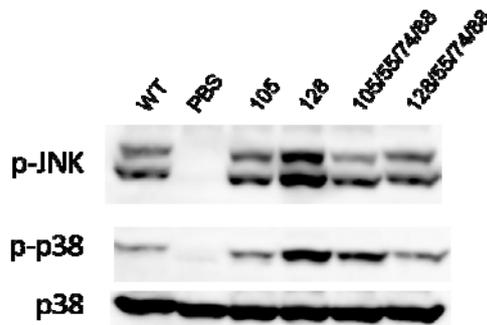


Figure 11



以上、本研究により下記の成果を得た。

- 1) IL-1 \cdot はインテグリンに直接結合した。
- 2) IL-1R 非結合の IL-1 \cdot 変異体の中のいくつかは滑膜細胞に IL-6 を誘導した。従って、IL-1R 非依存性に IL-6 を誘導する経路の存在が示唆された。
- 3) IL-1R とインテグリンの両者に非結合の IL-1 \cdot 変異体は、滑膜細胞に IL-6 を誘導しなかった。
- 4) IL-1R に結合しない IL-1 \cdot 変異体は、NF- \cdot B 経路を活性化するものと活性化しないものの 2 つに分類することができた。

Point mutation の位置によるシグナル伝達の違いは、IL-1 \cdot の細胞表面への結合から始まるシグナルを解明するカギとなる可能性があり、インテグリンシグナルを中心として今後も詳細な検討を続ける予定としている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Yamaji S, Saegusa J, Ieguchi K, Fujita M, Takada YK, Takada Y. A novel

- fibroblast growth factor-1 (FGF1) mutant that acts as an FGF antagonist. **PLoS One**. 21;5(4):e10273, 2010 査読有
2. Takada Y, Ono Y, Saegusa J, Mitsiades C, Mitsiades N, Tsai J, He Y, Maningding E, Coleman A, Ramirez-Maverakis D, Rodriquez R, Takada Y, Maverakis E. A T cell-binding fragment of fibrinogen can prevent autoimmunity. **J Autoimmun**. 34(4):453-9, 2010 査読有
 3. Saegusa J, Yamaji S, Ieguchi K, Wu CY, Lam KS, Liu FT, Takada YK and Takada Y. The direct binding of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) to integrin $\alpha v \beta 3$ is involved in IGF-1 signaling. **J Biol Chem**. 284(36):24106-14, 2009 査読有
 4. Saegusa J, Hsu DK, Chen HY, Yu L, Fermin A, Fung MA and Liu FT. Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. **Am J Pathol**. 174(3):922-31, 2009 査読有
 5. Saegusa J, Akakura N, Wu CY, Hoogland C, Ma Z, Lam KS, Liu FT, Takada YK, Takada Y. Pro-inflammatory secretory phospholipase A2 type IIA binds to integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 4 \beta 1$ and induces proliferation of monocytic cells in an integrin-dependent manner. **J Biol Chem**. 19;283(38):26107-15, 2008 査読有
 6. Saegusa J, Hsu DK, Liu W, Kuwabara I, Kuwabara Y, Yu L and Liu FT. Galectin-3 protects keratinocytes from UVB-induced apoptosis by enhancing AKT activation and suppressing ERK activation. **J Invest Dermatol**. 128(10):2403-11, 2008 査読有
 3. 三枝 淳, 急性期蛋白ホスホリパーゼA2 group IIA はインテグリンと結合して細胞内に炎症性シグナルを伝える、第 56 回日本臨床検査医学会学術集会、2009 年 8 月 27 日、札幌
 4. 三枝 淳, インテグリンはホスホリパーゼA2 group IIA (sPLA2-IIA) のレセプターとして働き炎症性シグナルを伝達する、第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2009 年 4 月 25 日、東京
 5. 三枝 淳, ガレクチン-3 は皮膚アレルギー性炎症の進行に重要な役割を果たしている、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1-3 日、京都
 6. J Saegusa, Galectin-3 promotes activation of AKT and protects keratinocytes from apoptosis. *International Investigative Dermatology*, 2008 年 5 月 14-17 日、京都

〔図書〕 (計 1 件)

1. Liu FT, Hsu DK, Yang RY, Chen HY and Saegusa J. Galectins in Regulation of Inflammation and Immunity. *In: Galectins*. Oxford University Press. 97-114, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三枝 淳 (SAEGUSA JUN)
神戸大学・大学院医学研究科・特命助教
研究者番号：20514970

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

高田 義一 (TAKADA YOSHIKAZU)
カリフォルニア大学デービス校・教授
研究者番号：57770230

〔学会発表〕 (計 6 件)

1. J Saegusa, An integrin binding-defective FGF^{R50E} mutant promotes synoviocyte apoptosis by activating caspase-9 through modulation of Bcl-2 and Bim expression. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 4 日、大阪
2. J Saegusa, Secretory Phospholipase A2 Group IIA Binds to Integrin $\alpha v \beta 3$ and Induces Proinflammatory Signaling. 第 75 回米国リウマチ学会、2009 年 10 月 20 日、フィラデルフィア