

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590064

研究課題名(和文) インターロイキン1の作用発現とその制御に関する研究

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of the induction and function of IL-1

研究代表者 小野 菊夫

(ONOZAKI KIKUO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号 20101313

研究成果の概要(和文)：(1) IL-1 $\alpha$ の恒常的産生機構：IL-1 $\alpha$ の恒常的産生には、HDAC1の活性低下とSp1の活性増強が重要であった。(2) 性ホルモンによるIL-1の作用調節：ヒト関節リウマチ患者由来細胞株MH7Aにおいて、男性ホルモンは、ホルモン受容体依存的にIL-1 $\alpha$ 、TNF $\alpha$ 刺激による炎症性サイトカインの産生誘導をNF- $\kappa$ Bを介して抑制した。(3) 化学物質によるIL-1の発現制御：タバコの煙抽出物は、ヒト関節リウマチ患者由来細胞からの炎症性サイトカインの産生を誘導するとともに、マウスにおける関節炎の発症、病態を増強した。

研究成果の概要(英文)：(1) The mechanism of constitutive production of IL-1 $\alpha$ ：For the constitutive production of IL-1 $\alpha$  in human melanoma cells down-regulation of HDAC1 activity and up-regulation of Sp1 activity appeared to be important. (2) Regulation of IL-1 function by sex hormone：Dihydrotestosterone inhibited the proinflammatory cytokine production in human synovial fibroblast cells through hormone receptor-mediated down-regulation of NF- $\kappa$ B activity. (3) Regulation of IL-1 production by chemicals：Cigarette smoke condensate induced proinflammatory cytokines from RA patient-derived synovial cells, and augmented the development of collagen-induced arthritis in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：IL-1, 化学物質, タバコ, 関節リウマチ, 炎症性サイトカイン, 性ホルモン, 自己免疫

## 1. 研究開始当初の背景

インターロイキン1(IL-1)は、免疫、炎症、造

血、内分泌等の生体反応に重要な役割を果たしているサイトカインである。IL-1は、種々

のケモカイン、IL-1、TNF $\alpha$ 、IL-6などの炎症性サイトカインやシクロオキシゲナーゼ 2、プロスタグランジン E2、マトリックスメタロプロテアーゼ、NO合成酵素、細胞接着因子の産生や発現を誘導することから特に、急性、慢性の炎症に中心的な役割を果している。

IL-1の局所における持続的、恒常的な産生は、関節リウマチ、痛風、糖尿病、アルツハイマー病、強皮症など多くの慢性炎症性疾患の発症や病態に寄与している。また、IL-1は細胞の増殖も制御し、細胞により増殖促進、抑制と相反する作用を示す。IL-1は、血管内皮細胞や線維芽細胞の老化因子でもある。また、腫瘍細胞が恒常的に産生するIL-1は、癌の悪性化因子でもある。

IL-1レセプター(IL-1R)にはI型とII型があり、I型(IL-1RI)のみがシグナルを伝達する。従って、IL-1の作用発現調節機構を明らかにすることは、IL-1の生理的、病理的役割を明らかにし、慢性炎症性疾患や癌の悪性化、細胞の老化の原因を探り、病態を明らかにし、治療法や予防法を開発する上で重要である。

## 2. 研究の目的

1. **恒常的なIL-1 $\alpha$ の産生機構**: 申請者達は、IL-1の増殖抑制作用に抵抗性を獲得したヒト・メラノーマ細胞を得たところ、恒常的にIL-1 $\alpha$ を産生していた(Int.J.Cancer,1997)。IL-1 $\beta$ の産生はなかった。解析の結果、IL-1 $\alpha$ によるNF- $\kappa$ B活性化を介したオートクラインな増強作用を見いだした(CYTOKINE,1998)。さらに、申請者達は、メラノーマ細胞におけるIL-1 $\alpha$ の恒常的転写活性化にIL-1 $\alpha$ 遺伝子上流のGC-boxに転写因子Sp1とヒストンデアセチラーゼHDAC1が結合することとHDAC1の活性低下が重要な役割を果していることを見いだした(J.Leuk.Biol.,2007)。本研究では、その機構を明らかにすることが目的である。

2. **性ホルモンによるIL-1の作用調節**: 関節リウマチ(RA)発症の原因として、関節の線維芽細胞様滑膜細胞からのIL-1の産生がRAの発症に重要な役割を果していることが明らかにされている。IL-1 $\alpha$ は主にRAの発症に、IL-1 $\beta$ はRAの進行に寄与する。RAは女性に多い疾患であり(女:男=4:1)、性ホルモンの関与が考えられているが、その機構は明らかになっていない。

申請者達は、RA患者由来線維芽細胞様滑膜細胞やヒト滑膜細胞においてエストロゲンE2(E2)がエストロゲンレセプター $\alpha$ (ER $\alpha$ )を介して、IL-1 $\alpha$ 遺伝子プロモーターのGC-box上でSp1と結合しているヒストンデ

アセチラーゼ2(HDAC2)の分解を促し、IL-1 $\alpha$ 産生を誘導することを見いだしている(J.Immunol.,2007)。さらに、男性ホルモンは、逆にTNF $\alpha$ 刺激によるIL-1 $\alpha$ の産生を抑制すること(Biol.Pharm.Bull.,2007)、IL-1刺激によるIL-8の産生も抑制することを見いだしている。本研究では、男性ホルモンのIL-1刺激によるIL-8産生抑制機構を明らかにする。

3. **化学物質によるIL-1の発現制御**: 線維芽細胞様滑膜細胞からのIL-1の産生は関節リウマチ(RA)の発症や進行に重要な役割を果していることが明らかにされている。申請者達は、ダイオキシンやベンツピレンなどの多環芳香族炭化水素化合物(PAHs)が、RA患者由来線維芽細胞様滑膜細胞からIL-1 $\alpha$ やIL-1 $\beta$ の産生を誘導することを見いだした(Biol.Pharm.Bull.,2004)。興味深いことに、RAは、骨、文献、絵画等の研究により、西欧では17世紀まで存在せず、その理由は医学史上大きな謎とされていることが分った。一方、タバコはアメリカ大陸から西欧にもたらされ、タバコは疫学的に証明されたRAの唯一の環境危険因子である。さらに、申請者達は、PAHsを多量に含むタバコの煙抽出物は、主流煙、副流煙ともに、IL-1発現誘導作用を示すことを見いだした(論文投稿中)。本研究では、PAHsやタバコの成分によるIL-1誘導機構を明らかにするとともに、動物実験によって、タバコの煙抽出物がRAの発症に寄与することを明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 細胞培養: RPMI1640培地に非動化したFBSを添加して各種細胞を培養した。サイトカインmRNA:Real time PCR法によりmRNAの発現レベルを定量した。
- (2) サイトカイン測定: 培養上清中のサイトカイン量は市販のキットを用いてELISA法により測定した。
- (3) Western blotting: 各因子に対する抗体を用いて行った。
- (4) タバコの煙抽出物: チヤコールフィルターのついたタバコからガラスチャンバー装置を用い、主流煙、副流煙をそれぞれグラスフィルターにトラップして集め、ベンゼン・エタノール(1/3)溶液で抽出、乾固し、エタノールに溶かして原液として実験に用いた。
- (5) 動物実験: DBA1/Jマウス雄を用い、初回免疫時、ウシII型コラーゲン、マイコバクテリア、Complete Freund Adjuvantにpolymyxin Bを0.4mg/mlになるように加え懸濁させ、マウスの四肢の付け根に皮内投与した。3週間

後、II型コラーゲンを腹腔内投与し、誘導される関節炎の重症度をスコア化した。

#### 4. 研究成果

##### 1. 恒常的なIL-1 $\alpha$ の産生機構

本研究で検討した結果、HDAC1の活性は非産生株が強く、Sp1の活性は産生株が強かった。HDAC1の過剰発現は産生株におけるIL-1 $\alpha$ のプロモーター活性やIL-1 $\alpha$ の産生を抑制し、HDAC阻害剤は非産生株からのIL-1 $\alpha$ の産生を誘導した。しかし、両細胞間で、Sp1の発現量、Sp1のリン酸化、Sp1とHDAC1との結合量に差は見られなかった。また、産生、非産生株間のHDAC1の遺伝子に変異は見られなかった。

従って、IL-1恒常的産生株のHDAC1の活性低下の原因は、タンパク修飾やHDAC1の変異ではなく、タンパク複合体の形成能あるいは構成している成分の違いによる可能性が示唆された。本研究は、IL-1を恒常的に産生する疾患やがんの悪性化の解明に寄与すると思われる。

##### 2. 性ホルモンによるIL-1の作用調節

ヒト関節リウマチ患者由来細胞株MH7Aを用い、男性ホルモンDHTのIL-1 $\alpha$ 、TNF $\alpha$ 刺激による炎症性サイトカインの産生誘導に及ぼす影響を調べたところ、DHTはアンドロゲン受容体依存的にIL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8の産生を抑制した。さらに、IL-8遺伝子プロモーターのレポータープラスミドを用いた結果、NF- $\kappa$ B結合部位が重要であること、NF- $\kappa$ Bの活性化がアンドロゲンレセプター(AR)依存的にDHTにより抑制されること、プライマリー滑膜細胞内のARの発現量には差があることから、DHTの効果発現には滑膜細胞内のAR発現量が重要であることが明らかになった。以上の結果は、関節リウマチの発症が男性に多い機構の解明につながるものである。

##### 3. 化学物質によるIL-1の発現制御

**滑膜細胞を用いての解析：**タバコの煙抽出物CSCは、主流煙、副流煙共に、ヒト関節リウマチ患者由来細胞株MH7AやRA患者由来線維芽細胞様滑膜細胞からの炎症性サイトカイン、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8のmRNA、タンパクの発現を誘導した。しかし、肺上皮細胞株肺胞上皮癌株A549、肺線維芽細胞株MRC5、変形性関節症患者由来線維芽細胞様滑膜細胞ではIL-1 $\beta$  mRNAの誘導はほとんど認められなかった。MH7A細胞においてはCSC刺激によりNF- $\kappa$ BとAP-1の活性化が

誘導されたが、肺線維芽細胞株においては、NF- $\kappa$ Bの活性化は誘導されたが、AP-1活性化はあまりみられなかった。従って、CSCによるMH7A細胞と肺線維芽細胞におけるIL-1 $\beta$ mRNAの誘導の違いはAP-1活性化によるものと考えられた。また、主流煙抽出物CSCを分画したところ、MH7A細胞においてIL-1 $\beta$ mRNAを誘導する活性の多くはpH9では水層に、pH6ではエーテル層に見出された。

**動物における関節炎発症：**主流煙CSCをコラーゲンとともにDBA1/Jマウスに投与すると、コラーゲン誘導性関節炎の発症が用量依存的に増強された。同様な増強作用は副流煙でも認められた。さらに、主流煙と副流煙をコラーゲンで免疫する1日前に腹腔内投与した場合でも関節炎発症の増強効果が認められた。従って、CSCの増強作用は全身的なものであることが明らかになった。さらに、より喫煙に近い条件を想定し、CSCを一次免疫7日前と1日前に鼻腔内に投与しても、同様に関節炎発症の増強効果が認められた。鼻腔内投与は、一次免疫1日前の一回投与でも有効であった。また、CSC中の活性物質は、ニコチンとは異なること、pH13では水層に、pH9ではエーテル層に分画されることを明らかにした。DBA1/Jマウスは多環芳香族炭化水素に抵抗性であることから、活性物質は多環芳香族炭化水素とは異なるものであることが示唆された。本研究は、関節リウマチの発症、増悪に喫煙が関与することを実験的に支持する世界で初の研究成果である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計19件)

1. Okamoto S, Adachi M, Chujo S, Yamada K, Akita K, Itoh S, Takii T, Hayakawa K, and Onozaki K.  
Etiological role of cigarette smoking in rheumatoid arthritis: Nasal exposure to cigarette smoke condensate extracts augments the development of collagen-induced arthritis in mice.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 404(4): 1088-92, 2011.
2. Horita Y, Takii T, Kuroishi R, Chiba T, Ogawa K, Kremer L, Sato Y, Lee Y, Hasegawa T, and Onozaki K.  
Synthesis and evaluation of anti-tubercular activity of new dithiocarbamate sugar derivatives.

- Bioorg Med Chem Lett.* 21(3): 899-903, 2011.
3. Ito T, Takii T, Mitsuo Maruyama M, Daisuke Hayashi D, Takeshi Wako T, Azusa Asai A, Yasuhiro, Horita Y, Taniguchi K, Yano I, Yamamoto S, and Onozaki K  
Effectiveness of BCG vaccination to aged mice  
*Immunity & Ageing* 7:12-15,2010.
  4. Chujo S, Okamoto S, Sunahara R, Adachi M, Yamada K, Hayashi H, Taakii T, Hayakawa K, and Onozaki K  
Cigarette smoke condensate extracts augment collagen-induced arthritis in mice.  
*Int Immunopharmacol.* 10(10):1194-9,2010.
  5. Sakai S, Ohoka N, Onozaki K, Kitagawa M, Nakanishi M, and Hayashi H.  
Dual mode of regulation of cell division cycle 25 A protein by TRB3.  
*Biol Pharm Bull.* 33(7):1112-6, 2010.
  6. Hayashi D, Takii T, Mukai T, Makino M, Yasuda E, Horita Y, Yamamoto R, Fujiwara A, Kanai K, Kondo M, Kawarazaki A, Yano I, Yamamoto S, and Onozaki K.  
Biochemical characteristics among Mycobacterium bovis BCG substrains.  
*FEMS Microbiol Lett.* 306(2):103-9,2010.
  7. Tokunaga H, Saito S, Sakai K, Yamaguchi R, Katsuyama I, Arakawa T, Onozaki K, Arakawa T, and Tokunaga M.  
Halophilic beta-lactama as a new solubility- and folding-enhancing tag protein: production of native human interleukin 1 alpha and human neutrophil alpha-defensin.  
*Appl Microbiol Biotechnol.* 86(2):649-658,2010.
  8. Arakawa T, Hayashi H, Itoh S, Takii T, and Onozaki K.  
IL-1-induced ERK1/2 activation up-regulates p21(Waf1/Cip1) protein by inhibition of degradation via ubiquitin-independent pathway in human melanoma cells A375.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 392(3):369-372,2010.
  9. Ohoka N, Sakai S, Onozaki K, Nakanishi M, and Hayashi H.  
Anaphase-promoting complex/cyclosome-cdh1 mediates the ubiquitination and degradation of TRB3.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 92(3):289-294, 2010.
  10. Itoh S, Hamada E, Kamoshida G, Yokoyama R, Takii T, Onozaki K, and Tsuji T.  
Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) binds to human immune-Globulin G (IgG) and inhibits complement activation via the classical pathway.  
*Mol Immunol.* 47(4):932-8, 2010.
  11. Onozaki K.  
Etiological and biological aspects of cigarette smoking in rheumatoid arthritis.  
*Inflamm Allergy Drug Targets.* 8(5):364-8,2009.
  12. Horita Y, Takii T, Chiba T, Kuroishi R, Maeda Y, Kurono Y, Inagaki E, Nishimura K, Yamamoto Y, Abe C, Mori M, and Onozaki K.  
Synthesis of new sugar derivatives and evaluation of their antibacterial activities against Mycobacterium tuberculosis  
*Bioorg Med Chem Lett.* 15;19(22):6313-6,2009.
  13. Itoh Y, Hatano N, Hayashi H, Onozaki K, Miyazawa K, and Muraki K.  
An environmental sensor, TRPV4 is a novel regulator of intracellular Ca<sup>2+</sup> in human synoviocytes.  
*Am J Physiol Cell Physiol.* 297(5):C1082-90, 2009.
  14. Hayashi D, Takii T, Fujiwara N, Fujita Y, Yano I, Yamamoto S, Kondo M, Yasuda E, Inagaki E, Kanai K, Fujiwara A, Kawarazaki A, Chiba T, and Onozaki K.  
Comparable studies of immunostimulating activities in vitro among Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) substrains.  
*FEMS Immunol Med Microbiol.* 56(2):116-28, 2009.
  15. Onozaki K  
Population is a Critical Factor for Global Carbon Dioxide Increase.  
*J. Health Sci.* 55(1):125-127, 2009.
  16. Asamitsu K, Yamaguchi T, Nakata K,

Hibi Y, Victoriano AF, Imai K, Onozaki K, Kitade Y, and Okamoto T.  
Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by Blocking I{ $\kappa$ }B Kinase with Noraristeromycin.  
*J. Biochem.* 144(5):581-589, 2008.

17. Shizu M, Itoh Y, Sunahara R, Chujo S, Hayashi H, Ide Y, Takii T, Koshiko M, Chung SW, Hayakawa K, Miyazawa K, Hirose K, and Onozaki K.  
Cigarette smoke condensate up-regulates the gene and protein expression of proinflammatory cytokines in human fibroblast-like synoviocyte line.  
*J. Interferon Cytokine Res.* 28: 509-522, 2008.

18. Arakawa T, Yamamura T, Hattori T, Hayashi H, Mori A, Yoshida A, Uchida C, Kitagawa M and Onozaki K.  
Contribution of extracellular signal-regulated kinases to the IL-1-induced growth inhibition of human melanoma cells A375.  
*Int Immunopharmacol.* 8(1):80-89, 2008.

19. Enya K, Hayashi H, Takii T, Ohoka N, Kanata S, Okamoto T, and Onozaki K.  
The interaction with Sp1 and reduction in the activity of histone deacetylase 1 are critical for the constitutive gene expression of IL-1 $\alpha$  in human melanoma cells.  
*J. Leuk. Biol.* 83(1):190-199, 2008.

[学会発表] (計 43 件)

1. マウス関節炎の発症増強作用を示すタバコ成分に関する研究  
秋田 邦彦, 岡本 翔佑, 中条 里美, 足達実季, 山田 恭平, 伊藤 佐生智, 瀧井 猛将, 早川 和一, 小野寄 菊夫  
日本薬学会 第 131 回年会 2011 年 3 月 30 日 (静岡) p253

2. タバコ抽出物によるマウス関節炎の増強作用  
足達 実季, 岡本 翔佑, 中条 里美, 山田 恭平, 秋田 邦彦, 伊藤 佐生智, 瀧井 猛

将, 早川 和一, 小野寄 菊夫  
日本薬学会 第 131 回年会 2011 年 3 月 30 日 (静岡) p253

3. K. Onozaki, S. Okamoto, S. Itoh, T. Takii  
Rheumatoid arthritis patient-derived synoviocytes are more sensitive to cigarette smoke condensate extracts-induced IL-1 beta mRNA expression through NF- $\kappa$ B activation than OA patient-derived synoviocytes, human lung fibroblasts and human lung epithelial cells  
14th International Congress of Immunology 2010, Kobe, Japan - August 22 - 27, 2010, PP-036-13

4. 許 鍵, 伊藤 友香, 瀧井 猛将, 林 秀敏, 小野寄 菊夫  
男性ホルモンによる関節リウマチ滑膜細胞からの炎症性サイトカインの産生抑制日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 30 日 (岡山) OP-pm035

5. Onozaki K, Chujo S, Okamoto S, Sunahara R, Itoh Y, Hayashi H, Takii T and Hayakawa K  
Cigarette smoke condensate extracts induce proinflammatory cytokines from synovial cells and exacerbate collagen-induced arthritis in mice  
Tri-Society Annual Conference 2009 of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research  
Lisbon, 2009 年 11 月 21 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寄 菊夫 (ONOZAKI KIKUO)

名古屋市立大学大学院・薬学研究科・生体防御機能学分野・教授

研究者番号: 20101313