急性期炎症蛋白産生調節におけるインターロイキン1リセプターアンタゴニストの役割に関する研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 本荘, 茂
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9152

金沢大学十全医学会雑誌　第104巻　第4号　492−504 (1995)

急性期炎症蛋白産生調節におけるインターロイキン1 リセプターアンタゴニストの役割に関する研究

金沢大学医学部整形外科学講座（主任：富田勝郎教授）
本　荘　　茂

急性炎症においては様々な媒介化学物質が関与していることが近年の研究によって明らかになってきており，その中でもインターロイキン1 (interleukin-1, IL-1), IL-6, IL-8，腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor α, TNFα) などの炎症性サイトカインは重要な役割を果たしているものと考えられている．これらのサイトカインは相互に影響を及ぼし合い，サイトカインネットワークを形成して炎症反応が進展していくものと考えられている．一方では IL-1 レセプターアンゴニスト (IL-1 receptor antagonist, IL-1ra) などのサイトカイン阻害物質が存在することも明らかになっており，負のフィードバックによって働いて，進展する炎症反応を制御しているものと考えられている．本研究ではマウスにテレピン油を投与して急性炎症を引き起こし，その後に血清中に産生されるハプトグロビンと IL-1, IL-6, TNFα および IL-1ra の血中濃度を測定した．それによると血清中ハプトグロビンはテレピン油投与12時間後より増加し始めるが，それに先立って IL-1α, IL-6 が発現，産生されることが明らかとなった．IL-1α のピークは2時間と48時間に認められ，IL-6 のピークは12時間に認められた．TNFα はいずれの時間においても検出されなかった．また IL-1ra は48時間後に産生のピークを迎え，しかも長期間にわたって高濃度に産生されていた．これらから急性炎症においては炎症性サイトカインと IL-1ra の両方が産生されており，IL-1ra は炎症の制御に関与しているものと考えられた．しかしマウスの生体内においては，遺伝子組み替え型 IL-1ra によってテレピン油によるハプトグロビンの産生誘導を抑制できなかった．このことは急性期炎症蛋白の誘導が IL-1 によってだけではなく，IL-1 非依存的に IL-6 などの経路によってももたらされている可能性を示唆した．

Key words acute phase protein, haptoglobin, inflammatory cytokine, turpentine oil, IL-1 receptor antagonist

外傷後や感染，慢性関節リウマチなどの炎症性疾患においては，様々な炎症所見が認められる．炎症局所には発赤，腫脹，浮腫，疼痛，熱感などが認められ，これらは古くから炎症の主徴とされてきた[1]．また全身的にも患者はしばしば発熱や傾眠傾向，食欲不振，体重減少などの臨床症状を呈する[2]．一方，血液生化学検査においては白血球の増加，核の左方移動，赤血球沈降速度 (erythrocyte sedimentation rate, ESR) の亢進，フィブリノーゲンや C-反応性蛋白質 (C-reactive protein, CRP)，ハプトグロビンなどの急性期炎症蛋白の増加，血清アルブミンの低下などが認められる[3]．

近年これらの現象が種々の媒介化学物質により引き起こされていることが明らかになりつつあり，特にリンパ球やマクロファージなどから分泌されるサイトカインと呼ばれる生理活性物質が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきている[4]．その中でもインターロイキン1 (interleukin-1, IL-1)，腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor α, TNFα), IL-6, IL-8 などは炎症反応に大きくかかわっているため，炎症性サイトカインと呼ばれている[5]．これらのサイトカインは相互にネットワークを形成してお互いに，あるいは自己自身をも刺激，誘導し相乗的に炎症反応が進展すると考えられている[6]．

その一方でこれらの炎症性サイトカインに対する天然拮抗物質が存在することも近年明らかになり，可溶性 IL-1 受容体 (soluble IL-1 receptor, sIL-1R) や可溶性 TNFα 受容体 (soluble TNFα receptor, sTNFαR), IL-1 リセプターアンタゴニスト (IL-1 receptor antagonist, IL-1ra) などが報告されてる[7~13]．これらの拮抗物質は炎症反応を制御しているものと考えられており，最近では媒介化学物質と拮抗物質とのバランスが炎症反応において重要であると考えられている[14]．しかしその詳細については明らかではない．

本研究では急性炎症において産生される炎症性サイトカインによる急性期炎症蛋白産生調節作用について検討する目的で，マウスに急性炎症を引き起こし血清中のハプトグロビンの産生，推移を検討した．そして血清中で検出される炎症性サイトカインを検索し，同時に炎症性サイトカインの拮抗物質のひとつである IL-1ra の発現，産生を調べ，急性炎症における役割について検討した．

平成7年1月13日受付，平成7年8月3日受理

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; Con-A, concanavalin A; CRP, C-reactive protein; DEAE, diethylaminoethyl; DEPC, diethyl pyrocarbonate; ESR, erythrocyte sedimentation rate; FCS, fetal calf serum; FPLC, fast protein, polypeptide, polynucleotide, liquid chromatography; IFN, interferon; IL,

材料および方法

Ⅰ．実験動物

C3H/HeJ マウス（6ないし8週齢，雌，日本クレア，富山），体重 15－20g で金沢大学の動物実験に関する指針に基づき飼育ならびに管理されたものを用いた．50μl マイクロシリンジ（テルモ，東京）を用いて，無菌的な化学薬剤による炎症モデルとして[15)16)] マウスの背部皮下に 20μl ずつテレピン油（和光純薬工業，大阪）を注射した．テレピン油投与後0，2，4，6，12，24，48，72時間後に各群3匹ずつそれぞれ速やかにエーテル麻酔下に心臓穿刺法にて血液を採取し，3000回転15分間遠心して血清を分離した．また同時に肝臓，脾臓より速やかに RNA を抽出した．

Ⅱ．RNA の調整およびノーザンブロッティング

マウスの背部皮下へのテレピン油の注射に伴い，全身的に炎症性サイトカインが誘導，発現しているかを調べるため，肝臓および脾臓から mRNA を抽出しノーザンブロッティングを行った．全 RNA はグアニジンチオシアネート法により抽出した[17)18)]．抽出した肝臓，脾臓を速やかにホモジナイザーに移し，RNAzol B (CINNA BIOTECX, Houston, USA) を組織 100mg あたり 2ml 添加して，Dounce ホモジナイザー（岩城硝子，船橋）により懸濁した．懸濁液を有栓遠心管にとり 2ml あたり 0.2ml クロロホルム（和光純薬工業）を加え，激しく震盪して混和し氷浴中に5分間静置した．12000回転で15分間遠心し，分離した上層の水層を別の遠心管へ移し同量のイソプロパノール（和光純薬工業）を加え，4℃ で15分間静置した．12000回転で15分間遠心し，上清を捨て75％エタノール（和光純薬工業）を加えて強く震盪し，7500回転で8分間遠心した．上清を捨て，沈殿をデシケーターに入れ吸引により乾燥させて0.5％ジエチルピロカーボネイト (diethylpyrocarbonate, DEPC) (Sigma, St. Louis, USA) 添加滅菌蒸留水に懸濁した．

全 RNA 各 20μg をホルムアルデヒド6.5％添加1％アガロースゲル上で 100V，3時間電気泳動後，ナイロンメンブレン (Hybond-N, Amersham, Buckinghamshire, England) に転写した．さらに80℃，2時間のベーキングを行い，転写した RNA をナイロンメンブレン上に固定した．これらのメンブレンを用いて IL-1α, IL-1β, IL-6, TNFα, IL-1ra についてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行ったが，方法はいずれも同じであるため IL-1ra について述べる．プローブとして用いた IL-1ra cDNA は^{32}P-dCTP をマルチプライム法 (multiprime DNA labeling kit, Amersham) で標識した．メンブレンフィルターのノーザンハイブリダイゼーションは42℃で行い，ハイブリダイゼーション液の組成は，5×Denhardt 液 [1×Denhardt 液は 0.02％フィコール (ficoll), 0.02％ ポリビニルピロリドン (polyvinylpyrrolidone), 0.02％ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) よりなる]，50％ホルムアミド，0.1％ SDS, 5×SSC (1×SSC は，0.15M NaCl. 0.015M クエン酸ナトリウムよりなる)，および10％硫酸デキストランからなるものを用いた．メンブレンフィルターを42℃のハイブリダイゼーション液中で16～20時間振盪した後，0.1×SSC, 0.1％SDS で洗浄し，イメージングプレート（富士フィルム，東京）上に12時間露光させ，バイオイメージアナライザー FUJIX BA100（富士フィルム）にてオートラジオグラムを読影した．リボソーム RNA の 18S, 28S のバンドの位置の決定には，アガロースゲルの一部のレーンに標準 RNA（コントロールのマウスから抽出した RNA）20μg を電気泳動した．その後ゲルを切除して 10μg/ml エチジウムブロマイド水溶液 (ethidium bromide, Sigma) 中で染色し，脱色後ゲル中のバンドの位置を計測してオートラジオグラムにおけるバンドの位置を決定した．

Ⅲ．ロケット電気泳動法

テレピン油の注射によって血清中に誘導されるハプトグロビンの時間的推移を調べるために，ロケット電気泳動法を行い解析した．ロケット電気泳動法は Laurell の方法によった[19)]．Tris-バルビタール緩衝液（Tris8.9g，バルビタール 4.5g，乳酸カルシウム 0.5g，アジ化ナトリウム 0.2g を脱イオン水に溶かして 1000ml とする）添加1％アガロース溶液 8ml を加温して溶解した後，ウサギ抗マウスハプトグロビン血清（金沢大学がん研究所薬理部，松島綱治教授より供与）70μl を Tris-バルビタール緩衝液 1ml にて希釈したものを混合してガラス板フレームに流し，10cm×6cm，厚さ 1.5mm のゲルプレートを作製した．各血清 5μl を Tris-バルビタール緩衝液 100μl にて希釈し，それぞれ 2μl をゲル上に作製した直径 2mm の試料孔に添加した．ゲルプレートを10℃に冷却しながら 50V，12～16時間電気泳動した．泳動後はホウ酸緩衝食塩水 (H_3BO_4 9.0g, $Na_2B_4O_7$ 5.4g, NaCl 7.9g を脱イオン水で 1l とする）中で24時間脱蛋白処理をした後乾燥し，クマシーブリリアントブルー水溶液 (0.20％ クマシーブリリアントブルー G250, 10％酢酸，40％メタノール）中で染色した．染色後脱色液（組成はメタノール 4500ml，酢酸 250ml，蒸留水 250ml からなる）中で余分な色素を脱色し乾燥した．

Ⅳ．2次元電気泳動法

テレピン油の注射によって変動するマウス血清中の蛋白の全体像をつかむため，2次元電気泳動法を行った．2次元電気泳動法は O'Farrell の方法によった[20)21)]．一端をパラフィルムで被ったガラス管（内径 2.5mm×130mm）にゲル液 [A 液，アクリルアミド 28.38g，ビスアクリルアミド 1.62g を脱イオン水 100ml に溶かしたもの；B 液，10％ノニデット P-40；C 液，アンホライン，pH5～7；D 液，10％過硫酸アンモニウムの各溶液を調整し，尿素 5.5g, A 液 1.33ml, B 液 2.00ml, C 液 0.50ml, D 液 0.01ml，テトラメチルエチレンジアミン (N, N. N', N'-tetramethylethelenediamide, TEMED) 7μl を脱イオン水で総量 10ml として混合，溶解させたもの] を注入した．48％尿素液を重層し，ゲルが固まったのち試料溶解液（尿素 5.7g, NP-40 0.2g，アンホライン 0.5ml, 2-メルカプトエタノール 0.5ml を脱イオン水で総量 10ml とする）を入れ，水を重層した．ゲル上部の液を取り除き試料溶解液を重層し，陰極液 (0.08％NaOH) を重層した後，予備泳動 (200 V-15 分，300 V-30 分，400 V-30 分の順）を行った．一旦泳動を止めてゲル上層の液を除き，試料溶解液に溶かした試料を添加後，400 V-12 時間，800 V-1 時間の等電点電気泳動を行った．泳動後 SDS 平衡化液

---

interleukin; LPS, lipopolysaccharide; LB, Luria-Bertani; PBS, phosphate-buffered saline; ra, receptor antagonist; RPMI, Roswel Park Memorial Institute; SAA, serum amyloid A; TEMED, N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor

(Tris0.76g, グリセロール 10g, 2-メルカプトエタノール 5ml, SDS2.3g を水に溶かし，塩酸で pH6.8 に調整後，全量を 100ml にしたもの) 中にゲルを押し出し，室温で30分間平衡化したのち，2次元目の電気泳動を行った．2次元目の電気泳動は SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル上に1次元目のゲルを固定し，上部緩衝液に加えた 0.1% ブロムフェノールブルー溶液がゲル下端に達するまで泳動した．泳動後はゲルをクマシーブリリアントブルー水溶液 (クマシーブリリアントブルー R-250 1.25g, Sigma をエタノール 500ml に溶解濾過したものに，蒸留水 400ml，酢酸 20ml, 37% ホルマリン 54ml を加えたもの) にて染色し，脱色液 (エタノール 400ml，酢酸 50ml を脱イオン水で全量 1l とする) で余分な色素を取り除いた[22]．分子量の同定には，免疫化学的検出法によって既知の蛋白を同定した報告を参考として，分離された蛋白の分子量を推定した[21)22)]．

V．ELISA 法

マウスの血清中に分泌される炎症性サイトカインの変動を調べるため，ELISA を行い分析した．

1．IL-1ra

0.1M 炭酸緩衝液 (pH9.6) にて 4μg/ml に希釈したウサギ抗マウス IL-1ra 抗体 (血清を IgG 分画に精製したもの，金沢大学がん研究所薬理部，松島綱治教授より供与) を96穴マイクロタイタープレート (Nunc, Copenhagen, Denmark) に1ウェルあたり 100μl ずつ注入し，4℃に一晩静置し固相化した．洗浄液 [0.05% トウィーン20添加 0.1M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS), pH7.4] にて洗浄した後，1% BSA (和光純薬工業) 添加 PBS を 100μl 注入し，37℃，1時間反応させてブロッキングを行った．洗浄操作の後，1% BSA 添加 PBS で5倍に希釈した試料 100μl を加え，一晩4℃に静置した．洗浄後，二次抗体としてビオチン化ウサギ抗マウス IL-1ra 抗体 2μg/ml を各ウェル 100μl 加え，37℃に1時間静置した．洗浄後，1%BSA/PBS で1000倍に希釈したストレプトアビジンアルカリフォスファターゼを各ウェル 100μl 加え，37℃に1時間静置した．洗浄後 0.1mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチオドリン酸 (nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, NADP) を各ウェル 100μl 加えて室温で20分間静置し，さらに 100μl の酵素水溶液 [アルコールデヒドロゲナーゼ 2mg，ジアフォラーゼ 1.5mg を 10ml の緩衝液で溶解，その緩衝液は 20mM リン酸 pH7.2，エタノール4%，パラヨードニトロテトラゾリウムバイオレット (p-iodonitrotetrazolium violet, INT) 0.55mM, BSA 5mg/ml からなる] を加え，室温で70分間放置した．0.2M 硫酸を各ウェル 50μl 加えて反応を停止し，OD492nm で吸光度を測定した[23]．

2．IL-6, IL-1α, IL-1β および TNFα

血清中のこれらのサイトカインの濃度は,市販の ELISA キット (IL-6 は ENDOGEN Inc., Boston Massachusetts, USA, IL-1α は Genzyme, Cambridge, USA, IL-1β は PerSeptive, Cambridge, USA, TNFα は Genzyme) によって測定した．

VI．遺伝子組み換え型マウス IL-1ra の発現

IL-1ra 蛋白の分離培養細胞に対する作用やマウスの生体内での作用を調べるために，大腸菌を用いて遺伝子組み換え型マウス IL-1ra を発現させ[24]，それぞれの生物学的活性について検討した．

1．形質転換[25]

マウス IL-1ra プラスミド DNA は金沢大学がん研究所薬理部，松島綱治教授より供与された．このマウス IL-1ra の cDNA は1951ヌクレチオドの長さからなり，98－100番目の ATG コドンから始まり632－634番目の TAG コドンで終わる単一の長い読み枠 (open reading frame) を含んでいる．5'末端に推定される97ヌクレチオドの翻訳されない配列の中には，18－20および57－59残基の二つの ATG コドンに始まり129－131残基の TAA 停止コドンで終わる読み枠が存在している．これら三つの ATG コドンはいずれも翻訳開始に共通の配列を構成しない．読み枠の後には翻訳されない1320のヌクレチオドが存在し，ここにはポリアデニル化のためのシグナル (1921－1926

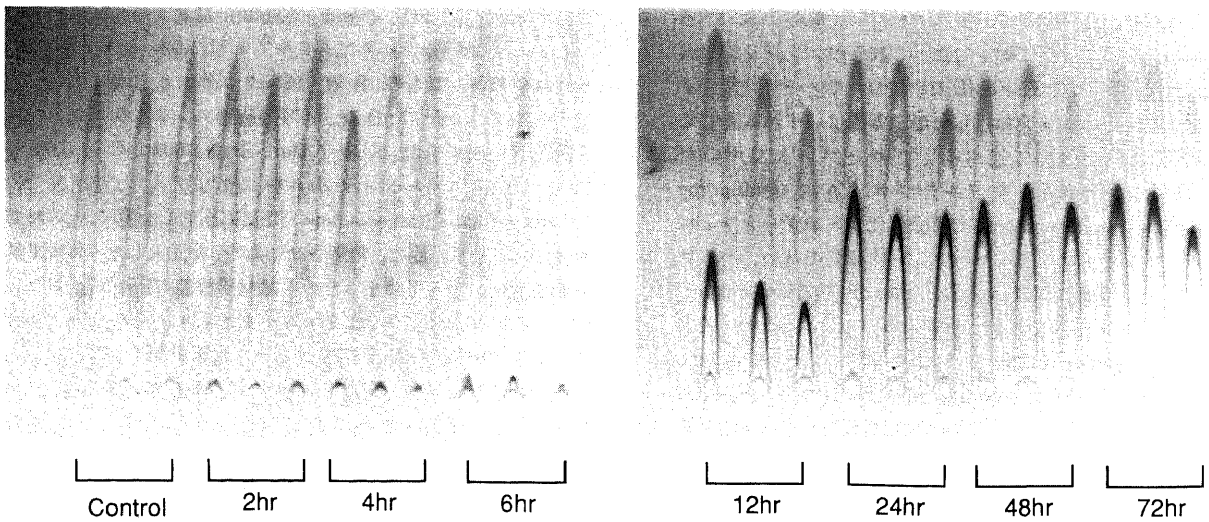

Fig. 1. Precipitation bands of rocket immunoelectrophoresis. Serum was obtained from the the mouse 2～72 hr after injection of turpentine oil. Control is the serum obtained from the mouse without any treatment. Samples were diluted with barbital buffer and 3 samples in each time point were applied to the agarose gel containing anti-haptoglobin antibody. Electrophoresis was performed for 12－16 hr at 50 V. Serum haptoglobin level began to increase 12 hr after injection of turpentine oil, and reached peak level after 24 hr. Maximum level of serum haptoglobin was continued until 72 hr.

残基) が含まれ，その 3'末端にはポリ A 配列が続いている．多くのサイトカイン mRNA の 3'末端の非翻訳部位にみられる AUUUA に富んだ特徴的な部位は，マウス IL-1ra の 3'末端には認められなかった[24]．

コンピテントセル [TAKARA *Escherichia coli* (*E. coli*) HB101 competent cells] 5μl にプラスミド DNA1μl を加えたものを氷浴中で30秒静置し，それを42℃で30秒間加温した．氷浴中に 5 分間静置後，Luria-Bertani (LB) 培地 (LB 培地は酵母エキス 5g，トリプトン 10g, NaCl 10g に脱イオン水を加えて総量 900ml とし，高圧蒸気滅菌したもの) 200μl を加えて混和し，37℃で 1 時間振盪培養した．LB アンピシリンプレート (アンピシリン 50μg/ml，バクトアガール 15g/l を滅菌した LB 培地に溶解後，20ml ずつをプレートに播き固まらせたもの) 上に適当量を播き，37℃で一晩培養した．翌朝成育したコロニーを分離し，LB アンピシリンプレート上で継代培養した．

2．遺伝子組み換え蛋白の発現，精製[26)27)]

得られたコロニーを滅菌 L 字管中で 12ml の LB 培地に植え，35℃で一晩培養した．この大腸菌培養液 2ml を 200ml の培養液 (培養液の組成は LB 培地 180ml に M9 塩グリセロール溶液 16ml, 20% カザミノ酸水溶液 5ml, 1M $MgSO_4$ 1ml, 100mM $CaCl_2$ 0.5ml を加えて高圧蒸気滅菌したものに，滅菌フィルターを通した 2mg/ml ビタミン B_1 0.5ml を加えたものからなり，M9 塩グリセロール溶液は $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 75g, KH_2PO_4 15g, NH_4Cl 5g，グリセロール 20g に脱イオン水を加えて 900ml としたもの) に植え35℃，2 時間培養した後 8mg/ml インドールアクリル酸 [0.2g インドールアクリル酸 (3-β-indoleacrylic acid, Sigma) を 25ml のエタノールで溶解] 500μl を添加した．その後35℃でさらに28時間培養した．大腸菌懸濁液を6000回転 5 分間遠心分離し，沈渣を 10ml の Tris-NaCl 緩衝液 (50mM Tris, 30mM NaCl, pH8.0) に懸濁，6000回転 5 分間遠心分離した．沈渣に再び 10ml の Tris-NaCl 緩衝液を加えて懸濁し，10mg/ml 蛋白リゾチーム (Tris-NaCl 緩衝液にて溶解) 1ml を添加後，30分間氷浴中に静置した．凍結融解 (ドライアイスとエタノール中で凍結後，37℃恒温槽中で溶解する) を 3 回繰り返した後，10% エチレンイミン (ethyleneimine，東京化成工業，東京，50mM Tris, pH8.0 に溶解) 200μl を加え，氷浴中に10分間静置した．11000回転20分間遠心後，上清に硫酸アンモニウム (和光純薬工業) 5.31g を加え，氷浴中で15分間攪拌した．11000回転20分間遠心後，沈殿を 0.02M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) 4ml に溶解した．溶解液を透析膜中に移し，0.02M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) 1l 中で一晩透析した．透析後，7000回転で10分間遠心し，上清をジエチルアミノエチル (diethylaminoethyl, DEAE) セファセルカラムに通し rIL-1ra 蛋白を分離した．つぎに YM-10 フィルター (Amicon, Inc., Massachusetts, USA) を用いて 2ml 以下に濃縮し，10000回転 5 分間遠心後，上清を高速液体クロマトグラフィー (fast protein, polypeptide, polynucleotide, liquid chromatography, FPLC) のスーパーロースカラム (superose-12HR10/30, Pharmacia，東京) に通した．得られた各分画を SDS-PAGE によって分子量を確認し，rIL-1ra 蛋白が多く含まれている分画を，さらに0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) で透析した後，高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) の CM-HPLC カラム (TSK G3000SW，東ソー，東京) を通して rIL-1ra 蛋白を精製した．精製した蛋白は，SDS-PAGE によって分子量を確認した．

Ⅶ．マイトゲン刺激胸腺細胞を用いた IL-1 測定法

遺伝子組み換え型マウス IL-1ra がマウス培養胸腺細胞において IL-1 の生物学的活性を抑制するかを調べるために，マイトゲン刺激胸腺細胞を用いた IL-1 測定法を行って検討した[28)29)]．C3H/HeJ マウスの胸腺を無菌的に摘出し，氷冷ハンクス液中で細切し，ステンレスメッシュを通した細胞浮遊液を作り，1000回転で10分間遠心分離して胸腺細胞を分離した．培養液 [100ml の組成は RPMI 1640 87ml，胎児ウシ血清 (fetel calf serum, FCS, 56℃ 30分非動化) 10ml，ペニシリン 10000U，ストレプトマイシン (10000μg/ml) 1ml, L-グルタミン (30mg/ml) 1ml, 1M HEPES 1ml, 0.1M 2-メルカプトエタノール 20μl よりなる] 中に懸濁し，1.2×10^7cells/ml に調整した．96穴細胞培養プレート (Nunc) にあらかじめ 5%BSA-PBS で希

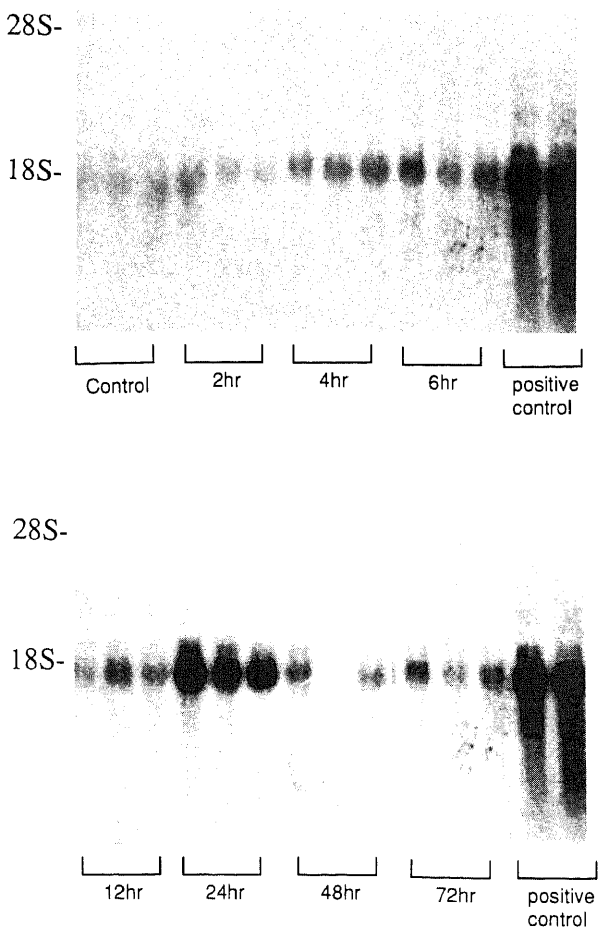

Fig. 2. Northern blot anlysis of total RNA from the liver. Total RNA was extracted from the liver of the mouse 2～72 hr after injection of turpentine oil. Control is the RNA obtained from the liver of the mouse without any treatment. Positive control is the RNA obtained from the spleen cells of the mouse 3 and 6 hr after stimulation by LPS. 3 samples in each time point were applied to the agarose gel containing 6.5% formaldehyde and electrophoresised, transferred to the nylon memmbrane and hybridized. Expression of the signal of IL-1ra mRNA was observed in the liver 24 hr after turpentine oil injection. 18S and 28S on the left indicate the position of the ribosomal RNA.

釈したマウス rIL-1ra と，標準ヒト IL-1α，マウス IL-1α，マウス IL-1β 各 1ng/ml とを4℃で6時間静置した後，胸腺細胞懸濁液を各ウエル 100μl とコンカナバリン A (concanavalin A, Con-A) を 1μg/ml になるよう添加した．炭酸ガス培養器 (37℃, 5% CO_2) で60時間培養した後，^{3}H-メチルチミジンを各ウエル 0.25mCi 添加した．さらに14時間培養後，セルハーベスターで胸腺細胞をグラスフィルターに回収し，胸腺細胞に取り込まれなかった ^{3}H-メチルチミジンを PBS により洗い流した．各ウエルに対応するグラスフィルターを分離してシンチレーションバイアルに入れて乾燥後，液体シンチレーター (ACS II, アマシャム，東京) 3ml を加え液体シンチレーションカウンターにて ^{3}H を計測した．

Ⅶ．マウス生体内における IL-1ra 蛋白の急性期炎症蛋白産生に及ぼす影響

マウス生体内において IL-1ra がテレピン油によって誘導される急性期炎症蛋白の産生を抑制するかを調べるために，テレピン油とともに IL-1ra をマウスに投与し，血清中のハプトグロビンレベルをロケット電気泳動法によって検討した．C3H/HeJ マウスの背部皮下にマイクロシリンジを用いてテレピン油 20μl を注射し，同時に PBS で希釈した IL-1ra 蛋白 1, 10,

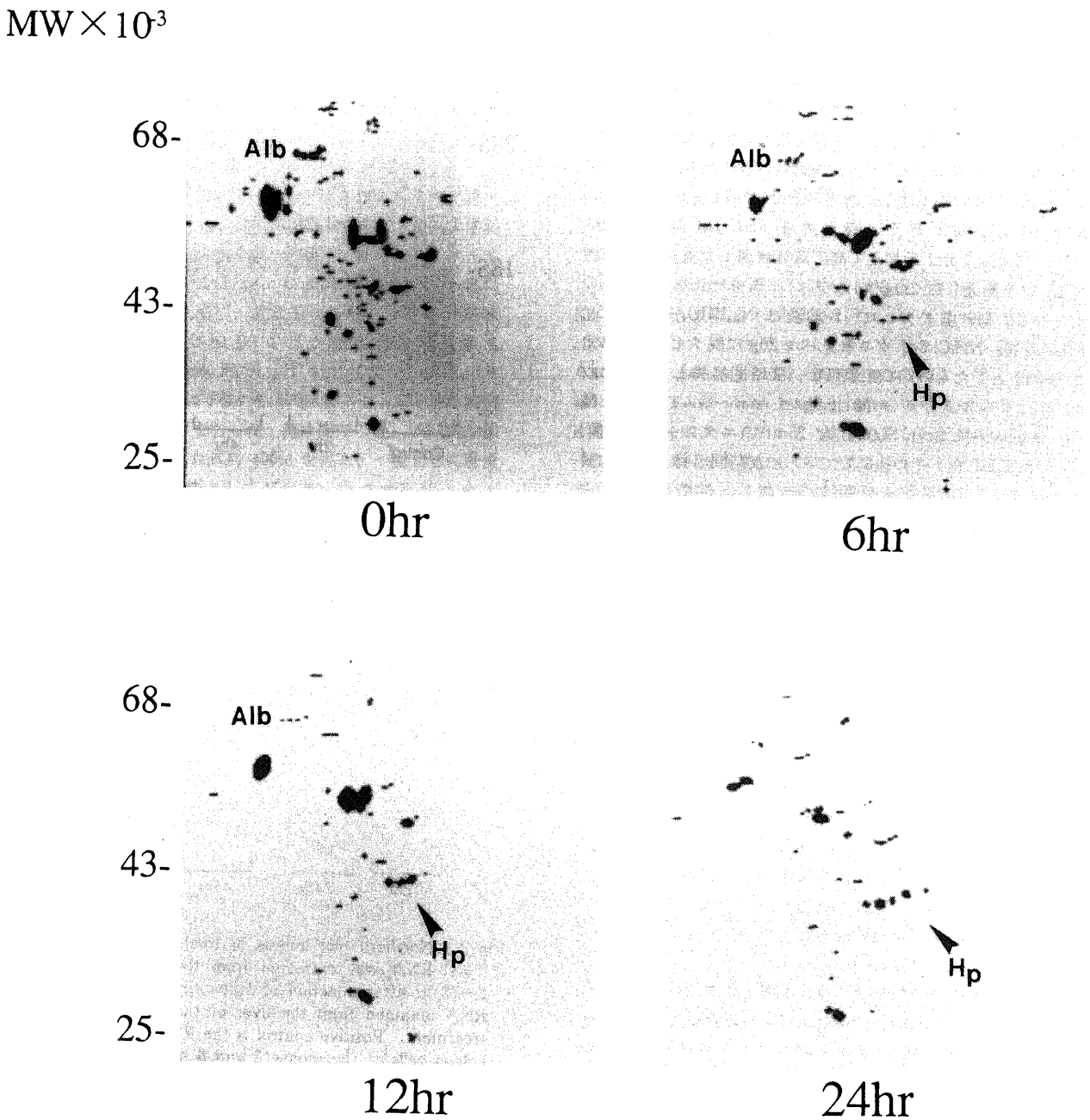

Fig. 3. Two-dimensional gel electrophoresis pattern of serum protein of the mouse 0, 6, 12 and 24 hr after turpentine oil injection. Significant increase of haptoglobin (Hp) level was recognized. In contrast, serum albumin (Alb) and apolipoprotein levels were decreased. The numbers on the left indicate MW×10^{-3}, estimated from the MW markers. The pH gradient achieved in the first dimension separation decreases from left to right.

100, 300μg を腹腔内投与した．テレピン油注射24時間後に心臓より採血し，血清を分離した．血清中のハプトグロビンレベルをロケット電気泳動法によって調べた．また浸透圧ポンプ (Alza, Palo Alto, California, USA) 内に IL-1ra 蛋白 140μg を注入した後，C3H/HeJ マウスの背部皮下に埋め込み 7 日間持続投与した．埋め込み 4 日後にテレピン油 20μl を反対側の背部皮下に注射した．同様にして24時間後に採血し，血清中のハプトグロビンレベルをロケット電気泳動法によって調べた．

成　　績

Ⅰ．急性期炎症における血清ハプトグロビン量の変動

アガロースゲルに封入した抗マウスハプトグロビン抗体を用いたロケット電気泳動では，テレピン油注射後 6 時間までに血清中ハプトグロビンレベルの明らかな上昇は認められなかった．テレピン油注射後12時間から徐々に血清中ハプトグロビンレベルは上昇し始め，24時間後にはピークレベルに達した．そのレベルはテレピン油注射後72時間後まで持続し，プラトーとなった (図 1)．すなわち局所に炎症起因物質が投与されてから，血清中に急性期炎症蛋白が誘導され検出されるまで約12時間を要した．その後急性期炎症蛋白が最大限に誘導されるまでにさらに12時間を要し，以後はプラトーとなった．

Ⅱ．肝臓および脾臓における炎症性サイトカイン mRNA の発現

IL-1ra に関しては，テレピン油投与後24時間で肝臓において mRNA のシグナルの強い発現を認め，肝臓で IL-1ra が発現，産生されていることが示された (図 2)．IL-1α, IL-1β, IL-6, TNFα については肝臓，脾臓では明らかなシグナルの発現を認めなかった．

Ⅲ．二次元電気泳動法による血清蛋白質の解析

二次元電気泳動法では，テレピン油注射後に変動する血清中蛋白の全体像が明らかとなった (図 3)．それによると，ハプト

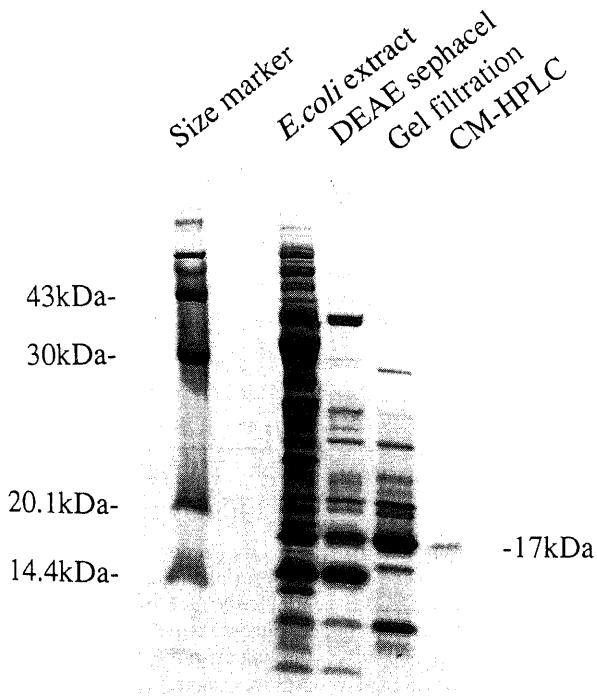

Fig. 4. Expression and purification of recombinant murine IL-1ra protein from *Escherichia coli* (*E. coli*). The proteins at each purification step were analysed by SDS-PAGE. At the final step signal band of IL-1ra of 17 kDa was observed.

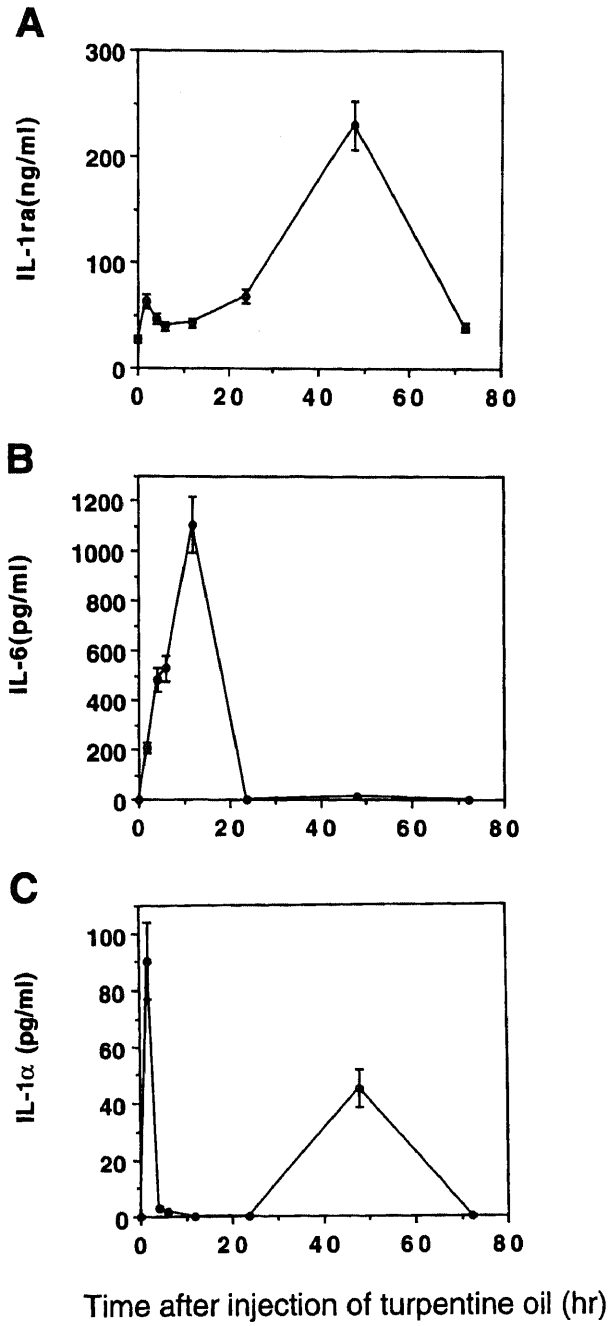

Fig. 5. Serum levels of inflammatory cytokines IL-1ra (A), IL-6 (B) and IL-1α (C). IL-1ra levels were measured by amplified ELISA system and other cytokine levels were measured commercialy available ELISA kit. Turpentine oil was injected subcutaneously to mice, from which the serum was obtained at each time. Data are expressed as $\bar{x} \pm$SEM. Serum IL-1α level increased moderately at 2 hr and significantly at 48 hr (A). Serum IL-6 level showed a single peak at 12 hr (B). Serum IL-1ra showed a small peak at 2 hr and a large peak at 48 hr (C).

グロビンはテレピン油注射後に増加する急性期炎症蛋白の一つであることがわかった．他にテレピン油注射後に増加するものに α_1酸性糖蛋白があり，逆にアルブミンやアポリポプロテインは減少することが認められた．血清アミロイド A (serum amyloid A, SAA) やヘモペキシンは本実験では確認できなかった．その他にも増減する蛋白が認められたが，同定することはできなかった．この実験によりテレピン油による急性炎症においては，血清を構成する蛋白成分に変化が生じることが認められ，それらには増加するものと減少するものとがある事が明らかとなった．

Ⅳ．遺伝子組み替え型マウスIL-1ra の大腸菌での発現とその精製

大腸菌培養液1リットルあたり約 2.4mg の IL-1ra が発現，精製された．SDS-PAGE による分子量の解析においては，大腸菌抽出液では多数の分子量を示すバンドが認められたが，精製により最終的には分子量 17kDa の単一のバンドが認められた (図4)．

Ⅴ．急性期炎症におけるマウスの血清中の炎症性サイトカイン量の変動

いずれのサイトカインも無刺激のコントロール群では，血清中に検出されなかった．IL-1ra に対する ELISA では，血清中 IL-1ra はテレピン油注射後2時間より増加し始め，24時間より急増し48時間で最大の 230ng/ml となることが認められた．その後72時間後には，速やかに減少していた (図 5A)．血清中 IL-6 はテレピン油注射後速やかに上昇し，12時間後に最大の 1107pg/ml となることが認められたが，24時間後にはほとんど検出されなくなった (図 5B)．血清中 IL-1α はテレピン油注射後2時間で最大の 90.4pg/ml に達し，その後6時間にはほぼ元のレベルにもどった．しかし48時間後には再び上昇し 44.9pg/ml に達したが，72時間後には速やかに元のレベルに復していた (図 5C)．血清中 IL-1β, TNFα についてはいずれの時点でも検出できなかった．

Ⅵ．マイトゲン刺激胸腺細胞を用いた IL-1 測定法に対する IL-1ra の影響

マウス胸腺細胞の増殖は Con-A の存在下において同時に存在する IL-1 の濃度に依存して増強されるが，ヒト IL-1α，マウス IL-1α，マウス IL-1β と共にマウス IL-1ra であらかじめ培養してから胸腺細胞を培養すると，各 IL-1 のもつ生物学的活性はマウス IL-1ra の濃度依存的に抑制された (図6)．ほぼ完全に各 IL-1 の生物学的活性が抑制されるには，ヒト IL-1α，マウス IL-1α，マウス IL-1β それぞれ 1ng/ml に対して IL-1ra は約 1μg/ml の濃度が必要であり，モル比にして約1000倍量の IL-1ra を必要とした．マウス IL-1ra はヒト，マウスの種を問わず，また IL-1α, β にかかわらずそれらのマウス胸腺細胞に対する生物学的活性を抑制した．

Ⅶ．マウス生体内におけるIL-1ra 蛋白の急性期炎症蛋白産生に対する影響

テレピン油とともに IL-1ra 蛋白を投与したが，1μg から 300μg の濃度の同時投与では血清中ハプトグロビンの産生抑制は認められなかった．また浸透圧ポンプを用いて持続投与を試みたが，同様に血清中ハプトグロビンの産生抑制は認められなかった (図7)．

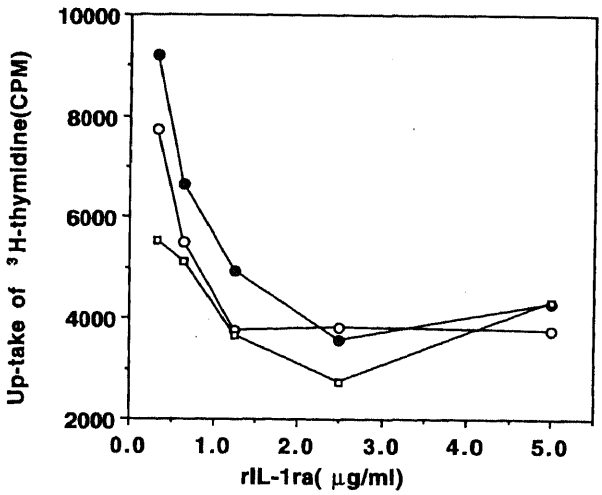

Fig. 6. Inhibitory effect of rIL-1ra to the up-take of ^{3}H-thymidine in the murine thymocyte co-stimulator assay. rIL-1ra was co-incubated with IL-1 as indicated below for 6 hr at 4℃ before addition of thymocytes: ●, murine IL-1 alpha (1 ng/ml); ○, murine IL-1 beta (1 ng/ml); □, human IL-1 alpha (1 ng/ml). Thymocytes in conditioned medium containing 1 μg/ml concanavalin A was added to each co-incubation mixture and incubated for 60 hr at 37℃ in the pressence of 5% CO_2. More than 1000-fold excess of rIL-1ra was required to inhibit the biological activity of each IL-1.

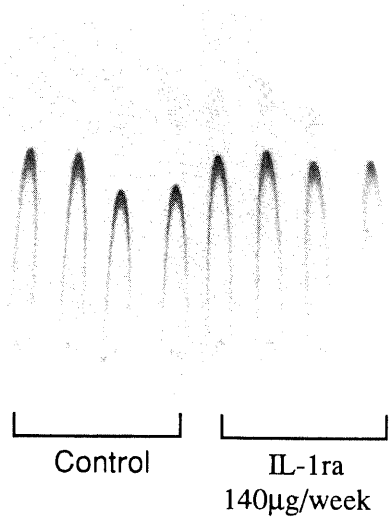

Fig. 7. Influence of rIL-1ra on the production of serum haptoglobin induced by the turpentine oil injection. 140 μg of rIL-1ra was supplied continuously to 2 mice in a week by a osmotic pump buried subcutaneously in the back before, during and after the injection of turpentine oil. Serum of the normal mouse was supplied to 2 control mice by a osmotic pump in a same manner. Serum was obtained from the mice 24 hr after injection of turpentine oil. 2 samples in each group were electrophoresised in duplicate. No difference of serum haptoglobin level between the control group and the rIL-1ra-administerd group was recognized in rocket immuno-electrophoresis.

考　　察

急性炎症は生体内に侵入した異物や組織侵入などに対して生じる生体の一連の防御，修復反応である[1]．細菌，ウイルス，各種抗原の侵入に伴って，生体には様々な防御反応が生じる．近年これらの炎症反応が多くの媒介化学物質によって制御されていることが明らかになりつつあり[4)~6)]，炎症に伴って生体は様々な現象を呈する[30]．

本研究で検索したハプトグロビンは，マウスにおいて急性炎症時に増加する急性期炎症蛋白の一つであり，他には SAA, α_1酸性糖蛋白，ヘモペキシン，α_1アンチキモトリプシンなどもマウスの急性炎症時に増加する[31]．炎症時に増加する急性期炎症蛋白の多くは，プロテアーゼ阻害活性やオキシダーゼ活性を示すことによって，生体の非特異的防御機構の一環として働いていると言われている[32]．一方血清アルブミンは，急性炎症時には逆に減少する．テレピン油を投与してから約12時間後に血清中にハプトグロビンが増加し始めているが，局所に投与されたテレピン油の刺激に引き続いて肝臓から急性期炎症蛋白が産生されるまでの間には，様々な媒介化学物質が関与しているものと考えられる．

急性期炎症蛋白を誘導することができるサイトカインとしては従来 IL-1[33]や TNFα[34], IL-6[35]などが報告されてきたが，最近の研究では IL-6 が急性期炎症蛋白誘導の主役を担っているものと考えられている[36]．その他に急性期炎症蛋白の産生を誘導することが明らかになっているものとしては IL-11[37]，白血病細胞増殖阻止因子 (leukemia inhibitory factor, LIF)[38]，腫瘍化増殖因子 (transforming growth factor β, TGF-β)[39)40]，オンコスタチン M (oncostatin-M)[41]などが報告されている．これらのサイトカインが受容体に結合してシグナルが伝達される機構は解明が進んでおり，急性期炎症蛋白が産生される際にはサイトカインに共通のシグナル伝達系である糖蛋白 (glycoprotein130, gp130) を介するものが多い[37)42]．

本研究では血清中の急性期炎症蛋白と同時に，血清中の炎症性サイトカインについても検討した．それによると IL-1α はテレピン油投与後 2 時間にピークを認めた後，速やかに低下したが，その後48時間にも血中濃度が再び上昇する二峰性の変化を認めた．一方血清中 IL-6 はテレピン油投与後12時間にピークを認め，その後速やかに低下していた，しかし，TNFα については，いずれの経過時間においても検出できなかった．これらのサイトカインの誘導はそれぞれが相互に深く関連していると考えられ，IL-1α の最初のピークの産生はテレピン油投与による直接的な効果であると考えられる．しかし第二のピークは自己が産生した IL-1 自身によって誘導されたオートクリンによるものや，テレピン油によって誘導された他のサイトカインなどによって誘導されたパラクリンによるものである可能性が考えられた．これまでにも産生された急性期炎症蛋白は IL-1β を誘導すること[43]や，TGFβ が IL-1β を誘導すること[44]などが報告されている．

一方 IL-6 の産生はテレピン油投与による直接的な効果と，IL-1 を介した間接的な効果による可能性が考えられた．最近では IL-1 や TNFα が IL-6 を誘導することが明らかになっており[45]，本研究においても誘導された IL-1 が IL-6 を誘導した可能性は十分考えられた．本研究において肝臓，脾臓においては IL-6 の mRNA シグナルの強い発現は認めず，IL-6 の産生はテレピン油投与した局所およびその周囲組織において行われているものと考えられた．リポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS) や他の刺激によっても IL-6 が誘導される[46]が，それらは IL-1 を介して誘導されることも明らかとなっている．Damtew らは LPS 刺激された単球の培養液を加えて株化肝細胞を培養すると，急性期炎症蛋白の産生の増加を認めたが，これに IL-1ra を加えると CRP と SAA のみ産生が抑制され，他の成分の産生には影響が少なかったと報告している[47]．また Gershenwald らはマウスにテレピン油とともにラット抗マウス IL-1 レセプター抗体を投与し血中 IL-1 をブロックしたところ，血清中の IL-6 と SAA の上昇は抑制されたが，完全ではなかったと報告している[48]．

血清中ハプトグロビンの産生誘導は IL-1 によるものと，さらに IL-1 から IL-6 を介する経路が想定された．しかしこれまでの研究では，IL-1 によってすべての急性期炎症蛋白の産生は誘導されず，一部のみ誘導されることが明らかとなっている[33]．ところが IL-6 によってヒトのすべての急性期炎症蛋白が誘導されることから[35)49]，IL-6 が急性期炎症蛋白の産生において中心的な役割を果たしていると考えられている[36]．またハプトグロビンや SAA の誘導においては，IL-1 と IL-6 の果たす役割が異なることが明らかとなっている．生体内の系においては各サイトカインは互いに影響を及ぼし合っており，それぞれの果たす役割を明確に区別することは困難である．また本研究では BALB/c マウスにヒト IL-6 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの血清中ハプトグロビンレベルについても検討し，無刺激の状態でも血清中に高濃度にハプトグロビンが産生されていることが明らかになった (未発表データ)．このマウスにおいては血清中に M 蛋白血症および IL-6 の持続的高値が認められる[50]．このことからも急性期炎症蛋白の産生においては IL-6 が中心的な役割を果たしているものと推測された．

一方テレピン油投与後の血清中には炎症性サイトカインのみならず，IL-1 の受容体の拮抗物質である IL-1ra も発現，産生されていた．IL-1ra のピークはテレピン油投与後48時間後に認められており，従来の報告[51]にもあるように炎症誘発後に遅れて長時間にわたって産生されていた．また混合リンパ球反応試験においても IL-1ra 産生のピークは48時間後にあるとされ[52]，従来の報告に一致した．これまでに IL-1ra の発現を誘導するものは多く報告されており，LPS やフォルボル　ミリステート　アセテート (phorbol myristate acetate, PMA)[52]，固相化 IgG[54]，IL-1[53]，IL-4[55)~58]，IL-6[59]，IL-10[60]，TNFα[53]，TGFβ[44]，顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte macropahge colony stimulating factor, GM-CSF)[61]，インターフェロン α (interferon α, IFNα)，IFNβ[62)63]，急性期炎症蛋白[43]によっても誘導されることがわかっている．IL-1ra は肝臓において発現，産生されていたが，肝臓においては他の炎症性サイトカインのシグナルは発現していなかった．この IL-1ra を誘導するものとしては血中の IL-1α や IL-6，急性期炎症蛋白などが考えられた．全身的に波及する急性炎症を制御するために生体内で IL-1ra 蛋白を産生する場としては，肝臓が最もふさわしいと考えられる．局所の炎症部位から産生された IL-1 や IL-6 を認識して，炎症を制御するために急性期炎症蛋白や IL-1ra が産生され，負のフィードバックによって機能しているものと推察された．この IL-1ra の血清中濃度は他の炎症性サイトカインの血清中濃度に比較して，はるかに高い濃度が産生されていた．最近の研

究では IL-1ra は IL-1 と受容体で拮抗してその生物学的活性を抑制し，両者のバランスによって炎症反応が制御されていると考えられている．IL-1 受容体の 5% が IL-1 と結合すれば十分なシグナル伝達が成立するといわれており，IL-1ra により IL-1 のシグナル伝達を抑制するには IL-1 に対し100から1000倍以上の IL-1ra が必要であるとされている[64]．本研究において産生されていた血清中 IL-1ra は濃度においても，時間的推移においても炎症反応の制御に十分影響を及ぼしているものと考えられる．

テレピン油の投与に伴って，マウスには臨床的に様々な変化が認められた．すなわち活動性の低下，摂食行動の抑制，体毛の起毛性の低下などが認められたが，これらの変化はテレピン油投与後数時間において認められ，その後は投与前の状態に回復した．従来の報告においてもテレピン油投与後には食欲減退，体重減少，体温上昇などが認められているが[48]，これらは最近の研究によれば IL-1 の持つ作用であると考えられている．これらの現象は IL-1ra 投与により抑制される．本研究において IL-1α の上昇はテレピン油投与二時間後にピークが認められており，臨床的変化に矛盾しない．しかし48時間後に再び IL-1α のピークを迎えてもマウスに臨床的変化が認められなかったのは，IL-1ra などのサイトカイン阻害物質による影響が推測された．もしも IL-1ra の産生をブロックすれば炎症反応の終焉が遅延し，炎症症状が持続した可能性がある．IL-1ra によるフィードバック機構が抑制されると，IL-1 がオートクリンに刺激・産生され，その結果として炎症反応が持続していくものと考えられた．また急性期炎症蛋白の産生も，長時間にわたって維持されるものと推測された．

さらに本研究では遺伝子組み換え技術によって，大腸菌を用いて遺伝子組み換え型 IL-1ra 蛋白を発現，精製した．IL-1ra は1990年に Hannum らによって完全精製[8]され，同年 Eisenberg らによってクローニングされ構造が決定された[54]．IL-1ra は IL-1α, IL-1β と高い相同性を持ち，これらと競合して IL-1 受容体（I 型）に結合して拮抗作用を発現する．IL-1ra そのものが IL-1 受容体に結合してもシグナルの伝達は生じないことがわかっている[65]．最近の解析によれば IL-1ra には糖鎖結合のある分子量 22kDa のものと，糖鎖結合のない分子量 17kDa のものがあることが明らかとなった[8]．本研究で遺伝子組み換えにより発現した IL-1ra は後者のタイプであるが，マウスのマイトゲン刺激胸腺細胞を用いた IL-1 測定法による検討では IL-1 のもつ生物学的活性を抑制することが示された．しかしそれには従来の報告にもあるように[64]，IL-1 に対して1000倍以上の IL-1ra が必要であり，IL-1 のシグナル伝達を抑制するには相対的に大量の IL-1ra が必要であった．

一方マウスの生体内における検討で，マウスにテレピン油とともに IL-1ra を投与したが，ハプトグロビンの産生は抑制されなかった．その原因としては産生される IL-1 に対して相対的に投与した IL-1ra の量が少ない，IL-1ra の血中半減期が短い[66]，IL-1 を介さない急性期炎症蛋白の産生経路が存在するなどが考えられた．テレピン油によって IL-6 が誘導され，それによって肝細胞から急性期炎症蛋白が産生される系の存在は明らかになっており，それによっても IL-1ra の投与によりハプトグロビンの産生が抑制されなかったことは説明可能である．また Gershenwald らはテレピン油とともに抗 IL-1 受容体抗体を投与したが，血清中 IL-6 濃度や血清アミロイド P は完全には抑制されなかったと報告している[48]．遺伝子組み換え型 IL-1ra によってテレピン油によるハプトグロビンの産生は抑制できなかったが，マウスに生じた変化として創傷の治癒遅延とテレピン油投与後の全身衰弱度の抑制が認められた（未発表データ）．マウスに浸透圧ポンプを埋め込んだ創傷の治癒状態を観察すると，コントロールとしてマウス血清を注入した群に比べて明らかに創傷の治癒が遅延していた．IL-1 による線維芽細胞の増殖や血管新生，$KMnO_4$ による肉芽腫の形成が IL-1ra によって抑制されるとの報告もあり[67][68]，この創傷の治癒の遅延は IL-1ra の作用であると考えられた．またテレピン油投与後の活動性の低下，摂食行動の抑制，体毛の起毛性の低下などは IL-1 の作用であると考えられたが[48]，これらも IL-1ra によって抑制されたものと推測された．IL-1ra は急性期炎症性蛋白の産生される急性炎症の早期には誘導されず，急性期炎症蛋白の誘導相には関与してはいなかった．しかし IL-1ra は急性炎症の後期に高濃度に誘導・産生されており，炎症反応の終焉に関与している可能性が示唆された．

炎症反応の進展においては様々なサイトカインが相互に複雑に関係し，いわゆるサイトカインネットワークを形成している（図 8）．本研究においては炎症性サイトカインである IL-1, IL-6 と天然拮抗物質の一つである IL-1ra，そして急性期炎症蛋白とが相互に関連していることが示唆された．IL-2 や IL-4, IL-6, TNFα, INFγ に対する拮抗物質も多数報告されており[13]，これらの複雑なサイトカインネットワークの中でそれぞれが微妙なバランスを保っている．阻害物質を優勢に保つことにより，炎症反応の終焉が促進されるとの報告もあり[69]，今後はこのような阻害物質が広く臨床応用されていくものと期待される．IL-1ra を投与することによって敗血症ショックや出血性ショックにおける致死率が低下する[70]~[74]，実験的肺線維症や糸

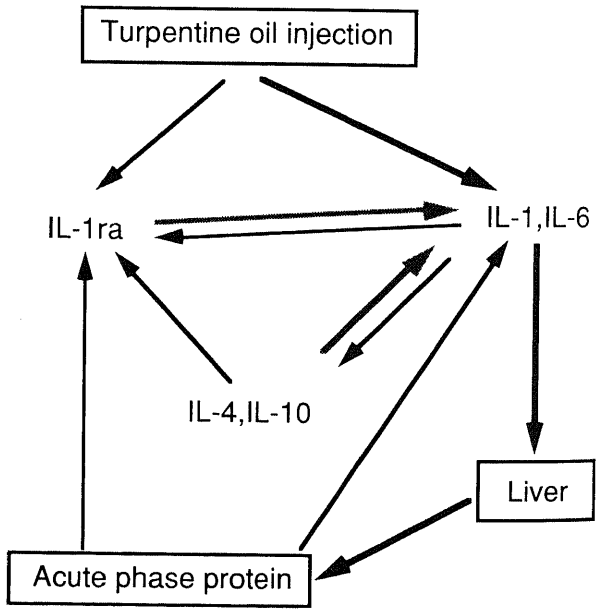

Fig. 8. Scheme of the cytokine network in acute inflammation. Each cytokine influences on the other cytokines as stimulator or suppressor. A complex relationship exists among these cytokines. Black arrow indicates induction and gray arrow indicates inhibition.

球体腎炎の発症を抑制する[75)76)]，虚血による脳ニューロンの障害を抑制する[77)]，臓器移植において拒絶反応が抑制され生着率が増加する[78)79)]，など疾患モデルにおいてその重症度が軽減する報告が多い[80)]．実際に可溶性 IL-1 受容体，可溶性 TNFα 受容体，IL-1ra などはすでに臨床治験が開始されており，新しい治療薬としての将来に大きな期待が寄せられている．

結　　論

テレピン油刺激によるマウスの急性期炎症蛋白の産生および炎症性サイトカイン，IL-1ra の発現，変動について検討した．また遺伝子組み換え型 IL-ra を発現，精製し，その生物学的活性を検討し以下の結論を得た．

1．テレピン油刺激により急性期炎症蛋白の一つであるハプトグロビンが誘導，産生された．それに先駆けて IL-1α と IL-6 の産生が認められ，これらにより急性期炎症蛋白が誘導されることが明らかとなった．また遅れて IL-1ra の産生も認められ，急性炎症の進展に影響を与えているものと考えられた．以上から急性炎症における炎症性サイトカインと急性期炎症蛋白との関わり，および IL-1ra による炎症の制御が示唆された．

2．大腸菌から遺伝子組み換え型 IL-1ra が発現，精製された．マイトゲン刺激胸腺細胞を用いた IL-1 測定法において遺伝子組み換え型 IL-1ra は IL-1 のもつ生物学的活性を抑制したが，マウスにおいてテレピン油によるハプトグロビンの産生は抑制しなかった．すなわち IL-1 のみをブロックしてもハプトグロビンの産生は抑制されず，IL-6 など他の介在物質の関与が示唆された．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します．また終始直接の御指導・御助言を賜りました金沢大学がん研究所薬理部松島綱治教授，分子免疫部右田俊介名誉教授に心より謝意を表します．また多大なる御協力を頂きました金沢大学がん研究所薬理部ならびに分子免疫部教室員の皆様方，東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センターの皆様方に深謝いたします．なお本論文の一部は，第22回日本免疫学会総会（1992年名古屋）において発表した．

文　　献

1） **Joseph, C. F. & Peter, A. W**: Inflammation. Pathology, 1st ed., p36-64, Lippincott, Philadelphia, 1988.

2） **大澤仲昭**：サイトカインと炎症．サイトカイン，第1版，96-99 頁，医歯薬出版，東京，1992.

3） **吉崎和幸**：急性炎症の指標としてのサイトカイン．サイトカインと疾病，第1版，33-39 頁，日本医学館，東京，1992.

4） **笠倉新平**：炎症とサイトカイン，炎症．**9**, 9 (1991).

5） **笠倉新平**：炎症とサイトカイン．サイトカイン，第1版，121-127 頁，日本医学館，東京，1991.

6） **笠倉新平**：サイトカインカスケード．サイトカイン，第1版，113-118 頁，日本医学館，東京，1991.

7） **Symons, J. A., Eastgate, J. A. & Duff, G. W.**: Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin 1. J. Exp. Med., **174**, 1251-1254 (1991).

8） **Hannum, C. H., Wilcox, C. J., Arend, W. P., Joslin, F. G., Dripps, D. J., Heimdal, P. L., Armes, L. G., Sommer, A., Eisenberg, S. P. & Thompson, R. C.**: Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor, Nature, **343**, 336-340 (1990).

9） **Engelmann, H., Aderka, D. & Rubinstein, M.**: A tumor necrosis factor-binding protein purfied to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor. J. Biol. Chem., **264**, 11974-11980 (1989).

10） **Seckinger, P., Isaaz, S. & Dear, J. M.**: Purification and biologic characterzation of a specific tumor necrosis factor-inhibitor. J. Biol. Chem., **264**, 11966-11973 (1989).

11） **Heaney, M. L. & Golde, D. W.**: Soluble hormone receptors. Blood, **82**, 1945-1948 (1993).

12） **竹内　勤**：可溶性サイトカイン受容体．KEY WARD, 第1版，84-85 頁，先端医学社，東京，1994.

13） **Larrick, J. W. & Wright, S. C.**: Native cytokine antagonists. Baillieres clin. Haematol., **5**, 681-702 (1992).

14） **宮坂信之**：サイトカインの概説．サイトカイン，第1版，2-5 頁，メジカルビュー社，東京，1991.

15） **Schreiber, G., Howlett, G., Nagashima, M., Millership, A., Martin, H., Urban, J. & Kotler, L.**: The acute phase response of plasma protein synthesis during experimental inflammation. J. Biol. Chem., **257**, 10271-10277 (1982).

16） **Baumann, H., Held, W. A. $ Begger, F. G.**: The acute response of mouse liver. J. Biol. Chem., **259**, 566-573 (1984).

17） **Chomczynski, P. & Sacchi, N.**: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem., **162**, 156-159 (1987).

18） **Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.**: Extraction and Purification of RNA. Molecular Cloning, 2nd ed., p7. 1-7. 87, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

19） **Laurell, C. B**: Quantitive estimation of proteins by electrophoresis in agar gel containing antibodies. Anal. Biochem., **15**, 45-52 (1966).

20） **O'Farrell, P. K.**: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., **250**, 4007-4021 (1975).

21） **Anderson, N. G. & Anderson, N. L.**: Analytical techniques for cell fractions. XXI. Two-dimensional analysis of serum and tissue proteins: Multiple isoelectric focusing. Anal. Biochem., **85**, 331-340 (1978).

22） **浅川順一，高橋規郎**：O'Farrell の二次元電気泳動法．電気泳動実験法（平井秀松，織田敏次，松橋　直，島尾和男編），第1版，299-314 頁，文光堂，東京，1989.

23） **Stanley, C. J., Johannsson, A. & Self, C. H.**: Enzyme amplification can enhance both the speed and the sensitivity of immunoassays. J. Immunol. Methods., **83**, 89-95 (1985).

24） **Matsushime, H., Roussel, M. F., Matsushima, K. & Sherr, C. J.** : Cloning and expression of murine interleukin-1 receptor antagonist in macrophages stimulated by colony-stimulating factor. Blood, **78**, 616-623 (1991).

25） **Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.**: Plasmid Vectors. Molecular Cloning, 2nd ed., p1. 1-1. 110, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

26) **Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.:** Expression of Cloned Genes in Escherichia Coli, 2nd ed., p17. 1-17. 44, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

27) **Deutscher, M. P.:** Guide to Protein Purification, 1st ed., p93-498, Academic Press, Inc., California, 1990.

28) **Oppenheim, J. J., Stadler, B. M., Siraganian, R. P., Mage, M. & Mathieson, B.:** Lymphokines: their role in lymphocyte responses. Properties of interleukin 1. Fed. Proc., **41**, 257-262 (1982).

29) **後藤久美子，中村修二，吉永　秀:** IL-1 の測定法．I．マイトジェン刺激胸腺細胞を用いた IL-1 測定法 (The comitogenic assay). 実験免疫操作法13, 4257-4264 頁，日本免疫学会，東京，1984.

30) **Geiger, T., Andus, T., Klapproth, J., Castell, J. & Heinrich, P. C:** Induction of rat acute-phase proteins by interleukin-6 in vivo. Eur. J. Immunol., **18**, 717-721 (1989).

31) **Baumann, H., Held, W. A. & Berger, F. G.:** The acute phase response of mouse liver. J. Biol. Chem., **259**, 566-573 (1984).

32) **右田俊介:** 分子進化から見た急性期タンパク．感染/炎症/免疫，**14**, 339-358 (1984).

33) **Oppenheim, J. J., Kovacs, E. J. & Matsushima, K.:** There is more than one interleukin 1. Immunol. Today, **7**, 45-56 (1986).

34) **Dinarello, C. A., Cannon, J. G. & Wolff, S. M.:** Tumor necrosis factor (Cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. J. Exp. Med. **163**, 1433-1450 (1986).

35) **Gauldic, J., Richards, C. & Harnish, D.:** Interferon-β_2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 7251-7255 (1987).

36) **Akira, S., Taga, T. & Kishimoto, T.:** Interleukin-6 in Biology and Medicine. Advances in Immunology, Vol. **54**, 1st ed., p25-27, Academic Press, Inc., California, 1993.

37) **Baumann, H. & Schendel, P.:** Interleukin-11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6. J. Biol. Chem., **266**, 20424-20427 (1992).

38) **Baumann, H. & Wong, G. G.:** Hepatocyte-stimulating factor Ⅲ shares structural and functional identity with leukemia-inhibitory factor. J. Immunol., **143**, 1163-1167 (1989).

39) **Mackiewicz, A., Ganapathi, M. K., Schultz, D., Brabenec, A., Weinstein, J., Kelley, M. F. & Kushner, I.:** Transforming growth factor β1 regulates production of acute phase proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 1491-1495 (1990).

40) **Morrone, G., Cortese, R. & Sorrentino, V.:** Post-transcriptional control of negative acute phase genes by transforming growth factor beta. EMBO J., **8**, 3767-3771 (1989).

41) **Richard, C. D., Brown, T. J., Shoyab, M., Baumann, H. & Gauldie, J.:** Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase protein in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. J. Immunol., **148**, 1731-1736 (1992).

42) **Gearing, D. P. & Bruce, A. G.:** Oncostatin M binds the high-affinity leukemia inhibitory factor receptor. Science, **255**, 1434-1436 (1992).

43) **Tilg, H., Vannier, E., Vachino, G., Dinarello, C. A. & Mier, J. W.:** Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. J. Exp. Med., **178**, 1629-1636 (1993).

44) **Wahl, S. M. Costa, G. L., Corcoran, M., Wahl, L. M. & Berger, A. E.:** Transforming growth factor-beta mediates IL-1-dependent induction of IL-1 receptor antagonist. J. Immunol., **150**, 3553-3560 (1993).

45) **Isshiki, H., Akira, S. & Tanabe, O.:** Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. Mol. Cell. Biol., **10**, 2757-2764 (1990).

46) **Helfgott, D. C., Tatter, S. B., Santhanam, U., Clarick, R. H., Bhardwaj, N., May, L. T. & Sehgel, P. B.:** Multiple forms of IFN-β/IL-6 in serum and body fluids during an acute phase bacterial infection. J. Immunol., **142**, 948-953 (1989).

47) **Damtew, B., Rzewnicki, D., Lozanski, G. & Kushner, I.:** IL-1 receptor antagonist affects the plasma protein response of Hep 3B cells to conditioned medium from lipopolysaccharide-stimulated monocytes. J. Immunol., **150**, 4001-4007 (1993).

48) **Gershenwald, J. E., Fong, Y., Fahey Ⅲ, T. J., Calvano, S. E., Chizzonite, R., Kilian, P. L., Lowry, S. F. & Moldawer, L. L.:** Interleukin 1 receptor blockade attenuates the host inflammatory response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **87**, 4966-4970 (1990).

49) **Snick, J. V.:** Interleukin-6: an overview. Annu. Rev. Immunol., **8**, 253-278 (1990).

50) **Suematsu, S., Matsuda, T., Aozasa, K., Akira, S., Nakano, N., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T. & Kishimoto, T.:** IgG_1 plasmacytosis in interleukin-6 transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **86**, 7547-7551 (1989).

51) **大河原進，松川明博，枝光　淳，柳　文治:** IL-1 レセプター・アンタゴニスト．臨床免疫，**24**, 607-618 (1992).

52) **Lukacs, N. W., Kunnkel, S. L., Burdick, M. D., Lincoln, P. M. & Strieter, R. M.:** Interleukin-1 receptor antagonist blocks chemokine production in the mixed lymphocyte reaction. Blood, **82**, 3668-3674 (1993).

53) **Krezesicki, R. F., Hatfield, C. A., Bienkowski, M. J., McGuire, J. C., Winterrowed, G. E., Chapman, D. L., Berger, A. E., McEwan, R. N., Carter, D. B., Chosay, J. G., Tracey, D. E. & Chin, J. E.:** Regulation of expression of IL-1 receptor antagonist protein in human synovial and dermal fibroblast. J. Immunol., **150**, 4008-4018 (1993).

54) **Eisenberg, S. P., Evans, R. J., Arend, W. P., Verderber, E., Brewer, M. T., Hannum, C. H. & Thompson, R. C.**: Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receotor antagonist. Nature, **343**, 341-346 (1990).

55) **Atkins, M. B., Vachino, G., Tilg, H. J., Karp, D. D., Robert, N. J., Kappler, K. & Mier, J. W.**: Phase I evaluation of thrice-daily intravenous bolus interleukin-4 in patients with refractory malignancy. J. Clin. Oncol., **10**, 1802-1809 (1992).

56) **Fenton, M, J., Buras, J. A. & Donnely, R. P.**: IL-4 reciprocally regurates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes. J. Immunol., **149**, 1283-1288 (1992).

57) **Orino, E., Sone, S., Nii, A. & Ogura, T.**: IL-4 up-regulates IL-1 receptor antagonist gene expression and its production in human blood monocytes. J. Immunol., **149**, 925-931 (1992).

58) **Wong, H. L., Costa, G. L., Lotze, M. T. & Wahl, S. M.**: Interleukin (IL) 4 differentially regurates monocyte IL-1 family gene expression and synthesis in vitro and in vivo. J. Exp. Med., **177**, 775-781 (1993).

59) **Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M. B., Dinarello, C. A. & Mier, J. W.**: Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. Blood., **83**, 113-118 (1994).

60) **Cassatella, M. A., Meda, L., Gasperini, S., Calzetti, F. & Bonora, S.**: Interleukin-10 (IL-10) up-regulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. J. Exp. Med., **179**, 1695-1699 (1994).

61) **Shields, J., Bernasconi, L. M., Benotto, W., shaw, A. R. & Mazzei, G. J.**: Production of 26,000 dalton interleukin 1 inhibitor by human monocytes is regulated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Cytokine, **2**, 122-128 (1990).

62) **Arend, W. P.**: Interleukin-1 receptor antagonist. Adv. Immunol., **54**, 167-227 (1993).

63) **Tilg, H., Mier, J. W., Vogel, W., Aulitzky, W., E., Wiedermann, C. J., Vannier, E., Huber, C. & Dinarello, C. A.**: Induction of circulating IL-1 receptor antagonist by IFN treatment. J. Immunol., **150**, 4687-4692 (1993).

64) **Cominelli, F., Nast, C. C., Clark, B. D., Schindler, R., Lierena, R., Eysselein, V. E., Thompson, R. C. & Dinarello, C. A.**: Interleukin 1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. J. Clin. Invest., **86**, 972-980 (1990).

65) **Dripps, D. J., Brabdhuber, B. J., Thompson, R. C. & Eisenberg, S. P.**: Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. J. Biol. Chem., **266**, 10331-10336 (1991).

66) **Conti, P., Panara, M. R., Fridas, S., Barbacane, R. C., Grilli, A., Placido, F. C., Reale, M. & Fiore, S.**: Inhibition of glanuloma formation induced by potassium permanganate in the mouse by a specific human recombinant receptor antagonist for interleukin-1 (hrIL-1ra). Cell Immunol., **147**, 446-457 (1993).

67) **Faherty, D. A., Claudy, V., Plocinsky, J. M., Kaffka, K., Kilian, P., Thompson, R. C. & Benjamin, W. R.**: Failure of IL-1 receptor antagonist and monoclonal anti-IL-1 receptor antibody to inhibit antigen-specific immune responses in vivo. J. Immunol., **148**, 766-771 (1992).

68) **Fan, T. P., Hu, D. E., Guard, S., Gresham, G. A. & Watling, K. J.**: Stimulation of angiogenesis by substance P and interleukin-1 in rat and its inhibition by NK1 or interleukin-1 receptor antagonists. Br. J. Pharmacol., **110**, 43-49 (1993).

69) **Miller, L. C., Lynch, E. A., Isa, S., Logan, J. W., Dinarello, C. A. & Steere, A. C.**: Balance of synovial fluid IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist and recovery from Lyme arthritis. Lancet, **341**, 155-156 (1993).

70) **Pellicane, J. V., DeMaria, E. J., Abd-Elfattah, H., Reines, H. D., Vannice, J. L. & Carson, K. W.**: Interleukin-1 receptor antagonist improves survival and preserves organ adenosine-5'-triphosphate after hemorrhagic shock. Surgery, **114**, 278-283 (1993).

71) **Aiura, K., Gelfand, J. A., Burke, J. F., Thompson, R. C. & Dinarello, C. A.**: Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist prevents Staphylococcus epidermidis-induced hypotension and reduces circulating levels of tumor necrosis factor and IL-1 beta in rabbits. Infect. Immun., **61**, 3342-3350 (1993).

72) **Mancilla, J., Garcia, P. & Dinarello, C. A.**: The interleukin-1 receptor antagonist can either reduce or enhance the lethality of Klebsiella pneumoniae sepsis in newborn rats. Infect. Immun., **61**, 926-932 (1993).

73) **Ohlsson, K., Bjork, P., Bergenfeldt, M., Hageman, R. & Thompson, R. C.**: Interleukin-1 receptor antagonist reduces motality from endtoxin shock. Nature, **348**, 550-552 (1990).

74) **Dinarello, C. A.**: The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. J. Infect, Dis., **163**, 1177-1184 (1991).

75) **Piguet, P. F., Vesin, C., Grau, G. E. & Thompson, R. C.**: Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elecited in mice by bleomycin or silica. Cytokine, **5**, 57-61 (1993).

76) **Tang, W. W., Feng, L., Vannice, J. L. & Wilson, C. B.**: Interleukin-1 receptor antagonist ameliorates experimental anti-glomerular basement membrane antibody-associated glomerulonephriris. J. Clin. Invest., **93**, 273-279 (1994).

77) **Relton, J. K. & Rothwell, N. J.**: Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. Brain. Res. Bull., **29**, 243-246 (1992).

78) **Abhyankar, S., Gilliland, D. G. & Ferrara, J. L.:** Interleukin-1 is a critical effector molecule during cytokine dysregulation in graft versus host disease to minor histocompatibility antigens. Transplantation, **56**, 1518-1523 (1993).
79) **MacCarthy, P. L. Jr., Abhyankar, S., Neben, S., Newman, G., Sieff, C., Thompson, R. C., Burakoff, S. J. & Ferrara, J. L.:** Inhibition of interleukin-1 by an interleukin-1 receptor antagonist prevents graft-versus-host disease. Blood, **78**, 1915-1918 (1991).
80) **Dinarello, C. A. & Thompson, R. C.:** Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. Immunol. Today, **12**, 404-410 (1991).

Induction of Acute Phase Proteins by Inflammatory Cytokines and its Regulation by IL-1 Receptor Antagonist in Mice

Shigeru Honjo, Department of Orthopedics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med Soc., **104,** 492—504 (1995)

Key words acute phase protein, haptoglobin, inflammatory cytokine, turpentine oil, IL-1 receptor antagonist

Abstract

Inflammatory cytokines such as interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor α (TNF α) play an important role in acute inflammation and many inflammatory phenomena are reported to be mediated by these cytokines. They influence each other by forming a cytokine network, and consequently inflammation is thought to develope. On the other hand the existence of a natural antagonist such as interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) has been reported and they are thought to constitute a negative feedback system and regulate inflammation. To know the relation of cytokine network I investigated the mechanism of the induction of serum haptoglobin, one of the acute phase proteins. I also measured such inflammatory cytokines as IL-1, IL-6, TNF α and IL-1ra in inflammation induced by turpentine oil in mice. These results indicated that the serum haptoglobin level began to increase 6 hr after injection of turpentine oil and reached a peak level at 24 hr. IL-1 α and IL-6 were produced before the beginning of haptoglobin production. The peak level of IL-1 α was recognized at 2 and 48 hr, and that of IL-6 was at 12 hr. TNF α was not detected in any time course of the inflammation. IL-1ra exhibited a peak level at 48 hr after turpentine injection, and continued to be produced at a high concentration for a long period when other inflammatory cytokines were also produced. The production of both inflammatory cytokines and IL-1ra suggested that IL-1ra regulated the inflammatory process. However, administration of recombinant IL-1ra could not inhibit the production of serum haptoglobin induced by turpentine oil. These results suggested the possibility that the production of acute phase proteins was induced mainly by IL-6 independent of IL-1.