

平成22年 5月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590318

研究課題名（和文）分泌型ST2タンパク質の炎症抑制機能部分の同定と創薬への応用

研究課題名（英文）Identification of functional regions the soluble ST2 protein against inflammation, and its possible application for novel drugs.

研究代表者

富永 眞一（TOMINAGA SHINICHI）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：70155571

研究成果の概要（和文）：ST2タンパク質は、気管支喘息等のアレルギー疾患で病勢に応じて発現され、炎症、免疫反応に係る重要な分子である。ST2タンパク質の機能部位を解明し、疾患の治療に応用するための基礎的な研究を行った。コアタンパク質だけでも抗炎症効果があるが、糖鎖修飾はその効果を増強していることがわかった。今後は最小機能領域の探索をさらに進めていく予定である。

研究成果の概要（英文）：ST2 protein is induced in the case of allergic diseases, such as bronchial asthma, in parallel with disease activity. Possible usage of the functional region of the ST2 protein as a novel drug against inflammatory reaction in allergic diseases, we clarified that core protein itself is able to suppress inflammation, and its glycosylation enhanced the inhibitory activity. We are now identifying minimum effective region of the ST2 protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：ST2 遺伝子、糖鎖修飾、抗炎症作用

1. 研究開始当初の背景

ST2 は、マウス線維芽細胞の増殖開始過程で特異的に発現される遺伝子として同定され、その構造からインターロイキン1受容体ファミリーに分類された。ST2 遺伝子産物には、膜貫通受容体型（ST2L）と分泌型（ST2）の2種類の分子が存在する。これまでに、ST2

遺伝子がリンパ球のヘルパーT細胞で特異的に発現していること、喘息モデルマウスを用いた実験では抗ST2抗体や分泌型ST2タンパク質を投与すると症状が軽減されること、さらに気管支喘息や心筋梗塞の急性期などの患者の血液中のST2タンパク質濃度が上昇することなど、ST2と様々な疾患・免疫反応との関連が明らかにされている。近年、ST2Lの

リガンドとしてインターロイキン 33 (IL-33) が同定され、IL-33 が ST2L に結合することにより Th2 型のサイトカイン (IL-4、IL-12 など) を分泌することが報告され、その結果生じるシグナル伝達機構と最終的な効果、病態との関連が注目されている。このように様々な疾患への関与が示唆される ST2 に関して、アレルギー疾患等に対する新規医薬品の開発への応用が期待されている。

2. 研究の目的

(1) ST2 の機能部位の解析

分泌型 ST2 がリガンドとして細胞表面に結合し伝達する細胞内シグナルを検討することにより、ST2 タンパク質の部分・構造でそれに必要な最小限の単位を解明し、疾患の治療等に応用するための基礎的実験を行うことを目的とする。すなわち、ST2 タンパク質の構造的特徴である糖鎖の必要性を検討し、最終的には合成ペプチドを用いた実験を行い、機能的最小単位を絞り込み、創薬の基盤作りを行う。

(2) 血管内皮細胞における IL-33/ST2 系の発現と作用

非免疫系の細胞である内皮細胞 HPAEC (ヒト肺動脈内皮細胞) での ST2 の遺伝子発現が報告されている。今回、ST2 の未知の細胞内機能を明らかにするため、血管内皮細胞における ST2 遺伝子の発現様式と、IL-33 の血管内皮細胞に対する作用を検討する。

3. 研究の方法

(1) ST2 の機能部位の解析

① ST2 タンパク質の変異体の調製

ST2 の機能における糖鎖の必要性を検討するため、シグナルシーケンスを欠落した変異体 ($\Delta 7$)、また、9 つある糖鎖修飾部位のアスパラギンをすべてアラニンに変えた変異体 (9NA) を HEK293 細胞で産生させ、付加してある V5 タグと 6x ヒスチジンタグ (His タグ) のうち His タグを利用して精製した。

② 変異体 ST2 タンパク質の効果の検討

ヒト単球系白血病由来 THP-1 細胞は病原体の細胞壁成分である Lipopolysaccharide (LPS) を認識し、細胞内シグナル伝達系を介して、炎症性サイトカイン IL-6 を産生する。我々は、既に THP-1 細胞の LPS 刺激による IL-6 の産生を分泌型 ST2 が抑制することを報告した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 341:425-32, 2006)。今回、同様の系を用いて変異体 ST2 の作用を解析した。すなわち、野生型 ST2 または変異体 ST2 の存在下で

THP-1 細胞に LPS を作用させたとき分泌される IL-6 の量を比較することで、変異による ST2 の機能への影響を解析した。IL-6 の定量は、ELISA を用いた。

(2) 血管内皮細胞における IL-33/ST2 系の発現と作用

まず、血管内皮細胞 (HUVEC: ヒト臍帯静脈内皮細胞、HAEC: ヒト大動脈内皮細胞、HMVECc-Ad: ヒト皮膚微小血管内皮細胞、REC: ヒト網膜内皮細胞) における ST2 遺伝子の発現は RT-PCR により検討した。分泌型 ST2 タンパク質の定量は ELISA を用いた。ST2 遺伝子発現の細胞増殖依存性の検討は、増殖因子を加えない培養での細胞、また、マトリゲル上で培養することで分化した細胞について発現を解析した。ST2L のリガンドである IL-33 の血管内皮細胞に対する作用の解析は、IL-33 シグナル伝達経路の下流に位置する MAP キナーゼの活性化について ERK1/2、JNK、p38 のリン酸化を指標に解析した。

4. 研究成果

(1) ST2 の機能部位の解析

① ST2 タンパク質の変異体の調製

野生型の分泌型 ST2 (WT) および 2 つの変異体 ($\Delta 7$ 、9NA) について HEK293 細胞での発現を確認した。野生型については、培養培地を Ni-NTA カラムに添加しカラム結合タンパク質をイミダゾールで溶出することで約 60kD に相当する高純度の糖鎖結合型 ST2 タンパク質を得た (図 1.1)。グリコシダーゼを用いた実験から、精製した ST2 タンパク質は糖鎖結合型であることを確認した (データ未掲載)。

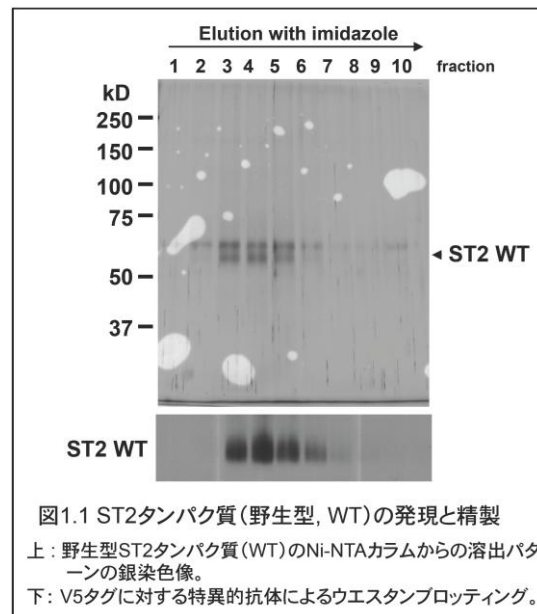


図1.1 ST2タンパク質(野生型, WT)の発現と精製

上: 野生型ST2タンパク質(WT)のNi-NTAカラムからの溶出パターンの銀染色像。

下: V5タグに対する特異的抗体によるウエスタンブロッティング。

一方、変異体 $\Delta 7$ と9NAは培地中に分泌されず細胞内にとどまることが確認され、その分子量は、糖鎖が結合していないときの37kDに相当することから、糖修飾がされていないと考えられた(図1.2)。細胞内から抽出した $\Delta 7$ と9NAについて野生型と同様にNi-NTAカラムを用いて精製を行ったところ、高純度の変異体タンパク質を得た(図1.2)。

② 変異体ST2タンパク質の効果の検討

精製したST2タンパク質(WT、 $\Delta 7$ 、9NA)存在下でTHP-1細胞をLPS刺激し、IL-6の産生量を測定した。 $\Delta 7$ および9NAの存在下では、野生型(WT)存在下よりもIL-6産生の抑制が緩和された(図1.3)。このことは、ST2の糖鎖形成が十全な機能発現に必要であることを示唆している。一方で、糖鎖形成がなくとも、IL-6産生の抑制はみられることから、糖鎖形成以外に重要な機能部位があることが予想される。今後、糖鎖形成と同様にST2に特徴的な構造である3つのグロブリン様ドメインについて研究をすすめていく予定である。

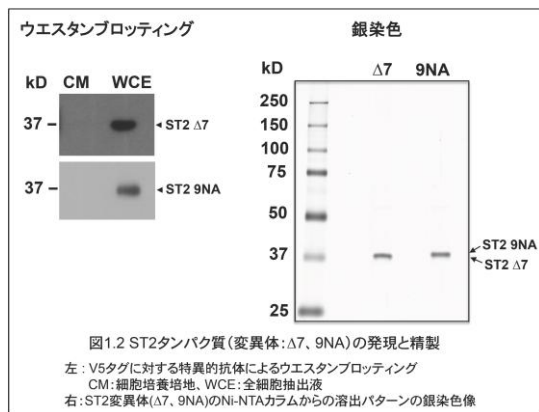


図1.2 ST2タンパク質(変異体: $\Delta 7$, 9NA)の発現と精製

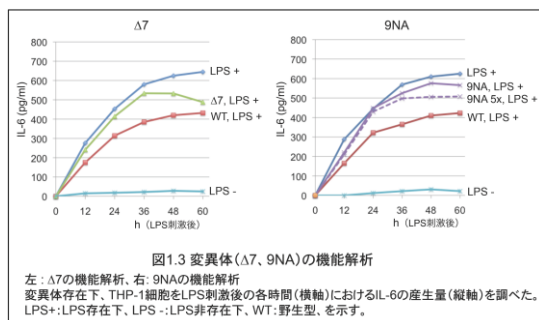


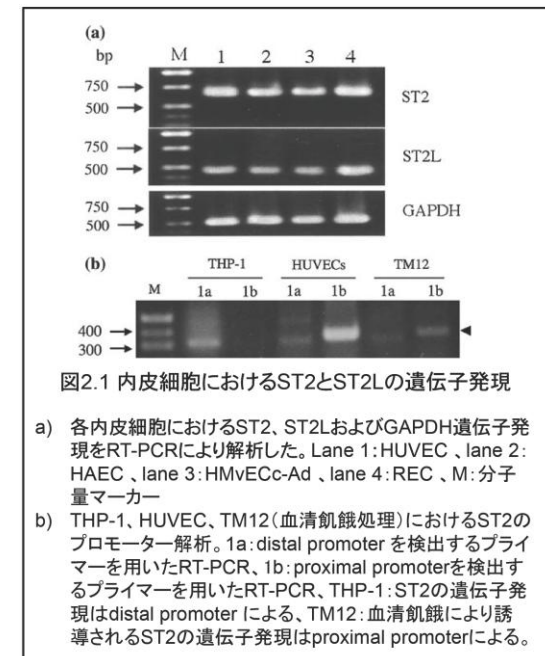
図1.3 変異体($\Delta 7$, 9NA)の機能解析

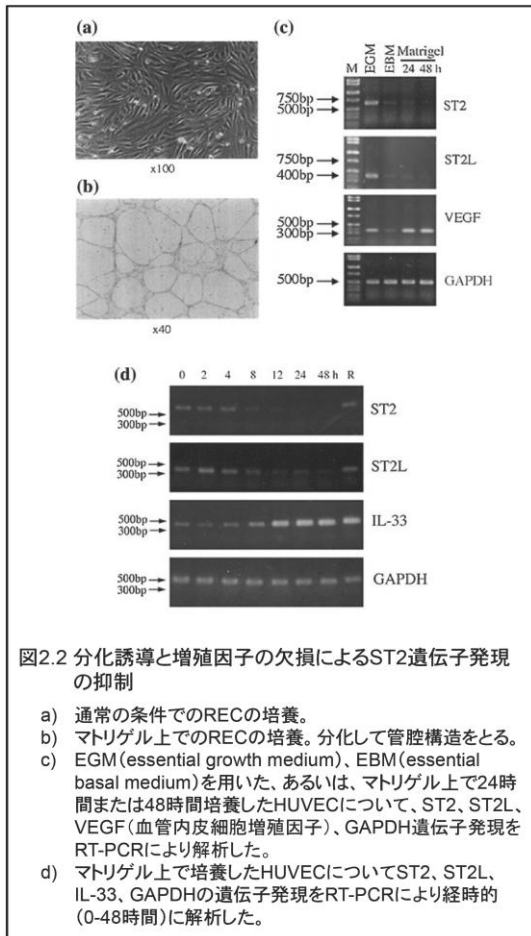
(2) 血管内皮細胞における IL-33/ST2 系の発現と作用

4つの血管内皮細胞、HUVEC、HAEC、HMVECc-Ad、RECにおけるST2の遺伝子発現をRT-PCRで調べたところ、すべての細胞においてST2とST2Lの遺伝子発現が認められた(図2.1a)。HUVECにおける遺伝子発現は、ST2がもつ2つのプロモーター、proximal promoterとdistal promoterのうち、proximal

promoterによるものであることが判明した(図2.1b)。

HUVECをマトリゲル上で培養し分化誘導したとき(図2.2a, b)ST2の遺伝子発現は著しく減少した。増殖因子を加えないとき(EBM)も加えたとき(EGM)と比べて発現が著しく減少した(図2.2c)。RECにおけるST2の発現も同様の傾向がみられた(データ未掲載)。マトリゲル上でHUVECを培養して8時間後からST2遺伝子の発現は低下したが、リガンドであるIL-33の遺伝子発現は逆にマトリゲル培養後8-12時間後から増加した(図2.2d)。また、タンパク質の発現をELISAで測定したところ、増殖因子を加えないとき、マトリゲル上で培養したときの双方で分泌型ST2タンパク質の発現が著しく低下した(図2.3)。以上のことから、内皮細胞では、ST2遺伝子の発現は増殖依存的事であることが示された。





次に、IL-33のHUVECに対する作用を検討するため、HUVEC培養培地にIL-33を添加したところ、15分後にMAPキナーゼのERK1/2が活性化した。一方で、JNK、p38は活性化がみられなかった。さらにIL-33のサイトカイン産生に対する作用は、IL-6とIL-8の産生を用量依存的に亢進させることが判明した。

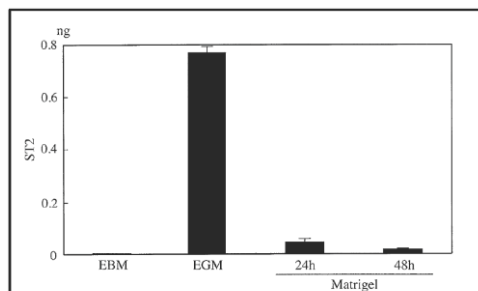
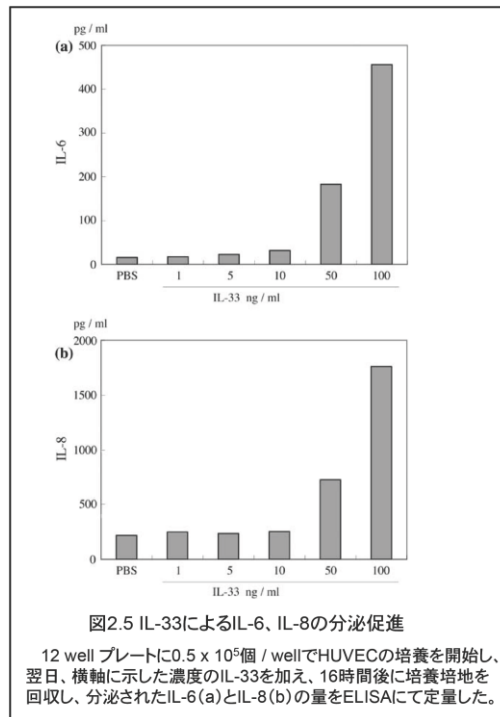
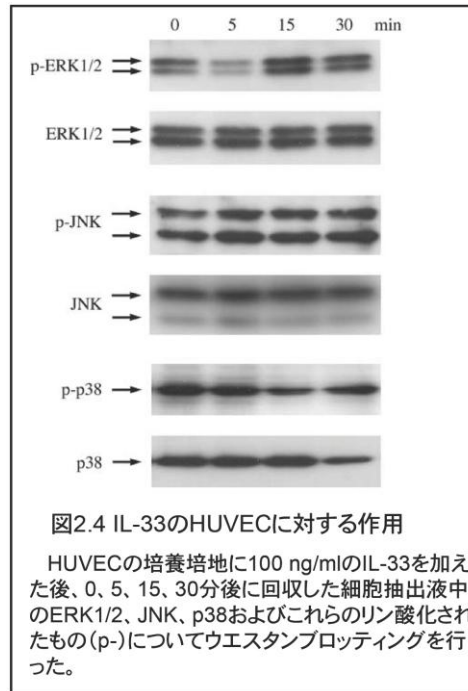


図2.3 HUVECにおける分泌型ST2の定量

EGM、EBMを用いた培養では24時間後、マトリゲル上での培養では24時間または48時間後に培養培地を回収し、分泌された分泌型ST2をELISAを用いて定量した。10⁶個細胞数あたりの分泌量を縦軸に示した。



以上の結果より、血管内皮細胞が増殖刺激を受けたとき、ST2Lの発現が増加し、そこにIL-33が作用すると、炎症反応を亢進させる可能性が示唆された。また、血管内皮細胞は分化時にST2Lの発現が減少し、IL-33の作用を受けにくくなるが、その細胞中にはIL-33タンパク質が増加し、炎症時等のIL-33のsourceになる可能性が示唆された。以上の成果は原著論文として発表するに至った (*Mol. Cell. Biochem.* 335:75-81, 2010)。

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 7 件)

- ① Aoki, S., Hayakawa, M., Ozaki, H., Takezako, N., Obata, H., Ibaraki, N., Tsuru, T., Tominaga, S., and Yanagisawa, K.: ST2 gene expression is proliferation-dependent and its ligand, IL-33, induces inflammatory reaction in endothelial cells. 査読有 *Mol. Cell. Biochem.* 335: 2010, 75-81.
- ② Matsuyama, Y., Okazaki, H., Tamemoto, H., Kimura, H., Kamata, Y., Nagatani, K., Nagashima, T., Hayakawa, M., Iwamoto, M., Yoshio, T., Tominaga, S., and Minota, S.: Increased levels of interleukin-33 in sera and synovial fluids from patients with active rheumatoid arthritis. 査読有 *J. Rheumatol.* 37: 2010, 18-25.
- ③ Hayakawa, M., Hayakawa, H., Matsuyama, Y., Tamemoto, H., Okazaki, H., and Tominaga, S.: Mature interleukin-33 is produced by calpain-mediated cleavage in vivo. 査読有 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387: 2009, 218-222.
- ④ Mato, N., Fujii, M., Hakamata, Y., Kobayashi, E., Sato, A., Hayakawa, M., Ohto-Ozaki, H., Bando, M., Ohno, S., Tominaga, S., and Sugiyama, Y.: IL-1R-related protein ST2 suppressed the initial stage of bleomycin-induced lung injury. 査読有 *Eur. Respir. J.* 33: 2009, 1415-1428.
- ⑤ Funakoshi-Tago, M., Tago, K., Hayakawa, M., Tominaga, S., Ohshio, T., Sonoda, Y., and Kasahara, T.: TRAF6 is a critical signal transducer in IL-33 signaling pathway. 査読有 *Cell. Signal.* 20: 2008, 1679-1686.
- ⑥ Hayakawa, H., Hayakawa, M., Kume, A., and Tominaga, S.: Soluble ST2 blocks IL-33 signaling in allergic airway inflammation. 査読有 *J. Biol. Chem.* 282: 2007, 26369-26380.
- ⑦ Tajima, S., Bando, M., Ohno, S., Sugiyama, Y., Oshikawa, K., Tominaga, S., Itoh, K., Takada, T., Suzuki, E., and Gejyo, F.: ST2 gene induced by type 2 helper T cell (Th2) and proinflammatory cytokine stimuli may modulate lung injury and fibrosis. 査読有 *Exp. Lung Res.* 33: 2007, 81-97.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 柳澤健, 太田聡, 松儀実広, 富永眞一 :

IL-33 induces inflammatory reaction in endothelial cells, and its receptor, ST2L is expressed in growth-dependent manner. (IL-33 は内皮細胞に炎症反応を惹起し, その受容体の ST2L は増殖依存性に内皮細胞に発現する.) 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月 12 日. (演題番号 4P-0721)

- ② 尾崎裕美, 黒岩憲二, 早川盛禎, 為本浩至, 富永眞一 : The immunological reactions induced by intraperitoneal administration of IL-33 were attenuated in ST2 transgenic mice. (ST2 トランスジェニックマウスを用いた, ST2 の抗 IL-33 効果の検討.) 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月 11 日. (演題番号 3P-0710)
- ③ 松山泰, 岡崎仁昭, 為本浩至, 早川盛禎, 岩本雅弘, 富永眞一, 蓑田清次: Increased levels of interleukin-33 in sera and synovial fluids from patients with active rheumatoid arthritis. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月 10 日. (演題番号 2P-0719)
- ④ 富永眞一, 早川裕子, 早川盛禎, 柳澤健 : ST2 遺伝子と病気. 3 学会合同大会 2008 自然免疫の最前線 第 73 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 / 第 19 回日本生体防御学会学術集会 / 第 45 回補体シンポジウム 3 学会合同集会, 札幌, 2008 年 7 月 11 日. (講演要旨集 p. 89)
- ⑤ 竹迫直樹, 早川裕子, 早川盛禎, 松儀実広, 柳澤健, 村尾捷利, 富永眞一 : 分泌型 ST2 タンパク質による単球系細胞の樹状細胞への分化抑制作用について. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同年会, 横浜, 2007 年 12 月 14 日. (講演要旨集 p. 844)
- ⑥ 早川裕子, 早川盛禎, 久米晃啓, 富永眞一 : 分泌型 ST2 による IL-33 シグナル伝達系の抑制. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同年会, 横浜, 2007 年 12 月 14 日. (講演要旨集 p. 844)
- ⑦ 多胡憲治, 多胡めぐみ, 水野憲一, 笠原忠, 富永眞一, 伊東広: Dynamic subcellular localization of atypical small GTPase kappaB-Ras and its possible contribution to oncogenic signals. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同年会, 横浜, 2007 年 12 月 13 日. (講演要旨集 p. 588)
- ⑧ 多胡めぐみ, 多胡憲治, 早川盛禎, 富永眞一, 園田よし子, 笠原忠: IL-33 シグナル伝達経路における TRAF6 の役割の解析 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同年会, 横浜, 2007 年 12 月 12 日. (講演要旨集 p. 388)

- ⑨ Hayakawa, M., Hayakawa, H., Kume, A., Kuroiwa, K., Hakamata, Y., and Tominaga, S.: Soluble ST2 suppresses ST2L-based IL-33 signaling pathway. 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, Cytokines in Health and Disease, San Francisco, California October 27, 2007 (Abstract: Cytokine 39, 14-15, 2007.)
- ⑩ Miwa, A., Takezako, N., Hayakawa, M., Yanagisawa, K., and Tominaga, S.: Incadronate can induce apoptosis in monocytic cells. XIth International Myeloma Workshop and the IVth International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia, Kos Island, Greece, June 25-30, 2007 (Abstract: Haematologica 92, 135, 2007.)
- ⑪ Mato, N., Bando, M., Ohno, S., Tominaga, S., and Sugiyama, Y.: ST2 works to suppress bleomycin induced lung injury. 2007 ATS International Conference in San Francisco, San Francisco, California May 21, 2007 (Abstract number 3177)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富永 眞一 (TOMINAGA SHINICHI)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：70155571

(2) 研究分担者

柳澤 健 (YANAGISAWA KEN)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：50182366

太田 聡 (OHTA SATOSHI)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：40528428

竹迫 直樹 (TAKEZAKO NAOKI)
独立行政法人国立病院機構
災害医療センター・診療部・医長
研究者番号：80424026

(3) 連携研究者

()

研究者番号：