

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 7日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590289

研究課題名（和文） ST2 遺伝子多型による構造変化と病気との関連

研究課題名（英文） The implication of conformational change of ST2 gene product due to polymorphism for various diseases.

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：7015571

研究成果の概要（和文）：ヒト ST2 遺伝子上の新たな多型が見いだされた。ヒト ST2L 発現細胞で多型による 78 番目のアミノ酸の違いが IL-33 シグナル伝達系に及ぼす影響を調べたが明確な違いは認められなかった。さらに解離の速さを表す値を測ってみると、A78 タイプの ST2 タンパク質が E78 タイプと比べてしっかり結合しているという結果が得られた。この生理的意味と病気との関連について今後さらに検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：Effect of novel polymorphism on human ST2 gene was studied. Comparison of signal transduction of IL-33 in stable transformants expressing A78 type ST2L and E78 type ST2L resulted in no remarkable difference. Measurement using surface plasmon resonance method revealed stronger binding of A78 type ST2 to IL-33. Further studies are necessary to clarify physiological and pathological meanings of this difference.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012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、IL-33、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

富永は細胞増殖開始過程で特異的に発現される遺伝子 ST2 をクローニングしたが、その後この遺伝子から選択的スプライシングで分泌型と細胞膜貫通受容体型の産物ができることがわかった。膜貫通型 ST2L は IL-33 の受容体であり、そのシグナル伝達によって炎症反応を惹起する。一方、分泌型 ST2 は IL-33 と結合することによってこの炎症反応を抑える効果がある。様々な病気で病勢に応

じて血中 ST2 が増減するのも、この防御反応のためとも考えられる。

我々が発見したアトピー性皮膚炎の発症に関わる ST2 遺伝子転写調節領域における多型は ST2 分子の量的変化をきたすことがわかった。一方、高血圧等生活習慣病の発症に関わることが示唆された ST2 および ST2L 翻訳領域に存在する多型は構造遺伝子内に存在し、従ってタンパク質の 3 次元構造の違いによる質的变化をもたらす可能性が考えられた。

2. 研究の目的

(1) ST2L 受容体の構造変化が IL-33 シグナル伝達系に及ぼす影響

IL-33 が結合してシグナルを伝え気管支喘息などの炎症反応を惹起する ST2L 受容体の多型 (78 番目のアミノ酸がアラニン (A78) かグルタミン酸 (E78)) による変化を検討し、炎症反応などへの影響を調べる。

(2) ST2 タンパク質と IL-33 の結合に及ぼす多型の影響

IL-33 と結合することによって炎症反応を抑制することがわかっている ST2 タンパク質の結合の強さが多型による 2 つのタイプで違いがあるか、あればその生理的意義および病気の関連を調べる。

3. 研究の方法

(1) ST2L 受容体の構造変化が IL-33 シグナル伝達系に及ぼす影響

① ヒト ST2L 発現安定細胞の樹立

まず、E78 または A78 タイプのヒト ST2L 発現プラスミドを構築した。エレクトポレーション法により、ST2L 発現プラスミドをマウス胸腺腫由来 EL-4 細胞にトランスフェクションした後、抗生物質 blasticidin を用いて発現安定細胞を選抜した。コントロールとして、ヒト ST2L cDNA 非挿入プラスミドをトランスフェクションした細胞 (Empty) も作製した。発現安定細胞におけるヒト ST2L の発現は、RT-PCR 法およびフローサイトメトリー法により確認した。

② IL-33 シグナル伝達系の活性化の検討

IL-33 に対するヒト ST2L 発現安定細胞およびコントロール細胞の応答性は、シグナル伝達因子 MAP キナーゼ p38、JNK、ERK および NF- κ Bp65 の活性化を指標に解析した。各細胞をヒト IL-33 により刺激した後、全細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロット法により各因子のリン酸化型および非リン酸化型を検出した。

(2) ST2 タンパク質と IL-33 の結合に及ぼす多型の影響

A78 タイプと E78 タイプの 2 種類のヒト ST2 タンパク質を HEK293 細胞に発現させ培養液から Ni カラムを用いて精製した。ヒト IL-33 タンパク質はセリン 112 より C 末端側の部分 (IL-33c) を T7 タグおよび His タグをつけ

て大腸菌で発現させ、Ni カラムを用いて精製した。

これらを用いて ST2 と IL-33c の相互作用について表面プラズモン共鳴 (SPR) 法で解析した。

4. 研究成果

(1) ST2L 受容体の構造変化が IL-33 シグナル伝達系に及ぼす影響

① ヒト ST2L 発現安定細胞の樹立

ヒト ST2L 発現安定細胞 (E78 または A78) およびコントロール細胞 (Empty) を、それぞれ 3 クローン樹立した。これらの細胞の細胞膜上におけるヒト ST2L の発現をフローサイトメトリーにより解析した (図 1)。各細胞を、ビオチン化抗ヒト ST2 モノクローナル抗体 (anti-hST2) および PE 標識ストレプトアビジンで染色し、細胞膜上のヒト ST2L を検出した。灰色ヒストグラムは未染色細胞 (unstain) を示し、白色ヒストグラムはビオチン標識抗ヒト ST2 モノクローナル抗体 + PE 標識ストレプトアビジン染色細胞を示す。各図において、ヒストグラムが右に移動するほど ST2L 陽性である。

樹立したヒト ST2L 発現安定細胞 E78 および A78 タイプには、ヒト ST2L の発現が明確に認められた。IL-33 シグナル伝達系の解析には、ST2L 発現が同レベルの E78 および A78 タイプの細胞を用いた。

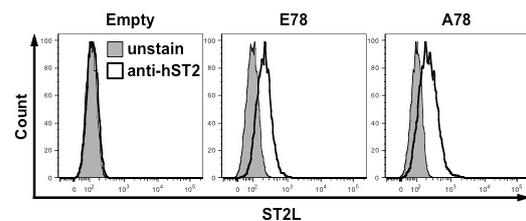


図 1 フローサイトメトリー法によるヒト ST2L 発現の検出

② IL-33 シグナル伝達系の活性化の検討

ヒト IL-33 で刺激したヒト ST2L 発現安定細胞およびコントロール細胞におけるシグナル伝達因子の活性化を検討した (図 2)。

各細胞の培養液にヒト IL-33 (最終濃度 10 ng/ml) を添加後、0、15、30、60 分後に細胞を回収し、全細胞抽出液を調製した。MAP キナーゼ p38、JNK、ERK および NF- κ Bp65 のリン酸化型 (P-) と非リン酸化型を、それぞれ特異的抗体を用いてウエスタンブロット法により検出した。GAPDH をコントロールとして検出した。

MAP キナーゼ p38、JNK、ERK のリン酸化は、刺激 15 分後から検出され、30 分または 60 分

後がピークであった。NF- κ Bp65 のリン酸化は、刺激 15 分後がピークであった。また、E78 と A78 タイプの細胞における各シグナル伝達因子の活性化パターンは、ほぼ同じであった。一方、コントロール細胞では、いずれのシグナル伝達因子においても、IL-33 刺激特異的な応答は見られなかった。

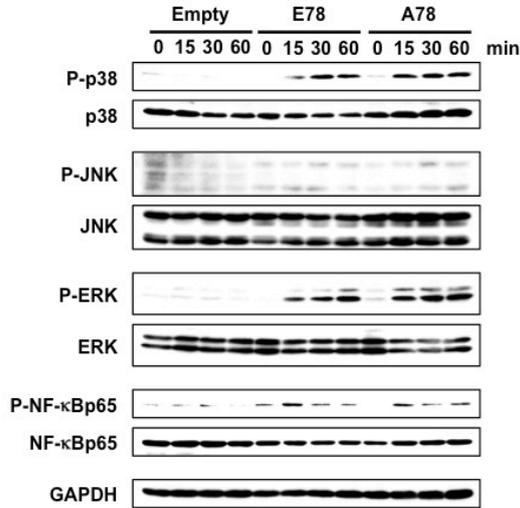


図 2 IL-33 刺激依存的な MAP キナーゼおよび NF- κ B の活性化

(2) ST2 タンパク質と IL-33 の結合に及ぼす多型の影響

精製した ST2 および IL-33 を示す (図 3)。

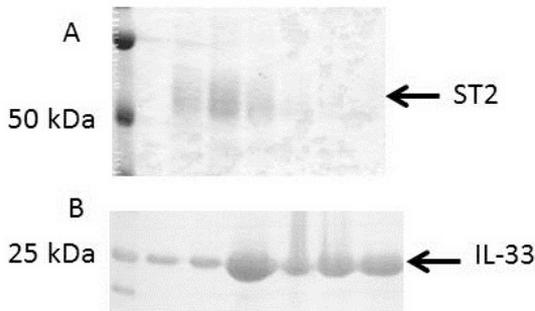


図 3 : ST2 と IL-33 の精製

まず ST2 タンパク質を CM5 チップに固定し、IL-33c 溶液を流して解析した。この場合 IL-33c を流し続けているにもかかわらず相互作用を示す RU が一時的に上昇したあとプラトーを形成せずに低下した (図 4-A)。この解釈として IL-33c 溶液中でオリゴマーが形成され、オリゴマーのまま ST2 に結合した IL-33c が再度解離する可能性が示唆された。このため逆に IL-33c を CM5 チップに固定し、

ST2 を流す方法を試みた。この方法では RU のすばやい立ち上がりとプラトーの形成を認め、ST2 溶液からバッファーのみに切り替えるとゆるやかな解離を認めた (図 4-B)。解離の速度は遅く ST2 と IL-33c の結合が強力であることを示唆した。A78 タイプと E78 タイプの ST2 についてセンサーグラムのパターンを比較したが著明な差を認めなかった。

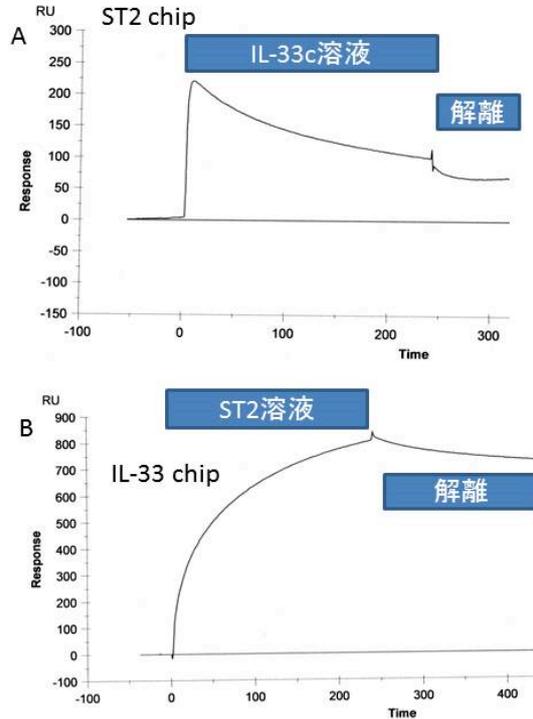


図 4 : IL-33 と ST2 の相互作用

より詳細な検討が必要と考えられたので、東京大学医科学研究所の津本教授に解析を依頼した。シングルサイクルキネティック法が使える機械では同一のチップに複数の濃度で ST2 を流し、センサーグラムを比較することにより解離定数 K_d を計算させることが可能である (図 5)。

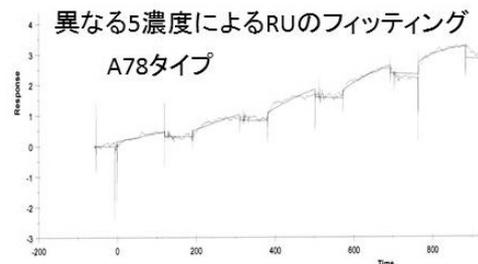


図 5 : シングルサイクルキネティック法による RU カーブのフィッティング

E78 タイプのST2はKdが 9.1×10^{-4} (1/s)と、A78 タイプの 2.8×10^{-4} (1/s)と比して約3倍大きいという結果であった。

この生理的意味と病気との関連について今後さらに検討が必要である。

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 10 件)

[1] Tominaga, S., Hayakawa, M., Tsuda, H., Ohta, S., and Yanagisawa, K. (2013) Presence of a novel exon 2E encoding a putative transmembrane protein in human IL-33 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 969-974. (DOI:10.1016/j.bbrc.2012.12.050) 査読有

[2] Miwa, A., Takezako, N., Hayakawa, H., Hayakawa, M., Tominaga, S., and Yanagisawa, K. (2012) YM-175 induces apoptosis of human native monocyte-lineage cells via inhibition of prenylation. *Am. J. Hematol.* 87, 1084-1088. (DOI:10.1002/ajh.23328) 査読有

[3] Tsuda, H., Komine, M., Karakawa, M., Etoh, T., Tominaga, S., and Ohtsuki, M. (2012) Novel splice variants of IL-33: Differential expression in normal and transformed cells. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2661-2664. (DOI:10.1038/jid.2012.180) 査読有

[4] Nagata, A., Takezako, N., Tamemoto, H., Ohto-Ozaki, H., Ohta, S., Tominaga, S., and Yanagisawa, K. (2012) Soluble ST2 protein inhibits LPS stimulation on monocyte-derived dendritic cells. *Cell. Mol. Immunol.* 9, 399-409. (DOI:10.1038/cmi.2012.29) 査読有

[5] Meephansan, J., Tsuda, H., Komine, M., Tominaga, S., and Ohtsuki, M. (2012) Regulation of IL-33 expression by IFN- γ and tumor necrosis factor- α in normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2593-2600. (DOI: 10.1038/jid.2012.185) 査読有

[6] Wakatabi, K., Komine, M., Meephansan, J., Matsuyama, Y., Tsuda, H., Tominaga, S., and Ohtsuki, M. (2012) The levels of

soluble ST2 in sera and bullous fluid from patients with bullous pemphigoid. *Eur. J. Dermatol.* 22, 333-336. (DOI: 10.1684/ejd.2012.1706) 査読有

[7] Meephansan, J., Komine, M., Tsuda, H., Tominaga, S., and Ohtsuki, M. (2012) Ultraviolet B irradiation induces the expression of IL-33 mRNA and protein in normal human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 65, 72-74. (DOI: 10.1016/j.jdermsci.2011.10.004) 査読有

[8] Matsuyama, Y., Okazaki, H., Hoshino, M., Onishi, S., Kamata, Y., Nagatani, K., Nagashima, T., Iwamoto, M., Yoshio, T., Ohto-Ozaki, H., Tamemoto, H., Komine, M., Sekiya, H., Tominaga, S. and Minota, S. (2012) Sustained elevation of interleukin-33 in sera and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis non-responsive to anti-tumor necrosis factor: possible association with persistent IL-1 β signaling and a poor clinical response. *Rheumatol. Int.* 32, 1397-1401. (DOI:10.1007/s00296-011-1854-6) 査読有

[9] Funakoshi-Tago, M., Tago, K., Sato, Y., Tominaga, S., and Kasahara, T. (2011) JAK2 is an important signal transducer in IL-33-induced NF- κ B activation. *Cell. Signal.* 23, 363-370. (DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.10.006) 査読有

[10] Ohto-Ozaki, H., Kuroiwa, K., Mato, N., Matsuyama, Y., Hayakawa, M., Tamemoto, H., and Tominaga, S. (2010) Characterization of ST2 transgenic mice with resistance to IL-33. *Eur. J. Immunol.* 40, 2632-2642. (DOI:10.1002/eji.200940291) 査読有

[学会発表] (計 14 件)

[1] 鴨下信彦、為本浩至、早川盛禎、富永眞一：ST2 遺伝子の選択的スプライシングにおけるトランス因子の解析。第 85 回日本生化学会大会 平成 24 年 12 月 15 日、福岡

[2] Nagata, A., Ohta, S., Tominaga, S., Yanagisawa, K.: Soluble ST2 protein inhibits LPS stimulation on monocyte-derived dendritic cells. 第 35 回日本分子生物学会年会 平成 24 年 12 月 14 日、福岡

[3] Tamemoto, H., Kamoshita, N.,

Kashiwada, M., Hayakawa, M., Ozaki, H., Tominaga, S.: Shedding of receptor for IL-33 (ST2L) 第35回日本分子生物学会年会 平成24年12月12日、福岡

[4] Tsuda, H., Komine, M., Oshio, T., Tominaga, S., Ohtsuki, M.: Nuclear IL-33 in relation to proliferation and cell cycle of normal human epidermal keratinocytes. 第35回日本分子生物学会年会 平成24年12月11日、福岡

[5] Meehansan, J., Tsuda, H., Komine, M., Karakawa, M., Tominaga, S., Ohtsuki, M.: IL-17 up regulates IL-33 expression in keratinocytes; negative feedback loop in psoriatic epidermis. *The 42nd Annual ESDR (European Society for Dermatological Research) Meeting*, Venice, Italy, September 7-10, 2012.

[6] Meehansan, J., Tsuda, H., Komine, M., Karakawa, M., Tominaga, S., Ohtsuki, M.: Regulation of IL-33 expression by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in normal human epidermal keratinocytes. *Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology*, Raleigh, North Carolina, USA, May 9-12, 2012.

[7] Kamoshita, N., Tamemoto, H., Hayakawa, M., Tominaga, S.: Alternative splicing in ST2 gene. 第34回日本分子生物学会年会 平成23年12月16日、横浜

[8] Tsuda, H., Meehansan, J., Karakawa, M., Tominaga, S., Komine, M., and Ohtsuki, M.: Novel splicing variants of IL-33 and its expression variation. 第34回日本分子生物学会年会 平成23年12月15日、横浜

[9] Tamemoto, H., Hayakawa, M., Kamoshita, N., Ozaki, H., Tominaga, S.: Localization of intracellular domain of ST2L. 第34回日本分子生物学会年会 平成23年12月14日、横浜

[10] Meehansan, J., Komine, M., Tsuda, H., Yano, S., Tominaga, S., Ohtsuki, M.: IL-33 is produced by normal human keratinocytes with environmental and inflammatory stimuli: A novel "alarmin" in the skin. *Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology*, Phoenix, Arizona, USA, May 4-7, 2011.

[11] Matsuyama, Y., Okazaki, H., Hoshino, T., Onishi, S., Ohto-Ozaki, H., Tamemoto, H., Tominaga, S., and Minota, S.: Sustained elevation of interleukin-33 in serum and synovial fluid is associated with a poor response of rheumatoid arthritis to anti-tumor necrosis factor therapy. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同年会 平成22年12月9日、神戸

[12] Ohto-Ozaki, H., Kuroiwa, K., Matsuyama, Y., Hayakawa, M., Tamemoto, H., and Tominaga, S.: Soluble ST2 attenuated the IL-33-induced M2 polarization of peritoneal macrophages. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同年会 平成22年12月8日、神戸

[13] Tamemoto, H., Ozaki, H., Kamoshita, N., Hayakawa, M., and Tominaga, S.: Ectodomain shedding of ST2L, a member of IL-1 receptor family. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同年会 平成22年12月8日、神戸

[14] Meehansan, J., Komine, M., Wakatabi, K., Tominaga, S., Ohtsuki, M.: Environmental stimuli up regulate IL-33 in normal human keratinocytes. *Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology*, Atlanta, Georgia, USA, May 5-8, 2010.

〔図書〕 (計1件)

[1] 早川盛禎、富永眞一 (2010) IL-33 の基礎とアレルギー性炎症の誘導 炎症と免疫 (Inflammation and Immunity) (先端医学社) Vol.18、No.6、p.15-20.

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

為本 浩至 (TAMEMOTO HIROYUKI)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90292630

小宮根 真弓 (KOMINE MAYUMI)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00282632

早川 盛禎 (HAYAKAWA MORISADA)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：30326847

(3) 連携研究者

()

研究者番号：