

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460393

研究課題名(和文) ST2の細胞増殖抑制効果発現機序の解明と抗がん作用の検証

研究課題名(英文) Study on the mechanism of cell growth regulation by ST2 and its possible anti-cancerous effect.

研究代表者

富永 眞一 (Tominaga, Shin-ichi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：70155571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ST2遺伝子は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クローニングされた。その構造がインターロイキン1受容体に類似しており、リガンドが炎症反応を惹起するIL-33であることから、免疫学的アプローチが主流であった。原点に立ち返りST2遺伝子産物及びそのリガンドIL-33がNIH-3T3線維芽細胞の増殖に及ぼす影響を調べたところ、IL-33については増殖開始過程を抑制するが、増殖開始後は増殖促進に働くことがわかった。一方で、分泌型ST2は当初の仮説に反して増殖を促進することがわかった。両者の相互作用が増殖に及ぼす影響については今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：The ST2 gene was originally identified as a gene induced during the initiation of cell proliferation. Since the products had a sequence very similar to the interleukin 1 receptor and IL-33 was found as a ligand inducing inflammatory responses, the major concern has been immunological aspect. In the present study, coming back to the original findings, we investigated the roles of IL-33 and ST2 in cell proliferation of NIH-3T3 fibroblastic cell line. IL-33 had dual functions, namely, a suppressive effect on the growth initiation of quiescent cells, and a growth-promoting effect on cycling cells. On the other hand, contrary to the initial hypothesis, soluble ST2 had a growth-promoting effect. The relationship between IL-33 and ST2 in terms of growth regulation remains to be elucidated in future.

研究分野：生化学

キーワード：ST2 IL-33 線維芽細胞 細胞増殖 NIH-3T3 cells シグナル伝達 分泌

1. 研究開始当初の背景

富永は 1980 年代後半に、休止期のマウス線維芽細胞に血清刺激を加えて細胞増殖を開始させる過程で、特異的に発現される遺伝子 ST2 (serum **ST**imulation-**2**) をクローニングした。その後この遺伝子から選択的スプライシングによって 2 つの分泌型 (ST2、ST2LV) と 2 つの細胞膜貫通受容体型 (ST2L、ST2V) 計 4 種類の産物ができることがわかった。cDNAs の構造解析からこれらはいずれもインターロイキン 1 (IL-1) 受容体に酷似した構造を持つことがわかり、IL-1 受容体ファミリーに分類された。

長らく不明であった受容体型 ST2L に対するリガンドが 2005 年に発見され、IL-33 と命名された。IL-33 が ST2L に結合してシグナルが伝わると、NF- κ B の活性化を通じて炎症反応が惹起される。一方で分泌型 ST2 については、我々が開発した ELISA 法を用いて様々な疾患をスクリーニングしてみると、気管支喘息発作時、特発性肺線維症増悪時、SLE 等自己免疫疾患増悪時、さらに急性心筋梗塞後にも血中の ST2 値が上昇し、寛解すると低下することがわかった。

この分泌型 ST2 の誘導の意義について調べてみると、ST2 が IL-33 と結合して、いわば"中和"する形で IL-33 の受容体 ST2L への結合を阻害してシグナル伝達が生じないようにさせ、抗炎症効果をもたらすことがわかった。

この発見が ST2 の免疫学的意義と病気への影響という視点に偏っていた我々を原点に立ち返らせてくれた。すなわち、細胞増殖開始過程で発現誘導される ST2 遺伝子産物が IL-33 との相互作用を通じて増殖に関与しているのか否かという疑問に立ち向かうことにした。

2. 研究の目的

(1) 細胞増殖の確かなアッセイ系の確立

細胞の増殖の制御は決して全か無かで

はなく、促進するにせよ抑制するにせよ、僅かな効果が最終的に大きな結果をもたらす。従って、増殖促進や増殖抑制を検出できる信頼性の高いシステムの開発が大前提となる。

(2) IL-33 の細胞増殖に及ぼす効果の検討

IL-33 が受容体型 ST2L と結合してシグナル伝達を行い、増殖を促進するのか抑制するのかを調べる。

(3) 分泌型 ST2 の細胞増殖に及ぼす効果の検討

ST2 が細胞増殖開始時期に発現されるのが、更に増殖を促進させるためなのか、自律的に増殖を抑制して無制限の細胞増殖 (がん化?) を防ぐためなのかを検証する。

(4) IL-33 と ST2 の細胞増殖における相互作用

IL-33 と ST2 がそれぞれ独立して働くのか、お互いが結合することによって最終的な効果が生じるのかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 細胞増殖の確かなアッセイ系の確立

ST2 クローニング時に用いた BALB/c-3T3 細胞がもはや使用できないので、休止期 (G₀ 期) に導入できることがわかっている NIH-3T3 細胞を用いた。少数の細胞からの増殖アッセイを行うので、培養液の呈色反応で測定できる WST-1 assay system を用いた。

(2) IL-33 の細胞増殖に及ぼす効果の検討

研究成果 (1) に記載した方法を用いマウス組換え IL-33 タンパク質を NIH-3T3 細胞外から加えて増殖に及ぼす効果を検討した。WST-1 法による結果の信頼性を確認するために別角度からの検証として細胞数の計測も必要と考え、ミリポアの Sceptor™ handheld automated cell counter を用いた。また、細胞死の影響の有無を検討するため、

JC-1 fluorescence 法と Annexin V index 法を用いた。

(3) 分泌型 ST2 の細胞増殖に及ぼす効果の検討

細胞増殖アッセイは(2)と同じ方法を用いた。ST2 遺伝子産物の効果を見るために、ST2 強制発現細胞と ST2L 強制発現細胞をヘルパーレトロウイルスプラスミド (MSCV-ires-Puro^R) による形質転換法によって得た。ST2 遺伝子産物については定量的 PCR 法で mRNA の発現を、Western Blotting 法でタンパク質の発現を、それぞれ確認した。増殖促進効果が得られた場合には、shRNA を用いた RNA 干渉法で増殖促進効果が低下するか、さらに MSCV-ires-Puro^R を用いて ST2 遺伝子産物を補充した時に元に戻るかを検討した。

(4) IL-33 と ST2 の細胞増殖における相互作用

NIH-3T3 細胞の増殖曲線について、IL-33 と ST2 を同時に強制発現させた細胞と、それぞれ単独に強制発現させた細胞とを比較検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖の確かなアッセイ系の確立

個体、組織のように様々な細胞が混在する系ではある因子の増殖に対する効果を正しく判定できないので、均一の細胞 (マウス NIH-3T3 細胞) を用いた細胞培養系で検討することにした。加えた因子が増殖に影響を与えるか否かを見る上で重要なのは、細胞自体は健康であることである。この NIH-3T3 細胞は血清を添加しないと状態が悪くなる。一方で血清中には増殖因子が含まれ、これが過剰にあると加えた因子の効果が見えなくなる恐れがある。予備実験を重ねた結果、5% FBS (牛胎児血清) が最適の条件であった。また増殖中の細胞を使った予備実験では

IL-33 も ST2 も効果が見えなかったので、ST2 をクローニングした時と同様に一旦休止期 (G₀ 期) に導入し同期させた後、血清刺激で増殖を開始させるシステムとした。

NIH-3T3 細胞は接触阻止現象によって増殖が停止するので、増殖促進もしくは抑制を検出するためには、細胞周期を数回繰り返させる必要がある。そのため最初の播種率は 1 : 20 と小さくした。したがって細胞剥離、計数操作は不正確になるので、細胞には侵襲を加えずに培養液の呈色反応で測定できる WST-1 法を用いることとした。吸光度が 2 を超えると直線性が失われるので、WST-1 との反応時間は 1 ないし 2 時間とした。これらの条件で、各実験ごとに凍結保存してある細胞を解凍し、2 日後に 1 : 10 で播き 5 日間 DME + 5% FBS で培養して G₀ 期に導入した後、24 well plate に 1 : 20 で播く。1 日ごとに 6 日間 WST-1 法を行って細胞増殖曲線を描くシステムを確立した (図 1)。



図1: 細胞増殖アッセイ法

(2) IL-33 の細胞増殖に及ぼす効果の検討

IL-33 は細胞増殖に関して複雑な効果を発揮した。G₀ 期に導入した NIH-3T3 細胞を IL-33 で前処理すると、図 2 の太線で示すように播種後の増殖開始過程が抑制された。

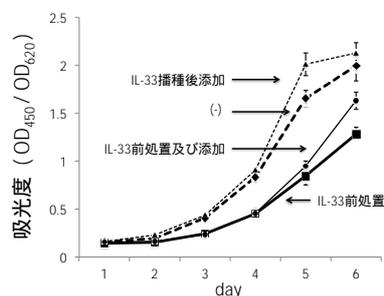


図 2: IL-33 の増殖促進効果と増殖抑制効果

一方で、NIH-3T3 細胞を播種した後で IL-33 を添加すると増殖は促進された (図 2 の細線)。

さらに細胞増殖抑制効果は細胞死とは関係ないことを2つの手法で確認した。また念のためWST-1法の結果は実際の細胞数計測結果とよく符合することも確認した。すなわちIL-33には増殖促進効果と増殖抑制効果、両者が存在することがわかった。IL-33の細胞増殖抑制効果は初めての発見である。

(3) 分泌型 ST2 の細胞増殖に及ぼす効果の検討

ST2 を強制発現させた細胞では、野生型細胞に比べて増殖が促進されていた。一方、ST2L 強制発現細胞と野生型細胞では増殖曲線に差がみられなかった (図3)。

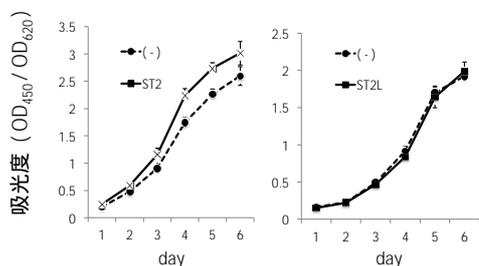


図3: ST2常時発現細胞の増殖促進

この効果が細胞内で産生されているST2タンパク質によるものか、一旦分泌されて外から作用しているのかを検討するため、ST2タンパク質を精製して培地中に加えてみると、やはり増殖促進効果がみられた (図4)。

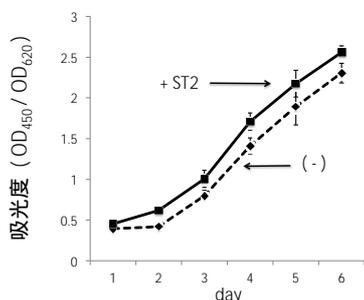


図4: 精製ST2添加による増殖促進

ここまでの実験の弱点は、野生型 NIH-3T3 細胞でも、増殖開始過程で ST2 が誘導され細胞外に分泌されるので、外から加えた ST2 の

効果は増殖開始過程早期に限定されるといふ点である。従って次に shRNA 法を用いて ST2 をロックダウンする方策をとることにした。残念ながら ST2 と ST2L の共通部分 (細胞外部分、図5) にしか至適な標的配列がなく、両者ともに発現が抑制されることとなった。ST2、ST2L どちらが増殖促進効果を持つか検討するために ST2 遺伝子産物をロックダウンした細胞にさらに shRNA の標的とならない変異型塩基配列 (図5) を持つウイルスベクターをトランスフェクションし、回復実験を行った。

標的配列: (876-894)

A AGG ATA ACT GGT GTG ACA (野生型)
 R I T G V T (アミノ酸配列)
 A AGA ATC ACA GGA GTC ACA (変異型)

図5: 同じアミノ酸配列をコードするがロックダウンされない変異塩基配列

その結果、図6に示すように分泌型 ST2 を補充すると増殖が回復するが、ST2L を補っても増殖の回復はみられなかった。これらの結果を総合すると、分泌型 ST2 が NIH-3T3 細胞の増殖を促進する効果を持つことがわかった。

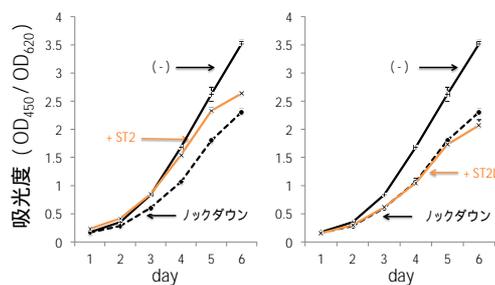


図6: ST2 補充による増殖の回復

(4) IL-33 と ST2 の細胞増殖における相互作用

IL-33 が増殖促進効果と増殖抑制効果を持ち、分泌型 ST2 が増殖促進効果を持つことがわ

かったので、両者の相互作用の有無を調べるため、強制発現細胞の比較検討を行ったが、現在までに有意のデータは得られていない。解決すべき今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Tominaga, S., Tago, K., Tsuda, H., and Komine, M. (2015) Dual function of IL-33 on proliferation of NIH-3T3 cells. *Cytokine* **72**, 105-108.

DOI:10.1016/j.cyto.2014.12.004 査読有

Tominaga, S., Ohta, S., and Tago, K. (2016) Soluble form of the ST2 gene product exhibits growth promoting activity in NIH-3T3 cells. *Biochem. Biophys. Rep.* **5**, 8-15. DOI:10.1016/j.bbrep.2015.11.020 査読有

Hayakawa, H., Hayakawa, M., and Tominaga, S. (2016) Soluble ST2 suppresses the effect of interleukin-33 on lung type 2 innate lymphoid cells. *Biochem. Biophys. Rep.* **5**, 401-407. DOI:10.1016/j.bbrep.2016.02.002 査読有

〔学会発表〕(計16件)

Hayakawa, H., Hayakawa, M., Ohto-Ozaki, H., and Tominaga, S.: Soluble ST2 controls allergic inflammation in a murine model of asthma. *Experimental Biology 2013, Boston, U.S.A., April 19-24, 2013.* (C-402, 835.4)

為本浩至、富永眞一、島生乃、渡部肇：糖尿病患者の血清 HMGB-1 値と肝機能。第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、熊本、2013 年 5 月 16 日-18 日。(糖尿病 56 Suppl. 1, S-436)

鴨下信彦、富永眞一、中島信彦：昆虫 RNA

ウイルス遺伝子間領域の翻訳機構

(Termination readthrough of intergenic region of dicistrovirus, *Plautia stali* intestine virus) 第 15 回日本 RNA 学会年会、松山、2013 年 7 月 25 日 (演題番号 P-12)

早川盛禎、早川裕子、柏田正樹、鴨下信彦、為本浩至、富永眞一：IL-33 は線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を調節する。第 86 回日本生化学会大会要旨集 1T11a-02(1P-214) (第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日、横浜)

岡本一飛、多胡めぐみ、早川盛禎、富永眞一、笠原忠：Th2 様に分化させた EL-4 細胞における IL-33/ST2L シグナル伝達機構の解析。第 86 回日本生化学会大会要旨集 2P-276(第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 12 日、横浜)

Tamemoto, H., Hayakawa, M., Kamoshita, N., Endo, H., Tominaga, S.: Association of Txnip with PRMT5. 第 86 回日本生化学会大会要旨集 2LBA-002 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日、横浜)

鴨下信彦、為本浩至、早川盛禎、富永眞一：ヒトメラノサイトにおける ST2 スプライスバリエント ST2V2 の発現と解析。第 86 回日本生化学会大会要旨集 3P-372 (第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 13 日、横浜)

鴨下信彦、富永眞一：DNA から IRES 依存性ジシストロニック RNA を発現させる系の構築。第 61 回ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 11 日 (演題番号 P2-068)

鴨下信彦、富永眞一、中島信彦：培養細胞と無細胞翻訳系を用いた昆虫 RNA ウイルスの翻訳終止コドンリードスルーの解析。第

87 回日本生化学会大会 3P-351(4T15a-01)
(第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月
17、18 日、京都)

早川盛禎、早川裕子、富永眞一：
Interleukin-33 は TGF- β /Smad シグナル伝
達経路の活性化を抑制する。第 87 回日本生
化学会大会 4P-286(第 87 回日本生化学会大
会、2014 年 10 月 18 日、京都)

H. Hayakawa, M. Hayakawa, S.
Tominaga: Soluble ST2 suppresses the
effect of IL-33 on type 2 innate lymphoid
cells. 第 37 回日本分子生物学会年会
1P-0729 (第 37 回日本分子生物学会年会
2014 年 11 月 25 日、横浜)

津田英利、小宮根真弓、大塩智之、富永
眞一、大槻マミ太郎：ケラチノサイトにおけ
る IL-33 のノックダウンは細胞分裂を抑制す
る。第 37 回日本分子生物学会年会 3P-0413
(第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11
月 27 日、横浜)

H. Hayakawa, M. Hayakawa, S.
Tominaga: Effect of Soluble ST2 on
Activation of Type 2 Innate Lymphoid Cells
in a Murine Model of Asthma. **30th
Congress of the International Society for
Advancement of Cytometry (Cyto 2015)**,
Glasgow, UK, June 26-30 2015. (Program
Book 168/B37)

津田英利、小宮根真弓、富永眞一、大槻
マミ太郎：IL-33 は表皮角化細胞核内で細胞
分裂に関与している。第 38 回日本分子生
物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合
同大会 (BMB2015) 1P-0122 (第 38 回日本
分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大
会 合同大会 2015 年 12 月 1 日、神戸)

早川盛禎、早川裕子、大森司、富永眞一：
分泌型 ST2 はアトピー性皮膚炎における皮
膚炎症を軽減する。第 38 回日本分子生物学
学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大
会 (BMB2015) 3T 特-04、3P-1128 (第 38
回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生
化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 3 日、神
戸)

鴨下信彦、富永眞一、中島信彦：ジシス
トロウイルス PSIV 遺伝子間領域の RNA 配
列と終止コドンリードスルー。第 38 回日本
分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大
会 合同大会(BMB2015)3T25-03、3P-0737
(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日
本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 3
日、神戸)

〔図書〕(計 1 件)

富永眞一 (2015) IL-33 受容体 ST2L と分
泌型 ST2 医学のあゆみ (医歯薬出版)
Vol.252、No.12、p. 1193-1196.

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

多胡 憲治 (TAGO KENJI)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：20306111