

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460376

研究課題名(和文) ST2タンパク質(分泌型IL-33受容体)によるLPSシグナル阻害機構の解明

研究課題名(英文) Investigation on inhibitory mechanism of soluble ST2 protein (secreted IL-33 receptor) against LPS signal

研究代表者

柳沢 健 (Yanagisawa, Ken)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50182366

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)：IL-33の受容体(ST2L)の細胞外部分に相当する分泌型タンパク質のST2のLPS作用の阻害機構を検討した。ST2はLPSのLPS受容体への結合を阻害しなかった。LPS受容体複合体を構成するTLR4, CD14, MD2の各個とはST2は結合せず、受容体複合体の高次構造が結合に必要なことが示唆された。さらに、IL-33がST2を介さない機構でRasによる細胞の形質転換に必須であることを報告した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of inhibitory effect of soluble ST2 protein, which is the extracellular domain of IL-33 receptor (ST2L protein), against the LPS signal transduction. ST2 protein did not inhibit the binding of LPS with LPS receptor. Each component of LPS receptor complex, TLR 4, CD14 and MD2, did not show the binding with ST2 protein, and each combination of two components of above also failed to bind with ST2, which suggests higher structure of LPS receptor complex is required for the binding with ST2. Furthermore, We found novel proteins such as IFITM3 which bind with ST2L protein, and IL-33 is indispensable for the cellular transformation by Ras independent of ST2 protein, and IL-33 promotes the translation of cyclin D.

研究分野：生化学

キーワード：ST2 LPS シグナル伝達 細胞がん化

1. 研究開始当初の背景

われわれはIL-1受容体類似のST2Lタンパク質遺伝子をクローニングし(Yanagisawa *et al.* **FEBS Lett.** 1993) それは以後メンバーを増やしていくIL-1受容体ファミリー発見の嚆矢となった。ST2Lには、スプライシングバリエーションで細胞外部分に相当する分泌タンパク質ST2が存在し、私達はそれらST2遺伝子産物がリンパ球系ではTh2ヘルパーT細胞に特異的に発現している事を明らかにし、液性免疫への関与を最初に提示した。(Yanagisawa *et al.* *J. Biochem.* 1993)

2005年にIL-33がST2Lのリガンド

であることが報告され(Schimitz *J. et al.* **Immunity** 2005) IL-33の作用はTh2細胞の活性化と液性免疫の亢進、炎症反応の活性化等であり、喘息等の病態にも関与することが明らかとなった。われわれもIL-33が血管内皮細胞に作用し、IL-6、IL-8の分泌を亢進させる事を明らかにした(Aoki, *et al.* **Mol. Cell. Biochem.** 2010)。

また、ST2タンパク質の血中濃度が、喘息、膠原病、リウマチ性関節炎、心筋梗塞、潰瘍性大腸炎などの患者で上昇することがわれわれを含めた多数のグループより報告されており、特に近年は、心筋梗塞や心不全、高血圧、敗血症、糖尿病等のバイオマーカーとして近年注目を受けている。

われわれは、ST2タンパク質が、単球系の細胞に対するLPSの作用を抑制する事を報告したが(Takezako, *et al.* **Biochem Biophys Res Commun.** 2006) その後、単球系細胞がLPS刺激により樹状細胞(DC)に分化する系で、やはりST2タンパク質がLPSの作用を抑制し、分化を阻害する事を見いだすとともに、抹消血単球由来の未熟樹状細胞(iDC)を用いて、ST2タンパク質がIL-33非依存的にLPS刺激を阻害し、LPS受容体複合体を発現する細胞の表面にST2タンパク質が結合することを報告し(Nagata, *et al.* **Cell. Mol. Immunol.** 2012)、次にその機構の解明に着手した。

2. 研究の目的

- (1) ST2タンパク質のLPSシグナル伝達に対する阻害機構を解明する。
- (2) ST2タンパク質の結合タンパク質をさらにスクリーニングする。
- (3) ST2遺伝子の血清による誘導機構を検討する。
- (4) ST2と結合するIL-33タンパク質の細胞内シグナルに対する作用を検討する。

3. 研究の方法

- (1) ST2タンパク質がLPSの受容体への結合を阻害しないか検討する。
LPSの結合とシグナル伝達がよく健乙されているTHP-1細胞と、HEK293細胞にLPS受容

体複合体を強制的に発現したHEK-TLR4/CD14/MD2細胞を用いて、放射線ラベルしたLPSを用い、インキュベートした後オリブオイル/N-ブチルフルタル酸のクッションを通し、細胞に結合したLPSを計測する。

(2) ST2タンパク質とLPS受容体複合体の結合機構の解明；

LPS受容体複合体を構成する、TLR4、CD14、MD2をそれぞれNIH3T3細胞に強制発現させ、共発現させたST2タンパク質、あるいはリコンビナントST2タンパク質を加え、免疫沈降法で結合タンパク質を検討する。

(3) ST2タンパク質に結合するタンパク質のスクリーニング；

FLAGタグを付加したST2タンパク質、あるいはST2Lタンパク質とHisタグをつけたIL-33タンパク質を共発現させ、細胞を可溶化し抗FLAG抗体とニッケルアガロースでST2またはST2Lタンパク質を分離する。共沈してきたタンパク質をSDS-PAGEで分離し、染色し検出したタンパク質を溶出し、MALDI-TOF-質量分析計で同定する。

(4) ST2遺伝子の血清による誘導機構を検討；

ヒトとマウスのST2遺伝子のプロモーター領域を検討し、転写因子結合モチーフの検討を行い、その領域の欠損が転写誘導に重要かレポーター遺伝子を用いて検討する。さらに候補の転写因子の強制発現、または阻害剤を用いた実験で、そのモチーフの重要性を検討する。

(5) ST2と共に細胞増殖に関与するとされるIL-33の検討；

IL-33をNIH3T3線維芽細胞に強制発現させ、またshRNAによる発現抑制を行い、がん化を持つRas変異体のフォーカス形成能、あるいは軟寒天培地中のコロニー形成能に対する影響を検討する。さらに、ST2タンパク質のそれに対する作用、また、MAPキナーゼやサイクリンD合成に対する作用を検討する。

4. 研究成果

(1) ST2のLPSシグナルに対する阻害作用の検討；

LPS受容体複合体を構成する3つのタンパク質、TLR4、CD14、MD2を強制発現させたHEK293細胞、またはLPSが作用することが知られているTHP-1細胞に対する結合能を測定し、それに対するST2タンパク質の効果を検討したが、LPSの結合には変化は見られず、ST2はLPSの受容体への結合阻害により阻害作用を及ぼす訳ではないことが示唆された。

次に、LPS受容体複合体とST2タンパク質の相互作用を検討するため、

TLR4, CD14, MD2 のそれぞれを強制発現させ、免疫沈降法により ST2 タンパク質との結合を調べたが、単独のタンパク質では ST2 タンパク質の結合は見られなかった。さらに、上記の組み合わせ、TLR4 と CD14、TLR4 と MD2、CD14 と MD2 を強制発現させ検討したが、いずれも ST2 との結合を検出できなかった。これより、可能性として TLR4, CD14, MD2 の受容体複合体の高次構造が ST2 の結合に必要なことが示唆され、今後検討する予定である。

ST2 は 3 つの免疫グロブリン様ドメインからなる分泌タンパク質であり、他グループの報告では IL-33 との結合には 1 番目と 3 番目のドメイン (IG1 と IG3) が重要であるという報告がある。われわれも ST2 の種々の欠損変異体を構築し、発現を試みたが、その分泌には N 末のシグナルペプチドの他に、IG3 の一部が重要であるという結果が得られた。

(2) ST2 結合タンパク質の検討；

幾つかのタンパク質が同定されたが、確度の高いものとして以下のものが同定された。

A) ST 2 結合タンパク質

1. Parlecan
2. フィブロネクチン
3. IGF-II 受容体 (カチオン非依存性 M6P 受容体)

B) ST2L 結合タンパク質

1. IL-1R accessory protein
2. Rps27a (Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a)
3. IFITM3
4. WD repeat-containing protein 90
5. Retinitis Pigmentosa 1-like 1

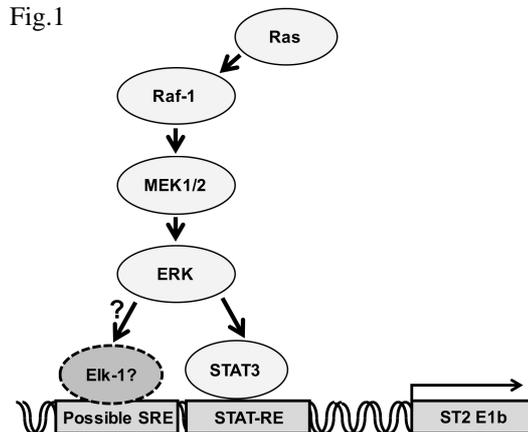
ST2 との結合が示された Parlecan は ST2 タンパク質がヘパリンセファロースに結合することから、糖鎖を介しての結合である可能性がある。また、ST2L 結合タンパク質のうち、IL-1R accessory protein は既知の IL-33 受容体複合体を構成するタンパク質である。この中でわれわれが解析を進めているものは IFITM3 である。このタンパク質はインターフェロンのシグナルに関わる分子として見出されていたが、NIH3T3 細胞では、IFITM3 が ST2L と結合して ST2L のターンオーバーを促進し、ST2L の発現量を減少させることが判明した。またその為と考えられるが、IFITM3 が IL-33 のシグナル伝達を阻害することが判り、IFITM3 が新たな自然免疫系、あるいは液性免疫系を負に調節している可能性が明らかとなった。また、もう一つの ST2L 結合タンパク質である Rps27a はユビキチンのドナーとなるタンパク質であり、Rps27a と ST2L を共発現させると ST2L のユビキチン化が亢進することが判明したが、その

生理的意義については不明である。

(3) ST2 遺伝子の血清誘導機構の検討；

われわれは ST 2 遺伝子の近位プロモーター領域、転写開始点から -100 付近で、ヒトとマウス双方に STAT 結合モチーフに類似した配列を見出し (Fig. 1)、その領域が血清による発現上昇に不可欠であることを明らかにした。さらに ST2 の発現誘導には、STAT3 の恒常的活性型を強制発現させた時、強く発現上昇をもたらすことと、MEK1/2 と STAT3 の阻害剤によりプロモーター活性が抑制される結果が得られ、Ras のシグナル伝達の下流にある ERK の活性化と STAT3 が重要であることを発見した (Fig. 2)。

Fig.1



(4) IL-33 の細胞内機能

上述のように血清刺激で G1/S 移行期に発現誘導される ST2 タンパク質は線維芽細胞の細胞増殖を促進するが、その機構は不明であり、LPS 受容体との相互作用の関与も不明である。われわれは、ST2 結合性を持つ IL-33 が ST2 の増殖促進に関与するか検討する中で、IL-33 が変異型 Ras による NIH3T3 細胞の形質転換に必須であることを見出した。

Fig. 2 は IL-33 の過剰発現が活性型 Ras による線維芽細胞のフォーカスフォーメーションを促進していることを示しており、

Fig.2

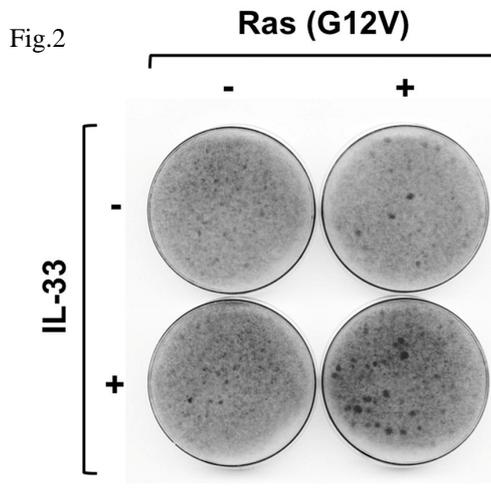
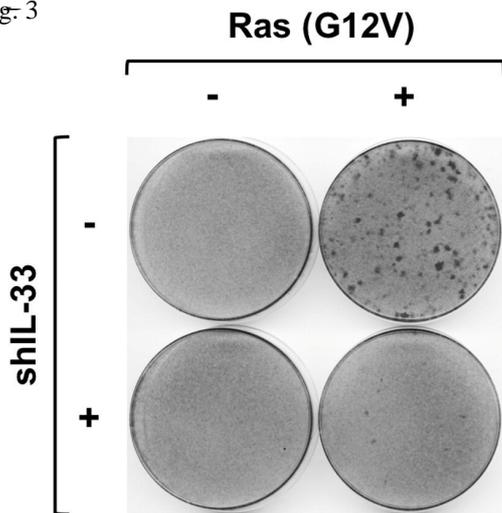


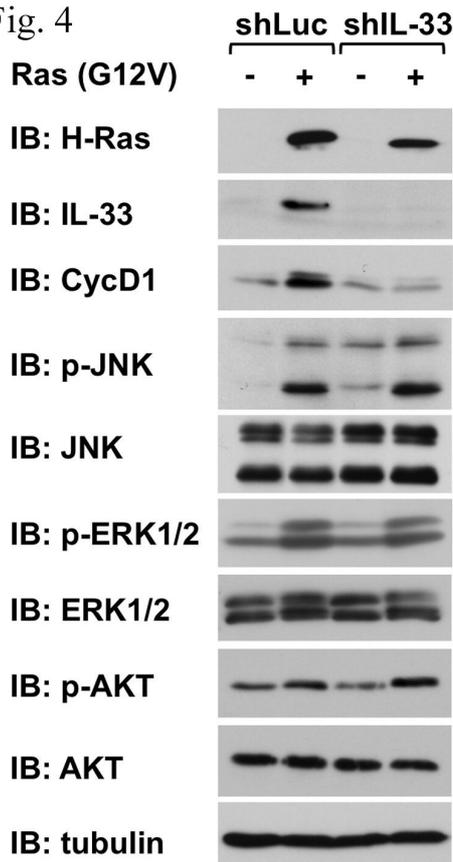
Fig. 3はshRNAによるIL-33の発現減少によりRasのトランスフォーメーション能が阻害されていることを示している。

Fig-3



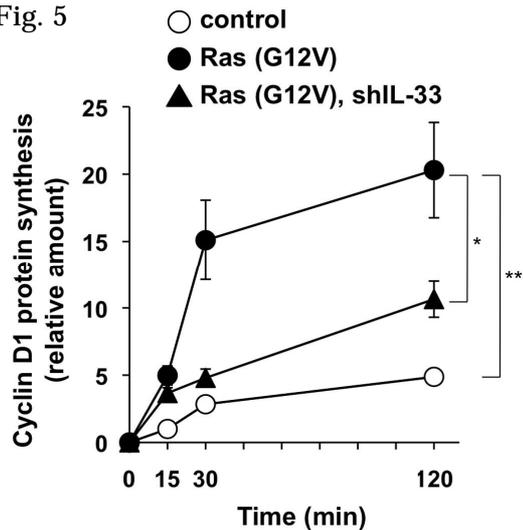
IL-33がRasによる線維芽細胞の形質転換に必要とされるメカニズムを検討するため、種々の細胞内シグナル伝達系の検討を行ったところ、Rasの下流にあるとされる主なシグナル系のMAPキナーゼ系やAKTなどは影響を受けていないが、サイクリンDタンパク質の発現がIL-33をノックダウンすると著減することが判明した(Fig. 4)。

Fig. 4



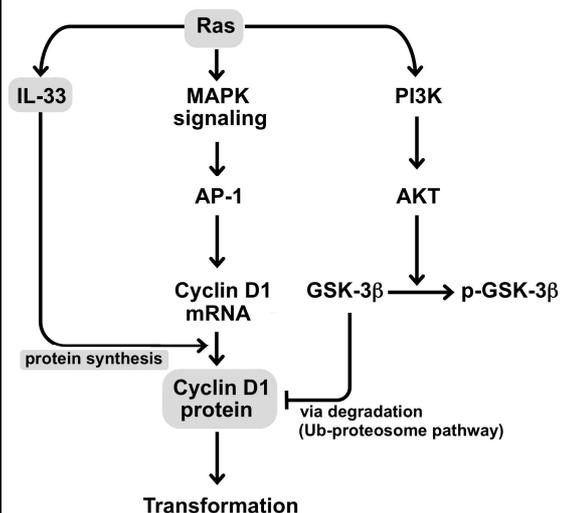
このサイクリンDの発現量の調節メカニズムを検討すると、転写レベルの調節でもなく、プロテアソームを介した、タンパク質分解系による調節も関与していなかった。放射線ラベルしたメチオニンの取り込み実験より、IL-33はサイクリンDの翻訳レベルを調節していることが示唆された(Fig.5)。

Fig. 5



また、これらの作用はST2タンパク質に依存していないことが示唆された。IL-33は以前より、サイトカインとしての機能の他に、核内での機能が報告されていたが不明な点が多かった。われわれの発見は、IL-33がサイクリンDの翻訳を調節することで細胞増殖や細胞がん化に関与していることを明らかにした(Fig.6)。

Fig. 6



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 2 件)

(1) K. Tago, S. Ohta, M. Funakoshi Tago, C. Aoki Ohmura, J. Matsugi, S. Tominaga, K. Yanagisawa; STAT3 and ERK pathways are involved in cell growth stimulation of the ST2/IL1RL1 promoter. FEBS Open Bio. 2017, 7(2), 293-302.

(2) S. Ohta, K. Tago, M. Funakoshi-Tago, J. Matsugi, K. Yanagisawa; Intracellular NF-HEV/IL-33 harbors essential roles in Ras-induced cellular transformation by contributing to cyclin D1 protein synthesis. Cell. Signal. 2016, 28(8), 1025-1036.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 太田 聡、多胡 憲治、多胡めぐみ、松儀実広、柳澤 健 : IL-33 前駆体は、がん化型 Ras 変異体が誘導する形質転換とサイクリン D1 のタンパク質合成に必須の役割を担う。第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会(神戸) 2015 年 12 月 1 日

(2) 多胡 憲治、多胡めぐみ、太田 聡、松儀実広、柳澤 健 : 新規 IL-33 シグナル調節蛋白質 IFITM3 の同定。第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会(神戸) 2015 年 12 月 2 日

(3) 太田 聡、多胡 憲治、多胡めぐみ、松儀実広、柳澤 健 : IL-33 は、がん化型 Ras 変異体が誘導する形質転換とサイクリン D1 の発現に必須の役割を担う。第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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

太田 聡 (OHTA, Satoshi)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 40528428

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()