

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461494

研究課題名(和文) IL33受容体ST2遺伝子の発現制御によるアレルギー反応の抑制

研究課題名(英文) Inhibitory effect of allergic reaction by IL33 receptor ST2

研究代表者

前田 啓子 (MAEDA, Keiko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：20053374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー炎症反応を抑制することが期待されるデコイレセプター可溶性IL33レセプターsST2の産生メカニズムについて検討した。マスト細胞においてsST2はIL33、抗原刺激により産生されるが、抗原刺激においてはIL33刺激とは異なり脱顆粒と同時に細胞外に放出され、タンパク質合成を阻害した細胞からも産生されることが明らかになった。この結果からsST2は顆粒内に貯蔵され脱顆粒により放出される可能性が示唆された。また、アレルギー、炎症性疾患で増加するsST2の役割を解析するためsST2遺伝子欠損マウスの解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：Soluble ST2, a spliced variant of IL33 receptor ST2, was released from lymphocytes of allergy or inflammatory diseases. It is reported that sST2 act as a decoy receptor for IL33 and modulates IL33 activity, and the level of sST2 in sera was elevated in heart failure and play as a biomarker. Although sST2 is elevated in sera of patients, the mechanisms of release from cells remains unclear. We have investigated how mouse mast cells release sST2 protein from cytosol under antigen stimulation. When mast cells were pretreated with protein synthesis inhibitor and degranulated, they released sST2 and granule, simultaneously. Immunofluorescent analysis showed that CD63, degranulation marker, and ST2 in cytosol are migrated to cell surface by antigen stimulation. These data suggested that sST2 protein is stored in granule and others, and release from cells by stimulation.

研究分野：免疫学

キーワード：IL33受容体ST2 アレルギー マスト細胞

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患は遺伝的要因と環境要因が複雑に絡む免疫反応により発症すると考えられている。そこで遺伝的要因からのアプローチとしてアレルギー疾患で重要な役割を果たすと考えられるマスト細胞、好塩基球、樹状細胞を材料に IgE 高親和性受容体 (FcεRI)、幹細胞増殖因子受容体 (c-kit, CD117) の転写調節について解析、さらに遺伝子多型と発現調節との関連について検討を行ってきた。マウスマスト細胞の IgE 受容体を構成しその細胞表面への発現に必須であるβ鎖の発現調節には血球系特異的な転写因子 GATA1 と共役因子 FOG1 が必要であること、マスト細胞の分化に必要である c-kit (CD117) の発現調節には GATA2、Sp1 が必要であることを明らかにしアレルギー関連分子の発現について解析を行ってきた。また遺伝的要因としてプロモーター領域の SNP に注目して解析を進めヒトアトピー性皮膚炎の発症と相関があると考えられる FcεRI α鎖の発現においては GATA1 の遺伝子に対する親和性が SNP により変化すること、さらに近傍にある SNP に結合する転写因子 HNG1/2 が協調的に作用して GATA1 の転写活性を増加させることを明らかにした。さらにヒト FcεRI α鎖の発現においてはさらに上流のプロモーター領域にある SNP がある転写因子 YY1 配列、β鎖の発現にも YY1 配列の SNP が転写活性に影響をあたえることを報告し転写調節がアレルギー疾患の発症において重要であることを示した。

他方アレルギー疾患において炎症の抑制も大きな課題である。近年炎症に關与する重要なサイトカインとして IL33 とその受容体である ST2 についての解析が多く行われている。IL1ファミリーのサイトカインである IL33 は線維芽細胞、血管内皮細胞などの核内に転写因子として存在するが感染や障害による細胞壊死により細胞外にアラミンとして放

出されるとマスト細胞、樹状細胞、好塩基球、好酸球、Th2 細胞、Treg 細胞などの表面に発現する IL33 受容体 ST2 に結合しサイトカイン、ケモカイン産生を促し炎症反応を惹起する。ST2 遺伝子にはアトピー性皮膚炎、喘息、アレルギー性鼻炎などと相関のある遺伝子多型があることが報告されていたが、日本人のアトピー性皮膚炎患者においても健常人との間に相関が認められアレルギー疾患の遺伝的要因の一端が明らかになった。ST2 遺伝子は膜結合型 ST2 (ST2L) と可溶性 ST2 (sST2) の両者をスプライシング変異体として発現し、細胞表面に発現する ST2L は IL33 との結合により IL1RAcP、MyD88 などとレセプター複合体を形成して細胞内にシグナルを伝達し Th2 細胞、NK 細胞などからは IL4、IL5、IL13 などの Th2 タイプサイトカイン、マスト細胞、好塩基球、好酸球などからはさらに IL6、TNFα などの炎症性サイトカイン、ケモカインの産生を促しアレルギー反応を惹起する。マウス腹腔内に IL33 を投与するとマスト細胞からサイトカインが産生され好中球などの浸潤により炎症が引き起こされるが ST2 欠損マウスのマスト細胞を移入しても炎症は起こらなかったことからマスト細胞、ST2 が炎症反応において重要であることが解る。そこでヒトマスト細胞、好塩基球の ST2L の発現を低下させ IL33 によるシグナルを阻害する目的で発現を調節する転写因子について解析した。その結果、転写因子 GATA2 が発現調節に關与しヒト末梢血中の好塩基球を用いた実験においても GATA2 の発現低下が ST2L の発現を抑制することが明らかになり ST2L の発現調節がアレルギー反応の抑制に有用であることが示唆された。

一方 sST2 は ST2L タンパク質の細胞膜結合および細胞質内のドメインを欠失したたんぱく質として発現し細胞外に放出されるため細胞外に存在する IL33 と結合することが出来る。sST2 を高発現するトランスジェニック

マウスの解析から sST2 は IL33 と細胞表面に発現する ST2L への結合を阻害するデコイレセプターとして作用しアレルギー反応、炎症反応を抑制することが出来ると推定されている。しかし sST2 発現を特異的に調節する転写因子、プロモーター領域の解析については不明な点が多く残されている。さらに喘息、自己免疫疾患、心筋梗塞などの患者血清中では sST2 に増加傾向が認められ、このことからこれら疾患のバイオマーカーとしての有用性が報告されているが、心筋梗塞後の心筋肥大と心不全の抑制に関与するとの報告もあり生理的な役割やこれらの疾患との相反する現象をどのように解析するかは重要な課題である。したがって、sST2 の発現、役割を明らかにすることはアレルギー疾患、炎症反応の治療、予防に有用であり基礎のみならず臨床医学でも貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では IL33 受容体 ST2L の発現制御およびデコイレセプターとされる sST2 によるアレルギー反応の抑制を目的にマウスマスト細胞を用いて研究を行う。sST2 は IL33 などの刺激により細胞内にシグナルが伝達されマスト細胞、好塩基球などから細胞外に産生され同時に IL6、TNF α などのサイトカイン、ケモカインも産生され炎症が惹起される。アレルギー反応を抑制するためには sST2 を特異的に産生させて IL33 の受容体への結合を阻害することが重要と考えられるが sST2 はその他の自己免疫疾患、心筋梗塞などの疾患によっても産生が増加し sST2 の産生メカニズム、役割については不明な点が多く存在する。そこでマウスマスト細胞を用いて様々な刺激による sST2、サイトカインの産生の違いと阻害効果、細胞外に放出されるメカニズムについて解析する。

3. 研究の方法

(1) マウスマスト細胞(BMMC) : マウス骨髄

細胞を IL3、幹細胞因子(SCF)存在下で 4 週間以上培養しマスト細胞として使用した。

- (2) sST2-Fc の調整 : sST2-Fc/PME18s を感染させた 293T 細胞の培養上清から精製した。
- (3) sST2、サイトカイン定量 : 細胞の培養上清を Quantikine ELISA ST2、IL6、TNF α (R & D Systems)により定量した。
- (4) 定量的 PCR(qPCR) : RNeasy micro kit (Qiagen) により 総 RNA を抽出し Thunderbird Probe qPCR Mix (Toyobo) を用いて cDNA を合成した。特異的 RNA の発現は TaqMan プローブ (Appliedbiosystems)を用い $\Delta\Delta Ct$ 法により定量を行った。
- (5) フローサイトメーター解析 : 細胞内染色は Intracellular cytokine staining protocol(Biolegend)により PE 標識抗 ST2 抗体、抗 TNF α 抗体を用いて行った。
- (6) トランスフェクタントの作製 : マウス骨髄細胞に レトロネクチン(Takara)を用いて FLAG-sST2/PMX-IP を感染させピューロマイシンで選択後 sST2 トランスフェクタント(FLAG-sST2/BMMC)として使用した。
- (7) 蛍光顕微鏡観察 : 抗 CD63 抗体、抗 FLAG 抗体により染色後観察した。

4. 研究成果

- (1) IL33/ST2 シグナルを阻害することによりサイトカイン産生は低下した : sST2 による IL33/ST2 シグナルの阻害効果を検討するため sST2-Fc を作製し BMMC 培養上清に加えた後 IL33 を加え産生されるサイトカインを ELISA により測定した。その結果 IL33 刺激 BMMC による IL6、TNF α 産生は sST2-Fc による阻害効果により低下することが確認された。NF κ B、MAPK などのシグナル阻害剤を用いて sST2 合成に関与するシグナルについて検討した結

果、NF κ B シグナルを阻害することにより sST2 産生は低下した。以上の結果より IL33/ST2 シグナルを阻害することによりサイトカイン産生は低下し炎症反応を低下させることは期待できるが sST2 産生のみを増加させることが必要であり sST2 産生のメカニズムについてさらに検討することが重要である。

- (2) sST2 産生は IL33、抗原刺激により増加した：BMMC における sST2 産生について検討するため BMMC をイオノマイシン、LPS、IL33、抗原、SCF により刺激し培養上清に産生される sST2、TNF α 、IL6 濃度を ELISA により測定した結果、それぞれ濃度依存的に sST2、TNF α 、IL6 産生が増加した。sST2 産生に関して SCF は IL3 と協調的に作用し、さらに IL33 と抗原刺激も協調的に作用して sST2 産生を増加させた。sST2 の IL33 刺激による培養上清への産生は刺激後 1-2 時間から 4-5 時間まで徐々に増加したが、抗原刺激の場合は 1-2 時間まで急速に増加した。しかし細胞表面の ST2L の発現についてフローサイトメーター解析した結果、発現に変化は認められなかった。次に qPCR により IL33、抗原刺激による sST2 mRNA 合成について検討した。sST2 mRNA は刺激後時間経過により増加するが、IL33 刺激による sST2 mRNA は刺激後 1 時間から 4-5 時間徐々に増加しその後上清中の sST2 が徐々に増加していた。一方で抗原刺激による mRNA の増加は IL33 とは異なり刺激後 1 時間で mRNA が急速に増加し同時に細胞培養上清中でも sST2 濃度の増加が認められた。sST2 mRNA 合成と細胞外への放出がほとんど同時に起こることから sST2 が細胞内にたんぱく質として貯蔵され抗原刺激による脱顆粒と同時に細胞外に放出されている可能性を示していた。
- (3) sST2 産生のメカニズム：sST2 の細胞外へ

の放出のメカニズムについて明らかにするため FLAG と sST2 の融合タンパク質 (FLAG-sST2) を過剰発現させたマウス培養マスト細胞 (FLAG-sST2/BMMC) を作成し検討した。FLAG-sST2/BMMC を IL33、抗原で刺激すると BMMC と同様に培養上清中の sST2、IL6、TNF α の産生が増加し、抗 FLAG 抗体による細胞内染色においても FLAG-sST2 の発現が確認された。FLAG-sST2/BMMC を抗原刺激すると約 1 時間後 β -ヘキソミニダーゼの放出が認められ、同時に分泌顆粒膜の指標である CD63 の細胞内から細胞表面への移行がフローサイトメーター解析の結果認められた。そこで蛍光顕微鏡により FLAG-sST2/BMMC を材料に BMMC で認められた抗原刺激前後での sST2 の CD63 と sST2 の関連について抗 CD63 抗体と抗 FLAG 抗体を用いて解析した。未刺激の FLAG-sST2/BMMC において FLAG-sST2 は細胞質内全体に存在していたが抗原刺激により細胞膜に移動していることが認められた。CD63 も sST2 と同様に刺激により細胞質内から細胞表面に移動することが確認され sST2 と CD63 が脱顆粒と同時に細胞外に放出される可能性が示された。次にたんぱく質合成阻害剤シクロホスファミド (CHX) 処理により sST2 合成を阻害した状態の細胞に刺激を行い培養上清中の sST2 を測定した。未処理の細胞培養上清では刺激後脱顆粒のため細胞外に放出された sST2 により sST2 濃度が増加し、時間経過により新たに合成された sST2 がさらに放出されるため上清中の濃度が増加した。一方、CHX 処理を行った BMMC 培養上清中の sST2 濃度は抗原刺激による脱顆粒により一時的に sST2 濃度が増加するがその後ほとんど変化しないことが明らかになった。これらの結果から sST2 は細胞内に貯留されており刺激に

より直ちに放出されることが示唆された。放出された sST2 の役割については不明であり今後の検討が必要である。また抗原刺激と IL33 刺激による sST2 の産生とは異なるメカニズムが示されたことからその役割も異なっている可能性があり更なる検討を行う。

- (4) sST2 についてはデコイレセプターとしての作用が期待される一方で炎症性疾患、心臓疾患の病態によって血液中で増加していることが知られており病態により変動することからバイオマーカーとしても注目されている。また sST2 は IL33 刺激、抗原刺激による産生以外に生理的にも産生されることからその作用、意義には不明な点が多い。そこで今後は新たに作製した sST2 を特異的に欠損した遺伝子改変マウスを用いて野生型マウスあるいは ST2L 欠損マウスとの比較検討によりマスト細胞をはじめとする様々な免疫細胞の解析をおこなう。さらにはアレルギー、炎症性疾患モデルについてその病態を比較解析することにより生理的に産生される sST2 の機能と作用メカニズムを解明し各種疾患のバイオマーカーとしての意義を明らかにする。

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5件)

(全て査読あり)

1. Shiba E, Izawa K, Kaitani A, Isobe M, Maehara A, Uchida K, Maeda K, Nakano N, Ogawa H, Okumura K, Kitamura K, Shimizu T, Kitaura J. (2017) Ceramide-CD300f Binding Inhibits Lipopolysaccharide-induced Skin Inflammation *J. Biol. Chem.* 292, 2924-2932. doi:10.1074/jbc.M116.768366
2. Miura R, Kasakura K, Nakano N, Hara M, Maeda K, Yashiro T, Nishiyama C. (2016)

Role of PU.1 in MHC class II Expression via CIITA Transcription in Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS One.* 11, e0154094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154094>

3. Yamazaki S, Nakano N, Honjo A, Hara M, Maeda K, Nishiyama C, Kitaura J, Ohtuka Y, Okumura K, Ogawa H, Shimizu T. (2015) The transcription factor Ehf is involved in TGF- β -induced suppression of Fc ϵ RI and c-kit expression and Fc ϵ RI-mediated activation in mast cells. *J Immunol.* 195, 3427-3435. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402856>
4. Ishiyama K, Yashiro T, Nakano N, Kasakura K, Miura R, Hara M, Kawai F, Maeda K, Tamura N, Okumura K, Ogawa H, Takasaki Y, Nishiyama C. (2015) Involvement of PU.1 in NFATc1 promoter function in osteoclast development. *Allergol Int.* 64, 241-247. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.alit.2015.01.006>
5. Nakajima A, Negishi N, Tsurui H, Kadowaki-Ohtsuji K, Maeda K, Nanno M, Yamaguchi Y, Shimizu N, Yagita H, Okumura K, Habu S. (2014) Commensal bacteria regulate thymic Aire expression. *Plos One.* 9, e105904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105904>

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

6 . 研究組織

(1)研究代表者

前田 啓子 (MAEDA, Keiko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20053374