

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10075

研究課題名(和文)免疫受容体TREM2に着目した炎症性骨破壊のメカニズム解析と治療戦略の検討

研究課題名(英文)Analysis of Inflammatory Bone Resorption Focused on Immunoreceptor TREM2

研究代表者

坂東 健二郎 (BANDOW, Kenjiro)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：50347093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は歯周病のような炎症性骨破壊を来す疾患において重要な役割を担っていると考えられる破骨前駆細胞とマクロファージに注目し、これらの細胞に共通して存在する免疫受容体 TREM2 の役割を明らかにする事を目指した。TREM2 はマクロファージのケモカインや炎症性サイトカインの発現を調節し、M1 マクロファージへの分極を促していた。また、破骨細胞抑制因子である Caldecrin の受容に関わっている事も明らかになった。そして、細胞外に分泌された TREM2 がなんらかの生理作用を有している可能性がある事が判明した。これらの結果は TREM2 が炎症性骨吸収のキーファクターである事を物語っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は歯肉の炎症と歯槽骨の破壊が起きる病気です。炎症と骨吸収の両方に深く関わっているのがマクロファージと破骨細胞です。この2つの細胞は共通の細胞から分化します。我々が注目したのはこの2つの細胞に共通して存在する TREM2 という免疫受容体です。この研究により、TREM2 は炎症を促進する作用と抑制する作用の両方があり、M1 マクロファージと言う炎症性のマクロファージに変化するのを進める作用がある事がわかりました。また、TREM2 の遺伝子をノックアウトした細胞は骨を壊す破骨細胞に変化しませんでした。今後、この TREM2 をターゲットとした歯周病治療法が開発されていく事が期待されます。

研究成果の概要(英文)：We focused on osteoclast progenitors and macrophages, which are thought to play an important role in diseases that cause inflammatory bone resorption, such as periodontal disease. The purpose of this study is to clarify the role of TREM2, which is commonly present in these cells. TREM2 regulated the expression of chemokines and inflammatory cytokines in macrophages and promoted their polarization to M1 macrophages. Then, it became clear that it is involved in the reception of Caldecrin, which is an osteoclast inhibitory factor. Furthermore, it was found that extracellular TREM2 may have some physiological effect. These results indicate that TREM2 is a key factor in inflammatory bone resorption.

研究分野：生化学

キーワード：TREM2 LPS TLR4 macrophage M1 polarization chemokine

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病などによる炎症性骨破壊では、炎症が進むにつれて、細菌の LPS (Lipopolysaccharide) や炎症性サイトカインにより、破骨細胞の分化・活性化が起こり、不可逆的に歯槽骨が吸収されていく。そこで、破骨細胞を活性化する RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) のシグナルと炎症を惹起する LPS のシグナルを同時に抑制するという目的で、なるべく発現が破骨前駆細胞とマクロファージに限局している分子として、免疫受容体 TREM2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2) に着目した。予備実験により、培養マウスマクロファージ株 RAW264.7 細胞の *Trem2* 遺伝子をノックアウトしたところ、TREM2 は RANKL による破骨細胞分化と LPS に応答した炎症性サイトカインの発現に重要な因子である事が示唆された。こうした経緯から、炎症性骨破壊における TREM2 の役割を明らかにする事により、炎症を抑えながら、いち早く破骨細胞の活性化を抑制する新しい治療戦略を開発する事を目的とした研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究は歯周病のような炎症性骨破壊を来す疾患において重要な役割を担っていると考えられる破骨前駆細胞とマクロファージに注目し、これらの細胞の TREM2 の役割を明らかにする事により、炎症を抑えながら、いち早く破骨細胞の活性化を抑制する新しい治療法へ道を拓く事を目的としている。TREM2 が LPS シグナルに与える影響は研究されてきているが、逆に、LPS シグナルがどのように TREM2 に作用するのかを検討する研究は本研究の他にない。この研究により、破骨細胞の抑制と LPS シグナルの抑制を同時に行う事を目指し、ほかの骨疾患治療への応用を検討する。例えば、骨粗鬆症の治療において破骨細胞をビスホスホネートや抗 RANKL 抗体などで抑制した後、重篤な顎骨壊死を来す場合があるが、この原因は、口腔内の外科的処置後の細菌感染と考えられており、トリガーの一つとして LPS が挙げられている。本研究のように LPS シグナルを抑制しつつ、破骨細胞分化を抑える事で、顎骨壊死を予防する事も可能であるかもしれない。

### 3. 研究の方法

#### 【動物】

ddY マウスは三協ラボサービス (Tokyo, Japan) より購入した。飼育と実験への使用は明海大学歯学部動物実験倫理委員会の審議を経て承認された。(承認番号: A1938; A2119)

#### 【細胞培養】

マウス培養マクロファージ株 RAW264.7 細胞は理化学研究所バイオリソース研究センター細胞材料開発室 (Ibaraki, Japan) より購入した。ヒト皮膚線維芽細胞とヒトケラチノサイトは米国タフツ大学の Garlick 教授より提供を受けた。その他に、マウス骨髄細胞はマウスの大腿骨と脛骨の量骨端を切断し、PBS (Phosphate buffered saline) で洗い出し、回収した。また、マウス腹腔マクロファージは、マウスの腹腔内に 5% チオグリコレート培地 2mL を注入し、2 日後に腹腔内の細胞を PBS で洗い出し、回収した。骨髄細胞のマクロファージへの分化誘導は 10 ng/mL 含有培地で 3 日間培養する事により行った。また、マクロファージおよび RAW264.7 細胞の M1 マクロファージへの分化誘導は 50 ng/mL IFN (Interferon)  $\gamma$  および 50 ng/mL LPS 含有培地で 24 時間処理する事により行い、フローサイトメーター (model SH800S; Sony, Tokyo, Japan) で F4/80 と CD11c の陽性を確認した。線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化誘導は 5ng/mL TGF (Transforming growth factor)  $\beta$ 1 含有培地で 8 日間培養する事により行った。

#### 【CRISPR/Cas9 による細胞の遺伝子ノックアウト】

マウス *Trem2* 遺伝子特異的な CRISPR RNA (crRNA)、ATTO550 標識した trans-activating crRNA (tracrRNA) と CRISPR Cas9 nuclease は IDT (Integrated DNA Technology; Coralville, IA, USA) 社から購入した。crRNA と tracrRNA をアニーリングし、CRISPR Cas9 nuclease と混合し、RNP 複合体を形成させた。この複合体を RAW264.7 細胞に HyliMax 試薬 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて導入し、24 時間後に ATTO550 陽性細胞をセルソーター (SH800S) で回収した。回収した細胞を培養し、細胞表面の TREM2 の発現が失われている事をフローサイトメトリーで確認した。

#### 【RNA 干渉法】

IDT 社で設計と合成をされた siRNA (small interfering RNA) を Oligofectamine 試薬 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で無血清培地中の細胞にリポフェクションし、24 時間後、通常培地に交換し、実験に用いた。細胞表面の TREM2 の発現が減少している事をフローサイトメトリーで確認した。

#### 【リアルタイム PCR (Polymerase chain reaction) 法】

培養された細胞から TRI reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) を用いて total RNA を抽出し、RevarTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて cDNA に逆転写した。20000 倍希釈した SYBR Green I (Cambrex, East Rutherford, NJ, USA) を加えて PCR 反応を行い、反応中の蛍光を CFX-96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で読み取り、発現していた mRNA を定量した。解析に用いた PCR プライマーは Primer3 version 0.4.0 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) で設計し、IDT 社で合成を行った。

#### 【フローサイトメトリー】

培養ディッシュに付着した細胞は 5 mM EDTA/PBS で剥離し、氷上で蛍光標識一次抗体と 30 分間反応させた。その後、細胞はセルストレイナー (40  $\mu$ m メッシュ) でろ過され、セルソーター (SH800S) で計測された。データの解析は Cell Sorter Software ver. 2.1.5 (Sony) を用いて行われた。

#### 【ウェスタンブロット法】

実験に用いた細胞は RIPA buffer で溶解し、8%または 10%ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行った。泳動後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜にトランスファーし、2%ウシアルブミンまたは 5%スキムミルク含有 TBS でブロッキングを行った。一次抗体と反応させたのち、ペルオキシダーゼ標識二次抗体と反応させた。その後、Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) で化学発光させ、ChemiDoc XRS plus (Bio-Rad) でデジタルスキャンした。また、一部の PVDF 膜は X 線フィルムに焼き付け、現像を行った。

#### 【ヒト皮膚様組織 3D 培養】

24-well 細胞培養プレートに Millicell Hanging Cell Culture Insert PET 0.4  $\mu$ m (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) をセットし、Polyethylene Terephthalate (PET) 膜上にヒト線維芽細胞を 7 万个播種し、アスコルビン酸含有培地で 3 週間培養し、PET 膜上に結合組織層を形成させた。形成された結合組織層の上にヒトケラチノサイトを 17.5 万个播種し、角化培地で 8 日間培養し、ヒト皮膚様組織を形成させた。形成された組織の一部は 10%ホルマリンで固定後、パラフィン包埋し、6  $\mu$ m の切片標本を作製に用いた。標本はヘマトキシリン・エオジン染色され、顕微鏡観察とデジタル写真撮影後、ZEN 3.3 software (Blue edition; Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) を用いて間質層の厚みの測定を行った。

## 4 . 研究成果

#### 【Caldecrin 受容体として機能する TREM2】

血清カルシウム降下因子である Caldecrin は破骨細胞中の転写因子 NFATc1 (Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 1) の活性化を抑制することにより、破骨細胞の分化と活性化を抑制することが知られている。破骨細胞の NFATc1 は ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) を持つ受容体により活性化される事が知られており、TREM2 はその有力な候補の一つである。そこで、RAW264.7 細胞の *Trem2* 遺伝子をノックアウトし、RANKL 含有培地で破骨細胞分化を確認したところ、*Trem2* KO RAW264.7 細胞は破骨細胞分化が起こらなかった。この結果から、Caldecrin の作用が TREM2 を介していると考え、*Trem2* ノックアウト細胞を用いて検討を行った。

*Trem2* KO RAW264.7 細胞を LPS で刺激し、MAP (Mitogen activated protein) kinase のリン酸化を確認したところ、コントロールの細胞に比べ、ERK (Extracellular signal regulated kinase) 1/2 と p38 が強くリン酸化された。この時、同時に Caldecrin を加えると、コントロールの I $\kappa$ B のリン酸化が抑制されたが、*Trem2* KO RAW264.7 細胞ではこの抑制が見られなかった。RAW264.7 細胞を LPS で刺激した際の IL (Interleukin) 1 $\beta$ 、IL-6、TNF (Tumor necrosis factor)  $\alpha$  の遺伝子発現を確認したところ、*Trem2* KO RAW264.7 細胞では *Il1b* の発現は促進されたが、*Il6* と *Tnfa* の発現は抑制された。また、この時に Caldecrin を同時に添加するとこれら炎症性サイトカインの遺伝子発現は抑制された。この Caldecrin による抑制はマウス骨髄由来のマクロファージでも同様であった。しかし、*Trem2* KO RAW264.7 細胞においてはこれらの遺伝子の発現の抑制は認められなかった。これらの結果は TREM2 が LPS の受容体である TLR4 (Toll like receptor 4) と協調して働いている事、Caldecrin が TREM2 を介して LPS-TLR4 シグナルを調節している事を示唆している。

#### 【マクロファージの M1 分極への TREM2 と Caldecrin の影響】

次に、LPS により誘導される M1 マクロファージへの分極への影響を検討した。RAW264.7 細胞を LPS と IFN $\gamma$  で M1 マクロファージに誘導し、フローサイトメーターで確認した。すると、*Trem2* KO RAW264.7 細胞では M1 マクロファージに分化した細胞の割合が若干、低かった。この時に Caldecrin を同時に添加すると、RAW264.7 細胞の M1 マクロファージへの分極が有意に抑制された。この Caldecrin による M1 分極抑制はマウス骨髄由来のマクロファージでも同様であった。しかし、*Trem2* KO RAW264.7 細胞においてはこの Caldecrin による M1 分極抑制は認められなかった。これらの結果は TREM2 がマクロファージの M1 分極を部分的で

あるがポジティブに調節しており、Caldecrinはこの調節を TREM2 を介して抑制している事が示唆された。

#### 【LPS 誘導性ケモカイン発現への TREM2 の影響】

TREM2 が LPS-TLR4 シグナルをどのように調節しているかを確認するため、RAW264.7 細胞を LPS で刺激し、2 時間後の RNA を回収し、ケモカインの遺伝子発現を網羅的に解析した。すると、11 のケモカインの遺伝子発現が 2 倍以上増加していた。次に、RAW264.7 細胞の *Trem2* 遺伝子を siRNA でノックダウンし、LPS で刺激したところ、LPS で誘導される 11 のケモカインの内、3 つの CC ケモカインと 2 つの CXC ケモカインの遺伝子は発現の誘導が抑制されていた。*Trem2* KO RAW264.7 細胞では LPS により *Il1b* の発現は促進されたが、*Trem2* の siRNA によって発現が促進されたケモカインは無かった。また、マウス腹腔マクロファージについても実験を行ったが、同様の結果が得られた。これまで、TREM2 は LPS-TLR4 シグナルを抑制的に調節すると考えられていたが、LPS-TLR4 シグナルの一部で TREM2 依存的な経路が存在する事が示唆された。

#### 【細胞外 TREM2 の影響】

RAW264.7 細胞の培養上清中の TREM2 を ELISA 法で解析したところ、TREM2 は構成的に培地中に分泌されている事が判明した。さらに、RAW264.7 細胞を LPS で刺激後、細胞表面の TREM2 をフローサイトメトリーで確認したところ、2 時間でほとんどの TREM2 は消失していた。これらの事から、細胞外の TREM2 が LPS-TLR4 シグナルに何らかの影響をしていると推察した。そこで、TREM2 の細胞外ドメインの組換え体タンパク質を LPS と同時に RAW264.7 細胞の培地に添加したところ、TREM2 依存的に LPS により誘導されると考えられる 5 つのケモカインの内、2 つのケモカインの発現が組換え体 TREM2 に増強されたが、3 つのケモカインの発現は組換え体 TREM2 の影響は受けなかった。また、マウス腹腔マクロファージについても実験を行ったが、同様の結果が得られた。TREM2 は ADAM (A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein) 10 または ADAM17 により細胞外ドメインが shedding を受けたり、エキソソームの一部として放出されたりして細胞外に存在している事が知られている。これまで、細胞外の TREM2 はデコイ受容体として抑制的に働くと考えられてきたが、これらの結果はマクロファージにおいて細胞外の TREM2 が LPS-TLR4 シグナルを促進的に調節している事を示唆している。

#### 【骨芽細胞への TREM2 の効果の検討】

*Trem2* KO RAW264.7 細胞を用いた実験で TREM2 が破骨細胞分化に必須であったので、骨芽細胞についても検討する事にした。マウス頭蓋冠由来骨芽細胞をアスコルビン酸と  $\beta$ -グリセロリン酸含有培地で分化させ、TREM2 の遺伝子発現を確認したが、分化による発現の変化は認められなかった。しかし、グルコース代謝が骨芽細胞分化に影響を与えていたので、引き続き解析する事とした。骨芽細胞を分化させると、GLUT1 (Glucose transporter 1) の発現を抑制する p53 の発現が減少し、PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) によって調節される PKB (Protein kinase B) のリン酸化が促進された。そして、PI3K を阻害すると、p53 の発現を増強し、Glut1 の発現が抑制された。また、骨芽細胞における解糖系の阻害は ATP 含有量を大幅に減少させた。これらの結果は、骨芽細胞が p53 のダウンレギュレーションを通じて GLUT1 の発現を増加させ、分化中に代謝経路を解糖系に切り替えることを示唆している。

#### 【筋線維芽細胞への TREM2 の効果の検討】

マクロファージにおいて TREM2 が一部のケモカインの発現に関与している事が判明したので、結合組織の免疫担当細胞である筋線維芽細胞における TREM2 の作用を検討する事とした。ヒト皮膚筋線維芽細胞を TGF- $\beta$ 1 含有培地で筋線維芽細胞に分化させ、ケモカインの遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。すると、3 つのケモカインの発現が分化の過程で誘導される事が判明した。一方でケモカイン受容体の遺伝子発現についても網羅的に解析したが、分化により発現が 2 倍以上増加する受容体は無かった。また、筋線維芽細胞の TREM2 の遺伝子発現は検出限界よりやや多い程度で、筋線維芽細胞分化による発現の変動は認められなかった。さらに、TREM2 の細胞外ドメインの組換え体タンパク質を加えて実験を行ったが、ケモカイン発現の有意な変化は認められなかった。残念ながら筋線維芽細胞において TREM2 が作用する事は証明できなかったが、筋線維芽細胞分化で発現が上昇するケモカインについては引き続き解析する事とした。

#### 【CCL20 の筋線維芽細胞分化への影響】

筋線維芽細胞分化の過程で発現が促進されたケモカインのうち、CXCL5 と CXCL8 については前立腺筋線維芽細胞で筋線維芽細胞の分化を促進する事が報告されているので、CCL20 に同様な効果があるか検討した。筋線維芽細胞を組換え体 CCL20 で刺激したところ、I 型コラーゲンの遺伝子発現が促進されたが、 $\alpha$ -平滑筋アクチンの遺伝子発現は変化が認められなかった。また、筋線維芽細胞分化に従って促進される CCL20、CXCL5、CXCL8 の発現は CCL20 により有意に増加した。

次に、筋線維芽細胞分化における CCL20 の影響を検討するため、ヒト皮膚線維芽細胞に CCL20 siRNA をトランスフェクションしたのち、TGF- $\beta$ 1 で筋線維芽細胞に分化させ、解析を行った。筋線維芽細胞分化により COL1A2 の発現は促進されるが、CCL20 をノックダウンした細胞では有意に抑制された。しかし、ACTA2 の発現は CCL20 siRNA をトランスフェクションした細胞とスクランブル siRNA をトランスフェクションした細胞で有意な差は認められなかった。

これらの結果は CCL20 が I 型コラーゲン合成とメンテナンスに関わっている事を示唆している。

#### 【ヒト皮膚様組織 3D 培養における CCL20 の作用】

ここまで、線維芽細胞分化における CCL20 の機能について *in vitro* で検討してきたので、より *in vivo* に近いヒト皮膚様組織 3D 培養を用いて検討を行った。Transwell 上で線維芽細胞を 3 週間培養した後、CCL20 siRNA をトランスフェクションし、24 時間後に線維芽細胞層の上にケラチノサイトを播種し、8 日間してヒト皮膚様組織を形成させた。形成された 3D 組織で切片標本を作成し、HE 染色後に顕微鏡で観察を行った。すると、線維芽細胞に CCL20 siRNA をトランスフェクションした組織ではコントロールの組織に比べ、真皮層が薄くなっていた。また、3D 組織からタンパク質と RNA を抽出し、解析を行ったが、CCL20 siRNA をトランスフェクションした組織では、I 型コラーゲン合成のタンパク質と遺伝子の発現が抑制されていた。これらの結果は CCL20 が皮膚組織の真皮層で出現する筋線維芽細胞におけるコラーゲン合成を部分的に調節している可能性がある事を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Bandow Kenjiro, Hasegawa Hiroya, Tomomura Mineko, Tomomura Akito	4. 巻 523
2. 論文標題 Caldecrin inhibits lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokines and M1 macrophage polarization through the immunoreceptor triggering receptor expressed in myeloid cells-2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1027 ~ 1033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohnishi Tomokazu, Kusuyama Joji, Bandow Kenjiro, Matsuguchi Tetsuya	4. 巻 477
2. 論文標題 Glut1 expression is increased by p53 reduction to switch metabolism to glycolysis during osteoblast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 1795 ~ 1811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20190888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomomura Akito, Bandow Kenjiro, Tomomura Mineko	4. 巻 8
2. 論文標題 Purification and Biological Function of Caldecrin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicines	6. 最初と最後の頁 41 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicines8080041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長谷川 紘也 (HASEGAWA Hiroya) (00635899)	明海大学・歯学部・講師  (32404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Department of Diagnostic Science	School of Dental Medicine	Tufts University	