

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24年 6月 4日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790376

研究課題名（和文） 遺伝子改変マウスを用いた Trem-like4 の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of Trem-like 4 in mice

研究代表者

邊見 弘明 (HEMMI HIROAKI)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門助教

研究者番号：20451924

研究成果の概要（和文）：1回膜貫通型受容体 Trem-like 4 (Trem14) の生理的機能の解明を目指して、そのリガンドの同定の試みと遺伝子欠損マウスの解析を行った。その結果、候補分子の結合を確認することができた。一方、遺伝子欠損マウスを用いた解析により、Trem14 遺伝子欠損マウスでも正常マウスと同様のクロスプレゼンテーションが誘導された。また、抗原を付加した抗 Trem14 抗体の投与により、Trem14 を発現している抗原提示細胞への効率的な抗原輸送ができることが確認できた。

研究成果の概要（英文）：Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells (Trem) family is characterized by an immunoglobulin-like domain at extracellular domain and short cytoplasmic tail. In this study, we aimed to clarify physiological functions of a Trem family member, Trem-like 4 (Trem14). We could find a candidate molecule of Trem14 ligand. In addition, we analyzed Trem14-deficient mice. In Trem14-deficient mice, uptake of dying cells and cross-presentation of cell-associated antigens in vivo was similarly observed to that in littermate control mice, suggesting that Trem14 is not involved in these responses. We also found that an engineered anti-Trem14 antibody conjugated with antigens can efficiently induce T cell responses.

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	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：樹状細胞・マクロファージ・イムノグロブリンスーパーファミリー

1. 研究開始当初の背景

Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells (Trem) ファミリーは、細胞質外領域に一つのイムノグロブリン様ドメインと短い細胞質内領域を有する1回膜貫通型膜タンパクである。多くのファイリーメンバーは、

ITAMモチーフを有するアダプター分子 DAP12 と会合してシグナル伝達を行う。これまでに、Trem1 は感染症や炎症応答時にその分泌型が誘導され敗血症性ショックの指標となる他、膜結合型 Trem1 の活性化は Toll-like receptor (TLR) リガンドと協調的に作用し

て炎症性サイトカイン産生を誘導することが報告されている。実際、マウスでは、Trem1の阻害によってリポポリサッカライド (LPS) による敗血症性ショックが緩和されることが報告されている。Trem2 は、ヒトにおいては、破骨細胞の分化に関与すると共に、多発性骨嚢胞による病的骨折と白質脳症による若年性認知症を主徴とする那須ハコラ病 (Nasu-Hakola disease) の原因遺伝子の一つとして知られている。また、マウス Trem2 は、炎症性サイトカイン産生に対して抑制的に働くことも報告されている。この様に、Trem ファミリー分子は、細胞の活性化状態を調節する機能を有していると考えられている。これら Trem ファミリーは、それぞれ発現している細胞が異なる。Trem1 は、単球や好中球に、Trem2 は破骨細胞や単球、マクロファージやマイクログリアに発現している。このファミリーに属する分子は、その生理的機能について不明なものが多く、その中に本研究にて解析を行っている Trem-like 4 (Trem14) がある。

樹状細胞 (DC) は、抗原提示細胞として自然免疫と獲得免疫との橋渡しをする細胞として知られている。この DC は、単一の細胞集団ではなく、細胞表面分子の発現パターンやそれぞれに特徴的な生理的機能によっていくつかのサブセットに分類される。マウス脾臓 DC は、インターフェロン産生を特徴とする形質細胞様 DC (plasmacytoid DC) や、通常型 DC (conventional DC) に分類される。この通常型 DC は、さらに細かいサブセットに分類され、アポトーシス細胞を取り込む能力が高く、また、取り込んだ抗原を MHC class I 上に提示するクロスプレゼンテーション活性化が高い CD8 α ⁺ DC と、CD4 T 細胞の活性化能が高いとされている CD8 α ⁻ DC とに分けられる。

この通常型 DC のうち、CD8 α ⁺ DC に高く発現している分子の一つとして、Trem14 を見いだした。これまでの解析により、Trem14 は、CD8 α ⁺ 陽性サブセットの他にも脾臓辺縁帯に認められる好金属性マクロファージ (marginal metallophilic macrophage) や赤脾髄マクロファージ (red pulp macrophage)、そして単球に発現していることが判明した。この Trem14 の細胞質外領域とヒト IgG Fc 領域との融合タンパク質が、死細胞に結合することを見いだしてきた。しかしながら、その生理的機能は不明である。また、CD8 α ⁺ DC は、上記の様な特徴を有しており、その機能に関わっている分子について不明な点も多い。

2. 研究の目的

上記の様に Trem14 は、これまでの研究により細胞質外領域とヒト IgG Fc 領域との融

合タンパク質が死細胞に結合することは判明していたが、そのリガンドや生体内での機能は不明であった。そこで、これまでに確認された、Trem14 と結合しうる候補分子に関して、その結合を確認するとともに、Trem14 遺伝子欠損マウスを用いて、その生理的機能、特に、死細胞由来抗原に対する免疫応答を検討し、また、疾患モデルを適用して、態を評価することにより、Trem14 の機能について解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) これまでに同定した、Trem14 と結合する可能性のある分子について発現ベクターを構築して 293T 細胞に発現させて細胞溶解液を調整した。この細胞溶解液を用いて Trem14 と IgG Fc 領域との融合タンパク質 (Trem14-Ig) による pull-down assay を行った。また、当該候補分子を細胞膜結合型として強制的に細胞上に発現させて、上記 Trem14-Ig 融合タンパク質の結合を FACS にて解析した。

(2) MHC class I を欠損する TAP 遺伝子欠損細胞に抗原として卵白アルブミン (OVA) タンパク質を担架し、かつ、アポトーシスを誘導してアジュバント共に Trem14 遺伝子欠損マウスやそのコントロール同腹仔 (ヘテロマウス) に投与した。アジュバントは α -galactosylceramide を用いた。投与後一週間後に脾臓細胞を調整し、in vitro にて OVA ペプチドにて脾細胞を刺激し、抗原特異的にインターフェロン γ を産生する CD8 陽性 T 細胞の割合を、細胞質内染色による FACS 解析にて評価して、抗原特異的 T 細胞反応を検討した。

4. 研究成果

(1) Trem14 と結合する分子の同定

これまでに Trem14 と結合することが示唆された候補分子について、myc 標識されたそ

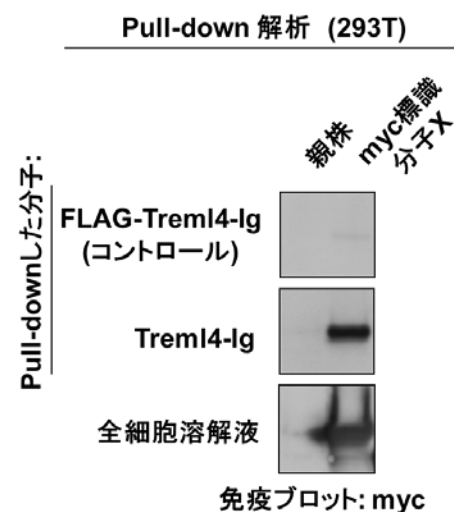


図 1. Pull-down 解析

これらの発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、その細胞溶解液を用いて pull-down 解析を行った。その結果、死細胞とは結合しない FLAG-Trem14-Ig では、候補分子との結合が認められなかったが、Trem14-Ig との結合が認められた (図 1. 未発表データ)。さらに、この結果を確認するために、HA 標識をした候補分子、または、コントロールとして HA 標識した CD4 を 293T 細胞の細胞膜上に強制的に発現させ、これら細胞へ Trem14-Ig が結合するかどうかを FACS にて解析した (図 2. 未発表データ)。その結果、Trem14-Ig は、何も強制発現させていない親株 (MOCK) や CD4 を発現させた細胞への結合を示さなかったが、候補遺伝子を発現させた細胞への結合が確認された。今後の課題として、実際にこの候補分子が、Trem14 の活性化を誘導するか等、さらなる解析が必要である。

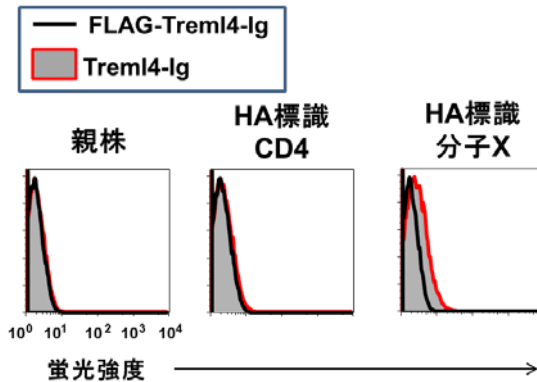


図 2. 候補分子を発現させた細胞への Trem14-Ig の結合

(2) Trem14 遺伝子欠損マウスの解析

前述の様に、CD8 α + DC の特徴の一つにアポトーシス細胞の取り込みとクロスプレゼンテーション活性がある。これまでの解析で、Trem4 遺伝子欠損マウスでもアポトーシス細胞の取り込みが正常に認められたため、今回は死細胞由来抗原に対するクロスプレゼンテーションを検討した。そこで、抗原として OVA を担架した MHC class I 陰性細胞 (TAP $^{-/-}$) にアポトーシスを誘導し、アジュバントと

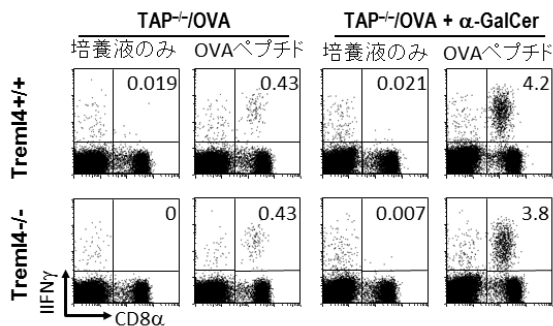


図 3. 死細胞抗原のクロスプレゼンテーション

共にマウスに投与して、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の活性化を検討した。その結果、この抗原特異的に IFN γ を産生する CD8 陽性 T 細胞は、正常マウスと同程度に認められた (図 3, 4)。

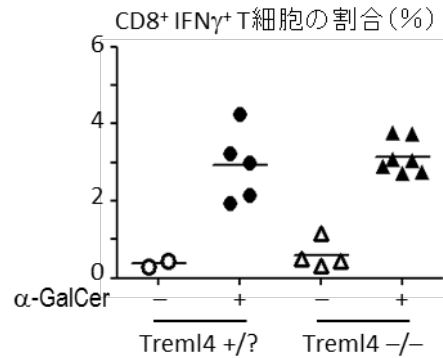


図 4. 死細胞へのクロスプレゼンテーション (図 3. の CD8+IFN γ +細胞をまとめた)

この成果は、これまでの結果と併せて、Journal of Immunology 誌に掲載された (雑誌論文①)。

この他、Trem14 遺伝子欠損マウスにいくつかの疾患モデルを適用し、様々な病態における Trem14 遺伝子の機能の解明を試みた。一つは、TLR7 リガンドの一種であるイミキモド (Imiquimod) を含むクリーム (尖圭コンジローマの治療薬としても知られている) を繰り返しマウスの皮膚に塗布することによる尋常性乾癬のモデルである。しかしながら、皮膚組織切片の観察により、Trem14 遺伝子欠損マウスでも野生型 (もしくは、ヘテロマウス) と同様に皮膚の肥厚や炎症性細胞の浸潤が認められた (未発表データ)。

また、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (myelin oligo-dendrocyte glycoprotein (MOG)) を免疫することによって誘導される、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルを行い、症状の重症度をスコア付けしたところ、ヘテロマウスと比べて重傷度に大きな差は認められなかった (未発表データ)。

引き続き、Trem14 の機能を探索するために、アポトーシスを誘導する、もしくは、死細胞 (ネクローシス) を大量に産生する疾患モデルを適用する等、さらなる解析が必要である。

(3) 抗 Trem14 抗体を用いた抗原輸送

これまでの報告で、DC 上に発現している分子に対する抗体に免疫応答を誘導したい抗原を付加して個体に投与することで、効率的な抗原の輸送およびその後の抗原特異的免疫応答を誘導できることが報告されている。これまで報告されてきた分子として、例えば、

C型レクチンである DEC-205 や Langerin、Clec9a 等が知られている。そこで、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する Trem14 分子をターゲットにして、同様な効果が認められる検討を行った。Trem14 を認識する抗 Trem14 抗体を産生するハイブリドーマから抗体遺伝子を同定し、抗原を付加した、人工的な抗体を作成した。これを用いて、マウスに免疫することにより、抗原の輸送とその後の抗原に対する免疫応答を検討したところ、抗 Trem14 抗体は、Trem14 発現細胞に効率良く結合し、また、免疫応答を誘導することが飽きたかになった。この成果も、上記成果と共に雑誌論文①に掲載された。

(4) さらに、Trem-like 4 とともに CD8 α +DC において強く発現しているケモカイン受容体 XCR1 についても解析を行った。その結果、XCR1 は CD8 α +DC に発現しており、そのリガンドである XCL1 は CD8 α +DC に対して走化性を誘導した。また、XCL1 は NK 細胞や活性化 CD8 陽性 T 細胞に発現しており、CD8 α +DC による CD8 陽性 T 細胞の活性化に何らかの役割を持っていることが示唆された (雑誌論文③)。

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 3 件)

① Hiroaki Hemmi, Neeha Zaidi, Bei Wang, Ines Matos, Christopher Fiorese, Ashira Lubkin, Lori Zbytnuik, Koji Suda, Kenneth Zhang, Masaki Noda, Tsuneyasu Kaisho, Ralph M. Steinman, and Juliana Idoyaga. Trem14, an Ig Superfamily Member, Mediates Presentation of Several Antigens to T Cells In Vivo, Including Protective Immunity to HER2 Protein. *J Immunol.* 188: 1147-1155, 2012. (査読有)
DOI: 10.4049/jimmunol.1102541

② 邊見弘明, 山崎千尋, 星野克明, 改正恒康. CD8 陽性樹状細胞サブセットの動的制御機構の解析. *Cytometry Research.* 22: 31-35, 2012. (査読有)

<http://www.cytometry.jp/scientist/journals/%E3%83%90%E3%83%83%E3%82%AF%E3%83%8A%E3%83%B3%E3%83%90%E3%83%BC>

③ Chihiro Yamazaki, Rie Miyamoto, Katsuaki Hoshino, Yuri Fukuda, Izumi Sasaki, Masuyoshi Saito, Hironori Ishiguchi, Takahiro Yano, Takahiro Sugiyama, Hiroaki Hemmi, Takashi Tanaka, Eri Hamada, Takeshi Hirashima, Ryuichi

Amakawa, Shirou Fukuhara, Shosaku Nomura, Tomoki Ito, Tsuneyasu Kaisho. Conservation of a chemokine system, XCR1 and its ligand, XCL1, between human and mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 397: 756-761, 2010. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.06.029

[学会発表] (計 2 件)

① 山崎千尋, 邊見弘明, 宮本理恵, 佐々木泉, 伊藤量基, 星野克明, 改正恒康. ケモカイン受容体 Xcr1 発現樹状細胞の in vivo における機能的意義. 第 40 回日本免疫学会学術集会. 2011.11.28. 幕張メッセ.

② 邊見弘明, 山崎千尋, 星野克明, 改正恒康. CD8 陽性樹状細胞の動的制御機構の解析. 第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会. 2011.6.26. 京都市国際会館.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

邊見 弘明 (HEMMI HIROAKI)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門助教

研究者番号: 20451924

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし