

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790526

研究課題名（和文） 新規 TLR 応答制御分子における TLR 制御機構および生理的意義の解明

研究課題名（英文） Elucidating the physiological meaning of a novel TLR regulatory molecule

研究代表者

柴田 琢磨（SHIBATA TAKUMA）

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：30554505

研究成果の概要（和文）：我々は、TLR に会合する新規分子である Epithelial membrane protein 3(Emp3)を同定し、*in vitro* の実験系において Emp3 のノックダウンが複数の TLR による免疫応答を顕著に増長することを見出した。しかしながら、Emp3 の Transgenic (Tg) および Knock Out マウス由来の骨髄マクロファージでは TLR により誘導される免疫応答に優位な変化が認められなかった。一方、Emp3 を全身性に発現する Emp3 Tg は半年以内に 100%が死亡し、その多くで拡張型心筋症様の症状が認められた。また小腸炎を呈す個体も散見された。今後、Emp3 Tg で認められた表現型が TLR 応答の制御を介するものか否かを検討していく必要がある。

研究成果の概要（英文）：We identified a novel TLR associating molecule, Epithelial membrane protein (Emp3), and found that knock-down of Emp3 in RAW macrophage cell line resulted in upregulation of multiple TLR response. However, bone marrow derived macrophages from Emp3 KO and Emp3 Tg mice did not show clear differences in various types of TLR response. On the other hand, Emp3 Tg mice died within 6 months and most of them showed Dilated Cardiomyopathy (DCM) like heart symptoms. In addition, some Emp3 Tg mice showed enteritis. It still remained to be determined whether these phenotypes are associated with unknown TLR function regulated by Emp3 or not.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫、TLR

1. 研究開始当初の背景
病原体認識レセプターである Toll Like Receptor (TLR) ファミリーは免疫細胞に高

発現し、様々な免疫応答を惹起することで生体防御に必須の役割を果す。一方、TLR の過

剰応答は自己免疫疾患の発症につながるものが報告されている。この為、TLR 応答の厳密な制御は恒常性維持において必須であり、様々な TLR 会合分子が TLR 応答制御に関与していると考えられる。

2. 研究の目的

申請者は、これまでに **Functional Cloning** を通じて新たな TLR 関連分子 **Epithelial membrane protein 3 (Emp3)** を同定し、ノックダウンを用いた実験系を用いて同分子が TLR 応答の負の制御因子である可能性を見出してきた。

本研究では、作製した **Emp3** のトランスジェニックマウスおよびコンディショナルノックアウトマウスより得られる免疫細胞の解析を通じ、**Emp3** の TLR 応答制御における意義を明確にする。また、同分子の極端な発現量変化に伴う TLR 応答抑制機構の破綻が生体に及ぼす影響を同マウスの表現型解析を通じて示し、TLR 応答におけるバランス制御が恒常性維持において果たす役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

1. **Emp3** コンディショナルノックアウトおよびトランスジェニックマウス、抗 **Emp3** モノクローナル抗体の作製

申請者は B6 バックグラウンド ES 細胞の JM8 A3 株を用い、**Emp3** Conditional KO および ROSA26 領域を利用した Knock In Tg マウスの作製を行う。作製した Conditional KO および Tg マウスに関しては、最初に CAG-Cre マウスと交配することで全身性のノックアウトマウスまたは Tg マウスを作製して解析を行う。

またウサギを使用した抗 **Emp3** ポリクローナル抗体の作製、Balb/c バックグラウンドの **Emp3** KO マウスを利用した抗 **Emp3** モノクロー

ナル抗体の作製も行う。

2. **Emp3** 欠損マクロファージ・樹状細胞における TLR 応答の解析

Emp3 KO および **Emp3** Tg マウスより得られる骨髄マクロファージ/樹状細胞における TLR 応答を網羅的に解析する。これらの解析を通じ、**Emp3** により制御される TLR 応答バランスを明確に特徴付ける。

3. 生体内免疫応答における **Emp3** の役割

Emp3 KO または **Emp3** Tg マウスを使用し、TLR がその病態に深く関与するエンドトキシンショック(急性炎症モデル)や Dextran sulfate sodium による腸炎誘発(慢性炎症モデル)などを解析する。これらの解析を通じ、恒常性維持における **Emp3** の役割を解析する。また、**Emp3** KO または **Emp3** Tg マウスの通常飼育下における疾患の発症、生存率および死亡原因も調べる。特に **Emp3** は腫瘍抑制因子である可能性が多くの論文にて示唆されていることより、腫瘍の発症率を重視して解析を行う。

4. 研究成果

1. **Emp3** コンディショナルノックアウトおよびトランスジェニックマウス、抗 **Emp3** モノクローナル抗体の作製

JM8 A3 を用いた **Emp3** Conditional KO および **Emp3** Tg マウスの作製が成功した。Germ Line Transmission 後に CAG-Cre マウスと交配を行い、全身性 KO および全身性 Tg マウスを問題なく得ることができた。

また、ウサギに **Emp3** の細胞外ドメインの一部を免疫した結果、抗マウス **Emp3** ポリクローナル抗体の作製にも成功した。

モノクローナル抗体の作製に関しては、Balb/c に 6 回バッククロスを行った **Emp3** KO マウスを用いて作製を試みたが、現在のところ

るハイブリドーマの取得には至っていない。

2. Emp3 欠損マクロファージ・樹状細胞における TLR 応答の解析

RAW 細胞における Emp3 ノックダウンの結果、TLR2, 4, 7, 9 リガンド刺激による NO の産生、細胞表面 CD40 の発現、IL-6, RANTES, IL-12p40, IL-10 などのサイトカイン産生が顕著に上昇した。一方、TNF- α , MCP-1, G-CSF, GM-CSF の産生に変化は認められなかった。また、インターフェロン(IFN) 誘導性の TLR4, TLR7, TLR9 では、分子 E ノックダウンによりリガンド刺激に伴う IFN- β mRNA の誘導も顕著に上昇した。

しかしながら、Emp3 ノックダウン細胞における Emp3 cDNA の complementation ではこれらフェノタイプの回復が認められなかった。

また Emp3 KO および Emp3 Tg マウスより得られた骨髄マクロファージ/樹状細胞の TLR リガンドに対する免疫応答(サイトカイン産生、CD40 や CD86 の細胞表面発現上昇など)にも優位な差が認められなかった。同様に、これらマウスにおいて TLR1/2/4/5/6 の細胞表面発現量は全く影響を受けていなかった。以上の結果より Emp3 は TLR 会合分子ではあるが、Emp3 は TLR の細胞内分布を制御しないこと、TLR が誘導する炎症応答を制御する分子ではないことが判明した。

3. 生体内免疫応答における Emp3 の役割

Emp3 KO と Emp3 Tg マウスを使用し、エンドトキシンショックおよび Dextran sulfate sodium による腸炎誘発モデルの解析を行った。その結果、コントロールマウスとの間に優位な差は認められなかった。

また Emp3 は腫瘍抑制因子であることが示唆されていることから Emp3 KO マウスにおける腫瘍の発症率を一年間にわたり解析したが、

肉眼的に検知できるような腫瘍の発生および異常は全く認められなかった。

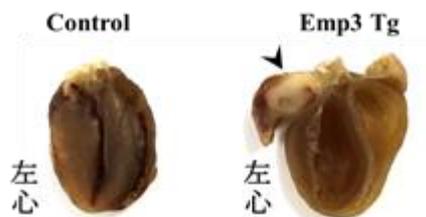


図1. Emp3 Tg マウスで認められた高度の心筋非薄化と心拡張。矢頭は左心房内の血栓。

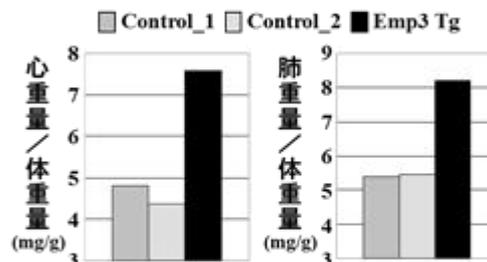


図3. Emp3 Tg マウスの心および肺重量。

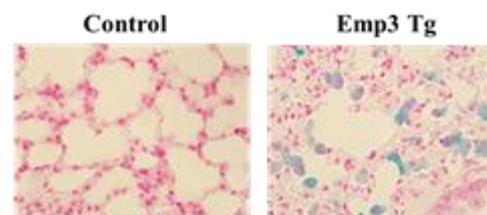


図3. Emp3 Tgの肺における鉄染色(ベルリンブルー染色)の結果。

一方、CAG-Cre マウスと交配することで得られた全身に Emp3 を強制発現する Emp3 Tg/CAG-Cre マウスは、通常飼育下において6ヶ月齢までに体重減少または急激な体重増加を呈して全個体が死亡した(n=11)。特に体重増加を認めた Emp3 Tg/CAG-Cre マウスでは全身皮下における浮腫および胸水や腹水の貯留が認められ、心筋の菲薄化に伴って心腔が高度に拡張していた(図 1)。また、慢性的なうっ血を示唆する左心房内の血栓(鉄染色陽性)や心肺重量の増加が認められた(図 2)。病理組織学的所見では、肺のうっ血を示唆するヘモジデリンを貪食したマクロファージ(心臓病細胞)が肺胞内に多数浸潤する像が認められた(図 3)。また、心筋には高度の錯綜配列や線維化が認められた。以上の所見より、Emp3 Tg/CAG-Cre マウスは

張型心筋症を発症していると考えられる。また小腸炎を発症する個体も散見された。

しかしながら、CAG-Cre 遺伝子を除いた Emp3 Tg マウスでは既述の症状が全く発症しなくなるという予想外の結果が得られた。

CAG-Cre マウス自体は拡張型心筋症や小腸炎を発症することは全くないが、無症候性に突然死する個体が散見される。このことを考慮すると、Cre 遺伝子の強制発現により誘導された何らかの異常を Emp3 が増長した結果として症状が発症したと考えられる。

今後、Emp3 Tg における拡張型心筋症や小腸炎の発症に TLR が関与しているのか否かを検討している必要がある。関与が認められた場合、Emp3 は昨今報告されているような TLR を介した代謝制御に特異的に関与しているのかもしれない。

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 1 件)

Shibata T, Takemura N, Motoi Y, Goto Y, Karuppuchamy T, Izawa K, Li X, Akashi-Takamura S, Tanimura N, Kunisawa J, Kiyono H

, Akira S, Kitamura T, Kitaura J, Uematsu S, Miyake K. PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells.

International Immunology, 査読有, 24 巻, 10 号, 2012, 613-23.

DOI: doi: 10.1093/intimm/dxs068

[学会発表] (計 3 件)

1. Shibata Takuma, Motoi Yuji, Akashi-Takamura Sachiko and Miyake Kensuke

Intracellular TLR4/MD-2 in macrophages

senses LPS and induces a unique set of TLR4 responses. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ、千葉

2. Takuma Shibata, Naoki Takemura, Yuji Motoi, Satoshi Uematsu, Kensuke Miyake. PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells. The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society (IEIIS) meeting, 2012 October 23, Tokyo, Japan

3. Shibata Takuma, Takemura Naoki, Motoi Yuji, Goto Yoshiyuki, Uematsu Satoshi, Miyake Kensuke. PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会、2012 年 12 月 6 日、神戸ポートピアホテル、兵庫県

[図書] (計 2 件)

1. 柴田 琢磨 他

Life Science Information Center、モデル動物利用マニュアル<疾患モデルの作製と利用 免疫疾患>、2011 年、P481~P489

2. 柴田 琢磨 他

医学書院、「medicina」、2013 年、50 巻、3 号

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/kanseniden/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 琢磨 (SHIBATA TAKUMA)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：30554505

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：