

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790424

研究課題名(和文) 炎症増強分子TREM-1のリガンド探索 -敗血性ショックの制御をめざして-

研究課題名(英文) Isolation and identification of TREM-1 binding proteins as candidate for TREM-1 ligands in neutrophil-like differentiated HL-60 cells

研究代表者

細田 浩司 (Hosoda, Hiroshi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40408662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：TREM-1は、単球・マクロファージにおいて膜受容体として炎症性サイトカイン産生を誘導して炎症反応を増強するが、リガンドは不明である。好中球から放出された網目状構造物NETsがマクロファージを活性化することから、好中球NETsの構成成分中のTREM-1リガンドの同定を試みた。

TREM-1-GST融合タンパク質と、好中球様に分化誘導させたHL-60細胞から得た核タンパク質をGST-pull down assayに供し、TREM-1と結合する分子を検索した。その結果、約72 kDaの分子が特異的にTREM-1と結合した。この分子について現在質量分析による同定およびリガンド活性の測定を行っている。

研究成果の概要(英文)：TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells-1) plays a role in inflammation by augmenting inflammatory responses via the production of proinflammatory cytokines in macrophage. Although natural TREM-1 ligands have not been identified, flow cytometrical analyses of the binding of labeled-recombinant TREM-1 suggest that TREM-1 ligands are expressed on neutrophils. Recent studies have demonstrated that neutrophil extracellular traps (NETs) was released from neutrophil to activate macrophage. Here we attempted to identify a potential TREM-1 ligand in the components of NETs. HEK293 cells lysate of over-expressing TREM-1-GST fusion protein and nuclear extract from the neutrophil-like differentiated HL-60 cells were subjected to GST-pull down assay. As a result, about 72 kDa molecules were specifically bind to TREM-1. At present, these molecules were identified by mass spectrometric analysis, and measured ligand potency.

研究分野：生化学

キーワード：TREM-1 Ligand 好中球 マクロファージ 好中球NETs

## 1. 研究開始当初の背景

TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells-1) は単球・マクロファージや好中球で発現する炎症性受容体として知られているが、その活性化メカニズムはいまだに不明である。TREM-1 発現は細菌感染により亢進され、敗血症マウスモデルにおける抑制性ペプチド (TREM-1 の部分ペプチド: LP17) による TREM-1 の阻害は、マウスモデルの死亡率を改善することが知られている。

TREM-1 に対するリガンドが不明なことから、TREM-1 による細胞内応答はアゴニスト作用を有する TREM-1 抗体を利用して研究されており、細胞内シグナル伝達を仲介する DAP12 (DNAX protein of 12 kDa) を介したシグナル伝達によって細胞の活性化、サイトカイン産生、炎症応答の増幅を誘導が誘導される。

TREM-1 の機能や TREM-1 自身の疾患との関連性をより理解するためには、TREM-1 の生理的リガンドの同定を必要とする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、現在までに単離されていない TREM-1 の生理的リガンドを同定することを目的とする。これまでに、TREM-1 が好中球に結合することから、好中球細胞表面に TREM-1 のリガンド分子が存在すると考えられてきた。そこで、好中球成分より TREM-1 のリガンド分子の探索・同定を試みる。

また、TREM-1 リガンド候補分子を同定した後、それらのリガンド活性を測定する。そのための実験系を確立する。

## 3. 研究の方法

### 抗体や試薬など

抗 GST 抗体を MBL 社より購入した。抗 TREM-1 抗体を R&D より購入した。X-tremeGENE HP DNA トランスフェクション試薬を Roche より購入した。LPS を (E.coli O111: B4) シグマ社から購入した。活性化型ビタミン D3 を SantaCruz 社より購入した。GST 発現プラスミド pGEX-4T-3 を GE healthcare より購入した。NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Regents を Thermo 社より購入した。PluriBeads CD11b および Ly6G を PluriSelect 社より購入した。ヒト IL-1 $\beta$  ELISA kit を ebioscience 社より購入した。ワンステップ CBB 染色液をバイオクラフト社より購入した。

### 細胞培養

HEK293 細胞およびヒト単球系細胞 THP-1 は 10% FBS、100 units/mL ペニシリン、100mg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM 培地で維持した。ヒト骨髄性白血病細胞 HL-60、ヒトマクロファージ系細胞 J774 およびマウスマクロファージ系細胞 RAW264.7 は 10% FBS、100 units/mL ペニシリン、100mg/mL ストレプトマイシンを含む RPMI-1640 培地で維持した。

HL-60 ( $1 \times 10^7$  個) を 150mm ディッシュに播種した。培地に 1.25% DMSO (dimethyl sulfoxide) を添加し 7 日間培養して、顆粒球様に分化誘導させた。二日おきに培地交換し、最終的に  $2 \times 10^7$  の顆粒球様 HL-60 細胞を得た。

### RT-PCR

THP-1 細胞 ( $1 \times 10^6$  個) を 35 mm ディッシュに播種・培養した後、分化誘導剤の活性化型ビタミン D3 (VtD3, 100 nM) で 48 時間、および LPS (100 ng/ml) で 24 時間刺激し、細胞を回収した後 total RNA を調製した。その後、RT-PCR 法によって TREM-1 mRNA 発現レベルを測定した。

### ELISA

J774 細胞 ( $1 \times 10^4$  個) を 96 well プレートに播種した後、VtD3 (100 nM)、LPS (100 pg/ml) および抗 TREM-1 アゴニスト抗体 (5  $\mu$ g/ml) で 24 時間培養し、上清を ELISA のサンプルとした。ELISA にはヒト IL-1 $\beta$  ELISA kit を用い、取扱説明書に従って行った。

### TREM-1 発現プラスミド作成

マウス TREM-1 全長 (TREM-1-full) の cDNA を RAW264.7 細胞の mRNA より PCR にて増幅し、pcDNA3 ベクターにサブクローニングした (pcDNA3TREM-1)。GST の cDNA を pGEX-4T-3 より増幅し、pcDNA3 ベクターにサブクローニングした (pcDNA3GST)。TREM-1 全長の C 末端に GST を融合させたキメラタンパク質を発現するプラスミド、pcDNA3 TREM-1-GST を作成した。

### 好中球の単離

C57BL/6 マウスから採血し全血を得た。全血 1000  $\mu$ l に対して 40  $\mu$ l の PluriBeads CD11b あるいは Ly6G を混ぜ、室温で 30 分間ローターを用い穏やかに反応させた。S-pluriStrainer を 50mL 遠沈管に設置し、サンプルを流し込んだ後、2 ml の wash buffer で洗浄した。S-pluriStrainer を新たな 50mL 遠沈管に設置し、1 ml の detachment buffer でビーズから細胞を回収した。マウスの全血 1000  $\mu$ l あたり、およそ  $5 \times 10^5$  個の細胞を得た。

### GST-pull down assay

HEK293 細胞 ( $3 \times 10^6$  個) を 100mm ディッシュに播種・培養した後、10  $\mu$ g の pcDNA3 TREM-1-GST、pcDNA3TREM-1-IgG-L-GST、

pcDNA3TREM-1-JM-GST および pcDNA3 GSTを X-tremeGENE HP 試薬を用いてトランスフェクションした。48 時間培養後、2 回 cold PBS で洗浄、回収した後、lysis buffer (20mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 1% NP40、25% グリセロール、1×complete protease cocktail (Roche)) で 4°C、30 分インキュベートした。サンプルを 500×g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を GST 融合タンパク質サンプルとして -80°C で保存した。

顆粒球様に分化させた HL-60 細胞あるいはマウス好中球から、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Regents を用い説明書に従って可溶性画分と核抽出液をそれぞれ得た。それぞれの溶液に、等量の buffer (20mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 50% グリセロール、1×complete protease cocktail (Roche)) を加え -80°C で保存した。

GST 融合タンパク質を含むライゼートに Glutathione sepharose 4B (GE healthcare) ビーズを加え 4°C で 4 時間ローテーターを用い反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、HL-60 細胞あるいは好中球の可溶性画分あるいは核抽出液を加え、4°C で一晩ローテーターを用い反応させた。その後 PBS で 3 回洗浄し、サンプルとした。

一方、TREM-1-GST、TREM-1-IgG-GST、TREM-1-JM-GST が結合した sepharose に対して、2.5 μg の抗 TREM-1-PE 抗体あるいはアイソタイプコントロールを 100 μl の PBS 中で 4°C、1 時間ローテーターを用いて反応させた。その後 PBS で 3 回洗浄し、サンプルとした。

なお、細胞抽出液や Glutathione sepharose 4B 反応後のビーズ、pull-down 後の一部サンプルをウエスタンブロットに供し、サンプル中の TREM-1-GST の存在を確認した。

#### SDS-PAGE

GST-pull down assay を行ったサンプルに 2×SDS sample buffer を加え、98°C で 5 分間インキュベートした。サンプルを 12% アクリルアミドゲルで電気泳動し分離した。

#### CBB 染色

SDS-PAGE 後のアクリルアミドゲルをワンステップ CBB 染色液を用いて一晩染色し、その後蒸留水で脱色操作を施した。検出されたバンドから、対照群と比較して特異的あるいは多く検出されたバンドを TREM-1 に結合しうるタンパク質として質量分析に供した。

#### Western blot

SDS-PAGE 後のアクリルアミドゲルから、電気泳動により分離したタンパク質をセミドライ式ブロッティング装置 (BioRad) を用いて PVDF 膜に転写した。1×Block Ace (雪印) を含む 1×TBS (20mM Tris-HCl

pH7.4、150mM NaCl) - 0.05% Tween-20 (TBS-T) で、室温で 1 時間インキュベートし、ブロッキングした。その後、膜を TBS-T で 3 回洗浄し、抗 GST 抗体 (1:200) を含む TBS-T で、4°C で一晩インキュベートした。TBS-T で膜を三回洗浄した後、抗ラビット IgG-HRP (1:2000) を含む TBS-T で、室温で 2 時間インキュベートした。その後、膜を TBS-T で 3 回洗浄し、Super Signal West Femto 試薬 (Thermo) を用い、ウエスタンブロットイメージングシステム C-Digit (LI-COR 社) を使用してシグナルを得た。

GST pull-down assay において擬似的なリガンドとして抗 TREM-1 抗体と反応させたサンプルにおいては、TREM-1 抗体を認識する抗ラット IgG-HRP を反応させ、その結合を確認した。

#### 4. 研究成果

これまでの報告から、TREM-1 はリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) による TLR4 シグナルと協調して、IL-1βや TNF-αなどの炎症性サイトカイン産生を増強することが知られている。また、TREM-1 は単球からマクロファージへ分化・成熟するに従って発現増強されることも明らかにされている (Ref. 1)。本研究では、TREM-1 リガンドの候補分子を分離・同定し、そのリガンド活性を調べることが必要である。TREM-1 発現レベルを高められればリガンドによる刺激が入りやすくなり、より感度の良いリガンド活性測定法が確立できるのではないかと考えた。単球・マクロファージ系細胞を分化誘導する薬剤として活性化型ビタミン D (VtD3) を用い、単球系細胞 THP-1 の TREM-1 発現が亢進するのか、LPS 刺激によってさらに TREM-1 発現が亢進するのか RT-PCR によって調べた (Fig. 1)。

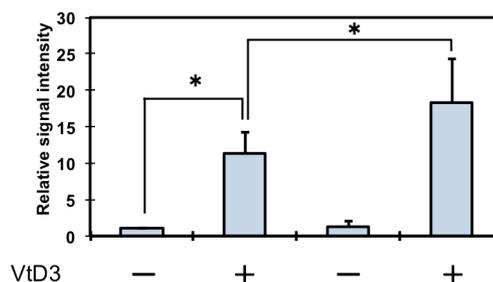


Fig. 1 THP-1 細胞を VtD3 (100 nM) や LPS (100ng/ml) で刺激し、TREM-1 mRNA 発現を RT-PCR 法で測定した。

その結果、VtD3 処理によって TREM-1 mRNA 発現は有意に亢進した。また、24 時間後から LPS 刺激を施すと、さらに TREM-1 発現が亢進した (Fig.1, Ref. 2)。なお、LPS の刺激のみでは TREM-1 発現は誘導されなかった。この結果から、単球系細胞において LPS 刺激が起こらなくとも TREM-1 の発現誘導が可能なが示された。この結果については、VtD3 による TREM-1 の発現制御メカニズムについてさらに解析し International Journal of Molecular Medicine 誌に報告した (Ref. 2)。

次に、マクロファージ系細胞 J774 を VtD3 や LPS で刺激し、さらに TREM-1 アゴニスト抗体を作用させることでサイトカイン産生が誘導できるのか確かめ、リガンド活性測定法の確立を試みた。

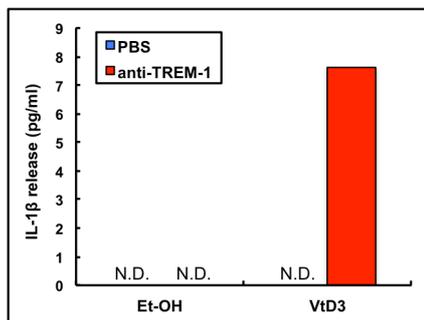


Fig. 2 J774 細胞を 100pg/ml の LPS 存在下で VtD3 や TREM-1 アゴニスト抗体で刺激し、IL-1β 放出を ELISA 法で測定した。N.D.: 検出限界以下

100 pg/ml の低濃度 LPS の存在下において、24 時間の VtD3 処理と同時に、TREM-1 アゴニスト抗体 (anti-TREM-1) 処理を施した場合、IL-1β の放出が観察された。一方、VtD3 処理を施さない場合 (Et-OH) や、施した場合においても 100 pg/ml の LPS 刺激のみでは IL-1β の放出が観察されなかった (Fig. 2)。この結果から、リガンドである TREM-1 アゴニスト抗体による TREM-1 活性化によってサイトカイン産生が亢進することが明らかになり、VtD3 による TREM-1 発現亢進と低濃度 LPS 刺激を施すことで、TREM-1 アゴニスト活性を測定する実験系が確立できたものと考えている。

TREM-1 のリガンド分子を単離するために、TREM-1 全長の C 末端に GST が融合したキメラタンパク質を発現するプラスミドを作成し、HEK293 細胞に TREM-1-GST を発現させ、Glutathione sepharose 4B で精製した。また、擬似的なリガンドとして細胞表面の TREM-1 を認識する anti-TREM-1-PE を反応させた。その結果、TREM-1-GST 全長の発現、および Glutathione sepharose による精製を抗 GST 抗体によるウエスタンブロットによって確認した (data not shown)。さらに sepharose 上の TREM-1-GST を抗 TREM-1 抗体が認識することも、抗 TREM-1 抗体を認識する抗ラット IgG-HRP のシグナルで確認した (data not shown)。以上の実験から TREM-1-GST を用いることで好中球成分からのリガンド候補分子を単離・同定することが可能となると考えられた。

そこで、マウス好中球や顆粒球様に分化させた HL-60 細胞の可溶性画分中の TREM-1 結合分子の取得を試みた。しかし、使用した好中球や HL-60 細胞の可溶性画分が少なかったためか、TREM-1 に結合するタンパク質は見られるものの、安定した結果は得られなかった。

最近の報告で、好中球から放出された

DNA やヒストンタンパク質を含む網目状構造物 NETs (neutrophil extracellular traps) が、細菌を捕獲・殺菌するだけでなくマクロファージを活性化することが見出され、敗血症の病態における NETs の役割が注目されている (Ref. 3)。さらに、NETs の構成成分として知られている HSP-70 や HMGB-1 がマクロファージを活性化することが *in vitro* において見出されている (Ref. 4)。以上の知見から、好中球 NETs に含まれる分子が TREM-1 リガンドとして働き、マクロファージの活性化をもたらす可能性を考えた (Fig.3)。

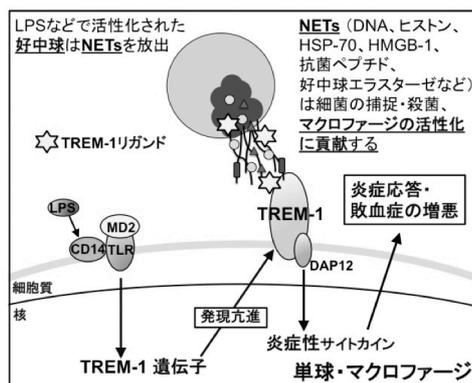


Fig. 3 LPS 刺激された単球・マクロファージ系細胞では TREM-1 の発現が亢進する。また、好中球由来のリガンド分子が NETs とともに放出され TREM-1 と結合し、炎症応答を増強する (仮説)。

また、大量のタンパク質が必要になるため、顆粒球様に分化・成熟させた HL-60 細胞の抽出液を用いて TREM-1 リガンドの単離・同定を試みた。Glutathione sepharose 4B で精製した TREM-1-GST あるいは GST と  $2 \times 10^7$  個の HL-60 細胞から得た可溶性画分あるいは核抽出液を用いて GST pull-down assay を行った。

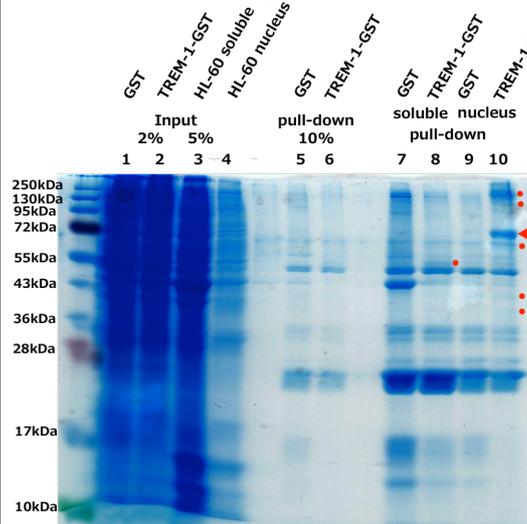


Fig. 4 TREM-1-GST あるいは GST と顆粒球様に分化・成熟させた HL60 細胞の可溶性画分、核抽出液を用いて GST pull-down assay を行った。電気泳動後アクリルアミドゲルを CBB 染色した。◀: TREM-1 に特異的に結合した分子、•: 対照群の GST に比べ TREM-1-GST に多く結合した分子。

その結果、核抽出液のタンパク質において赤三角 (◀) で示された約 72kDa の分子が TREM-1 と特異的に結合することが示された (Fig. 4、レーン 10)。また、可溶性画分あるいは核抽出液のタンパク質において、赤点 (•)

で示された約 55kDa のバンド (可溶性画分、レーン 8)、約 200kDa、150kDa、65kDa、43kDa、38kDa の分子 (核抽出液、レーン 10) は、対照群の GST よりも TREM-1-GST で多く検出されていることから、TREM-1 結合分子の可能性が考えられる (Fig. 4)。また、GST pull-down に使用した input と GST pull-down 産物を抗 GST 抗体によるウェスタンブロット分析に供した結果、GST pull-down assay が成功していることを確認した (data not shown)。

以上の結果より、TREM-1-GST を用いて顆粒球様に分化させた HL-60 細胞の核抽出液および可溶性画分から、TREM-1 に結合する可能性のある複数の分子を得ることに成功した。現在これらについて、質量分析により分子の同定を行っており、前述のリガンド活性測定法を用いて、TREM-1 リガンドとしての能力を調べたいと考えている。

本研究による TREM-1 リガンドの単離・同定は、敗血症の病態をより正確に理解し、新たな敗血症治療法の確立に貢献することが期待される。

#### <引用文献>

1. Gingras MC, Lapillonne H, and Margolin JF: TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol Immunol* 38: 817-824, 2002.
2. Hosoda H, Tamura H, and Nagaoka I. Evaluation of the lipopolysaccharide -induced transcription of human TREM-1 gene in vitamin D3-matured THP-1 macrophage-like cells. *International Journal of Molecular Medicine*, In press, 2015
3. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, and Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 303(5663): 1532-1535, 2004
4. El Mezayen R, El Gazzar M, Seeds MC, McCall CE, Dreskin SC, and Nicolls MR. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol Lett.* 111(1): 36-44, 2007.

#### 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)

1. Hiroshi Hosoda, Hiroshi Tamura, and Isao Nagaoka. Evaluation of the lipopolysaccharide -induced transcription of human TREM-1 gene

in vitamin D3-matured THP-1 macrophage -like cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 査読有 In press, 2015

[学会発表] (計 7 件)

1. 細田浩司、田村弘志、長岡 功、マクロファージ様細胞における TREM-1 遺伝子の発現制御メカニズム 第 33 回日本炎症再生医学会総会、2012 年 7 月 5 日～6 日、ホテル日航福岡

2. Hiroshi Hosoda, Hiroshi Tamura, and Isao Nagaoka. Regulation of the expression of TREM-1 by LPS in human monocytes/macrophages. The 12<sup>th</sup> Biennial International Endotoxin and Innate Immunity Society (IEIIS) meeting 2012, 23 Oct 2012～26 Oct, National Center of Sciences Building, Tokyo.

3. 細田浩司、田村弘志、長岡功、ヒト単球・マクロファージ系細胞 THP-1 における TREM-1 の発現制御、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14 日～16 日、福岡国際会議場

4. 細田浩司、田村弘志、長岡功、Regulation of TREM-1 gene expression by LPS in human monocytes/macrophages. 第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18 日～20 日、幕張メッセ国際会議場

5. 細田浩司、田村弘志、長岡功、C/EBP 転写調節因子群によるヒト単球・マクロファージ系細胞における TREM-1 の転写制御、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日～13 日、パシフィコ横浜

6. Hiroshi Hosoda, Hiroshi Tamura, and Isao Nagaoka. Regulation of TREM-1 gene expression in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. The 12<sup>th</sup> Japan-Korea International Symposium on Microbiology 2014, 24 Mar 2014～25 Mar, Tower Hall Funabori

7. Hiroshi Hosoda, Hiroshi Tamura, and Isao Nagaoka. Regulation of TREM-1 gene expression by C/EBP family of transcription factors in human monocytes/macrophages. 第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日～18 日、京都国際会館

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

細田浩司 (HOSODA, Hiroshi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40408662

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし