

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16654

研究課題名（和文）炎症性疾患におけるPGLYRP1/PGNを介したTREM-1シグナル伝達の役割

研究課題名（英文）Role of TREM-1 signaling by PGLYRP1/PGN in inflammatory diseases

研究代表者

細田 浩司（Hosoda, Hiroshi）

東京農業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：40408662

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）：TREM-1はマクロファージの膜受容体として、炎症性サイトカイン産生を増強し敗血症の病態を悪化させ、また、様々な非感染性の慢性炎症性疾患の増強因子としても働く。ペプチドグリカン(PGN)認識タンパクPGLYRP1が菌体のPGNとTREM-1リガンドとして働くことが報告されたが、そのメカニズムは不明だった。TREM-1受容体シグナルのレポーター細胞を作成し、PGLYRP1/PGNをリガンドとするTREM-1シグナルの役割について解析した。市販のPGLYRP1やPGNによりTREM-1シグナルは活性化されたが、自作のPGNを用いた場合にはTREM-1シグナルへの影響を観察できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TREM-1の活性化により腫瘍の縮小が見られるなどTREM-1シグナリングと慢性炎症や腫瘍形成の関係に注目が集まっている。今回マウスマクロファージ系細胞株のJ774.1細胞をベースにTREM-1シグナル下流のNFATの活性化をモニターするLuciferaseレポーター細胞を作成し研究に用いた。PGLYRP1/PGNによるTREM-1の活性化について自作のPGNでは調査できなかったものの、細胞内Ca²⁺シグナルの惹起やTREM-1抗体により活性化されることが示されたことから、TREM-1シグナルのモニター、TREM-1シグナルを増強・減弱する分子のスクリーニングに利用できると思われる。

研究成果の概要（英文）：TREM-1 acts as a membrane receptor on innate immune cells to enhance inflammatory cytokine production and exacerbate the pathogenesis of sepsis, as well as an enhancer of various non-infectious chronic inflammatory diseases. The peptidoglycan (PGN) recognition protein PGLYRP1 was reported to act as a PGN and TREM-1 ligand for the fungus, but the mechanism of this function was unknown. Therefore, we generated reporter cells for TREM-1 receptor signaling in macrophage-based cells and analyzed the role of TREM-1 signaling with PGLYRP1/PGN as a ligand. TREM-1 signaling was activated by commercially available PGLYRP1 and PGNs, but no effect on TREM-1 signaling was observed when using PGNs created by us.

研究分野：細菌学(含真菌学)

キーワード：TREM-1 Ligand PGLYRP1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells-1) は、主に単球・マクロファージにおいて膜受容体として細胞内シグナルを活性化させ、炎症性サイトカイン産生を誘導して敗血症などにおいて炎症反応を増強する。そして、TREM-1 は炎症性腸疾患やコラーゲン誘発性関節炎など非感染性の慢性炎症性疾患においても増強因子として働くことが示唆され、阻害ペプチドで TREM-1 機能を抑制すると病態緩和がもたらされる。以上の知見より、TREM-1 は幅広い”炎症”の増強因子として機能することが示唆されている。TREM-1 のリガンド分子については不明であったが、好中球顆粒成分に含まれるペプチドグリカン (PGN) 認識タンパクの PGLYRP1 (peptidoglycan recognition protein 1) が細菌由来の PGN とともに TREM-1 のリガンドとして働くことが報告された (Read *et al. J. Immunol.* 194:1417, 2015)。

2. 研究の目的

PGLYRP1/PGN 複合体が TREM-1 リガンドとして働く際に、どのような形態の PGLYRP1 や PGN がリガンドとして機能するのか、グラム陽性菌とグラム陰性菌の両者の PGN とともに TREM-1 リガンドとして働くとされているが、そのリガンドとしての分子基盤は不明であった。そこで、PGLYRP1/PGN 複合体を介した TREM-1 シグナル伝達について詳細に解析し、幅広い”炎症”疾患の病態形成における TREM-1 の役割について明らかにすること、さらに、TREM-1 シグナルが病態形成に關与する疾患モデル動物を作成し、TREM-1 の関係について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TREM-1 シグナリングレポーター細胞の作成

TREM-1 シグナルは細胞内 Ca^{2+} 上昇をもたらす下流のシグナル伝達分子を活性化することが知られている。TREM-1 シグナルを調べるためのレポーターとして NFAT が知られており、今回は NFAT-nanoLuc をレポーター遺伝子として (pNL[NLucP/NFAT-PE/Hygro]vector, promega 社) マウスマクロファージ系 J774.1 細胞に Stable Transfection した。その際、レポータープラスミドが J774.1 細胞により異物認識され細胞の活性化をもたらさないように、異物認識から免れる NATE™ 試薬 (InvivoGen 社) を用いた。次に、Hygromycin 入りの RPMI1640/10%FBS 培地で培養し、レポータープラスミドが Stable Transfection された J774.1 細胞をスクリーニングした。合計 3 株のレポーター細胞株を取得した。

(2) レポーター細胞株の評価

レポーター遺伝子が TREM-1 シグナルを伝達しているか確かめるために、マウス TREM-1 アゴニスト抗体 (mouse MAB1187, R&D 社) による刺激、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)、PGLYRP1 (mouse recombinant, R&D) / PGN (*S. aureus*, *E. coli*, R&D) 複合体を用いて TREM-1 シグナル活性化が起こるのか Luciferase レポーターアッセイを行なった。その際、細胞抽出液を作成し、BCA アッセイによってタンパク質濃度を調べ、重量 (μg) あたりの RLU 値として算出した。以前より、TREM-1 抗体による TREM-1 の活性化は、抗体をプレート上に固着させた上で細胞を播種することが知られていた (Bouchon A. *et al. J. immunology*, 164:4991, 2000, Read CB. *et al. J. Immunol.* 194:1417, 2015)。そこで、TREM-1 抗体および PGLYRP1/PGN でレポーター細胞を刺激する場合には、これらを培養プレート底面に固着させ、レポーター細胞を播種し実験を行なった。また、マクロファージ系細胞は様々な受容体により微生物認識されるため、TLR2 inhibitor や NOD2 inhibitor peptide を培地中へ添加し実験を行なった。以降のグラフは平均値 \pm 標準偏差で表した。

(3) 乳酸菌ペプチドグリカン精製及びレポーター細胞刺激による TREM-1 シグナルへの影響

乳酸菌株 *Lactiplantibacillus plantarum* 標準菌株培養ペレットを緩衝液に懸濁し、ガラスビーズを加えマルチビーズショッカーにより破碎し遠心分離により膜画分を集めた。4% SDS 処理、5% トリクロロ酢酸で処理し、乾燥させることで粗ペプチドグリカン (粗 PGN) を得た。市販の PGLYRP1 と市販の PGN あるいは粗 PGN、*L. plantarum* 死菌体を培養プレートに固着させ、レポーター細胞を播種しレポーターアッセイを行なった。さらに、市販の PGLYRP1/PGN 複合体によるレポータ上昇を粗 PGN が阻害するのか検討した。

(4) 病態モデル動物の作成 (デキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎)

BALB/c (雄) 9 週齢マウスを 4 群に分け、10ppm 塩素水 (NC)、5% DSS 塩素水 (PC)、5% DSS (デキストラン硫酸ナトリウム、分子量 5000, Nacalai tesque) 塩素水 + *Weissella Thailandensis* A 株 (未発表データのため株名は非公表) (2.5×10^8 CFU) を 9 日間投与した。投与期間の体重測定、便の形状観察 (DAI) を行い、イソフルラン吸入麻酔下での心臓採血による屠殺後、各種臓器 (脾臓、肝臓、腸) 重量と腸長を計測した。また、腸管中央部の組織を回収し、組織染色 (HE

染色)を行った。心臓採血で得た血液サンプルから、ELISA 試験を行いサイトカイン (TNF- α 、IL-6、IL-17) の測定を行った。

(5) 病態モデル動物の作成 (*Listeria monocytogenes* 感染マウス)

L. monocytogenes EGD 株 (九州大学生体防御医学研究所より供与) を BALB/c 系雄マウスに腹腔投与し強化培養し、グリセロールストックを作成した。9 週齢 BALB/c 系雄マウスに 3.3×10^8 CFU/100 μ l に調整した *Weissella Thailandensis* A 株 (WA 群)、B 株 (WB 群) (未発表データのため株名は非公表) 及び PBS (NC 群、PC 群) を経口ゾンデを用いて 1 日 100 μ l、週 5 回 2 週間飲用させた。次に、PC 群、WA 群、WB 群に対して、*L. monocytogenes* EGD 株 1.0×10^6 CFU を腹腔内投与し、NC 群に対しては PBS を投与した。*L. monocytogenes* 投与の 72h 後、心臓採血にて屠殺し、さらに腹腔に 5ml PBS を注入し腹腔洗浄液を回収した。続いて、脾臓、肝臓を摘出し重量の計測後、ホモジェネートを作成した。腹腔洗浄液サンプル、脾臓及び肝臓ホモジェネートを段階希釈し、BHI 寒天培地に播種、37°C で一晚培養後コロニー数を計測した。さらに血漿中のサイトカインレベル (IFN-) を ELISA によって測定した。

4. 研究成果

(1) TREM-1 シグナリングレポーター細胞の作成と評価

単球・マクロファージ系細胞におけるリガンドである PGLYRP1/PGN の TREM-1 シグナルに対する役割を解析するためには、TREM-1 シグナルが伝達されていることを知る簡便な実験手法の確立が求められる。そこで、マウス単球・マクロファージ系 J774.1 細胞に、TREM-1 シグナルの下流に位置する NFAT の応答配列を有するルシフェラーゼレポーター遺伝子 (NFAT-Luc) を有する stable transfection cell の構築を試みた。しかし、J774.1 細胞はレポーター遺伝子を異物として認識し、細胞活性化、その結果細胞死が誘導された。そこで、プラスミドを異物認識から免れさせる NATE™ (InvivoGen) を用い stable transfectant を得ようと試みた。その結果、NATE™ を用いることで、レポータープラスミドを Transfection しても J774.1 細胞は活性化されず、Hygromycin による stable transfectant のスクリーニングを行える状況となった。結果として 3 株の stable transfectant (NFATL-6、NFATL-7、NFATL-11) を得た。

次に、3 株がレポーター細胞として有用であるか確認した。以前より TREM-1 は TREM-1 アゴニスト抗体によって刺激されシグナル伝達されること、TREM-1 シグナリングは細胞内 Ca^{2+} 上昇を引き起こすこと、PGLYRP1/PGN によるシグナル伝達されることが知られている。この 3 点について TREM-1 レポーター細胞の有用性について確認した。96well plate に TREM-1 アゴニスト抗体を播種・固着させ、レポーター細胞を播種、24 時間後にレポーターアッセイを行った。その結果、NFATL-7 および NFATL-11 が TREM-1 アゴニスト抗体に反応し、反応性は NFATL-11 の方が高いことが示された。次に PMA (細胞内 Ca^{2+} 上昇) によってレポーターが反応するのかが確認した。その結果、PMA の濃度上昇に伴い、Luciferase 活性が上昇したことから TREM-1 シグナルに反応するものと考えられた (図 1)、以降 NFATL-11 の結果のみを示す。

TREM-1 のリガンドが PGLYRP1/PGN であることが示唆されていたため、市販のマウス PGLYRP1 と PGN (*S. aureus*, *E. coli*) を用いて、レポーターが反応するのかが確認した。また、PGLYRP1 の抗体を用いることで、反応が阻害されるのかが検討した。その結果、マウス PGLYRP1 と PGN-SA あるいは PGN-EC によって Luciferase 活性が上昇したこと、PGLYRP1 抗体の共存下では活性上昇が阻害されることが示された。

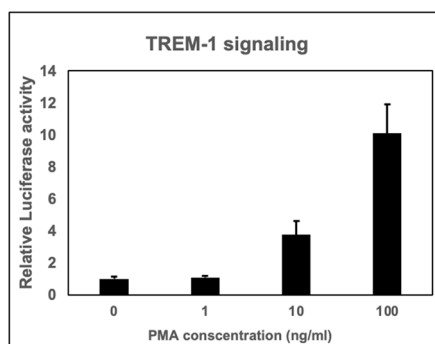


図 1 TREM-1 レポーター細胞の PMA 刺激に対する応答

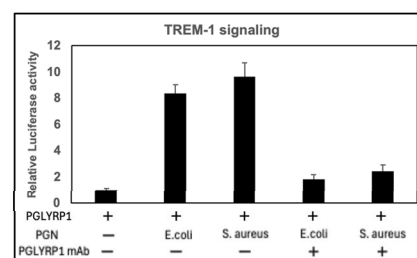


図 2 PGLYRP1/PGN の効果

(2) *Lactiplantibacillus plantarum* 標準菌株ペプチドグリカンと PGLYRP1 による TREM-1 レポーター細胞刺激

レポーター細胞の有用性が確認されたことから、乳酸菌株からペプチドグリカン抽出・単離し、市販の PGLYRP1 と共に刺激に用いた。 5×10^6 cell に相当するペプチドグリカン及び PGLYRP1 をプレートに固着させ、 5×10^4 個のレポーター細胞を播種し培養したのち、レポーターアッセイに供したが、レポーター遺伝子の発現上昇は観察されなかった。また、市販の PGLYRP1 と PGN によるレポーター活性の上昇に対して単離したペプチドグリカンが影響を与えるのか、PGLYRP1/PGN と共存させてプレートに固着しレポーター細胞を刺激したが、レポーター活性の上昇はほとんど影響を受けなかった。現在、単離したペプチドグリカンについて質の評価を行っており、ペプチドグリカンの単離方法自体を検討する必要があると考えている。

これらの研究を行っている期間に PGLYRP1 の部分ペプチドが TREM-1 に結合し、TREM-1 の

シグナリングに影響を与えること (Sharapova *et al. Int. J. Mol. Sci.* 22(20): 11213, 2021) さらに PGLYRP1 の N 末端の部分ペプチドが TREM-1 のリガンドとなり得ることが発表された (Sharapova *et al. Int. J. Mol. Sci.* 23(10):5752, 2022)。これらの現象へのペプチドグリカンの作用については記載されていないものの、PGLYRP1 が単独で、あるいはペプチドグリカンとの複合体として TREM-1 シグナルのリガンドとなり得ることを示しており興味深い。これらの論文を参考にし、今後の研究の方向性を定めていきたいと考えている。

(3) デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性大腸炎における *Weissella* 属乳酸菌飲用効果
 研究の後半では、病態モデル動物における TREM-1 シグナルの役割について検討を行う計画をしていた。そこで、すでに TREM-1 の病態への関与が示唆されている病態モデル動物として、DSS 誘発性大腸炎マウスモデルを作成し、*Weissella* 属乳酸菌飲用の効果を検討した。

DSS 投与開始 3 日目以降から 5% DSS 群の体重が他の群と比較して有意に減少していることが認められ、屠殺日の 9 日目において投与開始から約 20% 低下していた。一方、*Weissella* 属乳酸菌投与群においては、投与開始 4 日目以降より体重の減少傾向が観察され、屠殺日では約 15 ポイントの低下と減少抑制を示した (図 3)。また、便の軟度を計測したところ、PC 群では平均 2.4 ポイントであったのに対し、W 群では 1.8 ポイントと便の軟化抑制が認められた (図 4)。

臓器重量を計測したところ、NC 群に対して、PC 群と W 群で肝臓での有意な減少と脾臓での有意な増加が観察された。また W 群と PC 群では臓器重量の差異は認められなかった。腸長においては NC 群と PC 群で差異は見受けられず、NC 群と W 群では、有意に減少している結果となった。また、PC 群と W 群において虫垂の黒変が確認されたが、PC 群と比べ W 群の黒変部位は少ない傾向にあった。

屠殺時に採取した血液サンプル中の炎症性サイトカインレベル (TNF- α 、IL-6、IL-17) を ELISA によって調べたが、IL-6 が一部のサンプルにおいて微量に検出されたのみであった。

大腸中央部位の HE 染色では、PC 群の腸管粘膜組織の損傷が確認された。また、W 群の腸管粘膜組織では粘膜組織の損傷は少ない傾向にあった。

これらの解析より病態の形成に TREM-1 の関与が知られていた DSS 誘発性大腸炎において、*Weissella* 属乳酸菌の飲用により大腸炎の症状の改善効果が認められた。

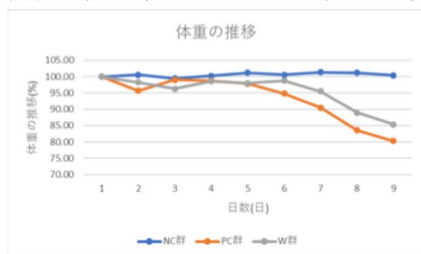


図 3 DSS 誘発性大腸炎マウスに対する *Weissella* 属乳酸菌飲用の体重に対する効果

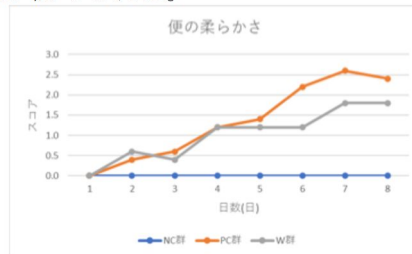


図 4 DSS 誘発性大腸炎マウスに対する *Weissella* 属乳酸菌飲用の便の柔らかさに対する効果

(4) *Listeria monocytogenes* 感染マウスにおける *Weissella* 属乳酸菌飲用効果

研究の後半では、病態モデル動物における TREM-1 シグナルの役割について検討を行う計画をしていた。そこで、TREM-1 は細菌感染症において炎症増強効果があることが知られていたことから、*Listeria monocytogenes* 感染マウスを作成し、*Weissella* 属乳酸菌飲用の効果を検討した。

肝臓において、PBS を経口投与した群に対し、*W. thailandensis* を経口投与した群では *L. monocytogenes* と思われるコロニーが約 70% に、脾臓において約 50% に抑えられた (図 5、6)。一方腹腔滲出液では減少傾向は見られなかった。一方、血漿中のサイトカインレベルについては、IFN- γ は PBS を経口投与した群に対し、*W. thailandensis* を経口投与した群では 2.3 倍高いレベルで検出された。

これらの解析より病態の形成に TREM-1 の関与が知られている細菌感染症 (*Listeria monocytogenes* 感染症) において、*Weissella* 属乳酸菌の飲用により病原である *Listeria monocytogenes* の生菌数の低下と細胞性免疫活性化の指標となる IFN- γ の増加効果が認められた。すなわち *Weissella* 属乳酸菌により免疫賦活効果がもたらされ、*Listeria monocytogenes* の感染を抑制している可能性が示唆された。

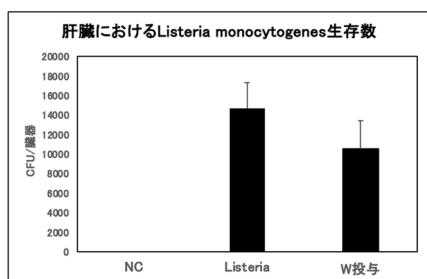


図 5 *Listeria monocytogenes* 感染マウスに対する *Weissella* 属乳酸菌飲用の肝臓生菌数に対する効果

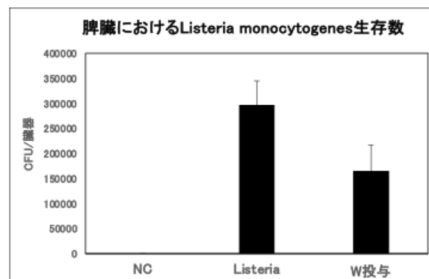


図 6 *Listeria monocytogenes* 感染マウスに対する *Weissella* 属乳酸菌飲用の脾臓生菌数に対する効果

< 引用文献 >

Read CB, Kuijper JL, Hjorth SA, Heipel MD, Tang X, Fleetwood AJ, Dantzer JL, Grell SN, Kastrup J, Wang C, Brandt CS, Hansen AJ, Wagtmann NR, Xu W and Stennicke VW. Cutting Edge: identification of neutrophil PGLYRP1 as a ligand for TREM-1. *J. Immunol.* (2015) 194(4):1417-1421.

Bouchon A, Dietrich J and Colonna M. Cutting Edge: Inflammatory Responses Can Be Triggered by TREM-1, a Novel Receptor Expressed on Neutrophils and Monocytes. *J. Immunol.* (2000) 164(10):4991-4995.

Sharapova TN, Romanova EA, Chernov AS, Minakov AN, Kazakov VA, kudriaeva AA, Belogurov Jr AA, Ivanova OK, Gabibov AG, Telegin GB, Yashin DV and Sashchenko LP. Protein PGLYRP1/Tag7 Peptides Decrease the Proinflammatory Response in Human Blood Cells and Mouse Model of Diffuse Alveolar Damage of Lung through Blockage of the TREM-1 and TNFR1 Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* (2021) 22(20):11213.

Sharapova TN, Ivanova OK, Romanova EA, Sashchenko LP and Yashin DV. N-Terminal Peptide of PGLYRP1/Tag7 Is a Novel Ligand for TREM-1 Receptor. *Int. J. Mol. Sci.* (2022) 23(10):5752.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawamoto-Miyamoto Noriko, Hosoda Hiroshi, Miyoshi Kazuyuki, Nomoto Koji	4. 巻 86
2. 論文標題 Glutamate in the medium of Lactiplantibacillus plantarum FL-664 affects the production of IL-12(p40) on murine spleen cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 535 ~ 542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac006	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroshi Hosoda, Naoto Tanaka, Koji Nomoto
2. 発表標題 Immunostimulatory activity by Weissella SP in BALB/c mice.
3. 学会等名 The International Symposium on Bifidobacterium Research（国際学会）
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 青木 吉光、山口 穂高、竹山 広也、岩屋 朝天、羽田 未里、丸山 弘子、細田 浩司
2. 発表標題 デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎マウスに対するブドウ果皮発酵物投与の影響
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部会
4. 発表年 2023年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------