

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790299

研究課題名（和文） 新規 Trem 分子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of a new Trem molecule

研究代表者

邊見 弘明 (HEMMI HIROAKI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任講師

研究者番号：20451924

研究成果の概要（和文）：

Triggering receptor expressed on myeloid cells (Trem) ファミリーは、細胞の活性化を調節する分子群の一つとして報告されてきている。本研究では、新規に同定され、死細胞に親和性を示すことが示唆されている Trem ファミリー分子の機能の解明を目指した。この分子は、樹状細胞やマクロファージに発現しているが、その発現は他のファミリー分子と異なり、樹状細胞の活性化によっては変化しなかった。また、同じ死細胞に親和性を示す Trem2 が細菌を認識しうるのに対し、この分子は親和性を示さなかった。また、遺伝子欠損マウスを用いた解析から、この分子はアポトーシス細胞の取り込み自体には関しておらず、炎症性サイトカインや炎症応答に対して負に作用している可能性が示唆されたが、その関与としては強力に抑制するのではなく、fine tuning 的に働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Triggering receptor expressed on myeloid cells (Trem) family is known to regulate activation status of immune cells. In this study, we tried to uncover the function of a newly identified Trem molecule. It has been reported that the expression levels of other Trem members are up-regulated or down-regulated when the cells were activated. However, the expression of this molecule on dendritic cells (DCs) was not altered after their activation. In addition, the results from analyses of gene-knocked out mice suggest that this molecule is not involved in uptake of apoptotic cells by DCs. On the other hand, gene knocked-out mice showed slightly enhanced responses in terms of cytokine productions and antibody induced arthritis, suggesting that this molecule may be negatively involved in inflammatory responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：分子・樹状細胞・マクロファージ・サイトカイン産生

## 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もつI型膜タンパク質である。このファミリーは、主に免疫担当細胞上に発現し、その細胞の活性状態を正もしくは負に制御する分子と考えられている。これまでの研究で、特に Trem2 は中枢神経系や骨に異常をきたすヒトの Nasu-Hakola 病の原因遺伝子一つであることが明らかにされている。また、Trem1 は炎症反応に対して負に関与していることが報告されている。この様に機能が判明している分子もある一方で、これら Trem ファミリーに属する分子の中には、その機能が不明なものも多い。その中に、樹状細胞・マクロファージに発現していることを見いだした新規 Trem 分子 (Trem-like 4) もあり、その詳細な発現分布や生理的な機能は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、Trem ファミリーに属する新規分子の生理的な機能の解明を目指すものである。これまでに、マウス樹状細胞サブセット間の genechip analysis を行い、マウス CD8 陽性樹状細胞サブセットに強く発現している新規 Trem 様分子を同定した。本研究では、抗体やヒト IgG との融合タンパク質を用いた *in vitro* での解析や遺伝子欠損マウスを用いた解析を行い、この新規分子の生理的な機能を明らかとすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

新規 Trem 分子の機能を探索する目的で、その soluble form (細胞質外領域とヒト IgG Fc 領域との融合タンパク質) を用いて、死細胞・微生物などに対して affinity を示すかどうか、FACS を用いて検討を行った。また、いくつかの Trem 分子は、細胞の活性化によってその発現が変化することが報告されている。そこで、マウス樹状細胞にリポポリサッカライド (LPS) など樹状細胞を活性化さ

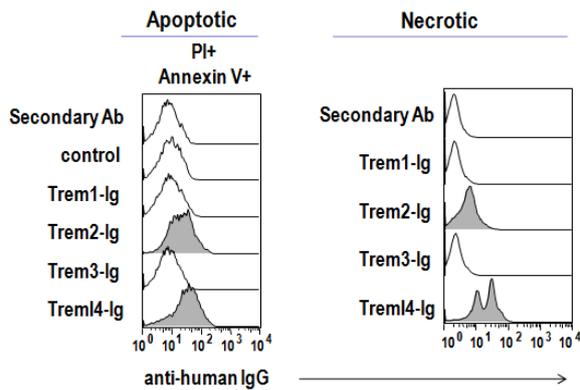
せる Toll-like receptor のリガンドを作用させて、樹状細胞上での新規分子の発現の変化を検討した。

さらに、生体内での機能を明らかにする目的で、遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。蛍光ラベルした apoptotic cells をマウスに投与し、その後の取り込みを FACS にて検討して、死細胞の取り込みへの関与を検討した。また、他の Trem ファミリー分子が炎症性サイトカイン産生に対して、協調的にもしくは抑制的に働くことが報告されているので、マウス個体に LPS を投与して血中サイトカインレベルの検討を行った。さらには、関節炎誘導モデルとして、K/BxN serum transfer を行った。これは、関節炎を自然発症する K/BxN マウス由来の血清をマウス個体に投与することにより関節炎を誘導させるもので、この関節炎は基本的に自然免疫担当細胞によってになわれていることが知られている。そこで、関節炎を誘導し、炎症反応における Trem-like 4 の関与を検討した。

## 4. 研究成果

これまでの研究で、Trem-like 4 は、その細胞質外領域とヒト IgG Fc 領域との fusion protein が、死細胞に対して affinity を示すことが判明している。そこで、本分子とともに Trem family 分子である Trem1, Trem2, Trem3 について同様な融合タンパク質を作成・精製し、死細胞に対して親和性を示すかどうか検討した (Fig. 1)。その結果、Trem2 が Trem-like 4 と同様に Annexin V 陽性 / propidium Iodide 陽性の後期アポトーシス細胞に親和性を示した。さらに、Trem2、Trem-like 4 とともに、熱処理をしてネクローシスを起こさせた細胞への親和性も観察された。その一方で、Trem1 や Trem3 はこういった結合能を示さなかった。

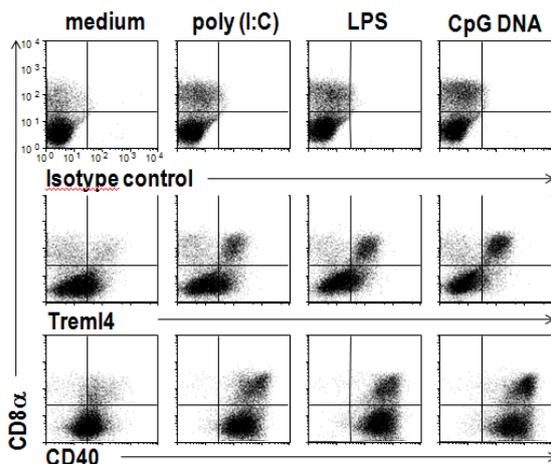
また、これら fusion protein が大腸菌や酵母、ブドウ球菌に対して親和性を示すかどうか検討したところ、Trem2 はこれまでの報告と同様に大腸菌やブドウ球菌への結合が認められたが、Trem-like 4 に関しては少なくともその表面への結合は認められなかった。



(Fig. 1)

また、当該分子を発現している樹状細胞・マクロファージと同じ細胞系譜に属し骨吸収に関与している破骨細胞について、Trem2やTrem-like 4の発現を検討したところ、これまでの報告に一致してTrem2の強い発現は認められた。しかしながら、Trem-like 4の発現は非常に弱いものであった。これらのことより、Trem-like 4はTrem2とともに死細胞への結合能を有するが、その一方でその発現パターンやリガンドに関してTrem2と異なることが示唆された。

さらに、他のTremファミリー分子は、細胞の活性化やサイトカイン刺激によってその発現量が増加(Trem1やPDC-Trem)や減少(Trem2)することが知られている。そこで、Trem-like 4について検討するために、マウス脾臓樹状細胞を回収し、*in vitro*にてpoly(I:C) (TLR3), LPS (TLR4), CpG DNA (TLR9)で刺激して検討を行った(Fig. 2)。いずれの刺激においても、樹状細胞上のTrem-like 4の発現量に大きな変化は認められなかった。



(Fig. 2)

さらに、生体内での機能を検討する目的で遺伝子欠損マウスを用いて検討を行った。

CSFEで蛍光ラベルした細胞にアポトーシスを誘導してマウスに投与し、その後の取り込みをFACSにて検討したところ、wild-typeのそれと差が認められなかった。

また、生体内での炎症性サイトカイン産生を検討する目的で、マウスにLPSを投与し血中のサイトカイン産生を検討した。その結果、生死に関しては野生型のそれと有意な差が認められなかったが、血中サイトカインレベルはKOマウスの方が高い傾向が認められた。

関節炎を自然発症するK/BxNマウス由来の血清をマウス個体に投与することによる実験的関節炎モデルを行ったところ、遺伝子欠損マウスにおいて関節の腫脹がcontrolのそれと比べてひどくなる傾向が観察された。

このように、Trem4が炎症応答において、負に作用している可能性が示唆されたが、その関与は、炎症に対して強力に抑制するのではなく、fine tuning的に働いている可能性が示唆された。

これまで、このTrem-like 4の発現や機能についてほとんど不明であった。本研究によりその一端が示唆された。このTremファミリー分子の中には、ヒトにおける遺伝性疾患の原因遺伝子として知られているものや炎症に深く関与しているものも知られており、注目されている分子群である。今後は、さらに解析を進めて、この分子の生理的な機能を明らかにすることを目指すと共に、リガンドも不明であることから、その解析も進めたいと考えている。

## 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4件)

1. Hiroaki Hemmi, Juliana Idoyaga, Koji Suda, Nao Suda, Kathleen Kennedy, Masaki Noda, Alan Aderem, Ralph M. Steinman. A new triggering receptor expressed on myeloid cells (Trem) family member, Trem-like 4, binds to dead cells and is a DNAX activation protein 12-linked marker for subsets of mouse macrophages and dendritic cells. *Journal of Immunology* (2009) 182: 1278-1286. 査読有。

[学会発表] (計5件)

1. 邊見弘明, Juliana Idoyaga, 高井俊行, 齊

藤隆, 野田政樹, Ralph M. Steinman. マウス脾臓樹状細胞/マクロファージに発現しているTremファミリー分子Trem-like 4の同定とその解析. 第39回日本免疫学会学術集会・総会. 2009年12月2-4日. 大阪.

2. Hiroaki Hemmi, Juliana Idoyaga, Koji Suda, Masaki Noda, Ralph M. Steinman. The Identification and Characterization of A New Trem-like Molecule. The 31st annual meeting of American Society for Bone and Mineral Research. 2009年9月11-15日. Denver, CO, USA.
3. Hiroaki Hemmi, Juliana Idoyaga, Koji Suda, Nao Suda, Masaki Noda, Ralph M. Steinman. Identification and characterization of a Trem-like molecule expressed on mouse splenic DCs and macrophages. The 10th International Symposium on Dendritic Cells. 2008年10月1-5日. 神戸.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

邊見 弘明 (HEMMI HIROAKI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任講師

研究者番号：20451924

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし