

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791402

研究課題名（和文）

TACE は TREM1 の shedding を介して monocyte の活性を調節する

研究課題名（英文）

TACE mediate the activity of monocyte via TREM1 shedding

研究代表者

内川 伸一（UCHIKAWA SHINICHI）

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70365443

研究成果の概要（和文）:

本研究課題名にある TREM1 の shedding に関しては、生体内で観察した結果を生化学的手法にて再現できなかったため、対象遺伝子を IL-1 受容体に変更し、立案計画に沿って解析を続行した。IL-1 は炎症および感染防御において重要な機能を有するサイトカインであり、その活性は極めて高度に調節されている。IL-1 の受容体には 2 種（IL-1RI, IL-1RII）存在するが、IL-1RII は細胞内領域を欠損しており、IL-1 シグナルを負に調節すると考えられている。さらに、これらの受容体は細胞膜上にて蛋白質分解作用（以下、shedding）を受け、可溶性蛋白質としても存在することが報告されている。昨年度は、各種蛋白質分解酵素阻害剤、TACE 遺伝子改変マウスおよび TACE 欠損細胞を用いて生化学的な評価を試みた。その結果、IL-1 受容体のうち IL-1RII のみが TACE にて選択的に shedding を受け、TACE は IL-1RII の shedding を介して細胞内の IL-1 シグナルを正に制御していることが示された。本年度は、TACE 遺伝子改変マウスの骨髓細胞を用いて FACS 解析を行い、IL-1RII のみが TACE にて選択的に shedding を受けることを確認し、さらに IL-1RII 変異体を作成し、IL-1RII は細胞膜近傍で切断されることを確認した。またヒト細胞や TACE 欠損細胞を用いて IL-1 シグナル解析を行った。

炎症性疾患・免疫に極めて深く関与している IL-1 シグナルの調節機構を解明することは、臨床応用へのフィードバックの一助となると考える。

研究成果の概要（英文）:

Since the results observed in vivo was not able to be reproduced with the results in vitro about shedding of TREM1 in this research, the object gene was changed into IL-1 receptor and analysis was continued along with the planning plan. IL-1 receptor type II (IL-1RII) is a cytokine receptor that belongs to the IL-1 receptor family and acts as a decoy receptor that competitively inhibits the activity of its ligands due to lacking of most part of the cellular domain, therefore, not mediated IL-1 signaling. IL-1RII is initially synthesized as a membrane-bound protein, which must be cleaved to become a soluble type. However, little is known about the specific enzyme involved in the proteolytic release of IL-1RII. TNF- α converting enzyme (TACE) is involved in the proteolytic release of the ectodomain of diverse cell surface proteins with critical roles in development, immunity, and hematopoiesis. We found that Tace selectively released IL-1RII, but not IL-1RI and IL-1RAcP, and serum IL-1RII levels in Tace deficient mice were significantly lower, both after LPS treatment and in the absence of such a challenge, further

corroborating the relevance of Tace as IL-1R sheddase in vivo. Moreover, after shedding of IL-1R from cell surface, IL-1 signaling was further augmented in autologous cells due to less remaining of its inhibitory effect, but had a higher inhibitory effect in remote cells. Therefore, we concludes Tace plays a crucial role on IL-1 signaling by regulating the shedding of IL-1R from cell surface, and may come to involve a therapeutic advance in the treatment of inflammation diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：TACE, shedding, IL-1

1. 研究開始当初の背景

近年、関節リウマチ（以下RA）治療の進歩はめざましく、今後もより優れた治療薬が臨床の場で活用されることが期待される。しかしながらその副作用や費用の面からまだ十分であるとは言えず、より低コストで副作用の軽減された治療薬の開発が必要である。またアメリカリウマチ学会においてもRA早期発見・早期治療の重要性はコンセンサスが得られており、より早期検出が可能なマーカー、より正確な活動性の指標となるマーカーの開発が必要である。そこでわれわれはRAや炎症性疾患に際に血清中に可溶性蛋白として放出されることで知られているTREM1(triggering receptor expressed on myeloid cells-1)に着目し本研究を立案した。

(1) TREM1の発現は炎症の病状を反映する
TREM1は単球および好中球に発現し、その活性化によりTNF, IL8, IL1, GM-CSFなどの炎症性サイトカインを産生する分子として

同定されている。このことからTREM1はRA等の炎症性疾患と関連していることが示唆されるが、近年の研究からRA患者の滑膜や血清においてTREM1が高発現しその病態に相関していることが報告されている。またRA患者から採取した滑膜細胞を抗TREM1抗体で刺激することによりTNF産生を亢進しうる事が明らかとなっている。興味深いことにRA患者の滑膜組織においてOA患者に比較してTREM1が高発現していることも示されており、さらにRA患者末梢血のCD45(造血系のマーカー)陽性細胞集団にTREM1様細胞が高い確率で含まれることが報告されている。

これらの知見は、TREM1値が炎症性疾患の病態を反映する有用なマーカーとなりうることを示唆する。TREM1がRA等の疾患に対する分子標的となりうることを示唆する。

(2)RA患者、感染症患者において可溶性TREM1が検出される

TREM1はもともと膜型蛋白として産生されるが、急性炎症時に血清中にTREM1が可溶型タンパクとして検出されることがこれまでに報告されている。さらにこの可溶型TREM1はRA患者と感染患者において健常者と比べて有意に高濃度であったことが報告されている。これらの知見から膜型TREM1が炎症時において蛋白分解作用を受け、可溶型タンパクとして血清中に放出 (shedding) されている可能性が考えられる。

(3) TREM1は感度の高い炎症マーカーである
可溶型TREM1は敗血症患者においてCRPよりも感度が高い早期診断マーカーである。また敗血症患者の入院時における血清中可溶型TREM1の濃度は、生存した患者と死亡した患者間で有意な差があった。さらに敗血症発症時の末梢血中TREM1濃度測定は、他のどの炎症マーカー測定よりも感度と特異性が高かった。以上の報告よりTREM1が炎症の病態に密接に関係しており、可溶型TREM1が臨床の場においても非常に有用な診断マーカーであることが分かる。

(4) ectodomain sheddingの中心的役割を果たすTACE (TNF converting enzyme)
Ectodomain sheddingとは膜蛋白質がその細胞膜貫通領域の近傍部位にて蛋白質分解酵素の作用を受けその細胞外領域 (ectodomain) が切断され、放出 (shed) される現象をさす。マトリックスメタロプロテアーゼをはじめとしてこれまで複数の蛋白質分解酵素がsheddingに関わっていることが報告されているが、その中でもTACEは近年最も注目されている分子である。TACEは膜型前駆体として産生されるTNF を可溶型蛋白質に変換する酵素として同定された蛋白質であるが、近年TNF 以外にも多くの膜蛋白質がTACEの基質として同定されてきた。

(5) TREM1の蛋白質分解酵素の候補としての

TACE

当研究室では研究代表者の指導者としてTACE研究第一人者である堀内圭輔 (慶應義塾大学医学部抗加齢運動器学寄付講座講師) と本研究を立案しており、TREM1をsheddingする蛋白質分解酵素の候補としてTACEの関与を考えた。

これまでの予備検討において以下にも示すとおり、間葉系細胞特異的TACE欠損マウスではLPS刺激による敗血症性ショック誘発後の血清中可溶型TREM1の濃度が、コントロールマウスと比べて有意に低かったため、TACEが働かないとTREM1のsheddingが起こらない、すなわちTACEによってTREM1がsheddingを受けている可能性が高いと考えられた。

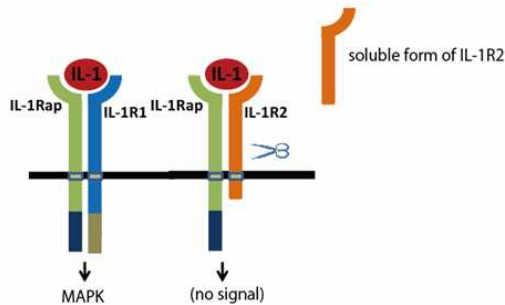
TACEの生体における多彩な機能を解明することで、TACEやTREM1をターゲットとした新規治療薬の開発や病態解明、早期マーカーとしてRAや炎症性疾患などの治療に貢献し臨床の場へフィードバックされうるものと考えた。

2. 研究の目的

我が国で70万人を超すといわれているRAや、時に生命を脅かす敗血症性ショックなど、臨床の現場において未だ治療に難渋し、早期発見・早期治療が必要とされる炎症性疾患の解明は臨床の場において重要な課題である。また近年、RAや敗血症性ショックなどの炎症時に血清中で発現が上昇することが発見された可溶型TREM1がectodomain sheddingを受けることが報告された。そこでわれわれはこのTREM1遺伝子に着目し、TREM1の生理的役割やTREM1のshedding機構を解明することでRAや敗血症性ショックなどの病態解明、さらに新薬開発や炎症マーカーとして臨床にフィードバックされうるものと考え本研究を立案した。

3. 研究の方法

本研究立案にある TREM1 の shedding に関しては、生体内で観察した結果を生化学的手法にて再現できなかったため、対象遺伝子を IL-1 受容体に変更し、立案計画に沿って解析を続行した。IL-1 は炎症および感染防御において重要な機能を有するサイトカインであり、その活性は極めて高度に調節されている。

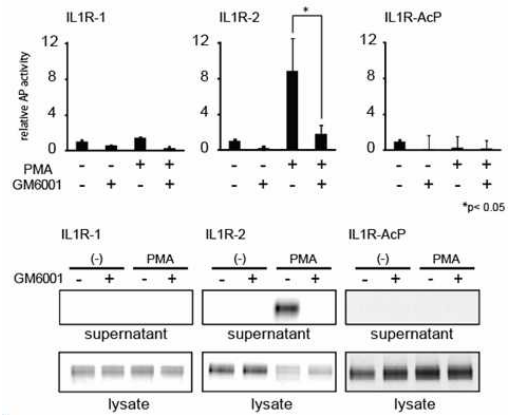


IL-1 の受容体には 2 種 (IL-1R1, IL-1R2) 存在するが、IL-1R2 は細胞内領域を欠損しており、IL-1 シグナルを負に調節されている。さらに、これらの受容体は細胞膜上で蛋白質分解作用 (以下、shedding) を受け、可溶性蛋白質としても存在することが報告されている。本研究では各種蛋白質分解酵素阻害剤、TACE 遺伝子改変マウスおよび TACE 欠損細胞を用いて生化学的な評価を試みた。また TACE 遺伝子改変マウスを用いた生体内における IL-1R shedding の動向や、IL-1R の shedding が IL-1 シグナルに与える影響を解析した。

4. 研究成果

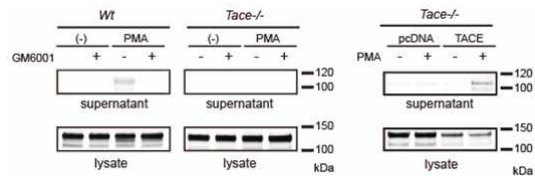
(1) IL-1 受容体のうち IL-1R のみが PMA 刺激によるタンパク分解を認めた。

細胞外ドメインにアルカリフォスファターゼ (AP) の標識をつけた IL-1 受容体の construct を作成し、PMA 刺激と MMP 阻害薬である GM6001 を添加し 37 °C で 1 時間反応させると、IL-1R のみ細胞上清中に優位に AP が検出された。



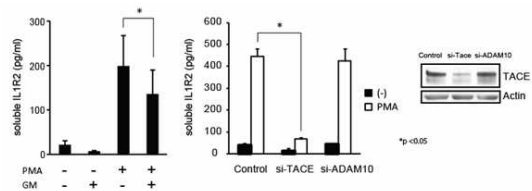
(2) IL-1R の sheddase は TACE である

TACE 欠損マウス細胞と野生型マウス細胞に IL-1R 遺伝子を導入し PMA 刺激で 1 時間反応させると、TACE 欠損細胞では IL-1R の shedding が消失したが、TACE を共発現させると反応がレスキューされた。



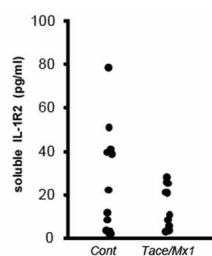
(3) ヒト細胞においても IL-1R は TACE によって shedding を受け、可溶性 IL-1R として細胞外に放出された。

ヒト CFU-GM 細胞を培養し siRNA 法で TACE をノックダウンさせ PMA で反応後に上清を採取した。培養上清中の可溶性 IL-1R の濃度を ELISA で検出した。siTACE では上清中の可溶性 IL-1R 濃度が低く、PMA による shedding が優位に抑制された。



(4) マウス生体内においても TACE が IL1R の shedding に重要な役割を担っている .

骨髄系細胞において TACE 遺伝子を欠損しているマウスの血清中可溶性 IL-1R 濃度を ELISA で測定した . 野生型マウスと比べ優位に可溶性 IL-1R の濃度低下を認めた .



(5) IL-1R の shedding を受けた細胞内では IL-1 シグナルが促進される

PMA で 1 時間前処理を行ったマウス MC3T3-E1 細胞の上清を除去し IL-1 を添加すると ,IL-1 シグナル下流の JNK リン酸化が促進された . またその反応は前処理の段階で GM6001 を PMA と同時に添加すると抑制された .

以上の結果から ,TACE は IL1 RII の shedding を介して細胞内の IL-1 シグナルを正に制御していることが示唆された .

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

内川伸一

IL-1 受容体シグナルにおける TNF - converting enzyme (TACE) の機能解析
第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会
平成 23 年 10 月 21 日
ベイシア文化ホール (群馬県民会館)

内川伸一

TNF converting enzyme is involved in the IL-1 Signaling Pathway via ectodomain shedding of IL-1 Receptor Type II

第 29 回日本骨代謝学会

平成 23 年 7 月 28 日

大阪国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

内川 伸一 (UCHIKAWA SHINICHI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号 : 70365443