

Mini Review

尿酸結晶誘発性炎症における TREM-1 の作用の解析

村上洋介^{1,4)}, 赤星 透²⁾, 北里英郎³⁾¹⁾北里大学大学院医療系研究科環境感染学, ²⁾同 臨床検査診断学, ³⁾同 環境微生物学,⁴⁾財団法人ヒューマンサイエンス振興財団*A role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression during monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation*

Triggering receptor expressed on myeloid cells(TREM)-1 is a cell surface molecule that has been identified on monocytes and neutrophils and is implicated in the early inflammatory response induced by microbes. However, it has been remained unclear how the expression of TREM-1 is regulated in non-microbial inflammatory diseases. This study was undertaken to evaluate the biologic role of TREM-1 in the initiation of acute attacks of gout. We investigated TREM-1 expression by monosodium urate monohydrate(MSU) crystal-stimulated resident murine peritoneal macrophages(RPM), and assessed whether TREM-1 signaling amplified response to MSU crystals. TREM-1 expression by RPM stimulated with various inflammatory agents was determined by quantitative real-time PCR and western blot analysis. Cytokine production by RPM cultured with both anti-TREM-1 agonist antibody and MSU crystals was assayed by ELISA. TREM-1 expression was significantly induced in RPM by MSU crystals. The peaks of TREM-1 transcript and product occurred rapidly after 1 and 4 hours of MSU crystal stimulation, respectively. The level of TREM-1 transcript induced was consistent with the result obtained using LPS, a potent TREM-1 inducer. Induction of TREM-1 by anti-TREM-1 agonist Ab and MSU crystals synergistically increased production of IL-1 β and MCP-1 by RPM compared with MSU crystals alone. These findings indicate that rapid induction of TREM-1 expression in RPM by MSU crystals may contribute to the onset of acute gouty arthritis, followed by induction of proinflammatory cytokines.

Rec.11/18/2004, Acc.12/14/2004, pp160-163

Yousuke Murakami^{1,4)}, Tohru Akahoshi²⁾, Hidero Kitasato³⁾¹⁾Departments of Environmental Infectious Diseases, ²⁾Laboratory Medicine, ³⁾Environmental Microbiology,

Kitasato University Graduate School of Medical Sciences

⁴⁾Japan Health Sciences Foundation**Key words** MSU crystals, acute gouty arthritis, TREM-1

はじめに

Triggering receptor expressed on myeloid cells-1(TREM-1)は、好中球、マクロファージの細胞表面に発現する分子量約30kDaのレセプターである¹⁾。TREM-1はImmunoglobulin superfamilyに属し、細菌や真菌感染において toll-like receptor-4(TLR-4)のリガンドである lipoteichoic acid や lipopolysaccharide(LPS)などの微生物構成成分の刺激により発現が誘導される。生体内における TREM-1 のリガンドは

現在も不明である。しかし、TREM-1 に対しアゴニストとして作用するモノクローナル抗体を作製すると、TREM-1 と結合することにより、炎症性サイトカインやケモカイン、接着分子などの発現を増強し、多彩な炎症反応を引き起こすことが報告されている¹⁻³⁾。一方、微生物感染が認められない潰瘍性大腸炎や乾癬、免疫複合体による血管炎などの炎症性疾患では、TREM-1 の発現がほとんど検出されない²⁾。また、微生物感染においては、好中球やマク

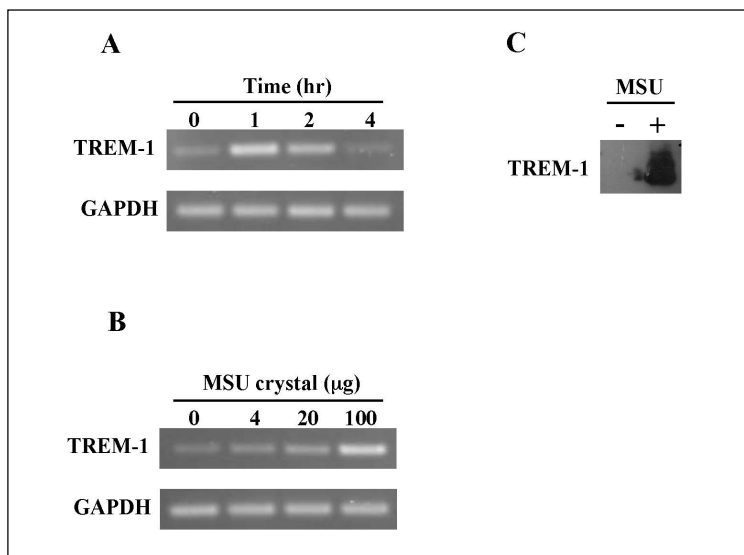


図1 尿酸結晶で刺激したマウス腹腔マクロファージ細胞における TREM-1の発現

(A) 尿酸結晶(100 µg/ml)で細胞をそれぞれ1, 2, 4時間刺激し, TREM-1 mRNA発現をRT-PCR法で解析した。(B) 4, 20, 100 µg/mlの濃度の尿酸結晶で細胞をそれぞれ1時間刺激し, mRNA発現をRT-PCR法で解析した。(C) 細胞を尿酸結晶(100 µg/ml)で4時間刺激し, TREM-1のタンパク発現をwestern blot法で解析した。

ロファージの TREM-1 発現が亢進するだけでなく, 可溶型の TREM-1 が体液中に増加することが明らかにされた⁴⁻⁶⁾。

以上の結果は, 血清や肺泡洗浄液中における可溶性 TREM-1の検出が微生物感染の有無を診断する指標として有用である可能性を示唆している。このように, TREM-1は微生物による炎症反応に重要な役割を果たしていることが報告されているが, 微生物が関与しない炎症性疾患における TREM-1の発現とその意義は十分には検討されていない。

痛風性関節炎では, 尿酸結晶の沈着により好中球を主体とした著明な白血球浸潤が認められる⁷⁾。浸潤白血球は関節腔内の尿酸結晶を貪食または接触することにより炎症性サイトカインやケモカインなどの生理活性物質を放出し, 痛風の病態形成に重要な役割を果たしている。好中球やマクロファージがどのような機序によって尿酸結晶を認識し, 起炎刺激としてのシグナルを受けるのかは不明であった。

Liu-Bryanらは, 炎症性浸潤細胞上に発現している TLR-2 が尿酸結晶を認識することによって細胞内にシグナルが入り, 炎症性サイトカインなどの産生を誘導していることを報告した⁸⁾。細菌感染においては TLR-2 と TREM-1 が相互に作用し合うことが報告されている。TREM-1は TLR-2 のリガンドによってその発現が誘導されるだけでなく, TLR-2 のリガンドと協調的に炎症性サイトカインの産生を増強する。しかし, 微生物が関与しない炎症性疾患である痛風における尿酸結晶と TREM-1との関わりは明らかではない。そこで本稿では, 尿酸結晶誘発性炎症モデルにおける TREM-1の発現とその病態的な意義を検討したので報告する。

尿酸結晶による TREM-1の誘導

尿酸結晶は, マクロファージや好中球を刺激することで様々な炎症性分子の放出を誘導する。そこで, マウス腹腔マクロファージ細胞を尿酸結晶で刺激し, TREM-1の発現を reverse transcriptase-PCR(RT-PCR)法, western blot 法でそれぞれ解析した。尿酸結晶は刺激から1時間でマウス腹腔マクロファージ細胞の TREM-1 mRNA 発現を著明に誘導し, TREM-1 発現はその後速やかに低下した(図1A)。また, マウス腹腔マクロファージ細胞を 4, 20, 100 µg/ml の濃度の尿酸結晶でそれぞれ刺激すると, 尿酸結晶濃度依存的に TREM-1 の発現が誘導されることが観察された(図1B)。また, TREM-1 のタンパクの発現も尿酸結晶の刺激によって誘導されることが認められた(図1C)。

*In vitro*の実験系において尿酸結晶が TREM-1 の発現を誘導することが認められたことから, *in vivo*における TREM-1の発現をさらに検討した。マウス背部の皮下に空気を注入して空気嚢胞を作製し, 尿酸結晶で刺激した。この空気嚢胞モデルは痛風性関節炎に類似した病態を呈することが明らかにされている。尿酸結晶刺激から4時間後には, 好中球を主体とした細胞浸潤が嚢胞内に認められ, 刺激から8時間後において最も細胞浸潤が最大となる(図2A)。この浸潤細胞における TREM-1 の発現を RT-PCR 法で解析した。TREM-1 の遺伝子発現は, 尿酸結晶刺激4時間後に発現が強く認められた(図2B)。以上の結果から, 尿酸結晶誘発性炎症では TREM-1 発現が強く誘導されることが明らかとなった。

様々な炎症性分子による TREM-1の誘導

これまでの報告で, 炎症性サイトカインなどの非微生物

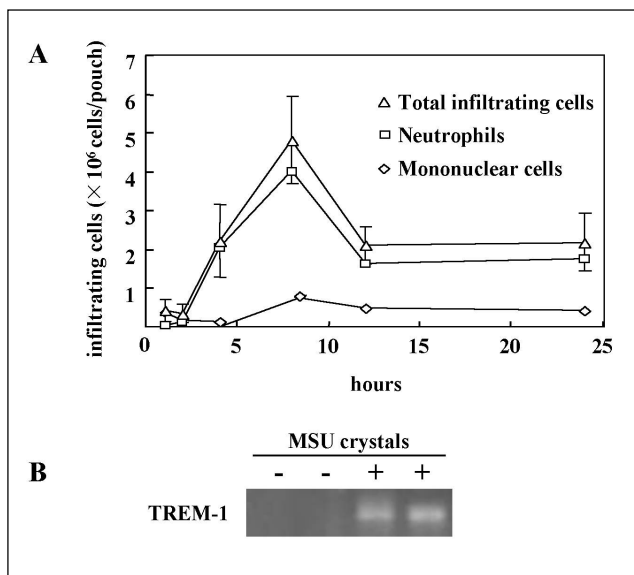


図2 尿酸結晶誘発性炎症におけるTREM-1の発現
マウス空気嚢胞に尿酸結晶(3mg)を注入し、所定時間後にPBSで嚢胞内を洗浄して嚢胞内浸出液を回収した。浸出液中の細胞数を測定し、細胞分画をギムザ染色により決定した(A)。尿酸結晶刺激から4時間後の浸潤細胞におけるTREM-1発現はRT-PCR法で解析した(B)。

構成成分はTREM-1の発現誘導能が弱く、ZymosanやLPSなどの微生物構成成分はTREM-1の発現を強く誘導することが明らかとなっている。そこで、炎症性サイトカイン(IL-1 β , TNF α)、尿酸結晶、LPSでそれぞれ腹腔マクロファージ細胞を刺激し、これら炎症性分子によるTREM-1の発現誘導能をRT-PCR法で解析した。これまでに報告されたとおり、炎症性サイトカインであるIL-1 β やTNF α のTREM-1の発現誘導能はわずかであった。このことは、微生物が関与しない炎症性疾患においてTREM-1の発現が低いとの報告と一致する。一方、尿酸結晶はTREM-1の発現を顕著に誘導し、TREM-1の強力な誘導因子であるLPSとほぼ同等のTREM-1発現誘導能を有していることが明らかとなった(図3)。

尿酸結晶によるTREM-1の発現がLPSによるコンタミネーションではないことを確認するため、LPSに結合し、その作用を抑制するpolymyxinBを腹腔マクロファージ細胞に投与し、尿酸結晶で刺激した。しかし、polymyxinBは尿酸結晶によるTREM-1発現誘導を阻害しなかったことから、尿酸結晶自体がTREM-1の発現を誘導することが明らかとなった(図3)。

尿酸結晶とTREM-1による炎症性サイトカインの増強作用

単球をLPSとTREM-1のアゴニスト抗体で共刺激する

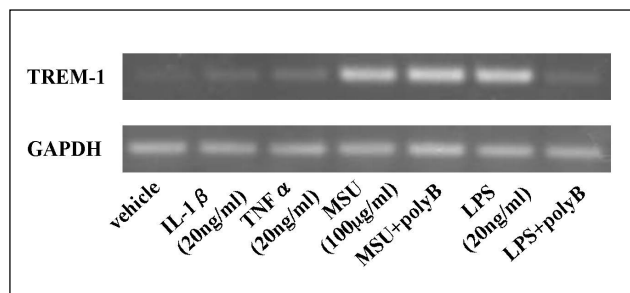


図3 種々の炎症性分子によるTREM-1の発現誘導能の比較

マウス腹腔マクロファージ細胞をpolymyxin B(5 μ g/ml)存在・非存在下で培養し、図に示した炎症性分子でそれぞれ1時間刺激した。TREM-1の発現はRT-PCR法で解析した。

と、炎症性サイトカイン、ケモカインの産生が増強されることが報告されている¹⁻³⁾。この作用はToll-like receptor 4 (TLR4)のリガンドであるLPSが、NF- κ Bの活性化を介してTREM-1の発現を誘導することによって考えられている。TREM-1を介したシグナルはtyrosineリン酸化、mitogen-activated protein kinase(MAPK)活性化、Ca²⁺ mobilizationを誘導し、LPSによるNF- κ B活性化と共作用することにより、炎症性サイトカインの産生を飛躍的に増強させる^{1-3,9)}。一方、尿酸結晶もNF- κ Bを活性化することが報告されている¹⁰⁾。そこで、96ウェルプレートにTREM-1アゴニスト抗体をコーティングし、尿酸結晶とともに腹腔マクロファージ細胞を培養した。マクロファージを尿酸結晶またはTREM-1アゴニスト抗体でそれぞれ単独に刺激した場合と比較し、共刺激ではIL-1 β 、MCP-1の産生を著明に増強した(図4)。この結果から、尿酸結晶により誘導されるTREM-1は機能的に作用していることが明らかとなった。

まとめ

尿酸結晶は、*in vitro*, *in vivo*でTREM-1の発現を誘導し、その誘導能はLPSに類似する程強力であることが証明された。さらに、尿酸結晶とTREM-1アゴニスト抗体による共刺激は、マクロファージのサイトカイン産生を飛躍的に増強させた。

以上の結果から、尿酸結晶により誘導されるTREM-1は、炎症性サイトカインの産生を増強させることで、痛風性関節炎における炎症の引き金もしくは増悪の役割を果たしていることが示唆された。また、TREM-1アゴニスト抗体は単球のintercellular adhesion molecule-1(ICAM)やCD40の発現を誘導するとともに、抗炎症性サイトカイン産生を抑制することも報告されている^{1-3,9)}。以上よりTREM-1は結晶誘発性炎症の進展に深く関与していること

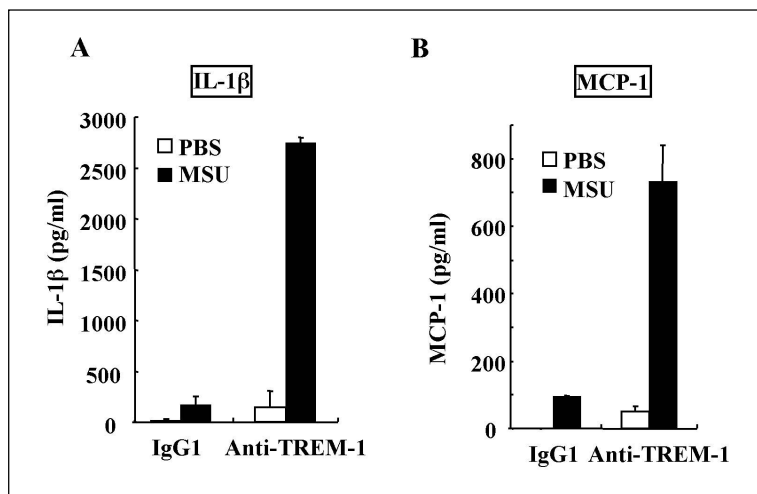


図4 TREM-1と尿酸結晶による炎症性サイトカインの増強

5 µg/mlのTREM-1アゴニスト抗体もしくはコントロール抗体をコートしたプレートで、マウス腹腔マクロファージ細胞を尿酸結晶とともに24時間培養し、IL-1β (A)、MCP-1(B)の産生をELISAで測定した。

が推察された。

今後は、可溶性TREM-1-Ig融合タンパクを尿酸結晶誘発性炎症モデルに投与し、TREM-1の作用を阻害することにより、結晶誘発性炎症におけるTREM-1の役割をさらに詳細に解析する予定である。

謝 辞

本研究は、第25回日本炎症・再生医学会発表優秀演題に採択され、このような執筆の機会を与えて頂きました関係諸氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Bouchon A, Dietrich J, Colonna M: Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol*, 164: 4991-4995, 2000.
- 2) Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M: TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature*, 410: 1103-1107, 2001.
- 3) Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, Sieling PA, Stenger S, Colonna M, Modlin RL: A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J Immunol*, 170: 3812-3818, 2003.
- 4) Dieppe PA, Doherty M: The role of particles in the pathogenesis of joint disease. *Curr Top Pathol*, 71: 199-233, 1982.
- 5) Gibot S, Cravoisy A, Levy B, Bene MC, Faure G, Bollaert PE: Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *N Engl J Med*, 350: 451-458, 2004.
- 6) Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Cravoisy A, Levy B, Faure GC, Bollaert PE: Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann Intern Med*, 141: 9-15, 2004.
- 7) Dieppe PA, Doherty M: The role of particles in the pathogenesis of joint disease. *Curr Top Pathol*, 71: 199-233, 1982.
- 8) Liu-Bryan R, Pritzker K, Firestein GS, Terkeltaub R: TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation. *J Immunol*, 174: 5016-5023, 2005.
- 9) Colonna M: TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol*, 3: 445-453, 2003.
- 10) Jaramillo M, Godbout M, Naccache PH, Olivier M: Signaling events involved in macrophage chemokine expression in response to monosodium urate crystals. *J Biol Chem*, 279: 52797-52805, 2004.