

ミクログリアにおける膜貫通型タンパク質 TREM2 の新規機能の解明

山田 淳真（筑波大学生物学類）

指導教員：鶴田 文憲（筑波大学生命環境系）

【背景と目的】

中枢神経系の免疫担当細胞であるミクログリアは、神経変性疾患などの病態において、ダメージ関連分子パターンや凝集タンパク質など、様々な病態関連分子を感知して免疫応答や食食を行い、脳内環境を維持している。一方、ミクログリアの過剰な活性化は、慢性的な神経炎症や異常な食食によって、神経傷害を引き起こす。したがって、ミクログリアの厳密な制御は脳の恒常性維持のために重要である。ミクログリアに存在する膜貫通型タンパク質 Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) は、病態関連分子の受容体として機能し、食食や抗炎症反応、ミクログリアの増殖などの経路を活性化することが知られている。また TREM2 は、細胞外ドメインで切断されて可溶性の断片 (sTREM2) として放出され、病態から神経細胞を保護することが示唆されている。しかし、sTREM2 が神経保護作用を制御する正確なメカニズムは不明である。本研究では、細胞外に存在する sTREM2 がミクログリアに及ぼす影響とその分子メカニズムの解明を目的とした。

【実験方法】

1. 組換え体タンパク質の精製

HEK293T 細胞に sTREM2-His の発現プラスミドを導入し、48-72 時間培養した。細胞上清を回収し、Ni カラムを用いて sTREM2-His を精製した。その後、透析を行い、Bradford 法によって濃度を測定した。

2. ミクログリア細胞株 BV2 の刺激

マウスのミクログリア細胞株 (BV2) を、DMEM/F12 培地を用いて培養した。48 時間培養した後、精製した sTREM2-His (400 ng/mL) を混合した培地へ置換し、さらに 6 時間 (RT-qPCR 用) または 8 時間 (免疫細胞染色用) 培養した。

3. RT-qPCR

Isogen II (Nippongene) を用いて BV2 細胞から total-RNA を抽出した。その後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて逆転写を行い、SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher) を用いて RT-qPCR を行った。5S を内部標準として、*Cd68*, *Iba1*, *Il1β*, *Trem2* の mRNA 量を定量した。

4. 免疫細胞染色

BV2 細胞を冷却した 4%PFA/PBS で 10 分間固定した。PBS で洗浄した後、5%BSA / 0.4% Triton X-100 / PBS で 30 分間透過処理を行った。その後、5%BSA/PBS に希釈した抗 CD68 抗体 (1:1000)、抗 Iba1 抗体 (1:1000) を用いて 4°C で一晩反応させた。一次抗体反応後、蛍光標識二次抗体 (1:1000) と核を染色する Hoechst (1:2000) を室温で 30 分間反応させた。染色画像は、蛍光顕微鏡 (Keyence, BIOREVO BZ-9000) を用いて取得し、Image J を用いて解析した。

5. 共免疫沈降

HEK293T 細胞に TREM2-His と sTREM2-HA の発現プラスミド

を導入した。48 時間後に細胞を回収し、Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 5 mM EDTA) に溶解した。その後、Lysis buffer で洗浄した Protein A ビーズと抗 HA 抗体を加え、4°C で 3 時間混和した。混和后、ビーズを Lysis buffer で洗浄し、タンパク質をウエスタンブロッティングで検出した。

6. ウエスタンブロッティング

作成したサンプル中のタンパク質を SDS-PAGE によって分離し、PVDF 膜に転写した。その後、5%スキムミルク/TBS-T でブロッキングし、抗 HA 抗体 (1:1000)、抗 His 抗体 (1:1000) を用いて 4°C にて一晩反応させた。一次抗体反応後、TBS-T で洗浄し、5%スキムミルク/TBS-T に希釈した二次抗体 (1:20000) を用いて室温にて 1 時間反応させた。二次抗体反応後の PVDF 膜を TBS-T で洗浄した後、化学発光検出試薬を用いて検出した。

【結果・考察】

sTREM2 は BV2 細胞の状態を変化させる

sTREM2 がミクログリアへ与える影響を調べるために、精製した sTREM2-His でミクログリア細胞株 BV2 を刺激し、RT-qPCR を行った。その結果、リソソームマーカーである *Cd68* およびアクチン細胞骨格の再編成に関与する *Iba1*、炎症性サイトカインである *Il1β* の mRNA 量が減少した。また、免疫細胞染色の結果から、CD68 の発現量が減少していた。以上の結果から、sTREM2 の刺激によって、BV2 細胞の活性が抑制されることが示唆された。アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患の初期段階では、過剰な食食や炎症が抑制されることが神経保護に寄与するとされている。今回の結果から、sTREM2 が病態の初期における神経保護的な役割を持つ可能性が考えられた。

sTREM2 は TREM2 と相互作用する

TREM2 が sTREM2 に対する受容体になるか検証するため、sTREM2 と TREM2 自身の相互作用を共免疫沈降によって確認した。その結果、両者が細胞外領域である N 末端側で相互作用することが示唆された。このことから、TREM2 が sTREM2 の受容体として働く可能性が示唆された。

sTREM2 は TREM2 の発現量を制御する

次に、sTREM2 によって TREM2 の発現が制御されるか検証した。BV2 細胞を sTREM2 で刺激した後に RT-qPCR を行った結果、*Trem2* の mRNA 量が減少した。よって、sTREM2 は、受容体として存在する TREM2 の量を減少させることで、ミクログリアの状態を変化させることが示唆された。

今後、細胞外の sTREM2 が実際にミクログリアの機能に変化を生じさせるか検証する。また、sTREM2 によるミクログリアの状態変化が TREM2 を介したものであるのか確認する。さらに、TREM2 の発現量や膜局在量を制御する仕組みを解明していく。