

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19405

研究課題名(和文)慢性関節リウマチの病態生理における分泌小胞としてのエクソソームの役割

研究課題名(英文)Role of exosomes as secretory vesicles in the pathophysiology of rheumatoid arthritis

研究代表者

奈良場 博昭(NARABA, HIROAKI)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：90296517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは細胞から分泌される小胞であり、様々な病態に関わることが示唆されている。本研究では関節リウマチを発症するマウスを用いて、その血中エクソソームに含まれるmicroRNAの解析を行った。血中エクソソームのマイクロアレイ解析を行い、発現を網羅的に解析した。この情報とスコア化した関節炎の炎症状態の相関性を検討し、幾つかの疾患連動型のmicroRNAを同定した。その中から特定のmicroRNAの発現量が、炎症症状の伸展と良く相関することが明らかとなった。これらのmicroRNAは、炎症性病態の発症や進行に密接に関わるとともに治療における標的分子の同定や、疾患マーカーとなる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性炎症と異なり、慢性炎症は長期のストレス応答などにより炎症反応の遷延化が生じ、機能破綻につながり、生活習慣病やがんなどの病態の基盤となっていることが提唱されている。このような自然炎症と呼ばれる状態の病態生理に関して、現在、様々なアプローチが行われているが、まだ十分な理解には至っていない。本研究から慢性関節リウマチなどの遷延化炎症状態におけるエクソソームの関与とそこに含まれる特定分子種のmicroRNAの重要性を示すことが出来た。本研究の進展は、将来、難治性疾患等を発症する可能性を早期に見極め、その対応と発症予防につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are vesicles secreted by cells and have been implicated in various pathological conditions. In this project, we analyzed the microRNAs contained in blood exosomes of mice with rheumatoid arthritis. Microarray analysis of blood exosomes was performed to comprehensively analyze the expression. We examined the correlation between this information and the scored inflammatory state of arthritis, and identified several disease-linked microRNAs. It was clarified that the expression level of specific microRNA correlates well with the spread of inflammatory symptoms. These microRNAs are closely related to the onset and progression of inflammatory pathologies, and are considered to have potential for therapeutic target molecule identification and disease markers.

研究分野：炎症性病態解析学

キーワード：エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1983年にJohnstoneらは、網状赤血球から分泌される小胞をエクソソームと名付けた。その後、幾つかの細胞での報告が続いたが、大きな注目を集めるまでには至らなかった。しかし、2000年代半ばから、エクソソーム研究は大きく拡大し、その存在と意義に関して知見が集まりつつある。その傾向は、2010年以降も続いており、一部では、がんのバイオマーカーとして臨床応用する試みも始まっている。

エクソソーム中には様々な生理活性分子が含まれるが、その中には遺伝子発現を制御する低分子RNAであるmicroRNAも存在しており、その役割とその病態への関与は注目を集めている。しかし、神経性や腫瘍性疾患など、エクソソームの病態での役割の解析が進んでいるものは限られており、病態生理における全体像の理解は不十分と考えられる。

我々は、これまでエクソソームの炎症性疾患における役割を明らかにするため、培養マクロファージのエクソソームにおいてプロスタグランジンの産生に関与する酵素としてiPLA2、COX-2、PGE合成酵素の存在を確認していた。近年、数ヶ月で終息する急性炎症と異なり、長期のストレス応答などにより炎症反応の遷延化が生じ、機能破綻につながり、生活習慣病や癌などの病態の基盤となっていることが提唱されている。この様な自然炎症と呼ばれる状態の病態生理に関して、現在、様々なアプローチが行われているが、まだ十分な理解には至っていない。この炎症反応の遷延化にも、主に循環血中のエクソソームが重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。近年、早期診断、早期治療の観点から様々な疾患マーカーが開発・臨床応用されている。エクソソームに関しても、内包するmicroRNAのプロファイルから癌のバイオマーカーとしての研究開発が進められている。我々は、エクソソームに存在するプロスタグランジ合成酵素群の誘導作用から、循環血中のエクソソームが炎症状態にある局所の同定に有用なバイオマーカーとなることを想定している。

2. 研究の目的

炎症性メディエーターとして研究の長い歴史があるプロスタグランジンは、マクロファージなどの細胞から産生され、近傍の細胞や組織に作用するオートコイドであり、その作用は局所的である。しかし、本研究では細胞から分泌されるエクソソームが、プロスタグランジン(PG)産生の場となり、エクソソームの移動に伴い、PGの作用の可能性は大きく広げられるものと考えている。つまり、オートコイドであるプロスタグランジンは、エクソソームからも産生されるという可能性を検証することを目的の一つとした。また、多くの疾患においては、その病因となっている臓器や組織等の部位が存在し、その同定が治療方法の選択において重要な意味を持つことは疑いない。一方で、局所の異常は、他所あるいは全身性の生体反応として、表出する場合も多くあり、それらは、神経やホルモン等の全身性の生体システムを介するものと理解されている。本研究は、エクソソームを局所の異常を伝える未知の全身性の生体システムと捉えており、その意義の解明は、病態の理解と疾患の治療において大きな意味をもつものと考えられた。

難治性炎症性疾患である慢性関節リウマチは、近年の分子標的薬の開発などから、早期の治療により寛解導入が可能となる場合もある。一方で、血管炎をはじめとする関節外症状を認め、内臓が系統的に侵され、間質性肺炎をとともなう場合もあり、その進行の制御に苦慮する場合もある。この疾患の発症には、遺伝や環境など様々な要因が考えられるが、その原因は不明である。本研究では、前述の様にエクソソームが局所炎症を全身性の重篤な症状につながる原因と捉え、その関与及び役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

マクロファージ由来エクソソームにおけるプロスタグランジン(PG)合成系の存在を確認するため、培養細胞からの効率的なエクソソームの単離方法を確立し、複数のマイクロフィルターを用いた分画方法やショ糖密度勾配遠心法を組み合わせ、簡便で精度の高い方法を検討した。SDS/PAGE及びプロテインブロット法による関連タンパク質の検出として機能性タンパク質の抗体検出を行った。対象は、プロスタグランジン関連酵素群(PLA2s、COXs、各種PG合成酵素)、HSPs、脂質raft関連タンパク質などとした。また、エクソソームマーカーとしてFlotillinやTsg101などを同時検出した。PG生合成関連酵素群の活性測定のため、エクソソームにおけるPG産生能力を評価し、PG産生経路の試験管内での再構築を検討した。エクソソーム由来のlysateを作成し、基質(アラキドン酸、PGH2など)や補因子の存在下での各種PGの産生を検出した。また、エクソソームそのものにおけるPG産生能に関しても同様に検討を行った。

定量的PCR法を用いたmicroRNAの検出を行うと共に、マイクロアレイによる網羅的解析を実施した。更に、関節リウマチモデル(SKGマウス)におけるエクソソームの存在確認及びその性質の解析として、炎症性の組織浸出液や血漿を採取し、エクソソームとリポプロテインなどの分

離のためカラムクロマトグラフィーの適用を行った。

免疫電子顕微鏡を用いたエクソソームの形態及びタンパク質の同定として、電子顕微鏡を用いて、エクソソームの形態を病理学的に観察した。また、これまでに解析してきた機能性タンパク質に関して免疫電顕を用いた検出も行った。

遷延化炎症状態(自然炎症)におけるバイオマーカーとしてのエクソソームの解析として、エクソソームの生体内動態の解析を行った。生体或いは培養細胞から単離したエクソソームを蛍光標識し、生体(実験動物)に局所投与した場合の生体内動態をライブイメージングで解析した。更に、その動態に対して、局所炎症等が与える影響や抗炎症薬による変化も観察した。エクソソームのバイオマーカーとしての可能性の検討として、関節リウマチモデル(SKG マウス)における病状や抗炎症薬等の治療による治癒効果をスコア化し、それに対するエクソソーム中のプロスタグランジン関連酵素群の量的及び質的变化を比較検討し、エクソソームのバイオマーカーとしての可能性を考察した。

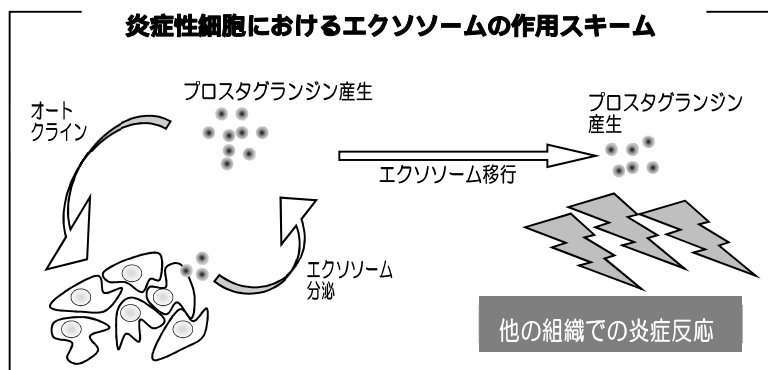
多重及び複合炎症モデルを用いた生体システムにおけるエクソソームの解析として、同一個体に対して複数の異なる箇所での起炎反応や別モデルの組み合わせなどを試みて、生体反応が相互に作用を及ぼす可能性とそこに介在するエクソソームの役割をこれまで用いた生化学的手法或いはバイオイメージング技術を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) エクソソームに存在するプロスタグランジン(PG)合成系の検討

培養上清や生体体液など、様々なサンプルにおいて、効率的なエクソソームの単離方法を確立した。これは、複数のマイクロフィルターを用いた分画方法であり、簡便で精度の高い方法である。電子顕微鏡による形態観察から、約 50 から 100 nm に相当する均一なエクソソームの存在を確認した。更に、免疫染色により、エクソソーム中に含有されると考えられるプロスタグランジンの産生に関与する酵素として iPLA2、COX-2、PGE 合成酵素の検出を試みたが、今回の研究期間では、明確な存在を示す画像を得ることが出来なかった。これに関しては、サンプルの前処理方法の問題や抗体の特異性など、幾つかの原因が想定され、今後、検討を行って、その実態の解明につなげたいと考えている。

次に、この精製エクソソームを用いて SDS/PAGE 及びプロテインブロット法による関連タンパク質の検出や microRNA の定量を行った。更に、エクソソームにおける PG 産生能力を評価し、PG 産生酵素群の存在およびその活性を確認し、生体内を移動するエクソソームが局所において PG 産生を担う場となる可能性が示唆された。



(2) エクソソームのライブイメージング手法の検討

エクソソームの生体内挙動を検討する方法として各種蛍光色素を用いて、培養細胞由来エクソソームをラベルし、IVIS Imaging Systemにて生体外からの検出を試みた。その結果、蛍光色素として、生体の pH レンジに依存せず、赤外ダイオードレーザーに匹敵する赤外蛍光色素(励起波長: 655 nm、蛍光波長: 675 nm)である Claret Far Red Fluorescent Cell Linker が最も適することを見いだした。今回は、研究期間の関係もあり、これ以上の検討は出来なかったが、今後この方法は、エクソソームの生体内挙動を調べ、局所炎症等が与える影響や抗炎症薬による変化およびその役割を検討する有用な手段となると考えられた。

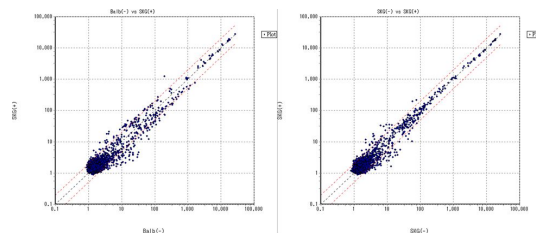
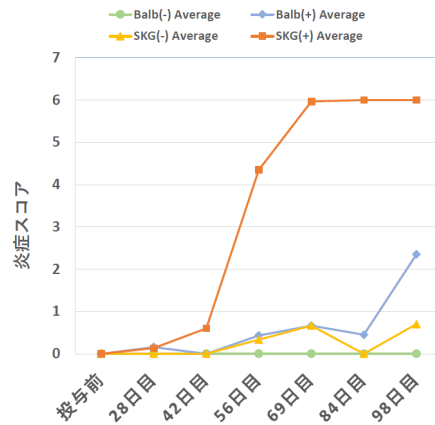
(3) 関節リウマチモデル(SKG マウス)におけるエクソソームの存在確認及びその性質の解析
SKG マウスは、Balb/c マウスに由来するが、若齢期に多糖の Laminarin を腹腔内に投与することにより、加齢と共に関節炎を発症していく。しかし、その発症率の安定には、若干問題があり、また、幾つかの炎症性マーカーとの相関性からも改善の余地があると考えていた。

一方、我々は、これまで急性炎症を研究するモデルとして、酵母の細胞壁成分である Zymosan をマウスやラットの胸腔や腹腔に投与し、胸膜炎や腹膜炎を惹起する手法を用いて研究を行ってきた。今回、関節リウマチモデル SKG マウスで、より確実に関節炎を誘導する方法を検討した。様々な起炎物質を試み、また投与量を検討し、特定週齢の SKG マウスに一定濃度の Zymosan を投与することにより、確実に安定的な関節炎を誘導することが可能となった。

右に示した様に Zymosan 投与後 42 日目より関節炎のスコアは SKG マウスにおいて顕著に上昇し、各種血中炎症マーカーや腫瘍壊死因子 (TNF) 及びインターロイキン-1 等の上昇も炎症スコアと相関して上昇することが確認された。非投与群やコントロールとなる Balb/c マウスでの炎症は、84 日目まで、ほぼ認められない。

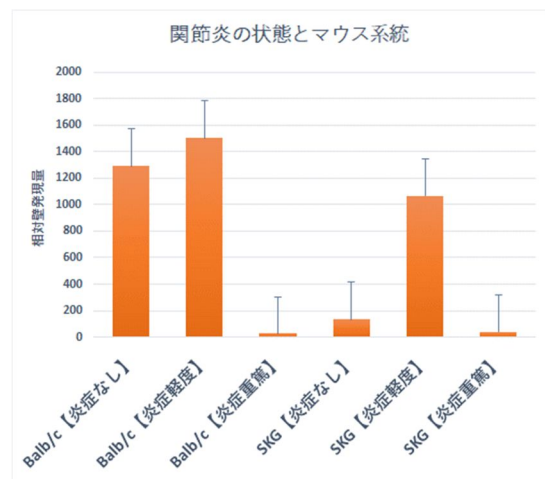
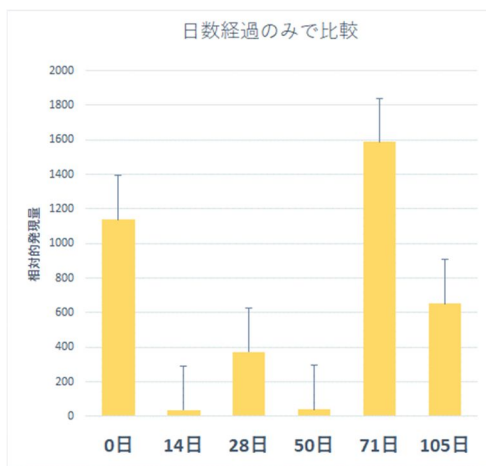
次にこれらの病態モデルから経時的に採血を行い、前述の方法を用いて血中エクソソームの精製を行った。次に精製して定量したエクソソーム中の microRNA の発現量をマイクロアレイ GeneChip miRNA Array4.0 (Filgen) を用いて、網羅的に解析した(右図)。

この結果を解析し、発現量が変動する microRNA として約 50 種類の候補を見いだした。これらの候補に関して、内在性コントロールとして miR-159a を添加して、TaqMan Advanced miRNA Assays (Thermo Fisher) を用いてリアルタイム PCR により、発現量の違いを詳細に解析した。そして、最終的な候補として、miR-328-5p を見いだした。他の候補も考えられたが、研究期間の関係もあり、miR-328-5p について重点的に解析することとした。



日数経過における発現量を検討したところ(下左図)、関節炎の症状が急速に進行していく時期において、miR-328-5p が顕著に低下していることが明らかとなった。また、全サンプルにおける Balb/c マウスと SKG マウスを比較した場合においても SKG は miR-328-5p の発現が優位に低く、その傾向は、起炎物質投与前においても認められた。更に、各系統の炎症スコア症状との相関を調べたところ(下右図)、症状のない Balb/c マウスが最も miR-328-5p の発現が高値となることが明らかとなった。

以上のことから、miR-328-5p は、何らかの標的遺伝子の発現を抑制することにより慢性関節リウマチの発症を抑制的に制御している可能性が推測された。標的遺伝子やその役割に関する解明までは至らなかったが、今後の研究の焦点を明確にすることが出来た。また、miR-328-5p の低値は遺伝的な背景や発症前の状況を反映している可能性が考えられ、慢性炎症性疾患のバイオマーカーとしての有用であることも考えられる。



数ヶ月で終息する急性炎症と異なり、慢性炎症は長期のストレス応答などにより炎症反応の遷延化が生じ、機能破綻につながり、生活習慣病やがんなどの病態の基盤となっていることが提唱されている。このような自然炎症と呼ばれる状態の病態生理に関して、現在、様々なアプローチが行われているが、まだ十分な理解には至っていない。我々は、本研究から慢性関節リウマチなどの遷延化炎症状態におけるエクソソームの関与とそこに含まれる特定分子種の microRNA の重要性を示すことが出来た。本研究の進展は、将来、難治性疾患等を発症する可能性を早期に見極

め、その対応と発症予防につながるものと考えられ、本研究が一定の成果を得ることが出来たと考えている。

引用文献

- Pan, B. T., and Johnstone, R. M. (1983) *Cell* 33,967-977
- Raposo G, Stoorvogel W. *J Cell Biol.* 2013 Feb 18;200(4):373-383
- Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015 Feb;13(1):17-24
- Wortzel I, Dror S, Kenific CM, Lyden D. *Dev Cell.* 2019 May 6;49(3):347-360
- Nathan C, Ding A. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):871-82
- Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. *J Control Release.* 2015 Dec 10;219:278-294
- Hara S. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2017;93(9):703-723

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奈良場博昭
2. 発表標題 ラット炎症モデルの滲出液中におけるエクソソーム分泌とその含有機能性タンパク質の解析
3. 学会等名 第38回日本炎症再生医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奈良場博昭
2. 発表標題 慢性関節リウマチモデルマウスの血中エクソソームにおける低分子RNAと病態の関係
3. 学会等名 第39回日本炎症再生医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奈良場博昭、青山玲子
2. 発表標題 慢性関節リウマチモデルマウスの血中エクソソームにおける低分子RNAと病態の関係
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩花 諒、青山 玲子、奈良場 博昭
2. 発表標題 関節リウマチの炎症症状とエクソソーム由来マイクロRNAの発現変動の検討
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部会
4. 発表年 2019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
研究協力者	青山 玲子 (AOYAMA reiko)		