

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06838

研究課題名(和文)小腸特異的エクソソームの同定と新たな腸免疫制御の解明

研究課題名(英文) Identification of gut-derived extracellular vesicles and their possible role in gut immunity

研究代表者

上田 祐司 (Ueta, Hisashi)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10364556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：臓器の排導リンパに着目して小腸特異的エクソソームの単離、同定と機能の解析を行った。まず、ラット胸管カニューレクションとアフィニティ精製法を用いることで、リンパ中に恒常的なエクソソームの存在を示した。次に、腸間膜根リンパ節切除術を応用して実験群と対照群のエクソソームを網羅的に比較解析することで、小腸特異的エクソソームにおける核酸およびタンパク質の同定を行った。その結果、約10個のmiRNA、3個のタンパク質において小腸エクソソーム特異的分子として見出した。また、免疫応答の系でエクソソーム産生、受容細胞としてフェノタイプと組織内局在が異なる樹状細胞亜群を同定し、これらの臨床応用法を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームは遠隔細胞間で情報交換する手段である。しかし、その生体内挙動や臓器特異性はほとんどが明らかになっていない。本研究ではリンパにもエクソソームが恒常的に産生されていることが初めて証明された。また、小腸からリンパへ産生される小腸特異的なエクソソームを同定することができた。腸は莫大な量の情報処理を行いながら、他の器官系と連携して体の恒常性を維持しており、腸機能の変化や失調は腸のみならず様々な臓器の疾患にも繋がるとされる。本研究成果は、腸発の新たな細胞間相互作用を解き明かすことで生命の理解を深め、疾患の予防や治療に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the nature of lymphatic systems, we tried to identify tissue-specific extracellular vesicles (EVs) in lymph. First, we directly prove the existence of EVs in the thoracic duct lymph from normal rat. Next, by employing preoperative mesenteric lymphadenectomy and comprehensive analysis, we identified about 10 miRNAs and 3 proteins as gut-EV specific molecules. Furthermore, we also identified dendritic-cell subsets which had different tissue localization and phenotypic markers as EV-producing and -uptaking cells in the alloimmune response model.

研究分野：解剖学、免疫学

キーワード：exosome extracellular vesicles lymph miRNA proteome dendritic-cells rat

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞、あるいはエクソソームを介した細胞間相互作用は免疫系細胞における抗原提示経路の1つとして以前より知られていたが、近年、生命を構成する他の器官系の細胞同士がエクソソームを介して遠隔間で相互作用することが示されつつあった。しかし、その多くはがん等の病態における血中エクソソームの増減からその病態との因果関係を推察する研究や、培養細胞を *in vitro* にて薬剤等で刺激してエクソソーム産生を解析する研究が主であった。

腸に代表される消化器系は、日々様々な器官系と連携しながら生命の恒常性維持に必須な生理作用を担っていることから、腸発のエクソソームが存在することが予想されるが、大腸癌の転移機構に関与することが知られ始めていたものの、生体内の実在や挙動など恒常的なエクソソームの実態は不明であった。

2. 研究の目的

組織由来成分は排導リンパにも吸収されることに着目し、本研究ではリンパ中のエクソソームの存在と単離法を確立した上で、生体の小腸より臓器特異的エクソソームを単離する。次に小腸由来エクソソームの内包因子を同定し、生体内挙動(産生/受容細胞、動態、伝達経路)を個体レベルで明らかにする。さらに腸免疫モデルにおける小腸エクソソームの関与を解析し、腸免疫に果たす役割を考察する。

3. 研究の方法

(1)リンパ由来エクソソームの単離法の開発と小腸特異的エクソソーム分子の同定

11-12週齢の雄Lewisラットに麻酔下で胸管カニューレーションを行い、リンパ液を採取する。リンパ液を出発材料に市販のエクソソーム単離キット(5種類程度)からエクソソームを単離後、ナノトラッキングによりエクソソーム粒子径と濃度を算出し、BCA法でタンパク質濃度を測定する。小腸特異的エクソソームを得る際には、生後5週齢時に腸間膜根リンパ節を無菌的に切除し6週間経過させる。これにより当該リンパ節の輸入、輸出リンパ管が繋がるので小腸由来のリンパが直接胸管に流入するようになる。分子発現の差異を対照群(開腹のみ。リンパ節切除無し。)と比較する事で、実験群に高濃度あるいは特異的な分子を腸由来エクソソーム分子として同定する。

(2)免疫応答におけるエクソソーム産生細胞、受容細胞群の同定

エクソソームを介した細胞間相互作用の可能性が示唆されるアロ免疫応答の系(予備実験により確認済み)で、エクソソーム産生細胞・受容細胞の同定を行った。異系ACIラットのT細胞をCFSE標識してLewisラットに細胞移入し、36時間後の脾臓、リンパ節より樹状細胞(dendritic-cell, DC)を単離してレシピエントDCマーカー、CFSEのマルチカラーフローサイトメトリーを行い、CFSE+DCのフェノタイプを解析する。次に同様に細胞移入後の48時間における脾臓、リンパ節の新鮮凍結切片で免疫多重染色を行い、抗原提示レシピエントDCのフェノタイプを決定する。これらの結果より、異系ラットの抗原提供者と提示細胞の細胞型からエクソソーム産生細胞と受容細胞を見いだす。

4. 研究成果

(1)リンパ由来エクソソームの単離法の開発と小腸特異的エクソソーム分子の同定

臓器特異的エクソソームの単離法の開発

エクソソームは遠隔細胞に作用すべく細胞外へと放出されるが、末梢血より単離したエクソソームでは産生部位を明らかにする事は不可能である。その大きな要因はマウスでは小さ過ぎるため、微小循環よりエクソソームを得ることが極めて困難な為である。そこでラットを実験動物に胸管カニューレーション法でリンパ液を採取し、これを出発材料に、原理の異なるさまざまな方法でエクソソーム単離を試みた。平均粒子径、収量、純度等を指標に最適な単離法を検討したところ、アフィニティ法による単離が最も優れていると考えられた。得られたエクソソームは平均粒子径 97.6 ± 3.4 nm、濃度 $5.7 \pm 1.3 \times 10^{10}$ particle/mL であることから、正常リンパ中にも恒常的にエクソソームが産生されることを証明できた(図1)。

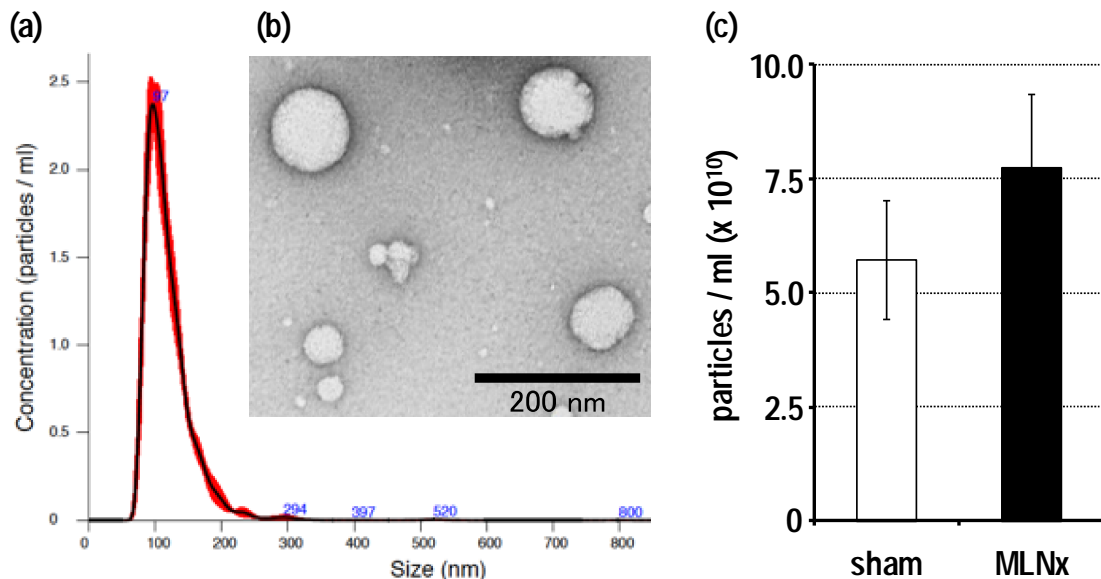


図1. 胸管リンパ由来エクソソームの単離: (a) ナノトラッキング解析による粒子解析, (b) 透過電子顕微鏡解析, (c) 小腸リンパが直接流入する胸管リンパ (MLNx) におけるエクソソーム量の比較。

小腸特異的エクソソーム分子の同定

次に臓器特異的エクソソームをリンパより得るべく、事前にリンパ節切除を施した。これにより切除リンパ節に排導していた臓器由来のリンパは直接胸管へと流入するようになり、切除群と対照群を比較することで、臓器特異的エクソソーム分子を見いだす事が可能となる。miRNA発現の解析結果、切除群で高値を示す12個のmiRNA分子を見いだした。それらの中には腸の炎症やがん免疫応答を抑制的を導く分子も存在した。反対に、切除群で発現の低いmiRNA分子も約20種同定された。ここで切除群で低値、対照群で高値を示す分子は腸所属リンパ節から輸送リンパ管へ産出される分子と考えられる。

同様の方法でプロテオーム解析を行い小腸由来エクソソームに固有なタンパク質の網羅的解析を行なった。その結果、再現性をもって高発現を示す候補分子として3つのタンパク質を見いだした。このうち分子Aは、興味深いことに、他の器官系の病態関連因子として知られているものの消化器系における発現はこれまで報告されておらず、腸から発信されるエクソソームが新たな作用の可能性が示唆された。また、切除群で発現の低いタンパク質も数種同定された。これら小腸エクソソーム特異的分子の機能は引き続き解析中である。

(2)免疫応答におけるエクソソーム産生細胞、受容細胞群の同定

エクソソームは大きさが100 nmと細胞の100分の1以下であるため、生体組織内で需要細胞を捉えることが決して容易でないと予想された。そこで組織内においてエクソソームを介した相互作用が確認できる系を押さえるべく、エクソソームの関与が最も深く知られている免疫応答における抗原伝達の微小環境を探索した。異系細胞由来の移植抗原がエクソソーム伝達因子となる系で解析したところ、異系細胞を捉えて移植抗原に純化する細胞は脾臓やXCR1+SIRP1a-の樹状細胞(dendritic-cells, DCs)であったのに対し、移植抗原に対する免疫応答を誘導すべくT細胞に抗原提示を行うDCの大部分はXCR1-SIRP1a+型であった。ここで、XCR1-SIRP1a+型DC自体は異系細胞を取り込こんではいなかったこと、2つのDCは臓器内には共在するものの近接はしていなかったことから、XCR1+SIRP1-DCからXCR1-SIRP1a+DCへと抗原情報が伝達されたことが強く示唆された(図2)。これらDC亜群は腸の所属リンパ節でも同様に認められ、フローサイトメリーにて単離可能なことからエクソソーム産生・受容機構の解析に適しており、今後本研究をさらに深めてゆく上で非常に有用であると考えられた。また、本研究成果で見出された免疫応答の効率性に関する知見は感染予防やワクチンに臨床応用できる可能性が高く、特許として承認された。

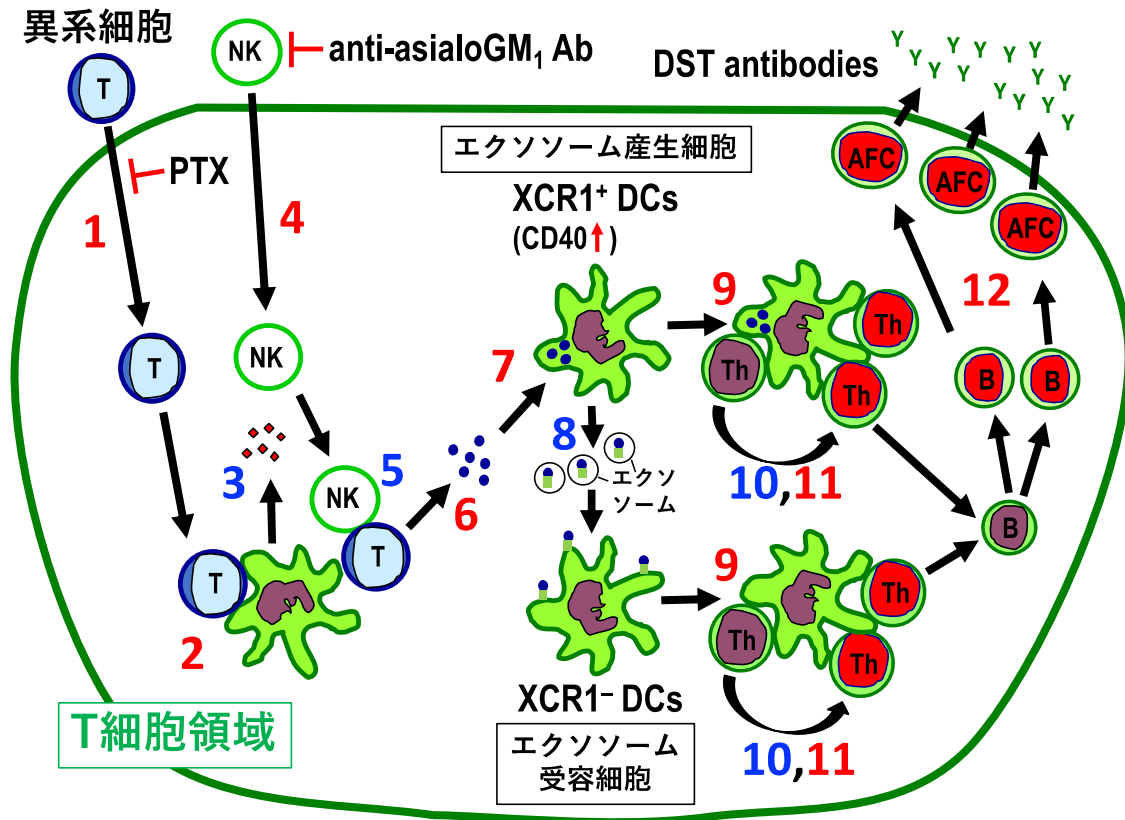


図2. 免疫応答におけるエクソソーム産生・受容細胞の同定 (文献を改変)

(3) 腸免疫作動モデルの確立

腸免疫の大きな作用として経口免疫寛容がある。これは腸で吸収された外来抗原に対して免疫応答が作動しないように積極的に抑制する機構であり、腸エクソソームが作用する可能性が高い。実験的自己免疫性脳炎 (EAE) はミエリン塩基性タンパク質 (MBP) に対する自己免疫応答であるが、EAE 発症マウスに MBP を経口投与すると免疫寛容が誘導されることが知られている。そこでラットの系で病態モデルの作製を試みた。ラットの EAE T 細胞系を得て、培養環境、刺激条件を検討して結果、リンパ節由来のフィーダー細胞に、IL-2 と superagonist CD28 抗体の存在下で培養すると、EAE 特異的な活性化 T 細胞を以って病態を誘導できることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueta H, Xu XD, Yu B, Kitazawa Y, Yu E, Hara Y, Morita-Nakagawa M, Zhou S, Sawanobori Y, Ueha S, Rokutan K, Tanaka T, Tokuda N, Matsushima K, Matsuno K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Suppression of liver transplant rejection by anti-donor MHC antibodies via depletion of donor immunogenic dendritic cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 261-272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa076.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitazawa Y, Ueta H, Sawanobori Y, Katakai T, Yoneyama H, Ueha S, Matsushima K, Tokuda N, Matsuno K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel Targeting to XCR1+ Dendritic Cells Using Allogeneic T Cells for Polytopical Antibody Responses in the Lymph Nodes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.01195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田祐司、徳田信子
2. 発表標題 小腸特異的エクソソームの単離と分子解析
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会 全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ueta H, Kitazawa Y, Sawanobori Y, Katakai T, Ueha S, Matsushima K, Tokuda N, Matsuno K
2. 発表標題 Novel DC targeting by allogenic T-cells for multifocal prophylactic antibody production
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会 全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 T細胞ワクチン	発明者 松野健二郎、上田祐 司、北沢祐介	権利者 獨協医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6884450	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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 分 担 者	田中 十志也 (Toshiya Tanaka) (20396930)	東京大学・先端科学技術研究センター・特任教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------