

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17687

研究課題名（和文）マスト細胞由来エクソソームmiRNAによるIL-5産生増強機構の解明

研究課題名（英文）Analysis for the mechanism by which IL-5 production is reinforced by miRNA in exosome from mast cells

研究代表者

豊島 翔太（Toyoshima, Shota）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30807954

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、IgE依存性に活性化したマスト細胞から遊離されたエクソソームには、miR103a-3pを高頻度で内包されていることを明らかにした。それを取り込んだ2型自然リンパ球（ILC2）のPRMT5の発現を低下させ、GATA3のアルギニン残基のメチル化を脱メチル化へと傾けることで、好酸球増多をもたらすIL-5の産生を増強させていた。さらに、アトピー患者血清中のエクソソームを調べると、miR103a-3pが高値であったことから、アトピー性皮膚炎など、好酸球増多を伴うアレルギー疾患では、マスト細胞由来のmiR103a-3pがアレルギーの遷延化に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームに内包されるタンパク質やmiRNAは細胞間相互作用に重要な役割を果たすことがよく知られているが、マスト細胞が遊離するエクソソーム中のmiRNAの役割に関して、初めて明らかにした。その結果、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患を遷延化させるメカニズムの一端を明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：The present study demonstrated that miR103a-3p was highly expressed in exosomes released by mast cells. These exosomes reduced the expression levels of PRMT5 in group 2 innate lymphoid cells and skewed methylated GATA3 to demethylated GATA3 in ILC2, leading to enhancement of IL-5 production, contributing to eosinophilia, from ILC2. Together, these might suggest that miR103a-3p in exosomes from mast cells contributed to the exacerbation of eosinophil-mediated allergic inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：マスト細胞 細胞外小胞 microRNA 2型自然リンパ球 アレルギー炎症

### 1. 研究開始当初の背景

全ての細胞は細胞外小胞と呼ばれる小胞を分泌している。その小胞には、マイクロRNA (miRNA) やメッセンジャーRNA (mRNA) などの核酸やタンパク質などが内包され、受け手側の細胞の遺伝子発現やシグナル伝達に影響を及ぼすことが知られている。

miRNA は、約 22 塩基の核酸でタンパク質に翻訳されない遺伝子として知られている。相互作用する mRNA と結合し、遺伝子レベルで発現を制御することで細胞の機能を調整している。

マスト細胞は、アトピー性皮膚炎や気管支喘息などに代表される IgE 依存性アレルギー疾患の責任細胞の一つである。アレルゲンとアレルゲン特異的な IgE 活性化すると、ヒスタミンを遊離し、血管透過性を亢進したり、IL-4 や IL-13 などの 2 型サイトカインなどを産生し、2 型免疫応答を増強する役割を担っている。マスト細胞が遊離する細胞外小胞には、抗原を保持した MHC class II や PLA2G4 などのタンパク質が含まれ、樹状細胞やランゲルハンス細胞の抗原提示能を亢進させることが報告されている。しかしながら、マスト細胞が遊離する細胞外小胞中の miRNA の特徴や役割については言及されていなかった。

これまでに、ヒトマスト細胞を刺激なし、IL-33 刺激 (IL33-EVs)、IgE 感作 (IgE-EVs) もしくは IgE と抗 IgE 抗体で刺激した時に遊離される細胞外小胞 (IgE/anti-IgE-EVs) 中の miRNA のプロファイル調べた結果、IgE 依存性に活性化したヒトマスト細胞から遊離される細胞外小胞中で、特異的に miR23b-3p や miR103a-3p などの 7 個の miRNA の発現が、特異的に亢進していることを明らかにしている (表 1)。また、これらのマスト細胞由来の細胞外小胞を、IL-33 依存性に IL-5 や IL-13 などの 2 型サイトカインを産生しアレルギー炎症に寄与する 2 型自然リンパ球 (ILC2) と共培養したところ、IgE/anti-IgE-EVs と共培養した時のみ、ILC2 からの IL-5 産生が増強され、IL-13 産生には影響を及ぼさないことを見出している。

表1. IgE依存性に活性化したヒトマスト細胞から遊離される細胞外小胞に特異的なmiRNA

	Donor #1	Donor #2	Donor #3
miR134-5p	107.1	99.7	3.0
miR1290	3.9	14.1	3.9
miR23b-3p	38.0	2.3	2.4
miR103a-3p	6.4	3.2	2.8
miR3940-5p	4.6	3.5	3.7
miR4734	36.3	58.0	72.8
miR6728-5p	2.6	3.5	2.2

### 2. 研究の目的

本研究計画では、ヒトマスト細胞由来細胞外小胞 miRNA による IL-5 産生増強機序を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒトマスト細胞からの細胞外小胞の回収

関節滑膜由来ヒトマスト細胞を 0 もしくは 100 ng/mL recombinant human (rh) IL-33 で 24 時間刺激した。また、関節滑膜由来ヒトマスト細胞を 0.5 µg/mL の human myeloma IgE で 24 時間刺激、もしくは 0.5 µg/mL の human myeloma IgE で 1 時間感作したのち、3 µg/mL の polyclonal rabbit anti-IgE antibody で 24 時間刺激した。この培養上清を回収し、3,000 x g で 15 分間の遠心を行い、その上清を回収した。回収した上清に ExoQuick-TC を加え、4 で一晚反応させた。その後、6,000 x g で 30 分間の遠心を行い、上清を除去し、細胞外小胞を回収した。

#### (2) ヒト ILC2 の単離・培養

健常者ヒト末梢血より、lymphocyte separation medium を用いて、比重遠心により末梢血単核球を単離し、cell sorter を用いて、Lin-CD45+CRTh2+CD161+細胞 (human ILC2) を回収した。マイトマイシン C で不活化した末梢血単核球をフィーダー細胞として、100 IU/mL の rh IL-2 存在下で 4 週間培養し、各実験に用いた。

#### (3) miRNA mimic および siRNA の導入

In vitro で培養した human ILC2 に、MISSION siRNA Transfection Reagent を用いて、nonsense miRNA, miR103a mimic, siRNA negative control もしくは PRMT5 に対する siRNA を導入した。導入から 4 時間後、細胞を PBS で洗浄し、10 IU/mL の rhIL-2 と 30 ng/mL の rhIL-33 存在下もしくは非存在下で 72 時間培養した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト ILC2 からの IL-5 産生を増強させる miRNA の探索

まず、IL-33 依存性ヒト ILC2 からの IL-5 産生増強に寄与する miRNA を探索するために、ヒトマスト細胞由来の IgE-EVs もしくは anti-IgE-EVs とヒト ILC2 を共培養した。経時的に anti-IgE-EVs で特異的に発現が亢進していた miRNA の qPCR を行ったところ、表 1 で示

している 7 個の miRNA 中で、miR103a-3p のみが anti-IgE-EVs と共培養したヒト ILC2 で、IgE-EVs と共培養した ILC2 よりも有意に発現が上昇していた。このことから、ヒト ILC2 からの IL-5 産生の増強には、miR103a-3p が関与していることが示唆された。この点に関して検証するために、nonsense miRNA もしくは miR103a mimic を in vitro で培養した human ILC2 に過剰発現させ、IL-33 で 72 時間刺激したのち、IL-5 産生および IL-13 産生を ELISA で測定した。その結果、miR103a-3p を過剰発現している human ILC2 は、nonsense miRNA を過剰発現させた human ILC2 よりも IL-5 の産生が有意に上昇し、その一方で IL-13 の産生には影響を及ぼさなかった。従って、miR103a-3p が human ILC2 からの IL-5 産生を増強させる miRNA であることが明らかになった。

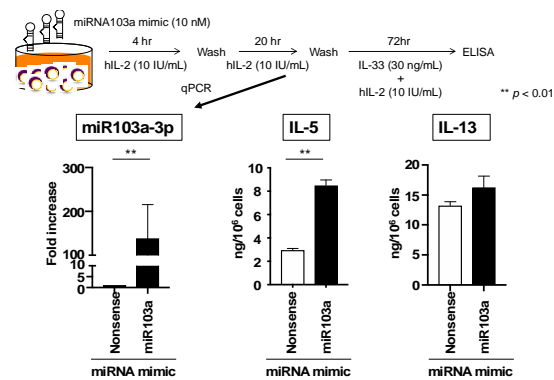


図1. nonsense miRNAおよびmiR103a mimicを導入したhuman ILC2のmiR103a-3pの発現およびサイトカイン産生

### (2) miR103a-3p による IL-5 産生増強機序の解明

これまでに、2 型ヘルパー T 細胞が休止状態の時、IL-5 および IL-13 の転写因子である GATA3 の 261 番目のアルギニン残基がメチル化された状態にあり、これらの転写に必要な co-factor や RNA polymerase II が転写開始領域に結合できず、IL-5 の転写が起こらないが、T 細胞受容体からの刺激により、活性化した 2 型ヘルパー T 細胞の GATA3 の 261 番目のアルギニン残基が脱メチル化され、転写に必要な因子が転写開始領域に結合できるようになり、IL-5 の転写が起こることが報告されている (Hosokawa et al., JBC, 2015)。しかしながら、この GATA3 の脱メチル化は、IL-13 の転写には影響しないことも報告されている。これらのことから、miR103a-3p は、ILC2 の GATA3 のアルギニン残基のメチル化・脱メチル化に関する遺伝子を標的としている可能性が考えられた。タンパク質のアルギニン残基は、Protein arginine methyltransferase (PRMT)によってメチル化され、Jumonji domain-containing (JMJD)によって、脱メチル化されることが知られている。そこで、in silico で miRNA の標的を探索する TargetScan を用いて、miR103a-3p の標的を探索したところ、PRMT4, PRMT5 および PRMT8

が標的となる可能性が伺われた。ILC2 内で miR103a-3p がこれらの分子を標的としているかを検証するために、IgE-EVs もしくは anti-IgE-EVs と共培養した human ILC2 で、PRMT4, PRMT5 および PRMT8 の qPCR を行ったところ、PRMT5 の発現が IgE-EVs と共培養した human ILC2 よりも anti-IgE-EVs と共培養した

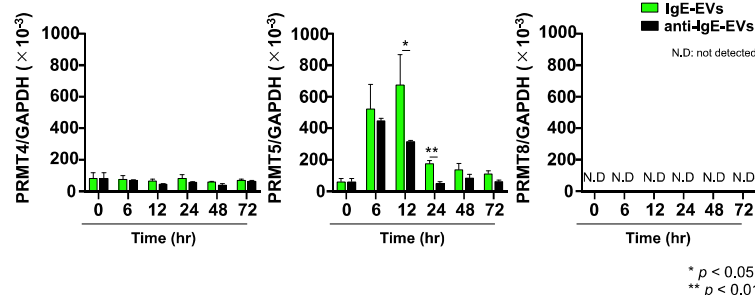


図2. miR103a-3pは、PRMT5を標的としている

human ILC2 で有意に低下していた (図 2)。さらに、マスト細胞由来の EVs と共培養した human ILC2 を用いて western blot を行なったところ、PRMT5 の発現は、タンパク質レベルでも低下し、GATA3 のアルギニン残基のメチル化レベルも低下し、脱メチル化へと傾いていた。この現象は、miR103a mimic を過剰発現した human ILC2 でも観察されたことから、miR103a-3p は、PRMT5 の発現を低下させ、GATA3 をメチル化から脱メチル化へ傾けることで、IL-5 の産生を増強させていることが示唆された。

### (3) PRMT5 の IL-5 産生への関与

次に、PRMT5 自体が ILC2 の IL-5 産生に寄与するかを検証した。In vitro で培養している human ILC2 に PRMT5 に対する siRNA を導入し、PRMT5 をノックダウンし、30 ng/mL の rhIL-33 で 72 時間培養し、サイトカイン産生を ELISA で測定した。Ctrl の siRNA の導入と比較して、PRMT5 に対する siRNA を導入した human ILC2 では、PRMT5 のタンパク質レベルの発現低下が認められ、さらに IL-33 で刺激すると、IL-5 の産生が有意に増強したが、IL-13 の産生には影響を及ぼさなかった (図 3)。したがって、PRMT5 は、ILC2 において IL-5 産生に重要な役割を担っていることが明らかになった。

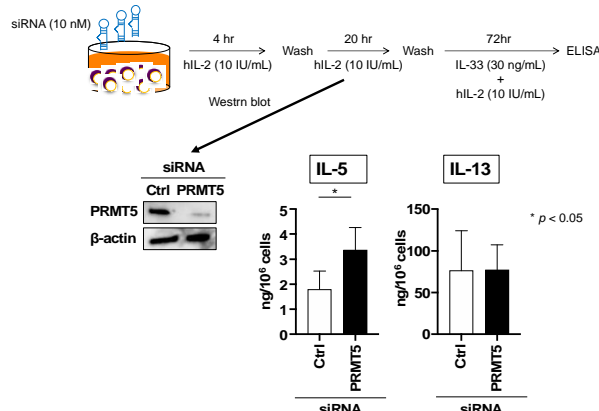


図3. PRMT5のノックダウンによって、human ILC2からのIL-5産生は増強した

したがって、PRMT5 は、ILC2 において IL-5 産生に重要な役割を担っていることが明らかになった。

#### (4) miR103a-3p のアトピー性皮膚炎 (AD)への関与

miR103a-3p による IL-5 産生増強がアレルギー疾患でも起こり得るのかを検証した。日本大学板橋病院の皮膚科を 2018 年から 2020 年までに受診した AD 患者血清中から細胞外小胞を回収し、miR103a-3p の発現を健常者コントロールと比較した (承認番号: RK-160112-2 および RK-150908-12)。その結果、健常者コントロールよりも AD 患者血清中の細胞外小胞の方が、有意に miR103a-3p の発現が高値であった (図 4)。

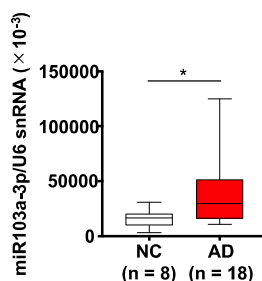


図4.アトピー患者の血清EVのmiR103a-3pの発現は、健常者よりも有意に高い

アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の遷延化の原因の一つとして、好酸球増多が観察されている。IL-5 は、好酸球の生存・分化・増殖に重要なサイトカインの一つである。本研究により、IgE 依存性に活性化したマスト細胞から遊離された細胞外小胞には、miR103a-3p が多く含まれており、それが ILC2 に取り込まれると PRMT5 の発現を低下を介し、GATA3 のアルギニン残基を脱メチル化させることで、好酸球増多をもたらす IL-5 の産生を増強させ、アトピー性皮膚炎を遷延化させるメカニズムを新たに明らかにできた。

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 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mishima Shintaro, Kashiwakura Jun-ichi, Toyoshima Shota, Sasaki-Sakamoto Tomomi, Sano Yutaka, Nakanishi Kazuyoshi, Matsumoto Kenji, Okayama Yoshimichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Higher PGD2 production by synovial mast cells from rheumatoid arthritis patients compared with osteoarthritis patients via miR-199a-3p/prostaglandin synthetase 2 axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-84963-7	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 -

1. 著者名 Toyoshima Shota, Sakamoto-Sasaki Tomomi, Kurosawa Yusuke, Hayama Koremasa, Matsuda Akira, Watanabe Yasuo, Terui Tadashi, Gon Yasuhiro, Matsumoto Kenji, Okayama Yoshimichi	4. 巻 -
2. 論文標題 miR103a-3p in extracellular vesicles from Fc RI-aggregated human mast cells enhances IL-5 production by group 2 innate lymphoid cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	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） 10.1016/j.jaci.2021.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shota Toyoshima, Shintaro Mishima, Jun-ichi Kashiwakura, Tomomi Sasaki-Sakamoto, Yutaka Sano1, Kazuyoshi Nakanishi, Kenji Matsumoto, Yoshimichi Okayama
2. 発表標題 Higher PGD2 production by synovial mast cells from rheumatoid arthritis patients compared with osteoarthritis patients via miR199a-3p/Cyclooxygenase 2 axis
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shota Toyoshima, Tomomi Sakamoto-Sasaki, Yusuke Kurosawa, Koremasa Hayama, Akira Matsuda, Yasuo Watanabe, Tadashi Terui, Yasuhiro Gon, Kenji Matsumoto, Yoshimichi Okayama
2. 発表標題 miR103a-3p in extracellular vesicles from Fc RI-aggregated 1 human mast cells enhances IL-5 production by group 2 innate lymphoid cells
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 IgE依存性に活性化したマスト細胞が遊離する細胞外小胞中のmiR103a-3pは、2型自然リンパ球からのIL-5産生を増強させる。
2. 発表標題 豊島翔太, 坂本朋美, 黒澤雄介, 葉山惟大, 松田彰, 渡部保男, 照井正, 權寧博, 松本健治, 岡山吉道
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 miR103a-3p in extracellular vesicles from Fc RI-aggregated human mast cells enhances IL-5 production by group 2 innate lymphoid cells
2. 発表標題 Shota Toyoshima, Tomomi Sakamoto-Sasaki, Yusuke Kurosawa, Koremasa Hayama, Akira Matsuda, Yasuo Watanabe, Tadashi Terui, Yasuhiro Gon, Kenji Matsumoto, Yoshimichi Okayama
3. 学会等名 APSR2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shota Toyoshima, Tomomi Sakamoto-Sasaki, Yusuke Kurosawa, Koremasa Hayama, Akira Matsuda, Y Watanabe, Tadashi Terui, Yasuhiro Gon, Kenji Matsumoto, Yoshimichi Okayama
2. 発表標題 miR103a-3p in extracellular vesicles derived from human mast cells following aggregation of Fc RI enhances IL-5 production from IL-33-stimulated type2 innate lymphoid cells via PRMT5
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toyoshima S, Sakamoto-Sasaki T, Matsumoto K, Okayama Y
2. 発表標題 miR103a-3p in extracellular vesicles derived from human mast cells following aggregation of FcεRI enhances IL-5 production from IL-33-stimulated type2 innate lymphoid cells (ILC2) via silencing protein arginine methyltransferase.
3. 学会等名 WAC (World Allergy Congress) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Shota Toyoshima, Tomomi Sasaki-Sakamoto, Yusuke Kurosawa, Yasuhiro Gon, Chisei Ra, Kenji Matsumoto, Yoshimichi Okayama.
2. 発表標題	miRNA103a-3p in extracellular vesicles derived from anti-IgE Ab activated human mast cells enhances IL-5 production in ILC2 in the presence of IL-33.
3. 学会等名	第48回日本免疫学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	豊島翔太, 坂本朋美, 黒澤雄介, 權寧博, 羅智靖, 松本健治, 岡山吉道
2. 発表標題	抗IgE抗体によって活性化したマスト細胞が遊離する細胞外小胞中のmiR103a-3pは, 2型自然リンパ球からのIL-5産生を増強させる.
3. 学会等名	2019年アレルギー・好酸球研究会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Shota Toyoshima, Tomomi Sasaki-Sakamoto, Yasuhiro Gon, Chisei Ra, Kenji Matsumoto, Yoshimichi Okayama
2. 発表標題	Exosomal miRNA derived from anti-IgE activated human mast cells enhances IL-5 production in ILC2 in the presence of IL-33.
3. 学会等名	第68回日本アレルギー学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	豊島翔太
2. 発表標題	マスト細胞の細胞外小胞による新たなアレルギー制御機序の解明
3. 学会等名	第71回日本アレルギー学会
4. 発表年	2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

アレルギー炎症を増悪・遷延化させ、その炎症を全身に拡げるメカニズムの解明  
[https://www.med.nihon-u.ac.jp/up\\_pdf/20210222140231.pdf](https://www.med.nihon-u.ac.jp/up_pdf/20210222140231.pdf)

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------