

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03445

研究課題名(和文)細胞外小胞を介した炎症反応誘導機構の分子基盤解析

研究課題名(英文)The molecular basis for exosome-induced inflammatory responses

研究代表者

中村 能久(Nakamura, Takahisa)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：30396874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：Aim 1では、マクロファージにおけるEVのRNAセンサーであるTRBPによるEV認識機構の解析を行い、TRBPが炎症性EVで誘導される細胞内炎症性経路の活性化、および炎症性サイトカインに発現に欠かれないことを見出した。また、TRBP以外にも、炎症性EV応答に必須のタンパク質群を同定しており、それらの解析も継続中である。Aim2では、マクロファージ特異的TRBP欠損マウスの解析を行い、in vivoにおいても、TRBPが肝細胞由来炎症性EVに対する応答に重要なこと、そして肥満で誘導される炎症反応に重要な機構を担っていることを見出した。これらの知見について、現在論文の投稿準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本を含む多くの国では、肥満や2型糖尿病、非アルコール性脂肪肝炎など、食物・栄養摂取量の増加と関連する代謝性疾患の罹患率が、若年層を中心に増加しており、大きな問題となっている。近年、高脂肪・高栄養素摂取が、肝臓や脂肪組織などのエネルギー代謝臓器において、炎症反応を誘導し、代謝性疾患の発症・亢進の一因になることが示されている。しかしながら、高脂肪・高栄養素摂取による炎症の誘導・発症機構については、不明な点が多い。本研究では、これらの炎症反応に肝細胞由来細胞外小胞、およびマクロファージ内のRNA結合タンパク質が重要な役割を果たすことを見出した。

研究成果の概要(英文)：In Aim 1, we analyzed the recognition mechanism of extracellular vesicles (EVs) in macrophages by TRBP, an RNA sensor in EVs, and found that TRBP is essential for the activation of intracellular inflammatory pathways induced by inflammatory EVs and the expression of inflammatory cytokines. In addition, we have identified a group of proteins essential for the inflammatory EV response other than TRBP, and the analysis of these is ongoing. In Aim 2, we analyzed macrophage-specific TRBP knockout mice and found that TRBP is important for the response to inflammatory EVs derived from liver cells in vivo and that it plays a key role in the inflammatory response induced by obesity. We are currently preparing to submit a paper on these findings.

研究分野：基礎医学

キーワード：慢性炎症 細胞外小胞 エネルギー代謝性疾患

1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EV) は、生体内の多くの細胞から分泌され、血清などの体液に存在し、近接した、または遠隔にある細胞に取り込まれ、その受容細胞の機能調節に関与することが示されている。EV は脂質二重膜に包まれた小胞であり、RNA やタンパク質、脂質などを含んでいる。これらの構成は、EV 分泌細胞内の状態を反映するとみられ、細胞内の RNA やタンパク質、脂質の発現が変化すれば、EV 内因子の構成も変化するものと考えられる。しかしながら、分泌細胞を取り囲む環境が変化した時、EV 構成因子変化を担う分子機構、また、EV 受容細胞への影響については不明な点が多い。近年、特定の条件下の細胞から分泌された EV が、マクロファージなどの免疫細胞に取り込まれ、炎症反応を惹起することが、培養細胞を用いた実験において示されている。この知見は、EV 分泌細胞の状況変化に応じて EV が炎症性となり、EV を受容する免疫細胞を活性化することを示唆する。EV を介した炎症反応が実際に個体で起きているのであれば、様々な炎症性疾患の発症の一因となる可能性があり、EV が炎症性を獲得する機構、そして、EV 受容細胞を活性化する分子基盤の確立が急務である。しかしながら、EV を基盤とした炎症反応の分子基盤は不明な点が多い。

2. 研究の目的

私たちは、RNA 結合タンパク質 TRBP (TAR-RNA binding protein) が、マクロファージにおいて、炎症性の EV を認識し、炎症反応を誘導することを見出した。本研究では、TRBP の *in vitro*、*in vivo* での機能解析を通し、EV を介した炎症反応の分子基盤を確立し、慢性炎症性疾患治療への応用を目指す。

3. 研究の方法

本目的のため、以下を Specific Aims として研究を遂行した。

Aim 1. EV 受容マクロファージが炎症性 EV・EV-RNA に応答する機構の解析。

Aim 2. マウス個体において EV を介した肝細胞-マクロファージ間の細胞間コミュニケーションの機構解析

4. 研究成果

炎症性 EV を受け取ったマクロファージ内の sEV 内 RNA 積荷と相互作用するタンパク質を特定するために、最新の技術であるウイルス RNA と宿主 RNA 結合タンパク質の相互作用を同定する手法を応用し、sEV 細胞外 RNA (exRNA) の交差リンクおよび固相精製 (EVeR-CLASP) を開発しました。EVeR-CLASP では、まず肝細胞に RNA アナログである 4-チオウリジン (4SU) を処理し、4SU が RNA カーゴに取り込まれた培養液から EV を分離しました。次に、マクロファージに 4SU 標識された sEV を投与し、その後、紫外線照射を行い、4SU が取り込まれた sEV 内 RNA 積荷と相互作用するタンパク質とフォトリソクロスリンクできるようにしました (図 1A)。これらのタンパク質サンプルは精製、銀染色、プロテオミクス、ウェスタンブロット (WB) の解析を行いました。これらの研究により、マクロファージ内の TRBP が sEV 内 RNA 積荷と相互作用することが明らかになりました (図 1B)。TRBP は HIV-1 TAR RNA に結合する能力が発見されましたが、RBP は Dicer と Argonaute とともに、RNA シレンシングを調節することでも知られており、miRNA 誘導シレンシング複合体の一部として機能します。したがって、TRBP は外因性および内因性 RNA と相互作用することができます。重要なことに、最近の報告では、肝臓の TRBP が肥満マウスで c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) の活性化を調節することが示されました。マクロファージにおける TRBP の役割を調査するために、LysM Cre ドライバーマウス株 (M-TRBP WT および KO マウス) を用いて、ミエロイド細胞特異的な TRBP 欠損マウスを生成し、初代マクロファージを分離し、パルミチン酸 (PA) で処理された肝細胞の培養液から得られた炎症性 sEV に曝露し、q-PCR および FCM 解析を行いました。炎症性 L-sEV は WT マクロファージでは TNF α mRNA の発現と IKK および JNK のリン酸化 (これらのキナーゼの活性化形

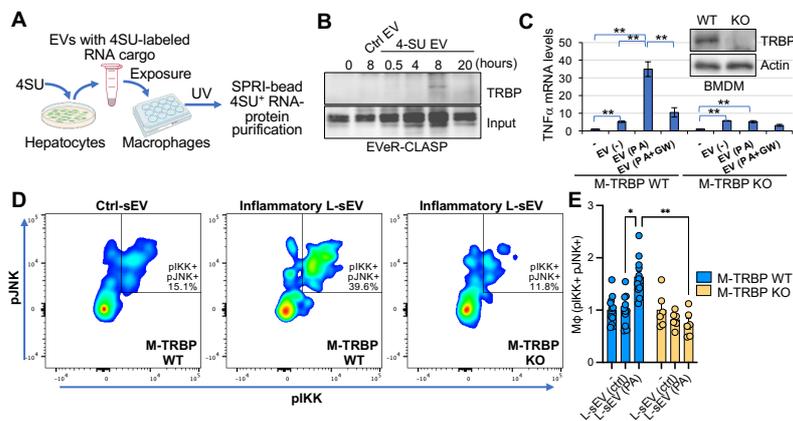


Fig. 1. マクロファージ TRBP は炎症性 EV 応答に必須である。

態)を誘導しましたが、TRBP 欠損細胞では誘導されませんでした(図1C-E)。注意すべきは、TRBP 欠損マクロファージはリポ多糖(LPS)などのTLRリガンドに正常に反応することができます(データは示されていません)。これらのデータから、マクロファージ内のTRBPはsEVによる炎症反応の媒介に必要であることが示唆されます。

TRBPが炎症性sEVのセンサーであることを考慮し、次にM-TRBP KOマウスが肥満による炎症

反応に対して耐性があるかどうかを評価しました。M-TRBP KOマウスはRDおよびHFD条件の両方でWTマウスと同様に体重を増加しました(図2A)。しかし、血中炎症性サイトカインのレベルは、HFDにおいてM-TRBP KOマウスで有意に低下していました(図2B)。さらに、M-TRBP KOマウスはHFDによるインスリン抵抗性と膵β細胞の機能障害から保護されることが確認されました(図2C)。eWATマクロファージのトランスクリプトーム解析では、CD38を含むいくつかの炎症性遺伝子および経路がTRBP欠損マクロファージで抑制されていることが示されました(図2D、E)。また、肝細胞由来EV、およびCD38陽性マクロファージは敗血症反応に関与しているため、マクロファージ内のTRBPの欠損が敗血症、特に肥満における臓器の機能障害を緩和する可能性があることも示唆されます。実際に、内毒素性ショックモデルでは、M-TRBP KOマウスは肺の好中球浸潤がM-TRBP WTマウスに比べて低く、肝臓でのCD38発現も低いことが確認されました(図2F)。

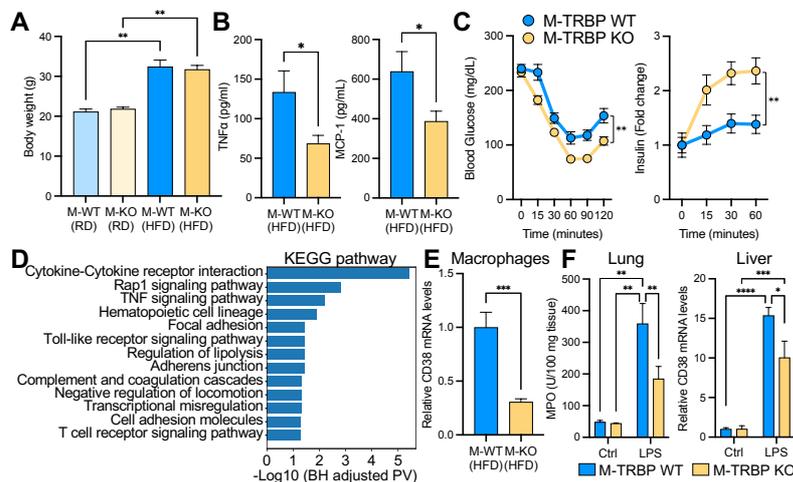


Fig. 2. ミエロイド細胞特異的な TRBP 欠損マウスでは肥満で誘導される炎症が抑制される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	本橋 ほづみ (Motohashi Hozumi) (00282351)	東北大学・加齢医学研究所・教授 (11301)	
研究分担者	谷貝 知樹 (Yagai Tomoki) (50868669)	東北大学・加齢医学研究所・助教 (11301)	
研究分担者	北村 大志 (Kitamura Taishi) (20706949)	東北大学・未来型医療創成センター・助教 (11301)	

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