

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15280

研究課題名（和文）アレルギー疾患の根治を指向したTr1細胞誘導性エクソソームの創出

研究課題名（英文）Development of Tr1 cell-inducing exosome for early remission of allergies

研究代表者

松田 将也（Matsuda, Masaya）

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：30783005

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：生体内において抗原特異的type 1 regulatory T細胞を効率的に誘導することができれば、アレルギーの早期根治が期待できる。そこで、本研究では、細胞外小胞の一種であるエクソソームに着目し、Tr1細胞誘導因子（IL-27、IL-21およびTGF- β ）を搭載したエクソソームの作製を企図し、下記の成績を得た。（1）マウス樹状細胞株であるDC2.4に、上記因子の遺伝子をトランスフェクションし、Tr1細胞誘導因子高発現細胞株を樹立した。（2）Tr1細胞誘導因子高発現細胞株から産生されるエクソソームは、IL-27を含有していたが、IL-21ならびにTGF- β の存在は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題の手法では、IL-27以外のTr1誘導性サイトカインの含有は認められなかったため、今後培養方法などを改良する必要がある。生体内においてTr1細胞を効率よく誘導することができれば、アレルギーを早期根治に導く新規治療薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：If it is possible to induce antigen-specific type 1 regulatory T (Tr1) cells in the body, early remission of allergies can be expected. Therefore, in this study, we focused on exosomes, a type of extracellular vesicle, and aimed to create exosomes carrying Tr1 cell-inducing factors (IL-27, IL-21, and TGF- β). We achieved the following results: (1) We transfected the genes of the Tr1 cell-inducing factors into DC2.4, a mouse dendritic cell line, and established a cell line with high expression of Tr1 cell-inducing factors. (2) Exosomes produced from the cell line with high expression of Tr1 cell-inducing factors contained IL-27, but the presence of IL-21 and TGF- β was not detected.

研究分野：アレルギー、薬理学

キーワード：アレルギー エクソソーム Tr1細胞 細胞外小胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギーの根治療法であるアレルギー免疫療法を行った個体においては、抗原特異的に炎症を抑制する **type 1 regulatory T (Tr1)** 細胞が誘導され、抗原に対する免疫寛容が成立する。生体内において抗原特異的 **Tr1** 細胞を効率的に誘導することができれば、アレルギーの早期根治が期待できる。抗原感受マウスの脾臓細胞を抗原、**IL-21**、**IL-27** および **TGF-β** 存在下において培養することで、抗原特異的 **Tr1** 細胞が顕著に増加することを明らかにしてきた^{1,2)}。したがって、生体内においてナイーブ **T** 細胞が抗原提示を受ける際、上記三種のサイトカイン (**Tr1** 細胞誘導性サイトカイン) 刺激を受ける免疫環境を構築することが出来れば、効率よく **Tr1** 細胞を誘導することが可能となる。

エクソソームは、宿主細胞由来の **mRNA** ならびにタンパク質を含有した膜小胞であり、細胞間コミュニケーションに利用される³⁾。どの分子がエクソソームに封入されるかは細胞内における発現量に依存する。また、樹状細胞は、活発にエクソソームを分泌する免疫担当細胞であり、それ由来のエクソソームは、宿主細胞が貪食した抗原の運搬能、他の抗原提示細胞に対する向性、ならびに抗原特異的 **T** 細胞誘導能を有する。上記知見より、**Tr1** 細胞誘導性サイトカインを高発現させた樹状細胞を抗原刺激することにより得られるエクソソーム (**Tr1** 細胞誘導性エクソソーム) には、**Tr1** 細胞誘導性サイトカインおよび抗原が含有されると考えられる。

エクソソームは、樹状細胞以外の免疫細胞からも産生されるが、**Tr1** 細胞が産生するエクソソームに関する報告は皆無である。

2. 研究の目的

本研究では、上記樹状細胞由来エクソソームの特徴に着目し、**Tr1** 細胞誘導因子を含有したエクソソーム (**Tr1** 細胞誘導性エクソソーム) を作製すること、ならびに **Tr1** 細胞由来エクソソームの抗炎症能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

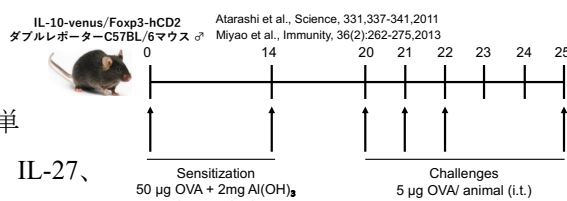
(3-1) **Tr1** 細胞誘導性サイトカイン (**IL-27**、**IL-21** および **TGF-β**) 高発現樹状細胞株の樹立
マウス樹状細胞株である **DC2.4** に、**IL-27** の構成分子である **p28** および **EBI3**、**IL-21**、ならびに **TGF-β** 遺伝子をトランスフェクションした。その後、**puromycin** による導入細胞の薬剤選択を行うことで、**Tr1** 細胞誘導性サイトカイン高発現細胞株を樹立した。

(3-2) エクソソームの単離および特徴解析

(3-1) において樹立した細胞株の培養上清を回収し、超遠心分離法ならびにポリマー沈殿法によりエクソソームを単離した。その後、粒子系測定ならびにタンパク定量を、それぞれ動的光散乱法ならびにウェスタンブロッティング法により実施した。

(3-3) **Tr1** 細胞の *in vitro* 誘導および単離

IL-10-venus/Foxp3-hCD2 ダブルレポーター **C57BL/6** マウスの脾臓より磁気分離法によって単離した **CD4⁺ T** 細胞を抗 **CD3/CD28** 抗体、**IL-21**、**IL-27**、および **TGF-β** (それぞれ **30 ng/ml**) 存在下にて **3** 日間培養し誘導を行った。培養後、**flow cytometry** により **Tr1 (IL-10⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ T)** 細胞を単離した。



ナイーブ CD4⁺ T 細胞は、磁気分離法により単離した。

(3-4) 肺内 ILC2 の単離

最終惹起 24 時間後に全肺を摘出し、CD45⁺ CD90.2⁺ CD278⁺ ST2⁺ lineage⁻ 細胞として検出し flow cytometry を用いてソーティングを行った。

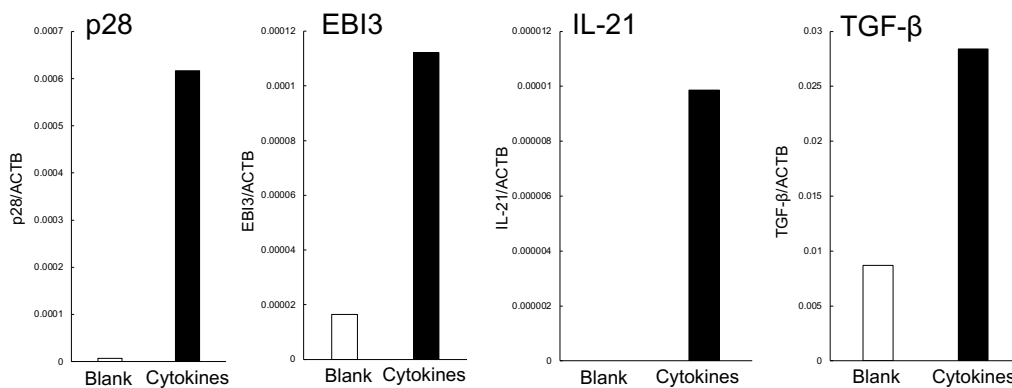
(3-5) Tr1 細胞由来エクソソームの抗炎症能解析

単離した Tr1 細胞を dynabeads mouse CD3/CD28 存在下 3 日間培養した後、培養液を回収した。回収した培養液を (3-2) と同様の方法で処理し、エクソソームを得た。ILC2 を IL-33 および TSLP、Tr1 細胞あるいはナイーブ CD4⁺ T 細胞由来エクソソーム (40 あるいは 400 µg/ml) 存在下で 72 時間培養後、上清中の IL-5 ならびに IL-13 を ELISA 法、増殖を luminescent cell viability assay により解析した。

4. 研究成果

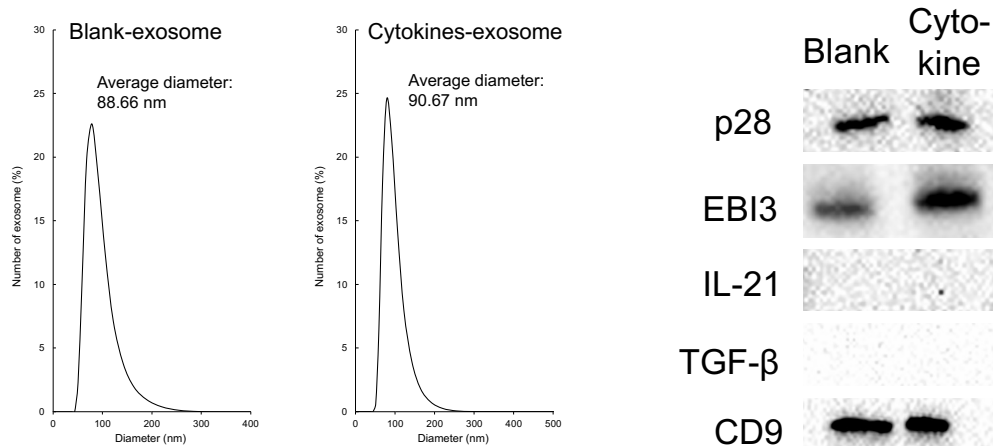
(4-1) Tr1 細胞誘導性サイトカイン高発現樹状細胞株の樹立

IL-27 の構成分子である p28 および EBI3、IL-21、ならびに TGF-β 遺伝子を DC2.4 にトランスフェクションした。下図に示すように、4 種の遺伝子をトランスフェクションした DC2.4 細胞株 (Cytokines) においては、それら遺伝子の高発現が認められた。



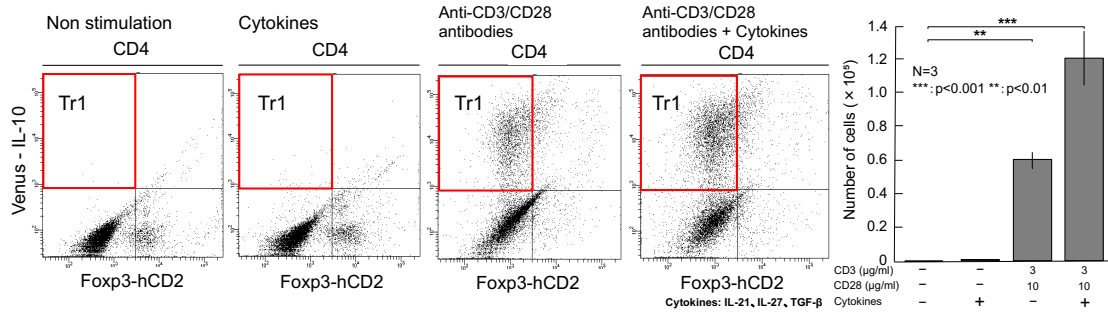
(4-2) Tr1 細胞誘導性エクソソームの特徴解析

下図に示すように、いずれのエクソソームも平均粒子径が約 90 nm を示した。エクソソームに目的の 4 因子のタンパクが含有されるか否か解析を行ったところ、Cytokines 由来エクソソーム内 p28 ならびに EBI3 のタンパク発現量は、Blank のそれと比較して多い傾向にあった。一方、IL-21 ならびに TGF-β に関しては、いずれのエクソソームにおいてもその発現は認められなかったことから、樹状細胞のトランスフェクション法を再度検討する必要がある。



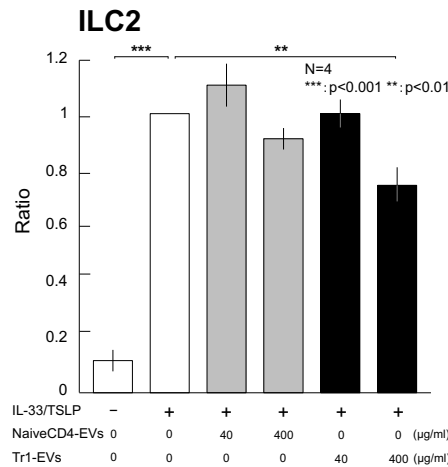
(4-3) Tr1 細胞の誘導

サイトカイン類 (IL-21、IL-27 および TGF- β) のみの条件下においては、Tr1 細胞の誘導はほとんど認められなかった。一方、CD3/CD28 抗体のみの条件下においては顕著な Tr1 細胞の増加が認められた。さらに、CD3/CD28 抗体およびサイトカイン類存在下においては、その誘導が増強する傾向にあった。



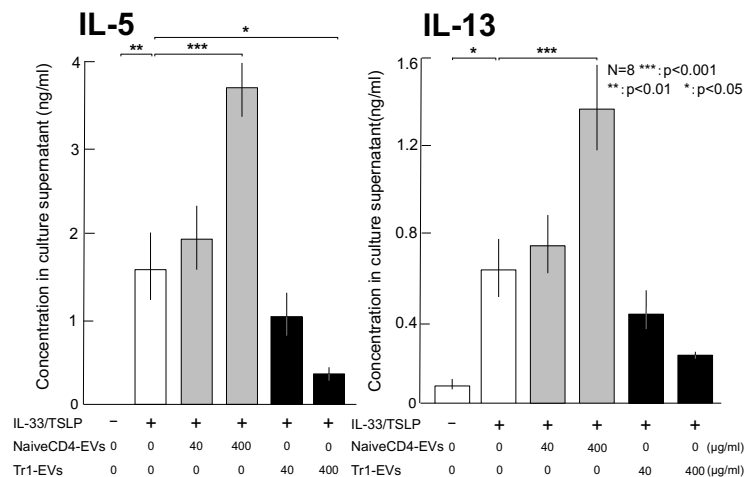
(4-4) ILC2 増殖に対する Tr1 細胞由来エクソソーム (Tr1 細胞由来 EVs) の影響

Tr1 細胞由来 EVs の存在下において ILC2 を培養すると、その増殖が有意に減弱した。一方、ナイーブ CD4⁺ T 細胞由来 EVs の ILC2 増殖に対する有意な抑制は認められなかった。



(4-5) ILC2 のサイトカイン産生に対する Tr1 細胞由来 EVs の影響

Tr1-EVs は、ILC2 の IL-5 および IL-13 産生を濃度依存的に抑制した。一方、ナイーブ CD4⁺ T 細胞由来 EVs は、その産生を濃度依存的に増強した。



〈引用文献〉

1. Matsuda M, Doi K, Tsutsumi T, Fujii S, Kishima M, Nishimura K, Kuroda I, Tanahashi Y, Yuasa R, Kinjo T, Kuramoto N, Mizutani N, Nabe T. Regulation of allergic airway inflammation by adoptive transfer of CD4⁺ T cells preferentially producing IL-10. *Eur J Pharmacol.* 2017;812:38-47.
2. Matsuda M, Doi K, Tsutsumi T, Inaba M, Hamaguchi J, Terada T, Kawata R, Kitatani K, Nabe T. Adoptive transfer of type 1 regulatory T cells suppressed the development of airway hyperresponsiveness in ovalbumin-induced airway inflammation model mice. *J Pharmacol Sci.* 2019;141(4):139-145.
3. Popowski K, Lutz H, Hu S, George A, Dinh PU, Cheng K. Exosome therapeutics for lung regenerative medicine. *J Extracell Vesicles.* 2020;9(1):1785161.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuda Masaya, Shimizu Seito, Kitatani Kazuyuki, Nabe Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Extracellular Vesicles Derived from Allergen Immunotherapy-Treated Mice Suppressed IL-5 Production from Group 2 Innate Lymphoid Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 1373 ~ 1373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens11111373	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 Matsuda Masaya, Inaba Miki, Hamaguchi Junpei, Tomita Hiro, Omori Miyu, Shimora Hayato, Sakae Harumi, Kitatani Kazuyuki, Nabe Takeshi	4. 巻 110
2. 論文標題 Local IL-10 replacement therapy was effective for steroid-insensitive asthma in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 109037 ~ 109037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2022.109037	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 -

1. 著者名 Matsuda Masaya, Terada Tetsuya, Kitatani Kazuyuki, Kawata Ryo, Nabe Takeshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Roles of type 1 regulatory T (Tr1) cells in allergen-specific immunotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Allergy	6. 最初と最後の頁 981126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/falgy.2022.981126	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 Matsuda Masaya, Tanaka Yoshiyuki, Shimora Hayato, Takemoto Naoki, Nomura Miku, Terakawa Ryogo, Hashimoto Kennosuke, Sakae Harumi, Kanda Akira, Iwai Hiroshi, Kitatani Kazuyuki, Nabe Takeshi	4. 巻 916
2. 論文標題 Pathogenic changes in group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) in a steroid-insensitive asthma model of mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 174732 ~ 174732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2021.174732	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西馬俊祐、松田将也、北谷和之、奈邊 健
2. 発表標題 アレルギー免疫療法の効果発現におけるTr1細胞由来extracellular vesiclesの役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（札幌）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松田 将也、清水聖登、木下雅稀、大森美侑、北谷 和之、奈邊 健
2. 発表標題 アレルギー免疫療法を行ったマウス由来の血清エクソソームによる2型自然リンパ球からのIL-5産生の抑制
3. 学会等名 第139回 日本薬理学会近畿部会（名古屋、オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田将也、清水聖登、木下雅稀、大森美侑、北谷和之、奈邊 健
2. 発表標題 アレルギー免疫療法の効果発現におけるエクソソームの役割
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2021（札幌、オンライン）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

摂南大学薬学部薬効薬理学研究室 http://www.setsunan.ac.jp/~p-yakko/index.html
--

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