

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22659306

研究課題名（和文） エクソゾームによるスギ花粉症治療の可能性

研究課題名（英文） New strategy for seasonal allergic rhinitis by exosomes

研究代表者 藤枝 重治

(SHIGEHARU FUJIEDA)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：30238539

研究成果の概要（和文）：

エクソゾームは、ドナー細胞の細胞質内にある親水性の蛋白、細胞膜、その近傍にある蛋白とともに小胞体を形成し、MHC class I、II の抗原情報を含んでいる。この情報が隣接した細胞内に取り込まれたり、細胞表面の受容体を刺激したりする。そこで舌下免疫療法にて著効した患者血漿中からエクソゾームがそのような効果があるか調べることを目的として、まず血漿中からエクソゾームの分離を試みた。その結果 15 μ g から 80 μ g のエクソゾームが分離できた。さらにウエスタンブロットを行うと MHC クラス II α 鎖、CD9、CD86 のバンドが検出できた。しかし抗 CryJ1 抗体では、バンドは検出できなかった。以上からエクソゾームの回収は可能であるが、やはり量が少ないことが問題であり、更なる検討には、回収量の改善と検出感度の向上が必須であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Exosomes are complex structures composed of a lipid bilayer that contains transmembrane proteins and encloses soluble hydrophilic components derived from the cytosol of the donor cells. They also contain the information of antigens with MHC class I & II. These molecules would be taken by neighboring cells and stimulate the receptors in the surface of cells. In this study we examined whether isolated exosomes from good responder of sublingual immunotherapy for allergic rhinitis (Japanese cedar pollen) could have an effect on immune systems. We got 15 to 80 μ g exosomes from the human sera. Western blots demonstrated that exosomes had MHC class II α chain, CD9 and CD86 molecules. No band was found by anti-Cry J1 (Japanese cedar pollen antigen) antibody in western blots. This study showed that we could isolate exosomes from human sera. However, we need more improvement methods to get high volume of exosomes and sensitivity to detect them for the advanced study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	0	2,100,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	240,000	3,140,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：エクソゾーム、スギ花粉症、MHC class II、CD9、CD86

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、新しいスギ花粉症治療として、スギ抗原特異的舌下免疫療法 (SLIT) に関する臨床研究を行い、その有用性を証明した。さらに SLIT 施行患者血漿において網羅的蛋白解析を行い、新しい治療薬および臨床マーカーとしてアポ蛋白 A-IV を見出した。しかし血漿そのものを使用したアプローチでは、アポ蛋白 A-IV を見出すのが精一杯で、次なる候補因子の獲得は、存在量や感度の点からかなり困難であることを痛感した。そこでこれまでとは異なったアプローチで新しい治療薬の候補を検討した。その結果、対象としてエクソゾームを見つけた。

細胞間同士のコミュニケーションは、サイトカイン・ケモカインなどの蛋白分泌が主とされている。しかしエクソゾームは、それ以外に、ドナー細胞の細胞質内にある親水性の蛋白や細胞膜やその近傍にある蛋白とともに小胞体を形成し、分泌され、近傍の細胞にいろいろな方法で影響を与える。エクソゾームとは、直径 30~100nm の粒子で、樹状細胞、B 細胞、好中球、癌細胞、線維芽細胞、胎盤上皮から分泌され、抗原情報である MHC class I、II を含んでいる。さらに ICAM-1、Integrin、phosphatidylserine receptor などもエクソゾームの細胞表面に発現しているので、いろいろな細胞がそれらのリガンドを介して容易に結合し、エクソゾームを細胞内に取り込みやすくなっている。エクソゾーム内に microRNA や exosomal shuttle

RNA をも含み、受け取り側細胞の遺伝情報の変更にも影響を及ぼせることが判明している。分泌されたエクソゾームは、ヒト血漿、気管支肺胞洗浄液、母乳、尿、癌性胸水中にその存在が証明され、分離されている。

アレルギー性鼻炎患者において SLIT において著効を示した患者血漿中エクソゾームが、制御性 T 細胞を誘導し、Th2 へのシフトを阻止するならば、そのエクソゾームを他の人に投与しても著効患者の MHC をも同時に移入して、同様に抗原に反応しなくなる可能性がある。このことは画期的なことであり、新しい免疫療法が誕生することになる。

2. 研究の目的

- (1) エクソゾームをスギ花粉症患者および SLIT 施行患者血漿から分離する。
- (2) エクソゾーム内に含まれる蛋白を解析する。

3. 研究の方法

- (1) 未治療スギ花粉症患者 10 名、SLIT 著効者 10 名から各 400ml の採血を行った。血漿を 3,000g・20 分、10,000g・30 分・4°C、110,000g・1 時間・4°C で順次超遠心して沈殿物を回収し PBS で溶解した。
- (2) PBS 溶解液中には、いろいろな不純物を含むため、13 段階 (各 1cc) の蔗糖密度勾配を溶液上に載せ、40,000rpm・15 時間・4°C 遠心した。13 分画をそれぞれ 1cc ずつ 13 チューブに移した。
- (3) 1cc 入ったサンプルチューブに 4.9ml

の RPS55T-2 と 20mM HEPES を加え、110,000g・1 時間・4°C で超遠心後、100 μ l の PBS で溶解し、エクソゾーム濃度を測定した。-80°C で保存し、解析時に解凍した。

(4) ウェスタンブロットは、それぞれの抗体を用いて通常の方法で行った。

4. 研究成果

(1) 蔗糖密度勾配後に得られたエクソゾームの蛋白量は、多いもので 80 μ g、少ないもので 15 μ g であった。未治療のスギ花粉症患者と SLIT 著効者からのエクソゾームの回収率には、有意差は認めなかった。

(2) MHC クラス II 分子は、マクロファージや樹状細胞、活性化 T 細胞、B 細胞などの抗原提示細胞を含め、限られた細胞にのみ発現している。MHC クラス II 分子は、 α 鎖と β 鎖の 2 つの重合体であり、それぞれ 2 つの細胞外領域および膜貫通領域、細胞内領域からなる。エンドサイトーシスにより抗原提示細胞に取り込まれた外来抗原は、蛋白分解酵素により、ペプチド断片になり、これに MHC クラス II 分子が結合し細胞表面に発現する。一般に CD4 陽性細胞はこの MHC クラス II 分子を介して抗原情報を獲得する。そのため MHC クラス II の α 鎖をエクソゾームに持つことは、CD4 陽性細胞に遺伝情報の伝達が可能であることを示す。そこで得られたエクソゾームを含むサンプルに、MHC クラス II の α 鎖が含まれているかウェスタンブロットにて検討した。図 1 に示すように、抗

MHC クラス II α 鎖抗体によって、バンドが検出できた。これは未治療のスギ花粉症患者群 8 名と SLIT 著効者群 7 名において検出できた。バンドが認められなかった検体は、いずれも蛋白量が少ないサンプルであった。MHC クラス II α 鎖の検出は、エクソゾームの蛋白量が最低 30 μ g ないと不可能であった。

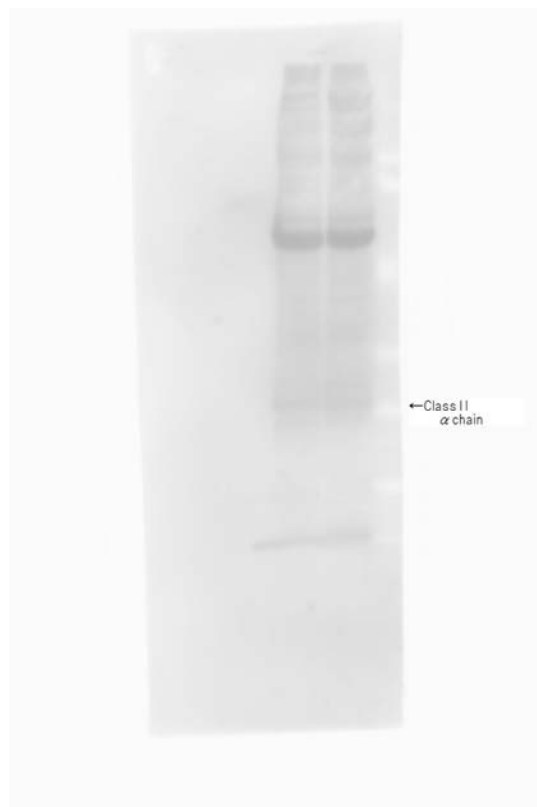


図 1 : 抗 MHC クラス II α 鎖によるウェスタンブロット。右 2 レーンが患者サンプル

(3) CD9 は、VLA (Very Late Activation) インテグリン分子や HLA-DR などの分子と関連し、細胞間の接着やシグナル伝達、細胞の運動能に関与すると考えられており、単球、B 細胞、好酸球、好塩基球、および活性化した T 細胞に認められる。今回回収したエクソゾームサンプルは、末梢血 400ml から得られたものであり、エクソゾ

ーム産生細胞は同定できないので CD9 分子のような多くの活性化した細胞が持つ分子を調べることにした。抗 CD9 抗体を用いたウエスタンブロットでは、未治療のスギ花粉症患者群 6 名と SLIT 著効者群 4 名において検出できた (図 2)。

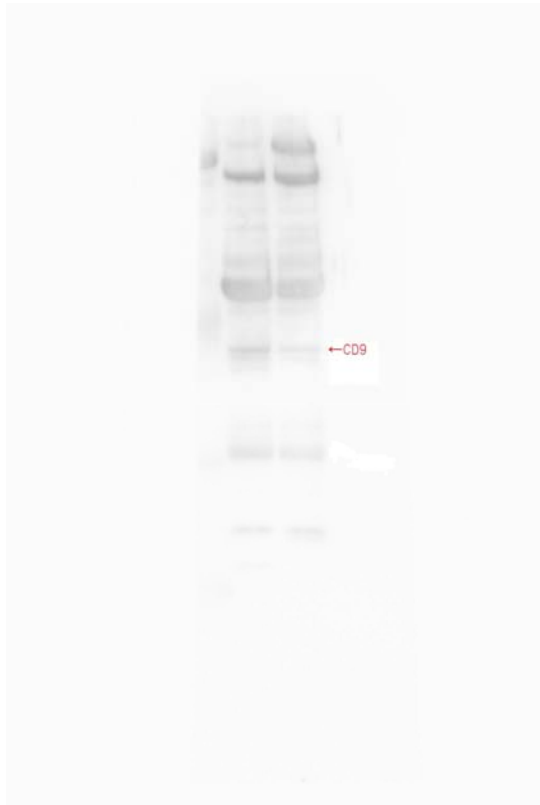


図 2 : 抗 CD9 抗体によるウエスタンブロット。右 2 レーンが患者サンプル

(4) CD86 (B7-2) は、免疫グロブリンスーパーファミリーの分子で、CD80 (B7-1) とともに、CD28 や CD152 (CTLA-4) との相互作用を介して、T 細胞の共刺激に関与する。CD86 は、正常組織では非常に低密度の発現だが、活性化した樹状細胞、単球、B 細胞で発現が増強する。CD86 (B7-2) の発現誘導が急速なことから、免疫応答の初期に発現する、主要な CD28 リガンドであると考えられている。そこで得られたエ

クソゾームに CD86 が含まれていないか、ウエスタンブロットにて検討した。その結果、CD86 のバンドは、発現が弱かったが、未治療のスギ花粉症患者群 4 名と SLIT 著効者群 4 名において検出できた。

(5) スギ花粉症患者においてとりわけ SLIT 患者では、スギ花粉抗原に関する情報分子が、鼻粘膜、口腔・咽頭粘膜を介して体内に取り入れられているはずである。SLIT 患者では、スギアレルゲンワクチンを舌下し、口内・咽頭内で抗原提示細胞が取り込むことから、治療効果が得られると考えられている。すなわちスギ抗原のペプチドが抗原提示細胞 (樹状細胞や B 細胞) から T 細胞に MHC を介して提示されているはずである。そこで得られたエクソゾームサンプルにおいて抗 CryJ1 抗体を用いて同様にウエスタンブロットを行った。その結果、いずれのサンプルにおいてもバンドの検出はできなかった。

(6) 今回、回収したエクソゾームの量は 15 μ g から 80 μ g であった。しかし未治療のスギ花粉症患者群と SLIT 著効者群では、回収量に有意差は認めず、回収量は個人差によるものであると考えられた。30 μ g 以下の蛋白量では、ウエスタンブロットで検出できなかった。エクソゾームの回収は、かなりの過程を経なければいけない。15 時間の超遠心を夜間に行うとして、確実に 2 日は必要となる。蔗糖密度勾配もかなり複雑で繊細な作業であり、修練が必要である。400ml の末梢血からエクソゾームの回収を行ったが、事情が許せば 1 検体から 600ml から 800ml 採血できるともっと多くの解析ができるかも知れない。それだけの採血

が不可能な場合、数人のサンプルを混合して、エクソゾームの回収を行う必要があると思われる。特に各細胞を分離して、たとえば単球のみから、CD4 陽性細胞から、B 細胞からなど、単一細胞からのエクソゾーム解析は、絶対に複合サンプルを混合させる必要があると思われる。

ウエスタンブロットは、多くの細胞にかつ多くの情報として含まれているだろうと考えられる分子から検討した。MHC クラス I α 鎖は、樹状細胞や B 細胞から提示されるが、量としてはかなり多い方だと思われる。今回も 75%の症例で検出が可能であり、予想どおりであった。次なるステップは、B 細胞を中心とした CD9 を検討した。50%の症例で検出可能であったが、やはり最初の抗原量が少ないものが、検出できなかった。3 番目に活性化樹状細胞のマーカーである CD86 の存在を検討した。すると検出可能な検体は 40%に落ち、得られた陽性バンドも弱いものであった。正式な定量はできないが、相対的に抗原量が少ないことは判明した。最終段階としてスギ抗原 CryJ1 の検出を試みたが、20 症例すべて陰性であった。これに関してはエクソゾーム内に CryJ1 情報が存在しない可能性と CryJ1 はより小さなペプチドなどの分子に分解されて存在する可能性の 2 つが考えられる。MHC 上に表現されるペプチドとして存在する場合、蛋白質としては短くかつ少量であるので、かなり検出は難しいのかも知れない。

今後この少ないサンプルから、スギ花粉に関する情報を得るためには、もう一工夫が必要だと痛感した。ただ今回のサンプルでは、未治療のスギ花粉症群と SLIT 群では、回収できたエクソゾームには違いが認められなかった。おそらく遺伝情報の解析は、ウエスタンブロットのようなあまり繊細でない検出の方法は不適であり、他の鋭

敏な方法に変更する必要があると感じた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1) Takabayashi T, Kato A, et al. (11,⑩)
Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Apr 23. [Epub ahead of print] 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.046>

2) Haenuki Y, Matsushita K, et al. (10,⑤)
A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Mar 27. [Epub ahead of print] 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.013>

3) Fujieda S, Kurono Y, et al. (9)
Examination, diagnosis and classification for Japanese allergic rhinitis: Japanese guideline. *Auris Nasus Larynx.* 2012 Mar 6. [Epub ahead of print] 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2011.12.006>

4) Osawa Y, Suzuki D, et al. (7,⑦)
Prevalence of inhaled antigen sensitization and nasal eosinophils in Japanese children under two years old. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2012;76(2):189-93. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijporl.2011.10.024>

5) Yamada T, Yamamoto H, et al. (12, ⑫) Efficacy of mometasone furoate nasal spray for nasal symptoms, quality of life, rhinitis-disturbed sleep, and nasal nitric oxide in patients with perennial allergic rhinitis. Allergy Asthma Proc. 2012; 33(2):9-16. 査読有
<http://dx.doi.org/10.2500/aap.2012.33.3509>

6) Yamamoto H, Yamada T, et al. (11, ⑪) Efficacy of prophylactic treatment with montelukast and montelukast plus add-on loratadine for seasonal allergic rhinitis. Allergy Asthma Proc. 2012; 33(2):17-22. 査読有
<http://dx.doi.org/10.2500/aap.2012.33.3514>

7) Higashino M, Takabayashi T, et al. (8, ⑧) Interleukin-19 downregulates interleukin-4-induced eotaxin production in human nasal fibroblasts. Allergol Int. 2011;60(4): 449-57. 査読有
DOI:10.2332/allergolint.10-OA-0262

8) Yamamoto H, Yamada T, et al. (6, ⑥) Platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase enhanced human IgE production. Allergol Int. 2011;60(1): 79-85. 査読有
DOI:10.2332/allergolint.10-OA-0220

9) Matsumoto Y, Noguchi E, et al. (6, ⑥) Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. Allergol Int. 2011; 60(1):87-92. 査読有
DOI:10.2332/allergolint.10-OA-0230

10) Yamada T, Jiang X, et al. (6, ⑥) B type CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced B_{LyS} expression and production in human tonsillar fibroblasts. Clin Immunol. 2011; 141(3):365-71. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2011.09.012>

[学会発表] (計 2 件)

1) Fujieda S, et al.: Association between genetic variant of interleukin-33 and seasonal allergic rhinitis in the Japanese population. Collegium Oro-Rhio-Laryngology-icum Amicitiae Sacrum 2011.9.6. Bruges, Belgium

2) Fujieda S: New clinical marker for allergic rhinitis.14th International Rhinology Society & 30th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose 2011.9. 22. Tokyo, Japan

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤枝 重治 (SHIGEHARU FUJIEDA)

福井大学・医学部・教授

研究者番号 : 30238539

(2) 研究分担者

なし