

令和元年5月17日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08581

研究課題名(和文) 老化に伴う腸上皮バリア機能障害の遺伝子発現調節ネットワークの仕組み

研究課題名(英文) Examination of regulatory network profiles for gene expression of intestinal epithelial barrier dysfunction in aging

研究代表者

朴 恩正 (PARK, Eun Jeong)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20644587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：老化に伴う腸管上皮細胞の遺伝子発現調節の分子機序を明らかにするために、老化マウスモデルを用いて小腸と大腸から回収した上皮細胞のマイクロRNA発現パターンを包括的に分析した結果、有意な発現変化を示す多数のマイクロRNAが見つかった。また、腸管移行性T細胞のエキソソームにより小腸へのリンパ球ホーミングが抑制される事を確認し、T細胞エキソソームがリンパ球の過剰な腸管組織浸潤を制御する可能性を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体防御システムである免疫系の老化は、老化による免疫系の機能減退の分子メカニズムの解明は非常に重要な研究課題である。老化に伴う腸管上皮細胞の遺伝子発現調節の分子機序を明らかにすることは重要であり、本研究有意な発現変化を示す多数のマイクロRNAは、今後粘膜免疫関連アンチエイジング研究に結び付ける重要な基礎資料になると考えられる。腸管移行性T細胞のエキソソームがリンパ球に先回り腸管内皮細胞に、マイクロRNAを伝達し、腸管組織特異的にリンパ球ホーミングを負に制御するという仮説の検証は、新たな炎症性腸疾患治療に向けての基礎研究で創造性が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism of regulating comprehensive gene expressions in intestinal epithelial cells in aging, we analyzed miRNA profiling of epithelial cells in small and large intestines of aged mice. As a result, multiple miRNAs were found to be altered by aging.

To understand the role of T-cell exosomes in tissue specific homing of lymphocytes, we isolated the exosomes from the culture of gut-tropic T cells and analyzed in-vivo homing of lymphocytes. We have found that the exosomes possess an ability in negatively regulating subsequent lymphocyte homing to the gut. This negative effect was considered to be due to expression reduction of the ligand molecules important for lymphocyte homing, possibly by exosomal delivery of miRNAs to the gut endothelial cells.

研究分野：免疫学

キーワード：老化 マイクロRNA 腸管上皮細胞 エキソソーム T細胞 ホーミング インテグリン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢者社会に入った日本は、高齢者の健康状態の維持や悪化予防は社会的に重要な問題である。健康寿命を延ばして老化を遅らせる医療研究開発戦略の構築は、高齢者の生活の質の向上だけでなく国家の経済的利益のためにも重要な課題であると考えられる。生体防御システムである免疫系の老化は、高齢者にとって避けて通れない生理的な現状であり、免疫機能の顕著な低下を誘発させて、がん、炎症、感染症などの合併疾患を引き起こす。従って、老化による免疫系の機能減退の分子メカニズムの解明は非常に重要な研究課題である。哺乳類の腸は免疫系の大きな部分を占めて約 100 兆個に達する腸内細菌叢と密着している。特に、腸上皮細胞は、腸内環境から腸管組織を保護する生体防御の前線の役割を果たす。例えば、腸上皮層は、腸内免疫系と外部環境の間で有機的なコミュニケーションを通して生理活性分子(サイトカイン、ケモカイン、抗菌防御物質等)の分泌により免疫反応を引き起こして多様な免疫細胞の腸組織への浸潤を誘導する(Kagnoff, J. Clin. Invest. 2014)。腸上皮細胞が粘膜免疫誘導に重要であることはよく知られているが、老化に伴う生体防御と免疫誘導の低下を巻き起こす腸上皮内遺伝子発現調節の包括的なプロファイルはまだ明らかになっていない。また腸管粘膜での炎症反応の制御機構の理解は炎症性腸炎の病態解析と関係して進展してきたが、老化との関連については不明な点が非常に多い。従って、腸管組織内免疫老化の誘導機構の解明に向けた腸上皮遺伝子発現調節システムの分析は、実に極めて重要であると考えられている。近年、ショウジョウバエを用いた研究で、暦年齢とは関係なく個体死滅の前に、腸上皮細胞のバリア機能障害が発生し、腸内細菌叢の不均衡(dysbiosis)も見られることが明らかになった(Rera et al. PNAS 2012; Clark et al. Cell. Rep. 2015)。また、老化によるバリア機能障害に関連し、抗菌ペプチド産生の増加、粘膜での炎症惹起が観察された。このように少なくともショウジョウバエモデルでは“腸管上皮バリア機能破綻が老化死のバイオマーカー”と考えられている(Rera et al. PNAS 2012)。しかし、哺乳類で腸上皮細胞のバリア機能障害が老化の病態生理学的に重要な誘発要素またはバイオマーカーであるかどうかは全く解明されていない。さらに、老化個体の腸上皮細胞のバリア機能に重要な分子群の発現制御システム(例えば、マイクロRNA 主導遺伝子発現調節機構)の包括的な解析も行われていない。従って、本研究課題で、このショウジョウバエでの仮説的概念が哺乳類で適用できることをマウス実験で明らかにしたい。

### 2. 研究の目的

【1】哺乳類の腸管上皮バリア機能障害に老化及び急性炎症疾患の発生が関与するという仮説の検証を行うため、我々は老化に伴う腸管上皮細胞の遺伝子発現調節の分子機序を明らかにする目的の一環として、老化マウスモデルを用い小腸と大腸から回収した上皮細胞内のマイクロRNA発現パターンを包括的に分析することを目的とする。

【2】エクソソームは、ナノサイズ細胞外小胞であり機能的な遺伝物質やタンパク質を保持している。がん細胞から分泌されるエクソソームががん細胞に先回りしその遠隔組織の微小環境をリモデリングしてがん転移に役立つという報告があった(Hoshino et al., Nature, 2015)。しかし、粘膜組織の炎症や組織特異的なリンパ球ホーミングにおけるエクソソームの役割はまだ明らかになっていない。我々は、活性化されたT細胞からのエクソソームがリンパ球のホーミングを制御するという仮説の検証を目指す。

### 3. 研究の方法

【1】老化に伴う腸管上皮細胞の遺伝子発現調節の分子機序を明らかにする目的の一環として、老化マウスモデルを用い小腸と大腸から回収した上皮細胞内のマイクロRNA発現プロファイルを包括的に分析した。

【2】マウスT細胞から分泌するエクソソームを超遠心分離で回収した。そのエクソソームの組織特異的なリンパ球のホーミングに及ぼす影響を分析するために、生体内リンパ球ホーミングエッセイを遂行した。

【3】マウス敗血症 CLP モデルを用いて、腸管内腔に分泌されるエクソソームを超遠心分離で回収し、エクソソーム表面マーカーの発現をフローサイトメトリーで分析した。さらに、抗炎症機能または治癒効果の持つという仮説を検証するために、マウス腸炎モデルの回腸ループに局所注入し、回腸組織の炎症性サイトカインの発現レベルの変化を定量 PCR で分析した。

#### 4. 研究成果

【1】老化に伴う腸管上皮細胞の遺伝子発現調節の分子機序を明らかにする目的として、老化マウスモデルを用い小腸と大腸から回収した上皮細胞のマイクロ RNA 発現パターンを包括的に分析した。その結果、有意な発現変化を示す多数のマイクロ RNA が見付き、その老化特異的な腸管上皮バイオマーカー遺伝子調節ネットワークのバイオインフォマティクスデータベース結果が得られた。

【2】マウス T 細胞から分泌するエクソソーム (T エクソソーム) は、腸管組織ホーミング受容体であるインテグリン  $\alpha 4 \beta 7$  依存的に、小腸絨毛の粘膜固有層に分布されることを見いだした。さらに、この腸管移行性 T エクソソームが、インテグリン  $\alpha 4 \beta 7$  リガンドである MadCAM-1 を結合することが分かった。さらに、小腸 MadCAM-1 発現の制御、小腸へのリンパ球ホーミングを抑制すること確認した (図 1)。従って、T エクソソームがマイクロ RNA のような機能的な遺伝物質を腸管内皮細胞に伝達しリンパ球ホーミングに重要なリガンド発現を低下させ、炎症性リンパ球の過剰な腸管組織浸潤を制御するという可能性を示唆した。これらの結果に踏まえてエクソソームが組織特異的なリンパ球ホーミングにおいて負の制御に関わる可能性が挙げられる (図 2) (Park et al, Blood Advances, 2019)。

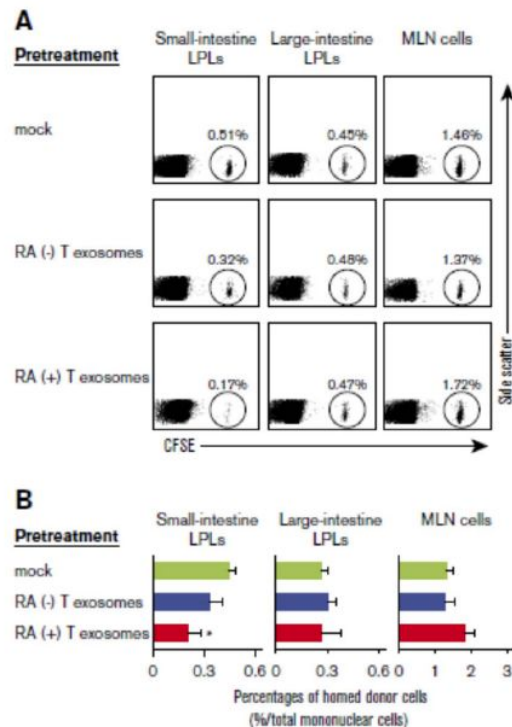


図 1. T細胞エクソソームによる腸管組織へのリンパ球ホーミング制御

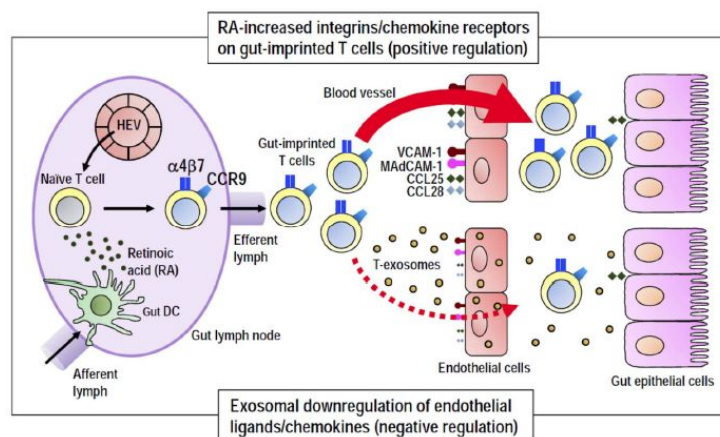


図 2. Tリンパ球エクソソームによる粘膜腸管組織へのリンパ球ホーミングの制御機序

【3】敗血症マウスモデルで腸管内腔に分泌されるエクソソームが抗炎症機能を持つという仮説を検証するために、まずそのエクソソームが、腸管上皮細胞由来であり敗血症に伴い分泌率が増加することを確認した。さらに、敗血症腸管内腔エクソソームが、炎症性サイトカインの腸管組織発現を抑制することも確認した。また、抗炎症性機能をもつと考えられる多数のマイクロ RNA 群が敗血症腸管内腔エクソソームに含まれていることも確認した。従って、敗血症腸管内腔エクソソームがマイクロ RNA を標的細胞に伝達し、腸管粘膜組織障害の治癒機序に関わると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計15件)

Soe ZY, Prajuabjinda O, Myint PK, Gaowa A, Kawamoto E, Park EJ, Shimaoka M. Talin-2 regulates integrin functions in exosomes. Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有、512、2019、429-434

DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.03.027

Kawamoto E, Nago N, Okamoto T, Gaowa A, Masui-Ito A, Sakakura Y, Akama Y, Soe ZY, Prajuabjinda O, Darkwah S, Appiah MG, Myint PK, Obeng G, Park EJ, Imai H, Shimaoka M. Anti-adhesive effects of human soluble thrombomodulin and its domains. Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有、511、2019、312-317

DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.03.027

Shimaoka M, Kawamoto E, Gaowa A, Okamoto T, Park EJ. Connexins and Integrins in Exosomes. Cancers (Basel). 査読有、11、2019、1-15

DOI: 10.3390/cancers11010106

Park EJ, Prajuabjinda O, Soe ZY, Darkwah S, Appiah MG, Kawamoto E, Momose F, Shiku H, Shimaoka M. Exosomal regulation of lymphocyte homing to the gut. Blood Advances. 査読有、3、2019、1-11

DOI: 10.1182/bloodadvances.2018024877

Kawamoto E, Masui-Ito A, Eguchi A, Soe ZY, Prajuabjinda O, Darkwah S, Park EJ, Imai H, Shimaoka M. Integrin and PD-1 Ligand Expression on Circulating Extracellular Vesicles in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis. Shock. 査読有、2018

DOI: 10.1097/SHK.0000000000001228

Okamoto T, Takagi Y, Kawamoto E, Park EJ, Usuda H, Wada K, Shimaoka M. Reduced substrate stiffness promotes M2-like macrophage activation and enhances peroxisome proliferator-activated receptor expression. Experimental Cell Research. 査読有、367、2018、264-273

DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.04.005

Takemura N, Kurashima Y, Mori Y, Okada K, Ogino T, Osawa H, Matsuno H, Ayam L, Kaneto S, Park EJ, Sato S, Matsunaga K, Tamura Y, Ouchi Y, Kumagai Y, Kobayashi D, Suzuki Y, Yoshioka Y, Nishimura J, Mori M, Ishii KJ, Rothenberg ME, Kiyono H, Akira S, Uematsu S. Eosinophil depletion suppresses radiation-induced small intestinal fibrosis. Science Translational Medicine. 査読有、10、2018、1-14

DOI: 10.1126/scitranslmed.aan0333

Niimi K, Usami K, Fujita Y, Abe M, Furukawa M, Suyama Y, Sakai Y, Kamioka M, Shibata N, Park EJ, Sato S, Kiyono H, Yoneyama H, Kitazawa H, Watanabe K, Nochi T, Aso H. Development of immune and microbial environments is independently regulated in the mammary gland. Mucosal Immunology. 査読有、11、2018、643-653

DOI: 10.1038/mi.2017.90

島岡 要、長太 のどか、川本 英嗣、朴 恩正. インテグリン活性化と炎症制御. Shock. 32、2018、48-51

<https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=cb1shock&ye=2018&vo=32&nu=2>

長太 のどか、米田 操、朴 恩正、島岡 要. LPS 肝炎に続く敗血症性炎症病変における腹部内進展のMRI イメージング. Shock. 32、2017、55

<https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=cb1shock&ye=2017&vo=32&issue=1>

Okamoto T, Kawamoto E, Takagi Y, Akita N, Hayashi T, Park EJ, Suzuki K, Shimaoka M. Gap junction-mediated regulation of endothelial cellular stiffness. Scientific Reports. 査読有、7、2017、643-653

DOI: 10.1038/s41598-017-06463-x

Park EJ, Shimaoka M, Kiyono H. MicroRNA-mediated dynamic control of mucosal immunity. International Immunology. 査読有、29、2017、157-163

DOI: 10.1093/intimm/dxx019

Joo S, Fukuyama Y, Park EJ, Yuki Y, Kurashima Y, Ouchida R, Ziegler SF, Kiyono H. Critical role of TSLP-responsive mucosal dendritic cells in the induction of nasal antigen-specific IgA response. *Mucosal Immunology*. 査読有、10、2017、901-911

DOI: 10.1038/mi.2016.103

朴 恩正. 抗老化に向けた腸管上皮細胞と細胞外小胞のマイクロ RNA 遺伝子情報データベース構築. *アレルギーの臨床*. 36、2016、1278-1280

[http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/03allergy/a2016\\_12.html](http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/03allergy/a2016_12.html)

Lee J, Park EJ, Kiyono H. MicroRNA-orchestrated pathophysiologic control in gut homeostasis and inflammation. *BMB Reports*. 査読有、49、2016、263-269

<http://www.bmbreports.org/journal/view.html?volume=49&number=5&spage=263>

〔学会発表〕(計5件)

Park EJ, Appiah MG, Darkwah S, Soe ZY, Kawamoto E, Shimaoka M. Intraluminally secreted extracellular vesicles from the intestinal epithelial cells in sepsis support mucosal healing. 第47回 日本免疫学会. 2018年12月

Kawamoto E, Masui-Ito A, Eguchi A, Soe ZY, Prajuabjinda O, Park EJ, Imai H, Shimaoka M. Integrin and PD-1 ligand expression on circulating extracellular vesicles in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. 41st Annual Conference on Shock. 2018年6月

Park EJ, Prajuabjinda O, Soe ZY, Kawamoto E, Shimaoka M. Beta-7 integrin-mediated homing of exosomes to the gut. 第46回 日本免疫学会. 2017年12月

長太 のどか、米田 操、朴 恩正、島岡 要. LPS 肝炎に続く敗血症性炎症病変における腹部内進展のMRI イメージング. 第32回 日本ショック学会. 2017年9月

Prajuabjinda O, Soe ZY, Kawamoto E, Shimaoka M, Park EJ. Cancer exosomes stimulate endothelial cell migration. 20th World Congress on Clinical Nutrition. 2016年12月

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：島岡 要

ローマ字氏名：SHIMAOKA, Motomu

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 40281133

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：清野 宏

ローマ字氏名：(KIYONO, Hiroshi)

研究協力者氏名：水口 賢司

ローマ字氏名：(MIZUGUCHI, Kenji)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。