

令和元年6月12日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09550

研究課題名(和文) 自己免疫疾患におけるエクソソームによる炎症制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of the role of exosomes for inflammation of autoimmune diseases

研究代表者

高松 漂太 (Takamatsu, Hyota)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30584411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデス(SLE)は、様々な臓器障害を合併する自己免疫疾患で、自己の核成分に対する免疫寛容の破綻に伴うI型インターフェロン(IFN-I)が病因の一つと指摘されています。これまで実際のSLE患者でIFN-Iを測定することは困難でしたが、レポーター細胞を用いることで血清中のIFN-I活性を評価出来るようになりました。そして、SLE患者血清は、IFN-I活性並びにIFN-I産生誘導活性が高いこと、アポトーシス細胞に由来する核酸を含んだ膜小胞が、IFN-I産生を誘導することを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLEに対してインターフェロン受容体を標的とした治療薬開発が進められていますが、すべての患者さんに有効なわけではありません。レポーター細胞によるモニタリングは、インターフェロン治療が効く症例の層別化に有用で、治療効果のモニタリングにも応用可能であると思われます。また、SLE患者血清における膜小胞を介したインターフェロン産生経路の存在は、今後のより効果的な治療薬の開発に、重要なヒントとなる成果だと思われま

研究成果の概要(英文)：Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that predominates in young women with various organ disorders, and it is pointed out that one of the etiologies is type I interferon (IFN-I) associated with the failure of immune tolerance to its own nuclear components. It has been known that measuring IFN-I in actual SLE patients is difficult due to the low sensitivity of the ELISA method, but we revealed that by using reporter cells, it become possible to evaluate IFN-I activity in serum. Then, we clarified that 1) IFN-I activity and IFN-I-inducing activity is high in SLE serum, 2) there are apoptotic cell-derived membrane vesicles (AdMVs) which contain double-stranded DNA in SLE serum promoted additional production of IFN-I, and that 3) IFN-I production by AdMVs was mediated via the cGAS-STING pathway. These findings are considered to provide the effective and safe medical treatment for SLE.

研究分野：免疫学

キーワード：膠原病 インターフェロン 核酸 SLE 診断 核酸受容体 内因性膜小胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

膠原病は、発熱や倦怠感、疼痛などの全身症状に加えて、皮膚、関節、腎臓、肺などの重要臓器に障害を生じる疾患です。近年関節リウマチに対しては様々な分子標的治療薬が開発されその恩恵に与っているものの、全身性エリテマトーデス（SLE）や強皮症といった疾患では、いまだ有効な分子標的療法がないため、再燃や治療、ステロイドと免疫抑制剤療法による過度な免疫抑制による合併症のため、QOLが低い点が課題です。多くの膠原病に対して、サイトカインや自己抗体、自己反応性T細胞、抑制性T細胞など、様々な角度からその病因の究明が行われていますが、未だ原因は解明されていません。

近年、50-100nmほどの極微小分泌膜小胞のエクソソームが、分泌細胞の情報を周囲の細胞に伝え、癌の微小環境の調整や、網膜の恒常性維持、免疫応答やウイルス感染応答などへの関与が報告されています。申請者のこれまでの研究から、自己免疫疾患患者から単離したエクソソームをマウスや培養細胞に添加すると、炎症が誘導されることを見出していました。また、膠原病の種類により、単離したエクソソームによって誘導される炎症像が異なるという興味深い現象を見出し、疾患により放出されるエクソソームの内容物が異なっている、あるいは、エクソソームによって誘導される炎症誘導機序が異なっている可能性が示唆されていました。しかし、それぞれの疾患で具体的にどのような炎症が誘導されるのか、疾患特異的な炎症に重要な具体的なシグナル経路については分かっておらず、また、エクソソーム中の具体的な炎症誘導性物質やその物質がエクソソームに取り込まれるメカニズムなどについてはほとんど分かっていませんでした。

## 2. 研究の目的

そこで、様々な自己免疫疾患患者の血液からエクソソームを単離して、それらをマウスの骨髄由来樹状細胞やマクロファージ、脾臓から調整したリンパ球、ヒト末梢血から単離した単核球（PBMCs）に添加して、誘導されるサイトカインを測定したり、好中球の遊走活性を評価したりして、疾患ごとに誘導される炎症像について明らかにします。また、その炎症像が、疾患活動性や疾患特異的な病理像と関連するかについて明らかにすることを、本研究の主要な目的としました。また、単離したエクソソームの内容物の解析を通じて、疾患に特異的なバイオマーカーの検索もすすめることとし、また、エクソソームによる炎症誘導に関与する具体的な分子機構について、遺伝子欠損マウスなどを利用して明らかにすることを目標にしました。そして、自己免疫疾患の増悪のメカニズムや新規治療標的の同定に発展することを目的としました。

## 3. 研究の方法

当初の計画では、様々な自己免疫疾患患者の血液からエクソソームを単離して、それらをヒト末梢血細胞やマウスの腹腔に投与して、それにより誘導される炎症像についてサイトカイン ELISA 法や FACS による浸潤細胞の評価により明らかにする。との実験計画を立てていましたが、超遠心法を用いたエクソソームの単離は非常に煩雑で、必要とされる血清量も多いため、貴重な保存血清を消費してしまう問題から、多くのサンプルを用いて評価する前に、まず、各疾患で、血清によって誘導される炎症について評価する方針としました。そのため、血清中のサイトカイン活性やサイトカイン産生誘導活性を、安定かつ簡便に評価可能な測定系の樹立が必要となりました。従来の ELISA 法や、サイトカインのマルチプレックスアッセイなどによる検討も試みましたが、いずれも感度に課題がありました。また、活性を評価できることのメリットを考慮して、市販のレポーター細胞等を用いるなどしてサイトカイン活性やサイトカイン誘導活性評価系の確立に取り組みました。レポーター細胞は、HEK293 細胞や THP1 細胞に、サイトカイン受容体やその下流のシグナル分子と、STAT や IRF などのサイトカイン関連転写因子が結合するプロモーター配列の下流にレポーター分子を繋いだベクターを形質導入することにより作成しており、それぞれのサイトカインに特異的にまた、用量依存的にレポーター産生が誘導されることを確認しました。

そして、さまざまなサイトカイン活性を評価可能なレポーター細胞を用いて、自己免疫疾患患者由来の血清中のサイトカイン活性を評価すると、SLE では I 型 IFN (IFN-I) の活性が、ベーチェット病 (BD) では IL-1 $\beta$  や IL-17 の活性が高いことが分かりました。意外なことに TNF- $\alpha$  の活性は健康者血清と疾患とであまり違いがありませんでした。そこで上記結果から、SLE と BD に着目して、サイトカインが産生亢進するメカニズムについて、膜小胞に着目して検討を進めました。

また、サイトカイン産生メカニズムを明らかにする目的に、CRISPR/Cas9 による遺伝子編集技術を用いた遺伝子欠損細胞株の樹立に取り組みました。まず、ヒトサンプル

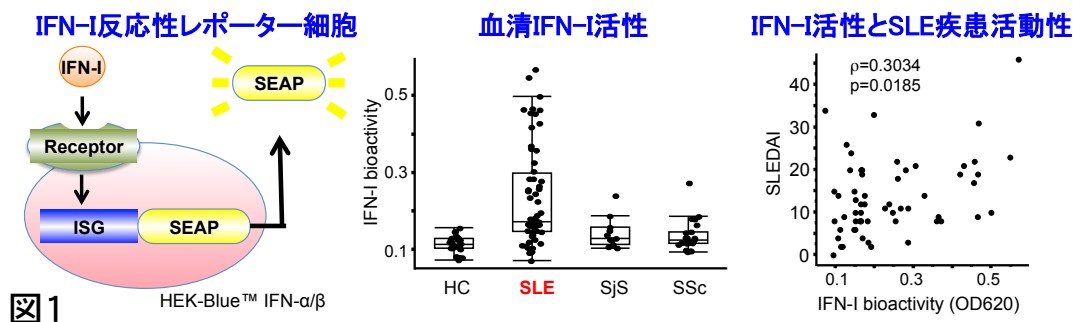
ルにおいてサイトカイン産生などの免疫系反応を評価する必要性から、ヒト単球系細胞株である THP1 に対して遺伝子編集を行うことが理想的であったため、遺伝子導入が非常に難しいことで知られていた THP1 細胞に、レンチウイルスベクターを用いて高効率に形質導入可能なプロトコルを確立しました。そして、IFN-I 受容体欠損レポーター細胞株や、TLR や cGAS-STING などの細胞内核酸受容体欠損レポーター細胞、インフラマソーム関連分子の遺伝子欠損細胞株を作成し、どのようにして膜小胞が IFN-I や IL-1 $\beta$  などの産生に関与するのか、その分子機構について解析できるツールを作成しました。

このような評価ツールを準備し、SLE における IFN-I 産生が、BD において IL-1 $\beta$  産生が誘導される cell extrinsic なメカニズムについて、患者血清を用いて検討を行い、SLE について以下のような研究成果を得ました。BD については現在検討中で、論文投稿の準備を進めています。

#### 4. 研究成果

SLE は若年女性に後発し、発熱などの全身症状に加えて、様々な臓器障害を来す疾患で、自己の核酸に対する免疫寛容の破綻により IFN-I 産生が亢進していることが病気の要因であると考えられています。また、IFN-I 受容体を標的とした IFNAR1 抗体治療薬が開発途上にあり、フェーズ 2 試験で IFN-I に関連する遺伝子群の発現が高い患者において有効性を示すとの報告がなされていました。しかし、IFNAR1 抗体の有効症例を層別化する簡便な方法はなく、ELISA 法による IFN-I 濃度の測定は低感度ゆえ困難であったため、血清 IFN-I をモニタリングする方法の開発が求められていました。

上述した種々のレポーター細胞を用いて SLE 血清中の炎症誘導活性について評価すると、きれいに血清中の IFN-I 活性を測定することができ、SLE 血清では IFN-I の活性が高く、SLE の疾患活動性の評価指標として広く用いられている SLEDAI-2000 のスコアとも血清 IFN-I 活性は正の相関を示し、また、疾患活動性が高いと観察される低補体血症とも強い相関が観察されました。このことから、IFN-I 活性測定用のレポーター細胞は IFN-I 活性の高い症例を層別化するのに有用である可能性が示されました (図 1)。



一方、IFN-I の誘導活性を評価できる別のレポーター細胞を用いて、SLE の血清による IFN-I 産生誘導活性について評価したところ、SLE 血清は IFN-I 産生誘導活性も高いことが分かりました。IFN-I 産生には、IFN-I 自身による産生誘導ループが存在するため、IFN-I シグナルを完全に遮断する抗体カクテルや、IFN-I 受容体 IFNAR2 欠損レポーター細胞株を用いて、IFN-I によるポジティブフィードバックループの寄与について検討したところ、IFN-I 自身による IFN-I 誘導活性に加えて、IFN-I 以外にも IFN-I 産生を誘導する因子が、SLE 血清中に存在することを見出しました。そこで、SLE 血清に含まれる核酸について評価しますと、SLE 血清中には dsDNA が存在し、それらは DNase I で分解されないことから、膜小胞中に存在するのではないかと考え、SLE 血清から 110,000g で単離されるエクソソーム分画と 16,000g で単離されるアポトーシス細胞由来する膜小胞 (AdMVs) 中の dsDNA 並びにそれらの IFN-I 産生誘導活性について評価しました。すると、AdMVs 分画中から dsDNA が検出され、それらをヒト PBMC に添加すると IFN-I 産生が誘導されることが分かりました。さらに、遺伝子編集技術により細胞内核酸センサーをノックアウトしたレポーター細胞を樹立して、SLE 血清による IFN-I 産生機序について検討したところ、STING 欠損細胞で SLE 血清による IFN-I 産生が減弱することが分かりました。

以上のことから、SLE では、組織障害により生じたアポトーシスによって、二本鎖 DNA を含んだ膜小胞が血液中に放たれ、それらが細胞に取り込まれて cGAS-STING 経路を介してさらに IFN-I を産生していることが明らかとなりました (図 2)。よって、SLE においては、従来の IFN-I 自身による機序、核酸と抗 DNA 抗体からなる免疫複合体による機序に加えて、膜小胞を介した IFN-I の産生メカニズムが、cell extrinsic な IFN-I 産生メカニズムとして存在していることが示されました。これらの研究成果は、現在開発中のインターフェロン受容体を標的とした抗体治療の有効症例の層別化や、今後の SLE 治療薬開発に重要なヒントを与える成果であることが認められ、リウマチ関連誌の最上位誌である *Annals of Rheumatic Disease* 誌に掲載されました。

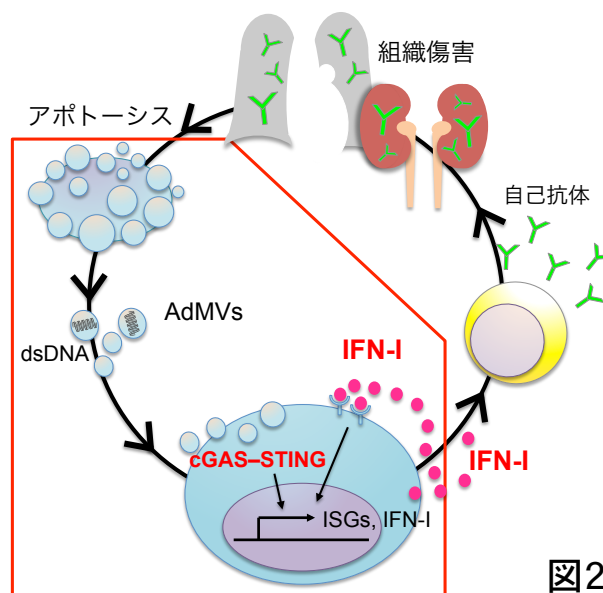


図 2

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

(1) Apoptosis-derived membrane vesicles drive cGAS-STING pathway and enhance type-I IFN production in systemic lupus erythematosus. Kato Y, Park J, Takamatsu H (\*Corresponding author), Konaka H, Aoki W, Aburaya S, Ueda M, Nishide M, Koyama S, Hayama Y, Kinehara Y, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Kumanogoh A, *Ann Rheum Dis.* 77: 1507-15, 2018 査読あり

〔学会発表〕 (計 12 件)

(1) 小中八郎、高松漂太、熊ノ郷淳 Mitochondrial DNA in membrane vesicles plays critical roles in pathogenesis for Behçet's disease 第 47 回日本免疫学会 福岡 2018/12/10-12 国内

(2) 朴正薫、高松漂太、熊ノ郷淳 The Involvement of Type I Interferon in Human Autoimmune Diseases 第 47 回日本免疫学会 福岡 2018/12/10-12 国内

(3) 小中八郎、高松漂太、熊ノ郷淳 ベーチェット病の病態生理の解明 第 4 回骨免疫学会 沖縄 2018/6/24-26 国内

(4) 小中八郎、高松漂太、熊ノ郷淳 Mitochondrial DNA in membrane vesicles plays critical roles in pathogenesis for Behçet's disease 第 62 回日本リウマチ学会 東京 2018/4/24-28 国内

(5) 朴正薫、高松漂太、熊ノ郷淳 Study of Human Autoimmune Diseases Enabled by Gene Editing in Reporter Cell Lines 第 62 回日本リウマチ学会 東京 2018/4/24-28 国内

(6) 加藤保宏、高松漂太、熊ノ郷淳 SLE 血清中の membrane vesicle は STING を介して type-I IFN 産生を誘導する 第 62 回日本リウマチ学会、東京 2018/4/24-28 国内

(7) 加藤保宏、高松漂太、熊ノ郷淳 SLE 患者血清は Stimulator of interferon genes (STING) を介して type-I IFN を誘導する 第 46 回日本免疫学会、仙台 2017/12/12-14 国内

(8) 朴正薫、高松漂太、熊ノ郷淳 Study of Human Autoimmune Diseases Enabled by Gene Editing in Reporter Cell Lines 第 46 回日本免疫学会、仙台 2017/12/12-14 国内

(9) 加藤保宏、高松漂太、熊ノ郷淳 Stimulator of interferon genes (STING) は SLE 患者血清による type-I IFN 誘導において重要な役割を担っている 第 61 回日本リウマチ学会、福岡 2017/4/20-22、国内

(10) JeongHoon Park, Hyota Takamatsu, Atsushi Kumanogoh, Stimulator of interferon genes (STING) plays a crucial role in type-I IFN production induced by the sera from SLE patients Keystone symposia, Banff, 2017/3/21-24、国外

(11) Yasuhiro Kato, Hyota Takamatsu, Atushi Kumanogoh, Stimulator of interferon genes (STING) plays a crucial role in type-I IFN production induced by the sera from SLE patients Lupus 2017, Melbourne, 2017/3/26-29、国外

(12) 加藤保宏、高松漂太、熊ノ郷淳 SLE の病態形成における STING の役割について 第2回骨免疫学会 沖縄 2016/7/6-7、国内

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○ 出願状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。