

令和元年6月5日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15759

研究課題名(和文) 腹部臓器大網乳斑が分泌するトレロソームが敗血症による免疫麻痺を引き起こす

研究課題名(英文) The peritoneum omentum exosomes in the septic immune paralysis

研究代表者

島岡 要 (SHIMAOKA, Motomu)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40281133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症性ショックでは持続する炎症でリモデリングされた大網乳斑から分泌されるエクソソームが、局所ではパラクライン的にマクロファージを炎症促進型M1から炎症抑制型M2に変化させ、さらに循環血液中を流れ遠隔リンパ組織に到達し、全身性にはリンパ球や抗原提示細胞に作用し病的免疫寛容を引き起こすことにより、強力な免疫麻痺を引き起こすという独創的な仮説を検証する。免疫麻痺が起こる敗血症晩期では、大網乳斑が構造的・機能的にリモデリングされることをマウス盲腸結紮穿孔刺(CLP)モデルで解析する。本提案では、大網乳斑に局在するマクロファージが敗血症病態、特に免疫麻痺に重要な役割を果たしているという仮説を研究した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1) 免疫系の過剰活性ではなく、致死率の高い病態晩期での免疫麻痺に着眼したいこと、2) マクロファージ単体ではなく、大網乳斑という微小環境の変化によるマクロファージ機能の劇的変化を検討したこと、3) 「トレロソームによる免疫麻痺」や「炎症による大網乳斑リモデリング」という新規病態概念の提唱したことが学術的意義である。

本研究より敗血症病態理解の全く新しい方向性が示されることが予想され、病期や重症度の診断のためのバイオマーカーの開発や、免疫麻痺を解除する新規治療法につながる医学的意義がある。

研究成果の概要(英文)： We have studied the research hypothesis that the exosomes secreted from the peritoneum omentum milky spots play a critical role in the suppression of immune system during the course of septic shock. Such exosomes are referred to here as tolerosomes. The tolerosomes act in a paracrine manner to local macrophages, thereby skewing the M1-macrophages to the M2-macrophages. In addition, the tolerosomes travel in the circulation and act in a systemic manner to lymphocytes, thereby upregulating PD-1 and/or inducing regulatory cells. In this way, the tolerosomes induce immune paralysis in septic shock. We have tested this hypothesis using mouse CLP model, an established sepsis model. We utilized molecular biological, immunological, and pathohistological approaches to address this important problem.

研究分野：細胞接着と炎症のメカニズムの解明

キーワード：炎症 免疫 敗血症 ショック 免疫学 感染症 病理学

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

1. 研究開始当初の背景

「腹部臓器大網乳班が分泌するトレロソームが敗血症による免疫麻痺を引き起こす(挑戦的萌芽研究: 16K15759)」についての背景について以下に説明する。敗血症性ショックは感染症などを契機に発症する過剰な全身性の炎症反応であり、多臓器不全を引き起こし高い致死率を示す。現在有効な特異的治療法はなく、毎年 2500 万人の患者が全世界的に敗血症性ショックを発症し、その 3 分の 1 が死亡する社会的にも脅威であり、新規治療法に開発の基礎となる病態の理解が望まれる。敗血症性ショックは病態早期には免疫系は過剰に活性化され炎症反応を主徴とするが、致死率の高い晩期には免疫麻痺 (immunoparalysis) と呼ばれる、病原体に対して免疫寛容 (トレランス) 状態に陥ることが動物実験や臨床サンプルの解析により示されているが、この病的免疫寛容誘導の分子機序については不明な点が多い。我々は「腹膜臓器大網に散在するマクロファージが豊富なリンパ節様組織“乳斑”が、敗血症性ショック多臓器不全による虚血や炎症ストレスでリモデリングされ、トレロソーム (Tolerosome) と呼ばれるナノサイズの粒子 (エキソソーム) を分泌し、病的免疫寛容を誘導し免疫麻痺を引き起こしている」と考えられる。

敗血症性ショックの研究では高サイトカイン血症など免疫系の過剰活性化が臓器障害を引き起こす病態の中心で間であると考えられていた。しかし致死率の高い病態晩期に見られる現象はむしろ免疫麻痺と呼ばれる免疫活性化の障害による生体防御機能の低下であり、これが抗生剤治療抵抗性の重症感染症や日和見感染症を引き起こす原因となっている。敗血症病態の中心に位置するマクロファージが炎症促進型の M1 タイプから、炎症抑制型の M2 タイプに変遷することが、敗血症性ショックが免疫麻痺に至るプロセスを制御しているという説は有力であるが、そのようなマクロファージが(A)どこに局在し、(B)どのようなシグナルを契機にして表現型を変化させ、(C)どのようなメディエーターを介して全身性の免疫麻痺を誘導するのかは完全には解明されていなかった。

マウス盲腸結紮穿孔(CLP)モデルは細菌性腹膜炎を契機に発症する敗血症性ショックモデルで、腹膜炎以外の原因により発症する人の敗血症性ショックの病態の重要な部分は、現在報告されているモデルの中では最も信頼できると考えられている。確かに大網乳班の構造的に大規模なリモデリングは CLP モデルで用いる腹膜炎に特異的な現象かもしれないが、ここで明らかになることが期待される「トレロソームによる免疫麻痺」という概念、つまり持続する炎症を引き起こす微小環境リモデリングにより間葉細胞や脂肪細胞からなるストローマ細胞とマクロファージが相互に作用しながら、病的免疫寛容を引き起こす活性のあるトレロソームを分泌し、オートクライン・パラクラインだけでなく全身性にはたらき、免疫麻痺を引き起こすメカニズムは、腹膜炎以外の感染部位を契機とし引き起こされる敗血症性ショックの病態へも一般化できると考える。

2. 研究の目的

「敗血症性ショックでは持続する炎症でリモデリングされた大網乳班から分泌されるエキソソーム (トレロソーム) が、局所ではパラクライン的にマクロファージを炎症促進型 M1 から炎症抑制型 M2 に変化させ、さらに循環血液中を流れ遠隔リンパ組織に到達し、全身性にはリンパ球や抗原提示細胞に作用し病的免疫寛容を引き起こすことにより、強力な免疫麻痺を引き起こす」という仮説を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

マウス CLP 敗血症モデルは病態晩期には、炎症を促進する TNF の血中濃度は低下し、代わ

りに抗炎症活性を持つ IL-10 が優勢となる免疫麻痺状態が観察した。TNF 低下 IL-10 上昇に加え、リンパ球数の減少と分裂能や活性化能の低下、抗原提示細胞の MHCII 発現レベル低下による抗原提示能の低下という免疫麻痺に象徴的なシグニチャーが現れた。このような敗血症晩期にあるマウス CLP モデルの腹腔内より、癒着した大網を注意深く取り出し、乳班の形態的・機能的解析を行い、リモデリングが起こっている。さらにリモデリングされた乳班の構成細胞（マクロファージ、リンパ球、樹状細胞などの非炎症時も存在する免疫細胞と、リモデリングによって遊走してくる間葉系細胞と脂肪細胞など）の表現形と機能を解析した。

CLP マウスモデルの作成：麻酔下に回復し、盲腸結紮穿孔を行う。盲腸穿孔の具合を調節することにより、死亡率を 60%程度に調整し病態晩期に上記免疫麻痺に象徴的なシグニチャーの出現を確認した。免疫麻痺状態にある病態晩期の CLP マウスより大網を取り出し、乳班分子して一部は固定し免疫組織学的解析を行いリモデリングの概要を形態学的に理解した。

細胞レベルでの解析：乳班より細胞を分離しフローサイトメトリーにより、表面抗原の発現より各種構成細胞の分画を定量的に解析した。リンパ球とマクロファージ/単球分画では細胞内染色によりサイトカイン発現レベルを測定し、リンパ球（Th1/Th2/Th17）とマクロファージ/単球（M1/M2）の機能と分化を解析した。リモデリングされた大網乳班が分泌するエキソソームが免疫寛容を誘導する能力を解析し、トレロソーム活性を明らかにした。免疫麻痺状態にある晩期 CLP モデルの腹腔洗浄液よりエキソソームを分離し、免疫細胞に対する活性を *in vitro* で検討した。

エキソソームの分離：市販キットを用いて腹腔洗浄液より分離した

免疫細胞に対する効果の検討：免疫麻痺シグニチャーのうち マクロファージへの効果（免疫抑制型 M2 タイプの誘導） リンパ球への影響（活性化抑制、遊走能抑制） 抗原提示細胞への効果（MHCII の発現抑制）を *in vitro* アッセイで検討した。

器官培養システムをおこなった。

免疫麻痺を誘導する活性を確認できた器官培養上清中のエキソソーム（トレロソーム）に内包される活性分子（膜タンパク、サイトカイン、miRNA 等）を研究した。活性分子がタンパクまたは miRNA である可能性を想定し、プロテオミクスや次世代シーケンサーを用いた解析を行った。

4．研究成果

「腹部臓器大網乳班が分泌するトレロソームが敗血症による免疫麻痺を引き起こす」という仮説を検証することと関連して以下の研究成果を獲得した。

1. Okamoto et al. Gap junction-mediated regulation of endothelial cellular stiffness. *Sci Rep.* 2017 Jul 21;7(1):6134

血管内皮細胞は腹部臓器大網乳班が分泌するトレロソームの全身への分布の制御に関わっている可能性がある。血管内皮細胞の細胞間コミュニケーションに関わっているギャップジャンクションタンパクであるコネクシンの機能を検討したところ、基質の硬さという物理的な刺激が誘導する機械的な刺激が重要であることがわかってきた。Atomic Force Microscopy を利用して血管内皮の物理的な性質を測定し、細胞骨格の再構成が起こる過程にギャップジャンクションを経由した低分子物質の輸送と、それがトリガーするシグナリングの重要性が明らかになった。

2. Park et al. MicroRNA-mediated dynamic control of mucosal immunity. *Int Immunol.* 2017 Apr 1;29(4):157-163.

腹部臓器大網乳班が分泌するトレロソームの粘膜免疫への役割を考察し、文献的な意味付けを行った。とくにマイクロ RNA によるエピジェネティックな制御の可能性が示唆されている。

3. Gayle A, Shimaoka M. Public Response to Scientific Misconduct: Assessing Changes in Public Sentiment Toward the Stimulus-Triggered Acquisition of Pluripotency (STAP) Cell Case via Twitter. *JMIR Public Health Surveill.* 2017 Apr 20;3(2):e21

腹部臓器大網乳班が分泌するトレロソームの研究成果を世の中に発信する上で、また研究不正を防止する点で、STAP に関する一連の事象をモデルとして、ソーシャル・ネットワークでの情報のダイナミクスについて検討を加えたところ、他の世の中の科学以外のニュースが広がるパターンと同じであることがわかった。

4. Kawamoto et al. LFA-1 and Mac-1 integrins bind to the serine/threonine-rich domain of thrombomodulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 473(4):1005-12

腹部臓器大網乳班が分泌するトレロソームの細胞接着に関する可能性を検討する過程で、トロンボモジュリンが細胞接着に関与するメカニズムについて検討した。白血球インテグリンである LFA-1&Mac-1 は血管内皮細胞に発現する主要なリガンドである ICAM-1 に加えて、トロンボモジュリンにも結合することを示し、その構造的な基礎を解明した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Soe ZY, Prajuabjinda O, Myint PK, Gaowa A, Kawamoto E, Park EJ, Shimaoka M. Talin-2 regulates integrin functions in exosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019; 512(3): 429-434. 査読有
2. 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. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019; 511(2): 312-317. 査読有
3. 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 Adv.* 2019; 3(1): 1-11. 査読有
4. 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 γ expression. *Exp Cell Res.* 2018; 367(2):264-273. 査読有
5. Okamoto T, Kawamoto E, Takagi Y, Akita N, Hayashi T, Park EJ, Suzuki K, Shimaoka M. Gap junction-mediated regulation of endothelial cellular stiffness. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 6134. 査読有
6. Park EJ, Shimaoka M, Kiyono H. MicroRNA-mediated dynamic control of mucosal immunity. *Int Immunol.* 2017; 29(4):157-163. 査読有
7. Gayle A, Shimaoka M. Public Response to Scientific Misconduct: Assessing Changes in

Public Sentiment Toward the Stimulus-Triggered Acquisition of Pluripotency (STAP) Cell Case via Twitter. JMIR Public Health Surveill. 2017; 3(2): e21. 査読有

8. Kawamoto E, Okamoto T, Takagi Y, Honda G, Suzuki K, Imai H, Shimaoka M. LFA-1 and Mac-1 integrins bind to the serine/threonine-rich domain of thrombomodulin. Biochem Biophys Res Commun. 2016; 473(4): 1005-1012. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 岡本貴行, 川本英嗣, 島岡 要 他, 炎症時の血管内皮細胞の硬化にリコモジュリンが及ぼす影響の解析, 第 40 回日本血栓止血学会学術集会, 2018
2. 川本英嗣, 江口暁子, 島岡 要 他, 細胞外小胞 (EV) インテグリンの敗血症病態への関与の研究を目的とした CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いたインテグリンノックアウト EV の作製, 第 33 回日本 Shock 学会総会, 2018
3. Park EJ, Shimaoka M et al., Intraluminally secreted extracellular vesicles from the intestinal epithelial cells in sepsis support mucosal healing, 第 47 回日本免疫学会学術集会, 2018
4. 島岡 要, Platelet activation and integrin signaling (招待講演), 第 39 回日本血栓止血学会学術集会, 2017
5. 島岡 要, インテグリン活性化と炎症制御, 第 32 回日本 Shock 学会総会, 2017
6. 川本英嗣, 島岡 要 他, 敗血症患者の細胞外小胞にはインテグリン, PD-L1, PD-L2 が発現する, 第 32 回日本 Shock 学会総会, 2017
7. 長太のどか, 島岡 要 他, 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 Shock 学会総会, 2017
8. Park EJ, Shimaoka M et al., B7 Integrin mediated homing of exosomes to the gut, 第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017
9. 島岡 要, インテグリンの機能制御 (招待講演), 第 38 回日本血栓止血学会学術集会, 2016
10. 岡本貴行, 島岡 要 他, マクロファージの分化における細胞外基質の硬さの影響, 第 38 回日本血栓止血学会学術集会, 2016

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 朴 恩正

ローマ字氏名: (PARK, eun jeong)

所属研究機関名: 三重大学

部局名: 医学系研究科

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 20644587

研究分担者氏名: 岡本 貴行

ローマ字氏名: (OKAMOTO, takayuki)

所属研究機関名: 島根大学

部局名: 学術研究院医学・看護学系

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 30378286

研究分担者氏名：江口 暁子

ローマ字氏名：(EGUCHI, akiko)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：特任助教（研究担当）

研究者番号（8桁）: 00598980

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。