

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02622

研究課題名(和文) エキソソームによる腸管特異的リンパ球ホーミングの制御機序の解明

研究課題名(英文) Exosomal regulation of leukocyte trafficking

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：感染症防御の最前線である粘膜組織へのエフェクター/メモリー・リンパ球ホーミングが過少であれば生体防御能が低下する、一方過剰であれば組織障害につながる可能性がある。本研究ではリンパ球自身が分泌するエキソソームが先回りして遠隔臓器に作用し、リンパ球ホーミングを制御する新規メカニズムを見出した。粘膜指向性リンパ球が分泌するエキソソームはホーミング受容体インテグリンa4b7を高発現し、マイクロRNAを介したエピジェネティックな様式で、遠隔臓器の血管内皮に作用しMAdCAM-1を含むインテグリンリガンド発現抑制により、ホーミングを負に制御する重要なブレーキとして機能することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘膜組織は外界に存在する病原体と直接接する生体防御の最前線である。免疫系の中心的なプレーヤーであるリンパ球の多様性は限られているので、限られた生体防御リソースをできるだけ効率的に使用する機序として、リンパ球の臓器特異的ホーミングを積極的に促進する制御メカニズムの存在が知られ、正の制御の中心的なプレーヤーとして細胞接着分子インテグリンが知られている。しかし正の制御のカウンターバランスを取るためのメカニズムは不明であった。本研究ではリンパ球が分泌するエキソソームが、先回りして粘膜組織に到着し、血管内皮細胞をエピジェネティックに影響を与える負の制御機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The homing of effector/memory lymphocytes to mucosal tissues, which is the frontline of infectious disease defense, can lead to a decrease in the body's defensive capacity if it is insufficient, while excessive homing can lead to tissue damage that could be associated with inflammatory bowel diseases. In this study, we have found a novel mechanism by which exosomes secreted by lymphocytes themselves regulate lymphocyte homing by preemptively acting on distant organs such as intestinal mucosal tissues. The exosomes secreted by mucosal-directed lymphocytes highly express the homing receptor integrin a4b7 and act on the vascular endothelium of distant organs in a microRNA-mediated epigenetic manner to negatively regulate homing by suppressing integrin ligand expression, including MAdCAM-1. The results showed that MAdCAM-1 acts as an important brake to negatively regulate homing by suppressing the expression of integrin ligands including MAdCAM-1.

研究分野：免疫学

キーワード：インテグリン エキソソーム 細胞外小胞 細胞接着 炎症

1. 研究開始当初の背景

リンパ球は、病原体から宿主を守るための適応免疫の重要な担い手であり、抗原依存的にエフェクター/制御機能を発揮している。リンパ球が効果的に機能するためには、リンパ球は体内をランダムに移動するのではなく、特定の組織に移動するように制御されなければならない。このようなメカニズムは、組織特異的ホーミングと呼ばれ、腸管粘膜組織で最も広く理解されている。腸管粘膜組織のリンパ節で抗原に遭遇したナイーブ T リンパ球は、リンパ節で採取された抗原に反応するようプログラムされ、腸管粘膜指向性のエフェクター/メモリー T リンパ球として腸の組織に戻るよう刷り込まれる (インプリンティング)。この腸管粘膜組織特異的ホーミングは、腸内に侵入し増殖する病原体に反応する T リンパ球クローンが、腸内で物理的に対抗できる可能性を最大限に高めるメカニズムとして機能している。これにより、腸管粘膜組織で効果的な適応免疫を獲得することができるのである。腸管組織特異的なホーミングは、ホーミングニッチと呼ばれる、腸管組織へのリンパ球の移動と定着をサポートする微小環境の存在によって可能となる。腸管粘膜組織の毛細血管床に存在する特殊な内皮細胞である高内皮性静脈 (HEV) 内皮細胞は、ホーミングニッチの中心に位置している。HEV 内皮細胞は、ケモカインや接着分子が存在する環境を作り出し、腸管粘膜獲得免疫を担うリンパ球を引き寄せることができる。具体的には、HEV 内皮細胞は、ケモカイン C-C モチーフケモカインリガンド 25 (CCL25) と接着分子である粘膜アドレシン細胞接着分子-1 (MAdCAM-1) を発現しており、ケモカイン受容体 C-C モチーフケモカイン受容体 25 (CCR9) を発現する腸管栄養型リンパ球の移動をサポートする。後者は、CCL25 とインテグリン $\alpha 4 \beta 7$ が MAdCAM-1 に結合することでシグナルを発する。

MAdCAM-1 の発現は発生的に制御されており、健康な成人の場合、腸内では安定して限られたレベルにとどまっている。転写因子である Nirenberg-Kim (NK) 2 homeobox 3 (NKX2.3) は、腸内での MAdCAM-1 発現の発達制御に重要であり、NKX2.3 欠損マウスでは MAdCAM-1 の発現が見られない。例えば、炎症性腸疾患の腸管組織では、MAdCAM-1 の発現が増大し、インテグリン $\alpha 4 \beta 7$ を発現する異常に活性化された T リンパ球の蓄積が促進されるという。このように腸管粘膜へのリンパ球ホーミングを促進する正の制御メカニズムはよく知られているが、過剰なリンパ球集積を抑制するカウンターバランスのための負の制御メカニズムについてはよくわかっていなかった。本研究で検討した学術的な未解決問題は、リンパ球の粘膜組織特異的ホーミングの負の制御メカニズムの解明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の研究仮説を検証することである。

リンパ球の粘膜組織特異的ホーミングは、腸管刺激性 T リンパ球から分泌されるエクソソームによって駆動され、HEV における MAdCAM-1 の発現を抑制するのではないかとこの負の制御メカニズムはエピジェネティックな経路を通して行われるのではないかと。エクソソームは活性化リンパ球の組織特異的な流入を微調整するために、ホーミングニッチのリモデリングのプロセスに中心的な役割を果たしているのではないかと。また T リンパ球エクソソームの粘膜組織の血管内皮細胞へ指向性を付与する機能は、インテグリン $\alpha 4 \beta 7$ とその活性化を制御する細胞内アダプター分子タリンによって制御されているのではないかと。

3. 研究の方法

「リンパ球の粘膜組織特異的ホーミングは、腸管指向性 T リンパ球から分泌されるエクソソームによって駆動され、HEV における MAdCAM-1 の発現を抑制するのではないか」

この仮説を検証するために、まず腸管指向性 T リンパ球を試験内で作成する方法を確立した。T 細胞受容体刺激が粘膜組織の抗原提示細胞（樹状細胞）から提供されると、細胞表面のインテグリン 4 7 とケモカイン受容体 CCR9 の発現が上昇することが知られているが、この減少を試験管内で再現しモデル化するために、粘膜組織樹状細胞が産生するレチノイン酸を培養液中に添加する方法を使用した。更に腸管指向性 T リンパ球のモデル細胞として T 細胞株 TK-1 細胞を確立した。TK-1 細胞はレチノイン酸処理によりインテグリン 4 7 の発現上昇が誘導されることを確定し、実験系として確立した。またエクソソームに存在するインテグリン 4 7 の活性が、腸管粘膜組織指向性を制御していることを実験的に検証するためには、ストレートな方法として、インテグリン 4 7 欠損エクソソームを作成することである。そのために CRISPR-Cas9 遺伝子編集技術を用いて、インテグリン 4 7 のうち 7 サブユニットのエクソン 1 にノンセンス変異を導入しインテグリン 4 7 を欠損する TK-1 細胞株を確立する方法と、スモールヘアピン RNA (shRNA) 技術を用いて、インテグリン 4 7 のうち 7 サブユニットのメッセンジャー RNA (mRNA) の蛋白への翻訳を阻害する方法とを確立した。またリンパ球エクソソームが腸管指向性 T リンパ球の臓器特異的ホーミングに与える影響を、高い精度で定量的に検証するために、2 色の蛍光色素を使った競合的エクソソームホーミングアッセイを、従来の競合的細胞ホーミングアッセイの原理を応用して確立した。

「この負の制御もメカニズムはエピジェネティックな経路を通して行われるのではないか」

この仮説を検証するために、エクソソームに含有される低分子制御性 RNA 特にマイクロ RNA を解析する実験方法を確立した。T 細胞エクソソームから RNA を分離し、ディープシーケンシングによりマイクロ RNA の発現プロフィールを網羅的に解析する方法を使用した。またディープシーケンシング結果をより定量的に解析するために、定量的リアルタイム RT-PCR 法を使用した。また選択的に発現が増加したマイクロ RNA の標的 mRNA を予測するアルゴリズムとして TargetScan を使用するバイオインフォマティクス的研究方法を使用した。さらに TargetScan のバイオインフォマティクスの予測結果を、細胞レベルで実験的に検証するために、そのマイクロ RNA の発現を抑制する Antagomir と、そのマイクロ RNA の発現を上昇させる Mimetic の双方を使用して機能的な支持データを獲得する方法を使用した。また細胞内で特定のマイクロ RNA と予想された標的 mRNA の 3 プライム非翻訳領域との直接的な相互作用を検出するためのルシフェラーズアッセイを使用した。

「エクソソームは活性化リンパ球の組織特異的な流入を微調整するために、ホーミングニッチのリモデリングのプロセスに中心的な役割を果たしているのではないか」

この仮説を検証するために、腸管粘膜組織の血管内皮細胞の遺伝子発現、特にリンパ球ホーミングを支持する重要な分子であるインテグリン 4 7 の主要なリガンドである MAdCAM-1 とその発現を制御する転写因子 NKX2.3 の発現を、定量的リアルタイム RT-PCR 法で mRNA レベルで測定する方法を使用した。またリンパ球の腸管組織指向性を誘導するケモカインの発現も同様に RT-PCR で測定する方法を用いた。また蛋白レベルで MAdCAM-1 とケモカインの発現を測定するために、特異的なモノクローナル抗体を用いた蛍光免疫組織染色方法と、

フローサイトメトリーを用いた方法を使用した。またリンパ球ホーミング量を測定するために、2色の蛍光色素を使った従来の競合的細胞ホーミングアッセイ法を使用した。

「Tリンパ球エクソソームの粘膜組織の血管内皮細胞へ指向性を付与する機能は、インテグリン 4 7 とその活性化を制御する細胞内アダプター分子タリンによって制御されているのではないか」

この仮説を検証するために、細胞内アダプター分子タリンの発現を欠損したエクソソームを作成するために、CRISPR-Cas9 遺伝子編集技術を用いて、タリンのエクソン 1 にノンセンス変異を導入しタリンサブタイプの一つタリン 2 を欠損する TK-1 細胞株を確立し、タリン 2 欠損エクソソームを獲得した。

4 . 研究成果

「リンパ球の粘膜組織特異的ホーミングは、腸管指向性 T リンパ球から分泌されるエクソソームによって駆動され、HEV における MAdCAM-1 の発現を抑制するのではないか」

Park EJ, et al (Exosomal regulation of lymphocyte homing to the gut. *Blood Adv.* 2019 Jan 8;3(1):3656-3666)で、論文として発表したように、腸管指向性 T リンパ球から分泌されるエクソソームが、先回りして粘膜組織血管内皮における MAdCAM-1 の発現を抑制し、リンパ球ホーミングを負に制御するメカニズムであること証明した。

「この負の制御もメカニズムはエピジェネティックな経路を通して行われるのではないか」
上記論文で発表したように、腸管粘膜組織指向性リンパ球エクソソームに選択的に発現が上昇するマイクロ RNA として、miR-132, miR-212, miR-431, miR-456, miR-670 を同定し、その標的 mRNA として MAdCAM-1, NKX2.3, ICAM-1, VCAM-1 などのインテグリンリガンドを同定した。

「エクソソームは活性化リンパ球の組織特異的な流入を微調整するために、ホーミングニッチのリモデリングのプロセスに中心的な役割を果たしているのではないか」

Myint PK, et al. (Targeted remodeling of cancer and immune cell homing niches by exosomal integrins. *Diagn. Pathol* 2020 Apr 18;15(1):38)で論文として発表したように、エクソソームがホーミングニッチのリモデリングに中心的役割を果たしているモデルを提唱した(図 A-C)。このリモデリングのメカニズムはリンパ球のような生理的な非腫瘍細胞の微小環境では、カウンターバランスとして負の制御メカニズムとして機能するが(図 A)、病理的な腫瘍細胞の微小環境では、過剰な正の制御として働き、癌の転移を促進したり(図 B)、肺の慢性炎症である慢性閉塞性肺疾患(COPD)では、組織障害を促進する病態を招くというコンセプトにまとめ、より包括的に理解することを提唱した。

「Tリンパ球エクソソームの粘膜組織の血管内皮細胞へ指向性を付与する機能は、インテグリン 4 7 とその活性化を制御する細胞内アダプター分子タリンによって制御されているのではないか」

Soe ZY, et al. (Talin-2 regulates integrin functions in exosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Mar 14. pii: S0006-291X(19)30404-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.027.) で論文として発表したように、タリン 2 を欠損したリンパ球エクソソームは MAdCAM-1 に対する接着性が低下

し、マウス腸管粘膜組織へのホーミング分布が減少すること、血管内皮細胞への取り込みが減少することを証明した。

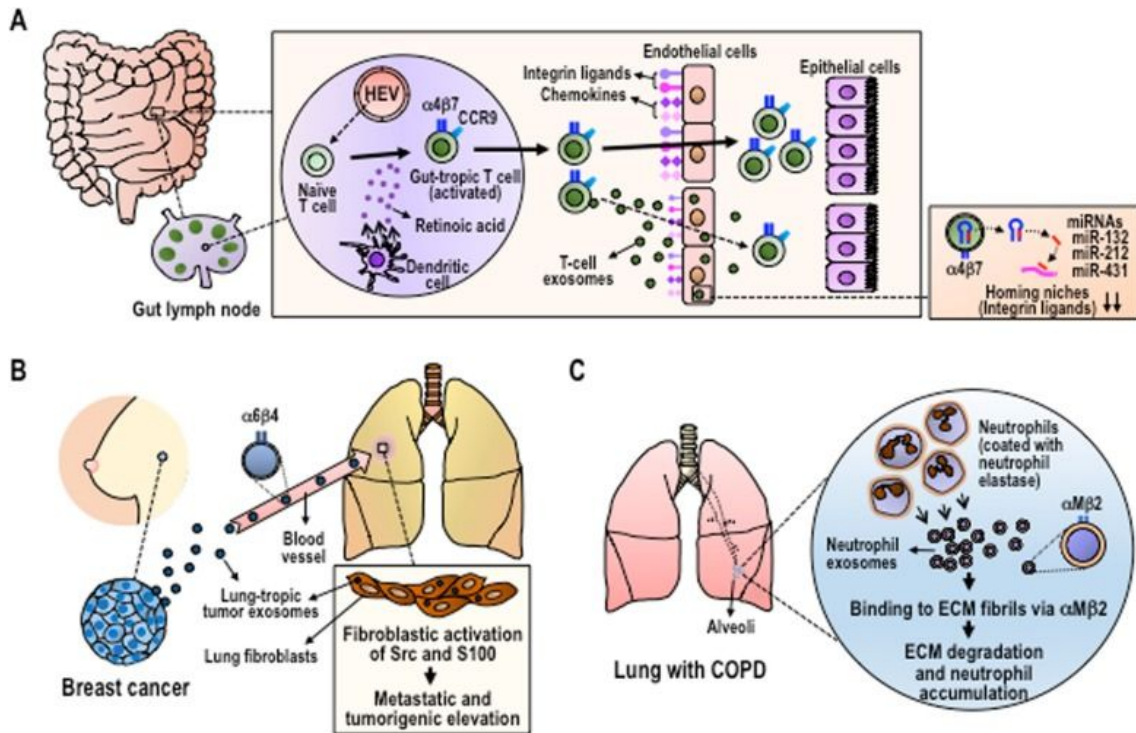


図 エキソソームによりホーミングニッチのリモデリング (Myint PK, et al. (Targeted remodeling of cancer and immune cell homing niches by exosomal integrins. *Diagn. Pathol* 2020 Apr 18;15(1):38)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Park EJ, Prajuabjinda O, Soe ZY, Darkwah S, Appiah MG, Kawamoto E, Momose F, Shiku H, Shimaoka M.	4. 巻 3(1)
2. 論文標題 Exosomal regulation of lymphocyte homing to the gut	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2018024877.	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 Takayuki Okamoto, Yoshimi Takagi, Eiji Kawamoto, Eun Jeong Park, Haruki Usuda, Koichiro Wada, Motomu Shimaoka	4. 巻 367(2)
2. 論文標題 Reduced Substrate Stiffness Promotes M2-like Macrophage Activation and Enhances Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 264-273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2018.04.005	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 Soe Zay Yar, Prajuabjinda Onmanee, Myint Phyo Kyaw, Gaowa Arong, Kawamoto Eiji, Park Eun Jeong, Shimaoka Motomu	4. 巻 512
2. 論文標題 Talin-2 regulates integrin functions in exosomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 429 ~ 434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.03.027	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 Park Eun J., Appiah Michael G., Myint Phyo K., Gaowa Arong, Kawamoto Eiji, Shimaoka Motomu	4. 巻 25
2. 論文標題 Exosomes in Sepsis and Inflammatory Tissue Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Pharmaceutical Design	6. 最初と最後の頁 4486 ~ 4495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1381612825666191116125525	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 Myint Phyo Kyaw, Park Eun Jeong, Gaowa Arong, Kawamoto Eiji, Shimaoka Motomu	4. 巻 15
2. 論文標題 Targeted remodeling of breast cancer and immune cell homing niches by exosomal integrins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostic Pathology	6. 最初と最後の頁 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13000-020-00959-3	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 Appiah Michael G., Park Eun Jeong, Darkwah Samuel, Kawamoto Eiji, Akama Yuichi, Gaowa Arong, Kalsan Manisha, Ahmad Shandar, Shimaoka Motomu	4. 巻 21
2. 論文標題 Intestinal Epithelium-Derived Luminally Released Extracellular Vesicles in Sepsis Exhibit the Ability to Suppress TNF- and IL-17A Expression in Mucosal Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8445 ~ 8445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228445	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	川本 英嗣 (Kawamoto Eiji) (20577415)	三重大学・医学部附属病院・助教 (14101)	
研究分担者	朴 恩正 (Park Eun Jeong) (20644587)	三重大学・医学系研究科・准教授 (14101)	
研究分担者	高娃 阿栄 (Arong Gaowa) (50643805)	三重大学・医学系研究科・助教 (14101)	

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