

自己免疫・アレルギー疾患の難治化における マスト細胞の役割の解明

豊島翔太¹⁾, 坂本朋美¹⁾, 黒澤雄介¹⁾, 葉山惟大¹⁾, 松田 彰²⁾, 渡部保男²⁾,
照井 正¹⁾, 高橋恭子³⁾, 斎藤 修¹⁾, 権 寧博¹⁾, 松本健治⁴⁾, 岡山吉道¹⁾

Elucidation of roles of mast cells in the pathogenesis of refractory autoimmune and allergic diseases

Shota TOYOSHIMA¹⁾, Tomomi SAKAMOTO-SASAKI¹⁾, Yusuke KUROSAWA¹⁾,
Koremasa HAYAMA¹⁾, Akira MATSUDA²⁾, Yasuo WATANABE²⁾,
Tadashi TERUI¹⁾, Kyoko TAKAHASHI³⁾, Shu SAITO¹⁾, Yasuhiro GON¹⁾,
Kenji MATSUMOTO⁴⁾, Yoshimichi OKAYAMA¹⁾

要旨

マスト細胞 (Mast Cells: MCs) と2型自然リンパ球 (Group 2 innate lymphoid cells: ILC2) は、アレルギー症状の惹起のみならず、アレルギー症状の増悪化に重要な役割を果たしている。細胞が遊離する細胞外小胞 (Extracellular Vesicles: EVs) は、microRNA (miRNA) やタンパク質を内包し、受け手側の細胞の表現系や機能を制御することが明らかにされ、細胞間相互作用の新たな様式として注目されている。しかしながら、MCsとILC2の細胞間において、EVsを介する相互作用はまだ知られていない。今回我々は、IgE依存性に活性化したマスト細胞から遊離されたEVsが、IL-33刺激によるILC2からの2型サイトカインのIL-5の産生を有意に増強させることを見出した。このEVsには、miR103a-3pの発現が特異的に増加していた。このmiR103a-3pは、ILC2内で、protein arginine methyltransferase protein 5 (PRMT5) の発現を抑制し、転写因子のGATA3の脱メチル化を促進することでIL-5産生を増強していた。さらに、アトピー性皮膚炎患者の血清EVs中のmiR103a-3pの発現は、アレルギー素因のない健常人と比較して有意に高かった。したがって、IgE依存性に活性化したマスト細胞から遊離されるEVsは、IL-5産生を増強させ、好酸球性炎症を増悪化させていることが示唆された。

1. はじめに

IgE依存性に活性化したMCsは、ヒスタミンを遊離し、IL-5やIL-13などの2型サイトカインおよび脂質メディエーターなどを産生することによってアトピー性皮膚炎や気管支喘息などのIgE依存性のアレルギー疾患の発症・増悪に寄与することが知られている。^{1), 2)} ILC2も2型サイトカインを産生し、アレルギー疾患や寄生虫感染防御に寄与している。^{3), 4)} アレルギー疾患や寄生虫感染において、MCsが産生するサイトカインや脂質メディエーターが、ILC2の

機能を制御することが報告されている。⁵⁾ つまり、MCsとILC2の相互作用は、アレルギー疾患の発症や増悪化に重要である。ほとんど全ての細胞はmicroRNA (miRNA) を内包したEVsを遊離し、受け手側の細胞の表現系や機能発現に影響を及ぼすことが明らかになった。^{6), 7)} しかしながら、アレルギー疾患におけるIgE依存性に活性化したMCsが遊離するEVsの役割はまだ知られていない。

1) 日本大学医学部
2) 順天堂大学医学部眼科
3) 日本大学生物資源科学部
4) 国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部
岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

2. 目的

本研究ではIgE依存性に活性化したヒトMCsが遊離するEVsが、ILC2の機能にどのような影響を及ぼすかを検証することを目的とした。

3. 対象及び方法

3-1 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-150908-12およびRK-160112-2)。

3-2 ヒトマスト細胞の培養

ヒト滑膜マスト細胞は、変形性関節症の滑膜組織から分離培養した。滑膜組織を採取後ただちに2% FBS, 100 IU/mLのstreptomycin/penicillinおよび1% fungizoneを含んだIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) に入れ細切した。1.5 mg/mLのcollagenase type Iと0.75 mg/mLのhyaluronidaseを用いて37°Cで1時間反応させた。比重遠心によってマスト細胞の前駆細胞を単離し100 ng/mLのrecombinant human stem cell factor (rhSCF) および50 ng/mLのrhIL-6を含んだ無血清培地 (Iscove methylcellulose mediumとIMDM) で培養した。

3-3 細胞外小胞の単離

ヒト培養滑膜MCsを刺激なし、100 ng/mLのIL-33, IgE感作のみ、およびIgE感作後、抗IgE抗体で24時間刺激し細胞上清を回収した。回収した細胞上清にExoQuick-TCを添加し、一晚反応させ、6,000 x g 30分遠心を行いEVsを単離した。

3-4 ヒトILC2の単離・培養

末梢血からLSMを用いて末梢血単核球から単離し、CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD16およびCD19 Microbeadsを用いてlineage陰性細胞を単離した。この細胞からLin⁻CD45⁺CRTh2⁺CD161⁺細胞(ILC2)をFACS Aria IIuで単離した。単離したILC2をマイトマイシン処理した末梢血単核球と100 IU/mLのIL-2存在下で培養した。

3-5 サイトカイン測定

ILC2の培養上清中のIL-5およびIL-13はELISAで測定した。

3-6 統計解析

3群以上の統計解析はtwo-way analysis of variance (ANOVA) およびTukey's multiple comparison test

もしくはone-way ANOVAおよびTukey's multiple comparison testで行った。臨床データの2群間比較は、Mann-Whitney U testで行った。p値が0.05未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は、GraphPad Prism 8 (MDF, Tokyo, Japan) を使用した。

4. 結果

抗IgE抗体刺激したヒトMCs由来のEVs (anti-IgE-EVs) は、IL-33刺激によるILC2からのIL-5産生を有意に増強させたが、IL-13産生には影響を及ぼさなかった。miRNAの網羅的解析を行ったところ、anti-IgE-EVs中では、miR103a-3pやmiR23b-3pを含んだ7個のmiRNAの発現が特異的に上昇していた。リアルタイムPCRで実際の発現を解析したところ、miR103a-3pおよびmiR23b-3pがanti-IgE-EVsで特異的に発現が上昇していた。この二つのmiRNAのうちanti-IgE-EVsと共培養したILC2においては、miR103a-3pの発現が有意に増強していた。miR103a-3pの過剰発現によって、ILC2からのIL-33刺激によるIL-5産生が増強された。miR103a-3pの標的となる遺伝子をin silicoで探索したところ、protein arginine methyltransferase protein 5 (PRMT5) が標的となることが明らかになった。anti-IgE-EVと共培養およびmiR103a-3pを過剰発現したILC2においては、PRMT5の発現低下が認められた。さらにmiR103a-3pの過剰発現のよってGATA3の脱メチル化も増強された。また、アトピー患者血清中EVsにおけるmiR103a-3pの発現レベルは、アレルギー素因のない健康人血清中のEVsにおけるmiR103a-3pの発現レベルよりも有意に高値であった。

5. 考察

IgE依存性の刺激によって活性化したマスト細胞は、miR103a-3pを含んだEVsを遊離し、ILC2がそのEVsを取り込むとPRMT5の発現が低下し、メチル化されたGATA3から脱メチル化されたGATA3へとなり、ILC2からのIL-5の産生を増強させることが唆された。さらに、EVs中のmiR103a-3pは、アトピー性皮膚炎の増悪化に関与している可能性が考えられた。

6. 結語

IgE依存性に活性化されたマスト細胞由来のEVs

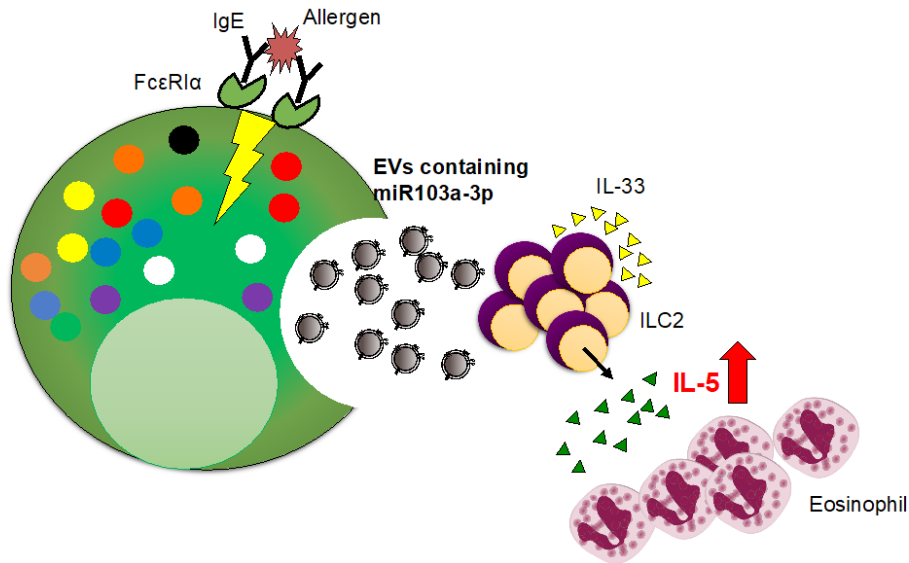


図1 IgE依存性に活性化したマスト細胞から遊離されるEVsは、IL-5産生を増強させ、好酸球性炎症を増悪化させている

は、miR103a-3pを含有し、ILC2などのIL-5産生細胞からのIL-5産生を増強させることで好酸球性炎症の増悪化・難治化に寄与している可能性が考えられた(図1)。

謝 辞

本研究の成果は、令和元年度日本大学学術研究助成金〔総合研究〕の支援によりなされたものであり、ここに深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Galli SJ, Tsai M: IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med.* 2012; 18: 693-704.
- 2) Liu FT, Goodarzi H, Chen HY: IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011; 41: 298-310.

- 3) Artis D, Spits H: The biology of innate lymphoid cells. *Nature.* 2015; 517: 293-301.
- 4) Mjösberg J, Spits H: Human innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2016; 138: 1265-1276.
- 5) Xue L, Salimi M, Panse I, Mjösberg JM, McKenzie AN, Spits H, Klenerman P, Ogg G: Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemottractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133: 1184-1194.
- 6) Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 654-659.
- 7) Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavie G, Thery C: Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol.* 2019; 21: 9-17