

アトピー性皮膚炎・慢性特発性蕁麻疹における 細胞外小胞による病態制御機構の解明

岡山吉道¹⁾²⁾, 豊島翔太¹⁾²⁾³⁾, 坂本朋美¹⁾²⁾, 高橋恭子⁴⁾, 葉山惟大¹⁾⁵⁾,
木澤靖夫⁶⁾, 藤田英樹¹⁾⁵⁾, 李賢鎬⁷⁾, 丸岡秀一郎¹⁾³⁾

Elucidation of pathophysiological control mechanism in atopic dermatitis and chronic spontaneous urticaria

Yoshimichi OKAYAMA¹⁾²⁾, Shota TOYOSHIMA¹⁾²⁾³⁾, Tomomi SAKAMOTO¹⁾²⁾,
Kyoko TAKAHASHI⁴⁾, Koremasa HAYAMA¹⁾⁵⁾, Yasuo KIZAWA⁶⁾,
Hideki FUJITA¹⁾⁵⁾, Kenkou Lee⁷⁾, Shuichiro MARUOKA¹⁾³⁾

要旨

ヒトマスト細胞からIgE依存性の刺激で特異的に分泌される細胞外小胞内のmiR103a-3pがILC2に取り込まれ、Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5)の発現を下げることによってGATA3のアルギニン残基の脱メチル化を起こし、IL-33存在下の2型自然リンパ球 (group 2 innate lymphoid cell: ILC2)においてIL-5 mRNA発現を増強し、IL-5産生を増加させることを見出した。これによって好酸球性炎症を増悪されることが示唆された。

1. はじめに

生体の維持には細胞間のコミュニケーションが必須である。その方法としては、細胞同士の接着により刺激を伝達する機構やホルモン、細胞増殖因子、サイトカインや脂質メディエーターなどを細胞が分泌することに加え、細胞が遊離する数十～数百ナノメートルのサイズの細胞外小胞がある。¹⁾²⁾細胞外小胞は、遠隔の細胞間のコミュニケーションを媒介し、免疫応答や血液凝固などさまざまなプロセスに関与している。³⁾しかしながら、アレルギー・免疫疾患患者の血清中の細胞外小胞に含まれるタンパク質、核酸 (mRNA, microRNA [miRNA], ノン・コーディング RNA) や脂質が疾患の病勢によってどのようなダイナミックな変化を起こしているのかは、全く知られていない。今回、私達はヒトマスト細胞からIgE依存性の刺激で分泌される細胞外小胞内のmiR103a-3pが2型自然リンパ球 (group 2 innate lym-

phoid cell: ILC2)に取り込まれ、IL-33刺激によるIL-5産生を特異的に増強し、好酸球性炎症を増悪させること、アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis; AD)患者では血清中の細胞外小胞内miR103a-3p発現が有意に増加していることを見出した。マスト細胞から分泌される細胞外小胞はマスト細胞特異的なマーカーを発現していることを見出した。

2. 対象及び方法

(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)。

(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

1) 日本大学医学部付属板橋病院アレルギーセンター

2) 日本大学医学部医学教育学分野

3) 日本大学医学部呼吸器内科学分野

4) 日本大学生物資源科学部

5) 日本大学医学部皮膚科学分野

6) 日本大学薬学部

7) 日本大学医学部整形外科学分野

岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

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 (rh-SCF) 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) 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。

(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。

(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。

(6) miR103a-3p mimicおよびmiRNA mimic controlのILC2への遺伝子導入

miR103a-3p mimicおよびmiRNA mimic controlは, 10 nM, Sigma-Aldrich社製を用いた。ILC2への遺伝子導入は, MISSION siRNA Transfection Reagent Sigma-Aldrich社製を用いた。

(7) 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。

3. 結果

(1) ヒトマスト細胞からIgE依存性の刺激で分泌される細胞外小胞内のmiR103a-3pがILC2に取り込まれ, IL-33刺激によるIL-5産生を増強

IgE非依存性およびIgE依存性のアレルギー疾患におけるマスト細胞由来細胞外小胞中miRNAの特徴と役割を調べるために, ヒトマスト細胞を刺激なし, IL-33, IgEおよびIgEと抗IgE抗体で刺激し, 細胞外小胞を単離した。各々の細胞外小胞をIL-33存在下のILC2と共培養し, 細胞上清中のIL-5を測定

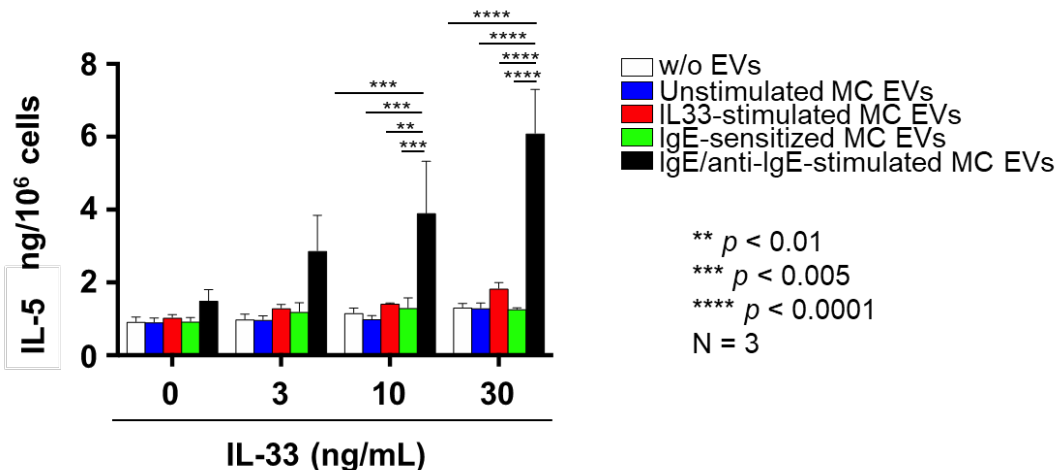


図1 IgEと抗IgE抗体で刺激したマスト細胞由来細胞外小胞は, ILC2のIL-5産生を有意に増強

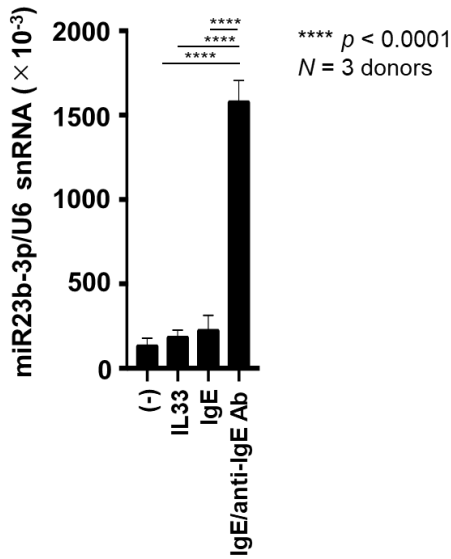


図2 IgEと抗IgE抗体で刺激したマスト細胞由来細胞外小胞中では、miR103a-3pの発現が有意に上昇

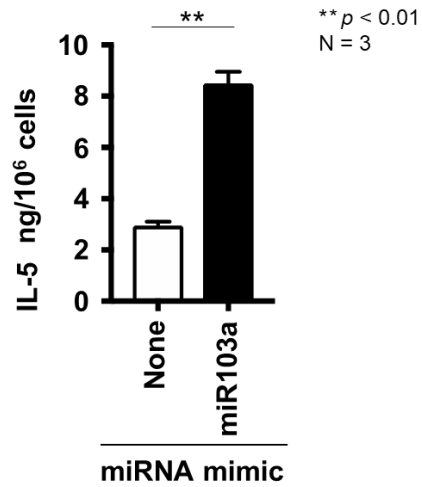


図3 miR103a-3p mimic 導入 ILC2においてIL-5産生が増強

したところ、IgEと抗IgE抗体で刺激したマスト細胞由来細胞外小胞は、ILC2のIL-5産生を有意に増強させた(図1)。⁴⁾さらに、IgEと抗IgE抗体で刺激したマスト細胞由来細胞外小胞中では、miR103a-3pの発現が有意に上昇していた(図2)。⁴⁾

(2) マスト細胞由来細胞外小胞中miR103a-3pによる2型自然リンパ球, Th2細胞からのIL-5産生制御機序の解明

miR103a-3p mimicおよびmiRNA mimic control (10nM)をILC2に導入し、各濃度のIL-33存在下で3日間培養した後、IL-5とIL-13のELISAおよびmRNAのqPCRを行ったところmiR103a-3p mimic導入ILC2においてIL-5産生が増強した(図3)。⁴⁾

次にmiR103a-3p mimicおよびmiRNA mimic controlをILC2に導入し、Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5)およびPRMT8 mRNAの発現レベルが低下するかどうかを検証するために、PRMT5およびPRMT8のqPCRを行ったところmiR103a-3p mimic導入ILC2においてPRMT5 mRNAの発現レベルが低下した(図4)。⁴⁾

miR103a-3p mimicおよびmiRNA mimic controlをILC2に導入し、ILC2のGATA3のアルギニン残基の脱メチル化の程度を解析したところmiR103a-3p mimic導入ILC2においてGATA3のアルギニン残基の脱メチル化が促進されていた。⁴⁾

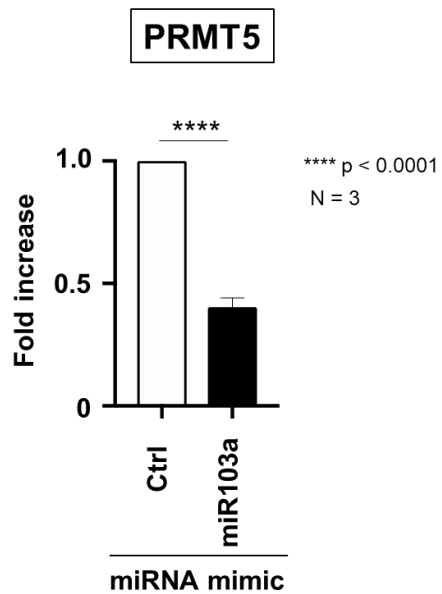


図4 miR103a-3p mimic 導入 ILC2においてPRMT5 mRNAの発現レベルが低下

4. 考察

以上の結果からIgE依存性刺激にてヒトマスト細胞から遊離させる細胞外小胞内miRNAは、刺激なしや他の刺激とは異なるmiRNAを含有し、免疫細胞機能を制御(この場合アレルギー炎症を増強)していることがわかった。実際にマスト細胞が活性化され

ているAD患者の血清中の細胞外小胞内miR103a-3pの発現が有意に増加していることを見出した。⁴⁾したがってAD患者では、患者ご自身の皮膚において好酸球炎症を増強していると考えられた。

5. 結 語

ヒトマスト細胞からIgE依存性の刺激で特異的に分泌される細胞外小胞内のmiR103a-3pがILC2に取り込まれ、Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) の発現を下げることによってGATA3のアルギニン残基の脱メチル化を起し、IL-33存在下のILC2においてIL-5 mRNA発現を増強し、IL-5産生を増加させることを見出した。これによって好酸球性炎症を増悪されることが示唆された。

謝 辞

本研究の成果は、令和3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) Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116:281-97.
- 2) Makeyev EV, Maniatis T. Multilevel regulation of gene expression by microRNAs. *Science*. 2008; 319:1789-90.
- 3) Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007; 9:654-9.
- 4) Toyoshima S, Sakamoto-Sasaki T, Kurosawa Y, et al. miR103a-3p in extracellular vesicles from FcεRI-aggregated human mast cells enhances IL-5 production by group 2 innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2021; 147: 1878-1891.