

# 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<sup>1)</sup>, 豊島翔太<sup>1)</sup>, 坂本朋美<sup>1)</sup>, 高橋恭子<sup>2)</sup>, 葉山惟大<sup>1)</sup>,  
木澤靖夫<sup>3)</sup>, 藤田英樹<sup>1)</sup>, 李賢鎬<sup>1)</sup>, 丸岡秀一郎<sup>1)</sup>

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

Yoshimichi OKAYAMA<sup>1)</sup>, Shota TOYOSHIMA<sup>1)</sup>, Tomomi SAKAMOTO<sup>1)</sup>,  
Kyoko TAKAHASHI<sup>2)</sup>, Koremasa HAYAMA<sup>1)</sup>, Yasuo KIZAWA<sup>3)</sup>,  
Hideki FUJITA<sup>1)</sup>, Hyunho LEE<sup>1)</sup>, Shuichiro MARUOKA<sup>1)</sup>

### 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2型自然リンパ球 (group 2 innate lymphoid cell: 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。

### 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。<sup>1)2)</sup> 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。<sup>3)</sup> 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 lymphoid 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。

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。

### 2. 対象及び方法

#### (1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては, 日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会に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) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

3) 日本大学薬学部

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

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's methylcellulose mediumとIMDM) で培養した。

### (3) 細胞外小胞の単離

ヒト培養滑膜マスト細胞を刺激なし、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<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CRTh2<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>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) mRNAの発現解析

mRNAの発現解析にはquantitative RT-PCR法を用いた。

### (8) タンパク質の発現解析

タンパク質の発現解析にはウエスタンブロッティング法を用いて解析をおこなった。

### (9) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

PRMT5のwild typeとmiR103a-3p結合サイトを欠損させたPRMT5を作製しmiR103a-3p mimicあるいはnonsense miRNA mimicの影響をルシフェラーゼの活性を用いて定量化した。

### (10) 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) IL-33刺激したILC2に発現するPRMT4, PRMT5およびPRMT8に対するmiR103aの影響

ILC2のIL-5, IL-13の転写はGATA3によって制御されていることが知られている。また、Hosokawaら<sup>4)</sup>は、GATA3のアルギニン残基261の脱メチル化がIL-5の転写を促進するがIL-13の転写を促進しないと報告している。そこでmiR103a-3pがILC2においてGATA3のアルギニン残基のメチル化に影響を及ぼすという仮説を立てた。miR103a-3pはprotein arginine methyltransferase (PRMT) familyの4, 5および8の3'UTRに作用できることがin silicoの検索から判明したのでこれら酵素がIL-33刺激したILC2に発現しているかを検討した。図1の如くPRMT4の発現は低くmiR103a-3pの影響はなかった。PRMT5はIL-33によって発現が増強するがmiR103a-3pの添加によって有意に発現が抑制された。PRMT8はILC2において発現が見られなかった。

### (2) IgE依存性刺激後にヒトマスト細胞から遊離される細胞外小胞のIL-33刺激したILC2に発現するGATA3のアルギニン残基のメチル化 (symmetric dimethyl-arginine : SDMA) とPRMT5の発現に対する影響

次にmiR103a-3pの影響がPRMT5への直接作用かどうか調べるためにルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったPRMT5のwild typeとmiR103a-3p結合

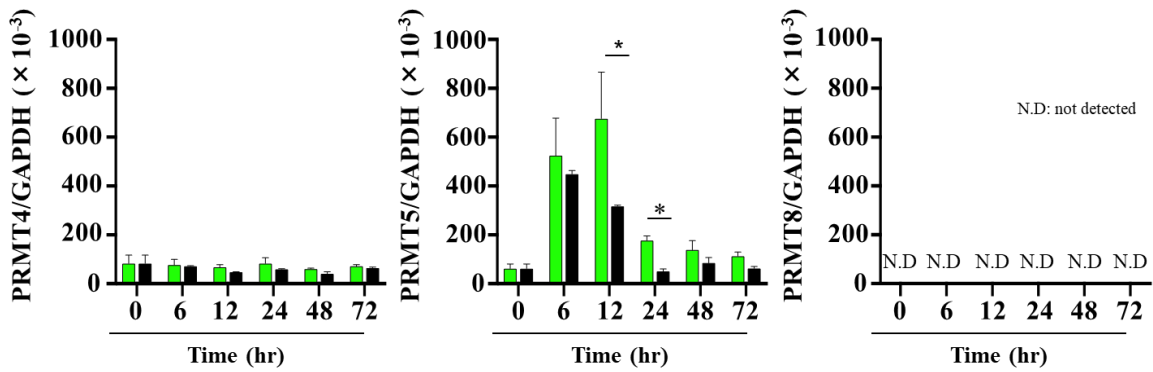


図 1 IL-33 刺激した ILC2 に発現する PRMT4, PRMT5 および PRMT8 に対する miR103a の影響。時間は IL-33 刺激時間。緑のバーが miR103a-3p の添加なし。黒が添加あり。

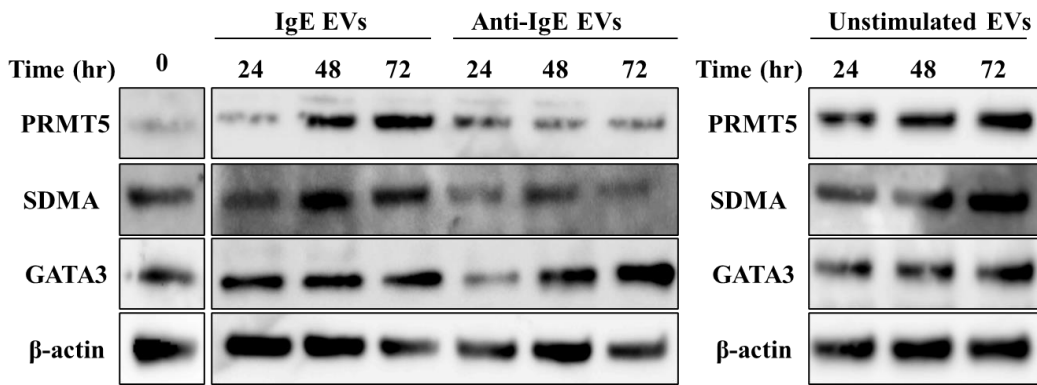


図 2 IgE 依存性刺激後にヒトマスト細胞から遊離される細胞外小胞の IL-33 刺激した ILC2 に発現する GATA3 のアルギニン残基のメチル化 (symmetric dimethyl-arginine : SDMA) と PRMT5 の発現に対する影響

サイトを欠損させた PRMT5 を作製し miR103a-3p mimic あるいは nonsense miRNA mimic の影響を調べたところ miR103a-3p 結合サイトを欠損させた PRMT5 においては miR103a-3p によるルシフェラーゼ活性の低下が抑制され miR103a-3p の影響が PRMT5 への直接作用と確認された。

実際に IgE 依存性刺激後にヒトマスト細胞から遊離される細胞外小胞が IL-33 刺激した ILC2 に発現する GATA3 のアルギニン残基のメチル化に影響を及ぼすかどうかウエスタンブロッティング法を用いて検討した。IgE 依存性刺激後にヒトマスト細胞から遊離される細胞外小胞を IL-33 刺激した ILC2 に添加 24-72 時間後に GATA3 のアルギニン残基のメチル化 (SDMA) は減弱し PRMT5 の発現は低下した (図 2)。

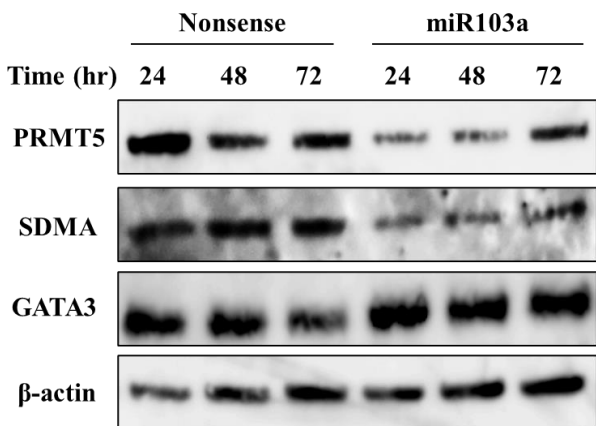


図 3 miR103a-3p の IL-33 刺激した ILC2 に発現する GATA3 のアルギニン残基のメチル化への影響

GATA3タンパクの発現量には影響はなかった。

(3) miR103a-3pのIL-33刺激したILC2に発現するGATA3のアルギニン残基のメチル化への影響  
次にmiR103a-3pが直接IL-33刺激したILC2に発現するGATA3のアルギニン残基のメチル化を減弱させるかを検討した。図3の如くmiR103a-3pが直接IL-33刺激したILC2に発現するGATA3のアルギニン残基のメチル化を減弱させ、PRMT5の発現を低下させた。

(4) IL-33刺激したILC2からのIL-5産生に対するPRMT5の発現低下の影響  
最後にPRMT5の発現を減弱させるとIL-5の産生が増加するかについて検討を行った。IL-33刺激したILC2にshRNAの技術を用いてPRMT5の発現を低下させると図4のように確かにIL-5の産生は増加するがIL-13の産生には影響がないことが分かった。

#### 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

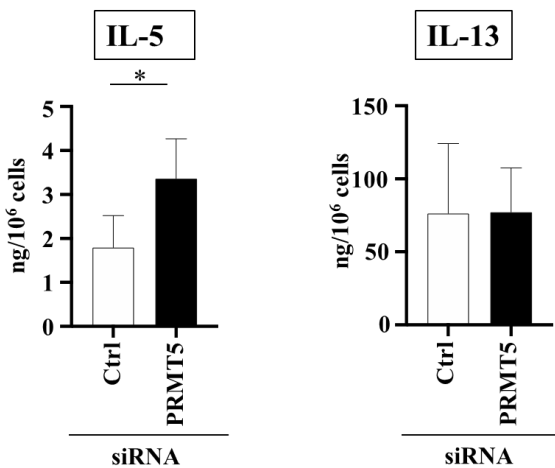


図4 IL-33刺激したILC2からのIL-5産生に対するPRMT5の発現低下の影響

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。<sup>5)</sup>したがってAD患者では、患者の全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、4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, 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; 9:654-9.
- 4) Hosokawa H, Kato M, Tohyama H, Tamaki Y, Endo Y, Kimura MY, et al. Methylation of Gata3 protein at Arg-261 regulates transactivation of the Il5 gene in T helper 2 cells. *J Biol Chem* 2015; 290:13095-103.
- 5) Toyoshima S, Sakamoto-Sasaki T, Kurosawa Y, Hayama K, Matsuda A, Watanabe Y, Terui T, Gon Y, Matsumoto K, Okayama Y: miR103a-3p in extracellular vesicles from Fc ε RI-aggregated human mast cells enhances IL-5 production by group 2 innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol* 2021; 147: 1878-1891.