

# FcεRI の凝集により活性化したヒトマスト細胞が遊離する細胞外小胞中の miR103a-3p は、2 型自然リンパ球からの IL-5 産生を増強させる

## miR103a-3p in extracellular vesicles from FcεRI aggregated human mast cells enhances IL-5 production from type2 innate lymphoid cells

豊島翔太<sup>1), 2), 3)</sup>, 坂本朋美<sup>1), 2), 3)</sup>, 黒澤雄介<sup>3), 4)</sup>, 葉山惟大<sup>3), 5)</sup>, 松田 彰<sup>6)</sup>, 渡部保男<sup>6)</sup>, 照井 正<sup>3), 5)</sup>, 権 寧博<sup>3), 4)</sup>, 松本健治<sup>7)</sup>, 岡山吉道<sup>1), 3), 4)</sup>

Shota TOYOSHIMA<sup>1), 2), 3)</sup>, Tomomi SAKAMOTO-SASAKI<sup>1), 2), 3)</sup>, Yusuke KUROSAWA<sup>3), 4)</sup>, Koremasa HAYAMA<sup>3), 5)</sup>, Akira MATSUDA<sup>6)</sup>, Yasuo WATANABE<sup>6)</sup>, Tadashi TERUI<sup>3), 5)</sup>, Yasuhiro GON<sup>3), 4)</sup>, Kenji MATSUMOTO<sup>7)</sup>, Yoshimichi OKAYAMA<sup>1), 2), 3)</sup>

<sup>1)</sup>日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、<sup>2)</sup>日本大学医学部 医学教育センター、<sup>3)</sup>日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、<sup>4)</sup>日本大学医学部 内科学系呼吸器内科、<sup>5)</sup>日本大学医学部 皮膚科学系皮膚科学分野、<sup>6)</sup>順天堂大学 眼科、<sup>7)</sup>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

### [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) の相互作用が、アレルギー疾患の増悪化に重要な役割を果たす。近年、細胞が遊離する細胞外小胞 (Extracellular Vesicles: EVs) は、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、MCs と ILC2 において、EVs を介する相互作用はまだ言及されていなかった。IgE 依存性に活性化したマスト細胞から遊離された EVs は、ILC2 からの 2 型サイトカインの一つである IL-5 の産生を有意に増強させた。この EVs には、miRNA の一つである miR103a-3p の発現が特異的に増加していた。この miR103-3p 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 中では、miR103a-3p の発現が有意に高知であった。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。(図 1)

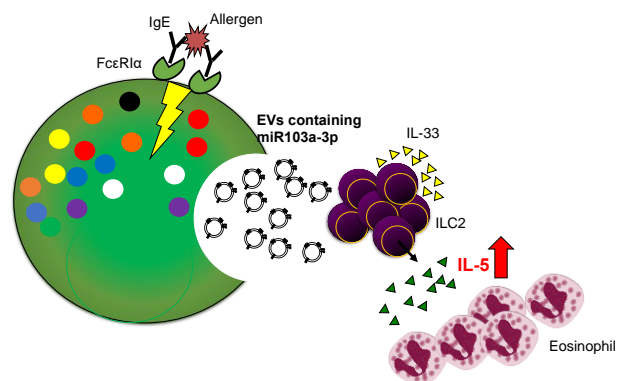


図1. IgE依存性に活性化したマスト細胞から遊離されるEVsは、IL-5産生を増強させ、好酸球性炎症を増悪化させている

### [背景]

IgE 依存性に活性化した MCs は、ヒスタミン、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し、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。<sup>1),2)</sup> 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。<sup>3),4)</sup> 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。<sup>5)</sup> 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。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。<sup>6),7)</sup> 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 の役割はまだ言及されていない。

## [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 の機能に及ぼす影響を検証することを目的とした。

## [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 (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 もしくは IgE+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 そして 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) 統計解析  
3 群以上の統計解析は two-way analysis of variance (ANOVA) および Turkey's multiple comparison test もしくは one-way ANOVA および Turkey's multiple comparison test で行った。臨床データの 2 群間比較は、Mann-Whitney U test。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。

## [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 (図 2)。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 (図 3)。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 の過剰発現は、GATA3 の脱メチル化も増強した。また、アトピー患者血清中 EVs の miR103a-3p の発現レベルは、健常コントロール血清中の EVs の miR103a-3p の発現レベルよりも有意に高値であった (図 4)。

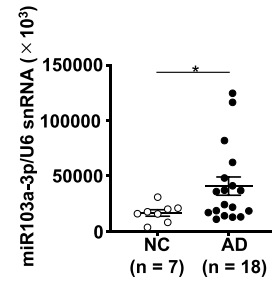


図4. アトピー性皮膚炎患者におけるmiR103a-3pの発現

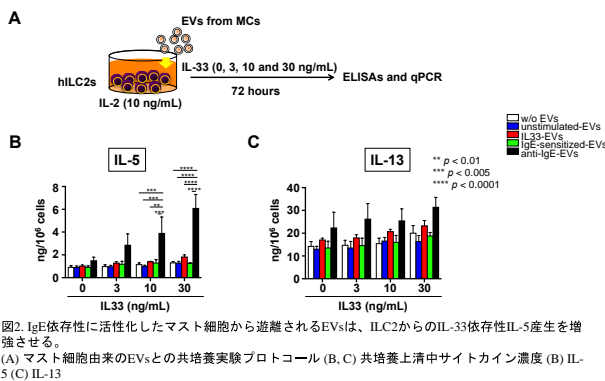


図2. IgE依存性に活性化したマスト細胞から遊離されるEVsは、ILC2からのIL-33依存性IL-5産生を増強させる。(A) マスト細胞由来のEVsとの共培養実験プロトコル (B, C) 共培養上清中サイトカイン濃度 (B) IL-5 (C) IL-13

## [結論]

IgE 依存性に活性化されたマスト細胞由来の EVs 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に寄与している可能性が考えられた。

## [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示唆された。さらに、EVs 中の miR103a-3p は、アトピー性皮膚炎の発症・増悪化に関与している可能性が考えられた。

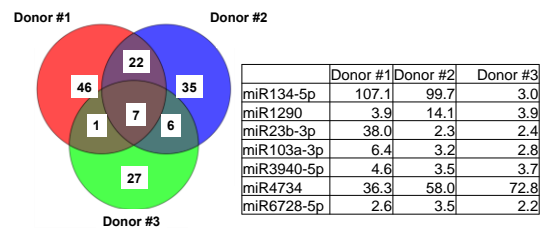


図3. IgE依存性に活性化したマスト細胞から遊離されるEVs特異的なmiRNA  
IgE感作したマスト細胞から遊離されたEVs中のmiRNAの発現を"1"とした時、IgE + anti-IgE Absで刺激したマスト細胞から遊離されたEVs中のmiRNAの発現

### [参考文献]

- <sup>1)</sup> Galli SJ, Tsai M: IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med.* 2012; 18: 693-704.
- <sup>2)</sup> Liu FT, Goodarzi H, Chen HY: IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011; 41: 298-310.
- <sup>3)</sup> Artis D, Spits H: The biology of innate lymphoid cells. *Nature.* 2015; 517: 293-301.
- <sup>4)</sup> Mjösberg J, Spits H: Human innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2016; 138: 1265-1276.
- <sup>5)</sup> 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 chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133: 1184-1194.
- <sup>6)</sup> 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.
- <sup>7)</sup> Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu 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.