

ニッポンハム食の未来財団 平成 28 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	膜小胞「エクソソーム」を介した経口免疫寛容誘導機構の解析
フリガナ	アオキ アヤコ
代表者名	青木 綾子
所属機関（機関名） （役職名）	東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 食糧化学研究室 特任助教
本助成金による発表論文，学会発表	

研究結果要約

経口免疫寛容は、経口的に摂取した抗原に対し全身の免疫応答が抑制される機構のことであり、その破綻は食物アレルギー発症に関与すると考えられている。このため、経口免疫寛容誘導を強化できれば食物アレルギーを予防・治療できる可能性がある。エクソソームは、血液・尿・母乳などの体液中を循環する 50～90 nm の膜小胞のことで、体内の離れた細胞や組織に情報を伝達し、生体機能を調節する役割を担っている。腸管上皮細胞から分泌されるエクソソームには、MHC class II 分子が発現しており、T 細胞への抗原提示に関わっていることが明らかになっているなど、エクソソームは経口免疫寛容誘導に寄与していると考えられている。そこで本研究では、経口免疫寛容におけるエクソソームの役割を解明することを目的とし、卵白アルブミンを投与したマウス血清由来エクソソーム（OVA エクソソーム）が免疫応答に及ぼす影響を解析した。その結果、OVA エクソソームは完全フロイントアジュバントをアジュバントとする免疫応答に対しては、Th2 応答を活性化し、DTH 反応を抑制する一方、抗体応答を高めることを明らかにした。一方、アラムをアジュバントとする免疫応答に対しては、抗体応答を抑制し、Th2 応答を抑制する方向に働く可能性が示唆された。以上より、OVA エクソソームは用いるアジュバントによって異なる免疫調節作用を発揮することが明らかになった。

研究目的

乳幼児における食物アレルギーはその発症頻度が高く問題となっている。乳幼児にとっては乳や卵といった高栄養食品がアレルゲンになりやすく、複数の食物アレルギーに罹患した場合に栄養不足に陥る危険性がある。そのため、食物アレルギーをもつ乳幼児にとっては早い時期の寛解が望まれており、アレルゲン除去のみに頼らない対処が重要となる。また、食物アレルギーを発症した乳幼児は、その後高い確率でアトピー性皮膚炎や喘息など一連のアレルギーを発症することが知られており、食物アレルギーに対しては早期寛解とともにその予防が重要である。

経口免疫寛容とは、経口的に摂取した抗原に対し全身の免疫応答が抑制される機構のことであり、その破綻は食物アレルギー発症に関与すると考えられている。このため、経口免疫寛容誘導を強化できれば食物アレルギーを予防・治療できる可能性がある。経口免疫寛容誘導には、抗原特異的 T 細胞のアポトーシスや不応答化、抑制性 T 細胞の誘導が関係することが知られているが、その誘導機構に関しては完全には解明されていない。

エクソソームは、血液・尿・母乳などの体液中を循環する 50~90 nm の膜小胞のことで、体内の離れた細胞や組織に情報を伝達し、生体機能を調節する役割を担っている。エクソソームは異種細胞に mRNA や microRNA を運搬するなど、核酸による細胞間情報伝達に寄与する¹⁾。腸管上皮細胞から分泌されるエクソソームには、MHC class II 分子が発現しており、T 細胞への抗原提示に関わっていることが明らかになっているなど²⁾、エクソソームは経口免疫寛容誘導に寄与している可能性が考えられる。そこで本研究では、経口免疫寛容におけるエクソソームの役割を解明することを目的とした。

研究計画及び研究手法

1. 食物抗原を投与したマウス由来の血清エクソソームが遅延型過敏反応(DTH)に与える影響

BALB/c マウスに卵白アルブミン (OVA) を 0.1%~10%含有する水を 1 日自由飲水させた。血液を採取し Total Exosome Isolation kit (Invitrogen)を用いて血清エクソソームを精製した (OVA エクソソーム)。精製した OVA エクソソームを静脈経路でレシピエントの BALB/c マウスに移入した。移入後、OVA を完全フロイントアジュバント (CFA) とともにマウス尾基底部に免疫し、10 日後に、足に OVA を投与することで DTH 反応を誘導した。48 時間後の足の腫れを比較することで、DTH 反応に対する血清エクソソームの移入効果を検討した。

2. 食物抗原を投与したマウス由来の血清エクソソームが、抗体産生応答に与える影響

1 と同様の方法により、OVA 投与マウスから血清エクソソームを精製した。OVA エクソソームをレシピエントの BALB/c マウスの尾静脈に 3 回移入した。移入開始から 7 日後、さらにその 14 日後

に OVA をアジュバントとともにマウス腹腔に 2 度免疫した。アジュバントは CFA/IFA とアラム (Alum) を検討した。最後の免疫から 1 週間後に採血を行い、ELISA により OVA 特異的抗体量を測定した。

3. 血清エクソソームの T 細胞への抗原提示機構の解明

DO11.10 マウスは、OVA に特異的な T 細胞を有するトランスジェニックマウスで、このマウスの遺伝的背景は BALB/c マウスと同じである³⁾。DO11.10 マウスから脾臓細胞を調製し、1 と同様の方法で精製した OVA エクソソームの添加が、*in vitro*において DO11.10 マウス脾臓細胞の増殖およびサイトカインの IL-4、IL-10、IFN- γ 産生に与える影響を調べた。計画ではその後、脾臓細胞から抗原提示細胞を調製し、その存在下および非存在下において、血清エクソソームが OVA 特異的 T 細胞の増殖およびサイトカイン産生に与える影響を調べる予定であった。さらに、血清エクソソームの抗原提示機構に抗原提示細胞が必要であることが明らかになった場合には、血清エクソソームを蛍光標識し、どの抗原提示細胞にエクソソームが取り込まれるかをフローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡観察により明らかにすることを予定していた。しかし、OVA エクソソームに対する DO11.10 マウス由来脾臓細胞の応答が観察できなかったため、これらは実施しなかった。一方で、エクソソーム自体が T 細胞応答に与える影響がわかっていなかったため、その影響を検討した。T 細胞を anti-CD3/anti-CD28 で刺激した場合と T 細胞と抗原提示細胞 (APC) を共培養し anti-CD3 で刺激した際の T 細胞応答に与えるエクソソームの添加効果を検討した。なお、CD63 (エクソソームのマーカー) や A33 (腸管上皮細胞由来エクソソームのマーカー)、MHC クラス II 等の抗体ビーズを用いてエクソソーム精製画分から当該分子を有する膜小胞を除去し、これを 1~3 の試験に用いることで、各試験における免疫応答を誘導する成分がエクソソームであることを確認するとともに、免疫応答を誘導する膜小胞の特徴を明らかにすることを予定していたが、実施にはいたらなかった。

結果と考察

本助成研究の結果

1. 食物抗原を投与したマウス由来の血清エクソソームが DTH に与える影響

OVA エクソソームは、エクソソームを移入しなかった BALB/c マウスに比べ、OVA 投与濃度 0.1% と 1% で足の腫れを有意に抑制した (図 1)。DTH 反応は、Th1 細胞によって起こる反応である。我々はこれまでに OVA エクソソームの移入により、CFA で OVA を免疫した際のリンパ節のサイトカイン応答が、Th1 系から Th2 系に傾くという結果を得ている。これらの結果から、OVA エクソソームは CFA による免疫を修飾し、T 細胞分化を Th1 から Th2 に傾けることで DTH 反応を抑制していることが示唆された。

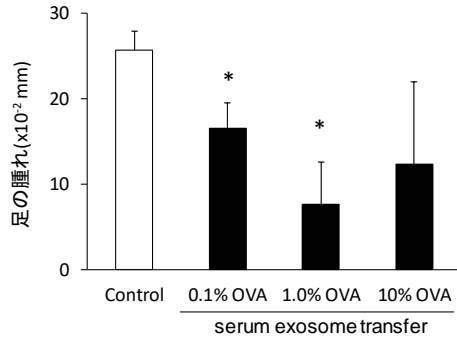


図1. 卵白オボアルブミン (OVA) を投与したマウス由来の血清エキソソームがDTH反応に与える影響

(A) Control群(血清エキソソームを移入していない群、さらにマウスに投与したOVA水の濃度に対応して、OVA 0.1%群、OVA 1.0%群、OVA 10%群、あわせて4群を用意した。実験開始1,3,5日目の3回にわたり、尾静脈よりOVAエキソソームを移入した。7日目に、CFAとともにOVAを尾基底部に注射した。17日目に、PBSを左の足せぎに、OVA/PBS(-)を右の足せぎに注射した。48時間後に左右の足の厚みの差を測定し、足の腫れとして評価した。各群の平均値+SDを示した。有意差の検定は、Student's *t* test法を用いてcontrol群との間で検定した。(n=4, *: $p<0.05$)

(B)。この結果は用いるアジュバントによって、OVAエキソソームが抗体応答に与える影響が異なることを示しており大変興味深い。抗原特異的抗体応答にはTh2細胞が介在することが知られている。そのため、CFAをアジュバントとして用いた場合には、OVAエキソソームによりTh2細胞が活性化されていることが示唆される。これは1のDTHに対するOVAエキソソームの実験結果とよく一致する。一方、Alumを用いた場合にはOVAエキソソームにより、Th2細胞応答が抑制されている可能性がある。一般的に、Th1応答を活性化する場合にはCFAを、Th2応答を活性化する場合にはAlumを用いるが、OVAエキソソームはアジュバントの効果を打ち消す方向に免疫を修飾することが示唆された。

3. 血清エキソソームのT細胞への抗原提示機構の解明

1、2の実験から、OVAエキソソームは抗原特異的な免疫応答を修飾していることが示されたが、このような調節には、抗原特異的なT細胞が関与していることが強く示唆される。さらに、腸管上皮細胞由来のエキソソームがMHCクラスII分子と抗原の複合体を形成し、免疫応

2. 食物抗原を投与したマウス由来の血清エキソソームが、抗体産生応答に与える影響

経口免疫寛容誘導では、抗原特異的抗体応答が抑制されることが知られていることから、OVAエキソソームが、抗原特異的な抗体の産生に与える影響について検討した。その結果、OVAエキソソームの移入は、Alumアジュバントを用いた場合には、OVA特異的IgG抗体応答を抑制した(図2-A)。一方で、CFA/IFAを用いた場合には、OVA特異的IgG抗体応答を高めた(図2

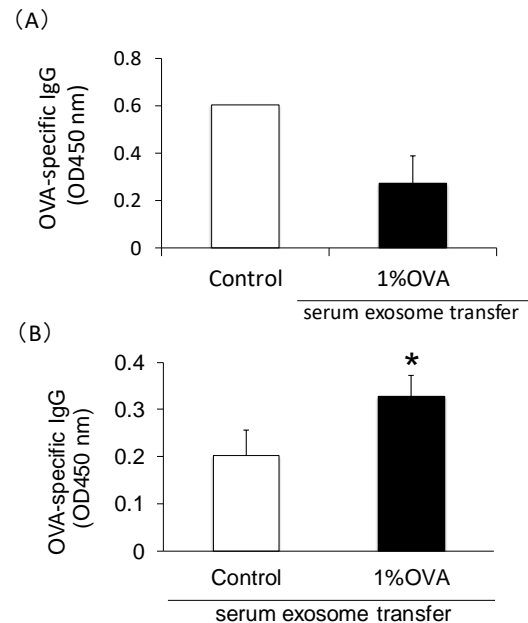


図2. OVAエキソソームの移入がマウス血中OVA-specific IgG抗体価に与える影響

1%OVAは1.0%OVA水を投与したマウスの血清エキソソームを移入した群。実験開始1,3,5日目の3回にわたり、尾静脈よりOVAエキソソームを移入した。(A)7日目、21日目に、アルミニウムゲルとともにOVAを腹腔注射した。(B)7日目にOVA/CFAを、21日目にOVA/IFAを腹腔注射した。(A,B)28日目に血清を採取し、OVA特異的IgG抗体価をELISAを用いて測定した。各群の平均値+SDを示した。有意差の検定は、Student's *t* test法を用いてcontrol群との間で検定した。(n=4, *: $p<0.05$) (A) Control群:血清をpoolした値

答を起こすという報告がある⁴⁾。よって、OVA エキソソームは抗原特異的 T 細胞を誘導する可能性が高いと考えられた。そこで、OVA 特異的な TCR を持つ DO11.10 マウスの脾臓細胞を用い、OVA エキソソームが抗原特異的な T 細胞の応答を誘導するか検討した。その結果、予想外に、OVA エキソソームは、細胞の増殖応答 (図 3-A)、IL-4 (図 3-B)、IL-10 (図 3-C) 及び IFN- γ (図 3-D) のサイトカイン応答について、ほとんど何の影響も示さなかった。DO11.10 マウスがもつ TCR は OVA ペプチドの 323-339 残基を特異的に認識するため、OVA がエキソソーム上に抗原提示されていたとしても、OVA の 323-339 残基以外の部分が抗原提示されているために、T 細胞の増殖を引き起こすことができないという可能性が考えられた。

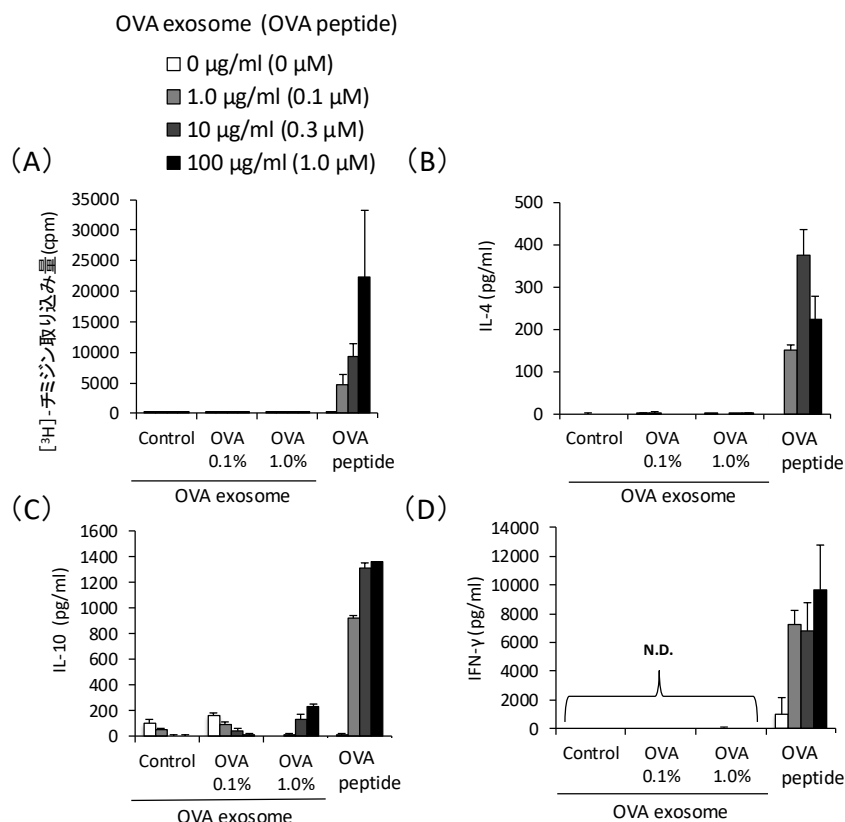


図3. OVAエキソソームがDO11.10マウス由来脾臓細胞の応答に与える影響

(A)増殖応答、(B)IL-4量、(C)IL-10量、(D)IFN- γ 量。各群の平均値+SDを示す。凡例の濃度はエキソソーム溶液中のタンパク質濃度を表し、()内の濃度はポジティブコントロールとして加えたOVAペプチドの濃度を表す。IFN- γ については、ポジティブコントロール以外のサンプルについては検出できなかった(N.D.)。

一方、本研究では、エキソソーム自体が T 細胞応答を調節しているという可能性も考え、T 細胞の単独培養と、T 細胞と APC の共培養に与えるエキソソームの添加効果を検討した。その結果、非常に興味深いことにエキソソームは抗原非特異的に、T 細胞単独の場合はその応答を増強させ、APC

と共培養の場合は T 細胞応答を抑制することがわかった (図 4 -A, B, C, D)。この結果から、エクソソームには、T 細胞を直接活性化する作用がある一方で、APC に対しては T 細胞を抑制するよう働きかけているという非常に複雑な免疫調節作用を有することが示唆された。この作用機構に関しては現時点ではまったく分かっていない。また、OVA エクソソームが DO11.10 マウス由来脾臓に対して T 細胞応答を誘導できなかった原因に関しては、上述の可能性とともに、エクソソーム自体が APC を介して、非特異的に T 細胞応答を抑制してしまっているという可能性も考えられる。

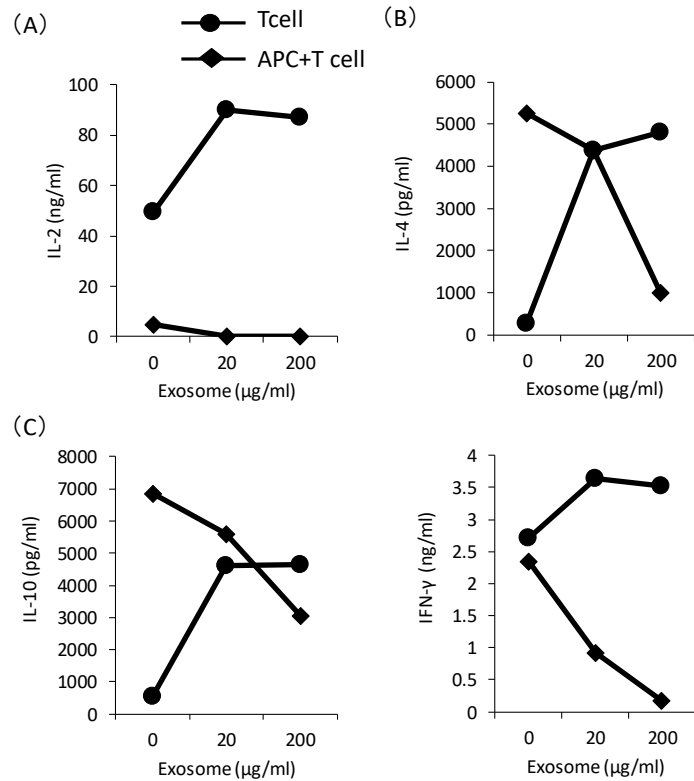


図4. T細胞の単独培養およびT細胞とAPCの共培養に与えるエクソソームの添加効果 (A)IL-2量、(B)IL-4量、(C)IL-10量、(D)IFN-γ量。各群の平均値+SDを示す。●: T細胞のみ、◆: T細胞とAPCの共培養を示す。

本助成研究で、所期の結果は得られたか？また、残された課題

本研究では、所期の目的に従い、OVA エクソソームが免疫応答に与える影響を解析し、OVA エクソソームが抗原特異的に免疫応答を修飾することを明らかにした。その修飾は、興味深いことに、用いるアジュバントの効果を打ち消す方向に働いていることが示唆された。その作用機構に OVA エクソソームによる抗原特異的な T 細胞の誘導が関わっているかについて検討したが、出産に伴う研究の中止期間もあり、そこに関しては明らかにすることができなかった。

学会や論文発表等の予定

これまでに得られた成果に関しては食品免疫学会での発表を予定している。また、OVA エクソソームの作用機構の解明をもって、論文として取りまとめる予定である。

今後の研究活動について

今後の研究方針

本研究では、OVA エクソソームが抗原特異的に免疫応答を修飾することを明らかにしたが、その作用機構については、あきらかにできていない。そこで、まずは、DO11.10 マウス脾臓から T 細胞

のみを調製し、OVA エキソソームが T 細胞応答を誘導できるか、再度検討する予定である。OVA エキソソームが T 細胞応答を誘導できることが確認できた場合には、誘導された T 細胞の性質を調べることで、OVA エキソソームによる免疫の修飾が、誘導される T 細胞により引き起こされるのかについて明らかにしたいと考えている。また、本研究により、エキソソームが APC を介して T 細胞応答を抑制している可能性が見出されことから、これがどのような機構により引き起こされているのか、またこの効果は生体においても認められるのかということについても検討したいと考えている。

今後の研究活動

これらのエキソソームに関する基礎的な知見を増やしていくことで、エキソソームを基盤とする食物アレルギー予防方法の研究につなげていきたい。

参考文献

- 1) Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):654-9.
- 2) Van Niel G, Mallegol J, Bevilacqua C, Candalh C, Brugière S, Tomaskovic-Crook E, Heath JK, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut.* 2003 Dec;52(12):1690-7.
- 3) Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes in vivo. *Science.* 1990 Dec;21,250(4988):1720-1723.
- 4) Van Niel G, Mallegol J, Bevilacqua C, Candalh C, Brugière S, Tomaskovic-Crook E, Heath JK, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut.* 2003 Dec;52(12): 1690-1697.

以上