

主論文の要旨

Macrophage-derived extracellular vesicles regulate concanavalin A-induced hepatitis by suppressing macrophage cytokine production

マクロファージ由来細胞外小胞はマクロファージにおけるサイトカイン産生の抑制を介してコンカナバリンA誘発性肝炎の病態を調節する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
分子医薬学講座 トキシコゲノミクス分野

(指導：横井 毅 教授)

川田 玲央

【緒言】

急性肝不全は重度の肝機能障害を伴う臨床症候群であり、死亡率は約 30%に至る。急性肝不全の主な原因の一つとして自己免疫性肝炎が挙げられる。自己免疫性肝炎の標準的治療法は免疫抑制療法であるが、ほとんどの免疫抑制剤において副作用が問題となっている。細胞外小胞 (Extracellular vesicles, EVs) は細胞から分泌される直径 50 – 200 nm の小胞であり、包含する RNA やタンパク質等分子を細胞間で輸送することで細胞間情報伝達において重要な役割を果たしている。近年、EVs がこれら包含分子の細胞間輸送を介して様々な疾患における免疫反応を調節することが報告されており、治療標的やツールとして注目を集めている。コンカナバリン A (Con A) 誘発性肝炎マウスは自己免疫性肝炎モデルとして広く用いられている。Con A は肝臓中マクロファージ細胞や T 細胞を刺激し、炎症性サイトカイン産生を促すことで肝炎を誘発する。本研究では、自己免疫性肝炎に対する新たな治療戦略としての EVs の可能性を明らかにするため、Con A 肝炎モデルマウスにおける EVs の免疫調節作用の関与を検討した。

【方法】

Con A 15 mg/kg を雌 BALB/c マウスに単回静脈内投与することで急性肝炎を誘発し、血清中 EVs を超遠心法により単離した。また、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞あるいはマウス肝癌由来細胞株である Hepa1-6 細胞に Con A を処置し、培養上清中 EVs を超遠心法により単離した。これら EVs サンプル中の粒子数を Nano Tracking Analysis により測定し、Con A 処置による放出 EVs 数の変動を検討した。また、*in vitro* においてこれら EVs 前処置が Con A 刺激 RAW264.7 細胞における炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。加えて、EVs 中の炎症性サイトカイン産生調節因子を同定するため、miRNA-seq 解析によりこれら EVs 及び *in vitro* EVs 処置 RAW264.7 細胞における miRNA レベルの変動を網羅的に解析し、変動 miRNAs の予測標的遺伝子セットを用いたパスウェイエンリッチメント解析を行った。さらに shRNA 発現アデノウイルスベクターを用いて EVs 分泌促進因子である RAB27A をノックダウンした際の、Con A 肝炎モデルマウスにおける肝障害グレードへの影響を検討した。

【結果】

Con A 肝炎モデルマウスにおいて、血清 EVs 数が有意に増加した。また *in vitro* 実験において、Con A 処置により RAW264.7 細胞の分泌 EVs 数は有意に増加したが、Hepa1-6 細胞においては変動しなかった。Con A 肝炎モデルマウス血清 EVs (Serum Con A EVs) あるいは Con A 処置 RAW264.7 細胞分泌 EVs (RAW Con A EVs) を RAW264.7 細胞へ処置することにより、EVs が細胞内に取り込まれ、Con A 刺激による炎症性サイトカイン (interleukin-6, interleukin-1 β 及び tumor necrosis factor- α) の細胞内 mRNA レベル及び培養上清中タンパク質レベルの増加が抑制された。miRNA-seq

解析の結果、Serum Con A EVs 及び RAW Con A EVs 中の mmu-miR-122-5p 及び mmu-miR-148a-3p レベルが、各媒体処置群から単離した EVs 中と比較して顕著に高いことが示された。また、Serum Con A EVs あるいは RAW Con A EVs 処置により、RAW 264.7 細胞中に両 miRNAs が取り込まれ、有意に増加することが示された。これら miRNAs の標的遺伝子予測及びパスウェイエンリッチメント解析の結果、いくつかの炎症性サイトカイン産生パスウェイが抽出された。これらパスウェイ上の標的遺伝子である mitogen-activated protein kinase kinase 1, mitogen-activated protein kinase kinase 13, AKT serine/threonine kinase 3 及び Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1 の mRNA レベルは Serum Con A EVs あるいは RAW Con A EVs 処置 RAW 264.7 細胞において有意に減少した。また肝臓における RAB27A のノックダウンにより、Con A 肝炎モデルマウスにおける肝障害が有意に増悪した。

【考察】

Con A 処置により RAW264.7 細胞分泌 EVs 数が増加したことから、Con A 肝炎モデルマウス血清中で増加した EVs の由来細胞がマクロファージ細胞であることが示唆された。Serum Con A EVs あるいは RAW Con A EVs の細胞内への取り込みにより RAW264.7 細胞における炎症性サイトカインの産生が抑制されたことから、*in vivo* Con A 肝炎においてもマクロファージ由来 EVs が炎症性サイトカイン産生調節作用を介して病態調節に関与していることが示唆された。Serum Con A EVs 及び RAW Con A EVs 中の mmu-miR-122-5p 及び mmu-miR-148a-3p レベルが高く、これら EVs 処置 RAW264.7 細胞においても両 miRNAs が有意に増加したことから、Con A 肝炎時、マクロファージ細胞間でこれら miRNAs が EVs を介して輸送されることが示唆された。また、Serum Con A EVs あるいは RAW Con A EVs 処置 RAW264.7 細胞において炎症性サイトカイン産生パスウェイ上の miRNAs 標的遺伝子発現が抑制されたため、これら miRNAs が炎症性サイトカイン産生抑制因子であることが示唆された。*in vivo* においても EVs 分泌促進因子 RAB27A のノックダウンにより Con A 肝炎が増悪し、EVs が Con A 肝炎病態調節に関与していることが示された。

【結論】

マクロファージ由来 EVs が包含 miRNAs の細胞間輸送による炎症性サイトカイン産生調節を介して、Con A 誘発性肝炎の病態調節に重要な役割を果たすことが示唆された。本研究により、EVs は自己免疫性肝炎の治療標的として有用となりうることを示された。