93　エクソソームによる自然免疫制御の新規メカニズム解明	押海　裕之

【目的】自然免疫は感染初期の生体防御に必須であり、炎症応答やナイーブT細胞のプライミングを介して獲得免疫系を活性化させる。一方で、近年宿主細胞から放出されるエクソソームと呼ばれる細胞外小胞が機能的なRNA等を運び細胞間情報伝達を担うことが明らかとなってきたが、その自然免疫に於ける役割については不明である。

本研究では、細胞間情報伝達を担うエクソソームが、自然免疫応答に果たす役割とそのメカニズムを明らかにすることで、自然免疫の新規メカニズムを解明することを目的とする。

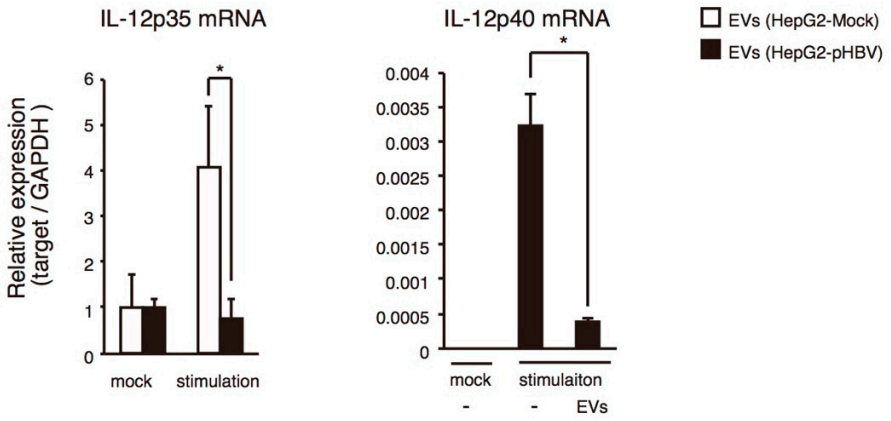
【方法】B型肝炎ウイルス（Hepatitis B virus: HBV）感染時の自然免疫応答について、感染ウイルス粒子とヒト肝細胞を用いた試験管内の実験を実施した。また、マウスへのインフルエンザウイルス感染実験による生体内での解析に加え、健常人由来の血清と、ヒト末梢血単核細胞、ヒトマクロファージ細胞株などを用い、エクソソームが自然免疫応答に果たす役割について検討した。

【結果】HBVやインフルエンザウイルスを用いた研究から以下の事実を発見した。1. HBVは、感染肝細胞から放出されるエクソソームを介して宿主IL-12産生を抑制する、2. インフルエンザウイルス感染時には、血清のエクソソーム内のmiR-451a量が増加する、3. エクソソーム内のmiR-451aはマクロファージのサイトカイン産生を抑制する。

また、ヒト血清を用いた実験から下記の事実を明らかとした。1. ヒト血清細胞外小胞内のmiR-451a量は健常人では約10倍程度の個人差がある、2. miR-451a量の変化が、マクロファージの応答性を制御する。

上記の研究成果から、ウイルス感染時の自然免疫応答において細胞外小胞が重要な役割をしていることが明らかとなった。特に、宿主の自然免疫は細胞外小胞を利用して感染細胞内のウイルスRNAを検出するのに対し、ウイルスは細胞外小胞を介して自然免疫応答を制御することが明らかとなった。

ウイルス感染細胞から放出されるエクソソームによるサイトカイン産生制御



93. エクソソームによる自然免疫制御の新規メカニズム解明

押海　裕之

熊本大学 大学院生命科学研究部 免疫学分野

Key words : 自然免疫，ウイルス，細胞外小胞，エクソソーム，サイトカイン

緒　言

自然免疫は感染初期の生体防御に必須の役割を果たす。ウイルス感染初期にはマクロファージや樹状細胞などが Toll 様受容体や RIG-I 様受容体を介してウイルス由来の RNA を認識し、炎症性サイトカインとしての IL-6 や IL-12 に加えて I 型インターフェロンなどの産生も誘導する［1］。一方で、近年様々な宿主細胞から放出されるエクソソームと呼ばれる細胞外小胞には mRNA や microRNA などの機能的な RNA が含まれ、これを細胞から細胞へと伝達する役割を果たすことが明らかとなってきた。しかし、細胞外小胞が自然免疫応答にどのような影響を与えるのかはまだ十分には解明されていない。

我々は、このような細胞外小胞が自然免疫に与える影響について調べるため、まず、ヒトの肝がんの主要な原因である C 型肝炎ウイルス（Hepatitis C virus: HCV）に対する自然免疫応答について調べたところ、HCV 感染肝細胞から放出されるエクソソームには C 型肝炎ウイルス由来の RNA が含まれ、これが、通常型樹状細胞のエンドソーム内に存在する TLR3 分子により認識され、I 型インターフェロン産生を含む自然免疫応答が惹起されることを発見した［2］。

このように、エクソソームがウイルス感染時の自然免疫応答に於いて重要な役割を果たすことに着目し、我々はB型肝炎ウイルス（Hepatitis B virus: HBV）や季節性インフルエンザウイルス（Influenza A virus）に対する自然免疫応答でもエクソソームがどのような役割を果たすのかについて詳細に調べることで、ウイルス感染時の自然免疫応答におけるエクソソームの重要性とそのメカニズムの解明に取り組んだ。

方　法

1. 細胞とウイルス

HBV に対する自然免疫応答の研究では下記のヒト由来細胞とウイルスを用いた : HepG2 細胞、ヒト初代培養肝細胞（Hepatocyte）、HBV の全長の 1.4 倍のゲノムを発現するプラスミド、HBV のウイルス感染粒子。

インフルエンザウイルス感染における自然免疫応答では、C57BL/6 マウス（九動）と A 型インフルエンザウイルス（H1N1）のマウス順化株である PR8 株を用いた。血清とヒト末梢血単核細胞の採取になどに於いては、倫理委員会の承認を受けた実験計画に従って実験を実施した。ヒトマクロファージ細胞株としては THP-1 細胞を、PMA を用いて分化させた細胞を用いた。

2. マウス個体への感染実験

インフルエンザウイルス PR8 株のマウス個体への感染においては、1×10^5 個のウイルス粒子を経鼻感染させ、感染後の血清をマウス尾静脈より採取した血液より調製した。血清のエクソソームは、Exosome Isolation Kit (from serum)（Thermo Fisher Scientific）を用いて添付のプロトコールに従い調製した。エクソソーム内の RNA は TRIZOL（Thermo Fishser Scientific）を用いて抽出した。

結　果

1. HBV 感染時の自然免疫応答におけるエクソソームの役割

HBV 感染肝細胞から放出されるエクソソームには少なくとも下記の 2 種類の RNA が存在することを明らかとした。

・HBV 由来の RNA

・IL-12 産生を抑制する宿主 microRNA

上記の各 RNA が引き起こす免疫応答に関しては下記の通りの結果を得た。

1）HBV 由来の RNA

感染細胞から放出されるエクソソーム中に存在するウイルス由来 RNA は、感染肝細胞からマクロファージへとエクソソームを介して伝達されると、マクロファージに発現する TLR3、TLR7、RIG-I などのパターン認識受容体により認識され、I 型インターフェロン産生などの自然免疫応答を誘導した。これは、ヒトの自然免疫系は感染細胞内のウイルス RNA をエクソソームを介して認識できることを示唆する。

2）IL-12 産生を抑制する宿主 microRNA

肝細胞から放出されるエクソソーム内の microRNA の中で、IL-12 産生を抑制する microRNA の濃度が、HBV 感染により著しく上昇した。また、このエクソソームをマクロファージ培養液中に添加することで、マクロファージの IL-12p35 と IL-12p40 の遺伝子の発現が顕著に減少した（図 1）。これは、ウイルスがエクソソームを介して宿主自然免疫を抑制することを示唆する［3］。

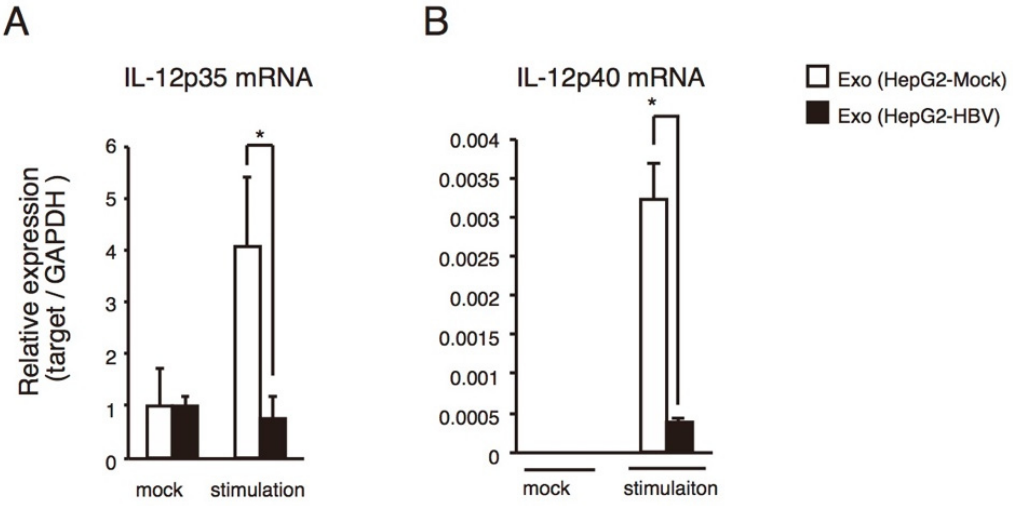


図 1. HBV 感染肝細胞から放出されるエクソソームによる IL-12 産生の抑制

非感染肝細胞（□）と HBV 感染肝細胞（■）から放出されるエクソソームをマクロファージの培養液に添加したのち、マクロファージを HBV 由来の核酸で刺激した。結果、HBV 感染肝細胞から放出されたエクソソームはコントロールと比較してマクロファージの IL-12p35（A）と IL-12p40（B）の mRNA の発現を減少させた。（N = 3、*p < 0.05、t-test）

2. インフルエンザウイルス感染時の自然免疫応答におけるエクソソームの役割

生体内での自然免疫応答におけるエクソソームの役割を解明するため、マウス動物モデルを用いてインフルエンザウイルス感染実験を実施した。

実験はマウスの各個体へ季節性インフルエンザウイルス（PR8）株を経鼻感染させ、感染 5 日後のマウス血清を採取し、そこからエクソソームを回収した。さらに、エクソソーム内の RNA を抽出したのち、次世代シークエンサー（Mi-Seq）を用いた RNA-Seq 解析を実施した。結果、ウイルス感染後 5 日後の血清では、そのエクソソーム内の miR-451a 量が

上昇することを発見した（図 2）。miR-451a は I 型インターフェロンや IL-6 などの産生を抑制することが知られており、HBV ウイルスと同様にインフルエンザウイルスもエクソソーム内の自然免疫抑制性の microRNA 濃度を上昇させることを示唆する。

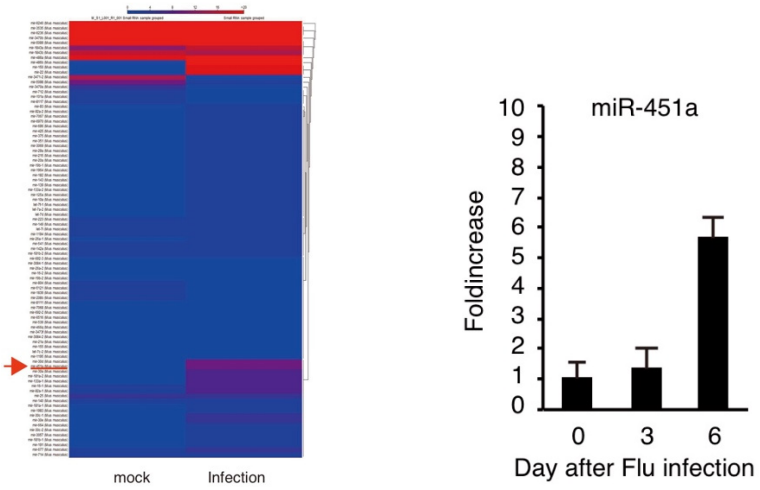


図 2. インフルエンザウイルス感染時の血清のエクソソーム内の microRNA 量

C57BL/6 マウスにA型インフルエンザウイルス（PR8 株）を経鼻感染させ、感染後 5 日後の血清をマウスより調整し、血清内の microRNA を RNA-Seq 法により網羅的に解析した（左図）。非感染マウスの血清のエクソソーム内の microRNA 量と比較し、感染後の血清のエクソソーム内では miR-451a 量が大きく上昇していた（左図、矢印）。また、同様の実験を、定量 PCR 法を用いて実施したところ、定量 PCR 法に於いても血清のエクソソーム内の miR-451a 量がウイルス感染により大きく上昇することが明らかとなった（右図）。

3. エクソソーム内 miR-451a による自然免疫応答の阻害

健常人のヒト血清中にも miR-451a を含むエクソソームが豊富に存在することを我々は明らかとした。この miR-451a を含むエクソソームが自然免疫応答を制御する仕組みについて検討したところ、マクロファージの I 型インターフェロン産生と IL-6 の産生を抑制することを明らかとした（図 3）。

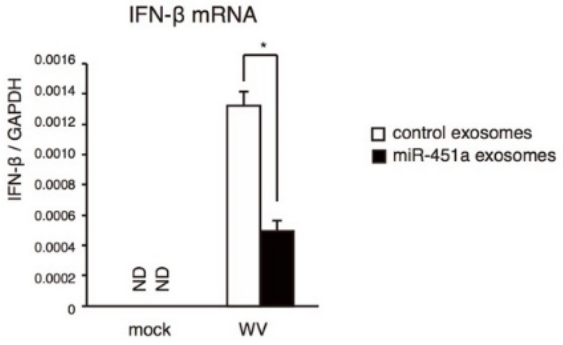


図 3. エクソソーム内 miR-451a による自然免疫応答の抑制

miR-451a の機能を模した mimic RNA を培養細胞に形質導入し、その後、細胞から放出されるエクソソームを回収した。mimic RNA を形質導入した細胞から放出されたエクソソームと、mimic RNA を形質導入していない細胞から放出されたエクソソームを用いて、それぞれマクロファージを培養した。その後、マクロファージをフォルマリン固定したインフルエンザウイルス（WV）で刺激し、I 型インターフェロン産生能を比較した。結果、miR-451a の mimic RNA を多く含むエクソソームはマクロファージの I 型インターフェロン産生を抑制した。（n = 3、*p < 0.05、t-test）

考　察

エクソソームは細胞から放出される100 nm程の直径を持つ小胞である。このエクソソームは様々な細胞から放出され機能的なRNAを細胞から細胞へと伝える。本研究ではこのエクソソームがウイルス感染時の自然免疫応答に果たす役割について調べたところ、ウイルスはエクソソームを介して宿主自然免疫を制御することが示唆された。

ウイルスは従来から宿主自然免疫を抑制する能力を有することが知られている。この時ウイルスは、感染した細胞の免疫応答を主に抑制する。例えば、C型肝炎ウイルスは感染肝細胞内のIPS-1分子を破壊し、I型インターフェロン産生を抑制し、HIVウイルスはCD4陽性ヘルパーT細胞を破壊し、宿主自然免疫応答を抑制する。本研究から、ウイルスはエクソソームを介して非感染細胞の自然免疫応答も抑制できることが示唆された。これまでウイルス感染患者の樹状細胞やマクロファージの機能低下が報告されているが、そのメカニズムの詳細は明らかでなかった。つまり、このような感染症の患者での非感染細胞の免疫機能低下がエクソソームを介したメカニズムによって引き起こされている可能性も考えられる。今後、このような視点からの臨床研究を実施することで、ウイルス感染時の自然免疫応答の全容解明につながると期待される。

ウイルスがエクソソームを介して宿主自然免疫を制御する一方で、エクソソームは宿主自然免疫応答にも利用されている。我々はHBV感染肝細胞から放出されるエクソソームにはウイルス由来のRNAが含まれており、これが宿主自然免疫により認識されることを発見した。これは、エクソソームによる細胞間情報伝達が宿主にとってもウイルスにとっても自己の生存のための必須のツールとなっていることを示唆する。そのため、今後、エクソソームを人為的に制御することで感染症をコントロールする新たな治療法や創薬につながる可能性を示唆する。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行する上で協力して頂いた熊本大学大学院生命科学研究部免疫学分野の教員及び大学院生に感謝いたします。

文　献

1) Oshiumi H, Kouwaki T, Seya T. Accessory Factors of Cytoplasmic Viral RNA Sensors Required for Antiviral Innate Immune Response. Frontiers in Immunology 2016 Mya 25; 7: 200. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00200.

2) Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 is essential for type III IFN production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. J. Immunology 2014 Mar 15; 1926): 2770-2777. DOI: 10.4049/jimmunol.1301459.

3) Kouwaki T, Fukushima Y, Daito T, Sanada T, Yamamoto N, Mifsud EJ, Leong CR, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Matsumoto M, Seya T, Oshiumi H. Extracellular vesicles including exosomes regulate innate immune responseto hepatitis B virus infection. Frontiers in Immunology 2016 Aug 31; 7: 335. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00335.