

研究終了報告書

「T 細胞分化における細胞外小胞の役割とその応用」

研究期間：2019 年 10 月～2022 年 3 月

研究者：山野 友義

1. 研究のねらい (1000 字以内)

胸腺における T 細胞の自己免疫寛容（中枢性寛容）の誘導は、自己反応性の T 細胞から自己を守る上で必須であり、その破綻は自己免疫疾患を引き起こす。中枢性寛容は、T 細胞受容体 (TCR) の再構成を終えて、機能的な TCR を形成したものを選出するポジティブセレクションと、その中の自己反応性 T 細胞を除去するネガティブセレクション、更に、自己反応性 T 細胞の制御性 T 細胞への分化という 3 つの機構から構成されている。ポジティブセレクションは、胸腺皮質上皮細胞 (cTEC) 上の抗原-MHC 複合体を未熟 T 細胞が認識することで達成される。一方、ネガティブセレクションおよび制御性 T 細胞分化は、胸腺髄質上皮細胞 (mTEC)、胸腺樹状細胞が提示した自己抗原を自己反応性 T 細胞が認識することで誘導される。mTEC は、本来特定の組織に発現する抗原 (ex. インスリン、CRP 等) を発現し、それらに反応する T 細胞を除去する。Aire 遺伝子は mTEC における組織特異的抗原の発現制御を担っており、Aire の欠損により自己免疫疾患を引き起こすことから、中枢性寛容において必須の役割を持つ。胸腺には EV が多く存在することが知られており、その EV 中には組織特異的抗原が含まれていることが報告されている。私は胸腺 EV によって mTEC から胸腺樹状細胞へと抗原が伝わる可能性を想定し、胸腺 EV の解析を行ったところ予想に反し、胸腺 EV そのものが " 直接 " 抗原提示を行う能力があることを発見した。そこで本研究では胸腺 EV の T 細胞分化と免疫寛容に与える影響を解明することを目的とした。次に胸腺 EV が抗原提示細胞と同様に機能することができるのならば、人工的に抗原提示細胞と同等か、それ以上の機能を持った人工抗原提示小胞が作製できないかと考えた。膜貫通タンパク質であるテトラスパニンとのキメラタンパク質を作製することで蛍光タンパク質である GFP がエクソソームに発現することが報告されていた為、T 細胞活性化に必要な抗原-MHC クラス I 複合体、補助シグナル分子、サイトカインなどと、CD63 や CD9 などのテトラスパニンとのキメラ分子を作製することで、それらをエクソソーム上に発現させることができると考えた。複数の免疫制御因子を同時にエクソソーム上に載せることで、免疫を正または負に制御する人工抗原提示小胞の開発を行う。

2. 研究成果

(1) 概要

胸腺に存在する抗原提示細胞は細胞外小胞 (EV) を放出するという報告があるが、その役割はほとんどわかっていない。私は胸腺 Large EV 上に MHC および補助シグナル分子の発現があること、また培養実験および EV の胸腺内投与の実験により、胸腺 EV が直接 T 細胞に抗原提示をすることで T 細胞分化に寄与することを示した。また胸腺抗原提示細胞を模倣するような細胞を作製し、その培養上清の Large EV を用いても同様に抗原特異的 T 細胞を活性化させることがわかった。以上の結果より、これまで胸腺抗原提示細胞が T 細胞分化に関わること

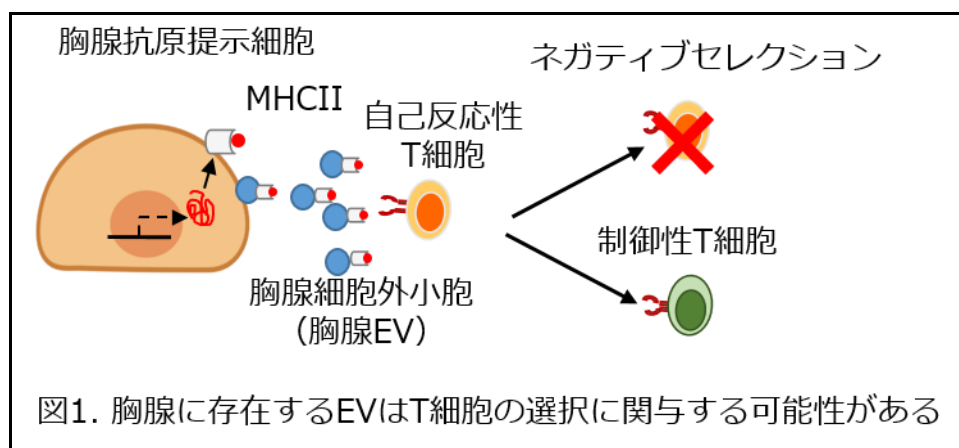
が知られていたが、これに加え胸腺抗原提示細胞が放出する Large EV も T 細胞分化に関わることが強く示唆された。

エクソソームのマーカーであるテトラスパニンと融合タンパク質を作製することで、目的のタンパク質を自在にエクソソーム上に発現させることが可能であることが知られている (Stickney et al., BBRC. 2016)。私は、この技術を応用することで、免疫制御に関わる因子をエクソソーム上に同時に発現させ、免疫系を制御する人工抗原提示小胞の開発を行った。本基盤技術の特徴は、エクソソームというプラットフォーム上に複数の免疫制御因子を同時に発現させられる点である。複数の免疫制御因子が同じ場で作用することで、個々の単純な併用では見られない相乗効果の発揮が期待される。実際に抗原-MHC クラス I 複合体、補助シグナル分子、IL-2 を同時にエクソソーム上に発現させた人工抗原提示小胞 (Antigen Presenting Exosome, AP-Exo-CTL) は in-vitro、in-vivo において抗原特異的 CD8T 細胞を活性化させることに成功した。また AP-Exo-CTL において活性化された T 細胞は顕著な抗腫瘍効果を発揮した。またエクソソーム上に抗原-MHC クラス II 複合体、IL-2、TGF- β を発現させた人工抗原提示エクソソーム AP-Exo (Treg) を作製し、抗原特異的制御性 T 細胞を分化させる技術開発を行い、培養実験で抗原特異的制御性 T 細胞を分化させることに成功した。

(2) 詳細

研究テーマA「生体内における胸腺EVのT細胞分化と免疫寛容に与える影響の解析」

胸腺 EV をそれぞれ large EV および small EV の分画に精製し、フローサイトメリーで細胞表面上の MHC の発現および、補助シグナル分子の発現を確認した。結果、Small EV だけではなく、large EV 上にも MHC の発現があることがわかった。large EV 上の MHC の発現は small EV より高く、さらに large EV には補助シグナル分子である CD80 の発現も確認された。MHC の発現があることから胸腺 EV が直接抗原を提示できるかどうかを NFAT レポーターを持つ HA-TCR ハイブリドーマ細胞と共培養することで調べた。結果、Aire-HA マウスから調整した胸腺 small EV は T 細胞ハイブリドーマ細胞を活性化させることはできなかった。一方で Aire-HA マウスから調整した胸腺 large EV は T 細胞ハイブリドーマ細胞を活性化させた。これらの結果より、胸腺 large EV は直接抗原提示をする能力があることが明らかになった。次に Aire-HA マウスから精製した胸腺 large EV を HATCRtgRagKO マウスの胸腺に移入することで、生体内において制御性 T 細胞を誘導するかを評価した。結果、野生型マウスの胸腺 large EV は制御性 T 細胞を誘導することはなかったが、Aire-HA マウスから精製した胸腺 large EV は抗原特異的に制御性 T 細胞を分化させた。次に胸腺 EV にどのような抗原が載っているかを調べる為に胸腺 large EV を溶解させたのち、抗 MHCII 抗体結合 bead を用いて MHCII を精製、ペプチドを遊離し、質量分析を行った。結果、胸腺 largeEV 上には 1076 のペプチドが同定され、この中には組織特異的抗原も含まれていた。これらの結果より、胸腺 largeEV 上には自己抗原を載せた MHCII が発現しており、自己反応性 T 細胞に抗原を直接提示することで、中枢性寛容を誘導することが示唆された (図1)。



研究テーマ B 「人工抗原提示小胞(AP-Exo-CTL)による腫瘍特異的免疫増強法の開発」

エクソソームのマーカであるテラスパニンと融合タンパク質を作製することで、目的のタンパク質を自在にエクソソーム上に発現させることが可能であることが知られている (Stickney et al., BBRC. 2016)。私は、この技術を応用することで、免疫制御に関わる因子をエクソソーム上に同時に発現させ、免疫系を制御する人工抗原提示小胞の開発を行った。私が開発した本基盤技術の特徴は、同じ媒体上に複数の免疫制御因子を同時に発現させられる点である。複数の免疫制御因子が同じ場で作用することで、個々の単純な併用では見られない相乗効果の発揮が期待される。抗原特異的 CD8T 細胞を活性化させるため抗原-MHC クラス I 複合体、補助シグナル分子、IL-2 を同時にエクソソーム上に発現させた人工抗原提示小胞 (Antigen Presenting Exosome) AP-Exo-CTL を作製した。AP-Exo-CTL を用いて in-vitro、in-vivo において抗原特異的 CD8T 細胞を活性化させることに成功した。また OVA を発現する EL-4 細胞をマウスに投与する実験において、コントロール群では腫瘍の増殖がみられたが、AP-Exo-CTL を投与した群においては腫瘍の増殖が顕著に抑えた。

研究テーマ C 「人工抗原提示小胞(AP-Exo-Treg)による抗原特異的制御性 T 細胞の分化法の開発」

エクソソーム上に抗原-MHC クラス II 複合体、CD80、IL-2、TGF- β を発現させた人工抗原提示小胞 AP-Exo (Treg) を作製し、抗原特異的制御性 T 細胞を分化させることで、自己免疫抑制法を開発を行った。抗原としては OVA_p を載せた AP-Exo (Treg) に加え、多発性硬化症の発症に関わると考えられているミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (Mog) ペプチドを発現した AP-Exo (Treg) を作製した。OVA 特異的 TCR_{tg} マウスおよび Mog 特異的 TCR_{tg} マウスを用いて、培養実験で AP-Exo (Treg) が抗原特異的制御性 T 細胞を誘導することに成功した。

3. 今後の展開

CD8T 細胞を活性化させる人工抗原提示小胞はマウスの系において生体内で選択的に抗原特異的 CD8T 細胞を活性化し、抗腫瘍免疫を強めることに成功した。今後は人工抗原提示小胞をヒト化し、非臨床試験に向けた研究を行う予定である。複数の免疫制御因子をターゲット細胞に届けるといふ基盤技術を疾患に対して最適化することによって、これまで治療法のない疾患に対する治療法を確立することが期待できる。

4. 自己評価

「生体内における胸腺 EV の T 細胞分化と免疫寛容に与える影響の解析」においてはこれまで抗原提示細胞だけが、T 細胞の分化に関わっているという考えに対し、抗原提示細胞が放出する小胞も直接抗原提示を行い T 細胞の分化に関わる可能性、新しい概念を示すことができたと考える。一方で小胞が T 細胞分化にどの程度関わっているのか、小胞がない場合には中枢性寛容は破綻してしまうのかという問いに対する答えは未だに出せていない。生体内で抗原提示細胞の抗原提示を保ちつつ、小胞の分泌を阻害するという環境を作り出すのは今の技術では限界があり、技術革新および実験系の工夫が必要であると考え。

人工提示小胞に関しては免疫を制御する人工小胞を複数開発し、特許出願を行った。複数の免疫制御因子を同時に発現させるという本研究の技術開発をベースに、免疫制御因子の組み合わせの妙で新しい薬剤の開発ができるのではないかと期待している。

5. 主な研究成果リスト

E Sajidah, K Lim, **T Yamano**, G Nishide, Y Qiu, T Yoshida, H Wang, A Kobayashi, M Hazawa, F Dewi, R Hanayama, T Ando, R Wong, Spatiotemporal tracking of small extracellular vesicle nanotopology in response to physicochemical stresses revealed by HS-AFM, J Extracell Vesicles, 2022,11(11),e12275

X Lyu, S Imai, **T Yamano**[★], R Hanayama[★], Preventing SARS-CoV-2 Infection Using Anti-spike Nanobody-IFN- β Conjugated Exosomes, Pharm Res, 2022,1-9 [★] : Corresponding author

Wang R, Yamada T, Kita K, Taniguchi H, Arai S, Fukuda K, Terashima M, Ishimura A, Nishiyama A, Tanimoto A, Takeuchi S, Ohtsubo K, Yamashita K, **Yamano T**, Yoshimura A, Takayama K, Kaira K, Taniguchi Y, Atagi S, Uehara H, Hanayama R, Matsumoto I, Han X, Matsumoto K, Wang W, Suzuki T, Yano S. Transient IGF-1R inhibition combined with osimertinib eradicates AXL-low expressing EGFR mutated lung cancer. Nat Commu, 2020

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:3件

1. E Sajidah, K Lim, **T Yamano**, G Nishide, Y Qiu, T Yoshida, H Wang, A Kobayashi, M Hazawa, F Dewi, R Hanayama, T Ando, R Wong, Spatiotemporal tracking of small extracellular vesicle nanotopology in response to physicochemical stresses revealed by HS-AFM, J Extracell Vesicles, 2022,11(11),e12275

高速原子間力 AFM を用いて様々な環境におけるエクソソームの形態を観察した。

2. X Lyu, S Imai, **T Yamano**, R Hanayama, Preventing SARS-CoV-2 Infection Using

Anti-spike Nanobody-IFN- β Conjugated Exosomes, Pharm Res, 2022,1-9
SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質に対する nanobody と IFN- β を同時に発現する改変エクソソームを作製し、SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス免疫を高めることができる改変エクソソームを開発した
3. Wang R, Yamada T, Kita K, Taniguchi H, Arai S, Fukuda K, Terashima M, Ishimura A, Nishiyama A, Tanimoto A, Takeuchi S, Ohtsubo K, Yamashita K, Yamano T , Yoshimura A, Takayama K, Kaira K, Taniguchi Y, Atagi S, Uehara H, Hanayama R, Matsumoto I, Han X, Matsumoto K, Wang W, Suzuki T, Yano S. Transient IGF-1R inhibition combined with osimertinib eradicates AXL-low expressing EGFR mutated lung cancer. Nat Commu, 2020
抗がん剤の組み合わせと投与方法を工夫することで EGF に変異がある胃がんに対して効果的な薬剤投与プロトコルを開発した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 3件(特許公開前のもも含む)

1	発 明 者	山野友義, 的場一隆, 華山力成
	発 明 の 名 称	抗原提示細胞外小胞, それを含む組成物, 及びそれらを製造するための方法
	出 願 人	国立大学法人金沢大学, 日産化学株式会社
	出 願 日	2020/2/28
	出 願 番 号	特願 2020-033331
	概 要	

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 10th International mRNA Health Conference でのポスター発表
- 第 48 回日本免疫学会学術集会ベストプレゼンテーション賞
- 実験医学増刊 「T 細胞分化および機能制御における細胞外小胞の役割」
- 臨床免疫・アレルギー科「細胞末梢性寛容および末梢での Aire の役割」
- 改変エクソソームによる新型コロナウイルス感染阻害法を開発
<https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/111330>