

研究課題 細胞外小胞(Extracellular microvesicles)によるアレルギー性炎症の病態解析と
モニタリングへの応用



研究代表者 秋田大学大学院総合診療・検査診断学講座・秋田大学附属病院中央検査部

植木重治

【感想】臨床検査はとても奥深い領域だと感じています。診断学と密接に関わりながら、医学の全ての分野に関わっています。遺伝子、分子、細胞の動態などの視点から、通常ホメオスタシスでは認められない疾患の特性を見いだすという視点は、臨床検査医学会に教えて頂いた気がします。私たちの研究を学術推進プロジェクトに採択して頂き、大変励みになりました。お陰様で、この2年間は多くのコラボレーターとの出会いや論文出版に

恵まれ、これからの課題も見えてきました。関係各位へ感謝いたしますとともに、本事業のますますの発展を祈念しております。

【概要】

細胞が産生する細胞外小胞(Extracellular (micro)vesicles: EVs)は、様々な小胞の総称で、membrane vesicles (MVs), exosome, apoptotic bodies などに分類されている。EVs は細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を担っているだけでなく、バイオマーカーやドラッグデリバリーシステムとしての臨床応用も期待されている。我々はこれまでに、アレルギーにおける主要な炎症細胞である好酸球に着目して諸般の検討を行ってきた。末梢血から高純度分離したヒト好酸球を用いて、in vitro で好酸球を刺激すると、細胞表面から CD9、CD63、フォスファチジルセリンを発現している EVs が産生される。一方、ヒト好酸球を用いて、PKC 活性化物質である PMA, 固相化した IgG、もしくは IL-5 と血小板活性化因子(PAF)の共刺激を行うと、1~3 時間で好酸球に ETosis と呼ばれる迅速な非アポトーシス細胞死(Eosinophil ETosis: EETosis)を誘導することができる。このとき、細胞が崩壊する直前の形態変化プロセスとして細胞膜から budding する形で EVs が分泌

される。この EVs は、直径がおよそ 5 μ m ほどになる場合もあり、通常の EVs よりもかなり大きいことがわかった。この様子は顕微鏡によるタイムラプス観察でも確認された。

EETosis に関連して産生される EVs (EETosis-EVs) についてさらに明らかにするために、はじめに *in vitro* での検討を行った。まず EETosis-EVs の細胞膜や細胞質の蛍光染色を行い、細胞膜におおわれた intact な構造であることを確認した。次に、好酸球に特異的かつ大量に存在するレクチンである galectin-10 を免疫染色によって検討した。この結果、galectin-10 は細胞質内に偏在しているが、EETosis の経過中に細胞質で均質に分布し、細胞膜から budding する EETosis-EVs にもローディングされることがわかった。これによって、galectin-10 を多く含んだ EETosis-EVs が大量に産生され、本体の細胞が崩壊しても形態を保ったまま残存する様子が認められた。galectin-10 の詳細な好酸球の細胞内局在を検討したところ、細胞膜直下に偏在しており、通常の脱顆粒プロセスでは放出されないことも明らかになった。興味深いことに、galectin-10 は EETosis の過程で好酸球性炎症の古典的な所見として知られるシャルコー・ライデン結晶を形成する。

EETosis-EVs はアポトーシス小体と異なり、貪食細胞にとって find-me シグナルとなるフォスファチジルセリンを表出していない。このことから、組織においてはマクロファージなどによって貪食を免れることが示唆される。実際に、好酸球性副鼻腔炎などの組織を

病理学的に検討すると、崩壊した好酸球が存在する部位には、しばしば galectin-10 陽性の EETosis-EVs が多数認められる。一方、細胞外に放出された顆粒も多く存在しており、組織学的評価の際は好酸球の細胞死を示すものと考えられる。今後さらに EVs との関連を検討していく予定であるが、一部の好酸球性炎症疾患では血中の galectin-10 が病勢と一致することも見いだしており、より簡便な好酸球性炎症マーカーとなる可能性がある。