

令和元年6月12日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08348

研究課題名(和文) エキソソームによる粘膜免疫賦活機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of mucosal immunity activation by exosome

研究代表者

小川 裕子 (OGAWA, Yuko)

帝京平成大学・薬学部・准教授

研究者番号：30267330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：免疫関連タンパク質のDPP IV、IgA、唾液タンパク質のムチン5B、口腔内細菌由来のLPSは、ヒト唾液由来エキソソーム表面に緩く相互作用している。これら表面分子のうちムチン5Bは消化酵素で分解され、IgAおよびLPSの大部分はゲルろ過クロマトグラフィーによりエキソソーム表面から剥がれるが、一部は強固に結合していた。表面分子を除去したエキソソームはマクロファージからのNO産生を増強させた。本作用には膜貫通タンパク質であるDPP IVがLPSと協調している可能性を見いだした。唾液由来の粘膜免疫エキソソームは口腔内では免疫系の過剰な活性化を抑制し、消化管内では免疫系の活性化に関与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により得られた粘膜免疫エキソソームの機能および安定性に関する知見は、将来的には経口投与により抗体(分泌型IgA)の産生を起こす粘膜免疫ワクチンへの応用のための基礎データとなる。分泌型IgAは現在主流の皮下注射ワクチンでは産生されないが、中和抗体として感染予防に有利であり、米国等ではIgAを産生する経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンが承認されている。粘膜免疫エキソソームに感染や炎症の原因タンパク質などを導入したワクチンが実現すれば、効率的なsIgA産生が可能となるだけでなく、個人ごとに対応したオーダーメイドワクチン開発の可能性もある。

研究成果の概要(英文)：Human whole saliva contains exosomes that have mucosal immunomodulatory potential. Immune-related proteins such as DPP IV and IgA, salivary proteins such as mucin 5B, and lipopolysaccharide (LPS) derived from oral bacteria were associated with surface of the exosomes. Mucin 5B was digested with gastrointestinal enzymes. Although IgA and LPS were dissociated by size-exclusion chromatography, a part of them was tightly associated with the exosomes. Salivary exosome without the surface molecules increased production of nitric oxide (NO) from murine macrophages. In addition, we found that DPP IV may contribute to the NO production by collaboration with LPS. Salivary exosome is presumed to suppress the excessive activation in oral cavity and cause the activation of mucosal immunity after exposure to the gastrointestinal condition.

研究分野：衛生薬学

キーワード：exosome 唾液 LPS マクロファージ DPP IV

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、細胞間の新しい情報伝達機構としてエキソソームなどの細胞外小胞 (EVs) が注目されている。これら EVs は分泌後、遠隔器官に分泌細胞のタンパク質、核酸などの情報を伝達すると考えられ、特にがんの転移に関与することから、疾病バイオマーカーの分野で精力的に研究が行われている。申請者は唾液中にエキソソームが豊富に存在することを世界で初めて報告し、本エキソソームにジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP IV)、IgA 等の免疫関連タンパク質が豊富に含まれること、これらタンパク質が結腸癌培養細胞 (LIM-1863、DKO-1、SW480 など) に由来するエキソソームに共通して見いだされることを見いだした。そこで、これらエキソソームを粘膜免疫エキソソームと名付けた。また、粘膜免疫エキソソームの将来的なバイオマーカー探索および DDS への応用のために唾液由来エキソソームの安定性を検討した結果、体内で安定である可能性を見いだした。以上のことから、唾液由来の粘膜免疫エキソソームは口腔内に分泌後、消化管内にて安定に存在し、腸管まで到達して免疫機構を活性化する機構があるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では主に以下の 2 点について、検討を行った。

- (1) 粘膜免疫エキソソームのマクロファージ (M<sub>1</sub>) 等の免疫関連細胞に対する活性化機構の解明
- (2) 粘膜免疫エキソソームの体内条件での安定性の検討

### 3. 研究の方法

#### (1)- エキソソームの分離

ヒト全唾液からの粘膜免疫エキソソームは、唾液採取後にフィルターろ過および遠心濃縮した後、ゲル濾過クロマトグラフィー (Sephacryl S-1000) により分離した。得られた画分はタンパク質濃度測定 (BCA protein assay)、DPP IV 活性、エキソソームマーカータンパク質 (Alix、TSG101、CD9) および唾液由来エキソソームに豊富に存在するタンパク質 (DPP IV、ムチン 5B、IgA) のウェスタンブロットによる検出、lipopolysaccharide (LPS) 濃度の測定、Zetasizer を用いた粒子径測定、電子顕微鏡による形態観察を行った。

#### (1)- エキソソームの M<sub>1</sub> 活性化機構の解明

マウス M<sub>1</sub> 細胞株 RAW264.7 細胞を用い、粘膜免疫エキソソーム (LPS 濃度として 1 ng/mL) をインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 5 ng/mL と共に添加して培養した。一酸化窒素 (NO) 産生量は Greiss 試薬で測定し、iNOS 発現量はウェスタンブロットを指標として比較検討した。

#### (1)- エキソソーム表面分子の解析

エキソソーム画分に含まれる LPS の結合状態は、(A) ポリミキシン B (PMB) 結合レジンを用いたブルダウンアッセイにより検討した。エキソソーム表面分子の解析のために (B) EVSecond を用いたゲルろ過クロマトグラフィーのリクロマトグラフィー、(C) 分画遠心法での分離を行った。(A)~(C) の処理後は (1)- の方法で性状を解析し、(1)- の方法で RAW264.7 細胞に添加した。

#### (2) エキソソームの安定性の検討

安定性の指標として、DPP IV 活性、SDS-PAGE、ウェスタンブロット ((1)- のタンパク質の検出)、粒子径測定 (ゼータサイザー)、電子顕微鏡によるエキソソームの形態観察を行った。

#### (2)- 体内(消化管内)の条件

37<sup>o</sup>C、pH7.4 および pH3.0 にて検討した。さらに胃内条件として消化酵素のペプシン添加 (37<sup>o</sup>C、pH3.0)、腸内条件として膵液抽出物のパンクレアチン添加 (37<sup>o</sup>C、pH7.4)、腸内の界面活性剤である胆汁酸 (コール酸ナトリウム) 添加 (37<sup>o</sup>C、pH7.4) を行い、それぞれ用量および時間によるエキソソームの形態および構成成分の変化 ((1)- の方法) を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 粘膜免疫エキソソームの M<sub>1</sub> 等の免疫関連細胞に対する活性化機構の解明

既に唾液由来粘膜免疫エキソソームは RAW264.7 細胞のような M<sub>1</sub> 細胞株に対し NO 産生を起こすこと、この NO 産生は IFN- $\gamma$  の添加により増強されることを見いだしている。この NO 産生は Toll 様受容体 4 (TLR4) ノックアウトマウス由来の M<sub>1</sub> により一部抑制されることからエキソソームに存在する LPS が関与すると考えられた。しかしながら、エキソソームの LPS 濃度を 1 ng/mL に合わせて RAW264.7 細胞に IFN- $\gamma$  と共添加すると、NO 産生は同濃度の LPS 標準品および同濃度の LPS を含む全唾液 (WS) よりも抑制されていた (図 1、Exo+IFN- $\gamma$ )。

LPSの除去に用いられるPMB結合レジンを用いてエキソソームのブルダウンアッセイを行い、エキソソームとPMBとの結合性を検討したが、LPSは除去できずに20%が非結合画分から検出され、エキソソームはほとんど結合しなかった(図2左)。以上のことから、エキソソームに結合したLPSはRAW264.7細胞表面のTLR4およびPMBとの結合が阻害される状態であることが考えられた。PMBレジン処理を繰り返すとエキソソームはレジンに結合すること、PMBレジン処理エキソソームをRAW264.7細胞に添加すると、NO産生はLPS標準品と同等になったこと(図1、Exo-PMB + IFN- $\gamma$ )から、LPSの一部はエキソソーム表面に強固に結合し、NO産生に寄与していることが考えられた。

前述のようにPMB結合レジンにエキソソームは結合しなかったが、レジンからはIgAが強く検出された(図2右)。IgAはエキソソームに豊富に含まれているタンパク質であるが、抗IgA抗体を用いて免疫沈降を行うとエキソソームは沈降しなかった。以上のことから、エキソソームの表面ではLPSとIgAが結合した状態で存在しているが、これらのエキソソームとの相互作用は緩いことが考えられた。

唾液由来エキソソームはゲルろ過クロマトグラフィーで精製を行っているので、得られた画分のリクロマトグラフィーを行うことにより、エキソソーム表面の相互作用の緩い分子が分離されるかを検討した。EV-Secondを用いたリクロマトグラフィーではIgAおよびLPSの一部がエキソソームより分離された(図3)。また、リクロマトグラフィーで得られたエキソソーム画分のNO産生はPMBレジン処理エキソソームと同様に増強された。

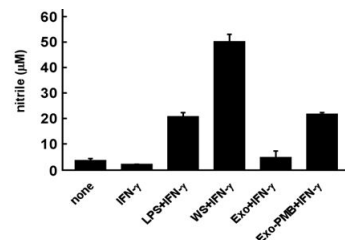


図1 全唾液およびエキソソームによるRAW264.7細胞からのNO産生

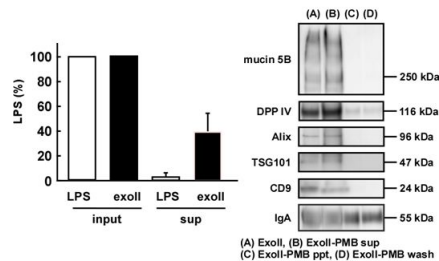


図2 PMブレジンによるブルダウンアッセイ

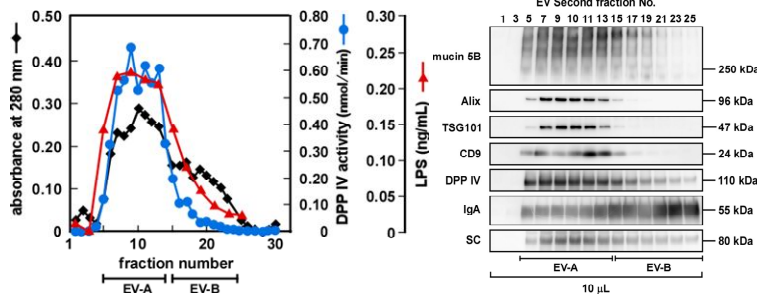


図3 唾液由来エキソソームのEVSecondによるリクロマトグラフィー

さらに、エキソソームを超遠心することで、表面分子の完全な分離を行った。超遠心上清にはIgAおよびLPSのほかムチン5Bが上清から検出された。この超遠心後のエキソソームについてもNO産生は増強されていた。ムチン5Bについては抗ムチン5B抗体を用いた免疫沈降を行い、エキソソームは沈降しないことを確認した。

以上を考え合わせると、エキソソーム表面にはIgA、LPS、ムチン5Bが緩く結合しており、これらを除去したエキソソーム本体には一部強固に結合したLPSが存在している状態であると考えられた(図4)。エキソソーム表面の分子群については現在、プロテオーム解析により精査しているところである。

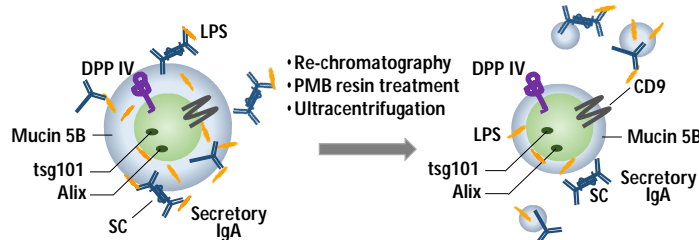
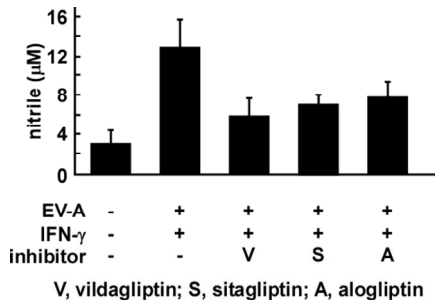


図4 粘膜免疫エキソソーム表面分子の挙動

表面分子の除去のために行った3つの方法(PMBレジソ処理、リクロマトグラフィー、超遠心)ではエキソソームに豊富に存在するDPP IVの酵素活性が上昇する現象が認められた。最近、DPP IVとLPSはTLR4を介したNO産生を増強することが報告されている。組換え型DPP IVとLPSをRAW264.7細胞に添加するとDPP IV濃度依存的にNO産生は増強された。一方、EVSecondでリクロマトグラフィーを行ったエキソソームをDPP IV阻害剤処理後にRAW264.7細胞に添加するとNO産生は抑制された(図5)。DPP IVは型膜タンパク質としてエキソソーム表面に強固に結合しており、抗DPP IV抗体を用いた免疫沈降ではエキソソームはほぼ100%沈降した。以上のことから、エキソソームの表面分子を除去するとDPP IVの活性中心が露出し、エキソソーム本体に強固に結合したLPSとともにRAW264.7細胞のNO産生の増強に寄与している可能性が考えられた。



V, vildagliptin; S, sitagliptin; A, alogliptin  
 図5 EVSecond後エキソソームによるNO産生に対するDPP IV阻害剤の効果(RAW264.7細胞)

## (2) 粘膜免疫エキソソームの体内条件での安定性の検討

エキソソームの体内での安定性については、体内条件(37℃、pH7.4)では10時間まで安定に存在していた。胃内条件(ペプシン存在下、37℃、pH3.0)では胃内のペプシン濃度(3 mg/mL)で3時間まで検討した。表面分子として同定したムチン5Bは5分でほぼ完全に分解され、テトラスパニンとしてエキソソームの膜を貫通しているCD9も分解されたが、他の構成成分および形態には変化が見られなかった。腸内条件(パンクレアチン存在下、37℃、pH7.4)ではペプシン処理と同様にムチン5BおよびCD9の分解が見られたが、他の指標に変化は認められなかった。さらに、腸内の界面活性剤としてコール酸ナトリウム処理を行った。構成成分および形態はコール酸濃度依存的に可溶化されたが、腸内の濃度(0.1%)では37℃、1時間まで変化は認められなかった(図6)。以上のことから、唾液由来エキソソームは分泌後に腸管まで安定に移動する可能性が示された。さらに、表面分子として同定されたムチン5Bの分解が起こったことから、消化酵素によりエキソソームの表面が露出して、(1)項のような免疫活性化作用を発揮する可能性が考えられた。

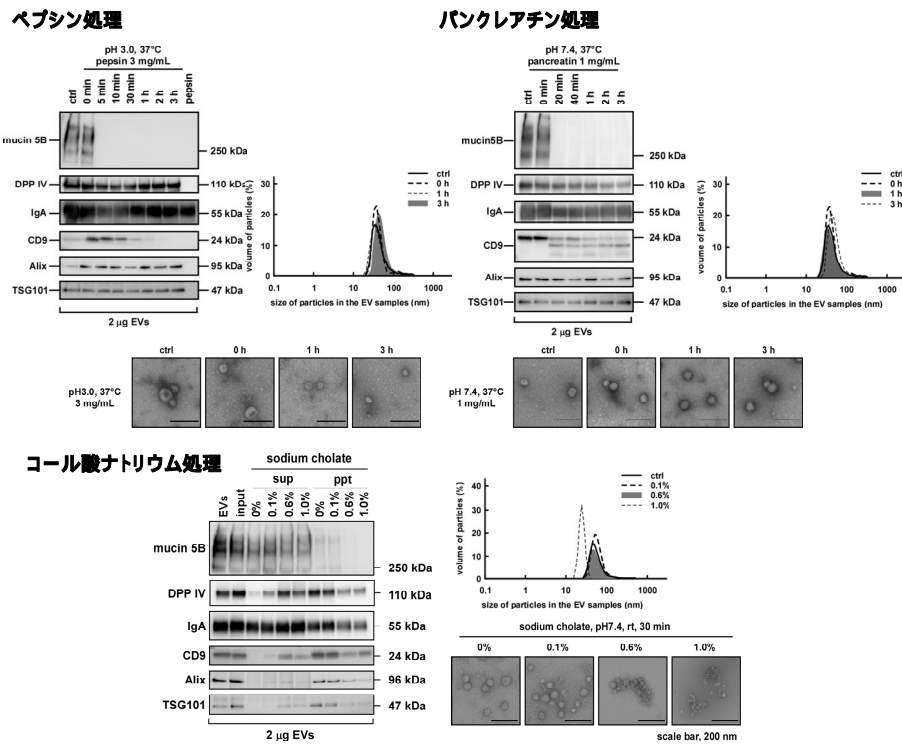


図6 エキソソームの消化酵素、胆汁酸処理

以上、本研究により口腔内の粘膜免疫エキソソームは、口腔内において過剰な免疫活性化を抑制すると共に、消化管内では比較的安定に存在し、表面分子の消化と共にエキソソーム本体による免疫活性化作用が発揮される可能性を見いだした。

## 5. 主な発表論文等 [雑誌論文](計3件)

1. 矢ノ下 良平・小川 裕子

2. Goto Y, Ogawa Y, Tsumoto H, Miura Y, Nakamura TJ, Ogawa K, Akimoto Y, Kawakami H, Endo T, Yanoshita R, Tsujimoto M.

Contribution of the exosome-associated form of secreted endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 to exosome-mediated macrophage activation. *Biochim Biophys Acta*. 査読あり Vol. 1865, No. 6, 2018, pp. 874 - 888

3. Kumeda N, Ogawa Y, Akimoto Y, Kawakami H, Tsujimoto M, Yanoshita R.

Characterization of Membrane Integrity and Morphological Stability of Human Salivary Exosomes. *Biol Pharm Bull*. 査読あり Vol. 40, No. 8, 2017, pp. 1183 - 1191

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Yuko Ogawa, Mamoru Ikemoto, Yoshihiro Akimoto, Hayato Kawakami, Ryohei Yanoshita, Stability of human salivary exosomes in gastrointestinal tract, Annual Meeting ISEV(The International Society for Extracellular Vesicles), 2019

2. 小川 裕子, 桑田 奈宝子, 小林 菜央, 高橋 花菜子, 三浦 里奈, 高瀬 祐実, 山崎 悠希, 池本 守, 秋元 義弘, 川上 速人, 矢ノ下 良平, ヒト唾液由来 exosome の消化管内条件における安定性の検討、日本薬学会第 139 年会、2019

3. 小川 裕子, 桑田 奈宝子, 後藤 芳邦, 辻本 雅文, 秋元 義弘, 川上 速人, 矢ノ下 良平, ヒト唾液由来 exosome の表面分子の結合状態および免疫活性化の制御への関与、第 63 回日本唾液腺学会学術集会、2018

4. 小川 裕子, 桑田 奈宝子, 辻本 雅文, 秋元 義弘, 川上 速人, 矢ノ下 良平, ヒト唾液由来 exosome の保存条件および体内条件における安定性の検討、第 11 回 中野医学会、2018

5. 小川 裕子, 伊藤 芹奈, 池本 守, 桑田 奈宝子, 後藤 芳邦, 辻本 雅文, 秋元 義弘, 川上 速人, 矢ノ下 良平, ヒト唾液由来エキソソームの表面分子によるマクロファージ活性化機構の解析、第 62 回 日本薬学会関東支部大会、2018

6. 小川 裕子, 桑田 奈宝子, 高瀬 祐実, 山崎 悠希, 秋元 義弘, 川上 速人, 矢ノ下 良平, 胃腸液中におけるヒト唾液 exosome の安定性、第 10 回日本 RNAi 研究会/第 5 回日本細胞外小胞学会、2018

7. 小川 裕子, 池本 守, 村上 舞, 本車田 悠希, 吉川 侑, 桑田 奈宝子, 後藤 芳邦, 辻本 雅文, 秋元 義弘, 川上 速人, 矢ノ下 良平, マクロファージ活性化に關与するヒト唾液由来エキソソーム表面分子の解析、日本薬学会 第 138 年会、2018

8. 後藤 芳邦, 小川 裕子, 津元 裕樹, 三浦 ゆり, 中村 孝博, 小川 健司, 服部 明, 秋元 義弘, 川上 速人, 遠藤 玉夫, 矢ノ下 良平, 辻本 雅文, ERAP1 結合型エキソソームによるマクロファージの古典的活性化、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 90 回日本生化学会大会、第 40 回日本分子生物学会年会)、2017

9. 小川 裕子, 村上 舞, 本車田 悠希, 吉川 侑, 市川 結樹, 陰山 采夏, 鈴木 恵理香, 平山 碧穂, 桑田 奈宝子, 後藤 芳邦, 辻本 雅文, 秋元 義弘, 川上 速人, 矢ノ下 良平, ヒト唾液由来エキソソームの表面に存在する分子は免疫活性化作用を制御する  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 90 回日本生化学会大会、第 40 回日本分子生物学会年会)、2017

10. 小川 裕子, 桑田 奈宝子, 秋元 義弘, 川上 速人, 辻本 雅文, 矢ノ下 良平, ヒト唾液由来エキソソームの膜構造体としての安定性の検討、第 62 回日本唾液腺学会学術集会、2017

11. 小川 裕子, 桑田 奈宝子, 秋元 義弘, 川上 速人, 矢ノ下 良平, ヒト唾液由来エキソソーム画分中 LPS の結合状態およびマクロファージの活性化への影響、日本薬学会第 137 年会、2017

12. 桑田 奈宝子, 小川 裕子, 秋元 義弘, 川上 速人, 矢ノ下 良平, ヒト唾液エキソソームの消化酵素に対する安定性 日本薬学会第 137 年会、2017

13. 小川 裕子、辻本 雅文、矢ノ下 良平、ヒト唾液由来の2種類のエキソソームに含まれるRNAの次世代シーケンサーによる網羅的解析、第61回日本唾液腺学会学術集会、2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://pharm.thu.ac.jp/research/unit/makukinou.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：矢ノ下 良平

ローマ字氏名：YANOSHITA, Ryohei

研究協力者氏名：辻本 雅文

ローマ字氏名：TSUJIMOTO, Masafumi

研究協力者氏名：後藤 芳邦

ローマ字氏名：GOTO, Yoshikuni

研究協力者氏名：池本 守

ローマ字氏名：IKEMOTO, Mamoru

研究協力者氏名：秋元 義弘

ローマ字氏名：AKIMOTO, Yoshihiro

研究協力者氏名：三浦 ゆり

ローマ字氏名：MIURA, Yuri

研究協力者氏名：桑田 奈宝子

ローマ字氏名：KUMEDA, Nahoko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。