

令和 5 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：2020～2022

課題番号：20K07162

研究課題名(和文) 免疫活性化能を有する唾液exosomeを利用した歯周病自家ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of autovaccine for periodontal disease using human salivary exosomes with immune activity

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト唾液由来のexosome様細胞外小胞(Exo)は、膜小胞とそれを覆う外層から構成されている。唾液Exoは免疫活性化因子として口腔内細菌由来LPSおよびDPP IVを含有し、マクロファージ(M₁)を活性化させる。Exoから解離した外層によるM₁活性化は増強された。一方、Exo構成成分でLPS結合タンパク質群(LBPs)であるCAP18は、M₁活性化を抑制していると考えられた。Exoの外層は分解されやすいが、膜小胞およびDPP IVは安定であった。以上のことから、Exoは口腔内でLPSを吸着して免疫系の過剰な活性化を抑制しているが、外層の解離により免疫活性化が起こる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られたLPS/DPP IV-Exoの構成成分、免疫系における機能、安定性に関する知見より、本Exoは口腔内から消化管を通じて免疫系を制御するリソースとなることが期待できる。LPS/DPP IV-Exoは唾液中のLPSの10～20%を結合している。口腔内で本ExoはLPSを吸着し、免疫系の過剰な活性化を抑制しているが、消化管では消化に伴う外層の解離による免疫活性化が起こると考えられた。外層と本体の消化に伴う免疫系への作用を分子レベルで解明することで、外来性の病原体に対して免疫系を制御し、効率的な生体防御を行う機能的Exoを構築できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Exosome-like extracellular vesicles (Exo) derived from human saliva is composed of both a membrane vesicle and an outer layer surrounding it. Salivary Exo contain LPS derived from oral bacteria and DPP IV as immunostimulators and activate macrophage (M₁). In addition, M₁ activation by the dissociated outer layer were enhanced. CAP18, a LPS-binding protein, that is contained in salivary Exo is considered to function suppressively in M₁ activation. The outer layer of the Exo is easily degraded, while the vesicle including DPP IV were relatively stable. Therefore, the Exo adsorbs LPS and suppresses excessive activation of the immune system in the oral cavity. Enhanced immune activation may occur when the outer layer is dissociated from the Exo.

研究分野：衛生薬学

キーワード：細胞外小胞 唾液 LPS マクロファージ DPP IV

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は生活習慣病と関連する重要疾患であるが、その原因菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) に対する感染の予防法は確立されていない。申請者はヒト唾液中に免疫関連分子の DPP IV (CD26)、口腔内細菌に由来するエンドトキシン (LPS) を含む exosome (LPS/DPP IV-Exo) を発見した。本 Exo は、LPS によるマウスマクロファージ (M ϕ) からの一酸化窒素 (NO) 産生能を有し、体内の条件で比較的安定に存在している。以上のことから、本 Exo は消化管内の腸管関連リンパ組織 (GALT) に到達して M ϕ に抗原提示し、形質細胞を誘導する可能性があると考えた。形質細胞は共通粘膜免疫システム (CMIS) を介して唾液腺に移行し、唾液中に sIgA を分泌させる。従って、本 Exo の免疫活性化機構を明らかにし、Pg 由来の抗原を吸着させた機能性 Exo を構築すれば、Pg に対して sIgA の分泌を促す自家ワクチンになりうると考えた。

2. 研究の目的

本研究は LPS/DPP IV-Exo の免疫活性化機構を解明し、本 Exo に Pg 特異的抗原を結合させて自家免疫することで、Pg に対する sIgA 産生誘導が起こるかを検討し、最終的には Pg 抗原結合 LPS/DPP IV-Exo を用いた歯周病を予防する自家ワクチンの開発を目標とした。

主に以下の 3 点について、検討を行った。

- (A) M ϕ 活性化の分子機構の解明
- (B) LPS/DPP IV-Exo の構成成分の同定
- (C) LPS/DPP IV-Exo の消化管内での安定性の解析

3. 研究の方法

(A)- LPS/DPP IV-Exo の分離および口腔内 LPS の抽出

ヒト全唾液中の LPS/DPP IV-Exo は、唾液採取後にフィルターを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。さらに EVSecond L70 を用いてリクロマトグラフィーを行い、Exo 本体と外層を分離した。得られた画分はタンパク質濃度測定、DPP IV 活性測定、唾液由来 Exo の構成タンパク質のウェスタンブロットによる検出、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。

口腔内 LPS は全唾液からホットフェノール法で抽出した。LPS 濃度はエンドトキシンアッセイにより測定した。

(A)- M ϕ 活性化機構の検討

M ϕ 細胞株 RAW264.7 細胞を用い、LPS/DPP IV-Exo (LPS 濃度として 1 ng/mL) をインターフェロン- γ (IFN- γ) 5 ng/mL と共に添加して培養した。培養上清の 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で検討した。LPS/DPP IV-Exo の LPS 結合タンパク質 (LBPs、B- で同定) による M ϕ 活性化機構の検討では、LBPs の組換えタンパク質および LPS、IFN- γ を RAW264.7 細胞に添加し、NO 産生量を測定した。

(B)- LPS/DPP IV-Exo 本体の構成成分の同定

LPS/DPP IV-Exo の本体の構成成分を明らかにするために、ゲルろ過クロマトグラフィー後に分画遠心法での分離を行った。LPS/DPP IV-Exo を 20,000 \times g で遠心して、microvesicle 様の細胞外小胞を除去した。次に、100,000 \times g で超遠心して得られた沈殿を界面活性剤で可溶化後、トリプシン処理し、LC-MS/MS を用いてプロテオーム解析を行った。

(B)- LPS/DPP IV-Exo の LBPs の同定

LPS/DPP IV-Exo に含まれる LBPs を同定するために、LPS 結合レジン を調製し、界面活性剤処理した Exo を添加してプルダウンアッセイを行った。共沈したタンパク質を LC-MS/MS で同定した。LBPs の Exo における存在状態は、本 Exo のリクロマトグラフィー後 (A)-)、ウェスタンブロットングを行って検討した。

(C)- LPS/DPP IV-Exo の消化管内条件での検討

消化管内での状況を再現するために、胃内条件としてペプシン存在下 (37 $^{\circ}$ C、pH3.0、) 腸内条件として膵液抽出物のパンクレアチンおよび腸内の界面活性剤であるコール酸ナトリウム (37 $^{\circ}$ C、pH7.4) 存在下での連続消化を行い、Exo の形態および構成成分の変化を検討した。

4. 研究成果

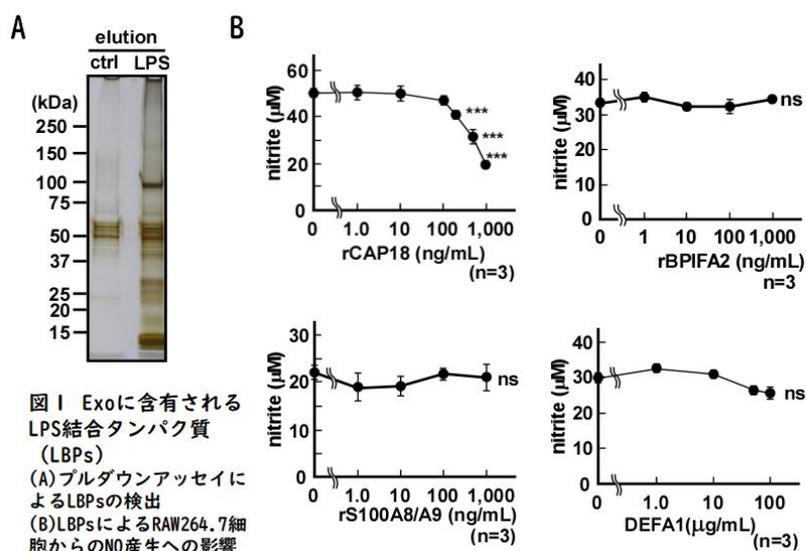
(A)-1 LPS/DPP IV-Exo による M ϕ 活性化の分子機構の解明

既に、LPS/DPP IV-Exo は M ϕ に添加すると濃度依存的に NO を産生させること、この NO 産生は LPS に結合するポリミキシン B の添加により抑制されること、トル様受容体 4 (TLR4) ノックアウトマウス由来の M ϕ により抑制されることを明らかにしている。これらの知見は本 Exo による NO 産生が Exo に含有される LPS によることを示している。

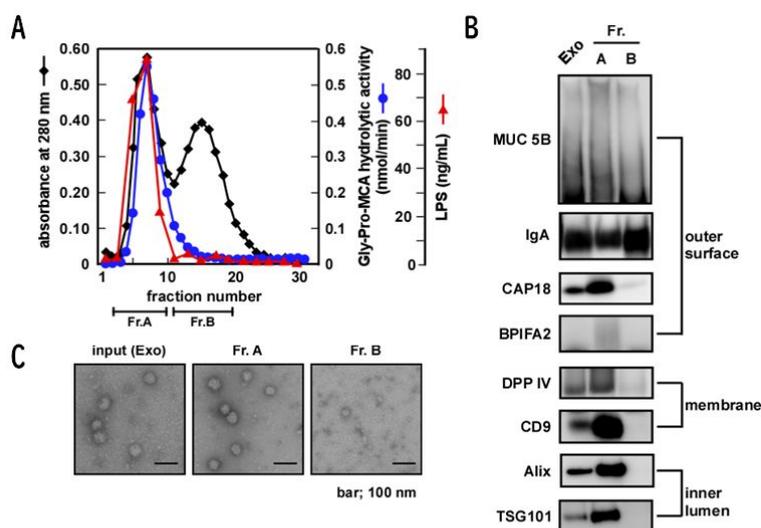
本 Exo を M に添加すると、NO の他に MIM の指標とされる IL-1 および TNF を産生するものの、産生量は同濃度の LPS を含む全唾液 (WS) よりも抑制されていた。歯周病の原因菌 *P. gingivalis* 菌由来の LPS (Pg-LPS) については、他のグラム陰性菌由来の LPS と構造が異なるため、TLR4 に結合しづらく、M の活性化は起こりにくかった。

(B) LPS/DPP IV-Exo の構成成分の同定

本 Exo をリクロマトグラフィーし、本体と外層に分離するとそれぞれの NO 産生が増加したことから、LPS/DPP IV-Exo への LPS の結合状態が NO 産生能に関与することが考えられた。すなわち、Exo には LPS に結合するタンパク質 (LBPs) が存在し、LPS による M 活性化を抑制していると考えた。そこで、Exo 本体の構成成分のプロテオーム解析を行い、1,011 タンパク質を同定した。次に、LPS 結合レジンを選択し、界面活性剤処理した Exo を添加して、LBPs のプルダウンアッセイを行った (図 1A)。得られたバンドからタンパク質同定を行い、プロテオーム解析の結果と比較して、4 種類の LBPs を抽出した。LBPs の組換えタンパク質を LPS と共に M に添加すると、18-kDa cationic antimicrobial protein (CAP18) が濃度依存的に NO 産生を抑制した (図 1B)。CAP18 は LPS に結合する抗菌ペプチド LL-37 の前駆体であり、近年、唾液中に存在することが報告されている。



本 Exo の LPS および CAP18 はリクロマトグラフィー後に Exo と同じ挙動を示した (図 2)。同定した LBPs について、Pg-LPS との結合性を検討した結果、得られた LBPs のうち、1 種類と結合する可能性が示された。



(A)-2 LPS/DPP IV-Exo の本体およびの M 活性化の検討

リクロマトグラフィーで得られた Exo の本体と外層による M 活性化を検討した。Exo 本体の LPS 濃度を合わせて M に添加すると NO 産生は増強された。リクロマトグラフィー前後の

粒子数を合わせて M に添加すると、NO 産生は同等であった (図 3)。従って、Exo 本体の NO 産生能は外層除去後も変化していないと考えられた。一方、分離した外層の M への添加では、NO 産生は同濃度の LPS を含む WS よりも増強された。外層の主成分は唾液中の粘性の由来となる mucin 5B および sIgA である (図 2)。従って LPS は Exo 外層では mucin 5B 等の外層の構成成分に非特異的に結合して存在し、M 等の表面と接触しにくくなることにより、その活性化が抑制されていると考えられた。

Pg-LPS については、健常者の唾液由来 Exo 由来 LPS における含量は少ないことが推察された。LPS による M 活性化は rDPP IV の添加により増強される傾向であった。今後は、Exo のプロテオームデータから免疫活性化因子を抽出し、Pg-LPS との相互作用を検討する予定である。

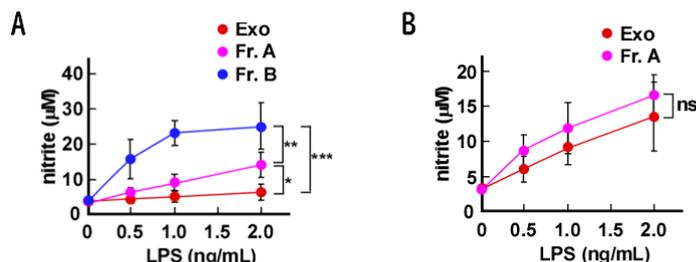


図3 Exo、Exo本体 (Fr.A)、外層 (Fr.B) によるRAW264.7細胞からのNO産生
(A) Exo、Exo本体 (Fr.A)、外層 (Fr.B) の添加
(B) ExoとExo本体 (Fr.A)の粒子数を合わせて添加

(C) LPS/DPP IV-Exo の消化管内での安定性の解析

唾液中に分泌された Exo の消化管内条件における安定性の検討では、ペプシン、パンクレアチン、コール酸ナトリウムそれぞれの単独の添加では外層は容易に消化されるが、Exo 本体は安定に存在していた。消化管内を模して、ペプシン消化後にパンクレアチンおよびコール酸ナトリウムで連続して処理すると、本体は可溶化して凝集が起こったが、DPP IV 酵素活性および分子量は保たれていた (図 4)。従って、本 Exo は胃内までは安定して存在し、腸内では消化されること、DPP IV は比較的安定に存在していることが示された。

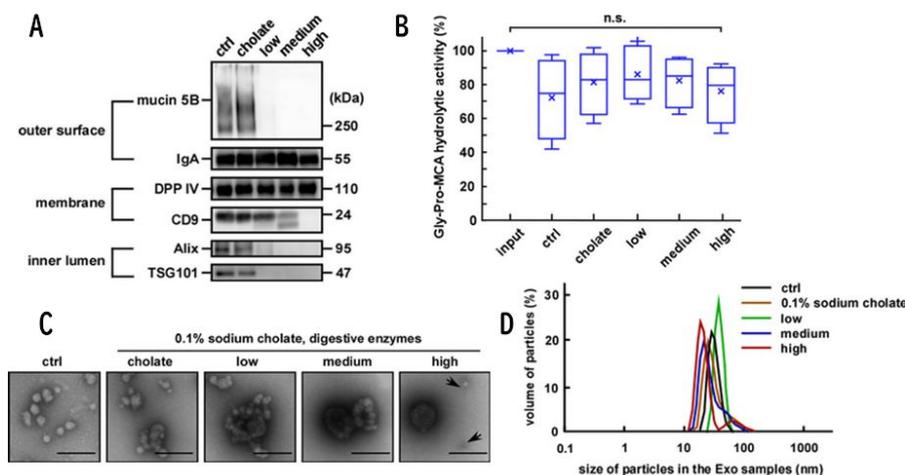


図4 Exoの胃内条件、腸内条件による連続消化酵素濃度の組み合わせ

low (L) 0.03 mg/mL pepsin, 0.01 mg/mL pancreatin,
medium (M) 0.3 mg/mL pepsin and 0.1 mg/mL pancreatin
high (H) 3.0 mg/mL pepsin and 1 mg/mL pancreatin

(A) Western blotting、(B) DPP IV活性
(C) TEM (矢印は断片化したExo)、(D) 粒子径測定 (DLS)

以上のことから、LPS/DPP IV-Exo の M に対する作用として図 5 の機構が予測された。本 Exo は外層と本体とで口腔内の LPS を補足して、M の活性化を抑制している。リクロマトグラフィー（消化）により外層が分離することで、解離した LPS による M 活性化が起こる。外層による M 活性化と Exo 本体における DPP IV 等の活性化因子との関連は今後の課題である。

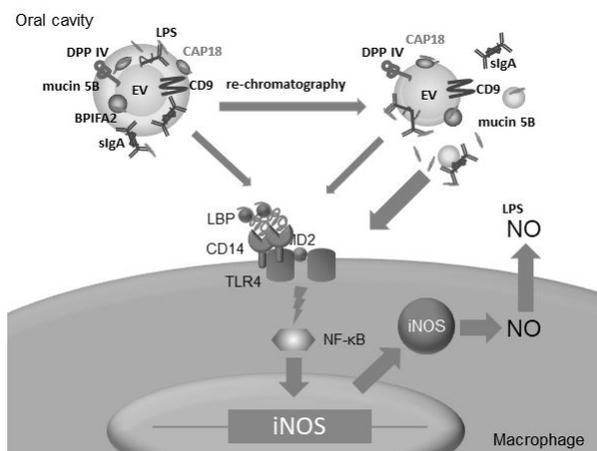


図5 唾液由来Exoによるマクロファージ活性化機構（仮説）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuko Ogawa, Yoshihiro Akimoto, Mamoru Ikemoto, Yoshikuni Goto, Anna Ishikawa, Sakura Ohta, Yumi Takase, Hayato Kawakami, Masafumi Tsujimoto, Ryohei Yanoshita	4. 巻 27
2. 論文標題 Stability of human salivary extracellular vesicles containing dipeptidyl peptidase IV under simulated gastrointestinal tract conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101034
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.101034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川 裕子、三浦 ゆり、伊藤 麻衣、後藤 芳邦、池本 守、遠藤 玉夫、秋元 義弘、矢ノ下 良平
2. 発表標題 ヒト唾液由来細胞外小胞に存在するLPS結合タンパク質はマクロファージの活性化を制御する
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川 裕子、三浦 ゆり、大西 敦、後藤 芳邦、青木 一真、池本 守、本車田 悠希、堤 周平、長島 茉央、廣谷 莉花、武井 亮太郎、秋元 義弘、遠藤 玉夫、矢ノ下 良平
2. 発表標題 ヒト唾液にはMUC1/APNとDPP IV/CD9を指標とする2種類の細胞外小胞が存在する
3. 学会等名 第66回 日本唾液腺学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川 裕子、三浦 ゆり、伊藤 麻衣、後藤 芳邦、池本 守、遠藤 玉夫、秋元 義弘、矢ノ下 良平
2. 発表標題 ヒト唾液由来細胞外小胞に存在するLPS結合タンパク質の同定およびマクロファージ活性化機構の検討
3. 学会等名 第9回 日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川 裕子、池本 守、三浦 ゆり、津元 裕樹、遠藤 玉夫、本車田 悠希、堤 周平、長島 茉央、松岡 千裕、原 紅音、秋元 義弘、川上 速人、矢ノ下 良平
2. 発表標題 アミノペプチダーゼに着目したヒト唾液由来細胞外小胞の性状解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川裕子、石川杏奈、太田櫻、池本守、 秋元義弘、川上速人、矢ノ下良平
2. 発表標題 ヒト唾液由来細胞外小胞の胃から腸内における条件での安定性の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

帝京平成大学 薬学部特設サイト ユニット紹介 細胞機能教育研究部門 膜機能ユニット https://pharm.thu.ac.jp/research/unit/makukinou.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------