

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460172

研究課題名(和文) アミノペプチダーゼ内包エキソソームによる免疫活性化カスケードの分子機構とその制御

研究課題名(英文) Molecular mechanism and regulation of immune activation cascade by aminopeptidase contained 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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの唾液中にはジペプチジルペプチダーゼ4(DPP-IV)を豊富に含有する膜小胞(DPP-IV-エキソソーム：DPP4exo)とDPP-IV-非含有エキソソーム(dDPP4exo)が存在する。DPP4exoは細菌に由来するリポ多糖(LPS)を豊富に含み、その一部はエキソソーム表面に強く結合している。DPP4exoは単独ではマクロファージの活性化作用はないが、インターフェロン- γ (IFN- γ)添加で強いNO産生作用を示す。dDPP4exoはIFN- γ 添加時もNO産生を起こさない。DPP4exoは口腔内の細菌感染などの炎症時にIFN- γ 濃度の上昇に伴って、NO産生を起こすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human whole saliva contains two types of extracellular vesicles. One type highly expresses dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) and the other type rarely expresses them. We designate former as DPP-IV-exosome (DPP4exo), and later as deficient DPP-IV-exosome (dDPP4exo). DPP4exo contained lipopolysaccharide (LPS) abundantly, and dDPP4exo contained it slightly. Although large amount of LPS interacted weakly with DPP4exo or existed separately forming micelle, part of LPS bind DPP4exo tightly. DPP4exo alone did not activate murine macrophage, however, DPP4exo with interferon-gamma produce high level of nitric oxide (NO) from murine macrophage. dDPP4exo did not cause NO production, even when interferon-gamma was added. DPP4exo is presumed to induce NO production from macrophage, when inflammation caused by bacterial infection, and associated with increased levels of interferon-gamma in oral cavity.

研究分野：衛生化学

キーワード：exosome マクロファージ DPP-IV 唾液 LPS Toll like receptor 4 一酸化窒素 細胞間情報伝達

1. 研究開始当初の背景

エキソソームは新しい情報伝達手段として近年注目されている。我々は唾液中のエキソソームの発見とそのプロテオーム解析、トランスクリプトーム解析およびアミノペプチダーゼの機能解明研究を行ってきた。その過程で(1)MHC クラス I 抗原ペプチドの生成を行うアミノペプチダーゼがエキソソームに含まれること、(2)アミノペプチダーゼがマクロファージを活性化すること、を見いだした。以上のことから、活性化されたマクロファージから分泌されたエキソソームにより免疫反応が連鎖的に引き起こされる新しい免疫活性化のシステム「エキソソーム免疫カスケード」が存在すると考えた。この機構を解明することで、アミノペプチダーゼ-エキソソームの免疫反応における役割を分子レベルで明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

(1)アミノペプチダーゼ含有エキソソームによる多段階的な免疫活性化システム「エキソソーム免疫カスケード」の分子レベルでの解明を目指す。

(2)エキソソームがネイティブなアジュバントとして働く、機能性アミノペプチダーゼ-エキソソームの開発のための分子基盤の構築を行う。

3. 研究の方法

(1)アミノペプチダーゼ含有エキソソームによるマクロファージ活性化機構の解明

(1)- DPP IV-エキソソームおよび DPP IV 非含有エキソソームの分離

唾液中の Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP IV) -エキソソームと、DPP IV-非含有エキソソームの分離はゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

(1)- DPP IV-エキソソームによるマクロファージ活性化機構の解明

マクロファージ活性化への影響は、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を用い、一酸化窒素 (NO) 産生および iNOS 発現量のウェスタンブロットを指標として比較検討した。NO 産生を亢進する可能性がある各種サイトカイン(インターフェロン- (IFN-) TNF、IL-1、IL-6、IL-8) についてエキソソームと共に RAW264.7 細胞に添加し、NO 産生量を検討した。

(1)- 唾液由来 DPP IV-エキソソームに存在する lipopolysaccharide (LPS) および LPS 関連タンパク質の解析

LPS の濃度測定はリムルステストを行った。マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞、C57BL/6 マウス腹腔内マクロファージ (野生型または LPS の受容体である Toll 様受容体 4

(TLR4) ノックアウト (KO) マウス、Toll 様受容体 2/4 (TLR2/4) ダブルノックアウト (DKO) マウスを用いた。DPP IV-エキソソームによる NO 産生に関わると考えられた LPS の受容体 (TLR4、TLR2)、コレセプター (CD14、LBP、MD2) および複合体 (TLR4/MD2)、LPS 結合タンパク質 (CAP-18、BPI) について、エキソソームと共に RAW264.7 細胞に添加し、NO 産生量を測定した。

(1)- エキソソーム表面分子の結合状態の解析

DPP IV および LPS 結合タンパク質とエキソソームとの結合状態を調べるために、抗 DPP IV 抗体、抗 CD9 抗体、抗 CD63 抗体、抗 IgA 抗体、抗 Mucin-5B 抗体結合磁気ビーズを用いた免疫沈降、ポリミキシン B (PMB) 結合レジソラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーを行った。LPS 濃度測定 (リムルステスト)、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) およびエキソソームに豊富に存在するタンパク質 (DPP IV、Mucin-5B) のウェスタンブロットを指標として、エキソソーム表面における DPP IV、LPS、Mucin-5B、IgA 等の存在状態を検討した。

(1)- ERAP1-エキソソームによるマクロファージ活性化機構の解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞から超遠心法により、Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 (ERAP1) -エキソソームを分離した。構成成分の同定を行い、種々の細胞へ添加することでその活性化を NO 産生、貪食活性を指標として検討した。

(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)- 項で示したタンパク質の検出)、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の確認を行った。

(2)- 体内(消化管内)の条件

37、pH7.4 および pH3 にて検討した。胃内条件は消化酵素のペプシン添加 (3 mg/mL、37、pH3)、腸内条件は膵液抽出物のパンクレアチン添加 (1 mg/mL、37、pH7.4) にて、経時的にエキソソームの状態を検討した。

(2)- 全唾液中でのエキソソームの状態の検討

全唾液を採取後 4 保存し、経時的 (7 日後、28 日後) にエキソソームの分画を行った。

(2)- エキソソームの保存条件の検討

4、-20、-80 にて 1 日保存後のエキソソームの変化を検討した。

(2)- エキソソームの構造の検討

界面活性剤 (NP-40、Triton X-100、SDS ; 終濃度 1%) 存在下でのエキソソームの変化を検討した。

4. 研究成果

(1) DPP IV-エキソソームの供給には当初 Caco-2 細胞由来 DPP IV-エキソソームを使用予定であった。しかしながら唾液中には DPP IV-エキソソーム(exosome II と称する; 研究成果の概要には DPP4exo と記載)が Caco-2 エキソソーム培養上清の 10 倍以上の高濃度で存在し、DPP IV-非含有エキソソーム(exosome I と称する; 研究成果の概要には dDPP4exo と記載)も存在すること、すでにプロテオーム、トランスクリプトーム解析が行われていることから、DPP IV-エキソソームの機能解析の第一段階として、唾液由来 exosome II について主に検討を行った。

(1)- 唾液由来 exosome I と exosome II の分離条件の検討

エキソソームの分離は超遠心法が主流であるが、我々はエキソソーム研究の当初よりゲル濾過クロマトグラフィーにより、exosome I と II を分離してきた。今回、2 種類のエキソソームをより確実に分離するためゲル濾過担体の検討を行った。従来使用してきた Sephacryl S-500 と Sephacryl S-1000 で分離を比較した結果、後者の方が両画分は十分に分離したと考えられた (図 1、A 画分が exosome I、C 画分が exosome II)。

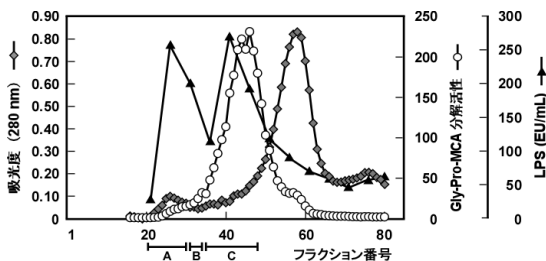


図 1 Sephacryl S-1000 によるヒト全唾液のゲル濾過クロマトグラフィー

(1)- exosome II (DPP IV-エキソソーム) によるマクロファージ活性化機構の解析

マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) に exosome II を終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう添加したところ、陽性対照の 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS と同程度の NO 産生および iNOS の発現亢進が認められた (図 2)。

exosome II 依存的な RAW264.7 細胞活性化は DPP IV 阻害剤では抑制されず、LPS 阻害剤である PMB によってほぼ完全に抑制された。エキソソームによる NO 産生を亢進する可能性がある各種サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8) について単独あるいはエキソソームと共に RAW264.7 細胞に添加し

たところ、IFN- γ の添加で NO 産生量は顕著に増加した。よって exosome II 画分には LPS が含まれ、IFN- γ と協調的にマクロファージを活性化させると考えられた。

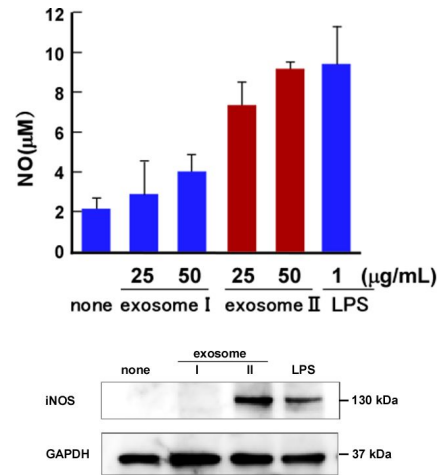


図 2 エキソソームによる刺激に伴う RAW264.7 細胞の NO 産生

(1)- 唾液由来エキソソームの LPS および LPS 関連タンパク質の解析

exosome II の LPS 濃度と NO 産生との関係を検討した。全唾液の LPS 濃度は $0.119 \pm 0.17 \mu\text{g}/\text{mL}$ exosome protein (n=27) であり、全唾液中の LPS のうち、exosome I には $1.31 \pm 0.93\%$ 、exosome II には $20.4 \pm 18\%$ が存在していた。精製時のゲル濾過クロマトグラフィーにおける各フラクションの LPS 濃度を測定すると、exosome I および exosome II のタンパク質ピークと LPS のピークはほぼ一致し、同程度の濃度を示した (図 1)。しかしながら、エキソソーム画分を回収・濃縮後の exosome I 精製標品の LPS 濃度は exosome II の 16 分の 1 (上記) となっている。LPS は高分子のミセルを形成することが知られているので、exosome I (DPP IV-非含有エキソソーム) 画分には遊離の LPS が多く含まれ、濃縮中にフィルター等に吸着して失われることが考えられた。

マウスマクロファージからの NO 産生量は exosome II 画分に含まれる LPS 量に比例しており、TLR4KO マウス由来マクロファージではほぼ抑制されたので、TLR4 を介することが考えられた。しかしながら、TLR4KO マウス由来マクロファージに exosome II および IFN- γ を添加すると、野生型マウス由来マクロファージの 10~30% 程度の NO 産生が起きた。このことから exosome II によるマクロファージ活性化には LPS 以外にグラム陽性菌由来のペプチドグリカンを取り組とする TLR2 も介する可能性が考えられた。TLR2/4DKO マウスにエキソソームおよび IFN- γ を添加すると NO 産生はほぼ抑制された。以上のことから、exosome II は口腔内の外来生物由来の LPS およびペプチドグリカンを含み、感染、炎症時

にサイトカイン濃度が上昇すると NO 産生を惹起することが考えられた。

exosome II の LPS 結合タンパク質を同定するため、これまでに行ったプロテオーム解析、トランスクリプトーム解析の結果を精査した。LPS 受容体(TLR4)およびそのコレセプター(CD14、LBP、MD2)、LPS 結合タンパク質(CAP-18、BPI)が豊富に含まれていることを見だし、ウェスタンブロットにより exosome II に高発現していることを確認した(図3)。これら LPS 関連タンパク質と exosome II を RAW264.7 細胞に添加したところ、CAP-18 添加時に NO 産生が抑制された。CAP-18 は LPS 中和作用および殺菌作用を有し、唾液中に存在している。よって exosome II (DPP IV-含有エキソソーム)によるマクロファージの活性化は、平常時には唾液中の成分により抑制されている可能性が示された。

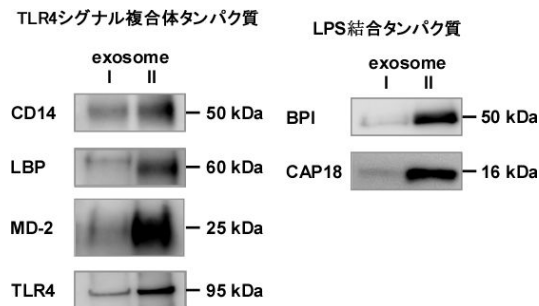


図3 唾液由来エキソソームの LPS 関連タンパク質のウェスタンブロット

(1)- exosome II (DPP IV-エキソソーム) 表面分子の結合状態の解析

マクロファージの活性化に直接関与すると考えられる exosome II 表面の分子種の結合状態を検討した。exosome II を抗 DPP IV 抗体で免疫沈降すると、DPP IV 活性はほぼ 100%が沈降した。エキソソームマーカータンパク質の Alix、Tsg101、CD9 は沈降画分から検出されたので、DPP IV は exosome II に型膜タンパク質として存在すると考えられた。一方、exosome II 画分の LPS の約 70%は上清から検出された。PMB レジンカラムクロマトグラフィーでは非結合画分に DPP IV 活性のほぼ 100%、LPS の 40%、タンパク質量の 55%が検出された。非結合画分をリクロマトすると、ほぼ全ての LPS、DPP IV 活性、タンパク質が PMB レジンに結合した。PMB カラム(1回目)非結合画分の SDS-PAGE のバンドパターンは PMB カラム前とほぼ同じであった。以上のことから exosome II 画分の LPS は、1) ミセル化していてエキソソームと異なる挙動を示すもの、2)エキソソーム表面と緩く相互作用し、PMB レジンに吸着してエキソソームと分離するもの、3)エキソソーム表面に強く結合し、PMB レジンにエキソソームごと結合するもの、の3つの状態で存在することが推察された。

さらに、エキソソーム表面のマーカータン

パク質の抗体を用いた免疫沈降を行った。exosome II は抗 CD9 抗体では一部が沈降したが、抗 CD63 抗体では沈降しなかった。exosome II に豊富に存在する Mucin-5B、IgA の抗体による免疫沈降を行っても exosome II はほとんど沈降しなかった。よって、exosome II 画分には、エキソソーム本体への結合が緩い、結合せずに相互作用しているタンパク質が存在することが考えられた(図4)。

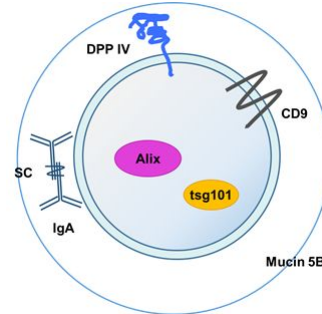


図4 exosome II のタンパク質の存在状態(推測)

exosome II の PMB カラム非結合画分の LPS 含有量は低下し(表1)、RAW264.7 細胞添加時には NO 産生はほぼ抑制された。しかしながら、PMB カラム処理 exosome II と IFN- γ を RAW264.7 細胞に添加すると、NO 産生は PMB カラム未処理 exosome II と同様に顕著に増加した。

表1 exosome II 画分の PMB カラム処理における LPS 濃度の変化

	total protein (μ g)	total LPS (ng)	LPS/exosome protein (ng/ μ g)
control	50.0	31.1	0.622
PMB column-1*	27.6	6.89	0.250
PMB column-2*	5.20	N.D.**	-

* Fraction No.1
** N.D., not detected

* カラムを通過した最初の画分 (No.1) で測定を行った。

exosome I (DPP IV-非含有エキソソーム) については exosome II と同様に PMB 固定化レジン処理で LPS は除去しきれず、リクロマトで全ての成分がレジンに吸着した。しかしながら RAW264.7 細胞に PMB カラム非結合画分および IFN- γ を添加しても NO 産生は見られなかった。

以上のことから、exosome II (DPP IV-エキソソーム) は平常時には表面に LPS を吸着して、口腔内での過剰な防御反応(炎症)を抑制し、炎症時には IFN- γ と協調的にマクロファージを活性化し、殺菌作用を持つ NO 産生を起こす作用があることが示唆された。

(1)- ERAP1-エキソソームによるマクロファージ活性化機構の解明

LPS で活性化した RAW264.7 細胞より ERAP1-エキソソームを単離し、未活性化状態の RAW264.7 細胞に添加すると、終濃度 50

ug/mL 添加時には PMB 存在下においても LPS 刺激時と同程度の活性化(NO 産生および貪食活性の亢進) を認めた。さらに ERAP1 は exosome II (DPP IV-エキソソーム)にのみ存在することも見いだした。以上のことから、マクロファージ活性化能を持つエキソソームにはアミノペプチダーゼが豊富に含まれ、アミノペプチダーゼ-エキソソームは LPS が関与しないマクロファージ活性化経路も有することが考えられた。

(2) エキソソームのナノキャリアとしての可能性の検証

エキソソームの臨床的応用および体内挙動の解析を目的とした安定性の検討を行った。精製した唾液由来エキソソームは 4、約 2 年経過後もタンパク質濃度、DPP IV 活性、エキソソームタンパク質 (DPP IV、Alix、Tsg101、CD9)、電子顕微鏡画像、粒子径はほぼ保たれていた (図 5) ことから、様々な条件下での安定性を検討した。本研究には唾液由来 DPP IV-エキソソームである exosome II を用いた。

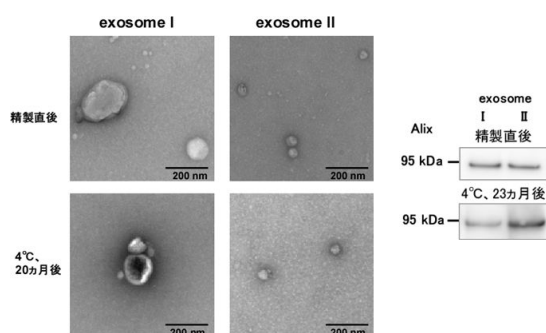


図 5 4、20 ヶ月以上保存したエキソソームの透過電顕およびエキソソームマーカータンパク質のウェスタンブロット

(2)- エキソソームの体内挙動の検討

37、pH7.4 では、10 時間までは上記指標に変化は認められなかった。胃内条件(37、pH 3)では胃内通過時間(3 h)で DPP IV 活性が約 80%に減少した以外に変化は認められなかった。胃内消化酵素のペプシン添加時は、DPP IV 活性は 3 時間後に約 50%となり、CD9 は 1 時間後以降では完全に分解された。パンクレアチン添加時は、DPP IV 活性は 3 時間後もほぼ保たれていたが、CD9 は 1 時間後以降に分解物と見られる低分子のバンドが検出された。いずれの条件でも他の検討したタンパク質、形態に変化は認められなかった。よって、口腔内に分泌されたエキソソームは一部の外部タンパク質が分解されるが、腸内に達する可能性が十分にあると考えられた。

(2)- 全唾液の保存条件の検討

オーダーメイド医療に唾液エキソソームを利用するためには、全唾液を採取後に保存

することが想定される。4、7 日間または 28 日間保存後にエキソソームを精製し、採取直後に精製したエキソソームと比較した。DPP IV 活性、エキソソームマーカータンパク質 (Alix、Tsg101、CD9) に変化はみられなかったが、エキソソーム表面に存在すると考えられる Mucin-5B は経時的に分解産物が検出された。形態に変化は認められなかった。よって、エキソソームは唾液を低温に保存すれば一ヶ月以内は精製可能と考えられた。

(2)- エキソソームの保存条件の検討

唾液エキソソームにおける凍結融解の影響を調べた。4、-20、-80 で一晩保存後、融解したエキソソームの DPP IV 活性は保存温度が下がるほど減少し、-80 では約 80%になった。粒子径には変化は認められなかったため、短期間であれば 4 での保存が良いと考えられた。

(2)- 界面活性剤 (NP-40、Triton X-100、SDS) 存在下でのエキソソームの変化

唾液エキソソームの安定性に関わる構造を調べるため、NP-40、Triton X-100、SDS を添加後、超遠心を行い、沈殿と上清の変化を上記指標により検討した。NP-40 および Triton X-100 添加時には DPP IV 活性は完全に上清に移行した。ウェスタンブロットでは、膜タンパク質 (CD9) は完全に上清に移行したが、細胞内タンパク質の Alix および Tsg101 は沈殿から検出された。SDS 添加時は調べた全てのタンパク質が上清に移行した。粒子径は未処理のエキソソーム > NP-40 処理エキソソーム > Triton X-100 処理エキソソームの順に低下し、SDS 処理では粒子は確認できなかった。電顕写真でも、SDS 以外の界面活性剤添加時は小胞が存在していた。以上のことから、エキソソーム内部は比較的強固な構造であり、脂質二重膜の溶解後も、細胞内タンパク質は保たれていることが推察された。

以上、本研究を通して DPP IV-エキソソームは、細菌感染などによる炎症により、免疫反応を活性化し、特に唾液由来 exosome II (DPP IV-エキソソーム)においては、口腔内の生体防御に関わることが示唆された。ただし、アミノペプチダーゼと免疫活性化の関連については今後さらに詳細な検討が必要である。また、唾液由来エキソソームの高度な安定性が明らかとなり、オーダーメイド医療における生体由来の素材として有望であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Involvement of Phenylalanine 297 in the Construction of the Substrate Pocket

of Human Aminopeptidase B.
Ohnishi A., Watanabe J., Ogawa Y., Goto Y.,
Hattori A., Tsujimoto M.
Biochemistry. 6;54(39):6062-70, (2015)査
読有

(2) Role of glutamine-169 in the substrate
recognition of human aminopeptidase B.
Ogawa Y., Ohnishi A, Goto Y., Sakuma Y,
Watanabe J, Hattori A, Tsujimoto M.
Biochim Biophys Acta. 1840(6):1872-1881.
(2014) 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

(1) 桑田 奈宝子, 小川 裕子, 小倉 葵,
谷口 由真, 米川 綾, 秋元 義弘, 川上
速人, 矢ノ下 良平 (代表者 桑田 奈宝
子) ヒト唾液由来エキソソームの消化管内環
境における安定性の検討
第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会
大会合同大会 BMB2015 神戸 2015 年 12 月 1
日 「神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)」

(2) 小川 裕子, 秋元 義弘, 桑田 奈宝
子, 谷口 由真, 米川 綾, 小倉 葵, 矢
ノ下 良平 (代表者 小川 裕子) ヒト唾
液由来エキソソームの消化酵素に対する安
定性の検討 日本薬学会 第 135 年会 2015
年 3 月 28 日 「デザイン・クリエイティブ
センター神戸(兵庫県・神戸市)」

(3) 小川(池本) 裕子, 桑田 奈宝子, 後
藤 芳邦, 池本 守, 辻本 雅文, 矢ノ下
良平 (代表者 小川 裕子) ヒト唾液エキソ
ソームによるマクロファージの活性化 第
87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 18 日
「国立京都国際会館(京都府・京都市)」

(4) 小川 裕子, 角田 圭, 登松 千晴,
秋元 義弘, 矢ノ下 良平 (代表者 小川
裕子) ヒト唾液由来エキソソームの安定性の
検討 日本薬学会 第 134 年会 2014 年 3 月
28 日 「熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)」

〔その他〕

ホームページ等

[http://pharm.thu.ac.jp/research/unit/ma
kukinou.html](http://pharm.thu.ac.jp/research/unit/ma
kukinou.html)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

辻本 雅文 (TSUJIMOTO Masafumi)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：00281668

矢ノ下 良平 (YANOSHITA Ryohei)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：90267336

後藤 芳邦 (GOTO Yoshikuni)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：90455345