

唾液中の細胞外小胞に秘められた体内メッセージ

小川裕子

帝京平成大学薬学部 細胞機能教育研究部門 膜機能ユニット 准教授

責任著者連絡先：帝京平成大学薬学部
〒164-8530 東京都中野区中野 4-21-2
小川裕子
email: y.ogawa@thu.ac.jp

細胞外小胞 (extracellular vesicles, EVs) は、新しい細胞間情報伝達機構として注目されている。EVs はすべての細胞で分泌されると考えられており、血液、尿等の体液および唾液、母乳、涙液等の分泌液にも存在している。EVs の一種である exosome は 1980 年代の発見当初、細胞内の不要な成分を細胞外に放出する機構と認識されたが、免疫細胞由来 exosome が抗原提示能を示すことが報告され、その機能が注目されるようになった。その後、EVs 内部に mRNA および miRNA などの核酸が存在し、他の細胞に融合後、mRNA が翻訳されること (Valadi H, et al. Nat Cell Biol. 2007)、がんの転移に関与すること (Hoshino A, et al. Nature. 2015) が報告された。EVs 研究は現在、基礎研究のみならず疾患バイオマーカーの探索、DDS 素材、遺伝子治療等の医療への応用の分野で急速に発展している。

筆者らは、ヘビ毒に含まれるジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP IV) 等の酵素を研究対象としていたが、ヘビ毒中の DPP IV が膜貫通部位を有していること、ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) において排除体積で溶出されることから、ヘビ毒由来 EVs を見出した (Ogawa Y, et al. Toxicon. 2008)。ヘビの毒腺はヒトの唾液腺に相当することから、ヒト唾液に DPP IV が結合した EVs が存在することを報告した (Ogawa Y, et al. Biol Pharm Bull. 2008)。

EVs の分離は、超遠心で沈殿させる方法が汎用されているが、筆者らは、上記の経緯により限外ろ過と GFC を組み合わせて唾液由来 EVs を分画している (図 1)。唾液を GFC で分離すると、排除体積付近と DPP IV 活性のピークの 2 画分から EVs が検出され、それぞれ EV-I (平均直径 84 nm)、EV-II (平均直径

41 nm) と称している (Ogawa Y, et al. Biol Pharm Bull. 2011)。EV-I、EV-II のタンパク質構成成分は類似しており、共に EVs からよく検出されるタンパク質 (Alix, CD63, TSG101) および唾液タンパク質 (IgA と mucin 5B) が含有されていた。さらに EV-I には膜タンパク質として mucin 1, アミノペプチダーゼ N, 内部からは ezrin 等の細胞膜裏打ちタンパク質が多く検出された。一方、表面の膜タンパク質の存在状態には差があり、EV-I は mucin 1, EV-II は DPP IV に加えて CD9 が EVs 表面に露出していた。DPP IV は喘息、MUC1 は上皮性のがんで発現が亢進することが知られている。EVs はこれら疾患の重症度、進行度および罹患の有無を知らせるマーカーになりうる。

唾液由来 EVs の RNA 解析では、mRNA, miRNA の他に piwi-interacting RNA (piRNA), small nucleolar RNA (snoRNA) およびレトロトランスポゾン、pseudogene などの non-coding RNA が検出された (Ogawa Y, et al. Biol Pharm Bull. 2013, 2015)。これら RNA は核酸分解酵素により分解されやすいため、EVs に内包されることでメッセージを遠隔器官に伝える運び手になる。

唾液由来 EV-II は非常に安定性が高く、4℃、約 2 年間保存しても形態に変化はなく、唾液を 4℃で 28 日保存後に GFC を行っても、その形態と構成タンパク質はほとんど変化しなかった (Kumeda N, et al. Biol Pharm Bull. 2017)。in vitro で消化管内を模した条件 (胃内条件としてペプシン存在下、37℃、pH3.0 で反応後、腸内条件として唾液抽出物パンクレアチンと胆汁酸存在下で 37℃、pH7.4 で反応) では EV-II は可溶化された (図 2)。しかしながら胃内条件までは EV-II 表面のタンパク質は分解されるものの、内部のタンパク質は保

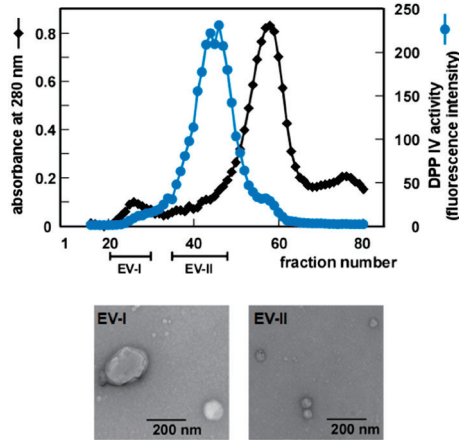


図1 ヒト唾液由来EVの分離
唾液中のEVは、排除体積付近の (EV-I) およびDPP IV活性のピーク (EV-II) に溶出される。

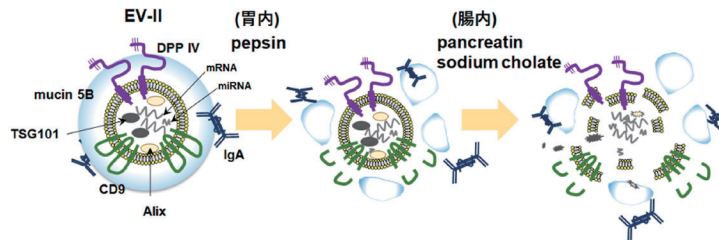


図2 EV-IIの消化管内条件における安定性

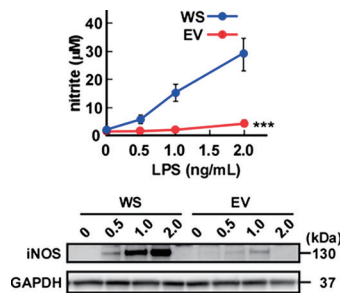


図3 全唾液 (WS) およびEV-IIによるRAW264.7細胞からのNO産生

持され、形態も維持された。したがってEV-IIは腸管に到達するまでは安定にメッセージを保持する可能性が考えられた (Ogawa Y, et al. BB Reports. 2021)。

唾液由来EVsの機能解析の一端として、EV-IIのマクロファージへの作用を検討した。全唾液をマクロファージ様培養細胞株 (RAW264.7細胞) に添加すると一酸化窒素 (NO) が産生される (図3)。このNO産生は唾液中のリポ多糖 (LPS) がToll様受容体4を介して誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) を発現させたことによるものである。一方、唾液由来EV-IIによるNO産生は抑制されていた。唾液中のLPSの平均2割はGFCでEV-IIと同じ挙動を示す。EV-IIには、LPSに結合する抗菌ペプチドLL-37の前駆体 (CAP18) が含有されるが、CAP18はLPSによる

RAW264.7細胞からのNO産生を抑制した。以上のことから、唾液由来EV-IIは口腔内のLPSを結合しており、口腔内から消化管内において平常時は過剰な炎症を抑制し、恒常性を保っている可能性がある。

以上、筆者らが得てきた成果は、EVsが体内状態を知らせるメッセージ、あるいはその運び手になることを示唆するものである。唾液は非侵襲的に採取できるので、唾液由来EVsは疾患バイオマーカーとして期待できる。一方で、その生理的役割はまだほとんど解明されていない。唾液中には複数の種類のEVsが存在すること、それぞれが多様な構成成分を含んでいることが、解析を困難にする一因である。今後、これらの問題を解決し、EVsからのメッセージの全容を明らかにしたい。