

乳酸菌を貪食したマクロファージが放出する細胞外小胞の脂肪細胞および骨格筋細胞への取り込み

Intracellular uptake of extracellular vesicles shed by bone marrow-derived macrophages stimulated with lactic acid bacteria in adipocyte and skeletal muscle cell line

鶴田 剛司¹、伊藤 洋平¹、西野 直樹¹、Teresia Aluoch Muhomah¹、
勝又恵実子¹、園山 慶²

Takeshi Tsuruta¹, Yohei Ito¹, Naoki Nishino¹, Teresia Aluoch Muhomah¹,
Emiko Katsumata¹, Kei Sonoyama²

¹岡山大学大学院環境生命科学研究科

²北海道大学大学院農学研究院

¹Okayama University Graduate School of Environmental and Life Science

²Hokkaido University, Research Faculty of Agriculture

はじめに

細胞外小胞(Extracellular vesicles :EVs)は直径30~100nmの膜小胞であり、マクロファージ、白血球、上皮細胞、腫瘍細胞などの多様な細胞から分泌される(1)。分泌されたEVs内には分泌細胞由来のタンパク質、Messenger RNA(mRNA)、microRNA(miRNA)が含まれており、これらの分子を介して細胞間・組織間の情報伝達を行う(2)。我々は生体内で起こる様々な細胞間情報伝達の中でも、マクロファージ-脂肪細胞間および骨格筋細胞間のEVsを介した細胞間情報伝達に着目し、研究を進めてきた。マクロファージは腸管をはじめとする様々な組織に存在する免疫細胞で、マクロファージが分泌するEVsは脂肪細胞に取り込まれることが報告されている(3)。また、マクロファージはプロバイオティック乳酸菌の刺激により活性化し、マクロファージの分泌物のプロファイルが変化することが報告されている(4)。しかし、プロバイオティック乳酸菌の刺激がマクロファージの分泌するEVsの分泌量、EVs内のタンパク質発現量、脂肪細胞および骨格筋細胞へのEVsの取り込み量にどのような影響を及ぼすかはこれまで検証されていない。そこで本研究では、マウス骨髄由来のマクロファージをプロバイオティック乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* No14株(LP14)で刺激し、分泌されたEVsを用いてそれらを検証した。

方法

マウス骨髄由来マクロファージの培養

7週齢の雄性C57BL/6マウスから大腿骨および腓骨を採取した。骨の両端を切り、片側の骨の切断面より注射針を挿入し、RPMI培地を充填したシリンジを用いて骨髄細胞を回収した。回収した骨髄細胞をセルストレイナー(70μm)に通した後、3mLのACK lysis bufferを添加し、室温で5分間静置した。RPMI培地で骨髄細胞を洗浄後、15cmディッシュに播種し、分化誘導培地(DMEM、20%L929培養上清、10%FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン/ゲンタマイシン)で培養した。3日ごとに培地を交換し、80%コンフルエントに達するまで培養した後、骨髄由来のマクロファージとして供試した。

細胞外小胞の回収

培地を試験培地(DMEM、1%L929培養上清、1%EVsフリーFBS、ペニシリン/ストレプトマイシン/ゲンタマイシン)に置換した。対照区およびLP14添加区を設け、LP14処理区には 5×10^7 CFUのLP14を添加した。72時間培養後、培養上清を回収した。それぞれの培養上清を、段階的に遠心加速度を上げて3段階の遠心分離を行った(1回目:200×g、10分、2回目:500×g、10分、3回目:2,000×g、10分、すべて4°Cで実施)。遠心分離後、回収した上清を0.22μmフィルターによりろ過した。フィルターろ過した上清を超遠心分離し(120,000×g、1時間、4°C)、上清を除去後、沈殿したEVsをPBSで懸濁した。対照区より回収したEVsをLP14(-)EVs、LP14添加区より回収したEVsをLP14(+)EVsとした。

細胞外小胞の分泌量

細胞外小胞の分泌量は、一般的に細胞外小胞内に含まれるタンパク質量を指標としている。回収した EVs 内に含まれるタンパク質濃度を BCA 法 (タカラバイオ) により定量した。

細胞外小胞のテトラスパニンファミリーの発現

EVs のマーカータンパク質であるテトラスパニンファミリー CD9、CD63、CD81 の発現をウェスタンブロッティング法により定量した。タンパク質量が 10 μg になるよう調整した各 EVs を Nu-PAGE ゲル (Invitrogen) に添加し、電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体として抗 CD9、CD63、CD81 抗体 (R&D systems) を転写膜に添加し、室温で 1 時間静置した。次いで、HRP 標識の二次抗体を転写膜に添加し、室温で 1 時間静置した。抗体反応後、ECL select (GE Healthcare UK) を使用し、化学発光により標的タンパク質を検出した。

細胞外小胞の細胞内取り込み

マウス脂肪細胞株である 3T3L1 細胞およびマウス骨格筋細胞株である C2C12 細胞を 96 ウェルプレートおよびカルチャースライド (Watson) に播種し、100%コンフルエントに達するまで DMEM 培地 (10%FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン) で培養した。コンフルエントに達した後に、培地を DMEM 培地 (1% EVs フリー FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン) に置換し 16 時間培養し、EVs の細胞内取り込み試験に供試した。

EVs の細胞内取り込み (Dose test)

上記で回収したマクロファージ由来の EVs を PKH67 (Sigma aldrich) で蛍光染色した。96 ウェルプレートで培養した各細胞株にそれぞれ 6 つの試験区を設け、各試験区に 2 倍段階希釈した PKH67 染色 EVs を添加した (0.015625-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。12 時間の培養後、上清を除去し、PBS で細胞を洗浄した。洗浄後、蛍光プレートリーダー (SH-9000) を用いて、PKH67 の蛍光値を測定した。この際、2 倍段階希釈した PKH67 染色 EVs (0.015625-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のみを添加したウェルの蛍光値も測定し、検量線を作成した。作成した検量線から細胞内に取り込まれた EVs 量を算出した。

EVs の細胞内取り込み (経時変化)

96 ウェルプレートで培養した各細胞株に 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の PKH67 染色 EVs を添加し、添加後 3、6、

9、12 時間後に EVs の細胞内取り込み量を上記の方法により蛍光プレートリーダーで定量した。

EVs の細胞内取り込みの観察

カルチャースライドに培養した各細胞株に 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の PKH67 染色 EVs を添加し、12 時間培養した。培養後、上清を除去し、10%ホルマリンを添加した。15 分の静置後、PBS で細胞を洗浄し、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories) で封入処理及び核染色を施し、蛍光顕微鏡 (BZ-X710) で観察した。

統計解析

測定値は平均値 \pm 標準誤差で示し、群間の差の検定には Graphpad Prism 7 を用いた。独立した 2 群間の差の検定は Student t 検定を行った。EVs の取り込み解析では、LP14 刺激の有無および EVs 添加量、あるいは LP14 刺激の有無および EVs 添加後の培養時間の二要因でそれぞれ二元配置分散分析を行った。なお、いずれの場合も有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果および考察

細胞外小胞の分泌量およびテトラスパニンファミリータンパク質発現

LP14(+) EVs の分泌量 (16.84 \pm 2.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は LP14(-) EVs の分泌量 (31.80 \pm 2.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と比較して有意に低い値を示した。この結果から LP14 株に刺激されることによって、マクロファージから

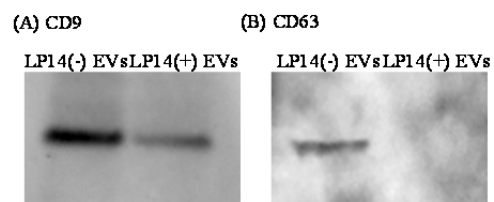


図1 細胞外小胞のテトラスパニンファミリータンパク質発現。
(A) CD9、(B) CD63

分泌される EVs 量は減少することが示唆された。

細胞外小胞のテトラスパニンファミリータンパク質の発現解析結果を図 1 に示した。CD81 は LP14(-) EVs および LP14(+) EVs のどちらにおいても発現が確認されなかった。CD9 の発現量は LP14(+) EVs と比較して LP14(-) EVs で発現量が大きく、CD63 は LP14(-) EVs でのみ発現が確認された。これらの結果から、マクロファージが LP14 に刺激されることにより分泌される細胞膜小胞のテトラスパニンファミリータンパク質 CD9 および

CD63 の発現が減少することが示唆された。CD9 は樹状細胞においてエクソソームの形成に関わっていることが示唆されていることから(5)、LP14(-) EVs および LP14(+ EVs の CD9 発現量の差がこれらの EVs の分泌量の差に関係していると考えられる。Segura らは樹状細胞が分泌する EVs の CD9 の発現が、樹状細胞を細菌の炎症誘導分子であるリポ多糖で刺激することによって減少することを報告している(6)。リポ多糖は貪食細胞の表面に存在する Toll like receptor 4 (TLR4) によって認識され、NF-κ B シグナル伝達系を活性化する(7)。また、乳酸菌の主要な菌体成分であるペプチドグリカンやリポタンパク質は TLR2 のリガンドであり、MyD88 をアダプター分子として NF-κ B シグナル伝達系を活性化する(7 Akira et al, 2006)。これらの報告から、LP14 によるマクロファージの NF-κ B シグナル伝達系の活性化が EVs の CD9 や CD63 などのテトラスペニンファミリータンパク質の発現を抑制している可能性が考えられる。

細胞外小胞の細胞内取り込み

LP14(-) EVs および LP14(+ EVs の 3T3L1 細胞および C2C12 細胞への取り込み量を評価した結果を図 2 (Dose test) および図 3 (経時変化) に示した。また、各細胞株への EVs の取り込みを蛍光顕微鏡で観察した結果を図 4 に示した。LP14(-) EVs および LP14(+ EVs は EVs 添加量に依存し

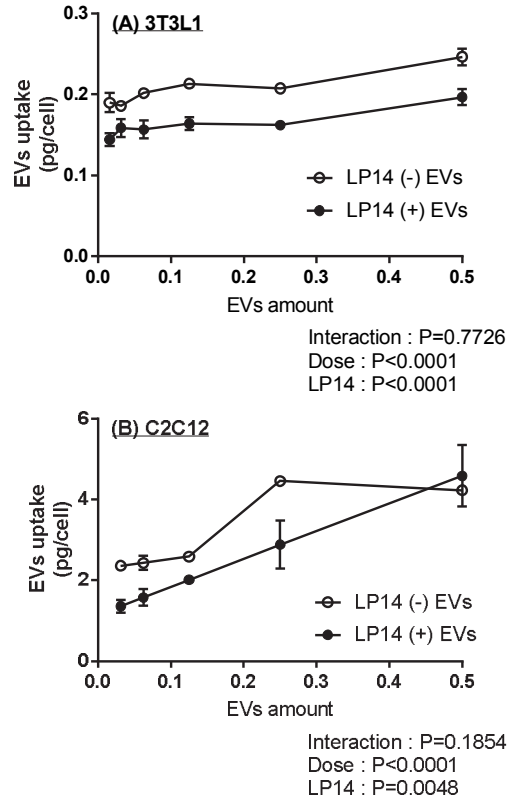


図2 細胞外小胞の細胞内取り込み (Dose test) 。
(A) 3T3L1細胞内へのEVs取り込み
(B) C2C12細胞内へのEVs取り込み

て脂肪細胞株 3T3L1 細胞および骨格筋細胞株である C2C12 細胞内への EVs 取り込み量は有意に増加した(図 2A, P<0.0001、図 2B, P<0.0001)。また、各細胞株への EVs の取り込みは EVs 添加後の培養時間に依存して増加した(図 3A, P<0.0001、図 3B, P<0.0001)。さらに、LP14(+ EVs の細胞内への取り込み量は 3T3L1 細胞および C2C12 細胞のどちらの細胞株においても LP14(-) EVs の取り込み量と比較して有意に低かった(図 2A, P<0.0001、図 2B, P=0.0048、図 4)。

この結果から、マクロファージが LP14 に刺激されることで、マクロファージから分泌される EVs は

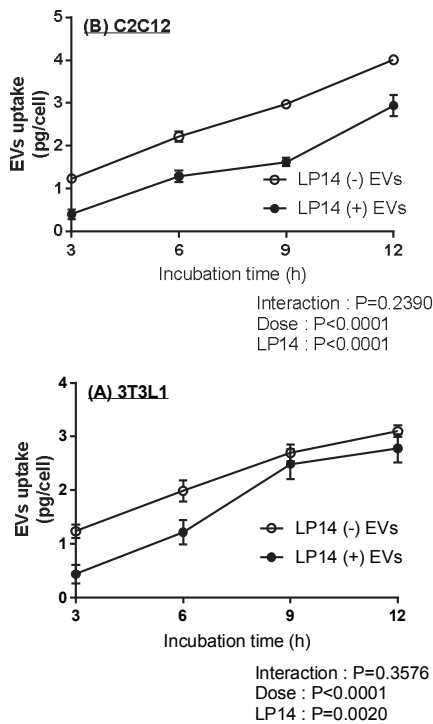


図3 細胞外小胞の細胞内取り込み (経時変化) 。
(A) 3T3L1細胞内へのEVs取り込み
(B) C2C12細胞内へのEVs取り込み

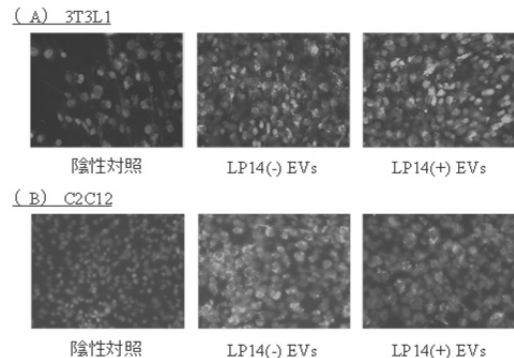


図4 細胞外小胞の細胞内取り込み観察。
(A) 3T3L1細胞内へのEVs取り込み
(B) C2C12細胞内へのEVs取り込み
緑: PKH67 (EVs)、青: DAPI (細胞核)

脂肪細胞および骨格筋細胞に取り込まれにくくなることが示唆された。Escrevente らは、卵巣がん細胞への EVs の取り込みに EVs の膜表面に存在するタンパク質が関係していることを報告している (8)。本研究においても、LP14(+) EVs は LP14(-) EVs と比較して EVs 表面タンパク質のひとつである CD9 および CD63 の発現が減少していた (図 1)。LP14 の刺激によってマクロファージが分泌した EVs の細胞内取り込みが減少する詳細な機序は依然として不明であるが、CD9 および CD63 などの EVs 表面タンパク質がこの現象に関係している可能性がある。

【文献】

1. Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200(4), 373-383.
2. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654.
3. Zhang, Y., Shi, L., Mei, H., Zhang, J., Zhu, Y., Han, X., & Zhu, D. (2015). Inflamed macrophage microvesicles induce insulin resistance in human adipocytes. *Nutrition & metabolism*, 12(1), 21.
4. Matsumoto, S., Hara, T., Hori, T., Mitsuyama, K., Nagaoka, M., Tomiyasu, N., Suzuki, A., & Sata, M. (2005). Probiotic *Lactobacillus* induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 140(3), 417-426.
5. Wong, W. (2010). Exit by Exosome. *Sci. Signal.*, 3(141), ec294-ec294.
6. Segura, E., Nicco, C., Lombard, B., Véron, P., Raposo, G., Batteux, F., Amigorena, S., & Théry, C. (2005). ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood*, 106(1), 216-223.
7. Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology*, 4(7), 499-511.
8. Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P., & Costa, J. (2011). Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC cancer*, 11(1), 108.