

乳児小腸上皮による乳細胞外小胞認識と応答の分子基盤の解析

名古屋大学大学院 生命農学研究科
大島 健司

要旨

【背景と目的】

細胞外小胞 (extracellular vesicles; EVs) には膜タンパク質、膜脂質のみでなく、産生細胞の細胞質に由来するタンパク質や核酸 (mRNA, non-coding RNA など) が含まれ、細胞間での複雑な情報伝達手段として使用されることが明らかとされつつある。乳中に含まれる大量の EVs は、標的細胞の遺伝子やタンパク質の発現パターンを変化させ、乳児の代謝制御や組織発達、免疫調節に関与すると考えられている。しかしながら EVs による生理機能発揮の基礎的な作用機序の知見が不十分であり、乳児にどのような作用を与えているか未だに明確になっていない。我々は、乳脂肪球皮膜の主要タンパク質の一つである milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) が、乳 EVs 表面に結合していることを明らかとしている。MFG-E8 はその構造により、細胞間や小胞-細胞間を架橋する認識タンパク質として働くため、標的細胞による乳 EVs の認識にも関与していると考えられる。本研究では、乳児消化管で機能する乳 EVs 上の認識分子として MFG-E8 に焦点を当て解析を行った。

【方法】

C57BL/6N 系統 Mfge8 遺伝子ヘテロ接合型(hetero)マウスと C57BL/6N 系統ホモ接合型 Mfge8 遺伝子欠損(KO)マウスを交配させ、生まれた仔マウス (hetero または KO) を母親マウス(hetero または KO)に 10 日間哺育させた後、仔マウスの近位小腸組織から total RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。有意に発現変動が見られた遺伝子について、リアルタイム PCR 解析により再現性を調べた。また乳児小腸および胃内容物に含まれる MFG-E8 の Western blot 解析を行った。

【結果・考察】

乳児胃内と小腸内から未分解 MFG-E8 が検出され、乳児消化管内で機能性を持った MFG-E8 が存在することが示唆された。RNA-seq 解析から、母親マウスの遺伝型 (乳中 MFG-E8 の有無) に依存して 23 種の遺伝子の発現量が偽陽性率 10% 以下の確率で変化した。一方、仔マウスの遺伝型に依存して有意に発現変動した遺伝子は Mfge8 を含め 2 種のみだった。これは、乳中 MFG-E8 が乳児消化管の遺伝子発現を制御していることを示唆している。発現変動遺伝子の遺伝子オンロジーエンリッチメント解析の結果、KO 母親マウスの仔において薬物代謝関連遺伝子が濃縮して減少していた。リアルタイム PCR 解析の結果、発現変動量が比較的大きい遺伝子で RNA-seq 解析の再現性が確認された。以上の結果から、乳中 MFG-E8 は生体異物および毒物の排出を促進し、乳児腸管の恒常性維持に寄与する可能性が考えられる。

緒言

乳中には、乳児の生育に十分な栄養素だけでなく、乳児の健康な発育を促進するため進化により獲得された様々な生理活性物質が含まれている¹⁾。長年に渡る乳成分の機能解析により、主要な乳成分の機能性について多くの知見が得られているが、比較的マイナーな乳成分の機能性については、未解明なものが数多く残されている。このような乳中の機能性成分のうち、細胞外小胞 (extracellular vesicles; EVs) について近年注目が集まっている。EVs は、細胞膜に由来する脂質二重膜からなるリポソーム状の分泌型膜小胞であり、その構成成分は、膜タンパク質、膜脂質のみでなく、小胞内腔側には産生細胞の細胞質に由来する特定のタンパク質や核酸 (mRNA, non-coding RNA など) が含まれ、細胞間での複雑な情報伝達手段として使用されていることが明らかにされつつある。乳 EVs は標的細胞の遺伝子やタンパク質の発現パターンを変化させ、乳児の代謝制御や組織発達、免疫調節に関与すると考えられている²⁾。乳中には他の体液と比べ高濃度の EVs が含まれているため、牛乳から安定かつ大量に調製できる乳 EVs は、新たな機能性食品資源としても期待される。しかしながら EVs による生理機能発揮の基礎的な作用機序の知見が不十分であり、乳児にどのような作用を与えているか未だに明確になっていない点が、乳 EVs を利用する上での問題である。そこで本研究では、乳 EVs が健康な乳児の腸内環境に作用する分子メカニズムについて基礎的な解析を行うことを目的とした。

我々は、乳脂肪球皮膜の主要タンパク質の一つである milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) が、乳 EVs 表面にも結合していることを明らかとしている³⁾。MFG-E8 は泌乳期の乳腺から乳中へと分泌される膜表在型タンパク質であり、分子中にインテグリン結合モチーフと負電荷リン脂質結合ドメインを含んでいる。この2つの構造により、MFG-E8 は細胞間や小胞-細胞間を架橋する認識タンパク質として働くことが知られており、標的細胞による EVs の認識にも関与していると考えられている⁴⁾。標的細胞による EVs の認識は、その後の細胞応答を決定するために重要であるが、乳 EVs についての解析は進んでいない。本研究では、乳 EVs 上の認識分子として MFG-E8 に焦点を当て、*Mfge8* ノックアウトマウスを用いて乳中 MFG-E8 が乳児消化管で発揮する機能について解析を行った。

方法

1. 実験動物

C57BL/6N 系統野生型マウス (+/+; WT マウス) は日本 SLC 株式会社より購入した。C57BL/6N 系統ホモ接合型 *Mfge8* 遺伝子欠損マウス (*Mfge8^{tm1Osa}/Mfge8^{tm1Osa}*; KO マウス) は、京都大学医学研究科長田重一教授より(株)オリエンタルバイオサービスを介して分譲された個体を当研究室で繁殖させた。WT マウスと KO マウスを交配し、生まれたマウスを *Mfge8* 遺伝子ヘテロ接合型マウス (+/*Mfge8^{tm1Osa}*; hetero マウス) とした。hetero マウスを KO マウスと交配させ、生まれた hetero または KO 乳児マウスを母親マウスとともに飼育した (図 1)。マウスは、市販の固形飼料 (CE-2、日本クレア) と水道水を自由摂取させた。

2. RNA-seq 解析

乳児マウスは出生日を 0 日齢として 10 日齢で解剖を行い、小腸を摘出して三等分し、胃に最も近い上部から total RNA を抽出した。それぞれの群各 3 個体の Total RNA から mRNA を精製し、次世代シーケンサーにより RNA-seq 解析を行った。データの解析には、FastQC (バージョン 0.11.9)、HISAT2 (バージョン 2.2.1)、SAMtools、stringtie

(バージョン 2.1.7)、RStudio (バージョン 2022.12.0+353)、iDEP1.0 (<http://149.165.154.220/idepg/>) を使用した。

3. リアルタイム PCR 解析

10 日齢マウス小腸上部の total RNA から cDNA を調製した。全個体の cDNA について、RNA-seq 解析で有意に発現変動した遺伝子についてプライマーを作成し、リアルタイム PCR により群間の相対発現量を比較した。

4. 乳児消化管内の乳由来 MFG-E8 タンパク質の検出

生後 10 日目に、hetero 親または KO 親のミルクを摂取した KO 仔マウスから胃内容物を回収し PBS 懸濁した。段階的な遠心分離により脂質画分、EVs 画分、超遠心上清画分を得た。同じ個体の小腸組織から小腸上部管腔内容物を得た。得られたサンプル中に含まれる MFG-E8 タンパク質を Western blot により解析した。

結果

1. 乳児消化管内での MFG-E8 消化の解析

hetero 親に哺育された KO 仔マウス (Mfge8(+)) の胃内容物全画分、脂肪画分、超遠心後上清および EVs 画分において、66kDa あたりに母乳中 MFG-E8 と思われるバンドが検出された (図 2)。このバンドは、KO 親に哺育された KO 仔マウスでは観察されなかった。同様に、hetero 親 KO 仔マウス 2 個体の小腸上部 (SI1, 2 画分) において、未分解の乳中 MFG-E8 と思われるバンドが検出された (図 3)。

2. 乳中 MFG-E8 摂取により乳児小腸で発現変動する遺伝子の解析

乳児により摂取された MFG-E8 の機能を解析するため、hetero マウスと KO マウスを交配させ 4 群の仔マウス (hetero の母親を持つ hetero または KO の仔および KO の母親を持つ hetero または KO の仔) を得た (図 1)。この実験系で得られた仔マウスの遺伝子発現解析を行うことで、発現変化の要因が乳中 MFG-E8 によるものなのか、乳児組織の内因性 MFG-E8 によるものなのかを判別することが可能である。各群の仔マウス小腸上部で発現する遺伝子を RNA-seq により網羅的に解析したところ、母親マウスの遺伝型に依存して 23 種の遺伝子の発現量が偽陽性率 10%以下の確率で変化した。その一方、仔マウスの遺伝型に依存して有意に発現変動した遺伝子は Mfge8 を含め 2 種のみだった。発現変動遺伝子の遺伝子オンロジーエンリッチメント解析の結果、KO 母親マウスの仔において第 2 層の薬物代謝および解毒代謝に関与する遺伝子が濃縮して減少していた (図 4)。

RNA-seq 解析で発現変動する遺伝子として候補に上がった遺伝子のうち、発現変動の大きかった 2 遺伝子と薬物代謝に関連する 5 遺伝子についてリアルタイム PCR 解析を行った。その結果、発現変動が大きい 2 遺伝子と薬物代謝に関連する 2 遺伝子について RNA-seq 解析の再現性が確認された。

考察

1. 乳児消化管内での MFG-E8 消化の解析

未分解の MFG-E8 が乳児胃内から検出された。これは、ヒト乳児消化器系を模した in vitro 消化解析を行った過去の解析と一致している⁵⁾。このことから、乳児マウスの胃中で母乳中 MFG-E8 は、酵素消化に対して安定であることが示された。また胃内容物を

分画したところ、MFG-E8 は脂肪画分や EVs 画分から検出された。そのため、MFG-E8 が胃内でも milk fat globule membrane や EVs の脂質二重膜に存在するリン脂質と結合していると考えられる。一方小腸では上部でのみ未分解タンパク質に相当するバンドが検出されたため、MFG-E8 は小腸内で分解されることが考えられる。過去の文献でも、ペプシン分解後にトリプシンとキモトリプシンによる連続分解を行うと、MFG-E8 は限定分解されることが観察されており、今回の結果と合致していた⁶⁾。以上から、乳中 MFG-E8 は乳児消化管の上部では未分解な状態で存在することが示された。

2. 乳中 MFG-E8 摂取により乳児小腸で発現変動する遺伝子の解析

乳児小腸上部で変動する遺伝子数は、乳児の *Mfge8* 遺伝子が欠損し内因性の MFG-E8 を産生できない場合よりも、母親の *Mfge8* 遺伝子が欠損した場合の方が多かった。この結果は、乳中 MFG-E8 が乳児消化管の遺伝子発現を制御していることを示唆している。母親の *Mfge8* 遺伝子が欠損した場合に変動する遺伝子は、化学物質代謝に関連する遺伝子が多かったことから、乳中 MFG-E8 は生体異物および毒物の排出を促進し、乳児腸管の恒常性維持に寄与する可能性が考えられた。しかし、母乳による乳児解毒作用の向上については未だ知見がなく、今回観察された遺伝子の発現変動が乳児においてどのような意味を持つかは、さらなる解析が必要である。また、MFG-E8 による遺伝子発現変動に EVs が関与しているかについても、さらなる解析が必要である。今回は遺伝子の発現変動を解析する組織として小腸上部を選択したが、未分解 MFG-E8 が最も多く存在するのは胃内であった。また化学物質代謝を主に担っている組織は肝臓である。そのため、今後は同様の解析を胃や肝臓で行う必要がある。

参考文献

- 1 Carr, L. E. *et al.* Role of Human Milk Bioactives on Infants' Gut and Immune Health. *Front Immunol* **12**, 604080 (2021). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.604080>
- 2 Leroux, C., Chervet, M. L. & German, J. B. Perspective: Milk microRNAs as Important Players in Infant Physiology and Development. *Adv Nutr* **12**, 1625-1635 (2021). <https://doi.org/10.1093/advances/nmab059>
- 3 Oshima, K., Aoki, N., Kato, T., Kitajima, K. & Matsuda, T. Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles. *Eur J Biochem* **269**, 1209-1218 (2002). <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02758.x>
- 4 Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**, 581-593 (2009). <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- 5 Chatterton, D. E. W., Rasmussen, J. T., Heegaard, C. W., Sørensen, E. S. & Petersen, T. E. *In vitro* digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Research on biological functions. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 373-383 (2004).
- 6 Le, T. T. *et al.* Stability of milk fat globule membrane proteins toward human enzymatic gastrointestinal digestion. *J Dairy Sci* **95**, 2307-2318 (2012). <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4947>

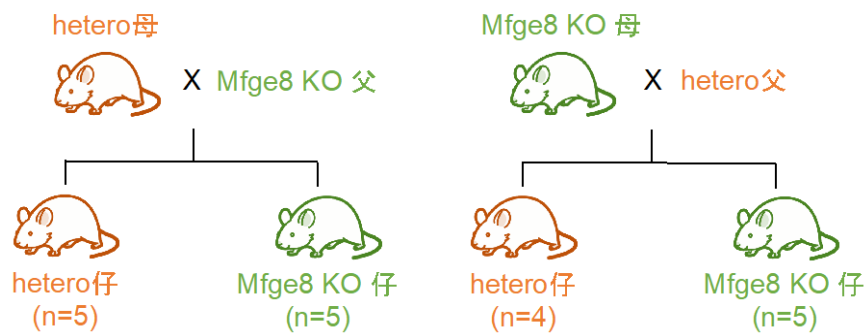


図1 乳 MFG-E8 機能解析のための
母親マウスと仔マウスの組み合わせ

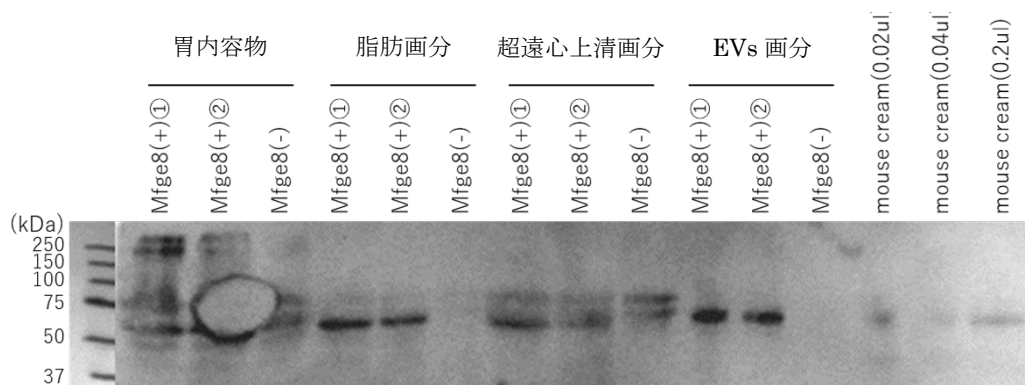


図2 乳児胃内から検出された MFG-E8
①、②は個体番号

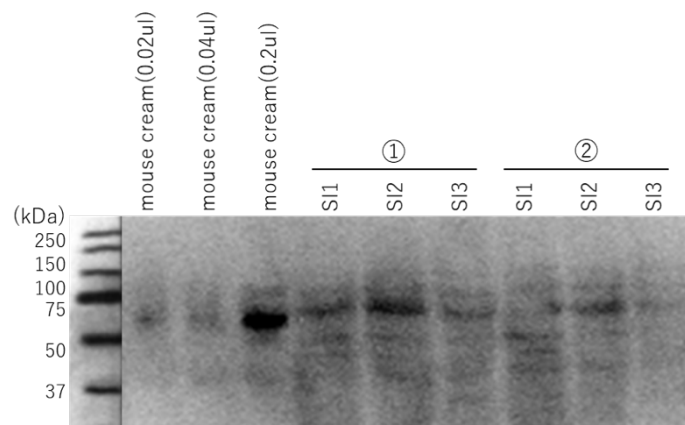


図3 乳児小腸から検出された MFG-E8
①、②は個体番号

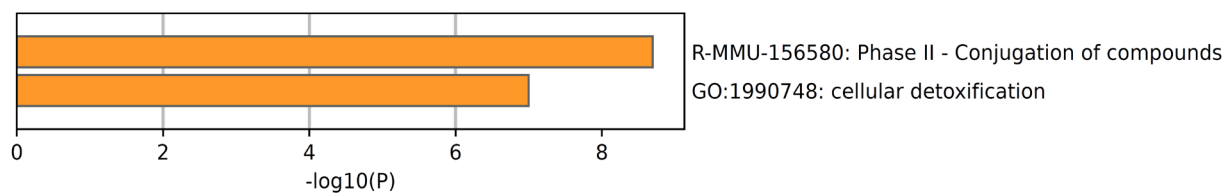


図 4 MFG-E8 を欠損する母乳で哺育された仔マウス小腸上皮で
発現変動する遺伝子のエンリッチメント解析