



細胞外に分泌される膜小胞：構成成分と生物学的機能

1. はじめに

細胞は、増殖因子やサイトカインに代表される様々なタンパク質性因子を外界からの刺激に応じて分泌し、自身、近傍、あるいは全身の標的細胞に対してシグナルを送る。これら液性因子に加えて、リン脂質二重層の生体膜からなる小胞（以下、膜小胞）が細胞種を問わず分泌される。このような膜小胞の膜上あるいは内腔には特定のタンパク質が存在することが報告されている。膜小胞分泌については、網状赤血球が分化過程で不要になった自身の膜タンパク質（トランスフェリン受容体）を「捨てる」ための手段として報告された論文が最初である。しかし、その後様々な細胞、特に免疫担当細胞や腸上皮細胞から分泌される膜小胞が、抗原提示や免疫寛容の誘導などに関わるということが明らかになり、情報伝達に加えて、細胞間でのタンパク質な

どの物質輸送担体としての機能が示唆されるようになった。本稿では、膜小胞の種類、形成・分泌、機能に関する最近の研究について概説すると共に、筆者らが研究対象としている乳腺上皮細胞から分泌され、乳中に存在する膜小胞について紹介したい。

2. 分泌膜小胞の種類と形成・分泌機構

細胞から分泌される膜小胞は、その形成と分泌機構から2種類に大別される。図1に推定される形成・分泌機構を模式的に示す。

エキソソーム (exosome) と呼ばれる膜小胞は、電子顕微鏡観察により直径が30~100nmとされ、密度勾配超遠心分離により密度が1.13g/mL前後の画分に分布するという特徴を持つ^{1,2)}。増殖因子受容体などの細胞膜表面に存在するタンパク質がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、エンドサイトーシス小胞を介して初期エンドソーム、引き続き後期エンドソームが形成される。後期エンドソームを経てリソソームで分解を受けるタンパク質がある一方で、後期エンドソーム膜がさらに内向きにくびれて形成される小さな腔内膜小胞 (ILV, intraluminal membrane vesicle) とともに後期エンドソーム内に移行するタンパク質もある。このようなILVを含む多胞体 (MVB, multivesicular body) と呼ばれるエンドソームが細胞膜と融合することにより、ILVは細胞外へと開口分泌される。このような機構で分泌される小胞がエキソソームと呼ばれる。ILVが形成される際には、後期エンドソームの限界膜 (limiting membrane) が重要な役割を果たす。なかでも限界膜表面に存在する ESCRT (endosomal sorting complex re-

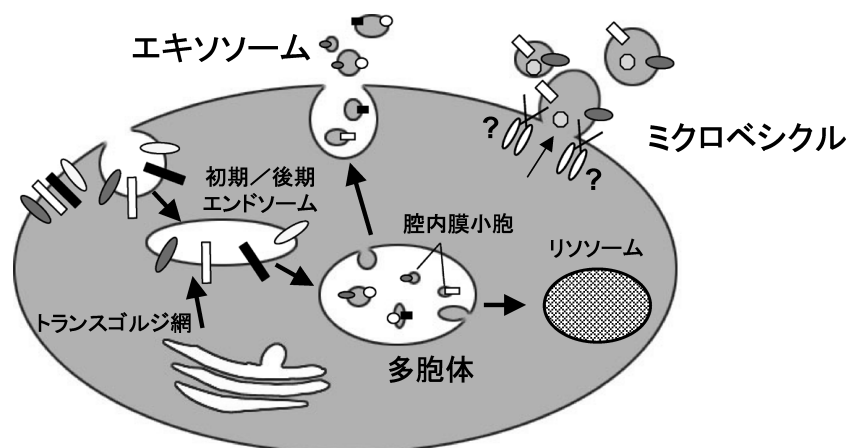


図1 膜小胞分泌経路の概略
詳細は本文参照。

quired for transport) と呼ばれるタンパク質複合体, および後述するリン脂質, コレステロール, カベオリン (caveolin) などのラフトタンパク質やテトラスパニン (tetraspanin) が ILV 形成時に積極的に関与し, 特定のタンパク質が ILV に乗るか, あるいはリソソームに向かって分解されるかを運命づける重要な役割を果たす.

一方, ミクロベシクル (microvesicle; membrane vesicle, exovesicle と呼ばれる) は, 酵母やウイルスの出芽と同様に, 細胞膜の一部が外側にくびり取られるようにして細胞外へと離出分泌される. エキソソームに比べて大きく, 直径が 1 μm に至る例も報告されている. 細胞膜の切り出しに関与する分子をはじめとして, 局在する分子や, その形成・分泌過程などについては未だ不明な点が多い.

3. 分泌膜小胞の構成成分: エキソソームを例にして

分泌される膜小胞のうちで, エキソソームを構成するタンパク質に関しては多くの知見が蓄積されている. エキソソームは後期エンドソーム膜に由来することから, 細胞内小胞輸送に関わるタンパク質 (アネキシン annexin, 低分子量 G タンパク質) が主要成分として含まれるのに加え

て, 細胞膜に由来する膜貫通型タンパク質 (インテグリン integrin, テトラスパニン), 膜表在タンパク質 (MFG-E8), ラフト構成タンパク質 (カベオリン, フロティリン flottilin), ILV がくびり取られる際に一緒に小胞内に取り込まれる細胞質タンパク質 (アクチン actin, チューブリン tubulin, 種々の細胞質酵素, 熱ショックタンパク質), および膜小胞を分泌する各細胞に特有のタンパク質 (表 1) が存在する. これらの多くは, 二次元電気泳動や質量分析を用いた網羅的なプロテオミクス解析により同定されている^{1,2)}.

一方, 膜小胞タンパク質に比べて, 脂質成分に関する知見は限られている. 網状赤血球由来のエキソソームの脂質構成成分と赤血球膜の脂質構成成分が類似すること, B 細胞由来のエキソソームには後期エンドソーム膜に濃縮されて存在しているリゾビスホスファチジン酸 (lysobisphosphatidic acid) が存在すること, エキソソームの表面には通常は細胞膜の内葉に偏在するホスファチジルセリンが存在すること, コレステロールが比較的豊富に含まれていることなどが報告されている¹⁾.

表 1 これまでに報告されている代表的な膜小胞

分泌細胞・由来	膜小胞の種類 (特定の名称)	特徴的な構成タンパク質
造血細胞		
網状赤血球	エキソソーム	トランスフェリン受容体
B 細胞	エキソソーム	MHC クラス I およびクラス II
T 細胞	エキソソーム	CD3
樹状細胞	エキソソーム	MHC クラス II
マスト細胞	エキソソーム	MHC クラス II
血小板	エキソソーム, ミクロベシクル	CD63, インテグリン αIIb , β1 , β3
単球細胞	ミクロベシクル	IL-1 β
非造血細胞		
小腸上皮細胞	エキソソーム (トレロソーム)	MHC クラス II, A33 抗原
シュワン細胞	エキソソーム	プリオン
神経細胞	エキソソーム	グルタミン酸受容体 2/3
脂腺細胞	ミクロベシクル	ヒストン H3
肝癌細胞	ミクロベシクル	FGF2
筋肉細胞	ミクロベシクル	IL-14
乳腺上皮細胞	エキソソーム, ミクロベシクル	MFG-E (ラクトアドヘリン)
生体液		
血漿	エキソソーム	MHC クラス I およびクラス II, Lamp-2
尿	エキソソーム	アクアポリン-2
精液	エキソソーム (プロスタソーム)	CD81
精巣上体液	エキソソーム	ジペプチジルペプチダーゼ IV, neprilysin
胸腔内液	エキソソーム	MHC クラス I

それぞれの原著論文は本稿引用文献を参考にされたい.

4. 分泌膜小胞の生物学的機能

膜小胞を分泌する細胞は多岐にわたる。その発見の先駆けとなった網状赤血球を始め、B細胞、T細胞、樹状細胞、マスト細胞、血小板などの造血細胞、小腸上皮細胞や、がん細胞、シュワン細胞、神経細胞、脂腺細胞、精子、乳腺上皮細胞などの非造血細胞が、エキソソームまたはマイクロベシクル、あるいはその両方を分泌することが報告されている(表1)。

B細胞、T細胞、樹状細胞から分泌されるエキソソームには抗原提示に必要なMHCクラスIおよびクラスIIタンパク質が存在する。B細胞から分泌されたエキソソームは、濾胞性樹状細胞に取り込まれてT細胞への抗原提示に利用され、抗原特異的でMHCクラスII拘束性のT細胞応答を誘導することが示されている³⁾。またT細胞由来のエキソソームに局在するFasリガンドがFasを介して標的細胞にアポトーシスを誘導し、無用な細胞応答を抑制することが報告されている⁴⁾。小腸上皮細胞が分泌するトレロソームと呼ばれるエキソソームは、経口摂取された抗原に由来するペプチドを結合したMHCクラスIIタンパク質を有しており、細胞基底側へ分泌された後に血液中へと移行して免疫寛容を誘導することが示されている⁵⁾。

FGF2とインターロイキン-1 β (IL-1 β)は、それぞれ細胞の増殖と免疫系の制御を司る重要な増殖因子とサイトカインであるが、それらの一次構造には典型的なシグナル配列は存在せず、その分泌機構は長らく不明であった。ごく最近になり、いずれもマイクロベシクルを介して細胞外へと分泌されることが実証され、マイクロベシクルの生物学的重要性が示された^{6,7)}。

血漿⁸⁾、精液⁹⁾、尿¹⁰⁾といった体液成分中にもエキソソーム様小胞が存在することが、ここ数年の間に相次いで報告されている。しかし、*in vivo*でのエキソソームおよびマイクロベシクルの明確な機能や作用を示した報告はまだほとんどない。血漿中のエキソソームを産生して分泌した細胞を特定することは難しいが、血流に乗って全身を循環することから内分泌系や免疫系に関与することが予想される。精液中に見出されたエキソソーム(プロスタソーム)はその名の通り前立腺細胞により分泌され、精子の運動性を亢進させ、精子細胞膜と融合することで先体反応を促進することが報告されている⁹⁾。一方、尿中に存在するエキソソームには、腎臓疾患に関わるタンパク質が数多く含まれており、尿由来エキソソームを腎疾患の新たなバイオマーカーとして利用できる可能性が示唆されている¹⁰⁾。

5. 乳中に分泌される膜小胞

乳腺は哺乳動物に特有の器官であり、泌乳期には乳腺胞の内壁に並ぶ乳腺上皮細胞が大量のタンパク質、脂質、乳糖などを合成して分泌する。筆者らは、乳脂肪の離出分泌に関する研究の過程で、マウス乳腺上皮細胞株がエキソソーム様膜小胞を分泌することを見出した。この膜小胞には、前述のエキソソームマーカーの一つであり、RGDモチーフを含むEGF様ドメインとリン脂質結合ドメイン(ディスコイジンドメイン)を有する膜表面タンパク質のMFG-E8が含まれる。また、MFG-E8のドメイン欠失変異体を細胞で発現して分泌させ、密度勾配超遠心分離により細胞外液中におけるその分布を調べたところ、ディスコイジンドメインを欠くMFG-E8はエキソソーム様膜小胞画分には局在できないことも判明した¹¹⁾。さらに、マウス¹²⁾およびウシ(村上ら、未発表データ)乳汁をショ糖密度勾配超遠心分離法により分画すると、MFG-E8はエキソソームに相当する画分(密度1.05-1.18g/L)に検出され、その画分を電子顕微鏡で観察することにより、図2に示すようにエキソソームと類似するサイズの脂質二重膜に包まれた膜小胞の存在が確認された。

では乳腺上皮細胞から分泌されるエキソソーム様膜小胞の役割は何であろうか? 乳腺は泌乳期に乳腺上皮細胞を増殖・分化させてその機能的なピークを迎えるが、授乳の必要がなくなると速やかに退縮して妊娠前の状態に戻る。この退縮期には、乳腺上皮細胞はアポトーシスにより急激に減少する。アポトーシス細胞を貪食細胞(マクロファージ)が認識・識別する機構は長い間不明であったが、最近になりMFG-E8がアポトーシス細胞表面に露出したホスファチジルセリンに結合して、いわゆる“eat me signal”として機能することが報告されて注目されている¹³⁾。離乳後数日の退縮期乳腺では、カゼインなどの乳タンパク質の発現が急激に低下するのに対して、MFG-E8の発現はむしろ上昇する。さらに、泌乳期および退縮期の乳汁をショ糖密度勾配超遠心分離法により分画して比較すると、退縮期にはエキソソーム様小胞画分に分布するMFG-E8が増加し、アポトーシスを誘導した乳腺上皮細胞や固相化したホスファチジルセリンに対する結合能も著しく増大することが判明した¹²⁾。これらの結果は、乳腺上皮細胞から分泌された膜小胞がMFG-E8の担体として機能し、退縮後期に大量に生成するアポトーシス細胞をマクロファージが貪食して処理する際に何らかの役割を果たすことを示唆している。

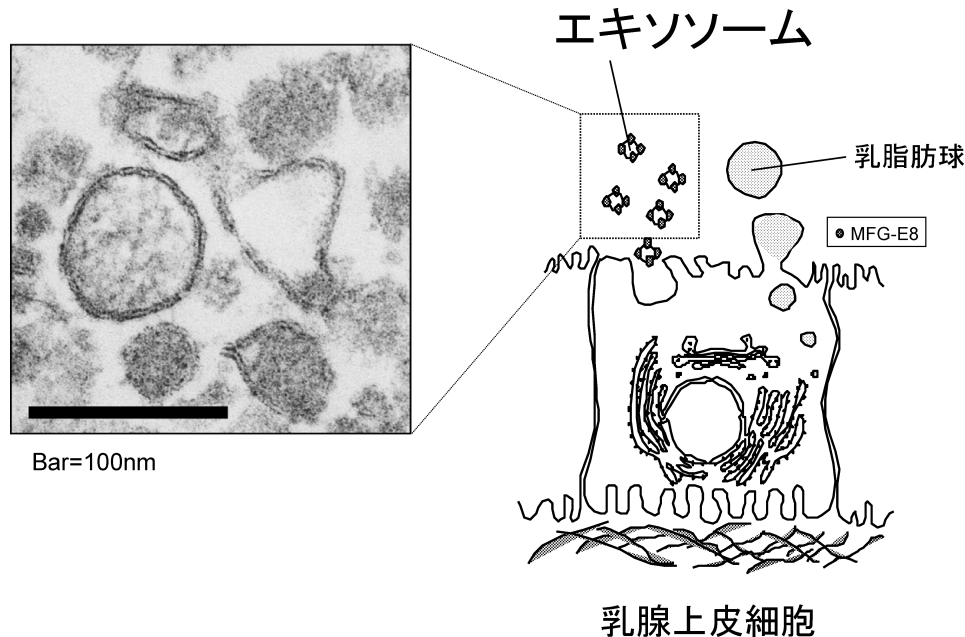


図2 乳汁中に存在する膜小胞

乳腺上皮細胞から分泌されたと推定されるウシ乳汁中のエキソソーム様膜小胞を透過型電子顕微鏡により観察した。乳汁の密度勾配超遠心分離において、MFG-E8はこの膜小胞に結合した形で密度1.05-1.18の画分に分離されたと考えられる。(村上ら、未発表データ)

また興味深いことに、乳がん患者の血液中では、MFG-E8 (ヒトの場合 BA46 と呼ばれる) が増加することが知られている¹⁴⁾。血漿中にもエキソソーム様膜小胞が存在することが証明されていることから、乳がん患者の血液中で増加する MFG-E8 はエキソソームに結合して存在する可能性が高いと考えられる。

6. おわりに

本稿で紹介した膜小胞は、未だ生化学や分子生物学の教科書にも記載されていない新規の「細胞間での情報伝達や物質輸送の媒介手段」と考えられる。生体膜の一部が離出して形成される小胞という点では細胞内膜小胞輸送系の小胞と共通であるが、膜のトポロジーはまったく逆であり、理論的には、小胞の膜表面には細胞膜表面のタンパク質が、内腔には細胞質成分が含まれることになる。これまでに知られている細胞間コミュニケーションは、細胞表面の複数の膜分子間の直接の結合を除けば、タンパク質やペプチド、アミノ酸、脂質メディエーター、ステロイドホルモンなどのように、いずれも単一の分子が細胞外液中を拡散や血流によって標的細胞に到達するタイプのものである。一方、細胞から分泌される膜小胞は、多様な分子の複合体であり、近傍のみならず、血流にのせて遠隔の細胞にまで

多くの分子や情報を同時に運ぶことができるため、細胞間コミュニケーションにおけるより高機能の液性因子と考えることもできる。狂牛病原タンパク質プリオン^{1,2)}やアルツハイマー病原タンパク質βアミロイドペプチド¹⁵⁾がエキソソームに結合して分泌されることも報告されており、基礎と応用の両面で分泌性膜小胞の今後の研究が展開されることを期待したい。

- 1) Fevrier, B. & Raposo, G. (2004) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 415-421.
- 2) van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S., & Raposo, G. (2006) *J. Biochem. (Tokyo)*, **140**, 13-21.
- 3) Denzer, K., van Eijk, M., Kleijmeer, M.J., Jakobson, E., de Groot, C., & Geuze, H.J. (2000) *J. Immunol.*, **165**, 1259-1265.
- 4) Alonso, R., Rodriguez, M.C., Pindado, J., Merino, E., Merida, I., & Izquierdo, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 28439-28450.
- 5) Karlsson, M., Lundin, S., Dahlgren, U., Kahu, H., Pettersson, I., & Telemo, E. (2001) *Eur. J. Immunol.*, **31**, 2892-2900.
- 6) Taverna, S., Ghersi, G., Ginestra, A., Rigogliuso, S., Pecorella, S., Alaimo, G., Saladino, F., Dolo, V., Dell' Era, P., Pavan, A., Pizzolanti, G., Mignatti, P., Presta, M., & Vittorelli, M.L. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 51911-51919.
- 7) MacKenzie, A., Wilson, H.L., Kiss-Toth, E., Dower, S.K., North, R.A., & Surprenant, A. (2001) *Immunity*, **15**, 825-835.
- 8) Caby, M.P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G.,

- & Bonnerot, C. (2005) *Int. Immunol.*, **17**, 879–887.
- 9) Palmerini, C.A., Cametti, C., Sennato, S., Gaudino, D., Carlini, E., Bordini, F., & Arienti, G. (2006) *J. Membr. Biol.*, **211**, 185–190.
- 10) Pisitkun, T., Shen, R.F., & Knepper, M.A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13368–13373.
- 11) Oshima, K., Aoki, N., Kato, T., Kitajima, K., & Matsuda, T. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1209–1218.
- 12) Nakatani, H., Aoki, N., Nakagawa, Y., Jin-No, S., Aoyama, K., Oshima, K., Ohira, S., Sato, C., Nadano, D., & Matsuda, T. (2006) *Biochem. J.*, **395**, 21–30.
- 13) Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (2002) *Nature*, **417**, 182–187.
- 14) Larocca, D., Peterson, J.A., Urrea, R., Kuniyoshi, J., Bistrain, A.M., & Ceriani, R.L. (1991) *Cancer Res.*, **51**, 4994–4998.
- 15) Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., & Simons, K. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11172–11177.

青木 直人¹, 松田 幹²

¹ 三重大学大学院生物資源学研究科生物圏生命科学専攻,

² 名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻)

Secreted membrane vesicles: components and biological functions

Naohito Aoki (Department of Life Sciences, Graduate School of Bioresources, Mie University, 1577 Kurimamachiya-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan) and Tsukasa Matsuda (Department of Applied Molecular Biosciences, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan)

IgA の糖鎖不全と IgA 腎症

1. はじめに

IgA 腎症は 1968 年にフランスの Berger らによってはじめて報告され、アジア太平洋地域と南ヨーロッパに多くの患者が報告されている。日本人に特に多く、我が国では慢性糸球体腎炎の約半数を占める代表的な腎疾患である。20 歳代をピークに子供から大人まで幅広い年代で発症し、進行は緩慢であるが、20 年の歳月を経て、約 40% の患者が人工透析や腎臓移植を必要とする腎不全に陥る予後不良の難治性疾患である。働き盛りの年代に人工透析が必要となるために、患者の QOL の著しい低下と共に経済的な損失も大きな社会問題となっている。

学校や職場での検尿で無症候性の血尿・蛋白尿として発見されることが多く、確定診断には腎生検が必要である。

①メサンギウム細胞と基質の増殖性変化 (光学顕微鏡所見), ②メサンギウム領域を主体とする IgA 優位の沈着 (蛍光免疫染色), ③メサンギウム基質内, 特にパラメサンギウム領域を主体とする高電子密度物質沈着 (電子顕微鏡所見) の三つが確定診断とされている。

血中の IgA を主体とする免疫複合体が腎糸球体のメサンギウム領域に沈着することが原因であると考えられるが、発症の分子機構はよくわかっていない。原因抗原として、細菌やウイルス、食物、自己抗原などが疑われたが、確定的なものは見出されていない。一方、糸球体のメサンギウムにおける IgA 特異的な受容体の関与が提唱されている。その候補として、Fcα 受容体、アシアロ糖タンパク質受容体、ポリ IgA 受容体、Fcα/μ 受容体、トランスフェリン受容体などが登場したが、これらが IgA 腎症の原因となっているか否かは不明である。

2. IgA 腎症と IgA1 の O 型糖鎖不全

IgA 腎症は IgA が特異的に沈着することが特徴であり、腎臓移植を行っても高率に再発し、逆に IgA 腎症の腎臓を移植してしまった事例では IgA 沈着が消失したことから、IgA 分子の研究が進められた。ヒト IgA は IgA1 と IgA2 のサブクラスが存在するが、糸球体への沈着が IgA1 優位であることから、IgA1 に特徴的な構造に注目が集まった。ヒトと霊長類だけが IgA1 を持ち、そのヒンジ部のアミノ酸配列は Ser と Thr に富んでおり、血清糖タンパク質には珍しい O 型糖鎖が 5 か所程度に付加することが知られている (図 1A)。IgA 腎症患者の血清 IgA1 や糸球体へ沈着している IgA1 の O 型糖鎖の構造が詳細に解析され、ガラクトースやシアル酸の欠損が検出された (図 1C)^{1,2)}。また、IgA1 の O 型糖鎖を酵素学的に除去すると、自己凝縮してメサンギウムの細胞外マトリックスに結合しやすくなり³⁾、ラットの腎動脈に大量に投与すると糸球体に沈着した⁴⁾。以上の結果から、O 型糖鎖不全の IgA1 が IgA 沈着の原因であるとの説が提唱された。一方、IgA 腎症患者では、O 型糖鎖不全 IgA1 の露出した GalNAc に対する IgA1 や IgG タイプの自己抗体が産生されて、免疫複合体を形成しているという報告がなされた⁵⁾。自己免疫が IgA 腎症の原因となっている可能性もある。

3. IgA 腎症の動物モデル

IgA 腎症の発症機構の解明と治療法の開発のためには、