

# 上皮組織の恒常性に関わる細胞外小胞の機能解析

松 沢 健 司\*

## Elucidating the Role of Extracellular Vesicles in Epithelial Tissue Homeostasis

Kenji MATSUZAWA\*

Extracellular vesicles (EV) serve as a crucial mode of cell-cell communication by transferring bioactive molecules, thereby influencing recipient cell function and contributing to diverse biological processes. Epithelial tissues form critical selective barriers that maintain the separation between interior of the body and the external environment. This research proposal aimed to characterize EV released from a model epithelial cell line under steady state conditions, and to elucidate their physiological functions. Our findings revealed that the epithelial adhesion molecule Claudin plays a crucial role in EV production. Furthermore, epithelial EV were shown to modulate epithelial adhesions, a process dependent on their lipid profile. Therefore, EV likely play a significant role in maintaining epithelial homeostasis. Ongoing research is focused on further characterizing the heterogeneity and mechanisms of action of these epithelial EV.

### 1. 背景

細胞間の情報伝達は、多細胞生物が複雑なプロセスを協調して機能させるために不可欠であり、発生、免疫応答、組織修復などで重要な役割を果たす。その手段として、物理的な接触や機械受容、ホルモンや成長因子などの液性因子が広く研究されてきた。一方で、体液中には脂質膜で包まれた多種多様な小胞（細胞外小胞、EV）が存在している。細胞外小胞（EV）は、臨床における非侵襲的診断ツールとして活用されることに加え、EVが運ぶ様々な生理活性物質（カーゴ：タンパク質、核酸、脂質など）の作用により、細胞間情報伝達の中心的役割を担う（図1）。

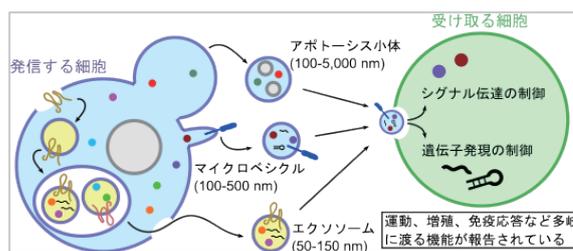


図1 多彩な細胞外小胞（EV）による細胞間情報伝達。

上皮細胞シートから構成される上皮組織は、体表や器官の表面に位置しており、体内外を分け隔てる選択的バリアとして機能する。上皮細胞シートの欠落は、体外からの異物の侵入や体内のイオンや水分の漏出を引き起こす。実際に、上皮組織の完全性を担う細胞接着構造（タイトジャンクション）の接着分子であるクローディン（Claudin）の機能不全は、様々な慢性炎症性疾患の発症に関与している。本研究提案では、上皮組織の恒常性に関わるEVの機能解明を目的とし、EVの産生メカニズムや細胞接着の形成・維持におけるEVの関与について、典型的な上皮細胞株を用いて検討を行った。

### 2. クローディンを欠いた上皮細胞ではEVの産生量が減少する

本研究ではマウス乳腺由来の上皮細胞株 EpH4 の野生型（WT）と先立って作成したクローディン欠損細胞株<sup>1</sup>（Eph4 Cl d null）を使用した。クローディンは、哺乳類では27種類のアイソフォームが存在し、上皮組織のバリア機能に必須である。一方で、卵巣がん患者の体液中に循環しているEVにクローディン含まれていることが報告されている<sup>2</sup>。そこで、クローディンが上皮細胞接着の形成のみならず、EVの産生に寄与している可能性について検討した。まず、超遠心分離法により EpH4 WT 細胞に由来するEVを精製して、ウェスタンブロットにてクローディンの有無を調べたところ、複数のクローディンのアイソフォームがEVに含まれることが明らかになった（図2A）。また、別の接着分子であるカドヘリン（E-cadherin）は検出されず、上皮細胞接着タンパク質の中でもクローディンが特異的にEVに濃縮することが示唆された。一方で、クローディンのアイソ

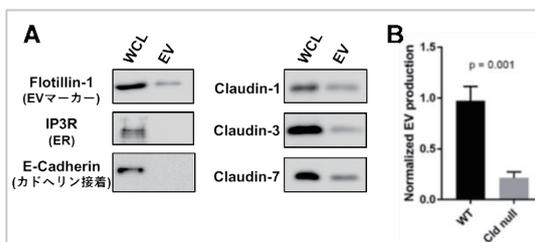


図2 クローディンはEVのカーゴでありEV形成を制御する。

ソフォームがEVに含まれることが明らかになった（図2A）。また、別の接着分子であるカドヘリン（E-cadherin）は検出されず、上皮細胞接着タンパク質の中でもクローディンが特異的にEVに濃縮することが示唆された。一方で、クローディンのアイソ

2025年3月14日 受理

\* 豊田理研スカラー

九州大学大学院医学研究院

フォーム間での EV への濃縮には、有意な差が認められなかった。次に、EpH4 WT 細胞及び EpH4 Clad null 細胞に由来する EV を精製して、EV 産生能の違いを検討するために、EV 全般に含まれる Flotillin-1 のウエスタンブロットによる定量解析を行った。すると、EpH4 Clad null 細胞では、EpH4 WT 細胞と比較して EV の産生量は有意に減少していた (図 2 B)。これらの結果は、クローディンの EV 形成への関与を強く示唆する。

### 3. EV は上皮細胞接着の分布や収縮力を制御する

上皮細胞が恒常的に分泌する EV の役割を検討するために、EpH4 WT から精製した EV を細胞に添加して、細胞接着構造 (クローディンに結合する ZO-1) とそれを裏打ちする細胞骨格 (アクチン) の状態を蛍光免疫法により評価した。通常の細胞培養で用いる血清は EV を含むことから、無血清培地で実験を行った。興味深いことに、EV を添加した Total EV 細胞では、クローディンの結合因子 ZO-1 が細胞接着領域により多く集積していた (図 3)。また、上皮細胞シート内では、隣り合う細胞同士が同等の力で引っ張り合うことにより、細胞のサイズを均一に保ち、平面的な細胞のシートを維持している。しかし、Total EV 細胞では細胞のサイズは不均一であり、細胞間で生じる張力の均衡が破綻していることを示す。

細胞膜脂質のホスファチジルセリン (PS) は、EV が標的細胞に取り込まれる際の重要なシグナルの一つとして機能する<sup>3</sup>。PS が EV 膜の外側に露出することで、標的細胞上の PS 受容体と結合し、エンドサイトーシスなどの機構を介して EV の取り込みが促進される。そこで、PS 結合タンパク質を用いたアフィニティ法により、PS を露出する EV を除去した EV (PS(-) EV) を分取し細胞に添加したところ、細胞サイズの不揃いは解消され、細胞接着における ZO-1 の集積も Control 細胞程度まで低下した。我々は以前、それぞれの細胞の収縮力を制御するミオシンの活性を平衡状態に保つ分子メカニズムを明らかにしている<sup>4</sup>。これらの結果は、この経路に PS を提示する EV が作用することを示唆する。

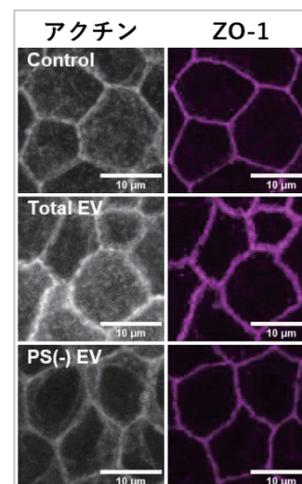


図3 EVによる上皮細胞接着の制御。

### 4. 今後の展望

本研究では、上皮細胞における細胞外小胞 (EV) の産生と機能において、細胞接着分子であるクローディンが重要な役割を果たすことを明らかにした。クローディン欠損細胞では EV 産生量が減少し、野生型細胞から精製した EV は上皮細胞接着を拡大させ、収縮力を増強させた。特に、EV 膜に存在する PS が、これらの制御に重要な役割を担うことが示された。これらの結果は、EV が上皮組織の恒常性維持に寄与する可能性を強く示唆する。今後は、クローディンのように EV の形成に関与するのか、上皮細胞接着や収縮力に作用する EV カージは何なのか、上皮細胞では PS を提示する EV がどのように標的細胞に取り込まれ、細胞内シグナル伝達系を活性化するのかなど、EV が上皮組織の恒常性維持に果たす役割を詳細に究明したい。また、本研究では培養上皮細胞を上皮組織のモデルとしたが、様々な上皮組織 (皮膚、腸管、気道など) における EV の機能解析を行うことで、EV が上皮組織の恒常性維持に果たす役割をより深く理解することができると考える。特に、疾患モデル動物などの解析を通じて EV の病態生理学的意義を明らかにし、さらなる発展を目指したい。

### REFERENCES

- 1) K. Shigetomi, Y. Ono, K. Matsuzawa and J. Ikenouchi, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **120** (2023) e2217561120.
- 2) A. Yokoi, H. Kajiyama, *et al.*, *Sci Adv*, **9** (2023) eade6958.
- 3) L. A. Mulcahy, R. C. Pink and D. R. F. Carter, *J Extracell Vesicles*, **3** (2014) 24641.
- 4) K. Matsuzawa, H. Ohga, K. Shigetomi, T. Shiiya, M. Hirashima and J. Ikenouchi, *Commun Biol*, **4** (2021) 337.