

乳の膜小胞/エクソソーム

和 泉 裕 久

(森永乳業株式会社 研究本部 健康栄養科学研究所, 〒252-8583 神奈川県座間市東原 5-1-83)

Milk-derived vesicle/exosome

Hirohisa IZUMI*

(Morinaga Milk Industry Co., Ltd. R&D Division Wellness & Nutrition Science Institute, 1-83, 5-Chome, Higashihara, Zama-City, Kanagawa 252-8583, Japan)

要約

血液や尿など様々な体液中に存在するエクソソームであるが、乳中にも存在することが知られている。エクソソームは、non-coding small RNA の一種である microRNA (miRNA) を含み、エクソソームによって運搬された miRNA, mRNA が受容細胞で機能することが報告されて以降、細胞間の情報伝達を担う分子として再注目されている。本総説では、乳中に含まれるエクソソーム, miRNA を中心に、現在報告されている生理機能や研究上の今後の課題などに関して概説する。

1. はじめに

大きさが50-200 nm の脂質二重膜でできた膜小胞であるエクソソームは、1980年代にヒツジ網状赤血球が分泌する粒子として発見された¹⁾。内部に、ヘモグロビン合成時には必要だったトランスフェリンレセプターが含まれていたことから、発見当初は、細胞が成熟する過程で不要になった分子を放出する「ごみ袋」のようなものと考えられた。ところが、1990年代以降、B細胞が放出するエクソソームに MHC クラス II 分子が含まれ、T細胞に抗原提示しうること²⁾、抗原性ペプチドを結合した MHC クラス II 分子を含むエクソソームが小腸上皮細胞から分泌され、寛容を誘導しうること³⁾などが明らかになり、2000年代前半には生物学的に意味があるものと見なされるようになった⁴⁾。その後、2007年に Valadi らによって、エクソソーム内には

たんぱく質だけでなく、microRNA (miRNA), mRNA も存在し、内包された mRNA は *in vitro* でたんぱく質に翻訳されることが示され⁵⁾、2010年になってエクソソーム内の miRNA が受容細胞で機能することが3つのグループによってほぼ同時に証明されて⁶⁻⁸⁾以降、細胞間の情報伝達を担うメッセージジャーとして再び注目を浴びるようになった。このエクソソームは、ほぼすべての細胞が分泌するとされ、血液、尿、脳脊髄液、唾液、腹水など様々な体液中に存在が確認されている。由来する細胞の特徴を一定程度反映することから、「がん」などの疾患に関し、侵襲性の低いリキッドバイオプシー診断の手段としても大変注目されている。

このように現在では様々な分野で注目され、報告数も指数関数的に増加しているエクソソームであるが、乳中にも存在することが知られている。

2. 乳中エクソソームの発見

上述の通り2007年の Valadi らの報告が、エクソ

* E-mail: h-izumi@morinagamilk.co.jp

ソームが再注目されることになった一つの契機であるが、乳については、「エクソソーム」という言葉が生まれる前の1953年に、牛乳中に核酸を含む「マイクロソーム」として⁹⁾、1978年にラットおよびウシ乳腺組織に由来する「分泌小胞」としての報告¹⁰⁾がある。ただ、「エクソソーム」として認識されたのは2002年のOshimaらによるマウス乳腺上皮細胞 COMMA-1D 培養液中に認識された報告¹¹⁾が文献的に初めてと考えられ、同グループはその後マウス乳中にも存在を確認している¹²⁾。表面に MFG-E8 (Milk Fat Globule EGF factor VIII) (他にラクトアドヘリン, PAS6/7 とも呼ばれる) を発現していること、離乳に伴う乳腺退縮期に乳腺組織およびエクソソームで MFG-E8 の発現が増加すること、MFG-E8 は、アポトーシス細胞の「eat me signal」として死細胞表面に露出したホスファチジルセリンと結合し、マクロファージによる貪食を誘導することから、彼らは、乳腺退縮期にアポトーシスに至った乳腺細胞が速やかに貪食されるための機構であると考察している。

ヒト母乳中のエクソソームの存在は、2007年に Admyre らによって示された¹³⁾。表面に MHC class I, II, CD63, CD81, CD86, Muc1 を発現していること、MHC class II 発現量について出産後4日以内の初乳の方が出産1ヶ月以降の成熟乳よりも多いこと、抗原刺激を加えた末梢血単核球からの IL-2, IFN- γ 産生を抑制すること、CD4 陽性 T 細胞中の Foxp3 陽性制御性 T 細胞割合を用量依存的に増加させることが示されている。

3. 乳中 miRNA の発見

ヒト母乳や牛乳中にスクレオチドが含まれていることは1960年代に報告されていたが¹⁴⁾、国立がんセンター研究所を中心とした筆者らのグループは2010年にヒト母乳乳清中に miRNA が存在することを報告した¹⁵⁾。その後、筆者らの報告を含めウシ^{16,17)}、ブタ¹⁸⁾、ラット¹⁹⁾乳中にも miRNA が存在することが報告されている。これらの報告は乳から直接、あるいは乳清調製後に乳清から直接 RNA を

抽出・精製し、定量 PCR, マイクロアレイあるいはシーケンサーによって miRNA を検出しているが、酸性条件下、RNase 存在下でも安定であり^{14,17)}、牛乳から製造された乳児用調製粉乳中にも検出されること^{16,17)}、界面活性剤処理により乳中に内在する RNase によって速やかに分解されること¹⁷⁾から、エクソソーム中に存在するものと考えられた。

4. 乳由来エクソソームに含まれる miRNA について

乳由来 miRNA はエクソソーム内に存在すると考えられたが、細胞外 miRNA に関し、例えば血中の miRNA については HDL 内に存在するものがあること²⁰⁾、Argonaute2 など RNA 結合たんぱく質と複合体を形成して存在するものがあること²¹⁾が報告されている。そこで筆者らは、乳清中に含まれている miRNA が全てエクソソームに含まれるのか、その存在形態を調べるため、牛乳乳清から超遠心により調製したエクソソームと、超遠心後の上清それぞれから RNA を抽出・精製し、マイクロアレイにより比較を行なった²²⁾。その結果、RNA 濃度としては約3割が超遠心後の上清に、約7割が超遠心により調製したエクソソームに認められ、マイクロアレイの結果、両者に存在する miRNA だけでなく、超遠心上清にのみ、あるいはエクソソームにのみ検出される miRNA が相当数存在した²²⁾。この結果は、乳中には RNA 結合たんぱく質との複合体などエクソソーム以外の形態、あるいは一般にエクソソーム調製に使用されている重加速度では沈殿しない小さな膜小胞内に存在する miRNA がある可能性を示唆する。

乳中エクソソームに含まれる miRNA のうち、let-7a, miR-148a など発現量が多い miRNA は種間で比較的共通していることが、ヒト、ウシ、ブタ、パンダなど複数哺乳類種の乳中エクソソーム由来 miRNA に関する研究を比較した報告で示されている²³⁾。また、乳由来エクソソームに含まれる miRNA の種類に関しては、複数の報告が免疫系に

関与する miRNA が多いようであることを示しているが²⁴⁻²⁶⁾、個々の miRNA の役割に関してはまだ明らかになっていないことが多く、その役割に関して免疫分野における研究が進んでいる点は念頭に置く必要がある。

5. 乳由来エクソソームの作用 (*in vitro*)

miRNA は約22残基程度の塩基からなる Non-coding small RNA の一種であり、標的とする mRNA の主に 3'非翻訳領域に結合し、翻訳抑制、mRNA 分解を引き起こすことで発現を抑制する。現在ヒトでは約2,700種類、ウシでは約1,000種類 (miRbase Rel. 22.1) が見つかっており、進化上高度な生物種ほど多いとされ、ヒトでは全遺伝子の6割程度が影響を受けると考えられている。そのため、乳中に含まれる miRNA が摂取後に消化管で作用するならば、様々な生理機能を示すと考えられるが、*in vitro* の試験では、主に種々細胞による乳由来エクソソームの取り込み有無、その機構、取り込まれた後の作用が調べられている。

Sun らは、ウシ初乳由来エクソソームには成熟乳由来のエクソソームよりも免疫関連 miRNA が多く、マウス由来マクロファージ細胞株である Raw264.7がこれら牛乳由来エクソソームを取り込むこと、ウシ初乳または成熟乳由来エクソソームを取り込んだ同細胞株を LPS で活性化したところ、初乳由来エクソソームを取り込んだ群の方が炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6 産生量が多く、抗炎症性サイトカインである IL-10産生量が少ないことを報告している²⁷⁾。また、Wolf らはヒト大腸由来細胞株 Caco-2 とラット小腸由来細胞株 IEC-6 を用い、Kusuma らはヒト血管内皮細胞株 HUVEC を用い、ウシとは異種に由来するこれら細胞に牛乳由来エクソソームが取り込まれること、エクソソームの取り込みはエンドサイトーシスによって行なわれ、それにはエクソソーム表面のたんぱく質抗原が重要であることを示している^{28,29)}。さらに Naslund らは、ヒト母乳由来エクソソームがヒト単球から分化させた樹状細胞に取り込まれること、樹状細胞表

面の DC-SIGN に結合することで HIV-1 の感染とその後の CD4 陽性 T 細胞へのウイルス伝播を抑制することを報告している³⁰⁾。*In vitro* で種の異なる乳由来エクソソームを比較した研究もあり、Gao らは、ヤクの乳中にはウシ乳中よりも多くのエクソソームが存在し、TSG101, CD63, HSP70のたんぱく質量が牛乳由来エクソソームよりも多いこと、低酸素環境下で培養した IEC-6 の生存率を牛乳由来エクソソームよりも増加させることを示している³¹⁾。乳由来エクソソームの作用に関して、主に *in vitro* で検討が行なわれた上記報告を表1にまとめた。

6. 乳由来エクソソームの作用 (*in vivo*)

上述の通り乳由来エクソソームは例え異種の乳由来であっても生体に作用し得ると考えられるが、*in vivo* においてもいくつかの報告がなされている。Chen らはブタ乳由来エクソソームが、ブタ消化管由来細胞株の IPEC-J2 に取り込まれ、エクソソーム由来の miRNA が細胞内で増加すること、同細胞の増殖を促進すること、マウスへの経口投与により十二指腸、空腸の絨毛長や陰窩の深さを有意に増加させることを報告しており³²⁾、同グループはその後ブタ乳由来エクソソームが、LPS により誘導される IPEC-J2 のアポトーシスを抑制すること、同エクソソームの経口投与により、LPS 投与により誘導されるマウス消化管の炎症が抑制され、炎症抑制はブタ乳由来エクソソームに含まれる miRNA によることも示している³³⁾。Li らは、牛乳由来エクソソームが、ヒト大腸由来細胞株 LS174T に取り込まれ、Trefoil Factor 3, Mucin 2 の発現量を増加させること、高浸透圧ミルク、LPS 投与、低酸素曝露の3条件により実験的に壊死性腸炎を誘導したマウス新生仔に対して、牛乳由来エクソソームを同時に投与すると、炎症が抑制され、杯細胞の消失も抑えられることを示した³⁴⁾。腸炎については、デキストラン硫酸ナトリウムによりマウスに大腸炎を誘導したモデルでも牛乳由来エクソソーム経口投与によって炎症が抑制されることが示されている

表 1 乳由来エクソソームの作用に関して主に *in vitro* で検討されている報告

乳の由来	概 要	参考文献
ヒト	ヒト母乳エクソソームはヒト末梢血単核球からの IL-2, IFN- γ 産生を抑制。末梢血単核球中 CD4 陽性 T 細胞における Foxp3 陽性の制御性 T 細胞割合を増加させる。	13
ウシ	蛍光色素でラベルした牛乳由来エクソソームは、マクロファージ様に分化させたヒト単球由来細胞株 THP-1 には取り込まれるが、未分化単球には取り込まれない。取り込みは 4°C 培養により低下。	22
ウシ	牛乳由来エクソソームはマウス由来マクロファージ Raw264.7 細胞に取り込まれる。ウシ成熟乳エクソソームと比較し、初乳エクソソームは Raw264.7 の炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6) 産生を亢進、抗炎症性サイトカイン (IL-10) 産生を抑制。	27
ウシ	牛乳由来エクソソームはヒト大腸由来細胞株 Caco-2, マウス小腸由来細胞株 IEC-6 に取り込まれる。取り込みは 4°C 培養, プロテアーゼ K によるエクソソーム膜表面の抗原切断, エンドサイトーシス阻害剤によって抑制。	28
ウシ	牛乳由来エクソソームはヒト血管内皮細胞株 HUVEC に取り込まれる。取り込みは 4°C 培養, プロテアーゼ K によるエクソソーム膜表面の抗原切断, エンドサイトーシス阻害剤によって抑制。蛍光ラベルした牛乳由来エクソソームをマウスに経口投与したところ, 肝臓, 脾臓, 肺に経口色素が検出された。	29
ヒト	ヒト母乳由来エクソソームはヒト単球から分化させた樹状細胞に取り込まれる。ヒト母乳由来エクソソームは, 樹状細胞表面の DC-SIGN に結合し, HIV-1 感染とその後の CD4 陽性 T 細胞への感染伝播を抑制。	30
ヤク, ウシ	ウシ科のヤクの乳に由来するエクソソームは, 低酸素環境によりマウス小腸由来細胞株 IEC-6 で誘導される PHD-1 (prolyl hydroxylase-1) の減少, HIF- α (hypoxia-inducible factor- α), VEGF (vascular endothelial growth factor) の増加を, 牛乳由来エクソソームよりも抑制し, 生存率を増加させる。	31

る³⁵⁾が, 興味深いことに, 35,000 g と 100,000 g で調製したエクソソームでは, 前者の方が大腸炎に伴う大腸短腸化やタイトジャンクション機能低下の抑制能は高いにも関わらず, 大腸における炎症性サイトカインやケモカイン量は後者のエクソソームを投与した方が少ないなど, エクソソームサイズによって抗炎症能や作用点・機序が異なることが示唆されている。腸炎以外の炎症では, Arntz らにより, 牛乳由来エクソソーム経口投与による関節炎抑制作用が IL-1Ra ノックアウトマウスあるいはコラーゲン誘導性関節炎モデルマウスの 2 つのモデルを用いて報告されている³⁶⁾。彼らは, マウスマクロファージ細胞株 Raw264.7, 脾細胞, 消化管細胞が牛乳由来エクソソームを取り込むことも示している。「乳」として我々日本人には珍しいが, 中東で良く飲用されるラクダ乳由来のエクソソームに関する報告もある。Badawy らは, ヒト乳がん細胞 MCF7 を移入したラットにラクダ乳由来エクソソームを投

与すると, 抗酸化能, 抗炎症能, 免疫反応が亢進されることにより, がん細胞のアポトーシスが誘導されることを示している³⁷⁾。

このように, 生体に対し乳由来エクソソームは基本的には抗炎症的に働くようであるが, 炎症を促進するという報告もある。Nordgren らは, 牛乳由来エクソソームを含むまたは含まない餌をマウスに摂取させ, 有機ダストを鼻腔内に単回投与する急性炎症モデル, 連日投与する慢性炎症モデルの両者において, 牛乳由来エクソソーム餌投与群の方が, 肺への好中球浸潤が増加し, 肺胞洗浄液中炎症性サイトカイン, ケモカイン濃度が高かったこと, 腹腔マクロファージの炎症性サイトカイン産生が増加し, 抗炎症性サイトカイン産生が減少した炎症誘導性の M1 形質マクロファージにシフトしていたことを示した³⁸⁾。乳由来エクソソームの作用に関して, 主に *in vivo* で検討が行なわれた研究について, 上述した報告を含め, 紹介しきれなかった報告も表 2

表2 乳由来エクソソームの作用に関して主に *in vivo* で検討されている報告

乳の由来	概 要	参考文献
ブタ	ブタ乳由来エクソソームはブタ消化管由来細胞株 IPEC-J2 に取り込まれる。エクソソーム由来 miRNA が細胞内で増加。同エクソソームをマウスに経口投与したところ、十二指腸と空腸の絨毛長とクリプトの深さが有意に増加。	32
ブタ	ブタ乳由来エクソソームは LPS により誘導される上記 IPEC-J2 のアポトーシスを抑制。同エクソソームをマウスに経口投与したところ、LPS 投与により誘導される消化管炎症が抑制され、炎症抑制作用にはエクソソーム由来 miRNA が関与。	33
ウン	牛乳由来エクソソームは、ヒト大腸由来細胞株 LS174T に取り込まれ、TFF3 (trefoil factor 3), Mucin 2 の発現量を増加させた。実験的に壊死性腸炎を誘導した新生仔マウスに同エクソソームを同時投与したところ、炎症・杯細胞消失が抑制された。	34
ウン	牛乳由来エクソソームをデキストラン硫酸ナトリウムにより腸炎を誘導したマウスに投与したところ、炎症が抑制された。35,000 g と 100,000 g で調製したエクソソームの効果に差あり。	35
ウン	牛乳由来エクソソームはマウスマクロファージ細胞株 Raw264.7, マウス脾細胞, マウス消化管細胞に取り込まれる。同エクソソームを IL-1Ra ノックアウトマウス, コラーゲン誘導性関節炎マウスに経口摂取させたところ、MCP-1, IL-6 などの血中炎症マーカーが低下し、関節炎症状が抑制。	36
ラクダ	ラクダ乳由来エクソソームがヒト乳がん細胞 MCF7 の細胞死を誘導することを <i>in vitro</i> で確認。同エクソソームを MCF7 を移入したラットに経口投与したところ、がん細胞のアポトーシスを誘導。	37
ウン	単回、または連日有機ダスト経鼻投与による急性炎症、慢性炎症マウスモデルにおいて、牛乳由来エクソソーム含有餌給餌により肺への好中球浸潤や肺胞洗浄液中炎症性サイトカインが増加。牛乳由来エクソソーム含有餌給餌マウスより得られた腹腔マクロファージは炎症誘導性の M1 マクロファージに形質がシフト。	38
ウン	牛乳由来エクソソーム含有餌あるいは非含有餌をマウスに給餌したところ、非含有餌給餌群の方が腓腹筋の断面積中筋繊維、含有 RNA 量が増加。	59
ウン	牛乳由来エクソソーム含有餌あるいは非含有餌をマウスに給餌したところ、含有餌給餌によって盲腸内容物中の腸内細菌叢が変化 (門レベルでは <i>Tenericutes</i> が増加, 科レベルでは <i>Verrucomicrobiaceae</i> が減少し, <i>Lachnospiraceae</i> が増加)。	60
ウン	牛乳由来エクソソームをマウスに経口投与したところ、脛骨の海綿骨面積には変化が認められなかったものの、骨細胞数は増加し、骨髄中脂肪細胞割合が低下。	61
ウン	牛乳由来エクソソーム除去餌給餌により、マウス肝臓のプリン代謝産物が増加。大豆乳ベースの調製乳を飲用しているヒト乳児尿中プリン代謝産物はヒト母乳、または牛乳ベースの調製乳を飲用している乳児よりも増加した。乳製品の摂取をしない成人の血中、尿中プリン代謝物は摂取する成人と比較して増加。	62

にまとめた。

7. 乳由来 miRNA・エクソソームの血中移行や遠隔臓器到達について

乳由来エクソソームが細胞に取り込まれることから、経口摂取後の血中移行や遠隔臓器到達に関する検討もなされているが、食物に由来する miRNA の血中移行に関しては、2012年の Zhang らによる報告に端を発する³⁹⁾。米に豊富に存在する MIR168a

が中国人の血中から検出されたことから始まった研究であるが、米を摂取させたマウス血中でも MIR168a が増加し、同 miRNA のターゲットと予測された LDLRAP1 (low-density lipoprotein receptor adaptor protein 1) の肝臓での発現が抑制されていることが示された。ただし、本報告に関しては別のグループから再現性について疑問が呈されており⁴⁰⁾、miRNA の検出方法や実験環境の違いなども含めその解釈には注意を要する。乳由来 miRNA に

表3 乳由来エクソソームの血中移行や遠隔臓器到達に関する報告

乳の由来	概 要	参考文献
ブタ	ブタ新生仔をブタ初乳のみあるいは成熟乳のみで飼育し、血中 miRNA を比較。初乳のみで飼育した新生仔ブタ血中 miRNA のうちいくつかは、成熟乳のみで飼育した群と比較し、初乳中に多い miRNA は多く、成熟乳中に多い miRNA は少なかった。	25
ウシ	ヒト成人に牛乳を飲用させたところ、牛乳中に豊富に存在する miR-29b, miR-200c の血中濃度が飲用量依存的に増加。miR-29b のターゲットである RUNX2 の末梢血単核球中発現が増加。植物であるブロッコリー摂取では同様の事象は起こらず。牛乳由来 miRNA を除く餌でマウスを4週間飼育したところ、血中 miR-29b が有意に減少。	41
ウシ	牛乳由来エクソソームをドラッグデリバリー担体として利用することを目指した研究。蛍光色素で標識した牛乳由来エクソソームをマウスに経口投与したところ、投与24時間後をピークに血中蛍光色素量が増加し、投与後144時間まで蛍光色素が検出された。投与4日後に肝臓、脾臓などの臓器中色素量が増加した。牛乳由来エクソソームをラットに単回経口投与した6時間後、連日経口投与した15日後のいずれにおいても AST, ALT などの肝酵素などに変化は無かったが、血中中性脂肪が低下。	42
ウシ, ブタ, マウス	蛍光色素でラベルした牛乳由来エクソソームをマウスに経口投与したところ、投与量によるものの、肝臓、腎臓、心臓、肺、脳で蛍光色素量が増加。CD63に GFP を発現させたマウス乳を摂取させた乳仔マウスにおいて脾臓、心臓、肺で蛍光量が増加。Pri-miRNA のプロセッシングに必須の Drosha に関し、タモキシフェン誘導性の Drosha ノックアウトマウスに牛乳由来エクソソーム含有餌、または非含有餌を給餌させたが、両群間の寿命に差は無し。	43
マウス	乳腺上皮細胞特異的に miR-30b を過剰発現させたトランスジェニックマウスの乳と野生型マウスの乳を摂取させた仔マウスの臓器中 miR-30b を比較。その結果、乳中と胃を除く肝臓、小腸、腎臓、肺、血液中の miR-30b 量に差を認めず。	44
マウス	miR-375, miR-200c ノックアウトマウス (KO マウス) と野生型マウスを用い、野生型マウスの仔に、あるいは KO マウスの仔に野生型、あるいは KO マウスの乳を摂取させた。その結果、野生型、KO マウスどちらの乳を摂取した場合でも、空腸、回腸、大腸、肝臓、脾臓、血漿の miR-375, miR-200c 量に差は無かった。	45

関しては、Gu らの報告が血中移行を示唆した最初の報告となる²⁵⁾。彼らは、ブタ新生仔にブタの初乳のみ、あるいは成熟乳のみを摂取させて飼育し、初乳のみで飼育した新生仔ブタ血中 miRNA のいくつかについて、成熟乳のみで飼育した群と比較し、初乳中に多い miRNA が多く、成熟乳に多い miRNA は少なかったことを示した。ブタ初乳に由来する何らかの因子が仔ブタ消化管に作用し、結果として特定の血中 miRNA が増加した可能性もあるが、乳由来 miRNA が血中に移行する可能性を示した点で興味深い。その後 Baier らにより、牛乳250 mL ~ 1 L を摂取したヒト成人の血中に、牛乳中に多い miR-29b, miR-200c が摂取した牛乳の用量依存的に増加すること、miR-29b のターゲットである RUNX2 の末梢血単核球における発現が増加することが示された⁴¹⁾。米など植物にも miRNA が存在す

ることは上述の通りだが、彼らは 34~102 g のブロッコリー摂取では同様の事象が起こらなかったこと、また、牛乳由来 miRNA を除去した餌あるいは含有する餌をマウスに4週間摂取させたところ、除去餌摂取マウス血中では、含有餌摂取マウス血中と比較し、miR-29b が約6割減少したことも示している。

このように経口摂取後に血中に移行することが示唆される乳由来 miRNA であるが、血液を介した遠隔臓器への到達についても検討がなされている。乳は細胞培養液などと比較すると多数のエクソソームを含むため、牛乳由来エクソソームをドラッグデリバリーの担体として利用することを検討した研究がある。同研究では、蛍光ラベルした牛乳由来エクソソームをヌードマウスに経口投与し、血中色素が投与後144時間まで検出されること、肝臓、脾臓、

肺、腎臓、脳など複数の臓器で検出されること、安全性確認のためラットに牛乳由来エクソソームを投与したところ、単回投与6時間後、連日投与15日後のいずれにおいても血中中性脂肪が減少することが示されている⁴²⁾。また、Mancaらは、蛍光ラベルした牛乳由来エクソソームをマウスに投与したところ、投与量によるものの、肝臓、腎臓、心臓、脳など複数の臓器に到達し得ることを示している⁴³⁾。

一方で乳由来エクソソーム、miRNAの血中移行や遠隔臓器到達に関して否定的な報告も存在する。LaubierらはmiR-30bを過剰発現させたトランスジェニックマウスの乳を乳仔マウスに摂取させても、胃を除く各臓器と血中でmiR-30bのレベルは変化がなかったと報告しており⁴⁴⁾、Titleらは、合成miRNAと比較し、乳由来miRNAが消化酵素に対して分解抵抗性であることを、乳仔マウス消化管内容物分析から示しているものの、miR-375, miR-200cノックアウトマウスの乳仔に野生型マウスの乳を摂取させた場合と、KOマウスの乳を摂取させた場合の、乳仔マウス血中および各臓器中miR-375, miR-200cレベルは変わらなかったことを報告している⁴⁵⁾。ただし、前者の報告に対しては、miR-30bがそもそもエクソソーム内に含まれていなかった可能性が考えられており⁴⁶⁾、後者の報告に対しては、野生型マウス乳にmiR-375, miR-200cが本来高発現していないこと、両miRNAがエンドサイトーシス・エキソサイトーシスに関与することから、消化管におけるエクソソーム取り込みに問題が生じた可能性が指摘されている⁴⁷⁾。乳由来エクソソームの血中移行や遠隔臓器到達に関し、上記報告を表3にまとめた。

8. 乳由来エクソソームに含まれる mRNA, たんぱく質, lncRNA について

上述したように様々な生理作用が報告されている乳由来エクソソームであるが、各生理機能に関して、エクソソーム中の責任分子は必ずしも明らかになっていない。エクソソームにはmiRNAだけでなく、mRNAやたんぱく質も含まれており、mRNA

は受容細胞で翻訳され、機能しうることを考慮すると、乳由来エクソソームに含まれる mRNA やたんぱく質も重要である。

mRNAに関して、筆者らの行なったラット乳清から直接抽出・精製したRNAのmRNAマイクロアレイ解析では、10,948種類のmRNAを検出し¹⁹⁾、ウシ生乳由来エクソソームのmRNAマイクロアレイ解析では19,320種類のmRNAを検出した¹⁷⁾。発現量が多いものは各種カゼイン、各種乳清たんぱく質など、乳たんぱく質をコードするmRNAやリボソーム構成たんぱく質をコードするmRNAが多かった。Chenらはブタ乳由来エクソソームから16,304のmRNAを検出しており、やはり乳関連たんぱく質、リボソーム構成たんぱく質をコードするmRNAが多かったことを報告している⁴⁸⁾。現在のところ乳中mRNAの機能は明らかになっていないが、筆者らの報告から、乳清や乳由来エクソソーム中に存在するmRNAは、乳中たんぱく質の量と必ずしも一致しない。このことは、乳由来エクソソーム中のmRNAが、たんぱく質翻訳後のただの残渣ではないことを示唆している。

乳由来エクソソームについてプロテオーム解析を行なった報告もいくつか存在する。Reinhardtらは牛乳由来エクソソームに2,107種類のたんぱく質を確認し、エクソソームマーカーたんぱく質だけでなく、乳脂肪球被膜 (Milk fat globule membrane; MFGM) 関連たんぱく質が多く含まれていることを報告している⁴⁹⁾。また、Samuelらはウシ初乳、成熟乳由来エクソソームについてプロテオーム解析を行ない、初乳由来エクソソームに8,124種類、成熟乳由来エクソソームに4,443種類のたんぱく質を同定し、成熟乳と比較し、初乳由来エクソソームには自然免疫反応や炎症反応に関連するたんぱく質が多いことを示している⁵⁰⁾。「6. 乳由来エクソソームの作用 (*in vivo*)」の項で35,000gで調製したエクソソーム (35 K) と100,000gで調製したエクソソーム (100 K) 間に生理活性に差があること³⁵⁾を紹介したが、Benmoussaらは、両エクソソームに

共通するたんぱく質が1,838種あり、35 K、100 K 各々にのみ存在するたんぱく質をそれぞれ20、41種 同定し、35 Kにのみ認められるたんぱく質は主に 翻訳、細胞増殖、細胞寿命に関与する分子が、100 Kにのみ認められるたんぱく質は代謝や免疫に関 与する分子が多いと推測されるとしている⁵¹⁾。

乳由来エクソソームには、200残基以上でたんぱ く質をコードしないlong non-coding RNA (lncR- NA)も存在する。Karlssonらは、ヒト母乳由来エ クソソームについてqPCRにより87種のlncRNA を調べ、55種類のlncRNAを検出した⁵²⁾。Zengら はシーケンサーにより牛乳由来エクソソーム中に 3,481種類のlncRNAを検出し、高発現している lncRNAは免疫機能、骨芽細胞形成、神経系発達な どに関与すること、泌乳時期によって発現量が異なることを示し、口腔から消化管下部までの消化条件 を模した*in vitro* digestionモデルを用い、牛乳由 来エクソソーム、および内包されるlncRNAが安定であることを示した⁵³⁾。上述の通り、lncRNAは その定義が「200残基以上のたんぱく質情報を持た ない(non-coding) RNA」とされているが、近年、 一部のlncRNAはたんぱく質に翻訳されている (多くは100アミノ酸以下のポリペプチド)ことが 明らかになってきている⁵⁴⁾。lncRNAから翻訳され る新規ポリペプチドは、生命にとって重要な役割を 担っていると考えられており、乳由来エクソソーム に含まれるlncRNAやlncRNAから翻訳されたポリ ペプチドが生体に機能するならば大変興味深い。

9. 乳由来エクソソーム研究の今後の課題

細胞が分泌する膜小胞には、大きさや、起源とす る細胞によって、マイクロベシクル、エクソソーム などエクソソーム以外のものも存在する。所謂「エ クソソーム」は、細胞内でエンドソーム内に腔内小 胞(intraluminal vesicle; ILV)が形成され、多胞 性エンドソーム(multivesicular endosome; MVE) になった後、MVEの膜の一部が陥入し、出芽する ことによって産生される。そのため、ILV内に多 く含まれるテトラスペニンのCD9やCD63を膜上

に持つことになり、これら分子が「エクソソーム」 マーカーとして頻用されるが、例えば超遠心によっ て回収した膜小胞に対してウェスタンブロットを行 ない、これら分子の発現が認められたとしても、エ クソソーム以外の膜小胞を含まないとは限らない。 従って、本稿では、広く認知されている「エクソ ソーム」という名称を使用してきたが、「エクソソ ーム」研究においては、エクソソーム以外の膜小胞 を含む例があることや、エクソソームを調べているに も関わらず、別名称で記載されている可能性がある 点に注意いただきたい。現在では上記理由から、混 乱を避けるために「細胞外小胞(Extracellular vesicle; EV)」と呼ぶことを「国際細胞外膜小胞学 会(International Society for Extracellular Vesicles; ISEV)」が提唱している。名称や調べている膜小胞 の実態に関する混乱は、「エクソソーム」研究全般 に共通する課題である。

また、「エクソソーム」研究全般に言えることでは あるが、特に乳由来エクソソーム研究で課題になる ことに、エクソソームの精製方法が挙げられる。「乳」 の場合、エクソソーム調製前に乳清を調製する 必要があるが、乳清調製のためのカゼイン除去にも EDTAによる除去、遠心による除去、酸沈殿による 除去などがあり、統一されていない。従って現在 も乳清調製方法がその後のエクソソーム調製に与 える影響について研究がなされている^{55,56)}。遠心による 除去に関しては、12,000 gでもCD63陽性の膜 小胞が一定量除去されていることが示されてお り^{57,58)}、報告によってはその後35,000 g、70,000 g の遠心を行なうことでカゼインを除去している研究 もある。このため、現在乳由来エクソソームの生理 機能に関して報告されている研究の中には、結果的に エクソソームの中でも特に小さい集団のみを対象 に調べていることになっているものもあり、上述の 35 Kエクソソームと100 Kエクソソームでその効 果が異なるとする報告³⁵⁾も踏まえると、乳清調 製方法にも注意を払う必要がある。乳清調製後のエ クソソーム調製に関しても、密度勾配、超遠心、沈 殿試薬、抗体、カラムなど様々な選択肢があること

から、「乳由来エクソソーム総体」の生理機能の一般化については、乳清調製・エクソソーム精製の方法統一化が重要と考えられる。

10. 最 後 に

エクソソーム、あるいはEVは、その大きさの割に検出されるたんぱく質分子、RNA分子の種類や量が多い。このことは、エクソソームが相当にヘテロな集団であることを示唆している。大きさ、表面抗原、表面糖鎖、内包するたんぱく質、RNA分子個々の機能や、標的細胞の違いなどが明らかになることで乳由来エクソソームが生体に与える機能の詳細が解明されていくと思われる。

引用文献

- 1) Pan, B. T., and Johnstone, R. M., Fate of transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*, 33, 967-978 (1983).
- 2) Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., and Geuze, H. J., B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.*, 183, 1161-1172 (1996).
- 3) Karlsson, M., Lundin, S., Dahlgren, U., Kahu, H., Petterson, I., and Telemo, E., "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *Eur. J. Immunol.*, 31, 2892-2900 (2001).
- 4) Février, B., and Raposo, G., Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16, 415-421 (2004).
- 5) Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M, Lee, J. J., Lötvall J. O., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.*, 9, 654-659 (2007).
- 6) Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. A., van Eijndhoven, M. A., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., de Gruijl, T. D., Wurdinger, T., and Middeldorp, J. M., Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 6328-6333 (2010).
- 7) Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., Sun, Q., Wang, K., Ba, Y., Wang, Q., Wang, D., Yang, J., Liu, P., Xu, T., Yan, Q., Zhang, J., Zen, K., and Zhang, C. Y., Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol. Cell*, 39, 133-144 (2010).
- 8) Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., and Ochiya, T., Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.*, 285, 17442-17452 (2010).
- 9) Morton, R. K., Microsomal particles of normal cow's milk. *Nature* 171, 734-735 (1953).
- 10) Sasaki, M., Eigel, W. N., and Keenan, T. W., Lactose and major milk proteins are present in secretory vesicle-rich fractions from lactating mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 5020-5024 (1978).
- 11) Oshima, K., Aoki, N., Kato, T., Kitajima, K., and Matsuda, T., Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.*, 269, 1209-1218 (2002).
- 12) Nakatani, H., Aoki, N., Nakagawa, Y., Jin-No, S., Aoyama, K., Oshima, K., Ohira, S., Sato, C., Nadano, D., and Matsuda, T., Weaning-induced expression of a milk-fat globule protein, MFG-E8, in mouse mammary glands, as demonstrated by the analyses of its mRNA, protein and phosphatidylserine-binding activi-

- ty. *Biochem. J.*, 395, 21–30 (2006)
- 13) Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J. J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E. P., Scheynius, A., and Gabrielsson, S., Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J. Immunol.*, 179, 1969–1978 (2007)
 - 14) Kobata, A., Suzuoki, Z., and Kida, M., The acid-soluble nucleotides of milk. I. Quantitative and qualitative differences of nucleotide constituents in human and cow's milk. *J. Biochem.*, 51, 277–287 (1962)
 - 15) Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K., and Ochiya, T., MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 1, 7 (2010)
 - 16) Chen, X., Gao, C., Li, H., Huang, L., Sun, Q., Dong, Y., Tian, C., Gao, S., Dong, H., Guan, D., Hu, X., Zhao, S., Li, L., Zhu, L., Yan, Q., Zhang, J., Zen, K., and Zhang, C. Y., Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Res.*, 20, 1128–1137 (2010)
 - 17) Izumi, H., Kosaka, N., Shimizu, T., Sekine, K., Ochiya, T., and Takase, M., Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *J. Dairy Sci.*, 95, 4831–4841 (2012)
 - 18) Gu, Y. R., Liang, Y., Gong, J. J., Zeng, K., Li, Z. Q., Lei, Y. F., He, Z. P., and Lv, X. B., Suitable internal control microRNA genes for measuring miRNA abundance in pig milk during different lactation periods. *Genet. Mol. Res.*, 11, 2506–2512 (2012)
 - 19) Izumi, H., Kosaka, N., Shimizu, T., Sekine, K., Ochiya, T., and Takase, M., Time-dependent expression profiles of microRNAs and mRNAs in rat milk whey. *PLoS One*, 9, e88843 (2014)
 - 20) Vickers, K. C., Palmisano B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., and Remaley, A. T., MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.*, 13, 423–433 (2011)
 - 21) Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanian, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F., and Tewari, M., Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 5003–5008 (2011)
 - 22) Izumi, H., Tsuda, M., Sato, Y., Kosaka, N., Ochiya, T., Iwamoto, H., Namba, K., and Takeda, Y., Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages. *J. Dairy Sci.*, 98, 2920–2933 (2015)
 - 23) van Herwijnen, M. J. C., Driedonks, T. A. P., Snoek, B. L., Kroon, A. M. T., Kleinjan, M., Jorritsma, R., Pieterse, C. M. J., Hoen, E. N. M. N., and Wauben, M. H. M., Abundantly present miRNAs in milk-derived extracellular vesicles are conserved between mammals. *Front. Nutr.*, 5, 81 (2018)
 - 24) Zhou, Q., Li, M., Wang, X., Li, Q., Wang, T., Zhu, Q., Zhou, X., Wang, X., Gao, X., and Li, X., Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *Int. J. Biol. Sci.*, 8, 118–123 (2012)
 - 25) Gu, Y., Li, M., Wang, T., Liang, Y., Zhong, Z., Wang, X., Zhou, Q., Chen, L., Lang, Q., He, Z., Chen, X., Gong, J., Gao, X., Li, X., and Lv, X., Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes.

- PLoS One, 7, e43691 (2012)
- 26) Chen, T., Xi, Q. Y., Ye, R. S., Cheng, X., Qi, Q. E., Wang, S. B., Shu, G., Wang, L. N., Zhu, X. T., Jiang, Q. Y., and Zhang, Y. L., Exploration of microRNAs in porcine milk exosomes. *BMC Genomics*, 15, 100 (2014)
- 27) Sun, Q., Chen, X., Yu, J., Zen, K., Zhang, C. Y., and Li, L., Immune modulatory function of abundant immune-related microRNAs in microvesicles from bovine colostrum. *Protein Cell*, 4, 197–210 (2013)
- 28) Wolf, T., Baier, S. R., and Zempleni, J., The intestinal transport of bovine milk exosomes is mediated by endocytosis in human colon carcinoma Caco-2 cells and rat small intestinal IEC-6 cells. *J. Nutr.*, 145, 2201–2206 (2015)
- 29) Kusuma, R. J., Manca, S., Friemel, T., Sukreet, S., Nguyen, C., and Zempleni, J., Human vascular endothelial cells transport foreign exosomes from cow's milk by endocytosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 310, C800–807 (2016)
- 30) Naslund, T. I., Paquin-Proulx, D., Paredes, P. T., Vallhov, H., Sandberg, J. K., and Gabrielson, S., Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ T cells. *AIDS*, 28, 171–180 (2014)
- 31) Gao, H. N., Guo, H. Y., Zhang, H., Xie, X. L., Wen, P. C., and Ren, F. Z., Yak-milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells in an hypoxic environment. *J. Dairy Sci.*, 102, 985–996 (2019)
- 32) Chen, T., Xie, M. Y., Sun, J. J., Ye, R. S., Cheng, X., Sun, R. P., Wei, L. M., Li, M., Lin, D. L., Jiang, Q. Y., Xi, Q. Y., and Zhang, Y. L., Porcine milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells. *Sci. Rep.*, 6, 33862 (2016)
- 33) Xie, M. Y., Hou, L. J., Sun, J. J., Zeng, B., Xi, Q. Y., Luo, J. Y., Chen, T., and Zhang, Y. L., Porcine milk exosome miRNAs attenuate LPS-induced apoptosis through inhibiting TLR4/NF- κ B and p53 pathways in intestinal epithelial cell. *J. Agric. Food Chem.*, 67, 9477–9491 (2019)
- 34) Li, B., Hock, A., Wu, R. Y., Minich, A., Botts, S. R., Lee, C., Antounians, L., Miyake, H., Koike, Y., Chen, Y., Zani, A., Sherman, P. M., and Pierro, A., Bovine milk-derived exosomes enhance goblet cell activity and prevent the development of experimental necrotizing enterocolitis. *PLoS One*, 14, e0211431 (2019)
- 35) Benmoussa, A., Diallo, I., Salem, M., Michel, S., Gilbert, C., Seigny, J., and Provost, P., Concentrates of two subsets of extracellular vesicles from cow's milk modulate symptoms and inflammation in experimental colitis. *Sci. Rep.*, 9, 14661 (2019)
- 36) Arntz, O. J., Pieters, B. C., Oliveira, M. C., Broeren, M. G., Bennink, M. B., de Vries, M., van Lent, P. L., Koenders, M. I., van den Berg, W. B., van der Kraan, P. M., and van de Loo, F. A., Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse models. *Mol. Nutr. Food Res.*, 59, 1701–1712 (2015)
- 37) Badawy, A. A., El-Magd, M. A., and Al-Sadrah, S. A., Therapeutic effect of camel milk and its exosomes on MCF7 cells in vitro and in vivo. *Integr. Cancer Ther.*, 17, 1235–1246 (2018)
- 38) Nordgren, T. M., Heires A. J., Zempleni, J., Swanson, B. J., Wichman, C., and Romberger, D. J., Bovine milk-derived extracellular vesicles enhance inflammation and promote M1 polarization following agricultural dust exposure in mice. *J. Nutr. Biochem.*, 64, 110–120

- (2019)
- 39) Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., Yin, Y., Wang, C., Zhang, T., Zhu, D., Zhang, D., Xu, J., Chen, Q., Ba, Y., Liu, J., Wang, Q., Chen, J., Wang, J., Wang, M., Zhang, Q., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C. Y., Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res.*, 22, 107–126 (2012)
- 40) Dickinson, B., Zhang, Y., Petrick, J. S., Heck, G., Ivashuta, S., and Marshall, W. S., Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice. *Nat. Biotechnol.*, 31, 965–967 (2013)
- 41) Baier, S. R., Nguyen, C., Xie, F., Wood, J. R., and Zemleni, J., MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *J. Nutr.*, 144, 1495–1500 (2014)
- 42) Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J., and Gupta, R. C., Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett.*, 371, 48–61 (2016)
- 43) Manca, S., Upadhyaya, B., Mutai, E., Desaulniers, A. T., Cederberg, R. A., White, B. R., and Zemleni, J., Milk exosomes are bioavailable and distinct microRNA cargos have unique tissue distribution patterns. *Sci. Rep.*, 8, 11321 (2018)
- 44) Laubier, J., Castille, J., Le Guillou, S., and Le Provost, F., No effect of an elevated miR-30b level in mouse milk on its level in pup tissues. *RNA Biol.*, 12, 26–29 (2015)
- 45) Title, A. C., Denzler, R., and Stoffel, M., Uptake and function studies of maternal milk-derived microRNAs. *J. Biol. Chem.*, 290, 23680–23691 (2015)
- 46) Tomé-Carneiro, J., Fernández-Alonso, N., Tomá-Zapico, C., Visioli, F., Iglesias-Gutierrez, E., and Davalos, A., Breast milk microRNAs harsh journey towards potential effects in infant development and maturation. Lipid encapsulation can help. *Pharmacol. Res.*, 132, 21–32 (2018)
- 47) Alsaweed, M., Hartmann, P. E., Geddes, D. T., and Kaklas, F., MicroRNAs in breast milk and the lactating breast: Potential immunoprotectors and developmental regulators for the infant and the mother. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12, 13981–14020 (2015)
- 48) Chen, T., Xi, Q. Y., Sun, J. J., Ye, R. S., Cheng, X., Sun, R. P., Wang, S. B., Shu, G., Wang, L. N., Zhu, X. T., Jiang, Q. Y., and Zhang, Y. L., Revelation of mRNAs and proteins in porcine milk exosomes by transcriptomic and proteomic analysis. *BMC Vet. Res.*, 13, 101 (2017)
- 49) Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D., Nonnecke, B. J., and Sacco, R. E., Bovine milk exosome proteome. *J. Proteomics*, 75, 1486–1492 (2012)
- 50) Samuel, M., Chisanga, D., Liem, M., Keerthikumar, S., Anad, S., Ang, C. S., Adda, C. G., Versteegen, E., Jois, M., and Mathivanan, S., Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth. *Sci. Rep.*, 7, 5933 (2017)
- 51) Benmoussa, A., Gotti, C., Bourassa, S., Gilbert, C., and Provost, P., Identification of protein markers for extracellular vesicle (EV) subsets in cow's milk. *J. Proteomics*, 192, 78–88 (2019)

- 52) Karlsson, O., Rodosthenous, R. S., Jara, C., Brennan, K. J., Wright, R. O., Baccarelli, A. A., and Wright, R. J., Detection of long non-coding RNAs in human breastmilk extracellular vesicles: Implications for early child development. *Epigenetics*, 11, 721–729 (2016)
- 53) Zeng, B., Chen, T., Xie, M. Y., Luo, J. Y., He, J. J., Xi, Q. Y., Sun, J. J., and Zhang, Y. L.: Exploration of long noncoding RNA in bovine milk exosomes and their stability during digestion in vitro. *J. Dairy Sci.*, 102, 6726–6737 (2019)
- 54) Matsumoto, A., and Nakayama, K. I., Hidden peptides encoded by putative noncoding RNAs. *Cell Struct. Funct.*, 43, 75–83 (2018)
- 55) Yamauchi, M., Shimizu, K., Rahman, M., Ishikawa, H., Takase, H., Ugawa, S., Okada, A., Inoshima, Y., Efficient method for isolation of exosomes from raw bovine milk. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 45, 359–364 (2019)
- 56) Rahman, M. M., Shimizu, K., Yamauchi, M., Takase, H., Ugawa, S., Okada, A., Inoshima, Y., Acidification effects on isolation of extracellular vesicles from bovine milk. *PLoS One*, 14, e0222613 (2019)
- 57) Benmoussa, A., Ly, S., Shan S. T., Laugier, J., Boilard, E., Gilbert, C., and Provost, P.: A subset of extracellular vesicles carries the bulk of microRNAs in commercial dairy cow's milk. *J. Extracell. Vesicles*, 6, 1401897 (2017)
- 58) Benmoussa, A., Lee, C. H., Laffont, B., Savard, P., Laugier, J., Boilard, E., Gilbert, C., Fliss, I., and Provost, P.: Commercial dairy cow milk microRNAs resist digestion under simulated gastrointestinal tract conditions. *J. Nutr.*, 146, 2206–2215 (2016)
- 59) Parry, H. A., Mobley, C. B., Mumford, P. W., Romero, M. A., Haun, C. T., Zhang, Y., Roberson, P. A., Zemleni, J., Ferrando, A. A., Vechetti, I. J. Jr., McCarthy, J. J., Young, K. C., Roberts, M. D., and Kavazis, A. N., Bovine milk extracellular vesicles (EVs) modification elicits skeletal muscle growth in rats. *Front. Physiol.*, 10, 436 (2019)
- 60) Zhou, F., Paz, H. A., Sadri, M., Cui, J., Kachman, S. D., Fernando, S. C., and Zemleni, J., Dietary bovine milk exosomes elicit changes in bacterial communities in C57BL/6 mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 317, G618–G624 (2019)
- 61) Oliveira, M. C., Arntz, O. J., Blaney Davidson, E. N., van Lent, P. L., Koenders, M. I., van der Kraan, P. M., van den Berg, W. B., Ferreira, A. V., and van de Loo, F. A., Milk extracellular vesicles accelerate osteoblastogenesis but impair bone matrix formation. *J. Nutr. Biochem.*, 30, 74–84 (2016)
- 62) Aguilar-Lozano, A., Baier, S., Grove, R., Shu, J., Giraud, D., Leifeman, A., Mercer, K. E., Cui, J., Badger, T. M., Adamec, J., Andres, A., and Zemleni, J., Concentrations of purine metabolites are elevated in fluids from adults and infants and in livers from mice fed diets depleted of bovine milk exosomes and their RNA cargos. *J. Nutr.*, 148, 1886–1894 (2018)