

尿中エクソソームタンパク質解析

中山 亜紀*[§] 飯島 史朗*

[Key Words] バイオマーカー、エクソソーム、二次元電気泳動法

はじめに

臨床検査学教育において、卒業研究は、研究技術の習得に加えて、情報収集・発信能力を培う、重要な機会である。予算も設備も限られた中で研究指導を行うことは時に困難なこともあるが、我々は、研究協力者の支援を受けながら、毎年4月から9月初旬まで、8名前後の卒研生を受け入れ、修士課程の大学院生を合わせて、10名程度で研究室を運営している。当研究室では、学生が各研究テーマについて正しい知識を客観的に集め、英語論文読解力を向上させ、正確な技術をもって分析し、正しく発信できるプレゼンテーション能力を身につけられるよう、指導を心掛けている。当たり前のことのように聞こえるが、様々な業務の中で綿密な指導を行うためには、教員と学生互いの忍耐が必要である。マンパワーの小さい研究室であることを利点に、コミュニケーションを密にし、研究を行う上でのマナーを身に付けさせることをモットーにしている。研究テーマは、炎症や腫瘍等の病態の指標となる生体成分分析を基本としており、その中で本稿では、エクソソーム研究の現状と尿中エクソソームタンパク質解析について紹介したい。

I. バイオマーカーソースとして期待されているエクソソーム

細胞外小胞(extracellular vesicles, EV)には複数の種類があり、大きく分けて二通りの分泌経路がある。アポトーシス小胞やマイクロベシクルは、細胞膜が外側に出芽するようにして分泌される。一方で、後期エンドソームから由来するEVをエクソソームと一般的に呼んでいる(図1)。細胞膜が内側に陥入し、エンドソームを形成して後期エンドソームが形成される。後期エンドソームはエンドソーム輸送選別複合体(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)と呼ばれる一連のタンパク質群によって、内側に出芽し、腔内膜小胞(intraluminal vesicles, ILV)を多数有する多胞体(multivesicular body, MVB)を形成する。一部のMVBはリソソームと融合して分解される。一方、MVBが細胞膜と融合した場合、保有していた小胞が細胞外に分泌される。これがエクソソームの正体である¹⁻³⁾。

エクソソームは細胞膜脂質二重膜で形成されており、直径が約40~100nmとされている。その生成経路から、エクソソーム表面には、テトラスパニン(CD9、CD63、CD81など)や、膜輸送関連タンパク質であるannexinや、MVB形成に関与

*文京学院大学保健医療技術学部 [§] anak@bgu.ac.jp

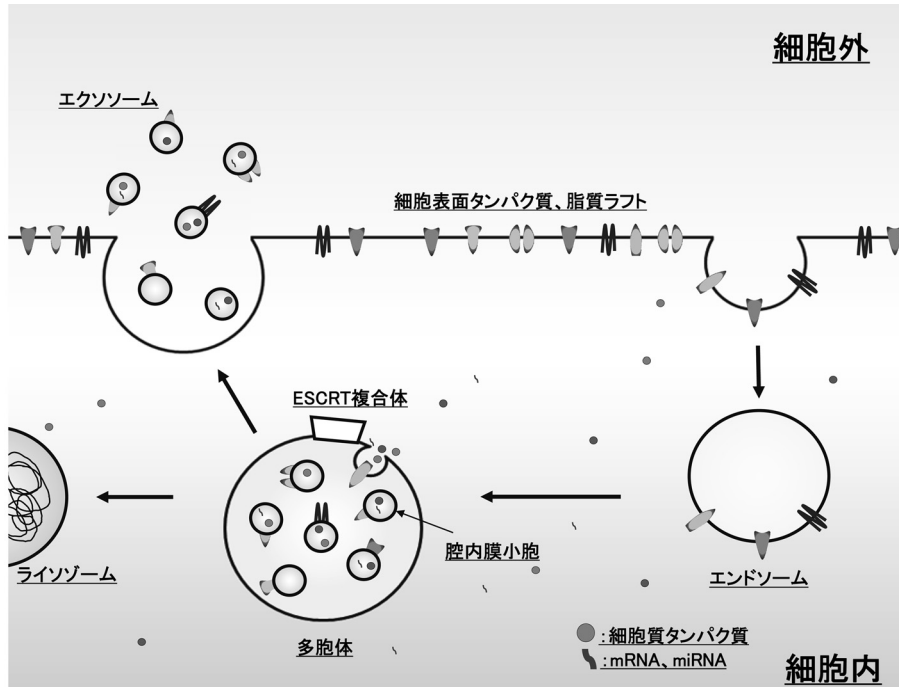


図1 エクソソーム生成・分泌機序

する tumor susceptibility gene 101 (TSG101) や ALG-2 interacting protein X (ALIX) が発現しており、これらがしばしば、エクソソームマーカータンパク質として解析に利用される。エクソソームには核酸や脂質なども内包されている。これまでに、ヒトの血液や尿、唾液、髄液、乳汁、また、様々な培養細胞から、エクソソームの分泌が確認されている²⁾。各エクソソームは、共通の特徴を有しながら、由来する細胞によって、構成成分が異なることが報告されている。また、エクソソーム分泌そのものが、微細環境変化に応じて変動することが明らかにされてきた。King らは低酸素下で乳がん細胞株由来のエクソソーム分泌が亢進することを報告した⁴⁾。また、熱刺激や、酸性 pH 下でエクソソーム分泌が促進することも明らかにされている^{5,6)}。これらのことから、低侵襲で行える liquid biopsy の一つ的手段として、エクソソームの組成と数、両面の変化が、臨床診断や臨床検査法へ応用されることが期待されている。

II. エクソソームタンパク質解析のための分離・分析方法

エクソソームの密度は約 $1.10 \sim 1.21 \text{g/cm}^3$ であり、100,000 から 200,000g の超遠心法、もしくは、スクロースを用いた密度勾配遠心法によって分離される。また、エクソソーム分離用のキットも発売されている。分離されたエクソソームの確認方法としては、主に以下の三つの方法が用いられている。1) ウエスタンブロット法による、エクソソーム分泌経路を反映するタンパク質 (TSG101、ALIX、CD9、CD63、CD81 等) を検出する。2) 免疫電気泳動法により、エクソソームマーカー陽性粒子を検出する。3) フローサイトメトリー法によりエクソソーム表面マーカーを検出する (直接検出するには粒子が小さすぎるため、専用のビーズに吸着させる)⁷⁾。このほか、目的の抗体を2種類用いて、サンドイッチ ELISA 法によってエクソソームを半定量的に測定することも可能である⁸⁾。また、iZON 社より、エクソソーム数を計測でき

る装置が開発され、分離したエクソソーム分画を個数/mLとして表現することが容易になった。

また、超速心法等の煩雑な分離法を用いず、血液から直接エクソソームを捕獲し、表面に発現するマーカータンパク質を定量するため、エクソソーム研究をけん引する国立がんセンター研究所の吉岡らは、ExoScreenという革新的なエクソソーム検出法を報告した⁹⁾。同グループは、大腸がん培養細胞由来のエクソソーム表面に、正常大腸由来の細胞には認められないCD147が多量に発現していることを明らかにし、エクソソームに普遍的なマーカーであるCD9とともに検出することで、たった5 μ Lの血清からエクソソームの定量を可能にした。本法は最も臨床検査への応用が近い方法として注目されている。

III. 尿中エクソソームタンパク質解析

我々が解析対象としている尿中エクソソームは、糸球体のポドサイト、尿細管、および膀胱に由来している¹⁰⁾。尿中エクソソームは腎・尿路系細胞の生理的機能を反映し、病態変化に応じて構成成分が変化することから、腎生検等に代わる、疾患の早期発見、診断、予後予測、また、治療の効果判定に有用な成分であると考えられている。

尿中エクソソームを分離する上で問題となっているのが、尿中に多量に存在するTamm-Horsfall protein (THP)のコンタミネーションである¹¹⁻¹³⁾。THPは遠位尿細管上皮細胞より分泌される、質量約100kDの糖タンパク質であり、尿円柱の主成分として知られている。また、感染防御に関与している報告もあるが、その他の機能については不明な点が多いタンパク質である。THPは低温で、また高塩濃度下で重合しやすく、一部のエクソソームが結合している。これを解離するため、分離の過程でDTTを添加し、THPをモノマーとすることで、より多くのエクソソームを回収することができる¹³⁾。分離の過程で除けないTHPは、SDS PAGE上で幅広いバンドとして検出され、タンパク質同定の妨げになっていた。我々は、二次元電気泳動法によって尿中エクソソームタンパク質を分離する際、THPは自身のpIである3.5付

近に収束し、その他の大半のエクソソームタンパク質がpI 4~10の範囲に検出されることから、エクソソームタンパク質同定が容易になることを報告した(図2-A)¹²⁾。さらに、分離したエクソソーム分画のペレットよりエクソソームタンパク質を解析する際、PBSによって浮遊させると、残留THPの再重合を促進し、エクソソーム分析が困難となるため、細胞溶解緩衝液であるRIPAバッファーを用いる方が適しており、PBSに比べRIPAバッファーで約30種のタンパク質が多く二次元電気泳動で分離されることを確認した(図2-B)。さらに、二次元電気泳動の際のサンプル可溶化のためのRehydration buffer (Rb)に使用する非イオン性界面活性剤の組成を替え、最も尿中エクソソームタンパク質解析に適した条件の検討を行った。4種のRb(Rb1: 4% CHAPS、Rb2: 3% CHAPS、1% Triton X-100、Rb3: 2% dodecyl maltoside、Rb4: 2% ASB-14)のうち、Rb1~3については分離されたタンパク質数とそのパターンに違いが認められなかったが、Rb4では、THPの質量である100kDa付近の全pIに渡ってアーチファクトが検出され、尿中エクソソームタンパク質の検出には適さなかった(図2-A)¹²⁾。最もバックグラウンドがクリアであったRb2を採用し、質量分析法と合わせてこれまでに約100種のタンパク質を同定した。一部、エクソソームのデータベースであるExocartaおよびUrinary Exosome Protein Databaseに掲載されていないタンパク質が同定されたことから、本法の有用性が確認できた¹⁴⁾。

尿中エクソソームを分離する過程でのDTT処理の弊害として、免疫学的測定法を用いたエクソソーム直接検出法へ応用する場合の抗原性の低下が問題視されている。そのため、DTTを用いることなく、THPを効果的に除去する方法の検討が必要である。また、これまで解析してきた尿中エクソソームは、腎・尿路系細胞に由来するエクソソームが混在している。今後は、細胞表面マーカーを用いてソーティングし、各細胞由来のエクソソームをより詳細に解析することで、これらの細胞に由来するエクソソームの量、半減期や、構成成分の違いを明らかにしていきたい。

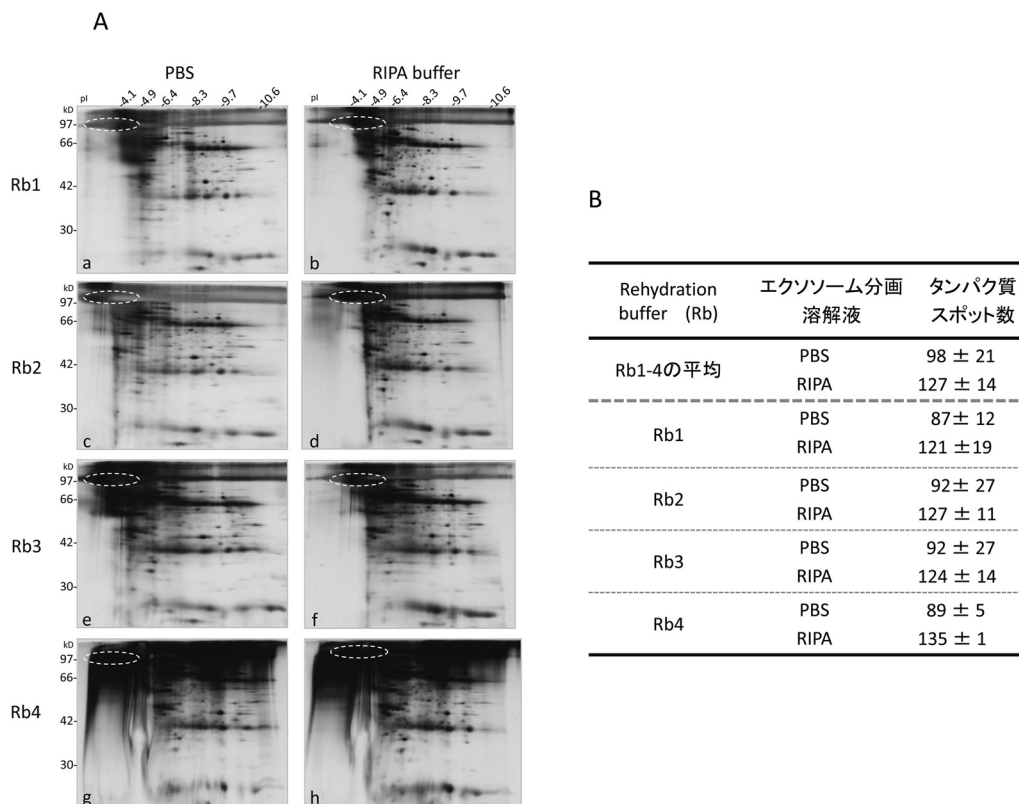


図2 溶解法および組成の異なる rehydration buffer による尿中エクソソームタンパク質の二次元電気泳動パターン(文献12)より一部転用)

おわりに

生体試料や細胞を扱うスペシャリストを目指し、臨床検査学を学ぶ学生が取り組む研究対象として、エクソソームは親近感を持てる生体成分である。特に尿中エクソソームは研究の歴史が浅く、日々、学生と共に学ぶことが多い。学生には、研究室の経験を通して、臨床現場で遭遇した疑問を解決し、そこから研究に応用するためのステップを学んでほしい。臨床検査技師の研究活動は、臨床検査技術の発展に欠かせないものとなっており、また、臨床検査技師の地位向上にもつながる。良質な研究成果を発信できる臨床検査技師となる卒業生を輩出するためには、我々臨床検査学に携わる教員の自己研鑽が欠かせない。

文 献

- 1) Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, et al. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 2002; 3: 321-30.
- 2) Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820: 940-8.
- 3) Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010; 73: 1907-20.
- 4) King HW, Michael MZ, Gleadle JM. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* 2012; 12: 421.
- 5) Clayton A, Turkes A, Navabi H, et al. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci* 2005;

- 118: 3631-8.
- 6) Parolini I, Federici C, Raggi C, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 34211-22.
 - 7) Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 2005; 17: 879-87.
 - 8) Logozzi M, De Milito A, Lugini L, et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009; 4: e5219.
 - 9) Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, et al. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun* 2014; 5: 3591.
 - 10) Fang DY, King HW, Li JY, et al. Exosomes and the kidney: blaming the messenger. *Nephrology (Carlton)* 2013; 18: 1-10.
 - 11) Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 13368-73.
 - 12) Kosaka A, Nakayama A, Yamaguchi I, et al. Comparison of urinary exosomal protein solubilization methods for two-dimensional gel electrophoresis. *J Electrophoresis* 2012; 56: 7-11.
 - 13) Fernández-Llama P, Khositseth S, Gonzales PA, et al. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int* 2010; 77: 736-42.
 - 14) 中山亜紀. 尿中エクソソーム蛋白質の探索研究. *臨床病理* 2014; 62: 684-91.