

学生優秀発表賞受賞者：山田 直 演題番号 055

## 細胞外へ放出される膜小胞エキソソームは 不均一な集団である

山田 直\*<sup>1</sup> 柏木 悠里\*<sup>1</sup> 千葉 満\*<sup>2§</sup>

### I. 研究の概要

#### 【はじめに】

エキソソームとは細胞から放出されるエンドソーム由来の細胞外小胞(Extracellular Vesicles ; EVs)のことで、様々な体液や培養上清中に存在することが知られている。2007 年には内部に microRNA を内包していること、エキソソームが別の細胞に取り込まれることが初めて証明された。エキソソーム内には様々な核酸やタンパク質成分が存在することが知られている。エキソソーム膜にはテトラスパニン類をはじめとする膜タンパク質が存在し、膜の脂質は細胞膜の成分とは異なり、セラミドやホスファチジルセリンが多いことが知られている。エキソソームは電子顕微鏡による観察により不均一な粒子集団であることが予想されているが、その証明にはいまだ至っていない。

#### 【目 的】

本研究では、培地上清中の粒子数測定と microRNA コピー数の絶対定量により、エキソソーム粒子集団の均一性について検討した。

#### 【方法・結果】

膵癌細胞株(PK-45H)の培養上清から超遠心法によりエキソソームを回収した。得られたエキソソームペレットからタンパク質と RNA を抽出した。ウエスタンブロッティングを行ったところ、

回収マーカーの CD63 が検出された。またバイオアナライザーを行ったところ、25~200 スクレオチドの small RNA が検出された。これらのことより確かにエキソソームが回収できていることが分かる。次に、エキソソームの粒子数と粒子径を測定するために NanoSight による解析を行った。その結果、ブラウン運動により運動するエキソソーム粒子が観察された。これらの粒子径を測定したところ約 100nm であり、エキソソームに該当する粒子径であった。次にエキソソーム集団に含まれる microRNA 種の同定を行った。その結果 PK-45H のエキソソームに最も多く存在する microRNA として miR-204-3p および miR-638 を同定した。セラミドはエキソソームの生合成に重要なスフィンゴ脂質であり、スフィンゴミエリンから中性スフィンゴミエリナーゼ 2(nSMase2)の作用でセラミドが生成される。nSMase2 の阻害剤である GW4869 を処理した時の microRNA コピー数と粒子数の変化を解析するために、検量線を用いた絶対定量法により、PK-45H 上清 1 $\mu$ L 当たりのエキソソーム内の miR-204-3p と miR-638 のコピー数を定量した。その結果、miR-204-3p は GW4869 の濃度依存的に減少傾向を示した。miR-638 は 10 $\mu$ M 処理した時にコピー数の有意な減少が認められた。このことより、PK-45H 由来エキソソーム内 miR-638 の細胞外放出には nSMase2 が重要な役割を

\*<sup>1</sup> 弘前大学医学部保健学科検査技術科学専攻

\*<sup>2</sup> 弘前大学大学院保健学研究科生体検査科学領域 § mchiba32@hirosaki-u.ac.jp

果たしていることが分かった。最後にエクソソーム当たりの microRNA コピー数を算出したところ、GW4869 を処理しても、粒子数の著しい変化は認められなかった。そこで、miR-204-3p と miR-638 の 1 $\mu$ L 当たりのコピー数と粒子数の値から、エクソソーム 10,000 個当たりのコピー数を計算した。その結果、miR-204-3p と miR-638 はエクソソーム 10,000 個当たりそれぞれ 1~数コピー数程度しか存在していないことが分かった。さらに、GW4869 を 10 $\mu$ M 処理した時、エクソソーム当たりのコピー数が著しく減少しているため、エクソソーム内への microRNA の取り込みが阻害されているのではないかと考えられる。

#### 【考 察】

これらのことより、microRNA を内包しているエクソソームは 10,000 個当たり 1~数個程度で、エクソソームは不均一な集団であることが分かった。そしてエクソソームの細胞外放出には nSMase2 が重要で、エクソソームの形成ではなく、microRNA のエクソソーム内へのソーティングへの関与が示唆された。

## II. 受賞の感想

この度は優秀発表賞という荣誉ある賞に選出いただき、誠にありがとうございました。本大会には初めて参加しましたが、賞を頂いたことでこれからの研究に対するモチベーションアップにつながったと同時に、臨床検査学に関する多くの知識を得ることができ、大変有意義なものになりました。本番は非常に緊張しましたが、先生方から頂いたアドバイスを活かし、スムーズに発表を進めることができました。この場を借りて心より御礼申し上げます。

## III. 将来への抱負

検査科は自動化が進んでいますが、最終的な判断を下すのは人です。そのためには、向上心を持って、常に最先端の技術・知識を身につけることが必要だと考えています。これからも積極的に学会等に参加し、自分の知見を広げ、将来のチーム医療を担う一員としての役割をしっかりと果たせるよう頑張っていきたいと思っております。