

厚生労働科学研究委託費（膵管内乳頭粘液腫瘍患者における超早期膵がん捕捉技術の開発研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

## 血清中のエキソソーム回収方法と回収効果の検討とmiRNAの発現パターンに関する研究

業務分担者 上田 貴子 博士研究員

## 研究要旨

エキソソームは、細胞から分泌される直径30 nm-150 nmの膜小胞であり、タンパク質やRNA、DNAを内包している。エキソソームは、血液中に放出され体内を循環しており、内包している分子を介して、細胞間の情報の授受を行っているといわれている。正常細胞と同様に、がん細胞からもエキソソームは分泌されており、内包されているmiRNAの種類は、がん細胞によって異なる。そのため、エキソソーム内包RNAは、がんの診断マーカー分子となるとして注目されている。

しかしながら、エキソソームの同定方法は確立されておらず、また汎用されているエキソソーム回収方法は、エキソソーム単独溶液となるものではなく、エキソソーム含有溶液である。そのため、すい臓がんのエキソソーム由来miRNAとして報告されているmiRNAの発現パターンは、論文により大きく異なる。エキソソーム内包miRNAは、診断マーカーとして非常に魅力的であるが、血清中のtotal RNAと比較し、血清中のエキソソームを回収したときのmiRNAの発現パターンが大きく変化するか、また血清中に放出されているがん細胞由来のエキソソームは、エキソソーム回収効果が反映される程に多く含まれているのかどうかということは、明らかになっていない。本研究では、いくつかのエキソソーム回収方法を用いて、それらの違いによりmiRNAの発現パターンに差異があるかどうか、エキソソーム回収効果がmiRNAの発現パターンによく反映されるのは、どの回収方法かなどを検討し、「膵管内乳頭粘液腫瘍患者における超早期膵がん捕捉技術の開発」における手法の礎となる基礎データを収集した。

## A．研究目的

血清中に存在するmiRNAは、エキソソーム内包miRNA、アルゴナートタンパク複合体miRNA、アポトーシス小胞内包miRNA、リポプロテイン複合体miRNA等様々な形で存在している。この中の、がん細胞由来エキソソーム内包miRNAの発現パターンを調べ、血清total RNAの発現パターンとの比較により、エキソソーム回収効果を調べる。がん特有のmiRNAの発現パターンが最もよく反映され、血液診断可能な方法を調べる。

## B．研究方法：

エキソソーム回収方法とされている、(1)超遠心法、(2)サイズ排除クロマトグラフィー、(3)高分子疎水凝集効果を用いた回収法、(4)静電的相互作用を利用したカラムフィルトレーションの四つの方法を用いて、エキソソーム画分とその他の上清に分離し、それぞれの画分に存在するmiRNAの発現パターンの差異を調べた。

エキソソーム含有画分であることは、エキソソームの表面抗原のひとつであるCD63の有無や、電子顕微鏡による30 nm-150 nmの粒子の存在から確認した。

（倫理面への配慮）

血清サンプルは、記号化し個人情報が流出しないように努めた。

## C．研究結果：

健常者の血清を用いて、エキソソーム内に多く存在するとされているmiRNA(let 7a, miR-142)とエキソソーム外に多く存在するとされているmiRNA(miR-16, miR-92)の発現量を比較した結果、エキソソーム画分のlet7aは、その他の上清中のlet7aと比較し、発現量はわずかに多く、また上清中のmiR-16, miR-92は、エキソソーム画分のmiR-16, miR-92の発現量よりも有意に多かった。しかしながら、l

et7a, miR-142, miR-16, miR-92の発現量順位は、エキソソーム画分と上清で同様の結果であった (miR-16 > miR-92 > let7a > miR-142)。

また、サイズ排除クロマトグラフィーにより、280 nmの波長で分離した4つのフラクションについて、上記の四種類のmiRNAの発現を調べた。四つのフラクションは、エキソソームが含まれると考えられるフラクション、含まないと考えられるフラクションすべてにおいて、miRNAの発現があり、発現量順位は先に記した通りであった。

## D．考察：

エキソソーム画分とその他の画分、またクロマトグラフィーの各フラクションのmiRNAの発現量順位に変化がないということは、エキソソームは、miRNAを保護する役割を有する膜小胞であるが、そこに内包されるmiRNAは、選択された特定のものではなく、細胞内の各miRNAの存在比率が保持された状態である可能性が考えられる。がん細胞由来エキソソームの比率が大きくなれば、miRNAの発現量順位が変化することも考えられるが、著しい変化になるかは分からない。

## E．結論：

がん細胞由来エキソソームが含まれるエキソソーム画分において、健常血清との差異が明確になるように、健常血清におけるmiRNAの発現パターンと発現量の正常範囲を決定する必要がある。

## F．健康危険情報：

なし

## G．研究発表：

なし

## H．知的財産権の出願・登録状況：

なし