

nm) が細胞外環境 (体液・培養液) に放出されたものである。エクソソームの産生・放出は、外部刺激 (例えば P2X7-R) に応答してセラミド・スフィンゴミエリンを介し増強する。エクソソームの機能としては、放出する細胞と近隣細胞との細胞間情報伝達、プリオン・レトロウイルスの伝搬、抗原提示等が報告されている。

エクソソーム膜・内部には、細胞で発現されているタンパク質・mRNA・microRNA の一部が含まれる。特定細胞由来のエクソソームはその細胞に特徴的なタンパク質を含み、エクソソーム含有蛋白の解析から特定の病態が把握できることを示唆する。

本研究では尿中エクソソームを検体とする新たな検査法の確立を目的として、その基礎検討をおこなう。さらに病態検査上の意義を RNA 検査、蛋白検査の両面から検討する。

<研究方法・目的>

健常人尿を用い、以下の方法を応用して分離同定法をまず確立する。これを基礎に尿中エクソソームの動態分析を行い、生理・病態関連成分を同定し、病態検査上の意義を明らかにする。

1. 限外ろ過 (スピнкаラム) 法によるエクソソームの簡易精製

ポアサイズの異なる Nanomembrane concentrator (pore size 13 ~ 200 nm) を用いてエクソソーム (直径 40-100 nm) の簡易精製を試みる。

2. ラテックス凝集法を応用した簡易精製法の開発

抗体をラテックス・磁器ビーズに感作してエクソソーム簡易精製法を試みる。

<研究結果>

遠心法 (15,000 rpm 後の上清) と限外ろ過法 (分子量 10 万 kd) の組み合わせにより、尿エクソソーム (直径 40-100 nm) 分画の濃縮が可能であった。この分画に含まれる podocalyxin を western blot 法にて解析した。健常人尿 10 ml 程度から得られる濃縮分画を用いた場合、podocalyxin を western blot 法にて検出できた。一部の検体では分子量の異なるバンド (アイソフォーム?) を確認できた。

エクソソームには MHC クラス I の発現が報告されている。クラス I 抗体-ラテックス粒子によりエクソ

20) 尿エクソソーム検査法確立のための基礎的検討

研究代表者 河端 薫雄

【研究成果の概要】

<背景と目的>

エクソソームはエンドソームに起源を持つ脂質二重膜小胞であり、多胞エンドソーム (multivesicular body; MVB) 内に含まれている小胞 (直径 40-100

ソームを濃縮し、この分画に含まれる podocalyxin を western blot 法にて解析した。この濃縮・解析法では podocalyxin は検出できなかった。

<考察・展望>

エキソソームに含まれる podocalyxin の解析から、このタンパク質を測定する臨床検査の可能性が示唆される。エキソソーム内部には mRNA・microRNA が含まれているといわれる。今後これらの意義を明らかにしていきたい。