

第10号：リキッドバイオプシ特集③

～中/大型サイズのヒト体液に存在する細胞外小胞～

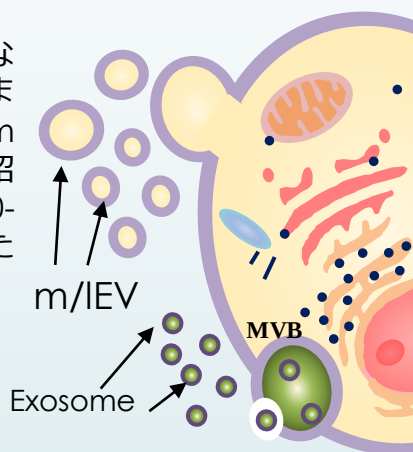
INDEX

- 中/大型サイズの細胞外小胞 (m/IEV) とは
- ショットガンプロテオミクス (DDA法) によるm/IEVの解析
- 血漿中のm/IEVの特徴
- 尿中のm/IEVの特徴

中/大型サイズの細胞外小胞 (m/IEV) とは

細胞外小胞 (EV) は、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たし、病気を診断する上で重要な対象物と考えられています。以前、KPSL news vol.5では特にExosomeと称される100nm以下のsmall EVについて、その新しい分析技術：ExoCounterを紹介しました。本稿ではExosomeとは異なる中/大型サイズ (200-1000nm) のEVに焦点をあて、その診断価値を見出すべく実施したKPSLと九州大学との共同研究成果を基にその性状を紹介します。

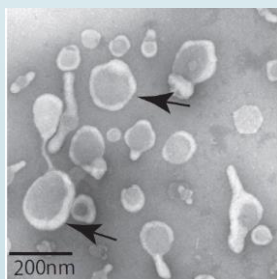
中/大型サイズのEV (以下、m/IEV) は、原形質膜が出芽することにより直接生成され、一方Exosomeはエンドソーム経路を介してMVBと呼ばれる多胞体小胞より生成され、その生成経路が異なると考えられています。m/IEVは血液中のマイクロパーティクル、癌細胞が分泌するマイクロベシクル、エクソソームなど古くから研究対象によって呼び名は様々ですが、その細胞内の由来とサイズにおいては同じものを表している (= m/IEV) と考えています。



血漿のm/IEV



尿のm/IEV

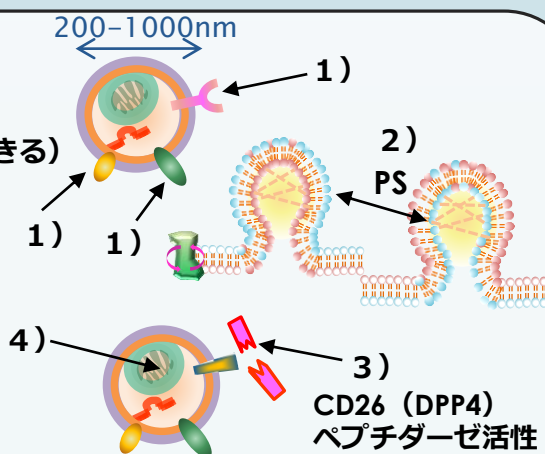


Characterization and function of medium and large extracellular vesicles from plasma and urine by surface antigens and Annexin V
PeerJ Analytical Chemistry 2:e4
<https://doi.org/10.7717/peerj-achem.4> より

健康人の血漿及び尿から抽出したm/IEV画分の電子顕微鏡で観測した像

見出されたm/IEVの特徴

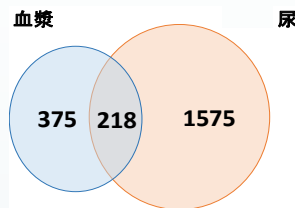
- 1) 複数の細胞表面マーカーでキャラクタライズできる。
(マルチカラーフローサイトメーターで、抗原性を確認できる)
- 2) フォスファチジルセリン (PS) が由来細胞によって、内向き、外向きが異なる。
- 3) 酵素活性をベシクル上に有することによる機能性を持つ
- 4) オルガネラを含有する可能性がある



血液、尿を低速遠心（2,330×g）し細胞成分を除去後、高速遠心（18,900×g）を繰り返し実施し、1μm以下のm/IEVを濃縮しました。これをショットガンプロテオミクス解析にかけて、抽出画分の細胞外小胞としての妥当性確認とフローサイトメーター解析用表面マーカー探索を行いました。血漿では593、尿では1,793のタンパク質が検出されました。DAVIDによるジーンオントロジー解析ではExosome、plasma membraneなどにカテゴライズされるタンパク質が多く、抽出分画のEVに由来する妥当性を示しています。また、オルガネラに由来するタンパク質も数多く存在することからm/IEV画分が含まれていることを示唆しています。

各コンポーネントに含まれる数
/ 検出された全タンパク質数 (%)

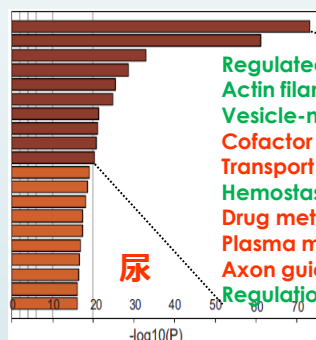
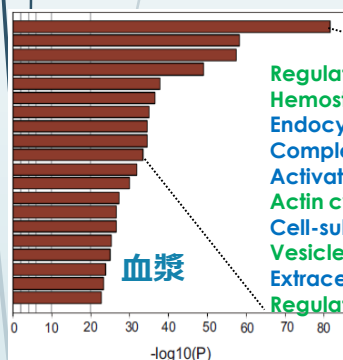
-DAVIDによるジーンオントロジー解析-



血漿、尿でタンパク質の機能は大きく異なっていました。血漿では止血、免疫応答、補体活性血液機能。尿では代謝プロセス、低分子輸送、細胞伸長突起など腎臓の栄養素再吸収を示唆するものでした。

-Metascapeによるジーンエンリッチメント解析-

緑：血漿、尿共通機能



DDA法により検出できたタンパク質リスト（スコア順）

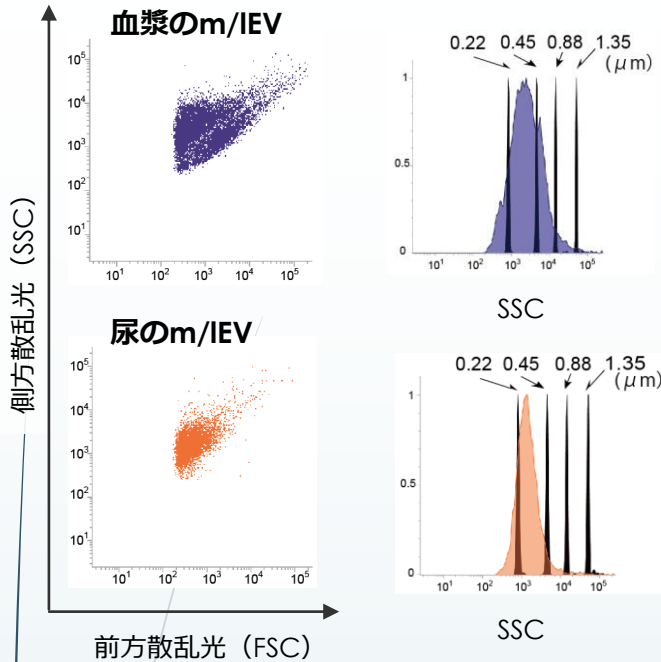
血漿

Protein name	Score
Ficolin-3	8772
Hemoglobin subunit alpha	1735
Actin, cytoplasmic 1	927
Hemoglobin subunit beta	602
Actin, gamma-enteric smooth muscle	500
Talin-1	368
Filamin-A	353
Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	321
Myosin-9	317
Mannan-binding lectin serine protease 1	308
Band 3 anion transport protein	277
Beta-actin-like protein 2	252
Hemoglobin subunit delta	215
Spectrin beta chain, erythrocytic	183
Complement C1q subcomponent subunit C	170
Ankyrin-1	164
CD5 antigen-like	164
Integrin alpha-IIb (CD41)	129
Complement C1q subcomponent subunit B	122
Deaminated glutathione amidase	118
Integrin beta-3(CD61)	57
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C (CD45)	29
CD59 glycoprotein	7
Glycophorin-A(CD235a)	4

尿

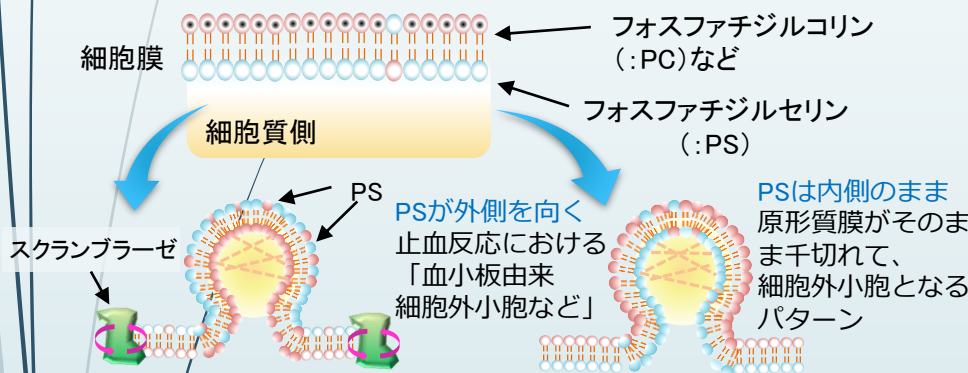
Protein name	Score
Actin, cytoplasmic 1	1618
Nephrilysin (CD10)	1194
Uromodulin	821
Solute carrier family 12 member 1	720
Alpha-enolase	708
Moesin	548
Ezrin	544
Aminopeptidase N (CD13)	486
Actin, gamma-enteric smooth muscle	476
Pyruvate kinase PKM	447
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	446
Radixin	364
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13	363
Triosephosphate isomerase	325
Multidrug resistance protein 1	324
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	316
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	306
V-type proton ATPase catalytic subunit A	298
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	285
Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2	277
Dipeptidyl peptidase 4 (CD26)	164
Mucin-1 (CD227)	51

黄色：フローサイトメーターでの観測に使用できたタンパク質

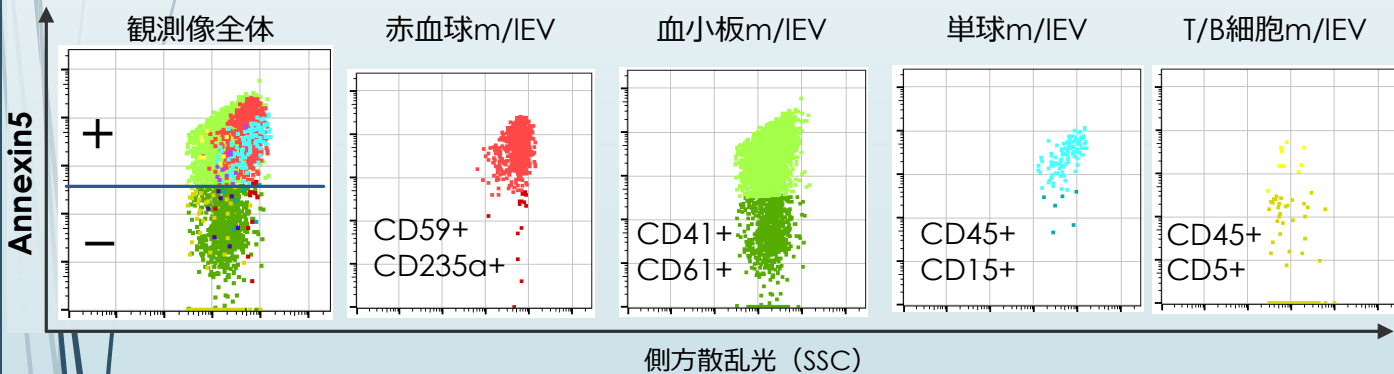


m/IEVを多種類の表面抗原でキャラクタライズするためにフローサイトメーターを使用しました。先述と同様な段階的な遠心操作を血漿及び尿に実施し、それを測定に供し、200-300nmに分布の中央値をもつ、正規分布を表す粒子集団として観測像を設定しました。非特異反応を及ぼす粒子は蛍光標識したIgGが陽性となるものをゲートアウトすることで観測像から除去しています。

m/IEVが細胞から放出される際には、細胞膜の脂質2重層の非対称性が崩れて、フォスファチジルセリンが表面を向いた形で出されるパターンと非対称性を保ったまま放出されるパターンがあると考えられます。この性質をフォスファチジルセリン特異的な蛍光標識Annexin5でm/IEVを染色し観測しました。

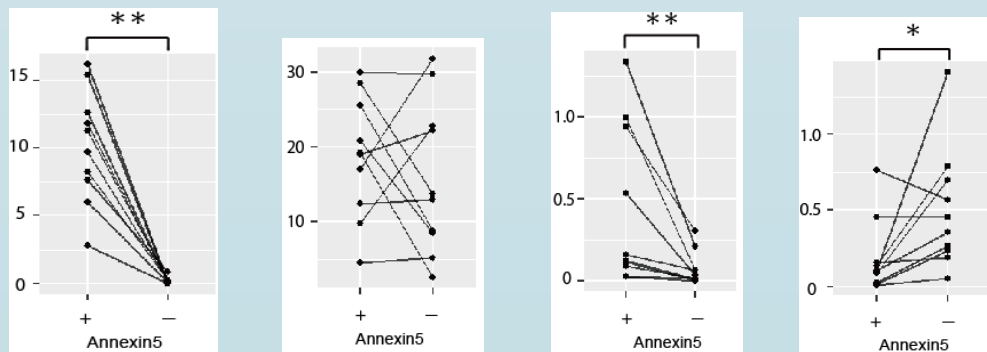


血小板に由来するm/IEVは観測像の40%と数としては最も多いものとなりました。止血作用にはPSがポジティブになるものが関与していると考えられます。次に数の多い赤血球に由来するm/IEVはPSがポジティブとなるものが大部分でした。



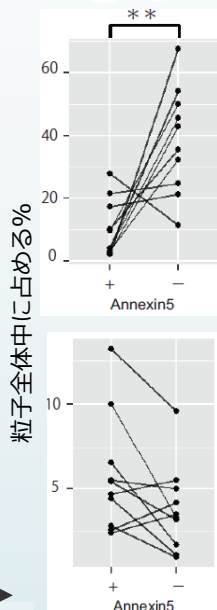
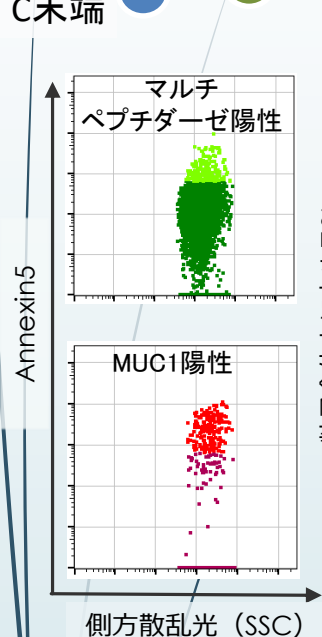
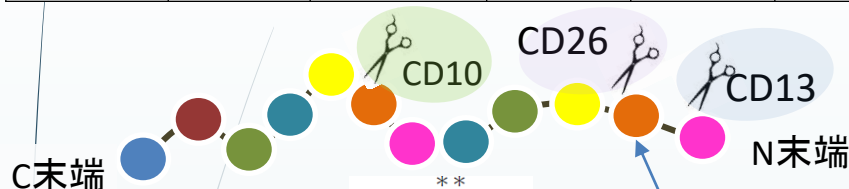
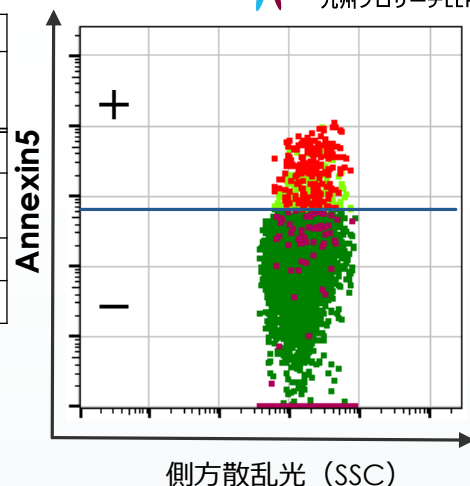
免疫細胞に由来するm/IEVは数が少なく全体の1%以下になることが多いですが、骨髄系（単球/マクロファージ）とリンパ系（T/B細胞）でPSの表出度合いは異なっていました。

粒子全体中に占める%



健康人10名の各細胞由来m/IEVのPS表出 (Annexin5+/-) の比較

	Annexin5	CD10 ・neutral endopeptidase ・Neprilysin	CD13 ・ Amino peptidase N	CD26 ・ Dipeptidyl Peptidase-4 (DPPIV)	CD227 ・ Mucin 1 (MUC1)
マルチ ペプチダー ゼ陽性	+	+	+	+	-
	-	+	+	+	-
MUC1 陽性	+		-		+
	-		-		+

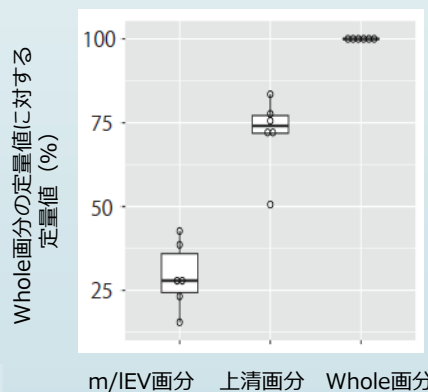
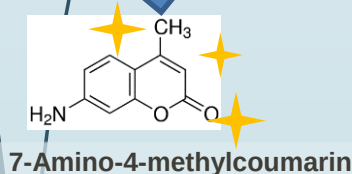
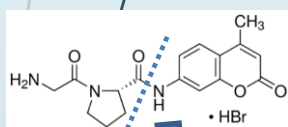


プロリン or アラニン

尿からは2つの異なったm/IEVを同定することができました。マルチペプチダーゼ陽性のm/IEVは腎臓に発現特異性があるユニークな3種類の膜型ペプチダーゼを全て同時に搭載するものでした。一方でMUC1は上皮細胞に特異的な抗原として知られており、このm/IEVは膀胱壁など尿路上皮に由来するものと考えられます。

マルチペプチダーゼm/IEVですがPSがネガティブとなるものが大部分であり、これらはリン脂質の裏返しを伴わない、尿細管の絨毛がちぎれてそのまま出てくるのではないかと考察しています。MUC1 m/IEVですが、こちらはマルチペプチダーゼとは異なり、PSがポジティブとなるものも観察されました。

尿m/IEV にはDPPIV (CD26)ペプチダーゼ活性が存在する



KPSLではインクレチン関連アッセイとして合成基質を利用したDPPIV (CD26) ペプチダーゼ切断活性測定を行っています。これを活用し、尿を3分画して、m/IEV画分のCD26活性を測定したところ、酵素活性の存在を認めました。

Characterization and function of medium and large extracellular vesicles from plasma and urine by surface antigens and Annexin V
PeerJ Analytical Chemistry 2:e4

KPSLでは医学検査分野の研究とその実用化に向けて、臨床有用性を持った新しいバイオマーカーを見出すために引き続き研究活動を実施しています！！

KPSLは各種バイオマーカー測定・網羅解析を提供します。医学・生命科学研究でお困りの際はお気軽にご相談ください。

KPSL News バックナンバー

- Vol.1 プロテオミクス特集
～次世代定量プロテオミクス『iMPAQ』分析始めました～
- Vol.2 メタボロミクス特集 ～網羅分析からターゲット分析へ～
- Vol.3 高感度マルチイオンアッセイ特集
- Vol.4 遺伝子解析特集
～次世代シーケンサーの基本原則と新たな技術の紹介～
- Vol.5 リキッドバイオプシ特集
～細胞外小胞(Extracellular Vesicles)の新たな展開～
- Vol.6 リキッドバイオプシ特集② ～ctDNA解析について～
- Vol.7 プロテオミクス特集②
～DIA法による網羅的なタンパク質解析～
- Vol.8 川崎病研究の最前線とリビドミクス解析
- Vol.9 COVID-19: 「日本の謎・アジアの謎」

【お問い合わせ先】

九州プロサーチ有限責任事業組合

〒819-0388 福岡県福岡市西区九大新町4-1

TEL:092-805-3239 FAX:092-805-3239

MAIL: info@kpsl.jp

←URL: <https://kpsl.jp/>

