

5.6 低線量率放射線照射による臓器間ネットワークの解析（次世代シーケンシング技術導入に関するフィージビリティ試験）

Application of Next-generation Sequencing Technologies to Analysis of the Effects of Aging and Low Dose- Irradiation on DNA Methylation

杉原 崇

生物影響研究部

Takashi SUGIHARA

Department of Radiobiology

Abstract

Exosomes are extracellular vesicles that contain various proteins and RNAs. Exosomes released from one cell reach another cell (target cell), and the mRNA contained in the exosome is translated into protein, while the miRNA (microRNA) contained in the exosome controls gene expression in the target cell by inhibiting the translation of the target gene. It has been proposed that exosomes generated in one organ enter the blood circulation system and impart their effects on other organs. We hypothesize that the exosomes in the sera of mice exposed to low dose-rate radiation contain characteristic miRNAs, and we plan to identify and investigate these radiation-specific miRNAs. This year, preliminary work was conducted to extract exosomes from the sera of mice using magnetic beads combined with the extracellular region of the exosome receptor protein Tim4. Analysis of the particle size of the purified exosomes showed that the exosomes were in the range between 30 nm and 150 nm, suggesting that they were of high quality and usable for microarray analysis of miRNAs contained in the exosomes.

1. 目的

エクソソームは、細胞外小胞の一種で、各種のタンパク質やRNAを含む。ある細胞から放出されたエクソソームは、他の細胞（標的細胞）に至り、含まれていたmRNAは蛋白質に翻訳される一方、miRNA（マイクロRNA）は標的遺伝子の翻訳を抑制することで、標的細胞内での遺伝子発現を制御する。

放射線照射によってある臓器から発生したエクソソームは、血管を通して体全体に拡散し、放射線影響を他の臓器に伝達するという機序が提唱されている。低線量率（20 mGy/日）ガンマ線を照射したマウスの血清中エクソソームは照射マウスの肝臓等で発生した特徴的なmiRNAを含有していると考え、血清中のmiRNAを解析し、照射による影響を確認することを考えた。具体的には、照射マウス及び非照射

マウス血清からエクソソームを抽出し、そこからさらにmiRNAを抽出し、マイクロアレイ法により発現解析することを考えた。

そこで、本研究では、そのような実験のためのフィージビリティ試験を行った。具体的には照射および非照射マウスの血清からのエクソソーム精製抽出を行い、このような方法が、低線量率放射線影響の解析、また、今後の交付金調査事業にとって有用であるかを検討した。

2. 方法

6週齢のB6C3F1雄マウスを購入し、2週間の検疫の後、8週齢から低線量率20mGy/日で100日間（総線量2Gy）照射を行った。雄マウスは100日齢で照射群、非照射群共に脂肪肝を持たないため、脂肪肝の影響のないマウスサンプルとして考えられる。照射群（12

匹)、非照射群(12匹)のマウスの血清を得て、MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS(富士フィルム)を用いて血清からエクソソームを抽出後、ナノサイトLM10(Malvern Panalytical)によってエクソソーム粒子の大きさを測定し、エクソソームの正常性を確認した。

3. 成果の概要

これまでエクソソームを精製する方法として、超遠心法やPEG沈殿法を利用した各種市販キットが主に用いられてきたが、これらの方法では非常に多くの夾雑物が混入する。今回の実験では、マクロファージに発現するエクソソームの受容体タンパク質Tim4の細胞外領域と磁気ビーズとを結合させた試薬を用いて精製を行った。この方法では、高純度なエクソソームを再現性よく回収できるとされている。

精製したエクソソームの粒子径の分布解析を行

ったところ、すべてのマウスのサンプルから30nm~150nmのナノ粒子が検出され、良好なエクソソームが抽出できることがわかった(図1)。現在、これらのエクソソーム内のmiRNAのマイクロアレイ解析の条件の検討を行っている。

本研究により、マウス血清からのエクソソーム精製抽出の技術が導入された。このような技術は、低線量率放射線影響の解析や今後の交付金事業に有用であると推測される。

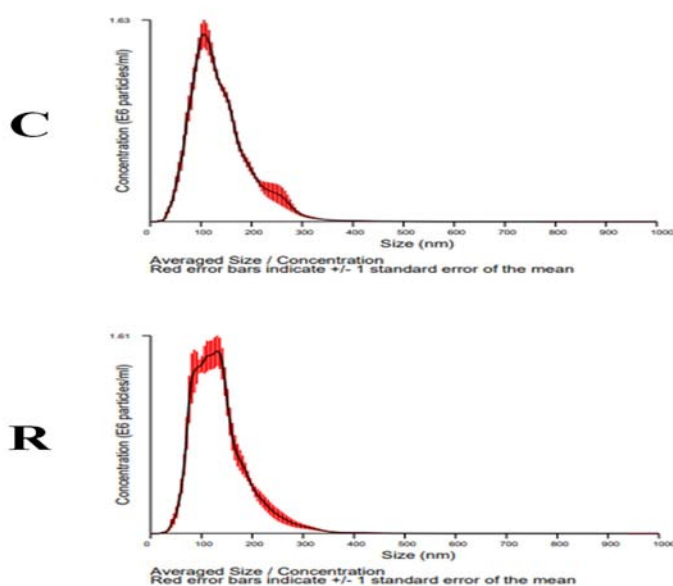


Fig.1 Size distribution of the exosomes.

C, exosomes from a non-irradiated mouse; R, exosomes from an irradiated mouse.

図1 エクソソームの粒子径分布解析の結果

C: 非照射群、R: 照射群