

# がん細胞への X 線照射後に分泌される細胞外小胞解析 Analysis of Extracellular Vesicles on X-Rays Irradiated Cancer Cells

大原麻希\*, 宇佐美徳子

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 放射光実験施設

〒305-0801 つくば市大穂 1-1

Maki OHARA\* and Noriko USAMI

Photon Factory, Institute of Materials Structure Science,

High Energy Accelerator Research Organization,

1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

## 1 はじめに

細胞から分泌される直径50~150 nm の膜小胞であるエクソソームは細胞外小胞の一種である。マイクロRNA やシグナルペプチドなどの機能性分子を内包し細胞間の情報伝達を担うため、抗原提示、アポトーシス、血管形成、炎症などの様々な生物学的プロセスに関与する。エクソソームはがん細胞における細胞間情報伝達にも活用されており、がん細胞由来エクソソーム中にはがん特異的な核酸やタンパク質が存在し、血管新生や細胞浸潤・転移などのがん悪性化を促進することが報告されている。また、放射線応答においてはバイスタンダー効果の誘導に関与することも報告されている[1,2]。しかし、エクソソームにより運搬される機能分子は多種多様であり、エクソソームによる細胞間情報伝達のがん悪性化や放射線応答にどのように関係しているのかは明らかにされていない。本研究では、がんの放射線抵抗性メカニズムとエクソソームによる細胞間情報伝達の関係性を明らかにするため、がん細胞から放射線照射後に分泌される細胞外小胞を解析した。また、細胞外小胞の構成成分であるスフィンゴシン脂質の一種であり、エクソソーム生成に関与するSphingosine 1-phosphate (s1p)[3]とs1pの産生に必要な Sphingosine kinase 1 (SPHK1)、Sphingosine kinase 2 (SPHK2)の放射線による変化を調べた。

## 2 実験

がん細胞は悪性黒色腫 (A2058) を使用した。X線発生装置 (SOFTEX M60-W) を用いてがん細胞に X 線を照射し、CO<sub>2</sub> インキュベータにて CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37°C で 72 時間培養した。その後、細胞培養上清からは超遠心法により細胞外小胞を遠心力の違いにより small vesicles (SEVs; エクソソーム)、large vesicles (LEVs; マイクロベジクル)、Apoptotic vesicles の 3 分画に分けて回収した。回収した細胞外小胞をナノ粒子解析システム NanoSight で粒子数と粒径を測定した。細胞からはタンパク質を抽出して s1p 関連タンパク質の発現を western blot 法により確認した。

## 3 結果および考察

培養上清中の細胞外小胞の粒子数は SEVs より LEVs の方が多かった。SEVs は低線量の 3Gy では粒子数・粒径ともに大きな増減はなかったが、高線量の 10Gy では著しく増加した。LEVs は粒子数・粒径とも線量依存的に増加した。(図 1) また、X 線照射後の細胞内 s1p, SPHK1, SPHK2 の発現量を確認した。X 線照射により s1p の発現が増加した。(図 2)

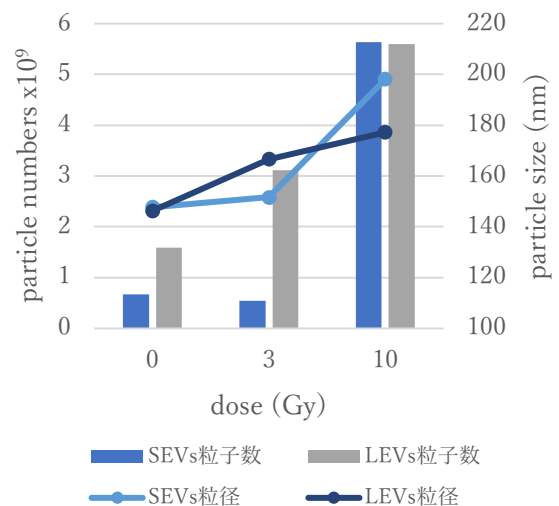


図 1 : 細胞外小胞の粒子数と粒径

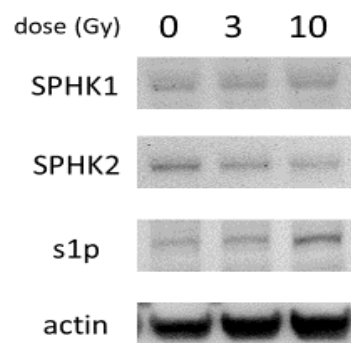


図 2 : s1p 関連タンパク質の発現変化

#### 4 まとめ

X線により細胞外へ分泌されるエクソソームの粒子数・粒径は高線量で増加した。マイクロベジクルの粒子数・粒径は比較的low線量でも2倍に増加していることから、細胞間情報伝達にエクソソームだけでなくマイクロベジクルも関与する可能性がある。

現在、放射光X線マイクロビーム照射装置を用いて核のみ照射、細胞質のみ照射による細胞内への部位選択的照射を行い、DNA損傷がエクソソームの分泌を誘導するのかを検討している。これらの結果と単離したがん細胞由来エクソソーム内包物を解析することにより、がん細胞エクソソームによる細胞間情報伝達と放射線抵抗性の関係が明らかになるだろう。

#### 謝辞

本研究は JST, CREST, JPMJCR17H3 の支援を受けて実施しました。本研究を進めるにあたりご協力いただきました名古屋大学環境医学研究所の澤田誠先生と小野健治先生に深謝いたします。

#### 参考文献

- [1] H. Klammer *et al.*, *Cancer Lett.* 356(1), 58-71 (2015).
- [2] M. Mothersill *et al.*, *Int J Radiat Biol.* 94(8), 696-707 (2018).
- [3] T. Kajimoto *et al.*, *Nat Commun.* 4, 2712 (2013).

\* maki.ohara@kek.jp