

エクソソームの単離濃縮試薬 ExoCap® (エクソキャップ)

ExoCap™ Exosome Isolation and Enrichment Kits

JSR ライフサイエンス株式会社／株式会社 医学生物学研究所

「ExoCap」, 「Magnosphere」, 「Blockmaster」はJSR株式会社の登録商標です。

1 はじめに

生体関連物質を分析して創薬や診断につなげようとする研究開発の中で、血液や尿等に含まれるエクソソームがターゲットとして注目されている。エクソソームは、体内のあらゆる細胞から分泌される小胞で、細胞に由来する核酸やタンパク質等の情報を保持している。このため、各種疾患に関わるバイオマーカーの運び屋とも言われている。今回、エクソソーム研究ツールとして、血液等の体液からも高純度のエクソソームを効率的に単離できるExoCapについて紹介する。

2 ExoCapの目的

2.1 エクソソームとは

エクソソームは、細胞内の小胞輸送を介して細胞外に放出される直径30～100 nmほどの細胞外小胞の一種である。膜表面上のテトラスパンと呼ばれる4回膜貫通タンパク質 (CD9, CD63, CD81等) がエクソソームのマーカーとして知られ、内部にはタンパク質、脂質、核酸等が含まれている (Figure 1)。2007年、エクソソーム中のmiRNAの存

在が明らかとなり、離れた細胞への情報伝達の担い手として注目が集まっている (Figure 2)。血液、尿、唾液等あらゆる体液に存在するエクソソームは、がん等の各種疾患の診断やDDSによる治療への応用が期待されている。

2.2 ExoCapとは

ExoCapは、免疫沈降法を基本原理とし (Figure 3)、体外診断で実績のあるJSRライフサイエンス社独自の磁性粒子Magnosphere (マグノスフィア) を用いた分離用担体と、エクソソームの捕捉・洗浄・溶出に最適化した緩衝液とを組み合わせた研究試薬キットである (Figure 4, 5, Table 1)。

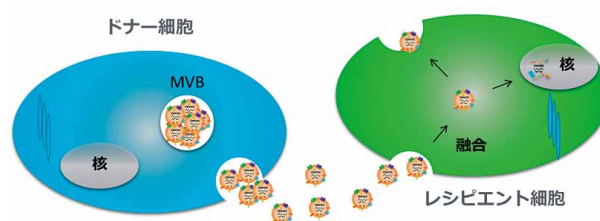


Figure 2 エクソソームの分泌と細胞間情報伝達

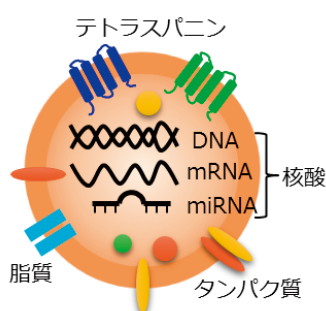


Figure 1 エクソソームの模式図

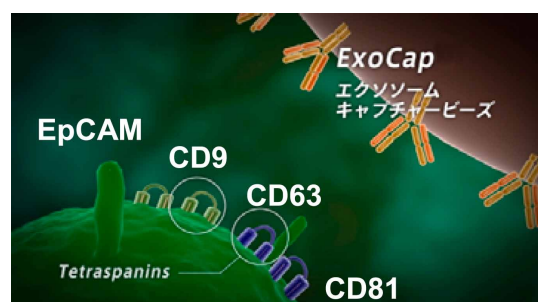


Figure 3 ExoCapによるエクソソーム捕捉



Figure 4 ExoCap Kit for Serum Plasma



Figure 5 ExoCap Streptavidin Kit

ExoCap Kit for Serum Plasma (Figure 4)は、エクソソームの表面抗原を認識する抗体を粒子に架橋しており、エクソソームに共通して存在するCD9, CD63, CD81またはEpCAM(上皮細胞接着分子)をマーカーに捕捉する。ExoCap Streptavidin Kit (Figure 5)は、研究者が保有する抗体(ビオチン標識)と組み合わせることで、目的とする疾患細胞由来のエクソソームを特異的に捕捉できる (Figure 6)。

磁性粒子Magnosphereは、親水性ポリマーの表面を有しており、さらにJSRライフサイエンス社独自のタンパク質吸着抑制用ポリマー Blockmasterと併用することにより、夾雑タンパク質等の非特異吸着を防止している。その他の構成成分として (Table 1), Treatment Bufferは、エ



Figure 6 ビオチン標識抗体結合粒子の調製

クソソームの非特異的結合を抑制し、Washing/Dilution Bufferは、磁性粒子の分散性を上げることで洗浄能を高め、Exosome Elution Bufferは、抗体結合粒子からのエクソソームの回収率を高めている (Figure 7)。

2.3 ExoCap 関連製品

医学生物学研究所 (MBL) からは、従来の抗体よりも反応性を高めたCD9抗体, CD63抗体, CD81抗体, および

Table 1 ExoCap Exosome Isolation and Enrichment Kits

製品名	種類	磁性粒子	その他構成成分
ExoCap Kit for Serum Plasma	5種類 • CD9 Kit • CD63 Kit • CD81 Kit • EpCAM Kit • Composite Kit	各キットに各抗体結合粒子を付属 • CD9 Capture Beads • CD63 Capture Beads • CD81 Capture Beads • EpCAM Capture Beads • Composite Capture Beads (4種の混合)	Treatment Buffer Washing/Dilution Buffer Exosome Elution Buffer
ExoCap Streptavidin Kit	1種類	Streptavidin Magnetic Beads ※ビオチン標識抗体は別売	Treatment Buffer Washing/Dilution Buffer

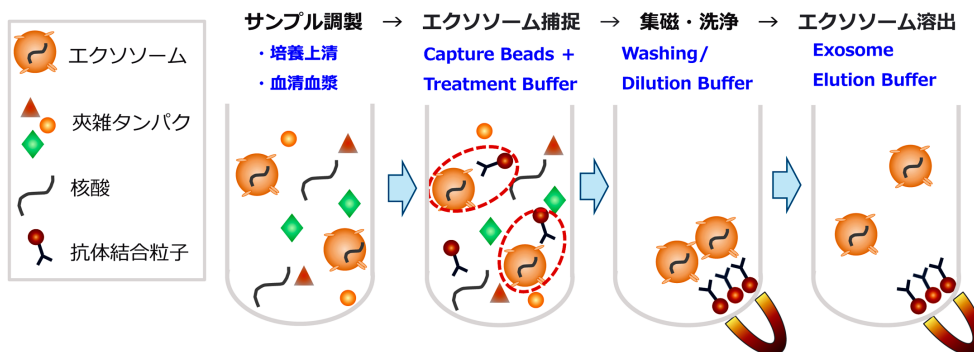


Figure 7 ExoCapによるエクソソームの単離

Table 2 MBL製ExoCap関連抗体

抗体名	Code No.	品名	アイソタイプ	クローン	標識
CD9抗体	MEX001-3	Anti-CD9 mAb	Mouse IgG2a κ	A100-4	Unlabeled
	MEX001-6	Anti-CD9 mAb-Biotin			Biotin
	MEX001-4	Anti-CD9 mAb-FITC			FITC
	MEX001-12	Anti-CD9 mAb-ALP			AP
CD63抗体	MEX002-3	Anti-CD63 (LAMP-3) mAb	Mouse IgG2b κ	C047-1	Unlabeled
	MEX002-6	Anti-CD63 (LAMP-3) mAb-Biotin			Biotin
	MEX002-4	Anti-CD63 (LAMP-3) mAb-FITC			FITC
	MEX002-12	Anti-CD63 (LAMP-3) mAb-ALP			AP
CD81抗体	MEX003-3	Anti-CD81 (TAPA1) mAb	Mouse IgG2a κ	A103-10	Unlabeled
	MEX003-6	Anti-CD81 (TAPA1) mAb-Biotin			Biotin
	MEX003-4	Anti-CD81 (TAPA1) mAb-FITC			FITC
	MEX003-12	Anti-CD81 (TAPA1) mAb-ALP			AP
EpCAM抗体	MEX004-6	Anti-CD326 (EpCAM) mAb-Biotin	Mouse IgG1 κ	B8-4	Biotin
isotype control 抗体	M075-6	Mouse IgG1 (isotype control) -Biotin	Mouse IgG1 κ	2E12	Biotin
	M076-6	Mouse IgG2a (isotype control) -Biotin	Mouse IgG2a κ	6H3	Biotin
	M077-6	Mouse IgG2b (isotype control) -Biotin	Mouse IgG2b κ	3D12	Biotin
	M078-6	Mouse IgG3 (isotype control) -Biotin	Mouse IgG3	6A3	Biotin

それらをビオチン標識, 蛍光FITC標識, 化学発光酵素アルカリフォスファターゼ標識した抗体が販売されている (Table 2). ビオチン標識 isotype control 抗体も用意されているため, Flow cytometry や PCR 解析等のネガティブコントロールとして使用できる. また, 捕捉したエクソソームに内包された mRNA や miRNA は, ExoCap Nucleic Acid Elution Buffer (Code No. MEX-E) (Figure 8) を使用すれば, 高品質・高回収率で抽出することが可能である.

2.4 エクソソームの分離方法

エクソソーム精製のゴールドスタンダードは, 超遠心分離法である. ただし, 高額な装置と時間を要するため, 通常の遠心分離機でもサンプルに添加すれば沈殿回収可能な濃



Figure 8 ExoCap Nucleic Acid Elution Buffer

Table 3 ExoCapと他社製品の比較

アプリケーション	サンプル	抗体結合磁性粒子		
		A社	B社	ExoCap
免疫沈降 (Western blotting)	培養上清	▲	●	●
	血清・血漿	×	●	●
Flow cytometry	培養上清	▲	▲	●
	血清・血漿	×	▲	●
qPCR	培養上清	-	-	●
	血清・血漿	-	-	●

▲ : サンプルの前処理 (超遠心分離、濃縮試薬) を必要とする場合
 × : メーカーがサンプルとして血清・血漿を推奨しない場合
 - : qPCR用のプロトコールがない場合

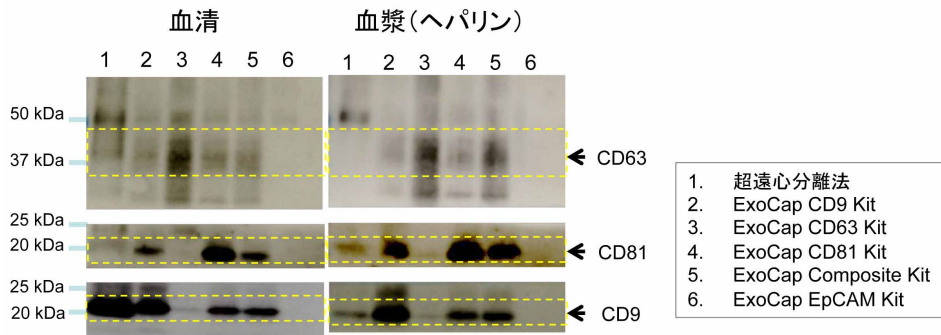


Figure 9 ExoCapによるヒト血清・血漿からのエクソソームの分離

縮試薬が他社より販売されている。遠心分離による手法は、大量のサンプルを一度に処理できるメリットはあるが、夾雑タンパク質等の沈殿、多検体処理およびFlow cytometry等のアプリケーションへの対応が課題となる。一方、ExoCapのような抗体結合磁性粒子の場合、特別な装置を必要とせず、多検体から高純度のエクソソームを簡単に単離でき、様々なアプリケーションにも応用可能である。特に、ExoCapは、Ready to useのキット構成で、血清・血漿サンプルからも前処理を必要とせず、qPCRにも対応している点が他社製品にはない特長となっている (Table 3)。

3 ExoCapの基本性能

3.1 エクソソームの回収率

各種ExoCap Kitを用いてヒト血清・血漿からエクソソームを回収し、Western blotting解析(エクソソームマーカー CD9, CD63, CD81の検出)を行った。キットの種類によってエクソソームの捕捉量(マーカーの検出強度)は異なるが、超遠心分離法(100,000g, 75分間×2回)と同等以上の回収率であった(Figure 9, レーン1~5)。EpCAM Kitにおいては、健常者検体からEpCAM陽性エクソソームは検出されなかった(レーン6)。

3.2 夾雑タンパク質の確認

各分離法で血清から回収したエクソソームの夾雑タンパク質をCBB染色で確認した。遠心分離法、特に濃縮試薬を使用した場合には、血清由来の夾雑タンパク質(アルブミンやグロブリン)までもが大量に沈殿してしまうが、ExoCapではほとんどみられなかった(Figure 10)。

3.3 単離エクソソームの形態

ExoCap CD9 Capture Beadsで捕捉したエクソソームをExosome Elution Bufferで溶出し、透過電子顕微鏡TEM (Figure 11)とナノ粒子解析装置NanoSight (Figure 12)で解析した。ExoCapで単離したエクソソームは、直径100 nm程度の形態を維持していた。

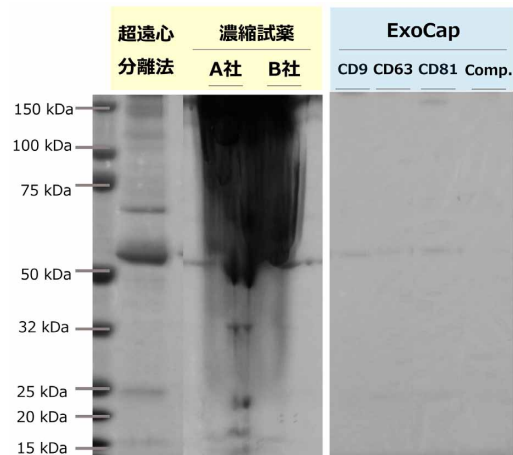


Figure 10 分離エクソソーム中の夾雑タンパク質

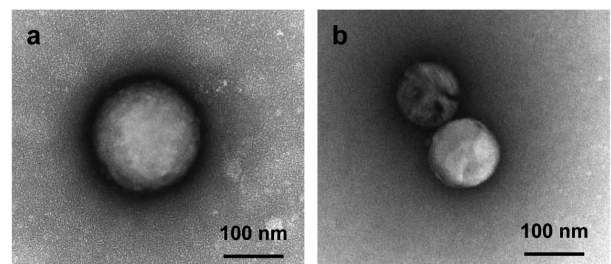


Figure 11 培養上清由来エクソソームのTEM画像
(a) 酢酸ウラニル,
(b) リンタングステン酸でのネガティブ染色

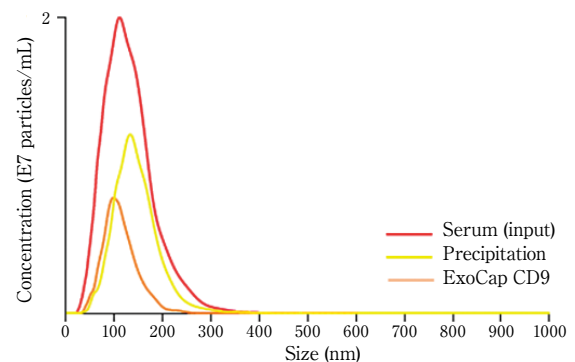


Figure 12 NanoSightによる粒径測定

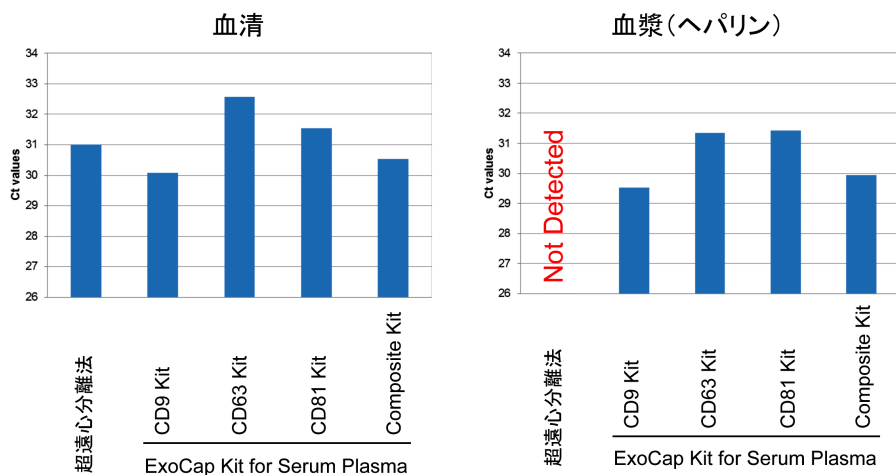


Figure 13 ヒト血清・血漿から捕捉したエクソソーム中のmiR-21解析 (qPCR)

4 ExoCapのアプリケーション

4.1 qPCR解析

ヒト血清・血漿から前処理なしでエクソソームを回収し、qPCR法で核酸を解析した。タンパク解析と同様にキットの種類によって異なるが、血清からは超遠心分離法と同程度のmiR-21が検出された (Figure 13左)。ヘパリン血漿の超遠心分離ではPCR自体が阻害され解析できなかったが、ExoCapは前処理なしでも検出できた (Figure 13右)。

4.2 Flow cytometry解析

ExoCap Kit for Serum Plasmaと蛍光標識CD9抗体を用いてFlow cytometry解析を行った。超遠心分離等による濃縮や精製を行わなくても、血清由来のエクソソームを検出できた (Figure 14)。

4.3 CLEIA法 (化学発光酵素免疫測定法)

ビオチン標識CD9抗体 (MEX001-6)、CD63抗体 (MEX002-6)を用いて、ExoCap Streptavidin KitでHT29細胞

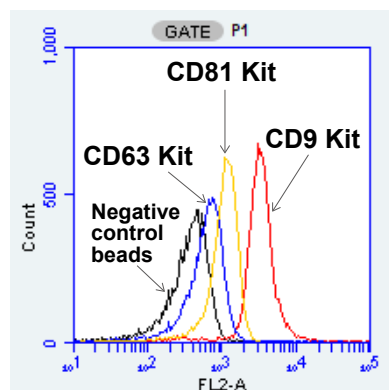


Figure 14 ExoCapによる血清由来エクソソームのFlow cytometry解析

培養上清のエクソソームを捕捉し、ALP標識CD81抗体 (MEX003-12)で検出した。ExoCap関連製品 (Table 2)を組み合わせることで、1000倍希釈した培養上清からもエクソソームを検出することができた (Figure 15)。

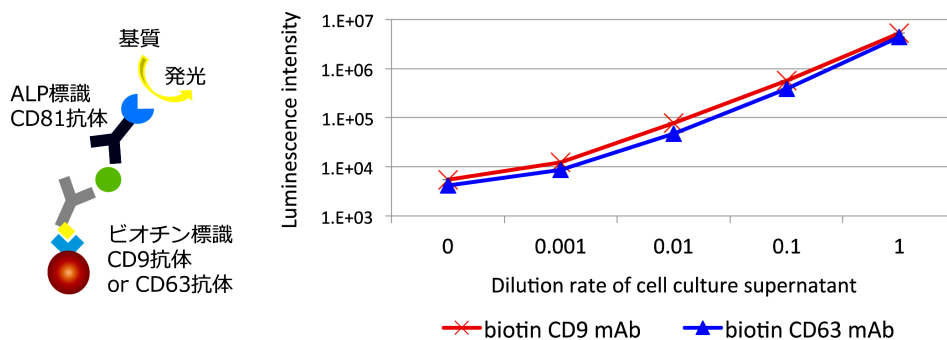


Figure 15 ExoCap関連製品を用いたCLEIA法

5 おわりに

ExoCapは、細胞培養上清だけでなく、血清・血漿等の体液からも前処理なしでエクソソームを高純度に回収でき、Western blotting, Flow cytometry, PCR, CLEIA等の様々なアプリケーションに対応できる。今後は、磁性粒子を用いた免疫沈降法の強みを生かし、多検体処理や自動化に対応した体外診断システムへの応用が期待される。

参考文献

- 1) 秀潤社編：“細胞工学”，Vol.32 No.1 (2013).
- 2) 落谷孝広：“エクソソーム解析マスターレッスン”，羊土社, (2014. 12. 10).