

細胞培養上清からの効率的なエクソソーム単離と 4 °C保存エクソソームの安定化

High recovery method of exosome from cell culture supernatant and the storage stability of exosome at 4 degrees Celsius

上野 勝*¹ 和久井 世紀*²
Masaru Ueno Seiki Wakui

Exosomes and microvesicles are submicron extracellular vesicles which are secreted by various cells. They contain various proteins, nucleic acids and molecular constituents to contribute to cell to cell communication. Recently, many methods to collect exosome have been developed. Above all, ultracentrifugation is the most commonly isolation method by most of researchers. However, the method has disadvantage of the lower recovery ratio from Cell culture supernatant. Moreover, as for the isolated exosome, the problem is the unstable storage at 4 degrees Celsius in the tube. The one of the main reason of low recovery ratio and unstable storage could be the absorption of exosome on the tube surface. Here we offer the new reagents to improve the recovery ratio of ultracentrifugation and improve the storage period at 4 degrees Celsius.

1 諸言

細胞から分泌される細胞外小胞が生理的にも、また、疾患においても生体内で重要な機能を持っていることが明らかとなり、世界中で研究の活性化が起きている。こうした細胞外小胞の一つがエクソソームであり、細胞間コミュニケーションとしての機能解析に加えてバイオマーカーとしての利用が検討されている¹⁾。

世界各国の研究者に最も使用されているエクソソーム単離法は超遠心法である²⁾。しかしながら、本法ではエクソソーム単離・濃縮の回収率が低いという問題が観察されている。さらに、精製された純度の高いエクソソームが保存中に減少してしまうという問題が観察されている。

今回、エクソソーム回収率を向上させ、かつ精製エクソソーム濃度を4 °C保存でも安定に維持する方法を開発したので、ここに紹介する。

2 理論

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 Multivesicular body (MVB) から細胞外に放出される直径30 ~ 100 nmほどの細胞外小胞 (Extracellular vesicle; EV) の一種である。エクソソームの膜表面上にはテトラスパンと呼ばれる4回膜貫通タンパク質が多く発現していて、CD9やCD63といった分子が一般的なエクソソームのマーカーとして知られている。また、内部にはタンパク質、脂質、核酸などが含まれている。エクソソームは細胞外に分泌された後、血液や尿、唾液などの体液を介して隣接もしくは離れた組織に取り込まれ、細胞間情報伝達の担い手として機能することが示唆されている。

2.2 エクソソーム単離法の比較

エクソソーム単離法として主に使用されている手法を Table 1にまとめる。

超遠心法はエクソソーム研究において最もよく使用されている手法である。本法はラージスケールの試験にも

*1 2003年入社 JSR・慶応義塾大学 医学化学イノベーションセンター

*2 2010年入社 JSR・慶応義塾大学 医学化学イノベーションセンター

Table 1 Comparison of exosome isolation method

	Ultracentrifugation	Affinity method (antibody)
Advantage	<ul style="list-style-type: none"> • Suitable for large scale • Absence of selection bias of surface marker 	<ul style="list-style-type: none"> • Selectable of high purity of surface specific marker • High recovery rate
Dis-Advantage	<ul style="list-style-type: none"> • Expensive initial investment • Lower recovery rate • Non-selectable 	<ul style="list-style-type: none"> • Potential for selection bias of surface marker • Unsuitable for large scale
Usage	<ul style="list-style-type: none"> • Comprehensive Analysis 	<ul style="list-style-type: none"> • (Disease) specific marker analysis
Product	<ul style="list-style-type: none"> • ExoCap™ Ultracentrifugation/Storage Booster 	<ul style="list-style-type: none"> • ExoCap™ Streptavidin Kit

適応でき、エクソソームの表面抗原のパターンによるバイアス無く回収できるものの、エクソソーム回収率が低いことが課題である。一方、アフィニティ法は回収率に優れ、かつ目的とする表面抗原選択的にエクソソームを単離できる。言い換えると、表面抗原のパターンによるバイアスがかかることになる。また、ラージスケールへの適用が困難である。したがって、それらの特徴に基づき、研究の目的に応じて各手法を使い分ける必要がある。今回報告する手法は超遠心法の抱える課題を解決する方法であり、さまざまな研究に広く利用できると考えられる。なお、本法は既に試薬化され、図1に示すように株式会社医学微生物学研究所 (MBL) より ExoCap™ Ultracentrifugation/Storage Booster (ExoCap USB) の名称で販売されている。



Figure 1 ExoCap™ Ultracentrifugation / Storage Booster (ExoCap USB).

2.3 開発の方針

超遠心法によるエクソソームの単離における回収率の低さは容器への吸着ロスに起因すると推察した。また、4℃保存において、エクソソームは夾雑物を含有する状態では比較的安定なもの、高純度に精製すると不安定であったことから、こちらも同様の要因と推察した。

そこで、界面活性剤、ポリマーおよびブロッキング剤などをスクリーニングした。多くのエクソソーム研究において単離・精製されたエクソソームが培養細胞等に添加されていることから細胞毒性が低いことが好ましいと考え、その中からFDA既認可の界面活性剤を選択し、至適な使用濃度を決定した。

製品開発のコンセプトは、図2に示すような煩雑な作業をできる限り排除したシンプルな試薬構成にある。試薬は1本のボトルのみでユーザーへ提供され、超遠心によるエクソソーム単離試験の際には、無血清培養上清に Exo-cap USBを加えて超遠心に供すだけ、精製エクソソームの4℃保存時には試料溶液に ExoCap USBを加えるだけで効果が期待できる。

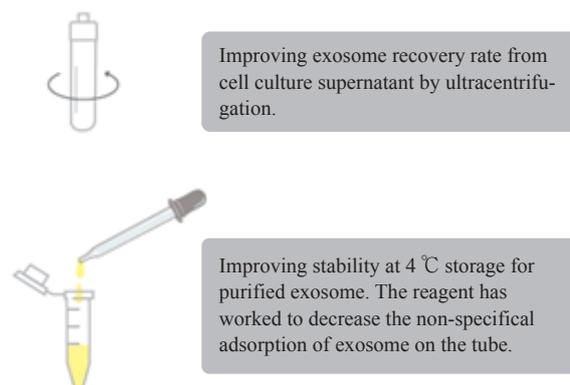


Figure 2 Concept of the the ExoCap USB.

3 実験

3.1 ExoCap USBによる、超遠心法による培養細胞株由来エクソソームの単離

ExoCap USBを用いた超遠心法によるエクソソーム単離のプロトコルを図3に示す。無血清培養上清に本試薬を添加し超遠心 (100,000 g, 4℃, 70 min.) によりエクソソームを沈殿させる。次いで、本試薬を水で10倍希釈した液 (Recovery buffer) で沈殿を再分散し、洗浄のために超遠心 (100,000 g, 4℃, 70 min.) によりエクソソームを沈殿させる。本試薬を水で10倍に希釈した液 (Recovery buffer) に沈殿を再分散し、そのまま実験に使用する。

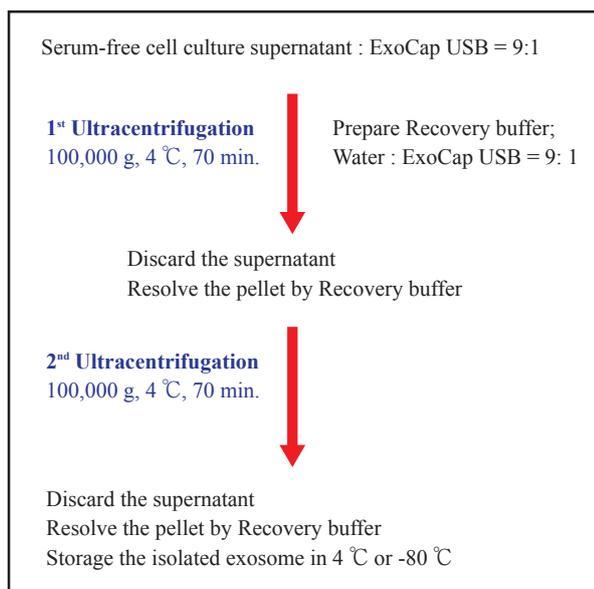


Figure 3 Ultracentrifugation standard protocol and the addition of the new reagent

3.2 評価

3.2.1 CLEIA (Chemiluminescent Enzyme Immuno Assay)

CLEIAのプロトコルを図4に示す。Streptavidin beads (MBL製 ExoCap™ Streptavidin Kit)と Anti-CD81 mAb-Biotin (MBL)を60分間反応させた後、未反応物を洗浄・除去してエクソソーム捕捉用のCapture beadsとした。次いで、Capture beadsと試料中のエクソソームを反応させて複合体を形成させた後、集磁して洗浄する。Capture beads複合体に Alkaline phosphatase labeled antibody (MBL製 Anti-CD9 mAb-ALP)を反応させた後、再度集磁して洗浄する。基質液として CDP star reagentを加え、インキュベーションした後にプレートリーダーにて測定し、シグナル強度を比較した。

3.2.2 銀染色, ウェスタンブロットティング

CLEIAの手法にて単離されたCapture beads-エクソソーム複合体を SDS-PAGEにより分離し、銀染色法により蛋白質の発現量を検証した。別に、同様に SDS-PAGEに供したゲルから蛋白質を膜に転写し、Anti-CD9 mAb

(MBL), Anti-CD81 mAb (MBL)および Anti-CD63 mAb (MBL)を用いてウェスタンブロットティングを行い、エクソソーム表面抗原の発現量を検証した。

4 結果および考察

4.1 CLEIAによるエクソソーム回収率の比較

大腸がん細胞株 HT29 細胞の無血清培養上清を材料とし、ExoCap USBを添加/未添加の条件で超遠心法にて単離されたエクソソームを調製し、CLEIAで回収率を評価した。結果を図5に示す。本試薬を添加したことにより、約6倍の回収率向上効果が認められた。

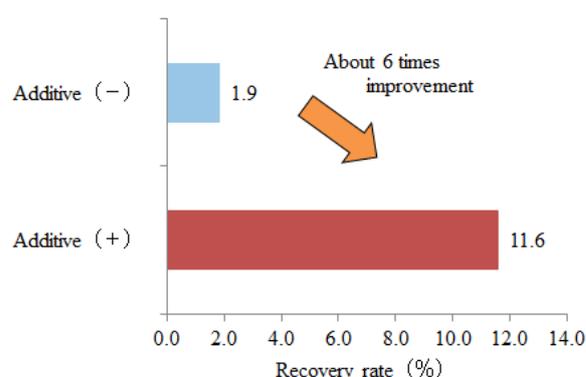


Figure 5 Evaluation of the ExoCap USB effect for ultracentrifugation by CLEIA.

4.2 銀染色, ウェスタンブロットティングによるエクソソーム回収率の比較

大腸がん細胞株 HT29 細胞の無血清培養上清を材料とし、ExoCap USBを添加/未添加の条件で超遠心法にて単離されたエクソソームを調製し、銀染色およびエクソソーム表面抗原を標的としたウェスタンブロットティング法により回収量を評価した。図6に示すように CD9, CD81 および CD63 のいずれのエクソソーム表面抗原においても、本試薬を添加したことにより、シグナルが強く検出され、回収率の向上効果が確認された。

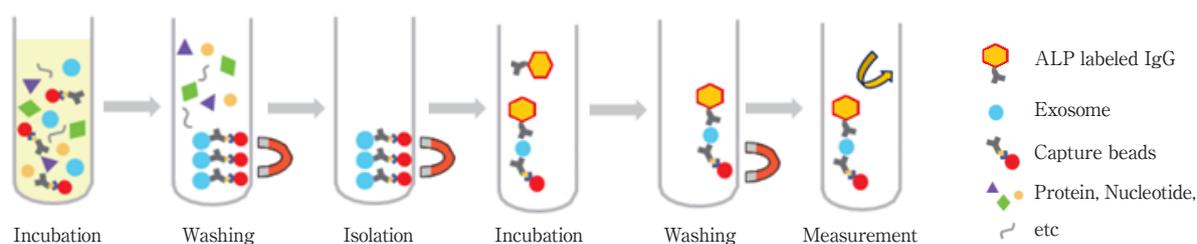


Figure 4 Principle of CLEIA measurement.

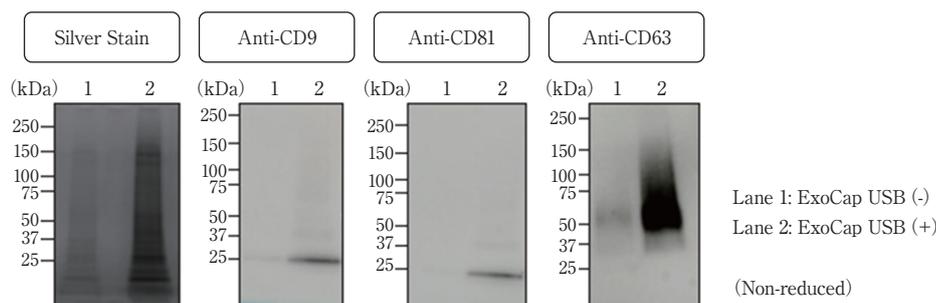


Figure 6 Evaluation of the ExoCap USB effect for ultracentrifugation by Western blotting.

4.3 単離エクソソームの4℃保存安定性の向上-1

高純度に精製されたエクソソームほどチューブ等への吸着によるロスが顕著である。各社から市販されている、蛋白質低吸着チューブで精製エクソソームを保存されることが多いが、その効果は万全ではない。

通常の超遠心により単離されたエクソソームにExoCap USBを添加/未添加した試料を調製し、4℃、一晩静置した(エクソソーム保存濃度は4.5 ug/mL)。エクソソーム濃度はBSAを標準物質としたBCAアッセイにより規定した。それら試料についてCLEIAを行い、4℃保存前の試料のシグナルに対する比率(Recovery ratio(%))を評価した。蛋白質低吸着チューブは一般的なPPチューブより

安定にエクソソーム濃度を保持できたものの、その性能は限定的であった。しかしながら、図7に示すように、本試薬を添加することにより、蛋白質低吸着チューブだけでなく通常のPPチューブにおいてもエクソソーム濃度をより安定に保持できた。

4.4 単離エクソソームの4℃保存安定性の向上-2

ExoCap USBを添加/未添加の超遠心による単離エクソソームをPPチューブにて4℃保存(エクソソーム保存濃度は0.15 ug/mL)し、CLEIA法で安定性を評価した。BSAを標準物質としたBCAアッセイによりエクソソーム濃度を規定した。図8に示すように、未添加の条件では4℃保存、1日で反応性が約50%以下に低下した一方で、

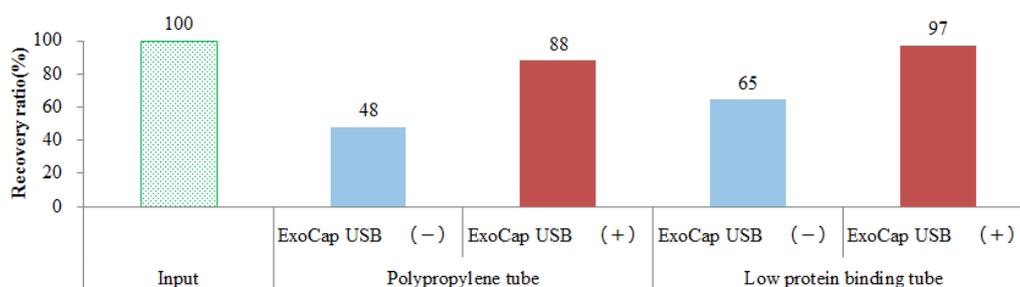


Figure 7 Effect of the ExoCap USB for exosome storage at 4℃ for 1day in some containers

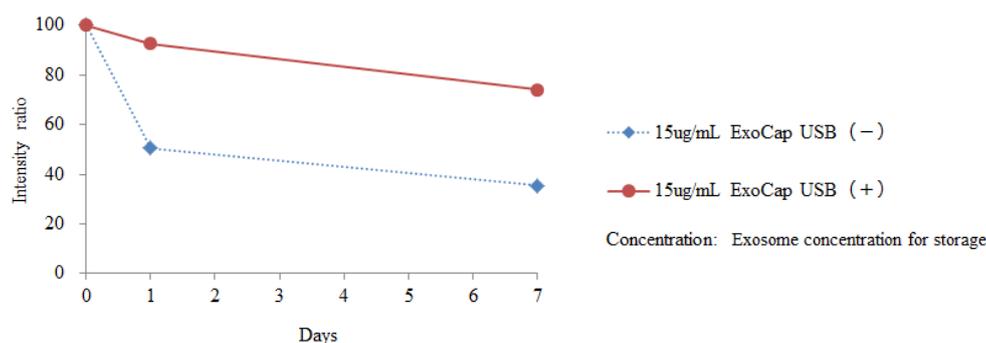


Figure 8 Stability at 4℃ for 7 days in regular Polypropylene tube.

本試薬を添加したことにより、4℃保存におけるエクソソーム濃度が維持された。

5 おわりに

ExoCap USBは、超遠心法によるエクソソーム回収効率を上げるだけではなく、精製エクソソームの4℃保存安定性をも向上させる効果が期待される試薬である。エクソソーム研究において最も主流であるエクソソーム単離法の課題を解消し、さらには4℃保存時の安定性にかかる課題にも対処する本試薬は、エクソソーム研究のツールとして有力である。エクソソームは、未だに明らかにされていないことの方が多く、臨床応用など様々な可能性を秘めている。拡大を続けるエクソソーム研究の一層の発展に貢献できることを期待する。

発表先

2017 Tri-Conference ポスター発表 (2017.2.20-22)。

2017 ISEV Annual Meeting ポスター発表 (2017.5.18-21)。

参考文献

- 1) 落谷孝広：“エクソソーム解析マスターレッスン”，羊土社, (2014)。
- 2) Chris Gardiner, Dolores Di Vizio, Susmita Sahoo, Clotilde Théry, Kenneth W. Witwer, Marca Wauuben & Andrew F. Hill : *Journal of Extracellular Vesicles*, **5**, 32945, (2016)。