

5号：リキッドバイオプシ特集

～細胞外小胞（Extracellular Vesicles）の新たな展開～

INDEX

- はじめに
- 細胞外小胞のカテゴライズ
- 新たなExosome解析機器・技術の紹介（ExoCounter）

はじめに

九州プロサーチLLP（KPSL）では、生体試料を用いた研究支援を実施すべく、種々のテクノロジーを用いた分析を実践しております。特に血液や尿など体液に由来するものを分析試料として取り扱う機会は多く、これらには細胞間、組織間の情報伝達物質が含まれ疾患は勿論、様々な生理機能に重要な役割を果たしていることは言うまでもありません。

がんの検査、治療において、“組織生検”は癌種の特定さらにはその分子解析による個別化医療への指針にもなり、欠くことのできないものである一方、侵襲的で、リスクを伴い、費用がかかり、かつ、疼痛を伴うというデメリットがあります。これを補完し、また、その代替法となる可能性があるものが“リキッドバイオプシ”で、体液中の少量の腫瘍由来生体物質、すなわち、DNAやたんぱく質などの分子ならびに細胞やその分泌小胞などを指します。

KPSLでは疾患への理解と診断の分野において、その応用が期待されるリキッドバイオプシにおいて特に“細胞外小胞”にフォーカスした共同研究ならびに技術開発に取り組んでおり、vol.5ではExosome新技術（試験的な受託解析可能）を紹介します。

細胞外小胞のカテゴライズ

Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018
(MISEV2018) JOURNAL OF EXTRACELLULAR VESICLES
2018, VOL. 7, 1535750を改変



size	Large and/or medium EVs >200nm		Small EVs <100nm or <200nm	
	large EVs >1000nm Apoptotic bodies	medium EVs microvesicles, ectosomes, microparticles	small EVs	late endosome- derived Small EVs=exosome
common Protein(All EVs)	1- Transmembrane or GPI-anchored proteins associated to plasma membrane and/or endosomes non-tissue specific.(Tetraspanins, MHC class I, Integrins), cell/tissue specific(Some TSPANs, EPCAM, CD45, MHC class II) 2- Cytosolic proteins recovered in EVs with lipid or membrane protein-binding ability(ESCRT-I/II/III, Flotillins-1 Heat shock Proteins) promiscuous incorporation in EVs(actin, tubulin, GAPDH)			
characterizing protein	4- Transmembrane, lipidbound and soluble proteins associated to other intracellular compartments than PM/endosomes nucleus(Histones Lamin A/C) mitochondria(IMMT,cytochromeC,TOMM20) ER.Golgi(calnexin,HSP90B1,BIP, GM130) ,cytoskeleton(Actinin1/4)			

エクソソームは、細胞外小胞においてsmall EVs (Extracellular Vesicles) にカテゴライズされるもので治療や診断、創薬等の幅広い領域での応用が期待されています。これらの研究において、疾患や臓器に特異的なたんぱく質を発現した特異的エクソソームを定量することが重要であると考えられます。研究方法としては、電子顕微鏡による形状と大きさの観測、粒子数測定装置による粒度分布の確認、抽出したエクソソームの含有たんぱく質確認等が実施されています。

しかし、既存の測定法は測定の前工程として、試料からのエクソソームの単離が必要である等の理由から、特異的エクソソームを高精度かつ簡便に測定する手法は確立されていませんでした。

次世代エクソソーム定量システムExoCounter : エクソカウンター (※)

ExoCounterは、試料中の特異的エクソソームの数を高精度に測定する新たな手法です。アッセイには、表面に抗体をコートした専用ディスクを用い、試料をディスク上でインキュベーションすることで、ターゲットとするたんぱく質を表面に持つエクソソームを捕捉します。ディスク表面は溝構造を有しており、抗体による特異性と溝構造による大きさ選択性の合わせ技でエクソソームを確実に捕捉します。次に、捕捉されたエクソソームを抗体ナノビーズで標識しますが、溝構造(260nm)とナノビーズ (200nm)によるサイズ制限効果により、エクソソームとナノビーズを一对一の関係で結合させています(図1)。エクソソームに結合したナノビーズを専用の光ディスク装置で検出することで、エクソソームをカウントします。特異的エクソソームを確実に検出出来るため、細胞培養上清や血清・血漿等の体液試料中の特異的エクソソームを、煩雑な単離・精製処理なしに直接測定することが可能になりました。この度KPSLでは、ExoCounterを用いて各種試料中のエクソソーム量を測定する受託サービスを開始しました。

※「ExoCounter」はJVCKENWOODの商標または登録商標です

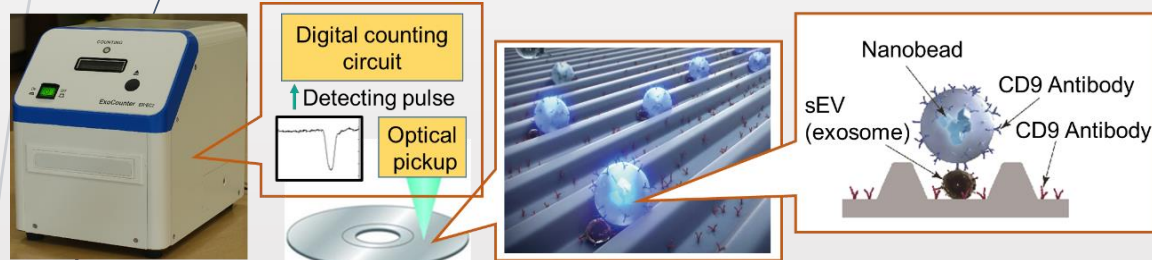


図1 ExoCounterの構成

ExoCounterによる測定例 (SEC : Size Exclusion Chromatography 法での精製エクソソームの評価)

様々な試料からエクソソームを単離あるいは濃縮するためにSECカラムが使われています。ここでは、血清を試料としてSECで分画した各画分の特性を検証しました(図2)。

図3Aは、各画分の、総粒子数(NTA測定)、CD9陽性エクソソーム数(ExoCounter)、総たんぱく量(280nm吸光度法)の測定結果を示します。総粒子数とCD9陽性エクソソーム数は、画分4~7で最大となりました。エクソソーム試料の純度指標とされる「総粒子数/総たんぱく質量」は画分4で最大でしたが、この画分の、「CD9陽性エクソソーム数/総粒子数」は0.14%でした(図3B)。より早い画分で「CD9陽性エクソソーム数/総粒子数」が高い結果でした。

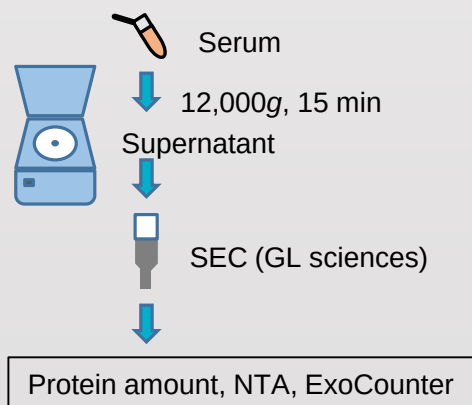


図2 SEC法の検証実験プロトコル

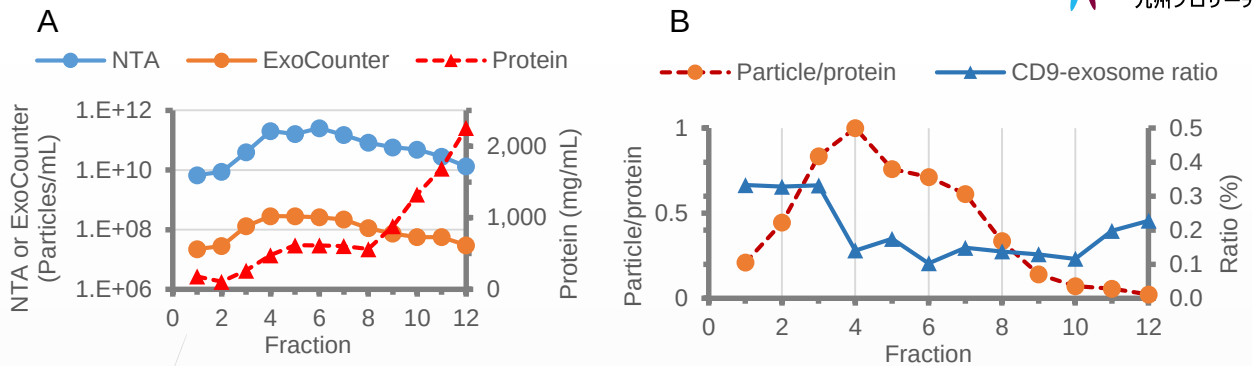


図3 SEC法で分画した血清試料の解析

抗体セットの特徴

ExoCounterは、ディスク抗体と抗体ナノビーズを組み合わせてエクソソームを検出します。汎エクソソーム抗体としては、CD9とCD63を用意していますが、今後CD81が追加される予定です（表1）。疾患特異的な抗原は研究対象により様々なものが要求されますので、比較的ニーズの多いCD147, HER2を標準測定項目としています。これ以外の抗体についても対応が可能ですので、お気軽にお問い合わせください。また、抗体の組み合わせに関しては、疾患特異抗原に対する抗体をディスク側に用いることが推奨されます。これは、比較的少数の疾患特異的エクソソームの検出において、試料中で多数を占める疾患に無関係なエクソソームの干渉を低減できるためです。

表1
推奨組み合わせ表

推奨度
◎ > ○ > △

		ビーズ				
		CD9	CD63	CD147	HER2	custom
ディスク	CD9	◎	◎	△	△	△
	CD63	◎	◎	△	△	△
	CD147	◎	◎	○	△	△
	HER2	◎	◎	○	○	△
	custom	◎	◎	○	○	△

測定例

1) 細胞培養液中の特異的エクソソームの測定

大腸がん細胞株(HCT116)、乳がん細胞株(BT474, SKBR3)、肺がん細胞株(A549)の各培養液中のエクソソームを、汎エクソソーム抗原及びがんに関連するたんぱく質と結合する抗体を固定したナノビーズを使い測定しました。測定は培養液を希釈せずに直接測定しています。結果は、大腸がん細胞株HCT116でCD147陽性エクソソームが高値であること、2つの乳がん細胞株でHER2陽性エクソソームが高値であることが示されました。これらの結果は、がんに関連するエクソソームをExoCounterで高精度に計測できることを示しています（図4）。
Kabe, Y. et al. Clin. Chem. 64, 1463 LP-1473 (2018).

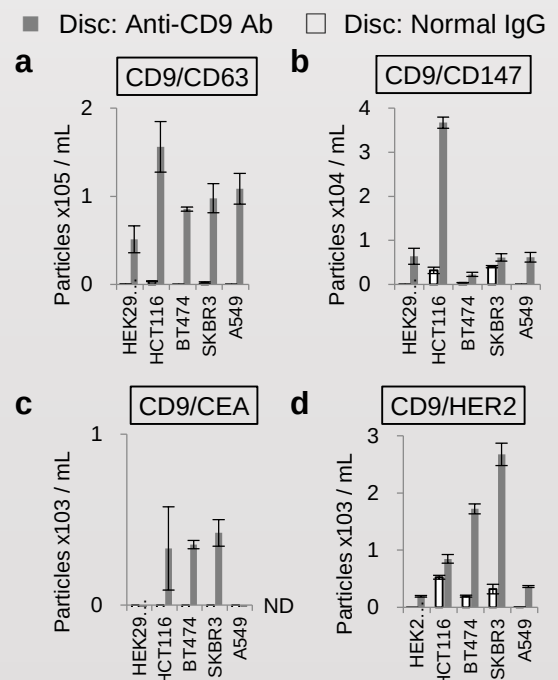


図4 細胞培養液中のエクソソームの検出

2) がん患者血清中のHER2陽性エクソソームの検出

各種のがんまたは非がん性疾患の患者血清と健常者の血清を、がんに関連する抗原HER2を発現した特異的エクソソームの数をExoCounterを使い測定しました(図5)。

乳がんと卵巣がんでは中央値が高く、各検体の値について統計解析を行った結果、乳がん患者と卵巣がん患者の血清で、健常者または非がん性疾患の患者の血清に対して有意にエクソソーム数が多いことが示されました(nは検体数を、×は枠以外のデータ数を示す。★★、★は、統計検定で有意差があった水準1%、5%を示す)。HER2たんぱく質を持ったエクソソームのがん患者試料での増加は、これまでも定性的な報告が存在しますが、この結果は、大規模コホート研究により、初めてがん患者血清中のHER2タンパク質を持ったエクソソーム数が統計的に有意に上昇することを示したものです。

Kabe, Y. et al. Clin. Chem. 64, 1463 LP-1473 (2018)

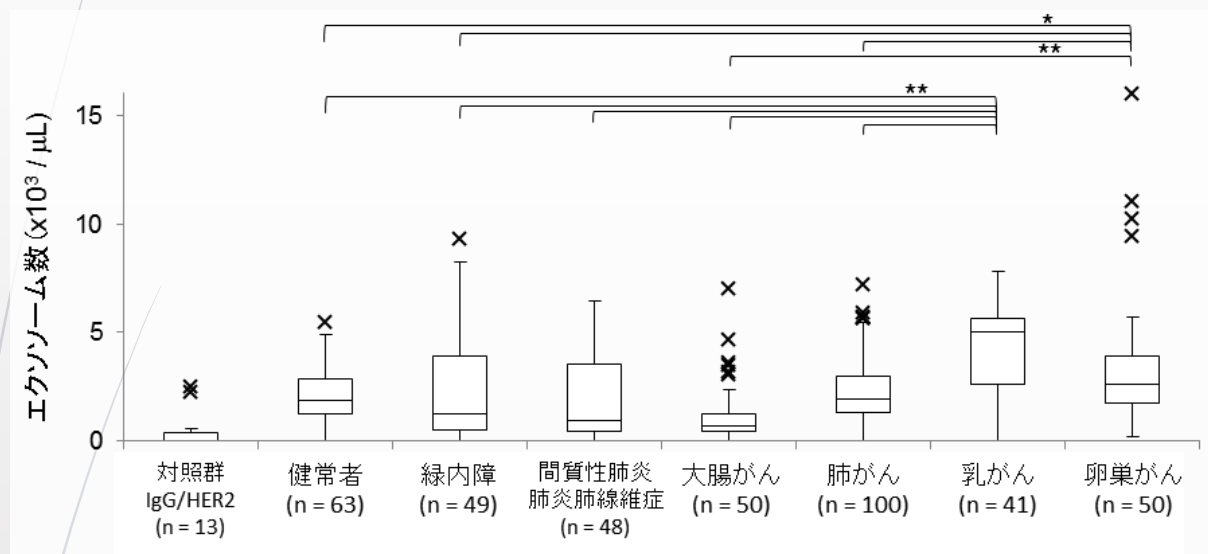


図5 CD9抗体をコートした基板を用いて検出して、がん患者、非がん疾患患者、健常者の血清中のHER2/CD9重陽性エクソソーム

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 高感度マルチ免疫アッセイ特集

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～

ホームページからダウンロード
または配布希望をご連絡ください

【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/



KPSL
九州プロサーチLLP