

## Exosome ELISAを用いたパーキンソン病患者血液検体中のEVマーカー量解析

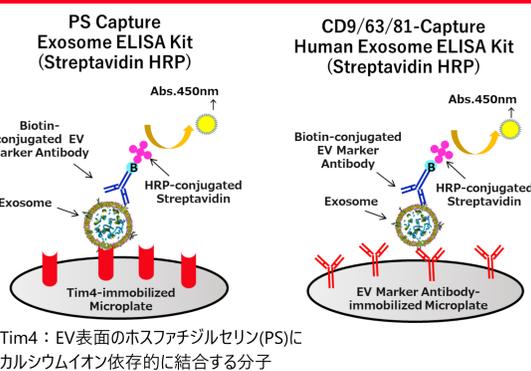
○今若直子<sup>1</sup> 請川亮<sup>1</sup> 常深泰司<sup>2</sup> 服部信孝<sup>2</sup> 西部隆宏<sup>1</sup>

<sup>1</sup>富士フイルム和光純薬株式会社バイオ技術センター、<sup>2</sup>順天堂大学医学部附属順天堂医院脳神経内科

### 要旨

エクソソームを含む細胞外小胞 (EV) は、細胞由来の核酸やタンパク質、脂質等を内包する膜小胞であり、分泌されたEVが血液などの体液を循環していることから、低侵襲な早期診断法が求められているパーキンソン病 (PD) をはじめとする神経変性疾患分野においてもバイオマーカーとしての有用性が期待されている。本研究ではPDにおける血液中EV量変化をモニタリングする目的で、カルシウム依存的にEV表面のホスファチジルセリンと結合するTim4を用いてEVを捕捉するPS Capture ELISAおよびEVマーカー抗体を用いてEVを捕捉する抗体サンドイッチELISAにより、健常者およびPD患者血液検体中のEVマーカーCD9、CD63、CD81量を測定した。その結果、3種類のEVマーカーの中でCD9がPD患者血漿検体で顕著に低下していることが両ELISA系で確認された。また、血清検体についても血漿と同様にPD患者検体においてCD9量が有意に低下しており、Hoehn and Yahr (HY) ステージ1や2の早期患者検体においても有意に低下していることが確認された。以上よりPD患者血液中CD9陽性EV量の低下が示唆されたため、CD9陽性EVの特性解析として血小板由来EVとの関連性を調査した。FCMを用いたEV一粒子解析の結果、血小板マーカーCD41陽性EVおよびCD61陽性EVの約90%がCD9を共発現していることが示され、さらにPS Capture ELISAによりPD患者血漿中EVのCD41量が顕著に低下していることが示された。以上の結果からPD患者血液におけるCD9量低下に血小板由来EVの減少が関与していることが示唆された。

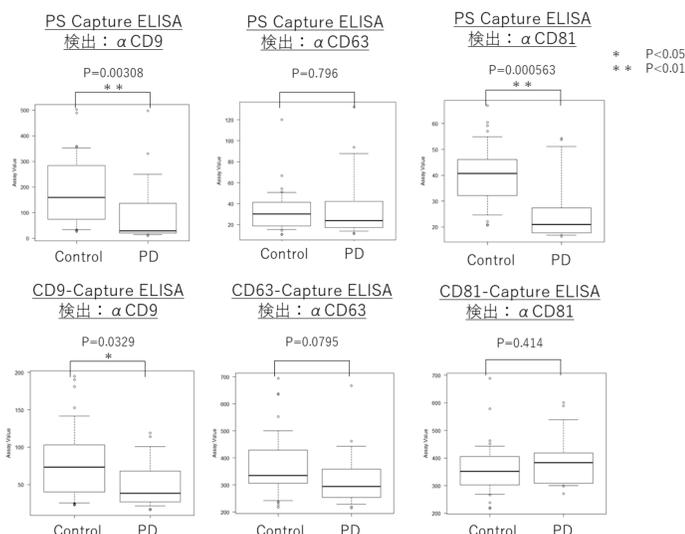
### Exosome ELISAによるEVマーカー測定



Tim4をベースとしたPSアフィニティーELISA (PS Capture ELISA) でPS陽性EV表面のCD9、CD63、CD81を測定および抗体サンドイッチELISA (CD9/CD63/CD81-Capture ELISA) でCD9、CD63、CD81陽性EVを測定した。また、ELISAスタンダードとしてCOLO201細胞由来精製EVを用いて測定値を算出した。

### EDTA血漿測定 (健常者EDTA血漿37検体、PD患者EDTA血漿16検体)

PS Capture ELISAおよびCD9/CD63/CD81-Capture ELISAにより、健常者およびパーキンソン病患者由来EDTA血漿中のEVマーカーCD9、CD63、CD81を測定した。

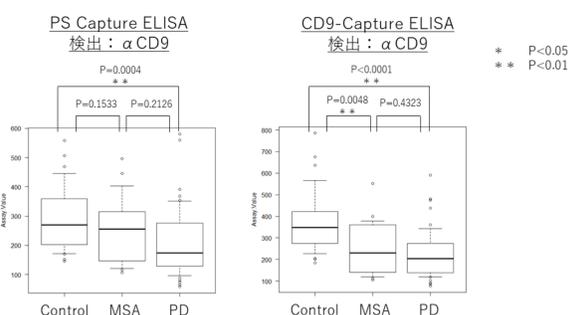


結果、両ELISA測定系において、CD9量がControl (健常者) に比べPD患者検体で有意に低下していることが示された。一方CD81量はPS Capture ELISAでのみ低下が確認された。

### 血清測定 (健常者血清30検体、MSA患者血清17検体、PD患者血清50検体)

PS Capture ELISAおよびCD9-Capture ELISAにより、健常者、多系統萎縮症 (MSA)、PD患者由来血清中のCD9量を測定した。

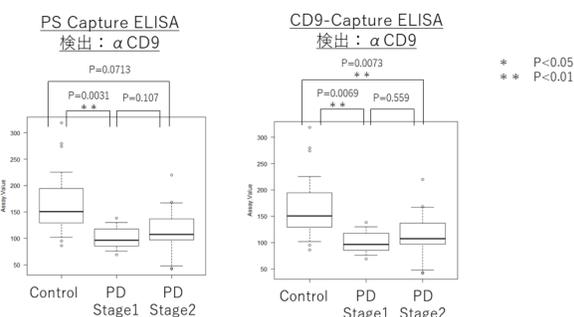
結果、血清検体においても両ELISA測定系で健常者に比べPD患者で有意にCD9量が低下しており、MSA患者検体より有意差が大きいたことが示された。



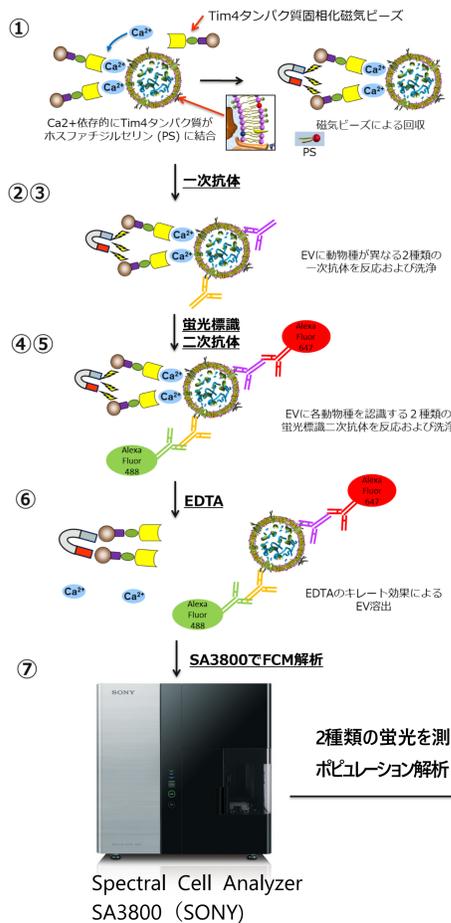
### 血清測定 (健常者血清30検体、PD HY Stage1患者血清5検体、HY Stage2患者血清14検体)

PS Capture ELISAおよびCD9-Capture ELISAにより、健常者および早期 (HY stage 1または2) PD患者由来血清中のCD9量を測定した。

結果、早期PD患者においても健常者に比べCD9量が有意に低下していることが示された。

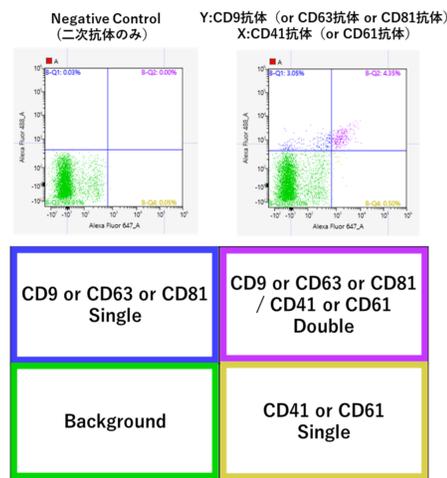


### PS陽性Exosomeの一粒子解析



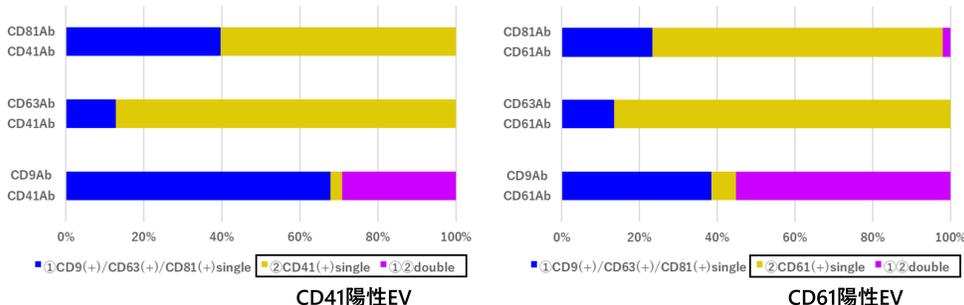
### EV一粒子解析プロトコル

- ① MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2のExosome Capture固相化磁気ビーズにサンプルを添加しEVを捕捉
- ② EV-磁気ビーズに一次抗体を反応
- ③ 洗浄
- ④ EV-磁気ビーズに蛍光標識二次抗体を反応
- ⑤ 洗浄
- ⑥ MagCaptureキット付属Elution Bufferで溶出
- ⑦ SA3800でFCM解析



### EDTA血漿測定 (健常者EDTA血漿)

健常者由来個別EDTA血漿を用いてPS陽性EVのEVマーカーCD9、CD63、CD81および血小板マーカーCD41、CD61の共発現性をFCMによる一粒子解析にて調べた。EVマーカーCD9、CD63、CD81のみ発現しているEVの割合は青色、血小板マーカーCD41、CD61のみ発現しているEVの割合は黄色、共発現しているEVの割合は紫色で示している。



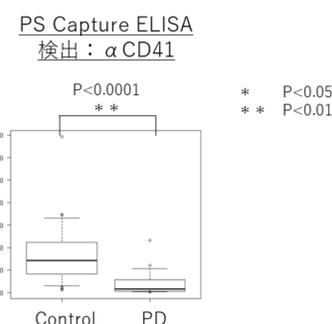
結果、血小板由来CD41陽性EVおよびCD61陽性EVの約90%がCD9を共発現しているのに対して、CD63、CD81については数%以下程度しか共発現していないことが示された。本結果から、多くの血小板由来PS陽性EVはCD9を発現していることが示された。

### Exosome ELISAによる血小板マーカー測定

#### EDTA血漿測定 (健常者EDTA血漿37検体、PD患者EDTA血漿16検体)

PS Capture ELISAにより、健常者およびPD患者由来EDTA血漿中の血小板マーカーCD41を測定した。また、ELISAスタンダードとしてEDTA血漿由来精製EVを用いて測定値を算出した。

結果、PD患者検体のCD41量が有意に低下していることが示された。またCD9量測定に比べAUCが0.753⇒0.851に上がり、さらに感度も向上する結果を示した。本結果から、PD患者検体のCD9量低下に血小板由来EVの減少が関与している可能性が示唆された。



### 結論

以上の結果、血小板由来EVの多くがCD9を発現しており、PD患者血液検体においてCD9量と血小板マーカーCD41量が減少していることが示されたことから、PD患者血液において血小板由来EVの減少が起こっている可能性が示唆された。PD患者の血小板には形態や機能の異常が見られることがこれまでに報告されており、EV分泌にも影響が及んでいる可能性も考えられる。今後、他の神経変性疾患における血小板由来EV量についても検討を進め、バイオマーカーとしての有用性を調査していく予定である。

今回の演題に関連して、開示すべき利益相反はありません。