

PSアフィニティー法を利用した Exosomeのフローサイトメトリー解析

○成瀬 健⁴、中井 渉¹、吉田 孟史^{1,2}、Diego Diez³、宮竹 佑治^{1,2}、西部 隆宏⁴、
請川 亮⁴、今若 直子⁴、山根 昌之⁴、定村 佳房⁴、華山 力成^{1,2,5}

1.大阪大・IFREC・免疫ネットワーク
2.金沢大・医学系・免疫学
3.大阪大・IFREC・定量免疫学
4.和光純薬工業株式会社
5.JST・CREST

要旨

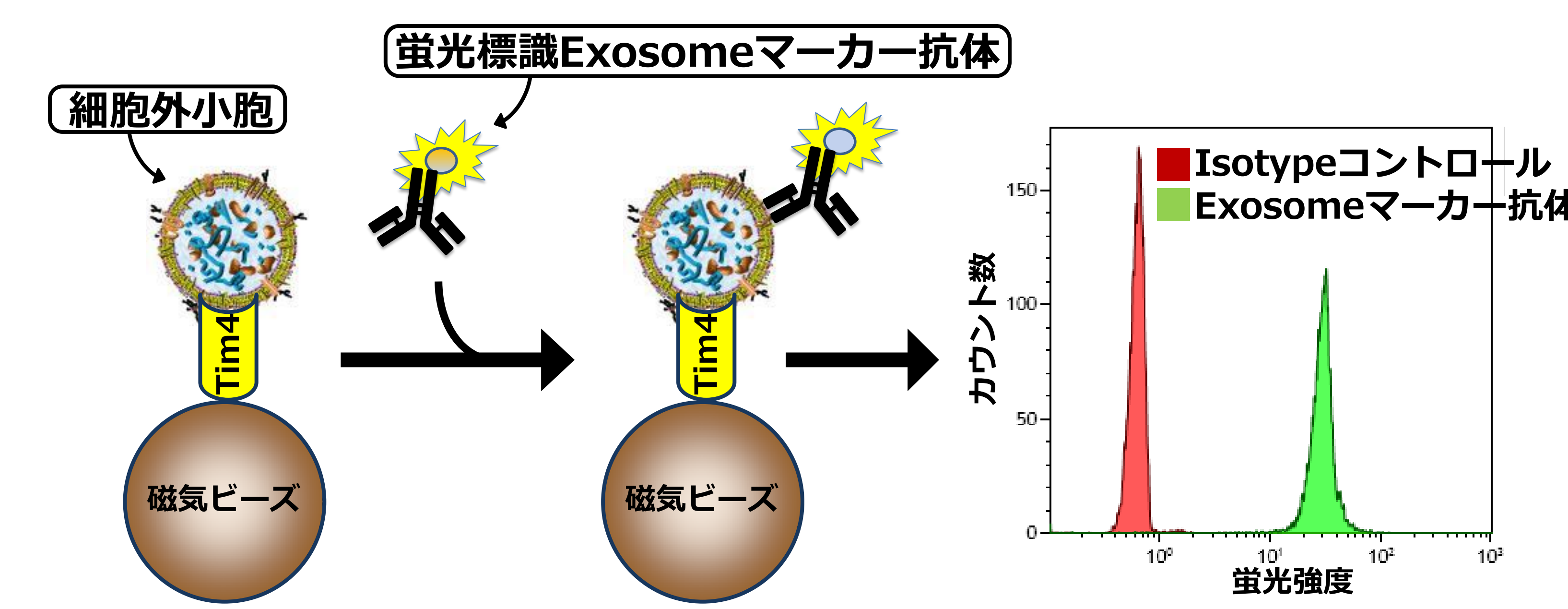
Exosomeを始めとする細胞外小胞は、表面または内部にタンパク質や脂質、mRNA、microRNA、DNAなどを含み、細胞から分泌された後、血液、尿、唾液、髄液、母乳などの体液中で安定的に存在していることから、細胞間コミュニケーションのメッセンジャーや疾患バイオマーカーとして注目を集めている。フローサイトメトリーは、細胞のマーカー解析や分取において汎用的に用いられている技術であるが、一般的なアナライザーではExosome等の小さなサイズの細胞外小胞（50nm~150nm）を直接解析することは困難であるため、粒径の大きなビーズにExosomeを固定化し、フローサイトメトリー解析を行う手法が利用されている。

今回、我々は、Tim4タンパク質がホスファチジルセリン（PS）を介してExosomeに結合する性質（PSアフィニティー[※]）を利用して、Tim4固相化磁気ビーズによるExosomeマーカーのフローサイトメトリー解析法を開発した。本手法では、最初にTim4固相化磁気ビーズを用いてサンプル中からExosomeを単離する。次に、Tim4を介して磁気ビーズに結合したExosomeに、蛍光標識したExosomeマーカー抗体を結合させる。最後に、磁気ビーズとExosome、蛍光標識抗体の複合体をフローサイトメトリーにより解析することで、Exosomeマーカーを検出する。本手法の特徴としては、Exosomeの単離から検出までの全行程に要する時間がわずか2.5時間程度であり、簡単な実験操作で再現性の高い結果を得ることができる。さらに、Exosomeマーカー抗体を固相化した磁気ビーズを用いた場合に比べて、高感度にExosomeマーカーを検出できることが挙げられる。

このように、PSアフィニティーを応用したフローサイトメトリーを用いることで、細胞培養上清や体液検体中のExosomeマーカーを簡便、迅速、かつ高感度に測定することが可能になり、Exosome研究のさらなる発展に寄与できるものと考えられる。

※ Nakai W. et al. "A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles." *Sci Rep* 6: 33935

Tim4固相化磁気ビーズを用いた細胞外小胞フローサイトメトリー解析法の概要

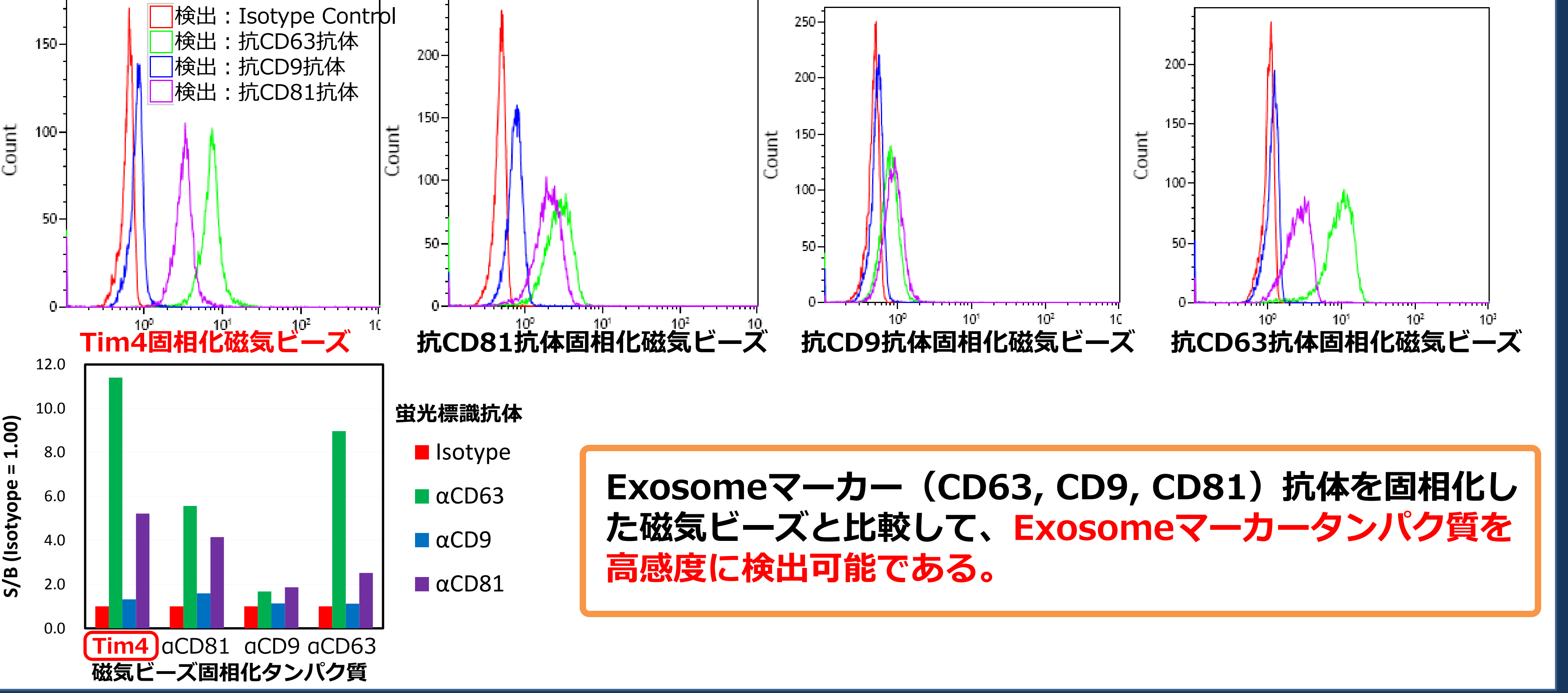


①細胞外小胞表面のホスファチジルセリン（PS）とTim4の結合により、サンプル中の細胞外小胞をTim4固相化磁気ビーズ上に捕捉しB/F分離する。
②蛍光標識Exosomeマーカー抗体により、Tim4固相化磁気ビーズに捕捉された細胞外小胞を染色する。
③Tim4固相化磁気ビーズに細胞外小胞と蛍光標識抗体が結合した状態でフローサイトメトリー解析を行い、Exosome表面マーカータンパク質の解析を行う。

- ### 本解析法の特徴
- ◆ 磁気ビーズによる簡便な操作法
 - ◆ 細胞培養上清、体液サンプル（血清、血漿）中のExosome表面の抗原を検出可能
 - ◆ 2.5時間程度で、Exosomeの単離から検出までの全行程が完了

Tim4固相化磁気ビーズと抗体固相化磁気ビーズの性能比較

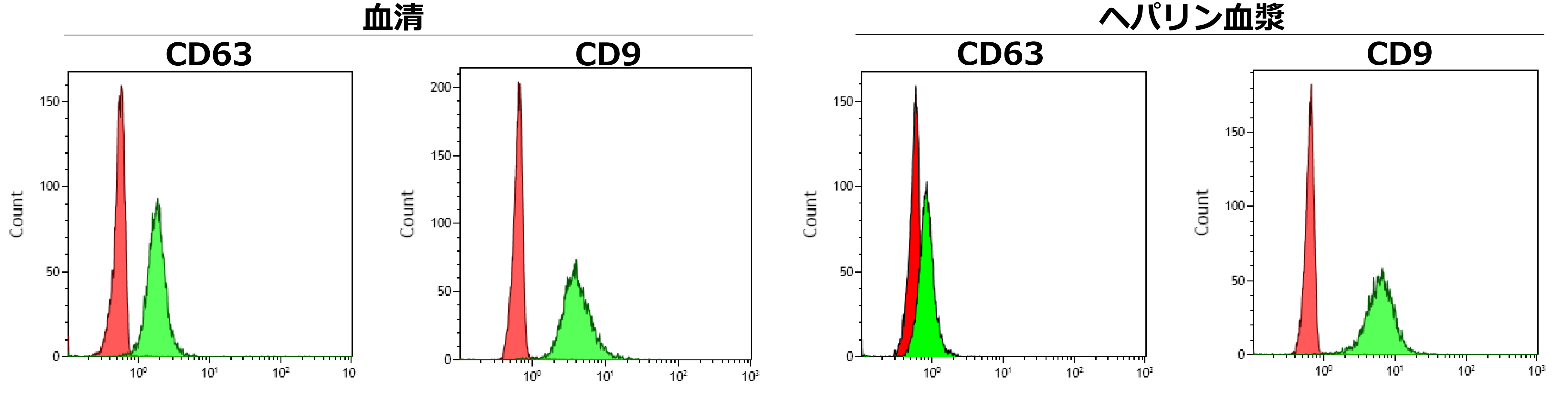
K562細胞培養上清からTim4またはExosomeマーカー抗体固相化磁気ビーズにより細胞外小胞を単離し、ExosomeマーカーのCD63、CD9、CD81を各々の蛍光標識抗体により検出した。



Exosomeマーカー（CD63、CD9、CD81）抗体を固相化した磁気ビーズと比較して、Exosomeマーカータンパク質を高感度に検出可能である。

体液サンプル中のExosome検出

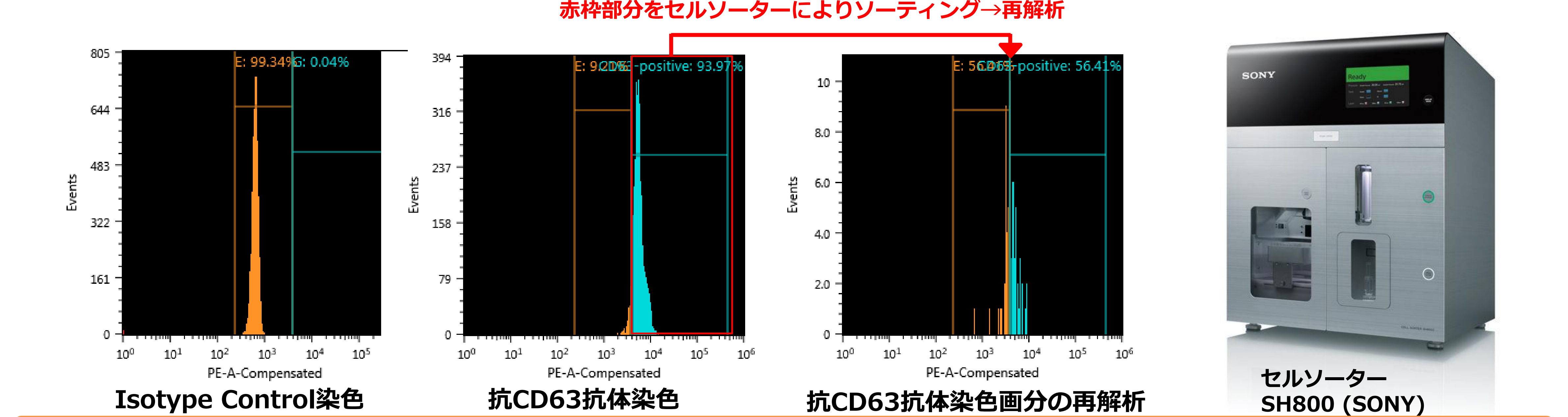
ヒト血清、ヒト血漿（ヘパリン血漿）に含まれる細胞外小胞をTim4固相化磁気ビーズにより単離し、蛍光標識抗CD63またはCD9抗体によりExosomeマーカーCD63またはCD9の検出を行った。



細胞培養上清に加えて、体液サンプル（血清、ヘパリン血漿）に含まれるExosomeマーカータンパク質も検出可能である。

Tim4固相化磁気ビーズ結合細胞外小胞のソーティング解析

Tim4固相化磁気ビーズにCOLO201培養上清に含まれる細胞外小胞を結合させて、蛍光標識抗CD63抗体により染色した。その後、抗CD63抗体で染色された画分をセルソーターによりソーティング→再解析した。

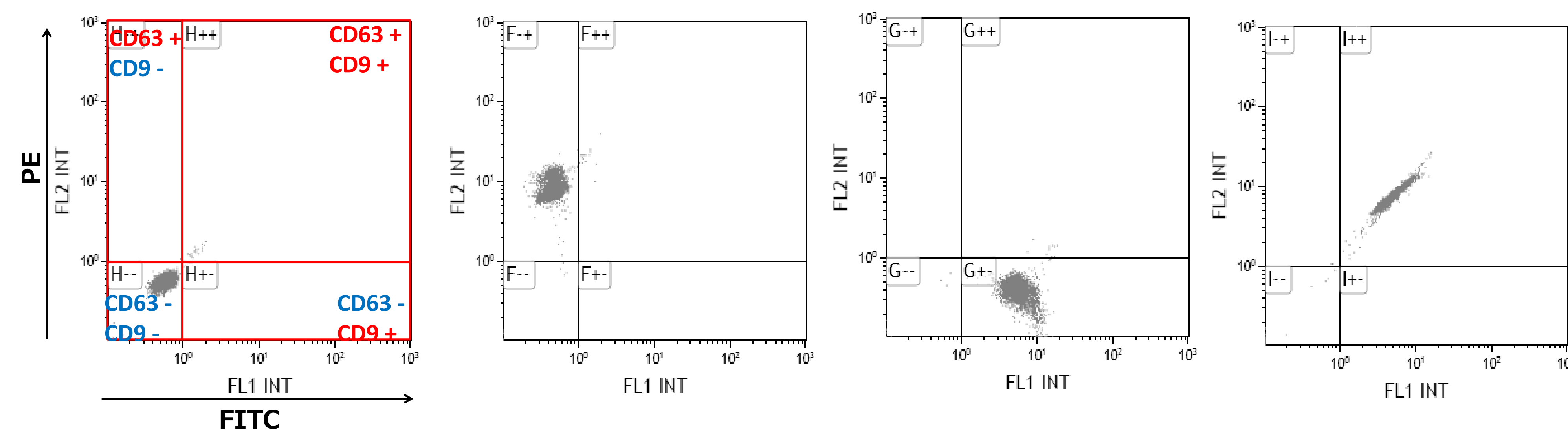


セルソーター SH800 (SONY)

細胞外小胞が結合した磁気ビーズは、セルソーターによるソーティングを行うことができた。Tim4固相化磁気ビーズと細胞外小胞の結合はCa²⁺依存性であるため、ソーティングされた画分に含まれる細胞外小胞をCa²⁺キレート剤（EDTAなど）によりTim4固相化磁気ビーズから剥がすことができる。

Tim4固相化磁気ビーズ結合細胞外小胞の多重染色解析

COLO201培養上清からエクソソームを単離後、FITC標識抗CD9抗体、PE標識抗CD63抗体により二重染色した。ネガティブコントロールとして、FITC標識、PE標識のマウスIgGアイソタイプコントロールを使用。

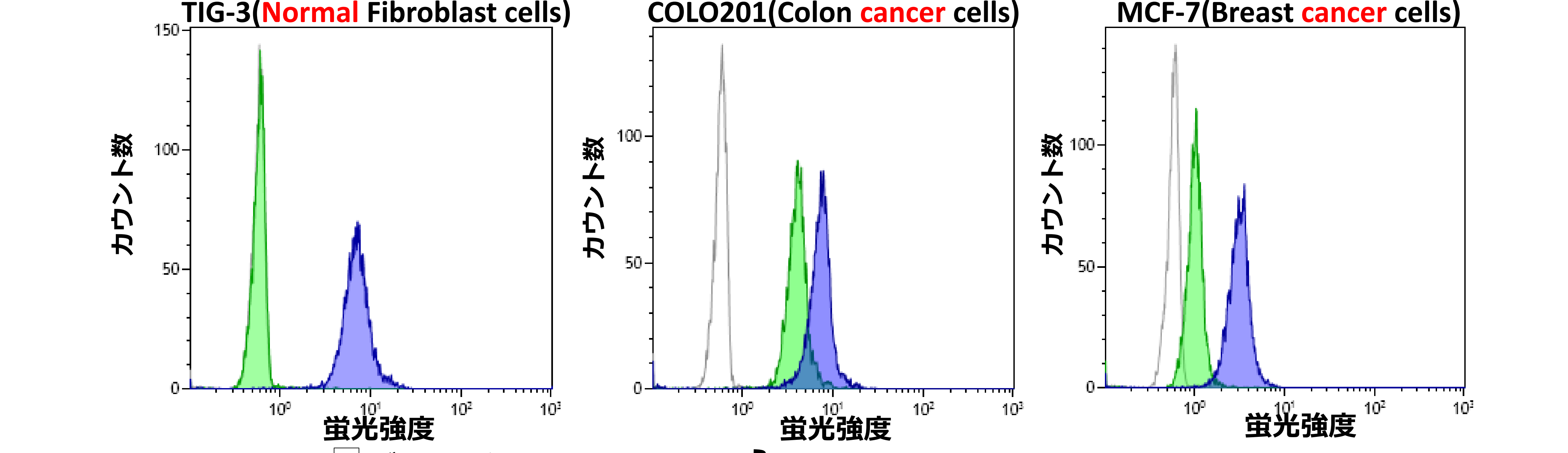


FITC-Isotype Control PE-Isotype Control FITC-αCD9 PE-Isotype Control FITC-αCD9 PE-αCD63

一度の測定で、複数のExosome表面抗原を同時に検出することが可能

癌細胞株由来ExosomeにおけるEpCAM発現の解析

EpCAM陽性Exosome量と卵巣癌の進行度の相関性が報告されている(Taylor DD and Gercel-Taylor et al., 2008)。ここでは、TIG-3細胞（正常細胞）、COLO201細胞（大腸癌細胞株）、MCF-7細胞（乳癌細胞株）培養上清に含まれる細胞外小胞を単離し、CD63またはEpCAMの発現を解析した。



正常細胞に比べて癌細胞株由来のExosome上にはEpCAMが高レベルで発現していることが示された →癌細胞株特異的なExosomeマーカータンパク質を、Tim4固相化磁気ビーズを用いたフローサイトメトリーにより解析できる

まとめ

PSアフィニティー法を利用したExosomeフローサイトメトリー解析法は、抗体固相化磁気ビーズを利用した方法と比較して、高感度にExosomeのマーカータンパク質の検出を行うことができた。また、体液サンプル（血清、血漿）中のエクソソームの解析が行えることが示された。さらに、二重染色を行うことにより、複数のマーカータンパク質を同時に検出することができた。このように、本解析法は簡便な操作で迅速・高感度にExosomeマーカータンパク質の定性解析を行うことができる。今後、PSアフィニティー法によるExosomeフローサイトメトリー解析を利用することで、Exosome研究のさらなる発展に貢献できるものと考えられる。

PS Capture™ Exosome Flow Cytometry Kit (300 Assays)

