

第19回日本再生医療学会総会  
共催学術セミナー：エクソソームの再生医療応用  
SES-28-2

# 新規細胞外小胞精製技術 PSアフィニティー法

富士フイルム和光純薬株式会社

# 第19回日本再生医療学会総会

## 筆頭発表者のCOI開示

筆頭発表者氏名：山根 昌之

演題発表に関連し、  
開示すべきCOI関係にある企業等はありません。



華山力成 教授



## SCIENTIFIC REPORTS

OPEN A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles

Nakai *et al.*, *Sci Rep.* 2016 Sep 23;6

**エクソソーム精製キット**  
 MagCapture™ Exosome  
 Isolation Kit PS  
 299-77603 (2回用)  
 293-77601 (10回用)

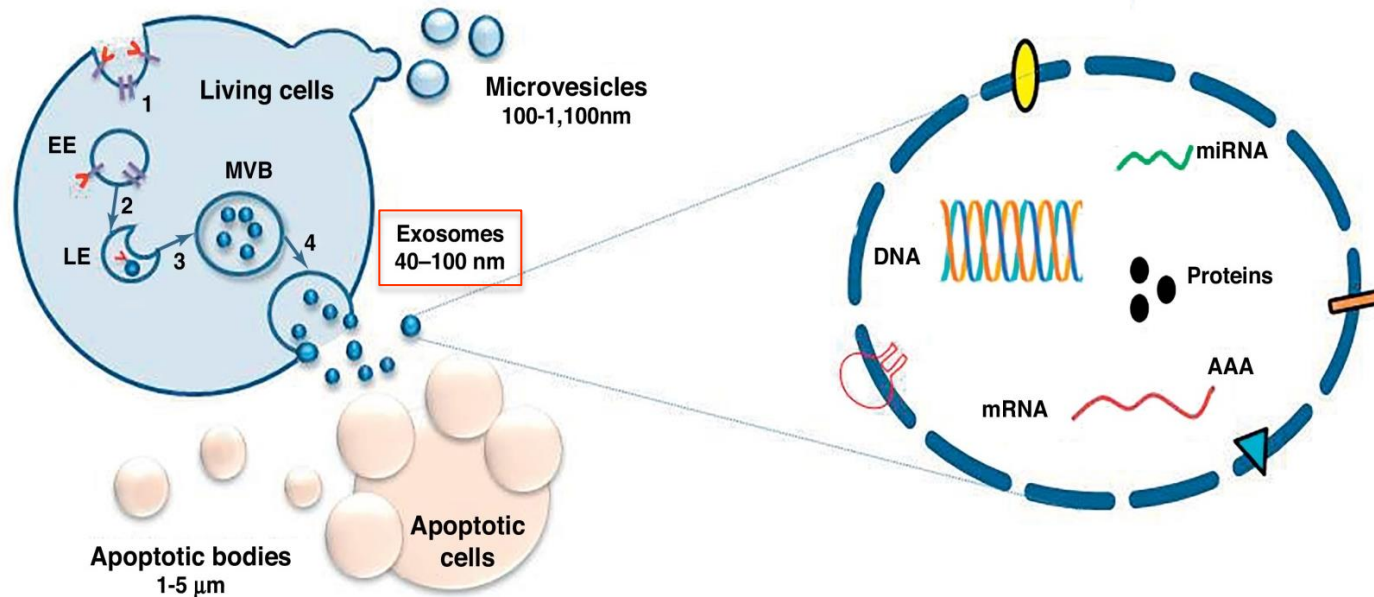
- 金沢大学 華山力成 教授との共同研究により新規エクソソーム精製技術・[PSアフィニティ法](#)を開発
- 細胞膜のホスファチジルセリン (PS) を標的とした全く新たな手法
- 高純度、高回収率を可能にした理想的な精製

### 本日の発表内容

- エクソソームについて
- PSアフィニティ法の概要
- 再生医療分野におけるPSアフィニティ法の有用性

- 細胞外小胞であるエクソソームは、細胞から分泌される脂質二重膜の粒子であり、内包されたmRNAやmicroRNAといった核酸、あるいはタンパク質の運搬を介した細胞間情報伝達を担う。
- 近年、幹細胞に由来するエクソソームが組織修復効果を示すことが明らかとなり、再生医療分野においても注目を集めている。
- 従来のエクソソーム精製方法が純度や回収率において問題点が指摘される中、当社はホスファチジルセリン（Phosphatidylserine : PS）を標的とした新たな精製法であるPSアフィニティ法を開発した。
- 本発表においては、**再生医療分野におけるPSアフィニティ法の有用性**について報告する。

# エクソソームとは？



*Drug Discov. Today* 2017 Mar 10 in press. Vanni I. et al.

- 細胞から分泌される40-100nmの脂質二重膜粒子
- CD9、CD63、CD81がマーカーとして知られている
- 脂質、タンパク質、核酸 (DNA・miRNA・mRNA) といった成分を含む
- 体液に存在：血液 (血清・血漿)、尿、唾液、母乳等
- エクソソームを利用したバイオマーカーや治療用製剤の研究開発が活発化

## 種々のエクソソーム精製手法

超遠心分離法

沈殿法

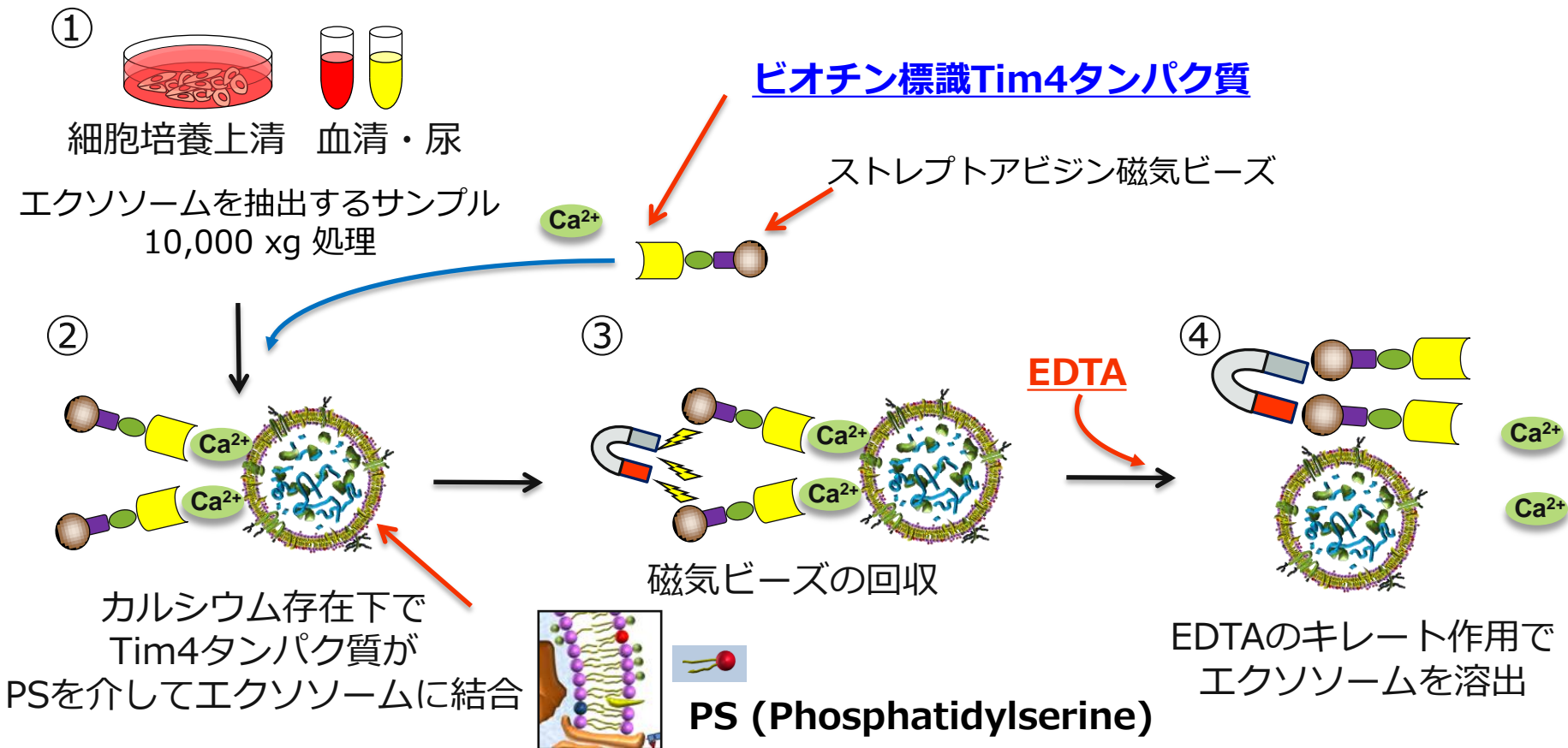
密度勾配

抗体アフィニティー法

手法				
純度	■ ■	■	■ ■ ■ ■	■ ■ ■
インタクト ○/×	△	○	○	×
操作性	簡単	簡単 早い	煩雑	簡単 再現性高い
回収量	■	■ ■ ■ ■	■	■ ■

- 最も使用されている手法は超遠心分離法 (Gardiner et al., 2016)
- 高純度・高回収率を実現したエクソソーム精製手法は存在しない

# PSアフィニティ法

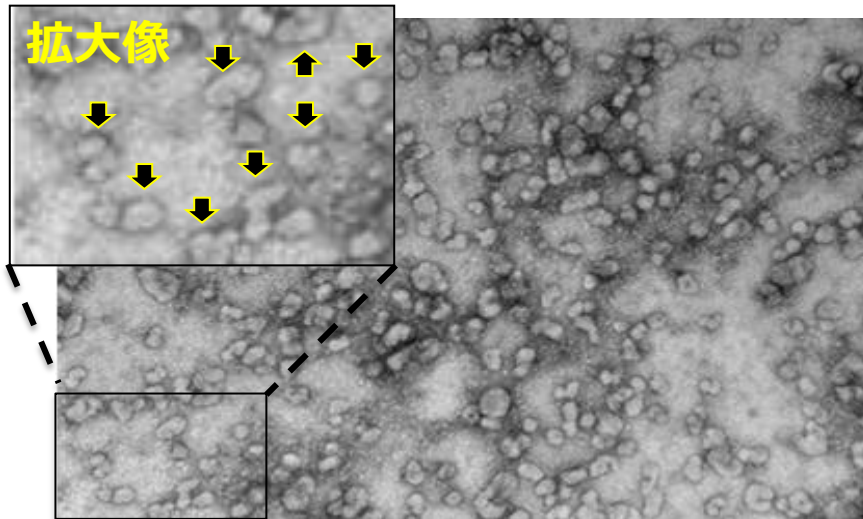


- カルシウム依存的にエクソソーム表面のホスファチジルセリン (PS) に結合するTim4タンパク質を使用
- 高純度・高効率での回収が可能
- EDTAのキレート効果を利用したマイルドな溶出



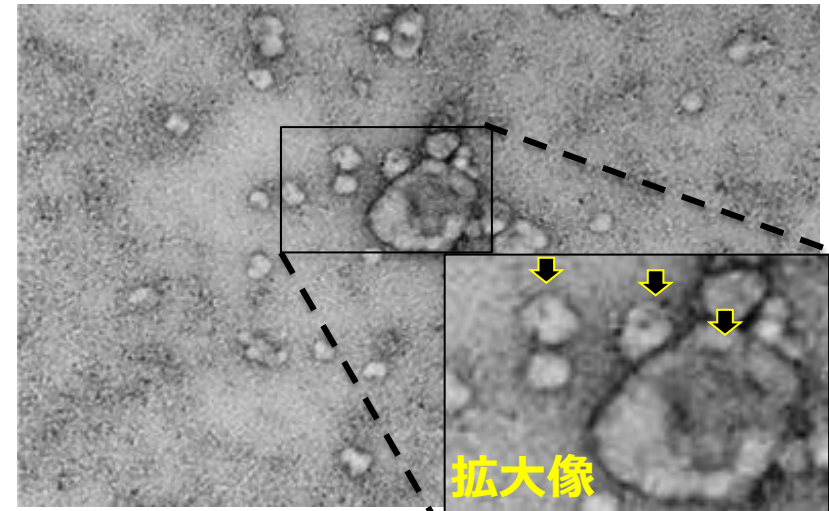
## PSアフィニティ法と超遠心分離法の比較

PSアフィニティ法精製エクソソーム



- 均一性が高いエクソソーム精製を実現
- コンタミネーションが少ない

超遠心分離法精製エクソソーム



- 物理的負荷によるエクソソーム凝集
- コンタミネーションが多い

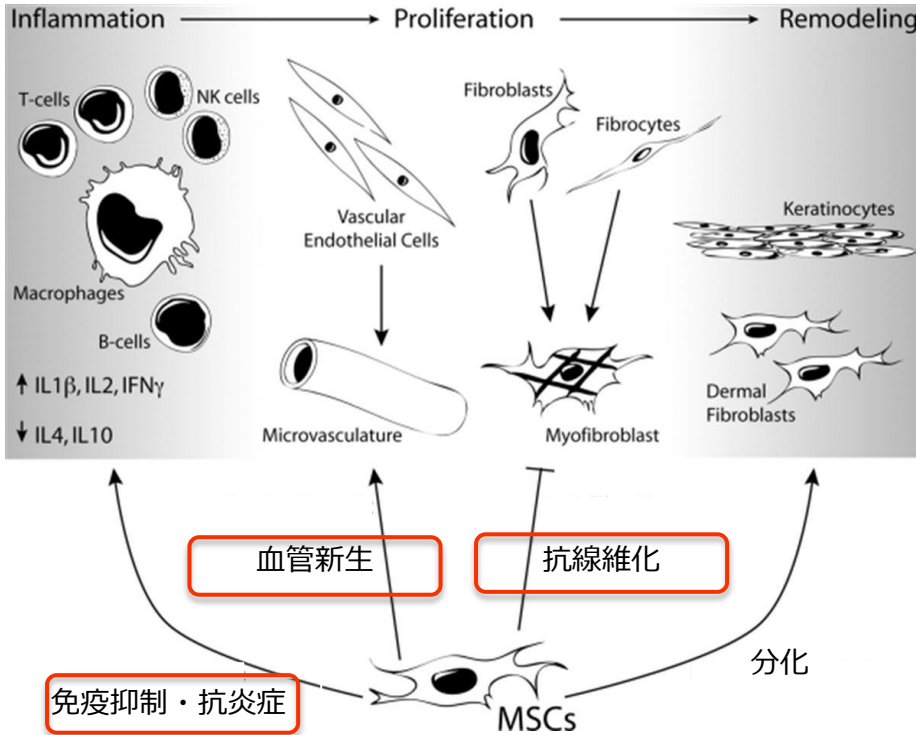
COLO201細胞由来エクソソームを超遠心分離法とPSアフィニティ法により精製して透過型電子顕微鏡により観察した結果

- PSアフィニティ法で精製したエクソソームは純度が高く回収量も多い
- 凝集したEVが少なく、粒子径が均一なエクソソームが単離される
- 従来の精製方法では不可能であった**高純度・高回収率での精製を実現**



# 間葉系幹細胞 (MSC) 由来エクソソーム

## 多岐にわたるMSCの効果



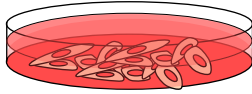
- MSCは中胚葉由来の体性幹細胞
- 種々の組織への分化能に加えて免疫抑制・抗炎症、血管新生、抗線維化を誘導するパラクライン作用を有する
- これらパラクライン作用がエクソソームによるものであると示唆されている



抗炎症と抗線維化をモデルに再生医療分野におけるPSアフィニティ法の有用性を検討

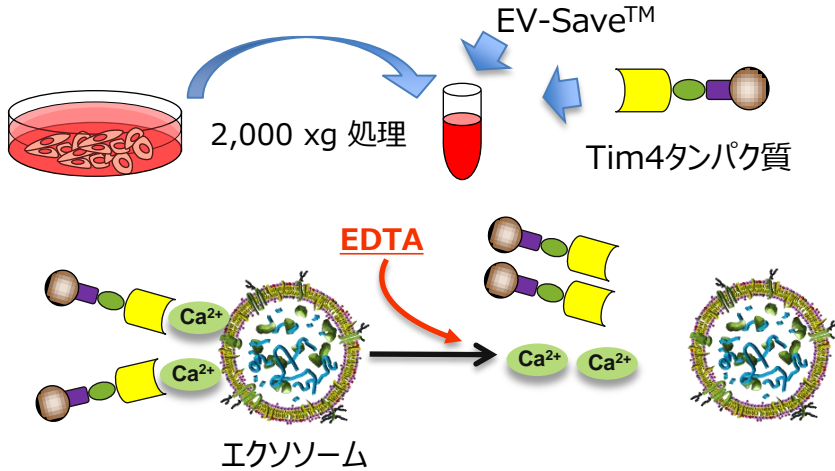
STEM CELLS Translational Medicine, Volume: 1,  
Issue: 1, Pages: 44-50

## ①細胞培養上清の準備



骨髄由来MSCを90%コンフルエントまで培養して  
エクソソーム除去FBSを10%添加したDMEMに  
置換し、120時間培養

## ②エクソソーム精製



細胞培養上清を2,000 xgで処理した後、  
エクソソーム吸着抑制試薬である  
EV-Save™(058-09261)を添加してTim4加える

エクソソームを単離した後、  
1mM EDTAを含むD-PBSにEV-Save™を  
添加した溶出液で溶出

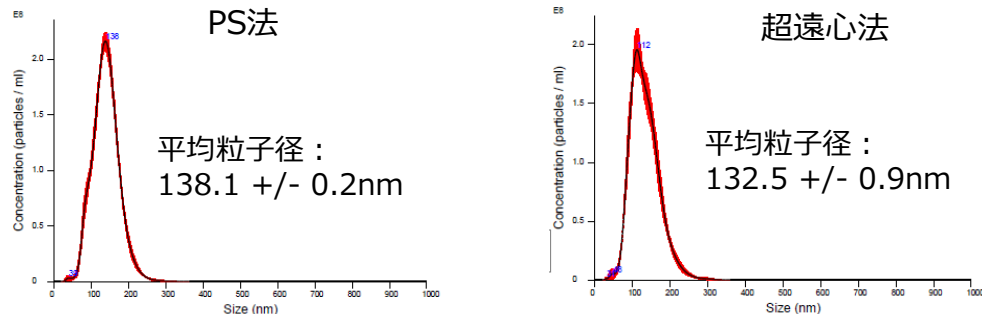
## ③Buffer交換



100K PES限外濾過カラム (ザルトリウス ビバスピ  
500等) を用いてD-PBSにEV-Save™を 添加した  
溶液に置換した後にエクソソーム溶液を取得

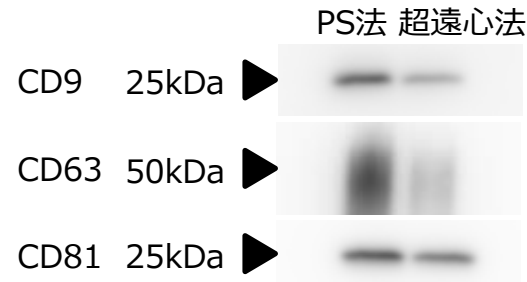
# 精製したMSC由来エクソソームの解析

## NanoSightによる粒子径解析



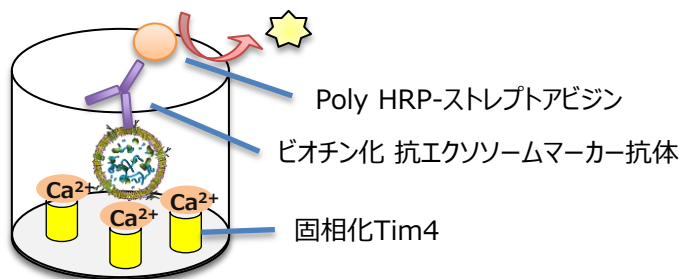
各手法で精製したエクソソームを解析した結果

## ウェスタンブロットによるマーカー検出

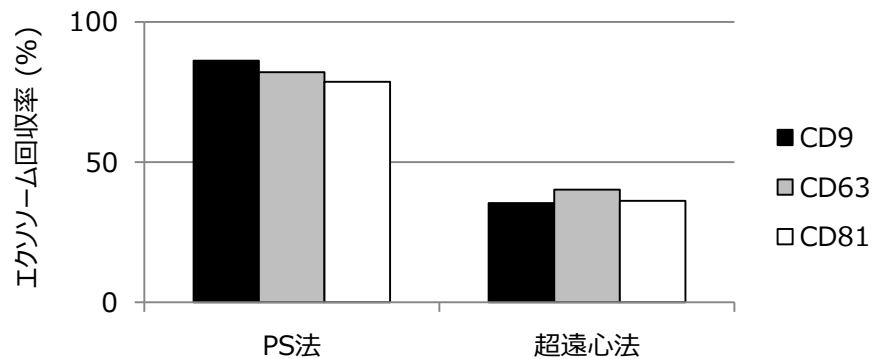


エクソソームマーカー発現確認

## PS ELISAによる回収率測定



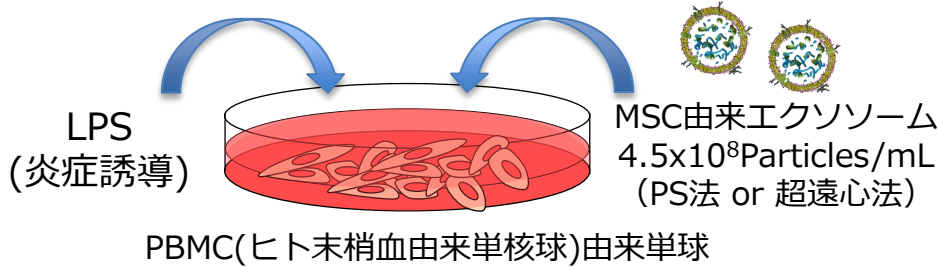
PS ELISA : 溶液中のエクソソームの定量解析が可能



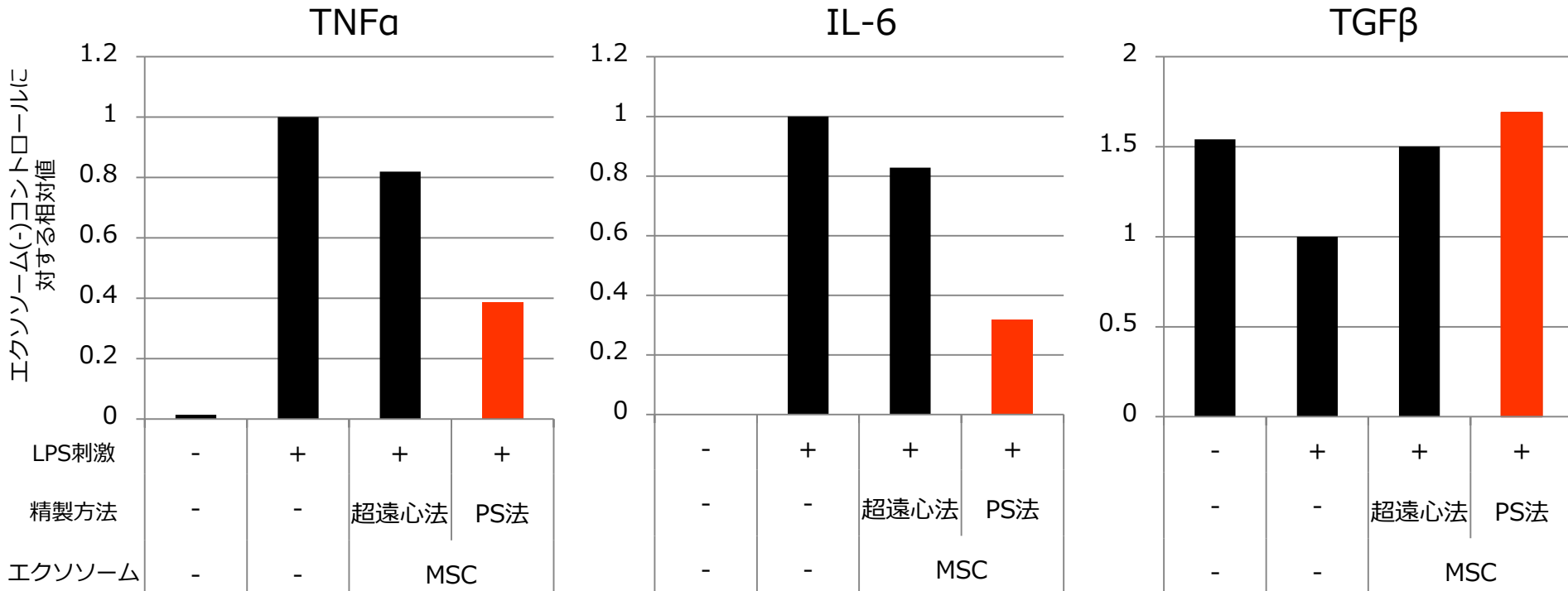
PS ELISAにより培養上清とエクソソーム溶液に含まれるマーカータンパク質を検出して回収率を定量

- PSアフィニティ法はMSC由来エクソソームも高効率で回収することが可能

# MSC由来EVの抗炎症活性評価

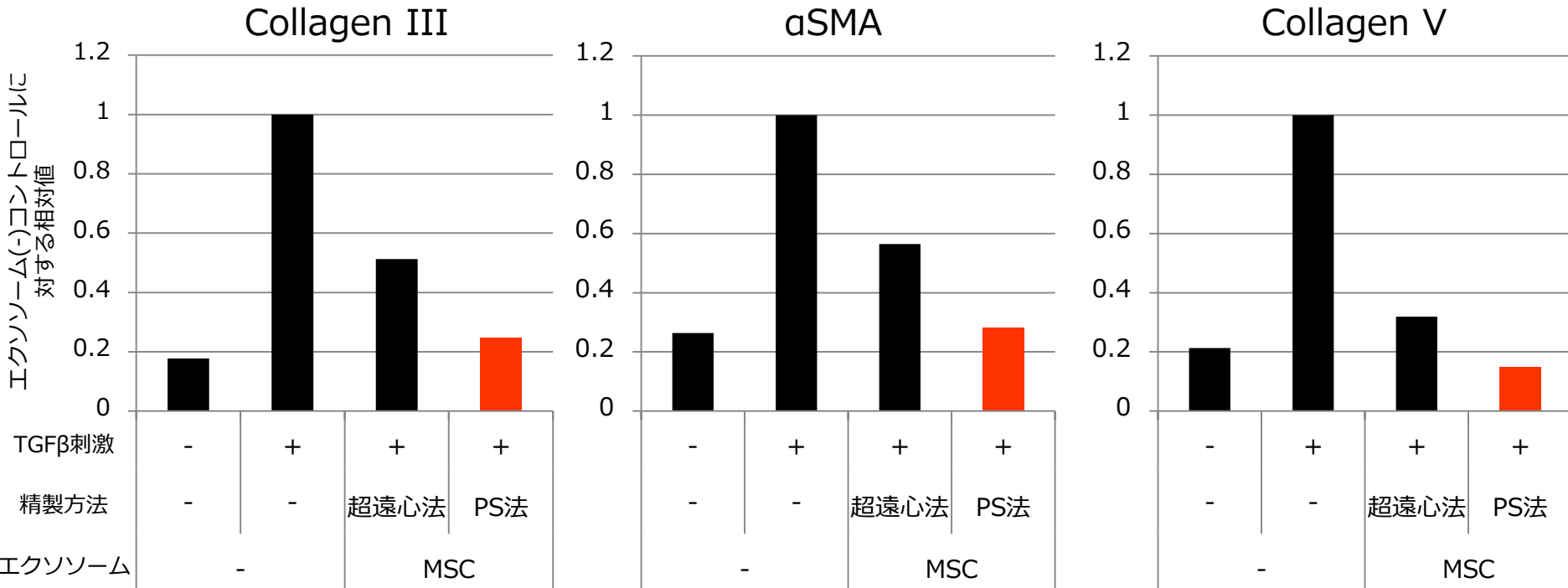
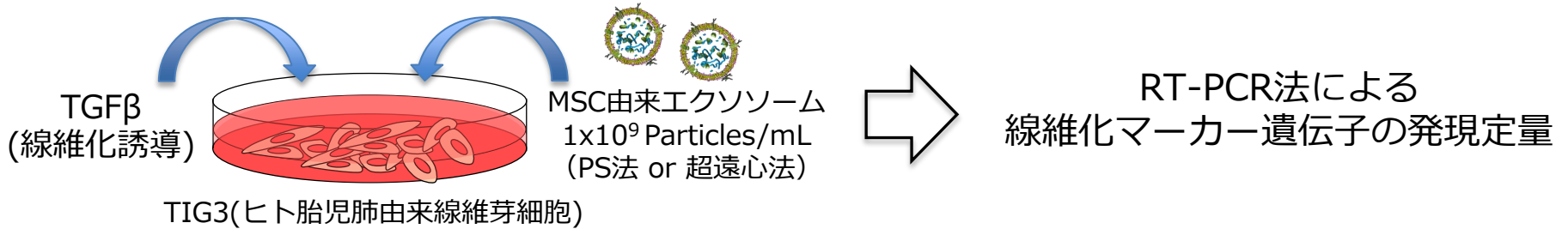


RT-PCR法による  
炎症・抗炎症マーカー遺伝子の発現定量



- PSアフィニティ法で精製したエクソソームは抗炎症活性が高い

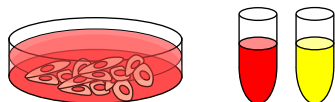
# MSC由来エクソソームの抗線維化活性評価



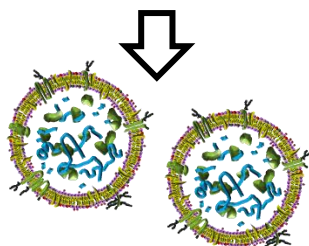
- PSアフィニティ法で精製したエクソソームは抗線維化活性が高い

- PSアフィニティ法は高純度・高回収量でのエクソソーム精製を可能にした理想的な精製手法
- 凝集を軽減して均一性が高いエクソソームの精製が可能
- 再生医療分野において注目されるMSC由来エクソソームへも利用可能
- PSアフィニティ法により精製したMSC由来エクソソームは超遠心分離法に比べて高い活性を有している

## 精製・保存



エクソソーム由来サンプル (血清・尿 等)



精製エクソソーム

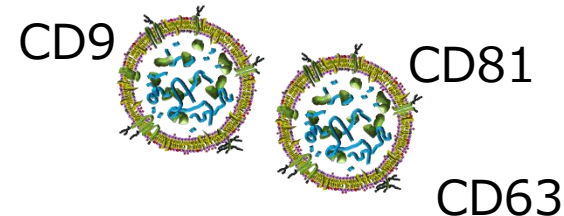
### エクソソーム精製

- MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS: 299-77603 (2回用), 293-77601 (10回用)
- PS Capture™ エクソソームアイソレーションレジンキット 290-80301 (1キット(0.5 mL Slurry))

### エクソソーム吸着防止剤

- EV-Save™ 細胞外小胞ブロッキング試薬 : 058-09261 (1mL)

## 解析



### エクソソーム ELISA

- PS Capture™ エクソソームELISAキット (抗マウスIgG POD) : 297-79201 (96回用)
- PS Capture™ エクソソームELISAキット (ストレプトアビジンHRP) : 298-80601 (96回用)

### エクソソーム フローサイトメトリー

- PS Capture™ エクソソームフローサイトメトリーキット : 297-79701 (300回用)

### エクソソームマーカー抗体

- 各エクソソームマーカーに対する抗体多数

### 精製エクソソーム

- エクソソーム, COLO201細胞由来, 精製品 052-09301 (50μL)

製品の詳細につきましては当社ホームページをご覧ください  
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/index.html>



- エクソソーム研究試薬カタログを無料プレゼント中！
- 当社のエクソソーム研究関連製品はもちろん、エクソソームの総説や豊富なアプリケーションを掲載しています！
- 当社Webサイトからダウンロード可能です！

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/index.html>



**FUJIFILM**  
Value from Innovation