

第7回日本細胞外小胞学会
企業テクニカルワークショップセミナー

PSアフィニティー法が実現した
高活性なMSC由来細胞外小胞の精製

— 細胞外小胞を用いた再生医療における全く新たな戦略の提案 —

富士フイルム和光純薬株式会社



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



WPI KANAZAWA UNIVERSITY

華山カ成 教授



細胞外小胞精製キット

MagCapture™ Exosome

Isolation Kit PS

299-77603 (2回用)

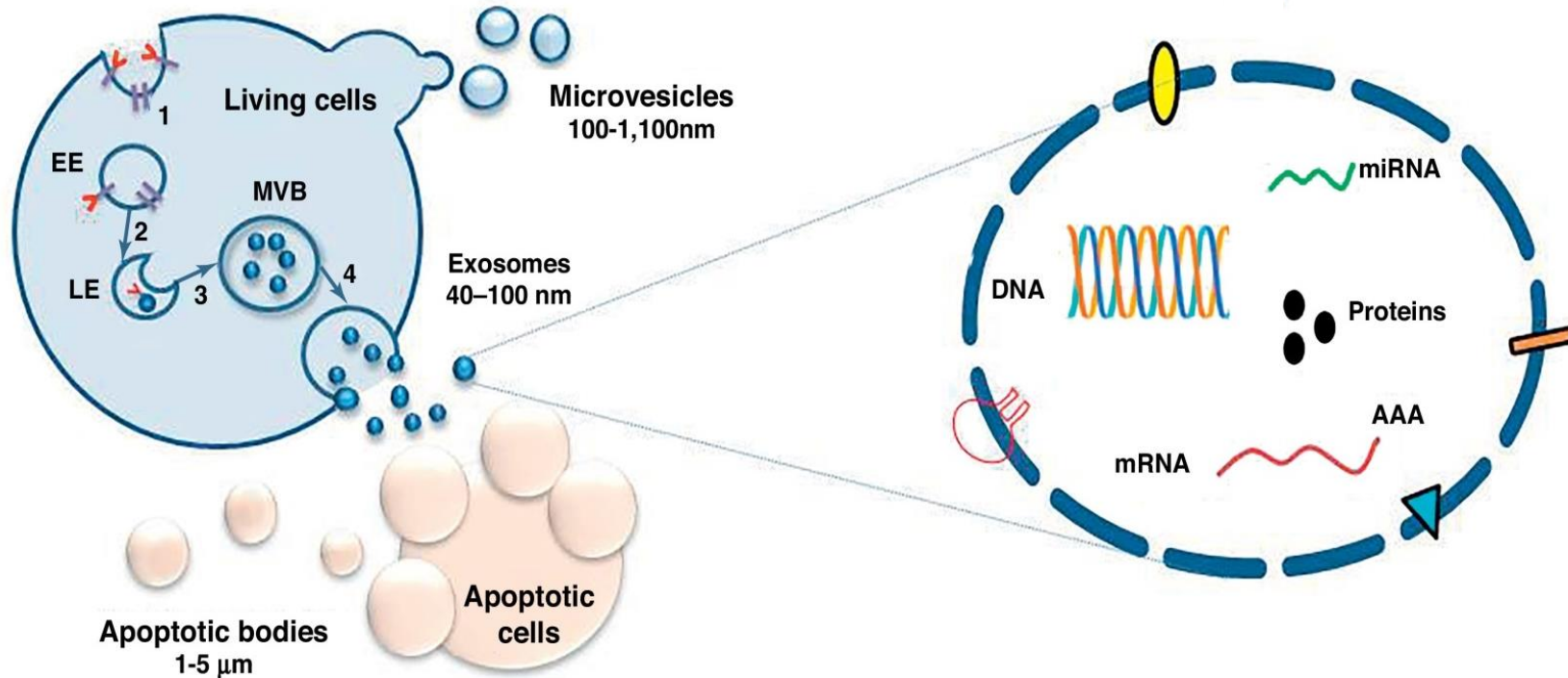
293-77601 (10回用)

- 金沢大学 華山カ成 教授との共同研究により新規細胞外小胞精製技術・[PSアフィニティー法](#)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
- 回収率、精製純度、インタクトな粒子の取得に優れた理想的な精製方法

本日の発表内容

- 細胞外小胞について
- PSアフィニティー法の概要
- 再生医療分野におけるPSアフィニティー法の有用性

細胞外小胞 (Extracellular Vesicle:EV)



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

- 細胞から分泌される1000nm以下の脂質二重膜粒子
- 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
- EV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EV精製手法

超遠心分離法

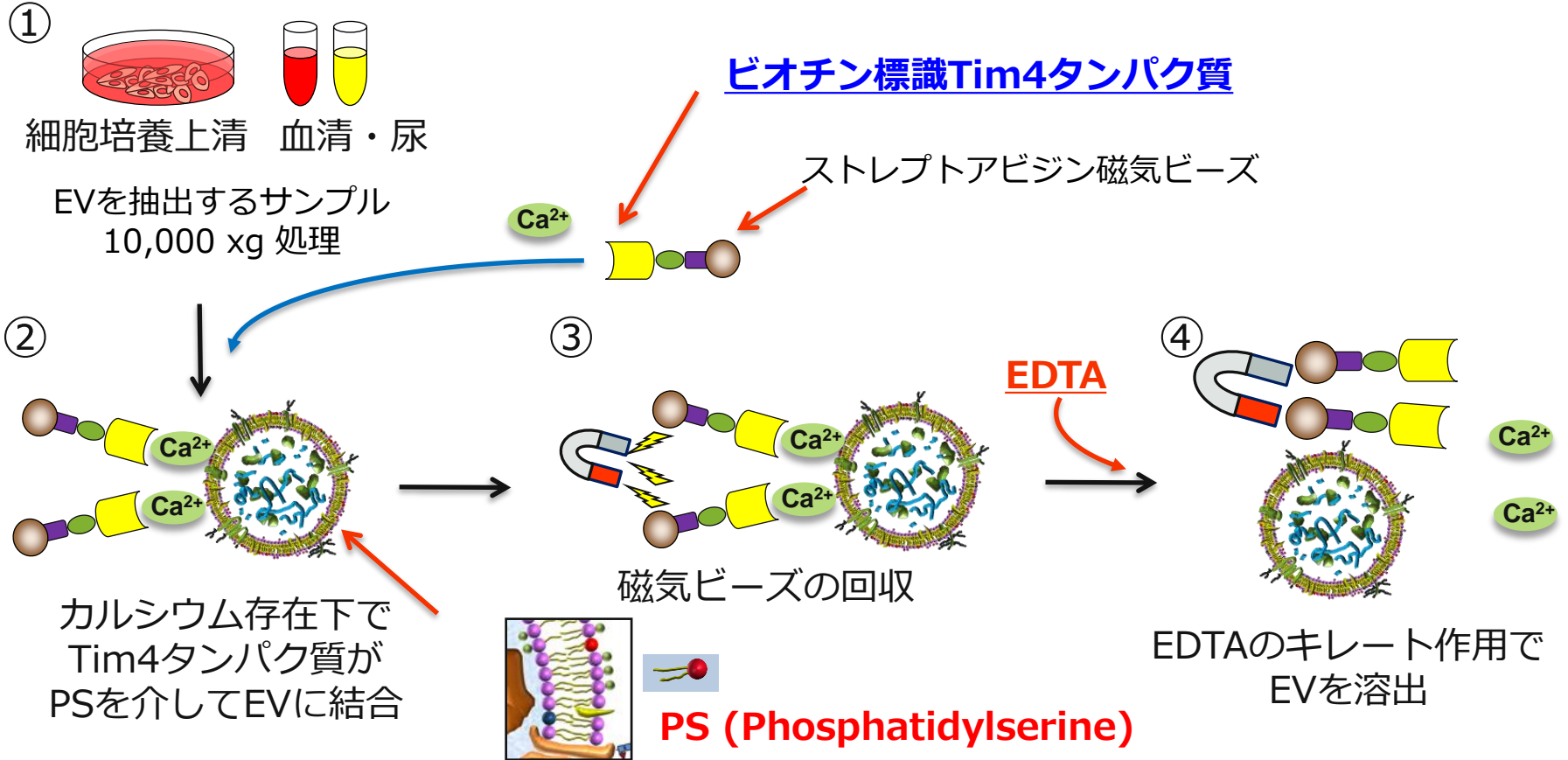
沈殿法

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	■	■ ■ ■ ■	■	■ ■

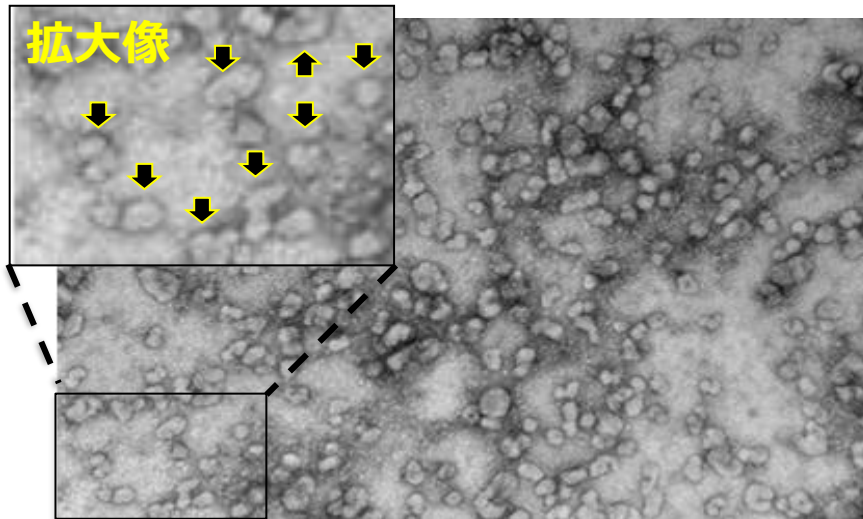
- 最も使用されている手法は超遠心分離法 (Gardiner et al., 2016)
- 高純度・高回収率を実現したEV精製手法は存在しない



- カルシウム依存的にEV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
- EDTAのキレート効果を利用したマイルドな溶出

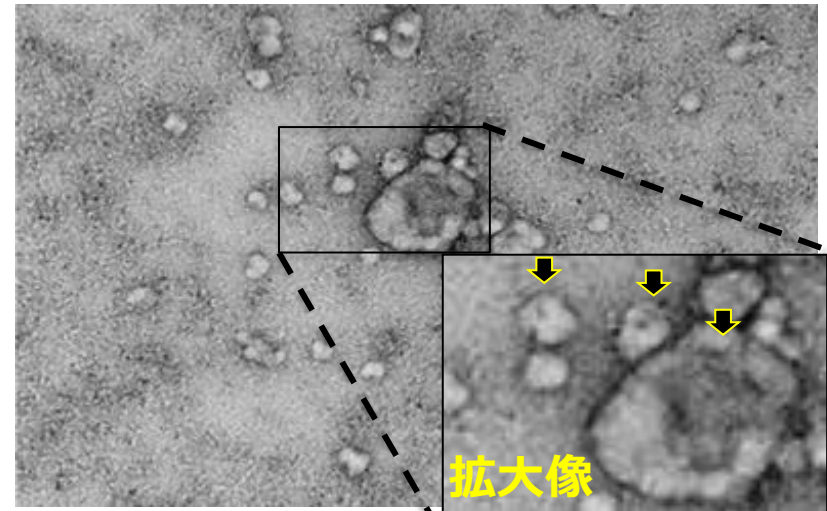
PSアフィニティ法と超遠心分離法の比較

PSアフィニティ法精製EV



- 均一性が高いEV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EV



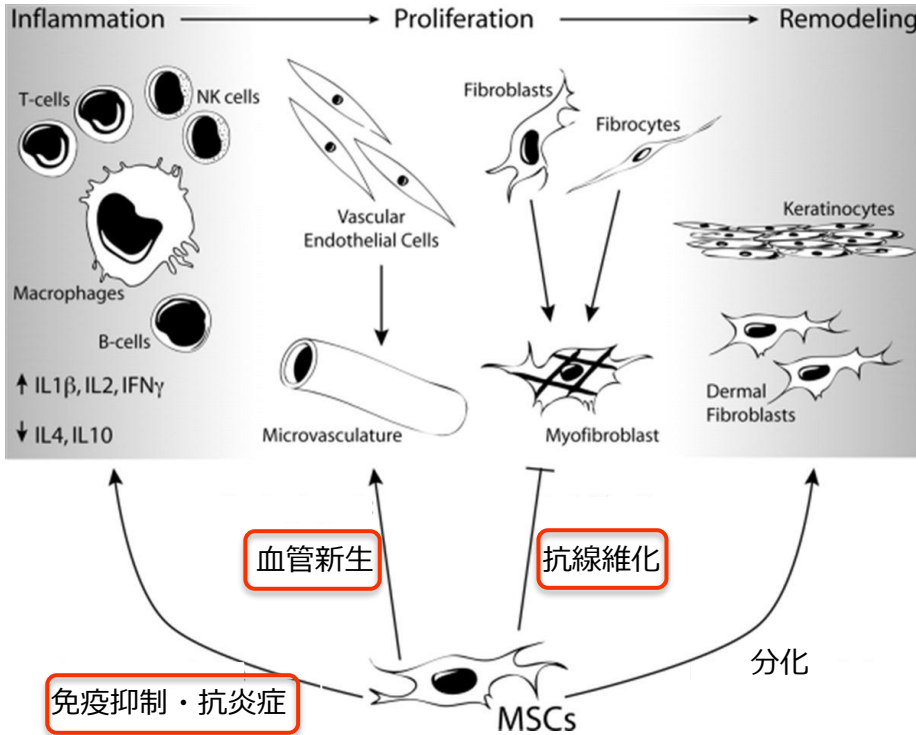
- 物理的負荷によるEV凝集
- コンタミネーションが多い

COLO201細胞由来EV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EV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EVが単離される
- 回収率、精製純度、インタクトな粒子の取得を実現した理想的な手法

間葉系幹細胞 (MSC) 由来EV

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EVによるものであることが示唆されている

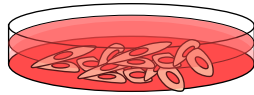


抗炎症と抗線維化をモデルに
再生医療分野におけるPSアフィニティ法の
有用性を評価

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

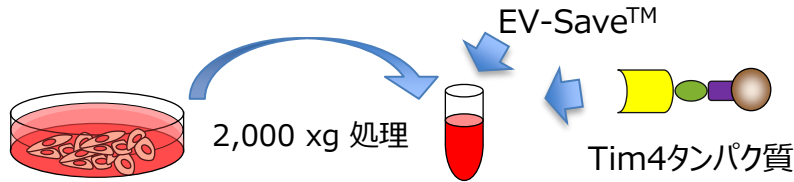
PSアフィニティー法によるMSC由来EVの精製

①細胞培養上清の準備

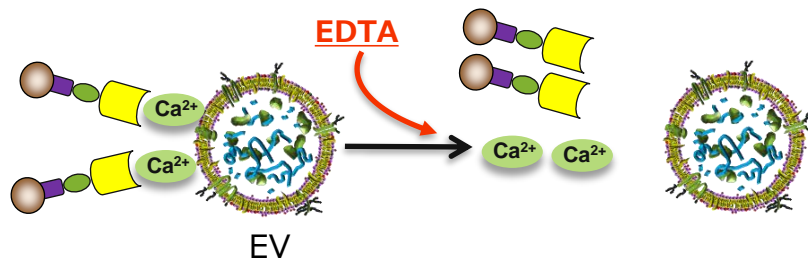


骨髓由来MSCを90%コンフルエントまで培養してEV除去FBSを10%添加したDMEMに置換し、120時間培養

②EV精製



細胞培養上清を2,000 xgで処理した後、EVの吸着を抑制する試薬であるEV-Save™(058-09261)を添加してTim4加える



EV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

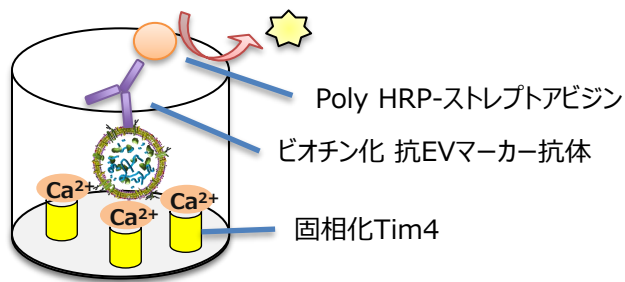
③Buffer交換



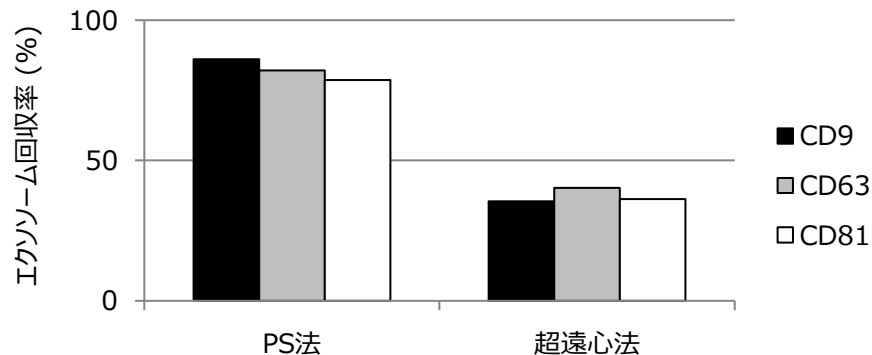
100K PES限外濾過カラム (ザルトリウス ビバスピ 500等) を用いてD-PBSにEV-Save™を添加した溶液に置換した後にEV溶液を取得

精製したMSC由来EVの解析

PS ELISAによる回収率測定

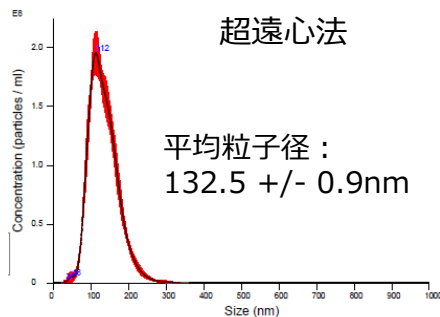
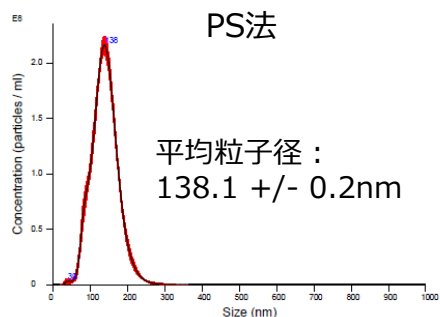


PS ELISA : 溶液中のEVの定量解析が可能



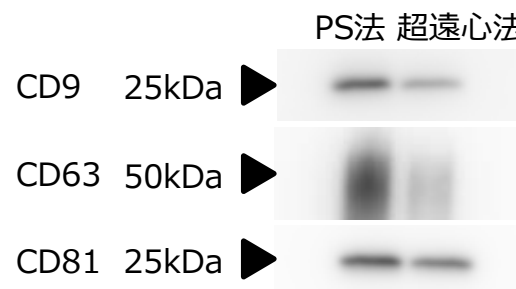
PS ELISAにより培養上清とEV溶液に含まれるマーカータンパク質を検出して回収率を定量

NanoSightによる粒子径解析



各手法で精製したEVを解析した結果

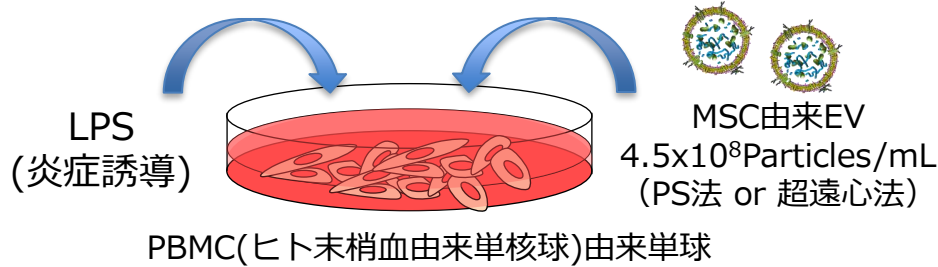
ウェスタンブロットによるマーカー検出



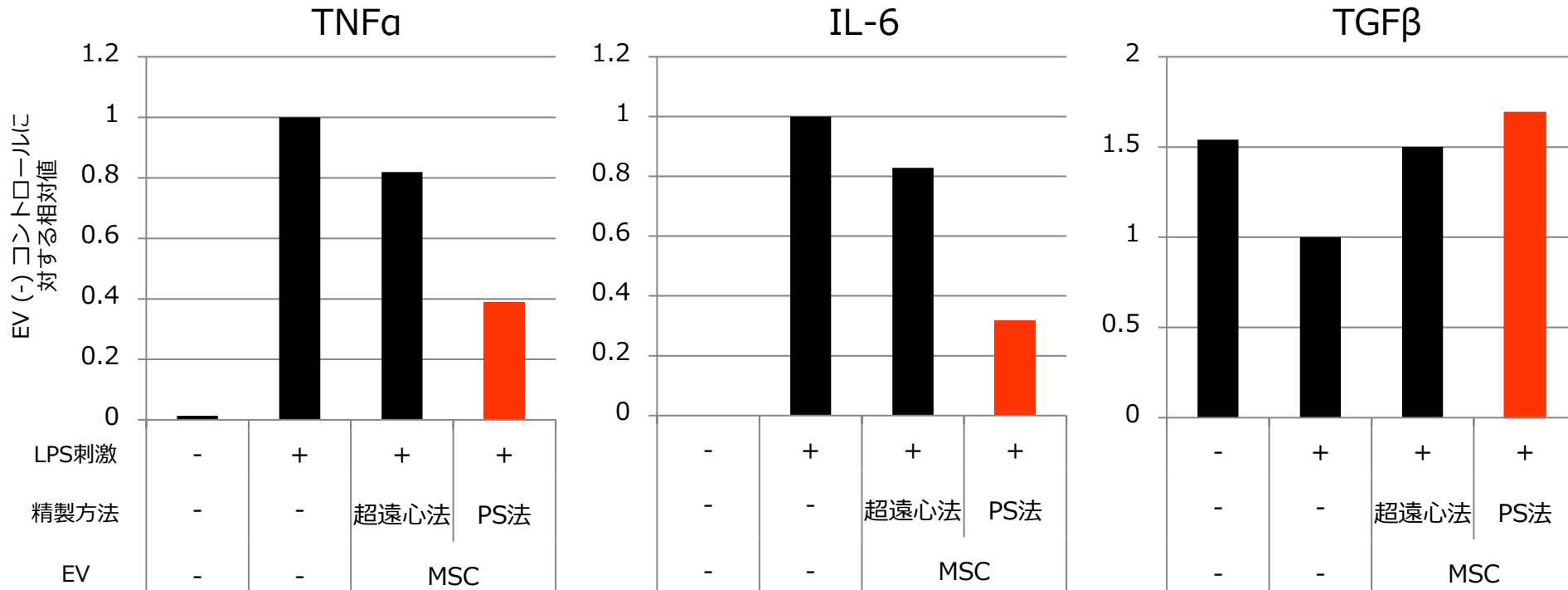
EVマーカー発現確認

- PSアフィニティ法はMSC由来EV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

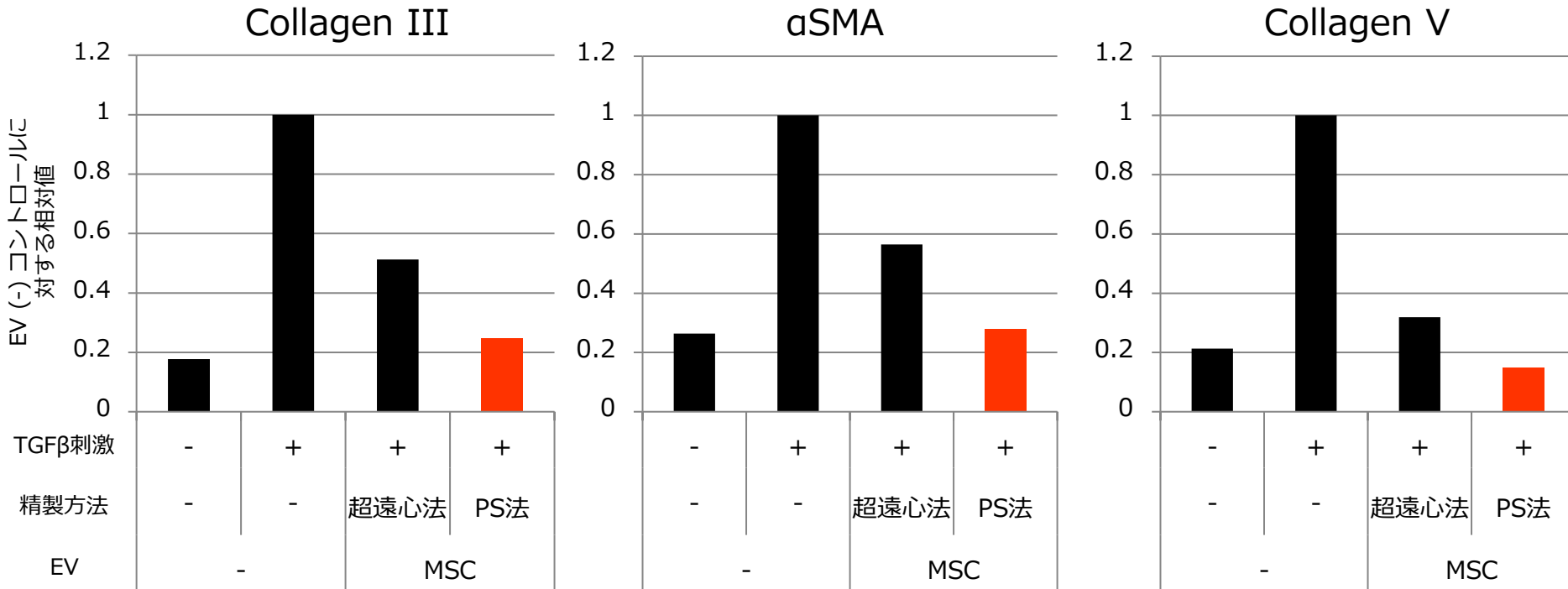
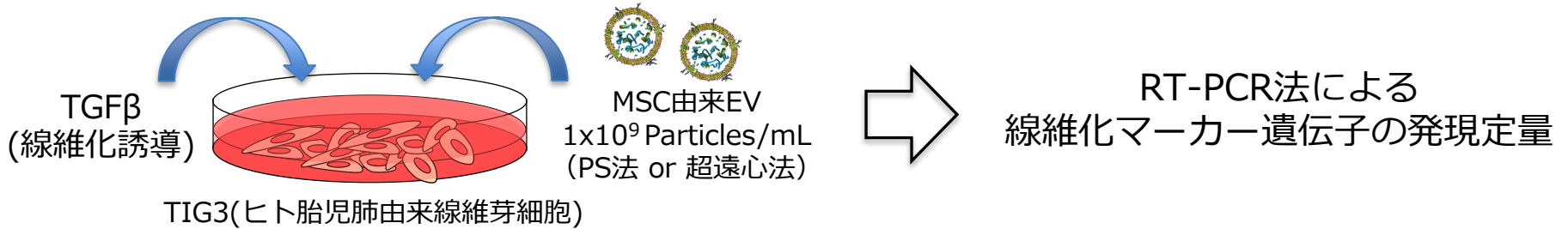


⇒ RT-PCR法による
炎症・抗炎症マーカー遺伝子の発現定量



- PSアフィニティ法で精製したEV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EVは抗線維化活性が高い

- PSアフィニティ法は回収率、精製純度、インタクトな粒子の取得に優れた理想的な精製手法
- 再生医療分野において注目されるMSC由来EVへも利用可能
- PSアフィニティ法により精製したMSC由来EVは超遠心分離法に比べて極めて高い活性を有している

FUJIFILM
Value from Innovation