

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15502

研究課題名(和文) 機能性ナノ磁性微粒子を使用したエクソソームの抽出と解析

研究課題名(英文) Exosome extraction from supernatant using Functional nanomagnetic fine particles

研究代表者

盛 真一郎 (MORI, Shinichiro)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：00620519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： HCT116ポジコンにてHCT116のエクソソームを電子顕微鏡で確認。 ExoQuik TC(EQ)を使用し、HCT116の細胞培養の上清のエクソソームを回収し、電子顕微鏡で確認。 超遠心機を使用しHCT116のエクソソームを回収し、電子顕微鏡で確認。 exoEasy Kit(Kit)を使用し、HCT116の細胞培養の上清のエクソソームを回収し、電子顕微鏡で確認。 電子顕微鏡の結果より、ExoQuik TC(EQ)、exoEasy Kit(Kit)で安定してエクソソームが回収できることを確認。

研究成果の概要(英文)： (Method)HCT116 cells washed with phosphate-buffered saline (PBS), and the culture medium replaced with RPMI medium without FBS. After incubation for 24 h, the supernatant collected and centrifuged at 2,000 g for 10 min at 4 °C. Five ml of supernatant containing 1 ml of the ExoQuick incubated 24 hour at at 4 °C and centrifuged at 1,500 g for 30 min. After centrifugation of the pellet at 1,500 g for 5 min at 4 °C, the supernatant removed again. The pellet added 1.5 ml of PBS for further SEM. Sample was placed on membrane grid for 10 min and then fixed using a solution of 2% of glutaraldehyde and 2% of paraformaldehyde in a 0.1 M of sodium cacodylate/HCl buffer pH 7.2. Specimen dried naturally and scanned for examination. (Results and Discussion)We concentrated exosome derived from HCT116 using the ExoQuick and confirmed it via the scanning of electronic microscope. The ExoQuick was suitable for extraction of exosome without waste.

研究分野：消化器外科

キーワード：エクソソーム 大腸癌幹細胞 EMT miRNA ナノ磁気ビーズ

1. 研究開始当初の背景

近年、癌研究の translational medicine の分野において、癌幹細胞、Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)、循環血液中腫瘍細胞、循環血液中腫瘍 DNA、エクソソーム、miRNA などの研究が盛んになされている。重要な研究分野の一つであるエクソソームは、細胞から分泌される直径 20~120 nm の膜状粒子で、miRNA や mRNA、DNA、タンパク質などが豊富に含まれ、循環血液内においても安定している。癌細胞もまた、エクソソームを分泌するため、癌バイオマーカーとしての可能性が有望視されている。しかし、エクソソームの検出には超遠心などの複雑な工程が必要であり、正常細胞由来のものも多く含まれているため、特異的なものを抽出し、miRNA、mRNA、DNA、タンパク質などを解析する研究は、未だ発展の途中で。一方、Tauro BJ らは、大腸癌細胞株である LIM1863 の培養上層液から、EpCAM(CD326)と磁気ビーズを使用したエクソソームの抽出方法を報告し、大腸癌症例に対しての免疫沈降反応によるエクソソーム抽出の可能性を示した。東京工業大学・半田研究室のグループは、フェライト粒子をポリマーで強固に被覆した表面に設けられたリンカーの先端に、薬剤、タンパク質等をリガンドとして固定化し、その標的物質をアフィニティー精製する担体として使用できる約 200nm のナノ磁性微粒子を開発した。本研究は、任意のリガンドをナノ磁性微粒子に固定化し、大腸癌および大腸癌幹細胞の細胞表面マーカーとの免疫沈降反応によりエクソソームを抽出し、miRNA を網羅的に解析すると同時に、EMT マーカーを中心とした mRNA、タンパク質を解析しようとするものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸癌および大腸癌幹細胞由来のエクソソームをナノ磁気ビーズと細胞膜タンパクの免疫沈降反応により抽出し、大腸癌に特異的な microRNA(miRNA)を網羅的解析により見出し、EMT マーカーを中心とした mRNA、タンパク質を解析することにより、大腸癌の発生、増殖、転移のメカニズムを探求し、早期発見、悪性度評価、予後予測に貢献することである。

3. 研究の方法

・平成 27 年度、28 年度の計画

平成 27 年度は、大腸癌細胞株よりエクソソームの抽出を行う。10 種類の大腸癌細胞株 (HCT116, HCT15, HT29, COLO201, COLO205, SW1116, SW620,

SW480, LIM1863, PLR123)を購入し、培養する。多摩川精機株式会社の受託サービスに依頼し、FG ビーズにエクソソームの表面膜たんぱく質である CD9, CD63, CD147 の 3 種類のリガンドの固定化を行う。

平成 28 年度は、大腸癌細胞株より幹細胞由来のエクソソームの抽出を行う。大腸癌幹細胞マーカーである LGR5, EphB2, EpCAM, CD133, CD44, CD166, CD24, CD26, CD29 の中から、5 つを選択し、リガンドを FG ビーズに固定化し、エクソソームを検出する。

・平成 29 年度の計画

臨床研究として同意の得られた健常者、大腸ポリープ症例、大腸癌症例の血清を使用し、エクソソームの表面膜たんぱく質である CD9, CD63, CD147 および大腸癌幹細胞マーカーである LGR5, EphB2, EpCAM, CD133, CD44, CD166, CD24, CD26, CD29 から 5 つを選択し、リガンドを固定化した FG ビーズを用いて、エクソソームを抽出し、miRNA, mRNA, タンパク質を解析する

4. 研究成果

【実験 1】培養細胞のエクソソーム回収。

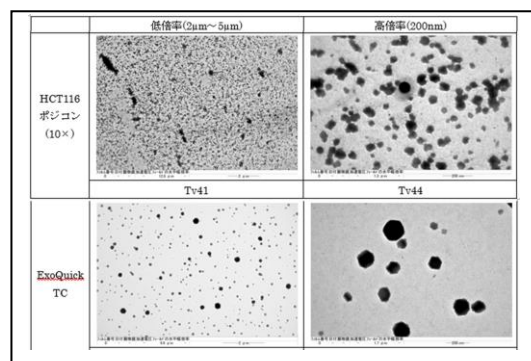
①HCT116 を RPMI1640+10%FBS 培養液にて培養し、FBS フリーとし 24h 培養し、上層液を回収する。

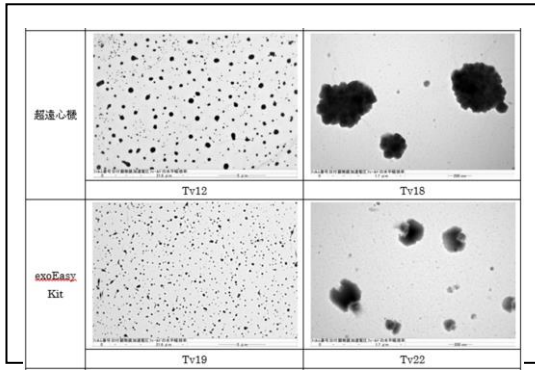
②4℃, 2000g×10 分で遠心し、上層液を回収する。

③回収した上清 5ml に ExoQuick 1ml を加え、転倒混和 (4 回), 4℃で overnight, 4℃・1500g×30 分で遠心し、上清を除去し、更に残った上清を除去する為に 4℃, 1500g×5 分で遠心し、可及的に上清を取り除く。ペレットに PBS100μl を加えて懸濁し、1.5ml 低タンパク吸着チューブへ移し、電子顕微鏡へ移行する。

④電子顕微鏡操作：サンプルを膜張グリッド上に載せ 10 分静置、サンプル量とほぼ同量の 2%リンタングステン水溶液を垂らし、サンプルを落とすパラフィルム上に 2%リンタングステン水溶液を 2 つ用意し、グリッドを接触 1sec×2 ろ紙で余分な染色剤を吸収し、自然乾燥させ観察する。

【結果 1】電子顕微鏡所見





- ①HCT116 ポジコンにて HCT116 のエクソソームを電子顕微鏡で確認。
  - ②ExoQuik TC(EQ)を使用し、HCT116 の細胞培養の上清のエクソソームを回収し、電子顕微鏡で確認。
  - ③超遠心機を使用し HCT116 のエクソソームを回収し、電子顕微鏡で確認。
  - ④exoEasy Kit(Kit)を使用し、HCT116 の細胞培養の上清のエクソソームを回収し、電子顕微鏡で確認。
- 電子顕微鏡の結果より、ExoQuik TC(EQ), exoEasy Kit(Kit)で安定してエクソソームが回収できることを確認。

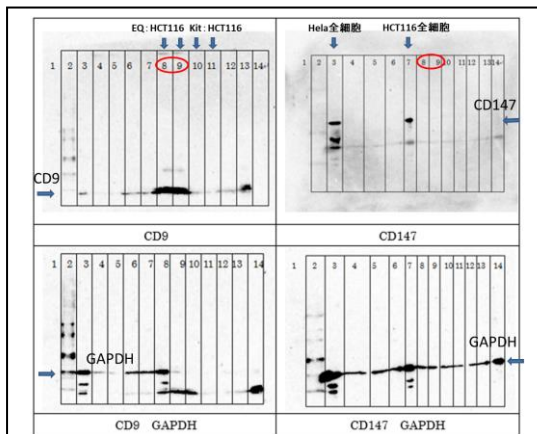
【結果 2】抽出されたエクソソームのタンパク質定量  
ExoQuik TC(EQ)

HeLa	0.72mg/ml	100 $\mu$ l
HCT116	1.57mg/ml	100 $\mu$ l

exoEasy Kit(Kit)

HeLa	0.03mg/ml	100 $\mu$ l
HCT116	0.05mg/ml	100 $\mu$ l

【結果 3】ウェスタンブロット



レーン	サンプル	レーン	サンプル
1	泳動マーカー	8	EQ 16ml HCT116
2	WB マーカー	9	濃縮 EQ HCT116
3	Hela 全細胞 (10 $\times$ )	10	Kit HCT116
4	EQ 16ml Hela	11	Kit HCT116 7/27
5	濃縮 EQ Hela	12	ポジコン (HCT116)
6	Kit Hela 7/27	13	ネガコン
7	HCT116 全細胞 (10 $\times$ )	14	WB マーカー

回収されたエクソソームより抽出されたタンパク質を使用しウェスタンブロットを行った結果、ExoQuik TC(EQ)により回収された HCT116 細胞で、CD9 が確認できた。しかしながら、ターゲットの CD147 はウェスタンブロットでは確認できなかった。

【実験 2】臨床検体を使用したエクソソーム回収。

研究課題名“大腸癌に対する血清エクソソームの抽出と解析”で IRB を通過し、説明し同意が得られた患者（健常人、大腸ポリープ保有者、大腸癌 Stage0, I, II, III, IV の患者より採血にて血清を採取し、エクソソームの回収を行った。

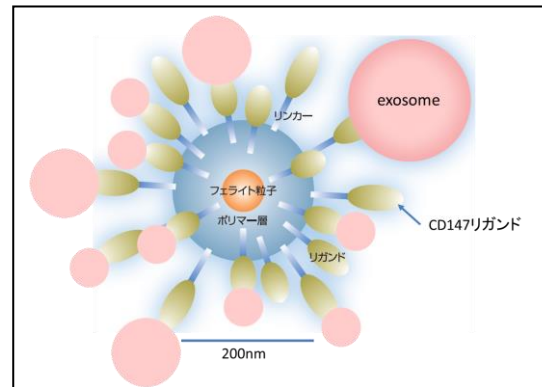
【結果】

ExoQuik を使用し、StageIV 患者のエクソソームを回収したが、タンパク質量にて著明なタンパク質が抽出され、不純物の混入が疑われた。臨床検体でのエクソソーム回収の精度を向上させるべく、現在実験継続中である。

【実験 3】

多摩川精機株式会社の受託サービスに依頼し、FG ビーズにエクソソームの表面膜タンパク質である CD9, CD63, CD147 の 3 種類のリガンドの固定化を行った。

【結果 1】リガンドの固定化



CD9 および CD147 の固定は可能であったが、CD63 の固定は不可であった。

【結果 2】

FG ビーズにエクソソームの表面膜タンパク質である CD9 を固定化し、HCT116 の上清から免疫沈降反応によりエクソソームの抽出を試みた。しかしながらエクソソームは抽出されず、現在、免疫沈降反応の条件を検討中である。

【考察】

本研究の目的は、大腸癌および大腸癌幹細胞由来のエクソソームをナノ磁気ビーズと組

胞膜タンパクの免疫沈降反応により抽出し、大腸癌に特異的な microRNA(miRNA)を網羅的解析により見出し、mRNA、タンパク質を解析することにより、大腸癌の早期発見、悪性度評価、予後予測に貢献することであったが、回収されたエクソソームから抽出したタンパク質から CD147 が検出されず、大腸癌に特異的な microRNA(miRNA)を網羅的解析することが困難であった。しかしながら、大腸癌細胞株上清を用いたエクソソームの回収は可能であり、手技も安定していたことから、臨床検体を使用したエクソソーム回収が今後の課題として残った。

#### 【まとめ】

- ①大腸癌細胞株 HT116 の上清より,ExoQuik を用い、エクソソームの回収は可能であった。しかしながら臨床検体での回収は困難であり、現在実験継続中である。
- ②FG ビーズにエクソソームの表面膜タンパク質である CD9, および癌に特異的な CD147 を固定化することは可能であった。しかしながら、エクソソームとの免疫沈降反応が機能せず、現在、条件検討中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

盛 真一郎 (MORI Shinichiro)  
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教  
研究者番号：00620519

##### (2) 研究分担者

奥村 浩 (OKUMURA Hiroshi)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員  
研究者番号：10398282

前村 公成 (MAEMURA Kousei)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授  
研究者番号：30398292

喜多 芳昭 (KITA Yoshiaki)  
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教  
研究者番号：30570692

夏越 祥次 (NATSUGOE Shoji)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  
研究者番号：70237577