

エクソソーム内包物 (miRNA・DNA・タンパク質) の分析技術紹介

技術開発センター 丸谷 曜子・高橋 昭博

1 はじめに

エクソソームは、あらゆる細胞から分泌され、体液中に放出される直径100 nm前後の小胞です。脂質二重膜に覆われた中には、分泌細胞に由来するタンパク質、核酸 (miRNA, DNA, mRNA)、脂質等、生理活性や情報伝達の指標となる物質が豊富に含まれています。疾患に関係する細胞からもこの小胞が分泌されるため、がん領域や各種疾患 (神経、循環器等) における病態を知る新たなツールとして、バイオマーカーの探索や臨床試験への活用に期待されています。

本稿では、エクソソームのバイオマーカーとしての活用を念頭に、その内包物 (miRNA, DNAおよびタンパク質) の分析手法と事例を紹介します。

2 遺伝子 (miRNA, DNA) の分析事例

エクソソーム中のmiRNAは、遠隔での遺伝子発現調節を通して、疾患の進展に寄与する重要な因子として注目が集まる一方で、実用化に向けては分析法に関する課題があります。例えば、従来の定量PCR (qPCR) 法のアッセイには内在性コントロールが不可欠ですが、エクソソームでは定まっていない

ため、選択するコントロールにより異なる結果が得られることがあります。また、疾患に関するエクソソーム中miRNAを体液から検出するためには、さらに高感度な解析法が求められます。

今回、膵臓がん患者血清から精製したエクソソームを用いて、以前の報告例¹⁾で増加が認められたがん関連miRNAであるmiR-21およびmiR-17-5pについて、ドロップレットデジタルPCR (ddPCR) 法により絶対定量を行いました。事前に膵臓がん細胞PANC-1由来エクソソームを用いてバリデーションを行ったところ、良好な直線性 ($R^2 \geq 0.99$) と精度 (日内 CV $\leq 10\%$, 日間 CV $\leq 15\%$) を持ち、従来のqPCR法では定量が難しくなる低濃度域 (Ct値30以上) においても、内在性コントロールなしで高感度かつ安定的 (CV $\leq 25\%$) に検出できることを確認しました。

この方法を膵臓がん患者血清エクソソームに適用したところ、健常者と比較して、前述のmiRNA発現の増加が認められました (図1)。ddPCR法は、内在性コントロールを使用せずに定量することが可能であり、エクソソーム中miRNAを高感度、高精度に定量できる有用な測定法と考えられます。

また、エクソソームにはDNAの断片が内包されており、その変異部位の特定により、層別化マーカーとしての利用が期待されています。今回、次世代シーケンサーを用いて50のがん関連遺伝子について血清由来エクソソーム中DNAの変異解析を行いました。市販の膵臓がん患者血清エクソソームからがん関連遺伝子変異を検出したところ、エクソソーム中の1 ng以下のDNAから変異を検出し、中には膵臓がんでよく見られるTP53やKRASの変異が含まれていました (図2)。進行がんのバイオ

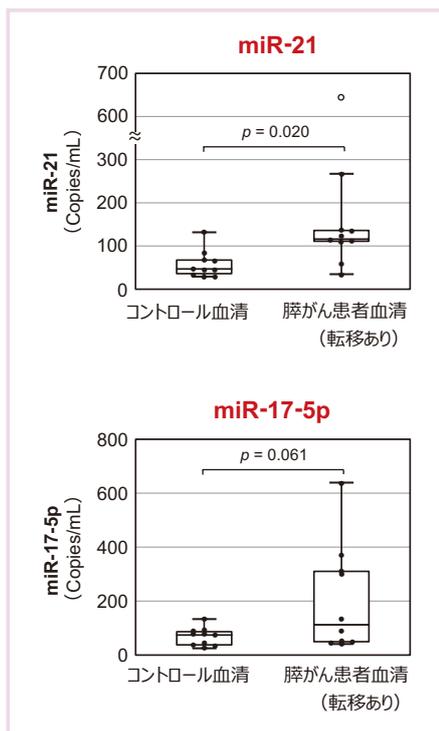


図1 ddPCRによる膵臓がん患者および健常人の血中エクソソームmiRNAの比較

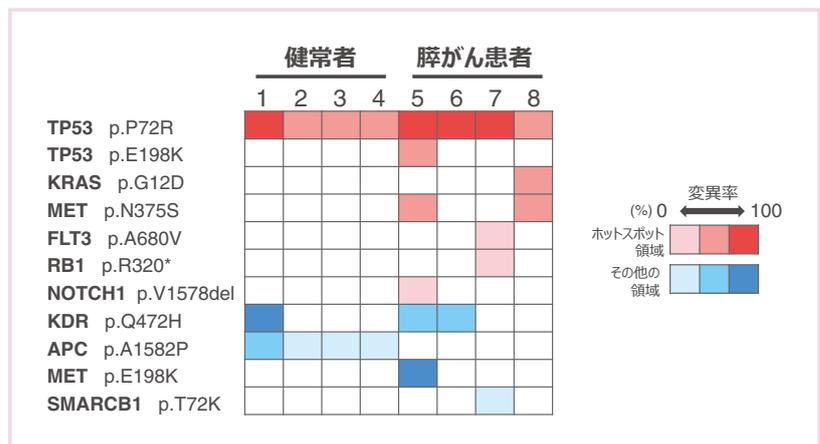


図2 NGS (次世代シーケンサー) による膵臓がん患者および健常人の血液由来エクソソーム中 DNA 変異検出

マーカーとして活用が期待される末梢血循環腫瘍細胞 (CTC) や ctDNA の解析には数 mL 以上の新鮮血が必要であるのに対し、進行の程度に関わらずがん細胞から放出されるエクソソームを利用すれば、がんの初期段階でより少量の血清から変異解析が可能となり、早期診断や医薬品開発における患者層別化に寄与できると考えられます。

3 タンパク質の分析事例

パーキンソン病における α -シヌクレイン²⁾ のように、体液中に漏れ出した疾患関連細胞由来のエクソソーム内包タンパク質が、疾患や重症度のバイオマーカーとして機能することが報告されています。疾患の早期診断や層別化に有用なマーカー候補が同定された場合、ELISA 等のイムノアッセイ法に基づく検証が行われますが、エクソソーム膜タンパク質と比較して、内包タンパク質の解析は十分に進んでいません。理由として、エクソソームの膜に囲まれた内包タンパク質 (抗原) と抗体を反応させるイムノアッセイに課題があることが挙げられます。

当社では、エクソソームの頑丈な脂質二重膜を破壊可能で、かつ抗原抗体反応を阻害しない可溶化剤を見出し、従来では

困難だったエクソソーム内包タンパク質を標的としたイムノアッセイによる検出と絶対定量を可能としました (図3)。本方法を用いることで、膵臓がんの肝転移マーカーとして報告されているマクロファージ遊走阻害因子 (MIF) や Heat Shock Protein 70 (HSP70) 等の内包タンパク質を検出・定量することができました (図4)。また、希釈直線性 ($R^2 \geq 0.99$) および精度 ($CV \leq 25\%$) についても良好であることを確認しました。当技術は目的のタンパク質に応じた可溶化剤の選択とイムノアッセイ系の最適化を簡便かつ低コストに進めることができ、多検体処理を必要とするマーカー候補分子の検証において非常に有用です。

4 おわりに

エクソソームはバイオマーカーとしての利用のみならず、再生医療、DDS (薬物輸送システム)、化粧品、食品等様々な分野での活用が期待されています。本稿で紹介したエクソソーム分析技術はこれらの分野へも応用可能です。当社では、分離・精製から解析にいたるまでの受託実績があり、お客様のご要望や研究目的に沿って柔軟に対応することが可能です。また、現在、医薬品

開発における規制対応が可能な試験実施体制の整備を進めています。ご用意の際はお気軽に当社までお問い合わせください。

文献

- 1) R. Que, G. Ding, J. Chen, L. Cao: *World Journal of Surgical Oncology*, **11**:219 (2013) .
- 2) M. Shi, C. Liu, T. J. Cook, K. M. Bullock, Y. Zhao, C. Gingham, Y. Li, P. Aro, R. Dator, C. He, M. J. Hipp, C. P. Zabetian, E. R. Peskind, S. Hu, J. F. Quinn, D. R. Galasko, W. A. Banks, J. Zhang: *Acta Neuropathologica*, **128**: 639-650 (2014) .

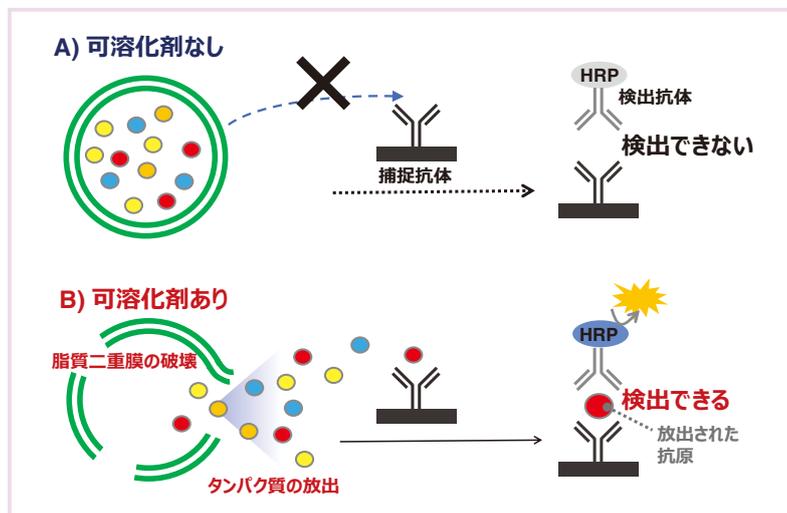


図3 エクソソーム内包タンパク質のイムノアッセイ

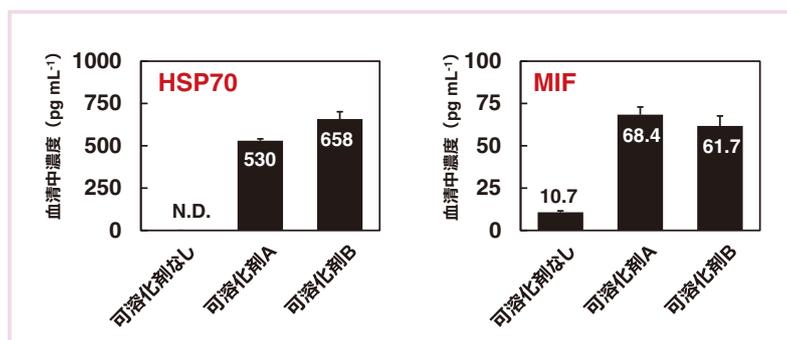


図4 エクソソーム脂質二重膜可溶化剤の効果



丸谷 曜子
(まるたに ようこ)
技術開発センター



高橋 昭博
(たかはし あきひろ)
技術開発センター