

細胞外小胞(エクソソーム)の分離精製およびプロテオーム解析

技術開発センター 高橋 昭博・丸谷 曜子

1 はじめに

エクソソーム(図1)は脂質二重膜より成る直径50~200 nmの細胞外小胞の一種です。正常または病巣部の臓器を構成する細胞より分泌されるエクソソームは、細胞間の情報伝達手段として重要な役割を担っています。近年、がんや神経変性をはじめ様々な疾患の発症や進展にエクソソームが関与していることが報告されており、病変細胞より分泌されるエクソソームを介して疾患の発症因子、例えば、変異型がん遺伝子やアルツハイマー病の病原性タンパク質であるアミロイドβなどが運搬されていると考えられています。本稿では、膵がん細胞より分泌されるエクソソームを例に、その分離精製および疾患バイオマーカーの発見に有用なプロテオーム解析について紹介します。

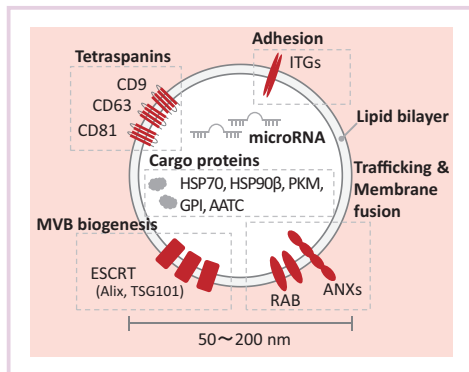


図1 エクソソームの構成

2 エクソソームの分離精製

膵がん細胞(PANC-1およびMIA PaCa-2)を無血清培地中で48時間培養し、得られた上清を分画遠心することによりアポトーシス小体やマイクロ小胞を除去し、エクソソームを分離しました。分画遠心法では遠心ローターの種類や試料の粘性などによってエクソソームの回収量が変動するため、試料ごとに適切な遠心分離条件を設定することが重要です。図2に分離精製の手順と条件を示します。抵抗パルス検出法による粒子径の測定、およびウエスタンブロット法によるマーカー発現(CD9, CD81, Alix, TSG101およびFlotillin-1)の検出により、当該画分にエクソソーム小胞の存在を確認しました(図3)。

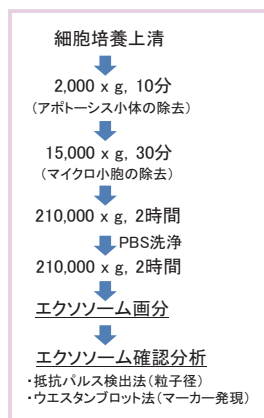


図2 分画遠心法のプロトコール

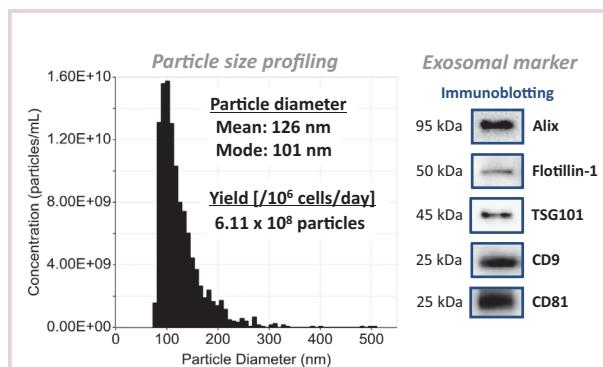


図3 膵がん細胞(PANC-1)の上清210,000 x g画分の粒子径およびマーカー発現

3 エクソソームのプロテオーム解析

分画遠心法により得た膵がん細胞エクソソームを高磁場型フーリエ変換質量分析計へ供し、SEQUEST検索(FDR < 0.01)を実施しました。Gene Ontology(GO)解析の結果、GTP結合タンパク質(Rasファミリーなど)や膜タンパク質(テトラスパニン群、インテグリン、SLCトランスポーターなど)が、エクソソーム中に高発現していることを見出しました。さらに、GTP結合タンパク質について詳細に解析したところ、PANC-1およびMIA PaCa-2由来エクソソームよりK-ras^{G12D}およびK-ras^{G12C}変異体を、それぞれタンパク質レベルで検出しました。Ras遺伝子群は12番目や13番目などのアミノ酸コドンの点突然変異により活性化されることでがん化に関与することが知られており、膵がん患者のおよそ80%でK-rasコドン12の変異(G12D, G12C, G12VおよびG12R)が確認されています。この他に、Glypican-1, Plectin, Met, MIF, CD97, CD44, Tspan8およびEpCAMなどのがんの進展促進に関与しているタンパク質因子やがん特異抗原の発現を、膵がん細胞エクソソーム中に検出しました。さらに、K-ras^{G12D}およびGlypican-1については安定同位体標識ペプチドを内部標準物質として用いることで、単位粒子あたりのタンパク質発現量を313および70.3 fmol/10¹¹ particlesとそれぞれ見積もりました。病変細胞より分泌されるエクソソームには疾患発症因子をはじめ、由来細胞の特徴が色濃く反映されていることが推察されます。

4 今後の展開

エクソソームを利用した疾患バイオマーカーの解析技術を開発する上で、体液試料からの疾患(あるいは臓器)特異的なエクソソームの分離精製(あるいは差分化)、およびエクソソーム中の発現成分の検出やそれらの変動を定量的に評価する技術の確立は重要な課題です。今後ますます医薬産業分野への応用が期待されるエクソソームの新規分析法の開発を進め、お客様の研究開発に貢献したいと考えています。ご用意の際はお気軽に当社までお問い合わせください。



高橋 昭博
(たかがし あきひろ)
技術開発センター



丸谷 曜子
(まるたに ようこ)
技術開発センター