

エクソソームの捕集・計測法

近年、細胞が放出する膜小胞、エクソソームの研究が注目を集めている。エクソソームはあらゆる生体液中に含まれていると言われており、がん診断のバイオマーカー、ドラッグデリバリー担体としての利用や、がん転移との関与について研究が進んでいる。本稿では、一般的に用いられているエクソソームの捕集法と計測法について解説する。

金 田 隆

1 はじめに

細胞外小胞とは細胞が放出する脂質二分子膜から成る小胞の総称であり、その産生機構によってエクソソーム（あるいはエキソソーム）、マイクロベシクル、アポトーシス小体の三つに分類される。各細胞外小胞の産生機構を図1に示す。エクソソームは、エンドサイトーシスによって形成された初期エンドソームが細胞内で多胞性エンドソームを形成した後に、エキソサイトーシスによって細胞外に放出された小胞である。一方、マイクロベシクルは、細胞膜が外側へ出芽して分離することで形成された小胞であり、アポトーシス小体は細胞がアポ

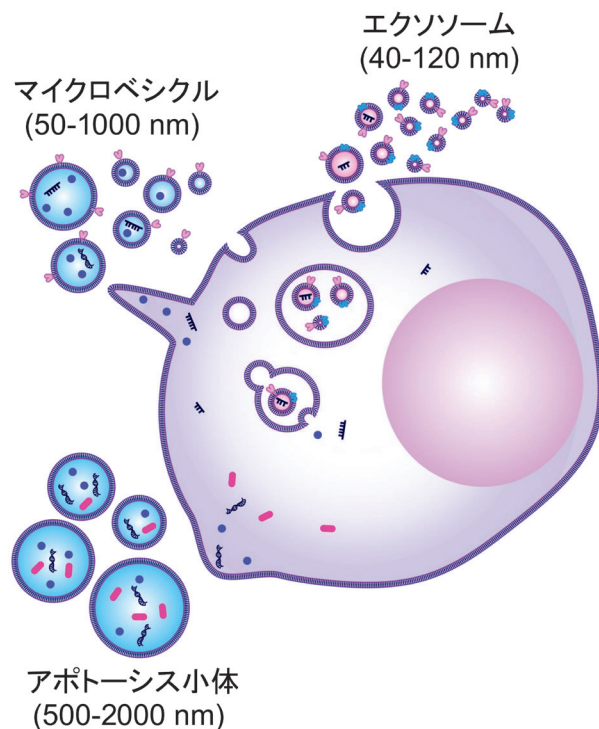


図1 細胞外小胞の産生過程を示すモデル図

トーシス（細胞死）を起こした際に生ずる小胞である。一般にエクソソームは直径40~120 nm程度の大きさであると言われているが（ただし文献によって異なり、大きさの厳密な定義はない）、マイクロベシクルにも同程度の大きさのものがあるため、大きさによりそれらを同定することはできない。このため、エクソソームの研究では、これらの小胞を大きさの違いにより分画するだけでなく、含有するタンパク質等を計測して、いずれの小胞であるかを確認する必要がある。

エクソソームはあらゆる生体液中に存在すると言われており、近年、その研究が注目を集めている。エクソソームの存在は古くから知られていたものの、単に細胞から放出される老廃物であると考えられていた。しかし、この小胞がmRNAやタンパク質などの生体高分子を内包しており、細胞外でのタンパク質発現に関与していることが報告されてから、エクソソームを用いたがん診断やドラッグデリバリー、がん転移との関与を解明するための研究が盛んに行われるようになってきた。2012年には、スウェーデンに拠点を置く国際的な学会、International Society for Extracellular Vesicles、が設立されるとともに、同学会から細胞外小胞に特化した論文誌、Journal of Extracellular Vesicles（第1巻、2012年）とJournal of Extracellular Biology（第1巻、2021年）が出版されており、この分野における研究の活性化がうかがえる。本稿では、標準的な細胞外小胞の捕集法やエクソソームの選択的捕集法、並びに計測法と同定法について概説する。

2 エクソソームの捕集法

細胞外小胞の研究における試料収集、単離法、分析法の標準化に関する論文は2013年にJournal of Extracellular Vesiclesにおいて報告されている¹⁾。その中では、標準的な試料収集法、捕集法、分析法が解説されている。表1に各捕集法の利点と欠点をまとめている。

細胞外小胞の捕集法は、サイズ分離と抗原抗体反応を

表 1 各捕集法の利点と欠点

方法	利 点	欠 点
超遠心分離法		
	<ul style="list-style-type: none"> ・高濃縮率 ・技術的に簡便 ・タンパク質, mRNA, miRNA への影響がない 	<ul style="list-style-type: none"> ・粘度の高い試料で低効率 ・同じサイズの粒子による汚染 ・時間と労力を要する
サイズ排除クロマトグラフィー		
	<ul style="list-style-type: none"> ・高純度 ・エクソソームの構造と活性を保持 ・タンパク質, mRNA, miRNA への影響がない 	<ul style="list-style-type: none"> ・高価 ・低処理効率 ・時間を要する
ろ過法		
	<ul style="list-style-type: none"> ・高純度 ・迅速かつ高処理効率 ・短時間 	<ul style="list-style-type: none"> ・エクソソーム成分の損失 ・小さな物質による汚染 ・タンパク質の劣化
ポリマー沈殿法		
	<ul style="list-style-type: none"> ・高効率 ・容易 ・タンパク質, mRNA, miRNA への影響がない 	<ul style="list-style-type: none"> ・特異性が低い ・分離前, 分離後の精製が必要 ・時間を要する
アフィニティー沈降法		
	<ul style="list-style-type: none"> ・目的エクソソームに対する高特異性と高効率 ・容易 ・タンパク質, mRNA, miRNA への影響がない 	<ul style="list-style-type: none"> ・試料の前処理が必要 ・処理量と収率が低い ・広範囲のエクソソームに適用できない
マイクロ流体デバイス		
	<ul style="list-style-type: none"> ・高純度, 高速, 簡便 ・自動化可能 ・他の方法との集積化が可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・収率が低い ・標準化された方法がない ・臨床試料に対して検証が必要

用いたアフィニティー分離に大別することができる。一般に生体試料から細胞外小胞を捕集した場合、濃度、サイズ分布の測定に加えて、エクソソームやマイクロベシクルのマーカートンパク質を測定して、捕集された細胞外小胞がいずれであるのかを同定することが要求されるので、注意が必要である。一方、現在では、エクソソームの標準品が市販化されているが、これらについては通常、サイズ分布や含有タンパク質に関するデータが与えられている。しかしながら、そのほとんどは培養細胞由来のものであり、実際に生体試料から細胞外小胞を捕集して用いる場合には、捕集方法の選択とマーカートンパク質による同定が必要となる。

2.1 試料収集

標準法として推奨されている試料収集法は、試料の種類によって方法が異なる。具体的に報告されている生体

試料には、胸水、血漿^{けっしょう}、眼球流体や房水、母乳、腹水、羊水、精液、唾液、鼻汁、脳脊髄液、気管支肺洗浄液、滑液、胆汁、尿などがあり、それぞれ試料の収集法は異なっている。また、試料の前処理法に関しても、目的に応じて適切な方法を用なければならない。例えば、血液試料では、適切な抗凝固剤を選択する必要がある。一般に、後の分析でPCRを用いる場合には、ヘパリンはPCRにおいて偽陰性の結果を与えるために、ヘパリン抗凝固剤は推奨されない。その他、EDTA、フッ化ナトリウム/シュウ酸カリウム、クエン酸ナトリウムが抗凝固剤として利用できる。これらの抗凝固剤の中から、目的に応じたものを選択することが推奨されている。

2.2 超遠心分離法

従来から広く用いられているエクソソームの捕集法は超遠心分離法である。通常、低速回転で細胞小片や大きな粒子を除去した後に、高速回転により、微小な小胞を回収する。単純に超遠心分離法により細胞外小胞のペレットを回収する方法をペレットダウン法と呼んでいる。文献において、この方法を用いて唾液、血漿、母乳中のエクソソームを捕集した際の条件を表2に示す²⁾。エクソソーム捕集には、120000×g程度の遠心速度が必要である。

また、スクロールクッション法や密度勾配法を用いることで、細胞外小胞を大きさの違いにより回収することができる。この方法は小胞の密度の違いによる分離であるため、エクソソームのみを単離することはできないが、エクソソームリッチな試料を得ることができる。

表 2 唾液、血漿、母乳からのエクソソーム捕集の条件²⁾

操 作	唾 液	血 漿	母 乳
1. 細胞小片の除去	16500×g ・20分間	1800×g ・10分間	300×g ・10分間
		29500×g ・20分間	16500×g ・20分間
2. ろ過	0.2 μm フィルター	0.2 μm フィルター	0.2 μm フィルター
3. 捕集	120000×g ・70分間	120000×g ・90分間	120000×g ・70分間

2.3 サイズ排除法

サイズ排除法にはカラム法とろ過法がある。カラム法はサイズ排除クロマトグラフィーの手法に基づくものであり、ろ過法はタンパク質精製に利用される限外ろ過法と同じである。エクソソームの捕集を目的としたサイズ排除用のカートリッジカラムや限外ろ過用のフィルターは市販されており、容易に入手することができる。限外ろ過法では、大きな細胞片を除去するために0.8 μmのフィルターを用い、次いで0.2 μmのフィルターで小さ

な小胞を捕集する。吸引や加圧によりフィルターを通過させると、小胞が変形してしまう可能性があるため、吸引や加圧は必要最小限に留めるべきである。

2・3 ポリマー沈殿法

細胞外小胞をポリマーにより凝集させて、通常の遠心分離法で沈降させる方法も用いられている。市販されているポリマー試薬の組成は不明であるが、操作が簡便で容易に細胞外小胞を捕集することができる。ポリマー沈殿法はRNA量、タンパク質純度、小胞量に関して、他の方法よりも優れているとの報告もあるが³⁾、質の高い小さな小胞を捕集するには密度勾配超遠心分離法が優れているとの報告がある⁴⁾。したがって、この方法を用いる場合には、エクソソームの純度評価も推奨されている。

2・4 アフィニティー沈降法

アフィニティー沈降法は、エクソソームの膜タンパク質に対する抗体を修飾したポリマー微粒子や磁気微粒子によりエクソソームを微粒子上に捕捉し、回収する方法である。ポリマー微粒子であれば遠心分離で、磁気微粒子であれば磁石で微粒子を回収することができる。エクソソームは種々の膜タンパク質を含んでおり、これらの抗体との親和力を利用してエクソソームを捕集する。アフィニティー沈降法では、エクソソームマーカーとして知られているテトラスパニン系のタンパク質であるCD9、CD63、CD81などの抗体が一般的に用いられている。アフィニティーを用いる方法の原理は、マーカータンパク質と抗体との相互作用に基づくので、エクソソームを選択的に捕集することができる。しかしながら、一般に回収率は他の方法よりも低く、コストも高いことが問題点として挙げられる。

2・5 マイクロ流体デバイス

マイクロ流体デバイスは微量試料の取り扱いに優れており、これを利用する細胞外小胞捕集法についてもいくつか報告されている。細胞外小胞の物理的性質（主にサイズ）に加えて、チャンネル内に抗体を修飾して捕集する方法が報告されているが、実試料からの捕集に関しての報告は進んでいないのが現状である。また、マイクロ流体デバイスは各研究グループで作製されたものであるため、標準化された方法はなく、市販化されたものもない。したがって、研究レベルでのみ用いられているのが現状である。

3 エクソソームの計測法

粒径の違いによって分画、捕集された細胞外小胞は、粒径分布や濃度の測定に加えて、含有タンパク質の測定が要求される。表3に細胞外小胞計測法を比較した。

表3 細胞外小胞計測法の比較

方法	原理	目的・情報
ナノ粒子トラッキング解析		
	光散乱 ブラウン運動	粒子数 粒径分布
コールターカウンター法		
	ナノ細孔前後での電気抵抗測定 (Coulter 原理)	粒子数 粒径分布
電子顕微鏡・原子間力顕微鏡		
	電子線 原子間力	粒径 粒子形態 粒子数 (遠視野像での計数)
ウエスタンブロッティング		
	電気泳動 抗原抗体反応 酵素反応	マーカータンパク質計測
フローサイトメトリー		
	蛍光・光散乱 抗原抗体反応	粒子数 マーカータンパク質計測
ELISA		
	吸光・蛍光・光散乱 抗原抗体反応 酵素反応	マーカータンパク質計測 粒子数
質量分析		
	質量/電荷比	プロテオーム解析 バイオマーカー探索

物理的な情報と化学的な情報を得るために種々の方法が用いられており、捕集した細胞外小胞を特徴付けするためには、これらのうち、複数の方法を用いた評価を行う必要がある。一般的には、少なくとも、濃度と粒径分布、形態、マーカータンパク質検出に関する情報が必要である。現在入手可能な市販のエクソソームに関しては、これらの情報が与えられているべきである。以下に、表3に記載した細胞外小胞の測定法について概説する。

3・1 ナノ粒子トラッキング解析 (NTA)

現在では、細胞外小胞の研究における標準方法として、広く利用されている方法である。この方法は、レーザー光による光散乱と小胞のブラウン運動から、懸濁液中の小胞の粒径分布と濃度を測定することができるが、小胞の大きさがわかるのみであるので、その結果からエクソソームとマイクロベシクルを区別することはできない。しかしながら、実験室で捕集した細胞外小胞の粒径分布は、論文において必ず要求されるため、NTAでの測定は必須であると言える。NTA装置は高価であるが、頻繁に用いるのでなければ、依頼分析サービスも利用できる。試料の濃度にもよるが、必要体積は数百μL程度で十分である。

3・2 コールターカウンタ法

エクソソームの計数と粒径分布の情報を獲得できる装置として、ナノ細孔を用いた電気抵抗測定 (Coulter 原理) による粒径測定装置が市販化されている。この方法では、ナノ細孔の前後で電圧を印加し、電気抵抗を測定する。ナノ粒子が細孔を通過際には、電気抵抗が増加し、パルス信号が発生する。このとき、パルスの幅から粒子径を、パルスの頻度から粒子数を計測することができる。

3・3 顕微観察

細胞外小胞の形態を観察するために、走査型電子顕微鏡 (SEM)、透過型電子顕微鏡 (TEM)、原子間力顕微鏡 (AFM) が広く利用されている。特に TEM での観察は捕集した小胞の形状を観察するために多くの研究で用いられている。TEM で得られる情報は大きさと形状であるが、抗体で修飾した金ナノ粒子を用いれば、エクソソームマーカーを検出することもできる。しかしながら、顕微観察の結果を濃度の決定に利用することは極めて稀であり、NTA と顕微観察の両方の結果が多くの論文において示されている。

顕微画像を示す際には、二つ以上の異なる倍率で撮影した画像を示すことが推奨されている。例えば、複数の細胞外小胞を撮影した画像と一つの細胞外小胞を拡大して撮影した画像を示し、サイズ分布と詳細な形態について議論することが望ましい。

3・4 ウエスタンブロッティング

エクソソームの同定に最も広く用いられている手法はウエスタンブロッティングであり、いくつかのマーカータンパク質が一般的に用いられている。マーカータンパク質として代表的なものは CD9, CD63, CD81, Alix, Tsg101 である。一方、マイクロベシクルのマーカータンパク質としては、CD40, インテグリン, セレクチンなどが知られている。これらのマーカータンパク質はエクソソームやマイクロベシクルの特異的なマーカータンパク質ではなく、比較的豊富に含まれているタンパク質であることに注意しなければならない。すなわち、これらのタンパク質が存在したからと言って、細胞外小胞がエクソソームであると断定できない。この理由から、International Society for Extracellular Vesicles が提案する指針においては、三つ以上のマーカータンパク質を半定量的に測定することが推奨されている⁹⁾。

エクソソームとマイクロベシクルはサイズ分布が重なっているため、捕集した細胞外小胞がエクソソームであるか、マイクロベシクルであるか、あるいはその混合物であるかを明確にする必要があり、その目的のためにウエスタンブロッティングによるマーカータンパク質の測定は必須となる。したがって、ウエスタンブロッティ

ングは細胞外小胞の研究において欠かすことのできない分析法の一つとなっている。

3・5 フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは、ウエスタンブロッティングに代わるマーカータンパク質の測定法として利用できる。一般的には、細胞外小胞は極めて小さいため、抗体で標識したポリマー微粒子や磁気微粒子と細胞外小胞を反応させて検出する。抗体固定化微粒子に細胞外小胞を捕捉した後に、捕捉された細胞外小胞を蛍光標識抗体と反応させ、マーカータンパク質を同定する。一方、蛍光標識した抗体と細胞外小胞を直接反応させて蛍光検出する方法も報告されている。いずれの方法においても、波長の異なるレーザーでの測定が可能であるため、複数のマーカータンパク質を同時検出することもできる。

3・6 ELISA

ELISA はタンパク質分析の有効な手法の一つであり、エクソソームのマーカータンパク質を測定するためのキットが入手可能である。具体的には、CD9, CD63, CD81 測定用の ELISA キットが市販されている。キットには、いずれかのマーカータンパク質の抗体がマイクロプレートのウエル内に固定化されているものと、微粒子に固定化されているものがある。

一般的な ELISA とは異なるが、プレートに固定化した抗体とエクソソームを反応させた後に、抗体で修飾したナノビーズと反応させてエクソソームを計数する装置も市販化されている。この方法では、ウエル内に固定化されたナノビーズをレーザーや発光ダイオードで計数する。

3・7 質量分析

質量分析法はタンパク質分析に広く用いられており、エクソソームのタンパク質解析にも利用されている。しかし、質量分析法はエクソソームの同定よりは、むしろエクソソームのプロテオーム解析によるバイオマーカー探索に用いられている⁹⁾。質量分析法によるプロテオーム解析では、化学標識法、代謝標識法、非標識法などが用いられる。化学標識法では、化学反応、あるいは酵素反応により、ペプチドやタンパク質に同位体原子や同位体コードタグを添加して解析を行う。代謝標識法では、同位体で標識されたアミノ酸などを細胞培養培地に添加して、細胞に取り込ませることでタンパク質を標識する。質量分析法によるプロテオーム解析法には様々な手法があり、多くの研究が報告されている。ここでは、詳細については割愛する。

4 ま と め

細胞外小胞、特にエクソソームに関する研究は、ます

ます活発化している。それらは新しい捕集法、計測法、バイオマーカーの探索、ドラッグデリバリー、診断への応用、がん転移機構の解明など、多岐にわたっている。これらの研究を行う上で、標準的な方法に基づく小胞の捕集、評価は、研究の正当性を示す上で必要不可欠である。本稿では、一般的に用いられている手法について概説した。新しい捕集、計測法が妥当であるかどうかを評価するためには、一般的な方法との比較が要求されるであろうし、応用研究においては、収集した小胞がどのような細胞外小胞であるかを確認しておく必要がある。本稿が新しく細胞外小胞の研究に携わろうとする研究者の一助になれば幸いである。

文 献

- 1) K. W. Witwer, E. I. Buzás, L. T. Bemis, A. Bora, C. Lässer, J. Lötval, E. N. N. Hoen, M. G. Piper, S. Sivaraman, J. Skog, C. Théry, M. H. Wauben, F. Hochberg : *J. Extracell. Vesicles*, **2**, 20360 (2013).
- 2) C. Lässer, V. S. Alikhani, K. Ekström, M. Eldh, P. T. Paredes, A. Bossios, M. Sjöstrand, S. Gabrielsson, J. Lötval, H. Valadi : *J. Transl. Med.*, **9**, 9 (2011).

- 3) D. D. Taylor, W. Zacharias, C. Gercel-Taylor : *Methods Mol. Biol.*, **728**, 235 (2011).
- 4) T. Yamada, Y. Inoshima, T. Matsuda, N. Ishiguro : *J. Vet. Med. Sci.*, **74**, 1523 (2012).
- 5) J. Lötval, A. F. Hill, F. Hochberg, E. I. Buzás, D. D. Vizio, C. Gardiner, Y. S. Gho, I. V. Kurochkin, S. Mathivanan, P. Quesenberry, S. Sahoo, H. Tahara, M. H. Wauben, K. W. Witwer, C. Théry : *J. Extracell. Vesicles*, **3**, 26913 (2014).
- 6) L. Xu, R. C. Gimple, W. B. Lau, B. Lau, F. Fei, Q. Shen, X. Liao, Y. Li, W. Wang, Y. He, M. Feng, H. Bu, W. Wang, S. Zhou : *Mass Spectrom. Rev.*, **39**, 745 (2020).



金田 隆 (Takashi KANETA)

岡山大学学術研究院自然科学学域 (〒700-8530 岡山市北区津島中 3-1-1)。北海道大学大学院理学研究科博士後期課程修了。博士(理学)。《現在の研究テーマ》レーザーを用いた分析法とペーパー分析デバイスの研究。《主な著書》“Advanced Microfluidics Based Point-of-Care Diagnostics: A Bridge Between Microfluidics and Biomedical Applications”, (CRC Press Taylor & Francis)。《趣味》バスケットボール, ギター。
E-mail : kaneta@okayama-u.ac.jp

会 員 の 拡 充 に 御 協 力 を !!

本会では、個人(正会員:会費年額9,000円+入会金1,000円,学生会員:年額4,500円)及び団体会員(維持会員:年額1口79,800円,特別会員:年額30,000円,公益会員:年額28,800円)の拡充を行っております。分析化学を業務としている会社や分析化学関係の仕事に従事している人などがお知り合いにおられましたら、ぜひ本会への入会を御勧誘くださるようお願い致します。

入会の手続きなどの詳細につきまして、本会ホームページ (<https://www.jsac.jp>) の入会案内をご覧ください。

◇〒141-0031 東京都品川区西五反田1-26-2 五反田サンハイツ 304号 (公社)日本分析化学会会員係

[電話:03-3490-3351, FAX:03-3490-3572, E-mail: mem@jsac.or.jp]