

ポリアミン類を用いた新たな細胞外小胞回収法による培養細胞由来試料の特性解析

山田美結¹, 成瀬有純², 菊池有純², 高木公暁³, 堤内要¹

¹ 中部大学応用生物学部, ² 大雄会医科学研究所, ³ 大雄会第一病院泌尿器科

Characterization of extracellular vesicles from cultured cells by a novel recovery method with polyamine

Miyuu Yamada¹, Azumi Naruse², Arizumi Kikuchi², Kimiaki Takagi³, Kaname Tsutsumiuchi¹

¹ College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, ² Daiyukai Research Institute for Medical Science, Daiyukai Health Systems, ³ Department of Urology, Daiyukai Daiichi Hospital

【目的】細胞はエクソソームという細胞外小胞 (EV) を分泌しており、それらを介して細胞間で情報を伝達し、機能していることが報告されている^{1,2}。ゆえに、ヒトの血液や尿などから EV を採取して成分分析を行えば、病気の診断に利用できると期待される。EV 抽出法として最も標準的な方法である超遠心法は特殊な装置が必要で、時間もかかり、EV の回収率も低い³。磁気ビーズを用いた免疫沈殿法やカラム吸着に基づく方法などが発表されているが、これらの方法も EV 収量が低く、試薬等が高価である。そこで我々はポリアミン類を用いた新たな EV 回収法を検討した。

【方法・結果】培養細胞としてヒト慢性骨髄性白血病由来細胞 K562 を用いた。EV の回収操作を行う際、培地を無血清培地に置換して 48 時間培養し、その細胞培養上清を実験に用いた。EV 回収法にはポリアミン類を用いた新規回収法、比較対象として超遠心法とアフィニティー法 (MagCapture エクソソームアイソレーションキット PS, 富士フィルム和光) を検討した。得られた試料がエクソソームであることの確認は、ウェスタンブロッティングによりポジティブマーカーである CD81、Flotilin 1 とネガティブマーカーの Calnexin の有無を確認することで行った。これらの試料を膜タンパク質可溶化試薬 (MPEX PTS Reagents, GL Sciences) で可溶化し、ペプチド脱塩・濃縮チップ (GL-Tip GC) で前処理した後、水-アセトニトリル (97:3) 混合溶媒 (0.1%ギ酸含有) に溶解して LC-MS/MS 測定用試料溶液とした。LC-MS/MS の装置は Nexera X2 - LCMS-8060 (島津製作所) を用いた。カラムには Inertsil WP300 C18 5 μ m (ϕ 1.0 \times 150 mm)、溶媒には (A) 水 (0.1%ギ酸含有)、(B) アセトニトリル (0.1%ギ酸含有) を用い、流速 50 μ L/min、溶媒 B の組成を 3% (0 min) – 30% (30 min) – 90% (35-45 min) – 3% (47-60 min) としたグラジエント溶出を行った。観測質量範囲を m/z 100-1300 としてプロダクトイオンスキャンを行い、EV に含まれるペプチド成分の分析を行った。今回検討した新たな回収法により得られた EV に含まれるペプチド成分の特性解析の結果、従来法と共通する点と異なる点がそれぞれ認められた。

¹ H. Valadi *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, **9**, 654-659 (2007). ² A. Zomer *et al.*, *Cell*, **161**, 1046-1057 (2015).

³ P. Li *et al.*, *Theranostics*, **7**, 789-804 (2017).