

|           |   |
|-----------|---|
| Title     | No. 10 : 唾液エクソソーム精製条件の確立  |
| Author(s) | 岩井, 千弥; 吉田, 光孝; 芝, 清隆; 吉成, 正雄; 矢島, 安朝   |
| Journal   | 歯科学報, 113(2): 201-201   |
| URL       | <a href="http://hdl.handle.net/10130/3023">http://hdl.handle.net/10130/3023</a> |
| Right     |   |

## No.9 : EpCAM 陽性エクソソーム分離カラムの開発

吉田光孝<sup>1)2)3)</sup>, 岩井千弥<sup>1)2)3)</sup>, 芝 清隆<sup>3)</sup>, 吉成正雄<sup>1)</sup>, 矢島安朝<sup>1)2)</sup>  
 (東歯大・口科研・インプラント)<sup>1)</sup> (東歯大・口腔インプラント)<sup>2)</sup>  
 ((財)がん研究会がん研究所・蛋白創製研究部)<sup>3)</sup>

**目的:** エクソソームはほとんど全ての細胞から放出されるナノサイズ (直径100nm 程度) の小胞で、唾液、血液、尿など全身のあらゆる体液に存在する。エクソソームはそれを放出した細胞に由来するタンパク質や mRNA, miRNA などを含み、これを他の細胞へと伝達することが分かっている。がんの転移や神経変性などの疾患に関わっていることが次々と明らかにされつつあり、また、容易に体液から回収できることから、リキッド・バイオプシーの切り札としても期待が集まっている。しかしながら、体液に含まれるエクソソームは、全身の臓器から放出されるエクソソームの混合物である。したがって、このごちゃ混ぜ状態のエクソソームを、何らかの指標でサブグループに分画する手法の確立が急務とされている。

我々は上皮細胞の表面に存在する EpCAM という分子に注目したエクソソーム分画法の開発を目指している。EpCAM は、多くの悪性腫瘍でその発現が亢進しており、血中循環腫瘍細胞 (CTC) のマーカーとしても臨床利用されている。いくつかのがんでは、その悪性化に伴い、EpCAM 陽性の体液中心エクソソーム量の増加も報告されている。蛋白創製研究部では、EpCAM に親和性を有するペプチド

アプタマー (Ep114) と、そのコート剤 (EpiVeta) の開発に成功しており、この EpiVeta をカラムに応用し、EpCAM を発現しているエクソソームを単離する方法の開発を進めている。

**方法:** エクソソームは、癌細胞株 HT-29, HEK293T (それぞれ EpCAM+, -) の培養上清より回収した。精製は、蔗糖密度勾配超遠心にておこない、暗視野レーザー顕微鏡、Western Blot 法などにより性質を解析した。そして回収されたエクソソームを EpiVeta 応用カラムに溶出することで、EpCAM との相互作用を確認した。

**結果:** 培養上清由来エクソソームの精製プロトコルを確立した。その結果、密度1.13g/ml 付近に、CD63 (+), 直径100nm 前後の粒子が回収された。それらを EpiVeta コートカラムで溶出すると、EpCAM 発現の有無でエクソソームを分画する事が出来た。

**考察:** 今回、EpCAM を発現しているエクソソームに対して親和性を有したカラムの作製に成功した。今後は、条件の至適化をおこない、精製エクソソーム以外のサンプルについても検討していく予定である。

## No.10 : 唾液エクソソーム精製条件の確立

岩井千弥<sup>1)2)3)</sup>, 吉田光孝<sup>1)2)3)</sup>, 芝 清隆<sup>3)</sup>, 吉成正雄<sup>1)</sup>, 矢島安朝<sup>1)2)</sup>  
 (東歯大・口科研・インプラント)<sup>1)</sup> (東歯大・口腔インプラント)<sup>2)</sup>  
 ((財)がん研究会がん研究所・蛋白創製研究部)<sup>3)</sup>

**目的:** 近年、唾液を用いた診断の非侵襲性に注目が集まっているが、特に唾液中エクソソームは、宿主細胞由来の遺伝情報 (miRNA/タンパク質) を保持しているためその解析から得られる情報量が多い。唾液中のエクソソームの解析は、口腔内疾患のみならず、他の疾患の診断にもつながる可能性の高い診断法である。しかしながら、精製度の高い唾液エクソソームの分離には、他の体液からの方法をそのまま使うことは難しい。これは、唾液がもつ独特の高い粘性によるものである。ここでは、唾液から安定に精製度の高いエクソソームを単離するプロトコルの確立を進めた。

**方法:** 超音波による前処理の効果、Nycodenz 密度勾配超遠心での効果を、各密度分画のタンパク質パターンの電気泳動による解析、エクソソームマーカーのウェスタンブロットによる確認、NTA 法によるエクソソームの数と大きさの測定、AFM の水中タッピングモードによる形態観察を通じて評価した。

**結果:** 安静時唾液15ml を低温下で採取し、各種条件の前処理操作をおこない、シヨ糖密度勾配超遠心

で密度により分画し、前処理効果の評価をおこなった。その結果、10分の水浴型超音波処理を加えたものが、最も安定した結果を与えることがわかった。また、通常のシヨ糖を用いた密度勾配超遠心と、より高密度の分画まで解析できる Nycodenz を用いた密度勾配超遠心を比較したところ、後者を用いた方法のみで、エクソソームの密度に相当する1.15g/ml 前後にエクソソームマーカーである CD63, TSG-101, EpCAM の存在が確認できた。Nano Sight を用いた NTA 法にて各分画の粒子数と大きさを解析したところ、粒子は密度1.04~1.20g/ml 分画に集中していた。また、分画4 を AFM 水中タッピングモードで観察したところ、エクソソーム様の粒子が確認された。

**考察:** 唾液からのエクソソームの精製には、超音波前処理と Nycodenz 密度勾配超遠心を組み合わせた方法が最適であることが明らかとなった。粘膜上皮からは、ムチンにコートされた密度の高いエクソソームが分泌されているといった報告もあるため、ムチン関連抗体を使用し、他の密度にエクソソーム様分子が存在する可能性を吟味している。