

| | |
|-------------|--|
| Title | Preferential Capture of EpCAM-expressing extracellular vesicles on solid surfaces coated with an aptamer-conjugated zwitterionic polymer |
| Author(s) | 吉田, 光孝 |
| Journal | 歯科学報, 119(6): 530-531 |
| URL | http://hdl.handle.net/10130/5069 |
| Right | |
| Description | |

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | よしだみつたか (千葉県) 吉田光孝 |
| 学位の種類 | 博士(歯学) |
| 学位記番号 | 第 2105 号(甲第 1318 号) |
| 学位授与の日付 | 平成27年3月31日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位論文題目 | Preferential Capture of EpCAM-expressing extracellular vesicles on solid surfaces coated with an aptamer-conjugated zwitterionic polymer |
| 掲載雑誌名 | Biotechnology and Bioengineering 2017 |
| 論文審査委員 | (主査) 片倉 朗教授 (副査) 矢島 安朝教授 村松 敬教授 吉成 正雄教授 橋本 貞充教授 |

論文内容の要旨

1. 研究目的

近年、細胞が放出する「エクソソーム」と疾患の関連が示唆され、新規バイオマーカーとして注目を集めている。体液中にはさまざまな細胞由来のエクソソームが混在しているため、診断・治療の応用には疾患細胞由来のエクソソームを分別する必要がある。我々は「がん細胞から放出されたエクソソームを選別」するために、がん悪性化との関連が重要視されている EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) 分子に注目した。本研究では、EpCAM 結合ペプチド「Ep114」およびそのコート材「EpiVeta」を固体表面に固層化し、EpCAM を発現しているエクソソームを捕捉することを目的としている。今回、シリカビーズ表面に EpiVeta を固層化し、培養細胞上清由来のエクソソームとの相互作用を検証した。

2. 研究方法

1) EpiVeta シリカビーズの作製、機能評価

Ep114の取得、および EpiVeta の合成は蛋白創製研究部にて行われた。EpiVeta に FITC (蛍光色素) を導入しシリカビーズへコートした。まずは、ビーズ表面を Ep114 認識抗体 (蛍光色素複合体) で染色した。続いて、ビーズと精製 EpCAM 分子をインキュベートし洗浄後、EpCAM に対する抗体 (蛍光色素複合体) にて染色を行った。いずれの反応も共焦点顕微鏡にて確認した。

2) 評価用エクソソームの準備

EpiVeta シリカビーズとの相互作用を評価するためのエクソソームは、培養上清より蔗糖密度勾配超遠心法にて精製した。細胞株種は、HT-29, HEK-293T (それぞれ EpCAM 陽、陰性) を選択した。エクソソームの解析は、ナノ粒子追跡解析法、およびウエスタンブロッティングにより行った。

3) EpiVeta シリカビーズとエクソソームの相互作用評価

EpiVeta シリカビーズと EpCAM 陽、陰性エクソソームをインキュベートし、洗浄後、エクソソーム表面に発現する蛋白に対する抗体 (蛍光色素複合体) にて染色を行った。

3. 研究成績および考察

1) EpiVeta シリカビーズの機能評価

EpiVeta シリカビーズは、Ep114抗体により表面を取り巻くように染色された。すなわち、ビーズ表面にEp114ペプチドが提示されている事を確認できた。また、ビーズ表面と精製EpCAM分子の実験でも、同様の結果が得られた。以上より、EpCAM分子に結合能を有するビーズの作製に成功したといえる。

2) 評価用エクソソームの準備

エクソソームは、HT-29では分画5, 6(密度1.10~1.13 g/mL), HEK293Tでは分画4, 5(密度1.10~1.18 g/mL)へと濃縮された。これらの分画(順に5, 6)における粒子の直径最頻値は、HT-29では(158, 150 nm), HEK-293Tでは(145, 124 nm)となった。タンパク発現については、HT-29では、EpCAM, CD63, Alix, CD9, CD44, Annexin Vが発現していたのに対し、HEK293Tでは、CD63, Alix, Annexin Vのみ発現が認められた。

3) EpiVeta シリカビーズとエクソソームの相互作用評価

HT-29エクソソームでは、ビーズ表面を取り巻くような蛍光シグナルが確認されたのに対して、HEK-293Tエクソソームではシグナルが認められなかった。すなわち、EpCAM陽性エクソソームに親和性を有するビーズを作製できたといえる。この技術を応用することで、親和性分離装置の作製が可能になると考えられる。

4. 結 論

人工ペプチドEp114よりなる、コート材EpiVetaを固体表面上に固層化することで、EpCAMを発現しているエクソソームを捕捉することに成功した。

論 文 審 査 の 要 旨

本論文は、がんマーカーである「EpCAM」に対して結合能を有する人工ペプチド「Ep114」を固体表面上へコートすることで、EpCAMを発現しているエクソソームを捕捉する新技術の開発に関する研究である。ここでは、Ep114のコート材「EpiVeta」を用いて、シリカ、およびポリスチレン表面にEp114を固相化し、次に、培養細胞上清より精製したエクソソームとこの表面との相互作用を、免疫顕微鏡観察、生化学的手法、原子間力顕微鏡観察で評価している。その結果、EpCAMを発現するエクソソームが、EpiVetaコート表面で捕捉されていることが確認されている。本研究で確立した手法をさらに発展させることにより、がん分野における新規診断法の開発へとつながると期待できる。

本審査委員会は、平成27年2月4日に行われ、まず吉田光孝大学院生から論文内容の説明がなされた。その後、各審査委員より次のような質問がなされた。すなわち、1)ペプチドをコート材として利用する理由について、2)臨床応用を想定した際の、EpiVetaの使用方法について、3)この技術の、がん分野以外への応用の可能性について、である。これらの質問に対する回答として、1)汎用性があがり、実用的となる、2)EpiVetaを担体や流路にコートすることで、親和性分離装置としての機能が期待できる、3)EpCAM以外の分子に対して、親和性を有する人工ペプチドを取得することで、他の疾患をターゲットとすることが可能となる、と概ね妥当な回答が得られた。その他、英文の表現、論文の構成、用語の統一など多くの修正すべき点が指摘され、訂正が行われた。その結果、本研究で得られた結果は、今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。