

脂質膜固定分子を用いたヒト血清中エクソソーム回収法の開発

Development of the isolation method for exosome in human serum

immobilized by biocompatible anchor for membrane

東大院工¹, 東大 CNBI², 国立がん研究所³○小林 雅¹, 加藤 啓¹, 赤木 貴則^{1,2}, 小坂 展慶³, 落谷 孝広³, 一木 隆範^{1,2}Sch of Eng.¹, CNBI², Univ of Tokyo, Nat. Cancer Center Res. Inst.³○Masashi Kobayashi¹, Kei Kato¹, Takanori Akagi^{1,2}, Nobuyoshi Kosaka³, Takahiro Ochiya³,
Takanori Ichiki^{1,2}

E-mail: masashi.kobayashi@bionano.t.u-tokyo.ac.jp

【緒言】近年、エクソソーム中に含まれる microRNA が新規血中がんマーカーとして注目されている。従来、エクソソームの回収には超遠心が用いられてきたが、煩雑で多くの処理時間を要するという問題があった。臨床応用するためには、簡易かつ迅速な回収方法の開発が求められる。我々は、精製したエクソソームを簡易かつ選択的に固定化し回収するデバイス技術を開発しており、細胞膜修飾剤 BAM (Biocompatible Anchor for cell Membrane) を用いて固相表面への吸着による高効率な回収が可能であることを確認している。今回、BAM を用いてヒト血清中からエクソソームを回収が可能か検討した。

【実験方法と結果】Fig.1 (a),(b)に Oleyl chain and poly(ethylene glycol) derivatives (BAM)/poly(ethylene glycol) (PEG)の修飾方法、およびエクソソームの回収モデルを示す。表面改質ではまず、カバーガラス（松浪ガラス，30×30×0.5 mm³）表面に APTES(aminopropyl triethoxysilane)修飾を 90℃で 1h 施した。さらに、APTES のアミノ基と BAM の N-hydroxy-succinimide(NHS)基を 37℃で 1 h 反応させ、脂質二重膜を選択的に固定可能なオレイル基を修飾した。また、非特異吸着を抑制するために、未反応のアミノ基には NHS-PEG-CH₃を 37℃で 1 h 反応させた。ヒト血清中エクソソームを BAM 修飾基板上に固定化し、AFM 観察した像を Fig.2(a)に示す。また、ヒト血清中エクソソームを膜染色し、パターンニングされた BAM 修飾基板上に固定化・蛍光観察した像を Fig.2(b)に示す。Fig.2 は、ヒト血清のような多くのタンパク質を含むサンプルでも、BAM でエクソソームを固定化できる可能性があることを示している。

【謝辞】本研究は、日本学術振興会の最先端研究開発支援プログラムにより、助成を受けたものである。

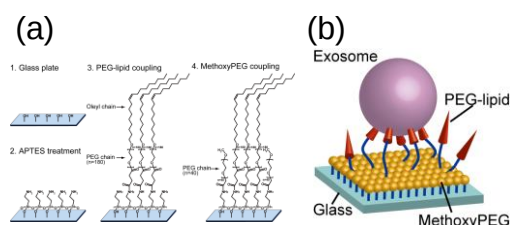


Figure 1 (a) Substrate fabrication process of BAM/PEG, (b) Immobilization model of exosomes.

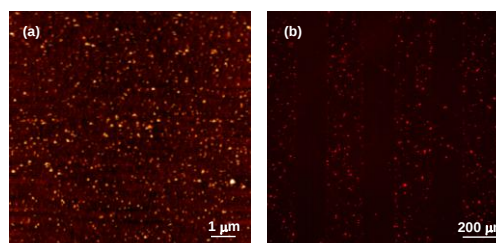


Figure 2 (a) AFM image of exosomes captured on BAM/PEG substrate, (b) Fluorescent image of exosomes stained by PKH26 on patterned BAM/PEG substrate.