

エキソソーム中 microRNA の回収方法の検討

Development of recovery method for microRNA encapsulated in exosomes

東大院工¹, 東大 CNBI²,

○小林 雅¹, 林綾子¹, 赤木 貴則^{1,2}, 一木 隆範^{1,2}

School of Engineering¹, Center for NanoBio Integration², University of Tokyo

○Masashi Kobayashi¹, Ayako Hayashi¹, Takanori Akagi^{1,2}, Takanori Ichiki^{1,2}

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

【緒言】 近年、新規疾病診断バイオマーカーとしてエキソソームおよびそれに内包されるマイクロ RNA(miRNA)が注目を集めている。従来、エキソソームの回収には超遠心法が用いられてきたが、より迅速かつ簡易な回収を目指し、我々は PEG 脂質誘導体修飾基板による固層精製法および、蛍光標識による固定化されたエキソソーム量の評価法を開発してきた[1]。本研究は、体液に含まれるエキソソーム中の miRNA 精製を目的としている。今回、修飾基板上に固定化されたエキソソームを破碎し、更にエキソソーム中の miRNA を回収することを試みた。

【実験方法】 まず、ガラスに APTES を修飾し、APTES のアミノ基と PEG 脂質の NHS 基を反応させ、脂質二重膜を選択的に固定するオレイル基を修飾した。更に、非特異吸着を抑制するために、NHS-PEG-OCH₃ を反応させた。miRNA143 を過剰発現するよう改変した HEK293 細胞の培養上清から超遠心で回収したエキソソームを、修飾基板上に固定化させた。ヒト anti-CD9 抗体(マウス)、量子ドット修飾 anti-Mouse IgG 抗体を反応させ蛍光標識し、エタノールとグアニジンイソシアネートで構成される破碎液を加えた後に蛍光観察した。また、破碎後のサンプルを回収しリアルタイム PCR にかけることで、回収した miRNA 量を定量した。

【結果と考察】 Fig.1 に示すように、破碎液を加えると蛍光強度が徐々に減少することが観察され、これはエキソソームが破碎液によって破碎されていることを示していると考えられる。また、破碎時間を長くすることで、回収される miRNA 量が増加されることを PCR により確認した (Fig.2)。以上の結果は、PEG 脂質誘導体修飾基板上に固定化されたエキソソームが、破碎液によって破碎され、エキソソーム中の miRNA を回収可能であることを示していると考えられる。

【参考文献】 1. 小林ら、第 74 回秋季応用物理学会学術講演会, 17a-C4-10 (2013)

【謝辞】 本研究は、日本学術振興会を通じて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。

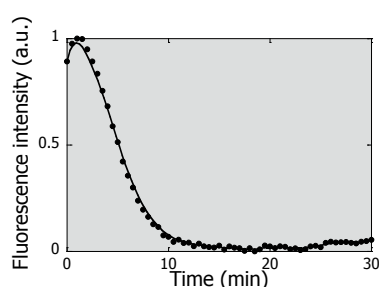


Figure 1 蛍光標識されたエキソソームの破碎時間と蛍光強度の関係

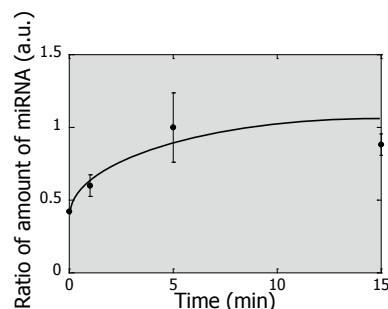


Figure 2 エキソソームの破碎時間と microRNA 回収量の関係