

## 小型細胞外小胞(sEV)の定量法開発における sEV粒子の個数濃度計測

キーワード：sEV、extracellular vesicles、Exosome、細胞外小胞、エクソソーム、エクソソームマーカー

小型細胞外小胞(small Extracellular Vesicles : sEV)は、エクソソームといった、細胞から放出される核を持たない脂質二重膜で囲まれた粒子で、生物活性代謝産物を含み、細胞間の情報伝達の機能を担っています。sEVは体内の生物学的・病理的な機能を調節し、循環するsEV量は特定の疾患の進行と相関があることが報告されています。そのためsEVの産生を制御できる低分子化合物は、sEVの機能解明や新たな治療薬として期待されています。これまでsEVの定量には超遠心やクロマトグラフィーといった時間のかかる精製工程が必要であり、迅速かつ高感度なsEVの定量法が望まれています。本アプリケーションノートでは、sEVの定量法の開発におけるsEV粒子の個数濃度計測にナノ粒子径分布・濃度測定装置が用いられた事例を紹介するとともに、sEVの産生を制御できる低分子化合物をスクリーニングした結果を示します。

マウスメラノーマ細胞 B16BL6 に Gaussia luciferase (gLuc) レポータータンパク質\*と sEV マーカー (CD63) 発現遺伝子をトランスフェクションし、マーカータンパク質である CD63 に結合した gLuc タンパク質を用いて sEV 膜内を標識しました。B16BL6-CD63-gLuc 細胞培養液を遠心し、ナノ粒子径分布・濃度測定装置 ViewSizer 3000 を用いて、上清から分離した sEV の粒子数濃度を計測し、ルシフェラーゼ (gLuc) 活性の定量を行いました。その結果、gLuc 活性と sEV 粒子数の間には、正の相関があり (図1)、gLuc 活性データは、sEV 定量のための推定値として使用できることが実証されました。さらに、B16BL6 細胞株とトランスフェクションした B16BL6-CD63-gLuc 細胞株間において、上清に分泌された sEV 数に有意差は認められないことが ViewSizer 3000 を用いた粒子数計測から確認されました (図2)。

\*生体発光反応するガウシアルシフェラーゼ (タンパク質)

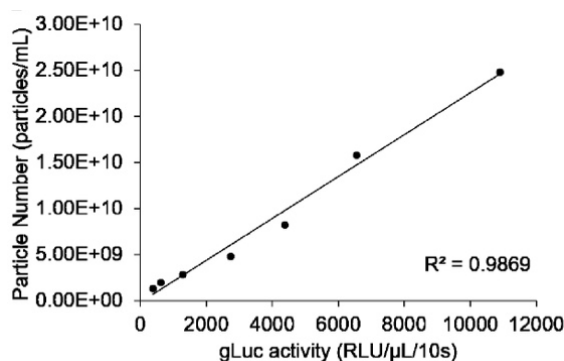


図1. gLuc活性と粒子数の相関

粒子数計測には、培養液を300 x g 10分、2000 x g 20分の順に遠心分離、バッファーを用いて1/20, 1/4, 1/8, 1/160, 1/320, 1/1640, 1/1280 比で希釈したものを使用

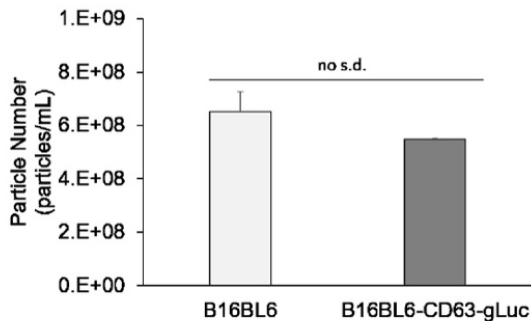


図2. B16BL6細胞株とB16BL6-CD63-gLuc細胞株における上清のsEV数の比較

このことから、今回開発されたCD63-gLuc融合タンパク質を用いた定量方法は、最小限の前処理（2000 x g、20分）で、高感度でハイスループットにsEVを定量する方法として有効な手法であることが確認されました。

今回新たに開発されたGaussia Luciferase(gLuc)レポータータンパク質とsEVマーカーの融合タンパク質を用いた迅速かつ高度なsEV定量法を用いて、合計480種類におよぶ低分子化合物のスクリーニングを行ったところ、2つの新規化合物(KPYC08425と

KPYC12163)が、細胞毒性を最小限に抑えながらsEVの産生に有意な差が確認されています。候補化合物のsEV産生に対する効果を確認するため、候補化合物を添加し細胞培養を行った培地から超遠心分離によりsEVを分離し、sEVタンパク質産生量の評価をブラッドフォード法により行いました。

その結果、KPYP08425の添加で、コントロール(DMSO)と比較してsEVタンパク質量が1.5倍増加（図3a）し、KPYP12163の添加で、約70%減少することが確認できました（図3b）。なお、新規化合物を添加した培地で培養した細胞から得られたsEVは約100nmの丸い2層構造で、形態とサイズが従来のsEVと一致していることがTEM観察により確認されています。

同定された2つのsEVの産生量を調整する化合物は、今後、sEVの機能解明やsEVを用いた治療に貢献する手法になると期待されます。

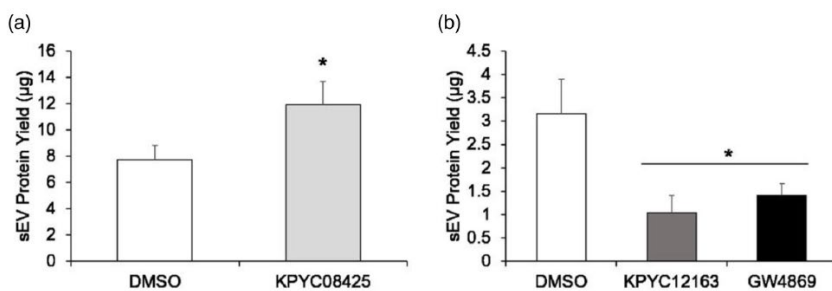


図3. 2つの新規化合物(KPYP08425とKPYP12163)のsEV産生量への影響 (GW4869は、sEVの生産と輸送を阻害する働きを持つ阻害剤)

## まとめ

エクソソームなどの定量法開発において、ViewSizer3000を用いたsEVの個数濃度の結果からgLuc活性データがsEV定量の推定値として使用できることが実証されました。ViewSizer3000はキュベットセル方式を採用しているため、試料の取り扱いや洗浄も容易です。

参考文献 : Yamamoto, A., Takahashi, Y., Inuki, S., Nakagawa, S., Nakao, K., Ohno, H., Doi, M., & Takakura, Y. (2022). The Identification of novel small extracellular vesicle (sEV) production modulators using luciferase-based sEV quantification method. *Journal of Extracellular Biology*, **1**(9), e62. & Supplementary Information

## ナノ粒子径分布・濃度測定装置 ViewSizer 3000

3波長光源とカラーCCDを搭載。ブラウン運動のイメージング解析による粒子径・個数濃度測定が可能です。測定はキュベットセル方式で、セル内に攪拌機構を備えており、高再現性を実現します。

粒子濃度 :  $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^8$  particles/mL

測定粒子径 : 10 nm ~ 15  $\mu$ m (直径)



## 分析のお問い合わせ

- リンク先のフォームにご記入の上、お問い合わせください。

<https://www.horiba.com/jpn/service/solution/contract-analysis/service-support-request/>



Analytical Solution Plaza

HORIBAグループは、10の国と地域に分析センターを17拠点展開しています。日本では、東京と京都に分析を主要な業務とする“Analytical Solution Plaza”を設置しています。

## 株式会社 堀場製作所

〒601-8510 京都市南区吉祥院宮の東町2番地 075-313-8121  
<http://www.horiba.co.jp>

## 株式会社堀場テクノサービス

本社/京都S.S. 〒601-8305 京都市南区吉祥院宮の東町2番地 075-313-8125

Application Note ADS-1080