

Centrifuge CS-(F)NX シリーズを使用した 血液からのエクソソーム採取

Aya Shoda¹, Shuichi Kani², Pascal Rowart³, Jan Hanhart⁴

¹ Theoria Science, Inc., Tokyo, Japan; ² Eppendorf Himac Technologies, Tokyo, Japan; ³ Eppendorf Application Technologies S.A., Namur, Belgium;

⁴ Eppendorf SE, Hamburg, Germany

はじめに

エクソソームは脂質二重層に囲まれた膜小胞として細胞から体液中に分泌され、体全体を循環します。エクソソームは小胞内にタンパク質、核酸、脂質、代謝物を含んでおり、細胞間コミュニケーション媒体 [1] として機能することが分かっています。最近、細胞内の異常を反映するバイオマーカーが、それらの細胞から分泌されたエクソソーム内に発見され、診断マーカー [2] として注目されています。エクソソームは体液（血液、尿、唾液など）中に存在するため、リキッドバイオプシーとして注目されています。リキッドバイオプシーは、病変部位の直接サンプル採取を必要とせず（低侵襲性）、患者への負担が少ない検査方法です [3] [4]。エクソソームの精製には、スイングバケットローターを使用した超遠心分離が推奨されます。エクソソームは遠心管の底に沈殿物として集められるため、効率的に回収することができます。ただし、スイングバケットローターでは一度に多くのサンプルを処理することはできません。

このショートプロトコルでは、1.5 mL マイクロチューブ用のアングルローターを使用してエクソソームの収集および精製をしました。1.5 mL マイクロチューブ (C) は底が円錐状になっており、サンプル量が少ない場合でも沈殿物が底の一点に集まりやすくなります。アングルローターは、スイングバケットローターよりも短時間で複数のサンプルを一度に分離できます。



図 1 : Rotor S55A2 と Centrifuge CS150NX、Centrifuge CS150FNX

材料と方法

使用した材料

1.5 mL マイクロチューブ (C)、Rotor S55A2 と Centrifuge CS150NX または Centrifuge CS150FNX を使用しました (図 1)。Rotor S55A2 の最高回転速度は 55,000 rpm (201,000 $\times g$) です。12 本のチューブを同時に遠心分離できます。1.5 mL

マイクロチューブ (C) は少量のサンプルを処理するのに適しており、特に 1.5 mL マイクロチューブ (C) は、指定された最大容量より少ない量や、空でも使用できます。そのため、ここで紹介するワークフローは、さらに少量のサンプル量でも実現可能です。

ヒト血清精製プロセス

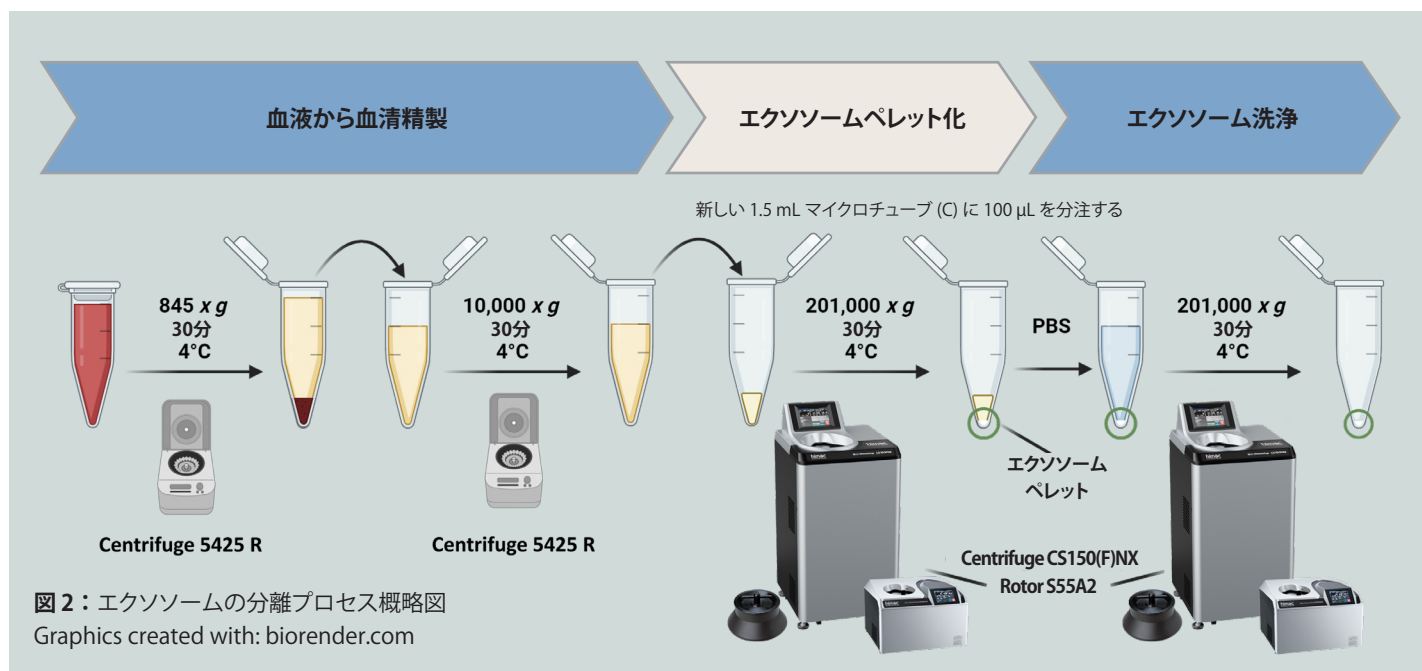
約 1 mL のヒト血液を採取し、Centrifuge 5425 R (Rotor FA-24x2 を装着) にセットした 1.5 mL マイクロチューブ (Eppendorf Tubes 3810X) 内で 3,000 rpm (845 $\times g$)、約 30 分間遠心分離しました (図 2)。血清上清は、新しいチューブに移しました。

次に、その血清を 4°C で 20 ~ 30 分間、10,319 rpm (10,000 $\times g$) で遠心分離し、細胞残骸を除去しました。上清を再び新しいチューブに移しました。

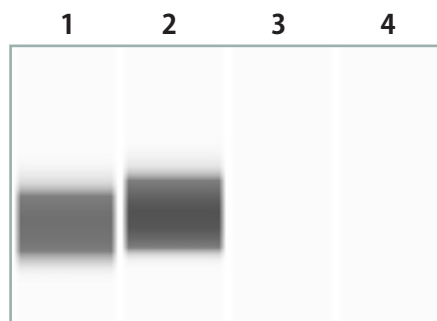
エクソソームの分離プロセス

1.5 mL マイクロチューブ (C) を Rotor S55A2 に装填し、Centrifuge CS150NX または Centrifuge CS150FNX にセットし、4°C で 20 ~ 30 分間、55,000 rpm (201,000 $\times g$) で遠心分離しました。上清を除去し、ペレットを 1 mL の PBS に再懸濁させました。次に、1.5 mL マイクロチューブ (C) を Rotor S55A2 にセッ

トし、4°C で 55,000 rpm (201,000 $\times g$) で 20 ~ 30 分間遠心分離しました。上清を除去し、ペレットを 50 ~ 100 μ L の PBS に再懸濁させました。



がん特異的抗体



エクソソーム特異的抗体

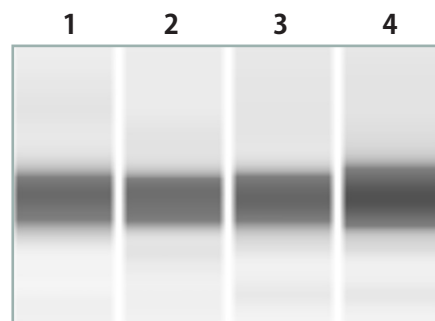


図 3：ウェスタンブロッティングの結果

ウェスタンブロッティングにより検出されたエクソソーム上のがんマーカーの発現。がんマーカーはがん陽性検体でのみ検出されました。レーン 1 と 2 には陽性検体が含まれています。レーン 3 と 4 には陰性検体が含まれています。

ウェスタンブロッティングにより検出されたがんマーカー（左パネル）とエクソソーム表面マーカー（右パネル）。全自動ウェスタンブロッティングは Simple Western（ProteinSimple 社製、米国）上で実行しました。

まとめ

このショートプロトコルでは、Centrifuge CS150NX または Centrifuge CS150FNX と Rotor S55A2 を使用して、ヒト血清からエクソソームを分離し、ウェスタンブロッティングによってエクソソームマーカーとがんマーカーを検出しました（図 3）。超遠心分離法は、エクソソームの分離に最も広く使用されている手段のひとつです。スイングバケットローターを使用した超遠心分離の分離条件は多くの論文で紹介されていますが、少量のサンプルの場合、必ずしも最適であるとは限りません。

謝辞

このショートプロトコルは、Theoria Science, Inc.（テオリアサイエンス株式会社）の正田 彩博士の支援を受けて作成されました。Theoria Science Inc. は、エクソソーム研究の第一人者である東京医科大学の落谷 孝広博士らの研究成果をもとに、

円錐状の底と任意の容量を備えた 1.5 mL マイクロチューブ (C) は、少量のエクソソームをペレット化するのに最適です。Rotor S55A2 と組み合わせると、12 本のチューブを同時に遠心分離できるためハイスループットが要求される臨床検査に適したロータだと考えられます。

2012 年 5 月 17 日に設立されました。同社はエクソソームを標的としたがんの早期発見のための検査技術や創薬の研究開発を推進することを目的としています。

参考文献

[1] Gould SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles.J Extracell Vesicles.2013 Feb 15;2. doi:10.3402/jev.v2i0.20389.

[2] Naito Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ochiya T. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles.Cell Mol Life Sci.2017 Feb;74(4):697-713. doi:10.1007/s00018-016-2346-3.

[3] Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA.Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine.Proc Natl Acad Sci U S A.2004 Sep 7;101(36):13368-73. doi:10.1073/pnas.0403453101.

[4] Fujita Y, Yoshioka Y, OchiyaT.Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components.Cancer Sci.2016 Apr;107(4):385-90. doi:10.1111/cas.12896.

注文情報

注文情報

製品	メーカー	注文番号
Centrifuge CS150NX	Eppendorf	5720 131 511
Centrifuge CS150FNX	Eppendorf	5720 121 511
Rotor S55A2	Eppendorf	5720 221 011
1.5 mL マイクロチューブ (C)	Eppendorf	5720 411 009
Centrifuge 5425 R	Eppendorf	5405 000 364
Rotor FA-24x2	Eppendorf	5495 500 006
エッペンドルフチューブ 3810 X (1.5mL)	Eppendorf	0030 125 150

Your local distributor: www.eppendorf.com/contact
Eppendorf SE · Barkhausenweg 1 · 22339 Hamburg · Germany
eppendorf@eppendorf.com · www.eppendorf.com

www.eppendorf.com

Methods are intended for molecular research applications. They are not intended, verified or validated, for use in the diagnosis of disease or other human health conditions. Eppendorf SE reserves the right to modify its products and services at any time. This Short Protocol is subject to change without notice. Although prepared to ensure accuracy, Eppendorf SE assumes no liability for errors, or for any damages resulting from the application or use of this information. Viewing this Short Protocol alone cannot as such provide for or replace reading and respecting the current version of the operating manual.

Eppendorf® and the Eppendorf Brand Design are registered trademarks of Eppendorf SE, Germany. Eppendorf SE reserves the right to modify its products and services at any time. This short protocol is subject to change without notice. Although prepared to ensure accuracy, Eppendorf SE assumes no liability for errors, or for any damages resulting from the application or use of this information. Viewing application notes alone cannot as such provide for or replace reading and respecting the current version of the operating manual.

All rights reserved, including graphics and images. Copyright © 2024 by Eppendorf SE, Hamburg, Germany.