

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 高純度エクソソーム精製法による新規腫瘍マーカーの同定
2. 研究開発代表者： 氏名 華山力成（金沢大学医薬保健研究域医学系）
3. 研究開発の成果

### ・人の血液・尿からエクソソーム精製を行い、精製条件を確立

前年度にヒト白血病細胞株を用いた培養細胞系で、Tim4-Fc 磁気ビーズによるエクソソーム精製法の条件検討と改良を行い、従来の方法（超遠心法や PEG 沈殿法）に比べ、圧倒的に高純度のエクソソームが精製できることを示した（純度：超遠心法 11%、PEG 沈殿法 5%、Tim4 法 83%）。この成果を元に平成 26 年 12 月 5 日に特許出願を行った（特願 2014-246876 発明者 華山力成）。本年は、Tim4-Fc 磁気ビーズを用いて実際に生体試料からのエクソソームの高純度精製が可能であるかを検討する為、人の血液・尿からエクソソームの精製を行い、精製条件の最適化を行った。まず、健常人の血液及び尿を採取し、段階希釈して Tim4-Fc 磁気ビーズを用いてエクソソームを精製したところ、希釈により精製効率が著しく減少することが明らかとなった。一方、希釈せずにそのまま直接精製を行ったところ、超遠心法や PEG 沈殿法に比べ遜色のない量のエクソソームが精製された。一方、NanoSight を用いたナノ粒子解析によりエクソソームの直径を調べたところ、Tim4-Fc 法で精製したエクソソームは、他の方法で精製したエクソソームに比べ 70-80%程直径が少なく、高純度のエクソソームが精製できていることが確認できた（不純物の混入により直径が大きくなることが知られている）。以上の成果により、平成 27 年 12 月より、和光純薬工業株式会社から「MagCapture Exosome Isolation Kit PS」という商品名で、本技術をまず日本国内で販売を開始した。今後、アメリカ・ヨーロッパでも発売する予定である。

### ・1細胞からのエクソソーム捕捉法の開発

生体内で少量しか存在しない癌細胞由来エクソソームは、多量にある健常細胞由来のエクソソームに隠れてしまう為、高感度の早期診断が困難である。そこで、大阪大学大学院工学研究科の民谷栄一教授との共同で、1細胞を捕捉できるマイクロ流体チップを開発した。このチップに細胞を流し込み、実際に1細胞ずつ捕捉されていることを確認した。このチップに予め Tim4-Fc を固定化しておいたところ、1細胞から放出されたエクソソームを捕らえることができた。

### ・フローサイトメトリーを用いたエクソソームの腫瘍マーカー検出法を開発

Tim4-Fc 磁気ビーズで捕捉したエクソソームを CD63 に対するモノクローナル抗体で染色し、フローサイトメトリーで定量したところ、CD63 抗体で捕捉したエクソソームに比べ、3 倍程、感度が良いことが判明した。今後臨床検査の現場で、エクソソーム上のバイオマーカーを簡単に検出する技術として期待される。

### 4. その他

特に無し。