

細胞外小胞のフィルタリングにおける変性可能性の検討

Study of the possibility of degeneration in extracellular vesicle filtering

東京大学¹, ナノ医療イノベーションセンター²○樋田健斗, 溝井千春¹, 瀬尾尚宏¹, 一木隆範^{1,2}The University of Tokyo¹, Innovation Center of NanoMedicine(iCONM)²○Kento Toyoda¹, Chiharu Mizoi¹, Naohiro Seo¹, Takanori Ichiki^{1,2}

E-Mail: toyoda@bionano.t.u-tokyo.ac.jp

【緒言】エクソソームは、脂質二重膜構造を持つ細胞外小胞 (EV) と呼ばれる生体内粒子の一種であり、50~150 nm 程度の大きさを持つ不均質な集団である。細胞間の情報伝達を担うことが知られており、診断ツールやエクソソーム製剤などの医用材料としての利用が期待されている [1]。EV の分離精製法としては、超遠心分離法、サイズ排除クロマトグラフィー、免疫沈降法など、さまざまな手法が報告されている [2]。しかし、これらの工程に起因して粒子の形態や性状が変化する可能性が指摘されている。そこで本研究では、フィルター内における EV の変性について、定量的に評価することを試みた。

【実験方法】フィルターにはエクソソームを 30 分以内という短時間で抽出できる陰イオン交換膜 (CATAROSEV[®] 東洋紡) を用いた。直径 2.5 cm、孔径が約 400 nm であるフィルターを専用のアタッチメントにセットし、DPSC (ヒト歯髄幹細胞) 培養上清 10 mL をシリンジからフィルターを通過させた。洗浄液とサンプル粒子の溶媒は 0.1 M NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) であり、エクソソームと別の EV の集団であるマイクロベシクルをそれぞれ 0.3 M、0.8 M で抽出した。粒子の測定はナノ粒子トラッキング解析 (NTA) 法を用いた Ex400 [3] で解析する。この装置ではマイクロ流路チップに試料をセットし、シートレーザーを照射し粒子の散乱光を暗視野観察し記録する (Fig.1)。ブラウン運動と電気泳動の軌跡を解析し、1 粒子ごとの粒径とゼータ電位の値をそれぞれストークス・アインシュタインの式、スモルコフスキーの式から算出する。

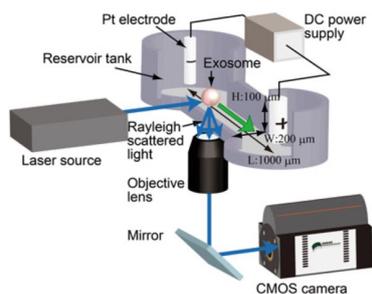


Fig1. Overview of the optical system of Ex400 [3]

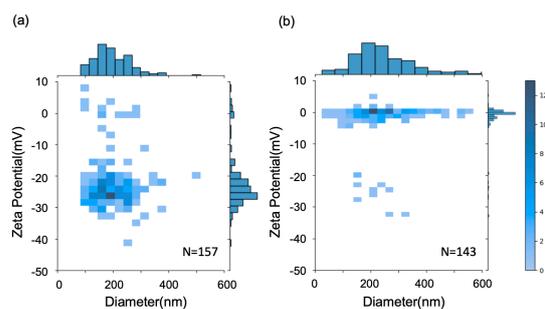


Fig2. Relationship between particle size and zeta potential of solution extracted with (a) 0.3 M and (b) 0.8 M

【実験結果】それぞれ約 150 μ L/sec の速度で抽出した溶液について Ex400 により粒径とゼータ電位を測定した (Fig.1 (a), (b))。横軸が粒径、縦軸がゼータ電位を示し、濃淡はそのエリアに含まれる粒子数を示している。この条件では (a) のエクソソームは回収できたが、より低いゼータ電位であるマイクロベシクルのゼータ電位が 0 に近い値となった。これはフィルターを通過する際に、エクソソームと比較して大きい粒子であるマイクロベシクルがフィルターを通過する際に損傷・変性している可能性があると考えられる。

【結言】陰イオン交換膜を用いた EV の回収では、エクソソームを高効率で回収できた一方で、マイクロベシクルが損傷している可能性が示唆された。今後は、より正確な孔径と孔密度を持つトラックエッチドメンブレンを使用し、フィルターの孔径と EV の粒径の関係を詳しく検討する。また、フィルター内での EV の変性挙動を評価し、変性前後における機能の違いを明らかにする。

【参考文献】

- [1] L. Barile, et al. *Pharmacol. & therapeutics* 174 (2017): 63-78.
- [2] Chen, Jiacy, et al. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 9 (2022): 811971.
- [3] Takanori Akagi, and Takanori Ichiki. *Extracellular vesicles: methods and protocols* (2017): 209-217.