

高吸水ポリマーゲルを利用した 超高回収・精製度エクソソーム抽出方法

徳島大学 大学院医歯薬学研究部 生体機能解析学
准教授 富永 辰也

2021年8月17日

研究の背景：慢性腎臓病(CKD)患者とその予備群

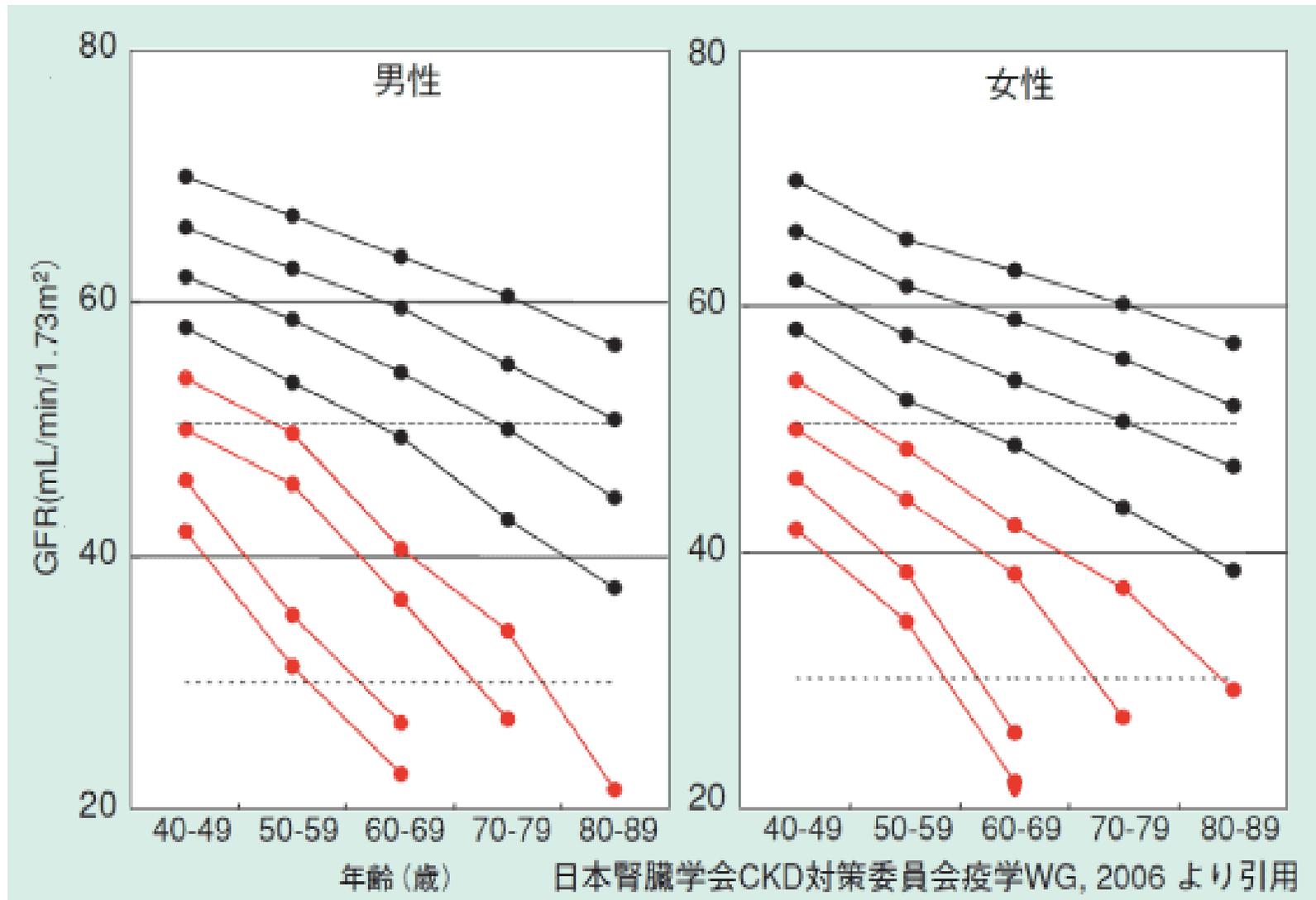
GFR ステージ	GFR (mL/分/1.73 m ²)	微量アルブミン尿 2-20 mg/dL	
		尿蛋白 -~±	試験紙1+が30 mg/dL相当 尿蛋白 1+以上
G1	≥90	2,803 万人	61 万人 (0.6%)
G2	60~89	6,187 万人	171 万人 (1.7%)
G3a	45~59	886 万人 (8.6%)	58 万人 (0.6%)
G3b	30~44	106 万人 (1.0%)	24 万人 (0.2%)
G4	15~29	10 万人 (0.1%)	9 万人 (0.1%)
G5	<15	1 万人 (0.01%)	4 万人 (0.03%)

CKDに相当：治療を要するレベル



- ・G4以上のステージでは尿毒症などの明確な病状が現れ、透析患者も多い。
- ・慢性透析患者は国内で34万人以上。
- ・CKD患者は国内だけで1300万人、予備軍を含むと7000万人

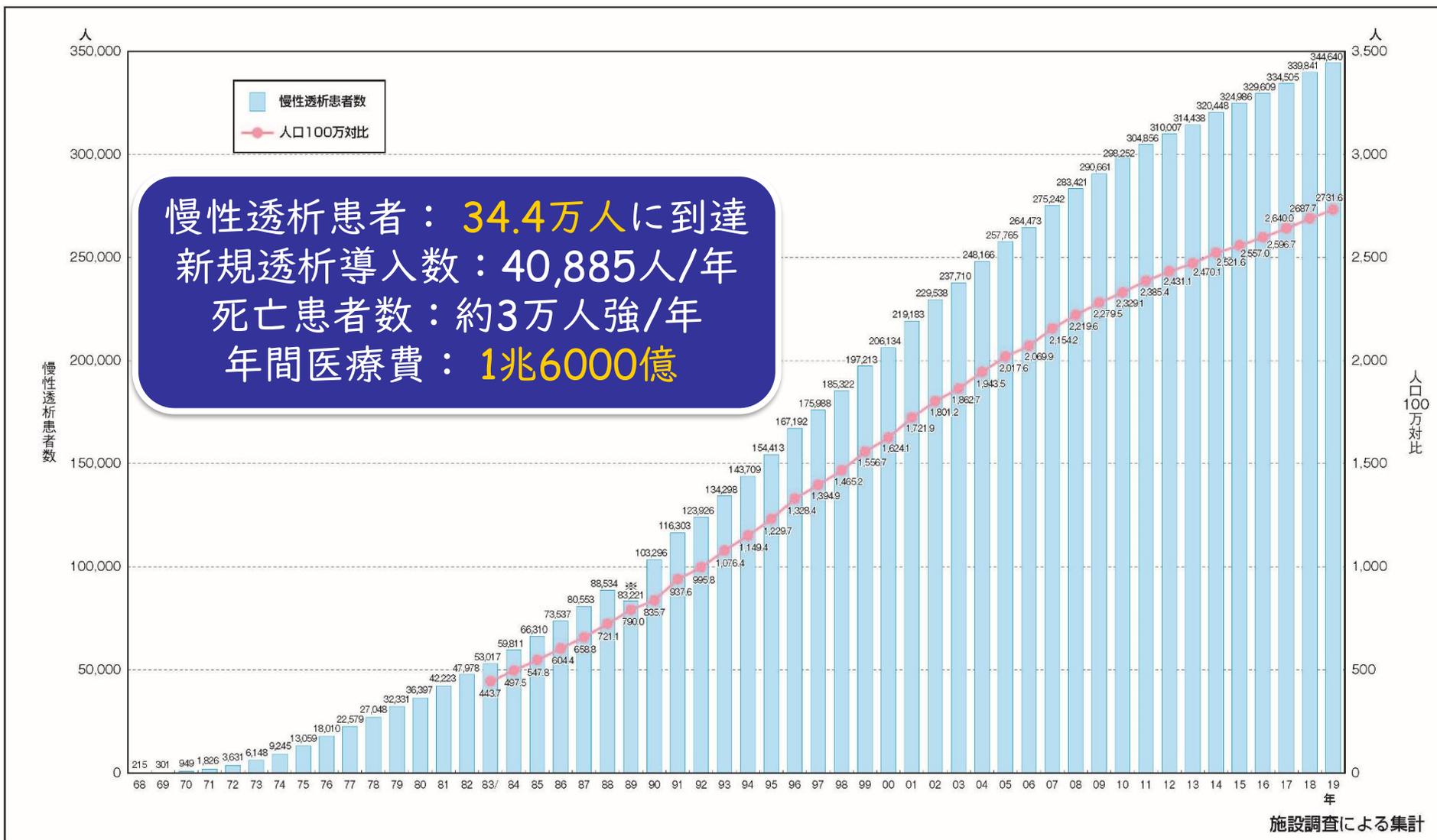
健康であっても加齢に伴い腎機能は低下する



- ・腎機能低下は年齢とともに着実に進行する
- ・CKDの早期診断と早期介入が必要

透析患者増加を止める為に新たな診断方法が必要

(1) 慢性透析患者数（1968-2019年）と有病率（人口100万対比，1983-2019年）の推移（図1）



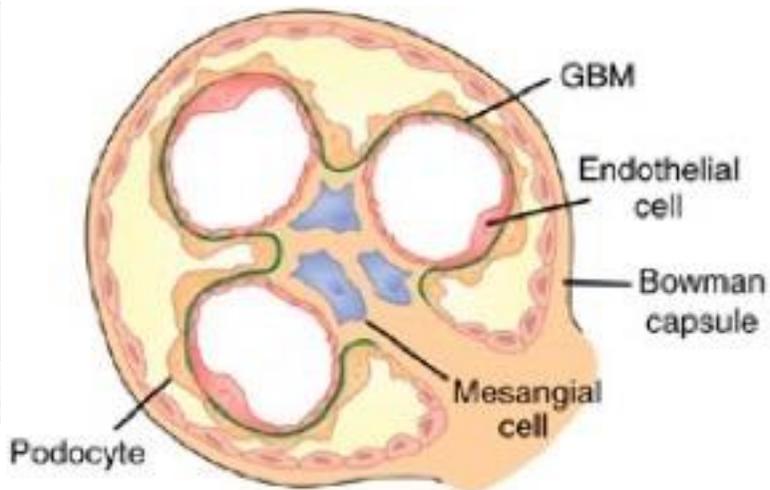
『一般社団法人日本透析医学会「わが国の慢性透析療法の現況（2019年12月31日現在）」』

腎疾患の確定診断には侵襲性が高い腎生検を要する

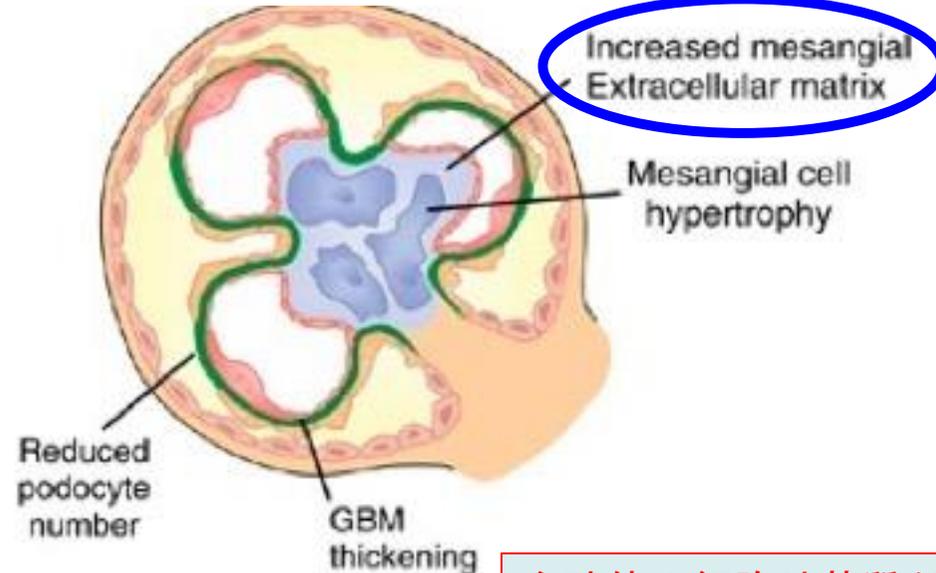


(Courtesy of Waykin Napanitaya, Ph.D.)
©2004-2010 "Way" Ltd. All rights reserved.

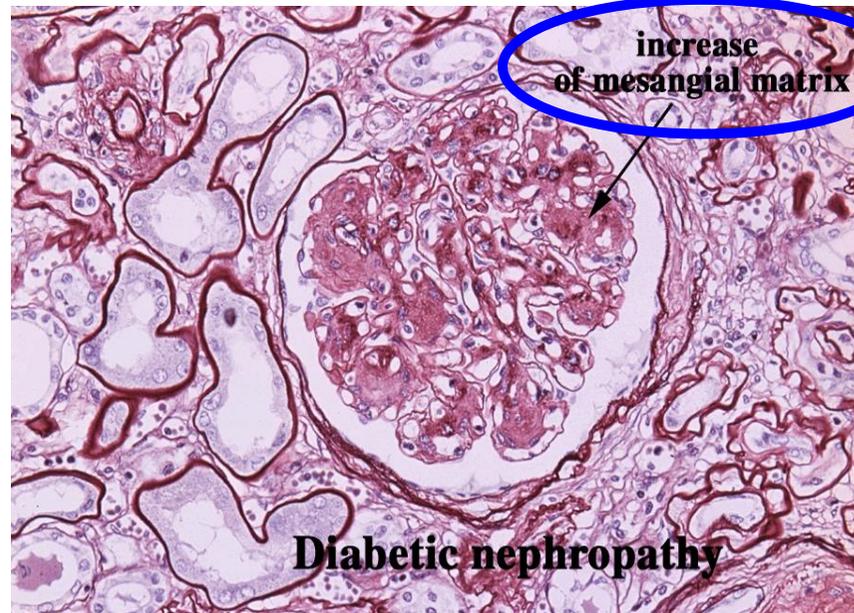
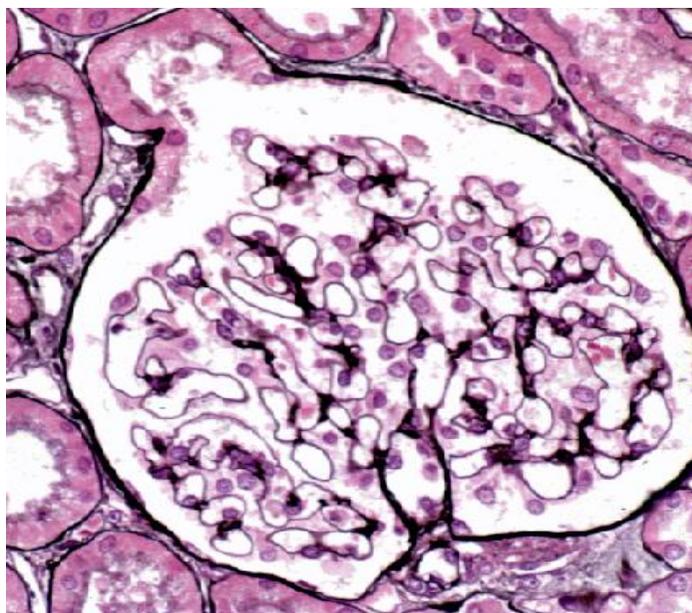
正常



糖尿病性腎症



糸球体の細胞外基質が増生

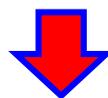


研究課題：透析のない社会を目指して

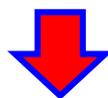
CKD診断技術の開発を行っている

【CKDが蔓延している根源的な理由】

1. 特異的な診断法がない
2. 診断基準に一致しない病態がある
3. 治療薬がない
4. 予防法が確立していない
5. 多くの人がこの問題に気付いていない



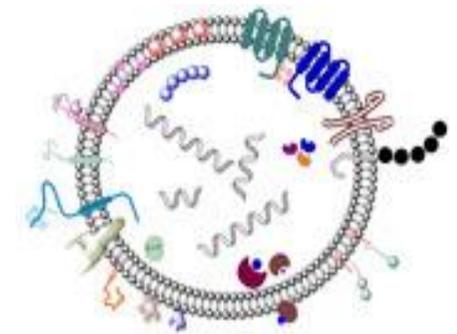
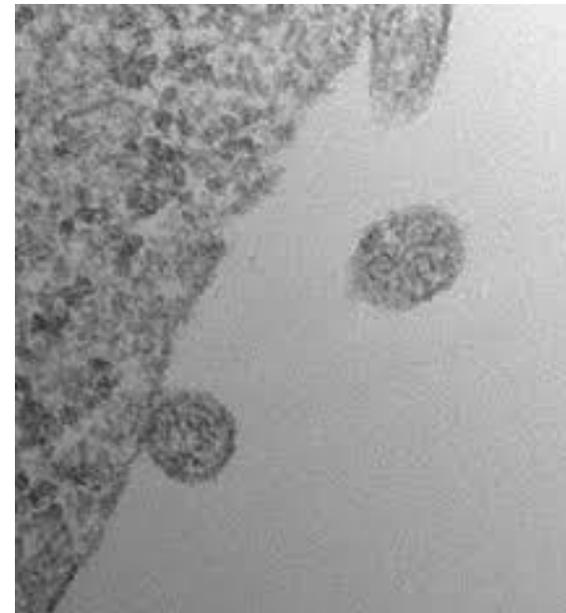
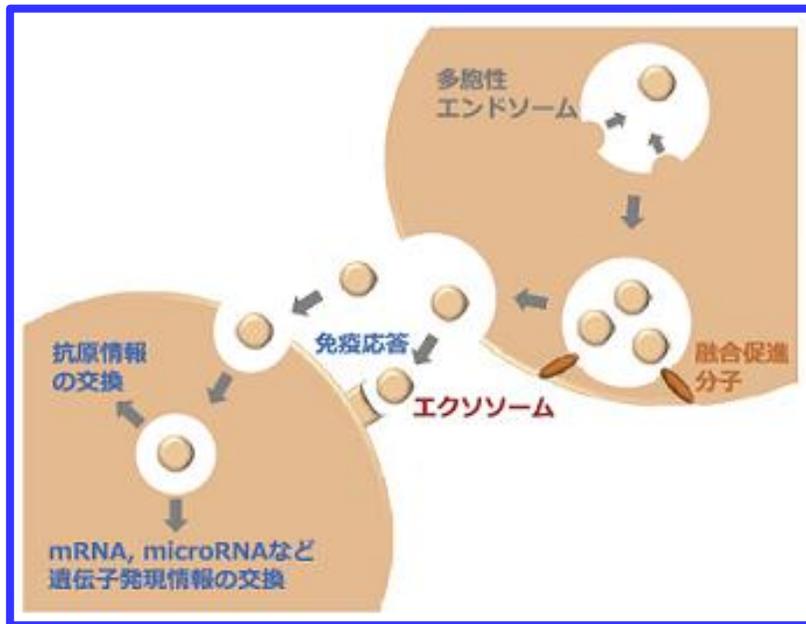
- 生細胞から分泌されるエクソソームに着目
- 内包タンパク質や核酸の評価が、病態反映に繋がる



尿中エクソソームを利用したCKD診断のリキッドバイオプシー開発に着手

近年注目を集めるエクソソーム

- ・エクソソームは、生細胞から放出される直径30-150nmの微小粒体(下図)
- ・内容物の機能は未知な部分が多い
- ・内容成分は元の細胞の内部情報(miRNA, mRNAやタンパク質)を含む
- ・あらゆる組織や体液に存在し、膜貫通型および糖脂質結合型として細胞間移送される
- ・細胞間の情報伝達に使われている(細胞間コミュニケーションツール)



- ・エクソソーム研究は現代の細胞生物学の最もホットな研究領域である。
- ・価値ある新規バイオマーカーが含まれている可能性があり、注目されている。
- ・病態診断、予後予測、治療効果の評価に役立つことが期待されている。

実績：尿エクソソーム中から 糸球体特異的分子「WT-1」の単離成功

ORIGINAL

Urinary Exosomal mRNA of WT1 as Diagnostic and Prognostic Biomarker for Diabetic Nephropathy

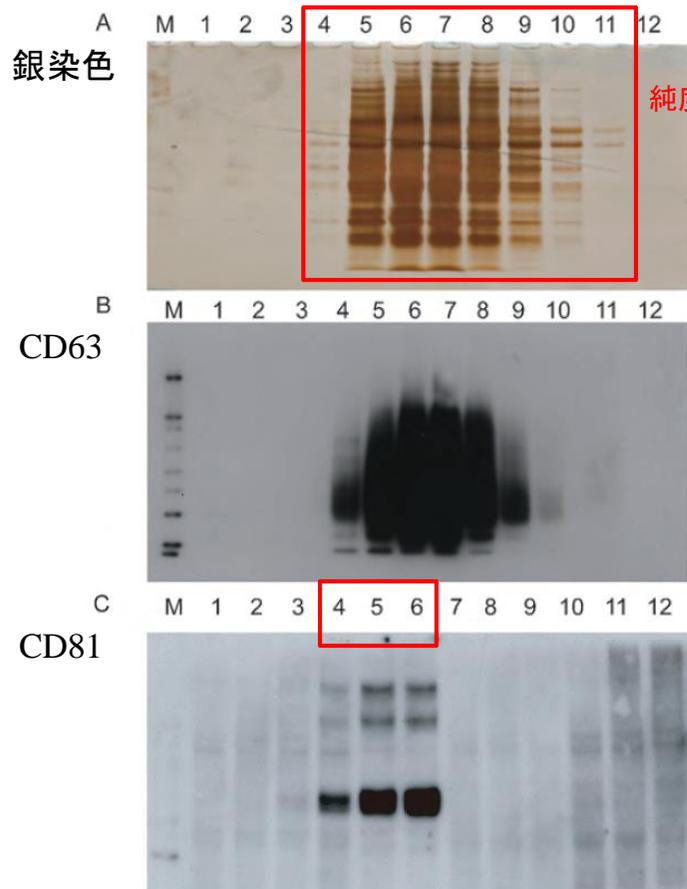
Hideharu Abe*, Akiko Sakurai*, Hiroyuki Ono, Sanae Hayashi, Sakiya Yoshimoto, Arisa Ochi, Sayo Ueda, Kenji Nishimura, Eriko Shibata, Masanori Tamaki, Fumi Kishi, Seiji Kishi, Taichi Murakami, Kojiro Nagai, and Toshio Doi

Department of Nephrology, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School, Tokushima, Japan

尿の超遠心分離精製フラクション

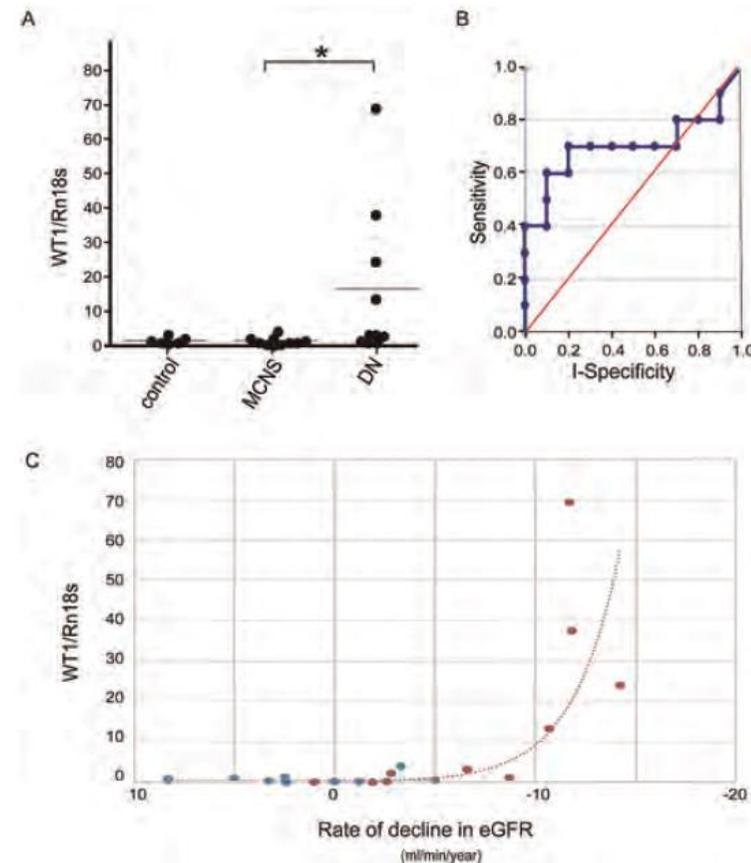
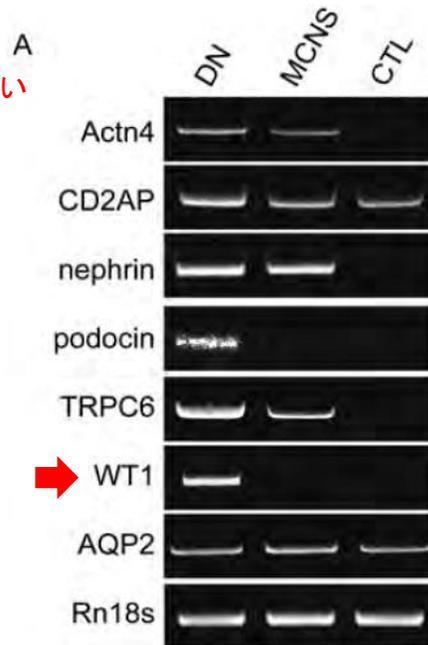
糖尿病腎症でWT1を検出

エクソソームWT1mRNAは
糖尿病腎症の予後マーカーとなる



純度が低い

← No.5,6がエクソソーム含有高い



従来技術の問題点

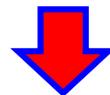
エクソソームの適切な分離技術が存在しない!!

現状のエクソソーム分離法

- ・超遠心分離精製法(ゴールドスタンダード)
- ・アフィニティ法(エクソソーム表面マーカを用いる)
- ・サイズ排除クロマトグラフィー
- ・フィルトレーション
- ・沈降法(ポリマーなど)

問題点

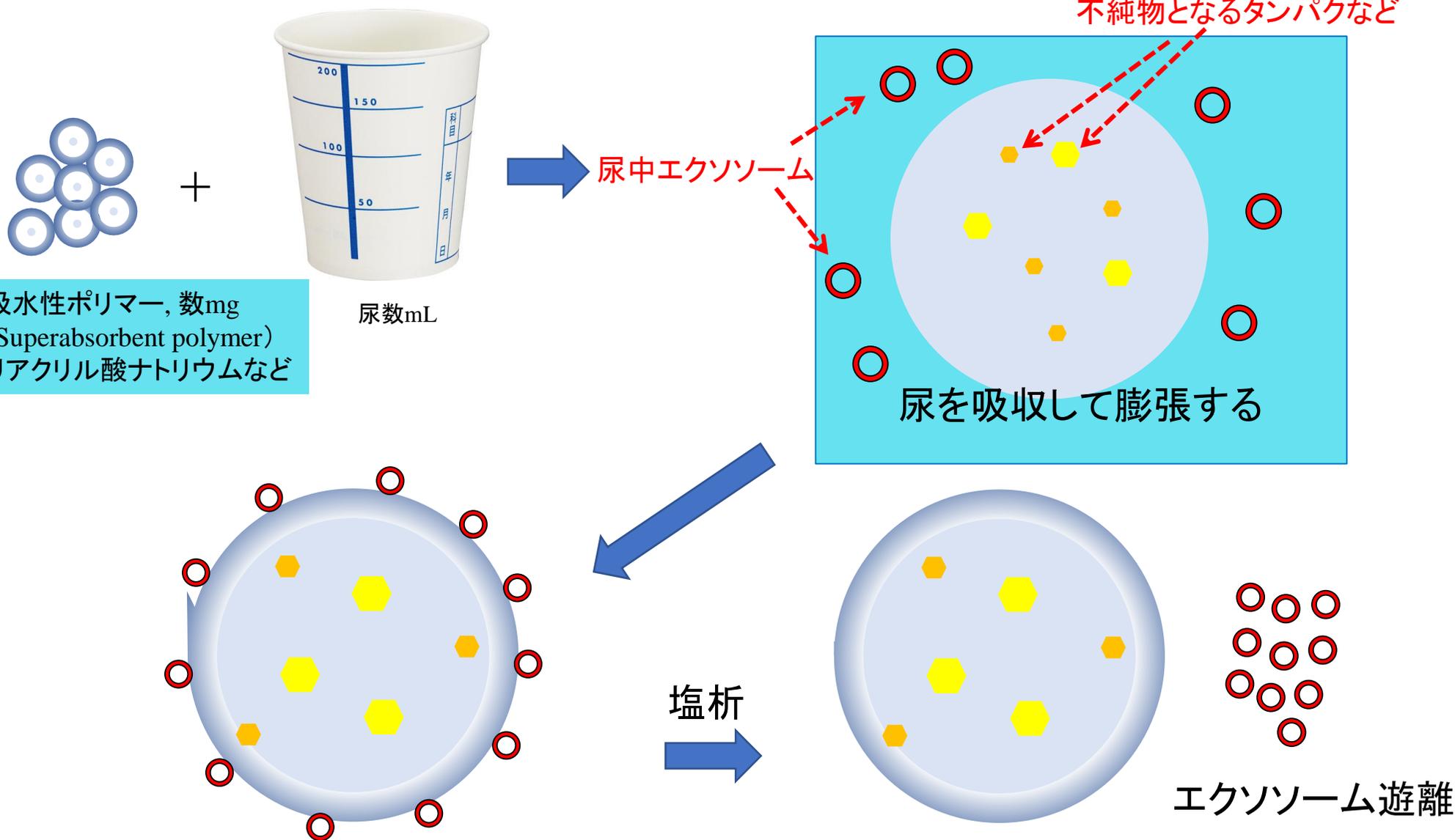
- ・血漿タンパク、尿細管由来タンパク等の夾雑物との分離が難しい
- ・得られるエクソソームが低純度、回収量が少ない
- ・比較的多量の検体を要し、少量の検体からの分離が難しい
- ・操作が煩雑、かつ時間がかかる
- ・大型機器を要する(遠心機)
- ・精製法の違いで得られるデータに差異が出やすい



- ・臨床応用、工業化するためには、高純度・多量精製できる方法が必要
- ・迅速・簡便で特異性の高い分離法の確立が望まれている

本発明の原理

架橋ポリマーの網目サイズ・表面吸着を利用した分離方法



比較的大きなサイズの大きなエクソソームは架橋ゲルの内部に取り込まれず、塩析によって浮遊させ、不純物から分離することができる

本発明の原理

架橋高吸水性ポリマーへの蛍光ビーズ吸収状態の観察

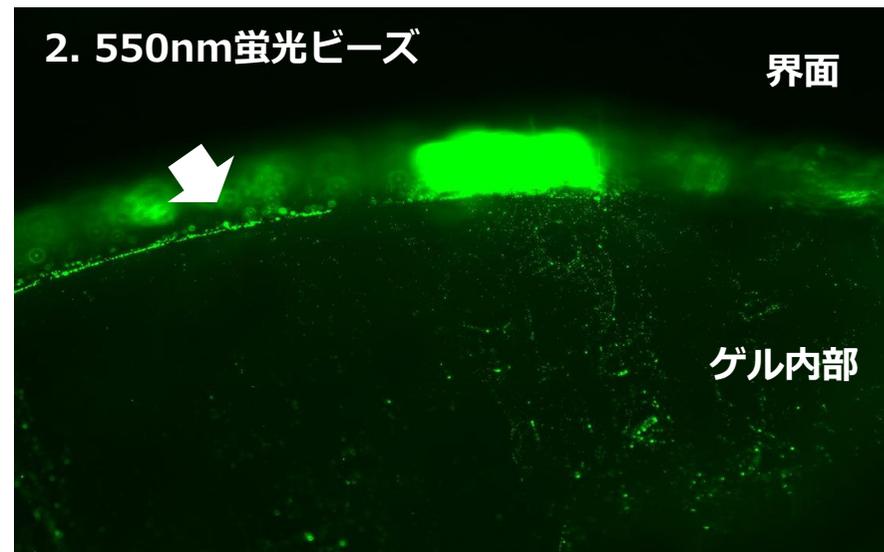
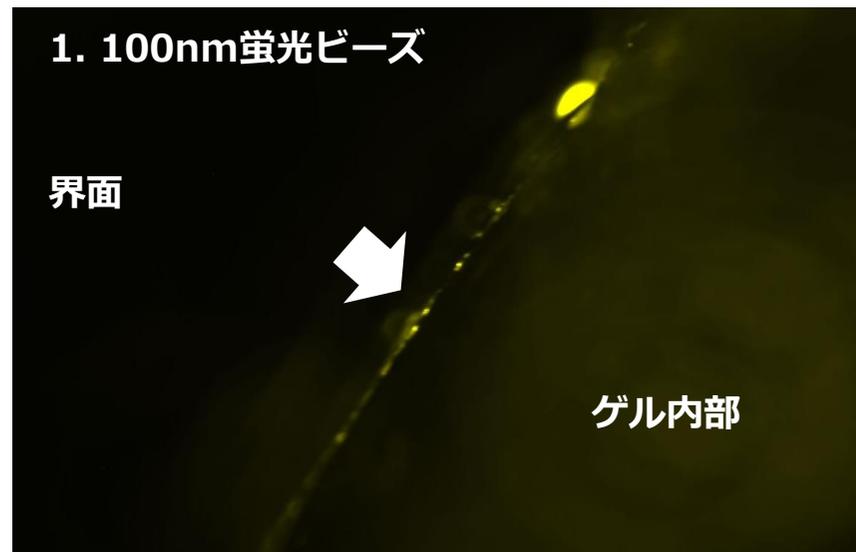
＊□エクソソームサイズに見立てた蛍光ビーズ

1. 粒子径 100nm (エクソソームサイズ 30~200nm)
2. 粒子径 550nm (マイクロベジクルサイズ 100~1000nm)

粒子溶解液を高吸水ポリマーと混和

↓

ポリマー膨張後、ポリマーの切断面を観察



・蛍光標識ビーズは、架橋高吸水ポリマーの内部に取り込まれず、界面に吸着している

本発明の評価①

標準法および競合他社製品との比較

プロトコルの比較（操作・時間・器具）

超遠心法 ゴールドスタンダード法	新技術 架橋高吸水性ポリマー法	Norgen アフィニティ・スピノラム法	ThermoFisher 沈殿法	富士フィルム和光 アフィニティ・磁気ビーズ法
尿前処理 1,200G x 10min	尿前処理 500G x 10min	尿前処理 500G x 10min	尿前処理 500G x 10min	尿前処理 500G x 10min
↓	↓	↓	↓	↓
検体30mL	検体1mL	検体1mL	検体1mL	検体1mL
↓	↓	↓	↓	↓
10,000G x 30min	架橋高吸水性ポリマー 数mg	各kitプロトコル	各kitプロトコル	各kitプロトコル
↓	↓			
70,000G x 60min	ポリマー吸収 30min			
↓	↓			
スクロース濃度勾配に沈殿物を加える	未吸着尿の除去 1000G x 1min			
↓	↓			
100,000G x 20時間	生理食塩水で洗浄 1000G x 1min x 3回			
↓	↓			
濃度勾配成分の分画	塩析 30min			
↓	↓			
200,000 x 60min	エクソソーム回収 1000G x 1min			
↓	↓			
PBS 50 μLで懸濁	透析・脱塩処理			
3 days	180min→90min (改良)	120min	120min	420min
超遠心機	卓上低速遠心機	高速遠心機	高速遠心機	卓上低速遠心機 磁気スタンド

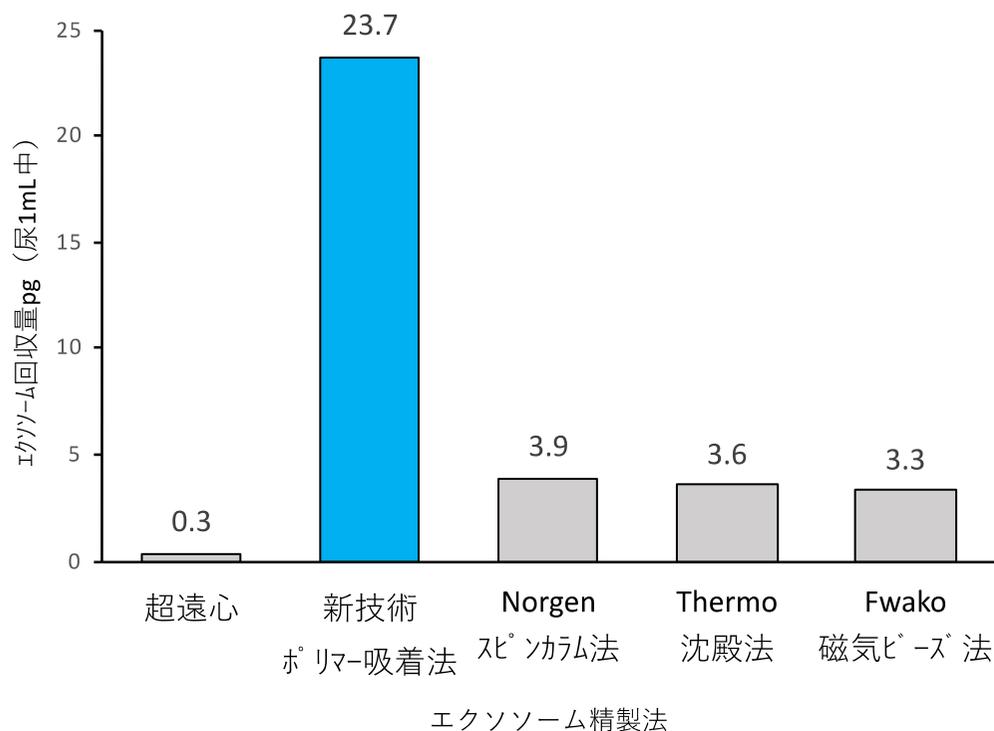
- ・新技術では短時間でエクソソームを精製できる。
- ・大型の遠心機を必要としない簡便な方法である。

本発明の評価②

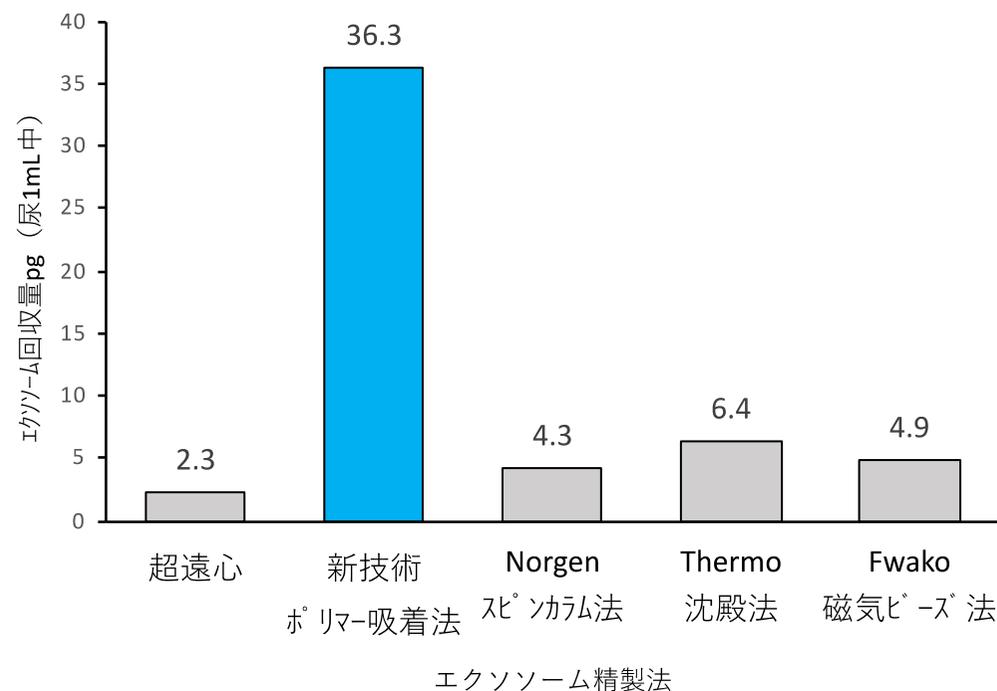
標準法および競合他社製品との比較

抽出物中のエクソソーム含有量の比較

健常者尿：エクソソーム回収率 (CD9/CD63 ELISA算出)



患者尿：エクソソーム回収率 (CD9/CD63 ELISA算出)



・新技術法のエクソソーム回収率は、超遠心の10倍以上、競合法の5倍以上優れている。

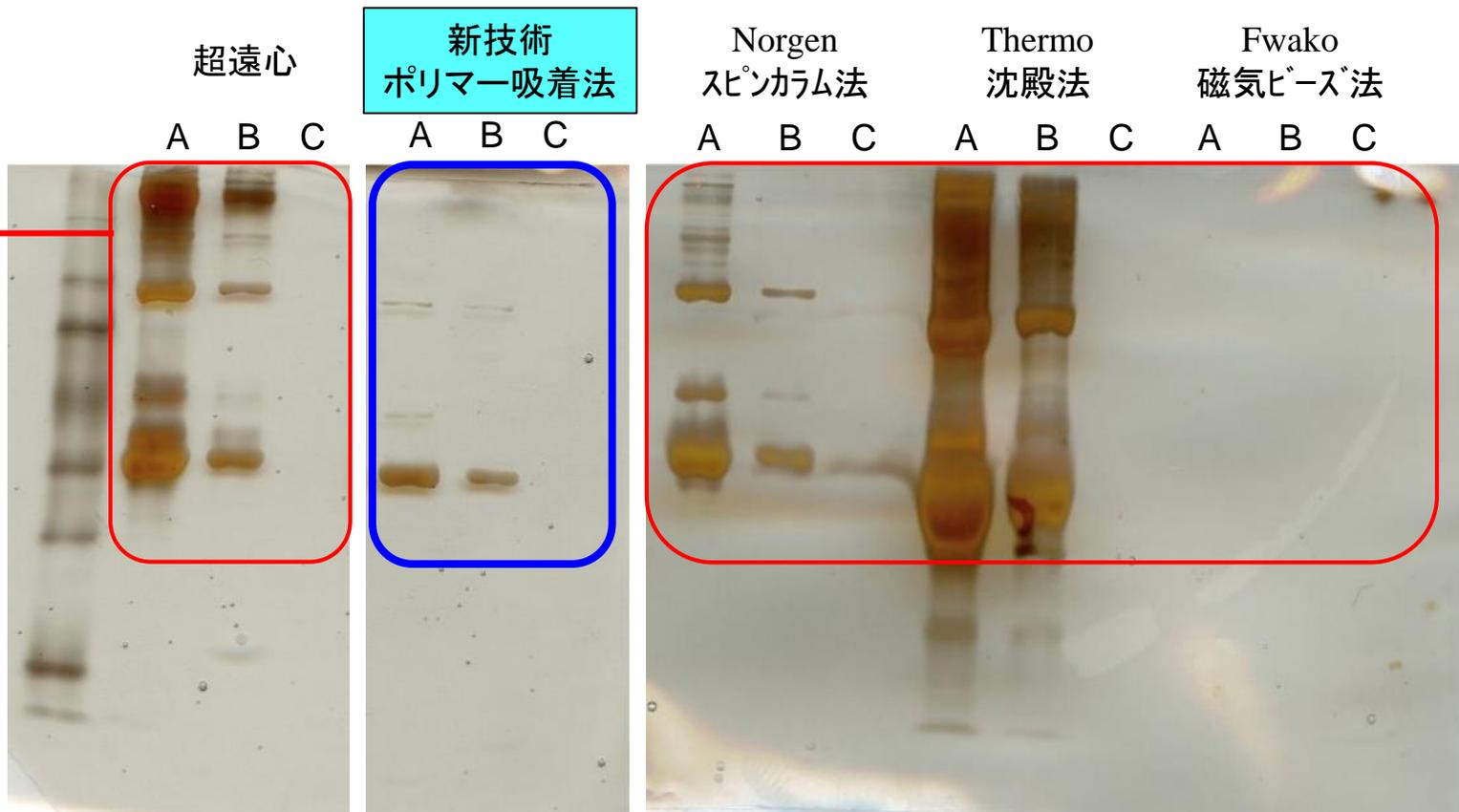
本発明の評価③

標準法および競合他社製品との比較 抽出物中のエクソソーム精製度の比較

銀染色

A: 患者尿
B: 患者尿(希釈)
C: 健常者尿

抽出物中の夾雑物



- ・新技術法では、競合法に比較して夾雑物が少ない。
- ・夾雑物はその後の測定系(抗原抗体反応, PCR)を阻害する。
- ・磁気ビーズ法の夾雑物は少ないが、回収量も少ない。

新技術の高吸水性ポリマー吸着法は高純度・多量精製できる

想定される用途

- 尿中エクソソームを迅速且つ高収率、高純度で回収する試薬キット
- 尿中エクソソームをターゲットとした診断薬キットの前処理キット
- 細胞培養液等に放出されたエクソソームの大量精製装置

実用化に向けた課題

- 現在、尿からについてエクソソーム精製が可能なところまで開発済み。血液や培養液への適性と濃縮等後処理の最適化を行っていく。
- 実用化に向けて、処理精度をあげるためのキット開発技術を確立する必要あり。
- 連続化、多検体処理のための、精製処理の自動化技術も確立していきたい。

企業への期待

- 試薬キットの販売
- エクソソームをターゲットとした診断薬の共同研究
(前処理を含む診断マーカー開発)
- 細胞培養液等からエクソソームを大量精製する
装置開発の共同開発

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：架橋ポリマー、物質を分離する方法、物質を分離するためのキット、疾患を検査するためのキット及び物質を分離するための装置
- 出願番号：特願2020-060546
- 出願人：徳島大学
- 発明者：安部 秀斉、右手 浩一

お問い合わせ先

徳島大学

研究支援・産官学連携センター 矢野 慎一

TEL 088-656-9402

FAX 088-656-7274

e-mail yano@s-tlo.co.jp