

CIMmultus™ EV-1 カラムを用いたエクソソームの精製

K. Vrabec¹, T. Lojpur¹, S. Staubach², P. Gagnon¹

¹ BIA Separations d.o.o., Mirce 21, 5270 Ajdovščina, Slovenia

² University Hospital Essen, Institute for Transfusion Medicine, AG Giebel, Hufelandstraße 55, 45122 Essen, Germany



INTRODUCTION

エクソソームは、その表面レセプターと内包ペイロードにより、標的性と情報伝達能を持ち、細胞間のコミュニケーションに重要な役割を担っています。その性質から、さまざまな診断・治療への応用が期待されており、迅速・ロバスト、かつスケラブルな精製手法へのニーズが高まっています。

エクソソームの表面脂質膜は、さまざまなストレスに対する脆弱性、ひいては、その取扱いの条件やプロセスに用いる材料の選択の制限の要因となっています。既存の多くの多孔質クロマトグラフィゲルは、エクソソームの1/5~1/50ほどのサイズに過ぎないタンパク質分子の精製に最適化されており、それよりはるかに大きなエクソソームでは、ゲル細孔表面へのアクセスが著しく制限されます。こうした結合容量の制限に加え、エクソソームはせん断力により容易にダメージを受けます。充填カラム内部で発生する「渦流」が、表面脂質膜の破壊を招きます。

CIMmultus™ モノリスカラムは、エクソソームのような大型のバイオリジクスの分画のニーズにマッチするデザインにより、従来多孔質ゲルに比べ10-100倍の結合容量と、2-3倍の優れた回収率を与えます。さらに、結合容量や分離能を損なうことなく、従来の充填カラムに対し10-50倍の流速で運用が可能です。モノリス基材内部のフローは「層流」であり、充填カラムに見られるような渦流の発生によるせん断ストレスを低減します。

ここでは、CORNERSTONE Exosome Process Development Packを用いた細胞培養からのエクソソームの精製と、イメージングフローサイトメトリーによるエクソソーム性小胞の解析事例を紹介します。

PURIFICATION PROCESS

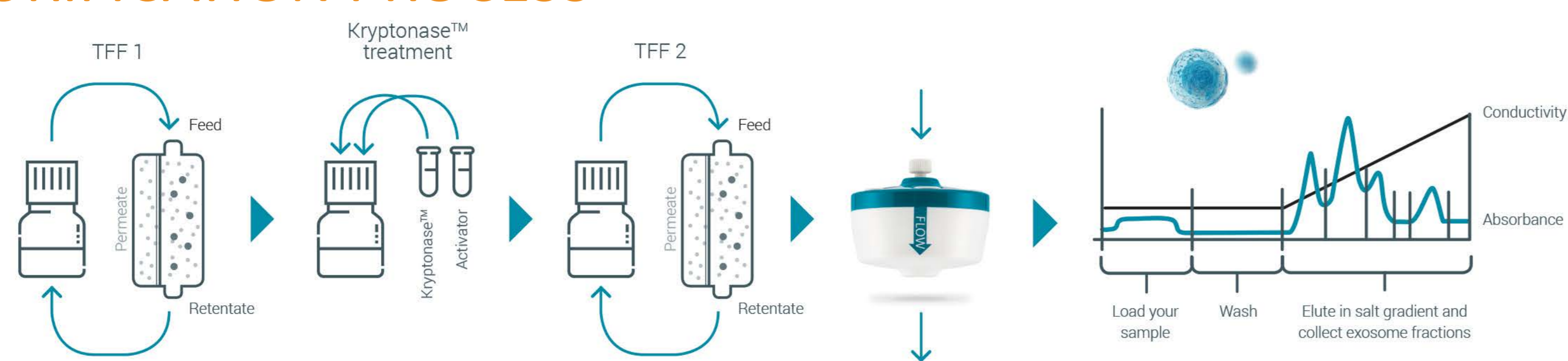


図2 精製プロセスの概要

ろ過した細胞培養液に、同梱のKryptonase™を添加しTFFで前処理（本ステップの結果は図4に示した）。TFF部分精製サンプルをCIMmultus™ EVカラムに供試、エクソソームを塩グラジエントにより溶出した。精製フラクションの評価事例を図5に示した。

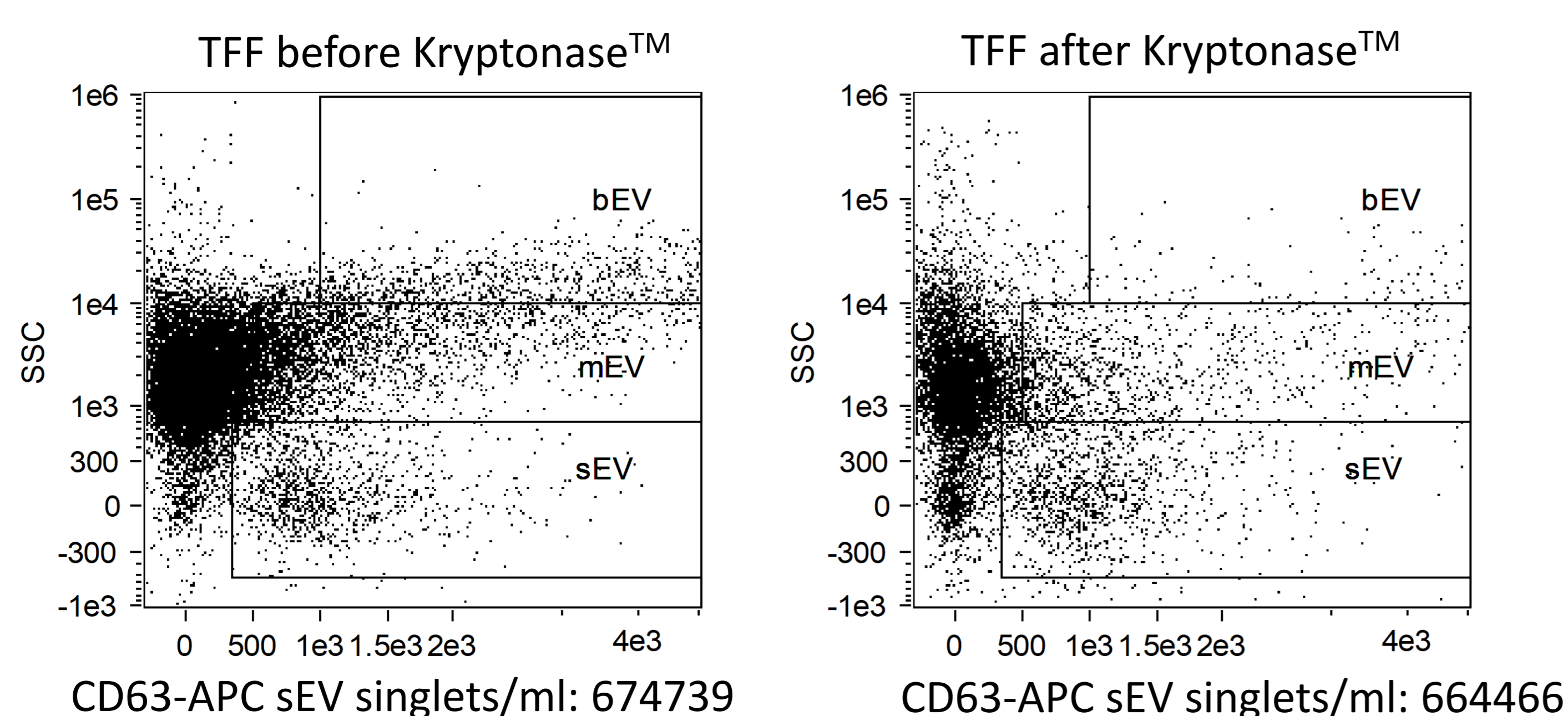


図4 Kryptonase™処理前後の細胞外小胞（EVs）のイメージストリームフローサイトメトリー（ISX）

エクソソーム表面マーカータンパク質を蛍光修飾抗体により染色し、単一分散小胞を可視化。マーカー陽性小胞の計数にISXを使用した。小胞のサイズに応じて、エクソソームと微小小胞体に対応するsEVsを、200 nm以下に対応するsEVプロットエリアに反映。図はKryptonase™処理前後における、HEK293細胞培養物中のTFF処理後のクロマチン凝集物の除去効果を示す。bEV、mEVのサイズを持つ凝集物はKryptonase™処理により顕著に低減される一方、エクソソームの存在量に変化はなかった。

CONCLUSIONS

- 細胞培養からの、高品質な試験研究グレードのエクソソーム精製プロセスに関する新規なアプローチを示しました。
- モノリスは、層流による低せん断性の環境と、高い結合容量を提供し、エクソソームのような大型・不安定なプロダクトの処理に好適です。
- イメージストリームフローサイトメトリーの結果は、エクソソーム群の分離と、凝集物や非エクソソーム性小胞の低減を示唆しました。

The authors would like to thank Bernd Giebel from University Hospital Essen, especially for provision of the imaging flow cytometry platform for exosome quantification; Sebastijan Peljhan and analytical group from BIA for supporting analytical aspects of exosome purification; and Maja Leskovec and the applications development group at BIA for supporting process development on monoliths and technical aspects of purification.

MATERIALS AND METHODS

- 試料： 無血清培地 (FiberCell社, Frederick, MD) による HEK293T培養液。
- 精製エクソソームフラクション調製： Kryptonase™と、CIMmultus™ EVモノリスカラムより構成される CORNERSTONE Exosome Process Development Pack (BIA Separations社製) を使用。
- 解析： ImageStreamX MKII イメージストリームフローサイトメトリーによる。エクソソーム表面マーカーに対する蛍光抗体標識を使用。設定は細胞外小胞に最適化。

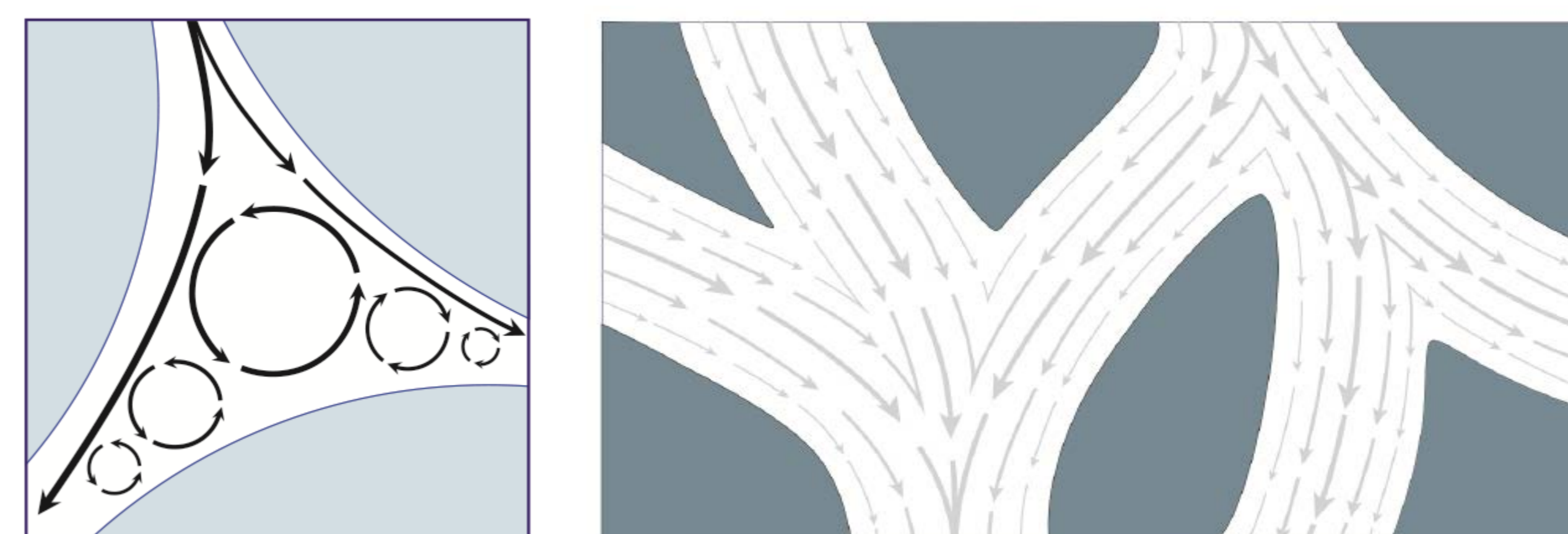


図1 従来クロマトグラフィメディア（左）と、モノリスメディア（右）のフロー分布比較

クロマトグラフィ中のせん断力は、充填ゲル間隙に生じる渦（渦流）によって発生する（図左）。脂質エンベロープを持つバイオリジクスはせん断力に対し脆弱である。モノリスメディアにおいてチャンネルを通過するフローは層流であり（図右）、このような乱流によるせん断ストレスを発生しない。

RESULTS

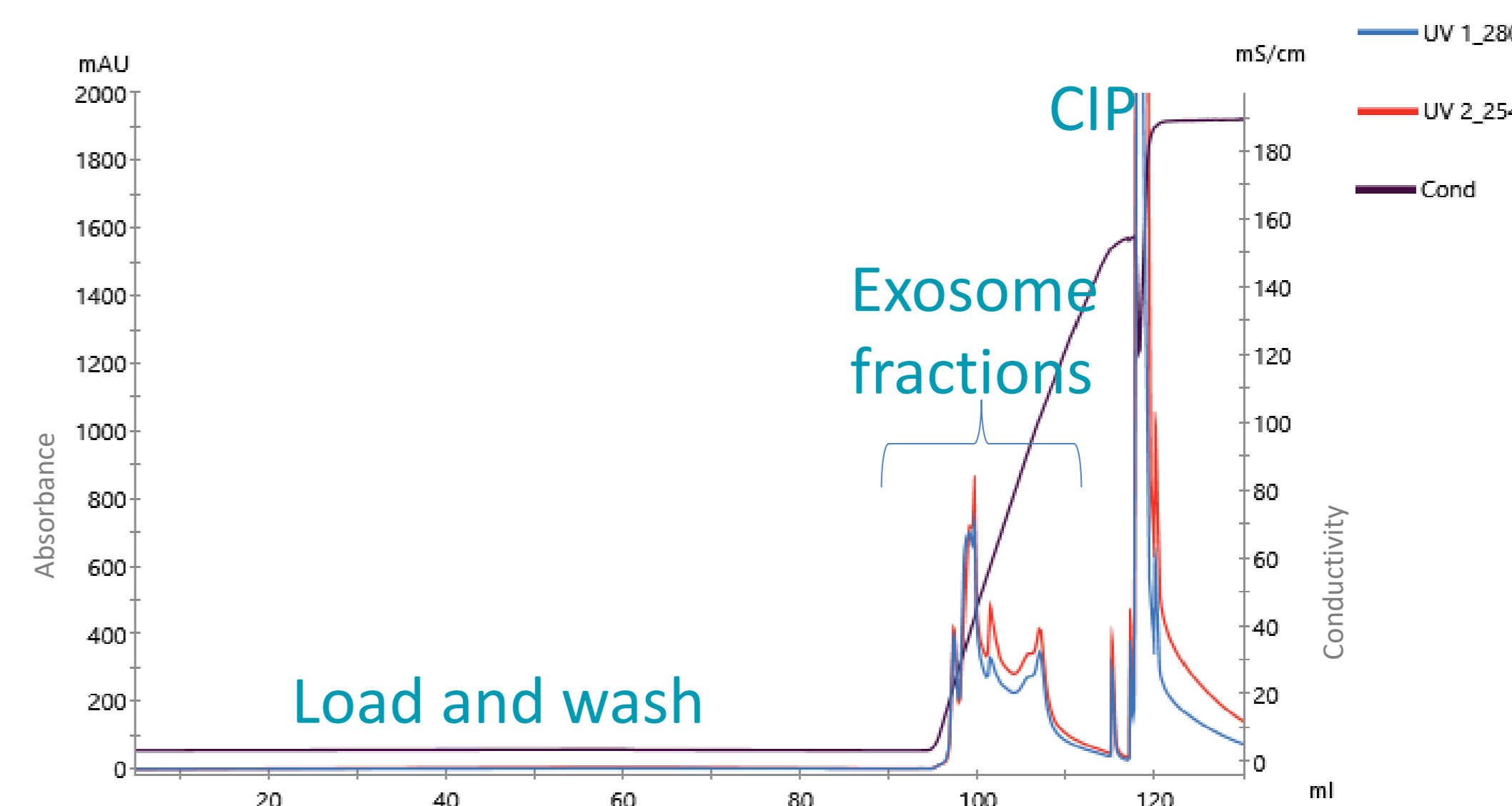


図3 CIMmultus™ EVによる濃縮とポリッシング、宿主由来タンパク質とDNAの低減

55 mLの部分精製HEK293培養物をCIMmultus™ EV-1 mLカラムに供試し、溶出容量に応じ回収した。

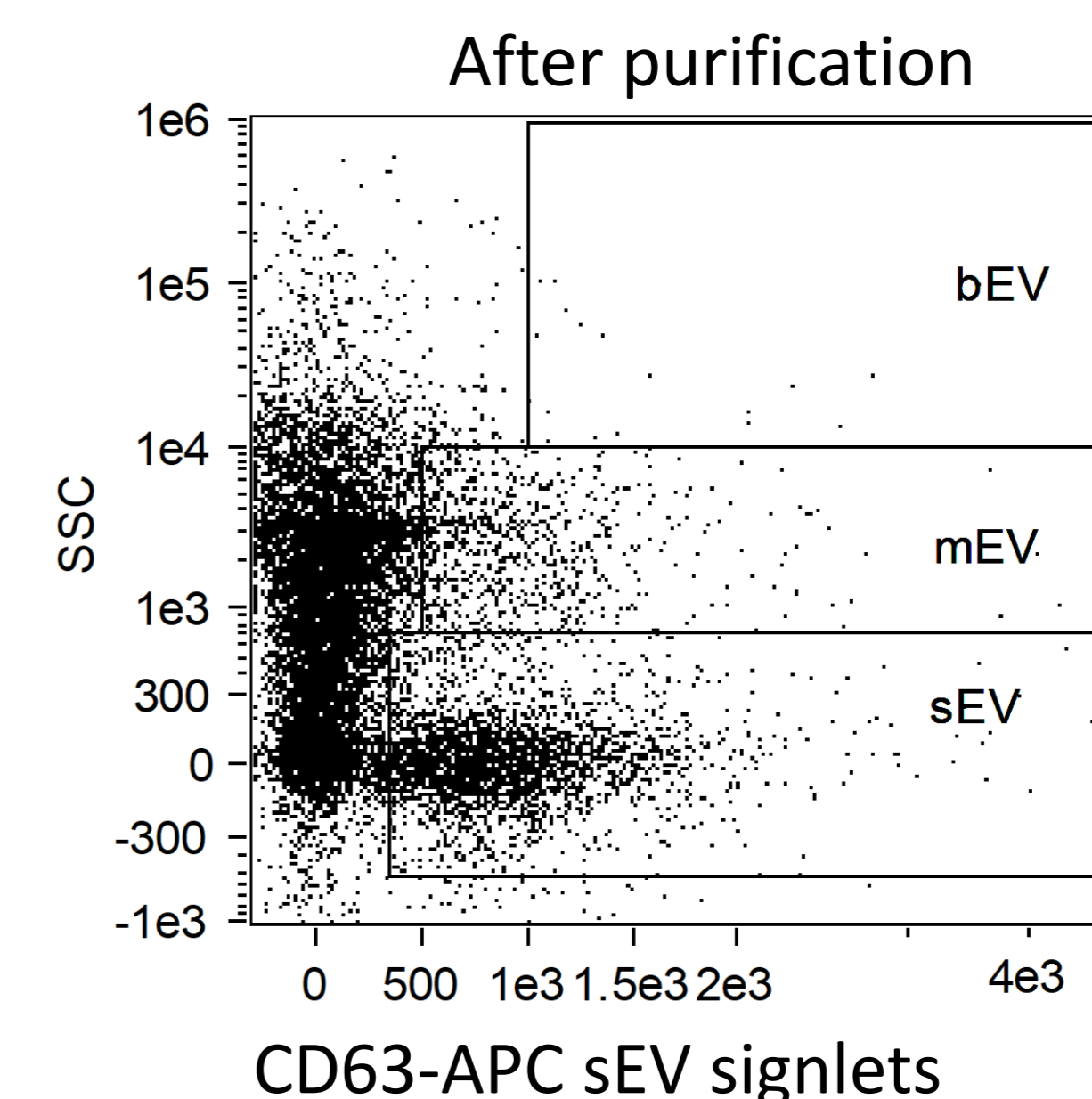


図5 精製後の細胞外小胞（EVs）のイメージストリームフローサイトメトリー（ISX）

HEK293細胞培養上清を、CORNERSTONE Exosome Process Development Packで処理し、濃縮された高純度の細胞外小胞のフラクションを得た。sEV領域の高度な濃縮と、残存するbEV、mEV領域に相当する非エクソソーム性成分の低減が顕著である。