

# 血漿・尿中mRNA分析キット“ExoComplete”

Exosomal mRNA Analysis kit from plasma and urine, “ExoComplete”

小倉 美絵子 Mieko Ogura

日立化成アメリカ 研究開発センター

## 1 概要

ExoCompleteキットは尿、血漿等の臨床検体からExosome(エキソソーム)およびMicrovesiclesと呼ばれる細胞外小胞(Extracellular Microvesicles以下EMVs)を捕捉し、EMVsからmRNAを抽出し定量測定するためのキットである。EMVsは、ほとんどの細胞で分泌される膜小胞であり、Exosomeの直径は約30-150 nm、Microvesiclesの直径は約100-1000 nmである。EMVsにはさまざまなタンパク質や脂質、miRNA、mRNA、DNAなどが含まれている。EMVsはがんなどのさまざまな疾患に関与する細胞からも分泌されており、それらの疾患の診断、予後、モニタリングなどのバイオマーカーとしても注目されている。ExoCompleteキットは従来法である超遠心法と比較して同等のEMVsの捕捉能力を有しつつ、短時間で、同時多検体を測定可能としている。2015年9月に研究用キットとして販売を開始したのでその特徴および経緯について以下報告する。

The ExoComplete kit is a seamless system capable of isolating exosomes and microvesicles (Extracellular Microvesicles: EMVs) from biological samples such as plasma and urine but also quantifying EMV mRNA. EMVs are membrane vesicles released from various cell types. They include exosomes (30 nm - 150 nm in diameter) and microvesicles (100 nm - 1000 nm in diameter). There is growing evidence that EMVs play a role in intercellular communication and their contents of proteins, lipids, miRNA, mRNA and DNA have clinical interest as potential biomarkers in diagnosis, prognosis and monitoring of various health conditions including cancer detection. Compared to conventional ultracentrifuge methods, our method can capture the equivalent or better yield of EMVs far more rapidly and high throughput. Accordingly, we launched the ExoComplete kit for research use in September 2015.

## 2 新製品の特徴

- ・ 短時間で簡易にEMVsを捕捉
- ・ 再現性が良い。
- ・ 同時に多くの検体を処理できる。(ハイスループット)

## 3 開発の経緯

従来、EMVsの捕捉方法は超遠心法やそれを応用した密度勾配遠心法、GPC法、等が行われているが、操作が煩雑で遠心分離に時間がかかる(8-30時間)ことが課題であった。しかしここ数年、EMVsの研究が急激に進むにつれ、沈殿法、抗体やレクチンを使ったビーズ法やコラム法などの簡便で短時間に検出できる試薬が開発され始めた。しかしこれらの方法も再現性が低く、多検体の処理が困難であった。我々は簡便にEMVsを捕捉する方法を開発し、また従来から保有していたmRNAの精製技術と組み合わせることで、臨床検体(尿、血漿等)からEMVsの捕捉およびmRNAの精製を実施可能なキットの開発に着手した。図1に操作手順を示す。本キットは2種類のフォーマットがあり、尿や細胞培養液など検体の量の多いものはチューブ(12.5 mLまで)で、血漿等検体の量の少ないものは96穴のプレート(0.1-0.4 mL)でEMVsを捕捉できる。mRNAの精製は同様の方法で処理できる。

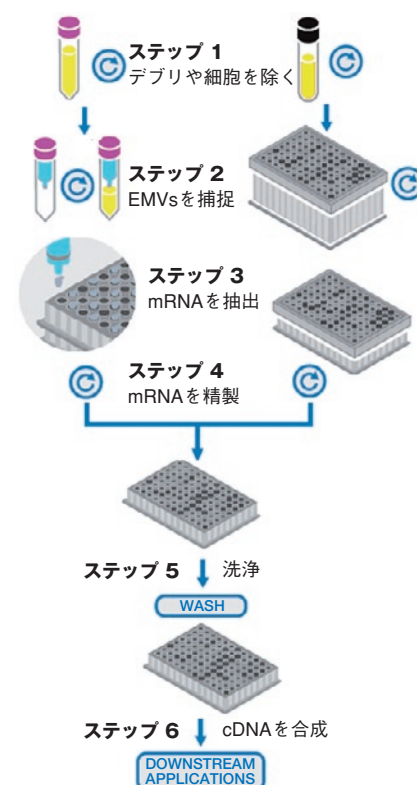


図1 操作の手順

Figure 1 Procedural flow

## 4 技術内容

EMVs中のエキソソームのような微小粒子(30 nm)を捕捉するため、孔径の微細化による物理的な捕捉効果だけでなく、静電引力による吸着効果を利用できるような材質のフィルターを選定した。さらに孔径の異なる2層のフィルターを用いることで、目詰まりを抑制しつつ、EMVsの捕捉効率を満足させることが可能であった。

### 1) EMVs捕捉の確認

フィルター上に捕捉された粒子がEMVsであるか確認するため、抗CD63抗体(EMVs膜標識タンパク)で標識し、金コロイドにて染色した際のSEM画像を図2に示す。フィルターに捕捉された100 nm程度の粒子がEMVsであることを確認できた。

### 2) 従来法(超遠心法)との比較

同一の尿検体(10 mL)からEMVsをExoComplete法と従来法(超遠心法)で捕捉し、その後mRNAを精製し、測定対象のmRNAとしてハウスキーピング遺伝子である $\beta$ アクチン(ACTB)とグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)をリアルタイムqPCRにて定量した。mRNAの測定値としてCt値の平均値(n=8)を図3に示す。ExoCompleteで定量されたCt値の中央値は、従来法と比較して同等であった。一方、Ct値の分布に関してはExoComplete法の方が狭く、従来法よりも再現性に優れていることを確認できた。

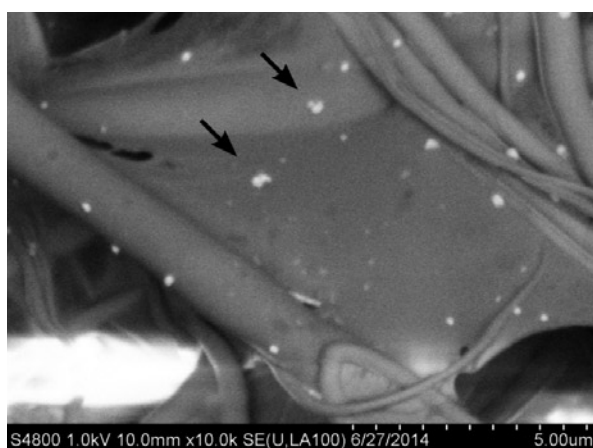


図2 フィルターに捕捉されたEMVsのSEM画像(参考文献1)  
Figure 2 SEM image of EMVs captured in the filter membrane

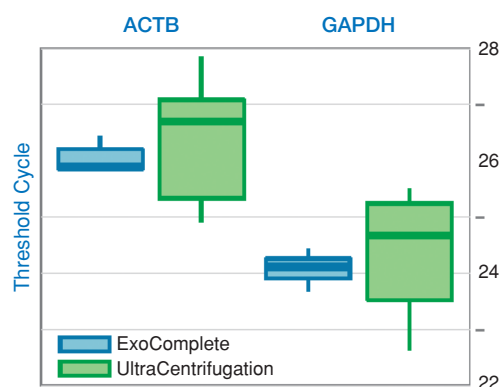


図3 従来法(超遠心法)との比較  
Figure 3 Comparing the conventional method (ultracentrifugation) to our method

## 5 今後の展開

・検査センターでの臨床検査への展開

### 【関連特許】

US Patent Nos. 5976797, 6638428, 6844158, 7258976, 7214781/ 7374881/7741023/7745180/7939300, 7981608, 7968288, 8076105, 8101344, 7816081, 7838239/ 8268982, 8268566; JP4772055, EP1802776, ZL200580035896.6, JP4945554, KR10-0983450, JP5706913

### 【参考文献】

- 1) Murakami T, et al. Development of Glomerulus-, Tubule-, and collecting Duct-Specific mRNA Assay in Human Urinary Exosomes and Microvesicles. PLOS/One 2014: Vol 9 Issue 10 e109074