

Sorvall LYNX 6000大容量高速冷却遠心機とT29-8x50固定角ローターを使ってエクソソームと細胞外小胞の分離プロセスを合理化する ～ 研究者のための包括的ガイド～

エクソソーム、エクソソーム分離、EV
分離、細胞外小胞分離、大容量高速冷
却遠心機、LYNX、LYNX 6000、T29-
8x50固定角ローター

EVやエクソソームの分離には、一般的に超遠心分離が使われてきましたが、Thermo Scientific™ Sorvall™ LYNX 6000大容量高速冷却遠心機（図2）とThermo Scientific™ T29-8x50固定角ローター（図2）を用いることで、初期の大容量サンプルの前処理からエクソソーム単離ステップまでを1台で実行できます（図3）。このアプリケーションノートでは、エクソソームおよびEVを効率的に分離するためのプロトコルを紹介します。

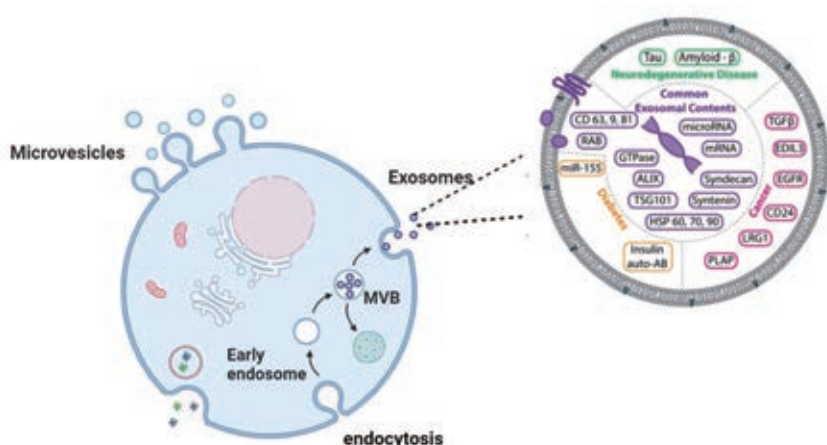


図1. エクソソームの生合成経路 エクソソームの生合成は、エンドソーム系の多胞体(MVB) 内で行われる[1]。図はCreative Commons Attribution 4.0 International Public Licenseに基づき使用。



図2. Sorvall LYNX 6000高速冷却遠心機、T29-8x50チタン製固定角ローター



エクソソーム精製のための培養上清の収集 コンディショニング培地の回収と除去

1. 接着細胞の場合、70～80%のコンフルエントになるまで培養し、浮遊細胞の場合は最大濃度の60～70%になるまで培養する[2]。
2. 少なくとも70 mLのコンディショニング培地が得られるよう、十分な数の細胞を使用する[2]。
 - » エクソソームの精製は、初期のサンプル量が多いほど収量が増加するため、より大量のコンディショニング培地を使用することが推奨される。このためには、最低7個の10 cmディッシュ、または最大20個の15 cmディッシュが必要となる場合がある[2]。
3. 接着細胞の場合、培養液を除去し、同量のエクソソーム産生培地と交換する[2]。
4. 浮遊細胞は、300 ×g、4℃で10分間遠心する。上清を除去し、同量のエクソソーム産生培地に細胞を再懸濁する[2]。
5. 細胞をインキュベーターに戻し、24～48時間培養する[2]。
6. 細胞が急速に増殖し、オーバーコンフルエントになり、48時間後に細胞死が起こる場合は、24時間後に調整培地を回収する。
 - » エクソソーム産生培地やFBSフリー培地で細胞の感受性が高かったり、細胞が増殖しない場合は、24時間で上清を回収する。
7. 接着細胞の場合、コンディショニング培地を回収し、50 mLポリプロピレン遠心チューブに移し、300 ×g、4℃で10分間遠心し、コンディショニング培地をピペットで回収する[2]。
8. 浮遊細胞の場合、細胞を300 ×g、4℃で10分間遠心し、コンディショニング培地をピペットで回収し、50 mLポリプロピレン製遠心チューブに移す[2]。



細胞デブリの除去

9. コンディショニング培地を2,000 ×g、4℃で10分間遠心する[3-10]。
10. 上清を高速チューブ（50 mLコニカルチューブまたは50 mLオークリッジチューブ）に移し、20,000 ×g、4℃で30分間遠心する[3-10]。



エクソソームの単離

11. ステップ10の上清を新しいThermo Scientific™ 50 mL Nalgene™オークリッジチューブに移す[3-9]。
12. この時、細胞デブリを多く含むペレットが回収され、上清が汚染されないようにする。
 - » 固定角ローターでは、ペレットはチューブの上向き側、底に近い方にあるため、この面にマーカーペンで印をつけておく。
 - » ピペットを使って上清を除去する時は、チューブを斜めに傾け、ペレットが常に上清に覆われた状態になるようにする。
 - » 上清の除去は、ペレットを覆っている液体がまだ0.5 cm程度残っている時点で止める。
13. Sorvall LYNX 6000高速冷却遠心機のT29-8x50チタン製超高速ローターを用いて、4℃で29,000 rpm (100,605 ×g)、70分間遠心する[3-10]。
 - » この高速遠心分離では、チューブの変形を防止するために、全てのチューブがその実用量の少なくとも80%以上が溶液で充填されている必要がある。チューブが4分の3に満たない場合は、PBSを加える。
 - » 4℃を保持して遠心する場合は、T29-8x50ローターを冷凍庫または冷蔵庫で予冷しておく。チューブは十分冷却したローターにロードする[2-10]。
14. 上清を完全に除去する。



エクソソームの濃縮と洗浄

15. 各チューブのペレットを1 mLの滅菌PBSに再懸濁する[2]。
 - » 同じ細胞からの材料を含む全てのチューブの再懸濁ペレットを一つの遠心チューブにまとめる。
 - » チューブをPBSで完全に満たす。この段階ではペレットを目視することはできない。
 - » EVやエクソソームのペレットが付着してであろう部分をPBSで上下に流し、内容物を再懸濁する。
16. ステップ15を繰り返し、再懸濁したペレットをPBSに入れ、100,605 ×g (29,000 rpm)、4 °Cで70分間遠心する[2-10]。
17. 上清をできるだけ完全に除去する。
18. エクソソームペレットを50~100 µLの滅菌PBSまたはTBSに懸濁する。
19. エクソソームは、100 µLずつ分注することで-80 °Cで1年間の保存が可能となる[2-10]。
 - » 凍結と融解の繰り返しは避ける。

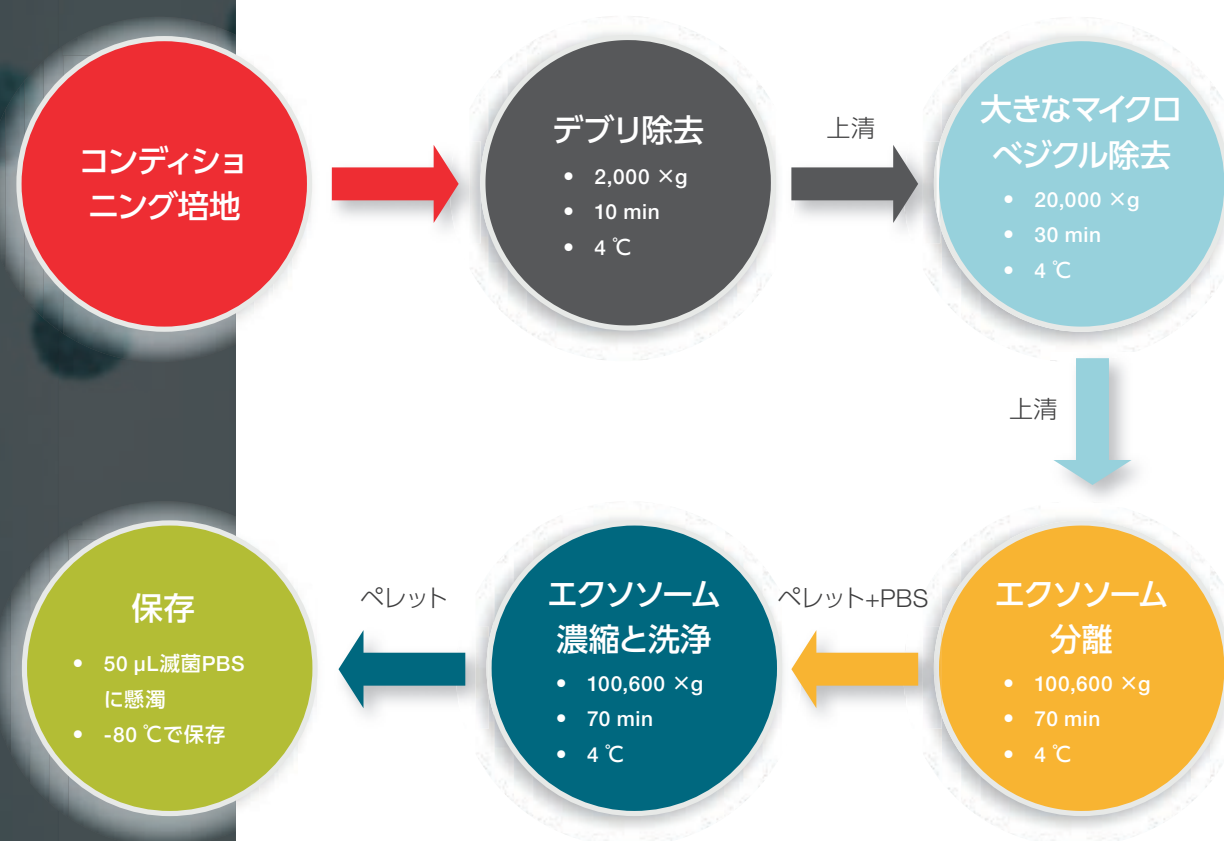


図3. エクソソーム分離プロトコル

結論

エクソソームやEVの分離は、汎用遠心機による細胞デブリの除去と、それに続く超遠心分離機を用いた密度勾配遠心分離による微分法を実施するのが一般的な精製プロセスでした。本アプリケーションノートでは、Sorvall LYNX 6000大容量高速冷却遠心機と最大100,605 ×gのT29-8x50チタン製固定角ローターを組み合わせることで、エクソソームの分離プロセスが大幅に簡素化されることを示しました(図4)。

Sorvall LYNX 6000大容量高速冷却遠心機は、最大6.0 Lを処理できる大容量と最高100,605 ×gを出力するパフォーマンスを特長とし、さらに多様なローターセットにより幅広いアプリケーションでお使いいただけます。また、超遠心分離機に比べて汎用性に優れ、費用対効果の高いものとなります。超遠心機へのアクセスが制限されていたり、新しいユニットを取得するための予算上の制約がある場合にはSorvall LYNX 6000大容量高速冷却遠心機とT29-8x50チタン製固定角ローターの組み合わせが、エクソソーム研究の抽出・精製システムとして有効な選択肢であることが示されました。

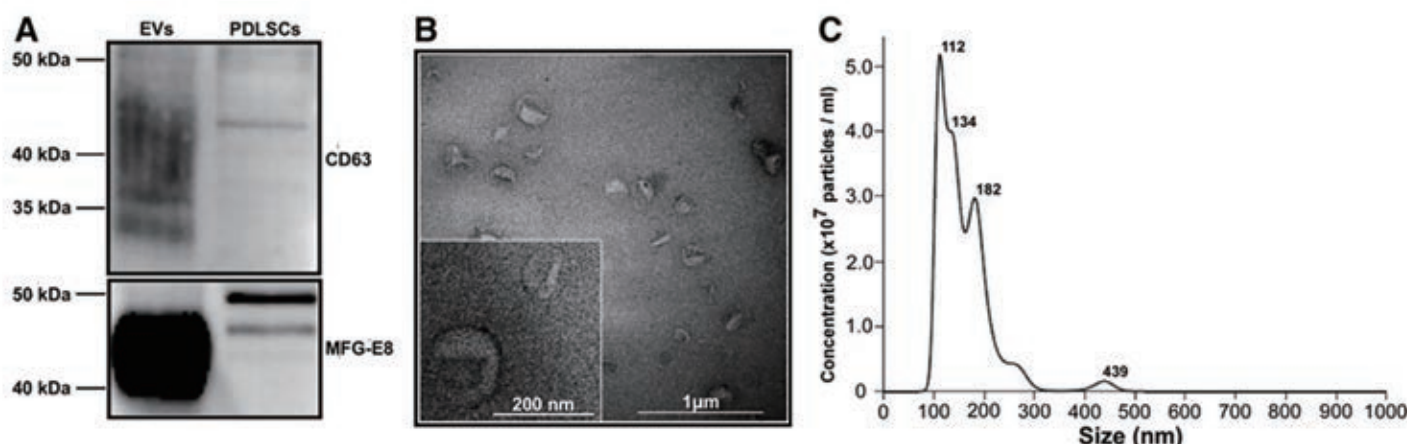


図4. Čebatariūnienė A, Kriaučiūnaitė K, Prunskaitė J, Tunaitis V, Pivoriūnas, *Stem Cells Dev* (2019) Aug 1;28 (15) :1037-1049. から引用した LYNX 6000とT29-8x50ローターを用いて歯根膜幹細胞 (PDLSC) から分離したEVの特性解析。図4A. EV画分 (EV) と歯根膜幹細胞 (PDLSCs) のサンプルを電気泳動にかけ、ブロットし、EVマーカーCD63とMFG-E8に対する抗体でメンブレンをブロープし、HRP結合2次抗体で検出した結果。図4B. PDLSCから単離したEVの透過型電子顕微鏡像 (3万倍)。EVの拡大像を左のパネルに示す (12万倍)。図4C. PDLSCs由来のEVの濃度と粒子径の測定。NTAはNanoSight™ LM10装置 (Malvern Panalytical) を用いて行った。EVの粒径分布は112~182 nmであった。算出されたサイズ分布 (n = 3) を平均-SDで示す。Ab、抗体; EVs、細胞外小胞; NTA、ナノ粒子追跡分析; SD、標準偏差。

参考文献

- Li, X., Corbett, A., Taatizadeh, E., Tasmin, N., Little, J., Garnis, C., Gaugaard, M., Guns, E., Hoorfar, M., & Li, I. (2019). Challenges and opportunities in exosome research - Perspectives from biology, engineering, and cancer therapy. *APL Bioengineering* 3(011503-1-011503-21)
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology*, 30(1), 3-22.
- Čebatariūnienė A, Kriaučiūnaitė K, Prunskaitė J, Tunaitis V, Pivoriūnas A. Extracellular Vesicles Suppress Basal and Lipopolysaccharide-Induced NFκB Activity in Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2019 Aug 1;28(15):1037-1049. doi: 10.1089/scd.2019.0021. Epub 2019 May 24. PMID: 31017040.
- Pivoriūnas, A. (2022). Extracellular vesicles promote lipid raft formation in human microglia through TLR4, P2X4R, and αVβ3/αVβ5 signaling pathways.
- Jarmalavičiūtė, A., Tunaitis, V., Pivoriūtė, U., Venalis, A., & Pivoriūnas, A. (2015). Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6-hydroxy-dopamine-induced apoptosis. *Cytotherapy*, 17(7), 932-939
- Romenskaja, D., Jonavice, U., & Pivoriūnas, A. (2023). Extracellular vesicles promote autophagy in human microglia through lipid raft-dependent mechanisms. *bioRxiv*, 2023-07.
- Jonavičė, U., Romenskaja, D., Kriaučiūnaitė, K., Jarmalavičiūtė, A., Pajarskienė, J., Kašėta, V., ... & Pivoriūnas, A. (2021). Extracellular vesicles trigger ATP release and promote migration of human microglia through the P2X4 receptor/MFG-E8-dependent mechanisms.
- Jonavičė, U., Romenskaja, D., Kriaučiūnaitė, K., Jarmalavičiūtė, A., Pajarskienė, J., Kašėta, V., ... & Pivoriūnas, A. (2021). Extracellular vesicles from human teeth stem cells trigger ATP release and promote migration of human microglia through P2X4 receptor/MFG-E8-dependent mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 10970.
- Narbutė, K., Pilipenko, V., Pupure, J., Dzirkale, Z., Jonavičė, U., Tunaitis, V., ... & Pivoriūnas, A. (2019). Intranasal administration of extracellular vesicles derived from human teeth stem cells improves motor symptoms and normalizes tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and striatum of the 6-hydroxydopamine-treated rats. *Stem Cells Translational Medicine*, 8(5), 490-499.
- Zhao, G., Lyu, J., Huang, X., Huang, G., Chen, F., Wei, Y., ... & Shi, J. (2023). The role and underlying mechanism of dental pulp stem cell-derived exosomal miR-31 in the treatment of osteoarthritis by targeting mTOR to enhance chondrocyte autophagy levels. *Archives of Medical Science*.

研究用のみ使用できます。診断用には使用いただけません。これらの製品は一般的なラボでの使用を目的としています。

製品の性能がお客様の用途やアプリケーションに適しているかどうかはお客様自身でご確認ください。

© 2024 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

NanoSight is a trademark of Malvern Panalytical Ltd.

実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc **LET500-A24090B**

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

お問い合わせはこちら thermofisher.com/contact

thermo scientific