

成功研发提取高纯度外泌体方法，

有望革新癌症等的早期诊断和治疗效果判定技术

国立大学法人 大阪大学
国立研究开发法人 日本医疗研究开发机构

研究成果要点：

- 开发提取高纯度细胞囊泡、外泌体的新方法
- 外泌体是癌细胞等病态细胞的重要生物标记物（注1），然而目前纯化法所提取的外泌体纯度低，在生物标记作用上，可信度不佳。
- 本研究成果所用的高纯度外泌体提取试剂盒，作为日本国产试剂已经被产品化。

概述：

大阪大学免疫学前沿研究中心的华山力成特约教授（金泽大学医学系免疫学教授）、中井涉特任研究员和日本和光纯药工业株式会社研究组织，共同成功研发了操作简单、高重复性的高纯度外泌体提取方法（如图所示）。

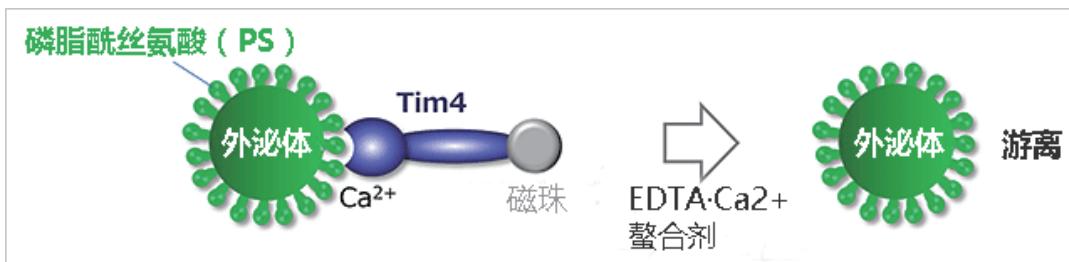
该研究结果实现了外泌体中的蛋白质和RNA类别鉴定，有望革新癌症等各种疾病的早期诊断和治疗效果判定技术。

本研究成果已在线刊登于英国科学杂志《Scientific Reports》（日本时间9月23日18点）。

研究背景：

外泌体是指由各种细胞分泌出来的直径为30~100nm的细胞外囊泡。近年来，有报道指出外泌体中的蛋白质和RNA，是癌细胞等病态细胞的生物标记物，可应用于疾病早期诊断和治疗效果判定的相关性研究。

但是，目前的提纯方法所提取的外泌体含有的杂质较多，因此在生物标记作用的可信度不佳。



图：Tim4磁珠提取外泌体新方法

研究内容：

华山特约教授等研究小组发现，Tim4膜蛋白是靶细胞上外泌体的特异性受体。因此研制了能与Tim4细胞外域结合的磁珠——【Tim4磁珠】，建立捕获细胞培养液和体液中外泌体的方法（如图所示）。以提取人白血病细胞分泌外泌体为例，Tim4磁珠法与目前的提纯法相比，Tim4磁珠法可回收10~100倍以上的高纯度外泌体。

研究成果对社会的影响（研究意义）：

今后，本技术提纯的外泌体，不仅对癌症研究，就连免疫系统和循环系统、脑神经系统、内分泌系统等多种疾病的生物标记物鉴定和分析均可起重要作用。

另外，本技术无需使用超离心机等高价仪器，因操作简便被广泛应用于临床检测。今后有望应用于各种疾病的早期诊断和治疗效果的判定、预后预测等。

和光纯药工业株式会社已通过本技术生产出MagCapture™ Exosome外泌体提取试剂盒，并在全世界销售。

特别记载事项：

本研究成果，已在线刊登于英国科学杂志《Scientific Reports》（日本时间9月23日18点）。

作者：Wataru Nakai, Takeshi Yoshida, Diego Diez, Yuji Miyatake, Takahiro Nishibu, Naoko Imawaka, Ken Naruse, Yoshifusa Sadamura and Rikinari Hanayama.

题目：A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles.

本研究是国立研究开发法人日本医疗研究开发机构（AMED）研发实业——革新型癌症医疗实用化研究实业研发课题“利用高纯度外泌体提取方法鉴定新型肿瘤标记物”（研发代表：华山力成）的重要环节。

详细研究解说：

研究背景：

外泌体是由各种细胞分泌的，直径为30~100nm的细胞外囊泡，是分泌细胞和靶细胞间交换脂质和蛋白质、RNA等的新媒介。近年来，有报道称，外泌体的组成分子（特别是蛋白质和RNA）是癌细胞等病态细胞的重要生物标志物（[注1](#)），被应用于疾病早期诊断、治疗效果的判定和预后预测等相关性研究上。如恶性黑色肿瘤细胞分泌的外泌体中TYRP2、VLA-4、MET等蛋白质的浓度极高，可作为预测肿瘤细胞的转移功能、恶化能力的标记（Nat Med. 18：881 - 891(2012)）。另外，外泌体中含有大量分泌细胞来源的mRNA和non - coding RNA，利用微量样本通过PCR法即可进行扩增，作为划时代的生物标志物对疾病的相关性和特异性被广泛研究（Biochim Biophys Acta. 1806(2) : 200 - 207(2010)）。

目前，外泌体提纯的方法主要是超离心法（[注2](#)）和PEG沉淀法（[注3](#)）等。但这些提纯法所提取的外泌体含有较多杂质，作为生物标志物的可信度较差。另外，超离心法操作繁琐，回收量不稳定，不仅无法进行外泌体定量分析，还需要高价的超离心机，存在无法进行多检体分析等问题。综合上述，将外泌体作为生物标记物存在一定难度，因此开发一种可通过简单操作就能提取到高纯度外泌体的技术就尤为令人期待了。

研究成果内容：

我们发现Tim4膜蛋白是靶细胞中外泌体的特异性受体。Tim4蛋白在细胞外域中IgV域，与外泌体膜表面的磷脂酰丝氨酸（PS）且在钙离子依存条件下强力结合，在细胞中获取外泌体。因此我们研制了Tim4细胞外域、磁珠相结合的Tim4磁珠。在钙离子依存下Tim4结合外泌体膜表面的PS后，加入含有EDTA螯合剂的缓冲解离液解离外泌体，有效的提取高纯度外泌体。

事实上，用Tim4法提取人白血病细胞分泌的外泌体纯度与超离心法、PEG沉淀法提取的外泌体纯度相比，Tim4磁珠法可高重复性回收到比其他方法纯度高10~100倍以上的高纯度外泌体（如图2所示）。实现了外泌体中的蛋白质和RNA类别鉴定。综上所述，Tim4磁珠法的可行性标志着简易操作高度提纯外泌体的方法研发成功。



图1 . Tim4磁珠提纯外泌体

Tim4磁珠在钙离子依存下与外泌体表面的磷脂酰丝氨酸结合。与Tim4磁珠结合的外泌体在EDTA·Ca²⁺ 融合剂作用下重新游离。

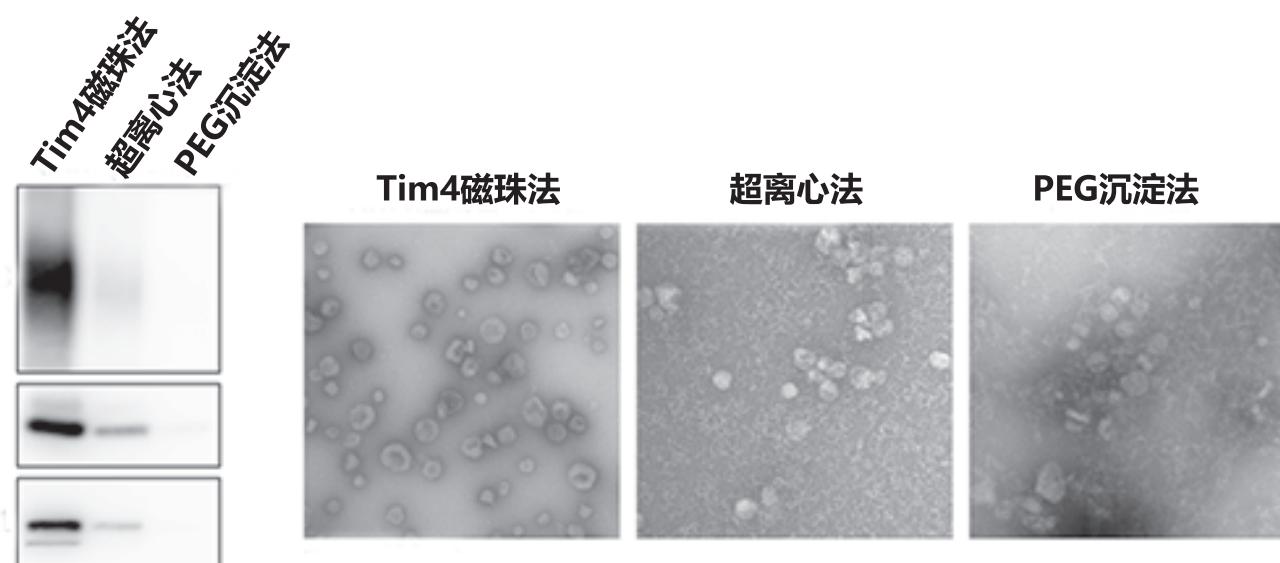


图2 . 各提纯法提取外泌体的纯度比较

与超离心法和PEG沉淀法相比，Tim4磁珠法检测外泌体特异性蛋白的能力更强（左），同时几乎不含外泌体以外的杂质（右）。

本研究成果对社会的影响（本研究成果的意义）：

近年来，外泌体研究虽加速发展，但研究使用的超离心法和PEG沉淀法所提取的低纯度外泌体，无法证实能否真实反映外泌体本身的功能。此次开发的高纯度外泌体提取技术，在外泌体研究方法上是一个分析技术的大革新。今后，不仅可以通过本技术对癌症研究，还可对免疫系统和循环系统、脑神经系统、内分泌系统等各种疾病生物标记物进行鉴定解析。本技术无需使用超离心机等高价仪器，其简便性更可广泛应用于临床检测中。今后，使其与流行病学研究相关，可应用于各种疾病的早期诊断和治疗效果判定、预后预测等。和光纯药工业株式会社已通过本技术生产出MagCapture™ Exosome外泌体提取试剂盒，并在全世界销售。

词语解析：

（注1）：生物标记物

血液、尿液、脊髓液等体液中含有的蛋白质和RNA等物质，其浓度可作为特定疾病存在、进展相关的指标依据。

（注2）：超离心法

利用超离心机的强大离心力，分离样品成分的方法。

（注3）：PEG沉淀法

通过聚乙二醇沉淀样品中的高分子成分的方法。

（注4）：螯合剂

与金属离子结合，使金属离子惰性化的物质。

（注5）：缓冲解析液

使特定物质间结合解离的溶液。



和光純薬工業株式会社
Wako Pure Chemical Industries, Ltd.



宝柏·中国



北京 Tel: 010 85804838

上海 Tel: 021 62884751

广州 Tel: 020 87326381

香港 Tel: 852 27999019

Email: info@boppard.cn

1705WABU01