

# 培養上清中のエクソソーム量の比較

岡田 竜美<sup>1</sup> 小川 誠司<sup>1,2</sup> 久永 一郎<sup>1</sup> 伊沢 博美<sup>1</sup>

伊沢：現在、MBT、<sup>2</sup>藤田医科大学東京 先端医療研究センター

## 緒言

細胞から分泌されるエクソソーム(EVs)は、さまざまな疾患に関与していることが知られており、EVsを用いた診断や治療の開発が進められている。間葉系幹細胞(臍帯血、脂肪、骨髄など)のEVsは広く研究されているが、月経血由来幹細胞のEVsの研究はまだ少ない。当院では、月経血由来幹細胞、脂肪由来幹細胞、NK細胞の提供を行っている。そこで当院で培養した月経血由来幹細胞、脂肪由来幹細胞、NK細胞の培養上清に含まれるEVsを測定し比較した。

## 原料及び方法

原料	患者情報
月経血	40代・60代女性
大腿部の脂肪組織	60代女性
末梢血	40代男性

### 【月経血からの細胞の単離】

月経血を比重遠心法により細胞を分離した。分離した細胞から不要な細胞をマイクロビーズを用いて除去し細胞を単離した。

### 【脂肪組織からの細胞の単離】

大腿部より少量の脂肪組織から皮膚などを取り除き、コラゲナーゼ処理にて細胞を単離した。

### 【幹細胞の細胞培養】

それぞれの細胞を自己血清を含む培養液で懸濁し培養容器に播種した。2,3日置きに培地交換した。70~90%コンフルエントになった時点で継代を実施し、5継代まで繰り返した。

### 【NK細胞の培養】

末梢血をバキュティナ採血管に入れ比重遠心法により細胞を分離した。分離した細胞は、NK細胞培養キットを用いて培養した後、培養液入りカルチャーバッグに移しさらに拡大培養した。

### 【Nanosight】

幹細胞: 継代時に培養上清を回収し遠心分離した。  
NK細胞: カルチャーバッグから細胞ごと培養液を回収した。回収した培養液を遠心分離し、細胞と培養上清に分離した。遠心分離後の培養上清を0.22 μmフィルターに通し、残存細胞などを除去したのち凍結保存した。  
EVsの精製・測定は検査会社依頼した。  
検査会社にて37°Cで融解後、粗遠心したのち、0.22 μmでフィルトレーションした。  
フィルトレーション後超遠心し、エクソソームを精製しNANOSIGHTで測定した。

## 結果

### 【NANOSIGHT】

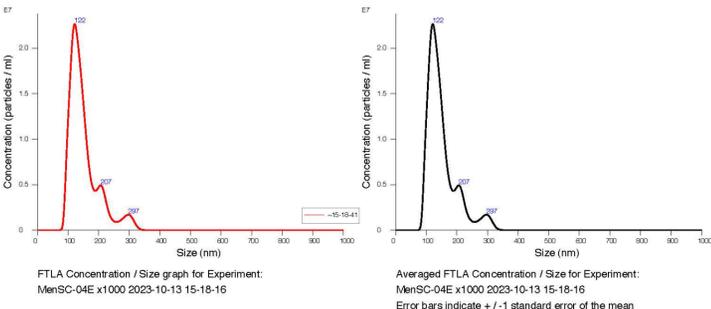
測定結果:

Sample No.	Sample name	Information	希釈倍数	Camera level	Detection Threshold	測定値 (particles / ml)	計算値 (particles / ml)
1	NSO-001		100	13	7	1.57E+09	1.57E+11
2	NSS-001		1000	13	7	1.63E+09	1.63E+12
3	ADSC-02M		200	13	7	1.89E+09	3.78E+11
4	MenSC-04E		1000	13	7	1.64E+09	1.64E+12
5	MenSC-03K		500	13	7	2.14E+09	1.07E+12
	PBS	測定限界以下(5.00E+8以下)	1	13	7	1.99E+06	1.99E+06

NSO-001,NSS-001:NK細胞,ADSC-02M:脂肪由来幹細胞,MenSC-04E,MenSC-03K:月経血由来幹細胞

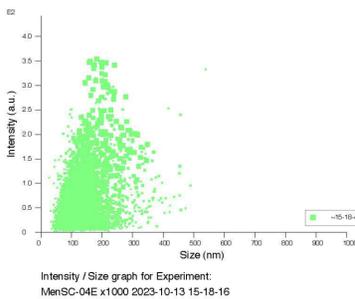
## NANOSIGHT

MenSC-04E x1000 2023-10-13 15-18-16



## NANOSIGHT

MenSC-04E x1000 2023-10-13 15-18-16



Included Files	Results
MenSC-04E x1000 2023-10-13 15-18-16	Stats: Merged Data Mean: 150.5 nm Mode: 121.5 nm SD: 48.7 nm D10: 104.5 nm D50: 136.4 nm D90: 217.3 nm
<b>Details</b> NTA Version: NTA 3.4 Build 3.4.4 Script Used: SOP Standard Measurement 03-18-16PM 130- Time Captured: 15:18:16 13/10/2023 Operator: Pre-treatment: Sample Name: MenSC-04E Diluent: 1000 Remarks:	Stats: Mean +/- Standard Error Mean: 150.5 +/- 0.0 nm Mode: 121.5 +/- 0.0 nm SD: 48.7 +/- 0.0 nm D10: 104.5 +/- 0.0 nm D50: 136.4 +/- 0.0 nm D90: 217.3 +/- 0.0 nm Concentration: 1.54E+09 +/- 0.00E+00 particles/ml 89.4 +/- 0.0 particles/frame 89.1 +/- 0.0 centres/frame
<b>Capture Settings</b> Camera Type: sCMOS Laser Type: Blue405 Camera Level: 13 Slider Shutter: 1232 Slider Gain: 219 FPS: 25.0 Number of Frames: 1499 Temperature: 27.2 °C Viscosity: (Water) 0.8 cP Dilution factor: Dilution not recorded	
<b>Analysis Settings</b> Detect Threshold: 7 Blur Size: Auto Max Jump Distance: Auto: 8.3 pix	

Script Used: (Full Text):
SOP Standard Measurement 03-18-16PM 130Oct2023.txt

### 【上清回収時の細胞数】

Sample name	細胞数	1細胞当たりのEvs数
NSO-001	3.0x10 <sup>7</sup> cells	5233.3 particles
NSS-001	1.16x10 <sup>9</sup> cells	1405.2 particles
ADSC-02M*	3.24x10 <sup>7</sup> cells	11,666.7 particles
MenSC-04E*	1.62x10 <sup>7</sup> cells	101,234.6 particles
MenSC-03K*	8.7x10 <sup>6</sup> cells	122,988.5 particles

\*3継代後の細胞数

## まとめ

NK細胞は細胞数の数と比例し、細胞数が多いほどEVsの数が多くなる傾向が見られた。培地や培養期間・環境による影響があるが、月経血由来幹細胞のEVs産生能は高い可能性が見い出された。クリニックでは完全なる環境の均等化は難しい。しかし、今回の手法は臨床の現場で普通に行われるそれぞれの培養方法であることから、実際のEVs比較になっているとも言える。環境や個体の偏りを排除するために、今後さらに症例数を増やし比較し、統計解析を行う。。また、このエクソソームに何が含まれているのか、どのような機能を持つのかをmiRNA等の解析を実施していく。

第23回日本再生医療学会総会  
筆頭発表社のCOI開示  
筆頭発表者: 岡田 竜美

演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある企業等はありません。