

Exosome ELISAを用いた神経変性疾患患者血液検体中のEVマーカー量解析

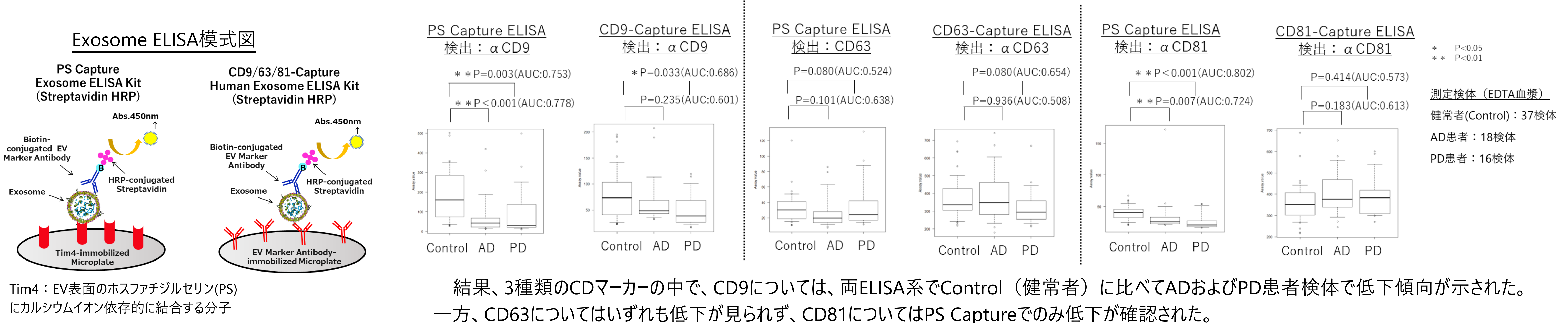
○今若直子¹ 請川亮¹ 西部隆宏¹ ¹富士フイルム和光純薬株式会社 バイオ技術センター

1. 要旨

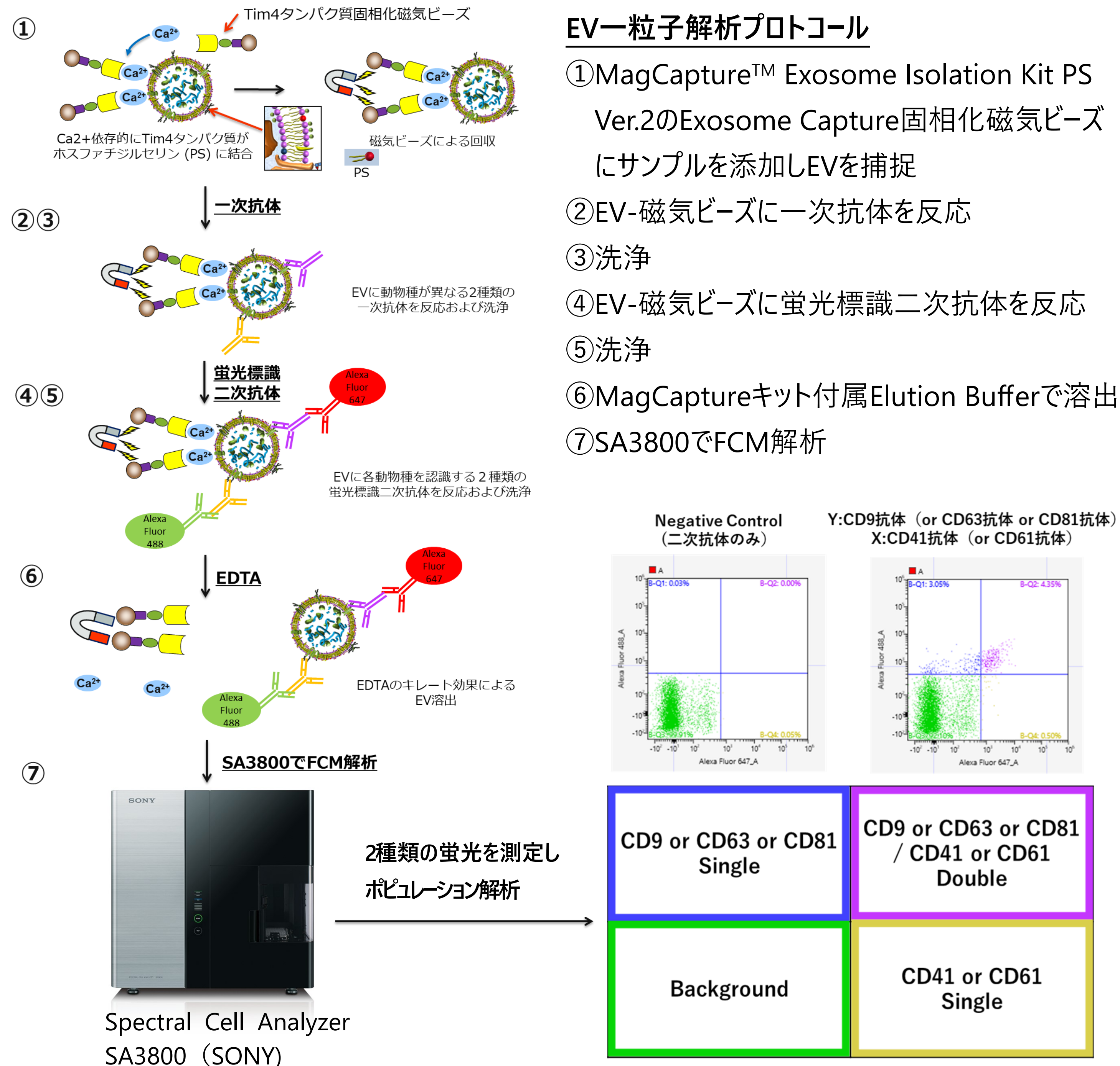
エクソソームを含む細胞外小胞 (EV) は、細胞由来の核酸やタンパク質、脂質等を内包する膜小胞であり、分泌されたEVが血液などの体液を循環していることから、低侵襲な早期診断法が求められているアルツハイマー病 (AD) やパーキンソン病 (PD) をはじめとする神経変性疾患分野においてもバイオマーカーとしての有用性が期待されている。本研究では神経変性疾患における血液中EV量変化をモニタリングする目的で、カルシウム依存的にEV表面のホスファチジルセリンと結合するTim4を用いてEVを捕捉するPS Capture ELISAおよびEVマーカー抗体を用いてEVを捕捉する抗体サンドイッチELISAにより、健常者および神経変性疾患患者血液検体中のEVマーカー-CD9、CD63、CD81量を測定した。その結果、3種類のEVマーカーの中でCD9がADおよびPD患者血漿検体で顕著に低下していることが両ELISA系で確認された。神経変性疾患患者血液検体中CD9陽性EV量の低下が示唆されたため、CD9陽性EVの特性解析として血小板由来EVとの関連性を調査した。FCMを用いたEV一粒子解析の結果、血小板マーカー-CD41陽性EVおよびCD61陽性EVの約90%がCD9を共発現していることが示され、さらにPS Capture ELISAおよび抗体サンドイッチELISAにより、神経変性疾患患者血漿中EVのCD9量だけでなくCD41量およびCD61量も健常者に比べて低下傾向が示された。以上の結果から神経変性疾患患者血液において、血小板由来EVが減少している可能性が示唆された。

2. Exosome ELISAによるEVマーカー測定

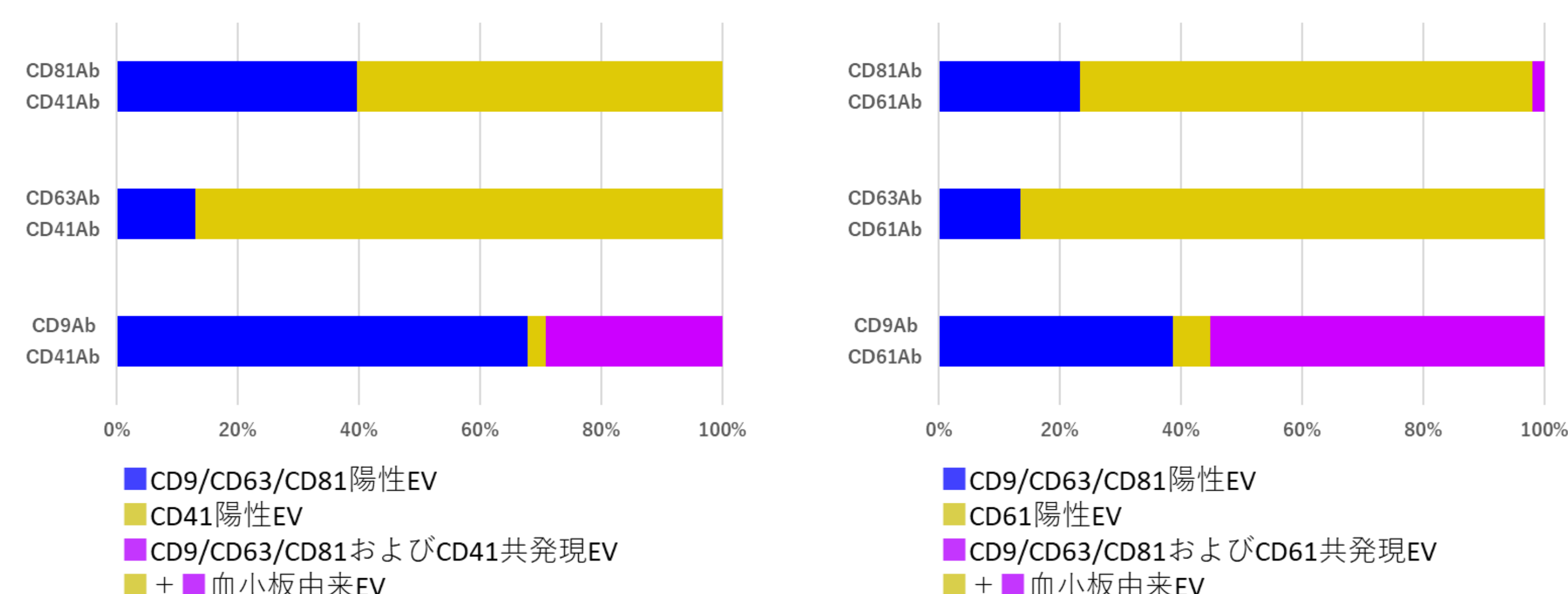
健常者および神経変性疾患患者 (ADおよびPD) 血漿検体について、Tim4をベースとしたPSアフィニティーELISA (PS Capture ELISA) および抗体サンドイッチELISA (CD9/CD63/CD81-Capture ELISA) でCD9、CD63、CD81量を測定した。また、ELISAスタンダードとしてCOLO201細胞由来精製EV (CD9/CD63/CD81陽性EV) を用いて測定値を算出した。



3. PS陽性Exosomeの一粒子解析



健常者由来EDTA個別血漿を用いてPS陽性EVのEVマーカー-CD9、CD63、CD81および血小板マーカー-CD41、CD61の共発現性をFCMによる一粒子解析にて調べた。EVマーカー-CD9、CD63、CD81のみ発現しているEVの割合は青色、血小板マーカー-CD41、CD61のみ発現しているEVの割合は黄色、共発現しているEVの割合は紫色で示している。

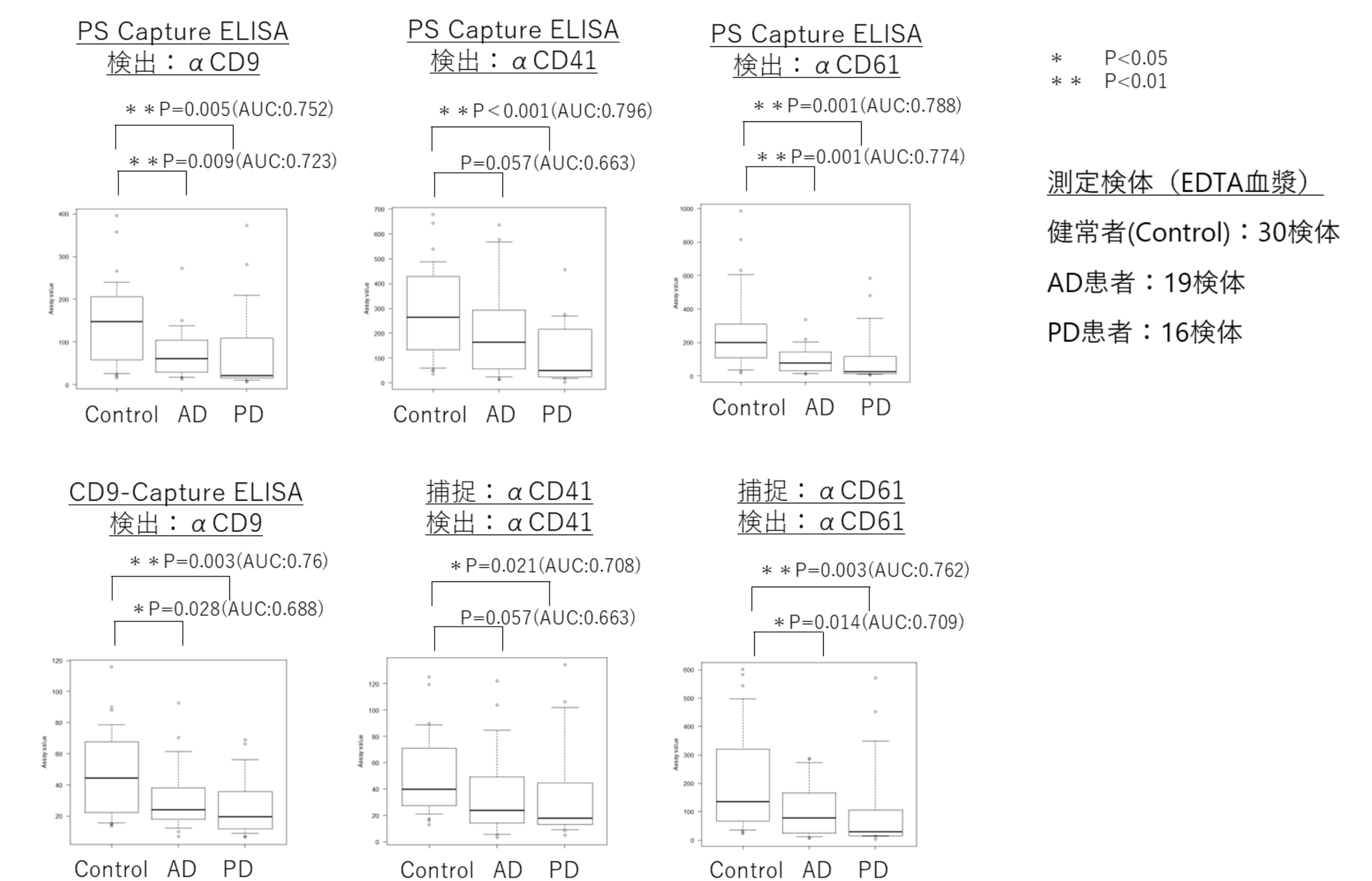


【参考】健常者検体69歳以下と70歳以上のCD9マーカー量比較



4. Exosome ELISAによる血小板マーカー測定

健常者および神経変性疾患患者 (ADおよびPD) 血漿検体について、PS Capture ELISAおよび抗体サンドイッチELISAにより、EVマーカー-CD9、血小板マーカー-CD41およびCD61量を測定した。また、ELISAスタンダードとしてCD9測定はCOLO201細胞由来精製EV、CD41およびCD61測定は健常者EDTA血漿由来精製EV (CD41/CD61陽性EV) を用いて測定値を算出した。



5. 結論

以上の結果から、血小板由来EVの多くがCD9を共発現していること、ADおよびPD患者血漿検体においてCD9量と血小板マーカー-CD41量およびCD61量が減少していることが示され、ADおよびPD患者血液において血小板由来EVが減少している可能性が示唆された。血小板と神経変性疾患の関連については、ADの病態メカニズムや進行に血小板が関与すること、PD患者の血小板には形態や機能の異常が見られることなどがこれまでに報告されており、EV分泌にも影響が及んでいる可能性が考えられる。今後、他の疾患における血小板由来EVマーカー量についても検討を進め、神経変性疾患バイオマーカーとしての有用性を調査していく予定である。

第44回日本認知症学会学術集会
利益相反開示
筆頭発表者名: 今若直子
本演題発表に関連し、開示すべき利益相反関係にある企業
・研究費および給与の支給: 富士フイルム和光純薬株式会社