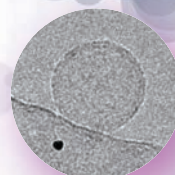
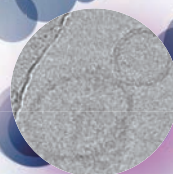
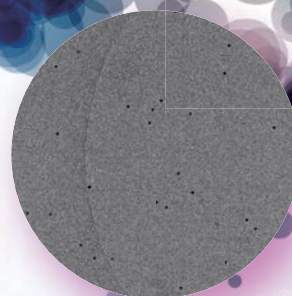
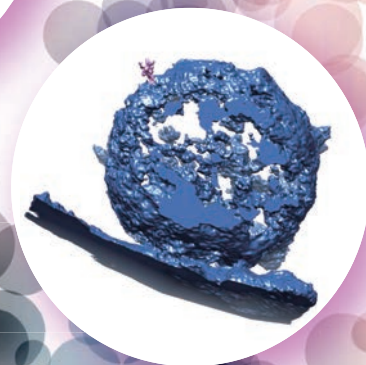
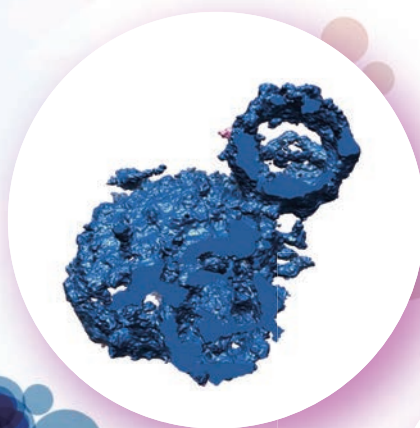


エクソソーム研究試薬

Application Note 集



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

エクソソーム研究試薬 Application Note 集

Application Note 目次

- 抗エクソソーム抗体を使用したエクソソームの免疫電子顕微鏡下での観察例 p 5
- エクソソームマーカーを認識するモノクローナル抗体の使用例 p 6・7
- 抗 CD 81 抗体を用いた Western blotting 法によるエクソソーム蛋白の検出 p 8
- CD 63 抗体（クローン：8A12）を使用したがん細胞が産生する
エクソソームの蛍光免疫染色 p 9
- CD 9 / CD 63 ELISA キットによるがん細胞由来エクソソームの定量 p 10
- ExoTrap Exosome Isolation Spin Column Kit for protein research p 18

商品目次

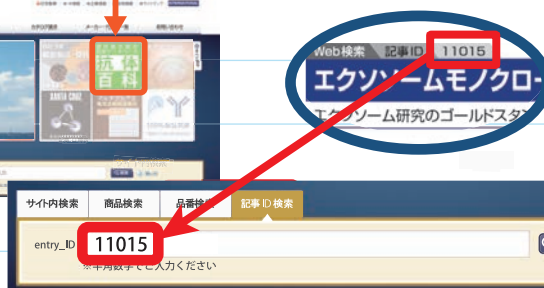
- エクソソームモノクローナル抗体（Anti CD 9, CD 63, CD 81） p 3・4
- ヒト由来エクソソーム定量用 CD 9 / CD 63 ELISA キット p 11
- ヒト由来エクソソーム定量用 CD 9 / CD 9 と CD 63 / CD 63 ELISA キット p 12
- ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit p 13
- CD91(LRP1) 抗体 p 14
- EpCAM 抗体 p 14
- ヒト母乳由来エクソソーム p 15
- ミルクエクソソーム抗体 p 15
- ミルクエクソソーム p 16
- ミルクエクソソーム（CD 81）ELISA キット p 17
- エクソソーム検出ツール作製受託サービス p 19

抗体検索はコチラのアイコンから！

記事 ID 検索のご案内



1 トップページ
「記事 ID 検索」
をクリック！



2 お目当ての「記事 ID」を入力し、検索をクリック！

このアイコンの数字が、
情報を得るための近道です！

これだけ！



エクソソームモノクローナル抗体(Anti CD9, CD63, CD81)

エクソソーム研究のゴールドスタンダード

エクソソームマーカーとして知られているCD9、CD63、CD81を特異的に認識する抗体で、血清、培養上清から免疫沈降法を用いて、エクソソームを単離することができる抗体です。

Biotin、Tide Fluor™ 5、Tide Fluor™ 2WSなどの修飾抗体も販売しています。

特許成立済み

特長

- エクソソーム膜タンパク質CD9、CD63、CD81を高い特異性で認識
- 1 µgの抗体でサンプル150 µlに含まれるエクソソームをほぼ100%単離可能
- エクソソーム表面抗原タンパク質、内在性RNA (miRNA)、タンパク質解析に有用

アプリケーション

- CD9: WB、IP、ELISA、Flowcytometry
- CD63: WB、IP、ELISA、Flowcytometry
- CD81: WB、IP

対応サンプル(ヒトサンプルにて検証)

- CD9: 血清、血漿、培養上清、尿
- CD63: 血清、血漿、培養上清、尿
- CD81: 血清、血漿、培養上清

適用例

IP-WB

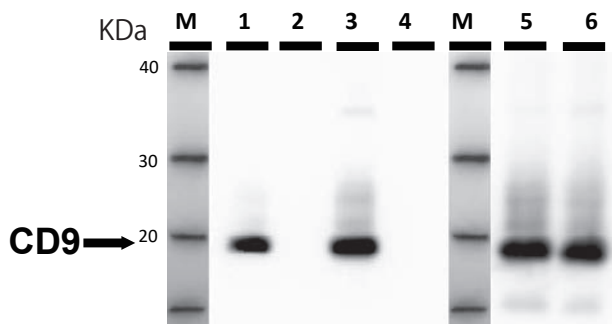


図1 CD9抗体(12A12)による血中エクソソームのIP-WB結果

- | | |
|-----------------|-----|
| 1. CD9抗体(12A12) | 血清A |
| 2. コントロール抗体 | 血清A |
| 3. CD9抗体(12A12) | 血清B |
| 4. コントロール抗体 | 血清B |
| 5. 超遠心 | 血清A |
| 6. 超遠心 | 血清B |

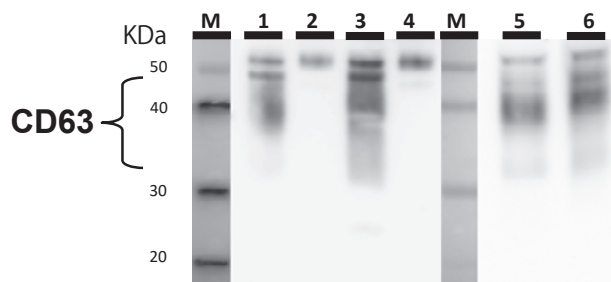


図2 CD63抗体(8A12)による血中エクソソームのIP-WB結果

- | | |
|-----------------|-----|
| 1. CD63抗体(8A12) | 血清A |
| 2. コントロール抗体 | 血清A |
| 3. CD63抗体(8A12) | 血清B |
| 4. コントロール抗体 | 血清B |
| 5. 超遠心 | 血清A |
| 6. 超遠心 | 血清B |

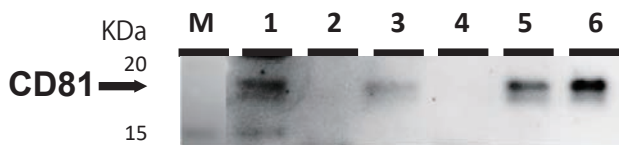


図3 CD81抗体(12C4)による血中エクソソームのIP-WB結果

- | | |
|-----------------|-----|
| 1. CD81抗体(12C4) | 血清A |
| 2. コントロール抗体 | 血清A |
| 3. CD81抗体(12C4) | 血清B |
| 4. コントロール抗体 | 血清B |
| 5. 超遠心 | 血清A |
| 6. 超遠心 | 血清B |

免疫蛍光細胞染色 (ICC/IF)

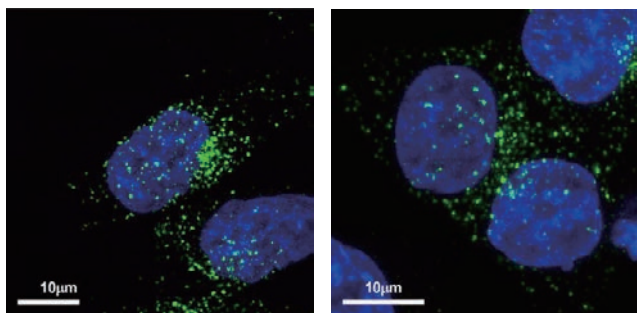


図4 前立腺がん細胞PC-3M及び大腸がん細胞HCT116におけるCD63の局在
A: 前立腺がん細胞PC-3M
B: 大腸がん細胞HCT116
二次抗体に Alexa Fluor® 488 標識抗マウス二次抗体を使用した。
データ提供: 国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 東京医科大学 産学連携講座
細胞外小胞創薬研究講座 小坂 展慶 先生

免疫電子顕微鏡

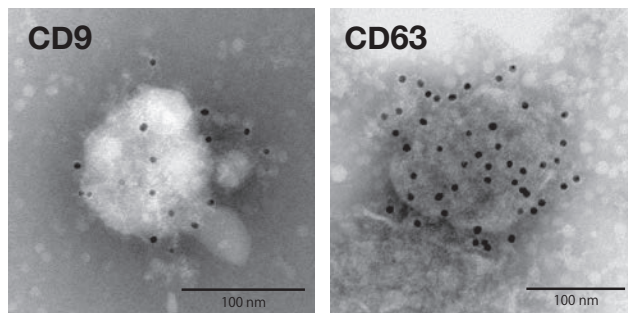


図5 抗ヒトCD9及び抗ヒトCD63抗体によって標識されたヒト乳がん細胞株由来EVの免疫電子顕微鏡画像
抗ヒトCD9抗体 (品番: SHI-EXO-M01) 及び抗ヒトCD63抗体 (品番: SHI-EXO-M02) により、ヒト乳がん細胞株 (MDA-MB-231-luc-D3H2LN) 由来の細胞外小胞 (EV) 表面上のCD9及びCD63分子を検出した。
データ提供: 国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 西田 奈央 先生

クライオ電子顕微鏡

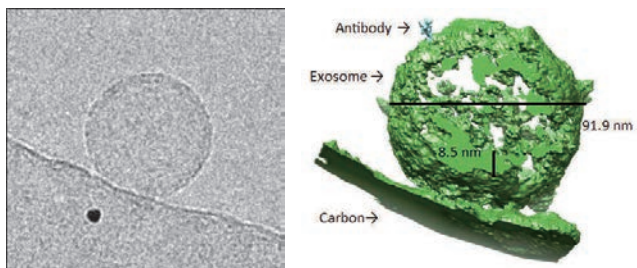


図6 クライオ電子顕微鏡像によるエクソソームと抗ヒトCD63抗体 (clone 8A12) の検出
エクソソームと抗ヒトCD63抗体 (clone 8A12) を混合し、クライオ電子顕微鏡 Titan Krios で撮影した (左)。撮影画像を3次元構築したものが (右) である。
撮影: 沖縄プロテントモグラフィー株式会社

製品使用文献

■ CD9

- S Tsuda *et al.*, *Sci Rep.* 2017 Oct 11;7(1):12989.
- N Nishida-Aoki *et al.*, *Mol Ther.* 2017 Jan 4;25(1):181-191.
- K Matsuzaki *et al.*, *Oncotarget.* 2017 Apr 11;8(15): 24668-24678.
- Kazutoshi Fujita *et al.*, *Sci Rep.* 2017; 7: 42961.
- Yoshioka Y *et al.*, *Nat Commun.* 2014 Apr 7;5:3591.
- Saito S *et al.*, *Sci Rep.* 2018 Mar 5;8(1):3997.
- Yagi Y *et al.*, *Neurosci Lett.* 2017 Jan 1;636:48-57.
- Ueda K *et al.*, *Sci Rep.* 2014 Aug 29;4:6232.

■ CD63

- N Nishida-Aoki *et al.*, *Mol Ther.* 2017 Jan 4;25(1):181-191.
- Yoshioka Y *et al.*, *Nat Commun.* 2014 Apr 7;5:3591.
- Saito S *et al.*, *Sci Rep.* 2018 Mar 5;8(1):3997.

■ CD81

- M Somiya *et al.*, *J Extracell Vesicles.* 2018 Feb 21;7(1):1440132.
- Takahashi A *et al.*, *Nat Commun.* 2017 May 16;8:15287.

■ エクソソームモノクローナル抗体 (非標識)

コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号: CAC

品名	標識	免疫動物 (クローン)	種由来	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti CD9	非標識	mouse (12A12)	human	SHI-EXO-M01	100 μℓ (1 mg/ml)	¥65,000	凍
Anti CD63		mouse (8A12)		SHI-EXO-M02	100 μℓ (1 mg/ml)	¥65,000	凍
Anti CD81		mouse (12C4)		SHI-EXO-M03	100 μℓ (1 mg/ml)	¥65,000	凍

■ エクソソームモノクローナル抗体 (標識付)

コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号: CAC

品名	標識	免疫動物 (クローン)	種由来	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti CD9	Biotin	mouse (12A12)	human	SHI-EXO-M01-B	100 μℓ (1 mg/ml)	¥85,000	凍
Anti CD63		mouse (8A12)		SHI-EXO-M02-B	100 μℓ (1 mg/ml)	¥85,000	凍
Anti CD81		mouse (12C4)		SHI-EXO-M03-B	100 μℓ (1 mg/ml)	¥85,000	凍
Anti CD9	Tide Fluor™ 5	mouse (12A12)	human	SHI-EXO-M01-TF5	100 μℓ (1 mg/ml)	¥85,000	凍
Anti CD63		mouse (8A12)		SHI-EXO-M02-TF5	100 μℓ (1 mg/ml)	¥85,000	凍
Anti CD81		mouse (12C4)		SHI-EXO-M03-TF5	100 μℓ (1 mg/ml)	¥85,000	凍
Anti CD9	Tide Fluor™ 2WS	mouse (12A12)	human	SHI-EXO-M01-TF2	100 μℓ (1 mg/ml)	¥85,000	凍
Anti CD63		mouse (8A12)		SHI-EXO-M02-TF2	100 μℓ (1 mg/ml)	¥85,000	凍
Anti CD81		mouse (12C4)		SHI-EXO-M03-TF2	100 μℓ (1 mg/ml)	¥85,000	凍

研究者が使ってみました！

Application Note

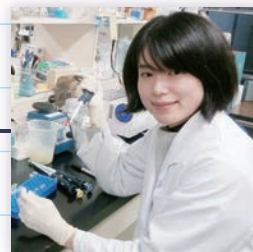
あぶりけしゅんのーと

抗エクソソーム抗体を使用したエクソソームの免疫電子顕微鏡下での観察例

ユーザーレポート

西田 奈央 Nao Nishida-Aoki

国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野



Products

- Anti Human CD9, clone: 12A12 (品番: SHI-EXO-M01)
 - Anti Human CD63, clone: 8A12 (品番: SHI-EXO-M02)
- メーカー: コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号: CAC

エクソソームは直径 100 nm ほどの脂質二重膜の小胞であり、がん細胞はエクソソームを細胞外に分泌して周囲の細胞に悪影響を与え、がんの浸潤や転移を促進する。ならば、がん細胞由来のエクソソームの機能を阻害すれば、がんの転移が抑えられるのではないかとそこで私たちはエクソソームに結合する抗体を用いて、がん細胞由来のエクソソームの作用を阻害し、がんの転移を抑制することを目的に実験を開始した。

今回はヒト乳がん細胞を移植したマウスを転移モデルとして用い、ヒト乳がん細胞由来のエクソソームを認識するための抗体として、抗ヒト CD9 抗体 (clone 12A12) および抗ヒト CD63 抗体 (clone 8A12) をこのマウスモデルに投与することにした。まず、乳がん細胞から単離してきたエクソソームの表面に抗体が結合することを確認しなければならない。エクソソームは直径 100 nm の小胞なので、通常の顕微鏡の倍率では観察できず、電子顕微鏡を使用する必要がある。エクソソームに抗体が結合しているのを確認する術は他にもあるが、百聞は一見に如かず。抗体がエクソソームに結合しているかどうか、免疫電子顕微鏡で直接観察することにした。

しかし免疫電子顕微鏡は様々な条件検討が必要で、確実に標的の分子に結合するという抗体でないと試みにくい。これらの抗体は免疫沈降法に使用できる実績があり、エクソソーム表面の CD9、CD63 に結合することが分かっていたので試しやすかった。

実際には CD63 はすんなりと検出できたものの、CD9 のほうはなかなか検出できなかった。様々な条件の変更を経て、ようやく検出することができた (図 1)。

また、今回の実験の目的では、マウスとヒトの種特異性が大変重要になる。マウスに投与した抗体が、ヒトがん細胞由来の CD9、CD63 だけでなくマウス体内の CD9、CD63 にも結合すれば、毒性があることが容易に予想できるからである。これらの抗体は種特異性が大変高く、ウェスタンブロット法ではヒト由来の CD9、CD63 を容易に検出できたが、マウス由来の CD9、CD63 は、超高感度の検出試薬を使用してもほぼシグナルを検出できなかった (図 2)。そのためか、マウスにヒト CD9、CD63 抗体を投与しても明確な毒性は見られず、抗体投与実験を進めることができた。

以上の結果から、これらの抗体が乳がん細胞由来のエクソソームに特異的に結合するという確信を得て、抗体を乳がんのモデルマウスに投与し、狙い通り実際にがんの転移を抑制することができた (文献)。今回の実験の成功は、ひとえに高品質の抗体によるところが大きいのと考えている。この抗体が、より多くの人の研究に役立つことを願っている。

文献

Nishida-Aoki, N., N. Tominaga, F. Takeshita, H. Sonoda, Y. Yoshioka, and T. Ochiya. 2017. 'Disruption of Circulating Extracellular Vesicles as a Novel Therapeutic Strategy against Cancer Metastasis', *Mol Ther*, 25: 181-91.

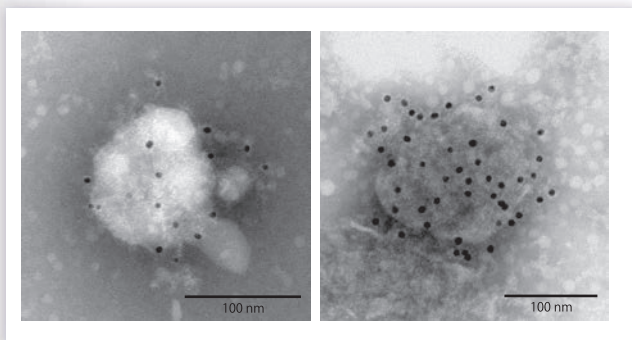


図1 免疫電子顕微鏡によるエクソソーム表面のヒト CD9、CD63 タンパク質の検出例
(A) 抗ヒト CD9 抗体 (clone 12A12) を用いて、ヒト乳がん細胞由来のエクソソームの表面に存在する CD9 の検出を行った。
(B) 抗ヒト CD63 抗体 (clone 8A12) を用いて、ヒト乳がん細胞由来のエクソソームの表面に存在する CD63 の検出を行った。

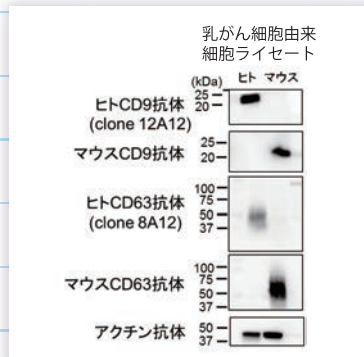


図2 ウェスタンブロット法による CD9、CD63 タンパク質の検出例

抗ヒト CD9 抗体 (clone 12A12)、抗ヒト CD63 抗体 (clone 8A12)、抗マウス CD9 抗体、抗マウス CD63 抗体を用いて、ヒト乳がん細胞株 (MDA-MB-231-D3H2LN) およびマウス乳がん細胞株 (4T1-luc) 由来の細胞ライゼートから、CD9、CD63 の検出を行った。

敬称は省略させていただきます

研究者が使ってみました！

Application Note

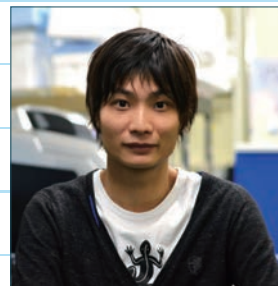
あぷりけいしょんのーと

エクソソームマーカーを認識する モノクローナル抗体の使用例

ユーザーレポート

吉岡 祐亮 Yusuke Yoshioka

国立がん研究センター研究所



Products

- Anti CD9 for Exosome Isolation, Human (Mouse) Unlabeled, 12A12 (品番：SHI-EXO-M01)
 - Anti CD63 for Exosome Isolation, Human (Mouse) Unlabeled, 8A12 (品番：SHI-EXO-M02)
 - Anti CD81 for Exosome Isolation, Human (Mouse) Unlabeled, 12C4 (品番：SHI-EXO-M03)
- メーカー：コスモ・バイオ株式会社

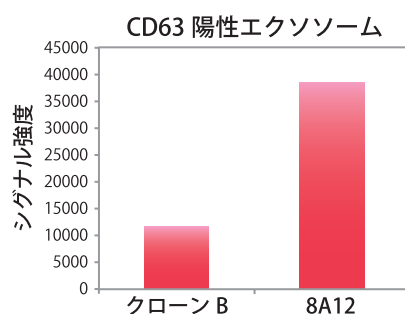
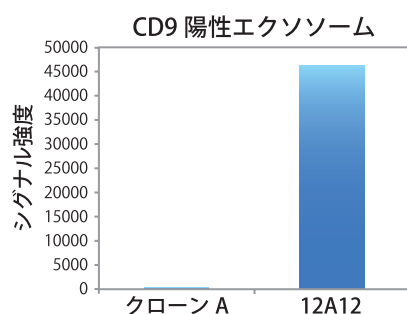
1975年にジョージ・ケーラーとセーサル・ミルスタインはモノクローナル抗体作製技術を発明し、1984年にはノーベル生理学・医学賞を受賞した。ただ、単一のエピトープを認識するというだけであるが、モノクローナル抗体の存在は、現在の診断分野、抗体医薬品などの分子標的治療薬などの医薬品に革命をもたらしている。医療分野のみならず、われわれ生命科学研究者への貢献も多大である。モノクローナル抗体は特定のタンパク質の検出、細胞内の局在やタンパク質間の相互作用、アフィニティー精製など、様々な用途に使用されており、「良い」抗体を手に入れることは、研究の推進力になりうる。この場合の「良い」は、その用途や状況によって異なるが、概ね、対象となる解析アプリケーションにて単一の分子を認識し、強く結合することである。

エクソソーム研究においても、「良い抗体」を手に入れることは重要である。エクソソームは100 nm前後の大きさであり、脂質二重膜の内部や膜上には様々なタンパク質が存在している。現在、体液や培養上清からエクソソームを回収し、その存在を確認する方法として、免疫電子顕微鏡法やイムノプロット法によるエクソソームマーカーの検出が挙げられる。これら方法はどちらも抗体が必要となる。また、エクソソームタンパク質の定量法としてELISA法などが用いられることもあり、こちらも抗体が必要である。さらに、

エクソソーム膜タンパク質に対して、抗体を用いて、免疫沈降法やカラムを用いたアフィニティー精製を行い、特定のエクソソームポピュレーションのみを回収する方法にも抗体は利用されている。

このようにエクソソーム研究において、抗体の使用用途は多岐に渡るが、実際どのような抗原を認識する抗体がエクソソーム研究において重宝されるかである。エクソソームは様々な分子から成る複合体であるため、同一細胞から分泌されたエクソソームが全て同じ分子を内包しているとは限らない。しかし、エクソソームマーカーと呼ばれるタンパク質が、大部分のエクソソームに含まれるとされている。正確な割合などは分からないものの、エクソソームと呼ばれるものを回収して、エクソソームマーカーの有無を調べるとその存在が確認できる。現在は、主にCD9やCD63、CD81などのテトラスパニンがエクソソームマーカーとして用いられており（文献1）、これら抗原に対する抗体はエクソソーム研究においても、必然的に使用頻度および必要性が高くなる。

私がエクソソーム研究を始めるにあたり、エクソソーム検出系を構築するところから始めたが、この検出系においてエクソソームマーカーを認識するモノクローナル抗体を探すのに苦労した。いくつものクローンを試したものの、イマイチな結果であった。かろうじて、ウェスタンブロット法に使えるエクソソームマーカー



(左) 抗 CD9 抗体を用いて CD9 陽性エクソソームの検出を行った。クローン A はシグナルを得られなかったが 12A12 は良好なシグナルが得られた。

(右) 抗 CD63 抗体を用いて CD63 陽性エクソソームの検出を行った。クローン B はシグナルが得られたものの、8A12 を使用することでさらに強いシグナルが得られた。

図 1 エクソソーム検出系における抗体の比較例

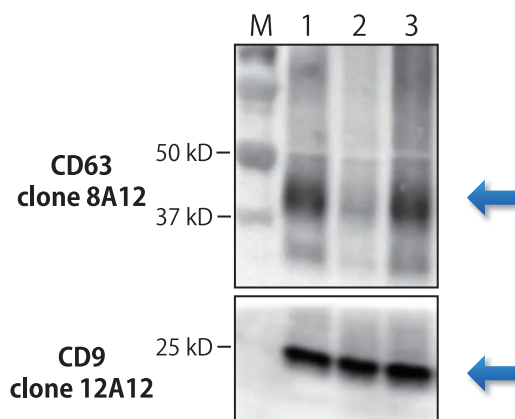
抗体を手に入れたが、私の使用用途には合わなかった。そのような時、抗 CD9 抗体 12A12 と抗 CD63 抗体 8A12 と出会い、エクソソーム検出系が上手く行くこととなった (図 1) (文献 2 参照)。この抗体はエクソソーム検出の際に行うウェスタンブロット法 (図 2) や免疫電子顕微鏡法にも利用可能であった。ヒト以外の動物種、例えばマウス CD9 やマウス CD63 は認識しないため、マウスの系には利用できないが、マウスへのヒトがん細胞移植系の実験などではヒトとマウスのエクソソームを区別することができるため、返って重宝する場合もある。

エクソソームマーカーに限ったことではないが、良い抗体が手に入らずに行いたい実験系が組めないことは良く耳にする。もし、ヒトエクソソームの検出などで困った場合、抗 CD9 抗体 12A12 や抗 CD63 抗体 8A12、抗 CD81 抗体 12C4 を利用することで実験が上手く進むかもしれない。

1. Yoshioka Y, et al.: *J Extracell Vesicles*, 2: 20424, 2013

2. Yoshioka Y, et al.: *Nat Commun*, 5: 3591, 2014

ヒト血清由来エクソソーム



(上) 抗 CD63 抗体を用いてヒト血清由来エクソソームにおける CD63 陽性エクソソームの検出を行った。

(下) 抗 CD9 抗体を用いてヒト血清由来エクソソームにおける CD9 陽性エクソソームの検出を行った。

図 2 ウェスタンブロット法におけるエクソソームマーカーの検出例

エクソソーム単離用モノクローナル抗体 Anti CD9, CD63, CD81

人と科学の未来を拓く
コスモ・バイオ株式会社

本製品はエクソソームマーカーとして知られている CD9, CD63, CD81 を特異的に認識する抗体で、血清、培養上清から免疫沈降法を用いて、エクソソームを単離することが出来る抗体です。

- エクソソーム膜タンパク質 CD9, CD63, CD81 を高い特異性で認識
- 1 µg の抗体でサンプル 150 µL に含まれるエクソソームをほぼ 100% 単離可能

コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号: CAC

品名	適用	品番	包装	希望販売価格
Anti CD9 for Exosome Isolation, Human (Mouse) Unlabeled, 12A12	WB, ELISA, IP	SHI-EXO-M01	100 µL	¥100,000
Anti CD63 for Exosome Isolation, Human (Mouse) Unlabeled, 8A12	WB, IP	SHI-EXO-M02	100 µL	¥100,000
Anti CD81 for Exosome Isolation, Human (Mouse) Unlabeled, 12C4	WB, IP	SHI-EXO-M03	100 µL	¥100,000

詳しい情報は、3 ページへ

研究者が使ってみました！

Application Note

あぶりけーしょんのーと

抗 CD81 抗体を用いた Western blotting 法によるエクソソーム蛋白の検出

ユーザーレポート

高橋 暁子 Takahashi Akiko

公益財団法人がん研究会 がん研究所 細胞老化プロジェクト

Products

● Anti CD81, Human (Mouse) Unlabeled, 12C4

品番：SHI-EXO-M03 コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号：CAC



エクソソームは、後期エンドソームに ESCRT 複合体やセラミド合成酵素によって腔内小胞が形成された多胞性エンドソーム (Multivesicular body) を経て、細胞外へと分泌される直径 50-150nm 程の細胞外膜小胞である。蛋白質、脂質、核酸のような様々な細胞内構成分子がエクソソームによって他の細胞に伝達されることから、近年エクソソームが細胞間コミュニケーションツールとして働いていることが報告され大変に注目を集めている。

私たちは老化細胞が炎症性サイトカインやケモカインなどの炎症性蛋白質を高発現し細胞外へと分泌する SASP

(Senescence-associated secretory phenotype) の解析を行う過程で、老化細胞は炎症性蛋白質だけではなく細胞外分泌膜小胞の一種であるエクソソームの分泌も亢進していることを見出した¹⁾。ヒト正常線維芽細胞を用いて分裂寿命による細胞老化 (Replicative senescence) と活性化型がん遺伝子

(RasV12) による細胞老化 (Oncogene-induced senescence) を誘導し、あらかじめ血清中のエクソソーム画分を除去した培地で 48 時間培養後に、培養上清中のエクソソームを超遠心法で回収した。そして細胞が分泌するエクソソームの量を NTA 法 (Nanoparticle Tracking Analysis 法) で計測したところ、老化細胞ではエクソソームの分泌量が若い細胞の約 30 ~ 50 倍亢進していることが明らかとなった (図 1、上段)。さらに細胞が分泌したエクソソームマーカー蛋白の量を比較解析するために、回収したエクソソーム画分を用いて Western blotting を行った。この時、コスモ・バイオ社から発売されている抗ヒト CD81 モノクローナル抗体 (SHI-EXO-M03) を 1:1000 希釈で使用したところ、老化細胞では若い細胞に比べて明らかにエクソソーム蛋白質の分泌量が増加していることが確認された (図 1、下段)。私たちは老化細胞で分泌量

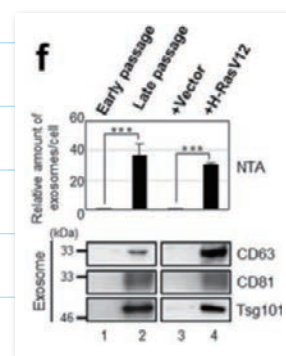


図 1 ヒト正常線維芽細胞 (TIG-3) が分泌するエクソソームの解析^{*1}
NTA 法によるエクソソームの測定結果と Western blotting 法によるエクソソームマーカー蛋白の検出。

^{*1} ©Akiko Takahashi (Japanese Foundation For Cancer Research) Nature Communications volume 8, Article number: 15287 (2017) (<https://www.nature.com/articles/ncomms15287>) (Licensed under CC BY 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

が亢進しているエクソソームは、乳がん細胞 (MCF-7) の増殖促進作用を示すことも観察している²⁾。

エクソソームはこれまで、その細胞間コミュニケーションツールとしての機能や診断ツールとしての有用性が特に注目され研究が進んできたが、細胞が何故エクソソームを分泌するのか、その生物学的な意義についてはまだまだ未知の部分が多い。私たちは正常な細胞がエクソソームを分泌する詳細な分子メカニズムを解析することで、エクソソーム分泌の生物学的意義を明らかにしたいと考えている。さらに、老化細胞が分泌する SASP 因子としてのエクソソームの機能を解析することで、エクソソームが生体内で果たす役割やがんをはじめとする加齢性疾患とエクソソームの関りを解明したい。

1) Takahashi, A. et al. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun* 8, 15287 (2017).

2) Takasugi, M. et al. Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nat Commun* 8, 15729 (2017).

こちらを使ってみました！

エクソソームモノクローナル抗体 Anti CD81

人と科学のステキな未来へ
コスモ・バイオ株式会社

品名	品番	包装	希望販売価格
Anti CD81, Human (Mouse) Unlabeled, 12C4	SHI-EXO-M03	100 µL [1 mg / mL]	¥65,000

詳しい情報は、3 ページへ

メーカー：コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号：CAC

敬称は省略させていただきます

研究者が使ってみました！

Application Note

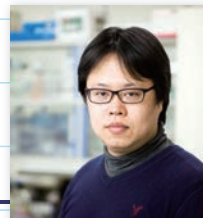
あぷりけいしょんのーと

CD63 抗体 (クローン :8A12) を使用したがん細胞が産生するエクソソームの蛍光免疫染色

ユーザーレポート

小坂 展慶 Nobuyoshi Kosaka

国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野
東京医科大学産学連携講座細胞外小胞創薬研究講座



Products

● Anti CD63, Human (Mouse) Unlabeled, 8A12

品番：SHI-EXO-M02 メーカー：コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号：CAC

直径約 100 nm ほどの小胞であるエクソソームは、細胞外に分泌される脂質の二重膜をもつ小胞顆粒である。ISEV (International Society for Extracellular Vesicles) により、様々な分泌顆粒をまとめる用語として細胞外小胞顆粒 (Extracellular Vesicles) の使用が推奨されている。多様な分泌顆粒の中でエクソソームは、エンドソーム由来のものと定義されている。

昨今のエクソソーム研究の隆盛により、多くの疾患におけるエクソソームの役割が明らかにされている。しかし、1) エクソソームの生理学的な役割の理解、2) エクソソームを標的とした疾患治療の実現、のためには、エクソソームの産生機構を理解する必要がある。特に、他の細胞よりもエクソソームの分泌量が多いがん細胞におけるエクソソームの産生機構を解明することは、新たながんの治療に結びつく可能性が示唆されている。そこで、エクソソームの産生機構を理解するために、エクソソームのマーカータンパク質として有名な CD63 の免疫染色を行い、細胞内のエクソソーム産生の動態を追跡することにした。ヒト CD63 に対する抗体は、様々なものが手に入るが、今回はコスモ・バイオ社から発売している抗ヒト CD63 抗体 (clone 8A12) を用いた。

その結果、前立腺がん細胞株 PC-3M (図 1)、大腸がん細胞株 HCT116 (図 2) において、多数の CD63 陽性の顆粒様構造が見られた。今回の実験では、抗ヒト CD63 抗体のみの染色であり、がん細胞が多くの CD63 陽性の顆粒を持つことだけがわかった。今後はこの抗ヒト CD63 抗体をその他のエンドソームマーカーなどと共染色することにより、どのような遺伝子が、がん細胞におけるエクソソームの産生を制御しているかを解明したい。

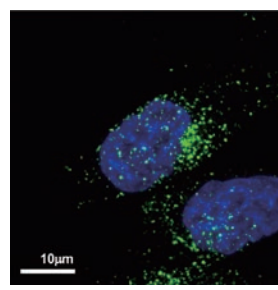


図 1 前立腺がん細胞 PC-3M における CD63 の局在。二次抗体に Alexa Fluor® 488 標識抗マウス二次抗体を使用した。

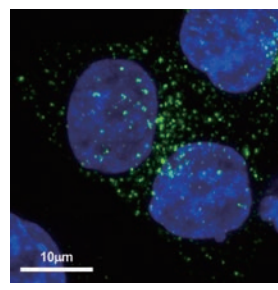


図 2 大腸がん細胞 HCT116 における CD63 の局在。二次抗体に Alexa Fluor® 488 標識抗マウス二次抗体を使用した。

本抗体は、ヒト CD63 に対する特異性が非常に高く、本抗体の投与により、エクソソームによるがんの転移を抑えることに成功している。さらにウェスタンブロッティングや免疫電子顕微鏡、そして ELISA にも使用可能である。今回、免疫染色にも使用できることがわかったため、エクソソーム研究において非常に汎用性の高い抗ヒト CD63 抗体であると言える。

こちらを使ってみました！

エクソソームモノクローナル抗体 Anti CD63



人と科学の未来を拓く
コスモ・バイオ株式会社

品名	品番	包装	希望販売価格
Anti CD63, Human (Mouse) Unlabeled, 8A12	SHI-EXO-M02	100 μL [1 mg / mL]	¥57,000

詳しい情報は、3 ページへ

メーカー：コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号：CAC

敬称は省略させていただきます

研究者が使ってみました！

Application Note

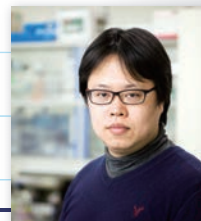
あぶりけーしょんのーと

CD9 / CD63 ELISA キットによるがん細胞由来エクソソームの定量

ユーザーレポート

小坂 展慶 Nobuyoshi Kosaka

国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野
東京医科大学産学連携講座細胞外小胞創薬研究講座



Products

● CD9/CD63 Exosome ELISA Kit

品番：EXH0102EL メーカー：コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号：CSR

最近、様々な研究分野で注目を浴びるエクソソームは、脂質の二重膜をもつ直径約 100 nm ほどの細胞外に分泌される小胞である。エクソソームの定義として、エンドソーム由来の顆粒とされているが、その産生・分泌機構に関しては不明な点が多い。エクソソーム研究が盛んになるにつれ、様々な疾患におけるエクソソームの機能が明らかにされているが、今後のさらなる研究の進展やエクソソームを標的とした疾患治療法の開発には、エクソソームの産生機構を十分に理解する必要がある。

エクソソームの産生機構の理解には、エクソソームの定量が必須であるが、これまでのエクソソームの定量法は、超遠心によりエクソソームを単離した後に、タンパク質量や NTA 法（Nanoparticle Tracking Analysis 法）などにより粒子数の測定をする方法が一般的であった。しかしこれらの方法では、エクソソームの産生機構に関わる遺伝子のスクリーニングには不向きであり、精製なしにエクソソームを高感度に定量できる方法が必須である。

エクソソームの定量方法として様々なものが販売されているが、今回は簡便性と実用性を考えて、普段の研究でも使用している ELISA 法を用いることとし、コスモ・バイオ社から発売している CD9 / CD63 ELISA キットを使用した。

図に示した細胞数で前立腺がん細胞株 PC-3M 細胞を 96 ウェルプレートに播種した翌日、培養液を無血清培地に変え、2 日間培養した。その後培養上清を回収し、「遠心などの精製行程」をしないで本キットによる定量を行った。図に示すよ

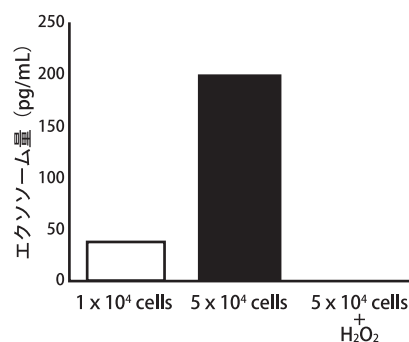


図 それぞれの PC-3M 細胞数と H₂O₂ 処理後の培養上清におけるエクソソームの定量

うに、培養上清中のエクソソーム量を定量することに成功した。さらにその量は、細胞の播種数に依存して増えることがわかった。興味深いことに、H₂O₂ で処理して細胞死を起こした PC-3M 細胞の培養上清では、一切のシグナルが検出されなかった。

本 ELISA キットは、細胞死により生じた細胞断片でも偽陽性を示さなかったことから非常にエクソソームに特異性の高い ELISA キットであると言える。今後、エクソソームの産生機構を解明することを目的とした様々なスクリーニングに貢献すると思われる。

詳しい情報は、右ページへ

敬称は省略させていただきます

ヒト由来エクソソーム定量用CD9／CD63 ELISA キット

血液サンプルや細胞上清から直接定量できます

エクソソームの定量法としては、エクソソームが含むタンパク質量で代替する方法や、ナノトラッキング法による粒子解析がありますが¹⁾、これらの方法は超遠心法などで一旦エクソソームを精製する必要があります。体液中や細胞培養液中のエクソソームを直接定量する手段は極めて限られており、これまで一般的な方法は開発されてきませんでした。

本商品は、エクソソーム・マーカーであるCD9とCD63に対する高性能抗体を用いたサンドイッチELISAにより、体液中や細胞培養上清中に含まれる表面に**CD9分子とCD63分子を合わせ持つ**エクソソームを相対的に定量することができます。

参考文献

1) V. Filipe, A. Hawe and W. Jiskoot: *Pharm Res.*, 27, 796 (2010).

キットの原理

プレートには抗ヒトCD9抗体が固相されていて、検体を加えると検体中のエクソソームがトラップされます。洗浄後、トラップされたエクソソーム表面のCD63に対してHRP標識した抗ヒトCD63抗体を反応させ基質添加後HRPによる発色をプレートリーダーで読み取り定量します。

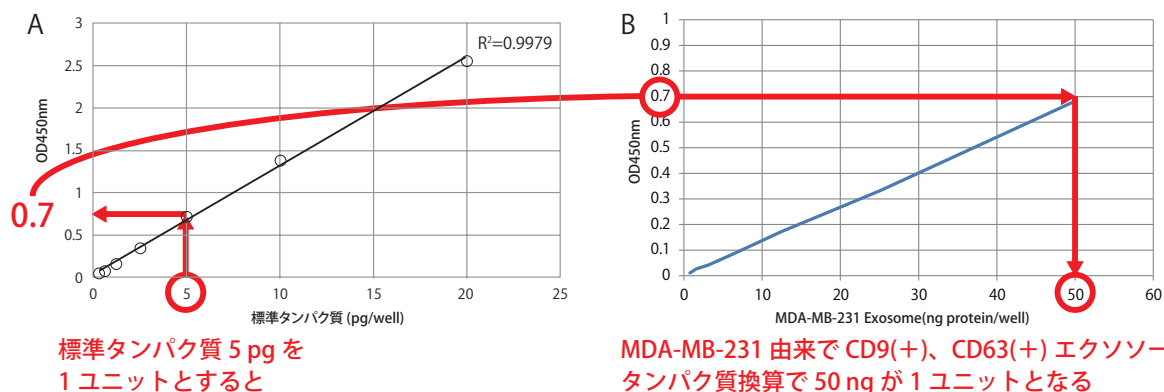


図1 CD9/CD63融合タンパク質による標準化と相対定量の概要

乳がん細胞株MDA-MB-231の培養上清から超遠心法により精製したエクソソームを0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 ng ずつウェルに加え測定した。CD9/CD63融合タンパク質を標準タンパク質として検量線を描き(図1. A)、例えばCD9/CD63融合タンパク質 5 pg を1ユニットとした場合、そのOD450測定値は約0.7である。MDA-MB-231細胞由来エクソソームのOD450測定値をプロットした図1. Bに照合すると、測定値が0.7に相当するのは、約50 ngであり、これをCD9陽性かつCD63陽性エクソソームとみなすことができる。

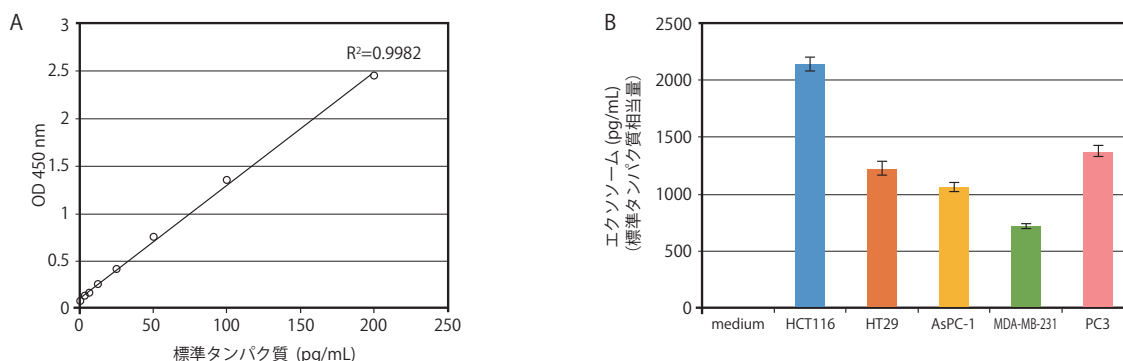


図2 細胞培養上清サンプルの測定例

10%ウシ胎児血清(FBS)を含む培地を用いて様々な細胞株(HCT116, HT29, AsPC-1, MDA-MB-231, PC3)を8日間培養した後にその上清を回収し、遠心上清をサンプルとした。測定値が検量線範囲内に収まるようサンプルを適宜希釈し、希釈調整した標準タンパク質とともに測定した。本キットでは標準タンパク質を基準とした相対定量を行う。標準タンパク質の測定結果をもとに横軸に標準タンパク質量、縦軸に吸光度を取り検量線を描く(図2. A)。この検量線とサンプルの吸光度を照らし合わせることで、サンプル中のエクソソーム量を標準タンパク質相当量として計算する(図2. B)。実験ごとに検量線を描くことで、異なる実験間のエクソソーム量を直接比較できる。

コスモバイオ株式会社 メーカー略号: CSR

品名 / 構成内容	感度	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CD9/CD63 Exosome ELISA Kit					
● 抗CD9抗体固相化96ウェルプレート ● アッセイバッファー ● HRP標識抗CD63抗体 (500×) ● 停止液 (2N H₂SO₄)	3.125 pg/mL	EXH0102EL	1kit (96 test)	¥100,000	Ⓔ
● 標準タンパク質 (2000 pg/mL) ● 洗浄バッファー (10×) ● 基質液 ● プレートシール					

ヒト由来エクソソーム定量用 CD9/CD9とCD63/CD63のELISA キット

エクソソーム構造を模したCD9あるいはCD63スタンダードビーズで正確に補正

エクソソームの定量法としては、エクソソームが含むタンパク質量で代替する方法や、ナノトラッキング法による粒子解析がありますが¹⁾、これらの方法は超遠心法などで一旦エクソソームを精製する必要があります。体液中や細胞培養液中のエクソソームを直接定量する手段は極めて限られており、これまで一般的な方法は開発されてきませんでした。

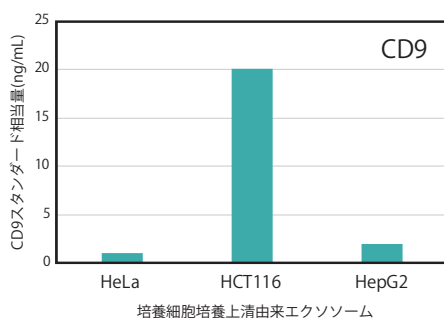
本キットは、エクソソーム・マーカーであるCD9とCD63それぞれに対する高性能抗体を用いたサンドイッチELISAにより、表面に**CD9**あるいは**CD63**分子を持つエクソソームを相対的に定量することができます。

参考文献

1) V. Filipe, A. Hawe and W. Jiskoot: *Pharm Res.*, 27, 796 (2010) .

特 長

- 標準試薬として保存安定性に欠けるエクソソームそのものを使用せず、CD9あるいはCD63を固定した粒子径200 nmのビーズを使用して安定性と再現性を確保
- エクソソーム構造を模したCD9あるいはCD63スタンダードビーズにより補正することで、各サンプルの相対定量が可能
- 特殊な装置は不要（通常のプレートリーダーを使用）



標準タンパク質ビーズ換算	(ng/mL)		
	HeLa	HCT116	HepG2
exosome 500 ng/mL	1.0	20.1	2.0

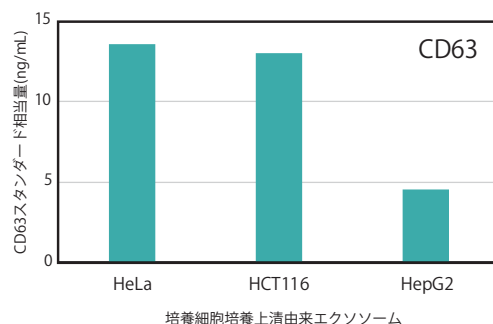
図1 CD9/CD9 ELISAによる精製エクソソームの定量

図注釈 3種類のヒトがん細胞株 (HeLa, HCT116, HepG2) の培養上清 (無血清) から超遠心法で精製したエクソソームを500 ng/mLの濃度に希釈し、それぞれCD9/CD9 ELISA (図1) あるいはCD63/CD63 ELISA (図2) で測定した。定量値はCD9 (あるいはCD63) タンパク質を固定したスタンダードビーズによる標準曲線にあててそれぞれのスタンダードビーズ相当量 (ng/mL) で示した。その結果、細胞種によって表面のCD9、CD63の相対量に特長があることがわかった。

構成内容

- 抗CD9 (もしくは抗CD63) 抗体固相化96ウェルプレート
- CD9 (もしくはCD63) スタンダードビーズ 200 μ l ^{※1}
- アッセイバッファー 25 mL
- 洗浄バッファー (10X) 25 mL
- HRP 標識抗CD9 (もしくはCD63) 抗体 (500X) 20 μ l
- 基質液 12 mL
- 停止液 (2N H₂SO₄) 6 mL
- プレートシール 2枚

※1: n=2として、検量線4回分



標準タンパク質ビーズ換算	(ng/mL)		
	HeLa	HCT116	HepG2
exosome 500 ng/mL	13.6	13.0	4.5

図2 CD63/CD63 ELISAによる精製エクソソームの定量

株式会社ハカレル メーカー略号: HAK

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ヒト由来エクソソーム定量用CD9 / CD9 ELISA キット	HAK-HEL0909-1	1 kit (8 well × 12 strips)	¥100,000	㊟
ヒト由来エクソソーム定量用CD63 / CD63 ELISA キット	HAK-HEL6363-1	1 kit (8 well × 12 strips)	¥100,000	㊟

PD-L1 陽性エクソソーム (CD9) ELISA キット

ヒト血液サンプルや細胞培養上清から

PD-L1 陽性エクソソームを1 Step ELISA 法で直接定量!

株式会社ハカレル メーカー略号: HAK

品名	品番	包装	希望販売価格
ヒトPD-L1陽性エクソソーム (CD9) ELISAキット	HAK-HELPL109-1	1 キット	¥100,000

詳しい情報は、コスモ・バイオ Web サイト「記事 ID 検索」で。 [36119](#) クリック!

ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit

スピナラムでプロテオミクス研究グレードのエクソソーム精製

スピナラムにエクソソームマーカーとして知られているヒトCD9抗体を固相化し、ヒト血清、血漿、唾液、尿、培養上清から30分以内でウェスタンブロット、質量分析等のタンパク質研究に使用できるエクソソーム由来タンパク質を濃縮することができます。

特長

- 血清、血漿、尿、唾液、培養上清（全てヒトサンプルのみで試験済み）から高純度なエクソソーム由来のタンパク質を30分以内で濃縮することができる
- 使いやすいスピナラムタイプ

ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- 1.7 mlチューブ（ビーエム機器 品番：BM4017推奨）
- PBS
- 溶出バッファー

血清、血漿サンプルからの精製プロトコール

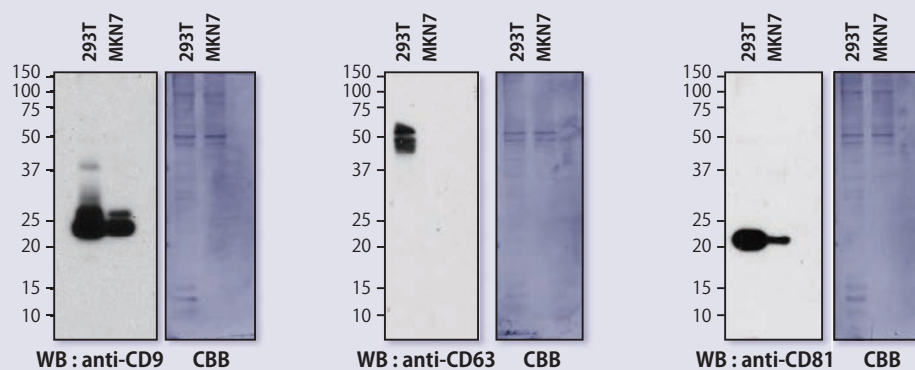
- ① 血清、血漿をPBSで6倍希釈し、12,000 rpm、4℃、15 min遠心する。
- ② 0.22 μmのフィルターで上清をろ過し、新しいチューブに回収する。
- ③ ExoTrap™ の上下のキャップを開封し、1.7 mlチューブにカラムをセットし、5,000 rpm、20℃、1分遠心して保存液を捨てる。
- ④ サンプル600 μl をカラムにアプライし、5,000 rpm、20℃、1分遠心し、FTを除去する。
- ⑤ ④を必要回数繰り返す。（この実験例ではEDTA血漿200 μl を6倍希釈し、2回繰り返した）
- ⑥ PBS 600 μl をカラムにアプライし、5,000 rpm、20℃、1分遠心し、FTを除去する。
- ⑦ ⑥をもう一度繰り返してカラムを洗浄する。
- ⑧ カラムを新しい1.7 mlチューブに寄せ換える。
- ⑨ 各種アプリケーションに適した溶出バッファーをカラムのフィルタ部分にアプライする。
- ⑩ 37℃、30分インキュベートする。
- ⑪ 7,500 rpm、20℃、1分遠心してサンプルを回収する。

細胞培養上清、尿、脳脊髄液などタンパク質濃度が低いサンプルには別のプロトコールを用います。

ウェスタンブロットによる実験例

ExoTrap™ を使用してSDSサンプルバッファー50 μl にてエクソソーム由来タンパク質を回収後、ウェスタンブロットにてエクソソームマーカーの発現を確認した。

1. 培養上清からのエクソソーム単離

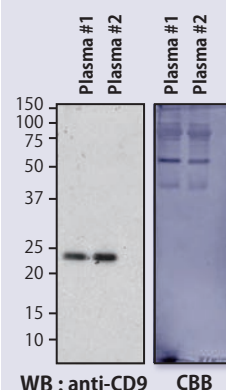


サンプル：293T細胞培養上清、MKN7細胞培養上清

一次抗体：Anti CD9（品番：SHI-EXO-M01）、Anti CD63（品番：SHI-EXO-M02）、
Anti CD81（品番：SHI-EXO-M03）

アプライ量：20 μl / レーン

2. ヒト血漿からのエクソソーム単離



サンプル：ヒト血漿 EDTA 処理

一次抗体：Anti CD9（品番：SHI-EXO-M01）

アプライ量：20 μl / レーン

製品使用文献

- Yoshitaka S. (2017) Elimination of LMP1-expressing cells from a monolayer of gastric cancer AGS cells, *Oncotarget*, 8(24): 39345-39355. PMID: PMC5503617
- Tsuda S. (2017) Novel mechanism of regulation of the 5-lipoxygenase/leukotriene B4 pathway by high-density lipoprotein in macrophages, *Sci Rep.*, 7(1):12989. PMID: PMC5636875

コスモバイオ株式会社 メーカー略号：CSR

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit for Protein Research	SHI-EXO-K010	10 prep.	¥57,000	Ⓔ

CD91 (LRP1) 抗体

エクソソーム研究に

背景

LDL Receptor-Related Protein (LRP1、CD91)¹⁾は、ミエリン関連糖タンパク質 (MAG)²⁾の高親和性エンドサイトーシス受容体として、リガンドに結合してシグナル伝達特性を示し³⁾、リポタンパク質代謝、プロテアーゼの分解、リソソーム酵素の活性化、細菌毒素とウイルスの細胞侵入⁴⁾などの多様な分野で役割を果たすことが知られています。

CD91 (LRP1) は、潜在的な NSCLC (非小細胞肺癌) のエクソソームマーカーである可能性が示されています⁵⁾。CD91 (LRP1) の発現は肺がんの転帰の改善と関連し⁶⁾、アゴニストは脊髄損傷後の再生を促進します⁷⁾。

参考文献

- 1) Herz J, et al., *EMBO J.* 1988 Dec 20;7(13):4119-27. PMID: 3266596.
- 2) Stiles TL, et al., *J Cell Sci.* 2013 Jan 1;126(Pt 1):209-20. PMID: 23132925.
- 3) Etique N, et al., *Biomed Res Int.* 2013;152163. PMID: 23936774
- 4) Lillis AP, et al., *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1884-93. PMID: 16102056

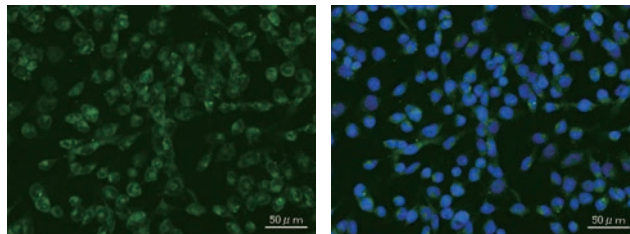


図1 SJRH30細胞株の免疫染色画像
サンプル: SJRH30細胞株
一次抗体: anti-CD91 (B3-3E11) 抗体 (10 μg/ml)
二次抗体: Anti-Mouse IgG-Alexa Fluor 488 抗体 (8 μg/ml)
核染色: Hoechst 33342 (緑色: 抗体, 青色: 染色された核)

5) Huang SH, et al., *Cancer Invest.* 2013;31: 330-335. PMID: 23614656

6) Meng H, et al., *Clin Cancer Res.* 2011 Apr 15;17(8):2426-33. PMID: 21325077

7) Yoon C, et al., *J Biol Chem.* 2013 Sep 13;288(37):26557-68. PMID: 23867460

コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号: CAC

品名	免疫動物 (クローン)	交差種	適用	抗体クラス	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti CD91 (LRP1)	mouse (B3-3E11)	human	WB, IS	IgG1κ	SHI-EXO-M04	100 μl	¥50,000	園

EpCAM 抗体

エクソソームの cargo protein の検出や卵巣がんの研究に

背景

EpCAM (上皮細胞接着分子: epithelial cell adhesion molecule) は、偽重層上皮の一種である移行上皮及び単層上皮に特異的な細胞間の接着分子としてホモフィリック結合様式で機能する糖タンパク質です。固形腫瘍の多くは上皮系細胞から発生するため、様々な種類のがん腫で高度に発現し、エクソソームの cargo protein として同定されています¹⁾。

EpCAM 陽性循環腫瘍エクソソーム (もしくは循環腫瘍細胞由来 EpCAM 陽性エクソソーム) を用いた microRNA プロファイリングは、生検時の診断マーカーとして自覚症状のないがん患者の診断に利用できる可能性が示唆されています²⁾。さらに、卵巣腫瘍由来エクソソームにおけるマイクロ RNA、EpCAM 及び CD24 の存在に関する最近の発見は、卵巣がんの早期検出のために非常に有望であると考えられています^{2) 3) 4)}。

参考文献

- 1) Taylor DD, et al., *Gynecologic Oncology*, 2008 Jul;110(1):13-21. PMID: 18589210
- 2) Beach A, et al., *J Ovarian Res.* 2014 Jan 25;7:14. PMID: 24460816
- 3) Runz S, et al., *Gynecologic Oncology* 2007 Dec;107(3):563-71. PMID: 17900673
- 4) Rupp AK, et al., *Gynecologic Oncology* 2011 Aug;122(2):437-46. PMID: 21601258

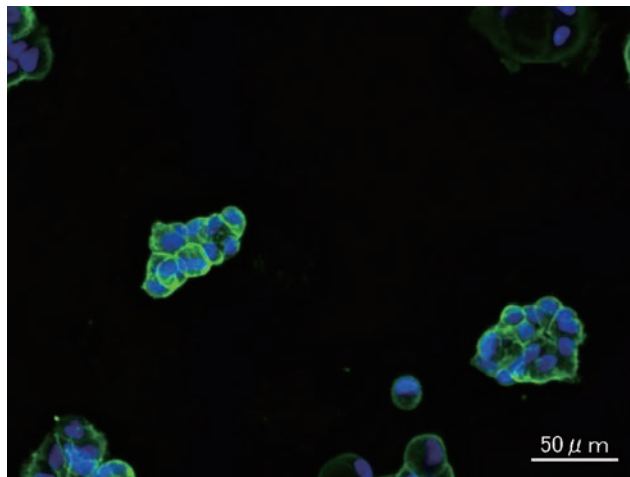


図1 ZR-75-1細胞株の免疫染色画像
サンプル: ZR-75-1細胞株
一次抗体: Anti-EpCAM (BT-11C5) 抗体 (10 μg/ml)
二次抗体: Anti-Mouse IgG-Alexa Fluor 488 抗体 (8 μg/ml)
核染色: Hoechst 33342 (緑色: 抗体, 青色: 染色された核)

コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号: CAC

品名	免疫動物 (クローン)	交差種	適用	抗体クラス	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti EpCAM	mouse (BT-11C5)	human	WB, IS	IgG1κ	SHI-EXO-M05	100 μl	¥50,000	園

ヒト母乳由来エクソソーム

母乳中のエクソソームの機能・作用メカニズムの研究に

本商品は、健康なヒトから倫理的に適切な手続きを経て提供された母乳から、超遠心分離法によって調整したエクソソーム画分です。*In vitro* から *in vivo* まで幅広い実験にご利用いただけます。原料母乳はFDAの認める方法によって感染症 (HIV-1、HCV、HBV by NAT、HBsAg、HCV Ab、HIV1 及び 2Ab、RPR) に非感染であることが確認されています。

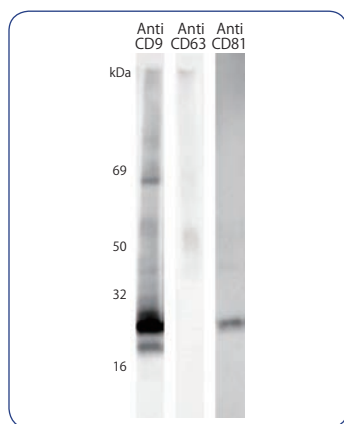


図1 CD9,63,81モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットの結果
タンパク質量として0.5 µgを用いて、Anti-CD9モノクローナル抗体 (品番: SHI-EXO-M01)、Anti-CD63モノクローナル抗体 (品番: SHI-EXO-M02) 及びAnti-CD81モノクローナル抗体 (品番: SHI-EXO-M03) で検出した。

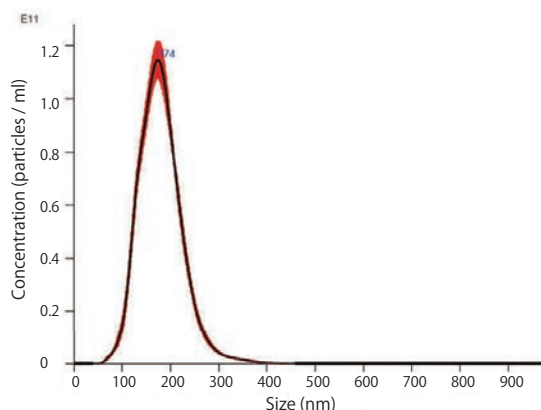


図2 NanoSightを用いた粒度分布測定の結果
本品をPBSで200倍希釈し、NanoSight LM10で測定した。
平均粒度: 179 nm
本品1 mL当たりの粒子数: 2.3×10^{12} particles

コスモバイオ株式会社 メーカー略号: CSR

品名	種由来	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Breast Milk Exosome	human	EXHM100L	1 set (100 µL × 10 vial)	¥60,000	Ⓔ

エクソソーム粒子数はロットごとに異なります。商品に添付の試験成績書をご参照ください。

ミルクエクソソーム抗体

ウェスタンブロットに適用

本商品はウシミルクから超遠心法で精製したエクソソームを抗原として作製したポリクローナル抗体です。最近の研究ではエクソソームの性質を利用して、ドラッグデリバリー担体 (DDS) としての研究もおこなわれており、特に生乳由来のエクソソームは抗がん剤の経口投与手段としても注目されています¹⁾。

参考文献

1) Ashish K. Agrawal et al., *Nanomedicine*. 2017 Jul; 13 (5) : 1627-1636.

交差種	ウシ
アプリケーション	ウェスタンブロット
特異性	牛乳由来の全エクソソーム
精製方法	硫酸アンモニウム沈殿 (乳清タンパク質吸収処理済み)
性状	PBS (-) 15 ppm Proclin300
使用時推奨希釈率	ウェスタンブロット時 1/1000

次ページにミルクエクソソームを紹介しています。
ミルクエクソソームと合わせての研究に！

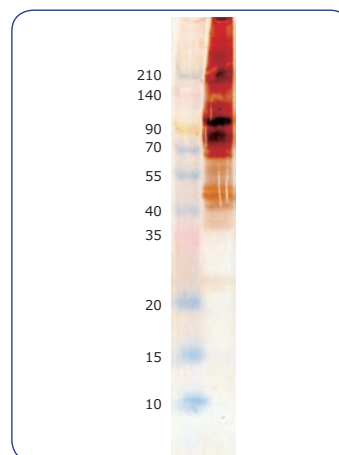


図1 品番: EXO-AB-01のウェスタンブロット

コスモバイオ株式会社 メーカー略号: CAC

品名	免疫動物	交差種	適用	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ウシミルクエクソソーム抗体	rabbit	bovine	WB	EXO-AB-01	100 µL (1 mg/mL)	¥30,000	Ⓔ

ミルクエクソソーム

エクソソームの機能研究やドラッグデリバリー担体としての研究に

国産生乳由来のエクソソームです。健康な牛から採取された生乳から超遠心分離法によりエクソソーム画分を調製しています。*In vitro* から *in vivo* まで幅広い実験にご利用いただけます。

本商品は、国立がん研究センター研究所 分子細胞治療分野 吉岡祐亮先生の研究プロジェクトによる成果を応用して開発しました。

日本医療研究開発機構 (AMED)

革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業

課題名：エクソソーム改変技術を用いた新規ドラッグデリバリーシステムの開発

研究代表者：吉岡祐亮 先生

背景

エクソソームはヒト、ウシ、ラットなどの広範な動物の乳中にも存在します。最近では、エクソソームがmiRNAやmRNA、タンパク質などを内包し、標的細胞へ取り込まれることによってそれらが機能する性質を利用したドラッグデリバリー担体 (DDS) としての研究もおこなわれており、特に生乳由来のエクソソームは、抗がん剤の経口投与手段としても注目されています¹⁾。

参考文献

1) Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel, Ashish K.Agrawal *et al.*, *Nanomedicine*. 2017 Jul; 13(5): 1627-1636.

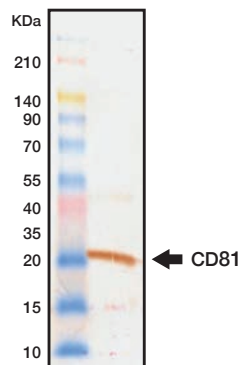


図1 CD81モノクローナル抗体を用いた Western Blotting
タンパク質量として2 µgを用いてAnti-CD81モノクローナル抗体 (品番: SHI-EXO-M03) で検出した。

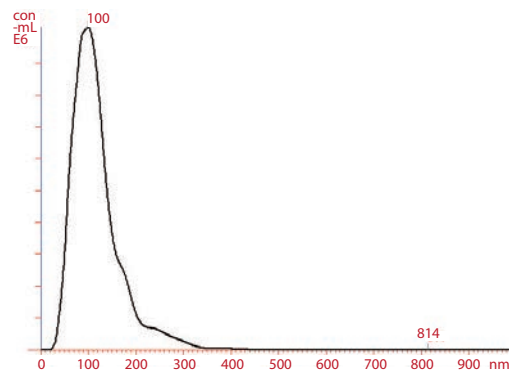


図2 NanoSightを用いた粒度分布測定
Size Distribution : Mean : 119 nm

コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号: CSR

品名	種由来	濃度	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
牛乳由来エクソソーム	bovine	タンパク質濃度: 100 µg/ml PBS ろ過滅菌済み	EXBM100L	1 set (100 µl × 10 vial)	¥30,000	④
			EXBM1000L	1 set (1 ml × 10 vial)	¥100,000	④

エクソソーム研究用の汎用商品

コスモ・バイオのWebでは、本冊子では紹介していないエクソソーム研究用商品を多数紹介しています。下記はその一部です。

■ DiagExo® 血清エクソソームタンパク質抽出キット

Web 検索 記事ID: 11767

ヒトの血清、母乳、唾液、腹膜流体、脳脊髄液 (CSF)、胃腸液 (GI)、羊水から、エクソソーム由来のタンパク質を単離するためのキットです。わずか100 µlのサンプルから効率的にタンパク質を抽出します。

■ エクソソーム RNA 分離キット

Web 検索 記事ID: 16040

様々な量の血漿 / 血清、尿、唾液および培養培地から精製済みのエクソソームサンプルから、RNAを迅速に単離するための簡便なキットです。

■ Exosome-TEM-easy Kit

Web 検索 記事ID: 12907

エクソソームを透過型電子顕微鏡 (TEM; transmission electron microscopy) を用いて観察する際に使用する試料作製キットです。

ミルクエクソソーム(CD81)ELISA キット

超遠心による精製は不要! CD81 を検出

最近の研究では、エクソソームの性質を利用して、ドラッグデリバリー担体 (DDS) としての研究もおこなわれており、とくに、生乳由来のエクソソームは、抗がん剤の経口投与手段としても注目されています¹⁾。

本製品は抗ミルクエクソソーム抗体をキャプチャー抗体とし、エクソソームマーカーの1つである抗CD81モノクローナル抗体を検出用抗体としたサンドイッチELISAキットです。

健康な牛から採取された生乳から超遠心分離法により調製したエクソソーム画分を標準エクソソームとして、ウシミルクやウシ血清といった検体中のエクソソームを定量することができます。

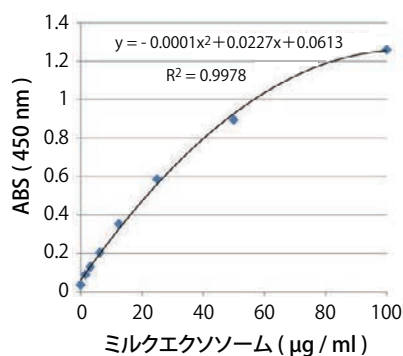


図1 標準曲線の例

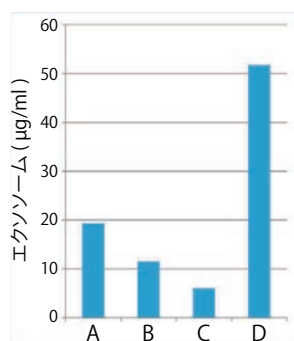


図2 ウシミルク中のエクソソームの測定例
ウシミルク間でエクソソーム含量に違いがあったことがわかった。

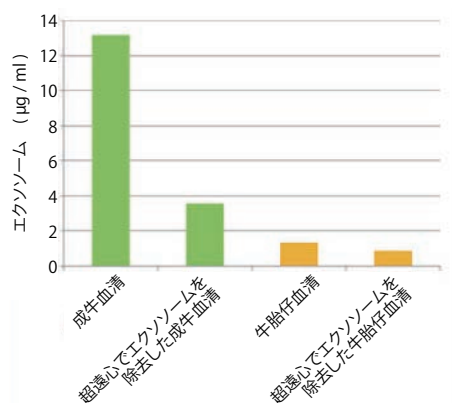


図3 ウシ血清中のエクソソームの測定例
エクソソーム濃度は成牛血清濃度が高く、超遠心でエクソソームを除去すると低くなった。これに比べ牛胎仔血清はエクソソーム含量が低いことがわかった。

参考文献

1) Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel, Ashish K.Agrawal et al., *Nanomedicine*. 2017 Jul; 13(5): 1627-1636.

特長

- ウシミルク、ウシ血清などに含まれるエクソソームを直接定量
- 特殊な装置は不要、通常のプレートリーダーで測定可能
- 超遠心精製法により分画したウシ由来ミルクエクソソームを標準品として添付

構成内容

- 固相化抗体 (× 100)
- 96 well プレート, 8-well × 12 strips
- アッセイバッファー, 50 ml
- ミルクエクソソーム標準液 (450 μl / ml)
- HRP 標識アビジン (× 100)
- 固相化抗体希釈液
- プレートシール (3 枚)
- 洗浄液 (× 10)
- ビオチン化・抗CD81抗体 (× 100)
- 発色基質溶液
- 反応停止液

コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号: CSR

品名	測定範囲	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
ウシ由来ミルクエクソソームELISA キット	1.56~100 μg/ml	EXBMEL	1 kit (96 test)	¥85,000	④

研究者が使ってみました！

Application Note

あぶりけーしょんのーと

ExoTrap Exosome Isolation Spin Column Kit for protein research

ユーザーレポート

佐藤 好隆 Yoshitaka Sato

名古屋大学大学院医学系研究科
総合医学専攻 ウイルス学分野



Products

● ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit for Protein Research

品番：SHI-EXO-K010 メーカー：コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号：CSR

エクソソーム (Exosome) は様々な細胞から分泌される脂質二重膜に囲まれた直径 30~100 nm の膜小胞体で、タンパク質や核酸などを内包しています。体液中を循環することで、離れた場所にある細胞に様々なシグナルを伝えることが可能です。このエクソソームを介した細胞間のコミュニケーションは、抗原提示、アポトーシス、炎症、腫瘍の進展・悪性化などとの関連が指摘され、がん細胞から分泌されるエクソソームによるがんの早期診断やエクソソーム自体を Cargo としたドラッグデリバリーシステムの開発など分野を超えた応用に期待されています。

私たちはウイルス感染細胞とその周りに存在する非感染細胞の相互作用に興味を持って研究をしています。あるウイルスタンパク質を発現させた細胞とそのタンパク質を発現させていない細胞を混合培養し、蛍光免疫染色でウイルスタンパク質を検出すると、ウイルスタンパク質発現細胞の周囲の細胞（ウイルスタンパク質非発現細胞）にもウイルスタンパク質がドット状に検出されました。このことから、細胞間コミュニケーションを介する分子としてエクソソームに興味を持ちました。

さて、実際に研究を進めていく上で、「どのようにエクソソームを精製するか？」が問題となりました。エクソソームの存在は知っていましたが、実際に扱ったことはありません。一般的には超遠心でエクソソームを精製するのですが、様々な条件や多くのサンプルからエクソソームを比較するには、時間と操作性で問題があります。そこで、操作の簡便さ（だれでも精製出来る）・精製に掛かる時間（短時間で精製出来る）・アプリケーションの豊富さ（エクソソーム自体も、内包されるタンパク質や核酸も解析できる）という視点で、各社から発売されているキットを検討し、ExoTrap Exosome Isolation

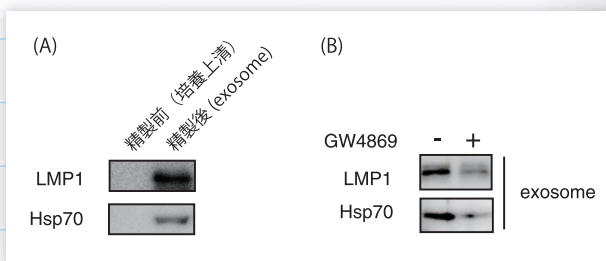


図 1: エクソソーム精製前後およびエクソソーム分泌阻害剤投与前後のウェスタンブロッティング

(A) ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit を用いてエクソソームを精製後、エクソソームに内包される LMP1 および Hsp70 の発現量を WB より比較した。精製後の WB では LMP1 および Hsp70 が濃縮されていることがわかる。
(B) エクソソーム阻害剤 (GW4869) 処理した細胞培養上清から ExoTrap™ Exosome Isolation Spin Column Kit を用いてエクソソームを精製し、LMP1 および Hsp70 の発現量を WB より比較した。GW4869 処理により LMP1 および Hsp70 が減少し、これらのタンパク質がエクソソームに内包されていることがわかる。

Spin Column Kit for protein research”を見つけました。

本製品の最大の利点は、少量のサンプルをカラムにアプライし、遠心するだけという“簡便さ”と、わずか 30 分という“短時間”でエクソソームが精製出来るということです。エクソソーム初心者だった私たちは本製品を使うことで、培養上清（精製前）では検出感度以下のため検出出来なかったエクソソームに内包されるウイルスタンパク質が、カラム精製後のサンプルでは WB でしっかりと検出されることを示すことが出来ました。さらに、エクソソーム阻害剤 (GW4869) 処理した細胞の培養上清からカラム精製したものでは、このウイルスタンパク質は検出されず、エクソソームに内包されていることが確認できました (Sato et al., Oncotarget, 8; 39345-39355, 2017)。多量のエクソソームを安価にという目的には不向きかもしれませんが、本製品はエクソソームを短時間に簡便に精製するという場合には強くお勧めです。

詳しい情報は、13 ページへ

敬称は省略させていただきます

エクソソーム検出ツール作製受託サービス

エクソソーム研究をトータルサポート！

株式会社ハカレル メーカー略号：HAK

エクソソーム検出法の研究サポートを中心に、組換えタンパク質の作製、モノクローナル抗体の作製、ELISA 測定系の構築、エクソソーム ELISA 測定等をトータルサポートします。

サービス概要

● 組換えタンパク質の作製

エクソソーム表面マーカーの抗体を取るための免疫源としてのタンパク質を動物細胞で発現・精製します。技術的には、抗原タンパク質と抗体のFc領域との融合タンパク質を設計し動物細胞から分泌させて精製します。また、ELISA 構築サービスのオプションとして、標準物質としての融合タンパク質（2種類の抗体のエピトープをタンデムに連結させた組換えタンパク質）の受託合成も実施します。

● エクソソーム表面マーカーに対するモノクローナル抗体作製

標的タンパク質及びCD63を発現しているエクソソームを用いて、エクソソーム表面上に存在する標的タンパク質の3次元構造を認識する抗体を選択します（図1）。高性能な抗CD63抗体（クローン8A12）をF(ab')₂化することにより、高いS/N比を実現します。

● ELISA 測定系の構築

- 抗テトラスパニン抗体でエクソソームを捕捉
- エクソソーム表面抗原に対する標識抗体でサンドイッチ
- 標識抗体のカスタム調製（市販抗体でもOK）
- 独自技術による標準試薬の作製

● エクソソーム ELISA 測定

サンプル中のエクソソームをヒト由来エクソソーム定量用CD9/CD63 ELISA キットにて定量します。

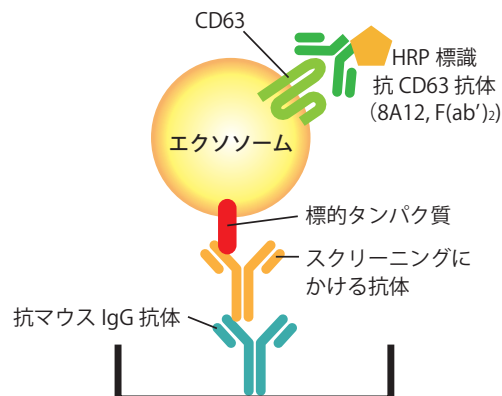


図1 エクソソーム表面マーカーに対するモノクローナル抗体作製

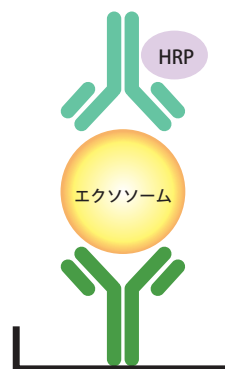


図2 ELISA 測定系の構築

表 参考販売価格

品番	商品	サービス内容	参考価格	備考
PS-1	組換えタンパク質作製	ご希望のタンパク質を動物細胞で発現させ、精製まで	¥800,000～	精製タンパク質 1.5 mg
MA-1	抗体作製	(1) 免疫（マウス1系統3匹）	¥300,000～	抗原タンパク質はカスタマーがご用意。マウスに免疫し、抗体価の確認まで。
MA-2		(2) 細胞融合し、エクソソームなどを用いたスクリーニング	¥700,000～	—
MA-3		(3) 精製抗体とハイブリドーマ（3クローンまで）納品	¥500,000～	—
MA-4		(4) 抗体の大量調製	¥100,000（1 mg当たり）	—
CE-1	ELISA 構築	(1) エクソソームを挟み込むサンドイッチ ELISA 作製	¥300,000～ （条件設定とプレート1枚分納品）	任意の抗体を標識。固相（抗CD9）抗体と組み合わせ。標準試薬はカスタマーがご用意。
CE-2		(2) 追加キット	¥100,000 （プレート1枚分当たり）	—
QE-1	ELISA 測定	CD9/CD63 ELISA（コスモ・バイオ社製）の受託測定	¥250,000（プレート1枚当たり）	—
QE-2			¥8,000（1ウェル当たり）	—

お見積もり・お問い合わせ先

本商品を紹介するコスモ・バイオのWebより、お見積もりのご依頼を受け付けています。専用フォームにあるお見積もりに必要な情報をご記入ください。

ご質問・ご不明の点は創業・受託サービス部までお問い合わせください。また、秘密保持契約等につきましても、ご対応いたします。

TEL：03-5632-9615 FAX：03-5632-9614 E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

好評配布中！

ハンドブック

コスモ・バイオでは、様々な切り口から構成したハンドブックを無料配布中です。研究用試薬、抗体、装置などを紹介するほか、技術解説やアプリケーションノートなどの情報も掲載しております。ぜひ、みなさまのお手元近くに置いてご活用ください。

■ エクソソームハンドブック



A4版 62ページ

エクソソームは細胞から分泌された脂質二重膜で形成される直径 50 ~ 150 nm 程度の小胞です。生体では唾液、血液、尿、羊水、悪性腹水等の体液中で観察され、培養細胞からも分泌されます。近年、エクソソームには様々なタンパク質や RNA が含まれている事が報告され、細胞間の情報を伝達する役割を担っている可能性があります。

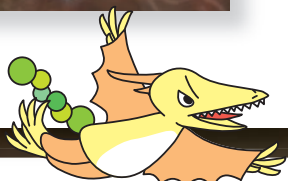
【総説】 落谷 孝広 先生

国立研究開発法人 国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 主任分野長

【論文】 国立がん研究センター研究所 小野 麻紀子 先生 落谷 孝広 先生

内 容

- エクソソームの単離/精製
- エクソソームの精製&RNAの分離
- エクソソームからタンパク質を抽出
- エクソソームからRNAを抽出
- エクソソームからDNAを抽出
- エクソソームの定量
- エクソソームのFACS解析
- エクソソームの観察
- エクソソームスタンダード
- エクソソーム抗体
- Small RNAをエクソソームに導入
- FBS中のエクソソームを除去
- 技術解説
- アプリケーションノート



RNAiハンドブック
【第3版】



細胞培養
ミニカタログ



ゲノム編集
ハンドブック【第3版】

コスモバイオニュースを1冊

いかがですか？

ダイレクトメール登録者募集中

コスモ・バイオホームページ右下の
「お申込み」、
もしくは右記から
ご登録を
お願いします。



ハンドブックのご請求は、弊社 Web サイト「カタログ請求」
または、弊社商品取扱い販売店へお願い致します。

取扱店

お願い / 注意事項

記載の社名・商品名等の名称は、弊社または各社の商標または登録商標です。

【希望販売価格】 記載の希望販売価格は 2019 年 11 月 1 日現在の価格で、予告なく改定される場合があります。また、「希望販売価格」「キャンペーン中の参考価格」は参考価格であり、販売店様からの実際の販売価格ではございません。ご注文の際には販売店様へご確認くださいますようお願い申し上げます。表示価格に消費税は含まれておりません。

【使用範囲】 記載の商品およびサービスは全て、「研究用」です。人や動物の医療用・臨床診断用・食品用等としては使用しないよう、十分ご注意ください。

<https://www.cosmobio.co.jp/>



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

— 商品の価格・在庫・納期に関するお問い合わせ —
TEL: 03-5632-9630 (受付時間 9:00 ~ 17:30)
FAX: 03-5632-9623

— 商品に関するお問い合わせ —
TEL: 03-5632-9610 (受付時間 9:00 ~ 17:30)
FAX: 03-5632-9619

本社所在地 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル