

報告 2 - 5

2022/03/31

報告書

エクソソームの簡便定量法による乳製品の新規機能及び規格の構築

岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科

工学部 化学・生命工学科

竹森 洋

1. 要旨

エクソソームは細胞から分泌される微細な細胞外小胞で、培養細胞上清のみならず、血液、母乳などに存在しその機能が着目されている。しかし、エクソソームのサイズが 100 nm 前後と小さいことに加えて、生物種を超えた定量方法が存在しないことが、産業応用において障壁となっている。

GIF-2250 は生細胞特異的な環境応答性の細胞内小胞ライブイメージャーである。一方で、“生きているとは言えない”エクソソームも染色可能である。そこで本研究では、エクソソームを大量に含有する牛乳（ミルク）を原料として、GIF-2250 の標的物質を探索することでエクソソームを染色できる機構を解明した。また、GIF-2250 が簡便にエクソソームを定量できることを利用し、牛乳からミルクエクソソームの大量・簡便精製法を開発し、その生理活性作用の探求に役立てた。

ミルクエクソソームに大量に含有される物質を GIF-2250 の標的物質と想定し蛍光強度で評価した。結果、リン脂質、RNA、NAD⁺などと反応することが判明した。新鮮及び劣化ミルクエクソソームで比較したところ、GIF-2250 の輝度に違いが観察された。次に、市販の牛乳からエクソソームを簡便に精製する方法を構築した。結果、新鮮な低温殺菌牛乳にミルクエクソソームの大量含有が示された。また、エクソソームマーカー(CD9・CD81)量と GIF-2250 の輝度に相関が示された。更に高温殺菌牛乳を原料としたヨーグルトから乳酸菌由来と予想される乳酸菌エクソソームも大量に精製することもできた。

これらエクソソームの生理作用を培養細胞でスクリーニングしたところ、抗炎症活性が見出せた。我々独自の炎症腸疾患モデルで効果を検証したところ、痔に対して効果が確認できた。以上より、GIF-2250 はミルクエクソソームの簡便定量及び品質評価・管理での利用が期待される。今後は GIF-2250 を利用した食品・化粧品分野でのエクソソーム品質評価方法に対する JIS 規格策定や、新たな臨床検査プローブとしての開発を目指す。

緒言

エクソソームは細胞から分泌される直径 100nm 前後の細胞外小胞である。エクソソームは、培養細胞上清だけではなく、血液、尿、唾液、羊水、母乳などの様々な体液から検出・精製することができる¹⁻⁴⁾。エクソソーム膜の主成分は脂質とタンパク質である。膜にはエクソソームマーカータンパク質である CD9、CD81、CD63 というタンパク質が発現している。また、内部にはタンパク質に加えてマイクロ RNA (miRNA) など様々な核酸が含まれている。内部の核酸情報は起源細胞に基づくためエクソソームは細胞間の情報伝達の役割を担っている^{1,5-7)}。

エクソソームは近年、ドラッグデリバリーシステム (DDS) として再生医療分野での応用が期待されている⁸⁾。更に、化粧品分野では抗シワ・肌のバリア機能の強化・傷治癒効果・抗老化作用が報告されている⁹⁾。そのため皮膚再生や若返り効果の期待からも注目が高まっている。しかし、エクソソームはサイズが小さいことに加えて、定量の標準的手法が存在しないことが産業応用への課題となっている。今回はエクソソームとして牛乳に含まれるミルクエクソソームに着目した。

牛乳にはカゼインというタンパク質がタンパク質の 8 割を占めている¹⁰⁾。カゼインはセリン残基にリン酸が結合したリンタンパク質である¹¹⁾。そのため、カゼインは、分子全体としてマイナスの電荷を帯びており、カルシウムイオンと結びつきやすい。牛乳中ではカルシウムと結合してカルシウム-カゼイン-リン酸複合体の形で存在している。この時、カゼインのうち水溶性の高い k-casein の働きでミセルを形成している^{12,13)}。カゼインは安定剤として、不溶性成分が析出することなく均質な状態を長時間保つ役割を果たしている。また、カゼインは等電点が pH4.6 である。等電点下では、牛乳から容易に分離することも可能であり、酢酸を牛乳に加えて pH を等電点にすることでカゼインを分離し、余分なタンパク質を除け、エクソソームを精製できると予想される。

エクソソームの精製は試薬を使った方法¹⁴⁾ (Tim4-磁気ビーズ¹⁵⁾、超遠心^{16,17)}、などが挙げられる。これらは、コストが高い。例えば超遠心であると数千万円の機械が必要であり、試薬や磁気ビーズも購入には数十万円が必要である。精製済みミルクエクソソームは、市販では、100 μ g/mL の濃度が 1mL あたり 3 万円で販売されている。そこで、今回はコストをできるだけ抑え短時間で大量精製する方法の構築も目指した。

岐阜大学では、約 2000 種以上の化合物ライブラリーからメラニン産生抑制剤の探索を行ってきた。その中でも岐阜大学工学部古田 (分担研究者) が合成した GIF-化合物に、メラニン産生抑制および神経保護作用を示すことが分担研究者の森田と共に見出した。GIF-化合物の作用機序を解明するための蛍光化 GIF-化合物として、GIF-2250 の細胞内動態を検討したところ、マウスメラノーマ B16F10 細胞の細胞内小胞を可視化できることを見出した。一方、死細胞では細胞内小胞を可視化することができなかった。そのため GIF-2250 は生細胞特異的であることが判明した。また、その染色標的はメラノソームやエクソソーム及びリソソームを含む後期エンドソーム由来の小胞であることが判明した。

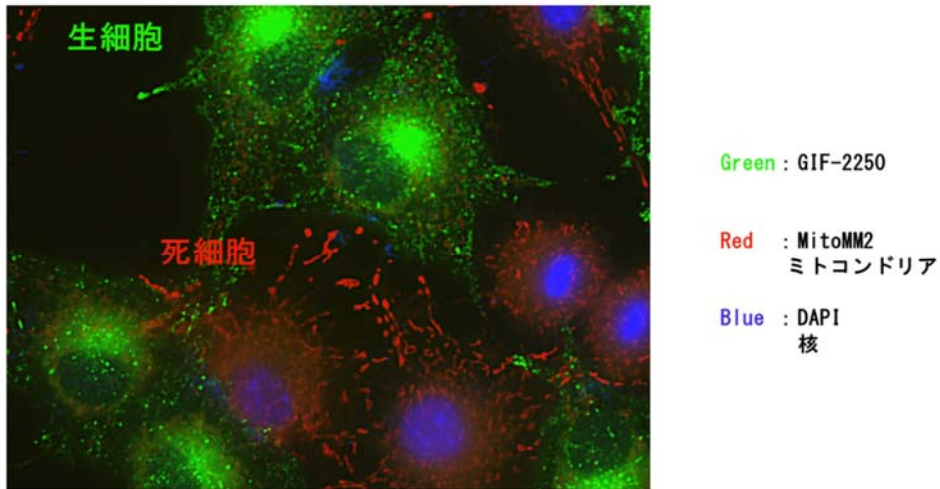


Figure 1 GIF-2250 の細胞染色

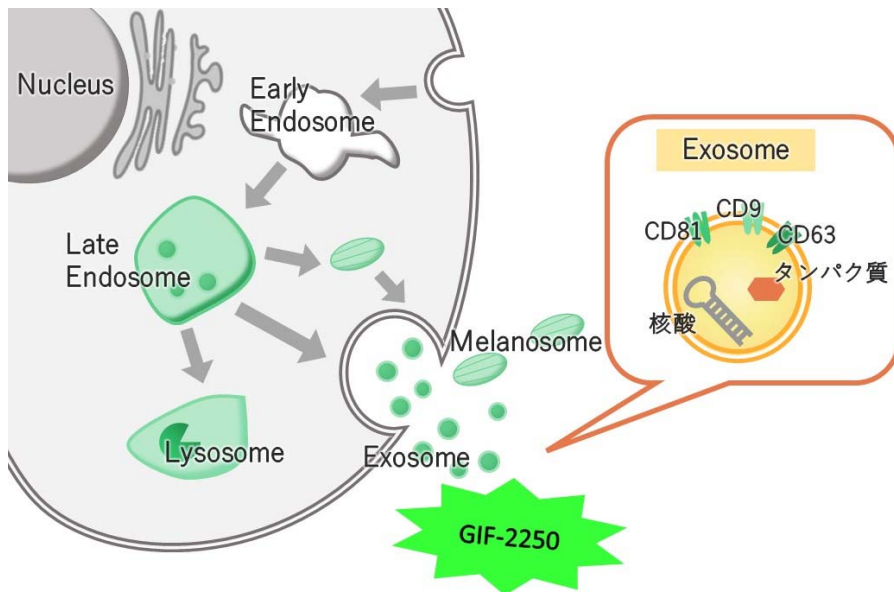


Figure 2 GIF-2250 標的小胞

そこで本研究では、GIF-2250 の標的物質の解明を行った。そして、生細胞と異なり“生きているとは言えない”エクソソームがなぜ光るのかを解明した。GIF-2250 がエクソソームと反応し光ることを利用してエクソソームの定量や評価を目指した。加えて、GIF-2250 が簡便にエクソソームの定量が可能であることを利用して、市販の牛乳から牛乳由来エクソソーム（ミルクエクソソーム）の精製方法の確立を目指した。また、このミルクエクソソームや偶然見出した乳酸菌エクソソームの生理作用も検討した。

以下に GIF-2250 の構造を示す。

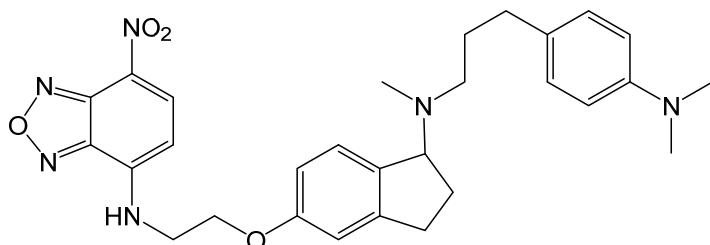


Figure 3 GIF-2250

研究計画

本研究では、計画書に記載したように2つの目標を達成する。

- 1) 新規蛍光化合物の結合標的の同定と社会実装のための応用
- 2) 乳製品中のエクソソームの細胞導入効率と生理作用(病態改善効果)の検証

方法

1 蛍光強度測定

GIF-2250 の標的物質を解明するため、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。96 well plate (96 Well Black/Clear, Tissue Culture Treated Plate, Flat Bottom with Lid FALCON®) に PBS 90 μ L/well をベースとし、様々な試薬を 10 μ L/well で各 well に入れた(n=3)。試薬の終濃度は 10 mM となるように加えた。ここに GIF-2250 を終濃度 3 μ M となるように加え、Blank には PBS を加えた。EX = 490 nm, EM = 510~570 nm のフィルターを用いて、プレートリーダーで蛍光強度を測定した。用いた試薬は Table 1 に示す。今後、試薬の名称は略称で示す。

Table 1 リン脂質・核酸

略称	正式名称	メーカー
PC	3- <i>sn</i> -Phosphatidylcholine, from Egg Yolk	Wako
PS	Phosphatidylserines(soy) (sodium salt)	CAY
PI	L- α -Phosphatidylinositol Sodium Salt from Soybean	ナカライテスク
PE	Phosphatidylethanolamine	SRL

略称	正式名称	メーカー
ATP	Adenosine-5'-triphosphate Disodium Salt Hydrate from Yeast	ナカライテスク

ADP	Adenosine 5'-Diphosphate Disodium Salt	東京化成
AMP	5'-Adenylic Acid	東京化成
Adenosine	Adenosine	東京化成
Adenine	Adenine (6-Aminopurine)	Wako
R5P	Ribose-5-phosphate Sodium Salt	ナカライテスク
UTP	Uridine 5'-triphosphate trisodium salt hydrate	SIGMA
GTP	Guanosine-5'-triphosphate Disodium Salt	ナカライテスク
CTP	Cytidine 5'-triphosphate disodium salt	SIGMA
IMP	Inosine 5'-Monophosphate Disodium Salt n-Hydrate, from Yeast	Wako
dNTPs	dNTP Set, PCR Grade 100mM, 4×100 μL	QIAGEN
NAD+	β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide	ナカライテスク
NADH	β-Diphosphopyridine Nucleotide Disodium Salt, Reduced form	Wako

2 蛍光強度撮影

0.2 ml 8 連 PCR チューブ(ドームキャップ:カーク)に PBS 90 μL、試薬を終濃度 10 mM になるように 10 μL 入れた。ここに GIF-2250 を終濃度 3 μM になるように加え混合し遠心した。チューブを ChemiDOC XRS+imaging system (Bio-Rad) を用いて撮影し蛍光強度を可視化した。

3-3 細胞培養

マウスメラノーマ由来 B16F10 細胞を 10% の FETAL BOVINE SERUM (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) と 0.6% のペニシリン-ストレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (High Glucose) (Sigma-Aldrich) を培地として、5% CO₂ 存在下 37°C で培養し、トリプシン処理により 2 日毎に新しい Cell Culture Dish (ASONE Co., Ltd., Osaka, Japan) に移して継代した。

ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞を 10% の FBS と 0.6% のペニシリン-ストレプトマイシンを含む DMEM (Low Glucose) (Sigma-Aldric) を培地として、5% CO₂ 存在下 37°C で培養し、トリプシン処理により 2 日毎に新しい Cell Culture Dish に移して継代した。

RAW264.7 マクロファージは、RPMI 培地(Sigma-Aldrich) (10%非動物血清) で 5% CO₂ 存在下 37°C で培養し、トリプシン処理により 2 日毎に新しい Cell Culture Dish に移して継代した。

4 顕微鏡観察

細胞の蛍光観察は、オールインワン蛍光顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 (Keyence, TOKYO, Japan) で、撮影した。イメージングは撮影した画像を、Imaji J Fiji (<https://imagej.nih.gov>) プログラムを使用して取得した。全ての画像処理は BZ- II Analyzer (Keyence, TOKYO, Japan) プログラムを使用して実行した。

2250 誘導体は、観察の直前に終濃度 1 μM となるように処理した。

(NAD^+ 上昇による GIF-2250 の輝度)

3-3 で培養した B16F10 細胞を播種して一晩経過した Glass Bottom Culture Dish GBCD15 (ASONE) に GIF-2250 を終濃度 0.5 μM で加え顕微鏡で観察した。次に培地に 2-Deoxy-D-glucose (Wako) を 3,500 mg/L となるように加え、培地交換後 3 時間培養した。その後、GIF-2250 を終濃度 0.5 μM で加え顕微鏡で観察した。

5 NAD^+ アッセイ

NAD/NADH Assay Kit-WST (Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて NAD^+/NADH を測定した。B16F10 細胞を、6 well plate に 5×10^5 cells / well で播種し、5% CO_2 、37°C条件下で一晩培養した。培養後、2-Deoxy-D-glucose 培地に交換して 5% CO_2 、37°C条件下で 3 時間培養した。その後、トリプシン処理により細胞を回収し、キットのプロトコルに沿って行い 450nm の吸光度を測定した。Standard solution の吸光度から検量線を作製し、検量線からサンプルの NADH 量、総量を求めた。 NAD^+ 量を総量と NADH 量の差から求め、 NAD^+/NADH を算出した。

6 ミルクエクソソームの精製

市販の牛乳を使用しミルクエクソソームを簡単に精製する方法を試した。市販の牛乳は殺菌が義務付けられている⁽²¹⁾。牛乳は殺菌方法の異なる 12 種と関牛乳から頂いた生乳を使用した。使用した市販の牛乳の一例を図 4 に示す。初めに、牛乳 500 mL を High-Speed Refrigerated Centrifuge CR22GIII (HITACHI) で 8,000rpm 60min 遠心し、コーヒーフィルターを用いて析出した脂質を取り除いた。次に 50mL チューブに移し、酢酸 (関東化学株式会社) を総量の 1/100 加え pH を等電点である pH4.6 付近とし、5min 間放置した後、High Speed Refrigerated Centrifuge 6500 (KUBOTA) で $8,000 \times g$ 20min 遠心し、コーヒーフィルターを用いて上清を回収した。0.45 μm のポンプフィルター(Sartolab® BT Vacuum Filtration Units 180A4-E, 0.45 μm Cellulose Acetate, 500 ml)を通し、0.1 μm のポンプフィルター(Sartorius Sartolab™ RF Vacuum Filtration Units ,0.1 μm polyethersulfone (PES), 500 ml)で濃縮した。0.1 μm フィルターを PBS で洗浄した後、PBS 1mL で回収しミルクエクソソームサンプルとした。

(乳酸菌由来エクソソームの精製)

ヨーグルトから乳酸菌由来のエクソソームを精製した。高温殺菌牛乳を1 L ビーカーに500 mL 入れた。そこにスーパーケフィアヨーグルトたね菌 Plus(株式会社ロイヤルユキ,Tokyo, Japan)を1本入れて25°Cで24時間以上静置した。24時間静置すると牛乳が固まり出し、固形のヨーグルトが完成した。静置し続けるとヨーグルトとホエイが分離した。その様子をに示した。ホエイを50 mL チューブに移し、8,000 rpm で20 min 遠心した。遠心後、余分な脂質を取り除くためにコーヒーフィルターでろ過した。10 mL シリンジを使用し、ホエイ10 mL で1.2 μm (CA) \rightarrow 0.8 μm (CA) \rightarrow 0.45 μm (PES)の順にフィルターろ過を行った。使用したフィルターはTable 2 に示した。ホエイを流した後、フィルターを洗浄するために2 mL のPBS を流した。フィルター済みの溶液を0.1 μm 、300 K、のフィルターで13,000 rpm 10 min、1000 K のフィルターで5,000 rpm 15 min 遠心を繰り返し濃縮した。濃縮後フィルターを500 μL のPBS で洗浄し、PBS 200 μL で回収した。



Figure 4 使用した牛乳

Table 2 使用したフィルター

大きさと素材	正式名称	メーカー
1.2 μm CA	Minisart® Single use filter unit. Non-pyrogenic. CA 1.2	Sartorius stedim biotech
0.8 μm CA	SINGLE USE FILTER UNIT 0.80 μm CA	GVS
0.45 μm PES	Sterile Syringe Filter33mm Hydrophilic PES 0.45 μm	Hawach Scientific
0.1 μm PVDF	Ultrafreer®-MC-VV Centrifugal Filters Durapore®PDVF 0.1 μm	Merck
300 K PES	Microcon®-300 Centrifugal Filters Biomax® 300kDa Membrane Polyethersulfone(PES) membrane 300,000 NMWL	Merck
1000 K PES	Vivaspin®20 Membrane: 1,000,000MWCO PES	SARTORIUS

7 エクソソーム定量

回収したミルクエクソソームで GIF-2250 の蛍光強度を測定した。

96well plate (96 Well Black/Clear, Tissue Culture Treated Plate, Flat Bottom with Lid FALCON®) に PBS 90 μ L/well をベースとし、ミルクエクソソームを 10 μ L/well で各 well に入れた(n=3)。ここに GIF-2250 を終濃度 3 μ M となるように加え、Blank には PBS を加えた。EX=490 nm , EM=510~570 nm の蛍光フィルターを用いて、プレートリーダーで蛍光強度を測定した。検量線は、PBS の希釈率を変えて作成した。

8 ウェスタンブロット解析

電気泳動用サンプルを 10%、15%SDS-PAGE ゲルで電気泳動 (200 V、33 mA、1 時間) しタンパクを分離した。泳動後、Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell (Bio-Rad)を用いて、メタノールで親水処理した PVDF 膜に、ゲル上のタンパク質を 25V、1 時間かけて転写した。PVDF 膜を TBS-T に溶解した 0.5%スキムミルクで 1 時間振盪させてブロッキングを行った。1 時間後、TBS-T で 5 分間洗浄した。洗浄後、一次抗体 (CD9: Wako ; CD81: Wako)を 20 % Blocking One /TBS-T で抗原抗体反応を一晩かけて行った。翌日、PVDF 膜を TBS-T で 5 分×3 回洗浄した後、二次抗体 (anti-mouse IgG-HRP) を 20 % Blocking One /TBS で 1:5000 に希釈した溶液中で、2-3 時間反応させた。2 次抗体反応後、TBS で 5 分×4 回洗浄し、EzWestLumi plus (ATTO Corporation) に浸して発色させ、ChemiDOC XRS+imaging system (Bio-Rad) を用いて撮影した。

(タンパク質発現量の数値化)

ウェスタンブロット解析で ChemiDOC XRS+imaging system (Bio-Rad) を用いて撮影した後、数値化を行った。ChemiDOC XRS+imaging system (Bio-Rad) 内の Volume Tools を使用した。バンドを Rectangle で囲い Analysis Table で数値を出した。バンドの濃さはメンブレンのバックグラウンドの数値を引いて求めた。

9 エクソソーム観察

エクソソーム染色試薬には ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Red (Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan) を用いた。初めに、100 μ g/mL のミルクエクソソーム (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan)と精製したミルクエクソソームをそれぞれ 1.5 mL チューブにとり、キット付属の染色用試薬 Mem Dye-Red 1 μ L と 2250 終濃度 1 μ M を加えた。プロトコルに従ってミルクエクソソームを染色した。2250 で染色したエクソソームを、Microscope Cover Glasses Laminillas Cubreobjetos (Deckgläser) にのせて 3-4 と同様に観察した。

10 Fluore HPLC-ゲル濾過解析

エクソソームの蛍光標識と限外濾過によるサイズ分画の技術を組み合わせたエクソソーム定量法を構築した。概要を Figure 5 に示した。また、タイムプログラムを Table 2 に示した。

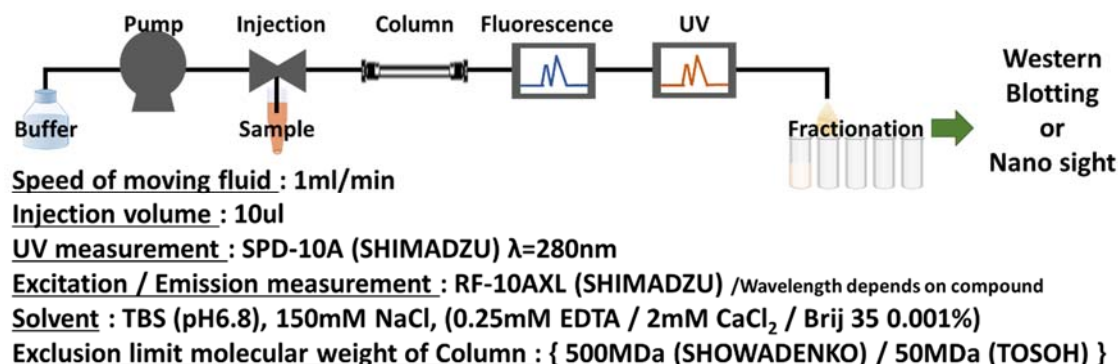


Figure 5 Fluore HPL-ゲル濾過解析機の概要

Table 3 タイムテーブル

時間(min)	ユニット	処理命令	数値
0.10	ポンプ	A.Flow	1
0.10	ポンプ	B.Flow	0
0.10	RF-10AXL	Emission Wavelength	EM [※]
0.10	RF-10AXL	Excitation Wavelength	EX [※]
0.10	SPD-10AVP	Absorption Wavelength	280
0.10	オートサンプラ	Inject	-
0.10	カラムオープン	Oven Temp	40
0.10	コントローラ	Start	-
0.10	RF-10AXL	Zero	-
0.10	SPD-10AVP	Zero	-

溶離液には 1M Tris HCl pH6.8 を終濃度 10mM、NaCl を終濃度 150mM、EDTA を終濃度 0.25mM になるように dH₂O で調整した。

限外濾過システムの流量は 1mL/min、注入量は 10 μ L で行った。

UV-VIS DETECTOR の波長を 280nm に設定し、FLUORESCENCE DETECTOR は化合物によって最適な条件に励起/蛍光波長を設定した。ExoSparkler の励起/蛍光波長である 560/600nm と Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor[®] 488) ab150077 (abcam) の励起/蛍光波長である 490/520nm に設定した。

11 抗炎症活性（培養細胞）一酸化窒素（NO）産出測定

培地に含まれる NO 産生量は、NO 産生物の濃度を示す Griess 試薬⁽¹⁹⁾を用いて測定した。Griess 試薬は、NO の酸化生成物 NO₂ とカップリング反応して 560 nm が吸収極大波長であるジアゾ化合物を生成するため、吸光度の測定により簡易的かつ正確に NO 産生量を測定できる。48-well plate に RAW264.7 細胞を 2×10⁵ 個 /well で播種し、18 時間ほど 37 °C でインキュベートさせた後、Lipopolysaccharide (LPS) (500 ng/mL) (Wako) とエクソソームを含んだ RPMI1640 の無血清培地を 300 μL/well 加えて 12 時間インキュベートした。上清 100 μL を別のウェルに移し、そこに Griess 試薬を 100 μL 加え 30 分室温で放置した後、Glomax Multi Detection System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて 560 nm の吸収極大波長における吸光度を測定した。

12 抗炎症活性 (in vivo)

マウスは 8:00-20:00 の明暗サイクルで飼育した。飼料 CE-2(クレア社, 組換え DNA 実験は (30-041)、動物実験は (2021-155) の承認で実施した。

SIK3-KO :: hSIK3 の変異マウスのうち、約半年たち僅かながら肛門が赤いマウスをマークした。ステロイドとしてプレドニゾロン吉草酸エステル (Kowa, Aichi) を 100 μL 程度を 1 日一回塗布した。また、エクソソーム(10 mg/ml)を 1mg を 1:1 でワセリン(Wako)に混ぜ込み同様に塗布した。両者の処置は、プレドニゾロン吉草酸エステルへエクソソームを等量混ぜた。1ヶ月間の連続塗布 (土・日は休薬) とし、1ヶ月後の赤みの度合いを評価した (病態進行と進行抑制)。進行抑制と判断された場合も、念のため、さらに1ヶ月間の非投与期間を設定し、差がないことを確認した。

実験結果

1 リン脂質膜との反応性

GIF-2250 がエクソソームと反応し光るのがなぜか調べるために標的が何かを調べることにした。まず、エクソソームの膜の構成物質であるリン脂質で人工ミセル (小胞) を構築し、そのミセルとの反応性を調べた。プレートリーダーを用いて GIF-2250 の蛍光強度を測定しグラフ化した。また、チューブを ChemiDOC XRS+imaging system (Bio-Rad) を用いて撮影した。

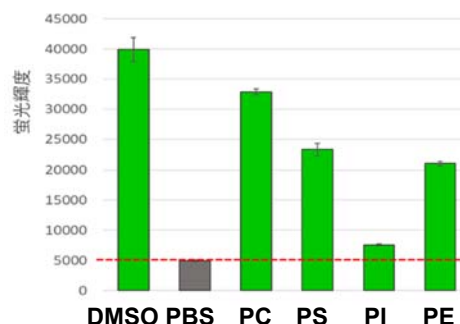
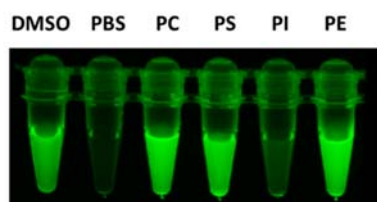


Figure 4 GIF-2250 のリン脂質反応性

PC:ホスファチジルコリン、PS:ホスファチジルセリン、PI: ホスファチジルイノシトール、PE: ホスファチジルエタノールアミン

GIF-2250 の PBS のみでの基底蛍光を Figure 8 に赤線で示した。PC、PS、PE(1 mM のミセル)は基底蛍光より輝度が高くなったが、PI はそれほど変化が見られなかった。中でも、PC 特異性が観察された。なお、DMSO でも蛍光を発するが、100%DMSO を利用しているためである。これらから、GIF-2250 はエクソソームのリン脂質膜と反応していると予想した。

2 核酸との反応性

リン脂質は細胞膜の構成成分であり、エクソソーム特異性は説明できない。そこで、エクソソーム内部の成分に着目した。エクソソーム内部には核酸が含まれている。どんな構造を持つ核酸が、GIF-2250 と反応するのかを調べた。4-1 と同様にプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。

まず、Figure 9 に各種核酸と GIF-2250 の反応性を示す。

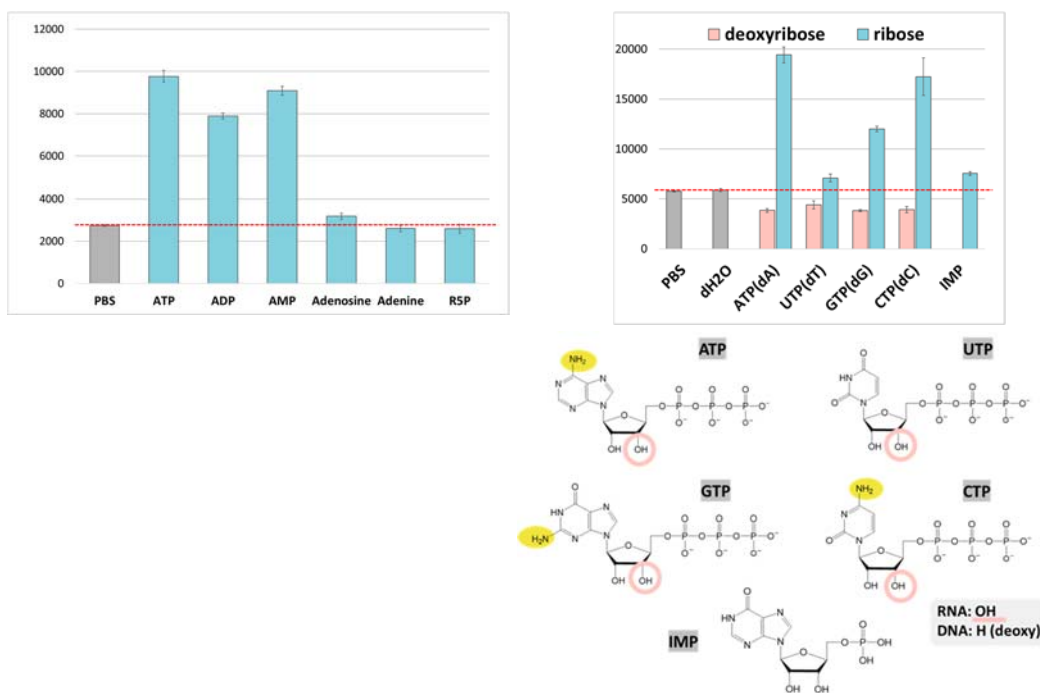


Figure 9 利用した核酸と GIF-2250 のリン脂質反応性

マーク部分が存在すると GIF-2250 は反応する。

ATP, ADP, AMP は基底蛍光より輝度が高くなったが、Adenosine, Adenine, R5P は変化が見られなかった。リン酸の数が異なる ATP, ADP, AMP には大きな差は観察されなかった。次に塩基部分の影響を考える目的で UTP, GTP, CTP, IMP を調べた。

Figure 9 に示したリボースの丸で囲んだ OH が H であるデオキシリボース体は塩基の構造に関係することなくどれも輝度が上昇しなかった。一方で、リボース体では ATP, GTP, CTP で輝度が上昇した。よって、リボースの構造が必要であることが示唆された。リボースの物質間での差は塩基内の構造の NH₂ に関係していることが予想される (Figure 9)。GIF-2250 の標的には、NH₂ をもつ塩基、リボース、リン酸の全ての構造を持つことが必要であると考えられた。

3 NAD⁺

NAD⁺ は塩基、リボース、リン酸の構造を全て持っているため、GIF-2250 と反応すると予想した。NAD⁺ は酸化還元反応でニコチンアミド部分の構造が変化して NADH となる。これらの反応性についてマイクロプレートリーダーで調べた。NAD⁺ と NADH の構造を Figure 10 に示した。

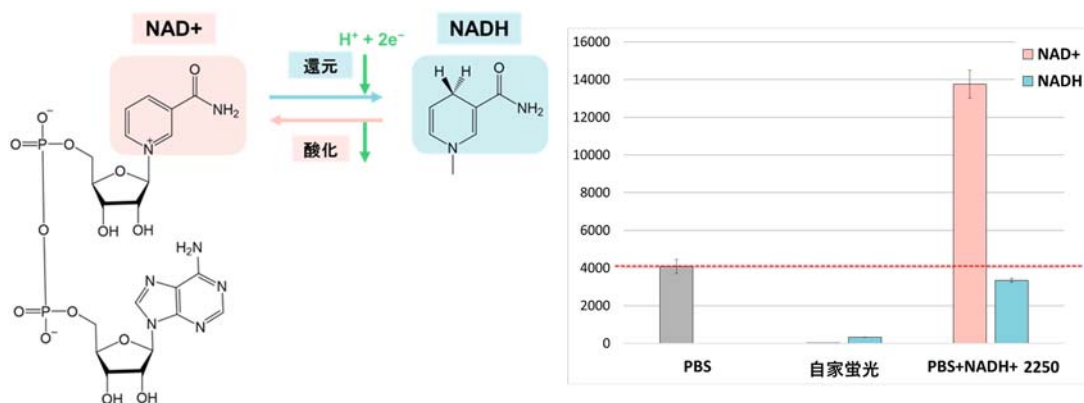


Figure 5 NAD⁺、NADH の構造と GIF-2250 との反応性

NADH は、340 nm 付近の紫外域に吸収バンドを持ち、460 nm 付近を中心とする青色の蛍光を発する⁽²⁰⁾。Figure 15 のグラフからも NADH の自家蛍光が観察された。一方 NAD⁺ には自家蛍光が存在しない。GIF-2250 との反応は、NAD⁺ では輝度が上昇したが、NADH では輝度が上昇しなかった。

2-Deoxy-D-glucose(2-DG)による NAD⁺/NADH の変化

次に細胞内で GIF-2250 と NAD⁺ との反応を調べた。Figure 11 に構造を示した 2-Deoxy-D-glucose(2-DG) は解糖系を阻害する物質である⁽²¹⁻²⁶⁾。解糖系が阻害されると NAD⁺ が蓄積して、NADH に変化しなくなる。すなわち、NAD⁺ が増えて NADH が減ることになる。

B16F10 メラノーマ細胞を 2-DG 含有培地で 3 時間培養し、NAD⁺ が増え、NADH が減った状況を作り顕微鏡で観察した。NAD⁺ に反応し、GIF-2250 の輝度が上昇するかを調べた。観察する際は露光時間を統一して、露光時間による輝度の差が出ないようにした。

2-DG 含有培地で培養後観察したところ、輝度が上昇して粒がはっきりと見えるようになった。

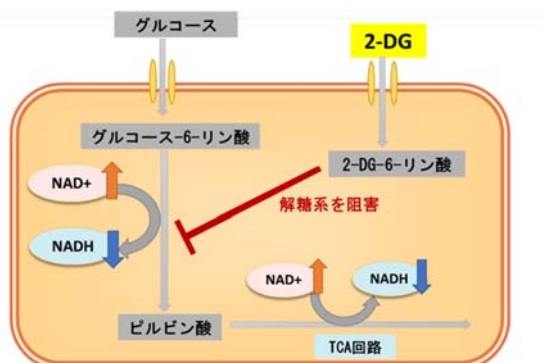
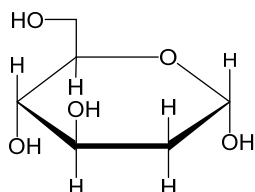
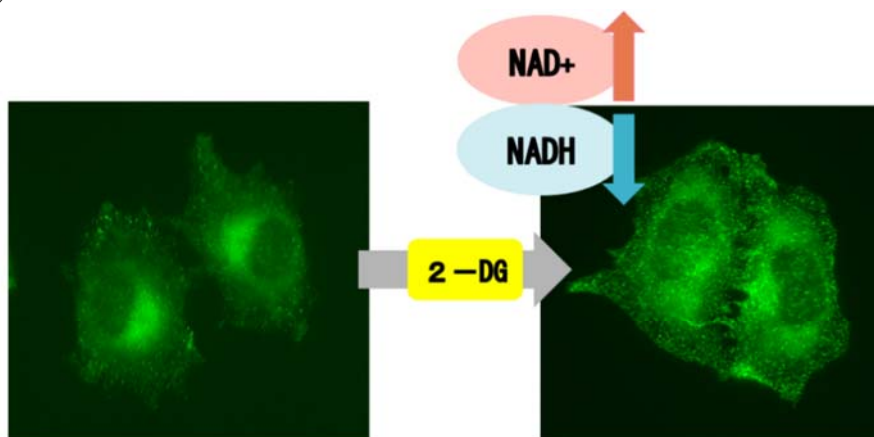


Figure 6 2-Deoxy-D-glucose(2-DG)の構造と細胞内代謝

B16F10 メラノーマ細胞を 2-DG 含有培地で 3 時間培養し、 NAD^+ が増え、 NADH が減った状況を作り顕微鏡で観察した。 NAD^+ に反応し、GIF-2250 の輝度が上昇するかを調べた。観察する際は露光時間を統一して、露光時間による輝度の差が出ないようにした。2-DG 含有培地で培養後観察したところ、輝度が上昇して粒がより鮮明に検出された (Figure 12)



B16F10マウスメラノーマ細胞

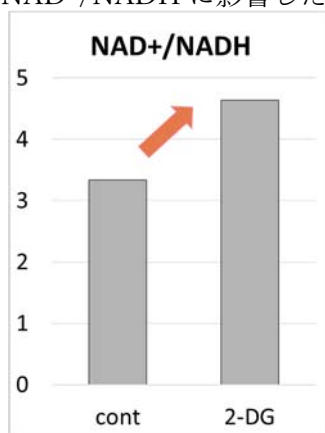
Green : GIF-2250

※露光時間統一

Figure 7 2-Deoxy-D-glucose による GIF-2250 の輝度上昇

この時、2-DG を加えることで実際に NAD^+ が増えて NADH が減るとい状況あるかを確認するために NAD/NADH Assay Kit-WST を使用して NAD^+ アッセイを行った。2-DG を加えて 3 時間培養した細胞では通常の培地で培養した細胞と比較して NAD^+/NADH が

上昇していることが確認された。Figure 13 の NAD⁺定量によって、Figure 12 の輝度の差が NAD⁺/NADH に影響したものであると示唆された。



NAD/NADH Assay Kit-WST
Dojindo

Figure 8 NAD⁺/NADH の変化

一方、細胞内の NAD⁺絶対量は必ずしも 2-DG 処理で上昇しないと予想される。そのため、GIF-2250 誘導体のうち、小胞特異性が低い化合物との比較で検証することにした。まずは、GIF-2250 の構造の内どの部分が NAD⁺を標的にしているか解明するために、GIF-2250 と構造が似た GIF-2264, GIF-2273, GIF-2269 を同様にして B16F10 メラノーマ細胞を 2-DG 含有培地で 3 時間培養し、NAD⁺が増え、NADH が減った状況を作り顕微鏡で観察した。

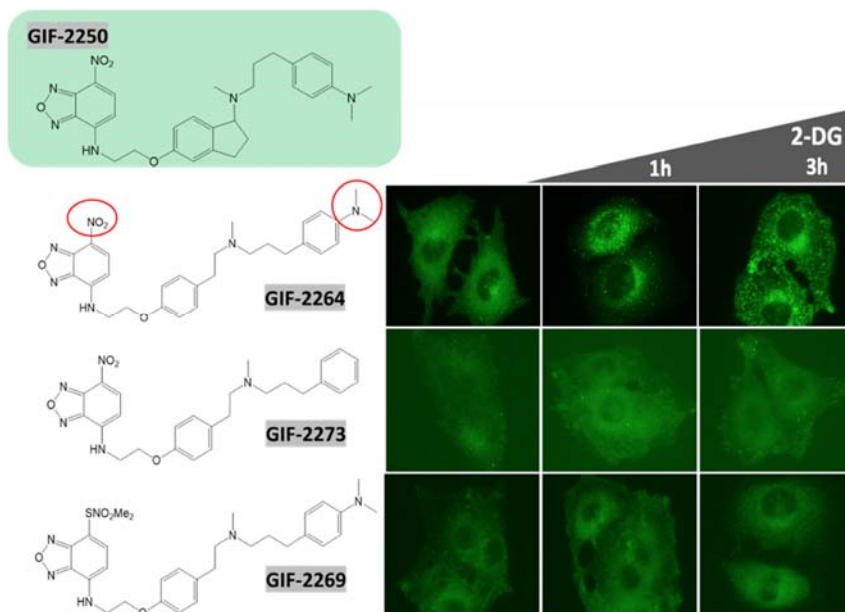


Figure 9 GIF-2264, GIF-2273, GIF-2269 の 2-DG 培地の影響

観察の結果、GIF-2264 では輝度の上昇が見られたが、GIF-2273, GIF-2269 では輝度の変化は見られなかった。そのことから、Figure 14 の赤丸で示した部分が NAD⁺ と反応すると考えら、実際に GIF-2264 のみが NAD⁺ 存在下で輝度上昇が観察された。

4 エクソソームの品質評価

エクソソームの新鮮なものと 1 年経って劣化したもので輝度に変化があるか観察した。100 µg/mL の市販のミルクエクソソームを GIF-2250 と ExoSparkler で染色し、顕微鏡で観察した。

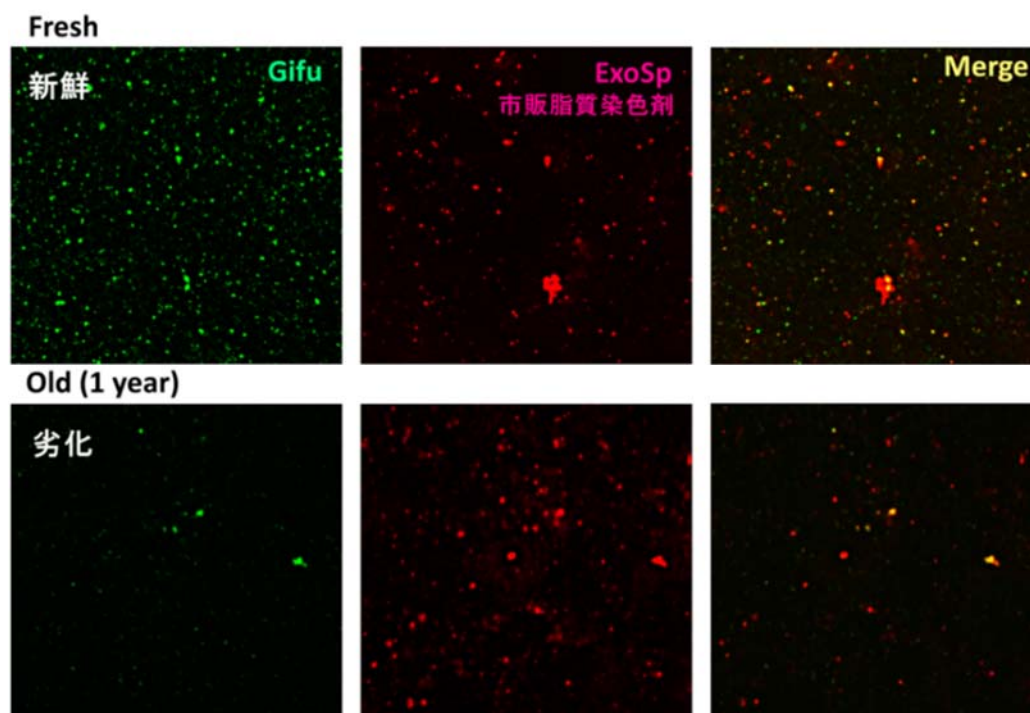


Figure 15 エクソソーム品質評価

緑：GIF-2250、赤：市販の脂質染色剤 ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Red

ExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Red では、新鮮・劣化間の差が見られなかった。一方、GIF-2250 では新鮮なエクソソームと比べて劣化したエクソソームで輝度が低くなった。

5 ミルクエクソソームの定量

市販ミルクエクソソームを PBS で希釈し、GIF-2250 を加え蛍光強度を測定した。0.03 ng、0.01 ng、0.3 ng、1 ng、3 ng のミルクエクソソームを GIF-2250 と反応させた。蛍光強度とミルクエクソソーム濃度で検量線を作成した。データのスポットに近似直線を引くことができた。

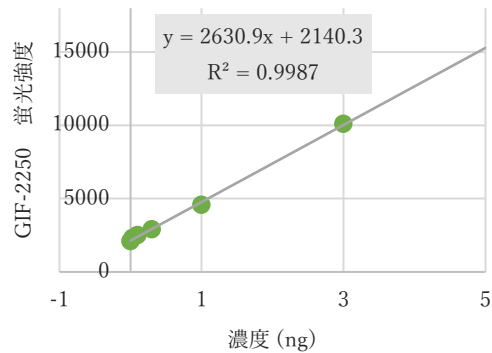


Figure 10
エクソソーム定量 GIF-2250 検量線

6 精製ミルクエクソソームと GIF-2250

市販の牛乳を酢酸処理、遠心、フィルターで回収した。回収したサンプルを GIF-2250 で蛍光強度を測定した。市販の牛乳は殺菌済みのものである。その殺菌の方法も様々な種類がある。今回使用した牛乳は、130°Cで2秒殺菌する超高温瞬間殺菌という方法で殺菌した牛乳と、65°C前後で30分程度殺菌する連続式低温殺菌という方法で殺菌した牛乳である。それぞれの殺菌方法の牛乳でミルクエクソソームを精製した。精製したミルクエクソソームを GIF-2250 で蛍光強度を調べた。以下に、同じ週に精製したエクソソームの一例を示す。

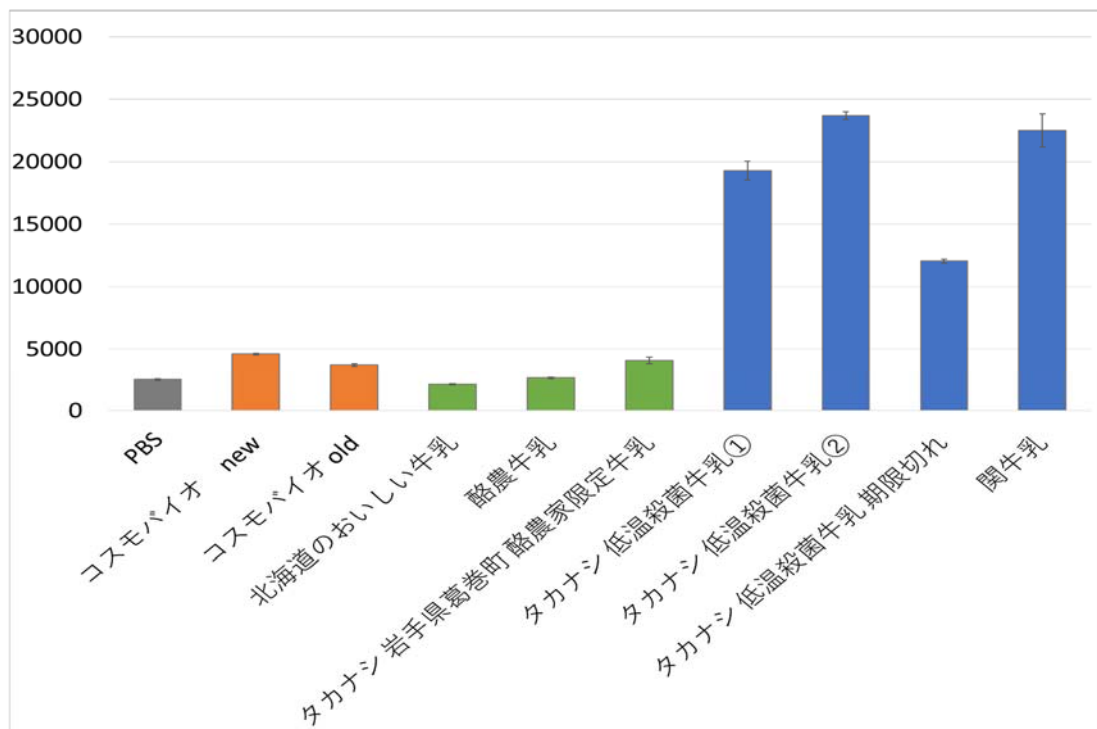


Figure 11 高温殺菌牛乳と低温殺菌牛乳の GIF-2250 反応性

精製したミルクエクソソームを PBS で 10% 希釈して GIF-2250 を加えてマイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定した。市販ミルクエクソソームは 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。高温殺菌牛乳は GIF-2250 の蛍光強度が基底蛍光からほぼ変化がなかった。一方で、低温殺菌牛

乳では蛍光強度が基底蛍光より高かった。また、同じ低温殺菌牛乳を使用しても、消費期限切れのものは通常より輝度が低くなった。このことから、低温殺菌牛乳且つ新鮮な牛乳であればミルクエクソソームを大量に精製することが可能であると考えた。そのため、今後ミルクエクソソームを精製する際に使用する牛乳は低温殺菌牛乳で新鮮な牛乳とすることにした。その中でもタカナシ低温殺菌牛乳がエクソソーム含有量が安定したため、以後は本牛乳を使用することにした。

7 精製ミルクエクソソームの解析

ウエスタンブロット解析

GIF-2250 の蛍光強度を測定した精製ミルクエクソソームで CD9、CD81 のウエスタンブロット解析を行った。Figure24 のグラフのサンプルと対応させて電気泳動を行いウエスタンブロッティングを行った。

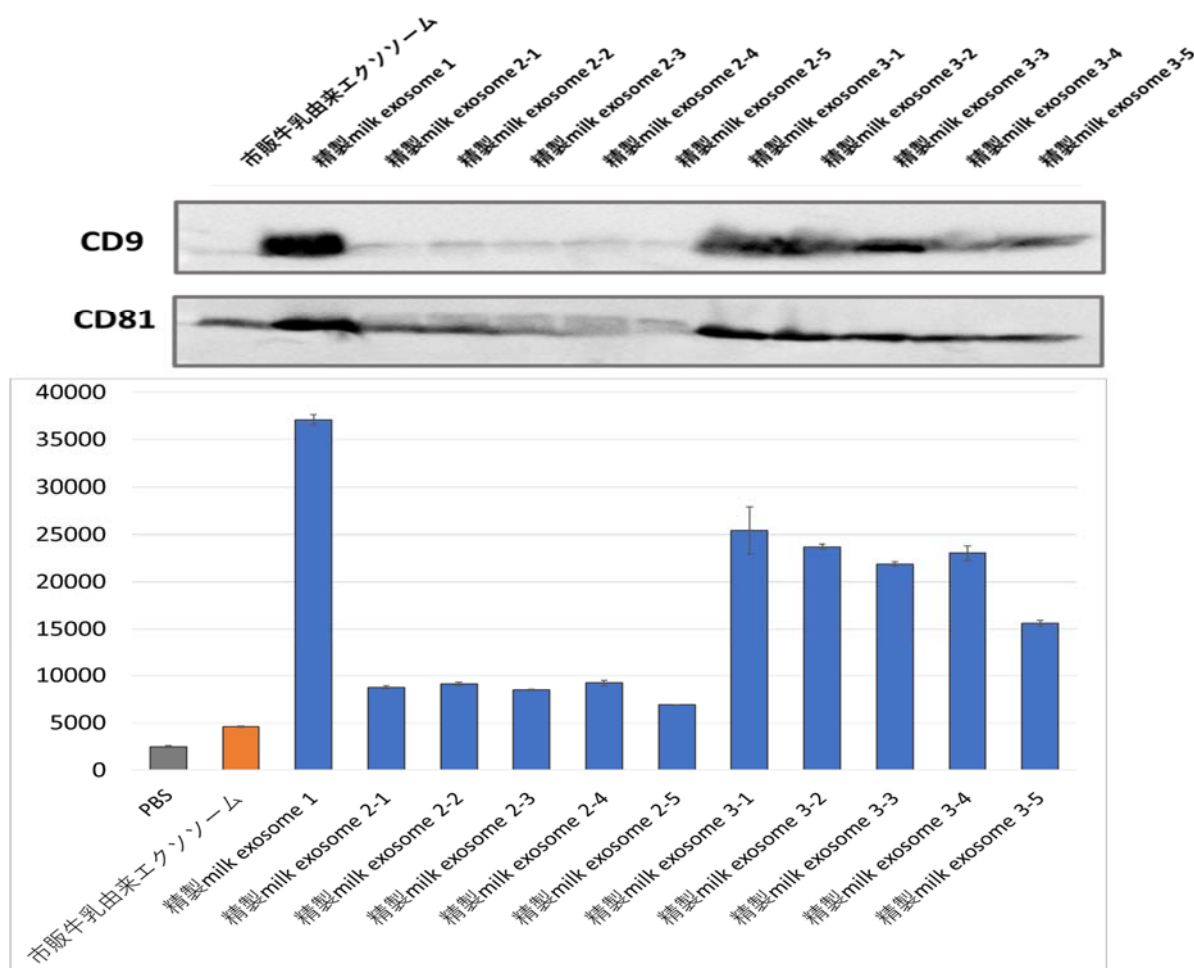


Figure 18 GIF-2250 蛍光強度と CD9、CD81 の相関

WB の写真からバンドの濃さを数値化し、GIF-2250 の蛍光強度と散布図を作成した。また、GIF-2250 の蛍光強度と CD9、CD81 のバンドの濃さの相関係数を Excel の CORREL 関数を用いて求めた。CORREL 関数の式は以下の通りである。

この時、 \bar{x} と \bar{y} は標本平均である。

$$\text{CORREL}(X, Y) = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2} \sqrt{\sum(y - \bar{y})^2}}$$

CORREL 関数の結果 CD9 の相関係数は約 0.95、CD81 の相関係数は約 0.92 であった。どちらも正の強い相関があることが示唆された。また、散布図から検量線付近にスポットが多く確認された。

抗体	相関係数
CD9	0.952866635
CD81	0.921632739

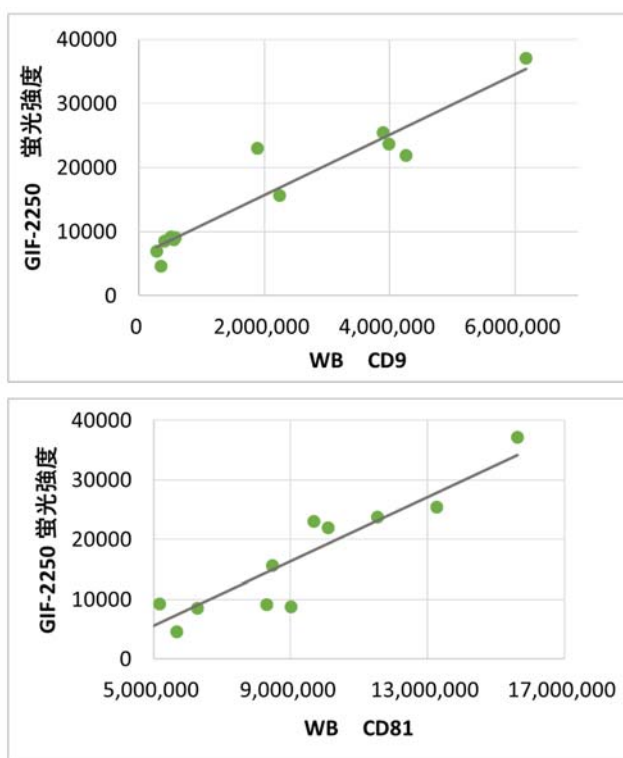


Figure 19 GIF-2250 蛍光強度と CD9、CD81 の相関

相関係数とグラフより、GIF-2250 の蛍光強度とエクソソームマーカーである CD9、CD81 量に高い相関が示された。

(顕微鏡観察)

相関解析に利用したミルクエクソソームを GIF-2250、ExoSparkler で染色し蛍光顕微鏡で観察した。ともにエクソソームとみられる粒が確認され、重なりが確認できた。

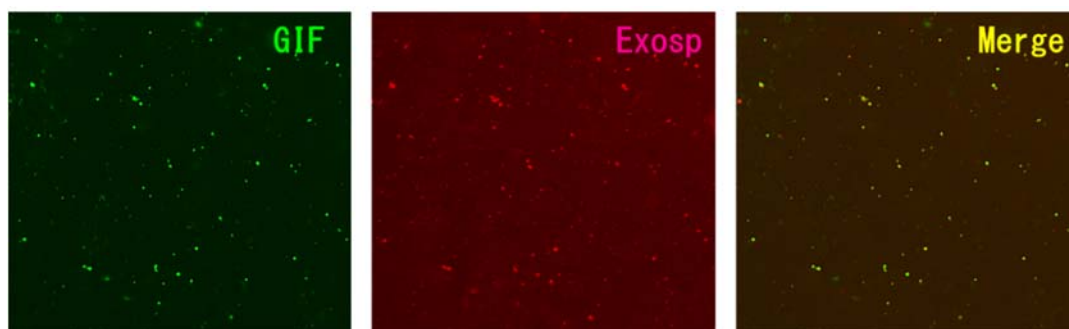


Figure 20 精製ミルクエクソソームの確認

Fluore HPLC-ゲル濾過解析

精製したミルクエクソソーム 10 μ L を PBS 40 μ L と HPLC ビーカーに入れて、ExoSparkler で染色し、HPLC を行った。その際タンパク質の溶出位置を調べるために緑蛍光の2次抗体である Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)も PBS で 1/1000 希釈したものを 1 μ L 加えた。

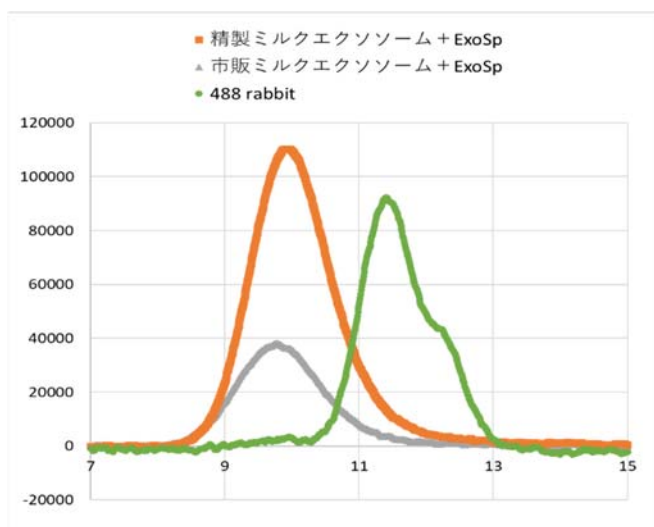


Figure 21 Fluore HPLC-ゲル濾過

エクソソームは9分後半から10分前半に検出され、タンパク質はエクソソームより小さくエクソソームより後の11分付近で検出される。

市販ミルクエクソソームと同じ位置に精製した精製ミルクエクソソームが検出されたことから精製は成功したと結論できる。また、輝度が市販のミルクエクソソームより高く、高濃度であることも確認された。以上のウエスタンブロット解析、顕微鏡観察、HPLCの結果から、回収したサンプルにミルクエクソソームが大量に含有されることが確認された。

8 ミルクエクソソーム精製におけるフィルターの重要性

ミルクエクソソームの精製でタンパク質などの不純物を取り除くためにフィルターを何重にかけた。ポンプで行うときは、 $0.45\mu\text{m}$ (CA) $\rightarrow 0.1\mu\text{m}$ (PES)で行っていたが、それだけではタンパク質が全て取り除くことはできていなかった。そこで、 $1.2\mu\text{m}$ (CA) $\rightarrow 0.8\mu\text{m}$ (CA)の工程を加えることでタンパク質をより取り除こうと考えた。

$1.2\mu\text{m}$ (CA) $\rightarrow 0.8\mu\text{m}$ (CA)の工程の有無以外は同様の方法で精製したミルクエクソソームを Fluore HPLC にかけることでタンパク質が取り除けているか調べた。エクソソーム $10\mu\text{L}$ と PBS $40\mu\text{L}$ を HPLC ビーカーに入れて、ExoSparkler で染色し、HPLC 解析を行った。

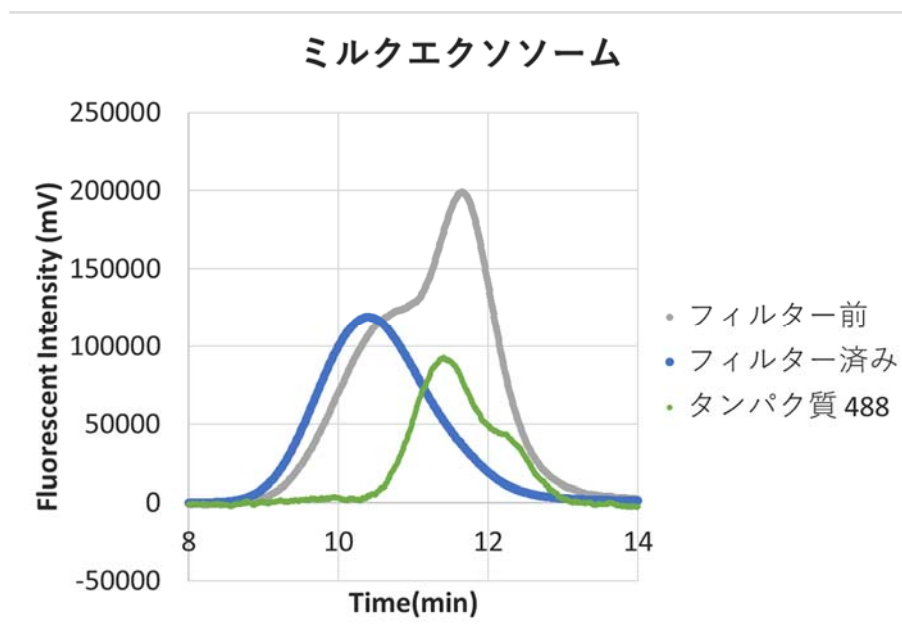


Figure 22 フィルターの重要性

$1.2\mu\text{m}$ (CA) $\rightarrow 0.8\mu\text{m}$ (CA)の工程を入れることで、Figure 22 の緑色で示したタンパク質の位置(11.4min あたり)のピークがグレーと青色を比較するとなくなったことが分かる。フィルターをかけることで、タンパク質を減らし、より不純物が少ない高精度のミルクエクソソームを精製することができた。

9 ミルクエクソソーム熱変性

ミルクエクソソームを精製する前に牛乳を 60°C 、 70°C 、 80°C で 1 h 処理による熱変性の影響を調べた。まず、それぞれの温度で牛乳を保温し、その後精製に移った。牛乳を酢酸処理した後、 $1.2\mu\text{m}$ (CA) $\rightarrow 0.8\mu\text{m}$ (CA) $\rightarrow 0.45\mu\text{m}$ (CA)のフィルターを通し $0.1\mu\text{m}$ のフィル

ターで回収した。その後、精製したミルクエクソソームを GIF-2250 の蛍光強度測定、HPLC で解析した。

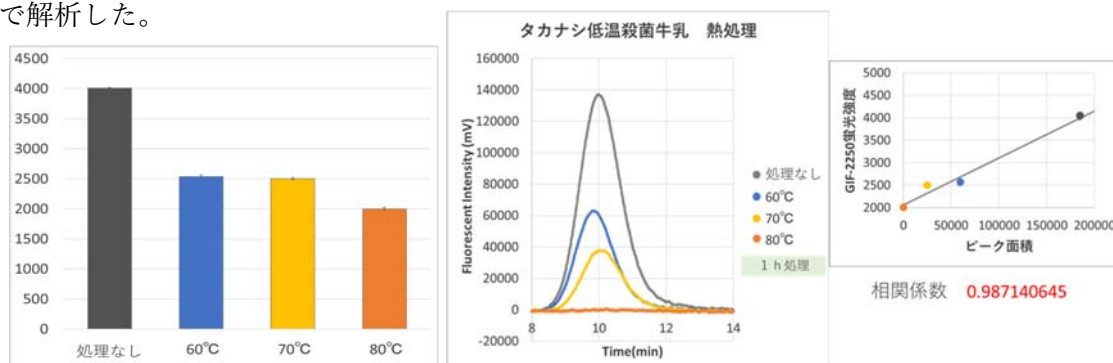


Figure 12 熱変性と GIF-2250 蛍光輝度と HPLC-ゲル濾過解析

熱処理の温度が高くなるほど、エクソソームは壊れ回収量が減ったため、GIF-2250 の輝度に差が生じたと考えられる。(輝度 2000 が基底蛍光) GIF-2250 の蛍光強度と同じく、HPLC でも確認できた。GIF-2250 と HPLC の結果に相関があるか調べた。HPLC の結果から積分でピーク面積を求めた。また、GIF-2250 と HPLC のピーク面積の相関係数を CORREL 関数で算出した。GIF-2250 と HPLC のピーク面積の相関係数は約 0.98 であり、強い正の相関があることが示された。

次に、処理なしで精製したミルクエクソソームを精製後に 80°C で 1 h 処理し、エクソソームの熱耐性を調べた。精製後に 1 h 熱処理をすると、ミルクエクソソームが壊れ、量が減っていることが示唆された。精製前に熱処理をした方が、ミルクエクソソーム量への影響が大きかった。また、時間経過によるエクソソームの劣化では、ExoSparkler では十分検出できるが、HPLC-ゲル濾過解析では、熱によるシグナル低下が観察された。熱処理は、エクソソームそのものの破壊に繋がることを示唆された。

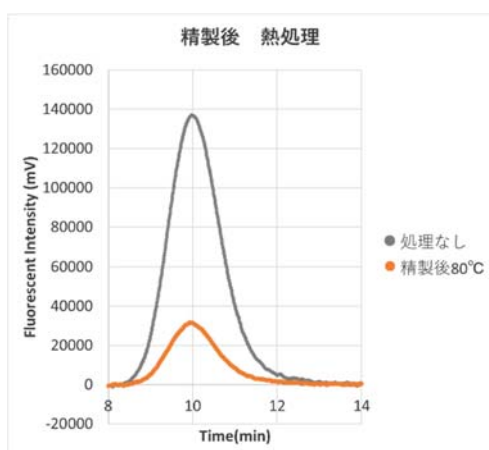


Figure 24 精製後 熱処理

10 エクソソームの pH による影響

エクソソームに対しての pH が影響を調べた。精製したミルクエクソソーム 40 μ L と PBS 40 μ L を 96well plate に入れた。そこに、HCl 0.1N, NaOH 0.1N, NaCl 0.1N を 10 μ L 加えて 1 時間放置した。この時の pH はそれぞれ pH2.2, pH10.7, pH6.7 であった。1 時間後、それぞれ、中和してから GIF-2250 を加えて蛍光強度測定した。プレートから 30 μ L と PBS 20 μ L を HPLC ビーカーに入れて ExoSparkler で染色し、HPLC を行った。

GIF-2250 の蛍光強度測定と HPLC の結果より、エクソソームは pH2~10 では影響がないことが示唆された。

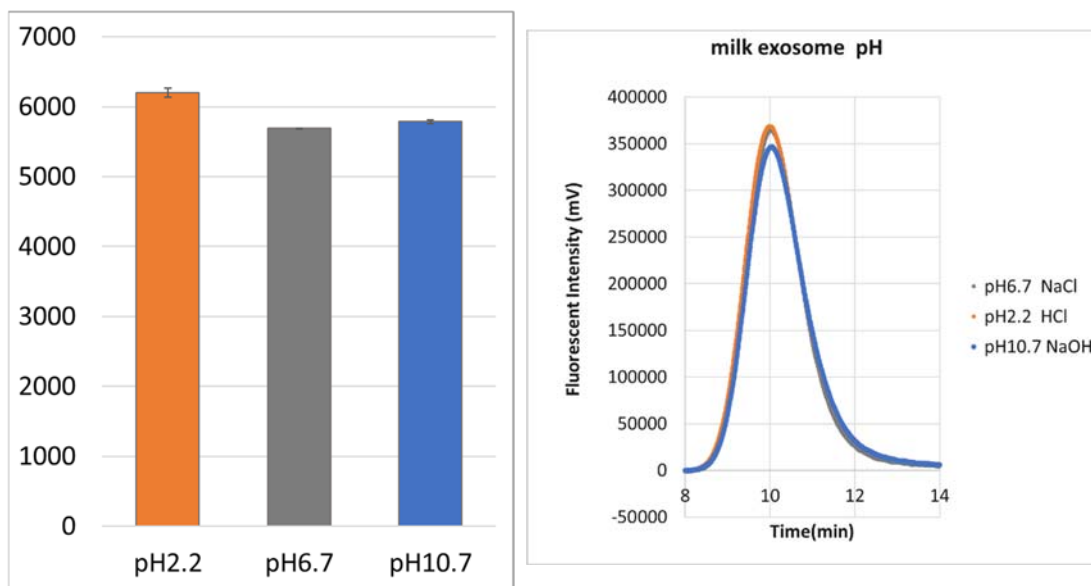


Figure 25 pH 変化処理後の GIF-2250 測定と HPLC-ゲル濾過解析

11 乳酸菌由来エクソソーム

ヨーグルトから精製したエクソソームとミルクエクソソームを比較するために、GIF-2250 解析と Fluore HPLC-ゲル濾過解析と顕微鏡観察を行った。

GIF-2250 解析

精製したエクソソームを GIF-2250 で蛍光強度を調べた。

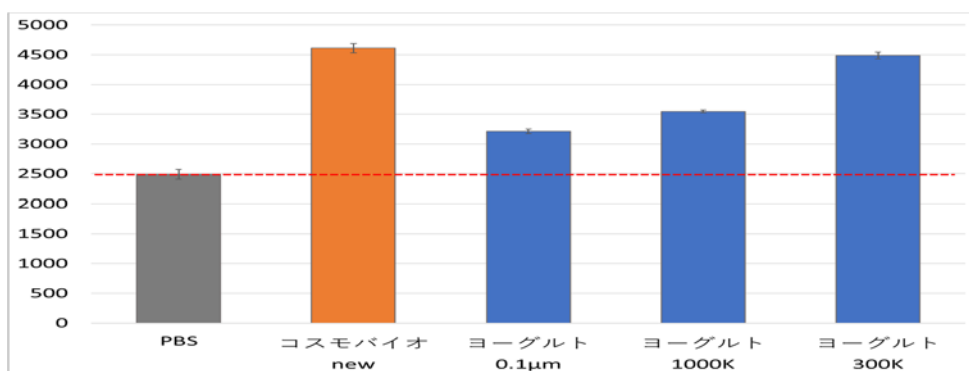


Figure 26 乳酸菌由来エクソソームと GIF-2250

どの大きさのフィルターでも基底蛍光より輝度が高くなった。特に、300K で輝度が高くなった。

(Fluore HPLC—ゲル濾過)

ヨーグルトから精製したエクソソーム未希釈で ExoSparkler で染色し HPLC 解析を行った。その際タンパク質の位置を調べるために緑色蛍光の 2 次抗体を 1 μ L 加えた。ミルクエクソソームは 1/5 希釈し検出される時間に差があるか調べた。

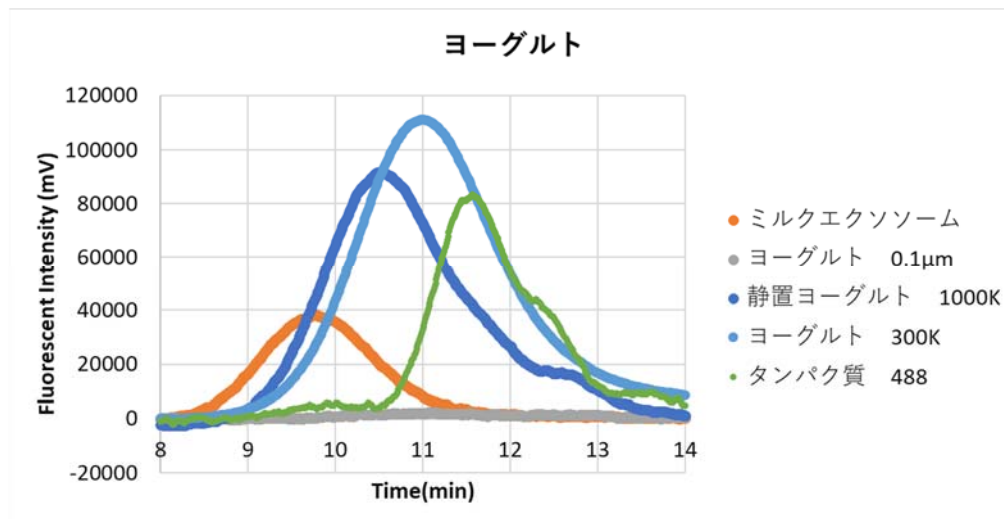


Figure 13 ヨーグルト (乳酸菌由来) エクソソーム

ヨーグルトから精製したエクソソームは 0.1 μ m では回収することができなかったが、1000K、300K のフィルターでは回収することができた。ミルクエクソソームは 9.8min 付近に検出され、ヨーグルトから精製したエクソソームは 1000K: 10.5min、300K: 10.8min に検出された。ミルクエクソソームより遅く検出されたことから、粒がミルクエクソソームより小さいことが予想された。

(顕微鏡観察)

ヨーグルトから精製したエクソソームを GIF-2250 と ExoSparkler で染色し、観察した。

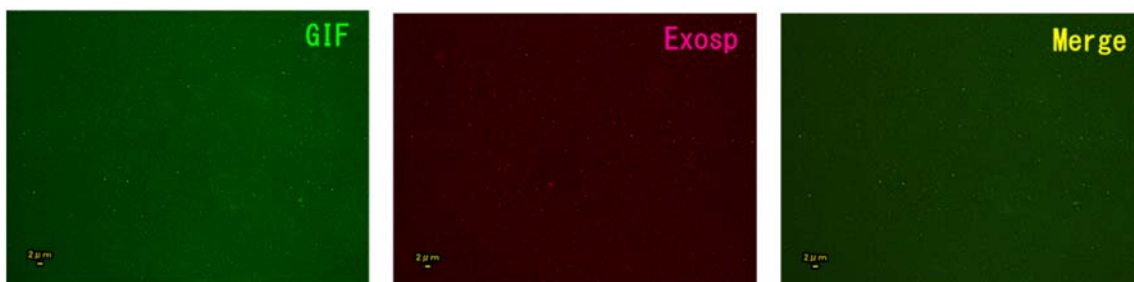


Figure 28 乳酸菌由来エクソソーム顕微鏡観察

ミルクエクソソームを観察した際より、エクソソームとみられる粒は小さかった。また、ミルクエクソソームと同じように GIF-2250 と ExoSparkler とともにエクソソームとみられる粒が確認され、重なりが確認できた。Fluore HPLC-ゲル濾過と顕微鏡観察の結果と合わせて、ヨーグルトからとったエクソソームの大きさはミルクエクソソームより小さいことが示唆された。

4-12 ウェスタンブロット解析

高温殺菌牛乳、低温殺菌牛乳、ヨーグルトから精製したエクソソームをウェスタンブロット解析で CD9、CD81 の発現を調べた。コントロールとして市販ミルクエクソソームを使用した。

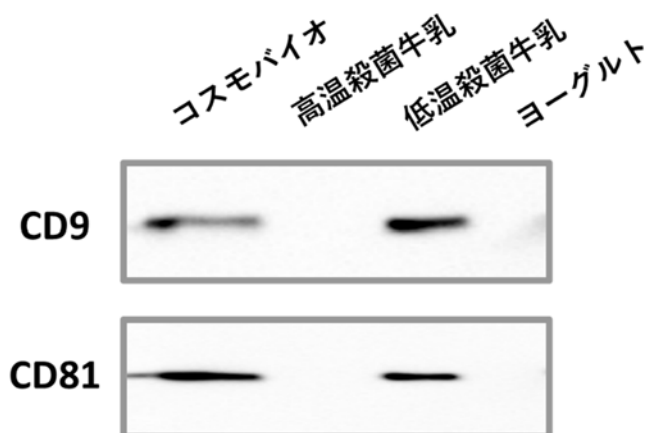


Figure 29 CD9、CD81 の発現

高温殺菌牛乳、乳酸菌由来エクソソームはバンドが確認されなかった。一方で、低温殺菌牛乳から精製したミルクエクソソームは市販のミルクエクソソームより濃く発現していた。また、低温殺菌牛乳からの発酵後のエクソソーム様小胞も、CD9 および CD81 陰性であった。これらのことから、ヨーグルトエクソソームは乳酸菌が独自に放出した小胞であり、ミルクエクソソームの分解物・修飾体ではないと結論した。

4-13 薬効解析

培養細胞

GIF-2250 の標的探索を通じて、牛乳由来の 2 種類のエクソソーム（ミルクエクソソームと乳酸菌「ヨーグルト」エクソソーム）を高濃度で精製することに成功した。また、それらの品質を確認することも可能となった。そこで、これらエクソソームの生物活性の検討に移った。まずは、培養細胞で複数の生物活性評価を実施した。GIF-2250 の蛍光輝度からの算出で、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の終濃度とした。

差が検出されなかったものとして、

1) メラニン合成、2) 脂肪燃焼促進、3) 神経細胞の酸化ストレス抑制作用は影響が観察されなかった。4) 培養軟骨細胞でのコラーゲン産生修飾は、時によって促進に作用したが、再現性が乏しく、混入物の影響である可能性が否定できない。一方、エクソソーム研究で広く認知されている 5) 抗炎症作用は、我々も検出できた。特にミルクエクソソームで高い抗炎症活性が検出できた。

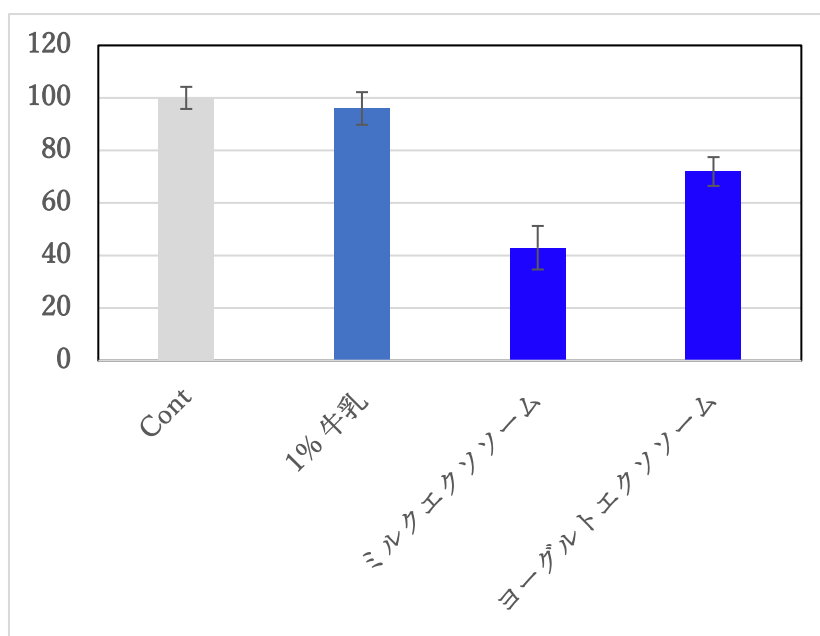


Figure 14 RAW264.7 細胞における NO 産生抑制 (%)

RAW264.7 (マクロファージ) 細胞 に 500 ng/mL の濃度で LPS を作用させ、1 2 時間後の培地の NO 量を測定した。その結果、ミルクエクソソーム及びヨーグルトエクソソームを 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.01%換算) の濃度で培地へ添加した場合に NO 産生抑制作用が観察された。また、その活性は GIF-2250 輝度で補正した場合は、ミルクエクソソームの方が高かった。比較対象として、低温殺菌牛乳を 1%を加えたが、顕著な効果は観察されなかった。

in vivo 評価 (1)

次に、モデル動物での薬効確認を行うことにした。我々は炎症モデルとして SIK 3-KO マウスを有し、自然発生 (症) の炎症性腸疾患 (大腸炎) モデルを評価できる。そこで、ミル

クエクソームをそのまま（1mg/匹/回：40mg/kg/回）朝・晩2回の経口投与による炎症を評価した。炎症性腸疾患を確実に誘導するために、デキストランサルフェートを2%濃度で飲料水に含有し3日間経口摂取させた。今回は、体重減少の惹起率・程度で予防効果を検証した。野生型マウスでは2%デキストランサルフェートでは、炎症は明確には発症しない。一方、SIK3-KOでは、ほぼ全てのマウスで炎症が誘導され、体重減少が5日後から観察される。この炎症惹起に、ミルクエクソソーム投与は効果を発揮しなかった。また、血糖値やインスリン値などの、代謝指標にも影響は観察されなかった。

理由として、1mg/匹/回では十分な量とは言えない可能性が予想される。特に、小腸で分解され、大腸まで届いていないと考えられる。

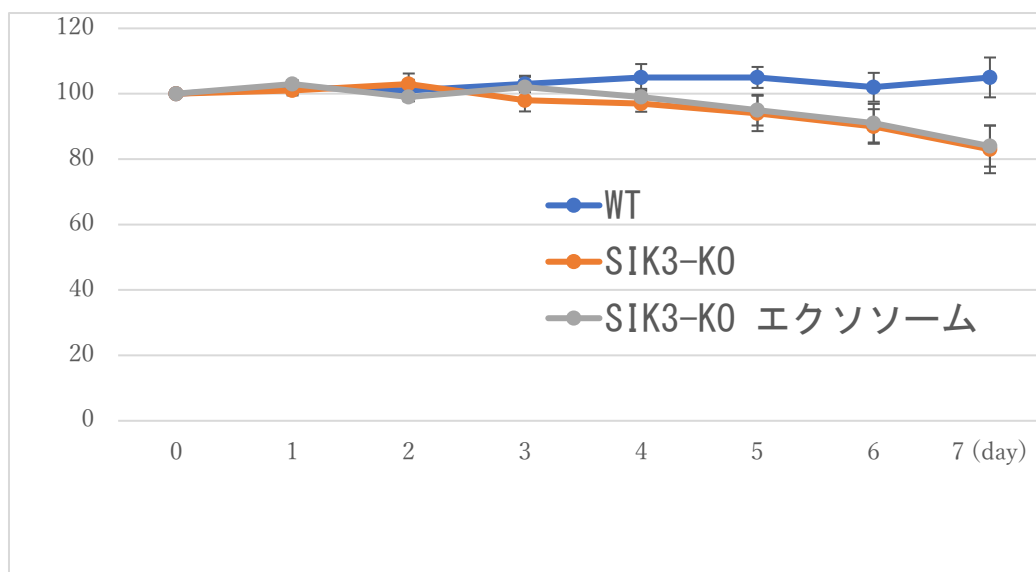


Figure 31 デキストランサルフェート誘導性腸炎による体重減少（%）3日間の処理。

in vivo 評価（2）

炎症性腸疾患モデルでの検証が困難であることから、「痔」のモデルマウスを利用することにした。

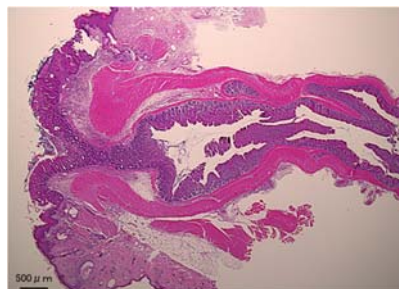
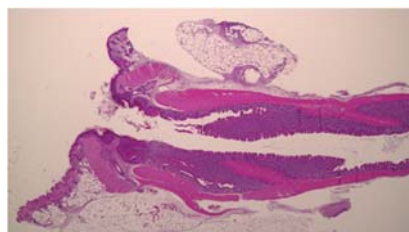


Figure 32 「痔」のモデルマウス

正常な肛門（上）、痔（下）

痔のモデルマウスは SIK3-KO に全身性に SIK 3 を僅かながら発現を戻したマウスで、約半年で痔を自然に発症する。発症前に肛門が少し赤くなり、その後1ヶ月で表面が腫れる。肛門が少し赤くなった状態で、ステロイドを塗布すると発症が抑制される。そこで、ミルクエクソソーム（10 mg/mL）を同様にワセリン混合 1:1 で塗布し、炎症の進行の度合いを確認した。

痔の同時（同週齢）発症は未だ条件が確立できていないこともあり、半年間飼育を続け、僅かに発症した個体を順次各グループへと振り分けた。なお、飼育中に別のマウスと分けることは行わず、同一のケージで処理を続けた（雌雄は元々別々であるが、発症までに時間を必要とすることから今回はどちらか一方に統一できなかった）。各グループで5匹を確保し、1ヶ月間の処置で病態が進行した場合を発症とし、病態が進行しなかった個体は未発症と分類した。なお、病態が進行しない場合もさらに1ヶ月間の経過観察とし、病態が進行していないことを確認した。この経過観察期間は処置は行っていない。

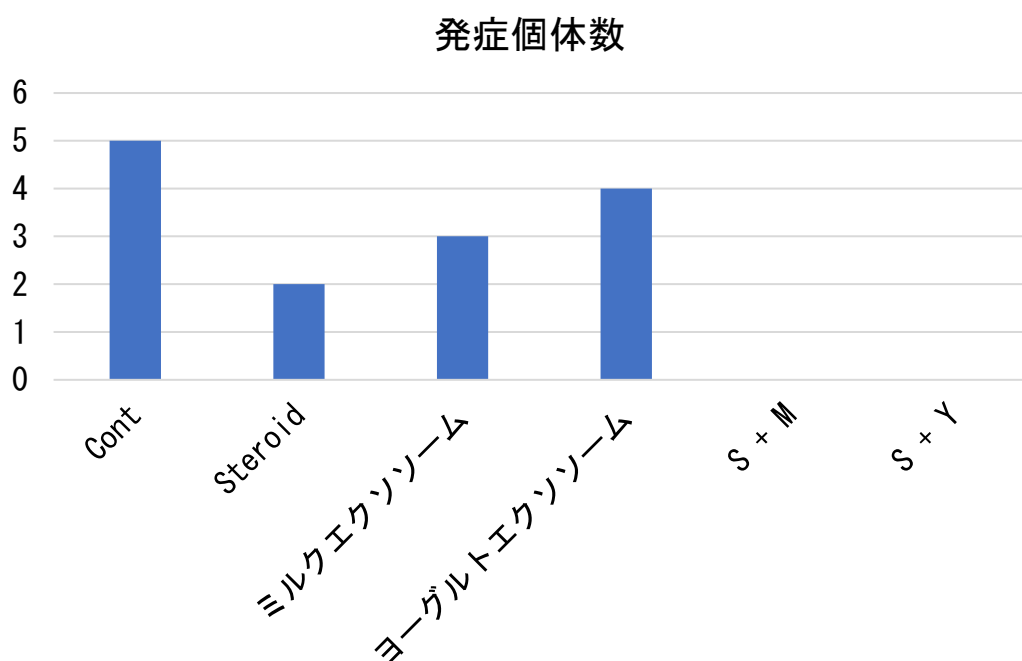


Figure 33 痔を発症しや個体数（各群 5 引き） S+M（Steroid+ミルクエクソソーム）、S+Y（Steroid+ヨーグルトエクソソーム）

ステロイドは痔の発症を抑制できた。また、エクソソーム塗布群も僅かではあるが、病態が進行しない個体が観察された。一方、ステロイド軟膏にエクソソームを混ぜた場合は、病態進行を阻止できた。エクソソーム中に、ステロイドの作用を増強する成分が含まれていると予想された。

また、本病態に軟便が伴われていたが下痢の発症には至らないため、整調機能は検討しないことにした。

結論

フィルターを使うだけで市販の牛乳やヨーグルトからエクソソームを濃縮・精製できた。また、エクソソーム安定化のための牛乳の調整条件が確認できた。GIF-2250も輝度を元に機能性エクソソームの定量を行い、培養細胞での抗炎症活性ならびにマウス痔モデルに対して病態発症抑制効果を確認できた。今後は、ミルクエクソソームの抗炎症標的の同定により治療効果を明確化する必要がある。

参考文献

- 1) Colombo M, Raposo G, & Thery C (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30 : 255-289. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
- 2) van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R (July 2012). “Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles”. *Pharmacological Reviews* 64 (3): 676-705. DOI:10.1124/pr.112.005983. PMID 22722893
- 3) Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P (November 2006). “Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function”. *Immunology Letters* 107 (2): 102-8. DOI:10.1016/j.imlet.2006.09.005. PMID 17067686.
- 4) Spaul R, McPherson B, Gialeli A, Clayton A, Uney J, Heep A, Cordero-Llana Ó (April 2019). “Exosomes populate the cerebrospinal fluid of preterm infants with post-haemorrhagic hydrocephalus”. *International Journal of Developmental Neuroscience* 73: 59-65. doi:10.1016/j.ijdevneu.2019.01.004. PMID 30639393
- 5) Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 6328-33.
- 6) Zhang Y, Liu D, Chen X et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 2010; 39: 133-44.
- 7) Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 17442-52.
- 8) Masaharu Somiya, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya Drug delivery application of extracellular vesicles; insight into production, drug loading, targeting, and pharmacokinetics. *AIMS Bioengineering*, 2017,4(1): 73-92.
- 9) <https://granpro-clinic.com/blog/exosomes>

- 10) Kunz, C; Lönnerdal, B (1990). "Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods". *Am. J. Clin. Nutr.* 51 (1): 37–46. doi:10.1093/ajcn/51.1.37. PMID 1688683
- 11) 中野 智木 酸性条件下におけるカゼインの熱挙動特性, ミルクサイエンス, 2018, 67 巻, 3 号, p. 186-194, 公開日 2018/12/23, Online ISSN 2188-0700, Print ISSN 1343-0289
- 12) Farrell HM (1973). "Models for Casein Micelle Formation". *Journal of Dairy Science.* 56 (9): 1195–1206. doi:10.3168/jds.S0022-0302(73)85335-4. PMID 4593735.
- 13) Schmidt, D. G.: Association of caseins and casein micelle structure. In *Development in Dairy Chemistry-1*. P. F. Fox, ed. Applied Science Publishers, London, UK. pp. 61-86 (1982)
- 14) https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/exo-prep-exosomes-isolation-hnb.asp?entry_id=14501
- 15) <https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0129-7760.html>
- 16) <https://www.beckman.jp/resources/reading-material/case-studies/exosome-purification-separation>
- 17) <https://www.wakenyaku.co.jp/ctg/ls.php?i=177>
- 18) 中林孝和, 太田信廣 自家蛍光寿命イメージングによる細胞観察
北海道大学電子科学研究所
- 19) K. C. Cheng, C. I. Chang, Y. C. Lin, C. I. Liu, Y. C. Zeng, and Y. S. Lin, "Secoiridoids from the seed of gonocaryum calleryanum and their inhibitory potential on lps-induced tumor necrosis factor and nitric oxide production," *Molecules*, vol. 23, no. 7, 2018, doi: 10.3390/molecules23071633.
- 20) Wick, A.N.; Drury, D.R.; Nakada, H.I.; Wolfe, J.B. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J. Biol. Chem.* 1957, 224, 963–969.
- 21) Woodward, G.E.; Hudson, M.T. The effect of 2-desoxy-d-glucose on glycolysis and respiration of tumor and normal tissues. *Cancer Res.* 1954, 14, 599–605.
- 22) Mukherjee, P.; Mulrooney, T.J.; Marsh, J.; Blair, D.; Chiles, T.C.; Seyfried, T.N. Differential effects of energy stress on AMPK phosphorylation and apoptosis in experimental brain tumor and normal brain. *Mol. Cancer* 2008, 7, 37.
- 23) <https://www.dojindo.co.jp/products/N509/>
NAD/NADH 測定キット (Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan)
https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/nad-nadh-assay-kit-cbl.asp?entry_id=17200
- 24) NAD⁺/NADH アッセイキット (比色/蛍光) (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan)
- 25) <https://www.funakoshi.co.jp/contents/201233>
BioVision 社 NAD⁺/NADH Quantification Kit (Funakoshi Co., Ltd., Tokyo, Japan)

- 26) Xiao-Hong Zhu, Ming Lu, Byeong-Yeul Lee, Kamil Ugurbil, and Wei Che. In vivo NAD assay reveals the intracellular NAD contents and redox state in healthy human brain and their age dependences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Mar 3; 112(9): 2876–2881.
- 27) Sanosaka M, Fujimoto M, Ohkawara T, Nagatake T, Itoh Y, Kagawa M, Kumagai A, Fuchino H, Kunisawa J, Naka T, Takemori H. Salt-inducible kinase 3 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of pro-inflammatory molecules in mice. *Immunology.* 2015, 145, 268-78