(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2016-520803
(P2016-520803A)
(43)公表日　平成28年7月14日(2016.7.14)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/574	***(2006.01)***	G01N	33/574	ZNAA	4B024
G01N 33/53	***(2006.01)***	G01N	33/53	M	4B063
C12Q 1/68	***(2006.01)***	C12Q	1/68	A	4C084
C12N 15/09	***(2006.01)***	C12N	15/00	A	4C085
C12N 15/113	***(2010.01)***	C12N	15/00	G	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 138 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-502475 (P2016-502475)
(86)(22)出願日　平成26年3月14日 (2014.3.14)
(85)翻訳文提出日　平成27年10月13日 (2015.10.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/027541
(87)国際公開番号　WO2014/152622
(87)国際公開日　平成26年9月25日 (2014.9.25)
(31)優先権主張番号　61/791,301
(32)優先日　平成25年3月15日 (2013.3.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　500039463
ボード・オブ・リージエンツ，ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム
アメリカ合衆国、テキサス・７８７０１、オーステイン、ウエスト・セブンス・ストリート・２０１
(71)出願人　305049506
ベス　イスラエル　デアコネス　メディカル　センター，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２２１５，　ボストン，　ブルックリン　アベニュー　３３０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】診断及び治療のためのエクソソームにおけるｍｉＲＮＡバイオジェネシス

(57)【要約】
ｍｉＲＮＡ及びその前駆体を含むエクソソームの使用による癌の診断及び処置方法。例えば幾つかの態様において、癌は、対象から得た試料中のエクソソームのｍｉＲＮＡ量を決定することにより、又はエクソソームにおけるｍｉＲＮＡプロセシングを検出することにより、診断又は評価されてもよい。癌細胞により分泌されたエクソソームは、非癌性エクソソームと比較して独特であり、該癌性エクソソームは、ｍｉＲＮＡ及び活性ＲＮＡプロセシングＲＩＳＣ複合体の独特のレパートリーを含む。そのようなカプセル化されたＲＮＡ－ＲＩＳＣ複合体は、標的細胞において細胞非依存性のｍｉＲＮＡバイオジェネシス及び高効率のｍＲＮＡサイレンシングに利用される可能性もある。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象における癌バイオマーカのインビトロ検出方法であって、
（ａ）前記対象から生物学的試料を得ること；
（ｂ）（ｉ）前記試料のエクソソーム画分中のＲＩＳＣタンパク質；
（ｉｉ）前駆体ｍｉＲＮＡ；
（ｉｉｉ）前記試料のエクソソーム画分中の表５に示されたｍｉＲＮＡから選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）；及び／又は
（ｉｖ）前記試料のエクソソーム画分中の一次ｍｉＲＮＡ若しくは前駆体ｍｉＲＮＡプロセシング活性、
のレベルを測定すること；並びに
（ｃ）前記ｍｉＲＮＡ（複数可）、前駆体ｍｉＲＮＡ、ＲＩＳＣタンパク質又はｍｉＲＮＡプロセシング活性の測定レベルに基づき、癌バイオマーカを有する又は有さない前記対象を同定すること、
を含む前記方法。
【請求項２】
前記試料が、本質的に細胞を含まない、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記試料が、リンパ、唾液、尿又は血漿試料である、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記試料のエクソソーム画分を精製すること、又は前記試料のエクソソーム画分の生成を増加させること、をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記癌が、乳癌、肺癌、頭頸部癌、前立腺癌、食道癌、気管癌、脳癌、肝臓癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、精巣癌、結腸癌、直腸癌又は皮膚癌である、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記癌が、乳癌である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記ｍｉＲＮＡの少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９．１０のレベルを測定することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
ダイサー、ＡＧＯ２、又はＴＲＢＰのレベルを測定することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前駆体ｍｉＲＮＡのレベルを測定することが、表５のｍｉＲＮＡ（複数可）の１つの前駆体のレベルを測定することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記対象が、過去に癌を処置されている、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
前記対象が、過去に腫瘍を外科的に摘出されている、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記対象を癌バイオマーカを有する又は有さないと同定することが、前記測定されたｍｉＲＮＡレベル（複数可）、前駆体ｍｉＲＮＡレベル、ＲＩＳＣレベル、又はｍｉＲＮＡプロセシング活性を、癌のリスクと相関させることをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
前記対象を癌バイオマーカを有する又は有さないと同定することが、アルゴリズムを用いた、前記測定されたｍｉＲＮＡレベル（複数可）、前駆体ｍｉＲＮＡレベル、ＲＩＳＣレベル、又はｍｉＲＮＡプロセシング活性の解析をさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１４】
前記分析が、コンピュータにより実施される、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
ｂ）（ｉ）前記試料及び参照試料のエクソソーム画分中のＲＩＳＣタンパク質；
（ｉｉ）前記試料及び参照試料のエクソソーム画分中の前駆体ｍｉＲＮＡ；
（ｉｉｉ）前記試料及び参照試料のエクソソーム画分中の表５に示されたｍｉＲＮＡから選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）；並びに／又は
（ｉｖ）前記試料及び参照試料のエクソソーム画分中のｍｉＲＮＡプロセシング活性、のレベルを測定すること；並びに
（ｃ）前記対象の前記試料中のＲＩＳＣ、前駆体ｍｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ（複数可）、又はｍｉＲＮＡプロセシング活性のレベルを、前記参照試料中のｍｉＲＮＡ（複数可）、前駆体ｍｉＲＮＡ、ＲＩＳＣ又はｍｉＲＮＡプロセシング活性のレベルに比較することにより、前記対象を癌バイオマーカを有する又は有さないと同定すること、
をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
ＲＩＳＣタンパク質レベルを測定することが、ウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡ、又は抗体アレイへの結合を実施することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
ｍｉＲＮＡレベルを測定することが、プロセシングされたｍｉＲＮＡレベルを測定することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
ｍｉＲＮＡレベルを測定することが、ＲＴ－ＰＣＲ、ノーザンブロット又はアレイハイブリダイゼーションを実施することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
前記対象が癌バイオマーカを有するか、又は有さないかを報告することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２０】
報告することが、記載された報告書又は電子的報告書を用意すること含む、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記報告書を患者、医者、病院、又は保険会社に提出することをさらに含む、請求項１９に記載の方法。
【請求項２２】
対象の処置方法であって、
請求項１に記載の癌バイオマーカを有すると同定された対象を選択すること；及び
前記対象に抗癌治療を施すこと、
を含む、前記方法。
【請求項２３】
前記抗癌治療が、化学療法、放射線治療、ホルモン療法、標的治療、免疫療法、又は外科的治療である、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記抗癌治療が、脳をターゲットとする、請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
対象の処置方法であって、
（ａ）前記対象から得た試料のエクソソーム画分中の、（ｉ）表５に示されたｍｉＲＮＡから選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）；（ｉｉ）前駆体ｍｉＲＮＡレベル；（ｉｉｉ）ＲＩＳＣタンパク質；又は（ｉｖ）ｍｉＲＮＡプロセシング活性、のレベルを得ること；
（ｂ）前記ｍＲＮＡ（複数可）、前駆体ｍｉＲＮＡ、ＲＩＳＣタンパク質又はｍｉＲＮＡプロセシング活性のレベルに基づき、癌バイオマーカを有する対象を選択すること；及

び
（ｃ）前記選択された対象を抗癌治療で処置すること、
を含む、前記方法。
【請求項２６】
前記抗癌治療が、化学療法、放射線治療、ホルモン療法、標的治療、免疫療法、又は外科的治療である、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
診断手順のための対象の選択方法であって、
（ａ）前記対象から得た試料のエクソソーム画分中の、（ｉ）表５に示されたｍｉＲＮＡから選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）；（ｉｉ）前駆体ｍｉＲＮＡ；（ｉｉｉ）ＲＩＳＣタンパク質、又は（ｉｖ）ｍｉＲＮＡプロセシング活性、のレベルを得ること；
（ｂ）前記ｍＲＮＡ（複数可）、前駆体ｍｉＲＮＡ、ＲＩＳＣタンパク質又はｍｉＲＮＡプロセシング活性のレベルに基づき、癌バイオマーカを有する対象を選択すること；及び
（ｃ）前記対象において前記選択された通り、診断手順を実施すること、
を含む、前記方法。
【請求項２８】
前記診断手順が、診断画像を含む、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記画像が、Ｘ線、ＣＴ、ＭＲＩ又はＰＥＴ画像である、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
コンピュータ可読コードを含む有体のコンピュータ可読媒体であって、コンピュータに実行させる際に、
ａ）対象から得た試料のエクソソーム画分中の、（ｉ）表５に示されたｍｉＲＮＡから選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）；（ｉｉ）前駆体ｍｉＲＮＡ；（ｉｉｉ）ＲＩＳＣタンパク質；又は（ｉｖ）ｍｉＲＮＡプロセシング活性、のレベルに対応する情報を受け取ること、及び；
ｂ）前記ｍｉＲＮＡ又はＲＩＳＣタンパク質の１つ以上の、参照レベルに比較した相対的レベルを決定すること、
を含む操作を前記コンピュータに実施させ、参照レベルに比較したレベルの変化により前記対象が癌バイオマーカを有することが示される、
前記有体のコンピュータ可読媒体。
【請求項３１】
癌を有さない対象のエクソソーム画分中の、（ｉ）表５に示されたｍｉＲＮＡから選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）；（ｉｉ）前駆体ｍｉＲＮＡ；（ｉｉｉ）ＲＩＳＣタンパク質、又は（ｉｖ）ｍｉＲＮＡプロセシング活性、の参照レベルに対応する情報を受け取ることをさらに含む、請求項３０に記載の有体のコンピュータ可読媒体。
【請求項３２】
前記参照レベルが保存される、請求項３０に記載の有体のコンピュータ可読媒体。
【請求項３３】
前記情報を受け取ることが、対象から得た試料中の、ｍｉＲＮＡ、前駆体ｍｉＲＮＡ、ＲＩＳＣタンパク質又はｍｉＲＮＡプロセシング活性のレベルに対応する情報を、有体のデータ保存デバイスから受け取ることを含む、請求項３０に記載の有体のコンピュータ可読媒体。
【請求項３４】
コンピュータに実行させる際に、ｍｉＲＮＡ、前駆体ｍｉＲＮＡ、ＲＩＳＣタンパク質又はｍｉＲＮＡプロセシング活性の相対レベルに対応する情報を、有体のデータ保存デバイスに送信すること、を含む１つ以上のさらなる操作を前記コンピュータに実施させる、コンピュータ可読コードをさらに含む、請求項３０に記載の有体のコンピュータ可読媒体

。
【請求項３５】
前記情報を受け取ることが、対象から得た試料中の、前記ｍｉＲＮＡの少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０のレベルに対応する情報を受け取ることをさらに含む、請求項３０に記載の有体のコンピュータ可読媒体。
【請求項３６】
前記コンピュータ可読コードが、コンピュータに実行させる際に、ｃ）前記患者の診断スコアを計算すること、をさらに含む操作を前記コンピュータに実施させ、前記診断スコアが、前記試料が癌を有する対象のものである可能性を示す、請求項３０に記載の有体のコンピュータ可読媒体。
【請求項３７】
対象における癌バイオマーカのインビトロ検出方法であって、
（ａ）前記対象から生物学的試料を得ること；
（ｂ）表５に示された前記ｍｉＲＮＡから選択される、前記試料中の１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）のレベルを測定すること；及び
（ｃ）前記ｍｉＲＮＡ（複数可）の前記測定レベルに基づき、癌バイオマーカを有する、又は有さない前記対象を同定すること、を含む、前記方法。
【請求項３８】
前記試料が、本質的に細胞を含まない、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記試料が、体液のエクソソーム画分である、請求項３７に記載の方法。
【請求項４０】
前記試料が、リンパ、唾液、尿又は血漿試料である、請求項３７に記載の方法。
【請求項４１】
細胞を、ＲＩＳＣタンパク質複合体と会合して提供される阻害性ＲＮＡと接触させることを含む、活性の阻害性ＲＮＡのインビトロ送達方法。
【請求項４２】
前記ＲＩＳＣタンパク質複合体が、ＴＲＢＰ、ダイサー及びＡＧＯ２を含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記阻害性ＲＮＡが、ｓｉＲＮＡ又はｓｈＲＮＡである、請求項４１に記載の方法。
【請求項４４】
前記阻害性ＲＮＡが、ヒトｍｉＲＮＡである、請求項４１に記載の方法。
【請求項４５】
前記阻害性ＲＮＡ及びＲＩＳＣタンパク質複合体が、脂質二重層を含むリポソーム、ナノ粒子又はマイクロカプセル中に含まれる、請求項４１に記載の方法。
【請求項４６】
前記マイクロカプセルが、エクソソームである、請求項４６に記載の方法。
【請求項４７】
細胞を接触させることが、細胞を、前記阻害性ＲＮＡ及びＲＩＳＣタンパク質複合体でトランスフェクトすることを含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項４８】
前記阻害性ＲＮＡ及びＲＩＳＣタンパク質複合体を対象に投与することをさらに含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項４９】
ＲＩＳＣタンパク質複合体と会合した組換え又は合成阻害性ＲＮＡを含む組成物であって、前記複合体が、リポソーム、ナノ粒子又はマイクロカプセル中に含まれる、前記組成物。
【請求項５０】
前記ＲＩＳＣタンパク質複合体が、ＴＲＢＰ、ダイサー及びＡＧＯ２を含む、請求項４

９に記載の組成物。
【請求項５１】
前記阻害性ＲＮＡが、ｓｉＲＮＡ又はｓｈＲＮＡである、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５２】
前記阻害性ＲＮＡが、ヒトｍｉＲＮＡである、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５３】
前記複合体が、合成リポソーム、ナノ粒子又はマイクロカプセル中に含まれる、請求項４９に記載の組成物。
【請求項５４】
前記マイクロカプセルが、エクソソームである、請求項４９に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、内容全体が参照により本明細書に取り込まれる、２０１３年3月１５日出願の米国特許仮出願第６１／７９１，３０１号の優先権の利益を主張するものである。
【０００２】
本発明は、米国国立衛生研究所により授与された助成金番号ＥＢ００３４７２、ＥＢ００６４６２、ＣＡ１３５４４４、ＣＡ１２５５５０、ＣＡ１５５３７０、ＣＡ１５１９２５、ＤＫ０８１５７６、及びＤＫ０５５００１、並びに米国国立科学財団により授与された助成金番号ＥＦＲＩ－１２４０４１０、ＣＢＥＴ－０９２２８７６、及びＣＢＥＴ－１１４４０２５に下に、米国政府の援助を受けてなされた。米国政府は、本発明において特定の権利を有する。
【０００３】
本発明は、一般に、分子生物学、腫瘍学及び医薬品の分野に関する。より詳細には本発明は、特有のエクソソーム量による癌の検出方法及び阻害性ＲＮＡ療法を向上させる方法に関係する。
【背景技術】
【０００４】
全ての細胞は、増殖因子、サイトカイン、ホルモン、ケモカイン、膜結合タンパク質及び脂質などの多くの異なる経路により周囲環境とコミュニケートしている。エクソソームは、そのようなコミュニケーションを媒介することが可能であり、長い距離にわたりこれを実行する（Ｍａｔｈｉｖａｎａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１０；Ｋａｈｌｅｒｔ ａｎｄ Ｋａｌｌｕｒｉ，２０１３）。エクソソームを介したコミュニケーションは、増殖因子／サイトカイン／ケモカイン／ホルモンの安定性及び拡散に関連する限界を克服する可能性がある（Ｍａｔｈｉｖａｎａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１０）。エクソソームは、３０～１４０ｎｍサイズのナノ小胞体であり、脂質二重層により保護されたタンパク質、ｍＲＮＡ及びマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）を含む（Ｃｏｃｕｃｃｉ ｅｔ ａｌ．，２００９；Ｓｉｍｏｎｓ ａｎｄ Ｒａｐｏｓｏ，２００９；Ｓｉｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００８；Ｔｈｅｒｙ ｅｔ ａｌ．，２００２）。近年行われた複数の研究により、エクソソームが癌細胞、幹細胞、免疫細胞及び神経細胞をはじめとする複数の細胞型により分泌されることが実証された（Ｓｉｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００８；Ｔｈｅｒｙ，２００１）。癌細胞が、正常細胞よりも多くのエクソソームを分泌することも、認められている（Ｔａｙｌｏｒ ａｎｄ Ｇｅｒｃｅｌ－Ｔａｙｌｏｒ，２０１１）。さらにエクソソームは、正常な対象に比較して癌患者の循環において増加するが（Ｌｏｇｏｚｚｉ ｅｔ ａｌ．，２００９；Ｔａｙｌｏｒ ａｎｄ Ｇｅｒｃｅｌ－Ｔａｙｌｏｒ，２００８）、機能的役割は依然として不明である。エクソソームが癌の進行及び転移において重要な役割を担う可能性が、近年のエビデンスから示唆される（Ｌｕｇａ ｅｔ ａｌ．，２０１２；Ｐｅｉｎａｄｏ ｅｔ ａｌ．，２０１２；Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１１）。
【０００５】

エクソソームが細胞間のＲＮＡ及びｍｉＲＮＡの輸送を媒介するという着想は、体内での細胞間コミュニケーションの複雑さをさらに増大させた。ＲＮＡｉは、遺伝子の発現及び活性の制御に参画する生存細胞内の自然な生物学的プロセスである。細胞外ｍｉＲＮＡは、最初、エクソソームの内部だけに含まれると考えられていた（Ｖａｌａｄｉ ｅｔ ａｌ．，２００７）。それ以後、複数の報告で、アポトーシス小体（Ｚｅｒｎｅｃｋｅ ｅｔ ａｌ．，２００９）、高比重及び低比重リポタンパク質（Ｖｉｃｋｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，２０１１）（ＨＤＬ／ＬＤＬ）、マイクロ小胞体と称されるＡＧＯ２に関連する大きな細胞外小胞体（Ａｒｒｏｙｏ ｅｔ ａｌ．，２０１１；Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，２０１２；Ｔｕｒｃｈｉｎｏｖｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，２０１１）におけるｍｉＲＮＡの存在が確認された。しかし近年の報告から、ヒト血清及び唾液中で検出された大部分のｍｉＲＮＡが、主にエクソソーム中に豊富であることが示唆されている（Ｇａｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，２０１２）。エクソソーム中のｍｉＲＮＡの存在は、細胞の遺伝子発現を離れた部位で調節する可能性を示している（Ｇｕｅｓｃｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，２０１０；Ｖａｌａｄｉ ｅｔ ａｌ．，２００７；Ｍｉｔｔｅｌｂｒｕｎ ｅｔ ａｌ．，２０１１；ｖａｎ Ｂａｌｋｏｍ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。ｍｉＲＮＡは、ｍＲＮＡ翻訳の調節を介して、遺伝子の全組み合わせの発現を調和させ、生物体のトランスクリプトームを形成する（Ｂａｒｔｅｌ，２００９）。

【０００６】

ｍｉＲＮＡは、多くの異なる細胞型に由来するエクソソーム中に豊富に存在する（Ｖａｌａｄｉ ｅｔ ａｌ．，２００７）。それらは、遺伝子発現を転写後に制御する、１８～２４ヌクレオチド（ｎｔ）長の低分子非コード化ＲＮＡである。それらは、ドローシャ及びダイサーエンドヌクレアーゼの連続作用により合成され、ｍＲＮＡをターゲットとするＲＩＳＣ（ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体）に取り込まれる（Ｂａｒｔｅｌ，２００９；Ｍａｎｉａｔａｋｉ ａｎｄ Ｍｏｕｒｅｌａｔｏｓ，２００５）。ダイサーノックアウトマウスにおいては、ｍｉＲＮＡ生合成が不能であり、胚幹細胞増殖及び分化の欠損により死に至る（Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，２００３；Ｆｕｋａｇａｗａ ｅｔ ａｌ．，２００４）。

【０００７】

マイクロＲＮＡは、配列特異的相互作用及びｍｉＲＮＡが会合したＲＩＳＣ（ダイサー、ＴＲＢＰ及びＡＧＯ２タンパク質で構成）とターゲットｍＲＮＡとの対合により機能する（Ｂａｒｔｅｌ，２００９）。この作用は、結果として翻訳を阻害し、そして／又はｍＲＮＡ不安定化を誘起する（Ｆｉｌｉｐｏｗｉｃｚ，２００５）。ｍｉＲＮＡ及びそのｍＲＮＡターゲットの相補性の度合いが、ｍＲＮＡ不安定化／分解又は翻訳阻害のいずれかを介して、ｍＲＮＡサイレンシングの工程を決定づける（Ａｍｂｒｏｓ，２００４；Ｂａｒｔｅｌ，２００９）。完全な相補性が、ｍｉＲＮＡとターゲットｍＲＮＡ配列の間に成立すれば、ＲＩＳＣ複合体は、分離のために結合されたｍＲＮＡを切断するように作用する（Ａｍｂｒｏｓ，２００４；Ｂａｒｔｅｌ，２００９）。絶対的な相補性が成立しなければ、動物細胞内のｍｉＲＮＡのほとんどの例と同様に、翻訳が阻害されて、遺伝子サイレンシングに至る（Ａｍｂｒｏｓ，２００４；Ｂａｒｔｅｌ，２００９）。

【０００８】

ｍｉＲＮＡが機能的で、効率的ｍｉＲＮＡ媒介遺伝子サイレンシングを実現するためには、ｍｉＲＮＡが、ＲＬＣ（ＲＩＳＣローディングコンプレックス）タンパク質であるダイサー、ＴＲＢＰ及びＡＧＯ２と共に複合体化しなければならない。ＲＬＣのうち、ダイサー及びＴＲＢＰは、エクスポーティン－５を介して核から出現した後に前駆体ｍｉＲＮＡをプロセシングしてｍｉＲＮＡを生成し、ＡＧＯ２と会合する必要がある。成熟ｍｉＲＮＡと結合したＡＧＯ２は、最小のＲＩＳＣを構成し、続いてダイサー及びＴＲＢＰから解離され得る（Ｃｈｅｎｄｒｉｍａｄａ ｅｔ ａｌ．，２００５；Ｇｒｅｇｏｒｙ ｅｔ ａｌ．，２００５；Ｈａａｓｅ ｅｔ ａｌ．，２００５；ＭａｃＲａｅ ｅｔ ａｌ．，２００８；Ｍａｎｉａｔａｋｉ ａｎｄ Ｍｏｕｒｅｌａｔｏｓ

，２００５；Ｍｅｌｏ ｅｔ ａｌ．，２００９）。一本鎖ｍｉＲＮＡが単独でＲＩＳＣに組み込まれることは非常に少なく、それゆえ転写後調節のためにターゲットｍＲＮＡに効率的に誘導することはできない（Ｔａｎｇ，２００５；Ｔｈｏｍｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。

【０００９】

合成ｓｉＲＮＡ（二本鎖）は、ターゲットｍＲＮＡとの完璧な塩基対合を通してｍＲＮＡ崩壊を誘起する（Ａｍｂｒｏｓ，２００４；Ｂａｒｔｅｌ，２００９）。そのようなｓｉＲＮＡは、ＲＩＳＣタンパク質であるダイサー、ＴＲＢＰ及びＡＧＯ２に直接取り込まれる（Ｔａｎｇ，２００５）。一本鎖ｍｉＲＮＡは、ＲＩＳＣに組み込むことができず、それゆえ翻訳阻害又は分解のためにターゲットｍＲＮＡに誘導することができない（Ｔａｎｇ，２００５）。

幾つかの報告により、エクソソーム中に含まれるｍｉＲＮＡが標的細胞内での遺伝子発現に影響を及ぼし得ることが示唆されたが（Ｉｓｍａｉｌ ｅｔ ａｌ．，２０１３；Ｋｏｇｕｒｅ ｅｔ ａｌ．，２０１１；Ｋｏｓａｋａ ｅｔ ａｌ．，２０１３；Ｎａｒａｙａｎａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３；Ｐｅｇｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，２０１０；Ｖａｌａｄｉ ｅｔ ａｌ．，２００７；Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１０）、これらのｍｉＲＮＡが適切なｍＲＮＡ認識及び効率的翻訳停止のためにｐｒｅ－ｍｉＲＮＡとしてＲＩＳＣに組み込まれない場合、ｍＲＮＡをサイレンシングする際にこれらｍｉＲＮＡがどれほど効率的であるか、という疑問が依然として残る。成熟ｍｉＲＮＡ（一本鎖）は、標的細胞のＲＩＳＣと会合できないが、エクソソームのｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、標的細胞のＲＩＳＣタンパク質を組み入れることにより遺伝子サイレンシングをある程度は誘導し得る。それにもかかわらず、そのようなプロセスは、標的細胞のｍｉＲＮＡバイオジェネシス経路に関与するタンパク質の潜在的飽和状態により、非常に非効率的で緩やかである。近年の報告から、ＨＩＶ－１感染細胞の細胞培養上清及びＨＩＶ患者の血清のエクソソーム中のドローシャ及びダイサーの存在が示された（Ｎａｒａｙａｎａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。加えて、別の研究で、後期エンドソーム／ＭＶＢ（多小胞体）内のダイサー、ＴＲＢＰ及びＡＧＯ２の共画分（ｃｏ－ｆｒａｃｔｉｏｎａｔｉｏｎ）が示された（Ｓｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１０】

【非特許文献１】Ｍａｔｈｉｖａｎａｎ，Ｓ．，Ｊｉ，Ｈ．，ａｎｄ Ｓｉｍｐｓｏｎ，Ｒ．Ｊ．（２０１０）．Ｅｘｏｓｏｍｅｓ：ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｏｒｇａｎｅｌｌｅｓ ｉｍｐｏｒｔａｎｔ ｉｎ ｉｎｔｅｒｃｅｌｌｕｌａｒ ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ ７３，１９０７－１９２０．

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１１】

癌細胞により分泌されたエクソソームは、非癌性エクソソームと比較して独特であり、該癌性エクソソームは、ｍｉＲＮＡ及び活性ＲＮＡプロセシングＲＩＳＣ複合体の独特のレパートリーを含む。そのようなカプセル化されたＲＮＡ－ＲＩＳＣ複合体は、標的細胞において細胞非依存性のｍｉＲＮＡバイオジェネシス及び高効率のｍＲＮＡサイレンシングに利用される可能性もある。

【００１２】

一実施形態において、本開示は、対象における癌バイオマーカの検出方法であって、（ａ）該対象から生物学的試料を得ること；（ｂ）（ｉ）該試料のエクソソーム画分中の表５に示されたｍｉＲＮＡから選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）；（ｉｉ）前駆体ｍｉＲＮＡ；（ｉｉｉ）該試料のエクソソーム画分中のＲＩＳＣタンパク質、又は（ｉｖ）該試料のエクソソーム画分中のｍｉＲＮＡプロセシング活性（例えば、一次ｍｉＲＮ

Ａ及び／又は前駆体ｍｉＲＮＡプロセシング活性）、のいずれかのレベルを測定すること；並びに（ｃ）前記ｍｉＲＮＡ（複数可）、前駆体ｍｉＲＮＡ、ＲＩＳＣタンパク質又はｍｉＲＮＡプロセシング活性の測定レベルに基づき、癌バイオマーカを有する又は有さない対象を同定すること、を含む該方法を提供する。幾つかの態様において、該方法は、前記ｍｉＲＮＡの少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０のレベルを測定することを含む。さらなる態様において、該方法は、ＡＧＯ２、ＴＲＢＰ、又はダイサータンパク質のレベルを測定することを含む。

【００１３】

幾つかの態様において、該生物学的試料は、本質的に細胞を含まない。例えば該試料は、１０未満、９未満、８未満、７未満、６未満、５未満、４未満、３未満、２未満、又は１未満の細胞（複数可）を有し得る。一態様において、該生物学的試料は、細胞を含まない。特定の態様において、該生物学的試料は、リンパ、唾液、尿又は血液（例えば、血漿）試料であってもよい。さらなる態様において、該方法は、試料のエクソソーム画分を精製すること、及び／又は試料のエクソソーム画分の生成を増加させること、をさらに含む。

【００１４】

特定の態様において、該癌は、乳癌、肺癌、頭頸部癌、前立腺癌、食道癌、気管癌、脳癌、肝臓癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、精巣癌、結腸癌、直腸癌又は皮膚癌である。特定の態様において、該癌は、乳癌である。一態様において、該対象は、過去に癌を処置されているか、又は過去に腫瘍を外科的に摘出されている。

【００１５】

幾つかの態様において、対象を癌バイオマーカを有する、又は有さないと同定することは、測定されたｍｉＲＮＡレベル（複数可）、前駆体ｍｉＲＮＡレベル、ＲＩＳＣレベル、又はｍｉＲＮＡプロセシング活性を、癌のリスクと相関させることをさらに含む。さらなる態様において、対象を癌バイオマーカを有する、又は有さないと同定することは、アルゴリズムを用いた、測定されたｍｉＲＮＡレベル（複数可）、前駆体ｍｉＲＮＡレベル、ＲＩＳＣレベル、又はｍｉＲＮＡプロセシング活性の解析をさらに含む。幾つかの例において、分析は、コンピュータにより実施され得る。

【００１６】

特定の態様において、該実施形態の方法は、（ｉ）該試料及び参照試料のエクソソーム画分中の表５に示されたｍｉＲＮＡから選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）；（ｉｉ）前駆体ｍｉＲＮＡ；（ｉｉｉ）該試料及び参照試料のエクソソーム画分中のＲＩＳＣタンパク質、又は（ｉｖ）該試料及び参照試料のエクソソーム画分中のｍｉＲＮＡプロセシング活性、のいずれかのレベルを測定すること、並びに（ｃ）該対象の試料中の前記ｍｉＲＮＡ（複数可）、前駆体ｍｉＲＮＡ、ＲＩＳＣ又はｍｉＲＮＡプロセシング活性のレベルを、参照試料中のｍｉＲＮＡ（複数可）、前駆体ｍｉＲＮＡ、ＲＩＳＣ、ｍｉＲＮＡプロセシング活性のレベルに比較することにより、該対象を癌バイオマーカを有する又は有さないと同定すること、をさらに含む。

【００１７】

幾つかの態様において、ＲＩＳＣタンパク質レベルを測定することは、ウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡ、又は抗体アレイへの結合を実施することを含む。別の態様において、ｍｉＲＮＡレベルを測定することは、プロセシングされたｍｉＲＮＡレベルを測定することを含む。幾つかの例において、ｍｉＲＮＡレベルを測定することは、ＲＴ－ＰＣＲ、ノーザンブロット又はアレイハイブリダイゼーションを実施することを含む。

【００１８】

幾つかの態様において、該方法は、対象が癌バイオマーカを有するか、又は有さないかを報告することをさらに含む。報告することは、記載された報告書、口頭での報告、又は電子的報告書を用意することを含み得る。例えば該報告書は、患者、医者、病院、又は保険会社に提出され得る。

【００１９】

さらなる実施形態において、本開示は、対象の処置方法であって、該実施形態により癌バイオマーカを有すると同定された対象を選択すること、及び該対象に抗癌治療を施すこと、を含む、該方法を提供する。例えば該方法は、（ａ）該対象から得た試料のエクソソーム画分中の、（ｉ）表５に示されたｍｉＲＮＡから選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）；（ｉｉ）前駆体ｍｉＲＮＡ；（ｉｉ）ＲＩＳＣタンパク質、又は（ｉｉｉ）ｍｉＲＮＡプロセシング活性、のいずれかのレベルを得ること；（ｂ）前記ｍｉＲＮＡ（複数可）、前駆体ｍｉＲＮＡ、ＲＩＳＣタンパク質又はｍｉＲＮＡプロセシング活性のレベルに基づき、癌バイオマーカを有する対象を選択すること；及び（ｃ）該選択された対象を抗癌治療で処置すること、を含み得る。特定の態様において、該抗癌治療は、化学療法、放射線治療、ホルモン療法、標的治療、免疫療法、又は外科的治療である。

【００２０】

さらなる実施形態において、本開示は、診断手順のための対象の選択方法であって、（ａ）該対象から得た試料のエクソソーム画分中の、（ｉ）表５に示されたｍｉＲＮＡから選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）；（ｉｉ）前駆体ｍｉＲＮＡレベル；（ｉｉｉ）ＲＩＳＣタンパク質、又は（ｉｖ）ｍｉＲＮＡプロセシング活性、のいずれかのレベルを得ること；（ｂ）前記ｍＲＮＡ（複数可）、ＲＩＳＣタンパク質又はｍｉＲＮＡプロセシング活性のレベルに基づき、癌バイオマーカを有する対象を選択すること；及び（ｃ）該対象において診断手順を実施すること、を含む、該方法を提供する。一態様において、該診断手順は、診断画像を含む。該画像は、生検、Ｘ線、ＣＴ、ＭＲＩ又はＰＥＴ画像であってもよい。

【００２１】

さらなる実施形態において、本開示は、コンピュータ可読コードを含む有体のコンピュータ可読媒体であって、該コンピュータに実行させる際に、（ａ）対象から得た試料のエクソソーム画分中の、（ｉ）表５に示されたｍｉＲＮＡから選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）；（ｉｉ）前駆体ｍｉＲＮＡ；（ｉｉｉ）ＲＩＳＣタンパク質、又は（ｉｖ）ｍｉＲＮＡプロセシング活性、のいずれかのレベルに対応する情報を受け取ること、及び；（ｂ）前記ｍｉＲＮＡ、前駆体ｍｉＲＮＡ、ＲＩＳＣタンパク質又はｍｉＲＮＡプロセシング活性の１つ以上の、参照レベルに比較した相対的レベルを決定すること、を含む操作をコンピュータに実施させ、参照レベルに比較したレベルの変化により該対象が癌バイオマーカを有することが示される、該有体のコンピュータ可読媒体を提供する。

【００２２】

特定の態様において、該有体のコンピュータ可読媒体の操作は、癌を有さない対象のエクソソーム画分中の、（ｉ）表５に示されたｍｉＲＮＡから選択される１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）；（ｉｉ）前駆体ｍｉＲＮＡ；（ｉｉｉ）ＲＩＳＣタンパク質、又は（ｉｖ）ｍｉＲＮＡプロセシング活性、の参照レベルに対応する情報を受け取ることをさらに含む。

【００２３】

特定の態様において、該有体のコンピュータ可読媒体は、コンピュータに実行させる際に、ｍｉＲＮＡ、前駆体ｍｉＲＮＡ、ＲＩＳＣタンパク質又はｍｉＲＮＡプロセシング活性の相対レベルに対応する情報を、有体のデータ保存デバイスに送信すること、を含む１つ以上のさらなる操作をコンピュータに実施させる、コンピュータ可読コードをさらに含む。

【００２４】

さらなる態様において、該参照レベルは、前記有体のコンピュータ可読媒体に保存される。一態様において、情報を受け取ることは、該対象から得た試料中の、ｍｉＲＮＡのレベル、前駆体ｍｉＲＮＡレベル、ＲＩＳＣタンパク質又はｍｉＲＮＡプロセシング活性に対応する情報を、有体のデータ保存デバイスから受け取ることを含む。幾つかの態様において、情報を受け取ることは、対象から得た試料中の、前記ｍｉＲＮＡの少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０のレベルに対応する情報を受け取ることをさらに含む。

【００２５】
幾つかの態様において、該コンピュータ可読コードは、コンピュータに実行させる際に、（ｃ）該患者の診断スコアを計算すること、をさらに含む操作をコンピュータに実施させ、該診断スコアは、該試料が癌を有する対象のものである可能性を示す。
【００２６】
さらなる実施形態において、本開示は、対象における癌バイオマーカの検出方法であって、（ａ）該対象から生物学的試料を得ること；（ｂ）表５に示されたｍｉＲＮＡ又はその前駆体ｍｉＲＮＡから選択される、試料中の１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）のレベルを測定すること；及び（ｃ）前記ｍｉＲＮＡ（複数可）の測定レベルに基づき、癌バイオマーカを有する、又は有さない対象を同定すること、を含む、該方法を提供する。一態様において、該生物学的試料は、本質的に細胞を含まない。特定の態様において、該生物学的試料は、リンパ、唾液、尿又は血漿試料であってもよい。一態様において、該方法は、体液のエクソソーム画分を精製することをさらに含み得る。
【００２７】
さらなる実施形態において、本開示は、細胞を、ＲＩＳＣタンパク質複合体と会合して提供される阻害性ＲＮＡと接触させることを含む、活性の阻害性ＲＮＡの送達方法を提供する。一態様において、該ＲＩＳＣタンパク質複合体は、ＴＲＢＰ、ダイサー及びＡＧＯ２を含む。幾つかの態様において、該阻害性ＲＮＡは、ｓｉＲＮＡ又はｓｈＲＮＡである。一態様において、該阻害性ＲＮＡは、ヒトｍｉＲＮＡである。
【００２８】
特定の態様において、該阻害性ＲＮＡ及びＲＩＳＣタンパク質複合体は、脂質二重層を含むリポソーム、ナノ粒子又はマイクロカプセル中に含まれる。一態様において、該マイクロカプセルは、エクソソームである。
【００２９】
幾つかの態様において、該方法は、細胞を、阻害性ＲＮＡ及びＲＩＳＣタンパク質複合体でトランスフェクトすることをさらに含む。別の態様において、該方法は、阻害性ＲＮＡ及びＲＩＳＣタンパク質複合体を対象に投与することをさらに含む。
【００３０】
さらなる実施形態において、本開示は、ＲＩＳＣタンパク質複合体と会合した組換え又は合成阻害性ＲＮＡを含む組成物であって、前記複合体が、リポソーム、ナノ粒子又はマイクロカプセル中に含まれる、該組成物を提供する。一態様において、ＲＩＳＣタンパク質複合体は、ＴＲＢＰ、ダイサー及びＡＧＯ２を含む。幾つかの態様において、該阻害性ＲＮＡは、ｓｉＲＮＡ又はｓｈＲＮＡである。幾つかの態様において、該阻害性ＲＮＡは、ヒトｍｉＲＮＡである。特定の態様において、該複合体は、合成リポソーム、ナノ粒子又はマイクロカプセル中に含まれる。一態様において、該マイクロカプセルは、エクソソームである。
【００３１】
先に詳述された実施形態の特定の態様は、表５に示されたものから選択される、試料のエクソソーム画分中の１つ以上のｍｉＲＮＡ（複数可）（又はｍｉＲＮＡ前駆体）のレベルを測定することに関する。例えば方法は、ｍｍｕ－ｍｉＲ－７０９、ｈｓａ－ｍｉＲ－１３０８、ｍｍｕ－ｍｉＲ－６１５－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６０ｂ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１９３７ａ、ｍｍｕ－ｍｉｒ－３２１－Ａ、ｈｓａ－ｍｉＲ－６１５－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１９７９、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１９３７ｂ、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７３、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１９３７ｃ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２７３ｄ－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－７２０、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１２７４ａ、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６５－Ａ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１９３１、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２４６、ｈｓａ－ｍｉｒ－５９４－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２１－Ａ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－２１４５－１－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉｒ－６３９－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－７２０、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２８０、ｍｍｕ－ｍｉＲ－３４７３、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６０、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２８１、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１２２４－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－６９０、ｈｓａ－ｍｉＲ－３７５－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－４３０１、ｍｍｕ－ｍｉＲ－７００

、mmu－miR－125b－5p、mmu－miR－1191－P、hsa－miR－1274a、hsa－miR－3197、mmu－miR－1935、hsa－miR－1975－P、hsa－miR－4324、hsa－miR－886－3p、hsa－miR－1274b、mmu－miR－1957、hsa－miR－933、hsa－mir－675、hsa－miR－595、mmu－miR－2137、hsa－mir－572－P、mmu－miR－1195、hsa－miR－4294－P、mmu－mir－1899－P、mmu－miR－689－P、hsa－miR－199b－3p、hsa－miR－3117－P、mmu－mir－321－P、mmu－miR－1961－P、hsa－mir－10a、mmu－miR－669d－P、mmu－miR－1937b－2－P、hsa－miR－3125－P、mmu－miR－1934－P、hsa－miR－574－3p、hsa－miR－718、mmu－miR－1198、mmu－miR－2182－P、hsa－miR－1273、mmu－miR－2133－P、hsa－miR－92b*、hsa－miR－1290、hsa－miR－448、mmu－miR－689、mmu－miR－449a、mmu－miR－1937b－4－P、hsa－miR－4286、mmu－miR－1947、mmu－miR－342－3p、hsa－miR－1303－P、mmu－miR－2132、hsa－miR－4321－P、hsa－miR－4256－P、hsa－miR－4311、mmu－miR－130a、mmu－miR－1939、hsa－miR－1268－P、mmu－miR－31、mmu－miR－99b、mmu－miR－2141、hsa－miR－1202－P、mmu－miR－466b－3p、mmu－miR－2133、hsa－miR－1268、hsa－miR－466、mmu－miR－494、hsa－miR－1289、hsa－miR－320b、hsa－miR－4254、hsa－mir－7－3－P、hsa－miR－923、hsa－miR－764、mmu－miR－291a－3p、mmu－miR－883b－3p、hsa－mir－594－A、mmu－miR－1948－P、hsa－miR－206、hsa－mir－565－P、mmu－miR－467e*、hsa－miR－1826、mmu－miR－467a*、mmu－miR－1983、hsa－miR－324－5p、mmu－let－7c、mmu－miR－1965、hsa－mir－632－P、hsa－miR－181a*MM2GT／AC、hsa－miR－1265、hsa－miR－323b－5p、hsa－mir－1914、hsa－mir－1910、hsa－miR－21、hsa－miR－431*、hsa－miR－3135－P、mmu－miR－187－P、mmu－miR－126－3p、mmu－miR－669a－P、hsa－miR－367、mmu－mir－320－P、hsa－miR－181a*MM1G／C、mmu－miR－484－P、mmu－miR－467c－P、hsa－miR－3154、mmu－miR－466d－3p、hsa－miR－3162－P、mmu－miR－201、mmu－miR－1946a、hsa－miR－937、hsa－miR－3147、hsa－mir－596－P、hsa－miR－3148、hsa－miR－1304、hsa－miR－222MM2GG／AC、mmu－miR－125a－5p、hsa－miR－1272－P、hsa－miR－638、hsa－mir－320、hsa－miR－545*、hsa－mir－1908－P、hsa－let－7d－v2－P、mmu－mir－30d－P、hsa－miR－4297、mmu－miR－182、hsa－miR－3166－P、hsa－miR－494、mmu－miR－669o－P、hsa－miR－566、mmu－miR－1188、mmu－miR－2134－AP、hsa－miR－4259－P、mmu－miR－152、mmu－miR－2134、hsa－miR－3193－AP、hsa－miR－125b、hsa－miR－3124－P、hsa－miR－10b、hsa－miR－455－5p、mmu－miR－144、hsa－miR－130a、hsa－miR－1285、hsa－miR－516b*、hsa－miR－27a、hsa－miR－138－1*、mmu－miR－471、hsa－miR－4298－P、hsa－miR－301b、hsa－mir－147－P、hsa－miR－362－5p、mmu－mir－471－P、mmu－miR－466a－3

ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－５６１、ｈｓａ－ｍｉＲ－４８６－５ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－２８６１、ｈｓａ－ｍｉＲ－５８７、ｍｍｕ－ｍｉＲ－３７５、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２９－２－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－２８６１－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４４＊、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２５５ａ－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９ａ－２－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－３４ｃ－５ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－４６６ｅ－３ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－７４３ｂ－５ｐ、ｍｍｕ－ｍｉｒ－３５０－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１８１ｄ、ｈｓａ－ｍｉＲ－３７６ａ＊、ｈｓａ－ｍｉＲ－１３０８－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－４６７ｇ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１９４６ａ－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４７－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－９２３－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－４６５ｃ－５ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－８９１ａ、ｈｓａ－ｍｉＲ－２８－５ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－４２９２、ｍｍｕ－ｍｉＲ－６７７－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－４２５７、ｈｓａ－ｍｉＲ－４３２６、ｈｓａ－ｍｉＲ－１７＊ＭＭ２ＧＧ／ＡＡ、ｈｓａ－ｍｉＲ－９３９－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－２１８２、ｈｓａ－ｍｉＲ－２２０ｃ－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－３１３２－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－５３２－５ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１９４７－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－２９ａ、ｈｓａ－ｍｉＲ－３１６２、ｈｓａ－ｍｉＲ－３７５ＭＭ１Ｃ／Ｇ、ｈｓａ－ｍｉＲ－７６８－３ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１８２－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－２０５－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－５０５、ｈｓａ－ｍｉＲ－３１４６－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－７２１、ｍｍｕ－ｍｉＲ－３７６ｃ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１１７９－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１９７０、ｈｓａ－ｍｉＲ－３１３３－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－２００ｃ、ｈｓａ－ｍｉＲ－２２０ａ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１００、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２５５ｂ、ｈｓａ－ｍｉＲ－２２２ＭＭ１Ｇ／Ａ、ｈｓａ－ｍｉＲ－８８５－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－５１７ｂ、ｈｓａ－ｍｉＲ－２００ａ、ｈｓａ－ｍｉＲ－３１４１、ｍｍｕ－ｍｉＲ－６６９ｈ－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１３０１、ｈｓａ－ｍｉＲ－８７７、ｈｓａ－ｍｉｒ－９４１－２、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８７ｂ－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－４３０２、ｈｓａ－ｍｉＲ－９９ｂ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２５３、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ａ＊、ｈｓａ－ｍｉＲ－３４ａＭＭ２ＣＴ／ＴＣ、ｈｓａ－ｍｉＲ－３１８１－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－３２００、ｈｓａ－ｍｉＲ－３１２９－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－９３＊、ｈｓａ－ｍｉＲ－５４８ｑ－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－４６６ｇ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１５５、ｈｓａ－ｍｉＲ－２２７８－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－３０６５－５ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－６３３、ｈｓａ－ｍｉＲ－４２６５、ｍｍｕ－ｍｉＲ－２１３５－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１９０、ｍｍｕ－ｍｉＲ－６６９ｆ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１３２３、ｈｓａ－ｍｉＲ－５８８、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１８３＊、ｈｓａ－ｍｉｒ－９４１－４、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９１３、ｈｓａ－ｍｉＲ－２１１６＊、ｈｓａ－ｍｉＲ－１１７８、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１９６ａ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－５７４－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－３４６、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１１９９、ｍｍｕ－ｍｉＲ－６８１、ｈｓａ－ｍｉＲ－４２９２－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－５２２、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１１－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－３１７１、ｈｓａ－ｍｉＲ－６３５、ｈｓａ－ｍｉＲ－１１９７－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－６０４、ｍｍｕ－ｌｅｔ－７ａ＊、ｈｓａ－ｍｉＲ－３３５、ｍｍｕ－ｍｉＲ－４６６ｃ－３ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－４６６ｉ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２９７、ｍｍｕ－ｍｉＲ－３３８－５ｐ、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２６ａ－２－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１８１ａＭＭ２ＧＣ／ＡＧ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１８、ｈｓａ－ｍｉＲ－９２４－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１９０－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－３４５、ｍｍｕ－ｍｉＲ－７１１、ｈｓａ－ｍｉＲ－３１１６－２－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－９９ａ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－２６ａ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２４８－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－７２１－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－８０１－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１８２６－Ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２３６、ｈｓａ－ｍｉＲ－３３９－５ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－８０４、ｍｍｕ－ｍｉＲ－４６７ｄ＊、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１１９１、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４８ａ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４１、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１９３７ａ－Ｐ、ｍｍｕ－ｍｉＲ－６９６及びｈｓａ－ｍｉＲ－３０２ａ（即ち、表５に列挙されたもの）からなる群から選択される１つ以上のｍｉＲＮＡのレベルを測定することを含み得る。

【００３２】

本明細書本文で用いられる「ａ」又は「ａｎ」は、１つ以上を意味し得る。本明細書の請求項（複数可）で用いられる、言語「含んでいる」と共同で用いられる場合の「ａ」又

は「ａｎ」は、１つ、又は１つを超えることを意味し得る。
【００３３】
特許請求の範囲内の用語「又は」の使用は、代替物のみを指すこと、又はその代替物が互いに排他的であることが明確に示されていない限り、「及び／又は」を意味するために用いられているが、本開示は、代替物のみ、及び「及び／又は」を指す定義を支持する。本明細書で用いられる「別の」は、少なくとも１つの第二又はそれを超えるものを意味し得る。
【００３４】
本出願を通して、用語「約」は、値が、デバイスに関する固有の誤差変動、値を測定するために用いられる方法、又は被験対象の間に存在する変動を含むことを示すために用いられている。
【００３５】
本発明の他の目的、特色及び利点は、以下の詳細な説明から明白となろう。しかし、詳細な説明から本発明の主旨及び範囲内で様々な変動及び改良が当業者に明白となるため、詳細な説明及び具体的な実施例が、本発明の好ましい実施形態を示すが例示に過ぎないことは、理解されなければならない。
【００３６】
以下の図面は、本明細書の一部を形成しており、本発明の特定の態様をさらに示すために含まれる。特許又は出願ファイルは、色を付した図面を少なくとも１つ含む。カラー図面（複数可）を含むこの特許又は特許出願発行物のコピーは、必要な時に、必要な料金を支払えば、当局により提供されよう。本発明は、これらの１つ以上の図面を、本明細書に示された特定の実施形態の詳細な説明と併せて参照することで、より理解されるであろう。
【図面の簡単な説明】
【００３７】
【図１Ａ】エクソソームの特徴づけ　－　オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性ｍｉＲＮＡが豊富である。（Ａ）オンコソームの透過型電子顕微鏡写真（上左写真及び下左写真及び挿入ズーム写真；点線はズームエリアを示す）。下右画像は、抗ＣＤ９抗体及び透過型電子顕微鏡測定を利用した免疫金標識により作製した。金粒子を、黒色の点として示している。グラフは、１１２のＴＥＭ写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。（Ｂ）乳癌細胞から得たエクソソームの原子間力顕微鏡画像。中央のグラフは、カバースリップ内の粒子の分散をエクソソームのサイズ範囲と共に示している。右のグラフは、２６のＡＦＭ写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。（Ｃ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株（左のブロット、最初のパネル）；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１（中央のブロット、最初のパネル）；ヒト癌細胞株ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１（右のブロット、最初のパネル）から採取されたエクソソームにおいて抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；エクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｄ）エクソソームマーカである、０．４μｍビーズに結合したＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソームのＴＳＧ１０１、ＣＤ９、フロチリン－１、及びＣＤ６３抗体を用いたフローサイトメトリー分析。（Ｅ）光散乱分光法（ＬＳＳ）でのエクソソームのサイズ選別。該システムの較正は、２４ｎｍ及び１００ｎｍの公称直径を有するガラスマイクロスフェア、並びに１１９ｎｍ、１７５ｎｍ、３５６ｎｍ及び４５７ｎｍの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）懸濁液からのシグナルを利用して実施した。実験スペクトル及び得られたフィットを、１００ｎｍの名目直径を有するガラスマイクロスフェア及び３５６ｎｍの名目直径を有するポリスチ

レンマイクロスフェアに関して左のグラフに示している。右のグラフは、癌性エクソソームのＰＢＳ懸濁液のサイズ測定を表す。挿入図は、細胞及び細胞片による本発明者らのエクソソーム調製物の潜在的コンタミネーションを排除するために１０μｍまで拡大してた同グラフを示している。（Ｆ）ＮａｎｏＳｉｇｈｔを用いたエクソソームのサイズ分布。左のグラフは、溶液中の粒子のサイズ分布を表しており、平均サイズ１０５ｎｍを示し、より大きなサイズのピークが示されていない。右のグラフは、ＮａｎｏＳｉｇｈｔによる溶液中の粒子のサイズ及び濃度による分布を表す。図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３つの独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。

【図１Ｂ】エクソソームの特徴づけ　－　オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性ｍｉＲＮＡが豊富である。（Ａ）オンコソームの透過型電子顕微鏡写真（上左写真及び下左写真及び挿入ズーム写真；点線はズームエリアを示す）。下右画像は、抗ＣＤ９抗体及び透過型電子顕微鏡測定を利用した免疫金標識により作製した。金粒子を、黒色の点として示している。グラフは、１１２のＴＥＭ写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。（Ｂ）乳癌細胞から得たエクソソームの原子間力顕微鏡画像。中央のグラフは、カバースリップ内の粒子の分散をエクソソームのサイズ範囲と共に示している。右のグラフは、２６のＡＦＭ写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。（Ｃ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株（左のブロット、最初のパネル）；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１（中央のブロット、最初のパネル）；ヒト癌細胞株ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１（右のブロット、最初のパネル）から採取されたエクソソームにおいて抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；エクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｄ）エクソソームマーカである、０．４μｍビーズに結合したＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソームのＴＳＧ１０１、ＣＤ９、フロチリン－１、及びＣＤ６３抗体を用いたフローサイトメトリー分析。（Ｅ）光散乱分光法（ＬＳＳ）でのエクソソームのサイズ選別。該システムの較正は、２４ｎｍ及び１００ｎｍの公称直径を有するガラスマイクロスフェア、並びに１１９ｎｍ、１７５ｎｍ、３５６ｎｍ及び４５７ｎｍの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）懸濁液からのシグナルを利用して実施した。実験スペクトル及び得られたフィットを、１００ｎｍの名目直径を有するガラスマイクロスフェア及び３５６ｎｍの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアに関して左のグラフに示している。右のグラフは、癌性エクソソームのＰＢＳ懸濁液のサイズ測定を表す。挿入図は、細胞及び細胞片による本発明者らのエクソソーム調製物の潜在的コンタミネーションを排除するために１０μｍまで拡大してた同グラフを示している。（Ｆ）ＮａｎｏＳｉｇｈｔを用いたエクソソームのサイズ分布。左のグラフは、溶液中の粒子のサイズ分布を表しており、平均サイズ１０５ｎｍを示し、より大きなサイズのピークが示されていない。右のグラフは、ＮａｎｏＳｉｇｈｔによる溶液中の粒子のサイズ及び濃度による分布を表す。図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３つの独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。

【図１Ｃ】エクソソームの特徴づけ　－　オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性ｍｉＲＮＡが豊富である。（Ａ）オンコソームの透過型電子顕微鏡写真（上左写真及び下左写真及び挿入ズーム写真；点線はズームエリアを示す）。下右画像は、抗ＣＤ９抗体及び透過型電子顕微鏡測定を利用した免疫金標識により作製した。金粒子を、黒色の点として示している。グラフは、１１２のＴＥＭ写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。（Ｂ）乳癌細胞から得たエクソソームの原子間力顕微鏡画像。中央のグラフは、カバースリップ内の粒子の分散をエクソソームのサイズ範囲と共に示している。右のグラフは、２６のＡＦＭ写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。（Ｃ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株（左のブロッ

ト、最初のパネル）；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１（中央のブロット、最初のパネル）；ヒト癌細胞株ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１（右のブロット、最初のパネル）から採取されたエクソソームにおいて抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；エクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｄ）エクソソームマーカである、０．４μｍビーズに結合したＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソームのＴＳＧ１０１、ＣＤ９、フロチリン－１、及びＣＤ６３抗体を用いたフローサイトメトリー分析。（Ｅ）光散乱分光法（ＬＳＳ）でのエクソソームのサイズ選別。該システムの較正は、２４ｎｍ及び１００ｎｍの公称直径を有するガラスマイクロスフェア、並びに１１９ｎｍ、１７５ｎｍ、３５６ｎｍ及び４５７ｎｍの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）懸濁液からのシグナルを利用して実施した。実験スペクトル及び得られたフィットを、１００ｎｍの名目直径を有するガラスマイクロスフェア及び３５６ｎｍの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアに関して左のグラフに示している。右のグラフは、癌性エクソソームのＰＢＳ懸濁液のサイズ測定を表す。挿入図は、細胞及び細胞片による本発明者らのエクソソーム調製物の潜在的コンタミネーションを排除するために１０μｍまで拡大してた同グラフを示している。（Ｆ）ＮａｎｏＳｉｇｈｔを用いたエクソソームのサイズ分布。左のグラフは、溶液中の粒子のサイズ分布を表しており、平均サイズ１０５ｎｍを示し、より大きなサイズのピークが示されていない。右のグラフは、ＮａｎｏＳｉｇｈｔによる溶液中の粒子のサイズ及び濃度による分布を表す。図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３つの独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。

【図１Ｄ】エクソソームの特徴づけ　－　オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性ｍｉＲＮＡが豊富である。（Ａ）オンコソームの透過型電子顕微鏡写真（上左写真及び下左写真及び挿入ズーム写真；点線はズームエリアを示す）。下右画像は、抗ＣＤ９抗体及び透過型電子顕微鏡測定を利用した免疫金標識により作製した。金粒子を、黒色の点として示している。グラフは、１１２のＴＥＭ写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。（Ｂ）乳癌細胞から得たエクソソームの原子間力顕微鏡画像。中央のグラフは、カバースリップ内の粒子の分散をエクソソームのサイズ範囲と共に示している。右のグラフは、２６のＡＦＭ写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。（Ｃ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株（左のブロット、最初のパネル）；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１（中央のブロット、最初のパネル）；ヒト癌細胞株ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１（右のブロット、最初のパネル）から採取されたエクソソームにおいて抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；エクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｄ）エクソソームマーカである、０．４μｍビーズに結合したＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソームのＴＳＧ１０１、ＣＤ９、フロチリン－１、及びＣＤ６３抗体を用いたフローサイトメトリー分析。（Ｅ）光散乱分光法（ＬＳＳ）でのエクソソームのサイズ選別。該システムの較正は、２４ｎｍ及び１００ｎｍの公称直径を有するガラスマイクロスフェア、並びに１１９ｎｍ、１７５ｎｍ、３５６ｎｍ及び４５７ｎｍの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）懸濁液からのシグナルを利用して実施した。実験スペクトル及び得られたフィットを、１００ｎｍの名目直径を有するガラスマイクロスフェア及び３５６ｎｍの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアに関して左のグラフに示している。右のグラフは、癌性エクソソー

ムのＰＢＳ懸濁液のサイズ測定を表す。挿入図は、細胞及び細胞片による本発明者らのエクソソーム調製物の潜在的コンタミネーションを排除するために１０μｍまで拡大してた同グラフを示している。（Ｆ）ＮａｎｏＳｉｇｈｔを用いたエクソソームのサイズ分布。左のグラフは、溶液中の粒子のサイズ分布を表しており、平均サイズ１０５ｎｍを示し、より大きなサイズのピークが示されていない。右のグラフは、ＮａｎｏＳｉｇｈｔによる溶液中の粒子のサイズ及び濃度による分布を表す。図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３つの独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。

【図１Ｅ】エクソソームの特徴づけ　－　オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性ｍｉＲＮＡが豊富である。（Ａ）オンコソームの透過型電子顕微鏡写真（上左写真及び下左写真及び挿入ズーム写真；点線はズームエリアを示す）。下右画像は、抗ＣＤ９抗体及び透過型電子顕微鏡測定を利用した免疫金標識により作製した。金粒子を、黒色の点として示している。グラフは、１１２のＴＥＭ写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。（Ｂ）乳癌細胞から得たエクソソームの原子間力顕微鏡画像。中央のグラフは、カバースリップ内の粒子の分散をエクソソームのサイズ範囲と共に示している。右のグラフは、２６のＡＦＭ写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。（Ｃ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株（左のブロット、最初のパネル）；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１（中央のブロット、最初のパネル）；ヒト癌細胞株ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１（右のブロット、最初のパネル）から採取されたエクソソームにおいて抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；エクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｄ）エクソソームマーカである、０．４μｍビーズに結合したＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソームのＴＳＧ１０１、ＣＤ９、フロチリン－１、及びＣＤ６３抗体を用いたフローサイトメトリー分析。（Ｅ）光散乱分光法（ＬＳＳ）でのエクソソームのサイズ選別。該システムの較正は、２４ｎｍ及び１００ｎｍの公称直径を有するガラスマイクロスフェア、並びに１１９ｎｍ、１７５ｎｍ、３５６ｎｍ及び４５７ｎｍの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）懸濁液からのシグナルを利用して実施した。実験スペクトル及び得られたフィットを、１００ｎｍの名目直径を有するガラスマイクロスフェア及び３５６ｎｍの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアに関して左のグラフに示している。右のグラフは、癌性エクソソームのＰＢＳ懸濁液のサイズ測定を表す。挿入図は、細胞及び細胞片による本発明者らのエクソソーム調製物の潜在的コンタミネーションを排除するために１０μｍまで拡大してた同グラフを示している。（Ｆ）ＮａｎｏＳｉｇｈｔを用いたエクソソームのサイズ分布。左のグラフは、溶液中の粒子のサイズ分布を表しており、平均サイズ１０５ｎｍを示し、より大きなサイズのピークが示されていない。右のグラフは、ＮａｎｏＳｉｇｈｔによる溶液中の粒子のサイズ及び濃度による分布を表す。図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３つの独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。

【図１Ｆ】エクソソームの特徴づけ　－　オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性ｍｉＲＮＡが豊富である。（Ａ）オンコソームの透過型電子顕微鏡写真（上左写真及び下左写真及び挿入ズーム写真；点線はズームエリアを示す）。下右画像は、抗ＣＤ９抗体及び透過型電子顕微鏡測定を利用した免疫金標識により作製した。金粒子を、黒色の点として示している。グラフは、１１２のＴＥＭ写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。（Ｂ）乳癌細胞から得たエクソソームの原子間力顕微鏡画像。中央のグラフは、カバースリップ内の粒子の分散をエクソソームのサイズ範囲と共に示している。右のグラフは、２６のＡＦＭ写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。（Ｃ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株（左のブロット、最初のパネル）；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１（中央のブロット、最初のパネ

ル）；ヒト癌細胞株ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１（右のブロット、最初のパネル）から採取されたエクソソームにおいて抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；エクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｄ）エクソソームマーカである、０．４μｍビーズに結合したＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソームのＴＳＧ１０１、ＣＤ９、フロチリン－１、及びＣＤ６３抗体を用いたフローサイトメトリー分析。（Ｅ）光散乱分光法（ＬＳＳ）でのエクソソームのサイズ選別。該システムの較正は、２４ｎｍ及び１００ｎｍの公称直径を有するガラスマイクロスフェア、並びに１１９ｎｍ、１７５ｎｍ、３５６ｎｍ及び４５７ｎｍの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）懸濁液からのシグナルを利用して実施した。実験スペクトル及び得られたフィットを、１００ｎｍの名目直径を有するガラスマイクロスフェア及び３５６ｎｍの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアに関して左のグラフに示している。右のグラフは、癌性エクソソームのＰＢＳ懸濁液のサイズ測定を表す。挿入図は、細胞及び細胞片による本発明者らのエクソソーム調製物の潜在的コンタミネーションを排除するために１０μｍまで拡大してた同グラフを示している。（Ｆ）ＮａｎｏＳｉｇｈｔを用いたエクソソームのサイズ分布。左のグラフは、溶液中の粒子のサイズ分布を表しており、平均サイズ１０５ｎｍを示し、より大きなサイズのピークが示されていない。右のグラフは、ＮａｎｏＳｉｇｈｔによる溶液中の粒子のサイズ及び濃度による分布を表す。図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３つの独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。

【図２Ａ】オンコソームがｍｉＲＮＡを豊富に含むようになっている。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム及びＭＣＦ１０Ａエクソソーム中の発現されたｍｉＲＮＡの相関グラフ。（Ｂ）７２ｈの無細胞培養の後、ノルモソームとオンコソームの間で差次的に発現されたｍｉＲＮＡの６種（ｍｉＲ－１０ａ、ｍｉＲ－１０ｂ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２７ａ、ｍｉＲ－１５５、及びｍｉＲ－３７３）を利用した細胞中のｍｉＲＮＡと各エクソソームの間の相関グラフ。（Ｃ）ノルモソーム及びオンコソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁させて、２４及び７２ｈの無細胞培養物に保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取し、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。グラフのプロットは、７２ｈ後に採取されたエクソソーム中の腫瘍サプレッサ（ＴＳ）及び発癌性（ＯＮＣ）ｍｉＲＮＡの倍率変化の平均を、２４ｈ後に採取されたものに比較して表している。（Ｄ）２４及び７２ｈの無細胞培養後のノルモソーム、培養していないオンコソーム、並びに２４ｈ、７２ｈ及び９６ｈの無細胞培養後のオンコソームから得られたｍｉＲＮＡ－１０及びｍｉＲ－２１のノーザンブロット。ｔＲＮＡＭｅｔを負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｅ）７２ｈの無細胞培養後の、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞中の１５種の定量されたｍｉＲＮＡと、それらの各エクソソームの間の相関プロット。オンコソームは、ノルモソームと比較して（左グラフ）、起源細胞（中央及び右グラフ）との低い相関値を示している。（Ｆ）１秒（ｓ）あたりの蛍光単位（ＦＵ）で示されたバイオアナライザーグラフ表示、並びにノルモソーム及びオンコソームのエクソソームＲＮＡ量のゲル画像。

【図２Ｂ】オンコソームがｍｉＲＮＡを豊富に含むようになっている。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム及びＭＣＦ１０Ａエクソソーム中の発現されたｍｉＲＮＡの相関グラフ。（Ｂ）７２ｈの無細胞培養の後、ノルモソームとオンコソームの間で差次的に発現されたｍｉＲＮＡの６種（ｍｉＲ－１０ａ、ｍｉＲ－１０ｂ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２７ａ、ｍｉＲ－１５５、及びｍｉＲ－３７３）を利用した細胞中のｍｉＲＮＡと各エクソソームの間の相関グラフ。（Ｃ）ノルモソーム及びオンコソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁

させて、２４及び７２ｈの無細胞培養物に保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取し、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。グラフのプロットは、７２ｈ後に採取されたエクソソーム中の腫瘍サプレッサ（ＴＳ）及び発癌性（ＯＮＣ）ｍｉＲＮＡの倍率変化の平均を、２４ｈ後に採取されたものに比較して表している。（Ｄ）２４及び７２ｈの無細胞培養後のノルモソーム、培養していないオンコソーム、並びに２４ｈ、７２ｈ及び９６ｈの無細胞培養後のオンコソームから得られたｍｉＲＮＡ－１０及びｍｉＲ－２１のノーザンブロット。ｔＲＮＡＭｅｔを負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｅ）７２ｈの無細胞培養後の、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞中の１５種の定量されたｍｉＲＮＡと、それらの各エクソソームの間の相関プロット。オンコソームは、ノルモソームと比較して（左グラフ）、起源細胞（中央及び右グラフ）との低い相関値を示している。（Ｆ）１秒（ｓ）あたりの蛍光単位（ＦＵ）で示されたバイオアナライザーグラフ表示、並びにノルモソーム及びオンコソームのエクソソームＲＮＡ量のゲル画像。

【図２Ｃ】オンコソームがｍｉＲＮＡを豊富に含むようになっている。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム及びＭＣＦ１０Ａエクソソーム中の発現されたｍｉＲＮＡの相関グラフ。（Ｂ）７２ｈの無細胞培養の後、ノルモソームとオンコソームの間で差次的に発現されたｍｉＲＮＡの６種（ｍｉＲ－１０ａ、ｍｉＲ－１０ｂ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２７ａ、ｍｉＲ－１５５、及びｍｉＲ－３７３）を利用した細胞中のｍｉＲＮＡと各エクソソームの間の相関グラフ。（Ｃ）ノルモソーム及びオンコソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁させて、２４及び７２ｈの無細胞培養物に保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取し、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。グラフのプロットは、７２ｈ後に採取されたエクソソーム中の腫瘍サプレッサ（ＴＳ）及び発癌性（ＯＮＣ）ｍｉＲＮＡの倍率変化の平均を、２４ｈ後に採取されたものに比較して表している。（Ｄ）２４及び７２ｈの無細胞培養後のノルモソーム、培養していないオンコソーム、並びに２４ｈ、７２ｈ及び９６ｈの無細胞培養後のオンコソームから得られたｍｉＲＮＡ－１０及びｍｉＲ－２１のノーザンブロット。ｔＲＮＡＭｅｔを負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｅ）７２ｈの無細胞培養後の、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞中の１５種の定量されたｍｉＲＮＡと、それらの各エクソソームの間の相関プロット。オンコソームは、ノルモソームと比較して（左グラフ）、起源細胞（中央及び右グラフ）との低い相関値を示している。（Ｆ）１秒（ｓ）あたりの蛍光単位（ＦＵ）で示されたバイオアナライザーグラフ表示、並びにノルモソーム及びオンコソームのエクソソームＲＮＡ量のゲル画像。

【図２Ｄ】オンコソームがｍｉＲＮＡを豊富に含むようになっている。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム及びＭＣＦ１０Ａエクソソーム中の発現されたｍｉＲＮＡの相関グラフ。（Ｂ）７２ｈの無細胞培養の後、ノルモソームとオンコソームの間で差次的に発現されたｍｉＲＮＡの６種（ｍｉＲ－１０ａ、ｍｉＲ－１０ｂ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２７ａ、ｍｉＲ－１５５、及びｍｉＲ－３７３）を利用した細胞中のｍｉＲＮＡと各エクソソームの間の相関グラフ。（Ｃ）ノルモソーム及びオンコソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁させて、２４及び７２ｈの無細胞培養物に保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取し、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。グラフのプロットは、７２ｈ後に採取されたエクソソーム中の腫瘍サプレッサ（ＴＳ）及び発癌性（ＯＮＣ）ｍｉＲＮＡの倍率変化の平均を、２４ｈ後に採取されたものに比較して表している。（Ｄ）２４及び７２ｈの無細胞培養後のノルモソーム、培養していないオンコソーム、並びに２４ｈ、７２ｈ及び９６ｈの無細胞培養後のオンコソームから得られたｍｉＲＮＡ－１０及びｍｉＲ－２１のノ

ーザンブロット。ｔＲＮＡＭｅｔを負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｅ）７２ｈの無細胞培養後の、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞中の１５種の定量されたｍｉＲＮＡと、それらの各エクソソームの間の相関プロット。オンコソームは、ノルモソームと比較して（左グラフ）、起源細胞（中央及び右グラフ）との低い相関値を示している。（Ｆ）１秒（ｓ）あたりの蛍光単位（ＦＵ）で示されたバイオアナライザーグラフ表示、並びにノルモソーム及びオンコソームのエクソソームＲＮＡ量のゲル画像。

【図２Ｅ】オンコソームがｍｉＲＮＡを豊富に含むようになっている。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム及びＭＣＦ１０Ａエクソソーム中の発現されたｍｉＲＮＡの相関グラフ。（Ｂ）７２ｈの無細胞培養の後、ノルモソームとオンコソームの間で差次的に発現されたｍｉＲＮＡの６種（ｍｉＲ－１０ａ、ｍｉＲ－１０ｂ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２７ａ、ｍｉＲ－１５５、及びｍｉＲ－３７３）を利用した細胞中のｍｉＲＮＡと各エクソソームの間の相関グラフ。（Ｃ）ノルモソーム及びオンコソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁させて、２４及び７２ｈの無細胞培養物に保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取し、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。グラフのプロットは、７２ｈ後に採取されたエクソソーム中の腫瘍サプレッサ（ＴＳ）及び発癌性（ＯＮＣ）ｍｉＲＮＡの倍率変化の平均を、２４ｈ後に採取されたものに比較して表している。（Ｄ）２４及び７２ｈの無細胞培養後のノルモソーム、培養していないオンコソーム、並びに２４ｈ、７２ｈ及び９６ｈの無細胞培養後のオンコソームから得られたｍｉＲＮＡ－１０及びｍｉＲ－２１のノーザンブロット。ｔＲＮＡＭｅｔを負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｅ）７２ｈの無細胞培養後の、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞中の１５種の定量されたｍｉＲＮＡと、それらの各エクソソームの間の相関プロット。オンコソームは、ノルモソームと比較して（左グラフ）、起源細胞（中央及び右グラフ）との低い相関値を示している。（Ｆ）１秒（ｓ）あたりの蛍光単位（ＦＵ）で示されたバイオアナライザーグラフ表示、並びにノルモソーム及びオンコソームのエクソソームＲＮＡ量のゲル画像。

【図２Ｆ】オンコソームがｍｉＲＮＡを豊富に含むようになっている。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム及びＭＣＦ１０Ａエクソソーム中の発現されたｍｉＲＮＡの相関グラフ。（Ｂ）７２ｈの無細胞培養の後、ノルモソームとオンコソームの間で差次的に発現されたｍｉＲＮＡの６種（ｍｉＲ－１０ａ、ｍｉＲ－１０ｂ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２７ａ、ｍｉＲ－１５５、及びｍｉＲ－３７３）を利用した細胞中のｍｉＲＮＡと各エクソソームの間の相関グラフ。（Ｃ）ノルモソーム及びオンコソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁させて、２４及び７２ｈの無細胞培養物に保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取し、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。グラフのプロットは、７２ｈ後に採取されたエクソソーム中の腫瘍サプレッサ（ＴＳ）及び発癌性（ＯＮＣ）ｍｉＲＮＡの倍率変化の平均を、２４ｈ後に採取されたものに比較して表している。（Ｄ）２４及び７２ｈの無細胞培養後のノルモソーム、培養していないオンコソーム、並びに２４ｈ、７２ｈ及び９６ｈの無細胞培養後のオンコソームから得られたｍｉＲＮＡ－１０及びｍｉＲ－２１のノーザンブロット。ｔＲＮＡＭｅｔを負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｅ）７２ｈの無細胞培養後の、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞中の１５種の定量されたｍｉＲＮＡと、それらの各エクソソームの間の相関プロット。オンコソームは、ノルモソームと比較して（左グラフ）、起源細胞（中央及び右グラフ）との低い相関値を示している。（Ｆ）１秒（ｓ）あたりの蛍光単位（ＦＵ）で示されたバイオアナライザーグラフ表示、並びにノルモソーム及びオンコソームのエクソソームＲＮＡ量のゲル画像。

【図３－１】エクソソームはｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを含む。（Ａ）試験された成熟ｍｉＲＮ

Ａに対応する１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを、ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームのｑＰＣＲを用いて定量した。存在量を反映するために、各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットしており、値は±ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）オンコソーム及びノルモソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、７２ｈの無細胞培養後のＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養と比較して示しており、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｃ）２４ｈ及び７２ｈの無細胞培養後のＭＣＦ１０Ａ、並びに０ｈ、２４ｈ、７２ｈ、及び９６ｈの無細胞培養によるＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームを用いたｐｒｅ－ｉＲ－１０ｂ及びｐｒｅ－ｍｉＲ－２１のノーザンブロット。ｔＲＮＡＭｅｔを負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｄ）上のグラフ：オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）の発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及び発癌性ｍｉＲＮＡ（右グラフ）を、２４ｈ及び７２ｈの無細胞培養条件後に定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及びｍｉＲＮＡ（右グラフ）のΔＣｔ値の逆数をプロットしており、指数関数的傾向が認められた。示されたデータは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。下のグラフ：オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及び成熟ｍｉＲＮＡ（右グラフ）を、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２ｈ及び９６ｈの無細胞培養条件後に定量した。異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及びｍｉＲＮＡ（右グラフ）のΔＣｔ値の逆数をプロットしており、指数関数的傾向が認められた。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３回の独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）オンコソーム及びノルモソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に０ｈ、２４ｈ、７２ｈ及び９６ｈ保持した。エクソソームを異なる時点で抽出して、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットした。

【図３－２】エクソソームはｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを含む。（Ａ）試験された成熟ｍｉＲＮＡに対応する１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを、ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームのｑＰＣＲを用いて定量した。存在量を反映するために、各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットしており、値は±ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）オンコソーム及びノルモソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、７２ｈの無細胞培養後のＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養と比較して示しており、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｃ）２４ｈ及び７２ｈの無細胞培養後のＭＣＦ１０Ａ、並びに０ｈ、２４ｈ、７２ｈ、及び９６ｈの無細胞培養によるＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームを用いたｐｒｅ－ｉＲ－１０ｂ及びｐｒｅ－ｍｉＲ－２１のノーザンブロット。ｔＲＮＡＭｅｔを負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｄ）上のグラフ：オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）の発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及び発癌性ｍｉＲＮＡ（右グラフ）を、２４ｈ及び７２ｈの無細胞培養条件後に定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及びｍｉＲＮＡ（右グラフ）のΔＣｔ値の逆数をプロットしており、指数関数的傾向が認められた。示されたデータは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。下のグラフ：オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及び成熟ｍｉＲＮＡ（右グラフ）を、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２ｈ及び９６ｈの無細胞培養条件後に定量した。異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及びｍｉＲＮＡ（右グラフ）のΔＣｔ値の逆数をプロットしており、指数関数的傾向が認められた。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３回の独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）オンコソーム及びノルモソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件

に０ｈ、２４ｈ、７２ｈ及び９６ｈ保持した。エクソソームを異なる時点で抽出して、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットした。

【図３－３】エクソソームはｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを含む。（Ａ）試験された成熟ｍｉＲＮＡに対応する１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを、ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームのｑＰＣＲを用いて定量した。存在量を反映するために、各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットしており、値は±ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）オンコソーム及びノルモソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、７２ｈの無細胞培養後のＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養と比較して示しており、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｃ）２４ｈ及び７２ｈの無細胞培養後のＭＣＦ１０Ａ、並びに０ｈ、２４ｈ、７２ｈ、及び９６ｈの無細胞培養によるＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームを用いたｐｒｅ－ｉＲ－１０ｂ及びｐｒｅ－ｍｉＲ－２１のノーザンブロット。ｔＲＮＡＭｅｔを負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｄ）上のグラフ：オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）の発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及び発癌性ｍｉＲＮＡ（右グラフ）を、２４ｈ及び７２ｈの無細胞培養条件後に定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及びｍｉＲＮＡ（右グラフ）のΔＣｔ値の逆数をプロットしており、指数関数的傾向が認められた。示されたデータは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。下のグラフ：オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及び成熟ｍｉＲＮＡ（右グラフ）を、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２ｈ及び９６ｈの無細胞培養条件後に定量した。異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及びｍｉＲＮＡ（右グラフ）のΔＣｔ値の逆数をプロットしており、指数関数的傾向が認められた。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３回の独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）オンコソーム及びノルモソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に０ｈ、２４ｈ、７２ｈ及び９６ｈ保持した。エクソソームを異なる時点で抽出して、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットした。

【図３－４】エクソソームはｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを含む。（Ａ）試験された成熟ｍｉＲＮＡに対応する１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを、ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームのｑＰＣＲを用いて定量した。存在量を反映するために、各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットしており、値は±ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）オンコソーム及びノルモソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、７２ｈの無細胞培養後のＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養と比較して示しており、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｃ）２４ｈ及び７２ｈの無細胞培養後のＭＣＦ１０Ａ、並びに０ｈ、２４ｈ、７２ｈ、及び９６ｈの無細胞培養によるＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームを用いたｐｒｅ－ｉＲ－１０ｂ及びｐｒｅ－ｍｉＲ－２１のノーザンブロット。ｔＲＮＡＭｅｔを負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｄ）上のグラフ：オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）の発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及び発癌性ｍｉＲＮＡ（右グラフ）を、２４ｈ及び７２ｈの無細胞培養条件後に定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及びｍｉＲＮＡ（右グラフ）のΔＣｔ値の逆数をプロットしており、指数関数的傾向が認められた。示されたデータは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。下のグラフ：オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及び成熟ｍｉＲＮＡ（右グラフ）を、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２ｈ及び９６ｈの無細胞培養条件後に定量した。異なる

時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（左グラフ）及びｍｉＲＮＡ（右グラフ）のΔＣｔ値の逆数をプロットしており、指数関数的傾向が認められた。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３回の独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）オンコソーム及びノルモソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に０ｈ、２４ｈ、７２ｈ及び９６ｈ保持した。エクソソームを異なる時点で抽出して、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットした。

【図４－１】オンコソームはＲＬＣを含む。（Ａ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１；ヒト癌細胞株ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｂ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、ＩｇＧを指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上２つの画像の定量を表す。（Ｃ）エンプティベクター（ｐＣＭＶ－Ｔａｇ４Ｂ；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びＦｌａｇ－ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされた細胞から採取されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム中の抗Ｆｌａｇ抗体（上パネル）を用いた免疫ブロット。ＣＤ９免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした（下パネル）。（Ｄ）カルシウムイオノフォアＡ２３１８７で処置されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上パネル）。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。ＣＤ９免疫ブロット（したパネル）を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。（Ｅ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞、並びにｓｈスクランブル及びｓｈダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上ブロット）。ＣＤ９免疫ブロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした（下ブロット）。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。（Ｆ）ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、ＥＭ写真の金粒子の定量を示す。（Ｇ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｈ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）を、エクソソームマーカとして用いた。（Ｉ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネ

ル）。β－アクチンを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｊ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソーム中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。（Ｋ）ｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中のＡＧＯ２　ｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｌ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞又はｓｉ対照若しくはｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｍ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの５％を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（Ｎ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（５％）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、対照として用いた（下パネル）。

【図４－２】オンコソームはＲＬＣを含む。（Ａ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１；ヒト癌細胞株ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｂ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、ＩｇＧを指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上２つの画像の定量を表す。（Ｃ）エンプティベクター（ｐＣＭＶ－Ｔａｇ４Ｂ；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びＦｌａｇ－ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされた細胞から採取されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム中の抗Ｆｌａｇ抗体（上パネル）を用いた免疫ブロット。ＣＤ９免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした（下パネル）。（Ｄ）カルシウムイオノフォアＡ２３１８７で処置されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上パネル）。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。ＣＤ９免疫ブロット（したパネル）を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。（Ｅ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞、並びにｓｈスクランブル及びｓｈダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上ブロット）。ＣＤ９免疫ブロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした（下ブロット）。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。（Ｆ）ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、ＥＭ写真の金粒子の定量を示す。（Ｇ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、

トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｈ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）を、エクソソームマーカとして用いた。（Ｉ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β－アクチンを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｊ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソーム中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。（Ｋ）ｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中のＡＧＯ２　ｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｌ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞又はｓｉ対照若しくはｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｍ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの５％を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（Ｎ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（５％）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、対照として用いた（下パネル）。

【図４－３】オンコソームはＲＬＣを含む。（Ａ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１；ヒト癌細胞株ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｂ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、ＩｇＧを指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上２つの画像の定量を表す。（Ｃ）エンプティベクター（ｐＣＭＶ－Ｔａｇ４Ｂ；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びＦｌａｇ－ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされた細胞から採取されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム中の抗Ｆｌａｇ抗体（上パネル）を用いた免疫ブロット。ＣＤ９免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした（下パネル）。（Ｄ）カルシウムイオノフォアＡ２３１８

７で処置されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上パネル）。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。ＣＤ９免疫ブロット（したパネル）を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。（Ｅ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞、並びにｓｈスクランブル及びｓｈダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上ブロット）。ＣＤ９免疫ブロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした（下ブロット）。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。（Ｆ）ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、ＥＭ写真の金粒子の定量を示す。（Ｇ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｈ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）を、エクソソームマーカとして用いた。（Ｉ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β－アクチンを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｊ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソーム中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。（Ｋ）ｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中のＡＧＯ２　ｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｌ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞又はｓｉ対照若しくはｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｍ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの５％を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（Ｎ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（５％）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、対照として用いた（下パネル）。

【図４－４】オンコソームはＲＬＣを含む。（Ａ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１；ヒト癌細胞株ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク

質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｂ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、ＩｇＧを指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上２つの画像の定量を表す。（Ｃ）エンプティベクター（ｐＣＭＶ－Ｔａｇ４Ｂ；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びＦｌａｇ－ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされた細胞から採取されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム中の抗Ｆｌａｇ抗体（上パネル）を用いた免疫ブロット。ＣＤ９免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした（下パネル）。（Ｄ）カルシウムイオノフォアＡ２３１８７で処置されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上パネル）。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。ＣＤ９免疫ブロット（したパネル）を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。（Ｅ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞、並びにｓｈスクランブル及びｓｈダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上ブロット）。ＣＤ９免疫ブロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした（下ブロット）。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。（Ｆ）ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、ＥＭ写真の金粒子の定量を示す。（Ｇ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｈ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）を、エクソソームマーカとして用いた。（Ｉ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β－アクチンを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｊ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソーム中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。（Ｋ）ｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中のＡＧＯ２　ｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｌ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞又はｓｉ対照若しくはｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージＪソフト

ウエアを用いて、定量を実施した。（Ｍ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの５％を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（Ｎ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（５％）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、対照として用いた（下パネル）。

【図４－５】オンコソームはＲＬＣを含む。（Ａ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１；ヒト癌細胞株ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｂ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、ＩｇＧを指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上２つの画像の定量を表す。（Ｃ）エンプティベクター（ｐＣＭＶ－Ｔａｇ４Ｂ；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びＦｌａｇ－ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされた細胞から採取されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム中の抗Ｆｌａｇ抗体（上パネル）を用いた免疫ブロット。ＣＤ９免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした（下パネル）。（Ｄ）カルシウムイオノフォアＡ２３１８７で処置されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上パネル）。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。ＣＤ９免疫ブロット（したパネル）を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。（Ｅ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞、並びにｓｈスクランブル及びｓｈダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上ブロット）。ＣＤ９免疫ブロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした（下ブロット）。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。（Ｆ）ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、ＥＭ写真の金粒子の定量を示す。（Ｇ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｈ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）を、エクソソー

ムマーカとして用いた。（Ｉ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β－アクチンを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｊ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソーム中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。（Ｋ）ｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中のＡＧＯ２　ｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｌ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞又はｓｉ対照若しくはｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｍ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの５％を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（Ｎ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（５％）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、対照として用いた（下パネル）。

【図４－６】オンコソームはＲＬＣを含む。（Ａ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１；ヒト癌細胞株ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｂ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、ＩｇＧを指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上２つの画像の定量を表す。（Ｃ）エンプティベクター（ｐＣＭＶ－Ｔａｇ４Ｂ；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びＦｌａｇ－ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされた細胞から採取されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム中の抗Ｆｌａｇ抗体（上パネル）を用いた免疫ブロット。ＣＤ９免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした（下パネル）。（Ｄ）カルシウムイオノフォアＡ２３１８７で処置されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上パネル）。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。ＣＤ９免疫ブロット（したパネル）を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。（Ｅ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞、並びにｓｈスクランブル及びｓｈダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上ブロット）。ＣＤ９免疫ブロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした（下ブロット）。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。（Ｆ）ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、ＥＭ写真の金粒子の定量を示す。（Ｇ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０

Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｈ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）を、エクソソームマーカとして用いた。（Ｉ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β－アクチンを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｊ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソーム中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。（Ｋ）ｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中のＡＧＯ２　ｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｌ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞又はｓｉ対照若しくはｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｍ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの５％を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（Ｎ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（５％）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、対照として用いた（下パネル）。

【図４－７】オンコソームはＲＬＣを含む。（Ａ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１；ヒト癌細胞株ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｂ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、ＩｇＧを指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上２つの画像の定量を表す。（Ｃ）エンプティベクター（ｐＣＭＶ－Ｔａｇ４Ｂ；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びＦｌａｇ－ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされた細胞から採取されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム中の抗Ｆｌａｇ

抗体（上パネル）を用いた免疫ブロット。ＣＤ９免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした（下パネル）。（Ｄ）カルシウムイオノフォアＡ２３１８７で処置されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上パネル）。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。ＣＤ９免疫ブロット（したパネル）を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。（Ｅ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞、並びにｓｈスクランブル及びｓｈダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上ブロット）。ＣＤ９免疫ブロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした（下ブロット）。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。（Ｆ）ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、ＥＭ写真の金粒子の定量を示す。（Ｇ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｈ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）を、エクソソームマーカとして用いた。（Ｉ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β－アクチンを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｊ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソーム中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。（Ｋ）ｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中のＡＧＯ２　ｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｌ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞又はｓｉ対照若しくはｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｍ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの５％を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（Ｎ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（５％）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、対照として用いた（下パネル）。

【図４－８】オンコソームはＲＬＣを含む。（Ａ）非腫瘍原性マウス（ＮＭｕＭＧ）及びヒト（ＭＣＦ１０Ａ）細胞株；マウス癌細胞株６７ＮＲ及び４Ｔ１；ヒト癌細胞株ＭＣＦ

７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｂ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、ＩｇＧを指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上２つの画像の定量を表す。（Ｃ）エンプティベクター（ｐＣＭＶ－Ｔａｇ４Ｂ；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びＦｌａｇ－ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされた細胞から採取されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム中の抗Ｆｌａｇ抗体（上パネル）を用いた免疫ブロット。ＣＤ９免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした（下パネル）。（Ｄ）カルシウムイオノフォアＡ２３１８７で処置されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上パネル）。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。ＣＤ９免疫ブロット（したパネル）を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。（Ｅ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞、並びにｓｈスクランブル及びｓｈダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット（上ブロット）。ＣＤ９免疫ブロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした（下ブロット）。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。（Ｆ）ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、ＥＭ写真の金粒子の定量を示す。（Ｇ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（Ｈ）オンコソーム（ＭＣＦ７及びＭＤＡ－ＭＢ２３１）及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ）から採取されたエクソソーム中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンＸに続いてプロテオキナーゼＫで処置されたエクソソーム（トリトン＋ＰＫ）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼＫで処置されたエクソソーム（ＰＫ）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。ＴＳＧ１０１（二列目）及びＣＤ９（三列目）を、エクソソームマーカとして用いた。（Ｉ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β－アクチンを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｊ）ＧＦＰ－ＡＧＯ２プラスミドでトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソーム中の抗ＧＦＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。（Ｋ）ｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中のＡＧＯ２　ｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｌ）ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞又はｓｉ対照若しくはｓｉＡＧＯ２でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中

のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＴＳＧ１０１（中央パネル）及びＣＤ９（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｍ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの５％を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（Ｎ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（５％）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、対照として用いた（下パネル）。

【図５Ａ】オンコソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして成熟ｍｉＲＮＡを生成する。（Ａ）エクソソームを、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈダイサー細胞（上グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈスクランブル及びＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈダイサー細胞（下グラフ）から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）エクソソームを、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈダイサー細胞（上グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈスクランブル及びＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈダイサー細胞（下グラフ）から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４ｈ無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を示し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｃ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞のエクソソーム中で電気穿孔された重鎖（ＨＣ）及び軽鎖（ＬＣ）一次ダイサー抗体と、一次アクチン抗体を検出するための抗ウサギ及び抗マウス二次抗体と、を用いた免疫ブロット。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞由来の抗体を含まずに電気穿孔されたエクソソームを、陰性対照として用いた。プロテアーゼＫ処置を電気穿孔後に実施して、エクソソーム中に含まれない抗体の消耗を確認した。（Ｄ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）は、２本ずつ（下グラフ）又は４本ずつ（上グラフ）採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗ＴＲＢＰ抗体と共に電気穿孔した。試料＋対照を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、６種の発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（上グラフ）、又は１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（下グラフ）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｐｒｅ－ｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（下のグラフにおいて、ＴＳ＝腫瘍サプレッサ；ＯＮＣ＝発癌性）の平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）を４本ずつ（上グラフ）又は２本ずつ（下グラフ）採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗ＴＲＢＰ抗体と共に電気穿孔した。試料＋対照を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、６種の発癌性ｍｉＲＮＡ（上グラフ）、又は１５種のｍｉＲＮＡ（下グラフ）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡ（下のグラフにおいて、ＴＳ＝腫瘍サプレッサ；ＯＮＣ＝発癌性）の平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。

【図５Ｂ】オンコソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして成熟ｍｉＲＮＡを生成する。（Ａ）エクソソームを、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈスクランブル、ＭＣ

Ｆ１０Ａ　ｓｈダイサー細胞（上グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈスクランブル及びＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈダイサー細胞（下グラフ）から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）エクソソームを、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈダイサー細胞（上グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈスクランブル及びＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈダイサー細胞（下グラフ）から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４ｈ無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を示し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｃ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞のエクソソーム中で電気穿孔された重鎖（ＨＣ）及び軽鎖（ＬＣ）一次ダイサー抗体と、一次アクチン抗体を検出するための抗ウサギ及び抗マウス二次抗体と、を用いた免疫ブロット。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞由来の抗体を含まずに電気穿孔されたエクソソームを、陰性対照として用いた。プロテアーゼＫ処置を電気穿孔後に実施して、エクソソーム中に含まれない抗体の消耗を確認した。（Ｄ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）は、２本ずつ（下グラフ）又は４本ずつ（上グラフ）採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗ＴＲＢＰ抗体と共に電気穿孔した。試料＋対照を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、６種の発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（上グラフ）、又は１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（下グラフ）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｐｒｅ－ｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（下のグラフにおいて、ＴＳ＝腫瘍サプレッサ；ＯＮＣ＝発癌性）の平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）を４本ずつ（上グラフ）又は２本ずつ（下グラフ）採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗ＴＲＢＰ抗体と共に電気穿孔した。試料＋対照を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、６種の発癌性ｍｉＲＮＡ（上グラフ）、又は１５種のｍｉＲＮＡ（下グラフ）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡ（下のグラフにおいて、ＴＳ＝腫瘍サプレッサ；ＯＮＣ＝発癌性）の平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。

【図５Ｃ】オンコソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして成熟ｍｉＲＮＡを生成する。（Ａ）エクソソームを、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈダイサー細胞（上グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈスクランブル及びＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈダイサー細胞（下グラフ）から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）エクソソームを、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈダイサー細胞（上グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈスクランブル及びＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈダイサー細胞（下グラフ）から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４ｈ無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を示し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｃ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞のエクソソーム中で電気穿孔された重鎖（ＨＣ）及び軽鎖（ＬＣ）一次ダイサ

ー抗体と、一次アクチン抗体を検出するための抗ウサギ及び抗マウス二次抗体と、を用いた免疫ブロット。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞由来の抗体を含まずに電気穿孔されたエクソソームを、陰性対照として用いた。プロテアーゼＫ処置を電気穿孔後に実施して、エクソソーム中に含まれない抗体の消耗を確認した。（Ｄ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）は、２本ずつ（下グラフ）又は４本ずつ（上グラフ）採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗ＴＲＢＰ抗体と共に電気穿孔した。試料＋対照を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、６種の発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（上グラフ）、又は１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（下グラフ）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｐｒｅ－ｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（下のグラフにおいて、ＴＳ＝腫瘍サプレッサ；ＯＮＣ＝発癌性）の平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）を４本ずつ（上グラフ）又は２本ずつ（下グラフ）採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗ＴＲＢＰ抗体と共に電気穿孔した。試料＋対照を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、６種の発癌性ｍｉＲＮＡ（上グラフ）、又は１５種のｍｉＲＮＡ（下グラフ）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡ（下のグラフにおいて、ＴＳ＝腫瘍サプレッサ；ＯＮＣ＝発癌性）の平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。

【図５Ｄ】オンコソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして成熟ｍｉＲＮＡを生成する。（Ａ）エクソソームを、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈダイサー細胞（上グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈスクランブル及びＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈダイサー細胞（下グラフ）から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）エクソソームを、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈダイサー細胞（上グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈスクランブル及びＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈダイサー細胞（下グラフ）から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４ｈ無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を示し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｃ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞のエクソソーム中で電気穿孔された重鎖（ＨＣ）及び軽鎖（ＬＣ）一次ダイサー抗体と、一次アクチン抗体を検出するための抗ウサギ及び抗マウス二次抗体と、を用いた免疫ブロット。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞由来の抗体を含まずに電気穿孔されたエクソソームを、陰性対照として用いた。プロテアーゼＫ処置を電気穿孔後に実施して、エクソソーム中に含まれない抗体の消耗を確認した。（Ｄ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）は、２本ずつ（下グラフ）又は４本ずつ（上グラフ）採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗ＴＲＢＰ抗体と共に電気穿孔した。試料＋対照を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、６種の発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（上グラフ）、又は１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（下グラフ）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｐｒｅ－ｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（下のグラフにおいて、ＴＳ＝腫瘍サプレッサ；ＯＮＣ＝発癌性）の平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）オンコ

ソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）を４本ずつ（上グラフ）又は２本ずつ（下グラフ）採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗ＴＲＢＰ抗体と共に電気穿孔した。試料＋対照を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、６種の発癌性ｍｉＲＮＡ（上グラフ）、又は１５種のｍｉＲＮＡ（下グラフ）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡ（下のグラフにおいて、ＴＳ＝腫瘍サプレッサ；ＯＮＣ＝発癌性）の平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。

【図５Ｅ】オンコソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして成熟ｍｉＲＮＡを生成する。（Ａ）エクソソームを、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈダイサー細胞（上グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈスクランブル及びＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈダイサー細胞（下グラフ）から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）エクソソームを、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０Ａ　ｓｈダイサー細胞（上グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈスクランブル及びＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｈダイサー細胞（下グラフ）から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４ｈ無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を示し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｃ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞のエクソソーム中で電気穿孔された重鎖（ＨＣ）及び軽鎖（ＬＣ）一次ダイサー抗体と、一次アクチン抗体を検出するための抗ウサギ及び抗マウス二次抗体と、を用いた免疫ブロット。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞由来の抗体を含まずに電気穿孔されたエクソソームを、陰性対照として用いた。プロテアーゼＫ処置を電気穿孔後に実施して、エクソソーム中に含まれない抗体の消耗を確認した。（Ｄ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）は、２本ずつ（下グラフ）又は４本ずつ（上グラフ）採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗ＴＲＢＰ抗体と共に電気穿孔した。試料＋対照を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、６種の発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（上グラフ）、又は１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（下グラフ）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｐｒｅ－ｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（下のグラフにおいて、ＴＳ＝腫瘍サプレッサ；ＯＮＣ＝発癌性）の平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）を４本ずつ（上グラフ）又は２本ずつ（下グラフ）採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗ＴＲＢＰ抗体と共に電気穿孔した。試料＋対照を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、６種の発癌性ｍｉＲＮＡ（上グラフ）、又は１５種のｍｉＲＮＡ（下グラフ）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡ（下のグラフにおいて、ＴＳ＝腫瘍サプレッサ；ＯＮＣ＝発癌性）の平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。

【図６－１】オンコソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして成熟ｍｉＲＮＡを生成する。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞のエクソソームを採取して、ゲルダナマイシンと共に電気穿孔した。試料を無細胞培養条件で２４及び７２ｈ放置し、その後、エクソソームを抽出して、６種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後の

エクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）合成ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１を、ＭＣＦ１０Ａ（ＭＣＦ１０Ａ電気泳動）、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー（ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー電気泳動）、ＭＤＡＭＢ２３１（ＭＤＡ－ＭＢ２３１電気泳動）及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー（ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー電気泳動）細胞から採取されたエクソソーム中で電気穿孔した。７２ｈ無細胞培養条件後に、エクソソームを採取した。７２ｈ電気穿孔及び培養の前後に、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１をｑＰＣＲにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の０ｈ後に比較した電気穿孔の７２ｈ後のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１の倍率変化を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの非存在下で電気穿孔されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームを、対象として用いて、ベースレベルを強調した。（Ｃ）合成ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１を、ＭＣＦ１０Ａ（ＭＣＦ１０Ａ電気泳動）、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー（ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー電気泳動）、ＭＤＡＭＢ２３１（ＭＤＡ－ＭＢ２３１電気泳動）及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー（ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー電気泳動）細胞から採取されたエクソソーム中に電気穿孔した。無細胞培養条件で７２ｈ後に、エクソソームを採取した。７２ｈの電気穿孔及び培養の前後に、ＭｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１をｑＰＣＲにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の０ｈ後（上グラフ）又は２４ｈ後（下グラフ）に比較した、電気穿孔の７２ｈ後のｍｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１の倍率変化を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの非存在下で電気穿孔されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームを、所定のベースレベルへの対照として用いた。（Ｄ）検出プローブを用いずダイシングアッセイ（ｄｉｃｉｎｇ　ａｓｓａｙ）から得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成ｐｒｅ－ｍｉＲ－１０ｂを、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及びクローン２から得たエクソソーム（それぞれＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　１　ｅｘｏｓ及びＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　２　ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　＋　ダイサーＡＢ）であった。（Ｅ）検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成ｐｒｅ－ｍｉＲ－２１を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及びクローン２から得たエクソソーム（それぞれＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　１　Ｅｘｏｓ及びＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　２　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　＋ダイサーＡＢ）であった。（Ｆ）検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成ｐｒｅ－ｃｅｌ－ｍｉＲ－１を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサーエクソソーム（ＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　ｅｘｏｓ）、及びダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　＋ダイサーＡＢ）であった。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図６－２】オンコソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして成熟ｍｉＲＮＡを生成する。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞のエクソソームを採取して、ゲルダナマイシンと共に電気穿孔した。試料を無細胞培養条件で２４及び７２ｈ放置し、その後、エクソソ

ームを抽出して、６種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）合成ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１を、ＭＣＦ１０Ａ（ＭＣＦ１０Ａ電気泳動）、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー（ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー電気泳動）、ＭＤＡＭＢ２３１（ＭＤＡ－ＭＢ２３１電気泳動）及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー（ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー電気泳動）細胞から採取されたエクソソーム中で電気穿孔した。７２ｈ無細胞培養条件後に、エクソソームを採取した。７２ｈ電気穿孔及び培養の前後に、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１をｑＰＣＲにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の０ｈ後に比較した電気穿孔の７２ｈ後のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１の倍率変化を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの非存在下で電気穿孔されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームを、対象として用いて、ベースレベルを強調した。（Ｃ）合成ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１を、ＭＣＦ１０Ａ（ＭＣＦ１０Ａ電気泳動）、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー（ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー電気泳動）、ＭＤＡＭＢ２３１（ＭＤＡ－ＭＢ２３１電気泳動）及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー（ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー電気泳動）細胞から採取されたエクソソーム中に電気穿孔した。無細胞培養条件で７２ｈ後に、エクソソームを採取した。７２ｈの電気穿孔及び培養の前後に、ＭｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１をｑＰＣＲにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の０ｈ後（上グラフ）又は２４ｈ後（下グラフ）に比較した、電気穿孔の７２ｈ後のｍｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１の倍率変化を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの非存在下で電気穿孔されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームを、所定のベースレベルへの対照として用いた。（Ｄ）検出プローブを用いずダイシングアッセイ（ｄｉｃｉｎｇ　ａｓｓａｙ）から得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成ｐｒｅ－ｍｉＲ－１０ｂを、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及びクローン２から得たエクソソーム（それぞれＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　１　ｅｘｏｓ及びＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　２　ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　＋　ダイサーＡＢ）であった。（Ｅ）検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成ｐｒｅ－ｍｉＲ－２１を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及びクローン２から得たエクソソーム（それぞれＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　１　Ｅｘｏｓ及びＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　２　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　＋ダイサーＡＢ）であった。（Ｆ）検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成ｐｒｅ－ｃｅｌ－ｍｉＲ－１を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサーエクソソーム（ＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　ｅｘｏｓ）、及びダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　＋ダイサーＡＢ）であった。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図６－３】オンコソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして成熟ｍｉＲＮＡを生成する。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞のエクソソームを採取して、ゲルダナマイシン

と共に電気穿孔した。試料を無細胞培養条件で２４及び７２ｈ放置し、その後、エクソソームを抽出して、６種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）合成ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１を、ＭＣＦ１０Ａ（ＭＣＦ１０Ａ電気泳動）、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー（ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー電気泳動）、ＭＤＡＭＢ２３１（ＭＤＡ－ＭＢ２３１電気泳動）及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー（ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー電気泳動）細胞から採取されたエクソソーム中で電気穿孔した。７２ｈ無細胞培養条件後に、エクソソームを採取した。７２ｈ電気穿孔及び培養の前後に、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１をｑＰＣＲにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の０ｈ後に比較した電気穿孔の７２ｈ後のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１の倍率変化を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの非存在下で電気穿孔されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームを、対象として用いて、ベースレベルを強調した。（Ｃ）合成ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１を、ＭＣＦ１０Ａ（ＭＣＦ１０Ａ電気泳動）、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー（ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー電気泳動）、ＭＤＡＭＢ２３１（ＭＤＡ－ＭＢ２３１電気泳動）及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー（ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー電気泳動）細胞から採取されたエクソソーム中に電気穿孔した。無細胞培養条件で７２ｈ後に、エクソソームを採取した。７２ｈの電気穿孔及び培養の前後に、ＭｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１をｑＰＣＲにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の０ｈ後（上グラフ）又は２４ｈ後（下グラフ）に比較した、電気穿孔の７２ｈ後のｍｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１の倍率変化を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの非存在下で電気穿孔されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームを、所定のベースレベルへの対照として用いた。（Ｄ）検出プローブを用いずダイシングアッセイ（ｄｉｃｉｎｇ　ａｓｓａｙ）から得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成ｐｒｅ－ｍｉＲ－１０ｂを、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及びクローン２から得たエクソソーム（それぞれＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　１　ｅｘｏｓ及びＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　２　ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　＋　ダイサーＡＢ）であった。（Ｅ）検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成ｐｒｅ－ｍｉＲ－２１を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及びクローン２から得たエクソソーム（それぞれＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　１　Ｅｘｏｓ及びＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　２　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　＋ダイサーＡＢ）であった。（Ｆ）検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成ｐｒｅ－ｃｅｌ－ｍｉＲ－１を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサーエクソソーム（ＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　ｅｘｏｓ）、及びダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　＋ダイサーＡＢ）であった。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図６－４】オンコソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして成熟ｍｉＲＮＡを

生成する。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞のエクソソームを採取して、ゲルダナマイシンと共に電気穿孔した。試料を無細胞培養条件で２４及び７２ｈ放置し、その後、エクソソームを抽出して、６種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）合成ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１を、ＭＣＦ１０Ａ（ＭＣＦ１０Ａ電気泳動）、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー（ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー電気泳動）、ＭＤＡＭＢ２３１（ＭＤＡ－ＭＢ２３１電気泳動）及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー（ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー電気泳動）細胞から採取されたエクソソーム中で電気穿孔した。７２ｈ無細胞培養条件後に、エクソソームを採取した。７２ｈ電気穿孔及び培養の前後に、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１をｑＰＣＲにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の０ｈ後に比較した電気穿孔の７２ｈ後のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１の倍率変化を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの非存在下で電気穿孔されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームを、対象として用いて、ベースレベルを強調した。（Ｃ）合成ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１を、ＭＣＦ１０Ａ（ＭＣＦ１０Ａ電気泳動）、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー（ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー電気泳動）、ＭＤＡＭＢ２３１（ＭＤＡ－ＭＢ２３１電気泳動）及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー（ＭＤＡＭＢ２３１ｓｈダイサー電気泳動）細胞から採取されたエクソソーム中に電気穿孔した。無細胞培養条件で７２ｈ後に、エクソソームを採取した。７２ｈの電気穿孔及び培養の前後に、ＭｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１をｑＰＣＲにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の０ｈ後（上グラフ）又は２４ｈ後（下グラフ）に比較した、電気穿孔の７２ｈ後のｍｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１の倍率変化を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの非存在下で電気穿孔されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームを、所定のベースレベルへの対照として用いた。（Ｄ）検出プローブを用いずダイシングアッセイ（ｄｉｃｉｎｇ　ａｓｓａｙ）から得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成ｐｒｅ－ｍｉＲ－１０ｂを、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及びクローン２から得たエクソソーム（それぞれＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　１　ｅｘｏｓ及びＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　２　ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　＋　ダイサーＡＢ）であった。（Ｅ）検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成ｐｒｅ－ｍｉＲ－２１を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及びクローン２から得たエクソソーム（それぞれＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　１　Ｅｘｏｓ及びＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　２　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　＋ダイサーＡＢ）であった。（Ｆ）検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成ｐｒｅ－ｃｅｌ－ｍｉＲ－１を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　Ｅｘｏｓ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサーエクソソーム（ＭＤＡ２３１ｓｈダイサー　ｅｘｏｓ）、及びダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　＋ダイサーＡＢ）であった。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図７－１】オンコソームは、ダイサー依存的にレシピエント細胞におけるトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。（Ａ）抗ＰＴＥＮ抗体と、無細胞培養後にＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｂ）抗ＨＯＸＤ１０抗体と、無細胞培養条件後にＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｃ）３’ＵＴＲ－ＰＴＥＮ－ＷＴ、３’ＵＴＲＰＴＥＮ－Ｍｕｔ、３’ＵＴＲ－ＨＯＸＤ１０－ＷＴ及び３’ＵＴＲ－ＨＯＸＤ１０－Ｍｕｔで一過性トランスフェクトされ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から得られたオンコソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞中のルシフェラーゼレポータ活性を示すグラフ。（Ｄ）抗ＰＴＥＮ抗体（上パネル）及び抗ＨＯＸＤ１０抗体（中パネル）、並びに無細胞培養条件後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｅ）抗Ｓｍａｄ４抗体（上パネル）、ＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物、並びに抗ｍｉＲ－１８２－５ｐを有するＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム及び無細胞培養時間を含まないＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｆ）ＭＣＦ１０Ａ細胞、無細胞培養時間を含まずにＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ）、無細胞培養時間を含みＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１ｅｘｏｓ培養物）、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）の５日培養時のＭＴＴアッセイにより測定された細胞生存率であり、±ｓ．ｄ．として表している。＊　ｐ＝０．００２７。（Ｇ）コロニー形成アッセイにより、８日のＭＣＦ１０Ａ細胞培養、無細胞培養時間を含まずにＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ）、無細胞培養時間を含みＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ培養物）、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）の後に、培養プレート中でＭＴＴ試薬で標識されたコロニーの形成を示している。（Ｈ）上グラフ：ＭＣＦ１０Ａ細胞、ＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ培養物）、ダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）、及びのアクチン抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡＭＢ２３１オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓアクチンＡＢ）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。＊ｐ＝０．００５。下グラフ：ＭＣＦ１０Ａ細胞、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞及びオンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示している。

【図７－２】オンコソームは、ダイサー依存的にレシピエント細胞におけるトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。（Ａ）抗ＰＴＥＮ抗体と、無細胞培養後にＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｂ）抗ＨＯＸＤ１０抗体と、無細胞培養条件後にＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｃ

）３’ＵＴＲ－ＰＴＥＮ－ＷＴ、３’ＵＴＲＰＴＥＮ－Ｍｕｔ、３’ＵＴＲ－ＨＯＸＤ１０－ＷＴ及び３’ＵＴＲ－ＨＯＸＤ１０－Ｍｕｔで一過性トランスフェクトされ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から得られたオンコソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞中のルシフェラーゼレポータ活性を示すグラフ。（Ｄ）抗ＰＴＥＮ抗体（上パネル）及び抗ＨＯＸＤ１０抗体（中パネル）、並びに無細胞培養条件後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｅ）抗Ｓｍａｄ４抗体（上パネル）、ＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物、並びに抗ｍｉＲ－１８２－５ｐを有するＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム及び無細胞培養時間を含まないＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｆ）ＭＣＦ１０Ａ細胞、無細胞培養時間を含まずにＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ）、無細胞培養時間を含みＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１ｅｘｏｓ培養物）、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）の５日培養時のＭＴＴアッセイにより測定された細胞生存率であり、±ｓ．ｄ．として表している。＊　ｐ＝０．００２７。（Ｇ）コロニー形成アッセイにより、８日のＭＣＦ１０Ａ細胞培養、無細胞培養時間を含まずにＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ）、無細胞培養時間を含みＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ培養物）、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）の後に、培養プレート中でＭＴＴ試薬で標識されたコロニーの形成を示している。（Ｈ）上グラフ：ＭＣＦ１０Ａ細胞、ＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ培養物）、ダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）、及びのアクチン抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡＭＢ２３１オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓアクチンＡＢ）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。＊ｐ＝０．００５。下グラフ：ＭＣＦ１０Ａ細胞、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞及びオンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示している。

【図７－３】オンコソームは、ダイサー依存的にレシピエント細胞におけるトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。（Ａ）抗ＰＴＥＮ抗体と、無細胞培養後にＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｂ）抗ＨＯＸＤ１０抗体と、無細胞培養条件後にＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｃ）３’ＵＴＲ－ＰＴＥＮ－ＷＴ、３’ＵＴＲＰＴＥＮ－Ｍｕｔ、３’ＵＴＲ－ＨＯＸＤ１０－ＷＴ及び３’ＵＴＲ－ＨＯＸＤ１０－Ｍｕｔで一過性トランスフェクトされ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から得られたオンコソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞中のルシフェラーゼレポータ活性を示すグラフ。（Ｄ）抗ＰＴＥＮ抗体（上パネル）及び抗ＨＯＸＤ１０抗体（中パネル）、並びに無細胞培養条件後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照とし

て用いた。（Ｅ）抗Ｓｍａｄ４抗体（上パネル）、ＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物、並びに抗ｍｉＲ－１８２－５ｐを有するＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム及び無細胞培養時間を含まないＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｆ）ＭＣＦ１０Ａ細胞、無細胞培養時間を含まずにＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ）、無細胞培養時間を含みＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１ｅｘｏｓ培養物）、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）の５日培養時のＭＴＴアッセイにより測定された細胞生存率であり、±ｓ．ｄ．として表している。＊　ｐ＝０．００２７。（Ｇ）コロニー形成アッセイにより、８日のＭＣＦ１０Ａ細胞培養、無細胞培養時間を含まずにＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ）、無細胞培養時間を含みＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ培養物）、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）の後に、培養プレート中でＭＴＴ試薬で標識されたコロニーの形成を示している。（Ｈ）上グラフ：ＭＣＦ１０Ａ細胞、ＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ培養物）、ダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）、及びのアクチン抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡＭＢ２３１オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓアクチンＡＢ）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。＊ｐ＝０．００５。下グラフ：ＭＣＦ１０Ａ細胞、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞及びオンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示している。

【図７－４】オンコソームは、ダイサー依存的にレシピエント細胞におけるトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。（Ａ）抗ＰＴＥＮ抗体と、無細胞培養後にＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｂ）抗ＨＯＸＤ１０抗体と、無細胞培養条件後にＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｃ）３’ＵＴＲ－ＰＴＥＮ－ＷＴ、３’ＵＴＲＰＴＥＮ－Ｍｕｔ、３’ＵＴＲ－ＨＯＸＤ１０－ＷＴ及び３’ＵＴＲ－ＨＯＸＤ１０－Ｍｕｔで一過性トランスフェクトされ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から得られたオンコソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞中のルシフェラーゼレポータ活性を示すグラフ。（Ｄ）抗ＰＴＥＮ抗体（上パネル）及び抗ＨＯＸＤ１０抗体（中パネル）、並びに無細胞培養条件後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｅ）抗Ｓｍａｄ４抗体（上パネル）、ＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物、並びに抗ｍｉＲ－１８２－５ｐを有するＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム及び無細胞培養時間を含まないＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｆ）ＭＣＦ１０Ａ細胞、無細胞培養時間を含まずにＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ）、無細胞培養時間を含みＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞

＋　ＭＤＡ２３１ｅｘｏｓ培養物）、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）の５日培養時のＭＴＴアッセイにより測定された細胞生存率であり、±ｓ．ｄ．として表している。＊　ｐ＝０．００２７。（Ｇ）コロニー形成アッセイにより、８日のＭＣＦ１０Ａ細胞培養、無細胞培養時間を含まずにＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ）、無細胞培養時間を含みＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ培養物）、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）の後に、培養プレート中でＭＴＴ試薬で標識されたコロニーの形成を示している。（Ｈ）上グラフ：ＭＣＦ１０Ａ細胞、ＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ培養物）、ダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）、及びのアクチン抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡＭＢ２３１オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞　＋　ＭＤＡ２３１　ｅｘｏｓアクチンＡＢ）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。＊ｐ＝０．００５。下グラフ：ＭＣＦ１０Ａ細胞、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞及びオンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示している。

【図８－１】乳癌患者の血清は、ダイサーを含み、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングする。（Ａ）ヒト及びマウスのダイサーを認識する抗ダイサー抗体と、ヒト腫瘍で異種移植されたマウスから採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット（図１８Ａに示す）。ＯＶＡ１－５は、ヒト卵巣異種移植片を表し；ＥＮＤ１－３は、ヒト子宮内膜異種移植片を表し；ＢＲＳＴ１及び２は、ヒト乳癌異種移植片を表す。４Ｔ１エクソソーム及び細胞を、ネズミダイサーの対照として用いた。ｈｓａ－ダイサーは、ヒトダイサー分子量を表し、ｍｍｕ－ダイサーは、ネズミダイサー分子量を表す。負荷対照としての膜のクーマシー染色については図１８Ｄを参照されたい。（Ｂ）８名の健常ドナー（左グラフ）及び１１名の乳癌患者（右グラフ）の血清から抽出されたエクソソームのサイズ分布を示すＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析。サイズをより上手く示すために、試料の濃度を標準化した。（Ｃ）乳癌患者の血清から採取されたエクソソームの透過型電子顕微鏡写真。（Ｄ）ＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析により評価された８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の血清から得たエクソソームの濃度。＊　ｐ＝０．０１２。（Ｅ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｐｒｅ－ｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｆ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのドットプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表す。パネルＥ及びＦは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｇ）ＭＣＦ１０Ａ細胞、健常なドナーの

エクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（Ｈ１－８）及び乳癌患者のエクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＢＣ１－１１）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのＸ軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｈ）抗ダイサー抗体と、５名の健常個体（Ｃ４６、Ｃ４５、Ｃ４４、Ｃ４３及びＣ４１）及び４名の転移性乳癌（Ｍｅｔ２１９、Ｍｅｔ３５４、Ｍｅｔ２９９及びＭｅｔ３５６）から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてＣＤ９ブロットを用いた免疫ブロット。（Ｉ）ＨＤＦ及びオンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）で処置されたＨＤＦの倍加時間。＊　ｐ＝０．０１１４。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。

【図８－２】乳癌患者の血清は、ダイサーを含み、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングする。（Ａ）ヒト及びマウスのダイサーを認識する抗ダイサー抗体と、ヒト腫瘍で異種移植されたマウスから採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット（図１８Ａに示す）。ＯＶＡ１－５は、ヒト卵巣異種移植片を表し；ＥＮＤ１－３は、ヒト子宮内膜異種移植片を表し；ＢＲＳＴ１及び２は、ヒト乳癌異種移植片を表す。４Ｔ１エクソソーム及び細胞を、ネズミダイサーの対照として用いた。ｈｓａ－ダイサーは、ヒトダイサー分子量を表し、ｍｍｕ－ダイサーは、ネズミダイサー分子量を表す。負荷対照としての膜のクーマシー染色については図１８Ｄを参照されたい。（Ｂ）８名の健常ドナー（左グラフ）及び１１名の乳癌患者（右グラフ）の血清から抽出されたエクソソームのサイズ分布を示すＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析。サイズをより上手く示すために、試料の濃度を標準化した。（Ｃ）乳癌患者の血清から採取されたエクソソームの透過型電子顕微鏡写真。（Ｄ）ＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析により評価された８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の血清から得たエクソソームの濃度。＊　ｐ＝０．０１２。（Ｅ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｐｒｅ－ｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｆ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのドットプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表す。パネルＥ及びＦは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｇ）ＭＣＦ１０Ａ細胞、健常なドナーのエクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（Ｈ１－８）及び乳癌患者のエクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＢＣ１－１１）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのＸ軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｈ）抗ダイサー抗体と、５名の健常個体（Ｃ４６、Ｃ４５、Ｃ４４、Ｃ４３及びＣ４１）及び４名の転移性乳癌（Ｍｅｔ２１９、Ｍｅｔ３５４、Ｍｅｔ２９９及びＭｅｔ３５６）から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてＣＤ９ブロットを用いた免疫ブロット。（Ｉ）ＨＤＦ及びオンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）で処置されたＨＤＦの倍加時間。＊　ｐ＝０．０１１４。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。

【図８－３】乳癌患者の血清は、ダイサーを含み、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングする。（Ａ）ヒト及びマウスのダイサーを認識する抗ダイサー抗体と、ヒト腫瘍で異種移植されたマウスから採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット（図１８Ａに示す）。ＯＶＡ１－５は、ヒト卵巣異種移植片を表し；ＥＮＤ１－３は、ヒト子宮内膜異種移植片を表し；ＢＲＳＴ１及び２は、ヒト乳癌異種移植片を表す。４Ｔ１エクソソーム及び細胞を、ネズミダイサーの対照として用いた。ｈｓａ－ダイサーは、ヒトダイサー分子量を表し、ｍｍｕ－ダイサーは、ネズミダイサー分子量を表す。負荷対照としての膜のクーマシー染色については図１８Ｄを参照されたい。（Ｂ）８名の健常ドナー（左グラフ）及び１１名の乳癌患者（右グラフ）の血清から抽出されたエクソソームのサイズ分布を示すＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析。サイズをより上手く示すために、試料の濃度を標準化した。（Ｃ）乳癌患者の血清から採取されたエクソソームの透過型電子顕微鏡写真。（Ｄ）ＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析により評価された８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の血清から得たエクソソームの濃度。＊　ｐ＝０．０１２。（Ｅ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｐｒｅ－ｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｆ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのドットプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表す。パネルＥ及びＦは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｇ）ＭＣＦ１０Ａ細胞、健常なドナーのエクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（Ｈ１－８）及び乳癌患者のエクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＢＣ１－１１）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのＸ軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｈ）抗ダイサー抗体と、５名の健常個体（Ｃ４６、Ｃ４５、Ｃ４４、Ｃ４３及びＣ４１）及び４名の転移性乳癌（Ｍｅｔ２１９、Ｍｅｔ３５４、Ｍｅｔ２９９及びＭｅｔ３５６）から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてＣＤ９ブロットを用いた免疫ブロット。（Ｉ）ＨＤＦ及びオンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）で処置されたＨＤＦの倍加時間。＊　ｐ＝０．０１１４。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。

【図８－４】乳癌患者の血清は、ダイサーを含み、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングする。（Ａ）ヒト及びマウスのダイサーを認識する抗ダイサー抗体と、ヒト腫瘍で異種移植されたマウスから採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット（図１８Ａに示す）。ＯＶＡ１－５は、ヒト卵巣異種移植片を表し；ＥＮＤ１－３は、ヒト子宮内膜異種移植片を表し；ＢＲＳＴ１及び２は、ヒト乳癌異種移植片を表す。４Ｔ１エクソソーム及び細胞を、ネズミダイサーの対照として用いた。ｈｓａ－ダイサーは、ヒトダイサー分子量を表し、ｍｍｕ－ダイサーは、ネズミダイサー分子量を表す。負荷対照としての膜のクーマシー染色については図１８Ｄを参照されたい。（Ｂ）８名の健常ドナー（左グラフ）及び１１名の乳癌患者（右グラフ）の血清から抽出されたエクソソームのサイズ分布を示すＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析。サイズをより上手く示すために、試料の濃度を標準化した。（Ｃ）乳癌患者の血清から採取されたエクソ

ソームの透過型電子顕微鏡写真。（Ｄ）ＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析により評価された８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の血清から得たエクソソームの濃度。＊　ｐ＝０．０１２。（Ｅ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｐｒｅ－ｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｆ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのドットプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表す。パネルＥ及びＦは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｇ）ＭＣＦ１０Ａ細胞、健常なドナーのエクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（Ｈ１－８）及び乳癌患者のエクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＢＣ１－１１）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのＸ軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｈ）抗ダイサー抗体と、５名の健常個体（Ｃ４６、Ｃ４５、Ｃ４４、Ｃ４３及びＣ４１）及び４名の転移性乳癌（Ｍｅｔ２１９、Ｍｅｔ３５４、Ｍｅｔ２９９及びＭｅｔ３５６）から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてＣＤ９ブロットを用いた免疫ブロット。（Ｉ）ＨＤＦ及びオンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）で処置されたＨＤＦの倍加時間。＊　ｐ＝０．０１１４。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。

【図８－５】乳癌患者の血清は、ダイサーを含み、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングする。（Ａ）ヒト及びマウスのダイサーを認識する抗ダイサー抗体と、ヒト腫瘍で異種移植されたマウスから採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット（図１８Ａに示す）。ＯＶＡ１－５は、ヒト卵巣異種移植片を表し；ＥＮＤ１－３は、ヒト子宮内膜異種移植片を表し；ＢＲＳＴ１及び２は、ヒト乳癌異種移植片を表す。４Ｔ１エクソソーム及び細胞を、ネズミダイサーの対照として用いた。ｈｓａ－ダイサーは、ヒトダイサー分子量を表し、ｍｍｕ－ダイサーは、ネズミダイサー分子量を表す。負荷対照としての膜のクーマシー染色については図１８Ｄを参照されたい。（Ｂ）８名の健常ドナー（左グラフ）及び１１名の乳癌患者（右グラフ）の血清から抽出されたエクソソームのサイズ分布を示すＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析。サイズをより上手く示すために、試料の濃度を標準化した。（Ｃ）乳癌患者の血清から採取されたエクソソームの透過型電子顕微鏡写真。（Ｄ）ＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析により評価された８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の血清から得たエクソソームの濃度。＊　ｐ＝０．０１２。（Ｅ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｐｒｅ－ｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｆ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び

７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのドットプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表す。パネルＥ及びＦは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｇ）ＭＣＦ１０Ａ細胞、健常なドナーのエクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（Ｈ１－８）及び乳癌患者のエクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＢＣ１－１１）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのＸ軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｈ）抗ダイサー抗体と、５名の健常個体（Ｃ４６、Ｃ４５、Ｃ４４、Ｃ４３及びＣ４１）及び４名の転移性乳癌（Ｍｅｔ２１９、Ｍｅｔ３５４、Ｍｅｔ２９９及びＭｅｔ３５６）から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてＣＤ９ブロットを用いた免疫ブロット。（Ｉ）ＨＤＦ及びオンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）で処置されたＨＤＦの倍加時間。＊　ｐ＝０．０１１４。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。

【図８－６】乳癌患者の血清は、ダイサーを含み、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングする。（Ａ）ヒト及びマウスのダイサーを認識する抗ダイサー抗体と、ヒト腫瘍で異種移植されたマウスから採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット（図１８Ａに示す）。ＯＶＡ１－５は、ヒト卵巣異種移植片を表し；ＥＮＤ１－３は、ヒト子宮内膜異種移植片を表し；ＢＲＳＴ１及び２は、ヒト乳癌異種移植片を表す。４Ｔ１エクソソーム及び細胞を、ネズミダイサーの対照として用いた。ｈｓａ－ダイサーは、ヒトダイサー分子量を表し、ｍｍｕ－ダイサーは、ネズミダイサー分子量を表す。負荷対照としての膜のクーマシー染色については図１８Ｄを参照されたい。（Ｂ）８名の健常ドナー（左グラフ）及び１１名の乳癌患者（右グラフ）の血清から抽出されたエクソソームのサイズ分布を示すＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析。サイズをより上手く示すために、試料の濃度を標準化した。（Ｃ）乳癌患者の血清から採取されたエクソソームの透過型電子顕微鏡写真。（Ｄ）ＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析により評価された８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の血清から得たエクソソームの濃度。＊　ｐ＝０．０１２。（Ｅ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｐｒｅ－ｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｆ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのドットプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表す。パネルＥ及びＦは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｇ）ＭＣＦ１０Ａ細胞、健常なドナーのエクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（Ｈ１－８）及び乳癌患者のエクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＢＣ１－１１）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのＸ軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、±ｓ．ｄ．として表し

ている。（Ｈ）抗ダイサー抗体と、５名の健常個体（Ｃ４６、Ｃ４５、Ｃ４４、Ｃ４３及びＣ４１）及び４名の転移性乳癌（Ｍｅｔ２１９、Ｍｅｔ３５４、Ｍｅｔ２９９及びＭｅｔ３５６）から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてＣＤ９ブロットを用いた免疫ブロット。（Ｉ）ＨＤＦ及びオンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）で処置されたＨＤＦの倍加時間。＊　ｐ＝０．０１１４。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。

【図８－７】乳癌患者の血清は、ダイサーを含み、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングする。（Ａ）ヒト及びマウスのダイサーを認識する抗ダイサー抗体と、ヒト腫瘍で異種移植されたマウスから採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット（図１８Ａに示す）。ＯＶＡ１－５は、ヒト卵巣異種移植片を表し；ＥＮＤ１－３は、ヒト子宮内膜異種移植片を表し；ＢＲＳＴ１及び２は、ヒト乳癌異種移植片を表す。４Ｔ１エクソソーム及び細胞を、ネズミダイサーの対照として用いた。ｈｓａ－ダイサーは、ヒトダイサー分子量を表し、ｍｍｕ－ダイサーは、ネズミダイサー分子量を表す。負荷対照としての膜のクーマシー染色については図１８Ｄを参照されたい。（Ｂ）８名の健常ドナー（左グラフ）及び１１名の乳癌患者（右グラフ）の血清から抽出されたエクソソームのサイズ分布を示すＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析。サイズをより上手く示すために、試料の濃度を標準化した。（Ｃ）乳癌患者の血清から採取されたエクソソームの透過型電子顕微鏡写真。（Ｄ）ＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析により評価された８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の血清から得たエクソソームの濃度。＊　ｐ＝０．０１２。（Ｅ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｐｒｅ－ｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表し、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｆ）エクソソームを、８名の健常ドナー及び１１名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、６種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中の２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡに比較して定量した。グラフのドットプロットは、２４ｈエクソソームに比較した７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの平均倍率変化を表す。パネルＥ及びＦは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｇ）ＭＣＦ１０Ａ細胞、健常なドナーのエクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（Ｈ１－８）及び乳癌患者のエクソソームと混合されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＢＣ１－１１）を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのＸ軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｈ）抗ダイサー抗体と、５名の健常個体（Ｃ４６、Ｃ４５、Ｃ４４、Ｃ４３及びＣ４１）及び４名の転移性乳癌（Ｍｅｔ２１９、Ｍｅｔ３５４、Ｍｅｔ２９９及びＭｅｔ３５６）から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてＣＤ９ブロットを用いた免疫ブロット。（Ｉ）ＨＤＦ及びオンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１）で処置されたＨＤＦの倍加時間。＊　ｐ＝０．０１１４。イメージＪソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。

【図９】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質ＣＤ４３はダイサーをエクソソーム中に動員する。（Ａ）ダイサー抗体（ＩＰ　ダイサー）又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞のタンパク質抽出物中のＣＤ４３の免疫ブロット（上パネルの、それぞれ右及び中央レーン）。ダイサー単独での免疫ブロットを、対照として用いた（下パネル）。（Ｂ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソーム及びＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｓｉＣＤ４３由

来エクソソームのタンパク質抽出物中のダイサーの免疫ブロット。ＣＤ９免疫ブロットを負荷対照として用いた。イメージＪソフトウエアを利用して、定量を実施した。
【図１０Ａ】エクソソームの特徴づけ。（Ａ）遠心分離管の底のＰＫＨ２６染色エクソソームの写真。挿入写真は、エクソソームのデジタルズーム画像を表す。（Ｂ）ＬＳＳスペクトルを回収するために用いられた実験系の略図。（Ｃ）ＭＣＦ１０Ａ、ＮＭｕＭＧ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞の５日培養時のＭＴＴアッセイにより測定された細胞生存率。（Ｄ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞のヨウ化プロピジウム（ＰＩ）及びアネキシンＶについてのフローサイトメトリー分析。エトポシドで処置されたＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を、アポトーシスの陽性対照として用いた。（Ｅ）陽性対照としてＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を用い、エクソソームの負荷対照としてＴＳＧ１０１を用いた、エクソソーム中のチトクロムＣの免疫ブロット分析。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。
【図１０Ｂ】エクソソームの特徴づけ。（Ａ）遠心分離管の底のＰＫＨ２６染色エクソソームの写真。挿入写真は、エクソソームのデジタルズーム画像を表す。（Ｂ）ＬＳＳスペクトルを回収するために用いられた実験系の略図。（Ｃ）ＭＣＦ１０Ａ、ＮＭｕＭＧ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞の５日培養時のＭＴＴアッセイにより測定された細胞生存率。（Ｄ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞のヨウ化プロピジウム（ＰＩ）及びアネキシンＶについてのフローサイトメトリー分析。エトポシドで処置されたＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を、アポトーシスの陽性対照として用いた。（Ｅ）陽性対照としてＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を用い、エクソソームの負荷対照としてＴＳＧ１０１を用いた、エクソソーム中のチトクロムＣの免疫ブロット分析。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。
【図１０Ｃ】エクソソームの特徴づけ。（Ａ）遠心分離管の底のＰＫＨ２６染色エクソソームの写真。挿入写真は、エクソソームのデジタルズーム画像を表す。（Ｂ）ＬＳＳスペクトルを回収するために用いられた実験系の略図。（Ｃ）ＭＣＦ１０Ａ、ＮＭｕＭＧ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞の５日培養時のＭＴＴアッセイにより測定された細胞生存率。（Ｄ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞のヨウ化プロピジウム（ＰＩ）及びアネキシンＶについてのフローサイトメトリー分析。エトポシドで処置されたＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を、アポトーシスの陽性対照として用いた。（Ｅ）陽性対照としてＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を用い、エクソソームの負荷対照としてＴＳＧ１０１を用いた、エクソソーム中のチトクロムＣの免疫ブロット分析。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。
【図１０Ｄ】エクソソームの特徴づけ。（Ａ）遠心分離管の底のＰＫＨ２６染色エクソソームの写真。挿入写真は、エクソソームのデジタルズーム画像を表す。（Ｂ）ＬＳＳスペクトルを回収するために用いられた実験系の略図。（Ｃ）ＭＣＦ１０Ａ、ＮＭｕＭＧ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞の５日培養時のＭＴＴアッセイにより測定された細胞生存率。（Ｄ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞のヨウ化プロピジウム（ＰＩ）及びアネキシンＶについてのフローサイトメトリー分析。エトポシドで処置されたＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を、アポトーシスの陽性対照として用いた。（Ｅ）陽性対照としてＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を用い、エクソソームの負荷対照としてＴＳＧ１０１を用いた、エクソソーム中のチトクロムＣの免疫ブロット分析。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。
【図１０Ｅ】エクソソームの特徴づけ。（Ａ）遠心分離管の底のＰＫＨ２６染色エクソソームの写真。挿入写真は、エクソソームのデジタルズーム画像を表す。（Ｂ）ＬＳＳスペクトルを回収するために用いられた実験系の略図。（Ｃ）ＭＣＦ１０Ａ、ＮＭｕＭＧ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞の５日培養時のＭＴＴアッセイにより測定された細胞生存率。（Ｄ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞のヨウ化プロピジウム（ＰＩ）及びアネキシンＶについてのフローサイトメトリー分析。エトポシドで処置されたＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を、アポトーシスの陽性対照として用いた。（Ｅ）陽性対照としてＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を用い、エクソソームの負荷対照としてＴＳＧ１０１を用いた、エクソソーム

中のチトクロムＣの免疫ブロット分析。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。
【図１１Ａ】オンコソームは、ノルモソームに比較してｍｉＲＮＡが豊富である。（Ａ）ヒト乳房ＭＣＦ１０Ａ（非腫瘍原性）及びＭＤＡ－ＭＢ２３１（乳癌）細胞株の、ヌクレオチド（ｎｔ）あたりの蛍光単位（ＦＵ）で示されたバイオアナライザーグラフ表示（グラフ）、並びにＲＮＡ量のゲル画像（右の画像）。（Ｂ）４Ｔ１、ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。グラフは、それぞれ２４及び７２ｈの無細胞培養後のノルモソームと比較した、２４及び７２ｈの無細胞培養後のオンコソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして示している。（Ｃ）１５種の成熟ｍｉＲＮＡ（表４参照）を、ＭＣＦ１０Ａ（左グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１（中央グラフ）及び４Ｔ１（右グラフ）細胞並びにそれらの各エクソソーム中でｑＰＣＲにより定量した。エクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、細胞中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。ＴＳ：腫瘍サプレッサｍｉＲＮＡ；ＯＮＣ：発癌性ｍｉＲＮＡ。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして示している。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。データは、図２Ｃの倍率変化平均グラフの詳細なグラフに対応する。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）７２ｈの無細胞培養後のＭＣＦ７及び６７ＮＲ細胞中と、それらの各エクソソーム中との間の、１５種の定量されたｍｉＲＮＡの相関プロット。
【図１１Ｂ】オンコソームは、ノルモソームに比較してｍｉＲＮＡが豊富である。（Ａ）ヒト乳房ＭＣＦ１０Ａ（非腫瘍原性）及びＭＤＡ－ＭＢ２３１（乳癌）細胞株の、ヌクレオチド（ｎｔ）あたりの蛍光単位（ＦＵ）で示されたバイオアナライザーグラフ表示（グラフ）、並びにＲＮＡ量のゲル画像（右の画像）。（Ｂ）４Ｔ１、ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。グラフは、それぞれ２４及び７２ｈの無細胞培養後のノルモソームと比較した、２４及び７２ｈの無細胞培養後のオンコソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして示している。（Ｃ）１５種の成熟ｍｉＲＮＡ（表４参照）を、ＭＣＦ１０Ａ（左グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１（中央グラフ）及び４Ｔ１（右グラフ）細胞並びにそれらの各エクソソーム中でｑＰＣＲにより定量した。エクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、細胞中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。ＴＳ：腫瘍サプレッサｍｉＲＮＡ；ＯＮＣ：発癌性ｍｉＲＮＡ。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして示している。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。データは、図２Ｃの倍率変化平均グラフの詳細なグラフに対応する。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）７２ｈの無細胞培養後のＭＣＦ７及び６７ＮＲ細胞中と、それらの各エクソソーム中との間の、１５種の定量されたｍｉＲＮＡの相関プロット。

【図１１Ｃ】オンコソームは、ノルモソームに比較してｍｉＲＮＡが豊富である。（Ａ）ヒト乳房ＭＣＦ１０Ａ（非腫瘍原性）及びＭＤＡ－ＭＢ２３１（乳癌）細胞株の、ヌクレオチド（ｎｔ）あたりの蛍光単位（ＦＵ）で示されたバイオアナライザーグラフ表示（グラフ）、並びにＲＮＡ量のゲル画像（右の画像）。（Ｂ）４Ｔ１、ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。グラフは、それぞれ２４及び７２ｈの無細胞培養後のノルモソームと比較した、２４及び７２ｈの無細胞培養後のオンコソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして示している。（Ｃ）１５種の成熟ｍｉＲＮＡ（表４参照）を、ＭＣＦ１０Ａ（左グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１（中央グラフ）及び４Ｔ１（右グラフ）細胞並びにそれらの各エクソソーム中でｑＰＣＲにより定量した。エクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、細胞中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。ＴＳ：腫瘍サプレッサｍｉＲＮＡ；ＯＮＣ：発癌性ｍｉＲＮＡ。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして示している。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。データは、図２Ｃの倍率変化平均グラフの詳細なグラフに対応する。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）７２ｈの無細胞培養後のＭＣＦ７及び６７ＮＲ細胞中と、それらの各エクソソーム中との間の、１５種の定量されたｍｉＲＮＡの相関プロット。

【図１１Ｄ】オンコソームは、ノルモソームに比較してｍｉＲＮＡが豊富である。（Ａ）ヒト乳房ＭＣＦ１０Ａ（非腫瘍原性）及びＭＤＡ－ＭＢ２３１（乳癌）細胞株の、ヌクレオチド（ｎｔ）あたりの蛍光単位（ＦＵ）で示されたバイオアナライザーグラフ表示（グラフ）、並びにＲＮＡ量のゲル画像（右の画像）。（Ｂ）４Ｔ１、ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。グラフは、それぞれ２４及び７２ｈの無細胞培養後のノルモソームと比較した、２４及び７２ｈの無細胞培養後のオンコソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして示している。（Ｃ）１５種の成熟ｍｉＲＮＡ（表４参照）を、ＭＣＦ１０Ａ（左グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１（中央グラフ）及び４Ｔ１（右グラフ）細胞並びにそれらの各エクソソーム中でｑＰＣＲにより定量した。エクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、細胞中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。ＴＳ：腫瘍サプレッサｍｉＲＮＡ；ＯＮＣ：発癌性ｍｉＲＮＡ。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして示している。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。データは、図２Ｃの倍率変化平均グラフの詳細なグラフに対応する。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）７２ｈの無細胞培養後のＭＣＦ７及び６７ＮＲ細胞中と、それらの各エクソソーム中との間の、１５種の定量されたｍｉＲＮＡの相関プロット。

【図１１Ｅ】オンコソームは、ノルモソームに比較してｍｉＲＮＡが豊富である。（Ａ）ヒト乳房ＭＣＦ１０Ａ（非腫瘍原性）及びＭＤＡ－ＭＢ２３１（乳癌）細胞株の、ヌクレ

オチド（ｎｔ）あたりの蛍光単位（ＦＵ）で示されたバイオアナライザーグラフ表示（グラフ）、並びにＲＮＡ量のゲル画像（右の画像）。（Ｂ）４Ｔ１、ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを採取して、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。グラフは、それぞれ２４及び７２ｈの無細胞培養後のノルモソームと比較した、２４及び７２ｈの無細胞培養後のオンコソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして示している。（Ｃ）１５種の成熟ｍｉＲＮＡ（表４参照）を、ＭＣＦ１０Ａ（左グラフ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１（中央グラフ）及び４Ｔ１（右グラフ）細胞並びにそれらの各エクソソーム中でｑＰＣＲにより定量した。エクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、細胞中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。ＴＳ：腫瘍サプレッサｍｉＲＮＡ；ＯＮＣ：発癌性ｍｉＲＮＡ。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして示している。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、２４ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。データは、図２Ｃの倍率変化平均グラフの詳細なグラフに対応する。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）７２ｈの無細胞培養後のＭＣＦ７及び６７ＮＲ細胞中と、それらの各エクソソーム中との間の、１５種の定量されたｍｉＲＮＡの相関プロット。

【図１２－１】エクソソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを含む。（Ａ）これまで定量された成熟ｍｉＲＮＡに対応する１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（表４参照）を、ＮＭｕＭＧ及び４Ｔ１エクソソーム中でｑＰＣＲにより定量した。存在量を反映するために、各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットした。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）ＮＭｕＭＧ及び４Ｔ１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４ｈの無細胞培養後のと比較した、７２ｈの無細胞培養後のＮＭｕＭＧ及び４Ｔ１エクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｃ）対照細胞への倍率変化として比較した、２つの一過性トランスフェクトされたｓｉＲＮＡ標的化ＸＰＯ５を含むＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞のＸＰＯ５　ｍＲＮＡ発現。（Ｄ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞をＸＰＯ５　ｓｉＲＮＡ構築物でトランスフェクトして、ｍｉＲ－２１発現をトランスフェクトの１２ｈ後の複数の時点（０ｈ、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２ｈ及び９６ｈ）で評価した。長時間遠心分離の影響を示すための比較として、ＸＰＯ５　ｓｉＲＮＡ構築物でトランスフェクトされたＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を、４℃で３時間遠心分離して、培地に戻した。ＭｉＲ－２１発現を、遠心分離後の複数の時点（０ｈ、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２ｈ及び９６ｈ）で評価した。ｐｒｅ－ｍｉＲ２１からｍｉＲ－２１へのプロセシングは、遠心分離された細胞では遅延している（緑のバー）。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）ＮＭｕＭＧ及び４Ｔ１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に０ｈ、２４ｈ、７２ｈ及び９６ｈ保持した。エクソソームを異なる時点で抽出して、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットした。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図１２－２】エクソソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを含む。（Ａ）これまで定量された成熟ｍｉＲＮＡに対応する１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（表４参照）を、ＮＭｕＭＧ及び

４Ｔ１エクソソーム中でｑＰＣＲにより定量した。存在量を反映するために、各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットした。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）ＮＭｕＭＧ及び４Ｔ１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４ｈの無細胞培養後のと比較した、７２ｈの無細胞培養後のＮＭｕＭＧ及び４Ｔ１エクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｃ）対照細胞への倍率変化として比較した、２つの一過性トランスフェクトされたｓｉＲＮＡ標的化ＸＰＯ５を含むＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞のＸＰＯ５　ｍＲＮＡ発現。（Ｄ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞をＸＰＯ５　ｓｉＲＮＡ構築物でトランスフェクトして、ｍｉＲ－２１発現をトランスフェクトの１２ｈ後の複数の時点（０ｈ、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２ｈ及び９６ｈ）で評価した。長時間遠心分離の影響を示すための比較として、ＸＰＯ５　ｓｉＲＮＡ構築物でトランスフェクトされたＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を、４℃で３時間遠心分離して、培地に戻した。ＭｉＲ－２１発現を、遠心分離後の複数の時点（０ｈ、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２ｈ及び９６ｈ）で評価した。ｐｒｅ－ｍｉＲ２１からｍｉＲ－２１へのプロセシングは、遠心分離された細胞では遅延している（緑のバー）。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）ＮＭｕＭＧ及び４Ｔ１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に０ｈ、２４ｈ、７２ｈ及び９６ｈ保持した。エクソソームを異なる時点で抽出して、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットした。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図１２－３】エクソソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを含む。（Ａ）これまで定量された成熟ｍｉＲＮＡに対応する１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（表４参照）を、ＮＭｕＭＧ及び４Ｔ１エクソソーム中でｑＰＣＲにより定量した。存在量を反映するために、各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットした。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ｓ．ｄ．として表している。（Ｂ）ＮＭｕＭＧ及び４Ｔ１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４ｈの無細胞培養後のと比較した、７２ｈの無細胞培養後のＮＭｕＭＧ及び４Ｔ１エクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｃ）対照細胞への倍率変化として比較した、２つの一過性トランスフェクトされたｓｉＲＮＡ標的化ＸＰＯ５を含むＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞のＸＰＯ５　ｍＲＮＡ発現。（Ｄ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞をＸＰＯ５　ｓｉＲＮＡ構築物でトランスフェクトして、ｍｉＲ－２１発現をトランスフェクトの１２ｈ後の複数の時点（０ｈ、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２ｈ及び９６ｈ）で評価した。長時間遠心分離の影響を示すための比較として、ＸＰＯ５　ｓｉＲＮＡ構築物でトランスフェクトされたＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を、４℃で３時間遠心分離して、培地に戻した。ＭｉＲ－２１発現を、遠心分離後の複数の時点（０ｈ、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２ｈ及び９６ｈ）で評価した。ｐｒｅ－ｍｉＲ２１からｍｉＲ－２１へのプロセシングは、遠心分離された細胞では遅延している（緑のバー）。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験３回の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。（Ｅ）ＮＭｕＭＧ及び４Ｔ１細胞から採取されたエクソソームをＤＭＥＭ培地に再懸濁して、無細胞培養条件に０ｈ、２４ｈ、７２ｈ及び９６ｈ保持した。エクソソームを異なる時点で抽出して、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのΔＣｔ値の逆数をプロットした。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図１３－１】オンコソームはダイサーを含む。（Ａ）ＭＣＦ１０Ａ細胞由来エクソソーム中の抗ダイサー抗体（右写真）及び陰性対照（左写真）を用いた免疫金標識により得られた透過型電子顕微鏡写真。ＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームの陽性免疫金標識に関して図４Ｂと比較されたい。（Ｂ）抗ＧＦＰ抗体　ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソームを用いた免疫金標識により得られた透過型電子顕微鏡写真。（Ｃ）エンプティベクター（ｐＣＭＶ－Ｔａｇ４Ｂ；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びＦｌａｇ－ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中の抗Ｆｌａｇ抗体（上パネル）を用いた免疫ブロット。β－アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｄ）それぞれＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈスクランブル、並びにＭＣＦ１０Ａｓｈダイサークローン１及び２（ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサークローン１及びＭＣＦ１０Ａｓｈダイサークローン２）細胞において抗ダイサー抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β－アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｅ）それぞれＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、並びにＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及び２（ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン２）細胞において抗ダイサー抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β－アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。イメージＪソフトウエアを用いて、免疫ブロットの定量を実施した。（Ｆ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの５％を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（Ｇ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（５％）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（Ｈ）Ａ５４９（ヒト肺癌）、ＳＷ４８０（ヒト結腸癌）、ＨｅＬａ（ヒト子宮頸癌）及び４Ｔ０７（ネズミ乳癌）細胞株からのオンコソーム中のダイサーの免疫ブロット。ＴＳＧ１０１免疫ブロットを用いて、エクソソーム及び負荷の存在を確認した（下ブロット）。

【図１３－２】オンコソームはダイサーを含む。（Ａ）ＭＣＦ１０Ａ細胞由来エクソソーム中の抗ダイサー抗体（右写真）及び陰性対照（左写真）を用いた免疫金標識により得られた透過型電子顕微鏡写真。ＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームの陽性免疫金標識に関して図４Ｂと比較されたい。（Ｂ）抗ＧＦＰ抗体　ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソームを用いた免疫金標識により得られた透過型電子顕微鏡写真。（Ｃ）エンプティベクター（ｐＣＭＶ－Ｔａｇ４Ｂ；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びＦｌａｇ－ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中の抗Ｆｌａｇ抗体（上パネル）を用いた免疫ブロット。β－アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｄ）それぞれＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈスクランブル、並びにＭＣＦ１０Ａｓｈダイサークローン１及び２（ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサークローン１及びＭＣＦ１０Ａｓｈダイサークローン２）細胞において抗ダイサー抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β－アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｅ）それぞれＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、並びにＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及び２（ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン２）細胞において抗ダイサー抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β－アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。イメージＪソフトウエアを用いて、免疫ブロットの定量を実施した。（Ｆ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの５％を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降

の対照として用いた（下パネル）。（Ｇ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（５％）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（Ｈ）Ａ５４９（ヒト肺癌）、ＳＷ４８０（ヒト結腸癌）、ＨｅＬａ（ヒト子宮頸癌）及び４Ｔ０７（ネズミ乳癌）細胞株からのオンコソーム中のダイサーの免疫ブロット。ＴＳＧ１０１免疫ブロットを用いて、エクソソーム及び負荷の存在を確認した（下ブロット）。

【図１３－３】オンコソームはダイサーを含む。（Ａ）ＭＣＦ１０Ａ細胞由来エクソソーム中の抗ダイサー抗体（右写真）及び陰性対照（左写真）を用いた免疫金標識により得られた透過型電子顕微鏡写真。ＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームの陽性免疫金標識に関して図４Ｂと比較されたい。（Ｂ）抗ＧＦＰ抗体　ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソームを用いた免疫金標識により得られた透過型電子顕微鏡写真。（Ｃ）エンプティベクター（ｐＣＭＶ－Ｔａｇ４Ｂ；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びＦｌａｇ－ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中の抗Ｆｌａｇ抗体（上パネル）を用いた免疫ブロット。β－アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｄ）それぞれＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈスクランブル、並びにＭＣＦ１０Ａｓｈダイサークローン１及び２（ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサークローン１及びＭＣＦ１０Ａｓｈダイサークローン２）細胞において抗ダイサー抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β－アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。（Ｅ）それぞれＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、並びにＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及び２（ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサークローン２）細胞において抗ダイサー抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β－アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。イメージＪソフトウエアを用いて、免疫ブロットの定量を実施した。（Ｆ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のＡＧＯ２抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの５％を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（Ｇ）ダイサー抗体又はＩｇＧで免疫沈降されたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗ＴＲＢＰ抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（５％）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（Ｈ）Ａ５４９（ヒト肺癌）、ＳＷ４８０（ヒト結腸癌）、ＨｅＬａ（ヒト子宮頸癌）及び４Ｔ０７（ネズミ乳癌）細胞株からのオンコソーム中のダイサーの免疫ブロット。ＴＳＧ１０１免疫ブロットを用いて、エクソソーム及び負荷の存在を確認した（下ブロット）。

【図１４－１】エクソソームにおけるダイサーの検出。（Ａ）４Ｔ１、４Ｔ１ｓｈスクランブル及び４Ｔ１ｓｈダイサー細胞中の抗ダイサー抗体と、並びに４Ｔ１（４Ｔ１　ｅｘｏｓ）及び４Ｔ１ｓｈダイサー（４Ｔ１ｓｈダイサー　ｅｘｏｓ）細胞から採取されたエクソソームと、を用いた免疫ブロット（上ブロット）。ＧＡＤＰＨ免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下ブロット）。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｂ）エクソソームを、４Ｔ１、４Ｔ１ｓｈスクランブル及び４Ｔ１ｓｈダイサー細胞から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４ｈ無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養後の異なるエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｃ）エクソソームを、４Ｔ１、４Ｔ１ｓｈスクランブル及び４Ｔ１ｓｈダイサー細胞から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量し

た。グラフは、２４ｈ無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養後の異なるエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｄ）エクソソームを、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から２本ずつ採取した。試料の一方を抗ダイサー抗体と共に電気穿孔した。両方の試料を無細胞条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４ｈ及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出し、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中での２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した、７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を表しており、図５Ｄに表されたグラフの詳細な分析である。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｅ）エクソソームを、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から２本ずつ採取した。試料の一方を抗ダイサー抗体と共に電気穿孔した。両方の試料を無細胞条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４ｈ及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出し、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中での２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した、７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの倍率変化を表しており、図５Ｅに表されたグラフの詳細な分析である。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｆ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｅｘｏｓ）と比較した、ダイサーと共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）中のダウンレギュレートされたｍｉＲＮＡの分類（発癌性、腫瘍サプレッサ、及び癌に関して未確定）のグラフ表示。マイクロＲＮＡを、文献に基づき各分類に帰属させた。この図に表されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３つの独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。

【図１４－２】エクソソームにおけるダイサーの検出。（Ａ）４Ｔ１、４Ｔ１ｓｈスクランブル及び４Ｔ１ｓｈダイサー細胞中の抗ダイサー抗体と、並びに４Ｔ１（４Ｔ１　ｅｘｏｓ）及び４Ｔ１ｓｈダイサー（４Ｔ１ｓｈダイサー　ｅｘｏｓ）細胞から採取されたエクソソームと、を用いた免疫ブロット（上ブロット）。ＧＡＤＰＨ免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下ブロット）。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｂ）エクソソームを、４Ｔ１、４Ｔ１ｓｈスクランブル及び４Ｔ１ｓｈダイサー細胞から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４ｈ無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養後の異なるエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｃ）エクソソームを、４Ｔ１、４Ｔ１ｓｈスクランブル及び４Ｔ１ｓｈダイサー細胞から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４ｈ無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養後の異なるエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｄ）エクソソームを、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から２本ずつ採取した。試料の一方を抗ダイサー抗体と共に電気穿孔した。両方の試料を無細胞条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４ｈ及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出し、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中での２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した、７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を表しており、図５Ｄに表されたグラフの詳細な分析である。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｅ）エクソソームを、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から２本ずつ採取した。試料の一方を抗ダイサー抗体と共に電気穿孔した。両方の試

料を無細胞条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４ｈ及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出し、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中での２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した、７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの倍率変化を表しており、図５Ｅに表されたグラフの詳細な分析である。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｆ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｅｘｏｓ）と比較した、ダイサーと共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）中のダウンレギュレートされたｍｉＲＮＡの分類（発癌性、腫瘍サプレッサ、及び癌に関して未確定）のグラフ表示。マイクロＲＮＡを、文献に基づき各分類に帰属させた。この図に表されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３つの独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。

【図１４－３】エクソソームにおけるダイサーの検出。（Ａ）４Ｔ１、４Ｔ１ｓｈスクランブル及び４Ｔ１ｓｈダイサー細胞中の抗ダイサー抗体と、並びに４Ｔ１（４Ｔ１　ｅｘｏｓ）及び４Ｔ１ｓｈダイサー（４Ｔ１ｓｈダイサー　ｅｘｏｓ）細胞から採取されたエクソソームと、を用いた免疫ブロット（上ブロット）。ＧＡＤＰＨ免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下ブロット）。イメージＪソフトウエアを用いて、定量を実施した。（Ｂ）エクソソームを、４Ｔ１、４Ｔ１ｓｈスクランブル及び４Ｔ１ｓｈダイサー細胞から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４ｈ無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養後の異なるエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｃ）エクソソームを、４Ｔ１、４Ｔ１ｓｈスクランブル及び４Ｔ１ｓｈダイサー細胞から採取して、無細胞条件下に２４及び７２ｈ保持した。２４及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出して、１５種のｍｉＲＮＡをｑＰＣＲにより定量した。グラフは、２４ｈ無細胞培養に比較した、７２ｈ無細胞培養後の異なるエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を示している。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｄ）エクソソームを、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から２本ずつ採取した。試料の一方を抗ダイサー抗体と共に電気穿孔した。両方の試料を無細胞条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４ｈ及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出し、１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中での２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した、７２ｈエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化を表しており、図５Ｄに表されたグラフの詳細な分析である。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｅ）エクソソームを、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から２本ずつ採取した。試料の一方を抗ダイサー抗体と共に電気穿孔した。両方の試料を無細胞条件で２４及び７２ｈ、放置した。２４ｈ及び７２ｈ後に、エクソソームを再度抽出し、１５種のｍｉＲＮＡ（表４参照）をｑＰＣＲにより定量した。７２ｈの無細胞培養後のエクソソーム中の各ｍｉＲＮＡの倍率変化を、各試料中での２４ｈ無細胞培養後のエクソソーム中の同じｍｉＲＮＡと比較して定量した。グラフのプロットは、２４ｈエクソソームに比較した、７２ｈエクソソーム中のｍｉＲＮＡの倍率変化を表しており、図５Ｅに表されたグラフの詳細な分析である。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｆ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｅｘｏｓ）と比較した、ダイサーと共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ｅｘｏｓ　ダイサーＡＢ）中のダウンレギュレートされたｍｉＲＮＡの分類（発癌性、腫瘍サプレッサ、及び癌に関して未確定）のグラフ表示。マイクロＲＮＡを、文献に基づき各分類に帰属させた。この図に表されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３つの独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している

。
【図１５－１】エクソソームにおけるダイサー検出。（Ａ）エクソソームを、ＭＣＦ１０、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞から採取して、合成ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１と共に電気穿孔した。各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを、電気穿孔されたエクソソーム中でｑＰＣＲにより定量して、電気穿孔緩衝液のみを用いて電気穿孔されたエクソソームと比較した倍率変化として表した。（Ｂ）ビオチンで内部標識されたｐｒｅ－ｍｉＲ－２１、－１０ｂ及びｃｅｌ－１のドットブロット。（Ｃ）ｐｒｅ－ｍｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ細胞のｍｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１の発現分析。各バーは、非トランスフェクト細胞と比較した、トランスフェクト細胞の倍率変化を表している。この図に表されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３つの独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。
【図１５－２】エクソソームにおけるダイサー検出。（Ａ）エクソソームを、ＭＣＦ１０、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞から採取して、合成ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１と共に電気穿孔した。各ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを、電気穿孔されたエクソソーム中でｑＰＣＲにより定量して、電気穿孔緩衝液のみを用いて電気穿孔されたエクソソームと比較した倍率変化として表した。（Ｂ）ビオチンで内部標識されたｐｒｅ－ｍｉＲ－２１、－１０ｂ及びｃｅｌ－１のドットブロット。（Ｃ）ｐｒｅ－ｍｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ細胞のｍｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１の発現分析。各バーは、非トランスフェクト細胞と比較した、トランスフェクト細胞の倍率変化を表している。この図に表されたデータは、それぞれが三重測定で行われた３つの独立した実験の結果であり、±ｓ．ｄ．として表している。
【図１６－１】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質ＣＤ４３はダイサーをエクソソームに動員する。（Ａ）グラフは、イメージＪソフトウエアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。（Ｂ）Ｈｒｓ及びＴＳＧ１０１には２つの異なるｓｉＲＮＡを用い、ＢｉＧ２には２つの異なるｓｈクローンを用いた、ダウンレギュレーション後のＨｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２　ｍＲＮＡ発現。非トランスフェクト細胞及びｓｈスクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。（Ｃ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（左グラフ）、ＭＣＦ１０ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（中央グラフ）、並びにＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（右グラフ）から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、ＳＤとして表された３回の生物学的反復実験の結果である。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ）及びＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（上ブロット）；ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ）及び　ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞の　エクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（下ブロット）（Ｅ）Ｈｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示したＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１ｓｉＴＳＧ１０１、－ｓｉＨｒｓ及びｓｈＢｉＧ２由来エクソソームのＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。（Ｆ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１、４Ｔ１、４Ｔ１ｓｉＨｒｓ、４Ｔ１ｓｈＢｉＧ２及び４Ｔ１ｓｉＴＳＧ１０１細胞中のダイサーのｍＲ

ＮＡ発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｇ）抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー（上ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（上ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン（下ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（下ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。（Ｈ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のＣＤ４３のｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｉ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のダイサーのｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図１６－２】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質ＣＤ４３はダイサーをエクソソームに動員する。（Ａ）グラフは、イメージＪソフトウエアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。（Ｂ）Ｈｒｓ及びＴＳＧ１０１には２つの異なるｓｉＲＮＡを用い、ＢｉＧ２には２つの異なるｓｈクローンを用いた、ダウンレギュレーション後のＨｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２　ｍＲＮＡ発現。非トランスフェクト細胞及びｓｈスクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。（Ｃ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（左グラフ）、ＭＣＦ１０ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（中央グラフ）、並びにＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（右グラフ）から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、ＳＤとして表された３回の生物学的反復実験の結果である。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ）及びＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（上ブロット）；ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ）及び　ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞の　エクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（下ブロット）（Ｅ）Ｈｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示したＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１ｓｉＴＳＧ１０１、－ｓｉＨｒｓ及びｓｈＢｉＧ２由来エクソソームのＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。（Ｆ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１、４Ｔ１、４Ｔ１ｓｉＨｒｓ、４Ｔ１ｓｈＢｉＧ２及び４Ｔ１ｓｉＴＳＧ１０１細胞中のダイサーのｍＲＮＡ発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｇ）抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー（上ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（上ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン（下ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（下ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。（Ｈ）ＭＣＦ１０Ａ、Ｍ

ＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のＣＤ４３のｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｉ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のダイサーのｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図１６－３】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質ＣＤ４３はダイサーをエクソソームに動員する。（Ａ）グラフは、イメージＪソフトウエアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。（Ｂ）Ｈｒｓ及びＴＳＧ１０１には２つの異なるｓｉＲＮＡを用い、ＢｉＧ２には２つの異なるｓｈクローンを用いた、ダウンレギュレーション後のＨｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２　ｍＲＮＡ発現。非トランスフェクト細胞及びｓｈスクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。（Ｃ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（左グラフ）、ＭＣＦ１０ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（中央グラフ）、並びにＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（右グラフ）から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、ＳＤとして表された３回の生物学的反復実験の結果である。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ）及びＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（上ブロット）；ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ）及び　ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞の　エクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（下ブロット）（Ｅ）Ｈｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示したＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１ｓｉＴＳＧ１０１、－ｓｉＨｒｓ及びｓｈＢｉＧ２由来エクソソームのＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。（Ｆ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１、４Ｔ１、４Ｔ１ｓｉＨｒｓ、４Ｔ１ｓｈＢｉＧ２及び４Ｔ１ｓｉＴＳＧ１０１細胞中のダイサーのｍＲＮＡ発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｇ）抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー（上ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（上ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン（下ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（下ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。（Ｈ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のＣＤ４３のｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｉ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のダイサーのｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図１６－４】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質ＣＤ４３はダイサーをエクソソー

ムに動員する。（Ａ）グラフは、イメージＪソフトウエアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。（Ｂ）Ｈｒｓ及びＴＳＧ１０１には２つの異なるｓｉＲＮＡを用い、ＢｉＧ２には２つの異なるｓｈクローンを用いた、ダウンレギュレーション後のＨｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２　ｍＲＮＡ発現。非トランスフェクト細胞及びｓｈスクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。（Ｃ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（左グラフ）、ＭＣＦ１０ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（中央グラフ）、並びにＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（右グラフ）から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、ＳＤとして表された３回の生物学的反復実験の結果である。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ）及びＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（上ブロット）；ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ）及び　ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞の　エクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（下ブロット）（Ｅ）Ｈｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示したＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１ｓｉＴＳＧ１０１、－ｓｉＨｒｓ及びｓｈＢｉＧ２由来エクソソームのＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。（Ｆ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１、４Ｔ１、４Ｔ１ｓｉＨｒｓ、４Ｔ１ｓｈＢｉＧ２及び４Ｔ１ｓｉＴＳＧ１０１細胞中のダイサーのｍＲＮＡ発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｇ）抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー（上ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（上ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン（下ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（下ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。（Ｈ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のＣＤ４３のｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｉ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のダイサーのｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図１６－５】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質ＣＤ４３はダイサーをエクソソームに動員する。（Ａ）グラフは、イメージＪソフトウエアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。（Ｂ）Ｈｒｓ及びＴＳＧ１０１には２つの異なるｓｉＲＮＡを用い、ＢｉＧ２には２つの異なるｓｈクローンを用いた、ダウンレギュレーション後のＨｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２　ｍＲＮＡ発現。非トランスフェクト細胞及びｓｈスクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。（Ｃ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（左グラフ）、ＭＣＦ１０ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（中央グラフ）、並びにＭＣＦ１０Ａ

ｓｉＴＳＧ１０１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（右グラフ）から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、ＳＤとして表された３回の生物学的反復実験の結果である。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ）及びＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（上ブロット）；ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ）及び　ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞の　エクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（下ブロット）（Ｅ）Ｈｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示したＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１ｓｉＴＳＧ１０１、－ｓｉＨｒｓ及びｓｈＢｉＧ２由来エクソソームのＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。（Ｆ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１、４Ｔ１、４Ｔ１ｓｉＨｒｓ、４Ｔ１ｓｈＢｉＧ２及び４Ｔ１ｓｉＴＳＧ１０１細胞中のダイサーのｍＲＮＡ発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｇ）抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー（上ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（上ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン（下ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（下ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。（Ｈ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のＣＤ４３のｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｉ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のダイサーのｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図１６－６】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質ＣＤ４３はダイサーをエクソソームに動員する。（Ａ）グラフは、イメージＪソフトウエアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。（Ｂ）Ｈｒｓ及びＴＳＧ１０１には２つの異なるｓｉＲＮＡを用い、ＢｉＧ２には２つの異なるｓｈクローンを用いた、ダウンレギュレーション後のＨｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２　ｍＲＮＡ発現。非トランスフェクト細胞及びｓｈスクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。（Ｃ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（左グラフ）、ＭＣＦ１０ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（中央グラフ）、並びにＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（右グラフ）から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、ＳＤとして表された３回の生物学的反復実験の結果である。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ）及びＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（上ブロット）；ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ

）及び　ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞の　エクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（下ブロット）（Ｅ）Ｈｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示したＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１ｓｉＴＳＧ１０１、－ｓｉＨｒｓ及びｓｈＢｉＧ２由来エクソソームのＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。（Ｆ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１、４Ｔ１、４Ｔ１ｓｉＨｒｓ、４Ｔ１ｓｈＢｉＧ２及び４Ｔ１ｓｉＴＳＧ１０１細胞中のダイサーのｍＲＮＡ発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｇ）抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー（上ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（上ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン（下ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（下ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。（Ｈ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のＣＤ４３のｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｉ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のダイサーのｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図１６－７】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質ＣＤ４３はダイサーをエクソソームに動員する。（Ａ）グラフは、イメージＪソフトウエアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。（Ｂ）Ｈｒｓ及びＴＳＧ１０１には２つの異なるｓｉＲＮＡを用い、ＢｉＧ２には２つの異なるｓｈクローンを用いた、ダウンレギュレーション後のＨｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２　ｍＲＮＡ発現。非トランスフェクト細胞及びｓｈスクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。（Ｃ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（左グラフ）、ＭＣＦ１０ｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（中央グラフ）、並びにＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（右グラフ）から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、ＳＤとして表された３回の生物学的反復実験の結果である。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ）及びＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（上ブロット）；ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１（ｓｉＴＳＧ１０１）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ（ｓｉＨｒｓ）及び　ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２（ｓｈＢｉＧ２）細胞の　エクソソームタンパク質抽出物中のＣＤ９の免疫ブロット（下ブロット）（Ｅ）Ｈｒｓ、ＴＳＧ１０１及びＢｉＧ２ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示したＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１ｓｉＴＳＧ１０１、－ｓｉＨｒｓ及びｓｈＢｉＧ２由来エクソソームのＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。（Ｆ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０Ａｓｈスクランブル、ＭＣＦ１０ＡｓｉＨｒｓ、ＭＣＦ１０ＡｓｈＢｉＧ２、ＭＣＦ１０ＡｓｉＴＳＧ１０１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈスクランブル、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＨｒｓ、

ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈＢｉＧ２、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＴＳＧ１０１、４Ｔ１、４Ｔ１ｓｉＨｒｓ、４Ｔ１ｓｈＢｉＧ２及び４Ｔ１ｓｉＴＳＧ１０１細胞中のダイサーのｍＲＮＡ発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｇ）抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー（上ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（上ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降されたＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン（下ブロット、２つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの５％（下ブロット、２つの右レーン）の免疫ブロット。（Ｈ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のＣＤ４３のｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。（Ｉ）ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３細胞中のダイサーのｍＲＮＡ発現。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、３回の生物学的反復実験の結果であり、ＳＤとして表している。

【図１７－１】オンコソームは、ダイサー依存的に、収容細胞のトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ＣＤ６３－ＧＦＰ細胞由来のエクソソームのＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析。黒色線は、エクソソーム集団全体の測定を表し、緑色線は、４８８ｎｍレーザビームを備えたＮａｎｏＳｉｇｈｔを用いてＣＤ６３－ＧＦＰで標識されたエクソソーム集団を示す。薄灰色及び薄緑色は、各測定のエラーバーを表す。（Ｂ）抗ＰＴＥＮ抗体と、抽出されて間もないＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈの間処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｃ）抗ＨＯＸＤ１０抗体と、抽出されて間もないＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ細胞をＸＰＯ５に関してｓｉＲＮＡでトランスフェクトして、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの流れを核から細胞質にダウンレギュレートした。ＭＣＦ１０ＡｓｉＸＰＯ５細胞、並びにダイサー抗体を含む、及び含まないＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０ＡｓｉＸＰＯ５細胞中で、時間経過に伴う（６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ及び４８ｈ）ｍｉＲ－１５レベルを測定することにより、ｐｒｅ－ｍｉＲ１５のプロセシングを評価した。有意な変動は示されなかった。（Ｅ）ｍｉＲ１８２－５ｐ発現を、時間経過に伴い（０ｈ、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２及び９６ｈ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソーム中でモニタリングした。エラーバーは、０ｈと比較した、各時点の倍率変化を表している。有意差は認められなかった。（Ｆ）グラフは、図７Ｇのコロニー数定量を示している。＊ｐ＝０．０００６．（Ｇ）抗ダイサー抗体と、無細胞培養後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。α－チューブリンを負荷対照として用いた。

【図１７－２】オンコソームは、ダイサー依存的に、収容細胞のトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ＣＤ６３－ＧＦＰ細胞由来のエクソソームのＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析。黒色線は、エクソソーム集団全体の測定を表し、緑色線は、４８８ｎｍレーザビームを備えたＮａｎｏＳｉｇｈｔを用いてＣＤ６３－ＧＦＰで標識されたエクソソーム集団を示す。薄灰色及び薄緑色は、各測定のエラーバーを表す。（Ｂ）抗ＰＴＥＮ抗体と、抽出されて間もないＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈの間処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｃ）抗ＨＯＸＤ１０抗体と、抽出されて間もないＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで

０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ細胞をＸＰＯ５に関してｓｉＲＮＡでトランスフェクトして、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの流れを核から細胞質にダウンレギュレートした。ＭＣＦ１０ＡｓｉＸＰＯ５細胞、並びにダイサー抗体を含む、及び含まないＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０ＡｓｉＸＰＯ５細胞中で、時間経過に伴う（６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ及び４８ｈ）ｍｉＲ－１５レベルを測定することにより、ｐｒｅ－ｍｉＲ１５のプロセシングを評価した。有意な変動は示されなかった。（Ｅ）ｍｉＲ１８２－５ｐ発現を、時間経過に伴い（０ｈ、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２及び９６ｈ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソーム中でモニタリングした。エラーバーは、０ｈと比較した、各時点の倍率変化を表している。有意差は認められなかった。（Ｆ）グラフは、図７Ｇのコロニー数定量を示している。＊ｐ＝０．０００６．（Ｇ）抗ダイサー抗体と、無細胞培養後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。α－チューブリンを負荷対照として用いた。

【図１７－３】オンコソームは、ダイサー依存的に、収容細胞のトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ＣＤ６３－ＧＦＰ細胞由来のエクソソームのＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析。黒色線は、エクソソーム集団全体の測定を表し、緑色線は、４８８ｎｍレーザビームを備えたＮａｎｏＳｉｇｈｔを用いてＣＤ６３－ＧＦＰで標識されたエクソソーム集団を示す。薄灰色及び薄緑色は、各測定のエラーバーを表す。（Ｂ）抗ＰＴＥＮ抗体と、抽出されて間もないＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈの間処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｃ）抗ＨＯＸＤ１０抗体と、抽出されて間もないＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｄ）ＭＣＦ１０Ａ細胞をＸＰＯ５に関してｓｉＲＮＡでトランスフェクトして、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの流れを核から細胞質にダウンレギュレートした。ＭＣＦ１０ＡｓｉＸＰＯ５細胞、並びにダイサー抗体を含む、及び含まないＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０ＡｓｉＸＰＯ５細胞中で、時間経過に伴う（６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ及び４８ｈ）ｍｉＲ－１５レベルを測定することにより、ｐｒｅ－ｍｉＲ１５のプロセシングを評価した。有意な変動は示されなかった。（Ｅ）ｍｉＲ１８２－５ｐ発現を、時間経過に伴い（０ｈ、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２及び９６ｈ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソーム中でモニタリングした。エラーバーは、０ｈと比較した、各時点の倍率変化を表している。有意差は認められなかった。（Ｆ）グラフは、図７Ｇのコロニー数定量を示している。＊ｐ＝０．０００６．（Ｇ）抗ダイサー抗体と、無細胞培養後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。α－チューブリンを負荷対照として用いた。

【図１７－４】オンコソームは、ダイサー依存的に、収容細胞のトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ２３１　ＣＤ６３－ＧＦＰ細胞由来のエクソソームのＮａｎｏＳｉｇｈｔ粒子トラッキング分析。黒色線は、エクソソーム集団全体の測定を表し、緑色線は、４８８ｎｍレーザビームを備えたＮａｎｏＳｉｇｈｔを用いてＣＤ６３－ＧＦＰで標識されたエクソソーム集団を示す。薄灰色及び薄緑色は、各測定のエラーバーを表す。（Ｂ）抗ＰＴＥＮ抗体と、抽出されて間もないＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈの間処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｃ）抗ＨＯＸＤ１０抗体と、抽出されて間もないＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。β－アクチンを負荷対照として用いた。（Ｄ）ＭＣＦ１

０Ａ細胞をＸＰＯ５に関してｓｉＲＮＡでトランスフェクトして、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの流れを核から細胞質にダウンレギュレートした。ＭＣＦ１０ＡｓｉＸＰＯ５細胞、並びにダイサー抗体を含む、及び含まないＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームで処置されたＭＣＦ１０ＡｓｉＸＰＯ５細胞中で、時間経過に伴う（６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ及び４８ｈ）ｍｉＲ－１５レベルを測定することにより、ｐｒｅ－ｍｉＲ１５のプロセシングを評価した。有意な変動は示されなかった。（Ｅ）ｍｉＲ１８２－５ｐ発現を、時間経過に伴い（０ｈ、６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２及び９６ｈ）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来エクソソーム中でモニタリングした。エラーバーは、０ｈと比較した、各時点の倍率変化を表している。有意差は認められなかった。（Ｆ）グラフは、図７Ｇのコロニー数定量を示している。＊ｐ＝０．０００６．（Ｇ）抗ダイサー抗体と、無細胞培養後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームで０、３０ｍｉｎ、１ｈ、１２ｈ及び２４ｈ、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。α－チューブリンを負荷対照として用いた。

【図１８－１】乳癌患者のエクソソームはダイサーを含み、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして、異なる臓器の細胞に侵入する。（Ａ）ヌードマウスの採取間もない原発性ヒト卵巣腫瘍、子宮内膜腫瘍及び乳房腫瘍のフラグメント由来の同所性異種移植片の代表的写真。（Ｂ）卵巣癌、子宮内膜癌及び乳癌の同所性異種移植片のヘマトキシリン－エオジン（ＨＥ）染色。（Ｃ）同所性腫瘍異種移植片を有するマウスから採取された血清エクソソームの透過型電子顕微鏡写真。（Ｄ）図８Ａに示された免疫ブロットの膜のクーマシー染色。

【図１８－２】乳癌患者のエクソソームはダイサーを含み、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして、異なる臓器の細胞に侵入する。（Ａ）ヌードマウスの採取間もない原発性ヒト卵巣腫瘍、子宮内膜腫瘍及び乳房腫瘍のフラグメント由来の同所性異種移植片の代表的写真。（Ｂ）卵巣癌、子宮内膜癌及び乳癌の同所性異種移植片のヘマトキシリン－エオジン（ＨＥ）染色。（Ｃ）同所性腫瘍異種移植片を有するマウスから採取された血清エクソソームの透過型電子顕微鏡写真。（Ｄ）図８Ａに示された免疫ブロットの膜のクーマシー染色。

【図１８－３】乳癌患者のエクソソームはダイサーを含み、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして、異なる臓器の細胞に侵入する。（Ａ）ヌードマウスの採取間もない原発性ヒト卵巣腫瘍、子宮内膜腫瘍及び乳房腫瘍のフラグメント由来の同所性異種移植片の代表的写真。（Ｂ）卵巣癌、子宮内膜癌及び乳癌の同所性異種移植片のヘマトキシリン－エオジン（ＨＥ）染色。（Ｃ）同所性腫瘍異種移植片を有するマウスから採取された血清エクソソームの透過型電子顕微鏡写真。（Ｄ）図８Ａに示された免疫ブロットの膜のクーマシー染色。

【発明を実施するための形態】

【００３８】

癌の進行は、腫瘍中の効果的な細胞間コミュニケーションに依存する。エクソソームは、全ての細胞型により分泌されるナノ小胞体であり、タンパク質及び核酸を含む。癌細胞により分泌されたエクソソームは、特異的にＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ；ダイサー／ＴＲＢＰ／ＡＧＯ２）と会合したマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）を含み、前駆体マイクロＲＮＡ（ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ）を成熟ｍｉＲＮＡにプロセシングする細胞自律性能力を有する。ネイキッドｍｉＲＮＡの代わりにＲＩＳＣ会合ｍｉＲＮＡが存在することで、標的細胞内でのｍＲＮＡの高効率的で急速なサイレンシングが可能になり、それらのトランスクリプトームを効果的に改変する。癌細胞中のＲＩＳＣタンパク質は、特にＣＤ４３依存的に多小胞体（ＭＶＢ）に誘導され、次にエクソソームに誘導される。エクソソームの、ＲＩＳＣに組み込まれたｍｉＲＮＡが、非腫瘍原性上皮細胞を刺激して、発癌性経路の特異的誘導を介して腫瘍を形成し、間質線維芽細胞を活性化する。本研究は、正常細胞をさらに支配して癌の発生及び進行に参画する発癌性「フィールド効果（ｆｉｅｌｄ　ｅｆｆｅｃｔ）」を導入する際の、癌性エクソソームの可能な役割を解明する。その上、ｍｉＲＮＡバイオジェネシスは、エクソソーム中で細胞依存的に起こり得て、無数

の疾患のための効率的なｍｉＲＮＡ媒介標的治療を操作するための新たなチャンスを提示する。

【００３９】

Ｉ．癌由来エクソソーム

腫瘍は、癌細胞及び間質成分を含む（Ｔｓｅ　ａｎｄ　Ｋａｌｌｕｒｉ，　２０１１）。腫瘍細胞と周囲組織とのコミュニケーションもまた癌の全身拡大の速度及び強度を決定づけることが、近年のエビデンスから示唆される（Ｌｕｇａ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２）。原発性腫瘍が、癌細胞分泌因子を介して、その後に転移を起こす続発性腫瘍部位を養成及び準備する可能性が、幾つかの試験から示唆された（Ｈｏｏｄ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１１；　Ｐｅｉｎａｄｏ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２）。可溶性増殖因子、グルコース代謝産物、ケモカイン、酵素、マイクロ粒子、マイクロ小胞体、エクソソーム及び遊離核酸をはじめとする、複数のそのような仲介物質が同定された（Ｇｕｅｒｍｏｎｐｒｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，　２００２；　Ｌｕｇａ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２；　Ｐｅｉｎａｄｏ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２；　Ｓｉｍｏｎｓ　ａｎｄ　Ｒａｐｏｓｏ，　２００９；　Ｔｈｅｒｙ　ａｎｄ　Ｃａｓａｓ，　２００２）。

【００４０】

近年は、エクソソーム及びエクソソームと癌との関連性に関する多数の発行物が見られる（Ｙａｎｇ　ａｎｄ　Ｒｏｂｂｉｎｓ，　２０１１）。癌細胞が正常細胞と比較して、多数のエクソソームを分泌することが、ほとんどの研究で示されている（Ｙａｎｇ　ａｎｄ　Ｒｏｂｂｉｎｓ，　２０１１）。低酸素の癌細胞は、正常酸素の癌細胞よりも多くのエクソソームを放出する（Ｋｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２）。癌由来エクソソームは、ｍｉＲＮＡをはじめとするタンパク質及び核酸の特異的含有量を運搬すると推測される（Ｖａｌａｄｉ　ｅｔ　ａｌ．，　２００７）。そのような研究は、刺激的であったが、タンパク質及びｍｉＲＮＡが、少なからぬ機能的変化を至る所にある標的細胞に導入し得る方法を説明するには至っていない。ほとんどの研究が、エクソソーム中の成熟ｍｉＲＮＡを同定したが、その機能は大部分が未知である。その上、一本鎖ｍｉＲＮＡは、ターゲットｍＲＮＡのサイレンシングにおいては効果が非常に低く、ＲＩＳＣ組み込みを利用せずにｍＲＮＡ認識を促進する。ＲＬＣのタンパク質がそのｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを認識して、それを２２ヌクレオチドのＲＮＡ二本鎖にプロセシングする。ＡＧＯ２は、次の遺伝子サイレンシングのための一本の鎖を選択し、他の鎖は多くの場合、分解される。その全体的反応は自然発生的であり、その３種のタンパク質及び組み込まれたｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを越える任意の因子を必要としない（Ｍａｎｉａｔａｋｉ　ａｎｄ　Ｍｏｕｒｅｌａｔｏｓ，　２００５）。ｍｉＲＮＡを完全に機能的にするために、その反応は、そのｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをＲＬＣに組み込むプロセシング、並びにＡＧＯを介したｍＲＮＡ認識及びサイレンシングを必要とする。

【００４１】

本明細書において、癌細胞（オンコソーム）及び対照細胞（ノルモソーム）から得たエクソソームのｍｉＲＮＡプロファイルを探査して、エクソソームｍｉＲＮＡの機能的能力を、遺伝子サイレンシングの実現及び標的細胞トランスクリプトーム改変を実現することにおいて評価した。オンコソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡからｍｉＲＮＡへのプロセシング能力を有する機能的複合体として、ダイサー、ＴＲＢＰ及びＡＧＯ２を特異的に含む。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、全てのエクソソームに存在するが、ＲＬＣの存在によりオンコソーム中のみでプロセシングされる。興味深いこととして、オンコソームでは発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ／ｍｉＲＮＡの蓄積が好適となり、これが、一般には発癌性ｍｉＲＮＡ／ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡが豊富である癌細胞のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ量の単なる反映となった可能性がある（Ｂａｒｔｅｌｓ　ａｎｄ　Ｔｓｏｎｇａｌｉｓ，　２００９；　Ｎｉｃｏｌｏｓｏ　ｅｔ　ａｌ．，　２００９）。

【００４２】

これまでの報告は、エクソソーム中のｍｉＲＮＡの存在を示唆し、機能に関して推測した（Ｖａｌａｄｉ　ｅｔ　ａｌ．，　２００７；　Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１

０）。ｍｉＲＮＡがｍＲＮＡターゲットの適切なサイレンシングのための理論的濃度で存在する必要があるならば、循環内のエクソソームは、標的トランスクリプトームを抑制するのに十分な濃度の成熟ｍｉＲＮＡを提供することは考えにくい。レシピエント細胞内でのｍｉＲＮＡバイオジェネシスは、細胞内に既に存在するプロセシングに利用可能なｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの総量により律速されるだけでなく必要とされる酵素が律速的量であるため、レシピエント細胞中のエクソソームから生成されたｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのプロセシングは起こりそうにない事象である。つまり、プロセシングはｐｒｅ－ｍｉＲＮＡがレシピエント細胞に移動する場合に起こり、各成熟ｍｉＲＮＡではないため、プロセシング経路を通ることなく転写後に遺伝子発現の直接改変するにはレシピエント細胞に成熟ｍｉＲＮＡを侵入させることがより効率的である。エクソソーム中の特異的ｍｉＲＮＡバイオジェネシスは、癌細胞についてのこの難問を解決する。オンコソームはＲＩＳＣ会合型である成熟ｍｉＲＮＡのサブセットが非常に豊富になり、標的細胞の表現型を形成する際に重要な生物学的枠割を担う可能性がある。

【００４３】

その上、癌細胞は、癌細胞に増殖的及び生存的利点を提供し、臨床段階の進行、転移及び予後不良に関連するｍｉＲ－２１及びｍｉＲ－１５５などの発癌能力を有するｍｉＲＮＡを過剰発現する（Ｙａｎ ｅｔ ａｌ．，２００８）。これらのｍｉＲＮＡが癌患者の循環において過剰発現されることも、これまでに報告されている（Ｍａｏ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。細胞内でのｍｉＲＮＡの合成は酵素反応であり、それゆえ細胞質に存在するダイサーなどの鍵を握る酵素の量に依存する。ダイサーは、乳癌細胞及び乳房腫瘍においてダウンレギュレートされることが記載されている（Ｇｒｅｌｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００９；Ｍａｒｔｅｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，２０１０）。それゆえこれらの癌細胞が合成し得るｍｉＲＮＡ量は、限られている。エクソソーム生成は連続工程であるため、癌細胞は特異的ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをＲＬＣタンパク質と共に詰め込むことでエクソソーム中の成熟ｍｉＲＮＡを高濃度にし、同時に元の細胞内でこれらのｍｉＲＮＡのアップレギュレーションを維持すると推定される。オンコソームはＲＩＳＣ会合型の成熟ｍｉＲＮＡが非常に豊富であり、標的細胞の表現型を形成する上で重要な生物学的枠割を担う可能性がある。同時に本来の細胞は、有利な発癌性ｍｉＲＮＡの過剰発現を維持するが、レシピエント細胞は、エクソソームを通したｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの侵入で過飽和となったバイオジェネシス経路を見ることはない。

【００４４】

本研究は、癌性エクソソームがｍｉＲＮＡのサブセットを豊富に含むようになるＲＩＳＣ依存性メカニズムを明らかにしている。エクソソームｍｉＲＮＡの任意の減少は、ダイサー抑制による低レベルのｍｉＲＮＡの単なる反映の可能性があるため、癌細胞中のダイサーに対抗するｓｉＲＮＡ／ｓｈＲＮＡの使用は、エクソソーム中のｍｉＲＮＡ量を探査するための実現可能な選択肢にはならなかった。それゆえ中和する抗体をエクソソームに直接送達する電気穿孔法を開発した。この方法は、エクソソーム中のダイサー活性を効率的に阻害してｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのプロセシングを防止する働きがあった。

【００４５】

特定のｍｉＲＮＡは、特異的腫瘍をアップレギュレートするが（Ｖｏｌｉｎｉａ ｅｔ ａｌ．，２００６）、ヒトの癌においては、ｍｉＲＮＡの全体的な減少が起こることも報告されている（Ｋｕｍａｒ ｅｔ ａｌ．，２００７；Ｌｕ ｅｔ ａｌ．，２００５；Ｍｅｌｏ ｅｔ ａｌ．，２０１１；Ｍｅｌｏ ｅｔ ａｌ．，２０１０；Ｍｅｌｏ ｅｔ ａｌ．，２００９；Ｏｚｅｎ ｅｔ ａｌ．，２００８）。ダイサーは、癌細胞で抑制されることが記載されているが、腫瘍の成長を維持するのに低レベルで十分である（Ｋｕｍａｒ ｅｔ ａｌ．，２００９）。ｍｉＲ－１０３／１０７を介した部分的なダイサーダウンレギュレーションは、細胞増殖に影響を及ぼすことなく癌細胞の侵襲性を増強する（Ｍａｒｔｅｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，２０１０）。ダイサーの完全な喪失は、細胞生存にとって有害である（Ｆｕｋａｇａｗａ ｅｔ ａｌ．，２００４）。一方で低レベルのダイサーは、肺及び卵巣癌患者の生存率低下に関連す

る（Ｋａｒｕｂｅ ｅｔ ａｌ．， ２００５； Ｍｅｒｒｉｔｔ ｅｔ ａｌ．， ２００８）。同様にダイサーのヘテロ接合性喪失は、乳癌患者の転移に相関する（Ｍａｒｔｅｌｌｏ ｅｔ ａｌ．， ２０１０）。ｍＲＮＡレベルは不変であるため、乳癌におけるダイサーのダウンレギュレーションは、転写後にも起こる（Ｇｒｅｌｉｅｒ ｅｔ ａｌ．， ２００９； Ｗｉｅｓｅｎ ａｎｄ Ｔｏｍａｓｉ， ２００９）。癌細胞においてダイサー画分は、ＣＤ４３依存的にエンドソーム／ＭＶＢを標的化される。最終的にダイサーは、エクソソームを通して分泌される。エクソソームのバイオジェネシス経路の成分であるＨｒｓ、ＢｉＧ２及びＴＳＧ１０１のダウンレギュレーションは、ダイサータンパク質の細胞内局在化に劇的な変化をもたらす。癌細胞におけるダイサーレベル抑制の１つの考えられる説明は、エクソソームを介した能動輸送を原因とする可能性がある。エクソソーム分泌経路が閉鎖されると、癌細胞がダイサータンパク質増加を感知して、ｍＲＮＡ発現をダウンレギュレートする。加えて癌細胞は、成熟ｍｉＲＮＡの生成を援助し得なくなると、ダイサータンパク質を核内コンパートメントに運搬する。これに関連して、高悪性度の癌細胞におけるダイサーアップレギュレーションは。癌細胞を低悪性度にする（Ｐａｒｋ ｅｔ ａｌ．， ２０１１）。

【００４６】

ＣＤ４３は、白血球中に優勢に存在する膜貫通型タンパク質である。一部の癌細胞では、切断されたＣＤ４３が、細胞質及び核内で観察される（Ｓｈｅｌｌｅｙ ａｔ ａｌ． ２０１２）。ＣＤ４３は、特定の膜タンパク質をエクソソームに標的化させ得ることが、これまでに示されている（Ｓｈｅｎ ｅｔ ａｌ．， ２０１１ａ）。同所性乳癌のマウスモデルにおけるＣＤ４３の抑制は、腫瘍量を７６％減少させる（Ｓｈｅｌｌｅｙ ｅｔ ａｌ．， ２０１２）。臨床試験により、ＣＤ４３発現が乳癌患者の生存率低下に相関することが示唆されている（ｄｅ Ｌａｕｒｅｎｔｉｉｓ ｅｔ ａｌ．， ２０１１）。この報告から、ＣＤ４３がオンコソーム内へのダイサー誘導に機能的に関与することが確認される。

【００４７】

近年の研究で、黒色腫由来エクソソームが転移において役割を担い、線維芽細胞由来のエクソソームが乳癌細胞の遊走において役割を担うことが示されている（Ｌｕｇａ ｅｔ ａｌ．， ２０１２； Ｐｅｉｎａｄｏ ｅｔ ａｌ．， ２０１２）。癌細胞由来のエクソソームは、ｍＲＮＡ及び血管形成促進性タンパク質の移動に関連した腫瘍化促進的役割を有する（Ｌｕｇａ ｅｔ ａｌ．， ２０１２； Ｐｅｉｎａｄｏ ｅｔ ａｌ．， ２０１２； Ｓｋｏｇ ｅｔ ａｌ．， ２００８）。癌細胞由来のエクソソームは、ＥＧＦＲｖＩＩＩなどの発癌遺伝子の水平移動にも寄与する可能性がある（Ｓｋｏｇ ｅｔ ａｌ．， ２００８）。オンコソームは、ＲＩＳＣ会合ｍｉＲＮＡを介して標的細胞内で重要なトランスクリプトーム改変を媒介する。無数の生物学的工程が、標的細胞において影響を受け、増殖を誘導し、非腫瘍原性細胞を腫瘍形成細胞に変換する。それにもかかわらず、レシピエント細胞に及ぼすオンコソームの潜在的インビボ作用は、複数の他の環境パラメータ及びアクセスに対する障害物質（ａｃｃｅｓｓｉｂｉｌｉｔｙ ｂａｒｒｉｅｒｓ）に依存する。

【００４８】

オンコソームは、間質線維芽細胞も活性化して、筋線維芽細胞の表現型を獲得する。一例として、それぞれオンコソーム由来のｍｉＲ－２１及びｍｉＲ－１０ｂを介した腫瘍サプレッサＰＴＥＮ及びＨＯＸＤ１０をサイレンシングするオンコソームの能力が例証された（Ｍａ ｅｔ ａｌ．， ２００７； Ｍａｅｈａｍａ， ２００７）。これらの結果から、悪性腫瘍に達する癌細胞により採用されるコミュニケーションの複雑な性質が強調される。これらのデータは、癌細胞がエクソソームを利用し、周囲の正常細胞を操作して癌進行を促進し、反応性間質を動員する可能性を例証している。

【００４９】

多くの研究で、線維芽細胞及び正常な上皮細胞も、明らかな突然変異を起こさずに腫瘍サプレッサのダウンレギュレーション及び発癌遺伝子の活性化を呈することが示された。

総括すると、本研究は、隣接する正常細胞をさらに支配して癌の発生及び進行に参画する発癌性「フィールド効果」を導入する際に癌性エクソソームが担う可能な役割を解明している。オンコソームは、発癌性経路の活性化を介して非腫瘍原性細胞を腫瘍形成細胞に変換することが可能である。加えてオンコソームは、反応性間質の活性化の生成にも参画し得る。これは、定義された遺伝子突然変異を必要とせずに起こる可能性があり、突然変異した癌細胞が微細環境及び巨大環境からの支援を動員するアジェンダを拡大する方法の複雑さを説明している。

【００５０】

ＩＩ．バイオマーカの検出

当該技術分野で周知の様々な技術により、バイオマーカ又は遺伝子の発現を測定することができる。バイオマーカのメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）のレベルを定量することを利用して、バイオマーカの発現を測定してもよい。あるいはバイオマーカのタンパク質生成物レベルを定量することを利用して、バイオマーカの発現を測定してもよい。以下に議論する方法に関連するさらなる情報は、Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）又はＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）に見出すことができる。パラメータを操作して該当するｍＲＮＡ又はタンパク質の検出を最適化し得ることは、当業者に公知であろう。

【００５１】

幾つかの実施形態において、前記の発現情報を得ることは、ＲＮＡの定量、例えばｃＤＮＡマイクロアレイ、定量ＲＴ－ＰＣＲ、インサイシュハイブリダイゼーション、ノーザンブロッティング、又はヌクレアーゼプロテクションを含んでいてもよい。前記の発現情報を得ることは、タンパク質の定量を含んでいてもよく、例えばタンパク質定量には、免疫組織化学，ＥＬＩＳＡ、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、免疫放射線アッセイ、蛍光イムノアッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、ゲル電気泳動法、ウェスタンブロット分析、質量分析法、又はタンパク質マイクロアレイがある。

【００５２】

核酸マイクロアレイを利用して、複数のバイオマーカの差次的発現を定量してもよい。例えばアフィメトリックス・ジーンチップ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　ＧｅｎｅＣｈｉｐ）（登録商標）技術（カリフォルニア州サンタクララ）又はインサイト社（カリフォルニア州フリーモント）のマイクロアレイシステムを使用することなど、市販の装置を使用して、製造業者のプロトコルに従い、マイクロアレイ分析を実施してもよい。例えば一本鎖核酸（例えば、ｃＤＮＡ又はオリゴヌクレオチド）を、マイクロチップ基板上に配置又は配列させてもよい。配列されたシークエンスを、その後、該当する細胞の特異的核酸プローブとハイブリダイズさせる。該当する細胞から抽出されたＲＮＡの逆転写により蛍光標識されたデオキシヌクレオチドを取り込むことにより、蛍光標識されたｃＤＮＡプローブを生成させてもよい。あるいはＲＮＡをインビトロ転写により増幅させてもよく、ビオチンなどのマーカで標識させてもよい。標識されたプローブを、その後、高ストリンジェント条件下で、マイクロチップ上に固定された核酸にハイブリダイズする。ストリンジェントな洗浄で非特異的に結合したプローブを除去した後、共焦点レーザ顕微鏡測定、又は別の検出方法、例えばＣＣＤカメラにおより、チップをスキャンする。ハイブリダイゼーションファイルの蛍光強度の生データは、ロバストマルチチップアベレージ（ＲＭＡ）アルゴリズムで前処理して、発現値を作成する。

【００５３】

定量リアルタイムＰＣＲ（ｑＲＴ－ＰＣＲ）を用いて、複数のバイオマーカの差次的発現を測定することもできる。ｑＲＴ－ＰＣＲでは、ＲＮＡテンプレートは一般に、ｃＤＮＡに逆転写され、その後、ＰＣＲ反応により増幅される。ＰＣＲ産物の量は、リアルタイムでサイクルごとにたどるため、ｍＲＮＡの初期濃度を決定することができる。ＰＣＲ産物の量を測定するために、二本鎖ＤＮＡに結合するＳＹＢＲグリーンなどの蛍光色素の存在下で反応を実施させてもよい。反応は、増幅されるＤＮＡに特異的な蛍光レポータプローブを用いて実施してもよい。

【００５４】
蛍光レポータプローブの非限定的例には、タックマン（ＴａｑＭａｎ）（登録商標）プローブ（アプライド・バイオシステムズ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）。カリフォルニア州フォスターシティ所在）がある。クエンチャーがＰＣＲ延長サイクルの間に除去されると、蛍光レポータプローブが蛍光を発する。マルチプレックスｑＲＴ－ＰＣＲは、それぞれが異なる発蛍光団を含む複数の遺伝子特異的レポータプローブを用いることにより実施することができる。蛍光値は、各サイクルの間に記録され、増幅反応でその時点まで増幅された生成物の量を表す。誤差を最小限に抑えて任意の試料間変動を低減するために、参照標準を利用してｑＲＴ－ＰＣＲを実施してもよい。理想的な参照標準は、異なる組織でも一定の値で表され、実験的処理による影響を受けない。適切な参照標準としては、ハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）及びβ－アクチン用のｍＲＮＡが挙げられるが、これらに限定されない。元の試料のｍＲＮＡレベル又は各バイオマーカの発現の倍率変化を、当該技術分野で周知の計算を利用して決定してもよい。

【００５５】
免疫組織化学的染色を利用して、複数のバイオマーカの差次的発現を測定してもよい。この方法は、タンパク質と特異的抗体との相互作用により組織切片の細胞におけるタンパク質局在化を可能にする。このために、組織をホルマリン又は他の適切な固定剤で固定して、ワックス又はプラスチックに包埋し、ミクロトームを用いて薄切片（約０．１ｍｍ～数ｍｍ厚）に切り出すことができる。あるいは組織を凍結し、クリオスタットを用いて薄切片に切り出してもよい。組織切片を固体表面に配列させ、それに固定してもよい（即ち、組織マイクロアレイ）。組織切片を、該当する抗原に対する一次抗体と共にインキュベートして、洗浄し、非結合抗体を除去する。一次抗体を検出システムに結合させるか、又は一次抗体を、検出システムに結合した二次抗体で検出してもよい。検出システムは、発蛍光団であってもよく、又は基質を比色、蛍光、若しくは化学発光生成物に変換し得る西洋ワサビペルオキシダーゼ若しくはアルカリホスファターゼなどの酵素であってもよい。染色された組織切片は一般に、顕微鏡下でスキャンされる。癌対象から得た組織試料は、異成分からなる、即ち一部の細胞が正常で他の細胞が癌性であり得るため、組織における陽性染色細胞の割合を決定してもよい。この測定を、染色強度の測定と一緒に利用して、バイオマーカの発現値を作成してもよい。

【００５６】
酵素免疫測定法、即ちＥＬＩＳＡを利用して、複数のバイオマーカの差次的発現を測定してもよい。ＥＬＩＳＡアッセイには多数の変法がある。全てが、固体表面、一般にはマイクロタイタープレートでの抗原又は抗体の固定化に基づいている。本来のＥＬＩＳＡ法は、該当するバイオマーカタンパク質を含む試料を調製すること、マイクロタイターのウェルを該試料でコーティングすること、各ウェルを特異的抗原を認識する一次抗体と共にインキュベートすること、非結合抗体を洗い流すこと、その後、抗体－抗原複合体を検出すること、を含む。抗体－抗原複合体は、直接検出してもよい。このために、一次抗体を、検出可能な生成物を生成する酵素などの検出システムにコンジュゲートする。抗体－抗原複合体を、間接的に検出してもよい。このためには一次抗体は、先に記載された検出システムにコンジュゲートされた二次抗体により検出される。マイクロタイタープレートをその後、スキャンし、当該技術分野で公知の手段を利用して、強度の生データを発現値に変換することができる。

【００５７】
抗体マイクロアレイを利用して、複数のバイオマーカの差次的発現を測定してもよい。このためには、複数の抗体を配列させて、マイクロアレイ又はバイオチップの表面に共有結合させる。該当するバイオマーカタンパク質を含むタンパク質抽出物は、一般に、蛍光色素又はビオチンで標識されている。標識されたバイオマーカタンパク質を、抗体マイクロアレイと共にインキュベートする。洗浄して非結合タンパク質を除去した後、マイクロアレイをスキャンする。蛍光強度の生データを、当該技術分野で公知の手段を利用して、

発現値に変換することができる。

【００５８】

ルミネックス・マルチプレキシング・マイクロスフェア（Ｌｕｍｉｎｅｘ　ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｉｎｇ　ｍｉｃｒｏｓｐｈｅｒｅｓ）を利用して、複数のバイオマーカの差次的発現を測定してもよい。これらの微視的ポリスチレンビーズは、内部が蛍光色素でカラーコードされているため、各ビーズは特有のスペクトルシグネチャを有する（そのうち最大１００存在する）。同じシグネチャを有するビーズを、該当するターゲット（即ち、それぞれバイオマーカｍＲＮＡ又はタンパク質）に結合する特異的オリゴヌクレオチド又は特異的抗体でタグ付けする。その一方でターゲットは、蛍光レポータでタグ付けされている。こうして、一方はビーズから、他方はターゲット上のレポータ分子から、という２種の色素源が存在する。その後ビーズは、ターゲットを含む試料と共にインキュベートされ、そのうち最大１００種が、１つのウェルで検出され得る。小さなサイズ／表面積のビーズ及びターゲットへのビーズの三次元暴露により、結合反応の間にほぼ溶液相の反応速度が得られる。捕捉されたターゲットは、アッセイの間に捕捉された各ビーズを同定する内部色素及び任意のレポータ色素をレーザで励起するフローサイトメトリーに基づく高度の流体工学により検出される。当該技術分野で公知の手段を用いて、取得ファイルからのデータを発現値に変換することができる。

【００５９】

インサイチュハイブリダイゼーションを利用して、複数のバイオマーカの差次的発現を測定してもよい。この方法は、組織切片の細胞において該当するｍＲＮＡの局在化を可能にする。この方法では、組織を凍結するか、又は固定して包埋し、その後、薄切片に切り出して、固体表面に配列及び付着させる。組織切片を、該当するｍＲＮＡとハイブリダイズする、標識されたアンチセンスプローブと共にインキュベートする。ハイブリダイゼーション及び洗浄ステップは、一般に、高ストリンジェント条件下で実施される。プローブは、別のタンパク質又は抗体により検出され得る発蛍光団又は低分子タグ（ビオチン又はジゴキシゲニンなど）で標識してもよく、それにより標識されたハイブリッドを顕微鏡下で検出及び視覚化してもよい。各アンチセンスプローブが識別可能な標識を有する場合には、複数のｍＲＮＡを同時に検出することができる。ハイブリッドされた組織アレイは、一般に、顕微鏡下でスキャンされる。癌対象から得た組織試料は、異成分からなる、即ち一部の細胞が正常で他の細胞が癌性であり得るため、組織における陽性染色細胞の割合を決定してもよい。この測定を、染色強度の測定と一緒に利用して、各バイオマーカの発現値を作成してもよい。

【００６０】

さらなる実施形態において、マーカレベルを、対照のマーカレベルと比較してもよく、その場合の対照が、特定の転移腫瘍を有する、若しくは特定の転移腫瘍を有さない、又はそれらの両方であると決定された１名以上の患者から採取された１つ以上の腫瘍試料を含んでいてもよい。

【００６１】

対照は、患者の個別のデータと同時に（例えば、同じハイブリダイゼーション実験で）得られたデータを含んでいてもよく、又は保存された値若しくは値の組み合わせであってもよく、例えばコンピュータ若しくはコンピュータ可読媒体に保存されていてもよい。後者が利用される場合、初期又は追跡調査試料から得られた選択されたマーカ（複数可）に関する新しい患者データを、さらなる対照実験を必要とせずに同じマーカ（複数可）の保存データと比較することができる。

【００６２】

ＩＩＩ．定義

本明細書で用いられる「生物学的試料を得ること」又は「血液試料を得ること」は、例えば直接的又は間接的のいずれかで、生物学的試料又は血液試料を受け取ることを指す。例えば幾つかの実施液体において、血液試料又は末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含む試料などの生物学的試料は、生物学的試料を分析する実験室又は場所で、又はその付近で対象

から直接得られる。他の実施形態において、生物学的試料は、第三団体により引き出され、又は採取され、その後、例えば分析用の別の物体又は場所に輸送されてもよい。別の実施形態において、試料は、ポイント・オブ・ケア試験を利用して、同じ場所で採取し、テストしてもよい。これらの実施形態において、前記採取は、例えば患者から、実験室から、診療所から、郵便物から、裁判所から、又は郵便局から、などにより試料を受け取ることを指す。幾つかのさらなる態様において、該方法は、対象に、保険者、担当医師、薬剤師、薬剤給付管理者、又は決定が該当し得る任意の人に、決定を報告することをさらに含み得る。

【００６３】

「対象」又は「患者」は、治療又は診断テストが望ましい任意の単一対象を意味する。この場合、対象又は患者は、一般にヒトを指す。臨床試験に関与し、疾患の任意臨床兆候を示さない任意の対象、又は疫学研究に関与する対象、又は対照として用いられる対象もまた、対象として含まれるものとする。

【００６４】

本明細書で用いられる「発現増加」は、適切な対照（例えば、非癌性組織又は細胞試料、参照標準）に比較して癌試料での発現レベルが上昇又は増加していて、遺伝子発現レベルの上昇又は増加が統計学的に有意であること（ｐ＜０．０５）を指す。対照に比較した癌試料での遺伝子発現の増加が統計学的に有意であるかどうかは、適切なｔ検定（例えば、一標本ｔ検定、二標本ｔ検定、ウェルチのｔ検定）又は当業者に公知の他の統計学的検定を用いて決定することができる。癌において過剰発現される遺伝子は、例えば癌で過剰発現されることが公知である、又はこれまでに決定されている遺伝子であってもよい。

【００６５】

本明細書で用いられる「発現減少」は、適切な対照（例えば、非癌性組織又は細胞試料、参照標準）に比較して癌試料での発現レベルが低下又は減少していて、遺伝子発現レベルの低下又は減少が統計学的に有意であること（ｐ＜０．０５）を指す。幾つかの実施形態において、遺伝子発現レベルの低下又は減少は、遺伝子発現の完全な欠如又は発現レベルゼロであってもよい。対照に比較した癌試料での遺伝子発現の減少が統計学的に有意であるかどうかは、適切なｔ検定（例えば、一標本ｔ検定、二標本ｔ検定、ウェルチのｔ検定）又は当業者に公知の他の統計学的検定を用いて決定することができる。癌において過小発現される遺伝子は、例えば癌で過小発現されることが公知である、又は過去に決定されている遺伝子であってもよい。

【００６６】

本明細書で用いられる用語「抗原結合フラグメント」は、広義に用いられており、具体的にはモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも２つのインタクト抗体から形成される多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体フラグメントを含む。

【００６７】

本明細書で用いられる用語「プライマー」は、テンプレート依存性工程において新生核酸の合成を刺激することが可能な任意の核酸を包含することを意味する。プライマーは、１０～２０及び／又は３０塩基対の長さのオリゴヌクレオチドであってもよいが、より長いシークエンスを用いることができる。プライマーは、二本鎖及び／又は一本鎖形態で提供されてもよいが、一本鎖形態が好ましい。

【実施例】

【００６８】

ＩＶ．実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例で開示された技術が本発明の実践において十分に機能するために本発明者により発見された技術を表し、つまり実践に好ましい様式を構成すると判断され得ることは、当業者に認識されるはずである。しかし当業者は、本開示に照らせば、多くの変更を開示された特定の実施形態に施すことができ、それでも尚、本発明の主旨及び範囲を逸脱することなく類似又は同様の結果を得ることができることを認識するはずである。

【００６９】

実施例１－　実験の手順

エクソソームの単離及び精製。エクソソームを過去に記載された分画遠心法により精製した（Ｔｈｅｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，　２００６；　Ｌｕｇａ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２）。手短に言えば、２４ｈ培養された細胞から得た上清を、８００ｇ及び２０００ｇの連続遠心分離ステップに供して、培養瓶内で０．２μｍフィルターを用いて上清をろ過した。エクソソームを、ＳＷ４０Ｔｉスイングバケットロータ（ベックマン）内で１００，０００ｇで２時間、ペレット化した。上清を廃棄して、１時間の洗浄ステップのためにＰＢＳを添加した。ペレットをエクソソームについて分析した。ＲＮＡ抽出用のエクソソームは、トリゾール５００μｌに再懸濁させ、タンパク質抽出用のエクソソームは、溶解緩衝液（８Ｍ尿素／２．５％ＳＤＳ、５μｇ／ｍｌロイペプチン、１μｇ／ｍｌペプスタチン及び１ｍＭフッ化フェニルメチルスルホニル）２５０μｌに再懸濁させ、処置用のエクソソームは、ＰＢＳに再懸濁させた。凍結させた血清試料を氷上で解凍し、５００μｌをＰＢＳ　１２ｍＬに添加して、前述と同じ手順に従った。遠心分離により精製されたエクソソームを、ＲＮａｓｅ不含水に溶解された５００ｇ／ｍＬプロテイナーゼＫ（シグマ－アルドリッチ）で処置し（３７℃、６０分間）、その後、該プロテアーゼを熱失活させて（６０℃、１０分間）、２ｇ／ｍＬプロテアーゼ不含ＲＮａｓｅＡ（シグマ－アルドリッチ）と共にインキュベートして（３７℃、１５分間）、１０倍濃縮されたＲＮａｓｅ阻害剤（アンビオン）を添加した。エクソソーム処置については、エクソソームを２本ずつ精製し、一方のペレットをタンパク質精製に用いた。

【００７０】

エクソソームのフローサイトメトリー分析。エクソソーム調製物（５～１０μｇ）を４μｍ径アルデヒド／硫酸ラテックスビーズ（インターフェイシャル・ダイナミクス、オレゴン州ポートランド所在）５μｌと共にインキュベートし、２％ＢＳＡを含むＰＢＳ　４００μｌ中に再懸濁させた。エクソソームでコーティングしたビーズ（２０μｌ）を以下の抗体：抗ＣＤ６３（サンタクルズ）、抗ＣＤ９（アブカム）、抗ＴＳＧ１０１（アブカム）、抗フロチリン－１（サンタクルズ）と共に４℃で３０分間インキュベートし、次いで必要であれば、ＦＩＴＣ－コンジュゲート二次抗体と共にインキュベートして、ＦＡＣＳキャリバー・フローサイトメータ（ＢＤバイオサイエンシズ）で分析した。

【００７１】

エクソソームの電気泳動。総タンパク濃度１００μｇ（ブラッドフォードアッセイにより測定）のエクソソームと、ダイサー抗体５μｇ（ポリクローナルＳＣ－３０２２６、サンタクルズ、カリフォルニア州所在）、アクチン抗体５μｇ、又はｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－２１、－１０ｂ及びｃｅｌ１　１０μｇを、４００μＬの電気泳動緩衝液（１．１５ｍＭリン酸カリウムｐＨ７．２、２５ｍＭ塩化カリウム、２１％オプティプレップ）中に混合し、ジーンパルサー・エックスクセル・エレクトロポレーションシステム（バイオラッド）を用いて４ｍｍキュベット中で過去に記載された通り（Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１１）電気泳動した。電気泳動の後、エクソソームを、適宜、プロテアーゼＫ及び／又はＲＮａｓｅで処置した。

【００７２】

光散乱分光法（ＬＳＳ）。ＬＳＳスペクトルを、図１０Ｂに記載された実験システムを利用して回収した。フィアニウムＳＣ－４５０－２広帯域スーパーコンティニウムレーザを、白色光源として用いた。スーパーコンティニウムレーザの光を、長焦点レンズにより試料に集光させた。エクソソーム又はマイクロスフェアのいずれかの懸濁液からなる試料を、特注の立方体形水晶サンプルホールダに入れた。バックグランドシグナルを、エクソソーム又はマイクロスフェアを含まない溶媒試料から回収した。エクソソーム又はマイクロスフェアにより入射光に対して９０°で散乱された光を、他の長焦点レンズで回収して、高効率性のアンドール・テクノロジー・イクソンＤＶ８８５ＥＭＣＣＤ（Ａｎｄｏｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ｉＸｏｎ　ＤＶ８８５　ＥＭＣＣＤ）検出器に連結されたプリンストン・インスツルメンツ・アクトン２３００ｉイメージング・スペクトログラフ（Ｐｒ

ｉｎｃｉｔｏｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ Ａｃｔｏｎ ２３００ｉ ｉｍａｇｉｎｇ ｓｐｅｃｔｒｏｇｒａｐｈ）に送信した。検出は、４７０～８７０ｎｍ波長範囲で実施した。検出器をコンピュータで制御して、データを送信、保存及び処理した。

【００７３】

システムを較正し、波長よりも小さい場合がある粒子サイズの正確な検出能力を確立するために、名目直径２４ｎｍ～１００ｎｍのガラスマイクロスフェア及び名目直径１１９ｎｍ、１７５ｎｍ、３５６ｎｍ及び４５７ｎｍのポリスチレンマイクロスフェアのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）懸濁液からのシグナルを測定した。過去に開発された最小二乗法による最小化法（Ｆａｎｇ ｅｔ ａｌ．， ２００３）を利用して、ミー理論から予測されたスペクトルをデータにフィットさせた。実験でのスペクトル及び得られたフィットを、名目直径１００ｎｍのガラスマイクロスフェア及び名目直径３５６ｎｍのポリスチレンマイクロスフェアについて、図１Ｅに示す。ここでは、波長の四乗を掛けたレイリー散乱から得られた偏差を、ＬＳＳスペクトルの非レイリー挙動を強調するために示している。マイクロスフェアに関してＬＳＳで得られたサイズ分布を製造業者が提供した仕様書と比較することにより、ＬＳＳ法の正確度が１０ｎｍと推定されることが結論づけられた。再建されたサイズ分布がマイクロスフェア及び溶媒の反射率に対して無感応であることも推定された。ここでは、小分子の光散乱がそれらのサイズの六乗に比例することから、５０ｎｍよりも小さな粒子を、より大きな粒子の存在下で検出するには、実験システムの信号雑音比を実質的に上昇させる必要があることが指摘されなければならない。

【００７４】

その後、エクソソームのＰＢＳ懸濁液を用いたＬＳＳ実験を実施した。エクソソームの実験的ＬＳＳスペクトル及び対応するミーフィットを、図１Ｂに示す。再建されたスペクトルのフィットは、優れている。上述の再建技術を利用して（Ｆａｎｇ ｅｔ ａｌ．２００３；Ｉｔｚｋａｎ ｅｔ ａｌ．２００７；Ｆａｎｇ ｅｔ ａｌ．２００７）、１０４ｎｍをピークとするエクソソームのサイズ分布が見出された（図１Ｒの右グラフ及び挿入図）。この抽出されたサイズ分布を、類似のエクソソーム試料のＴＥＭ写真により実施された形態計測法（図１Ａ）と比較した。ＴＥＭ写真での粒子数は、統計学的に意義のある分布をプロットするのに十分多くないため、５０ｎｍよりも大きな平均粒子サイズは、ＴＥＭ写真から計算して、９５ｎｍであることが見出された。つまり、ＬＳＳで再建されたサイズ分布とエクソソームのＴＥＭ写真で実施された形態測定法は、全てのデータで一致している。

【００７５】

Ｎ－Ｒｈ－ＰＥ処置。細胞を氷冷１×ハンクス緩衝液（インビトロジェン、カリフォルニア州カールスバッド所在）で希釈された８μＭ Ｎ－Ｒｈ－ＰＥ（アバンティ・ポーラ・リピッド、アラバマ州アラバスター所在）と共に氷上で１時間インキュベートすることにより、Ｎ－Ｒｈ－ＰＥで標識した。その後、細胞を氷冷ハンクス緩衝液で３回洗浄した後、それらをＤＭＥＭ培地で平板培養した。Ｎ－Ｒｈ－ＰＥ細胞を、標識のおよそ２４ｈ後に共焦点撮像に用いた。

【００７６】

免疫金標識及び電子顕微鏡測定。最適な濃度の固定された標本を、３００メッシュのカーボン／ホルムバールコーティンググリッドに滴下して、最低でも１分間、ホルムバールに吸収させた。免疫金染色では、グリッドをブロック／易透過ステップ用のブロッキング緩衝液中に１時間入れた。グリッドは、すすがずに直ちに適切に希釈された一次抗体に４℃で一夜入れた（ポリクローナル抗ダイサー１：１０ ＳＣ－３０２２６、サンタクルズ；モノクローナル抗ＣＤ９ １：１０、アブカム）。対照として、一部のグリッドを一次抗体に暴露しなかった。翌日、グリッドの全てをＰＢＳですすぎ、その後、１０ｎｍ金粒子（オーリオン、ペンシルバニア州ハットフィールド所在）を付着させた適切な二次抗体の液滴に室温で２時間浮遊させた。グリッドをＰＢＳですすぎ、０．１Ｍリン酸緩衝液中の２．５％グルタルアルデヒド中に１５分間入れた。ＰＢＳ及び蒸留水ですすいだ後、グリッドを乾燥させ、酢酸ウラニルで対比染色させた。試料をテクナイ・バイオ・ツイン透

過型電子顕微鏡（ＦＥＩ、オレゴン州ヒルズボロ所在）で観察して、ＡＭＴ　ＣＣＤカメラ（アドバンスト・マイクロスコピー・テクニック、マサチューセッツ州ダンバース所在）で撮像した

【００７７】

タンパク質ブロット及び抗体。内因性の遺伝子応答をモニタリングするために、細胞はＲＩＰＡ緩衝液に採取し、エクソソームは８Ｍ尿素／２．５％ＳＤＳ、５μｇ／ｍｌロイペプシン、１μｇ／ｍｌペプスタチン及び１ｍＭフッ化フェニルメチルスルホニル緩衝液に採取した。タンパク質をブラッドフォード定量法によりアクリルアミドゲルにロードし、湿式電気泳動転写によりＰＶＤＦ膜（イモビロンＰ）に転写した。同位性異種移植片モデルから採取された血清エクソソームのタンパク質試料では、１５ｃｍ高の４％アクリルアミドゲルを用いて、ヒト及びマウスダイサーのバンドを分解した。概して、ブロットをＰＢＳ／０．０５％ツイーン中の５％脱脂粉乳を用いて室温で１時間ブロックし、以下の一次抗体と共に４℃で一夜インキュベートした：１：５００抗ダイサー（ＳＣ－３０２２６）、サンタクルズ；１：１０００抗ユビキチニル化タンパク質、クローンＦＫ２ミリポア；１：５００抗Ｆｌａｇ　Ｍ２－ペルオキシダーゼ　クローンＭ２、シグマ；１：５００抗ＣＤ４３　ａｂ９０８８、アブカム；１：５００抗ＰＴＥＮ、ａｂ３２１９９、アブカム；１：３００抗ＣＤ９　ａｂ９２７２６、アブカム；１：５００抗ＧＡＤＰＨ　ａｂ９４８３、アブカム；１：２５０抗ＴＲＢＰ　ａｂ７２１１０、アブカム；１：３００抗ＴＳＧ１０１　ａｂ８３、アブカム；１：４００抗ＡＧＯ２　ａｂ３２３８１、アブカム；１：４０００抗β－アクチンペルオキシダーゼ　クローンＡＣ－１５、シグマ；１：５００抗ＧＦＰ　ａｂ６５５６、アブカム；１：５００抗ＨＯＸＤ１０　ａｂ７６８９７、アブカム。二次抗体を室温で１時間インキュベートした。抗体インキュベーション後の洗浄を、１×ＰＢＳ０．０５％ツイーン２０と共にオービタルシェーカで１０分間隔で４回実施した。ブロットを、ピアースの化学発光試薬を用いて発光させた。

【００７８】

リアルタイムＰＣＲ分析。トリゾール（インビトロジェン）での総ＲＮＡ精製に続いて、ＭｕｌｔｉＳｃｒｉｂｅリバーストランスクリプターゼ（アプライド・バイオシステムズ）及びオリゴｄ（Ｔ）プライマーを用いて、ＤＮａｓｅ処置されたＲＮＡを、後方に転写した。ｍＲＮＡのリアルタイムＰＣＲを、ＳＹＢＲ・グリーン・マスター・ミックス（アプライド・バイオシステムズ）及び対照としてのβ－アクチンを用いて、ＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ　７３００ＨＴシークエンス・ディテクション・システム・インスツルメントで実施した。プライマーを表１に列挙する。

【００７９】

ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを、１５０ｎｇのＤＮａｓｅで処置されたＲＮＡ及びＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩプラチナ・ワンステップ・ＲＴ－ｑＰＣＲキット（インビトロジェン）を用いて定量した（Ｓｃｈｍｉｔｔｇｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２００４）。プライマーを表１に列挙する。

【００８０】

ｍｉＲＮＡ発現分析では、ＲＮＡ　１０ｎｇを、特異的ｍｉＲＮＡプライマーを含むＴａｑＭａｎマイクロＲＮＡリバーストランスクリプションキット試薬と混合して、製造業者の使用説明書（アプライド・バイオシステムズ）に従って逆転写した。反応混合物を１６℃で３０分間、４２℃で３０分間、及び８５℃で５分間インキュベートした。リアルタイムＰＣＲを、試験されている各ｍｉＲＮＡ用の市販のアッセイオンデマンド（アプライド・バイオシステムズ）を利用し、ＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ　７３００ＨＴシークエンス・ディテクション・システム・インスツルメント（アプライド・バイオシステムズ）を用いて実施した。ｍｉＲＮＡの発現を、ＲＮＡ量及びインテグリティの内部対照として働く１８Ｓ　ｒＲＮＡ（ＴａｑＭａｎプレデベロップド・アッセイ・リージェント；アプライド・バイオシステムズ）の発現に標準化させた。各測定は、三重測定で実施した。閾値サイクル（Ｃｔ）、つまり増幅されたターゲットの量が一定の閾値に達した部分サイクル数（ｆｒａｃｔｉｏｎａｌ　ｃｙｃｌｅ　ｎｕｍｂｅｒ）を決定して、過去に報告された通り（

Ｌｉｖａｋ ａｎｄ Ｓｃｈｍｉｔｔｇｅｎ，２００１）、$2^{-\Delta Ct}$式を用いて発現を測定した。

【表１－１】

表１．ｑＰＣＲプライマーのシークエンス

プライマー名	プライマーのシークエンス	SEQ ID NO:
BiG2 F	5’ CAGGAGGTGGTGAAGGACAT3’	1
BiG2 R	5’ CCCGTTGGTCTGTGAGTTT3’	2
TSG101 F	5’ GATACCCTCCCAATCCCAGT3’	3
TSG101 R	5’ GTCACTGACCGCAGAGATGA3’	4
Hrs F	5’ AGTGGCTGTCGGGTATTCATC3’	5
Hrs R	5’ CCGTCCATATCCCTTGAAGAATC3’	6
CD43 F	5’ GCTGGTGGTAAGCCCAGAC3’	7
CD43 R	5’ GGCTCGCTAGTAGAGACCAAA3’	8
hsa-アクチン F	5’ CATGTACGTTGCTATCCAGGC3’	9
hsa-アクチン R	5’ CTCCTTAATGTCACGCACGAT3’	10
mmu-アクチン F	5’ GGCTGTATTCCCCTCCATCG3’	11
mmu-アクチン R	5’ CCAGTTGGTAACAATGCCATGT3’	12
Pre-miR-let7-a F	5’ AGGTAGTAGGTTGTATAGTTTTAGG3’	13
Pre-miR-let7-a R	5’ TAGGAAAGACAGTAGATTGTATAGT3’	14
Pre-miR-15b F	5’ AGCACATCATGGTTTACATGC3’	15
Pre-miR-15b R	5’ CTAGAGCAGCAAATAATGATTGG3’	16
Pre-miR-26a F	5’ TTCAAGTAATCCAGGATAGGCTGT3’	17
Pre-miR-26a R	5’ TGCAAGTAACCAAGAATAGGCC3’	18
Pre-miR-31 F	5’ TGAGTGTGTTTTCCCTCCCT3’	19
Pre-miR-31 R	5’ GCCATGGCTGCTGTCAG3’	20
Pre-miR-125a F	5’ GTCCCTGAGACCCTTTAACC3’	21
Pre-miR-125a R	5’ AACCTCACCTGTGACCCTG3’	22
Pre-miR-125b F	5’ GTCCCTGAGACCCTAACTTG3’	23
Pre-miR125b R	5’ AGCCTAACCCGTGGATTT3’	24
Pre-miR-200a F	5’ TTCCACAGCAGCCCCTG3’	25
Pre-miR-200a R	5’ GATGTGCCTCGGTGGTGT3’	26
Pre-miR-200c F	5’ CTCGTCTTACCCAGCAGTGT3’	27
Pre-miR-200c R	5’ GTCATCATTACCAGGCAGTATTAG3’	28
Pre-miR-335 F	5’ GTCAAGAGCAATAACGAAAAATG3’	29
Pre-miR-335 R	5’ GAGGTCAGGAGCAATAATGAA3’	30
Pre-miR-10a,b F	5’ TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG3’	31
Pre-miR-10a,b R	5’ ATTCCCCTAGATACGAATTTGTGA3’	32

【表１－２】

プライマー名	プライマーのシークエンス	SEQ ID NO:
Pre-miR-21 F	5’ GCTTATCAGACTGATGTTGACTG3’	33
Pre-miR-21 R	5’ CAGCCCATCGACTGGTG3’	34
Pre-miR-27a F	5’ GCAGGGCTTAGCTGCTTG3’	35
Pre-miR-27a R	5’ GGCGGAACTTAGCCACTGT3’	36
Pre-miR-155 F	5’ GTTAATGCTAATCGTGATAGGG3’	37
Pre-miR-155 R	5’ GCTAATATGTAGGAGTCAGTTGGA3’	38
Pre-miR-373 F	5’ CTCAAAATGGGGGCGCTT3’	39
Pre-miR-373 R	5’ CACCCCAAAATCGAAGCACT3’	40
Pre-cel-1 F	5’ CCACCCCGTTCTACATACTTC3’	41
Pre-cel-1 R	5’ ACCGTACCGAGCTGCATACT3’	42

【００８１】

ノーザンブロット。成熟ｍｉＲＮＡに対する逆相補鎖の３’　Ｂｉｏ［ＴＥＧ］ＤＮＡオリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、ノーザンブロットを実施した（表２参照）。尿素／アクリルアミド１５％ゲルを用いて、エクソソームＲＮＡ（ＤＮａｓｅ処置）４０μｇを１×ＲＮＡローディングダイと共に９５℃で２分間、その後、氷上で２分間ロードした。マイクロＲＮＡマーカを、製造業者（Ｎ２１０２、ニューイングランド・バイオラブズ）の使用説明書に従って使用した。ＴＢＥ　１Ｘを使用して、電気泳動を４℃で３時間実施した。ワットマンブロッティングペーパー及びＢｒｉｇｈｔＳｔａｒ－Ｐｌｕｓ正電化ナイロンメンブレン（アンビオン）を用い、ＴＢＥ　０．５Ｘと共に、転写を４℃で２時間実施した。ＵＶトランスルミネータを用いて、ＲＮＡを膜に２０分間架橋させた。アンビオンのＵＬＴＲＡｈｙｂ（登録商標）－Ｏｌｉｇｏハイブリダーゼーション溶液（アンビオン）中、４２℃で１時間回転させることにより、膜をプレイハイブリダイズした。プローブを氷上で解凍して、９５℃で５分間インキュベートした後にハイブリダイゼーション緩衝液１ｍＬあたりに、１５０ｎｇを添加し、その後、膜を４２℃で一晩回転させた。以下の洗浄を実施した：２Ｘ　ＳＳＰＥ／０．５％ＳＤＳ　－　１５分間を２回；０．２ＳＳＰＥ／０．５％ＳＤＳ　－　３０分間を２回、及び２Ｘ　ＳＳＰＥ　－　５分間。これらの初期洗浄ステップの後、さらに洗浄し、その後、ブロットをＢｒｉｇｈｔＳｔａｒ　ＢｉｏＤｅｔｅｃｔキットを用い、製造業者（アンビオン）の使用説明書に従って発光させた。ブロットを２つの積層フィルムに一夜暴露した。ブロットを上手く剥離させて、さらに２回再プローブした。

【表２】

表２．ノーザンプローブシークエンス

プローブ名	プローブのシークエンス	SEQ ID NO:
miR-10b	5’ CACAAATTCGGTTCTACAGGG3’	43
miR-21	5’ TCAACATCAGTCTGATAAGCTA3’	44
miR-cel-1	5’ AGTATGCAGCTCGGTACGGT3’	45
pre-miR-10b	5’ TGAAGTTTTTGCATCGACCATATATTCCCCTAGAATCGAA3’	46
pre-miR-21	5’ TGTCAGACAGCCCATCGACTGGTGTTGCCATGAGAT3’	47
tRNAMet	5’ CAGCACGCTTCCGCTGCGCCACTCT3’	48

【００８２】

細胞培養、プラスミド、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ及びｓｉＲＮＡ。ＭＣＦ１０Ａ、ＭＣＦ７、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、Ａ５４９、ＳＷ４８０及びＨｅＬａヒト細胞株と、ＮＭｕＭＧ、

６７ＮＲ及び４Ｔ１マウス乳房細胞株を、ＤＭＥＭ　１０％ＦＢＳ中で培養した（細胞は全て、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション－ＡＴＣＣから得られた）。ｓｉＲＮＡ用のリポフェクタミン２０００試薬（インビトロジェン）を用いて、トランスフェクションを実施した。合成ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡトランスフェクションでは、ＲＮＡ　ｉＦｅｃｔ（キアゲン）を、全ての細胞株で用いた。ｓｉＲＮＡのシークエンスを表３に列挙する。

【表３】

表３．ｓｉＲＮＡシークエンス

ｓｉＲＮＡ名	ｓｉＲＮＡのシークエンス	SEQ ID NO:
Hrs	5’GGAACGAGCCCAAGUACAATT3’	49
Hrs	5’UUGUACUUGGGCUCGUUCCGG3’	50
TSG101	5’GUUUAUCAUUCAAGUGUAATT3’	51
TSG101	5’UUACACUUGAAUGAUAAACTG3’	52
CD43	5’GGAGAGCCUUUGGUCUCUATT3’	53
CD43	5’UAGAGACCAAAGGCUCUCCGG3’	54
AGO2	5’GGCGUUACACGAUGCACUUTT3’	55
AGO2	5’AAGUGCAUCGUGUAACGCCTG3’	56

【００８３】

プラスミド。ｐ－ＣＭＶ－Ｔａｇ４Ｂ－ダイサー（Ｍｅｌｏ　ｅｔ　ａｌ．，２００９）；オリジーンのｐ－ＣＭＶ６－ＣＤ６３－ＧＦＰ（ＲＧ２１７２３８）；アドジーンのＧＦＰ－ｈＡＧＯ２（プラスミド１１５９０）；オリジーンのｐＧＦＰ－ｓｈＢｉＧ２（ＴＧ３１４６９７）；オリジーンのｐＧＦＰ－ｓｈダイサー（ＴＧ３０４９９１）；合成ｐｒｅ－ｍｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１は、アンビオンから購入した；３’ＵＴＲ－ＷＴＰＴＥＮ、３’ＵＴＲ－ミュータント－ＰＴＥＮ（Ｄｒ．Ｊｏｓｈｕａ　Ｍｅｎｄｅｌｌの実験室）、３’ＵＴＲ－ＷＴＨＯＸＤ１０及び３’ＵＴＲ－ミュータント－ＨＯＸＤ１０（Ｄｒ．Ｒｏｂｅｒｔ　Ｗｅｉｎｂｅｒｇの実験室）は、アドジーンから購入した。

【００８４】

免疫細胞化学及び共焦点顕微鏡測定。カバースリップが挿入された１２ウェルプレートに、細胞をほぼコンフルエントに播種して、一夜培養した。翌日、細胞を低温ＰＢＳ　１Ｘで洗浄し、４％ＰＦＡ／ＰＢＳを用いて室温で２０分間固定した。スライドにＰＢＳ　０．５％トリトンＸ－１００を室温で１０分間浸透させ、ＢＳＡ５％により室温で１時間ブロックし、ＰＢＳＴ（ＰＢＳ、０．１％トリトン）　２％ＢＳＡ中の一次抗体：１：１００抗ダイサー（ＳＣ－３０２２６）、サンタクルズ；１：５００抗Ｆｌａｇ、シグマ；　１：５０抗ＣＤ４３　ａｂ９０８８（アブカム）；１：１００抗ＴＳＧ１０１　ａｂ８３（アブカム）；１：５００抗ＧＦＰ　ａｂ６５５６（アブカム）；１：１００抗ＬＡＰＭ－１　ａｂ２５６３０（アブカム）；１：１００抗Ｈｒｓ　ａｂ５６４６８（アブカム）；１：１００抗ＢｉＧ２　ａｂ７５００１（アブカム）；１：５００抗ビオチン　ａｂ６６２３３（アブカム）と共に４℃で一夜インキュベートした。二次抗体のヤギ抗ウサギＡｌｅｘａ５４３又はヤギ抗マウスＡｌｅｘａ－４８８を室温で１時間インキュベートし、ＰＢＳＴ　２％ＢＳＡで１：２００に希釈した。ＤＡＰＩを用いて核を染色した。エクソソームの分析では、採取されたエクソソームをトリトンＸ－０．０５％と共に室温で１５分間、次に５％ＢＳＡと共に室温で１時間インキュベートした。最初の一次抗体（抗ＣＤ９、１：５０）を１００μｌ　ＰＢＳＴ中、４℃で一夜インキュベートし、二次抗体である抗Ｆｌａｇ（１：５０）を翌日に添加し、室温で１時間インキュベートした。二次抗体を連続して添加し、同じく室温で１時間インキュベートした。エクソソームを、４％ＰＦＡが入った１２ウェルプレート中のカバースリップ上部で４５分間平板培養し、低温ＰＢＳで洗浄した。同一設定を維持するためにリサイクルツールを利用して、ツァイスＬＳ

Ｍ５１０アップライト・コンフォーカル・システムで画像を得た。エクソソームの凝集により、共焦点顕微鏡で可視となる２００ｎｍを超える構造が得られた。データ解析では、少なくとも２つの独立した実験から得られたプールから画像を選択した。図は、代表的な視野を示す。

【００８５】

インビトロダイシングアッセイ。エクソソームタンパク質抽出物（１０μｇ）を、３ｍＭ $MgCl_2$、３０ｍＭ ＮａＣｌ及び１００ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ ７．５の存在下、３ｐｍｏｌのｐｒｅ－ｍｉＲ－１０ｂ、－２１及びｃｅｌ－１ ビオチンで内部標識されたヘアピンと共に３７℃でインキュベートした。各反応物の最終容量は、１０μｌであった。ホルムアミドゲルローディング緩衝液１０μｌの添加により、反応を停止させた。変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を利用してＲＮＡを分解し、ＢｒｉｇｈｔＳｔａｒ ＢｉｏＤｅｔｅｃｔキットを用い、製造業者（アンビオン）の使用説明書に従って発光させた。

【００８６】

細胞生存率及びコロニー形成アッセイ。細胞を９６ウェルプレートに播種して、採取されたエクソソームを１００μｇ／ｍＬの濃度で１日目に添加した。細胞生存率を、３－（４，５－ジメチル－２－チアゾリル）－２，５－ジフェニル－２Ｈ－テトラゾリウムブロミド（ＭＴＴ）アッセイにより決定した。コロニー形成実験では、細胞を１２ウェルプレートに播種して、エクソソームを１００μｇ／ｍＬの濃度で培養の１日目及び５日目に添加した。８日後に、コロニーを固定して、ＭＴＴ試薬で染色した。

【００８７】

イルミナ・ヒト－ＨＴ１２ ｍＲＮＡ発現アレイ。ＲＮＡをイルミナヒト－ＨＴ１２ ｍＲＮＡ発現アレイ中でハイブリダイズした。Ｒパッケージ「ｌｉｍｍａ」により提示されたｎｅｑｃルーチンを利用して、データを標準化した（Ｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，２０１０）。遺伝子存在量を、１遺伝子あたりのプローブ数の中央値により決定した。遺伝子（列）及び試料（行）のユークリット距離の算術平均により、クラスタリングを実施する。

【００８８】

ｍｉＲＮＡ発現アレイ。特注のｍｉＲＮＡアレイを、９に記載された通り使用した。アレイは、１８３３のヒトマイクロＲＮＡプローブ、１０８４のマウスマイクロＲＮＡプローブ、及びその他の７８の非コード化ＲＮＡプローブを含む。プローブは、二重にプリントした。各プローブに関連するＧｅｎｅＢａｎｋアクセションＩＤが含まれる。バイオインフォマティック分析を、Ｒ（バージョン２．１４．２）（ｒ－ｐｒｏｊｅｃｔ．ｏｒｇのワールドワイドウェブより）及びバイオコンダクター（ｂｉｏｃｏｎｄｕｃｔｏｒ．ｏｒｇ／のワールドワイドウェブより）を用いて実施した。各プローブの生データの強度は、バックグランド中央値を差し引いたピクセル強度の中央値特性である。オフセット１を設定することで、データを対数変換した後、負の値が確実に存在しなくなる。データをクォンタイル標準化した後、ｌｏｇ２変換した。同じｍｉＲＮＡを測定するプローブからのシグナルを平均した。ＬＩＭＭＡライブラリーの機能を利用して、解析を実施した。ｍａｄｅ４ライブラリーのヒートプロット関数を利用して、ヒートマップを作成した。テクニカルレプリケートを実施すると、ヒートマップは、反復測定から得られた平均発現値を表した。

【００８９】

卵巣腫瘍、子宮内膜腫瘍及び乳房腫瘍の同所性異種移植片。４～６週齢の雌無胸腺ｎｕ／ｎｕマウス（ハーラン）を、個別換気ケージにおいて１２時間の明暗周期で２１～２３℃及び湿度４０～６０％で飼育した。マウスは自由に放射線照射飼料及び滅菌水に接近することができた。全ての動物プロトコルを、スペイン施設内動物管理使用委員会（Ｓｐａｎｉｓｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅｓ）が再審査及び承認した。

【００９０】

原発性腫瘍標本を、Ｈｏｓｐｉｔａｌ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔａｒｉ ｄｅ Ｂｅｌｌｖｉｔｇｅ（Ｌ’Ｈｏｓｐｉｔａｌｅｔ ｄｅ Ｌｌｏｂｒｅｇａｔ，スペイン、バルセロナ所在）から入手した。治験審査委員会が、試験を認可した。記入されたインフォームドコンセントを、患者から回収した。摘出された５つの代表的なヒト上皮性卵巣腫瘍（ＥＯＣ）：漿液性、類内膜、明細胞腫瘍及び粘液性腫瘍から得た非壊死性組織片（約２～３ｍｍ^3）を選択して、１０％ＦＢＳ及びペニシリン／ストレプトマイシンを補充したＤＭＥＭ（バイオウィッタカー）中、室温で平板培養した。イソフルランで誘導された麻酔の下、動物を側部開腹術に供し、卵巣を露出させて、プロリーン７．０縫合糸で腫瘍片を卵巣表面に固定した。さらに、ヒト乳房腫瘍及び子宮内膜腫瘍の切片を、それぞれ乳房脂肪体及び子宮内膜壁に移植した

【００９１】

同所性移植腫瘍を成長させて、殺処分の際に血液２ｍｌを心臓穿刺により麻酔下のマウスから得た。試料を１４，０００ｒｐｍで遠心分離して、－８０℃で凍結した。

【００９２】

免疫沈降。細胞及びエクソソームを採取し、ＰＢＳで洗浄して、それぞれ遠心分離又は超遠心分離して、ペレットを採取した。氷冷ＲＩＰＡ緩衝液又は８Ｍ尿素／ＳＤＳ緩衝液を、それぞれ細胞及びエクソソームに添加した。懸濁液を細胞では４℃で１５分間、エクソソームでは４℃で２時間、穏やかに振とうした。ライセートを予め冷却された遠心分離機において１４，０００ｇで１５分間遠心分離して、ペレットを廃棄した。プロテインＡ又はＧアガロース／セファロースビーズを、ＰＢＳで２回洗浄し、ＰＢＳを含む５０％スラリーで復元した。ビーズ／スラリーミックス（１００μｌ）を細胞ライセート１ｍＬ及びエクソソームライセート５００μｌに添加して、４℃で１０分間インキュベートした。１４，０００×ｇで４℃で１０分間遠心分離することによりビーズを除去して、ペレットを廃棄した。ダイサー抗体（細胞５μｇ及びエクソソーム１０μｇ）を細胞ライセート５００μｌ又はエクソソームライセート２５０μｌ（１μｇ／μｌ細胞、１０μｇ／μｌエクソソーム）に添加して、オービタルシェーカにより４℃で一夜インキュベートした。プロテインＡ又はＧアガロース／セファロースビーズズラリー　１００μｌを添加して、４℃で一夜放置した。遠心分離後、上清を廃棄して、ビーズを、細胞なら氷冷ＲＩＰＡ緩衝液で、又はエクソソームなら尿素／ＳＤＳ緩衝液で、３回洗浄した。アガロース／セファロースビーズを５分間煮沸して、免疫複合体をビーズから解離させた。ビーズを遠心分離により回収して、タンパク質のブロットを上清で実施した。

【００９３】

Ｃａ$^{2+}$イオノフォアＡ２３１８７の存在下での培養条件。細胞（８×１０^{7}細胞）を、ＤＭＥＭ中に５×１０^{5}細胞／ｍｌで播種した。細胞を処置するために、Ａ２３１８７（最終濃度２００ｎＭ、カルビオケム、カリフォルニア州ラホヤ所在）を４時間後に培養物に添加した。処置又は非処置細胞の培地を回収して、エクソソームを採取した。

【００９４】

ヌードマウスの細胞の同所性注射。過去に記載された通り（Ｗｅｌｃｈ，　１９９７）、ＭＣＦ１０Ａ非腫瘍原性乳房上皮細胞、ＭＤＡ－ＭＢ２３１－由来エクソソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ　非腫瘍性乳房上皮細胞、及びＭＤＡ－ＭＢ２３１乳癌細胞（ＰＢＳ０．２ｍｌ中の１×１０^{5}細胞）を、３週齢雌無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体内に注射することにより、同所性腫瘍の成長を測定した。腫瘍の長さ及び幅をキャリパーで測定することにより、腫瘍の成長をモニタリングして、過去に記載された通り（Ｗｅｌｃｈ，１９９７）平均腫瘍直径として報告した。動物は全て、腫瘍細胞注射後２１日目に、安楽死された。

【００９５】

統計処理。エラーバーは、生物学的反復実験の間のＳ．Ｄ．を示す。各実験の技術的及び生物学的三重測定を実施した。統計学的有意性は、スチューデントＴ検定により計算した。

【００９６】

実施例２　－　結果

エクソソームの単離及び同定。癌細胞（ＭＤＡ－ＭＢ２３１トリプルネガティブヒト転移性乳癌、ＭＣＦ７ヒト乳房腺癌、６７ＮＲマウス非転移性乳癌及び４Ｔ１マウス転移性乳癌）から得たエクソソーム、及び対照細胞（ＭＣＦ１０Ａ非腫瘍原性ヒト上皮性乳房及びＮＭｕＭＧ非腫瘍原性マウス上皮性乳房）を、確立された超遠心分離法を利用して単離した（図１０Ａ）（Ｌｕｇａ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２；　Ｔｈｅｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，　２００６）。採取されたエクソソームは、透過型電子顕微鏡測定（ＴＥＭ）及び原子間力顕微鏡測定（ＡＦＭ）により分析した。４０～１４０ｎｍサイズの粒子を、同定した（図１Ａ～Ｂ）（Ｔｈｅｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，　２００２）。さらに、２種のエクソソームマーカ：ＴＳＧ１０１及びＣＤ９を検出することにより、エクソソームの同一性を確認した（図１Ｃ）（Ｏｓｔｒｏｗｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１０）。単離されたエクソソームは、免疫金標識電子顕微鏡測定により分析すると、ＣＤ９マーカに関しても陽性であった（図１Ａ）。ラテックスビーズに結合されたエクソソームもフローサイトメトリーにより分析して、一般に用いられるエクソソームマーカであるテトラスパニン　ＣＤ９、ＣＤ６３、ＴＳＧ１０１及びフロチリン１の表面発現を示した（図１Ｄ）。さらに、光散乱分光法（ＬＳＳ）（Ｆａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　２００７；　Ｉｔｚｋａｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２００７；　Ｂａｎｇ　ａｎｄ　Ｓｅｔａｂｕｔｒ，　２０１０；　Ｂｅｎｉｔｅｚ－ｖｉｅｙｒａ　ｅｔ　ａｌ．，　２００９；　Ｋｈａｉｒｋａｒ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１０；　Ｍｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１０）を用いて、単利された試料が直径１０４ｎｍをピークとする狭いサイズ分布を呈することを示した（ＦＩＧ．１Ｅ、右パネル）。ＬＳＳシステムは、異なる直径のガラスマイクロスフェアを内部対照として用いることにより、エクソソーム抽出物中の全ての粒子サイズの正確な検出を可能にした。ＬＳＳはまた、これらの単離物中のマイクロ小胞体及び細菌又は細胞破片の潜在的混入を排除した（図１Ｅ、右グラフの挿入図参照）。さらに、そしてＬＳＳデータと一致して、ＮａｎｏＳｉｇｈｔナノ粒子トラッキング分析から、直径１０５±１．０ｎｍをピークとするサイズ分布の粒子が明らかとなり（図１Ｆ）、ろ過されない場合に溶液中に存在する異なるサイズ範囲の潜在的混入物の存在がさらに排除された（図１Ｆ、右グラフ）。アポトーシス小体又はランダムな細胞破片が単離物に混入する可能性を排除するために、比色細胞生存率アッセイ（ＭＴＴ）、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いたｄＵＴＰニックエンドラベリング（ＴＵＮＥＬ）アッセイ、アネキシンＶ及びヨウ化プロピジニルのフローサイトメトリー分析、並びにエクソソームのチトクロムＣ免疫ブロット（図１０Ｃ～Ｅ）を利用して、エクソソーム抽出前の細胞生存率を示した。癌細胞から単離されたエクソソームは、過去に定義された通り（Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１１）、集合的にオンコソームと称される。対照細胞から単離されたエクソソームは、集合的にノルモソームと称される。

【００９７】

オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性ｍｉＲＮＡが特異的に豊富に存在する。オンコソーム及びノルモソームの全体的なｍｉＲＮＡ量を調査した。エクソソームから単離されたＲＮＡのマイクロフルイディクス分析から、ノルモソームに比較した場合の、オンコソームの低分子ＲＮＡ量増加が明らかとなった（図２Ｆ）。さらに、ノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ由来）のｍｉＲＮＡレベルとオンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１由来）のｍｉＲＮＡレベルの間に低い相関が観察され、R^2値は０．３５であった（図２Ａ）。全体的ｍｉＲＮＡアレイ分析から、ノルモソームと比較して、オンコソーム中でｍｉＲＮＡ量が豊富であることが示された。この分析では、ノルモソームと比較した場合のオンコソームの非常に異なるｍｉＲＮＡプロファイルも明らかとなった。ｍｉＲＮＡアレイデータは、オンコソームとノルモソームの間の３０５の差次的に発現されるｍｉＲＮＡ（表５）と共に、ノルモソームと比較した場合のオンコソーム中のｍｉＲＮＡ量の全体的な増加を示した。癌細胞は、非腫瘍原性細胞と比較して、総低分子ＲＮＡの全体量の減少を示したため、オンコソーム中でｍｉＲＮＡが豊富であったことは、癌細胞中のｍｉＲＮＡ増加の単なる反映ではなかった（図１１Ａ）。それゆえエクソソーム中のｍｉＲＮＡの蓄積は

、特異的で、標的化されていると思われる。

【００９８】

癌細胞中と、オンコソームとノルモソーム間にあるｍｉＲＮＡアレイの差次的発現が見出されたこれらの細胞由来のエクソソームの１５種のｍｉＲＮＡの発現を、さらに評価した（表４及び５）。癌進行において示唆されてきたこれらの採取物から得られた６種のｍｉＲＮＡ（発癌性ｍｉＲＮＡ：ｍｉＲ－１０ａ、ｍｉＲ－１０ｂ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２７ａ、ｍｉＲ－１５５及びｍｉＲ－３７３）及び９種のｍｉＲＮＡは、腫瘍抑制機能を有することが報告されており（腫瘍サプレッサｍｉＲＮＡ：ｌｅｔ７ａ、ｍｉＲ１５ｂ、ｍｉＲ２６ａ、ｍｉＲ３１、ｍｉＲ１２５ａ、ｍｉＲ１２５ｂ、ｍｉＲ２００ａ、ｍｉＲ２００ｃ、ｍｉＲ３３５）、細胞、及びそれらの細胞由来のエクソソーム中で発現される（図１１Ｂ～Ｃ、及び表４）。エクソソーム中のｍｉＲＮＡの半減期を決定するために、無細胞系を開発して、単離されたエクソソーム中のｍｉＲＮＡを試験した。細胞を含まない精製されたエクソソームを培地に入れ、３７℃で２４ｈ又は７２ｈのいずれかの時間、インキュベートした。インキュベーション時間の後、エクソソームをｍｉＲＮＡ量について分析して、それらの起源の細胞と比較した。２４ｈに比較して７２ｈでは、細胞に比較してオンコソーム中でこれらのｍｉＲＮＡの相関値の減少が存在したが（R^2＝０．６０対R^2＝０．４３）、ノルモソームとＭＣＦ１０Ａ細胞（ノルモソームを得るために用いられた細胞）の間には、高い相関が維持された（R^2＝０．９８対R^2＝０．９８）（図２Ｂ）。６種の分析された発癌性ｍｉＲＮＡの顕著なアップレギュレーションが、２４ｈ培養のオンコソームに比較し、排他的に７２ｈ培養のオンコソームで観察され、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１由来オンコソームはの平均倍率変化はそれぞれ１７．６及び１３．２であったことから、時間に伴うオンコソーム中ｍｉＲＮＡ量の特異的増加が裏づけられた（図２Ｃ中央及び下グラフ、並びに図１１Ｄ右、上及び下グラフ）。オンコソームを２４ｈ又は７２ｈのいずれかで培養した場合に、腫瘍抑制ｍｉＲＮＡについて、有意でない差が認められた（図２Ｃ及び図１１Ｄ）。ノルモソームは、培養時間とは無関係に、ｍｉＲＮＡ量の任意の差を示さなかった（図２Ｃ及び図１１Ｄ）。１５種のｍｉＲＮＡ全ての存在が、７２ｈ培養のノルモソームとそれが得られた細胞とで同一であり、相関係数は０．９３であった（図２Ｅ左）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１エクソソームの相関係数は有意に低く（それぞれr^2＝０．５６及び０．４２）、時間に伴うオンコソーム中ｍｉＲＮＡレベルの特異的変化が裏づけられた（図２Ｅ中央及び右）。さらに、オンコソームをＭＣＦ７（r^2＝０．７６）、ＭＤＡ－ＭＢ２３１（r^2＝０．５６）、６７ＮＲ（r^2＝０．６４）及び４Ｔ１（r^2＝０．４２）と比較すると、細胞株の悪性度上昇に伴い相関レベルが低下する（図２Ｅ及び図１１Ｅ）。それゆえ、ノルモソームのｍｉＲＮＡ量は、全ての時間で起源細胞を反映したが、オンコソームは、細胞に非依存的に時間に伴いｍｉＲＮＡ量が変化した。

【００９９】

ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１オンコソームのｍｉＲＮＡ量をＭＣＦ１０Ａ及びＮＭｕＭＧ細胞のノルモソームのそれと比較すると、２４ｈ培養されたオンコソーム中で発癌性ｍｉＲＮＡが豊富であることが観察され、平均倍率変化がそれぞれ２．７及び２．０であった（図１１Ｂ）。７２ｈの時点では、それぞれＭＣＦ１０Ａ及びＮＭｕＭＧ由来ノルモソームに比較して、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１由来オンコソーム中の発癌性ｍｉＲＮＡで、３０及び１８．２の平均倍率変化が検出された（図１１Ｂ）。ノーザンブロットで、オンコソーム中で排他的に発癌性ｍｉＲ－１０ｂ及びｍｉＲ－２１のアップレギュレーションが確認され、ｍｉＲＮＡアレイ及びｑＰＣＲ分析の両方が裏づけられた（図２Ｄ）。

【０１００】

オンコソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ及びコアＲＬＣタンパク質を含む。単離されて間もないオンコソームの無細胞培養ではｍｉＲＮＡの増加が得られ、エクソソームの活性バイオジェネシスが示唆された。さらにマイクロフルイディクス分析からも、より大きなＲＮＡ分子の存在が示唆された（図２Ｆ）。それゆえノルモソーム及びオンコソーム調製物

中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの潜在的存在を模索した。単離後２４ｈ又は７２ｈのエクソソームの無細胞培養を実施して、可能性のある任意の余分なエクソソームＲＮＡを消耗するためにＲＮＡｓｅ処置に供した。これに続いて、エクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを検出した。分析されたｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、過去に評価された１５種の成熟ｍｉＲＮＡ（表４）に対応するものであった。

【表４】

表４．オンコソームとノルモソームで差次的に発現される１５種のｍｉＲＮＡ

マイクロＲＮＡ ＩＤ	参考資料
miR-let7-a	Kim *et al.*, 2012; Spizzo *et al.*, 2009
miR-15b	Cimmino *et al.*, 2005; Palamarchuk *et al.*, 2010
miR-26a	Kota *et al.*, 2009
miR-31	Valastyan *et al.*, 2009
miR-125a	Guo *et al.*, 2009; Spizzo *et al.*, 2009
miR-125b	Spizzo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011
miR-200a	Park *et al.*, 2008; Spizzo *et al.*, 2009
miR-200c	Park *et al.*, 2008; Spizzo *et al.*, 2009
miR-335	Heyn *et al.*, 2011; Scarola *et al.*, 2010; Tavazoie *et al.*, 2008
miR-10a	Tan *et al.*, 2009
miR-10b	Spizzo *et al.*, 2009; Yigit *et al.*, 2012
miR-21	Spizzo *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2008
miR-27a	Guttilla and White, 2009; Mertens-Talcott *et al.*, 2007
miR-155	Mattiske *et al.*, 2012
miR-373	Spizzo *et al.*, 2009; Voorhoeve *et al.*, 2006

【０１０１】

分析された１５種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ全てが、エソソーム（ノルモソーム及びオンコソーム）中に存在した（図３Ａ及び図１２Ａ）。ｍｉＲＮＡで観察された通り、オンコソームは、発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ中では非常に豊富であったが、腫瘍抑制ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、提示未満であった（図３Ａ及び図１２Ａ）。エクソソームを２４ｈ又は７２ｈ培養すると、２４ｈ培養されたオンコソームに比較して７２ｈ培養されたオンコソームで、発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの有意なダウンレギュレーションが観察された。そのような変動は、ノルモソームでは見出されなかった（図３Ｂ及び１２Ｂ）。腫瘍抑制ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、オンコソーム又はノルモソーム中で任意の差を示さなかった（図３Ｂ及び図１２Ｂ）。その上、オンコソーム中で発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ量が減少し、ノルモソームでは減少しないことが、培養の９６ｈ後に認められ、その時点で発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡレベルは、腫瘍抑制ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのレベルに達した（図３Ｅ及び１２Ｅ）。オンコソーム中の発癌性ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのダウンレギュレーションを、ｐｒｅ－ｍｉＲ１０ｂ及びｐｒｅ－ｍｉＲ２１についてのノーザンブロットにより確認した（図３Ｃ）。次に、エクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ及びｍｉＲＮＡの経時的分析を実施した。単離されたオンコソームを６ｈ、１２ｈ、２４ｈ、３６ｈ、４８ｈ、７２ｈ及び９６ｈ培養することにより、６種の分析されたｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのレベルが培養時間に伴い各ｍｉＲＮＡに反比例することが観察された（図３Ｄ）。成熟ｍｉＲＮＡは、２４ｈ～７２ｈの培養で量が増加し、その後、プラトーに達した（図３Ｄ）。それゆえ、オンコソームは、時間が経過するとｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ量を消耗し、同時に各成熟ｍｉＲＮＡが増加した。この観察から、オンコソームがｍｉＲＮＡバイオジェネシスの能力を有するという仮説が導びかれた。

【０１０２】

培養されたエクソソーム中のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのプロセシングが、直後ではなく２４ｈ後に開始する理由を理解するために、エクスポーティン－５（ＸＰＯ５）に関してサイレンシングされたＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中の６種のｍｉＲＮＡ全てをモニタリングした（図１２Ｃ及びＤ）。ＸＰＯ５は、核から細胞質へのｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ輸送を担う（Ｙｉ　ｅｔ　ａｌ．，　２００３）。ＸＰＯ５のサイレンシングは、核から細胞質へのｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの流れを妨害し、核から新しい細胞質ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのを導入せずに細胞質ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのプロセシングの評価を可能にする。マイクロＲＮＡ－２１を、遠心分離前後のＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＸＰＯ５細胞中でモニタリングし（図１２Ｃ及びＤ）、それをエクソソーム単離の条件を模倣して４℃で３時間実施した。非遠心分離細胞に対して遠心分離細胞の間に、ｍｉＲ－２１の有意なアップレギュレーションが同じ時点で観察されなかったが、前者の細胞には２４ｈのラグタイムがある（図１２Ｃ及びＤ）。つまり、細胞及びエクソソームの両方が、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのプロセシングを開始するのに、４℃での遠心分離のストレスから回復する期間を必要とする。そのような順化は、組織培養継代の後の培養細胞中の酵素活性に関して予測される。

【０１０３】

オンコソームはコアＲＩＳＣ（ＲＬＣ）タンパク質を含む。オンコソームは、時間に伴ってｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ濃度を消耗し、同時に各成熟ｍｉＲＮＡを増加させる。このことにより本発明者らは、エクソソーム中のｍｉＲＮＡバイオジェネシス及びｐｒｅ－ｍｉＲＮＡプロセシング能力を検討することとなった。マイクロＲＮＡバイオジェネシスは、ＲＬＣ、ダイサー、ＴＲＢＰ及びＡＧＯ２といった鍵を握るタンパク質成分を必要とする（Ｃｈｅｎｄｒｉｍａｄａ　ｅｔ　ａｌ．，　２００５）。ダイサー及びＴＲＢＰが、ダイサータンパク質に安定性をもたらす複合体を形成し、ＡＧＯ２が、バイオジェネシス経路の後期に動員されて、鎖の選択及びＲＮＡ巻き戻しプロセスを支援することが、これまでに示されている（Ｃｈｅｎｄｒｉｍａｄａ　ｅｔ　ａｌ．，　２００５）。ダイサータンパク質は、ＭＣＦ７、ＭＤＡ－ＭＢ２３１、６７ＮＲ及び４Ｔ１癌細胞由来のオンコソーム中で検出された（図１Ｃ及び図４Ａ～Ｂ）。これまで記載された通り（Ｍｏｎｔｅｃａｌｖｏ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２）、エクソソームタンパク質抽出の前にエクソソーム調製物の全てをプロテイナーゼＫで処置することにより、混入している余分なエクソソームダイサータンパク質を検出する可能性が排除された（図１Ｃ及び図４Ａ～Ｂ）。加えて、Ａ５４９（ヒト肺癌）、ＳＷ４８０（ヒト大腸癌）、ＨｅＬａ（ヒト子宮頸癌）及び４Ｔ０７（マウス乳癌）などの様々な癌細胞株もまた、ダイサー含有エクソソームを生成する（図１３Ｈ）。ダイサータンパク質は、ＭＣＦ１０Ａ（ヒト非腫瘍原性乳房上皮細胞）及びＮＭｕＭＧ（マウス非腫瘍原性乳房上皮細胞）細胞株により生成されたノルモソーム中では検出されなかった（図１Ｃ及び４Ａ）。透過型電子顕微鏡測定を利用したエクソソームの免疫金標識は、オンコソーム中のダイサータンパク質の存在を確証したが、ノルモソームではしなかった（図４Ｂ及び１３Ａ）。加えて、抗ＧＦＰ抗体を、免疫金標識実験において別の陰性対照として用いたが、エクソソーム中には何も検出されなかった（図１３Ｂ）。

【０１０４】

ダイサータンパク質は、ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞において、Ｎ末端Ｆｌａｇタッグが過剰発現された（図１３Ｃ）。免疫ブロッティング及び共焦点顕微鏡測定ではさらに、Ｆｌａｇ－ダイサータンパク質の存在がオンコソーム中で特異的に確認され、ノルモソームではされなかった（図４Ｃ）。細胞内Ｃａ２＋レベルの上昇は、エクソソーム分泌を刺激する（Ｓａｖｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．，　２００３）。Ca^{2+}イオノフォアＡ２３１８７を、ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞の培地に添加して、エクソソームを採取した。本発明者らは、ＣＤ９発現による判断としてエクソソーム生成の有意な増加を観察した（図４Ｄ）。ダイサータンパク質は、オンコソーム中で検出されたが、ノルモソームではされなかった（図４Ｄ）。これらの結果から、これがエクソソームの量ではなく、内容物というよりむしろダイサー蓄積をもたらす特異的メカニズムを決定することがさらに示唆された。加えて、ダイサー発現は、ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３

１細胞中の２つのショートヘアピン構築物の安定した発現を介して減少した（図１３Ｄ～Ｅ）。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１ｓｈダイサー細胞に由来するオンコソームは、免疫ブロッティング及び免疫金標識により検出されたｓｈスクランブル又は親ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞に比較して、有意に少ないダイサーを含んでいた（図４Ｅ～Ｆ）。同じくダイサーは、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー細胞由来のノルモソーム中では検出されなかった（図４Ｅ）。

【０１０５】

加えてＲＬＣタンパク質、ＡＧＯ２及びＴＲＢＰもまた、オンコソーム中で検出され、ノルモソームではされなかった（図４Ｇ～Ｈ）。エクソソームを、ＧＦＰがタッグされたＡＧＯ２でトランスフェクトされたＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞から抽出した（図４Ｉ）。抗ＧＦＰ抗体を使用して、ＧＦＰ－ＡＧＯ２の存在を、ＭＤＡ－ＭＢ２３１－ＧＦＰ－ＡＧＯ２細胞から抽出されたエクソソーム中で検出した（図４Ｊ）。ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞中のＡＧＯ２のｓｉＲＮＡサイレンシングの際、ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来オンコソーム中のＡＧＯ２タンパク質のダウンレギュレーションが観察された（図４Ｋ～Ｌ）。本発明者らは、ＡＧＯ２がオンコソーム中のダイサーに結合するが、両者ともノルモソームでは検出不能であることを、免疫沈降により示した（図４Ｍ）。ダイサーの安定性を誘導してそのｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ切断活性を支援する不可欠なパートナーが、ＴＲＢＰである（Ｃｈｅｎｄｒｉｍａｄａ ｅｔ ａｌ．，２００５；Ｍｅｌｏ ｅｔ ａｌ．，２００９）。免疫沈降から、オンコソーム中のダイサー／ＴＲＢＰ複合体の存在が明らかとなったが、ノルモソームではならなかった（図４Ｎ）

【０１０６】

坑ダイサー抗体を利用した免疫沈降により、ＡＧＯ２がオンコソーム中のダイサーに結合するが、両者ともノルモソームでは検出不能であることが明らかとなった（図１３Ｆ）。ダイサーの安定性を誘導してそのｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ切断活性を支援する不可欠なパートナーが、ＴＲＢＰである（Ｃｈｅｎｄｒｉｍａｄａ ｅｔ ａｌ．，２００５；Ｍｅｌｏ ｅｔ ａｌ．，２００９）。坑ダイサー抗体を用いた免疫沈降から、オンコソーム中のダイサー／ＴＲＢＰ複合体の存在が明らかとなったが、ノルモソームではならなかった（図１３Ｇ）

【０１０７】

オンコソームはＲＬＣを利用してｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングし、成熟ｍｉＲＮＡを生成する。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡから成熟ｍｉＲＮＡを生成するために、オンコソーム中のＲＬＣタンパク質（ダイシング及びサイレンシングの特性）の機能性を試験した。ダイサーが欠如したエクソソームを、ＭＣＦ１０Ａｓｈダイサー細胞、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｈダイサー細胞及び４Ｔ１ｓｈダイサー細胞から抽出した（図１４Ａ）。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ及びｍｉＲＮＡ量から、ダイサーの任意の有意な変化が時間と共にエクソソームをダウンレギュレートすることは明らかにならず、オンコソーム中にダイサーが存在しなければ、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡがプロセシングされてｍｉＲＮＡを生成することがないことが示された（図５Ａ～Ｂ及び図１４Ｂ～Ｃ）。次に、電気穿孔により坑ダイサー及び坑ＴＲＢＰ抗体をエクソソームに挿入して、エクソソームの外側での抗体の存在を回避するために電気穿孔後にプロテイナーゼＫで処置された坑アクチン対照抗体で電気穿孔されたオンコソーム及びノルモソームと比較した（図５Ｃ）。対照坑アクチン抗体で電気穿孔されたオンコソームは、これまで言及された通りｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ及びｍｉＲＮＡレベルで同じ変動を示した（図５Ｄ～Ｅ及び図１４Ｄ～Ｅ）。坑ダイサー及び坑ＴＲＢＰ抗体を有するオンコソームにおいて、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ及びｍｉＲＮＡレベルの有意でない変化が、時間に伴って観察され、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡプロセシングの阻害が示唆された（図５Ｄ～Ｅ及び図１４Ｄ～Ｅ）。７２ｈ無細胞培養後に、オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来）、坑ダイサー抗体で電気穿孔されたオンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来）、及びノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ由来）のｍｉＲＮＡ発現アレイにより、総ｍｉＲＮＡ量を評価した。坑ダイサー抗体を有するオンコソームの総ｍｉＲＮＡ量は、ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来オンコソーム（R^2＝０．４８）よりもＭＣＦ１０Ａノルモソームに（R^2＝０．７９）より類似していた。オンコソームを、坑ダイサー抗体を含むオンコソームと比較する

と、１９８の差次的に発現されたｍｉＲＮＡが観察され、そのうち４８％は、有意にダウンレギュレートされた（表６）。これらのうちの１９％は発癌性であり、１％だけが、過去に発行された文献に基づき腫瘍抑制性を有することが報告されている（図１４Ｆ、表６）。

【０１０８】

ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを成熟ｍｉＲＮＡに変換する酵素反応が自然発生的であり、３種のＲＬＣタンパク質、組み込まれたｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ、及びエクソソーム中に存在するタンパク質Ｈｓｐ９０以外の任意の因子を必要としない（Ｍａｎｉａｔａｋｉ ａｎｄ Ｍｏｕｒｅｌａｔｏｓ，２００５；ＭｃＣｒｅａｄｙ ｅｔ ａｌ．，２０１０）。これをさらに確認するために、オンコソームを、Ｈｓｐ９０活性を選択的に阻害する薬物ゲルダナマイシンを用いて電気穿孔した（Ｍｉｙａｔａ，２００５）。ゲルダナマイシンの存在下で合成された成熟ｍｉＲＮＡの量の有意な減少が、対照との比較の際に見出された（図６Ａ）。成熟ｍｉＲＮＡ発現に及ぼすＨｓｐ９０タンパク質の影響は、２つの重複する可能性があるプロセス：ｍｉＲＮＡバイオジェネシスにおいてＡＧＯ２を支援する能動的役割、及びＲＩＳＣ中のＡＧＯ２タンパク質に結合した成熟ｍｉＲＮＡの安定性によって媒介される可能性がある。

【０１０９】

オンコソームの特異的なｐｒｅ－ｍｉＲＮＡプロセシング能力をさらに確認するために、合成ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１０ｂ及び－２１と、Ｃ．エレガンス前駆体ｐｒｅ－ｃｅｌ－１　ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをエクソソーム中に電気穿孔して、それらのプロセシングを試験した（図１５Ａ）。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの有意なダウンレギュレーション及び各ｍｉＲＮＡのアップレギュレーションが、７２ｈ培養後のオンコソーム中で観察された（図６Ｂ～Ｃ）。ダイサー抗体を含むオンコソームからは、７２ｈ培養後のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ量の差が明らかにならなかった（図６Ｂ～Ｃ）。ｓｈダイサー細胞由来のオンコソームからは、７２ｈ培養後にｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ量の差が明らかにならなかった（図６Ｂ～Ｃ）。加えて、ｐｒｅ－ｍｉＲ－１０ｂ、－２１及び－ｃｅｌ－１を、ビオチン－デオキシチミジン（ｄＴ）で標識して、それらをＭＣＦ１０Ａ細胞にトランスフェクトした。ｄＴ－で修飾されたｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして、成熟ｍｉＲＮＡを生成し、その標識がプロセシング能力を改変しないことを確認した（図１５Ｂ～Ｃ）。修飾されたｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを「ダイシング」アッセイに用いて、ダイサーを含むエクソソームが特異的にｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングすることが可能であり、成熟ｍｉＲＮＡを生成することを示した（図６Ｄ～Ｆ）。

【０１１０】

癌細胞内の細胞質ＣＤ４３はダイサーの動員に寄与する。多小胞体（ＭＶＢ）は、形質膜との融合の際に最終的にエクソソームとして放出されるエクソソームを含む細胞内オルガネラである（Ｐａｎｔ ｅｔ ａｌ．，２０１２）。ＲＩＳＣタンパク質をエンドソームに動員させ、次にエクソソーム中に放出させる可能なメカニズムを探求した。最初に、ダイサーが対照細胞と比較して癌細胞中のＭＶＢと会合するかについて探求した。ＭＶＢのマーカと併せたダイサーの細胞内分布、及びエクソソームのバイオジェネシス経路を比較した。Ｈｒｓ及びＢｉＧ２は、早期エンドソームマーカであり、ＴＳＧ１０１は、ＭＶＢのマーカである（Ｒａｚｉ ａｎｄ Ｆｕｔｔｅｒ，２００６；Ｓｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，２００４）。ダイサーは、ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞内でＨｒｓ、ＢｉＧ２及びＴＳＧ１０１と共局在化した（図１６Ａ）。外来的に送達されたＮ－ローダミン標識ホスファチジルエタノールアミン（ＮＲｈＰＥ）は、細胞に取り込まれ、ＭＶＢ内に保持される（Ｓｈｅｒｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００３）。ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞内で染色されるダイサーは、大部分がＭＶＢ内でＮＲｈＰＥと共局在化し、最終的にエクソソームを生成する。これらのデータは、ダイサー、ＴＲＢＰ及びＡＧＯ２が後期エンドソーム／ＭＶＢ画分中に現れた、共画分試験における過去の観察と一致している（Ｓｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。これに反して、対照細胞（ＮＭｕＭＧ及びＭＣＦ１０Ａ）中には、ダイサーとＨｒｓ、ＢｉＧ２、ＴＳＧ１０１又はＮＲｈＰＥとの

共局在化が存在しなかった（図１６Ａ）。さらにＭＤＡ－ＭＢ２３１及びＭＣＦ１０Ａ細胞において、Ｈｒｓ及びＴＳＧ１０１遺伝子を２つの異なるｓｉＲＮＡを用いてサイレンシングし、ＢｉＧ２遺伝子を２つの異なるｓｈＲＮＡを用いてサイレンシグし、ダイサータンパク質発現を評価した（図１６Ｂ）。Ｈｒｓ、ＢｉＧ２及びＴＳＧ１０１のサイレンシングは、ＭＶＢ形成を損傷し、エクソソーム生成のダウンレギュレーションをもたらした（図１６Ｃ～Ｅ）。ダイサータンパク質の増加が、ｓｉＨｒｓ、ｓｈＢｉＧ２又はｓｉＴＳＧ１０１を有するＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞の細胞質及び核内で観察された。同様の結果が、４Ｔ１細胞をＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞の代わりに用いた場合に得られた。Ｈｒｓ、ＢｉＧ２又はＴＳＧ１０１遺伝子が、ＭＣＦ１０Ａ細胞においてサイレンシングされると、ダイサータンパク質発現及び位置（細胞質）の改変が観察されなかった。興味深いこととして、ダイサーｍＲＮＡ発現は、ｓｉＨｒｓ、ｓｈＢｉＧ２及びｓｉＴＳＧ１０１　ＭＤＡ－ＭＢ２３１及び４Ｔ１細胞において減少した（図１６Ｆ）。これにより、細胞中のダイサータンパク質量と転写レベルの間にあるネガティブフィードバックループを表すことができる。これらの結果から、ダイサータンパク質のエクソソーム媒介輸送が潜在的に癌細胞内のダイサーを消耗させる律速段階になることが示唆される。ＭＶＢ形成を損傷することで、ダイサーの転写レベルを上昇させずに、細胞質及び核全体にダイサータンパク質の蓄積を導いた。

【０１１１】

ＭＶＢはまた、次のリソゾームによる分解のためにユビキチン化タンパク質を封鎖する（Ｌｕｚｉｏ　ｅｔ　ａｌ．，　２００９）。本発明者らは、ダイサータンパク質がユビキチン化されず、リソゾーム用に広範に用いられるマーカ：ＬＡＭＰ－１と共局在化しないことを示した。これらの結果から、ダイサーが癌細胞内での分解のために標的化されず、むしろエクソソームを介して分泌されることが示唆される（図１６Ｇ）。

【０１１２】

タンパク質にＭＶＢ及びエクソソームを標的化させるシグナルは、大部分が未知である。近年になり、ＣＤ４３などの様々な形質膜のアンカータンパク質が、ＭＶＢ及びエクソソームへのタンパク質輸送の可能なメディエータとして推測された（Ｓｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１１ｂ）。ＣＤ４３は、主に癌細胞内で高度に発現される白血球膜貫通シアログリコプロテインである（Ｓｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２）。ＣＤ４３は、乳癌をはじめとする多くの固形腫瘍で検出され、癌の進行及び転移と相関する（Ｓｈｅｌｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，　２０１２）。本発明者らはＣＤ４３がＭＶＢへのＲＩＳＣタンパク質の輸送に寄与し得るかについて探求した。本発明者らは、ダイサーがＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞内でＣＤ４３タンパク質と共に免疫沈降することを示している（図９Ａ）。ＣＤ４３が、ＭＣＦ１０Ａ及びＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞内でｓｉＲＮＡを用いてダウンレギュレートされる際に、ダイサーレベルがオンコソーム中で有意に減少し（図９Ｂ及び１６Ｈ）、ダイサータンパク質は核及び細胞質に蓄積される。ダイサーｍＲＮＡ発現のダウンレギュレーションは、ｓｉＨｒｓ、ｓｈＢｉＧ２及びｓｉＴＳＧ１０１を用いる前の観察と同様に、ＭＤＡ－ＭＢ２３１ｓｉＣＤ４３癌細胞内で観察されたが、ＭＣＦ１０ＡｓｉＣＤ４３非腫瘍原性細胞では観察されなかった（図１６Ｉ）。

【０１１３】

オンコソームはダイサー依存的に標的細胞のトランスクリプトームを改変する。癌細胞（ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞）は、エクソソームのマーカであるＣＤ６３－ＧＦＰでトランスフェクトされた（Ｅｓｃｏｌａ　ｅｔ　ａｌ．，　１９９８）。ＣＤ６３－ＧＦＰ　ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を用いて、ＧＦＰ＋エクソソームを単離し、次にＭＣＦ１０Ａ細胞と共にインキュベートした。ＭＤＡ－ＭＢ２３１－ＣＤ６３－ＧＦＰから得たエクソソームは、緑色蛍光を発光する粒子を検出するレーザビームを補充されたＮａｎｏＳｉｇｈｔを用いることにより緑色になることが示された（図１７Ａ）。ＣＤ６３－ＧＦＰ＋オンコソームは、ＭＣＦ１０Ａ細胞に侵入して、細胞質内に現れることが示された。ｍｉＲＮＡ発現アレイを用いると、ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞が、親ＭＣＦ１０Ａ細胞とは異なりＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞と類似した新しいｍｉＲ

ＮＡ発現プロファイルを獲得することが示された。ｍｉＲＮＡ発現アレイを用いると、ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞が、親ＭＣＦ１０Ａ細胞とは異なる新しいｍｉＲＮＡ発現プロファイルを獲得することが示された。オンコソームで処置されたＭＣＦ１０Ａの全体的トランスクリプトームのプロファイリングは、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞により類似している。ｍＲＮＡ発現プロファイルにおけるそのような少なからぬ改変は、ＭＣＦ１０Ａ細胞がダイサー抗体を含むＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームに暴露された時に逆行され、発現パターンが、親ＭＣＦ１０Ａ細胞により再度クラスタリングする。

【０１１４】

親ＭＣＦ１０Ａ細胞と比較した、ＭＤＡ－ＭＢ２３１オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞におけるｍｉＲＮＡ及びｍＲＮＡ発現プロファイルの綿密な分析から、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞内での特定のｍｉＲＮＡの有意なアップレギュレーション、及び記載されたｍＲＮＡターゲットのダウンレギュレーションが明らかとなった。例として、ｍｉＲＮＡ－２１及び－１０ｂは、他の発癌性ｍｉＲＮＡと共に、処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞内でアップレギュレートされた（それぞれ４．６倍及び２．３倍）。マイクロＲＮＡ－２１及び－１０ｂは、乳癌の進行、侵襲性及び転移において示唆された（Ｍａ ｅｔ ａｌ．， ２００７； Ｙａｎ ｅｔ ａｌ．， ２０１１）。以前に示された通り、ｍｉＲ－２１及び－１０ｂは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡから得たオンコソーム中で合成された。ＰＴＥＮ及びＨＯＸＤ１０は、ｍｉＲ－２１及びｍｉＲ－１０ｂターゲットとして記載されており、対照ＭＣＦ１０Ａ細胞と比較すると、オンコソームにより処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞の発現アレイ分析において抑制された。ウェスタンブロット分析から、ＰＴＥＮ及びＨＯＸＤ１０レベルが、オンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞において抑制されていることが示された（図７Ａ～Ｂ）。オンコソーム中のｍｉＲ－２１及びｍｉＲ－１０ｂがＭＣＦ１０Ａレシピエント細胞におけるＰＴＥＮ及びＨＯＸＤ１０をサイレンシングし得るかについて検査するために、ＭＣＦ１０Ａ細胞を、ｍｉＲ－２１及びｍｉＲ－１０ｂへの結合が可能なＰＴＥＮ又はＨＯＸＤ１０遺伝子の野生型３’－ＵＴＲを含むルシフェラーゼレポータで一過性にトランスフェクトした。ＰＴＥＮ又はＨＯＸＤ１０ベクターの変異体３’ＵＴＲを、対照として用いた。ルシフェラーゼレポータ活性の低下が、オンコソームと共にインキュベートされたＭＣＦ１０Ａ細胞で認められ、オンコソームからレシピエント細胞へのｍｉＲＮＡの機能的送達が確認された（図７Ｃ）。オンコソームと共にインキュベートされた細胞において、ＰＴＥＮ及びＨＯＸＤ１０発現レベルを異なる時点で評価した。７２ｈ培養されたエクソソームによる細胞処置の直後に、ＰＴＥＮ及びＨＯＸＤ１０発現において有意な減少が検出された（図７Ａ～Ｂ）。ＰＴＥＮ及びＨＯＸＤ１０発現レベルは、単離されて間もないエクソソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞では極わずかの変動となり、十分な濃度の成熟ｍｉＲＮＡがこの時点で存在しなかったことが示唆される（図１７Ｂ～Ｃ）。坑ダイサー抗体と共に７２ｈ培養されたオンコソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞は、ＰＴＥＮ及びＨＯＸＤ１０の有意でないダウンレギュレーションを示した（図７Ｄ及び１７Ｇ）。加えて、ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来オンコソーム中で検出されなかったｍｉＲＮＡである、細胞中のｍｉＲ－１５のプロセシングは、ダイサー抗体を含むＭＤＡ－ＭＢ２３１エクソソームによるＭＣＦ１０Ａ細胞の処置により改変せず、処置された細胞におけるダイサー抗体の有意でない影響が示された（図１７Ｄ）。幾つかの報告では、エクソソームと共にインキュベートされた細胞内では、長時間培養を必要とせずに、ｍｉＲＮＡターゲットのダウンレギュレーションが示されている（Ｋｏｓａｋａ ｅｔ ａｌ．， ２０１３； Ｎａｒａｙａｎａｎ ｅｔ ａｌ．， ２０１３； Ｐｅｇｔｅｌ ｅｔ ａｌ．， ２０１０）。ｍｉＲ－１８２－５ｐは、オンコソーム処置によりＭＣＦ１０Ａ細胞においてアップレギュレートされたｍｉＲＮＡの１種であり、ｍｉＲ－１８２－５ｐターゲットであるＳｍａｄ４（Ｈｉｒａｔａ ｅｔ ａｌ．， ２０１２）は、これらの細胞のオンコソーム処置によりダウンレギュレートされた遺伝子の１種である（図７Ｅ）。培養時間中のｍｉＲ－１８２－５ｐのアップレギュレーションは観察されず、ｐｒｅ－ｍｉＲ１８２－５ｐは、オンコソーム中で検出されなかった

（図１７Ｅ）。それゆえオンコソームは、ｐｒｅ－ｍｉＲのプロセシングを必要とせずに成熟ｍｉＲＮＡも含有している。そのような成熟ｍｉＲＮＡが関連の理論量で存在する場合、それらは、これまで示された通りレシピエント細胞の遺伝子発現を調節することが可能かもしれない（Ｉｓｍａｉｌ ｅｔ ａｌ．，２０１３；Ｋｏｇｕｒｅ ｅｔ ａｌ．，２０１１；Ｋｏｓａｋａ ｅｔ ａｌ．，２０１３；Ｎａｒａｙａｎａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３；Ｐｅｇｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，２０１０；Ｖａｌａｄｉ ｅｔ ａｌ．，２００７；Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１０）。しかし、一部の成熟ｍｉＲＮＡが、エクソソーム中に存在せず、それらのｐｒｅ－ｍｉＲＮＡが存在すれば、これらは成熟ＲＬＣ会合ｍｉＲＮＡにプロセシングされるため、ターゲットに対して尚も生物学的影響を有し得る。

【０１１５】

７２ｈ培養されたオンコソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞の細胞生存率及び増殖は増加し、それは単離されて間もないオンコソームを用いた場合には観察されなかった（図７Ｆ）。その差は、ＭＣＦ１０Ａ細胞を、坑ダイサー抗体を含むＭＤＡ－ＭＢ２３１由来オンコソームで処置された場合には観察されなかった（図７Ｆ）。同じパターンが、オンコソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞のコロニー形成能力についても当てはまる（図７Ｇ及び１７Ｆ）。７２ｈ培養オンコソームで処置されたＭＣＦ１０Ａ細胞は、非処置細胞と比較して、コロニーを形成する（図７Ｇ）。そのようなコロニー形成は、単離されて間もないオンコソーム又はダイサー抗体を含むオンコソームを用いた場合には、観察されなかった（図７Ｇ）。

【０１１６】

オンコソームは非腫瘍原性上皮細胞の腫瘍形成を誘導し、線維芽細胞を活性化する。近年の研究で、骨髄間葉系間質細胞由来のエクソソームが、多発性骨髄腫の細胞増殖を支持することが示唆された（Ｒｏｃｃａｒｏ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。ＭＣＦ１０Ａ細胞及び予めオンコソームに暴露されたＭＣＦ１０Ａ細胞（ＭＣＦ１０Ａ細胞－オンコソーム）の機能的な「発癌能力」について取り組むために、近年記載されたプロトコルと同様に（Ｌｕｇａ ｅｔ ａｌ．，２０１２）、これらの細胞を雌ｎｕ／ｎｕマウスの乳房脂肪体に同位性に注射した。ＭＣＦ１０Ａ細胞は、以前の報告と同様に、これらのマウスにおいて腫瘍を形成しなかった（Ｍａｖｅｌ ｅｔ ａｌ．，２００２；Ｔｈｅｒｙ ｅｔ ａｌ．，２００２）（図７Ｈ）。ＭＣＦ１０Ａ細胞－オンコソームは、対照ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞と同様に、２１日後に腫瘍を形成した（図７Ｈ）。坑ダイサー抗体（対照坑アクチン抗体ではなく）を含むオンコソームと共にインキュベートされたＭＣＦ１０Ａ細胞は、腫瘍体積の有意な減少を示した（図７Ｈ）。これらの結果は、ダイサータンパク質を含むオンコソームに暴露された場合のＭＣＦ１０Ａの発癌性変換を裏づけている（図７Ｆ～Ｈ及び図１７Ｆ）

【０１１７】

癌患者から得られた血清エクソソームはダイサーを含み、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡをプロセシングして成熟ｍｉＲＮＡを生成する。ヒト腫瘍のエクソソームを、ＲＩＳＣタンパク質に関して検査した。癌細胞の特異性を得るために、単離されて間もないヒト原発性卵巣、乳房及び子宮内膜の腫瘍片を、雌無胸腺ｎｕ／ｎｕマウスの適切な臓器に同所性移植した（図１８Ａ～Ｂ）。これらのマウスの血清エクソソームを、電子顕微鏡により評価した（図１８Ｃ）。これらのエクソソームから単離された内容物のサイズ排除タンパク質ブロッティングから、排他的にヒト起源のダイサータンパク質（ｈｓａ－ダイサー）の存在が実証された（図８Ａ及び図１８Ｄ）。４Ｔ１－由来エクソソーム及び４Ｔ１－細胞からのタンパク質抽出物を、マウス起源で異なる分子量を呈するダイサー（ｍｍｕ－ダイサー）を示す対照として用いた（図８Ａ）。

【０１１８】

ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞からのオンコソームを、ヒト皮膚線維芽細胞（ＨＤＦ）と共にインキュベートした。オンコソームとインキュベートされた線維芽細胞の全体的な遺伝子発現プロファイリングは、対照と比較して、トランスクリプトームへの有意な影響が示す

。α－ＳＭＡ（ＡＣＴＡ）（１８倍）、ＣＯＬ１Ａ１（１２倍）、ＴＧＦβ１（１５倍）、ＣＴＧＦ（８倍）、Ｒａｓ（６倍）及びＥＲＫ（４倍）のアップレギュレーションが観察された。オンコソームと共にインキュベートされた線維芽細胞は、高速で増殖した（図８Ｉ）。これらの結果から、オンコソームが、筋線維芽細胞表現型と類似していてカルチノマ結合線維芽細胞と関連する特徴的な性質を示す、間質線維芽を活性化し得ることが示唆される。

【０１１９】

次に、エクソソームを、健常な個体（Ｈ）８名及び乳癌患者（ＢＣ）１１名から得て間もない血清試料１００μｌから単離した（図８Ｂ）。脂質二重層を、エクソソームの電子顕微鏡測定により識別した（図８Ｃ）。乳癌患者の血清は、健常ドナーの血清と比較して、有意に多量のエクソソームを含んでいた（図８Ｄ）。同数のエクソソームを培養物中に２４ｈ及び７２ｈ入れると、６種のｐｒｅ－ｍｉＲＮＡが排他的に乳癌患者でダウンレギュレートされ、各成熟ｍｉＲＮＡが７２ｈ培養後にアップレギュレートされることが見出され、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡが乳癌患者の採取間もない血清から得たエクソソーム中で成熟形態にプロセシングされ、健常対照ではプロセシングされないことが示唆された（図８Ｅ～Ｆ）。次に、エクソソーム単独、又はＭＣＦ１０Ａ細胞と一緒にしたエクソソームを、雌ｎｕ／ｎｕマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。ＭＣＦ１０Ａ細胞と一緒にした乳癌患者由来の血清エクソソーム１１本のうち５本が腫瘍を形成したが、健常ドナーのエクソソーム又はエクソソーム単独では腫瘍を形成しなかった（図８Ｇ）。興味深いことに、腫瘍を形成したエクソソームは、７２ｈ培養後に成熟ｍｉＲＮＡ量の最大倍率増加を有することも示された（図８Ｅ～Ｆ）。

【０１２０】

エクソソームを、さらに健常個体５名（Ｃ４６、Ｃ４５、Ｃ４４、Ｃ４３、及びＣ４１）及び転移性乳癌患者４名（Ｍｅｔ２１９、Ｍｅｔ３５４、Ｍｅｔ２９９及びＭｅｔ３５６）から得られた血清試料の新しい組み合わせから単離した。エクソソーム中のダイサー発現は、転移性乳癌試料のみに観察され、健常な個体の血清のエクソソームでは観察されなかった（図８Ｈ）。

【表５－１】

表５．オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来）とノルモソーム（ＭＣＦ１０Ａ由来）の間で差次的に発現されたｍｉＲＮＡ

miRNA	p値
mmu-miR-709	1.30E-06
hsa-miR-1308	3.71E-06

【表５－２】

miRNA	p値
mmu-miR-615-3p	9.08E-06
hsa-miR-1260b	1.06E-05
mmu-miR-1937a	1.36E-05
mmu-mir-321-A	1.54E-05
hsa-miR-615-3p	1.80E-05
hsa-miR-1979	2.10E-05
mmu-miR-1937b	2.72E-05
hsa-mir-373	3.15E-05
mmu-miR-1937c	3.28E-05
hsa-miR-1273d-P	3.68E-05
mmu-miR-720	4.08E-05
mmu-miR-1274a	4.45E-05
hsa-mir-565-A	6.63E-05
mmu-miR-1931	6.77E-05
hsa-miR-1246	7.35E-05
hsa-mir-594-P	7.56E-05
hsa-mir-321-A	7.83E-05
mmu-miR-2145-1-P	9.36E-05
hsa-mir-639-P	9.54E-05
hsa-miR-720	0.000112771
hsa-miR-1280	0.000116
mmu-miR-3473	0.000136388
hsa-miR-1260	0.000178848
hsa-miR-1281	0.000193167
mmu-miR-1224-P	0.00019941
mmu-miR-690	0.000223064
hsa-miR-375-P	0.000242513
hsa-miR-4301	0.000254614
mmu-miR-700	0.000322167
mmu-miR-125b-5p	0.000333431
mmu-miR-1191-P	0.000412736
hsa-miR-1274a	0.000420621
hsa-miR-3197	0.00042765
mmu-miR-1935	0.000459256
hsa-miR-1975-P	0.000467699
hsa-miR-4324	0.000595518
hsa-miR-886-3p	0.00060906
hsa-miR-1274b	0.000643024
mmu-miR-1957	0.000679996
hsa-miR-933	0.000752624

【表５－３】

miRNA	p値
hsa-mir-675	0.000775607
hsa-miR-595	0.000835784
mmu-miR-2137	0.000867405
hsa-mir-572-P	0.000935968
mmu-miR-1195	0.000971222
hsa-miR-4294-P	0.001008217
mmu-mir-1899-P	0.00104201
mmu-miR-689-P	0.001048727
hsa-miR-199b-3p	0.001330193
hsa-miR-3117-P	0.001331776
mmu-mir-321-P	0.001407081
mmu-miR-1961-P	0.001479699
hsa-mir-10a	0.001756816
mmu-miR-669d-P	0.001842801
mmu-miR-1937b-2-P	0.001855411
hsa-miR-3125-P	0.00206976
mmu-miR-1934-P	0.002222993
hsa-miR-574-3p	0.002231887
hsa-miR-718	0.002533178
mmu-miR-1198	0.002640837
mmu-miR-2182-P	0.002722356
hsa-miR-1273	0.002723198
mmu-miR-2133-P	0.002794947
hsa-miR-92b*	0.003046008
hsa-miR-1290	0.003307286
hsa-miR-448	0.003318093
mmu-miR-689	0.003367203
mmu-miR-449a	0.003657703
mmu-miR-1937b-4-P	0.004021961
hsa-miR-4286	0.004068181
mmu-miR-1947	0.00408589
mmu-miR-342-3p	0.004178728
hsa-miR-1303-P	0.004771531
mmu-miR-2132	0.004826438
hsa-miR-4321-P	0.004925885
hsa-miR-4256-P	0.004994658
hsa-miR-4311	0.005120539
mmu-miR-130a	0.005138148
mmu-miR-1939	0.005186979
hsa-miR-1268-P	0.005383176

【表５－４】

miRNA	p値
mmu-miR-31	0.005491579
mmu-miR-99b	0.005498217
mmu-miR-2141	0.005742427
hsa-miR-1202-P	0.005825202
mmu-miR-466b-3p	0.005831681
mmu-miR-2133	0.005962416
hsa-miR-1268	0.006022349
hsa-miR-466	0.006338384
mmu-miR-494	0.006386665
hsa-miR-1289	0.006571828
hsa-miR-320b	0.006612583
hsa-miR-4254	0.006670963
hsa-mir-7-3-P	0.00673441
hsa-miR-923	0.006748425
hsa-miR-764	0.006790693
mmu-miR-291a-3p	0.007141562
mmu-miR-883b-3p	0.007204478
hsa-mir-594-A	0.00721747
mmu-miR-1948-P	0.007524668
hsa-miR-206	0.007553353
hsa-mir-565-P	0.007700663
mmu-miR-467e*	0.00778865
hsa-miR-1826	0.007812174
mmu-miR-467a*	0.007840082
mmu-miR-1983	0.007889552
hsa-miR-324-5p	0.008058633
mmu-let-7c	0.008070282
mmu-miR-1965	0.00810043
hsa-mir-632-P	0.008277449
hsa-miR-181a*MM2GT/AC	0.008292477
hsa-miR-1265	0.008367622
hsa-miR-323b-5p	0.008373161
hsa-mir-1914	0.008444953
hsa-mir-1910	0.008458754
hsa-miR-21	0.008557419
hsa-miR-431*	0.008595529
hsa-miR-3135-P	0.008851151
mmu-miR-187-P	0.009290275
mmu-miR-126-3p	0.009334952
mmu-miR-669a-P	0.00943601

【表５－５】

miRNA	p値
hsa-miR-367	0.009568574
mmu-mir-320-P	0.009788835
hsa-miR-181a*MM1G/C	0.009821714
mmu-miR-484-P	0.009847016
mmu-miR-467c-P	0.010318688
hsa-miR-3154	0.010452692
mmu-miR-466d-3p	0.01047819
hsa-miR-3162-P	0.010642567
mmu-miR-201	0.010827783
mmu-miR-1946a	0.010877863
hsa-miR-937	0.011009279
hsa-miR-3147	0.011883963
hsa-mir-596-P	0.012205467
hsa-miR-3148	0.012245577
hsa-miR-1304	0.012451991
hsa-miR-222MM2GG/AC	0.012512207
mmu-miR-125a-5p	0.012630083
hsa-miR-1272-P	0.012893462
hsa-miR-638	0.012956727
hsa-mir-320	0.013366703
hsa-miR-545*	0.013713081
hsa-mir-1908-P	0.01374103
hsa-let-7d-v2-P	0.013846844
mmu-mir-30d-P	0.014771375
hsa-miR-4297	0.015365603
mmu-miR-182	0.015432962
hsa-miR-3166-P	0.015893116
hsa-miR-494	0.015960208
mmu-miR-669o-P	0.016133286
hsa-miR-566	0.01616152
mmu-miR-1188	0.016736136
mmu-miR-2134-AP	0.016811955
hsa-miR-4259-P	0.016856716
mmu-miR-152	0.01715464
mmu-miR-2134	0.017178929
hsa-miR-3193-AP	0.017496022
hsa-miR-125b	0.017917521
hsa-miR-3124-P	0.018466818
hsa-miR-10b	0.018671177
hsa-miR-455-5p	0.018771585

【表５－６】

miRNA	p値
mmu-miR-144	0.019121516
hsa-miR-130a	0.019424172
hsa-miR-1285	0.019710834
hsa-miR-516b*	0.020003951
hsa-miR-27a	0.020049082
hsa-miR-138-1*	0.020302422
mmu-miR-471	0.020513954
hsa-miR-4298-P	0.020520647
hsa-miR-301b	0.0205242
hsa-mir-147-P	0.020570657
hsa-miR-362-5p	0.020602873
mmu-mir-471-P	0.020639505
mmu-miR-466a-3p	0.020737186
hsa-miR-561	0.020878532
hsa-miR-486-5p	0.021122352
mmu-miR-2861	0.021313137
hsa-miR-587	0.021396357
mmu-miR-375	0.021423748
hsa-mir-329-2-P	0.021718025
mmu-miR-2861-P	0.022230123
hsa-miR-144*	0.022500042
hsa-miR-1255a-P	0.022928296
hsa-mir-519a-2-P	0.023328916
hsa-miR-34c-5p	0.023452529
mmu-miR-466e-3p	0.023486196
mmu-miR-743b-5p	0.023621503
mmu-mir-350-P	0.023797354
mmu-miR-181d	0.024929082
hsa-miR-376a*	0.025160569
hsa-miR-1308-P	0.025400926
mmu-miR-467g	0.025684158
mmu-miR-1946a-P	0.025903246
hsa-miR-147-P	0.025981647
hsa-miR-923-P	0.026407247
mmu-miR-465c-5p	0.026498492
hsa-miR-891a	0.026826475
hsa-miR-28-5p	0.026908406
hsa-miR-4292	0.02699168
mmu-miR-677-P	0.027117156
hsa-miR-4257	0.027412394

【表５－７】

miRNA	p値
hsa-miR-4326	0.027447003
hsa-miR-17*MM2GG/AA	0.02747134
hsa-miR-939-P	0.027590618
mmu-miR-2182	0.027770773
hsa-miR-220c-P	0.027834269
hsa-miR-3132-P	0.027949304
hsa-miR-532-5p	0.028123552
mmu-miR-1947-P	0.028342198
mmu-miR-29a	0.028448253
hsa-miR-3162	0.028472579
hsa-miR-375MM1C/G	0.028539316
hsa-miR-768-3p	0.028631264
mmu-miR-182-P	0.028668937
mmu-miR-205-P	0.029630816
hsa-miR-505	0.029688956
hsa-miR-3146-P	0.02981021
mmu-miR-721	0.029874269
mmu-miR-376c	0.030446032
hsa-miR-1179-P	0.030947356
mmu-miR-1970	0.030975459
hsa-miR-3133-P	0.031120572
hsa-miR-200c	0.031203313
hsa-miR-220a	0.031358991
mmu-miR-100	0.031556595
hsa-miR-1255b	0.031601448
hsa-miR-222MM1G/A	0.031650652
hsa-miR-885-3p	0.031822949
hsa-miR-517b	0.032138191
hsa-miR-200a	0.032181877
hsa-miR-3141	0.032551657
mmu-miR-669h-3p	0.033076965
hsa-miR-1301	0.033141515
hsa-miR-877	0.033292052
hsa-mir-941-2	0.033355824
hsa-mir-487b-P	0.033372231
hsa-miR-4302	0.033621907
hsa-miR-99b	0.033827759
hsa-miR-1253	0.034018422
hsa-let-7a*	0.034034943
hsa-miR-34aMM2CT/TC	0.034301895

【表５－８】

miRNA	p値
hsa-miR-3181-P	0.034366501
hsa-miR-3200	0.034397879
hsa-miR-3129-P	0.034538091
hsa-miR-93*	0.03464146
hsa-miR-548q-P	0.035140723
mmu-miR-466g	0.035388049
mmu-miR-155	0.035624947
hsa-miR-2278-P	0.03584678
hsa-miR-3065-5p	0.035885091
hsa-miR-633	0.035994294
hsa-miR-4265	0.036055664
mmu-miR-2135-P	0.036119609
hsa-miR-190	0.036305474
mmu-miR-669f	0.036533893
hsa-miR-1323	0.036541729
hsa-miR-588	0.036661363
mmu-miR-183*	0.037276389
hsa-mir-941-4	0.037411697
hsa-mir-1913	0.037527439
hsa-miR-2116*	0.037682483
hsa-miR-1178	0.037847724
mmu-miR-196a	0.038163687
mmu-miR-574-3p	0.038418252
hsa-miR-346	0.038809144
mmu-miR-1199	0.039417628
mmu-miR-681	0.039465517
hsa-miR-4292-P	0.039841449
hsa-miR-522	0.040524939
hsa-mir-611-P	0.040860413
hsa-miR-3171	0.040895673
hsa-miR-635	0.041506047
hsa-miR-1197-P	0.041944121
hsa-miR-604	0.04380685
mmu-let-7a*	0.043829675
hsa-miR-335	0.043971349
mmu-miR-466c-3p	0.044407376
mmu-miR-466i	0.044504428
hsa-miR-1297	0.04456723
mmu-miR-338-5p	0.044824503
hsa-mir-526a-2-P	0.044992512

【表５－９】

miRNA	p値
hsa-miR-181aMM2GC/AG	0.045005369
hsa-miR-15b*	0.0452752
hsa-miR-924-P	0.045840226
mmu-miR-190-P	0.046060702
hsa-miR-345	0.046092233
mmu-miR-711	0.046378698
hsa-miR-3116-2-P	0.046593825
hsa-miR-99a	0.046936625
mmu-miR-26a	0.04716311
hsa-miR-1248-P	0.047256233
mmu-miR-721-P	0.047540414
mmu-miR-801-P	0.048152879
hsa-miR-1826-P	0.048243592
hsa-miR-1236	0.048451235
hsa-miR-339-5p	0.048498093
mmu-miR-804	0.04863614
mmu-miR-467d*	0.048653868
mmu-miR-1191	0.048884442
hsa-miR-148a	0.048962197
hsa-miR-141	0.049152638
mmu-miR-1937a-P	0.049351966
mmu-miR-696	0.049529754
hsa-miR-302a	0.049722628

【表６－１】

表６．オンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来）とダイサー抗体を含むオンコソーム（ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来）の間で差次的に発現されたｍｉＲＮＡ

miRNAs	倍率変化
mmu-miR-3470a-P	-68.72008593
mmu-miR-1186	-37.7790082
mmu-miR-3470b	-25.9441337
mmu-miR-1935	-21.29735527
mmu-miR-3473-P	-17.73956758
hsa-miR-665-P	-11.30652094
mmu-miR-3470a	-21.53678167
hsa-miR-1975-P	-8.378567946
mmu-miR-1195	-14.95080951
mmu-miR-1196	-41.418791
mmu-miR-669h-3p	7.716169349
mmu-miR-4661	6.182505826
mmu-miR-1954-P	-8.004541887
mmu-miR-681-P	-5.576609952

【表６－２】

miRNAs	倍率変化
mmu-miR-467a*	7.720120341
hsa-miR-4294-P	－6.14881956
hsa-miR-718	－5.926179859
hsa-mir-1910-P	－5.828360182
hsa-miR-3188-P	－7.974527314
hsa-miR-324-5p	－5.711776077
mmu-miR-1937b-4-P	－5.520796704
mmu-miR-669d-P	6.842367137
mmu-miR-3473	－5.977639047
hsa-miR-595	－6.658387264
hsa-miR-3197	－6.118703616
hsa-miR-4256-P	4.894289461
mmu-miR-201	5.429305446
mmu-miR-2861-P	－5.546034309
mmu-miR-3471-2-P	－5.968684885
hsa-miR-3120-P	－5.809647124
mmu-miR-494	－5.460136383
mmu-miR-690	－6.785641527
hsa-mir-591-P	－4.676566053
hsa-miR-943	－4.21472556
hsa-miR-24-2*	－5.267717705
hsa-miR-891a	3.970259655
mmu-miR-467e*	4.371589059
mmu-miR-196a	－4.673219124
mmu-miR-763-P	－4.837159778
mmu-miR-689-P	－4.006113822
mmu-miR-1961-P	－4.02458343
mmu-miR-709	－43.11955582
hsa-miR-3147	－4.083582871
hsa-miR-1323	3.866709935
mmu-miR-761	－4.758191473
hsa-miR-1979	－22.63130882
hsa-miR-1255b	3.856857003
mmu-miR-3072	－3.955191268
hsa-miR-1248-P	3.690795669
hsa-mir-147-P	4.119353729
hsa-miR-3195	－5.808376336
hsa-miR-1273d-P	－7.045907865
mmu-miR-207	－4.467339352
mmu-miR-689	－3.348018214

【表６－３】

miRNAs	倍率変化
hsa-miR-4257	-4.323649906
mmu-miR-466d-3p	3.585840199
hsa-miR-923	-3.344759672
mmu-miR-1931	-4.744652197
hsa-mir-650-P	-6.161006285
mmu-miR-466g	3.874674458
mmu-miR-1191-P	-4.045803649
hsa-mir-1538	-3.744109297
hsa-miR-1246	-3.337472797
hsa-miR-124*	3.31414605
hsa-miR-4321-P	-7.691122096
mmu-miR-1946a-P	-6.219634371
hsa-miR-1972-2-P	-5.073720863
hsa-miR-3200	3.335177401
mmu-miR-1947	-7.215369611
mmu-miR-669o-P	3.389226018
mmu-miR-466e-3p	3.534048216
mmu-miR-707	3.877366764
hsa-miR-4297	-6.529597429
hsa-miR-4313	-4.609062464
mmu-miR-1935-AP	-10.94537064
mmu-miR-467g	4.667383343
mmu-miR-2133	-4.243694889
hsa-miR-923-P	-3.64025311
hsa-miR-1236	3.197494004
hsa-miR-1280	-6.234163314
mmu-miR-1937b-2-P	-5.358528363
mmu-miR-499-P	3.275110007
hsa-miR-1263-P	3.338653962
hsa-miR-466	3.265124658
hsa-mir-595-P	-3.780075724
hsa-miR-1285-1-P	-3.392089631
mmu-miR-338-5p	3.139715849
hsa-miR-3140	3.152896366
mmu-miR-2182	-4.235843782
hsa-miR-23b*	-5.32306966
hsa-mir-639-P	-7.052485203
mmu-miR-1947-P	-5.939897094
mmu-miR-22	-3.74236459
mmu-miR-1970	-3.108998272

【表６－４】

miRNAs	倍率変化
mmu-miR-665-P	-3.597686151
hsa-miR-3065-5p	3.113930424
mmu-miR-467c-P	3.155074202
hsa-miR-1268	-2.922890303
mmu-miR-24-2*	-3.48139554
hsa-mir-1914	-3.832959976
hsa-miR-3118-5-P	2.977569863
mmu-miR-1306-P	-3.281316308
mmu-miR-669f	5.194629536
mmu-miR-466b-3p	3.438581421
hsa-miR-1268-P	-3.678227949
hsa-mir-1913	-3.946642192
mmu-miR-3470b-P	-4.037857355
mmu-miR-32	2.989834039
hsa-miR-1826-P	-4.872011411
hsa-miR-147-P	3.923947787
hsa-miR-3172-P	3.056599217
hsa-miR-801	-6.14009908
hsa-miR-941-1	-4.658601465
mmu-miR-301a-P	2.770796433
mmu-miR-669a-P	3.643950881
hsa-miR-1289	3.559525037
hsa-miR-548j	2.858203465
hsa-miR-877*	-3.015914917
hsa-miR-10a	-5.70499997
mmu-miR-181c	2.79663413
hsa-miR-3149-P	3.067063437
mmu-miR-3099*	-3.100792371
mmu-miR-705-P	-4.314489552
mmu-miR-2861	-3.008526128
hsa-miR-1976	-2.80557125
mmu-miR-1934-P	-6.614312993
hsa-miR-138-1*	2.769430194
hsa-miR-1243	2.78669354
hsa-miR-3160	-3.16046745
hsa-miR-500	2.766201976
mmu-miR-1945	-3.975181107
hsa-mir-941-4	-4.644133225
hsa-miR-4301	-16.10443714
hsa-miR-1208	-3.230411171

【表６－５】

miRNAs	倍率変化
hsa-mir-565-A	－8.232319234
hsa-miR-1244	2.796864338
mmu-miR-669j	3.675114173
hsa-miR-4314	2.810648214
hsa-miR-502-5p	2.743400714
hsa-miR-371-5p	2.607678279
mmu-miR-10b	－3.034387515
mmu-miR-26a	－3.497092003
mmu-miR-483*	－2.743822775
hsa-mir-487b-P	4.073173842
mmu-miR-1930-P	－3.656852693
hsa-miR-1255a	2.690838416
hsa-miR-202	－3.352756633
hsa-miR-4311	－2.706852207
hsa-miR-1226*	2.753774039
mmu-miR-1943-P	2.568476663
hsa-mir-594-P	－7.693094002
hsa-miR-21	－3.331077571
mmu-miR-466a-3p	2.590518002
hsa-miR-1301-P	2.83454983
hsa-miR-638	－5.006318026
hsa-mir-320	－3.08053158
mmu-miR-667	－2.55941239
mmu-miR-27a	2.535988521
hsa-miR-937	－3.726272762
hsa-miR-1255a-P	3.247591046
mmu-miR-505	2.610666762
hsa-miR-1263	2.736571865
mmu-miR-302b*	2.945119065
mmu-miR-721-P	2.91504884
hsa-miR-18b	2.611682702
hsa-mir-31	－2.702014494
mmu-miR-801-A	－6.683601538
has-let-7f-1*	3.908401267
hsa-miR-1259-P	2.644459942
mmu-mir-320-P	－3.437080879
mmu-miR-1939	－4.465923575
hsa-miR-1228	－2.567882638
hsa-miR-483-3p	－2.775662208
hsa-miR-129-5p	2.655425404

【表６－６】

miRNAs	倍率変化
mmu-miR-145*	2.552327584
hsa-miR-544	3.017286257
hsa-miR-3124-P	3.475660577
hsa-let-7a*	3.67482271
hsa-miR-1308-P	－2.815549142
hsa-miR-124	2.518148474
mmu-miR-500-P	2.439916722
hsa-miR-589	2.619270955
hsa-miR-155MM1G/T	－3.153648547
hsa-miR-1254	3.039211354
hsa-miR-1259	2.60142506
mmu-mir-1904	2.553756257
hsa-miR-320e	－3.6162361
hsa-mir-373	－9.005026193
hsa-miR-3191-P	2.777191568
mmu-miR-700	－4.536931094
hsa-mir-539-P	2.617416119
hsa-miR-4259-P	3.451286701
hsa-miR-548h	2.525655861
mmu-miR-669e-P	2.554714867
mmu-miR-207-P	－3.619675577
hsa-mir-1908-P	－3.739948569
hsa-miR-4254	－4.156361026

【０１２１】

本開示を参照することにより、過剰な実験を行わなくとも、本明細書に開示及び請求された方法の全てを作成及び実行することができる。本発明の組成物及び方法は、好ましい実施形態に関連して記載したが、本発明の概念、主旨及び範囲を逸脱することなく、本明細書に記載された方法及びその方法のステップ又は一連のステップに変更を施し得ることは、当業者に明白であろう。より具体的には、化学及び生理学の両方に関連する特定の薬剤を、本明細書に記載された薬剤の代わりに使用してもよく、同様又は類似の結果が得られることは明白であろう。当業者に明白なそのような同様の代用及び改良の全てが、添付の特許請求の範囲に定義された本発明の主旨、範囲及び概念に含まれるものとする。

参考資料

以下の参考資料は、例示的手順、又は本明細書に示された事柄を補足する他の詳細を提供する限りにおいて、参照により本明細書に取り込まれる。

【化１－１】

Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. Nature cell biology 10, 619-624.

Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S., and Wood, M.J. (2011).

【化１－２】

Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. Nature biotechnology 29, 341-345.
Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. Nature 431, 350-355.
Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., *et al.* (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 5003-5008.
Ausubel *et al.*, Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons Ltd, Wiley Interscience, 2003.
Bang, G.M., and Setabutr, P. (2010). Periocular capillary hemangiomas: indications and options for treatment. Middle East Afr J Ophthalmol 17, 121-128.
Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 136, 215-233.
Bartels, C.L., and Tsongalis, G.J. (2009). MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. Clinical chemistry 55, 623-631.
Benitez-vieyra, S., Medina, A.M., and Cocucci, A.A. (2009). Variable selection patterns on the labellum shape of Geoblasta pennicillata, a sexually deceptive orchid. J Evol Biol 22, 2354-2362.
Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., and Hannon, G.J. (2003). Dicer is essential for mouse development. Nature genetics 35, 215-217.
Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature 436, 740-744.
Cocucci, E., Racchetti, G., and Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. Trends Cell Biol 19, 43-51.
Cosacov, A. *et al.* New insights into the phylogenetic relationships, character evolution, and phytogeographic patterns of Calceolaria (Calceolariaceae). Am J Bot 96, 2240-2255, (2009).
de Laurentiis, A., Gaspari, M., Palmieri, C., Falcone, C., Iaccino, E., Fiume, G., Massa, O., Masullo, M., Tuccillo, F.M., Roveda, L., *et al.* (2011). Mass spectrometry-based identification of the tumor antigen UN1 as the transmembrane CD43 sialoglycoprotein. Mol Cell Proteomics 10, M111 007898.
Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., and Geuze, H.J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. The Journal of biological chemistry 273, 20121-20127.
Fang, H., Qiu, L., Vitkin, E., Zaman, M. M., Andersson, C., Salahuddin, S., Kimerer, L. M., Cipolloni, P. B., Modell, M. D., Turner, B. S., *et al.* (2007). Confocal light absorption and scattering spectroscopic microscopy. Applied optics 46, 1760-1769.

【化１－３】

Filipowicz, W. (2005). RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. Cell 122, 17-20.
Fukagawa, T., Nogami, M., Yoshikawa, M., Ikeno, M., Okazaki, T., Takami, Y., Nakayama, T., and Oshimura, M. (2004). Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. Nature cell biology 6, 784-791.
Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., and Illei, G. G. (2012). The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. PloS one 7, e30679.
Gibbings, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. Nature cell biology 11, 1143-1149.
Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. Cell 123, 631-640.
Grelier, G., Voirin, N., Ay, A.S., Cox, D.G., Chabaud, S., Treilleux, I., Leon-Goddard, S., Rimokh, R., Mikaelian, I., Venoux, C., *et al.* (2009). Prognostic value of Dicer expression in human breast cancers and association with the mesenchymal phenotype. British journal of cancer 101, 673-683.
Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol 20, 621-667.
Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., and Agnati, L.F. (2010). Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. J Neural Transm 117, 1-4.
Gyorgy, B., Szabo, T.G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., Laszlo, V., Pallinger, E., Pap, E., Kittel, A., *et al.* (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. Cell Mol Life Sci 68, 2667-2688.
Haase, A. D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., Gatignol, A., and Filipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. EMBO reports 6, 961-967.
Hirata, H., Ueno, K., Shahryari, V., Tanaka, Y., Tabatabai, Z. L., Hinoda, Y., and Dahiya, R. (2012). Oncogenic miRNA-182-5p targets Smad4 and RECK in human bladder cancer. PloS one 7, e51056.
Hood, J.L., San, R.S., and Wickline, S.A. (2011). Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. Cancer research 71, 3792-3801.
Ismail, N., Wang, Y., Dakhlallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T. D., Tridandapani, S., *et al.* (2013). Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. Blood 121, 984-995.
Itzkan, I., Qiu, L., Fang, H., Zaman, M. M., Vitkin, E., Ghiran, I. C., Salahuddin, S., Modell, M., Andersson, C., Kimerer, L. M., *et al.* (2007). Confocal light absorption and scattering spectroscopic microscopy monitors organelles in live

【化１－４】

cells with no exogenous labels. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 17255-17260.
Kahlert, C., and Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. J Mol Med (Berl) 91, 431-437.
Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., *et al.* (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. Cancer science 96, 111-115.
Khairkar, P.H., Bang, G.M., Singh, A.B., and Tiple, P.G. (2010). Possible cross-sensitivity between sertraline and paroxetine in a panic disorder patient. Indian J Pharmacol 42, 110-111.
King, H.W., Michael, M.Z., and Gleadle, J.M. (2012). Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. BMC Cancer 12, 421.
Kogure, T., Lin, W. L., Yan, I. K., Braconi, C., and Patel, T. (2011). Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. Hepatology 54, 1237-1248.
Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F., and Ochiya, T. (2013). Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. The Journal of biological chemistry 288, 10849-10859.
Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R., and Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. Nature genetics 39, 673-677.
Kumar, S., Ansari, F.A., and Scaria, V. (2009). Prediction of viral microRNA precursors based on human microRNA precursor sequence and structural features. Virol J 6, 129.
Lee, T.H., D'Asti, E., Magnus, N., Al-Nedawi, K., Meehan, B., and Rak, J. (2011). Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'. Semin Immunopathol 33, 455-467.
Li, L., Zhu, D., Huang, L., Zhang, J., Bian, Z., Chen, X., Liu, Y., Zhang, C. Y., and Zen, K. (2012). Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. PloS one 7, e46957.
Liu, C. G., Calin, G. A., Volinia, S. & Croce, C. M. MicroRNA expression profiling using microarrays. Nat Protoc 3, 563-578, (2008).
Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25, 402-408.
Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabro, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M.L., Federici, C., Iessi, E., *et al.* (2009). High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. PloS one 4, e5219.
Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D.,

【化１－５】

Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., *et al.* (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 435, 834-838.
Luga, V., Zhang, L., Viloria-Petit, A.M., Ogunjimi, A.A., Inanlou, M.R., Chiu, E., Buchanan, M., Hosein, A.N., Basik, M., and Wrana, J.L. (2012). Exosomes Mediate Stromal Mobilization of Autocrine Wnt-PCP Signaling in Breast Cancer Cell Migration. Cell 151, 1542-1556.
Luzio, J.P., Parkinson, M.D., Gray, S.R., and Bright, N.A. (2009). The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. Biochemical Society transactions 37, 1019-1021.
Ma, L., Teruya-Feldstein, J., and Weinberg, R.A. (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. Nature 449, 682-688.
MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V., and Doudna, J. A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 512-517.
Maehama, T. (2007). PTEN: its deregulation and tumorigenesis. Biological & pharmaceutical bulletin 30, 1624-1627.
Maniataki, E., and Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ. Genes & development 19, 2979-2990.
Mao, X., Sun, Y., and Tang, J. (2013). Serum miR-21 is a diagnostic and prognostic marker of primary central nervous system lymphoma. Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology.
Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T., *et al.* (2010). A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. Cell 141, 1195-1207.
Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. Journal of proteomics 73, 1907-1920.
Mavel, S., Thery, I., and Gueiffier, A. (2002). Synthesis of imidazo[2,1-a]phthalazines, potential inhibitors of p38 MAP kinase. Prediction of binding affinities of protein ligands. Arch Pharm (Weinheim) 335, 7-14.
McCready, J., Sims, J. D., Chan, D., and Jay, D. G. (2010). Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. BMC cancer 10, 294.
Melo, S., Villanueva, A., Moutinho, C., Davalos, V., Spizzo, R., Ivan, C., Rossi, S., Setien, F., Casanovas, O., Simo-Riudalbas, L., *et al.* (2011). Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 4394-4399.
Melo, S.A., Moutinho, C., Ropero, S., Calin, G.A., Rossi, S., Spizzo, R., Fernandez, A.F., Davalos, V., Villanueva, A., Montoya, G., *et al.* (2010). A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. Cancer cell 18, 303-315.

【化１－６】

Melo, S.A., Ropero, S., Moutinho, C., Aaltonen, L.A., Yamamoto, H., Calin, G.A., Rossi, S., Fernandez, A.F., Carneiro, F., Oliveira, C., *et al.* (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. Nature genetics 41, 365-370.

Merritt, W.M., Lin, Y.G., Han, L.Y., Kamat, A.A., Spannuth, W.A., Schmandt, R., Urbauer, D., Pennacchio, L.A., Cheng, J.F., Nick, A.M., *et al.* (2008). Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. The New England journal of medicine 359, 2641-2650.

Min, M., Bang, G.S., Lee, H., and Yu, B.C. (2010). A photoswitchable methylene-spaced fluorinated aryl azobenzene monolayer grafted on silicon. Chem Commun (Camb) 46, 5232-5234.

Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M. A., Bernad, A., and Sanchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. Nature communications 2, 282.

Miyata, Y. (2005). Hsp90 inhibitor geldanamycin and its derivatives as novel cancer chemotherapeutic agents. Current pharmaceutical design 11, 1131-1138.

Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Stolz, D. B., Sullivan, M. L., Karlsson, J. M., Baty, C. J., Gibson, G. A., Erdos, G., Wang, Z., *et al.* (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. Blood 119, 756-766.

Narayanan, A., Iordanskiy, S., Das, R., Van Duyne, R., Santos, S., Jaworski, E., Guendel, I., Sampey, G., Dalby, E., Iglesias-Ussel, M., *et al.* (2013). Exosomes derived from HIV-1-infected cells contain trans-activation response element RNA. The Journal of biological chemistry 288, 20014-20033.

Nicoloso, M.S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S., and Calin, G.A. (2009). MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. Nature reviews Cancer 9, 293-302.

Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., *et al.* (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. Nature cell biology 12, 19-30; sup pp 11-13.

Ozen, M., Creighton, C.J., Ozdemir, M., and Ittmann, M. (2008). Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. Oncogene 27, 1788-1793.

Pant, S., Hilton, H., and Burczynski, M.E. (2012). The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. Biochemical pharmacology 83, 1484-1494.

Park, H.J., Bang, G., Lee, B.R., Kim, H.O., and Lee, P.H. (2011). Neuroprotective effect of human mesenchymal stem cells in an animal model of double toxin-induced multiple system atrophy parkinsonism. Cell Transplant 20, 827-835.

【化１－７】

Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. A., van Eijndhoven, M. A., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., de Gruijl, T. D., Wurdinger, T., and Middeldorp, J. M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 6328-6333.

Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C., *et al.* (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. Nat Med 18, 883-891.

Razi, M., and Futter, C. E. (2006). Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. Molecular biology of the cell 17, 3469-3483.

Roccaro, A. M., Sacco, A., Maiso, P., Azab, A. K., Tai, Y. T., Reagan, M., Azab, F., Flores, L. M., Campigotto, F., Weller, E., *et al.* (2013). BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. The Journal of clinical investigation.

Rothstein, D. M. *et al.* Targeting signal 1 through CD45RB synergizes with CD40 ligand blockade and promotes long term engraftment and tolerance in stringent transplant models. J Immunol 166, 322-329 (2001).

Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Savina, A., Furlan, M., Vidal, M., and Colombo, M.I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. The Journal of biological chemistry 278, 20083-20090.

Schmittgen, T.D., Jiang, J., Liu, Q., and Yang, L. (2004). A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. Nucleic acids research 32, e43.

Shen, B., Fang, Y., Wu, N., and Gould, S.J. (2011a). Biogenesis of the posterior pole is mediated by the exosome/microvesicle protein-sorting pathway. The Journal of biological chemistry 286, 44162-44176.

Shen, B., Wu, N., Yang, J.M., and Gould, S.J. (2011b). Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. The Journal of biological chemistry 286, 14383-14395.

Shen, J., Xia, W., Khotskaya, Y. B., Huo, L., Nakanishi, K., Lim, S. O., Du, Y., Wang, Y., Chang, W. C., Chen, C. H., *et al.* (2013). EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. Nature 497, 383-387.

Sherer, N.M., Lehmann, M.J., Jimenez-Soto, L.F., Ingmundson, A., Horner, S.M., Cicchetti, G., Allen, P.G., Pypaert, M., Cunningham, J.M., and Mothes, W. (2003). Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. Traffic 4, 785-801.

Shi, W., Oshlack, A., and Smyth, G.K. (2010). Optimizing the noise versus bias trade-off for Illumina whole genome expression BeadChips. Nucleic acids research 38, e204.

【化１－８】

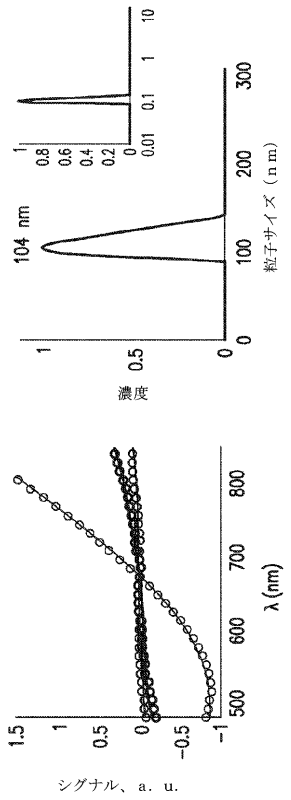
Shin, H. W., Morinaga, N., Noda, M., and Nakayama, K. (2004). BIG2, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors: its localization to recycling endosomes and implication in the endosome integrity. Molecular biology of the cell 15, 5283-5294.
Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. Curr Opin Cell Biol 21, 575-581.
Simpson, R.J., Jensen, S.S., and Lim, J.W. (2008). Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. Proteomics 8, 4083-4099.
Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. Nature cell biology 10, 1470-1476.
Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. Trends Biochem Sci 30, 106-114.
Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. Gynecologic oncology 110, 13-21.
Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2011). Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. Semin Immunopathol 33, 441-454.
Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al] Chapter 3, Unit 3 22.
Thery, C. *et al.* Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. Nat Immunol 3, 1156-1162, (2002).
Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat Rev Immunol 2, 569-579.
Thery, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. F1000 biology reports 3, 15.
Thery, M., and Casas, J. (2002). Predator and prey views of spider camouflage. Nature 415, 133.
Thomson, D. W., Bracken, C. P., Szubert, J. M., and Goodall, G. J. (2013). On measuring miRNAs after transient transfection of mimics or antisense inhibitors. PloS one 8, e55214.
Tse, J.C., and Kalluri, R. (2011). Waking up dormant tumors. Breast cancer research : BCR 13, 310.
Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., and Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. Nucleic acids research 39, 7223-7233.
Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of

【化１－９】

genetic exchange between cells. Nature cell biology 9, 654-659.
van Balkom, B. W., de Jong, O. G., Smits, M., Brummelman, J., den Ouden, K., de Bree, P. M., van Eijndhoven, M. A., Pegtel, D. M., Stoorvogel, W., Wurdinger, T., and Verhaar, M. C. (2013). Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. Blood 121, 3997-4006, S3991-3915.
Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., and Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. Nature cell biology 13, 423-433.
Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., *et al.* (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 2257-2261.
Welch, D.R. (1997). Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. Clinical & experimental metastasis 15, 272-306.
Wiesen, J.L., and Tomasi, T.B. (2009). Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. Mol Immunol 46, 1222-1228.
Yan, L. X., Huang, X. F., Shao, Q., Huang, M. Y., Deng, L., Wu, Q. L., Zeng, Y. X., and Shao, J. Y. (2008). MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. RNA 14, 2348-2360.
Yan, L.X., Wu, Q.N., Zhang, Y., Li, Y.Y., Liao, D.Z., Hou, J.H., Fu, J., Zeng, M.S., Yun, J.P., Wu, Q.L., *et al.* (2011). Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth. Breast cancer research : BCR 13, R2.
Yang, C., and Robbins, P.D. (2011). The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. Clin Dev Immunol 2011, 842849.
Yang, X., Meng, S., Jiang, H., Zhu, C., and Wu, W. (2011). Exosomes derived from immature bone marrow dendritic cells induce tolerogenicity of intestinal transplantation in rats. J Surg Res 171, 826-832.
Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes & development 17, 3011-3016.
Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Koppel, T., Jahantigh, M. N., Lutgens, E., *et al.* (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. Science signaling 2, ra81.
Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., *et al.* (2010). Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. Molecular cell 39, 133-144.

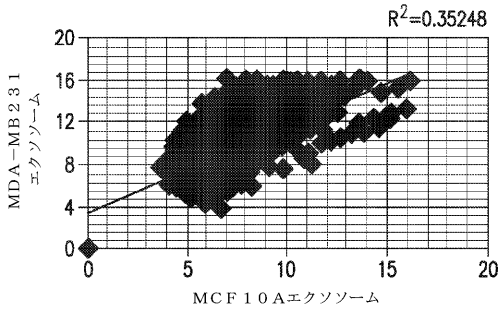
【図１Ｅ】

【図１Ｅ】



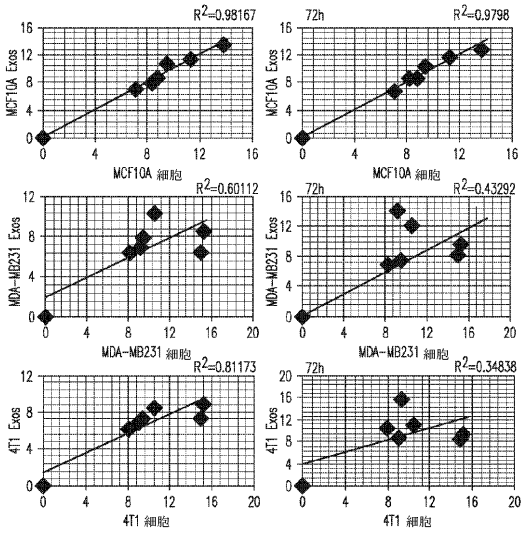
【図２Ａ】

【図２Ａ】



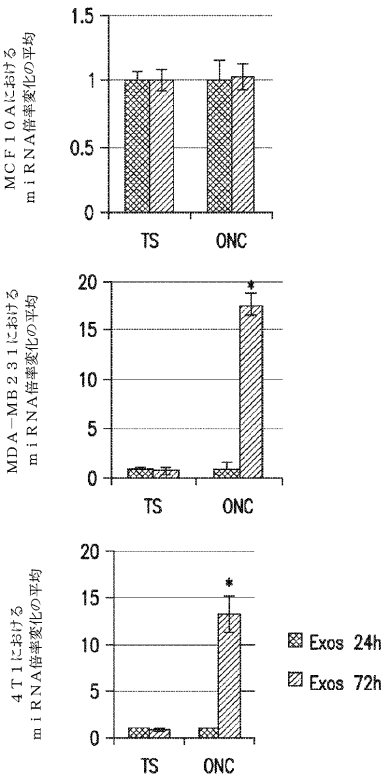
【図２Ｂ】

【図２Ｂ】

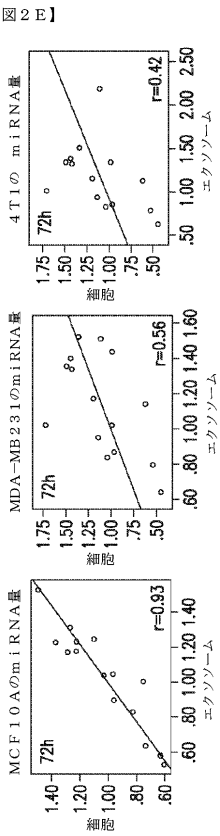


【図２Ｃ】

【図２Ｃ】



【図２Ｅ】



【図２Ｆ】

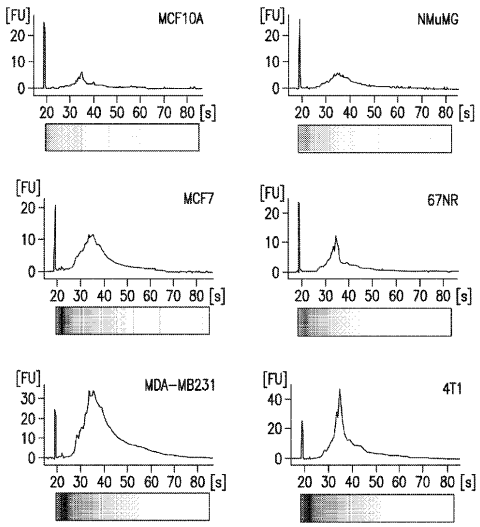
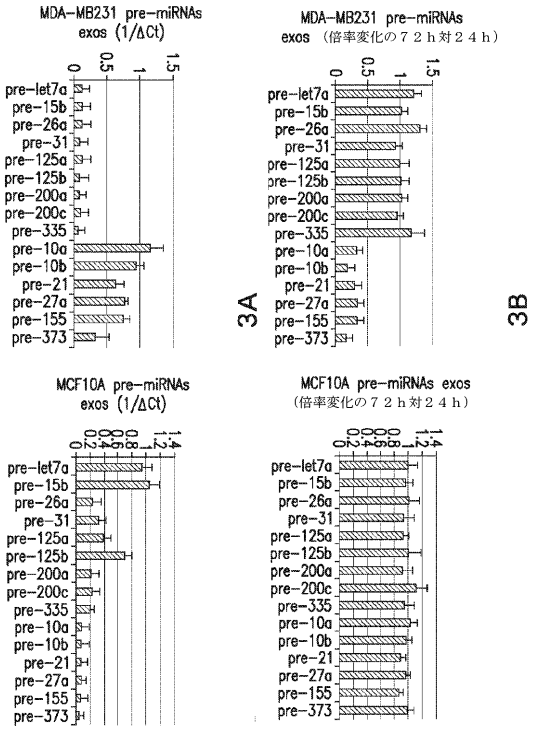


FIG.2F

【図３－１】



【図３－２】

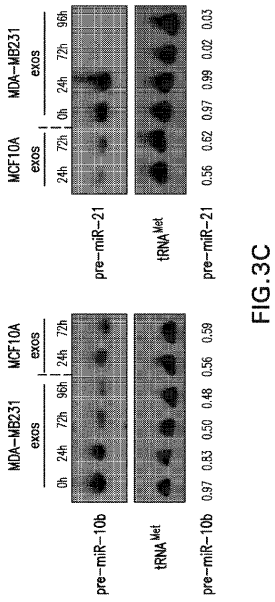
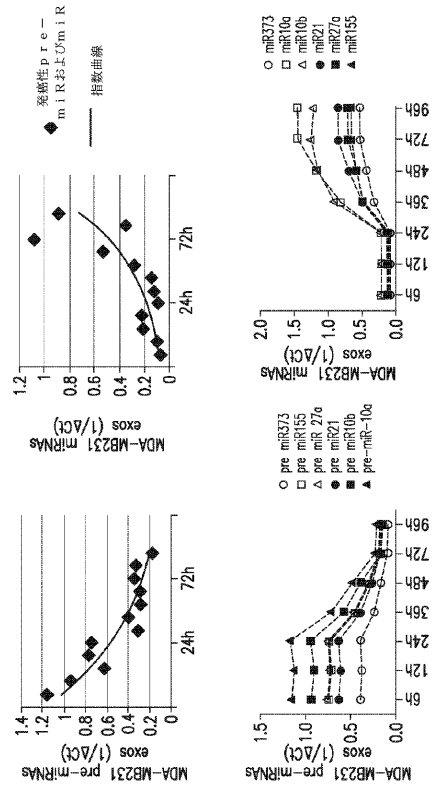


FIG.3C

【図３－３】

【図３Ｄ】



【図３－４】

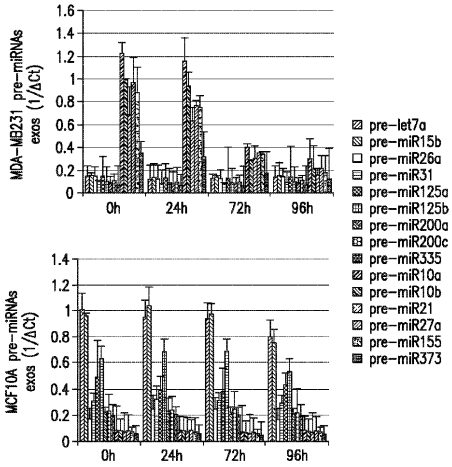
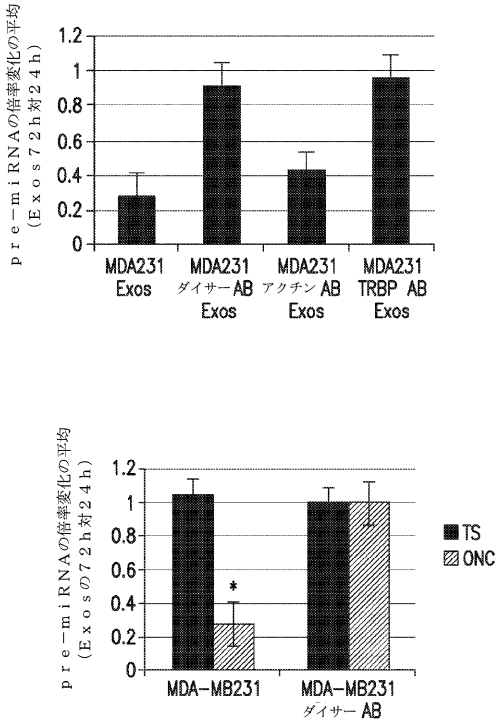


FIG.3E

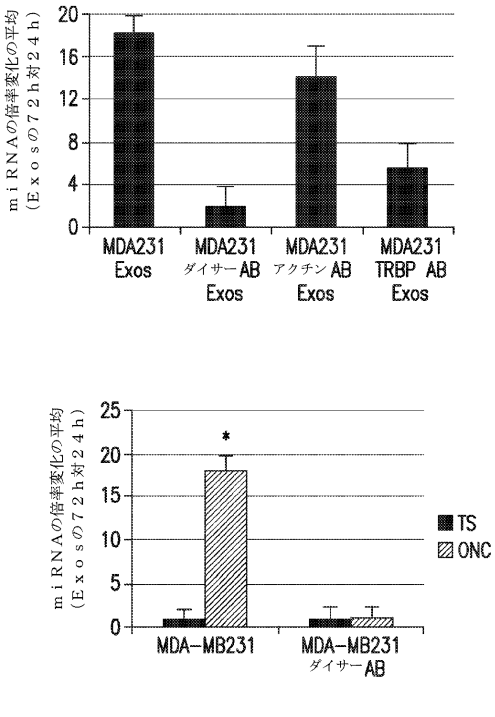
【図５Ｄ】

【図５Ｄ】



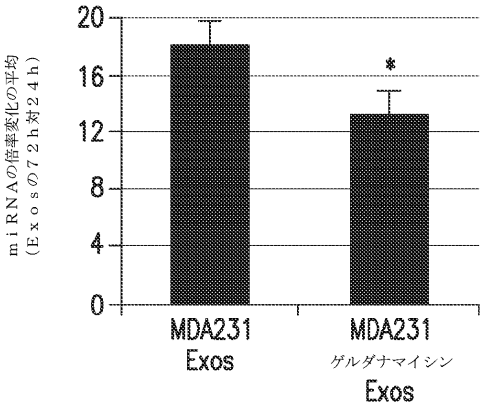
【図５Ｅ】

【図５Ｅ】



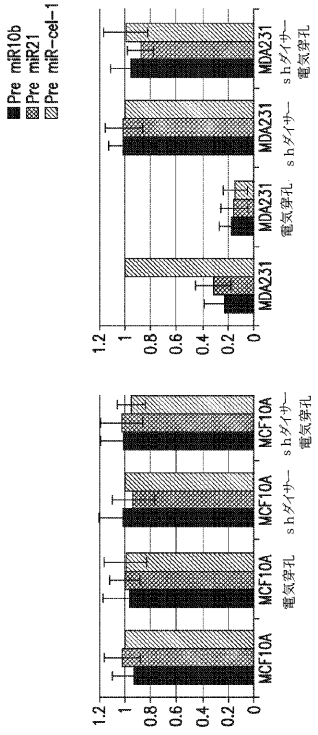
【図６－１】

【図６Ａ】



【図６－２】

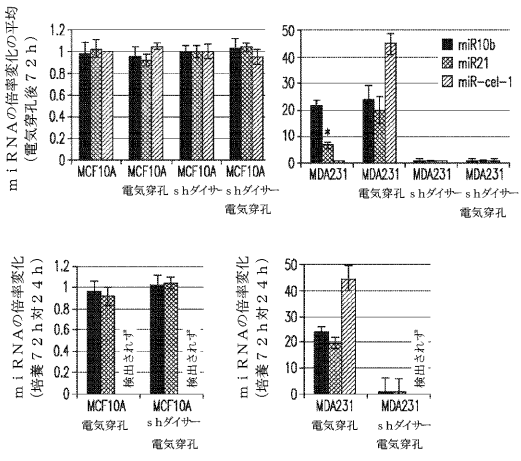
【図６Ｂ】



ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの倍率変化の平均
（電気穿孔後７２ｈ）

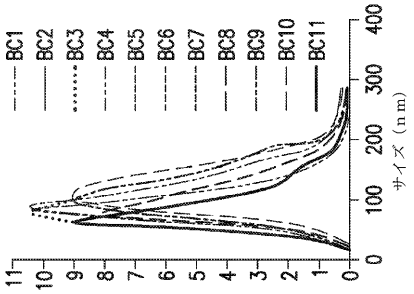
【図６－３】

【図６Ｃ】

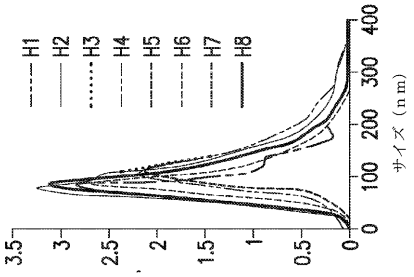


【図８－２】

【図８Ｂ】



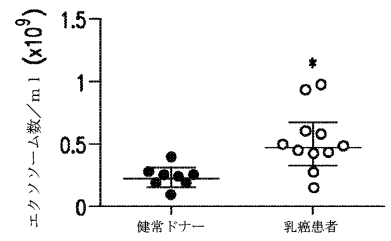
健常ドナーのエクソソームの
標準化された濃度



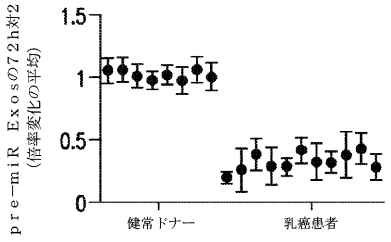
乳癌患者のエクソソームの
標準化された濃度

【図８－４】

【図８Ｄ～８Ｅ】



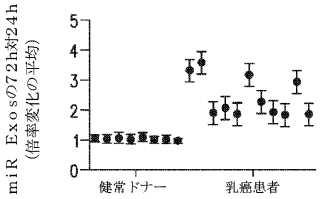
8D



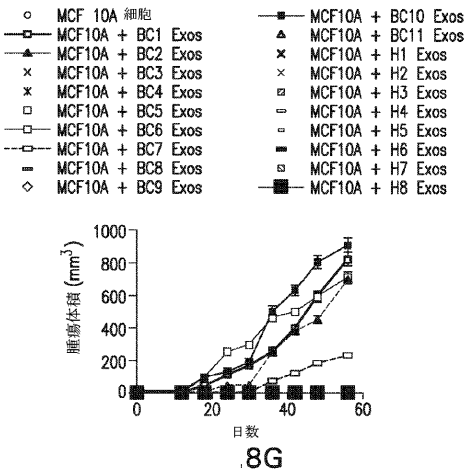
8E

【図８－５】

【図８Ｆ～８Ｇ】



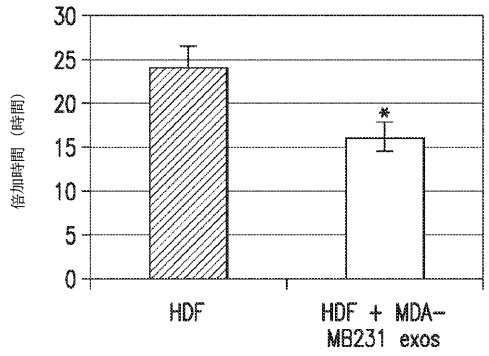
8F



8G

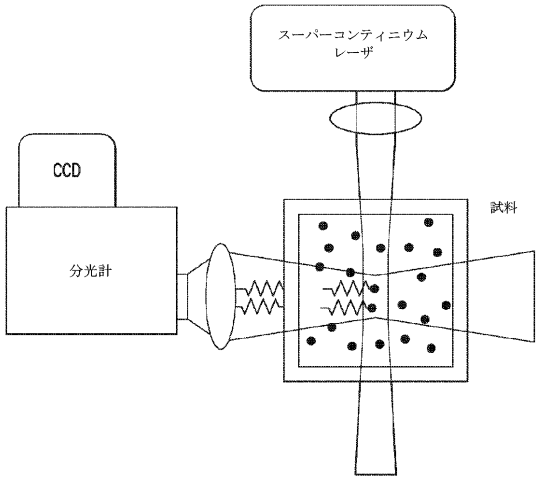
【図８－７】

【図８Ｉ】



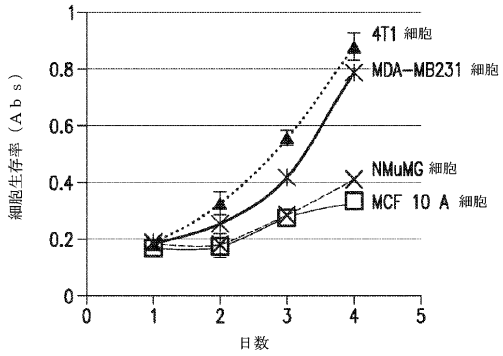
【図１０Ｂ】

【図１０Ｂ】



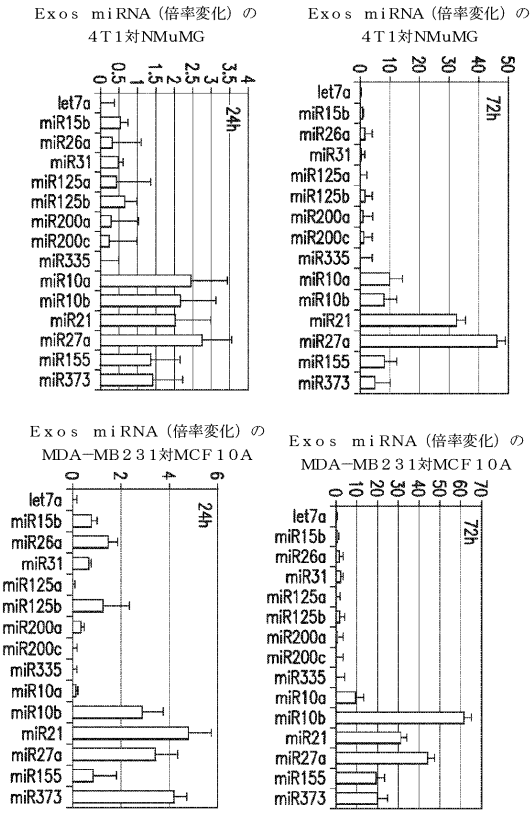
【図１０Ｃ】

【図１０Ｃ】



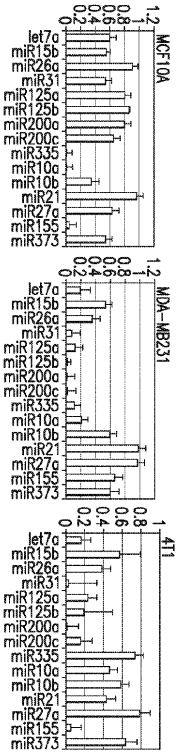
【図１１Ｂ】

【図１１Ｂ】



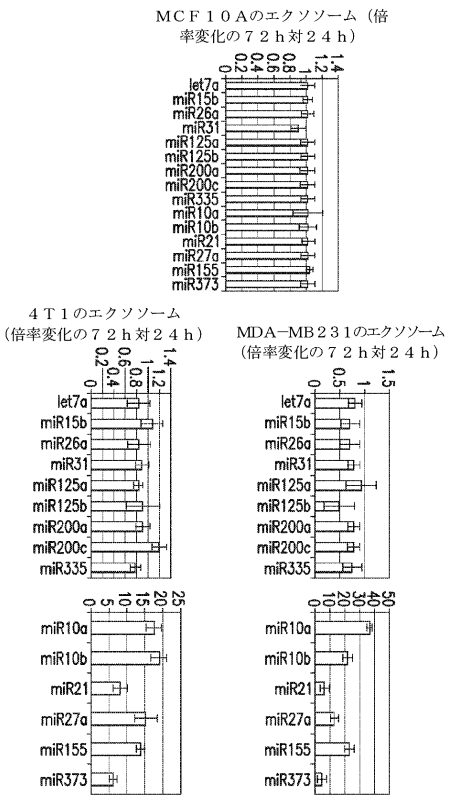
【図１１Ｃ】

【図１１Ｃ】



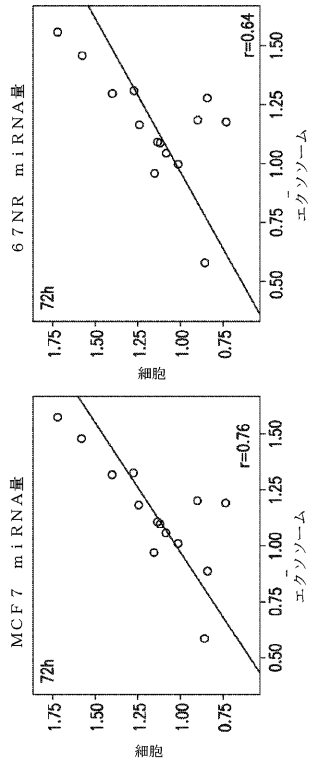
【図１１Ｄ】

【図１１Ｄ】



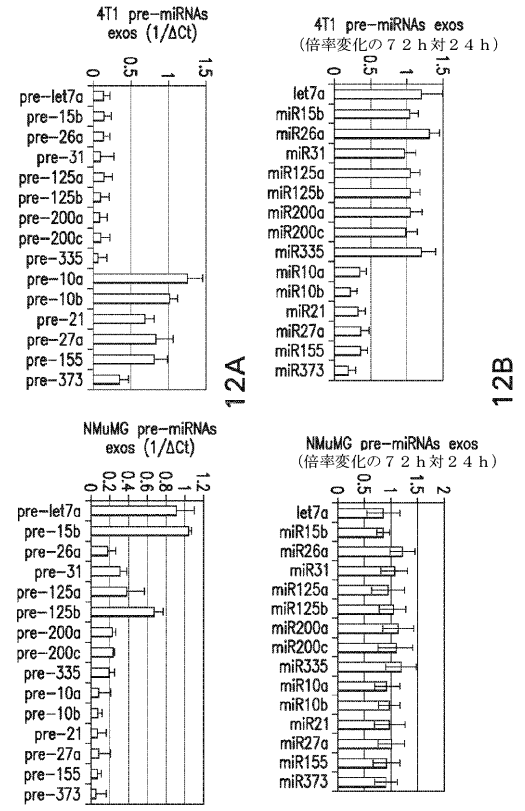
【図１１Ｅ】

【図１１Ｅ】



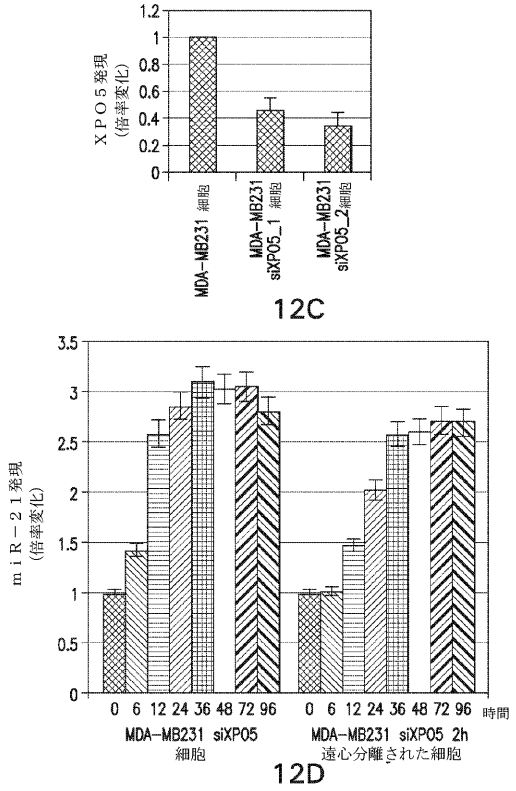
【図１２－１】

【図１２Ａ～１２Ｂ】



【図１２－２】

【図１２Ｃ～１２Ｄ】



【図１２－３】

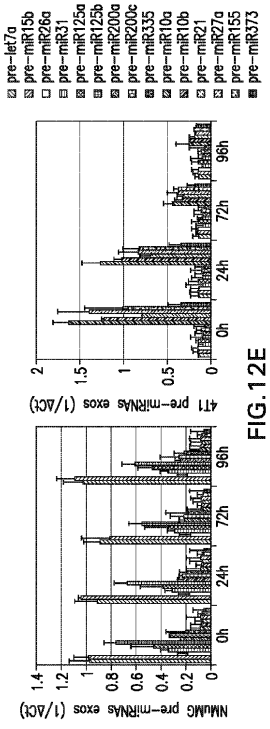
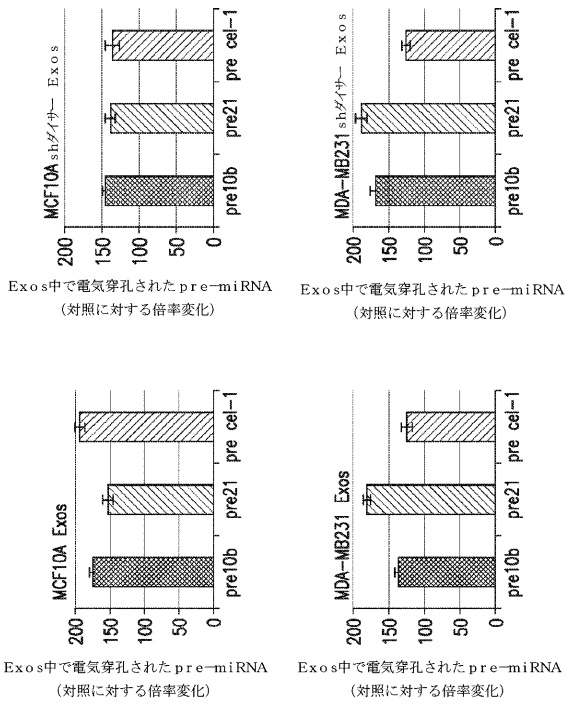


FIG.12E

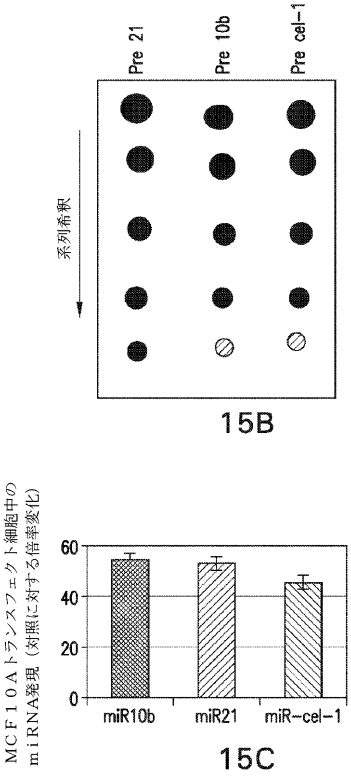
【図１５－１】

【図１５Ａ】



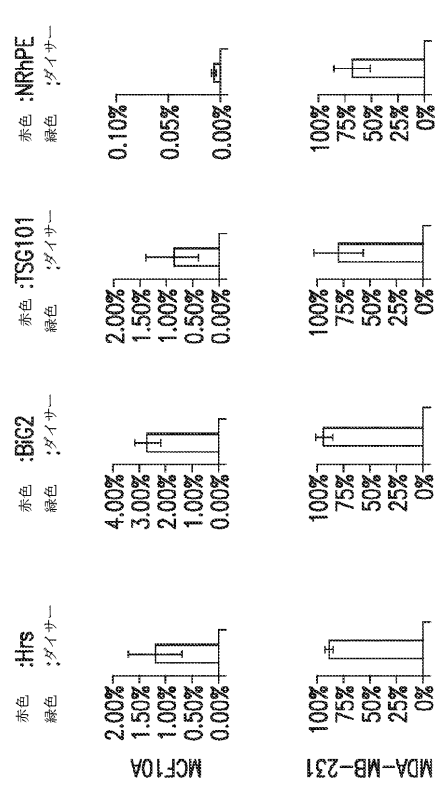
【図１５－２】

【図１５Ｂ～１５Ｃ】



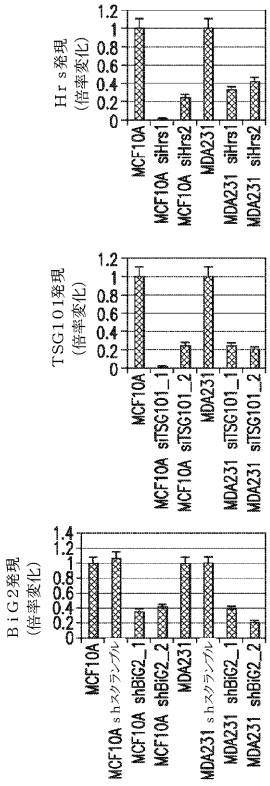
【図１６－１】

【図１６Ａ】



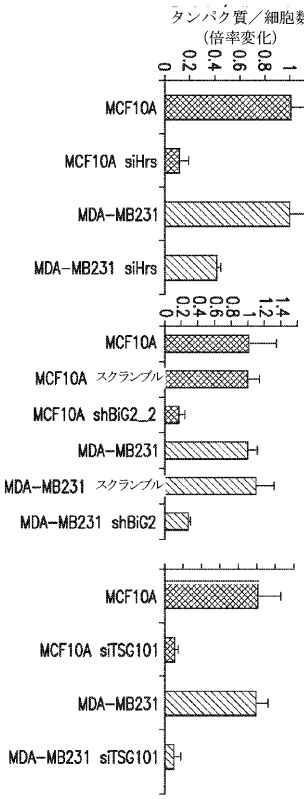
【図１６－２】

【図１６Ｂ】



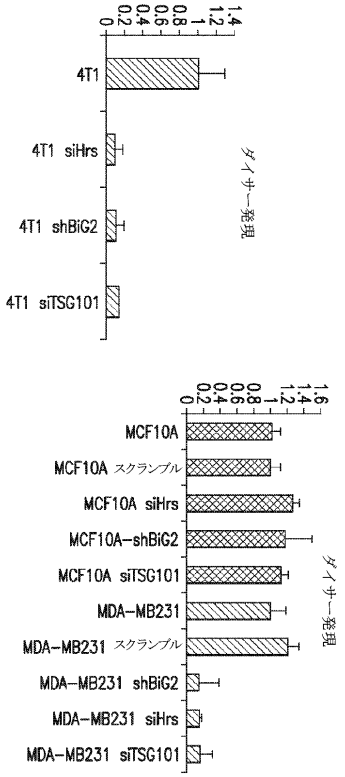
【図１６－３】

【図１６Ｃ】



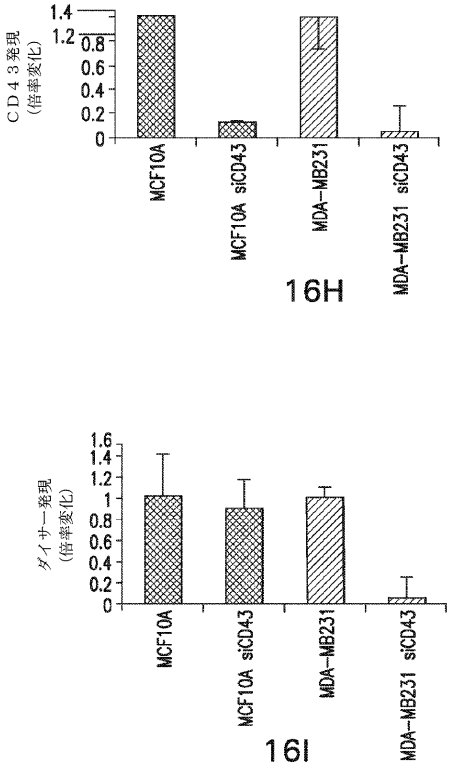
【図１６－５】

【図１６Ｆ】



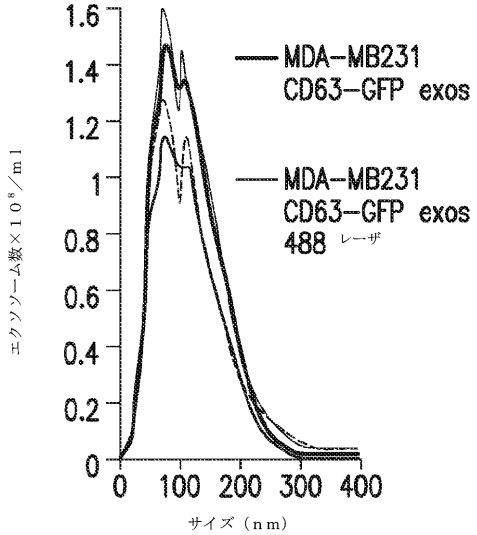
【図１６－７】

【図１６Ｈ～１６Ｉ】



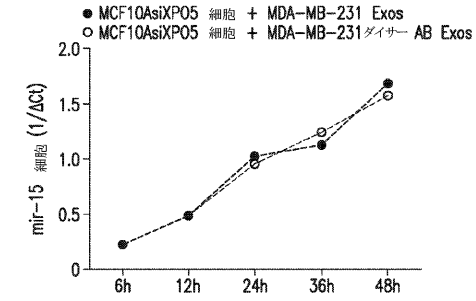
【図１７－１】

【図１７Ａ】

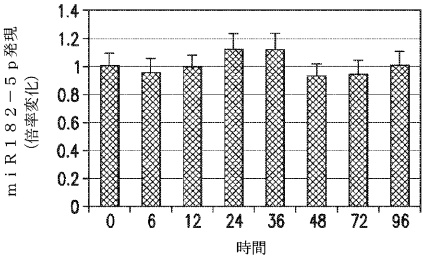


【図１７－３】

【図１７Ｄ～１７Ｅ】



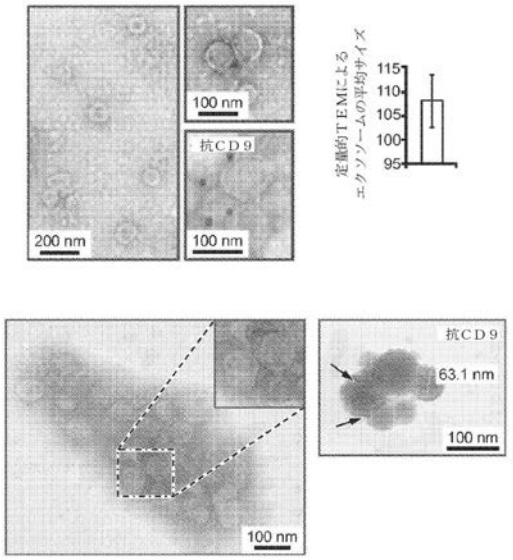
17D



17E

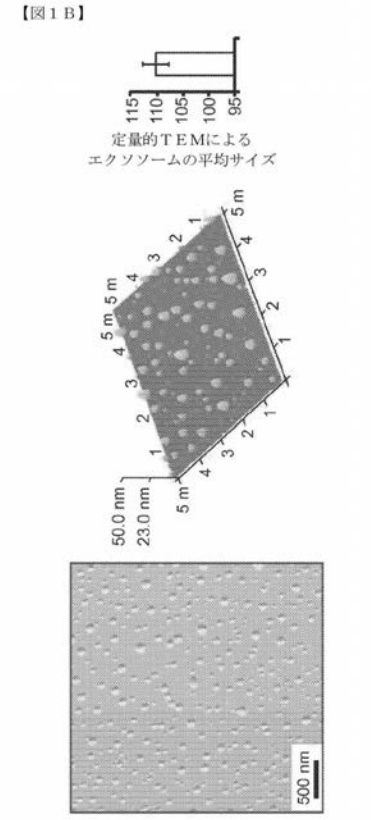
【図１Ａ】

【図１Ａ】



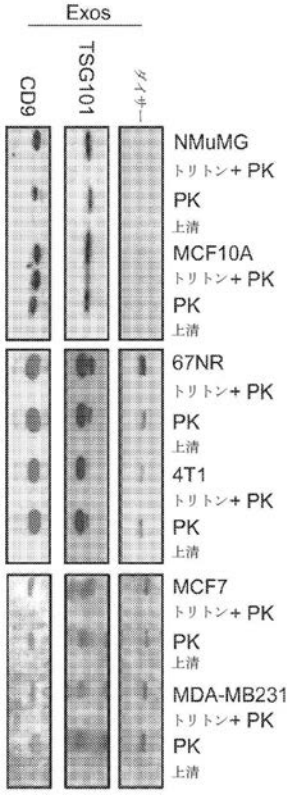
【図１Ｂ】

【図１Ｂ】

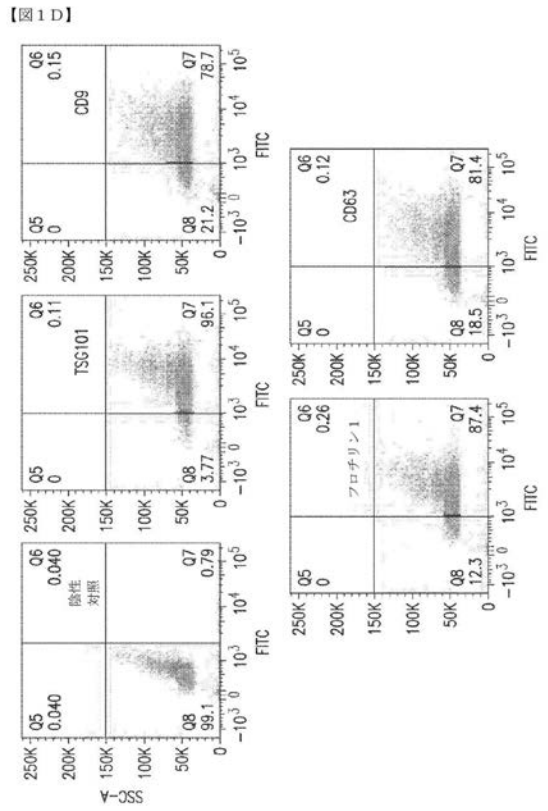


【図１Ｃ】

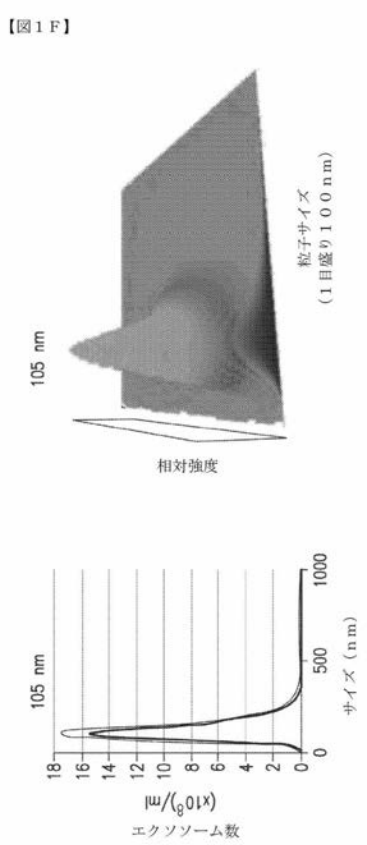
【図１Ｃ】



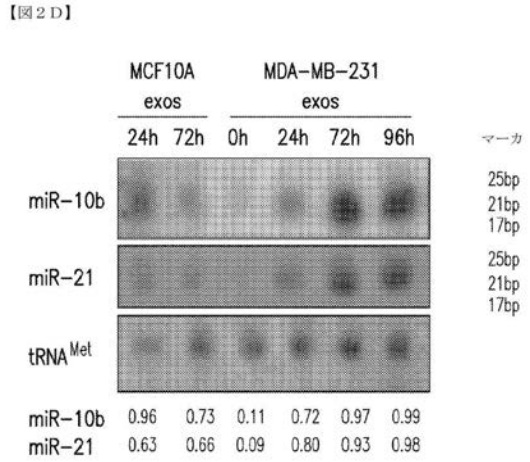
【図１Ｄ】



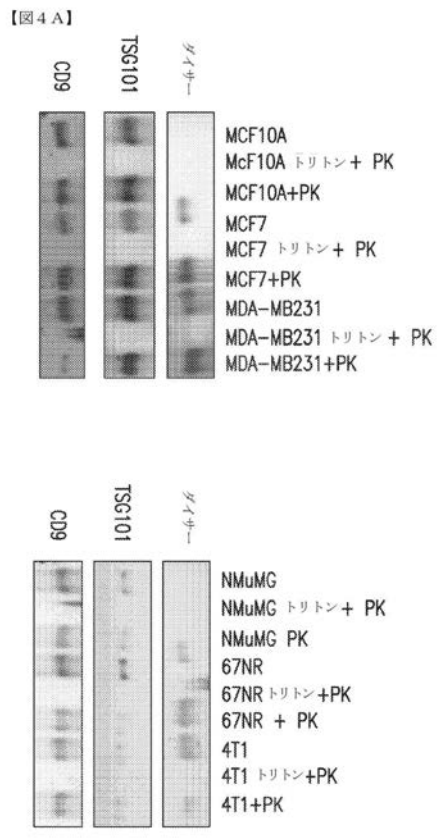
【図１Ｆ】



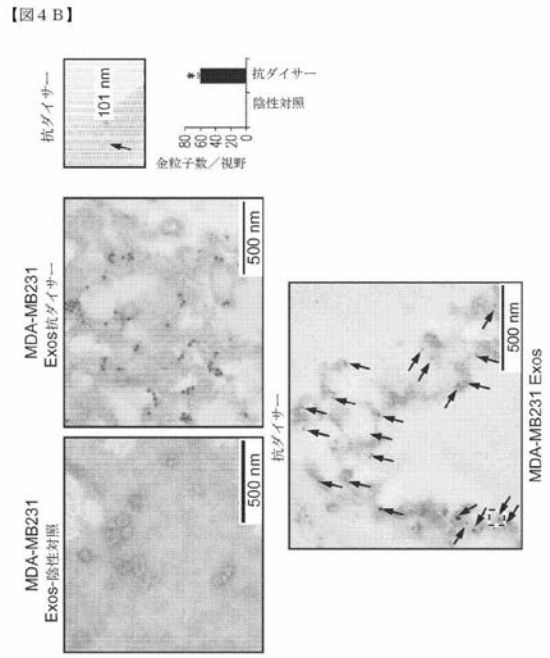
【図２Ｄ】



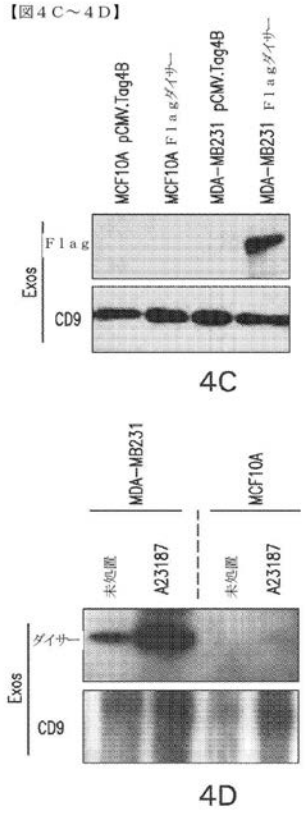
【図４－１】



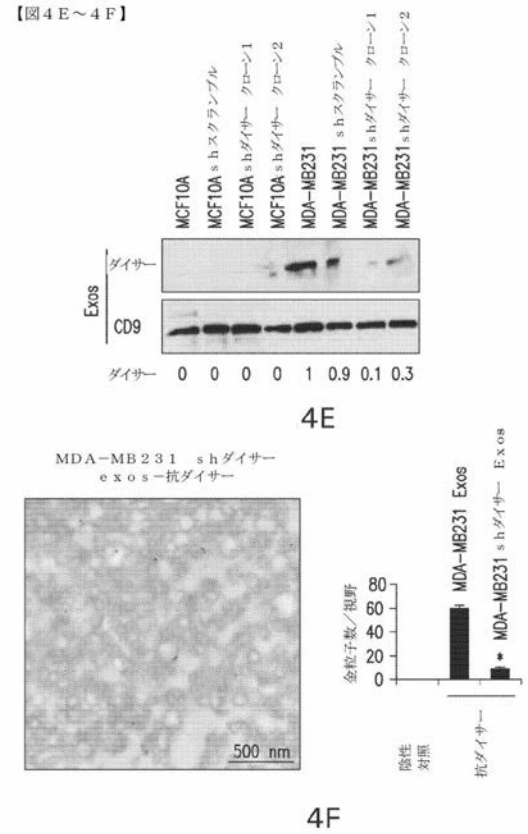
【図４－２】



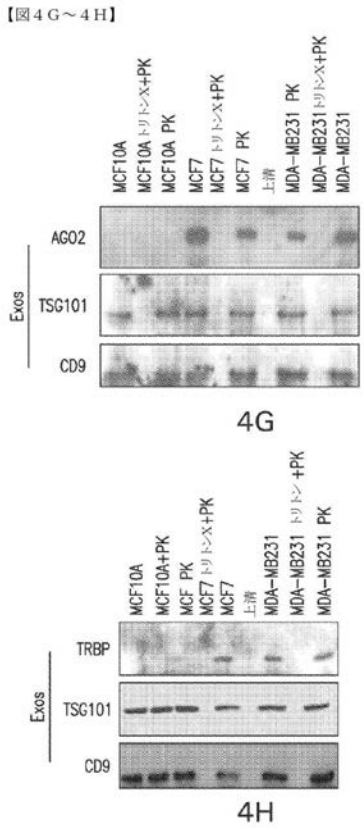
【図４－３】



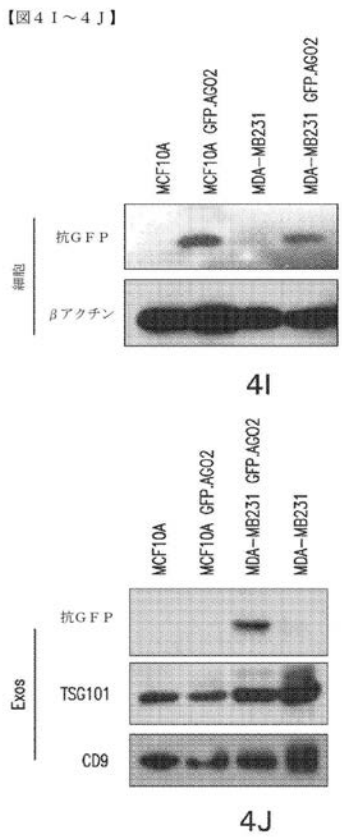
【図４－４】



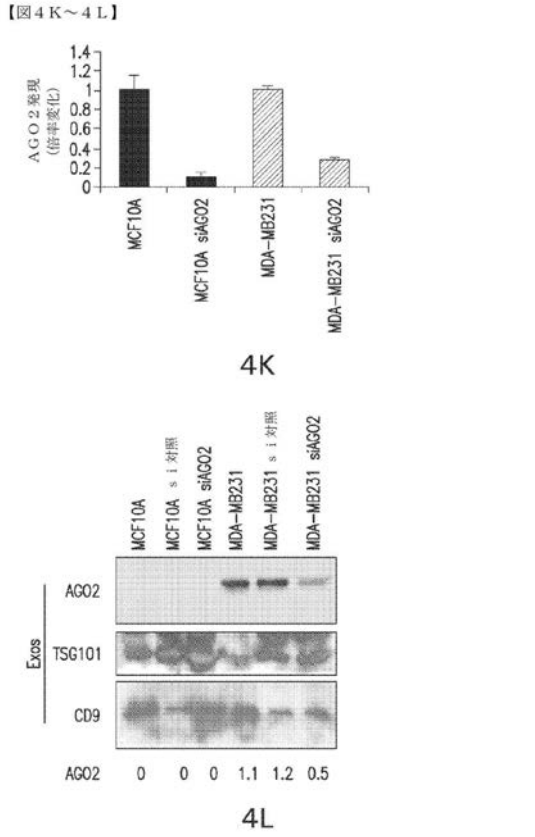
【図４－５】



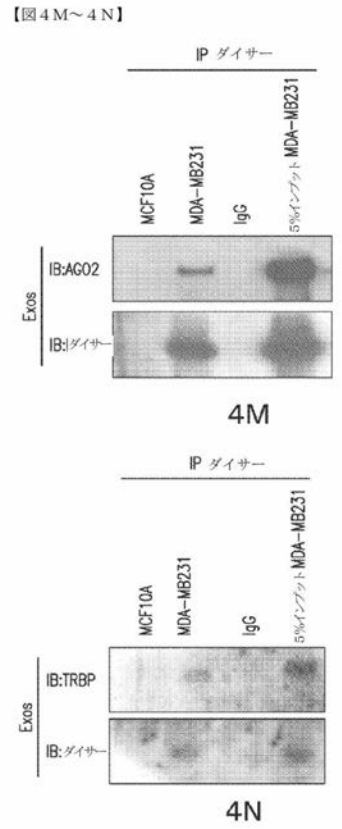
【図４－６】



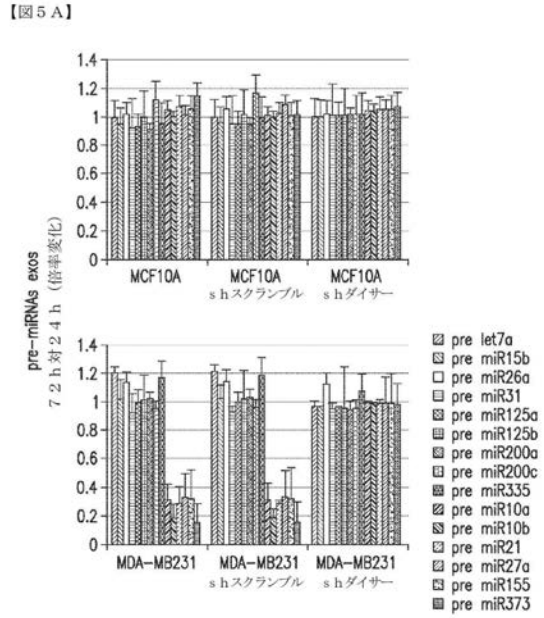
【図４－７】



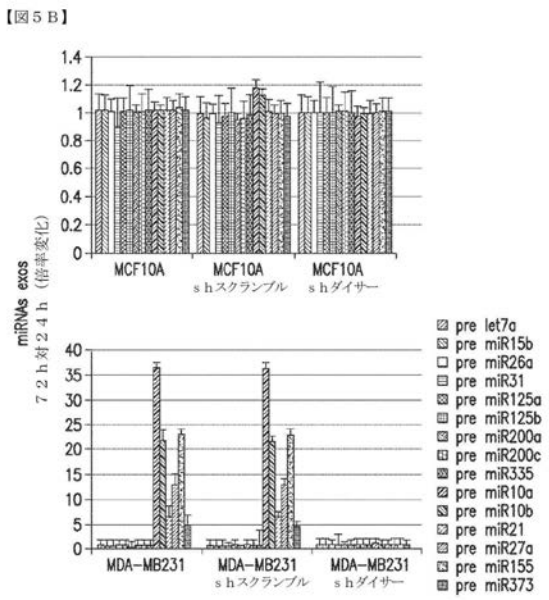
【図４－８】



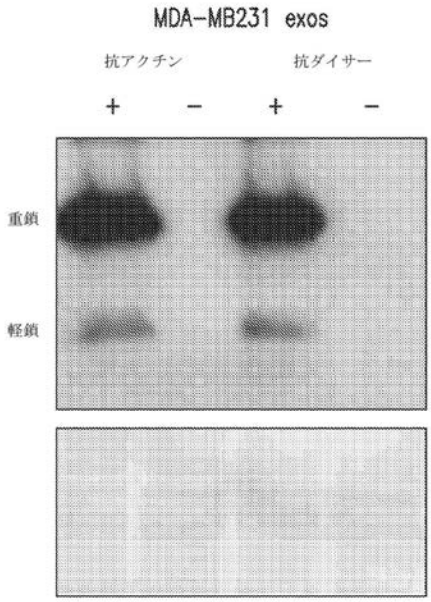
【図５Ａ】



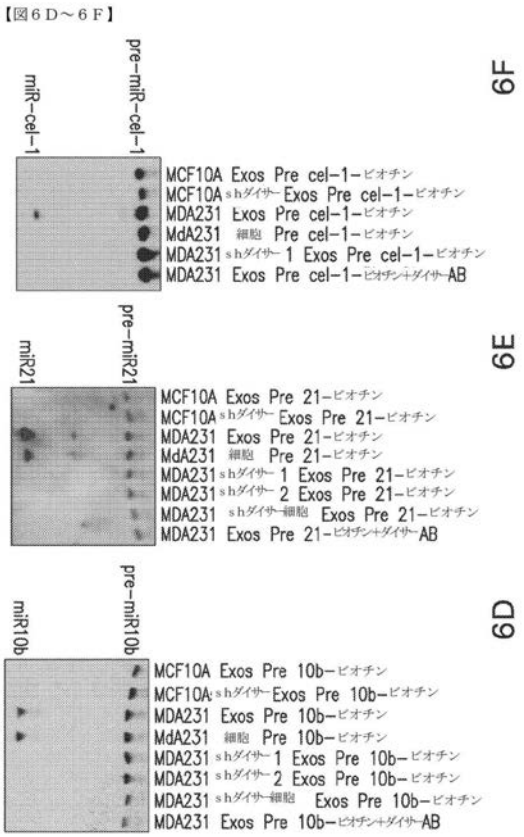
【図５Ｂ】



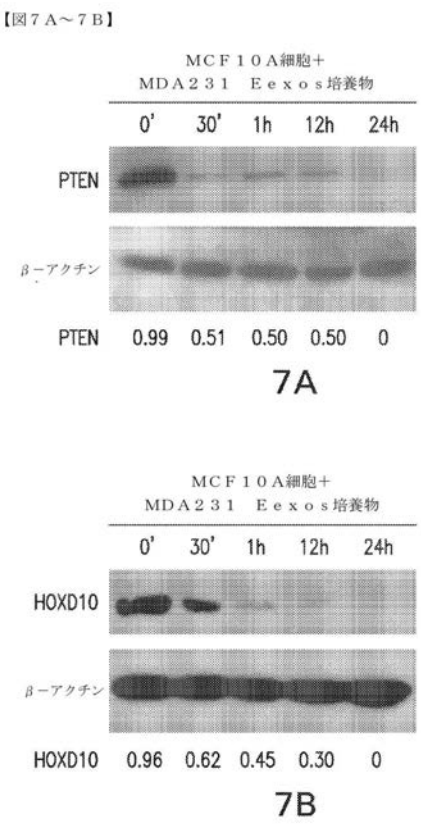
【図５Ｃ】



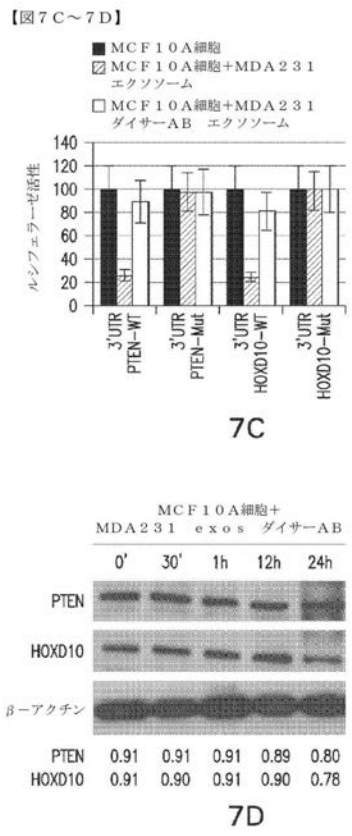
【図６－４】



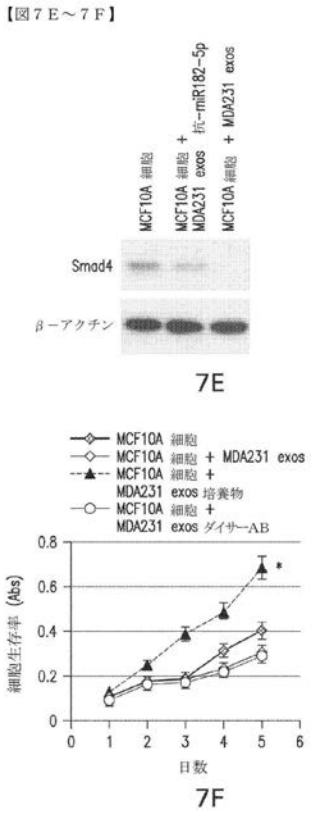
【図７－１】



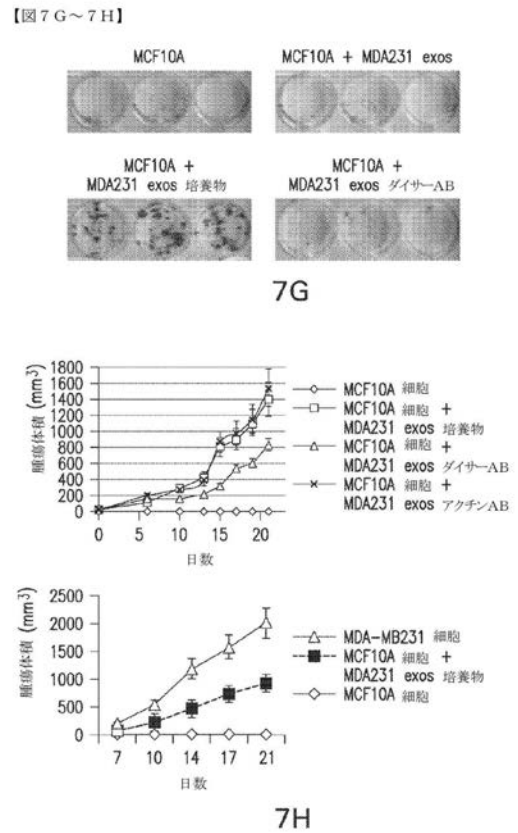
【図７－２】



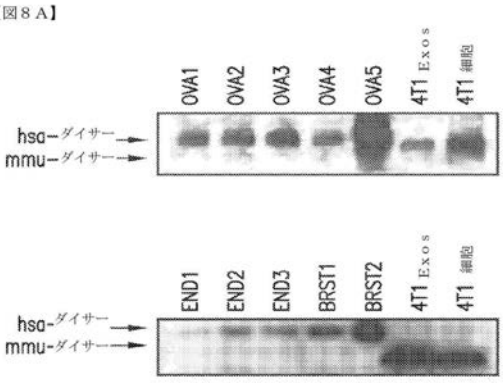
【図７－３】



【図７－４】

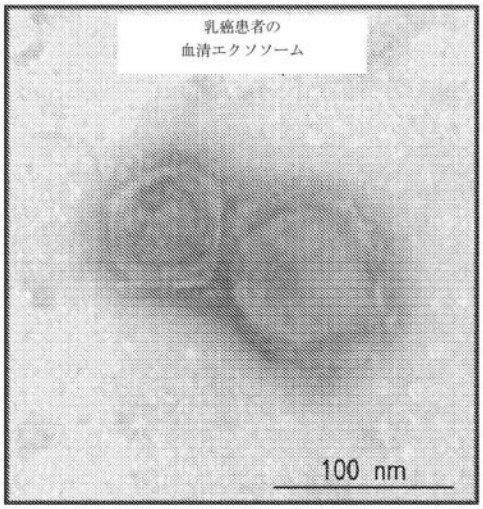


【図８－１】



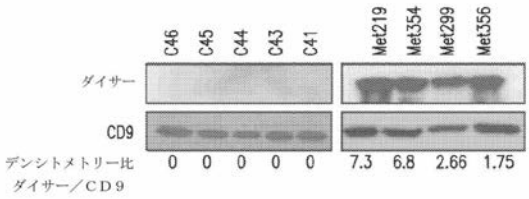
【図８－３】

【図８Ｃ】



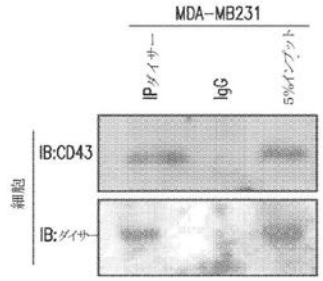
【図８－６】

【図８Ｈ】

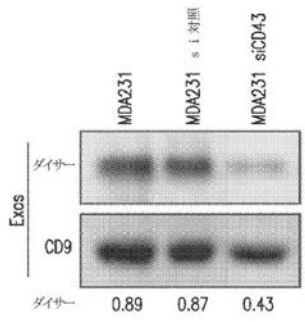


【図９】

【図９Ａ～９Ｂ】



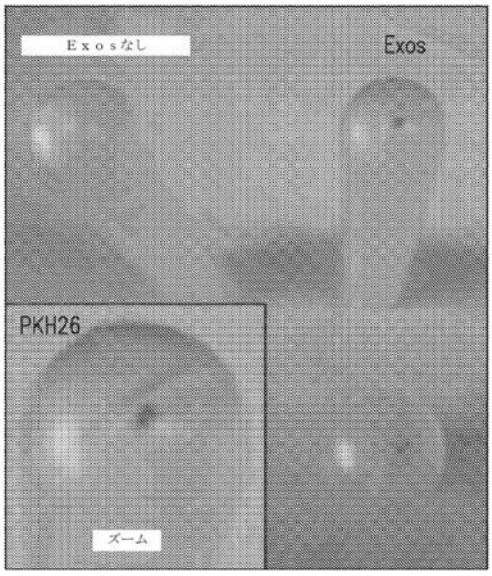
9A



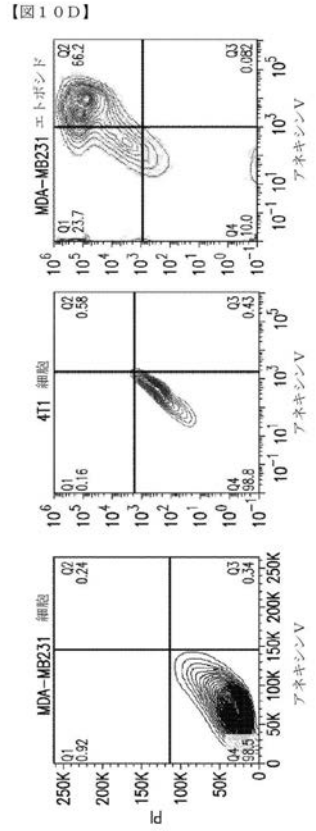
9B

【図１０Ａ】

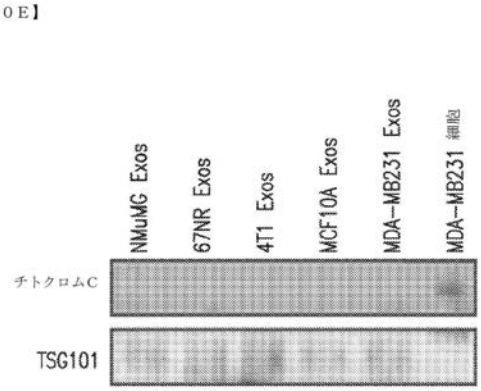
【図１０Ａ】



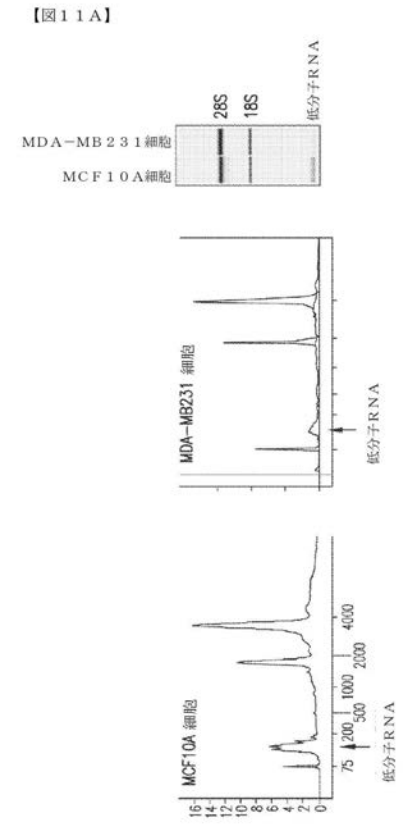
【図１０Ｄ】



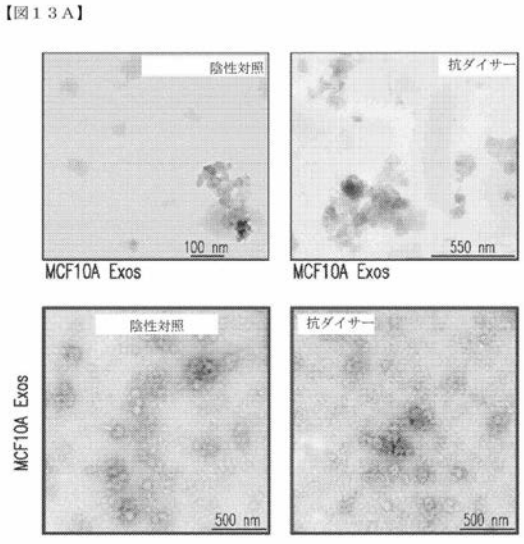
【図１０Ｅ】



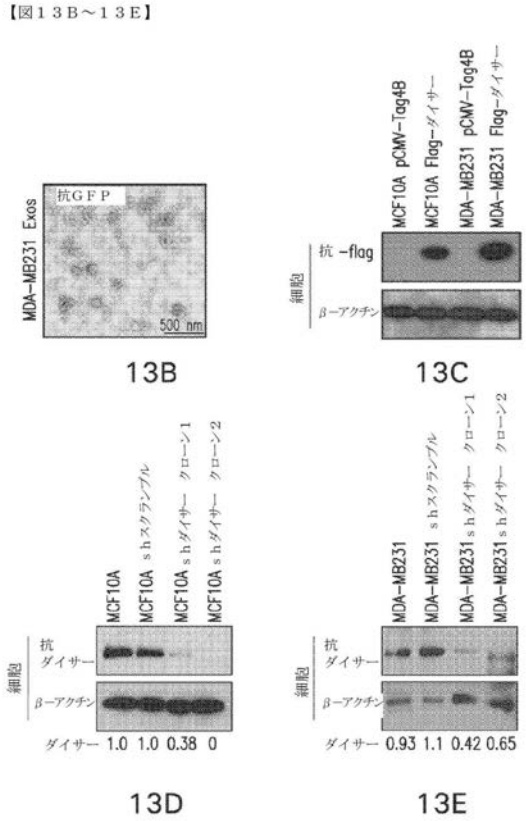
【図１１Ａ】



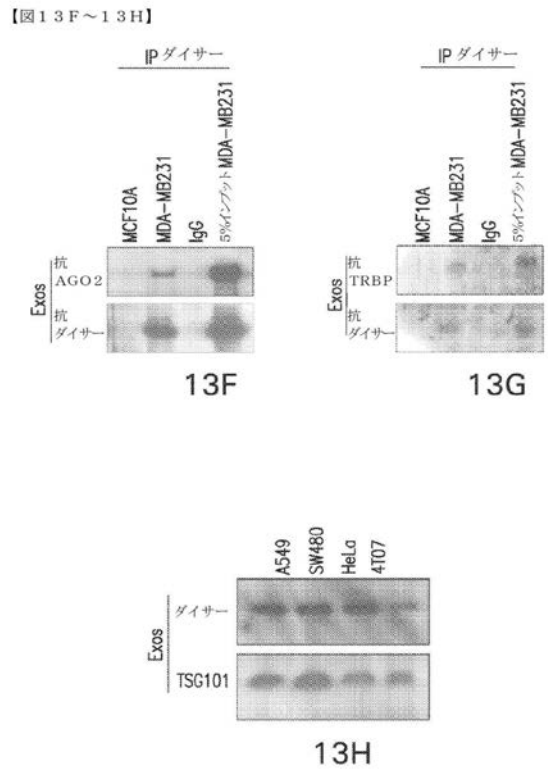
【図１３－１】



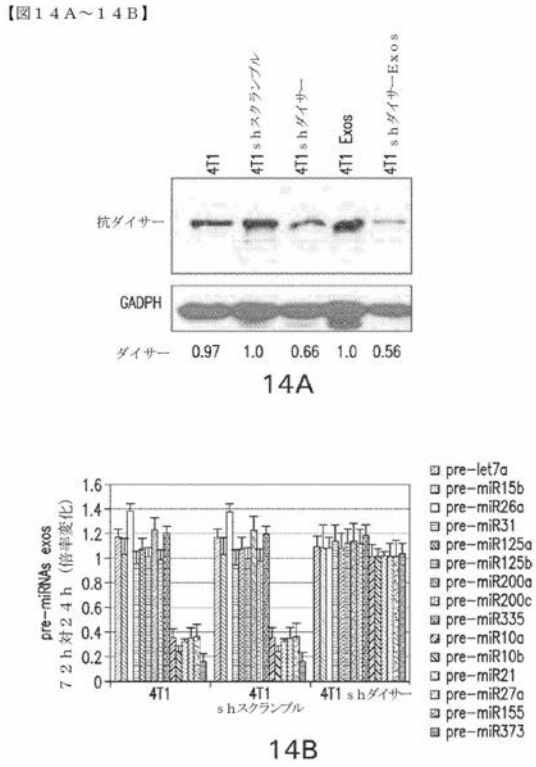
【図１３－２】



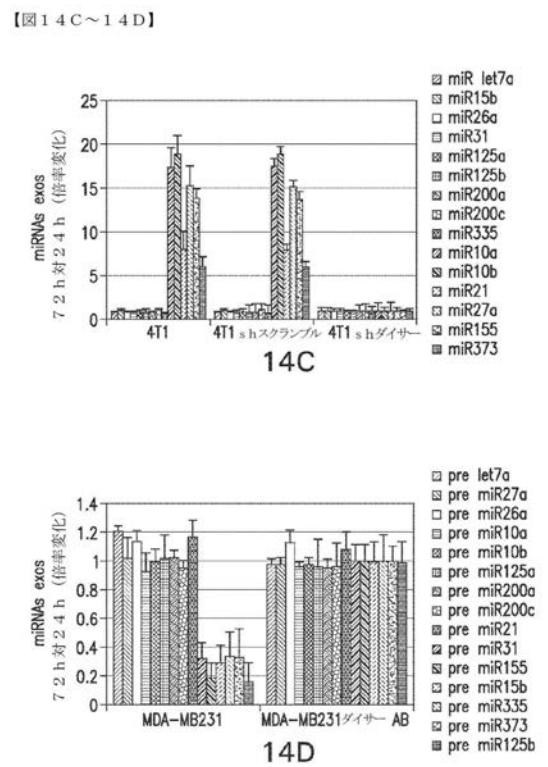
【図１３－３】



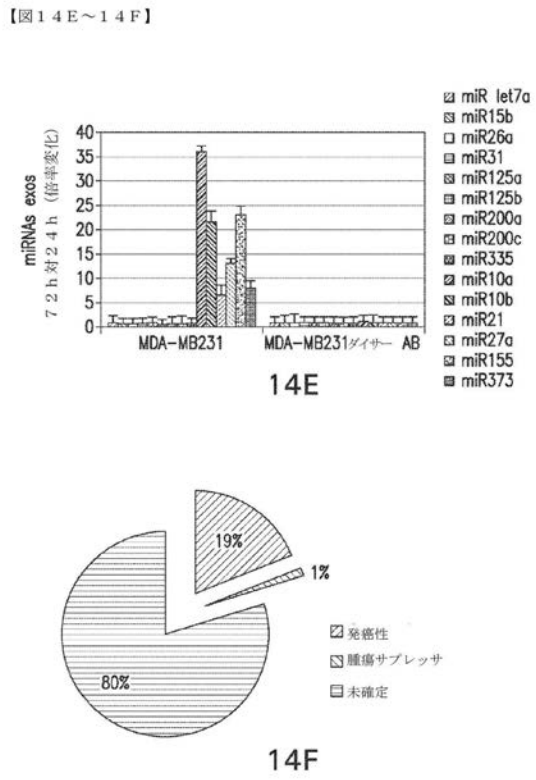
【図１４－１】



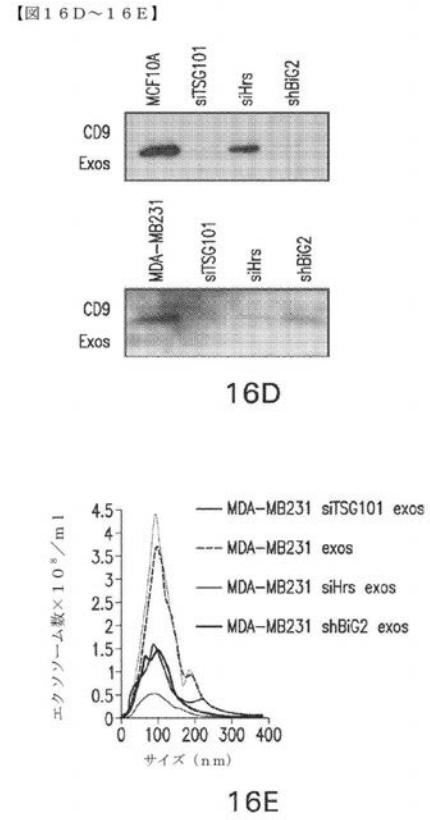
【図１４－２】



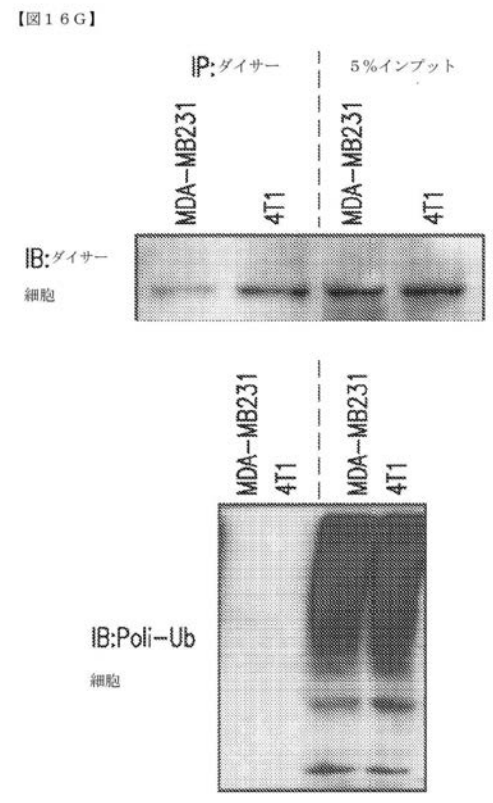
【図１４－３】



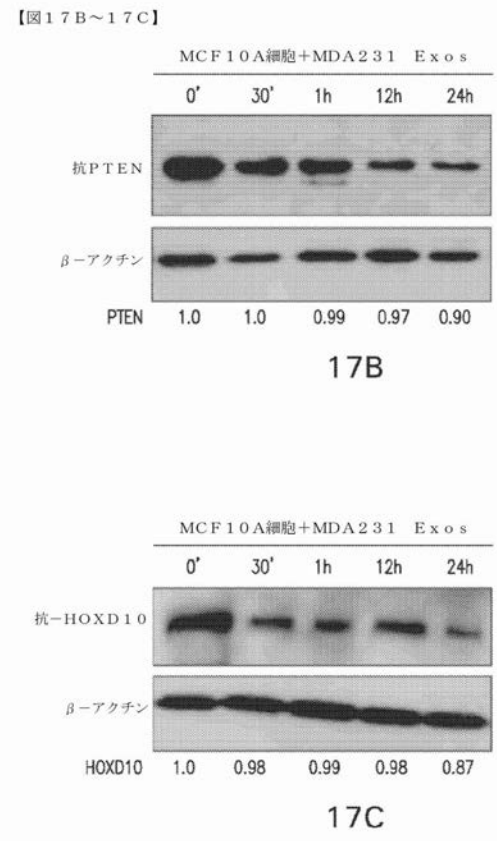
【図１６－４】



【図１６－６】

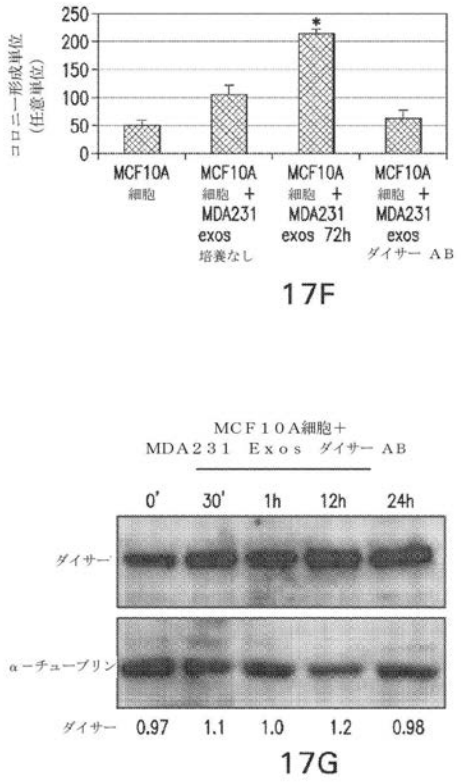


【図１７－２】



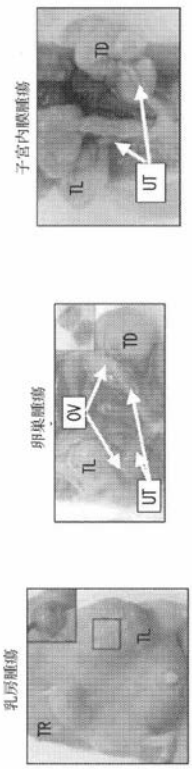
【図１７－４】

【図１７Ｆ～１７Ｇ】



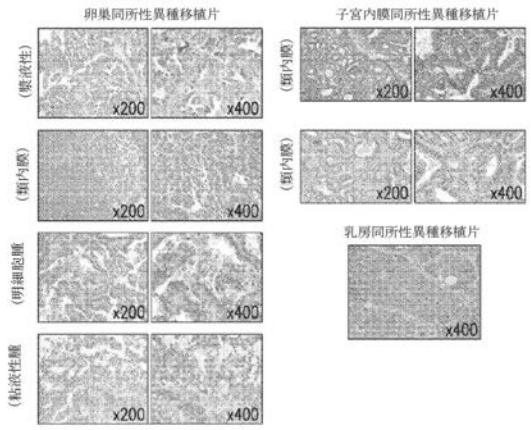
【図１８－１】

【図１８Ａ】



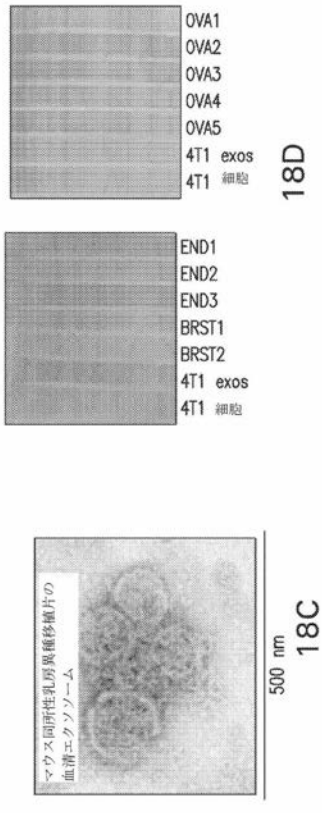
【図１８－２】

【図１８Ｂ】



【図１８－３】

【図１８Ｃ～１８Ｄ】



【配列表】
2016520803000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/027541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q 1/68; A61K 31/7088; C40B 30/04; G01N 33/574; C12N 15/11; A61K 48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: computer readable medium, cancer, miRNA, RISC, TRBP, DICER, AGO2, exosome

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011-0237450 A1 (KLASS et al.) 29 September 2011 See abstract and paragraphs [0321], [0337], [0338], [0343], [0860] and [0862].	30-36
A		41-47,49-54
X	MACFARLANE et al., 'MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer' Current genomics, Vol.11, No.7, pp.537-561 (23 August 2010) See abstract, pages 551, 552 and 541 and figure 3.	41-47,49-54
A		30-36
A	US 2011-0054009 A1 (CROCE et al.) 03 March 2011 See abstract and claim 1.	30-36,41-47,49-54
A	SEN et al., 'A brief history of RNAi: the silence of the genes' The FASEB Journal, Vol.20, No.9, pp.1293-1299 (2006) See abstract and figure 1.	30-36,41-47,49-54
A	US 2012-0238467 A1 (TAYLOR et al.) 20 September 2012 See abstract and claim 1.	30-36,41-47,49-54

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 July 2014 (10.07.2014)	**21 July 2014 (21.07.2014)**

Name and mailing address of the ISA/KR
International Application Division
Korean Intellectual Property Office
189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-472-7140

Authorized officer
KIM, Seung Beom
Telephone No. +82-42-481-3371

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/027541

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-29, 37-40, 48
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-29, 37-40 and 48 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2014/027541

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011-0237450 A1	29/09/2011	CA 2743211 A1	20/05/2010
		CN 102301002 A	28/12/2011
		EP 2350320 A2	03/08/2011
		EP 2350320 A4	14/11/2012
		EP 2730662 A1	14/05/2014
		GB 0921348 D0	20/01/2010
		GB 2463401 A	17/03/2010
		GB 2463401 A8	15/05/2013
		GB 2463401 B	29/01/2014
		IL 212768 D0	31/07/2011
		JP 2012-508577 A	12/04/2012
		US 2010-184046 A1	22/07/2010
		US 2010-203529 A1	12/08/2010
		US 2011-151460 A1	23/06/2011
		US 2013-005599 A1	03/01/2013
		US 7897356 B2	01/03/2011
		US 8211653 B2	03/07/2012
		US 8278059 B2	02/10/2012
		WO 2010-056337 A2	20/05/2010
		WO 2010-056337 A3	10/09/2010
US 2011-0054009 A1	03/03/2011	AU 2009-219197 A1	03/09/2009
		AU 2009-219197 B2	10/04/2014
		CA 2716938 A1	03/09/2009
		CN 102027129 A	20/04/2011
		CN 102027129 B	12/03/2014
		EP 2260109 A2	15/12/2010
		EP 2260109 A4	08/06/2011
		JP 2011-517283 A	02/06/2011
		US 2013-085077 A1	04/04/2013
		WO 2009-108860 A2	03/09/2009
		WO 2009-108860 A3	14/01/2010
		WO 2009-108860 A8	27/01/2011
US 2012-0238467 A1	20/09/2012	US 2009-239630 A1	24/09/2009
		US 2010-151480 A1	17/06/2010
		US 8637254 B2	28/01/2014

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ　25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｋ　45/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		
Ａ６１Ｋ　49/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	49/04	Ａ	
Ａ６１Ｋ　51/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	49/02	Ａ	
Ａ６１Ｋ　49/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	49/00	Ｃ	

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　カルリ，　ラグフ
アメリカ合衆国　テキサス　７７０２５，　ヒューストン，　マロニール　ストリート　３７２６
(72)発明者　メロ，　ソニア
アメリカ合衆国　テキサス　７７００４，　ヒューストン，　ファニン　ストリート　５２５３，　アパートメント　２６０６

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 AA12 CA04 CA09 CA20 DA02 DA03 EA04 GA11
4B063 QA01 QA19 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS25 QS32 QS33 QS34
4C084 AA17 NA14 ZA021 ZB261
4C085 HH03 HH05 HH07 LL13 LL18

专利名称(译)	外泌体中的miRNA生物发生用于诊断和治疗		
公开(公告)号	JP2016520803A	公开(公告)日	2016-07-14
申请号	JP2016502475	申请日	2014-03-14
申请(专利权)人(译)	Rijientsu董事会，德州系统的通用名称 贝斯以色列Deakonesu医疗中心有限公司		
[标]发明人	カルリラグフ メロソニア		
发明人	カルリ, ラグフ メロ, ソニア		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C12Q1/68 C12N15/09 C12N15/113 A61P35/00 A61P25/00 A61K45/00 A61K49/04 A61K51/00 A61K49/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P25/00 A61P35/00 C07K14/4703 C07K16/40 C12N15/113 C12Q1/6886 C12Q2600/158 C12Q2600/178 G16B20/00 Y02A90/26 C12N2310/14 C12N2310/141 G01N33/57488 G01N2333/4704		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A G01N33/53.M C12Q1/68.A C12N15/00.A C12N15/00.G A61P35/00 A61P25/00 A61K45/00 A61K49/04.A A61K49/02.A A61K49/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QS34 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZB261 4C085/HH03 4C085/HH05 4C085/HH07 4C085/LL13 4C085/LL18		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/791301 2013-03-15 US		
其他公开文献	JP6554458B2 JP2016520803A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过使用包含miRNA及其前体的外来体来诊断和治疗癌症的方法。 例如，在一些方面，可以通过确定来自受试者的样品中外泌体的miRNA含量或通过检测外泌体中的miRNA加工来诊断或评估癌症。

(21) 出願番号　特願2016-502475 (P2016-502475)
(86) (22) 出願日　平成26年3月14日 (2014.3.14)
(85) 翻訳文提出日　平成27年10月13日 (2015.10.13)
(86) 国際出願番号　PCT/US2014/027541
(87) 国際公開番号　WO2014/152622
(87) 国際公開日　平成26年9月25日 (2014.9.25)
(31) 優先権主張番号　61/791,301
(32) 優先日　平成25年3月15日 (2013.3.15)
(33) 優先権主張国　米国 (US)

(71) 出願人　500039463
ボード・オブ・リージエンツ, ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム
アメリカ合衆国、テキサス・78701、オースティン、ウエスト・セブンス・ストリート・201
(71) 出願人　305049506
ベス イスラエル デアコネス メディカル センター, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02215, ボストン, ブルックリン アベニュー 330
(74) 代理人　100078282
弁理士 山本 秀策

最終頁に続く