(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年1月2日(02.01.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/004683 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/574 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/019760

(22) 国際出願日： 2024年5月29日(29.05.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-107773 2023年6月30日(30.06.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (**OSAKA UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 Osaka (JP).

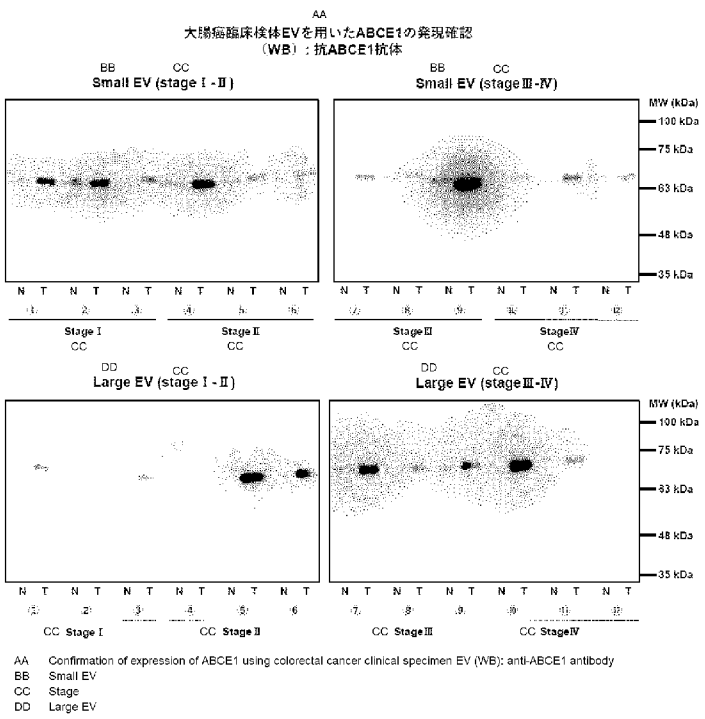
(72) 発明者: 辻川 和丈 (**TSUJIKAWA, Kazutake**); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 神宮司 健太郎 (**JINGUSHI, Kentaro**); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 庄司 隆, 外 (**SHOJI, Takashi** et al.); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目６番１３号御幸ビル３０７号 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,

(54) **Title:** CANCER EXAMINATION METHOD AND CANCER TREATMENT AGENT

(54) 発明の名称： がん検査方法及びがん治療剤



(57) **Abstract:** Provided is a biomarker useful for the diagnosis of cancer and the development of new drugs. Further provided are a cancer examination method, a treatment agent, and a reagent for studies of cancer, in each of which the biomarker is used. A useful biomarker is provided by identifying a protein that is expressed on the surface of the membrane of an extracellular vesicle (EV) in a cancer-specific manner. The cancer examination method includes detecting a protein (biomarker) that is expressed, in a cancer-specific manner, on the surface of the membrane of an EV contained in a

WO 2025/004683 A1

［続葉有］

HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能):ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

collected body fluid specimen to detect a cancer-specific EV. An antibody against a protein expressed on the surface of the membrane of an EV in a cancer-specific manner can be used in a cancer examination method, a cancer treatment agent, and a reagent for studies of cancer.

(57) 要約:がんの診断や新薬開発に有用なバイオマーカーを提供する。更には当該バイオマーカーを利用するがんの検査方法、治療剤及びがんの研究用試薬を提供する。細胞外小胞(extracellular vesicle: EV)の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を同定することにより、有用なバイオマーカーを提供する。採取した体液検体に含まれるEVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質(バイオマーカー)を検出することでがん特異的EVを検出する、がんの検査方法を提供する。EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体は、がんの検査方法のほか、がん治療剤及びがんの研究用試薬として利用することができる。

明　細　書

発明の名称 ： がん検査方法及びがん治療剤

技術分野

[0001]　本発明はがん検査方法、がん治療剤及びがんの研究用試薬に関する。

[0002]　本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願2023-107773号優先権を請求する。

背景技術

[0003]　バイオマーカーとは、ある疾患の有無や進行状態を示す生理学的指標となるタンパク質や遺伝子などの生体内の物質等をいう。バイオマーカーは、生化学検査、血液検査、腫瘍マーカーのようないわゆる臨床検査値や、CT（Computed Tomography）検査やMRI（磁気共鳴画像、Magnetic Resonance Imaging）検査のような画像診断データなど様々なものを含み、例えば生体内の生物学的変化を定量的に把握するため、生体情報を数値化・定量化した指標等が挙げられる。特に、疾患の指標として疾患の存在や進行度を表すバイオマーカーは、疾患の発見、診断、予後予測など、現在の診療においてなくてはならないものとなっている。また、バイオマーカーは、新薬開発において、開発化合物の選択や、評価において利用されている。

[0004]　がんの悪性度や浸潤の範囲を正確に評価することは、治療方針を決定するうえで重要である。特に、疾患の初期の段階では自覚症状の乏しいがんでは、診断や創薬ツールとして有用なバイオマーカーが望まれている。

[0005]　生検は診断、予後、治療等の判断のために特にがん患者にとって極めて重要である。しかしながら、例えば非小細胞肺がん（non-small cell lung cancer: NSCLC）などの一部のがん種では、患者の状態や腫瘍の位置により、バイオマーカー検査のために生検から十分な量の組織を切除することは容易ではない場合がある。近年腫瘍組織検体の取得に関する障壁を補完、又は克服する代替の検体取得法として血液、尿、唾液、脳脊髄液、心嚢水、胸水、腹水、便等の体液、分泌物又は排出物を検査用検体として採取するリキッドバ

イオプシー（liquid biopsy）が注目されている。リキッドバイオプシーによれば組織生検などに比べて侵襲性が低く、繰り返し行うことができる。リキッドバイオプシーの解析対象としては、血中循環腫瘍細胞（Circulating Tumor Cells: CTC）、細胞の死滅によって放出されるDNA（cell free DNA: cfDNA）やがん細胞に由来するDNA（Circulating Tumor DNA: ctDNA）が挙げられる。しかし、CTCやctDNAはがん細胞が転移する際に検出されることが想定されるため、がんの予後予測には向いているものの早期診断には用いることができない。

[0006] リキッドバイオプシーの解析対象として、cfDNA、ctDNAやCTCに加えて細胞外小胞も注目されている。細胞外小胞は、そのサイズや起源によって エクソソーム（exosome）、エクトソーム（ectosome）、微小小胞体（microvesicles: MV）など様々な名称がある。それらを総称して細胞外小胞（extracellular vesicle: EV）という。細胞は液性因子とともにEVを放出し、特にがん細胞からもEVは放出されている。EVによるがん細胞の転移誘導や免疫機能抑制作用等が報告されている。EVのうち、特にエクソソームは、microRNA、脂質、タンパク質といった由来細胞の特性を高度に反映するバイオマーカーを含んでいる。がん細胞が正常細胞よりも多くのエクソソームを産生しているといわれている。

[0007] 被検者の血液試料中に存在する細胞外小胞の膜に存在するCHL1（cell adhesion molecule L1 like）とCHL1パートナータンパク質との複合体を解析する工程を含む、肺がんの検査方法について開示がある（特許文献１）。特許文献１には、各種CHL1パートナータンパク質について開示がある。

[0008] 疾患組織から組織滲出性の細胞外小胞（te-EVs）を単離し、バイオマーカーを解析することについて開示がある（特許文献２）。特許文献２ではがん患者のがん組織と正常組織各由来のte-EVsを用い、エクソソームマーカーとして知られている、CD63、CD81及びCD9等のテトラスパニン分子を同定し、その発現量を液体クロマトグラフ質量分析（LC/MS）で解析したことが報告されている。しかしながら、抗テトラスパニン抗体についての開示はない。

[0009] 尿の細胞外小胞を解析し、特定の膜タンパク質群が尿路上皮がんのバイオマーカーとして有用であることが開示されている（特許文献３）。各マーカーの検出には免疫学的測定方法や抗体を用いて検出してもよいことが開示されている。

[0010] ヒトの体内でのがん関連細胞外小胞（EV）の機能を確認するため、手術で切除した生細胞性腎細胞がん（ccRCC）組織と隣接する正常腎組織（n520）から直接EVを抽出し、定量的LC/MS分析により3,871種の組織滲出性EV（Te-EV）タンパク質を同定したことが報告されている。その中でazurocidin（AZU1）は腫瘍Te-EVに高濃度に含まれており、AZU1の含有量は、健常者ドナーの血清EVと比較して、CCRCC患者の血清EVで有意に高いことが報告されている。Te-EVは生理的なEVの機能を調べるための理想的なリソースであることが示唆されている（非特許文献１）。疾患の診断や、新薬開発に有効なバイオマーカーとしての細胞外小胞膜タンパク質の解析や、検査や治療方法に結び付く細胞外小胞膜タンパク質に対する選択的抗体の取得が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特開2021-188970号公報

特許文献2：国際公開WO2018/079689号（特許6712737号公報）

特許文献3：国際公開WO2020/071489号

非特許文献

[0012] 非特許文献1：K. Jingushi et al., Int. J. Cancer: 142, 607-617 (2018)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明は、がんの診断や新薬開発に有用なバイオマーカーの提供に関し、更には当該バイオマーカーを用いるがんの検査方法、がん治療剤及びがんの研究用試薬を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、がん特異的な細胞外小胞（以下、単に「EV」という場合がある。）に着目し、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を同定することに成功し、がんの診断や新薬開発に有用なバイオマーカーを提供することができた。がんの検査方法は、採取した体液検体に含まれるEVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質（バイオマーカー）を検出することによる。EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体は、がんの検査方法に利用することができる他、さらにはがん治療剤及びがんの研究用試薬として利用することができる。

[0015] すなわち、本発明は以下よりなる。

１．採取した体液検体に含まれる細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を検出し、がん特異的細胞外小胞を検出することを特徴とするがんの検査方法。

２．前記細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質が、ABCE1（ATP binding cassette subfamily E member 1）、STAT1（Signal transducer and activator of transcription 1）及びZA2G（Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding）から選択される１種又は複数種のタンパク質である、前項１に記載のがんの検査方法。

３．がんが、大腸がん、胃がん、膵がん、肺がん、卵巣がん、子宮がん、腎がん及び膠芽腫から選択される１種又は複数種のがんである、前項１又は２に記載のがんの検査方法。

４．採取した体液検体が、血液又は唾液である、前項１又は２に記載のがんの検査方法。

５．前記細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体と、細胞外小胞特異的膜表面マーカータンパク質に対する抗体若しくは前記細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体との免疫サンドイッチ法又はフローサイトメトリー法を用いて前記がん特異的細胞外小胞を検出することを特徴とする、前項１又は２に記載のがんの検査方

法。

６．前記細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体と、細胞外小胞特異的膜表面マーカータンパク質若しくは細胞外小胞膜に結合するタンパク質との免疫サンドイッチ法又はフローサイトメトリー法を用いて前記がん特異的細胞外小胞を検出することを特徴とする、前項１又は２に記載のがんの検査方法。

７．細胞外小胞特異的膜表面マーカータンパク質が、CD9、CD63、CD81、Integrin、Selectin、CD40から選択される１又は複数種であり、細胞外小胞膜に結合するタンパク質がTim4である、前項５に記載の検査方法。

８．細胞外小胞特異的膜表面マーカータンパク質が、CD9、CD63、CD81、Integrin、Selectin、CD40から選択される１又は複数種であり、細胞外小胞膜に結合するタンパク質がTim4である、前項６に記載の検査方法。

９．ABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種のタンパク質に対する抗体を固定した基材を含む、がんの検査用デバイス。

１０．採取した体液検体に含まれる細胞外小胞からがん特異的細胞外小胞を検出するための、以下の１）～３）より選択されるいずれかの構成を少なくとも含む、がんの検査用キット：

１）細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体を固定した基材と、細胞外小胞を特異的に検出可能な標識試薬；

２）細胞外小胞特異的膜表面マーカータンパク質に対する抗体若しくは細胞外小胞膜に結合するタンパク質を固定した基材と、細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を検出可能な標識試薬；

３）細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体を固定した基材と、細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を検出可能な標識試薬。

１１．前記がん特異的に発現するタンパク質が、ABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種のタンパク質である、前項１０に記載のがんの検査用キット。

１２．細胞外小胞特異的膜表面マーカータンパク質が、CD9、CD63、CD81、Integrin、Selectin、CD40から選択される１又は複数種であり、細胞外小胞膜に結合するタンパク質がTim4である、前項１０又は１１に記載のがんの検査用キット。

１３．がん特異的細胞外小胞の膜表面に発現するタンパク質に対する抗体を有効成分として含むがん治療剤。

１４．がん特異的細胞外小胞の膜表面に発現するタンパク質が、ABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種のタンパク質である前項１３に記載のがん治療剤。

１５．がん特異的細胞外小胞の膜表面に発現するタンパク質に対する抗体が、IgG免疫グロブリン及び／又はscFv（single chain Fv）である、前項１３又は１４に記載のがん治療剤。

発明の効果

[0016] がん術前、術後血漿ならびに健常人血漿を用いた評価によれば、がん患者では体液検体、具体的には血液検体や唾液中にがん特異的EVの存在を認め、EVの膜表面にがん特異的タンパク質が発現していることが確認された。そのレベルは術後に低下することが確認された。このことから、EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質をマーカーとして検出することで、がんの早期診断やがんのステージ判定、治療等の指標とすることが期待できる。がん組織には、がん細胞を攻撃するため免疫細胞の浸潤がある。免疫細胞の中でNK細胞はがん細胞を早期に発見・攻撃する細胞である。しかしがん細胞はその攻撃から回避する手段としてEVを放出し、そのEV内の多様なRNAやタンパク質によってNK細胞からの攻撃を免れていると考えられている。EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体は、がん特異的EVを除去できる。これによりがん特異的EVにより抑制されていたNK細胞の作用を回復することができ、がん細胞の生存抑制作用が期待できる。よってEVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体はがん治療薬として利用することができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]ステージI～ステージIVの大腸がん患者のがん部位（T）及び正常部位（N）より採取した組織片から得たsmall EVとlarge EVについて、抗ABCE1抗体を用いたウエスタンブロット法により各EVの膜表面のABCE1の発現を確認した結果を示す。（実施例１）

[図2]大腸がん組織培養上清由来EVと、抗ABCE1抗体との反応性をフローサイトメトリーにより確認した結果を示す。抗ABCE1抗体との結合は、大腸がん非がん部組織由来EVでは検出限界以下であったが、がん部位組織由来EVでは顕著であった。（実施例２）

[図3]大腸がん患者における抗ABCE1抗体の反応性を、術前及び術後の大腸がん患者血漿と、健常人血漿を用いてELISA法により確認した結果を示す。（実施例３）

[図4]大腸がん患者について非がん部及びがん部から採取したEVによるNK細胞のがん細胞傷害活性に及ぼす作用を確認した結果を示す。（参考例１）

[図5]大腸がん由来EVによるNK細胞の細胞傷害活性抑制作用に対し、抗ABCE1抗体の効果を確認した結果を示す。図５ａはHT29細胞由来EVについて抗ABCE1抗体又はコントロール抗体処理のプロトコールを示し、図５ｂはHT29細胞由来SEVライセートについて抗ABCE1抗体によるウエスタンブロットの結果を示す。図５ｃは抗ABCE1抗体処理の有無によるEVのNK細胞の細胞傷害活性に対する作用をHT29細胞の生存率にて確認した結果を示す。（実施例４）

[図6]大腸がん患者のがん組織（N, Stage I～IV）、非がん組織（N）由来Large EV、Small EVにおけるSTAT1の発現を抗STAT1抗体（Santacruz、sc-417）確認した結果を示す。（参考例２）

[図7]卵巣がん患者（Stage I～IV、各2例）のがん組織、非がん組織（Normal、2例）由来Large EV、Small EVにおけるZA2Gの発現を抗ZA2G抗体（Abcam、ab-180574）を用いて確認した結果を示す。（実施例５）

[図8]卵巣がん患者における抗ABCE1抗体、抗STAT1抗体及び抗ZA2G抗体の反応性を、術前及び術後の卵巣がん患者血漿と、健常人血漿を用いてELISA法によ

り確認した結果を示す。（実施例６）

発明を実施するための形態

[0018] 本発明は採取した体液検体に含まれる細胞外小胞（EV）の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を検出し、がん特異的EVを検出することを特徴とするがんの検査方法に関する。

[0019] 本明細書において「細胞外小胞（EV）」とは、さまざまな種類の細胞から分泌される、膜構造を有する微小な小胞をいい、例えば、エクソソーム、エクトソーム、微小小胞体、マイクロベシクル及びアポトーシス小体などが挙げられる。

[0020] 本明細書において「細胞外小胞（EV）の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質」として、例えばABCE1（ATP binding cassette subfamily E member 1）、STAT1（Signal transducer and activator of transcription 1）及びZA2G（Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding）が挙げられる。ABCE1、STAT1及びZA2Gは、いずれも細胞質タンパク質として機能することが知られており、各種バイオマーカーとして検出するためには遺伝子の発現を検出することが必要であった。一方、本発明においてこれらのタンパク質が、EVの膜表面にがん特異的に発現することを初めて見出した。すなわち本発明において、EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質、即ちABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種のタンパク質をバイオマーカーとして初めて見出した。

[0021] 本明細書において「がん特異的に発現する」とは、がん組織特異的に発現することを意味するが、正常組織と比べてがん組織選択的に発現する場合や、正常組織と比べてがん組織に起因して顕著に高発現し、明らかに正常組織と識別可能な場合も含まれる。

[0022] ABCE1は、ATP結合カセット（ABC）トランスポーターの一員である。ABCタンパク質は、様々な生理学的基質の輸送を調節する。ABCタンパク質は、ATP加水分解のエネルギーをタンパク質分子の構造変化に変換し、それとカップリングすることによって薬剤を細胞の中から外へ輸送することから、薬物の

体内動態プロファイル（吸収、分布、代謝、排泄、ターゲット部位での薬剤実効濃度）を規定し、ひいては薬物の全体的な薬理効果をも左右するといわれている。

[0023] STAT1は、STATタンパク質ファミリーの一員である。STATファミリーメンバーは、サイトカイン及び増殖因子に応答して、受容体関連キナーゼによってリン酸化され、次いでホモ二量体又はヘテロ二量体を形成し、細胞核に移行し、そこで転写アクチベーター（転写活性化因子）として作用する。

[0024] ZA2Gは、AZGP1（Alpha-2-Glycoprotein 1, Zinc-Binding）とも呼ばれ，MHCクラスIと類似した構造を有し、β2ミクログロブリンと結合する41 kDaの可溶性糖タンパク質である。体液中に存在することが知られており、脂質代謝に機能していると考えられている。がんでは悪液質時の脂肪組織の減少と関連していると推測されている。

[0025] 本明細書において、「体液検体」とはリキッドバイオプシーによって採取される検体をいい、例えば血液や唾液が好適である。本発明の検査方法の対象となる生物種は特に制限されず、例えばヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウサギなどの種々の哺乳類動物が挙げられるが、最も好ましくはヒトである。

[0026] 本発明のがんの検査方法において、検査に供する被検試料は、体液検体から適宜調製することができる。体液検体が血液の場合は、被検試料として自体公知の方法又は今後開発される方法で調製した血清、血漿等を使用することができ、通常の臨床検査のために調製した被検試料を利用することができる。体液検体が唾液の場合についても、自体公知の方法又は今後開発される方法で前処理し、調製した試料を使用することができる。さらに被検試料として採取した体液検体からEVを分離精製したものを使用することもできる。EVは体液検体から、自体公知の方法、又は今後開発されるあらゆる方法に従って精製、分離、濃縮等することができる。EVを精製、分離、濃縮等する方法としては、例えば超遠心法（例えばペレットダウン法、スクロースクッション法、密度勾配遠心法等）、イムノアフィニティー担体を用いる方法、ゲル

ろ過法、フィールド・フロー分画法、FACS法等が挙げられる。また、市販のキットを用いてEVの精製、分離、濃縮等を行うことも可能である。

[0027] 本発明の「がんの検査方法」は、EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質をバイオマーカーとして検出し、がん特異的EVを検出する方法による。具体的には、採取した体液検体に含まれるEVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質、即ちバイオマーカーとしてのABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種のタンパク質を検出可能な方法であればよく特に限定されない。バイオマーカーとしてのABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種のタンパク質を検出することで、がん特異的EVを検出することができる。

[0028] 本明細書において、「EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質」としてABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種のタンパク質が例示される。また、「EV特異的膜表面マーカータンパク質」としてCD9、CD63、CD81、Integrin、Selectin及びCD40から選択される１又は複数種のタンパク質が例示され、「EV膜に結合するタンパク質」としてTim4が例示される。

[0029] 本明細書において、EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を検出可能な方法として、例えば免疫学的検出方法を適用することができる。免疫学的検出法としては、自体公知の方法又は今後開発されるあらゆる方法を適用することができ、例えば免疫サンドイッチ法を適用することができ、具体的にはELISA法、サンドイッチELISA法、EIA法、RIA法、ウエスタンブロット法等を好適に例示することができる。

[0030] 免疫サンドイッチ法として、EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体を被検試料と反応させ、前記タンパク質に対する抗体と反応した被検試料に対して反応する検出用試薬を用いて検出することができる。具体的には、EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体を固定した基材を用い、基材に補足された前記抗体と反応した被検試料について、検出用試薬としてEV特異的に検出可能な標識試薬、具体的にはEV特異的膜表面マーカータンパク質に対する標識抗体若しくはEV膜に結合する標識タ

ンパク質を用いて検出することができる。あるいは、検出用試薬の他の態様として、EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する標識抗体を用いて検出することができる。EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する本発明の抗体はがんの研究用試薬として使用することもできる。

[0031] 免疫サンドイッチ法の他の態様として、例えばEV特異的膜表面マーカータンパク質に対する抗体若しくはEV膜に結合するタンパク質を被検試料と反応させ、前記EV特異的膜表面マーカータンパク質に対する抗体若しくはEV膜に結合するタンパク質と反応した被検試料について、検出用試薬としてEVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する標識抗体を用いて検出することができる。標識抗体としては、所望の標的を検出可能であれば、標識抗IgG抗体や標識抗Fc抗体であってもよい。

[0032] 本発明における採取した体液検体中に含まれるEVの膜表面に発現するタンパク質を検出可能な他の方法として、質量分析計を用いた質量分析法を適用することもできる。イオン源を用いてイオン化する方法としては、EI（electron ionization）法、CI（Chemical Ionization）法、FD（Field Desorption）法、FAB（Fast Atom Bombardment）法、MALDI（Matrix Assisted Laser Desorption Ionization）法、ESI（ElectroSpray Ionization）法などの方法を適宜選択することができ、また、分析部において、イオン化したペプチド試料を分離する方法としては、磁場偏向型、四重極型、イオントラップ型、飛行時間（TOF）型、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型などの分離方法を適宜選択することができる。また、2以上の質量分析法を組み合わせたタンデム型質量分析（MS／MS）やトリプル四重極型質量分析を利用することができる。また、サンプルがリン酸化したペプチドを含む試料の場合、質量分析計へのサンプル導入前に、サンプルを鉄イオン固定化アフィニティークロマトグラフィー（Fe-IMAC）を用いて濃縮することができる。また、液体クロマトグラフ（LC）やHPLCにより、対象バイオマーカーを構成するペプチドを分離・精製して被検試料とすることができる。しかしながら、本発明の検出方法は、上述の免疫学的検出方法を適用できる点で簡便に検査を行うことがで

きることが特徴である。

[0033] 本発明は、本発明のがんの検査方法に使用される検査用デバイス、即ちEVの膜表面に発現するタンパク質であって、がん特異的に発現するタンパク質を検出可能な検査用デバイスにも及ぶ。検査用デバイスとしては、例えばEVの膜表面に発現するがん特異的なタンパク質に対する抗体を固定した基材が挙げられる。また、検出用試薬との関係で、EVマーカータンパク質に対する抗体若しくはEV膜に結合するタンパク質を固定した基材も使用することができる。EVマーカータンパク質に対する抗体若しくはEV膜に結合するタンパク質を固定した基材からなる検査用デバイスの場合は、EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を検出可能な検出試薬が必要である。

[0034] 本発明はEVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を検出可能な検査用キットにも及ぶ。検査用キットとしては、少なくとも前記検査用デバイスを含み、さらに検出用試薬等を含むことができる。具体的には以下の１）～３）より選択されるいずれかの構成を少なくとも含む、がんの検査用キットが挙げられる。

１）EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体を固定した基材と、EVを特異的に検出可能な標識試薬；

２）EV表面マーカータンパク質に対する抗体若しくはEV膜に結合するタンパク質を固定した基材と、EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を検出可能な試薬；

３）前記EVの膜表面に発現するがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体を固定した基材と、EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を検出可能な標識抗体。

[0035] 本発明の検査用デバイスに用いられる基材の材質や形状は特に限定されず、抗体が固定可能でEV膜表面に発現するタンパク質を検出可能な基材であればよく、自体公知の基材、既に市販されている基材、今後開発される基材等を利用することができる。検査用デバイスに固定する抗体や検出用試薬に含まれる抗体は、抗原結合性を有する抗体であれば特に制限されず、例えば抗

体断片であっても本発明の抗体に包含される。例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体が挙げられ、さらに一本鎖抗体、又はFabフラグメントやFab発現ライブラリーによって生成されるフラグメントなどのように抗原結合性を有する上記抗体の一部であってもよい。上記検出用試薬において使用可能な標識物として例えば蛍光色素、酵素、タンパク質、放射性同位体、化学発光物質、ビオチン等の付加が挙げられる。対象となる抗原、例えばバイオマーカーに対する抗体や検出試薬に含まれる抗体の作製に使用される免疫抗原は、公知の遺伝子配列情報に基づいて、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養及び培養物からのタンパク質の回収の操作等により取得することができる。これらの操作は、自体公知の方法、又は今後開発されるあらゆる方法を適用することができる。

[0036] 本発明の検査用キットには、上記基材と検出用試薬のほかに、各種試薬（例えば二次抗体、緩衝液等）、器具（例えばEVの精製、分離、濃縮用器具、例えばカラム）等を含んでいてもよい。

[0037] 本発明の検査方法によれば、対象となるがんの検出指標である対象バイオマーカーの量及び／又は濃度を提供することができる。本発明の検査方法の対象となるがんは、大腸がん、胃がん、膵がん、肺がん、卵巣がん、子宮がん、腎がん及び膠芽腫が挙げられ、特に好適には大腸がん、胃がん、卵巣がん、及び膠芽腫である。

[0038] 本発明は、本発明の検査方法を用いることによるがんのスクリーニング方法にも及ぶ。がん組織には、がん細胞を攻撃するため免疫細胞の浸潤がある。免疫細胞の中でNK細胞はがん細胞を早期に発見・攻撃する細胞である。しかしながら、がん細胞はその攻撃から回避する手段としてEVを放出する。本発明の体液検体（例えば血液、唾液）を用いるがん検査方法によれば、被検試料からEVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質陽性EVの存在を容易に検出することができる。例えば健常人とがん患者についてEVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質陽性EVの存在を容易に検出することができる

。さらにはがん患者の術前、術後やがんのステージに応じたがん特異的に発現するタンパク質陽性EVの存在を容易に検出することができる。具体的には、例えば大腸がん患者では血中（血漿）にABCE1陽性のEVの存在が認められ、そのレベルについて術後に低下する等の確認検査を行うことができる。このABCE1陽性EVは卵巣がん、腎がん等他がん種からも放出されていると考えられる。本発明のがん検査方法又はがんのスクリーニング方法は、がんの判定、治療効果判定、病態解明、予後予測、患者層別化、治療方法の選択（個別化医療、治療反応性）等の鑑別等の補助のために用いることができ、有用である。

[0039] 本発明は、がん特異的EVの膜表面に発現するタンパク質に対する抗体を有効成分として含むがん治療剤にも及ぶ。あるいは、EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体を有効成分として含むがん治療剤にも及ぶ。具体的には、例えばABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種に対する抗体を有効成分として含むがん治療剤にも及ぶ。繰り返しになるが、がん細胞はがん特異的EVを放出し、そのEV内の多様なRNAやタンパク質によってNK細胞からの攻撃を免れていると考えられている。そこで、がん特異的EVの膜表面に発現するタンパク質に対する抗体、具体的にはABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種に対する抗体を用いることで、がんEVからABCE1陽性のがんEV、STAT1陽性のがんEV及び／又はZA2G陽性のがんEVを除去することができる。その結果、例えばNK細胞による抗腫瘍作用が期待される。さらにがんEVはがん細胞の特徴を保有していると考えられている。そこで抗原提示細胞にそのがんの特徴（ネオアンチゲン）を効率よく提供できれば獲得免疫を効果的に発動すると期待できる。本発明のABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種に対する抗体を有効成分として含むがん治療剤の投与により、あるいはin vitroでがん患者由来EVと本発明のABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種に対する抗体との反応物を投与することにより、生体内での抗原提示細胞Fc受容体を介した各抗体結合がんEVの取り込みの促進が期待され、新たながん免疫誘導剤としての可能性も考え

られる。

[0040] 本発明のがん治療剤に含まれる抗体、即ちEVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体、具体的にはABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種に対する抗体は、がん特異的タンパク質が膜表面に発現したEVに特異的に結合性を有する抗体であれば特に制限されず、例えば抗体断片であっても本発明の抗体に包含される。例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体が挙げられ、さらに一本鎖抗体、又はFabフラグメントやFab発現ライブラリーによって生成されるフラグメントなどのように抗原結合性を有する上記抗体断片であってもよい。その抗体断片は、重鎖可変領域（VH-CDR）及び／又は軽鎖可変領域（VL-CDR）又はその断片を含むことができる。抗体のクラスは、抗体の重鎖（H鎖）に備わる定常ドメイン又は定常領域のタイプのことをいい、例えばIgA、IgD、IgE、IgG及びIgMが挙げられる。本明細書における抗体のクラスは特に限定されないがIgGが最も好適である。IgGのサブクラスとしては、例えばIgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4などが挙げられ、好適にはIgG_1又はIgG_2である。抗体断片は例えば、Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、$F(ab')_2$又はそれらの組合せを含むことができる。抗体は抗体ライブラリーから取得することができる。例えばヒト抗体ライブラリーを用いて、バイオパニング法によりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を元に適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438、WO95/15388を参考にすることができる。

[0041] がんの治療は、がん特異的EVの膜表面に発現するタンパク質に対する抗体、具体的にはABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種に対する

抗体を投与するほか、自体公知の治療方法を適宜併用することができる。併用する治療方法としては、例えば化学療法、外科治療法、放射線治療法、免疫療法などが挙げられる。これらは公知の方法に従って実施することができる。

[0042] 本発明のがん治療剤の形態は特に限定されないが、抗体製剤として投与可能な剤型が望ましい。本発明のがん治療剤について組成物の適用（例えば、投与、摂取、接種など）量は、薬効を発現する有効量であればよく特に限定されない。通常は、有効成分の重量として、一般に一日あたり0.1～1000 mg/kg体重である。上記投与量は1日1回又は2～3回に分けて投与するのが好ましく、年齢、病態、症状により適宜増減することもできる。

[0043] がん特異的EVの膜表面に発現するタンパク質に対する抗体の作製に使用される免疫抗原は、がん特異的EVの膜表面に発現するタンパク質に基づく公知の遺伝子配列情報や新たに検出される遺伝子配列情報の全部又は部分に基づいて、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養及び培養物からのタンパク質の回収の操作等により取得することができる。これらの操作は、自体公知の方法、又は今後開発されるあらゆる方法を適用することができる。

実施例

[0044] 以下、本発明の理解を深めるために、実施例を示してより具体的に説明するが、本発明は実施例の記載に限定されないことはいうまでもない。

[0045]（実施例１）大腸がん術後がん組織由来細胞外小胞（EV）におけるABCE1の発現確認

本実施例では、大腸がん患者のがん組織由来細胞外小胞（EV）におけるABCE1の発現を確認した。

[0046] ステージI～ステージIVの大腸がん患者（各12名）のがん部位（T）及び正常部位（N）より採取した組織片から得たSEV（Small EV: 1.0×10^8粒子）及びLEV（Large EV: 1.0× 107粒子）について、抗ABCE1抗体（Abcam社、Cat No. ab185548、1/1000希釈で使用）を用いたウエスタンブロット法により各EVに

おけるABCE1の発現を確認した。各EVに1×Laemmli SDS sample buffer（TEFCO社）を加えてSDS-PAGE（12%ゲル）にて展開し、PVDFメンブレンにトランスファーした。3% BSA/TBS-Tを用いて1時間室温でブロッキングした後、抗ABCE1抗体（1/1000希釈で使用）と4℃ O/Nで反応させた。TBS-Tによるメンブレンの洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体（Cell Signaling Technology社、Cat No. 7076、1/5000希釈で使用）と室温で1時間反応させた。TBS-Tによるメンブレンの洗浄後、ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent（Cytiva社、Cat No. RPN2232）と反応させ、Amersham™ Imager 680（Cytiva社）にてバンドを検出した。

[0047] その結果、ステージI～IVの大腸がん組織由来SEV及びLEVのいずれについてもがん部でABCE1が検出された。また正常大腸組織由来EVよりも顕著な発現レベルであることを認めた。さらにLEVにおけるABCE1タンパク質量はステージ（stage）に依存して増加する傾向が示された（図１）。

[0048]（実施例２）大腸がん組織培養上清由来がんEVの抗ABCE1抗体の反応性

本実施例では、大腸がん組織培養上清由来EVと抗ABCE1抗体との反応性を確認した。

[0049] フローサイトメトリー解析用サンプルとして、PS capture™ exosome flow cytometry kit（富士フィルム和光純薬、 Cat. No. 297-79701）を用いて、大腸がん組織培養上清由来EVを調製した。Tim4-conjugated EV capture beads（ビーズ）10μlに大腸がんの非がん部組織又はがん部組織の培養上清100μlを混合し、20分毎に攪拌しながら1時間室温で反応させた。1×wash buffer（kit 付属）によるビーズの洗浄後、抗ABCE1抗体（Abcam社、Cat No. ab185548、1/200希釈で使用）を添加し、20分毎に攪拌しながら1時間室温で反応させた。1×wash buffer（kit 付属）によるビーズの洗浄後、FITC標識ヒトIgG抗体（Sigma社、Cat. No. F5512-1ML、1/400希釈で使用）及びAlexa Fluor 568標識ウサギIgG抗体（Invitrogen社、Cat. No. A10042、1/200希釈で使用）を添加し、20分毎に攪拌しながら1時間室温で反応させた。1×wash buffer（kit 付属）によるビーズの洗浄後、MACS Qunat X（Miltenyi社）にて測定し

た。

[0050] その結果、EVと抗ABCE1抗体の結合は、いずれも大腸がん非がん部組織由来EVでは検出限界以下であったが、がん部位組織由来EVでは顕著な結合が認められた。このことは抗ABCE1抗体が認識するABCE1タンパク質は、大腸がんEVにおいて膜上に発現していることを示すものである（図２）。

[0051] （実施例３）大腸がん患者血漿における抗ABCE1抗体の反応性

本実施例では、術前及び術後の大腸がん患者血漿を用いて抗ABCE1抗体の反応性をELISA法により確認した。

[0052] 抗ABCE1抗体（Abcam社、Cat No. ab185548、0.1μg分）を96 wellプレートに添加し、4℃ O/Nでコートした。PBS-T（0.05% Tween-20を含むPBS）で3回洗浄後、1% BSAを含むPBSを用いて37℃で1時間室温でブロッキングした後、大腸がん患者の術前、術後の血漿（8例）及び健康人血漿（2例）を各100μl加え、37℃で2時間震盪し反応させた。血漿を除きPBS-Tで3回洗浄した後に、抗CD9抗体（コスモバイオ社、Cat No. SHI-EXO-M01、0.1μg分）を添加し、37℃で1時間静置した。抗CD9抗体を除去し、PBS-Tで3回洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体（Cell signaling technology社、Cat No. 7076、1/5000希釈で使用）を添加して37℃で1時間静置した。PBS-Tで洗浄後、TMB Substrate Set（BioLegend社、Cat No. 421101）を用いて化学発色させ、iMark マイクロプレートリーダー（Biorad社）により450 nmでの発色・吸光度を測定した。

[0053] 図３上に示す構築した大腸がん患者血漿中のABCE1発現EVのELISA検出法により、大腸がんの術前血漿と比較し、術後血漿において測定値が健康人血漿とほぼ同程度まで低下するという結果を得た（図３下）。このことから、抗ABCE1抗体は大腸がんEVをがん選択的に検出できることが明らかになり、本構築ELISA系が大腸がんの診断に応用できることを示した。

[0054] （参考例１）大腸がんEVによるNK細胞の細胞傷害活性に及ぼす作用

NK細胞はがん細胞を早期に発見・攻撃する細胞であるが、がん細胞はその攻撃から回避する手段としてEVを放出するといわれている。そこで本参考例では、大腸がん細胞由来EVによるNK細胞の細胞傷害活性に及ぼす作用を確認

した。

[0055] 大腸がん術後検体の非がん部由来EV（SEV: 3.95×10^9粒子、LEV: 1.70×10^8粒子）及びがん部由来EV（SEV: 3.95×10^9粒子、LEV: 1.70×10^8粒子）をNK細胞（KHYG-1細胞、2×10^5細胞）に添加し、48時間培養した。その後NK細胞数に対し3：1の割合の大腸がん細胞株HT29細胞又はSW620細胞（ヒト結腸腺癌）と48時間共培養した。CD45抗体（Miltenyi Biotec社、Cat No. 130-108-020、1/200希釈で使用）でNK細胞を染色し、ヨウ化プロピジウム（Propidiumu Iodide: PI）により死細胞を染色後、フローサイトメーターによって生存している大腸がん細胞株（CD45陰性、PI陰性）の割合を測定した。

[0056] その結果、SEV、LEVのいずれについても大腸がんの非がん部由来EVに比べ、がん部由来EVを共培養したときにHT29細胞及びSW620細胞の生存性が高かった（図４）。がん部由来EVはがん細胞に対するNK細胞の細胞傷害活性を抑制する作用を有することが明らかとなった。この結果は、大腸がん細胞は自己の生存性を維持するためEVを放出してNK細胞の細胞傷害活性を抑制することが示された。

[0057]（実施例４）ヒト抗ABCE1抗体の大腸がんEVのNK活性に及ぼす作用

上記参考例では、がん細胞由来EVがNK細胞の細胞傷害活性を抑制することが確認された。そこで、本実施例ではがん細胞由来EVを抗ABCE1抗体で処理し、NK細胞のがん細胞傷害活性の抑制に及ぼす効果を確認した。

[0058] １）HT29細胞SEV中の抗ABCE1抗体反応性EVの除去

Dynabeads Protein G（Life technologies社、Cat No. 10003D）1.5 mg分に抗ABCE1抗体又はコントロール抗体としてのNormal Rabbit IgG（富士フイルム和光純薬、Cat No. 148-09551）2μgを混合し、室温で回転させながら10分間反応させ、抗体をDynabeads Protein Gに結合させた。コントロール抗体をDynabeads Protein Gに結合させたものをコントロール抗体結合ビーズとした。PBS-Tで洗浄後、HT29細胞SEV（0.5×10^{10}粒子）をコントロール抗体結合ビーズと混合し、室温で回転させながら10分間反応させた。反応後のビーズをPBS-Tで3回洗浄し、1×Laemmli SDS sample buffer 20μlをビーズに加え

、70℃で10分間処理した。上清（EVライセート）を下記２）ウエスタンブロット使用した。また、下記３）の解析には、抗ABCE1抗体結合ビーズ又はコントロール抗体結合ビーズとSEVを反応させ、反応物を磁石により除去した上清を用いた。なお抗ABCE1抗体結合ビーズ、コントロール抗体結合ビーズにより処理したSEVをそれぞれ大腸がんSEV low、大腸がんSEV highとして記載した（図５ａ）。

[0059] ２）抗ABCE1抗体によるウエスタンブロット

上記１）で得られたEVライセートをSDS-PAGE（10%ゲル）にて展開し、PVDFメンブレンにトランスファーした。3% BSA/TBS-Tを用いて1時間室温でブロッキングした後、抗ABCE1抗体（1 g/mlで使用）と4℃ O/Nで反応させた。TBS-Tによるメンブレンの洗浄後、HRP標識rabbitIgG抗体（Cell signaling technology社、Cat No. 7074、1/10000希釈で使用）と室温で1時間反応させた。TBS-Tによるメンブレンの洗浄後に、ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent（Cytiva社、Cat No. RPN2232）と反応させ、Amersham™ Imager 680（Cytiva社）にてバンドを検出した（図５ｂ）。

[0060] ３）NK細胞の細胞傷害活性評価

上記１）で得られた大腸がんSEV high分画及び大腸がんSEV low分画をNK細胞（KHYG-1細胞、20×10^4細胞）に添加し、48時間培養した。大腸がんSEVを作用させたNK細胞（KHYG-1細胞）数と3:1の割合のHT29細胞と48時間共培養した。CD45抗体（Miltenyi Biotec社、Cat No. 130-108-020、1/200希釈で使用）でNK細胞を染色し、フローサイトメーターによって生存しているHT29細胞（CD45陰性）を測定した（図５ｃ）。

[0061] その結果、抗ABCE1抗体を大腸がん細胞株HT-29のSEVと反応させた後回収したSEVでは、コントロールIgGとの反応では検出されないABCE1のバンドがウエスタンブロットにより検出された（図５ｂ）。またKHYG-1細胞により誘導されるHT29細胞の細胞傷害活性は、抗ABCE1抗体によりキャプチャーされたHT29細胞SEV（大腸がんSEV low）ではコントロール抗体によりキャプチャーされたHT29細胞SEV（大腸がんSEV high）と比べ顕著な回復が認められた（図５ｃ

）。これらの結果は、抗ABCE1抗体反応性大腸がんSEVの除去によりNK細胞による細胞傷害活性が回復することを示唆するものである。

[0062]（参考例２）大腸がん術後検体がん部由来EVにおけるSTAT1の発現確認

本実施例では、大腸がん患者のがん組織由来細胞外小胞（EV）におけるSTAT1の発現を確認した。

[0063] 大腸がん臨床検体EV（非がん部EV: N、がん部EV: T; Small EV: 3.0×10^8粒子、Large EV: 3.0×10^7粒子）に1×Laemmli SDS sample bufferを加えたものをサンプルとし、SDS-PAGE（12%ゲル）にて展開し、PVDFメンブレンにトランスファーした。3% BSA/TBS-Tを用いて1時間室温でブロッキングした後、抗STAT1抗体（Santa Cruz Biotechnology社、Cat No. sc-417、1/1000希釈で使用）と4℃ O/Nで反応させた。TBS-Tによるメンブレンの洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体（Cell signaling technology社、Cat No. 7076、1/5000希釈で使用）と室温で1時間反応させた。TBS-Tによるメンブレンの洗浄後に、ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent（Cytiva社、Cat No. RPN2232）と反応させ、Amersham™ Imager 680（Cytiva社）にてバンドを検出した。

[0064] その結果、大腸がん臨床検体がん部由来EVでは、非がん部由来EVと比べSTAT1のEVへの顕著な搭載が認められる症例の存在が明らかになった（図６）。

[0065]（実施例５）卵巣がん術後検体がん部由来EVにおけるZA2Gの発現確認

卵巣がん臨床検体EV（非がん部EV: Normal (1),(2)、がん部EV: Stage I (3),(4), Stage II (5),(6), Stage III (7),(8), Stage IV (9),(10); Small EV: 3.0×10^8粒子、Large EV: 3.0×10^7粒子）に1×Laemmli SDS sample bufferを加えたものをサンプルとし、SDS-PAGE（12%ゲル）にて展開し、PVDFメンブレンにトランスファーした。3% BSA/TBS-Tを用いて1時間室温でブロッキングした後、抗ZA2G抗体（Abcam社、Cat No. ab-180574で使用）と4℃ O/Nで反応させた。TBS-Tによるメンブレンの洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体（Cell signaling technology社、Cat No. 7076、1/5000希釈で使用）と室温で1時間反応させた。TBS-Tによるメンブレンの洗浄後に、ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent（Cytiva社、Cat No. RPN2232）と反応させ、Ame

rsham™ Imager 680（Cytiva社）にてバンドを検出した。

[0066] その結果、卵巣がん臨床検体の非がん部由来EVでは検出されないZA2Gが、卵巣がん臨床検体のがん部由来EVでは顕著に発現することが明らかになった（図７）。

[0067]（実施例６）卵巣がん患者血漿における各抗体の反応性

本実施例では、術前及び術後の卵巣がん患者血漿を用いて抗ABCE1抗体、抗STAT1抗体及び抗ZA2G抗体の反応性をELISA法により確認した。

[0068] 抗ABCE1抗体（Abcam社、Cat No. ab185548、0.1μg分）、抗STAT1抗体（Santa Cruz Biotechnology社、Cat No. sc-417、1/1000希釈で使用、0.1μg分）又は抗ZA2G抗体（Abcam社、ab-180574、0.05μg分）を96 wellプレートに各々添加し、4℃ O/Nでコートした。PBS-T（0.05% Tween-20を含むPBS）で3回洗浄後、1% BSAを含むPBSを用いて37℃で1時間室温でブロッキングした後、卵巣がん患者の術前、術後の血漿（8例）及び健康人血漿（2例）を各100μl加え、37℃で2時間震盪し反応させた。血漿を除きPBS-Tで3回洗浄した後に、抗CD9抗体（コスモバイオ社、Cat No. SHI-EXO-M01、0.1μg分）を添加し、37℃で1時間静置した。抗CD9抗体を除去し、PBS-Tで3回洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体（Cell signaling technology社、Cat No. 7076、1/5000希釈で使用）を添加して37℃で1時間静置した。PBS-Tで洗浄後、TMB Substrate Set（BioLegend社、Cat No. 421101）を用いて化学発色させ、iMark マイクロプレートリーダー（Biorad社）により450 nmでの発色・吸光度を測定した。

[0069] 実施例３（図３上）に示す方法と同手法により卵巣がん患者血漿中のABCE1発現EV、STAT1発現EV及びZA2G発現EVのELISA検出法により、卵巣がんの術前血漿と比較し、術後血漿において有意に測定値が低下するという結果を得た（図８）。このことから、抗ABCE1抗体、抗STAT1抗体及び抗ZA2G抗体は卵巣がんEVをがん選択的に検出できることが明らかになり、本構築ELISA系が卵巣がんの診断に応用できることを示した。

産業上の利用可能性

[0070] 以上詳述したとおり、EVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質をマ

ーカーとして検出することで、がんの早期診断やがんのステージ判定、治療等の指標とすることが期待できる。本発明の検査方法によれば、血液や唾液等の体液検体を試料として検査することができ、被検者から侵襲的に生体検体を取得することなく検査可能である点で、被検者への負担も低く有用である。

[0071] さらにがん組織には、がん細胞を攻撃するため免疫細胞の浸潤がある。免疫細胞の中でNK細胞はがん細胞を早期に発見・攻撃する細胞である。しかしがん細胞はその攻撃から回避する手段としてEVを放出し、そのEV内の多様なRNAやタンパク質によってNK細胞からの攻撃を免れていると考えられている。本発明において見出されたEVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体は、がん特異的EVを除去することができる。これによりがん特異的EVにより抑制されていたNK細胞の作用を回復することができ、がん細胞の生存抑制作用が期待できる。またがんEVはがん細胞の特徴であるネオアンチゲンを保有していると考えられていることから、抗原提示細胞にそのがんの特徴を効率的よく提供できれば獲得免疫を効果的に発動することもできる。よってEVの膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体はがん治療薬として利用することができ、産業上非常に有用である。

請求の範囲

[請求項1] 採取した体液検体に含まれる細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を検出し、がん特異的細胞外小胞を検出することを特徴とするがんの検査方法。

[請求項2] 前記細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質が、ABCE1（ATP binding cassette subfamily E member 1）、STAT1（Signal transducer and activator of transcription 1）及びZA2G（Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding）から選択される１種又は複数種のタンパク質である、請求項１に記載のがんの検査方法。

[請求項3] がんが、大腸がん、胃がん、膵がん、肺がん、卵巣がん、子宮がん、腎がん及び膠芽腫から選択される１種又は複数種のがんである、請求項１又は２に記載のがんの検査方法。

[請求項4] 採取した体液検体が、血液又は唾液である、請求項１又は２に記載のがんの検査方法。

[請求項5] 前記細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体と、細胞外小胞特異的膜表面マーカータンパク質に対する抗体若しくは前記細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体との免疫サンドイッチ法又はフローサイトメトリー法を用いて前記がん特異的細胞外小胞を検出することを特徴とする、請求項１又は２に記載のがんの検査方法。

[請求項6] 前記細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体と、細胞外小胞特異的膜表面マーカータンパク質若しくは細胞外小胞膜に結合するタンパク質との免疫サンドイッチ法又はフローサイトメトリー法を用いて前記がん特異的細胞外小胞を検出することを特徴とする、請求項１又は２に記載のがんの検査方法。

[請求項7] 細胞外小胞特異的膜表面マーカータンパク質が、CD9、CD63、CD81、Integrin、Selectin、CD40から選択される１又は複数種であり、細胞外小胞膜に結合するタンパク質がTim4である、請求項５に記載の検査

方法。

[請求項8] 細胞外小胞特異的膜表面マーカータンパク質が、CD9、CD63、CD81、Integrin、Selectin、CD40から選択される１又は複数種であり、細胞外小胞膜に結合するタンパク質がTim4である、請求項６に記載の検査方法。

[請求項9] ABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種のタンパク質に対する抗体を固定した基材を含む、がんの検査用デバイス。

[請求項10] 採取した体液検体に含まれる細胞外小胞からがん特異的細胞外小胞を検出するための、以下の１）～３）より選択されるいずれかの構成を少なくとも含む、がんの検査用キット：

１）細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体を固定した基材と、細胞外小胞を特異的に検出可能な標識試薬；

２）細胞外小胞特異的膜表面マーカータンパク質に対する抗体若しくは細胞外小胞膜に結合するタンパク質を固定した基材と、細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を検出可能な標識試薬；

３）細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質に対する抗体を固定した基材と、細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を検出可能な標識試薬。

[請求項11] 前記がん特異的に発現するタンパク質が、ABCE1、STAT1及びZA2Gから選択される１種又は複数種のタンパク質である、請求項１０に記載のがんの検査用キット。

[請求項12] 細胞外小胞特異的膜表面マーカータンパク質が、CD9、CD63、CD81、Integrin、Selectin、CD40から選択される１又は複数種であり、細胞外小胞膜に結合するタンパク質がTim4である、請求項１０又は１１に記載のがんの検査用キット。

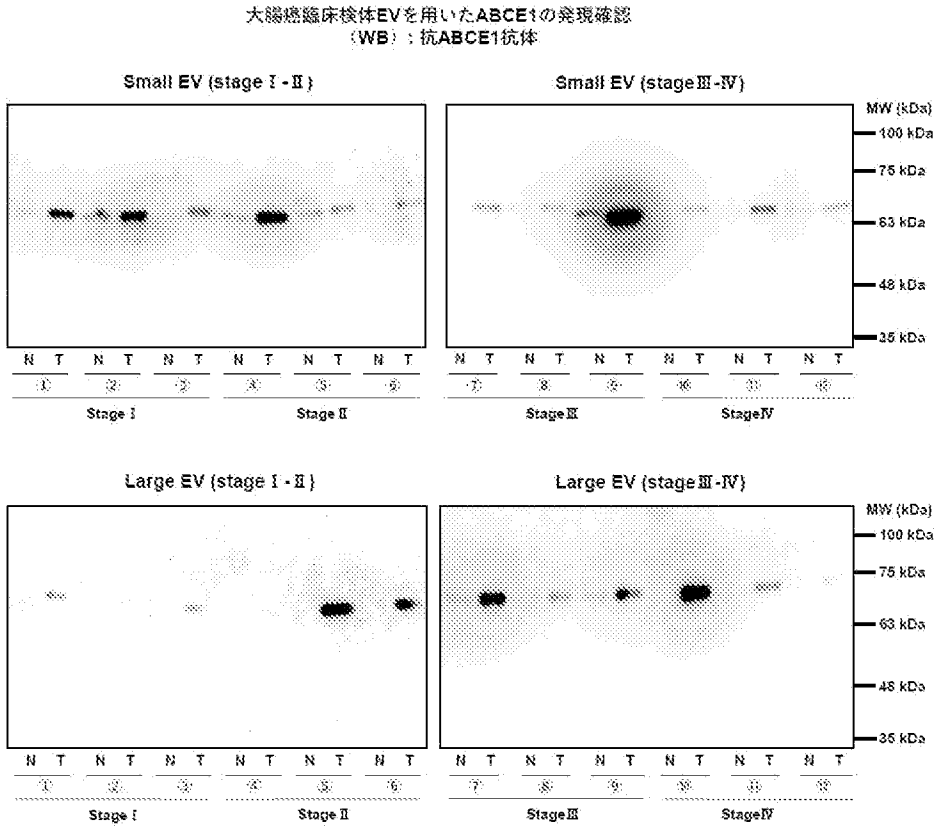
[請求項13] がん特異的細胞外小胞の膜表面に発現するタンパク質に対する抗体を有効成分として含むがん治療剤。

[請求項14] がん特異的細胞外小胞の膜表面に発現するタンパク質が、ABCE1、STA

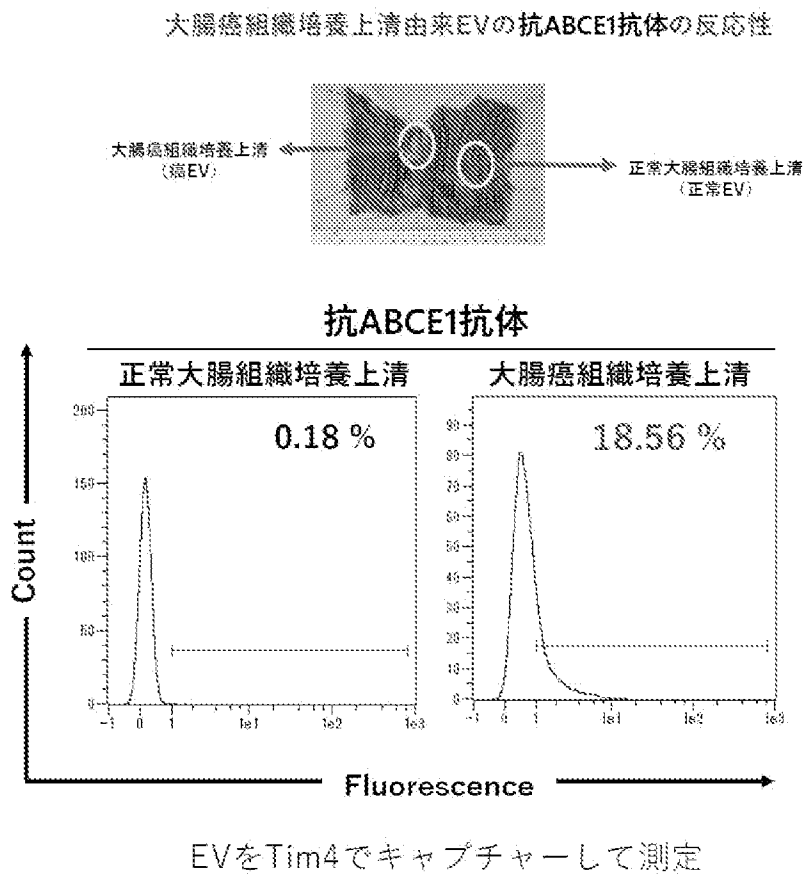
T1及びZA2Gから選択される１種又は複数種のタンパク質である請求項１３に記載のがん治療剤。

[請求項15] がん特異的細胞外小胞の膜表面に発現するタンパク質に対する抗体が、IgG免疫グロブリン及び／又はscFv（single chain Fv）である、請求項１３又は１４に記載のがん治療剤。

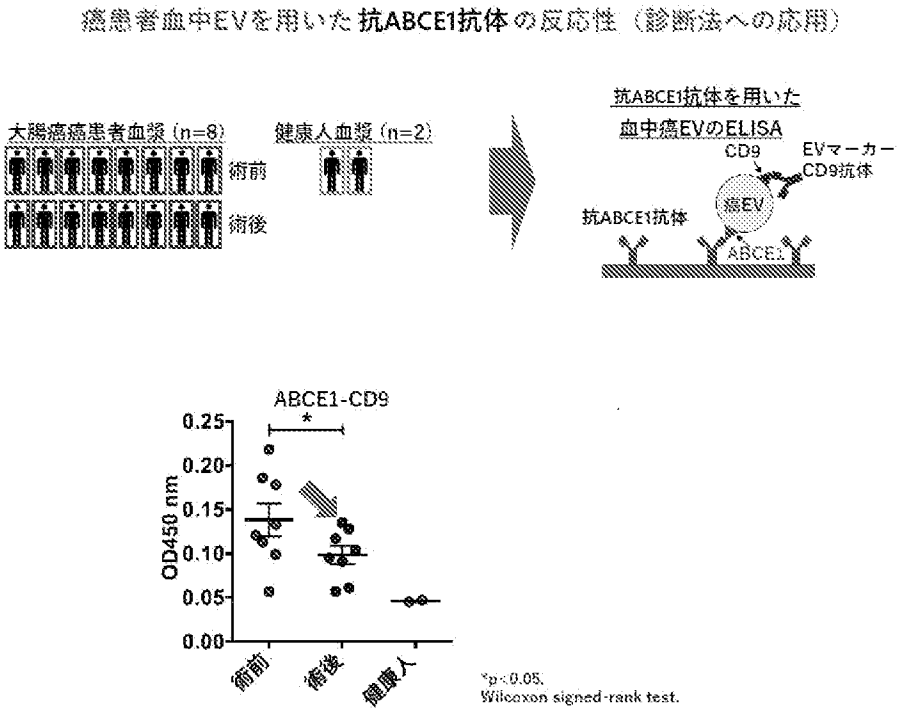
[図1]


大腸癌臨床検体EVを用いたABCE1の発現確認
（WB）：抗ABCE1抗体
Small EV (stage Ⅰ-Ⅱ)
Small EV (stageⅢ-Ⅳ)
MW (kDa)
100 kDa
75 kDa
63 kDa
48 kDa
35 kDa
N T N T N T N T N T N T
① ② ③ ④ ⑤ ⑥
⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫
Stage Ⅰ
Stage Ⅱ
StageⅢ
StageⅣ
Large EV (stage Ⅰ-Ⅱ)
Large EV (stageⅢ-Ⅳ)

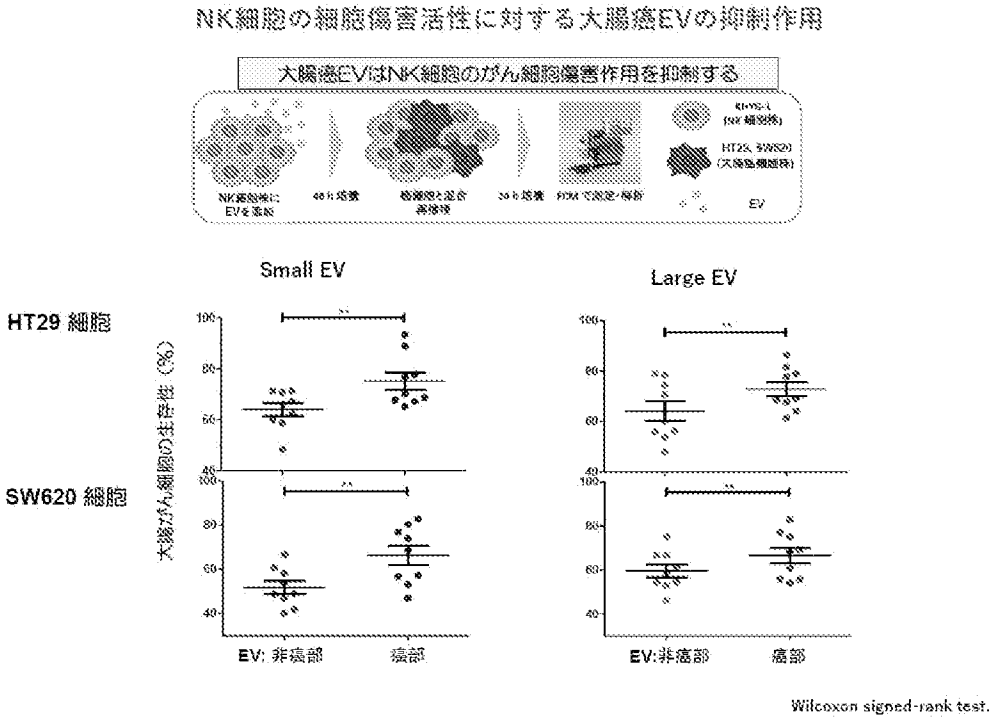
[図2]


大腸癌組織培養上清由来EVの抗ABCE1抗体の反応性
大腸癌組織培養上清
（癌EV）
正常大腸組織培養上清
（正常EV）
抗ABCE1抗体
正常大腸組織培養上清
大腸癌組織培養上清
0.18 %
18.56 %
Count
Fluorescence
EVをTim4でキャプチャーして測定

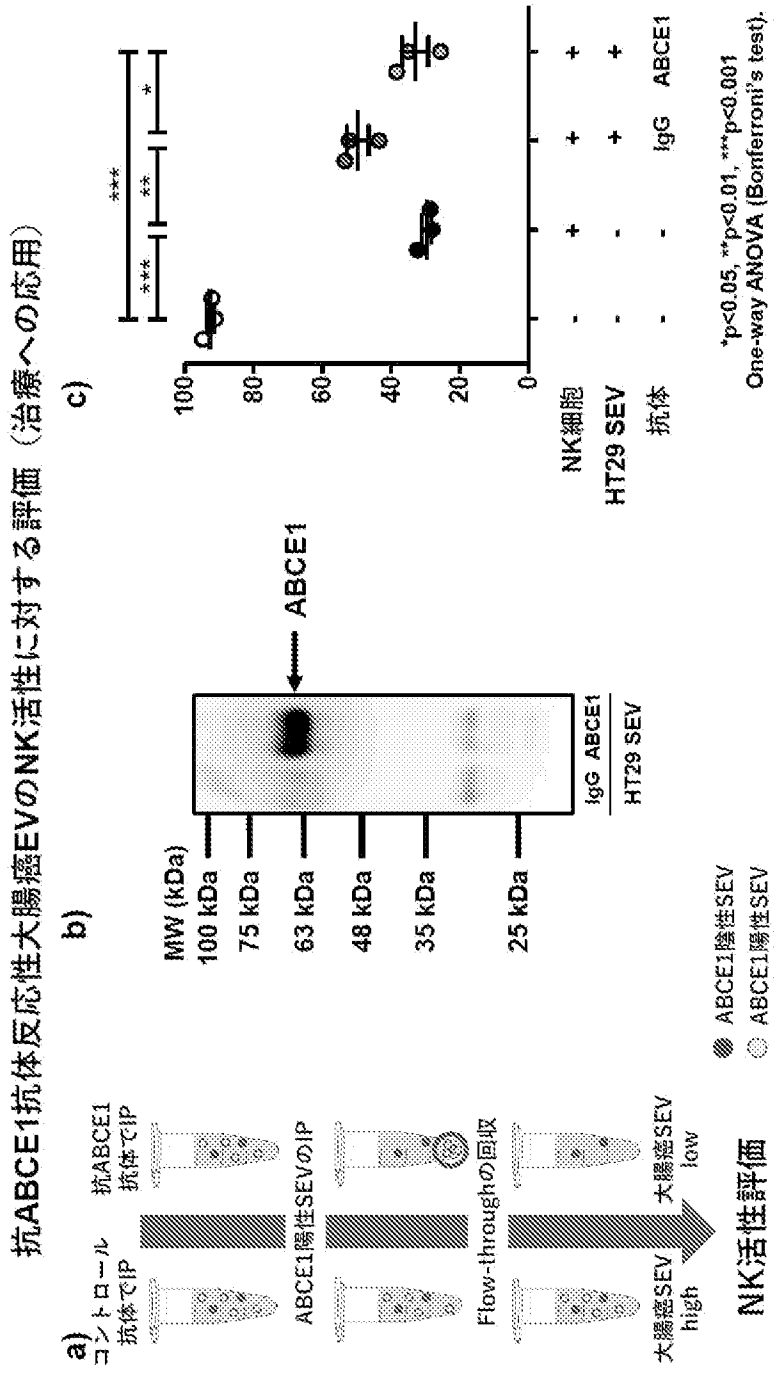
[図3]


癌患者血中EVを用いた抗ABCE1抗体の反応性（診断法への応用）
大腸癌癌患者血漿（n=8）
健康人血漿（n=2）
術前
術後
抗ABCE1抗体を用いた
血中癌EVのELISA
CD9
EVマーカー
CD9抗体
癌EV
抗ABCE1抗体
ABCE1
ABCE1-CD9
OD450 nm
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
*
術前
術後
健康人
*p<0.05,
Wilcoxon signed-rank test.

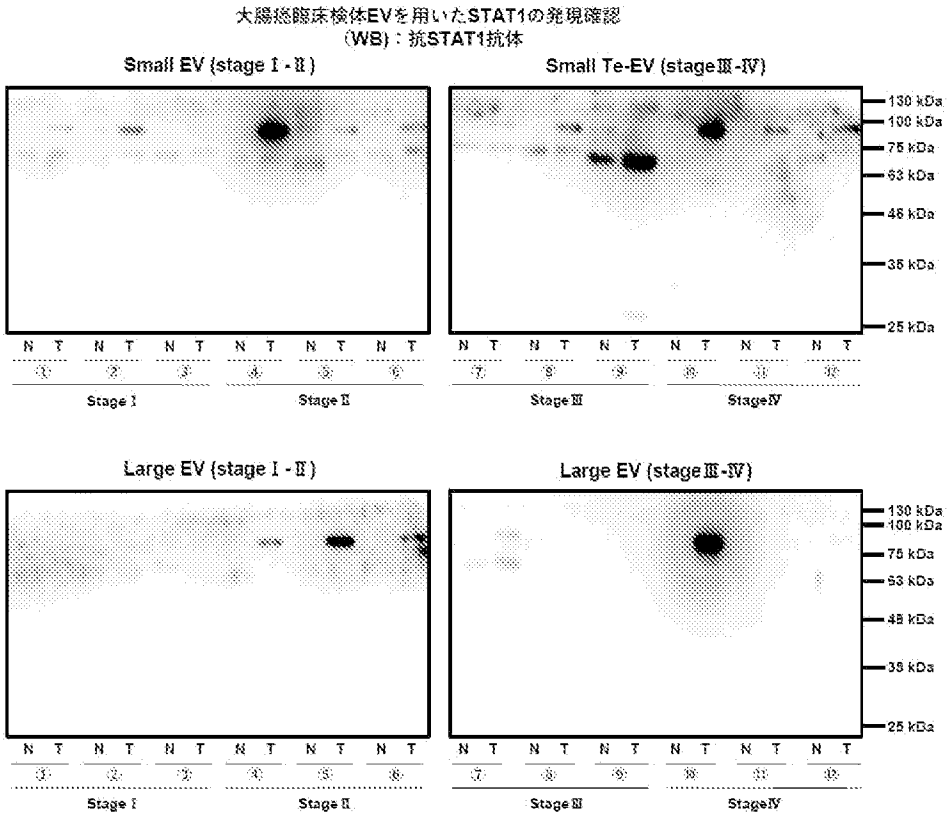
[図4]


NK細胞の細胞傷害活性に対する大腸癌EVの抑制作用
大腸癌EVはNK細胞のがん細胞傷害作用を抑制する
EV
Small EV
Large EV
HT29 細胞
SW620 細胞
大腸がん細胞の生存率（%）
EV: 非癌部
癌部
EV:非癌部
癌部
Wilcoxon signed-rank test.

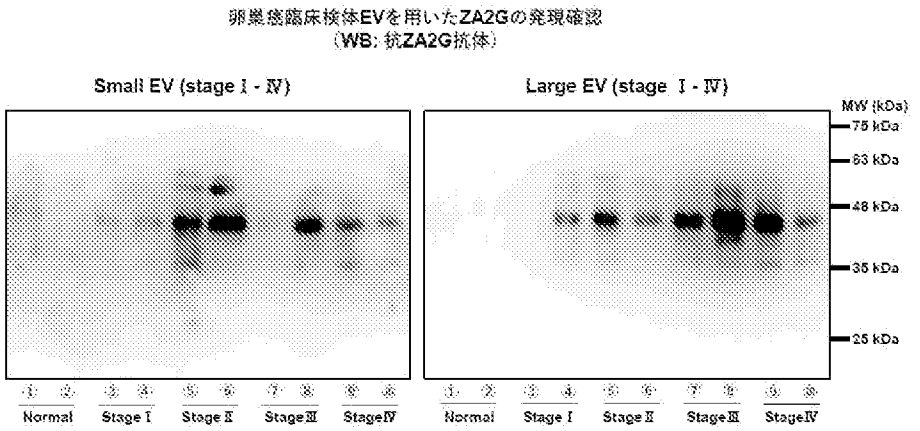
[図5]


抗ABCE1抗体反応性大腸癌EVのNK活性に対する評価（治療への応用）
a)
コントロール 抗体でIP
抗ABCE1 抗体でIP
ABCE1陽性SEVのIP
Flow-throughの回収
大腸癌SEV high
大腸癌SEV low
NK活性評価
b)
MW (kDa)
100 kDa
75 kDa
63 kDa
48 kDa
35 kDa
25 kDa
ABCE1
IgG ABCE1
HT29 SEV
c)
NK細胞
HT29 SEV
抗体
IgG
ABCE1
ABCE1陰性SEV
ABCE1陽性SEV
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001
One-way ANOVA (Bonferroni's test).

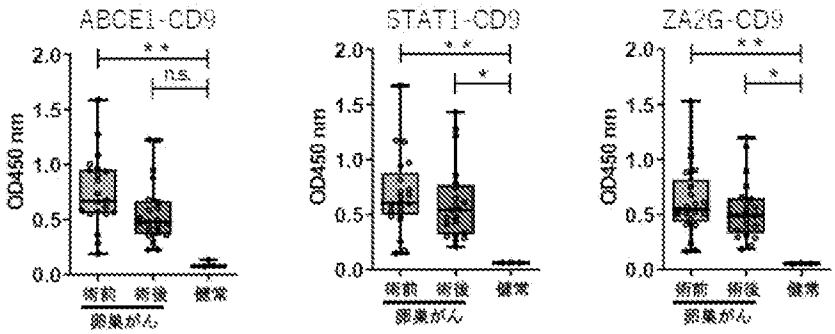
[図6]


大腸癌臨床検体EVを用いたSTAT1の発現確認
(WB)：抗STAT1抗体
Small EV (stage Ⅰ-Ⅱ)
Small Te-EV (stageⅢ-Ⅳ)
130 kDa
100 kDa
75 kDa
63 kDa
48 kDa
35 kDa
25 kDa
N T N T N T N T N T N T
① ② ③ ④ ⑤ ⑥
⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫
Stage Ⅰ
Stage Ⅱ
Stage Ⅲ
StageⅣ
Large EV (stage Ⅰ-Ⅱ)
Large EV (stageⅢ-Ⅳ)

[図7]


卵巣癌臨床検体EVを用いたZA2Gの発現確認
(WB: 抗ZA2G抗体)
Small EV (stage Ⅰ - Ⅳ)
Large EV (stage Ⅰ - Ⅳ)
MW (kDa)
75 kDa
63 kDa
48 kDa
35 kDa
25 kDa
① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩
Normal
Stage Ⅰ
Stage Ⅱ
Stage Ⅲ
StageⅣ

[図8]



卵巣癌検体：21ペア、Kruskal-Wallis test (post hoc Dunn's multiple comparisons test)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/019760

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/574(2006.01)i; ***A61K 39/395***(2006.01)i; ***A61P 35/00***(2006.01)i; ***C07K 16/00***(2006.01)i; ***G01N 33/543***(2006.01)i
FI: G01N33/574 A; A61K39/395 T; A61P35/00; G01N33/543 515A; C07K16/00

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)

G01N33/574; A61K39/395; A61P35/00; C07K16/00; G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2023/112980 A1 (TOSOH CORP.) 22 June 2023 (2023-06-22) paragraphs [0011], [0014], [0018], [0022], [0030], [0122]-[0124]	1, 3-8, 10, 12
Y		1-2, 9-11
X	WO 2019/065747 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 04 April 2019 (2019-04-04) abstract, paragraphs [0049], [0052], [0113], [0114]	1, 3-8, 10, 12-13
Y		1-2, 9-11
Y	CHEN, Dongping. LncRNA HOTAIRM1 knockdown inhibits cell glycolysis metabolism and tumor progression by miR-498/ABCE1 axis in non-small cell lung cancer. Genes & Genomics. 03 February 2021, vol. 43, no. 2, pp. 183-194 abstract, Introduction, Discussion	2, 9, 11
X		13-15

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
02 August 2024	**13 August 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TIAN, Ye. ABCE1 plays an essential role in lung cancer progression and metastasis. Tumour biology. 05 January 2016, vol. 37, no. 6, pp. 8375-8382 abstract	2, 9, 11
X		13-15
Y	GAO, Ying. Expression of a New Tumor Metastasis-related Gene ABCE1 in Non-small Cell Lung Cancer and Its Significance. Journal of China Medical University [ISSN: 0258-4646]. October 2011, vol. 40, no. 10, pp. 911-914 abstract, table 1, fig. 1, 2	2, 9, 11
X		9
Y	ZHOU, Di. Functional expression of miR-203 regulating ABCE1 in progression of non-small cell lung cancer. Journal of China Medical University [ISSN: 0258-4646]. June 2021, vol. 50, no. 6, pp. 548-552, DOI 10.12007/j.issn.0258-4646.2021.06.015 abstract	2, 9, 11
A	CENGIZ, Bagdat Burcu. Therapeutic potential of inhibiting ABCE1 and eRF3 genes via siRNA strategy using chitosan nanoparticles in breast cancer cells. Journal of Nanoparticle Research. 01 April 2015, vol. 17, no. 4, Page. article number 168 abstract	1-13
A	HRISTOS, Glavinas. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. Curr Drug Deliv. January 2004, vol. 1, no. 1, pp. 27-42 abstract	1-13
A	TAURO, Bow J. Two Distinct Populations of Exosomes Are Released from LIM1863 Colon Carcinoma Cell-derived Organoids. Molecular & Cellular Proteomics. 10 December 2012, vol. 12, no. 3, pp. 587-598 RESULTS AND DISCUSSION (Protein Expression Profile of sMVs Is Distinct from That of A33- and EpCAM-Exos)	1-13
A	XU, Rong. Highly-purified exosomes and shed microvesicles isolated from the human colon cancer cell line LIM1863 by sequential centrifugal ultrafiltration are biochemically and functionally distinct. Methods. 16 April 2015, vol. 87, pp. 11-25 abstract, table 2 (p. 21)	1-13
A	US 2021/0003577 A1 (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 07 January 2021 (2021-01-07) table 2 (p. 17, left)	1-13
A	JP 2019-168223 A (WAKAYAMA MEDICAL UNIVERSITY) 03 October 2019 (2019-10-03) abstract, claims, paragraphs [0016], [0017]	1-13
A	WO 2021/132245 A1 (FUJIFILM WAKO PURE CHEMICAL CORPORATION) 01 July 2021 (2021-07-01) abstract, paragraphs [0177], [0183], [0187]	1-13
A	JP 2023-524102 A (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORP.) 08 June 2023 (2023-06-08) abstract, claims	13-15
Y	JP 2022-513928 A (SENGENICS SDN BHD) 09 February 2022 (2022-02-09) abstract, claims, table 1, paragraph [0081]	1-2, 9-11
X	YUAN, Jianming. Clinical significance of serum interferon-γ and signal transducer and activator of transcription 1 in patients with gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi [ISSN: 1009-3079]. 2009, vol. 17, no. 29, pp. 3048-3051 abstract	9
X	林哲太郎, STAT1シグナルは膀胱癌の抗がん剤耐性化を促進し予後不良に寄与するが,STAT1発現抑制は抗がん剤感受性を回復させ,新規併用治療法となる, 西日本泌尿器科, 20 October 2018, vol. 80 extra edition, p. 178, (HAYASHI, Tetsutaro. Nishinihon Journal of Urology.), non-official translation (STAT1 signaling promotes anticancer drug resistance in bladder cancer and contributes to poor prognosis, but repression of STAT1 expression restores sensitivity against anti-cancer drugs and provides a novel combination therapy) O-060	13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/019760

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAYASHI, Tetsutaro. STAT1シグナルは抗がん剤耐性膀胱癌で亢進し, STAT1抑制は抗がん剤感受性の回復に関与する, 日本癌学会学術総会抄録集, 2016, vol. 75th, p. 1247, (STAT1 inhibition restored chemotherapy sensitivity in bladder cancer), non-official translation (Abstracts of the Annual Meeting of the Japanese Cancer Association) P-3015	13-15
A	MEISSL, Katrin. The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours. Cytokine. 26 November 2015, vol. 89, pp. 12-20 abstract	2, 9, 11
A	JP 6122776 B2 (THE ROYAL INSTITUTION FOR THE ADVANCEMENT OF LEARNING / MCGILL UNIVERSITY) 26 April 2017 (2017-04-26) claims	2, 9, 11
A	ATAY, Safinur. Insights into the Proteome of Gastrointestinal Stromal Tumors-Derived Exosomes Reveals New Potential Diagnostic Biomarkers. Molecular & Cellular Proteomics. 14 December 2017, vol. 17, no. 3, pp. 495-515 fig. 4	2, 9, 11
A	NARANJO, Nicole M. IFIT3 (interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3) modulates STAT1 expression in small extracellular vesicles. Biochemical Journal. 12 November 2021, vol. 478, no. 21, pp. 3905-3921 abstract, Introduction	2, 9, 11
A	LU, Huimin. Exosomal αvβ6 Integrin Is Required for Monocyte M2 Polarization In Prostate Cancer. Matrix Biology. 09 March 2018, vol. 70, pp. 20-35 abstract	2, 9, 11
A	JP 2021-165278 A (SINGH MOLECULAR MEDICINE LLC) 14 October 2021 (2021-10-14) claims	2, 9, 11, 13-15
A	WO 2022/017487 A1 (MABWELL (SHANGHAI) BIOSCIENCE CO., LTD.) 27 January 2022 (2022-01-27) claims	2, 9, 11, 13-15
A	WO 2022/120191 A1 (SHATTUCK LABS, INC.) 09 June 2022 (2022-06-09) claim 107	2, 9, 11
Y	KIM, Ye-Eun. Exosomal AZGP1 as a New Diagnostic Marker Candidate for Pancreatic Cancer. Biomarkers Journal. 26 December 2022, vol. 8, no. 10, p. 162 abstract	1-2, 9-11
Y	WO 2022/075774 A1 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 14 April 2022 (2022-04-14) claims	1-2, 9-11
X	MA, Yue. Comprehensive Analysis of the Functions and Prognostic Value of RNA-Binding Proteins in Thyroid Cancer. Frontiers in Oncology. 17 March 2021, vol. 11, p. 625007 abstract	9
A	JP 2014-513959 A (CLINICAL GENOMICS PTY LTD.) 19 June 2014 (2014-06-19) claim 1 (15)	2, 9, 11
X	FANG, Ye-Ying. AZGP1 Up-Regulation is a Potential Target for Andrographolide Reversing Radioresistance of Colorectal Cancer. Pharmacogenomics and personalized medicine. 13 December 2022, vol. 15, pp. 999-1017 abstract, Introduction	13-15
A	PHILLEY, Julie V. Exosome secretome and mediated signaling in breast cancer patients with nontuberculous mycobacterial disease. Oncotarget. 01 February 2017, vol. 8, no. 11, pp. 18070-18081 abstract	2, 9, 11
A	JUNG, Hee-Yeon. Potential urinary extracellular vesicle protein biomarkers of chronic active antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients. Journal of Chromatography B. 26 December 2019, vol. 1138, p. 121958 abstract	2, 9, 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/019760

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2022/226391 A1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 27 October 2022 (2022-10-27) abstract, claim 10	2, 9, 11
A	KOVAK, M R. Proteomic identification of galectin-3 binding ligands and characterization of galectin-3 proteolytic cleavage in human prostasomes. Andrology. 09 July 2013, vol. 1, no. 5, pp. 682-691 abstract	2, 9, 11
A	TANG, Yunpeng. Overview of the molecular mechanisms contributing to the formation of cancer-associated adipocytes. Molecular Medicine Reports. 03 September 2021, vol. 24, no. 5, Page. Article No.: 768 abstract	2, 9, 11
A	冨山栄輔, 尿中および組織分泌細胞外小胞のプロテオミクス解析による新規膀胱癌バイオマーカーの探索, 日本分子腫瘍マーカー研究会プログラム・講演抄録, 29 September 2021, vol. 41st, pp. 50-51, (TOMIYAMA, Eisuke. Proteomic analysis of urinary and tissue-exudative extracellular vesicles for the discovery of novel bladder cancer biomarkers.), non-official translation (Program and Abstracts of Japan Society for Molecular Tumor Marker Research) title O2-3	1-12
A	冨山栄輔, A novel strategy for the development of bladder cancer biomarkers by proteomic analysis of urinary and tissue-exudate extracellular vesicles. 日本泌尿器科学会総会, 2021, vol. 109th. p. 712, (TOMIYAMA, Eisuke. The Annual Meeting of the Japanese Urological Association.) ISA03-05	1-12
A	石津谷祐, 去勢抵抗性前立腺癌患者の血清エクソソームの網羅的タンパク解析による新規治療標的の探索と同定, 日本泌尿器科学会総会, 2019, vol. 107th, p. 631, (ISHIZUYA, Yu. The Annual Meeting of the Japanese Urological Association.), non-official translation (Search and Identification of novel therapeutic targets by comprehensive protein analysis of serum exosomes from patients with castration-resistant prostate cancer) AOP-112	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/019760

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:

First, the invention in claim 1 is to detect a protein expressed on the surface of an extracellular vesicle to examine cancer, whereas the invention in claims 13-15 uses an antibody against a protein expressed on the surface of an extracellular vesicle as a cancer treatment agent. It cannot be said that the invention in claim 1 and the invention in claims 13-15 share the common special technical feature.

In addition, document 1 disclose a cancer detecting method, which is characterized by detecting a protein cancer-specifically expressed on the membrane surface of an extracellular vesicle included in a collected body fluid sample and detecting cancer-specific extracellular vesicles, wherein the detection of such extracellular vesicles is performed by a sandwich EIA method using antibodies to the cancer-specifically expressed protein and antibodies to CD63, CD9, and CD81 or ligands to phosphatidylserine.
Also, document 1 also discloses a reagent for detecting.

In addition, document 2 also discloses detecting exosomes expressing cancer-specific proteins on their surface by exosome ELISA using antibodies that bind to cancer-specific proteins and proteins that specifically bind to molecules present on the exosome surface, such as phosphatidylserine and examining cancer.

In that case, the invention in claim 1 of the present application has no difference from document 1 or document 2, lacks novelty in light of document 1 or 2, and thus claim 1 has no special technical features of the invention.
In addition, since document 2 discloses an anti-tumor agent targeting a cancer-specific protein on the surface of exosomes, the invention in claim 13 of the present application also lacks novelty in light of document 2, and thus claim 13 also has no special technical features of the invention.

From the above points, it is considered that claims 1-15 of the present application include a group of inventions classified as the special technical features of the invention below.

(First invention) Invention relating to ABCE1 in claims 2, 9 and 11, which has a special technical feature of detecting exosomes expressing ABCE1 on their membrane surface to examine cancer.
In addition, the inventions in claims 1, 3-8, 10, and 12 are also classified as the first invention.
In addition, claim 13 is added to the first invention because it is described in document 2 for convenience.
Accordingly, the first invention includes the invention in claims 1, 3-8, 10, and 12-13 and the ABCE1 of claims 2, 9, and 11.

(Second invention) Invention relating to STAT1 in claims 2, 9, and 11, which has a special technical feature of detecting exosomes expressing STAT1 on their membrane surface to examine cancer.

(Third invention) Invention relating to ZA2G in claims 2, 9, and 11, which has a special technical feature of detecting exosomes expressing ZA2G on their membrane surface to examine cancer.

(Fourth invention) Invention relating to claims 14-15, which has a special technical feature of a cancer treatment agent comprising an antibody against ABCE1 expressed on the membrane surface of cancer-specific extracellular vesicles as an active ingredient.

(Fifth invention) Invention relating to claims 14-15, which has a special technical feature of a cancer treatment agent comprising an antibody against STAT1 expressed on the membrane surface of cancer-specific extracellular vesicles as an active ingredient.

(Sixth invention) Invention relating to claims 14-15, which has a special technical feature of a cancer treatment agent comprising an antibody against ZA2G expressed on the membrane surface of cancer-specific extracellular vesicles as an active ingredient.

Document 1: WO 2023/112980 A1 (TOSOH CORP.) 22 June 2023 (2023-06-22) paragraphs [0011], [0014], [0018], [0022], [0030], [0122]-[0124] (Family: none)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/019760

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

Document 2: WO 2019/065747 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 04 April 2019 (2019-04-04) abstract, paragraphs [0049], [0052], [0113], [0114] & EP 3690051 A1 abstract, paragraphs [0049], [0052], [0111], [0112] & US 2020/0377580 A1

1. ☑ As all required additional 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 additional fees, this Authority did not invite payment of 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/JP2024/019760

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2023/112980 A1	22 June 2023	(Family: none)	
WO 2019/065747 A1	04 April 2019	EP 3690051 A1 abstract, paragraphs [0049], [0052], [0111], [0112] US 2020/0377580 A1 CN 111133108 A	
US 2021/0003577 A1	07 January 2021	(Family: none)	
JP 2019-168223 A	03 October 2019	WO 2018/030511 A1	
WO 2021/132245 A1	01 July 2021	US 2022/0326242 A1 abstract, paragraphs [0285], [0292], [0310] EP 4083624 A1 CN 115004031 A	
JP 2023-524102 A	08 June 2023	WO 2021/222861 A1 abstract, claims US 2023/0203153 A1 EP 4142793 A1 KR 10-2023-0034944 A CN 116096753 A	
JP 2022-513928 A	09 February 2022	WO 2020/122817 A1 abstract, table 1, p. 21, lines 8-22, claims US 2022/0260571 A1 EP 3894861 A1 KR 10-2021-0104073 A CN 113614536 A	
JP 6122776 B2	26 April 2017	WO 2011/127585 A1 claims US 2010/0255514 A1 US 2013/0203081 A1 US 2015/0293101 A1 US 2020/0141936 A1 US 2022/0187300 A1 US 2012/0070848 A1 US 2016/0245812 A1 EP 2558502 A1 EP 3473651 A2 EP 2176665 A1 EP 2696203 A2	
JP 2021-165278 A	14 October 2021	WO 2016/065323 A2 claims US 2016/0115226 A1 US 2016/0115244 A1 US 2016/0115247 A1 US 2016/0115248 A1 US 2017/0267784 A1 US 2017/0327598 A1 US 2018/0072815 A1 US 2019/0177437 A1 US 2022/0396637 A1 US 2016/0115226 A1	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/019760

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 3209685 A2	
		EP 3590962 A1	
		EP 4006052 A1	
		TW 201615834 A	
		CN 106852148 A	
		KR 10-2017-0070002 A	
		KR 10-2019-0107199 A	
		KR 10-2019-0108646 A	
		CN 111848793 A	
WO 2022/017487 A1	27 January 2022	JP 2023-534738 A	
		US 2023/0365653 A1	
		EP 4194002 A1	
		CN 113968903 A	
WO 2022/120191 A1	09 June 2022	JP 2024-500065 A	
		US 2024/0016892 A1	
		US 2024/0011101 A1	
		WO 2022/120187 A2	
		EP 4255464 A1	
		EP 4256344 A2	
		CN 116847866 A	
		KR 10-2023-0129229 A	
		CN 116829953 A	
WO 2022/075774 A1	14 April 2022	KR 10-2022-0046910 A	
JP 2014-513959 A	19 June 2014	WO 2012/149609 A1 claim 1	
		US 2014/0155280 A1	
		EP 2705164 A1	
		CN 103874768 A	
		KR 10-2014-0064732 A	
WO 2022/226391 A1	27 October 2022	US 2024/0053344 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/019760

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/574(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i
FI: G01N33/574 A; A61K39/395 T; A61P35/00; G01N33/543 515A; C07K16/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N33/574; A61K39/395; A61P35/00; C07K16/00; G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2023/112980 A1 (東ソー株式会社) 22.06.2023 (2023-06-22) [００１１][００１４][００１８][００２２][００３０][０１２２]－[０１２４]	1,3-8,10,12
Y		1-2,9-11
X	WO 2019/065747 A1 (国立大学法人大阪大学) 04.04.2019 (2019-04-04) [要約][００４９][００５２][０１１３][０１１４]	1,3-8,10,12-13
Y		1-2,9-11
Y	CHEN Dongping, LncRNA HOTAIRM1 knockdown inhibits cell glycolysis metabolism and tumor progression by miR-498/ABCE1 axis in non-small cell lung cancer, Genes & Genomics, 2021.02.03, Vol.43 No.2, Page.183-194 Abstract, Introduction, Discussion	2,9,11
X		13-15

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
02.08.2024	13.08.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
三木　隆 2J 3312

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	TIAN Ye, ABCE1 plays an essential role in lung cancer progression and metastasis, Tumour biology, 2016.01.05, Vol.37 No.6, Page.8375-8382 Abstract	2,9,11
X		13-15
Y	GAO Ying, Expression of a New Tumor Metastasis-related Gene ABCE1 in Non-small Cell Lung Cancer and Its Significance, Journal of China Medical University [ISSN: 0258-4646], 2011.10, Vol.40 No.10, Page.911-914 Abstract, 表１, 図１, 図２	2,9,11
X		9
Y	ZHOU Di, Functional expression of miR-203 regulating ABCE1 in progression of non-small cell lung cancer, Journal of China Medical University [ISSN: 0258-4646], 2021.06, Vol.50 No.6, Page.548-552, DOI 10.12007/j.issn.0258-4646.2021.06.015 Abstract	2,9,11
A	CENGIZ Bagdat Burcu, Therapeutic potential of inhibiting ABCE1 and eRF3 genes via siRNA strategy using chitosan nanoparticles in breast cancer cells, Journal of Nanoparticle Research, 2015.04.01, Vol.17 No.4, Page. article number 168 Abstract	1-13
A	HRISTOS Glavinas, The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity, Curr Drug Deliv, 2004.01, Vol.1 No.1, Page.27-42 Abstract	1-13
A	TAURO, Bow J., Two Distinct Populations of Exosomes Are Released from LIM1863 Colon Carcinoma Cell-derived Organoids, Molecular & Cellular Proteomics, 2012.12.10, Vol.12 No.3, Page.587-598 RESULTS AND DISCUSSION(Protein Expression Profile of sMVs Is Distinct from That of A33- and EpCAM-Exos)	1-13
A	XU, Rong, Highly-purified exosomes and shed microvesicles isolated from the human colon cancer cell line LIM1863 by sequential centrifugal ultrafiltration are biochemically and functionally distinct, Methods, 2015.04.16, Vol.87, Page.11-25 Abstract, Table2(21ページ)	1-13
A	US 2021/0003577 A1 (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 07.01.2021 (2021-01-07) TABLE2(17ページ左)	1-13
A	JP 2019-168223 A (公立大学法人和歌山県立医科大学) 03.10.2019 (2019-10-03) [要約][特許請求の範囲][００１６][００１７]	1-13
A	WO 2021/132245 A1 (富士フイルム和光純薬株式会社) 01.07.2021 (2021-07-01) 要約[０１７７][０１８３][０１８７]	1-13
A	JP 2023-524102 A (ザ チルドレンズ メディカル センター コーポレーション) 08.06.2023 (2023-06-08) [要約][特許請求の範囲]	13-15
Y	JP 2022-513928 A (センジェニクス・エスディーエヌ・ビーエイチディー) 09.02.2022 (2022-02-09) [要約] [特許請求の範囲][表１][００８１]	1-2,9-11
X	YUAN, Jianming, Clinical significance of serum interferon-γ and signal transducer and activator of transcription 1 in patients with gastric carcinoma, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi [ISSN: 1009-3079], 2009, Vol.17 No.29, Page.3048-3051 Abstract	9

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	林哲太郎, STAT1シグナルは膀胱癌の抗がん剤耐性化を促進し予後不良に寄与するが,STAT1発現抑制は抗がん剤感受性を回復させ,新規併用治療法となる, 西日本泌尿器科, 2018.10.20, Vol.80 増刊号, Page.178 O-060	13-15
X	HAYASHI Tetsutaro, STAT1シグナルは抗がん剤耐性膀胱癌で亢進し,STAT1抑制は抗がん剤感受性の回復に関与する, 日本癌学会学術総会抄録集, 2016, Vol.75th, Page.1247 P-3015	13-15
A	MEISSL Katrin, The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours, Cytokine, 2015.11.26, Vol.89, Page.12-20 Abstract	2,9,11
A	JP 6122776 B2 (ザ ロイヤル インスティチューション フォー ザ アドバンスメント オブ ラーニング／マギル ユニバーシティ) 26.04.2017 (2017-04-26) [特許請求の範囲]	2,9,11
A	ATAY, Safinur, Insights into the Proteome of Gastrointestinal Stromal Tumors-Derived Exosomes Reveals New Potential Diagnostic Biomarkers, Molecular & Cellular Proteomics, 2017.12.14, Vol.17 No.3, Page.495-515 Fig.4	2,9,11
A	NARANJO, Nicole M., IFIT3 (interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3) modulates STAT1 expression in small extracellular vesicles, Biochemical Journal, 2021.11.12, Vol.478 No.21, Page.3905-3921 Abstract, Introduction	2,9,11
A	LU, Huimin, Exosomal αvβ6 Integrin Is Required for Monocyte M2 Polarization In Prostate Cancer, Matrix Biology, 2018.03.09, Vol.70, Page.20-35 Abstract	2,9,11
A	JP 2021-165278 A (シン モレキュラー メディシン、エルエルシー) 14.10.2021 (2021-10-14) [特許請求の範囲]	2,9,11,13-15
A	WO 2022/017487 A1 (MABWELL (SHANGHAI) BIOSCIENCE CO., LTD.) 27.01.2022 (2022-01-27) Claims	2,9,11,13-15
A	WO 2022/120191 A1 (SHATTUCK LABS, INC.) 09.06.2022 (2022-06-09) Claim107	2,9,11
Y	KIM Ye-Eun, Exosomal AZGP1 as a New Diagnostic Marker Candidate for Pancreatic Cancer, Biomarkers Journal, 2022.12.26, Vol.8 No.10, Page.162 Abstract	1-2,9-11
Y	WO 2022/075774 A1 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 14.04.2022 (2022-04-14) 特許請求の範囲	1-2,9-11
X	MA Yue, Comprehensive Analysis of the Functions and Prognostic Value of RNA-Binding Proteins in Thyroid Cancer, Frontiers in Oncology, 2021.03.17, Vol.11, Page.625007 Abstract	9
A	JP 2014-513959 A (クリニカル ジェノミクス ピーティーワイ リミテッド) 19.06.2014 (2014-06-19) [請求項１] （１５）	2,9,11
X	FANG Ye-Ying, AZGP1 Up-Regulation is a Potential Target for Andrographolide Reversing Radioresistance of Colorectal Cancer, Pharmacogenomics and personalized medicine, 2022.12.13, Vol.15, Page.999-1017 Abstract, Introduction	13-15

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	PHILLEY Julie V, Exosome secretome and mediated signaling in breast cancer patients with nontuberculous mycobacterial disease, Oncotarget, 2017.02.01, Vol.8 No.11, Page.18070-18081 Abstract	2,9,11
A	JUNG Hee-Yeon, Potential urinary extracellular vesicle protein biomarkers of chronic active antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients, Journal of Chromatography B, 2019.12.26, Vol.1138, Page.121958 Abstract	2,9,11
A	WO 2022/226391 A1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 27.10.2022 (2022-10-27) Abstract, Claim10	2,9,11
A	KOVAK M R, Proteomic identification of galectin-3 binding ligands and characterization of galectin-3 proteolytic cleavage in human prostasomes, Andrology, 2013.07.09, Vol.1 No.5, Page.682-691 Abstract	2,9,11
A	TANG, Yunpeng, Overview of the molecular mechanisms contributing to the formation of cancer-associated adipocytes, Molecular Medicine Reports, 2021.09.03, Vol.24 No.5, Page.Article No.: 768 Abstract	2,9,11
A	冨山栄輔, 尿中および組織分泌細胞外小胞のプロテオミクス解析による新規膀胱癌バイオマーカーの探索, 日本分子腫瘍マーカー研究会プログラム・講演抄録, 2021.09.29, Vol.41st, Page.50-51 演題02-3	1-12
A	冨山栄輔, A novel strategy for the development of bladder cancer biomarkers by proteomic analysis of urinary and tissue-exudate extracellular vesicles, 日本泌尿器科学会総会, 2021, Vol.109th, Page.712 ISA03-05	1-12
A	石津谷祐, 去勢抵抗性前立腺癌患者の血清エクソソームの網羅的タンパク解析による新規治療標的の探索と同定, 日本泌尿器科学会総会, 2019, Vol.107th, Page.631 AOP-112	1-12

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/019760

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

まず、請求項１に係る発明は、細胞外小胞表面に発現するタンパク質を検出してがんを検査することであるのに対して、請求項１３－１５に係る発明は、細胞外小胞表面に発現するタンパク質に対する抗体をがん治療剤とすることであり、請求項１に係る発明と、請求項１３－１５に係る発明とにおいて、発明の特別な技術的特徴が共通しているとはいえない。

また、文献１には、採取した体液検体に含まれる細胞外小胞の膜表面にがん特異的に発現するタンパク質を検出し、がん特異的細胞外小胞を検出することを特徴とするがんの検査方法が記載されており、そのような細胞外小胞の検出は、がん特異的に発現するタンパク質に対する抗体と、ＣＤ６３、ＣＤ９、ＣＤ８１に対する抗体やホスファチジルセリンに対するリガンドを用いた、サンドイッチＥＩＡ法により実施することが記載されている。
また、文献１には、そのための試薬も記載されている。

また、文献２にも、がん特異的タンパク質を表面に発現するエクソソームを、がん特異的タンパク質と結合する抗体と、ホスファチジルセリン等のエクソソーム表面に存在する分子に特異的に結合するタンパク質とを用いたエクソソームELISAにより検出し、がんを検査することが記載されている。

すると、本願の請求項１に係る発明は、文献１または文献２に記載のものと差異がなく、文献１または文献２により新規性を有しないから、請求項１には発明の特別な技術的特徴はない。
さらに、文献２には、エクソソーム表面のがん特異的タンパク質を標的とした抗腫瘍剤が記載されているから、本願の請求項１３に係る発明も文献２により新規性を有しないから、請求項１３にも発明の特別な技術的特徴はない。

以上のことから、本願の請求項１－１５には、下記の発明の特別な技術的特徴により区分される発明群が含まれているものと認められる。

（第１発明）ABCE1を膜表面に発現するエクソソームを検出しがんを検査することを発明の特別な技術的特徴とする、請求項２，９，１１のABCE1に関する発明。
また、請求項１，３－８，１０，１２に係る発明も第１発明に区分する。
なお、請求項１３については、文献２に記載されたものであることから、便宜的に第１発明に加える。
よって、第１発明には、請求項１，３－８，１０，１２－１３に係る発明及び、請求項２，９，１１のABCE1に関する発明が含まれる。

（第２発明）STAT1を膜表面に発現するエクソソームを検出しがんを検査することを発明の特別な技術的特徴とする、請求項２，９，１１のSTAT1に関する発明。

（第３発明）ZA2Gを膜表面に発現するエクソソームを検出しがんを検査することを発明の特別な技術的特徴とする、請求項２，９，１１のZA2Gに関する発明。

（第４発明）がん特異的細胞外小胞の膜表面に発現するABCE1に対する抗体を有効成分とするがん治療剤を発明の特別な技術的特徴とする、請求項１４－１５に関する発明。

（第５発明）がん特異的細胞外小胞の膜表面に発現するSTAT1に対する抗体を有効成分とするがん治療剤を発明の特別な技術的特徴とする、請求項１４－１５に関する発明。

（第６発明）がん特異的細胞外小胞の膜表面に発現するZA2Gに対する抗体を有効成分とするがん治療剤を発明の特別な技術的特徴とする、請求項１４－１５に関する発明。

文献１：WO 2023/112980 A1（東ソー株式会社）22.06.2023(2023-06-22)
［００１１］［００１４］［００１８］［００２２］［００３０］［０１２２］－［０１２４］
（ファミリーなし）

文献２：WO 2019/065747 A1（国立大学法人大阪大学）04.04.2019(2019-04-04)
［要約］［００４９］［００５２］［０１１３］［０１１４］

第Ⅲ欄　　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

& EP 3690051 A1
Abstract, [0049][0052][0111][0112]
& US 2020/0377580 A1

1. ☑ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☑ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/019760

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2023/112980 A1	22.06.2023	（ファミリーなし）	
WO 2019/065747 A1	04.04.2019	EP 3690051 A1 Abstract, [0049][0052][0111][0112] US 2020/0377580 A1 CN 111133108 A	
US 2021/0003577 A1	07.01.2021	（ファミリーなし）	
JP 2019-168223 A	03.10.2019	WO 2018/030511 A1	
WO 2021/132245 A1	01.07.2021	US 2022/0326242 A1 Abstract ,[0285][0292][0310] EP 4083624 A1 CN 115004031 A	
JP 2023-524102 A	08.06.2023	WO 2021/222861 A1 Abstract, Claims US 2023/0203153 A1 EP 4142793 A1 KR 10-2023-0034944 A CN 116096753 A	
JP 2022-513928 A	09.02.2022	WO 2020/122817 A1 Abstract, Table 1, 21ページ8行-22行, Claims US 2022/0260571 A1 EP 3894861 A1 KR 10-2021-0104073 A CN 113614536 A	
JP 6122776 B2	26.04.2017	WO 2011/127585 A1 Claims US 2010/0255514 A1 US 2013/0203081 A1 US 2015/0293101 A1 US 2020/0141936 A1 US 2022/0187300 A1 US 2012/0070848 A1 US 2016/0245812 A1 EP 2558502 A1 EP 3473651 A2 EP 2176665 A1 EP 2696203 A2	
JP 2021-165278 A	14.10.2021	WO 2016/065323 A2 Claims US 2016/0115226 A1 US 2016/0115244 A1 US 2016/0115247 A1 US 2016/0115248 A1 US 2017/0267784 A1 US 2017/0327598 A1 US 2018/0072815 A1 US 2019/0177437 A1 US 2022/0396637 A1 US 2016/0115226 A1	

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/019760

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
		EP 3209685 A2	
		EP 3590962 A1	
		EP 4006052 A1	
		TW 201615834 A	
		CN 106852148 A	
		KR 10-2017-0070002 A	
		KR 10-2019-0107199 A	
		KR 10-2019-0108646 A	
		CN 111848793 A	
WO 2022/017487 A1	27.01.2022	JP 2023-534738 A	
		US 2023/0365653 A1	
		EP 4194002 A1	
		CN 113968903 A	
WO 2022/120191 A1	09.06.2022	JP 2024-500065 A	
		US 2024/0016892 A1	
		US 2024/0011101 A1	
		WO 2022/120187 A2	
		EP 4255464 A1	
		EP 4256344 A2	
		CN 116847866 A	
		KR 10-2023-0129229 A	
		CN 116829953 A	
WO 2022/075774 A1	14.04.2022	KR 10-2022-0046910 A	
JP 2014-513959 A	19.06.2014	WO 2012/149609 A1 Claim1	
		US 2014/0155280 A1	
		EP 2705164 A1	
		CN 103874768 A	
		KR 10-2014-0064732 A	
WO 2022/226391 A1	27.10.2022	US 2024/0053344 A1	