(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2017-514519
(P2017-514519A)
(43)公表日　平成29年6月8日(2017.6.8)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	***(2006.01)***	C12Q	1/68	ZNAA	4B063
G01N 30/88	***(2006.01)***	G01N	30/88	E	
C12N 15/09	*(2006.01)*	C12N	15/00	A	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 90 頁）

(21)出願番号　特願2017-508751 (P2017-508751)
(86)(22)出願日　平成27年4月21日 (2015.4.21)
(85)翻訳文提出日　平成28年12月26日 (2016.12.26)
(86)国際出願番号　PCT/EP2015/058614
(87)国際公開番号　WO2015/165779
(87)国際公開日　平成27年11月5日 (2015.11.5)
(31)優先権主張番号　14166802.0
(32)優先日　平成26年5月1日 (2014.5.1)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　516180058
スティヒティング　フェーユーエムセー
オランダ国　１０８１　ハーフェー　アムステルダム　デー　ボエレラン　１１１７
(71)出願人　508254576
ウニベルシダト　デ　グラナダ
スペイン国グラナダ、アベニダ、デル、オスピシオ、シン、ヌメロ、オスピタル、レアル
(74)代理人　110000442
特許業務法人　武和国際特許事務所
(72)発明者　ペストル，ディルク　ミヒール
オランダ国　１０８１　ハーフェー　アムステルダム　デ　ブーレラン　１１１７内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】バイオマーカーとしての低分子のノンコーディングＲＮＡ

(57)【要約】
本開示は、個体の健康状態を分類するためのバイオマーカーとしての低分子のノンコーディングＲＮＡを提供する。本開示は、ノンコーディングＲＮＡのバイオマーカーを同定するためのスクリーニング方法もまた提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
低分子のノンコーディングＲＮＡのバイオマーカー対を同定するための方法であって、
第１の参照個体から取得された第１の体液サンプル、および、第２の参照個体から取得された第２の体液サンプルのそれぞれに含まれる前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種の量を決定するステップと、
前記第１の参照個体は、前記第２の参照個体から変えられた健康状態であり、
前記第１の体液サンプル中の前記２つの異なる変種の比率を決定するステップと、
前記第２の体液サンプル中の前記２つの異なる変種の比率を決定するステップと、
前記第１の体液サンプルからの比率と前記第２の体液サンプルからの比率とを比較するステップと、
前記第１の体液サンプルと前記第２の体液サンプルとの間で前記比率が変えられている場合に、前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種をバイオマーカー対として同定するステップと
を含み、
第１の変種および第２の変種は、標準配列の５’末端または３’末端においてトリミングされた、および／または、５’末端または３’末端において伸長されたノンコーディングＲＮＡ、ならびに、任意選択で５’末端または３’末端においてトリミングされた、または、５’末端または３’末端において伸長された、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
前記ノンコーディングＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合に、
第１の変種は、前記標準配列のノンコーディングＲＮＡ、および、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
第２の変種は、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡであることを特徴とする方法。
【請求項２】
前記第１の参照個体は、１または複数の健康な個体に由来するものであり、
前記第２の参照個体は、障害を有する１または複数の個体に由来するものであり、
前記障害は、好ましくは、前立腺がんである
ことを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記第１の参照個体は、障害を有する個体に由来するものであり、
前記第２の参照個体は、前記障害に対して処置が行われた後の前記個体に由来するものである
ことを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項４】
低分子のノンコーディングＲＮＡのバイオマーカー対を使用して、個体の健康状態を分類するための方法であって、
前記個体に由来する体液サンプル中のバイオマーカー対の量を決定するステップと、
前記体液サンプル中のバイオマーカー対の比率を決定するステップと、
前記比率と、参照サンプルに由来する体液中のバイオマーカー対の比率とを比較するステップと、
を含み、
前記個体に由来するサンプルと前記参照サンプルとの間の比率における差異の有無に基づいて、前記個体の健康状態を分類し、
前記バイオマーカー対は、ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種からなり、
第１の変種および第２の変種は、標準配列の５’末端または３’末端においてトリミングされた、および／または、５’末端または３’末端において伸長されたノンコーディングＲＮＡであるノンコーディングＲＮＡ、ならびに、任意選択で５’末端または３’末端においてトリミングされた、または、５’末端または３’末端において伸長された、３’

末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
前記ノンコーディングＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合に、
前記第１の変種は、前記標準配列のノンコーディングＲＮＡ、および、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
前記第２の変種は、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡであることを特徴とする方法。
【請求項５】
低分子のノンコーディングＲＮＡのバイオマーカー対を使用して、個体の健康状態に関するデータを収集するための方法であって、
前記個体に由来する体液サンプル中のバイオマーカー対の量を決定するステップと、
前記体液サンプル中のバイオマーカー対の比率を決定するステップと、
を含み、
前記バイオマーカー対は、ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種からなり、
第１の変種および第２の変種は、標準配列のノンコーディングＲＮＡ、５’末端または３’末端においてトリミングされた、および／または、５’末端または３’末端において伸長されたノンコーディングＲＮＡ、ならびに、任意選択で５’末端または３’末端においてトリミングされた、または、５’末端または３’末端において伸長された、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
前記ノンコーディングＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合に、
前記第１の変種は、前記標準配列のノンコーディングＲＮＡ、および、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
前記第２の変種は、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡであることを特徴とする方法。
【請求項６】
前記参照サンプルは、１または複数の健康な個体に由来するものであることを特徴とする請求項４または請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記参照サンプルは、障害を有する１または複数の個体に由来するものであることを特徴とする請求項４または請求項５に記載の方法。
【請求項８】
前記参照サンプルは、障害に対する処置における良好な反応を有する１または複数の個体に由来するものである
ことを特徴とする請求項４または請求項５に記載の方法。
【請求項９】
前記ノンコーディングＲＮＡは、トランスファーＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、ｓｎｏＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、核内低分子、Ｙ　ＲＮＡ、ヴォールトＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、ｐｉｗｉＲＮＡから選択され、好ましくは、ノンコーディングＲＮＡは、ｍｉＲＮＡから選択される
ことを特徴とする請求項１から請求項８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記第１の変種および前記第２の変種は、
それぞれが、
標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ａ、
標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
３’末端ＮＴＡ－Ｇおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
３’末端ＮＴＡ－Ｇおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
３’末端ＮＴＡ－Ｇおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
３’末端ＮＴＡ－Ｃおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、

３’末端ＮＴＡ－Ｃおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
３’末端ＮＴＡ－Ｕおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
標準配列および５’末端トリミングされた、
標準配列および３’末端トリミングされた、
５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
３’末端トリミングされたおよび５’末端トリミングされた、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
伸長されたおよび５’末端トリミングされた、
伸長されたおよび３’末端トリミングされた、
５’末端または３’末端トリミングされたおよび５’末端または３’末端伸長された、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ａ、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
（トリミング、および／または、伸長された）および標準配列、
のいずれかから選択される
ことを特徴とする請求項１から請求項９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１１】
前記バイオマーカー対に含まれるそれぞれのノンコーディングＲＮＡの変種は、少なくとも、１６ヌクレオチドを含む
ことを特徴とする請求項１から請求項１０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２】
前記バイオマーカー対は、表１、表２、表４、表５、表６、表９において示されるバイオマーカー対から選択されたひとつである
ことを特徴とする請求項１から請求項１１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３】
前記変種は、ディープシーケンシング（ＲＮＡ－ｓｅｑ）を使用して定量化されていることを特徴とする請求項１から請求項１２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４】
前記体液サンプルからエキソソーム小胞を単離するステップと、
単離された前記エキソソーム小胞と関連する前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種の量を決定するステップと、
をさらに含むことを特徴とする請求項１から請求項１３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５】
前記体液サンプルからタンパク質画分を単離するステップと、
前記タンパク質画分と関連する前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種の量を決定するステップと、
をさらに含むことを特徴とする請求項１から請求項１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６】
エキソソーム小胞またはタンパク質画分は、

前記体液サンプルをサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）で単離されることを特徴とする請求項１４または請求項１５に記載の方法。

【請求項１７】

個体における古典的ホジキンリンパ腫の状態を特徴付けるための方法であって、

前記個体に由来する体液サンプルに由来する１または複数のｍｉＲＮＡの量を決定するステップと、

前記１または複数のｍｉＲＮＡの量を参照サンプルと比較するステップと、

を含み、

前記１または複数のｍｉＲＮＡの存在の差異、または、前記１または複数のｍｉＲＮＡの量の差異は、前記個体の状態を特徴付け、

前記１または複数のｍｉＲＮＡは、ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１９０８－５ｐ、ｍｉＲ－５１８９－５ｐ、ｍｉＲ－９２ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－４２５－３ｐ、ｍｉＲ－６２５－３ｐ、ｍｉＲ－７７０６、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－７６０、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｍｉＲ－１２２－５ｐ、ｍｉＲ－８９１ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１５５－５ｐ、ｍｉＲ－１２９－５ｐ、ｍｉＲ－１８２－５ｐ、ｍｉＲ－１２４６、ｍｉＲ－３２０ｂ、ｍｉＲ－１２７－３ｐ、ｍｉＲ－９－５ｐ、ｍｉＲ－７６９－５ｐ、ｍｉＲ－１９３ｂ－３ｐおよびｍｉＲ－１４６ｂ－３ｐから選択されることを特徴とする方法。

【請求項１８】

前記１または複数のｍｉＲＮＡは、ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１９０８－５ｐ、ｍｉＲ－５１８９－５ｐ、ｍｉＲ－９２ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－４２５－３ｐ、ｍｉＲ－６２５－３ｐ、ｍｉＲ－７７０６、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－７６０、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｍｉＲ－１２２－５ｐから選択されることを特徴とする請求項１７に記載の方法。

【請求項１９】

前記１または複数のｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１２７－３ｐおよびｍｉＲ－１５５－５ｐから選択されることを特徴とする請求項１７に記載の方法。

【請求項２０】

前記個体が古典的ホジキンリンパ腫に罹患しているかどうかを前記古典的ホジキンリンパ腫の状態を特徴付けることで決定するステップを含む

ことを特徴とする請求項１７から請求項１９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２１】

前記参照サンプルは、１または複数の健康な個体に由来するものであることを特徴とする請求項１７から請求項２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２２】

前記参照サンプルは、古典的ホジキンリンパ腫を有する１または複数の個体に由来するものであることを特徴とする請求項１７から請求項２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２３】

古典的ホジキンリンパ腫に対する処置を受けている個体において処置効力を古典的ホジキンリンパ腫の状態を特徴付けることで決定するステップを含むことを特徴とする請求項１７から請求項２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２４】

前記参照サンプルは、古典的ホジキンリンパ腫に対する処置を受ける前と同じ個体に由来するものであることを特徴とする請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

古典的ホジキンリンパ腫に罹患している個体の予後を古典的ホジキンリンパ腫の状態を特徴付けることで決定するステップを含むことを特徴とする請求項１７から請求項２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６】

前記参照サンプルは、障害に対する処置における良好な反応を有する１または複数の個体に由来するものであり、または、障害に対する処置における不十分な反応を有する１ま

たは複数の個体に由来するものであることを特徴とする請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記体液サンプルからエキソソーム小胞を精製するステップと、
精製された前記エキソソーム小胞と関連する１または複数のｍｉＲＮＡの量を決定するステップと、
をさらに含むことを特徴とする請求項１７から請求項２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
前記エキソソーム小胞は、
前記体液サンプルをサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）で精製されていることを特徴とする請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記エキソソーム小胞は、
空隙容量画分を取得することによって単離されていることを特徴とする請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記体液は血液であることを特徴とする請求項１から請求項２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
前記体液が尿であることを特徴とする請求項１から請求項２９のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、個体の健康状態を分類するためのバイオマーカーとしての低分子のノンコーディングＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）を提供する。本開示は、ノンコーディングＲＮＡバイオマーカーを同定するためのスクリーニング方法もまた提供する。
【背景技術】
【０００２】
ヒトゲノムは、大量の低分子タンパク質にコードされないＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ、ノンコーディングＲＮＡ）転写物をコードする。存在量の多いトランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、ｍｉｃｒｏＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）およびｐｉｗｉ相互作用性ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）を含む、複数のｎｃＲＮＡクラスが記載されている（Ａｍａｒａｌら、２００８；Ｍａｒｔｅｎｓ－Ｕｚｕｎｏｖａら、２０１３）。ｍｉＲＮＡは、適切な配列相補性を有する部位において標的ｍＲＮＡに結合することによって翻訳リプレッサーとして作用する（Ａｍｅｒｅｓら、２００７）。存在量の多い細胞質Ｙ　ＲＮＡは、Ｒｏタンパク質の細胞内位置に影響を与えることで、ＲＮＡ品質制御において機能する（Ｓｉｍら、２００９）。ｍＲＮＡ翻訳における成熟ｍｉＲＮＡの抑圧活性は、規定された細胞内位置においてレトロトランスポゾンをサイレンシングするｐｉＲＮＡに加えて、ｓｉＲＮＡおよびｅｎｄｏ－ｓｉＲＮＡを含む他のクラスのｎｃＲＮＡによって共有される（ＣｈｕｍａおよびＰｉｌｌａｉ、２００９）。ｍｉＲＮＡ活性は、細胞質における存在量が十分なレベルであるか、および、エンドソーム膜に局在するＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）との相互作用に依存するが（Ｇｉｂｂｉｎｇｓら、２００９；Ｌｅｅら、２００９ａ）、存在量の少ないｍｉＲＮＡは、翻訳抑圧に対してあまり影響しない。結果として、特定のｍｉＲＮＡのレベルの変化がわずかであって、既に細胞プロセスに対して影響している可能性があり、強い撹乱は疾患を引き起こす可能性がある。存在量に加えて、（ＲＩＳＣ）タンパク質との相互作用だけではなく、ＲＮＡパートナーや正しい細胞内局在は、ｍｉＲＮＡの生理機能を制御する相互関係のある因子である（Ｍｕｌｌｏｋａｎｄｏｖら、２０１２；Ｗｅｅら、２０１２）。
【０００３】

ｍｉＲＮＡは、非常に特異的な様式で機能し、翻訳後遺伝子調節の重要な局面を制御する、２２～２５ヌクレオチドの低分子である非コード調節性ＲＮＡのクラスである。ｍｉＲＮＡは、特異的遺伝子調節因子として作用し、その発現が、がんの発症において高頻度で撹乱されるので、バイオマーカーとしてそれらを使用することについて調査がなされている。ｍｉＲ－２１などの特定のｍｉＲＮＡ（ｏｎｃｏｍｉｒ）の過剰発現、または、ｍｉＲ２００ファミリーなどの発現の欠如は、臨床的に侵襲性、または、転移性の疾患転帰と相関するようである。慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）では、循環ｍｉＲＮＡが疾患階層化に使用され、また、治療的介入に対する反応が予測されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００４】

ｍｉＲＮＡプロファイリングが比較的標準技術であるにもかかわらず、相反するデータのために、循環ｍｉＲＮＡの広範な臨床的実行が妨げられている。個体の健康状態をより良く予測できるｎｃＲＮＡバイオマーカーが必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

本開示の一態様は、低分子のノンコーディングＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）のバイオマーカー対を同定するための方法であって、

ｎｃＲＮＡについて、第１の参照個体から取得された第１の体液サンプル、および、第２の参照個体から取得された第２の体液サンプルにそれぞれ含まれる前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種の比率を決定するステップと、

第１の参照個体は、第２の参照個体から変えられた健康状態であり、

前記第１の体液サンプルからの比率と第２の体液サンプルからの比率とを比較するステップと、

前記第１の体液サンプルと第２の体液サンプルとの間で前記比率が変えられている場合、前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種をバイオマーカー対として同定するステップと

を含み、

第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、および、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、

第２の変種は、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡであり、

前記ｎｃＲＮＡがｍｉＲＮＡである場合に、

前記第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端でトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、

前記第２の変種は、５’末端または３’末端でトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択されることを特徴とする方法を提供する。

【０００６】

代替的に述べると、

第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端でトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、

第２の変種は、５’末端または３’末端でトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、

ｎｃＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合、前記第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、前記第２の変種は、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡである。

【０００７】
好ましくは、これら第１の変種および第２の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端でトリミングされた、および／または、５’末端または３’末端で伸長されたｎｃＲＮＡ、ならびに、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた、または、５’末端または３’末端で任意に伸長された３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、
ｎｃＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合、前記第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、前記第２の変種は、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡである。
【０００８】
好ましくは、この方法は、第１の体液サンプル中のｎｃＲＮＡの２つの異なる変種の量を決定するステップと、第２の体液サンプル中のｎｃＲＮＡの２つの異なる変種の量を決定するステップとを含む。
【０００９】
好ましくは、この第１の参照個体は、１または複数の健康な個体に由来するものであり、第２の参照個体は、障害を有する１または複数の個体に由来するものであり、この障害は、好ましくは、前立腺がんである。
【００１０】
好ましくは、この第１の参照個体は、障害を有する個体に由来するものであり、第２の参照個体は、その障害の処置後の同じ個体に由来するものである。
【００１１】
本明細書に開示される方法の好ましい態様では、バイオマーカー対の比率は、各サンプル中の２つの異なる変種を定量化すること、および、２つの量の間の関係性を決定すること、によって決定される。好ましくは、この変種は、ディープシーケンシング（ＲＮＡ－ｓｅｑ）を使用して定量化される。
【００１２】
本開示のさらなる一態様は、低分子のノンコーディングＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）のバイオマーカー対を使用して、個体の健康状態を分類するためのデータを収集するための方法を提供する。この方法は、個体に由来する体液サンプル中のバイオマーカー対の比率を決定するステップと、この比率を、参照サンプル（例えば、上記第２の参照個体）に由来する体液中のバイオマーカー対の比率と比較するステップとを含み、
前記個体に由来するサンプルと前記参照サンプルとの間の比率における差異の有無に基づいて、前記個体の健康状態を分類するのに役立ち、
前記バイオマーカー対は、ｎｃＲＮＡの２つの異なる変種からなり、
第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、第２の変種は、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡであり、
ｎｃＲＮＡがｍｉＲＮＡである場合に、前記第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端でトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、前記第２の変種は、５’末端または３’末端でトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択される。
【００１３】
代替的に述べると、
第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端でトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、
第２の変種は、５’末端または３’末端でトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有す

るｎｃＲＮＡから選択され、
ｎｃＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合に、前記第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、前記第２の変種は、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡである。
【００１４】
好ましくは、これら第１の変種および第２の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端でトリミングされた、および／または、５’末端または３’末端で伸長されたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた、または、５’末端または３’末端で任意に伸長された３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、
ｎｃＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合に、前記第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、前記第２の変種は、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡである。
【００１５】
かかる方法において取得されたデータは、個体が障害を有すると診断するために、単独で、または他の因子（例えば、さらなるバイオマーカーの存在、患者における臨床症状、など）と組み合わせてなどのうち、いずれかで使用される。
【００１６】
本開示のさらなる一態様は、低分子のノンコーディングＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）のバイオマーカー対を使用して、個体の健康状態を分類するための方法を提供し、この方法は、個体に由来する体液サンプル中のバイオマーカー対の比率を決定するステップと、この比率を、参照サンプルに由来するの体液中のバイオマーカー対の比率と比較するステップとを含み、
前記個体に由来するサンプルと前記参照サンプルとの間の比率における差異の有無に基づいて前記個体の健康状態を分類し、
前記バイオマーカー対は、ｎｃＲＮＡの２つの異なる変種からなり、
第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、第２の変種は、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡであり、
ｎｃＲＮＡがｍｉＲＮＡである場合、前記第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端でトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、前記第２の変種は、５’末端または３’末端でトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択される。
【００１７】
代替的に述べると、
第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端でトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、
第２の変種は、５’末端または３’末端でトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、
前記ｎｃＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合に、前記第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、前記第２の変種は、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡである。
【００１８】
好ましくは、これら第１の変種および第２の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端でトリミングされた、および／または、５’末端または３’末端で伸長されたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた、または、５’末端

または３’末端で任意に伸長された３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、
前記ｎｃＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合、前記第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、前記第２の変種は、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡである。
【００１９】
好ましくは、これらの方法は、個体に由来するサンプル中のバイオマーカー対の量を決定するステップを含む。
【００２０】
好ましくは、参照サンプルは、１または複数の健康な個体に由来するものである。
【００２１】
好ましくは、この参照サンプルは、障害を有する１または複数の個体に由来するものである。
【００２２】
好ましくは、本明細書に開示される障害は、がん、より好ましくは、前立腺がん、乳房がん、ｃＨＬ、精巣がん、または、結腸直腸がんである。好ましくは、この障害は、前立腺がん、乳房がん、または、ｃＨＬである。好ましくは、この障害は、アルツハイマー病である。
【００２３】
好ましくは、参照サンプルは、障害に対する処置における良好な反応、または、不十分な反応を有する１または複数の個体に由来するものである。
【００２４】
本明細書に開示される方法の好ましい態様では、このｎｃＲＮＡは、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、ｓｎｏＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｓｉＲＮＡ、核内低分子（ｓｎＲＮＡ）、Ｙ　ＲＮＡ、ヴォールトＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、ｐｉｗｉＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）から選択され、このｎｃＲＮＡは、好ましくは、ｍｉＲＮＡから選択される。
【００２５】
本明細書に開示される方法の好ましい態様では、この体液は、尿または血液である。
【００２６】
本明細書に開示される方法の好ましい態様では、これら２つの異なる変種は、
それぞれが、
標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ａ、
標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
３’末端ＮＴＡ－Ｇおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
３’末端ＮＴＡ－Ｇおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
３’末端ＮＴＡ－Ｇおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
３’末端ＮＴＡ－Ｃおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
３’末端ＮＴＡ－Ｃおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
３’末端ＮＴＡ－Ｕおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
標準配列および５’末端トリミングされた、
標準配列および３’末端トリミングされた、
５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、

３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
３’末端トリミングされたおよび５’末端トリミングされた、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
伸長されたおよび５’末端トリミングされた、
伸長されたおよび３’末端トリミングされた、
５’末端または３’末端トリミングされた、および、５’末端または３’末端伸長された、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ａ、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
（トリミング、および／または、伸長された）および標準配列、のいずれかから選択される。

【００２７】

本明細書に開示される方法の好ましい態様では、バイオマーカー対のｎｃＲＮＡは、それぞれ、少なくとも１６ヌクレオチドを含む。

【００２８】

図１２は、本発明のバイオマーカー対の一実施形態を例示したものである。表１は、一方のバイオマーカーが標準配列であり、他方のバイオマーカーが、それぞれの３’末端ＮＴＡ－Ａ変種、例えば、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｇ－５ｐ標準配列、および、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｇ－５ｐ　３’末端ＮＴＡ－Ａであることを開示するものである。したがって、表１Ａは、９つの別個のバイオマーカー対を開示する。表１Ｂは、５つの別個のバイオマーカー対（例えば、ｈｓａ－ｍｉＲ－２００ｃ－３ｐ標準配列、および、ｈｓａ－ｍｉＲ－２００ｃ－３ｐ　３’末端ＮＴＡ－Ｕ）を開示し、表１Ｃは、４つの別個のバイオマーカー対（例えば、ｈｓａ－ｍｉＲ－２０４－５ｐ標準配列、および、ｈｓａ－ｍｉＲ－２０４－５ｐ　３’末端ＮＴＡ－Ｃ）を開示し、表１Ｄは、９つの別個のバイオマーカー対（例えば、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｆ－５ｐ標準配列、および、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｆ－５ｐ　３’末端ＮＴＡ－Ｇ）を開示し、表１Ｅは、１１つの別個のバイオマーカー対（例えば、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｆ－５ｐ標準配列、および、３’末端トリミングされたｈｓａ－ｌｅｔ－７ｆ－５ｐ）を開示し、表１Ｆは、３つの別個のバイオマーカー対（例えば、ｈｓａ－ｍｉＲ－１８１ｂ－５ｐ標準配列、および、５’末端トリミングされたｈｓａ－ｍｉＲ－１８１ｂ－５ｐ）を開示する。

【００２９】

本明細書に開示される方法の好ましい態様では、バイオマーカー対は、図１２中に示されるバイオマーカー対のうち、１つから選択される。バイオマーカー対は、好ましくは、表１Ａから選択される。バイオマーカー対は、好ましくは、表１Ｂから選択される。バイオマーカー対は、好ましくは、表１Ｃから選択される。バイオマーカー対は、好ましくは、表１Ｄから選択される。バイオマーカー対は、好ましくは、表１Ｅから選択される。バイオマーカー対は、好ましくは、表１Ｆから選択される。

【００３０】

図２１は、本発明のバイオマーカー対のさらなる実施形態を例示したものである。表２は、前立腺がんを特徴付けるために有用であるｔＲＮＡバイオマーカー対を示す。表２は、一方のバイオマーカーが標準配列であり、他方のバイオマーカーがそれぞれのバリアント（変種）であることを開示するものである。特に、これらのバイオマーカー対は、尿に含まれるバイオマーカー対を決定する方法において有用である。表４および表１０は、ｃＨＬを特徴付けるために有用であるｍｉＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。特に

、これらのバイオマーカーは、血液から抽出されたエキソソーム小胞に含まれるバイオマーカー対を決定する方法において有用である。表４および表１０は、一方のバイオマーカーが標準配列であり、他方のバイオマーカーがそれぞれのバリアントであることを開示するものである。表５および表１１は、ｃＨＬを特徴付けるために有用であるｍｉＲＮＡバイオマーカー対を示す。特に、これらのバイオマーカー対は、血液から抽出されたタンパク質画分に含まれるバイオマーカー対を決定する方法において有用である。表５および表１１は、一方のバイオマーカーが標準配列であり、他方のバイオマーカーがそれぞれのバリアントであることを開示するものである。表６は、乳房がんを特徴付けるために有用であるｍｉＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。特に、これらのバイオマーカー対は、血液サンプルに含まれるバイオマーカー対を決定する方法において有用である。表６は、一方のバイオマーカーが標準配列であり、他方のバイオマーカーがそれぞれのバリアントであることを開示するものである。表７は、精巣胚細胞腫瘍を特徴付けるために有用であるｍｉＲＮＡバイオマーカー対を示す。表７は、一方のバイオマーカーが標準配列であり、他方のバイオマーカーがそれぞれのバリアントであることを開示するものである。表８は、結腸直腸がんにおいて有用なｍｉＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。表８は、一方のバイオマーカーが標準配列であり、他方のバイオマーカーがそれぞれのバリアントであることを開示するものである。表９は、アルツハイマー病において有用であるｍｉＲＮＡバイオマーカー対を示す。表９は、一方のバイオマーカーが標準配列であり、他方のバイオマーカーがそれぞれのバリアントであることを開示するものである。特に、これらのバイオマーカー対は、血液サンプルに含まれるバイオマーカー対を決定する方法において有用である。

【００３１】

本明細書に開示される方法の好ましい態様では、このバイオマーカー対は、表１、２、または表４～表１１から、好ましくは、表１、表２、表４、表５、表６および表９～表１１から選択される。

【００３２】

好ましくは、本明細書に開示された方法では、前記ｎｃＲＮＡの２つの異なる変種の量は、体液サンプルから精製されたエキソソーム小胞から決定される。好ましくは、本明細書に開示された方法では、前記ｎｃＲＮＡの２つの異なる変種の量は、体液サンプルから精製されたタンパク質画分から決定される。このエキソソーム小胞またはタンパク質画分は、好ましくは、体液サンプルをサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）に供することによって精製される。

【００３３】

本発明のさらなる一態様では、個体における古典的ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）の状態を特徴付けるための方法が提供され、この方法は、個体に由来する体液サンプル由来の１または複数のｍｉＲＮＡの量を決定するステップと、１または複数のｍｉＲＮＡの量を参照サンプルと比較するステップとを含み、１または複数のｍｉＲＮＡの存在または量の差異は、個体の状態を特徴付ける。個体の健康状態に関するデータを収集するための方法もまた提供され、この方法は、個体に由来する体液サンプル由来の１または複数のｍｉＲＮＡの量を決定するステップと、１または複数のｍｉＲＮＡの量を参照サンプルと比較するステップを含む。このデータは、個体における古典的ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）の状態を特徴付けるために使用される。

【００３４】

これらの方法で使用される１または複数のｍｉＲＮＡは、表３から選択される。

【００３５】

この１または複数のｍｉＲＮＡは、好ましくは、ｍｉＲ２１－５ｐ、ｌｅｔ７ａ－５ｐ、ｍｉＲ１２７－３ｐおよびｍｉＲ１５５－５ｐから選択される。

【００３６】

表３は、個体における古典的ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）の状態を特徴付けるために有用であるｍｉＲＮＡを示す。特に、これらのバイオマーカーは、血液から抽出されたタン

パク質画分に含まれるバイオマーカー対を決定する方法において有用である。この方法は、好ましくは、個体がｃＨＬに罹患しているかどうかを決定することによって、ｃＨＬの状態を特徴付ける。

【００３７】

参照サンプルは、好ましくは、１または複数の健康な個体に由来するものである。

【００３８】

この参照サンプルは、好ましくは、ｃＨＬを有する１または複数の個体に由来するものである。

【００３９】

ｃＨＬの状態を特徴付けることは、好ましくは、ｃＨＬに対する処置を受けている個体において処置の効力を決定するステップを含む。参照サンプルは、好ましくは、ｃＨＬに対する処置を受ける前と同じ個体に由来するものである。

【００４０】

ｃＨＬの状態を特徴付けることは、好ましくは、ｃＨＬに罹患している個体の予後を決定するステップを含む。参照サンプルは、好ましくは、この障害に対する処置における良好な反応を有する１もしくは複数の個体に由来するもの、またはこの障害に対する処置に対する不十分な反応を有する１もしくは複数の個体に由来するものである。

【００４１】

好ましい実施形態では、これらの方法は、体液サンプルからエキソソーム小胞を精製するステップと、精製されたエキソソーム小胞と関連する１または複数のｍｉＲＮＡの量を決定するステップとをさらに含む。好ましい実施形態では、これらの方法は、体液サンプルからタンパク質画分を精製するステップと、精製されたエキソソーム小胞と関連する１または複数のｍｉＲＮＡの量を決定するステップとをさらに含む。この精製は、好ましくは、体液サンプルをサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）に供することを含む。エキソソーム小胞は、好ましくは、空隙容量画分を取得することによって単離される。

【００４２】

好ましい実施形態では、この体液は血液である。

【００４３】

本明細書に開示された方法は、好ましくは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで実施される。特に、関連するバイオマーカーを定量化するステップはｉｎ　ｖｉｔｒｏで実施される。

【図面の簡単な説明】

【００４４】

【図１Ａ】Ｂ細胞、および、そのエキソソームに由来する低分子ＲＮＡレパートリーを示す図である。サンプルの特性およびＲＮＡ－ｓｅｑデータの概要を示す図である。ｃＤＮＡライブラリーは、細胞およびエキソソームの低分子ＲＮＡ画分から作製されたものである。目的のゲノム（ヒトゲノムである、ｈｓｇ１９）へのマッピング前後の全てのライブラリーからの総リード数を指定する。ヒトゲノムにマッピングされたＲＮＡエレメントにアノテーションを付けるために、現在公知のデータベース１）ｍｉＲＢａｓｅバージョン１９に由来する成熟ｍｉＲＮＡおよびｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの配列、２）０６／０２／２０１３にダウンロードされたＮＣＢＩ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　ＳｅｑｕｅｎｃｅｓのヒトＲｅｆＳｅｑ遺伝子、３）ゲノムｔＲＮＡデータベースに由来するｔＲＮＡ配列、４）ＵＣＳＣからダウンロードしたＲｅｐｅａｔＭａｓｋｅｒアルゴリズムによって検出されたリピートに由来する配列（Ｒｅｐｅａｔ　Ｄｅｒｉｖｅｄ　ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ）、５）ＮＣＢＩヌクレオチドのデータベースからダウンロードしたｐｉｗｉＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）、に対して全てのマッピングされたリード（塩基配列）を分析した図である。

【図１Ｂ】細胞およびエキソソームの低分子ＲＮＡ画分から作製されたｃＤＮＡライブラリーを示す図である。ＲＮＡシーケンシングライブラリーを作成するために使用したサンプル群、細胞株、およびサンプル画分の型が示される。

【図１Ｃ】細胞およびエキソソーム画分に由来する全てのマッピングされたリードを、それらが由来する細胞転写物へのアノテーションによってグループ分けし、マッピングされ

たリードの分布頻度として％で示した図である。
【図２Ａ】ｍｉｃｒｏＲＮＡがエキソソーム中に非ランダムに取り込まれることを示す図である。ｍｉＲＮＡを、正規化（リード／１００万、ＲＰＭはｒｅａｄｓ　ｐｅｒ　ｍｉｌｌｉｏｎの略である）後に、細胞から放出されたｍｉＲＮＡの量と細胞中に保持された量との間の比率に従って、ｘ軸に示された５つの群に分類したものである。データは、５つの群にわたって分布したｍｉＲＮＡ画分の百分率としてプロットされている。
【図２Ｂ】エキソソームおよび細胞中の有意に過剰発現されたｍｉＲＮＡを、ｘ軸において示し、それらのリードの存在量が、ｙ軸（対数目盛）で１００リード／１００万（正規化、ＲＰＭ）を超えるものを示すものであるエラーバーは、平均のＳＤである（ＬＣＬ１～３サンプルであるから、ｎ＝３である）。
【図２Ｃ】エキソソームおよび細胞中の有意に過剰発現されたｍｉＲＮＡを、ｘ軸において示し、それらのリードの存在量が、ｙ軸（対数目盛）で１００リード／１００万（正規化、ＲＰＭ）を超えるものを示すものであるエラーバーは、平均のＳＤである（ＬＣＬ１～３サンプルであるから、ｎ＝３である）。
【図２Ｄ】ステムーループベースのｑＲＴ－ＰＣＲによるＬＣＬ細胞およびそれらの対になったエキソソームにおけるｍｉＲＮＡ検出を示すものである。データは、２つの独立した実験からのｍｉＲ－９２ａのＣｔ値に対して正規化された技術的反復実験のΔΔＣｔ値を示す。
【図３Ａ】ｍｉｃｒｏＲＮＡがバーキットリンパ腫エキソソーム中に非ランダムに取り込まれることを示す図である。ＢＬ（ＢＬ１および２）のエキソソームおよび細胞画分に由来するｍｉＲＮＡを、ＬＣＬサンプルとして分析する。ｅｄｇｅＲ分析により、エキソソームにおける、統計的に有意に過剰発現されたｍｉＲＮＡが得られ、それらのリードの存在量は、１００リード／１００万（正規化、ＲＰＭ）を超える（。ｙ軸は、非ランダムに分布したｍｉＲＮＡの相対的な存在量を示す。有意に排除され、または、保持されているｍｉＲＮＡは、それらの保持された、または、排除された等価物と比較される。エラーバーはＳＤであり（ｎ＝２）、ｙ軸は対数目盛である。
【図３Ｂ】ｍｉｃｒｏＲＮＡがバーキットリンパ腫エキソソーム中に非ランダムに取り込まれることを示す図である。ＢＬ（ＢＬ１および２）のエキソソームおよび細胞画分に由来するｍｉＲＮＡを、ＬＣＬサンプルとして分析する。ｅｄｇｅＲ分析により、細胞における統計的に有意に過剰発現されたｍｉＲＮＡが得られ、それらのリードの存在量は、１００リード／１００万（正規化、ＲＰＭ）を超える（。ｙ軸は、非ランダムに分布したｍｉＲＮＡの相対的な存在量を示す。有意に排除され、または、保持されているｍｉＲＮＡは、それらの保持された、または、排除された等価物と比較される。エラーバーはＳＤであり（ｎ＝２）、ｙ軸は対数目盛である。
【図４Ａ】ＥＢＶでコードされたｍｉＲＮＡは、ヒトｍｉＲＮＡよりも細胞を保持する傾向がより強いことを示す図である。ヒト（ＬＣＬ）およびＥＢＶのｍｉＲＮＡを、正規化（ＲＰＭ）後に、細胞から放出されたｍｉＲＮＡの量と細胞中に保持された量との間の比率に従って、５つの群に分類したものである。データは、５つの群にわたって分布しているｍｉＲＮＡ画分の百分率としてプロットされる。
【図４Ｂ】ヒト（ＬＣＬ１）およびＥＢＶのｍｉＲＮＡを、正規化（ＲＰＭ）後に、細胞から放出されたｍｉＲＮＡと細胞中に保持されたｍｉＲＮＡとの間の変化倍数（エキソ／細胞がｌｏｇ２として規定される）に従って分類したものである。細胞保持またはエキソソーム関連放出における４倍以上増加しているｍｉＲＮＡ画分を垂直線によって示す。赤い線は、ヒトｍｉＲＮＡ（灰色）間のウイルスｍｉＲＮＡの分布を示す。
【図５Ａ】個体のＬＣＬサンプル（ＬＣＬ１、２および３、細胞対エキソソーム）における成熟ｍｉＲＮＡおよびそれらのアイソフォームの分布を示す図である。Ａ）アノテーションされたｍｉＲＮＡ配列にマッピングされた各ライブラリーにおいて検出された全てのｍｉＲＮＡについてのシーケンシングリードを、成熟（標準配列）ｍｉＲＮＡおよびアイソフォーム配列についてさらに細分したものを示す。それらは、転写後修飾されたアイソフォーム（非テンプレート型ヌクレオチド付加；ＮＴＡ）および転写後修飾されていない

アイソフォーム（トランケーションおよび延長）へと、さらに下位に細分される。
【図５Ｂ】サンプルは、（成熟ｍｉＲＮＡ対アイソフォームについて）サンプル当たりの個々のｍｉＲＮＡに割り当てられた全てのリードの合計の百分率に対してプロットされる。
【図５Ｃ】サンプルは、ＮＴＡを有する全てのｍｉＲＮＡのリードの合計に対してプロットされる。
【図６】細胞とエキソソームとの間のｍｉＲＮＡのバリアント分布に対する３’末端ＮＴＡ型の影響についての統計分析および有意性を示す図である。ｐ値は、１２全てのサンプルにおいて発現された１１８のｍｉＲＮＡについて偽発見率を補正したものである。ｐ値は、細胞とエキソソームとの間の各ＮＴＡ（Ａ、Ｕ、Ｃ、Ｇ）のカウント割合を比較するロジスティックモデルから導出されている。各グラフの丸の色は、影響の方向を示す。なお、エキソ＞細胞とは、そのデータが、細胞と比較してエキソソームにおけるより大きい割合を示すことを意味し、エキソ＜細胞とは、そのデータが、エキソソームと比較して細胞におけるより大きい割合を示すことを意味する。これらの結果においては、３’末端アデニル化ｍｉＲＮＡアイソフォームが優先的に保持される（カイ二乗検定、ｐ＜０．０５）一方で、他の全てのＮＴＡが優先的に放出されることを示している（３’末端－Ｕは、カイ二乗検定、ｐ＝０．０２、３’末端－Ｃは、フィッシャー直接検定、ｐ＝０．０４、３’末端－Ｇはフィッシャー直接検定、ｐ＝０．０２である）。
【図７Ａ】３’末端の転写後修飾は、ｍｉＲＮＡの保持または放出を定義することを示す図である。ＬＣＬサンプルにおける成熟ｍｉＲＮＡおよびそれらの ＮＴＡ修飾または未修飾アイソフォームの分布を、細胞とエキソソームとの間で比較したものである。エラーバーは、平均のＳＤである（ＬＣＬ１～３サンプルであり、ｎ＝３である）。また、＊Ｐ値＝０．００５（スチューデントｔ検定）である。
【図７Ｂ】３’末端の転写後修飾は、ｍｉＲＮＡの保持または放出を定義することを示す図である。ＬＣＬサンプルにおける成熟ｍｉＲＮＡおよびそれらの ＮＴＡ修飾または未修飾アイソフォームの分布を、細胞とエキソソームとの間で比較したものである。エラーバーは、平均のＳＤである（ＬＣＬ１～３サンプルであり、ｎ＝３である）。また、＊Ｐ値＝０．００５（スチューデントｔ検定）である。
【図７Ｃ】個々のＬＣＬ細胞ライブラリーとエキソソームのライブラリーとの間でのｍｉＲ－４８６－５ｐの分布を示すものである。ｍｉＲ－４８６－５ｐにマッピングされた全てのシーケンシングリードを合計し、ｍｉＲ－４８６－５ｐのアイソフォーム型の寄与は、百分率として示される。
【図７Ｄ】ｑＰＣＲによる、細胞（ＬＣＬ）およびエキソソームＲＮＡ画分における標準配列のｍｉＲ－４８６－５ｐ、３’末端アデニル化ｍｉＲ－４８６－５ｐ（３’－ＡＡＡ）、３’末端ウリジル化ｍｉＲ－４８６－５ｐ（３’－ＵＵＵ）の検出を示すものである。データは、２つの独立した実験からの技術的複製の平均サイクル閾値（Ｃｔ）値を示す（エラーバーはＳＤである）。
【図８Ａ】３’末端アデニル化の程度は保持を増加させるが、３’末端ウリジル化はエキソソームの低分子ＲＮＡ輸送の境界を定めることを示す図である。３’末端－Ａおよび３’末端－Ｕアイソフォームのペアワイズ分析の頻度プロットを示すものである。細胞およびエキソソームの両方において発現することが見出されたｍｉＲＮＡを、それらのアデニル化リードおよびウリジル化リードの分布分析のために選択し（＞３００リードにおいて、１００のｍｉＲＮＡ）、全てのＮＴＡ修飾されたリードの合計に対する百分率として表したもの。赤い丸は、エキソソームにおいてより高い百分率を有するアイソフォームを示し、紫の丸は、細胞においてより高い百分率を有するアイソフォームを示し、白い丸は、等しい分布を示す。
【図８Ｂ】ヒトｍｉＲＮＡおよびウイルスｍｉＲＮＡの画分について、アデニル化リード（３’末端－Ａ）と同じｍｉＲＮＡの非アデニル化リードと対照して保持または放出傾向を測定したものを示す。アデニル化ｍｉＲＮＡは、保持される可能性が高く、これは、付加されたアデニンの数とともに増加する。

【図８Ｃ】ヒトｍｉＲＮＡおよびウイルスｍｉＲＮＡの画分について、アデニル化リード（３’末端－Ａ）と同じｍｉＲＮＡの非アデニル化リードと対照して保持または放出傾向を測定したものを示す。アデニル化ｍｉＲＮＡは、保持される可能性が高く、これは、付加されたアデニンの数とともに増加する。
【図８Ｄ】３’末端－Ａおよび３’末端－Ｕアイソフォームのペアワイズ分析の頻度プロットを示すものである。細胞およびエキソソームの両方において発現することが見出されたｍｉＲＮＡを、それらのアデニル化リードおよびウリジル化リードの分布分析のために選択し（＞３００リードにおいて、１００のｍｉＲＮＡ）、全てのＮＴＡ修飾されたリードの合計に対する百分率として表したもの。赤い丸は、エキソソームにおいてより高い百分率を有するアイソフォームを示し、紫の丸は、細胞においてより高い百分率を有するアイソフォームを示し、白い丸は、等しい分布を示す。
【図８Ｅ】アデニル化ではなく３’末端ウリジル化は、ＬＣＬエキソソーム、ＢＬエキソソーム、ヒト尿エキソソーム中に存在するｍｉＲＮＡアイソフォーム上で、より高頻度で発生することを示す。棒グラフは、３’末端ＮＴＡを有するサンプル（エキソソームのみ）当たりのアイソフォームリードの加重平均を示すものであり、ヌクレオチド型はｘ軸上に示される。エラーバーは、ＬＣＬについて３サンプル（ｎ＝３）、ｐ＝０．００５であり、ＢＬについて２サンプル（ｎ＝２）、ｐ＝０．００１であり、ヒト尿に由来するものについて６サンプル（ｎ＝６）、ｐ＜０．０００１（スチューデントｔ検定）の、ＳＤである。
【図８Ｆ】アデニル化ではなく３’末端ウリジル化は、ＬＣＬエキソソーム、ＢＬエキソソーム、ヒト尿エキソソーム中に存在するｍｉＲＮＡアイソフォーム上で、より高頻度で発生することを示す。棒グラフは、３’末端ＮＴＡを有するサンプル（エキソソームのみ）当たりのアイソフォームリードの加重平均を示すものであり、ヌクレオチド型はｘ軸上に示される。エラーバーは、ＬＣＬについて３サンプル（ｎ＝３）、ｐ＝０．００５であり、ＢＬについて２サンプル（ｎ＝２）、ｐ＝０．００１であり、ヒト尿に由来するものについて６サンプル（ｎ＝６）、ｐ＜０．０００１（スチューデントｔ検定）の、ＳＤである。
【図９Ａ】３’末端の転写後修飾は、プロセシングされた低分子ｎｃＲＮＡの分布に影響を与えることを示す図である。３’末端アデニル化を有するＹ　ＲＮＡ断片は、細胞画分とエキソソーム画分との間で示差的に分布することを示す。ＲＮＹ１、ＲＮＹ３、ＲＮＹ４およびＲＮＹ５から誘導されたプロセシングされたＹ　ＲＮＡ断片に対応するＲＮＡ画分（ｘ軸）が、３’末端修飾を有するＲＮＡ断片の百分率に対してプロットされている。
【図９Ｂ】３’末端の転写後修飾は、プロセシングされた低分子ｎｃＲＮＡの分布に影響を与えることを示す図である。３’末端ウリジル化を有するＹ　ＲＮＡ断片（右パネル）は、細胞画分とエキソソーム画分との間で示差的に分布することを示す。ＲＮＹ１、ＲＮＹ３、ＲＮＹ４およびＲＮＹ５から誘導されたプロセシングされたＹ　ＲＮＡ断片に対応するＲＮＡ画分（ｘ軸）が、３’末端修飾を有するＲＮＡ断片の百分率に対してプロットされている。
【図１０】低分子ＲＮＡシーケンシングによって尿エキソソームにおいて同定されたマッピングされたリードのリストを示す図である。ヒト尿細胞外小胞に由来するサンプルの特徴およびＲＮＡ－ｓｅｑデータの概要を示す。ｃＤＮＡライブラリーは、尿エキソソームを精製した後に、エキソソーム低分子ＲＮＡ画分から作製されたものである。目的のゲノム（ｈｓｇ１９／ＧＲＣｈ３７、パッチ５）へのマッピング前後の全てのライブラリーから総リード数が指定される。ヒトゲノムにマッピングされたＲＮＡエレメントにアノテーションを付けるために、現在公知のデータベース１）ｍｉＲＢａｓｅバージョン１９由来の成熟ｍｉＲＮＡ配列およびｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ配列、２）２０１３年５月にダウンロードされたＮＣＢＩ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　ＳｅｑｕｅｎｃｅｓのヒトＲｅｆＳｅｑ遺伝子、３）ゲノムｔＲＮＡデータベース由来のｔＲＮＡ配列、４）ＵＣＳＣからダウンロードされたＲｅｐｅａｔＭａｓｋｅｒアルゴリズムによって検出されたリピートに由来する配列５）ＮＣＢＩヌクレオチドのデータベースからダウンロードされたｐｉｗｉＲＮＡ（ｐ

ｉＲＮＡ）、に対して全てのマッピングされたリードを分析した図である。
【図１１Ａ】健康な腎組織生検対腎明細胞がん（腎臓組織）生検を示す図である。ｍｉｃｒｏＲＮＡ多様化を示すものである。アノテーションされたｍｉＲＮＡ配列にマッピングされた各ライブラリーにおいて検出されたシーケンシングリードはグループ分けされ、１つのｍｉＲＮＡとして示される。これらのマッピングされたリードは、成熟（標準的）ｍｉＲＮＡおよびアイソフォーム配列からなる。アイソフォームは、酵素的に修飾されたアイソフォーム（３’末端ＮＴＡ非テンプレート型ヌクレオチド付加）および修飾されていないアイソフォーム（３’末端および５’末端の両方において存在するトランケーションおよび延長）へと、さらに下位に細分される。
【図１１Ｂ】健康な腎組織生検対腎明細胞がん（腎臓組織）生検を示す図である。ＲＮＡＳｅｑによる、腎明細胞がん（ＣＣＲＣ；４つの実験群）からの公に入手可能なデータの分析結果を示すものである。成熟（ｍｉＲＢａｓｅ）配列に基づくデータ分析は、選択されたｍｉＲＮＡについての実験群の間での不十分な区別を示す。
【図１１Ｃ】健康な腎組織生検対腎明細胞がん（腎臓組織）生検を示す図である。４つの全ての実験群におけるｉｓｏｍｉＲと成熟ｍｉＲＮＡとの間の比率により、特に臨床的に関連する群の間における３’末端アデニン付加（アデニル化）の顕著な差異を明らかにした。アデニル化ｍｉＲＮＡの割合の有意差は、臨床的に規定された群間での分離を可能にする。
【図１２】健康な患者対前立腺がん患者を階層化する転写後修飾を示す図である。表には、データが「Ｃ／Ｖ」として示されているが、これらの比率は実際には「Ｖ／Ｃ」として示されている。この変更は、ＳＴＤにもｐ値にも影響しない。
【図１３Ａ】悪性リンパ腫患者において重要な腫瘍組織をモニタリングするための非侵襲的手順を示す図である。左は、処置前の古典的ホジキンリンパ腫患者のＦＤＧ／ＰＥＴ画像を示すものである。黒い矢印は、代謝的に活性な複数の腫瘍の塊を示すものである。右は、同じ患者の融合させたＰＥＴ／ＣＴ画像である。白い矢印は、生きた腫瘍の塊を示すものである。
【図１３Ｂ】悪性リンパ腫患者において重要な腫瘍組織をモニタリングするための非侵襲的手順を示す図である。リンパ腫腫瘍細胞（上の暗褐色）および正常細胞（下の淡褐色）は、ＭＶＢに由来するエキソソームを含む１００ナノメートルの小胞を、循環中に能動的に分泌することを示すものである。これらの細胞外小胞（ＥＶ）は、外部ＲＮＡｓｅから保護されているｍｉＲＮＡを含む。ＥＶによって封入されることに加えて、ｍｉＲＮＡは、タンパク質およびＨＤＬと付随することによって分解に対して保護されるが、これらは重要な腫瘍細胞を反映しない。さらに、瀕死の細胞は、生体分子（すなわち、ＲＮＡ、ＤＮＡ、タンパク質）を循環中に放出する。この図は、Ｈｏｒｉら、２０１３　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｍｅｄからの出典である。
【図１４Ａ】患者の血漿中の最適なｍｉＲＮＡ検出のために、一段階サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって、タンパク質／ＨＤＬから循環細胞外小胞（ＥＶ）を分離することを示す図である。ＥＶサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）カラム（現在、ＩＺＯＮｔｍから市販されている）を示すものである。ｑＥＶカラムは、１～１．５ｍｌの血漿からの循環ＥＶについて再現性のある一段階の単離を可能にし、循環タンパク質／ＨＤＬからそれらを分離する（Ｂｏｉｎｇら、ＪＥＶ　２０１４）。
【図１４Ｂ】患者の血漿中の最適なｍｉＲＮＡ検出のために、一段階サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって、タンパク質／ＨＤＬから循環細胞外小胞（ＥＶ）を分離することを示す図である。セファロースＣＬ－２Ｂ　ＳＥＣを使用してｃＨＬ患者から単離された血漿ＥＶのＥＭ画像を示すものである。サイズバーは、２００ｎｍを示し、ほとんどのＥＶは、１００ｎｍの範囲内であるものの、より大きい（２００ｎｍ）小胞が存在する。
【図１４Ｃ】患者の血漿中の最適なｍｉＲＮＡ検出のために、一段階サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって、タンパク質／ＨＤＬから循環細胞外小胞（ＥＶ）を分離することを示す図である。Ｂと同じ患者の血漿のタンパク質／ＨＤＬ画分のＥＭ画像を示

すものである。ＥＶと似た粒子は観察されない。
【図１４Ｄ】患者の血漿中の最適なｍｉＲＮＡ検出のために、一段階サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって、タンパク質／ＨＤＬから循環細胞外小胞（ＥＶ）を分離することを示す図である。調整可能な抵抗パルスセンシング（Ｔｕｎａｂｌｅ　Ｒｅｓｉｓｔｉｖｅ　Ｐｕｌｓｅ　Ｓｅｎｓｉｎｇ、ＴＲＰＳ）に基づく、ｑＮａｎｏ（ＩＺＯＮｔｍ）を使用した粒子分析を示すものである。ｃＨＬ患者の血漿ＥＶおよびタンパク質／ＨＤＬ画分を、ｑＥＶデバイスを使用して分離する。ＥＶ画分（橙色）には、ＢのＥＭ画像に対応するサイズ分布を有する粒子が非常に豊富に含まれている。
【図１４Ｅ】患者の血漿中の最適なｍｉＲＮＡ検出のために、一段階サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって、タンパク質／ＨＤＬから循環細胞外小胞（ＥＶ）を分離することを示す図である。ＳＥＣによって分離されたＥＶおよびタンパク質／ＨＤＬ画分のＲＴ－ＰＣＲ分析を示すものである。ＥＶ画分９～１２は、ｖｔＲＮＡ１－１について高度に富化されており、タンパク質／ＨＤＬ画分（１９～２２）は、（Ａｒｒｏｙｏら、ＰＮＡＳ　２０１１）と一致するｍｉＲ９２ａについて富化されている。
【図１５Ａ】血漿ＥＶ中の候補ｍｉＲＮＡバイオマーカーの選択および検証を示す図である。小胞に由来するｍｉＲＮＡの階層的クラスタリングを示すものである。ｃＨＬ患者（処置前）および健康な対照に由来するリンパ腫細胞株由来エキソソーム（ｎ＝７）および血漿細胞外小胞のＲＮＡｓｅｑ分析は、明らかに別個のプロファイルを示すものである。
【図１５Ｂ】血漿ＥＶ中の候補ｍｉＲＮＡバイオマーカーの選択および検証を示す図である。血小板、ＰＢＭＣおよびＥＶにおける最も豊富な１０個のｍｉＲＮＡのリスト（Ｐｌｅら、ＰＬｏＳｏｎｅ　２０１２）を示すものである。
【図１５Ｃ】血漿ＥＶ中の候補ｍｉＲＮＡバイオマーカーの選択および検証を示す図である。血漿ＥＶおよびホジキン細胞株由来エキソソーム（Ｌ１２３６）におけるｍｉＲＮＡのレベルの比較により、潜在的なｃＨＬ間質由来および腫瘍関連のｍｉＲＮＡマーカーが得られることを示すものである。示されるｍｉＲＮＡは、ｌｏｇ（ＦＣ）＞１異なる。
【図１５Ｄ】血漿ＥＶ中の候補ｍｉＲＮＡバイオマーカーの選択および検証を示す図である。ｃＨＬ患者（ｎ＝１０）および健康な対照（ｎ＝４）から単離された血漿ＥＶにおける候補となる４つのｍｉＲＮＡバイオマーカーのＲＴ－ＰＣＲデータを示すボックスプロットである。ｍｉＲ１９７３は、ｃＨＬ患者および健康な対照の両方に由来する血漿ＥＶにおいて、豊富に検出される。ｐ値は、両側、スチューデントのｔ検定を使用して算出されたものである。
【図１６Ａ】成功した治療の間において、血漿ＥＶにおけるｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルが減少することを示す図である。初回治療の（ＢＥＡＣＯＰＰ）２サイクル前（左）および後（右）のｃＨＬ患者のＰＥＴ画像。矢印は、代謝的に活性な腫瘍を示すものである。
【図１６Ｂ】成功した治療の間において、血漿ＥＶにおけるｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルが減少することを示す図である。ＲＴ－ＰＣＲ分析は、処置の間のＥＶ関連のｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ－７ａ－５ｐの強い減少（７０％）を示す。ｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ－７ａ－５ｐのレベルは、ｍｉＲ－１９７３に対して正規化され、減少倍数として示される（エラーバー、ＳＥＭ）。
【図１６Ｃ】成功した治療の間において、血漿ＥＶにおけるｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルが減少することを示す図である。ＢＥＡＣＯＰＰ処置の間のｄｅ　ｎｏｖｏ患者（Ｃ）と、ＤＨＡＰ／ＡＤＣによる処置とその後の自己幹細胞移植後に再発した患者（Ｄ）との両方において、ＥＶにおけるｍｉＲ２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルは、ＲＴ－ＰＣＲによって決定されるように減少することを示すものである。ｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ－７ａ－５ｐのレベルは、ｍｉＲ－１９７３に対して正規化され、減少倍数として示される（エラーバー、ＳＥＭ）。
【図１６Ｄ】成功した治療の間において、血漿ＥＶにおけるｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルが減少することを示す図である。ＢＥＡＣＯＰＰ処置の間のｄｅ　ｎｏｖｏ患者（Ｃ）と、ＤＨＡＰ／ＡＤＣによる処置とその後の自己幹細胞移植後に再

発した患者（Ｄ）との両方において、ＥＶにおけるｍｉＲ２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルは、ＲＴ－ＰＣＲによって決定されるように減少することを示すものである。ｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ－７ａ－５ｐのレベルは、ｍｉＲ－１９７３に対して正規化され、減少倍数として示される（エラーバー、ＳＥＭ）。

【図１６Ｅ】成功した治療の間において、血漿ＥＶにおけるｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルが減少することを示す図である。血清ＴＡＲＣレベルの低下によって決定されるように、治療に反応しているｃＨＬ患者においてＥＶにおけるｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルは減少するが（Ｅ）、ＴＡＲＣレベルが高いままであるｃＨＬ患者においてはＥＶにおけるｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルは減少しない（Ｆ）。ｍｉＲ２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルは、ｍｉＲ１９７３に対して正規化され、変化倍数として示される（エラーバー、ＳＥＭ）。

【図１６Ｆ】成功した治療の間において、血漿ＥＶにおけるｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルが減少することを示す図である。血清ＴＡＲＣレベルの低下によって決定されるように、治療に反応しているｃＨＬ患者においてＥＶにおけるｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルは減少するが（Ｅ）、ＴＡＲＣレベルが高いままであるｃＨＬ患者においてはＥＶにおけるｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルは減少しない（Ｆ）。ｍｉＲ２１－５ｐおよびｌｅｔ７ａ－５ｐのレベルは、ｍｉＲ１９７３に対して正規化され、変化倍数として示される（エラーバー、ＳＥＭ）。

【図１７Ａ】血漿ＥＶにおける候補ｍｉＲＮＡバイオマーカーレベルが、追跡期間中、低いままであることを示す図である。ｃＨＬ患者の血漿ＥＶにおけるｍｉＲ－１２７－３ｐ、ｍｉＲ－１５５－５ｐ、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｌｅｔ－７ａ－５ｐのレベルは、ＢＥＡＣＯＰＰ処置の間（ｔ＝１ヶ月）およびその後（ｔ＝３ヶ月）に減少し、治療後最大６ヵ月間、低いままである。ｍｉＲＮＡレベルは、ｍｉＲ－１９７３に対して正規化され、減少倍数として示される（エラーバー、ＳＥＭ）。

【図１７Ｂ】血漿ＥＶにおける候補ｍｉＲＮＡバイオマーカーレベルが、追跡期間中、低いままであることを示す図である。ＲＴ－ＰＣＲ分析は、健康なドナーの血漿ＥＶにおけるｍｉＲ－２１－５ｐ、ｌｅｔ－７ａ－５ｐのレベルが安定していることを示す。データは、Ｃｔ値として示される（エラーバー、ＳＥＭ）。

【図１８】ｃＨＬ血漿ＥＶにおける候補ｍｉＲＮＡの増加したレベルのが、疾患特異的であることを示す図である。ｍｉＲ－１２７－３ｐ、ｍｉＲ－１５５－５ｐ、ｍｉＲ－２１－５ｐおよびｌｅｔ－７ａ－５ｐのＲＴ－ＰＣＲレベルは、健康な対照（ｎ＝４）と比較して、ｃＨＬ患者の血漿ＥＶ（ｎ＝１０）において増加するが、自己免疫（ＳＬＥ）患者（ｎ＝３）においては増加しないことを示すものである。データは、Ｃｔ値として示される（エラーバー、ＳＥＭ）。ｐ値は、両側スチューデントｔ検定を使用して算出される。

【図１９Ａ】健康なドナーおよびホジキン患者の血漿ＥＶにおけるｍｉＲＮＡに対するＮＴＡ分析を示す図である。本発明者らは、健康なドナーおよびｃＨＬ患者由来の複数の血漿に対して、タンパク質および小胞画分の両方においてシーケンシングを実施し、ｓＲＮＡｂｅｎｃｈ（ｈｔｔｐ：／／ａｒｎ．ｕｇｒ．ｅｓ／ｓｒｎａｂｅｎｃｈ／）を用いてデータを分析した。３’末端ＮＴＡがＡまたはＵと定義された全ての同定されたｍｉＲＮＡの割合を示すグラフである。ｃＨＬ　ＥＶ画分のみが、３’末端ウリジル化ｍｉＲＮＡの割合が高いことを示している。

【図１９Ｂ】健康なドナーおよびホジキン患者の血漿ＥＶにおけるｍｉＲＮＡに対するＮＴＡ分析を示す図である。本発明者らは、健康なドナーおよびｃＨＬ患者由来の複数の血漿に対して、タンパク質および小胞画分の両方においてシーケンシングを実施し、ｓＲＮＡｂｅｎｃｈ（ｈｔｔｐ：／／ａｒｎ．ｕｇｒ．ｅｓ／ｓｒｎａｂｅｎｃｈ／）を用いてデータを分析した。Ａと同じであるが、ここでは、データは、ｍｉＲ－４８６－５ｐの３’末端転写後のＮＴＡベースの修飾について差異を示す。

【図１９Ｃ】健康なドナーおよびホジキン患者の血漿ＥＶにおけるｍｉＲＮＡに対するＮＴＡ分析を示す図である。本発明者らは、健康なドナーおよびｃＨＬ患者由来の複数の血漿に対して、タンパク質および小胞画分の両方においてシーケンシングを実施し、ｓＲＮ

Ａｂｅｎｃｈ（ｈｔｔｐ：／／ａｒｎ．ｕｇｒ．ｅｓ／ｓｒｎａｂｅｎｃｈ／）を用いてデータを分析した。Ｂに示されたＲＮＡｓｅｑデータが確認された２人のドナーの種々の画分におけるｍｉＲ４８６－５ｐに対する以前開示された（Ｋｏｐｐｅｒｓ－Ｌａｌｉｃら、２０１４）とおりのＴａｑｍａｎ　ＲＴ－ＰＣＲを行ったもの。

【図２０】ｍｉＲ－９２ａゲノム配列に対してアラインするマッピングされたリードのグラフ表示を示す図である。転写後修飾（ＮＴＡ）および５’末端または３’末端ヌクレオチドの延長／トランケーションは、延長については、下線付き文字で、また、トランケーションについては＊で示される。

【図２１Ａ】バイオマーカーを例示する図である。表２は、前立腺がん（ＰＣａ）患者の尿に由来するｔＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。

【図２１Ｂ】バイオマーカーを例示する図である。表２は、前立腺がん（ＰＣａ）患者の尿に由来するｔＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。

【図２１Ｃ】バイオマーカーを例示する図である。表２は、前立腺がん（ＰＣａ）患者の尿に由来するｔＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。

【図２１Ｄ】バイオマーカーを例示する図である。表２は、前立腺がん（ＰＣａ）患者の尿に由来するｔＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。

【図２１Ｅ】バイオマーカーを例示する図である。表３は、ｃＨＬを特徴付けるためのｍｉＲＮＡを示すものであるものである。

【図２１Ｆ】バイオマーカーを例示する図である。表４および表１０は、健康なドナーおよびｃＨＬ患者の血漿から抽出された細胞外小胞中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示す。

【図２１Ｇ】バイオマーカーを例示する図である。バイオマーカーを例示する図である。表４および表１０は、健康なドナーおよびｃＨＬ患者の血漿から抽出された細胞外小胞中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示す。

【図２１Ｈ】バイオマーカーを例示する図である。バイオマーカーを例示する図である。表４および表１０は、健康なドナーおよびｃＨＬ患者の血漿から抽出された細胞外小胞中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示す。

【図２１Ｉ】バイオマーカーを例示する図である。バイオマーカーを例示する図である。表４および表１０は、健康なドナーおよびｃＨＬ患者の血漿から抽出された細胞外小胞中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示す。

【図２１Ｊ】バイオマーカーを例示する図である。表５および表１１は、健康なドナーおよびｃＨＬ患者の血漿から抽出されたタンパク質画分（ＰＦ）中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。

【図２１Ｋ】バイオマーカーを例示する図である。表５および表１１は、健康なドナーおよびｃＨＬ患者の血漿から抽出されたタンパク質画分（ＰＦ）中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。

【図２１Ｌ】バイオマーカーを例示する図である。表５および表１１は、健康なドナーおよびｃＨＬ患者の血漿から抽出されたタンパク質画分（ＰＦ）中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。

【図２１Ｍ】バイオマーカーを例示する図である。表６は、乳がん患者の血清中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。

【図２１Ｎ】バイオマーカーを例示する図である。表６は、乳がん患者の血清中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。

【図２１Ｏ】バイオマーカーを例示する図である。表６は、乳がん患者の血清中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。

【図２１Ｐ】バイオマーカーを例示する図である。表６は、乳がん患者の血清中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。

【図２１Ｑ】バイオマーカーを例示する図である。表６は、乳がん患者の血清中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。

【図２１Ｒ】バイオマーカーを例示する図である。表６は、乳がん患者の血清中のｎｃＲ

ＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｓ】バイオマーカーを例示する図である。表６は、乳がん患者の血清中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｔ】バイオマーカーを例示する図である。表６は、乳がん患者の血清中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｕ】バイオマーカーを例示する図である。表７は、精巣胚細胞腫瘍におけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｖ】バイオマーカーを例示する図である。表７は、精巣胚細胞腫瘍におけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｗ】バイオマーカーを例示する図である。表７は、精巣胚細胞腫瘍におけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｘ】バイオマーカーを例示する図である。表７は、精巣胚細胞腫瘍におけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｙ】バイオマーカーを例示する図である。表８は、結腸直腸がんにおけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｚ】バイオマーカーを例示する図である。表８は、結腸直腸がんにおけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ａ２】バイオマーカーを例示する図である。表８は、結腸直腸がんにおけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｂ２】バイオマーカーを例示する図である。表８は、結腸直腸がんにおけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｃ２】バイオマーカーを例示する図である。表８は、結腸直腸がんにおけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｄ２】バイオマーカーを例示する図である。表８は、結腸直腸がんにおけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｅ２】バイオマーカーを例示する図である。表８は、結腸直腸がんにおけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｆ２】バイオマーカーを例示する図である。表８は、結腸直腸がんにおけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｇ２】バイオマーカーを例示する図である。表８は、結腸直腸がんにおけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｈ２】バイオマーカーを例示する図である。表８は、結腸直腸がんにおけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｉ２】バイオマーカーを例示する図である。表８は、結腸直腸がんにおけるｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｊ２】バイオマーカーを例示する図である。表９は、アルツハイマー患者の血清中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｋ２】バイオマーカーを例示する図である。表９は、アルツハイマー患者の血清中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｌ２】バイオマーカーを例示する図である。表９は、アルツハイマー患者の血清中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｍ２】バイオマーカーを例示する図である。表９は、アルツハイマー患者の血清中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｎ２】バイオマーカーを例示する図である。表４および表１０は、健康なドナーおよびｃＨＬ患者の血漿から抽出された細胞外小胞中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示す。
【図２１Ｏ２】バイオマーカーを例示する図である。表４および表１０は、健康なドナーおよびｃＨＬ患者の血漿から抽出された細胞外小胞中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示す。
【図２１Ｐ２】バイオマーカーを例示する図である。表４および表１０は、健康なドナー

およびｃＨＬ患者の血漿から抽出された細胞外小胞中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示す。
【図２１Ｑ２】バイオマーカーを例示する図である。表４および表１０は、健康なドナーおよびｃＨＬ患者の血漿から抽出された細胞外小胞中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示す。
【図２１Ｒ２】バイオマーカーを例示する図である。表５および表１１は、健康なドナーおよびｃＨＬ患者の血漿から抽出されたタンパク質画分（ＰＦ）中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｓ２】バイオマーカーを例示する図である。表５および表１１は、健康なドナーおよびｃＨＬ患者の血漿から抽出されたタンパク質画分（ＰＦ）中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【図２１Ｔ２】バイオマーカーを例示する図である。表５および表１１は、健康なドナーおよびｃＨＬ患者の血漿から抽出されたタンパク質画分（ＰＦ）中のｎｃＲＮＡバイオマーカー対を示すものである。
【発明を実施するための形態】
【００４５】
本明細書では、冠詞「１つの（ａ）」および「１つの（ａｎ）」を、１つまたは１よりも多く（即ち、少なくとも１つ）の文法的目的語を指す言葉として使用する。例として、「１つのエレメント（ａｎ　ｅｌｅｍｅｎｔ）」とは、１つのエレメントまたは１よりも多いエレメントを意味する。
【００４６】
本明細書で使用する場合、「体液」とは、血液（または血液の画分、例えば、血漿もしくは血清）、リンパ、粘液、涙、唾液、痰、尿、精液、便、ＣＳＦ（脳脊髄液）、母乳および腹水を含む、ｎｃＲＮＡを含む体液を指す。好ましくは、この体液は尿である。好ましくは、この体液は、血液から選択される。本明細書で使用する場合、「血液」は、血清および血漿も含む。好ましくは、この体液は血漿である。
【００４７】
「バイオマーカー」は、個体の健康状態を予測するのに有用な、さまざまな濃度で個体中に存在する生体分子を指すために使用する。
【００４８】
本明細書では、「含む」およびその活用は、この単語に続く項目が含まれることを意味する非限定的な意味で使用され、具体的に言及されていない項目が排除されないことを意味する。さらに、動詞「～からなる」は、「本質的に～からなる」と置き換えることができ、本明細書に定義されるような化合物または補助的化合物は、具体的に同定されたものよりも多くの成分を含んでいてもよく、この成分が、本発明の独自の特徴を変更しないことを意味するように使用する。
【００４９】
本明細書で使用する場合、「健康状態」とは、特定の時点における個体の全体的（肉体的／生理学的）状態を指す。健康状態には、例えば、神経学的障害（例えば、アルツハイマー病）、がん／腫瘍、感染性疾患、代謝疾患（例えば、アミロイドーシス）、心血管疾患および免疫学的障害などの疾患または障害の有無が含まれる。好ましくは、この障害は、前立腺がん、乳房がん、子宮頚がん、リンパ腫、結腸がん、神経膠芽腫、肺がんから選択される。
【００５０】
健康状態には、また、そのような障害を発症するリスク（即ち、一般的集団、または類似の年齢、遺伝的背景、環境リスク因子などを有する個体と比べて減少または増加したリスクを有すること）も含む。健康状態には、疾患／障害の特定のステージ、ならびに重症度および予後（例えば、生存予後）も含むがこれらに限定されない。健康状態とは、特定の薬剤によって効果的に治療される個体の予後をも指す。「健康状態を分類すること」とは、特定の障害を有するかまたは有さないか、障害を発症するリスクが増加したか、減少

したか、通常のリスクを有するか、特定の治療における良好な反応者であるかまたは不十分な反応者であるか、特定のステージであるかまたは重症度の疾患を有するか、生存または回復予後が良好なまたは不十分であるか、などによって個体が健康なものであるかを分類することを含む。

【００５１】

本明細書で使用する場合、「個体」とは、ヒトおよび動物、例えば、哺乳動物、例えば、飼育動物（例えば、イヌ、ネコ）、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ）または実験動物（例えば、サル、ラット、マウス、ウサギ、モルモット）を指す。好ましくは、個体はヒトである。

【００５２】

本明細書では、「低分子のノンコーディングＲＮＡ」（ｎｃＲＮＡ）とは、タンパク質へと翻訳されないＲＮＡを指し、これらには、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、ｓｎｏＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｓｉＲＮＡ、核内低分子（ｓｎＲＮＡ）、Ｙ　ＲＮＡ、ヴォールトＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、ｔｉＲＮＡ（転写開始ＲＮＡ）、ＴＳＳａ－ＲＮＡ（転写開始部位関連ＲＮＡ）およびｐｉｗｉＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）を含む。低分子ｎｃＲＮＡは、２００ヌクレオチド未満の長さを有する。

【００５３】

好ましくは、このｎｃＲＮＡは、好ましくはｔＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、ＹＲＮＡ、ヴォールトＲＮＡおよびｓｎＲＮＡから選択される、低分子Ｐｏｌ　ＩＩＩ　ＲＮＡである。好ましくは、このｎｃＲＮＡは、ｍｉＲＮＡ、Ｙ　ＲＮＡ、ヴォールトＲＮＡから選択され、より好ましくは、このｎｃＲＮＡはｍｉＲＮＡである。

【００５４】

好ましくは、低分子ｎｃＲＮＡは、本明細書で使用する場合、１６ヌクレオチドと２００ヌクレオチドとの間、より好ましくは１６ヌクレオチドと１００ヌクレオチドとの間、なお、より好ましくは、１６ヌクレオチドと４０ヌクレオチドとの間である。ｎｃＲＮＡは、内因性起源（例えば、ヒトｍｉＲＮＡ）または外因性起源（例えば、ウイルス、細菌、寄生生物）のものである。

【００５５】

「標準配列」のｎｃＲＮＡとは、特定のＲＮＡについて同定された最も豊富な配列である、ゲノム配列から予測されるＲＮＡの配列を指す。ｍｉＲＮＡの場合、これは、「標準ｍｉＲＮＡ経路」を介して形成されるｍｉＲＮＡを指す。前駆体ｍｉＲＮＡ（ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ）は、低分子のヘアピン型ＲＮＡに切断され、次いで、ダイサー酵素によるプロセシングのために細胞質中にエキスポートされる。得られる「標準」成熟ｍｉＲＮＡは、通常、２１～２２ヌクレオチド長である。

【００５６】

「トリミングされた」ｎｃＲＮＡとは、エキソヌクレアーゼ媒介性ヌクレオチドのトリミングによって、その分子の５’末端、および／または、３’末端において１または複数のヌクレオチドが除去されたｎｃＲＮＡを指す。好ましくは、このトリミングは、３’末端トリミングである。好ましくは、１ヌクレオチドが、標準配列の３’末端からトリミングされる。標準配列ｍｉＲＮＡの開始部位および停止部位は公知であるので、トリミングされたｍｉＲＮＡは容易に検出される。トリミングされたｎｃＲＮＡの例は、図２０および図２１（例えば、表１１Ｃを参照のこと）中に示される。

【００５７】

３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加（３’末端ＮＴＡ）とは、通常は、例えば、ＰＡＰＤ４、ＰＡＰＤ５、ＺＣＣＨＣ６およびＺＣＣＨＣ１１のようなＲＮＡヌクレオチジルトランスフェラーゼによる、ＲＮＡの３’末端への１または複数のヌクレオチドの翻訳後の付加を指す（Ｂｕｒｒｏｕｇｈｓら、２０１０；ＰｏｌｉｋｅｐａｈａｄおよびＣｏｒｒｙ、２０１３）。最も一般的な形態は、アデニル化（３’末端ＮＴＡ－Ａ）およびウリジル化（３’末端ＮＴＡ－Ｕ）であるが、シトシンの付加（３’末端ＮＴＡ－Ｃ）

およびグアニンの付加（３’末端ＮＴＡ－Ｇ）も可能である。一般に１つまたは２つのヌクレオチドが付加されるが、３以上のヌクレオチドの付加も可能である。ＮＴＡが生じる前に、標準配列は、任意選択で５’末端または３’末端においてトリミングされる。好ましくは、３’末端ＮＴＡは、３’末端ＮＴＡ－Ａ、３’末端ＮＴＡ－Ｇ、３’末端ＮＴＡ－Ｕおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃから選択される単一ヌクレオチド付加である。３’末端ＮＴＡ　ｎｃＲＮＡの例は、図２０および図２１に示される（例えば、表２Ａを参照のこと）。

【００５８】

「伸長されたｎｃＲＮＡ」とは、標準配列のｍｉＲＮＡよりも長いｍｉＲＮＡを指す言葉として当業界で認識された用語である。伸長を構成するヌクレオチドは、前駆体配列のヌクレオチドに対応するため、したがって、非テンプレート型ヌクレオチド付加とは対照的に、ゲノムによってコードされる。理論に拘泥するつもりはないが、伸長されたｎｃＲＮＡは、異なる前駆体ｍｉＲＮＡプロセシングの結果であると考えられる。一般に、このような伸長は、標準配列のｍｉＲＮＡと比較して、１～５、通常は１～３の余分なヌクレオチドを含む。標準配列のｍｉＲＮＡの開始部位および停止部位は公知であるので、伸長されたｍｉＲＮＡは容易に検出することができる。伸長されたｎｃＲＮＡの例を、図２０および図２１に示す（例えば、表１１Ａを参照のこと）。

【００５９】

ｎｃＲＮＡバリアントは、ｎｃＲＮＡの標準配列、ｎｃＲＮＡの５’末端または３’末端がトリミングされたバージョン、ｎｃＲＮＡの５’末端または３’末端が伸長バージョン、ｎｃＲＮＡの５’末端または３’末端がトリミングされたか、または、ｎｃＲＮＡの５’末端または３’末端が伸長されたバージョン（本明細書で集合的に「長さバリアント」と呼ぶ）、および、３’末端に非テンプレート型ヌクレオチド付加（３’末端ＮＴＡ）を有するｎｃＲＮＡから選択される。本明細書で使用する場合、「ｎｃＲＮＡバリアント」とは、単一のｎｃＲＮＡ遺伝子に由来する配列の群を指す。各バリアントは、例えば、５’末端または３’末端トリミングによって、または３’末端ＮＴＡの有無によって、互いに配列が異なる。これらのバリアントは、同じまたは異なる生物学的機能を有し得る。

【００６０】

理論に拘泥するつもりはないが、トリミングされたｎｃＲＮＡ（すなわち、トランケーションされた）および伸長されたｎｃＲＮＡ（すなわち、延長された）は、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡプロセシングにおいて類似の無効性を生じると考えられる。一部の実施形態では、ｎｃＲＮＡバリアントは、「長さバリアント」、すなわち、トリミングまたは伸長されたｎｃＲＮＡである。例えば、表５Ｂは、１つのバリアントが標準配列の構造であり、第２のバリアントが３’長さバリアントである、バイオマーカー対を例示したものである。一部の実施形態では、長さバリアントを伸長されたｎｃＲＮＡおよびトリミングされたｎｃＲＮＡへ分離することが好ましい。表１１は、同じデータの分析であるが、ここでは、長さバリアントは、伸長（３’末端伸長については表１１Ａを参照のこと）およびトリミングされたｎｃＲＮＡ（３’末端トリミングされたバリアントについては表１１Ｂを参照のこと）へと分割される。

【００６１】

定量化すること、および、定量化は、相互交換可能に使用することができ、サンプル中の物質（例えば、バイオマーカー）の量または存在量を相対的に絶対的に決定するプロセスを指す。例えば、定量化は、マイクロアレイ分析、ｑＲＴ－ＰＣＲ、ノーザンブロットにおけるバンド強度、標的化低分子ＲＮＡシーケンシングが含まれるがこれらに限定されない方法によって、または当業界公知の種々の他の方法によって、決定される。

【００６２】

用語「処置」は、予防的、および／または、治療的処置を含む。「予防的または治療的」という用語には、当業界で認識されており、本発明の組成物のうち１または複数の宿主への投与が含まれる。望ましくない状態（例えば、宿主動物の疾患または他の望ましくない状態）の臨床的症状が顕在化する前に投与される場合、この処置は予防的である（すな

わち、宿主が望ましくない状態を発症することを防止する）が、望ましくない状態が顕在化した後に投与される場合、この処置は治療的である（すなわち、既存の望ましくない状態またはその副作用を減退、寛解または安定化させることを意図している）。

【００６３】

一態様では、本開示は、低分子のノンコーディングＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）のバイオマーカー対を同定するための方法を提供する。好ましくは、これらのｎｃＲＮＡのバイオマーカーは、少なくとも１６ヌクレオチド長のものである。実施例３には、本明細書に記載される方法を使用して同定した、前立腺がんを有する患者から健康な患者を識別するためのバイオマーカー対を記載している。上位のバイオマーカー対が図１２に開示される。

【００６４】

この方法は、ｎｃＲＮＡについて、第１の参照個体から取得された第１の体液サンプル中および第２の参照個体から取得された第２の体液サンプル中の、ｎｃＲＮＡの２つの異なる変種の比率を決定するステップを含み、第１の参照個体は、第２の参照個体から変更された健康状態を有する。

【００６５】

これらの体液サンプルは、１または複数の個体に由来するものであるか、または個体の集団における平均比率であり得る。第１の参照個体（これは、１または複数の個体であってもよく、好ましくは１である）は、第２の参照個体（これは、１または複数の個体であってもよく、好ましくは１である）から変更された健康状態を有する。一部の実施形態では、この第１の参照個体および第２の参照個体は、個体の健康状態が変化した同じ個体に由来するものであり、例えば、これらのサンプルは、処置レジメンの前後において個体から取得される。

【００６６】

診断および予後のバイオマーカーを同定する方法は、当業界において周知である。サンプルの選択は、十分に当業者の技術範囲内であり、同定されるバイオマーカーの型に依存して変動する。

【００６７】

疾患のバイオマーカーの場合、例示的な一実施形態は、第１の参照個体が障害を有する個体に由来するものであり、第２のサンプルが、その障害を有さない参照個体に由来するものであることを提供する。好ましくは、この障害は、がんであり、より好ましくは、子宮頸がん、リンパ腫、結腸がん、神経膠芽腫、肺がん、前立腺がんから選択される。

【００６８】

リスク評価のためのバイオマーカーの場合、例示的な一実施形態は、障害を発症するリスクが増加した個体に由来する第１の参照個体と、リスクが増加していない個体に由来する第２の参照個体とを提供する。例えば、サンプルは、肺がんを発症する前のヘビースモーカーの個体から提供される。比率を分析し、一定の時間、例えば、１または２年の後に、この個体における肺がんの状態がモニタリングされる。

【００６９】

予後バイオマーカーの場合、例示的な一実施形態は、治療が成功した個体に由来する第１の参照個体と、治療が成功しなかった個体に由来する第２のサンプルとを提供する。

【００７０】

ＲＮＡの変種の比率は、当業者に公知の方法によって決定される。

【００７１】

好ましくは、この比率は、各サンプル中の２つの異なる変種を定量化すること、および、２つの量の間の関係性を決定することによって決定される。これは、好ましくは、一方を他方によって除算した商として表され、好ましくは、各変種の存在量が決定される。より好ましくは、各変種の相対的な存在量が決定される。

【００７２】

例示的な一実施形態では、この比率は、（ｎｃＲＮＡ変種２の存在量を標準配列のｎｃＲＮＡの存在量によって除算したもの）によって除算された（ｎｃＲＮＡ変種１の存在量

を標準配列のｎｃＲＮＡの存在量によって除算したもの）である。
【００７３】
ＲＮＡレベルを定量化するための方法は、周知である。プライミングおよび検出を容易にするために、ｎｃＲＮＡにさらなる配列を付加するいくつかの方法が存在する。特に、全てのｎｃＲＮＡに共通配列を付加することで、単一のユニバーサル伸長プライマーの使用を可能にすることができる。特に、ＱＰＣＲベースのｎｃＲＮＡ検出方法は、逆転写の前またはその間に、ｍｉＲＮＡにさらなる配列を付加してその長さを増加させる。低分子ＲＮＡに対してＰＣＲアッセイを実施するいくつかの市販のシステム（例えば、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｃｕｓｔｏｍ ＴａｑＭａｎ（登録商標）Ｓｍａｌｌ ＲＮＡ ＡｓｓａｙｓおよびＥｘｉｑｏｎのｍｉＲＣＵＲＹ ＬＮＡ（商標）ｍｉｃｒｏ ＲＮＡ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ）もまた存在する。好ましくは、ＲＮＡレベルを定量化するための方法は、「ディープシーケンシング」である。これは、ＲＮＡ分子の配列および頻度の両方を提供する方法を指す（例えば、一般的方法および特異的アダプター修飾については、米国特許出願公開２０１２／０３２２６９１号明細書を参照のこと）。
【００７４】
これらの方法は、第１の体液サンプルからの比率と第２の体液サンプルからの比率とを比較するステップと、第１の体液サンプルと第２の体液サンプルとの間で比率が変更されている場合、ｎｃＲＮＡの２つの異なる変種をバイオマーカー対として同定するステップとをさらに含む。第１のサンプルと第２のサンプルとの間で変更された比率は、ｎｃＲＮＡバイオマーカーとしてこのｎｃＲＮＡを同定する。より正確には、２つのｎｃＲＮＡ変種は、バイオマーカーとして集合的に同定される。変更された比率は、２つのサンプル中の比率の間における統計的に有意な差異である。好ましくは、第１のサンプルからの比率が、第２のサンプルの約１．０標準偏差、約１．５標準偏差、約２．０標準偏差、約２．５標準偏差の範囲外に入る場合に変更された比率が示される。
【００７５】
これらのｎｃＲＮＡ変種は、ｎｃＲＮＡの標準配列、ｎｃＲＮＡの５’末端または３’末端がトリミングされたバージョン、ｎｃＲＮＡの５’末端または３’末端が伸長されたバージョン、ｎｃＲＮＡの５’末端または３’末端がトリミングされた、またはｎｃＲＮＡの５’末端または３’末端が伸長されたバージョン（即ち、「長さバリアント」）、および３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加（３’末端ＮＴＡ）を有するｎｃＲＮＡから選択される。好ましくは、第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡから選択され、第２の変種は、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡであり、ｎｃＲＮＡがｍｉＲＮＡである場合、第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端においてトリミングされたｎｃＲＮＡ、および任意選択で５’末端または３’末端においてトリミングされた、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、第２の変種は、５’末端または３’末端においてトリミングされたｎｃＲＮＡ、および任意選択で５’末端または３’末端においてトリミングされた、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択される。この比率は、同じｎｃＲＮＡの２つの異なる変種についてのものであることは明らかである。
【００７６】
例示的な実施形態では、この比率は、
標準配列：３’末端ＮＴＡ－Ａ、標準配列：３’末端ＮＴＡ－Ｇ、標準配列：３’末端ＮＴＡ－Ｃ、標準配列：３’末端ＮＴＡ－Ｕ、３’末端ＮＴＡ－Ｇ：３’末端ＮＴＡ－Ｃ、３’末端ＮＴＡ－Ｇ：３’末端ＮＴＡ－Ｕ、３’末端ＮＴＡ－Ｇ：３’末端ＮＴＡ－Ａ、３’末端ＮＴＡ－Ｃ：３’末端ＮＴＡ－Ｕ、３’末端ＮＴＡ－Ｃ：３’末端ＮＴＡ－Ａ、３’末端ＮＴＡ－Ｕ：３’末端ＮＴＡ－Ａ、標準配列：５’末端トリミング、標準配列：３’末端トリミング、５’末端トリミング：３’末端ＮＴＡ－Ｃ、５’末端トリミング：３’末端ＮＴＡ－Ｕ、５’末端トリミング：３’末端ＮＴＡ－Ａ、５’末端トリミング：３’末端ＮＴＡ－Ｇ、３’末端トリミング：３’末端ＮＴＡ－Ｃ、３’末端トリミング：３’末端ＮＴＡ－Ｕ、３’末端トリミング：３’末端ＮＴＡ－Ａ、３’末端トリミング：

３’末端ＮＴＡ－Ｇ、３’末端トリミング：５’末端トリミング、伸長および３’末端ＮＴＡ－Ａ、伸長および３’末端ＮＴＡ－Ｇ、伸長および３’末端ＮＴＡ－Ｃ、伸長および３’末端ＮＴＡ－Ｕ、伸長および５’末端トリミング、伸長および３’末端トリミング、５’末端または３’末端トリミングおよび５’末端または３’伸長、（トリミングおよび伸長）および３’末端ＮＴＡ－Ｕ、（トリミングおよび伸長）および３’末端ＮＴＡ－Ａ、（トリミングおよび伸長）および３’末端ＮＴＡ－Ｇ、（トリミングおよび伸長）および３’末端ＮＴＡ－Ｃ、（トリミングおよび伸長）および標準配列から選択される。好ましくは、この比率は、標準配列：３’末端ＮＴＡまたは３’末端ＮＴＡ：異なる３’末端ＮＴＡから選択される。比率における分子および分母が逆転され得ることは、当業者に明らかである。好ましくは、ｎｃＲＮＡはｍｉＲＮＡである。

【００７７】

例示的実施形態では、この比率は、標準配列：３’末端ＮＴＡ－Ａ、標準配列：３’末端ＮＴＡ－Ｇ、標準配列：３’末端ＮＴＡ－Ｃ、標準配列：３’末端ＮＴＡ－Ｕ、３’末端ＮＴＡ－Ｇ：３’末端ＮＴＡ－Ｃ、３’末端ＮＴＡ－Ｇ：３’末端ＮＴＡ－Ｕ、３’末端ＮＴＡ－Ｇ：３’末端ＮＴＡ－Ａ、３’末端ＮＴＡ－Ｃ：３’末端ＮＴＡ－Ｕ、３’末端ＮＴＡ－Ｃ：３’末端ＮＴＡ－Ａ、および３’末端ＮＴＡ－Ｕ：３’末端ＮＴＡ－Ａから選択される。比率における分子および分母が逆転され得ることは、当業者に明らかである。

【００７８】

本開示は、ｎｃＲＮＡバイオマーカーの予測性能が、ｎｃＲＮＡの２つの変種の比率を調べることによって改善され得ることを実証している。実施例２は、４つの異なるｍｉＲＮＡの標準配列では、健康な組織と腎がんとを識別できないことを実証している。しかし、３’末端ＮＴＡ－Ａと、標準ｍｉＲＮＡとの比率が使用される場合、これら同じ４つのｍｉＲＮＡについて臨床的に関連する群を識別することができる。

【００７９】

したがって、本開示は、低分子のノンコーディングＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）のバイオマーカー対を使用して、個体の健康状態を分類するための方法、および、個体の健康状態に関するデータを収集するための方法もまた提供する。ｎｃＲＮＡ対は、任意の公知のｎｃＲＮＡバイオマーカー、または、例えば、本明細書に記載される方法によって同定されたものに基づくことができる。好ましくは、各ｎｃＲＮＡバイオマーカーは、少なくとも１６ヌクレオチド長である。バイオマーカーとしての使用について、種々のｎｃＲＮＡ分子（特に）ｍｉＲＮＡが示唆されている（例えば、黒色腫のマーカーについては国際公開２００９／０９９９０５号公報、肺疾患のマーカーについては国際公開２０１１／０２５９１９号公報、アルツハイマー病のマーカーについては国際公開２０１３／００３３５０号公報、気道疾患のマーカーについては米国特許出願公開２０１２／２８９４２０号明細書などを参照のこと）。これらのｎｃＲＮＡ分子のいずれかが、本発明の方法の一実施形態において使用され得る。

【００８０】

健康状態を分類するための方法は、個体に由来する体液サンプル中のバイオマーカー対の比率を決定するステップと、およびこの比率を、参照サンプルに由来する体液中のバイオマーカー対の比率と比較するステップとを含み、個体サンプルと参照サンプルとの間の比率における差異（即ち、ここでは変更された比率）の有無に基づいて、個体の健康状態を分類する。

【００８１】

参照サンプルは、単一の個体から、または個体の集団の平均から取得されていてもよい。参照サンプルについての比率は、本明細書に記載されるように決定されるか、または、これは、以前から入手可能な情報であり得る。参照サンプルと比較した、個体からの比率における変更は、参照から変更された健康状態を示す。

【００８２】

適切な参照サンプルの選択は、十分に当業者の技術範囲内である。一部の実施形態では

、参照サンプルは、特定の障害を有する個体に由来するものであり、変更は、その個体がその障害に罹患していないことを示す。

【００８３】

好ましい実施形態では、個体からの比率は、２つの参照サンプルと比較され、第１の参照サンプルは、「健康な」対照サンプルであり、第２の参照サンプルは、変更された健康状態を有する（変更されたとは、例えば、特定の疾患を発症するリスクがある状態のこと）個体に由来するものである。当業者は、個体の比率が、「変えられた健康状態」の比率からの比率により近い場合、この個体が変えられた健康状態を有する可能性がより高いことを認識する。

【００８４】

バイオマーカー対は、ｎｃＲＮＡの２つの異なる変種からなり、第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、および、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、第２の変種は、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡであり、ｎｃＲＮＡがｍｉＲＮＡである場合、第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端においてトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、第２の変種は、５’末端または３’末端においてトリミングされたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択される。比率および好ましいＲＮＡ変種の決定は、本明細書中にすでに記載されている。好ましくは、バイオマーカー対は、ｎｃＲＮＡの２つの異なる変種からなり、第１の変種および第２の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端においてトリミングされた、および／または、５’末端または３’末端において伸長されたｎｃＲＮＡ、５’末端または３’末端で任意にトリミングされた、または、５’末端または３’末端で任意に伸長された３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、ｎｃＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合、第１の変種は、標準配列のｎｃＲＮＡ、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡから選択され、第２の変種は、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するｎｃＲＮＡである。

【００８５】

好ましい実施形態では、本明細書に開示された方法は、個体が特定の処置における反応する可能性を決定する。好ましくは、これらの方法は、疾患または障害について、個体を治療するステップをさらに含む。好ましい実施形態では、これらの方法は、個体が特定の障害を発症するリスクを決定する。

【００８６】

好ましい実施形態では、本明細書に開示された方法は、疾患または障害を有するか個体を診断する。好ましい実施形態では、収集されたデータは、医師が診断または予後を行うことを補助するための１つの因子として使用することができる。好ましくは、これらの方法は、この疾患または障害について、個体を治療するステップをさらに含む。

【００８７】

好ましい実施形態では、この障害は前立腺がんであり、バイオマーカー対は、表１２（実施例３から）または表２から選択される。好ましい実施形態では、この障害はｃＨＬであり、バイオマーカー対は、表４または表５から選択される。好ましい実施形態では、この障害は乳がんであり、バイオマーカー対は、表６から選択される。好ましい実施形態では、この障害はアルツハイマー病であり、バイオマーカー対は、表９から選択される。

【００８８】

本開示は、個体における古典的ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）の状態を特徴付けるための方法、および個体の健康状態に関するデータを収集するための方法を、さらに提供する。これらの方法は、個体に由来する体液サンプル由来の１または複数のｍｉＲＮＡの量を決定するステップと、１または複数のｍｉＲＮＡの量を参照サンプルと比較するステップとを含む。これらのｍｉＲＮＡの量は、本明細書に既に開示されたように決定され得る。

【００８９】
実施例６は、ｃＨＬを分類することにおいて有用なｍｉＲＮＡの同定を記載している。したがって、これらの方法において有用な１または複数のｍｉＲＮＡは、表３から選択される。好ましくは、この１または複数のｍｉＲＮＡは、ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１９０８－５ｐ、ｍｉＲ－５１８９－５ｐ、ｍｉＲ－９２ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－４２５－３ｐ、ｍｉＲ－６２５－３ｐ、ｍｉＲ－７７０６、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－７６０、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｍｉＲ－１２２－５ｐから選択され、より好ましくは、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１２７－３ｐおよびｍｉＲ－１５５－５ｐから選択される。

【００９０】
参照サンプルは、単一の個体から、または個体の集団の平均から取得されていてもよい。

【００９１】
一部の実施形態では、参照サンプルは、１または複数の健康な個体（即ち、ｃＨＬに罹患していない個体）、ｃＨＬを有する１または複数の個体、ｃＨＬに対する処置を受ける前と同じ個体、障害に対する処置における良好な反応を有する１または複数の個体、または障害に対する処置における不十分な反応を有する１または複数の個体に由来するものである。例えば、健康な、または、罹患した個体から取得された参照レベルと比較した１または複数のｍｉＲＮＡの量は、その個体がｃＨＬに罹患しているかどうかを特徴付けるために有用である。処置前の個体におけるレベルと比較した、処置後の１または複数のｍｉＲＮＡの量は、例えば、処置が有効であった場合、または、患者が元の状態に戻った場合に、処置における反応を特徴付けるために有用である。処置に対する良好なまたは不十分な反応者のいずれかであることが既知の患者から取得された参照レベルと比較された処置後の１または複数のｍｉＲＮＡの量は、その個体が処置に対する良好な予後を有するかどうかを特徴付けるために有用であり得る。

【００９２】
本発明のさらなる一態様では、バイオマーカー／バイオマーカー対の同定、ならびに、健康状態を特徴付けるために、これらのバイオマーカー／バイオマーカー対は、体液を精製すること、すなわち、体液を異なる生化学的画分へと分離することによって、改善することができる。血液中の細胞外ｎｃＲＮＡの大部分は、タンパク質複合体、脂質小胞（ＬＤＬおよびＨＤＬ）および細胞外小胞を含む可溶性生化学的画分と関連している。好ましい実施形態では、体液は、好ましくはサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、細胞外小胞（すなわち、エキソソーム小胞）またはタンパク質が豊富な（タンパク質／ＨＤＬ）画分のいずれかに対して富化される。図１４Ｅは、サイズ排除クロマトグラフィーを使用したエキソソーム小胞およびタンパク質リッチ画分の分離、ならびに、これら２つの画分の間でのｍｉＲＮＡ分布における差異の一例を示すものである。表４は、健康なドナーとｃＨＬ患者との間で血液中のエキソソーム小胞画分を識別できるバイオマーカー対をさらに開示するものである。表５は、健康なドナーとｃＨＬ患者との間で血液中のタンパク質画分を識別できるバイオマーカー対を開示するものである。

【００９３】
本明細書に引用される全ての特許および参考文献は、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【００９４】
本発明は、以下の実施例においてさらに説明される。これらの実施例は、本発明の範囲を限定せず、単に本発明を明確にするように機能する。

【００９５】
＜実施例＞
＜実施例１＞
エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）によって形質転換したリンパ芽球様Ｂ細胞（ＬＣＬ）は、大量の、ヒトおよびウイルスｍｉＲＮＡが組み込まれたエキソソームと呼ばれ

るエンドソーム由来細胞外小胞（ＥＶ）を恒常的に分泌する。コピー数を測定することにより、エキソソームが、ｍｉＲＮＡの細胞－細胞間伝達を媒介して、レシピエント細胞における蓄積、および標的ｍＲＮＡ抑制をもたらすことが実証されている（Ｐｅｇｔｅｌら、２０１０）。ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏデータの増加は、エンドソーム膜におけるｍｉＲＮＡ選別が、細胞－細胞間伝達におけるエキソソームの機能を支持することを示唆している（ｖａｎ Ｂａｌｋｏｍら、２０１３；Ｋｏｓａｋａら、２０１０；Ｍｉｔｔｅｌｂｒｕｎｎら、２０１１；Ｍｏｎｔｅｃａｌｖｏら、２０１２；Ｐｅｇｔｅｌら、２０１０；Ｕｍｅｚｕら、２０１３；Ｚｈａｎｇら、２０１０；Ｚｈｕａｎｇら、２０１２）。注目すべきことに、エンドソーム膜におけるエキソソーム形成を妨害することは、機能的ｍｉＲＮＡの分泌を減少させる（Ｋｏｓａｋａら、２０１３；Ｍｉｔｔｅｌｂｒｕｎｎら、２０１１）。ＥＶを介したｍｉＲＮＡの分泌は、非ランダム様式で生じるものの（Ｂｅｌｌｉｎｇｈａｍら、２０１２；Ｇｕｄｕｒｉｃ－Ｆｕｃｈｓら、２０１２；Ｎｏｌｔｅ－’ｔ Ｈｏｅｎら、２０１２；Ｐａｌｍａら、２０１２）、精製されたエキソソーム集団および産生細胞における徹底的な比較分析は不十分であった。

【００９６】

＜低分子のノンコーディングＲＮＡファミリーは、Ｂ細胞とエキソソームとの間で示差的に分布している＞

２００ヌクレオチド未満の低分子ＲＮＡ変種が、エキソソーム中への取込みのための選択を受けるかどうかを決定するために、本発明者らは、ＥＢＶ駆動性ＬＣＬ（ｎ＝３）および３つのリンパ腫細胞株（ｎ＝３）のシーケンシングのために、細胞および対応するエキソソームの低分子ＲＮＡライブラリーを生成した。このアプローチは、定義された細胞のバックグラウンド内の細胞内ＲＮＡレパートリーおよび細胞外ＲＮＡレパートリーについて強力な統計分析を実施するための包括的データセットを提供した。ＲＮＡ－Ｓｅｑにより、ヒトおよびＥＢＶの両方のゲノムに対してアラインさせた、１サンプル当たり１００万を超えるゲノムマッピングされたリード（図１における個々のリードおよびアラインメント統計値）が得られた。ＲＮＡ参照ライブラリーとの比較により、細胞およびエキソソームの低分子ＲＮＡ画分は、多様なクラスのＲＮＡ由来の産物を含んでいることが明らかになった。低分子ＲＮＡ配列の大きい多様性に加えて、いくつかのＲＮＡクラスは、細胞において富化され（図１の黒い棒）、他はエキソソームにおいて過剰発現する（灰色の棒）ようである。全ての形質転換されたＢ細胞型において、ｍｉＲＮＡのクラス（ｍｉＲＢａｓｅ ｖ１９）は、低分子ＲＮＡプールのほぼ５０％を占める。しかし、エキソソームでのこの割合はたった２０％であり、これは、ｍｉＲＮＡが細胞中に保持されていることを示している。他のｎｃＲＮＡクラス（すなわち、ｔＲＮＡ、ｐｉＲＮＡ、ｒＲＮＡ、Ｙ ＲＮＡ、ヴォールトＲＮＡ）由来のＲＮＡエレメントは、一般に、クラス分布が細胞型の間で別個であっても、エキソソームにおいて濃縮されていた（図１Ｂ）。特に、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）（Ｍａｕｔｅら、２０１３）および他の腫瘍組織（Ｌｅｅら、２００９ｂ）においてｔＲＮＡおよびｔＲＮＡ由来の断片の発現が調節解除されている。ＤＬＢＣＬ由来のエキソソームでは、ｔＲＮＡ由来断片は、ＬＣＬ由来エキソソームと比較して高度に濃縮されていた（図１Ｂに示す、２４％対７．４％）。ＬＣＬエキソソームとリンパ腫エキソソームとの間の最も顕著な差異は、ヒトＹ ＲＮＡ断片の極度の存在量であった（図１に示す、３８％）。観察された低分子ＲＮＡ断片のリードの存在量（図１）が、全長転写物の存在を反映しているかどうかを調査するために、本発明者らは、シーケンシングに供したエキソソームＲＮＡに対する半定量ステム－ループＲＴ－ＰＣＲを実施した。本発明者らは、エキソソーム中で、高レベルのインタクトなＹ ＲＮＡ変種（すなわち、ＲＮＹ１、ＲＮＹ３、ＲＮＹ４、ＲＮＹ５）およびヴォールトＲＮＡ１－１を検出した（図１）。インタクトなＹ ＲＮＡおよびヴォールトＲＮＡは、ヒト尿サンプルから単離された小胞画分においても検出された（Ｉ．Ｖ．Ｂ．、Ｄ．Ｋ－ＬおよびＤ．Ｍ．Ｐ．、未公開データ）。このデータは、低分子細胞質調節性ＲＮＡが非細胞自律的機能を有し得るという以前の示唆（Ｎｏｌｔｅ－’ｔ Ｈｏｅｎら、２０１２）を支持しているものである。全体的に、本発明者らは、形質転換されたＢ細胞について

最も顕著であるように思われるＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ誘導されたＹ　ＲＮＡ転写物およびそれらの断片のエキソソーム組み込みに対する一貫したバイアスを明らかにした。興味深いことに、ヒト低分子ＲＮＡ、具体的には、Ｙ　ＲＮＡは、エンベロープおよび非エンベロープウイルス粒子にパッケージングされる（Ｇａｒｃｉａら、２００９；Ｋｈａｎら、２００７；Ｒｏｕｔｈら、２０１２）。宿主細胞から（レトロ）ウイルス粒子およびエキソソーム中への低分子Ｐｏｌ　ＩＩＩ　ＲＮＡの選択的な補充は、共通の分子機構がパッケージングプロセスを推進することを暗示している。この認識は、エキソソームの生合成および輸送選択を支配する細胞成分の今後の特徴付けを補助できる（Ｋｏｐｐｅｒｓ－Ｌａｌｉｃら、２０１２）。

【００９７】

＜高いおよび低い存在量のｍｉｃｒｏＲＮＡは、エキソソーム中に非ランダムに組み込まれている＞

ｍｉＲＮＡの転写および生合成については、十分に報告されているが（ＥｂｅｒｔおよびＳｈａｒｐ、２０１２）、エキソソームを介したｍｉＲＮＡのターンオーバー、細胞内輸送および放出を制御する機構、ならびに、これらの種々の因子が遺伝子調節活性にどのように影響を与えるかについては、いまだ完全には解明されていない（ＡｍｅｒｅｓおよびＺａｍｏｒｅ、２０１３）。

【００９８】

細胞対エキソソームにおけるｍｉＲＮＡ分布の間の可能な相違に関するより多くの洞察を得るために、本発明者らは、全ての細胞サンプルと対になるエキソソーム（ｎ＝１２）との間において正規化されたｍｉＲＮＡリードのＳｐｅａｒｍａｎ相関を計算し、データセット間での変動を決定した。クラスター分析は、ＬＣＬサンプルをリンパ腫サンプルから分離した。全てのサンプルについて、Ｓｐｅａｒｍａｎ相関（ｒ）は、０．４８から０．８１の範囲であった。ＬＣＬエキソソーム（ｒ＝０．７６～０．８）およびＬＣＬ細胞（ｒ＝０．７２～０．７６）は、す、比較的控えめなサンプル可変性を示し、生物学的な複製としてのそれらの有用性を示した。次に、マッピングされたｍｉＲＮＡの数を、ＲパッケージｅｄｇｅＲ（Ｒｏｂｉｎｓｏｎら、２０１０）を使用する一般化線形モデルにおいてフィッティングさせ、細胞およびエキソソーム中の個々のｍｉＲＮＡの相対的な存在量を比較した。細胞中で最も豊富なｍｉＲＮＡ（＞１０．０００リード／１００万（ＲＰＭ））は一般に、エキソソーム中でも、最も豊富なｍｉＲＮＡを示した（表Ｓ２、データ１）。エキソソーム画分中のｍｉＲＮＡ分布は、細胞ｍｉＲＮＡの存在量によって明らかに影響されるが、本発明者らは、細胞とエキソソームとの間で不一致に分布したｍｉＲＮＡのサブセットを同定した（偽発見率ＦＤＲ＝０．０５）。

【００９９】

どのｍｉＲＮＡが、ＬＣＬ、バーキットリンパ腫（ＢＬ）およびＤＬＢＣＬの背景において優先的に保持され、または、放出されるかを調査するために、全てのｍｉＲＮＡをグループ分けし、エキソソーム対細胞ｍｉＲＮＡリード（ＲＰＭ）における富化倍数に従ってランク付けした。本発明者らは、最も不調和的に分布したｍｉＲＮＡは、優先的に放出されるのではなく（８～１５％）優先的に保持される（１５～４２％）ことを観察した（図２Ａ）。それらの細胞対エキソソーム画分における保持された、および、放出されたｍｉＲＮＡの循環は、全てのサンプル群によって共有された放出されたｍｉＲＮＡの数が、確率から予測され得るものとは有意に異なることを実証した（ｚ－スコア＝２６．２）。重要なことに、多くの「放出された」ｍｉＲＮＡは、抑制的遺伝子調節活性にとって十分な１００～１０００ＲＰＭよりも高い相対的存在量を有する（図２Ｂ～Ｃ）（Ｍｕｌｌｏｋａｎｄｏｖら、２０１２）。

【０１００】

「保持された」または「放出された」として定義されたｍｉＲＮＡの分布が、他の方法論によって検出可能かどうかを評価するために、本発明者らは、エキソソーム（生物学的複製）を分泌するＢ細胞の新たなバッチを調製し、細胞およびエキソソームからＲＮＡを抽出した。次に、本発明者らは、ステム－ループベースの定量ＲＴ－ＰＣＲ分析を実施し

、放出されたヒトｍｉＲＮＡ　ｍｉＲ－４５１、ｍｉＲ－１２７－３ｐ、ｍｉＲ－４１０が、ＲＮＡ－ｓｅｑアプローチと一致して、エキソソーム画分において非常に豊富であることを観察した。際立ったことに、ｍｉＲ－４５１および１２７－３ｐは、優先的に「保持された」ｍｉＲＮＡ　ｍｉＲ－１２７５、ｍｉＲ－７４４、ｍｉＲ－１３０ｂとは対照的に、細胞ではほとんど検出されなかった（図２Ｄ）。ｍｉＲ－１２７－３ｐの排出は、リンパ腫形成における転写リプレッサーであるＢ細胞リンパ腫６（Ｂｃｌ６）ｍＲＮＡの負の調節因子としてのその機能に関連し得る（ＬｕｊａｍｂｉｏおよびＥｓｔｅｌｌｅｒ、２００７；Ｐａｒｅｋｈら、２００７）。実際に、ｍｉＲ－１２７－３ｐは、腫瘍抑制活性を示し（Ｓａｉｔｏら、２００６）、その放出は、Ｂ細胞リンパ腫細胞の増殖および生存に好都合である。

【０１０１】

＜ヒトおよびウイルスのｍｉＲＮＡ分布における差異＞

ＥＢＶ－ｍｉＲＮＡは、ＥＢＶ感染した増殖性Ｂ細胞およびＥＢＶ駆動性リンパ腫に、重要な成長利益を提供する（Ｆｅｅｄｅｒｌｅら、２０１１；Ｓｅｔｏら、２０１０；Ｖｅｒｅｉｄｅら、２０１３）。本発明者らは、内因性の腫瘍サプレッサーｍｉＲＮＡとは対照的に、ＥＢＶ－ｍｉＲＮＡが、エキソソームにおいて優先的に保持され、および、過小発現されると仮定した。本発明者らは、形質転換されたＢ細胞およびリンパ腫細胞におけるＥＢＶによってコードされる４４のｍｉＲＮＡの分布をグループ化し、分析した（Ｑｉｕら、２０１１）。本発明者らは、ＥＢＶ感染Ｂ細胞株に対する以前のＲＮＡ－ｓｅｑ研究（Ｒｉｌｅｙら、２０１２；Ｓｋａｌｓｋｙら、２０１２）と一致して、ＥＢＶ－ｍｉＲＮＡの存在量が広く変動し、最も豊富に存在するものがＢＡＲＴ－クラスターｍｉＲＮＡに属したことを確認した。本発明者らは、細胞から放出された全てのｍｉＲＮＡの量とそれらの分布の頻度に基づいて、リードを正規化した後に、細胞中に保持された量との間の比率を計算した（図４Ａ）。宿主ｍｉＲＮＡは放出される傾向がある（１７％が細胞保持される）が、ウイルスｍｉＲＮＡの大部分は、分泌を妨げられる（５４％が強く保持される）。これは、図４Ｂ中に示され、図中、ＥＢＶによってコードされるウイルスｍｉＲＮＡは、赤色で示される。この観察は、豊富なＥＢＶ　ＢＡＲＴクラスターｍｉＲＮＡが１３２のアポトーシス関連細胞性ｍＲＮＡを標的化することを見出したＲｉｌｅｙらからの結果（Ｒｉｌｅｙら、２０１２）と相違なく、ＥＢＶ　ｍｉＲＮＡが細胞死を防止することを示唆する。遺伝子オントロジー分析は、ＭＡＰＫ／ＰＩ３Ｋ生存経路を抑圧することが知られている多くの宿主ｍｉＲＮＡが優先的に放出されることを示した。生理学的に関連するｍｉＲＮＡの一貫性のある非ランダム分布の観察は、エキソソーム中への選別を媒介するメカニズムと一致する。

【０１０２】

＜３’末端ＮＴＡは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏでのｍｉＲＮＡの保持または放出を規定する＞

ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡヘアピン由来の最も豊富なｍｉＲＮＡ配列は、通常、成熟ｍｉＲＮＡ（ｍｉＲＢａｓｅ）と一般に称される、対応するｍｉＲＮＡを定義するために使用される。しかし、個々のｍｉＲＮＡのリードの分析およびそれに対応するｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ配列へのマッピングは、細胞およびエキソソームＲＮＡ画分中のｍｉＲＮＡの３’末端において広範な配列変異を示した。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡの不十分なドローシャまたはダイサー媒介性のプロセシングは、３’末端長さバリアント（例えば、トランケーションおよび延長）を生じる。さらに、ｍｉＲＮＡアイソフォームは、非テンプレート型末端ヌクレオチド付加（ＮＴＡ）とも呼ばれるヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介性の転写後修飾によって活発に生成される（Ｂｕｒｒｏｕｇｈｓら、２０１０；Ｍｏｒｉｎら、２００８；Ｗｙｍａｎら、２０１１）（図５Ａ）。ｍｉＲＮＡの３’末端変異の網羅的な分析は、３’末端長さアイソフォームが細胞とエキソソームとの間で等しく分布する一方で、３’末端ＮＴＡを有するｍｉＲＮＡは異なる分布を示したことを示した。ＮＴＡを有する全てのリードの合計と個々のＮＴＡ型（即ち、Ａ、Ｕ、ＣまたはＧ）との比較は、細胞画分におけるアデニル化ｍｉＲＮＡアイソフォームの濃縮を示した。対照的に、分析された全て

のＬＣＬサンプルのエキソソームにおいて、３’末端ウリジル化ｍｉＲＮＡが過剰発現された（図５Ｃ）。ＮＴＡ修飾されたリード（Ａ、Ｕ、Ｃ、Ｇ）の割合が、細胞サンプルとエキソソームサンプルとの間で有意に変化するかどうかを分析するために、３’末端ＮＴＡを有する各ｍｉＲＮＡ配列を、１２全てのサンプル（ＬＣＬ　ｎ＝６、ＢＬ　ｎ＝４、ＤＬＢＣＬ　ｎ＝２）から抽出し、（対応のある設計を構成する）細胞株効果についても補正するロジスティックモデルにフィッティングさせた。これらの結果は、３’末端アデニル化ｍｉＲＮＡアイソフォームが優先的に保持され（カイ二乗検定、ｐ＜０．０５）、全ての他のＮＴＡが優先的に放出される（３’末端－Ｕはカイ二乗検定でｐ＝０．０２、３’末端－Ｃ、はフィッシャー直接検定でｐ＝０．０４、３’末端－Ｇはフィッシャー直接検定でｐ＝０．０２）ことを示唆している。

【０１０３】

３つのＬＣＬサンプル（即ち、生物学的トリプリケート）において、本発明者らは、網羅的なＮＴＡの分布分析とは別に、細胞とエキソソームとの間での３’末端アデニル化またはウリジル化ｍｉＲＮＡアイソフォームの相違が有意であることを観察したが（ｐ＝０．００５、スチューデントｔ検定）、成熟ｍｉＲＮＡ（ｍｉＲＢａｓｅベースのアノテーション）配列または未修飾（延長された、または、トランケーションされた）アイソフォームについては観察されなかった。個々のｍｉＲＮＡの分布に対する３’末端ＮＴＡの影響を分析するために、本発明者らは、ＬＣＬ細胞において豊富に発現された１００種類のｍｉＲＮＡを選択し、エキソソーム画分を対にして分析した。これらの結果は、３’末端アデニル化を有する個々のｍｉＲＮＡの配列が、細胞画分とより関連しているが、３’末端ウリジル化を有する同じｍｉＲＮＡは、エキソソーム放出の傾向がより高いことを実証した。したがって、本発明者らは、付加されたヌクレオチドの型、すなわち、アデニンまたはウリジンが、細胞とエキソソームとの間のｍｉＲＮＡアイソフォーム分布に影響すると結論付けている。

【０１０４】

定義されアノテーションされた３’末端配列の外側の、より多くのミスマッチおよびより長い隣接領域（＋６ｎｔ）を許容する個々のｍｉＲＮＡ配列のより深い分析により、多くのｍｉＲＮＡの３’末端が、１よりも多い非テンプレートヌクレオチドで伸長されていることが明らかになった。転写後に付加されたヌクレオチドの数が、分布に対して累積的な影響を有するかどうかを調べるために、本発明者らは最初に、非修飾形態と共に、特定のＮＴＡ型を有する配列リードについて、付加されたヌクレオチドの数を考慮に入れて、細胞とエキソソームとの間での変化倍数の比率（排出係数として規定されるもの、実験手順を参照のこと）を計算した。３’末端アデニル化は、保持の確率を増加させ、この確率は、付加されたＡの数に比例して増加する（図８Ｂ～Ｃ）。驚くべきことに、トリ－アデニル化ヒトｍｉＲＮＡは、対応するエキソソーム中よりもＬＣＬ細胞中で５倍高頻度であったが（ｐ＝０．０３、対応のないｔ検定）、トリ－アデニル化ウイルスｍｉＲＮＡは、ＬＣＬ細胞画分でのみ検出される（図８Ｃ）。３’末端アデニル化と、ウイルスｍｉＲＮＡとの細胞保持における増加との関連は、ウイルスｍｉＲＮＡが細胞関連性のままである強い傾向を示すという本発明者らの観察（図４Ａ～Ｂ）をさらに裏付けている。重要なことに、本発明者らは、Ｂａｃｋｅｓら（Ｂａｃｋｅｓら、２０１２）によって最近実証されたようなｍｉＲＮＡ分解のシグナルとなる広範な３’末端ポリ－アデニル化（４よりも多いアデニン）を観察しなかった。

【０１０５】

３’末端アデニル化とは対照的に、３’末端にウリジンを有する低分子ＲＮＡの不均衡な存在は、エキソソームＲＮＡ輸送を規定するようである。これが培養物中のＢ細胞に限定された現象でないかどうかを調査するために（図８Ｆ）、本発明者らは、エキソソーム－単離プロトコール（Ｂｉｊｎｓｄｏｒｐら、２０１３；Ｖｅｒｗｅｉｊら、２０１３）を使用して、ヒト尿から天然に存在する細胞外小胞を収集および精製した。本発明者らは、健康な個体に由来する６つの尿エキソソームサンプル由来の低分子ＲＮＡ内容物をシーケンシングした（図１０）。Ｂ細胞エキソソームにおいて観察された３’末端ウリジル化

媒介性のｍｉＲＮＡアイソフォーム分布（図８Ｆ、ｐ値はｐ＜０．００５、スチューデントｔ検定）に完全に従って、ヒト尿エキソソームは、３’末端ウリジル化ｍｉＲＮＡが有意に濃縮されている（図８Ｆ、ｐ値＜０．０００１、スチューデントｔ検定）。集合的に、これらのデータは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏで、３’末端ウリジル化ｍｉＲＮＡが、細胞によって優先的に放出されること、ならびに、ｍｉＲＮＡアイソフォームの細胞保持が、ｍｉＲＮＡの３’末端に付加されたアデニンヌクレオチドの数に依存することを示している。

【０１０６】

＜個々のｍｉＲＮＡのエキソソーム選別に対する３’末端ＮＴＡの影響＞

本発明者らによる結果は、ＮＴＡが、細胞とエキソソームとの間のｍｉＲＮＡ分布を規定することを示している。しかし、個々のｍｉＲＮＡに対するＮＴＡの影響は、異なるものでありうる。例えば、エキソソーム富化されたｍｉＲＮＡ　４８６－５ｐ、１４３－３ｐおよび１０１－３ｐの３’末端ウリジル化リードの存在量は、エキソソーム画分中に存在する全てのウリジル化アイソフォームの平均を上回る百分率（３８％）を示す。しかし、ｍｉＲ－４８６－５ｐは、外見上、成熟ｍｉＲＮＡレベルでは等しく分布する（図７Ｃの灰色）。特に、成熟ｍｉＲ－４８６－５ｐ配列に位置する全てのリードの５０％は、アデニル化アイソフォームまたはウリジル化アイソフォームのいずれかである（図７Ｃ）。ＬＣＬサンプル中の全てのｍｉＲＮＡの加重平均を使用すると、本発明者らは、トリーウリジル化されたリードが、細胞内容物と比較して、ＬＣＬエキソソームにおいて９倍高頻度であることを観察した（ｐ＝０．０１、対応のないｔ検定）。この分布の違いを確認するために、本発明者らは、標準的な（成熟した）ｍｉＲＢａｓｅベースの配列よりも３ヌクレオチド長いｍｉＲ－４８６－５ｐ　３’末端トリーアデニル化および３’末端トリーウリジル化アイソフォームを識別するように設計したステムーループベースのプライマーを開発した。予測されるように、３’末端ヌクレオチド付加を有さない成熟ｍｉＲ－４８６－５ｐの検出は、細胞とエキソソームとの間で事実上、等しい分布を示し、３’末端トリーアデニル化アイソフォームは、細胞において濃縮され（１０倍）、３’末端トリーウリジル化アイソフォームは、エキソソームにおいて濃縮された（５倍）（図７Ｄ）。この独立したアプローチは、以前のＲＮＡｓｅｑデータ（図６）を支持し、異なる型の３’末端の転写後修飾が、ＲＴ－ＰＣＲによって検出可能であり、細胞保持およびエキソソーム選別プロセスを反映することを実証している。従って、豊富なｍｉＲＮＡおよびそれらのアイソフォームは、３’末端転写後修飾の型および程度に依存する独自の分布特性を有する下位集団を示す。

【０１０７】

ヒトおよびウイルスｍｉＲＮＡとは別に、本発明者らは、アデニル化およびウリジル化が、低分子細胞質Ｙ　ＲＮＡに由来するプロセシングされた断片の３’末端にも起こり得ることを見出した（図９）。重要なことに、３’末端が修飾された低分子ＲＮＡ分子のほとんどは、エキソソーム選別に関して、選別のためのシグナルとしてとしてのＮＴＡ修飾が、ｍｉＲＮＡのクラスに制限されず、ｍｉＲＮＡアイソフォームと同じ運命をたどることを示している。これらの結果は、３’末端ＮＴＡの関連性を強調し、ヌクレオチジルートランスフェラーゼファミリーの酵素に対する低分子ＲＮＡ基質の多様性に関する本発明者らの知識（ＭａｒｔｉｎおよびＫｅｌｌｅｒ、２００７）を拡大させる。

【０１０８】

細胞とエキソソームとの間でのｍｉＲＮＡレパートリーの比較は、エキソソームを介した豊富なｍｉＲＮＡの選択的な排除および放出の決定的な証拠を実証した。さらに、本発明者らは、３’末端アデニル化の程度が、エキソソームを介したｍｉＲＮＡアイソフォームの取込みおよび分泌を妨害するようであることが観察された。この知見は、この特定の型の修飾が特定のｍｉＲＮＡの安定性および活性を増加させるという見解と一致している（Ｂｕｒｎｓら、２０１１；Ｄ’Ａｍｂｒｏｇｉｏら、２０１２；Ｊｏｎｅｓら、２００９）。重要なことに、本発明者らは、３’末端ウリジル化ｍｉＲＮＡアイソフォームについては、反対の挙動を見出した。本発明者らは、天然に存在するヒト尿小胞においても、

エキソソームを介したｍｉＲＮＡの輸送、選別および放出が、ＮＴＡを介した転写後修飾によって一部規定されることが明らかになったと結論付けている。現在、これらのかすかな３’末端修飾の機能的重要性が明らかになりつつあるが（Ｂａｃｃａｒｉｎｉら、２０１１；Ｄ’Ａｍｂｒｏｇｉｏら、２０１２；Ｊｏｎｅｓら、２００９；Ｋａｔｏｈら、２００９；ＲｕｅｇｇｅｒおよびＧｒｏｓｈａｎｓ、２０１２；ＳｃｏｔｔおよびＮｏｒｂｕｒｙ、２０１３）、選択的なｍｉＲＮＡのターンオーバー、存在量および活性におけるそれらの正確な役割は、複雑すぎて解明されていない（ＡｍｅｒｅｓおよびＺａｍｏｒｅ、２０１３）。本発明者らの研究は、エキソソーム低分子ＲＮＡカーゴ選択のさらなる理解を提供し、エキソソーム生物学と関係したｍｉＲＮＡのプロセシング、修飾およびターンオーバーを研究するための理論的根拠を提供する。

【０１０９】

＜実験手順＞

＜ディープシーケンシングのためのＲＮＡサンプルの調製＞

各細胞またはエキソソームサンプルについて、製造業者の指示（Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ ＣＡ ＵＳＡ）に従って、ＴｒｕＳｅｑ ｓｍａｌｌ ＲＮＡ ｓａｍｐｌｅ ｐｒｅｐを使用してシーケンシングするために等量のインプットＲＮＡ（６００ｎｇのＲＮＡ）を調製した。Ａｇｉｌｅｎｔ ２１００ Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ、Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ ＣＡ ＵＳＡ）で、配列ライブラリーを測定し、１回の実行につき最大１２サンプルを等モルで合わせた。シーケンシングを、ＨｉＳｅｑ ２０００（Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ ＣＡ ＵＳＡ）ペアードエンド１００サイクル（ＰＥ１００）実行で実施した。

【０１１０】

＜非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するＲＮＡリードの検出および統計分析＞

ｍｉＲＮＡアイソフォームまたはｉｓｏｍｉＲを、逐次、分析によって読み出す。簡潔に述べると、本発明者らは、マッピングされたＲＮＡエレメントの３’末端におけるＮＴＡの検出のために、リードのヌクレオチド１８位において開始するアラインされたｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ配列に対して、読み出された配列を比較した。アルゴリズムが、リードと１８位との後のｐｒｅ－ｍｉｃｒｏＲＮＡとの間でミスマッチ位置を見出す場合、このリードは、ミスマッチ位置からリードの最後までさらに分析されるが、全ての後続のヌクレオチドは、ミスマッチ位置におけるものと等しい必要がある。異なるヌクレオチドに出くわすと、検索が、次のミスマッチ位置において継続されるか、またはリードが、非ＮＴＡとしてタグ付けされる。全てのＮＴＡリードを検出した後、本発明者らは、所与の核酸塩基（Ａ、Ｕ、Ｃ、Ｇ）のＮＴＡで終わるリードの数を、ｍｉＲＮＡにマッピングされたリードの総数によって除算することによって、１サンプル当たりの加重平均を計算する。ｍｉＲＮＡ毎、およびサンプル毎に、本発明者らは、そのｍｉＲＮＡにマッピングされたリードの総数に加えて、所与の核酸塩基のＮＴＡで終わるリードの総数を計算した。そうして、各核酸塩基について、本発明者らは、サンプル型（細胞またはエキソソーム）ならびに細胞株（対応のある設計を構成する）もまた含んだロジスティック回帰モデルにおいて、総数に関連したリードの数を使用できた。このモデルに基づいて、本発明者らは、細胞とエキソソームとの間での所与のヌクレオチドのＮＴＡを有するｍｉＲＮＡカウントの割合間の差異についてのｐ値を抽出した。ｍｉＲＮＡ毎にこのモデルをフィッティングさせた後で、複数の試験について補正するためにＢｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇ偽発見率（ＦＤＲ）を、ｐ値に適用する。

【０１１１】

＜非テンプレート型ヌクレオチド付加を有する低分子ＲＮＡの排出傾向＞

細胞とエキソソームとの間で、転写後修飾されたリード（ＮＴＡ）の分布の評価を以下のように実施した。ｍｉＲＮＡ関連のリードが、エキソソーム中に取り込まれる傾向または細胞内に保持される傾向のいずれを有するかを試験するために、本発明者らは、それらを、所与のｍｉＲＮＡのベースライン分布傾向（解析されたｉｓｏｍｉＲ型に属するものを除く、全ての他のリードによって規定される）と比較した。本発明者らは、特定の型の

非テンプレート型ヌクレオチド（ＮＴＡとして規定される）で終わるリードおよび末端修飾を有さないリード（ｎｏＮＴＡとして規定される）について、エキソソームと細胞との間の変化倍数の比率を計算することによって、排出係数（ＥＣ）を定義する。この係数は、０に近く、低分子ｎｃＲＮＡ配列のＮＴＡリードおよび非ＮＴＡリードが放出または保持される同じ傾向を有する。ＮＴＡリードが、非ＮＴＡリードと比較して、放出される傾向がより強い場合、この係数は正である。最後に、負の係数は、ＮＴＡリードが、非ＮＴＡリードと比較して、細胞内に留まる傾向がより強いことを示す。

【数１】

$$EC = \log_2 \left(\frac{RPM_{exosome}^{NTA} / RPM_{cell}^{NTA}}{RPM_{exosome}^{noNTA} / RPM_{cell}^{noNTA}} \right)$$

【０１１２】

＜エキソソーム収集手順＞

エキソソームを収集するために、各細胞株を、１０％エキソソーム枯渇ＦＢＳを補充したＲＰＭＩ－１６４０中で３連続ラウンド培養し、その後、エキソソーム含有上清を回収した（１回の収集ラウンドは、１つのエキソソーム含有調製物を示す。培地２００ｍｌ中に１００×１０^{6}細胞である。）。トリパン－ブルー排除によって細胞死を慣用的に分析し、生存率が９０％以下の培養物は、エキソソーム収集について考慮しなかった。エキソソームを、記載されたような分画遠心分離プロトコール（Ｖｅｒｗｅｉｊら、２０１３）を使用して、上清から単離および精製した。簡潔に述べると、最終ステップは、エキソソームを７０，０００×ｇ、１時間でペレット化させ、最後の超遠心分離ステップ（７０，０００×ｇ）の前にＰＢＳを用いてペレット洗浄を行った。ペレット化されたエキソソームを、１００μＬのＰＢＳ中に溶解させ、－８０℃で貯蔵した。全てのエキソソーム調製物を、以前に記載されたように（Ｐｅｇｔｅｌら、２０１０、Ｖｅｒｗｅｉｊら、２０１１）、イムノブロッティングによって分析し、エキソソームの存在および純度を確認した（データ示さず）。インフォームドコンセントにサインした後に、尿エキソソームの抽出のために、健康な男性（ｎ＝６）から新鮮な尿サンプル（５０ｍｌ体積）を収集した。これらの健康な男性は、泌尿器科（ＶＵ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ、Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）におけるこのプロジェクトと無関係の研究に参加している対象群の患者である。エキソソームを、分画遠心分離によって単離した。最初に、尿を、５００×ｇで２０分間、２０００×ｇで２０分間、１０，０００×ｇで３０分間および１００，０００×ｇで１．５時間遠心分離し、ＰＢＳでさらに１回洗浄した。インタクトなエキソソームをＰＢＳ中に収集し、ＲＮＡ単離前にＲＮＡｓｅ Ａ（４００ｎｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｚｗｉｊｎｄｒｅｃｈｔ、Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）で処理した。

【０１１３】

＜ＲＮＡ抽出、品質評価および半定量ＰＣＲアッセイ＞

ＲＮＡを、細胞および対になるエキソソームのペレットから抽出した。エキソソーム調製物を、４００ｎｇ／μｌのＲＮａｓｅ Ａ（Ｓｉｇｍａ）で３７℃、１時間、事前処理した。全てのエキソソーム調製物から、ＴＲＩｚｏｌ試薬（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によって、全ＲＮＡを抽出した。低い収量が予測される場合、イソプロパノール沈殿ステップの前に、５μｌのグリコーゲン（Ｒｏｃｈｅ）を添加した。細胞サンプルと、対になったエキソソーム（サイズが２００ｎｔ未満の低分子ＲＮＡ変種の大部分を含むことが知られている）との間での低分子ＲＮＡプロファイル比較を可能にするために、細胞ＲＮＡを、ガラス繊維フィルターベースの方法（ｍｉｒＶａｎａ ｍｉＲＮＡ単離キット、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して抽出し、細胞サンプル中に存在する低分子ＲＮＡ変種を濃縮した。抽出後、全ての細胞ＲＮＡサンプルは、低分子ＲＮＡ

変種（２００ｎｔ未満）を含んでいた。低分子細胞およびエキソソームＲＮＡプロファイルは、サイズ分布において類似のパターンを示した。抽出された低分子ＲＮＡ（細胞およびエキソソーム）の品質および量を、低分子ＲＮＡチップのプラットフォーム（Ａｇｉｌｅｎｔ　２１００　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ）を使用してアッセイした。

【０１１４】

ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ検出を用いるステム－ループベースの半定量逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）によって細胞およびエキソソームサンプル中の全長の低分子のノンコーディングＲＮＡの存在を検出し、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ４８０（Ｒｏｃｈｅ）によって分析した。この方法は、ＲＴ反応のためにステム－ループプライマーを使用する。ステム－ループプライマーを、目的の低分子ＲＮＡの３’末端における最後の８ヌクレオチドのストレッチを補完するように設計し、１２．５ｎＭの最終濃度で使用する。ＴａｑＭａｎ　ＭｉｃｒｏＲＮＡ　ＲＴキット（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用し、反応を製造業者の指示に従ってインキュベートした。生成物を、ＲＮＡ特異的フォワードプライマーならびに標的およびステム－ループＲＴプライマーの重複領域に特異的なリバースプライマーによって、増幅させた。増幅産物の分析は、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ４８０　Ｓｏｆｔｗａｒｅ（Ｒｏｃｈｅ）によって実施した。細胞およびエキソソームｍｉＲＮＡを、製造業者の指示に従って、ＴａｑＭａｎ　ｍｉｃｒｏＲＮＡアッセイおよびＣｕｓｔｏｍ　ＴａｑＭａｎ低分子ＲＮＡアッセイ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によって検出した。全てのｍｉＲＮＡデータを、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　７５００　Ｆａｓｔ　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍｓおよび提供された分析ソフトウェアによって分析したサンプルから取得する。全てのＲＴ－ＰＣＲ反応について、等量のＲＮＡを使用した。結果は、ΔΔＣｔ法を使用してＣｔ値をｍｉＲ－９２ａに対して正規化された図２Ｄを除いて、図４Ｂ中の二連実験からの２つの技術的反復の平均されたサイクル閾値（Ｃｔ）値（平均Ｃｔ値）として示される。４０よりも高いＣｔを有するサンプルは、陰性とみなす。

【０１１５】

＜ディープシーケンシングデータおよび低分子ＲＮＡの発現プロファイリングの分析＞

低分子ＲＮＡの発現プロファイリングを、ｍｉＲａｎａｌｙｚｅｒプログラム（Ｈａｃｋｅｎｂｅｒｇら、２０１１）に基づくパイプラインを用いて、さらなる分析ステップおよびカスタム化スクリプトを含めて実施した。簡潔に述べると、ｆａｓｔｑフォーマットでのリードの事前処理は、ｉ）アダプタートリミング（アダプターの少なくとも１０ｎｔが検出され、リードとアダプター配列との間で１ミスマッチを可能にする必要がある）、ｉｉ）１５ｎｔよりも短いクリーニングされたリードを削除する、ｉｉｉ）同一の配列を有する全てのリードを１つのエントリー（独自のリード）へと折り畳む、ことを含む。独自のリードのリード数は、対応するＲＮＡ分子が何回シーケンシングされたかを示す数である。

【０１１６】

アダプタートリミングおよび独自のリードのグループ分けの後、ヒト（ＵＣＳＣからｈｇ１９としてダウンロードした、ＧＲＣｈ３７パッチ・リリース５）およびＥＢＶゲノム（Ｇｅｎｅ　Ｂａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　ｎｕｍｂｅｒ　ＮＣ＿００７６０５）のプール化されたインデックスに対して、リードを、Ｂｏｗｔｉｅアルゴリズム（Ｌａｎｇｍｅａｄら、２００９）によってアラインさせた。本発明者らは、ゲノム中の４０未満の位置に位置するアラインメントのみを読み出し、１ミスマッチを許容する１９ｂｐのアラインメントのシード長さを使用する。これらの基準を満たす全てのもののうち、最良のアラインメントのみを受け入れるように、本発明者らは、Ｈａｃｋｅｎｂｅｒｇら（Ｈａｃｋｅｎｂｅｒｇら、２０１１）によって説明されたシード伸長法を適用した。Ｂｏｗｔｉｅのシードアラインメント法は、リードの最初のＬ塩基のみをアラインさせることができると。アデニン（Ａ）、ウラシル（Ｕ）、シトシン（Ｃ）、グアニン（Ｇ）の非ゲノムテンプレート型ヌクレオチド付加（ＮＴＡ）は、低分子ＲＮＡの３’末端においてＲＮＡシーケンシングによって検出される場合が多い。転写後に付加された塩基は、ゲノム配列中に

は存在せず、従って、アラインメントにおいてミスマッチとして検出される。このシードのアラインメントは、シード領域の外側のミスマッチとしてのこれらのリードの検出を可能にし、許容されたミスマッチは考慮されない。ゲノム（合わせたヒトおよびＥＢＶゲノム）へのアラインメントの後、いくつかのアノテーションを、低分子ＲＮＡ変種の発現プロファイリングのために使用する。一般に、リード位置は、低分子ＲＮＡアノテーションによって規定された領域内に完全に位置付けられなければならない、［染色体開始－３ｎｔ：染色体終了＋６ｎｔ］。本発明者らは、長さバリアントおよびＮＴＡを検出できるように、領域を隣接させている。所与の低分子ＲＮＡの発現値は、単純に、対応するゲノム領域内に位置する全てのリードの合計である。さらに、本発明者らは、各リードのＲＣを、マッピングされた染色体位置の数で除算することによって、調整されたリード数（ＲＣ）を計算する。最後に、本発明者らは、各低分子ＲＮＡエレメントについて、所与のＲＮＡ変種にマッピングされたリードの総数によるリード／１００万の発現値（ＲＰＭ）正規化を計算する。ＲＰＭは、正規化の最も一般的な型であり、発現値をリードの総数に依存しないものにする。

【０１１７】

ヒトおよびＥＢＶゲノムにマッピングされたＲＮＡエレメントにアノテーションを提供するために、全てのマッピングされたリードを、現在公知のデータベース、１）ｍｉＲＢａｓｅバージョン１９由来の成熟およびｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ配列（ＫｏｚｏｍａｒａおよびＧｒｉｆｆｉｔｈｓ－Ｊｏｎｅｓ、２０１１）、２）０６／０２／２０１３にダウンロードされたＮＣＢＩ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ＳｅｑｕｅｎｃｅｓヒトＲｅｆＳｅｑ遺伝子（Ｐｒｕｉｔｔら、２０１２）、３）ゲノムｔＲＮＡデータベース由来のｔＲＮＡ配列（ＣｈａｎおよびＬｏｗｅ、２００９）、４）ＵＣＳＣからダウンロードされたＲｅｐｅａｔＭａｓｋｅｒアルゴリズムによって検出された反復由来配列、５）ＮＣＢＩヌクレオチドのデータベースからダウンロードされたｐｉｗｉＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）に対して分析した。ｆａｓｔａフォーマットでのアノテーションについては、本発明者らは、配列をゲノムにマッピングすることによって、ゲノム座標を取得した。

【０１１８】

＜細胞およびエキソソームのサンプルを比較するための統計分析＞

ＲＮＡ－ｓｅｑライブラリーは、細胞全体に由来するＲＮＡまたはエキソソームのみに由来するＲＮＡのいずれかに対応する、細胞株当たり１対のライブラリーを含んでいた。各ｍｉＲＮＡの存在量を、細胞とエキソソームとのサンプルの間で比較するために、観察されたカウントを、ＲパッケージｅｄｇｅＲ（Ｒｏｂｉｎｓｏｎら、２０１０）を使用する一般化線形モデルにフィッティングさせた。これには、対応のある設計を含む細胞株、ならびにサンプル型（細胞またはエキソソームのいずれか）を含んだ。このモデルは、共通分散および傾向分散（ｃｏｍｍｏｎ ａｎｄ ｔｒｅｎｄ ｄｉｓｐｅｒｓｉｏｎ）だけでなく、タグワイズ分散（ｔａｇｗｉｓｅ ｄｉｓｐｅｒｓｉｏｎ）推定も含み、したがって、ライブラリー間の変動による余分な変動が許容される。複数の試験のために、サンプル型効果についての尤度比検定統計量に対応するｐ値を、Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇ偽発見率（Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ、２０１０）を使用して補正した。さらに、本発明者らは、６つのサンプル間で観察された交差を、ランダムな予測と比較した。簡潔に述べると、本発明者らは、ｉ）６つ全てのサンプルについて、エキソソームと細胞との間の発現値のｌｏｇ２比率を計算し、ｉｉ）全ての排出された（ｌｏｇ２＞＝２）ｍｉＲＮＡを抽出し、ｉｉｉ）所与の群について共有されたｍｉＲＮＡ、すなわち、この群の全てのサンプルにおいて排出されるものを抽出し、ｉｖ）各条件についてＸのｍｉＲＮＡをランダムに１０，０００回抽出する（Ｘは、観察された、すなわち、排出されたｍｉＲＮＡの数である）、ｖ）１０，０００回のランダムな実行の各々について、本発明者らは、共有されたｍｉＲＮＡの数を検出し、ｖｉ）１０，０００回のランダムな実行から、本発明者らは、ランダムな仮定の下で予測値およびその変動として与えられるランダムに共有されたＲＮＡの平均および標準偏差を計算する、ｖｉｉ）共有されたＲＮＡの観察された数ならびにランダムな平均および標準偏差によって、本発明者らは、統計的有意性を評価

するためにｚ－スコアを計算する。本発明者らは、１．６４５またはそれよりも高いｚ－スコアがｐ≦０．０５に相当し、を、有意とみなす。

【０１１９】

＜実施例２＞

本発明者らは、健康な（非腫瘍性腎皮質－ＮＲＣ）１１、および腎明細胞癌の２２のサンプルからなる腎明細胞癌（ｃｃＲＣＣ）（Ｏｓａｎｔｏ，Ｓ．ら、ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　２０１２）に対する実験を選択した。さらに、２２人のｃｃＲＣＣ患者は、３つの予後下位群、即ち、疾患の再発を伴わない群、再発を伴う群、および診断時に転移性の疾患を伴う群（ステージＩＶ）に属した。ＳＲＡアクセッションＳＲＰ０１２５４６を有するデータを、Ｓｈｏｒｔ　Ｒｅａｄ　Ａｒｃｈｉｖｅからダウンロードした。ｍｉＲＮＡ発現パターンをプロファイリングするためおよびｉｓｏｍｉＲの程度を決定するために、本発明者らは、複雑な（低分子の）ＲＮＡｓｅｑデータをアノテーションする、本発明者らが以前に開発した広く使用されるプログラムｍｉＲａｎａｌｙｚｅｒ（Ｈａｃｋｅｎｂｅｒｇ，Ｍ．ら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．２００９　＆　２０１１）を拡張させた。アダプタートリミング後、独自のリードを、ヒトゲノムにマッピングする。全ての配列のバリアントを検出するために、本発明者らは、５’末端における３ｎｔ変動および３’末端における５ｎｔにおいて、標準配列と比較した変動を許容する。

【０１２０】

所与のｍｉＲＮＡに属する全てのリードを検出した後に、それらのリードを、階層的に分類する（ｉｓｏｍｉＲ型に割り当てる）、ｉ）標準配列のｍｉＲＮＡ、ｉｉ）非テンプレート型付加（ＮＴＡ）、ならびにｉｉｉ）標準配列からの５’末端、および／または、３’末端配列長さバリアント（例えば、トランケーションまたは延長）。ｉｓｏｍｉＲ比率を、各ｍｉＲＮＡおよびｉｓｏｍｉＲ型について計算する。本発明者らは、それらを、所与のｍｉＲＮＡにマッピングされたリードの総数（標準配列のリード数＋全てのｉｓｏｍｉＲ）によって除算された、所与のｉｓｏｍｉＲ型に属するリードの数として規定する。

【０１２１】

本発明者らのパイプラインによってデータを分析した後に、本発明者らは、４つ全ての実験群（健康、再発なし、再発あり、ステージＩＶ）間で、観察されたｉｓｏｍｉＲ比率を比較した。統計的に有意な差異が２つの群の間で存在するｍｉＲＮＡを取得するために、本発明者らは、標準ｔ検定を適用した。本発明者らは、臨床的に関連する群の間で、アデニン付加（アデニル化）についての顕著な差異を見出した。本発明者らは、少なくとも１つの群において非常に高い百分率（＞＝３５％）のアデニル化リード、および、少なくとも１つの有意な比較を示した４つのｍｉＲＮＡを抽出した。４つの成熟ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－１９９ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－２１０－３ｐｍｉＲ－１５１ａ－３ｐである。図１１は、４つ全ての異なる患者群について、これら４つのｍｉＲＮＡのｉｓｏｍｉＲ比率を示す。

【０１２２】

＜予備的結果の簡潔な概要＞

１．ｍｉＲ－２１０－３ｐを含む個別のｍｉＲＮＡが、アデニル化頻度と発現レベルとの間の強い相関を示し、これは、成熟ｍｉＲＮＡ配列の安定化に対応する（Ｄ’Ａｍｂｒｏｇｉｏら、Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　２０１２）。ｍｉＲ－２１０－３ｐのレベルはＲＣＣ進行中に増加するが、これは、３’末端アデニル化の形態での転写後修飾を介したｍｉＲＮＡ安定化の結果であり得る。

【０１２３】

２．ステージＩＶの個体と健康な個体との間で、成熟ｍｉＲ－１９９ｂ－３ｐは示差的には発現されないが（図１１を参照のこと）、アデニル化パターンには、高度に有意な差異（ｐ値が３．８３Ｅ－０６）が存在する。さらに、ｍｉＲ－１９９ｂ－３ｐは、腎発癌に関する４つの関連性の高い遺伝子（ＭＥＤ６、ＫＲＴ７、ＭＥＴ、ＪＵＮＢ）を標的としている。したがって、このｍｉＲＮＡは、腫瘍形成に関与すると推定されるが、ｉｓｏ

ｍｉＲ含量を独立して決定することの重要さを強調する、従来の分析パイプラインによっては検出されない。

【０１２４】

３．処置後に再発を伴わないｃｃＲＲＣを有する個体は、健康な個体により近いｍｉＲ－１９９ｂ－３ｐアデニル化比率（３５％、ｐ値＝０．１３）を示すが、再発を伴う個体は、ステージＩＶ個体により近い比率（２２％、ｐ値＝４．７２＊１０－４）を有する。非常に類似したパターンがｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐについても観察できる（図１１を参照のこと）。これは、ｉｓｏｍｉＲが、予期しなかった予後バイオマーカーとしての潜在能を有することを示唆している。

【０１２５】

＜実施例３＞

＜生物流体中のｉｓｏｍｉＲは、がんサブタイプおよび健康な患者を識別する＞

４人の健康なボランティアおよび前立腺がんと診断された９人の患者から、尿を収集した。エキソソームを収集し、実施例１に記載したようにしてＲＮＡを抽出した。低分子ｎｃＲＮＡの発現プロファイリングおよびデータ分析を、実施例１および実施例２と同様に実施した。

【０１２６】

所与のｍｉＲＮＡに属する全てのリードを検出した後、リードをｉ）標準配列のｍｉＲＮＡ、ｉｉ）非テンプレート型付加（ＮＴＡ）、ｉｉｉ）５’末端および／または３’末端トリミングされたバリアントに、階層的に分類する（ｉｓｏｍｉＲ型に割り当てる）。各ｍｉＲＮＡおよびｉｓｏｍｉＲ型についてｉｓｏｍｉＲ比率を計算する。最も統計的に有意な比率（ｐ値によって決定される）は、図１２に示される。バリアント対標準配列の比率は、健康な患者と前立腺がんを有する患者との間で有意である。

【０１２７】

＜実施例４＞

＜ヒト血漿から小胞を一段階に単離するためのサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）＞

循環する血液中のｎｃＲＮＡ、例えば（ｍｉＲＮＡ）を測定することは、早期がん検出、予後およびモニタリングのために有用であり得る。組織および培養細胞に対する徹底的なＲＮＡシーケンシングは、ｎｃＲＮＡの複雑かつダイナミックなレパートリーを明らかにする。２０００以上の成熟ｍｉＲＮＡ種が同定されており、その多くは、循環および他の生物流体、例えば、唾液および尿において検出されている。しかし、単一のゲノム遺伝子座が、多くの機能的に異なるｎｃＲＮＡバリアントを産生することができる。

【０１２８】

血液中の細胞外ｎｃＲＮＡの大部分は、タンパク質複合体、脂質小胞（ＬＤＬおよびＨＤＬ）および細胞外小胞を含む可溶性の生化学的画分と関連している。総血清または血漿における包括的なｎｃＲＮＡプロファイリングは、技術的限界によって冗長なものとなっている。循環する低分子ＲＮＡおよびそれらのバリアントの低分子ＲＮＡライブラリー調製物は、アダプターライゲーションに利用可能である無傷なｎｃＲＮＡ種の十分な濃度および純度を必要とする。

【０１２９】

個体の健康状態と関連するｎｃＲＮＡを測定するためにシグナル対ノイズ比率を増加させるために、本発明者らは、精製されたエキソソーム小胞（ＥＶ）およびタンパク質画分中のｍｉＲＮＡを以下のように測定した。

【０１３０】

＜セファロースＣＬ－２Ｂの事前処理＞

・ビーカー中に２０ｍＬのセファロースＣＬ－２Ｂ（１カラム当たり）を注ぎ、セファロースＣＬ－２Ｂを少なくとも１５分間沈降させる。

・上清を廃棄する

・１５ｍＬの緩衝液を添加し、穏やかに旋回させ混合する

・セファロースを少なくとも１５分間沈殿させる
・２回洗浄を行う
・上清を廃棄し、１０ｍＬの緩衝液を添加する。
【０１３１】
＜カラム調製＞
・１０ｍＬシリンジを使用する
・ナイロン製パンティーストッキングをシリンジの出口に押し付ける
・洗浄したセファロースをカラム中にピペッティングする（プラスチックパスツールピペットを使用する）
・セファロースを静置させ、カラムが実行中に乾燥するのを防ぐ。使用の際、カラムは、垂直で、角度なしであるべきである
・セファロースが１０ｍＬ積み重なるまで、セファロースを添加する
・使用まで緩衝液を添加するか、またはシリンジ出口を栓で塞ぎ、カラムが実行中に乾燥するのを防ぐ。調製したカラムは数時間以内に使用する。
【０１３２】
＜サンプルローディング＞
緩衝液を、セファロースカラム中にほぼ完全に入れる（ただし、カラムが実行中に乾燥するのを防ぐ）
・１．５ｍＬの血漿をカラム上にロードする
・ただちに０．５ｍＬのサンプルの収集を開始する
・血漿サンプルがセファロースにほぼ完全に入ったら、シリンジが完全に満たされるまで、緩衝液を注意深く添加する
・全ての画分を収集するまで（最大２６画分）、緩衝液の添加を反復する。
【０１３３】
＜臨床サンプルに由来する循環する低分子ＲＮＡのシーケンシング＞
・Ｔｒｉｚｏｌ単離法を使用して、単一画分から総ＲＮＡを単離する
・バイオアナライザーでＲＮＡを測定し、品質制御のためにＲＴ－ＰＣＲを使用する
・製造業者のガイドライン（Ｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｔｒｕｓｅｑ）を使用して低分子ＲＮＡライブラリーを調製する
・製造業者の指示（Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑ）を使用して、ライブラリーをシーケンシングする。
【０１３４】
古典的ホジキンリンパ腫の患者から取得した血漿を、上記のようにＳＥＣに供した。図１４に示されるように、ＳＥＣは、血漿からの循環ＥＶの一段階単離を可能にする。ｍｉＲＮＡ分布は、ＥＶ画分とタンパク質／ＨＤＬ画分との間で異なる（図１４Ｅ）。
【０１３５】
上記方法を使用して、本発明者らは、ホジキンリンパ腫患者における治療反応モニタリングを可能にする複数の小胞関連ｍｉＲＮＡおよびタンパク質画分関連ｍｉＲＮＡを発見した。これらの結果は、実施例５で議論される。
【０１３６】
＜実施例５＞
＜ホジキンリンパ腫の血漿から単離されたＥＶ＞
ホジキンリンパ腫の患者から取得した血漿を、実施例４に記載されるようにＳＥＣに供した。結果を、図１６～図１８に示す。
【０１３７】
＜実施例６＞
生物流体中のｉｓｏｍｉＲは、ホジキンリンパ腫患者から健康な個体を識別する。細胞外小胞およびタンパク質結合ＲＮＡ画分の単離は、実施例４および実施例５に記載されるように実施した。低分子ｎｃＲＮＡの発現プロファイリングおよびデータ分析を、実施例１および実施例２と同様に実施した。

【０１３８】
所与のｍｉＲＮＡに属する全てのリードを検出した後に、それらのリードを、ｉ）標準配列のｍｉＲＮＡ、ｉｉ）非テンプレート型付加（ＮＴＡ）、ならびにｉｉｉ）標準配列からの５’末端および／または３’末端配列バリアント（例えば、トランケーションまたは延長）に、階層的に分類する（ｉｓｏｍｉＲ型に割り当てる）。ｉｓｏｍｉＲ比率を、各ｍｉＲＮＡおよび各ｉｓｏｍｉＲ型について計算する。本発明者らは、それらを、所与のｍｉＲＮＡにマッピングされたリードの総数（標準リード数＋全てのｉｓｏｍｉＲ）によって除算された、所与のｉｓｏｍｉＲ型に属するリードの数として定義する。最も統計的に有意な比率（ｐ値によって決定される）が、図１５に示される。バリアント対標準の比率は、ホジキンリンパ腫を有する個体と健康な個体との間で有意である。

【０１３９】
＜実施例７＞
生物流体中のｉｓｏｍｉＲは、乳がんステージＩＩと疾患のステージＩＩＩとを識別し、疾患が再発した乳がん患者を再発していないの乳がん患者から識別する。

【０１４０】
データソースおよび実験手順は、公に入手可能であり、以下においてアクセス可能である。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｓｒａ？ｔｅｒｍ＝ＳＲＰ０２７５８９およびｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｉｏｐｒｏｊｅｃｔ？ＬｉｎｋＮａｍｅ＝ｓｒａ＿ｂｉｏｐｒｏｊｅｃｔ＆ｆｒｏｍ＿ｕｉｄ＝４５５５８４。

【０１４１】
公に入手可能な血清中のｎｃＲＮＡの配列データを分析して、ｎｃＲＮＡバリアントの比率が健康状態を分類するために使用できるかどうかを決定した。低分子ｎｃＲＮＡの発現プロファイリングおよびデータ分析は、実施例２と同様に実施した。

【０１４２】
所与のｍｉＲＮＡに属する全てのリードを検出した後に、ｉ）標準配列のｍｉＲＮＡ、ｉｉ）非テンプレート型付加（ＮＴＡ）、ｉｉｉ）標準配列からの５’末端、および／または、３’末端配列バリアント（例えば、トランケーションまたは延長）に、それらのリードを、階層的に分類する（ｉｓｏｍｉＲ型に割り当てる）。ｉｓｏｍｉＲ比率を、各ｍｉＲＮＡおよび各ｉｓｏｍｉＲ型について計算する。本発明者らは、それらを、所与のｍｉＲＮＡにマッピングされたリードの総数（標準リード数＋全てのｉｓｏｍｉＲ）によって除算された、所与のｉｓｏｍｉＲ型に属するリードの数として規定する。最も統計的に有意な比率（ｐ値によって決定される）は、表６に示される。バリアント対標準の比率は、ステージＩＩ患者とステージＩＩＩ乳がんを有する患者との間で有意である。

【０１４３】
＜実施例８＞
＜組織中のｉｓｏｍｉＲは、精巣胚細胞腫瘍から非腫瘍隣接組織を識別する＞
データ供給源および実験手順は、公に入手可能であり、以下においてアクセス可能である。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｓｒａ？ｔｅｒｍ＝ＳＲＰ００７９４６およびｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｉｏｐｒｏｊｅｃｔ／１５４９９３。公に入手可能な血清中のｎｃＲＮＡの配列データを分析して、ｎｃＲＮＡバリアントの比率が健康状態を分類するために使用できるかどうかを決定した。

【０１４４】
低分子ｎｃＲＮＡの発現プロファイリングおよびデータ分析を、実施例２と同様に実施した。

【０１４５】
所与のｍｉＲＮＡに属する全てのリードを検出した後に、それらのリードを、ｉ）標準配列のｍｉＲＮＡ、ｉｉ）非テンプレート型付加（ＮＴＡ）、ｉｉｉ）標準配列からの５’末端および／または３’末端配列バリアント（例えば、トランケーションまたは延長）

に、階層的に分類する（ｉｓｏｍｉＲ型に割り当てる）。ｉｓｏｍｉＲ比率を、各ｍｉＲＮＡおよびｉｓｏｍｉＲ型について計算する。本発明者らは、それらを、所与のｍｉＲＮＡにマッピングされたリードの総数（標準リード数＋全てのｉｓｏｍｉＲ）によって除算された、所与のｉｓｏｍｉＲ型に属するリードの数として規定する。最も統計的に有意な比率（ｐ値によって決定される）は、表７に示される。バリアント対標準の比率は、隣接組織と精巣胚細胞腫瘍に由来する組織との間で有意である。

【０１４６】

＜実施例９＞

＜組織中のｉｓｏｍｉＲは、結腸直腸腫瘍組織から、および、結腸直腸がん関連転移組織から結腸直腸正常組織を識別する＞

データ供給源および実験手順は、公に入手可能であり、以下においてアクセス可能である。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／Ｔｒａｃｅｓ／ｓｒａ／？ｓｔｕｄｙ＝ＳＲＰ０２２０５４およびｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｉｏｐｒｏｊｅｃｔ／ＰＲＪＮＡ２０１２４５およびＲｏｈｒ Ｃら、「Ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｍｉＲＮＡ ａｎｄ ｍＲＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｏｆ ｐａｉｒｅｄ ｃｏｌｏｒｅｃｔａｌ ｎｏｒｍａｌ，ｔｕｍｏｒ ａｎｄ ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ ｔｉｓｓｕｅｓ ａｎｄ ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃ ｍｏｄｅｌｉｎｇ ｏｆ ｍｉＲＮＡ－１ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．」、ＰＬｏＳ Ｏｎｅ、２０１３ Ｊｕｌ ２；８（７）：ｅ６７４６１。公に入手可能な血清中のｎｃＲＮＡの配列データを分析して、ｎｃＲＮＡバリアントの比率が健康状態を分類するために使用できるかどうかを決定した。

【０１４７】

低分子ｎｃＲＮＡの発現プロファイリングおよびデータ分析を、実施例２と同様に実施した。

【０１４８】

所与のｍｉＲＮＡに属する全てのリードを検出した後に、それらのリードを、ｉ）標準配列のｍｉＲＮＡ、ｉｉ）非テンプレート型付加（ＮＴＡ）、ｉｉｉ）標準配列からの５’末端および／または３’末端配列バリアント（例えば、トランケーションまたは延長）に、階層的に分類する（ｉｓｏｍｉＲ型に割り当てる）。ｉｓｏｍｉＲ比率を、各ｍｉＲＮＡおよびｉｓｏｍｉＲ型について計算する。本発明者らは、それらを、所与のｍｉＲＮＡにマッピングされたリードの総数（標準リード数＋全てのｉｓｏｍｉＲ）によって除算された、所与のｉｓｏｍｉＲ型に属するリードの数として規定する。最も統計的に有意な比率（ｐ値によって決定される）は、表８に示される。バリアント対標準の比率は、正常結腸組織と結腸直腸腫瘍由来の組織との間、ならびに正常結腸組織と結腸直腸腫瘍関連転移との間、ならびに結腸直腸腫瘍組織と結腸直腸腫瘍関連転移との間で有意である。

【０１４９】

＜実施例１０＞

＜生物流体中のｉｓｏｍｉＲは、アルツハイマー病と診断された患者から健康な個体を識別する＞

データ供給源および実験手順は、公に入手可能であり、以下においてアクセス可能である。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｓｒａ？ｔｅｒｍ＝ＳＲＰ０２２０４３およびｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｂｉｏｐｒｏｊｅｃｔ？ＬｉｎｋＮａｍｅ＝ｓｒａ＿ｂｉｏｐｒｏｊｅｃｔ＆ｆｒｏｍ＿ｕｉｄ＝３８７９６７およびＬｅｉｄｉｎｇｅｒ Ｐら、「Ａ ｂｌｏｏｄ ｂａｓｅｄ １２－ｍｉＲＮＡ ｓｉｇｎａｔｕｒｅ ｏｆ Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ ｄｉｓｅａｓｅ ｐａｔｉｅｎｔｓ．」、Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌ、２０１３ Ｊｕｌ ２９；１４（７）：Ｒ７８。

【０１５０】

公に入手可能な血清中のｎｃＲＮＡの配列データを分析して、ｎｃＲＮＡバリアントの比率が健康状態を分類するために使用できるかどうかを決定した。低分子ｎｃＲＮＡの発

現プロファイリングおよびデータ分析を、実施例２と同様に実施した。

【０１５１】

所与のｍｉＲＮＡに属する全てのリードを検出した後に、リードを、ｉ）標準配列のｍｉＲＮＡ、ｉｉ）非テンプレート型付加（ＮＴＡ）、ｉｉｉ）標準配列からの５’末端、および／または、３’末端配列バリアント（例えば、トランケーションまたは延長）に、階層的に分類する（ｉｓｏｍｉＲ型に割り当てる）。ｉｓｏｍｉＲ比率を、各ｍｉＲＮＡおよびｉｓｏｍｉＲ型について計算する。本発明者らは、それらを、所与のｍｉＲＮＡにマッピングされたリードの総数（標準リード数＋全てのｉｓｏｍｉＲ）によって除算された、所与のｉｓｏｍｉＲ型に属するリードの数として規定する。最も統計的に有意な比率（ｐ値によって決定される）は、表９に示される。バリアント対標準の比率は、健康な個体とアルツハイマー病を有する個体との間で有意である。

【０１５２】

＜参考文献＞

Ａｍａｒａｌ，Ｐ．Ｐ．、Ｄｉｎｇｅｒ，Ｍ．Ｅ．、Ｍｅｒｃｅｒ，Ｔ．Ｒ．、およびＭａｔｔｉｃｋ，Ｊ．Ｓ．（２００８）．Ｔｈｅ ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ ｇｅｎｏｍｅ ａｓ ａｎ ＲＮＡ ｍａｃｈｉｎｅ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ３１９、１７８７～１７８９．

Ａｍｅｒｅｓ，Ｓ．Ｌ．、およびＺａｍｏｒｅ，Ｐ．Ｄ．（２０１３）．Ｄｉｖｅｒｓｉｆｙｉｎｇ ｍｉｃｒｏＲＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎ．Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１４、４７５～４８８．

Ａｍｅｒｅｓ，Ｓ．Ｌ．、Ｍａｒｔｉｎｅｚ，Ｊ．、およびＳｃｈｒｏｅｄｅｒ，Ｒ．（２００７）．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｂａｓｉｓ ｆｏｒ ｔａｒｇｅｔ ＲＮＡ ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ ａｎｄ ｃｌｅａｖａｇｅ ｂｙ ｈｕｍａｎ ＲＩＳＣ．Ｃｅｌｌ １３０、１０１～１１２．

Ａｍｅｒｅｓ，Ｓ．Ｌ．、Ｈｏｒｗｉｃｈ，Ｍ．Ｄ．、Ｈｕｎｇ，Ｊ．－Ｈ．、Ｘｕ，Ｊ．、Ｇｈｉｌｄｉｙａｌ，Ｍ．、Ｗｅｎｇ，Ｚ．、およびＺａｍｏｒｅ，Ｐ．Ｄ．（２０１０）．Ｔａｒｇｅｔ ＲＮＡ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｔｒｉｍｍｉｎｇ ａｎｄ ｔａｉｌｉｎｇ ｏｆ ｓｍａｌｌ ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ ＲＮＡｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２８、１５３４～１５３９．

Ｂａｃｃａｒｉｎｉ，Ａ．、Ｃｈａｕｈａｎ，Ｈ．、Ｇａｒｄｎｅｒ，Ｔ．Ｊ．、Ｊａｙａｐｒａｋａｓｈ，Ａ．Ｄ．、Ｓａｃｈｉｄａｎａｎｄａｍ，Ｒ．、およびＢｒｏｗｎ，Ｂ．Ｄ．（２０１１）．Ｋｉｎｅｔｉｃ ａｎａｌｙｓｉｓ ｒｅｖｅａｌｓ ｔｈｅ ｆａｔｅ ｏｆ ａ ｍｉｃｒｏＲＮＡ ｆｏｌｌｏｗｉｎｇ ｔａｒｇｅｔ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ．Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．２１、３６９～３７６．

Ｂａｃｋｅｓ，Ｓ．、Ｓｈａｐｉｒｏ，Ｊ．Ｓ．、Ｓａｂｉｎ，Ｌ．Ｒ．、Ｐｈａｍ，Ａ．Ｍ．、Ｒｅｙｅｓ，Ｉ．、Ｍｏｓｓ，Ｂ．、Ｃｈｅｒｒｙ，Ｓ．、およびｔｅｎＯｅｖｅｒ，Ｂ．Ｒ．（２０１２）．Ｄｅｇｒａｄａｔｉｏｎ ｏｆ ｈｏｓｔ ｍｉｃｒｏＲＮＡｓ ｂｙ ｐｏｘｖｉｒｕｓ ｐｏｌｙ（Ａ）ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｒｅｖｅａｌｓ ｔｅｒｍｉｎａｌ ＲＮＡ ｍｅｔｈｙｌａｔｉｏｎ ａｓ ａ ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ ａｎｔｉｖｉｒａｌ ｍｅｃｈａｎｉｓｍ．Ｃｅｌｌ Ｈｏｓｔ Ｍｉｃｒｏｂｅ １２、２００～２１０．

Ｂａｌａｊ，Ｌ．、Ｌｅｓｓａｒｄ，Ｒ．、Ｄａｉ，Ｌ．、Ｃｈｏ，Ｙ．－Ｊ．、Ｐｏｍｅｒｏｙ，Ｓ．Ｌ．、Ｂｒｅａｋｅｆｉｅｌｄ，Ｘ．Ｏ．、およびＳｋｏｇ，Ｊ．（２０１１）．Ｔｕｍｏｕｒ ｍｉｃｒｏｖｅｓｉｃｌｅｓ ｃｏｎｔａｉｎ ｒｅｔｒｏｔｒａｎｓｐｏｓｏｎ ｅｌｅｍｅｎｔｓ ａｎｄ ａｍｐｌｉｆｉｅｄ ｏｎｃｏｇｅｎｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ．Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．２，１８０．

Ｖａｎ Ｂａｌｋｏｍ，Ｂ．Ｗ．Ｍ．、ｄｅ Ｊｏｎｇ，Ｏ．Ｇ．、Ｓｍｉｔｓ，Ｍ．、Ｂｒｕｍｍｅｌｍａｎ，Ｊ．、ｄｅｎ Ｏｕｄｅｎ，Ｋ．、ｄｅ Ｂｒｅｅ，Ｐ．Ｍ．、ｖａｎ Ｅｉｊｎｄｈｏｖｅｎ，Ｍ．Ａ．Ｊ．、Ｐｅｇｔｅｌ，Ｄ．Ｍ．、Ｓｔｏｏｒｖｏｇｅｌ，Ｗ．、Ｗｕｒｄｉｎｇｅｒ，Ｔ．ら（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, S1－15.
Bellingham, S. A.、Coleman, B. M.、およびHill, A. F.（2012）. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion－infected neuronal cells. Nucleic Acids Res. 40、10937～10949.
Bijnsdorp, I. V, Geldof, A. A.、Lavaei, M.、Piersma, S. R.、van Moorselaar, R. J. A.、およびJimenez, C. R.（2013）. Exosomal ITGA3 interferes with non－cancerous prostate cell functions and is increased in urine exosomes of metastatic prostate cancer patients. J. Extracell. Vesicles 2.
Burns, D. M.、D'Ambrogio, A.、Nottrott, S.、およびRichter, J. D.（2011）. CPEB and two poly（A）polymerases control miR－122 stability and p53 mRNA translation. Nature 473、105～108.
Burroughs, A. M.、Ando, Y.、de Hoon, M. J. L.、Tomaru, Y.、Nishibu, T.、Ukekawa, R.、Funakoshi, T.、Kurokawa, T.、Suzuki, H.、Hayashizaki, Y.ら（2010）. A comprehensive survey of 3' animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness. Genome Res. 20、1398～1410.
Chairoungdua, A.、Smith, D. L.、Pochard, P.、Hull, M.、およびCaplan, M. J.（2010）. Exosome release of β－catenin：a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. J. Cell Biol. 190、1079～1091.
Chitwood, D. H.、およびTimmermans, M. C. P.（2010）. Small RNAs are on the move. Nature 467、415～419.
Chuma, S.、およびPillai, R. S.（2009）. Retrotransposon silencing by piRNAs：ping－pong players mark their sub－cellular boundaries. PLoS Genet. 5、e1000770.
Cullen, B. R.（2009）. Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs. Nature 457、421～425.
D'Ambrogio, A.、Gu, W.、Udagawa, T.、Mello, C. C.、およびRichter, J. D.（2012）. Specific miRNA stabilization by Gld2－catalyzed monoadenylation. Cell Rep. 2、1537～1545.
Ebert, M. S.、およびSharp, P. A.（2012）. Roles for microRNAs in conferring robustness to b

iological processes. Cell 149、515～524.
Feederle, R.、Haar, J.、Bernhardt, K.、Linnstaedt, S. D.、Bannert, H.、Lips, H.、Cullen, B. R.、およびDelecluse, H.－J.（2011）. The members of an Epstein－Barr virus microRNA cluster cooperate to transform B lymphocytes. J. Virol. 85、9801～9810.
Fernandez－Valverde, S. L.、Taft, R. J.、およびMattick, J. S.（2010）. Dynamic isomiR regulation in Drosophila development. RNA 16、1881～1888.
Garcia, E. L.、Onafuwa－Nuga, A.、Sim, S.、King, S. R.、Wolin, S. L.、およびTelesnitsky, A.（2009）. Packaging of host mY RNAs by murine leukemia virus may occur early in Y RNA biogenesis. J. Virol. 83、12526～12534.
Gibbings, D. J.、Ciaudo, C.、Erhardt, M.、およびVoinnet, O.（2009）. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. Nat. Cell Biol. 11、1143～1149.
Guasparri, I.、Bubman, D.、およびCesarman, E.（2008）. EBV LMP2A affects LMP1－mediated NF－kappaB signaling and survival of lymphoma cells by regulating TRAF2 expression. Blood 111、3813～3820.
Guduric－Fuchs, J.、O'Connor, A.、Camp, B.、O'Neill, C. L.、Medina, R. J.、およびSimpson, D. A.（2012）. Selective extracellular vesicle－mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. BMC Genomics 13, 357.
Guo, L.、Yang, Q.、Lu, J.、Li, H.、Ge, Q.、Gu, W.、Bai, Y.、およびLu, Z.（2011）. A comprehensive survey of miRNA repertoire and 3' addition events in the placentas of patients with pre－eclampsia from high－throughput sequencing. PLoS One 6、e21072.
Jones, M. R.、Quinton, L. J.、Blahna, M. T.、Neilson, J. R.、Fu, S.、Ivanov, A. R.、Wolf, D. A.、およびMizgerd, J. P.（2009）. Zcchc11－dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression. Nat. Cell Biol. 11、1157～1163.
Kai, Z. S.、およびPasquinelli, A. E.（2010）. MicroRNA assassins：factors that regulate the disappearance of miRNAs. Nat. Struct. Mol. Biol. 17, 5－10.
Katoh, T.、Sakaguchi, Y.、Miyauchi, K.、Suzuki, T.、Kashiwabara, S.－I.、Baba, T.、およびSuzuki, T.（2009）. Selective stabilization of mamm

alian microRNAs by 3’ adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. Genes Dev. 23、433～438.
Khan, M. A.、Goila-Gaur, R.、Opi, S.、Miyagi, E.、Takeuchi, H.、Kao, S.、およびStrebel, K.（2007）. Analysis of the contribution of cellular and viral RNA to the packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions. Retrovirology 4, 48.
Koppers-Lalic, D.、Hogenboom, M. M.、Middeldorp, J. M.、およびPegtel, D. M.（2012）. Virus-modified exosomes for targeted rna delivery; A new approach in nanomedicine. Adv. Drug Deliv. Rev.
Kosaka, N.、Iguchi, H.、Yoshioka, Y.、Takeshita, F.、Matsuki, Y.、およびOchiya, T.（2010）. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. J. Biol. Chem. 285、17442～17452.
Kosaka, N.、Iguchi, H.、Hagiwara, K.、Yoshioka, Y.、Takeshita, F.、およびOchiya, T.（2013）. Neutral sphingomyelinase 2（nSMase2）-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. J. Biol. Chem. 288、10849～10859.
Lee, Y. S.、Pressman, S.、Andress, A. P.、Kim, K.、White, J. L.、Cassidy, J. J.、Li, X.、Lubell, K.、Lim, D. H.、Cho, I. S.ら（2009a）. Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. Nat. Cell Biol. 11、1150～1156.
Lee, Y. S.、Shibata, Y.、Malhotra, A.、およびDutta, A.（2009b）. A novel class of small RNAs：tRNA-derived RNA fragments（tRFs）. Genes Dev. 23, 2639-2649.
Lujambio, A.、およびEsteller, M.（2007）. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. Cell Cycle 6、1455～1459.
Martens-Uzunova, E. S.、Olvedy, M.、およびJenster, G.（2013）. Beyond microRNA--novel RNAs derived from small non-coding RNA and their implication in cancer. Cancer Lett. 340、201～211.
Martin, G.、およびKeller, W.（2007）. RNA-specific ribonucleotidyl transferases. RNA 13、1834～1849.
Maute, R. L.、Schneider, C.、Sumazin, P.、Holmes, A.、Califano, A.、Basso, K.、およびDalla-Favera, R.（2013）. tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage resp

onse and is down－regulated in B cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110、1404～1409.
Mittelbrunn, M.、およびSanchez－Madrid, F.（2012）. Intercellular communication：diverse structures for exchange of genetic information. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13、328～335.
Mittelbrunn, M.、Gutierrez－Vazquez, C.、Villarroya－Beltri, C.、Gonzalez, S.、Sanchez－Cabo, F.、Gonzalez, M. A.、Bernad, A.、およびSanchez－Madrid, F.（2011）. Unidirectional transfer of microRNA－loaded exosomes from T cells to antigen－presenting cells. Nat. Commun. 2, 282.
Montecalvo, A.、Larregina, A. T.、Shufesky, W. J.、Stolz, D. B.、Sullivan, M. L. G.、Karlsson, J. M.、Baty, C. J.、Gibson, G. A.、Erdos, G.、Wang, Z.ら（2012）. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. Blood 119、756～766.
Morin, R. D.、O'Connor, M. D.、Griffith, M.、Kuchenbauer, F.、Delaney, A.、Prabhu, A.－L.、Zhao, Y.、McDonald, H.、Zeng, T.、Hirst, M.、ら（2008）. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. Genome Res. 18、610～621.
Mullokandov, G.、Baccarini, A.、Ruzo, A.、Jayaprakash, A. D.、Tung, N.、Israelow, B.、Evans, M. J.、Sachidanandam, R.、およびBrown, B. D.（2012）. High－throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. Nat. Methods 9、840～846.
Nolte－'t Hoen, E. N. M.、Buermans, H. P. J.、Waasdorp, M.、Stoorvogel, W.、Wauben, M. H. M.、およびt Hoen, P. A. C.（2012）. Deep sequencing of RNA from immune cell－derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non－coding RNA biotypes with potential regulatory functions. Nucleic Acids Res. 40、9272～9285.
Palma, J.、Yaddanapudi, S. C.、Pigati, L.、Havens, M. A.、Jeong, S.、Weiner, G. A.、Weimer, K. M. E.、Stern, B.、Hastings, M. L.、およびDuelli, D. M.（2012）. MicroRNAs are exported from malignant cells in customized particles. Nucleic Acids Res. 40、9125～9138.
Parekh, S.、Polo, J. M.、Shaknovich, R.、Juszczynski, P.、Lev, P.、Ranuncolo, S. M.、Yin, Y.、Kl

ein, U.、Cattoretti, G.、DallaFavera, R.ら（2007）. BCL6 programs lymphoma cells for survival and differentiation through distinct biochemical mechanisms. Blood 110、2067～2074.
Pegtel, D. M.、Cosmopoulos, K.、Thorley-Lawson, D. A.、van Eijndhoven, M. A. J.、Hopmans, E. S.、Lindenberg, J. L.、de Gruijl, T. D.、Wurdinger, T.、およびMiddeldorp, J. M.（2010）. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107、6328～6333.
Pegtel, D. M.、van de Garde, M. D. B.、およびMiddeldorp, J. M.（2011）. Viral miRNAs exploiting the endosomal-exosomal pathway for intercellular cross-talk and immune evasion. Biochim. Biophys. Acta 1809、715～721.
Polikepahad, S.、およびCorry, D. B.（2013）. Profiling of T helper cell-derived small RNAs reveals unique antisense transcripts and differential association of miRNAs with argonaute proteins 1 and 2. Nucleic Acids Res. 41、1164～1177.
Qiu, J.、Cosmopoulos, K.、Pegtel, M.、Hopmans, E.、Murray, P.、Middeldorp, J.、Shapiro, M.、およびThorley-Lawson, D. A.（2011）. A novel persistence associated EBV miRNA expression profile is disrupted in neoplasia. PLoS Pathog. 7、e1002193.
Riley, K. J.、Rabinowitz, G. S.、Yario, T. A.、Luna, J. M.、Darnell, R. B.、およびSteitz, J. A.（2012）. EBV and human microRNAs co-target oncogenic and apoptotic viral and human genes during latency. EMBO J. 31、2207～2221.
Robinson, M. D.、McCarthy, D. J.、およびSmyth, G. K.（2010）. edgeR：a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26、139～140.
Routh, A.、Domitrovic, T.、およびJohnson, J. E.（2012）. Host RNAs, including transposons, are encapsidated by a eukaryotic single-stranded RNA virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109、1907～1912.
Ruegger, S.、およびGroshans, H.（2012）. MicroRNA turnover：when, how、およびwhy. Trends Biochem. Sci. 37、436～446.
Saito, Y.、Liang, G.、Egger, G.、Friedman, J. M.、Chuang, J. C.、Coetzee, G. A.、およびJones, P. A.（2006）. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncog

ene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. Cancer Cell 9、435～443.
Scott, D. D.、およびNorbury, C. J. RNA decay via 3' uridylation. Biochim. Biophys. Acta 1829、654～665.
Scott, D. D.、およびNorbury, C. J.（2013）. RNA decay via 3'uridylation. Biochim. Biophys. Acta-Gene Regul. Mech. 1829、654～665.
Seto, E.、Moosmann, A.、Grominger, S.、Walz, N.、Grundhoff, A.、およびHammerschmidt, W.（2010）. Micro RNAs of Epstein-Barr virus promote cell cycle progression and prevent apoptosis of primary human B cells. PLoS Pathog. 6、e1001063.
Sim, S.、Weinberg, D. E.、Fuchs, G.、Choi, K.、Chung, J.、およびWolin, S. L.（2009）. The subcellular distribution of an RNA quality control protein, the Ro autoantigen, is regulated by noncoding Y RNA binding. Mol. Biol. Cell 20、1555～1564.
Skalsky, R. L.、Corcoran, D. L.、Gottwein, E.、Frank, C. L.、Kang, D.、Hafner, M.、Nusbaum, J. D.、Feederle, R.、Delecluse, H.-J.、Luftig, M. A.ら（2012）. The viral and cellular microRNA targetome in lymphoblastoid cell lines. PLoS Pathog. 8、e1002484.
Song, L.、Lin, C.、Gong, H.、Wang, C.、Liu, L.、Wu, J.、Tao, S.、Hu, B.、Cheng, S.-Y.、Li, M.ら（2013）. miR-486 sustains NF-κB activity by disrupting multiple NF-κB-negative feedback loops. Cell Res. 23、274～289.
Umezu, T.、Ohyashiki, K.、Kuroda, M.、およびOhyashiki, J. H.（2013）. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. Oncogene 32、2747～2755.
Vereide, D. T.、Seto, E.、Chiu, Y.-F.、Hayes, M.、Tagawa, T.、Grundhoff, A.、Hammerschmidt, W.、およびSugden, B.（2013）. Epstein-Barr virus maintains lymphomas via its miRNAs. Oncogene.
Verweij, F. J.、van Eijndhoven, M. A. J.、Middeldorp, J.、およびPegtel, D. M.（2013）. Analysis of viral microRNA exchange via exosomes in vitro and in vivo. Methods Mol. Biol. 1024、53～68.
Villarroya-Beltri, C.、Gutierrez-Vazquez, C.、Sanchez-Cabo, F.、Perez-Hernandez, D.、Vazquez, J.、Martin-Cofreces, N.、Martinez-Herrera, D. J.、Pascual-Montano, A.、Mittelbrunn,

M.、およびSanchez－Madrid, F.（2013）. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. Nat. Commun. 4, 2980.
Wee, L. M.、Flores－Jasso, C. F.、Salomon, W. E.、およびZamore, P. D.（2012）. Argonaute divides its RNA guide into domains with distinct functions and RNA－binding properties. Cell 151、1055～1067.
Wyman, S. K.、Knouf, E. C.、Parkin, R. K.、Fritz, B. R.、Lin, D. W.、Dennis, L. M.、Krouse, M. A.、Webster, P. J.、およびTewari, M.（2011）. Post－transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. Genome Res. 21、1450～1461.
Yao, B.、La, L. B.、Chen, Y.－C.、Chang, L.－J.、およびChan, E. K. L.（2012）. Defining a new role of GW182 in maintaining miRNA stability. EMBO Rep. 13、1102～1108.
Zhang, Y.、Liu, D.、Chen, X.、Li, J.、Li, L.、Bian, Z.、Sun, F.、Lu, J.、Yin, Y.、Cai, X.ら（2010）. Secreted monocytic miR－150 enhances targeted endothelial cell migration. Mol. Cell 39、133～144.
Zhuang, G.、Wu, X.、Jiang, Z.、Kasman, I.、Yao, J.、Guan, Y.、Oeh, J.、Modrusan, Z.、Bais, C.、Sampath, D.ら（2012）. Tumour－secreted miR－9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK－STAT pathway. EMBO J. 31、3513～3523.

【図１Ａ】

各サンプルの特性と低分子RNAのシーケンス結果

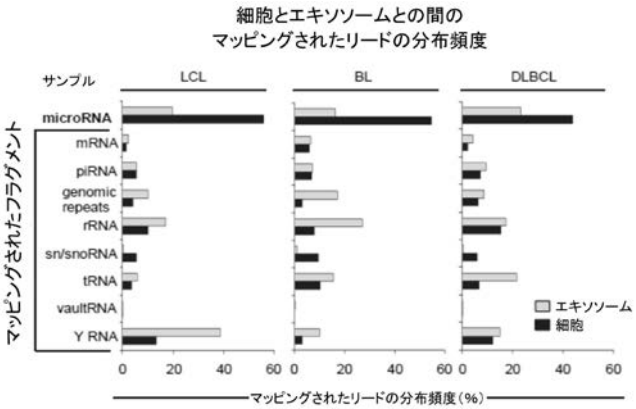
アノテーション	サンプル名	そのままのリード	破棄	ユニークなリード	マッピングされたリード数
DLBCL	BJAB cells	13337829	1939485	645476	11398344
	BJAB exosomes	6119426	4252910	188943	1866516
LCL3	RN cells	9876776	816448	382036	9060328
	RN exosomes	7948331	2179359	407540	5768972
LCL1	IK140508 cells	5946947	681212	352069	5265735
	IK140508 exosomes	6203008	1688894	319392	4514114
LCL2	IM-1 cells	8111347	3936763	219709	4174584
	IM-1 exosomes	1936176	728832	125077	1207344
BL1	Mutu I clone 9 cells	4954428	3393471	147551	1560957
	Mutu I clone 9 exo	8379288	4676116	460152	3703172
BL2	Mutu I clone 3 cells	7494150	4867868	241594	2626282
	Mutu I clone 3 exo	11934244	7068282	558980	4865962

【図１Ｂ】

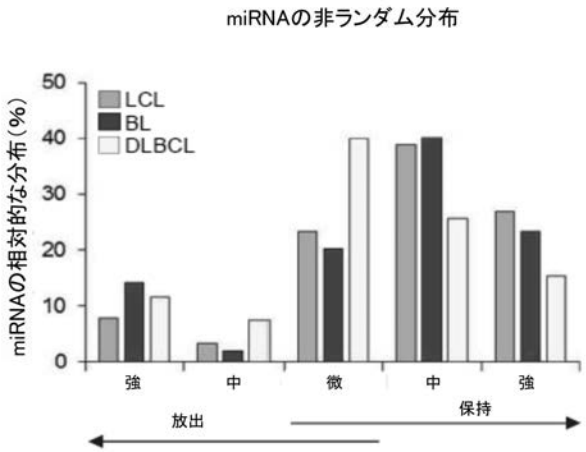
RNAシーケンシングに使用したサンプル
および低分子RNA画分

サンプル群	細胞株	画分（RNAシーケンシング）
リンパ芽球様 B細胞 EBV＋（n＝6）	LCL1	Cell + Exo
	LCL2	Cell + Exo
	LCL3	Cell + Exo
バーキットリンパ腫 EBV＋（n＝4）	BL1	Cell + Exo
	BL2	Cell + Exo
びまん性大細胞型 B細胞リンパ腫	DLBCL	Cell + Exo

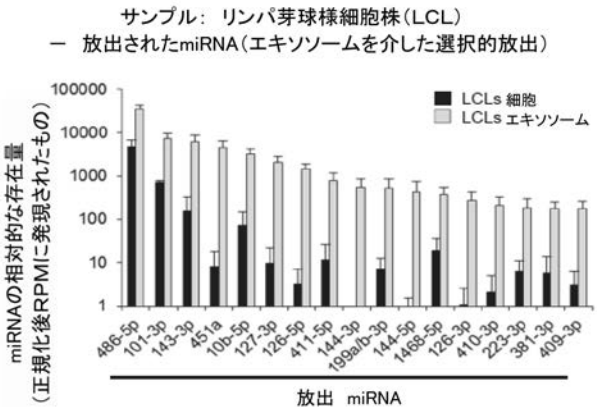
【図１Ｃ】



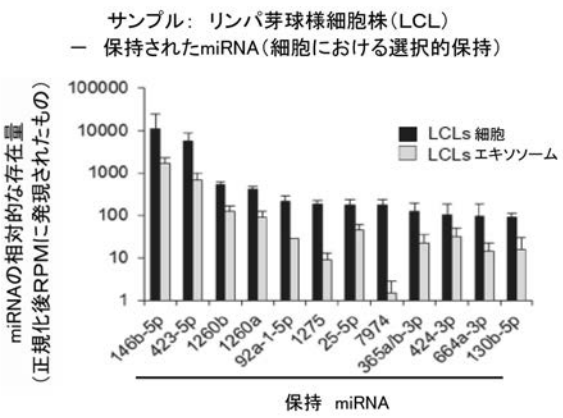
【図２Ａ】



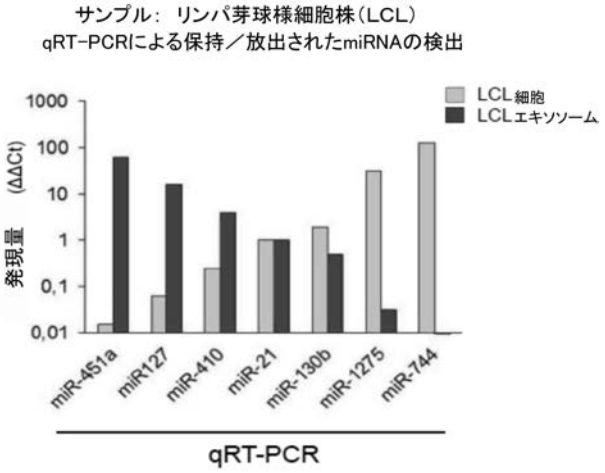
【図２Ｂ】



【図２Ｃ】



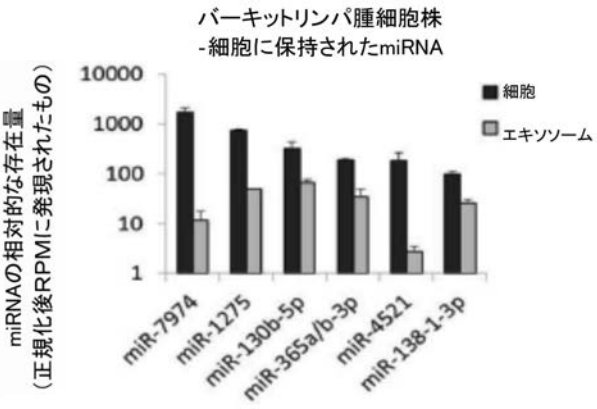
【図２Ｄ】



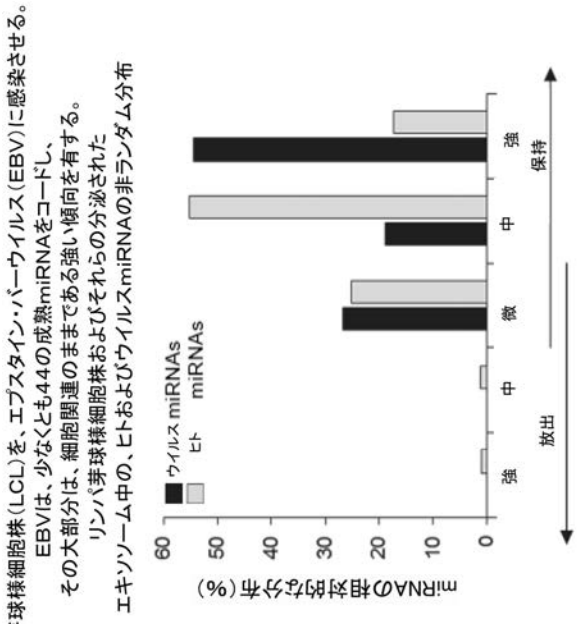
【図３Ａ】



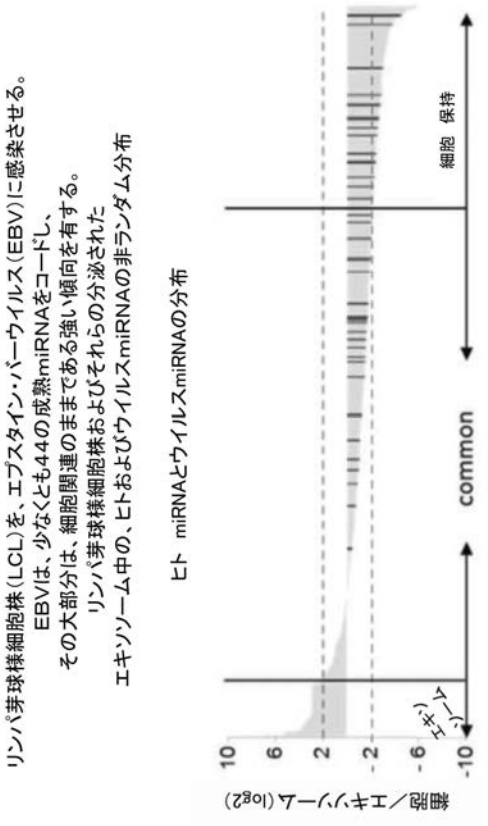
【図３Ｂ】



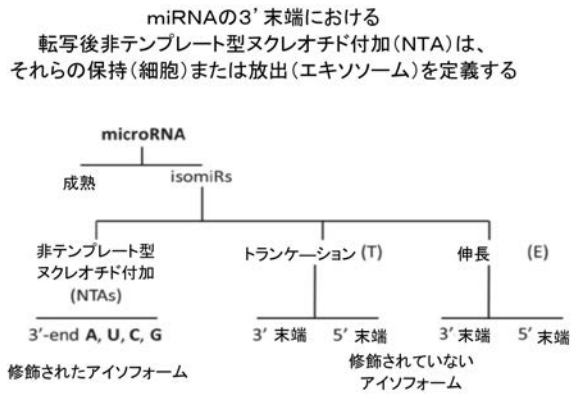
【図４Ａ】



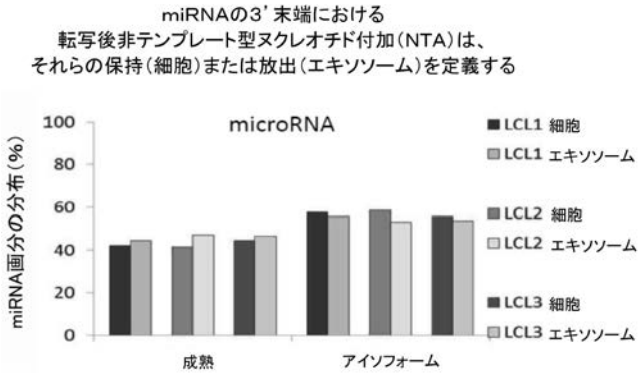
【図４Ｂ】



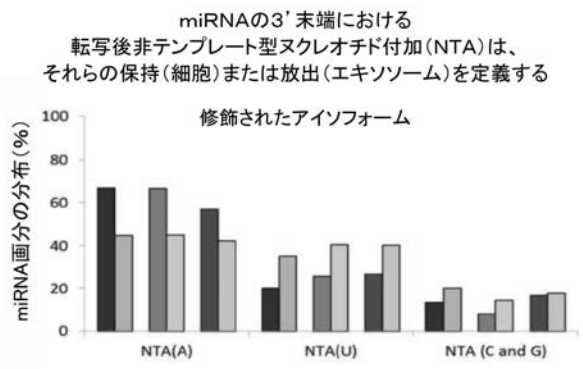
【図５Ａ】



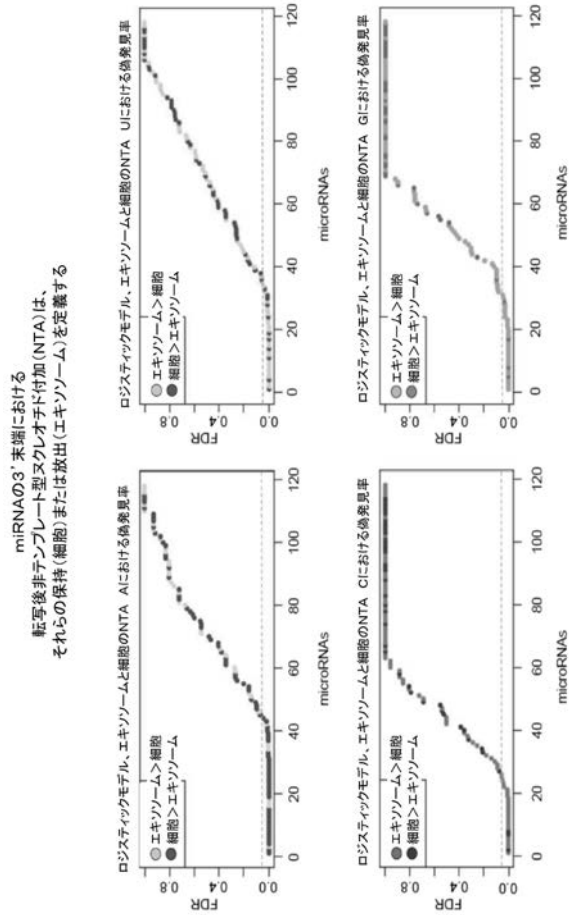
【図５Ｂ】



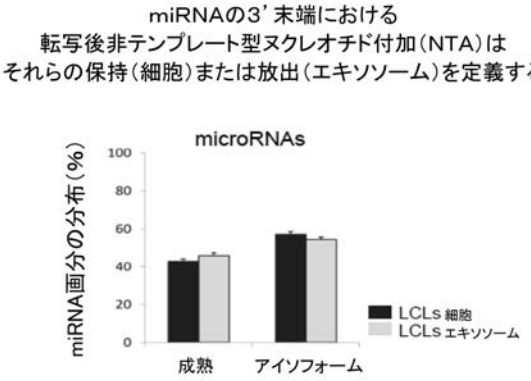
【図５Ｃ】



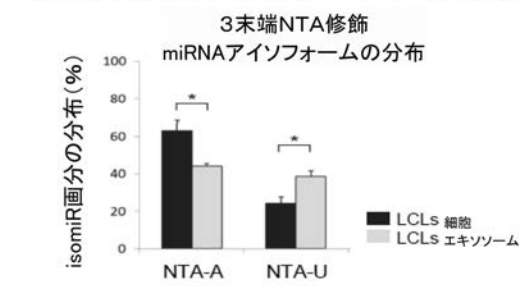
【図６】



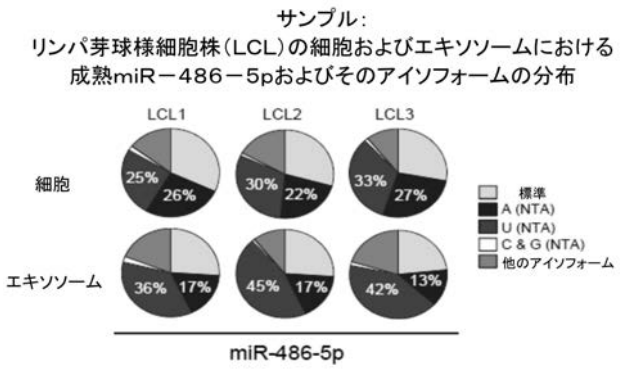
【図７Ａ】



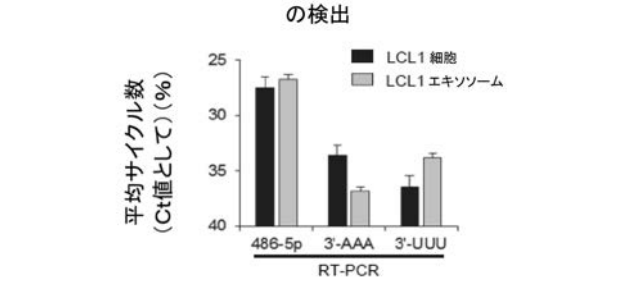
【図７Ｂ】



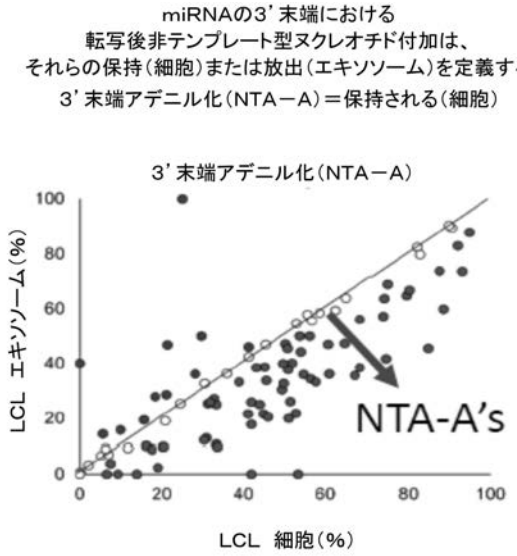
【図７Ｃ】



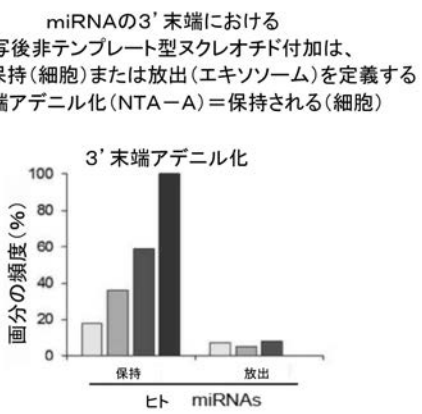
【図７Ｄ】



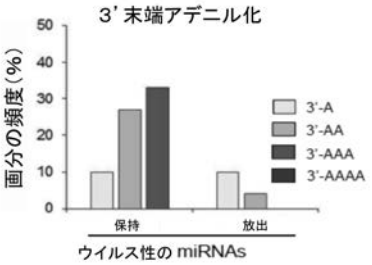
【図８Ａ】



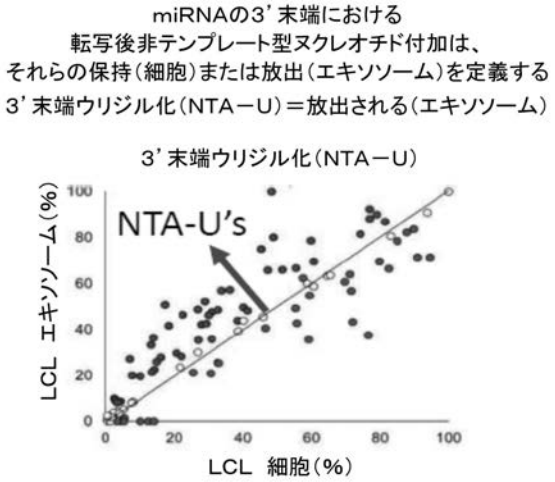
【図８Ｂ】



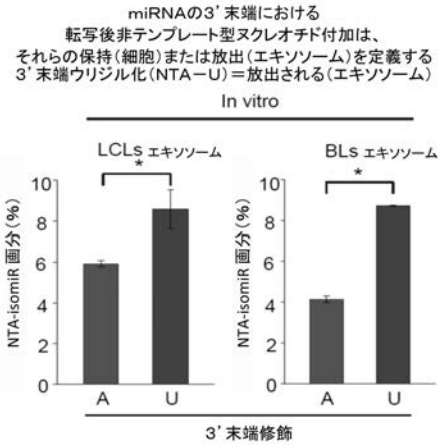
【図８Ｃ】



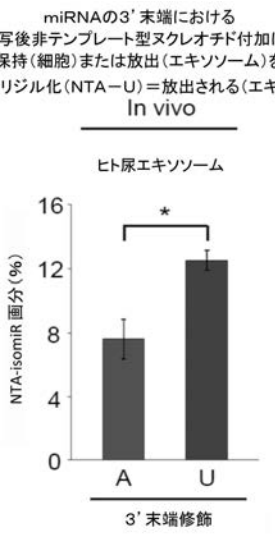
【図８Ｄ】



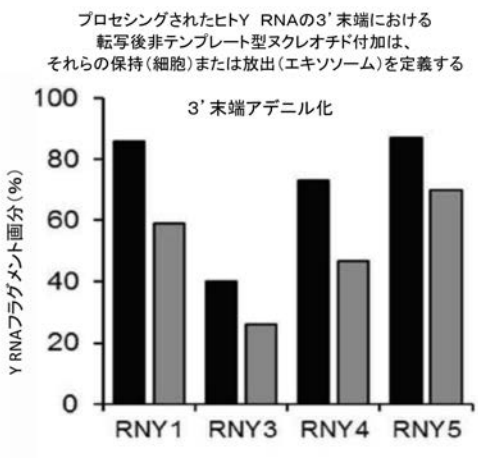
【図８Ｅ】



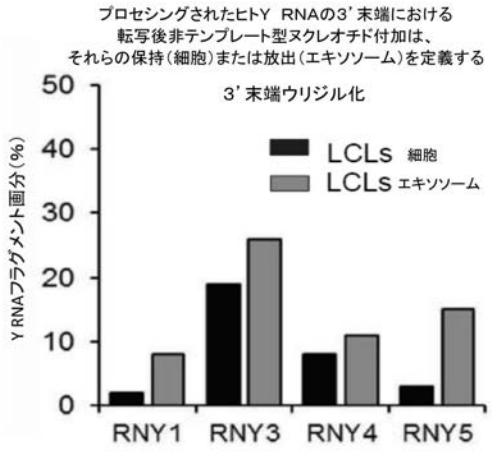
【図８Ｆ】



【図９Ａ】



【図９Ｂ】

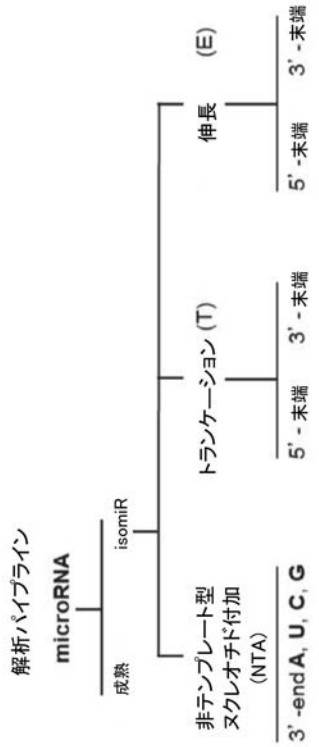


【図１０】

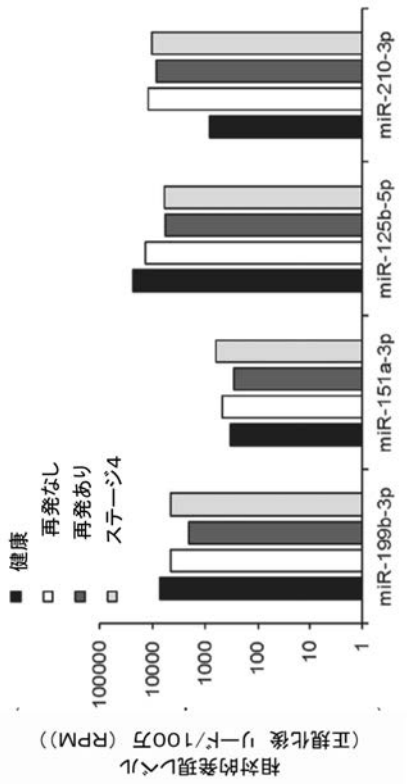
低分子RNAシーケンシングによって尿エキソソームにおいて同定されたマッピングされたリードのリスト

なまえ（マッピングされたシーケンス）	urine090	urine088	urine085	urine081	urine041	urine035
microRNAs	165620	231333	146943	213502	610477	425119
SRP RNAs	288	300	327	200	62	193
piRNA	13419	6548	3785	2085	3007	5977
Rnase P RNA	20	23	22	42	5	15
vault RNA	146	92	126	106	20	40
Y RNAs	34087	31794	40742	41938	21857	19802
RefSeq (ncRNAs)	40072	35162	43483	33394	19111	30043
tRNAs	3015504	269756	338741	338691	132178	222814
snoRNAs	98	60	51	147	53	72
snRNAs	47	63	50	59	130	46
rRNA フラグメント	131431	136238	99662	128293	23795	59346
mRNA フラグメント	44515	48319	38016	44911	27858	31978
ヒト その他 (RepBase, anti-sense, misc_RNA)	112944	111272	146317	101199	79164	97954
マッピングされていない もしくは 割り当てられていないもの	151729	118880	136499	91395	78826	101261

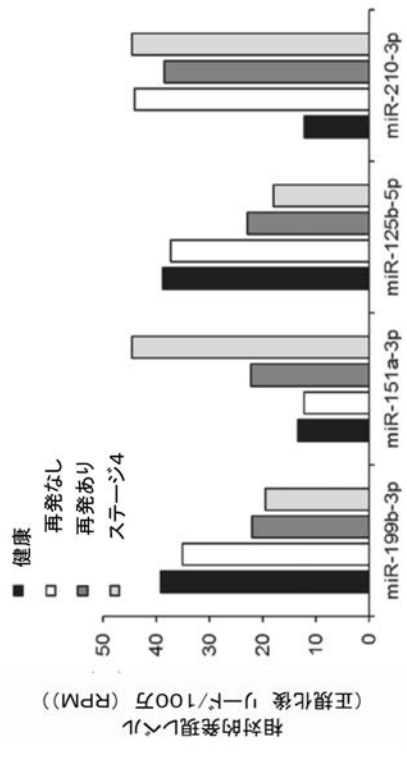
【図１１Ａ】



【図１１Ｂ】



【図１１Ｃ】



【図１２】

表1
C／V: 標準:バリアント
SEQ: シーケンシングIDナンバー

表1A:列挙されたmicroRNAの標準的配列への転写後修飾;3'末端NTAの型は、アデニン(A)である。

microRNA	miR1塩基中の標準(成熟)のシーケンス	SEQ:	健康な個体のC/V NTA-A	健康な個体のSTD	がん個体のC/V NTA-A	がん個体のSTD	p値
hsa-let-7g-5p	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT	1	0.135	0.001139395	0.217	0.001657857	0.004
hsa-miR-30e-3p	CTTTCAGTCGGATGTTTACAGC	2	0.042	3.35E-04	0.083	3.82E-04	0.004
hsa-miR-200a-3p	TAACACTGTCTGGTAACGATGT	3	0.121	2.97E-04	0.219	0.005998844	0.013
hsa-let-7e-5p	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT	4	0.308	0.011296606	0.468	0.00713208	0.019
hsa-miR-30a-5p	TGTAAACATCCTCGACTGGAAG	5	1.946	0.180317998	2.576	0.123396748	0.022
hsa-miR-204-5p	TTCCCTTTGTCATCCTATGCCT	6	0.038	2.02E-04	0.021	2.98E-05	0.024
hsa-miR-26a-5p	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	7	0.058	6.98E-05	0.046	6.27E-05	0.030
hsa-let-7i-5p	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT	8	0.353	0.003885292	0.446	0.003851599	0.032
hsa-miR-101-3p	TACAGTACTGTGATAACTGAA	9	0.873	0.027996513	1.397	0.252164314	0.036

表1B:列挙されたmicroRNAの標準的配列への転写後修飾;3'末端NTAの型は、ウラシル(U)である。

microRNA	miR1塩基中の標準(成熟)のシーケンス	SEQ:	健康な個体のC/V NTA-U	健康な個体のSTD	がん個体のC/V NTA-U	がん個体のSTD	p値
hsa-miR-200c-3p	TAATACTGCCGGGTAATGATGGA	10	0.392	0.015845068	0.218	0.005483231	0.019
hsa-miR-26a-5p	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	11	0.194	6.53E-04	0.141	0.00150199	0.021
hsa-let-7i-5p	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT	12	0.162	0.001185664	0.109	0.00104543	0.024
hsa-miR-320a	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA	13	1.465	0.267284889	2.321	0.435442855	0.034
hsa-miR-182-5p	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACT	14	0.104	2.44E-04	0.084	1.60E-04	0.043

表1C:列挙されたmicroRNAの標準的配列への転写後修飾;3'末端NTAの型は、シトシン(C)である。

microRNA	miR1塩基中の標準(成熟)のシーケンス	SEQ:	健康な個体のC/V NTA-C	健康な個体のSTD	がん個体のC/V NTA-C	がん個体のSTD	p値
hsa-miR-204-5p	TTCCCTTTGTCATCCTATGCCT	15	0.005	5.58E-06	0.002	7.98E-07	0.006
hsa-miR-101-3p	TACAGTACTGTGATAACTGAA	16	0.478	5.49E-02	0.779	2.91E-02	0.013
hsa-miR-200c-3p	TAATACTGCCGGGTAATGATGGA	17	0.004	3.51E-05	0.022	2.98E-04	0.019
hsa-let-7b-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT	18	0.018	3.98E-05	0.038	4.14E-04	0.020

表1D:列挙されたmicroRNAの標準的配列への転写後修飾;3'末端NTAの型は、グアニン(G)である。

microRNA	miR1塩基中の標準(成熟)のシーケンス	SEQ:	健康な個体のC/V NTA-G	健康な個体のSTD	がん個体のC/V NTA-G	がん個体のSTD	p値
hsa-let-7f-5p	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	19	0.009	2.40E-06	0.006	1.78E-06	0.005
hsa-miR-106b-5p	TACCCTGTAGAACCGAATTTGTG	20	0.112	3.79E-04	0.072	6.31E-04	0.013
hsa-let-7e-5p	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT	21	0.006	3.70E-05	0.016	2.99E-05	0.019
hsa-miR-30b-5p	TGTAAACATCCTACACTCAGCT	22	0.023	3.48E-05	0.012	7.39E-06	0.020
hsa-miR-26a-5p	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	23	0.019	4.43E-06	0.014	1.63E-05	0.026
hsa-miR-10a-5p	TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG	24	0.124	0.001207764	0.077	5.78E-04	0.027
hsa-miR-186-5p	CAAAGAATTCTCCTTTTGGGCT	25	0.036	7.91E-05	0.018	2.25E-04	0.035
hsa-miR-320a	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA	26	0.041	6.29E-04	0.094	0.002206116	0.035
hsa-miR-125a-5p	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTGA	27	0.449	0.044536121	0.224	0.0014339	0.037

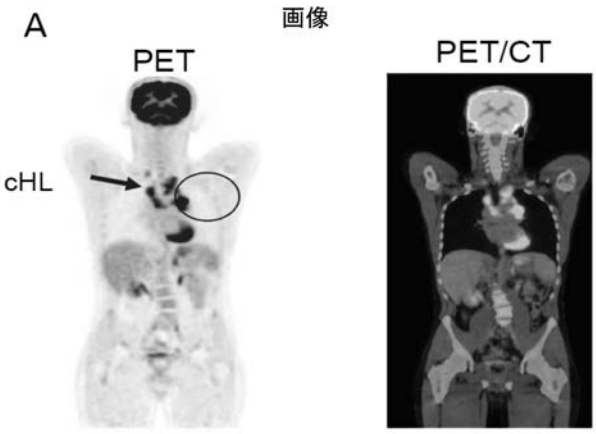
表1E:3'末端トリミングされたバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準的配列の転写後プロセシング

microRNA	miR1塩基中の標準(成熟)のシーケンス	SEQ:	健康な個体のC/V 3'末端	健康な個体のSTD	がん個体のC/V 3'末端	がん個体のSTD	p値
hsa-let-7f-5p	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	28	0.662	0.009028739	0.481	0.00305487	0.001
hsa-miR-181b-5p	AACATTCATTGCTGTCGGTGGGT	29	2.109	0.213109599	1.372	0.080779922	0.010
hsa-miR-22-3p	AAGCTGCCAGTTGAAGAACTGT	30	0.056	1.93E-04	0.111	0.001843821	0.013
hsa-miR-28-3p	CACTAGATTGTGAGCTCCTGGA	31	0.249	0.003029377	0.158	0.001208369	0.014
hsa-miR-320a	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA	32	0.757	0.062649693	1.323	0.159782031	0.016
hsa-miR-30e-3p	CTTTCAGTCGGATGTTTACAGC	33	0.172	0.006854715	0.034	2.09E-04	0.022
hsa-miR-125a-5p	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTGA	34	10.797	6.750391196	7.273	4.116969925	0.031
hsa-let-7d-5p	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT	35	0.876	0.032562757	0.660	0.010621945	0.036
hsa-miR-192-5p	CTGACCTATGAATTGACAGCC	36	0.064	2.62E-04	0.045	8.41E-05	0.043
hsa-let-7i-5p	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT	37	0.213	6.60E-04	0.110	4.91E-04	0.044
hsa-let-7e-5p	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT	38	0.789	0.020725976	1.054	0.060955799	0.049

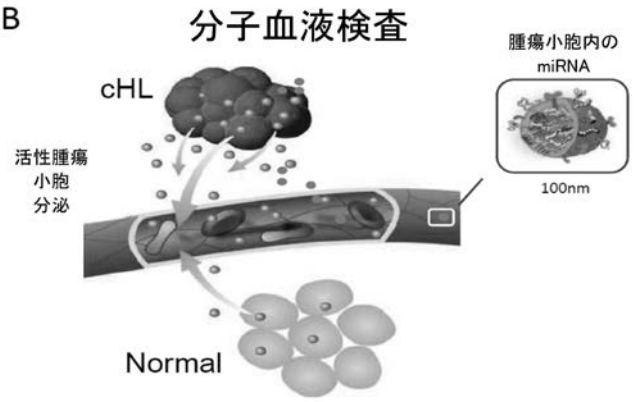
表1F:5'末端トリミングされたバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準的配列の転写後プロセシング

microRNA	miR1塩基中の標準(成熟)のシーケンス	SEQ:	健康な個体のC/V 5'末端	健康な個体のSTD	がん個体のC/V 5'末端	がん個体のSTD	p値
hsa-miR-181b-5p	AACATTCATTGCTGTCGGTGGGT	39	0.126	0.006865806	0.017	2.09E-04	0.014
hsa-miR-320a	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA	40	0.043	1.93E-04	0.020	1.59E-04	0.015
hsa-miR-106b-5p	TACCCTGTAGAACCGAATTTGTG	41	0.289	3.50E-04	0.248	7.83E-04	0.015

【図１３Ａ】



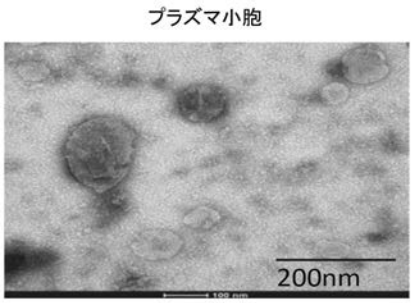
【図１３Ｂ】



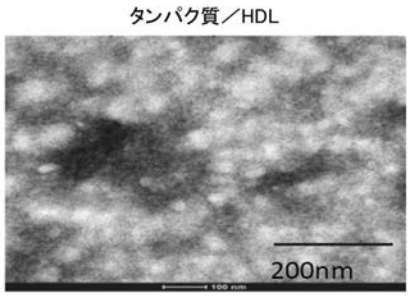
【図１４Ａ】



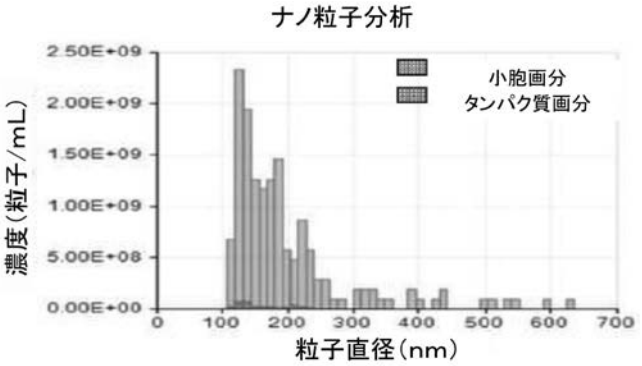
【図１４Ｂ】



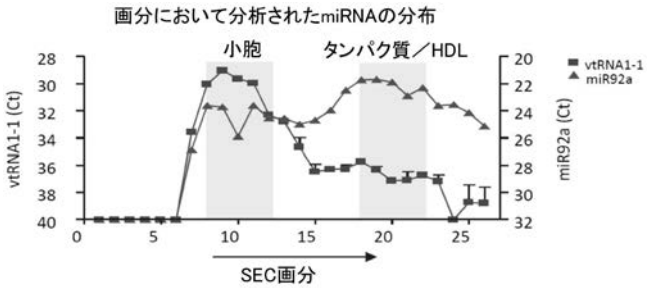
【図１４Ｃ】



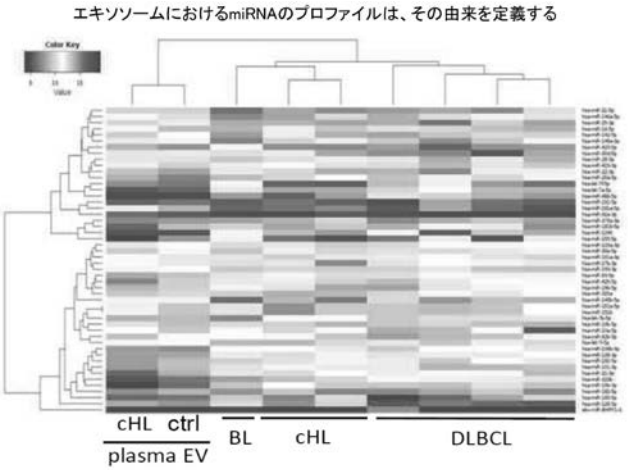
【図１４Ｄ】



【図１４Ｅ】



【図１５Ａ】

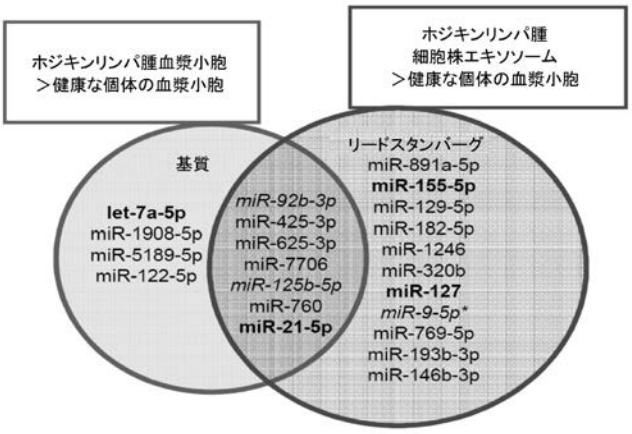


【図１５Ｂ】

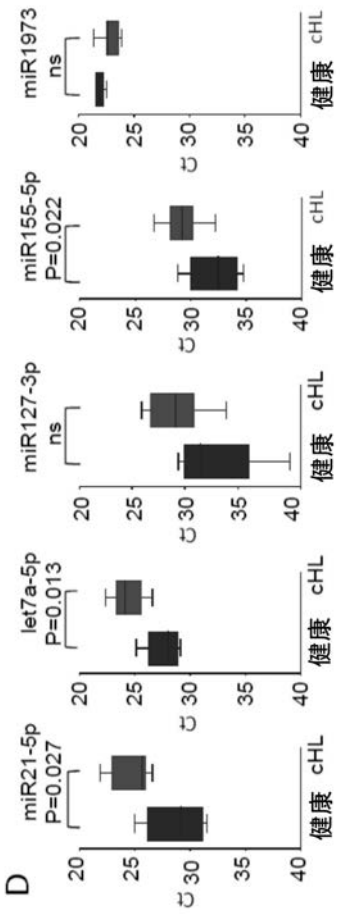
RNAシーケンシングによって決定された、上位10個の最も豊富なmiRNA種

血小板	末梢血単核球	プラズマ小胞
miR-142-3p	miR-223	miR-486-5p
miR-223	miR-150	miR-92a-3p
miR-26a	miR-146b	let-7a-5p
miR-126-5p	miR-16-5p	miR-191-5p
miR-16-5p	miR-484	let-7f-5p
miR-92a-3p	miR-146a	miR-26a-5p
miR-21	miR-191-5p	miR-423-5p
miR-103	miR-26a	miR-126-5p
miR-20a+b	miR-19b	miR-22-3p
let-7a	miR-20a	miR-181a-5p

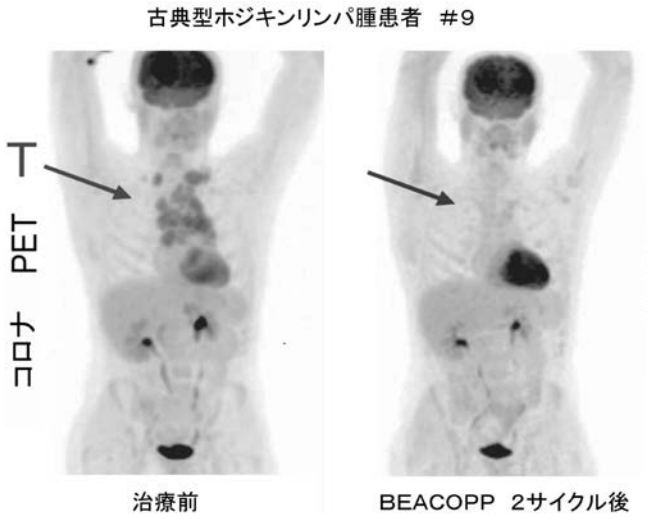
【図１５Ｃ】



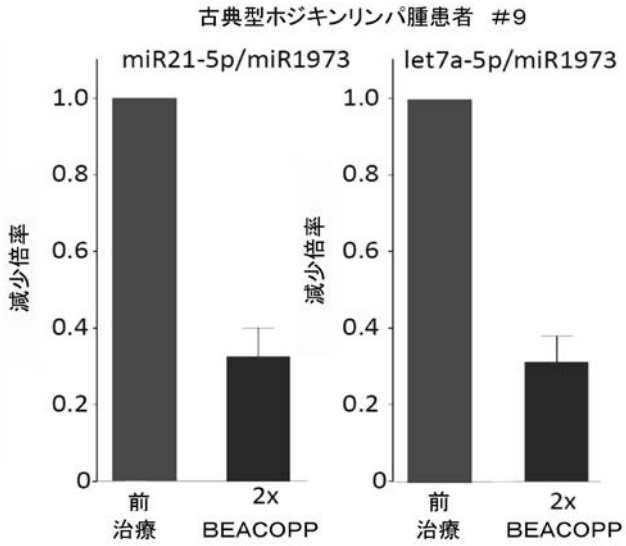
【図１５Ｄ】



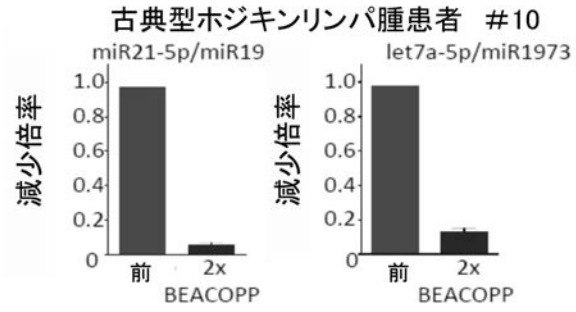
【図１６Ａ】



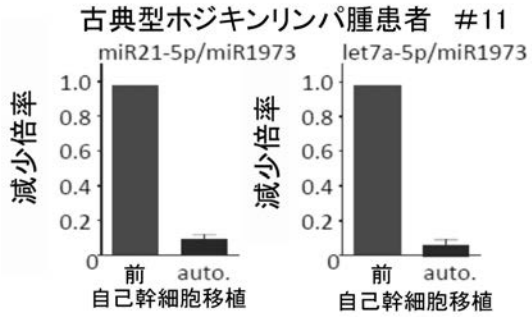
【図１６Ｂ】



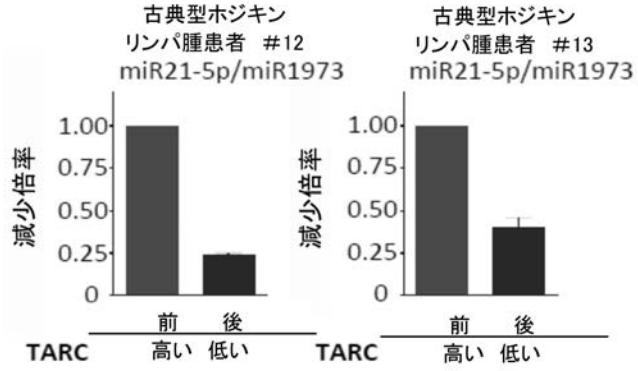
【図１６Ｃ】



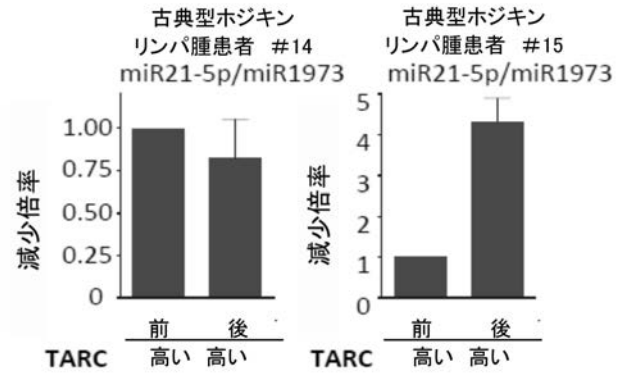
【図１６Ｄ】



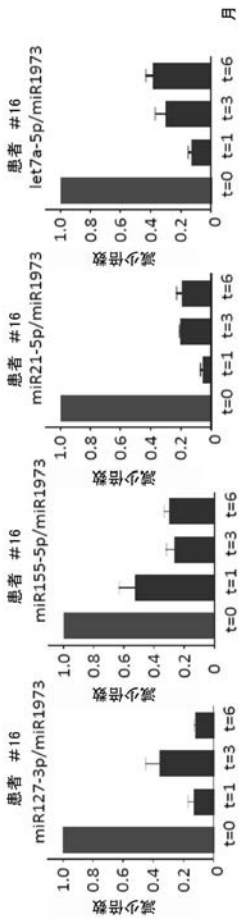
【図１６Ｅ】



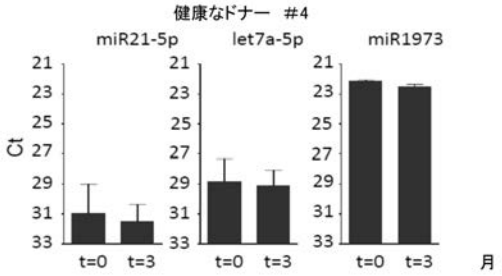
【図１６Ｆ】



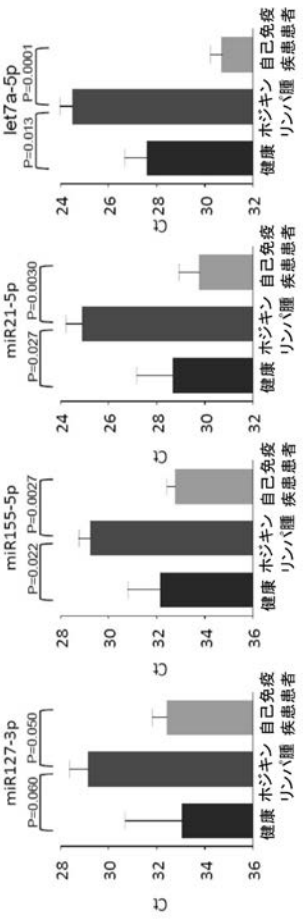
【図１７Ａ】



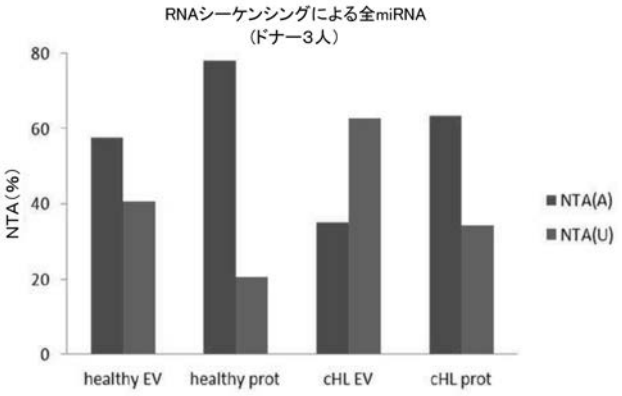
【図１７Ｂ】



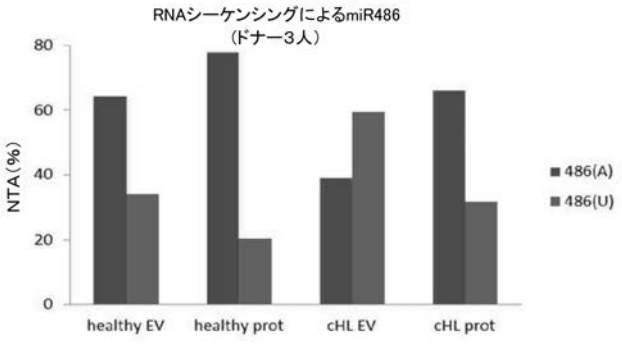
【図１８】



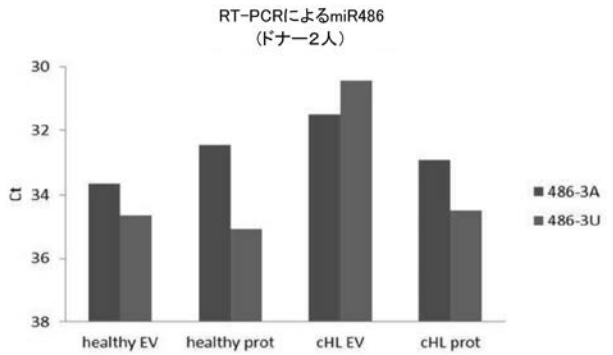
【図１９Ａ】



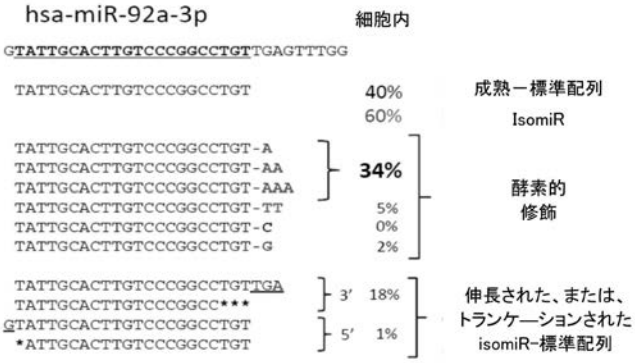
【図１９Ｂ】



【図１９Ｃ】



【図２０】



【図２１Ａ】

表2. microRNA起源ではない低分子ノンコーディングRNA（ncRNA）に起源するプロセシングされた断片の3'末端において同定された転写後修飾。健康なドナーおよび前立腺がん（PCa）患者の尿から抽出された細胞外小胞中に存在すると低分子RNAシーケンシングによって同定されたノンコーディングRNA（修飾された断片に起源する）のリスト

MF／TF ： 修飾された断片／全長低分子ncRNAにマッピングされた配列を有する総断片

表2A：健康対前立腺がん

列挙されたヒトtRNAにマッピングすると同定された配列を有する

3'末端NTAの型がアデニン（A）である、低分子RNA断片への転写後修飾

マッピングされた配列の由来	3'末端のMF／TF（健康）	STD（健康）	3'末端のMF／TF（PCa）	STD（PCa）	P値
Homo_sapiens_chr6.tma100-LeuCAA	0.005433993	1.73716E-06	0.000919334	3.38615E-06	0.0003
Homo_sapiens_chr6.tma140-LeuCAA	0.00538329	2.1043E-06	0.00094207	3.58969E-06	0.0006
Homo_sapiens_chr6.tma74-LeuCAA	0.00587606	2.29786E-06	0.001290749	3.8016E-06	0.0006
Homo_sapiens_chr1.tma117-GlyTCC	0.008568215	3.13574E-05	0.00039968	1.27795E-06	0.0016
Homo_sapiens_chr1.tma66-LeuCAA	0.000718331	1.93549E-07	7.83576E-05	4.91193E-08	0.0042
Homo_sapiens_chr11.tma12-ProTGG	0.013247561	3.52197E-05	0.004255265	1.63389E-05	0.0063
Homo_sapiens_chr17.tma36-ThrAGT	0.026963505	0.000555546	0	0	0.007
Homo_sapiens_chr19.tma13-ValCAC	0.014579569	0.000105725	0.002090942	1.00602E-05	0.007
Homo_sapiens_chr16.tma18-GlyGCC	0.000594112	2.08521E-08	0.000368039	1.4217E-08	0.009
Homo_sapiens_chr1.tma68-GlyGCC	0.00059877	2.22291E-08	0.000370691	1.45797E-08	0.0096
Homo_sapiens_chr11.tma17-ValTAC	0.003495544	1.03955E-05	0	0	0.0097

【図２１Ｂ】

表2B：前立腺がん（PCa）対前立腺がん関連転移（PCaM）

列挙されたヒトtRNAにマッピングすると同定された配列を有する

3'末端NTAの型がアデニン（A）である、低分子RNA断片への転写後修飾

マッピングされた配列の由来	3'末端のMF／TF（PCa）	STD（PCa）	3'末端のMF／TF（PCaM）	STD（PCaM）	P値
Homo_sapiens_chr15.tma7-GlnCTG	0.003705204	7.64119E-07	0.001180306	7.07327E-07	0.042
Homo_sapiens_chr6.tma10-AlaCGC	0.001846208	7.18883E-07	8.05932E-05	1.29905E-08	0.043
Homo_sapiens_chr6.tma119-AlaCGC	0.001845559	7.18964E-07	8.04182E-05	1.29342E-08	0.043

【図２１Ｃ】

表2C：健康なドナー対高リスク前立腺がん患者（HRPC）

列挙されたヒトtRNAにマッピングすると同定された配列を有する

3'末端NTAの型がアデニン（A）である、低分子RNA断片への転写後修飾

マッピングされた配列の由来	3'末端のMF／TF（健康）	STD（健康）	3'末端のMF／TF（HRPC）	STD（HRPC）	P値
Homo_sapiens_chr6.tma100-LeuCAA	0.005433993	1.73716E-06	0	0	0.00041
Homo_sapiens_chr6.tma140-LeuCAA	0.00538329	2.1043E-06	0	0	0.00076
Homo_sapiens_chr6.tma74-LeuCAA	0.00587606	2.29786E-06	0.000896057	1.60584E-06	0.0035

【図２１Ｄ】

表2D：健康なドナー対高リスク前立腺がん患者（HRPC）
列挙されたヒトY RNAにマッピングすると同定された配列を有する
3′末端NTAの型がアデニン（A）である、低分子RNA断片への転写後修飾

マッピングされた配列の由来	3′末端のMF／TF（健康）	STD（健康）	3′末端のMF／TF（HRPC）	STD（HRPC）	P値
NR_004392: Homo-sapiens Y_RNA (RNY3)	0.000688287	4.08821E-07	0.0020027774	1.30598E-08	0.016

【図２１Ｅ】

表3
SEQ：シーケンシングID番号
図15中に存在するmicroRNA配列のリスト（cHL）

microRNA 名前	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ
hsa-let-7a-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	42
hsa-miR-1908-5p	CGGCGGGGACGGCGATTGGTC	43
hsa-miR-5189-5p	TCTGGGCACAGGCGGATGGACAGG	44
hsa-miR-92b-3p	TATTGCACTCGTCCCGGCCTCC	45
hsa-miR-425-3p	ATCGGGAATGTCGTGTCCGCCC	46
hsa-miR-625-3p	GACTATAGAACTTTCCCCCTCA	47
hsa-miR-7706	TGAAGCGCCTGTGCTCTGCCGAGA	48
hsa-miR-125b-5p	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA	49
hsa-miR-760	CGGCTCTGGGTCTGTGGGGA	50
hsa-miR-21-5p	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	51
hsa-miR-122-5p	TGGAGTGTGACAATGGTGTTTG	52
hsa-miR-891a-5p	TGCAACGAACCTGAGCCACTGA	53
hsa-miR-155-5p	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT	54
hsa-miR-129-5p	CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGC	55
hsa-miR-182-5p	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACT	56
hsa-miR-1246	AATGGATTTTTGGAGCAGG	57
hsa-miR-320b	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGCAA	58
hsa-miR-127-3p	TCGGATCCGTCTGAGCTTGGCT	59
hsa-miR-9-5p	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA	60
hsa-miR-769-5p	TGAGACCTCTGGGTTCTGAGCT	61
hsa-miR-193b-3p	AACTGGCCCTCAAAGTCCCGCT	62
hsa-miR-146b-3p	TGCCCTGTGGACTCAGTTCTGG	63

【図２１Ｆ】

表4．健康なドナーおよびcHL患者の血漿から抽出され、
細胞外小胞中に存在すると低分子RNAシーケンシングによって同定された
転写後修飾されているmicroRNA

V／C ：バリアント／標準的

表4A：列挙されたmicroRNAの標準配列への3′末端NTAの型がアデニン（A）である転写後修飾

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	3′末端のV／C（健康）	STD（健康）	3′末端のV／C（cHL）	STD（cHL）	P値
hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	64	0.0509406394	9.98949E-05	0.0290019947	8.41686E-05	0.031

【図２１Ｇ】

表4B：列挙されたmicroRNAの標準配列への3′末端NTAの型がウラシル（U）である転写後修飾

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	3′末端のV／C（健康）	STD（健康）	3′末端のV／C（cHL）	STD（cHL）	P値
hsa-miR-486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	65	0.223592359	0.00428728	0.733684288	0.047373483	0.008

【図２１Ｈ】

表4C：3'末端長さバリアントとして規定された、列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR遺伝に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	3'末端のV／C（健康）	STD（健康）	3'末端のV／C（cHL）	STD（cHL）	P値
hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	66	0.0375	0.00421875	0.165542416	0.001179008	0.023

【図２１Ｉ】

表4D：5'末端長さバリアントとして規定された、列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR遺伝に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	5'末端のV／C（健康）	STD（健康）	5'末端のV／C（cHL）	STD（cHL）	P値
hsa-miR-92b-3p	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC	67	0.002392344	1.71699E-05	0.011509417	3.09912E-06	0.013

【図２１Ｊ】

表5. 健康なドナーおよびcHL患者の血漿から抽出された
タンパク質画分（PF）中に存在すると低分子RNAシーケンシングによって同定された
転写後修飾されたmicroRNA

V／C：バリアント／標準的

表5A：列挙されたmicroRNAの標準配列へのの3'末端NTAの型がアデニン（A）である転写後修飾

microRNA	miR遺伝に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	健康なの3'末端のV／C（PF）	健康なSTD（PF）	cHL/の3'末端のV／C（PF）	cHL/STD（PF）	P値
hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	68	0.350532	0.0122	0.0278	0.002314815	0.0063

【図２１Ｋ】

表5B：3'末端長さバリアントとして規定された、列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR遺伝に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	健康なの3'末端のV／C（PF）	健康なSTD（PF）	cHL/の3'末端のV／C（PF）	cHL/STD（PF）	P値
hsa-miR-151a-3p	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG	69	0.26948	0.00022	0.02053	0.00044	0.000025
hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGGCCCCUCAGU	70	1.92327	0.13555	0.26997	0.03743	0.001296
hsa-miR-128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	71	9.53030	5.95638	0.50000	0.75000	0.002168

【図２１Ｌ】

表5C：5’末端長さバリアントとして規定された、列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR陽基に含まれる標準(成熟)配列	SEQ	健康な5’末端のV／C(PF)	健康なSTD(PF)	cHLの5’末端のV／C(PF)	cHLのSTD(PF)	P値
hsa-miR-126-5p	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG	72	0.00726999	0.0000014	0.0014457	0.0000022	0.0051
hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	73	0.0129995	0.0000249	0.0004513	0.0000006	0.0086

【図２１Ｍ】

表6．低分子RNAシーケンシングによって乳房がん患者の血漿中に存在すると同定された転写後修飾されたmicroRNA

公的に入手可能なデータ：情報源　http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra?term=SRP027589　　V／C　：　バリアント／標準

BioProjectの詳細　http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject?LinkName=sra_bioproject&from_uid=455584　　SEQ：シーケンシングID番号

表6．1．ステージIIと診断された患者由来のサンプルとステージIII乳房がんと診断された患者由来のサンプルとの間の比較

表6．1A：列挙されたmicroRNAの標準配列への3’末端NTAの型がアデニン(A)である転写後修飾

microRNA	miR陽基に含まれる標準(成熟)配列	SEQ	ステージ2 3’末端のV／C	ステージ2STD	ステージ3 3’末端のV／C	ステージ3 STD	P値
hsa-miR-190b	UGAUAUGUUUGAUAUUGGGUU	74	0.538961039	0.554140665	2.900793651	4.237843285	0.001
hsa-miR-542-5p	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGAGA	75	0.016189037	0.000566183	0.000661376	8.74836E-06	0.008
hsa-miR-200a-3p	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	76	0.058696802	0.003456404	0.328946527	0.095441 56	0.009

【図２１Ｎ】

表6．1B：列挙されたmicroRNAの標準配列への3’末端NTAの型がウラシル(U)である転写後修飾

microRNA	miR陽基に含まれる標準(成熟)配列	SEQ	ステージ2 3’末端のV／C	ステージ2STD	ステージ3 3’末端のV／C	ステージ3 STD	P値
hsa-miR-3913-5p	UUUGGGACUGAUCUUGAUGUCU	77	0.266666667	0.118181818	0.021395747	0.002031877	0.004
hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	78	0.008633074	6.589976E-06	0.006072176	4.71662E-06	0.007

【図２１Ｏ】

表6．1C：3’末端長さバリアントとして規定された、列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR陽基に含まれる標準(成熟)配列	SEQ	ステージ2 3’末端のV／C	ステージ2STD	ステージ3 3’末端のV／C	ステージ3 STD	P値
hsa-miR-190a-5p	UGAUAUGUUUGAUAUUAGGU	79	28.67189405	362.637024	63.51078902	1833.272742	0.018

【図２１Ｐ】

表6. 1D：5′末端長さバリアントとして規定された、列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	ステージ2 5′末端のV／C	ステージ2STD	ステージ3 5′末端のV／C	ステージ3 STD	P値
hsa-miR-130b-3p	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	80	0.021607478	0.0001420981	0.04436697	0.0002998859	0.0007
hsa-miR-4772-5p	UGAUCAGGCAAAAUUGCAGACU	81	0.21212121	0.111570248	0.004329004	0.0003748086	0.009

【図２１Ｑ】

表6. 2：乳がんが再発した患者に由来するサンプルと再発のない患者に由来するサンプルとの間の比較
表6. 2A：列挙されたmicroRNAの標準配列への3′末端NTAの型がアデニン（A）である転写後修飾

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	再発あり 3′末端のV／C	再発ありSTD	再発なし 3′末端のV／C	再発なし STD	P値
hsa-miR-424-5p	CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA	82	0.134256332	0.007704542	0.326896169	0.057635652	0.003
hsa-miR-3138	UGUGGACAGUGAGGUAGAGGGAGU	83	1.629166667	10.68826968	9.4375	116.7148438	0.005

【図２１Ｒ】

表6. 2B：列挙されたmicroRNAの標準配列への3′末端NTAの型がウラシル（U）である転写後修飾

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	再発あり 3′末端のV／C	再発ありSTD	再発なし 3′末端のV／C	再発なし STD	P値
hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU	84	0.268790118	0.015669342	0.567696658	0.121362044	0.002
hsa-miR-6891-5p	UAAGGAGGGGGAUGAGGGG	85	0.023313492	0.004068395	0.26875	0.111835938	0.003
hsa-miR-1307-3p	ACUCGGCGUGGCGUCGGUCGUG	86	2.977727863	0.481034278	3.843716593	0.451959336	0.006
hsa-miR-125b-2-3p	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC	87	2.845622896	4.045451355	5.646329365	7.881816254	0.006
hsa-miR-6763-5p	CUGGGGAGUGGCUGGGGAG	88	0.027777778	0.017746914	0.395833333	0.346788194	0.009

【図２１Ｓ】

表6. 2C：3′末端長さバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	再発あり 3′末端のV／C	再発ありSTD	再発なし 3′末端のV／C	再発なし STD	P値
hsa-miR-6885-5p	AGGGGGGGCACUGCGCAAGCAAAGCC	89	0.131944444	0.178192515	1.125	0.961875	0.0006

【図２１Ｔ】

表6. 2D:5'末端長さバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	再発あり 3'末端のV／C	再発あり/STD	再発なし 3'末端のV／C	再発なし STD	P値
hsa-miR-3140-3p	AGCUUUUGGGAAUUCAGGUAGU	90	0.011904762	0.003256837	0.416666667	0.354166667	0.003
hsa-miR-125b-2-3p	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC	91	9.904273781	43.68473804	21.76339286	183.645156	0.004
hsa-miR-6866-5p	UUAGAGGCUGGAAUAGAGAUUCU	92	0.016666667	0.006388889	0.395833333	0.305121528	0.004
hsa-miR-574-3p	CACGCUCAUGCACACACCCACA	93	0.029712394	0.000448329	0.006994901	7.90746E-05	0.008
hsa-miR-4786-5p	UGAGACCAGGACUGGAUGCACC	94	0.015046296	0.002892179	0.133333333	0.03	0.008

【図２１Ｕ】

表7. 精巣胚細胞腫瘍由来のがん組織および
低分子RNAシーケンシングによってマッチした隣接組織中に存在すると同定された転写後修飾されたmicroRNA
公的に入手可能なデータ：情報源 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra?term=SRP007946 V／C：バリアント／標準
BioProject の詳細 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/154993 SEQ：シーケンシングID番号

表7：マッチした隣接組織（MAT）由来のサンプルと精巣胚細胞腫瘍（TGCT）由来のサンプルとの間の比較
表7A：列挙されたmicroRNAの標準配列への3'末端NTAの型がアデニン（A）である転写後修飾

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	MAT 3'末端のV／C	MAT STD	TGCT 3'末端のV／C	TGCT STD	P値
hsa-miR-3605-5p	UGAGGAUGGAAUAGCAAGGAAGCC	95	0.428571429	0.259007307	2.555555556	1.061728395	0.0045
hsa-miR-326	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG	96	1.666666667	8.285714286	10.66666667	10.88888889	0.0047
hsa-miR-502-3p	AAUGCACCUGGGCAAGGAUUCA	97	0.050357934	0.004477513	0.350900359	0.030093252	0.0068
hsa-miR-1268a	CGGGGCGUGGUGGUGGGGG	98	0.004959177	3.92296E-05	0.043611351	0.000643085	0.0097

【図２１Ｖ】

表7B：列挙されたmicroRNAの標準配列への3'末端NTAの型がウラシル（U）である転写後修飾

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	MAT 3'末端のV／C	MAT STD	TGCT 3'末端のV／C	TGCT STD	P値
hsa-miR-409-5p	AGGUUACCCGAGCAACUUUGCAU	99	0.002172732	2.83246E-05	0.031630033	5.14855E-05	0.0002
hsa-miR-371a-3p	AAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGU	100	0.002577951	2.21826E-05	0.022585965	1.11613E-05	0.0003
hsa-miR-199a-3p	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	101	0.124029366	0.025715835	0.944444444	0.048396062	0.0009
hsa-miR-181a-3p	ACCAUCGACCGUUGAUUGUACC	102	0.469029846	0.231621215	1.73452381	0.20524063	0.0066

【図２１Ｗ】

表7C：3'末端長さバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	MAT 3'末端のV／C	MAT STD	TGCT 3'末端のV／C	TGCT STD	P値
hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	103	0.507196851	0.168230816	2.269696961	0.217292737	0.00069
hsa-miR-455-3p	GCAGUCCAUGGGCAUAUACAC	104	1.403043323	1.168225689	5.161494253	3.251471132	0.0086
hsa-miR-520a-3p	AAAGUGCUUCCCUUUGGACUGU	105	0.54821091	0.287516172	2.24311491	0.74309101	0.0097

【図２１Ｘ】

表7D：5’末端長さバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miRBase に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	MAT 5’末端のV／C	MAT STD	TGCT 5’末端のV／C	TGCT STD	P値
hsa-miR-130b-3p	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	106	0.003446228	2.008655E-05	0.035700044	4.839255E-06	0.000005
hsa-miR-3605-5p	UGAGGAUGGAUAGCAAGGAAGCC	107	0.031746032	0.002519526	1.888888889	0.913580247	0.0018
hsa-miR-92a-1-5p	AGGUUGGGGAUCGGUUGCAAUGCU	108	0.000228739	1.86729E-07	0.002357306	1.058388E-06	0.0033

【図２１Ｙ】

表8．低分子RNAシーケンシングによって対になった
結腸直腸の正常、腫瘍および転移組織において発現されると同定された転写後修飾されたmicroRNA
公的に入手可能なデータ：情報源 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/?study=SRP022054
BioProject の詳細 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA201245

V／C ： バリアント／標準
SEQ：シーケンシングID番号

表8．1：対になった結腸直腸正常組織（CNT）由来のサンプルと結腸直腸腫瘍組織（CTT）由来のサンプルとの間の比較
表8．1A：列挙されたmicroRNAの標準配列への3’末端NTAの型がウラシル（U）である転写後修飾

microRNA	miRBase に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	CNT 3’末端のV／C	CNT STD	CTT 3’末端のV／C	CTT STD	P値
hsa-miR-874-3p	CUGCCCUGGCCCGAGGGACCGA	109	0.397582973	0.036348183	0.149046167	0.015221961	0.014

【図２１Ｚ】

表8．1B：3’末端長さバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miRBase に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	CNT 3’末端のV／G	CNT STD	CTT 3’末端のV／G	CTT STD	P値
hsa-miR-1266-5p	CCUCAGGGCUGUAGAACAGGGCU	110	0.461788212	0.087526184	0.1625	0.017190689	0.032

【図２１Ａ２】

表8．1C：5’末端長さバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miRBase に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	CNT 5’末端のV／C	CNT STD	CTT 5’末端のV／C	CTT STD	P値
hsa-miR-125b-2-3p	CUGCCCUGGCCCGAGGGACCGA	111	4.571428571	17.67349939	0.5	1.75	0.031

【図２１Ｂ２】

表8．2：対になった結腸直腸正常組織（CNT）由来のサンプルと結腸直腸腫瘍転移（CTM）由来のサンプルとの間の比較
表8．2A：列挙されたmicroRNAの標準配列への3’末端NTAの型がアデニン（A）である転写後修飾

microRNA	miRBase に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	CNT 3’末端のV／C	CNT STD	CTM 3’末端のV／C	CTM STD	P値
hsa-miR-135b-5p	UAUGGCUUUUUCAUUCCUAUGUGA	112	0.021601547	0.001258247	0.085917908	0.001505237	0.011

【図２１Ｃ２】

表8．2B：列挙されたmicroRNAの標準配列への3’末端NTAの型がウラシル（U）である転写後修飾

microRNA	miRBase に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	CNT 3’末端のV／C	CNT STD	CTM 3’末端のV／C	CTM STD	P値
hsa-miR-301a-5p	GCUCUGACUUUAUUGCACUACU	113	0.034094806	0.001045648	0.112977142	0.004842371	0.027

【図２１Ｄ２】

表8．2C：3’末端長さバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miRBase に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	CNT 3’末端のV／C	CNT STD	CTM 3’末端のV／C	CTM STD	P値
hsa-miR-154-3p	AAUCAUACACGGUUGACCUAUU	114	0.150361953	0.015317714	0.385300931	0.035279946	0.025

【図２１Ｅ２】

表8．2D：5’末端長さバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miRBase に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	CNT 5’末端のV／C	CNT STD	CTM 5’末端のV／C	CTM STD	P値
hsa-miR-191-3p	GCUGCGCUUGGAUUUCGUCCCC	115	0.346250684	0.123169835	1.176190476	0.614829832	0.036

【図２１Ｆ２】

表8．3：対になった結腸直腸腫瘍組織（CTT）由来のサンプルと結腸直腸腫瘍転移（CTM）由来のサンプルとの間の比較
表8．3A：列挙されたmicroRNAの標準配列への3’末端NTAの型がアデニン（A）である転写後修飾

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	CTT 3’末端のV／C	CNT STD	CTM 3’末端のV／C	CNT STD	CTM STD	P値
hsa-miR-212-5p	ACGUUGGCUCUAGACUGCUUACU	116	0.034779745	0.001324047	0.089537613	0.002490405	0.024	

【図２１Ｇ２】

表8．3B：列挙されたmicroRNAの標準配列への3’末端NTAの型がウラシル（U）である転写後修飾

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	CTT 3’末端のV／C	CNT STD	CTM 3’末端のV／C	CTM STD	P値
hsa-miR-30c-1-3p	CUGGGAGAGGGUGUUUACUCC	117	0.111805556	0.010535783	0.642393321	0.22787036	0.014

【図２１Ｈ２】

表8．3C：3’末端長さバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	CTT 3’末端のV／C	CNT STD	CTM 3’末端のV／C	CTM STD	P値
hsa-miR-30c-1-3p	CUGGGAGAGGGUGUUUACUCC	118	2.278472222	2.807179302	5.563388892	8.243342134	0.024

【図２１Ｉ２】

表8．3D：5’末端長さバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	CTT 5’末端のV／C	CNT STD	CTM 5’末端のV／C	CTM STD	P値
hsa-miR-324-3p	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG	119	0.425	0.214375	3.247252747	3.993177153	0.0032

【図２１Ｊ２】

表9．健康なドナー由来の血液サンプル中およびアルツハイマー患者由来の血液サンプル中に存在すると
低分子RNAシーケンシングによって同定された転写後修飾されたmicroRNA

公的に入手可能なデータ：情報源 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra?term=SRP022043　　V／C：バリアント／標準的

BioProject の詳細 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject?LinkName=sra_bioproject&from_uid=387967　　SEQ：シーケンシングID番号

表9A：列挙されたmicroRNAの標準配列への3'末端NTAの型がアデニン（A）である転写後修飾

microRNA	miRI塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	健康 3'末端のV／C	健康 STD	アルツハイマー 3'末端のV／C	アルツハイマー STD	P値
hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	120	0.411732	0.089286	0.117006	0.008993	0.00000006
hsa-miR-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC	121	1.599882	0.344643	0.971829	0.104322	0.0000003
hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	122	0.013759	0.000088	0.007026	0.000005	0.00002
hsa-miR-140-3p	UACCACAGGGUAGAACCACGG	123	96.360846	10796.78869	29.302897	103.5106	0.00005
hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	124	0.003587	0.000006	0.001915	0.000001	0.00006
hsa-miR-186-5p	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	125	0.021162	0.000270	0.011080	0.000025	0.0003
hsa-miR-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC	126	0.299683	0.104876	0.113701	0.004868	0.0004
hsa-miR-25-3p	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	127	0.036016	0.000094	0.029075	0.000043	0.0009
hsa-miR-532-5p	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU	128	2.167682	1.661605	3.223986	1.263253	0.001
hsa-miR-584-5p	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG	129	2.926921	4.255546	1.538687	1.593786	0.001
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	130	0.038029	0.000411	0.025135	0.000160	0.002
hsa-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUUCCAUGGGUU	131	0.229589	0.011971	0.161576	0.004596	0.003

【図２１Ｋ２】

表9B：列挙されたmicroRNAの標準配列への3'末端NTAの型がウラシル（U）である転写後修飾

microRNA	miRI塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	健康 3'末端のV／C	健康 STD	アルツハイマー 3'末端のV／C	アルツハイマー STD	P値
hsa-miR-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC	132	1.70518121	1.3926408	0.6879818	0.3964491	0.0000174
hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	134	0.0167074	0.0000738	0.0097654	0.0000198	0.0000416
hsa-miR-18a-3p	ACUGCCCUAAGUGCUCCUUCUGG	135	2.2783845	1.7943275	1.2244586	0.5932116	0.0001145
hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	137	0.1311864	0.0005699	0.1042053	0.0007957	0.0002756
hsa-miR-151a-3p	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG	138	0.8832042	0.1497361	1.2017309	0.0911402	0.0009641
hsa-miR-636	UGUGCUUGCUCGUCCCGCCCGCA	139	0.4686133	0.0820729	0.2967185	0.0182500	0.0012733
hsa-miR-28-3p	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA	140	0.0788520	0.0014452	0.0567764	0.0002994	0.0015863
hsa-miR-361-3p	UCCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU	141	0.2222736	0.0350978	0.5103031	0.1491994	0.0016134
hsa-miR-484	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU	142	0.3331470	0.0036495	0.2711522	0.0061310	0.0018272
hsa-miR-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC	143	0.8906028	0.1047794	0.6547852	0.0670671	0.0020061
hsa-miR-328-3p	CUGGCCCUCUCUGCCCUUCCGU	144	2.3156467	0.5040896	2.9731738	0.6961762	0.0023580

【図２１Ｌ２】

表9C：3'末端長さバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miRI塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	健康 3'末端のV／C	健康 STD	アルツハイマー 3'末端のV／C	アルツハイマー STD	P値
hsa-miR-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC	145	1.36139	0.43052	0.69854	0.09961	0.0000004
hsa-miR-15b-5p	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	146	0.34916	0.03394	0.18470	0.00879	0.0000069
hsa-miR-183-5p	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	147	1.11501	0.38349	0.64397	0.03574	0.0000115
hsa-miR-18a-3p	ACUGCCCUAAGUGCUCCUUCUGG	148	29.20176	414.25342	13.90097	38.81686	0.0000143
hsa-miR-652-3p	AAUGGCGCCACUAGGGUUGUG	149	22.13222	233.07454	9.706611	44.40786	0.0000146
hsa-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC	150	13.70508	55.58031	7.08323	19.10053	0.0000200
hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	151	14.22932	72.03828	7.50809	13.29942	0.0000215
hsa-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU	152	2.12943	0.22529	1.61001	0.19789	0.0000427
hsa-miR-140-3p	UACCACAGGGUAGAACCACGG	153	44.42029	609.92163	26.79512	90.11594	0.0000696
hsa-miR-501-3p	AAUGCACCCGGGCAAGGAUUCU	154	1.97822	1.26168	1.18843	0.27984	0.0001938
hsa-miR-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC	156	0.79301	0.31273	0.34567	0.13538	0.0002103
hsa-miR-7706	UGAAGGCGCUGUGCUGCCGAGA	157	0.83893	0.14441	0.55197	0.04900	0.0002165
hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	158	0.08491	0.00212	0.05356	0.00044	0.0002584
hsa-miR-502-3p	AAUGCACCUGGGCAAGGAUUCA	159	11.55906	90.82373	4.87880	24.68940	0.0003196
hsa-miR-30d-5p	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG	160	61.98171	941.7383	106.3779	2719.06939	0.0004995
hsa-miR-324-3p	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG	161	23.27968	1110.61079	5.59067	9.18954	0.0006186
hsa-miR-148a-3p	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	162	0.79164	0.26883	0.48802	0.02945	0.0006263
hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	163	3.47883	4.37419	1.93477	2.08603	0.0007687
hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	164	1.31323	0.51447	0.82346	0.19659	0.0009879
hsa-mir-1273c-3p	CAGAGUCUCGUUUCUGUUGCCCA	165	21.08865	446.58500	43.98982	744.30891	0.0010086
hsa-miR-941	CACCGGGCUGUGUGCACAUGUGC	166	3.17051	4.85542	1.91735	0.83898	0.0014978
hsa-miR-28-3p	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA	167	0.12458	0.00200	0.09833	0.00055	0.0022918
hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	168	1.33049	0.06605	1.12210	0.06223	0.0023040
hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	169	14.17067	243.07727	6.27938	23.69134	0.0025107
hsa-miR-326	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG	170	1.63637	3.37525	0.61730	0.96690	0.0040963

【図２１Ｍ２】

表9D：5'末端長さバリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miRI塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	健康 5'末端のV／C	健康 STD	アルツハイマー 5'末端のV／C	アルツハイマー STD	P値
hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	171	0.453893	0.024577	0.274961	0.004938	0.0000000011
hsa-miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	172	0.004378	0.0000007	0.002355	0.0000003	0.0002366507

【図２１Ｎ２】

表10. 健康なドナーおよびcHL患者の血漿から抽出された
細胞外小胞（EV）中に存在すると低分子RNAシーケンシングによって同定されたmicroRNA長さバリアント

V／C：バリアント／標準

SEQ：シーケンシングID番号

表10A：3'末端長さが延長／伸長された（E）バリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miRBase中に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	健康3'末端 dV／C(EV)	健康 STD (EV)	cHL 3'末端の V／C(EV)	cHL STD (EV)	P値
hsa-miR-486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	173	2.41E-04	1.16E-08	0.001798348	6.69E-07	0.0171
hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	174	0.324870615	0.014219315	0.600290274	0.013733156	0.0291

【図２１Ｐ２】

表10C：5'末端長さが延長／伸長された（E）バリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miRBase中に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	健康5'末端 dV／C(EV)	健康 STD (EV)	cHL 5'末端の V／C(EV)	cHL STD (EV)	P値
hsa-miR-92b-3p	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC	179	0.002392344	1.71699E-05	0.009532972	9.49554E-06	0.054

【図２１Ｏ２】

表10B：3'末端長さがトランケーション／トリミングされた（T）バリアントとして規定された
列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miRBase中に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	健康3'末端 dV／C(EV)	健康 STD (EV)	cHL 3'末端の V／C(EV)	cHL STD (EV)	P値
hsa-miR-99b-5p	CACCCGUAGAACCGAACCUUGCG	175	0.662985403	0.030698002	0.351704768	0.005615789	0.03
hsa-let-7d-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	176	0.227261558	0.009220008	0.071374471	2.98E-04	0.033
hsa-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	177	0.368602769	0.010848131	0.126572457	0.004359178	0.04
hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	178	0.608337676	0.121128655	0.085777775	8.71E-04	0.04

【図２１Ｑ２】

表10D：5'末端長さがトランケーション／トリミングされた（T）バリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miRBase中に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	健康5'末端 dV／C(EV)	健康 STD (EV)	cHL 5'末端の V／C(EV)	cHL STD (EV)	P値
hsa-miR-126-5p	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG	180	0.002802951	1.06E-06	0.001029033	3.83E-07	0.043

表11．健康なドナーおよびcHL患者の血漿から抽出された
タンパク質画分（PF）中に存在すると低分子RNAシーケンシングによって同定されたmicroRNA長さバリアント

V／C ： バリアント／標準

SEQ： シーケンシングID番号

表11A：3’末端長さが延長／伸長された（E）バリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	健康5’末端のV／C（PF）	健康 STD（PF）	cHL 5’末端のV／C（PF）	cHL STD（PF）	P値
hsa-miR-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	181	0.050775911	2.92E-06	0.171743333	0.005530906	0.063

表11B：3’末端長さがトランケーション／トリミングされた（T）バリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	健康5’末端のV／C（PF）	健康 STD（PF）	cHL 5’末端のV／C（PF）	cHL STD（PF）	P値
hsa-miR-151a-3p	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG	182	0.269480519	2.18E-04	0.020525452	0.000443	0.00003
hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	183	1.923265196	0.135546516	0.269970275	0.037429256	0.002
hsa-miR-128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	184	9.5	6.166666667	0.428571429	0.551020408	0.0021
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	185	0.319106352	0.00263648	0.151896475	0.002396259	0.014
hsa-miR-151a-5p	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU	186	0.397849462	0.029099917	0.047120329	1.16E-04	0.018
hsa-miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU	187	2.005847953	0.488372491	0.323284823	0.158653576	0.0190
hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	188	0.93728956 2	0.063561045	0.390106421	0.01061652	0.021
hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	189	3.089779417	2.341480252	0.275624934	0.021345504	0.027
hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	190	0.273738589	2.56E-04	0.127430857	0.004773519	0.029
hsa-miR-150-5p	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	191	1.458585859	0.150702989	0.365384615	0.169748521	0.029
hsa-miR-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	192	3.696142706	0.209072521	1.671846007	0.988592573	0.04
hsa-miR-345-5p	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	193	35.66666667	326.8888889	3.75	42.1875	0.04
hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	194	4.13263914	4.058191286	0.656464646	0.417524365	0.04
hsa-miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	195	7.250148851	6.193580602	2.207675439	2.877194281	0.04

表11C：5’末端長さがトランケーション／トリミングされた（T）バリアントとして規定された列挙されたmicroRNAの標準配列の転写後プロセシング

microRNA	miR塩基に含まれる標準（成熟）配列	SEQ	健康5’末端のV／C（PF）	健康 STD（PF）	cHL 5’末端のV／C（PF）	cHL STD（PF）	P値
hsa-miR-126-5p	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG	196	0.007269881	0.0000014	0.0012361	0.0000018	0.004
hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	197	0.012999534	0.0000249	0.0004513	0.0000006	0.009

【手続補正書】
【提出日】平成29年2月23日(2017.2.23)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
個体における古典的ホジキンリンパ腫の状態を特徴付けるための方法であって、
前記個体に由来する体液サンプルに由来する１または複数のｍｉＲＮＡの量を決定するステップと、
前記１または複数のｍｉＲＮＡの量を参照サンプルと比較するステップと、
を含み、
前記１または複数のｍｉＲＮＡの存在の差異、または、前記１または複数のｍｉＲＮＡの量の差異は、前記個体の状態を特徴付け、
前記１または複数のｍｉＲＮＡは、ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１９０８－５ｐ、ｍｉＲ－５１８９－５ｐ、ｍｉＲ－９２ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－４２５－３ｐ、ｍｉＲ－６２５－３ｐ、ｍｉＲ－７７０６、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－７６０、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｍｉＲ－１２２－５ｐ、ｍｉＲ－８９１ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１５５－５ｐ、ｍｉＲ－１２９－５ｐ、ｍｉＲ－１８２－５ｐ、ｍｉＲ－１２４６、ｍｉＲ－３２０ｂ、ｍｉＲ－１２７－３ｐ、ｍｉＲ－９－５ｐ、ｍｉＲ－７６９－５ｐ、ｍｉＲ－１９３ｂ－３ｐおよびｍｉＲ－１４６ｂ－３ｐから選択されることを特徴とする方法。
【請求項２】
前記１または複数のｍｉＲＮＡは、ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１９０８－５ｐ、ｍｉＲ－５１８９－５ｐ、ｍｉＲ－９２ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－４２５－３ｐ、ｍｉＲ－６２５－３ｐ、ｍｉＲ－７７０６、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－７６０、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｍｉＲ－１２２－５ｐから選択されることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記１または複数のｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１２７－３ｐおよびｍｉＲ－１５５－５ｐから選択されることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記個体が古典的ホジキンリンパ腫に罹患しているかどうかを前記古典的ホジキンリンパ腫の状態を特徴付けることで決定するステップを含む
ことを特徴とする請求項１から請求項３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記参照サンプルは、１または複数の健康な個体に由来するものであることを特徴とする請求項１から請求項４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記参照サンプルは、古典的ホジキンリンパ腫を有する１または複数の個体に由来するものであることを特徴とする請求項１から請求項４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
古典的ホジキンリンパ腫に対する処置を受けている個体において処置効力を古典的ホジキンリンパ腫の状態を特徴付けることで決定するステップを含むことを特徴とする請求項１から請求項４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記参照サンプルは、古典的ホジキンリンパ腫に対する処置を受ける前と同じ個体に由来するものであることを特徴とする請求項７に記載の方法。
【請求項９】

古典的ホジキンリンパ腫に罹患している個体の予後を古典的ホジキンリンパ腫の状態を特徴付けることで決定するステップを含むことを特徴とする請求項１から請求項４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記参照サンプルは、障害に対する処置における良好な反応を有する１または複数の個体に由来するものであり、または、障害に対する処置における不十分な反応を有する１または複数の個体に由来するものであることを特徴とする請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記体液サンプルからエキソソーム小胞を精製するステップと、
精製された前記エキソソーム小胞と関連する１または複数のｍｉＲＮＡの量を決定するステップと、
をさらに含むことを特徴とする請求項１から請求項１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記エキソソーム小胞は、
前記体液サンプルをサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）で精製されていることを特徴とする請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記エキソソーム小胞は、
空隙容量画分を取得することによって単離されていることを特徴とする請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
低分子のノンコーディングＲＮＡのバイオマーカー対を同定するための方法であって、
第１の参照個体から取得された第１の体液サンプル、および、第２の参照個体から取得された第２の体液サンプルのそれぞれに含まれる前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種の量を決定するステップと、
前記第１の参照個体は、前記第２の参照個体から変えられた健康状態であり、
前記第１の体液サンプル中の前記２つの異なる変種の比率を決定するステップと、
前記第２の体液サンプル中の前記２つの異なる変種の比率を決定するステップと、
前記第１の体液サンプルからの比率と前記第２の体液サンプルからの比率とを比較するステップと、
前記第１の体液サンプルと前記第２の体液サンプルとの間で前記比率が変えられている場合に、前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種をバイオマーカー対として同定するステップと
を含み、
第１の変種および第２の変種は、標準配列の５’末端または３’末端においてトリミングされた、および／または、５’末端または３’末端において伸長されたノンコーディングＲＮＡ、ならびに、任意選択で５’末端または３’末端においてトリミングされた、または、５’末端または３’末端において伸長された、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
前記ノンコーディングＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合に、
第１の変種は、前記標準配列のノンコーディングＲＮＡ、および、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
第２の変種は、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡであることを特徴とする方法。
【請求項１５】
前記第１の参照個体は、１または複数の健康な個体に由来するものであり、
前記第２の参照個体は、障害を有する１または複数の個体に由来するものであり、
前記障害は、好ましくは、前立腺がんである
ことを特徴とする請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】

前記第１の参照個体は、障害を有する個体に由来するものであり、
前記第２の参照個体は、前記障害に対して処置が行われた後の前記個体に由来するものである
ことを特徴とする請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
低分子のノンコーディングＲＮＡのバイオマーカー対を使用して、個体の健康状態を分類するための方法であって、
前記個体に由来する体液サンプル中のバイオマーカー対の量を決定するステップと、
前記体液サンプル中のバイオマーカー対の比率を決定するステップと、
前記比率と、参照サンプルに由来する体液中のバイオマーカー対の比率とを比較するステップと、
を含み、
前記個体に由来するサンプルと前記参照サンプルとの間の比率における差異の有無に基づいて、前記個体の健康状態を分類し、
前記バイオマーカー対は、ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種からなり、
第１の変種および第２の変種は、標準配列の５’末端または３’末端においてトリミングされた、および／または、５’末端または３’末端において伸長されたノンコーディングＲＮＡであるノンコーディングＲＮＡ、ならびに、任意選択で５’末端または３’末端においてトリミングされた、または、５’末端または３’末端において伸長された、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
前記ノンコーディングＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合に、
前記第１の変種は、前記標準配列のノンコーディングＲＮＡ、および、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
前記第２の変種は、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡであることを特徴とする方法。
【請求項１８】
低分子のノンコーディングＲＮＡのバイオマーカー対を使用して、個体の健康状態に関するデータを収集するための方法であって、
前記個体に由来する体液サンプル中のバイオマーカー対の量を決定するステップと、
前記体液サンプル中のバイオマーカー対の比率を決定するステップと、
を含み、
前記バイオマーカー対は、ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種からなり、
第１の変種および第２の変種は、標準配列のノンコーディングＲＮＡ、５’末端または３’末端においてトリミングされた、および／または、５’末端または３’末端において伸長されたノンコーディングＲＮＡ、ならびに、任意選択で５’末端または３’末端においてトリミングされた、または、５’末端または３’末端において伸長された、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
前記ノンコーディングＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合に、
前記第１の変種は、前記標準配列のノンコーディングＲＮＡ、および、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
前記第２の変種は、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡであることを特徴とする方法。
【請求項１９】
前記参照サンプルは、１または複数の健康な個体に由来するものであることを特徴とする請求項１７または請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記参照サンプルは、障害を有する１または複数の個体に由来するものであることを特徴とする請求項１７または請求項１８に記載の方法。
【請求項２１】
前記参照サンプルは、障害に対する処置における良好な反応を有する１または複数の個

体に由来するものである
ことを特徴とする請求項１７または請求項１８に記載の方法。
【請求項２２】
前記ノンコーディングＲＮＡは、トランスファーＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、ｓｎｏＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、核内低分子、Ｙ　ＲＮＡ、ヴォールトＲＮＡ、ンチセンスＲＮＡ、ｐｉｗｉＲＮＡから選択され、好ましくは、ノンコーディングＲＮＡは、ｍｉＲＮＡから選択される
ことを特徴とする請求項１４から請求項２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記第１の変種および前記第２の変種は、
それぞれが、
標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ａ、
標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
３’末端ＮＴＡ－Ｇおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
３’末端ＮＴＡ－Ｇおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
３’末端ＮＴＡ－Ｇおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
３’末端ＮＴＡ－Ｃおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
３’末端ＮＴＡ－Ｃおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
３’末端ＮＴＡ－Ｕおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
標準配列および５’末端トリミングされた、
標準配列および３’末端トリミングされた、
５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
３’末端トリミングされたおよび５’末端トリミングされた、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
伸長されたおよび５’末端トリミングされた、
伸長されたおよび３’末端トリミングされた、
５’末端または３’末端トリミングされたおよび５’末端または３’末端伸長された、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ａ、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
（トリミング、および／または、伸長された）および標準配列、
のいずれかから選択される
ことを特徴とする請求項１４から請求項２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
前記バイオマーカー対に含まれるそれぞれのノンコーディングＲＮＡの変種は、少なくとも、１６ヌクレオチドを含む
ことを特徴とする請求項１４から請求項２３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５】
前記バイオマーカー対は、表１、表２、表４、表５、表６、表９において示されるバイオマーカー対から選択されたひとつである
ことを特徴とする請求項１４から請求項２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記変種は、ディープシーケンシング（ＲＮＡ－ｓｅｑ）を使用して定量化されていることを特徴とする請求項１４から請求項２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
前記体液サンプルからエキソソーム小胞を単離するステップと、
単離された前記エキソソーム小胞と関連する前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種の量を決定するステップと、
をさらに含むことを特徴とする請求項１４から請求項２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
前記体液サンプルからタンパク質画分を単離するステップと、
前記タンパク質画分と関連する前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種の量を決定するステップと、
をさらに含むことを特徴とする請求項１４から請求項２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
エキソソーム小胞またはタンパク質画分は、
前記体液サンプルをサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）で単離されることを特徴とする請求項２７または請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記体液は血液であることを特徴とする請求項１から請求項２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
前記体液が尿であることを特徴とする請求項１から請求項２９のいずれか一項に記載の方法。

【手続補正書】
【提出日】平成29年3月27日(2017.3.27)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
低分子のノンコーディングＲＮＡのバイオマーカー対を同定するための方法であって、
第１の参照個体から取得された第１の体液サンプル、および、第２の参照個体から取得された第２の体液サンプルのそれぞれに含まれる前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種の量を決定するステップと、
前記第１の参照個体は、前記第２の参照個体から変えられた健康状態であり、
前記第１の体液サンプル中の前記２つの異なる変種の比率を決定するステップと、
前記第２の体液サンプル中の前記２つの異なる変種の比率を決定するステップと、
前記第１の体液サンプルからの比率と前記第２の体液サンプルからの比率とを比較するステップと、
前記第１の体液サンプルと前記第２の体液サンプルとの間で前記比率が変えられている

場合に、前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種をバイオマーカー対として同定するステップとを含み、
第１の変種および第２の変種は、標準配列の５’末端または３’末端においてトリミングされた、および／または、５’末端または３’末端において伸長されたノンコーディングＲＮＡ、ならびに、任意選択で５’末端または３’末端においてトリミングされた、または、５’末端または３’末端において伸長された、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
前記ノンコーディングＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合に、
第１の変種は、前記標準配列のノンコーディングＲＮＡ、および、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
第２の変種は、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡであることを特徴とする方法。
【請求項２】
前記第１の参照個体は、１または複数の健康な個体に由来するものであり、
前記第２の参照個体は、障害を有する１または複数の個体に由来するものであり、
前記障害は、好ましくは、前立腺がんである
ことを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記第１の参照個体は、障害を有する個体に由来するものであり、
前記第２の参照個体は、前記障害に対して処置が行われた後の前記個体に由来するものである
ことを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項４】
低分子のノンコーディングＲＮＡのバイオマーカー対を使用して、個体の健康状態を分類するための方法であって、
前記個体に由来する体液サンプル中のバイオマーカー対の量を決定するステップと、
前記体液サンプル中のバイオマーカー対の比率を決定するステップと、
前記比率と、参照サンプルに由来する体液中のバイオマーカー対の比率とを比較するステップと、
を含み、
前記個体に由来するサンプルと前記参照サンプルとの間の比率における差異の有無に基づいて、前記個体の健康状態を分類し、
前記バイオマーカー対は、ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種からなり、
第１の変種および第２の変種は、標準配列の５’末端または３’末端においてトリミングされた、および／または、５’末端または３’末端において伸長されたノンコーディングＲＮＡであるノンコーディングＲＮＡ、ならびに、任意選択で５’末端または３’末端においてトリミングされた、または、５’末端または３’末端において伸長された、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
前記ノンコーディングＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合に、
前記第１の変種は、前記標準配列のノンコーディングＲＮＡ、および、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、
前記第２の変種は、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡであることを特徴とする方法。
【請求項５】
低分子のノンコーディングＲＮＡのバイオマーカー対を使用して、個体の健康状態に関するデータを収集するための方法であって、
前記個体に由来する体液サンプル中のバイオマーカー対の量を決定するステップと、
前記体液サンプル中のバイオマーカー対の比率を決定するステップと、
を含み、
前記バイオマーカー対は、ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種からなり、

第１の変種および第２の変種は、標準配列のノンコーディングＲＮＡ、５’末端または３’末端においてトリミングされた、および／または、５’末端または３’末端において伸長されたノンコーディングＲＮＡ、ならびに、任意選択で５’末端または３’末端においてトリミングされた、または、５’末端または３’末端において伸長された、３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、

前記ノンコーディングＲＮＡがｍｉＲＮＡでない場合に、

前記第１の変種は、前記標準配列のノンコーディングＲＮＡ、および、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡから選択され、

前記第２の変種は、前記３’末端非テンプレート型ヌクレオチド付加を有するノンコーディングＲＮＡであることを特徴とする方法。

【請求項６】

前記参照サンプルは、１または複数の健康な個体に由来するものであることを特徴とする請求項４または請求項５に記載の方法。

【請求項７】

前記参照サンプルは、障害を有する１または複数の個体に由来するものであることを特徴とする請求項４または請求項５に記載の方法。

【請求項８】

前記参照サンプルは、障害に対する処置における良好な反応を有する１または複数の個体に由来するものである

ことを特徴とする請求項４または請求項５に記載の方法。

【請求項９】

前記ノンコーディングＲＮＡは、トランスファーＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、ｓｎｏＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、核内低分子、Ｙ　ＲＮＡ、ヴォールトＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、ｐｉｗｉＲＮＡから選択され、好ましくは、ノンコーディングＲＮＡは、ｍｉＲＮＡから選択される

ことを特徴とする請求項１から請求項８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０】

前記第１の変種および前記第２の変種は、

それぞれが、

標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ａ、

標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ｇ、

標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ｃ、

標準配列および３’末端ＮＴＡ－Ｕ、

３’末端ＮＴＡ－Ｇおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、

３’末端ＮＴＡ－Ｇおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、

３’末端ＮＴＡ－Ｇおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、

３’末端ＮＴＡ－Ｃおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、

３’末端ＮＴＡ－Ｃおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、

３’末端ＮＴＡ－Ｕおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、

標準配列および５’末端トリミングされた、

標準配列および３’末端トリミングされた、

５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、

５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、

５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、

５’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｇ、

３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、

３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、

３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、

３’末端トリミングされたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｇ、

３’末端トリミングされたおよび５’末端トリミングされた、

伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ａ、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
伸長されたおよび３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
伸長されたおよび５’末端トリミングされた、
伸長されたおよび３’末端トリミングされた、
５’末端または３’末端トリミングされたおよび５’末端または３’末端伸長された、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ｕ、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ａ、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ｇ、
（トリミング、および／または、伸長された）および３’末端ＮＴＡ－Ｃ、
（トリミング、および／または、伸長された）および標準配列、
のいずれかから選択される
ことを特徴とする請求項１から請求項９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記バイオマーカー対に含まれるそれぞれのノンコーディングＲＮＡの変種は、少なくとも、１６ヌクレオチドを含む
ことを特徴とする請求項１から請求項１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記バイオマーカー対は、表１、表２、表４、表５、表６、表９において示されるバイオマーカー対から選択されたひとつである
ことを特徴とする請求項１から請求項１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記変種は、ディープシーケンシング（ＲＮＡ－ｓｅｑ）を使用して定量化されていることを特徴とする請求項１から請求項１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記体液サンプルからエキソソーム小胞を単離するステップと、
単離された前記エキソソーム小胞と関連する前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種の量を決定するステップと、
をさらに含むことを特徴とする請求項１から請求項１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
前記体液サンプルからタンパク質画分を単離するステップと、
前記タンパク質画分と関連する前記ノンコーディングＲＮＡの２つの異なる変種の量を決定するステップと、
をさらに含むことを特徴とする請求項１から請求項１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
エキソソーム小胞またはタンパク質画分は、
前記体液サンプルをサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）で単離されることを特徴とする請求項１４または請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
個体における古典的ホジキンリンパ腫の状態を特徴付けるための方法であって、
前記個体に由来する体液サンプルに由来する１または複数のｍｉＲＮＡの量を決定するステップと、
前記１または複数のｍｉＲＮＡの量を参照サンプルと比較するステップと、を含み、
前記１または複数のｍｉＲＮＡの存在の差異、または、前記１または複数のｍｉＲＮＡの量の差異は、前記個体の状態を特徴付け、
前記１または複数のｍｉＲＮＡは、ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１９０８－５ｐ、ｍｉＲ－５１８９－５ｐ、ｍｉＲ－９２ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－４２５－３ｐ、ｍｉＲ－６２５－３ｐ、ｍｉＲ－７７０６、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－７６０、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｍｉＲ－１２２－５ｐ、ｍｉＲ－８９１ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１５５－５ｐ、ｍｉＲ

－１２９－５ｐ、ｍｉＲ－１８２－５ｐ、ｍｉＲ－１２４６、ｍｉＲ－３２０ｂ、ｍｉＲ－１２７－３ｐ、ｍｉＲ－９－５ｐ、ｍｉＲ－７６９－５ｐ、ｍｉＲ－１９３ｂ－３ｐおよびｍｉＲ－１４６ｂ－３ｐから選択されることを特徴とする方法。

【請求項１８】

前記１または複数のｍｉＲＮＡは、ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１９０８－５ｐ、ｍｉＲ－５１８９－５ｐ、ｍｉＲ－９２ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－４２５－３ｐ、ｍｉＲ－６２５－３ｐ、ｍｉＲ－７７０６、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－７６０、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｍｉＲ－１２２－５ｐから選択されることを特徴とする請求項１７に記載の方法。

【請求項１９】

前記１または複数のｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－２１－５ｐ、ｌｅｔ－７ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１２７－３ｐおよびｍｉＲ－１５５－５ｐから選択されることを特徴とする請求項１７に記載の方法。

【請求項２０】

前記個体が古典的ホジキンリンパ腫に罹患しているかどうかを前記古典的ホジキンリンパ腫の状態を特徴付けることで決定するステップを含む

ことを特徴とする請求項１７から請求項１９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２１】

前記参照サンプルは、１または複数の健康な個体に由来するものであることを特徴とする請求項１７から請求項２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２２】

前記参照サンプルは、古典的ホジキンリンパ腫を有する１または複数の個体に由来するものであることを特徴とする請求項１７から請求項２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２３】

古典的ホジキンリンパ腫に対する処置を受けている個体において処置効力を古典的ホジキンリンパ腫の状態を特徴付けることで決定するステップを含むことを特徴とする請求項１７から請求項２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２４】

前記参照サンプルは、古典的ホジキンリンパ腫に対する処置を受ける前と同じ個体に由来するものであることを特徴とする請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

古典的ホジキンリンパ腫に罹患している個体の予後を古典的ホジキンリンパ腫の状態を特徴付けることで決定するステップを含むことを特徴とする請求項１７から請求項２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６】

前記参照サンプルは、障害に対する処置における良好な反応を有する１または複数の個体に由来するものであり、または、障害に対する処置における不十分な反応を有する１または複数の個体に由来するものであることを特徴とする請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記体液サンプルからエキソソーム小胞を精製するステップと、

精製された前記エキソソーム小胞と関連する１または複数のｍｉＲＮＡの量を決定するステップと、をさらに含むことを特徴とする請求項１７から請求項２６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２８】

前記エキソソーム小胞は、

前記体液サンプルをサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）で精製されていることを特徴とする請求項２７に記載の方法。

【請求項２９】

前記エキソソーム小胞は、

空隙容量画分を取得することによって単離されていることを特徴とする請求項２８に記載の方法。

【請求項３０】
前記体液は血液であることを特徴とする請求項１から請求項２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
前記体液が尿であることを特徴とする請求項１から請求項２９のいずれか一項に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/058614

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68
ADD.

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

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUNG-CHOU LI ET AL: "miRNA arm selection and isomiR distribution in gastric cancer", BMC GENOMICS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 13, no. Suppl 1, 17 January 2012 (2012-01-17), page S13, XP021093261, ISSN: 1471-2164, DOI: 10.1186/1471-2164-13-S1-S13 abstract; figure 4; table 2 Methods; page 4, column 2, paragraph 3 - page 5, column 2, paragraph 1 page 8, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 3 ----- -/--	1-16

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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 2015	17/12/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gabriels, Jan

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/058614

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEUNG CHUNG-MAN ET AL: "Comprehensive microRNA profiling of prostate cancer cells after ionizing radiation treatment", ONCOLOGY REPORTS, vol. 31, no. 3, March 2014 (2014-03), pages 1067-1078, XP002728158, ISSN: 1021-335X abstract; figure 2	1-16
X	WO 2011/024157 A1 (ROSETTA GENOMICS LTD [IL]; SITBON EINAT [IL]; LITHWICK YANAI GILA [IL]) 3 March 2011 (2011-03-03) pages 2-5; examples 3,4	1-16

International application No.
PCT/EP2015/058614

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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:

see additional sheet

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 an 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.:

1-16

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 Application No. PCT/ EP2015/ 058614

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-16

A method for identifying a small non-coding RNA (ncRNA) biomarker pair, for classifying the health status of an individual using a small non-coding RNA (ncRNA) biomarker pair, and method for collecting data on the health status of an individual using a small non-coding RNA (ncRNA) biomarker pair.

---

2. claims: 17-31

A method for characterizing the status of classical Hodgkin's lymphoma (cHL) in an individual, the method comprising determining the quantity of one or more miRNAs from a bodily fluid sample from said individual and comparing the amount of the one or more miRNAs to a reference sample.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2015/058614

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011024157 A1	03-03-2011	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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,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

(72)発明者 コッパーズ－ラリッチ, ダニエラ
オランダ国 １０８１ ハーフェー アムステルダム デ ブーレラン １１１７内
(72)発明者 ヴルディンガー, トム
オランダ国 １０８１ ハーフェー アムステルダム デ ブーレラン １１１７内
(72)発明者 ベインスドルプ, イレーネ
オランダ国 １０８１ ハーフェー アムステルダム デ ブーレラン １１１７内
(72)発明者 ハッケンベルク, ミヒャエル
スペイン国 １８．０７１ グラナダ オスピタル レアル． アブダ． デル オスピシオ エス／エヌ 内

Ｆターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ52 QR35 QR55 QR62 QS25
QS34 QX02