

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6554458号
(P6554458)

(45) 発行日 令和1年7月31日 (2019.7.31)

(24) 登録日 令和1年7月12日 (2019.7.12)

(51) Int. Cl.

F I

G O 1 N 33/574 (2006.01)

G O 1 N 33/574 Z N A A

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53 M

C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6886

請求項の数 36 (全 138 頁)

(21) 出願番号 特願2016-502475 (P2016-502475)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月14日 (2014.3.14)
 (65) 公表番号 特表2016-520803 (P2016-520803A)
 (43) 公表日 平成28年7月14日 (2016.7.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/027541
 (87) 国際公開番号 W02014/152622
 (87) 国際公開日 平成26年9月25日 (2014.9.25)
 審査請求日 平成29年3月9日 (2017.3.9)
 (31) 優先権主張番号 61/791, 301
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500039463
 ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバ
 ーシテイ・オブ・テキサス・システム
 アメリカ合衆国 テキサス 78701,
 オースティン, ウェスト 7ティーエイチ
 ストリート 210
 (73) 特許権者 305049506
 ベス イスラエル デアコネス メディカ
 ル センター, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 215, ボストン, ブルックリン ア
 ベニュー 330
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象から得られた生物学的試料における癌バイオマーカのインビトロ検出方法であって、

(a) (i) 前記試料のエクソソーム画分中のダイサー；及び/又は

(ii) 前記試料のエクソソーム画分中の前駆体miRNAのダイサープロセッシング活性、

のレベルを測定すること；並びに

(b) 前記ダイサー又はダイサープロセッシング活性の測定レベルに基づき、癌バイオマーカを有する又は有さない前記対象を同定すること、

を含む前記方法。

【請求項 2】

前記試料が、本質的に細胞を含まない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記試料が、リンパ、唾液、尿又は血漿試料である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記試料のエクソソーム画分を精製すること、又は前記試料のエクソソーム画分の生成を増加させること、をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記癌が、乳癌、肺癌、頭頸部癌、前立腺癌、食道癌、気管癌、脳癌、肝臓癌、膀胱癌

、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、精巣癌、結腸癌、直腸癌又は皮膚癌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記癌が、乳癌である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 *miRNA* の少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10 のレベルを測定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

A G O 2、又は T R B P のレベルを測定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 9】

表 5 の *miRNA* (複数可) の 1 つの前駆体のレベルを測定することを含む前駆体 *miRNA* のレベルを測定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記対象が、過去に癌を処置されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記対象が、過去に腫瘍を外科的に摘出されている、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記対象を癌バイオマーカーを有する又は有さないと同定することが、前記測定されたダイサーレベル、又はダイサープロセッシング活性を、癌のリスクと関連させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 13】

前記対象を癌バイオマーカーを有する又は有さないと同定することが、アルゴリズムを用いた、前記測定されたダイサーレベル、又はダイサープロセッシング活性の解析をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記解析が、コンピュータにより実施される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

以下：

(i) 前記試料及び参照試料のエクソソーム画分中の A G O 2 又は T R B P、あるいは参照試料のエクソソーム画分中のダイサー；

30

(i i) 前記試料及び参照試料のエクソソーム画分中の前駆体 *miRNA* ；

(i i i) 前記試料及び参照試料のエクソソーム画分中の表 5 に示された *miRNA* A から選択される 1 つ以上の *miRNA* (複数可) ；並びに

(i v) 前記試料及び参照試料のエクソソーム画分中の *miRNA* プロセッシング活性、

のうちの 1 つ以上のレベルをさらに測定すること ；並びに

前記対象の前記試料中のダイサー、A G O 2、又は T R B P、前駆体 *miRNA*、*miRNA* (複数可)、又は *miRNA* プロセッシング活性のレベルを、前記参照試料中の *miRNA* (複数可)、前駆体 *miRNA*、ダイサー、A G O 2、又は T R B P、又は *miRNA* プロセッシング活性のレベルに比較することにより、前記対象を癌バイオマーカーを有する又は有さないと同定すること、

40

をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

ダイサー、A G O 2、又は T R B P のレベルを測定することが、ウェスタンブロット、E L I S A、又は抗体アレイへの結合を実施することを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

miRNA レベルを測定することが、プロセッシングされた *miRNA* レベルを測定することを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

50

m i R N A レベルを測定することが、R T - P C R、ノーザンブロット又はアレイハイブリダイゼーションを実施することを含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記対象が癌バイオマーカを有するか、又は有さないかを報告することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

報告することが、記載された報告書又は電子的報告書を用意することを含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記報告書を患者、医者、病院、又は保険会社に提出することをさらに含む、請求項 1 9 に記載の方法。 10

【請求項 2 2】

癌バイオマーカを、処置のための対象の選択のための指標として用いる方法であって、請求項 1 に記載の癌バイオマーカを有すると同定された対象を選択することを含み、前記対象が、さらに抗癌治療を施されるべきであることを特徴とする、方法。

【請求項 2 3】

前記抗癌治療が、化学療法、放射線治療、ホルモン療法、標的治療、免疫療法、又は外科的治療である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記抗癌治療が、脳をターゲットとする、請求項 2 2 に記載の方法。 20

【請求項 2 5】

癌バイオマーカを、処置のための対象の選択のための指標として用いる方法であって、
 (a) 前記対象から得た試料のエクソソーム画分中の、(i) ダイサー；又は(i i) 前駆体 m i R N A のダイサープロセッシング活性、のレベルを得ること；及び
 (b) ダイサー又はダイサープロセッシング活性のレベルに基づき、癌バイオマーカを有する対象を選択すること、
 を含み、前記選択された対象が、抗癌治療でさらに処置されるべきであることを特徴とする、方法。

【請求項 2 6】

前記抗癌治療が、化学療法、放射線治療、ホルモン療法、標的治療、免疫療法、又は外科的治療である、請求項 2 5 に記載の方法。 30

【請求項 2 7】

癌バイオマーカを、診断手順のための対象の選択のための指標として用いる方法であって、

(a) 前記対象から得た試料のエクソソーム画分中の、(i) ダイサー、又は(i i) 前駆体 m i R N A のダイサープロセッシング活性、のレベルを得ること；及び

(b) ダイサー又はダイサープロセッシング活性のレベルに基づき、癌バイオマーカを有する対象を選択すること、
 を含み、前記選択された対象において診断手順が実施されるべきであることを特徴とする、方法。 40

【請求項 2 8】

前記診断手順が、診断画像を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記画像が、X 線、C T、M R I 又は P E T 画像である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

コンピュータ可読コードを含む有体のコンピュータ可読媒体であって、コンピュータに実行させる際に、

a) 対象から得た試料のエクソソーム画分中の、(i) ダイサー；又は(i i) 前駆体 m i R N A のダイサープロセッシング活性、のレベルに対応する情報を受け取ること、及び；

b) ダイサー又はダイサープロセッシング活性の1つ以上の、参照レベルに比較した相対的レベルを決定すること、
を含む操作を前記コンピュータに実施させ、参照レベルに比較したレベルの変化により前記対象が癌バイオマーカを有することが示される、
前記有体のコンピュータ可読媒体。

【請求項31】

癌を有さない対象のエクソソーム画分中の、(i)ダイサー、又は(ii)前駆体miRNAのダイサープロセッシング活性、の参照レベルに対応する情報を受け取ることを含む、請求項30に記載の有体のコンピュータ可読媒体。

【請求項32】

前記参照レベルが保存される、請求項30に記載の有体のコンピュータ可読媒体。

【請求項33】

前記情報を受け取ることが、対象から得た試料中の、ダイサー又はダイサープロセッシング活性のレベルに対応する情報を、有体のデータ保存デバイスから受け取ることを含む、請求項30に記載の有体のコンピュータ可読媒体。

【請求項34】

コンピュータに実行させる際に、ダイサー又はダイサープロセッシング活性の相対レベルに対応する情報を、有体のデータ保存デバイスに送信すること、を含む1つ以上のさらなる操作を前記コンピュータに実施させる、コンピュータ可読コードをさらに含む、請求項30に記載の有体のコンピュータ可読媒体。

【請求項35】

前記情報を受け取ることが、対象から得た試料中の、前記miRNAの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、又は10のレベルに対応する情報を受け取ることを含む、請求項30に記載の有体のコンピュータ可読媒体。

【請求項36】

前記コンピュータ可読コードが、コンピュータに実行させる際に、c)前記患者の診断スコアを計算すること、をさらに含む操作を前記コンピュータに実施させ、前記診断スコアが、前記試料が癌を有する対象のものである可能性を示す、請求項30に記載の有体のコンピュータ可読媒体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、内容全体が参照により本明細書に取り込まれる、2013年3月15日出願の米国特許仮出願第61/791,301号の優先権の利益を主張するものである。

【0002】

本発明は、米国国立衛生研究所により授与された助成金番号EB003472、EB006462、CA135444、CA125550、CA155370、CA151925、DK081576、及びDK055001、並びに米国国立科学財団により授与された助成金番号EFRI-1240410、CBET-0922876、及びCBET-1144025に下に、米国政府の援助を受けてなされた。米国政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0003】

本発明は、一般に、分子生物学、腫瘍学及び医薬品の分野に関する。より詳細には本発明は、特有のエクソソーム量による癌の検出方法及び阻害性RNA療法を向上させる方法に関係する。

【背景技術】

【0004】

全ての細胞は、増殖因子、サイトカイン、ホルモン、ケモカイン、膜結合タンパク質及び脂質などの多くの異なる経路により周囲環境とコミュニケーションしている。エクソソームは、そのようなコミュニケーションを媒介することが可能であり、長い距離にわたりこれ

10

20

30

40

50

を実行する (Mathivanan et al., 2010; Kahlert and Kalluri, 2013)。エクソソームを介したコミュニケーションは、増殖因子/サイトカイン/ケモカイン/ホルモンの安定性及び拡散に関連する限界を克服する可能性がある (Mathivanan et al., 2010)。エクソソームは、30~140nmサイズのナノ小胞体であり、脂質二重層により保護されたタンパク質、mRNA及びマイクロRNA (miRNA) を含む (Cocucci et al., 2009; Simons and Raposo, 2009; Simpson et al., 2008; Thery et al., 2002)。近年行われた複数の研究により、エクソソームが癌細胞、幹細胞、免疫細胞及び神経細胞をはじめとする複数の細胞型により分泌されることが実証された (Simpson et al., 2008; Thery, 2001)。癌細胞が、正常細胞よりも多くのエクソソームを分泌することも、認められている (Taylor and Gercel-Taylor, 2011)。さらにエクソソームは、正常な対象に比較して癌患者の循環において増加するが (Logozzi et al., 2009; Taylor and Gercel-Taylor, 2008)、機能的役割は依然として不明である。エクソソームが癌の進行及び転移において重要な役割を担う可能性が、近年のエビデンスから示唆される (Luga et al., 2012; Peinado et al., 2012; Yang et al., 2011)。

【0005】

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

【0006】

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

【0007】

マイクロRNAは、配列特異的相互作用及びmiRNAが会合したRISC (ダイサー、TRBP及びAGO2タンパク質で構成) とターゲットmRNAとの対合により機能する (Bartel, 2009)。この作用は、結果として翻訳を阻害し、そして/又は

mRNA不安定化を誘起する (Filipowicz, 2005)。miRNA及びそのmRNAターゲットの相補性の度合いが、mRNA不安定化/分解又は翻訳阻害のいずれかを介して、mRNAサイレンシングの工程を決定づける (Ambros, 2004; Bartel, 2009)。完全な相補性が、miRNAとターゲットmRNA配列の間に成立すれば、RISC複合体は、分離のために結合されたmRNAを切断するように作用する (Ambros, 2004; Bartel, 2009)。絶対的な相補性が成立しなければ、動物細胞内のmiRNAのほとんどの例と同様に、翻訳が阻害されて、遺伝子サイレンシングに至る (Ambros, 2004; Bartel, 2009)。

【0008】

miRNAが機能的で、効率的miRNA媒介遺伝子サイレンシングを実現するためには、miRNAが、RLC (RISCローディングコンプレックス) タンパク質であるダイサー、TRBP及びAGO2と共に複合体化しなければならない。RLCのうち、ダイサー及びTRBPは、エクスポーティン-5を介して核から出現した後に前駆体miRNAをプロセシングしてmiRNAを生成し、AGO2と会合する必要がある。成熟miRNAと結合したAGO2は、最小のRISCを構成し、続いてダイサー及びTRBPから解離され得る (Chendrimada et al., 2005; Gregory et al., 2005; Haase et al., 2005; MacRae et al., 2008; Maniatakis and Mourelatos, 2005; Melo et al., 2009)。一本鎖miRNAが単独でRISCに組み込まれることは非常に少なく、それゆえ転写後調節のためにターゲットmRNAに効率的に誘導することはできない (Tang, 2005; Thomson et al., 2013)。

【0009】

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

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

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

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

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

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

10

【0012】

一実施形態において、本開示は、対象における癌バイオマーカの検出方法であって、(a)該対象から生物学的試料を得ること；(b)(i)該試料のエクソソーム画分中の表5に示されたmiRNAから選択される1つ以上のmiRNA(複数可)；(ii)前駆体miRNA；(iii)該試料のエクソソーム画分中のRISCタンパク質、又は(iv)該試料のエクソソーム画分中のmiRNAプロセッシング活性(例えば、一次miRNA及び/又は前駆体miRNAプロセッシング活性)、のいずれかのレベルを測定すること；並びに(c)前記miRNA(複数可)、前駆体miRNA、RISCタンパク質又はmiRNAプロセッシング活性の測定レベルに基づき、癌バイオマーカを有する又は有さない対象を同定すること、を含む該方法を提供する。幾つかの態様において、該方法は、前記miRNAの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10のレベルを測定することを含む。さらなる態様において、該方法は、AGO2、TRBP、又はダイサータンパク質のレベルを測定することを含む。

20

【0013】

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

30

【0014】

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

【0015】

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

40

【0016】

特定の態様において、該実施形態の方法は、(i)該試料及び参照試料のエクソソーム画分中の表5に示されたmiRNAから選択される1つ以上のmiRNA(複数可)；(

50

i i) 前駆体 m i R N A ; (i i i) 該試料及び参照試料のエクソソーム画分中の R I S C タンパク質、又は (i v) 該試料及び参照試料のエクソソーム画分中の m i R N A プロセシング活性、のいずれかのレベルを測定すること、並びに (c) 該対象の試料中の前記 m i R N A (複数可)、前駆体 m i R N A、R I S C 又は m i R N A プロセシング活性のレベルを、参照試料中の m i R N A (複数可)、前駆体 m i R N A、R I S C、m i R N A プロセシング活性のレベルに比較することにより、該対象を癌バイオマーカを有する又は有さないと同定すること、をさらに含む。

【 0 0 1 7 】

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

【 0 0 1 8 】

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

【 0 0 1 9 】

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

【 0 0 2 0 】

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

【 0 0 2 1 】

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

【 0 0 2 2 】

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

【0023】

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

10

【0024】

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

【0025】

20

幾つかの態様において、該コンピュータ可読コードは、コンピュータに実行させる際に、(c)該患者の診断スコアを計算すること、をさらに含む操作をコンピュータに実施させ、該診断スコアは、該試料が癌を有する対象のものである可能性を示す。

【0026】

さらなる実施形態において、本開示は、対象における癌バイオマーカの検出方法であって、(a)該対象から生物学的試料を得ること;(b)表5に示されたmiRNA又はその前駆体miRNAから選択される、試料中の1つ以上のmiRNA(複数可)のレベルを測定すること;及び(c)前記miRNA(複数可)の測定レベルに基づき、癌バイオマーカを有する、又は有さない対象を同定すること、を含む、該方法を提供する。一態様において、該生物学的試料は、本質的に細胞を含まない。特定の態様において、該生物学的試料は、リンパ、唾液、尿又は血漿試料であってもよい。一態様において、該方法は、体液のエクソソーム画分を精製することをさらに含み得る。

30

【0027】

さらなる実施形態において、本開示は、細胞を、RISCタンパク質複合体と会合して提供される阻害性RNAと接触させることを含む、活性の阻害性RNAの送達方法を提供する。一態様において、該RISCタンパク質複合体は、TRBP、ダイサー及びAGO2を含む。幾つかの態様において、該阻害性RNAは、siRNA又はshRNAである。一態様において、該阻害性RNAは、ヒトmiRNAである。

【0028】

特定の態様において、該阻害性RNA及びRISCタンパク質複合体は、脂質二重層を含むリポソーム、ナノ粒子又はマイクロカプセル中に含まれる。一態様において、該マイクロカプセルは、エクソソームである。

40

【0029】

幾つかの態様において、該方法は、細胞を、阻害性RNA及びRISCタンパク質複合体でトランスフェクトすることをさらに含む。別の態様において、該方法は、阻害性RNA及びRISCタンパク質複合体を対象に投与することをさらに含む。

【0030】

さらなる実施形態において、本開示は、RISCタンパク質複合体と会合した組換え又は合成阻害性RNAを含む組成物であって、前記複合体が、リポソーム、ナノ粒子又はマイクロカプセル中に含まれる、該組成物を提供する。一態様において、RISCタンパク

50

質複合体は、TRBP、ダイサー及びAGO2を含む。幾つかの態様において、該阻害性RNAは、siRNA又はshRNAである。幾つかの態様において、該阻害性RNAは、ヒトmiRNAである。特定の態様において、該複合体は、合成リボソーム、ナノ粒子又はマイクロカプセル中に含まれる。一態様において、該マイクロカプセルは、エクソソームである。

【0031】

先に詳述された実施形態の特定の態様は、表5に示されたものから選択される、試料のエクソソーム画分中の1つ以上のmiRNA(複数可)(又はmiRNA前駆体)のレベルを測定することに関する。例えば方法は、mmu-miR-709、hsa-miR-1308、mmu-miR-615-3p、hsa-miR-1260b、mmu-miR-1937a、mmu-miR-321-A、hsa-miR-615-3p、hsa-miR-1979、mmu-miR-1937b、hsa-miR-373、mmu-miR-1937c、hsa-miR-1273d-P、mmu-miR-720、mmu-miR-1274a、hsa-miR-565-A、mmu-miR-1931、hsa-miR-1246、hsa-miR-594-P、hsa-miR-321-A、mmu-miR-2145-1-P、hsa-miR-639-P、hsa-miR-720、hsa-miR-1280、mmu-miR-3473、hsa-miR-1260、hsa-miR-1281、mmu-miR-1224-P、mmu-miR-690、hsa-miR-375-P、hsa-miR-4301、mmu-miR-700、mmu-miR-125b-5p、mmu-miR-1191-P、hsa-miR-1274a、hsa-miR-3197、mmu-miR-1935、hsa-miR-1975-P、hsa-miR-4324、hsa-miR-886-3p、hsa-miR-1274b、mmu-miR-1957、hsa-miR-933、hsa-miR-675、hsa-miR-595、mmu-miR-2137、hsa-miR-572-P、mmu-miR-1195、hsa-miR-4294-P、mmu-miR-1899-P、mmu-miR-689-P、hsa-miR-199b-3p、hsa-miR-3117-P、mmu-miR-321-P、mmu-miR-1961-P、hsa-miR-10a、mmu-miR-669d-P、mmu-miR-1937b-2-P、hsa-miR-3125-P、mmu-miR-1934-P、hsa-miR-574-3p、hsa-miR-718、mmu-miR-1198、mmu-miR-2182-P、hsa-miR-1273、mmu-miR-2133-P、hsa-miR-92b^{*}、hsa-miR-1290、hsa-miR-448、mmu-miR-689、mmu-miR-449a、mmu-miR-1937b-4-P、hsa-miR-4286、mmu-miR-1947、mmu-miR-342-3p、hsa-miR-1303-P、mmu-miR-2132、hsa-miR-4321-P、hsa-miR-4256-P、hsa-miR-4311、mmu-miR-130a、mmu-miR-1939、hsa-miR-1268-P、mmu-miR-31、mmu-miR-99b、mmu-miR-2141、hsa-miR-1202-P、mmu-miR-466b-3p、mmu-miR-2133、hsa-miR-1268、hsa-miR-466、mmu-miR-494、hsa-miR-1289、hsa-miR-320b、hsa-miR-4254、hsa-miR-7-3-P、hsa-miR-923、hsa-miR-764、mmu-miR-291a-3p、mmu-miR-883b-3p、hsa-miR-594-A、mmu-miR-1948-P、hsa-miR-206、hsa-miR-565-P、mmu-miR-467e^{*}、hsa-miR-1826、mmu-miR-467a^{*}、mmu-miR-1983、hsa-miR-324-5p、mmu-let-7c、mmu-miR-1965、hsa-miR-632-P、hsa-miR-181a^{*}MM2GT/AC、hsa-miR-1265、hsa-miR-323b-5p、hsa-miR-1914、hsa-miR-1910、hsa-miR-21、hsa-miR-431^{*}、hsa-miR-3135-P、mmu-miR-187-P、mmu-miR-

10

20

30

40

50

1 2 6 - 3 p、mmu - mi R - 6 6 9 a - P、hsa - mi R - 3 6 7、mmu - mi
 r - 3 2 0 - P、hsa - mi R - 1 8 1 a * MM 1 G / C、mmu - mi R - 4 8 4 -
 P、mmu - mi R - 4 6 7 c - P、hsa - mi R - 3 1 5 4、mmu - mi R - 4 6
 6 d - 3 p、hsa - mi R - 3 1 6 2 - P、mmu - mi R - 2 0 1、mmu - mi R
 - 1 9 4 6 a、hsa - mi R - 9 3 7、hsa - mi R - 3 1 4 7、hsa - mi r -
 5 9 6 - P、hsa - mi R - 3 1 4 8、hsa - mi R - 1 3 0 4、hsa - mi R -
 2 2 2 MM 2 G G / A C、mmu - mi R - 1 2 5 a - 5 p、hsa - mi R - 1 2 7 2
 - P、hsa - mi R - 6 3 8、hsa - mi r - 3 2 0、hsa - mi R - 5 4 5 *、
 hsa - mi r - 1 9 0 8 - P、hsa - let - 7 d - v 2 - P、mmu - mi r - 3
 0 d - P、hsa - mi R - 4 2 9 7、mmu - mi R - 1 8 2、hsa - mi R - 3 1 10
 6 6 - P、hsa - mi R - 4 9 4、mmu - mi R - 6 6 9 o - P、hsa - mi R -
 5 6 6、mmu - mi R - 1 1 8 8、mmu - mi R - 2 1 3 4 - A P、hsa - mi R
 - 4 2 5 9 - P、mmu - mi R - 1 5 2、mmu - mi R - 2 1 3 4、hsa - mi R
 - 3 1 9 3 - A P、hsa - mi R - 1 2 5 b、hsa - mi R - 3 1 2 4 - P、hsa
 - mi R - 1 0 b、hsa - mi R - 4 5 5 - 5 p、mmu - mi R - 1 4 4、hsa -
 mi R - 1 3 0 a、hsa - mi R - 1 2 8 5、hsa - mi R - 5 1 6 b *、hsa -
 mi R - 2 7 a、hsa - mi R - 1 3 8 - 1 *、mmu - mi R - 4 7 1、hsa - m
 i R - 4 2 9 8 - P、hsa - mi R - 3 0 1 b、hsa - mi r - 1 4 7 - P、hsa
 - mi R - 3 6 2 - 5 p、mmu - mi r - 4 7 1 - P、mmu - mi R - 4 6 6 a - 3
 p、hsa - mi R - 5 6 1、hsa - mi R - 4 8 6 - 5 p、mmu - mi R - 2 8 6 20
 1、hsa - mi R - 5 8 7、mmu - mi R - 3 7 5、hsa - mi r - 3 2 9 - 2 -
 P、mmu - mi R - 2 8 6 1 - P、hsa - mi R - 1 4 4 *、hsa - mi R - 1 2
 5 5 a - P、hsa - mi r - 5 1 9 a - 2 - P、hsa - mi R - 3 4 c - 5 p、mm
 u - mi R - 4 6 6 e - 3 p、mmu - mi R - 7 4 3 b - 5 p、mmu - mi r - 3 5
 0 - P、mmu - mi R - 1 8 1 d、hsa - mi R - 3 7 6 a *、hsa - mi R - 1
 3 0 8 - P、mmu - mi R - 4 6 7 g、mmu - mi R - 1 9 4 6 a - P、hsa - m
 i R - 1 4 7 - P、hsa - mi R - 9 2 3 - P、mmu - mi R - 4 6 5 c - 5 p、h
 sa - mi R - 8 9 1 a、hsa - mi R - 2 8 - 5 p、hsa - mi R - 4 2 9 2、m
 mu - mi R - 6 7 7 - P、hsa - mi R - 4 2 5 7、hsa - mi R - 4 3 2 6、h
 sa - mi R - 1 7 * MM 2 G G / A A、hsa - mi R - 9 3 9 - P、mmu - mi R 30
 - 2 1 8 2、hsa - mi R - 2 2 0 c - P、hsa - mi R - 3 1 3 2 - P、hsa -
 mi R - 5 3 2 - 5 p、mmu - mi R - 1 9 4 7 - P、mmu - mi R - 2 9 a、hs
 a - mi R - 3 1 6 2、hsa - mi R - 3 7 5 MM 1 C / G、hsa - mi R - 7 6 8
 - 3 p、mmu - mi R - 1 8 2 - P、mmu - mi R - 2 0 5 - P、hsa - mi R -
 5 0 5、hsa - mi R - 3 1 4 6 - P、mmu - mi R - 7 2 1、mmu - mi R - 3
 7 6 c、hsa - mi R - 1 1 7 9 - P、mmu - mi R - 1 9 7 0、hsa - mi R -
 3 1 3 3 - P、hsa - mi R - 2 0 0 c、hsa - mi R - 2 2 0 a、mmu - mi R
 - 1 0 0、hsa - mi R - 1 2 5 5 b、hsa - mi R - 2 2 2 MM 1 G / A、hsa
 - mi R - 8 8 5 - 3 p、hsa - mi R - 5 1 7 b、hsa - mi R - 2 0 0 a、hs
 a - mi R - 3 1 4 1、mmu - mi R - 6 6 9 h - 3 p、hsa - mi R - 1 3 0 1、 40
 hsa - mi R - 8 7 7、hsa - mi r - 9 4 1 - 2、hsa - mi r - 4 8 7 b - P
 、hsa - mi R - 4 3 0 2、hsa - mi R - 9 9 b、hsa - mi R - 1 2 5 3、h
 sa - let - 7 a *、hsa - mi R - 3 4 a MM 2 C T / T C、hsa - mi R - 3
 1 8 1 - P、hsa - mi R - 3 2 0 0、hsa - mi R - 3 1 2 9 - P、hsa - mi
 R - 9 3 *、hsa - mi R - 5 4 8 q - P、mmu - mi R - 4 6 6 g、mmu - mi
 R - 1 5 5、hsa - mi R - 2 2 7 8 - P、hsa - mi R - 3 0 6 5 - 5 p、hsa
 - mi R - 6 3 3、hsa - mi R - 4 2 6 5、mmu - mi R - 2 1 3 5 - P、hsa
 - mi R - 1 9 0、mmu - mi R - 6 6 9 f、hsa - mi R - 1 3 2 3、hsa - m
 i R - 5 8 8、mmu - mi R - 1 8 3 *、hsa - mi r - 9 4 1 - 4、hsa - mi
 r - 1 9 1 3、hsa - mi R - 2 1 1 6 *、hsa - mi R - 1 1 7 8、mmu - mi 50

R - 196 a、mmu - miR - 574 - 3 p、hsa - miR - 346、mmu - miR - 1199、mmu - miR - 681、hsa - miR - 4292 - P、hsa - miR - 522、hsa - miR - 611 - P、hsa - miR - 3171、hsa - miR - 635、hsa - miR - 1197 - P、hsa - miR - 604、mmu - let - 7a*、hsa - miR - 335、mmu - miR - 466c - 3p、mmu - miR - 466i、hsa - miR - 1297、mmu - miR - 338 - 5p、hsa - miR - 526a - 2 - P、hsa - miR - 181aMM2GC/AG、hsa - miR - 18、hsa - miR - 924 - P、mmu - miR - 190 - P、hsa - miR - 345、mmu - miR - 711、hsa - miR - 3116 - 2 - P、hsa - miR - 99a、mmu - miR - 26a、hsa - miR - 1248 - P、mmu - miR - 721 - P、mmu - miR - 801 - P、hsa - miR - 1826 - P、hsa - miR - 1236、hsa - miR - 339 - 5p、mmu - miR - 804、mmu - miR - 467d*、mmu - miR - 1191、hsa - miR - 148a、hsa - miR - 141、mmu - miR - 1937a - P、mmu - miR - 696及びhsa - miR - 302a（即ち、表5に列挙されたもの）からなる群から選択される1つ以上のmiRNAのレベルを測定することを含み得る。

10

【0032】

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

20

【0033】

特許請求の範囲内の用語「又は」の使用は、代替物のみを指すこと、又はその代替物が互いに排他的であることが明確に示されていない限り、「及び／又は」を意味するために用いられているが、本開示は、代替物のみ、及び「及び／又は」を指す定義を支持する。本明細書で用いられる「別の」は、少なくとも1つの第二又はそれを超えるものを意味し得る。

【0034】

本出願を通して、用語「約」は、値が、デバイスに関する固有の誤差変動、値を測定するために用いられる方法、又は被験対象の間に存在する変動を含むことを示すために用いられている。

30

【0035】

本発明の他の目的、特色及び利点は、以下の詳細な説明から明白となる。しかし、詳細な説明から本発明の主旨及び範囲内で様々な変動及び改良が当業者に明白となるため、詳細な説明及び具体的な実施例が、本発明の好ましい実施形態を示すが例示に過ぎないことは、理解されなければならない。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

（項目1）

対象における癌バイオマーカのインビトロ検出方法であって、

（a）前記対象から生物学的試料を得ること；

（b）（i）前記試料のエクソソーム画分中のRISCタンパク質；

40

（ii）前駆体miRNA；

（iii）前記試料のエクソソーム画分中の表5に示されたmiRNAから選択される1つ以上のmiRNA（複数可）；及び／又は

（iv）前記試料のエクソソーム画分中の一次miRNA若しくは前駆体miRNAプロセッシング活性、

のレベルを測定すること；並びに

（c）前記miRNA（複数可）、前駆体miRNA、RISCタンパク質又はmiRNAプロセッシング活性の測定レベルに基づき、癌バイオマーカを有する又は有さない前記対象を同定すること、

を含む前記方法。

50

(項目2)前記試料が、本質的に細胞を含まない、項目1に記載の方法。(項目3)前記試料が、リンパ、唾液、尿又は血漿試料である、項目1に記載の方法。(項目4)前記試料のエクソソーム画分を精製すること、又は前記試料のエクソソーム画分の生成を増加させること、をさらに含む、項目1に記載の方法。(項目5)前記癌が、乳癌、肺癌、頭頸部癌、前立腺癌、食道癌、気管癌、脳癌、肝臓癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、精巣癌、結腸癌、直腸癌又は皮膚癌である、項目1に記載の方法。

10

(項目6)前記癌が、乳癌である、項目5に記載の方法。(項目7)前記miRNAの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10のレベルを測定することをさらに含む、項目1に記載の方法。(項目8)ダイサー、AGO2、又はTRBPのレベルを測定することをさらに含む、項目1に記載の方法。(項目9)前駆体miRNAのレベルを測定することが、表5のmiRNA(複数可)の1つの前駆体のレベルを測定することを含む、項目1に記載の方法。

20

(項目10)前記対象が、過去に癌を処置されている、項目1に記載の方法。(項目11)前記対象が、過去に腫瘍を外科的に摘出されている、項目10に記載の方法。(項目12)前記対象を癌バイオマーカーを有する又は有しないと同定することが、前記測定されたmiRNAレベル(複数可)、前駆体miRNAレベル、RISCレベル、又はmiRNAプロセッシング活性を、癌のリスクと相関させることをさらに含む、項目1に記載の方法。

30

(項目13)前記対象を癌バイオマーカーを有する又は有しないと同定することが、アルゴリズムを用いた、前記測定されたmiRNAレベル(複数可)、前駆体miRNAレベル、RISCレベル、又はmiRNAプロセッシング活性の解析をさらに含む、項目1に記載の方法。(項目14)前記分析が、コンピュータにより実施される、項目13に記載の方法。(項目15)b)(i)前記試料及び参照試料のエクソソーム画分中のRISCタンパク質；(ii)前記試料及び参照試料のエクソソーム画分中の前駆体miRNA；(iii)前記試料及び参照試料のエクソソーム画分中の表5に示されたmiRNAから選択される1つ以上のmiRNA(複数可)；並びに/又は

40

(iv)前記試料及び参照試料のエクソソーム画分中のmiRNAプロセッシング活性、のレベルを測定すること；並びに(c)前記対象の前記試料中のRISC、前駆体miRNA、miRNA(複数可)、又はmiRNAプロセッシング活性のレベルを、前記参照試料中のmiRNA(複数可)、前駆体miRNA、RISC又はmiRNAプロセッシング活性のレベルに比較することにより、前記対象を癌バイオマーカーを有する又は有しないと同定すること、をさらに含む、項目1に記載の方法。(項目16)RISCタンパク質レベルを測定することが、ウェスタンブロット、ELISA、又は

50

抗体アレイへの結合を実施することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 17)

m i R N A レベルを測定することが、プロセシングされた m i R N A レベルを測定することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 18)

m i R N A レベルを測定することが、R T - P C R、ノーザンブロット又はアレイハイブリダイゼーションを実施することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 19)

前記対象が癌バイオマーカを有するか、又は有さないかを報告することをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

10

(項目 20)

報告することが、記載された報告書又は電子的報告書を用意することを含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 21)

前記報告書を患者、医者、病院、又は保険会社に提出することをさらに含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 22)

対象の処置方法であって、
項目 1 に記載の癌バイオマーカを有すると同定された対象を選択すること；及び
前記対象に抗癌治療を施すこと、
を含む、前記方法。

20

(項目 23)

前記抗癌治療が、化学療法、放射線治療、ホルモン療法、標的治療、免疫療法、又は外科的治療である、項目 22 に記載の方法。

(項目 24)

前記抗癌治療が、脳をターゲットとする、項目 22 に記載の方法。

(項目 25)

対象の処置方法であって、
(a) 前記対象から得た試料のエクソソーム画分中の、(i) 表 5 に示された m i R N A から選択される 1 つ以上の m i R N A (複数可) ； (i i) 前駆体 m i R N A レベル ；
(i i i) R I S C タンパク質；又は (i v) m i R N A プロセシング活性、のレベルを得ること；

30

(b) 前記 m R N A (複数可) 、前駆体 m i R N A 、 R I S C タンパク質又は m i R N A プロセシング活性のレベルに基づき、癌バイオマーカを有する対象を選択すること；及び

(c) 前記選択された対象を抗癌治療で処置すること、
を含む、前記方法。

(項目 26)

前記抗癌治療が、化学療法、放射線治療、ホルモン療法、標的治療、免疫療法、又は外科的治療である、項目 25 に記載の方法。

40

(項目 27)

診断手順のための対象の選択方法であって、

(a) 前記対象から得た試料のエクソソーム画分中の、(i) 表 5 に示された m i R N A から選択される 1 つ以上の m i R N A (複数可) ； (i i) 前駆体 m i R N A ； (i i i) R I S C タンパク質、又は (i v) m i R N A プロセシング活性、のレベルを得ること；

(b) 前記 m R N A (複数可) 、前駆体 m i R N A 、 R I S C タンパク質又は m i R N A プロセシング活性のレベルに基づき、癌バイオマーカを有する対象を選択すること；及び

(c) 前記対象において前記選択された通り、診断手順を実施すること、

50

を含む、前記方法。

(項目28)

前記診断手順が、診断画像を含む、項目27に記載の方法。

(項目29)

前記画像が、X線、CT、MRI又はPET画像である、項目28に記載の方法。

(項目30)

コンピュータ可読コードを含む有体のコンピュータ可読媒体であって、コンピュータに実行させる際に、

a) 対象から得た試料のエクソソーム画分中の、(i)表5に示されたmiRNAから選択される1つ以上のmiRNA(複数可); (ii)前駆体miRNA; (iii)RISCタンパク質; 又は(iv)miRNAプロセシング活性、のレベルに対応する情報を受け取ること、及び;

b) 前記miRNA又はRISCタンパク質の1つ以上の、参照レベルに比較した相対的レベルを決定すること、

を含む操作を前記コンピュータに実施させ、参照レベルに比較したレベルの変化により前記対象が癌バイオマーカを有することが示される、

前記有体のコンピュータ可読媒体。

(項目31)

癌を有さない対象のエクソソーム画分中の、(i)表5に示されたmiRNAから選択される1つ以上のmiRNA(複数可); (ii)前駆体miRNA; (iii)RISCタンパク質、又は(iv)miRNAプロセシング活性、の参照レベルに対応する情報を受け取ることを含む、項目30に記載の有体のコンピュータ可読媒体。

(項目32)

前記参照レベルが保存される、項目30に記載の有体のコンピュータ可読媒体。

(項目33)

前記情報を受け取ることが、対象から得た試料中の、miRNA、前駆体miRNA、RISCタンパク質又はmiRNAプロセシング活性のレベルに対応する情報を、有体のデータ保存デバイスから受け取ることを含む、項目30に記載の有体のコンピュータ可読媒体。

(項目34)

コンピュータに実行させる際に、miRNA、前駆体miRNA、RISCタンパク質又はmiRNAプロセシング活性の相対レベルに対応する情報を、有体のデータ保存デバイスに送信すること、を含む1つ以上のさらなる操作を前記コンピュータに実施させる、コンピュータ可読コードをさらに含む、項目30に記載の有体のコンピュータ可読媒体。

(項目35)

前記情報を受け取ることが、対象から得た試料中の、前記miRNAの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、又は10のレベルに対応する情報を受け取ることを含む、項目30に記載の有体のコンピュータ可読媒体。

(項目36)

前記コンピュータ可読コードが、コンピュータに実行させる際に、c)前記患者の診断スコアを計算すること、をさらに含む操作を前記コンピュータに実施させ、前記診断スコアが、前記試料が癌を有する対象のものである可能性を示す、項目30に記載の有体のコンピュータ可読媒体。

(項目37)

対象における癌バイオマーカのインビトロ検出方法であって、

(a) 前記対象から生物学的試料を得ること;

(b) 表5に示された前記miRNAから選択される、前記試料中の1つ以上のmiRNA(複数可)のレベルを測定すること; 及び

(c) 前記miRNA(複数可)の前記測定レベルに基づき、癌バイオマーカを有する、又は有さない前記対象を同定すること、を含む、前記方法。

10

20

30

40

50

(項目 3 8)

前記試料が、本質的に細胞を含まない、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記試料が、体液のエクソソーム画分である、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記試料が、リンパ、唾液、尿又は血漿試料である、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 1)

細胞を、RISCタンパク質複合体と会合して提供される阻害性RNAと接触させることを含む、活性の阻害性RNAのインピトロ送達方法。

(項目 4 2)

前記RISCタンパク質複合体が、TRBP、ダイサー及びAGO2を含む、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記阻害性RNAが、siRNA又はshRNAである、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記阻害性RNAが、ヒトmiRNAである、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 5)

前記阻害性RNA及びRISCタンパク質複合体が、脂質二重層を含むリポソーム、ナノ粒子又はマイクロカプセル中に含まれる、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記マイクロカプセルが、エクソソームである、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 7)

細胞を接触させることが、細胞を、前記阻害性RNA及びRISCタンパク質複合体でトランスフェクトすることを含む、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記阻害性RNA及びRISCタンパク質複合体を対象に投与することをさらに含む、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 9)

RISCタンパク質複合体と会合した組換え又は合成阻害性RNAを含む組成物であって、前記複合体が、リポソーム、ナノ粒子又はマイクロカプセル中に含まれる、前記組成物。

(項目 5 0)

前記RISCタンパク質複合体が、TRBP、ダイサー及びAGO2を含む、項目 4 9 に記載の組成物。

(項目 5 1)

前記阻害性RNAが、siRNA又はshRNAである、項目 4 9 に記載の組成物。

(項目 5 2)

前記阻害性RNAが、ヒトmiRNAである、項目 4 9 に記載の組成物。

(項目 5 3)

前記複合体が、合成リポソーム、ナノ粒子又はマイクロカプセル中に含まれる、項目 4 9 に記載の組成物。

(項目 5 4)

前記マイクロカプセルが、エクソソームである、項目 4 9 に記載の組成物。

【 0 0 3 6 】

以下の図面は、本明細書の一部を形成しており、本発明の特定の態様をさらに示すために含まれる。特許又は出願ファイルは、色を付した図面を少なくとも1つ含む。カラー図面（複数可）を含むこの特許又は特許出願発行物のコピーは、必要な時に、必要な料金を支払えば、当局により提供されよう。本発明は、これらの1つ以上の図面を、本明細書に示された特定の実施形態の詳細な説明と併せて参照することで、より理解されるであろう。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1A】エクソソームの特徴づけ - オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性miRNAが豊富である。(A) オンコソームの透過型電子顕微鏡写真(上左写真及び下左写真及び挿入ズーム写真; 点線はズームエリアを示す)。下右画像は、抗CD9抗体及び透過型電子顕微鏡測定を利用した免疫金標識により作製した。金粒子を、黒色の点として示している。グラフは、112のTEM写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。(B) 乳癌細胞から得たエクソソームの原子間力顕微鏡画像。中央のグラフは、カバースリップ内の粒子の分散をエクソソームのサイズ範囲と共に示している。右のグラフは、26のAFM写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。(C) 非腫瘍原性マウス(NMUMG)及びヒト(MCF10A)細胞株(左のプロット、最初のパネル); マウス癌細胞株67NR及び4T1(中央のプロット、最初のパネル); ヒト癌細胞株MCF7及びMDA-MB231(右のプロット、最初のパネル)から採取されたエクソソームにおいて抗ダイサー抗体を利用した免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム(トリトン+PK); 余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム(PK); エクソソームを採取するための超遠心分離後の上清(上清)、であった。TS G 1 0 1(二列目)及びCD9(三列目)の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。(D) エクソソームマーカである、0.4 µmビーズに結合したMDA-MB231由来エクソソームのTS G 1 0 1、CD9、フロチリン-1、及びCD63抗体を用いたフローサイトメトリー分析。(E) 光散乱分光法(LSS)でのエクソソームのサイズ選別。該システムの較正は、24 nm及び100 nmの公称直径を有するガラスマイクロスフェア、並びに119 nm、175 nm、356 nm及び457 nmの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)懸濁液からのシグナルを利用して実施した。実験スペクトル及び得られたフィットを、100 nmの名目直径を有するガラスマイクロスフェア及び356 nmの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアに関して左のグラフに示している。右のグラフは、癌性エクソソームのPBS懸濁液のサイズ測定を表す。挿入図は、細胞及び細胞片による本発明者らのエクソソーム調製物の潜在的コンタミネーションを排除するために10 µmまで拡大して同グラフを示している。(F) NanoSightを用いたエクソソームのサイズ分布。左のグラフは、溶液中の粒子のサイズ分布を表しており、平均サイズ105 nmを示し、より大きなサイズのピークが示されていない。右のグラフは、NanoSightによる溶液中の粒子のサイズ及び濃度による分布を表す。図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた3つの独立した実験の結果であり、±s.d.として表している。

【図1B】エクソソームの特徴づけ - オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性miRNAが豊富である。(A) オンコソームの透過型電子顕微鏡写真(上左写真及び下左写真及び挿入ズーム写真; 点線はズームエリアを示す)。下右画像は、抗CD9抗体及び透過型電子顕微鏡測定を利用した免疫金標識により作製した。金粒子を、黒色の点として示している。グラフは、112のTEM写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。(B) 乳癌細胞から得たエクソソームの原子間力顕微鏡画像。中央のグラフは、カバースリップ内の粒子の分散をエクソソームのサイズ範囲と共に示している。右のグラフは、26のAFM写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。(C) 非腫瘍原性マウス(NMUMG)及びヒト(MCF10A)細胞株(左のプロット、最初のパネル); マウス癌細胞株67NR及び4T1(中央のプロット、最初のパネル); ヒト癌細胞株MCF7及びMDA-MB231(右のプロット、最初のパネル)から採取されたエクソソームにおいて抗ダイサー抗体を利用した免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム(トリトン+PK); 余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソ

10

20

30

40

50

ーム (PK) ; エクソソームを採取するための超遠心分離後の上清 (上清) 、であった。TS G 1 0 1 (二列目) 及びCD 9 (三列目) の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。(D) エクソソームマーカである、0.4 μ m ビーズに結合したMDA - MB 2 3 1 由来エクソソームのTS G 1 0 1、CD 9、フロチリン - 1、及びCD 6 3 抗体を用いたフローサイトメトリー分析。(E) 光散乱分光法 (LSS) でのエクソソームのサイズ選別。該システムの較正は、24 nm 及び100 nm の公称直径を有するガラスマイクロスフェア、並びに119 nm、175 nm、356 nm 及び457 nm の名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 懸濁液からのシグナルを利用して実施した。実験スペクトル及び得られたフィットを、100 nm の名目直径を有するガラスマイクロスフェア及び356 nm の名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアに関して左のグラフに示している。右のグラフは、癌性エクソソームのPBS 懸濁液のサイズ測定を表す。挿入図は、細胞及び細胞片による本発明者らのエクソソーム調製物の潜在的コンタミネーションを排除するために10 μ m まで拡大して同グラフを示している。(F) NanoSight を用いたエクソソームのサイズ分布。左のグラフは、溶液中の粒子のサイズ分布を表しており、平均サイズ105 nm を示し、より大きなサイズのピークが示されていない。右のグラフは、NanoSight による溶液中の粒子のサイズ及び濃度による分布を表す。図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた3つの独立した実験の結果であり、 $\pm$ s . d . として表している。

【図1C】エクソソームの特徴づけ - オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性miRNA が豊富である。(A) オンコソームの透過型電子顕微鏡写真 (上左写真及び下左写真及び挿入ズーム写真; 点線はズームエリアを示す)。下右画像は、抗CD 9 抗体及び透過型電子顕微鏡測定を利用した免疫金標識により作製した。金粒子を、黒色の点として示している。グラフは、112 のTEM 写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。(B) 乳癌細胞から得たエクソソームの原子間力顕微鏡画像。中央のグラフは、カバースリップ内の粒子の分散をエクソソームのサイズ範囲と共に示している。右のグラフは、26 のAFM 写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。(C) 非腫瘍原性マウス (NMuMG) 及びヒト (MCF 1 0 A) 細胞株 (左のプロット、最初のパネル) ; マウス癌細胞株67NR 及び4T1 (中央のプロット、最初のパネル) ; ヒト癌細胞株MCF 7 及びMDA - MB 2 3 1 (右のプロット、最初のパネル) から採取されたエクソソームにおいて抗ダイサー抗体を利用した免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンX に続いてプロテオキナーゼK で処置されたエクソソーム (トリトン + PK) ; 余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼK で処置されたエクソソーム (PK) ; エクソソームを採取するための超遠心分離後の上清 (上清) 、であった。TS G 1 0 1 (二列目) 及びCD 9 (三列目) の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。(D) エクソソームマーカである、0.4 μ m ビーズに結合したMDA - MB 2 3 1 由来エクソソームのTS G 1 0 1、CD 9、フロチリン - 1、及びCD 6 3 抗体を用いたフローサイトメトリー分析。(E) 光散乱分光法 (LSS) でのエクソソームのサイズ選別。該システムの較正は、24 nm 及び100 nm の公称直径を有するガラスマイクロスフェア、並びに119 nm、175 nm、356 nm 及び457 nm の名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 懸濁液からのシグナルを利用して実施した。実験スペクトル及び得られたフィットを、100 nm の名目直径を有するガラスマイクロスフェア及び356 nm の名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアに関して左のグラフに示している。右のグラフは、癌性エクソソームのPBS 懸濁液のサイズ測定を表す。挿入図は、細胞及び細胞片による本発明者らのエクソソーム調製物の潜在的コンタミネーションを排除するために10 μ m まで拡大して同グラフを示している。(F) NanoSight を用いたエクソソームのサイズ分布。左のグラフは、溶液中の粒子のサイズ分布を表しており、平均サイズ105 nm を示し、より大きなサイズのピークが示されていない。右のグラフは、NanoSight による溶液中の粒子のサイズ及び濃度による分布を表す。図に示されたデータは、それぞれが三

10

20

30

40

50

重測定で行われた3つの独立した実験の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。

【図1D】エクソソームの特徴づけ - オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性miRNAが豊富である。(A) オンコソームの透過型電子顕微鏡写真(上左写真及び下左写真及び挿入ズーム写真; 点線はズームエリアを示す)。下右画像は、抗CD9抗体及び透過型電子顕微鏡測定を利用した免疫金標識により作製した。金粒子を、黒色の点として示している。グラフは、112のTEM写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。(B) 乳癌細胞から得たエクソソームの原子間力顕微鏡画像。中央のグラフは、カバースリップ内の粒子の分散をエクソソームのサイズ範囲と共に示している。右のグラフは、26のAFM写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。(C) 非腫瘍原性マウス(NMUMG)及びヒト(MCF10A)細胞株(左のプロット、最初のパネル); マウス癌細胞株67NR及び4T1(中央のプロット、最初のパネル); ヒト癌細胞株MCF7及びMDA-MB231(右のプロット、最初のパネル)から採取されたエクソソームにおいて抗ダイサー抗体を利用した免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム(トリトン+PK); 余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム(PK); エクソソームを採取するための超遠心分離後の上清(上清)、であった。TS G 1 0 1(二列目)及びCD9(三列目)の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。(D) エクソソームマーカである、0.4 μ mビーズに結合したMDA-MB231由来エクソソームのTS G 1 0 1、CD9、フロチリン-1、及びCD63抗体を用いたフローサイトメトリー分析。(E) 光散乱分光法(LSS)でのエクソソームのサイズ選別。該システムの較正は、24 nm及び100 nmの公称直径を有するガラスマイクロスフェア、並びに119 nm、175 nm、356 nm及び457 nmの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)懸濁液からのシグナルを利用して実施した。実験スペクトル及び得られたフィットを、100 nmの名目直径を有するガラスマイクロスフェア及び356 nmの名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアに関して左のグラフに示している。右のグラフは、癌性エクソソームのPBS懸濁液のサイズ測定を表す。挿入図は、細胞及び細胞片による本発明者らのエクソソーム調製物の潜在的コンタミネーションを排除するために10 μ mまで拡大して同グラフを示している。(F) NanoSightを用いたエクソソームのサイズ分布。左のグラフは、溶液中の粒子のサイズ分布を表しており、平均サイズ105 nmを示し、より大きなサイズのピークが示されていない。右のグラフは、NanoSightによる溶液中の粒子のサイズ及び濃度による分布を表す。図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた3つの独立した実験の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。

【図1E】エクソソームの特徴づけ - オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性miRNAが豊富である。(A) オンコソームの透過型電子顕微鏡写真(上左写真及び下左写真及び挿入ズーム写真; 点線はズームエリアを示す)。下右画像は、抗CD9抗体及び透過型電子顕微鏡測定を利用した免疫金標識により作製した。金粒子を、黒色の点として示している。グラフは、112のTEM写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。(B) 乳癌細胞から得たエクソソームの原子間力顕微鏡画像。中央のグラフは、カバースリップ内の粒子の分散をエクソソームのサイズ範囲と共に示している。右のグラフは、26のAFM写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。(C) 非腫瘍原性マウス(NMUMG)及びヒト(MCF10A)細胞株(左のプロット、最初のパネル); マウス癌細胞株67NR及び4T1(中央のプロット、最初のパネル); ヒト癌細胞株MCF7及びMDA-MB231(右のプロット、最初のパネル)から採取されたエクソソームにおいて抗ダイサー抗体を利用した免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム(トリトン+PK); 余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム(PK); エクソソームを採取するための超遠心分離後の上清(上清)、であった。

10

20

30

40

50

TSG101 (二列目) 及び CD9 (三列目) の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。(D) エクソソームマーカである、0.4 μ m ビーズに結合した MDA-MB231 由来エクソソームの TSG101、CD9、フロチリン-1、及び CD63 抗体を用いたフローサイトメトリー分析。(E) 光散乱分光法 (LSS) でのエクソソームのサイズ選別。該システムの較正は、24 nm 及び 100 nm の公称直径を有するガラスマイクロスフェア、並びに 119 nm、175 nm、356 nm 及び 457 nm の名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 懸濁液からのシグナルを利用して実施した。実験スペクトル及び得られたフィットを、100 nm の名目直径を有するガラスマイクロスフェア及び 356 nm の名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアに関して左のグラフに示している。右のグラフは、癌性エクソソームの PBS 懸濁液のサイズ測定を表す。挿入図は、細胞及び細胞片による本発明者らのエクソソーム調製物の潜在的コンタミネーションを排除するために 10 μ m まで拡大して同グラフを示している。(F) NanoSight を用いたエクソソームのサイズ分布。左のグラフは、溶液中の粒子のサイズ分布を表しており、平均サイズ 105 nm を示し、より大きなサイズのピークが示されていない。右のグラフは、NanoSight による溶液中の粒子のサイズ及び濃度による分布を表す。図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた 3 つの独立した実験の結果であり、 $\pm$ s.d. として表している。

【図 1 F】エクソソームの特徴づけ - オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性 miRNA が豊富である。(A) オンコソームの透過型電子顕微鏡写真 (上左写真及び下左写真及び挿入ズーム写真; 点線はズームエリアを示す)。下右画像は、抗 CD9 抗体及び透過型電子顕微鏡測定を利用した免疫金標識により作製した。金粒子を、黒色の点として示している。グラフは、112 の TEM 写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。(B) 乳癌細胞から得たエクソソームの原子間力顕微鏡画像。中央のグラフは、カバースリップ内の粒子の分散をエクソソームのサイズ範囲と共に示している。右のグラフは、26 の AFM 写真から分析されたエクソソーム調製物の平均サイズを表す。(C) 非腫瘍原性マウス (NMuMG) 及びヒト (MCF10A) 細胞株 (左のプロット、最初のパネル); マウス癌細胞株 67NR 及び 4T1 (中央のプロット、最初のパネル); ヒト癌細胞株 MCF7 及び MDA-MB231 (右のプロット、最初のパネル) から採取されたエクソソームにおいて抗ダイサー抗体を利用した免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトン X に続いてプロテオキナーゼ K で処置されたエクソソーム (トリトン + PK); 余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼ K で処置されたエクソソーム (PK); エクソソームを採取するための超遠心分離後の上清 (上清)、であった。TSG101 (二列目) 及び CD9 (三列目) の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。(D) エクソソームマーカである、0.4 μ m ビーズに結合した MDA-MB231 由来エクソソームの TSG101、CD9、フロチリン-1、及び CD63 抗体を用いたフローサイトメトリー分析。(E) 光散乱分光法 (LSS) でのエクソソームのサイズ選別。該システムの較正は、24 nm 及び 100 nm の公称直径を有するガラスマイクロスフェア、並びに 119 nm、175 nm、356 nm 及び 457 nm の名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 懸濁液からのシグナルを利用して実施した。実験スペクトル及び得られたフィットを、100 nm の名目直径を有するガラスマイクロスフェア及び 356 nm の名目直径を有するポリスチレンマイクロスフェアに関して左のグラフに示している。右のグラフは、癌性エクソソームの PBS 懸濁液のサイズ測定を表す。挿入図は、細胞及び細胞片による本発明者らのエクソソーム調製物の潜在的コンタミネーションを排除するために 10 μ m まで拡大して同グラフを示している。(F) NanoSight を用いたエクソソームのサイズ分布。左のグラフは、溶液中の粒子のサイズ分布を表しており、平均サイズ 105 nm を示し、より大きなサイズのピークが示されていない。右のグラフは、NanoSight による溶液中の粒子のサイズ及び濃度による分布を表す。図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた 3 つの独立した実験の結果であり、 $\pm$ s.d. として表している。

10

20

30

40

50

【図 2 A】オンコソームが *miRNA* を豊富に含むようになっている。(A) MDA-MB 231 エクソソーム及び MCF 10 A エクソソーム中の発現された *miRNA* の相関グラフ。(B) 72 h の無細胞培養の後、ノルモソームとオンコソームの間で差次的に発現された *miRNA* の 6 種 (*miR* - 10 a、*miR* - 10 b、*miR* - 21、*miR* - 27 a、*miR* - 155、及び *miR* - 373) を利用した細胞中の *miRNA* と各エクソソームの間の相関グラフ。(C) ノルモソーム及びオンコソームを DMEM 培地に再懸濁させて、24 及び 72 h の無細胞培養物に保持した。24 及び 72 h 後に、エクソソームを採取し、15 種の *miRNA* (表 4 参照) を qPCR により定量した。72 h の無細胞培養後のエクソソーム中の各 *miRNA* の倍率変化を、24 h の無細胞培養後のエクソソーム中の同じ *miRNA* と比較して定量した。グラフのプロットは、72 h 後に採取されたエクソソーム中の腫瘍サプレッサ (TS) 及び発癌性 (ONC) *miRNA* の倍率変化の平均を、24 h 後に採取されたものに比較して表している。(D) 24 及び 72 h の無細胞培養後のノルモソーム、培養していないオンコソーム、並びに 24 h、72 h 及び 96 h の無細胞培養後のオンコソームから得られた *miRNA* - 10 及び *miR* - 21 のノーザンブロット。tRNA Met を負荷対照として用いた。イメージ J ソフトウェアを用いて、定量を実施した。(E) 72 h の無細胞培養後の、MCF 10 A、MDA-MB 231 及び 4 T 1 細胞中の 15 種の定量された *miRNA* と、それらの各エクソソームの間の相関プロット。オンコソームは、ノルモソームと比較して (左グラフ)、起源細胞 (中央及び右グラフ) との低い相関値を示している。(F) 1 秒 (s) あたりの蛍光単位 (FU) で示されたバイオアナライザーグラフ表示、並びにノルモソーム及びオンコソームのエクソソーム RNA 量のゲル画像。

10

20

【図 2 B】オンコソームが *miRNA* を豊富に含むようになっている。(A) MDA-MB 231 エクソソーム及び MCF 10 A エクソソーム中の発現された *miRNA* の相関グラフ。(B) 72 h の無細胞培養の後、ノルモソームとオンコソームの間で差次的に発現された *miRNA* の 6 種 (*miR* - 10 a、*miR* - 10 b、*miR* - 21、*miR* - 27 a、*miR* - 155、及び *miR* - 373) を利用した細胞中の *miRNA* と各エクソソームの間の相関グラフ。(C) ノルモソーム及びオンコソームを DMEM 培地に再懸濁させて、24 及び 72 h の無細胞培養物に保持した。24 及び 72 h 後に、エクソソームを採取し、15 種の *miRNA* (表 4 参照) を qPCR により定量した。72 h の無細胞培養後のエクソソーム中の各 *miRNA* の倍率変化を、24 h の無細胞培養後のエクソソーム中の同じ *miRNA* と比較して定量した。グラフのプロットは、72 h 後に採取されたエクソソーム中の腫瘍サプレッサ (TS) 及び発癌性 (ONC) *miRNA* の倍率変化の平均を、24 h 後に採取されたものに比較して表している。(D) 24 及び 72 h の無細胞培養後のノルモソーム、培養していないオンコソーム、並びに 24 h、72 h 及び 96 h の無細胞培養後のオンコソームから得られた *miRNA* - 10 及び *miR* - 21 のノーザンブロット。tRNA Met を負荷対照として用いた。イメージ J ソフトウェアを用いて、定量を実施した。(E) 72 h の無細胞培養後の、MCF 10 A、MDA-MB 231 及び 4 T 1 細胞中の 15 種の定量された *miRNA* と、それらの各エクソソームの間の相関プロット。オンコソームは、ノルモソームと比較して (左グラフ)、起源細胞 (中央及び右グラフ) との低い相関値を示している。(F) 1 秒 (s) あたりの蛍光単位 (FU) で示されたバイオアナライザーグラフ表示、並びにノルモソーム及びオンコソームのエクソソーム RNA 量のゲル画像。

30

40

【図 2 C】オンコソームが *miRNA* を豊富に含むようになっている。(A) MDA-MB 231 エクソソーム及び MCF 10 A エクソソーム中の発現された *miRNA* の相関グラフ。(B) 72 h の無細胞培養の後、ノルモソームとオンコソームの間で差次的に発現された *miRNA* の 6 種 (*miR* - 10 a、*miR* - 10 b、*miR* - 21、*miR* - 27 a、*miR* - 155、及び *miR* - 373) を利用した細胞中の *miRNA* と各エクソソームの間の相関グラフ。(C) ノルモソーム及びオンコソームを DMEM 培地に再懸濁させて、24 及び 72 h の無細胞培養物に保持した。24 及び 72 h 後に、エクソソームを採取し、15 種の *miRNA* (表 4 参照) を qPCR により定量した。72 h の無細胞

50

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

10

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

20

30

【図2E】オンコソームが *miRNA* を豊富に含むようになっている。(A) MDA-MB231 エクソソーム及び MCF10A エクソソーム中の発現された *miRNA* の相関グラフ。(B) 72 h の無細胞培養の後、ノルモソームとオンコソームの間に差次的に発現された *miRNA* の 6 種 (*miR* - 10a、*miR* - 10b、*miR* - 21、*miR* - 27a、*miR* - 155、及び *miR* - 373) を利用した細胞中の *miRNA* と各エクソソームの間の相関グラフ。(C) ノルモソーム及びオンコソームを DMEM 培地に再懸濁させて、24 及び 72 h の無細胞培養物に保持した。24 及び 72 h 後に、エクソソームを採取し、15 種の *miRNA* (表4参照) を qPCR により定量した。72 h の無細胞培養後のエクソソーム中の各 *miRNA* の倍率変化を、24 h の無細胞培養後のエクソソーム中の同じ *miRNA* と比較して定量した。グラフのプロットは、72 h 後に採取されたエクソソーム中の腫瘍サプレッサ (TS) 及び発癌性 (ONC) *miRNA* の倍率変化の平均を、24 h 後に採取されたものに比較して表している。(D) 24 及び 72 h の無細胞培養後のノルモソーム、培養していないオンコソーム、並びに 24 h、72 h 及び 96 h の無細胞培養後のオンコソームから得られた *miRNA* - 10 及び *miR* - 21 のノーザンプロット。tRNA Met を負荷対照として用いた。イメージJソフトウェアを用いて、定量を実施した。(E) 72 h の無細胞培養後の、MCF10A、MDA-MB2

40

50

3 1 及び 4 T 1 細胞中の 1 5 種の定量された *miRNA* と、それらの各エクソソームの間の相関プロット。オンコソームは、ノルモソームと比較して（左グラフ）、起源細胞（中央及び右グラフ）との低い相関値を示している。（F）1 秒（s）あたりの蛍光単位（FU）で示されたバイオアナライザーグラフ表示、並びにノルモソーム及びオンコソームのエクソソーム RNA 量のゲル画像。

【図 2 F】オンコソームが *miRNA* を豊富に含むようになっている。（A）MDA - MB 2 3 1 エクソソーム及び MCF 1 0 A エクソソーム中の発現された *miRNA* の相関グラフ。（B）7 2 h の無細胞培養の後、ノルモソームとオンコソームの間で差次的に発現された *miRNA* の 6 種（*miR* - 1 0 a、*miR* - 1 0 b、*miR* - 2 1、*miR* - 2 7 a、*miR* - 1 5 5、及び *miR* - 3 7 3）を利用した細胞中の *miRNA* と各エクソソームの間の相関グラフ。（C）ノルモソーム及びオンコソームを DMEM 培地に再懸濁させて、2 4 及び 7 2 h の無細胞培養物に保持した。2 4 及び 7 2 h 後に、エクソソームを採取し、1 5 種の *miRNA*（表 4 参照）を qPCR により定量した。7 2 h の無細胞培養後のエクソソーム中の各 *miRNA* の倍率変化を、2 4 h の無細胞培養後のエクソソーム中の同じ *miRNA* と比較して定量した。グラフのプロットは、7 2 h 後に採取されたエクソソーム中の腫瘍サプレッサ（TS）及び発癌性（ONC）*miRNA* の倍率変化の平均を、2 4 h 後に採取されたものに比較して表している。（D）2 4 及び 7 2 h の無細胞培養後のノルモソーム、培養していないオンコソーム、並びに 2 4 h、7 2 h 及び 9 6 h の無細胞培養後のオンコソームから得られた *miRNA* - 1 0 及び *miR* - 2 1 のノーザンプロット。tRNA Met を負荷対照として用いた。イメージ J ソフトウェアを用いて、定量を実施した。（E）7 2 h の無細胞培養後の、MCF 1 0 A、MDA - MB 2 3 1 及び 4 T 1 細胞中の 1 5 種の定量された *miRNA* と、それらの各エクソソームの間の相関プロット。オンコソームは、ノルモソームと比較して（左グラフ）、起源細胞（中央及び右グラフ）との低い相関値を示している。（F）1 秒（s）あたりの蛍光単位（FU）で示されたバイオアナライザーグラフ表示、並びにノルモソーム及びオンコソームのエクソソーム RNA 量のゲル画像。

【図 3 - 1】エクソソームは pre - *miRNA* を含む。（A）試験された成熟 *miRNA* A に対応する 1 5 種の pre - *miRNA* を、MCF 1 0 A 及び MDA - MB 2 3 1 エクソソームの qPCR を用いて定量した。存在量を反映するために、各 pre - *miRNA* の ΔCt 値の逆数をプロットしており、値は $\pm s.d.$ として表している。（B）オンコソーム及びノルモソームを DMEM 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 2 4 及び 7 2 h 保持した。2 4 及び 7 2 h 後に、エクソソームを再度抽出して、1 5 種の pre - *miRNA* を qPCR により定量した。グラフは、7 2 h の無細胞培養後の MCF 1 0 A 及び MDA - MB 2 3 1 エクソソーム中の各 pre - *miRNA* の倍率変化を、2 4 h の無細胞培養と比較して示しており、 $\pm s.d.$ として表している。（C）2 4 h 及び 7 2 h の無細胞培養後の MCF 1 0 A、並びに 0 h、2 4 h、7 2 h、及び 9 6 h の無細胞培養による MDA - MB 2 3 1 オンコソームを用いた pre - *miR* - 1 0 b 及び pre - *miR* - 2 1 のノーザンプロット。tRNA Met を負荷対照として用いた。イメージ J ソフトウェアを用いて、定量を実施した。（D）上のグラフ：オンコソーム（MDA - MB 2 3 1）の発癌性 pre - *miRNA*（左グラフ）及び発癌性 *miRNA*（右グラフ）を、2 4 h 及び 7 2 h の無細胞培養条件後に定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各 pre - *miRNA*（左グラフ）及び *miRNA*（右グラフ）の ΔCt 値の逆数をプロットしており、指数関数的傾向が認められた。示されたデータは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、SD として表している。下のグラフ：オンコソーム（MDA - MB 2 3 1）の pre - *miRNA*（左グラフ）及び成熟 *miRNA*（右グラフ）を、6 h、1 2 h、2 4 h、3 6 h、4 8 h、7 2 h 及び 9 6 h の無細胞培養条件後に定量した。異なる時点での各 pre - *miRNA*（左グラフ）及び *miRNA*（右グラフ）の ΔCt 値の逆数をプロットしており、指数関数的傾向が認められた。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた 3 回の独立した実験の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。（E）オンコソーム及びノルモソームを DMEM 培地に再懸濁して、無細胞培養条件

10

20

30

40

50

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

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

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

10

20

30

40

50

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

【図3-4】エクソソームは *pre-miRNA* を含む。(A) 試験された成熟 *miRNA* A に対応する 15 種の *pre-miRNA* を、MCF10A 及び MDA-MB231 エクソソームの qPCR を用いて定量した。存在量を反映するために、各 *pre-miRNA* の ΔC_t 値の逆数をプロットしており、値は $\pm s.d.$ として表している。(B) オンコソーム及びノルモソームを DMEM 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 24 及び 72 h 保持した。24 及び 72 h 後に、エクソソームを再度抽出して、15 種の *pre-miRNA* を qPCR により定量した。グラフは、72 h の無細胞培養後の MCF10A 及び MDA-MB231 エクソソーム中の各 *pre-miRNA* の倍率変化を、24 h の無細胞培養と比較して示しており、 $\pm s.d.$ として表している。(C) 24 h 及び 72 h の無細胞培養後の MCF10A、並びに 0 h、24 h、72 h、及び 96 h の無細胞培養による MDA-MB231 オンコソームを用いた *pre-miR-10b* 及び *pre-miR-21* のノーザンブロット。tRNA Met を負荷対照として用いた。イメージJソフトウェアを用いて、定量を実施した。(D) 上のグラフ：オンコソーム (MDA-MB231) の発癌性 *pre-miRNA* (左グラフ) 及び発癌性 *miRNA* (右グラフ) を、24 h 及び 72 h の無細胞培養条件後に定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各 *pre-miRNA* (左グラフ) 及び *miRNA* (右グラフ) の ΔC_t 値の逆数をプロットしており、指数関数的傾向が認められた。示されたデータは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SD として表している。下のグラフ：オンコソーム (MDA-MB231) の *pre-miRNA* (左グラフ) 及び成熟 *miRNA* (右グラフ) を、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 及び 96 h の無細胞培養条件後に定量した。異なる時点での各 *pre-miRNA* (左グラフ) 及び *miRNA* (右グラフ) の ΔC_t 値の逆数をプロットしており、指数関数的傾向が認められた。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた3回の独立した実験の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。(E) オンコソーム及びノルモソームを DMEM 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 0 h、24 h、72 h 及び 96 h 保持した。エクソソームを異なる時点で抽出して、*pre-miRNA* を qPCR により定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各 *pre-miRNA* の ΔC_t 値の逆数をプロットした。

【図4-1】オンコソームは RLC を含む。(A) 非腫瘍原性マウス (NMuMG) 及びヒト (MCF10A) 細胞株；マウス癌細胞株 67NR 及び 4T1；ヒト癌細胞株 MCF7 及び MDA-MB231 から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム (トリトン+PK)；及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム (PK) であった。TSG101 (二列目) 及び CD9 (三列目) の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。(B) オンコソーム (MDA-MB231) において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、IgGを指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上2つの画像の定量を表す。(C) エンブティベクター (pCMV-Tag4B；それぞれ最初及び三番目のレーン) 及び Flag-ダイサーベクター (二番目及び四番目のレーン) でトランスフェクトされた細胞から採取された MCF10A 及び MDA-MB231 エクソソーム中の抗 Flag 抗体 (上パネル) を用いた免疫ブロット。CD9 免疫ブロットを用いて、エクソソームの

存在を確認し、負荷対照とした（下パネル）。（D）カルシウムイオノフォア A 2 3 1 8 7 で処置された M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫プロット（上パネル）。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。C D 9 免疫プロット（したパネル）を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。（E）M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 親細胞、並びに s h スクランブル及び s h ダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫プロット（上プロット）。C D 9 免疫プロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした（下プロット）。イメージJソフトウェアを利用して、免疫プロットの定量を実施した。（F）M D A M B 2 3 1 s h ダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、E M 写真の金粒子の定量を示す。（G）オンコソーム（M C F 7 及び M D A - M B 2 3 1）及びノルモソーム（M C F 1 0 A）から採取されたエクソソーム中の抗 A G O 2 抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトン X に続いてプロテオキナーゼ K で処置されたエクソソーム（トリトン + P K）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼ K で処置されたエクソソーム（P K）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。T S G 1 0 1（二列目）及び C D 9（三列目）の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（H）オンコソーム（M C F 7 及び M D A - M B 2 3 1）及びノルモソーム（M C F 1 0 A）から採取されたエクソソーム中の抗 T R B P 抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトン X に続いてプロテオキナーゼ K で処置されたエクソソーム（トリトン + P K）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼ K で処置されたエクソソーム（P K）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。T S G 1 0 1（二列目）及び C D 9（三列目）を、エクソソームマーカとして用いた。（I）G F P - A G O 2 プラスミドでトランスフェクトされた M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞中の抗 G F P 抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。β - アクチンを、負荷対照として用いた（下パネル）。（J）G F P - A G O 2 プラスミドでトランスフェクトされた M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソーム中の抗 G F P 抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。T S G 1 0 1（中央パネル）及び C D 9（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。（K）s i A G O 2 でトランスフェクトされた M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞中の A G O 2 m R N A 発現。M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、S D として表している。（L）M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 親細胞又は s i 対照若しくは s i A G O 2 でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中の A G O 2 抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。T S G 1 0 1（中央パネル）及び C D 9（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージJソフトウェアを用いて、定量を実施した。（M）ダイサー抗体又は I g G で免疫沈降された M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の A G O 2 抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの 5 % を、対照として用いた。ダイサーの免疫プロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（N）ダイサー抗体又は I g G で免疫沈降された M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗 T R B P 抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（5 %）を、対照として用いた。ダイサーの免疫プロットを、対照として用いた（下パネル）。

【図 4 - 2】オンコソームは R L C を含む。（A）非腫瘍原性マウス（N M u M G）及びヒト（M C F 1 0 A）細胞株；マウス癌細胞株 6 7 N R 及び 4 T 1；ヒト癌細胞株 M C F 7 及び M D A - M B 2 3 1 から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用し

10

20

30

40

50

た免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム（トリトン+PK）；及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム（PK）であった。TS G 1 0 1（二列目）及びCD 9（三列目）の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（B）オンコソーム（MDA-MB 2 3 1）において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、Ig Gを指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上2つの画像の定量を表す。

（C）エンブティベクター（pCMV-Tag 4 B；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びFlag-ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされた細胞から採取されたMCF 1 0 A及びMDA-MB 2 3 1エクソソーム中の抗Flag抗体（上パネル）を用いた免疫プロット。CD 9免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした（下パネル）。（D）カルシウムイオノフォアA 2 3 1 8 7で処置されたMCF 1 0 A及びMDA-MB 2 3 1細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫プロット（上パネル）。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。CD 9免疫プロット（したパネル）を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。（E）MCF 1 0 A及びMDA-MB 2 3 1親細胞、並びにshスクランブル及びshダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫プロット（上プロット）。CD 9免疫プロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした（下プロット）。イメージJソフトウェアを利用して、免疫プロットの定量を実施した。（F）MDAMB 2 3 1 shダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、EM写真の金粒子の定量を示す。

（G）オンコソーム（MCF 7及びMDA-MB 2 3 1）及びノルモソーム（MCF 1 0 A）から採取されたエクソソーム中の抗AGO 2抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム（トリトン+PK）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム（PK）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。TS G 1 0 1（二列目）及びCD 9（三列目）の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（H）オンコソーム（MCF 7及びMDA-MB 2 3 1）及びノルモソーム（MCF 1 0 A）から採取されたエクソソーム中の抗TRBP抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム（トリトン+PK）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム（PK）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。TS G 1 0 1（二列目）及びCD 9（三列目）を、エクソソームマーカとして用いた。（I）GFP-AGO 2プラスミドでトランスフェクトされたMCF 1 0 A及びMDA-MB 2 3 1細胞中の抗GFP抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。β-アクチンを、負荷対照として用いた（下パネル）。（J）GFP-AGO 2プラスミドでトランスフェクトされたMCF 1 0 A及びMDA-MB 2 3 1細胞から抽出されたエクソソーム中の抗GFP抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。TS G 1 0 1（中央パネル）及びCD 9（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。（K）siAGO 2でトランスフェクトされたMCF 1 0 A及びMDA-MB 2 3 1細胞中のAGO 2 mRNA発現。MCF 1 0 A及びMDA-MB 2 3 1親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。（L）MCF 1 0 A及びMDA-MB 2 3 1親細胞又はsi対照若しくはsiAGO 2でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のAGO 2抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。TS G 1 0 1（中央パネル）及びC

10

20

30

40

50

D 9 (下パネル)を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージJソフトウェアを用いて、定量を実施した。(M)ダイサー抗体又はIgGで免疫沈降されたMCF 10 A及びMDA - MB 231細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のAGO 2抗体を用いた免疫プロット(上パネル)。MDA - MB 231細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの5%を、対照として用いた。ダイサーの免疫プロットを、免疫沈降の対照として用いた(下パネル)。(N)ダイサー抗体又はIgGで免疫沈降されたMCF 10 A及びMDA - MB 231細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗TRBP抗体を用いた免疫プロット(上パネル)。MDA - MB 231細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット(5%)を、対照として用いた。ダイサーの免疫プロットを、対照として用いた(下パネル)。

10

【図4-3】オンコソームはRLCを含む。(A)非腫瘍原性マウス(NMUMG)及びヒト(MCF 10 A)細胞株;マウス癌細胞株67NR及び4T1;ヒト癌細胞株MCF 7及びMDA - MB 231から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム(トリトン+PK);及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム(PK)であった。TSG 101(二列目)及びCD 9(三列目)の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。(B)オンコソーム(MDA - MB 231)において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、IgGを指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上2つの画像の定量を表す。

20

(C)エンブティベクター(pCMV - Tag 4 B;それぞれ最初及び三番目のレーン)及びFlag - ダイサーベクター(二番目及び四番目のレーン)でトランスフェクトされた細胞から採取されたMCF 10 A及びMDA - MB 231エクソソーム中の抗Flag抗体(上パネル)を用いた免疫プロット。CD 9免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした(下パネル)。(D)カルシウムイオノフォアA23187で処置されたMCF 10 A及びMDA - MB 231細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫プロット(上パネル)。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。CD 9免疫プロット(したパネル)を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。(E)MCF 10 A及びMDA - MB 231親細胞、並びにshスクランブル及びshダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫プロット(上プロット)。CD 9免疫プロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした(下プロット)。イメージJソフトウェアを利用して、免疫プロットの定量を実施した。(F)MDA MB 231 shダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、EM写真の金粒子の定量を示す。

30

(G)オンコソーム(MCF 7及びMDA - MB 231)及びノルモソーム(MCF 10 A)から採取されたエクソソーム中の抗AGO 2抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム(トリトン+PK);余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム(PK);及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清(上清)、であった。TSG 101(二列目)及びCD 9(三列目)の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。(H)オンコソーム(MCF 7及びMDA - MB 231)及びノルモソーム(MCF 10 A)から採取されたエクソソーム中の抗TRBP抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム(トリトン+PK);余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム(PK);及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の

40

50

上清（上清）、であった。TSG101（二列目）及びCD9（三列目）を、エクソソームマーカとして用いた。（I）GFP-AGO2プラスミドでトランスフェクトされたMCF10A及びMDA-MB231細胞中の抗GFP抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β-アクチンを、負荷対照として用いた（下パネル）。（J）GFP-AGO2プラスミドでトランスフェクトされたMCF10A及びMDA-MB231細胞から抽出されたエクソソーム中の抗GFP抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。TSG101（中央パネル）及びCD9（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。（K）siAGO2でトランスフェクトされたMCF10A及びMDA-MB231細胞中のAGO2 mRNA発現。MCF10A及びMDA-MB231親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。（L）MCF10A及びMDA-MB231親細胞又はsi対照若しくはsiAGO2でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のAGO2抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。TSG101（中央パネル）及びCD9（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージJソフトウェアを用いて、定量を実施した。（M）ダイサー抗体又はIgGで免疫沈降されたMCF10A及びMDA-MB231細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のAGO2抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。MDA-MB231細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの5%を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（N）ダイサー抗体又はIgGで免疫沈降されたMCF10A及びMDA-MB231細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗TRBP抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。MDA-MB231細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（5%）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、対照として用いた（下パネル）。

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

10

20

30

40

50

(G) オンコソーム (M C F 7 及び M D A - M B 2 3 1) 及び ノルモソーム (M C F 1 0 A) から採取されたエクソソーム中の抗 A G O 2 抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトン X に続いてプロテオキナーゼ K で処置されたエクソソーム (トリトン + P K) ; 余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼ K で処置されたエクソソーム (P K) ; 及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清 (上清) 、であった。 T S G 1 0 1 (二列目) 及び C D 9 (三列目) の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。 (H) オンコソーム (M C F 7 及び M D A - M B 2 3 1) 及び ノルモソーム (M C F 1 0 A) から採取されたエクソソーム中の抗 T R B P 抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトン X に続いてプロテオキナーゼ K で処置されたエクソソーム (トリトン + P K) ; 余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼ K で処置されたエクソソーム (P K) ; 及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清 (上清) 、であった。 T S G 1 0 1 (二列目) 及び C D 9 (三列目) を、エクソソームマーカとして用いた。 (I) G F P - A G O 2 プラスミドでトランスフェクトされた M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞中の抗 G F P 抗体を用いた免疫プロット (上パネル) 。 β - アクチンを、負荷対照として用いた (下パネル) 。 (J) G F P - A G O 2 プラスミドでトランスフェクトされた M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソーム中の抗 G F P 抗体を用いた免疫プロット (上パネル) 。 T S G 1 0 1 (中央パネル) 及び C D 9 (下パネル) を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。 (K) s i A G O 2 でトランスフェクトされた M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞中の A G O 2 m R N A 発現。 M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、S D として表している。 (L) M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 親細胞又は s i 対照若しくは s i A G O 2 でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中の A G O 2 抗体を用いた免疫プロット (上パネル) 。 T S G 1 0 1 (中央パネル) 及び C D 9 (下パネル) を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージ J ソフトウェアを用いて、定量を実施した。 (M) ダイサー抗体又は I g G で免疫沈降された M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の A G O 2 抗体を用いた免疫プロット (上パネル) 。 M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの 5 % を、対照として用いた。ダイサーの免疫プロットを、免疫沈降の対照として用いた (下パネル) 。 (N) ダイサー抗体又は I g G で免疫沈降された M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗 T R B P 抗体を用いた免疫プロット (上パネル) 。 M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット (5 %) を、対照として用いた。ダイサーの免疫プロットを、対照として用いた (下パネル) 。

【図 4 - 5】オンコソームは R L C を含む。 (A) 非腫瘍原性マウス (N M u M G) 及びヒト (M C F 1 0 A) 細胞株；マウス癌細胞株 6 7 N R 及び 4 T 1 ；ヒト癌細胞株 M C F 7 及び M D A - M B 2 3 1 から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトン X に続いてプロテオキナーゼ K で処置されたエクソソーム (トリトン + P K) ; 及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼ K で処置されたエクソソーム (P K) であった。 T S G 1 0 1 (二列目) 及び C D 9 (三列目) の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。 (B) オンコソーム (M D A - M B 2 3 1) において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、I g G を指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上 2 つの画像の定量を表す。 (C) エンブティベクター (p C M V - T a g 4 B ; それぞれ最初及び三番目のレーン) 及び F l a g - ダイサーベクター (二番目及び四番目のレーン) でトランスフェクトされ

た細胞から採取されたMCF10A及びMDA-MB231エクソソーム中の抗Flag抗体（上パネル）を用いた免疫プロット。CD9免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした（下パネル）。（D）カルシウムイオノフォアA23187で処置されたMCF10A及びMDA-MB231細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫プロット（上パネル）。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。CD9免疫プロット（したパネル）を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。（E）MCF10A及びMDA-MB231親細胞、並びにshスクランブル及びshダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫プロット（上プロット）。CD9免疫プロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした（下プロット）。イメージJソフトウェアを利用して、免疫プロットの定量を実施した。（F）MDAMB231shダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、EM写真の金粒子の定量を示す。（G）オンコソーム（MCF7及びMDA-MB231）及びノルモソーム（MCF10A）から採取されたエクソソーム中の抗AGO2抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム（トリトン+PK）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム（PK）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。TSGL1（二列目）及びCD9（三列目）の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（H）オンコソーム（MCF7及びMDA-MB231）及びノルモソーム（MCF10A）から採取されたエクソソーム中の抗TRBP抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム（トリトン+PK）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム（PK）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。TSGL1（二列目）及びCD9（三列目）を、エクソソームマーカとして用いた。（I）GFP-AGO2プラスミドでトランスフェクトされたMCF10A及びMDA-MB231細胞中の抗GFP抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。β-アクチンを、負荷対照として用いた（下パネル）。（J）GFP-AGO2プラスミドでトランスフェクトされたMCF10A及びMDA-MB231細胞から抽出されたエクソソーム中の抗GFP抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。TSGL1（中央パネル）及びCD9（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。（K）siAGO2でトランスフェクトされたMCF10A及びMDA-MB231細胞中のAGO2 mRNA発現。MCF10A及びMDA-MB231親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。（L）MCF10A及びMDA-MB231親細胞又はsi対照若しくはsiAGO2でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のAGO2抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。TSGL1（中央パネル）及びCD9（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージJソフトウェアを用いて、定量を実施した。（M）ダイサー抗体又はIgGで免疫沈降されたMCF10A及びMDA-MB231細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のAGO2抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。MDA-MB231細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの5%を、対照として用いた。ダイサーの免疫プロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（N）ダイサー抗体又はIgGで免疫沈降されたMCF10A及びMDA-MB231細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗TRBP抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。MDA-MB231細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（5%）を、対照として用いた。ダイサーの免疫プロットを、対照として用いた（下パネル）。

【図4-6】オンコソームはRLCを含む。（A）非腫瘍原性マウス（NMuMG）及び

10

20

30

40

50

ヒト (MCF10A) 細胞株 ; マウス癌細胞株 67NR 及び 4T1 ; ヒト癌細胞株 MCF7 及び MDA-MB231 から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトン X に続いてプロテオキナーゼ K で処置されたエクソソーム (トリトン + PK) ; 及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼ K で処置されたエクソソーム (PK) であった。TS G 101 (二列目) 及び CD9 (三列目) の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。(B) オンコソーム (MDA-MB231) において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、IgG を指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上 2 つの画像の定量を表す。

(C) エンブティベクター (pCMV-Tag4B ; それぞれ最初及び三番目のレーン) 及び Flag-ダイサーベクター (二番目及び四番目のレーン) でトランスフェクトされた細胞から採取された MCF10A 及び MDA-MB231 エクソソーム中の抗 Flag 抗体 (上パネル) を用いた免疫プロット。CD9 免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした (下パネル)。(D) カルシウムイオノフォア A23187 で処置された MCF10A 及び MDA-MB231 細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫プロット (上パネル)。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。CD9 免疫プロット (したパネル) を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。(E) MCF10A 及び MDA-MB231 親細胞、並びに shスクランブル及び shダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫プロット (上プロット)。CD9 免疫プロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした (下プロット)。イメージJソフトウェアを利用して、免疫プロットの定量を実施した。(F) MDAMB231 shダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、EM写真の金粒子の定量を示す。

(G) オンコソーム (MCF7 及び MDA-MB231) 及び ノルモソーム (MCF10A) から採取されたエクソソーム中の抗AGO2抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトン X に続いてプロテオキナーゼ K で処置されたエクソソーム (トリトン + PK) ; 余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼ K で処置されたエクソソーム (PK) ; 及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清 (上清)、であった。TS G 101 (二列目) 及び CD9 (三列目) の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。(H) オンコソーム (MCF7 及び MDA-MB231) 及び ノルモソーム (MCF10A) から採取されたエクソソーム中の抗TRBP抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトン X に続いてプロテオキナーゼ K で処置されたエクソソーム (トリトン + PK) ; 余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼ K で処置されたエクソソーム (PK) ; 及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清 (上清)、であった。TS G 101 (二列目) 及び CD9 (三列目) を、エクソソームマーカとして用いた。(I) GFP-AGO2 プラスミドでトランスフェクトされた MCF10A 及び MDA-MB231 細胞中の抗 GFP 抗体を用いた免疫プロット (上パネル)。β-アクトチンを、負荷対照として用いた (下パネル)。(J) GFP-AGO2 プラスミドでトランスフェクトされた MCF10A 及び MDA-MB231 細胞から抽出されたエクソソーム中の抗 GFP 抗体を用いた免疫プロット (上パネル)。TS G 101 (中央パネル) 及び CD9 (下パネル) を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。(K) siAGO2 でトランスフェクトされた MCF10A 及び MDA-MB231 細胞中のAGO2 mRNA 発現。MCF10A 及び MDA-MB231 親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。(L) MCF10A 及び MDA-MB231 親細胞又は si

10

20

30

40

50

対照若しくは s i A G O 2 でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中の A G O 2 抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。T S G 1 0 1（中央パネル）及び C D 9（下パネル）を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージJソフトウェアを用いて、定量を実施した。（M）ダイサー抗体又は I g G で免疫沈降された M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の A G O 2 抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの 5 % を、対照として用いた。ダイサーの免疫プロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（N）ダイサー抗体又は I g G で免疫沈降された M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗 T R B P 抗体を用いた免疫プロット（上パネル）。M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（5 %）を、対照として用いた。ダイサーの免疫プロットを、対照として用いた（下パネル）。

10

【図 4 - 7】オンコソームは R L C を含む。（A）非腫瘍原性マウス（N M u M G）及びヒト（M C F 1 0 A）細胞株；マウス癌細胞株 6 7 N R 及び 4 T 1；ヒト癌細胞株 M C F 7 及び M D A - M B 2 3 1 から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトン X に続いてプロテオキナーゼ K で処置されたエクソソーム（トリトン + P K）；及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼ K で処置されたエクソソーム（P K）であった。T S G 1 0 1（二列目）及び C D 9（三列目）の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（B）オンコソーム（M D A - M B 2 3 1）において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、I g G を指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上 2 つの画像の定量を表す。

20

（C）エンブティベクター（p C M V - T a g 4 B；それぞれ最初及び三番目のレーン）及び F l a g - ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされた細胞から採取された M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 エクソソーム中の抗 F l a g 抗体（上パネル）を用いた免疫プロット。C D 9 免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした（下パネル）。（D）カルシウムイオノフォア A 2 3 1 8 7 で処置された M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫プロット（上パネル）。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。C D 9 免疫プロット（したパネル）を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。（E）M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 親細胞、並びに s h スクランブル及び s h ダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫プロット（上プロット）。C D 9 免疫プロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした（下プロット）。イメージJソフトウェアを利用して、免疫プロットの定量を実施した。（F）M D A M B 2 3 1 s h ダイサー細胞由来のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、E M 写真の金粒子の定量を示す。

30

（G）オンコソーム（M C F 7 及び M D A - M B 2 3 1）及びノルモソーム（M C F 1 0 A）から採取されたエクソソーム中の抗 A G O 2 抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトン X に続いてプロテオキナーゼ K で処置されたエクソソーム（トリトン + P K）；余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼ K で処置されたエクソソーム（P K）；及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清（上清）、であった。T S G 1 0 1（二列目）及び C D 9（三列目）の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。（H）オンコソーム（M C F 7 及び M D A - M B 2 3 1）及びノルモソーム（M C F 1 0 A）から採取されたエクソソーム中の抗 T R B P 抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトン X に続いてプロテオキナーゼ K で処置されたエクソソーム

40

50

(トリトン + P K) ; 余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼ K で処置されたエクソソーム (P K) ; 及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清 (上清) 、であった。 T S G 1 0 1 (二列目) 及び C D 9 (三列目) を、エクソソームマーカとして用いた。 (I) G F P - A G O 2 プラスミドでトランスフェクトされた M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞中の抗 G F P 抗体を用いた免疫ブロット (上パネル) 。 β - アクチンを、負荷対照として用いた (下パネル) 。 (J) G F P - A G O 2 プラスミドでトランスフェクトされた M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソーム中の抗 G F P 抗体を用いた免疫ブロット (上パネル) 。 T S G 1 0 1 (中央パネル) 及び C D 9 (下パネル) を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。 (K) s i A G O 2 でトランスフェクトされた M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞中の A G O 2 m R N A 発現。 M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、S D として表している。 (L) M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 親細胞又は s i 対照若しくは s i A G O 2 でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中の A G O 2 抗体を用いた免疫ブロット (上パネル) 。 T S G 1 0 1 (中央パネル) 及び C D 9 (下パネル) を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージ J ソフトウェアを用いて、定量を実施した。 (M) ダイサー抗体又は I g G で免疫沈降された M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の A G O 2 抗体を用いた免疫ブロット (上パネル) 。 M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの 5 % を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた (下パネル) 。 (N) ダイサー抗体又は I g G で免疫沈降された M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗 T R B P 抗体を用いた免疫ブロット (上パネル) 。 M D A - M B 2 3 1 細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット (5 %) を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、対照として用いた (下パネル) 。

【図 4 - 8】オンコソームは R L C を含む。 (A) 非腫瘍原性マウス (N M u M G) 及びヒト (M C F 1 0 A) 細胞株 ; マウス癌細胞株 6 7 N R 及び 4 T 1 ; ヒト癌細胞株 M C F 7 及び M D A - M B 2 3 1 から採取されたエクソソームにおける抗ダイサー抗体を利用した免疫ブロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次にエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトン X に続いてプロテオキナーゼ K で処置されたエクソソーム (トリトン + P K) ; 及び余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼ K で処置されたエクソソーム (P K) であった。 T S G 1 0 1 (二列目) 及び C D 9 (三列目) の免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。 (B) オンコソーム (M D A - M B 2 3 1) において抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。右上の画像は、抽出物の新しい独立した画像からデジタル方式でズームしたものである。陰性対照は、I g G を指す。金粒子を黒色のドットとして表しており、下の画像では黒色の矢印により示されている。グラフは、左側の上 2 つの画像の定量を表す。 (C) エンブティベクター (p C M V - T a g 4 B ; それぞれ最初及び三番目のレーン) 及び F l a g - ダイサーベクター (二番目及び四番目のレーン) でトランスフェクトされた細胞から採取された M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 エクソソーム中の抗 F l a g 抗体 (上パネル) を用いた免疫ブロット。C D 9 免疫ブロットを用いて、エクソソームの存在を確認し、負荷対照とした (下パネル) 。 (D) カルシウムイオノフォア A 2 3 1 8 7 で処置された M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から採取されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット (上パネル) 。未処置細胞から抽出されたエクソソームを対照として用いた。C D 9 免疫ブロット (したパネル) を対照として用いて、エクソソーム分泌の増加を示した。 (E) M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 親細胞、並びに s h スクランブル及び s h ダイサー・プラスミドでトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のダイサーの免疫ブロット (上ブロット) 。C D 9 免疫ブロットを用いてエクソソームの存在を示し、負荷対照とした (下ブロット) 。イメージ J ソフトウェアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。 (F) M D A M B 2 3 1 s h ダイサー細胞由来

10

20

30

40

50

のオンコソーム中の抗ダイサー抗体を用いた免疫金標識の透過型電子顕微鏡写真。金粒子は、黒色のドットとして示されている。右のグラフは、EM写真の金粒子の定量を示す。

(G) オンコソーム(MCF7及びMDA-MB231)及びノルモソーム(MCF10A)から採取されたエクソソーム中の抗AGO2抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム(トリトン+PK); 余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム(PK); 及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清(上清)、であった。TS G101(二列目)及びCD9(三列目)の免疫プロットを用いて、エクソソームの存在を確認した。

(H) オンコソーム(MCF7及びMDA-MB231)及びノルモソーム(MCF10A)から採取されたエクソソーム中の抗TRBP抗体を用いた免疫プロット。用いられた対照は、エクソソームの溶解と、次のエクソソームタンパク質の分解を誘導するために、トリトンXに続いてプロテオキナーゼKで処置されたエクソソーム(トリトン+PK); 余分のエクソソームタンパク質を分解するためにプロテイナーゼKで処置されたエクソソーム(PK); 及びエクソソームを採取するための超遠心分離後の上清(上清)、であった。TS G101(二列目)及びCD9(三列目)を、エクソソームマーカとして用いた。

(I) GFP-AGO2プラスミドでトランスフェクトされたMCF10A及びMDA-MB231細胞中の抗GFP抗体を用いた免疫プロット(上パネル)。β-アクチンを、負荷対照として用いた(下パネル)。

(J) GFP-AGO2プラスミドでトランスフェクトされたMCF10A及びMDA-MB231細胞から抽出されたエクソソーム中の抗GFP抗体を用いた免疫プロット(上パネル)。TS G101(中央パネル)及びCD9(下パネル)を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。

(K) siAGO2でトランスフェクトされたMCF10A及びMDA-MB231細胞中のAGO2 mRNA発現。MCF10A及びMDA-MB231親細胞を、倍率変化比較のための相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。

(L) MCF10A及びMDA-MB231親細胞又はsi対照若しくはsiAGO2でトランスフェクトされた細胞から抽出されたエクソソーム中のAGO2抗体を用いた免疫プロット(上パネル)。TS G101(中央パネル)及びCD9(下パネル)を、エクソソームマーカ及び負荷対照として用いた。イメージJソフトウェアを用いて、定量を実施した。

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

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

【図5A】オンコソームは、pre-miRNAをプロセッシングして成熟miRNAを生成する。(A)エクソソームを、MCF10A、MCF10A shスクランブル、MCF10A shダイサー細胞(上グラフ)、MDA-MB231、MDA-MB231 shスクランブル及びMDA-MB231 shダイサー細胞(下グラフ)から採取して、無細胞条件下に24及び72h保持した。24及び72h後に、エクソソームを採取して、15種のpre-miRNAをqPCRにより定量した。グラフは、24無細胞培養に比較した、72h無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各pre-miRNAの倍率変化を、±s.d.として表している。

(B)エクソソームを、MCF10A、MCF10A shスクランブル、MCF10A shダイサー細胞(上グラフ)、MDA-MB231、MDA-MB231 shスクランブル及びMDA-MB231 shダイサー細胞(下グラフ)から採取して、無細胞条件下に24及び72h保持した。24及び72h後に、エクソソームを再度抽出して、15種のmiRNAをqPCRにより定量した

。グラフは、24 h 無細胞培養に比較した、72 h 無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各 *miRNA* の倍率変化を示し、 $\pm s.d.$ として表している。(C) MDA-MB 231 細胞のエクソソーム中で電気穿孔された重鎖 (HC) 及び軽鎖 (LC) 一次ダイサー抗体と、一次アクチン抗体を検出するための抗ウサギ及び抗マウス二次抗体と、を用いた免疫プロット。MDA-MB 231 細胞由来の抗体を含まずに電気穿孔されたエクソソームを、陰性対照として用いた。プロテアーゼ K 処置を電気穿孔後に実施して、エクソソーム中に含まれない抗体の消耗を確認した。(D) オンコソーム (MDA-MB 231) は、2本ずつ (下グラフ) 又は4本ずつ (上グラフ) 採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗 TRBP 抗体と共に電気穿孔した。試料 + 対照を、無細胞培養条件で24及び72 h、放置した。24及び72 h後に、エクソソームを再度抽出して、6種の発癌性 *pre-miRNA* (上グラフ)、又は15種の *pre-miRNA* (下グラフ) を qPCR により定量した。72 h の無細胞培養後のエクソソーム中の各 *pre-miRNA* の倍率変化を、各試料中の24 h 無細胞培養後のエクソソーム中の同じ *pre-miRNA* に比較して定量した。グラフのプロットは、24 h エクソソームに比較した72 h エクソソーム中の *pre-miRNA* (下のグラフにおいて、TS = 腫瘍サプレッサ; ONC = 発癌性) の平均倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。(E) オンコソーム (MDA-MB 231) を4本ずつ (上グラフ) 又は2本ずつ (下グラフ) 採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗 TRBP 抗体と共に電気穿孔した。試料 + 対照を、無細胞培養条件で24及び72 h、放置した。24及び72 h後に、エクソソームを再度抽出して、6種の発癌性 *miRNA* (上グラフ)、又は15種の *miRNA* (下グラフ) を qPCR により定量した。72 h の無細胞培養後のエクソソーム中の各 *miRNA* の倍率変化を、各試料中の24 h 無細胞培養後のエクソソーム中の同じ *miRNA* に比較して定量した。グラフのプロットは、24 h エクソソームに比較した72 h エクソソーム中の *miRNA* (下のグラフにおいて、TS = 腫瘍サプレッサ; ONC = 発癌性) の平均倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。

【図5B】オンコソームは、*pre-miRNA* をプロセッシングして成熟 *miRNA* を生成する。(A) エクソソームを、MCF10A、MCF10A shスクランブル、MCF10A shダイサー細胞 (上グラフ)、MDA-MB 231、MDA-MB 231 shスクランブル及びMDA-MB 231 shダイサー細胞 (下グラフ) から採取して、無細胞条件下に24及び72 h保持した。24及び72 h後に、エクソソームを採取して、15種の *pre-miRNA* を qPCR により定量した。グラフは、24 h 無細胞培養に比較した、72 h 無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各 *pre-miRNA* の倍率変化を、 $\pm s.d.$ として表している。(B) エクソソームを、MCF10A、MCF10A shスクランブル、MCF10A shダイサー細胞 (上グラフ)、MDA-MB 231、MDA-MB 231 shスクランブル及びMDA-MB 231 shダイサー細胞 (下グラフ) から採取して、無細胞条件下に24及び72 h保持した。24及び72 h後に、エクソソームを再度抽出して、15種の *miRNA* を qPCR により定量した。グラフは、24 h 無細胞培養に比較した、72 h 無細胞培養の後の異なるエクソソーム中の各 *miRNA* の倍率変化を示し、 $\pm s.d.$ として表している。(C) MDA-MB 231 細胞のエクソソーム中で電気穿孔された重鎖 (HC) 及び軽鎖 (LC) 一次ダイサー抗体と、一次アクチン抗体を検出するための抗ウサギ及び抗マウス二次抗体と、を用いた免疫プロット。MDA-MB 231 細胞由来の抗体を含まずに電気穿孔されたエクソソームを、陰性対照として用いた。プロテアーゼ K 処置を電気穿孔後に実施して、エクソソーム中に含まれない抗体の消耗を確認した。(D) オンコソーム (MDA-MB 231) は、2本ずつ (下グラフ) 又は4本ずつ (上グラフ) 採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗 TRBP 抗体と共に電気穿孔した。試料 + 対照を、無細胞培養条件で24及び72 h、放置した。24及び72 h後に、エクソソームを再度抽出して、6種の発癌性 *pre-miRNA* (上グラフ)、又は15種の *pre-miRNA* (下グラフ) を qPCR により定量した。72 h の無細胞培養後のエクソソーム中の各 *pre-miRNA* の倍率変化を、各試料中の24 h 無細胞培養後のエクソソーム中の同じ *pre-*

10

20

30

40

50

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

10

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

20

30

40

【図5D】オンコソームは、pre-miRNAをプロセシングして成熟miRNAを生

50

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

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

10

20

30

40

50

231細胞のエクソソーム中で電気穿孔された重鎖（HC）及び軽鎖（LC）一次ダイサー抗体と、一次アクチン抗体を検出するための抗ウサギ及び抗マウス二次抗体と、を用いた免疫ブロット。MDA-MB231細胞由来の抗体を含まずに電気穿孔されたエクソソームを、陰性対照として用いた。プロテアーゼK処置を電気穿孔後に実施して、エクソソーム中に含まれない抗体の消耗を確認した。（D）オンコソーム（MDA-MB231）は、2本ずつ（下グラフ）又は4本ずつ（上グラフ）採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗TRBP抗体と共に電気穿孔した。試料+対照を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを再度抽出して、6種の発癌性pre-miRNA（上グラフ）、又は15種のpre-miRNA（下グラフ）をqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各pre-miRNAの倍率変化を、各試料中の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じpre-miRNAに比較して定量した。グラフのプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のpre-miRNA（下のグラフにおいて、TS=腫瘍サプレッサ；ONC=発癌性）の平均倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。（E）オンコソーム（MDA-MB231）を4本ずつ（上グラフ）又は2本ずつ（下グラフ）採取した。試料を抗ダイサー抗体、抗アクチン抗体、又は抗TRBP抗体と共に電気穿孔した。試料+対照を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを再度抽出して、6種の発癌性miRNA（上グラフ）、又は15種のmiRNA（下グラフ）をqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を、各試料中の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAに比較して定量した。グラフのプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のmiRNA（下のグラフにおいて、TS=腫瘍サプレッサ；ONC=発癌性）の平均倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。

【図6-1】オンコソームは、pre-miRNAをプロセッシングして成熟miRNAを生成する。（A）MDA-MB231細胞のエクソソームを採取して、ゲルダナマイシンと共に電気穿孔した。試料を無細胞培養条件で24及び72h放置し、その後、エクソソームを抽出して、6種のmiRNAをqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を、各試料の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAに比較して定量した。グラフのプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のmiRNAの倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。（B）合成pre-miRNA-10b、-21及びcel-1を、MCF10A（MCF10A電気泳動）、MCF10Ashダイサー（MCF10Ashダイサー電気泳動）、MDAMB231（MDA-MB231電気泳動）及びMDA-MB231shダイサー（MDAMB231shダイサー電気泳動）細胞から採取されたエクソソーム中で電気穿孔した。72h無細胞培養条件後に、エクソソームを採取した。72h電気穿孔及び培養の前後に、pre-miRNA-10b、-21及びcel-1をqPCRにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の0h後に比較した電気穿孔の72h後のpre-miRNA-10b、-21及びcel-1の倍率変化を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。pre-miRNAの非存在下で電気穿孔されたMCF10A及びMDA-MB231エクソソームを、対象として用いて、ベースレベルを強調した。（C）合成pre-miRNA-10b、-21及びcel-1を、MCF10A（MCF10A電気泳動）、MCF10Ashダイサー（MCF10Ashダイサー電気泳動）、MDAMB231（MDA-MB231電気泳動）及びMDA-MB231shダイサー（MDAMB231shダイサー電気泳動）細胞から採取されたエクソソーム中に電気穿孔した。無細胞培養条件で72h後に、エクソソームを採取した。72hの電気穿孔及び培養の前後に、MiR-10b、-21及びcel-1をqPCRにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の0h後（上グラフ）又は24h後（下グラフ）に比較した、電気穿孔の72h後のmiR-10b、-21及びcel-1の倍率変化を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。pre-miRNAの非存在下で電気穿孔されたMCF10A及びMDA-MB231エクソソームを、所定のベースレベルへの対照として用いた。（

10

20

30

40

50

D) 検出プローブを用いずダイシングアッセイ (dicing assay) から得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成 pre-miR-10b を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、MCF10A、MCF10Ash ダイサー、MDAMB231 エクソソーム (MDA231 Exos)、MDA-MB231 sh ダイサー クローン1 及び クローン2 から得たエクソソーム (それぞれ MDA231 sh ダイサー 1 exos 及び MDA231 sh ダイサー 2 exos)、MDA-MB231 sh ダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔された MDA-MB231 エクソソーム (MDA231 exos + ダイサー AB) であった。(E) 検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成 pre-miR-21 を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、MCF10A、MCF10Ash ダイサー、MDAMB231 エクソソーム (MDA231 Exos)、MDA-MB231 sh ダイサー クローン1 及び クローン2 から得たエクソソーム (それぞれ MDA231 sh ダイサー 1 Exos 及び MDA231 sh ダイサー 2 Exos)、MDA-MB231 sh ダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔された MDA-MB231 エクソソーム (MDA231 exos + ダイサー AB) であった。(F) 検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成 pre-cel-miR-1 を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、MCF10A、MCF10Ash ダイサー、MDAMB231 エクソソーム (MDA231 Exos)、MDA-MB231 sh ダイサーエクソソーム (MDA231 sh ダイサー exos)、及びダイサー抗体と共に電気穿孔された MDA-MB231 エクソソーム (MDA231 exos + ダイサー AB) であった。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、SD として表している。

【図6-2】オンコソームは、pre-miRNA をプロセッシングして成熟 miRNA を生成する。(A) MDA-MB231 細胞のエクソソームを採取して、ゲルダナマイシンと共に電気穿孔した。試料を無細胞培養条件で 24 及び 72 h 放置し、その後、エクソソームを抽出して、6 種の miRNA を qPCR により定量した。72 h の無細胞培養後のエクソソーム中の各 miRNA の倍率変化を、各試料の 24 h 無細胞培養後のエクソソーム中の同じ miRNA に比較して定量した。グラフのプロットは、24 h エクソソームに比較した 72 h エクソソーム中の miRNA の倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。(B) 合成 pre-miRNA-10b、-21 及び cel-1 を、MCF10A (MCF10A 電気泳動)、MCF10Ash ダイサー (MCF10Ash ダイサー電気泳動)、MDAMB231 (MDA-MB231 電気泳動) 及び MDA-MB231 sh ダイサー (MDAMB231 sh ダイサー電気泳動) 細胞から採取されたエクソソーム中で電気穿孔した。72 h 無細胞培養条件後に、エクソソームを採取した。72 h 電気穿孔及び培養の前後に、pre-miRNA-10b、-21 及び cel-1 を qPCR により定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の 0 h 後に比較した電気穿孔の 72 h 後の pre-miRNA-10b、-21 及び cel-1 の倍率変化を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。pre-miRNA の非存在下で電気穿孔された MCF10A 及び MDA-MB231 エクソソームを、対象として用いて、ベースレベルを強調した。(C) 合成 pre-miRNA-10b、-21 及び cel-1 を、MCF10A (MCF10A 電気泳動)、MCF10Ash ダイサー (MCF10Ash ダイサー電気泳動)、MDAMB231 (MDA-MB231 電気泳動) 及び MDA-MB231 sh ダイサー (MDAMB231 sh ダイサー電気泳動) 細胞から採取されたエクソソーム中に電気穿孔した。無細胞培養条件で 72 h 後に、エクソソームを採取した。72 h の電気穿孔及び培養の前後に、MiR-10b、-21 及び cel-1 を qPCR により定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の 0 h 後 (上グラフ) 又は 24 h 後 (下グラフ) に比較した、電気穿孔の 72 h 後の miR-10b、-21 及び cel-1 の倍率変化を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。pre-miRNA の非存在下で電気穿孔された MCF10A

及びMDA-MB231エクソソームを、所定のベースレベルへの対照として用いた。(D)検出プローブを用いずダイシングアッセイ(dicing assay)から得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成pre-miR-10bを、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、MCF10A、MCF10Ashダイサー、MDAMB231エクソソーム(MDA231 Exos)、MDA-MB231shダイサークローン1及びクローン2から得たエクソソーム(それぞれMDA231shダイサー 1 exos及びMDA231shダイサー 2 exos)、MDA-MB231shダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソーム(MDA231 exos + ダイサーAB)であった。(E)検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成pre-miR-21を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、MCF10A、MCF10Ashダイサー、MDAMB231エクソソーム(MDA231 Exos)、MDA-MB231shダイサークローン1及びクローン2から得たエクソソーム(それぞれMDA231shダイサー 1 Exos及びMDA231shダイサー 2 Exos)、MDA-MB231shダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソーム(MDA231 exos + ダイサーAB)であった。(F)検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成pre-cel-miR-1を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、MCF10A、MCF10Ashダイサー、MDAMB231エクソソーム(MDA231 Exos)、MDA-MB231shダイサーエクソソーム(MDA231shダイサー exos)、及びダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソーム(MDA231 exos + ダイサーAB)であった。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。

【図6-3】オンコソームは、pre-miRNAをプロセシングして成熟miRNAを生成する。(A)MDA-MB231細胞のエクソソームを採取して、ゲルダナマイシンと共に電気穿孔した。試料を無細胞培養条件で24及び72h放置し、その後、エクソソームを抽出して、6種のmiRNAをqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を、各試料の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAに比較して定量した。グラフのプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のmiRNAの倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。(B)合成pre-miRNA-10b、-21及びcel-1を、MCF10A(MCF10A電気泳動)、MCF10Ashダイサー(MCF10Ashダイサー電気泳動)、MDAMB231(MDA-MB231電気泳動)及びMDA-MB231shダイサー(MDAMB231shダイサー電気泳動)細胞から採取されたエクソソーム中で電気穿孔した。72h無細胞培養条件後に、エクソソームを採取した。72h電気穿孔及び培養の前後に、pre-miRNA-10b、-21及びcel-1をqPCRにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の0h後に比較した電気穿孔の72h後のpre-miRNA-10b、-21及びcel-1の倍率変化を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。pre-miRNAの非存在下で電気穿孔されたMCF10A及びMDA-MB231エクソソームを、対象として用いて、ベースレベルを強調した。(C)合成pre-miRNA-10b、-21及びcel-1を、MCF10A(MCF10A電気泳動)、MCF10Ashダイサー(MCF10Ashダイサー電気泳動)、MDAMB231(MDA-MB231電気泳動)及びMDA-MB231shダイサー(MDAMB231shダイサー電気泳動)細胞から採取されたエクソソーム中に電気穿孔した。無細胞培養条件で72h後に、エクソソームを採取した。72hの電気穿孔及び培養の前後に、MiR-10b、-21及びcel-1をqPCRにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の0h後(上グラフ)又は24h後(下グラフ)に比較した、電気穿孔の72h後のmiR-10b、-21及びcel-1の倍率変化を示しており、 $\pm s$

10

20

30

40

50

、d.として表している。pre-miRNAの非存在下で電気穿孔されたMCF10A及びMDA-MB231エクソソームを、所定のベースレベルへの対照として用いた。(D)検出プローブを用いずダイシングアッセイ(dicing assay)から得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成pre-miR-10bを、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、MCF10A、MCF10Ashダイサー、MDAMB231エクソソーム(MDA231 Exos)、MDA-MB231shダイサークローン1及びクローン2から得たエクソソーム(それぞれMDA231shダイサー 1 exos及びMDA231shダイサー 2 exos)、MDA-MB231shダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソーム(MDA231 exos + ダイサーAB)であった。(E)検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成pre-miR-21を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、MCF10A、MCF10Ashダイサー、MDAMB231エクソソーム(MDA231 Exos)、MDA-MB231shダイサークローン1及びクローン2から得たエクソソーム(それぞれMDA231shダイサー 1 Exos及びMDA231shダイサー 2 Exos)、MDA-MB231shダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソーム(MDA231 exos + ダイサーAB)であった。(F)検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成pre-cel-miR-1を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、MCF10A、MCF10Ashダイサー、MDAMB231エクソソーム(MDA231 Exos)、MDA-MB231shダイサーエクソソーム(MDA231shダイサー exos)、及びダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソーム(MDA231 exos + ダイサーAB)であった。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。

【図6-4】オンコソームは、pre-miRNAをプロセシングして成熟miRNAを生成する。(A)MDA-MB231細胞のエクソソームを採取して、ゲルダナマイシンと共に電気穿孔した。試料を無細胞培養条件で24及び72h放置し、その後、エクソソームを抽出して、6種のmiRNAをqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を、各試料の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAに比較して定量した。グラフのプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のmiRNAの倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。(B)合成pre-miRNA-10b、-21及びcel-1を、MCF10A(MCF10A電気泳動)、MCF10Ashダイサー(MCF10Ashダイサー電気泳動)、MDAMB231(MDA-MB231電気泳動)及びMDA-MB231shダイサー(MDAMB231shダイサー電気泳動)細胞から採取されたエクソソーム中で電気穿孔した。72h無細胞培養条件後に、エクソソームを採取した。72h電気穿孔及び培養の前後に、pre-miRNA-10b、-21及びcel-1をqPCRにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の0h後に比較した電気穿孔の72h後のpre-miRNA-10b、-21及びcel-1の倍率変化を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。pre-miRNAの非存在下で電気穿孔されたMCF10A及びMDA-MB231エクソソームを、対象として用いて、ベースレベルを強調した。(C)合成pre-miRNA-10b、-21及びcel-1を、MCF10A(MCF10A電気泳動)、MCF10Ashダイサー(MCF10Ashダイサー電気泳動)、MDAMB231(MDA-MB231電気泳動)及びMDA-MB231shダイサー(MDAMB231shダイサー電気泳動)細胞から採取されたエクソソーム中に電気穿孔した。無細胞培養条件で72h後に、エクソソームを採取した。72hの電気穿孔及び培養の前後に、MiR-10b、-21及びcel-1をqPCRにより定量した。プロットの各バーは、電気穿孔の0h後(上グラフ)又は24h後(下グラフ)に比較した、電気

穿孔の72h後のmiR-10b、-21及びcel-1の倍率変化を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。pre-miRNAの非存在下で電気穿孔されたMCF10A及びMDA-MB231エクソソームを、所定のベースレベルへの対照として用いた。(D)検出プローブを用いずダイシングアッセイ(dicing assay)から得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成pre-miR-10bを、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、MCF10A、MCF10Ashダイサー、MDAMB231エクソソーム(MDA231 Exos)、MDA-MB231shダイサークローン1及びクローン2から得たエクソソーム(それぞれMDA231shダイサー 1 exos及びMDA231shダイサー 2 exos)、MDA-MB231shダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソーム(MDA231 exos + ダイサーAB)であった。(E)検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成pre-miR-21を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、MCF10A、MCF10Ashダイサー、MDAMB231エクソソーム(MDA231 Exos)、MDA-MB231shダイサークローン1及びクローン2から得たエクソソーム(それぞれMDA231shダイサー 1 Exos及びMDA231shダイサー 2 Exos)、MDA-MB231shダイサー細胞、並びにダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソーム(MDA231 exos + ダイサーAB)であった。(F)検出プローブを用いずダイシングアッセイから得た試料を用いたノーザンブロット。異なるエクソソームタンパク質抽出物、及びビオチンで内部標識された合成pre-cel-miR-1を、ダイシングアッセイに用いた。用いられた試料は、MCF10A、MCF10Ashダイサー、MDAMB231エクソソーム(MDA231 Exos)、MDA-MB231shダイサーエクソソーム(MDA231shダイサー exos)、及びダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソーム(MDA231 exos + ダイサーAB)であった。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。

【図7-1】オンコソームは、ダイサー依存的にレシピエント細胞におけるトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。(A)抗PTEN抗体と、無細胞培養後にMDA-MB231オンコソームで0、30min、1h、12h及び24h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。 β -アクチンを負荷対照として用いた。(B)抗HOXD10抗体と、無細胞培養条件後にMDA-MB231オンコソームで0、30min、1h、12h及び24h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。 β -アクチンを負荷対照として用いた。(C)3'UTR-PTEN-WT、3'UTRPTEN-Mut、3'UTR-HOXD10-WT及び3'UTR-HOXD10-Mutで一過性トランスフェクトされ、MDA-MB231細胞から得られたオンコソームで処置されたMCF10A細胞中のルシフェラーゼレポータ活性を示すグラフ。(D)抗PTEN抗体(上パネル)及び抗HOXD10抗体(中パネル)、並びに無細胞培養条件後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231オンコソームで0、30min、1h、12h及び24h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。 β -アクチンを負荷対照として用いた。(E)抗Smad4抗体(上パネル)、MCF10A細胞のタンパク質抽出物、並びに抗miR-182-5pを有するMDA-MB231エクソソーム及び無細胞培養時間を含まないMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。 β -アクチンを負荷対照として用いた。(F)MCF10A細胞、無細胞培養時間を含まずにMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exos培養物)、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10

10

20

30

40

50

A細胞 + MDA231exos (ダイサーAB) の5日培養時のMTTアッセイにより測定された細胞生存率であり、 $\pm s.d.$ として表している。* $p = 0.0027$ 。(G)コロニー形成アッセイにより、8日のMCF10A細胞培養、無細胞培養時間を含まずにMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A + MDA231 exos)、無細胞培養時間を含みMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exos培養物)、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exosダイサーAB)の後に、培養プレート中でMTT試薬で標識されたコロニーの形成を示している。(H)上グラフ:MCF10A細胞、MDA-MB231オンコソームに暴露されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exos培養物)、ダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231オンコソームに暴露されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exosダイサーAB)、及びのアクチン抗体と共に電気穿孔されたMDAMB231オンコソームに暴露されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exosアクチンAB)を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。* $p = 0.005$ 。下グラフ:MCF10A細胞、MDA-MB231細胞及びオンコソームに暴露されたMCF10A細胞(MDA-MB231)を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示している。

【図7-2】オンコソームは、ダイサー依存的にレシピエント細胞におけるトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。(A)抗PTEN抗体と、無細胞培養後にMDA-MB231オンコソームで0、30min、1h、12h及び24h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。 β -アクチンを負荷対照として用いた。(B)抗HOXD10抗体と、無細胞培養条件後にMDA-MB231オンコソームで0、30min、1h、12h及び24h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。 β -アクチンを負荷対照として用いた。(C)3'UTR-PTEN-WT、3'UTRPTEN-Mut、3'UTR-HOXD10-WT及び3'UTR-HOXD10-Mutで一過性トランスフェクトされ、MDA-MB231細胞から得られたオンコソームで処置されたMCF10A細胞中のルシフェラーゼレポータ活性を示すグラフ。(D)抗PTEN抗体(上パネル)及び抗HOXD10抗体(中パネル)、並びに無細胞培養条件後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231オンコソームで0、30min、1h、12h及び24h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。 β -アクチンを負荷対照として用いた。(E)抗Smad4抗体(上パネル)、MCF10A細胞のタンパク質抽出物、並びに抗miR-182-5pを有するMDA-MB231エクソソーム及び無細胞培養時間を含まないMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。 β -アクチンを負荷対照として用いた。(F)MCF10A細胞、無細胞培養時間を含まずにMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A + MDA231 exos)、無細胞培養時間を含みMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exos培養物)、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exosダイサーAB)の5日培養時のMTTアッセイにより測定された細胞生存率であり、 $\pm s.d.$ として表している。* $p = 0.0027$ 。(G)コロニー形成アッセイにより、8日のMCF10A細胞培養、無細胞培養時間を含まずにMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A + MDA231 exos)、無細胞培養時間を含みMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exos培養物)、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エ

クソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exo s ダイサーAB)の後に、培養プレート中でMTT試薬で標識されたコロニーの形成を示している。(H)上グラフ:MCF10A細胞、MDA-MB231オンコソームに暴露されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exo s 培養物)、ダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231オンコソームに暴露されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exo s ダイサーAB)、及びのアクチン抗体と共に電気穿孔されたMDAMB231オンコソームに暴露されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exo s アクチンAB)を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。 $*p=0.005$ 。下グラフ:MCF10A細胞、MDA-MB231細胞及びオンコソームに暴露されたMCF10A細胞(MDA-MB231)を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示している。

10

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

20

30

パク質抽出物を用いた免疫ブロット。 β -アクチンを負荷対照として用いた。(F)MCF10A細胞、無細胞培養時間を含まずにMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A + MDA231 exo s)、無細胞培養時間を含みMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exo s 培養物)、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exo s ダイサーAB)の5日培養時のMTTアッセイにより測定された細胞生存率であり、 $\pm s.d.$ として表している。 $*p=0.0027$ 。(G)コロニー形成アッセイにより、8日のMCF10A細胞培養、無細胞培養時間を含まずにMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A + MDA231 exo s)、無細胞培養時間を含みMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exo s 培養物)、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソームで処置されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exo s ダイサーAB)の後に、培養プレート中でMTT試薬で標識されたコロニーの形成を示している。(H)上グラフ:MCF10A細胞、MDA-MB231オンコソームに暴露されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exo s 培養物)、ダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA-MB231オンコソームに暴露されたMCF10A細胞(MCF10A細胞 + MDA231 exo s ダイサーAB)、及びのアクチン抗体と共に電気穿孔されたMDAMB231オンコソームに暴露されたMCF

40

50

10 A細胞 (MCF 10 A細胞 + MDA 231 exos アクチンAB) を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。* $p = 0.005$ 。下グラフ：MCF 10 A細胞、MDA - MB 231 細胞及びオンコソームに暴露されたMCF 10 A細胞 (MDA - MB 231) を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示している。

【図7 - 4】オンコソームは、ダイサー依存的にレシピエント細胞におけるトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。(A) 抗PTEN抗体と、無細胞培養後にMDA - MB 231 オンコソームで0、30 min、1 h、12 h及び24 h、処置されたMCF 10 A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。 β - アクチンを負荷対照として用いた。(B) 抗HOXD10抗体と、無細胞培養条件後にMDA - MB 231 オンコソームで0、30 min、1 h、12 h及び24 h、処置されたMCF 10 A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット。 β - アクチンを負荷対照として用いた。(C) 3' UTR - PTEN - WT、3' UTR PTEN - Mut、3' UTR - HOXD10 - WT及び3' UTR - HOXD10 - Mutで一過性トランスフェクトされ、MDA - MB 231 細胞から得られたオンコソームで処置されたMCF 10 A細胞中のルシフェラーゼレポータ活性を示すグラフ。(D) 抗PTEN抗体 (上パネル) 及び抗HOXD10抗体 (中パネル)、並びに無細胞培養条件後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA - MB 231 オンコソームで0、30 min、1 h、12 h及び24 h、処置されたMCF 10 A細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。 β - アクチンを負荷対照として用いた。(E) 抗Smad4抗体 (上パネル)、MCF 10 A細胞のタンパク質抽出物、並びに抗miR - 182 - 5pを有するMDA - MB 231 エクソソーム及び無細胞培養時間を含まないMDA - MB 231 エクソソームで処置されたMCF 10 A細胞のタンパク質抽出物を用いた免疫ブロット。 β - アクチンを負荷対照として用いた。(F) MCF 10 A細胞、無細胞培養時間を含まずにMDA - MB 231 エクソソームで処置されたMCF 10 A細胞 (MCF 10 A細胞 + MDA 231 exos 培養物)、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA - MB 231 エクソソームで処置されたMCF 10 A細胞 (MCF 10 A細胞 + MDA 231 exos ダイサーAB) の5日培養時のMTTアッセイにより測定された細胞生存率であり、 $\pm s.d.$ として表している。* $p = 0.0027$ 。(G) コロニー形成アッセイにより、8日のMCF 10 A細胞培養、無細胞培養時間を含まずにMDA - MB 231 エクソソームで処置されたMCF 10 A細胞 (MCF 10 A + MDA 231 exos)、無細胞培養時間を含みMDA - MB 231 エクソソームで処置されたMCF 10 A細胞 (MCF 10 A細胞 + MDA 231 exos 培養物)、及び無細胞培養時間を含みダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA - MB 231 エクソソームで処置されたMCF 10 A細胞 (MCF 10 A細胞 + MDA 231 exos ダイサーAB) の後に、培養プレート中でMTT試薬で標識されたコロニーの形成を示している。(H) 上グラフ：MCF 10 A細胞、MDA - MB 231 オンコソームに暴露されたMCF 10 A細胞 (MCF 10 A細胞 + MDA 231 exos 培養物)、ダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA - MB 231 オンコソームに暴露されたMCF 10 A細胞 (MCF 10 A細胞 + MDA 231 exos ダイサーAB)、及びのアクチン抗体と共に電気穿孔されたMDA - MB 231 オンコソームに暴露されたMCF 10 A細胞 (MCF 10 A細胞 + MDA 231 exos アクチンAB) を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。* $p = 0.005$ 。下グラフ：MCF 10 A細胞、MDA - MB 231 細胞及びオンコソームに暴露されたMCF 10 A細胞 (MDA - MB 231) を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。グラフは、時間に対する腫瘍体積を示している。

【図8 - 1】乳癌患者の血清は、ダイサーを含み、pre-miRNAをプロセッシングす

る。(A) ヒト及びマウスのダイサーを認識する抗ダイサー抗体と、ヒト腫瘍で異種移植されたマウスから採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット(図18Aに示す)。OVA1-5は、ヒト卵巣異種移植片を表し; END1-3は、ヒト子宮内膜異種移植片を表し; B R S T 1及び2は、ヒト乳癌異種移植片を表す。4 T 1エクソソーム及び細胞を、ネズミダイサーの対照として用いた。h s a - ダイサーは、ヒトダイサー分子量を表し、m m u - ダイサーは、ネズミダイサー分子量を表す。負荷対照としての膜のクーマシー染色については図18Dを参照されたい。(B) 8名の健常ドナー(左グラフ)及び11名の乳癌患者(右グラフ)の血清から抽出されたエクソソームのサイズ分布を示すN a n o S i g h t粒子トラッキング分析。サイズをより上手く示すために、試料の濃度を標準化した。(C) 乳癌患者の血清から採取されたエクソソームの透過型電子顕微鏡写真。(D) N a n o S i g h t粒子トラッキング分析により評価された8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の血清から得たエクソソームの濃度。

* $p = 0.012$ 。(E) エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを採取して、6種のp r e - m i R N Aをq P C Rにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各p r e - m i R N Aの倍率変化を、各試料中の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じp r e - m i R N Aに比較して定量した。グラフのプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のp r e - m i R N Aの平均倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。(F) エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを採取して、6種のm i R N Aをq P C Rにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各m i R N Aの倍率変化を、各試料中の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じm i R N Aに比較して定量した。グラフのドットプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のm i R N Aの平均倍率変化を表す。パネルE及びFは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験3回の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。(G) M C F 1 0 A細胞、健常なドナーのエクソソームと混合されたM C F 1 0 A細胞(H1-8)及び乳癌患者のエクソソームと混合されたM C F 1 0 A細胞(B C 1 - 1 1)を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのX軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。(H) 抗ダイサー抗体と、5名の健常個体(C46、C45、C44、C43及びC41)及び4名の転移性乳癌(M e t 2 1 9、M e t 3 5 4、M e t 2 9 9及びM e t 3 5 6)から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてC D 9プロットを用いた免疫ブロット。(I) H D F及びオンコソーム(M D A - M B 2 3 1)で処置されたH D Fの倍加時間。* $p = 0.0114$ 。イメージJソフトウエアを利用して、免疫ブロットの定量を実施した。

【図8-2】乳癌患者の血清は、ダイサーを含み、p r e - m i R N Aをプロセッシングする。(A) ヒト及びマウスのダイサーを認識する抗ダイサー抗体と、ヒト腫瘍で異種移植されたマウスから採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用いた免疫ブロット(図18Aに示す)。OVA1-5は、ヒト卵巣異種移植片を表し; END1-3は、ヒト子宮内膜異種移植片を表し; B R S T 1及び2は、ヒト乳癌異種移植片を表す。4 T 1エクソソーム及び細胞を、ネズミダイサーの対照として用いた。h s a - ダイサーは、ヒトダイサー分子量を表し、m m u - ダイサーは、ネズミダイサー分子量を表す。負荷対照としての膜のクーマシー染色については図18Dを参照されたい。(B) 8名の健常ドナー(左グラフ)及び11名の乳癌患者(右グラフ)の血清から抽出されたエクソソームのサイズ分布を示すN a n o S i g h t粒子トラッキング分析。サイズをより上手く示すために、試料の濃度を標準化した。(C) 乳癌患者の血清から採取されたエクソソームの透過型電子顕微鏡写真。(D) N a n o S i g h t粒子トラッキング分析により

10

20

30

40

50

評価された 8 名の健常ドナー及び 11 名の乳癌患者の血清から得たエクソソームの濃度。

* $p = 0.012$ 。(E)エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを採取して、6種のpre-miRNAをqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各pre-miRNAの倍率変化を、各試料中の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じpre-miRNAと比較して定量した。グラフのプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のpre-miRNAの平均倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。(F)エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを採取して、6種のmiRNAをqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を、各試料中の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAと比較して定量した。グラフのドットプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のmiRNAの平均倍率変化を表す。パネルE及びFは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験3回の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。(G)MCF10A細胞、健常なドナーのエクソソームと混合されたMCF10A細胞(H1-8)及び乳癌患者のエクソソームと混合されたMCF10A細胞(BC1-11)を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのX軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。(H)抗ダイサー抗体と、5名の健常個体(C46、C45、C44、C43及びC41)及び4名の転移性乳癌(Met219、Met354、Met299及びMet356)から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてCD9プロットを用いた免疫プロット。(I)HDF及びオンコソーム(MDA-MB231)で処置されたHDFの倍加時間。* $p = 0.0114$ 。イメージJソフトウエアを利用して、免疫プロットの定量を実施した。

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

* $p = 0.012$ 。(E)エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを採取して、6種のpre-miRNAをqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各pre-miRNAの倍率変化を、各試料中の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じpre-miRNAと比較して定量した。グラフのプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のpre-miRNAの平均倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。(F)エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを採取して、6種のmiRNAをqPCRにより定量した。7

2 hの無細胞培養後のエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を、各試料中の24 h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAに比較して定量した。グラフのドットプロットは、24 hエクソソームに比較した72 hエクソソーム中のmiRNAの平均倍率変化を表す。パネルE及びFは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験3回の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。(G) MCF10A細胞、健常なドナーのエクソソームと混合されたMCF10A細胞(H1-8)及び乳癌患者のエクソソームと混合されたMCF10A細胞(BC1-11)を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのX軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。(H)抗ダイサー抗体と、5名の健常個体(C46、C45、C44、C43及びC41)及び4名の転移性乳癌(Met219、Met354、Met299及びMet356)から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてCD9プロットを用いた免疫プロット。(I) HDF及びオンコソーム(MDA-MB231)で処置されたHDFの倍加時間。 $* p = 0.0114$ 。イメージJソフトウエアを利用して、免疫プロットの定量を実施した。

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

$* p = 0.012$ 。(E)エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72 h、放置した。24及び72 h後に、エクソソームを採取して、6種のpre-miRNAをqPCRにより定量した。72 hの無細胞培養後のエクソソーム中の各pre-miRNAの倍率変化を、各試料中の24 h無細胞培養後のエクソソーム中の同じpre-miRNAに比較して定量した。グラフのプロットは、24 hエクソソームに比較した72 hエクソソーム中のpre-miRNAの平均倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。(F)エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72 h、放置した。24及び72 h後に、エクソソームを採取して、6種のmiRNAをqPCRにより定量した。72 hの無細胞培養後のエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を、各試料中の24 h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAに比較して定量した。グラフのドットプロットは、24 hエクソソームに比較した72 hエクソソーム中のmiRNAの平均倍率変化を表す。パネルE及びFは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験3回の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。(G) MCF10A細胞、健常なドナーのエクソソームと混合されたMCF10A細胞(H1-8)及び乳癌患者のエクソソームと混合されたMCF10A細胞(BC1-11)を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのX軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。(H)抗ダイサー抗体と、5名の健常個体(C46、C45、C44、C43及

10

20

30

40

50

びC41)及び4名の転移性乳癌(Met219、Met354、Met299及びMet356)から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてCD9プロットを用いた免疫プロット。(I)HDF及びオンコソーム(MDA-MB231)で処置されたHDFの倍加時間。 $p = 0.0114$ 。イメージJソフトウェアを利用して、免疫プロットの定量を実施した。

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

* $p = 0.012$ 。(E)エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを採取して、6種のpre-miRNAをqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各pre-miRNAの倍率変化を、各試料中の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じpre-miRNAに比較して定量した。グラフのプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のpre-miRNAの平均倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。(F)エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを採取して、6種のmiRNAをqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を、各試料中の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAに比較して定量した。グラフのドットプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のmiRNAの平均倍率変化を表す。パネルE及びFは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験3回の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。(G)MCF10A細胞、健常なドナーのエクソソームと混合されたMCF10A細胞(H1-8)及び乳癌患者のエクソソームと混合されたMCF10A細胞(BC1-11)を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのX軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。(H)抗ダイサー抗体と、5名の健常個体(C46、C45、C44、C43及びC41)及び4名の転移性乳癌(Met219、Met354、Met299及びMet356)から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてCD9プロットを用いた免疫プロット。(I)HDF及びオンコソーム(MDA-MB231)で処置されたHDFの倍加時間。 $p = 0.0114$ 。イメージJソフトウェアを利用して、免疫プロットの定量を実施した。

【図8-6】乳癌患者の血清は、ダイサーを含み、pre-miRNAをプロセッシングする。(A)ヒト及びマウスのダイサーを認識する抗ダイサー抗体と、ヒト腫瘍で異種移植されたマウスから採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット(図18Aに示す)。OVA1-5は、ヒト卵巣異種移植片を表し；END1-3は、ヒト子宮内膜異種移植片を表し；BRST1及び2は、ヒト乳癌異種移植片を表す。4T1エクソソーム及び細胞を、ネズミダイサーの対照として用いた。hsa-ダイ

サーは、ヒトダイサー分子量を表し、mmu - ダイサーは、ネズミダイサー分子量を表す。負荷対照としての膜のクーマシー染色については図18Dを参照されたい。(B)8名の健常ドナー(左グラフ)及び11名の乳癌患者(右グラフ)の血清から抽出されたエクソソームのサイズ分布を示すNanoSight粒子トラッキング分析。サイズをより上手く示すために、試料の濃度を標準化した。(C)乳癌患者の血清から採取されたエクソソームの透過型電子顕微鏡写真。(D)NanoSight粒子トラッキング分析により評価された8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の血清から得たエクソソームの濃度。

* $p = 0.012$ 。(E)エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを採取して、6種のpre-miRNAをqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各pre-miRNAの倍率変化を、各試料中の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じpre-miRNAと比較して定量した。グラフのプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のpre-miRNAの平均倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。(F)エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを採取して、6種のmiRNAをqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を、各試料中の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAと比較して定量した。グラフのドットプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のmiRNAの平均倍率変化を表す。パネルE及びFは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験3回の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。(G)MCF10A細胞、健常なドナーのエクソソームと混合されたMCF10A細胞(H1-8)及び乳癌患者のエクソソームと混合されたMCF10A細胞(BC1-11)を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのX軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。(H)抗ダイサー抗体と、5名の健常個体(C46、C45、C44、C43及びC41)及び4名の転移性乳癌(Met219、Met354、Met299及びMet356)から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてCD9プロットを用いた免疫プロット。(I)HDF及びオンコソーム(MDA-MB231)で処置されたHDFの倍加時間。* $p = 0.0114$ 。イメージJソフトウェアを利用して、免疫プロットの定量を実施した。

【図8-7】乳癌患者の血清は、ダイサーを含み、pre-miRNAをプロセッシングする。(A)ヒト及びマウスのダイサーを認識する抗ダイサー抗体と、ヒト腫瘍で異種移植されたマウスから採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット(図18Aに示す)。OVA1-5は、ヒト卵巣異種移植片を表し;END1-3は、ヒト子宮内膜異種移植片を表し;BRST1及び2は、ヒト乳癌異種移植片を表す。4T1エクソソーム及び細胞を、ネズミダイサーの対照として用いた。hsa - ダイサーは、ヒトダイサー分子量を表し、mmu - ダイサーは、ネズミダイサー分子量を表す。負荷対照としての膜のクーマシー染色については図18Dを参照されたい。(B)8名の健常ドナー(左グラフ)及び11名の乳癌患者(右グラフ)の血清から抽出されたエクソソームのサイズ分布を示すNanoSight粒子トラッキング分析。サイズをより上手く示すために、試料の濃度を標準化した。(C)乳癌患者の血清から採取されたエクソソームの透過型電子顕微鏡写真。(D)NanoSight粒子トラッキング分析により評価された8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の血清から得たエクソソームの濃度。

* $p = 0.012$ 。(E)エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを採取して、6種のpre-miRNAをqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各pre-miRNA

Aの倍率変化を、各試料中の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じpre-miRNAに比較して定量した。グラフのプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のpre-miRNAの平均倍率変化を表し、 $\pm s.d.$ として表している。(F)エクソソームを、8名の健常ドナー及び11名の乳癌患者の採血間もない血清から採取した。抽出された試料を、無細胞培養条件で24及び72h、放置した。24及び72h後に、エクソソームを採取して、6種のmiRNAをqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を、各試料中の24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAに比較して定量した。グラフのドットプロットは、24hエクソソームに比較した72hエクソソーム中のmiRNAの平均倍率変化を表す。パネルE及びFは両者とも、それぞれが三重測定で行われた独立した実験3回の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。(G)MCF10A細胞、健常なドナーのエクソソームと混合されたMCF10A細胞(H1-8)及び乳癌患者のエクソソームと混合されたMCF10A細胞(BC1-11)を、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪体に同所性に注射した。用いられたエクソソームの数は体重あたりで計算されており、血清から回収された初期濃度を反映している。腫瘍を形成しなかった試料は、グラフのX軸と重なって見える。このグラフは、時間に対する腫瘍体積を示しており、 $\pm s.d.$ として表している。(H)抗ダイサー抗体と、5名の健常個体(C46、C45、C44、C43及びC41)及び4名の転移性乳癌(Met219、Met354、Met299及びMet356)から採取された血清エクソソームから得たタンパク質抽出物と、を用い、負荷対照としてCD9プロットを用いた免疫プロット。(I)HDF及びオンコソーム(MDA-MB231)で処置されたHDFの倍加時間。 $* p = 0.0114$ 。イメージJソフトウェアを利用して、免疫プロットの定量を実施した。

10

20

【図9】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質CD43はダイサーをエクソソーム中に動員する。(A)ダイサー抗体(IPダイサー)又はIgGで免疫沈降されたMDA-MB231細胞のタンパク質抽出物中のCD43の免疫プロット(上パネルの、それぞれ右及び中央レーン)。ダイサー単独での免疫プロットを、対照として用いた(下パネル)。(B)MDA-MB231由来エクソソーム及びMDA-MB231 siCD43由来エクソソームのタンパク質抽出物中のダイサーの免疫プロット。CD9免疫プロットを負荷対照として用いた。イメージJソフトウェアを利用して、定量を実施した。

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

30

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

40

【図10C】エクソソームの特徴づけ。(A)遠心分離管の底のPKH26染色エクソソ

50

ームの写真。挿入写真は、エクソソームのデジタルズーム画像を表す。(B) LSSスペクトルを回収するために用いられた実験系の略図。(C) MCF10A、NMuMG、MDA-MB231及び4T1細胞の5日培養時のMTTアッセイにより測定された細胞生存率。(D) MDA-MB231及び4T1細胞のヨウ化プロピジウム(PI)及びアネキシンVについてのフローサイトメトリー分析。エトポシドで処置されたMDA-MB231細胞を、アポトーシスの陽性対照として用いた。(E) 陽性対照としてMDA-MB231細胞を用い、エクソソームの負荷対照としてTSG101を用いた、エクソソーム中のチトクロムCの免疫プロット分析。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験3回の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。

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

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

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

10

20

30

40

50

± s . d . として表している。(E) 7 2 h の無細胞培養後の M C F 7 及び 6 7 N R 細胞中と、それらの各エクソソーム中との間の、15種の定量された m i R N A の相関プロット。

【図 1 1 B】オンコソームは、ノルモソームに比較して m i R N A が豊富である。(A) ヒト乳房 M C F 1 0 A (非腫瘍原性) 及び M D A - M B 2 3 1 (乳癌) 細胞株の、ヌクレオチド (n t) あたりの蛍光単位 (F U) で示されたバイオアナライザーグラフ表示 (グラフ) 、並びに R N A 量のゲル画像 (右の画像) 。(B) 4 T 1 、 M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から採取されたエクソソームを D M E M 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 2 4 及び 7 2 h 保持した。24 及び 7 2 h 後に、エクソソームを採取して、15種の m i R N A (表 4 参照) を q P C R により定量した。グラフは、それぞれ 2 4 及び 7 2 h の無細胞培養後のノルモソームと比較した、24 及び 7 2 h の無細胞培養後のオンコソーム中の各 m i R N A の倍率変化を示している。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、S D として示している。(C) 15種の成熟 m i R N A (表 4 参照) を、M C F 1 0 A (左グラフ) 、 M D A - M B 2 3 1 (中央グラフ) 及び 4 T 1 (右グラフ) 細胞並びにそれらの各エクソソーム中で q P C R により定量した。エクソソーム中の各 m i R N A の倍率変化を、細胞中の同じ m i R N A と比較して定量した。T S : 腫瘍サプレッサ m i R N A ; O N C : 発癌性 m i R N A 。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、S D として示している。(D) M C F 1 0 A 、 M D A - M B 2 3 1 及び 4 T 1 細胞から採取されたエクソソームを D M E M 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 2 4 及び 7 2 h 保持した。24 及び 7 2 h 後に、エクソソームを再度抽出して、15種の m i R N A (表 4 参照) を q P C R により定量した。72 h の無細胞培養後のエクソソーム中の各 m i R N A の倍率変化を、24 h の無細胞培養後のエクソソーム中の同じ m i R N A と比較して定量した。データは、図 2 C の倍率変化平均グラフの詳細なグラフに対応する。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験 3 回の結果であり、± s . d . として表している。(E) 7 2 h の無細胞培養後の M C F 7 及び 6 7 N R 細胞中と、それらの各エクソソーム中との間の、15種の定量された m i R N A の相関プロット。

【図 1 1 C】オンコソームは、ノルモソームに比較して m i R N A が豊富である。(A) ヒト乳房 M C F 1 0 A (非腫瘍原性) 及び M D A - M B 2 3 1 (乳癌) 細胞株の、ヌクレオチド (n t) あたりの蛍光単位 (F U) で示されたバイオアナライザーグラフ表示 (グラフ) 、並びに R N A 量のゲル画像 (右の画像) 。(B) 4 T 1 、 M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 細胞から採取されたエクソソームを D M E M 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 2 4 及び 7 2 h 保持した。24 及び 7 2 h 後に、エクソソームを採取して、15種の m i R N A (表 4 参照) を q P C R により定量した。グラフは、それぞれ 2 4 及び 7 2 h の無細胞培養後のノルモソームと比較した、24 及び 7 2 h の無細胞培養後のオンコソーム中の各 m i R N A の倍率変化を示している。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、S D として示している。(C) 15種の成熟 m i R N A (表 4 参照) を、M C F 1 0 A (左グラフ) 、 M D A - M B 2 3 1 (中央グラフ) 及び 4 T 1 (右グラフ) 細胞並びにそれらの各エクソソーム中で q P C R により定量した。エクソソーム中の各 m i R N A の倍率変化を、細胞中の同じ m i R N A と比較して定量した。T S : 腫瘍サプレッサ m i R N A ; O N C : 発癌性 m i R N A 。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、S D として示している。(D) M C F 1 0 A 、 M D A - M B 2 3 1 及び 4 T 1 細胞から採取されたエクソソームを D M E M 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 2 4 及び 7 2 h 保持した。24 及び 7 2 h 後に、エクソソームを再度抽出して、15種の m i R N A (表 4 参照) を q P C R により定量した。72 h の無細胞培養後のエクソソーム中の各 m i R N A の倍率変化を、24 h の無細胞培養後のエクソソーム中の同じ m i R N A と比較して定量した。データは、図 2 C の倍率変化平均グラフの詳細なグラフに対応する。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験 3 回の結果であり、± s . d . として表している。(E) 7 2 h の無細胞培養後の M C F 7 及び 6 7 N R 細胞中と、それらの各エクソソーム中との間の、15種の定量された m i R N A の相関プロット。

ト。

【図 1 1 D】オンコソームは、ノルモソームに比較して *miRNA* が豊富である。(A) ヒト乳房 MCF10A (非腫瘍原性) 及び MDA-MB231 (乳癌) 細胞株の、ヌクレオチド (nt) あたりの蛍光単位 (FU) で示されたバイオアナライザーグラフ表示 (グラフ)、並びに RNA 量のゲル画像 (右の画像)。(B) 4T1、MCF10A 及び MDA-MB231 細胞から採取されたエクソソームを DMEM 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 24 及び 72 h 保持した。24 及び 72 h 後に、エクソソームを採取して、15 種の *miRNA* (表 4 参照) を qPCR により定量した。グラフは、それぞれ 24 及び 72 h の無細胞培養後のノルモソームと比較した、24 及び 72 h の無細胞培養後のオンコソーム中の各 *miRNA* の倍率変化を示している。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、SD として示している。(C) 15 種の成熟 *miRNA* (表 4 参照) を、MCF10A (左グラフ)、MDA-MB231 (中央グラフ) 及び 4T1 (右グラフ) 細胞並びにそれらの各エクソソーム中で qPCR により定量した。エクソソーム中の各 *miRNA* の倍率変化を、細胞中の同じ *miRNA* と比較して定量した。TS: 腫瘍抑制性 *miRNA*; ONC: 発癌性 *miRNA*。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、SD として示している。(D) MCF10A、MDA-MB231 及び 4T1 細胞から採取されたエクソソームを DMEM 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 24 及び 72 h 保持した。24 及び 72 h 後に、エクソソームを再度抽出して、15 種の *miRNA* (表 4 参照) を qPCR により定量した。72 h の無細胞培養後のエクソソーム中の各 *miRNA* の倍率変化を、24 h の無細胞培養後のエクソソーム中の同じ *miRNA* と比較して定量した。データは、図 2 C の倍率変化平均グラフの詳細なグラフに対応する。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験 3 回の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。(E) 72 h の無細胞培養後の MCF7 及び 67NR 細胞中と、それらの各エクソソーム中との間の、15 種の定量された *miRNA* の相関プロット。

【図 1 1 E】オンコソームは、ノルモソームに比較して *miRNA* が豊富である。(A) ヒト乳房 MCF10A (非腫瘍原性) 及び MDA-MB231 (乳癌) 細胞株の、ヌクレオチド (nt) あたりの蛍光単位 (FU) で示されたバイオアナライザーグラフ表示 (グラフ)、並びに RNA 量のゲル画像 (右の画像)。(B) 4T1、MCF10A 及び MDA-MB231 細胞から採取されたエクソソームを DMEM 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 24 及び 72 h 保持した。24 及び 72 h 後に、エクソソームを採取して、15 種の *miRNA* (表 4 参照) を qPCR により定量した。グラフは、それぞれ 24 及び 72 h の無細胞培養後のノルモソームと比較した、24 及び 72 h の無細胞培養後のオンコソーム中の各 *miRNA* の倍率変化を示している。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、SD として示している。(C) 15 種の成熟 *miRNA* (表 4 参照) を、MCF10A (左グラフ)、MDA-MB231 (中央グラフ) 及び 4T1 (右グラフ) 細胞並びにそれらの各エクソソーム中で qPCR により定量した。エクソソーム中の各 *miRNA* の倍率変化を、細胞中の同じ *miRNA* と比較して定量した。TS: 腫瘍抑制性 *miRNA*; ONC: 発癌性 *miRNA*。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、SD として示している。(D) MCF10A、MDA-MB231 及び 4T1 細胞から採取されたエクソソームを DMEM 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 24 及び 72 h 保持した。24 及び 72 h 後に、エクソソームを再度抽出して、15 種の *miRNA* (表 4 参照) を qPCR により定量した。72 h の無細胞培養後のエクソソーム中の各 *miRNA* の倍率変化を、24 h の無細胞培養後のエクソソーム中の同じ *miRNA* と比較して定量した。データは、図 2 C の倍率変化平均グラフの詳細なグラフに対応する。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験 3 回の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。(E) 72 h の無細胞培養後の MCF7 及び 67NR 細胞中と、それらの各エクソソーム中との間の、15 種の定量された *miRNA* の相関プロット。

【図 1 2 - 1】エクソソームは、pre-*miRNA* を含む。(A) これまで定量された

成熟 *miRNA* に対応する 15 種の *pre-miRNA* (表 4 参照) を、NMuMG 及び 4 T 1 エクソソーム中で *qPCR* により定量した。存在量を反映するために、各 *pre-miRNA* の ΔCt 値の逆数をプロットした。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、*s.d.* として表している。(B) NMuMG 及び 4 T 1 細胞から採取されたエクソソームを DMEM 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 24 及び 72 h 保持した。24 及び 72 h 後に、エクソソームを再度抽出して、15 種の *miRNA* を *qPCR* により定量した。グラフは、24 h の無細胞培養後のと比較した、72 h の無細胞培養後の NMuMG 及び 4 T 1 エクソソーム中の各 *pre-miRNA* の倍率変化を示している。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、*SD* として表している。(C) 対照細胞への倍率変化として比較した、2 つの一過性トランスフェクトされた *siRNA* 標的化 XPO5 を含む MDA-MB 231 細胞の XPO5 mRNA 発現。(D) MDA-MB 231 細胞を XPO5 *siRNA* 構築物でトランスフェクトして、*miR-21* 発現をトランスフェクトの 12 h 後の複数の時点 (0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 及び 96 h) で評価した。長時間遠心分離の影響を示すための比較として、XPO5 *siRNA* 構築物でトランスフェクトされた MDA-MB 231 細胞を、4 で 3 時間遠心分離して、培地に戻した。*miR-21* 発現を、遠心分離後の複数の時点 (0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 及び 96 h) で評価した。*pre-miR21* から *miR-21* へのプロセッシングは、遠心分離された細胞では遅延している (緑のバー)。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験 3 回の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。(E) NMuMG 及び 4 T 1 細胞から採取されたエクソソームを DMEM 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 0 h、24 h、72 h 及び 96 h 保持した。エクソソームを異なる時点で抽出して、*pre-miRNA* を *qPCR* により定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各 *pre-miRNA* の ΔCt 値の逆数をプロットした。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、*SD* として表している。

【図 12-2】エクソソームは、*pre-miRNA* を含む。(A) これまで定量された成熟 *miRNA* に対応する 15 種の *pre-miRNA* (表 4 参照) を、NMuMG 及び 4 T 1 エクソソーム中で *qPCR* により定量した。存在量を反映するために、各 *pre-miRNA* の ΔCt 値の逆数をプロットした。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、*s.d.* として表している。(B) NMuMG 及び 4 T 1 細胞から採取されたエクソソームを DMEM 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 24 及び 72 h 保持した。24 及び 72 h 後に、エクソソームを再度抽出して、15 種の *miRNA* を *qPCR* により定量した。グラフは、24 h の無細胞培養後のと比較した、72 h の無細胞培養後の NMuMG 及び 4 T 1 エクソソーム中の各 *pre-miRNA* の倍率変化を示している。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、*SD* として表している。(C) 対照細胞への倍率変化として比較した、2 つの一過性トランスフェクトされた *siRNA* 標的化 XPO5 を含む MDA-MB 231 細胞の XPO5 mRNA 発現。(D) MDA-MB 231 細胞を XPO5 *siRNA* 構築物でトランスフェクトして、*miR-21* 発現をトランスフェクトの 12 h 後の複数の時点 (0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 及び 96 h) で評価した。長時間遠心分離の影響を示すための比較として、XPO5 *siRNA* 構築物でトランスフェクトされた MDA-MB 231 細胞を、4 で 3 時間遠心分離して、培地に戻した。*miR-21* 発現を、遠心分離後の複数の時点 (0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 及び 96 h) で評価した。*pre-miR21* から *miR-21* へのプロセッシングは、遠心分離された細胞では遅延している (緑のバー)。この図に示されたデータは、それぞれが三重測定で行われた独立した実験 3 回の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。(E) NMuMG 及び 4 T 1 細胞から採取されたエクソソームを DMEM 培地に再懸濁して、無細胞培養条件に 0 h、24 h、72 h 及び 96 h 保持した。エクソソームを異なる時点で抽出して、*pre-miRNA* を *qPCR* により定量した。存在量を反映するために、異なる時点での各 *pre-miRNA* の ΔCt 値の逆数をプロットした。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、*S*

Dとして表している。

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

10

20

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

30

40

50

B P抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。MDA - MB 231細胞から抽出されたエクソソームのライセートインブット（5%）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（H）A549（ヒト肺癌）、SW480（ヒト結腸癌）、HeLa（ヒト子宮頸癌）及び4T07（ネズミ乳癌）細胞株からのオンコソーム中のダイサーの免疫ブロット。TS G101免疫ブロットを用いて、エクソソーム及び負荷の存在を確認した（下ブロット）。

【図13-2】オンコソームはダイサーを含む。（A）MCF10A細胞由来エクソソーム中の抗ダイサー抗体（右写真）及び陰性対照（左写真）を用いた免疫金標識により得られた透過型電子顕微鏡写真。MDA - MB 231エクソソームの陽性免疫金標識に関して図4Bと比較されたい。（B）抗GF P抗体 MDA - MB 231由来エクソソームを用いた免疫金標識により得られた透過型電子顕微鏡写真。（C）エンブティベクター（pCMV - Tag 4B；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びFlag - ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされたMCF10A及びMDA - MB 231細胞中の抗Flag抗体（上パネル）を用いた免疫ブロット。β - アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。（D）それぞれMCF10A、MCF10A shスクランブル、並びにMCF10A shダイサークローン1及び2（MCF10A shダイサークローン1及びMCF10A shダイサークローン2）細胞において抗ダイサー抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β - アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。（E）それぞれMDA - MB 231、MDA - MB 231 shスクランブル、並びにMDA - MB 231 shダイサークローン1及び2（MDA - MB 231 shダイサークローン1及びMDA - MB 231 shダイサークローン2）細胞において抗ダイサー抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β - アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。イメージJソフトウェアを用いて、免疫ブロットの定量を実施した。（F）ダイサー抗体又はIgGで免疫沈降されたMCF10A及びMDA - MB 231細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のAGO2抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。MDA - MB 231細胞から抽出されたエクソソームのライセートインブットの5%を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（G）ダイサー抗体又はIgGで免疫沈降されたMCF10A及びMDA - MB 231細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗TRBP抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。MDA - MB 231細胞から抽出されたエクソソームのライセートインブット（5%）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（H）A549（ヒト肺癌）、SW480（ヒト結腸癌）、HeLa（ヒト子宮頸癌）及び4T07（ネズミ乳癌）細胞株からのオンコソーム中のダイサーの免疫ブロット。TS G101免疫ブロットを用いて、エクソソーム及び負荷の存在を確認した（下ブロット）。

【図13-3】オンコソームはダイサーを含む。（A）MCF10A細胞由来エクソソーム中の抗ダイサー抗体（右写真）及び陰性対照（左写真）を用いた免疫金標識により得られた透過型電子顕微鏡写真。MDA - MB 231エクソソームの陽性免疫金標識に関して図4Bと比較されたい。（B）抗GF P抗体 MDA - MB 231由来エクソソームを用いた免疫金標識により得られた透過型電子顕微鏡写真。（C）エンブティベクター（pCMV - Tag 4B；それぞれ最初及び三番目のレーン）及びFlag - ダイサーベクター（二番目及び四番目のレーン）でトランスフェクトされたMCF10A及びMDA - MB 231細胞中の抗Flag抗体（上パネル）を用いた免疫ブロット。β - アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。（D）それぞれMCF10A、MCF10A shスクランブル、並びにMCF10A shダイサークローン1及び2（MCF10A shダイサークローン1及びMCF10A shダイサークローン2）細胞において抗ダイサー抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。β - アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。（E）それぞれMDA - MB 231、MDA - MB 231 shスクランブル、並びにMDA - MB 231 shダイサークローン1及び2（MDA - MB 231 shダイサークローン1及びMDA - MB 231 shダイサークローン2）細胞

10

20

30

40

50

において抗ダイサー抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。 β -アクチン免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下パネル）。イメージJソフトウェアを用いて、免疫ブロットの定量を実施した。（F）ダイサー抗体又はIgGで免疫沈降されたMCF10A及びMDA-MB231細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中のAGO2抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。MDA-MB231細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプットの5%を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（G）ダイサー抗体又はIgGで免疫沈降されたMCF10A及びMDA-MB231細胞から抽出されたエクソソームタンパク質中の抗TRBP抗体を用いた免疫ブロット（上パネル）。MDA-MB231細胞から抽出されたエクソソームのライセートインプット（5%）を、対照として用いた。ダイサーの免疫ブロットを、免疫沈降の対照として用いた（下パネル）。（H）A549（ヒト肺癌）、SW480（ヒト結腸癌）、HeLa（ヒト子宮頸癌）及び4T07（ネズミ乳癌）細胞株からのオンコソーム中のダイサーの免疫ブロット。TS G101免疫ブロットを用いて、エクソソーム及び負荷の存在を確認した（下ブロット）。

【図14-1】エクソソームにおけるダイサーの検出。（A）4T1、4T1shスクランブル及び4T1shダイサー細胞中の抗ダイサー抗体と、並びに4T1（4T1 exo s）及び4T1shダイサー（4T1shダイサー exo s）細胞から採取されたエクソソームと、を用いた免疫ブロット（上ブロット）。GADPH免疫ブロットを、負荷対照として用いた（下ブロット）。イメージJソフトウェアを用いて、定量を実施した。（B）エクソソームを、4T1、4T1shスクランブル及び4T1shダイサー細胞から採取して、無細胞条件下に24及び72h保持した。24及び72h後に、エクソソームを再度抽出して、15種のpre-miRNAをqPCRにより定量した。グラフは、24h無細胞培養に比較した、72h無細胞培養後の異なるエクソソーム中の各pre-miRNAの倍率変化を示している。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。（C）エクソソームを、4T1、4T1shスクランブル及び4T1shダイサー細胞から採取して、無細胞条件下に24及び72h保持した。24及び72h後に、エクソソームを再度抽出して、15種のmiRNAをqPCRにより定量した。グラフは、24h無細胞培養に比較した、72h無細胞培養後の異なるエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を示している。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。（D）エクソソームを、MDA-MB231細胞から2本ずつ採取した。試料の一方を抗ダイサー抗体と共に電気穿孔した。両方の試料を無細胞条件下に24及び72h、放置した。24h及び72h後に、エクソソームを再度抽出し、15種のpre-miRNA（表4参照）をqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各pre-miRNAの倍率変化を、各試料中での24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAと比較して定量した。グラフのプロットは、24hエクソソームに比較した、72hエクソソーム中のpre-miRNAの倍率変化を表しており、図5Dに表されたグラフの詳細な分析である。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。（E）エクソソームを、MDA-MB231細胞から2本ずつ採取した。試料の一方を抗ダイサー抗体と共に電気穿孔した。両方の試料を無細胞条件下に24及び72h、放置した。24h及び72h後に、エクソソームを再度抽出し、15種のmiRNA（表4参照）をqPCRにより定量した。72hの無細胞培養後のエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を、各試料中での24h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAと比較して定量した。グラフのプロットは、24hエクソソームに比較した、72hエクソソーム中のmiRNAの倍率変化を表しており、図5Eに表されたグラフの詳細な分析である。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。（F）MDA-MB231エクソソーム（MDA-MB231 exo s）と比較した、ダイサーと共に電気穿孔されたMDA-MB231エクソソーム（MDA-MB231 exo s ダイサーAB）中のダウンレギュレートされたmiRNAの分類（発癌性、腫瘍サプレッサ、及び癌に関して未確定）のグラフ表示。マイクロRNAを、文献に基づき各分類に帰属させた。この図に表されたデータは、それぞ

10

20

30

40

50

れが三重測定で行われた3つの独立した実験の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。

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

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

S Dとして表している。(C)エクソソームを、4 T 1、4 T 1 s hスクランブル及び4 T 1 s hダイサー細胞から採取して、無細胞条件下に24及び72 h保持した。24及び72 h後に、エクソソームを再度抽出して、15種のmiRNAをqPCRにより定量した。グラフは、24 h無細胞培養に比較した、72 h無細胞培養後の異なるエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を示している。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、S Dとして表している。(D)エクソソームを、MDA - MB 231細胞から2本ずつ採取した。試料の一方を抗ダイサー抗体と共に電気穿孔した。両方の試料を無細胞条件下に24及び72 h、放置した。24 h及び72 h後に、エクソソームを再度抽出し、15種のpre-miRNA(表4参照)をqPCRにより定量した。72 hの無細胞培養後のエクソソーム中の各pre-miRNAの倍率変化を、各試料中での24 h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAと比較して定量した。グラフのプロットは、24 hエクソソームに比較した、72 hエクソソーム中のpre-miRNAの倍率変化を表しており、図5 Dに表されたグラフの詳細な分析である。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、S Dとして表している。(E)エクソソームを、MDA - MB 231細胞から2本ずつ採取した。試料の一方を抗ダイサー抗体と共に電気穿孔した。両方の試料を無細胞条件下に24及び72 h、放置した。24 h及び72 h後に、エクソソームを再度抽出し、15種のmiRNA(表4参照)をqPCRにより定量した。72 hの無細胞培養後のエクソソーム中の各miRNAの倍率変化を、各試料中での24 h無細胞培養後のエクソソーム中の同じmiRNAと比較して定量した。グラフのプロットは、24 hエクソソームに比較した、72 hエクソソーム中のmiRNAの倍率変化を表しており、図5 Eに表されたグラフの詳細な分析である。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、S Dとして表している。(F)MDA - MB 231エクソソーム(MDA - MB 231 exos)と比較した、ダイサーと共に電気穿孔されたMDA - MB 231エクソソーム(MDA - MB 231 exos ダイサーAB)中のダウンレギュレートされたmiRNAの分類(発癌性、腫瘍抑制、及び癌に関して未確定)のグラフ表示。マイクロRNAを、文献に基づき各分類に帰属させた。この図に表されたデータは、それぞれが三重測定で行われた3つの独立した実験の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。

【図15 - 1】エクソソームにおけるダイサー検出。(A)エクソソームを、MCF10、MCF10 A s hダイサー、MDA - MB 231及びMDA - MB 231 s hダイサー細胞から採取して、合成pre-miRNA - 10 b、- 21及びcel - 1と共に電気穿孔した。各pre-miRNAを、電気穿孔されたエクソソーム中でqPCRにより定量して、電気穿孔緩衝液のみを用いて電気穿孔されたエクソソームと比較した倍率変化として表した。(B)ピオチンで内部標識されたpre-miR - 21、- 10 b及びcel - 1のドットプロット。(C)pre-miR - 10 b、- 21及びcel - 1でトランスフェクトされたMCF10 A細胞のmiR - 10 b、- 21及びcel - 1の発現分析。各バーは、非トランスフェクト細胞と比較した、トランスフェクト細胞の倍率変化を表している。この図に表されたデータは、それぞれが三重測定で行われた3つの独立した実験の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。

【図15 - 2】エクソソームにおけるダイサー検出。(A)エクソソームを、MCF10、MCF10 A s hダイサー、MDA - MB 231及びMDA - MB 231 s hダイサー細胞から採取して、合成pre-miRNA - 10 b、- 21及びcel - 1と共に電気穿孔した。各pre-miRNAを、電気穿孔されたエクソソーム中でqPCRにより定量して、電気穿孔緩衝液のみを用いて電気穿孔されたエクソソームと比較した倍率変化として表した。(B)ピオチンで内部標識されたpre-miR - 21、- 10 b及びcel - 1のドットプロット。(C)pre-miR - 10 b、- 21及びcel - 1でトランスフェクトされたMCF10 A細胞のmiR - 10 b、- 21及びcel - 1の発現分析。各バーは、非トランスフェクト細胞と比較した、トランスフェクト細胞の倍率変化を表している。この図に表されたデータは、それぞれが三重測定で行われた3つの独立した実験の結果であり、 $\pm s.d.$ として表している。

【図16-1】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質CD43はダイサーをエクソソームに動員する。(A)グラフは、イメージJソフトウェアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。(B)Hrs及びTSG101には2つの異なるsiRNAを用い、BiG2には2つの異なるshクローンを用いた、ダウンレギュレーション後のHrs、TSG101及びBiG2 mRNA発現。非トランスフェクト細胞及びshスクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。(C)MCF10A、MCF10AsiHrs、MDA-MB231及びMDA-MB231siHrs(左グラフ)、MCF10shスクランブル、MCF10AshBiG2、MDA-MB231shスクランブル、MDA-MB231shBiG2(中央グラフ)、並びにMCF10AsiTSG101及びMDA-MB231siTSG101(右グラフ)から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、SDとして表された3回の生物学的反復実験の結果である。(D)MCF10A、MCF10AsiTSG101(siTSG101)、MCF10AsiHrs(sihrs)及びMCF10AshBiG2(shBiG2)細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のCD9の免疫プロット(上プロット);MDA-MB231、MDA-MB231siTSG101(siTSG101)、MDA-MB231siHrs(sihrs)及びMDA-MB231shBiG2(shBiG2)細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のCD9の免疫プロット(下プロット)(E)Hrs、TSG101及びBiG2ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示したMDA-MB231、MDA-MB-231siTSG101、-siHrs及びshBiG2由来エクソソームのNanoSight粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。(F)MCF10A、MCF10Ashスクランブル、MCF10AsiHrs、MCF10AshBiG2、MCF10AsiTSG101、MDA-MB231、MDA-MB231shスクランブル、MDA-MB231siHrs、MDA-MB231shBiG2、MDA-MB231siTSG101、4T1、4T1siHrs、4T1shBiG2及び4T1siTSG101細胞中のダイサーのmRNA発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。(G)抗ダイサー抗体で免疫沈降されたMDA-MB231及び4T1癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー(上プロット、2つの左レーン)と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの5%(上プロット、2つの右レーン)の免疫プロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降されたMDA-MB231及び4T1細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン(下プロット、2つの左レーン)と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの5%(下プロット、2つの右レーン)の免疫プロット。(H)MCF10A、MCF10AsiCD43、MDA-MB231及びMDA-MB231siCD43細胞中のCD43のmRNA発現。MCF10A及びMDA-MB231親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。(I)MCF10A、MCF10AsiCD43、MDA-MB231及びMDA-MB231siCD43細胞中のダイサーのmRNA発現。MCF10A及びMDA-MB231親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。

【図16-2】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質CD43はダイサーをエクソソームに動員する。(A)グラフは、イメージJソフトウェアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。(B)Hrs及びTSG101には2つの異なるsiRNAを用い、BiG2には2つの異なるshクローンを用いた、ダウンレギュレーション後のHrs、TSG101及びBiG2 mRNA発現。非トランスフェクト細胞及びshスクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。(C)MCF10A、MCF10AsiHrs、MDA-MB231及びMDA-MB231siHrs(左グラフ)、MCF10shスクランブル、MCF10AshBiG2、MDA-MB231s

10

20

30

40

50

hスクランブル、MDA-MB231shBiG2(中央グラフ)、並びにMCF10A siTSG101及びMDA-MB231 siTSG101(右グラフ)から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、SDとして表された3回の生物学的反復実験の結果である。(D)MCF10A、MCF10A siTSG101(siTSG101)、MCF10A siHrs(sihrs)及びMCF10A shBiG2(shBiG2)細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のCD9の免疫プロット(上プロット);MDA-MB231、MDA-MB231 siTSG101(siTSG101)、MDA-MB231 siHrs(sihrs)及びMDA-MB231 shBiG2(shBiG2)細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のCD9の免疫プロット(下プロット)(E)Hrs、TSG101及びBiG2ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示したMDA-MB231、MDA-MB-231 siTSG101、-siHrs及びshBiG2由来エクソソームのNanoSight粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。(F)MCF10A、MCF10A shスクランブル、MCF10A siHrs、MCF10A shBiG2、MCF10A siTSG101、MDA-MB231、MDA-MB231 shスクランブル、MDA-MB231 siHrs、MDA-MB231 shBiG2、MDA-MB231 siTSG101、4T1、4T1 siHrs、4T1 shBiG2及び4T1 siTSG101細胞中のダイサーのmRNA発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。(G)抗ダイサー抗体で免疫沈降されたMDA-MB231及び4T1癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー(上プロット、2つの左レーン)と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの5%(上プロット、2つの右レーン)の免疫プロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降されたMDA-MB231及び4T1細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン(下プロット、2つの左レーン)と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの5%(下プロット、2つの右レーン)の免疫プロット。(H)MCF10A、MCF10A siCD43、MDA-MB231及びMDA-MB231 siCD43細胞中のCD43のmRNA発現。MCF10A及びMDA-MB231親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。(I)MCF10A、MCF10A siCD43、MDA-MB231及びMDA-MB231 siCD43細胞中のダイサーのmRNA発現。MCF10A及びMDA-MB231親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。

【図16-3】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質CD43はダイサーをエクソソームに動員する。(A)グラフは、イメージJソフトウェアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。(B)Hrs及びTSG101には2つの異なるsiRNAを用い、BiG2には2つの異なるshクローンをを用いた、ダウンレギュレーション後のHrs、TSG101及びBiG2 mRNA発現。非トランスフェクト細胞及びshスクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。(C)MCF10A、MCF10A siHrs、MDA-MB231及びMDA-MB231 siHrs(左グラフ)、MCF10 shスクランブル、MCF10A shBiG2、MDA-MB231 shスクランブル、MDA-MB231 shBiG2(中央グラフ)、並びにMCF10A siTSG101及びMDA-MB231 siTSG101(右グラフ)から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、SDとして表された3回の生物学的反復実験の結果である。(D)MCF10A、MCF10A siTSG101(siTSG101)、MCF10A siHrs(sihrs)及びMCF10A shBiG2(shBiG2)細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のCD9の免疫プロット(上プロット);MDA-MB231、MDA-MB23

10

20

30

40

50

1 s i T S G 1 0 1 (s i T S G 1 0 1)、MDA - M B 2 3 1 s i H r s (s i H r s) 及び MDA - M B 2 3 1 s h B i G 2 (s h B i G 2) 細胞の エクソソームタンパク質抽出物中のCD9の免疫プロット(下プロット)(E) H r s、T S G 1 0 1 及び B i G 2 ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示したMDA - M B 2 3 1、MDA - M B - 2 3 1 s i T S G 1 0 1、- s i H r s 及び s h B i G 2 由来エクソソームの N a n o S i g h t 粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。(F) M C F 1 0 A、M C F 1 0 A s h スクランブル、M C F 1 0 A s i H r s、M C F 1 0 A s h B i G 2、M C F 1 0 A s i T S G 1 0 1、MDA - M B 2 3 1、MDA - M B 2 3 1 s h スクランブル、MDA - M B 2 3 1 s i H r s、MDA - M B 2 3 1 s h B i G 2、MDA - M B 2 3 1 s i T S G 1 0 1、4 T 1、4 T 1 s i H r s、4 T 1 s h B i G 2 及び 4 T 1 s i T S G 1 0 1 細胞中のダイサーのmRNA発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。(G) 抗ダイサー抗体で免疫沈降されたMDA - M B 2 3 1 及び 4 T 1 癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー(上プロット、2つの左レーン)と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの5%(上プロット、2つの右レーン)の免疫プロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降されたMDA - M B 2 3 1 及び 4 T 1 細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン(下プロット、2つの左レーン)と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの5%(下プロット、2つの右レーン)の免疫プロット。(H) M C F 1 0 A、M C F 1 0 A s i C D 4 3、MDA - M B 2 3 1 及び MDA - M B 2 3 1 s i C D 4 3 細胞中のCD43のmRNA発現。M C F 1 0 A 及び MDA - M B 2 3 1 親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。(I) M C F 1 0 A、M C F 1 0 A s i C D 4 3、MDA - M B 2 3 1 及び MDA - M B 2 3 1 s i C D 4 3 細胞中のダイサーのmRNA発現。M C F 1 0 A 及び MDA - M B 2 3 1 親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。

【図16-4】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質CD43はダイサーをエクソソームに動員する。(A) グラフは、イメージJソフトウェアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。(B) H r s 及び T S G 1 0 1 には2つの異なる s i R N A を用い、B i G 2 には2つの異なる s h クローンを用いた、ダウンレギュレーション後の H r s、T S G 1 0 1 及び B i G 2 m R N A 発現。非トランスフェクト細胞及び s h スクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。(C) M C F 1 0 A、M C F 1 0 A s i H r s、MDA - M B 2 3 1 及び MDA - M B 2 3 1 s i H r s (左グラフ)、M C F 1 0 s h スクランブル、M C F 1 0 A s h B i G 2、MDA - M B 2 3 1 s h スクランブル、MDA - M B 2 3 1 s h B i G 2 (中央グラフ)、並びに M C F 1 0 A s i T S G 1 0 1 及び MDA - M B 2 3 1 s i T S G 1 0 1 (右グラフ) から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、SDとして表された3回の生物学的反復実験の結果である。(D) M C F 1 0 A、M C F 1 0 A s i T S G 1 0 1 (s i T S G 1 0 1)、M C F 1 0 A s i H r s (s i H r s) 及び M C F 1 0 A s h B i G 2 (s h B i G 2) 細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のCD9の免疫プロット(上プロット); MDA - M B 2 3 1、MDA - M B 2 3 1 s i T S G 1 0 1 (s i T S G 1 0 1)、MDA - M B 2 3 1 s i H r s (s i H r s) 及び MDA - M B 2 3 1 s h B i G 2 (s h B i G 2) 細胞の エクソソームタンパク質抽出物中のCD9の免疫プロット(下プロット)(E) H r s、T S G 1 0 1 及び B i G 2 ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示したMDA - M B 2 3 1、MDA - M B - 2 3 1 s i T S G 1 0 1、- s i H r s 及び s h B i G 2 由来エクソソームの N a n o S i g h t 粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。(F) M C F 1 0 A、M C F 1 0 A s h スクランブル、M C F 1 0 A s i H r s、M C F 1 0 A s h B i G 2、M C F 1 0 A s i T S G 1 0 1、MDA

- M B 2 3 1、M D A - M B 2 3 1 s h スクランブル、M D A - M B 2 3 1 s i H r s、M D A - M B 2 3 1 s h B i G 2、M D A - M B 2 3 1 s i T S G 1 0 1、4 T 1、4 T 1 s i H r s、4 T 1 s h B i G 2 及び 4 T 1 s i T S G 1 0 1 細胞中のダイサーの m R N A 発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、S D として表している。(G) 抗ダイサー抗体で免疫沈降された M D A - M B 2 3 1 及び 4 T 1 癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー(上プロット、2 つの左レーン)と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの 5 % (上プロット、2 つの右レーン)の免疫プロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降された M D A - M B 2 3 1 及び 4 T 1 細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン(下プロット、2 つの左レーン)と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの 5 % (下プロット、2 つの右レーン)の免疫プロット。(H) M C F 1 0 A、M C F 1 0 A s i C D 4 3、M D A - M B 2 3 1 及び M D A - M B 2 3 1 s i C D 4 3 細胞中の C D 4 3 の m R N A 発現。M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、S D として表している。(I) M C F 1 0 A、M C F 1 0 A s i C D 4 3、M D A - M B 2 3 1 及び M D A - M B 2 3 1 s i C D 4 3 細胞中のダイサーの m R N A 発現。M C F 1 0 A 及び M D A - M B 2 3 1 親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、S D として表している。

【図 1 6 - 5】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質 C D 4 3 はダイサーをエクソソームに動員する。(A) グラフは、イメージ J ソフトウェアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。(B) H r s 及び T S G 1 0 1 には 2 つの異なる s i R N A を用い、B i G 2 には 2 つの異なる s h クローンを用いた、ダウンレギュレーション後の H r s、T S G 1 0 1 及び B i G 2 m R N A 発現。非トランスフェクト細胞及び s h スクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。(C) M C F 1 0 A、M C F 1 0 A s i H r s、M D A - M B 2 3 1 及び M D A - M B 2 3 1 s i H r s (左グラフ)、M C F 1 0 s h スクランブル、M C F 1 0 A s h B i G 2、M D A - M B 2 3 1 s h スクランブル、M D A - M B 2 3 1 s h B i G 2 (中央グラフ)、並びに M C F 1 0 A s i T S G 1 0 1 及び M D A - M B 2 3 1 s i T S G 1 0 1 (右グラフ) から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、S D として表された 3 回の生物学的反復実験の結果である。(D) M C F 1 0 A、M C F 1 0 A s i T S G 1 0 1 (s i T S G 1 0 1)、M C F 1 0 A s i H r s (s i H r s) 及び M C F 1 0 A s h B i G 2 (s h B i G 2) 細胞のエクソソームタンパク質抽出物中の C D 9 の免疫プロット(上プロット); M D A - M B 2 3 1、M D A - M B 2 3 1 s i T S G 1 0 1 (s i T S G 1 0 1)、M D A - M B 2 3 1 s i H r s (s i H r s) 及び M D A - M B 2 3 1 s h B i G 2 (s h B i G 2) 細胞のエクソソームタンパク質抽出物中の C D 9 の免疫プロット(下プロット)(E) H r s、T S G 1 0 1 及び B i G 2 ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示した M D A - M B 2 3 1、M D A - M B - 2 3 1 s i T S G 1 0 1、- s i H r s 及び s h B i G 2 由来エクソソームの N a n o S i g h t 粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。(F) M C F 1 0 A、M C F 1 0 A s h スクランブル、M C F 1 0 A s i H r s、M C F 1 0 A s h B i G 2、M C F 1 0 A s i T S G 1 0 1、M D A - M B 2 3 1、M D A - M B 2 3 1 s h スクランブル、M D A - M B 2 3 1 s i H r s、M D A - M B 2 3 1 s h B i G 2、M D A - M B 2 3 1 s i T S G 1 0 1、4 T 1、4 T 1 s i H r s、4 T 1 s h B i G 2 及び 4 T 1 s i T S G 1 0 1 細胞中のダイサーの m R N A 発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3 回の生物学的反復実験の結果であり、S D として表している。(G) 抗ダイサー抗体で免疫沈降された M D A - M B 2 3 1 及び 4 T 1 癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー(上プロット、2 つの左レーン)と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの 5 % (上プロット、2 つの右レーン)の免疫プロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降さ

10

20

30

40

50

れたMDA - MB 2 3 1及び4 T 1細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン（下プロット、2つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの5%（下プロット、2つの右レーン）の免疫プロット。（H）MCF 1 0 A、MCF 1 0 A s i C D 4 3、MDA - MB 2 3 1及びMDA - MB 2 3 1 s i C D 4 3細胞中のCD 4 3のmRNA発現。MCF 1 0 A及びMDA - MB 2 3 1親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。（I）MCF 1 0 A、MCF 1 0 A s i C D 4 3、MDA - MB 2 3 1及びMDA - MB 2 3 1 s i C D 4 3細胞中のダイサーのmRNA発現。MCF 1 0 A及びMDA - MB 2 3 1親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。

10

【図16 - 6】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質CD 4 3はダイサーをエクソソームに動員する。（A）グラフは、イメージJソフトウェアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。（B）Hrs及びTSG 1 0 1には2つの異なるsiRNAを用い、BiG 2には2つの異なるshクローンをを用いた、ダウンレギュレーション後のHrs、TSG 1 0 1及びBiG 2 mRNA発現。非トランスフェクト細胞及びshスクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。（C）MCF 1 0 A、MCF 1 0 A s i Hrs、MDA - MB 2 3 1及びMDA - MB 2 3 1 s i Hrs（左グラフ）、MCF 1 0 shスクランブル、MCF 1 0 A sh BiG 2、MDA - MB 2 3 1 shスクランブル、MDA - MB 2 3 1 sh BiG 2（中央グラフ）、並びにMCF 1 0 A s i TSG 1 0 1及びMDA - MB 2 3 1 s i TSG 1 0 1（右グラフ）から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、SDとして表された3回の生物学的反復実験の結果である。（D）MCF 1 0 A、MCF 1 0 A s i TSG 1 0 1（s i TSG 1 0 1）、MCF 1 0 A s i Hrs（s i Hrs）及びMCF 1 0 A sh BiG 2（sh BiG 2）細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のCD 9の免疫プロット（上プロット）；MDA - MB 2 3 1、MDA - MB 2 3 1 s i TSG 1 0 1（s i TSG 1 0 1）、MDA - MB 2 3 1 s i Hrs（s i Hrs）及びMDA - MB 2 3 1 sh BiG 2（sh BiG 2）細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のCD 9の免疫プロット（下プロット）（E）Hrs、TSG 1 0 1及びBiG 2 ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示したMDA - MB 2 3 1、MDA - MB - 2 3 1 s i TSG 1 0 1、- s i Hrs及びsh BiG 2 由来エクソソームのNanoSight粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。（F）MCF 1 0 A、MCF 1 0 A shスクランブル、MCF 1 0 A s i Hrs、MCF 1 0 A sh BiG 2、MCF 1 0 A s i TSG 1 0 1、MDA - MB 2 3 1、MDA - MB 2 3 1 shスクランブル、MDA - MB 2 3 1 s i Hrs、MDA - MB 2 3 1 sh BiG 2、MDA - MB 2 3 1 s i TSG 1 0 1、4 T 1、4 T 1 s i Hrs、4 T 1 sh BiG 2及び4 T 1 s i TSG 1 0 1細胞中のダイサーのmRNA発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。（G）抗ダイサー抗体で免疫沈降されたMDA - MB 2 3 1及び4 T 1癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー（上プロット、2つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの5%（上プロット、2つの右レーン）の免疫プロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降されたMDA - MB 2 3 1及び4 T 1細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン（下プロット、2つの左レーン）と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの5%（下プロット、2つの右レーン）の免疫プロット。（H）MCF 1 0 A、MCF 1 0 A s i C D 4 3、MDA - MB 2 3 1及びMDA - MB 2 3 1 s i C D 4 3細胞中のCD 4 3のmRNA発現。MCF 1 0 A及びMDA - MB 2 3 1親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。（I）MCF 1 0 A、MCF 1 0 A s i C D 4 3、MDA - MB 2 3 1及びMDA - MB 2 3 1 s i C D 4 3細胞中のダイサーのmRNA発現。MCF 1 0

20

30

40

50

A及びMDA-MB231親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。

【図16-7】ダイサーは多小胞体内に存在し、細胞質CD43はダイサーをエクソソームに動員する。(A)グラフは、イメージJソフトウェアを利用して定量された共焦点画像における共局在化の割合を表す。(B)Hrs及びTSG101には2つの異なるsiRNAを用い、BiG2には2つの異なるshクローンをを用いた、ダウンレギュレーション後のHrs、TSG101及びBiG2 mRNA発現。非トランスフェクト細胞及びshスクランブルトランスフェクト細胞を、対照として用いた。(C)MCF10A、MCF10AsiHrs、MDA-MB231及びMDA-MB231siHrs(左グラフ)、MCF10shスクランブル、MCF10AshBiG2、MDA-MB231shスクランブル、MDA-MB231shBiG2(中央グラフ)、並びにMCF10AsiTSG101及びMDA-MB231siTSG101(右グラフ)から抽出されたエクソソームのブラッドフォードアッセイによるタンパク質定量。親非トランスフェクト細胞を、倍率変化分析での相対的対照として用いた。データは細胞数により標準化されており、SDとして表された3回の生物学的反復実験の結果である。(D)MCF10A、MCF10AsiTSG101(siTSG101)、MCF10AsiHrs(sihrs)及びMCF10AshBiG2(shBiG2)細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のCD9の免疫プロット(上プロット);MDA-MB231、MDA-MB231siTSG101(siTSG101)、MDA-MB231siHrs(sihrs)及びMDA-MB231shBiG2(shBiG2)細胞のエクソソームタンパク質抽出物中のCD9の免疫プロット(下プロット)(E)Hrs、TSG101及びBiG2ダウンレギュレート細胞中のエクソソーム数のダウンレギュレートを示したMDA-MB231、MDA-MB-231siTSG101、-siHrs及びshBiG2由来エクソソームのNanoSight粒子トラッキング分析、並びにそのエクソソームで予測されるサイズ分布。(F)MCF10A、MCF10Ashスクランブル、MCF10AsiHrs、MCF10AshBiG2、MCF10AsiTSG101、MDA-MB231、MDA-MB231shスクランブル、MDA-MB231siHrs、MDA-MB231shBiG2、MDA-MB231siTSG101、4T1、4T1siHrs、4T1shBiG2及び4T1siTSG101細胞中のダイサーのmRNA発現。親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。(G)抗ダイサー抗体で免疫沈降されたMDA-MB231及び4T1癌細胞のタンパク質抽出物中のダイサー(上プロット、2つの左レーン)と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの5%(上プロット、2つの右レーン)の免疫プロット。抗ダイサー抗体で免疫沈降されたMDA-MB231及び4T1細胞のタンパク質抽出物中のポリユビキチン(下プロット、2つの左レーン)と、免疫沈降に用いられたタンパク質ライセートに対応するインプットの5%(下プロット、2つの右レーン)の免疫プロット。(H)MCF10A、MCF10AsiCD43、MDA-MB231及びMDA-MB231siCD43細胞中のCD43のmRNA発現。MCF10A及びMDA-MB231親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。(I)MCF10A、MCF10AsiCD43、MDA-MB231及びMDA-MB231siCD43細胞中のダイサーのmRNA発現。MCF10A及びMDA-MB231親細胞を、倍率変化比較での相対的対照として用いた。データは、3回の生物学的反復実験の結果であり、SDとして表している。

【図17-1】オンコソームは、ダイサー依存的に、収容細胞のトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。(A)MDA-MB231CD63-GFP細胞由来のエクソソームのNanoSight粒子トラッキング分析。黒色線は、エクソソーム集団全体の測定を表し、緑色線は、488nmレーザビームを備えたNanoSightを用いてCD63-GFPで標識されたエクソソーム集団を示す。薄灰色及び薄緑色は、各測定のエラーバーを表す。(B)抗PTEN抗体と、抽出されて間もないMDA-MB231

10

20

30

40

50

オンコソームで0、30 min、1 h、12 h及び24 hの間処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット。β - アクチンを負荷対照として用いた。(C) 抗HOXD10抗体と、抽出されて間もないMDA - MB231オンコソームで0、30 min、1 h、12 h及び24 h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット。β - アクチンを負荷対照として用いた。(D) MCF10A細胞をXPO5に関してsiRNAでトランスフェクトして、pre-miRNAの流れを核から細胞質にダウンレギュレートした。MCF10A siXPO5細胞、並びにダイサー抗体を含む、及び含まないMDA - MB231エクソソームで処置されたMCF10A siXPO5細胞中で、時間経過に伴う(6 h、12 h、24 h、36 h及び48 h) miR - 15レベルを測定することにより、pre-miR15のプロセッシングを評価した。有意な変動は示されなかった。(E) miR182 - 5p発現を、時間経過に伴い(0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72及び96 h)、MDA - MB231由来エクソソーム中でモニタリングした。エラーバーは、0 hと比較した、各時点の倍率変化を表している。有意差は認められなかった。(F) グラフは、図7Gのコロニー数定量を示している。* p = 0.0006。(G) 抗ダイサー抗体と、無細胞培養後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA - MB231オンコソームで0、30 min、1 h、12 h及び24 h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット。α - チューブリンを負荷対照として用いた。

【図17 - 2】オンコソームは、ダイサー依存的に、収容細胞のトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。(A) MDA - MB231 CD63 - GFP細胞由来のエクソソームのNanoSight粒子トラッキング分析。黒色線は、エクソソーム集団全体の測定を表し、緑色線は、488 nmレーザビームを備えたNanoSightを用いてCD63 - GFPで標識されたエクソソーム集団を示す。薄灰色及び薄緑色は、各測定のエラーバーを表す。(B) 抗PTEN抗体と、抽出されて間もないMDA - MB231オンコソームで0、30 min、1 h、12 h及び24 hの間処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット。β - アクチンを負荷対照として用いた。(C) 抗HOXD10抗体と、抽出されて間もないMDA - MB231オンコソームで0、30 min、1 h、12 h及び24 h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット。β - アクチンを負荷対照として用いた。(D) MCF10A細胞をXPO5に関してsiRNAでトランスフェクトして、pre-miRNAの流れを核から細胞質にダウンレギュレートした。MCF10A siXPO5細胞、並びにダイサー抗体を含む、及び含まないMDA - MB231エクソソームで処置されたMCF10A siXPO5細胞中で、時間経過に伴う(6 h、12 h、24 h、36 h及び48 h) miR - 15レベルを測定することにより、pre-miR15のプロセッシングを評価した。有意な変動は示されなかった。(E) miR182 - 5p発現を、時間経過に伴い(0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72及び96 h)、MDA - MB231由来エクソソーム中でモニタリングした。エラーバーは、0 hと比較した、各時点の倍率変化を表している。有意差は認められなかった。(F) グラフは、図7Gのコロニー数定量を示している。* p = 0.0006。(G) 抗ダイサー抗体と、無細胞培養後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA - MB231オンコソームで0、30 min、1 h、12 h及び24 h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット。α - チューブリンを負荷対照として用いた。

【図17 - 3】オンコソームは、ダイサー依存的に、収容細胞のトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。(A) MDA - MB231 CD63 - GFP細胞由来のエクソソームのNanoSight粒子トラッキング分析。黒色線は、エクソソーム集団全体の測定を表し、緑色線は、488 nmレーザビームを備えたNanoSightを用いてCD63 - GFPで標識されたエクソソーム集団を示す。薄灰色及び薄緑色は、各測定のエラーバーを表す。(B) 抗PTEN抗体と、抽出されて間もないMDA - MB231オンコソームで0、30 min、1 h、12 h及び24 hの間処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット。β - アクチンを負荷対照として用いた

。(C)抗H O X D 1 0抗体と、抽出されて間もないMDA - M B 2 3 1 オンコソームで0、30min、1h、12h及び24h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット。β - アクチンを負荷対照として用いた。(D)MCF10A細胞をXPO5に関してsiRNAでトランスフェクトして、pre-miRNAの流れを核から細胞質にダウンレギュレートした。MCF10AsiXPO5細胞、並びにダイサー抗体を含む、及び含まないMDA - M B 2 3 1 エクソソームで処置されたMCF10AsiXPO5細胞中で、時間経過に伴う(6h、12h、24h、36h及び48h)miR-15レベルを測定することにより、pre-miR15のプロセッシングを評価した。有意な変動は示されなかった。(E)miR182-5p発現を、時間経過に伴い(0h、6h、12h、24h、36h、48h、72及び96h)、MDA - M B 2 3 1 由来エクソソーム中でモニタリングした。エラーバーは、0hと比較した、各時点の倍率変化を表している。有意差は認められなかった。(F)グラフは、図7Gのコロニー数定量を示している。* p = 0.0006。(G)抗ダイサー抗体と、無細胞培養後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA - M B 2 3 1 オンコソームで0、30min、1h、12h及び24h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット。α - チューブリンを負荷対照として用いた。

10

【図17-4】オンコソームは、ダイサー依存的に、収容細胞のトランスクリプトーム改変及び腫瘍形成を誘導する。(A)MDA - M B 2 3 1 CD63 - GFP細胞由来のエクソソームのNanoSight粒子トラッキング分析。黒色線は、エクソソーム集団全体の測定を表し、緑色線は、488nmレーザビームを備えたNanoSightを用いてCD63 - GFPで標識されたエクソソーム集団を示す。薄灰色及び薄緑色は、各測定のエラーバーを表す。(B)抗PTEN抗体と、抽出されて間もないMDA - M B 2 3 1 オンコソームで0、30min、1h、12h及び24hの間処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット。β - アクチンを負荷対照として用いた。(C)抗H O X D 1 0抗体と、抽出されて間もないMDA - M B 2 3 1 オンコソームで0、30min、1h、12h及び24h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット。β - アクチンを負荷対照として用いた。(D)MCF10A細胞をXPO5に関してsiRNAでトランスフェクトして、pre-miRNAの流れを核から細胞質にダウンレギュレートした。MCF10AsiXPO5細胞、並びにダイサー抗体を含む、及び含まないMDA - M B 2 3 1 エクソソームで処置されたMCF10AsiXPO5細胞中で、時間経過に伴う(6h、12h、24h、36h及び48h)miR-15レベルを測定することにより、pre-miR15のプロセッシングを評価した。有意な変動は示されなかった。(E)miR182-5p発現を、時間経過に伴い(0h、6h、12h、24h、36h、48h、72及び96h)、MDA - M B 2 3 1 由来エクソソーム中でモニタリングした。エラーバーは、0hと比較した、各時点の倍率変化を表している。有意差は認められなかった。(F)グラフは、図7Gのコロニー数定量を示している。* p = 0.0006。(G)抗ダイサー抗体と、無細胞培養後にダイサー抗体と共に電気穿孔されたMDA - M B 2 3 1 オンコソームで0、30min、1h、12h及び24h、処置されたMCF10A細胞のタンパク質抽出物と、を用いた免疫プロット。α - チューブリンを負荷対照として用いた。

20

30

40

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

【図18-2】乳癌患者のエクソソームはダイサーを含み、pre-miRNAをプロセッシングして、異なる臓器の細胞に侵入する。(A)ヌードマウスの採取間もない原発性ヒト卵巣腫瘍、子宮内膜腫瘍及び乳房腫瘍のフラグメント由来の同所性異種移植片の代表的

50

写真。(B) 卵巣癌、子宮内膜癌及び乳癌の同所性異種移植片のヘマトキシリン - エオジン (H E) 染色。(C) 同所性腫瘍異種移植片を有するマウスから採取された血清エクソソームの透過型電子顕微鏡写真。(D) 図 8 A に示された免疫プロットの膜のクーマシー染色。

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

10

【発明を実施するための形態】

【0038】

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

20

【0039】

30

I. 癌由来エクソソーム

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

40

【0040】

近年は、エクソソーム及びエクソソームと癌との関連性に関する多数の発行物が見られる (Yang and Robbins, 2011)。癌細胞が正常細胞と比較して、多数のエクソソームを分泌することが、ほとんどの研究で示されている (Yang and Robbins, 2011)。低酸素の癌細胞は、正常酸素の癌細胞よりも多くのエクソソームを放出する (King et al., 2012)。癌由来エクソソームは、miRNA をはじめとするタンパク質及び核酸の特異的含有量を運搬すると推測される (Valadi et al., 2007)。そのような研究は、刺激的であったが

50

、タンパク質及びmiRNAが、少なからぬ機能的変化を至る所にある標的細胞に導入し得る方法を説明するには至っていない。ほとんどの研究が、エクソソーム中の成熟miRNAを同定したが、その機能は大部分が未知である。その上、一本鎖miRNAは、ターゲットmRNAのサイレンシングにおいては効果が非常に低く、RISC組み込みを利用せずにmRNA認識を促進する。RLCのタンパク質がそのpre-miRNAを認識して、それを22ヌクレオチドのRNA二本鎖にプロセシングする。AGO2は、次の遺伝子サイレンシングのための一本の鎖を選択し、他の鎖は多くの場合、分解される。その全体的反応は自然発生的であり、その3種のタンパク質及び組み込まれたpre-miRNAを越える任意の因子を必要としない(Maniatakis and Mourelatos, 2005)。miRNAを完全に機能的にするために、その反応は、そのpre-miRNAをRLCに組み込むプロセシング、並びにAGOを介したmRNA認識及びサイレンシングを必要とする。

10

【0041】

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

20

【0042】

これまでの報告は、エクソソーム中のmiRNAの存在を示唆し、機能に関して推測した(Valadi et al., 2007; Zhang et al., 2010)。miRNAがmRNAターゲットの適切なサイレンシングのための理論的濃度で存在する必要があるならば、循環内のエクソソームは、標的トランスクリプトームを抑制するのに十分な濃度の成熟miRNAを提供することは考えにくい。レシピエント細胞内のmiRNAバイオジェネシスは、細胞内に既に存在するプロセシングに利用可能なpre-miRNAの総量により律速されるだけでなく必要とされる酵素が律速的であるため、レシピエント細胞中のエクソソームから生成されたpre-miRNAのプロセシングは起こりそうにない事象である。つまり、プロセシングはpre-miRNAがレシピエント細胞に移動する場合に起こり、各成熟miRNAではないため、プロセシング経路を通ることなく転写後に遺伝子発現の直接改変するにはレシピエント細胞に成熟miRNAを侵入させることがより効率的である。エクソソーム中の特異的miRNAバイオジェネシスは、癌細胞についてのこの難問を解決する。オンコソームはRISC会合型である成熟miRNAのサブセットが非常に豊富になり、標的細胞の表現型を形成する際に重要な生物学的枠組を担う可能性がある。

30

40

【0043】

その上、癌細胞は、癌細胞に増殖的及び生存的利点を提供し、臨床段階の進行、転移及び予後不良に関連するmiR-21及びmiR-155などの発癌能力を有するmiRNAを過剰発現する(Yan et al., 2008)。これらのmiRNAが癌患者の循環において過剰発現されることも、これまでに報告されている(Mao et al., 2013)。細胞内でのmiRNAの合成は酵素反応であり、それゆえ細胞質に存在するダイサーなどの鍵を握る酵素の量に依存する。ダイサーは、乳癌細胞及び乳房腫瘍においてダウンレギュレートされることが記載されている(Grelhier et al., 2009; Martello et al., 2010)。それゆえこれらの癌細胞が合成し得るmiRNA量は、限られている。エクソソーム生成は連続工程である

50

ため、癌細胞は特異的 *pre-miRNA* を *RLC* タンパク質と共に詰め込むことでエクソソーム中の成熟 *miRNA* を高濃度にし、同時に元の細胞内でこれらの *miRNA* のアップレギュレーションを維持すると推定される。オンコソームは *RISC* 会合型の成熟 *miRNA* が非常に豊富であり、標的細胞の表現型を形成する上で重要な生物学的枠割を担う可能性がある。同時に本来の細胞は、有利な発癌性 *miRNA* の過剰発現を維持するが、レシピエント細胞は、エクソソームを通した *pre-miRNA* の侵入で過飽和となったバイオジェネシス経路を見ることはない。

【0044】

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

【0045】

特定の *miRNA* は、特異的腫瘍をアップレギュレートするが (Volinia et al., 2006)、ヒトの癌においては、*miRNA* の全体的な減少が起こることも報告されている (Kumar et al., 2007; Lu et al., 2005; Melo et al., 2011; Melo et al., 2010; Melo et al., 2009; Ozen et al., 2008)。ダイサーは、癌細胞で抑制されることが記載されているが、腫瘍の成長を維持するのに低レベルで十分である (Kumar et al., 2009)。miR-103/107 を介した部分的なダイサーダウンレギュレーションは、細胞増殖に影響を及ぼすことなく癌細胞の侵襲性を増強する (Martello et al., 2010)。ダイサーの完全な喪失は、細胞生存にとって有害である (Fukagawa et al., 2004)。一方で低レベルのダイサーは、肺及び卵巣癌患者の生存率低下に関連する (Karube et al., 2005; Merritt et al., 2008)。同様にダイサーのヘテロ接合性喪失は、乳癌患者の転移に相関する (Martello et al., 2010)。mRNA レベルは不変であるため、乳癌におけるダイサーのダウンレギュレーションは、転写後にも起こる (Grelrier et al., 2009; Wiesen and Tomasi, 2009)。癌細胞においてダイサー画分は、CD43 依存的にエンドソーム/MVB を標的化される。最終的にダイサーは、エクソソームを通して分泌される。エクソソームのバイオジェネシス経路の成分である Hrs、BiG2 及び TSG101 のダウンレギュレーションは、ダイサータンパク質の細胞内局在化に劇的な変化をもたらす。癌細胞におけるダイサーレベル抑制の1つの考えられる説明は、エクソソームを介した能動輸送を原因とする可能性がある。エクソソーム分泌経路が閉鎖されると、癌細胞がダイサータンパク質増加を感知して、mRNA 発現をダウンレギュレートする。加えて癌細胞は、成熟 *miRNA* の生成を援助し得なくなると、ダイサータンパク質を核内コンパートメントに運搬する。これに関連して、高悪性度の癌細胞におけるダイサーアップレギュレーションは、癌細胞を低悪性度にする (Park et al., 2011)。

【0046】

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

）。この報告から、CD43がオンコソーム内へのダイサー誘導に機能的に関与することが確認される。

【0047】

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

10

【0048】

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

20

【0049】

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

30

【0050】

II. バイオマーカの検出

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

40

【0051】

幾つかの実施形態において、前記の発現情報を得ることは、RNAの定量、例えばcDNAマイクロアレイ、定量RT-PCR、インサイシュハイブリダイゼーション、ノーザンブロットング、又はヌクレアーゼプロテクションを含んでいてもよい。前記の発現情報を得ることは、タンパク質の定量を含んでいてもよく、例えばタンパク質定量には、免疫組織化学、ELISA、放射免疫アッセイ (RIA)、免疫放射線アッセイ、蛍光イム

50

ノアッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、ゲル電気泳動法、ウェスタンブロット分析、質量分析法、又はタンパク質マイクロアレイがある。

【0052】

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

10

【0053】

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

20

【0054】

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

30

40

【0055】

免疫組織化学的染色を利用して、複数のバイオマーカの差次的発現を測定してもよい。この方法は、タンパク質と特異的抗体との相互作用により組織切片の細胞におけるタンパク質局在化を可能にする。このために、組織をホルマリン又は他の適切な固定剤で固定して、ワックス又はプラスチックに包埋し、ミクロトームを用いて薄切片 (約0.1mm~数mm厚) に切り出すことができる。あるいは組織を凍結し、クリオスタットを用いて薄切片に切り出してもよい。組織切片を固体表面に配列させ、それに固定してもよい (即ち、組織マイクロアレイ)。組織切片を、該当する抗原に対する一次抗体と共にインキュベートして、洗浄し、非結合抗体を除去する。一次抗体を検出システムに結合させるか、又

50

は一次抗体を、検出システムに結合した二次抗体で検出してもよい。検出システムは、発蛍光団であってもよく、又は基質を比色、蛍光、若しくは化学発光生成物に変換し得る西洋ワサビペルオキシダーゼ若しくはアルカリホスファターゼなどの酵素であってもよい。染色された組織切片は一般に、顕微鏡下でスキャンされる。癌対象から得た組織試料は、異成分からなる、即ち一部の細胞が正常で他の細胞が癌性であり得るため、組織における陽性染色細胞の割合を決定してもよい。この測定を、染色強度の測定と一緒に利用して、バイオマーカの発現値を作成してもよい。

【0056】

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

【0057】

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

【0058】

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

【0059】

インサイチュハイブリダイゼーションを利用して、複数のバイオマーカの差次的発現を測定してもよい。この方法は、組織切片の細胞において該当するmRNAの局在化を可能にする。この方法では、組織を凍結するか、又は固定して包埋し、その後、薄切片に切り出して、固体表面に配列及び付着させる。組織切片を、該当するmRNAとハイブリダイズする、標識されたアンチセンスプローブと共にインキュベートする。ハイブリダイゼー

ション及び洗浄ステップは、一般に、高ストリンジェント条件下で実施される。プローブは、別のタンパク質又は抗体により検出され得る発蛍光団又は低分子タグ（ビオチン又はジゴキシゲニンなど）で標識してもよく、それにより標識されたハイブリッドを顕微鏡下で検出及び視覚化してもよい。各アンチセンスプローブが識別可能な標識を有する場合には、複数の mRNA を同時に検出することができる。ハイブリッドされた組織アレイは、一般に、顕微鏡下でスキャンされる。癌対象から得た組織試料は、異成分からなる、即ち一部の細胞が正常で他の細胞が癌性であり得るため、組織における陽性染色細胞の割合を決定してもよい。この測定を、染色強度の測定と一緒に利用して、各バイオマーカの発現値を作成してもよい。

【 0 0 6 0 】

10

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

【 0 0 6 1 】

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

20

【 0 0 6 2 】

III. 定義

本明細書で用いられる「生物学的試料を得ること」又は「血液試料を得ること」は、例えば直接的又は間接的のいずれかで、生物学的試料又は血液試料を受け取ることを指す。例えば幾つかの実施液体において、血液試料又は末梢血単核細胞（P B M C）を含む試料などの生物学的試料は、生物学的試料を分析する実験室又は場所で、又はその付近で対象から直接得られる。他の実施形態において、生物学的試料は、第三団体により引き出され、又は採取され、その後、例えば分析用の別の物体又は場所に輸送されてもよい。別の実施形態において、試料は、ポイント・オブ・ケア試験を利用して、同じ場所で採取し、テストしてもよい。これらの実施形態において、前記採取は、例えば患者から、実験室から、診療所から、郵便物から、裁判所から、又は郵便局から、などにより試料を受け取ることを指す。幾つかのさらなる態様において、該方法は、対象に、保険者、担当医師、薬剤師、薬剤給付管理者、又は決定が該当し得る任意の人に、決定を報告することをさらに含み得る。

30

【 0 0 6 3 】

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

40

【 0 0 6 4 】

本明細書で用いられる「発現増加」は、適切な対照（例えば、非癌性組織又は細胞試料、参照標準）に比較して癌試料での発現レベルが上昇又は増加していて、遺伝子発現レベルの上昇又は増加が統計学的に有意であること（ $p < 0.05$ ）を指す。対照に比較した癌試料での遺伝子発現の増加が統計学的に有意であるかどうかは、適切な t 検定（例えば、一標本 t 検定、二標本 t 検定、ウェルチの t 検定）又は当業者に公知の他の統計学的検定を用いて決定することができる。癌において過剰発現される遺伝子は、例えば癌で過剰発現されることが公知である、又はこれまでに決定されている遺伝子であってもよい。

【 0 0 6 5 】

本明細書で用いられる「発現減少」は、適切な対照（例えば、非癌性組織又は細胞試料

50

、参照標準)に比較して癌試料での発現レベルが低下又は減少していて、遺伝子発現レベルの低下又は減少が統計学的に有意であること($p < 0.05$)を指す。幾つかの実施形態において、遺伝子発現レベルの低下又は減少は、遺伝子発現の完全な欠如又は発現レベルゼロであってもよい。対照に比較した癌試料での遺伝子発現の減少が統計学的に有意であるかどうかは、適切な t 検定(例えば、一標本 t 検定、二標本 t 検定、ウェルチの t 検定)又は当業者に公知の他の統計学的検定を用いて決定することができる。癌において過小発現される遺伝子は、例えば癌で過小発現されることが公知である、又は過去に決定されている遺伝子であってもよい。

【0066】

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

【0067】

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

【実施例】

【0068】

IV. 実施例

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

【0069】

実施例1 - 実験の手順

エクソソームの単離及び精製。エクソソームを過去に記載された分画遠心法により精製した(Thery et al., 2006; Luga et al., 2012)。手短に言えば、24h培養された細胞から得た上清を、800g及び2000gの連続遠心分離ステップに供して、培養瓶内で0.2 μ mフィルターを用いて上清をろ過した。エクソソームを、SW40Tiスイングバケットロータ(ベックマン)内で100,000gで2時間、ペレット化した。上清を廃棄して、1時間の洗浄ステップのためにPBSを添加した。ペレットをエクソソームについて分析した。RNA抽出用のエクソソームは、トリゾール500 μ lに再懸濁させ、タンパク質抽出用のエクソソームは、溶解緩衝液(8M尿素/2.5%SDS、5 μ g/mlロイペプチン、1 μ g/mlペプスタチン及び1mMフッ化フェニルメチルスルホニル)250 μ lに再懸濁させ、処置用のエクソソームは、PBSに再懸濁させた。凍結させた血清試料を氷上で解凍し、500 μ lをPBS 12mLに添加して、前述と同じ手順に従った。遠心分離により精製されたエクソソームを、RNase不含水に溶解された500g/mlプロテイナーゼK(シグマ-アルドリッチ)で処置し(37、60分間)、その後、該プロテアーゼを熱失活させて(60、10分間)、2g/mlプロテアーゼ不含RNase A(シグマ-アルドリッチ)と共にインキュベートして(37、15分間)、10倍濃縮されたRNase阻害剤(アンピオン)を添加した。エクソソーム処置については、エクソソームを2本ずつ精製し、一方のペレットをタンパク質精製に用いた。

【0070】

エクソソームのフローサイトメトリー分析。エクソソーム調製物(5~10 μ g)を4 μ m径アルデヒド/硫酸ラテックスビーズ(インターフェイシャル・ダイナミクス、オレ

10

20

30

40

50

ゴン州ポートランド所在) 5 μ l と共にインキュベートし、2 % BSA を含む PBS 400 μ l 中に再懸濁させた。エクソソームでコーティングしたビーズ (20 μ l) を以下の抗体: 抗 CD63 (サンタクルズ)、抗 CD9 (アブカム)、抗 TSG101 (アブカム)、抗 フロチリン-1 (サンタクルズ) と共に 4 で 30 分間インキュベートし、次いで必要であれば、FITC-コンジュゲート二次抗体と共にインキュベートして、FACS キャリバー・フローサイトメータ (BD バイオサイエンシズ) で分析した。

【0071】

エクソソームの電気泳動。総タンパク濃度 100 μ g (ブラッドフォードアッセイにより測定) のエクソソームと、ダイサー抗体 5 μ g (ポリクローナル SC-30226、サンタクルズ、カリフォルニア州所在)、アクチン抗体 5 μ g、又は pre-miRNA-21、-10b 及び cel1 10 μ g を、400 μ L の電気泳動緩衝液 (1.15 mM リン酸カリウム pH 7.2、25 mM 塩化カリウム、21 % オブティブレップ) 中に混合し、ジーンパルサー・エックスセル・エレクトロポレーションシステム (バイオラッド) を用いて 4 mm キュベット中で過去に記載された通り (Alvarez-Erviti et al., 2011) 電気泳動した。電気泳動の後、エクソソームを、適宜、プロテアーゼ K 及び/又は RNase で処置した。

【0072】

光散乱分光法 (LSS)。LSS スペクトルを、図 10B に記載された実験システムを利用して回収した。ファイニウム SC-450-2 広帯域スーパーコンティニウムレーザを、白色光源として用いた。スーパーコンティニウムレーザの光を、長焦点レンズにより試料に集光させた。エクソソーム又はマイクロスフェアのいずれかの懸濁液からなる試料を、特注の立方体形水晶サンプルホルダに入れた。バックグランドシグナルを、エクソソーム又はマイクロスフェアを含まない溶媒試料から回収した。エクソソーム又はマイクロスフェアにより入射光に対して 90° で散乱された光を、他の長焦点レンズで回収して、高効率性のアンドール・テクノロジー・イクソン DV885 EMCCD (Andor Technology ixon DV885 EMCCD) 検出器に連結されたプリンストン・インスツルメンツ・アクトン 2300i イメージング・スペクトログラフ (Princeton Instrument Acton 2300i imaging spectrograph) に送信した。検出は、470 ~ 870 nm 波長範囲で実施した。検出器をコンピュータで制御して、データを送信、保存及び処理した。

【0073】

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

【0074】

その後、エクソソームの PBS 懸濁液を用いた LSS 実験を実施した。エクソソームの実験的 LSS スペクトル及び対応するミーフィットを、図 1B に示す。再建されたスペクトルのフィットは、優れている。上述の再建技術を利用して (Fang et al.,

2003; Itzkan et al. 2007; Fang et al. 2007)、104 nmをピークとするエクソソームのサイズ分布が見出された(図1 Rの右グラフ及び挿入図)。この抽出されたサイズ分布を、類似のエクソソーム試料のTEM写真により実施された形態計測法(図1 A)と比較した。TEM写真での粒子数は、統計学的に意義のある分布をプロットするのに十分多くないため、50 nmよりも大きな平均粒子サイズは、TEM写真から計算して、95 nmであることが見出された。つまり、LSSで再建されたサイズ分布とエクソソームのTEM写真で実施された形態測定法は、全てのデータで一致している。

【0075】

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

【0076】

免疫金標識及び電子顕微鏡測定。最適な濃度の固定された標本を、300メッシュのカーボン/ホルムバールコーティンググリッドに滴下して、最低でも1分間、ホルムバールに吸収させた。免疫金染色では、グリッドをブロック/易透過ステップ用のブロッキング緩衝液中に1時間入れた。グリッドは、すすぐずに直ちに適切に希釈された一次抗体に4で一夜入れた(ポリクローナル抗ダイサー1:10 SC-30226、サンタクルズ;モノクローナル抗CD9 1:10、アブカム)。対照として、一部のグリッドを一次抗体に暴露しなかった。翌日、グリッドの全てをPBSですすぎ、その後、10 nm金粒子(オーリオン、ペンシルバニア州ハットフィールド所在)を付着させた適切な二次抗体の液滴に室温で2時間浮遊させた。グリッドをPBSですすぎ、0.1 Mリン酸緩衝液中の2.5%グルタルアルデヒド中に15分間入れた。PBS及び蒸留水ですすいだ後、グリッドを乾燥させ、酢酸ウラニルで対比染色させた。試料をテクナイ・バイオ・ツイン透過型電子顕微鏡(FEI、オレゴン州ヒルズボロ所在)で観察して、AMT CCDカメラ(アドバンスト・マイクロスコーピー・テクニク、マサチューセッツ州ダンバース所在)で撮像した

【0077】

タンパク質プロット及び抗体。内因性の遺伝子応答をモニタリングするために、細胞はRIPA緩衝液に採取し、エクソソームは8 M尿素/2.5%SDS、5 μg/mlロイペプシン、1 μg/mlペプスタチン及び1 mMフッ化フェニルメチルスルホン緩衝液に採取した。タンパク質をブラッドフォード定量法によりアクリルアミドゲルにロードし、湿式電気泳動転写によりPVDF膜(イモビロンP)に転写した。同位性異種移植片モデルから採取された血清エクソソームのタンパク質試料では、15 cm高の4%アクリルアミドゲルを用いて、ヒト及びマウスダイサーのバンドを分解した。概して、プロットをPBS/0.05%ツイーン中の5%脱脂粉乳を用いて室温で1時間ブロックし、以下の一次抗体と共に4で一夜インキュベートした:1:500抗ダイサー(SC-30226)、サンタクルズ;1:1000抗ユビキチン化タンパク質、クローンFK2ミリボア;1:500抗Fla g M2-ペルオキシダーゼ クローンM2、シグマ;1:500抗CD43 ab9088、アブカム;1:500抗PTEN、ab32199、アブカム;1:300抗CD9 ab92726、アブカム;1:500抗GADPH ab9483、アブカム;1:250抗TRBP ab72110、アブカム;1:300抗TSG101 ab83、アブカム;1:400抗AGO2 ab32381、アブカム;1:4000抗β-アクチンペルオキシダーゼ クローンAC-15、シグマ;1:500抗GFP ab6556、アブカム;1:500抗HOXD10 ab76897、アブカム。二次抗体を室温で1時間インキュベートした。抗体インキュベーション後の洗浄を、1×PBS0.05%ツイーン20と共にオービタルシェーカーで10分間隔で4回

実施した。プロットを、ピアースの化学発光試薬を用いて発光させた。

【0078】

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

【0079】

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

【0080】

miRNA発現分析では、RNA 10ngを、特異的miRNAプライマーを含むTaqManマイクロRNAリバーストランスクリプションキット試薬と混合して、製造業者の使用説明書（アプライド・バイオシステムズ）に従って逆転写した。反応混合物を16で30分間、42で30分間、及び85で5分間インキュベートした。リアルタイムPCRを、試験されている各miRNA用の市販のアッセイオンデマンド（アプライド・バイオシステムズ）を利用し、ABI PRISM 7300HTシークエンス・ディテクション・システム・インスツルメント（アプライド・バイオシステムズ）を用いて実施した。miRNAの発現を、RNA量及びインテグリティの内部対照として働く18S rRNA（TaqManブレデベロップド・アッセイ・リジェント；アプライド・バイオシステムズ）の発現に標準化させた。各測定は、三重測定で実施した。閾値サイクル（Ct）、つまり増幅されたターゲットの量が一定の閾値に達した部分サイクル数（fractional cycle number）を決定して、過去に報告された通り（Livak and Schmittgen, 2001）、 $2^{-\Delta C_t}$ 式を用いて発現を測定した。

10

20

【表 1 - 1】

表 1. qPCR プライマーのシーケンス

プライマー名	プライマーのシーケンス	SEQ ID NO:
BiG2 F	5' CAGGAGGTGGTGAAGGACAT3'	1
BiG2 R	5' CCCGTTGGTCTGTGAGTTT3'	2
TSG101 F	5' GATACCCTCCCAATCCCAGT3'	3
TSG101 R	5' GTCCTGACCGCAGAGATGA3'	4
Hrs F	5' AGTGGCTGTCGGGTATTCATC3'	5
Hrs R	5' CCGTCCATATCCCTTGAAGAATC3'	6
CD43 F	5' GCTGGTGGTAAGCCCAGAC3'	7
CD43 R	5' GGCTCGCTAGTAGAGACCAAA3'	8
hsa-アクチン F	5' CATGTACGTTGCTATCCAGGC3'	9
hsa-アクチン R	5' CTCCTTAATGTCACGCACGAT3'	10
mmu-アクチン F	5' GGCTGTATTCCCCTCCATCG3'	11
mmu-アクチン R	5' CCAGTTGGTAACAATGCCATGT3'	12
Pre-miR-let7-a F	5' AGGTAGTAGGTTGTATAGTTTTAGG3'	13
Pre-miR-let7-a R	5' TAGGAAAGACAGTAGATTGTATAGT3'	14
Pre-miR-15b F	5' AGCACATCATGGTTTACATGC3'	15
Pre-miR-15b R	5' CTAGAGCAGCAAATAATGATTGG3'	16
Pre-miR-26a F	5' TTCAAGTAATCCAGGATAGGCTGT3'	17
Pre-miR-26a R	5' TGCAAGTAACCAAGAATAGGCC3'	18
Pre-miR-31 F	5' TGAGTGTGTTTTCCCTCCCT3'	19
Pre-miR-31 R	5' GCCATGGCTGCTGTCAG3'	20
Pre-miR-125a F	5' GTCCCTGAGACCCCTTAACC3'	21
Pre-miR-125a R	5' AACCTCACCTGTGACCCCTG3'	22
Pre-miR-125b F	5' GTCCCTGAGACCCTAACTTG3'	23
Pre-miR125b R	5' AGCCTAACCCGTGGATT3'	24
Pre-miR-200a F	5' TTCCACAGCAGCCCCTG3'	25
Pre-miR-200a R	5' GATGTGCCTCGGTGGTGT3'	26
Pre-miR-200c F	5' CTCGTCTTACCCAGCAGTGT3'	27
Pre-miR-200c R	5' GTCATCATTACCAGGCAGTATTAG3'	28
Pre-miR-335 F	5' GTCAAGAGCAATAACGAAAAATG3'	29
Pre-miR-335 R	5' GAGGTCAGGAGCAATAATGAA3'	30
Pre-miR-10a, b F	5' TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG3'	31
Pre-miR-10a, b R	5' ATTCCCCTAGATACGAATTTGTGA3'	32

10

20

30

【表 1 - 2】

プライマー名	プライマーのシーケンス	SEQ ID NO:
Pre-miR-21 F	5' GCTTATCAGACTGATGTTGACTG3'	33
Pre-miR-21 R	5' CAGCCCATCGACTGGTG3'	34
Pre-miR-27a F	5' GCAGGGCTTAGCTGCTTG3'	35
Pre-miR-27a R	5' GGCGGAAGTTAGCCACTGT3'	36
Pre-miR-155 F	5' GTTAATGCTAATCGTGATAGGG3'	37
Pre-miR-155 R	5' GCTAATATGTAGGAGTCAGTTGGA3'	38
Pre-miR-373 F	5' CTCAAAATGGGGGCGCTT3'	39
Pre-miR-373 R	5' CACCCCAAAATCGAAGCACT3'	40
Pre-cel-1 F	5' CCACCCCGTTCTACATACTTC3'	41
Pre-cel-1 R	5' ACCGTACCGAGCTGCATACT3'	42

10

【0081】

ノーザンブロット。成熟miRNAに対する逆相補鎖の3' Bio[TEG]DNAオリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、ノーザンブロットを実施した(表2参照)。尿素/アクリルアミド15%ゲルを用いて、エクソソームRNA(DNase処置)40μgを1×RNAローディングダイと共に95で2分間、その後、氷上で2分間ロードした。マイクロRNAマーカを、製造業者(N2102、ニューイングランド・バイオラプズ)の使用説明書に従って使用した。TBE 1Xを使用して、電気泳動を4で3時間実施した。ワットマンブロッティングペーパー及びBrightStar-Plus正電化ナイロンメンブレン(アンピオン)を用い、TBE 0.5Xと共に、転写を4で2時間実施した。UVトランスルミネータを用いて、RNAを膜に20分間架橋させた。アンピオンのULTRAhyb(登録商標)-Oligoハイブリダーゼーション溶液(アンピオン)中、42で1時間回転させることにより、膜をプレイハイブリダイズした。プローブを氷上で解凍して、95で5分間インキュベートした後にハイブリダイゼーション緩衝液1mLあたりに、150ngを添加し、その後、膜を42で一晩回転させた。以下の洗浄を実施した: 2X SSPE/0.5%SDS - 15分間を2回; 0.2SSPE/0.5%SDS - 30分間を2回、及び2X SSPE - 5分間。これらの初期洗浄ステップの後、さらに洗浄し、その後、プロットをBrightStar BioDetectキットを用い、製造業者(アンピオン)の使用説明書に従って発光させた。プロットを2つの積層フィルムに一夜暴露した。プロットを上手く剥離させて、さらに2回再プローブした。

20

30

【表 2】

表 2. ノーザンプローブシーケンス

プローブ名	プローブのシーケンス	SEQ ID NO:
miR-10b	5' CACAAATTCGGTCTACAGGG3'	43
miR-21	5' TCAACATCAGTCTGATAAGCTA3'	44
miR-cel-1	5' AGTATGCAGCTCGGTACGGT3'	45
pre-miR-10b	5' TGAAGTTTTGCATCGACCATATATCCCCTAGAATCGAA3'	46
pre-miR-21	5' TGTCAGACAGCCCATCGACTGGTGTGCCATGAGAT3'	47
tRNAMet	5' CAGCACGCTTCGCTGCGCCACTCT3'	48

40

【0082】

細胞培養、プラスミド、pre-miRNA及びsiRNA。MCF10A、MCF7、MDA-MB231、A549、SW480及びHeLaヒト細胞株と、NMuMG、67NR及び4T1マウス乳房細胞株を、DMEM 10%FBS中で培養した(細胞は全て、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション-ATCCから得られた)。si

50

RNA用のリポフェクタミン2000試薬（インビトロジェン）を用いて、トランスフェクションを実施した。合成pre-miRNAトランスフェクションでは、RNAiFect（キアゲン）を、全ての細胞株で用いた。siRNAのシーケンスを表3に列挙する。

【表3】

表3. siRNAシーケンス

siRNA名	siRNAのシーケンス	SEQ ID NO:
Hrs	5' GGAACGAGCCCAAGUACAATT3'	49
Hrs	5' UUGUACUUGGGCUCGUUCCGG3'	50
TSG101	5' GUUUAUCAUUAAGUGUAATT3'	51
TSG101	5' UUACACUUGAAUGAUAACTG3'	52
CD43	5' GGAGAGCCUUUGGUCUCUATT3'	53
CD43	5' UAGAGACCAAAGGCUCUCCGG3'	54
AGO2	5' GGCGUUACACGAUGCACUUTT3'	55
AGO2	5' AAGUGCAUCGUGUAACGCCTG3'	56

【0083】

プラスミド。p-CMV-Tag4B-ダイサー（Melo et al., 2009）；オリジーンのp-CMV6-CD63-GFP（RG217238）；アドジーンのGFP-hAGO2（プラスミド11590）；オリジーンのpGFP-shBtg2（TG314697）；オリジーンのpGFP-shダイサー（TG304991）；合成pre-miR-10b、-21及びcel-1は、アンピオンから購入した；3'UTR-WTPTEN、3'UTR-ミュータント-PTEN（Dr. Joshua Mendellの実験室）、3'UTR-WTHOXD10及び3'UTR-ミュータント-HOXD10（Dr. Robert Weinbergの実験室）は、アドジーンから購入した。

【0084】

免疫細胞化学及び共焦点顕微鏡測定。カバースリップが挿入された12ウェルプレートに、細胞をほぼコンフルエントに播種して、一夜培養した。翌日、細胞を低温PBS 1Xで洗浄し、4%PFA/PBSを用いて室温で20分間固定した。スライドにPBS 0.5%トリトンX-100を室温で10分間浸透させ、BSA5%により室温で1時間ブロックし、PBST（PBS、0.1%トリトン）2%BSA中の一次抗体：1:100抗ダイサー（SC-30226）、サンタクルズ；1:500抗Flag、シグマ；1:50抗CD43 ab9088（アブカム）；1:100抗TSG101 ab83（アブカム）；1:500抗GFP ab6556（アブカム）；1:100抗LAPM-1 ab25630（アブカム）；1:100抗Hrs ab56468（アブカム）；1:100抗Btg2 ab75001（アブカム）；1:500抗ピオチン ab66233（アブカム）と共に4で一夜インキュベートした。二次抗体のヤギ抗ウサギAlexa543又はヤギ抗マウスAlexa-488を室温で1時間インキュベートし、PBST 2%BSAで1:200に希釈した。DAPIを用いて核を染色した。エクソソームの分析では、採取されたエクソソームをトリトンX-0.05%と共に室温で15分間、次に5%BSAと共に室温で1時間インキュベートした。最初の一次抗体（抗CD9、1:50）を100µl PBST中、4で一夜インキュベートし、二次抗体である抗Flag（1:50）を翌日に添加し、室温で1時間インキュベートした。二次抗体を連続して添加し、同じく室温で1時間インキュベートした。エクソソームを、4%PFAが入った12ウェルプレート中のカバースリップ上部で45分間平板培養し、低温PBSで洗浄した。同一設定を維持するためにリサイクルツールを利用して、ツイスLSM510アップライト・コンフォーカル・システムで画像を得た。エクソソームの凝集により、共焦点顕微鏡で可視となる200nmを超える構造が得られた。データ解析では、

少なくとも2つの独立した実験から得られたプールから画像を選択した。図は、代表的な視野を示す。

【0085】

インビトロダイシングアッセイ。エクソソームタンパク質抽出物(10 µg)を、3 mM MgCl₂、30 mM NaCl及び100 mM Hepes、pH 7.5の存在下、3 pmolのpre-miR-10b、-21及びcel-1 ビオチンで内部標識されたヘアピンと共に37 °Cでインキュベートした。各反応物の最終容量は、10 µlであった。ホルムアミドゲルローディング緩衝液10 µlの添加により、反応を停止させた。変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を利用してRNAを分解し、BrightStar BioDetectキットを用い、製造業者(アンピオン)の使用説明書に従って発光させた。

10

【0086】

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

【0087】

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

20

【0088】

miRNA発現アレイ。特注のmiRNAアレイを、9に記載された通り使用した。アレイは、1833のヒトマイクロRNAプローブ、1084のマウスマイクロRNAプローブ、及びその他の78の非コード化RNAプローブを含む。プローブは、二重にプリントした。各プローブに関連するGeneBankアクセションIDが含まれる。バイオインフォマティック分析を、R(バージョン2.14.2)(r-project.orgのワールドワイドウェブより)及びバイオコンダクター(bioconductor.org/のワールドワイドウェブより)を用いて実施した。各プローブの生データの強度は、バックグラウンド中央値を差し引いたピクセル強度の中央値特性である。オフセット1を設定することで、データを対数変換した後、負の値が確実に存在しなくなる。データをクォンタイル標準化した後、log₂変換した。同じmiRNAを測定するプローブからのシグナルを平均した。LIMMAライブラリーの機能を利用して、解析を実施した。made4ライブラリーのヒートプロット関数を利用して、ヒートマップを作成した。テクニカルレプリケートを実施すると、ヒートマップは、反復測定から得られた平均発現値を表した。

30

40

【0089】

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

【0090】

原発性腫瘍標本を、Hospital Universitari de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat, スペイン、バル

50

セロナ所在)から入手した。治験審査委員会が、試験を認可した。記入されたインフォームドコンセントを、患者から回収した。摘出された5つの代表的なヒト上皮性卵巢腫瘍(EOC):漿液性、類内膜、明細胞腫瘍及び粘液性腫瘍から得た非壊死性組織片(約 $2 \sim 3 \text{ mm}^3$)を選択して、10%FBS及びペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM(バイオウィットカー)中、室温で平板培養した。イソフルランで誘導された麻酔の下、動物を側部開腹術に供し、卵巢を露出させて、プロリン7.0縫合糸で腫瘍片を卵巢表面に固定した。さらに、ヒト乳房腫瘍及び子宮内膜腫瘍の切片を、それぞれ乳房脂肪体及び子宮内膜壁に移植した

【0091】

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

【0092】

免疫沈降。細胞及びエクソソームを採取し、PBSで洗浄して、それぞれ遠心分離又は超遠心分離して、ペレットを採取した。氷冷RIPA緩衝液又は8M尿素/SDS緩衝液を、それぞれ細胞及びエクソソームに添加した。懸濁液を細胞では4℃で15分間、エクソソームでは4℃で2時間、穏やかに振とうした。ライセートを予め冷却された遠心分離機において14,000gで15分間遠心分離して、ペレットを廃棄した。プロテインA又はGアガロース/セファロースビーズを、PBSで2回洗浄し、PBSを含む50%スラリーで復元した。ビーズ/スラリーミックス(100 μl)を細胞ライセート1mL及びエクソソームライセート500 μl に添加して、4℃で10分間インキュベートした。14,000 $\times$ gで4℃で10分間遠心分離することによりビーズを除去して、ペレットを廃棄した。ダイサー抗体(細胞5 μg 及びエクソソーム10 μg)を細胞ライセート500 μl 又はエクソソームライセート250 μl (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 細胞、10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ エクソソーム)に添加して、オービタルシェーカーにより4℃で一晩インキュベートした。プロテインA又はGアガロース/セファロースビーズスラリー100 μl を添加して、4℃で一晩放置した。遠心分離後、上清を廃棄して、ビーズを、細胞なら氷冷RIPA緩衝液で、又はエクソソームなら尿素/SDS緩衝液で、3回洗浄した。アガロース/セファロースビーズを5分間煮沸して、免疫複合体をビーズから解離させた。ビーズを遠心分離により回収して、タンパク質のプロットを上清で実施した。

【0093】

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

【0094】

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

【0095】

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

【0096】

実施例2 - 結果

エクソソームの単離及び同定。癌細胞(MDA-MB231トリプルネガティブヒト転

移性乳癌、MCF7ヒト乳房腺癌、67NRマウス非転移性乳癌及び4T1マウス転移性乳癌)から得たエクソソーム、及び対照細胞(MCF10A非腫瘍原性ヒト上皮性乳房及びNMuMG非腫瘍原性マウス上皮性乳房)を、確立された超遠心分離法を利用して単離した(図10A)(Luga et al., 2012; Thery et al., 2006)。採取されたエクソソームは、透過型電子顕微鏡測定(TEM)及び原子間力顕微鏡測定(AFM)により分析した。40~140nmサイズの粒子を、同定した(図1A~B)(Thery et al., 2002)。さらに、2種のエクソソームマーカ:TSG101及びCD9を検出することにより、エクソソームの同一性を確認した(図1C)(Ostrowski et al., 2010)。単離されたエクソソームは、免疫金標識電子顕微鏡測定により分析すると、CD9マーカに関しても陽性であった(図1A)。ラテックスビーズに結合されたエクソソームもフローサイトメトリーにより分析して、一般に用いられるエクソソームマーカであるテトラスパニン CD9、CD63、TSG101及びフロチリン1の表面発現を示した(図1D)。さらに、光散乱分光法(LSS)(Fang et al., 2007; Itzkan et al., 2007; Bang and Setabutr, 2010; Benitez-vieyra et al., 2009; Khairkar et al., 2010; Min et al., 2010)を用いて、単利された試料が直径104nmをピークとする狭いサイズ分布を呈することを示した(FIG. 1E、右パネル)。LSSシステムは、異なる直径のガラスマイクロスフェアを内部対照として用いることにより、エクソソーム抽出物中の全ての粒子サイズの正確な検出を可能にした。LSSはまた、これらの単離物中のマイクロ小胞体及び細菌又は細胞破片の潜在的混入を排除した(図1E、右グラフの挿入図参照)。さらに、そしてLSSデータと一致して、NanoSightナノ粒子トラッキング分析から、直径105±1.0nmをピークとするサイズ分布の粒子が明らかとなり(図1F)、ろ過されない場合に溶液中に存在する異なるサイズ範囲の潜在的混入物の存在がさらに排除された(図1F、右グラフ)。アポトーシス小体又はランダムな細胞破片が単離物に混入する可能性を排除するために、比色細胞生存率アッセイ(MTT)、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いたdUTPニックエンドラベリング(TUNEL)アッセイ、アネキシンV及びヨウ化プロピジニルのフローサイトメトリー分析、並びにエクソソームのチトクロムC免疫プロット(図10C~E)を利用して、エクソソーム抽出前の細胞生存率を示した。癌細胞から単離されたエクソソームは、過去に定義された通り(Lee et al., 2011)、集合的にオンコソームと称される。対照細胞から単離されたエクソソームは、集合的にノルモソームと称される。

【0097】

オンコソームは、ノルモソームに比較して発癌性miRNAが特異的に豊富に存在する。オンコソーム及びノルモソームの全体的なmiRNA量を調査した。エクソソームから単離されたRNAのマイクロフルイディクス分析から、ノルモソームに比較した場合の、オンコソームの低分子RNA量増加が明らかとなった(図2F)。さらに、ノルモソーム(MCF10A由来)のmiRNAレベルとオンコソーム(MDA-MB-231由来)のmiRNAレベルの間に低い相関が観察され、 R^2 値は0.35であった(図2A)。全体的miRNAアレイ分析から、ノルモソームと比較して、オンコソーム中でmiRNA量が豊富であることが示された。この分析では、ノルモソームと比較した場合のオンコソームの非常に異なるmiRNAプロファイルも明らかとなった。miRNAアレイデータは、オンコソームとノルモソームの間の305の差次的に発現されるmiRNA(表5)と共に、ノルモソームと比較した場合のオンコソーム中のmiRNA量の全体的な増加を示した。癌細胞は、非腫瘍原性細胞と比較して、総低分子RNAの全体量の減少を示したため、オンコソーム中でmiRNAが豊富であったことは、癌細胞中のmiRNA増加の単なる反映ではなかった(図11A)。それゆえエクソソーム中のmiRNAの蓄積は、特異的で、標的化されていると思われる。

【0098】

癌細胞中と、オンコソームとノルモソーム間にあるmiRNAアレイの差次的発現が見出されたこれらの細胞由来のエクソソームの15種のmiRNAの発現を、さらに評価した(表4及び5)。癌進行において示唆されてきたこれらの採取物から得られた6種のmiRNA(発癌性miRNA: miR-10a、miR-10b、miR-21、miR-27a、miR-155及びmiR-373)及び9種のmiRNAは、腫瘍抑制機能を有することが報告されており(腫瘍サプレッサmiRNA: let7a、miR15b、miR26a、miR31、miR125a、miR125b、miR200a、miR200c、miR335)、細胞、及びそれらの細胞由来のエクソソーム中で発現される(図11B~C、及び表4)。エクソソーム中のmiRNAの半減期を決定するために、無細胞系を開発して、単離されたエクソソーム中のmiRNAを試験した。細胞を含まない精製されたエクソソームを培地に入れ、37℃で24h又は72hのいずれかの時間、インキュベートした。インキュベーション時間の後、エクソソームをmiRNA量について分析して、それらの起源の細胞と比較した。24hに比較して72hでは、細胞に比較してオンコソーム中でこれらのmiRNAの相関値の減少が存在したが($R^2 = 0.60$ 対 $R^2 = 0.43$)、ノルモソームとMCF10A細胞(ノルモソームを得るために用いられた細胞)の間には、高い相関が維持された($R^2 = 0.98$ 対 $R^2 = 0.98$)(図2B)。6種の分析された発癌性miRNAの顕著なアップレギュレーションが、24h培養のオンコソームに比較し、排他的に72h培養のオンコソームで観察され、MDA-MB231及び4T1由来オンコソームはの平均倍率変化はそれぞれ17.6及び13.2であったことから、時間に伴うオンコソーム中miRNA量の特異的増加が裏づけられた(図2C中央及び下グラフ、並びに図11D右、上及び下グラフ)。オンコソームを24h又は72hのいずれかで培養した場合に、腫瘍抑制miRNAについて、有意でない差が認められた(図2C及び図11D)。ノルモソームは、培養時間とは無関係に、miRNA量の任意の差を示さなかった(図2C及び図11D)。15種のmiRNA全ての存在が、72h培養のノルモソームとそれが得られた細胞とで同一であり、相関係数は0.93であった(図2E左)。MDA-MB231及び4T1エクソソームの相関係数は有意に低く(それぞれ $r^2 = 0.56$ 及び 0.42)、時間に伴うオンコソーム中miRNAレベルの特異的变化が裏づけられた(図2E中央及び右)。さらに、オンコソームをMCF7($r^2 = 0.76$)、MDA-MB231($r^2 = 0.56$)、67NR($r^2 = 0.64$)及び4T1($r^2 = 0.42$)と比較すると、細胞株の悪性度上昇に伴い相関レベルが低下する(図2E及び図11E)。それゆえ、ノルモソームのmiRNA量は、全ての時間で起源細胞を反映したが、オンコソームは、細胞に非依存的に時間に伴いmiRNA量が変化した。

【0099】

MDA-MB231及び4T1オンコソームのmiRNA量をMCF10A及びNMuMG細胞のノルモソームのそれと比較すると、24h培養されたオンコソーム中で発癌性miRNAが豊富であることが観察され、平均倍率変化がそれぞれ2.7及び2.0であった(図11B)。72hの時点では、それぞれMCF10A及びNMuMG由来ノルモソームに比較して、MDA-MB231及び4T1由来オンコソーム中の発癌性miRNAで、3.0及び18.2の平均倍率変化が検出された(図11B)。ノーザンブロットで、オンコソーム中で排他的に発癌性miR-10b及びmiR-21のアップレギュレーションが確認され、miRNAアレイ及びqPCR分析の両方が裏づけられた(図2D)。

【0100】

オンコソームは、pre-miRNA及びコアRLCタンパク質を含む。単離されて間もないオンコソームの無細胞培養ではmiRNAの増加が得られ、エクソソームの活性バイオジェネシスが示唆された。さらにマイクロフルイディクス分析からも、より大きなRNA分子の存在が示唆された(図2F)。それゆえノルモソーム及びオンコソーム調製物中のpre-miRNAの潜在的な存在を模索した。単離後24h又は72hのエクソソームの無細胞培養を実施して、可能性のある任意の余分なエクソソームRNAを消耗するた

めにRNAse処置に供した。これに続いて、エクソソーム中のpre-miRNAを検出した。分析されたpre-miRNAは、過去に評価された15種の成熟miRNA(表4)に対応するものであった。

【表4】

表4. オンコソームとノルモソームで差次的に発現される15種のmiRNA

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

【0101】

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

【0102】

培養されたエクソソーム中のpre-miRNAのプロセッシングが、直後ではなく24h後に開始する理由を理解するために、エクスポーティン-5(XPO5)に関してサイレンシングされたMDA-MB231細胞中の6種のmiRNA全てをモニタリングした

(図12C及びD)。XPO5は、核から細胞質へのpre-miRNA輸送を担う(Yiet al., 2003)。XPO5のサイレンシングは、核から細胞質へのpre-miRNAの流れを妨害し、核から新しい細胞質pre-miRNAのを導入せずに細胞質pre-miRNAのプロセシングの評価を可能にする。マイクロRNA-21を、遠心分離前後のMDA-MB231s i XPO5細胞中でモニタリングし(図12C及びD)、それをエクソソーム単離の条件を模倣して4で3時間実施した。非遠心分離細胞に対して遠心分離細胞の間に、miR-21の有意なアップレギュレーションが同じ時点で観察されなかったが、前者の細胞には24hのラグタイムがある(図12C及びD)。つまり、細胞及びエクソソームの両方が、pre-miRNAのプロセシングを開始するのに、4での遠心分離のストレスから回復する期間を必要とする。そのような順化は、組織培養継代の後の培養細胞中の酵素活性に関して予測される。

10

【0103】

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

20

30

【0104】

ダイサータンパク質は、MCF10A及びMDA-MB231細胞において、N末端Flagタグが過剰発現された(図13C)。免疫プロットティング及び共焦点顕微鏡測定ではさらに、Flag-ダイサータンパク質の存在がオンコソーム中で特異的に確認され、ノルモソームではされなかった(図4C)。細胞内Ca²⁺レベルの上昇は、エクソソーム分泌を刺激する(Savina et al., 2003)。Ca²⁺イオノフォアA23187を、MCF10A及びMDA-MB231細胞の培地に添加して、エクソソームを採取した。本発明者らは、CD9発現による判断としてエクソソーム生成の有意な増加を観察した(図4D)。ダイサータンパク質は、オンコソーム中で検出されたが、ノルモソームではされなかった(図4D)。これらの結果から、これがエクソソームの量ではなく、内容物というよりむしろダイサー蓄積をもたらす特異的メカニズムを決定することがさらに示唆された。加えて、ダイサー発現は、MCF10A及びMDA-MB231細胞中の2つのショートヘアピン構築物の安定した発現を介して減少した(図13D~E)。MDA-MB-231shダイサー細胞に由来するオンコソームは、免疫プロットティング及び免疫金標識により検出されたshスクランブル又は親MDA-MB-231細胞

40

50

胞に比較して、有意に少ないダイサーを含んでいた（図4E～F）。同じくダイサーは、MCF10Ashダイサー細胞由来のノルモソーム中では検出されなかった（図4E）。

【0105】

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

【0106】

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

【0107】

オンコソームはRLCを利用してpre-miRNAをプロセッシングし、成熟miRNAを生成する。pre-miRNAから成熟miRNAを生成するために、オンコソーム中のRLCタンパク質（ダイシング及びサイレンシングの特性）の機能性を試験した。ダイサーが欠如したエクソソームを、MCF10Ashダイサー細胞、MDA-MB231shダイサー細胞及び4T1shダイサー細胞から抽出した（図14A）。pre-miRNA及びmiRNA量から、ダイサーの任意の有意な変化が時間と共にエクソソームをダウンレギュレートすることは明らかにならず、オンコソーム中にダイサーが存在しなければ、pre-miRNAがプロセッシングされてmiRNAを生成することがないことが示された（図5A～B及び図14B～C）。次に、電気穿孔により坑ダイサー及び坑TRBP抗体をエクソソームに挿入して、エクソソームの外側での抗体の存在を回避するために電気穿孔後にプロテイナーゼKで処置された坑アクチン対照抗体で電気穿孔されたオンコソーム及びノルモソームと比較した（図5C）。対照坑アクチン抗体で電気穿孔されたオンコソームは、これまで言及された通りpre-miRNA及びmiRNAレベルで同じ変動を示した（図5D～E及び図14D～E）。坑ダイサー及び坑TRBP抗体を有するオンコソームにおいて、pre-miRNA及びmiRNAレベルの有意でない変化が、時間に伴って観察され、pre-miRNAプロセッシングの障害が示唆された（図5D～E及び図14D～E）。72h無細胞培養後に、オンコソーム（MDA-MB231由来）、坑ダイサー抗体で電気穿孔されたオンコソーム（MDA-MB231由来）、及びノルモソーム（MCF10A由来）のmiRNA発現アレイにより、総miRNA量を評価した。坑ダイサー抗体を有するオンコソームの総miRNA量は、MDA-MB231由来オンコソーム（ $R^2 = 0.48$ ）よりもMCF10Aノルモソームに（ $R^2 = 0.79$ ）より類似していた。オンコソームを、坑ダイサー抗体を含むオンコソームと比較すると、198の差次的に発現されたmiRNAが観察され、そのうち48%は、有意にダウンレギュレートされた（表6）。これらのうちの19%は発癌性であり、1%だけが、過去に発行された文献に基づき腫瘍抑制性を有することが報告されている（図14F、表6

）。

【0108】

pre-miRNAを成熟miRNAに変換する酵素反応が自然発生的であり、3種のRLCタンパク質、組み込まれたpre-miRNA、及びエクソソーム中に存在するタンパク質Hsp90以外の任意の因子を必要としない(Maniatiki and Mourelatos, 2005; McCready et al., 2010)。これをさらに確認するために、オンコソームを、Hsp90活性を選択的に阻害する薬物ゲルダナマイシンを用いて電気穿孔した(Miyata, 2005)。ゲルダナマイシンの存在下で合成された成熟miRNAの量の有意な減少が、対照との比較の際に見出された(図6A)。成熟miRNA発現に及ぼすHsp90タンパク質の影響は、2つの重

10

【0109】

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

20

【0110】

癌細胞内の細胞質CD43はダイサーの動員に寄与する。多小胞体(MVB)は、形質膜との融合の際に最終的にエクソソームとして放出されるエクソソームを含む細胞内オルガネラである(Pant et al., 2012)。RISCタンパク質をエンドソームに動員させ、次にエクソソーム中に放出させる可能なメカニズムを探索した。最初に、ダイサーが対照細胞と比較して癌細胞中のMVBと会合するかについて探索した。MVBのマーカと併せたダイサーの細胞内分布、及びエクソソームのバイオジェネシス経路を比較した。Hrs及びBiG2は、早期エンドソームマーカであり、TSG101は、MVBのマーカである(Razi and Futter, 2006; Shin et al., 2004)。ダイサーは、MDA-MB231及び4T1細胞内でHrs、BiG2及びTSG101と共局在化した(図16A)。外来的に送達されたN-ローダミン標識ホスファチジルエタノールアミン(NRhPE)は、細胞に取り込まれ、MVB内に保持される(Sherer et al., 2003)。MDA-MB231及び4T1細胞内で染色されるダイサーは、大部分がMVB内でNRhPEと共局在化し、最終的にエクソソームを生成する。これらのデータは、ダイサー、TRBP及びAGO2が後期エンドソーム/MVB画分中に現れた、共画分試験における過去の観察と一致している(Shen et al., 2013)。これに反して、対照細胞(NMuMG及びMCF10A)中には、ダイサーとHrs、BiG2、TSG101又はNRhPEとの共局在化が存在しなかった(図16A)。さらにMDA-MB231及びMCF10A細胞において、Hrs及びTSG101遺伝子を2つの異なるsiRNAを用いてサイレンシングし、BiG2遺伝子を2つの異なるshRNAを用いてサイレンシングし、ダイサー

30

40

50

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

【0111】

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

【0112】

タンパク質にMVB及びエクソソームを標的化させるシグナルは、大部分が未知である。近年になり、CD43などの様々な形質膜のアンカータンパク質が、MVB及びエクソソームへのタンパク質輸送の可能なメディエータとして推測された(Shen et al., 2011b)。CD43は、主に癌細胞内で高度に発現される白血球膜貫通シアログリコプロテインである(Shen et al., 2012)。CD43は、乳癌をはじめとする多くの固形腫瘍で検出され、癌の進行及び転移と相関する(Shelley et al., 2012)。本発明者らはCD43がMVBへのRISCタンパク質の輸送に寄与し得るかについて探求した。本発明者らは、ダイサーがMDA-MB231細胞内でCD43タンパク質と共に免疫沈降することを示している(図9A)。CD43が、MCF10A及びMDA-MB231細胞内でsiRNAを用いてダウンレギュレートされる際に、ダイサーレベルがオンコソーム中で有意に減少し(図9B及び16H)、ダイサータンパク質は核及び細胞質に蓄積される。ダイサーmRNA発現のダウンレギュレーションは、siHrs、shBiG2及びsiTSG101を用いる前の観察と同様に、MDA-MB231 siCD43癌細胞内で観察されたが、MCF10A siCD43非腫瘍原性細胞では観察されなかった(図16I)。

【0113】

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

ムで処置されたMCF10Aの全体的トランスクリプトームのプロファイリングは、MDA-MB231細胞により類似している。mRNA発現プロファイルにおけるそのような少なからぬ変化は、MCF10A細胞がダイサー抗体を含むMDA-MB231オンソームに暴露された時に逆行され、発現パターンが、親MCF10A細胞により再度クラスタリングする。

【0114】

親MCF10A細胞と比較した、MDA-MB231オンソームに暴露されたMCF10A細胞におけるmiRNA及びmRNA発現プロファイルの綿密な分析から、処置されたMCF10A細胞内での特定のmiRNAの有意なアップレギュレーション、及び記載されたmRNAターゲットのダウンレギュレーションが明らかとなった。例として、miRNA-21及び-10bは、他の発癌性miRNAと共に、処置されたMCF10A細胞内でアップレギュレートされた（それぞれ4.6倍及び2.3倍）。マイクロRNA-21及び-10bは、乳癌の進行、侵襲性及び転移において示唆された（Ma et al., 2007; Yan et al., 2011）。以前に示された通り、miR-21及び-10bは、pre-miRNAから得たオンソーム中で合成された。PTEN及びHOXD10は、miR-21及びmiR-10bターゲットとして記載されており、対照MCF10A細胞と比較すると、オンソームにより処置されたMCF10A細胞の発現アレイ分析において抑制された。ウェスタンブロット分析から、PTEN及びHOXD10レベルが、オンソームに暴露されたMCF10A細胞において抑制されていることが示された（図7A～B）。オンソーム中のmiR-21及びmiR-10bがMCF10Aレシピエント細胞におけるPTEN及びHOXD10をサイレンシングし得るかについて検査するために、MCF10A細胞を、miR-21及びmiR-10bへの結合が可能なPTEN又はHOXD10遺伝子の野生型3'-UTRを含むルシフェラーゼレポーターで一過性にトランスフェクトした。PTEN又はHOXD10ベクターの変異体3'-UTRを、対照として用いた。ルシフェラーゼレポーター活性の低下が、オンソームと共にインキュベートされたMCF10A細胞で認められ、オンソームからレシピエント細胞へのmiRNAの機能的送達を確認された（図7C）。オンソームと共にインキュベートされた細胞において、PTEN及びHOXD10発現レベルを異なる時点で評価した。72h培養されたエクソソームによる細胞処置の直後に、PTEN及びHOXD10発現において有意な減少が検出された（図7A～B）。PTEN及びHOXD10発現レベルは、単離されて間もないエクソソームで処置されたMCF10A細胞では極わずかな変動となり、十分な濃度の成熟miRNAがこの時点で存在しなかったことが示唆される（図17B～C）。坑ダイサー抗体と共に72h培養されたオンソームで処置されたMCF10A細胞は、PTEN及びHOXD10の有意でないダウンレギュレーションを示した（図7D及び17G）。加えて、MDA-MB231由来オンソーム中で検出されなかったmiRNAである、細胞中のmiR-15のプロセッシングは、ダイサー抗体を含むMDA-MB231エクソソームによるMCF10A細胞の処置により改変せず、処置された細胞におけるダイサー抗体の有意でない影響が示された（図17D）。幾つかの報告では、エクソソームと共にインキュベートされた細胞内では、長時間培養を必要とせずに、miRNAターゲットのダウンレギュレーションが示されている（Kosaka et al., 2013; Narayanan et al., 2013; Pegtel et al., 2010）。miR-182-5pは、オンソーム処置によりMCF10A細胞においてアップレギュレートされたmiRNAの1種であり、miR-182-5pターゲットであるSmad4（Hirata et al., 2012）は、これらの細胞のオンソーム処置によりダウンレギュレートされた遺伝子の1種である（図7E）。培養時間中のmiR-182-5pのアップレギュレーションは観察されず、pre-miR182-5pは、オンソーム中で検出されなかった（図17E）。それゆえオンソームは、pre-miRのプロセッシングを必要とせずに成熟miRNAも含有している。そのような成熟miRNAが関連の理論量で存在する場合、それらは、これまで示された通りレシピエント細胞の遺伝子発現を調節することが可

10

20

30

40

50

能かもしれない (Ismail et al., 2013; Kogure et al., 2011; Kosaka et al., 2013; Narayanan et al., 2013; Pegtel et al., 2010; Valadi et al., 2007; Zhang et al., 2010)。しかし、一部の成熟 miRNA が、エクソソーム中に存在せず、それらの pre-miRNA が存在すれば、これらは成熟 RLC 会合 miRNA にプロセッシングされるため、ターゲットに対して尚も生物学的影響を有し得る。

【0115】

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

【0116】

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

【0117】

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

【0118】

MDA-MB231 細胞からのオンコソームを、ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) と共にインキュベートした。オンコソームとインキュベートされた線維芽細胞の全体的な遺伝子発現プロファイリングは、対照と比較して、トランスクリプトームへの有意な影響が示す。α-SMA (ACTA) (18 倍)、COL1A1 (12 倍)、TGFβ1 (15 倍)、CTGF (8 倍)、Ras (6 倍) 及び ERK (4 倍) のアップレギュレーションが観察された。オンコソームと共にインキュベートされた線維芽細胞は、高速で増殖した (図

10

20

30

40

50

8 I)。これらの結果から、オンコソームが、筋線維芽細胞表現型と類似していてカルチノマ結合線維芽細胞と関連する特徴的な性質を示す、間質線維芽を活性化し得ることが示唆される。

【0119】

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

【0120】

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

【表5-1】

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

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

10

20

30

【表 5 - 2】

miRNA	p値	
mmu-miR-615-3p	9.08E-06	
hsa-miR-1260b	1.06E-05	
mmu-miR-1937a	1.36E-05	
mmu-mir-321-A	1.54E-05	
hsa-miR-615-3p	1.80E-05	
hsa-miR-1979	2.10E-05	
mmu-miR-1937b	2.72E-05	10
hsa-mir-373	3.15E-05	
mmu-miR-1937c	3.28E-05	
hsa-miR-1273d-P	3.68E-05	
mmu-miR-720	4.08E-05	
mmu-miR-1274a	4.45E-05	
hsa-mir-565-A	6.63E-05	
mmu-miR-1931	6.77E-05	
hsa-miR-1246	7.35E-05	
hsa-mir-594-P	7.56E-05	20
hsa-mir-321-A	7.83E-05	
mmu-miR-2145-1-P	9.36E-05	
hsa-mir-639-P	9.54E-05	
hsa-miR-720	0.000112771	
hsa-miR-1280	0.000116	
mmu-miR-3473	0.000136388	
hsa-miR-1260	0.000178848	
hsa-miR-1281	0.000193167	
mmu-miR-1224-P	0.00019941	30
mmu-miR-690	0.000223064	
hsa-miR-375-P	0.000242513	
hsa-miR-4301	0.000254614	
mmu-miR-700	0.000322167	
mmu-miR-125b-5p	0.000333431	
mmu-miR-1191-P	0.000412736	
hsa-miR-1274a	0.000420621	
hsa-miR-3197	0.00042765	
mmu-miR-1935	0.000459256	
hsa-miR-1975-P	0.000467699	40
hsa-miR-4324	0.000595518	
hsa-miR-886-3p	0.00060906	
hsa-miR-1274b	0.000643024	
mmu-miR-1957	0.000679996	
hsa-miR-933	0.000752624	

【表 5 - 3】

miRNA	p値	
hsa-mir-675	0.000775607	
hsa-miR-595	0.000835784	
mmu-miR-2137	0.000867405	
hsa-mir-572-P	0.000935968	
mmu-miR-1195	0.000971222	
hsa-miR-4294-P	0.001008217	
mmu-mir-1899-P	0.00104201	10
mmu-miR-689-P	0.001048727	
hsa-miR-199b-3p	0.001330193	
hsa-miR-3117-P	0.001331776	
mmu-mir-321-P	0.001407081	
mmu-miR-1961-P	0.001479699	
hsa-mir-10a	0.001756816	
mmu-miR-669d-P	0.001842801	
mmu-miR-1937b-2-P	0.001855411	
hsa-miR-3125-P	0.00206976	20
mmu-miR-1934-P	0.002222993	
hsa-miR-574-3p	0.002231887	
hsa-miR-718	0.002533178	
mmu-miR-1198	0.002640837	
mmu-miR-2182-P	0.002722356	
hsa-miR-1273	0.002723198	
mmu-miR-2133-P	0.002794947	
hsa-miR-92b*	0.003046008	
hsa-miR-1290	0.003307286	30
hsa-miR-448	0.003318093	
mmu-miR-689	0.003367203	
mmu-miR-449a	0.003657703	
mmu-miR-1937b-4-P	0.004021961	
hsa-miR-4286	0.004068181	
mmu-miR-1947	0.00408589	
mmu-miR-342-3p	0.004178728	
hsa-miR-1303-P	0.004771531	
mmu-miR-2132	0.004826438	40
hsa-miR-4321-P	0.004925885	
hsa-miR-4256-P	0.004994658	
hsa-miR-4311	0.005120539	
mmu-miR-130a	0.005138148	
mmu-miR-1939	0.005186979	
hsa-miR-1268-P	0.005383176	

【表 5 - 4】

miRNA	p値	
mmu-miR-31	0.005491579	
mmu-miR-99b	0.005498217	
mmu-miR-2141	0.005742427	
hsa-miR-1202-P	0.005825202	
mmu-miR-466b-3p	0.005831681	
mmu-miR-2133	0.005962416	
hsa-miR-1268	0.006022349	10
hsa-miR-466	0.006338384	
mmu-miR-494	0.006386665	
hsa-miR-1289	0.006571828	
hsa-miR-320b	0.006612583	
hsa-miR-4254	0.006670963	
hsa-mir-7-3-P	0.00673441	
hsa-miR-923	0.006748425	
hsa-miR-764	0.006790693	
mmu-miR-291a-3p	0.007141562	20
mmu-miR-883b-3p	0.007204478	
hsa-mir-594-A	0.00721747	
mmu-miR-1948-P	0.007524668	
hsa-miR-206	0.007553353	
hsa-mir-565-P	0.007700663	
mmu-miR-467e*	0.00778865	
hsa-miR-1826	0.007812174	
mmu-miR-467a*	0.007840082	
mmu-miR-1983	0.007889552	30
hsa-miR-324-5p	0.008058633	
mmu-let-7c	0.008070282	
mmu-miR-1965	0.00810043	
hsa-mir-632-P	0.008277449	
hsa-miR-181a*MM2GT/AC	0.008292477	
hsa-miR-1265	0.008367622	
hsa-miR-323b-5p	0.008373161	
hsa-mir-1914	0.008444953	
hsa-mir-1910	0.008458754	40
hsa-miR-21	0.008557419	
hsa-miR-431*	0.008595529	
hsa-miR-3135-P	0.008851151	
mmu-miR-187-P	0.009290275	
mmu-miR-126-3p	0.009334952	
mmu-miR-669a-P	0.00943601	

【表 5 - 5】

miRNA	p値	
hsa-miR-367	0.009568574	
mmu-mir-320-P	0.009788835	
hsa-miR-181a*MM1G/C	0.009821714	
mmu-miR-484-P	0.009847016	
mmu-miR-467c-P	0.010318688	
hsa-miR-3154	0.010452692	
mmu-miR-466d-3p	0.01047819	10
hsa-miR-3162-P	0.010642567	
mmu-miR-201	0.010827783	
mmu-miR-1946a	0.010877863	
hsa-miR-937	0.011009279	
hsa-miR-3147	0.011883963	
hsa-mir-596-P	0.012205467	
hsa-miR-3148	0.012245577	
hsa-miR-1304	0.012451991	
hsa-miR-222MM2GG/AC	0.012512207	20
mmu-miR-125a-5p	0.012630083	
hsa-miR-1272-P	0.012893462	
hsa-miR-638	0.012956727	
hsa-mir-320	0.013366703	
hsa-miR-545*	0.013713081	
hsa-mir-1908-P	0.01374103	
hsa-let-7d-v2-P	0.013846844	
mmu-mir-30d-P	0.014771375	
hsa-miR-4297	0.015365603	30
mmu-miR-182	0.015432962	
hsa-miR-3166-P	0.015893116	
hsa-miR-494	0.015960208	
mmu-miR-669o-P	0.016133286	
hsa-miR-566	0.01616152	
mmu-miR-1188	0.016736136	
mmu-miR-2134-AP	0.016811955	
hsa-miR-4259-P	0.016856716	
mmu-miR-152	0.01715464	40
mmu-miR-2134	0.017178929	
hsa-miR-3193-AP	0.017496022	
hsa-miR-125b	0.017917521	
hsa-miR-3124-P	0.018466818	
hsa-miR-10b	0.018671177	
hsa-miR-455-5p	0.018771585	

【表 5 - 6】

miRNA	p値	
mmu-miR-144	0.019121516	
hsa-miR-130a	0.019424172	
hsa-miR-1285	0.019710834	
hsa-miR-516b*	0.020003951	
hsa-miR-27a	0.020049082	
hsa-miR-138-1*	0.020302422	
mmu-miR-471	0.020513954	10
hsa-miR-4298-P	0.020520647	
hsa-miR-301b	0.0205242	
hsa-mir-147-P	0.020570657	
hsa-miR-362-5p	0.020602873	
mmu-mir-471-P	0.020639505	
mmu-miR-466a-3p	0.020737186	
hsa-miR-561	0.020878532	
hsa-miR-486-5p	0.021122352	
mmu-miR-2861	0.021313137	20
hsa-miR-587	0.021396357	
mmu-miR-375	0.021423748	
hsa-mir-329-2-P	0.021718025	
mmu-miR-2861-P	0.022230123	
hsa-miR-144*	0.022500042	
hsa-miR-1255a-P	0.022928296	
hsa-mir-519a-2-P	0.023328916	
hsa-miR-34c-5p	0.023452529	
mmu-miR-466e-3p	0.023486196	30
mmu-miR-743b-5p	0.023621503	
mmu-mir-350-P	0.023797354	
mmu-miR-181d	0.024929082	
hsa-miR-376a*	0.025160569	
hsa-miR-1308-P	0.025400926	
mmu-miR-467g	0.025684158	
mmu-miR-1946a-P	0.025903246	
hsa-miR-147-P	0.025981647	
hsa-miR-923-P	0.026407247	40
mmu-miR-465c-5p	0.026498492	
hsa-miR-891a	0.026826475	
hsa-miR-28-5p	0.026908406	
hsa-miR-4292	0.02699168	
mmu-miR-677-P	0.027117156	
hsa-miR-4257	0.027412394	

【表 5 - 7】

miRNA	p値	
hsa-miR-4326	0.027447003	
hsa-miR-17*MM2GG/AA	0.02747134	
hsa-miR-939-P	0.027590618	
mmu-miR-2182	0.027770773	
hsa-miR-220c-P	0.027834269	
hsa-miR-3132-P	0.027949304	
hsa-miR-532-5p	0.028123552	10
mmu-miR-1947-P	0.028342198	
mmu-miR-29a	0.028448253	
hsa-miR-3162	0.028472579	
hsa-miR-375MM1C/G	0.028539316	
hsa-miR-768-3p	0.028631264	
mmu-miR-182-P	0.028668937	
mmu-miR-205-P	0.029630816	
hsa-miR-505	0.029688956	
hsa-miR-3146-P	0.02981021	20
mmu-miR-721	0.029874269	
mmu-miR-376c	0.030446032	
hsa-miR-1179-P	0.030947356	
mmu-miR-1970	0.030975459	
hsa-miR-3133-P	0.031120572	
hsa-miR-200c	0.031203313	
hsa-miR-220a	0.031358991	
mmu-miR-100	0.031556595	
hsa-miR-1255b	0.031601448	30
hsa-miR-222MM1G/A	0.031650652	
hsa-miR-885-3p	0.031822949	
hsa-miR-517b	0.032138191	
hsa-miR-200a	0.032181877	
hsa-miR-3141	0.032551657	
mmu-miR-669h-3p	0.033076965	
hsa-miR-1301	0.033141515	
hsa-miR-877	0.033292052	
hsa-mir-941-2	0.033355824	
hsa-mir-487b-P	0.033372231	40
hsa-miR-4302	0.033621907	
hsa-miR-99b	0.033827759	
hsa-miR-1253	0.034018422	
hsa-let-7a*	0.034034943	
hsa-miR-34aMM2CT/TC	0.034301895	

【表 5 - 8】

miRNA	p値	
hsa-miR-3181-P	0.034366501	
hsa-miR-3200	0.034397879	
hsa-miR-3129-P	0.034538091	
hsa-miR-93*	0.03464146	
hsa-miR-548q-P	0.035140723	
mmu-miR-466g	0.035388049	
mmu-miR-155	0.035624947	10
hsa-miR-2278-P	0.03584678	
hsa-miR-3065-5p	0.035885091	
hsa-miR-633	0.035994294	
hsa-miR-4265	0.036055664	
mmu-miR-2135-P	0.036119609	
hsa-miR-190	0.036305474	
mmu-miR-669f	0.036533893	
hsa-miR-1323	0.036541729	
hsa-miR-588	0.036661363	20
mmu-miR-183*	0.037276389	
hsa-mir-941-4	0.037411697	
hsa-mir-1913	0.037527439	
hsa-miR-2116*	0.037682483	
hsa-miR-1178	0.037847724	
mmu-miR-196a	0.038163687	
mmu-miR-574-3p	0.038418252	
hsa-miR-346	0.038809144	
mmu-miR-1199	0.039417628	30
mmu-miR-681	0.039465517	
hsa-miR-4292-P	0.039841449	
hsa-miR-522	0.040524939	
hsa-mir-611-P	0.040860413	
hsa-miR-3171	0.040895673	
hsa-miR-635	0.041506047	
hsa-miR-1197-P	0.041944121	
hsa-miR-604	0.04380685	
mmu-let-7a*	0.043829675	40
hsa-miR-335	0.043971349	
mmu-miR-466c-3p	0.044407376	
mmu-miR-466i	0.044504428	
hsa-miR-1297	0.04456723	
mmu-miR-338-5p	0.044824503	
hsa-mir-526a-2-P	0.044992512	

【表 5 - 9】

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

【表 6 - 1】

表 6. オンコソーム (MDA-MB 231 由来) とダイサー抗体を含むオンコソーム (MDA-MB 231 由来) の間で差次的に発現された miRNA

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

【表 6 - 2】

miRNAs	倍率変化	
mmu-miR-467a*	7.720120341	
hsa-miR-4294-P	- 6.14881956	
hsa-miR-718	- 5.926179859	
hsa-mir-1910-P	- 5.828360182	
hsa-miR-3188-P	- 7.974527314	
hsa-miR-324-5p	- 5.711776077	
mmu-miR-1937b-4-P	- 5.520796704	10
mmu-miR-669d-P	6.842367137	
mmu-miR-3473	- 5.977639047	
hsa-miR-595	- 6.658387264	
hsa-miR-3197	- 6.118703616	
hsa-miR-4256-P	4.894289461	
mmu-miR-201	5.429305446	
mmu-miR-2861-P	- 5.546034309	
mmu-miR-3471-2-P	- 5.968684885	
hsa-miR-3120-P	- 5.809647124	20
mmu-miR-494	- 5.460136383	
mmu-miR-690	- 6.785641527	
hsa-mir-591-P	- 4.676566053	
hsa-miR-943	- 4.21472556	
hsa-miR-24-2*	- 5.267717705	
hsa-miR-891a	3.970259655	
mmu-miR-467e*	4.371589059	
mmu-miR-196a	- 4.673219124	
mmu-miR-763-P	- 4.837159778	30
mmu-miR-689-P	- 4.006113822	
mmu-miR-1961-P	- 4.02458343	
mmu-miR-709	- 43.11955582	
hsa-miR-3147	- 4.083582871	
hsa-miR-1323	3.866709935	
mmu-miR-761	- 4.758191473	
hsa-miR-1979	- 22.63130882	
hsa-miR-1255b	3.856857003	
mmu-miR-3072	- 3.955191268	40
hsa-miR-1248-P	3.690795669	
hsa-mir-147-P	4.119353729	
hsa-miR-3195	- 5.808376336	
hsa-miR-1273d-P	- 7.045907865	
mmu-miR-207	- 4.467339352	
mmu-miR-689	- 3.348018214	

【表 6 - 3】

miRNAs	倍率変化	
hsa-miR-4257	- 4. 323649906	
mmu-miR-466d-3p	3. 585840199	
hsa-miR-923	- 3. 344759672	
mmu-miR-1931	- 4. 744652197	
hsa-mir-650-P	- 6. 161006285	
mmu-miR-466g	3. 874674458	
mmu-miR-1191-P	- 4. 045803649	10
hsa-mir-1538	- 3. 744109297	
hsa-miR-1246	- 3. 337472797	
hsa-miR-124*	3. 31414605	
hsa-miR-4321-P	- 7. 691122096	
mmu-miR-1946a-P	- 6. 219634371	
hsa-miR-1972-2-P	- 5. 073720863	
hsa-miR-3200	3. 335177401	
mmu-miR-1947	- 7. 215369611	
mmu-miR-669o-P	3. 389226018	20
mmu-miR-466e-3p	3. 534048216	
mmu-miR-707	3. 877366764	
hsa-miR-4297	- 6. 529597429	
hsa-miR-4313	- 4. 609062464	
mmu-miR-1935-AP	- 10. 94537064	
mmu-miR-467g	4. 667383343	
mmu-miR-2133	- 4. 243694889	
hsa-miR-923-P	- 3. 64025311	
hsa-miR-1236	3. 197494004	30
hsa-miR-1280	- 6. 234163314	
mmu-miR-1937b-2-P	- 5. 358528363	
mmu-miR-499-P	3. 275110007	
hsa-miR-1263-P	3. 338653962	
hsa-miR-466	3. 265124658	
hsa-mir-595-P	- 3. 780075724	
hsa-miR-1285-1-P	- 3. 392089631	
mmu-miR-338-5p	3. 139715849	
hsa-miR-3140	3. 152896366	
mmu-miR-2182	- 4. 235843782	40
hsa-miR-23b*	- 5. 32306966	
hsa-mir-639-P	- 7. 052485203	
mmu-miR-1947-P	- 5. 939897094	
mmu-miR-22	- 3. 74236459	
mmu-miR-1970	- 3. 108998272	

【表 6 - 4】

miRNAs	倍率変化	
mmu-miR-665-P	- 3.597686151	
hsa-miR-3065-5p	3.113930424	
mmu-miR-467c-P	3.155074202	
hsa-miR-1268	- 2.922890303	
mmu-miR-24-2*	- 3.48139554	
hsa-mir-1914	- 3.832959976	
hsa-miR-3118-5-P	2.977569863	10
mmu-miR-1306-P	- 3.281316308	
mmu-miR-669f	5.194629536	
mmu-miR-466b-3p	3.438581421	
hsa-miR-1268-P	- 3.678227949	
hsa-mir-1913	- 3.946642192	
mmu-miR-3470b-P	- 4.037857355	
mmu-miR-32	2.989834039	
hsa-miR-1826-P	- 4.872011411	
hsa-miR-147-P	3.923947787	20
hsa-miR-3172-P	3.056599217	
hsa-miR-801	- 6.14009908	
hsa-miR-941-l	- 4.658601465	
mmu-miR-301a-P	2.770796433	
mmu-miR-669a-P	3.643950881	
hsa-miR-1289	3.559525037	
hsa-miR-548j	2.858203465	
hsa-miR-877*	- 3.015914917	
hsa-miR-10a	- 5.70499997	30
mmu-miR-181c	2.79663413	
hsa-miR-3149-P	3.067063437	
mmu-miR-3099*	- 3.100792371	
mmu-miR-705-P	- 4.314489552	
mmu-miR-2861	- 3.008526128	
hsa-miR-1976	- 2.80557125	
mmu-miR-1934-P	- 6.614312993	
hsa-miR-138-1*	2.769430194	
hsa-miR-1243	2.78669354	
hsa-miR-3160	- 3.16046745	40
hsa-miR-500	2.766201976	
mmu-miR-1945	- 3.975181107	
hsa-mir-941-4	- 4.644133225	
hsa-miR-4301	- 16.10443714	
hsa-miR-1208	- 3.230411171	

【表 6 - 5】

miRNAs	倍率変化	
hsa-mir-565-A	- 8.232319234	
hsa-miR-1244	2.796864338	
mmu-miR-669j	3.675114173	
hsa-miR-4314	2.810648214	
hsa-miR-502-5p	2.743400714	
hsa-miR-371-5p	2.607678279	
mmu-miR-10b	- 3.034387515	10
mmu-miR-26a	- 3.497092003	
mmu-miR-483*	- 2.743822775	
hsa-mir-487b-P	4.073173842	
mmu-miR-1930-P	- 3.656852693	
hsa-miR-1255a	2.690838416	
hsa-miR-202	- 3.352756633	
hsa-miR-4311	- 2.706852207	
hsa-miR-1226*	2.753774039	
mmu-miR-1943-P	2.568476663	20
hsa-mir-594-P	- 7.693094002	
hsa-miR-21	- 3.331077571	
mmu-miR-466a-3p	2.590518002	
hsa-miR-1301-P	2.83454983	
hsa-miR-638	- 5.006318026	
hsa-mir-320	- 3.08053158	
mmu-miR-667	- 2.55941239	
mmu-miR-27a	2.535988521	
hsa-miR-937	- 3.726272762	30
hsa-miR-1255a-P	3.247591046	
mmu-miR-505	2.610666762	
hsa-miR-1263	2.736571865	
mmu-miR-302b*	2.945119065	
mmu-miR-721-P	2.91504884	
hsa-miR-18b	2.611682702	
hsa-mir-31	- 2.702014494	
mmu-miR-801-A	- 6.683601538	
has-let-7f-1*	3.908401267	
hsa-miR-1259-P	2.644459942	40
mmu-mir-320-P	- 3.437080879	
mmu-miR-1939	- 4.465923575	
hsa-miR-1228	- 2.567882638	
hsa-miR-483-3p	- 2.775662208	
hsa-miR-129-5p	2.655425404	

【表 6 - 6】

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

10

20

【0 1 2 1】

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

30

参考資料

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

40

【化 1 - 1】

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

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

【化 1 - 2】

Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology* 29, 341-345.

Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.

Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., *et al.* (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5003-5008. 10

Ausubel *et al.*, *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons Ltd, Wiley Interscience, 2003.

Bang, G.M., and Setabutr, P. (2010). Periocular capillary hemangiomas: indications and options for treatment. *Middle East Afr J Ophthalmol* 17, 121-128.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.

Bartels, C.L., and Tsongalis, G.J. (2009). MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clinical chemistry* 55, 623-631. 20

Benitez-vieyra, S., Medina, A.M., and Cocucci, A.A. (2009). Variable selection patterns on the labellum shape of *Geoblasta pennicillata*, a sexually deceptive orchid. *J Evol Biol* 22, 2354-2362.

Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., and Hannon, G.J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics* 35, 215-217.

Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744. 30

Cocucci, E., Racchetti, G., and Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19, 43-51.

Cosacov, A. *et al.* New insights into the phylogenetic relationships, character evolution, and phytogeographic patterns of *Calceolaria* (Calceolariaceae). *Am J Bot* 96, 2240-2255, (2009).

de Laurentiis, A., Gaspari, M., Palmieri, C., Falcone, C., Iaccino, E., Fiume, G., Massa, O., Masullo, M., Tuccillo, F.M., Roveda, L., *et al.* (2011). Mass spectrometry-based identification of the tumor antigen UN1 as the transmembrane CD43 sialoglycoprotein. *Mol Cell Proteomics* 10, M111 007898.

Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., and Geuze, H.J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 273, 20121-20127. 40

Fang, H., Qiu, L., Vitkin, E., Zaman, M. M., Andersson, C., Salahuddin, S., Kimerer, L. M., Cipolloni, P. B., Modell, M. D., Turner, B. S., *et al.* (2007). Confocal light absorption and scattering spectroscopic microscopy. *Applied optics* 46, 1760-1769.

【化 1 - 3】

Filipowicz, W. (2005). RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* 122, 17-20.
 Fukagawa, T., Nogami, M., Yoshikawa, M., Ikeno, M., Okazaki, T., Takami, Y., Nakayama, T., and Oshimura, M. (2004). Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nature cell biology* 6, 784-791.
 Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., and Illei, G. G. (2012). The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PloS one* 7, e30679.

Gibbings, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature cell biology* 11, 1143-1149.

Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631-640.

Grelier, G., Voirin, N., Ay, A.S., Cox, D.G., Chabaud, S., Treilleux, I., Leon-Goddard, S., Rimokh, R., Mikaelian, I., Venoux, C., *et al.* (2009). Prognostic value of Dicer expression in human breast cancers and association with the mesenchymal phenotype. *British journal of cancer* 101, 673-683.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667.

Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., and Agnati, L.F. (2010). Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm* 117, 1-4.
 Gyorgy, B., Szabo, T.G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., Laszlo, V., Pallinger, E., Pap, E., Kittel, A., *et al.* (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 68, 2667-2688.

Haase, A. D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., Gatignol, A., and Filipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO reports* 6, 961-967.
 Hirata, H., Ueno, K., Shahryari, V., Tanaka, Y., Tabatabai, Z. L., Hinoda, Y., and Dahiya, R. (2012). Oncogenic miRNA-182-5p targets Smad4 and RECK in human bladder cancer. *PloS one* 7, e51056.

Hood, J.L., San, R.S., and Wickline, S.A. (2011). Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer research* 71, 3792-3801.

Ismail, N., Wang, Y., Dakhallallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T. D., Tridandapani, S., *et al.* (2013). Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* 121, 984-995.

Itzkan, I., Qiu, L., Fang, H., Zaman, M. M., Vitkin, E., Ghiran, I. C., Salahuddin, S., Modell, M., Andersson, C., Kimerer, L. M., *et al.* (2007). Confocal light absorption and scattering spectroscopic microscopy monitors organelles in live

10

20

30

40

【化 1 - 4】

cells with no exogenous labels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17255-17260.

Kahlert, C., and Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* 91, 431-437.

Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., *et al.* (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer science* 96, 111-115.

10

Khairkar, P.H., Bang, G.M., Singh, A.B., and Tiple, P.G. (2010). Possible cross-sensitivity between sertraline and paroxetine in a panic disorder patient. *Indian J Pharmacol* 42, 110-111.

King, H.W., Michael, M.Z., and Gleadle, J.M. (2012). Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* 12, 421.

Kogure, T., Lin, W. L., Yan, I. K., Braconi, C., and Patel, T. (2011). Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology* 54, 1237-1248.

Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F., and Ochiya, T. (2013). Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *The Journal of biological chemistry* 288, 10849-10859.

20

Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R., and Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature genetics* 39, 673-677.

Kumar, S., Ansari, F.A., and Scaria, V. (2009). Prediction of viral microRNA precursors based on human microRNA precursor sequence and structural features. *Virol J* 6, 129.

Lee, T.H., D'Asti, E., Magnus, N., Al-Nedawi, K., Meehan, B., and Rak, J. (2011). Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'. *Semin Immunopathol* 33, 455-467.

30

Li, L., Zhu, D., Huang, L., Zhang, J., Bian, Z., Chen, X., Liu, Y., Zhang, C. Y., and Zen, K. (2012). Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. *PloS one* 7, e46957.

Liu, C. G., Calin, G. A., Volinia, S. & Croce, C. M. MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat Protoc* 3, 563-578, (2008).

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

40

Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabro, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M.L., Federici, C., Iessi, E., *et al.* (2009). High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PloS one* 4, e5219.

Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D.,

【化 1 - 5】

- Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., *et al.* (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
- Luga, V., Zhang, L., Vitoria-Petit, A.M., Ogunjimi, A.A., Inanlou, M.R., Chiu, E., Buchanan, M., Hosein, A.N., Basik, M., and Wrana, J.L. (2012). Exosomes Mediate Stromal Mobilization of Autocrine Wnt-PCP Signaling in Breast Cancer Cell Migration. *Cell* 151, 1542-1556.
- Luzio, J.P., Parkinson, M.D., Gray, S.R., and Bright, N.A. (2009). The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. *Biochemical Society transactions* 37, 1019-1021. 10
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., and Weinberg, R.A. (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449, 682-688.
- MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V., and Doudna, J. A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 512-517.
- Maehama, T. (2007). PTEN: its deregulation and tumorigenesis. *Biological & pharmaceutical bulletin* 30, 1624-1627.
- Maniataki, E., and Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & development* 19, 2979-2990. 20
- Mao, X., Sun, Y., and Tang, J. (2013). Serum miR-21 is a diagnostic and prognostic marker of primary central nervous system lymphoma. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*.
- Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T., *et al.* (2010). A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell* 141, 1195-1207.
- Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics* 73, 1907-1920. 30
- Mavel, S., Thery, I., and Gueiffier, A. (2002). Synthesis of imidazo[2,1-a]phthalazines, potential inhibitors of p38 MAP kinase. Prediction of binding affinities of protein ligands. *Arch Pharm (Weinheim)* 335, 7-14.
- McCready, J., Sims, J. D., Chan, D., and Jay, D. G. (2010). Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC cancer* 10, 294.
- Melo, S., Villanueva, A., Moutinho, C., Davalos, V., Spizzo, R., Ivan, C., Rossi, S., Setien, F., Casanovas, O., Simo-Riudalbas, L., *et al.* (2011). Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4394-4399. 40
- Melo, S.A., Moutinho, C., Roperio, S., Calin, G.A., Rossi, S., Spizzo, R., Fernandez, A.F., Davalos, V., Villanueva, A., Montoya, G., *et al.* (2010). A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer cell* 18, 303-315.

【化 1 - 6】

- Melo, S.A., Ropero, S., Moutinho, C., Aaltonen, L.A., Yamamoto, H., Calin, G.A., Rossi, S., Fernandez, A.F., Carneiro, F., Oliveira, C., *et al.* (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nature genetics* 41, 365-370.
- Merritt, W.M., Lin, Y.G., Han, L.Y., Kamat, A.A., Spannuth, W.A., Schmandt, R., Urbauer, D., Pennacchio, L.A., Cheng, J.F., Nick, A.M., *et al.* (2008). Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 359, 2641-2650. 10
- Min, M., Bang, G.S., Lee, H., and Yu, B.C. (2010). A photoswitchable methylene-spaced fluorinated aryl azobenzene monolayer grafted on silicon. *Chem Commun (Camb)* 46, 5232-5234.
- Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M. A., Bernad, A., and Sanchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications* 2, 282.
- Miyata, Y. (2005). Hsp90 inhibitor geldanamycin and its derivatives as novel cancer chemotherapeutic agents. *Current pharmaceutical design* 11, 1131-1138. 20
- Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Stolz, D. B., Sullivan, M. L., Karlsson, J. M., Baty, C. J., Gibson, G. A., Erdos, G., Wang, Z., *et al.* (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756-766.
- Narayanan, A., Iordanskiy, S., Das, R., Van Duyne, R., Santos, S., Jaworski, E., Guendel, I., Sampey, G., Dalby, E., Iglesias-Ussel, M., *et al.* (2013). Exosomes derived from HIV-1-infected cells contain trans-activation response element RNA. *The Journal of biological chemistry* 288, 20014-20033.
- Nicoloso, M.S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S., and Calin, G.A. (2009). MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nature reviews Cancer* 9, 293-302. 30
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., *et al.* (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology* 12, 19-30; sup pp 11-13.
- Ozen, M., Creighton, C.J., Ozdemir, M., and Ittmann, M. (2008). Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* 27, 1788-1793.
- Pant, S., Hilton, H., and Burczynski, M.E. (2012). The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochemical pharmacology* 83, 1484-1494. 40
- Park, H.J., Bang, G., Lee, B.R., Kim, H.O., and Lee, P.H. (2011). Neuroprotective effect of human mesenchymal stem cells in an animal model of double toxin-induced multiple system atrophy parkinsonism. *Cell Transplant* 20, 827-835.

【化 1 - 7】

- Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. A., van Eijndhoven, M. A., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., de Gruijl, T. D., Wurdinger, T., and Middeldorp, J. M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 6328-6333.
- Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C., *et al.* (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18, 883-891. 10
- Razi, M., and Futter, C. E. (2006). Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. *Molecular biology of the cell* 17, 3469-3483.
- Roccaro, A. M., Sacco, A., Maiso, P., Azab, A. K., Tai, Y. T., Reagan, M., Azab, F., Flores, L. M., Campigotto, F., Weller, E., *et al.* (2013). BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *The Journal of clinical investigation*.
- Rothstein, D. M. *et al.* Targeting signal 1 through CD45RB synergizes with CD40 ligand blockade and promotes long term engraftment and tolerance in stringent transplant models. *J Immunol* 166, 322-329 (2001). 20
- Sambrook *et al.*, *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Savina, A., Furlan, M., Vidal, M., and Colombo, M.I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 20083-20090.
- Schmittgen, T.D., Jiang, J., Liu, Q., and Yang, L. (2004). A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic acids research* 32, e43.
- Shen, B., Fang, Y., Wu, N., and Gould, S.J. (2011a). Biogenesis of the posterior pole is mediated by the exosome/microvesicle protein-sorting pathway. *The Journal of biological chemistry* 286, 44162-44176. 30
- Shen, B., Wu, N., Yang, J.M., and Gould, S.J. (2011b). Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. *The Journal of biological chemistry* 286, 14383-14395.
- Shen, J., Xia, W., Khotskaya, Y. B., Huo, L., Nakanishi, K., Lim, S. O., Du, Y., Wang, Y., Chang, W. C., Chen, C. H., *et al.* (2013). EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. *Nature* 497, 383-387.
- Sherer, N.M., Lehmann, M.J., Jimenez-Soto, L.F., Ingmundson, A., Horner, S.M., Cicchetti, G., Allen, P.G., Pypaert, M., Cunningham, J.M., and Mothes, W. (2003). Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* 4, 785-801. 40
- Shi, W., Oshlack, A., and Smyth, G.K. (2010). Optimizing the noise versus bias trade-off for Illumina whole genome expression BeadChips. *Nucleic acids research* 38, e204.

【化 1 - 8】

Shin, H. W., Morinaga, N., Noda, M., and Nakayama, K. (2004). BIG2, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors: its localization to recycling endosomes and implication in the endosome integrity. *Molecular biology of the cell* 15, 5283-5294.

Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21, 575-581.

Simpson, R.J., Jensen, S.S., and Lim, J.W. (2008). Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 8, 4083-4099.

10

Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology* 10, 1470-1476.

Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* 30, 106-114.

Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 110, 13-21.

20

Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2011). Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol* 33, 441-454.

Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al]* Chapter 3, Unit 3 22.

Thery, C. *et al.* Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 3, 1156-1162, (2002).

30

Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569-579.

Thery, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 biology reports* 3, 15.

Thery, M., and Casas, J. (2002). Predator and prey views of spider camouflage. *Nature* 415, 133.

Thomson, D. W., Bracken, C. P., Szubert, J. M., and Goodall, G. J. (2013). On measuring miRNAs after transient transfection of mimics or antisense inhibitors. *PloS one* 8, e55214.

Tse, J.C., and Kalluri, R. (2011). Waking up dormant tumors. *Breast cancer research : BCR* 13, 310.

40

Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., and Burwinkel, B. (2011).

Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research* 39, 7223-7233.

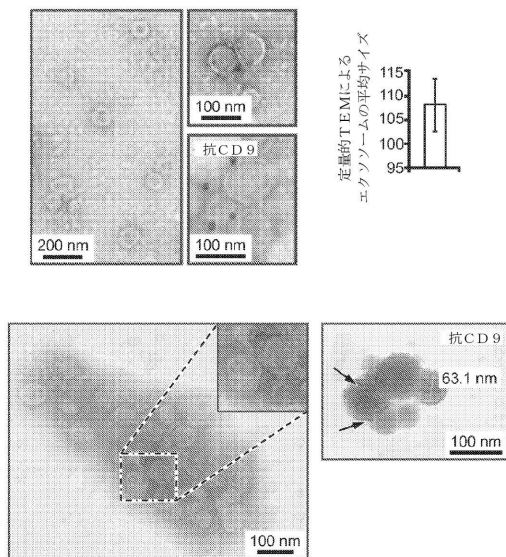
Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of

【化 1 - 9】

- genetic exchange between cells. *Nature cell biology* 9, 654-659.
- van Balkom, B. W., de Jong, O. G., Smits, M., Brummelman, J., den Ouden, K., de Bree, P. M., van Eijndhoven, M. A., Pegtel, D. M., Stoorvogel, W., Wurdinger, T., and Verhaar, M. C. (2013). Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. *Blood* 121, 3997-4006, S3991-3915.
- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., and Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology* 13, 423-433. 10
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., *et al.* (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2257-2261.
- Welch, D.R. (1997). Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. *Clinical & experimental metastasis* 15, 272-306.
- Wiesen, J.L., and Tomasi, T.B. (2009). Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol Immunol* 46, 1222-1228. 20
- Yan, L. X., Huang, X. F., Shao, Q., Huang, M. Y., Deng, L., Wu, Q. L., Zeng, Y. X., and Shao, J. Y. (2008). MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 14, 2348-2360.
- Yan, L. X., Wu, Q. N., Zhang, Y., Li, Y. Y., Liao, D. Z., Hou, J. H., Fu, J., Zeng, M. S., Yun, J. P., Wu, Q. L., *et al.* (2011). Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth. *Breast cancer research : BCR* 13, R2.
- Yang, C., and Robbins, P.D. (2011). The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. *Clin Dev Immunol* 2011, 842849. 30
- Yang, X., Meng, S., Jiang, H., Zhu, C., and Wu, W. (2011). Exosomes derived from immature bone marrow dendritic cells induce tolerogenicity of intestinal transplantation in rats. *J Surg Res* 171, 826-832.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* 17, 3011-3016.
- Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Koppel, T., Jahantigh, M. N., Lutgens, E., *et al.* (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Science signaling* 2, ra81. 40
- Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., *et al.* (2010). Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Molecular cell* 39, 133-144.

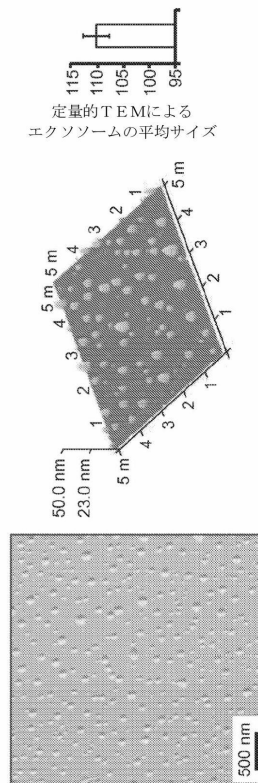
【図 1 A】

【図 1 A】



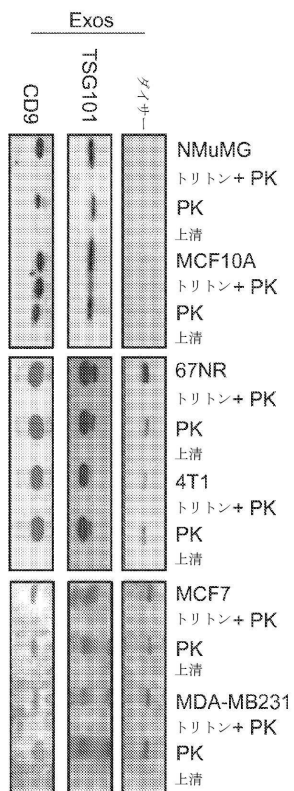
【図 1 B】

【図 1 B】



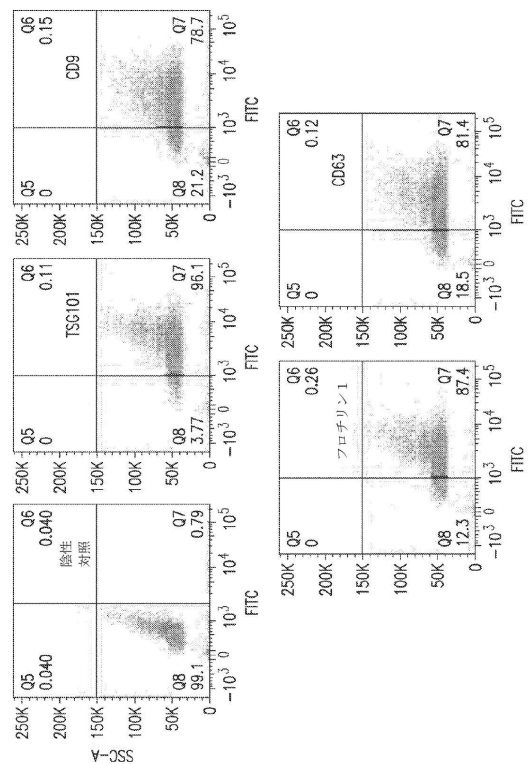
【図 1 C】

【図 1 C】



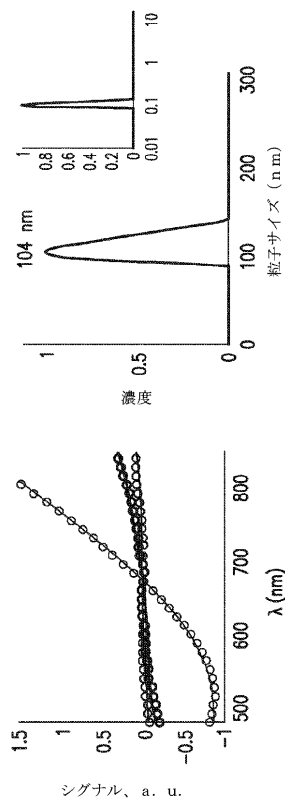
【図 1 D】

【図 1 D】



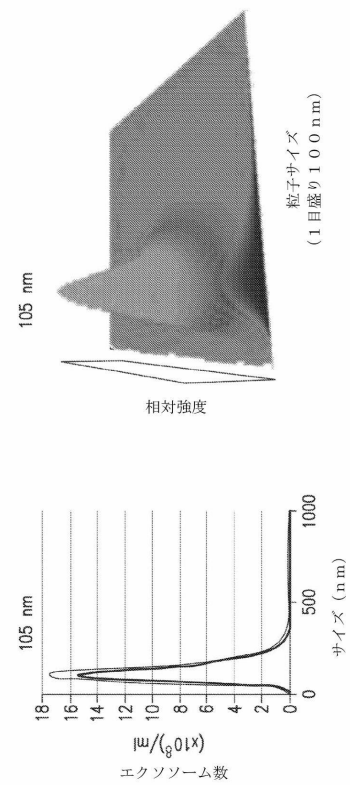
【図 1 E】

【図 1 E】



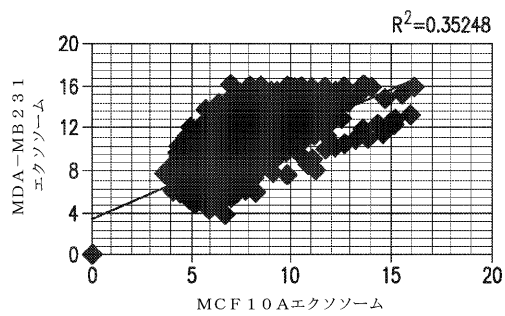
【図 1 F】

【図 1 F】



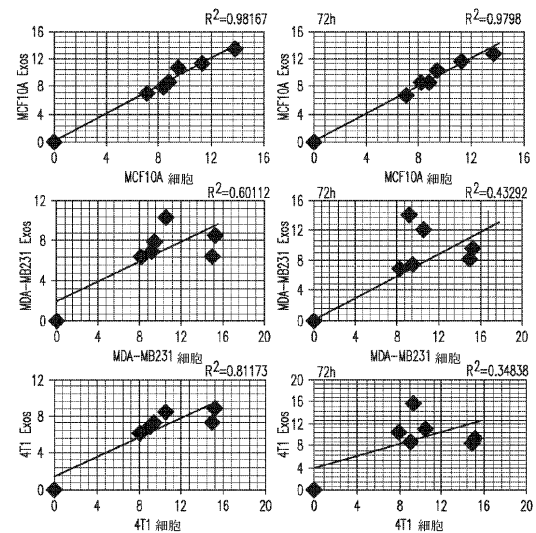
【図 2 A】

【図 2 A】



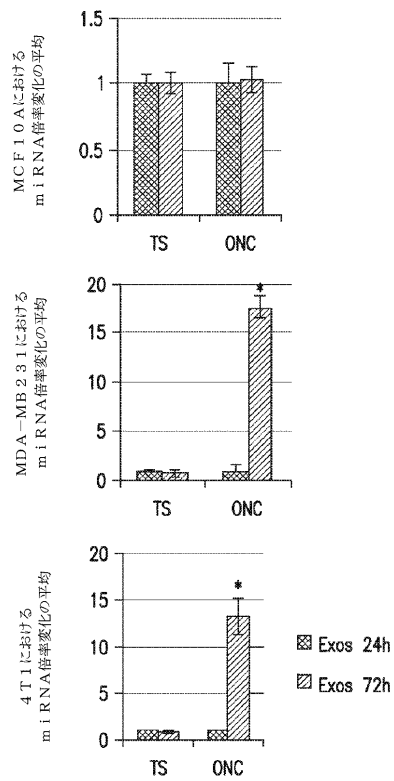
【図 2 B】

【図 2 B】



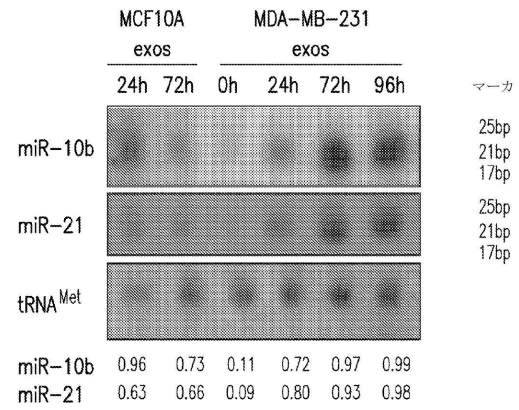
【図 2 C】

【図 2 C】



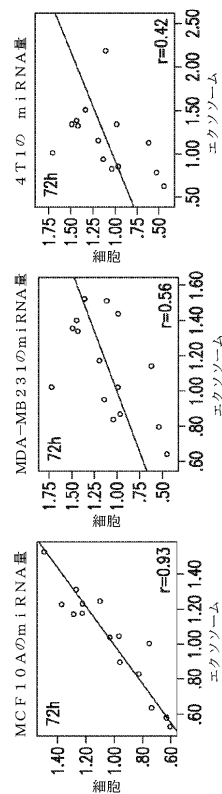
【図 2 D】

【図 2 D】



【図 2 E】

【図 2 E】



【図 2 F】

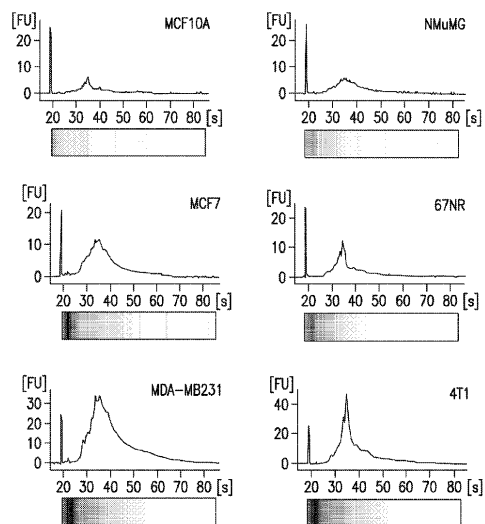
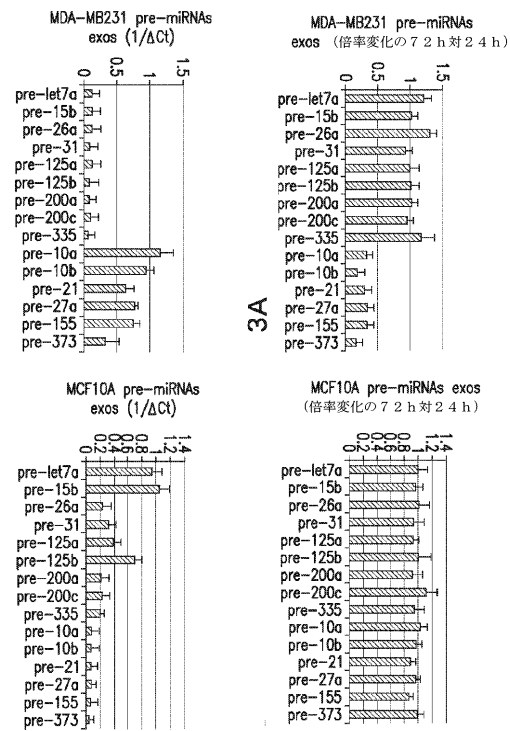


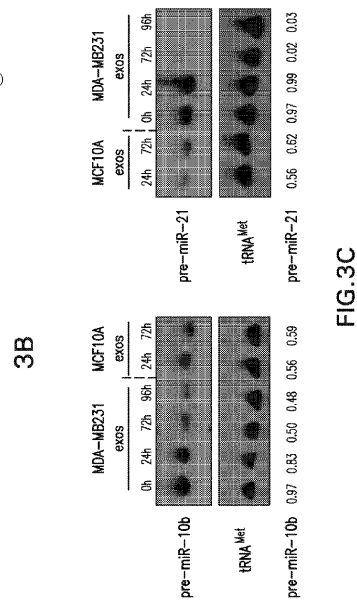
FIG.2F

【図 3 - 1】

【図 3 A ~ 3 B】

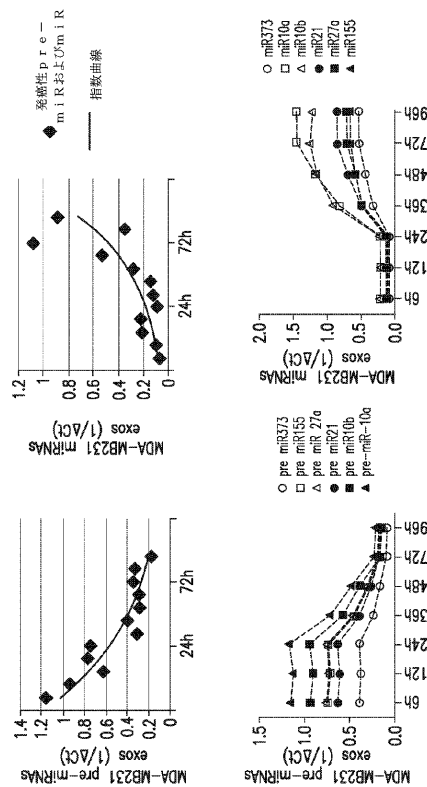


【図 3 - 2】



【図 3 - 3】

【図 3 D】



【図 3 - 4】

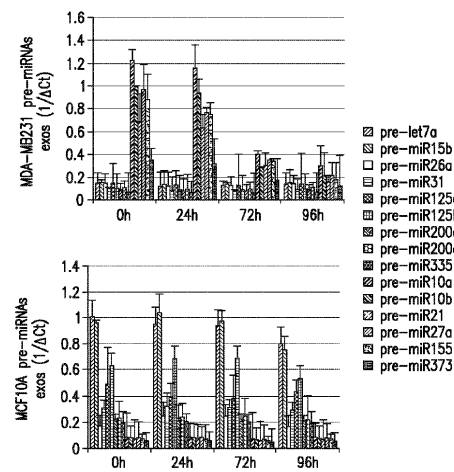
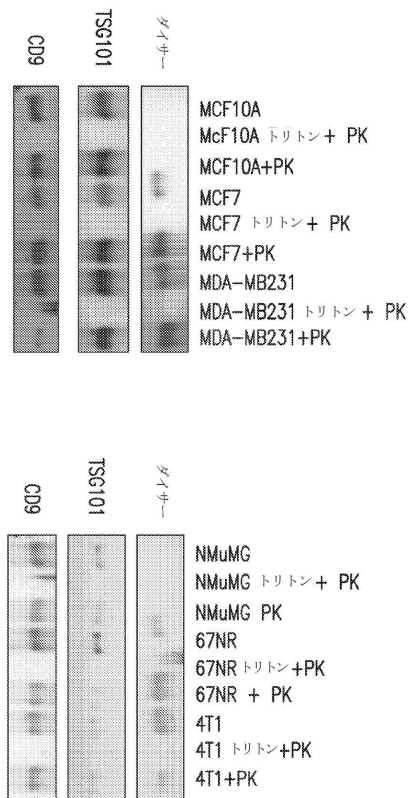


FIG.3E

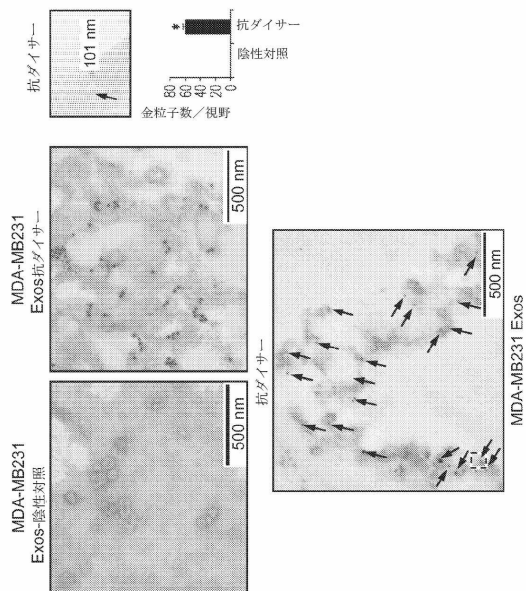
【図 4 - 1】

【図 4 A】



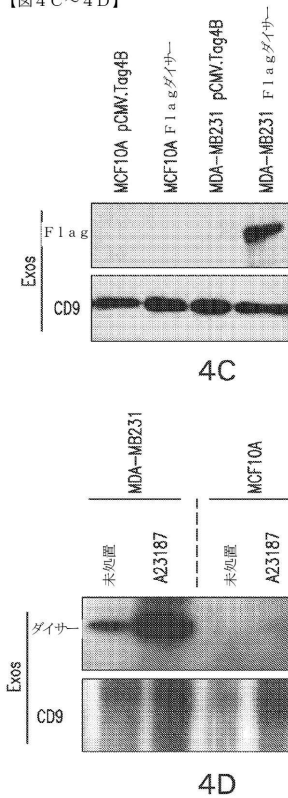
【図 4 - 2】

【図 4 B】



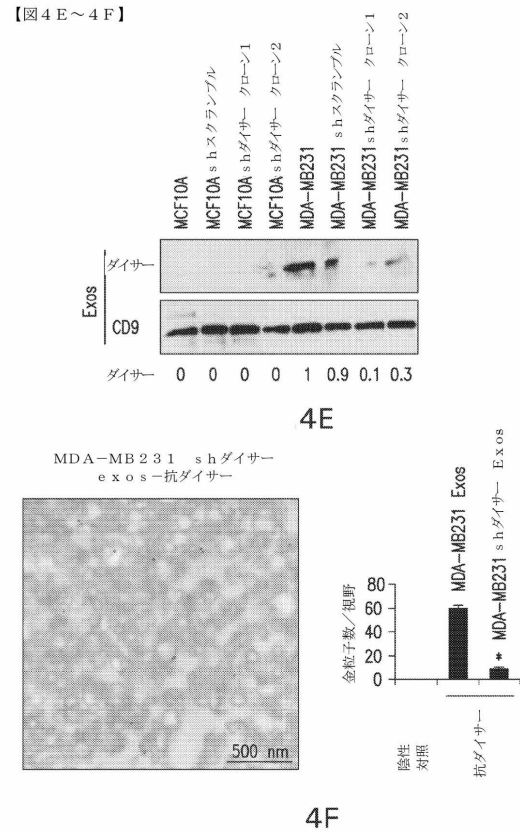
【図 4 - 3】

【図 4 C ~ 4 D】



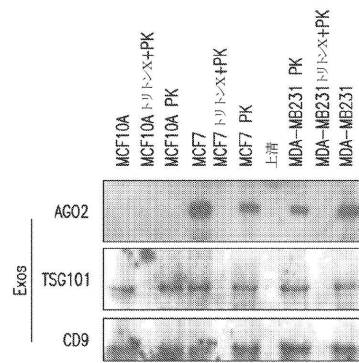
【図 4 - 4】

【図 4 E ~ 4 F】

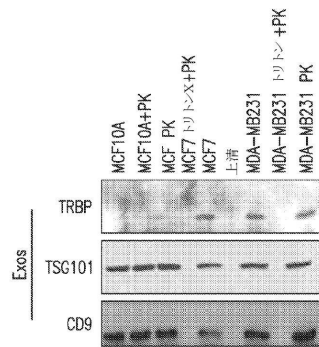


【図 4 - 5】

【図 4 G ~ 4 H】



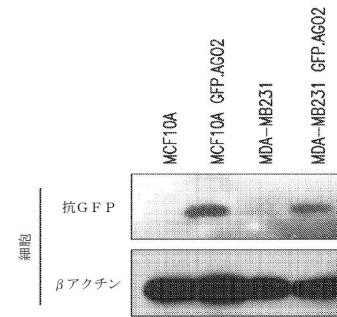
4G



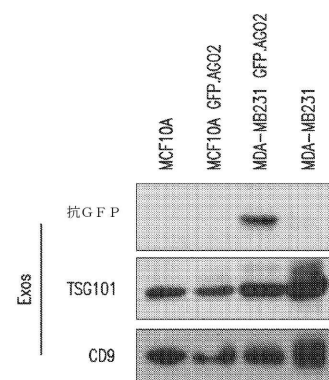
4H

【図 4 - 6】

【図 4 I ~ 4 J】



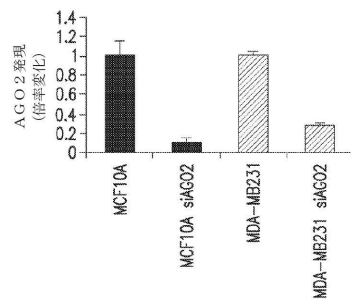
4I



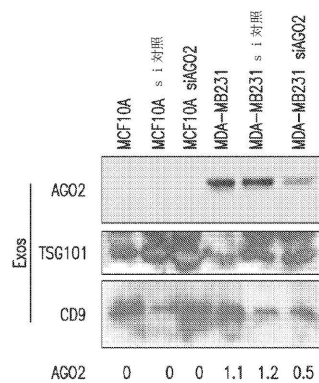
4J

【図 4 - 7】

【図 4 K ~ 4 L】



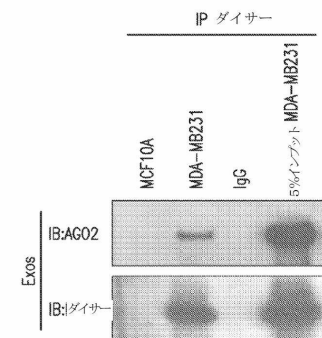
4K



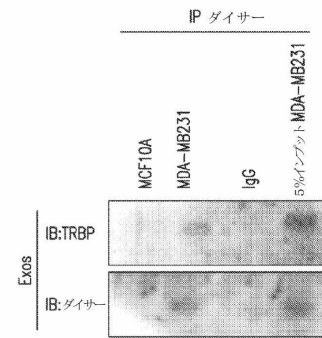
4L

【図 4 - 8】

【図 4 M ~ 4 N】



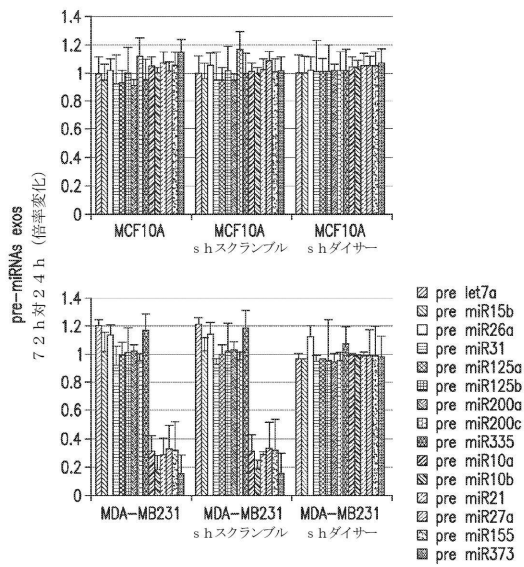
4M



4N

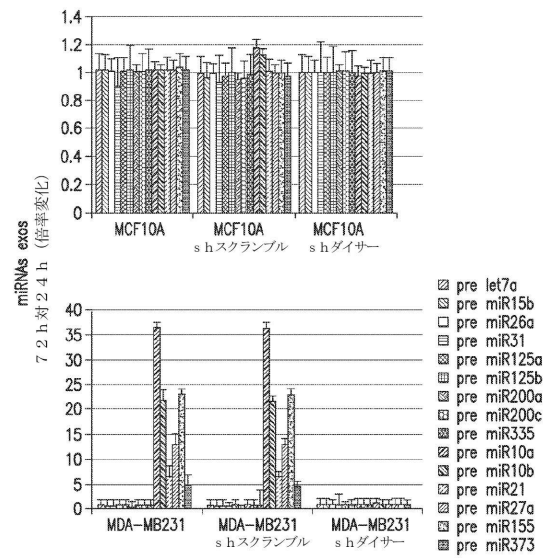
【図 5 A】

【図 5 A】



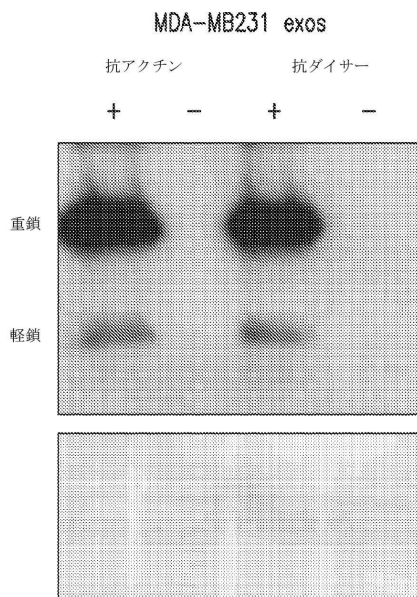
【図 5 B】

【図 5 B】



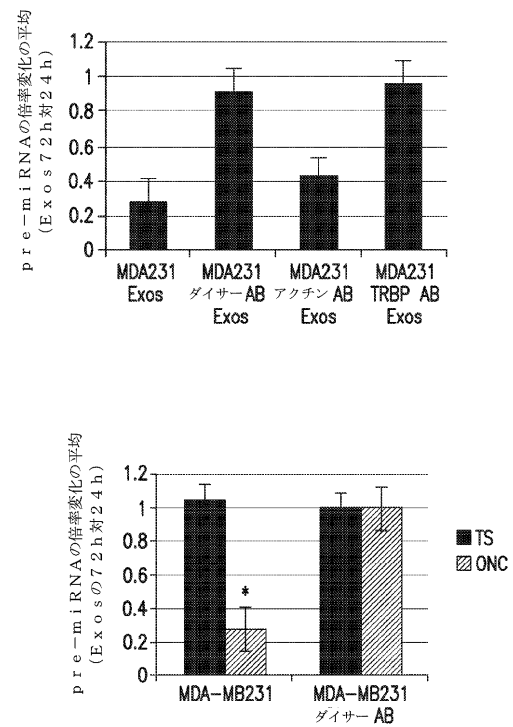
【図 5 C】

【図 5 C】



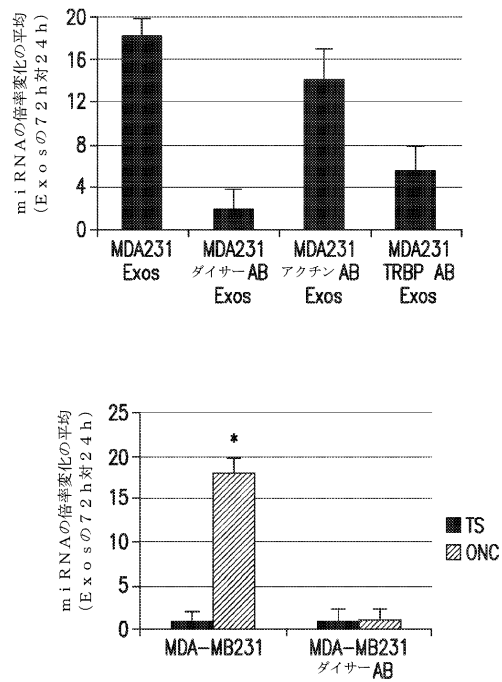
【図 5 D】

【図 5 D】



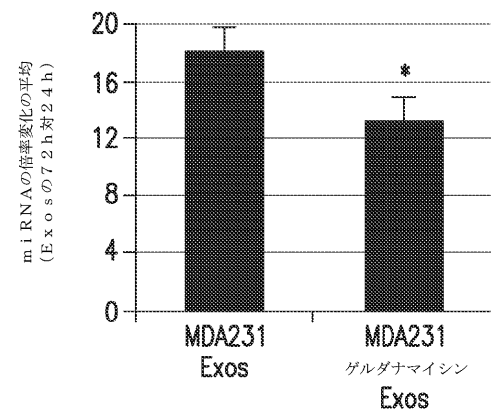
【図 5 E】

【図 5 E】



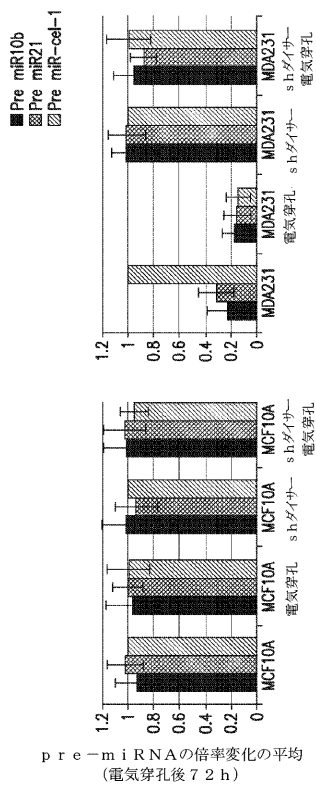
【図 6 - 1】

【図 6 A】



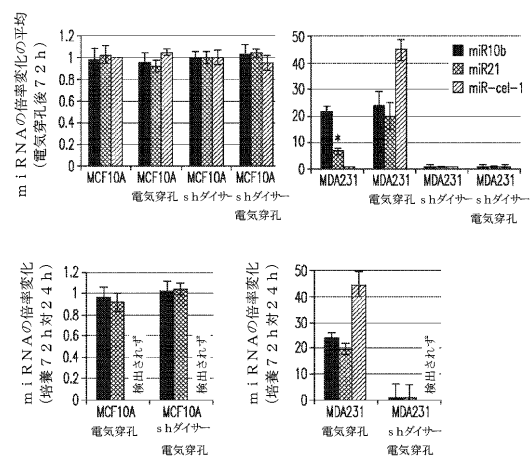
【図 6 - 2】

【図 6 B】



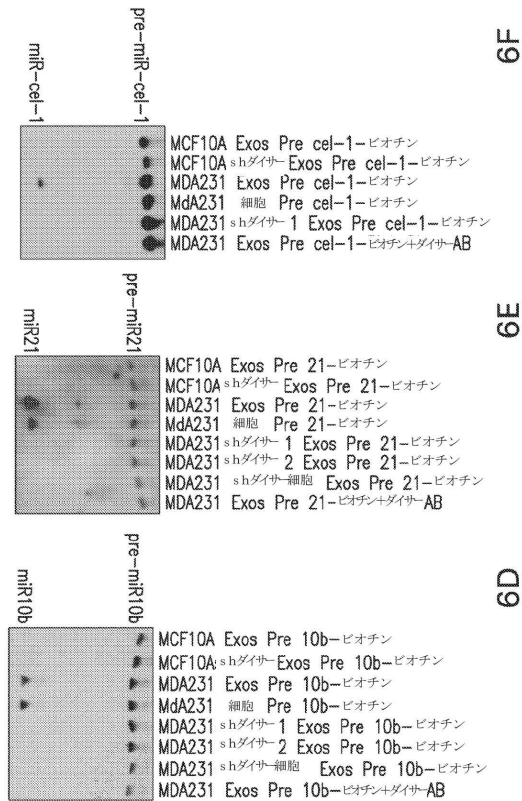
【図 6 - 3】

【図 6 C】



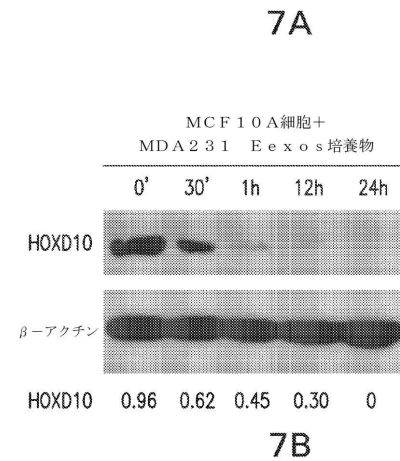
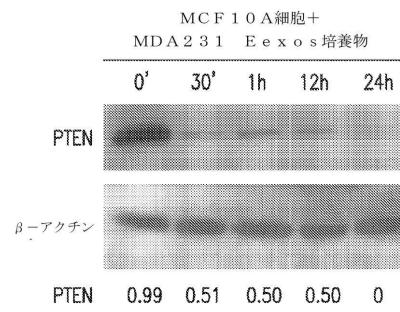
【図 6 - 4】

【図 6 D ~ 6 F】



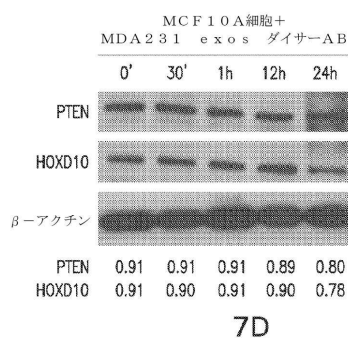
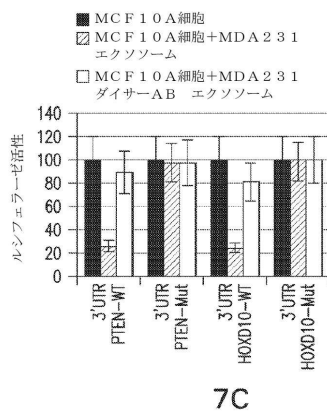
【図 7 - 1】

【図 7 A ~ 7 B】



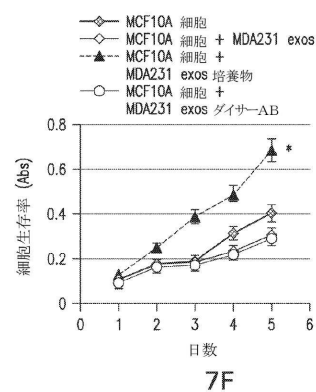
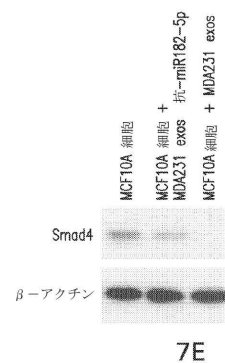
【図 7 - 2】

【図 7 C ~ 7 D】



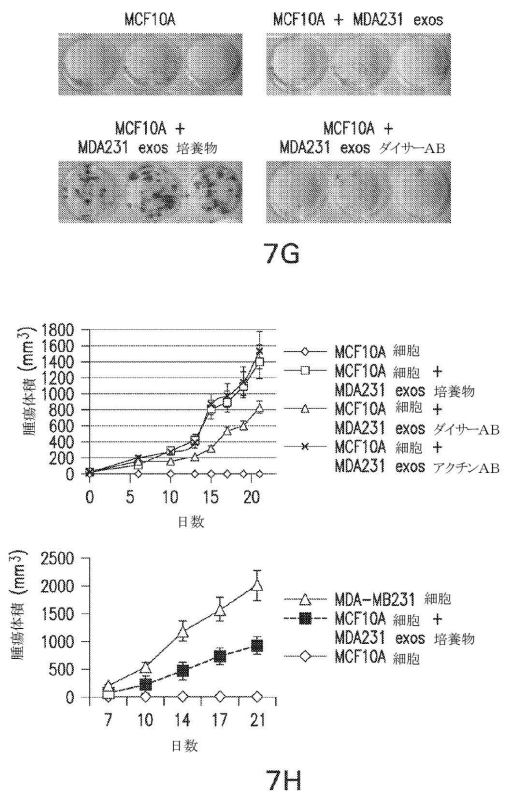
【図 7 - 3】

【図 7 E ~ 7 F】



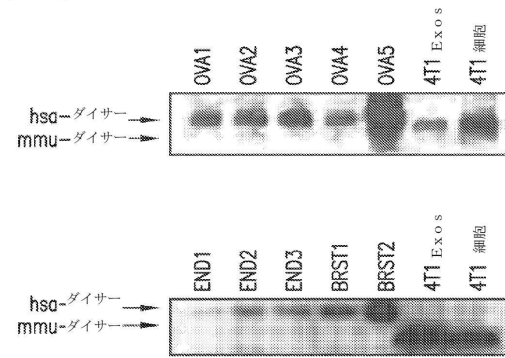
【図 7 - 4】

【図 7 G ~ 7 H】



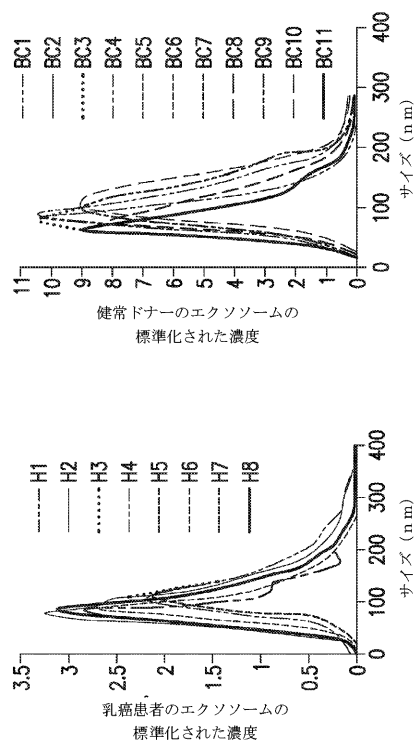
【図 8 - 1】

【図 8 A】



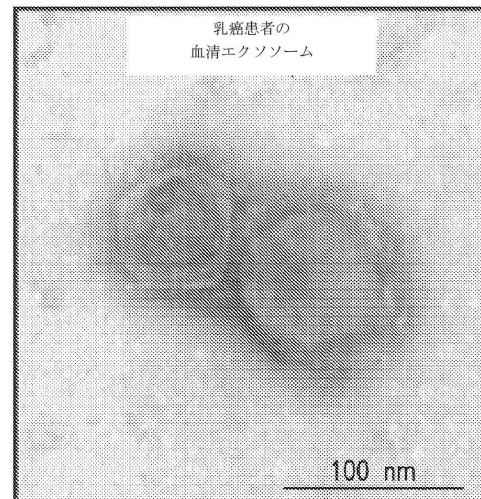
【図 8 - 2】

【図 8 B】



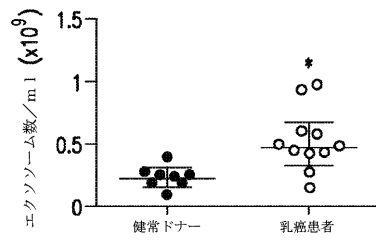
【図 8 - 3】

【図 8 C】

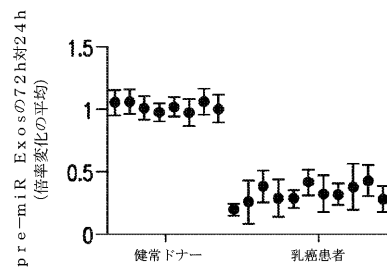


【図 8 - 4】

【図 8 D ~ 8 E】



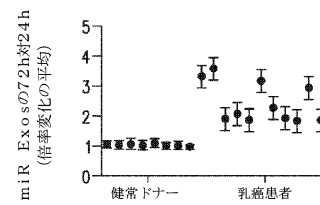
8D



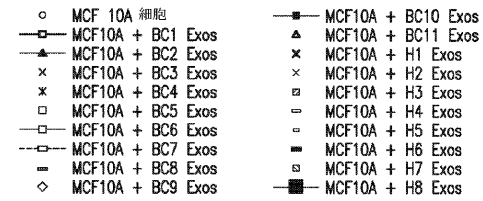
8E

【図 8 - 5】

【図 8 F ~ 8 G】



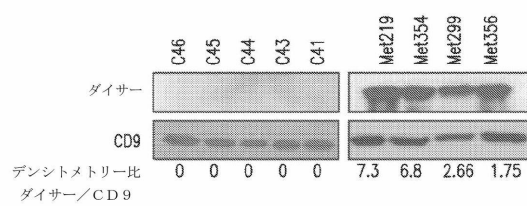
8F



8G

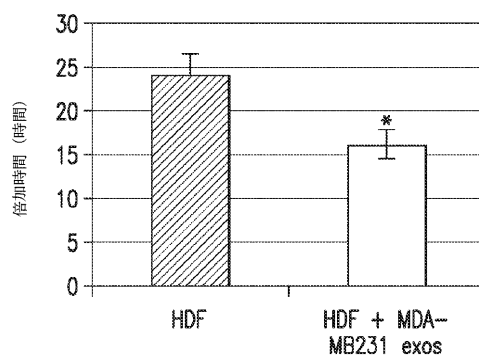
【図 8 - 6】

【図 8 H】



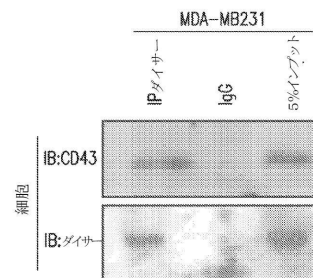
【図 8 - 7】

【図 8 I】

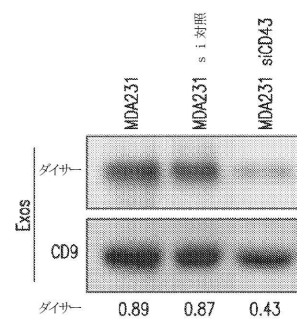


【図 9】

【図 9 A ~ 9 B】



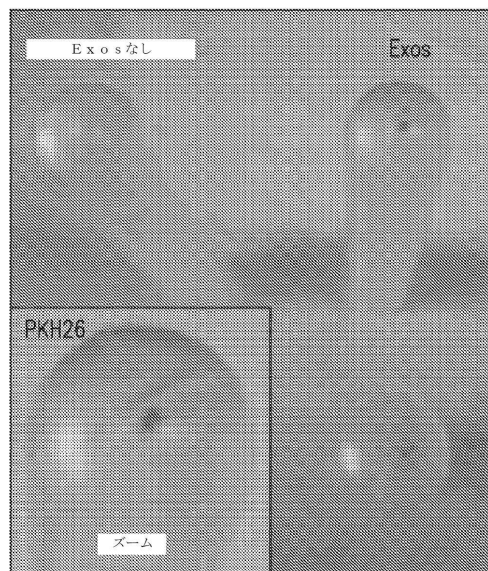
9A



9B

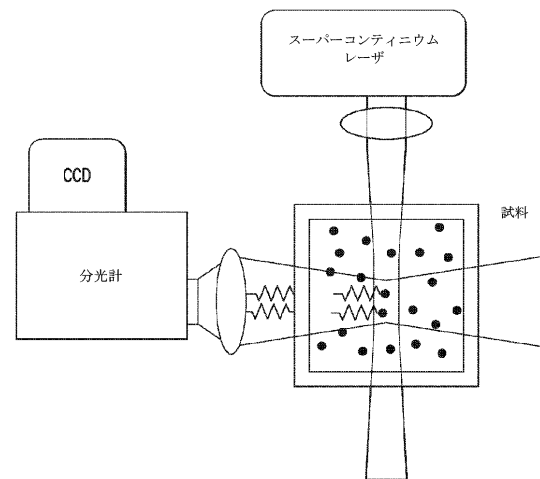
【図10A】

【図10A】



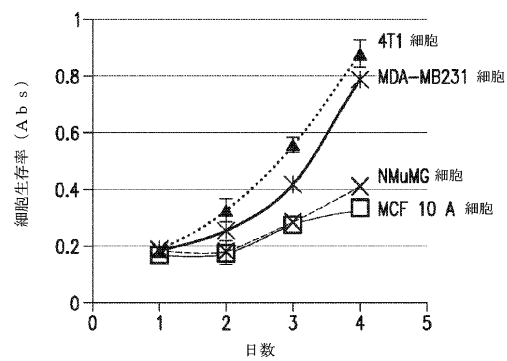
【図10B】

【図10B】



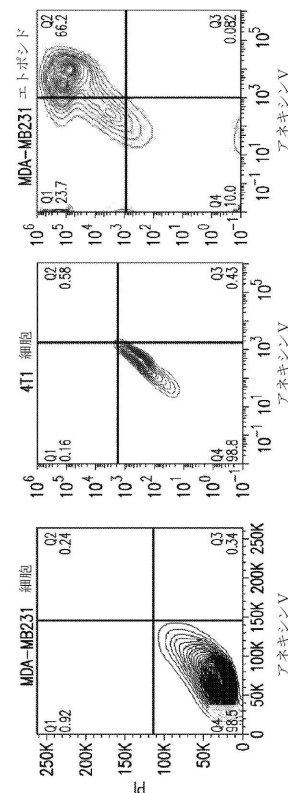
【図10C】

【図10C】



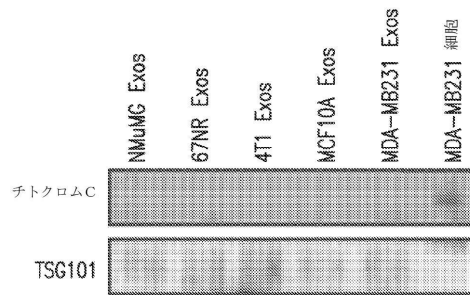
【図10D】

【図10D】



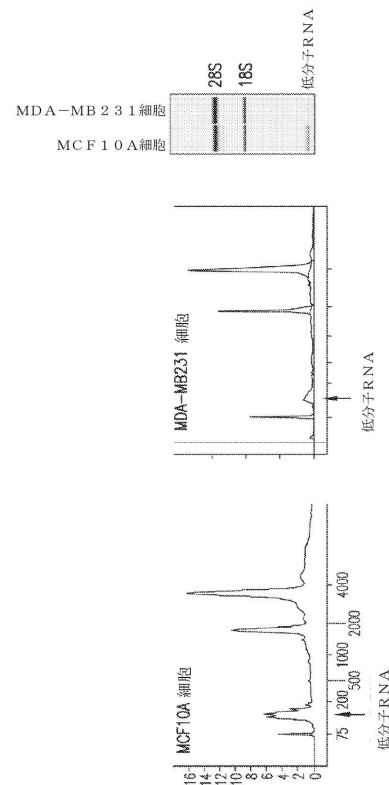
【図10E】

【図10E】



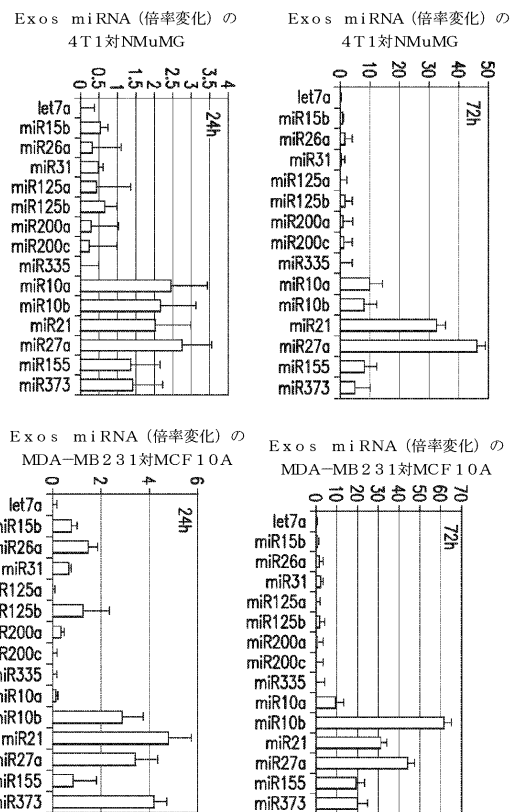
【図11A】

【図11A】



【図11B】

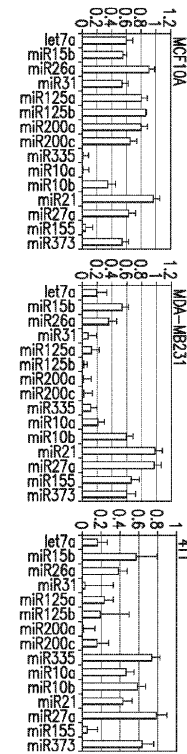
【図11B】



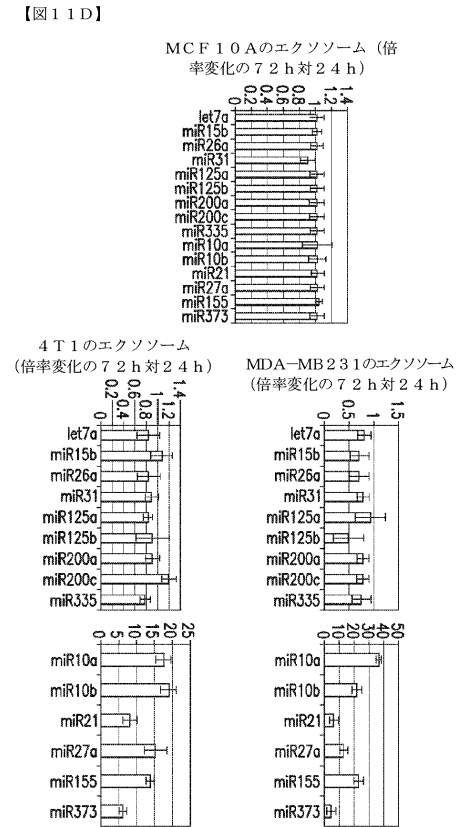
【図11C】

【図11C】

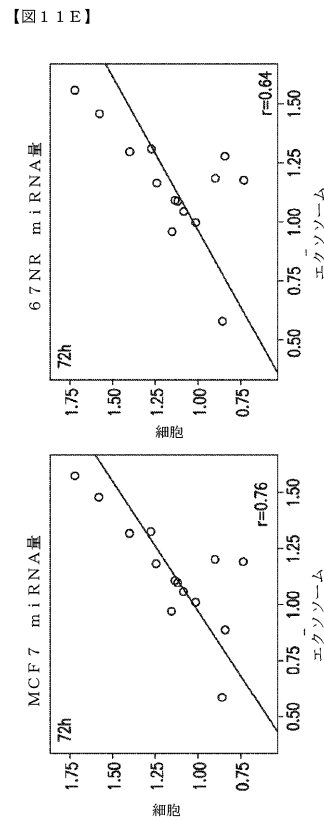
エクソソーム中のmiRNA
(細胞に対する倍率変化)



【図 1 1 D】

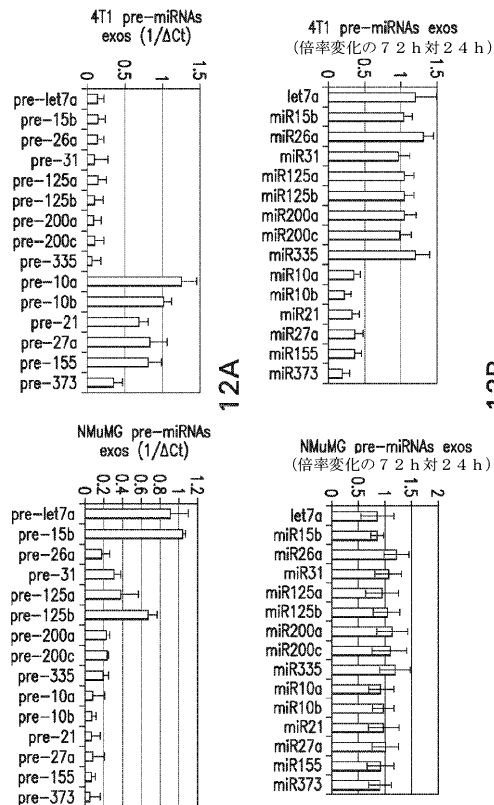


【図 1 1 E】



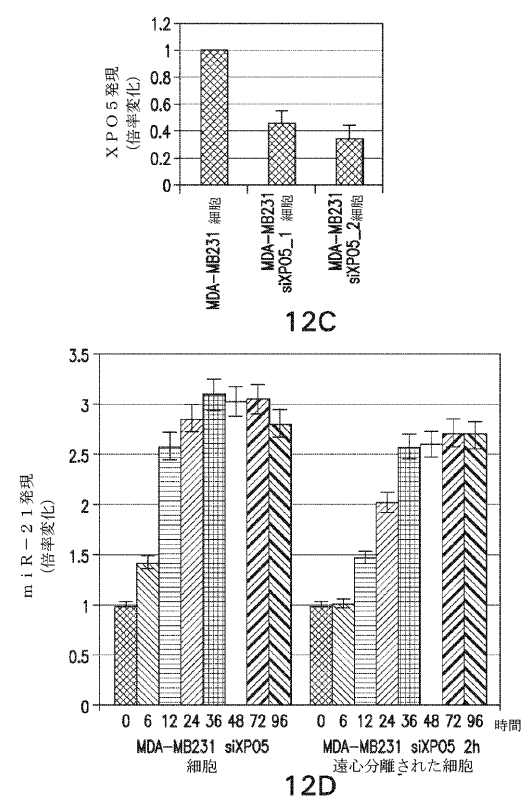
【図 1 2 - 1】

【図 1 2 A ~ 1 2 B】

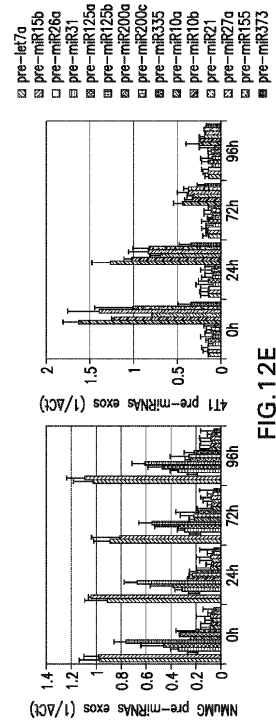


【図 1 2 - 2】

【図 1 2 C ~ 1 2 D】

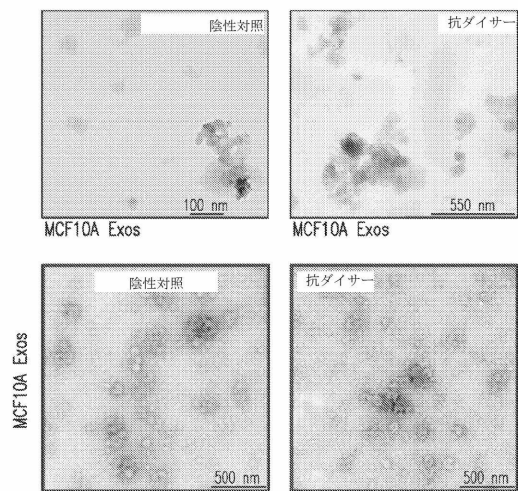


【図 1 2 - 3】



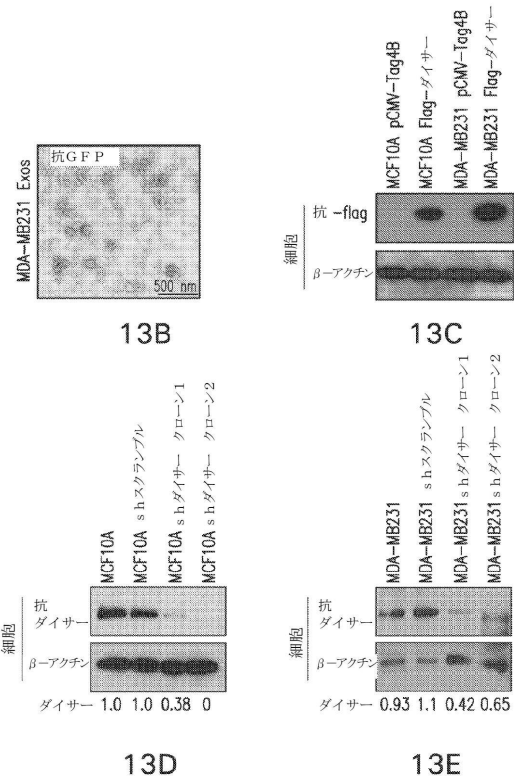
【図 1 3 - 1】

【図 1 3 A】



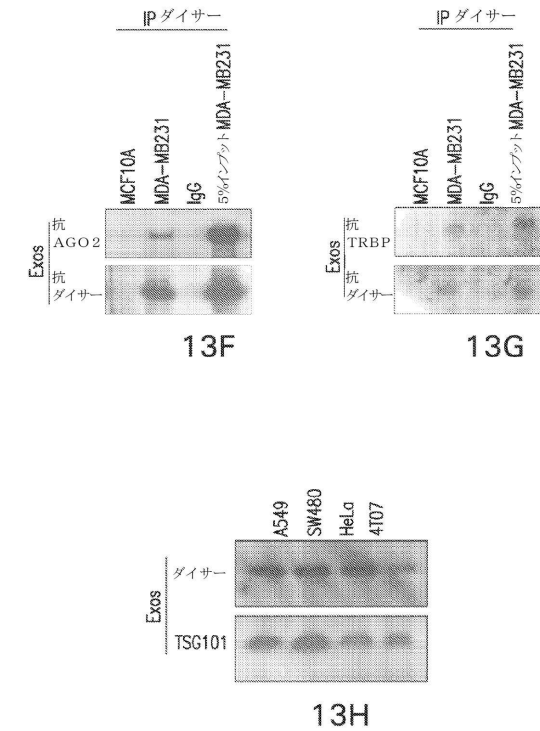
【図 1 3 - 2】

【図 1 3 B ~ 1 3 E】



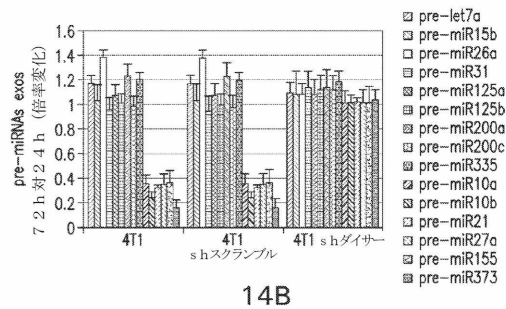
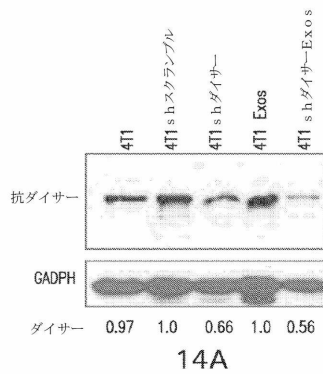
【図 1 3 - 3】

【図 1 3 F ~ 1 3 H】



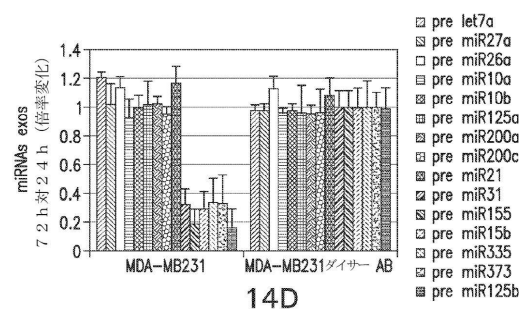
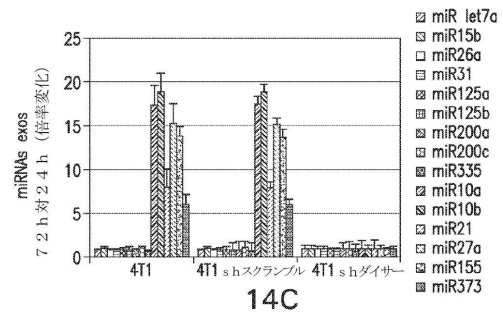
【図 14 - 1】

【図 14A～14B】



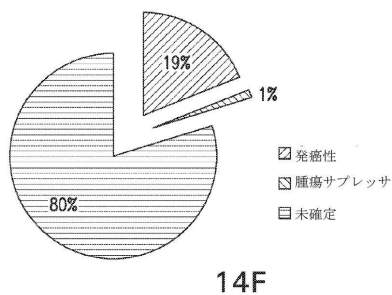
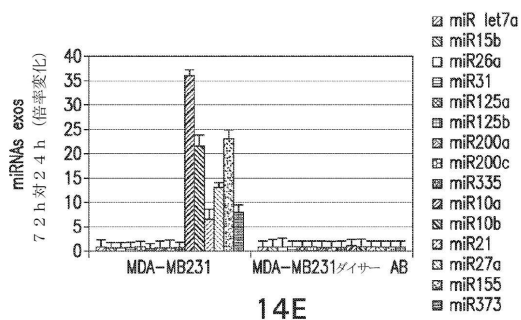
【図 14 - 2】

【図 14C～14D】



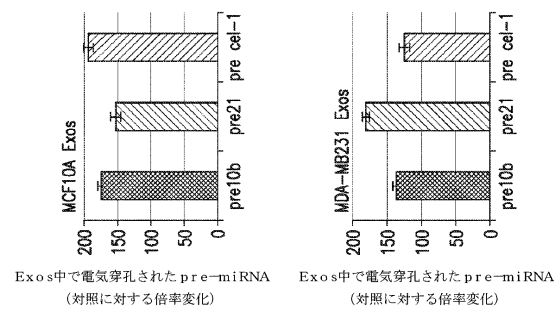
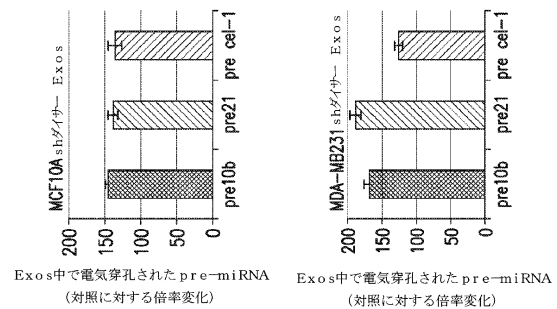
【図 14 - 3】

【図 14E～14F】



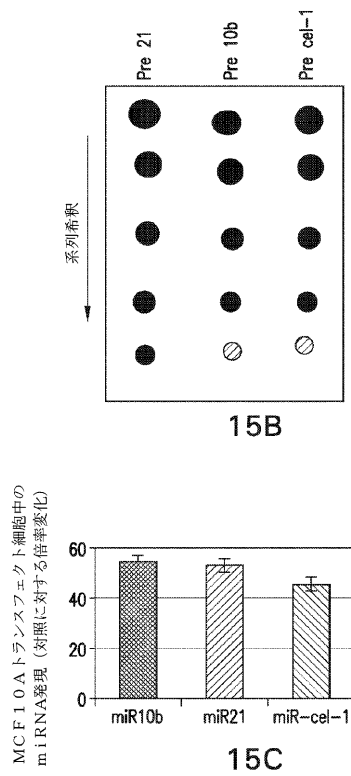
【図 15 - 1】

【図 15A】



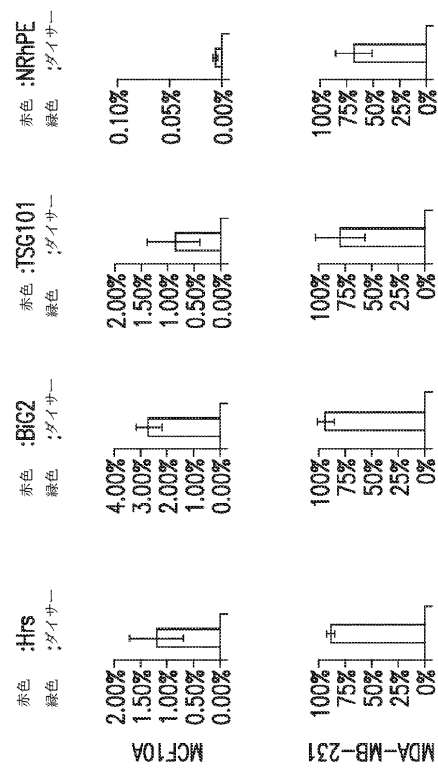
【図 15 - 2】

【図 15B～15C】



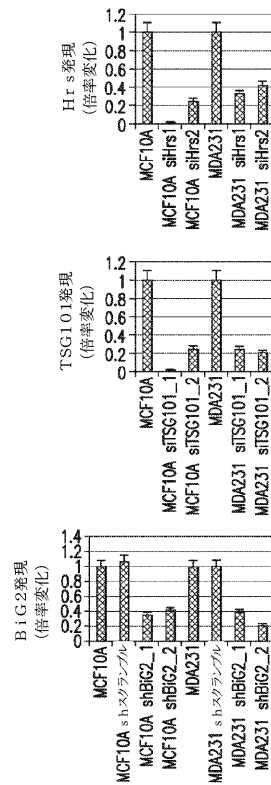
【図 16 - 1】

【図 16A】



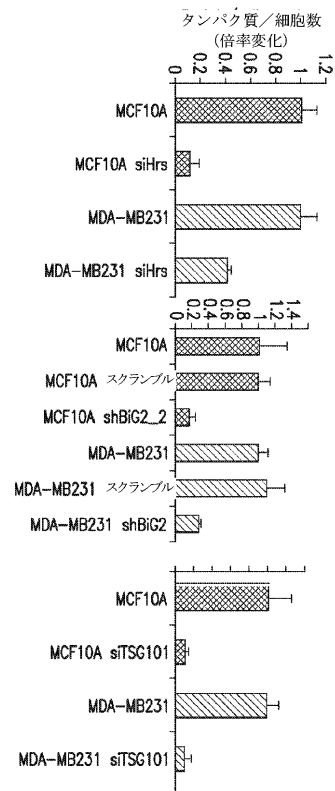
【図 16 - 2】

【図 16B】



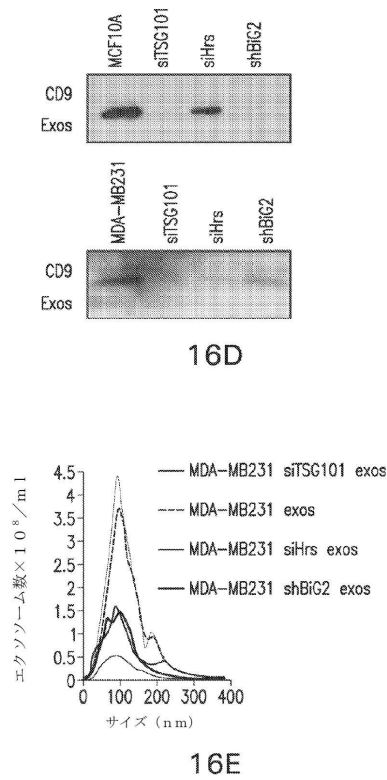
【図 16 - 3】

【図 16C】



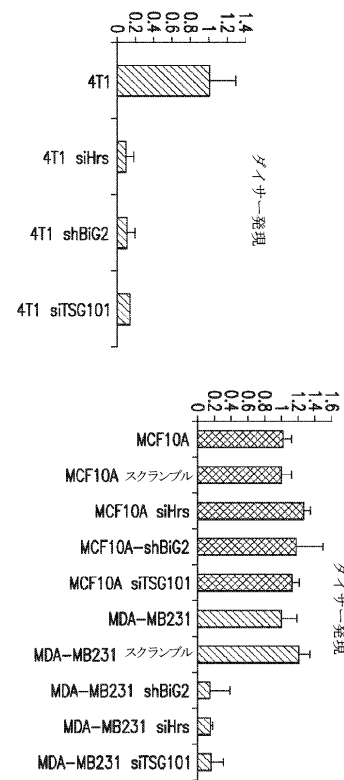
【図 16 - 4】

【図 16D~16E】



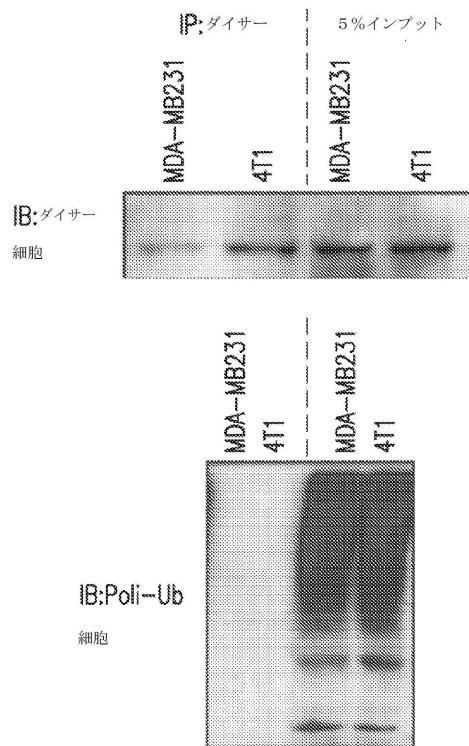
【図 16 - 5】

【図 16F】



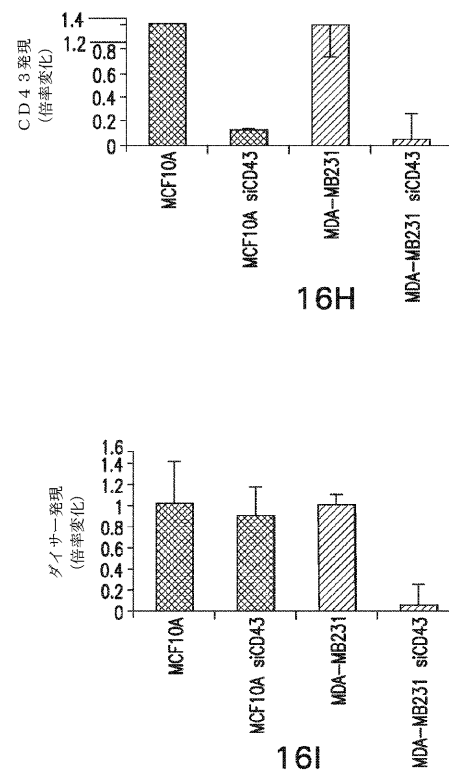
【図 16 - 6】

【図 16G】



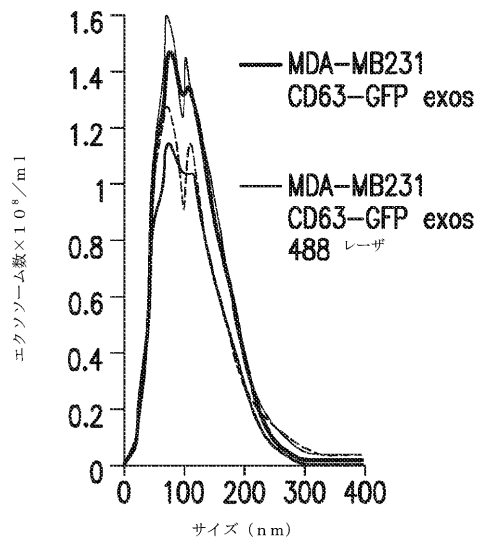
【図 16 - 7】

【図 16H~16I】



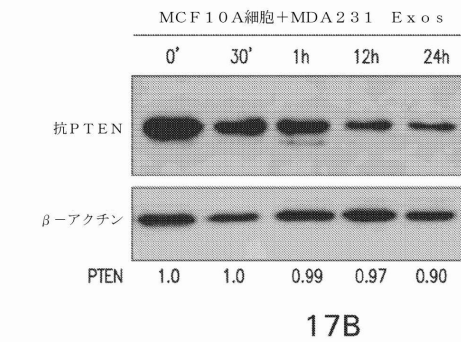
【図 17 - 1】

【図 17 A】

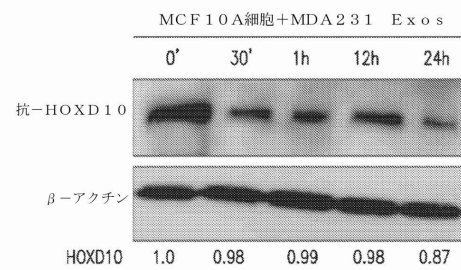


【図 17 - 2】

【図 17 B ~ 17 C】



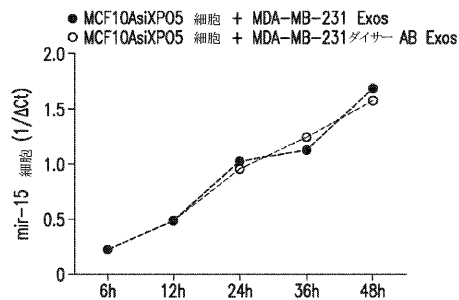
17B



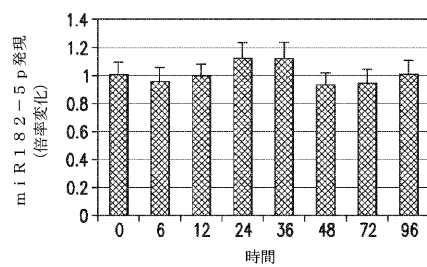
17C

【図 17 - 3】

【図 17 D ~ 17 E】



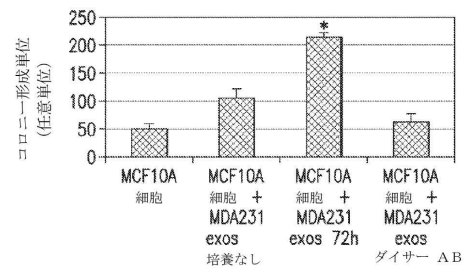
17D



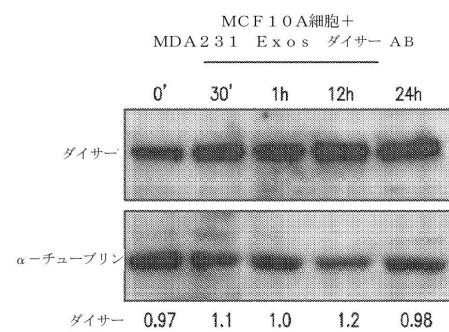
17E

【図 17 - 4】

【図 17 F ~ 17 G】

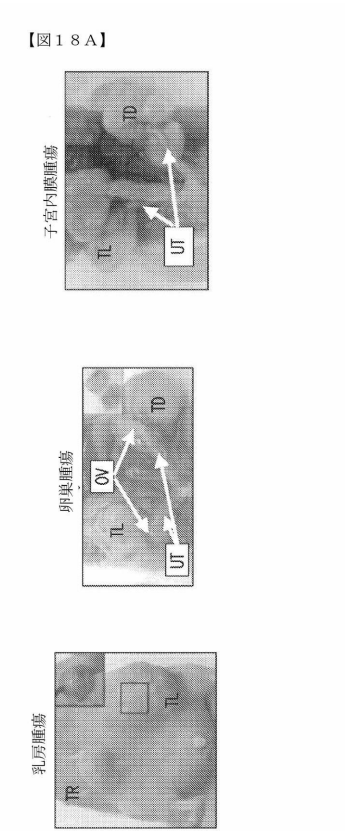


17F

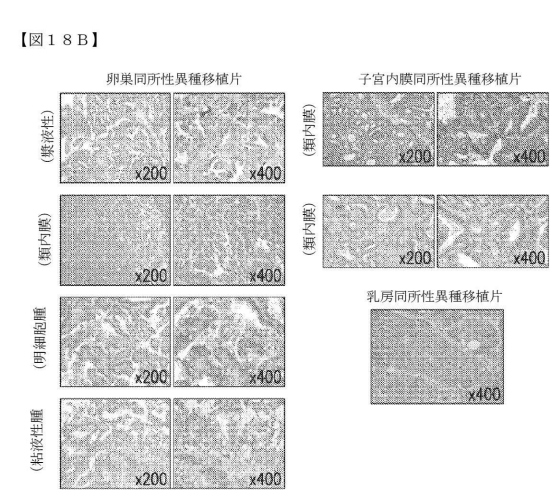


17G

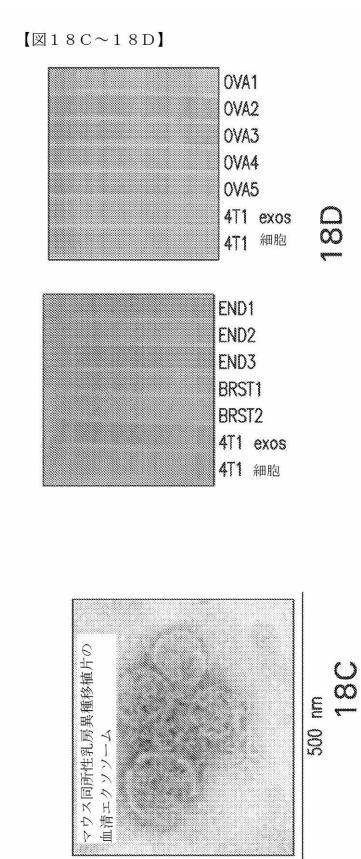
【図 1 8 - 1】



【図 1 8 - 2】



【図 1 8 - 3】



【配列表】

0006554458000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 カルリ, ラグフ

アメリカ合衆国 テキサス 77025, ヒューストン, マロニール ストリート 3726

(72)発明者 メロ, ソニア

アメリカ合衆国 テキサス 77004, ヒューストン, ファニン ストリート 5253,
アパートメント 2606

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特表2012-508577(JP,A)

国際公開第2013/022995(WO,A2)

特表2011-517283(JP,A)

国際公開第2012/125471(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

C12Q 1/68-1/6897

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)