

RNA デリバリーを目的としたエキソソームの
調製法に関する研究

(要約版)

2018

山下 拓真

目次

総論の部	1
緒言	1
第 1 章 エキソソーム回収法がエキソソームの特性に及ぼす影響の検討	2
1.1 各方法で回収したエキソソーム物性の比較	2
1.2 各方法によるエキソソーム収量の比較	4
1.3 各方法で回収したエキソソームを静脈内投与した際の血中濃度推移の比較	4
1.4 各方法で回収したエキソソームのろ過滅菌後回収率の比較	5
1.5 考察	5
第 2 章 効率的なエキソソーム回収のための培地体積の最適化	8
第 3 章 RNA 搭載法の開発を目的としたエキソソーム移行性 RNA 配列の探索	9
3.1 SELEX 法によるエキソソーム移行性配列の選別	9
3.2 SELEX 法により選別された配列の同定	10
3.3 配列 A のエキソソーム移行性の評価	12
3.4 考察	13
結論	14
謝辞	15
実験の部	
第 1 章	16
第 3 章	19
引用文献	21

総論の部

緒言

生体を構成する細胞は、遺伝子の転写、翻訳によりタンパク質を合成してその機能を維持している。したがって遺伝子の変異や遺伝子発現調節の異常は、しばしばがんをはじめとした疾患の原因となる。こうした遺伝子発現を調節可能な新しい医薬品として、短鎖 2 本鎖 RNA である short interfering RNA (siRNA)をはじめとした機能性 RNA を利用した RNA 医薬の治療応用が期待されている[1-3]。しかしながら RNA は生体内で酵素による分解を受けやすいため不安定であり、細胞膜を透過しにくいという性質も有することから、RNA 医薬の実用化には RNA を分解から保護し、標的細胞内へと効率的に送達可能なデリバリーキャリアの開発が必要である[1, 4]。内因性の RNA キャリアとして機能するエクソソームはその候補の一つとして期待されており、RNA キャリアとしてのエクソソームの利用可能性を示す報告もなされている[5-8]。

エクソソームは、様々な細胞が分泌する脂質二重層からなる直径 100 nm、密度 1.08-1.12 g/mL 程度の小胞であり、エンドソーム由来の多小胞体の開口分泌によって分泌される[9-12]。エクソソームには産生細胞に由来したタンパク質や核酸が内包されており、エクソソームを取り込んだ細胞にこれらの分子を送達する細胞間輸送キャリアとして機能しており、がんの転移や免疫機能など様々な生体内イベントに寄与することが知られている[10, 13]。生体内でマイクロ RNA (miRNA)などの RNA を輸送するキャリアとしての性質を有することから、エクソソームは安全かつ有効な RNA のデリバリーキャリアとなることが期待される。しかしながら、エクソソームを利用した RNA キャリアの開発に必要なエクソソームの産生方法や核酸の搭載方法については十分な検討がなされてはおらず、RNA を搭載したエクソソームの効率的な調製法は確立されていない。

そこで本研究では、エクソソームを利用した RNA デリバリーキャリアの開発を目的として、RNA 搭載エクソソームの効率的な調製方法の開発について検討した。具体的には、既存のエクソソーム回収方法の比較を行うとともに、エクソソーム回収効率増大のために培地体積の最適化を試みた。さらに、RNA 搭載方法の開発のため、エクソソーム移行性 RNA 配列の探索を行った。本研究で得られた結果を以下 3 章にわたり論述する。

第1章 エキソソーム回収法がエキソソームの特性に及ぼす影響の検討

エキソソームは様々な回収方法により回収可能であり、最も一般的に利用される超遠心法をはじめとして、サイズ排除クロマトグラフィー法、免疫沈降法、市販のエキソソーム濃縮試薬を用いた方法など多数の方法が用いられている[14, 15]。中でも、超遠心を用いた方法は最も一般的に使用されている方法である。この方法は低コストであり、分離試薬の混入も起こらず、エキソソームの収量が比較的高い等の利点を有する[14]。エキソソーム回収用の市販試薬を用いる方法は最も簡便であり、試料とインキュベートした後、低速で遠心分離することによってエキソソームを回収可能な試薬が代表的なものとして挙げられる。この方法は簡便であり特別な機器を必要としない点が大きな利点である[14]。

これらの回収法間では、回収中にエキソソームがおかれる環境が異なるために、回収されるエキソソームの状態が異なることが予想される。また、エキソソーム自体が多様な小胞が混合したヘテロな集団であることも明らかになってきており[16-18]、回収原理の異なるこれらの方法間では回収される小胞の特性も異なると考えられる。実際に先行研究では、回収法により、回収されるエキソソームの形態や、含有する miRNA およびタンパク質の組成などが異なることが報告されている[19-21]。一方で、デリバリーキャリアとしての利用を念頭に回収法について検討した研究は存在せず、回収法がエキソソームの製剤的特性に及ぼす影響については情報が乏しかった。そこで本章では、異なる回収法で回収したエキソソームについて収量、物性などを比較した後、ろ過滅菌後の回収率や静脈内投与後の血中濃度を比較した。

モデルのエキソソーム産生細胞としては、当研究室で繁用されており、エキソソーム産生量の多いマウスメラノーマ細胞株 B16BL6 細胞を選択した。比較する回収法としては、デリバリーキャリアとしての利用を念頭に、低コストで、エキソソームの希釈や抗体など投与に不適な試薬の混入の危険性が少ない超遠心を用いた3種類の方法と、操作が簡便な市販試薬を用いた方法を選択した。具体的には、超遠心によりエキソソームを沈殿させる方法(Pelleting 法)、超遠心により Iodixanol 溶液上にエキソソームを集める方法(Cushion 法)、Iodixanol 密度勾配遠心法(Gradient 法)および市販試薬 ExoQuick-TC を用いた方法(Reagent 法)を比較した。静脈内投与後の血中濃度推移およびろ過滅菌後の回収率の比較においては、当研究室で開発したエキソソーム指向性レポータータンパク質である、発光タンパク質 *gaussia luciferase* (gLuc)とエキソソーム膜結合タンパク質 *lactadherin* (LA)の融合タンパク質 gLuc-LA[22, 23]を用いた。

1.1 各方法で回収したエキソソーム物性の比較

B16BL6 細胞よりそれぞれの方法でエキソソームを回収し、透過型電子顕微鏡(TEM)により観察した(Figure 1A)。その結果、Reagent 法で回収したサンプルは数 μm 程度の大きな凝集体を多数含んでいることが確認され、画像解析の結果からもこれらの凝集体が画像内で多くの面積を占めていることが示された(Figure 1B)。こうした凝集体はエキソソーム本来の体内動態や機能とは大きく異なり、デリバリーキャリアとしての利用には不適と考えられたため、Reagent 法は以降の検討では除外することとした。1 μm を超えるような凝集体はその他の方法では確認されなかったものの、Pelleting 法と Cushion 法で回収したサンプルには数個程度のエキソソームの凝集体とみられる粒子が Gradient 法と比較して多く観察された。そこで Tunable resistive pulse sensing (TRPS) [24, 25] により各サンプルにおける粒子の粒度分布を測定した。その結果、Pelleting 法および Cushion 法で回収したエキソソームは Gradient 法で回収したエキソソームと比較して 100 nm 以上の粒子を多く含んでおり、平均粒子径はそれぞれ 111, 109, 85.3 nm であった(Figure 1C)。

ゼータ電位については、それぞれ-35.8, -37.5, -36.2 mV と同程度であった。またウエスタンブロッティングによってすべてのサンプルでエクソソームマーカータンパク質 Alix, HSP70 および CD63 が検出されることを確認し、同時に細胞片の混入の指標である Calnexin が検出されないことを確認した(Figure 2)。

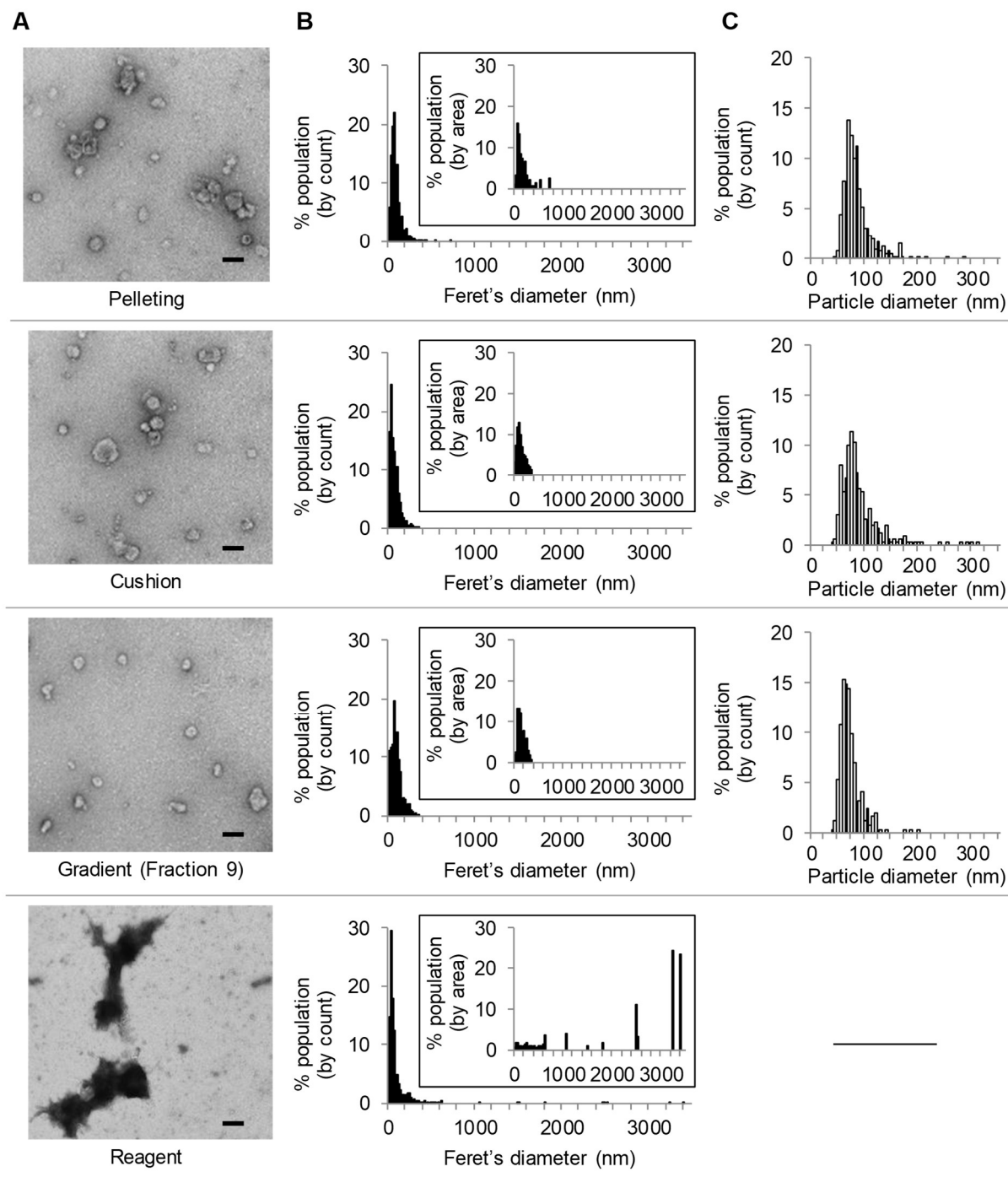


Figure 1. (A) Transmission electron microscopy (TEM) images of collected exosomes. TEM images of samples collected by pelleting, cushion, gradient, and reagent methods. Scale bar in the image of the sample from the reagent method represents 500 nm, and scale bars in the other images represent 100 nm. (B) Histograms of particle size distribution obtained by analyzing the TEM images. Vertical axis of larger histograms shows % population by number (by count) and that of the smaller one shows % population by occupied area (by area). (C) Histograms of particle size distribution determined by TRPS.

1.2 各方法によるエクソソーム収量の比較

各回収法によるエクソソームの収量をタンパク質定量および TRPS による粒子数測定により評価した。その結果、Pelleting 法では他の方法と比較して回収されるタンパク量が有意に高かったものの、粒子数については各方法間で有意な差は見られなかった(Figure 3)。

1.3 各方法で回収したエクソソームを静脈内投与した際の血中濃度推移の比較

上記の検討で確認された凝集の程度の違いは、静脈内投与後のエクソソームの血中濃度推移に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、各方法により回収したエクソソームの血中濃度推移を比較した。各方法で gLuc-LA 標識エクソソームを回収し、標識効率については大きな違いは存在しないことを確認した(Figure 4A)。回収した gLuc-LA 標識エクソソームをマウス尾静脈より投与し、継続的に血清中 gLuc 活性を測定した。その結果、どの回収法で回収したエクソソームについても投与後速やかに血中から消失し、方法間で大きな差は見られなかった(Figure 4B; Table 1)。

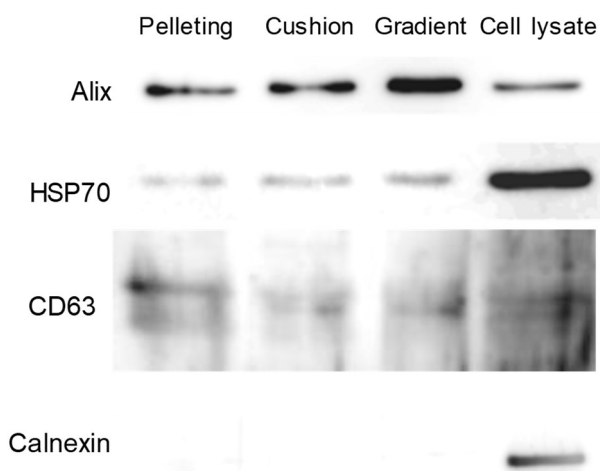


Figure 2. Confirmation of marker proteins in exosome preparations. Western blotting of samples by anti-Alix, anti-HSP70, anti-CD63, and anti-calnexin antibody.

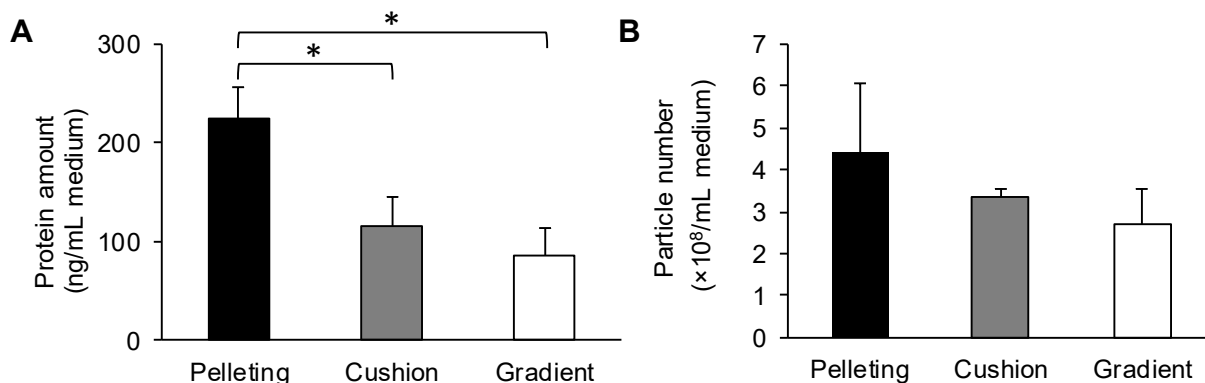


Figure 3. Yield of exosomes by each method. Yield of exosomes was estimated by (A) protein amount quantification and (B) particle number determined by TRPS. These results are expressed as means \pm standard deviations (n = 4). *: p < 0.05.

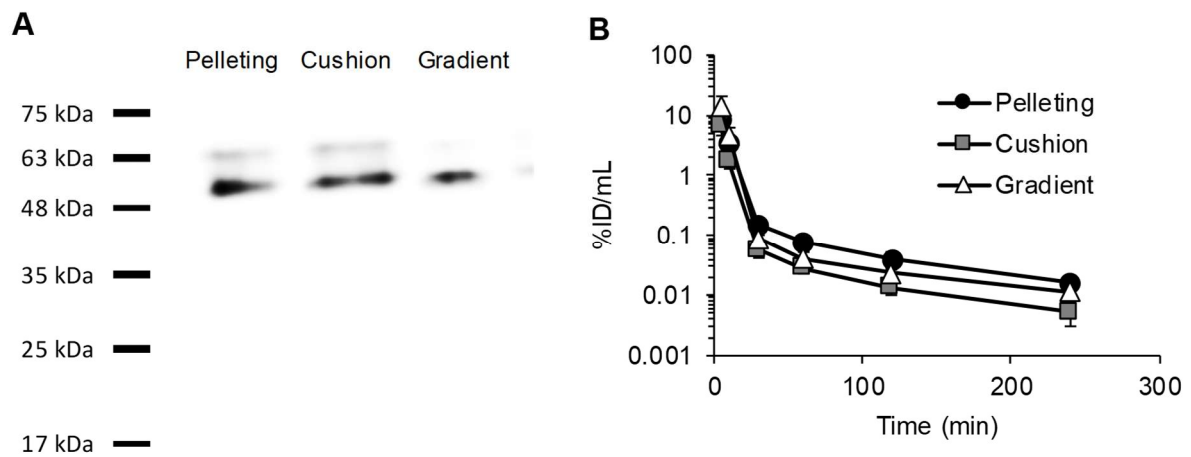


Figure 4. (A) gLuc zymography of gLuc-LA labeled exosomes collected by the three ultracentrifugation-based methods. (B) Time course of serum concentrations in each sample in mice after intravenous injection of the exosomes collected by pelleting (circles), cushion (squares), and gradient method (triangles). These results are expressed as means \pm standard deviations (n = 3).

Table 1. Pharmacokinetic analysis of intravenously injected exosomes

Sample	$T_{1/2} (\alpha)$ (min)	AUC (% ID·hr/ml)	MRT (hr)	CL (mL/hr)
Pelleting	3.66 \pm 0.69	2.61 \pm 0.75	0.26 \pm 0.02	40.2 \pm 10.4
Cushion	2.57 \pm 0.11	2.03 \pm 0.58	0.13 \pm 0.02	52.5 \pm 16.4
Gradient	3.28 \pm 0.66	4.09 \pm 2.11	0.17 \pm 0.04	28.2 \pm 11.2

1.4 各方法で回収したエクソソームのろ過滅菌後回収率の比較

エクソソームの製剤としての利用に際しては滅菌が必要になると考えられる。そこで各エクソソームを孔径 0.2 μ m のシリンジフィルターに通過させた際の回収率を比較した。Pelleting 法、Cushion 法、Gradient 法で回収したエクソソームのろ過滅菌後の回収率は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁した場合にはそれぞれ 9 %, 7 %, 25 % (Figure 5A)、2%ウシ血清アルブミン(BSA)を含む PBS で懸濁した場合にはそれぞれ 48 %, 41 %, 82 % (Figure 5B)と、いずれも Gradient 法で回収したエクソソームの回収率が有意に高かった。また、エクソソームマーカータンパク質の一つである Alix の量を指標にろ過滅菌後の回収率を比較した場合にも、gLuc 活性を指標とした場合と同様の結果が得られた(Figure 5C, D)。

1.5 考察

市販試薬を用いた方法は、操作が簡便であり超遠心機などの高価な機器を必要としないという利点をもっている。しかしながら、既報[26, 27]とも一致するように、市販試薬である ExoQuick-TC を用いて回収したエクソソームは、多数の巨大な凝集体を形成した。このような過度の凝集はエクソソームの性質を大きく変化させるとともに製剤としての均一性を損なわせることから、エクソソームのデリバリーキャリアとしての応用には不適であると考えられる。

エクソソームの収量について、タンパク質定量と粒子数測定の種類の方法で評価したが、Pelleting 法で回収したサンプル中のタンパク量が他と比較して多かったものの、粒子数には有意な差が認められないという結果が得られた。この結果の乖離は、Pelleting 法でのタンパク質凝集体の混入を反映しているものと考えられる[28]。高密度のタンパク質凝集体は、Pelleting 法ではエクソソームと同様に沈殿し混入

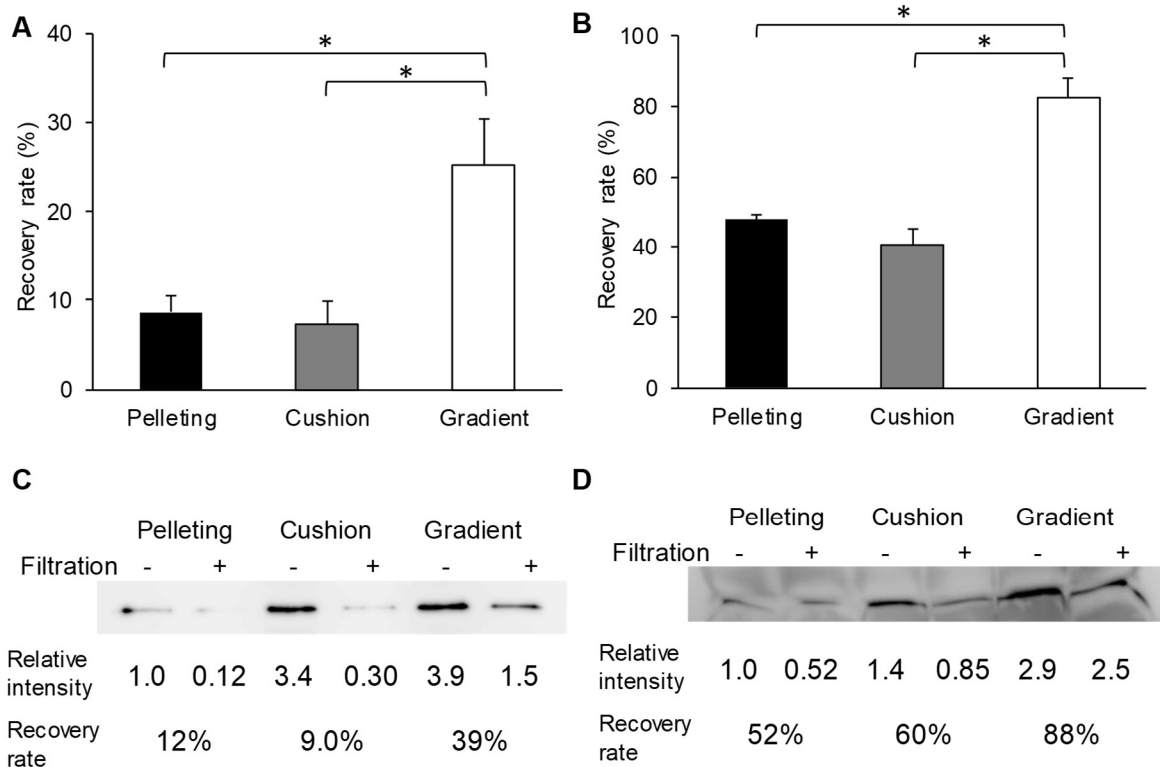


Figure 5. Recovery rate after sterile filtration. Recovery rate of the exosome collected by the pelleting (closed column), cushion (gray column), and gradient method (white column) suspended in (A) phosphate-buffered saline (PBS) or (B) PBS containing 2 % BSA after sterile filtration by 0.2 μm syringe filter estimated by measuring gLuc activity. These results are expressed as means \pm standard deviations ($n = 3$). *: $p < 0.05$. (C) and (D) Western blotting of samples diluted in (C) PBS or (D) PBS containing 2 % BSA before and after filtration.

する可能性が高い。一方で、他の Iodixanol を用いた方法では、エクソソームよりも密度が大きな凝集体はエクソソームよりも下の位置に沈降するため分離可能である。等量のタンパク質を用いてウエスタンブロットティングを行った場合に、Pelleting 法で回収したサンプルの Alix 由来バンドの強度が弱い(Figure 5C, D)という結果も、この考察を支持している。したがって、今回比較した各種方法間ではエクソソームの収量に大きな違いはないものの、非エクソソーム由来のタンパク質の混入の度合いが異なると推察される。またタンパク質定量はエクソソームの定量に用いられる一般的な方法であるが、Caradec らの報告[29]にもあるように、タンパク質の混入によりエクソソーム量を正しく反映しない場合があることが示唆された。

今回の結果と同様に、Pelleting 法により凝集したエクソソームが回収されるという報告は存在していた[19, 30]ものの、その原因については詳細な情報が存在しなかった。Pelleting 法および Cushion 法で凝集が見られたという今回の結果から、凝集の原因は超遠心によるエクソソームの沈殿の際にかかる機械的圧力や、局所的なエクソソーム濃度の上昇であると示唆される。Gradient 法では超遠心チューブの下端に押し付けられるような圧力を受けることなく、また等密度の溶液部分に分散して存在することができるために影響が少なかったと推察される。

静脈内投与後の血中濃度推移については、いずれの方法で回収したエクソソームも以前の検討[22, 23, 31]と同様のプロファイルを示した。以前の検討により、静脈内投与されたエクソソームは主に肝臓、脾臓のマクロファージにより取り込まれて血中から速やかに消失することが明らかとなっている[23, 31]。またマクロファージによる認識については、エクソソームの負電荷が一つの要因であることが報告されている[32]。これらのことを考えると、エクソソームのマクロファージによる認識には電荷や表面に存在するタンパ

ク質[33, 34]などの表面状態の寄与が大きく、今回見られた凝集の程度の違いはマクロファージによる認識には大きな影響を及ぼさなかったために、同様の速やかな血中からの消失が観察されたと考えられる。

ろ過滅菌後の回収率については、gLuc-LA と Alix のどちらを指標にした場合にも Gradient 法で回収したエクソソームの回収率が他と比較して有意に高かった。凝集した大きな粒子が多いほどフィルターを通過しにくいと考えられるため、回収法による凝集状態の違いがろ過滅菌後の回収率に影響していることが示唆される。エクソソームを PBS で懸濁した場合には回収率はどの群でも 30 %以下と低かったが、これは密度勾配遠心法で回収したエクソソームの 20 %以下しか滅菌フィルターを通過しなかったとする過去の報告[28]と同様の傾向を示している。0.2 μm 以上の粒子の割合がそれほど多くないにもかかわらずこのような低い回収率を示すことから、この消失の原因はエクソソームのフィルターへの吸着であると考えられる。BSA や多糖などで報告されているように、ろ過滅菌後の回収率はフィルターの孔径や素材などの要因により変動する[35, 36]。今回用いたフィルターはセルロース製であり、電荷をもたず負電荷のウイルスの吸着も起こしにくいことが報告されている[37]ことから、エクソソームは静電的相互作用ではなく疎水的相互作用によってフィルターに吸着し大部分が失われているのではないかと考えられる。また 2 % BSA の存在下では回収率が最大 80 %程度と大きく改善したことから、BSA の添加によりそのエクソソームとフィルター間の相互作用が阻害されて回収率が改善したことが示唆される。BSA 存在下においても、Gradient 法で回収したエクソソームの回収率が高かったことは、凝集状態の違いによりろ過滅菌後の回収率が変化していることを裏付ける結果である。しかしながら BSA 存在下においても、TRPS による測定の結果直径 200 nm 以上の粒子数はそれよりも少ないにもかかわらず、Pelleting 法および Cushion 法で回収したエクソソームの約 50 %、Gradient 法で回収したエクソソームの約 20 %がフィルターを通過しなかった。これについては、凝集したエクソソームは 1 粒子当たりより多くの gLuc-LA および Alix を搭載していることが一つの原因であると考えられる。また、凝集したエクソソームは球状ではないため、最大長が TRPS の測定結果よりも長く、フィルターに捕捉されやすい粒子が存在することもその一因となりうる。加えて、リポソームでの検討において直径 200 nm 以下のリポソームもフィルターに捕捉されることが報告されている[38]ことから、エクソソームでも同様のことが起こっている可能性がある。

以上、第 1 章ではエクソソームの回収法を比較し、回収法によりエクソソームの分散状態が異なること、それにより静脈内投与後の血中濃度推移には影響がないものの、ろ過滅菌後の回収率に影響することを明らかにした。これらの結果より、エクソソーム回収法の最適化が製剤としての利用に適した状態のエクソソームの回収に重要であることが示された。

第2章 効率的なエクソソーム回収のための培地体積の最適化

第2章 効率的なエクソソーム回収のための培地体積の最適化

エクソソームの利用を考えるうえで、エクソソームの回収量の低さは大きな問題の一つである。第一章において各回収法によるエクソソーム回収量が大きく変わらなかったことを考えると、回収量を増やすためには培養上清中に含まれるエクソソーム量を増大させることが必要と考えられる。

エクソソームの産生量は、ドキソルビシンの添加や低酸素、低 pH などの刺激により上昇することが報告されている[39-41]。しかしながら、刺激を受けた細胞から産生されるエクソソームはその組成や機能が変化することも同時に報告されている。従って、こうした細胞に刺激を与える方法によるエクソソーム産生の増大方法は、治療への応用を目的としたエクソソームには適さない可能性があると考えられる。

通常の培養環境において培養された細胞を用いた場合、その培地中のエクソソーム量には上限が存在するという報告が存在する[42]。この報告から、細胞の培養時には、培地中のエクソソーム濃度の経時的な上昇によりエクソソームの細胞取り込み速度が上昇していくために、見かけのエクソソーム産生速度が低下していき、エクソソーム濃度が上限に達しているのではないかという仮説を立てた。この仮説に基づき、回収時の培地体積を増大させることでエクソソームの性質を変化させることなく細胞数当たりのエクソソーム回収量が増大可能ではないかと考えた。一方で、培地中に存在するエクソソームが産生細胞に何らかのシグナルを与えることでエクソソーム産生が低下するという仮説も提唱されている。そこで、モデルの産生細胞として第一章と同様 B16BL6 細胞を選択しこれら仮説の検証を行った。

まず B16BL6 細胞の培養上清中エクソソーム量を経時的に測定したところ、およそ 12 時間でプラトーに達した。この原因としては、自己のエクソソームがエクソソーム分泌を負に制御している可能性も考えられた。しかしながら、あらかじめエクソソームを加えた状態で培養しても新規に分泌されるエクソソーム量に変化しないこと、エクソソームが濃度依存的に細胞へと取り込まれることが確認されたことから、プラトーに達する原因は、培養上清中エクソソーム濃度の上昇に伴ってエクソソームの取り込み速度が上昇し見かけの産生速度が低下するためであると示唆された。この結果をもとに、エクソソーム回収時の培地量を変化させたところ、培地量が多いほど細胞当たりのエクソソーム回収量が増加することが示された。

以上、第2章では効率的なエクソソーム回収には培地体積の増大が有効であることを示した。

第 3 章 RNA 搭載法の開発を目的としたエクソソーム移行性 RNA 配列の探索

エクソソームへの RNA 搭載法には大きく分けて 2 つの方法が存在する。一つは回収したエクソソームに外的刺激により RNA を搭載する方法で、エレクトロポレーションが繁用されている。しかしながら、エレクトロポレーションにおいては、電極に用いた金属と RNA との凝集体を作るために見かけの搭載効率は高くなるものの、実際にはエクソソームへの RNA 搭載効率は低いことが報告されている[49]。加えて、エレクトロポレーションがエクソソームを変性させて凝集体を形成させることも報告されている[50]。エレクトロポレーションの他にもリポソームと融合させる方法などいくつかの方法が報告されているが[51]、いずれも外的刺激によりエクソソームの性質を損なう可能性が高いと考えられ、デリバリーキャリアとしての利用に適さない可能性がある。もう一つの方法はエクソソーム産生細胞内の内因性の機構を用いて産生されるエクソソームに RNA を搭載する方法である。RNA もしくは RNA をコードしたベクターを産生細胞に導入し、エクソソームを回収することで RNA を搭載可能であり、エクソソーム自体には特別な操作を加えないことからエクソソームの変性などを引き起こさないと考えられる。しかしながら、この方法でも高効率にエクソソームへ RNA を搭載する方法は確立されておらず、応用は困難である。

内因性の RNA 搭載機構についてはいまだ不明な点が多い。先行研究では、神経膠芽腫細胞由来エクソソーム中の RNA には zipcode と名付けられた CUGGC および miR-1289 結合部位の両方を含む配列が多数存在することが報告されている[52]ほか、エクソソーム中に高頻度に発見される配列の存在が示されている[53]。上述した zipcode 配列については、green fluorescent protein (GFP)をコードする配列と zipcode 配列を結合させたプラスミドを細胞に導入することで、エクソソーム中の GFP mRNA 量が 2 倍程度上昇することが示されている。このようにエクソソーム移行性を持つ配列は目的 RNA のエクソソームへの搭載に有用ではあるものの、その効率は高くない。エクソソームの回収量が少ないことを考えても、治療効果を発揮できる量の RNA を含むエクソソームを得るためには、RNA 搭載効率を少しでも向上させることが望ましい。先行研究ではエクソソーム中に存在する RNA の網羅的解析によりエクソソーム移行性 RNA を探索しているため、内因性に存在しない配列の探索は不可能である。そこで、こうした手法とは異なる新たな配列探索手法として、合成したランダム配列を用いたスクリーニング法によるエクソソーム移行性配列の探索を試みた。この方法は、内因性には存在しないエクソソーム移行性配列の探索が可能である点、また必ずしも大規模な配列解析を必要としない点で従来法よりも優れていると考えられる。

本研究では、モデル細胞として B16BL6 細胞を用い、ランダム配列を含む 80 塩基の DNA プールを用いてアプタマーの選別に用いられる systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)法 [54]によるエクソソーム移行性配列の探索を行った。

3.1 SELEX 法によるエクソソーム移行性配列の選別

Figure 11 に示すように、調製した RNA プールをリポフェクションにより細胞に導入し、産生されたエクソソーム中 RNA から新たな RNA プールを調製する一連の SELEX 法の手順を 12 ラウンド実行した後、エクソソーム移行性配列の選別が行われているかどうかを確認した。配列の多様性が低くなる、すなわち配列の選別が進むほど相補でない 2 本鎖の形成確率が低下することから、融解温度(T_m)が上昇することが報告されている[55]。0,4,8,12 ラウンドの SELEX を行った後の DNA プールの融解温度曲線は Figure 12 の通りで、ラウンドが進むほどに T_m が増加したことから、配列の多様性が減少しており、目的通り配列が選別されていることが示された。

3.2 SELEX 法により選別された配列の同定

Figure 12 の融解温度曲線より、ラウンド 8 および 12 では DNA プールの多様性が十分低下していると判断し、これらのプール中の DNA 配列を調べた (Table 3)。その結果、A と名付けた配列が 56 クローン中 29 クローンと最も多く同定された。また A と数塩基の置換を持つ相同性の高い配列もいくつか存在した。一方初期 DNA プールではこうした配列の偏りは見られなかった (Table 4)。この結果からも、SELEX 法により配列が選別されたことが示された。

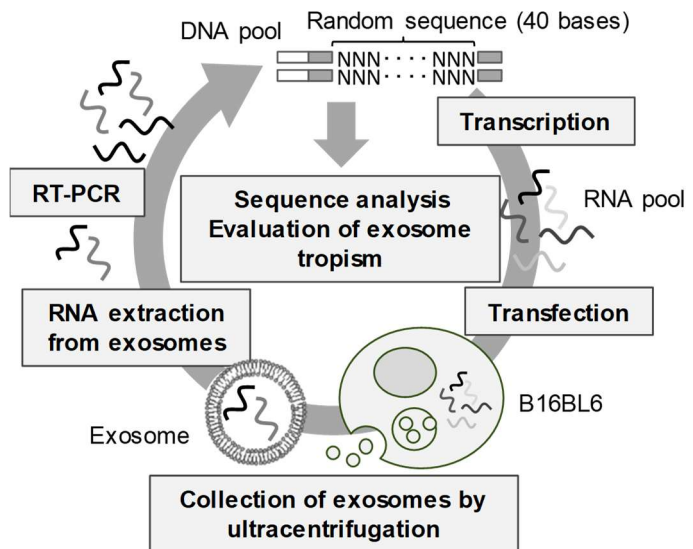


Figure 11. Schematic outline of the SELEX procedure against exosomes.

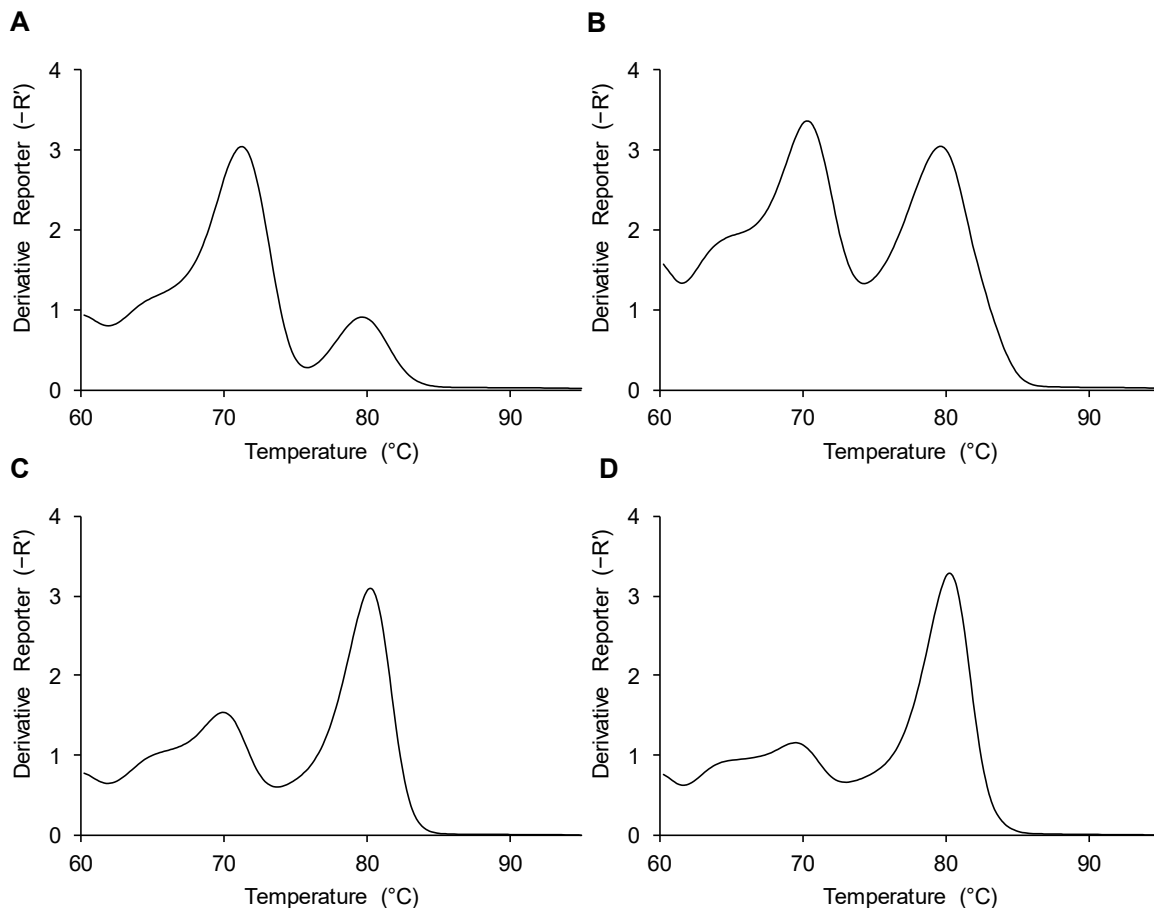


Figure 12. Melting profiles of DNA pool from 0, 4, 8, and 12 SELEX rounds. The assay is based on heat denaturation of PCR products of DNA pool from (A) 0, (B) 4, (C) 8, and (D) 12 SELEX rounds in the presence of an intercalating dye. At the melting temperature of the PCR product, DNA strands separate and fluorescence intensity decreases. This figure shows negative first order derivatives of melting curves with respect to temperature.

Table 3. The RNA sequences found from round 8 and 12 RNA pools

ID	Sequence	Number of colonies
A	GUUUCGGUGCGGC <u>A</u> UUC CC CUGGAUCUGUGAUUUUCUGAUA	29
B	GUUUCGGUGC <u>U</u> GC AUUC CC CUGGAUCUGUGAUUUUCUGAUA	3
C	G <u>U</u> U <u>C</u> CGGUGCGGC AUUC CC CUGGAUCUGUGAUUUUCUGAUA	1
D	G <u>U</u> UUCGGUGCGGC <u>A</u> <u>C</u> UC CC CUGGAUCUGUGAUUUUCUGAUA	1
E	<u>U</u> UUUCGGUGCGGC AUUC CC CUGGAUCUGUGAUUUUCUGAUA	1
F	GUUUCGGUGCGGC AUUC CC CUGGAC CUGUGAUUUUCUG <u>A</u> <u>G</u> A	1
G	GUUUCGGUGCGGC AU <u>U</u> CC CUGGAUCUGUGAUUUUCUGAUA	1
H	GUUUCGGUGCG <u>G</u> U AUUC CC CUGGAUCUGUGAUUUUCUGAUA	1
I	<u>G</u> <u>C</u> UUCGGUGC <u>U</u> GC AUUC CC <u>U</u> UGGAUCUGUGAUUUUCUGAUA	1
J	GUUUCGG <u>U</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> AUUC <u>U</u> C CUGGAUCUGUGAUUUUCUGAUA	1
K	GUUUCGAUGUCGC UUUC CUCUGGAUGUGUGAUUUUGUGAUA	1
L	UAUCCUCGC CUGGAUCC AGCUCUGUUAGUUUUUCC AAGUA	1
M	GGUUAGAGCUCUCUGAGGACUUCGUGUUUGUUCUGUUCGA	1
N	GCAUUUUUGAUUUUGUUGCGGUUGAUCUGGUUUUGGUCUGUU	1
O	CUGAUUUUGCAGCGUUUCAUCCUCUCUGUCUUC AUCUG	1
P	UAGUUUCUGUAAAGUUGUACCUCUUGUUGUGAUC CAAGC	1
Q	AGUUUUCUUUUGCCGUGGGGUGACGUGAGUUC CGGUUUC	1
R	GUUCUGCUGACGGAAUAGAUGAUGCUCCCGGGUCCGUC	1
S	GUUGAUUUUGUUC AUCGAGUUUCCUUUCUGGGGUUGUAUGA	1
T	CUUGACUUUUCGGUGCGCGGUUC CUUC CAGGGUCUGA CUA	1
U	AGUUAACCUUAGUUCUC AUUAGUCUUGUGGUAGUUUUGGU	1
V	CCAGUCUUGCCUUCCGUCGUUUCGGAUCCGUUUUGAAAC	1
W	CUGCUCUGAUUGUUUUCUUGC CCUC CUUUGGGGAUACAGG	1
X	GUACUGUUUUUCUGUGGUUUCUGCCUC CUUUGGGUC AUC	1
Y	UUUGGAU <u>U</u> UGG CUGUGACUACUCUGGGUC CGUUUAUAC	1
Z	UUGUUCAGAUUCGGAGAUAAUUUUC CUACUGGGGGCCUGU	1

RNA sequences found in 56 clones of round 8 and 12 RNA pools were shown. Only the sequences of the initially randomized 40-nucleotide part of the collected RNAs are presented. Underlining indicates the different bases from RNA-A sequence in the RNA-B to RNA-J.

Table 4. The RNA sequences found from round 0 RNA pool

ID	Sequence	Number of colonies
A	UCGAAAUCGUAUGCAUAAUCUACAGCUAAAUAUCUGACGA	1
B	UUC <u>C</u> CCUCGUC <u>A</u> UCCGUAGGCCGACGGAGCUGCGGACCUC	1
C	UUUAACACGGACUUUAUAGUCUAGUCCUUCAGCUUUCGGU	1
D	UUUGGUGGCUGUGACCCGUGUAGGCUCUACGGUUUCUCUU	1
E	UU <u>A</u> UUGUUCAUUUAGCGGGGU <u>A</u> UCGCUCUAGCCACCGCG	1
F	GCUUACACGCUUUUGGUUUUCUCCUUUUGGUUAUAGUCA	1
G	UUUGAGGGUUUUUAGAUACGCCGGUUCUAGUCUAAUGU	1
H	GGACAUUGGCGGUGCCGUGCUCGUAUUUGUCUUAUUUGC	1

RNA sequences found in 8 clones of round 0 RNA pool were shown. Only the sequences of the initially randomized 40-nucleotide part of the collected RNAs are presented.

3.3 配列 A のエキソソーム移行性の評価

同定した配列のうち4つの配列、配列 A, K, O, S と初期 RNA プール(round 0)について B16BL6 細胞に導入しエキソソーム移行性を評価した。その結果、エキソソーム回収時点での細胞内の RNA 量は各群で有意に変化しなかった一方で、エキソソーム中 RNA 量は配列 A が最も多く、round 0 と比較して有意に多かった(Figure 13)。続いて配列 A のスクランブル配列である Scr-A と配列 A のエキソソーム移行性を比較した。その結果、細胞内では両配列の量に有意な差が見られなかった一方で、Scr-A と比較してエキソソーム中の配列 A の量が 8 倍程度と有意に高かった(Figure 14)。

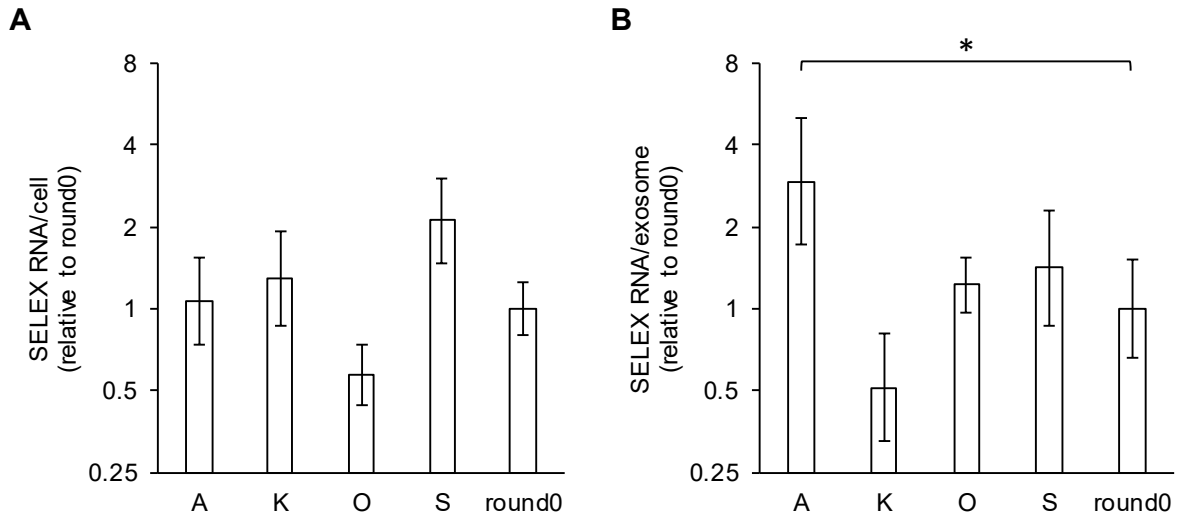


Figure 13. Quantification of RNA amount in exosomes and cells after transfection of each RNA. After transfection of each RNA into B16BL6 cells, the RNA amount in (A) cells and (B) exosomes were quantified. Round 0 was used as a control. The results are expressed as the means \pm standard deviations ($n = 3$).

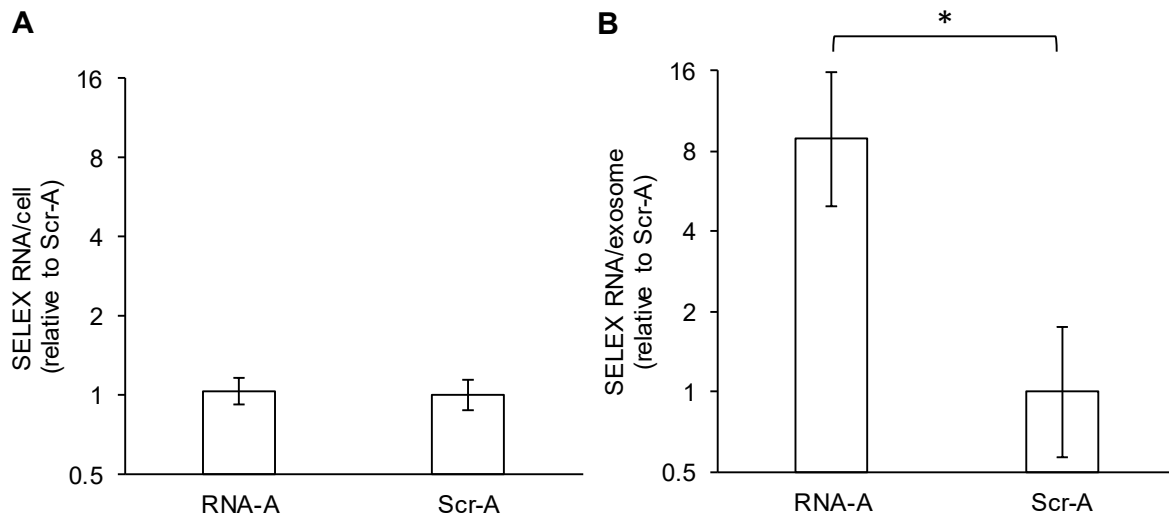


Figure 14. Quantification of RNA amount in exosomes and cells after transfection of RNA-A and the scrambled sequence. After transfection of each RNA into B16BL6 cells, the RNA amount in (A) cells and (B) exosomes were quantified. The results are expressed as the means \pm standard deviations. ($n = 5$).

3.4 考察

本研究ではエクソソーム移行性配列の探索のため、SELEX 法を用いた。エクソソーム移行性配列の探索については、冒頭でも述べたようにエクソソーム中 RNA を情報科学的手法により分析することにより行った先行報告が存在する[52, 53]。これらの先行研究の手法と比較した際に、今回の研究で用いた SELEX 法にはいくつかの利点が存在する。一つは内因性には存在しないエクソソーム移行性配列が発見できる可能性があること、もう一つは必ずしも大規模なシーケンシングを必要としない点である。また、目的の細胞でスクリーニングを行うことでその細胞で確実にエクソソーム移行性をもつ配列を探索可能なこと、RNA 搭載機構が不明でもスクリーニングを行うことが可能であることも利点だといえる。一方で、今回の方法では、最も多くエクソソームに搭載されているとされる 20 塩基程度の塩基長の配列の探索が不可能な点が欠点としてあげられる。これは増幅に polymerase chain reaction (PCR)を用いるために合計 40 塩基のプライマー結合部位が必要となるためである。アダプター-PCR を用いる方法など SELEX 法を改変した方法も報告されており[56]、こうした方法が短鎖 RNA の探索に利用できる可能性がある。また見出した配列のエクソソーム移行性に関与する部分のみを抽出することで、より短いエクソソーム移行性配列を得られる可能性もある。他に、このようなスクリーニングにおいては、PCR の増幅効率をはじめとした各プロセスでのバイアスが結果に影響する可能性があることが指摘されている[57, 58]。エクソソームから回収される微量な RNA を増幅せずに用いることは非常に困難であるから、この解決は現状では難しいと考える。ただし、今回問題なくエクソソーム移行性配列の探索に成功したことから、上記のようなバイアスによってエクソソーム移行性がより高い配列を見逃している可能性を否定することはできないけれども、こうしたバイアスの影響はそれほど大きくはないと考えられる。

SELEX 法によるスクリーニングの後、見つかった配列を比較し、配列 A のエクソソーム中の量が有意に増加した一方で、エクソソーム回収時の細胞内 RNA 量には有意な差が確認されなかったことを示した。この結果は、配列間で細胞への導入効率や安定性には大きな違いがなく、配列 A が細胞内でエクソソームに搭載されやすいことを示唆している。エクソソームへの移行量が増大したにもかかわらず細胞中の RNA 量は有意に減少しなかったが、これはエクソソーム中に搭載された RNA 量が細胞中の RNA 量と比較して非常に少ないために差が検出できなかったものと考えられる。配列 A はスクリーニング後のプール中に最も高頻度で見つかった配列であり、これが最も高いエクソソーム移行性を示すという結果は、SELEX 法によりエクソソーム移行性配列の選別に成功していることを示している。

見出した配列 A は、先行研究において報告されていた各種のエクソソーム移行性配列に類似する配列を有していなかった。また、配列 A の二次構造についてソフトウェア CentroidFold[59]を用いて評価したが、特徴的な構造を見出すことはできなかった。配列 A がエクソソーム移行性を示す機構については不明であるが、エクソソームへの RNA の搭載にはいくつかの RNA 結合タンパク質の関与が報告されている[60, 61]ことから、配列 A についても RNA 結合タンパク質が関与している可能性がある。ただし、別途 RAW264.7 細胞を用いて検討を行ったところ、配列 A はエクソソーム移行性を示さなかった(data not shown)ことから、配列 A のエクソソームへの搭載機構は少なくともすべての細胞に共通の機構ではないと考えられる。

以上、第 3 章では SELEX 法を用いて新規エクソソーム移行性配列である配列 A を見出した。同時に、SELEX 法を用いることでエクソソーム移行性配列の探索が可能であることを示した。この成果は、エクソソームへの RNA 搭載法の開発に有用な情報を提供するものと考えられる。

結論

著者は 3 章にわたり、エクソソーム回収法によるエクソソームへの影響、エクソソーム回収時の培地体積について評価するとともに、エクソソーム移行性 RNA 配列の探索を行い、以下の結論を得た。

第 1 章 エクソソーム回収法がエクソソームの特性に及ぼす影響の検討

超遠心を用いる 3 つの方法(Pelleting, Cushion, Gradient 法)と市販試薬を用いた方法によってエクソソームを回収した。これらのエクソソームの物性を比較し、Gradient 法で回収したエクソソームが他と比較して凝集が少ないことを示した。さらに、Gradient 法で回収したエクソソームは、マウス静脈内投与した際の血中濃度推移は他と比較して大きな差がないこと、ろ過滅菌後の回収率が有意に高いことを示した。これらの検討から、回収法によりエクソソームの凝集度合いが変化し、この違いがマウス静脈内投与後の血中濃度推移には影響しない一方、ろ過滅菌後の回収率に影響することが示された。

第 2 章 効率的なエクソソーム回収のための培地体積の最適化

B16BL6 細胞から回収されるエクソソーム量の経時的变化を評価し、時間に伴って回収量が増大するもののある時点で頭打ちとなることを示した。続いてエクソソームをあらかじめ培地に添加しても新規に産生されるエクソソーム量は変化しないことを明らかにするとともに、エクソソームが濃度依存的に細胞に取り込まれることを示した。さらに、エクソソーム回収時の培地体積を増大させることで、エクソソームの物性に大きな影響を与えることなく、細胞当たりのエクソソーム回収量が増大することを示した。これらの検討より、培地中のエクソソーム量は濃度依存的な取り込み速度の上昇により見かけの産生速度が低下するため、培地体積の増大が効率的なエクソソーム回収に有効であることが示された。

第 3 章 RNA 搭載法の開発を目的としたエクソソーム移行性 RNA 配列の探索

B16BL6 細胞を用いて、ランダム配列を含む初期プールから SELEX 法によるエクソソーム移行性配列の選別を行った。ラウンド 8 および 12 の後得られたプールから、最も高頻度に見つかった配列 A を見出した。配列 A のエクソソーム移行性がその他の SELEX により見つかった配列と比較して高いこと、配列 A のスクランブル配列と比較して有意に高いことを明らかにした。これらの検討より、見出した新規の配列 A がエクソソーム移行性を持つこと、加えて SELEX 法によりエクソソーム移行性配列の探索が可能であることが示された。

以上、著者は、RNA デリバリーキャリアとしてのエクソソームの調製法の最適化を目的として、エクソソーム回収法の比較、回収時培地体積に関する検討を行った。加えて新規エクソソーム移行性 RNA 配列を見出すとともに、エクソソーム移行性配列の探索が SELEX 法により可能であることを示した。本研究で得られた知見は、エクソソームを基盤とした RNA のデリバリーキャリアの開発に有用な情報を提供するものと考えられる。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 高倉喜信教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

終始御懇篤なる御助言と御指導を賜りました東京理科大学薬学部 西川元也教授、京都大学大学院薬学研究科 高橋有己准教授に謹んで深く感謝の意を表します。

また著者は、日本薬学会長井記念薬学研究奨励および日本学術振興会特別研究員の制度により支援を受けましたのでここに感謝致します。

種々の貴重な御助言を賜りました京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野教室一同、特に実験の一部に御協力戴いた篠塚春香氏、服部将太氏に深謝します。

最後に、研究に専念できる環境を与えて下さった父 重幸、母 恵美に深く感謝致します。

実験の部

第1章 実験の部

【1】細胞株

マウスメラノーマ細胞株 B16BL6 は、理研バイオリソースセンター社から購入した。細胞は、10 % FBS (MP Biomedicals 社)、0.15 % 炭酸水素ナトリウム、0.2 % グルコース、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシンを添加した DMEM 培地で、37 °C、5 % CO₂、加湿条件下で培養した。

【2】実験動物

5 週齢、雄性、C57BL6/J マウスは、日本エスエルシー株式会社より購入した。動物実験は京都大学動物実験委員会の承認を得て行った。

【3】B16BL6 細胞への遺伝子導入

既報の方法により pcDNA3.1 ベクターに gLuc-LA をコードする cDNA を挿入した pCMV-gLuc-LA を用意し[22]、DNA 16 µg を 0.323 g/L に調製した PEI Max (Polysciences 社) 128 µL と混合した。15 分間静置することにより複合体を形成させた後、70 %コンフルエント状態となった B16BL6 細胞へ複合体溶液を添加した。

【4】エキソソーム回収

用意した細胞を PBS で 2 回洗浄した後、Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific 社) を 30 mL/15cm dish で添加し 24 時間培養した。培養上清に対して、300 × g 10 分、2,000 × g 20 分、10,000 × g 30 分の順で遠心分離を行って細胞断片を除去し、その後孔径 0.2 µm のシリンジフィルターを用いて濾過操作を行うことで前処理培地を調製した。

Pelleting 法では、前処理培地に対して 100,000 × g 1 時間の超遠心操作を行うことでエキソソームを沈殿させた。培養上清を除去し PBS に置換し再度超遠心操作を 1 回行うことで培地由来のタンパク質を洗浄除去した。沈殿したエキソソームは PBS により懸濁した。

Cushion 法では、前処理培地を希釈液(25 mM スクロース, 10mM Tris-HCl; pH 7.5)で希釈した 40 % OptiPrep (Merck 社) 2 mL 上に重層し、100,000 × g 1 時間の超遠心操作を行うことで界面にエキソソームを沈殿させた。続いて界面を回収し PBS で懸濁した後超遠心操作を 1 回行った。沈殿したエキソソームは PBS により懸濁した。

Gradient 法では、まず上記と同様の希釈液により希釈した 40 %、20 %、10 %、5 % OptiPrep を 2.5 mL ずつ下から順に重層して密度勾配を作製した。これに対して Amicon Ultra 100k (Merck 社)により濃縮した前処理培地を重層し、100,000 × g、18 時間の超遠心操作を行った。遠心後、チューブの上から 1 mL ずつ回収し、9 番目のフラクションをエキソソームとして用いた。

Reagent 法では、ExoQuick-TC (System Biosciences 社)を用いて前処理培地より説明書に従ってエキソソームを回収した。

【5】透過型電子顕微鏡によるエクソソーム粒子の観察

エクソソームを 2 %パラホルムアルデヒド(PFA)中で固定した後、親水化処理した透過型電子顕微鏡(TEM)観察用グリッド(応研商事社)に添加した。PBS で洗浄後、1 %グルタルアルデヒドで再度固定し、精製水による洗浄後 1 %酢酸ウランを添加することで染色を行った。その後、エクソソーム粒子を TEM により観察した。画像解析は、ImageJ ソフトウェアにより行った。

【6】ウェスタンブロッティング

エクソソームおよび細胞溶解液を 0.1 M のジチオスレイトールの存在下、95 °C で 3 分間加熱した。その後、10 %ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により 100 V で電気泳動を行った。続いて、ゲルを回収し電気泳動によりポリビニルピロリドン(PVDF)膜へタンパク質を転写した。得られた PVDF 膜は Blocking One (ナカライテスク社)中で 30 分間振盪した後、各種一次抗体と 4 °Cで一晩処理した。その後 0.1 % tween 20 含有トリス緩衝生理食塩水(TBS; 250 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl)で洗浄し、peroxidase 標識 2 次抗体と室温にて 1 時間反応させた。洗浄後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck 社)で処理し、LAS-3000 imaging system (FUJIFILM 社)によりバンドを検出した。各抗体は下記に記した。

一次抗体
mouse anti-Alix antibody (1:1000; BD Biosciences 社)
rabbit anti-HSP70 antibody (1:2000; Cell Signaling Technology 社)
rabbit anti-CD63 antibody (1:200; Santa Cruz Biotechnology 社)
rabbit anti-Calnexin antibody (1:200; Santa Cruz Biotechnology 社)
二次抗体
rabbit anti-mouse IgG-HRP (1:1000; Thermo Fisher Scientific 社)
goat anti-rabbit IgG-HRP (1:5,000; Santa Cruz Biotechnology 社)

【7】エクソソームの物理化学的性質の評価

エクソソームの粒度分布および平均粒子径はナノ粒子マルチアナライザー^qNano (Izon 社)を用いて測定した。エクソソームの表面電荷については、Zetasizer Nano ZS (Malvern 社)を用いて測定した。

【8】エクソソームの収量の評価

粒子数についてはナノ粒子マルチアナライザー^qNano (Izon 社)を用いて測定した。タンパク質量については、Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad 社)を用いて測定した。

【9】エクソソーム体内動態の評価

gLuc-LA 標識エクソソームと非標識エクソソームを混合し gLuc 活性とタンパク質量をサンプル間でそろえた後、C57BL6 マウスに 1 匹当たり 5×10^8 RLU, 1 μ g prtein 静脈内投与した。経時的に尾静脈より採血し、血清中の gLuc 活性をピッカジーンデュアル(東洋ビーネット社)により測定した。血中濃度推移の速度論的解析には、非線形最小二乗法プログラム MULTI[62]を用いた。

【10】ろ過滅菌後の回収率の評価

gLuc-LA 標識エクソソームを 200 μ L の PBS あるいは 2 % BSA を含む PBS に懸濁し、0.2 μ m Minisart RC4 (Sartorius 社) によりろ過した。ろ過前後の gLuc 活性を指標に回収率を評価した。Alix を指標とした評価においては、非標識エクソソームを同様にろ過し、ウエスタンブロッティングにより得られたバンドの強度を付属ソフトウェア Multigauge により定量した。

【11】統計解析

データは Tukey-Kramer 法により検定し、p 値 0.05 以下を有意な差とした。

第3章 実験の部

【1】細胞株

B16BL6 細胞は第1章と同様の方法で実験に用いた。

【2】RNA の調製

40 塩基のランダム配列を有する RNA プールを、T7 プロモーターを含有する次の配列(5'-TAATACGACTCACTATAGGGGGGAAGATCTCGACCAGA-N40-GTGCGTCTACATGGATCCTCA-3'; N 40 は 40 塩基のランダム配列)の DNA 鎖の転写により作製した。ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit (東洋紡社) を用いて転写を行い、ポリアクリルアミド電気泳動後にゲル抽出により合成 RNA を精製した。

エキソソーム指向性の評価においては、SELEX によって見出された RNA である RNA-A、K、O 及び S、ならびに RNA-A のスクランブル配列(Scr-A、5'-GGGAAGAUCUCGACCAGAAUGUGGGUUCGGACCGAUUCUUUCUUGCCCGCUAUUGUGCGUCUACAUGGAUCCUCA-3')を上記と同じ手順により調製した。

【3】RNA の細胞への導入

B16BL6 細胞を 6 ウェルプレートに播種した 1 日後、Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて細胞に RNA を導入した。具体的には、1 μg の RNA を 3 μL の Lipofectamine 2000 と混合し、2 μg RNA/mL の最終濃度で OPTI-MEM I に溶解し 15 分インキュベートした。得られた複合体を細胞に添加し、4 時間インキュベートした。次に、培地を交換することによって残りの複合体を除去し、その後 24 時間、第二章と同様の FBS 由来エキソソーム非含有培地で培養した。

【4】エキソソームの回収

第二章と同様の方法でエキソソームを回収した。

【5】RNA 抽出と定量

Sepasol-RNA I Super G (ナカライテスク社)を使用して、エキソソーム回収のために培養上清を除去した時点の細胞および回収したエキソソームから RNA を抽出し、続いて ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡社)による cDNA 合成を行った。この cDNA を鋳型として PCR により DNA プールを調製した。PrimeSTAR Max DNA ポリメラーゼ(タカラバイオ社)を用いて PCR を行った。RNA の定量のためには、KAPA SYBR FAST ABI Prism 2X qPCR Master Mix (Kapa Biosystems 社)と StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems 社)を使用してリアルタイム PCR を行い、 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法[63]により分析した。内部標準としては、エキソソームではエキソソームに存在する 18S リボソーム RNA[64]を、細胞では β -アクトチン mRNA を使用した。

【6】SELEX 法によるエキソソーム移行性配列の探索

RNA プールを【3】に記載の方法で B16BL6 細胞に導入した 1 日後、エキソソームを第2章と同様の方法で上清から回収した。続いて、【5】に記載の方法で RNA を抽出し、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として PCR により DNA プールを調製した。この工程を SELEX の 1 ラウンドとし、12 ラウンド繰り返した。

【7】融解温度曲線の測定

各 SELEX ラウンドからの cDNA を、KAPA SYBR FAST ABI Prism 2X qPCR Master Mix を使用して増幅した。StepOnePlus リアルタイム PCR システムを使用し、95 °C から 65 °C まで温度を下げアニーリングした後、0.3 °C/2 s のステップグラジエントで温度を 60 °C から 95 °C まで上昇させた。得られたデータから付属ソフトウェアを用いて融解温度曲線を計算した。

【8】選別後の配列解析

ラウンド 8 および 12 の DNA プール中の DNA の配列を決定するために、Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (タカラバイオ社)を用いて DNA をプラスミドベクターに挿入した。この DNA を DH5 α に導入し、選択用プレートに播種した。コロニーから増幅した大腸菌よりプラスミド DNA を GenElute Plasmid Miniprep Kit (Merck 社)によって抽出し、挿入された DNA の配列を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社)および 3130 \times 1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)を用いて決定した。

【9】統計解析

2 群間の検定は Student の t 検定、多群間の検定は Dunnet 法で検定した。P 値 0.05 以下を有意な差とした。

引用文献

- 1 Lorenzer, C., Dirin, M., Winkler, A. M., Baumann, V. & Winkler, J. Going beyond the liver: progress and challenges of targeted delivery of siRNA therapeutics. *J Control Release* 203, 1-15, doi:10.1016/j.jconrel.2015.02.003 (2015).
- 2 Meng, Z. *et al.* A new developing class of gene delivery: messenger RNA-based therapeutics. *Biomater Sci* 5, 2381-2392, doi:10.1039/c7bm00712d (2017).
- 3 Rupaimoole, R. & Slack, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* 16, 203-222, doi:10.1038/nrd.2016.246 (2017).
- 4 Kim, H. J., Kim, A., Miyata, K. & Kataoka, K. Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 104, 61-77, doi:10.1016/j.addr.2016.06.011 (2016).
- 5 van Dommelen, S. M. *et al.* Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *J Control Release* 161, 635-644, doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.021 (2012).
- 6 E. L. Andaloussi, S., Mager, I., Breakefield, X. O. & Wood, M. J. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 12, 347-357, doi:10.1038/nrd3978 (2013).
- 7 Didiot, M. C. *et al.* Exosome-mediated Delivery of Hydrophobically Modified siRNA for Huntingtin mRNA Silencing. *Mol Ther* 24, 1836-1847, doi:10.1038/mt.2016.126 (2016).
- 8 Ohno, S. *et al.* Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther* 21, 185-191, doi:10.1038/mt.2012.180 (2013).
- 9 Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183, 1161-1172 (1996).
- 10 Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18, 883-891, doi:10.1038/nm.2753 (2012).
- 11 Thery, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9, 581-593, doi:10.1038/nri2567 (2009).
- 12 Hessvik, N. P. & Llorente, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 75, 193-208, doi:10.1007/s00018-017-2595-9 (2018).

- 13 Steinbichler, T. B., Dudas, J., Riechelmann, H. & Skvortsova, II. The role of exosomes in cancer metastasis. *Semin Cancer Biol* 44, 170-181, doi:10.1016/j.semcancer.2017.02.006 (2017).
- 14 Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J. & Gao, Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* 7, 789-804, doi:10.7150/thno.18133 (2017).
- 15 They, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3, Unit 3.22, doi:10.1002/0471143030.cb0322s30 (2006).
- 16 Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G. & Théry, C. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles* 1, doi:10.3402/jev.v1i0.18397 (2012).
- 17 Willms, E. *et al.* Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep* 6, 22519, doi:10.1038/srep22519 (2016).
- 18 Kowal, J. *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E968-977, doi:10.1073/pnas.1521230113 (2016).
- 19 Tauro, B. J. *et al.* Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* 56, 293-304, doi:10.1016/j.ymeth.2012.01.002 (2012).
- 20 Rekker, K. *et al.* Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling. *Clin Biochem* 47, 135-138, doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.10.020 (2014).
- 21 Yamada, T., Inoshima, Y., Matsuda, T. & Ishiguro, N. Comparison of methods for isolating exosomes from bovine milk. *J Vet Med Sci* 74, 1523-1525 (2012).
- 22 Takahashi, Y. *et al.* Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *J Biotechnol* 165, 77-84, doi:10.1016/j.jbiotec.2013.03.013 (2013).
- 23 Imai, T. *et al.* Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. *J Extracell Vesicles* 4, 26238, doi:10.3402/jev.v4.26238 (2015).
- 24 Maas, S. L., Broekman, M. L. & de Vrij, J. Tunable Resistive Pulse Sensing for the Characterization of Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol* 1545, 21-33, doi:10.1007/978-1-4939-6728-5_2 (2017).
- 25 Weatherall, E. & Willmott, G. R. Applications of tunable resistive pulse sensing. *Analyst* 140, 3318-3334, doi:10.1039/c4an02270j (2015).

- 26 Van Deun, J. *et al.* The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J Extracell Vesicles* 3, doi:10.3402/jev.v3.24858 (2014).
- 27 Zlotogorski-Hurvitz, A. *et al.* Human saliva-derived exosomes: comparing methods of isolation. *J Histochem Cytochem* 63, 181-189, doi:10.1369/0022155414564219 (2015).
- 28 Lamparski, H. G. *et al.* Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J Immunol Methods* 270, 211-226 (2002).
- 29 Caradec, J. *et al.* Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods. *Clin Biochem*, doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.06.011 (2014).
- 30 Jeppesen, D. K. *et al.* Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. *J Extracell Vesicles* 3, 25011, doi:10.3402/jev.v3.25011 (2014).
- 31 Morishita, M. *et al.* Quantitative analysis of tissue distribution of the B16BL6-derived exosomes using a streptavidin-lactadherin fusion protein and iodine-125-labeled biotin derivative after intravenous injection in mice. *J Pharm Sci* 104, 705-713, doi:10.1002/jps.24251 (2015).
- 32 Matsumoto, A. *et al.* Role of Phosphatidylserine-Derived Negative Surface Charges in the Recognition and Uptake of Intravenously Injected B16BL6-Derived Exosomes by Macrophages. *J Pharm Sci* 106, 168-175, doi:10.1016/j.xphs.2016.07.022 (2017).
- 33 Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B. & Record, M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* 89, 205-212, doi:10.1016/j.biochi.2006.10.014 (2007).
- 34 Wubbolts, R. *et al.* Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 278, 10963-10972, doi:10.1074/jbc.M207550200 (2003).
- 35 Mueller, J. & Davis, R. H. Protein fouling of surface-modified polymeric microfiltration membranes. *Journal of Membrane Science* 116, 47-60, doi:http://dx.doi.org/10.1016/0376-7388(96)00017-8 (1996).
- 36 Ulbricht, M., Ansoerge, W., Danielzik, I., König, M. & Schuster, O. Fouling in microfiltration of wine: The influence of the membrane polymer on adsorption of polyphenols and polysaccharides. *Separation and Purification Technology* 68, 335-342, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2009.06.004 (2009).
- 37 Lukasik, J., Scott, T. M., Andryshak, D. & Farrah, S. R. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Appl Environ Microbiol* 66, 2914-2920 (2000).

- 38 Barry, M. C., Hristovski, K. & Westerhoff, P. Membrane fouling by vesicles and prevention through ozonation. *Environ Sci Technol* 48, 7349-7356, doi:10.1021/es500435e (2014).
- 39 Parolini, I. *et al.* Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* 284, 34211-34222, doi:10.1074/jbc.M109.041152 (2009).
- 40 King, H. W., Michael, M. Z. & Gleadle, J. M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* 12, 421, doi:10.1186/1471-2407-12-421 (2012).
- 41 Harmati, M. *et al.* Stressors alter intercellular communication and exosome profile of nasopharyngeal carcinoma cells. *J Oral Pathol Med* 46, 259-266, doi:10.1111/jop.12486 (2017).
- 42 Riches, A., Campbell, E., Borger, E. & Powis, S. Regulation of exosome release from mammary epithelial and breast cancer cells - a new regulatory pathway. *Eur J Cancer* 50, 1025-1034, doi:10.1016/j.ejca.2013.12.019 (2014).
- 43 Franzen, C. A. *et al.* Characterization of uptake and internalization of exosomes by bladder cancer cells. *BioMed research international* 2014, 619829, doi:10.1155/2014/619829 (2014).
- 44 Christianson, H. C., Svensson, K. J., van Kuppevelt, T. H., Li, J. P. & Belting, M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 17380-17385, doi:10.1073/pnas.1304266110 (2013).
- 45 Holder, B. *et al.* Macrophage Exosomes Induce Placental Inflammatory Cytokines: A Novel Mode of Maternal-Placental Messaging. *Traffic* 17, 168-178, doi:10.1111/tra.12352 (2016).
- 46 Yuan, D. *et al.* Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain. *Biomaterials* 142, 1-12, doi:10.1016/j.biomaterials.2017.07.011 (2017).
- 47 Jeppesen, D. K. *et al.* Quantitative proteomics of fractionated membrane and lumen exosome proteins from isogenic metastatic and nonmetastatic bladder cancer cells reveal differential expression of EMT factors. *Proteomics* 14, 699-712, doi:10.1002/pmic.201300452 (2014).
- 48 Watson, D. C. *et al.* Efficient production and enhanced tumor delivery of engineered extracellular vesicles. *Biomaterials* 105, 195-205, doi:10.1016/j.biomaterials.2016.07.003 (2016).

- 49 Kooijmans, S. A. A. *et al.* Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles. *J Control Release* 172, 229-238, doi:10.1016/j.jconrel.2013.08.014 (2013).
- 50 Hood, J. L., Scott, M. J. & Wickline, S. A. Maximizing exosome colloidal stability following electroporation. *Anal Biochem* 448, 41-49, doi:10.1016/j.ab.2013.12.001 (2014).
- 51 Sutaria, D. S., Badawi, M., Phelps, M. A. & Schmittgen, T. D. Achieving the Promise of Therapeutic Extracellular Vesicles: The Devil is in Details of Therapeutic Loading. *Pharm Res* 34, 1053-1066, doi:10.1007/s11095-017-2123-5 (2017).
- 52 Bolukbasi, M. F. *et al.* miR-1289 and "Zipcode"-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles. *Mol Ther Nucleic Acids* 1, e10, doi:10.1038/mtna.2011.2 (2012).
- 53 Kossinova, O. A. *et al.* Cytosolic YB-1 and NSUN2 are the only proteins recognizing specific motifs present in mRNAs enriched in exosomes. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1865, 664-673, doi:10.1016/j.bbapap.2017.03.010 (2017).
- 54 Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng* 24, 381-403, doi:10.1016/j.bioeng.2007.06.001 (2007).
- 55 Schutze, T. *et al.* A calibrated diversity assay for nucleic acid libraries using DiStRO-- a Diversity Standard of Random Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 38, e23, doi:10.1093/nar/gkp1108 (2010).
- 56 Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H. & Ruml, T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv* 33, 1141-1161, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.008 (2015).
- 57 Thiel, W. H. *et al.* Nucleotide bias observed with a short SELEX RNA aptamer library. *Nucleic Acid Ther* 21, 253-263, doi:10.1089/nat.2011.0288 (2011).
- 58 Meyers, L. A., Lee, J. F., Cowperthwaite, M. & Ellington, A. D. The robustness of naturally and artificially selected nucleic acid secondary structures. *J Mol Evol* 58, 681-691, doi:10.1007/s00239-004-2590-2 (2004).
- 59 Sato, K., Hamada, M., Asai, K. & Mituyama, T. CENTROIDFOLD: a web server for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Res* 37, W277-280, doi:10.1093/nar/gkp367 (2009).
- 60 Guduric-Fuchs, J. *et al.* Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics* 13, 357, doi:10.1186/1471-2164-13-357 (2012).

- 61 Villarroya-Beltri, C. *et al.* Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun* 4, 2980, doi:10.1038/ncomms3980 (2013).
- 62 Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T. & Uno, T. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobiodyn* 4, 879-885 (1981).
- 63 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).
- 64 Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9, 654-659, doi:10.1038/ncb1596 (2007).