細胞外ベシクルの構造特性と機能制御

JST 戦略創造研究推進事業 (ERATO) バイオナノトランスポートプロジェクト^{*1)}・京都大学 工学研究科^{*2)}

下田麻子^{*1,2)}・澤田晋一^{*1,2)}・秋吉一成^{*1,2)}

Characterization and Functional Modification of Extracellular Vesicles

Cells from various origins release vesicles with unique biophysical and biochemical properties, making them of interest for diagnostic and therapeutic purposes. These extracellular vesicles are classified based on their biogenesis and size: vesicles formed by exocytosis of multivesicular bodies are called exosomes (with diameters from 30 to 200 nm), vesicles budded directly from the plasma membrane are called microvesicles (with diameters from 100 to 1000 nm) and vesicles derived from apoptotic cells are apoptotic bodies (with diameters from 1 μ m to 5 μ m). Extracellular vesicles play an important role in intercellular communication (they transfer proteins and/or miRNA between cells), therefore, they could be used as useful biomarkers of various diseases and drug delivery vehicles. In this review, we highlight fundamental information of extracellular vesicles including vesicle classification, standard protocols for isolation and characterization.

新たな細胞間コミュニケーションツールとして、細胞外ベシクルが注目されている。ベシクルの種類は、その発生機序、サイズにより大きく分けて 3 つに分類できる (エクソソーム: 30~200 nm、マイクロベシクル: 100~1000 nm、アポトーシス小体: 1~5 μ m)。特に、エクソソームに関してはその内部にタンパク質や micro RNA を含有していることから、疾患治療や予後診断、バイオマーカーとしての応用が期待される。本稿では、細胞外ベシクルの基礎的概念、単離方法や機能評価法などを紹介する。

Asako Shimoda^{*1,2)}, Shin-ichi Sawada^{*1,2)}, Kazunari Akiyoshi^{*1,2)}

Keywords: Extracellular vesicles, Exosome, Microvesicle, Isolation, Characterization

1. はじめに

あらゆる細胞は、脂質二重膜に囲まれたナノ~マイクロサイズのベシクルを細胞外へと分泌することが知られている。当初は細胞内の老廃物を細胞外に輸送するシステムとして考えられていたが、その内部にタンパク質のみならず、生体内で遺伝子発現抑制に重要な働きを示す micro RNA を保持していることが発見されたため、細胞間のコミュニケーションツールとして近年、注目を浴びている。また、細胞のみならず血液や体液、尿、母乳などの体液にも存在することから、治療、予後診断、バイオマ

ーカーとさまざまな分野への応用が期待される^{1~6)}。このベシクルの大きさは 30 nm から 1 μ m と幅広く、細胞起源や生物学的機能などにより、数種類に分類される。本特集で取りあげるエクソソームもその 1 つであるが、その定義については曖昧である。International Society for Extracellular Vesicle (ISEV) (<http://www.isevmeeting.org/>) では、これら細胞外分泌顆粒の総称として、Extracellular Vesicle (EV) と呼ぶことを提唱している。本章では、細胞外ベシクルの特徴やその単離方法、機能化による応用について解説する。

2. 細胞外ベシクルの種類と構成因子

細胞外ベシクルは、粒子サイズ、構成成分、形

^{*1)} Exploratory Research for Advanced Technology, Japan Science and Technology Agency, Bio-nanotransporter Project

^{*2)} Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

成メカニズムに基づき種々の名前で呼ばれている。ここでは、生成機構による、①エクソソーム、②マイクロベシクル、③アポトーシス小体の3つについて概説する。

1) エクソソーム (Exosome)

エンドサイトーシスにより形成したエンドソームは、まず初期エンドソームを形成し、続いて後期エンドソームへと移行する。この後期エンドソームがさらに内側にくびれて形成する腔内膜小胞 (ILV, intraluminal membrane vesicle) を多数含む多胞性エンドソーム (MVB, multivesicular body) が細胞膜と融合すると、ILV は細胞外へ放出される。このような機構で分泌される直径が 30~200nm の小胞がエクソソームと呼ばれている。

エクソソームは、上皮細胞、樹状細胞、T リンパ球、幹細胞など、さまざまな細胞および血液、尿などの体液からも分泌される。構成因子としてタンパク質、mRNA や miRNA が挙げられるが、特にシャペロン分子である Hsc70, Hsc90 やテトラスパニン (CD9, CD63, CD81) が特異的に存在していると報告されている^{7~10)}。

エクソソームを構成する分子に関するデータベース ExoCarta (www.exocarta.org) が存在し、また、細胞外ベシクル全般の最新の情報を知ることができる。

2) マイクロベシクル (Microvesicle)

エクソソームとマイクロベシクルの違いは明確にはされていないが、一般にサイズや構成分子、分泌機構により区別される。マイクロベシクルは細胞膜の一部がくびり取られ、ダイレクトに分泌される直径 100~1000nm の粒子である。Shedding microvesicle や ectosome とも呼ばれている。いくつかの報告では、マイクロベシクルに特異的なマーカーとして、flotillin-2, selectin, integrin, metalloproteinase などのタンパク質や、脂質においては、特にホスファチジルセリンが高発現しているとされている。発生メカニズムは、アゴニストの添加、刺激、障害などさまざまである。細胞膜を構成するリン脂質は、通常、ホスファチジルセリン

(PS) は細胞膜の内側に、ホスファチジルコリン (PC) は外側に配置している。この局在は Flippase および aminophospholipid translocase の 2 つの酵素により、ATP 依存的に保たれている。しかし、細胞内カルシウム濃度が高くなるとこの機能が低下し、代わりに脂質を双方向に輸送する働きを持つスクランプラーゼという酵素活性が増加する。これに加えて、細胞内システインプロテアーゼであるカルパインもカルシウム濃度依存的に活性化される。その結果、アクチンが切断され、細胞骨格の再編成を経て膜小胞の形成となる^{11~12)}。

3) アポトーシス小体 (Apoptotic blebs)

アポトーシス小体は、約 1~5 μm で、すべての細胞種によりアポトーシスの遅い段階に形成される。エクソソームやマイクロベシクルが通常の細胞過程で起こるのに対し、アポトーシス小体は、プログラムされた細胞死が起こったときのみ生じる。この際、細胞膜ホスファチジルセリンの表面への露出や細胞の凝縮、断片化が起こる。その後、膜の水疱形成および核の凝集・断片化が進むとアポトーシス小体が形成される。一般に、細胞はアポトーシス小体に急速に断片化され、すぐにマクロファージに貪食される。アポトーシス小体の遺伝物質の情報伝達についてもいくつか報告があり、腫瘍移植マウスの血管内でアポトーシス小体が検出された例や、EGFP 発現ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) から単離したアポトーシス小体を新生児ラットの心筋細胞に移植すると EGFP の蛍光が確認された例が挙げられる。これらの知見はアポトーシス小体が遺伝物質の伝達を担っていることを示唆しているが、サイズ分布が広いことから、単離の方法が未確立であるなどさらなる検討が必要である^{13~15)}。(図 1, 2 & 表 1)

3. 単離方法および特性評価法^{16~18)}

3-1) 単離方法

細胞外ベシクルの単離方法は、①超遠心法、②精密濾過法、③抗体による捕捉、④マイクロ流体システムの利用、⑤その他が挙げられる。

(1)超遠心法

超遠心による単離は最も多く用いられている手法である。まずは 300~2,000 g の低速度で細胞成分や ~1 μ m 程度のアポトーシス小体の除去を行い、次に 10,000~20,000 g もしくは 0.22 μ m のフィルター

処理でマイクロベシクルを除去する。これらの段階的遠心処理後に 100,000 g~120,000 g の超遠心を行うことでエクソソーム画分が回収できる。得られた沈殿にはエクソソームと同程度の大きさのタンパク質も夾雑物として含まれているので、エクソソーム

図 1 細胞外ベシクルの分泌経路 (Raposo G *et al.*⁹ を引用)

図 2 エクソソーム中の構成タンパク質

CD9, CD63, CD81 などのテトラスパンイン、Heat shock protein などが主にエクソソームマーカーとして知られている。(Azmi AS *et al.*¹⁰ を引用)

表 1 細胞外ベシクルの特徴

ベシクルの種類	エクソソーム	マイクロベシクル	アポトーシス小体
サイズ(nm)	30~200	100~1000	0.50~5000
密度(g/mL)	1.10~1.21	Undetermined	1.16~1.28
沈殿の際の遠心速度(g)	100,000~200,000	10,000~20,000	1,200, 10,000 or 100,000
脂質組成	コレステロール、 スフィンゴミエリン、セラミド	コレステロール、 ホスファチジルセリン	ホスファチジルセリン
主なマーカータンパク質	CD63, CD9, CD81, Alix, Tsg101	Selectins, Integrins, CD40	Histones, DNA
放出のメカニズム	多胞性エンドソームのエクソサイトosisによる放出	細胞膜からの出芽	細胞の凝縮、断片化の後に形成される小胞体の出芽
内包物	mRNA, microRNA (miRNA), non-coding RNAs; 細胞質及び膜タンパク質、MHC (major histocompatibility complex) 分子	mRNA, miRNA, non-coding RNAs; 細胞質及び膜タンパク質	核断片、細胞小器官

ムの密度が 1.10~1.21 g/mL であることを利用し、ショ糖密度勾配遠心を組み合わせることで精製できる。大量培養が必要なことや、超遠心に時間を要するなどの欠点があるが、確実にエクソソーム画分を得られる簡便な方法と言える。

(2)精密濾過法

0.1~0.8 μ m の段階的フィルター処理にて、死細胞、アポトーシス小体、マイクロベシクルを除去する手法であり、通常は超遠心法と組み合わせて用いることが多い。尿からのエクソソーム分離においてこの手法が用いられているが、メンブレンへのタンパク質吸着による収量の減少や、ベシクルの形状変化、サイズの大きいベシクルや血小板の破碎によるコンタミネーションなどの問題があるのが現状である。

(3)抗体による捕捉

細胞外ベシクルに特有の表面タンパク質、特に CD9, CD63, CD81 などのテトラスパニンの抗体をコートした磁気ビーズにより細胞外ベシクルを捕捉する方法である。ほかにも、腫瘍関連マーカーである HER2 や EpCAM 抗体を用いた例が報告されており、この手法により得られたベシクルは特異性が高く、フローサイトメトリーやイムノブロット、免疫電顕などによる機能評価が容易であるという利点が挙げられる。最近では、この原理を用いたハウスキーピングタンパク質である Rab-5 および CD63 を用いたサンドイッチ ELISA による血漿由来エク

ソソームの単離 kit (ExoTESTTM, HANSABIOMED, Tallinn, Estonia) が市販されている。しかし、すべてのベシクルに特定のマーカーが存在しているわけではないため、(1)の超遠心法に比べさらに収量は少なくなる。

(4)マイクロ流体システムの利用

微細加工技術を用いて微小な分析装置を基板に形成することで溶液の反応、分離、検出などの操作をマイクロ化するマイクロ流体システムの開発が盛んに行われている。この技術を応用し、Chen らは抗 CD63 抗体を固定化したデバイスを作製し、数百 μ L の血清サンプルからベシクルの単離、回収、さらには RNA の抽出までを短時間で行っている¹⁹⁾。また、Shao らはデバイスに固定化したベシクルをマイクロオーダーの核磁気共鳴システム (μ NMR) により検出した²⁰⁾。検出感度が高いことから、腫瘍細胞と正常細胞のベシクルの分離が可能であり、予測診断ツールとしての応用が期待される。しかし、一度に解析できるサンプル量に限りがあるため、(3)の抗体による捕捉と同様に収量が少なく、また得られたベシクルの純度に関する課題も残っている。Ichiki らは抗体のかわりに PEG (ポリエチレングリコール) 脂質誘導体を修飾したデバイスによるエクソソーム精製法を開発している。抗体による捕捉方法は、その抗体に特異的なエクソソームしか回収されないのに対し、この方法ではエクソソームを構成する脂質二重膜との相互作用を利用するため、吸着量が高いといった利点がある。捕捉されるベシクル

のサイズも制御可能となることから、超遠心法に代わる新たな細胞外ベシクル精製法としての応用が期待される²¹⁾。

(5)その他

(1)の超遠心法や(2)の精密濾過法の後に、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製する方法も報告されている。超遠心法よりもさらに時間を要するが、発現量が比較的少ないタンパク質についても検出可能な利点がある²²⁾。

ベシクル回収の時間短縮や超遠心を必要としないベシクル単離技術の確立を目的とし、いくつかのバイオ企業により単離キットが開発されている。代表的なものとして、ExoQuickTM(System Biosciences, Mountain View, CA, USA)、Total Exosome Isolation kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、PureExo[®] Exosome Isolation kit(101Bio, Palo Alto, CA, USA)が挙げられる。どの手法も付属の試薬と培養上清または体液を混合して静置し、低速度による遠心分離でベシクル(これらはエクソソームのみを単離すると記載している)を回収するというものである。超遠心に比べて、サンプル量が少なく済み、短時間でサンプルを得られることから、これらを用いて単離したエクソソームの機能評価を報告している論文がいくつか報告されている。初めて扱う細胞からエクソソームが分泌されているかどうかを調べるには最も簡便な方法であるが、リポ蛋白質などの混入による純度の問題やエクソソームに発現しているタンパク質やmiRNAを超遠心法により回収したサンプルと比較して異なるデータが得られたという報告もあることから、こちらも他の手法と組み合わせて用いるなどの工夫が必要かもしれない。

以上5つの異なる細胞外ベシクルの単離方法を挙げたが、すべてにおいて長所・短所が挙げられるため、現時点では超遠心法による単離をベースとし、目的に合わせて手法を選択し行うのがよいと考えられる。

3-2)特性評価法

(1)ウエスタンブロット

細胞外ベシクルに発現しているタンパク質を調べるのに適した方法である。テトラスパニンやヒートショックプロテイン、アクチンなど、さまざまな種類のタンパク質に対する抗体が市販されているので、エクソソームを単離した際にタンパク質の発現量を確認するのに優れた手法といえる。超遠心法および密度勾配遠心法で得られたベシクルはほとんど精製されたエクソソームといえるが、市販のキットを用いて回収したベシクルには不純物が含まれている可能性があるので、両者を比較してみるとよい。

(2)電子顕微鏡

ベシクルの形状を観察するのに、透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscopy; TEM)は最も簡便な方法である。四酸化オスミニウムや酢酸ウラニル、リンタングステン酸などの重金属で染色することで、ベシクルの脂質二重膜を観察できる。また、ベシクルに特有のマーカータンパク質を金ナノ粒子で標識することも可能である。ただし、測定時は脱水、固定、真空下で行うためベシクルが収縮し、多少の形状変化が起こる。一方で、クライオTEM(cryo-TEM)は、試料を急速凍結させ固定化することで、上記の影響を受けずに形状を保持したまま観察できる。この手法を用いることにより、今までに“cup-shaped”とされていたエクソソームの形状は球状に近い“mushroom-shaped”であることが確認されている。

(3)ナノ粒子解析装置(Nano Tracking Analysis; NTA)

ナノ粒子のブラウン運動の様子をリアルタイムで観察し、粒子の分散・凝集を個々に解析する装置(LM Series, Nanosight, Amesbury, UK)である。ストークス・アインシュタインの式より粒子の移動速度からサイズを算出することができる。分解能が高く細かい分布が得られるのが特徴である。

(4)ナノパーティクル計測器(qNano)

圧力可変モジュール(VPM)を使用し、ナノポアに粒子と溶液を同時に通過させることにより、個別に粒子を計測する装置である(IZON Science Ltd)。NTA が一定量の粒子の個数を要するのに対し、低濃度および少ないサンプル量でも測定ができる。

(5)フローサイトメトリー

細胞や微粒子のレーザー光を照射した際に得られる散乱光または蛍光を利用して、粒子特性を評価する手法であり、細胞外ベシクル表面のタンパク質の発現量や細胞内への取り込みを評価するのに適している。ただし、検出限界が300nm 前後であるため、一般にエクソソームを測定する際には、抗体を修飾したマイクロメーターサイズのラテックスビーズや磁気ビーズに結合させる必要がある。定量やベシクルの種類の区別などは難しいが、細胞への取り込み挙動を観察するには最も簡便な方法であるといえる。エクソソームの診断応用に関しては、小坂、落谷らの章を参照していただきたい。

4. エクソソームの機能改変(エクソソーム工学)

生体から従来備わっている細胞間コミュニケーションツールであるエクソソームに、人工的に新たな機能を付与することで、細胞の機能制御や、低分子薬物・核酸・タンパク質などの輸送担体としての応用が進められている。エクソソームの機能改変手法としては、①遺伝子工学的手法により分泌細胞を改変する手法や、②機能性材料によるエクソソームの人工的機能化法などが挙げられる。

1) 遺伝子工学的手法による機能改変

近年、遺伝子工学的手法を用いたさまざまなエクソソームの機能改変について報告されている²³⁾。例えば、ウイルスベクターを用いて任意のタンパク質遺伝子を細胞に導入し、その細胞からエクソソームを回収する方法がある。Kuroda らはがん細胞に高発現するEGFR(epidermal growth factor receptor)を標的とするペプチドを膜上に発現するエクソソームを作製したところ、効率よく細胞へ取り込まれたことを報告している²⁴⁾。また、Alvarez-Erviti らは

図3 エクソソームの機能化

siRNA のデリバリーキャリアとしてエクソソームを用いている。狂犬病ウイルス糖タンパク質(RVG; 神経細胞に発現するアセチルコリン受容体と特異的に結合)およびエクソソームマーカーの1つであるLAMP2bを発現させたエクソソームを作製し、エレクトロポレーションにて siRNA を封入したものをマウスに静注したところ、中枢神経での RNAi 誘導に成功している²⁵⁾。この結果はエクソソーム自体を治療の目的に応じて改変することが可能であり、薬剤のキャリアとしても使用できることを示唆している。エクソソームの細胞内取り込み機構や体内動態については、高橋、西川、高倉らの章で詳細に述べられている。siRNA のエクソソームへの導入法としては、エレクトロポレーションが最も有効であるとされているが、再現性に乏しいことや、最近ではエレクトロポレーションにより siRNA が凝集するといった報告もされている²⁶⁾。特定の miRNA を細胞に過剰発現させ、その miRNA を多く含有するエクソソームを得る方法も報告されている²⁷⁾。エクソソームの DDS 応用についての詳細は、黒田の章を参考にしていきたい。

2) エクソソームの人工的機能化

人工的に設計、合成された機能性材料を用いたエクソソームへの新たな機能付与手法も開発されつつある。我々は、エクソソーム機能改変による人工エクソソームの構築や機能性高分子、ナノゲル、リポソームなどとの複合化によるハイブリッドエクソソームの開発を行っている。例えば、エクソソーム単体では細胞内への取り込みや組織移行性は十分ではないことから、疎水化多糖ナノゲル材料との複合化により、エクソソームの細胞内導入効率の向上や徐放性制御を検討している(図3)。これまでに、親水性の多糖に疎水性基を部分的に置換した疎水化多糖が、希薄溶液中で約 30nm のナノゲルを形成し、タンパク質(癌ワクチン、経鼻ワクチン)や核酸(遺伝子、siRNA)のキャリアとして優れていることを

報告した^{28~29)}。また、この自己組織化ナノゲルは、エクソソームと同様な構造を有するリポソームの表面を被覆しえることを報告しており、実際、エクソソームの表面も効率よく疎水化多糖ナノゲルにより被覆、修飾しえることを見いだした。カチオン性ナノゲル³⁰⁾を用いるとエクソソームの細胞内導入効率が大きく向上した。細胞親和性ナノゲル³¹⁾を用いることで、組織指向性も制御しえる可能性がある。さらに、我々はナノゲルボトムアップ法により、ナノゲルを集積した新規マクロゲル材料を開発し、ナノゲル/リポソームハイブリッドゲルによるリポソームの徐放にも成功しており³²⁾、再生医療応用のためのエクソソームを封入した新規ゲル材料の開発を進めている。

我々は、一方で、エクソソームと種々のリポソームが複合化や条件によっては融合することを見いだしており、エクソソームの新規な機能化法としてその有用性を検討している(図3)。

5. おわりに

エクソソーム発見当初は、単に不要な細胞内物質を放出するための機構と考えられてきたが、近年、エクソソーム中には数百種類のタンパク質、mRNA、miRNA や DNA が内部に存在しており、細胞間の遺伝情報の伝達に大きな役割を果たしていることが報告された。その存在や作用は多様であり、母子間での情報伝達からエクソソームの分泌量依存によるがんの進行具合の指標など生体内のあらゆる場所で重要なファクターとなっていることは間違いない。

ここ数年で細胞外ベシクルに関する論文は数多く発表されているが、未だ簡便かつ再現性のよい単離方法の確立や細胞への導入効率の改善などさまざまな課題も残っている。今後、これらの問題を解決することで、画期的な疾患の診断・治療法の確立へとつながると期待される。

文献

- 1) Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 21, 575-581 (2009)
- 2) Théry C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 9, 581-593 (2009)
- 3) Chaput N., Théry C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol.* 33, 419-459 (2011)
- 4) EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 12, 347-357 (2013)
- 5) Borges FT, Reis LA, Schor N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz J Med Biol Res.* 46, 824-830 (2013)
- 6) Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 113, 1-11 (2013)
- 7) Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics.* 6, 267-283 (2009)
- 8) Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.* 1820, 940-948 (2012)
- 9) Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 200, 373-383 (2013)
- 10) Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev.* 32, 623-642 (2013)
- 11) Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 19, 43-51 (2009)
- 12) Roseblade A, Luk F, Rawling T, Ung A, Grau GE, Bebawy M. Cell-derived microparticles: new targets in the therapeutic management of disease. *J Pharm Pharm Sci.* 16, 238-253 (2013)
- 13) Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, Holmgren L. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 6407-6411 (2001)
- 14) Burghoff S, Ding Z, Gödecke S, Assmann A, Wirrwar A, Buchholz D, Sergeeva O, Leurs C, Hanenberg H, Müller HW, Bloch W, Schrader J. Horizontal gene transfer from human endothelial cells to rat cardiomyocytes after intracoronary transplantation. *Cardiovasc Res.* 77, 534-543 (2008)
- 15) Meckes DG Jr, Raab-Traub N. Microvesicles and viral infection. *J Virol.* 85, 12844-12854 (2011)
- 16) Théry 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. (2006)
- 17) El-Andaloussi S, Lee Y, Lakhali-Littleton S, Li J, Seow Y, Gardiner C, Alvarez-Erviti L, Sargent IL, Wood MJ. Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat Protoc.* 7, 2112-2126 (2012)
- 18) Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-Hoien EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* May 27; 2. (2013)
- 19) Chen, C., Skog, J., Hsu, C., Lessard, R. T., Balaj, L., Wurdinger, T., Carter, B. S., Breakefield, X. O., Toner, M., Irimia, D. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip.* 10, 505-511 (2010)
- 20) Shao, H., Min, C., Issadore, D., Liong, M., Yoon, T., Weissleder, R., Lee, H. Magnetic nanoparticles and microNMR for diagnostic applications. *Theranostics.* 2, 55-65 (2012)
- 21) 一木隆範、「体液エクソソームの診断プラットフォーム」、細胞工学, 32(1), pp. 91-95 (2013)
- 22) Rood IM, Deegens JK, Merchant ML, Tamboer WP, Wilkey DW, Wetzels JF, Klein JB, Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 78, 810-816 (2010)
- 23) Marcus ME, Leonard JN, FedExosomes: Engineering Therapeutic Biological Nanoparticles that Truly Deliver. *Pharmaceuticals (Basel).* 6, 659-680 (2013)
- 24) Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgi T, Ochiya T, Gotoh N, Kuroda M. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther.* 21, 185-191 (2013)
- 25) Alvarez-Erviti, L, Seow, Y, Yin, H, Betts, C, Lakhali, S and Wood, MJ, Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* 29, 341-345 (2011)
- 26) Kooijmans SA, Stremersch S, Braeckmans K, de Smedt SC, Hendrix A, Wood MJ, Schiffelers RM, Raemdonck K, Vader P, Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles. *J Control Release.* 172, 229-238 (2013)
- 27) Munoz JL, Bliss SA, Greco SJ, Ramkissoon SH, Ligon KL, Rameshwar P, Delivery of Functional Anti-miR-9 by Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes to Glioblastoma Multiforme Cells Conferred Chemosensitivity. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2, e126 (2013)
- 28) Sasaki Y., Akiyoshi K, Nanogel engineering for new nanobiomaterials: from chaperoning engineering to biomedical applications. *The Chemical Record.* 10, 366-376 (2010)
- 29) Sasaki Y., Akiyoshi K, Self-assembled Nanogel Engineering for Advanced Biomedical Technology. *Chem. Lett.* 41, 202-208 (2012)
- 30) Ayame H, Morimoto N, Akiyoshi K, Self-assembled cationic nanogels for intracellular protein delivery system. *Bioconjugate Chem.* 19, 882-890 (2008)
- 31) Shimoda A, Sawada S, Akiyoshi K, Cell Specific Peptide-Conjugated Polysaccharide Nanogels for Protein Delivery. *Macromol Biosci.* 11, 882-888 (2011)
- 32) Sekine Y, Moritani Y, Ikeda-Fukazawa T, Sasaki Y, Akiyoshi K, Hybrid hydrogel biomaterial by nanogel engineering: bottom-up design with nanogel and liposome building blocks to develop a multi-drug delivery system, *Advance Healthcare Materials,* 1, 722-728 (2012)