リキッドバイオプシーがもたらす 新たながん診断法の可能性

Liquid biopsy for cancer diagnosis: the potential of exosomes and circulating miRNAs

吉岡 祐亮 落谷 孝広

要約

現在、個別化医療やコンパニオン診断という言葉がよく使われている。従来、患者一人一人の疾患の性質を捉えるには、疾患部位における細胞の遺伝子変異や遺伝子発現解析、病理画像による診断が行われている。しかし、これらは、いわゆる生検によって組織を採取する必要があるため、患者への負担が大きい。そのため、低侵襲性の診断法の開発が求められている。

われわれの体液中には様々な物質が存在し、体内を循環している。それら物質を手掛かりに診断を行うリキッドバイオプシーは、低侵襲性の新たな検査法として注目されている。リキッドバイオプシーは遺伝子診断を源流として発生したが、現在では、その用途は多岐に渡り、遺伝子解析を主とした分子標的薬の選択やがんの早期診断、病態のモニタリングまで担う可能性が示されている。リキッドバイオプシーの解析対象は、cell free DNA や circulating tumor DNA, circulating tumor cells に加え、近年、リキッドバイオプシーの幅を広げるリソースとして細胞外小胞エクソソームやそれに由来するマイクロ RNA が注目されている。

本稿では、リキッドバイオプシーの現状を述べ、リキッドバイオプシーがもたらす未来とそれを実現するために克服すべき課題を概説する。

Key words リキッドバイオプシー、がん診断、エクソソーム、microRNA

(日老医誌 2020 ; 57 : 99-108)

はじめに

現在、生涯でがん罹患する割合は、約 50% と試算され、2 人に 1 人は、がんに罹ると言われている。近年では、従来の外科治療や放射線治療、殺細胞性抗がん剤などの化学療法に加え、分子標的薬などの登場により、がんの治療法は多岐に渡り、治療法の選択が重要である。また、これら医療の発展もあり、早期発見できた場合、治療成績は格段に良くなっていることから、早期発見の重要性が増している。治療法の選択

や早期がんの発見に生理的状態や疾患の状態を把握するための生体由来のマーカー、つまりバイオマーカーの利用が期待されている。早期発見や適切な治療法の選択は、患者の命を救うだけでなく、高騰している医療費の削減にも繋がる。さらに、受診者への身体的負担を減らすためにも、採血や採尿などによる検査への普及が期待されている。体液を用いた検査はリキッドバイオプシーと呼ばれ、従来の組織生検と比較して、侵襲性が低く、継続的な検査が可能となっている。そのような大きな期待を背負っているリキッドバイオプ

東京医科大学医学総合研究所分子細胞治療研究部門

連絡責任者：吉岡祐亮 東京医科大学医学総合研究所分子細胞治療研究部門〔〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 教育研究棟 14 階〕

doi: 10.3143/geriatrics.57.99

シーの開発だが、その歴史は必ずしも成功しているとは言いがたい。しかし、着実に臨床現場からのニーズに応えるべく、開発が進んでおり、本稿では、リキッドバイオプシー開発の歴史から現在に残る問題点、そして今後の可能性について述べる。とくにマイクロRNA (microRNA: miRNA) やエクソソーム (Exosome) と呼ばれる細胞外小胞を標的としたリキッドバイオプシーの登場と、その現状に触れる。

リキッドバイオプシーとは

リキッドバイオプシーとは、従来の組織生検と比較して、血液などの体液を用いることで、侵襲性の少ない検査法であり、腫瘍部位を採取せずとも遺伝情報を取得し、診断や治療効果予測を行う技術である。リキッドバイオプシーの定義を体液中の生体由来のマーカーによる診断・検査と広く定義付けすると、従来用いられていた腫瘍マーカーもこれに該当する。腫瘍マーカーの歴史は古く、1840年代後半に William Macintyre が多発性骨髄腫患者の尿中の異常タンパク質 (のちに Bence Jones タンパク質と名付けられた) を発見し、Bence Jones が分析法を確立し、その重要性を説いたことが始まりだとされている¹⁾。尿中の Bence Jones タンパク質は、特異的な熱凝固性を有するため、加熱による定性変化で Bence Jones タンパク質を検出し、多発性骨髄腫の有無を判断する材料となる。このように、がん化に伴って生じる物質の量的、質的变化を捉えて、臨床指標として用いる物質を腫瘍マーカーと呼んでいる。1960年代には Carcinoembryonic antigen (CEA) や Alpha-fetoprotein (AFP) などが発見され^{2)~6)}、その後、モノクローナル抗体の作製技術などによって、腫瘍マーカーの開発は加速し、現在では保険適用となっているものだけでも約40種類の腫瘍マーカーがある。もちろん、このような腫瘍マーカーは重要であるが、一方で、がんというのが、遺伝子異常に起因する疾患であることが明らかになると、その遺伝子情報を使った治療薬の登場などによって、がん細胞の遺伝情報が重要となってきた。そこで、登場したのが、リキッドバイオプシーという言葉であり、その歴史は1948年には血清、血漿中に核酸が存

在することが報告されたことから始まったとも考えられる⁷⁾。実際にリキッドバイオプシーという言葉が浸透してきたのは2010年前後であるが、元を辿ると、血液中に核酸 (= 遺伝情報) が存在することがリキッドバイオプシーの始まりかもしれない。1948年の発見からおよそ30年後には、健常人に比べてがん患者の血清中には細胞外DNAが多く含まれていることや、予後不良の患者にはさらに多く含まれている傾向が示された⁸⁾。また、血液中に存在するRNaseによって分解されと考えられていたRNAの存在も示唆され、1999年に悪性メラノーマの患者由来の血清からメラノーマ、メラノサイト特異的に発現するチロシナーゼのmRNAをRT-PCR法によって6例中4例の検体で検出したが、健常人由来の血清からは検出されなかった⁹⁾。このようにPCR法が開発されてからは、血中に存在する特定の遺伝子の有無を確認できることから、バイオマーカー (腫瘍マーカー) としての核酸にも注目が集まってきた。そして、リキッドバイオプシーという言葉が広く浸透する契機となったのは、血液中を循環するがん細胞もしくはがん細胞に由来するDNA (cfDNA: cell free DNA もしくは ctDNA: Circulating tumor DNA) を検出し、単にがんの有無を見分けるだけでなく、上述した通り、がん細胞の遺伝情報を含む性質も捉えることが可能であることが示されたことである¹⁰⁾¹¹⁾。血中を循環するがん細胞 (CTC: Circulating Tumor Cells) は血行性転移の一部だと考えられており、2000年代には、CTCの数を測定することで煩雑な組織生検による患者の身体的負担を減らした予後予測や治療の効果判定が可能であることが報告された¹¹⁾。例えば、肝臓がんにおいて、肝切除後の血中に循環する肝臓がん幹細胞 (CD45-, CD90+, CD44+) の数によって、転移を含む再発の有無に相関することが報告されている¹²⁾。一方で、進行乳がんにおいて、予後予測の指標としては有用性が示されたものの、CTCカウントの推移と従来の画像検査による治療効果判定の比較においては、その結果は芳しくなかったという報告もある¹³⁾。そのため、分子生物学的特徴をCTCから引き出すなどの工夫が必要だと考えられる。つまり、CTCの数だけではなく、CTCに発現する分子 (バイオマーカー) を解析することや、

遺伝子変異を調べることで分子標的薬のターゲットなどの個別化医療への応用に利用するというのである。同様に、cfDNAの解析を行うことで分子標的薬のターゲット決定などの個別化医療への応用が考えられる¹⁰⁾。このようにCTCやcfDNAを使うリキッドバイオプシーは従来の血中腫瘍マーカーとは異なる利用価値がある。しかし、cfDNAは血液中のDNA分解酵素によって、200 bp以下に切断されていることが多く、さらに、血中にはがん細胞に由来しないcfDNAが多く含まれており、がん細胞に由来するcfDNA、つまりctDNAは微量であり、遺伝子変異の検出が難しくなっているため、検出技術の向上が求められている。近年では、デジタルPCR法などの登場により検出感度が飛躍的に向上しており、実用化に近づいているが、さらなる技術開発が期待されている。また、検出される体細胞変異については、腫瘍由来ではなく、加齢に伴う遺伝子変異を持つ白血球由来のものが含まれることが指摘されており、留意する必要があるとされている¹⁴⁾¹⁵⁾。

上記のCTCやcfDNAが、リキッドバイオプシーのルーツではあるが、上述したように、リキッドバイオプシーの定義を体液中の生体由来のマーカーによる診断・検査と広く定義付けると、近年、リキッドバイオプシーの新たなリソースとして、体液中を循環するmiRNAやエクソソーム(Exosome)などの細胞外小胞が加わり、注目を集めている(図1)。

エクソソームリキッドバイオプシー

CTCやcfDNAとは異なるリキッドバイオプシーのリソースとして、細胞外小胞が挙げられる。細胞外小胞を用いたリキッドバイオプシーは2010年頃から急速に加速している。細胞外小胞とは、そのサイズや起源によってexosome, ectosome, microvesicles, shedding vesiclesなど様々な名称があるが、それらを総称してextracellular vesicles(EVs)と呼ばれている¹⁶⁾。さらに、近年では、small EVs(sEVs), medium/large EVs(m/IEVs)とも分類されるなど¹⁷⁾、それぞれの小胞の定義は曖昧な部分もあるが、国際細胞外小胞学会が分類・定義付けに注力しており、position paper

と位置付けられている総説などで徐々に整理されている¹⁷⁾。また、脂質膜を有さない35 nm以下の粒子の存在も確認され、exomereと名付けられている¹⁸⁾。これら細胞外小胞の中でも、exosome(エクソソーム)と呼ばれる小胞の研究が盛んである。そのサイズは100 nm前後であり、様々な細胞が分泌し、われわれの体液中を循環している¹⁶⁾。1983年にJhonstoneらによって、網状赤血球がヘモグロビン合成時には必要であったトランスフェリンレセプターを脂質二重膜構造の小胞顆粒(のちにexosomeと名付けられた)に内包し、細胞外へ放出していることを観察したことが、エクソソーム発見の経緯とされている¹⁹⁾。発見当時から、エクソソームなどの細胞外小胞にはタンパク質を含むことが知られていたが、2000年頃にはDNA断片が²⁰⁾、2006年にはmRNA²¹⁾、2007年にはmiRNAが²²⁾、含まれることが報告されて、エクソソームは核酸も内包していることが認知された。

以上が、エクソソームの簡単な説明となるが、エクソソームをリキッドバイオプシーに用いる際の利点としては、以下の特徴が挙げられる。

(1)エクソソームの内包物は由来する細胞や、細胞の状態、置かれている環境によって異なる²³⁾。つまり、疾患ごとや疾患関連細胞の状態によって体液中を循環するエクソソームには特徴を示す物質が内包されている。

(2)エクソソームには、タンパク質、核酸(mRNA, DNA, miRNA)、脂質などが内包され、多種多様な分子の複合体であるため、解析対象となる分子群が豊富に存在する¹⁶⁾。そのため、解析対象の選択が可能であり、汎用されている技術を解析に用いることができる。例えば、miRNAやmRNAなどの核酸を解析対象にした際は、PCR法での検出や、網羅的解析であれば、マイクロアレイなどで解析が可能である。最近では、次世代シーケンサーなどの技術発達により、より一層、解析方法の選択肢は増えている。同様にタンパク質であれば、ウェスタンブロット法やELISA法で解析可能である。

(3)ほぼ全ての細胞が自発的にエクソソームを分泌するため、早期のがん細胞においても、エクソソームを分泌している。それらのエクソソーム内包物に特異

図1 エクソソームリキッドバイオプシー

リキッドバイオプシーの解析対象は cfDNA や CTC などに加えて、エクソソームや miRNA などの分子群も対象となってきた。エクソソームリキッドバイオプシーは体液中に存在するエクソソームに含まれる分子を利用して、検査、診断を行う。しかし、エクソソームはがん細胞のみならず正常な細胞からも分泌されており、ヒトの体液中を循環している。そのため、がん細胞が分泌するエクソソームに含まれる特異的な分子を標的としてがん細胞由来のエクソソームを検出し、診断などを行う研究が盛んに行われている。

的な分子を見出せれば、それら分子を目印として、早期がん細胞が分泌したエクソソームを体液中から検出することで、早期がんの診断も可能である。また、がんに限らず、疾患特異的な細胞が分泌する特異的なエクソソームの存在が示唆されており、様々な疾患においてエクソソームを用いたリキッドバイオプシーの開発が可能であろう。

しかし、上述のように、エクソソームはあらゆる細胞から分泌されるため¹⁶⁾、体液中に含まれるエクソソームはヘテロな集団である。つまり、正常細胞が分泌している数多くのエクソソームから、疾患特異的なエクソソームを見分けて検出する必要がある。さらに、

エクソソームの大きさは細胞と比較して 100 から 1,000 倍も小さいことがエクソソームの検出および解析の難易度を上げている。そのような状況の中で、いくつかエクソソームを利用した診断法が報告されており、リキッドバイオプシーとしての可能性が期待されている。特にエクソソーム膜上に存在するタンパク質を利用した研究報告が多くあり、それらの一部を紹介する (表 1)。

エクソソーム膜上のタンパク質を利用する利点として、エクソソームを破壊せずに直接解析可能な標的分子であることが挙げられる。例えば、エクソソームに内包されているタンパク質や核酸を検出する場合、基

表1 エクソソーム膜表面を標的としたバイオマーカー

疾患	体液の種類	バイオマーカー	検出方法	引用文献
膠芽腫	血漿	EGFRvIII	μNMR	46
乳がん	血漿	Del-1	ELISA	24
乳がん	血漿	Fibronectin	ELISA	47
大腸がん	血清	CD147	ExoScreen	27
膵臓がん	血清	GPC-1	FACS	48
膵臓がん	血漿	EphA2	nPES	26
膵臓がん	血漿	EGFR, EPCAM, MUC1, WNT2, GPC1	NPS	49
肺がん	血清	CD91	ELISA	50
卵巣がん	腹水	CD24, EpCAM	nPLEX	25
卵巣がん	血漿	CD24, EpCAM, CA-125	ExoSearch	51
前立腺がん	血清, 血漿	Survivin	ELISA	52
咽頭がん	血漿	PD-L1	FACS	53
膀胱がん	尿	TACSTD2	ELISA	54
メラノーマ	血漿	PD-L1	ELISA	55
メラノーマ	血漿	CD63, Caveolin-1	Exotest (ELISA)	56

本的には体液中からのエクソソーム回収の工程および内部分子の抽出が必要である。しかし、膜上のタンパク質は抗体などを用いることで、検出することが可能であるため、体液からエクソソームを回収しなくても解析が可能である。その代表的な検出方法がELISA法の応用である。すでに臨床現場でも使用されているELISA法は多検体の処理も可能であることから、乳がん患者血清からELISA法を用いて Developmental endothelial locus-1 protein (Del-1) 陽性もしくは Del-1 と CD9 共陽性のエクソソームを検出する診断法の開発が報告されている²⁴⁾。その報告では、従来から利用されている腫瘍マーカー CA 15-3 はステージ 0 から III の患者血清中では健常者と差が認められず、ステージ IV のみで差が認められた。しかし、Del-1 陽性もしくは Del-1 と CD9 共陽性のエクソソームを測定することで、乳がんと良性腫瘍、非がん疾患、健常者を鑑別することができ、AUC は 0.95 程度であった。さらに早期乳がんに関しても同様に AUC 0.95 以上の鑑別能力があることが示された。また、別のエクソソーム検出方法として、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance; SPR) を利用したエクソソーム検出機器がある²⁵⁾。この報告では、金膜上に抗体を結合させ、抗体がエクソソームを補足すると、スペクトルのシフトと透過強度の変化が観察されることを利用した検出法を開発している。この方法を利用して卵巣がん

患者の腹水中の CD24 陽性もしくは EpCAM 陽性のエクソソームを解析した。その結果、肝硬変患者などの腹水と比較して、卵巣がん患者の腹水中には、エクソソームに含まれる CD24 と EpCAM の量が多かった。さらに化学療法の前後も比較しているが、治療効果が得られた患者腹水では CD24 と EpCAM の量も治療前に比べて、減少しており、エクソソームを標的としたリキッドバイオプシーは病態モニタリングにも使えることが示唆された。その他の検出方法として、金ナノ粒子 (Gold nanoparticles) の大きさによって、異なる表面プラズモン共鳴を利用した方法が報告されている²⁶⁾。この方法はガラススライド上に抗 CD81 抗体を固相化し、血中エクソソームを捕捉し、その後、直径 50 nm の金ナノ粒子を結合させた抗 EphA2 抗体と 25×60 nm の金ナノロッドを結合させた抗 CD9 抗体を添加し、血中のエクソソームを検出した。つまり、エクソソームマーカー CD81、エクソソームマーカー CD9、そして、膵臓がん細胞が分泌するエクソソームに多く存在するとされる EphA2、全てが陽性であるエクソソームを測定した。その結果、迅速かつ微量の血液で膵炎患者と早期の膵がん患者を区別することができ、診断が困難とされている膵臓がんの新たなリキッドバイオプシーとなりうることを示された。

また、われわれはエクソソームの精製、濃縮不要かつハイスループットな検出系の開発に取り組む

図2 体液中を循環する miRNA

体液中に存在する miRNA は、次のような状態で循環している。a) 脂質やタンパク質に結合している miRNA, b) エクソソームに含まれる miRNA, c) アポトーシス小体に含まれる miRNA, d) 細胞から漏出した miRNA に分類され、その総称を Circulating miRNAs という。

“ExoScreen 法”を開発した²⁷⁾。本方法はエクソソーム膜上に存在するタンパク質を異なる修飾が施された2種類のモノクローナル抗体で挟み込み、2種類の抗体が200 nm 以内に近接する場合のみ、蛍光シグナルが発生し、エクソソームの検出を可能とする。2種類ないし1種類のエクソソーム膜タンパク質をマーカーとして、疾患特異的エクソソームを検出する方法である。本方法を用いて、標的膜タンパク質をCD147とし、大腸がん患者血清と健常人血清中のCD147とCD9共陽性エクソソームについて大規模解析を行った、その結果、がん患者血清には有意にCD147とCD9共陽性エクソソームが存在することを明らかにした。従来使用されている腫瘍マーカーCA19-9やCEAでは検出が難しい早期大腸がん患者の血清中にもCD147とCD9共陽性エクソソームが多く存在することから、早期診断への可能性も示された。また、同一患者の術前術後の血清を同様に解析した結果、術後でCD147とCD9共陽性エクソソームが減少することを確認できており、術後の経過モニタリングに使用できる可能性を示した。

以上のようにエクソソーム膜タンパク質はエクソ

ソームを標的としたリキッドバイオプシーの開発にとって、重要な標的分子となりうる。また、これら方法の問題点の一つとして、臨床応用に耐えうるだけのスループット性、簡便性が問われているが、現在、臨床応用を見据えた様々なエクソソーム検出方法が開発され始め、実用化へ期待が高まっている。

体液中を循環する miRNA や mRNA

上述したように、2007年、エクソソームにmiRNAが内包され、細胞外に分泌されていることが報告された²²⁾。つまり、腫瘍細胞などが体液中にmiRNAを放出していることは容易に想像でき、リキッドバイオプシーの開発項目にmiRNAが加わることとなった。現在では、エクソソームに内包されるmiRNA以外にも、体液中にはいくつかの状態・様式でmiRNAが存在することが知られている。分類すると、図2のようにa) 脂質やタンパク質に結合しているmiRNA, b) エクソソームに含まれるmiRNA (exosomal miRNA), c) アポトーシス小体に含まれるmiRNA, d) 細胞から漏出したmiRNAに分けることができる。このような

体液中に存在する miRNA を総称して “circulating miRNAs” と呼ばれている (図)。現在、世界中で circulating miRNAs を標的としたバイオマーカーの探索が行われている。日本においても、2014 年に、早期がん診断のための circulating miRNA 研究に対し、政府が総額約 80 億円の予算を投じて、2018 年度までの 5 年間、研究開発が行われた。がんを中心とした血液中 miRNA 発現プロファイルデータベースを構築し、早期診断を実現させることを目的とし、大規模な産学官連携プロジェクトが行われており、2019 年末までにそれら成果が 15 報の論文として報告されている (現在も投稿中の論文などが多数ある)^{28)~42)}。本プロジェクトでは東レ社のマイクロアレイを用いて、血液中 miRNA を網羅的に解析し、複数の miRNA の発現パターンを解析することで、診断することを行うプラットフォームが開発された。同様に本プロジェクトでは東芝社からも miRNA を迅速に検出する診断機器装置の開発が報告され、実用化への兆しを見せた。

上述したように、体液中に存在する miRNA の総称を circulating miRNAs としているが、exosomal miRNA に着目したリキッドバイオブシーの開発を行っている例もある。circulating miRNAs と比較して、より生物学的情報を持つと考えられている exosomal miRNA を標的とすることで、より精度の高いリキッドバイオブシーの開発を目指している。例えば、Madhavan らは膵臓がん患者の血中ではエクソソームに内包されている miR-3976, miR-1246, miR-4306 と miR-4644 の量が上昇することを報告している⁴³⁾。これらの測定結果は 80% 以上の膵臓がん患者が健常人と比較して高値を示していた。他にも、Jin らは次世代シーケンサーを用いて、早期の肺がん患者血中に多く存在する exosomal miRNA を複数同定した⁴⁴⁾。それら miRNA を組み合わせて検出することで、非小細胞肺がんを高精度に検出することができた (AUC 0.899)。この報告で解析された肺がん患者の血清は、いずれもステージ I であったことから、exosomal miRNA の早期診断への利用が可能であることが示された。

また、miRNA のみならず mRNA もリキッドバイオブシーの標的となりうるということが分かってきた。われ

われは、卵巣がん患者の腹水に含まれるエクソソーム中の mRNA を標的としたリキッドバイオブシーの開発に取り組んでいる。転移性の卵巣がん細胞が分泌するエクソソームには細胞外マトリックスの分解を引き起こす matrix metalloproteinase 1 (MMP1) の mRNA が多く含まれていることを明らかにし、卵巣がんの腹膜播種転移を引き起こす一因であることを報告している⁴⁵⁾。また、卵巣がん組織における MMP1 の発現が予後と相関しうることも公共データベースから明らかになっており、腹水中のエクソソームに内包されている MMP1 mRNA が予後予測マーカーになりうると考えられた。実際、一部の卵巣がん患者の腹水中には MMP1 mRNA を含むエクソソームが存在しており、予後予測が可能な新たなリキッドバイオブシーとなりうることを示唆されている。しかし、現状としてエクソソーム中に含まれる miRNA や mRNA の内在性コントロールとして利用できる分子が定まっておらず、その存在量を単純に比較して良いのか、精査する必要がある。開発課題は残っている。さらに、上記の exosomal miRNA や mRNA を解析する場合、エクソソームの回収方法によって、結果が異なることが予想されることや、スループット性に考慮した方法ではなく、例えば、現在スタンダードとなっている超遠心法を用いた場合などは実用性も検討する必要がある。以上のように、エクソソームリキッドバイオブシーを行う際の臨床応用への課題は残しており、今後の開発に期待される。

おわりに

リキッドバイオブシーという言葉が浸透する以前から、多くの研究者がわれわれの体液中に潜む疾患の痕跡を探してきた。その成果は、リキッドバイオブシーという概念を作り、リキッドバイオブシーという新しい診断法・検査法は、ただ体内に腫瘍が存在するかを把握するだけではなく、その性質までも見抜く力を持っており、その用途は多岐に渡る。本稿では、がんを中心に概説したが、リキッドバイオブシーはがんのみならず、様々な疾患へ応用可能であり、組織生検が困難な疾患の診断や病態モニタリングに役立つであろう。

う。まだ、途上ではあるが、近い将来、リキッドバイオプシーによる診断が、がんを含む多くの疾患の治療を助け、一人でも多く、疾患に苦しむ人を救うことになることを期待している。

著者のCOI (Conflict of Interest) 開示：武田科学振興財団

文献

- 1) Jones HB: On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium. *Phil Trans R Soc Lond* 1848; 138: 55-62.
- 2) Gold P, Freedman SO: Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965; 121: 439-462.
- 3) Gold P, Freedman SO: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122: 467-481.
- 4) Thomson DMP, Krupey J, Freedman SO, Gold P: The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 64: 161-167.
- 5) Nagasue N, Inokuchi K, Kobayashi M, Saku M: Serum alpha-fetoprotein levels after hepatic artery ligation and postoperative chemotherapy: correlation with clinical status in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1977; 40: 615-618.
- 6) Chen DS, Sung JL, Sheu JC, Lai MY, How SW, Hsu HC, et al: Serum alpha-fetoprotein in the early stage of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1984; 86: 1404-1409.
- 7) Mandel P, Metais P: Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948; 142: 241-243.
- 8) Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-650.
- 9) Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD: Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1961-1965.
- 10) Diaz LA Jr, Bardelli A: Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014; 32: 579-586.
- 11) Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C: Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11: 129-144.
- 12) Fan ST, Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Yu WC, Wong J: Prediction of posthepatectomy recurrence of hepatocellular carcinoma by circulating cancer stem cells: a prospective study. *Ann Surg* 2011; 254: 569-576.
- 13) Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP, Leyland-Jones B, Srkalovic G, et al: Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol* 2014; 32: 3483-3489.
- 14) Hu Y, Ulrich BC, Supplee J, Kuang Y, Lizotte PH, Feeney NB, et al: False-Positive Plasma Genotyping Due to Clonal Hematopoiesis. *Clin Cancer Res* 2018; 24: 4437-4443.
- 15) Mayrhofer M, De Laere B, Whittington T, Van Oyen P, Ghysel C, Ampe J, et al: Cell-free DNA profiling of metastatic prostate cancer reveals microsatellite instability, structural rearrangements and clonal hematopoiesis. *Genome Med* 2018; 10: 85.
- 16) Raposo G, Stoorvogel W: Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200: 373-383.
- 17) Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al: Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018; 7: 1535750.
- 18) Zhang H, Freitas D, Kim HS, Fabijanic K, Li Z, Chen H, et al: Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat Cell Biol* 2018; 20: 332-343.
- 19) Pan BT, Johnstone RM: Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 1983; 33: 967-978.
- 20) Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I: Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 1999; 93: 3956-3963.
- 21) Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P: Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20: 847-856.
- 22) Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ,

- Lötvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 654–659.
- 23) de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, Vader P, Gremmels H, Posthuma G: Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J Extracell Vesicles* 2012; 1: 18396.
 - 24) Moon PG, Lee JE, Cho YE, Lee SJ, Jung JH, Chae YS, et al: Identification of Developmental Endothelial Locus-1 on Circulating Extracellular Vesicles as a Novel Biomarker for Early Breast Cancer Detection. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 1757–1766.
 - 25) Im H, Shao H, Park YI, Peterson VM, Castro CM, Weissleder R, et al: Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 490–495.
 - 26) Liang K, Liu F, Fan J, Sun D, Liu C, Lyon CJ, et al: Nanoplasmonic Quantification of Tumor-derived Extracellular Vesicles in Plasma Microsamples for Diagnosis and Treatment Monitoring. *Nat Biomed Eng* 2017; 1: 0021.
 - 27) Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, et al: Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun* 2014; 5: 3591.
 - 28) Shimomura A, Shiino S, Kawauchi J, Takizawa S, Sakamoto H, Matsuzaki J, et al: Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Sci* 2016; 107: 326–334.
 - 29) Yokoi A, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Yoneoka Y, Takahashi K, Shimizu H, et al: Integrated extracellular microRNA profiling for ovarian cancer screening. *Nat Commun* 2018; 9: 4319.
 - 30) Usuba W, Urabe F, Yamamoto Y, Matsuzaki J, Sasaki H, Ichikawa M, et al: Circulating miRNA panels for specific and early detection in bladder cancer. *Cancer Sci* 2019; 110: 408–419.
 - 31) Shiino S, Matsuzaki J, Shimomura A, Kawauchi J, Takizawa S, Sakamoto H, et al: Serum miRNA-based Prediction of Axillary Lymph Node Metastasis in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2019; 25: 1817–1827.
 - 32) Urabe F, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Kimura T, Hara T, Ichikawa M, et al: Large-scale Circulating microRNA Profiling for the Liquid Biopsy of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2019; 25: 3016–3025.
 - 33) Shigemizu D, Akiyama S, Asanomi Y, Boroevich KA, Sharma A, Tsunoda T, et al: Risk prediction models for dementia constructed by supervised principal component analysis using miRNA expression data. *Commun Biol* 2019; 2: 77.
 - 34) Asano N, Matsuzaki J, Ichikawa M, Kawauchi J, Takizawa S, Aoki Y, et al: A serum microRNA classifier for the diagnosis of sarcomas of various histological subtypes. *Nat Commun* 2019; 10: 1299.
 - 35) Sudo K, Kato K, Matsuzaki J, Boku N, Abe S, Saito Y, et al: Development and Validation of an Esophageal Squamous Cell Carcinoma Detection Model by Large-Scale MicroRNA Profiling. *JAMA Netw Open* 2019; 2: e194573.
 - 36) Sonoda T, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Sakurai T, Aoki Y, Takizawa S, et al: Serum MicroRNA-Based Risk Prediction for Stroke. *Stroke* 2019; 50: 1510–1518.
 - 37) Satomi-Tsushita N, Shimomura A, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Kawauchi J, Takizawa S, et al: Serum microRNA-based prediction of responsiveness to eribulin in metastatic breast cancer. *PLoS One* 2019; 14 (9): e0222024.
 - 38) Yokoi A, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Tate K, Yoneoka Y, Shimizu H, et al: Serum microRNA profile enables preoperative diagnosis of uterine leiomyosarcoma. *Cancer Sci* 2019; 110: 3718–3726.
 - 39) Sato J, Shimomura A, Kawauchi J, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Takizawa S, et al: Brain metastasis-related microRNAs in patients with advanced breast cancer. *PLoS One* 2019; 14: e0221538.
 - 40) Sudo K, Kato K, Matsuzaki J, Takizawa S, Aoki Y, Shoji H, et al: Identification of serum microRNAs predicting the response of esophageal squamous-cell carcinoma to nivolumab. *Jpn J Clin Oncol* 2019; pii: hyz146.
 - 41) Ohno M, Matsuzaki J, Kawauchi J, Aoki Y, Miura J, Takizawa S, et al: Assessment of the Diagnostic Utility of Serum MicroRNA Classification in Patients With Diffuse Glioma. *JAMA Netw Open* 2019; 2: e1916953.
 - 42) Noda-Narita S, Shimomura A, Tanabe Y, Kawauchi J, Matsuzaki J, Takizawa S, et al: Peripheral neuropathy from paclitaxel: risk prediction by serum microRNAs. *BMJ Support Palliat Care* 2020; pii: bmjpspcare-2019-001900.
 - 43) Madhavan B, Yue S, Galli U, Rana S, Gross W, Müller M, et al: Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. *Int J Cancer* 2015; 136: 2616–2627.
 - 44) Jin X, Chen Y, Chen H, Fei S, Chen D, Cai X, et al:

- Evaluation of Tumor-Derived Exosomal miRNA as Potential Diagnostic Biomarkers for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Using Next-Generation Sequencing. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 5311–5319.
- 45) Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, Kato T, et al.: Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. *Nat Commun* 2017; 8: 14470.
 - 46) Shao H, Chung J, Balaj L, Charest A, Bigner DD, Carter BS, et al.: Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat Med* 2012; 18: 1835–1840.
 - 47) Moon PG, Lee JE, Cho YE, Lee SJ, Chae YS, Jung JH, et al.: Fibronectin on circulating extracellular vesicles as a liquid biopsy to detect breast cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 40189–40199.
 - 48) Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al.: Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015; 523: 177–182.
 - 49) Yang KS, Im H, Hong S, Pergolini I, Del Castillo AF, Wang R, et al.: Multiparametric plasma EV profiling facilitates diagnosis of pancreatic malignancy. *Sci Transl Med* 2017; 9: pii: eal3226.
 - 50) Ueda K, Ishikawa N, Tatsuguchi A, Saichi N, Fujii R, Nakagawa H: Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. *Sci Rep* 2014; 4: 6232.
 - 51) Zhao Z, Yang Y, Zeng Y, He M: A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis. *Lab Chip* 2016; 16: 489–496.
 - 52) Khan S, Jutzy JM, Valenzuela MM, Turay D, Aspe JR, Ashok A, et al.: Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer. *PLoS One* 2012; 7: e46737.
 - 53) Theodoraki MN, Yerneni SS, Hoffmann TK, Gooding WE, Whiteside TL: Clinical Significance of PD-L1+ Exosomes in Plasma of Head and Neck Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2018; 24: 896–905.
 - 54) Chen CL, Lai YF, Tang P, Chien KY, Yu JS, Tsai CH, et al.: Comparative and targeted proteomic analyses of urinary microparticles from bladder cancer and hernia patients. *J Proteome Res* 2012; 11: 5611–5629.
 - 55) Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, et al.: Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 2018; 560: 382–386.
 - 56) Logozzi M, De Mito A, Lugini L, Borghi M, Calabrò L, Spada M, et al.: High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009; 4: e5219.