

〈特集：特別講演（第29回年次学術集会より）〉

## 細胞外小胞の情報伝達機構の解明と疾患の診断・治療

落谷 孝広

### A novel mechanisms of intracellular communication through extracellular vesicles towards the development of diagnostics and therapeutics of diseases

Takahiro Ochiya

**Summary** Extracellular vesicles (EVs) are nano-sized particles which transfer cellular components such as RNA, DNA, and proteins from one cell to another. Cancer-derived EVs promote cancer progression, acquiring drug resistance, and metastasis. Our first evidence of EVs lies cancer diagnosis and several technical advances allowed us to identify cancers as a liquid biopsy. Currently, it is expected to apply EVs to cancer therapies, such as utilizing EVs as drug delivery system (DDS) for anticancer drugs and as cancer vaccines to enhance immunity to cancer cells. Moreover, inhibiting the function of the cancer-derived EVs would be helpful to cancer therapies by suppressing cancer metastasis. Only few studies on treatments by inhibiting the functions of cancer-derived EVs have been reported at experimental and preclinical levels. Recently, we showed in a mouse model that disruption of cancer-derived EVs by antibodies could suppress metastasis of the human cancer cells to the lung and bone. EVs will provide us the multiple strategies to fight with cancer, however, it is important to confirm safety issues and overcome technical problems to bring EVs in practical use.

**Key words:** Extracellular vesicles (EVs), cancer, diagnostics, therapeutics, liquid biopsy

#### I. はじめに

エクソソームによって運ばれるマイクロRNAが、細胞間のコミュニケーションツールとして機能している。2007年に報じられたこのひとつのエクソソーム論文が世界中の研究者たちを震撼させてからもう10年が経とうとしている。細胞が本来備えているストレス応答機構に見られるように、生体に負荷される外部からの

様々なシグナルは、細胞の形態変化といった単純な細胞応答のみならず、ゲノム・エピゲノム変動をベースにしたよりダイナミックな防御態勢の構築へと細胞を導く結果となる。近年、急速に研究が加速している細胞外小胞（EV：“エクソソーム”はこのEVの一種である）もおそらくそうした細胞が必要とする応答機構の一つとして発達してきたと考えることができる。特に「がん」を考えた場合、その初期の発生の過

東京医科大学 医学総合研究所  
分子細胞治療研究部門教授  
〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1

Department of Molecular and Cellular Medicine,  
Institute of Medical Science, Tokyo Medical University,  
Shinjyuku 6-7-1, Tokyo, 160-0023, Japan.

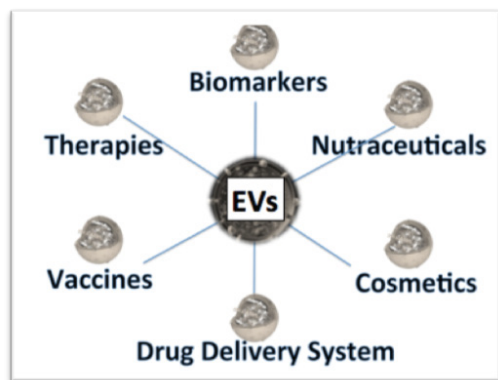


Fig. 1 EVs as novel biological medicine in a different scientific field

程から浸潤、薬剤耐性の獲得、転移といった進展に至るまで、様々な過程で周囲のがん微小環境を構成する細胞群からの監視と攻撃を受けながら体内で必死に成長する。こうした「がん」細胞にとっては、エクソソームという新たな武器を手に入れたことで、容易に相手の攻撃をかわすことが可能となり、がん細胞の生存にとってより有利となる微小環境を手に入れることに成功したのである。まさにがんの転移において、エクソソームは要の役割を果たしている。こうした生体が有する天然の細胞間情報デリバリーシステムであるエクソソームに多くを学ぶことで、医学生物学はもちろん、再生医療を始め様々な分野の新しい研究の起点となることが期待されている (Fig.1)。

## II. エクソソーム研究の歴史

エクソソームの発見は古く、30年以上前にさかのぼる。1981年、2つのグループによりほぼ同時に、網状赤血球の研究で発見されたのが最初であるが<sup>12)</sup>、前立腺液中に含まれる細胞外小胞にプロスタソームという名称が1970年代にすでにつけられているのはあまり知られていない。「エクソソーム」という名称は少し遅れて1987年に命名された<sup>3)</sup>。長らくエクソソームは、細胞にとって細胞内に生まれる燃焼物などの不要な物質を廃棄するための「ごみ箱」だと考えられてきた。しかし、1996年の、B細胞由来のエクソソーム表面に抗原が提示され、T細胞の活性化に関わるという報告<sup>4)</sup>や、2007年のスウ

エーデンのLötval博士のグループによる、miRNAがエクソソーム中に存在し、細胞間で受け渡しされるという報告<sup>5)</sup>などで、細胞間の情報交換にエクソソームが使用される可能性が示され、エクソソームに一気に注目が集まった。2011年に第2回目の国際会議がパリで開催された。このときは第一回のとくとは対照的に、用意した会場には収まりきれないほどの研究者が世界中から集結し、その会議に参加した研究者はまさに新しい歴史が始まる瞬間を共有したのであった。翌2012年にはLötval博士らが中心となってエクソソームの国際ソサイエティーであるISEV (International Society for Extracellular Vesicles: <https://www.isev.org/>) が発足したのである。我が国でも2014年にJSEV (日本細胞外小胞学会; HP <http://www.jsev.jp/>) が設立され、多くの若手の研究者や企業の研究者たちが集う活気のある会となっている。さらに2019年の4月にはISEVが初めてのアジアである日本の京都市で開催されるが、1200名以上の参加、うち海外から500名以上と、大盛況であった。

## III. エクソソームの基礎

EVsのなかで最もよく研究されているのがエクソソーム (Exosome) である。エクソソームとは、あらゆる細胞から分泌される直径100ナノメートル前後の小胞体であり、脂質二重膜で囲まれたその内部には、mRNA, microRNA, タンパク質等の多くの情報伝達物質が内包されている<sup>6)</sup>。この小胞は、エンドゾームに由来する機構で細胞外に放出されるが、これより少し大型の小胞であり、細胞膜がちぎれる形で放出された場合、マイクロベシクルというまた別の名称が付与されている。エクソソームは、直接細胞膜から形成されるのではなく、細胞内で形成されてから細胞外に分泌される。エクソソームは細胞質から初期エンドソームの内側に出芽するように形成され、その形成にはESCRT (endosomal sorting complex required for transport) やテトラスパニンが関与すると考えられている。エクソソームを多数含むエンドソームは、その形状からMultivesicular body (MVB) と呼ばれる。エクソソームの膜を構成する脂質はセラミドやスフィンゴミエリン、コレステロール

などが多く、脂質ラフトと類似していることから、MVBの脂質ラフトのような領域から形成されると考えられる。実際、セラミドの合成酵素であるnSMase2を過剰発現すると、エクソソームの分泌量が上昇することは既に証明済みである<sup>7)</sup>。MVBには、リソソームや細胞膜に融合する性質があり、複数のRABタンパク質に制御されている。細胞膜に融合した場合のみエクソソームは細胞外へ分泌される。細胞膜との融合はSNAREタンパク質の作用である。

エクソソームと受容する側の細胞への接着には、テトラスパニンが関わるのがよく知られている。エクソソームの細胞への取り込みの仕組みは、様々なエンドサイトーシス経路を通る可能性が示されている。それらはクラスリン依存的、非依存的な経路、カベオリンを介した取り込み、マクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、脂質ラフトを介した取り込み、など様々である<sup>8)</sup>。また、直接細胞膜に結合する形で取り込まれた場合、エクソソームは微小管で核周辺に輸送されるようだ<sup>9)</sup>。エクソソーム内包物はエンドソームに融合することで放出されるが<sup>8)</sup>、タンパク質はリソソームに取り込まれ、その膜部分は細胞表面に戻されるという観察報告もある<sup>9)</sup>。

細胞外小胞にはエクソソームの他に、アポトーシス小体、マイクロベシクルが知られている。現在、3種の細胞外小胞の回収は超遠心法が主流だが、それぞれの細胞外小胞を完全に分離することは不可能である。加えて、分泌する細胞によっても性質が異なるため、エクソソームの明確な定義は現在でも困難である<sup>10)</sup>。現状では「エクソソーム」が意味するものは論文間で相違があるので、論文を読む際には論文内の定義や分離方法に注意を払う必要がある。エクソソームの技術面でのposition paperが国際細胞外小胞協会のオフィシャルジャーナルであるJEVから出版されているので参照されたい<sup>11)</sup>。

細胞内の物質が選択的にエクソソームに内包されるかは興味深い問題である。エクソソームに内包される物質の割合は、ある程度細胞内の存在量を反映するようだ。細胞内に過剰発現させたmiRNAやタンパク質、mRNAはより多くエクソソームに内包されることは既に多くの論文で示されている。一方で、選択的に取り込まれ

るとする報告例もある。例えば、rRNAは細胞内のRNAの大部分を占めるにも関わらず、エクソソーム中にはほとんどrRNAが検出されない。また、乳がん細胞MCF-7において、細胞内で最も量の多いmiR-720のエクソソーム中での割合はわずか2%で、より細胞内の存在量が少ないmiR-451やmiR-107のほうが高濃度で存在した<sup>12)</sup>。しかし、実際にエクソソームに特異的にmiRNAを内包する機構はまだ明らかになっていない。

エクソソームの特定の細胞への運搬機構も、まだ十分には解明されていない。これまでに、T細胞から抗原提示細胞へ、エクソソームを介してmiRNAが一方向に輸送されるというものがあり、少なくとも特異的な輸送は存在するようである<sup>13)</sup>。しかし、どの程度一般的かは定かではなく、また現状では特異性を決定する因子は特定されていない。現在は遺伝子組換えでエクソソーム表面にリガンドを提示し、受容体—リガンド相互作用を利用してエクソソームを特異的に運搬する研究が行われている<sup>14)</sup>。もしエクソソームの特異的な輸送機構が解明されれば、エクソソームを応用したドラッグデリバリーシステム(DDS)が可能であり、すでに海外の製薬企業はアンチセンスDNAなどを封入したエクソソーム製品の臨床試験に参入している。

#### IV. エクソソーム診断

がんの進展に重要な機能を果たすエクソソームは、体液中に漏れ出て一定期間そこを循環するため、がんの病態を理解する上で、このがん特異的エクソソームの存在を検出する事が出来れば、新しい体液診断の開発に繋がる。すでに、がん特異的エクソソームの検出方法(エクソソームの脂質二重膜表面に搭載されたがん特異的分子を目印にした方法)が開発され、特許申請もなされており、実用化への努力がなされている。エクソソームの診断ベンチャーは、欧米では多く立ち上がっている。オランダQIAGEN社は2014年1月13日、米国のExosome Diagnostics社との戦略的パートナー契約を締結強化、血液中のエクソソーム診断による新しいバイオマーカー戦略を開始した。また同じく米国のCARIS

ライフサイエンス社も前立腺がんなどで臨床応用を進めている。そのなかでは、やはり先の米国のExosome Diagnostics社が群を抜いており、すでに2018年から肺がんや前立腺がんなどを対象に4品を上市する躍進ぶり（主にエクソソームが運ぶexRNAであるmRNA診断など）、今後さらにエクソソーム診断市場は拡大し、年平均成長率CAGRは23.8%とされている。

## V. エクソソーム治療

エクソソームはがん細胞の武器となつてがん微小環境を調整し、がん細胞は過酷な環境下でも生き延びる戦略を獲得した。がん細胞のエクソソーム分泌を抑制すると、*in vitro*での細胞の増殖や、動物へ移植した際の腫瘍形成には変化しないものの、動物での遠隔臓器への転移が抑制された<sup>7)</sup>。この結果が示すのは、がん細胞の転移にエクソソームは必要であり、またそのエクソソームの分泌を阻害することが、がん転移の抑制につながるという大きなヒントだ<sup>15)</sup>。つまり、エクソソームの分泌を阻害し、転移をコントロールすることで、がんに罹患してもがんと共存する社会の実現につながる可能性がある。すでに我々は、このエクソソーム表面分子に注目することで、その分子に対する中和抗体の結合が、マクロファージによる貪食能を高め、体内から抗体と結合したエクソソームが一掃されることで、転移を抑制することを実験的に証明した<sup>16)</sup>。今後、エクソソームを標的とした治療法の開発に期待がかかる。

## VI. 再生医療とエクソソーム

ここで注目すべきは、診断・治療、創薬などの医学生物学分野におけるエクソソーム研究の重要性のみならず、エクソソーム研究の成果が生み出す社会実装への期待である。それはまず再生医療分野での医療応用である。世界的に観ると、オープンになっているだけで100件以上の前臨床試験（動物疾患モデルでの検証実験）が既に走っている。そして92件以上の臨床研究が米国、フランス、中国、日本、イランで行われており、その多くはヒトの間葉系幹細胞（骨髄、脂肪、臍帯由来）や植物に由来するエクソ

ソームであり、対象疾患は「がん」、「慢性疾患」、「難治性疾患」、「心疾患」、「炎症性疾患」等が中心である。これらの実績は、細胞治療を凌駕するセルフリーセラピーの代表としてエクソソームの有用性を示す多くのデータがこの数年間で急速に得られたことによるものと推測される。次に期待されるエクソソーム研究が拓く新しい応用分野は、食品、化粧品分野である。フルーツや野菜に含まれるエクソソームあるいはエクソソーム様細胞外小胞はすでにその有用性が証明され（抗炎症作用等）、開発が進んでいる状況が世界中で報告されている。またエクソソームの持つ皮膚の老化に関するメカニズムを利用した化粧品が欧州大手化粧品メーカーで商品化される等、スキンケアに関する分野での需要も爆発的な広がりを見せている。現在、既に開発が進んでいるエクソソームの診断・治療分野での市場予測が2018年の推計2500万ドルから2025年には3億5000万ドルへと伸長が予測されているが、もしそこにこうした食品、化粧品分野での製品化競争が加わると、市場はもっと大きく伸びる可能性もある。

## VII. 今後のエクソソーム研究の課題

世界中がEV研究に熱狂するなかで、エクソソーム研究の課題は山積みだ。現在、世界中の研究者が苦慮しているのは、エクソソームあるいはEVsの不均質性（heterogeneity）である。最近ではsmall EV, large/middle EVなどの分類もされているが、それぞれの個性を持つ粒子にどのような機能的差異があるのかは、いまだ不明な点が多い。この課題をどう克服し、研究と応用化を進めるかは、エクソソーム製品の規格化を行う上では欠かせない課題である。そしてこの規格化を担うエクソソーム解析装置の技術開発も世界的な競争になっている。そしてセルフリーセラピーには欠かせない、大容量の培養液からエクソソームを含む高度な再生医療能力を持つ製剤を精製するシステムの構築だ。こうした各方面での技術革新がない限り、エクソソームによる未病社会の実現はあり得ない。いまこそ多くの叡智を結集して、この古くて新しい細胞の持つ天然のデリバリーシステムを人々の幸福に生かせるよう産官学の継続した努力が欠か

せない。

本論文内容に関連する著者(ら)の利益相反:  
なし

文献

- 1) Harding C, Heuser J, Stahl P: Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol*, 97: 329-339, 1983.
- 2) Pan BT, Johnstone RM: Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33: 967-978, 1983.
- 3) Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C: Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem*, 262: 9412-9420, 1987.
- 4) Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ: B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med*, 183: 1161-1172, 1996.
- 5) 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*, 9: 654-659, 2007.
- 6) Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T: Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*, 101: 2087-2092, 2010.
- 7) Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T: Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem*, 288: 10849-10859, 2013.
- 8) Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR: Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*, 3: 2014.
- 9) Tian T, Wang Y, Wang H, Zhu Z, Xiao Z: Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J. Cell. Biochem*, 111: 488-496, 2010.
- 10) Gould SL, Raposo G: As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2: 2013.
- 11) Théry C, 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*, 7: 1535750, 2018.
- 12) Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM: Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One*, 5: e13515, 2010.
- 13) Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F: Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*, 2: 282, 2011.
- 14) 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.
- 15) Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T: Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest*, 126: 1163-1172, 2016.
- 16) Nishida-Aoki N, Tominaga N, Takeshita F, Sonoda H, Yoshioka Y, Ochiya T: Disruption of Circulating Extracellular Vesicles as a Novel Therapeutic Strategy against Cancer Metastasis. *Mol Ther*, 25: 181-119, 2017.