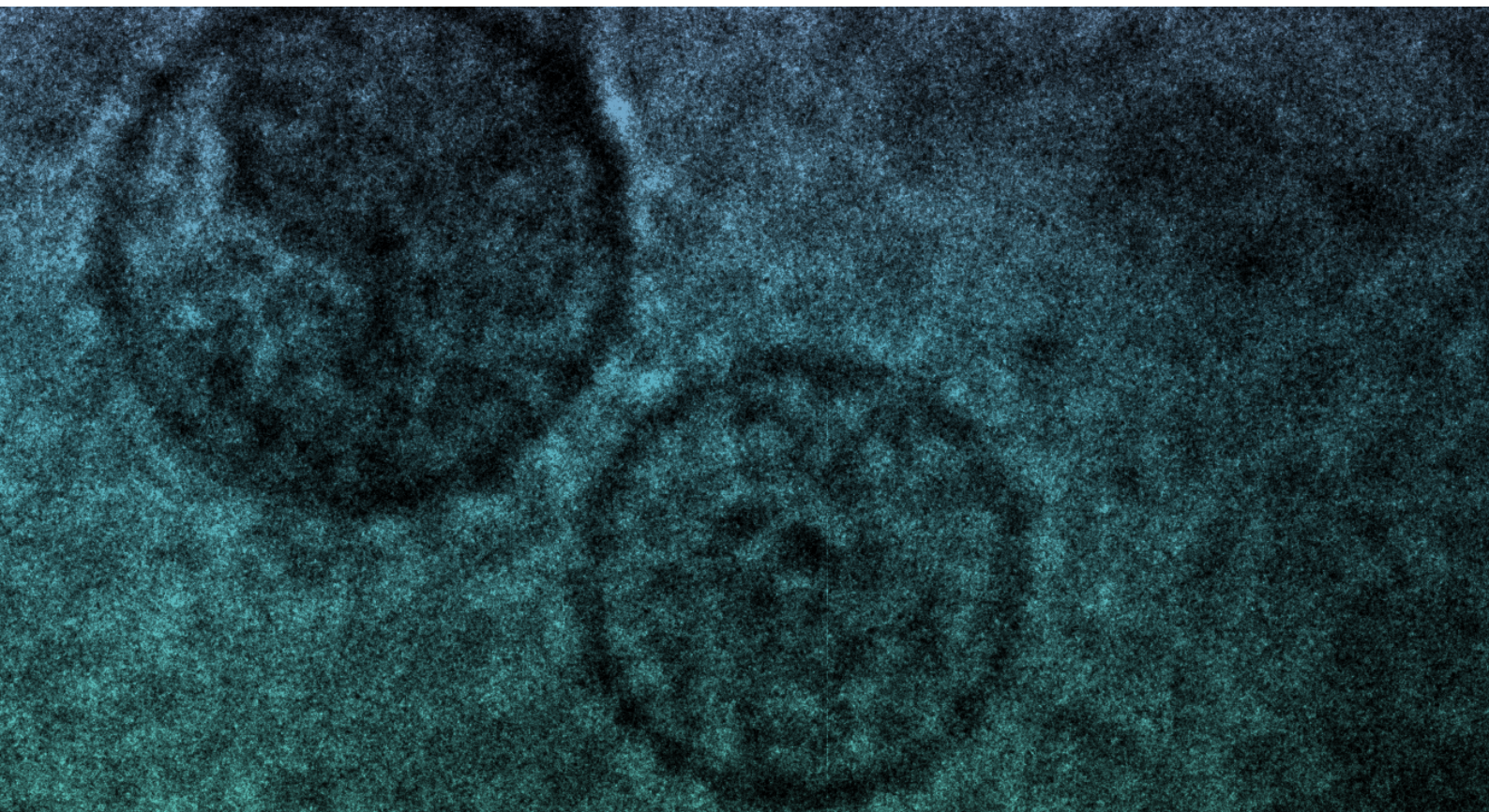


第37回 Wako ワークショップ  
**細胞外小胞の作動原理と  
生物学的展望**

---

**講演要旨集**



**2022年 11月24日(木)**

開催場所／**秋葉原コンベンションホール+ウェブセミナー**

〒101-0021 東京都千代田区外神田1丁目18-13 秋葉原ダイビル 2F

主催 **富士フイルム 和光純薬株式会社**

表紙の写真：

Epstein Barr ウイルス感染細胞より分泌される細胞外小胞 (クライオ電顕にて撮影)

幸谷 愛 先生 ご提供

(東海大学医学部基盤診療学系先端医療科学・東海大学総合医学研究所造血腫瘍分野 教授)

第37回 Wako ワークショップ

# 細胞外小胞の作動原理と 生物学的展望

---

## 講演要旨集

2022年11月24日(木)

秋葉原コンベンションホール＋ウェブセミナー

富士フイルム 和光純薬株式会社

# プログラム

- 10:00～ 開会挨拶 (富士フィルム和光純薬株式会社)
- 10:05～ はじめに  
…………… 幸谷 愛 (東海大学医学部基盤診療学系先端医療科学・東海大学総合医学研究所造血腫瘍分野)
- 10:10～10:40 レビュートーク 座長/幸谷 愛, 華山 力成  
…………… 落谷 孝広 (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)

## セッションⅠ 細胞外小胞の作動機序 座長/落谷 孝広, 高橋 暁子

- 10:40～11:25 新規翻訳修飾 UBL3 化を標的とした新たな治療戦略 3  
…………… 上田 洋司 (藤田医科大学 医科学研究センター 難病治療学)
- 11:25～12:10 細胞外小胞の新機能と SPREDS の臨床応用に向けて 6  
…………… 幸谷 愛 (東海大学医学部基盤診療学系先端医療科学・東海大学総合医学研究所造血腫瘍分野)
- 12:10～13:05 (昼 食)

## セッションⅡ 生体機能における細胞外小胞 座長/上田 洋司, 大塚 基之

- 13:05～13:50 改変エクソソームを用いた新規免疫制御法の開発 9  
…………… 華山 力成 (金沢大学 医学系 免疫学・金沢大学 ナノ生命科学研究所)
- 13:50～14:35 老化細胞が分泌する細胞外小胞の特性 12  
…………… 高橋 暁子 (公益財団法人がん研究会 がん研究所 細胞老化プロジェクト)
- 14:35～14:50 (コーヒーブレイク)

## セッションⅢ がんにおける細胞外小胞 座長/華山 力成, 幸谷 愛

- 14:50～15:35 膵癌の細胞外小胞に着目した病態解明と癌早期診断への応用 15  
…………… 大塚 基之 (東京大学大学院医学系研究科 内科学専攻器官病態内科学講座)
- 15:35～16:20 マルチモーダル医薬としてのエクソソーム創薬 18  
…………… 落谷 孝広 (東京医科大学医学総合研究所 分子細胞治療研究部門)
- 16:20～16:50 おわりに  
…………… 幸谷 愛 (東海大学医学部基盤診療学系先端医療科学・東海大学総合医学研究所造血腫瘍分野)
- 16:50～ 閉会挨拶 (富士フィルム和光純薬株式会社)



## 新規翻訳修飾 UBL3 化を標的とした新たな治療戦略

上田 洋司

藤田医科大学 医科学研究センター 難病治療学

### はじめに

タンパク質の大部分は、翻訳後に多様な因子が付加（翻訳後修飾）されることから、翻訳後修飾による制御は様々な疾患に関与する。新しい翻訳後修飾の解析は、新たな治療薬ターゲットに繋がるため、重要視されている。近年においても、乳酸化やセロトニン化などの新しい翻訳後修飾が発見されており、リン酸化修飾に対する阻害剤が白血病や抗がん剤として臨床応用されている。ユビキチンに着目すると、プロテアソーム阻害剤 Bortezomib、ユビキチン化阻害剤 MLN4924 などが抗がん剤として有用であることが知られている<sup>1,2)</sup>。

細胞外小胞の一種であるエクソソームは、Multivesicular Body (MVB) を介して、細胞外へ分泌される小胞であり、タンパク質や miRNA を内包している。エクソソームは、標的細胞に再び取り込まれることから、新たな細胞間コミュニケーション因子として知られている。

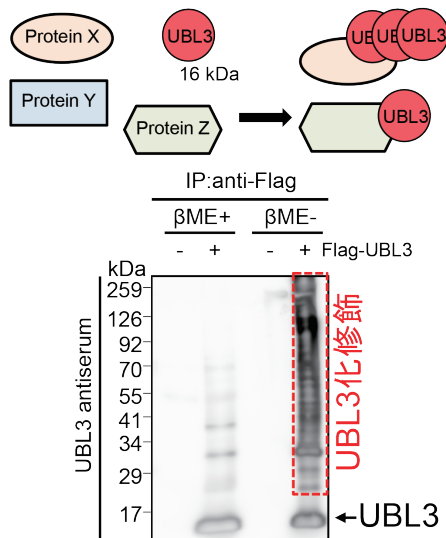


図 1. UBL3 による新規翻訳後修飾

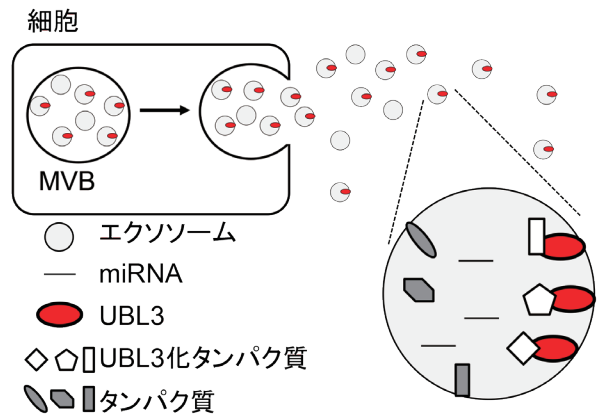


図 2. UBL3 化修飾は特定のタンパク質のエクソソームへの輸送を制御する

我々は、バイオインフォマティクスの手法により種間を超え進化的に保存されたユビキチン様タンパク質 Ubiquitin like 3 (UBL3) を見出した。UBL3 は還元剤依存的に解除される独特な修飾 (UBL3 化) を示し (図 1)、エクソソームへのタンパク質輸送を制御する (図 2)<sup>3)</sup>。今回の講演では、疾患に関与するタンパク質のエクソソームへの輸送機構について紹介し、新規翻訳後修飾 UBL3 化を基軸とした新たな治療戦略について議論したい。

### 本論

細胞外へ放出されるナノサイズの小胞であるエクソソームは、タンパク質を内包し標的細胞に再び取り込まれ、がん転移などの疾患を含めた様々な生命現象に関与している。グリオーマ細胞で発現している活性変異型 EGFR やメラノーマで発現している受容体型チロシンキナーゼ MET がエクソソームを介して正常細胞へ伝搬し、がん転移に関与することが報告されている<sup>4,5)</sup>。また、神経変性疾患に関与するアミロイド  $\beta$  や  $\alpha$  シヌクレインなどもエクソソームを介して病変部

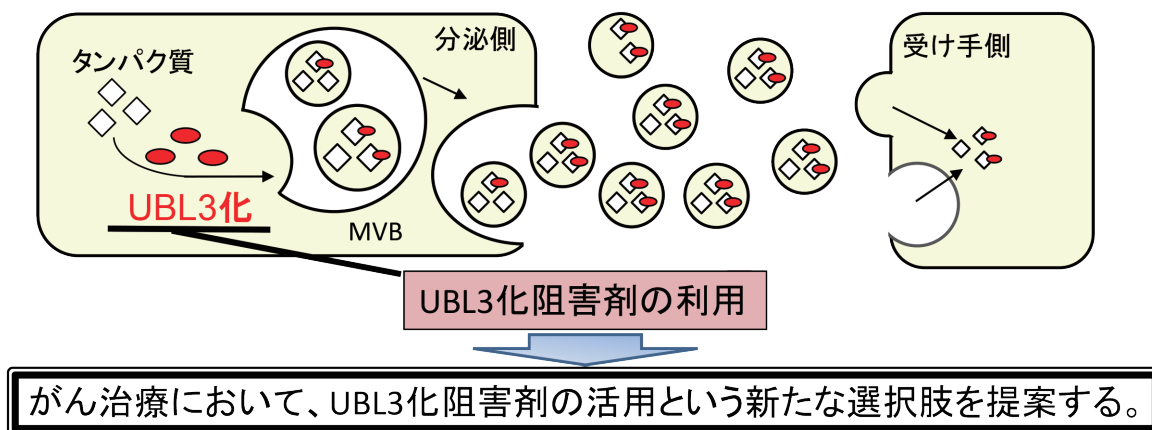


図 3. UBL3 化を基軸とした治療戦略

位を拡大することが知られている。しかし、これらの疾患関連タンパク質のエクソソームへの輸送機構は不明であった。

我々は、種間で高度に保存されたユビキチン様タンパク質 Ubiquitin like 3 (UBL3) が、①新規翻訳後修飾 UBL3 化を担うこと、② MVB へ特異的に輸送されること、③エクソソームへ輸送される全タンパク質の 60% は UBL3 依存的であること、④発がん性 RasG12V 変異体は UBL3 化修飾によりエクソソームへ輸送されることを示した<sup>3)</sup>。更に、我々は UBL3 に対する網羅的プロテオミクス解析を実施し、1244 個の UBL3 結合分子群を同定した。興味深いことに、UBL3 結合分子群を GO 解析したところ、31% が extracellular vesicular exosome とアノテーションされていた。UBL3 結合分子群には、KRAS、BMP 受容体、TGF $\beta$  受容体、RB1、Presenilin 1、Niemann-Pick C1、mTOR などのがん転移、神経変性疾患、糖尿病などの疾患関連分子が少なくとも 22 個含まれていた。以上のことから、UBL3 化阻害剤の探索は、がん転移に加え神経変性や糖尿病などの疾患に対しても有効な薬剤を提示できる可能性が高い (図 3)<sup>6, 7)</sup>。本講演では、新たに判明した UBL3 化修飾を受ける分子群への認識機構、がん関連タンパク質に対する UBL3 化修飾の影響、新たに見いだされた UBL3 化阻害活性を有する薬剤について報告を行い、UBL3 を基軸とした新たな治療戦略について議論したい。

## まとめ

がん治療において、外科療法、化学療法、放射線療法、免疫療法等、様々な治療法を組み合わせる集学的治療が注目されている。UBL3 化は、他のユビキチン様タンパク質 (ユビキチン、オートファジー関連分子 ATG12) のようにグリシン残基 (Gly) を介した修飾ではなく、これまでに例のない還元剤処理で結合が解除されるシステイン残基 (Cys) を介した修飾である。UBL3 化を基軸とした治療戦略は、従来のがん研究におけるパラダイムと全く異なるため、集学的治療の見地からも有望な戦略と考えられる。

## 参考文献

- 1) Paramore, A. & Frantz, S. : "Bortezomib", *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 611-612 (2003).
- 2) Soucy, T. A., Smith, P.G., Milhollen, M.A., Berger, A.J., Gavin J.M., Adhikari, S., Brownell, J.E., Burke, K.E., Cardin, D.P., Critchley, S., Cullis, C.A., Doucette, A., Garnsey, J.J., Gaulin, J.L., Gershman, R.E., Lublinsky, A.R., McDonald, A., Mizutani, H., Narayanan, U., Olhava, E.J., Peluso, S., Rezaei, M., Sintchak, M.D., Talreja, T., Thomas, M.P., Traore, T., Vyskocil, S., Weatherhead, G.S., Yu, J., Zhang, J., Dick, L.R., Claiborne, C.F., Rolfe, M., Bolen, J.B., Langston, S.P. : "An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer." *Nature*, **458**, 732-736 (2009).
- 3) Ageta, H., Ageta-Ishihara, N., Hitachi, K., Karayel, O., Onouchi, T., Yamaguchi, H., Kahyo, T., Hatanaka, K., Ikegami, K., Yoshioka, Y., Nakamura, K., Kosaka, N., Nakatani, M., Uezumi, A., Ide, T., Tsutsumi, Y., Sugimura, H., Kinoshita, M., Ochiya, T., Mann, M., Setou, M., Tsuchida, K. : "UBL3 modification

- influences protein sorting to small extracellular vesicles." *Nat. Commun.*, **9**, 3936 (2018).
- 4) Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., Rak, J. : "Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells." *Nat. Cell Biol.*, **10**, 619-624 (2008).
  - 5) Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B.A., Callahan, M.K., Yuan, J., Martins, V.R., Skog, J., Kaplan, R.N., Brady, M.S., Wolchok, J.D., Chapman, P.B., Kang, Y., Bromberg, J., Lyden, D. : "Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET." *Nat. Med.*, **18**, 883-891 (2012).
  - 6) Ageta, H. & Tsuchida, K. : "Post-translational modification and protein sorting to small extracellular vesicles including exosomes by ubiquitin and UBLs." *Cell Mol. Life Sci.*, **76**, 4829-4848 (2019).
  - 7) Ageta, H. & Tsuchida, K. : "Novel therapeutic strategies for exosome-related diseases." *J. Cell Signal.*, **3**, 105-109 (2022).

## 細胞外小胞の新機能と SPREDs の臨床応用に向けて

幸谷 愛

東海大学医学部基盤診療学系先端医療科学・東海大学総合医学研究所造血腫瘍分野

### はじめに

がんの発症や悪性化には、炎症の制御が深く関与しているが、中でも炎症反応が長引くことで構築される腫瘍微小環境は、腫瘍形成において極めて重要な役割を担うと考えられている。がんにおいては腫瘍細胞や、非腫瘍細胞が分泌する細胞外小胞 (EV) が、腫瘍微小環境の構築に多大な影響を及ぼすことが報告されている。EV はある細胞から分泌されて、他の細胞に取り込まれて内包物を届ける“細胞間コミュニケーター”として機能すると考えられてきた<sup>1)</sup>。

一方、脂質の一種であるリン脂質は、分泌性ホスホリパーゼ A2 (sPLA<sub>2</sub>) に加水分解されることを契機に機能性脂質「脂質メディエーター」を産生する。脂質メディエーターは近年、炎症やがんにおいて関与が大きいことが知られており、さまざまな疾患への sPLA<sub>2</sub> 群の関与が注目されている。sPLA<sub>2</sub> が加水分解する体液中のリン脂質の供給源については、アポトーシス細胞などが考えられてきたが詳細は不明であった<sup>2)</sup>。

### 本論

これまでに Epstein Barr virus (EBV) 関連リンパ腫に対する研究から、ウイルス由来非コード RNA を運ぶ EV がリンパ腫悪性化に必須であることを示してきた<sup>3)</sup>。しかしウイルス由来非コード RNA のみでは悪性化が誘導されないことから、EV が内包する小分子 RNA やタンパクに加え、まだ解析が進んでいない EV 膜を構成するリン脂質に対して網羅のプロファイル解析を行なった。結果、リン脂質分子内には抗炎症性脂質であるドコサヘキサエン酸 (DHA) などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が多く含まれるということ

が明らかになった。PUFA は脂質メディエーターの前駆体であり、通常はリン脂質に結合した状態で存在するが、リン脂質加水分解酵素 sPLA<sub>2</sub> によってリン脂質から切り離されると脂質メディエーターを産生する。DHA から産生される脂質メディエーターは抗炎症作用を有するため、腫瘍細胞が免疫を回避する上では有利に働く。そこで、「sPLA<sub>2</sub> が EV 膜上リン脂質に作用することで脂質メディエーターが生成され、腫瘍微小環境の構築の一助となる」との仮説を立て、その是非を問うた。

まず、EBV リンパ腫組織内で sPLA<sub>2</sub> を発現する細胞の同定を試み、腫瘍随伴マクロファージ (TAM) が sPLA<sub>2</sub>-X を発現することを見出した。そこで腫瘍由来 EV を sPLA<sub>2</sub>-X と試験管内で反応させたところ、大量のリン脂質分解産物が検出され、腫瘍由来 EV が sPLA<sub>2</sub> の基質となり加水分解を受けることが明らかとなった。sPLA<sub>2</sub> 処理 EV (sPLA<sub>2</sub> EV) によって① EV の古典的作動メカニズムであるマクロファージへの取り込みが促進される②マクロファージにおける TAM マーカー発現が著しく増加する③酵素反応により EV から生成される脂質メディエーター分子そのものも①・②の機能を促進する④ sPLA<sub>2</sub> の酵素反応は腫瘍細胞由来・患者血清由来の EV で起こり、健常者血清由来の EV では影響が小さいことが明らかになった。一方で、この酵素反応により生成される脂質メディエーターは細胞膜上の「G たんぱく質共役受容体 (GPCR)」を活性化することで効果を発揮することが知られており、「TGF  $\alpha$  Shedding assay」を用いて解析したところ、EV を取り込む能力のある単球様細胞株 THP-1 だけでなく、EV を取り込む能力の無い T リンパ球系細胞株である Jurkat でも sPLA<sub>2</sub> EV によるシグナル増強が確認された。これは「EV は細胞に取り込まれずとも作用する」というこれまでの EV 生



## sPLA<sub>2</sub>-reacted EV derivatives ( SPREDs)

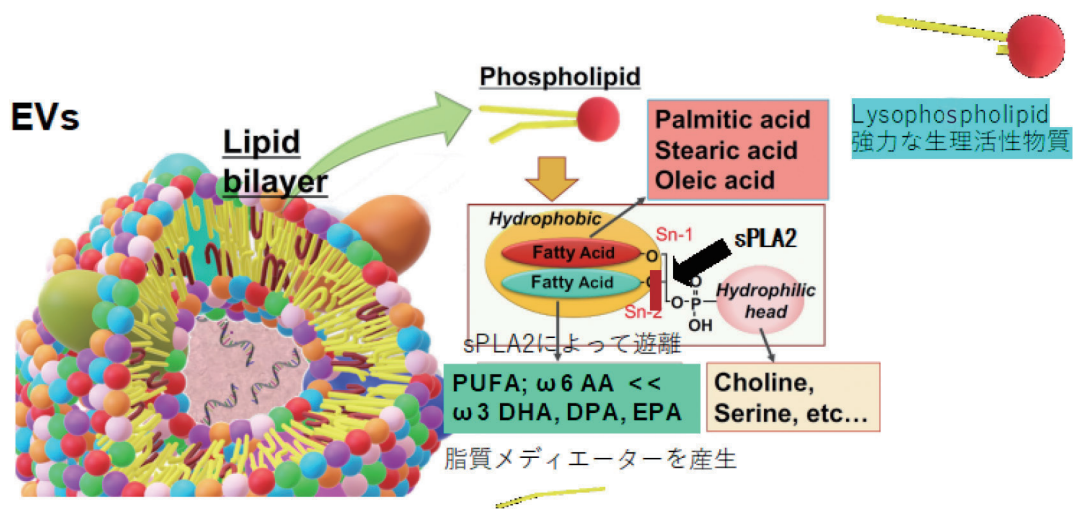


図 1. SPREDs の生成

EV 膜を構成するリン脂質を sPLA<sub>2</sub> が加水分解し、PUFA と Lysophospholipid (リゾリン脂質) を産生する。

物学にはない新規の作動メカニズムが存在することを意味しており、これにより生体内では sPLA<sub>2</sub> によって EV のターゲット層が大幅に拡大し、さまざまな細胞に影響し得ると考えられた。そこで sPLA<sub>2</sub> と反応した EV を sPLA<sub>2</sub> reacted EV derivatives (SPREDs) と名づけた。(特願 2021-121246) 炎症モデルマウスに SPREDs を投与し、リンパ腫由来 EV が本来持っている抗炎症・免疫抑制効果が sPLA<sub>2</sub> によって増強されるかを検討した。その結果、脾臓や肺におけるさまざまな抗炎症効果の増強が認められ、リンパ腫モデルにおいても劇的な腫瘍形成促進効果が認められた。また、生体内に存在する sPLA<sub>2</sub> を阻害剤によって抑制すると腫瘍形成が完全に抑制された。更に、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫と診断された患者の腫瘍組織検体全 100 例を用いてヒト腫瘍組織における sPLA<sub>2</sub> の発現の有無を調べた結果、sPLA<sub>2</sub>-X 陽性の患者では悪性度の指標となるバイオマーカーが陰性群より高値を示し、臨床病期も高い傾向が見られ、予後も不良であることが明らかとなった。以上の結果より、腫瘍形成においては腫瘍組織中の TAM より細胞外リン脂質分解酵素 sPLA<sub>2</sub> が分泌されており、腫瘍細胞から分泌された EV の膜リン脂質が分解されると、さまざまな脂肪酸やリゾリン脂質が生成され、

EV の形態変化・GPCR シグナル増強・取り込みの促進などが誘導され、結果的には腫瘍微小環境の構築が促進され腫瘍形成へとつながることが明らかにされた。一方でこの sPLA<sub>2</sub>-EV 軸を阻害する sPLA<sub>2</sub> 阻害剤の投与で腫瘍形成が抑制されたことから、がん治療の新規創薬ターゲットとなることが期待された<sup>4)</sup>。

上記で得られた知見より、SPREDs の臨床応用を目指して、高い組織保護効果を持つ EV として同定した肝細胞由来 EV<sup>5,6)</sup> を SPREDs 化し、COVID-19 感染症で問題となった各種のサイトカインストーム症候群に投与すると、EV 単独に比較し、顕著な治療効果の増強が認められた。興味深いことに、SPREDs を投与すると抗炎症性組織保護性脂質メディエーターが大量に産生される“リポドカウンターストーム”と名付けた現象が認められた。その分子機序も一端が明らかになり、それらに基づき人工 SPREDs の作成に成功し、治療効果を得られた。

### まとめ

SPREDs という現象をリンパ腫で見出し、独自技術として治療応用することに成功した。分子機序を更に明らかにすることによって、人工 SPREDs を至適

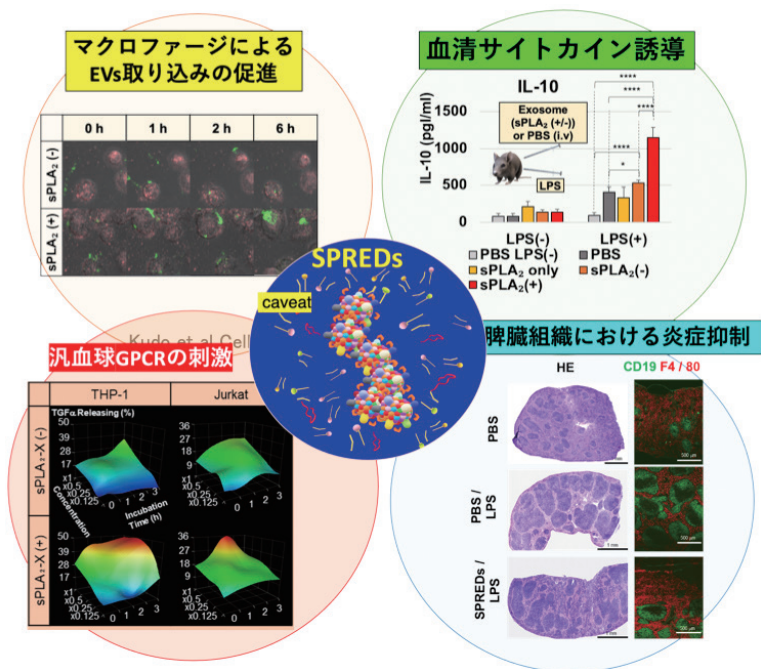


図 2. EBV 感染で明らかにした SPREDs の効果

マクロファージの取り込み、血清サイトカイン誘導の増加、EV を取り込まない細胞も含む細胞での GPCR の刺激、マウス生体内での炎症抑制効果が増強が認められる。

化し、有効な治療法の少ないサイトカインストーム症候群に対する新たな治療法が確立されることが期待される。

#### 参考文献

- 1) Takahashi, R.U., Prieto-Vila, M., Hironaka, A., Ochiya, T. : "The role of extracellular vesicle microRNAs in cancer biology." *Clin. Chem. Lab. Med.*, **55** (5), 648-656 (2017). ; doi 10.1515/cclm-2016-0708.
- 2) Murakami, M. : "Novel functions of phospholipase A<sub>2</sub>s" *Overview. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1864** (6), 763-765 (2019). ; doi 10.1016/j.bbalip.2019.02.005.
- 3) Higuchi, H., Yamakawa, N., Imadome, K.I., Yahata, T., Kotaki, R., Ogata, J. *et al.* : "Role of exosomes as a proinflammatory mediator in the development of EBV-associated lymphoma." *Blood*, **131** (23), 2552-2567 (2018). ; doi 10.1182/blood-2017-07-794529.
- 4) Kudo, K., Miki, Y., Carreras, J., Nakayama, S., Nakamoto, Y., Ito, M. *et al.* : "Secreted phospholipase A (2) modifies extracellular vesicles and accelerates B cell lymphoma." *Cell Metab.*, **34** (4), 615-33.e8 (2022). ; doi 10.1016/j.cmet.2022.02.011.
- 5) Kakizaki, M., Yamamoto, Y., Otsuka, M., Kitamura, K., Ito, M., Kawai, H.D. *et al.* : "Extracellular vesicles secreted by HBV-infected cells modulate HBV persistence in hydrodynamic HBV transfection mouse model." *J. Biol. Chem.*, **295** (35), 12449-12460 (2020). ; doi 10.1074/jbc.RA120.014317.
- 6) Kakizaki, M., Yamamoto, Y., Nakayama, S., Kameda, K., Nagashima, E., Ito, M. *et al.* : "Human hepatocyte-derived extracellular vesicles attenuate the carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice." *Cell Death Dis.*, **12** (11), 1010 (2021). ; doi 10.1038/s41419-021-04204-7.

## 改変エクソソームを用いた新規免疫制御法の開発

華山 力成

金沢大学 医学系 免疫学・金沢大学 ナノ生命科学研究所

### はじめに

近年、免疫チェックポイント阻害剤を用いたがん免疫療法の著しい成果により、免疫応答を利用した治療の可能性が期待されている。しかし、これらは免疫のブレーキを外し、免疫系を“非特異的”に増強するため、その副作用として自己免疫疾患や内分泌機能異常などが発症し問題となっている。よって、“がん特異的”に免疫を増強する新たな薬剤の開発が求められている。一方、多くの自己免疫疾患ではステロイドや免疫抑制剤を用いる治療が行われているが、これらは免疫系全体を“非特異的”に抑制するため、日和見感染などの副作用が発症する。よって、自己反応性の細胞を“特異的”に抑制する方法の開発が求められている。以上の様に、免疫の特徴である“特異性”を活用

した薬剤の開発により、これまでにない革新的な治療法の開発がもたらされると期待されているが、未だに達成されてはいない。そこで私たちは、エクソソームという細胞外小胞を人工的に改変することで、この“特異性”を付加した新規免疫制御法の開発を行っている。

### 本論

エクソソームはほとんどの細胞が分泌する直径50-150nm前後の細胞外小胞で、分泌細胞由来のタンパク質や脂質・RNAなどを運ぶことで、様々な機能を制御する新たな細胞間情報伝達媒体として注目されている<sup>1)</sup>(図1)。特に樹状細胞などの免疫細胞が分泌するエクソソーム上には、免疫系を活性化する分

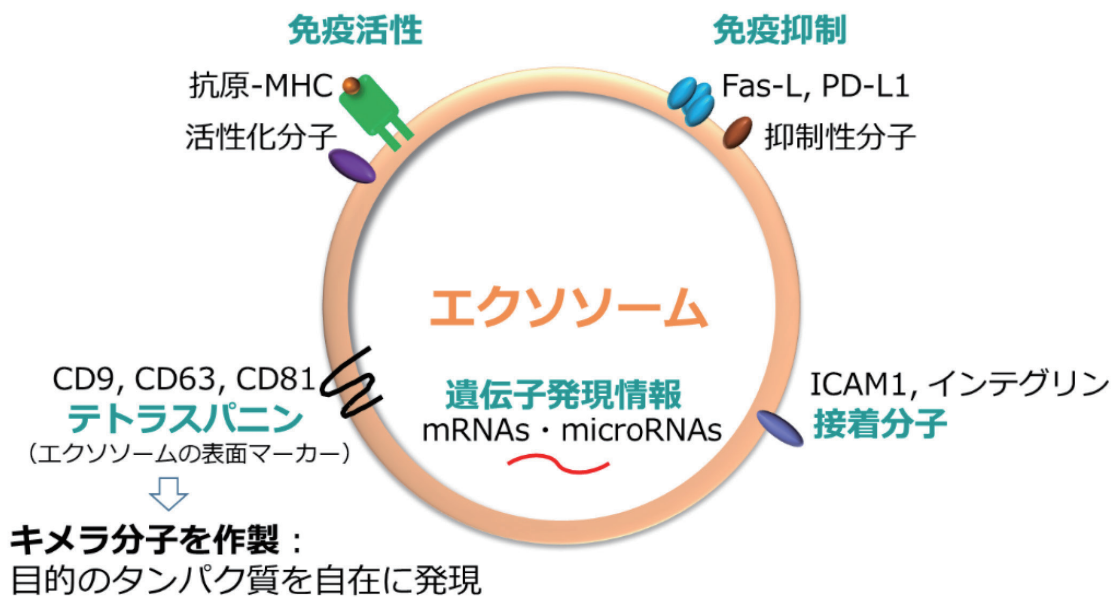


図1. 免疫系エクソソームの構成分子

エクソソームには様々な分子が載っているが、中でもテトラスパニンはエクソソームの表面マーカーとして知られている。テトラスパニンとのキメラ分子を作製することで、目的のタンパク質をエクソソーム上に自在に発現させることが可能となっている。

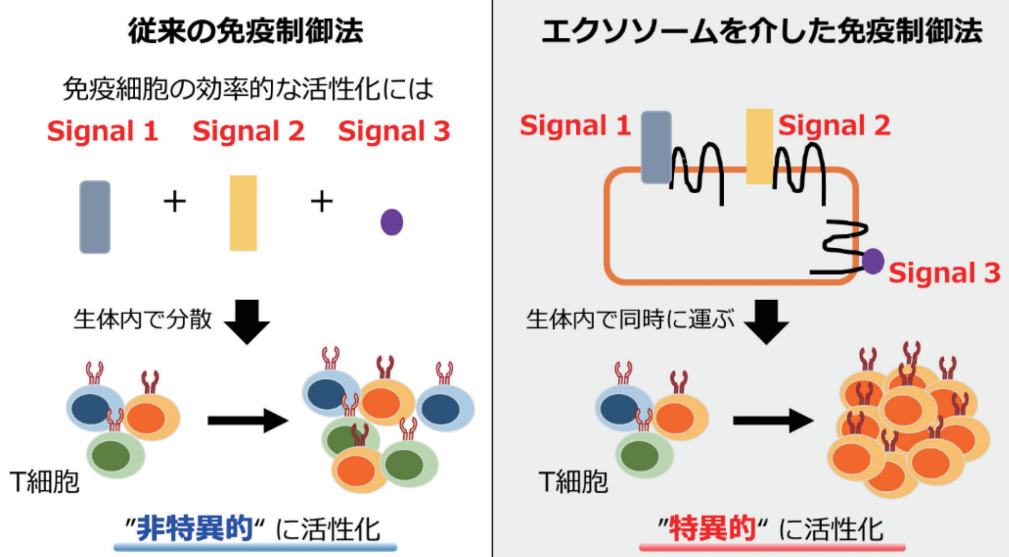


図 2. 改変エクソソームを用いた新規免疫制御法の開発

エクソソーム上に複数の免疫制御分子 (Signal 1, 2, 3) を同時に発現させる技術を開発することで、個々の単純な併用では実現することのできない革新的な免疫制御法の実現を目指している。

子 (抗原-MHC 複合体など) が<sup>2)</sup>、逆にがん細胞が分泌するエクソソーム上には、免疫系を抑制する分子 (Fas-L や PD-L1 など) が発現しており<sup>3)</sup>、これらの免疫制御分子を介して免疫応答やがん進展の制御など種々の生命現象に関与することが明らかとなっている<sup>4)</sup>。このことから現在、エクソソームを標的にした、もしくはエクソソームそのものを用いた創薬が大きく期待されている<sup>5)</sup>。

中でも近年、エクソソーム上に発現しているマーカー分子であるテトラスパニン (CD9、CD63、CD81 など) とのキメラ分子を作製することで、目的のタンパク質を自在にエクソソーム上に発現させることが可能となっており<sup>6)</sup>、私たちは、この技術を活用してエクソソーム上に「複数の免疫制御分子を同時に発現」させる技術を開発することで、個々の単純な併用では実現することのできない「革新的な免疫制御法の実現」を目指している。すなわち、免疫細胞の効率的な活性化には、複数の免疫制御分子によるシグナルが同時に入る必要があるが、従来の免疫制御法では、これらが生体内で分散してしまう (図 2 左)。その結果、目的の免疫細胞を効率的に活性化できないばかりか、目的外の免疫細胞をも“非特異的”に活性化してしま

い、様々な副作用が引き起こされてしまう。一方、私たちの技術では、エクソソームを介して生体内で複数の免疫制御分子を同時に運び同じ場で使うことで、個々の免疫制御分子の単純な併用では見られない相乗効果により、目的の免疫細胞のみを“特異的”に活性化させることが可能となる (図 2 右)。

私たちは、このように免疫制御機能を高めた改変エクソソームの開発を進めることで、これまでの技術では不可能であった「がん細胞のみを特異的に攻撃する免疫細胞」や「自己免疫疾患・アレルギーのみを特異的に抑制する免疫細胞」などを、改変エクソソームを用いて患者の体内に効率的に作り出す新規免疫制御法を開発を行っている (国際公開番号 WO2021-172595)。このことにより、これらの疾患に対して効率的かつ副作用の少ない治療法の実現を目指している。

## まとめ

近年、エクソソームを用いた創薬開発が世界で加速しており、本邦でも昨年 (独) 医薬品医療機器総合機構 (PMDA) に専門部会が設置されガイドラインの策定が進められるなど、その実現に向けた体制整備が



急速に進んでいる。多くのエクソソーム創薬開発では、間葉系幹細胞由来エクソソームなどの天然エクソソームが用いられている<sup>7)</sup>。一方、改変エクソソームは、天然エクソソームと比較して、高い標的指向性や自由な産生条件などの利点を有しており、エクソソーム創薬の可能性を大きく広げるものである<sup>8)</sup>。しかし、エクソソーム創薬全般の問題点として、均一かつ純度の高い品質をどのように管理するのか、また、ヒトへの投与に十分な産生量をどのように向上させるのかなど、更なる技術革新が求められている。改変エクソソームの開発を進めることで、がん・感染症、自己免疫・アレルギーのみならず、様々な疾患に対する効果的かつ副作用のない創薬の実現が期待される。

#### 参考文献

- 1) Kalluri, R., LeBleu, V.S. : "The biology, function, and biomedical applications of exosomes." *Science*, **367**, eaau6977 (2020).
- 2) Lindenberg, M.F.S., Stoorvogel, W. : "Antigen Presentation by Extracellular Vesicles from Professional Antigen-Presenting Cells." *Annu. Rev. Immunol.*, **36**, 435-459 (2018).
- 3) Daassi, D., Mahoney, K.M., Freeman, G.J. : "The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion." *Nat. Rev. Immunol.*, **20**, 209-215 (2020).
- 4) Veerman, R.E., Güçlüler Akpınar, G., Eldh, M., Gabrielsson, S. : "Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles-Functions and Therapeutic Applications." *Trends Mol. Med.*, **25**, 382-394 (2019).
- 5) Wiklander, O.P.B., Brennan, M.Á., Lötvall, J., Breakefield, X.O., El Andaloussi, S. : "Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles." *Sci. Transl. Med.*, **11** (2019).
- 6) Stickney, Z., Losacco, J., McDevitt, S., Zhang, Z., Lu, B. : "Development of exosome surface display technology in living human cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **472**, 53-59 (2016).
- 7) Phinney, D.G., Pittenger, M.F. : "Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy." *Stem Cells*, **35**, 851-858 (2017).
- 8) Jafari, D. *et al.* : "Designer Exosomes: A New Platform for Biotechnology Therapeutics." *BioDrugs*, **34**, 567-586 (2020).

## 老化細胞が分泌する細胞外小胞の特性

高橋 暁子

公益財団法人がん研究会 がん研究所 細胞老化プロジェクト

### はじめに

先進諸国の高齢化が進む中、我が国の平均寿命も年々延長し続け、それに伴い、がん・動脈硬化・アルツハイマー・肺線維症・骨粗鬆症のように加齢と共に罹患率が上昇する疾患（加齢性疾患）の増加が深刻な社会問題となっている。加齢性疾患の発症には様々な複合的な要因があげられるが、その一つとして加齢とともに体内に蓄積した老化細胞が関与している可能性が示唆されている。老化細胞においては炎症性蛋白質の遺伝子発現が亢進し、細胞外へと分泌する SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) をおこすことが知られており、老化細胞から分泌された SASP 因子は周囲の組織に慢性的な炎症を引き起こし、加齢性疾患の発症や個体の機能低下の要因となっていることが報告されている<sup>1)</sup>。さらに、老化細胞においては細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) の分泌も亢進しており、老化細胞が分泌する EVs は正常な細胞が分泌する EVs とは異なるさまざまな特性を示すことが明らかになりつつある<sup>2)</sup>。

### 本論

細胞老化はもともと、ヒトの組織から採取した体細胞を継代培養すると、一定の回数分裂を繰り返した後に細胞増殖が不可逆的に停止することから発見され、1961年に Hayflic 博士らにより細胞老化 (Cellular senescence) と命名された<sup>3)</sup>。このテロメア DNA の短縮による複製老化 (Replicative senescence) 以外にも、がん遺伝子の活性化による Oncogene-induced senescence や、放射線や抗がん治療によって誘導される Therapy-induced senescence などが報告されている<sup>1)</sup>。このようにストレスによって誘導される

細胞老化は、細胞周期チェックポイント因子である p21<sup>WAF1/CIP1</sup> や p16<sup>INK4a</sup> の発現が上昇し細胞の増殖を不可逆的に停止することで、異常をもった細胞が体内で増殖するのを防ぐ重要ながん抑制機構としてはたらいっている<sup>4,5)</sup>。

一方で、老化細胞は加齢によって体内に蓄積してゆき、炎症性蛋白質や細胞外小胞を細胞外へ分泌することで周囲の組織を改変してゆくことが明らかとなっている。我々は老化細胞においてはエクソソームなどの直径が約 100nm 前後の small EV の分泌も亢進しており、SASP 因子として機能することを報告してきた<sup>6,7)</sup>。さらに老化細胞においては、中性スフィンゴミエリン分解酵素 (nSMase2) の発現上昇とスフィンゴミエリン合成酵素 2 (SMS2) の発現低下によりセラミド合成経路が活性化しており、エクソソームの合成が亢進していることを見出した<sup>8)</sup>。老化細胞の細胞質では、ゲノム DNA 由来の核酸断片の蓄積が DNA センサーである cGAS-STING (cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon gene) 経路によって認識され、自然免疫応答の活性化により SASP 遺伝子群の発現が誘導されることが明らかとなっているが<sup>9,10)</sup>、エクソソームの分泌を阻害すると細胞質の核酸断片の量が増加しアポトーシスが誘導されることから、エクソソーム経路はオートファジー経路と同様に、細胞内の不要な物質の除去に働き、細胞の恒常性を維持していると考えられる<sup>8,9)</sup>。

がん微小環境に存在する間質の老化細胞が分泌する SASP 因子は、がんの浸潤や転移を促進し、抗腫瘍免疫を抑制することから、がんの進展に関わることが知られているが<sup>11)</sup>、我々は老化間質細胞が分泌するエクソソームががんの悪性化に関わる可能性があることを明らかにした<sup>12)</sup>。老化細胞のグローバルなエピゲノム解析から、染色体のペリセントロメア領域の繰り返

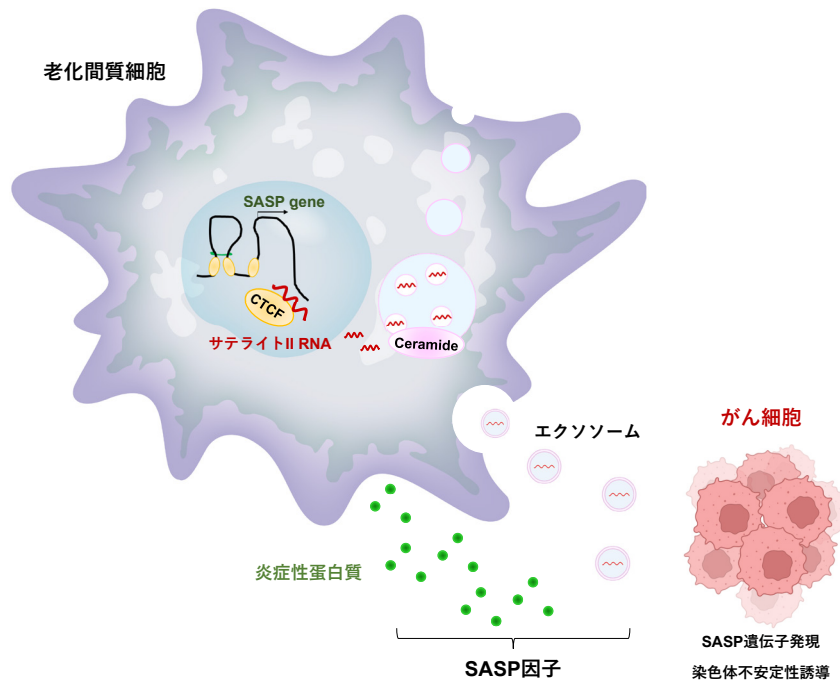


図 1. 老化細胞が分泌する EVs

返し配列であるサテライト II 領域からノンコーディング RNA (ncRNA) の発現が亢進しており、この ncRNA は染色体構造の維持に重要な CTCF (CCCTC-binding factor) 蛋白質に直接結合し、その DNA 結合機能を阻害することを見出した。その結果、サテライト II RNA は染色体構造を変化させ、炎症性遺伝子群 (SASP 遺伝子群) の発現や染色体不安定性を誘導していることが明らかとなった。また、サテライト II RNA は老化細胞から分泌されたエクソソームにも含まれており、エクソソームを取り込んだ受容細胞においても、炎症性遺伝子群の発現亢進、染色体不安定性やコロニー形成能獲得など、がんの悪性化に寄与することが示唆された (図 1)。

老化細胞が分泌する EVs には、正常細胞由来の EVs とは異なるタンパク質、脂質、核酸などが含まれていることから、リキッドバイオプシーに応用することで非侵襲に老化細胞や加齢性疾患を検出できるマーカーとしての可能性が示唆されている<sup>13, 14)</sup>。近年、生体に存在する老化細胞に選択的に細胞死を誘導することで、SASP 因子の分泌を抑制し加齢性疾患の発症を遅らせ、健康寿命を延ばす試みとして Senolytics の開発が進められている。我々も老化細胞

を標的とした Senolytic 薬の投与によって、がん抑制機構である細胞競合による変異細胞の除去効率が回復することや、がんの発症を抑制できることを報告してきた<sup>15, 16)</sup>。一方で、若い細胞や幹細胞由来の EVs には GSTM2 (glutathione-related protein) が含まれており、glutathione-S-transferase による抗酸化作用により、取り込んだ細胞の老化や加齢に関わる病態を抑制する効果があることも報告されており、新たな Senolytics の候補として EVs による加齢性疾患の治療の可能性も期待されている<sup>17)</sup>。

## まとめ

さまざまなストレスによって誘導される老化細胞は、年齢を重ねるごとに我々の体内に蓄積してゆき、病態の発症を誘発する危険性があることが明らかとなっている。老化した細胞が分泌する EVs は正常細胞が分泌する EVs とは異なる組成や性質を示すことから、EVs の詳細なプロファイルを明らかにすることで、将来的に加齢性疾患の新たな診断法や治療法の開発が期待される。

## 参考文献

- 1) Gorgoulis, V. *et al.* : "Cellular Senescence: Defining a Path Forward." *Cell*, **179**, 813-827 (2019).
- 2) Tanaka, Y. and Takahashi, A. : "Senescence-associated extracellular vesicle release plays a role in senescence-associated secretory phenotype (SASP) in age-associated diseases." *J. Biochem.*, **169**, 147-153 (2021).
- 3) Hayflick, L. and Moorhead, P.S. : "The serial cultivation of human diploid cell strains." *Exp. Cell Res.*, **25**, 585-621 (1961).
- 4) Takahashi, A. *et al.* : "Mitogenic signaling and the p16INK4a/Rb pathway co-operate to enforce irreversible cellular senescence." *Nat. Cell Biol.*, **8**, 1291-1297 (2006).
- 5) Loo, T.M. : "Cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype via the cGAS-STING signaling pathway in cancer." *Cancer Science*, **111**, 304-311 (2020).
- 6) Takahashi, A. *et al.* : "Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells." *Nat. Commun.*, **8**, 15287 (2017).
- 7) Takasugi, M. *et al.* : "Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2." *Nat. Commun.*, **8**, 15729 (2017).
- 8) Hitomi, K. *et al.* : "DNA damage regulates senescence-associated extracellular vesicle release via the ceramide pathway to prevent excessive inflammatory responses." *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (10), 3720 (2020).
- 9) Takahashi, A. *et al.* : "Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells." *Nat. Commun.*, **9** (1), 1249 (2018).
- 10) Ebata, H. *et al.* : "Telomere Maintenance and the cGAS-STING Pathway in Cancer." *Cells*, **11** (12), 1958 (2022).
- 11) Faget, D.V. *et al.* : "Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer." *Nat. Rev. Cancer*, **19**, 439-453 (2019).
- 12) Miyata, K. *et al.* : "Pericentromeric noncoding RNA changes DNA binding of CTCF and inflammatory gene expression in senescence and cancer." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118** (35), e2025647118 (2021).
- 13) Basisty, N. *et al.* : "A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development." *PLoS Biol.*, **18** (1) : e3000599 (2020).
- 14) Misawa, T. *et al.* : "Biology of extracellular vesicles secreted from senescent cells as senescence-associated secretory phenotype factors." *Geriatrics and Gerontology International*, **20**, 539-546 (2020).
- 15) Wakita, M. *et al.* : "A BET family protein degrader provokes senolysis by targeting NHEJ and autophagy in senescent cells." *Nat. Commun.*, **11** (1), 1935 (2020).
- 16) Igarashi, N. *et al.* : "Hepatocyte growth factor derived from senescent cells attenuates cell competition-induced apical elimination of oncogenic cells." *Nat. Commun.*, **13**, 4157 (2022).
- 17) Fafián-Labora, J.A. *et al.* : "Small Extracellular Vesicles Have GST Activity and Ameliorate Senescence-Related Tissue Damage." *Cell Metab.*, **32** (1), 71-86 (2020).



# 膵癌の細胞外小胞に着目した病態解明と癌早期診断への応用

大塚 基之

東京大学大学院医学系研究科 内科学専攻器官病態内科学講座

## はじめに

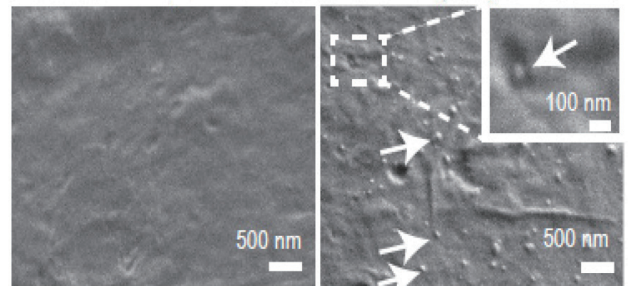
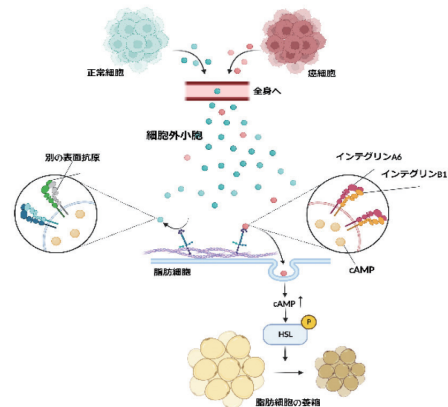
癌と細胞外小胞をめぐる研究は急速な展開を見せている。たとえば、癌によって惹起される様々な病態に細胞外小胞の持つ生物学的機能が深く関与することが明らかにされている。また、癌由来の細胞外小胞は癌由来の様々な情報を内包しており、これを血液で捉えることによる非侵襲的な診断への応用も試みられている。ここでは、難治癌の代表である膵癌を例にして、癌由来の細胞外小胞による病態形成の一端の解明についての紹介と、細胞外小胞を応用した癌の早期検出の試みと問題点について議論したい。

## 本論

### 1. 膵癌由来の細胞外小胞による癌の病態生理形成の解明

膵癌の臨床的な特徴のひとつとして、体重減少が比較的早期から見られることが挙げられる<sup>1,2)</sup>。癌における体重減少は「悪液質」と称され、食欲の低下や栄養不良、慢性炎症、脂肪萎縮や筋萎縮の亢進で説明されることが多いが、その機構はまだ不明な点が多い。今回、早期の膵癌という局所の病変にも関わらずなぜ全身性の体重減少が惹起されるのか、「局所」から「全身」をつなぐ因子として、細胞外小胞に着目した。

脂肪細胞の萎縮は典型的には細胞内のcAMPの上昇から始まるPKAの活性化、その下流のHSL (Hormone sensitive lipase) のリン酸化による活性化によって惹起される<sup>3)</sup>。In vitroにおいて、分化させたヒト脂肪細胞に膵癌細胞株の上清あるいは膵癌患者血清から単離した細胞外小胞を添加すると、膵癌関連の細胞外小胞を添加した場合に脂肪細胞の萎縮が有意に強く見られた。いっぽう、細胞外小胞内のcAMP



含量は健常者由来と膵癌患者由来には差がなかったため、担癌患者由来のEVによる脂肪萎縮は細胞外小胞内のcAMP含量に依存するのではなく、それ以外の要素の関与が示唆された。マウスの尾静脈から膵癌由来の細胞外小胞を定期的に静注すると、細胞外小胞は脂肪組織に選択的に取り込まれ脂肪萎縮が惹起された。このことから、膵癌由来の細胞外小胞は、脂肪組織に分布しやすい性質を持つことが考えられた。そこで、その責任分子を探索したところ、インテグリンB1とA6の関与が疑われた。水分を保持した電顕による検討(上図)でも、当該インテグリンをノックアウトすると、脂肪細胞表面への細胞外小胞の分布が消失し脂肪萎縮も起きにくくなった。実際に膵癌患者由来の細胞外小胞のインテグリン発現状況を見てみると、当初は健常人のそれと比べても差が無いように見

えたが、血清中の細胞外小胞全体から癌由来と考えられる細胞外小胞サブセットのみを特異的に単離して検討すると、膵癌由来の細胞外小胞は有意に多いインテグリン発現量を持つことが明らかとなった。これらの結果から、膵癌由来の細胞外小胞はインテグリンを介して脂肪細胞に優先的に分布し、cAMPを介して脂肪の萎縮が惹起され体重減少の原因の一端を作っていることが示唆された（前図）。また、この検討を進めるにあたって、癌に由来する細胞外小胞の特徴的所見を明らかにするためにも、血清中の細胞外小胞の一括解析ではなく、癌由来の細胞外小胞サブセットを単離取得し解析することの重要性が示唆された。

## 2. 細胞外小胞の膵癌早期診断への応用

細胞外小胞の内容物や性状を解析することで癌の早期診断を達成しようという試みは多数行われている。我々も早期診断が難しい膵癌で、この方法を応用することで、少しでも早く癌の検知が出来るようになればと考え研究を進めている。

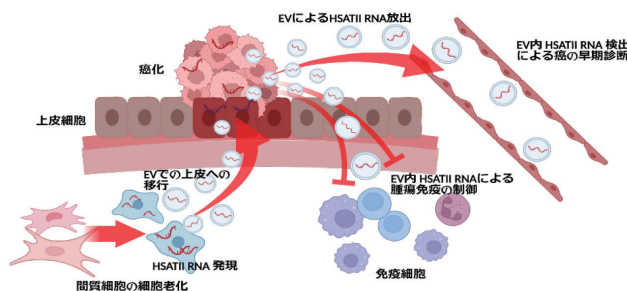
この研究を行うにあたり我々が着目したのが、2011年にScienceに発表されたMGHからの論文である<sup>4)</sup>。彼らは当時のlong sequencerを用いて、膵癌（を中心とした上皮癌）において、正常組織ではほとんど発現の無い染色体の反復配列由来のRNA、中でもHSAT II (human satellite II) RNAが高頻度に特異的に発現していることを報告した。そこで、我々はまず、この反復配列RNAの発現意義について検討した。ヒトとマウスの反復配列のシーケンスには相同性が乏しいため完全なカウンターパートとは言えないが癌組織で発現するマウスの反復配列RNAであるMST RNAを用いて、*in vitro*、*in vivo*で検討したところ、反復配列RNAの発現によってDNA修復能を持つRNA結合蛋白の機能が損なわれ、ゲノム変異やミトコンドリアDNA変異が蓄積していくこと<sup>5)</sup>、*in vivo*でもkRas変異で誘導される腫瘍形成が早まること<sup>6)</sup>を同定し、反復配列RNAの異常発現自体が「癌化の促進」あるいは「癌の不均一性の促進」という生物学的機能を持っていることを示した（癌細胞における反復配列RNAによるcell-autonomousな作用）。その後、がん研の高橋暁子先生らは、「HSAT II RNAの発現が細胞老化をきたした間質細胞で起き、細胞外

小胞に内包されたHSAT II RNAが近隣の上皮細胞に取り込まれる結果、癌化が促進される」ことを示されている（non cell-autonomousな作用）<sup>7)</sup>。また、Ting先生のところからは、癌細胞から細胞外小胞に内包されて放出されたHSAT II RNAが近傍の免疫細胞にとりこまれ腫瘍免疫を制御する作用があることも示されている<sup>8)</sup>。

このように癌をめぐる多彩な生物学的作用を持つHSAT II RNAであるが、我々はこれを血中の細胞外小胞から検出することで膵癌のよいバイオマーカーとなるのではないかと考え検討を行った。反復配列RNAは反復性ゆえに通常のPCRでは増幅が難しいが、反復性を逆手に取った定量法を新たに開発し、進行膵癌を多く含む症例群ではあったが、感度80%/特異度90%で膵癌を検出することが出来た。

その後、膵癌組織で正常膵組織よりも多く発現しているmicroRNAであるmiR21の定量との組み合わせによって、AUCの比較でHSAT II RNA定量単独を上回る結果を得ており、現在これを「PDAC-Index」と名付けてブラインド検体での検証作業を進めている。いずれにせよ、これらのRNAはその多くが細胞外小胞に内包されていることを確認しており、先の癌由来の細胞外小胞の特異的単離と合わせることでさらに精度の上がった癌検出法が達成されるかもしれない。

いっぽう、このような癌の早期検知を目指した細胞外小胞研究は盛んに行われているが、問題点もある。例えば現在の本邦での膵癌の年間罹患者数は、増えているとはいえ約4万人で全人口の0.03%に過ぎない。この罹患率だと、仮に感度99%・特異度99%という超高性能なマーカーがあったとしても、陽性的中率（陽性とされた中での真の陽性率）は2.9%となり、陽



性者の多くが空振りとなる。我々の研究も含めて、細胞外小胞に着目した新たなバイオマーカーは希望の光ではあるが、その適用対象には十分配慮する必要がある。陽性的中率を上げるべく、例えば膵癌罹患率が高いことが分かっている膵癌危険群（例えば濃厚な家族歴を持つ人・慢性膵炎・ある種の膵嚢胞性疾患を持つ人）にまずは適用するなど、バイオマーカー自体の開発と同時にその適用対象をどう設定するか（あるいは膵癌そのものの検知ではなく、膵癌ハイリスク患者を検知できるバイオマーカーの開発ができないか）という臨症的な見地を取り入れることが必要である。

## まとめ

癌に関連した細胞外小胞の研究は、癌の早期検知への応用、癌の病態生理の解明、それに基づく新たな治療法の開発、など新たな希望を感じさせる。いっぽうで、乱立する細胞外小胞の単離法や解析法、ヘテロ細胞外小胞の一括解析の是非など、まだまだ突き詰めていかなければならない点が多いとも感じる。様々な分野の基礎研究者や臨床医が一体となって、新たな知見や技術の積極的導入と、目的を明確に設定した研究を進めていくことで、新たな展開が開けることを期待している。

## 参考文献

- 1) Sah, R.P. *et al.* : "Phases of Metabolic and Soft Tissue Changes in Months Preceding a Diagnosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Gastroenterology*, **156**, 1742-1752 (2019).
- 2) Danai, L.V. *et al.* : "Altered exocrine function can drive adipose wasting in early pancreatic cancer." *Nature*, **558**, 600+ (2018).
- 3) Zechner, R. *et al.* : "FAT SIGNALS-Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling." *Cell Metabolism*, **15**, 279-291 (2012).
- 4) Ting, D.T. *et al.* : "Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers." *Science*, **331**, 593-596 (2011).
- 5) Kishikawa, T. *et al.* : "Satellite RNAs promote pancreatic oncogenic processes via the dysfunction of YBX1." *Nature Communications*, **7** (2016).
- 6) Kishikawa, T. *et al.* : "Satellite RNA Increases DNA Damage and Accelerates Tumor Formation in Mouse Models of Pancreatic Cancer." *Mol. Cancer Res.*, **16**, 1255-1262 (2018).
- 7) Miyata, K. *et al.* : "Pericentromeric noncoding RNA changes DNA binding of CTCF and inflammatory gene expression in senescence and cancer." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **118** (2021).
- 8) Porter, R.L. *et al.* : "Satellite repeat RNA expression in epithelial ovarian cancer associates with a tumor-immunosuppressive phenotype." *J. Clin. Invest.*, **132** (2022).



## マルチモーダル医薬としてのエクソソーム創薬

落谷 孝広

東京医科大学医学総合研究所 分子細胞治療研究部門

### はじめに

エクソソームに代表される細胞外小胞 (EV) は、疾患の新規診断となるリキッドバイオプシーの中心的役割を果たしている。なぜなら、タンパク質を始め、ノンコーディング RNA や mRNA、ctDNA などの核酸に至るまで、重要な情報伝達物質を運ぶカーゴであり、あらゆる体液中を循環することから、リキッドバイオプシーの重要な標的である (図 1)。さらに最近では、がんをはじめとする多くの疾患における細胞外小胞の機能解明が進んだことで、疾患の成り立ちの理解はもちろん、細胞外小胞を制御することで生まれる新しい治療法の確立に期待が持たれている。本講演では、細胞外小胞の再生医療への応用の現状を紹介するとともに、インターキングダムとも言える生物種をこえた細胞外小胞による情報交換を応用して、いかに細胞外小胞による医療革命が進んでいくか、その未来予想を考えたい。

### EV はがん細胞やウイルスに悪用されやすい存在である

EV 研究が世界中で盛んになった一つの要因は、がん細胞の分泌する EV が、がんの微小環境を制御する形で、転移と深く関わっている事にある<sup>1,2)</sup>。がん細胞は、高転移の性質に変化する場合、決まって分泌する EV の性状を変化させる。その変化は、EV の表面タンパク質の種類、糖鎖の状態、脂質二重膜の脂質の構成、表面に電気的に結合する DNA 断片、内包される情報伝達物質の種類と量、特にマイクロ RNA などの核酸物質や、タンパク質、代謝産物など、幅広いマルチモーダルな因子に影響が出る (図 1)。そしてこうした変化は、がんの微小環境における巧妙な制御に関与している<sup>3,4)</sup>。つまり血管内皮細胞の増殖による

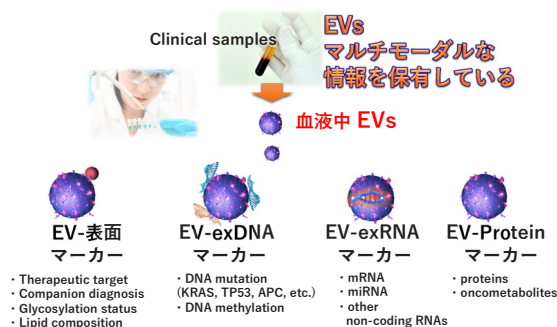


図 1. 血液中の EV には多様な情報物質が存在し、多くの疾患のリキッドバイオプシーに期待が寄せられている。

がん組織内への新生血管の誘導に始まり、線維芽細胞の CAF 誘導、マクロファージの M2 誘導などによるがん細胞自身の防御機能の増強、さらには攻撃してくる免疫細胞の撃退など多様な作用となって現れる。さらには、がん細胞の分泌する EV の運命を変え、その到達先の組織臓器への指向性の変化による転移先の運命づけや、その先でのニッチ構築によるがん転移の基盤作りなどの巧妙な技も持っているようだ。つまりがん細胞からは悪玉 EV が分泌される (図 2)。

EV を自身の生存のために悪用しているのはがん細胞だけではない。世界を震撼させた COVID19 と EV の関係も大変興味深い。この新型コロナウイルスも EV の物流システムを利用して、自身のウイルスコンポーネントを EV に内容し、感染した細胞から分泌する形でウイルスの全身への伝播や周囲の免疫細胞の過剰な活性化などにも利用されている様だ<sup>5)</sup>。実際、これまでに HIV を始め、EBV や HBV、HCV などの多くのウイルスが DNA タイプか RNA タイプかに関係なく、この EV のシステムをうまく利用していることがわかっている (図 2)。我々も COVID19 の軽症者





図 2. EV の善玉、悪玉の両面。がん、認知症を始め循環器疾患やウイルス感染症に到るまで、疾患 EVs は悪玉として働く。その一方、生体のstem細胞の分泌するEVsには多くの効果、効能が知られており、善玉のEVsとしての活躍が期待されている。

では、感染のごく初期に COPB2 というタンパク質を含む EV が血液中に見出されることを報告した<sup>6)</sup>。この COPB2 は、まさにゴルジ膜輸送に参与するタンパク質であるため、以下の様な仕組みが考察可能だ。つまり、COVID19 は細胞がもともと備えている COPB2 タンパク質を介した細胞内の膜輸送のシステムに、感染細胞内で複製させた自身の RNA やウイルスタンパク質をパッケージすることでさらに他の細胞や臓器へとウイルス伝播を果たすわけだが、いち早くウイルス感染に反応し、COPB2 を悪用されない様に、EV に詰め込んで細胞外に放出することができた感染者は軽症で済んだという仮説だ。実際にこうした COPB2 をマーカーにした血液 EV 診断は、感染者の予後を理解するためのリキッドバイオプシーに応用される可能性がある。

## EV の医薬品としての価値

上記の様に、EV という存在は、生理的な状態の変化や疾患などによって、我々の人体にはどうやら悪者として作用することがある様だが、そもそも善玉のEVも存在する(図2)。例えば、間葉系幹細胞(MSC)は、ES細胞やiPS細胞などの人工的な操作で製造された細胞と異なり、生理的に存在するstem細胞である。MSCの種類(乳歯歯髄、脂肪、骨髄、臍帯などのMSCの由来)によってそれぞれのEVの

能力には差異や特徴があるものの、MSC-EVsは人体の様々な疾患(がんや認知症)や炎症(呼吸器疾患など)などに対して多様な治療効果を発揮することがわかってきた<sup>7-9)</sup>。MSCのEVs治療は世界中で臨床研究が進んでおり、そのGMPグレードでの製造方法やレギュレーションについて多くの議論がなされており<sup>10)</sup>、いかに安全でかつ効果的な治療になるか、その作用機序の解明も含めて今後も注視する必要がある。さらにその先にあるのは、やはり生理的に多くの臓器組織に存在するstem細胞や前駆細胞の分泌するマルチモーダルな情報伝達物質が搭載されたEVsである。我々もすでに成熟肝細胞をリプログラミングすることで得られた肝臓前駆細胞<sup>11, 12)</sup>の分泌するEVsに肝疾患を治療する能力を見出している。今後、こうした細胞からのEVsの研究開発が進むことで、まさに細胞小胞による新たな医療革命の幕開けとなるであろう。

## まとめ

本稿では診断と治療の分野で今後大きな医療革命を起こすと考えられている細胞外小胞の生物学的意義を善悪の観点から考察した。おそらくその両者を分けるものはEVそのものの性質、つまりEVの脂質二重膜の性状や、内包物の多様な特徴にある。しかし、だからこそEVにはマルチモーダル医薬品としての魅力がある。今後、安全性、毒性試験はもちろん、多くの観点からEV医薬が真に人類の健康維持や増進に貢献するかどうか、検証を重ねていく必要がある。


## 参考文献

- 1) 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.*, Apr 12, **288** (15), 10849-10859 (2013). doi: 10.1074/jbc.M112.446831.
- 2) Costa-Silva, B., Aiello, N.M., Ocean, A.J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B.K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M.T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T.M., Garcia-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T.L., Labori, K.J., Lothe, I.M., Kure, E.H., Hernandez, J., Doussot, A., Ebbesen, S.H., Grandgenett, P.M., Hollingsworth, M.A., Jain, M., Mallya, K., Batra, S.K., Jarnagin, W.R., Schwartz, R.E., Matei, I., Peinado, H., Stanger, B.Z., Bromberg, J., Lyden, D.: "Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the

- liver." *Nat. Cell Biol.*, Jun, **17** (6), 816-826 (2015). doi: 10.1038/ncb3169.
- 3) Naito, Y., Yoshioka, Y., Yamamoto, Y., Ochiya, T. : "How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles." *Cell Mol. Life Sci.*, Feb, **74** (4), 697-713 (2017). doi: 10.1007/s00018-016-2346-3.
  - 4) Nishida-Aoki, N., Ochiya, T. : "Interactions between cancer cells and normal cells via miRNAs in extracellular vesicles." *Cell Mol. Life Sci.*, May, **72** (10), 1849-1861 (2015). doi: 10.1007/s00018-014-1811-0.
  - 5) Min Hee Kang, Jin-Hoi Kim, Sangiliyandi Gurunathan : "Diverse Effects of Exosomes on COVID-19: A Perspective of Progress From Transmission to Therapeutic Developments." *Front Immunol.*, **12**, 716407. Published online 2021 Jul 28. doi: 10.3389/fimmu.2021.716407.
  - 6) Fujita, Y., Hoshina, T., Matsuzaki, J., Yoshioka, Y., Kadota, T., Hosaka, Y., Fujimoto, S., Kawamoto, H., Watanabe, N., Sawaki, K., Sakamoto, Y., Miyajima, M., Lee, K., Nakaharai, K., Horino, T., Nakagawa, R., Araya, J., Miyato, M., Yoshida, M., Kuwano, K., Ochiya, T. : "Early prediction of COVID-19 severity using extracellular vesicle COPB2." *J. Extracell. Vesicles.*, Jun, **10**(8), e12092 (2021). doi: 10.1002/jev2.12092.
  - 7) Fujita, Y., Kadota, T., Araya, J., Ochiya, T., Kuwano, K. : "Clinical Application of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicle-Based Therapeutics for Inflammatory Lung Diseases." *J. Clin. Med.*, Oct 14, **7** (10), 355 (2018). doi: 10.3390/jcm7100355.
  - 8) Katsuda, T., Kosaka, N., Takeshita, F., Ochiya, T. : "The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles." *Proteomics*, May, **13** (10-11), 1637-1653 (2013). doi: 10.1002/pmic.201200373.
  - 9) Liew, L.C., Katsuda, T., Gailhouste, L., Nakagama, H., Ochiya, T. : "Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a glimmer of hope in treating Alzheimer's disease." *Int. Immunol.*, Jan 1, **29** (1), 11-19 (2017). doi: 10.1093/intimm/dxx002.
  - 10) Gimona, M., Brizzi, M.F., Choo, A.B.H., Dominici, M., Davidson, S.M., Grillari, J., Hermann, D.M., Hill, A.F., de Kleijn, D., Lai, R.C., Lai, C.P., Lim, R., Monguió-Tortajada, M., Muraca, M., Ochiya, T., Ortiz, L.A., Toh, W.S., Yi, Y.W., Witwer, K.W., Giebel, B., Lim, S.K. : "Critical considerations for the development of potency tests for therapeutic applications of mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles." *Cytotherapy*, May, **23** (5), 373-380 (2021). doi: 10.1016/j.jcyt.2021.01.001.
  - 11) Katsuda, T., Kawamata, M., Hagiwara, K., Takahashi, R.U., Yamamoto, Y., Camargo, F.D., Ochiya, T. : "Conversion of Terminally Committed Hepatocytes to Culturable Bipotent Progenitor Cells with Regenerative Capacity." *Cell Stem Cell*, Jan 5, **20** (1), 41-55 (2017). doi: 10.1016/j.stem.2016.10.007.
  - 12) Katsuda, T., Matsuzaki, J., Yamaguchi, T., Yamada, Y., Prieto-Vila, M., Hosaka, K., Takeuchi, A., Saito, Y., Ochiya, T. : "Generation of human hepatic progenitor cells with regenerative and metabolic capacities from primary hepatocytes." *Elife*, Aug 8, **8**, e47313 (2019). doi: 10.7554/eLife.47313.

# 富士フイルム 和光純薬株式会社

本 社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL: 06-6203-3741 (代表)  
東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL: 03-3270-8571 (代表)

 フリーダイヤル 0120-052-099

試薬 URL: <https://labchem-wako.fujifilm.com>  
E-mail: [ffwk-labchem-tec@fujifilm.com](mailto:ffwk-labchem-tec@fujifilm.com)

営業所: 九州・中国・東海・横浜・筑波・東北・北海道