

一話 題一

がん微小環境を制御する細胞外小胞：
バイオマーカーとしての可能性

日本医科大学先端医学研究所生体機能制御学部門

内藤 寛

エクソソームは、脂質二重膜構造をもつ細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) の一種であり、エンドソームに由来して細胞外に分泌される小胞のことである。エクソソームという名称は最近になってよく耳にするようになって来たが、研究自体は1980年初頭に報告された、赤血球の成熟過程におけるトランスフェリン受容体のリサイクリングの研究に端を発する。しかし、一部免疫細胞における機能が報告されていたものの、多くの細胞にとって、エクソソームは不要な物質を吐き出すだけの単なるゴミ箱と考えられていた。こうした背景の中で、2007年には、エクソソームには mRNA や microRNA (miRNA) を内包して細胞から細胞へ受け渡されること、さらに受け渡された細胞内部で mRNA はタンパク質に翻訳されて機能することが報告された¹。つまり、エクソソームはただのゴミ箱ではなく、実際には多くの細胞の間で情報伝達の一翼を担うことが明らかになったことで、エクソソームを含む EV についての研究が一気に加速した。EV はその原理から、血液や尿、唾液や母乳などの生体のあらゆる体液中に存在し、由来する細胞内部の情報を反映する性質をもつ。そのため、EV の疾患バイオマーカーとしての有用性にも期待が高まっている。現在では、EV の生合成や分泌・取り込み機構などの基礎生物学的な側面のみならず、様々な疾患の発生メカニズムへの関わりや、臨床開発に向けた研究もさかに行われている。

ところで、細胞外小胞 (EV) とは一体どういうものを指すのだろうか。EV は、上述したエクソソーム (粒子径は約 30~100 nm) を含む、細胞外に放出された脂質二重膜で覆われる小胞の総称をいう。つまり、EV の中には、細胞膜が千切れるような形で分泌されるマイクロベシクル (100~1,000 nm) や、細胞死の過程で細胞質が剪断された結果から生じるアポトーシス小体 (1,000 nm 以上) など含まれる。このように、EV はその起源や成り立ち、生じる粒子サイズも異なるうえ、その内容物まで極めてヘテロな集団であることが、世界中で EV 研究が拡大するにつれて明らかになってきた。そのため、エクソソームという名称は慣用的な表現とされ、細胞外小胞 (EV) という総称が提唱された。現在では、国際細胞外小胞学会 (International Society for Extracellular Vesicles: ISEV) が刊行する学会誌に公示された position paper である MISEV2018 にて、エクソソームを含む 100 nm 以下の小胞は small EV (sEV) と学術的に定義されている²。

これまでの EV 研究の中で、がん研究は常に中心に位置づけられる研究分野の一つになっている。これは、EV の分泌量が他の細胞と比べてがん細胞でより多かったことも理由の一つではあるが、がん細胞が EV を極めてうまく利用している事実が次々と明らかになったことが大きい。がんの進展と関わる代表的な細胞としては、がん微小環境を構成する免疫細胞や線維芽細胞、血管・リンパ管の内皮細胞や上皮細胞などが挙げられ、これら細胞とがん細胞は EV を介して密に相互作用している。例えば、2006年に乳がん細胞の分泌する EV は NK 細胞の細胞障害活性の抑制をすることが示されている³。近年注目されているがん免疫療法についても、特定のメラノーマ細胞由来の EV 表面に PD-L1 が発現しており、これが CD8 陽性 T 細胞の機能を阻害することで、抗 PD-1 抗体などによる免疫療法への治療抵抗性に関わることが報告されている⁴。がん組織内に存在する線維芽細胞、通称がん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts: CAFs) との相互作用においても、EV が注目されている。CAF はがんの浸潤や転移、薬物耐性や免疫応答と深く関わっているが、複数のがん細胞から分泌される EV には TGF- β などのシグナル分子が存在しており、CAF の誘導に関わることが報告されている⁵。また、近年のシングルセル解析の技術の躍進により、異なる性質を持った CAF サブタイプの存在が指摘されているが、このような特定の性質を持った CAF サブタイプの誘導に EV が関わることを、以前に筆者らは報告した⁶。このほか、がん細胞由来の EV が転移先の臓器や組織の環境を変えることでがん転移を促進することや^{7,8}、がん転移の臓器指向性が EV 表面上のインテグリンの種類によって決まる可能性が示唆されている⁹。本稿で提示した例はほんの一部であり、中皮細胞や骨芽細胞、間葉系幹細胞など、多岐にわたる細胞との相互作用における EV の機能が報告されている。また反対に、がん細胞由来の EV だけでなく、がん微小環境中の細胞が分泌する EV が、がん細胞に与える影響についても同様に研究されている。このように、従来は増殖因子やサイトカイン、ケモカインなどの液性因子が担っていると思われていた細胞間の情報伝達に、EV も深く関与している。

がんという疾患の原因からその病態の維持まで、あらゆるステップにおける関連について EV が研究されてきた一方で、これらを標的とした臨床開発としてはどのような戦略があるのだろうか。本稿では、その中でも特に EV をバイオマーカーとして利用する方法に焦点を当てたい。上述のように、EV に内包される分子は由来する細胞内の状態を反映する。つまり、がん細胞が分泌する EV にはがん特異的な分子が存在する可能性が高く、こうした EV の情報はがんの早期診断や病態のモニタリング、予後予測につながる。これまでに、がん細胞由来の EV に特異的な数多くの分子が同定され、がんの診断バイオマーカーや予後予測マーカーとしての可能性が証明されてきた。実際に、エク

ソームに最も多く存在すると考えられている miRNA の発現は、バイオマーカーとしての可能性までを証明した研究や、臨床試験の報告例も多数存在している。しかし、EV をがんバイオマーカーとして利用する上で、いくつか課題が存在する。一点目は、如何にしてがん特異的な EV をヒト体液中から同定するかという問題である。われわれの体を循環する EV には、がんを含む疾患細胞由来の EV 以外にも、正常組織・臓器由来の EV や、血小板由来の EV などが豊富に存在しており、がんなどの疾患細胞由来の EV は血中に存在する全 EV のうちのわずか 1% 未満と考えられている。つまり、臨床での検査を念頭においた場合、微量ながん由来の EV を高感度かつ特異的に、短時間で同定する技術の開発が求められる。さらに二点目の問題として、EV はその性質の不均一性から、すべての EV に共通して存在する内在性コントロールが無く、測定結果の標準化の難しさや EV 測定方法による結果のばらつきも大きな課題となっている。こうした中でも、実用化までに至ったケースはいくつかある。Exosome Diagnostics 社が開発した ExoDx[®] Prostate IntelliScore¹⁰ と ExoDx[®] Lung (ALK) は、ヒトの尿や血液から EV をフィルター精製し、前者は前立腺がんの特異的な RNA3 種 (PCA3 non-coding RNA, ERG mRNA, SPDEF mRNA) を、後者は肺がんで見られる EML4-ALK 融合遺伝子の転写産物をそれぞれ PCR により検出するキットとなっている。両者は、自家調整検査法 (Laboratory Developed Tests: LDT) として、世界中で受託検査発注が可能になっている。本邦においては、AlphaLISA の技術を応用して開発された、高感度 EV 検出技術 (ExoScreen¹¹) を用いた検診サービスがスタートしている。ExoScreen は、EV 中に豊富に存在する CD9 や CD63 などのタンパク質分子と、がん由来の EV に特異的な抗原に対する抗体の 2 種類を使用することで、がん由来の EV の検出感度をあげている。上述した以外にも、サンドイッチ ELISA による検出やマイクロ流体デバイスを用いた技術 (μNMR, nPLEX)、ブルーレイディスクを応用した EV 検出技術 (ExoCounter) など、様々な EV 検出技術が開発されており、EV を対象としたリキッドバイオプシーにおける問題解決に向けて、世界中で研究が続いている状況である。最近では、新たな EV 単離・解析ツールとして、セルロースナノファイバーを利用した EV シートが開発されている¹²。引き続き、EV を対象としたリキッドバイオプシー研究の今後の動向に注視したい。

本稿ではがん生物学における EV の役割と、そのバイオマーカーへの応用について記述した。世界中で研究が進んでいる EV であるが、その基本的な生物学的性質も含めて、全容はまだ明らかになっていない。EV を対象としたバイオマーカーの探索や社会実装へ向けた精力的な研究が、現在も求められている。最近では、ヘテロな集団である EV の一粒子解析も注目されており、EV の新たな側面の発見が見込まれる。こうした EV 研究から、医療革命がもたらされる可能性に期待したい。

Conflict of Interest : 開示すべき利益相反はなし。

文 献

1. 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.
2. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, 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.
3. Liu C, Yu S, Zinn K, et al.: Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol* 2006; 176: 1375-1385.
4. Chen G, Huang AC, Zhang W, et al.: Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 2018; 560: 382-386.
5. Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A: Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res* 2010; 70: 9621-9630.
6. Naito Y, Yamamoto Y, Sakamoto N, et al.: Cancer extracellular vesicles contribute to stromal heterogeneity by inducing chemokines in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* 2019; 38: 5566-5579.
7. Zhou W, Fong MY, Min Y, et al.: Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell* 2014; 25: 501-515.
8. Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, et al.: Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol* 2015; 17: 816-826.
9. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al.: Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015; 527: 329-335.
10. McKiernan J, Donovan MJ, O'Neill V, et al.: A Novel Urine Exosome Gene Expression Assay to Predict High-grade Prostate Cancer at Initial Biopsy. *JAMA Oncol* 2016; 2: 882-889.
11. Yoshioka Y, Shimomura M, Saito K, et al.: Circulating cancer-associated extracellular vesicles as early detection and recurrence biomarkers for pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2022; 113: 3498-3509.
12. Yokoi A, Yoshida K, Koga H, et al.: Spatial exosome analysis using cellulose nanofiber sheets reveals the location heterogeneity of extracellular vesicles. *Nat Commun* 2023; 14: 6915.

(受付 : 2024 年 2 月 5 日)

(受理 : 2024 年 2 月 8 日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的の場合、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことが出来る。