

Exosomes in breast cancer – Mechanisms of Action and Clinical Potential

Tiantong Liu et al.

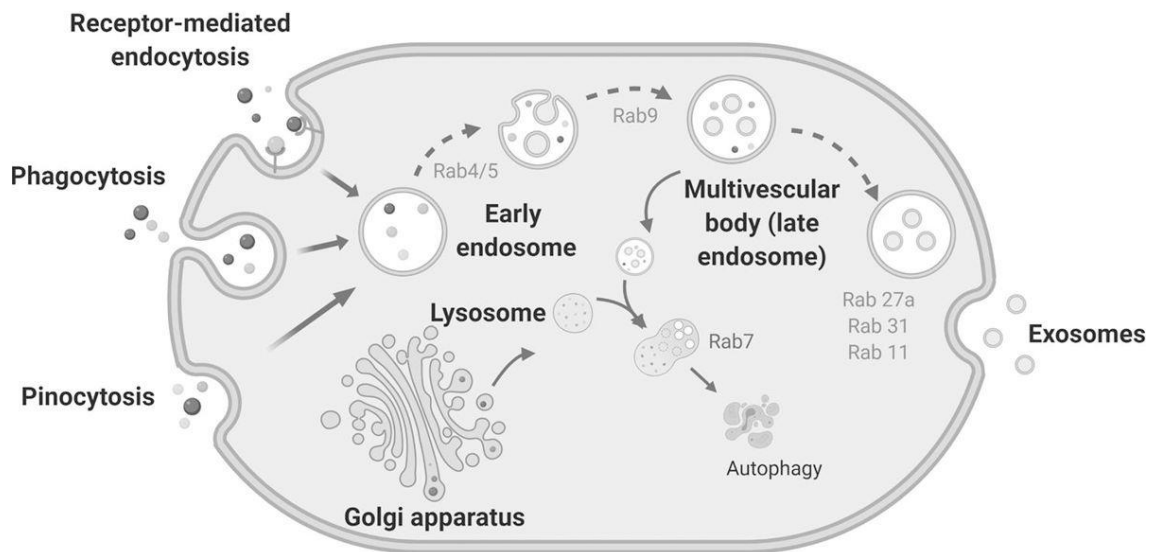
Molecular Cancer Research 2021 June, 19(6): 935-945

細胞外小胞は、細胞膜由来の様々な種類のものからなる集団で、アポトーシス小体、微小小胞、エクソソームなどから構成される。エクソソームはもともと廃棄物として理解されていたが、研究が進んで、細胞間の情報伝達、生物学的なプロセス、癌を含む疾患の発生に大きな役割を担っていることが分かってきた。特にエクソソームは、microRNA、脂質、蛋白といった由来細胞の特性を高度に反映するバイオマーカーを含んでいる。癌細胞が正常細胞よりも多くのエクソソームを産生していることは、特筆すべきことである。次々と明らかになる証拠は、エクソソームが腫瘍発生、癌の浸潤、血管発生、腫瘍の微小環境形成、癌の転移、に大きな役割を担っていることを示唆している。エクソソームと発がんの関連が明らかになるにつれて、エクソソームの臨床応用に関する興味が増してきている。このレビューでは、乳癌におけるエクソソームの役割を、乳癌の生物学、活動の機構、バイオマーカーや治療に利用できる可能性、といった観点から、掘り下げる。

エクソソーム(small extracellular vesicle)(sEV)は、様々な使われ方をしてきたが、次のような特徴がある物質として扱われてきた。

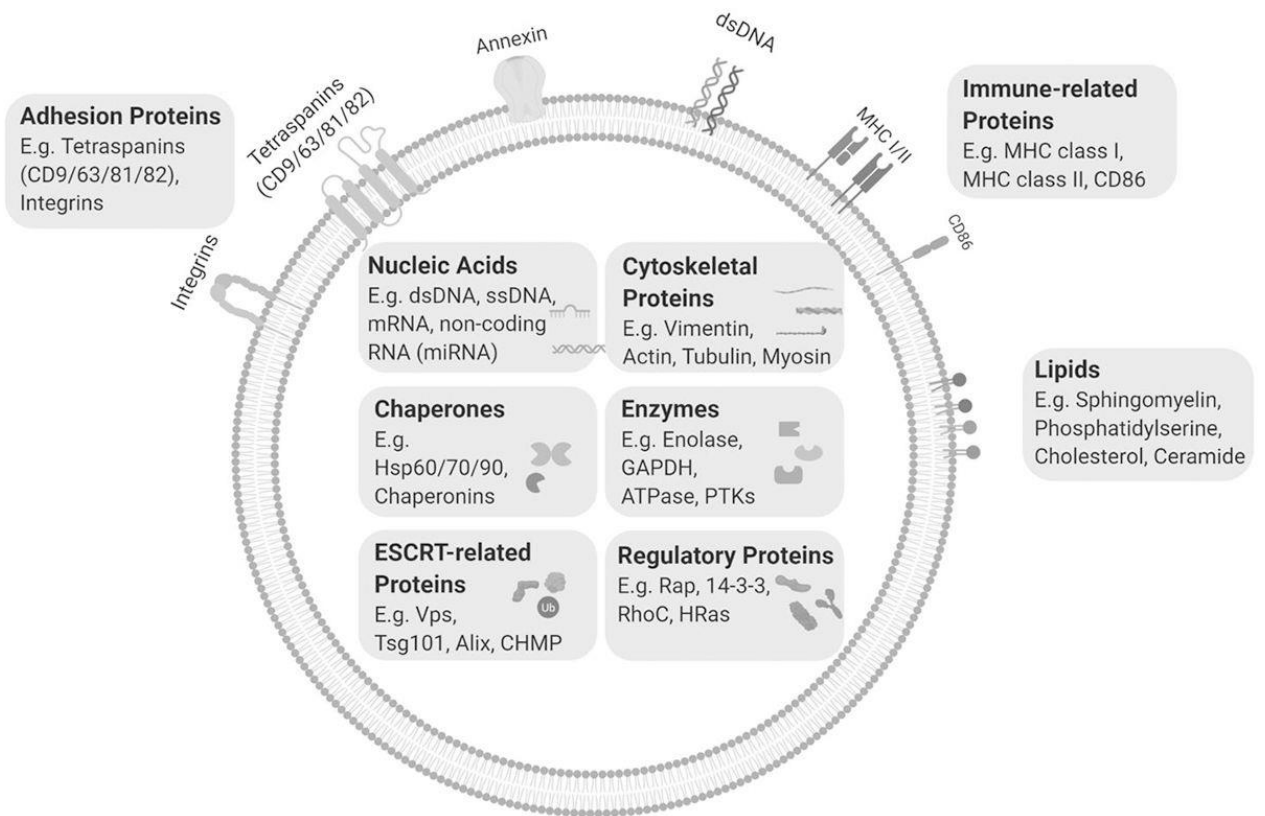
- 1) エンドソームを形成する経路、多小胞体(multi-vesicular body)の放出に由来する。
- 2) 30~150nm の大きさである。
- 3) 特定の蛋白を内部に有して運搬する。
- 4) CD63, CD81, CD9 といったテトラスパニンマーカーが表面マーカーとして陽性となる。

測定技術の進歩によって、これまでのエクソソームの定義に必要なだった CD63, CD81, CD9 といったテトラスパニンマーカーが陰性となるエクソソームが知られる様になった (non-classical exosome)。エクソソームはこれまで考えられていたよりも多彩な成員で構成されることになった。乳癌に関しては、癌の診断、癌の観察、予後判定、治療に、エクソソームの適用が広範に調べられている。たとえば miR-1246, miR-21 といった miR は乳癌の早期発見のために利用する候補となっている。Nano-drug delivery system に利用されるエクソソームや、癌の遺伝子発現を変化させる 抗 microRNA エクソソームを抗がん剤とともに投与される、といった研究がなされている。同時に、エクソソームは、乳癌の浸潤、転移、微小環境の形成に関わっている。エクソソームが細胞間の信号伝達に絶えず進歩しながら関わっていることは明らかであり、関わる細胞の種類、時間的な幅、変換、受容、DNA, RNA との反応、蛋白情報などの詳細な機構に関して更なる研究の広がりが期待されている。

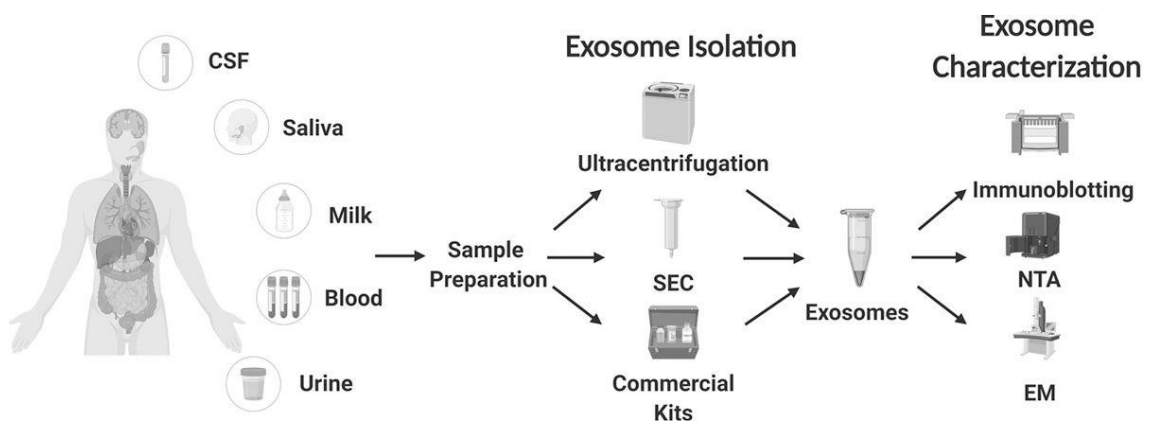


エクソソームの形成はエンドサイトーシスによって始まる。まず細胞膜に陥入が生じて intraluminal vesicle になり、それらが multivesicular body (MVBs)(late endosome)内に詰め込まれる。MVBs は細胞膜と癒合して、intraluminal vesicle がエクソソームとなって細胞外に放出される。この時は Rab 27a, Rab 31, Rab 11 といった small GTPase である Rab family 蛋白が関わる。別の経路では MVBs はリソソームと癒合して自己融解を起こす。この時は Rab 7 が関わる。

細胞由来の様々な種類の運搬物がエクソソーム内には含まれる。それらには、核酸、蛋白、脂質がある。DNA を運搬物に含めた場合、細胞質内に分離して含まれる増幅可能な循環 DNA は、細胞質内のエクソソーム由来であり、一重鎖、二重鎖 DNA が含まれる。癌患者ではそれらの多くを ctDNA (腫瘍由来循環 DNA) が占める。エクソソーム内 DNA、RNA の配列を決定すると、エクソソーム内の DNA と mRNA はヒトの遺伝子の抽出物として偏りがみられないが、ある種の microRNA は細胞内に比べてエクソソーム内に偏って多量に分布している。他の種類の non-coding RNA も同様である。MicroRNA は細胞外ではエクソソーム内に存在するのが一般的な形態となる。癌細胞では microRNA はしばしば劣化しており、腫瘍関連エクソソーム(TAEs)内に含まれている。エクソソーム内 microRNA は活発に体液内に分泌されており、腫瘍マーカーとして活用できる可能性がある。エクソソームのプロテオーム解析が腫瘍組織と非腫瘍組織の鑑別に利用できる可能性がある。



エクソソームは血液を含むあらゆる体液内に含まれている。エクソソームは単離され、冷凍、解凍を繰り返されても、たやすく劣化が進むことがなく内容物を保護するので、バイオマーカーとして利用する利点が多い。エクソソームは、超高速遠心分離、サイズエクスクルージョンコラム、商品化キットなどによって分離され、免疫ブロッティング、微小成分追跡器、電子顕微鏡などによって特性の解析がなされる。



Seed and soil 理論によれば、癌細胞がばらまかれても、あらかじめ用意された土壌がなければ転移は成立しない。原発巣の癌細胞から出された信号が、体内の離れた部位に送られて、土壌が熟成し、転移以前のニッチェが形成される。それ以降、その場所が循環する腫瘍細胞にとっては、種をまく適地となる。これで、腫瘍と担癌者にとってのいわば巨視的環境、が形成される。

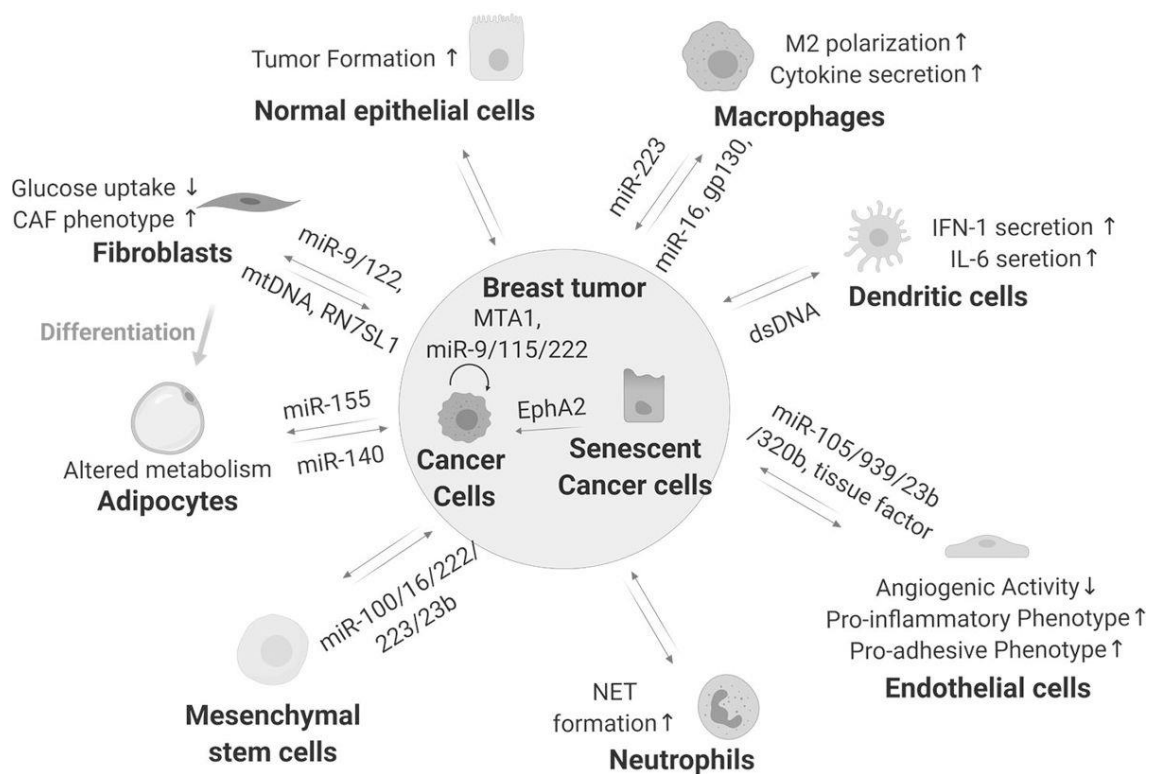
乳癌にはさまざまな **heterogeneity** が知られているが、転移形式に関して、乳癌の特定の **subtype** が臓器指向性を伴っていることが知られている。トリプルネガティブ乳癌は、脳、肺、肝臓に高い確率で転移する。臓器指向性は複雑な仕組みによって制御されており、播種した癌細胞、転移先の臓器の微小環境、原発乳癌の分泌、受容特性、の相互環境によっている。

Chen 等は、トリプルネガティブ乳癌組織が、免疫抑制的な **PD-L1** を含むエクソソームを分泌することを、**in vitro** で示した。Yang 等は、これらのエクソソームは細胞の免疫能を減弱化し癌の成長に寄与することを **in vitro** で示した。逆に、ホルモンレセプターを発現する細胞株 **MCF7** は **PD-L1** を少量しか含まないエクソソームを分泌し、腫瘍の成長効果を示さないことを示した。

Zhou 等は、転移以前の担癌患者の微小環境に関して、エクソソーム内の **miR-105** が内皮細胞間の結合を邪魔して、単離した乳癌細胞が血管内に侵入しやすくなることを示した。

Rodrigues 等によって、転移先の指向性をもった腫瘍細胞が分泌するエクソソームが、目的臓器の細胞に好んで取り込まれることが、示されている。転移先臓器の選別はインテグリンの種類によって決定される($\alpha 6 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 4$ は肺転移に関与し、 $\alpha v \beta 5$ は肝転移に関与する)。また、エクソソーム内の **CMIP** 蛋白が脳の内皮細胞と小膠細胞に取り込まれると血管の再構築と炎症を引き起こし、転移以前のニッチェの形成に結びつくことを示した。

転移はいきなり大きい転移巣を形成することなく、しばらく(数年間)潜伏状態にとどまる。潜伏状態の時期は決して不活性状態を続けているわけではなく、その間に癌細胞は、間質細胞と免疫細胞を勧誘し、**CAFs** や **TAMs** の様な腫瘍を支持する細胞となるように教育し。最終的に腫瘍にとって好ましいニッチェである、血管網、腫瘍関連細胞、細胞外基質からなる腫瘍微小環境(**TME**)が形成される。**TME** の形成には、構成細胞の複雑さと、腫瘍、非腫瘍細胞間の動的な信号伝達が必要不可欠である。この信号伝達に大きくかかわるのがエクソソームである。この絶え間ない腫瘍細胞と間質細胞との間の悪意に満ちた話し合いが、最終的に腫瘍叢の形成に寄与することになる。



エクソソームに介在された乳癌細胞間ないし変換以前の上皮細胞との情報伝達

原発乳癌細胞が分泌したエクソソームに含まれる転写制御因子である MTA1 は、エストロゲン信号の制御に関わる。

miR-9, miR-155 を豊富に含んだエクソソームはそれを受容した乳癌細胞の癌抑制遺伝子 PTEN, DUSP14 の発現低下をおこし、代わりに腫瘍発生を促進した。

転移能の低い癌細胞が miR-222 を含むエクソソームを受容すると、主に癌抑制遺伝子 PDLIM2 の抑制と NF- κ β 路の活性化によって、遊走能と浸潤能が促進された。miR-222 は乳癌細胞の細胞質内でも増加がみられた。

乳癌細胞は、周囲の上皮細胞に対して、成長と生存維持に関わる双方向の情報伝達を行い、形質転換を起こすことによって周囲の細胞を癌細胞に変換させていくが、その情報伝達にエクソソームが関わっている。

エクソソームに介在された乳癌細胞と免疫細胞との情報伝達

免疫細胞は、腫瘍抑制的にも、腫瘍細胞によって転換されて腫瘍促進的にも働く諸刃の剣だが、免疫細胞と腫瘍細胞間の情報伝達にもエクソソームが中心的な役割を果たしている。腫瘍細胞から分泌されたエクソソームが、マクロファージに受容されて IL-1, IL-6, TNF α の分泌が亢進したり、miR-16 の伝達によって M2 への極化を促し抗炎症、腫瘍促進効果を増加させる、といったことが起こる。逆に、活性化した腫瘍関連マクロファージ(TAM)が分泌したエクソソームを腫瘍細胞が受容して、miR-223 の伝達によって浸潤能が増加する

様なことも生じる。

M1 マクロファージの分泌するエクソソームは、乳癌細胞の静止状態を終わらせ、増殖状態を導く。

樹状細胞は腫瘍関連抗原に反応する抗原提示細胞だが、乳癌細胞にトポイソメラーゼ阻害薬を処置すると腫瘍細胞がエクソソームを分泌し免疫刺激的な二重鎖 DNA が樹状細胞の STING 経路を刺激し IL-6 の産生と INF-1 の活性化を促した。培養細胞が分泌したエクソソームが樹状細胞にアポトーシスをおこし成熟を阻害することも起こった。

好中球も乳癌細胞とエクソソームを介して情報伝達を行う。乳癌から分泌されたエクソソームは好中球の細胞外トラップ(NET)を増加させ腫瘍関連血栓症をおこす。

エクソソームに介在された乳癌細胞と間質線維芽細胞との情報伝達

エクソソームを介した乳癌細胞と間質線維芽細胞との間の情報伝達は、腫瘍の進展、薬剤耐性、腫瘍を促進する炎症反応、の制御に関わっている。間質線維芽細胞が分泌したエクソソームによって転移した RNA は、乳癌細胞の STAT1 経路と、免疫細胞の RIG1 受容体を同時に刺激する。これらが治療抵抗性腫瘍の増殖を促進する。線維芽細胞が分泌したエクソソームに含まれる RNARN7SL1 が乳癌細胞に取り込まれると、腫瘍の転移能と治療耐性が増大する。逆に、乳癌細胞が分泌したエクソソームに含まれる miR-9 が間質線維芽細胞を CAFs に変換させ、miR-122 は肺の間質線維芽細胞にブドウ糖取り込みの抑制を起こさせ、グルコース代謝のリプログラムによって、転移前のニッチ形成の確立に寄与する。線維芽細胞のある種のもは、脂肪細胞に形質転換を行い腫瘍関連脂肪細胞(CAAs)となる。浸潤の先端部に位置し、ECM レモデリングを示し、腫瘍促進効果を発揮する。腫瘍微小環境内では、脂肪細胞の前駆細胞が腫瘍と間質の相互関連を担っている。脂肪前駆細胞が分泌した miR-140 が、DCIS 細胞の幹細胞を刺激し、自己再生能を増加させた。逆に、乳癌細胞が分泌するエクソソームに含まれる miR-155 が脂肪細胞の代謝をリプログラムし、転移を促進した。

エクソソームに介在された乳癌細胞と間質幹細胞との情報伝達

乳癌細胞と間質幹細胞との間の情報伝達は腫瘍微小環境の成立に寄与している。間質幹細胞のエクソソームは、乳癌細胞の VEGF 分泌の減少を先導した。これはエクソソーム内に含まれる miR-16, miR-100 が乳癌細胞の mTOR/HIF1 α 信号の軸を変化させたことによる。この情報伝達は双方向性であり、乳癌の転移が成立した後は、乳癌の増殖を促進する正のフィードバック回路が働く。逆に間質幹細胞が分泌する miR222/223 は乳癌細胞の静止状態からの回避をとどまらせ、薬剤耐性を生じさせる。同様に骨髄の幹細胞は、miR-23b を転移し、静止状態を維持する。

エクソソームに介在された乳癌細胞と内皮細胞との情報伝達

癌細胞と内皮細胞間の情報伝達は三つの意味で重要である。一つは、腫瘍の大きさが増すにつれて、成長の維持のために血流量、栄養分の需要が増すということがある。ふたつめは、遠隔転移を起こすために、腫瘍細胞は血管内に侵入し、かつ血流外に脱する必要があるからである。三つめは、内皮細胞の分泌能が、腫瘍微小環境の成立に重要だということである。転移を起こした乳癌細胞から抽出したエクソソームは、*in-vitro* で遊走を起こした。これは **miR-105** を介した接着蛋白 **ZO-1** の劣化による。マウスを使った実験でも **miR-105** の豊富なエクソソームの体内注入は、体内のあらゆる場所の血管の透過性を亢進させた。乳癌細胞のエクソソーム内の **miR-939** は、内皮細胞のリプログラムを起こし、**VE-cadherin** のレセプターが減少させ、バリア機能が低下する。血管新生を阻害するドコサヘキサエノイック酸を処置すると、エクソソーム内の **microRNA** は変化し、**miR-23b/320b** を増加させ、血管新生を減少させた。乳癌細胞エクソソーム内の組織因子は、**PAR** 依存性に炎症反応性、細胞結合性を示す内皮細胞を増加させた。

血管内侵入、血管外への脱出にエクソソームがどう関わるか、原発巣と転移巣で、血管新生、増生に関わる指令が異なっているのはなぜなのか、といった疑問が残っている。

エクソソームと臨床応用

Liquid biopsy 内の重要な成分となる腫瘍由来のエクソソームは、由来となる腫瘍細胞が明らかであること、安定性が保証されていること、蛋白、DNA, RNA, 脂質、と利用できる包含要素が多様であること、といった特徴を有しており、将来性のあるバイオマーカーとして期待されている。たとえば、細胞外 DNA を使って、癌細胞の変異の状態を同時進行で知ることができる。

エクソソームのドラッグデリバリーシステムとしての利用

Precision medicine の時代には、微小な小胞体であるエクソソームには、抗原性を有していないこと、標的を設けやすいこと、解体が容易で体内に残らないこと、といった利点があり、個別の治療物質を運搬する物質として期待されている。

エクソソームを攻撃することを、新しい乳癌の治療戦略として用いること

腫瘍微小環境を形成するエクソソームの情報伝達を障害することは、乳癌治療の新しい戦略となりうる。エクソソームの放出、分子材料の運搬、取り込み、いずれの段階においても治療戦略を設定できる。

エクソソームの臨床治験

エクソソームを癌のバイオマーカーとして利用すること、トリプルネガティブ乳癌患者へのペンプロリズマブの反応性の評価、早期癌の発見にエクソソームの HSP-70 を利用すること、といったことが臨床治験として実際に行われている。循環浮遊 DNA の測定を予後判定の因子に利用することが治験として盛んにおこなわれているが、循環浮遊 DNA の測定技術は、浮遊している DNA 全体を評価するものだが、その対象は大半がエクソソーム内に見いだされるものなのであり、これらの治験から得られる結果は、エクソソームの分野に属するといってもいいのである。

結論と将来的な展望

癌細胞由来のエクソソームの利用は、大きい可能性を秘めているが、いまだ解決されていない疑問が多数残されている。例えば、エクソソームの放出、その内容を決定しているものは何なのか、標的細胞の選択性を決定するものは何なのか、といったことである。現状ではエクソソームの研究は *in vitro* で行われているものがほとんどであり、もっと複雑な微小環境や巨視的環境のもとでは行われていないので、その生物学的理解は限定されたものである。エクソソームの構成は多彩で、由来も目的も様々なので、*in vitro* で再現するのは困難である。*In vivo* における研究は将来的に残された課題である。より洗練された技術とアプローチ法によって由来を決定することが、エクソソームを介した信号伝達を正確に理解し、エクソソームをバイオマーカーとして利用するうえでも重要である。この研究分野を大きく発展させるものとして第一に挙げられるのは、エクソソームを単離する手法ならびに、単なる微小小胞にとどまらない、より広義のエクソソームを理解するための用語、の標準化と評価法である。克服すべき課題は多いが、我々は、乳癌の治療にエクソソームが重要な役割を果たすであろうことは確実であろうと信じている。

Take Home Message

エクソソームは、腫瘍組織と宿主組織の間の巨視的環境、微小環境の形成いずれにも関わっており、ドラッグデリバリー機構や早期がん発見、予後判定といった目的を達成するのに大きい可能性を持っている。