

Figure 7 Mixを接種したマウスの脾臓組織像 (X20中程度倍率)



Figure 8 Mixを接種したマウスの脾臓組織像 (X40 高倍率) GFP染色



Figure 9 Mixを接種したマウスのスーパー癌細胞による腫瘍形成 (G-luc)

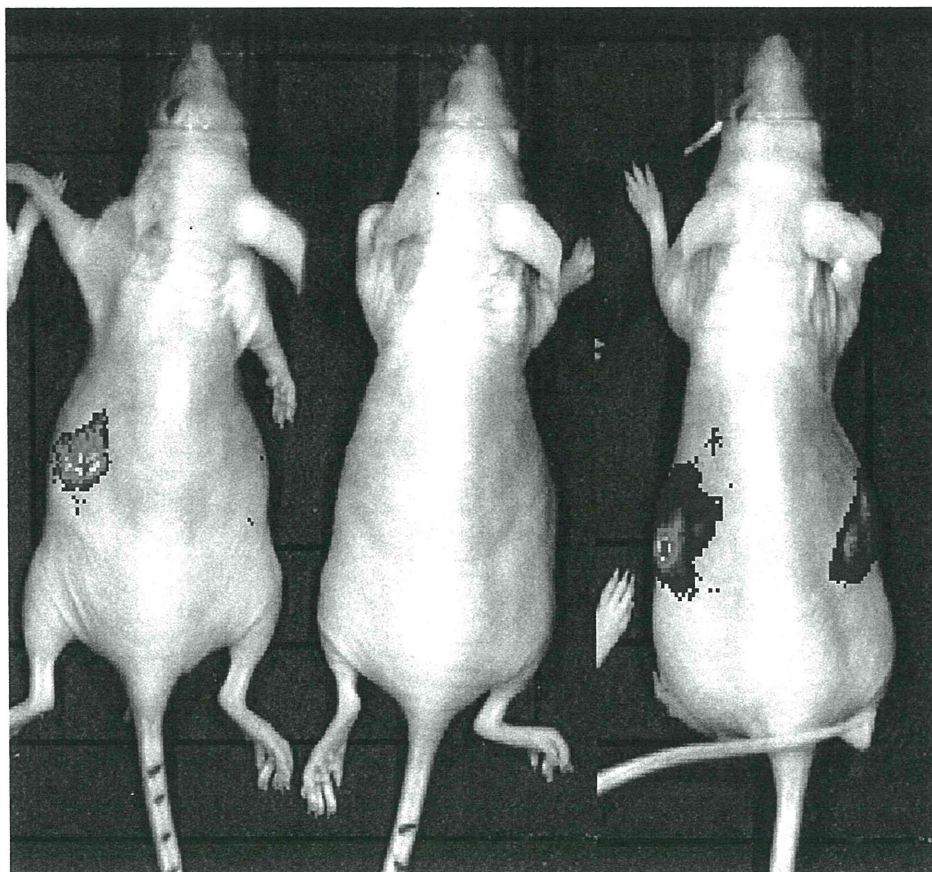


Figure 10 普通癌細胞を接種したマウスのスーパー癌細胞による腫瘍形成 (G-luc)
陰性コントロール

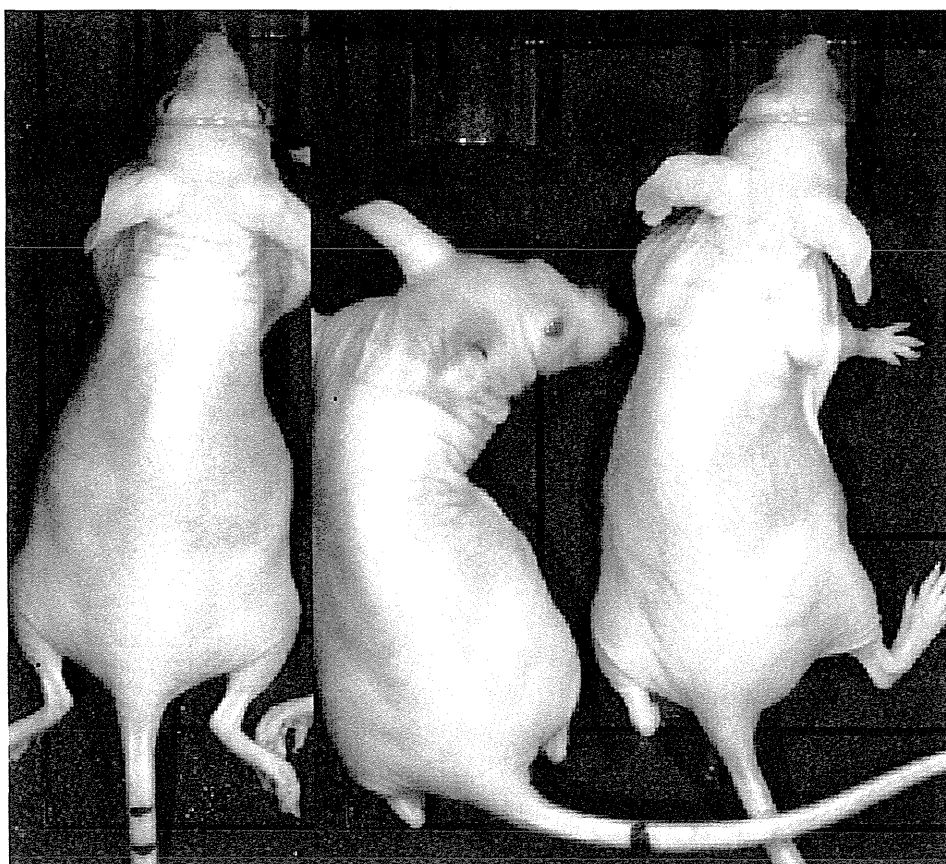
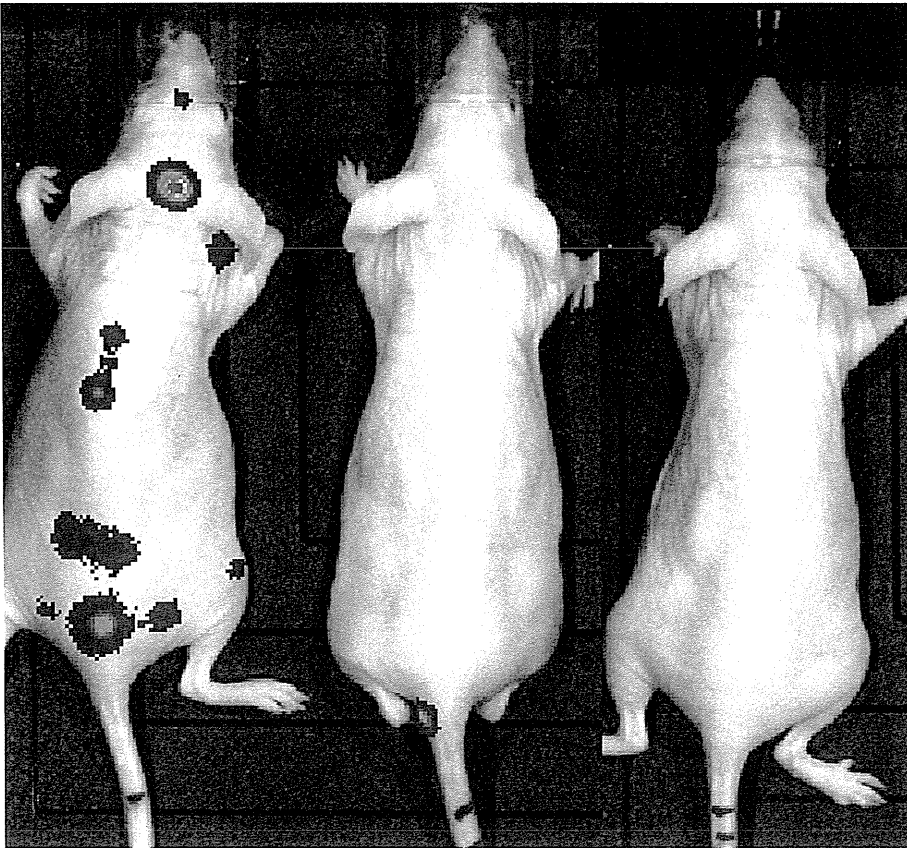


Figure 11 Mixを接種したマウスの普通癌細胞による腫瘍形成 (D-luc)



Figure 12 単独普通細胞を接種したマウスの普通癌細胞による腫瘍形成 (D-luc)



II. 研究成果の刊行に関する一覧表

II研究成果の刊行に関する一覧表

書籍
なし

雑誌
日本語
横山和明、幸谷 愛
細胞工学 Vol 32 No1 2013 P32-37
血液疾患・免疫疾患におけるエクソソームの役割

III. 研究成果の代表的論文

血液疾患・免疫疾患における エクソソームの役割

Role of Exosome in Hematological / Immune Disorder

横山和明, 幸谷 愛

Kazuaki Yokoyama, Ai Kotani

血液疾患・免疫疾患においても、他の疾患と同様、エクソソームは診断マーカーとして期待され、精力的に研究が行われている。さらに最近、デコイエクソソームを介したリンパ腫の抗体療法逃避機構や、1型糖尿病マウスにおけるエクソソーム単独での炎症惹起など、興味深い知見も得られてきた。本稿では、血液疾患・免疫疾患におけるエクソソームの役割について最近のトピックを紹介しながら、エクソソームを標的とした治療法開発の可能性について解説する。



デコイエクソソーム, Mφ, 炎症

はじめに

エクソソームは早くからワクチンとしての効果が期待され、これまでに多くの研究が行われてきた。さらにはドラッグデリバリーのキャリアとしても近年精力的に行われている(黒田氏の稿参照)。本稿では、血液疾患の1つである悪性リンパ腫、またEB (Epstein-Barr) ウイルス (以下、EBV) 感染および自己免疫疾患におけるエクソソームの役割について最近のトピックを紹介する。

I 血液疾患・免疫疾患における診断マーカーとしてのエクソソーム

近年、エクソソーム研究があらためて脚光を浴びた1つの理由はエクソソーム中にmiRNAが内包されていることが明らかになったからであるが、エクソソーム内外の分泌性miRNAが診断マーカーになることはこれまでも多く発表されている。特に、がんの早期診断マーカーとしての有用性については数多く報告されており、本邦からも急性白血病において先進的な仕事が発表された¹⁾。

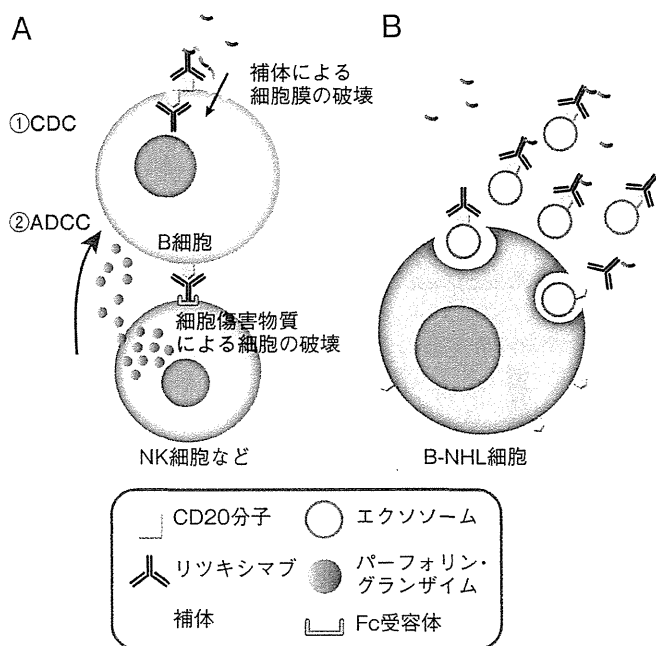
これに対してまだ多くの自己免疫疾患において有効な初期病変の鑑別に役立つ診断マーカー、病勢を示す生物学的指標は見つかっておらず、後れをとっている感は否めない。だが、自己免疫疾患においても体液中のエクソソームを標的とした診断マーカーの探索が有用と考えられている。現在のところ、簡便に検体採取ができるというメリットから、自己免疫腎疾

患について尿中エクソソームを用いた診断マーカー探索が精力的に行われている。腎疾患の多くはタンパク尿、血尿を初期症状とするものが多いが、鑑別診断には人体に侵襲的な腎生検が必要となるからである。IgA腎症や膜性腎症もそのような初期症状を呈するが、両者の鑑別診断マーカーになりうる尿中エクソソームマーカーとしてaminopeptidase N, vaserin precursor, α 1-antitrypsin, ceruloplasminなどが報告されている²⁾。

ネフローゼ症候群の予後マーカーになりうるエクソソーム内包タンパク質の検討も行われた。ネフローゼ症候群では初期に大量のタンパク尿が認められるが、大半はステロイド治療が奏功し、予後良好である。しかし、中にはステロイドに対して抵抗性を示す症例もある。そこで、すでに腎臓の足細胞の障害を反映するマーカーとして報告されていた尿中エクソソーム中のWt1についてステロイド抵抗性と因果関係が調べられたが、残念ながら因果関係は認められなかった³⁾。

II デコイエクソソームを介したリンパ腫の抗体療法逃避機構

多くのB細胞性非ホジキンリンパ腫(B-NHL)では、正常B細胞同様にCD20の発現が認められる。これを標的とする抗ヒトCD20ヒト・マウスキメラ型モノクローナル抗体リツキシマブ単独、または併用化学療法などが標準的治療法の1つとしてすでに確立されている。リツキシマブは標的細胞に対して殺細胞作用を有するが、その機序としては主に、①補体依存性細胞傷害作用(CDC)、②抗体依存性細胞傷害作用



■図1 リツキシマブの作用機序(A)とデコイエクソソームを介したリンパ腫細胞の抗体療法逃避機序(B)

A: リツキシマブは標的細胞に対して殺細胞作用を有するが、そのエフェクター作用の機序としては代表的なものとして下記の2つが挙げられる。CDC (補体依存性細胞傷害作用): 細胞表面上のCD20分子に結合したリツキシマブにより、血中の補体がカスケード上に結合して活性化され、最終的に細胞を傷害する。

ADCC (抗体依存性細胞傷害作用): 細胞表面上のCD20分子に結合したリツキシマブにより、Fc受容体を介してNK細胞、マクロファージなどが活性化され、細胞を傷害する。

B: リンパ腫細胞はCD20陽性デコイエクソソームを放出することで、リツキシマブ血中濃度の低下、補体の消費などにより、リツキシマブの作用を減弱させている。

(ADCC), などが挙げられる(図1A)。一方、リツキシマブ抵抗例は、リツキシマブ未治療例の約3~6割を占めると報告されており、治療上の1つの問題となっている。その原因としては、①腫瘍が補体制御タンパク質を高発現し、CDCに対して抵抗性を獲得していること、②標的としてのCD20抗原の発現が腫瘍において低下していること、③ADCCに対して何らかの機序で抵抗性を獲得していること、などが報告されているが、詳細は不明である^{4), 5)}。

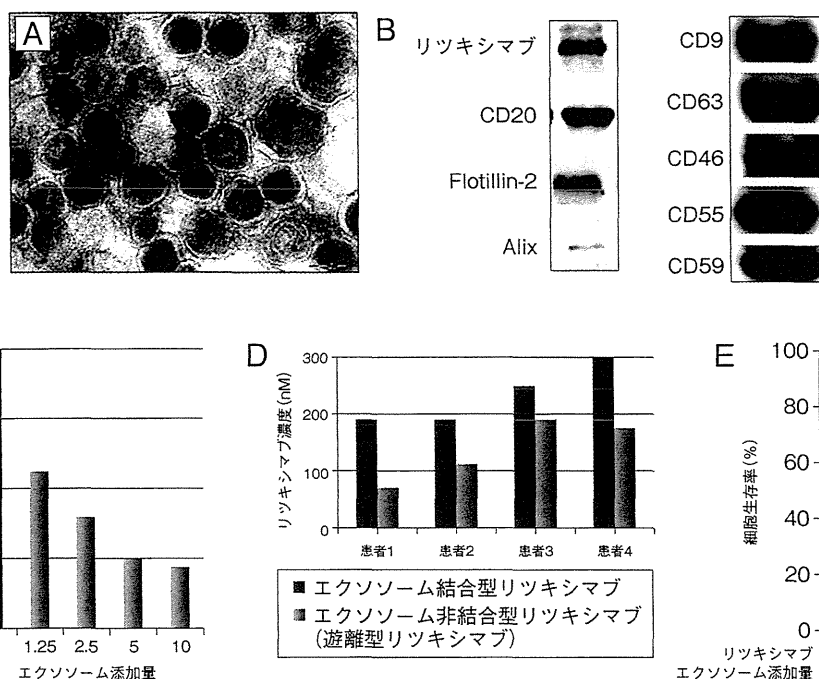
2011年にAungらによってB-NHLがCD20陽性デコイエクソソームを介して耐性を獲得するというユニークな機序が報告された(図1B)⁶⁾。各種B-NHL細胞株の培養上清にはエクソソームが存在し(図2A)、これらのエクソソームにはCD9やCD63を発現していたが、特筆すべきことに親細胞

同様、CD20を高発現していた(図2B)。さらに、これらのエクソソームは*in vitro*でリツキシマブ結合能を有し、エクソソームの濃度依存性に培養上清中の可溶性リツキシマブの濃度(図2C)および補体量が低下した。エクソソーム上にはCD55やCD59といった補体制御タンパク質の発現が見られ(図2B右)、エクソソームそのものは補体からの傷害に抵抗性であると考えられた。リツキシマブを投薬された患者において、投薬3時間後には全血漿の1/3から約半分の量のリツキシマブが腫瘍由来のエクソソームに結合していた(図2D)。

また、リンパ腫細胞株において自己・非自己由来にかかわらず、エクソソームの濃度依存性にリツキシマブによるリンパ腫細胞の殺細胞作用は抑制された(図2E)。患者由来の細胞、血漿を用いても同様の結果であったが、血漿中のエクソソームを除去すると細胞傷害作用の増強が認められた。さらに、リンパ腫細胞においてきわめてごく少量濃度のリツキシマブ投薬をトリガーとして、リンパ腫細胞からエクソソーム放出が増大した。以上から、リツキシマブを点滴静注しても、半分近くのリツキシマブがエクソソームに吸着され、有効血中濃度以上のリツキシマブが腫瘍細胞に到達しない可能性が示唆された。

一方、エクソソーム分泌抑制の報告があるラバマイシン〔多胞体(multivesicular body; MVB)の生成を阻害する〕、U18666A(細胞膜のコレステロール供給を抑制する)、インドメタシン〔MVB形成に重要なABCA3(ATP-binding cassette transporter A3)を抑制する〕を添加することで、リンパ腫細胞からのエクソソームの放出が抑制され、リツキシマブの細胞傷害作用が増強される。よって、エクソソームの生成および分泌経路がリンパ腫細胞の治療標的となりえ、大変興味深い。

以上のことから、リンパ腫細胞はCD20陽性デコイエクソソームを放出することでリツキシマブを吸着し、リツキシマブ血中濃度の低下、およびエクソソームに結合したリツキシマブを介した補体の消費などにより、リツキシマブの作用を減弱させていることが考えられる。この報告を機に、エクソソームは、血液疾患のみならず抗体療法抵抗性の機序の1つとして今後注目されるだろう。エクソソーム分泌抑制剤、生成阻害剤などが悪性リンパ腫のみならず、白血病における抗CD33抗体、慢性リウマチにおける抗TNF- α 抗体など、一般的な抗体療法に対する耐性例の治療標的にもなりうると考えられる。



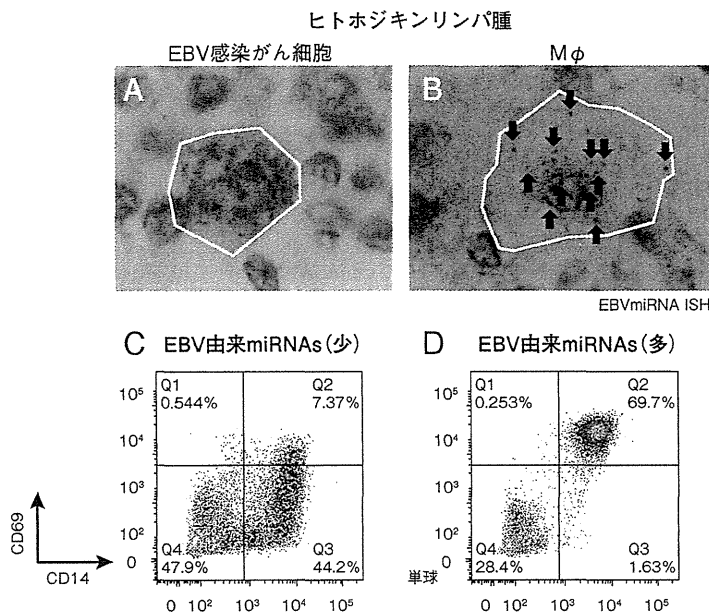
■図2 リンパ腫由来のエクソソームは*in vitro*においてデコイとして濃度依存性にリツキシマブを吸着し、その殺細胞作用を抑制する
 A：リンパ腫細胞株Balm-3より分離したエクソソームの電顕像。▼はエクソソームに結合したリツキシマブを示している。
 B：同細胞より分離したエクソソームのイムノブロット法の結果。エクソソームにはCD9、CD63、Flotillin-2、Alixといったエクソソームマーカー、そしてB細胞マーカーであるCD20、補体制御タンパク質CD55やCD59といった分子の発現が強く観察されている。
 C：リツキシマブを添加した培養上清に、Su-DHL-4由来のエクソソームを漸増して加え、培養上清中の可溶性リツキシマブの濃度をELISA法により測定したものの。Y軸はベースラインと比べた可溶性リツキシマブの相対量を表す。X軸のエクソソームは相対量で数値化されて示されている。
 D：リツキシマブ投薬3時間後の患者血漿中に含まれるエクソソーム分画に含まれるエクソソーム結合型リツキシマブおよびエクソソームを除いた血漿分画に存在する遊離型のエクソソーム非結合型リツキシマブ(可溶性)をELISA法で測定した結果。Y軸はリツキシマブの濃度を示す。
 E：リンパ腫細胞OCI-Ly1細胞のリツキシマブによるCDCを介した細胞傷害のエクソソームによるレスキュー効果。OCI-Ly1細胞に一定量のリツキシマブおよびエクソソーム(X軸のエクソソームは相対量で数値化されて示されている)を加え、リンパ腫細胞の細胞生存率をMTTアッセイにより定量したもの。エクソソームを加えると、濃度依存性に細胞生存率の上昇が確認される。
 Aung T, et al: *Kidney Int* (2010) 78: 810-816より改変。

III EBV感染症とエクソソーム

EBVはヘルペスウイルスの一種で、ヒトでは成人で90%が既感染である。CD21を介して感染し、B細胞および上皮細胞に感染する。多くは幼児期に不顕性感染し、一生持続感染する。宿主によるEBVの制御異常が多発性硬化症、全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患およびリンパ腫、胃がん、鼻咽頭がんを引き起こす。

EBVは約40種の固有のmiRNAをコードするが、近年それらがエクソソームに内包されて放出され、EBV非感染細胞に取り込まれることが明らかとなった。EBV非感染細胞である樹状細胞(DC)に取り込まれたEBVコードmiRNA

であるBHRF1(*Bam*HI fragment H rightward open reading frame 1)はターゲット遺伝子の1つであるケモカインCXCL11/*ι*-Tacの発現を減少させることが明らかにされ、エクソソームを介した分泌性EBV感染細胞由来EBVコードmiRNAが細胞間コミュニケーターとして機能する可能性が示された⁷⁾。また、EBV感染細胞由来のエクソソームはEBVがコードするタンパク質であるLMP1(latent membrane protein 1)を膜表面に発現している。これらが抗腫瘍、腫瘍支持のどちらに働くかは細胞の種類に依存する。EBV感染B細胞より放出されたエクソソームはT細胞の活性化を阻害するが、EBV感染上皮細胞から放出されたエクソソームは腫瘍支持に働く。EBVの感染制御は自己免疫疾患、腫瘍発生の予防となりうるため、EBV感染症におけるエ



■図3 EBV陽性ホジキンリンパ腫における
エクソソームを介した炎症性ニッチの制御

*in situ*ハイブリダイゼーション(ISH)法を用いてEBV陽性ホジキンリンパ腫におけるEBVコードmiRNAの発現を調べた。腫瘍(A)と非腫瘍細胞であるマクロファージ(B)にシグナルが認められ、腫瘍由来miRNAがマクロファージに取り込まれている。EBV腫瘍由来エクソソームを取り込んだ単球/マクロファージはEBVコードmiRNA依存的にCD69の発現を変化させる。(C)EBVコードmiRNAが少ないエクソソームおよび(D)EBVコードmiRNAの多いエクソソームは単球のCD69の発現に大きな差が生じる。

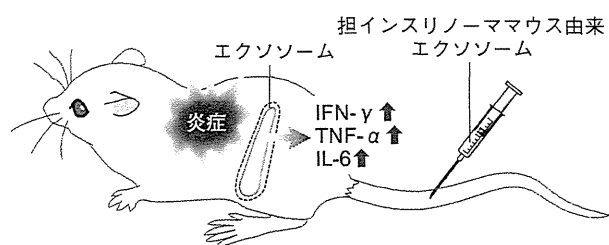
クソソームの生物学的機能の重要性、生成過程およびタンパク質、mRNA、miRNAといった内包物の選別メカニズムに関して詳細な解明が待たれる⁸⁾。筆者らは、EBV関連リンパ腫におけるEBV陽性リンパ腫細胞由来エクソソームが非腫瘍性炎症細胞に及ぼす影響を検討している。EBV陽性ホジキンリンパ腫は1%に満たないHRS(Hodgkin and Reed Sternberg)細胞と呼ばれるがん細胞と、99%以上を占める“炎症性ニッチ”と呼ばれる多種多様な炎症細胞からなる血液腫瘍である。炎症性ニッチの成り立ちについては、抑制性マクロファージ(Mφ)の関与が特に大きいこと以外、既存の遺伝子を中心とした切り口では未解決な問題が多く残る。EBVコードmiRNAはEBV感染細胞にのみ発現するため、炎症性ニッチでは腫瘍細胞だけに発現する。よって腫瘍組織においてEBV非感染細胞にEBVコードmiRNAが検出されたならば、それらがEBV由来エクソソームを介して移行したものであることが明確である。このシステムを利用し、患者検体を用いて腫瘍由来miRNAがMφに選択的に取り込まれることを見いだした。さらには*in vitro*で、EBVの潜伏感染タイプによってエクソソームによる単球/Mφに及ぼす機能変化が大きく異なり、その違いがエクソソームに含まれるEBVコードmiRNAの量によって規定されることを見いだした(図3)。EBV陽性リンパ腫、特にEBV陽性ホジキンリンパ腫では、腫瘍組織に浸潤するMφの数と予後に強い相関がある。よって炎症性ニッチ形成においても重要な役割を担うことが考えられるMφがEBVコードmiRNAを取り

込み、CD69の発現を上昇させるなどの劇的な形質変化を生じたことは、腫瘍が非腫瘍性炎症細胞を制御するうえでエクソソームを介してきわめて重大な事象を捉えている可能性があり、現在、マウスでの解析を進めている。前述のとおり、EBVはがんのほか、多発性硬化症、SLEなどの自己免疫疾患にも関与することが報告されており、これらの病態においてもエクソソームが果たす役割は大きいと考えられ、その解明が待たれる。

IV 自己免疫疾患におけるエクソソームの機能

自己免疫疾患において、患者由来細胞が放出するエクソソームには自己抗原が含まれることが報告されている。リウマチ患者由来唾液腺上皮が放出するエクソソームには自己抗原であるRo/SSA、La/SSB、Sm RNPsが含まれている⁹⁾。これらが自己免疫反応を誘導するのか、逆に免疫寛容に関与するのかは明らかになっていないが、少なくともマウスモデルにおいては、遺伝的背景にもよるが、エクソソームが自己免疫応答を惹起すると報告されている。

Shengらは、Th1型の自己免疫疾患である1型糖尿病モデルマウスであるNOD(non-obese diabetic)マウスに、担インスリノーママウスから採取したエクソソームを静注したところ、エクソソームはMyD88を介したTLR(Toll like receptor)経路を活性化する自然免疫を惹起し、エクソソ



■図4 担インスリノーマウス由来エクソソームは1型糖尿病モデル(NOD)マウスにおいて炎症を惹起する担インスリノーマウス由来エクソソームをNODマウスに静注すると、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6などのサイトカインを誘導し、膵臓に炎症反応を引き起こす。

ムに反応したTh1細胞が病変部に集積することを示した。エクソソームの中には膵臓由来の自己抗原が含まれており、それらを介した反応と考えられた。興味深いことに、上記の反応は遺伝学的背景に依存し、1型糖尿病になりやすいNODマウスの雌には上記のような免疫を惹起したが(図4)、NODマウスの雄や、1型糖尿病耐性であるコンジュニック(類遺伝子系統)マウスに静注してもそのような反応を引き起こさない。よってエクソソームを介した炎症誘導にも遺伝的背景が大きく関与することが示唆された。さらには、このエクソソーム中に内因性レトロウイルスの構成成分であるgagタンパク質、envタンパク質の存在が示された。内因性レトロウイルスの活性化が1型糖尿病の発症に関与するとの説を鑑みると興味深い知見である¹⁰⁾。

上記の結果や古くから行われてきた未熟DCが放出する免疫抑制的エクソソームなどを自己免疫疾患の治療に応用する試みは¹¹⁾、エクソソームが細胞などと比較して安定であるという点を考慮すると、自己免疫疾患の治療戦略の1つの柱として有望であると思われる。

V M ϕ による死細胞貪食におけるエクソソームの役割

近年、腫瘍や炎症におけるM ϕ の役割が注目を集めている。M ϕ がその機能や産生するサイトカインのプロファイルにより、炎症を惹起するM1型と炎症を収束させるM2型に分類される。そのM2 M ϕ の機能の1つに死細胞などの貪食が挙げられるが、この異常と自己免疫疾患の関連性が示唆されている。アポトーシスを起こした細胞はホスファジルコリンを表面に提示して“Eat me”シグナルを出し、M ϕ に貪食される。この現象に必須のタンパク質MFG-E8を欠損さ

せたマウスでは、M ϕ によるアポトーシス細胞の貪食に異常を来し、アポトーシス細胞から放出される自己タンパク質によって自己免疫疾患様の形質を示す¹²⁾。興味深いことに、MFG-E8は生理的に脾臓における胚中心のM ϕ に強く発現し、抗腫瘍効果などが報告されているDC由来のエクソソームにおける主要成分であるうえ、エクソソームの合成、取り込みに深く関与する^{13)、14)}。M ϕ による死細胞の貪食に必須のMFG-E8は遊離型のもので十分であり、エクソソームに内包される必要はないが、エクソソームによってM ϕ による死細胞の囲い込みは促進されることから¹⁵⁾、エクソソームそのものもM ϕ による死細胞の貪食に関わり、その異常が自己免疫疾患の発症に関与する可能性が示唆され、今後この分野の研究の発展が期待される。

おわりに

古くは赤血球が放出する脂質二重膜が発見され、そこからエクソソーム研究が始まったわけであるが、血液疾患・免疫疾患におけるエクソソーム研究は、がんに比べるとまだまだ知見が少ない。しかし、エクソソームがデコイとして働き、薬剤耐性に関わること、自己免疫応答を惹起すること、また逆に免疫抑制的な未熟DC由来のエクソソームが自己免疫疾患の治療に有効であるなどの報告から、エクソソームが有望な治療のターゲットになりうる魅力的な分野である。

自己免疫疾患、悪性腫瘍疾患において、ターゲットとなる機能性エクソソームを表面タンパク質などで分別し、選択的に除去したり、分泌を制御するなどの治療法の開発が進むことが期待される。

PROFILE 横山和明

- 東海大学創造科学技術研究機構 造血腫瘍分野
- E-mail : k-yoko@tokai-u.jp
- 趣味 : 生物統計

2001年神戸大学医学部卒業。2012年東京大学博士課程(医学)修了。現在、東海大学奨励研究員。EBウイルス陽性腫瘍と分泌性RNAに魅せられ、その分子病態における役割解明と治療法を目指し研究している。

PROFILE 幸谷 愛

- 東海大学創造科学技術研究機構医学部門幸谷研究室特任准教授/JST さきがけ研究者
- E-mail : ka102009@tsc.u-tokai.ac.jp
- 趣味 : 山登り、子どもと遊ぶこと(もうすぐ強制終了)。

1996年京都大学医学部卒業、2003年京都大学医学研究科修了。大野仁嗣・一戸辰夫先生に血液臨床、堀利行先生に研究を師事。2011年より現職。2012年10月JST さきがけ研究者兼任。夢は難治性造血悪性疾患に対する新規治療開発。志を共にする大学院生大募集!

文献

- 1) Tanaka M, et al: PLoS One (2009) 4: e5532
- 2) Moon PG, et al: Proteomics (2011) 11: 2459-2475
- 3) Aung T, et al: Kidney Int (2010) 78: 810-816
- 4) Stolz C, et al: Leuk Lymphoma (2009) 50: 873-885
- 5) Rezvani AR, et al: Best Pract Res Clin Haematol (2011) 24: 203-216
- 6) Aung T, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2011) 108: 15336-15341
- 7) Pegtel DM, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2010) 107: 6328-6333
- 8) Pegtel DM, et al: Biochim Biophys Acta (2011) 1809: 715-721
- 9) Kapsogeorgou EK, et al: Arthritis Rheum (2005) 52: 1517-1521
- 10) Sheng H, et al: J Immunol (2011) 187: 1591-1600
- 11) Kim SH, et al: J Immunol (2005) 174: 6440-6448
- 12) Hanayama R, et al: Science (2004) 304: 1147-1150
- 13) Oshima K, et al: Eur J Biochem (2002) 269: 1209-1218
- 14) Morelli AE, et al: Blood (2004) 104: 3257-3266
- 15) Miyanishi M, et al: Nature (2007) 450: 435-439

