microRNA による疾患診断の新展開

国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野

落谷 孝 広*

Secretory microRNA as a novel diagnostic marker

The existence of circulating miRNAs in the blood of cancer patients has raised the possibility that miRNAs may serve as a novel diagnostic marker. However, the secretory mechanism and biological function, as well as the meaning of the existence of extracellular miRNAs, remain largely unclear.

In this review, we summarize the usefulness of circulating miRNA for cancer diagnosis, prognosis, and therapeutics.

細胞外に分泌される分泌型 microRNA は体液中を循環するが、エクソソームのようなナノサイズの小胞顆粒に包埋されるため、多くの消化酵素が存在する血漿・血清中でも安定である。特に、がんをはじめとする疾患の病態や進行度合いなど、ヒトの生理状態によってその発現量や種類が大きく変化するため、血液を利用した非侵襲的な診断用バイオマーカーとしても期待されている。

本稿では、小さな分泌型 microRNA の発見がもたらすメガインパクトを中心に、疾患診断への応用や、その生物学的意義についても言及する。

Takahiro Ochiya*

Key words : microRNA, exosome, biomarker, body fluid, diagnosis

細胞外に分泌される分泌型 microRNA の存在が大きな注目を集めている。分泌型 microRNA は、体液中を循環するが、エクソソームのようなナノサイズの小胞顆粒に包埋されるため、多くの消化酵素が存在する血漿・血清中でも安定である。特に、がんをはじめとする疾患の病態や進行度合いなど、ヒトの生理状態によってその発現量や種類が大きく変化するため、血液を利用した非侵襲的な診断用バイオマーカーとしても期待されている。

一方で、エクソソーム中の microRNA の発見は、エクソソームを介した細胞間 microRNA 移送による情報伝達機構としても魅力的であるため、細胞外にホルモンのように放出される分泌型 microRNA を解析することの重要性は計り知れない。

本稿では小さな分泌型 microRNA の発見がもたらすメガインパクトを中心に、疾患診断への応用や、その生物学的意義についても言及する。

分泌型 microRNA の発見

non-coding RNA の一種である microRNA は、生命現象の微調整役として多くの遺伝子や蛋白質の発現制御に関与している。これまでの microRNA の発現解析では、もっぱら細胞内の microRNA が対象とされてきた。ところが最近になって、細胞外に分泌されるタイプの microRNA (分泌型 microRNA) に注目が集まるようになってきている。たとえば、がん患者と健常者とでは分泌型 miRNA のプロファイルに大きな違いがみられ、その違いががんの新たなマーカーとして診断や治療に応用できる可能性が示唆されている。この分泌型 microRNA の発見は、実はつい 3 年前、2007 年に、microRNA は裸で細胞外に出されるのではなく、エクソソームという小胞顆粒中に包埋されたかたちで分泌され、たとえば血液中を循環することが明らかとなった¹⁾。

では、このエクソソームとはいったい何だろうか？

細胞は、細胞質内で不要になった蛋白質やアミノ酸などを“エクソソーム”で包んだうえで、細胞外

* Division of Molecular and Cellular Medicine, National Cancer Center Research Institute

図1 エクソソームの成り立ちと構造機能

エクソソームはエンドソームに由来するリン脂質の小胞顆粒であり, 細胞外に分泌される。細胞表面には, CD 抗原等が発現し, 内容物としては, 多くのサイトカイン類, RNA, microRNA 等が知られている。生理的には, 細胞間のコミュニケーションのツールとして考えられるほか, 母乳中にも発見されたことから, 生殖以外で遺伝情報を個体間で伝搬する小胞であるとも定義される。

応用面では, 新しいデリバリーツールとしての開発が期待される他, 診断や病態の把握, 治療用医薬品としての開発も有望である。

へ輸送している。このようなエクソソームは, 血液, 唾液, 尿, 母乳などの体液中を循環することが知られていた。そもそもこのエクソソームの存在自体が知られたのはいまからおよそ 30 年も前にさかのぼり, Johnstone らがヒツジの網状赤血球から分泌された小胞を exosome(エクソソーム)と名付けたのがそのはじまりである²⁾。

エクソソームの生物学的意義

エクソソームの成り立ちと構造, 機能を図1に示す。エクソソームは, 直径 30~100 nm の小胞顆粒として定義され, 後期エンドソームにより形成される腔内膜小胞(ILV, intraluminal membrane vesicle)を含む多胞体(MVB, multivesicular body)が細胞膜と融合することにより, 細胞外へと分泌されたものである。このリン脂質顆粒であるエクソソームの膜には, コレステロール, スフィンゴミエリン,

フォスファチジルコリンといった通常の細胞膜とは異なる脂質成分が含まれている。

こうしたエクソソームは, 前述のように, 細胞内の老廃物を外に捨て去るためのツールとして誕生した機構であったと予測されるが, たとえばがん細胞等のような特殊な細胞は自身の微小環境を, 自分に有利な環境に変化させる目的でこのエクソソームを利用するようになったのではないだろうか。その根拠として, 最近の研究から, がん細胞と周辺の細胞の間のエクソソームによるコミュニケーションの重要性に注目が集まっている。たとえば, グリオーマ細胞はその悪性化に関わる EGFRv III 蛋白質を EGFRv III 蛋白質を発現してないグリオーマ細胞に移すことが明らかとなった³⁾。この蛋白質移送の役割を果たしているのがまさにエクソソームなのである。これにより EGFRv III 蛋白質を受け取ったグリオーマ細胞は増殖能力の増加など, がんの悪性化の道をたどる。

がん細胞が周辺細胞や自身の細胞にエクソソームを介して蛋白質や miRNA の水平伝搬を行っているという事実は、非常に興味深く、その機構を詳細に解明し、抑制する方策を探ることはがん治療の新たな戦略となりうる。腫瘍細胞がこれらのエクソソームを巧妙に利用していることを示すさまざまな報告があるが⁴⁾、エクソソーム中に新たに見いだされた microRNA の機能や意義に関しては研究がはじまったばかりである。

細胞間のコミュニケーションツールとしてのエクソソーム/microRNA

がん細胞とその微小環境における細胞との相互作用の研究が進んでいるが、microRNA が細胞内における遺伝子発現制御物質だけではなく、細胞間におけるコミュニケーションツールとして使われる可能性が示唆されている。細胞間のコミュニケーションの主流はもちろん増殖因子等のサイトカインやケモカインといった蛋白質が主体であったが、microRNA をエクソソームが内包している事実の発見は、microRNA の新たな分子生物学的意義を考えるうえで重要である。

なぜなら、たったひとつの microRNA は、数百という多くの遺伝子を制御するからであり、また、それによって複数のパスウェイを操ることで、特定の機能を発揮するに十分だからである。この microRNA を内包するエクソソームがたどり着き、それを受容した細胞では、新たに侵入してきた microRNA やサイトカイン類の蛋白質が導入された形となって、その細胞の形質を転換する可能性がある。

事実、筆者らのグループは、このような microRNA のトランスファーによる形質移入の現象が実際に細胞間で起きている事実を実験的に証明している⁵⁾。

個体間のコミュニケーションツールとしてのエクソソーム/microRNA

一方で、母体の胎盤と胎児のあいだでも、エクソソームを介した分泌型 microRNA の輸送が行われ

ていることがわかってきている。さらに、母親の分泌型 miRNA が母乳中にも存在し、母乳を介して microRNA が乳児に伝わっている可能性を筆者らは見いだした⁶⁾。

このように、RNA でありながら、体液中に豊富に存在するとされる分解酵素に耐えて分泌型 microRNA が安定に体液中に存在する理由こそ、エクソソームに包埋された形で存在するからである。実際に、細胞から分泌されたエクソソームを、過酷な条件、たとえば、加熱処理、pH2 などの酸性状態、RNase 処理等を施しても、エクソソームに内包されている限りは microRNA は分解されず安定に存在した。したがって、母乳を介したエクソソームによる microRNA の乳児への伝搬は、経口を介して胃へと運ばれたエクソソームは胃酸による分解を免れ、腸管にまで達し、そこで吸収されることが想像できる。

なによりも興味深いのは、母乳のエクソソーム中に存在する microRNA には、乳児の免疫系を成熟させる機能を持つ microRNA が豊富に存在することである。こうした一連の事実は、個体間での遺伝情報のコミュニケーションにエクソソーム/microRNA が役立っている可能性を示すものとして注目される。

分泌型 microRNA の疾患診断への応用

そもそもがん患者の血液中の RNA 量は、健常人のそれにくらべて多いことが知られていた。その理由は長らく不明であったが、最近になってその解決の糸口となる事実が報告された。

Taylor らは、肺がんのステージが上がるごとに、血液中を循環する腫瘍由来のエクソソームの量が増加することを報告した⁷⁾。エクソソーム中には 100～200 種類に及ぶ microRNA が存在することから、がん患者の血液中の RNA 成分の増加の一部はこの事実が影響している可能性がある。これまでも血液中を循環している核酸は血液診断におけるバイオマーカーとして注目されてきたが⁸⁾、図 2 に示すように、すでに多くの研究者が血液のみならず、唾液、尿などの体液中の microRNA をがんの診断に応用

図2 体液中の microRNA による疾患診断

エクソソームは、血液、唾液、尿などに存在するため、これらの体液中のエクソソーム由来の microRNA を疾患診断に応用する試みがはじまった。

しようとしている(小坂らの総説参照⁹⁾)。これらの体液中の microRNA の診断はがんに限ったことではなく、これまでに明確な評価基準のなかった疾患をはじめとして、さまざまな生理現象(痛み、疲労、精神疾患等)に対する新しい分子のもののさしとなることが期待される。しかしこれらの研究はまだ始まったばかりであり、体液中の microRNA の同定や microRNA 発現プロファイリングの解析方法などは、報告によってさまざまである。特に RNA 抽出方法や内在性コントロールの違いは、種々の報告を比較する際の大きな障害となる。体液に由来する microRNA を臨床応用するためには、これらの諸問題を解決し、多検体を迅速にアッセイ可能な新しいプラットフォームの構築が必要である。

エクソソームによる 核酸医薬デリバリーの可能性

miRNA の分泌に関わる機構はエクソソームだけではない。その一つがアポトーシス小体である。アポトーシス小体は、アポトーシスの際に生じる細胞の断片をさす。

Zernecke らは、血管内皮細胞から生じるアポトーシス小体が、隣接する血管内皮細胞に取り込まれることを明らかにした¹⁰⁾。この血管内皮細胞由来のアポトーシス小体には、miR-126 が存在し、アポトーシス小体を取り込んだ血管内皮細胞に血管内皮前駆細胞を動員するケモカインである CXCL12 の分泌を miR-126 は促進する。このアポトーシス小体の膜表面にあるホスファチジルセリンは、エクソソームの表面にも存在していることが知られている。

Miyanishi らは、ホスファチジルセリン依存的なアポトーシス細胞の貪食を阻害する抗体を見出し、その抗体が認識する抗原が Tim4 (T-cell immunoglobulin-and mucin-domain-containing molecule) であることを報告した¹¹⁾。Tim4 を発現した線維芽細胞はアポトーシス細胞の貪食能が向上するばかりでなく、Tim4 を発現する細胞株はホスファチジルセリン依存的にエクソソームに結合する。つまり、Tim4 がホスファチジルセリンの受容体である可能性を示唆することから、エクソソームの細胞内取り込み機構も一部はこれと同様の仕組みが働いていると想像できる。

さらに小分子 RNA の取り込み機構に関して、近

年興味深い現象が報告されている。また、膜貫通型の蛋白質 systemic RNA interference defective-1 (SID-1) が siRNA の細胞内への輸送に機能している報告がある¹²⁾。さらに、Wolfrum らは、コレステロールに結合した siRNA を用いて生体内におけるデリバリーに成功しているが、その取り込みに SID-1 が関わっていることを明らかにした¹³⁾。小分子核酸による核酸医薬の実現にはドラッグデリバリーシステムが必須であるが、どのようにして siRNA, miRNA が細胞に取り込まれるかに関しては、不明な点が多い。

おわりに

最近の話題に、シンガポールの Lim SK 博士らのグループが、間葉系幹細胞が分泌するエクソソームそのものを使った虚血性心疾患の治療研究を開始したことが報じられた¹⁴⁾。エクソソームの細胞間のやりとりに関しては、まだまだ解明すべき点が多々存在するものの、このようにエクソソームを治療薬として、あるいは核酸医薬の新規デリバリーとして活用しようとする動きが世界中ではじまっている。

がん細胞が分泌するエクソソームはどのような指向性を持って、周囲の同じがん細胞同士、あるいは血管内皮細胞や免疫担当細胞等に取り込まれるのかも詳細は明らかではないが、もしそこに特異性が存在するとすれば、がん細胞特異的デリバリーや新生血管特異的なデリバリー技術となりうるに違いはない。今後の研究の発展に期待したい。

本研究は最先端研究開発支援プログラムであるナノバイオ・ファースト(片岡一則代表)の支援による。

文 献

- 1) Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ et al. : Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9 : 654-659, 2007.
- 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) Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L et al. : Intercellular transfer of the oncogenic EGFRv III via tumor cell derived microvesicles. *Nat Cell Biol* 10 : 619-624, 2008.
- 4) Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C et al. : Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 7 : 297-303, 2001.
- 5) Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y et al. : Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. *J Biol Chem* 285 : 17442-17452, 2010. (Papers of the Week).
- 6) Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T : microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence* 1 : 7, 2010.
- 7) Taylor DD, Gercel-Taylor C : MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 110 : 13-21, 2008.
- 8) El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, Bigbee WL, Kirkwood JM et al. : Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem* 50 : 564-573, 2004.
- 9) 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.
- 10) Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L et al. : Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2 : ra81, 2009.
- 11) Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T et al. : Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450 : 435-439, 2007.
- 12) Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP : Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 295 : 2456-2459, 2002.
- 13) Wolfrum C, Shi S, Jayaprakash KN, Jayaraman M, Wang G et al. : Mechanisms and optimization of *in vivo* delivery of lipophilic siRNAs. *Nat Biotechnol* 25 : 1149-1157, 2007.
- 14) Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS et al. : Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 4 : 214-222, 2010.