エクソソームによる細胞集団内 RNA シグナルパスウェイ

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部*

田邊思帆里*

RNA signaling pathway via exosomes in cellular population

RNA signaling pathways are transduced via microvesicles or exosomes in cellular population. Wide varieties of RNA such as mRNA, microRNA, circular RNA, and long non-coding RNA play different roles in the signaling pathways. Treatment-resistant cancer has properties such as epithelial-mesenchymal transition (EMT) or cancer stem cells (CSCs), and signaling pathways mediated by microRNAs in exosomes alter corresponding to the surrounding environment in cancer metastasis. In this review, RNA signaling pathway in cellular population via exosome is focused.

細胞集団における RNA シグナルパスウェイは、小胞やエクソソームを介して伝達される。RNA には mRNA、microRNA、circular RNA、long non-coding RNA 等のさまざまな種類が存在し、それぞれの役割が異なると考えられる。治療抵抗性がんは上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition : EMT) やがん幹細胞 (Cancer stem cell : CSC) 様の性質を有し、がん転移の際には周囲の環境に応じ、エクソソーム microRNA 等のシグナルパスウェイが変化することが知られている。本稿においては、エクソソームによる細胞集団の RNA シグナルパスウェイに焦点を当てた。

Shihori Tanabe*

Keyword: RNA, signaling pathway, exosome, cellular population, network

1. 細胞集団におけるエクソソームの役割について

細胞集団は、接着分子等による細胞同士の直接シグナル伝達と同時に、エクソソームによる遠隔シグナル伝達により情報を交換している。がん細胞や免疫細胞から放出されるエクソソームは、がん微小環境形成やがん転移、抗腫瘍免疫調節に重要な役割を果たしている¹⁾。ある細胞から放出されたエクソソームは血流に乗って遠隔細胞へ情報を伝達し、細胞種により異なる RNA を包含したエクソソームが放出され、病態バイオマーカーとなる可能性が考えられることから、細胞集団におけるエクソソームの役割解明が進んでいる。エクソソームは多様な non-coding RNA を包含している

と考えられており、近年、がん微小環境に関連して解析が進んでいる RNA として、messenger RNA (mRNA)、microRNA (miRNA)、long non-coding RNA (lncRNA)、circular RNA (circRNA) 等があげられる²⁾。がん微小環境はがん細胞を取り巻く他の細胞や血流環境等により構成され、エクソソームは血流に沿って RNA を含む情報分子を運搬して、がんの最適環境を構築するものと考えられる。エクソソーム関連 RNA を表1としてまとめた^{3~8)}。

細胞外微小環境における情報伝達を媒介する細胞外小胞 (extracellular vesicle) は、大まかに、エクソソーム (ectosome) または脱粒小体 (shedding microvesicle)、エクソソーム (exosome)、アポトーシス体 (apoptotic body) の3分類が可能である (表2)⁹⁾。その中でも、エクソソームは直径が約 30~150nm の小胞であり、MVB (multivesicular bodies) と呼ばれる細胞内の多小胞体において内腔

* Division of Risk Assessment, Center for Biological Safety and Research, National Institute of Health Sciences

表1 エクソソーム関連RNA

英語名	和名(仮訳)	特徴	参考文献
messenger RNA (mRNA)	メッセンジャーRNA	poly-A配列を有するRNAであり、エクソソーム含有 mRNA 転写産物は、タンパク質合成やRNA転写後修飾等に関与していることが知られている。	S. Mathivana, <i>et al.</i> ⁵⁾ H. Valadi, <i>et al.</i> ⁶⁾
microRNA (miRNA)	マイクロRNA	約18~25ヌクレオチドから成る短いRNAであり、血管形成、造血、細胞外放出、腫瘍形成等に関与していることが知られている。	H. Valadi, <i>et al.</i> ⁶⁾ S. Tanabe, <i>et al.</i> ⁷⁾ M. J. Stoen, <i>et al.</i> ⁸⁾
long non-coding RNA (lncRNA)	長鎖非コーディングRNA	約200以上のヌクレオチドから成る長鎖RNAであり、DNA・RNA・タンパク質と相互作用することにより機能を発揮すると考えられている。	Z. Sun, <i>et al.</i> ⁴⁾
circular RNA (circRNA)	環状RNA	環状の単鎖RNAであり、pre-mRNAから生成される。比較的安定であり、miRNA阻害、上皮間葉転換、腫瘍形成等への関与が示唆されている。	J.N. Vo, <i>et al.</i> ³⁾

表2 細胞外微小環境における情報伝達媒介細胞外小胞 (extracellular vesicle : EV)

英語名	和名(仮訳)	直径
exosome	エクソソーム	約30~150nm
ectosome, or shedding microvesicle	エクトソーム、または脱粒小体	約100~1000nm
apoptotic body	アポトーシス体	約50~5000nm

小胞として生成され、細胞外に放出されてエクソソームと呼ばれるようになり、RNA やタンパク質等を運搬すると考えられている⁹⁾。細胞外小胞については、Vesiclepedia というサイトに内包タンパク質や mRNA 等の情報が掲載されている¹⁰⁾。

細胞外小体の1タイプとして分類されるエクソソームは、MVB と細胞膜が融合することにより多様な細胞から放出される⁵⁾。エクソソームは通常の細胞間シグナル伝達のみでなく、病態下における細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしている。エクソソームに含有される分子は、RNA、タンパク質、脂質等があげられ、ExoCarta というデータベースにて含有分子の検索が可能である⁵⁾。エクソソームに含有される mRNA は poly-A 配列を有する RNA であり、エクソソーム含有 mRNA 転写産物はタンパク質合成や RNA 転写後修飾等に関与していることが知られている⁶⁾。エクソソームに含有される miRNA は、約18~25ヌクレオチドから成る短い RNA であり、血管形成、造血、細胞外放出、腫瘍形成等に関与していることが知られている⁶⁻⁸⁾。また、エクソソームは免疫応答に関与していることが知られており、エプスタインバーウイルス (EBV) 感染B細胞から放出されるエクソ

ソームは、ウイルス由来の miRNA を含有し、単球に認識されるとウイルス miRNA ターゲティング遺伝子の発現に関与すると考えられている¹¹⁾。エクソソームに含有される lncRNA は約200以上のヌクレオチドから成る長鎖RNAであり、DNA・RNA・タンパク質と相互作用することにより機能を発揮すると考えられている⁴⁾。エクソソームに含有される circRNA は、環状の単鎖RNAであり pre-mRNA から生成される。比較的安定であり、miRNA 阻害、上皮間葉転換、腫瘍形成等への関与が示唆されている³⁾。

2. RNA シグナルパスウェイの分子ネットワーク

さまざまな病態において異なる分子ネットワークが形成されていると考えられている。ヒト大腸がんの分子ネットワークには、APC、TP53、SMAD4、PIK3CA、KRAS、ARID1A、SOX9、FAM123B の変異や、ERBB2、IGF2の増幅が関与していることが知られている¹²⁾。Cytoscape ソフトウェア¹³⁾では図1のような大腸がん分子ネットワークが生成され、このネットワークに関与する miRNA は、MIR146A、MIR17、MIR26B、MIR9-3、

図1 Cytoscape ソフトウェアによる大腸がん分子ネットワーク

MIR26A1、MIR200A、MIRLET7G、MIR26A2、MIR23B、MIR22、MIR429、MIR34A、MIR141、MIR338であった(表3)。

胃がんに関与する circRNA-miRNA-mRNA 制御ネットワークには、3種類の circRNA (hsa_circ_0009076、hsa_circ_0028190、hsa_circ_0041732)、22種類の miRNA、128種類の mRNA が含まれており、ハブとなる主要遺伝子は、*MYC*、*CTGF*、*TGFBR2*、*TGFBR1*、*SERPINE1*、*KRAS*、*ZEB1*、*THBS1*、*CDK6*、*TNSI*であった¹⁴⁾。また、びまん型胃がんと腸型胃がんにおいて関与する miRNA 関連制御ネットワークの制御因子として、mir-21の関与が示唆されている¹⁵⁾。これらのネットワーク RNA はマーカーとしての役割だけではなく機能的制御が考えられ、より詳細の解析が今後望まれる。

3. microRNA による分子制御とがんマーカーとしての役割

がんにおいて、miRNA は mRNA 発現制御や、DNA 変異とともにがんマーカーとしての役割を担っていると考えられている。miR-483 は insulin-like growth factor 2 (IGF2) のゲノム領域にコーディングされており、ヒト大腸がんにおいて増幅が観察されている¹²⁾。miR-483-3p はアポトーシス促進タンパク質である PUMA を制御し、アポトーシスを抑制することにより腫瘍形成に関与し

表3 大腸がんネットワーク関連miRNA

Canonical Name	Canonical Name
MIR146A(miRNA)	MIR26A2(miRNA)
MIR17(miRNA)	MIR23B(miRNA)
MIR26B(miRNA)	MIR22(miRNA)
MIR9-3(miRNA)	MIR429(miRNA)
MIR26A1(miRNA)	MIR34A(miRNA)
MIR200A(miRNA)	MIR141(miRNA)
MIRLET7G(miRNA)	MIR338(miRNA)

ていることが示唆されている¹⁶⁾。また、miR-17-5p の発現上昇は前立腺がん患者の予後不良の予測マーカーであるということが明らかとなっている⁸⁾。miR-17-5p は miR-17-92 クラスターに属しており、増殖や細胞周期、アポトーシス等の細胞機能に関与していると考えられている¹⁷⁾。miR-17-5p は腫瘍抑制因子である PTEN を阻害することにより PI3K-Akt-mTOR 経路を活性化して、がん促進へ至るメカニズムに関与しているものと考えられている^{8,17)}。miR-17-5p は腫瘍抑制因子を阻害することにより細胞周期促進や増殖、腫瘍転移を介して腫瘍増悪を来すものと考えられる⁸⁾。さらに、miR-133a は T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (Tim-1) の発現抑制による Wnt/beta-catenin 経路阻害に関与し、脳腫瘍細胞の増殖を抑制すると考えられている¹⁸⁾。miRNA は mRNA や lncRNA とともに制御ネットワークを形成することが知られており、このネットワークは miRNA が RNA 相同配列に基づくと思われる miRNA 応答配列 (miRNA response element : MRE) を介して mRNA や lncRNA 等の他の RNA に対してアンタゴニスト的作用を及ぼすと考えられることから、競合的内因性 RNA (competing endogenous RNA : ceRNA) ネットワークと呼ばれている¹⁹⁾。各種 RNA の相互作用と分子シグナルネットワークに及ぼす影響を今後研究していく必要がある。

4. がん微小環境の細胞間シグナルネットワーク

がん微小環境にはさまざまなシグナルネットワークが関与している。Ingenuity Pathway Analysis (IPA) アプリケーションには、がん微

表4 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) のがん微小環境パスウェイ内のマッピング分子

分子名	Entrez Gene名	局在	分子ファミリー
ARG1	arginase 1	Cytoplasm	enzyme
BCL2	BCL2 apoptosis regulator	Cytoplasm	transporter
BAD	BCL2 associated agonist of cell death	Cytoplasm	other
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	Extracellular Space	cytokine
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12	Extracellular Space	cytokine
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	Extracellular Space	cytokine
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
CFLAR	CASP8 and FADD like apoptosis regulator	Cytoplasm	other
CD274	CD274 molecule	Plasma Membrane	enzyme
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	Plasma Membrane	other
CSPG4	chondroitin sulfate proteoglycan 4	Plasma Membrane	other
CSF1	colony stimulating factor 1	Extracellular Space	cytokine
CSF2	colony stimulating factor 2	Extracellular Space	cytokine
CSF3	colony stimulating factor 3	Extracellular Space	cytokine
CCND1	cyclin D1	Nucleus	transcription regulator
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4	Plasma Membrane	transmembrane receptor
EGF	epidermal growth factor	Extracellular Space	growth factor
FAS	Fas cell surface death receptor	Plasma Membrane	transmembrane receptor
FASLG	Fas ligand	Extracellular Space	cytokine
FN1	fibronectin 1	Extracellular Space	enzyme
LGALS9	galectin 9	Plasma Membrane	other
HGF	hepatocyte growth factor	Extracellular Space	growth factor
HIF1a	hypoxia inducible factor 1 subunit alpha	Nucleus	transcription regulator
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
IL1B	interleukin 1 beta	Extracellular Space	cytokine
IL10	interleukin 10	Extracellular Space	cytokine
IL13	interleukin 13	Extracellular Space	cytokine
IL4	interleukin 4	Extracellular Space	cytokine
IL6	interleukin 6	Extracellular Space	cytokine
IL6R	interleukin 6 receptor	Plasma Membrane	transmembrane receptor
JAK2	Janus kinase 2	Cytoplasm	kinase
LEP	leptin	Extracellular Space	growth factor
LEPR	leptin receptor	Plasma Membrane	transmembrane receptor
MMP2	matrix metalloproteinase 2	Extracellular Space	peptidase
MMP9	matrix metalloproteinase 9	Extracellular Space	peptidase
MAP3K14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	Cytoplasm	kinase
MYC	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor	Nucleus	transcription regulator
NOS2	nitric oxide synthase 2	Cytoplasm	enzyme
OSM	oncostatin M	Extracellular Space	cytokine
PLAU	plasminogen activator, urokinase	Extracellular Space	peptidase
PDCD1LG2	programmed cell death 1 ligand 2	Plasma Membrane	enzyme
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Cytoplasm	enzyme
RAC1	Rac family small GTPase 1	Plasma Membrane	enzyme
SPP1	secreted phosphoprotein 1	Extracellular Space	cytokine
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	Nucleus	transcription regulator

(次頁に続く)

分子名	Entrez Gene名	局在	分子ファミリー
SLC1A4	solute carrier family 1 member 4	Plasma Membrane	transporter
SLC16A1	solute carrier family 16 member 1	Plasma Membrane	transporter
TNC	tenascin C	Extracellular Space	other
TSLP	thymic stromal lymphopoietin	Extracellular Space	cytokine
TIAM1	TIAM Rac1 associated GEF 1	Cytoplasm	other
TNFR1	TNF receptor superfamily member 1A	Plasma Membrane	transmembrane receptor
TNF	tumor necrosis factor	Extracellular Space	cytokine

図2 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) によるがん微環境パスウェイ

小環境に関するカノニカルパスウェイが“Tumor Microenvironment Pathway”として存在する²⁰⁾。図2は、Gene Expression Omnibus(GEO) データベース上の西ナイルウイルス感染ヒトマクロファージの遺伝子発現データをオーバーラップさせたがん微小環境ネットワークである²¹⁾。IPA のがん微小環境パスウェイである“Tumor Microenvironment Pathway”にマッピングされている分子を表4としてまとめた。また、このパスウェイネットワーク内にマッピングされているその他のカノニカルパスウェイ、内因性化学物質、疾患、機能を関連役割等として表5にまとめた。このネットワーク分子と直接の RNA-RNA 相互作用を有する RNA には、let-7、mir-135、mir-15、mir-155、mir-21、mir-26、mir-27、mir-34、mir-9、MIRLET7が含

まれていた(表6)。miRNA はがん微小環境の形成に関与している可能性がある。

5. RNA シグナルパスウェイをターゲットとした治療展開

がんへの RNA シグナルの関与については数多くの研究がなされており、今後のがん治療には RNA をターゲットとした戦略が展開していくものと考えられる。がん細胞由来エクソソームと免疫細胞由来エクソソーム内包 RNA から、がん免疫に関連する miRNA 等を組み合わせて抗腫瘍免疫を誘導する治療が実現することが望まれている¹⁾。がん治療のために mRNA をエクソソームにカプセル化して、変異遺伝子をレスキューするという手法も開発されて

表5 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) のがん微小環境パスウェイ内の関連役割等

関連役割等のシンボル名	役割	関連役割等のシンボル名	役割
Molecular mechanisms of cancer	canonical pathway	ATP accumulation	function
PD-1, PD-L1 cancer immunotherapy pathway		CD8 T cell immunity	
STAT3 pathway		CD8 ⁺ T cell apoptosis	
TCA Cycle II (Eukaryotic)		CTL apoptosis	
TNFR1 signaling		CTL immunity	
VEGF signaling		Development of regulatory T-cells	
Cysteine	chemical-endogenous mammalian	Differentiation of MDSCs	
Fatty acid		Differentiation of M2 macrophages	
GLN		ECM remodeling	
Glu		EMT	
Glucose		Glucose metabolism	
GSH		Induction of regulatory T-cells	
Lactate		Infiltration by MDSCs	
NO		Inflammation	
PGE2	disease	Inhibition of CTLs	
Apoptosis of tumor cells		Lymphangio-genesis	
Cancer cell invasion		Myeloid-derived suppressor cell accumulation	
Hypoxia of tumor		NK cell immunity	
Metastasis		Polarization of Th2 cells	
Proliferation of tumor cells		Proliferation of tumor-associated fibroblasts	
Survival of tumor cells	function	Recruitment of tumor-associated neutrophils	
Tumor cell invasion		Scavenging of ROS	
Adaptive immune response of CD8 ⁺ T cells		Th1 cell apoptosis	
Angiogenesis		Th17 cell differentiation	

表6 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) のがん微小環境パスウェイネットワーク分子と RNA-RNA 相互作用を及ぼす RNA

miRNAシンボル名	Entrez Gene名	局在	分子ファミリー
mir-135	microRNA 135b	Cytoplasm	microRNA
mir-155	microRNA 155		
mir-15	microRNA 15a		
mir-21	microRNA 21		
mir-26	microRNA 26b		
mir-27	microRNA 27a		
mir-34	microRNA 34a		
mir-9	microRNA 9-1		
let-7	microRNA let-7i	Other	group
MIRLET7			

いる²²⁾。また、アルツハイマー病の治療において、血清中の miRNA をプロファイリングしてネットワーク解析し、ターゲット遺伝子等から治療薬を探索する試みもなされている²³⁾。このアルツハイマー病の RNA ネットワークには、miRNA だけでなく lncRNA の関与が示唆されており、lncRNA のアルツハイマー病における機能に関する今後の研究の進展が期待される。近年の mRNA 等ワクチン開発においては、リポソーム等に mRNA 等をカプセル化して免疫反応を誘導することが多いが、導入 mRNA 等の体内におけるシグナルパスウェイ活性化について、今後も研究を進めていく必要があるだろう²⁴⁾。

6. おわりに

以上の項で述べてきたように、これまで機能がよくわかっていなかった RNA を含め、RNA シグナルネットワークの研究はますます脚光を浴びてい

くのではないかと考えられる。この度の新型コロナウイルス感染症の世界的パンデミックを受けて、RNA ゲノムウイルスであるコロナウイルスの感染機序やその病態の解明における RNA の役割解明の必要性が増大しているだけでなく、治療薬開発におけるターゲットとしての RNA ゲノム増幅機構や mRNA ワクチンの副反応予測、変異ウイルス対応 RNA ワクチン配列および新規治療薬・ワクチンの効果と安全性の予測の重要性がかつてないほど社会的に注目されている。RNA シグナルネットワークの免疫応答への関与も含め、今後この分野の研究が発展していくことが期待される。

謝辞

本稿の執筆にあたり、ここに記載しきれない程の数多くの共同研究者の先生方に感謝申し上げます。本研究は JSPS 科研費 JP21K12133 の助成および AMED の課題番号 JP21mk0101216 の支援を受けて実施したものです。

文献

- 1) 瀬尾尚宏ほか, *Drug Delivery System*, **29**, 152-159 (2014)
- 2) S. Tanabe, *Adv. Clin. Med. Res.*, **2**, 19 (2021)
- 3) J.N.Vo, *et al.*, *Cell*, **176**, 869-881 (2019)
- 4) Z. Sun, *et al.*, *Mol. Cancer*, **17**, 82 (2018)
- 5) S. Mathivanan, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **40**, D1241-D1244 (2012)
- 6) H. Valadi, *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, **9**, 654-659 (2007)
- 7) S. Tanabe, *et al.*, *AIMS Cell and Tissue Engineering*, **2**, 238-245 (2018)
- 8) M.J. Stoen, *et al.*, *Sci. Rep.*, **11**, 13864 (2021)
- 9) H. Kalra, *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 170 (2016)
- 10) M. Pathan, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D516-D519 (2019)
- 11) A. Bobrie, *et al.*, *Traffic*, **12**, 1659-1668 (2011)

- 12) The Cancer Genome Atlas Network, *Nature*, **487**, 330-337 (2012)
- 13) Cytoscape, <https://cytoscape.org/> (最終閲覧日: 2021年7月12日)
- 14) G. Yang, *et al.*, *Med. Sci. Monit.*, **25**, 8777-8796 (2019)
- 15) S. Tanabe, *et al.*, *Cancers (Basel)*, **12**, 3833 (2020)
- 16) A. Veronese, *et al.*, *Cancer Res.*, **70**, 3140-3149 (2010)
- 17) H. Dellago, *et al.*, *Gerontology*, **63**, 20-28 (2017)
- 18) L. Wei, *et al.*, *Cancer Cell Int.*, **21**, 347 (2021)
- 19) Y.B. Chen, *et al.*, *Biomed. Res. Int.*, **2021**, 5589101 (2021)
- 20) A. Krämer, *et al.*, *Bioinformatics*, **30**, 523-530 (2014)
- 21) F. Qian, *et al.*, *Viruses*, **5**, 1664-1681 (2013)
- 22) Z. Yang, *et al.*, *Nat. Biomed. Eng.*, **4**, 69-83 (2020)
- 23) L. Lu, *et al.*, *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen.*, **36**, 1-9 (2021)
- 24) S. Tanabe, *et al.*, *Front. Pharmacol.*, **11**, 904 (2020)