

細胞間の情報伝達を担う多様な細胞間物質輸送

東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科 准教授 草森 浩輔 (くさもり こうすけ)

■ 1. はじめに

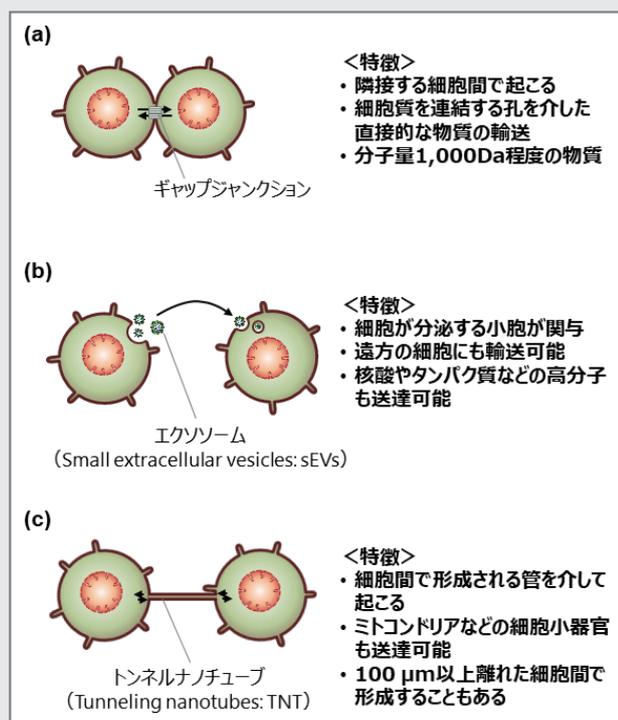
ヒトの身体は200種類を超える多種多様な細胞で構成されており、その総計は約37兆個であることが知られている¹⁾。これらの細胞は、それぞれが個性的な特性を有しており、独特の形状や大きさを持つだけでなく、遺伝情報や産生するタンパク質も多様である。さらに生体においては、それぞれの細胞が単独で活動するだけでなく、周囲の細胞と協調し合いながら組織や臓器を形成し、高度な生命活動を維持している。こうした生命活動を実現するには、同じ種類または異なる種類の細胞間における密接なコミュニケーションが重要であり、このコミュニケーションを介して特定の細胞で生じた微小な変化に対する適切な応答を達成している²⁾。古くから、細胞間の情報伝達には細胞表面分子や細胞が産生するサイトカインの役割が明らかにされており、直接的かつ間接的に細胞がコミュニケーションしていることが知られている。近年、細胞間コ

ミュニケーションに細胞が放出する小胞や細胞間で形成されるナノチューブの関与が明らかにされ、タンパク質や核酸に限らず、ミトコンドリアの輸送が報告されるなど、細胞間での物質輸送機構の多様性が示されている【図1】。

本稿においては、細胞間の情報伝達を担う多様な細胞間物質輸送とそれを利用した疾患治療に関する応用例について紹介する。

■ 2. 細胞間で輸送される物質

生体を構成する細胞は、外部から酸素や栄養素などを取り込むことで多様な機能を維持している。たとえば、グルコースやアミノ酸は炭水化物やタンパク質を含む食事を介して血中に移行し、全身の細胞に供給されることで恒常性を維持している。この血中のグルコース濃度を感知しているのは膵臓の内分泌機能を担う膵島(ランゲルハンス島)に存在するβ細胞であり、β細胞が血中のグルコース濃度に応答して産生するインスリンが肝臓や筋肉、脂肪細胞に作用することで血中のグルコース取り込みを調節し、血中のグルコース濃度が維持されている³⁾。また、マクロファージなどの免疫細胞は、生体に出現したがん細胞を認識して腫瘍壊死因子である tumor necrosis factor-α (TNF-α) などの抗腫瘍分子を産生するだけでなく、がん細胞を貪食することでがん抗原をT細胞に提示し、直接的な情報伝達を介してがんの成長を抑制している⁴⁾。一方、がん細胞は生体内で異常増殖を繰り返すことで腫瘍組織を形成するとともに、interleukin-6 (IL-6) などの放出を介してマクロファージを tumor-associated macrophage (TAM) に誘導し、マクロファージが腫瘍成長に有利に働くように教育している⁵⁾。さらに、腫瘍組織のがん細胞は、後述するエクソソームと呼ばれるナノメートルサイズの小胞を放出し、がん細胞由来エクソソームが移行した組織においてがん細胞が転移巣を形成しやすい環境にすることも報告されている⁶⁾。また、間葉系幹細胞が膠芽腫細胞にミトコンドリアを直接的に輸送し、細胞死を回避するとともに薬



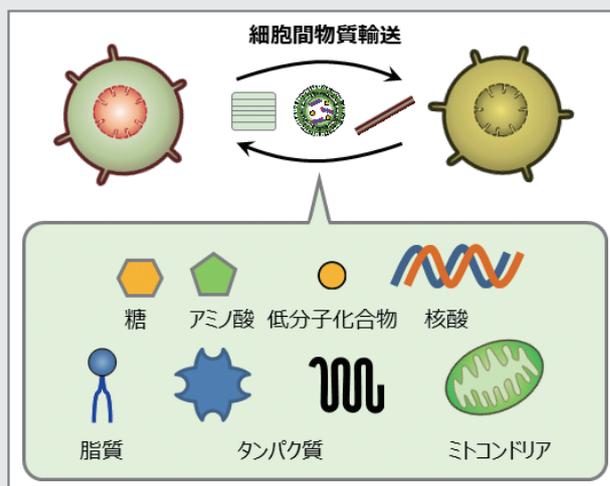
【図1】細胞間におけるさまざまな物質輸送機構。(a)隣接する細胞間での物質輸送。(b)細胞外小胞を介した物質輸送。(c)細胞間で形成される管を介した物質輸送。

剤耐性を獲得するという報告があり⁷⁾、細胞間で輸送されるミトコンドリアの機能解明に関する研究が盛んである。このように、細胞間で輸送される物質は極めて多様【図2】であり、特定の物質が輸送されると、複数種類の細胞を巻き込んで応答が起きる。ここでは、【図1】に示したように、細胞間での物質輸送について、隣接する細胞間での物質輸送、小胞を介した離れた細胞間での物質輸送、細胞間で形成された管を介した物質輸送に大別して整理した。

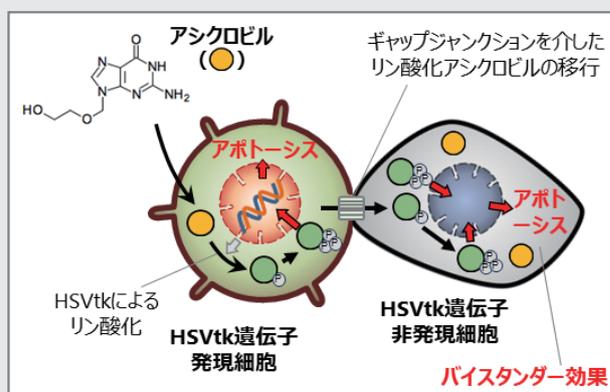
■ 3. 隣接する細胞間での物質輸送

隣接する細胞間では様々な相互作用が起きている。細胞間接着はその代表例であり、接着性の細胞は何かしらの細胞や上皮細胞などから形成される組織に接着しなければ足場依存的なアポトーシス（アノイキス）が起こる⁸⁾。細胞同士が接着する際には細胞表面分子の相互作用が必要であり、インテグリンやフィブロネクチンなどの細胞接着分子が相互作用に関与する⁹⁾。組織や臓器を構成する上で細胞接着は極めて重要であり、密な細胞接着を介して複数種類の細胞が複雑かつ系統的に並ぶことで高い機能を発揮している。膵島のβ細胞におけるグルコース濃度に応答したインスリン産生がわかりやすい例であり、β細胞と膵島を構成する細胞との細胞間相互作用を解消するとインスリン産生能が低下する¹⁰⁾。

隣接する細胞間では直接的な物質輸送が行われており、接着した細胞間での物質輸送にはギャップジャンクションと呼ばれる細胞間結合が関与する¹¹⁾。ギャップジャンクションは、2つの細胞が接触する細胞膜において形成されるトンネル状の構造であり、細胞質をつなぐ孔である。ギャップジャンクションを形成するタンパク質はコネクシンであり、コネクシンの6量体であるコネクソンを形成することでトンネル状の孔になる。ギャップジャンクションは親水性であり、直径が約2nmであることから、分子量が約1,000Daまでの分子はこの孔を介して細胞間を行き来できる。ギャップジャンクションを介した物質輸送については、無機塩類や糖、アミノ酸などの報告があり、最近では高分子の核酸やミトコンドリアの物質輸送にも関与することが示唆されている¹²⁾。ギャップジャンクションを介した細胞間での物質輸送は、細胞の恒常性維持に関与するだけでなく、発生や分化にも影響を及ぼすことが知られている。こうしたギャップジャンクションの機能が応用された細胞間の物質輸送の例と



【図2】細胞間で輸送される物質。糖やアミノ酸だけでなく、細胞膜タンパク質や核酸、ミトコンドリア、リソソームも細胞間で輸送される。



【図3】自殺遺伝子発現細胞による細胞自殺のバイスタンダー効果。ギャップジャンクションを介した物質輸送により自殺遺伝子非発現細胞も細胞死が誘導される。

して自殺遺伝子を利用したバイスタンダー効果が知られている¹³⁾。代表的な自殺遺伝子である単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ (herpes simplex virus-thymidine kinase; HSVtk) 遺伝子を発現する細胞は、抗ウイルス薬のアシクロビルやガンシクロビルによってアポトーシスが誘導される。これが細胞自殺であり、HSVtk 遺伝子を発現する細胞内でアシクロビルがリン酸化されてDNA複製を阻害することにより細胞死が起こる。アシクロビルは低分子であることから、ギャップジャンクションを通過可能であり、HSVtk 遺伝子発現細胞から隣接するHSVtk 遺伝子非発現細胞にリン酸化アシクロビルが移行することにより、HSVtk 遺伝子非発現細胞のアポトーシスも誘導される（バイスタンダー効果）【図3】。通常、HSVtk 遺伝子を腫瘍に導入してもがん細胞への導入効率は低いですが、バイスタンダー効果の影響により、抗腫瘍効果は遺伝子導入効率以上となることが知られている。また、腫瘍に積極的に集積することが報告されている間

葉系幹細胞に HSVtk 遺伝子を導入し、担がんマウスに対して HSVtk 遺伝子発現間葉系幹細胞とガンシクロピルを投与したところ、腫瘍の増大を抑制できることが報告されている¹⁴⁾。これは腫瘍組織に移行した HSVtk 遺伝子発現間葉系幹細胞が細胞内でガンシクロピルを代謝して、バイスタンダー効果により間葉系幹細胞周囲のがん細胞にリン酸化ガンシクロピルを送達することでアポトーシスを誘導できるというメカニズムである。

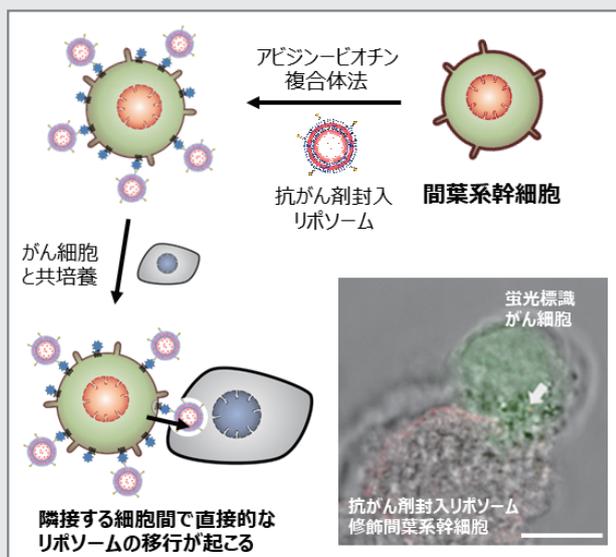
我々は、間葉系幹細胞表面に修飾した抗がん剤封入リポソームが効率的かつ迅速にがん細胞に直接移行する現象を見出し【図4】、隣接する細胞間での物質輸送を利用したがん治療法の開発に成功した¹⁵⁾。

まず、アビジンとビオチンが強固な複合体を形成するアビジン-ビオチン複合体法を応用し、細胞表面をアビジン化した間葉系幹細胞に、抗がん剤であるドキソルビシンを封入したビオチン化リポソームを添加することでドキソルビシン封入リポソーム修飾間葉系幹細胞を調製した。ドキソルビシン封入リポソーム修飾間葉系幹細胞をがん細胞に添加して共培養したところ、顕微鏡観察において、共培養を開始して30分以内に間葉系幹細胞表面から隣接するがん細胞にドキソルビシン封入リポソームが直接移行の様子が確認された。また、ドキソルビシン封入リポソーム修飾間葉系幹細胞との共培養群は、ドキソルビシン封入リポソーム添加群と比較して高い殺細胞効果を示した。この時、トランズウェルなどを用いて間接的に共培養した条件では、ドキソルビシン封入リポソーム修飾間葉系幹細胞

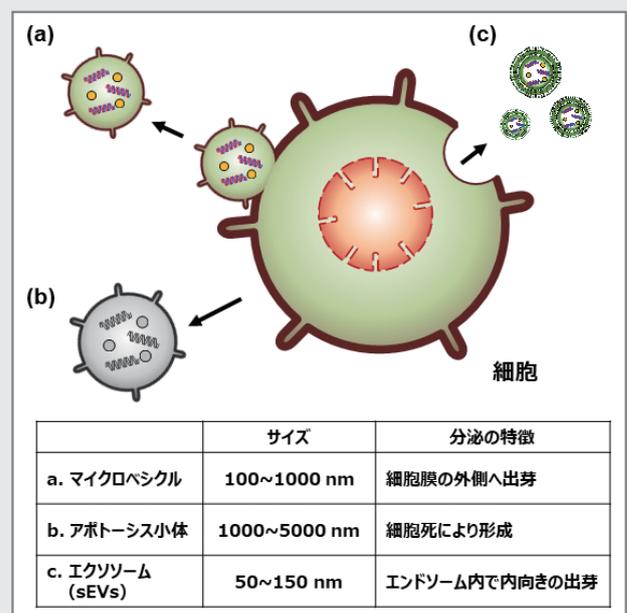
の殺細胞効果は低かった。そこで、細胞表面に修飾したリポソームの細胞間輸送メカニズムについて評価したところ、がん細胞によるリポソームの受け取りにはエンドサイトーシスによる取り込みが関与しており、一部の細胞では相手側の細胞膜ごと齧りとるトロゴサイトーシスが検出された。こうした知見をもとに、肺がんモデルマウスに対してドキソルビシン封入リポソーム修飾間葉系幹細胞を投与したところ、ドキソルビシン封入リポソーム修飾間葉系幹細胞は肺に効率的に移行し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 投与群やドキソルビシン封入リポソーム投与群と比較して、がんの成長を顕著に抑制した。この結果は、細胞間における新しい物質輸送の可能性を示すものであり、細胞を利用した薬物送達システムを開発できる可能性がある。現在、細胞種特異性やリポソームの移行効率などについて詳細に検討中である。

■ 4. 小胞を介した細胞間での物質輸送

細胞は、細胞内外の物質を運搬したり、貯蔵あるいは消化するために、細胞内で小さな袋 (小胞) を形成する。代表的な細胞内小胞がリソソームであり、細胞内でエンドソームなどと膜融合し、タンパク質や老廃物を分解する機能を担っている¹⁶⁾。一方で、細胞は細胞外に小胞を分泌する機能も有している。細胞外に分泌される小胞はそれぞれ大きさや産生機構が異なり、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体の3つに大別できる【図5】¹⁷⁾。このうち、エクソソ



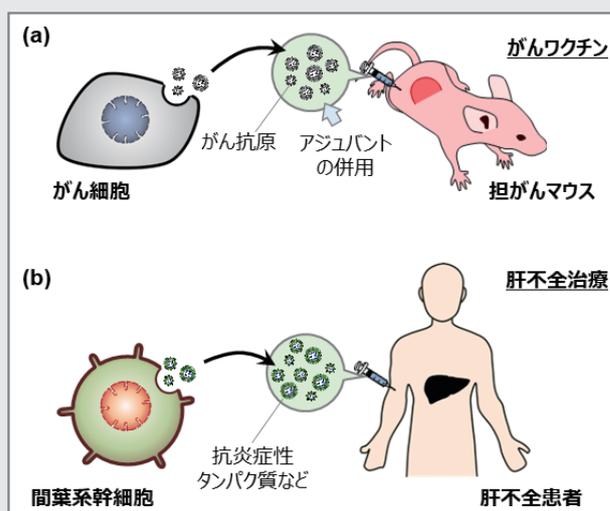
【図4】 間葉系幹細胞表面に修飾したリポソームのがん細胞への直接的な輸送。間葉系幹細胞とがん細胞が隣接している場合に効率的に起きる、図内のスケールバーは20 μm。矢印はがん細胞内に移行したリポソームを示す。



【図5】 細胞外小胞の分類。(a) マイクロベシクル。(b) アポトーシス小体。(c) エクソソーム (sEVs)。

ームは細胞間コミュニケーションに關与する、すべての細胞が分泌する小胞として知られ、病態關連因子や疾患治療用薬物送達担体としての応用が注目されている。エクソソームの存在は1980年代にすでに発見されていたものの、2007年に細胞間における mRNA や miRNA の交換現象にエクソソームの關与が報告されたことが契機となり、大きく注目された¹⁸⁾。この発見を皮切りに、エクソソームが細胞間の物質輸送を担う生体由来のナノ粒子であることが認識され、様々な研究が展開されている。近年、細胞外小胞に関する国際学会である International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) において細胞外小胞の研究に関するガイドラインが制定され、エクソソームを定義する実験的な情報が限定的である現状から、エクソソームを small EVs (sEVs) と呼称することが推奨されている¹⁹⁾。そこで以降は、エクソソームに関する記述について sEVs として記載した。

sEVs は一般に、直径が約 50-150 nm の脂質二重膜を有する小胞であることが知られており、透過型電子顕微鏡による観察において、明瞭な境界を有する球状の小胞であることが確認できる²⁰⁾。また、sEVs を定義する際のマーカーとして、膜輸送と融合に關与するアネキシンや多小胞体の生合成に關与する Alix, CD63 などの 4 回膜貫通タンパク質であるテトラスパニンが細胞種にかかわらず検出される。sEVs が包含するタンパク質や核酸は細胞種によって大きく異なり、細胞種に依存した特徴を示す。例えば、がん細胞由来の sEVs はがん由来の抗原を保持しており²¹⁾、間葉系幹細胞由来の sEVs は抗炎症性タンパク質の tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) を有している²²⁾。したがって、sEVs に存在するタンパク質を検出することで疾患を特定することが可能であり、sEVs に存在するタンパク質を利用した疾患治療も検討されている。一方で、sEVs に含まれるタンパク質や核酸の種類や量は実験ごとに大きく異なることが報告されており²³⁾、同じ細胞から同じプロトコルで回収しても再現性が低いことが課題である。また、培養細胞から培地中に分泌された sEVs をマウスの静脈内に投与した場合、血中からの消失半減期は数分以内であることが報告されており、その大部分は肝臓のクッパー細胞に貪食されることが明らかにされている²⁴⁾。この報告は、特定の細胞で産生された sEVs が血中を循環して遠方の細胞に移行するという仮説にそぐわないものであり、病態關連因子や疾患治療用ツールとしての有用性が疑問視されることもある。



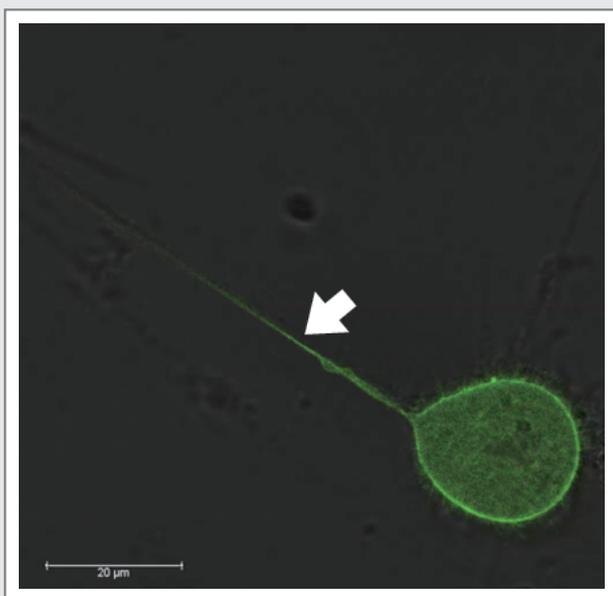
【図6】 sEVsによる物質輸送を利用した治療応用例。(a) がん細胞由来sEVsを利用したがん免疫療法。(b) 間葉系幹細胞由来sEVsを利用した肝不全治療。

一方で、最近では sEVs の種類が細分化され、血中滞留性の高い sEVs も報告されている²⁵⁾。今後、生体内における sEVs の役割や機能についてより詳細な理解が期待される。

上述のような課題は残されているものの、sEVs を介した物質輸送による疾患治療は数多く実施されている【図6】。これまでに、siRNA などの核酸を sEVs 内に搭載しようとする試みがなされていたものの、sEVs 内に核酸を効率良く搭載する方法は確立されておらず、搭載量に難がある。したがって、sEVs が包含する核酸やタンパク質をそのまま送達することによる疾患治療か、細胞由来である特性を利用して遺伝子導入を介した特定のタンパク質を搭載した sEVs を用いた疾患治療が報告されている。最近では、がん細胞由来 sEVs ががん抗原を保持していることに着目したがんワクチンが検討されており、sEVs を利用して免疫細胞にがん抗原を送達させる試みがなされている²⁶⁾。さらに、sEVs を利用したがんワクチンの効果を効率化するために、アジュバントとの併用なども試みられている。また、炎症性疾患には、抗炎症作用の高い間葉系幹細胞由来 sEVs の利用が試みられている²⁷⁾。sEVs が肝臓に移行しやすいという利点もあり、肝不全への応用が試みられている。一方で、間葉系幹細胞自身も肝不全に対する治療効果が報告されており、sEVs を利用するか細胞を利用するかについて、コストや有効性、安全性などについて議論されている。また、sEVs の定義が曖昧である現状や sEVs を構成する組成物の多様性が臨床応用のハードルになっている。

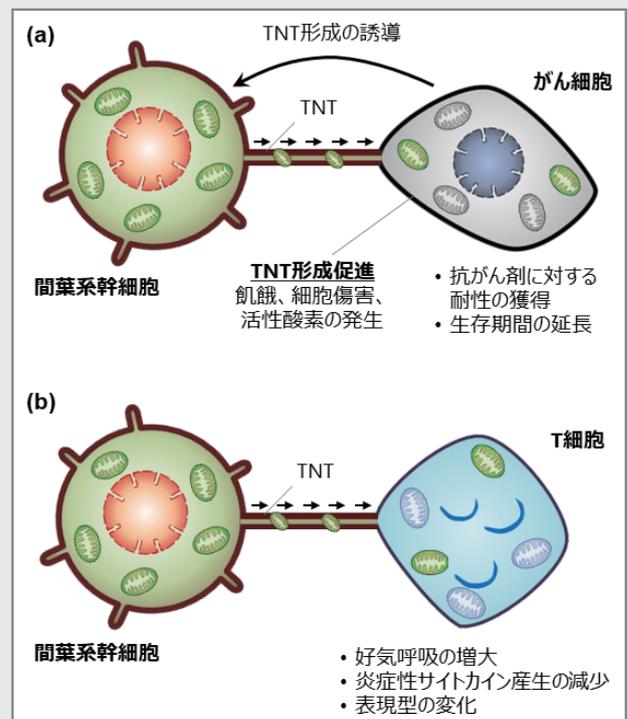
■ 5. 細胞間を連結する管を介した物質輸送

トンネルナノチューブ (Tunneling nanotube: TNT) は、細胞膜ナノチューブとも呼ばれ、隣接していない細胞間での物質輸送に関与することが報告されている²⁸⁾。1999年にショウジョウバエを用いた研究で初めて報告され、その後2000年代前半に哺乳類細胞においても同様の現象が報告された。TNTは片方の細胞が伸長して相手方の細胞の細胞膜と融合する場合もあれば、それぞれの細胞から伸長したTNTが接続する場合もある。TNTを介した物質の輸送はタンパク質に限らず、核酸や細胞小器官も含まれており、細胞間コミュニケーションや細胞機能の調節に関与していることが示唆されている²⁹⁾。TNTは微小管とアクチンを含んでいることから、アクチンを免疫染色することにより蛍光顕微鏡などを用いて観察可能である【図7】。長いものでは100 μm を超えて細胞間を接続する場合があります。物質は双方向に移動すると考えられている。TNTの形成メカニズムについては様々な報告があるものの、未だ完全には解明されていない。T細胞のTNT形成には細胞間での接触が必要であることや炎症条件下における細胞ではTNT形成が促進されること、傷害などを受けた細胞はTNTを形成しやすいことなどが報告されている。特定の条件下でTNTの形成が促進されると考えられる一方、通常の培養においてもTNTは形成されており、その生理的な意義については今後の解明が期待される。



【図7】 TNTの共焦点レーザー顕微鏡画像。GFP融合アクチン遺伝子を発現するマウス間葉系幹細胞株C3H10T1/2細胞を観察した。スケールバーは20 μm 。白矢印はTNTを示す。

TNTを介した物質輸送は、エンドサイトーシス小胞やリソソーム、ミトコンドリア、細胞膜タンパク質などについては報告があるものの、細胞質タンパク質に関する報告は少なく、がん細胞に関わるTNTにおいて一部の細胞質タンパク質の輸送が報告されている程度である³⁰⁾。がん細胞のTNT形成で輸送される物質で報告されているタンパク質には、がん幹細胞マーカーであるCD133や薬剤耐性タンパク質であるP-糖タンパク質 (P-glycoprotein: P-gp)、トランスフェリン受容体などがある。また、がん細胞に関するTNT形成においてはミトコンドリアの輸送に関する報告が多い。がん細胞のミトコンドリア取り込みについてはこれまでに、ギャップ結合やsEVs、細胞融合などが報告されているものの、細胞間でのTNT形成によるミトコンドリア輸送は、ミトコンドリアドナーとなる細胞が直接ミトコンドリアをがん細胞に輸送するという点で注目されている³¹⁾。がん細胞におけるTNT形成は、抗がん剤による細胞傷害や飢餓、活性酸素種により促進することが報告されており、がん細胞が生き延びるための手段としてTNTを形成することが示唆されている。また、がん細胞が活性酸素種を発生させるためにNADPH oxidase 2 (NOX2)を利用して間葉系幹細胞を刺激し、間葉系幹細胞とTNTを形成することでミトコンドリアの供与を促進すると



【図8】 TNT形成を介した間葉系幹細胞から他の細胞へのミトコンドリア輸送。(a) TNTを介した間葉系幹細胞からがん細胞へのミトコンドリア輸送。(b) TNTを介した間葉系幹細胞からT細胞へのミトコンドリア輸送。

いう報告も存在する³²⁾。したがって、TNTを介した細胞間におけるミトコンドリア輸送は、細胞の恒常性維持に働いているものと推察される。間葉系幹細胞によるミトコンドリアの輸送はがん細胞だけでなく、T細胞でも確認されている【図8】。T細胞の中でもTh17細胞は、間葉系幹細胞との共培養で最も効率的にミトコンドリアを取り込むことが報告されており、ミトコンドリアが輸送されたTh17細胞では好気呼吸が増大し、炎症性サイトカインの産生が減少することが報告されている³³⁾。また、興味深いことに、ミトコンドリアの供与を受けたTh17細胞は制御性T細胞の表現系を獲得する傾向が強く、ミトコンドリア輸送によるT細胞の表現型の変化が示唆されている。疾患関連タンパク質に関しては、神経変性タンパク質として、タウタンパク質や α シヌクレイン、プリオン、変性ハンチンチンなどのミスフォールディングタンパク質がTNTを介して輸送されることが報告されており、疾患発症との関連性も示唆されている³⁴⁾。

近年では、TNTによる物質輸送を介した疾患治療法も報告されている。マクロファージに抗がん剤のドキソルビシンを取り込ませ、がん細胞と共培養させてTNTを形成させるとドキソルビシンががん細胞に効率的に移行することでがん細胞の増殖を抑制できるというものである³⁵⁾。この報告においては、マクロファージとがん細胞とのTNT形成が極めて早く(TNTにおけるドキソルビシンの移動速度は1秒あたり約0.04 μ m)、TNTの形成頻度と薬物輸送効率が相関することも示されている。今後、TNTを介した薬物送達システムの開発も期待されると考えられる。

■ 6. おわりに

細胞間コミュニケーションは、生体の恒常性を維持する上で極めて重要な機能である。従来までに報告されてきた細胞間接着を介した相互作用やサイトカインなどを介した相互作用に加えて、sEVsやTNTといった複雑な細胞間相互作用も考慮すると、細胞間で起きている事象を読み解くことは一筋縄ではいかないことが理解できる。細胞間の情報伝達を担うこれら物質輸送機構は生命現象の解明に繋がることから、今後も研究が盛んになることが予想される。また、本稿でも一部取り上げたとおり、細胞間での物質輸送は、疾患治療を目的とした薬物送達システムへの応用が可能である。したがって、細胞間薬物輸送機構を詳細に理解することで新しい疾患治療法の開発も期待できると考えられる。

参考文献

- 1) Bianconi E, et al. *Ann Hum Biol*, 40, 463–71 (2013).
- 2) Armingol E, et al. *Nat Rev Genet*, 22, 71–88 (2021).
- 3) Lammert E and Thorn P. *J Mol Biol*, 432, 1407–18 (2020).
- 4) Aminin D, et al. *Kaohsiung J Med Sci*, 37, 749–58 (2021).
- 5) Mantovani A, et al. *Nat Rev Drug Discov*, 21, 799–820 (2022).
- 6) Hoshino A, et al. *Nature*, 527, 329–35 (2015).
- 7) Nakhle J, et al. *Cancer Res Commun*, 3, 1041–56 (2023).
- 8) Taddei ML, et al. *J Pathol*, 226, 380–93 (2012).
- 9) Watt FM and Hodivala KJ. *Curr Biol*, 4, 270–2 (1994).
- 10) Burrack AL, et al. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8, 343 (2017).
- 11) Totland MZ, et al. *Cell Mol Life Sci*, 77, 573–91 (2020).
- 12) Zhu Y, et al. *Biology (Basel)*, 11, 283 (2022).
- 13) van Dillen IJ, et al. *Curr Gene Ther*, 2, 307–22 (2002).
- 14) Matuskova M, et al. *Cancer Lett*, 290, 58–67 (2010).
- 15) Takayama Y, et al. *J Control Release*, 329, 1090–101 (2021).
- 16) Yang C and Wang X. *J Cell Biol*, 220, e202102001 (2021).
- 17) Gurung S, et al. *Cell Commun Signal*, 19, 47 (2021).
- 18) Valadi H, et al. *Nat Cell Biol*, 9, 654–9 (2007).
- 19) Théry C, et al. *J Extracell Vesicles*, 7, 1535750 (2018).
- 20) van Niel G, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 23, 369–82 (2022).
- 21) Yang C, et al. *PLoS One*, 6, e22517 (2011).
- 22) Jiang L, et al. *Biochimie*, 177, 40–9 (2020).
- 23) Nieuwland R, et al. *Eur J Cell Biol*, 101, 151226 (2022).
- 24) Takahashi Y, et al. *J Biotechnol*, 165, 77–84 (2013).
- 25) Kobayashi Y, et al. *Pharm Res*, 40, 855–61 (2023).
- 26) Matsumoto A, et al. *Biomaterials*, 252, 120112 (2020).
- 27) Keshtkar S, et al. *Stem Cell Res Ther*, 9, 63 (2018).
- 28) Rustom A, et al. *Science*, 303, 1007–10 (2004).
- 29) Turos-Korgul L, et al. *Front Cell Dev Biol*, 10, 915117 (2022).
- 30) Kretschmer A, et al. *Sci Rep*, 9, 7826 (2019).
- 31) Yan W, et al. *Stem Cell Res Ther*, 12, 140 (2021).
- 32) Marlein CR, et al. *Blood*, 130, 1649–60 (2017).
- 33) Kono M, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115, 9288–93 (2018).
- 34) Tardivel M, et al. *Acta Neuropathol Commun*, 4, 117 (2016).
- 35) Guo L, et al. *ACS Nano*, 13, 1078–96 (2019).

