

## 2.3.2 細胞外微粒子・細胞外小胞

### (1) 研究開発領域の定義

生体内には、外部から侵入した（外因性）または体内で生じた（内因性）さまざまな「細胞外微粒子」が存在している。外因性微粒子としては環境中の浮遊粒子状物質（Suspended Particulate Matter, SPM、PM2.5など）、内因性微粒子としては細胞外小胞（extracellular vesicles: EVs）などが挙げられる。どちらも小胞に含有されるDNA、RNA、タンパク質、脂質などが他の細胞に受け渡されることで、1細胞レベルを越えた様々な細胞間情報伝達を担うことが判明している。細胞の状態や疾患の進展、細胞間コミュニケーションに関連していると考えられており、医療、創薬、診断などへの応用を目指して、その機能解析やバイオマーカーとしての探索が進められている。

### (2) キーワード

細胞外小胞、エクソソーム、メンブレンベシクル、細胞間情報伝達、バイオマーカー、リキッドバイオプシー、細胞外DNA/RNA、ドラッグデリバリーシステム

### (3) 研究開発領域の概要

#### 【本領域の意義】

細胞外小胞は脂質二重膜で形成され、主に生成機構の違いに基づきエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体に分類される。エクソソームは、ほぼ全ての細胞から分泌される直径50～150 nm程度の小胞であり、血液や尿、髄液、涙、唾液などの体液や細胞培養液中に数多く存在している。また、細菌も同様に脂質二重膜からなる細胞外微粒子であるメンブレンベシクル（Membrane vesicles: MVs）（直径20～400 nm程度）を産生していることが知られている。

#### 【外因性微粒子】

近年、環境中の様々な微粒子（外因性微粒子）の生体への影響が注目されている。例えば、PM2.5やカーボンナノチューブなどと疾患との関連性の研究が進められている。しかし、外因性微粒子は、観察技術、定量的分析手法の制約から生体内への取り込み過程、分布や局在の挙動など多くが未解明であり、有害微粒子への対策は進んでいない。動態解析のための新技術開発により、微粒子が惹起する生命現象の本質を理解し、環境や生体に影響を及ぼす微粒子の機能解明を目的とした研究開発を推進することは環境や健康に関する各種課題解決に貢献するものである。

#### 【内因性微粒子：EVs、エクソソーム】

細胞外小胞の発見は1946年に遡り<sup>1)</sup>、1981年に網状赤血球の研究で発見された粒径100 nm程度の分泌小胞が1987年にエクソソームと命名された<sup>2)</sup>。その後、長いあいだ細胞内の不要物排出機構と考えられていたが、2007年スウェーデン Göteborg 大学 Lötvallらによって、エクソソーム内に分泌細胞由来の mRNA や miRNA が存在し、それらが他の細胞に受け渡されることで細胞間の情報交換が行われている可能性が示された<sup>3)</sup>。この報告をきっかけに、エクソソームは新たな細胞間情報伝達機構として注目され、新規機能解析やエクソソームを標的とした研究開発および応用した研究開発が世界中で活発に行われている。

エクソソームに内包、あるいは膜に存在するRNAやタンパク質などの機能性分子の量や種類は疾病で変動することから、エクソソームは疾病の検出や予後予測、また治療標的として利用することが期待されている。また、エクソソームが生体内に存在する天然のドラッグデリバリーシステム（DDS）と捉えられることから、DDSなど創薬技術として利用することも広く試みられている。さらに、エクソソームは種を超えて多くの生物種に存在していることから、異種間での情報伝達を行っている可能性も示唆され、様々な生命現象のメカニズム解明や健康・医療分野での広い応用に向けた研究開発が行われている。本研究領域の興隆に伴い、基礎生物学者のみならず、臨床研究、公衆衛生、ナノテクノロジー、バイオインフォマティクスなど様々な分野の

研究者が参入しており、分野横断的な融合研究が行われつつある。しかし、研究基盤となるエクソソームの解析技術や試料調製法などは未熟であり、突破口となり得る新たな技術開発が求められている。

### 【内因性微粒子：MVs】

細菌は地球上で最も多様で広範囲な環境に生息する細胞性生物のひとつであり、環境・健康・食料など我々の生活に直接関わっている。ほとんどの細菌は細胞外に脂質二重膜で構成される20～400 nm程度の細胞外微粒子を放出する<sup>4, 5)</sup>。細菌が形成する細胞外微粒子はメンブレンベシクル (MVs) と呼ばれ、その種類と機能が多岐に渡っていることが分かってきた。例えば、MVsは細菌間での情報伝達や細胞間での遺伝子のやり取り (遺伝子水平伝播) などの「細胞間相互作用」、感染した動・植物細胞への毒素の運搬や抗生物質耐性などの「細菌の病原性」、ウイルスや宿主の免疫系から逃れるなどの「防御機構」、さらには、細菌の栄養獲得や地球の「物質循環」にも寄与している<sup>6, 7)</sup>。細菌由来のMVsは広く環境中にも存在していることから、我々は日常的に暴露されていると考えられるが、その影響については不明なままである<sup>8)</sup>。MVsの機能や作用機序はまだ全容が解明されていないが、細菌の多様性を考慮し、古細菌や真菌も同様な膜小胞を放出することを考えると、MVs研究は微生物間、微生物-動物間相互作用を包括する生命ネットワークの理解のための一つの大きな柱となると言える。さらに、MVs表面に酵素を並べたナノ触媒としての利用や、宿主の免疫を誘導することからワクチン開発の基盤として注目されており、すでに認可されているものもある。近年では、がん細胞など特定の細胞をターゲットにしたDDSの開発も行われている<sup>9)</sup>。

### 【研究開発の動向】

#### 【外因性微粒子】

世界の疾病負担研究2015では、PM2.5による死者が全世界で420万人に上り、総死亡数原因の7.6%を占めると報告されるなど、外因性微粒子の健康への影響が注目されている<sup>10)</sup>。PM2.5が呼吸器系疾患や循環器系疾患などのリスクを上昇させると考えられることから、そのメカニズムを細胞、動物実験レベルで解明する試みが進んでいる<sup>11)</sup>。一方、疫学的にPM2.5への曝露と死亡、腎機能の関連などを調査し、その関連性を明らかにする研究も多数報告されている<sup>12, 13)</sup>。外因性微粒子には多種多様な物質が含まれており、どの微粒子・成分がどの細胞にどのような反応を起こさせているのか正確に捉えるための技術開発が進行中である。

#### 【内因性微粒子：EVs、エクソソーム】

内因性の微粒子として、ほとんど全ての細胞が細胞外に放出する膜小胞である細胞外小胞 (EVs) に注目が集まっている。EVsは主にその生成機構に基づいて、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小胞に分類される。しかし、細胞外に分泌されたEVsの由来を同定することは難しく、EVsをサイズで分画、分析することで脂質二重膜を持たないexomere、小さいエクソソーム (Exo-S)、大きいエクソソーム (Exo-L) に分類できることも報告されている<sup>14)</sup>。EVsの分類に関する定義にはまだ曖昧な部分があるが、国際細胞外小胞学会 (International Society for Extracellular Vesicles: ISEV) が主導して整理が進んでいる<sup>15)</sup>。

EVsの中でも、エクソソームに関する研究が加速度的に進展している。2010年に280報であった論文数は、2015年に1,100報、2021年には5,000報を越え、様々な生理機能や病態発症との関連が示唆されるとともに、その知見を診断や治療に利用する研究開発が進んでいる。

エクソソームの機能、応用に向けた研究が最も進んでいるのががんの領域である。膵臓がん由来のエクソソームは正常細胞を悪性形質転換させることが示され、膵臓がん細胞が分泌するエクソソームに内包され形質転換に関与するタンパク質が同定されている<sup>16)</sup>。がん細胞から放出されるエクソソームに内包されるmiRNAが腫瘍内から血管新生を誘導して増殖、転移に関与すること<sup>17)</sup>、転移性がん細胞から分泌されるエクソソームには特定のタンパク質が多く含まれ、それらが前転移ニッチの形成を促進していること<sup>18, 19)</sup>などが示されている。また、乳がん細胞が分泌するエクソソームに内包されるmiRNAのmiR-155が脂肪細胞のベージュ化、褐色化を促進、PPER  $\gamma$  発現抑制による代謝リモデリングを誘導してがんの悪液質に関与することが示唆されている<sup>20)</sup>。このように、エクソソームが発がん、悪性化に関与することが次々に見出されている。

また、神経変性疾患では、原因タンパク質と考えられる異常な凝集タンパク質がエクソソームによって細胞外へ放出され、周囲の細胞に伝播することが明らかとなっている<sup>21)</sup>。ウイルスが生体内で細胞間を伝播する過程でも、エクソソームがウイルスのゲノムやタンパク質などを感染細胞の周囲の細胞に送達し、ウイルスの生存に有利に働いていると考えられている<sup>22)</sup>。免疫系においては、免疫細胞間での抗原情報の交換や、免疫細胞の活性化・不活性化など、様々な免疫機能制御に関与する可能性が示されている<sup>23)</sup>。

このように、様々な疾病にエクソソームが関与し、疾病によってエクソソームに内包される、あるいは膜に存在する機能性分子の種類や量の変動することから、疾病の検出や予後予測、また治療標的としてなど、その応用が広く期待されている。エクソソームに内包あるいは膜に発現するRNAやタンパク質などの機能性分子は安定に保持され、疾病によりその量や種類が変動することから、疾病の検出や予後予測のバイオマーカーとして有望視されている。例えば、診断が難しい筋痛性脳脊髄炎、慢性疲労症候群患者において、血漿中EVs量が増大しており、特徴的に内包されるtalinやfilamin-Aなどアクチンネットワークタンパク質がバイオマーカーとなる可能性が報告されている<sup>24)</sup>。臨床応用に向けて最も研究開発が盛んなのががん診断の領域である。米国Exosome Diagnostics社は、非小細胞肺癌に対するALK阻害薬のコンパニオン診断として血液由来エクソソーム中RNA検出をベースとしたExoDx Lung (ALK)を2016年に上市、さらにExoDx Lung (T790M)、ExoDx Lung (EGFR)、尿由来エクソソームRNAを解析するExoDx Prostateも開発した。いずれも自家調製検査法 (Laboratory Developed Test : LDT) として利用されている。ExoDx Prostateは、2019年にFDAから画期的医療機器/デバイス指定を受け開発中である。わが国では、2014年度から国立がん研究センターがNEDOの支援の下、東レ社、東芝社、アークレイ社など9機関と共同で体液中miRNA測定技術基盤開発事業を開始した。血液中エクソソームのmiRNAを独自の電気化学的検出技術を活用して解析し、膵臓がん、乳がんなど13種類のがん患者と健常者を2時間以内に高精度で網羅的に識別できることが確認され、現在、社会実装に向けた実証試験が各参画企業で進められている。さらに、AMEDの研究支援を受けて、大腸がんやすい臓がんの早期発見を可能にするエクソソームの表面タンパク質の解析も進み<sup>25, 26)</sup>、これらの成果は、国内のアカデミア発ベンチャーであるテオリアサイエンス社からLDTとして上市され、国内でのエクソソームに診断による消化器がんの早期発見の検証が進みつつある。

また、神経細胞由来エクソソームには、タウや $\alpha$ -シヌクレイン、TDP-43など、神経細胞内で凝集することによりアルツハイマー病やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症の発症原因となるタンパク質が含まれており、各疾患の発症との関連性が注目されている。現在、脳由来のエクソソームを用いた研究や診断には、腰椎穿刺によって採取した脳脊髄液を用いられるが、脳由来エクソソームの一部が末梢血にも検出される可能性が示され、それらのマーカーとしてNCAM1やL1CAMなどが報告されている<sup>27)</sup>。さらに、尿中のエクソソームは腎臓や前立腺、膀胱疾患の新たな診断マーカーとして、髄液中のエクソソームは脳内の腫瘍や神経変性疾患マーカーとして、羊水中のエクソソームは胎児の状態を反映するマーカーとして期待されるなど、様々な体液を用いたバイオマーカーの開発が活発に行われている。

エクソソームが疾病のメディエーターとして機能することから、エクソソームの分泌を抑制することが新しい治療法になるとして注目されている。例えば、既存薬のドラッグリポジショニングでエクソソームの生成、分泌を制御することを目的に、前立腺がん細胞で4580化合物のハイスループットスクリーニングを行い、エクソソーム生成阻害剤候補5化合物、生成活性化剤候補6化合物が見いだされている<sup>28)</sup>。さらに、がん特異的制御を目指した検討として、前立腺がん細胞では、miR-26aとその制御遺伝子であるSHC4、PFDN4、CHORDC1がエクソソームの分泌を制御していることが同定され<sup>29)</sup>、治療標的となる可能性が示されている。

また、様々な細胞への分化能を有していることから再生医療において応用が進んでいる間葉系幹細胞治療の効果は、移植した細胞由来のエクソソームに内包されるmRNA、miRNA、タンパク質、脂質を含む液性因子に因ることが示唆されており<sup>30)</sup>、エクソソームを治療薬として利用する検討も進んでいる。間葉系幹細胞由来のエクソソームは肝臓疾患や腎臓疾患における組織の線維化を抑制するほか、心疾患やアルツハイマー病などにも治療効果があると報告されている<sup>31, 32)</sup>。オーストリアCelericon Therapeutics社は臍帯由来間



葉系間質細胞が分泌するエクソソームによる人工内耳手術後の神経保護、線維化抑制効果を検証する臨床試験を2019年に開始している。オーストラリア Exopharm 社は血小板由来エクソソームで創傷治癒効果を評価する臨床試験を2020年に開始したことを発表している。エクソソームの再生医療への応用研究は、臨床研究として世界中で開始されており、特にCOVID-19のパンデミックにより、中国などではサイトカインストームの抑制や感染症の治療効果を目指した間葉系幹細胞のエクソソーム治療の臨床試験が走っている(17件)。その他、心疾患(4件)、神経疾患(3件)、免疫疾患(4件)、創傷治癒(2件)など、NIHの臨床研究のサイトでは、合計54件のエクソソーム治療に関する臨床研究のエントリーが確認できる<sup>33)</sup>。国内では、何件かがPMDAとの事前相談や対面助言に進んでおり(慈恵会医科大学の呼吸器内科による気道上皮細胞由来のエクソソームによるIPF治療など)、非臨床試験から臨床試験(医師主導型)までの工程が着々と進められている。

エクソソームはリポソームなどとは異なる、天然のDDSとしても期待されており、siRNA、miRNAあるいは低分子化合物などを目的の細胞へ送達する試みが盛んになっている。エクソソームの膜表面には様々な細胞接着分子や糖鎖が発現しており、その発現様式によって、エクソソームがどの細胞と親和性があるかが明らかになりつつある。さらに、エクソソームの特性を改変・応用することによる新規DDSの開発が行われている<sup>24, 34, 35)</sup>。米国Codiak BioSciences社は、エクソソーム膜に治療用あるいはターゲティング用タンパク質を発現させる技術を有しており、Prostaglandin F2 receptor negative regulator (PTGFRN)を高発現させたエクソソームにSTINGアゴニストを内包し、がんで抗原提示細胞特異的にSTING経路を活性化させるexoSTING、および表面にIL-12を発現させたエクソソームでIL-12ががん局所で作用するexoIL-12を開発し、2020年9月に臨床試験が開始されている。また、米国PureTech Health社は、ウシ乳汁由来のエクソソームを、従来経口投与が困難であった核酸、ペプチド、低分子などの経口投与化するキャリアとして開発している。2018年、スイスHoffmann-La Roche社は核酸医薬の経口投与製剤化にこの乳汁由来エクソソームの利用を検討することを発表し話題となった。また、韓国のアカデミア発ベンチャーのILIAS社では、効率よく目的とするタンパク質などをエクソソームにパッケージングする独自の技術を開発し<sup>36)</sup>、炎症、がん、神経疾患で複数のドラッグパイプラインの開発が進んでいる。

上述のように、EVs、エクソソームに関する様々な研究開発が行われているが、EVsの製造・分離・解析のための効率的かつ標準的な技術が十分でないことがボトルネックとなっている<sup>37-39)</sup>。体液を扱う場合、EVsは多くのタンパク質や類似した物理的・化学的な特性を持つ細胞と共存しており、EVsの分離は本質的に複雑なものとなる。現在用いられている主な分離方法は、EVsの密度や大きさ、特定の表面マーカーの違いを用いる分離方法であり<sup>40)</sup>、超遠心法、沈殿法、ろ過法、サイズ排除クロマトグラフィー法、イムノアフィニティ(抗原抗体反応)法がある。

超遠心法は、細胞、EVs、タンパク質の密度と大きさの違いを利用する分離法である。EVsの回収には、通常、超遠心機を用いる分離法が用いられる<sup>40, 41)</sup>が、回収時間やスループットに大きな難がある。細胞やアポトーシス体、EVsの大きな小胞画分は、標準的な遠心分離法(<20,000 g)で分離可能であるが、タンパク質などからエクソソームを精製するには、超遠心分離(>100,000 g)を行う必要がある。本手法は大きな回転速度と長い操作時間(約5時間)が必要なのが欠点である。また、超遠心分離法では、エクソソームの回収率が低く、タンパク質凝集体が共沈するという欠点がある。超遠心分離法の追加技法として、シヨ糖密度勾配遠心分離法がエクソソームの分離純度効率を向上させるために使用される<sup>42-44)</sup>。

回収時間やスループットに難がある超遠心分離法以外の方法として、沈殿法が開発され、EVs・エクソソーム単離キットが販売されている(例えば、Exo-spin™、ExoQuick™ Exosome precipitation、Total Exo-some Isolation Reagent from Invitrogen™、PureExo® Exo-some Isolation kit、miRCURY™ Exosome Isolation kit)。これらは、EVs・エクソソームの沈殿を誘導するために特別な試薬(例えば、高分子添加剤)を使用しており、標準的な遠心機(約10,000 g)で30分以内に単離を行うことが可能である。沈殿法と超遠心分離法の分離効率を比較し、市販キットが高い分離効率を示すことが報告されている<sup>45-47)</sup>。

しかし、沈殿誘導試薬が残留することで、EVs・エクソソームの生物学的活性および特性に影響を与える可能性が指摘されており、重大な欠点となっている<sup>48, 49)</sup>。

ろ過法としては、メンブレンフィルター（例えば、polyvinylidene difluoride (PVDF) またはポリカーボネート、細孔径：約50～450 nm）が、生物学的サンプル中の細胞およびEVsの大きな小胞成分の分離に使用されている。ろ過法は、膜を用いて細胞やEVsの大きな小胞分画をふるいにかけ、その後、超遠心分離によりタンパク質からEVsの小さな小胞分画・エクソソームを分離する超遠心分離と組み合わせて使用されることが多い<sup>47, 50, 51)</sup>。超遠心分離を行わないため、タンパク質凝集体からEVsの小さな小胞分画・エクソソームを分離する手段として、限外ろ過（例えば、Amiconフィルター、100 kD MWCO）が使用されることもある<sup>47, 52)</sup>。ろ過法は一般的に超遠心分離法よりも迅速に処理可能であるが、操作手順の最適化が行われていない場合、目詰まりの影響により収率が低下する恐れがある<sup>40, 47)</sup>。

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）法は、EVs・エクソソームをタンパク質凝集体から分離するために使用されている。一般的に、細胞やEVsの大きな小胞分画を除去するため、最初に遠心分離やろ過を行い、その後、サイズ排除カラムを使用してEVsの小さな小胞分画・エクソソームの分離が行われる<sup>47, 52-55)</sup>。タンパク質のような小さな物質は固定相に長く保持されるが、より大きな物質（EVsの小さな小胞分画・エクソソーム）は早く溶出するため、EVsの小さな小胞分画・エクソソームの分離は、特定の時間に溶出する画分を回収することで達成可能である。SEC法を用いて分離するエクソソームは不純物が少ないという報告もあるが、最適な効率を得るためには適切な固定相のマトリックスの選択が不可欠である<sup>54)</sup>。

イムノアフィニティ分離法は、EVsの特定の表面マーカの違いを用いて分離する方法である。EVsは、起源細胞に特異的なマーカを含んでおり、抗原抗体反応が利用可能な場合がある。一般的なイムノアフィニティに基づく分離法は、体液中の特定のマーカを含むEVsを捕捉するために抗体コーティングされた磁気ビーズを利用して行われる。本手法は、EVsの特定のサブ分画を分離することを可能にするが、大量の生物学的サンプルからEVsを分離する場合には適していない<sup>40)</sup>。

これらの従来の分離方法は、専用の実験装置あるいは実験試薬や多段階の作業工程を必要とし、臨床現場でのルーチン診断ツールとしてEVsを解析することは多くの困難を伴っている。マイクロ流体システムは、これらの欠点を克服する可能性があり、臨床検体のEVs・エクソソームの迅速な分離・分析や診断や治療のためのアプリケーションが期待されている。また、マイクロ流体システムは、分離・分析のための多目的プラットフォーム提供だけでなく、複数のプロセスの統合と簡素化や、クロスコンタミネーションのリスク低減も期待される。現在、様々なマイクロ流体プラットフォームが世界中で開発されている。特に、急激にエクソソーム医薬品開発のための臨床研究が走り出したため、世界各国の大企業はCDMOビジネス、つまりエクソソーム医薬品のためのGMPグレードの細胞の大量培養を含むupstream から、TFFなどと陰イオン交換樹脂カラムを組み合わせたエクソソーム精製のdownstreamまでをカバーするシステム構築を加速させており、Lonza社がCodiak BioSciences社のエクソソーム製造設備を買収し、長期戦略的協力体制を確立したのに続いて、AGCバイオリオジクス社とルースターバイオ社がエクソソーム製造加速に向けた戦略的パートナーシップを提携するなど、世界の競争が激化している。

### 【内因性微粒子：MVs】

1960年頃より細菌外に細胞膜成分が放出されていることが報告され、MVsの存在が示唆されていた。その後、電子顕微鏡によって微細構造が確認され、様々な細菌でその生産が確認された。MVsの免疫原性や宿主への毒性が明らかになるにつれ、細菌の病原性との関わりが研究されるようになった。その結果、病原性細菌においては、MVsには特定の毒素が濃縮され、宿主細胞に運搬されることが明らかとなった<sup>56)</sup>。2010年頃からは、急速に発展してきたタンパク質の網羅的解析が様々な細菌で行われるようになり、その解析結果からMVsの機能や形成機構を推定する研究が盛んに行われた。その結果、MVsと細胞膜は異なるタンパク質の組成を持つことが示唆され、MVsの膜組成の生化学的な解析と合わせて、MVsに特異的に物質が取り込まれることが議論されている。また、タンパク質の網羅的解析により、同じ細菌の間でも増殖する環

境によってMVsの中身が変わることが明らかとなり、環境に応じたMVsの形成機構や役割があると考えられるようになった。2014年には海洋などの環境中にもMVsが豊富に存在することが明らかとなり、生態システムでの物質循環への寄与が注目されるようになった<sup>7)</sup>。

MVsの中身として、DNA、RNA (mRNAs, rRNAs, tRNAs, small RNAs (sRNA))、タンパク質、情報伝達物質、抗生物質などが報告されており、それらのほとんどはMVsを受容した細胞で機能することが確認されている。例えば、DNAについては、細菌はお互いに遺伝子のやりとりを種の壁を超えて行うことが可能であり、これは遺伝子の水平伝播と呼ばれている。遺伝子の水平伝播は生物の進化を考える上で、非常に重要なテーマである。一方で、薬剤耐性遺伝子の伝播にも関わっていることから、医療分野においては問題視されている。遺伝子の水平伝播がおこるメカニズムはいくつか存在するが、MVsもそれを媒介する新たな機構として報告された<sup>57)</sup>。さらに、MVs自体も抗生物質を吸着、分解し、細菌が抗生物質から逃れるのに役立っていることが明らかとなっている。

RNAについては、早くからMVsにRNAが含まれることが明らかになってきたが、RNAシーケンシング技術の急速な発展によって、その解析が進んでいる。さらにMVsに含まれるいくつかのsRNAは宿主のmRNAに対して相補配列を持っており、タンパク質の発現を阻害することが報告されている<sup>58)</sup>。従って、細菌のMVsは界を超えてタンパク質の発現制御に直接的に影響を与える可能性がある。

情報伝達物質については、2005年には細菌間コミュニケーションで用いられるシグナル化合物がMVsによって運搬されていることが明らかになり、MVsを介した細菌間情報伝達機構が発表された<sup>6)</sup>。その後、情報伝達物質が高濃度にMVsに濃縮されていることも明らかとなり、細菌に様々な情報伝達の形式があることが分かってきた<sup>59)</sup>。

上記のようなMVsの普遍性と多様な機能が明らかになってくるにつれ、MVs形成機構の解明に力が注がれることとなった。細菌の構造は、グラム陰性菌とグラム陽性菌で大きく二分される。グラム陰性菌は内膜と外膜の二重膜を有し、外膜が外側に露出している。グラム陽性菌は細胞質膜のみを有し、細胞質膜は厚い細胞壁で覆われているため、MVsを形成しないと長らく思われ、MVs形成機構はグラム陰性菌を中心に研究されてきた。グラム陰性菌においてMVs形成に影響を与える因子はいくつか同定されており、電子顕微鏡解析と生化学的解析により、細胞膜がたわんで出芽するようにしてMVsが形成されると考えられた<sup>4)</sup>。その後、超解像顕微鏡の開発によってMVsの形成過程を細胞が生きたまま観察できるようになり、MVs形成過程が詳細に解析されるようになってきた。その結果、細胞外膜がたわむ機構に加えて、溶菌を介したMVs形成機構が存在することが明らかになった<sup>60)</sup>。この溶菌機構には、細胞壁の分解酵素であるエンドリシンが関わっている。エンドリシンは、MVs形成因子としては最も広く細菌に保存されており、細菌に感染するファージが宿主細胞を壊して外に出て行く際に用いられる。2017年には、グラム陽性菌のMVs形成にもエンドリシンが関わるということが明らかとなり、グラム陽性菌のMVs形成機構がはじめて明らかとなった<sup>61)</sup>。さらに、グラム陽性菌のうち外膜を有するミコール酸含有細菌においても、エンドリシンがMVs形成を誘導することが明らかとなった。エンドリシンを介したグラム陰性菌とグラム陽性菌におけるMVs形成機構はいずれも集団の一部の細菌の細胞死を伴い、細菌における細胞死の新たな役割を示した。単細胞生物である細菌においてもMVs形成機構はいくつか存在しており、環境に応じてそれらを使い分けていることが分かってきている。MVsはこれまで一括りに扱われてきたが、形成機構によってMVsの中身が異なることから、2019年にはMVsの分類が提唱された<sup>62)</sup>。2021年にはMVで初めての国際会議 (EMBO workshop) が日本で開かれ、MVの種類が機能とどのように結びついてくるかについて、一つの大きな議論となった。



#### (4) 注目動向

##### [新展開・技術トピックス]

##### 【内因性微粒子：EVs、エクソソーム】

###### • 研究ガイドライン整備

エクソソームは細胞のエンドサイトーシスの過程で多胞性エンドソームから産生、細胞外に分泌されるEVsのひとつである。しかし、マイクロベシクルなど他のEVsと厳密に分離することは困難であり、EVsが沈降する遠心力の違いによって、small EVs（超遠心100,000 × gペレット画分：エクソソームに相当するサイズの粒子が沈降）、medium EVs（中間速度遠心20,000 × gペレット）およびlarge EVs（低速度遠心2,000 × gペレット）という呼称も提案されている<sup>63)</sup>。エクソソームは、検出、単離が難しく、さらに分類の曖昧さがあるため、文献ごとにエクソソームと呼んでいるEVsが一致しておらず、実験データの解釈や再現性の確認を困難にしている。2012年に設立された国際細胞外小胞学会（ISEV）が、EVsに関するPosition paperを発表し、ガイドラインを整備している<sup>15)</sup>。

###### • 細胞外小胞の新たな分離法・精製法の開発

エクソソームの膜表面に特異的に発現しているリン脂質ホスファチジルセリンと結合する分子を用いることで、超遠心法などの従来法と比較して、100倍以上高純度にエクソソームを精製かつ高感度にエクソソームを検出する技術が開発され、富士フイルム和光純薬社より、国産試薬として世界販売が開始されている<sup>64)</sup>。また、この他にも微粒子の粒径、形状、電荷などの特性を利用して分離するさまざまな方法が模索されつつある。

###### • 研究対象生物の拡大

これまでのエクソソーム研究は主に哺乳類などの動物を対象とした研究が行われてきたが、近年、植物もエクソソーム様のEVを放出することが明らかとなった。このエクソソームを用いることで、植物にとって有害となる真菌の増殖や毒性を抑制し、自身の防御を担う可能性が示唆されている<sup>65, 66)</sup>。また、ヒトが摂取する食物に含まれるエクソソームの生体に与える機能なども検討が進んでおり、摂取した植物由来のエクソソームが腸内微生物叢組成や宿主の生理機能に影響することが報告されている<sup>67)</sup>。

###### • 個別の細胞外小胞に含まれる分子の網羅的解析

細胞外小胞の個性を理解する重要性が認識されるにつれ、それらを1個1個独立に単離し、その中に含まれる分子を分析する技術が求められている。微細加工技術などを利用し流体中で単離するデバイスや、バーコードなどのタグをつけて単離する方法など、模索が続いている。1個の小胞に含まれる分子を分析する手法は課題であり、従来のオミクスの技術の延長では限界がある。金属近接場を利用した増強ラマン散乱法には期待がもたれる。個別の細胞外微粒子の表層タンパク質を、蛍光抗体を用いて解析する装置が最近市販された。

###### • EVsのライブイメージング

EVs形成のメカニズムを知るために有力な方法として、ライブイメージングが挙げられる。直径200 nm以下のエクソソームを観察するためには超解像イメージングが必須であり、その生細胞への適用が課題であったが、わが国では高速超解像のライブイメージング技術がすでに開発されており、その利用に期待がもたれる。また、一細胞観察チップを利用して、細胞外に放出された微粒子を実時間観察する手法が開発された。

###### • 内因性細胞外微粒子の新しい形成メカニズムの解明

多胞体由来のエクソソーム以外に、細胞外小胞が形成されるさまざまなメカニズムが想定されているが、その実態はまだまだ不明な点が多い。その解明を目指す細胞生物学的な基礎研究が進みつつある。

###### • エクソソームへの積荷選別機構の解明

エクソソームにはmRNA、miRNA、タンパク質など様々な機能性分子が内包される。しかし、その組成は必ずしも分泌由来細胞と一致しないことが知られている<sup>68, 69)</sup>。多胞体において内腔小胞に特定の分子が選別されるメカニズムは、まだ多くが謎に包まれているが、いくつかのRNA結合タンパク質の関与が示されるなど、

研究が進みつつある。

#### • データベースの構築

研究者間で評価の対象とするエクソソームが異なることから、論文における実験条件を記録する EV-TRACK というデータベースが公開されている。また、エクソソームの生成細胞、組成、含有物などに関するデータベース (ExoCarta、Vesiclepedia、EVpedia) の構築が進んでいる。

### 【内因性微粒子：MVs】

#### • MVsを利用したワクチン開発、新しい療法

MVsは免疫を活性化させることが様々な細菌で確かめられている。その性質を利用して、髄膜炎菌のワクチン開発がいち早く着手され、BEXSERO®として商品化されている。MVsワクチン開発に資する新たな技術も出てきており、COVID-19を含め、感染症に対するワクチン開発が世界中で加熱している。また、2017年には大腸菌由来のMVsにがん抑制効果があることが分かり、新しい免疫療法を提示した<sup>70)</sup>。そのメカニズムは分かっていないものの、MVsはがん細胞に蓄積しやすいことも知られており、特定の細胞を標的とした薬剤輸送システムのプラットフォームとしてもMVsは注目を浴びている。

#### • 生体内や腸内のMVsの解析

環境DNAの解析は生態システムを理解する有力な方法であるにも関わらず、DNAがどのような状態で環境中に存在するのかについて不明な点が多い。MVsが環境遺伝子プールになっている可能性も含め、環境DNAの形態を理解する必要がある。また、MVsは生体の体液中や腸内に存在が確認されているが、それらの機能のほとんどが未解明である。機能解明に向けた第一段階としてMVsの精製が重要となるが、生体由来膜微粒子からの細菌MVsの分離が課題となっている。密度勾配遠心による分離の有効性が示されているが、改善の余地があり技術革新が待たれる。

### [注目すべき国内外のプロジェクト]

#### • The International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)

細胞外微粒子に関わる研究者の情報交換の場として、2012年にスウェーデンで発足した国際学会であり、毎年Annual Meetingを開催している。“EV in immunology” (2020年3月)、“EV imaging *in vivo*” (2020年9月)や、ISEVxTech: EV Technology & Methods Summit (2022年11月)など、特化した領域のワークショップなども開催している。2012年に発刊されたオフィシャルジャーナルであるJournal of Extracellular Vesicles (JEV)は急速に発展し、今や世界の細胞生物学のジャーナルランクの上位を占め、3年間の平均インパクトファクターは20を超えている。また姉妹誌である、エクソソームバイオロジーにより特化したJournal of Extracellular Biology (JExBio)も2021年に創刊された。

#### • 日本細胞外小胞学会 (JSEV)

2014年に日本国内のエクソソーム研究の推進を目的に、ISEV設立にも貢献し、オフィシャルジャーナルのJEV編集委員を長年務める落谷孝広を中心に日本細胞外小胞学会が設立された。2022年には第9回のannual meetingが開催され、400名近くの参加者のもとに国内の最新の研究成果が討論され、また多くのエクソソーム関係の企業展示が行われた。

#### • Extracellular RNA Communication

米国NIH common fundによる研究プログラムとして2013年に開始された。資金提供を受けた研究者はExtracellular RNA Communication Consortium (ERCC)を発足させている。細胞外RNAの分泌、輸送、受容細胞に与える影響などに関する生物学的原理確立や臨床的有用性の評価を目的としていた。2019年より第2期として延長されており、細胞外RNAを運ぶEVsとの複合体の理解やそのためのツール、技術開発が行われている<sup>71)</sup>。



### • American Society for Exosomes and Microvesicles

米国にて 2012 年に発足したエクソソームやマイクロベシクルに関する学会であり、学会誌 Matters を出版している。上述の Extracellular RNA Communication Consortium と連携している。その他、欧州では、ドイツ、フランス、オーストリア、英国、ベルギー、オランダで、アジアでは、韓国、シンガポールで同様の学会が活動している。

### • JST-CREST/さきがけ「細胞外微粒子に起因する生命現象の解明とその制御に向けた基盤技術の創出」(2017～2024年度)

EVs、MVsをはじめとした内因性微粒子とPM2.5などの外因性微粒子を研究対象とし、これらの細胞外微粒子に対する生体応答機序の解明や、その解明において必要な各種計測技術の開発、微粒子の体内動態制御による将来の医療や産業応用等に向けた基盤研究を推進する。また本領域の特色として、内因性微粒子と外因性微粒子の研究コミュニティの融合を掲げ、生体応答に共通する原理発見や、相乗効果による生命現象の解明など、分野横断的なアプローチによる研究進展を目指している。

### • 農林水産省「細胞外小胞を用いた農水包括的好循環サイクルの機能性強化のための革新的研究開発プラットフォーム」(2018年～)

牛乳や発酵食品など動物由来のエクソソームに加え、野菜や果実などに含まれるエクソソームの機能解析によって、農作物の機能向上やヒトの健康長寿の実現を目指す。

### • AMED「感染症実用化研究事業」、「次世代がん医療創生研究事業 (P-CREATE)」

2020年度からそれぞれの事業で「抗線維化・再生誘導剤の開発：臨床を見据えた肝硬変に対する間葉系幹細胞由来のエクソソームを用いた次世代治療法開発への基盤研究」「細胞外脂質代謝酵素によるエクソソームの脂質修飾を介したがん微小環境の制御」がスタートしている。さらに循環器疾患領域においても、「循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業」によりエクソソームによる重症化予測マーカーとしてエクソソームの研究開発（高齢化・生活習慣病時代における末梢動脈疾患の動脈硬化重症度とその全身重複性を反映するバイオマーカーの開発）が開始されている。

### • 日本再生医療学会

日本再生医療学会は、2021年3月に「エクソソーム等の調製・治療に対する考え方」の提言をまとめると同時に、その内容を論文として発表した<sup>72)</sup>。

### • PMDA

PMDAも急増するエクソソーム研究や医薬品開発の現状を察知し、2021年8月にエクソソームを含む細胞外小胞 (EV) を利用した治療用製剤に関する専門部会を設置し、エクソソーム治療のレギュレーションに関する議論を開始した。6回の委員会が開かれ、専門家を交えた議論が尽くされた<sup>73)</sup>。近く報告書が公開される予定。

## 【内因性微粒子：MVs】

### • さきがけ「生体における微粒子の機能と制御」

微生物関連の課題が2019年度からスタートした。

### • ERATO 深津共生進化機構プロジェクト

2019年10月に開始されたプロジェクトの中で、MVsが細菌と宿主の共生で担う役割に関連して、マイクロバーム制御技術の開発研究が開始されている。

### • サントリー生命科学財団の SunRiSE

2020年4月からは、MVsの基礎的な研究に関するプロジェクトが始動した。

### • 科研費の挑戦的研究 (開拓)

MVsを物質生産やワクチン開発のプラットフォームとして利用するプロジェクトとして、2020年度、2021年度からそれぞれ研究が進められている。

- ERC “OMVac”

MVsの生体への影響が明らかになる一方で、MVsを基盤としたワクチン開発が非常に活発化し、ERCがサポートする大型プロジェクト“OMVac”が2014年から5年計画で実施され、一部計画の延長が決まっている。

- オランダ Intravacc

オランダ保健福祉スポーツ省によって設立された Intravacc (Institute for Translational Vaccinology) が中心となって、MVsを利用したワクチンの研究開発を行なっている。

- MVsに関する国際学会 (EMBO work shop)

2021年11月に世界で初めてのMVsに関する国際学会 (EMBO workshop) が、“Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions, and medical applications”と題してつくばで開催され、26カ国から200名近い研究者が参加した。

## (5) 科学技術的課題

### 【外因性微粒子：M2.5 など】

- 外因性微粒子の生体応答

外因性微粒子にはPM2.5、花粉、黄砂といった、無機物、有機物を問わない多種多様なものが含まれ、これらが生体にどのような影響を及ぼすのかは、ほとんど解明されていない。これらの微粒子に対する生体応答を担う主役は、マクロファージや好中球などの貪食細胞で共通しており、内因性・外因性微粒子に対する応答の相乗効果によって様々な炎症性疾患の発症が加速される可能性がある。エクソソームの生成を阻害することによって、その相乗効果を中和できれば、外因性微粒子に起因する喘息やアレルギーなどの治療法の開発に繋がる可能性がある。そのためには微粒子の精製と生体試料による実験系確立が必要だが、この問題に取り組む研究者の数は必ずしも多くはない。微粒子研究者とライフサイエンス研究者との共同研究が望まれる。

### 【内因性微粒子：EVs、エクソソーム】

- 1細胞/1粒子レベルでのエクソソーム解析技術

現在の技術で解析されるエクソソームは、様々な細胞が放出したエクソソームの総和であり、それらが平均化された解析しかできない。例えば、末梢血からエクソソームを単離し、病的細胞由来エクソソームの解析を行う場合、圧倒的多数の健常細胞由来エクソソームの影響によりバイオマーカーの検出感度が低くなる。よって、検査対象とする臓器や細胞に特異的なマーカーを用いたエクソソームの選別法の確立が求められる。さらに、1細胞/1粒子レベルでエクソソームを解析する技術の確立により、より感度の高い診断法の開発につながることを期待される。

- エクソソーム動態制御機構解明

生体内において、どのエクソソームがどこへ行くのかの生体内動態がほとんど解明されておらず、その動態を制御する分子機構の解明によって、より標的精度の高いDDSの開発に貢献する可能性を持っている。

- 特異的な除去方法の開発

病的細胞由来エクソソームを対象としたバイオマーカーの同定と、それらを用いた診断法の開発研究が盛んに行われている一方で、病的細胞由来エクソソームのみを特異的に除去する方法の開発はほとんど進展していない。病的細胞由来エクソソームに特異的な表面マーカーの同定により、正常細胞由来エクソソームに影響することのない除去法が開発が望まれる。

- エクソソーム内容物操作法の開発

エクソソームに内包される機能性分子を特異的に操作、改変できる技術は、エクソソームの機能解明および有効な機能発現に貢献する。

### • エクソソーム製造・品質保証方法の開発

エクソソームを治療薬やDDSのツールとして利用するためには、大量に安定した品質でエクソソームを調製することが必要である。産生する細胞の状態もエクソソームの品質に影響することから、厳密な培養条件の設定等が必要となる。エクソソーム産生量を増大させる手法なども期待される。また、超遠心法を使った単離・精製法を工業スケールで実施することは難しく、大量に処理できる方法論の確立が望まれる。さらに、エクソソームの品質（量、純度、粒度分布、均一性、力価、など）を厳密に規定する評価方法および考え方の確立が必要である。

## 【内因性微粒子：MVs】

### • MVsによるDNAやRNAの運搬

sRNAが細菌のMVsに含まれており、それらの一部は宿主細胞のタンパク質発現を制御することが報告された<sup>58)</sup>。また、植物が産生する細胞外微粒子によって伝達されるsRNAが真菌の病原タンパク質の発現を抑えることが見出されている<sup>66)</sup>。細胞外微粒子によって伝播する遺伝物質が生物界全体に渡って、界を超えたクロストークに関わっている可能性があり、その検証とそれらが生命ネットワークの中で果たしている役割を明らかにしていく必要がある。CRISPR-Cas9の研究で2020年にノーベル化学賞を受賞したエマニュエル・シャルパンティエを含め、多くの研究者が細菌のMVによるRNA輸送の研究に乗り出しており、競争が過熱する可能性がある<sup>74)</sup>。

また、抗生物質耐性遺伝子や病原性遺伝子の獲得は新興・再興感染症にも繋がるため、MVsを介した遺伝子の水平伝播を理解する必要がある。これらを踏まえ、MVs1粒子を対象としたシーケンシング技術の開発が必要となる。

### • ファージ（バクテリアに感染するウイルス）とMVsの関係の解明

MVs形成機構のひとつにファージが関わっていることが明らかとなった<sup>60, 61)</sup>。以前からMVsはファージの宿主への感染を防除することが報告されていたが、MVsがファージの宿主域を広げるのに役立っていることも報告された<sup>75)</sup>。さらにMVsによってファージが運搬されることも明らかとなり、ファージに対する機能性が注目されている<sup>61)</sup>。ファージやウイルスは宿主に対して極めて多様な働きかけを行っていることが次々に報告されており、その存在意義を捉え直す潮流ができています。MVs研究は新たなファージの位置付けを示す可能性がある。ファージとMVsの関係の解明は、細胞外微粒子研究全般に適応できる新たな概念を提供する可能性がある。

### • MVsによる中身の受け渡し

MVsによってその中身が他の細胞に受け渡されることはDNA、RNA、タンパク質や細胞間シグナル物質で解析されているが、その詳細な受け渡しのメカニズムは、最重要課題の一つであるにも関わらず、何も解明されていない。MVsは特異的に細胞に付着することも報告されており<sup>59, 76)</sup>、この機構を明らかにするためにはライブセルイメージングを含めた、観察技術開発が必要である。MVsの積荷の受け渡し機構を明らかにすることは、MVsがどの範囲の生物にまで影響を及ぼすのか、その機能性の理解に繋がるだけでなく、MVによる物質運搬制御の糸口が得られ、その成果はMVを模倣した人工微粒子の設計にも役立つ。

### • 腸内や生体内におけるMVsの働きの解明

腸内細菌はMVsを産生し、便からもMVsが回収されることから、腸内細菌のMVsが生体に影響を与えている可能性は高い。近年次々に腸内細菌の働きが明らかになっているなかで、MVsの機能はまだ注目されておらず、腸内細菌群と宿主の相互作用を解明するブレイクスルーが期待される。さらに、体液からもMVsは同定されており<sup>77)</sup>、生体内でのMVsの働きに注目が集まっている。今後、MVsの回収・精製技術の発展、さらには1微粒子解析手法の開発が必要である。

### • 土壌環境におけるMVsの働きの解明

これまでMVsは主に水環境で解析されてきた。土壌1gに100億匹もの微生物がいるとも言われているが、



土壌環境におけるMVsの解析は全く進んでいない。根圏微生物の働きなども踏まえると、土壌微生物のMVsは微生物間や微生物-宿主間相互作用に重要な役割を担っている可能性がある。腸内や生体内におけるMVsの機能解明と同様に、解析に当たった課題になるのは、土壌からのMVの回収・精製である。特にMVsの土壌粒子への吸着が問題になると思われるが、土壌からの細菌の単離やDNAの精製で様々なノウハウが蓄積されているので、こうした知見が応用できる可能性がある。

#### • MVsの種類と機能の多様性の解明

単一細菌種によって産生されたMVsであっても、その大きさや中身は不均一である。これは、MVs形成経路が複数存在することに由来すると考えられる。近年、異なる経路によって形成されたMVsは性質や機能が異なることが示唆されているが、現在までMVsは一括りに解析されてきた。今後、MVsの種類ごとに解析することで、MVsの本当の機能が明らかになり、その基礎的知見に基づいたより効果的な応用利用が見込まれる。この解明を促進させる基盤技術がMVsのソーティング技術と1MV粒子解析技術である。フローサイトメトリーを用いてナノ粒子を解析する技術の開発が盛んになってきており、発展が見込まれる。こうした技術は上記に挙げたMVsの不均一性や他の微粒子から見分ける技術にも転用できる。

#### • MVsを対象としたオミクス解析や化合物スクリーニング

メタゲノム解析やメタボロミクス解析など、これまで細菌の細胞に対して行われてきた解析の対象をMVsにすることで、細胞とは異なる情報を得ることができる。MVsに関するオミクス情報を蓄積していくことで、将来的には環境モニタリングのマーカーや生体での診断に使える可能性がある。さらに、MVsには特定の化合物が濃縮しやすい傾向も見られており、新規化合物スクリーニングの新たなターゲットとなり得る。

#### • MVsの改変および人工合成

MVsのワクチンや抗生物質の輸送体としての利用が世界で始まりつつあるが、MVsは不均一であるため社会実装には製品としての均一性を高める必要があるが、まだ世界の多くのMVsの（ワクチン応用も含めた）研究者はそれに気付いていない。一方、わが国のMVs研究者は、MVs生成機構の解明を通じて、その不均一性を証明し、その重要性をいち早く世界に発信している<sup>62)</sup>。MVs不均一性の質の理解にはアドバンテージがあり、MVsのワクチン利用についても海外との競争に打ち勝つことができると考えられる。そのためには分野融合によるMVsの改変や人工合成に取り組む必要がある。具体的には、リポソームを使用したDDSに関わる様々な分野の連携により、任意のタンパク質、核酸、その他の物質などを封入・局在化することができる、MVsをミミックした新たな人工膜粒子開発研究分野が必須となる。

#### • ナノチューブとMVsの関係の解明

MVsの他に細菌が細胞外に形成する膜構造体として、2011年にナノチューブと呼ばれる幅が50-70 nm、長さが数 $\mu$ mに及ぶチューブが報告された<sup>78)</sup>。ナノチューブは細胞間を架橋し、細胞質内の成分を交換できることが観察されている。その結果、抗生物質の分解に関わるようなタンパク質の交換も起き、受け取った細胞には抗生物質耐性など一過性の表現型が現れる。同様の構造物は多くの細菌で観察されているにも関わらず、ナノチューブの実体にはまだ不明な点が多い。ナノチューブとMVsは、互いの形成に関わっていることが示唆されている<sup>79)</sup>。また、共通して細胞壁の損傷がその形成や需要に関与することから<sup>80)</sup>、今後両者の関係も含めて基礎的な知見を蓄積する必要がある。

#### • イメージング技術の開発

数十から百nm程度の構造物の動態解析にイメージング技術の発達は欠かせない。MVsの動態解析にはクライオ電子顕微鏡のようなスナップショットでの高分解能イメージングだけでなく、生理状態の液体中でブラウン運動するMVsを高速、経時的にライブ観察できる顕微鏡が求められる。ウイルスやMVsのような通常の光学顕微鏡の分解能以下の物体であっても蛍光染色することにより観察可能であるが、蛍光退色やサンプル固定化など安定した実験データを得るには課題が多い。そのため、顕微鏡のみならず、サンプルの固定技術やマイクロ流体デバイス、蛍光試薬など、サンプルを観察するのに伴う技術の開発も必要である。また、得られた画像から正しく情報を引き出すには画像解析が必要であり、観察技術、解析技術の両輪からなるイメー

ジング技術開発が必要である。

## (6) その他の課題

### • 研究体制

エクソソーム研究は、世界中で加速度的な広がりを見せており、欧州の研究者を中心として国際細胞外小胞学会 (ISEV) が設立された。その支部として日本細胞外小胞学会 (JSEV) が設立されている。このような取り組みにより、エクソソームを研究する日本人研究者は徐々に増えており、研究者コミュニティの形成がなされつつある。今後、工学系など異分野の研究者が加わることによって、本研究分野の更なる活性化が期待される。特に、JST の戦略的創造研究推進事業の開始に伴い、多くの研究者が新たに参入しているが、一時的なブームで終わらせるのではなく、情報や技術を共有するなど有機的な連携を取ることによって、研究を支援する体制の構築が重要である。とくにさきがけでは若い気鋭の研究者達が挑戦的な課題に取り組んでいるが、基本的に個人研究であり、しかも3年半という短期間の資金しか保証されないため、優秀な人材への継続的なサポートが可能なシステムが求められる。CRESTの馬場総括の提案により、研究計画が折り合えば、さきがけ終了研究者が最長2年間CRESTチームに加わることを可能とする制度が始まり、その成果が期待される。

### • コンセンサス形成

エクソソームの検出や単離の難しさ、さらには種々の分類方法があるため、どの細胞外小胞をエクソソームと呼ぶのかは、未だに世界中でコンセンサスが得られておらず混乱している。国際基準のMISEVガイドラインに従った研究手法の共通化は有用であるが、同時に、ガイドラインに基づく新たな研究手法の開発も非常に重要である。特に、現在の主流である超遠心法やPEG沈殿法を用いたエクソソームの単離法では、多くの夾雑物が混入している為、これらのエクソソームを用いた実験結果が、真にエクソソームの機能を反映しているとは厳密には言い難い。革新的なエクソソーム解析技術の確立と普及が早急に求められている。

### • 制度整備

国内外の規制当局はエクソソームに関する規制ガイドラインを整備していない。創薬モダリティとしての位置づけ等、今後の課題である。また、ウシ・ブタなどの家畜や野菜・果物に含まれるエクソソームの人体への影響が解明されるに従い、それらを用いた予防法や治療法などの開発が行われる可能性がある。エクソソームの中にはRNAやDNAが含まれており、これらの異種の遺伝子情報がヒトのゲノムに与える影響や継代的影響は明らかになっていない。遺伝子治療などに準じた法整備が必要になるのか否か、今後の検討が必要になるであろう。

## (7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>AMEDや文部省科研費でのエクソソームの基礎分野に対する支援が年々伸びており、医学生物学はもちろん、薬学、工学、さらに農学などの他分野に広がっている。</li> <li>MV形成に関する基礎研究は世界をリードしている。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>再生医療分野でエクソソームの応用研究が進展している。間葉系幹細胞の細胞治療はその上澄またはエクソソームに焦点を当てた治療研究として成長が見込まれ、国内のエクソソームの医薬品としてのレギュレーション整備がPMDAの専門部会などで進んでいる。</li> <li>エクソソームは皮膚科学や美容分野、さらには機能性食品の開発分野でも産業化への気運が高まっている。</li> <li>国立がん研究センターにおいて血中エクソソームのmiRNAをバイオマーカーとする乳がん診断の有用性評価が行われている。</li> <li>国内初のエクソソーム診断のLDTがアカデミア発ベンチャーから上市された (すい臓がんや大腸がん診断)。</li> <li>ワクチン開発に資する基盤技術研究も活発である。</li> </ul>

米国	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・リキッドバイオプシー技術をベースとした Grail 社など大手ベンチャーもエクソソーム診断の開発に着手している。</li> <li>・NIHのグラントにおいてエクソソームの基礎研究分野が台頭している。</li> <li>・MVsの生態的な役割についてNSFの大型予算がついて基礎的研究が推進されている。また、腸内細菌のMVsなど、生体内におけるMVsの役割について研究されている。</li> <li>・ムーンショット計画の中に、がん早期発見の項目が設けられ、エクソソームもその一つ。</li> </ul>
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・幹細胞を使った細胞治療を手掛けていた企業が、次々にエクソソーム治療に転換するなど、再生医療の分野での急伸はもちろん、すでにエクソソームの診断が上市されている。</li> <li>・コーネル大を中心にMVsの改良技術の開発研究が盛んである。これを基にもとに Versatope Therapeutics 社など細菌のMVsを利用したワクチン開発企業が設立され、MVsを基盤にしたCOVID-19ワクチンも開発されている</li> </ul>
欧州	基礎研究	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ウイルス関係や疾患バイオマーカー開発の基礎研究が盛んである。</li> <li>・スウェーデンのウメオ大などを中心にしてMVsの細菌感染症病原性への関与について盛んに研究され、現在のワクチン開発の流れに繋がっている。腸内細菌や病原性細菌など、宿主-細菌間相互作用に関する基礎研究が盛んである。</li> <li>・宿主-細菌間相互作用に関する基礎研究が盛んであり、MVsを体液や糞便から分離する試みがベルギーのゲント大を中心に行われている。</li> </ul>
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・複数の大学と企業が再生医療の分野で臨床試験のパイプラインを走らせており、エクソソーム創業に力を注いでいる。EUのエクソソームに対する予算は、応用研究が70%に上る。</li> <li>・オランダの Intravacc 社を中心にMVsを利用した感染症ワクチン研究開発が長年に渡って行われている。</li> </ul>
中国	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・2019年にエクソソームの学会が正式に発足し、エクソソームの教書が中国語で発売されるなど、若手基礎研究者の育成に努めている。</li> <li>・MVsの病原性への関与およびワクチン利用を目指した基礎研究が活発化している。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・再生医療関連の法律が改定され、間葉系幹細胞やエクソソーム治療の可能性が生まれ、多くのベンチャーや製薬企業が注目している。</li> <li>・COVID-19の治療薬として間葉系幹細胞のエクソソームが臨床研究に入っている。</li> <li>・臨床実験の規制が緩く、海外から優秀な研究者を迎え入れているため、MVワクチン研究が活発になるにつれ一気に研究開発が盛んになる可能性がある。</li> </ul>
韓国	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>・基礎研究の費用は十分ではないとの情報がある一方、毎年、エクソソームの国際シンポジウムを熱心で開催している。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ILIAS Biologics社などアカデミアベンチャーが多く立ち上がり、DDS応用に軸に創薬に力を入れている。またサムソンなどの資金をバックに、美容から皮膚疾患治療を扱うベンチャーがアトピー性皮膚炎の臨床試験を韓国国内で開始した。</li> <li>・がん免疫療法プラットフォームの利用を視野に入れたMVsの研究が浦項工科大を中心に精力的に行われている。</li> </ul>
その他の国・地域 (任意)	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>・オーストラリア、シンガポール、台湾、などのアジアパシフィックの国々も、エクソソームの基礎研究には引き続き、国が支援している。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・オーストラリアは、神経疾患やがんなどの分野でエクソソームの臨床応用を準備中である。シンガポールではエクソソームベンチャーが複数立ち上がり、国の支援のもと、がんの診断や間葉系幹細胞エクソソーム治療の治験を推進している。台湾も積極的にエクソソーム診断と治療を視野に入れた産業化を目指している。</li> </ul>

2.3

俯瞰区分と研究開発領域  
基礎基盤



## (註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

## (註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDS の調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：顕著な活動・成果が見えていない

×：特筆すべき活動・成果が見えていない

## (註3) トレンド ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

## 関連する他の研究開発領域

- ・バイオマーカー・リキッドバイオプシー（ライフ・臨床分野 2.1.7）
- ・生体関連ナノ・分子システム（ナノテク・材料分野 2.2.2）

## 参考・引用文献

- 1) Erwin Chargaff and Randolph West, "The biological significance of the thromboplastic protein of blood," *Journal of Biological Chemistry* 166, no. 1 (1946) : 189-197.
- 2) Rose M. Johnstone, et al., "Vesicle formation during reticulocyte maturation: Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)," *Journal of Biological Chemistry* 262, no. 19 (1987) : 9412-9420.
- 3) Hadi Valadi, et al., "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells," *Nature Cell Biology* 9, no. 6 (2007) : 654-659., <https://doi.org/10.1038/ncb1596>.
- 4) Carmen Schwechheimer and Meta J. Kuehn, "Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions," *Nature Reviews Microbiology* 13, no. 10 (2015) : 605-619., <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>.
- 5) Lisa Brown, et al., "Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi," *Nature Reviews Microbiology* 13, no. 10 (2015) : 620-630., <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>.
- 6) Lauren M. Mashburn and Marvin Whiteley, "Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote," *Nature* 437, no. 7057 (2005) : 422-425., <https://doi.org/10.1038/nature03925>.
- 7) Steven J. Biller, et al., "Bacterial Vesicles in Marine Ecosystems," *Science* 343, no. 6167 (2014) : 183-186., <https://doi.org/10.1126/science.1243457>.
- 8) Masanori Toyofuku, et al., "Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications," *Advances in Colloid and Interface Science* 226, Part A (2015) : 65-77., <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.08.013>.
- 9) Vipul Gujrati, et al., "Bioengineered Bacterial Outer Membrane Vesicles as Cell-Specific Drug-Delivery Vehicles for Cancer Therapy," *ACS Nano* 8, no. 2 (2014) : 1525-1537., <https://doi.org/10.1021/nn405724x>.
- 10) Aaron J. Cohen, et al., "Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015," *Lancet* 389, no. 10082 (2017) : 1907-1918., <https://doi.org/10.1016/S0140->

6736 (17) 30505-6.

- 11) Ching-Chang Cho, et al., "In Vitro and In Vivo Experimental Studies of PM<sub>2.5</sub> on Disease Progression," *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15, no. 7 (2018) : 1380., <https://doi.org/10.3390/ijerph15071380>.
- 12) Takehiro Michikawa, et al., "Japanese Nationwide Study on the Association Between Short-term Exposure to Particulate Matter and Mortality," *Journal of Epidemiology* 29, no. 12 (2019) : 471-477., <https://doi.org/10.2188/jea.JE20180122>.
- 13) Qin Li, et al., "Association between airborne particulate matter and renal function: An analysis of 2.5 million young adults," *Environment International* 147 (2021) : 106348., <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106348>.
- 14) Haiying Zhang, et al., "Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation," *Nature Cell Biology* 20, no. 3 (2018) : 332-343., <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0040-4>.
- 15) Clotilde Théry, et al., "Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018) : a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines," *Journal of Extracellular Vesicles* 7, no. 1 (2018) : 1535750., <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
- 16) Karoliina Stefanius, et al., "Human pancreatic cancer cell exosomes, but not human normal cell exosomes, act as an initiator in cell transformation," *eLife* 8 (2019) : e40226., <https://doi.org/10.7554/eLife.40226>.
- 17) Nobuyoshi Kosaka, et al., "Neutral Sphingomyelinase 2 (nSMase2) -dependent Exosomal Transfer of Angiogenic MicroRNAs Regulate Cancer Cell Metastasis," *Journal of Biological Chemistry* 288, no. 15 (2013) : 10849-10859., <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.446831>.
- 18) Bruno Costa-Silva, et al., "Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver," *Nature Cell Biology* 17, no. 6 (2015) : 816-826., <https://doi.org/10.1038/ncb3169>.
- 19) Gonçalo Rodrigues, et al., "Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis," *Nature Cell Biology* 21, no. 11 (2019) : 1403-1412., <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0404-4>.
- 20) Qi Wu, et al., "RETRACTED ARTICLE: Tumour-originated exosomal miR-155 triggers cancer-associated cachexia to promote tumour progression," *Molecular Cancer* 17 (2018) : 155., <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0899-5>.
- 21) Eva-Maria Kramer-Albers and Andrew F. Hill, "Extracellular vesicles: interneural shuttles of complex messages," *Current Opinion in Neurobiology* 39 (2016) : 101-107., <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.04.016>.
- 22) Claudia Arenaccio, et al., "Exosomes from Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) -Infected Cells License Quiescent CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes To Replicate HIV-1 through a Nef- and ADAM17-Dependent Mechanism," *Journal of Virology* 88, no. 19 (2014) : 11529-11539., <https://doi.org/10.1128/JVI.01712-14>.
- 23) Angélique Bobrie, et al., "Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses," *Traffic* 12, no. 12 (2011) : 1659-1668., <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x>.
- 24) Akiko Eguchi, et al., "Identification of actin network proteins, talin-1 and filamin-A, in

- circulating extracellular vesicles as blood biomarkers for human myalgic encephalomyelitis/ chronic fatigue syndrome,” *Brain, Behavior, and Immunity* 84 (2020) : 106-114., <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.11.015>.
- 25) Yusuke Yoshioka, et al., “Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen,” *Nature Communications* 5 (2014) : 3591., <https://doi.org/10.1038/ncomms4591>.
- 26) Yusuke Yoshioka, et al., “Circulating cancer-associated extracellular vesicles as early detection and recurrence biomarkers for pancreatic cancer,” *Cancer Science* 113, no. 10 (2022) : 3498-3509., <https://doi.org/10.1111/cas.15500>.
- 27) Maja Mustapic, et al., “Plasma Extracellular Vesicles Enriched for Neuronal Origin: A Potential Window into Brain Pathologic Processes,” *Frontiers in Neuroscience* 11 (2017) : 278., <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00278>.
- 28) Amrita Datta, et al., “High-throughput screening identified selective inhibitors of exosome biogenesis and secretion: A drug repurposing strategy for advanced cancer,” *Scientific Reports* 8 (2018) : 8161., <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26411-7>.
- 29) Fumihiko Urabe, et al., “miR-26a regulates extracellular vesicle secretion from prostate cancer cells via targeting SHC4, PFDN4, and CHORDC1,” *Science Advances* 6, no. 18 (2020): eaay3051., <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay3051>.
- 30) Jeffrey L. Spees, Ryang Hwa Lee and Carl A. Gregory, “Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function,” *Stem Cell Research & Therapy* 7 (2016) : 125., <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0363-7>.
- 31) Kan Yin, Shihua Wang and Robert Chunhua Zhao, “Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: a new therapeutic paradigm,” *Biomarker Research* 7 (2019) : 8., <https://doi.org/10.1186/s40364-019-0159-x>.
- 32) Matthew H. Forsberg, et al., “Mesenchymal Stromal Cells and Exosomes: Progress and Challenges,” *Frontiers Cell and Developmental Biology* 8 (2020) : 665., <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00665>.
- 33) NIH ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/>)にて exosome/therapy, で検索, (2022年12月1日アクセス) .
- 34) Robin L. Webb, et al., “Human Neural Stem Cell Extracellular Vesicles Improve Tissue and Functional Recovery in the Murine Thromboembolic Stroke Model,” *Translational Stroke Research* 9, no. 5 (2018) : 530-539., <https://doi.org/10.1007/s12975-017-0599-2>.
- 35) Shin-ichiro Ohno, et al., “Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells,” *Molecular Therapy* 21, no. 1 (2013) : 185-191., <https://doi.org/10.1038/mt.2012.180>.
- 36) Nambin Yim, et al., “Exosome engineering for efficient intracellular delivery of soluble proteins using optically reversible protein-protein interaction module,” *Nature Communications* 7 (2016) : 12277., <https://doi.org/10.1038/ncomms12277>.
- 37) Jan Van Deun, et al., “The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling,” *Journal of Extracellular Vesicles* 3, no. 1 (2014) : 24858., <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24858>.
- 38) Aleksander Cvjetkovic, Jan Lötvald and Cecilia Lässer, “The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles,” *Journal of Extracellular*



- Vesicles* 3, no. 1 (2014) : 23111., <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23111>.
- 39) Agata Abramowicz, Piotr Widlak and Monika Pietrowska, "Proteomic analysis of exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation," *Molecular Biosystems* 12, no. 5 (2016): 1407-1419., <https://doi.org/10.1039/c6mb00082g>.
- 40) Fatemeh Momen-Heravi, et al., "Current methods for the isolation of extracellular vesicles," *Biological Chemistry* 394, no. 10 (2013) : 1253-1262., <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0141>.
- 41) Clotilde Théry, et al., "Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids," *Current Protocols in Cell Biology* Chapter 3 (2006) : Unit 3.22., <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>.
- 42) Martin P. Bard, et al., "Proteomic Analysis of Exosomes Isolated from Human Malignant Pleural Effusions," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 31, no. 1 (2004) : 114-121., <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-0238OC>.
- 43) Fabrice Andre, et al., "Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes," *Lancet* 360, no. 9329 (2002) : 295-305., [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09552-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09552-1).
- 44) Sascha Keller, et al., "Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics," *Journal of Translational Medicine* 9 (2011) : 86., <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-86>.
- 45) Rebecca E. Lane, et al., "Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing," *Scientific Reports* 5 (2015) : 7639., <https://doi.org/10.1038/srep07639>.
- 46) Richard J. Lobb, et al., "Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma," *Journal of Extracellular Vesicles* 4, no. 1 (2015) : 27031., <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27031>.
- 47) M. Lucrecia Alvarez, et al., "Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers," *Kidney International* 82, no. 9 (2012) : 1024-1032., <https://doi.org/10.1038/ki.2012.256>.
- 48) Lucia Paolini, et al., "Residual matrix from different separation techniques impacts exosome biological activity," *Scientific Reports* 6 (2016) : 23550., <https://doi.org/10.1038/srep23550>.
- 49) Ana Gámez-Valero, et al., "Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents," *Scientific Reports* 6 (2016) : 33641., <https://doi.org/10.1038/srep33641>.
- 50) Hyungsoon Im, et al., "Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor," *Nature Biotechnology* 32, no. 5 (2014) : 490-495., <https://doi.org/10.1038/nbt.2886>.
- 51) Youhei Tanaka, et al., "Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma," *Cancer* 119, no. 6 (2013) : 1159-1167., <https://doi.org/10.1002/cncr.27895>.
- 52) Joel Z. Nordin, et al., "Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11, no. 4 (2015) : 879-

- 883., <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.003>.
- 53) Laurent Muller, et al., “Isolation of biologically-active exosomes from human plasma,” *Journal of Immunological Methods* 411 (2014) : 55-65., <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.06.007>.
- 54) Tamás Baranyai, et al., “Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods,” *PLoS One* 10, no. 12 (2015) : e0145686., <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145686>.
- 55) Anita N. Böing, et al., “Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography,” *Journal of Extracellular Vesicles* 3, no. 1 (2014) : 23430., <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23430>.
- 56) Sun Nyunt Wai, et al., “Vesicle-Mediated Export and Assembly of Pore-Forming Oligomers of the Enterobacterial ClyA Cytotoxin,” *Cell* 115, no. 1 (2003) : 25-35., [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00754-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00754-2).
- 57) Sara Domingues and Kaare M. Nielsen, “Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes,” *Current Opinion in Microbiology* 38 (2017) : 16-21., <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.012>.
- 58) Katja Koeppen, et al., “A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles,” *PLoS pathogens* 12, no. 6 (2016) : e1005672., <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005672>.
- 59) Masanori Toyofuku, et al., “Membrane vesicle-mediated bacterial communication,” *The ISME Journal* 11, no. 6 (2017) : 1504-1509., <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.13>.
- 60) Lynne Turnbull, et al., “Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms,” *Nature Communications* 7 (2016) : 11220., <https://doi.org/10.1038/ncomms11220>.
- 61) Masanori Toyofuku, et al., “Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*,” *Nature Communications* 8 (2017) : 481., <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00492-w>.
- 62) Masanori Toyofuku, Nobuhiko Nomura and Leo Eberl, “Types and origins of bacterial membrane vesicles,” *Nature Reviews Microbiology* 17, no. 1 (2019) : 13-24., <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>.
- 63) Bogdan Mateescu, et al., “Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper,” *Journal of Extracellular Vesicles* 6, no. 1 (2017) : 1286095., <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1286095>.
- 64) Wataru Nakai, et al., “A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles,” *Scientific Reports* 6 (2016) : 33935., <https://doi.org/10.1038/srep33935>.
- 65) Mariana Regente, et al., “Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth,” *Journal of Experimental Botany* 68, no. 20 (2017) : 5485-5495., <https://doi.org/10.1093/jxb/erx355>.
- 66) Qiang Cai, et al., “Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes,” *Science* 360, no. 6393 (2018) : 1126-1129., <https://doi.org/10.1126/science.aar4142>.

- 67) Yun Teng, et al., “Plant-Derived Exosomal MicroRNAs Shape the Gut Microbiota,” *Cell Host & Microbe* 24, no. 5 (2018) : 637-652., <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.001>.
- 68) Alicia Llorente, et al., “Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831, no. 7 (2013) : 1302-1309., <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.04.011>.
- 69) Yusuke Yoshioka, et al., “Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types,” *Journal of Extracellular Vesicles* 2, no. 1 (2013) : 20424., <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20424>.
- 70) Oh Youn Kim, et al., “Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- $\gamma$ -mediated antitumor response,” *Nature Communications* 8 (2017) : 626., <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00729-8>.
- 71) Saumya Das, et al., “The Extracellular RNA Communication Consortium: Establishing Foundational Knowledge and Technologies for Extracellular RNA Research,” *Cell* 177, no. 2 (2019) : 231-242., <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.023>.
- 72) Atsunori Tsuchiya, et al., “Basic points to consider regarding the preparation of extracellular vesicles and their clinical applications in Japan,” *Regenerative Therapy* 21 (2022) : 19-24., <https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.05.003>.
- 73) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA)「エクソソームを含む細胞外小胞 (EV) を利用した治療用製剤に関する専門部会」<https://www.pmda.go.jp/rs-std-jp/subcommittees/0017.html>, (2023年2月16日アクセス) .
- 74) Ulrike Resch, et al., “A Two-Component Regulatory System Impacts Extracellular Membrane-Derived Vesicle Production in Group A Streptococcus,” *mBio* 7, no. 6 (2016) : e00207-16., <https://doi.org/10.1128/mBio.00207-16>.
- 75) Elhanan Tzipilevich, Michal Habusha and Sigal Ben-Yehuda, “Acquisition of Phage Sensitivity by Bacteria through Exchange of Phage Receptors,” *Cell* 168, no. 1-2 (2017) : 186-199.e112., <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.003>.
- 76) Yosuke Tashiro, et al., “Interaction of Bacterial Membrane Vesicles with Specific Species and Their Potential for Delivery to Target Cells,” *Frontiers in Microbiology* 8 (2017) : 571., <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00571>.
- 77) Joeri Tulkens, Olivier De Wever and An Hendrix, “Analyzing bacterial extracellular vesicles in human body fluids by orthogonal biophysical separation and biochemical characterization,” *Nature Protocols* 15, no. 1 (2020) : 40-67., <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0236-5>.
- 78) Gyanendra P. Dubey and Sigal Ben-Yehuda, “Intercellular Nanotubes Mediate Bacterial Communication,” *Cell* 144, no. 4 (2011) : 590-600., <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.015>.
- 79) Gyanendra P. Dubey, et al., “Architecture and Characteristics of Bacterial Nanotubes,” *Developmental Cell* 36, no. 4 (2016) : 453-461., <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.01.013>.
- 80) Amit K. Baidya, Ilan Rosenshine and Sigal Ben-Yehuda, “Donor-delivered cell wall hydrolases facilitate nanotube penetration into recipient bacteria,” *Nature Communications* 11 (2020) : 1938., <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15605-1>.