

エクソソーム等の調製・治療に対する考え方
一般社団法人日本再生医療学会
2021年3月10日

目次

1. 序論
2. 用語の定義・適応範囲
3. 安全性・有効性確保の上でのリスク（製造工程・品質）
4. 法規に関して
5. 治療に関して
6. 結語

要約

近年、エクソソーム（細胞外小胞の中でも粒径 100nm 前後のもの）が新たな治療ツールとして注目を集め、基礎研究のみならず、欧米では臨床試験に移行する動きが加速している。しかし、エクソソーム等（*）を利用した治療は、研究開発段階であり広く一般的に理解が深まっているとはいえ、安全性・有効性確保の上でのリスク、法規の整備状況、世界の研究開発動向などの周知・理解も不十分である。これまでに、革新的な医療技術である再生医療を、法整備も含め安全に有効に迅速に届けることを理念として研究開発を推進してきた日本再生医療学会では、近年急速に発展してきているエクソソーム等を利用した治療開発の現状を踏まえ、二つの立場を表明したい。それは 1) 自由診療下での治療に対する懸念と 2) 科学的な根拠に基づく治療に対する積極的な推進という立場である。

エクソソーム等は細胞から放出されるものであることから、特定細胞加工物の製造工程と類似点が多く、安全性確保上のリスクにおいて共通点が多い。また有効性についても、特定細胞加工物と同様に作用機序が不明確なことが多く、その場合、力価測定や有効性関連品質特性の同定、ならびに製法変更前後での品質の同等性評価が困難である。すなわち、エクソソーム等は特定細胞加工物と同様に、その複雑な特徴ゆえに限られた品質特性しか得られず、規格・特性解析で品質をすべて把握することが困難な製品である。したがって、エクソソーム等の品質管理戦略においては、原料及び製造工程の管理により最終製品（エクソソーム等）の品質を確保するという考え方が重要となる。

一方で、生きた細胞成分を含まないエクソソーム等は、特定細胞加工物には該当しないため、現在エクソソーム等を用いた臨床研究や自由診療は、再生医療等安全性確保法の対象とはならないため、医師法と医療法以外の実質的な法規制がなく、安全性・有効性についての科学的根拠が客観的に十分評価されない状態で治療が実施されるという懸念がある。

このような懸念がある一方、世界ではエクソソームを用いた治療開発が始動しており、原材料となる細胞の安定確保・大量培養技術およびエクソソーム等の大量抽出技術の開発、安全性・有効性確保の上でのリスクの明確化、そして法規の整備が進めば、非常に多くの新たな治療分野に展開できる可能性がある。日本再生医療学会として、このような発展性のある分野が安全性高く推進され国民に届くことを希望している。

（*）エクソソームは定義が流動的であり、精製の仕方により採取されるものも変化しうる。また精製上エクソソームの定義を満たすものだけを採取することは困難である。また、品質評価においては、厳密な評価基準が策定されておらず現時点で曖昧である。そのため、本報告書では、調製時に含まれるエクソソーム以外の様々なサイズ・産生過程を経た細胞外小胞全般、細胞培養上清に含まれるタンパク質成分も含むセクレトームという言葉で表現されるもの、更には細胞培養上清も含めてエクソソーム等と表現している。

キーワード：エクソソーム、再生医療、安全性、有効性

1. 序論

近年、ヒト培養細胞ばかりでなく、植物、果実、細菌、酵母などあらゆる細胞が放出する細胞外小胞(extracellular vesicle)が、細胞間の情報伝達物質の運び手 "Cargo" として、我々の生命活動に、様々な影響を与えていることが明らかになってきている [1]。放出される細胞外小胞は、その放出細胞固有のものであることから、がんの領域において、疾病の診断から治療への応用まで幅広く研究が進められている [2-4]。特に、細胞外小胞中でも粒径 100 nm 前後のものを特に小細胞外小胞 (small extracellular vesicle、もしくは日本ではエクソソームの方が頻用されている) が新たな治療ツールとして注目を集めている [5-11]。これらは基礎研究のみならず、欧米では臨床試験に移行する動きが急速に高まっており、世界のエクソソーム診断・治療の市場は、急速に進展していくことが期待されている。しかし、エクソソーム等を利用した治療は、いまだ研究

開発段階であり、安全性・有効性確保の上のリスク、法規の整備、世界の研究開発動向などの周知・理解も不十分である。特に、エクソソームを含む細胞外小胞、細胞上清などを治療に用いることは、国内において医師法と医療法以外の実質的な法規制がなく、安全性・有効性についての科学的根拠が、客観的に十分評価されない環境で治療が実施されている懸念がある。この懸念について、これまで、再生医療・細胞治療の法整備を推進してきた日本再生医療学会が、いち早く提言を行うべきであると考え、一年間にわたり、エクソソームの調製・治療に関する考え方ワーキンググループで議論し、自由診療下での安全性・有効性の担保に対する懸念、及び安全性・有効性の担保された治療の推進、という立場を確認し本報告書としてまとめた。

2. 用語の定義・適応範囲

本邦ではエクソソームという言葉がよく用いられているが、エクソソームは先に述べたように細胞外小胞の一部であり、本報告まとめるにあたり、まずは背景と用語の定義を明確にする。1980年代ごろから、さまざまな細胞が小胞を分泌することが観察され、これらの小胞は大きさや細胞からの起源により、exosome, ectosome, microvesicle, shedding vesicle, apoptotic body, oncosome, prostasome など様々な名称で呼ばれていた。そこで、小胞の国際的な研究学会である International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) が、これら細胞から分泌される小胞の総称として extracellular vesicle (EV; 細胞外小胞) の使用を推奨している [12, 13]。細胞外小胞の中でもエクソソームとは、図 1 に示すようにエンドサイトーシスにより細胞膜に存在する受容体をまき込みながらエンドソームが形成されその内側にくびれて腔内膜小胞 (intraluminal membrane vesicle: ILV) を形成されそののち、IVL を多く含む多胞性エンドソーム (multivesicular body: MVB) が細胞膜と融合し、細胞から放出されるものを厳密にはさす。そして膜にコレステロール、スフィンゴミエリン、セラミド、脂質ラフト構成成分を含み、また内部には多くのタンパク、mRNA、miRNA 等を含むことが知られている。これらは、細胞の由来ごとに異なることが知られているが、多くのエクソソームに共通に見られ特徴付けるマーカーとして知られているものとして、膜輸送や融合タンパク質 (GTPases, annexins, flotillin など)、熱ショックタンパク質 (HSP60, HSP70, HSP90 など)、テトラスパニン (CD9, CD63, CD81 など)、MVB 形成・輸送タンパク質 (TSG101, ALIX, Annexins など)、細胞骨格タンパク質 (Actin, Tubulin など) などが上げられる [1]。このような性質を持つエクソソームは、がんをはじめとした各種疾患の診断への応用ばかりでなく、脂質二重膜に覆われ内包物が安定であることから、drug delivery system (DDS) として新規治療応用も考えられている [11-13]。このエクソソームがどのような機序で標的細胞を見つけて取り込まれていくかなど、作用機序の詳細は未解明な部分もあるが表面の糖鎖やインテグリンなどの関与が報告されている [14]。

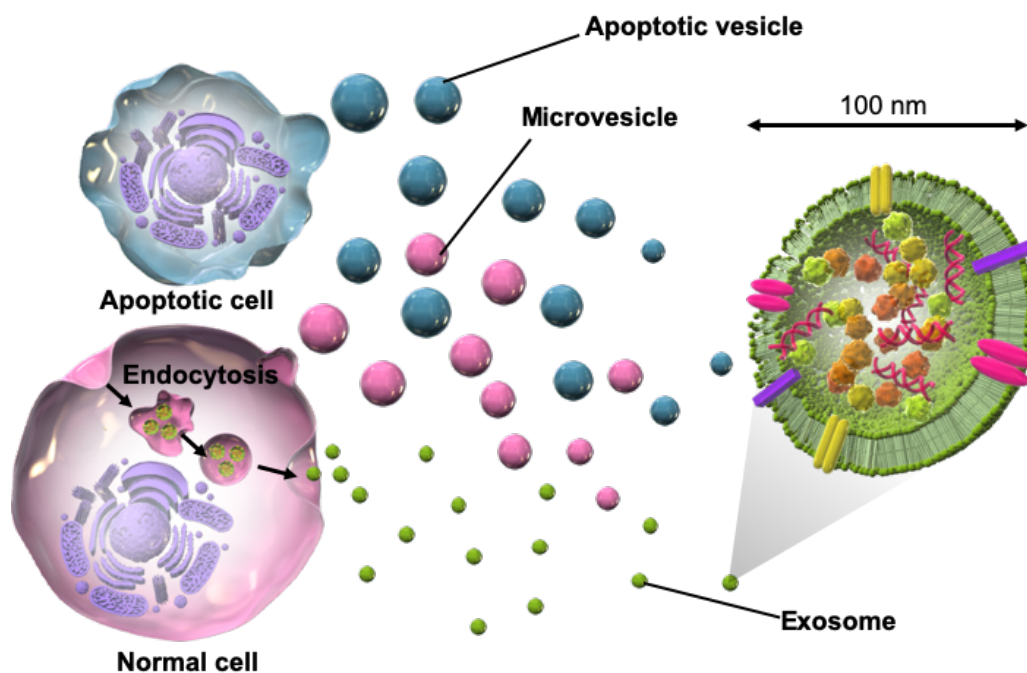


図1；細胞外小胞の産生経路と分類。細胞外小胞は由来細胞や放出の過程等により、大きさ、性状などが多彩でヘテロな集団で存在している。特に近年注目させているのはエンドサイトーシスにより細胞膜に存在する受容体をまき込みながらエンドソームが形成されその内側にくびれて腔内膜小胞（intraluminal membrane vesicle：ILV）を形成されそののち、IVLを多く含む多胞性エンドソーム（multivesicular body：MVB）が細胞膜と融合し、細胞から放出されるエクソソームである。エクソソームは大きさが100nm前後で膜にコレステロール、スフィンゴミエリン、セラミド、脂質ラフト構成成分を含み、また内部には多くのタンパク、mRNA、miRNA等を含むことが知られている。

また、エクソソームは採取の際に行われる超遠心や限外濾過等の手法において、同様のサイズの小胞も混在しうるため、厳密にはエクソソームだけを採取することは困難な場合が多い。そのため、世界的には small extracellular vesicle (sEV) として表現されることが多い [12, 13]。さらに、現行の採取方法では、細胞が分泌する細胞外小胞には含有されないタンパク質などの成分も含まれるため、セクレトームという言葉を用いている論文もある [15]。本論文では細胞培養上清からエクソソームのみを抽出する事が困難であることから、調製時に混入しうるエクソソーム以外の細胞外小胞や細胞培養上清に含まれるタンパク質成分も含めてエクソソーム等という言葉を使用する（図1）。

3. 安全性・有効性確保の上でのリスク（製造工程・品質）

エクソソーム等を臨床利用する場合の潜在的リスクには、例えば 1) ウイルス・細菌・真菌のような感染因子の混入による感染症伝播、2) アレルギーや拒絶反応などの好ましくない免疫反応、3) 同時に投与されるエクソソーム等以外の成分による有害な作用、4) 有効性や品質のばらつき、5) 好ましくない体内分布、などが挙げられる。エクソソーム等はそもそも細胞が放出するものであることから、その製造工程は細胞加工物の製造工程との類似点が多く、安全性・有効性確保のうえでのリスクにおいても共通点が多い。例えば、安全性の観点では、製造工程中での高度な精製やウイルスの不活化や除去は細胞加工物と同様に困難であることから、原料・材料の段階から一貫して感染因子混入の防止策が必要となる。また、製造に用いられる細胞の状態が変化しやすく、その細胞から放出されるエクソソーム等の品質・有効性・安全性も製造工程によって

大きく影響を受けるため、工程の管理が重要である。さらに、エクソソーム等は細胞加工物と同様に作用機序が不明確なことが多く、その場合、細胞加工物の力価測定や有効性関連品質特性の同定、ならびに製法変更前後での品質の同等性評価が困難である。すなわち、エクソソーム等は細胞加工物と同様に、その複雑な特徴ゆえに限られた品質特性しか得られず、規格・特性解析で品質をすべて把握することが困難な製品である。このため、エクソソーム等の品質は、最終製品（エクソソーム等）の規格・特性解析による管理に加え、原料・材料の品質管理及び製造工程の管理により確保することが基本となる。したがって、エクソソーム等の品質・有効性・安全性確保のためには、再生医療等安全性確保法下の再生医療等提供基準、または医薬品医療機器等法下の再生医療等製品（細胞加工製品）の品質管理・製造管理基準に準じた品質管理・製造管理を実施すべきである。

4. 法規に関して

生きた細胞成分を含まないエクソソーム等は、製造販売に関わる医薬品医療機器等法においては、薬理作用を示すのであれば医薬品に位置付けられ、物理作用を示すのであれば医療機器の扱いになり、再生医療等製品（細胞加工物）には該当しない。さらに、生きた細胞成分を含まない限り細胞加工物には該当しないので、現在エクソソーム等を用いた臨床研究や自由診療は再生医療等安全性確保法の対象にはならず、自由診療の下で行われているのが現状である。しかし、医師法と医療法以外の実質的な法規制がなく、安全性・有効性についての科学的根拠が十分評価されない状況で治療が実施されている懸念がある。今後、関連学会の基礎・臨床の専門家の意見を踏まえた品質管理、製造管理とともに法整備がなされることが期待される。

一方でヘルシンキ宣言（人間を対象とする医学研究の倫理的原則）の 37 条は以下の様に臨床における未実証の治療に関して述べている。“個々の患者の処置において証明された治療が存在しないかまたはその他の既知の治療が有効でなかった場合、患者または法的代理人からのインフォームド・コンセントがあり、専門家の助言を求めたうえ、医師の判断において、その治療で生命を救う、健康を回復するまたは苦痛を緩和する望みがあるのであれば、証明されていない治療を実施することができる。この治療は、引き続き安全性と有効性を評価するために計画された研究の対象とされるべきである。すべての事例において新しい情報は記録され、適切な場合には公表されなければならない。” 有効性と安全性が実証されていないエクソソーム等を用いた特定疾患に対する治療は、当然のことながらこのヘルシンキ宣言の下に医療従事者の高度な倫理観に基づき実施されるべきである。

5. 治療に関して

間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells；MSC）由来のエクソソームが、近年 MSC の細胞治療効果のメカニズムに、重要であることが多くの論文で発表されている [6, 9, 11, 16, 17]。エクソソーム等の供給細胞には様々な細胞や遺伝子改変細胞なども想定されるが、本項では代表的な例として MSC を取り上げることとする。MSC 細胞治療とエクソソーム療法のそれぞれの現行でのメリット、デメリットを挙げてみると以下の様になる。MSC 細胞治療のメリットは安全性・有効性確保の上でのリスクが明確で、また法規に関しても整っており、臨床までの道筋が明らかな点が挙げられる。デメリットは、細胞の大きさに起因する影響、特に血管内に投与する際には塞栓などの注意が必要になる点、また投与部位局所の炎症等の環境によって細胞がエクソソーム産生等に関して影響を受け、それに伴い予測される治療効果も左右される可能性、さらには多くが初代培養細胞であることから、由来臓器、ロット間差や、細胞老化に伴う製造過程での品質管理の困難さ、等が挙げられる。一方エクソソーム療法のメリットは、エクソソーム自体が細胞分泌成分を分離精製したものであり、細胞治療の様に投与細胞の局所での状態によって治療効果が影響を受けるようなリスクがないこと、また細胞よりもサイズが小さいため塞栓の可能性が理論上低いこと、標的組織への移行性が良いこと、細胞治療と異なり複数投与が可能であること、エク

ソーム等の粒子はその治療効果を発揮する有効成分としての定量化が容易であること、等の点が挙げられる。デメリットとしては細胞投与に必要な細胞数よりも大量の細胞数が必要なこと、安全性・有効性確保の上でのリスクが不明確で、品質管理、製造管理とともに法整備に関しても未成熟で、臨床までの道筋が見通しにくい点が挙げられる [1, 6, 9, 11, 16-20]。

2019年のISEVの機関誌であるJournal of Extracellular VesiclesにはMSC由来のエクソソームに関する治療に定義付けを行っている [12, 13, 21]。エクソソーム等は、供給源となる細胞ごとに変動する可能性があるが、現時点で治療に用いられるエクソソーム等の規格や特性評価の例を提示する (図2)。

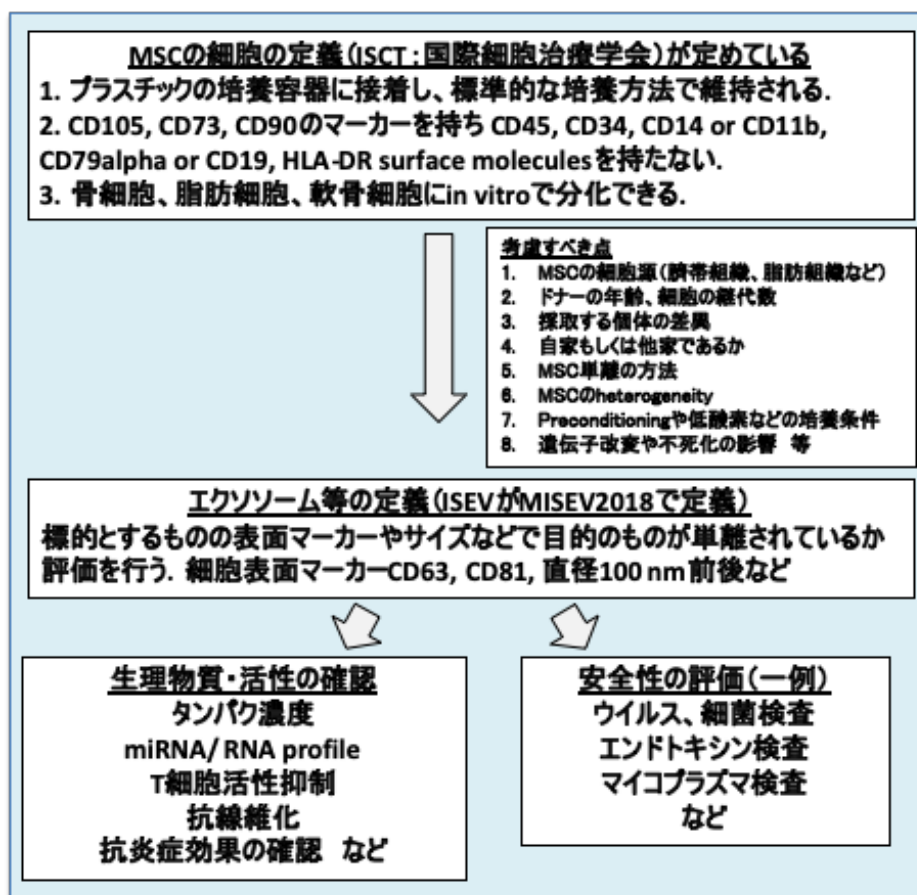


図2；MSC由来エクソソーム等の規格、特性評価の例；MSC由来のエクソソーム等を含む治療を開発する際に想定されるエクソソーム等の臨床応用時の評価項目例。

6. 結語

エクソソーム等を用いた治療はまだ動き出したばかりではあるが、難治性疾患の新たな治療方法としての可能性が期待され、世界的な開発競争になるであろう。新しい概念ゆえに、現在エクソソーム等を用いた臨床研究や自由診療に対する実質的な法規制の整備が不十分で、安全性・有効性についての科学的根拠が十分評価されない状況で治療が実施されてしまう懸念がある。一方で、原材料となる細胞の安定確保、大量培養技術およびエクソソーム等の大量抽出技術の開発、安全性・有効性確保の上でのリスクの明確化、そして法規の整備が進めば、新たな治療法として非常に多くの疾患で応用される可能性がある。さらにエクソソーム等の糖鎖などの修飾、目的のタンパクや核酸医薬品などの導入など内容物を変えることにより、更なる進歩・発展が期待される分野であり、技術開発の進歩に応じた対応が必要となるであろう [22, 23]。日本再生医療学会

として、先述のとおり有効性・安全性の確保という観点で科学的根拠に乏しい自由診療下での実施が危惧される点がある一方で、このような発展性のある新たな治療法について、国内外の関連学会と共に基礎研究を更に推進し、法や製造工程が整備された環境下で安全性を担保しつつ、発展的に推進され国民に届くことを期待している。

参考文献

1. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 2020; 367(6478).
2. Othman N, Jamal R, Abu N. Cancer-Derived Exosomes as Effectors of Key Inflammation-Related Players. *Front Immunol* 2019; 10:2103.
3. An T, Qin S, Xu Y, Tang Y, Huang Y, Situ B, et al. Exosomes serve as tumour markers for personalized diagnostics owing to their important role in cancer metastasis. *J Extracell Vesicles* 2015; 4:27522.
4. Thind A, Wilson C. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J Extracell Vesicles* 2016; 5:31292.
5. Watanabe T, Tsuchiya A, Takeuchi S, Nojiri S, Yoshida T, Ogawa M, et al. Development of a non-alcoholic steatohepatitis model with rapid accumulation of fibrosis, and its treatment using mesenchymal stem cells and their small extracellular vesicles. *Regenerative Therapy* 2020; 14:252-261.
6. Allan D, Tieu A, Lalu M, Burger D. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles for regenerative therapy and immune modulation: Progress and challenges toward clinical application. *Stem Cells Transl Med* 2020; 9(1):39-46.
7. He C, Zheng S, Luo Y, Wang B. Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics* 2018; 8(1):237-255.
8. Reiner AT, Witwer KW, van Balkom BWM, de Beer J, Brodie C, Corteling RL, et al. Concise Review: Developing Best-Practice Models for the Therapeutic Use of Extracellular Vesicles. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(8):1730-1739.
9. Rohde E, Pachler K, Gimona M. Manufacturing and characterization of extracellular vesicles from umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for clinical testing. *Cytotherapy* 2019; 21(6):581-592.
10. Russell AE, Sneider A, Witwer KW, Bergese P, Bhattacharyya SN, Cocks A, et al. Biological membranes in EV biogenesis, stability, uptake, and cargo transfer: an ISEV position paper arising from the ISEV membranes and EVs workshop. *J Extracell Vesicles* 2019; 8(1):1684862.
11. Witwer KW, Van Balkom BWM, Bruno S, Choo A, Dominici M, Gimona M, et al. Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications. *J Extracell Vesicles* 2019; 8(1):1609206.
12. Lener T, Gimona M, Aigner L, Borger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* 2015; 4:30087.
13. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, 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. *J Extracell Vesicles* 2018; 7(1):1535750.
14. Nishida-Aoki N, Tominaga N, Kosaka N, Ochiya T. Altered biodistribution of deglycosylated extracellular vesicles through enhanced cellular uptake. *J Extracell Vesicles* 2020; 9(1):1713527.
15. Xu S, Liu C, Ji HL. Concise Review: Therapeutic Potential of the Mesenchymal Stem Cell Derived Secretome and Extracellular Vesicles for Radiation-Induced Lung Injury: Progress and Hypotheses. *Stem Cells Transl Med* 2019; 8(4):344-354.
16. Elahi FM, Farwell DG, Nolte JA, Anderson JD. Preclinical translation of exosomes derived from mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells* 2020; 38(1):15-21.
17. Tsuchiya A, Takeuchi S, Watanabe T, Yoshida T, Nojiri S, Ogawa M, et al. Mesenchymal stem

cell therapies for liver cirrhosis: MSCs as "conducting cells" for improvement of liver fibrosis and regeneration. *Inflamm Regen* 2019; 39:18.

18. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014; 3.

19. Terai S, Tsuchiya A. Status of and candidates for cell therapy in liver cirrhosis: overcoming the "point of no return" in advanced liver cirrhosis. *J Gastroenterol* 2017; 52(2):129-140.

20. Watanabe Y, Tsuchiya A, Seino S, Kawata Y, Kojima Y, Ikarashi S, et al. Mesenchymal Stem Cells and Induced Bone Marrow-Derived Macrophages Synergistically Improve Liver Fibrosis in Mice. *Stem Cells Transl Med* 2019; 8(3):271-284.

21. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4):315-317.

22. Mendt M, Kamerkar S, Sugimoto H, McAndrews KM, Wu CC, Gagea M, et al. Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. *JCI Insight* 2018; 3(8).

23. Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* 2017; 546(7659):498-503.