

外泌體：新興的診斷治療工具

文、圖 / 李聰亮

榮總臺東分院皮膚科

前言

外泌體(exosomes)是一類源自小內胞體的膜性微囊泡(small endosomal-derived membrane microvesicles)，1980年代晚期在細胞外體液發現外泌體的存在，起初被認為是細胞受傷所產生的廢物，或細胞維持體內恆定之副產物。當時對其所扮演何種生理作用仍僅止於粗淺表面的認知，這些年來漸漸地吸引許多研究學者對於探究此微囊泡的興趣。本文介紹外泌體的生物生成(biogenesis)；潛在的生物性優勢，例如其低的免疫致敏性(reduced immunogenicity)，和可穿過生物屏障(biological barriers)的能力，因而被選定為一作為藥物(drug)、核酸(nucleic acid)、蛋白質(protein)、脂質(lipid)、和基因治療(gene therapy)所需的 siRNAs 和 miRNAs 等分子運送的最佳工具；以及應用外泌體作為液態切片(liquid biopsy)的方式，可輔助及提高早期癌症病例診斷的準確性。此外，外泌體由於其運送相關物質的生物性能力，也嘗試應用在一些疾病預後資訊的研究，包括慢性炎症(chronic inflammation)、神經退化性疾病(neurodegenerative disease)、心血管疾病(cardiovascular disease)、脂質代謝性疾病(lipid metabolic disease)、腎臟病(renal disease)和腫瘤(tumor)⁽¹⁾。

外泌體的發現

2000年初，米楔爾秋普(Michael Chopp)是密西根底特律亨利福特健康系統的神經科醫學家，他是那些最早探究成人幹細胞潛能研究的專家

之一。成人幹細胞最常引人注目的為其中一個亞型，間質基質細胞(mesenchymal stromal cells, MSCs) 或間質幹細胞(mesenchymal stem cells, MSCs)，可利用此類型細胞以改善脊椎損傷、中風、和其他神經外傷等病。秋普與其他研究人員假設 MSCs 實際上並非取代受傷的組織，這些細胞是經由分泌因子來修復組織。近日的證據強烈的指向一種膜性微囊泡，就是稱為外泌體。外泌體是在1980年代晚期即已被描述，但當時學術界對其扮演何種生理作用仍是有限的認知。外泌體是細胞外囊泡(extracellular vesicles)的一種，其生物化學結構是脂質雙層組成的膜性微囊泡，內含有核酸、蛋白質、醣類、脂質等多種訊號因子，作為細胞和細胞間訊息傳遞(signal transduction)的中介物，可經由調節細胞的生理作用，而影響疾病的病理發生機轉。

2010年，服務於新加坡一家有名的分子和細胞生物學研究機構(agency for science, technology and research, ASTAR)的細胞生物學家一林賽娟(Sai-Kiang Lim)，她是在此領域最早研究外泌體的學者。Lim 認為與其說我們找到外泌體，其實是外泌體發現了我們。外泌體含有極豐富的非編碼RNA(non-coding RNA)，這些分子顯示強力調節基因的表現，接著更發現有大於30000種不同組合的非編碼RNA，意謂著外泌體存在極多亟待探索的課題，十分吸引研究人員的重視⁽²⁾。

任何時間細胞內所含有的特殊mRNA和蛋白質，皆代表大分子之合成與解離速率達到平衡。為了控制細胞內大分子的水平，必須調節快速和具有效率的RNA和蛋白質之解離速率，但如對

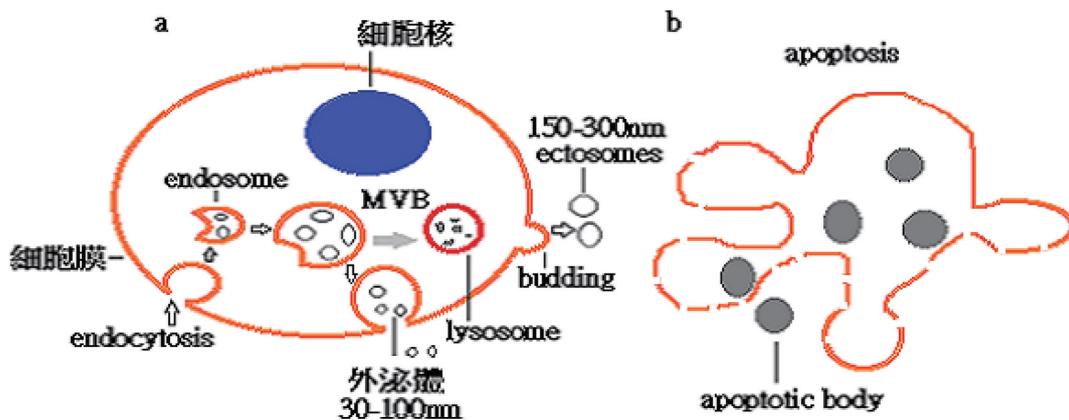


圖1 a圖示外泌體之生物發生：細胞原生質膜往內卷形成內胞體的腔內小囊泡，內胞體再成熟成為多囊泡體，多囊泡體和原生質膜融合，之後再釋放到細胞外，形成30-100nm 大小的外泌體。b圖示細胞啟動計劃性凋亡時，皺縮的原生質膜會起泡和斷裂，細胞凋亡體脫離⁽⁴⁾。

mRNA和蛋白質發生無區別的解離，則會造成細胞有害的後果。因此解離的作用必須在區隔的空間(compartmentalized space)進行，被標記解離的RNA和蛋白質會被圓環型或圓柱型的大分子複合體包住，基本上RNA是在外泌體，蛋白質則在蛋白酶體(proteasomes)⁽³⁾。

外泌體的生物發生

外泌體是一具有基本的結構模型，由六個亞單位的圓環圍繞一個中央空腔，其中一個或更多個亞單位含有RNase PH活力，外泌體會限制受質的親近和區隔開RNase PH。外泌體之生物發生是從原生質膜往內卷形成內胞體(endosomes)的腔內小囊泡(intraluminal vesicles, ILVs)，蛋白質、核酸、RNAs和miRNAs(microRNAs)等分子則包裹於其中。接著內胞體再成熟為多囊泡體(multivesicular bodies, MVBs)，一部分被溶酶體(lysosomes)解離，另一部分會與原生質膜融合而釋放到細胞外，就是外泌體(圖1)。胞外囊泡以其生物性生成、大小和表面標記的不同，可分為外泌體、細胞凋亡體(apoptotic bodies)和微囊泡(microvesicles,介於100 nm到1 μ m之間)三種。

外泌體之表面蛋白是取決於其內胞體路徑(endosomal pathway)，而被利用作為外泌體標記，包括腫瘤敏感基因101(tumor-sensitive gene 101, TSG101)，熱休克蛋白(heat shock proteins,

HSP70)，四跨膜蛋白(tetraspanins: CD9, CD63, CD81, 和CD82)，和融合蛋白(fusion proteins)⁽⁴⁾。

外泌體的生物性功能

外泌體可由不同型態的細胞釋出，包括巨噬細胞，上皮細胞，和腫瘤細胞等。除了血液(blood)存在外泌體，許多體液中，例如唾液(saliva)、乳汁(breast milk)、腦脊髓液(cerebrospinal fluid)、精液(semen)、腹水(ascites)、羊水(amniotic fluid)和尿液(urine)也可發現。目前已知外泌體扮演細胞與細胞間訊息傳遞的重要角色，外泌體可攜帶蛋白質、脂質、mRNA、miRNAs、DNA等遺傳物質以及細胞訊息傳遞相關的物質，且會選擇性的被鄰近的或遠端的細胞所利用，接受者細胞由於這些生物活性物質，而發生細胞重編程(reprogramming)的程序，因而促使接受者細胞發生暫時性或永久性型態改變。基於此種生物特性，因此發展成應用其非侵襲性的診斷生物標記(non-invasive diagnostic biomarkers)和藥物奈米傳輸(therapeutic nanocarriers)的特殊作用。外泌體含有豐富的蛋白質，例如四跨膜蛋白(CD9, CD63, CD81, CD82)，可參予細胞侵襲、滲透和融合等作用；熱休克蛋白(HSP70, HSP90)與壓力反應有關，牽涉到抗原結合和呈現(antigen binding and presentation)。至於TSG101、HSP70、CD81和CD63則皆可做為外泌體的標記蛋白。根據其複

雜的組成結構，外泌體曾經被認為是一種微型的親代細胞。外泌體因其所含的特殊分類的蛋白、核酸、脂質和相關的成分，為高度依賴於細胞來源的現狀。從不同型態的細胞檢測所含大量的組成元素，包括4400種蛋白質、194種脂質、1639種mRNAs和764種 miRNAs已被證實，因此可顯示其複雜性和潛在的不同功能⁽⁵⁾。

外泌體的分離和純化

實驗室製作純化的外泌體時，其分離和純化方式為利用一明確的、序列的離心步驟，目的是從培養基中移除細胞和微囊泡。外泌體之大小、功能、內容和來源皆是異質性的，因此不易分離。最常用的為超離心法(ultracentrifugation)，其過程是利用不一樣的沉降係數將不同大小的成分分離，首先以連續低到中速度的離心法移除死亡細胞、細胞殘骸和大的細胞外水泡。下一步驟為以超離心達到 $100,000 \times g$ 的離心力，可將外泌體分離出，之後再以磷酸鹽緩衝生理鹽水(phosphate buffered saline, PBS)洗滌使移除污染的蛋白質。密度差離心分離法(density gradient purification)與超離心法混合操作則可改善外泌體的純化，例如依賴不同的蔗糖密度(sucrose density gradient purification)，而更能將外泌體從其他不同大小的分子分離出，外泌體的蔗糖密度差為 1.13 g/mL ，對照於蛋白質聚集體則為 1.22 g/mL 。目前研究單位從細胞培養基分離和純化外泌體，較傾向以高速的超離心法，以及在不同的蔗糖密度下，將不同大小的蛋白質、核酸或其他污染物分離，最後才取得高度純化的外泌體片段⁽⁶⁾，但是這些操作方式卻是需耗費較長的時間。

外泌體的自然生物特性

外泌體本身自然的內在特性，包括低度的免疫原性(low immunogenicity)、優越的生物相容性(superior biocompatibility)、先天的穩定性(innate stability)和穿過生物性屏障的能力，因此非常適合作為運送相關物質的治療工具。

外泌體和標的細胞之相互關係牽涉到以下兩個機轉：外泌體要進入標的細胞是經由微胞飲作用(micropinocytosis)，或胞吞作用

(endocytosis)，或是外泌體與細胞膜融合和釋放相關物質，以活化不同的訊息路徑。另一個方式為外泌體和標的細胞，可經由表面配體-受體結合(ligand-receptor binding)，而刺激一序列的反應。因此外泌體賦與潛在的標的能力，可用於運送很大範圍的分子。除外，外泌體在藥物運送的潛力已被嘗試於臨床的使用，但此轉運系統仍會受限於其不確定的裝載效力，迅速地從血循環中被清除，和有時出現較弱的標的能力。到目前為止，已有很多研究證實可以對此外泌體的覆膜給予修飾，以延長其在血液的期間，和提高組織的選擇性，因此有利於增大外泌體在藥物運送的能力⁽⁷⁾。為了進一步利用外泌體在特殊靶向(組織或細胞)的應用，對於外泌體膜的設計和操作主要有兩種處理方法，一種是直接對外泌體作化學修飾(chemical modification)，另一種間接操作是對外泌體釋放的細胞作遺傳基因工程(genetic engineering)的修飾。

外泌體影響腫瘤微環境並和癌症進展有關

轉化生長因子 β (transforming growth factor, TGF- β)家族具有調節細胞增殖(cell proliferation)、細胞分化(cell differentiation)、細胞遷移(cell migration)、細胞計劃性凋亡(cell apoptosis)、血管生成(angiogenesis)、免疫抑制(immune suppression)和胚胎發育(embryogenesis)等多種不同的作用。TGF- β 的訊息路徑使Smads4轉譯因子(transcription factor)活化，Smads4進入細胞核開始啟動一些特殊基因的轉譯作用(gene transcription)，進而促使細胞發生作用。TGF- β 之生物性作用包括：1.可活化纖維芽細胞製造膠原纖維和彈性纖維，和血管生成以促進組織修復；2.抑制早期腫瘤的增生；3.與2.所述有相反的作用會促使侵襲性較強的腫瘤進展更快而發生轉移。TGF- β 的不同生物性作用主要依賴於細胞型態和細胞生長的环境，包括訊息傳導成分(the signal transduction components)、Smads中介物之轉譯輔因子(the transcriptional cofactors of SMAD mediators)，和細胞的表觀遺傳狀態(the epigenetic state of the cell)。癌細胞一般會製造比正常細胞更多的外泌體囊泡，癌細胞來源的

外泌體具有強大的修飾局部和轉移遠處微環境的能力。組織中的間質細胞接受癌細胞來源的外泌體會產生適宜癌細胞生長的原腫瘤微環境 (pro-tumor microenvironment)；而癌細胞接受間質細胞來源的外泌體則會促使癌細胞增生，和更具侵襲性。TGF- β 利用自體分泌 (autocrine) 的作用機轉，呈現抑制大多數上皮細胞的增生，TGF- β 經由誘導細胞週期的停止和細胞計劃性凋亡，而抑制腫瘤發育和生長，可知具有腫瘤抑制因子 (tumor suppressor) 的角色，尤其是在早期腫瘤成長階段。當在晚期腫瘤階段時會失去自體分泌TGF- β 的活性，或是外源性TGF- β 時，會選擇性地促使血管新生，和抑制自然殺手細胞 (natural killer cells) 以及淋巴細胞活化的殺手細胞 (lymphocyte-activated killer cells) 的功能，提供有利於癌細胞的生長，導致癌細胞大量增生，反而呈現促腫瘤生長 (pro-oncogenic effect) 的作用⁽⁸⁾。

對於TGF- β 訊息路徑的影響，目前還無法全盤地明瞭外泌體的調節和其他的功能，因此在臨床的應用仍是充滿挑戰。外泌體所含的成分，包括miRNA、非編碼RNA和蛋白質，可能是經由參與TGF- β 路徑的活化，調節腫瘤微環境，使促成癌症進展和癌細胞轉移的發生(圖2)⁽⁹⁾。

間質幹細胞來源的外泌體在治療的應用前必須先建立效價強度高的檢測方法

在全球已有超過1000個登錄的，使用間質基質細胞或間質幹細胞對抗許多疾病之臨床實驗。MSCs已證實可應用於治療GVHD疾病 (graft-versus-host disease) 和克隆氏病 (Crohn's disease)。然至今越來越清楚MSCs可經由旁分泌方式 (paracrine manner)，亦即是MSCs細胞分泌30-200奈米(直徑)，小的細胞外囊泡 (small extracellular vesicles, sEVs) 而達到其治療的作用。非細胞的MSC-sEV的製作比使用細胞性的MSCs之產物可能更安全，及較容易轉化成臨床的應用。2021年，Gimona和Brizzi等人描述到可量化的檢測方法用以定義MSC-sEVs的身份驗證。針對前瞻性效力分析以預測藥物的治療有效性要求，須依照國際醫藥法規協合評議會的指導方針 (international council for harmonisation of technical

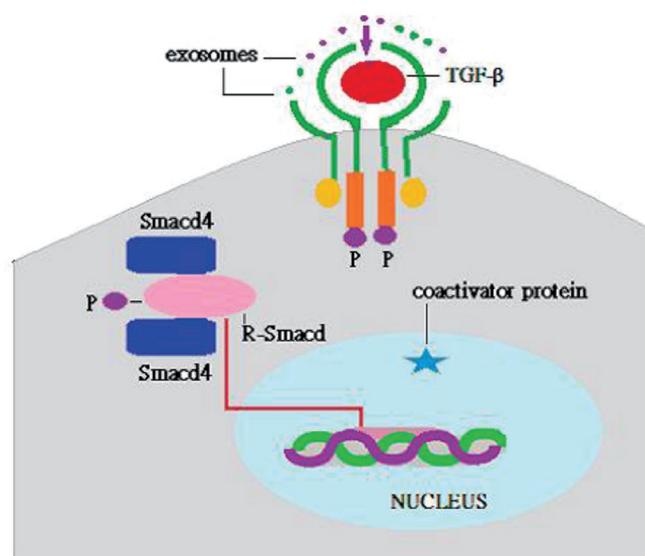


圖2 外泌體囊泡所含的成分，包括mRNA、非編碼RNA和參與TGF- β 訊息路徑相關的蛋白質，影響TGF- β 經由Smads轉譯因子的活化路徑，促使腫瘤演進成發生侵襲和轉移的變化。

requirements for pharmaceuticals for human use guidelines)。在實際製造MSC-sEVs時存在著挑戰，但仍需以提升一致，可重複的且有效的sEVs製劑之製造為目標。可見發展出效價強度高的檢測分析方法非常重要⁽¹⁰⁾。

外泌體在治療的應用

以外泌體為基礎的治療，主要是經由對免疫反應的調節。近來的研究發現外泌體含有不同的免疫相關的分子，包括溶小體有關的膜蛋白 (lysosome-associated membrane proteins)，和主要組織相容複合體分子MHC class I 和MHC class II (major histocompatibility complex class I and II molecules)，會刺激巨噬細胞的分化方向，和使T細胞分化成調節T細胞 (regulatory T cells)，因此會抑制CD4⁺T，CD8⁺T細胞，和NK細胞 (natural killer cells)，而表現抗發炎反應的效用。除外，外泌體促成的免疫調節也可經由類鐸受體 (toll-like receptors, TLRs) 和其他受體，而產生適應性免疫。外泌體造成的固有的免疫反應，則確認是經由特殊的和保留的致病原相關的分子型態 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP)，

而造成發炎性介質(inflammatory mediators)，和細胞激素(cytokines)的釋放，因而產生發炎性反應⁽¹¹⁾。

應用外泌體作為遺傳物質的轉運

在基因治療時，由於外泌體能保護核酸不被解離，外泌體可作為理想的核酸(siRNAs 和 miRNAs) 運送者。基於鑑定了解從自體乳癌細胞取得的外泌體，顯示有效的肺標靶能力(lung targeting capability)，這是肇因於此外泌體表面整合素 $\alpha 6\beta 1$ 和 $\alpha 6\beta 4$ (integrins $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$)，使其趨向與肺臟組織形成黏著。2020年 Zhao 團隊發展一新型態的模仿生物的奈米顆粒(biomimetic nanoparticles)，含有白蛋白和 siS100A4，其外包覆以外泌體膜，此種外泌體基礎的 siRNA 運送系統(exosome-based siRNA delivery system)可明顯的抑制乳癌手術後的癌細胞轉移，外泌體促成的siRNA 或 miRNA之運送，比傳統的轉染(transfection)方法更有效率以及呈現較低的細胞毒性⁽¹²⁾。

近年來CRISPR/Cas9 基因組編輯技術已蓬勃發展，具有很高的效率性和靈活性，可用於交換(exchange)、刪除(deletion)和替代(substitution)某一指定的基因。但目前轉運CRISPR/Cas9時發生的限制，主要是因其所產生的免疫原性。已知外泌體是一天然的運送者，呈現潛在的對CRISPR/Cas9封裝和運送能力，而能幫其進入細胞內。2017年Kim團隊以腫瘤來源的外泌體(tumor-derived exosomes) 裝載針對多聚ADP核糖聚合酶-1(poly[ADP-ribose] polymerase-1, PAPR-1)的CRISPR/Cas9，可產生抑制癌細胞之增生。此結果顯示，外泌體可提供有效率的CRISPR/Cas9 plasmids(CRISPR/Cas9 質體) 運送進入癌細胞的能力，且此裝載的外泌體可促進體內(in vivo)先進的抗腫瘤作用⁽¹³⁾。

外泌體促成炎症反應的發生

miRNAs(MicroRNAs) 為非編碼(non-coding)，單股的(single strand)RNA，約21-22核苷酸(nucleotides)長度，可抑制蛋白質的合成或使標的 mRNAs 解離，而呈現負性的基因調節。

此種轉譯作用後(post-transcription)的調節能力，因而牽涉到大範圍的生物性過程，包括細胞計劃性凋亡、免疫反應(immune response)、細胞增生和代謝(metabolism)。越來越多資料顯示miRNAs與許多發炎性疾病有關，以及發現 miRNAs作為介入性治療的新標的。miR-155 為哺乳類動物高度保留的 miRNA，近來也發現miR-155 在動脈粥狀硬化進行過程，可調節巨噬細胞促成的炎症反應。在嚴重敗血症(sepsis)發生時，含有豐富miR-155 的外泌體釋放到周邊血液，再進入肺臟巨噬細胞，周邊血漿的外泌體來源的miR-155 促進巨噬細胞(M1)增生，巨噬細胞釋放的促發炎性細胞激素和化學激素(chemokines)，具有針對白血球的化學趨化作用(chemotaxis)，因而增強急性炎症反應的發生，終於導致急性肺泡組織傷害。急性肺傷害的病理發生，主要是由於發炎細胞，例如巨噬細胞、白血球細胞的過度活化，導致不良的肺臟組織嚴重的炎症反應。因此可推測知以外泌體運送的miRNAs，具有調節免疫細胞和其他細胞功能的作用。

現已證實在免疫細胞與其他型態細胞之間，某些特殊miRNAs 可經由外泌體轉運。例如肝細胞來源的外泌體會轉運miR-122，而使單核球對內毒素發生敏感性。從胃癌細胞脫落的外泌體會活化巨噬細胞的NF- κ B 路徑，使增加促發炎反應細胞因子(proinflammatory cytokine) 的釋放，導致癌細胞侵襲性和轉移的進展⁽¹⁴⁾。

外泌體應用於胰臟疾病的診斷和治療

從嚴重的胰臟炎病人血液分離的外泌體會驅動NF- κ B 的活化，TNF- α 的釋放和其他炎症反應的發生。研究資料顯示胰腺泡細胞(pancreatic acinar cell)釋放攜帶miRNAs 的外泌體，會經由TRAF6-TAB2-TAK1-NIK/IKK-NF κ B路徑調節巨噬細胞的活化，此是MAPK訊息路徑其中的一個路徑(圖3)。目前的研究可提供新方法，利用外泌體以減輕引起胰臟炎發生有關的巨噬細胞之活化，使對胰臟炎疾病產生適切的療效，和診斷的生物標記物。急性胰臟炎病人血清miRNA的表現輪廓(miRNA expression profile)已經完成，對病人的臨床診療可能有幫助。

檢驗急性胰臟炎病人血清外泌體，含有顯著上調的miR-155，和下調的miR-21 和 miR-122。miR-155 為促發炎反應的作用，miR-21 和 miR-122則呈現抗發炎反應的作用。因此這些 miRNA 實際上為扮演調節巨噬細胞的活化程度，而釋放出發炎性細胞激素造成組織發炎反應的進行。利用蛋白酶體學分析(proteomic analysis)發現，血清外泌體之蛋白組成主要為來自於肝臟⁽¹⁵⁾。

已有數個研究聚焦於外泌體攜帶的miRNA，應用在診斷急性胰臟炎引起的全身性發炎反應的角色。研究結果提到外泌體miRNA可作為急性胰臟炎的生物標記物(biomarkers)，以miRNA 微陣列(miRNA microarray) 的檢驗，發現30種miRNA 呈現上調的表現。這還只是體外實驗數據，仍需待通過實際應用於人體的結果，才可決定此生物標記物是否適合臨床上的應用。

外泌體作為診斷癌症的生物標記

外泌體在癌症發生，癌症相關的免疫反應，和癌症轉移扮演重要角色。在胰臟癌的早期診斷，外泌體也是潛在新的生物標記物。從胰臟癌病人血液取得的外泌體蛋白質標記，包括CD44v6、Tspan8、EpCAM、MET 和 CD104，以及不同的miR-1246、miR-4644、miR-3976 和 miR-4306。這是與其他慢性胰臟炎、良性胰臟腫瘤，或正常人所取得外泌體成分，呈現明顯不同的成分⁽¹⁷⁾。

在以胰臟腺泡細胞癌移植於老鼠身上的動物實驗，利用外泌體裝載miRNA的治療評估，發現可抑制腫瘤的增生、侵襲，增加細胞計劃性凋亡和細胞週期停止，造成移植腫瘤明顯的縮小⁽¹⁶⁾。

特殊的外泌體miRNA為最廣泛使用在疾病診斷，或預後的生物標記物，尤其是對提高早期癌症診斷而言。外泌體蛋白質在疾病的診斷也具有潛在的價值，已有研究結果顯示可利用檢驗外泌體之磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1(glypican-1, GPC1)作為胰臟癌的診斷，從胰臟癌病人的血清取得的外泌體，含有豐富的GPC1，可明顯與慢性胰臟炎之病人作出區別⁽¹⁷⁾。

腫瘤來源的外泌體含有活性分子，特殊的基因組，和蛋白酶體特性，這些成分皆是

某一個別型態腫瘤的特徵，例如人血清外泌體的長非編碼RNAs-UCA1 和 miRNA可用來作為是否發生癌症的診斷生物標記。從血清外泌體檢測的 EGFR(epidermal growth factor receptor)、PLAP(placental alkaline phosphatase)、LRG1(leucine rich alpha-2-glycoprotein 1)，皆可作為非小細胞肺癌(non-small cell lung carcinoma)的生物標記。

間質基質細胞來源的外泌體之治療應用

間質基質細胞可從不同的人類組織中分離取得，為最易取得的幹細胞之一。間質基質細胞因其具有在組織修復、抗癌治療和抑制炎症反應等應用的潛能，而引起醫學研究人員的興趣。接著更進展到利用間質基質細胞來源的外泌體應用在一些疾病療效模式的探討，包括神經退行性疾病，例如阿茲海默症(Alzheimer's disease)和帕金森氏症(Parkinson's disease)、肌肉萎縮症(muscular dystrophy)、心肌梗塞、肝臟受傷、腎臟受傷、免疫疾病以及癌症等。外泌體除了可能有治療的效用外，基於不同細胞來源的外泌體訊號因子可反應其來源細胞的特異性，也可利用此特性漸漸發展成疾病檢測與治療的新型生物標記物(圖3)。2021年，Mario Gimona曾提到他們發現很快的，可以在實驗室重新呈現那些間質基質細胞來源的外泌體的生物性作用。間質基質細胞來源的外泌體在臨床的應用之優點，在於可避免直接移植外來的(異體的)基質細胞進入體內，可能產生的免疫排斥反應引起的嚴重不良副作用，例如CMV病毒感染(CMV infection)、間質性肺炎(interstitial pneumonia)、移植物對抗宿主疾病(graft versus host disease, GVHD)，和血小板低下紫斑症(thrombocytopenic purpura)等嚴重疾病⁽¹⁰⁾。

源自間質基質細胞的外泌體應用於炎症性疾病的治療

急性胰臟炎、慢性胰臟炎和胰臟癌等疾病，皆表現非常複雜及危急的臨床發病病程。由於胰臟癌不易在早期階段即獲得診斷，死亡率極高。急性胰臟炎和慢性胰臟炎的病理發生原因仍未十



圖3 外泌體可多層面應用於感染性疾病，神經退化性疾病，癌症等疾病的治療，以及應用於CRISPR/Cas9 基因編輯和奈米藥物的運載，而有助於疾病和癌症的治療。除外，也可應用於組織再生和修護，和疾病的診斷。

分明確，且缺乏有效的治療方式，導致病人死亡率亦居高不下。因此確認新的治療標的，和可靠的生物標記物非常迫切需要。現已知MSC來源的外泌體可用來減低炎症反應，和治療炎症性疾病，MSC來源的外泌體尤其是在治療胰臟炎具有潛在的臨床價值。源自MSC的外泌體會過度表現可羅素(Klotho, 由人類KL基因編碼而成的酵素)，此酵素會減輕胰臟炎症反應的嚴重性，可羅素則是從胰臟腺泡細胞所釋放的消化酵素，可羅素過度表現則可使IL-6和TNF- α 之表現降低；再者核蛋白的Bax和NF- κ B也明顯的下調。Bax的作用為啟動細胞計劃性凋亡，NF- κ B路徑則與炎症反應的發生有關。因此可羅素可明顯降低胰臟組織炎症反應和細胞計劃性凋亡的發生，此研究結果暗示可羅素在急性胰臟炎的治療佔有一席之地⁽⁴⁾。

腫瘤來源的外泌體應用於癌症治療仍是在臨床實驗階段

明瞭從腫瘤細胞釋放的外泌體為精確拷貝自原來的細胞的事實，那麼利用外泌體在癌症的免疫治療應是可行的。例如惡性黑色素細胞瘤來源的外泌體(melanoma-derived exosomes) 含有高度免疫原性的抗原，MelanA/Mart-1、結腸癌細胞來源的外泌體含有CEA(carcinoembryonic antigen)

和HER2(human epidermal growth factor Receptor-2)。外泌體所含的腫瘤抗原會刺激CD4+ 和CD8+T細胞，以及從體外培養的抗原呈現細胞(antigen presenting cells, APC)來源的外泌體，可輸入到體內使誘導T細胞活化，因而抑制腫瘤生長。在老鼠動物實驗可發現，樹突細胞來源的外泌體接受腫瘤來源的抗原的鼓動，引發強力的抗腫瘤T細胞反應，使腫瘤呈現消退的變化。

針對病人樹突細胞來源的外泌體和裝載腫瘤來源的dexosomes(Dex)，用於惡性黑色素細胞瘤(malignant melanoma)，和非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer)之免疫治療的一期臨床實驗以評估其療效，發現Dex免疫治療是可行的，能對固有的和適應性免疫反應(innate and adaptive immune response)產生誘導作用；且對部分病人顯現疾病的穩定性，和長期存活的療效。但必須注意的是，腫瘤來源的外泌體之強力的抗腫瘤效用的發生機轉仍然未清楚，此可由以下的事實證明：晚期癌症病患不管其製造豐富的腫瘤來源的外泌體，但這些外泌體無法產生有效的抗腫瘤的作用。腫瘤來源的外泌體曾有報告顯示，直接使用腫瘤來源的外泌體的治療，實際上卻造成免疫抑制，反導致促使腫瘤愈增長的病例。在體外實驗，利用來源於人類惡性黑色素細胞瘤細胞株的外泌體，和源自於人類結直腸癌細胞株的外泌體，使原本會分化成樹突細胞的單核球細胞朝向髓來源抑制細胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)分化，和運用 TGF- β 1 促成的T細胞受抑制作用⁽¹⁸⁾。對於腫瘤來源的外泌體應用於癌症治療前，必須將腫瘤來源的外泌體更加特性和分類，以及進一步確認其在癌症病理發生的影響作用關係，才能完全避免不良的副作用，而使其在癌症治療領域產生顯著正面的效益。

實驗室製造外泌體必須注意事項

外泌體在製造時，以下不同的限制必須切實執行：1. 在選擇適當的MSC時要注意存在於不同捐贈者和組織來源的異質性，2. 利用基因操作從最適合的MSC製造大量的生物製劑，3. 生物反應器允許它們在3D內生長，4. 在理想的培養情況下，例如O₂ 壓力、培養基型態、補充物、受

質和發炎性刺激，5. 在臨床醫學應用前，生物製劑必須經過適當的功能檢驗。

結語

當體內腫瘤在早期階段，或因腫瘤生長部位不易取得檢體時，針對癌症診斷也可利用另一替代方式。傳統取樣(sampling)的做法是利用手術取得組織標本，或細針穿刺，常見於肝、腎、肺、和甲狀腺，抽取小片組織，再製作成組織切片。目前較新的，且非侵襲性的疾病和癌症篩檢方式，即是液態切片。從不同細胞來源的外泌體所含特殊分類的蛋白、核酸、脂質、和相關的訊號因子，可反應其來源細胞的特徵，利用此特性可發展成疾病和癌症診斷的標記。抽取病人的體液或血液之外泌體所作的檢測分析，可追蹤細胞的來源，因此愈加提升疾病診斷的準確性。體液或血液所含外泌體是一種相對安全，且容易操作的液態切片檢驗方式。

許多臨床醫學研究聚焦於改善傳統藥物的效價，發展新的治療法，和直接針對疾病組織標靶之新藥運送系統的開發。外泌體為多功能的天然轉運者，具有高度的生物相容性，深度組織穿透性和通過生物性屏障的能力，例如血腦屏障(blood brain barrier)，多樣的物質運載能力等優點，因此非常適合發展成外泌體基礎的奈米藥物運送系統。在藥物/基因包裝的外泌體之治療應用時，尤其更需慎重的考慮外泌體的來源。不同來源外泌體給予它們不一樣的組成和特性，如是從腫瘤來源的外泌體就需冒著潛在的誘導腫瘤生成的危機。奈米藥物運送系統的發展，已嘗試創新應用於惡性腫瘤的治療，可克服傳統化學療法和放射療法所造成嚴重的副作用和藥物抵抗性。外泌體在臨床的應用，仍存在許多挑戰和困難必須解決。不久的將來在生物科技公司與學術研究單位共同合作下，朝向大規模純化的和優良品質管控的外泌體製造，可以提供符合臨床診斷需求的試劑，和適合應用於疾病治療的外泌體製劑。

參考文獻

1. Zhang Y, Liu Y, Liu H, et al.: Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell and Biosci* 2019; 19: 9-19.
2. Eisenstein M: Inside the stem-cell pharmaceutical factory: vesicles secreted by stem cells might give clinicians a safer and simpler alternative to cell therapy, but researchers are still grappling with how best to prepare and study these tiny particles. *Nature* 2020; 18: S16-S18.
3. Hardin J, Bertoni G, Kleinsmith LJ: *Becker's world of the cell*, 8th ed, San Francisco, Pearson, 2012: 748.
4. Di Bell MA: Overview and update on extracellular vesicles: considerations on exosomes and their application in modern medicine. *Biology* 2022; 804: 1-4.
5. Wu JY, Li YJ, Hu XB, et al.: Preservation of small extracellular vesicles for functional analysis and therapeutic applications: a comparative evaluation of storage conditions. *Drug Deliv* 2021; 28: 162-170.
6. Chen J, Xu Y, Lu W, et al.: Isolation and visible detection of tumor-derived exosomes from plasma. *Anal Chem* 2018; 90: 14207-14215.
7. Chen H, Wang L, Zeng X: Exosomes, a new star for targeted delivery. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 751079.
8. Massagué J: TGF β signaling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 616-630.
9. Zhang L, Yu D: Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2019; 1871: 455-468.
10. Gimona M, Brizzi MF, Choo ABH, et al.: Critical considerations for the development of potency tests for therapeutic applications of mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles. *Cytotherapy* 2021; 23: 373-380.
11. Chiu S, Bharat A: Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2016; 21: 239-245.
12. Zhao LW, Gu CY, Gan Y, et al.: Exosome-mediated siRNA delivery to suppress postoperative breast cancer metastasis. *J Control Release* 2020; 318: 1-15.

13. Kim SM, Yang Y, Oh SJ, et al.: Cancer-derived exosomes as a delivery platform of CRISPR/Cas9 confer cancer cell tropism-dependent targeting. *J Control Release* 2017; 266: 8-16.
14. Wu LJ, Zhang X, Zhang B, et al.: Exosomes derived from gastric cancer cells activate NF-kappa B pathway in macrophages to promote cancer progression. *Tumor Biol* 2016 ; 37: 12169-12180.
15. Jiménez-Alesanco A, Marcuello M, Pastor-Jiménez M, et al.: Acute pancreatitis promotes the generation of two different exosome populations. *Sci Rep* 2019; 9: 19887.
16. Zuo L, Tao H, Xu H, et al.: Exosomes-coated miR-34a displays potent antitumor activity in pancreatic cancer both in vitro and in vivo. *Drug Des Dev Ther* 2020; 14: 3495-3507.
17. Lu H, Niu F, Liu F, et al.: Elevated glypican-1 expression is associated with an unfavorable prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Med* 2017; 6: 1181-1191.
18. Van Niel G, d Angelo G, Raposo G: Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19: 213–228.

