

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09206

研究課題名(和文) 活性化内皮特異的エクソソーム解析によるCOPD病態マーカーの開発

研究課題名(英文) The analyses of cell type-specific extracellular vesicles derived from lung quiescent or cytokine-activated lung endothelial cells

研究代表者

山田 充啓 (YAMADA, MITSUHIRO)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00396483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：COPD病態に關与する刺激が血管内皮細胞のエクソソーム分泌に与える影響を調べた。その結果、炎症刺激が血管内皮細胞のエクソソーム放出を促進し、さらにエクソソームの表面抗原を変化させていた。肺線維症モデルマウスの血清エクソソームを解析し、補正血清エクソソームmicroRNA-21-5pが有意に上昇していた。IPF患者の補正血清エクソソームmicroRNA-21-5pは有意に増加しており、microRNA-21-5pが高い群では30ヶ月以内の死亡率が有意に高く独立した予後予測因子であることを示した。血清エクソソームmicroRNA-21-5pは特発性肺線維症患者の予後不良因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Serum EV miR-21-5p was elevated in both the acute inflammatory phase (day 7) and the chronic fibrotic phase (day 28) in the mouse model. In the clinical setting, serum EV miR-21-5p was significantly higher in IPF patients than in healthy control subjects. The baseline serum EV miR-21-5p was correlated with the rate of decline in vital capacity over 6 months. Furthermore, serum EV miR-21-5p was independently associated with mortality during the following 30 months, even after adjustment for other variables. In the survival analysis, IPF patients whose baseline serum EV miR-21-5p was high had a significantly poorer prognosis over 30 months. Our results suggest that serum EV miR-21-5p has potential as a prognostic biomarker for IPF.

研究分野：呼吸器内科学分野

キーワード：バイオマーカー COPD IPF エクソソーム 細胞外小胞

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) はタバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することで生じた肺の炎症性疾患であり、2020 年には全世界における死因の第 3 位に予測されるなど、世界的にも健康上の大きな脅威となっている。最近の観察研究により、COPD 患者の中に肺機能が急速に低下する患者群や急性増悪頻度が高い患者群が存在することが明らかになり、新しい発想に基づく治療管理法の開発が急務とされている。

近年、COPD は肺局所の炎症疾患だけではなく、全身性の炎症性疾患と考えられてきており (Barns PJ et al. Eur Respir J 2009; 33: 1165)、病態機序の一つとして、慢性炎症による肺および全身の血管傷害の存在が指摘されている。申請者らも、血管内皮傷害の指標である endothelial microparticles (EMPs) が COPD 患者にて有意に上昇していることを明らかにした (Takahashi T, Kobayashi S, Ota C, Yamada M, Yanai M, Kubo H. et al. Thorax 2012; 67: 1067)。

エクソソーム (exosome) は細胞内の小胞構造体である多胞性エンドソームに由来する分泌膜小胞であるが、最近、エクソソームの構成成分 (膜表面蛋白・microRNA など) が由来する細胞の種類・および状態 (炎症・癌化など) によって大きく異なることが明らかになり、新たなバイオマーカー・細胞間のメッセンジャーとして注目されている。そこで、研究代表者は、炎症刺激により活性化した血管内皮より放出される特異的エクソソームを検出することによって、新たな COPD 病態マーカーを確立できないかと考えた。

活性化内皮特異的エクソソームを検出する方法として、研究代表者は研究分担者の開発した ExoScreen 法 (Yoshioka Y, Ochiya T et al. Nature Commun 2014; 5: 3591) に注目した。ExoScreen 法は AlphaLISATM システムを応用したエクソソーム定量解析ツールで、従来のウェスタンや ELISA 法と異なり、全エクソソーム量の測定だけでなく、エクソソーム共通マーカーに対する抗体と特異的な抗原マーカーに対する抗体を組み合わせることによって、細胞種・病態特異的なエクソソームを検出することを可能にした新規の解析方法である。細胞上清の他に血清など体液検体からのエクソソームの検出も可能であり、解析時間についても 96 well assay plate の解析が 2 時間程度で完遂することができ、臨床検体解析に適したハイスループット解析法である。

研究代表者・分担者はヒト肺血管内皮培養細胞を用いた先行実験を行った。ヒト肺血管内皮培養細胞に炎症刺激として TNF を添加し、48 時間後の培養上清を回収した。TNF 刺激により、培養上清中の全エクソソーム (CD9 陽性エクソソーム) 量が優位に増加した。さらに、これまで炎症刺激により血管内皮細胞膜表面に発現が上昇すると報告されている活性化血管内皮マーカーの発現についてエクソソームを解析した所、無刺激では認めなかった、活性化内皮マーカー (E-selectin, VCAM, ICAM-1) 陽性エクソソームが TNF 刺激後に出現・増加していた。以上の結果から、ExoScreen 法により活性化内皮特異的エクソソームの解析が可能であることが明らかになった。そこで申請者は ExoScreen 法を用いた活性化内皮特異的エクソソーム解析による COPD 病態マーカーの開発、および活性化内皮特異的エクソソームの生物学的作用・COPD 病態における役割解明を研究目的とした。

当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義：本研究は研究分担者が新規に開発した ExoScreen 法による細胞種・病態特異的なエクソソーム解析技術を応用し、新規 COPD 病態マーカーの開発を目的としており、方法論も含め独創的な研究である。本マーカーを指標の一つとして治療内容の変更・改善を早期に実施することにより、COPD 患者の治療管理を進歩させ、患者の予後を改善させることが期待された。また、活性化内皮由来のエクソソームの放出機構、構成成分、生物学的作用を解析することにより COPD 病態との関連を明らかにし、放出の抑制や構成成分に対する阻害剤など、エクソソームの調整・介入による新たな治療戦略の構築も期待された。さらに、細胞や病態特異的なエクソソームを同定・解析するという当研究手法は他疾患にも応用可能な手法であり、本研究成果を他疾患の診断・病態解析にも応用・発展させることが十分に期待された。

2. 研究の目的

- (1) 活性化内皮特異的エクソソーム解析による新規 COPD 病態マーカー開発。
- (2) 難治性肺疾患患者に対する新規病態マーカーの開発

3. 研究の方法

- (1) 炎症刺激・酸化・ニトロ化ストレス下の血管内皮細胞由来エクソソームの動態

ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト肺微小血管内

皮細胞に TNF、H2O2、peroxynitrite を与え、回収した上清中エクソソームを ExoScreen 法により測定した。汎エクソソームマーカー (CD9)、血管内皮マーカー (CD105)、活性化血管内皮マーカー (E-selectin、ICAM-1) を用い、汎、および細胞・病態特異的エクソソームを ExoScreen 法にて測定 (Yoshioka Y, et al. Nature Commun 2014; 5:3591) を行った。

(2) 特発性肺線維症における血清エクソソームの解析

線維化病態を反映するエクソソーム microRNA 候補を効率的に抽出するため、ヒト IPF 患者よりも背景の均一であるプレオマイシン肺線維症モデルマウスを用いて解析した。プレオマイシン投与後の血清エクソソームより total RNA を抽出し、逆転写により cDNA を合成後、microRNA PCR array により血清エクソソーム microRNA の発現変化を網羅的に解析した。その際、血清エクソソーム総量により血清エクソソーム中の microRNA 総量が影響される可能性を考慮し、マウス血清エクソソーム量を ExoScreen 法にて測定した。各時点の microRNA 量をエクソソーム量で除した補正值 (補正血清エクソソーム microRNA 量) を算出した。さらに、上記マウスの実験結果にて線維化病態のマーカーの可能性が示唆されたエクソソーム microRNA について、ヒト IPF 患者で検討を行った。44 名を前向きコホート研究に登録して 30 ヶ月間追跡し、コホート登録時の血清エクソソーム microRNA 量および血清エクソソーム量を測定し、補正血清エクソソーム microRNA 量を算出し、IPF 患者の登録時の臨床指標、肺活量の低下率および観察期間における予後との関連を解析した。

4. 研究成果

(1) 炎症刺激・酸化・ニトロ化ストレス下の血管内皮細胞由来エクソソームの動態

COPD 病態に關与する刺激が血管内皮細胞のエクソソーム分泌に与える影響を調べた。ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト肺微小血管内皮細胞に TNF、H2O2、peroxynitrite を与え、回収した上清中エクソソームを ExoScreen 法により測定した。汎エクソソームマーカー (CD9)、血管内皮マーカー (CD105)、活性化血管内皮マーカー (E-selectin、ICAM-1) を用い、汎、および細胞・病態特異的エクソソームを測定した。非刺激下で両内皮細胞上清中に汎および内皮マーカー陽性エクソソームを検出したが、活性化内皮マーカー陽性エクソ

ソームは認めなかった。刺激下では TNF 投与群で汎エクソソームが増加し、活性化内皮マーカー陽性エクソソームを検出した (図 1)。炎症刺激が血管内皮細胞のエクソソーム放出を促進し、さらにエクソソームの表面抗原を変化させると考えられた。

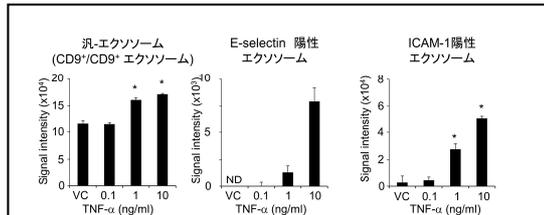


図 1: TNF 刺激後 24 時間後の肺血管内皮細胞上清中のエクソソーム解析。TNF- は 1 ng/ml 以上の刺激において、総エクソソームの放出量を上昇させていた。さらに、E-セレクチン陽性エクソソームは定常状態では同定されないが、TNF- 刺激下で上清中に出現・増加していた。ICAM-1 陽性エクソソームも定常状態に比べ TNF- 刺激により有意に上昇していた。VC: PBS コントロール, ND: 検出感度以下. 測定値は平均 ± 標準誤差 (n = 6), *p<0.05 vs VC.

(2) 特発性肺線維症における血清エクソソーム microRNA-21-5p と予後の関連

特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis: IPF) は、慢性進行性の呼吸器疾患であり、診断からの生存期間中央値が約 3 年であり、5 年生存率が 50% 難治性呼吸器疾患の一つである。IPF の診療の問題点の一つとして、病状の進行速度は個人差が大きく、適切な治療介入時期の決定が難しいことが指摘されており、IPF の病態評価や予後予測が可能でバイオマーカーの確立が望まれている。microRNA は転写後の翻訳調節を通じた遺伝子発現の制御により、生理的な役割のみならず、種々の疾患への関与が報告され、新たな治療標的として注目されている。特発性肺線維症を含めた肺線維化病態においても動物モデルや患者の肺組織における microRNA の発現の変化が報告されるなど、microRNA の線維化病態における役割が現在解析されている。最近、microRNA は本来 RNA が存在しえないと考えられていたヒト体液中にも存在することが判明し、その機序として、細胞外小胞の一つであるエクソソーム (exosome) に内包され安定的に存在していることが明らかとなった。さらに、エクソソームが microRNA を標的細胞へ運搬し、遺伝子発現を制御することが示され、新たな細胞

間コミュニケーションツールとして注目されている。エクソソームは生体内の多くの細胞から血液をはじめとする体液中に放出され、内部に microRNA・mRNA・蛋白質などを含有する。また細胞の状態・環境によりエクソソームの構成成分が変化することが知られている。これらの事実から、エクソソームおよび microRNA を含むエクソソーム成分は、各種疾患の病態を反映するバイオマーカーの有力な候補と考えられた。これまで、IPF 患者肺組織では microRNA 発現プロファイルが変化し、さらにある特定の microRNA が線維化病態の進行に参与していることが報告されている。一方、IPF をはじめ肺線維化病態におけるエクソソームの動態については内容物の microRNA も含めて知られていない。そこで今回我々は、血清エクソソーム中の microRNA プロファイルが線維症病態を反映する特異的な変化を示す可能性を考え、血清エクソソーム中の microRNA がバイオマーカーや病態の予後予測因子になる可能性があるのではないかと考え特発性肺線維症患者の血清エクソソーム中の microRNA の発現に注目し、病態や予後を予測可能なバイオマーカーの探索を試みた。

ブレオマイシン肺線維症モデルマウスの血清エクソソーム microRNA の網羅的解析により、microRNA-21-5p および 155-5p が急性期および慢性・線維化期の双方で有意に上昇していた。さらに各時点のマウスを N=9 とし、この 2 つの microRNA について定量的 PCR にて追加検討したところ、補正血清エクソソーム microRNA-21-5p のみ急性期から修復慢性・線維化期における両時期で有意に上昇していた。さらに、IPF 患者の補正血清エクソソーム microRNA-21-5p は健常対照群 (21 名) と比較して有意に増加しており、IPF 群ではコホート登録時の KL-6 やその後の肺活量の低下と有意な相関を認めた(図 2)。また、補正血清エクソソーム microRNA-21-5p が高い群では 30 ヶ月以内の死亡率が有意に高く、独立した予後予測因子であることを示した。一方、microRNA 測定値そのもの(無補正血清エクソソーム microRNA-21-5p)は肺活量の低下との相関はなかったが、高値群では 30 ヶ月以内の死亡率が有意に高いことが示された(図 3)。血清エクソソーム microRNA-21-5p は特発性肺線維症患者の独立した予後不良因子であることが示唆された。

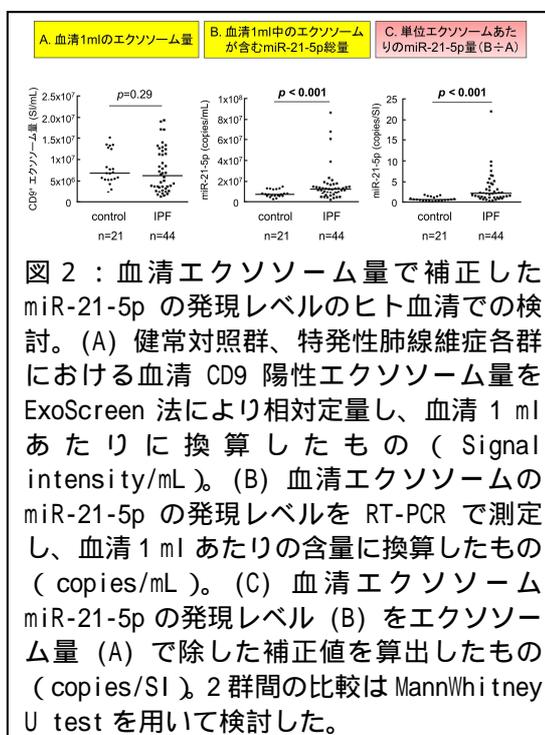


図 2 : 血清エクソソーム量で補正した miR-21-5p の発現レベルのヒト血清での検討。(A) 健常対照群、特発性肺線維症各群における血清 CD9 陽性エクソソーム量を ExoScreen 法により相対定量し、血清 1 ml あたりに換算したもの (Signal intensity/mL)。 (B) 血清エクソソームの miR-21-5p の発現レベルを RT-PCR で測定し、血清 1 ml あたりの含量に換算したもの (copies/mL)。 (C) 血清エクソソーム miR-21-5p の発現レベル (B) をエクソソーム量 (A) で除した補正值を算出したもの (copies/SI)。2 群間の比較は MannWhitney U test を用いて検討した。

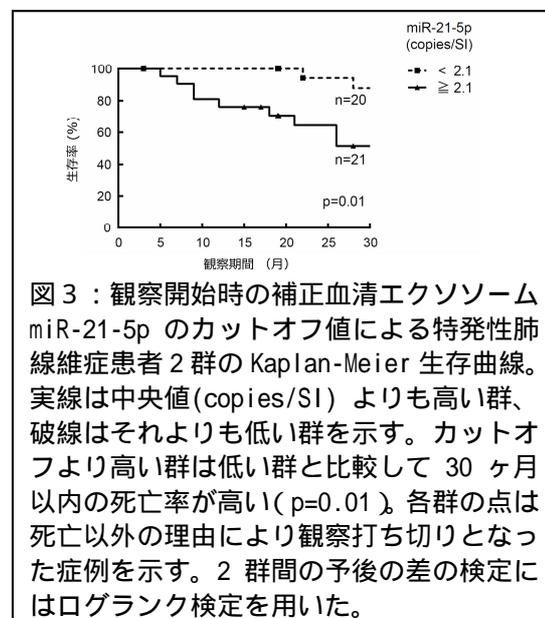


図 3 : 観察開始時の補正血清エクソソーム miR-21-5p のカットオフ値による特発性肺線維症患者 2 群の Kaplan-Meier 生存曲線。実線は中央値(copies/SI) よりも高い群、破線はそれよりも低い群を示す。カットオフより高い群は低い群と比較して 30 ヶ月以内の死亡率が高い (p=0.01)。各群の点は死亡以外の理由により観察打ち切りとなった症例を示す。2 群間の予後の差の検定にはログランク検定を用いた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

1. 山田充啓: ARDS におけるエクソソームと miRNA 呼吸器内科 2018;33: 66-71. 査読無
2. Hirano T, Yamada M, Sato K, Murakami K, Tamai T, Mitsuhashi Y, Tamada T, Sugiura H, Sato N, Saito R, Tominaga J, Watanabe A, Ichinose M. Invasive pulmonary mucormycosis: rare

presentation with pulmonary eosinophilia. BMC Pulm Med 2017; 17: 76. 査読有

DOI: 10.1186/s12890-017-0419-1

3. 山田充啓: 炎症性呼吸器疾患バイオマーカーとしてのエクソソームの意義 医学のあゆみ 2017; 260: 533-534. 査読無
4. Makiguchi T, Yamada M, Yoshioka Y, Sugiura H, Koarai A, Chiba S, Fujino N, Tojo Y, Ota C, Kubo H, Kobayashi S, Yanai M, Shimura S, Ochiya T, Ichinose M. Serum extracellular vesicular miR-21-5p is a predictor of the prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Res 2016; 17. 査読有 DOI: 10.1186/s12931-016-0427-3
5. Yamada M, Fujino N, Ichinose M. Inflammatory responses in the initiation of lung repair and regeneration: their role in stimulating lung resident stem cells. Inflammation and Regeneration 2016; 36: 15. 査読有 DOI: 10.1186/s41232-016-0020-7
6. Yamada M, Ichinose M. Cutting edge of COPD therapy: current pharmacological therapy and future direction. COPD Research and Practice 2015; 1. 査読有 DOI: 10.1186/s40749-015-0009-7
7. 山田充啓: 呼吸器疾患の分子病態に迫る「エクソソーム」 Respiratory Medical Research 2015;3: 8-13. 査読無
8. 山田充啓: 血管炎症におけるエクソソームを用いたバイオマーカー 血管医学 2015; 16: 61-68. 査読無
9. 山田充啓: 細胞外小胞に着目した呼吸器疾患の診断・病態マーカーの探索 医学のあゆみ 2015;255:203-208. 査読無

〔学会発表〕(計8件)

1. Tojo Y, Yamada M, Fujino N, Chiba S, Shibuya R, Koarai A, Sugiura H, Ogawa H, Ichinose M. Gene Expression Profiles in Isolated Lung Endothelial Cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. The International Conference of the American Thoracic Society 2017 in Washington DC, USA.
2. 山田充啓: 重症喘息の定義・分類と治療戦略 専門医の腕が試される「重症喘息の治療戦略: 下気道感染の観点から」第66回日本アレルギー学会学術集

- 会 東京 2017年4月(シンポジウム).
3. Makiguchi T, Yamada M, Yoshioka Y, Sugiura H, Koarai A, Kubo H, Ochiya T, Ichinose M. Identification of Serum Extracellular Vesicle microRNA as a Biomarker for Prognosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. The International Conference of the American Thoracic Society 2016 in San Francisco, USA.
4. 山田充啓: COPD 研究の新展開「microRNA と細胞外小胞 - 病態での役割とバイオマーカーとしての意義 - 」第56回日本呼吸器学会学術講演会 京都 2016年4月(シンポジウム).
5. 牧口友紀、山田充啓、吉岡祐亮、杉浦久敏、小荒井晃、大田千晴、久保裕司、小林誠一、矢内 勝、志村早苗、一ノ瀬正和: 特発性肺線維症の予後予測因子としての血清エクソソーム microRNA 第56回日本呼吸器学会学術講演会 京都 2016年4月(一般演題).
6. Makiguchi T, Yamada M, Yoshioka Y, Sugiura H, Koarai A, Kubo H, Ochiya T, Kikuchi T, Ichinose M. The Detection of Cell Type-Specific Extracellular Vesicles Derived from Lung Epithelial Cells, Stable or Cytokine-Activated Endothelial Cells by Exoscreen. The International Conference of the American Thoracic Society 2015 in Denver, USA.
7. 山田充啓: 炎症は再生を抑制するか “Inflammation and Regeneration in Cross-organs” 「肺の再生と炎症」第36回日本炎症・再生医学会 東京 2015年7月(シンポジウム).
8. 山田充啓: ARDS の多面的評価 「エクソソームと microRNA: 新規病態マーカーとしての可能性」第55回日本呼吸器学会学術講演会 東京 2015年4月(シンポジウム).

〔図書〕(計2件)

1. 山田充啓: 第6章 創薬~DDS/新規バイオマーカー 第6節 エクソソームを用いた炎症性肺疾患新規バイオマーカーの探索. 落谷孝広 監修. パラダイムシフトをもたらすエクソソーム機能研究最前線. エヌ・ティー・エス, p235-243, 2017.
2. 山田充啓: IV BAL の今後の展開 A. エクソソーム解析. 日本呼吸器学会びまん性肺疾患学術部会編集, 気管支肺泡洗浄(BAL)法の手引き, 改訂第3版. 克誠堂出版, p193-196, 2017.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 充啓 (YAMADA, Mitsuhiro)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：00396483

(2)研究分担者

吉岡 祐亮 (YOSHIOKA, Yusuke)
国立研究開発法人国立がん研究センター・
研究所・研究員
研究者番号：60721503