

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09219

研究課題名(和文) エクソソームの最新プロテオミクスによる新規COPDバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Proteomics of peripheral exosome identifies novel biomarkers for COPD

研究代表者

武田 吉人 (Takeda, Yoshito)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40452388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：閉塞性肺疾患のエクソソームの網羅的解析から、病態解明や個別化医療に役立つ新規BMを探索した。肺気腫モデルと喘息モデルの血清エクソソームについて、ノンラベル定量プロテオミクスを行った。COPDと喘息モデルにおいて、疾患特異的・両疾患共有の蛋白だけでなく、病勢との相関を認めるBM候補を同定した。同様に、ヒトについても新規BM候補を見出した。今後は、これらマウスとヒトから見出した新規BM候補についてターゲットプロテオミクスMRMにて大規模検証から臨床応用可能なBM同定に挑戦する。

研究成果の概要(英文)：In spite of massive investment in the discovery of novel biomarkers, there is currently no specific biomarker for COPD. In order to challenge this problem, we focused on exosomes which contain both great deal of information from pathogenic cells and less protein such as albumin by utilizing the most advanced proteomics. To explore novel biomarkers for inflammation as well as COPD, we utilized acute lung injury model by LPS and emphysema model by elastase. An iTRAQ-Based Proteomic Analysis and subsequent MRM verification were performed. From Quantitative Proteomics, we obtained 1300 proteins. Among them, 64 proteins were up-regulated in emphysema model, 52 proteins in LPS group, and 14 proteins in both groups. Of note, these proteomic profiles reflect their characteristics, respectively. Among 26 proteins from these candidates, 14 proteins were verified by MRM. Using these novel BM candidates, we are further going to validate them in human.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：バイオマーカー プロテオミクス エクソソーム 閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息 (BA) は、患者数が3億人に及ぶと推測され、有病率の増加が社会的・経済的負担となっている。**慢性閉塞性肺疾患 (COPD)** は、2020年には世界死因の第3位と推定されているものの、多くの患者は未診断のまま放置され、新規の病態解明や治療法開発が望まれる。これら閉塞性肺疾患は、遺伝的素因に加齢・環境・喫煙などの外的要因が加わることで発症する複雑・多様な疾患であるだけでなく、両者が合併するACOの存在も注目されていることから、診断・治療・新薬開発ストラテジーのパラダイムシフトとして特異性の高いバイオマーカー(BM)の開発が急務とされる。

革新的なテクノロジーの進歩により、種々の網羅的解析による病態解明が試みられているが、最も有用なバイオマーカー・サンプルとしての血清は、多くの夾雑物を含むためにプロテオミクスによるBM同定が困難である。そこで血球系細胞や上皮細胞をはじめあらゆる細胞から分泌される**細胞外小胞：エクソソーム (Exosome)** に注目した。脂質二重膜で包まれるエクソソームは、タンパク、核酸や脂質を内包し、ドナー細胞からレシピエント細胞へと細胞間や臓器間を移動する新たなメッセンジャーとして機能する。エクソソームは、(1) 病因となる細胞内の分子情報をプロテアーゼにより分解されずに保有、(2) 末梢や体液から容易に採取可能、(3) 大量夾雑物を含まない、などの理由から理想的なBMのリソースとみなしうる。

2. 研究の目的

本研究目的は、閉塞性肺疾患 (BA, COPD) のエクソソームの網羅的解析から、病態解明や個別化医療に役立つ新規 BM を探索することである。

3. 研究の方法

最新プロテオミクスによる多くの BM 候補から、定量的質量分析 (MRM/SRM) により選択的かつ効率的に大量 BM 候補から「真の BM」を絞り込む。ヘテロなヒト疾患のアプローチのために、マウスモデルから BM を絞り込みヒトへの応用を試みると同時に、ノンラベル・定量プロテオミクスにより、直接ヒト検体から画期的な BM 探索に挑戦する。

4. 研究成果

急性肺障害モデルと肺気腫モデルの末梢血から単離したエクソソームのラベル化・定量プロテオミクス比較解析から、1300種類のエクソソーム蛋白同定に成功した。さらに、従来組織でしか捉え

Qualitative difference in exosomal proteins

増加

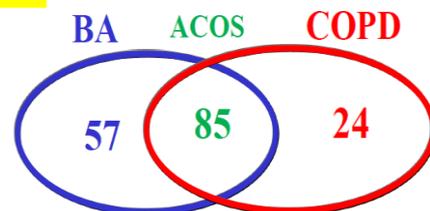


図2 末梢エクソソームから同定した新規BM候補
マウスモデルから、喘息特異的BMを57種類、COPD特異的BMを24種類、両疾患共通BMを85種類同

ることができなかった膜蛋白や鍵分子を含むだけでなく、エクソソームのタンパクプロフィールが急性炎症&慢性炎症の特徴を捉えていること示した。

さらに、COPD特異的&慢性炎症特異的BM候補から、MRM/SRMにて新規BMを約20種類検証するだけでなく、疾患活動性との相関があるBMの絞り込みに成功した。

2013年からエクソソームの種々の単離法(抗体法, 超遠心、研究協力者が開発したEV second)と検証(電子

顕微鏡, qNano) を確立している。喘息モデルとして標準とされる OVA 誘導性喘息モデルを、疾患コントロール (COPD) と比較することで、疾患特異的な BM 探索に挑戦する。末梢血由来エクソソームを、ノンラベル・定量プロテオミクス (Linear Trap Quadrupole (LTQ) Orbitrap Velos Mass Spectrometry) により解析する。本手法を用いることで、純粹かつ短時間で単離したエクソソームから、750 種類の蛋白同定に成功した。本解析により喘息特異的な BM (増加群) を 142 種類、COPD 特異的な BM を 109 種類、COPD と喘息共通の BM を 85 種類同定することに成功した。

マウスモデルを用いたエクソソームのプロテオミクスから、予想を上回る新規 BM 候補を同定した。上記結果につて、特許申請を終えて現在論文投稿準備中である。同時に、ヒトへの応用を検証中であり、臨床応用可能な BM 発見を目指す。

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] (11 件)

1. Lysosomal Protein Lamtor1 Controls Innate Immune Responses via Nuclear Translocation of Transcription Factor EB. Hayama Y, Kimura T, Takeda Y, Nada S, Koyama S, Takamatsu H, Kang S, Ito D, Maeda Y, Nishide M, Nojima S, Sarashina-Kida H, Hosokawa T, Kinehara Y, Kato Y, Nakatani T, Nakanishi Y, Tsuda T, Koba T, Okada M, Kumanogoh A. *J Immunol*. 2018 Apr 23. pii: ji1701283. doi: 10.4049/jimmunol.1701283.
2. Double deletion of tetraspanins CD9 and CD81 in mice leads to a syndrome resembling accelerated aging. Jin Y, Takeda Y, Kondo Y, Tripathi LP, Kang S, Takeshita H, Kuhara H, Maeda Y, Higashiguchi M, Miyake K, Morimura O, Koba T, Hayama Y, Koyama S, Nakanishi K, Iwasaki T, Tetsumoto S, Tsujino K, Kuroyama M, Iwahori K, Hirata H, Takimoto T, Suzuki M, Nagatomo I, Sugimoto K, Fujii Y, Kida H, Mizuguchi K, Ito M, Kijima T, Rakugi H, Mekada E, Tachibana I, Kumanogoh A. *Sci Rep*. 2018 Mar 23;8(1):5145.
3. WT1 peptide-based immunotherapy for advanced thymic epithelial malignancies. Oji Y, Inoue M, Takeda Y, Hosen N, Shintani Y, Kawakami M, Harada T, Murakami Y, Iwai M, Fukuda M, Nishida S, Nakata J, Nakae Y, Takashima S, Shirakata T, Nakajima H, Hasegawa K, Kida H, Kijima T, Morimoto S, Fujiki F, Tsuboi A, Morii E, Morita S, Sakamoto J, Kumanogoh A, Oka Y, Okumura M, Sugiyama H. *Int J Cancer*. 2018 Jan 11. doi: 10.1002/ijc.31253
4. Trastuzumab emtansine suppresses the growth of HER2-positive small-cell lung cancer in preclinical models. Morimura O, Minami T, Kijima T, Koyama S, Otsuka T, Kinehara Y, Osa A, Higashiguchi M, Miyake K, Nagatomo I, Hirata H, Iwahori K, Takimoto T, Takeda Y, Kida H, Kumanogoh A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jul 8;488(4):596-602
5. Effect of 4[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)carbamoyl]benzoic acid (Am80) on alveolar regeneration in adiponectin deficient-mice showing a chronic obstructive pulmonary disease like pathophysiology. Sakai H, Horiguchi M, Akita T, Ozawa C, Hirokawa M, Oiso Y, Kumagai H, Takeda Y, Tachibana I, Maeda N, Yamashita C. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017
6. Classification of idiopathic interstitial pneumonias using anti-myxovirus resistance-protein 1 autoantibody. Hamano Y, Kida H, Ihara S, Murakami A, Yanagawa M, Ueda K, Honda O, Tripathi LP, Arai T,

- Hirose M, Hamasaki T, Yano Y, Kimura T, Kato Y, Takamatsu H, Otsuka T, Minami T, Hirata H, Inoue K, Nagatomo I, Takeda Y, Mori M, Nishikawa H, Mizuguchi K, Kijima T, Kitaichi M, Tomiyama N, Inoue Y, Kumanogoh A. *Sci Rep*. 2017 Feb 23;7:43201.
7. Rapid intracranial response to osimertinib, without radiotherapy, in nonsmall cell lung cancer patients harboring the EGFR T790M mutation: Two Case Reports. Koba T, Kijima T, Takimoto T, Hirata H, Naito Y, Hamaguchi M, Otsuka T, Kuroyama M, Nagatomo I, Takeda Y, Kida H, Kumanogoh A. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Feb;96(6):e6087.
 8. Clarifying the biological significance of the CHK2 K373E somatic mutation discovered in The Cancer Genome Atlas database. Higashiguchi M, Nagatomo I, Kijima T, Morimura O, Miyake K, Minami T, Koyama S, Hirata H, Iwahori K, Takimoto T, Takeda Y, Kida H, Kumanogoh A. *FEBS Lett*. 2016 Dec;590(23):4275-4286.
 9. Sun J, Wang J, Pefanis E, Chao J, Rothschild G, Tachibana I, Chen JK, Ivanov II, Rabadan R, Takeda Y, Basu U. Transcriptomics Identify CD9 as a Marker of Murine IL-10-Competent Regulatory B Cells. *Cell Rep*. 2015 Nov 10;13(6):1110-7.
 10. Takeda Y, Suzuki M, Jin Y, Tachibana I. Preventive Role of Tetraspanin CD9 in Systemic Inflammation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015 Dec;53(6):751-60.
 11. Epiplakin is a Paraneoplastic Pemphigus Autoantigen and Related to Bronchiolitis Obliterans in Japanese Patients. Tsuchisaka A, Numata S, Teye K, Natsuaki Y, Kawakami T, Takeda Y, Wang W, Ishikawa K, Goto M, Koga H, Sogame R, Ishii N, Takamori S, Hoshino T, Brandt O, Pas HH, Fujiwara S, Hashimoto T. *J Invest Dermatol*. 2015 Oct 19.
- [学会発表] (10 件)
1. 武田吉人、木庭太郎、葉山善友、玄山宗到、滝本宜之、木田博、熊ノ郷淳、白水崇、朝長毅 Discovery of novel COPD biomarker from peripheral exosomes by Quantitative proteomics 呼吸器学会総会 2017. 4. 20 東京国際フォーラム
 2. 玄山宗到、武田吉人、葉山善友、滝本宜之、木島貴志、熊ノ郷 淳、植田幸嗣 エクソソームの最新プロテオミクスによる COPD・喘息の新規バイオマーカー探索 呼吸器学会総会 2017. 4. 20 東京国際フォーラム
 3. 滝本 宜之、武田 吉人、白水 崇、平田 陽彦、玄山 宗到、木田 博、木島 貴志、朝長 毅、熊ノ郷 淳 プロテオミクスによる肺リンパ脈管筋腫症の新規バイオマーカーの探索 呼吸器学会総会 2017. 4. 20 東京国際フォーラム
 4. Yoshito Takeda, Yasushi Kondo, Yingji Jin, Mari Ito, Lokesh P. Tripathi, Kenji Mizuguchi, Atsushi Kumanogoh Double deletion of tetraspanins CD9 and CD81 in mice leads to a syndrome resembling accelerated aging Keystone Symposia 2017. 5. 15. 横浜
 5. 玄山宗到、武田吉人、葉山善友、滝本宜之、木島貴志、熊ノ郷 淳、植田幸嗣 エクソソームの最新プロテオミクスによる COPD・喘息の新規バイオマーカー探索 第3回骨免疫学会、6月27日 石垣島
 6. 木庭太郎、武田吉人、葉山善友、玄山宗到、滝本宜之、木田博、熊ノ郷淳、白水崇、朝長毅 エクソソームの最新プロテオミクスによる新規 COPD バイオマーカーの探索 第3回骨免疫学会、6月27日 石垣島
 7. 武田 吉人・玄山 宗到・木庭 太郎・滝本 宜之・木田 博・植田 幸嗣・熊ノ郷 淳、エクソソームの最新プロテオミクスによる喘息の新規バイオマーカー探索 第15回日本プロテオーム学会 2017/7/27
 8. 木庭太郎、武田吉人、葉山善友、玄山宗到、滝本宜之、木田博、熊ノ郷淳、白水崇、朝長毅エクソソームの最新プロテオミクスによる新規COPDマーカーの探索 第15回日本プロテオーム学会 2017/7/27
 9. 木庭太郎、武田吉人、白水崇、葉山善友、熊ノ郷 淳、朝長 毅、エクソソームの最新プロテオミクスによる新規 COPD パ

- イオマーカーの探索, 第4回日本細胞外小胞学会 2017/8/30
10. 松木隆典、木庭太郎、滝本宜之、武田吉人、植田幸嗣. 血清エクソソームのプロテオミクスを用いた線維化バイオマーカーの探索 第4回日本細胞外小胞学会 2017/8/30

- (3) 連携研究者
なし
- (4) 研究協力者
なし

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 5 件)

特願2017-48161 炎症バイオマーカー、発明者：武田吉人、熊ノ郷淳、葉山善友、特許登録日 2017年3月14日

特願2017-48164 閉塞性肺疾患バイオマーカー、発明者：武田吉人、熊ノ郷淳、玄山宗到、植田幸嗣、特許登録日 2017年3月14日

特願2017-48167 組織線維化バイオマーカー、発明者：武田吉人、熊ノ郷淳、松木隆典、植田幸嗣、特許登録日 2017年3月14日

特願2017-48171 慢性閉塞性肺疾患バイオマーカー、発明者：武田吉人、熊ノ郷淳、木庭太郎、特許登録日 2017年3月14日

特願2017-48173 老化バイオマーカー、発明者：武田吉人、熊ノ郷淳、植田幸嗣、特許登録日 2017年3月14日

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/imed3/lab_8/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田吉人 (TAKEDA YOSHITO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40452388

(2) 研究分担者

なし