

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09600

研究課題名（和文）末梢血エクソソームRNA解析による閉塞性肺疾患の類似性・相違点・合併病態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of similarities, differences, and overlap in obstructive pulmonary diseases by peripheral blood exosomal RNA analysis

研究代表者

鈴木 雅（Suzuki, Masaru）

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：10374290

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）：質の高い末梢血エクソソームRNA収集に困難を極めたため、末梢血中の網羅的プロテオーム解析を行い、エクソソーム関連蛋白との関わりを検討した。COPDと難治性喘息の間には365の蛋白発現の有意な相違を認めた。プロテオームプロファイルによるクラスター解析により、COPDでは3つ、難治性喘息では4つのクラスターが同定された。そのクラスタリングに關与する蛋白群には有意にエクソソームマーカーが多く含まれていた。以上より、COPDと難治性喘息の血漿プロテオームプロファイルには違いがあるものの、両疾患のプロテオームによるクラスタリングにはエクソソームが強く關連していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢血中の網羅的プロテオーム解析を行ったところ、COPDならびに難治性喘息には臨床的な表現型とは異なった分子生物学的なエンドタイプが存在することが示され、またそのエンドタイプの形成にエクソソーム由来の蛋白質が関わっていることが示された。今後の治療ターゲットの探索においても閉塞性肺疾患の類似性・相違点・合併病態を分子生物学的な側面からさらに検討することが重要であると考えられ、今後も末梢血中のエクソソームを標的とした研究の継続が望まれる。

研究成果の概要（英文）：Because of the difficulty in collecting high-quality peripheral blood exosomal RNA, we performed a comprehensive proteome analysis in peripheral blood to investigate the relationship between exosome-related proteins. Proteome analysis revealed that 365 plasma proteins were significantly different between COPD and severe asthma. Cluster analysis by using proteome profile data identified three clusters in COPD and four clusters in severe asthma. The protein groups involved in the clustering contained significantly more exosome markers. These results indicate that although there are differences in the plasma proteome profiles of COPD and severe asthma, exosomes are strongly associated with proteomic clustering in both diseases.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：COPD 気管支喘息 エクソソーム プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息および慢性閉塞性肺疾患 (COPD) はともに慢性の気道炎症と閉塞性換気障害を特徴とする閉塞性肺疾患である。歴史的には別個の疾患として扱われてきたが、1960年代には既に両者は共通の素因を有する疾患群とするオランダ学説も登場し、類似性についても議論されてきた。さらに近年、両者の合併病態 (喘息-COPD オーバーラップ: ACO) がより重症で予後不良な患者群として注目され、特に高齢者における両者の合併病態が問題となっている。しかしながら臨床的に意義のある診断基準は未だ定まっておらず、ACO の中にも異なる臨床表現型が存在することが予想されている。よって、両者の類似性、相違点および合併病態の再整理ならびに個別化医療の実践に向けた分子生物学的病態の理解が必要である。

一方で、エクソソームは生体内で細胞から分泌される直径 30~100 nm 程度の脂質二重膜の小胞であるが、近年、エクソソームには様々な蛋白質や核酸が含まれていることが報告されている。特に多くの遺伝子や蛋白発現制御に関与している microRNA が内包されていることが示され、これまで細胞内でのみ働くとしてきた microRNA が細胞外へ分泌され、細胞間の情報伝達を担う重要な働きがあることが示された。そして、その RNA プロファイルは分泌元の細胞の状態を反映すると考えられるため、網羅的に解析することで病態の解明や非侵襲的なバイオマーカーの同定につながることを期待されている。

2. 研究の目的

当初の目的は観察コホート研究で得られた臨床サンプルの末梢血エクソソーム RNA の網羅的解析により、気管支喘息と COPD の類似性、相違点および合併病態の解明ならびに臨床的に意義のあるバイオマーカーを確立することであったが、末梢血中のエクソソーム単離ならびに質の高い RNA 収集に困難を極めた。そこで、末梢血中の網羅的プロテオーム解析を行い、両疾患の類似性と相違点の検討、および両疾患におけるプロテオームプロファイルからのクラスタリングを行うことを目的とし、エクソソーム関連蛋白との関わりを検討することとした。

3. 研究の方法

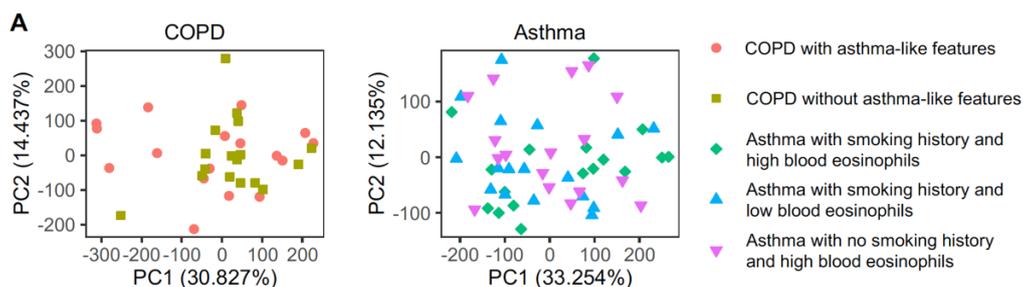
北海道 COPD コホート研究に参加した COPD 患者 34 名および北海道難治性喘息コホート研究に参加した難治性喘息患者 51 名を対象とした。COPD 患者は喘息様検査所見の有無により 2 群、難治性喘息患者は非喫煙・好酸球性、喫煙・好酸球性、喫煙・非好酸球性の 3 群、各 17 検体を用いた。血漿 150 μ L を用いて、SomaLogic 社の SOMAscan により、1310 種の蛋白質の定量を網羅的に行った。

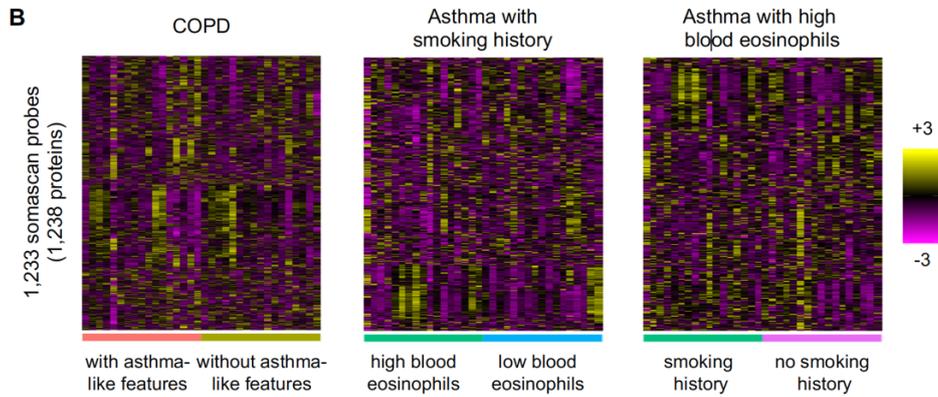
4. 研究成果

SOMAscan による測定で、1310 種中 1238 蛋白の定量結果が解析可能であった。

(1) COPD ならびに難治性喘息の臨床フェノタイプ間での末梢血プロテオームプロファイルの比較

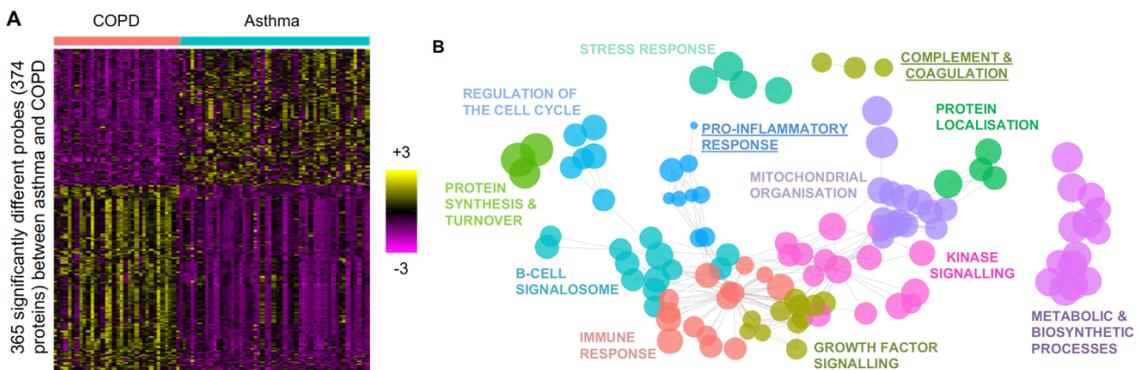
COPD 患者は喘息様検査所見の有無により 2 群、難治性喘息患者は非喫煙・好酸球性、喫煙・好酸球性、喫煙・非好酸球性の 3 群で末梢血プロテオームプロファイルを比較したが、主成分分析 (下図 A) ならびに各蛋白量のヒートマップ (下図 B) でも各疾患の各臨床フェノタイプ間で明らかなプロテオームプロファイルの相違は認められなかった。





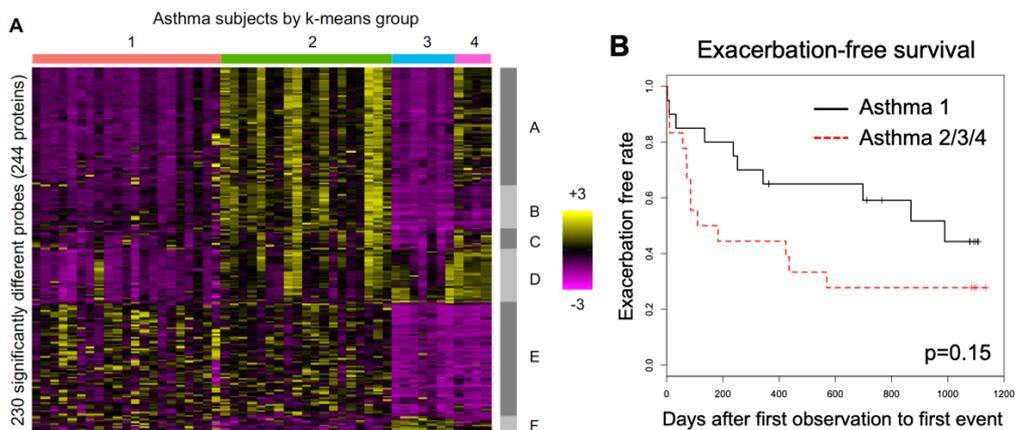
(2) COPD と難治性喘息間での末梢血プロテオームプロファイルの比較

次に、COPD 患者全体と難治性喘息患者全体での末梢血プロテオームプロファイルを比較した。その結果、365 蛋白が有意に両疾患間で定量結果が異なっていた (下図 A)。それらの蛋白を用いてネットワーク分析を行い、対応する生体機能を付した図を下に示す (下図 B)。



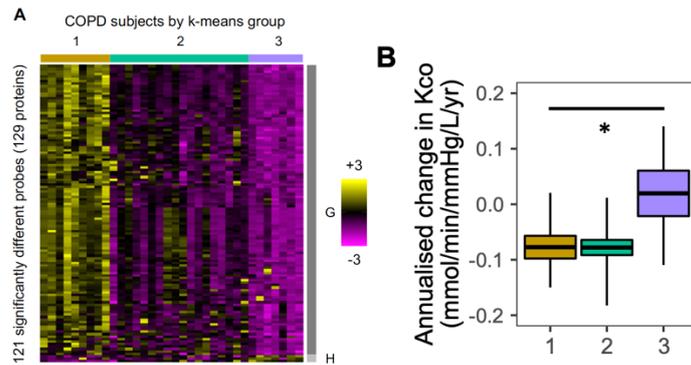
(3) 難治性喘息における末梢血プロテオームプロファイル情報のみに基づくクラスター解析

難治性喘息患者において末梢血プロテオームプロファイル情報のみに基づいてクラスター解析を行ったところ、6つの蛋白質群 (A~F) によって4つのクラスター (1~4) が同定された (下図 A)。ベースラインでの臨床的特徴に各クラスター間で大きな差は認められなかったが、クラスター1では他のクラスターに比べて無増悪期間が長い傾向にあった。



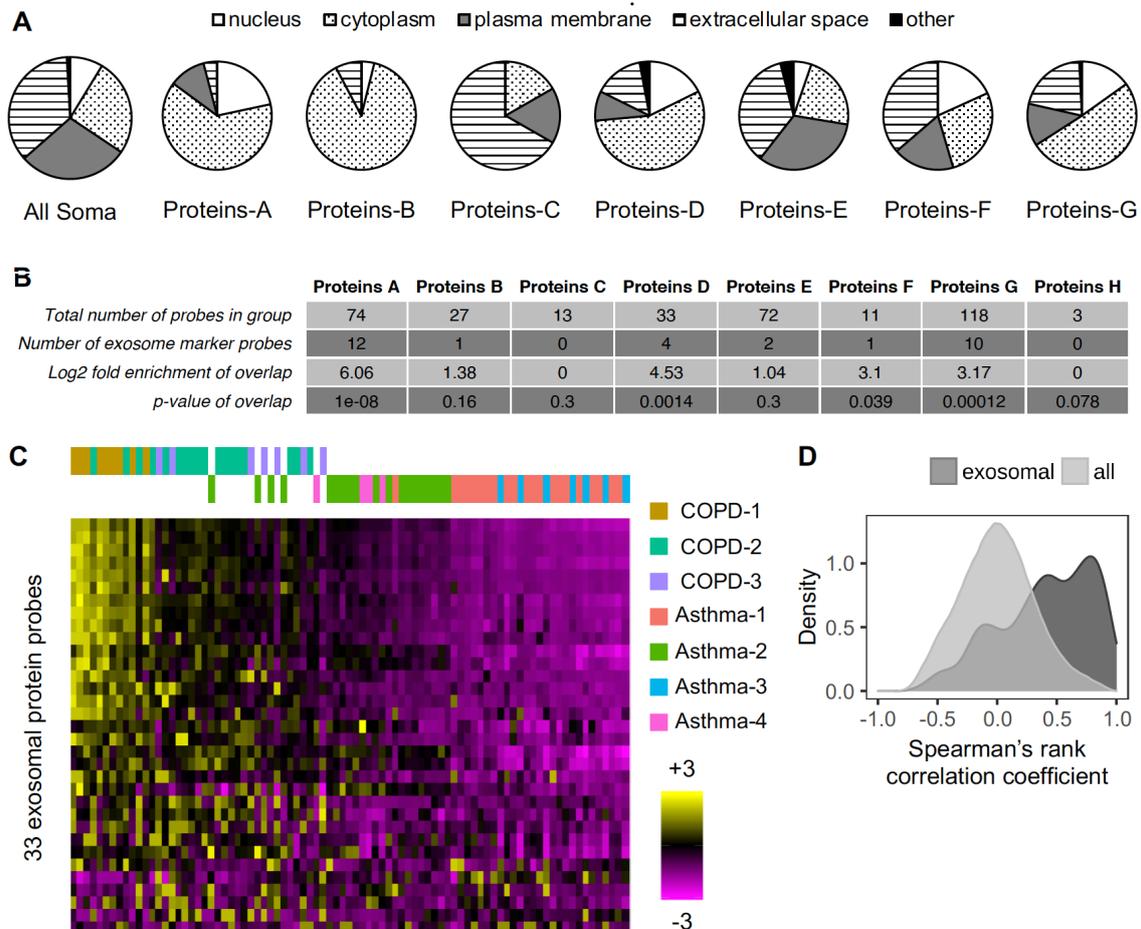
(4) COPD における末梢血プロテオームプロファイル情報のみに基づくクラスター解析

COPD 患者において末梢血プロテオームプロファイル情報のみに基づいてクラスター解析を行ったところ、2つの蛋白質群 (G, H) によって3つのクラスター (1~3) が同定された (下図 A)。ベースラインでの臨床的特徴に各クラスター間で大きな差は認められなかったが、クラスター3では他のクラスターに比べて肺拡散能力 (Kco) の経年低下量が緩やかであった (下図 B)。



(5) COPD と難治性喘息のクラスタリングに寄与する蛋白質群とエクソソームマーカーとの関わり

COPD と難治性喘息のクラスタリングに寄与する末梢血中の蛋白質群 (A~G) のうち、A、B、D、G は核内あるいは細胞質内に局在する蛋白質の割合が多かったため (下図 A)、細胞から放出されるエクソソームとの関連が示唆された。実際に、ExoCarta による 33 のエクソソームマーカーとの関連を検討すると、A、D、G の蛋白質群は有意にエクソソームマーカーを多く含んでいた (下図 B)。そして、COPD と難治性喘息患者合わせて 33 のエクソソームマーカーを用いて行ったクラスター解析では、特に COPD のクラスター1~3 および難治性喘息のクラスター2 と 4 が近い位置にクラスタリングされ、エクソソームとの関連が示唆された。さらに、これらのエクソソームマーカーが細胞外小胞の分泌を反映していることは、全ての蛋白質と比較してエクソソームマーカーが互いに強い相関を有していることからの支持された (下図 D)。



以上より、COPD ならびに難治性喘息の分子生物学的エンドタイプの形成にエクソソーム由来の蛋白質が関わっていることが示され、今後も末梢血中のエクソソームを標的とした研究の継続が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takei N, Suzuki M, Makita H, Konno S, Shimizu K, Kimura H, Kimura H, Nishimura M	4. 巻 14
2. 論文標題 Serum alpha-1 antitrypsin levels and the clinical course of chronic obstructive pulmonary disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Chron Obstruct Pulmon Dis	6. 最初と最後の頁 2885-2893
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/COPD.S225365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nozomu Takei, Masaru Suzuki, Hironi Makita, Satoshi Konno, Kaoruko Shimizu, Hiroki Kimura, Hirokazu Kimura, Masaharu Nishimura
2. 発表標題 Association of beta-2 adrenergic receptor (ADRB2) gene polymorphisms with long-term clinical course of COPD in Japanese population
3. 学会等名 The 114th American Thoracic Society International Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Suzuki, John J. Cole, Satoshi Konno, Hiroki Kimura, Masaharu Nishimura, Rose A. Maciewicz
2. 発表標題 Large-scale plasma proteome analysis of COPD and asthma: significant differences between the two diseases and identification of novel biological clusters within each disease
3. 学会等名 The 113th American Thoracic Society International Conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今野 哲 (Konno Satoshi) (20399835)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------