

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09196

研究課題名(和文) 気道分泌型エクソソームの情報に基づく喘息・COPDの病態解明とバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Identification of biomarker for pathogenesis on asthma and COPD based on airway secreted exosome

研究代表者

権 寧博 (GON, yasuhiko)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：80339316

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)：喘息とCOPDにおけるバイオマーカーは、治療が有効な対象を正確に同定し、気道疾患における精密な医療の提供を可能とする。miRNAは細胞外小胞(EV)を介し細胞間コミュニケーションに関係するが、気道炎症におけるEV内のmiRNAの役割は不明であった。本研究は、これらの役割を明らかにすることでEVのmiRNAを気道炎症の管理に役立てることを目的とした。本研究は、アレルゲン刺激でAEV量が増加するが、アレルギーに関係する遺伝子を抑制するmiRNAの遺伝子がAEVで増加し、肺組織中で低下する関係にあった。この結果から、AEV中のmiRNAはアレルギー性気道炎症のバイオマーカーとして役立つことが示された。

研究成果の概要(英文)：In the management of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), biomarkers will allow the identification of those patients who will respond to therapies and will also facilitate future therapeutic development. MicroRNAs (miRNAs) may facilitate cell-to-cell communication via extracellular vesicles (EVs). The biological roles of miRNAs in EVs on allergic airway inflammation is unclear. The amount of AEV increased allergen-exposed mice compared with that from sham-control mice. allergen exposure resulted in significant changes in the expression in EVs and in lung tissues. Expression changes of these miRNAs in AEVs and lung tissues after allergen exposure were inversely correlated. These results indicate that miRNAs in AEVs might be a candidate of biomarker for the management of asthma and COPD.

研究分野：アレルギー 喘息 COPD

キーワード：エクソソーム 喘息 COPD バイオマーカー microRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、気管支喘息、COPD の有病率は増加傾向であり、その phenotype も多種多様となっている。また、高齢者の増加に伴い両者を鑑別することがしばしば困難なことがあり、気道過敏性、喫煙への曝露、感染増悪等、共通の病態が存在することが指摘されている。今後、臨床症状、呼吸機能のみでは鑑別困難な病態に対しても最適な薬物選択が必要であり、その評価方法として、分子病態に立脚したバイオマーカーの確立が望まれる。

喘息と COPD におけるバイオマーカーは、複雑な多様性を有するこれら疾患の病態を分析可能とし、治療が有効な対象を正確に同定し、気道疾患における精密な医療の提供を可能とする。エクソソームを含む細胞外小胞 (extracellular vesicles; EVs) は、ここ数年、新たな診断・治療ツールとして注目を集めている。2007 年に John Lotvall らが exosome 内に microRNA や mRNA が存在し、microRNA の細胞間輸送に利用されている可能性があることを報告したことによる。この領域の研究は、マスペクトメトリーを初めとする質量分析技術の進歩によるプロテオミクスの技術の発展や、次世代シーケンズ技術の進歩により、近年、飛躍的に加速しており、このような OMICS 技術の進歩と、オーダーメイド医療や個別化治療をめざす医療側のニーズが合わさり、細胞外小胞の研究が一層活性化している。

特に、エクソソーム内 RNA (extracellular vesicles RNA; evRNA) は、レシピエント細胞の細胞活動における生物学的情報を反映していると考えられることから、新たなバイオマーカーのソースとして注目を集めている。evRNA 内にタンパクに翻訳される mRNA の他に、興味深いことに、非翻訳領域の RNA を多量に含んでおり、microRNA はこの翻訳領域に含まれている。ヒト miRNA は約 1800 種の前駆体と約 2500 種類の 20mer 長の成熟 microRNA が存在しており、microRNA は塩基配列特異的に mRNA の 3' 非翻訳領域に相補的に結合し、タンパク発現を翻訳レベルで障害し、分子発現を制御している。このような miRNA が exosome を介して細胞間を移動し、細胞間のコミュニケーションに利用されているということは、すなわち、exosome は生体情報を含む魅力的なバイオマーカーとして利用可能であること意味し、また、治療に応用することが期待できることを意味している。本研究では、近年注目されている細胞外小胞 (extracellular vesicles; EVs)、特に exosome に焦点を当て、その臨床応用、特に、喘息、COPD におけるバイオマーカーとしての応用の可能性について検討する。

2. 研究の目的

本研究は、これらの役割を明らかにすることで、EV の miRNA をアレルギー性気道炎症の管理に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

対照およびハウスダストダニ (HDM) アレルゲン曝露 HDM 感作マウスの気管支肺胞洗浄液 (BALF) から気道分泌型 EV (AEV) を単離し、単離方法の妥当性や分析方法を確立した。肺組織中の AEV または miRNA および mRNA 中の miRNA の発現を、miRNA マイクロアレイを用いて分析し、病態との関連性を解析した。

4. 研究成果

AEV の量は、コントロールマウス由来のものと比較して HDM 曝露マウス由来の BALF において 8.9 倍増加した (図 1)。

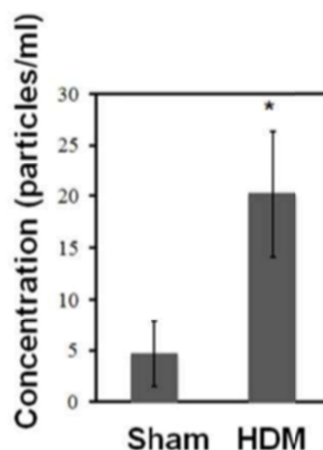


図 1

HDM 曝露は、肺組織中の EVs および miRNA 中の 139 個の miRNA の発現に有意な変化をもたらし、54 個の miRNA は両方の試料に共通であった。HDM 曝露後の AEV および肺組織中の miRNA 間のこれらの 54 個の miRNA の発現変化は、逆相関した (図 2)。

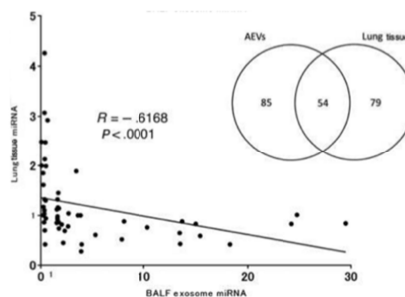


図 2

解析により、HDM 曝露後に IL-13 および IL-5Ra の抑制に関連する 31 の miRNA 遺伝子が、AEV でアップレギュレーションされ、肺組織においてダウンレギュレーションすることが観察された。HDM 処置マウスにおいて増加した AEV の由来を明らかにするために、ウェスタンブロット分析を行い、エクソソーム関連タンパク質、例えば、ALIX、TSG101 および CD63 の発現が増加していることを確認

した。このことは、増加する AEV の多くがエクソソームであることを意味している。

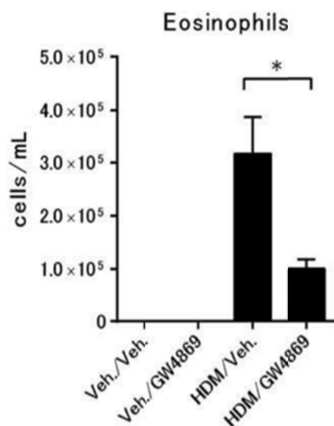


図 3

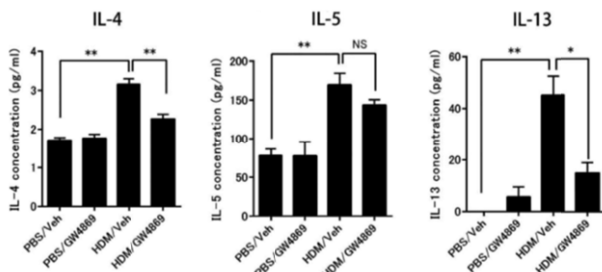


図 4

そこで、エクソソームの分泌を阻害するスフィンゴミエリナーゼ阻害剤 GW4869 のマウスへの投与が喘息の気道炎症にどのような影響を与えるかを解析した。GW4869 による処置により、BALF における Th2 サイトカインおよび好酸球数を減少させ（図 3）、気道粘膜における好酸球蓄積を減少させた（図 4）。

エクソソームへの特定のセットの miRNA の能動的なソーティングが行われている調節機構が存在することが報告されている。我々は、分泌された AEV および肺組織の miRNA 発現プロファイルを比較し、miRNA 発現変化が、AEV および肺組織において逆のパターンを示すことを見出した（図 2）。われわれはこの結果から、HDM 曝露後の気道への AEV を介した miRNA のソーティングと分泌が、肺組織（細胞）におけるこれらの miRNA のレベルの低下をもたらしたと考えた。

われわれは肺組織でダウンレギュレートされた miRNA に焦点を当て、バイオインフォマティクス分析を用いて同定した miRNA 調節が細胞内においてどのような mRNA を標的とするかを解析した。現在 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) は、包括的な遺伝子発現解析と分子相互作用およびシグナル伝達経路の予測のための最も信頼性の高いプログラムの一つであるが、IPA の miRNA-mRNA 相互作用

解析機能を使用して、miRNA の減少によってアップレギュレートされる標的となる肺組織中で mRNA を予測しました。miRNA-mRNA 相互作用では、「Tヘルパー細胞分化」、「顆粒球接着および接着」、「白血球曝露シグナル伝達」および「喘息における気道炎症」など、アレルギー性炎症に関連する経路を含む、最も関連性が高いと予測された 10 のカノニカル経路を見出した。

我々の結果は、いくつかの炎症性経路を調節することができる miRNA のエクソソーム分泌の増加が、アレルギー性気道炎症の病因において不活性な役割を果たす可能性があることを示唆したものである。この可能性を追求して、アレルギー性気道炎症に対するエクソソームの放出の阻害効果を調べたところ、スフィンゴミエリンからセラミドを生成する重要な調節酵素である中性スフィンゴミエリナーゼ 2 (nSMase2) の阻害によってエクソソーム分泌が防止され得ることを示された。この所見は、エクソソーム分泌の増加がセラミド/スフィンゴミエリン経路に依存することを示している。また、本研究は AEV 内の miRNA が喘息や COPD の慢性気道疾患における有益なバイオマーカーとなりうる可能性を示している。

本研究のひとつの目的は、同定したエクソソームのマーカーを患者検体を用いてその臨床的有用性を明らかにすることにあった。実際、本研究においては、我々は、ヒト血清からエクソソームを抽出し、エクソソーム内の miRNA を評価する方法を確立することにあった。本研究においては、ヒト血清から超遠心法やショ糖濃度勾配法を用いてエクソソームを抽出する方法と、エクソソーム内の RNA から miRNA を microarray を用いて解析する方法を確立した。本法を用いて、複数の喘息及び COPD 患者のエクソソーム内の RNA を測定し、重症度などの関連性を評価したが一定の傾向は得られず、今後、より安価で簡便に測定できる方法を確立し、多くの臨床検体を用いて有用なバイオマーカーを検出する検討が必要と考えられた。

* 図 1~4 は参考文献 1 より出典

参考文献；

1. Gon Y, et al: Clinical & Experimental Allergy. 2017; 47(12): 1586-1598.

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 6 件)

Gon Y, Maruoka S, Inoue T, Kuroda K, Yamagishi K, Kozu Y, Shikano S, Soda K, Lotvall J, Hashimoto S: Selective release of miRNAs via extracellular vesicles is associated with house dust mite allergen-induced airway

inflammation. Clinical & Experimental Allergy. 2017; 47(12): 1586-1598. doi: 10.1111/cea.13016. (査読あり)

権 寧博, 橋本 修: 重症喘息の多様性とバイオマーカー. 第 36 回六甲カンファレンス 喘息管理における現状の課題と今後の展望. 2017; 21-24. (査読なし)

Gon Y, Maruoka S, Inoue T, Mizumura K, Kuroda K, Fukano Y, Yamagishi K, Tsuboi E, Hashimoto S: Gene expression analysis in airway-secreting extracellular vesicles upon house dust mite exposure. Allergol Int. 2016; 65 Suppl: S53-S55. doi: 10.1016/j.alit.2016.04.003. (査読あり)

権 寧博, 丸岡秀一郎, 橋本 修: 臨床検体の exosome 解析. アレルギーの臨床. 2016; 36(13): 1259-1262. (査読なし)

権 寧博, 橋本 修: COPD のテーラード治療; 現状と未来. 呼吸器内科. 2016; 30(6): 521-524. (査読なし)

権 寧博, 橋本 修: 【特集 呼吸器疾患におけるバイオマーカー(BM)】COPD 重症化の評価に役立つバイオマーカー. 呼吸器内科. 2016; 30(5): 383-388. (査読なし)

〔学会発表〕(計 5 件)

権 寧博, 山岸賢司, 井上寿男, 黒田和道, 坪井絵莉子, 木澤靖夫, 橋本修: エクソソームの呼吸器疾患バイオマーカーへの応用. 平成 28 年度 日本大学学部連携研究推進シンポジウム. 東京都. 2017, 2.

権 寧博: バイオマーカーからみた呼吸器疾患の炎症病態. 第 203 回、順天堂大学呼吸器セミナー. 東京都. 2017, 2.

権 寧博: 喘息・COPD の血中バイオマーカー; 最近の話題. Chest Forum2016. 東京都. 2016, 11.

鹿野壮太郎, 井上寿男, 権 寧博, 丸岡秀一郎, 黒田和道, 山岸賢司, 曾田香織, 橋本 修: 急性肺障害モデルにおける exosome 由来 miRNA の発現解析. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会. 京都府, 京都市. 2016, 4.

井上寿男, 権 寧博, 丸岡秀一郎, 鹿野壮太郎, 黒田和道, 山岸賢司, 曾田

香織, 橋本 修: マウス LPS 誘導性肺障害におけるエクソソームの RNA 発現解析. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会. 京都府, 京都市. 2016, 4.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

権 寧博 (GON, Yasuhiro)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 80339316

(2) 研究分担者

黒田 和道 (KURODA, Kazumichi)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 50215109

木澤 靖夫 (KIZAWA, Yasuo)
日本大学・薬学部・教授
研究者番号: 80211192

丸岡 秀一郎 (MARUOKA, Shuichiro)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 80599358

山岸 賢司 (YAMAGISHI, Kenji)
日本大学・工学部・助教
研究者番号: 90460021

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：

(4)研究協力者 なし
()