

令和元年5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09580

研究課題名(和文) エクソソームの定量プロテオミクスによる肺線維症における画期的バイオマーカー探索

研究課題名(英文) Exploration of innovative biomarkers in pulmonary fibrosis by quantitative proteomics of exosomes

研究代表者

平田 陽彦 (HIRATA, HARUHIKO)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：30546867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肺線維症モデルマウスの血清エクソソームの定量プロテオミクスを用いて、診断だけでなく病態解明や治療に役立つ疾患特異的BMを探索した。

我々は、マウス血清エクソソームから697個のタンパクを同定し、その中には線維化との関連が考えられるものもみられた。そして、線維化モデルマウス群で3倍以上増加がみられた82個のタンパクを線維化のBM候補として挙げた。さらに、線維化の程度と正に相関がみられたものが21個あった。また、これらのBM候補タンパクが線維化病巣で増加していることを免疫染色で確認した。今後は、マウス・ヒト検体でさらなる検証を進めていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症は予後不良の疾患であり、遺伝的素因に外的要因が加わることで発症する複雑かつ多様な為、診断・治療・新薬開発に役立つ特異性の高いバイオマーカー(BM)の開発が求められている。

種々の細胞が分泌するエクソソーム(小胞)は、新たな細胞間・臓器間のコミュニケーション手段として病態形成・診断・治療応用から注目されている。本研究目的は、最新のタンパク解析技術を用いて、血清エクソソームから肺線維症に特異的なBMを探す。

研究成果の概要(英文)：By quantitative proteomics of serum exosomes of lung fibrosis model mice, we searched for disease-specific BMs useful not only for diagnosis but also for pathogenic clarification and treatment.

By label-free proteomics, 697 proteins were obtained from exosomes isolated by size-exclusion chromatography. Of note, these exosomal proteins reflected its characteristics of fibrosis to some degree. Among them, 82 proteins were listed as BM candidates whose expression increased 3-fold or more in fibrosis model. Furthermore, 21 BMs were narrow downed by disease activity using fibrotic score. In addition, it was confirmed by immunostaining that these BM candidate proteins are increased in fibrotic lesions. Now, we are going to verify these BM candidates in mice and human.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：エクソソーム 肺線維症 バイオマーカー プロテオミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis: IPF) は胞隔炎として始まり、慢性炎症による肺胞領域の破壊を伴って間質の線維化へと進行する予後不良の疾患である。詳細なメカニズムは不明で、根本的な治療法の開発も不十分である。既存の血清バイオマーカー (KL-6, SP-D) は、病型による特異性や予後との相関が必ずしも相関しないため、より有用なバイオマーカー (Biomarker: BM) の開発が急務である。

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**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 のリソースとなりうる。

2. 研究の目的

肺線維症のマウスモデルとヒト IPF 患者の血中エクソソームの最新プロテオミクスにより、疾患特異的 BM を探索することにより、診断だけでなく、病態解明や治療に寄与する。

3. 研究の方法

IPF の画期的バイオマーカーを、末梢血由来エクソソームからノンラベル・定量プロテオミクスの技術により探索 & 検証することにより、診断 (表現型分類)、病態解明や治療に役立つ。本研究では肺線維症マウスモデルを活用しながら、複雑・多様な IPF の新規 BM を検証することで、診断、病態解明、治療応用に役立つ。最新プロテオミクスによる多くの BM 候補からマウス肺組織の線維化スコアから絞り込んだ BM は、従来のウェスタンブロットィングや肺組織の免疫染色により検証する。

4. 研究成果

肺線維症マウスモデル (BLM 経気道投与) とコントロールマウスの血清から単離したエクソソームのノンラベル・定量プロテオミクス解析から 679 個のエクソソームタンパクを同定した。また、肺線維症モデルマウス群で 3 倍以上増加しているタンパクは 82 個であった。さらに BM 候補を絞り込むために、マウスの肺組織の Ashcroft score と血清エクソソームタンパクとの相関関係を調べ、 $R > 0.5$ の相関を認めたものが 21 個みられた。これら BM 候補タンパクの一部に対して肺の免疫染色を行ったところ、実際に肺組織でも増加しており、肺組織で起こっていることを血液中のエクソソームタンパクとして同定できることがわかった。以上より、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、病勢を反映する新規線維化 BM を同定した。今後、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

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Impact of sarcopenia in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with PD-1 inhibitors: A preliminary retrospective study. Shiroyama T, Nagatomo I, Koyama S, Hirata H, Nishida S, Miyake K, Fukushima K, Shirai Y, Mitsui Y, Takata S,

- Masuhiko K, Yaga M, Iwahori K, Takeda Y, Kida H, Kumanogoh A. Sci Rep. 2019 Feb 21;9(1):2447. 査読有 DOI: 10.1038/s41598-019-39120-6
2. SEMA4A promotes eosinophil survival and contributes to eosinophil-mediated allergic diseases. Maeda Y, Tsuda T, Takeda Y, Koyama S, Hayama Y, Nojima S, Kimura T, Ito D, Takamatsu H, Kang S, Nishide M, Morimoto K, Hosokawa T, Kinehara Y, Kato Y, Nakatani T, Takeda K, Hayama M, Obata S, Akazawa H, Shikina T, Inohara H, Kumanogoh A. Allergol Int. 2018 Oct 17. pii: S1323-8930(18)30143-6. 査読有 DOI: 10.1016/j.alit.2018.10.001
 3. 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 Jun 1;200(11):3790-3800. 査読有 DOI: 10.4049/jimmunol.1701283
 4. 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, Hirata H, Nagatomo I, Kida H, Mizuguchi K, Ito M, Kijima T, Rakugi H, Mekada E, Tachibana I, Kumanogoh A. Sci Rep. 2018 Mar 23;8(1):5145. 査読有 DOI: 10.1038/s41598-018-23338-x
 5. 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. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.090
 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. 査読有 DOI: 10.1038/srep43201

〔学会発表〕(計 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、滝本宣之、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、滝本宣之、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、2017年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、2017年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最新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 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
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

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 5 件)

名称：炎症バイオマーカー
発明者：武田吉人、熊ノ郷淳、葉山善友
権利者：大阪大学
種類：特許
番号：特願 2017-048161
出願年：2017 年
国内外の別：国内

名称：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
権利者：大阪大学
種類：特許
番号：特願 2017-048164
出願年：2017 年
国内外の別：国内

名称：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
権利者：大阪大学
種類：特許
番号：特願 2017-048167
出願年：2017 年
国内外の別：国内

名称：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
権利者：大阪大学
種類：特許
番号：特願 2017-048171
出願年：2017 年
国内外の別：国内

名称：老化バイオマーカー
発明者：武田吉人、熊ノ郷淳、植田幸嗣
権利者：大阪大学
種類：特許
番号：特願 2017-048173
出願年：2017 年
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.imed3.med.osaka-u.ac.jp/research/r-resp04.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：武田 吉人

ローマ字氏名：TAKEDA YOSHITO

所属研究機関名：大阪大学・

部局名：医学系研究科

職名： 講師

研究者番号（8桁）：40452388

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。