

令和元年6月25日現在

機関番号：84412

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09581

研究課題名(和文) リンパ脈管筋腫症の腫瘍進展におけるテトラスパニン・小胞輸送の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the roles of tetraspanins and vesicle transport in the tumor progression of lymphangiomyomatosis.

研究代表者

滝本 宜之 (Takimoto, Takayuki)

独立行政法人国立病院機構近畿中央呼吸器センター・その他部局等・内科医長

研究者番号：60767854

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)：リンパ脈管筋腫症(Lymphangiomyomatosis: LAM)はいわゆる「LAM細胞」が増殖し、主に肺に転移し、肺を破壊する、希少難病である。本研究では、テトラスパニン・小胞輸送に注目し、LAMの病態解明を行った。血液中の「エクソソーム」という小胞のプロテオミクス(タンパク解析)から、LAMでは凝固・補体の活性化や炎症が存在することや臨床的に異なる2つの患者群の蛋白プロフィールが異なることを見出した。さらに、LAMの血液のバイオマーカー候補を同定し、特許出願した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LAMは難病ではあるが、希少疾患のため研究助成や研究者が少ないのが現状である。本研究では、これまで試みられていない新たな手法により、LAMの新たな病態やバイオマーカー候補を見出すことができた。これらの成果は、LAMの診断や治療計画に役立ち、さらには、将来の治療法開発につながる可能性がある。LAMにおいても患者個人の違いが注目されるようになってきており、個別化治療の一助になるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Lymphangiomyomatosis (LAM) is a rare and progressive cystic lung disease, which is caused by proliferation of so-called 'LAM cells'. In the current project, we focused on tetraspanins and vesicle transport to elucidate the pathogenesis of LAM. We revealed not only the involvement of coagulation system and inflammation in LAM, but also different profiles between two clinically different populations by proteomic profiling of serum exosomes (vesicles). Furthermore, identified novel biomarkers for LAM were applied for a patent.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：リンパ脈管筋腫症 LAM エクソソーム 細胞外小胞 プロテオミクス バイオマーカー 結節性硬化症 TSC

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

1. 研究開始当初の背景

(1) リンパ脈管筋腫症

リンパ脈管筋腫症 (Lymphangiomyomatosis: LAM) は平滑筋細胞様の LAM 細胞が肺や体軸リンパ節などで増殖し、肺に多発性嚢胞を形成する、全身性疾患である。人口 100 万人あたり約 1.9~4.5 人と稀な難治性疾患で、厚生労働省に難病に指定されている。LAM 細胞(腫瘍)の肺への転移により、肺が進行性に破壊され、気胸などの合併症を生じたり、酸素療法、さらに進行すると、肺移植が必要となる。臨床的には、結節性硬化症 (tuberous sclerosis complex: TSC) を背景に発生する TSC-LAM と、単独で発生する孤発性 LAM (Sporadic-LAM) とに分類される。

病態は癌抑制遺伝子である TSC 遺伝子 (Tsc1 や Tsc2) の異常により生じる LAM 細胞が主にリンパ管などを通じて肺などに転移することにより引き起こされる、低悪性度腫瘍性疾患とされる。

LAM 細胞では TSC 遺伝子異常の結果、mTOR シグナルが亢進している。mTOR 阻害薬、Rapamycin は有効性が明らかにされた治療薬であるが、その効果は肺機能の若干の改善を認めるに留まっており、さらなる治療法開発が急務である。

(2) テトラスパニン・小胞輸送に着目した理由

テトラスパニンは癌の発生、増殖や転移に深く関わっている (Hemler, Nature Rev Cancer 2014)。また、テトラスパニンは腫瘍細胞だけでなく、その周囲の血管・リンパ管内皮細胞などにも発現し、腫瘍微小環境においても、癌の浸潤、転移 (Blood 2011)、血管新生 (Blood 2007)、リンパ管新生 (JBC 2012) に関わる鍵分子である。リンパ管新生は LAM 腫瘍の転移において中心的役割を担っている。

LAM 細胞ではテトラスパニン CD9 が高発現し、TSC2 LOH (loss of heterozygosity) にも関与している。LAM 細胞は平滑筋細胞様性質とともに melanocyte の性質も併せ持つため、テトラスパニン CD63 が高発現している。

テトラスパニン CD9、CD81、CD63 はエンドソームやエクソソームに存在し、小胞輸送の鍵分子として注目されている。小胞輸送とは、膜の分裂や融合によりオルガネラ同士あるいは細胞膜とオルガネラの間で、小胞(膜)を介してタンパク質や脂質などの輸送や、細胞外へ分泌因子の放出を行う機構である。近年、小胞輸送が種々の疾患に関わっていることが報告されており、その中でも細胞内小胞エンドソームから分泌されるエクソソームと呼ばれる顆粒が重要な役割を果たすことが明らかになってきた。LAM 細胞においては、mTOR シグナル亢進のためオートファジー機能が低下しており、神経疾患などのようにエクソソームの分泌が亢進している可能性があるが、これまで、小胞輸送に着目した検討はほとんどない。

2. 研究の目的

LAM 患者血液や肺組織、あるいは、LAM 細胞株を用いて、リンパ脈管筋腫症 (LAM) におけるテトラスパニン・小胞輸送の役割を検討する。ここでは、エクソソームに関連した研究について記載する。

3. 研究の方法

エクソソームを単離することで血液の大量の夾雑物を取り除き、網羅的解析が可能になることから、LAM 患者血清のエクソソームを用い、LAM の病態解明・バイオマーカーの探索を行った。エクソソームは標準法である、シュクロース利用・超遠心法超遠心法により行い、NanoSight Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) や電子顕微鏡にて検証した。

4. 研究成果

(1) 探索フェーズでは、LAM 患者 8 名 (Sporadic-LAM 3 名、TSC-LAM 5 名) および、コントロールとして健康人女性 4 名の血液からエクソソームを抽出し、網羅的・定量プロテオミクス Tandem Mass Tags based proteomics (TMT-MS) を行った。従来の血清解析では同定困難な膜蛋白を含む 573 種類の蛋白を同定した。LAM 患者で変動した蛋白についてバイオインフォマティクスにて解析したところ、LAM では凝固系活性化・炎症が存在することや、Sporadic-LAM と遺伝性疾患の TSC-LAM の蛋白プロファイルが異なることを見出した。

(2) 検証フェーズとして、Sporadic-LAM に着目し、絞り込んだ候補蛋白について、複数施設の検体を用い、次世代プロテオミクスとされる選択的・絶対定量プロテオミクス selected/multiple reaction monitoring (SRM/MRM) にて検証した。これらの結果から血液バイオマーカー候補として 30 蛋白を同定し、特許出願した (出願番号: 特願 2018-048266、発明の名称: リンパ脈管筋腫症バイオマーカー)。また、同様の手法で、miRNA についても網羅的解析を終え、BM 候補として 29 種を同定し、特許出願した (特願 2018-048266)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Hwang S, Takimoto T, Hemler ME. Integrin-independent support of cancer drug resistance by tetraspanin CD151. Cell Mol Life Sci. Apr;76(8):1595-1604, 2019 査読あり

り

2. Kinehara Y, Nagatomo I, Koyama S, Ito D, Nojima S, Kurebayashi R, Nakanishi Y, Suga Y, Nishijima-Futami Y, Osa A, Nakatani T, Kato Y, Nishide M, Hayama Y, Higashiguchi M, Morimura O, Miyake K, Kang S, Minami T, Hirata H, Iwahori K, Takimoto T, Takamatsu H, Takeda Y, Hosen N, Hoshino S, Shintani Y, Okumura M, Kumagai T, Nishino K, Imamura F, Nakatsuka SI, Kijima T, Kida H, Kumanogoh A. Semaphorin 7A promotes EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung adenocarcinoma cells. JCI Insight. Dec 20;3(24), 2018 査読あり
3. Osa A, Uenami T, Koyama S, Fujimoto K, Okuzaki D, Takimoto T, Hirata H, Yano Y, Yokota S, Kinehara Y, Naito Y, Otsuka T, Kanazu M, Kuroyama M, Hamaguchi M, Koba T, Futami Y, Ishijima M, Suga Y, Akazawa Y, Machiyama H, Iwahori K, Takamatsu H, Nagatomo I, Takeda Y, Kida H, Akbay EA, Hammerman PS, Wong KK, Dranoff G, Mori M, Kijima T, Kumanogoh A. Clinical implications of monitoring nivolumab immunokinetics in non-small cell lung cancer patients. JCI Insight. Oct 4;3(19), 2018 査読あり
4. 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. Double deletion of tetraspanins CD9 and CD81 in mice leads to a syndrome resembling accelerated aging. Sci Rep. 8(1):5145, 2018 査読あり
5. 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. Trastuzumab emtansine suppresses the growth of HER2-positive small-cell lung cancer in preclinical models. Biochem Biophys Res Commun. 488(4): 596–602, 2017 査読あり

〔学会発表〕(計 13 件)

1. T. Takimoto, Y. Takeda, T. Shiromizu, R. Narumi, T. Koba, T. Matsuki, M. Kuroyama, H. Kida, M. Hirose, Y. Inoue, T. Tomonaga, A. Kumanogoh. Identification of novel biomarkers for lymphangiomyomatosis by proteomics from serum exosomes. ATS 2018 2018.5.20 San Diego
2. T. Koba, Y. Takeda, T. Shiromizu, R. Narumi, Y. Hayama, T. Takimoto, M. Kuroyama, T. Matsuki, H. Kida, T. Tomonaga, A. Kumanogoh : Proteomic Profiling of Serum Exosomes to Identify Novel Biomarkers for COPD. ATS 2018 2018.5.20 San Diego
3. 滝本宜之, 武田吉人, 木庭 太郎, 玄山宗到, 木田博, 熊ノ郷淳, 広瀬雅樹, 井上義一, 鳴海良平, 朝長毅. 肺リンパ脈管筋腫症におけるエクソソームの最新プロテオーム解析 呼吸器学会総会 2018.4.27 大阪国際会議場
4. 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.
5. 滝本宜之, 武田吉人, 木庭太郎, 玄山宗到, 木田博, 白水崇, 朝長毅, 熊ノ郷淳 血中エクソソームの網羅的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探索 第15回日本プロテオーム学会 2017.7.27.大阪府
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 マーカーの探索 第15回日本プロテオーム学会 2017.7.27.大阪府
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.大阪府
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 バイオマーカーの探索 第3回骨免疫学会, 2017.6.27. 石垣島
9. 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, 2017.6.27. 石垣島
10. 滝本宜之, 平田陽彦, 木庭太郎, 玄山宗到, 大塚倫之, 長友泉, 武田吉人, 木田 博, 木島貴志, 熊ノ郷 淳 当院におけるリンパ脈管筋腫症(LAM)に対する薬物治療の検討 第40回日本呼吸器内視鏡学会学術集会 2017.6.10.長崎県
11. 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
12. 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
13. 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

〔図書〕(計 1 件)

滝本宜之 肺リンパ脈管筋腫症におけるエクソソーム解析 分子呼吸器病 2019 年 3 月号 Vol.23 No.1: 34-38

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：リンパ脈管筋腫症バイオマーカー

発明者：滝本 宜之、武田 吉人、井上 義一、熊ノ郷 淳

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2018-048266

出願年：2018 年

国内外の別：国内

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・医学系研究科

部局名：呼吸器内科

職名：講師

研究者番号(8桁): 40452388

研究分担者氏名：井上 義一

ローマ字氏名：YOSHIKAZU INOUE

所属研究機関名：独立行政法人 国立病院機構 近畿中央呼吸器センター

部局名：臨床研究センター

職名：臨床研究センター長

研究者番号(8桁): 90240895

(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。