

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15924

研究課題名(和文)末梢血エクソソームの定量プロテオミクスによる肺結核の画期的バイオマーカー探索

研究課題名(英文) Proteomic profiling of serum exosomes to identify novel biomarkers for tuberculosis

研究代表者

木庭 太郎 (Koba, Taro)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00812942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血由来エクソソームの最新プロテオミクスによる探索及び検証により、診断、病勢把握、治療反応性予測に役立つ結核の画期的バイオマーカーを見出すことを目標に研究を行った。健康人10人、結核患者10人の血清からサイズ排除クロマトグラフィーを用いてエクソソームの単離を行い、ノンラベル定量プロテオミクスにより1661種類のタンパクを同定した。同定したタンパクによるPCA解析では、健康人と結核患者がグルーピングされた。30個のタンパクが結核患者において有意に2倍以上上昇しており、バイオマーカー候補タンパクとした。その中には、結核治療により、良好に低下しているタンパクが複数同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

途上国では多剤耐性結核やHIV陽性結核が深刻な問題となっている。これらの問題解決には、結核の分子病態に立脚した診断、病勢把握、治療反応予測に有用なバイオマーカー開発が急務である。種々の細胞が分泌する細胞外小胞エクソソームは新たな細胞間・臓器間のコミュニケーション手段として脚光を浴びている。我々はこのエクソソームをバイオマーカー探索のソースとして使用した。結核患者血清からエクソソームを単離し、最新のプロテオミクスを駆使することにより、複数のバイオマーカー候補タンパクを同定した。このバイオマーカー探索の戦略は、様々な疾患に応用可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We conducted latest proteomic analyses of exosomes from peripheral blood to find novel biomarkers of tuberculosis for diagnosis, disease grasp, and treatment response prediction.

Exosomes were isolated from the sera of ten healthy controls and ten patients with tuberculosis by size exclusion chromatography, and 1661 proteins were identified by non-label quantitative proteomics. Using the PCA analysis by the identified proteins, healthy subjects and tuberculosis patients were grouped. Thirty proteins were significantly more than doubled in patients with tuberculosis, and considered as biomarker candidate proteins. Among them, several proteins that were favorably decreased by tuberculosis treatment were identified.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：結核 エクソソーム バイオマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

結核は、世界の10大死因のひとつであり、2015年には1,040万人が結核に罹患し、180万人が死亡している。結核治療における病勢の判定には、喀痰の塗抹所見および培養コロニー数による細菌学的な半定量評価が標準的な方法である。ただし、喀痰検査は、必ずしも良質な検体が得られないだけでなく、塗抹検査は必ずしも病勢を反映せず、培養結果が出るまで1か月程度を要するため、リアルタイムの評価が困難である。つまり、末梢血液から結核の重症度および経時の変化を正確に評価できるバイオマーカーの存在が望まれる。10年程前に実用化されたクオンティフェロン検査では、BCGや大部分の非結核性抗酸菌には存在しない結核菌特異抗原により血液を刺激し、結核菌感染により分化した抗原特異的T細胞からのIFN- $\gamma$ を測定することにより、高特異度で診断可能である。ただし、IFN- $\gamma$ 産生応答は免疫応答のごく一部であるため、本結果から結核感染免疫の動態把握は困難である。従って、結核の分子病態に立脚した診断、病勢把握、治療反応予測に有用なバイオマーカー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(オミックス)による病態解明が試みられている。最も有用なバイオマーカーのリソースとしての血液は、多くの夾雑物を含むため、網羅的解析を用いても有用なバイオマーカーの同定には至っていない。特にmicroRNAやmRNAなど遺伝情報の網羅的解析は多いものの、プロテオーム解析に関しては、方法や手技の未熟性から大きく遅れを取っている。特に、複雑性の高い血清エクソソームのプロテオミクスに関して、国内・国外問わずほとんど報告されていない。

### 2. 研究の目的

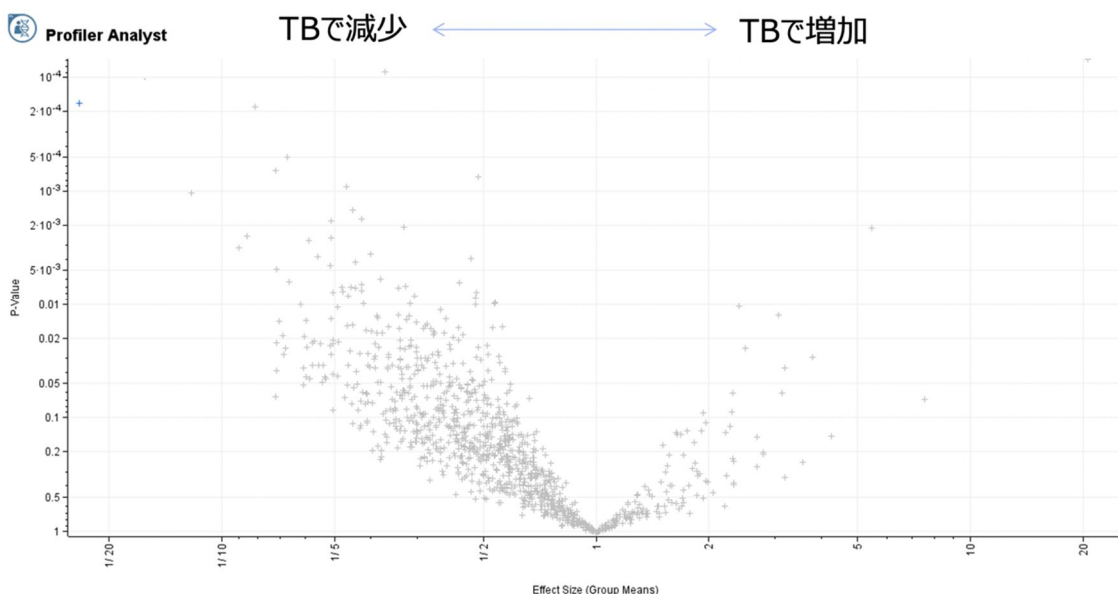
種々の細胞が分泌する細胞外小胞エクソソームは新たな細胞間・臓器間のコミュニケーション手段として脚光を浴びている。結核患者の末梢血から単離したエクソソームのプロテオミクスにより、結核の分子病態に立脚した結核の診断、病勢把握、治療反応予測に有用なバイオマーカーの開発を行う。

### 3. 研究の方法

健常人及び結核患者の血清からサイズ排除クロマトグラフィーを用いてエクソソームの単離を行い、ノンラベル定量プロテオミクスにより網羅的で定量的なタンパク解析を行った。

### 4. 研究成果

健常人10人、結核患者10人の血清からサイズ排除クロマトグラフィーを用いてエクソソームの単離を行い、ノンラベル定量プロテオミクスにより1661種類のタンパクを同定した。さらに、それらのエクソソーム蛋白は、従来組織でしか捉えることができなかった膜蛋白や鍵分子を含むことを見出した。同定したタンパクによるPCA解析では、健常人と結核患者がグルーピングされた。30個のタンパクが結核患者において有意に2倍以上上昇しており、バイオマーカー候補タンパクとした。



その中には、結核治療により、良好に低下しているタンパクが複数同定された。また、非結核性抗酸菌症患者やサルコイドーシス患者血清との比較においては、共通して上昇しているタンパクや、結核患者のみで上昇しているタンパクがあり、やはりPCA解析によりそれぞれ

れの疾患をグルーピングすることができた。

今後はバイオインフォマティクス解析による病態への関与等を検討し、また、さらなる解析により結核菌の断片等を同定することが期待される。さらには、患者数を増やした大規模試験で、Targeted proteomics (Selected Reaction Monitoring) による検証を行うことにより、バイオマーカー候補タンパクの精度や再現性の確認を行なっていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 矢賀元、木庭太郎、武田吉人	4. 巻 74(2)
2. 論文標題 プロテオミクスがひもとく炎症性呼吸器疾患	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 最新医学	6. 最初と最後の頁 233-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 白井雄也、木庭太郎、武田吉人	4. 巻 24(1)
2. 論文標題 血清エクソソームの最新定量プロテオミクスを用いた線維化マーカーの探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 分子呼吸器病	6. 最初と最後の頁 71-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 R. Edahiro , Y. Takeda , T. Koba , Y.N. Futami , M. Kuroyama , Y. Yano , M. Mori , M. Ito , K. Ueda , A. Kumanogoh
2. 発表標題 Quantitative Proteomics of Serum Exosomes to Identify Novel Biomarkers for Mycobacterium Avium Complex and Tuberculosis
3. 学会等名 American Thoracic Society 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 熊ノ郷 淳	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 252
3. 書名 免疫・炎症病態×治療Update	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----