

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：84412

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08642

研究課題名(和文)細胞外小胞に着目した包括的アプローチによるリンパ脈管筋腫症のバイオマーカー開発

研究課題名(英文) Identification of novel biomarkers for lymphangiomyomatosis from extracellular vesicles by comprehensive approach.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ脈管筋腫症(Lymphangiomyomatosis: LAM)は排他的に女性に発症する希少疾患で、厚生労働省の難病に指定されている。その病態は平滑筋細胞様のLAM細胞(腫瘍)が体軸リンパ節などで増殖し、主にリンパ管を通じて肺に転移し、多発性嚢胞を形成する、慢性・進行性かつ全身性疾患である。本研究では、血液・LAM細胞から得られたデータの統合解析により、LAMの病態解明およびバイオマーカーの開発を行った。得られたバイオマーカー候補蛋白につき、LAM患者の肺組織での免疫染色を行い、少なくとも4蛋白について、染色陽性を確認し、肺のLAM細胞由来であることが示唆された。

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、LAMの新たな診断バイオマーカーを絞り込むことができた。これらの成果は、LAMの診断に寄与し、将来の治療法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Lymphangiomyomatosis (LAM) is a rare and progressive cystic lung disease, which is intrinsically caused by the proliferation of so-called 'LAM cells'. In the current project, we focused on extracellular vesicles derived from patients' blood and LAM cell lines to identify novel biomarkers for lymphangiomyomatosis in a comprehensive approach. Biomarker proteins were further validated in LAM lungs by immunohistochemistry stains, and at least, four proteins were positively stained, suggesting derivation from the LAM cells in the lung.

研究分野：呼吸器学

キーワード：リンパ脈管筋腫症 LAM バイオマーカー 細胞外小胞 プロテオミクス miRNA エクソソーム 呼吸器難病

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

<リンパ脈管筋腫症とは？>

リンパ脈管筋腫症 (Lymphangiomyomatosis: LAM) は人口 100 万人あたり約 1.9~4.5 人と希少で、排他的に女性に発症し、厚生労働省の難病に指定されている。病態は平滑筋細胞様の LAM 細胞 (腫瘍) が体軸リンパ節などで増殖し、主にリンパ管を通じて肺に転移し、多発性嚢胞を形成する、慢性・進行性かつ全身性疾患である。本態は癌抑制遺伝子である TSC 遺伝子の異常により生じる LAM 細胞に起因する低悪性度腫瘍性疾患との認識がなされている。肺組織の破壊により、慢性呼吸不全を呈し、進行すると、酸素療法、さらには、肺移植に至る難病であるが、未だその診断・治療法の開発は進んでいない。

<LAM におけるバイオマーカーは？>

LAM のバイオマーカー (BM) としては血清 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - D が診断、治療効果を反映し、診断基準の一項目ともなっている。

血液は非侵襲的に繰り返し採取可能な最も理想的なサンプルと考えられるものの、99% 以上は BM の観点から爽雑物とされる多量の蛋白 (アルブミンなど) のため、プロテオミクスという観点から有用性を認めていないのが現状である。実際、LAM 患者の血液プロテオミクスの報告では有望な BM は検出されていないが、この難病の克服には病態解明や診断・治療法開発の観点から新たな BM 開発が急務である。

<LAM における細胞外小胞の役割は？>

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) を介して蛋白質や脂質などの輸送や、細胞外へ分泌性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、がんなどの疾患において、細胞内小胞エンドソームから分泌される細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EV、あるいは、exosome) と呼ばれる小胞顆粒が重要な役割を果たすことが明らかになってきた。EV は核酸や蛋白を内包する細胞間のメッセンジャーとして働いており、EV ではプロテアーゼ等による分解を免れ、病因となる細胞内の分子情報をそのまま保有しているとされ、末梢血・体液から繰り返し容易に採取可能で、いわゆる、liquid biopsy のツールとしての注目も集まっている。

LAM 細胞はメラノソーム (エンドソームの一種) を細胞内に豊富に有し、小胞輸送の鍵分子であり EV のマーカーとされる CD9、CD63 が高発現する。また、mTOR シグナル亢進のためオートファジー機能が低下していると報告されている。これらのことから小胞輸送は LAM の病態形成において何らかの役割を果たしていると推察され、LAM 患者の血液・体液の EV には病態に関わる重要な分子が含まれている可能性があるが、これまで全く検討がなされていない。

2. 研究の目的

EV に着目し、多種の検体 (血液・患者肺組織・肺胞洗浄液・LAM 細胞) からのデータの統合解析による病態解明および BM 絞り込みを行う。

3. 研究の方法

患者血液由来 EV

EV を単離することで血液の大量の爽雑物を取り除き、網羅的解析することが可能になる。申請者は血液 EV に着目し、最先端プロテオミクス技術を用い、LAM の血液バイオマーカー (BM) の探索を行っている。探索フェーズ: LAM 患者血液の EV から網羅的・定量プロテオミクス Tandem Mass Tags based proteomics (TMT-MS) を行い、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。疾患群で変化した蛋白のバイオフィオマティクスによるパスウェイ解析 (IPA、DAVID) を行い、凝固系・炎症の病態、および、単独で発生する孤発性 LAM と遺伝性疾患の結節性硬化症 (tuberous sclerosis complex: TSC) に発生する TSC-LAM の蛋白プロファイルの相違を示唆された。そこで、検証フェーズ: 候補蛋白について、複数施設の検体を用い、選択的・絶対定量プロテオミクス SRM/MRM にて検証する。

患者肺局所由来 (切除肺組織・肺胞洗浄液由来 EV・切除肺組織培養由来 EV) 病態をより直接反映する肺組織においても網羅的プロテオミクスを施行する。

LAM 細胞由来 EV

本態である LAM 細胞を用いた検討である。これまで、in vitro で使用可能なヒト LAM 細胞株は存在しないため、LAM 患者 iPS 細胞から分化誘導した LAM 細胞株、ヒト腎血管脂肪腫細胞株 (LAM 細胞の代用として最も汎用される細胞株) を用いて、細胞上清から分泌 EV を回収し、網羅的プロテオミクスを行う。

4. 研究成果

(1) BM 候補蛋白について、複数施設の血液検体を用い、検証フェーズとして、選択的・絶対定量プロテオミクス SRM/MRM にて検証した。重症度の指標となる肺機能や既存の BM である VEGF-D との関連の検討から、前者には LAM 肺由来と考えられる蛋白、後者には凝固・補体系の蛋白が

分類されることが明らかとなった。

(2) LAM 患者 iPS 細胞から分化誘導した LAM 細胞株を用いて、細胞上清から分泌 EV を回収し、網羅的プロテオミクスを行い、LAM 細胞株で増加した約 40 の候補蛋白を同定した。

(3)(1) により絞り込まれた、細胞外基質、プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ (Alpha-1-antitrypsin など)、凝固・補体系などのバイオマーカー候補蛋白につき、肺由来であるか、LAM 患者の肺組織での免疫染色を行った。12 の候補蛋白のうち、少なくとも 4 蛋白について、肺の LAM 細胞での染色陽性を確認できた。また、その候補蛋白のうち、(2) にも共通する 1 候補蛋白につき、それらが細胞外小胞内で特異的に増加しているのかを検証するため、血液検体での ELISA での検討を行った。その結果、血液での増加は微増にとどまることが判明し、細胞外小胞でより増加

していること、それゆえ、細胞外小胞に着目、検討する意義が示唆された。現在、さらなる検証を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Futami Y, Takeda Y, Koba T, Narumi R, Nojima Y, Ito M, Nakayama M, Ishida M, Yoshimura H, Naito Y, Fukushima K, Takimoto T, Eda Hiro R, Matsuki T, Nojima S, Hirata H, Koyama S, Iwahori K, Nagatomo I, Shirai Y, Suga Y, Satoh S, Futami S, Miyake K, Shiroyama T, Inoue Y, Adachi J, Tomonaga T, Ueda K, Kumanogoh A.	4. 巻 34(6)
2. 論文標題 CD14 and lipopolysaccharide-binding protein as novel biomarkers for sarcoidosis by proteomics of serum extracellular vesicles.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International immunology	6. 最初と最後の頁 327-340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac009	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 -

1. 著者名 Koba, Takeda, Narumi, Shiromizu, Nojima, Ito, Kuroyama, Futami, Takimoto, Matsuki, Eda Hiro, Nojima, Hayama, Fukushima, Hirata, Koyama, Iwahori, Nagatomo, Suzuki, Shirai, Murakami, Nakanishi, Nakatani, Suga, Miyake, Shiroyama, Kida, Sasaki, Ueda, Mizuguchi, Adachi, Tomonaga, Kumanogoh	4. 巻 7(1)
2. 論文標題 Proteomics of serum extracellular vesicles identifies a novel COPD biomarker, fibulin-3 from elastic fibres.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ERJ open research.	6. 最初と最後の頁 00658-2020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/23120541.00658-2020	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 -

1. 著者名 Takimoto T, Osa A, Morita S, Abe K.	4. 巻 59(3)
2. 論文標題 Diffuse Pulmonary Cysts in Metastatic Angiosarcoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 457-458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3644-19.	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 -

1. 著者名 Hwang S, Takimoto T, Hemler ME.	4. 巻 76(8)
2. 論文標題 Integrin-independent Support of Cancer Drug Resistance by Tetraspanin CD151	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Mol Life Sci.	6. 最初と最後の頁 1595-1604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-019-03014-7.	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takayuki Takimoto
2. 発表標題 Proteomic Profiling of Serum Exosomes to Identify Novel Biomarkers for Lymphangioliomyomatosis
3. 学会等名 2019 International Conference of the American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝本 宜之
2. 発表標題 エクソソームのプロテオミクスによるリンパ脈管筋腫症のバイオマーカー探索
3. 学会等名 第93回閉塞性肺疾患研究会
4. 発表年 2019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	武田 吉人 (Takeda Yoshito) (40452388)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	井上 義一 (Inoue Yoshikazu) (90240895)	独立行政法人国立病院機構近畿中央呼吸器センター・臨床研究センター・臨床研究センター長 (84412)	

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
---------	---------