

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17583

研究課題名（和文）エクソソームのオミックス解析情報に基づく新規心不全バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Omics approach for discovery of novel exosome biomarkers of heart failure

研究代表者

錦織 充広（Nishigori, Mitsuhiro）

福岡大学・理学部・助教

研究者番号：00633645

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）：日本では慢性心不全患者が急増しており、迅速かつ高精度に重症度評価や予後予測を行うためのバイオマーカーが求められている。本研究では、細胞から放出されるエクソソームに含まれるタンパク質やRNAより心不全の新規バイオマーカーを見出すため、エクソソーム中のタンパク質、RNAの解析法を確立した。さらに、心不全におけるミトコンドリアに着目し、心不全における細胞内ストレスとミトコンドリア異常との関連を調べた。その結果、酸化ストレス増加によるアポトーシスの促進が心筋障害を引き起こす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、心筋から放出されるエクソソーム中に含まれるタンパク質が見出された。今後、これらの心不全における経時的な変動や心筋における機能の詳細が明らかとなれば、心不全の新規診断マーカーとして利用できる可能性が高い。また、本研究により確立したエクソソームの精製法ならびにオミックス解析方法は、心不全だけでなく他の疾患における新規バイオマーカー探索に広く活用できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Since the number of patients with chronic heart failure is increasing in Japan, novel biomarkers useful for rapidly and accurate severity assessment and prognosis prediction are needed. In this study, we attempt to search for the biomarkers from proteins and RNAs which are included in exosomes released from cardiomyocytes. For this purpose, we established the protocols for exosome purification and sequential proteomic and transcriptomic analyses. In addition, we focused on the mitochondrial dynamics and dysfunction in heart failure, and investigated the relationship between intracellular stress and mitochondrial abnormalities. As a result, it was suggested that the promotion of apoptosis by increasing oxidative stress might cause the myocardial damage.

研究分野：プロテオーム

キーワード：エクソソーム 心不全 バイオマーカー ミトコンドリア オミックス解析

1. 研究開始当初の背景

日本では超高齢化社会を迎え、慢性心不全患者が増加の一途を辿っており、将来的には患者数が250万人に達する心不全パンデミックが起こると警告されている。心不全患者の予後は悪く、5年後の生存率は70%、5年間で40%以上の患者にイベント発生が認められ、入退院を繰り返して重症化する。このため、循環器医療の立場からは心不全の早期介入と改善、重症化防止が不可欠であり、迅速かつ高精度な重症度評価法や予後予測法の開発が急務である。

近年、様々な細胞が分泌するエクソソームに内包されるタンパク質やRNAが、がんの診断マーカーとして着目されている。心不全の診断マーカーとしての報告は無いが、心筋細胞から放出されたエクソソームが心筋梗塞を抑制することなどが報告されており、心臓で情報伝達機能を持つエクソソームが産生されていると考えられる。心不全状態で通常と異なるエクソソームが放出されていれば、それらに内包されるタンパク質やRNAが心不全に特異的なマーカーになる可能性は高い。

2. 研究の目的

本研究では、心不全時の心筋組織から放出されるエクソソーム中のタンパク質・遺伝子より、疾患の病態を反映し重症度評価や予後予測などに利用可能な新規バイオマーカーを発見することを目的とする。このため、エクソソームの精製法を検証し、プロテオーム解析やトランスクリプトーム解析によるタンパク質、遺伝子(比較的量の多いmiRNAが対象)の網羅的な検出・定量法について検証を行った。また、心不全においては心筋細胞においてミトコンドリアの異常が観測される。そこで細胞ストレス誘発時におけるミトコンドリアの形態変化やその関連タンパク質の機能を解析し、心不全とミトコンドリアとの関連の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1)エクソソーム精製法の検証

市販されている複数のエクソソーム精製キットを用いて血清よりエクソソームを回収した。得られたエクソソーム画分について、ウェスタンブロットによりエクソソームのマーカータンパク質を検出し、エクソソームの回収量および純度を比較・検証した。

(2)エクソソームのプロテオーム解析の検証

精製したエクソソームについて、還元アルキル化、Trypsin消化、脱塩を行いプロテオーム解析用サンプルを調製した。TT5600質量分析計を用いたLC-MS/MS解析を行い、エクソソームに含まれるタンパク質を解析した。タンパク質の同定はMascotソフトウェアを用いて実施した。

(3)培養細胞および組織から放出されるエクソソームの精製

培養細胞および組織から直接、分泌されるエクソソームの回収法を検討した。培養細胞としてラット平滑筋細胞を組織としてマウスから摘出した左心室組織を用いた。ラット平滑筋細胞および細分化した心筋を培地中でインキュベートし、放出されたエクソソームを回収した後、MagCaptureによる精製を行った。次いでプロテオーム解析を実施し、タンパク質同定数を確認した。

(4)エクソソームのRNA解析

血清より回収したエクソソームについて、miRNA Extractor SP kitを用いてmiRNAを回収した。さらにmiRCURY LNA Universal RT microRNA PCR Kitを用いてcDNAを調製し、qPCR法またはデジタルPCR法を用いて定量を行った。エクソソームでの発現が報告されているmiR-16およびmiR-21の発現を検証した。

(5)ミトコンドリアの機能障害における形態変化の観察

心臓は絶えず収縮と拡張を繰り返す器官であるため、その機能維持のために多くのエネルギーを必要とする。そのため、エネルギー産生を担うオルガネラであるミトコンドリアは心筋に多く存在する。心不全状態の心臓はエネルギーの産生が低下しており、ミトコンドリア内膜のクリステ構造の変性がしばしば認められるため、心不全とミトコンドリアの機能異常には密接な関わりがあると考えられる。そこで、脱共役剤によりミトコンドリアの機能不全を誘発した際のミトコンドリアの形態変化について免疫染色を用いて確認した。また、ミトコンドリア内膜の融合に関連するOPAタンパク質の切断についてウェスタンブロットにより検出した。

4. 研究成果

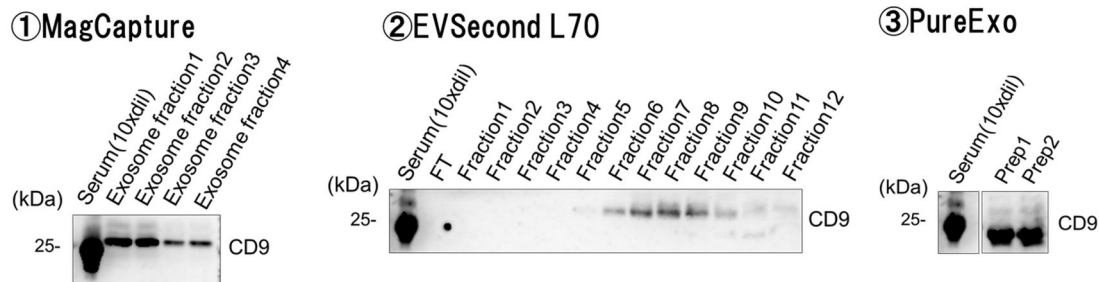
(1) エクソソーム精製法の検証

エクソソームの精製には、原理の異なる3種類のキット(下記)を検証した。

1. MagCapture Exosome Isolation Kit PS (Wako) : アフィニティ精製
2. EVSecond L70 (GL Sciences) : サイズ排除クロマトグラフィー
3. PureExo Exosome Isolation Kit (101 Bio) : 遠心分離

各キットについて、付属のプロトコルに従い血清中のエクソソームを精製した。得られたエクソソーム画分中に含まれるCD9(エクソソームに発現することが知られるエクソソームマーカーの1つ)について、特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した(図1)。

図1 : エクソソーム精製キットの評価



MagCapture および EVSecond を用いた精製では CD9 が十分に検出された。一方、PureExo に関しては非特異的なバンドが多く検出されることが明らかとなり、血清成分の混入が多いと予想された。以降は MagCapture および EVSecond について検証を進めた。

(2) エクソソームのプロテオーム解析の検証

MagCapture および EVSecond を用いて精製したエクソソームについてプロテオーム解析を実施した。また比較対照として超遠心分離により粗精製を行ったエクソソームを解析した。各調製方法においてタンパク質同定数を算出した。また、エクソソームタンパク質のデータベース ExoCarta (<http://exocarta.org/>) に登録されたタンパク質リストとの比較を行い、同定タンパク質のデータベース一致率を算出した。結果は下記の表1にまとめた。

表1 : プロテオーム解析によるタンパク質同定

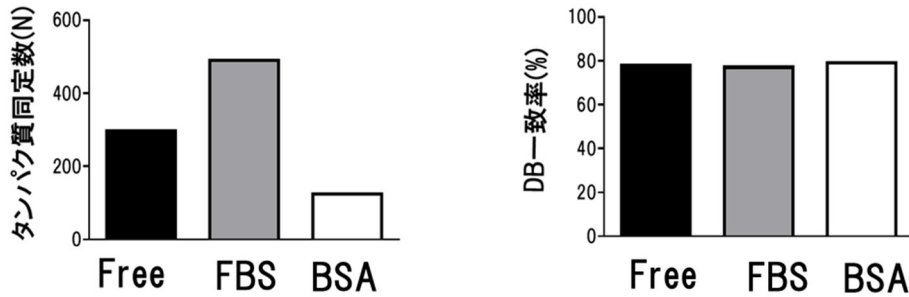
精製方法/kit	同定数	Exosome DB 一致率
超遠心粗精製	242	56%
MagCapture	542	74%
EVSecond L70	623	60%

各プロテオーム解析において、CD9 はいずれも同定されていた。他のエクソソームマーカーとして CD63 や CD81 が知られるが、CD63 は MagCapture および EVSecond で検出されたが、超遠心法では検出されなかった。一方、CD81 は MagCapture のみで検出された。以上の結果から MagCapture を用いた精製が最もエクソソームの精製度が高いと予想された。

(3) 培養細胞および組織から放出されるエクソソームの精製

ラットより摘出した大動脈から中膜平滑筋層を分離し、コラーゲナーゼ処理により初代培養細胞を作製した。ラット平滑筋細胞を 無血清、ウシ胎児血清 (FBS) 存在下、ウシ血清アルブミン (BSA) 存在下の条件で培養し、培地上清より回収したエクソソームのプロテオーム解析を実施した。培地に添加する FBS および BSA 溶液は、エクソソームのコンタミネーションを防ぐため、事前に超遠心処理を行った上清を使用した。

図 2 : ラット平滑筋細胞のエクソソーム解析

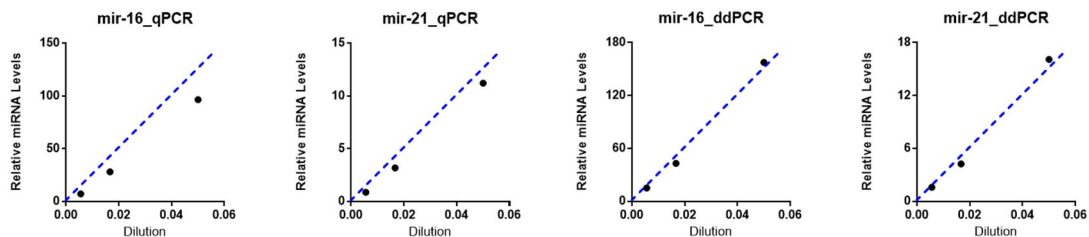


プロテオーム解析の結果、FBS を含む培地で培養した場合、最もタンパク質同定数が多くなることが明らかとなった (図 2)。一方、データベース一致率に違いは見られなかった。一方、マウス心筋組織から放出されるエクソソームについても検証した。マウスより摘出した左心室組織を細かく切断し、無血清培地中でインキュベートした。回収したエクソソームのプロテオーム解析の結果、タンパク質同定数は 334 個であり、データベース一致率は 65%であった。さらに、エクソソームマーカーである CD9、CD63、CD81 はいずれも同定されていた。インキュベート温度および時間を検討し、最適な条件を決定した。

(4)エクソソームの RNA 解析

血清中のセルフリーRNA を直接回収するための kit に関しては既にいくつか市販されているが、本研究ではエクソソームに特異的な miRNA をより高純度で回収するため、まずエクソソームを精製した後、抽出 kit を用いて miRNA を回収した。複数のキットの検証および DNase 処理による非特異的検出の抑制等を検討し、最終的に適切な精製条件を確立した。得られた miRNA に対して qPCR 法およびデジタル PCR 法での定量性の比較を行った (図 3)。

図 3 : エクソソームの miRNA 解析

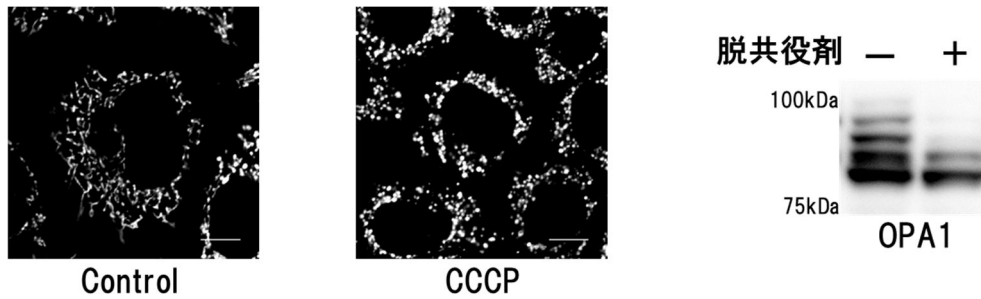


エクソソームに特異的な miRNA である miR-16 および miR-21 をそれぞれ希釈率を変えて検出したところ、qPCR 法に比べてデジタル PCR 法でより直線性が高く検出できた。したがってデジタル PCR 法で検出した場合、より定量性の高い解析が実施可能であることが示された。

(5)ミトコンドリアの機能障害における形態変化の観察

ミトコンドリアは内膜と外膜の 2 種類の膜に覆われた特殊な構造を持っており、内膜の内外 (膜間空 マトリックス) の間にプロトンの濃度差が生じている。このプロトン勾配を利用してミトコンドリアでは ATP が産生されるが、ここに CCCP などの脱共役剤を添加することでプロトンがマトリックスに流入し、機能障害が生じる。そこで 50uM の CCCP を添加した HeLa 細胞におけるミトコンドリアの形態を免疫染色により観察した。細胞をパラホルムアルデヒドで固定した後、ミトコンドリアに発現する COX IV の特異的抗体を反応させた。さらに蛍光標識を持つ 2 次抗体で反応させ、共焦点顕微鏡により画像撮影を行った (図 4)。

図4： CCCP 添加におけるミトコンドリアの形態変化と OPA1 の切断



ミトコンドリアは通常は融合と分裂を繰り返しネットワークを形成しているが、CCCPにより機能障害が起こるとミトコンドリアは分裂形態が優位となった。一方、ミトコンドリア内膜の融合因子である OPA1 は通常は 2 種類の long-form と 3 種類の short-form の形で存在するが、脱共役剤を添加すると、ミトコンドリア内膜の複数のプロテアーゼによって切断され、short-form のみとなる。その結果、OPA1 による内膜融合は抑制され、ミトコンドリアの断片化が促進する。

まとめ

本研究では新規心不全マーカーの発見を目指して、エクソソームに着目した解析を推進した。最終的なバイオマーカーの発見には至らなかったが、心筋組織から直接放出されるエクソソームの回収方法が確立され、プロテオーム解析より 300 以上の特異的タンパク質を同定することが出来た。これらのタンパク質の心不全時における発現変動を詳細に解析することが有望なバイオマーカー候補の発見につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagai-Okatani Chiaki, Nishigori Mitsuhiro, Sato Takashi, Minamino Naoto, Kaji Hiroyuki, Kuno Atsushi	4. 巻 99
2. 論文標題 Wisteria floribunda agglutinin staining for the quantitative assessment of cardiac fibrogenic activity in a mouse model of dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1749 ~ 1765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0279-9	査読の有無 有
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 Saito Kosuke, Yagi Hiroaki, Maekawa Keiko, Nishigori Mitsuhiro, Ishikawa Masaki, Muto Sayaka, Osaki Tsukasa, Iba Yutaka, Minatoya Kenji, Ikeda Yoshihiko, Ishibashi-Ueda Hatsue, Ogino Hitoshi, Sasaki Hiroaki, Matsuda Hitoshi, Saito Yoshiro, Minamino Naoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Lipidomic signatures of aortic media from patients with atherosclerotic and nonatherosclerotic aneurysms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 e15472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51885-4	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 Liu Xiaohui, Sakai Hiroki, Nishigori Mitsuhiro, Suyama Keitaro, Nawaji Tasuku, Ikeda Shin, Nishigouchi Makoto, Okada Hiroyuki, Matsushima Ayami, Nose Takeru, Shimohigashi Miki, Shimohigashi Yasuyuki	4. 巻 377
2. 論文標題 Receptor-binding affinities of bisphenol A and its next-generation analogs for human nuclear receptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114610 ~ 114610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.taap.2019.114610	査読の有無 有
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 Yagi Hiroaki, Nishigori Mitsuhiro, Murakami Yusuke, Osaki Tsukasa, Muto Sayaka, Iba Yutaka, Minatoya Kenji, Ikeda Yoshihiko, Ishibashi-Ueda Hatsue, Morisaki Takayuki, Ogino Hitoshi, Tanaka Hiroshi, Sasaki Hiroaki, Matsuda Hitoshi, Minamino Naoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Discovery of novel biomarkers for atherosclerotic aortic aneurysm through proteomics-based assessment of disease progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63229-8	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 錦織充広、小柴琢己	4. 巻 111
2. 論文標題 抗ウイルス自然免疫におけるミトコンドリアの応答ゾーン	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 福岡医学雑誌	6. 最初と最後の頁 77-85
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 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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 橘 勇人, 高橋 篤, 錦織充広, 大星直樹
2. 発表標題 確率モデルに基づく質量分析におけるマススペクトルの解析
3. 学会等名 第18回情報科学技術フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 劉 曉輝, 酒井大樹, 錦織充広, 巢山慶太郎, 縄司 奨, 池田 伸, 西垣内 誠, 岡田浩幸, 松島綾美, 野瀬 健, 下東美樹, 下東康幸
2. 発表標題 新世代ビスフェノールのヒト核内受容体に対するリスク評価
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡谷千晶, 錦織充広, 佐藤 隆, 南野直人, 梶 裕之, 久野 敦
2. 発表標題 Identification of Wisteria Floribunda Agglutinin as a Specific Lectin for Detection of Cardiac Fibrosis in a Dilated Cardiomyopathy Mouse Model Using Lectin Microarray-based Glycomic Analysis.
3. 学会等名 第83回日本循環器病学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	南野直人, 八木寛陽, 錦織充広, 村上裕輔, 武藤清佳, 池田善彦, 植田初江, 森崎隆幸, 伊庭 裕, 佐々木啓明, 湊谷謙司, 松田 均
2. 発表標題	Proteome information-based disease staging pave the way to discover new biomarkers for evaluating development and progression of aortic aneurysm.
3. 学会等名	第83回日本循環器病学会学術総会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	岡谷千晶, 錦織充広, 佐藤 隆, 南野直人, 梶 裕之, 久野 敦
2. 発表標題	心筋線維化の定量的評価法のための新規糖鎖マーカー開発に向けた、拡張型心筋症モデルマウス心臓のグライコーム、グライコプロテオーム解析
3. 学会等名	日本プロテオーム学会 2019年大会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	岡谷千晶, 錦織充広, 佐藤 隆, 南野直人, 梶 裕之, 久野 敦
2. 発表標題	Glycomic and Glycoproteomic Approaches for Development of Novel Glyco-Biomarkers of Cardiac Fibrogenesis Using a Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy
3. 学会等名	第18回ヒトプロテオーム機構国際会議(国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	劉曉輝, 酒井大樹, 錦織充広, 巢山慶太郎, 縄司奨, 池田伸, 西垣内誠, 岡田浩幸, 松島綾美, 野瀬健, 下東美樹, 下東康幸
2. 発表標題	新世代ビスフェノールのヒト核内受容体に対する結合親和性評価(Binding affinity evaluation of next generation bisphenol for human nuclear receptors)
3. 学会等名	第92回日本生化学会大会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 劉 暁輝, 酒井大樹, 錦織充広, 巢山慶太郎, 縄司 奨, 池田 伸, 西垣内 誠, 岡田浩幸, 松島綾美, 野瀬 健, 下東美樹, 下東康幸
2. 発表標題 新世代ビスフェノールのヒト核内受容体21種に対する結合親和性評価
3. 学会等名 第22回環境ホルモン学会 研究発表会
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
---------------------------	-----------------------	----

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