

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17636

研究課題名（和文）エクソソームのプロテオミクスによるサルコイドーシスの新規バイオマーカー探索

研究課題名（英文）Discovery of Novel Biomarkers for Sarcoidosis by proteomics

研究代表者

二見 悠（Futami, Yu）

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：40836409

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）：サルコイドーシス（サ症）は非乾酪性肉芽腫が全身に形成される原因不明の難病で、血清バイオマーカー（BM）に、ACEやsIL-2レセプターがあるものの、感度・特異度ともに十分ではなく、新たなBMの開発が急務とされる。種々の細胞が分泌するエンドソーム由来の細胞外小胞エクソソームに最新プロテオミクスを駆使することで、血清プロテオミクスでは捉えられない膜蛋白を同定できる事を利用し、疾患特異的、臓器特異的、治療予測可能な画期的BMの開発と病態解明に挑戦し、CD 14・LBPという2種類の蛋白をBMとして同定した。さらにBMとしての精度をACE、sIL2Rと比較し、臨床的な有用性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原因不明の難病サ症のBMとして同定したCD14、LBPは患者の肺や縦隔リンパ節の肉芽腫においても高発現していた。またマウス単球細胞にLPS刺激で多核球を誘導すると、細胞内のCD14、LBP発現が亢進すると同時に細胞上清中のエクソソームでも発現が亢進しておりin vitroでも病態が再現できた。重症度予測、臓器特異性などの項目に関しては従来のマーカーを超えられなかったが、感度、特異度はAUC0.8以上で診断に有用である。またCD14に関しては従来のBMと相関がなく、組み合わせる事で診断率の向上を期待できる。本ストラテジーは腫瘍領域では一般的であるが、サ症および他の難病にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： Sarcoidosis is a complex, polygenic, inflammatory granulomatous disease of unknown cause in multiple organs. . Unfortunately, the ideal biomarker for sarcoidosis has not yet been discovered. In serum biomarkers, ACE and sIL2R are the most relevant biomarkers, but lack sensitivity and specificity. By making full use of the latest proteomics for endosome-derived extracellular vesicle, secreted by various cells, it is possible to identify membrane proteins that cannot be captured by serum proteomics. In order to find BMs which are disease-specific, organ-specific, and predictable for treatment, we challenged to develop novel BMs and elucidate the pathophysiology of sarcoidosis. Then, we identified two kinds of proteins, CD 14 and LBP, as BMs for sarcoidosis. Furthermore, we compared them with ACE and sIL2R by ROC curve and verified the clinical usefulness.

研究分野：エクソソーム

キーワード：サルコイドーシス プロテオミクス バイオマーカー 個別化医療 肉芽腫性疾患 多核巨細胞 バイオインフォマティクス リキッドバイオプシー

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

サルコイドーシス(サ症)は非乾酪性肉芽腫が全身に形成される原因不明の難病である。肉芽腫が可逆的で自然治癒する症例があるものの、肺、眼、心臓をはじめとして多臓器に病変が出現し、不可逆となって線維化を起こし重篤な臓器障害をきたす予後不良例も存在する。細菌感染などの抗原暴露という単一の環境因子のみでは説明できず、複数の遺伝的要因が関連する。

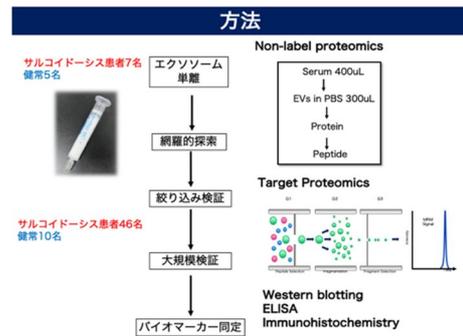
近年、本疾患のように多遺伝子および多様な表現型の疾患を理解するためにオミクスおよびシステム生物学の研究分野が広く適用されている。オミクスは包括的プロファイリングを可能にする技術であり、システム生物学により高度な計算手法を用いてオミクスから生まれる膨大なデータを解析可能である。さらに、ビッグデータを処理するバイオインフォマティクスの活用により、新たな BM や病態解明も可能となる(Annals ATS 2017)。サ症の血清バイオマーカー(BM)には40年前に見出された ACE や sIL-2 レセプターが代表的で、病勢はある程度反映しているものの診断、予後予測と言う点において感度・特異度ともに満足できるものではなく、それらを凌駕するような新規 BM の開発は臨床的には非常に重要であり、また難病の病態解明にも繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は第一にサ症において感度・特異度共に高く、臓器特異的で予後予測可能な BM の開発である。BM 探索にあたり最も有用なリソースとして血液が挙げられるが、血液中には多くの夾雑物を含むために網羅的解析に限界があると考えられる。そこで我々は新規 BM 探索を行うにあたり、近年新たな細胞間・組織間・臓器間のコミュニケーションツールとして脚光を浴びているエクソソームに着目した(Andaloussi et al. Nat Rev Drug Discov. 2013)。エクソソームは種々の細胞が分泌するエンドソーム由来の細胞外小胞であるが、単離の際に夾雑物は排除されるので、プロテオミクスに適している点が挙げられる。また、血中プロテアーゼやヌクレアーゼによる分解を免れ病因となる細胞膜・細胞内情報を保有しているという利点もある。サ症患者においても末梢血エクソソームの単離により、血清プロテオームの抱える種々の問題点を解決することが可能ではないかと考えた。第二にエクソソームに着目した BM 開発の戦略を確立する事である。現在まで、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は国内・国外問わず報告はわずかである。申請者のグループでは、2012年からエクソソームの種々の単離法(抗体法、超遠心法)と検証方法(電子顕微鏡、qNano)及び解析方法(Linear Trap Quadrupole (LTQ) Orbitrap Velos Mass Spectrometry)について検証し、最適なシステムを構築してきた。今回はサイズ排除クロマトグラフィー(EV second)を用いた単離法で難病サ症の BM 探索に挑戦した。

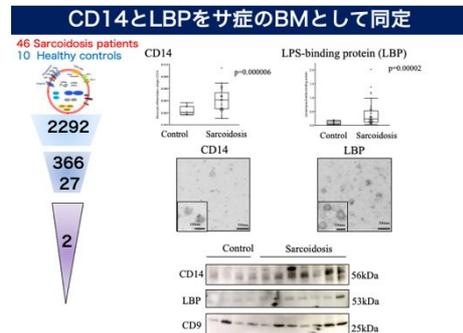
3. 研究の方法

サ症患者 7 名と健常人 5 名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を単離し LC-MS/MS による網羅的解析で大量の蛋白を検出した。それらの蛋白について 2 群間で優位に差のあった蛋白を同定し、各蛋白に関して文献的考察を行った上で絞り込み、MRM によるターゲットプロテオミクスを行った。大規模検証の対象とする血清サンプルは当教室の血清バンク（サ症患者 46 名、健常人 10 名）を利用し、真に BM となり得るかを検証した。サンプル数を増やす事で臓器別、治療反応性との相関や予後予測が可能かどうかを検証し、ROC 曲線を用いて既存の BM との比較を行った。最終的に、WB と ELISA による再現性と実用化まで検証する。またバイオインフォマティクス(IPA 解析)により病態や病勢を反映する pathway の変動を解析した。

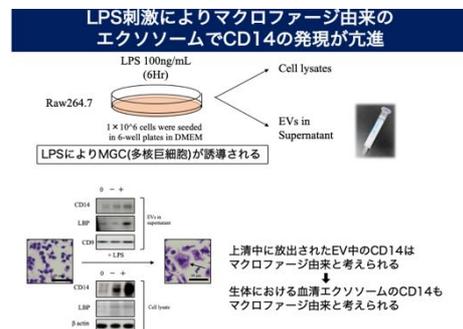


4. 研究成果

これまでにサ症患者 7 名と健常人 5 名の血清からエクソソームを単離し LC-MS/MS による網羅的解析で 2292 種類の蛋白を検出し、有意差のあった蛋白を 366 種類検出した。そのうち 42 種類の蛋白がサ症で上昇し 324 種類の蛋白がサ症で低下している事を見出した。バイオインフォマティクスによる解析 (IPA, MetaCore) でも免疫反応や細菌感染に伴う pathway が有意に変動するだけでなく、肉芽腫形成に関わる主要パスウェイが上位にランクされたことから、エクソソームの蛋白プロフィールが、病態を反映していることが示唆された。366 種類の蛋白から選択した 25 種類の候補蛋白について、大規模検証としてサ症患者 46 名と健常人 10 名の血清エクソソームでの発現量を次世代プロテオミクスである MRM により測定した。その結果 CD14、LBP という二つの蛋白を新規 BM として同定した。これらの蛋白はサ症患者の病理組織標本では免疫染色にて肉芽腫、多核球で発現が亢進している事が確認された。また in vitro 実験としてマウスのマクロファージに LPS で刺激を加えると細胞中の発現が亢進すると同時に、細胞上清に含まれるエクソソーム中の両者の発現量も亢進する事がわかった。以上からサ症患者の血清エクソソームに含まれる両蛋白はマクロファージ由来であると考えられ、病態に深く関与している事が示唆された。

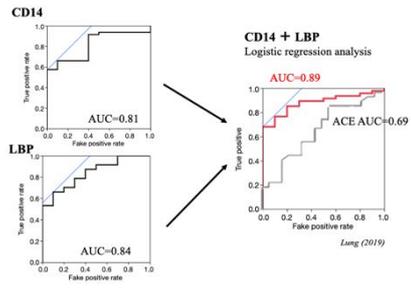


また CD14、LBP の BM としての精度を ROC 曲線を用いて評価したところ AUC はそれぞれ 0.81、0.84 で従来 BM に遜色ない結果であった。LBP は ACE、CRP と相関があったが CD14 は相関関係がなく、既存の BM と組み合わせることで診断率を向上させる事が可能と考える。また少数例のみであるがステロイド治療の前後で蛋白の発現量を WB で評価したところ治療後に発現低下を認めた。



Limitation として、サンプル数、症例の偏りが原因と思われるが臓器特異性、予後予測に関し

診断の有用性 (ROC curve)



では有意差のあるデータは捉えられなかった。しかし、今回見出した BM は既存のものよりも診断能は優っており、ACE や sIL-2R がいずれも陰性のサ症患者を診断できる可能性がある。

本ストラテジーによる BM 探索は、他疾患のバイオマーカー同定、個別化医療にも有用であると考えられる。(現在論文投稿中)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 二見悠
2. 発表標題 エクソソームの最新プロテオミクスによるサルコイドーシスの新規バイオマーカー探索
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会各術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二見悠
2. 発表標題 Next generation proteomics identifies novel biomarkers from exosomes in Sarcoidosis.
3. 学会等名 世界サルコイドーシス/国際肺疾患学術会議2019・第39回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二見悠
2. 発表標題 エクソソームの次世代プロテオミクスによるサルコイドーシスの新規バイオマーカー同定
3. 学会等名 第40回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二見悠
2. 発表標題 エクソソームの次世代プロテオミクスによるサルコイドーシスの新規バイオマーカー開発
3. 学会等名 第7回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二見悠
2. 発表標題 エクソソームの次世代プロテオミクスによるサルコイドーシスの新規バイオマーカー 開発
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020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