

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17180

研究課題名（和文）エクソソームの最新プロテオミクスによる気管支喘息の新規バイオマーカー探索

研究課題名（英文）Proteomics of serum exosome to identify a novel biomarker for bronchial asthma

研究代表者

木庭 太郎 (Koba, Taro)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

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）：気管支喘息患者の血液中に浮遊するエクソソーム（細胞外小胞）の網羅的解析により、3000種類以上に及ぶ膨大な蛋白を捉えるだけでなく、気管支喘息患者肺も同時に網羅的解析を加える統合解析により、気管支喘息の病態と密接に関わる新規バイオマーカーを同定した。とりわけ、ガレクチン10等のバイオマーカー分子は、喘息の診断や気流閉塞の予測に有用だけでなく、喘息病態と密接に関わるエトシス（好酸球の細胞死）と相関した。喘息のバイオマーカーとして血中好酸球数が主に活用されてきたが、エクソソーム中ガレクチン10は、好酸球数に優る新規バイオマーカー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

気管支喘息は、症状、気道過敏性や気道可逆性により総合的に診断される疾患で、血液検査では血中好酸球やIgE等により、肺内の病態を推測しながら治療法を検討しているものの、肺内の疾患活動性を反映する分子を血液で捉えるには限界があった。我々は、血中の細胞外小胞であるエクソソームに着目し、最新プロテオミクス（蛋白網羅的解析）を駆使することで新たな気管支喘息バイオマーカーの一つとしてガレクチン10を同定した。ガレクチン10を含む新規バイオマーカー分子は、通常、喘息の診断において、ゴールドスタンダードとされる末梢血好酸球数に診断能で優るだけでなく、気流閉塞や粘液栓とも有意な相関を認めた。

研究成果の概要（英文）：We have identified novel biomarkers related to the pathogenesis of bronchial asthma by comprehensively analyzing exosomes (extracellular vesicles) floating in the blood of bronchial asthma patients, identifying a vast number of proteins (more than 3000 kinds). Additionally, we integrated comprehensive analysis of bronchial asthma patients' lungs. In particular, biomarker molecules such as galectin-10 are not only useful for asthma diagnosis and predicting airflow obstruction but also correlated with etosis (eosinophil cell death), which is closely related to the pathophysiology of asthma. Although blood eosinophil count has been mainly utilized as a biomarker for asthma, galectin-10 in exosomes was suggested to be a novel biomarker superior to eosinophil count.

研究分野：プロテオミクスによる呼吸器疾患のバイオマーカー探索

キーワード：気管支喘息 エクソソーム バイオマーカー プロテオミクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、世界3億人の患者が推計される、複雑多様な表現型を示す慢性炎症性疾患である。しかし、活用可能なバイオマーカーは基本的に血中好酸球数、IgE、呼気中一酸化窒素の3種のみであり、個別化医療が求められる気管支喘息の診断や治療に用いるには不十分なため、新規バイオマーカーの開発が喫緊の課題であるとされている。

あらゆる細胞から分泌される細胞外小胞(エクソソーム)は、核酸や蛋白など種々の分子を内包し、細胞間・組織間・臓器間における新規情報伝達物質として注目されている。さらにエクソソームは、抗原提示などの免疫応答にも関与し、脂質二重膜に囲まれ安定で、容易に採取可能でもあることから、新規バイオマーカーの理想的なリソースと考えられる。実際にエクソソームの活用は、複数の悪性疾患の病態病理解明や診断・治療戦略の開発を可能にしてきた。尚、気管支喘息を含む慢性気道疾患では、個別化医療におけるバイオマーカーやドラッグデリバリーシステムとしてエクソソームが潜在的な役割を持つことが、近年急速に蓄積されてきたエビデンスによって示されている。例えば、気管支喘息患者の好酸球由来エクソソームは、気道上皮細胞の創傷治癒遅延と気道平滑筋のリモデリングを誘導することが報告されている。また、免疫関連のmiRNAは、気管支喘息のフェノタイプ/エンドタイプ分類や重症度を反映する非侵襲的なバイオマーカーとして使用できることが報告されている。

少量のエクソソームタンパク質を分析するのは困難であるため、エクソソームに関する呼吸器疾患研究のほとんどは、mRNAとmiRNAにのみ焦点を当ててきた。しかし、ヘテロで複雑な気管支喘息の表現型の分類に関しては、ゲノミクスやトランスクリプトミクスよりプロテオミクスの方が有利であろうと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、血清エクソソームの次世代プロテオミクスから、複雑多様な気管支喘息の個別化医療に有用なバイオマーカーの開発に挑戦した。

### 3. 研究の方法

健常者4人、非好酸球性喘息患者4人、および好酸球性喘息患者4人の血清エクソソームを用いて、最新プロテオミクスのdata-independent acquisition (DIA)を実施した。バイオマーカーを検証するために、23人の健常者と61人の気管支喘息患者のサンプルを用いてDIAによる再検証を実施した。気管支喘息群には非好酸球性喘息患者34人と好酸球性喘息患者27人が含まれていた。また、疾患対照として慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者13人、2型炎症性疾患の典型例としてアレルギー性気管支肺真菌症(ABPM)患者6人、好酸球性肉芽腫性多発血管炎(EGPA)患者5人も解析対象とした。さらに、健常者3人と気管支喘息患者4人の手術検体を用いて、気管支肺周囲組織の液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS/MS)を行った。その後、好酸球性副鼻腔炎(ECRS)のバイオマーカーを探索するため、Non-ECRS患者6人とECRS患者7人の検討も行った。

### 4. 研究成果

健常者、非好酸球性喘息患者、好酸球性喘息患者の血清から単離したエクソソームについて、DIAを行い、3032種類もの大量の蛋白を同定した。その中で、好酸球性喘息のバイオマーカータンパクとして23種類が候補となった。さらに、84人からなる検証コホートにおいて、好酸球性喘息のバイオマーカーを絞り込み、Galectin-10 (Gal-10), eosinophil

peroxidase (EPO), major basic protein-1, eosinophil derived neurotoxin, arachidonate 15-lipoxygenaseの5種類を好酸球性喘息の新規バイオマーカーとして同定した。なかでもGal-10は、シャルコーライデン結晶の構成成分であるだけでなく、難治性喘息の鍵分子として注目されるが、エクソソーム中Gal-10は喘息診断能だけでなく、閉塞性変化や気道粘液栓とも強い相関を示し、従来の気管支喘息バイオマーカーとされる血中好酸球数よりも優ることが示された。

発現量の変化していたタンパク質の機能的役割を検討するために、パスウェイ解析 (IPA) を行った。好酸球性喘息のバイオマーカー候補タンパクで検討したcanonicalパスウェイには、"喘息における気道炎症"や"NRF2を介した酸化ストレス応答"が含まれていた。タンパク質相互作用のネットワーク解析によると、好酸球性喘息バイオマーカーは細胞外シグナル調節キナーゼ、c-Jun N末端キナーゼ、ホスホイノシチド3-キナーゼ (PI3K) とコアタンパク質として相互作用していた。これらの結果は、同定されたタンパク群が好酸球性炎症を反映していることを示していた。注目すべきは、相互作用ネットワーク解析で明らかになったように、我々の研究における気管支喘息バイオマーカー候補タンパク質は、IL-4受容体やIL-13遺伝子などの気管支喘息関連遺伝子と関連していたことである。このことは、このアプローチが気管支喘息の病因に関与する分子を非侵襲的に同定できることを示唆していると考えられた。

重症気管支喘息に高頻度に合併する好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) についても、同様の検討を加えた。Non-ECRS患者6名、ECRS患者7名について、血清エクソソームだけでなく鼻ポリープ組織の同時DIAを行った。ECRSの新規バイオマーカー候補タンパクをエクソソームから29種類、組織から88種類同定することができた。とりわけ、Gal-10とEPOは、エクソソームと組織における蛋白発現量に有意な相関がみられ、やはりliquid biopsyとしての有用性が示唆された。

さらに、健康人由来の好酸球をIL-5とplatelet activating factorで刺激すると、eosinophil extracellular trapped cell death (EETosis) と呼ばれる特殊な好酸球性の細胞死を引き起こす。EETosisは喘息やECRSにおける粘液栓形成を促進する現象である。採取した慢性鼻副鼻腔炎組織におけるEETosisの程度を調べるため、in vivoにおけるEETosisと密接に相関するLund-Mackayスコアを算出した。注目すべきことに、このスコアはGal10、EPO、および血中好酸球数と有意な相関があった。さらに、Gal10は、EPOおよび血中好酸球数よりも、Lund-Mackayスコアとわずかに強く相関していた。これらのことから、エクソソームにおけるGal10の発現は、in vitroおよびin vivoにおけるEETosisとの関連を示唆する。好酸球由来エクソソーム中のGal-10は、in vitroにおけるEETosis誘導アッセイにおいて増加を認めるだけでなく、ECRS患者における粘液栓スコアとも相関したことから、liquid biopsyとしての有用性が検証された。

血清エクソソームを用いた最新プロテオミクスにより、好酸球性喘息の新規バイオマーカーを5種類同定した。とりわけ、エクソソーム中Gal-10は、喘息におけるゴールドスタンダードである血中好酸球数よりも気管支喘息病態 (気流閉塞、粘液栓形成) と強い相関を認めた。同時に、2型炎症性疾患の代表である好酸球性副鼻腔炎においても、Gal-10の有用性が示された。複雑多様な喘息における新規バイオマーカー開発が求められてきたが、本研究のストラテジーにより、血清の網羅的解析では同定しえなかった疾患の鍵となる蛋白を安定して定量することが可能となる。本研究で見出されたGal-10は、好酸球性炎症の鍵分子であり、気管支喘息やECRSだけでなく、慢性閉塞性肺疾患や種々の好酸球性炎症を捉えることも可能である。さらに、本アプローチは、種々の慢性炎症性疾患や難病における新規バイオマーカー開発のストラテジーとなるだけでなく、ヘテロな慢性炎症性疾患について分子に基づくクラスタリングや治療薬開発への有用性も示唆される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawasaki Takahiro, Takeda Yoshito, Edahiro Ryuya, et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 Next-generation proteomics of serum extracellular vesicles combined with single-cell RNA sequencing identifies MACROH2A1 associated with refractory COVID-19	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-022-00243-5	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 Futami Yu, Takeda Yoshito, Koba Taro, et al.	4. 巻 34
2. 論文標題 Identification of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein as novel biomarkers for sarcoidosis using 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 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 Koba Taro, Takeda Yoshito, Narumi Ryohei, et al.	4. 巻 7
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 Yoshimura Hanako, Takeda Yoshito, Shirai Yuya, Koba Taro, Nakayama Mana, Hirata Haruhiko, Koyama Shohei, Iwahori Kota, Nagatomo Izumi, Kawasaki Takahiro, Mizuguchi Kenji, Kawashima Yusuke, Adachi Jun, Nogami-Itoh Mari, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 153
2. 論文標題 Galectin-10 in serum extracellular vesicles reflects asthma pathophysiology	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1268 ~ 1281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2023.12.030	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉村華子、武田吉人、足立淳、伊藤真里、榎本貴俊、原伶奈、白井雄也、三宅浩太郎、白山敬之、平田陽彦、川崎貴裕、熊ノ郷淳
2. 発表標題 次世代プロテオミクスによる気管支喘息T2炎症の新規BM開発
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村華子、武田吉人、足立淳、伊藤真里、榎本貴俊、原伶奈、白井雄也、三宅浩太郎、白山敬之、平田陽彦、川崎貴裕、熊ノ郷淳
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気管支喘息T2炎症の新規バイオマーカー同定
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村華子、武田吉人、熊ノ郷淳
2. 発表標題 次世代プロテオミクスによる気管支喘息T2炎症の新規BM開発
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村華子、武田吉人、木庭太郎、菅泰彦、福島清春、白山敬之、平田陽彦、小山正平、長友泉、岩堀幸太、伊藤真理、熊ノ郷淳
2. 発表標題 エクソソームの定量プロテオミクスによる喘息の新規バイオマーカー同定
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村華子
2. 発表標題 エクソソームの定量プロテオミクスによる喘息のバイオマーカー同定
3. 学会等名 日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hanako Yoshimura
2. 発表標題 Identification of novel biomarkers for asthma reflecting lung eosinophilia by the non-targeted proteomics of serum exosomes
3. 学会等名 American Thoracic society (国際学会)
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