

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08437

研究課題名(和文)細胞外小胞に着目した膠原病の新規診断法および治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel diagnostic and therapeutic strategy for systemic autoimmune diseases focusing on extracellular vesicles

研究代表者

三枝 淳 (Saegusa, Jun)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20514970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：様々な膠原病の患者血清から細胞外小胞(EV)を単離し、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計(LC/MS)でEV中のタンパク質発現の網羅的解析を行った。Gene ontology analysisなどで候補を絞り込み、immunoblot/ELISAにより確認した。その結果、炎症性筋疾患患者の血清中でPlexin D1陽性EVが有意に上昇しており、筋痛や筋力低下と関連していることを明らかにした。さらに、関節リウマチ(RA)の血清EV中で発現上昇しているタンパクを1つ、ANCA関連血管炎(AAV)の血清EV中で発現上昇しているタンパクを3つ同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外小胞(EV)を介する情報伝達機構は、比較的最近明らかになったシステムであり、膠原病の病態におけるEVあるいはEVが内包するタンパクの関与を明らかにした研究はほとんど存在しない。したがって、本研究は膠原病、特に炎症性筋疾患の病態にEV表面上のタンパクが関わっている可能性を示した貴重な成果である。

膠原病の治療において、細胞間情報伝達物質であるサイトカインを阻害する治療法(抗サイトカイン療法)は大きな成功を収めている。本研究成果を基に、将来EVおよびその内包タンパクが膠原病の病態に関与していることが明らかになれば、それらをターゲットとする抗体治療が治療薬開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Extracellular vesicles (EVs) were isolated from the sera of patients with various collagen vascular diseases, and a comprehensive analysis of protein expression in the EVs was conducted using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS). The candidates were narrowed down through Gene Ontology analysis, and confirmed by immunoblotting or ELISA. As a result, it was revealed that Plexin D1-positive EVs were significantly elevated in the sera of patients with idiopathic inflammatory myopathies and correlated with muscle pain and weakness. In addition, we identified one protein with increased expression in the serum EVs of patients with rheumatoid arthritis (RA), and three proteins in those with ANCA-associated vasculitis (AAV).

研究分野：臨床免疫学

キーワード：エクソソーム 細胞外小胞 関節リウマチ ANCA関連血管炎 膠原病 全身性自己免疫疾患 炎症性筋疾患

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。

1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞 (EV) は、様々な細胞が分泌する膜小胞であり、脂質二重膜を有しているため比較的安定して血液や尿などの体液中に存在している。近年注目されているエクソソームは EV の一種である。以前は、EV は細胞の老廃物を捨てるゴミ袋のようなものと考えられていたが、1990年代後半に細胞が EV を能動的に分泌していることが明らかにされた。さらに 2000 年代から、EV に含まれるタンパク質、mRNA、マイクロ RNA (miRNA)、脂質などが、標的細胞に取り込まれて機能的に働くことや、細胞内シグナルを伝達することが次々と明らかとなっている。

その後の研究により、細胞から分泌される EV に含まれるタンパク質や核酸は細胞が置かれている状態や環境により変化することや、EV がサイトカインなどと同様に細胞間情報伝達において重要な役割を果たしていることが明らかにされた。免疫研究領域においても、EV がリンパ球と樹状細胞の活性化 / 不活性化や、抗原情報のやり取りに関与していることが知られている。

このような背景から研究代表者は、全身性自己免疫疾患 (膠原病) の病態に EV が深く関わっているのではないかと、という着想に至った。そして、血液中の EV が膠原病の病態を鋭敏に反映するバイオマーカーになるのではないかと、さらに EV をターゲットとすることで膠原病の新しい治療法が開発できるのではないかと、と考えて本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膠原病の病態における EV の関与を明らかにすることである。そして、膠原病の新しいバイオマーカーおよび治療ターゲットを同定したいと考えている。

EV は、様々な研究領域で新たなバイオマーカーとして期待されている。特にがん領域では、EV を利用した体液診断 (リキッドバイオプシー) の研究が盛んに行われている。しかし膠原病領域では、バイオマーカーとして有望な EV や、病態への関与が示唆される EV (および EV が内包する分子) に関する報告はほとんど存在しない。

また、本研究では EV の測定において、EV 表面のタンパク質をターゲットとしたサンドイッチ ELISA の構築を目指している。これにより前処理が不要で低コストでの測定が可能となるため、実際の臨床検査としての応用が現実的となる。

さらに、EV を介する情報伝達機構は最近明らかになったシステムである。膠原病の治療において、細胞間情報伝達を担うサイトカインを阻害する治療法が大きな成功を収めたことはよく知られている。したがって、EV をターゲットとする治療法は概念としては新しいが、有望な戦略であると思われる。

3. 研究の方法

膠原病患者および健常者の血清を試料として収集し、MagCapture Exosome Isolation Kit PS を応用した自動分注装置により血清エクソソームを単離する。続いて、液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (LC/MS) により、単離した血清エクソソーム中の全タンパク質の網羅的解析を行う。

LC/MS で得られた定量データの統計学的解析を行い、各膠原病患者の血清エクソソームで発現量が有意に高いタンパク質を候補分子として選定する。そして、エクソソームのデータベース (Exocarta/Vesiclepedia)、タンパク質データベース (UniProtKB/Swiss-prot) および既報の文献などを利用して、各膠原病の病態に関与する細胞や組織に由来する分子であるか否かを推定する。また、Gene ontology analysis も行い、候補タンパクが特定の膠原病とどのように関連している可能性があるかを解析する。

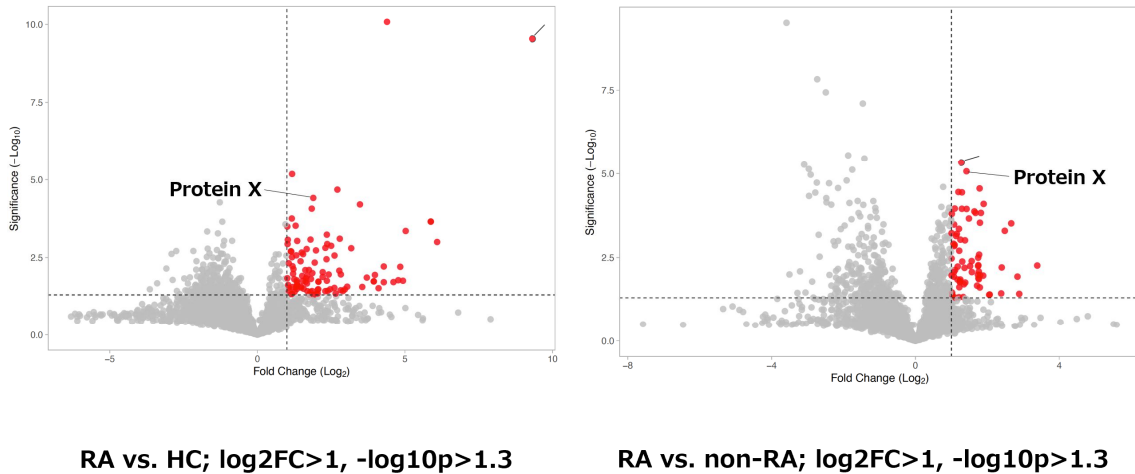
続いて、ウエスタンブロットやサンドイッチ ELISA などのアッセイにより、血清エクソソーム中の候補分子が実際に抗体により検出可能かについて検討する。そして、疾患群と健常人群とで比較することにより、実際に候補分子が膠原病患者の血清エクソソーム中で発現亢進 / 低下していることを明らかにする。

4. 研究成果

神戸大学医学部倫理委員会の承認 (No. B210240) の下、関節リウマチ (RA)、全身性エリテマトーデス (SLE)、ANCA 関連血管炎 (AAV)、原発性シェーグレン症候群 (pSS)、および健常者の血清試料を収集した。そして、血清サンプルから、高純度な血清エクソソームを単離し、LC/MS により血清エクソソーム中のタンパク質発現について網羅的に解析した。

まず RA についての解析を行った。LC/MS で得られた定量データからボルケーノプロットによるタンパク質発現解析を行い、RA 患者と健常人とを比較し、RA 患者の血清エクソソーム中で発現量が大きく変動しているタンパク質を複数抽出した (図 1、左)。さらに、ノンパラメトリック法の多群比較検定 (Kruskal-Wallis 検定および Dunn 多重比較検定) 等の比較解析を行った。同様に、RA 患者と RA 以外の膠原病患者との比較解析も行った (図 1、右) これらの解析により、Protein X を候補タンパクとして同定した (図 1)。

図 1

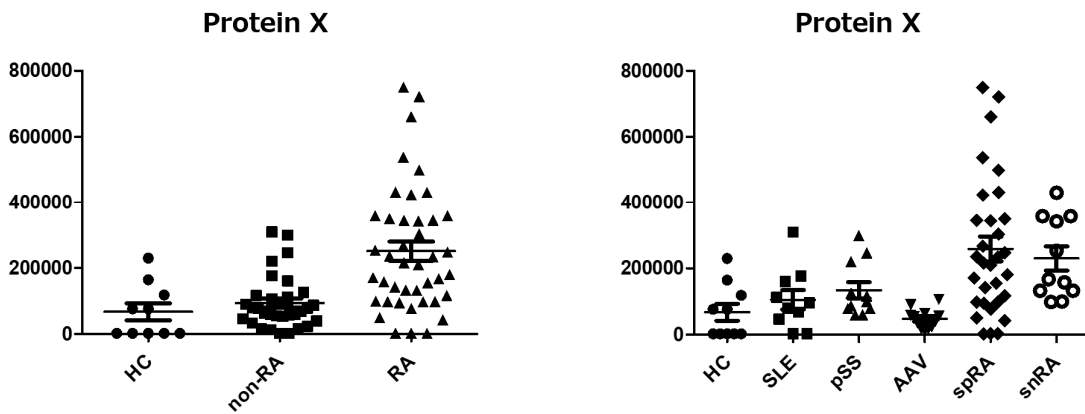


RA: 関節リウマチ患者、HC: 健常人

続いて、エクソソーム中の Protein X の発現について、健常人およびその他の膠原病患者と RA 患者とで比較した。その結果、血清エクソソーム中の Protein X レベルは、健常人およびその他の膠原病患者に比べて、RA 患者血清エクソソーム中で有意に高いことが明らかとなった(図 2、左)。

さらに、その他の膠原病患者を SLE、pSS、AAV に分けてそれぞれ解析したところ、Protein X の発現レベルが上昇 / 低下している疾患は RA 以外には認めなかった(図 2、右)。また、RA 患者について、血清反応陽性(抗 CCP 抗体 / RF 陽性、seropositive; sp)と血清反応陰性(抗 CCP 抗体 / RF 陰性、seronegative; sn)の患者で比較したところ、有意差は認められなかった(図 2、右)。

図 2

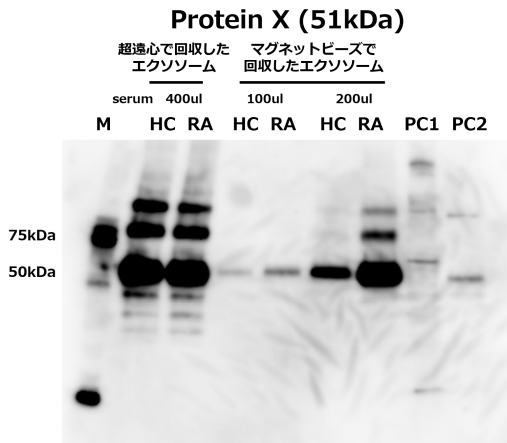


HC: 健常人、SLE: 全身性エリテマトーデス、pSS: 原発性シェーグレン症候群、AAV: ANCA 関連血管炎、spRA: 血清反応陽性関節リウマチ、snRA: 血清反応陰性関節リウマチ

続いて、候補分子 Protein X について、上記の対象患者の血清を試料として PS アフィニティ法、サイズ排除クロマトグラフィー法、エクソソーム表面マーカーに対する抗体を用いた免疫沈降法、超遠心法などによって単離した血清エクソソーム中に候補分子が発現している否かを、抗 Protein X 抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。

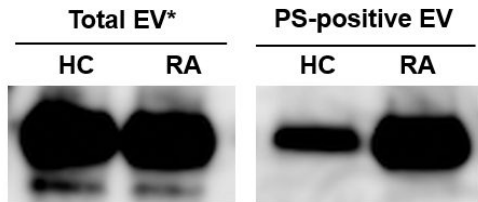
その結果、Protein X の発現は、RA 患者血清からマグネットビーズで回収したエクソソームにおいて有意に上昇していることを確認した(図 3)。

図 3



さらに、EV における Protein X の発現に関する解析を行い、超遠心による Total EV では差がなく PS-positive EV では発現量に差があることを確認した (図 4)。

図 4

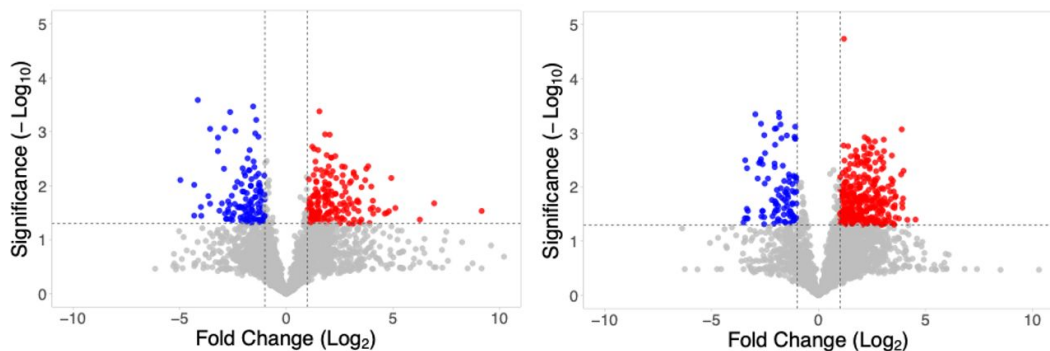


* 超遠心法により粗精製したエクソソーム

EV: 細胞外小胞

続いて、ANCA 関連血管炎(AAV)に着目して解析を行った。LC/MS による網羅的データをもとにして、RA と同様にボルケーノプロット解析などを利用して AAV 患者血清エクソソーム中で発現上昇あるいは低下しているタンパクの候補を複数同定した (図 5)。

図 5

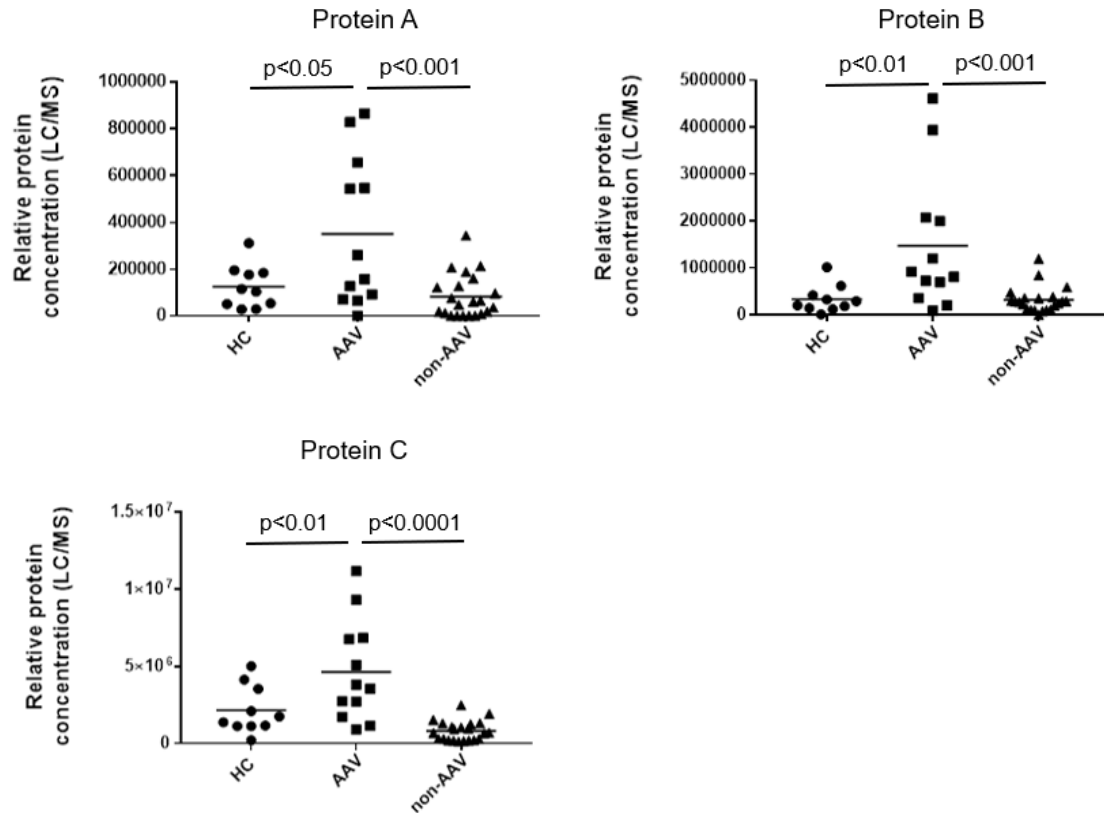


Thresholds: $p < 0.05$ (unpaired Student's t-test) and fold change 1.0 or -1.0

左: AAV 患者 vs 健常人、右: AAV 患者 vs その他の膠原病患者

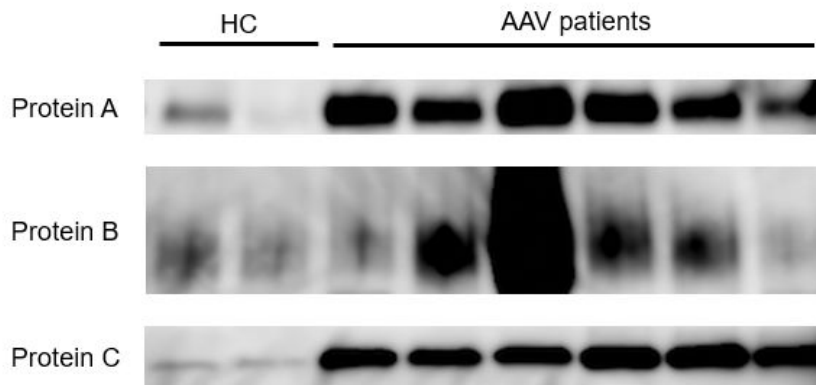
続いて、これらの候補タンパクのエクソソーム中における発現について、健常人、AAV 患者、およびその AAV 以外の膠原病患者とで比較を行った。その結果、血清エクソソーム中の Protein A, B, C の 3 つのタンパクの発現レベルが、健常人および AAV 以外の膠原病患者と比較して、AAV 患者血清エクソソームにおいて有意に高いことを発見した (図 6)。

図 6



さらに、AAV 患者および健常人の血清から、EV 表面上に存在するホスファチジルセリンと親和性の高い Tim-4 を固相化した磁気ビーズを用いた免疫沈降法 (PS アフィニティー法) により EV を抽出し、Western blot 法で Protein A, B, C の発現を解析した。その結果、AAV 患者血清中の AV において、Protein A, B, and C の発現が上昇していることを明らかにした (図 7)。

図 7



以上の結果より、ヒト血清中のエクソソームに発現するタンパクが RA / AAV の病態に関わっており、新規バイオマーカー / 治療ターゲットになる可能性が示唆された。今後も上記で同定したタンパクの役割に着目してさらに研究をすすめてゆく予定である。

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 5件）

1. 著者名 Nakamachi Yuji, Uto Kenichi, Hayashi Shinya, Okano Takaichi, Morinobu Akio, Kuroda Ryosuke, Kawano Seiji, Saegusa Jun	4. 巻 9
2. 論文標題 Exosomes derived from synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis promote macrophage migration that can be suppressed by miR-124-3p	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e14986 ~ e14986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2023.e14986	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 Uto Kenichi, Ueda Koji, Okano Takaichi, Akashi Kengo, Takahashi Soshi, Nakamachi Yuji, Imanishi Takamitsu, Awano Hiroyuki, Morinobu Akio, Kawano Seiji, Saegusa Jun	4. 巻 61
2. 論文標題 Identification of plexin D1 on circulating extracellular vesicles as a potential biomarker of polymyositis and dermatomyositis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1669 ~ 1679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keab588	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 Yoneda Katsuhiko, Ueda Yo, Tanimura Kenji, Arase Hisashi, Yamada Hideto, Saegusa Jun	4. 巻 25
2. 論文標題 Association of anti- 2-glycoprotein I/HLA-DR complex antibody with arterial thrombosis in female patients with systemic rheumatic diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-023-03175-8	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 Yamada Hirotaka, Saegusa Jun, Sendo Sho, Ueda Yo, Okano Takaichi, Shinohara Masakazu, Morinobu Akio	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of resolvin D5 on T cell differentiation and osteoclastogenesis analyzed by lipid mediator profiling in the experimental arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96530-1	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 Yamamoto Yuzuru, Okano Takaichi, Yamada Hirotaka, Akashi Kengo, Sendo Sho, Ueda Yo, Morinobu Akio, Saegusa Jun	4. 巻 23
2. 論文標題 Soluble guanylate cyclase stimulator reduced the gastrointestinal fibrosis in bleomycin-induced mouse model of systemic sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-021-02513-y	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Uto K, Ueda K, Okano T, Akashi K, Takahashi S, Nakamachi Y, Imanishi T, Kawano S, Yano Y, Saegusa J
2. 発表標題 Identification of Plexin D1 on Circulating Extracellular Vesicles as a Potential Biomarker of Polymyositis and Dermatomyositis.
3. 学会等名 American College of Rheumatology 85th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujikawa Y, Sendo S, Nagamoto T, Yamamoto Y, Yamada H, Okano T, Nishimura K, Ueda Y, Saegusa J
2. 発表標題 MDScs in the inflammatory joint of SKG mice have both T cell suppressive ability and osteoclast differentiation potential.
3. 学会等名 The 23rd Annual European Congress of Rheumatology - EULAR (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nagamoto T, Okano T, Fujikawa Y, Yamamoto Y, Yamada H, Ueda Y, Sendo D, Saegusa J
2. 発表標題 Butyric acid suppresses migration of human monocyte derived dendritic cell by inhibiting actin polymerization via mDia1 inhibition.
3. 学会等名 American College of Rheumatology 86th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoneda K, Ueda Y, Yamada H, Nishimura K, Sendo S, Tanimura K, Arase H, Yamada H, Saegusa J
2. 発表標題 The autoantibody for beta-2-glycoprotein I complexed with HLA-DR linked to arterial thrombosis in female patients with systemic rheumatic diseases.
3. 学会等名 The 24th Annual European Congress of Rheumatology - EULAR 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamashita M, Okano T, Shirasugi I, Hirotaka Y, Nishimura K, Sendo S, Ueda Y, Maeda T, Hayashi S, Yamamoto W, Onishi A, Murakami K, Shiba H, Hata K, Tsujimoto K, Ebina K, Son Y, Yoshida N, Hara R, Watanabe R, Hashimoto M, Kuroda R, Saegusa J
2. 発表標題 Effects of B/tsDMARDs on Non-inflammatory Pain in Patients with Rheumatoid Arthritis -ANSWER Longitudinal Cohort Study-
3. 学会等名 American College of Rheumatology 87th Annual Scientific Meeting, 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生戸 健一, 岡野 隆一, 中町 祐司, 今西 孝充, 河野 誠司, 矢野 嘉彦, 三枝 淳
2. 発表標題 多発性筋炎/皮膚筋炎の新規バイオマーカーとしてのPlexin D1陽性エクソソームの臨床的有用性の検討
3. 学会等名 第69回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------