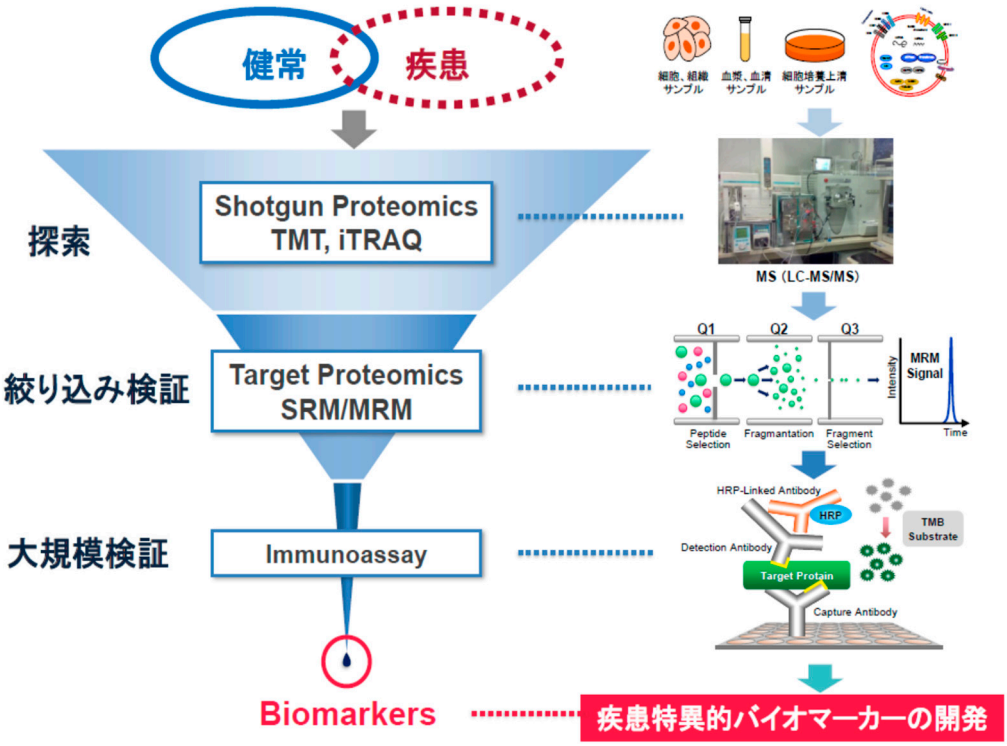
82　エクソソームによる閉塞性肺疾患のバイオマーカー開発	武田　吉人

【目的】閉塞性肺疾患（BA、COPD）のエクソソームの網羅的解析から、病態解明や個別化医療に役立つ新規 Biomarker（BM）を探索すること。

【方法】最新定量プロテオミクスによる多くの BM 候補から、ターゲットプロテオミクス（MRM／SRM）により選択的かつ効率的に大量 BM 候補から「真の BM」を絞り込む。ヘテロなヒト疾患のアプローチのために、マウスモデルから BM を絞り込みヒトへの応用を試みると同時に、ノンラベル・定量プロテオミクスにより、直接ヒト検体から新規 BM の探索に挑戦する。

【結果】肺気腫モデルと喘息モデルの血清から単離したエクソソームについて、ノンラベル・定量プロテオミクスを行った。同定された蛋白は、従来血清から検出されない膜蛋白など数百種類に及んだ。さらに、COPD と喘息モデルにおいて、疾患特異的・両疾患共有の蛋白だけでなく、病勢との相関を認める BM 候補も見出した。さらに、絞り込まれた BM 候補蛋白について、COPD 患者と喘息患者にて検証することができた。エクソソームの最新プロテオミクスにより COPD・喘息の新規バイオマーカーを見出した。

炎症性呼吸器疾患におけるバイオマーカー探索のための新規ストラテジー



82. エクソソームによる閉塞性肺疾患のバイオマーカー開発

武田　吉人

大阪大学 医学部 呼吸器・免疫内科学

Key words：閉塞性肺疾患，エクソソーム，プロテオミクス，気管支喘息，COPD

緒　言

気管支喘息（BA）は、患者数が 3 億人に及ぶと推測され、有病率の増加が社会的・経済的負担となっている。慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、2020 年には世界死因の第 3 位と推定されているものの、多くの患者は未診断のまま放置され、新規の病態解明や治療法開発が望まれる。これら閉塞性肺疾患は、遺伝的素因に加齢・環境・喫煙などの外的要因が加わることで発症する複雑・多様な疾患であるだけでなく、両者が合併する ACOS の存在も注目されている。このようなヘテロな疾患の解明や個別化医療に欠かせないのがバイオマーカー（BM）であり、診断・治療・新薬開発ストラテジーのパラダイムシフトとして期待されている。

BM 探索にオミックス研究が精力的に行われてきたが、SNPs 解析以外は有効に機能しているといえない。その原因として、疾患が多様であることや、サンプルの複雑性と入手の難しさがあげられる。特にサンプルの回収が容易な血清プロテオームは、診断や治療モニタリングに有用と期待されたが、高濃度タンパクのマスク効果により、鍵となる低濃度タンパクの検出が妨げられ、疾患の決め手となる BM を検出できていないのが現状である。

種々の細胞が分泌するエンドソーム由来の小胞顆粒であるエクソソームは、近年様々な生理現象のみならず、癌や感染症など種々の疾患に関与することから新たな細胞間・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。癌細胞から分泌されるエクソソームは免疫を制御するたんぱく質や遺伝情報を含み、樹状細胞や腫瘍微小環境に作用して、腫瘍免疫応答を調節していることなど、多くの疾患の病態や治療応用が次々に報告されている。そこで血球系細胞や上皮細胞をはじめあらゆる細胞から分泌される細胞外小胞：エクソソーム（Exosome）に注目した［1］。脂質二重膜で包まれるエクソソームは、タンパク、核酸や脂質を内包し、ドナー細胞からレシピエント細胞へと細胞間や臓器間を移動する新たなメッセンジャーとして機能する［2］。エクソソームは、1. 病因となる細胞内の分子情報をプロテアーゼにより分解されずに保有、2. 末梢や体液から容易に採取可能、3. 大量夾雑物を含まない、などの理由から理想的な BM のリソースとみなしうる。我々の予備実験からヒトエクソソームは、健常人でもばらつきが多いため、疾患の決め手となる BM 候補の探索には多大な労力とコストを要することが予想された。そこで、シンプルな疾患モデルマウスを利用することで、多様な表現型を含む炎症性呼吸器疾患の新規 BM を探索する。

本研究目的は、閉塞性肺疾患（BA、COPD）のエクソソームの網羅的解析から、病態解明や個別化医療に役立つ新規 BM を探索することである。最新プロテオミクスによる多くの BM 候補から、定量的質量分析（MRM／SRM）により選択的かつ効率的に大量 BM 候補から「真の BM」を絞り込む。ヘテロなヒト疾患のアプローチのために、マウスモデルから BM を絞り込みヒトへの応用を試みると同時に、ノンラベル・定量プロテオミクスにより、直接ヒト検体から画期的な BM 探索に挑戦する。

急性肺障害モデルと肺気腫モデルの末梢血から単離したエクソソームのラベル化・定量プロテオミクス比較解析から、1,300 種類のエクソソーム蛋白同定に成功した。さらに、従来組織でしか捉えることができなかった膜蛋白や鍵分子を含むだけでなく、エクソソームのタンパクプロフィールが急性炎症&慢性炎症の特徴を捉えていること示した。さらに、COPD 特異的&慢性炎症特異的 BM 候補から、MRM／SRM にて新規 BM を約 20 種類検証するだけでなく、疾患活動性との相関がある BM の絞り込みに成功した（論文投稿準備中、特許出願）

さらに、ブレオマイシンによる肺線維症モデルにおける解析では、エクソソームに肺由来の蛋白が多く含まれること、線維化と相関する新規 BM 候補を見出した。

そこで、本研究では、閉塞性肺疾患（BA、COPD）のエクソソームの網羅的解析から、病態解明や個別化医療に役立つ新規 BM 同定のために、マウスモデルを検討する。

方　法

エクソソームの単離法（超遠心、ショ糖密度勾配法）や検証（TEM、qNano）は確立済みであり、最新定量プロテオミクス *iTRAQ-LC/MS/MS* を用いる。同時に、喘息を含む種々の慢性炎症性肺疾患（喘息、COPD）に関しては、検体数に制限がないノンラベル定量（LTQ-Orbitrap-Velos LC/MS/MS）で解析し、Expressionist で統計解析する。さらに、BM 候補蛋白について従来法（WB & ELISA）だけでなく、抗体が利用できない BM 候補は MRM／SRM にて検証を予定する。最新プロテオミクスによる多くの BM 候補から、定量的質量分析（MRM／SRM）により選択的かつ効率的に大量 BM 候補から「真の BM」を絞り込む。ヘテロなヒト疾患のアプローチのために、マウスモデルから BM を絞り込みヒトへの応用を試みる。

結果および考察

2012 年からエクソソームの種々の単離法（抗体法、 超遠心、研究協力者が開発した EV second）と検証（電子顕微鏡、qNano）を確立している[3]。喘息モデルとして標準とされる OVA 誘導性喘息モデルを、疾患コントロール（COPD）と比較することで、疾患特異的な BM 探索に挑戦する。末梢血由来エクソソームを、ノンラベル・定量プロテオミクス（Linear Trap Quadropole（LTQ）Orbitrap Velos Mass Spectrometry）により解析する。

本手法を用いることで、純粋かつ短時間で単離したエクソソームから、750 種類の蛋白同定に成功した。EV-Second にて単離したエクソソームは、電子顕微鏡にて形態を確認するだけでなく、CD9 によるウェスタンブロット（WB）にてエクソソームであることを確認した。さらに、喘息モデル由来のエクソソームは、NanoSight を用いた粒子径と粒子数解析においては有意差を認めなかった。

本解析により喘息特異的な BM（増加群）を 142 種類、COPD（肺気腫）特異的な BM を 109 種類、COPD と喘息共通の BM を 85 種類同定することに成功した（図 1）。さらに、喘息モデルにおいては、肺内好酸球浸潤と相関する新規 BM を 19 種類同定し、COPD（肺気腫）モデルにおいては肺胞径と相関する新規 BM を 7 種類同定した。

喘息における好酸球浸潤は、喘息の活動性（過敏性、可逆性）を最も鋭敏に表すと考えられるものの、ダイレクトに定量する方法はなく、呼気 NO(FeNO)が代用マーカーとして汎用される。そこで病理解析により喘息モデル肺における好酸球浸潤とエクソソームにおけるタンパクとの相関を検討したところ、68 種類の BM は、肺局所における好酸球浸潤と相関を認めるものであった（$r > 0.7$、$r < -0.7$）。さらに、上記 BM 候補のから、10 種類の BM について肺内における発現を検討したところ、9 種類は喘息において、5 種類は COPD の肺内における発現増加を認めた。以上の結果から、両疾患モデルにおいて、肺内における発現増加を認めた分子は新たなバイオマーカーとなりうることが示唆された。

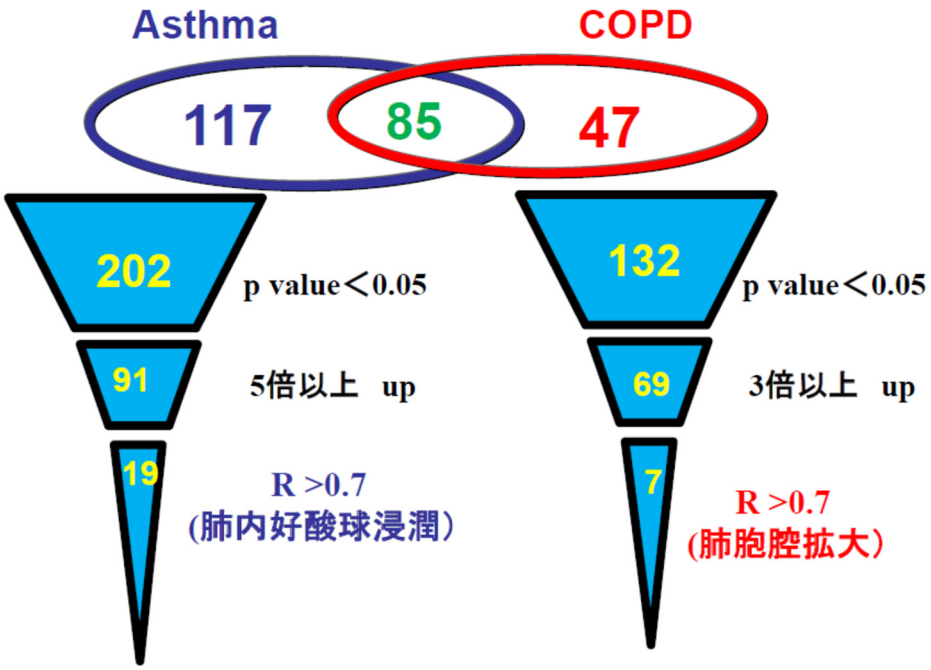


図 1. 末梢血由来のエクソソームから同定された新規 BM 候補蛋白数

マウスモデルから、喘息特異的 BM を 57 種類、COPD 特異的 BM を 24 種類、両疾患共通 BM を 85 種類同定した。さらに、喘息モデルにおいては、肺内好酸球浸潤と相関する新規 BM を 19 種類同定し、COPD（肺気腫）モデルにおいては肺胞径と相関する新規 BM を 7 種類同定した。

COPD は、世界に 2 億人の患者が推定され、日本では 600 万人、そのうち治療を受けている患者はわずか 5%に過ぎない（福地 Nippon NICE study）。一方、世界 2 億人の患者が推定されている喘息は、吸入ステロイドの普及により死亡者数は減少しているものの、罹患数は高齢化とともに増加し続けている。最近、COPD と喘息を合併する ACO は、予後不良であることや COPD 患者の 20%とも推定されているため注目されている。さらに、喘息は種々の表現型やエンドタイプが存在するため、個別化医療が求められている。このような現状のなかで、Th2 type の炎症を誘導する IL-5、IL-13、IgE などの分子を標的とした治療が次々に開発されてきた。海外でも次々に Th2 タイプの炎症を標的とした治療が開発されているものの、ペリオスチン含めて治療選択や有効性を判断する指標はほとんどないのが現状である。

もちろん、マウスにおける疾患活動性を示す BM の開発も急務である。なぜなら、創薬の開発にあたる大手製薬企業において、喘息モデルの評価法は、マウス呼吸機能を一匹ずつ測定するという原始的方法に頼らざるを得ないため、HT スクリーニングが不可能である。経時的にサンプルを採取して病態を把握することが可能な本ストラテジーによるエクソソーム・プロファイリングや BM 候補を確認すれば、一匹ずつ屠殺する必要がないので、コスト・効率・再現性・評価・動物愛護の観点から現行法より有利である。もちろん、ヘテロなヒト BA における画期的 BM 発見のために、マウスモデルから見出された BM を利用可能である。

マウスモデルを用いたエクソソームのプロテオミクスから、予想を上回る新規 BM 候補を同定した。上記結果について、特許申請を終えて現在論文投稿準備中である。今後、ヒトへの応用を展開中であり、臨床応用可能な BM 発見を目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、がんプレシジョン医療研究センターがんオーダーメイド医療開発プロジェクトプロジェクトリーダーの植田幸嗣先生である。

文　献

1) EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov. 2013 May;12(5):347-57. DOI: 10.1038/nrd3978
2) Valadi H, Ekström K, Bossios A et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. 2007 Jun;9(6):654-9. DOI: 10.1038/ncb1596
3) Ueda K, Ishikawa N, Tatsuguchi A, et al. Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. Sci Rep. 2014 Aug 29;4:6232. DOI: 10.1038/srep06232