146 メチル化cell free DNAによる全身性強皮症マーカーの検討

名古屋大学 医学部附属病院 皮膚科　　桃原　真理子

【研究の背景と目的】全身性強皮症（SSc）は、皮膚および内臓の線維化を特徴とする自己免疫疾患であり、特に抗セントロメア抗体（ACA）陽性例では血管障害と線維化が緩徐に進行する一方、早期診断に資する客観的バイオマーカーが乏しい。当初、本研究ではメチル化 cell-free DNA（cfDNA）解析により臓器線維化の組織起源を特定し、疾患モニタリングに応用することを計画した。しかし cfDNA は血中濃度が極めて低く、20 mL 以上の採血を複数回行っても十分量が安定して得られず、再現性に課題が残った。そこで研究計画を修正し、疾患関連情報を豊富に内包する細胞外小胞（EV）に着目して ACA 陽性 SSc の新規バイオマーカー探索を試みた。

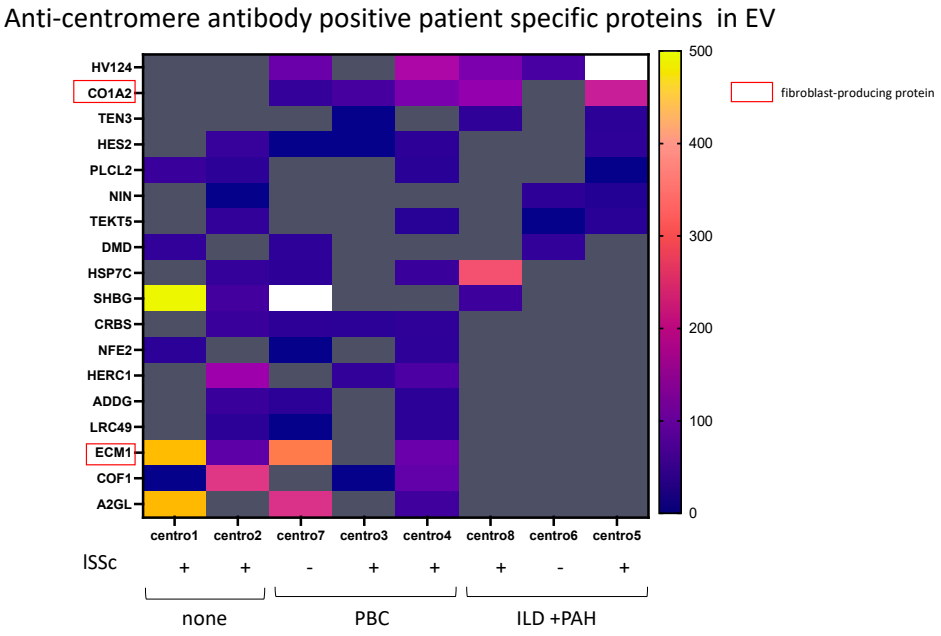
【方法】①ACA 陽性 SSc 患者 8 例、健常対照 5 例から採取した血漿よりサイズ排除クロマトグラフィーで EV を単離し、ナノトラッキング解析で粒子径と濃度を測定した。②EV タンパク質を LC-MS/MS で網羅的に解析し、疾患特異的発現プロテオームを抽出した。③候補マーカーを裏付けるためにヒト皮膚線維芽細胞を用いた機能アッセイを実施し、EV 刺激後 72 h に RNA-seq を行った。④DESeq2 と GO-GSEA で差次的遺伝子発現と経路活性化を評価した。

【結果】EV 単離は 1 mL 血漿当たり平均 1.6×10^{11} particles と安定しており、cfDNA 法に比してサンプル回収率が大幅に向上した。プロテオーム解析では 995 種のタンパク質を同定し、そのうち凝固関連蛋白 VWF、FA8 など 18 種が ACA 陽性群で有意に高発現していた（FDR＜0.05）。また、COL1A や ECM1 といった線維芽細胞由来の蛋白が ACA-EV にのみ認められた。線維芽細胞に ACA-EV を添加すると、コラーゲン合成経路、TGF-β シグナルが顕著に亢進した。

【考察】本研究は cfDNA 解析の限界を克服するアプローチとして EV を利用し、ACA 陽性 SSc に特有の線維化促進シグネチャーを同定した。EV は保存性が高く、少量血漿から多面的情報が得られるため、非侵襲的バイオマーカーとして極めて有望である。現在、得られたプロテオームとトランスクリプトームを統合したネットワーク解析を進めており、予後予測スコアの構築を目指している。本成果をまとめた論文を投稿中で、査読中である。本助成金により得た知見は SSc 患者の早期治療介入指標確立に有用と考えられる。

【発表】

1）　2024 年 11 月　日本皮膚科学会、口頭発表



抗セントロメア抗体陽性患者の細胞外小胞特異的な蛋白