

2019年度研究実施報告書

(対象期間 2019年11月13日～2020年3月31日)

担当課題：新薬創出を加速する人工知能の開発

研究機関名：国立大学法人大阪大学

研究責任者：熊ノ郷 淳 kumanogo@imed3.med.osaka-u.ac.jp

【1. 実施内容】

実施項目 1

1-1 研究目的

課題のプロジェクトは、PRISM(官民研究開発投資拡大プログラム)のサイバー空間基盤技術に採択されたプロジェクトとして、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所(医薬健栄研)が中心となり、省庁連携にて推進するプログラムである。その計画は、大量の疾患情報を整理、分類、蓄積した AI を構築し、臨床情報(診療情報及びマルチオミックスデータ)から分子と疾患の因果関係の推定や創薬ターゲット探索につながる仮説創出を行う。

1-2 研究概要・要旨

ヒト由来培養細胞・動物を用いた実験及び実臨床の情報により検証し、創薬ターゲット分子の発見・同定へと導く。対象疾患としては、指定難病の一つである特発性肺線維症と肺がんとし、それらに対する創薬ターゲット分子を提案する。

1-3 実施内容

当院および連携各病院においては、間質性肺炎(特発性肺線維症を含む)患者から同意を得て、①検査画像、②呼吸機能検査値およびフローボリュームカーブ(FVC)、③血液検査値、④画像読影所見、⑤診療記録、⑥初診時間診票、⑦血清サンプルを採取し医薬健栄研に提供する。その際、医療情報部が構築する CDGS システムと連携する。

1-4 結果、成果等

#1 電子カルテ入力テンプレートの作成と実装

成果：2017年度は、共同研究開始と同時にカルテテンプレートの作成に取り掛かり、わずか2か月間にて初診問診票とカルテテンプレート作成を完成した。PRISMにおいて欠かせないパーツで

ある患者情報の収集システム構築を整備した。今年度は、近畿中央呼吸器センター、羽曳野医療センター、さらに刀根山医療センターへ OCRnet を拡大し、関連病院のサンプルを収集できるインフラ整備を国内で先駆けて整備することに成功した。

費用（消耗品）：特に本目的での使用はありません。

#2 臨床検体の採取

成果：2017年度に呼吸器・免疫内科で継続する血清バンクシステムを構築し、2か月間で合計80検体の血清保存、そのうち肺線維症は5検体採取した。血清からエクソソームの単離について、種々のエクソソーム単離法の比較、エクソソームの質や量の比較をすることで今後の大量オミクスのための予備解析を進めた。具体的には、エクソソームの単離方法は、超遠心法だけでなく、EV-second やマグキャプチャー法などが報告されている。そこで、当科では予備検討として、どの方法が適切であるか？さらにどのようにしてエクソソームを検証するのかを確認した。プロテオミクスの結果から、マグキャプチャーによる単離法が、最も純度が高いことを見出した。さらに、検証法として、Nanosight や qNano、電子顕微鏡にてエクソソームを確認できること、さらにエクソソームの同定に必要な各種マーカー抗体による WB から、同定法も確認した。以上より、本研究において、今後収集する貴重な患者検体におけるエクソソームの単離法と検証法を確認できた。当院にて収集した血清検体を基盤研に提供した。当該サンプルは、基盤研にて単離法含めて構築した次世代プロテオミクスや他のオミクス（マルチオミクス）にて解析予定であり、AI のためのビッグデータとなる。

費用：エクソソームの単離&血清分離 (1)、エクソソームの確認に必要な試薬 (2) を購入した。大量サンプルを同時に検証するために、EV-Second L70 など単離回収に必要な試薬に充当した。

#3 解析における助言

成果：本研究目的は、カルテやエクソソームのマルチオミクスを活用して、病態解明、創薬、バイオマーカー開発に役立てることである。ところが、本研究にてフォーカスするエクソソームが、炎症性肺疾患の肺病変を反映するのか？そもそも、そのような物質がエクソソームに含まれることすら不明である。そこで、肺線維症の患者からエクソソームを単離して、プロテオミクスが肺の炎症や線維化病態を反映することを検証した。ただし、当科にて構築した血清バンクは極めて貴重であり、エクソソーム単離や予備検討に使用することは困難である。そこで、当科が今までに構築したマウス肺線維症モデル（ブレオマイシン誘導モデル）を、ヒトにおける検証の予備段階として解析することで、マウス肺内病変がエクソソームの蛋白に反映されること、さらに血液中のエクソソームの蛋白群が、肺線維化病態（TGF-beta signaling）を示唆することも見出した。さらに、発見したエクソソームの BM 候補蛋白は、肺線維化病変において発現が増加するだけでなく、有意な相関を見出した。

本成果を受けて、2018年度はマウスモデルで得られた内容を、ヒトにおいて検証へと進めた。基盤研が開発した次世代プロテオミクス DIA によるヒト血清エクソソームと肺線維症組織は解析を終えて、エクソソームの内容が肺組織を反映することが示唆された。

以上、我々が得た知見は、PRISMにおいて大量解析するサンプルとしてエクソソームを活用する合理性となるデータを提供するものであり、解析における助言として十分である。しかし、エクソソームの肺線維症における病的意義は不明であることから、単離エクソソームが上皮細胞や炎症細胞に与える役割を検討する必要がある。そこで、in vitro の解析としてマウスや患者エクソソームを、肺構成細胞への投与実験を行った。具体的には、マクロファージ・血管内皮細胞 (HUVEC)、上皮細胞にエクソソームを投与し、細胞増殖 (Cell Counting Kit-8)、細胞死 (APC Annexin V)、サイトカイン産生を解析した。

費用：血清エクソソームのプロテオミクス (受託解析) やマウスモデルにおける病理解析 (受託解析) 以外に、エクソソーム投与による細胞への影響を検討するために用いる in vitro 解析 (3) や細胞培養に必要な種々の消耗品 (4)、さらにはヒト実験の予備検討としてのマウス実験 (5) 成果報告のための学会参加 (6) が主な使用用途である。

【2. 外部発表、論文投稿等】

Dysregulated Expression of the Nuclear Exosome Targeting Complex Component Rbm7 in Nonhematopoietic Cells Licenses the Development of Fibrosis.

Fukushima K, Satoh T, Sugihara F, Sato Y, Okamoto T, Mitsui Y, Yoshio S, Li S, Nojima S, Motooka D, Nakamura S, Kida H, Standley DM, Morii E, Kanto T, Yanagita M, Matsuura Y, Nagasawa T, Kumanogoh A, Akira S.

Immunity. 2020 Mar 17;52(3):542-556.e13. doi: 10.1016/j.immuni.2020.02.007.

Pathological and therapeutic implications of eosinophil-derived semaphorin 4D in eosinophilic chronic rhinosinusitis.

Tsuda T, Nishide M, Maeda Y, Hayama Y, Koyama S, Nojima S, Takamatsu H, Okuzaki D, Morita T, Nakatani T, Kato Y, Nakanishi Y, Futami Y, Suga Y, Naito Y, Konaka H, Satoh S, Naito M, Izumi M, Obata S, Nakatani A, Shikina T, Takeda K, Hayama M, Inohara H, Kumanogoh A.

J Allergy Clin Immunol. 2020 Mar;145(3):843-854.e4.

LRRK2 regulates endoplasmic reticulum-mitochondrial tethering through the PERK-mediated ubiquitination pathway.

Toyofuku T, Okamoto Y, Ishikawa T, Sasawatari S, Kumanogoh A.

EMBO J. 2020 Jan 15;39(2):e100875.

Metagenome-wide association study of gut microbiome revealed novel aetiology of rheumatoid arthritis in the Japanese population.

Kishikawa T, Maeda Y, Nii T, Motooka D, Matsumoto Y, Matsushita M, Matsuoka H, Yoshimura M, Kawada S, Teshigawara S, Oguro E, Okita Y, Kawamoto K, Higa S, Hirano T, Narazaki M, Ogata A, Saeki Y, Nakamura S, Inohara H, Kumanogoh A, Takeda K, Okada Y.
Ann Rheum Dis. 2020 Jan;79(1):103-111.

【3. 知財化について】

該当なし